

배양조건에 따른 *Lactobacillus casei* YIT 9018의 내산성 변화

심재현* · 김상교 · 백영진 · 오태광¹ · 양한철²

한국야쿠르트 유업(주) 연구소, ¹한국과학기술원 유전공학연구소,

²고려대학교 식품공학과

Influence of Culture Conditions on Acid Tolerance of *Lactobacillus casei* YIT 9018

Jae-Hun Sim*, Sang-Kyo Kim, Young-Jin Baek,
Tae-Kwang Oh¹ and Han-Chul Yang²

Hankuk Yakult Institute, Euiwang-shi, Kyunggi-do, 437-020, Korea

¹Genetic Engineering Center, KIST, 360-333, Korea

²Department of Food Technology, Korea University, Seoul, 136-701, Korea

Abstract — We studied the influence of culture conditions on the acid tolerance of *Lactobacillus casei* YIT 9018 in artificial gastric juice with respect to relative amount of membrane bound ATPase and their biochemical characteristics. With raising incubation temperature from 30.5°C to 40.5°C and lengthening incubation time from exponential phase to late stationary phase, the acid tolerance of *L. casei* YIT 9018 was increased. As acid tolerance enhanced, C_{18:1} content of membrane fatty acid was reduced and C_{19:0 cyclo} was enriched but the others were not changed greatly. At high ATPase activity, proton permeability was relatively low but this phenomenon did not correspond to acid tolerance. In conclusion, it was considered that changes of C_{18:1} and C_{19:0 cyclo} were closely related to the acid tolerance of *L. casei* YIT 9018.

Probiotics로서 유용한 유산균은 각종 동물의 장내에 정착하면서 유익한 작용을 한다(1). 건강한 사람의 장내에는 *L. acidophilus*, *L. casei*, *L. fermentum*, *L. salivarius*, *L. plantarum* 및 *L. cellobiosus* 등의 유산균이 존재하는 것으로 보고되었다(2, 3). 이들 유산균은 세계 각지에서 발효유의 starter, 생균제 등으로 널리 이용되고 있다(1, 4-6). 그러나 유산균이 장내에서 유익한 역할을 수행하기 위해서는 인체 소화기관 내의 위액, 각종 소화효소, 담즙, 장의 연동운동, 면역반응 (immune response) 및 낮은 표면장력 등 미생물의 생존을 저해하는 요인들을 극복하여야 한다(4). 그 중에서 위액은 외부 미생물이 생존상태로 위장을 통과하지 못하도록 작용하며, 이러한 효과는 주로 염산에 의한 낮은 pH 때문이라는 것이 많은 연구자에 의해 입증되었다(7-9). 그러므로 유산균을 생균으로서 인체에 적용하기 위해서는 우선 위액에서 생존할 수 있는 균주를 선발해야 하며 이미 사용되어 온 균주의

경우는 산에 대한 내성을 증진시킬 수 있는 방법의 검토가 필요하다.

본 실험은 *L. casei* YIT 9018의 내산성을 배양시간, 배양온도와 pH에 따라 측정하고 이와 함께 유산균의 내산성에 관련되어 있는 것으로 생각되는 두가지 요인, 즉 원형질막에 결합되어 있는 H⁺-ATPase 활성과 원형질막의 지방산조성을 분석하여 *L. casei* YIT 9018의 내산성에 영향을 주는 요인을 규명함으로써 인공 위액에 대한 내성이 증진될 수 있는 배양방법을 정립할 목적으로 수행하였다.

재료 및 방법

사용균주 및 배지

한국야쿠르트 연구소에서 냉동보관 중인 *Lactobacillus casei* YIT 9018을 MRS 배지에서 보관, 계대하였으며 실험수행 직전 TYG 배지(tryptone 0.82%, yeast extract 0.36%, glucose 1.18%, pH 6.8)에서 2회 이상 계대하여 사용하였다.

Key words: Acid tolerance, *Lactobacillus casei* YIT 9018, membrane fatty acid, ATPase

*Corresponding author

배양조건 및 균체회수

TYG broth를 이용하여 30.5, 35.5, 40.5°C의 항온수조에서 배양하면서 11, 23, 32시간에 시료를 취한 후 원심분리(15,000×g, 20 min. Sorvall, Dupont, USA)하여 균체를 회수하였다.

내산성 실험

Kobayashi 등(10)의 방법을 변형한 것으로 회수된 균체를 생리 식염수(0.85% NaCl)로 2회 세척하고 생균수가 10⁸/ml 수준이 되도록 현탁하였다. MRS broth의 pH를 1 N 염산으로 2.0~3.0으로 조정하고 pepsin을 1000 unit/ml 되도록 첨가하여 인공위액을 만든 후 이에 균체현탁액을 2% 접종하였다. 이를 37°C 항온수조(Haake, Germany)에서 유지하면서 1시간 경과 후에 시료를 취하여 0.05% L-cysteine이 첨가된 phosphate buffered saline(pH 7.2, 0.2 M)에 희석한 다음 MRS 배지를 이용한 pour plate method로 생균수를 측정하였다.

원형질막의 지방산 분석

Sasser(11)의 방법을 변형한 것으로 회수된 균체를 0.5 N NaOH/methanol 8 ml에 현탁한 후 5분간 끓여서 검화하였다. 여기에 14% BF₃/methanol(Sigma) 9 ml를 넣고 3분간 끓여 methylation 시킨 다음 hexane 3 ml를 넣어 2분간 끓여 추출한 후 상온까지 냉각하였다. 여기에 포화 NaCl 용액을 검화 flask에 가득 넣은 후 hexane 층을 회수하여 Gas Chromatography(Hewlett-Packard 5890)의 시료로 사용하였으며 이때 지방산 분석조건은 다음과 같다.

Gas chromatographic conditions for fatty acid analysis of cell membranes

Detector	:	FID
Injection vol.	:	0.6~0.8 μl
Split ratio	:	1 : 50
Column	:	Ultra-2
Oven temp.	:	170°C
Injector temp.	:	250°C
Detector temp	:	250°C

ATPase 조효소액 제조

Bender 등(12)의 방법을 변형한 것으로 회수된 균체를 0.1 M KCl 용액으로 3회 세척하였다. 세척된 균체 0.5 g(wet wt.)은 0.4 mM sucrose와 2 mM MgCl₂를 함유한 Tris HCl buffer(pH 7.5, 75 mM) 10 ml에 현탁하여 glass beaker(50 ml)에 넣고, 60% pulse에서

10분간 초음파(Vibra cell™, Sonics & Material Inc.) 처리하여 파쇄한 다음 DNase I(Sigma)과 RNase A(Sigma)를 각각 10 μg/ml 되도록 첨가한 후 45분간 실온에서 반응시켰다. 반응이 끝난 균체 파쇄액을 15,000×g에서 20분간 원심분리하여 일부 파쇄되지 않은 균체와 세포벽 잔존물은 버리고 상등액을 모아 다시 20,000×g에서 20분간 원심분리한 후 상등액을 ATPase 활성 측정용 조효소용액으로 사용하였다. 이때 조효소용액 중의 단백질함량 측정은 Bradford의 방법(13)을 이용하였다.

ATPase 활성 측정

Fiske-Subbarow의 방법(13)을 이용한 것으로 조효소 용액 100 μl에 10 mM MgCl₂와 5 mM ATP(Sigma)를 함유한 Tris maleate buffer(pH 7.5, 50 mM) 900 μl를 가하고 37°C에서 10분 동안 효소반응시킨 후, 3 ml의 증류수와 1 ml의 3.5 N 황산 용액을 가하여 효소 반응을 종결시켰다. 효소 반응이 완료된 용액에 3.5% ammonium molybdate 용액 1 ml를 가한 후 2.1% NaHSO₃에 0.7% Developer(Kodak, D-76)를 혼합한 용액 1 ml를 첨가하였다. 실온에서 20분간 반응시킨 후 spectrophotometer(Beckman, DU 650)를 이용하여 660 nm에서 흡광도를 측정하고 ATPase에 의해 ATP로부터 유리된 inorganic phosphate의 양을 standard curve로부터 환산하였다. 효소의 단위는 1분 동안 1 μmole의 inorganic phosphate를 유리시키는 효소의 양을 1 unit로 하였다.

Proton 투과율의 상대비교

Bender 등(12)의 방법을 이용한 것으로, 회수된 균체를 5 mM MgCl₂ 용액으로 세척하고 동결건조한 후 1 mM MgCl₂와 150 mM KCl을 함유한 인산완충액(20 mM, pH 7.2)에 건조균체를 5 mg/ml 수준으로 현탁하고 37°C에서 30분 동안 유지하였다. 이를 원심분리(15,000×g, 20 min.) 하여 1 mM MgCl₂가 함유된 150 mM KCl 용액에 균체가 20 mg/ml 되도록 현탁하였다. 이에 100 mM HCl과 50 mM KCl 혼합용액을 가하여 pH 4 부근에서 안정되도록 유지한 후 (37°C, 20분) 이를 기준 pH로 설정한 다음, 10 ml beaker에 준비된 균액 5 ml를 넣고 위 혼합용액 40 μl를 다시 첨가하여 세포내외간에 proton gradient가 형성되도록 하였다. 이때를 시점으로 proton의 세포내 유입에 따른 pH의 경시적 변화(Δ pH)를 2분 간격으로 10분 동안 측정함으로써 proton 투과율을 상대적으로 비교하였다.

결 과

배양온도와 배양시간에 따른 내산성의 변화

Fig. 1에서 보는 바와 같이 같은 배양시간에 유사한 성장단계를 보여 본 실험에서는 각각 배양 11시간을 대수성장기로, 23시간을 정체기로, 32시간을 정체기 후반 또는 사멸기 초반으로 하여 분석하였다. Fig. 2, 3과 4는 다양한 pH의 인공위액에서 배양온도에 따른 내산성의 변화를 배양시간별로 나타낸 것으로, pH 2

에서는 배양온도와 배양시간에 관계없이 대부분 사멸하는 것을 알 수 있었다. pH 3의 경우 30.5°C에서 11시간 배양된 균체는 1시간 내에 거의 사멸하였으며, 23시간 배양된 균체는 대략 10^3 /ml 정도 생존하였고, 32시간 배양된 균체는 10^4 /ml 이상 생존하는 것으로 나타났다. 35.5°C에서 11, 23, 32시간 배양된 균체는 대략 10^1 , 10^4 , 10^5 /ml 정도 생존하였으며, 40.5°C에서 배양된 균체는 각각 10^2 , 10^5 , 10^6 /ml 정도 생존하였다.

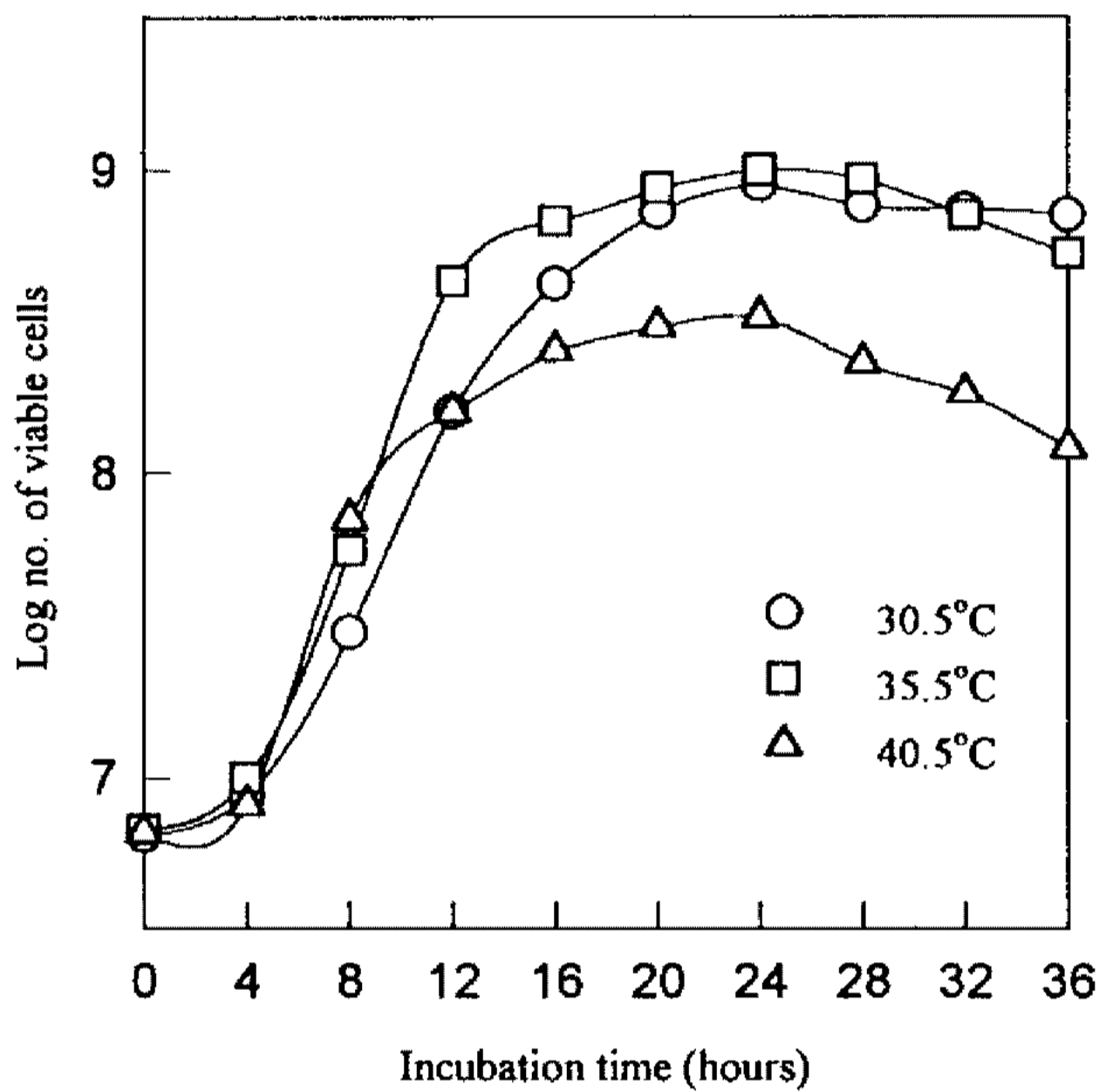


Fig. 1. Growth curves of *L. casei* YIT9018 in TYG broth at different temperature.

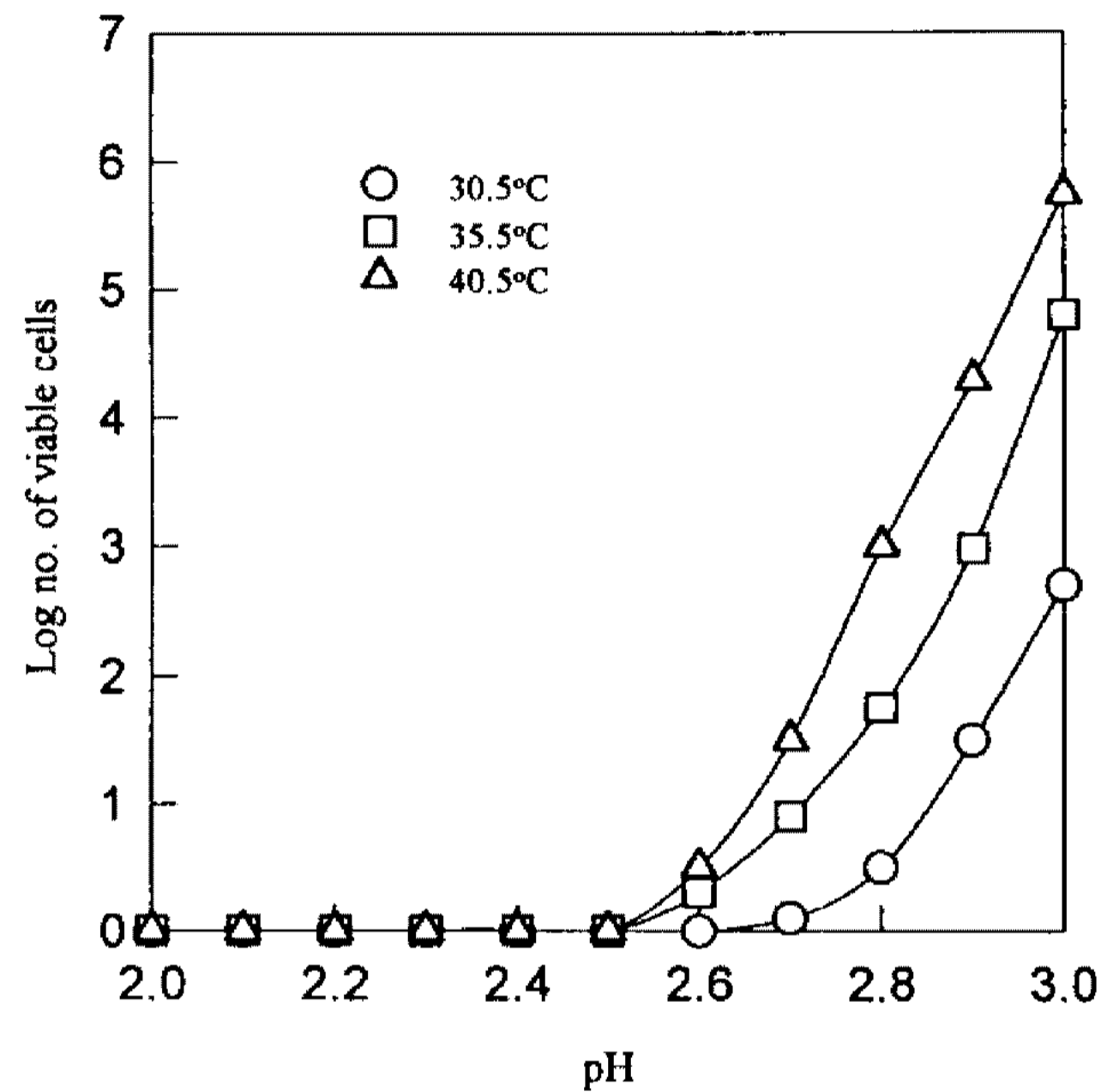


Fig. 3. Effect of pH on the viabilities of *L. casei* YIT 9018 precultured for 23 hours at 30.5, 35.5 and 40.5°C.

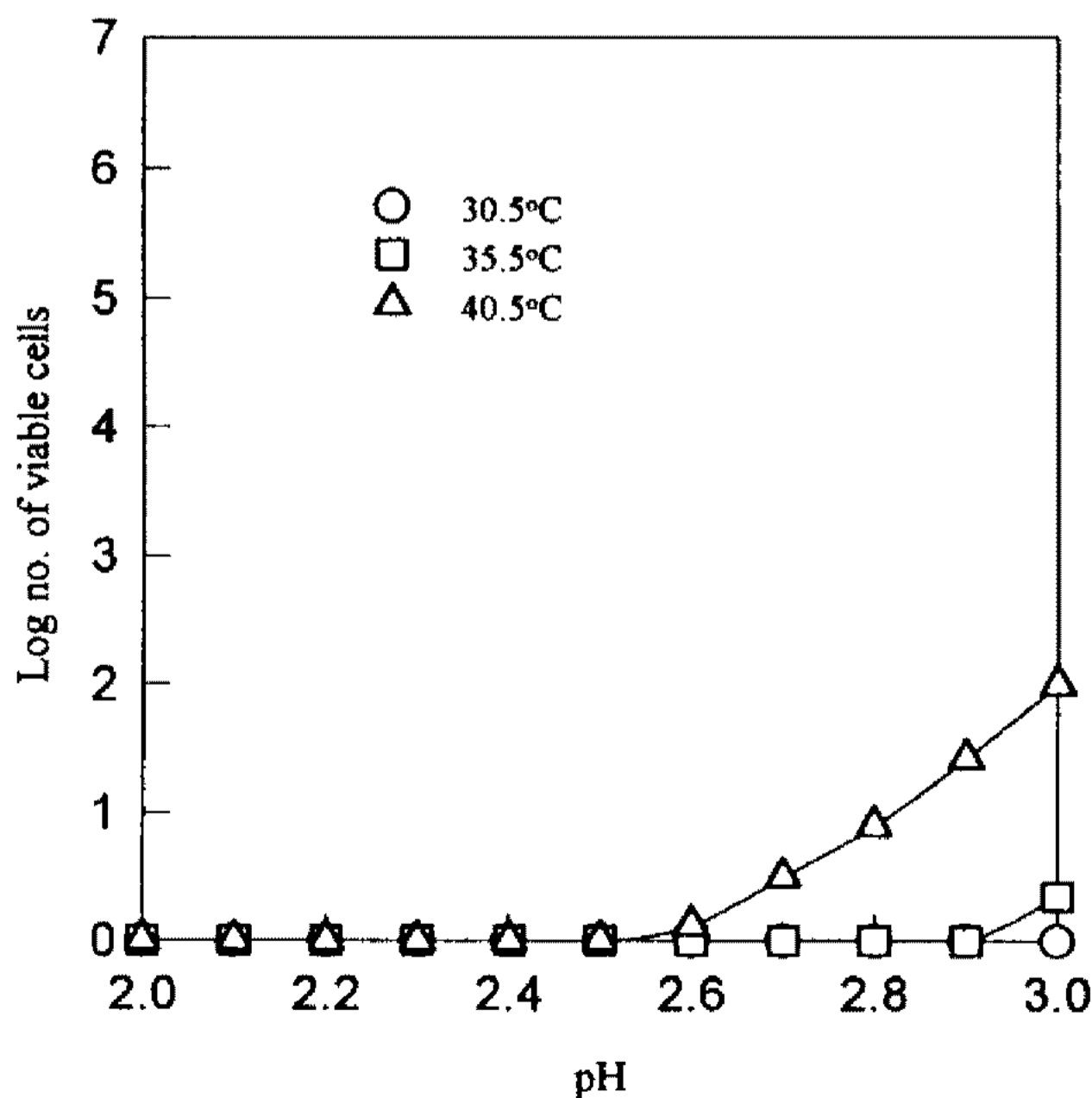


Fig. 2. Effect of pH on the viabilities of *L. casei* YIT 9018 precultured for 11 hours at 30.5, 35.5 and 40.5°C.

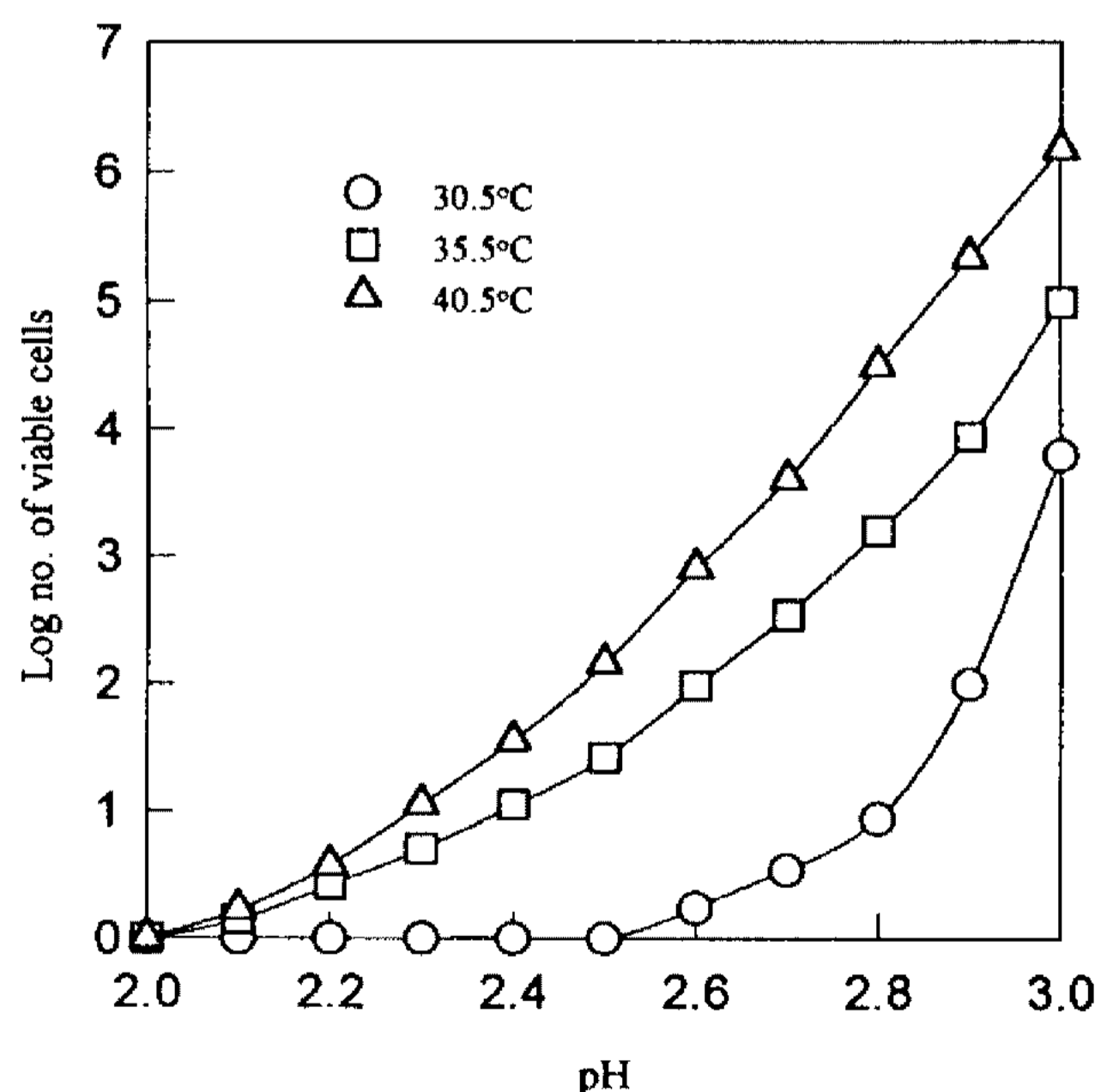


Fig. 4. Effect of pH on the viabilities of *L. casei* YIT 9018 precultured for 32 hours at 30.5, 35.5 and 40.5°C.

배양온도와 배양시간에 따른 원형질막 지방산 조성변화

35.5°C 에서 23시간 동안 배양된 균체에서 추출한

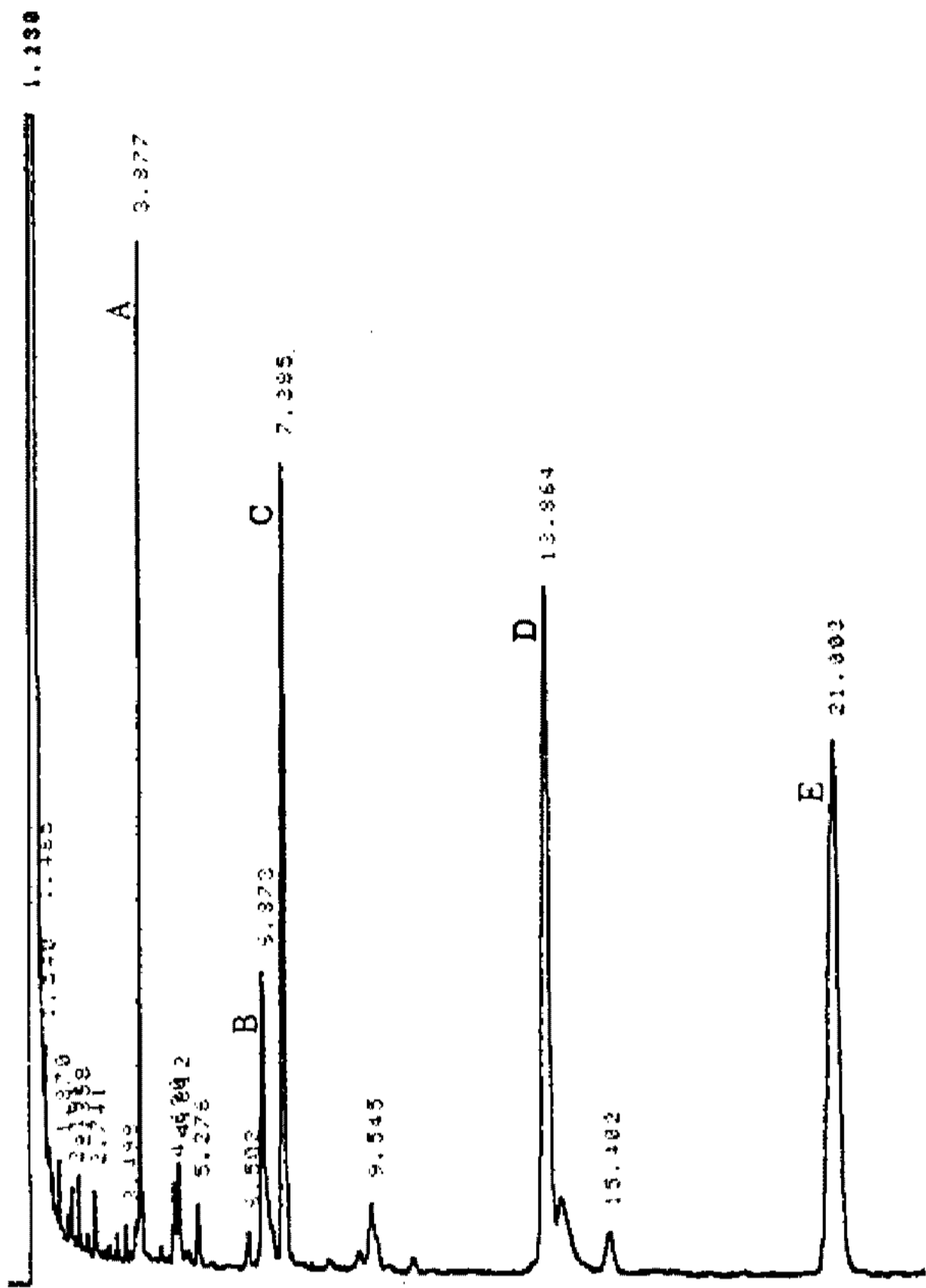


Fig. 5. GC spectrum of membrane fatty acid in *L. casei* YIT 9018.

원형질막의 GC spectrum은 Fig. 5와 같으며 A peak는 n-tetradecanoic acid(C_{14:0}), B peak는 hexadecenoic acid(C_{16:1}), C peak는 n-hexadecanoic acid(C_{16:0}), D peak는 octadecenoic acid(C_{18:1}), E peak는 11-12 methylene hexadecanoic acid(C_{19:0 cyclo})로 동정되었다.

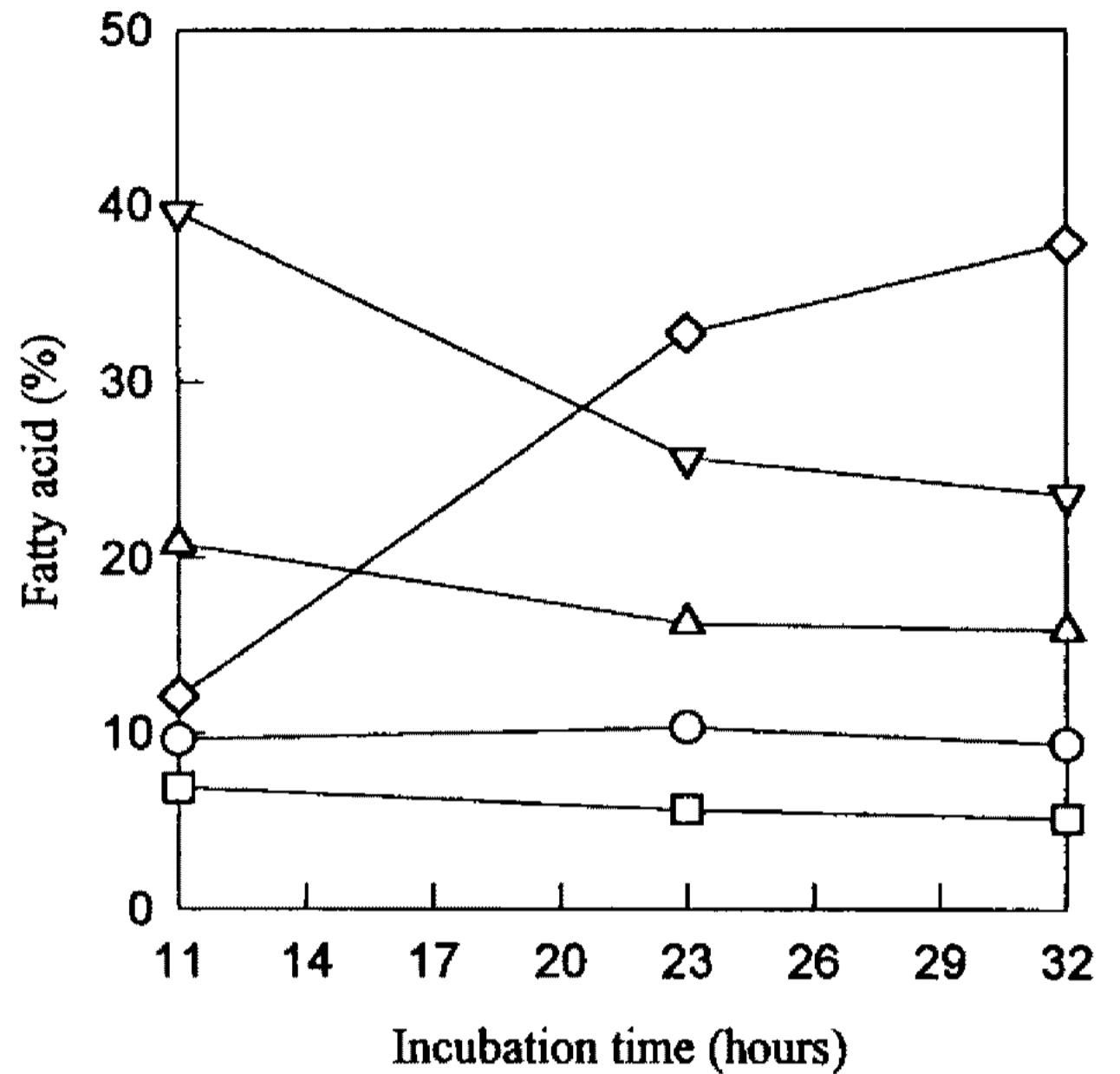


Fig. 7. Changes of fatty acid in cytoplasmic membrane of *L. casei* YIT 9018 during incubation at 35.5°C.

—○—: C_{14:0}, —□—: C_{16:0}, —△—: C_{16:1}, —▽—: C_{18:1}, —◇—: C_{19:0 cyclo}

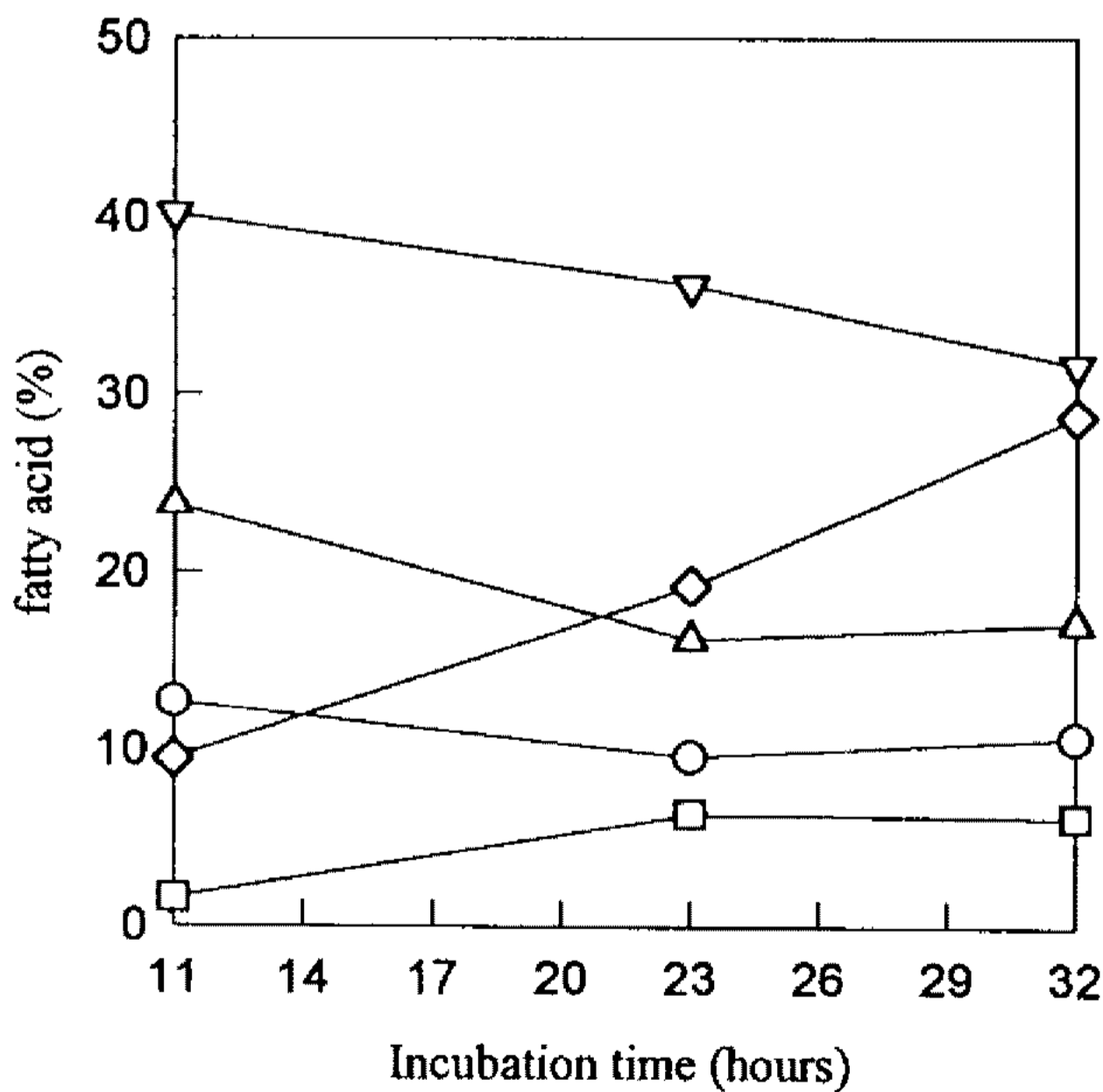


Fig. 6. Changes of fatty acid in cytoplasmic membrane of *L. casei* YIT 9018 during incubation at 30.5°C.

—○—: C_{14:0}, —□—: C_{16:0}, —△—: C_{16:1}, —▽—: C_{18:1}, —◇—: C_{19:0 cyclo}

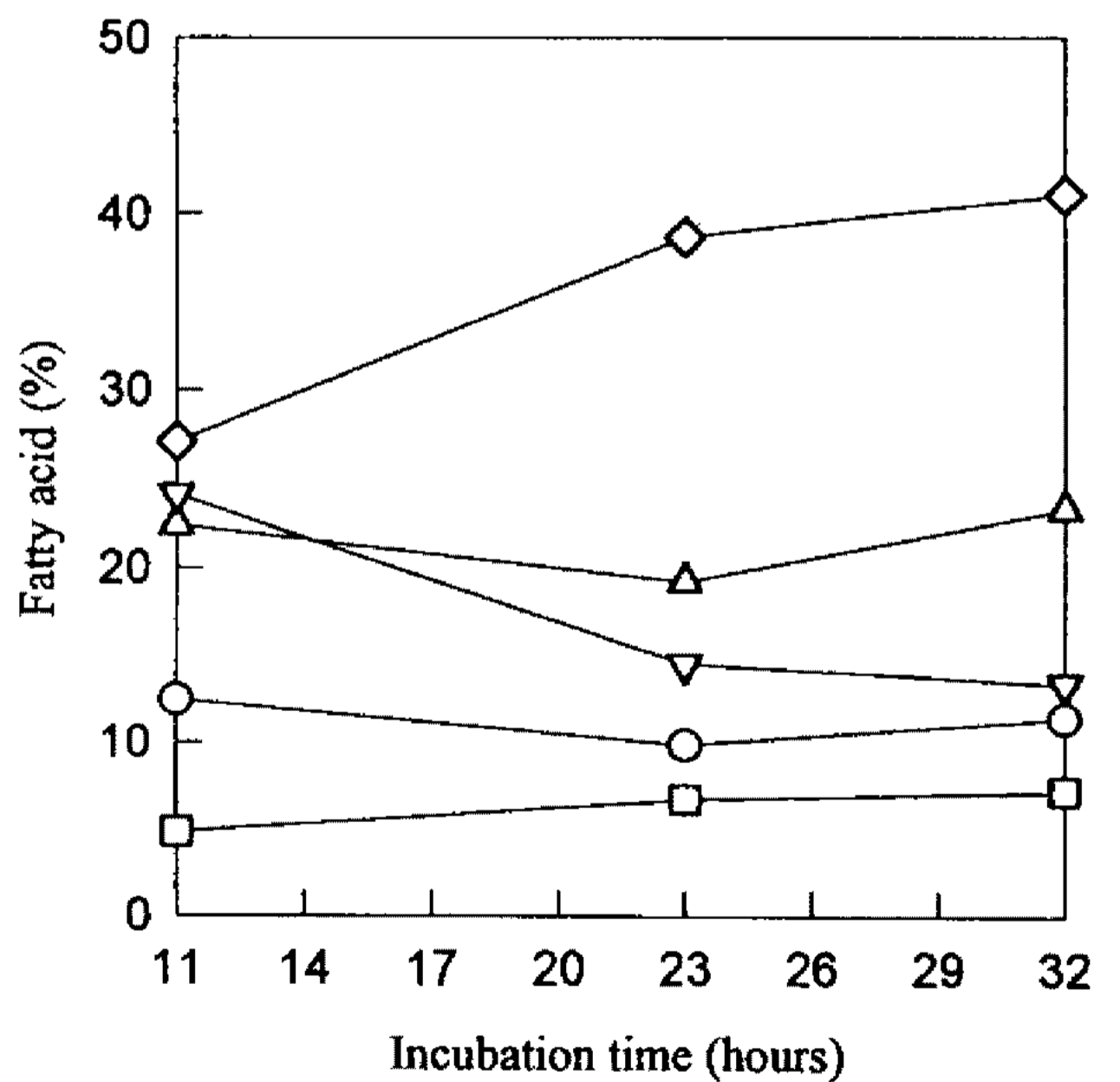


Fig. 8. Changes of fatty acid in cytoplasmic membrane of *L. casei* YIT 9018 during incubation at 40.5°C.

—○—: C_{14:0}, —□—: C_{16:0}, —△—: C_{16:1}, —▽—: C_{18:1}, —◇—: C_{19:0 cyclo}

배양온도가 30.5°C 에서 40.5°C 로 높아질수록, 배양시간이 11시간에서 32시간으로 길어질수록 C_{18:1}은 최고 40.2%에서 최저 13.4%까지 감소하였고 C_{19:0 cyclo}는 최저 9.5%에서 최고 41.1%로 현저히 증가하는 경향을 보여주었다(Fig. 6~8). C_{18:1}과 C_{19:0 cyclo} 이외의 주요 성분인 C_{14:0}, C_{16:1}, C_{16:0}은 배양온도나 배양시간에 따라 함량에 큰 변화가 없었다. 이는 배지종류, 배양온도 등의 배양조건과 배양시간에 따라 미생물의 지방산 조성에 큰 차이가 있었다는 Farrel과 Rose(14)의 결과와 일치하는 것이다.

ATPase 활성과 proton 투과율의 상대적 변화

L. casei YIT 9018의 H⁺-ATPase 활성은 배양온도와 배양시간에 따라 다소 차이가 있었다(Fig. 9). 30.5°C 에서 배양된 경우 specific activity는 배양 11, 23, 32시간에 각각 2.64, 4.29, 3.39이었으며 35.5°C 에서 배양된 경우는 배양시간에 따라 각각 3.82, 4.14, 2.53이었다. 40.5°C 에서 배양된 경우 11시간 배양된 균체에서 specific activity는 4.5로 가장 높게 나타났으나, 23, 32시간에는 4.15, 2.42로 저하되었다. Proton 투과도 실험에서 10분 동안 세포 내부로 proton이

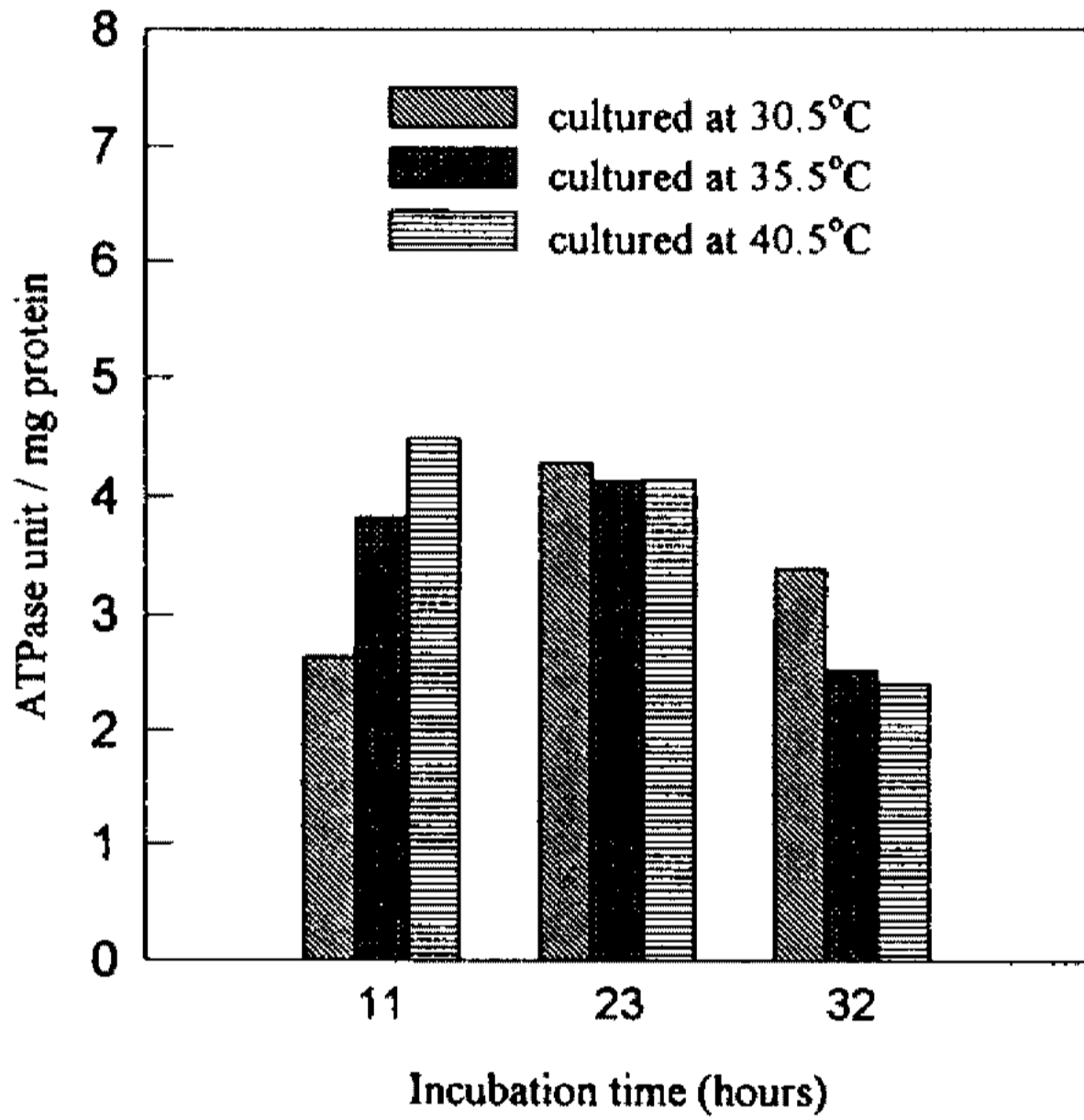


Fig. 9. Effects of incubation time and temperature on the ATPase activity of *L. casei* YIT 9018.

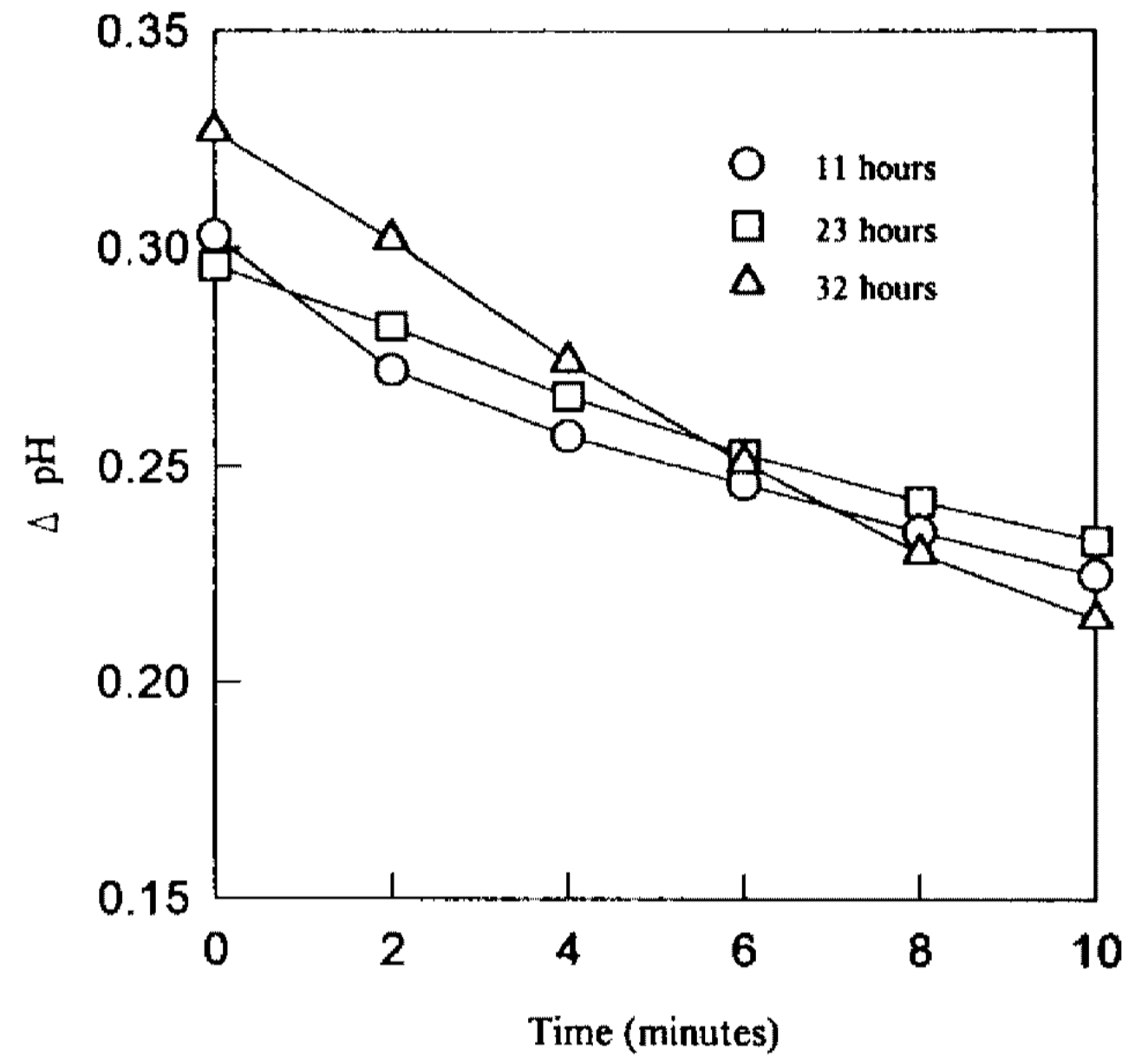


Fig. 11. Proton uptake by cells of *L. casei* YIT 9018 precultured at 35.5°C for 11, 23 and 32 hours.

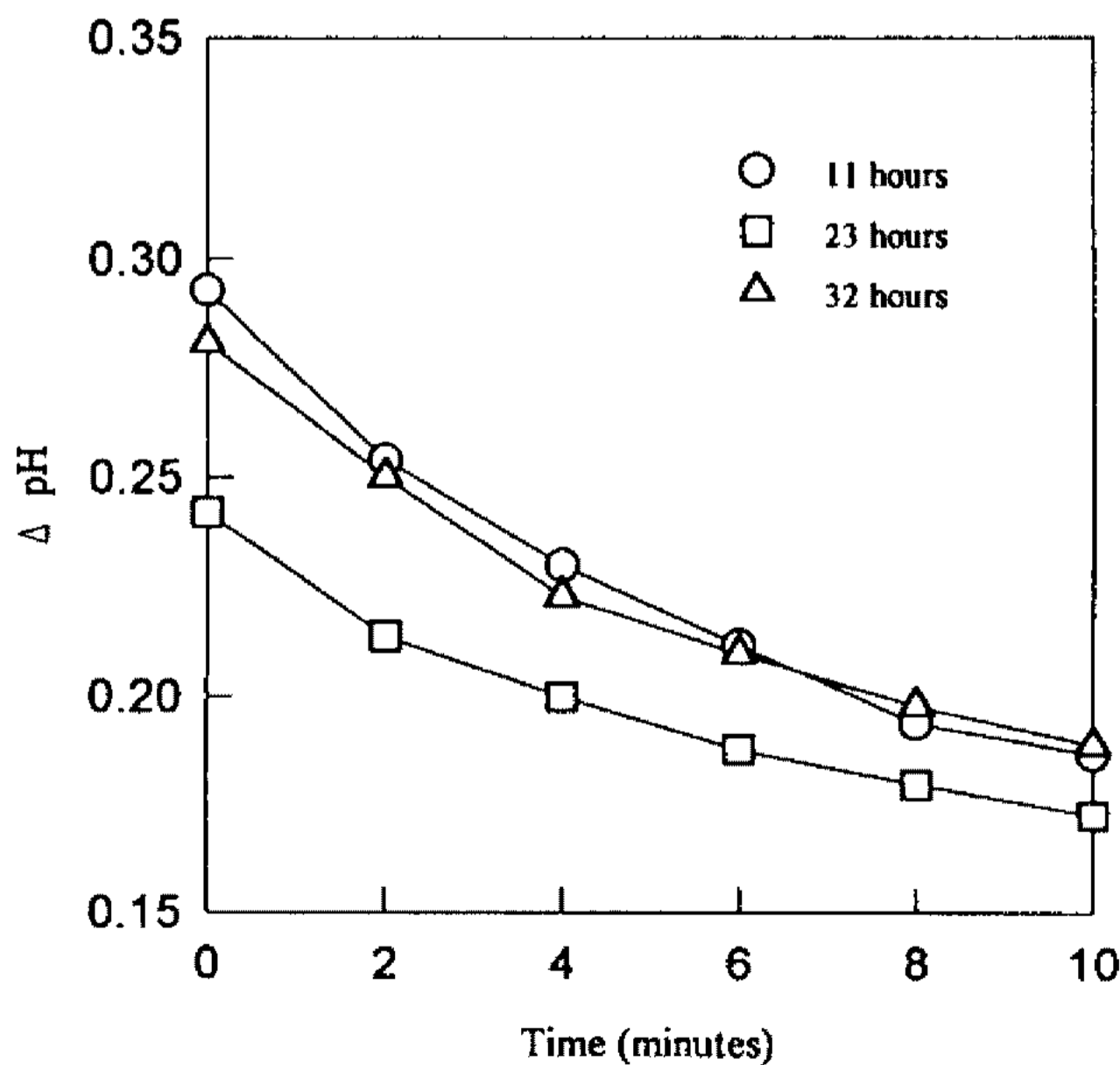


Fig. 10. Proton uptake by cells of *L. casei* YIT 9018 precultured at 30.5°C for 11, 23 and 32 hours.

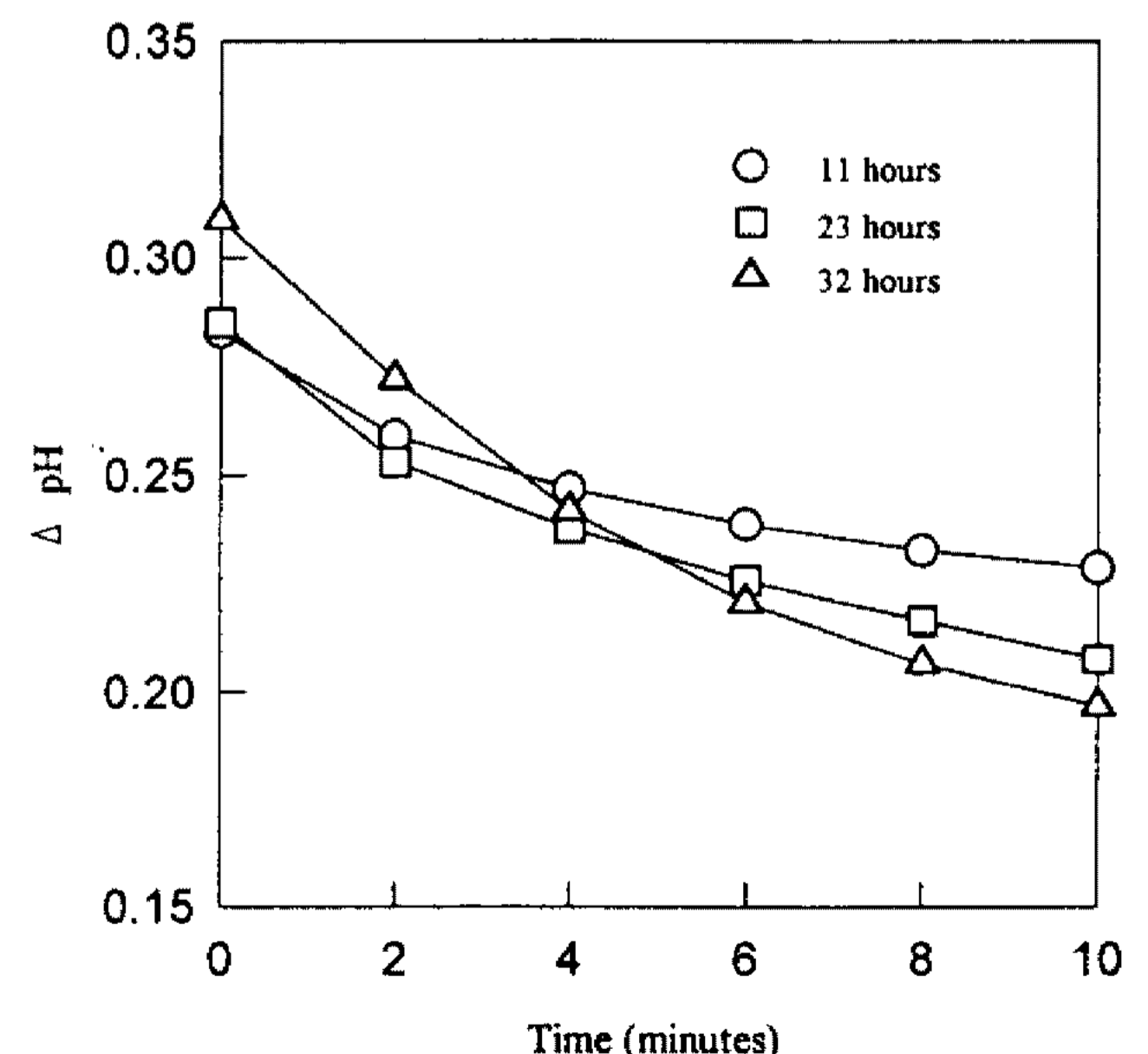


Fig. 12. Proton uptake by cells of *L. casei* YIT 9018 precultured at 40.5°C for 11, 23 and 32 hours.

유입됨으로써 변화되는 세포 외부의 Δ pH는 30.5°C에서 11, 23, 32시간 배양된 균체의 경우 0.106, 0.069, 0.092이었으며(Fig. 10), 35.5°C에서 배양된 균체는 각각 0.078, 0.063, 0.112이었다(Fig. 11). 또한 40.5°C에서 배양된 경우에는 각각 0.054, 0.077, 0.112로 나타났다(Fig. 12).

고 찰

일반적으로 유산균과 같은 혐기성 미생물은 호기성 미생물보다 생육 가능한 pH 범위가 넓어 상대적으로 낮은 pH에서도 생육이 가능한 것으로 알려져 있다(15, 16). 그러나 이러한 내산성의 기작에 대해서는 확실히 밝혀져 있지 않다(16). 다만 원형질막에 결합되어 있는 H⁺-ATPase의 활성과 양이 발효과정중 유산균의 내산성에 관여하는 것으로 보고되고 있다(12, 15, 17, 18). 즉 발효과정에서 생성되는 유기산에 의해 외부 pH가 낮아지면 세포내부로 proton의 유입이 늘어나게 되는데 이때 H⁺-ATPase 활성이 높을수록 proton을 효과적으로 방출하여 세포내부의 pH를 유지함으로써 산에 대한 내성을 나타내게 된다는 것이다.

본 실험에서 배양조건에 따라 *L. casei* YIT 9018의 H⁺-ATPase 활성에 차이가 있었으며(Fig. 9), H⁺-ATPase의 활성이 높을수록 pH 3.7 정도에서 세포내부로의 proton 투과도는 상대적으로 낮은 것으로 나타났다(Fig. 10~12). 따라서 *L. casei* YIT 9018은 생장이 가능한 최저 pH까지 H⁺-ATPase의 활성에 따라 세포질의 pH가 조절되어 산에 대한 내성을 나타내는 것으로 생각된다. 그러나 이에 비해 HCl 농도가 높은 인공위액에서의 배양조건에 따른 내산성 변화(Fig. 2~4)는 H⁺-ATPase 활성(Fig. 9)과 proton 투과도(Fig. 10~12)와 일치하지 않는 것으로 나타났는데 이는 인공위액조건으로 설정한 pH 2~3 범위에서 H⁺-ATPase가 내산성에 크게 영향을 주지 못하기 때문이라고 생각된다.

한편 Bender와 Marquis(17)는 *L. casei* 4646을 대상으로 낮은 pH에서 원형질막 손상에 따른 세포내부의 Mg 유출정도를 측정된 결과, pH 4에서는 유출이 없었으나 pH 3에서는 4시간 경과 후에 Mg이 유출되기 시작하였으며 pH 2에서는 1시간 이내에 대부분이 유출되었으므로 위액과 같은 매우 낮은 pH에서는 원형질막의 산에 대한 내성에 따라 생존율이 좌우될 것으로 보았다. 실험결과(Fig. 2~4)에 나타난 바와 같이 인공위액에 대한 내성은 온도가 30.5°C에서 40.5°C로 올라갈수록, 배양시간이 11시간에서 32시간

으로 길어질수록 현저히 증가하였다. 이러한 현상은 원형질막 지방산 중에서 C_{18:1}의 감소와 C_{19:0 cyclo}의 증가경향과 일치하는 것으로(Fig. 6~8) 이들이 *L. casei* YIT 9018의 내산성에 깊이 관련되어 있음을 시사해 준다. 이는 배지종류, 배양온도 등의 배양조건과 배양시간에 따라 미생물의 지방산 조성에 큰 차이가 있었다는 Farrel과 Rose(14)의 보고와 유사한 것으로 이와 같은 지방산의 변화에 대해 Goldberg와 Eschar(20)는 C_{19:0 cyclo}가 세포막 유동성에 매우 중요하며, 세포의 동결시 사멸율을 감소시켰다고 보고하였으며, Veerkamp(19)는 세포가 노화될 수록 C_{18:1}은 감소하고 C_{19:0 cyclo}는 증가하였으며 물질 투과성은 감소하였다고 하였다. Rizzo 등(21)은 유산균의 fatty acid를 분석한 결과 *L. casei*, *L. plantarum*, *L. acidophilus*의 C_{19:0 cyclo} 함량은 35~39%로 높았던 반면, *L. bulgaricus*는 그 함량이 13% 정도로 매우 낮았다고 보고하였다. 일반적으로 *L. casei*, *L. plantarum*, *L. acidophilus*의 내산성이 우수하며 *L. bulgaricus*는 내산성이 약한 균주임을 고려할 때 C_{19:0 cyclo}의 함량과 내산성과는 높은 상관성이 있음을 뒷받침해 준다. Bender와 Marquis(17)의 보고와 본 실험결과를 종합해 볼 때 동일한 균주이면서 배양조건에 따라 인공위액에서 생존율의 차이가 생기는 원인은 지방산중 C_{19:0 cyclo}의 증가와 C_{18:1}의 감소가 원형질막의 인공위액에 대한 내성을 증진시켰기 때문이라고 생각된다. 결국 배양온도, 배양시간 등 배양조건을 변화시켜 *L. casei* YIT 9018의 생리적인 변화를 유도함으로써 효과적으로 내산성을 증진시킬 수 있지만 산업적인 측면에서 생균수도 충분히 고려해야 할 것이다.

요 약

Lactobacillus casei YIT 9018을 대상으로 산업적으로 유용한 유산균이 갖추어야 할 중요한 성질인 내산성을 인공위액 조건에서 배양조건에 따라 측정함으로써 배양조건이 내산성에 미치는 영향과 내산성에 관련된 요인을 조사하기 위하여 실험을 수행하였다.

배양온도가 30.5°C에서 40.5°C로 높아질 수록, 배양시간이 대수성장기에서 정체기 후반으로 길어질 수록 내산성은 증가하였다. 내산성이 증가함에 따라 원형질막 지방산 함량 중 C_{18:1}은 감소하는 반면 C_{19:0 cyclo}는 현저히 증가하였으나 그 밖의 지방산에는 큰 변화가 없었다. ATPase 활성은 배양조건에 따라 다소 차이가 있었으며 활성이 높은 경우 proton 투과도는 상대적으로 낮았으나 이러한 현상이 인공위액에서의 내산성과는 일치하지 않는 것으로 나타났다. 결국 *L.*

casei YIT 9018의 내산성을 증진시키는 요인은 막지방산 중에서 C_{18:1}의 감소와 C_{19:0 cyclo}의 증가이며 이들이 원형질막의 인공위액에 대한 내성을 증진시켜 주는 것으로 사료된다.

감사의 글

본 실험에 많은 도움을 주신 한국야쿠르트유업(주) 연구소의 오세종 선임연구원과 김용재 연구원께 감사드립니다.

참고문헌

- Fuller, R. 1989. Probiotics in man and animals. *J. Appl. Bacteriol.* **66**: 365-378.
- Moore, W.E.C. and L.V. Holdeman. 1974. Human fecal flora: the normal flora of 20 Japanese-Hawaiians. *Appl. Microbiol.* **27**: 961-979.
- Yakult Honsha Co., Ltd. 1971. The summary of reports on Yakult. Yakult Honsha Co., Ltd., Tokyo, Japan.
- Gilliland, S.E. 1979. Beneficial interrelationships between certain microorganisms and humans: Candidate microorganisms for use as dietary adjuncts. *J. Food Prot.* **42**: 164-167.
- Kurmann, J.A. 1988. Starters for fermented milks. *Bulletin of the IDF.* **227**: 41-55.
- Fuller, R. 1991. Probiotics in human medicine. *Gut.* **32**: 439-442.
- Maffei, H.V.L. and F.J.N. brega. 1975. Gastric pH and microflora of normal and diarrhoeic infants. *Gut.* **16**: 719-726.
- Dare, R., J.T. Magee, and G.E. Mathison. 1972. In-vitro studies on the bacteriocidal properties of natural and synthetic gastric juices. *J. Med. Microbiol.* **5**: 395-406.
- Giannella, R.A., S.A. Broitman, and N. Zamcheck. 1972. Gastric acid barrier to ingested microorganisms in man: studies *in vivo* and *in vitro*. *Gut.* **13**: 251-256.
- Kobayashi, Y., K. Tohyama, and T. Terashima. 1974. Studies on biological characteristics of *Lactobacillus*: II. Tolerance of the multiple antibiotic resistance-strain, *L. casei* PSR3002, to artificial digestive fluids. *Jpn. J. Microbiol.* **29**: 691-697.
- Sasser, M. 1990. Identification of bacteria by gas chromatography of cellular fatty acids. MIDI Technical Note #101. MIDI, 115 Barksdale Prof. Center, Newark, DE 19711.
- Bender, G.R., V.W.S. Scott, and E.M. Robert. 1986. Acid tolerance, proton permeabilities, and membrane ATPases of oral streptococci. *Infect. Immun.* **53**: 331-338.
- Dryer, R.L. and G.F. Lata. 1989. Experimental biochemistry. Oxford university press.
- Farrell, J. and A.H. Rose. 1967. Temperature effects on microorganisms. *Annu. Rev. Microbiol.* **21**: 101-120.
- Booth, I.R. 1985. Regulation of cytoplasmic pH in bacteria. *Microbiol. Rev.* **49**: 359-378.
- McDonald, L.C., H.P. Fleming, and H.M. Hassan. 1990. Acid tolerance of *Leuconostoc mesenteroides* and *Lactobacillus plantarum*. *Appl. Environ. Microbiol.* **56**: 2120-2124.
- Bender, G.R. and R.E. Marquis. 1987. Membrane ATPases and acid tolerance of *Actinomyces viscosus* and *Lactobacillus casei*. *Appl. Environ. Microbiol.* **53**: 2124-2128.
- Kobayashi, H. 1985. A proton-translocating ATPase regulates pH of the bacterial cytoplasm. *J. Biol. Chem.* **260**: 72-76.
- Veerkamp, J.H. 1971. Fatty acid composition of *Bifidobacterium* and *Lactobacillus* strains. *J. Bacteriol.* **108**: 861-867.
- Goldberg, I. and L. Eschar. 1977. Stability of lactic acid bacteria to freezing as related to their fatty acid composition. *Appl. Environ. Microbiol.* **33**: 489-496.
- Rizzo, A.F., K. Hannu, and M. Ilkka. 1987. Gas chromatography analysis of cellular fatty acids and neutral monosaccharides in the identification of lactobacilli. *Appl. Environ. Microbiol.* **53**: 2883-2888.

(Received 1 October 1994)