



저온배양에 따른 *Lactobacillus acidophilus* CT 01의 저장 및 건조에 대한 저항성

유근형* · 권일경 · 김거유

강원대학교 동물자원과학대학 축산식품과학과

Effect of Suboptimal Temperature Incubation on the Resistance of *Lactobacillus acidophilus* CT 01 to Storage and Drying

Keun-Hyung Yu*, Il-Kyoung Kwon, and Gur-Yoo Kim

Department of Food Science and Technology in Animal Resources, Kangwon National University

Abstract

This study was carried out to determine the storage, cryotolerance, heat and drying resistance, when *Lactobacillus acidophilus* CT 01 isolated from preweaned piglet feces growing at suboptimal temperature. *L. acidophilus* CT 01 suboptimal temperature incubated for 48 hours had the slowest growth rate at 22°C but the highest viable cell number after 36 hours at 22°C, with 1.3×10^9 CFU/mL. In case of 4 and 20°C storage, the suboptimal temperature incubated groups had a viability higher than the control ($p < 0.01$). The cryotolerance of suboptimal temperature incubated *L. acidophilus* CT 01 was a higher than the control ($p < 0.01$). When *L. acidophilus* CT 01 was heat treated at 60°C for 15 minutes and 30 minutes, the suboptimal temperature incubated *L. acidophilus* CT 01 at 22°C had a viability higher more than the control ($p < 0.01$). *L. acidophilus* CT 01 incubated suboptimal temperature was inoculated by 30% to the carrier, and dried at 50°C for 12 hours had the highest viability in the suboptimal temperature incubated *L. acidophilus* CT 01 at 28°C.

Key words : suboptimal temperature, cold shock protein, storage, drying

서 론

가축이 받고 있는 스트레스는 가축의 생산성에 있어 밀접한 관계가 있다. 가축의 생산성을 높이기 위해 일반적으로 사료에 항생물질의 첨가가 널리 행해지고 있으나 장내균총의 파괴, 내성균의 출현과 축산물내에 항생물질의 잔류 등의 문제 때문에 이를 규제하는 방안이 정책적으로 시행되고 있다. 항생물질의 사용없이 가축을 사육할 수 있는 방안이 연구 중에 있으며, 이를 대처할 방법으로 사료에 유익한 미생물을 급여하는 생균제의 사용이 적극 검토되고 있다(Hanson, 1985 ; Kemp and Kiser, 1970 ; Salminen and Wright, 1998). 그러나 생균제가 갖는 기능적 특성 및 안전성을 확보하기 위해서는

무엇보다 산업적 조건하에서 제조과정 및 제품의 저장과정 중에 생존력을 확보해야 한다(Knorr, 1998 ; Svensson, 1999). 낮은 pH, 낮은 온도 및 낮은 수분활성 등은 젖산균을 산업적으로 이용하는데 있어 스트레스로 작용하게 되며, 이들 환경은 젖산균의 생존력 감소, 세포막 및 세포벽 손상, 능동수송 및 대사의 장애, 영양소 보유 및 세포형태 변화 등을 일으킨다(Shin, 2003). 생균제 제품이 건강에 유익한 작용을 하기 위해서는 적어도 10^7 CFU/g 수준의 박테리아가 제품내에 존재해야 한다(Ishibashi and Shimamura, 1993). 또한 이러한 생균제는 장관내에서 생균제가 갖는 기능적 특성들이 소실되지 말아야 한다. 따라서 보다 안전하고 기능적 특성을 갖는 생균제 제품을 제조하기 위해서는 젖산균의 스트레스에 의한 생리적 반응과 적응, 숙주간의 상호작용에 관한 기작의 이해가 요구되고 있다.

본 연구는 이유 전 자돈의 분변으로부터 분리·동정한 젖산균의 저온 배양에 따른 냉동, 저장 및 건조에 대한 저항성

* Corresponding author : Keun-Hyung Yu, Dept. of Food Science and Technology in Animal Resources, Kangwon National University, Chunchon 200-701, Korea. Tel: 82-33-250-8642, Fax: 82-33-244-2198, E-mail: manbal95@hotmail.com

을 조사하고자 실시하였다.

재료 및 방법

젖산균의 분리 및 동정

이유 전 자돈의 분변을 시료로 사용하여 sodium azide 0.02%를 첨가한 MRS agar(Difco, USA)에 도말한 후 37°C에서 48시간 배양하였으며, 배지상에서 성장한 특징적인 균락을 백금이로 채집하여 그람염색을 실시하였다. 그람양성이며, rod 형태의 균주를 따로 분리하여 15 및 45°C에서의 성장 유무, catalase 및 gas 형성 등을 조사하고 선발된 균주를 MRS agar에 도말하여 24시간 배양후 API kit(API 50 CHL, Bio Mérieux, France)를 이용하여 당발효 시험을 실시하였다. 당 발효 시험의 결과는 동정용 프로그램인 API LAB Plus(Bio Mérieux, France)를 이용하여 동정하였다. 균주 보존을 위해 최종 선발된 균주는 MRS broth에 3회 이상 계대 배양한 후, 3,000 rpm에서 20분간 원심분리를 실시하였다. Cell pellet에 glycerol 및 skim milk가 함유된 MRS broth를 혼합하고 vial에 1 mL씩 분주하여 -80°C의 냉동고에 보관하면서 본 시험에 사용하였다.

생균수 측정

생균수 측정은 배양액을 0.1%(w/v) peptone 용액에 십진 희석하여 MRS agar에 접종, 37°C에서 48시간 배양 후 형성된 균락을 계수하였다.

저온 배양에 따른 *L. acidophilus* CT 01의 성장

MRS broth에 *L. acidophilus* CT 01을 1.0% 접종하여 22, 28 및 37°C에서 48시간 동안 배양하며 경시적으로 생균수를 측정하였다.

저장성 및 냉동내성

MRS broth에 *L. acidophilus* CT 01을 1.0% 접종하여 22°C에서 36시간, 28°C에서 24시간 및 37°C에서 12시간 동안 배양을 실시하였다. 배양 후 4 및 20°C에서 저장을 실시하고 12일 후에 생균수를 측정하였다. 냉동내성은 각각의 온도에서 배양한 *L. acidophilus* CT 01을 -60°C에서 냉동을 실시하고 24시간 후에 생균수를 측정하였다.

열 저항성 및 건조에 대한 내성

MRS broth에 *L. acidophilus* CT 01을 1.0% 접종하여 22°C에서 36시간, 28°C에서 24시간 및 37°C에서 48시간 동안 배양을 실시하고 항온수조에서 60°C/15분 및 60°C/30분 열처리 후 생균수를 측정하였다. 건조에 대한 내성은 각각의 온도

에서 배양한 *L. acidophilus* CT 01을 부형제에 30% 접종하여 50°C의 건조기에서 12시간 건조하고 생균수 및 수분함량을 측정하였다.

통계분석

통계분석은 SAS(Statistics Analytics System, USA, 1995) program을 이용하여 ANOVA 분석을 하였고, 각 처리구 간의 유의성 검증은 Duncan의 multiple range test($p < 0.01$)로 분석하였다.

결과 및 고찰

젖산균의 동정

이유 전 자돈으로부터 분리된 젖산균주를 Gram 염색하여 현미경으로 관찰한 결과 Gram 양성, 간상형, catalase 음성으로 전형적인 젖산균의 성질을 보였다. 또한 분리된 균주는 45°C에서 생장이 가능하였고 15°C에서는 성장하지 않았으며 gas를 생성하지 않았다. Table 1에서 보는 바와 같이 분리된 균주의 당 이용성을 시험한 후 API LAB Plus 동정용 프로그램을 이용하여 분석한 결과 99.3%의 신뢰도로 *L. acidophilus* 1로 판명되었으며, 이를 *L. acidophilus* CT 01이라 명명하였다.

저온 배양에 따른 *L. acidophilus* CT 01의 성장

Fig. 1에서 저온 배양에 따른 *L. acidophilus* CT 01의 성장 곡선을 보면 배양 초기 대조구에 비해 22°C에서 성장한 *L. acidophilus* CT 01의 생균수가 3.8×10^6 CFU/mL로 가장 낮게 나타났으나, 배양 12시간부터 24시간까지 생균수가 급격히 증가하기 시작하여 배양 36시간에는 1.3×10^9 CFU/mL로 최대 생균수를 나타냈다. Băati 등(2000)은 *L. acidophilus*를 4, 15, 22, 30 및 37°C에서 배양한 결과 4 및 15°C에서 *L. acidophilus*가 성장하지 못했으며, 30 및 37°C에서는 매우 빠르게 성장하였고 22°C에서는 서서히 성장한다고 보고하였다.

저온 배양한 *L. acidophilus* CT 01의 저장성 및 냉동내성

저온 배양 후 4°C에서 저장한 결과는 Fig. 2에서 보는 바와 같다. 저온에서 배양하여 저온에 저장시킨 처리구 B와 C의 경우 생존률이 90.30와 90.67%로 37°C에서 배양한 대조구보다 높은 생존률(85.81%)을 나타냈다($p < 0.01$). 저온 배양 후 20°C에 저장한 경우(Fig. 3) 37°C에서 배양한 것의 생존률이 69.50%로 가장 낮게 나타났으며, 28°C에서 24시간 배양한 B가 82.67%로 가장 높은 생존률을 보였다($p < 0.01$). 냉동내성(Fig. 4)은 22와 28°C 저온에서 배양하여 냉동을 실시한 처리구 B와 C에서 95.73와 97.34%로 37°C에서 배양한 *L.*

Table 1. Utilization of carbohydrates by *L. acidophilus* CT 01

Carbohydrates	Reaction	Carbohydrates	Reaction
Control	-	Esculin	+
Glycerol	-	Salicin	+
Erythritol	-	Cellobiose	+
D-arabinose	-	Maltose	-
L-arabinose	-	Lactose	+
Ribose	-	Melibiose	-
D-xylose	-	Sucrose	+
L-xylose	-	Trehalose	-
Adonitol	-	Inulin	-
β-Methyl-D-xyloside	-	Melezitose	-
Galactose	+	Raffinose	-
Glucose	+	Starch	-
Fructose	+	Glycogen	-
Mannose	+	Xylitol	-
Sorbose	-	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-glucoamine	+	Gluconate	-
Amygdalin	+	2-keto-gluconate	-
Arbutin	-	5-keto-gluconate	-

+ : Fermented ; - : Not fermented.

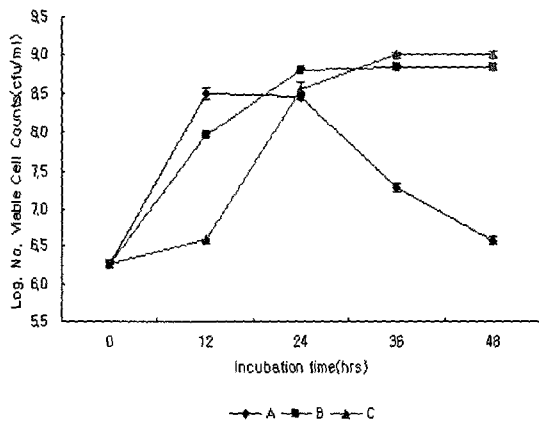


Fig. 1. The growth of *L. acidophilus* CT 01 in MRS broth at suboptimal temperature.

- A, incubated at 37°C for 48 hrs
- B, incubated at 28°C for 48 hrs
- C, incubated at 22°C for 48 hrs.

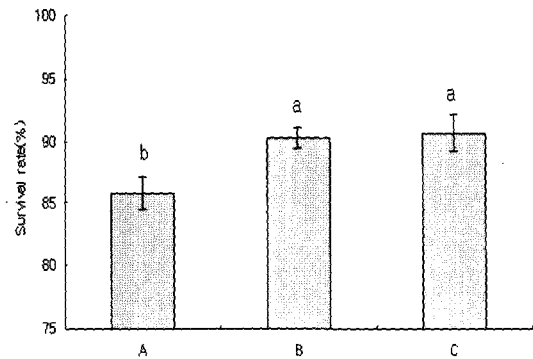


Fig. 2. The survival rate of *L. acidophilus* CT 01 during 12 days of storage at 4°C after suboptimal temperature incubated.

^{a-b} means ± standard deviation in the same row with different superscripts are significantly different ($p < 0.01$).

- A, incubated at 37°C for 12 hrs.
- B, incubated at 28°C for 24 hrs.
- C, incubated at 22°C for 36 hrs.

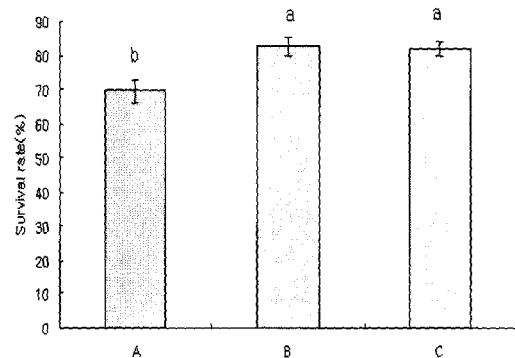


Fig. 3. The survival rate of *L. acidophilus* CT 01 during 12 days of storage at 20°C after suboptimal temperature incubated.

^{a-b} means ± standard deviation in the same row with different superscripts are significantly different ($p < 0.01$).

- A, incubated at 37°C for 12 hrs.
- B, incubated at 28°C for 24 hrs.
- C, incubated at 22°C for 36 hrs.

acidophilus CT 01에 비해 높은 생존률을 나타냈다($p < 0.01$). Bääti 등(2000)은 *L. acidophilus* ATCC 4356을 22°C에서 성장 정제기까지 배양하여 -80°C에 급속 냉동하고 24시간 후 생존률을 측정한 결과 89.2%의 높은 생존률을 나타냈다고 보고하였다. 또한 Fernandez Murga 등(2001)은 *L. acidophilus* CRL 640을 25°C에서 72시간 및 37°C에서 16시간 배양하여 -20°C에 냉동을 실시하고 생존률을 측정한 결과 25°C에서 생장한 *L. acidophilus* CRL 640은 67%의 생존률을 나타낸 반면 37°C에서 생장한 *L. acidophilus* CRL 640은 13%의 생존률을 나타냈다. Lorca와 Front de Valdez(1999)는 *L. acidophilus* CRL 639를

25℃에서 대수기 및 성장정체기까지 배양한 것이 37℃에서 성장정체기까지 배양한 것보다 냉동에 있어 냉동내성이 우수하지만 25℃에서 대수기까지 배양한 것과 성장정체기까지 배양한 것과의 차이는 없다고 하였다. Kim 등(1998)은 *Lactococcus lactis* LL41-1을 30℃에서 대수기까지 배양 후 대조구의 경우 바로 -20℃로 냉동하고 다른 처리구는 10℃에서 5시간 저온충격을 실시한 후 -20℃로 냉동하여 24시간 후 생존률을 측정한 결과 대조구의 생존률이 36%였다.

저온 배양한 *L. acidophilus* CT 01의 열저항성 및 건조에 대한 저항성

Fig. 5에서 보는 바와 같이 60℃에서 15분간 열처리한 결과 22℃에서 36시간 저온 배양한 처리구 C는 생존률 0.203%로 37℃에서 12시간 배양하여 열처리한 A(0.028%)에 비해 약 7 배 이상 생존률이 높은 것으로 나타났다($p < 0.01$). 60℃에서 30분간 열처리한 결과는 Fig. 6에서 보는 바와 같이 저온 배양한 처리구 B와 C의 생존률은 0.071과 0.108%로 나타나 37℃에서 12시간 배양한 대조구(0.0019%)에 비해 약 50배 이상 생존률이 높은 것으로 나타났다. Leyer와 Johnson(1993)는 *Salmonella typhimurium*을 이용하여 산에 대한 적응력과 환경 스트레스에 대한 저항성 관계를 조사한 결과 *S. typhimurium* 이 산, 열, lactoperoxidase, crystal violet 및 polymyxin B와 같은 다양한 스트레스에 대한 저항성이 증가하는 것으로 나타났다. *S. typhimurium*과 *Escherichia coli*의 경우 열충격 단백질은 아미노산이 부족한 기아상태나 H₂O₂ 및 산에 노출되었을 때 생성되는 것으로 밝혀졌다(Christman et al., 1985 ; Foster

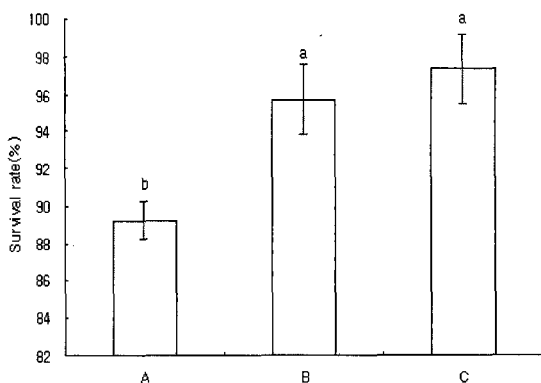


Fig. 4. Cryotolerance of *L. acidophilus* CT 01 after suboptimal temperature incubated. The *L. acidophilus* CT 01 was frozen at -60℃ for 24 hrs.

^{a-b} means±standard deviation in the same row with different superscripts are significantly different ($p < 0.01$).
 - A, incubated at 37℃ for 12 hrs.
 - B, incubated at 28℃ for 24 hrs.
 - C, incubated at 22℃ for 36 hrs.

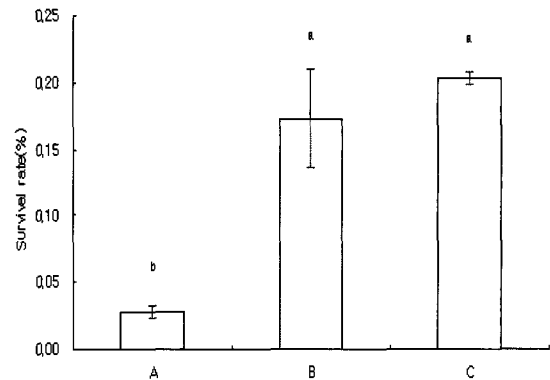


Fig. 5. Heat resistance of *L. acidophilus* CT 01 after suboptimal temperature incubated. The *L. acidophilus* CT 01 was heat treated for 15 min at 60℃.

^{a-b} means±standard deviation in the same row with different superscripts are significantly different ($p < 0.01$).
 - A : incubated at 37℃ for 12 hrs.
 - B : incubated at 28℃ for 24 hrs.
 - C : incubated at 22℃ for 36 hrs.

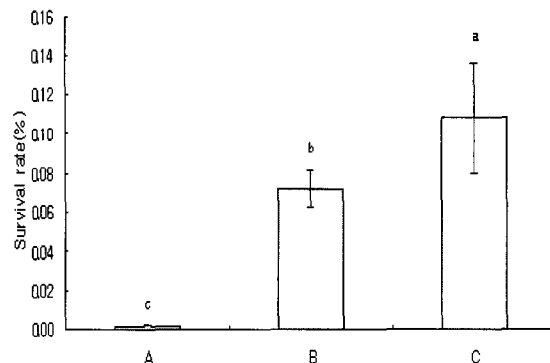


Fig. 6. Heat resistance of *L. acidophilus* CT 01 after suboptimal temperature incubated. The *L. acidophilus* CT 01 was heat treated for 30 min at 60℃.

^{a-c} means±standard deviation in the same row with different superscripts are significantly different ($p < 0.01$).
 - A : incubated at 37℃ for 12 hrs.
 - B : incubated at 28℃ for 24 hrs.
 - C : incubated at 22℃ for 36 hrs.

and Hall, 1990; Grossman et al., 1985; Heyde and Portaliere, 1990; VanBogelen et al., 1987). *Salmonellae*의 경우, 열충격 단백질의 합성을 유발하는 많은 종류의 스트레스나 기아상태가 열저항성을 증가시키지만(Leyer and Johnson, 1993), 열충격이 산에 대한 저항성을 증가시키지 못한다고 하였다(Foster, 1991). Komatsu 등(1990)에 의하면 *Saccharomyces cerevisiae*를 열충격을 가할 경우 열충격 단백질의 합성에 의해 냉동에 대한 저항성이 증가한다고 하였으며, Jeffery와 Chan(1999)은 *L. lactis*를 열충격 및 저온충격을 실시한 결과

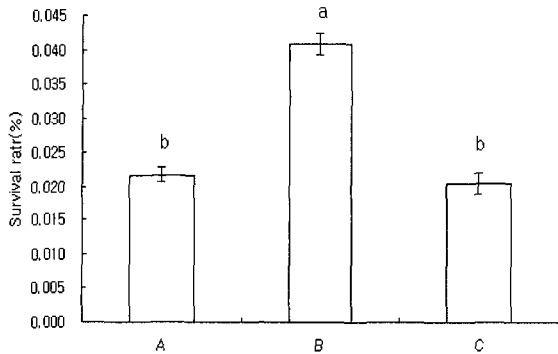


Fig. 7. Survival rate of *L. acidophilus* CT 01 after drying.

The *L. acidophilus* CT 01 was suboptimal temperature incubated. The *L. acidophilus* CT 01 was inoculated 30% of carrier dry weight and dried at 50 °C for 12 hrs.

^{a-b} means ± standard deviation in the same row with different superscripts are significantly different ($p < 0.01$).

- A : incubated at 37°C for 12 hrs.
- B : incubated at 28°C for 24 hrs.
- C : incubated at 22°C for 36 hrs.

냉동 및 동결건조에 대한 저항성이 증가한다고 보고하였다. Panoff 등(1995)은 *L. lactis*를 42°C에서 30분간 열충격을 가했을 경우 냉동에 대한 저항성이 증가하지 않지만 저온에 적응시킨 *L. lactis*는 냉동에 대한 저항성이 증가하고 52°C에서 30분간 열처리하였 때 열에 대한 열저항성이 대조구에 비해 60배에서 많게는 100배까지 증가한다고 보고하였다. 또한 저온에 *L. lactis*를 적응시키는 시간이 길면 길수록 열에 대한 저항성이 증가하였다. Fig. 7에서 보는 바와 같이 저온 배양을 실시하고 부형체에 30% 접종 후 교반하여 50°C 건조기에 12시간 건조한 결과 12시간 건조 후 수분함량은 $14.3 \pm 0.4\%$ 였다. 37°C에서 12시간 배양한 *L. acidophilus* CT 01의 생존률이 0.02%로 나타났고, 28°C에서 24시간 저온 배양한 *L. acidophilus* CT 01의 경우 생존률이 0.04%로 가장 높게 나타났으나, 이를 산업적으로 이를 이용하기엔 저온에서 배양한 처리구 역시 생존률이 낮기 때문에 좀 더 생존률을 높일 수 있는 방안이 모색되어야 할 것으로 사료된다. 생균제의 가장 큰 문제점은 제조과정 중 생존률이 감소하는 것이다. 열에 의한 스트레스 및 분무건조 동안 생균제에 있어서 생존률의 감소는 단순히 열에 의한 것뿐만 아니라 세포에 존재하는 결합수의 손실 역시 생균제의 생존률에 영향을 미친다는 것이다 (Daemen and van der Stege, 1982). Teixeira 등(1995a)은 *L. acidophilus*의 분무건조시 세포벽과 세포막 손상의 지표가 되는 lysozyme과 NaCl에 대한 민감도가 증가한다고 보고한 바 있으며, 열에 의한 스트레스와 분무건조가 DNA와 RNA에 손상을 일으켜 세포막으로부터 Mg^{2+} 의 손실을 초래한다고 하

였다(Teixeira et al., 1997). 분무건조시 생균제의 생존률과 세포의 파괴는 사용하는 건조기의 온도, 시간 및 생균제의 열에 대한 저항성이 큰 영향을 미친다(Teixeira et al., 1995a; Teixeira et al., 1995b).

요 약

본 연구는 이유 전 자돈의 분변으로부터 분리·동정한 젖산균의 저온 배양에 따른 기초지식을 확보하고 이를 생균제 생산에 적용함으로써 제품내 젖산균의 생존력을 증대시키기 위해 실시하였다. 이유 전 자돈의 분변으로부터 분리·동정한 젖산균은 *Lactobacillus acidophilus* 1로 판명되었으며, 이를 *L. acidophilus* CT 01이라 명명하였다. 48시간 동안 저온 배양한 *L. acidophilus* CT 01은 배양온도가 22°C일 때 성장속도가 가장 느리게 나타났으나 배양 12시간 이후부터 생균수가 급격히 증가하기 시작하여 배양 36시간에 1.3×10^9 CFU/mL로 최대 생균수를 나타냈다. *L. acidophilus* CT 01을 저온 배양하여 12일간 4°C와 20°C에 저장한 결과 4°C에 저장한 경우 저온 배양한 처리구의 생존률이 90.30와 90.67%로 대조구(85.81%) 보다 높은 생존률을 나타냈으며($p < 0.01$), 20°C 저장시 28°C에서 24시간 저온 배양한 처리구에서 가장 높은 생존률(82.67%)을 나타냈다($p < 0.01$). *L. acidophilus* CT 01의 냉동 내성은 저온 배양한 처리구가 대조구보다 생존률이 95.73와 97.34%로 높게 나타났다($p < 0.01$). *L. acidophilus* CT 01을 60°C에서 15분과 30분 동안 열처리하여 열저항성을 시험한 결과 22°C에서 저온 배양한 처리구의 생존률이 0.203와 0.108%로 대조구에 비해 높게 나타났다($p < 0.01$). *L. acidophilus* CT 01을 저온 배양하여 부형체에 30% 접종하고 50°C에서 12시간 건조하여 생존률을 조사한 결과 저온 배양한 처리구가 가장 높은 생존률을 나타냈다.

참고문헌

1. Băati, L., Fabre-Gea, C., Auriol, D., and Blanc., P. J. (2000) Study of the cryotolerance of *Lactobacillus acidophilus* : effect of culture and freezing conditions on the viability and cellular protein levels. *Int. J. Food Microbiol.* **59**, 241-247.
2. Christman, M., Morgan, R., Jacobson, F., and Ame, B. (1985) Positive control of a regulon for defenses against oxidative stress and some heat shock proteins in *Salmonella typhimurium*. *Cell.* **41**, 753-762.
3. Daemen, A. L. H. and van der Stege, H. J. (1982) The destruction of enzyme and bacteria during the spray drying of milk and whey. 2. The effect of the drying conditions.

- Neth. Milk Dairy J.* **36**, 211-229.
4. Fernandez Murga, M. L., de Valdez, G. F., and Anibal Disalvo, E. (2001) Effect of lipid composition on the stability of cellula membranes during freeze-thawing of *Lactobacillus acidophilus* grown at different temperatures. *Arch. Biochem. Biophys.* **338**, 179-184.
 5. Foster, J. W. (1991) *Salmonella* acid shock proteins are required for the adaptative acid tolerance response. *J. Bacteriol.* **173**, 6896-6902.
 6. Foster, J. W. and Hall, H. K. (1990) Adaptive acidification tolerance response of *Salmonella typhimurium*. *J. Bacteriol.* **172**, 771-778.
 7. Grossman, A. D., Taylor, W. E., Burton, Z. F., Burgess, R. R., and Gross, C. A. (1985) Stringent response in *Escherichia coli* induces heat shock protein. *J. Mol. Biol.* **186**, 357-365.
 8. Hanson, D. J. (1985) Human health effects of animal feed drugs unclear. *Chem. Eng. News.* **63**, 7-14.
 9. Heyde, M. and Portalier, R. (1990) Acid shock proteins of *Escherichia coli*. *FEMS Microbiol. Lett.* **69**, 19-26.
 10. Ishibashi, N. and Shimamura, S. (1993) Bifidobacteria: Research and development in Japan. *Food Technol.* **46**, 126-135.
 11. Jeffery, R. B. and Chan, L. (1999) Effect of heat shock or cold shock treatment on the resistance of *Lactococcus lactis* to freezing and lyophilization. *Cryobiol.* **39**, 88-102.
 12. Kemp, G. and Kiser, J. (1970) Microbial resistance and public health aspects of use of mediate feed. *J. Anim. Sci.* **31**, 1107-1117.
 13. Kim, W. S., Khunajakr, N., and Dunn, N. W. (1998) Effect of cold shock on protein synthesis and on cryotolerance of cells frozen for long periods in *Lactococcus lactis*. *Cryobiol.* **37**, 86-91.
 14. Knorr, D. (1998) Technology aspects related to microorganisms in functional foods. *Trends in Food Sci. and Technol.* **9**, 295-306.
 15. Komatsu, Y., Obuchi, K., Iwahashi, H., Kaul, S. C., Ishimura, M., Fahy, G. M., and Rall, W. F. (1990) Deuterium oxide, dimethylsulfoxide and heat shock confer protection against hydrosatic pressure damage in yeast. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **174**, 1141-1147.
 16. Leyer, G. J. and Johnson, E. A. (1993) Acid adaptation induces cross-protection against environmental stresses in *Salmonella typhimurium*. *Appl. Environ. Microbiol.* **59**, 1842- 1847.
 17. Lorca, G. L. and de Valdez, G. F. (1999) The Effect of suboptimal growth and growth phase on resistance of *Lactobacillus acidophilus* to environmental stress. *Cryobiol.* **39**, 144-149.
 18. Panoff, J. M., Thammavongs, B., Laplace, J. M., Hartke, A., Boutibonnes, P., and Auffray, A. (1995) Cryotolerance and cold adaptation in *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* IL 1403. *Cryobiology* **32**, 516-520.
 19. Salminen, S. and von Wright, A. (1998) Lactic acid bacteria : Microbiology and Functional Aspects. Marcel Dekker Inc., New York.
 20. Shin, J. G. (2003) Physiological properties of lactic acid bacteria exposed to low growth temperature. Ph. D. thesis, Seoul National Univ., Suwon, Korea.
 21. Svensson, U. (1999) Industrial perspectives. In: Probiotics : A critical review. Tannock, G. W. (ed), Horizon Scientific Press, Wymondham, UK.
 22. Teixeira, P., Castro, H., and Kirby, R. (1995a) Spray drying as method for preparing concentrated cultures of *Lactobacillus bulgaricus*. *J. Appl. Biotech.* **78**, 456-462.
 23. Teixeira, P., Castro, M. H., Malcata, F. X., and Kirby, R. M. (1995b) Survival of *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus* following spray drying. *J. Dairy Sci.* **78**, 1025-1031.
 24. Teixeira, P., Castro, H., Mohacsi-Farkas, C., and Kirby, R. (1997) Identification of sites of injury in *Lactobacillus bulgaricus* during heat stress. *J. Appl. Microbiol.* **83**, 219-226.
 25. VanBogelen, R. A., Kelley, P. M., and Neidhardt, F. C. (1987) Differential induction of heat-shock, SOS, and oxidation stress regulons and accumulation of nucleotides in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **169**, 26-32.