

# 유산균이 생산하는 Class II 박테리오신의 특성

오 세 종  
(주) 한국야쿠르트 중앙연구소

## I. 서 론

유산균, 또는 젖산균(Lactic acid bacteria; LAB)은 그람 양성균으로 구형 또는 막대 모양을 띄고 있으며, 탄수화물을 전환시켜 주요 최종 대사산물로 젖산을 생성하는 것이 특징이다. 이러한 젖산 생성과정은 homo 또는 heterofermentative pathway를 통해서 이루어진다. LAB는 일반적으로 G+C의 mol%가 50이하로 정의되지만 모든 미생물에 적용하기에는 다소 어려움이 있는 것 같다. 실제로 그람 양성균중에서 Clostridium 속 미생물이 범주에 속하기도 하며, Bifidobacterium 속의 경우 G+C mol%가 50이상이기 때문에 LAB의 범주 보다는 Actinomyces 한 가지(branch)로 보는 것이 더 타당한 것으로 여겨지고 있다(Schleifer and Ludwig, 1995). 그러나 Bifidobacterium 속은 장내에 존재하는 유용한 미생물로 다른 LAB와의 유사성이 많기 때문에 LAB로 분류되어 지기도 한다.

따라서 최근의 연구를 종합해보면 LAB는 Aerococcus, Carnobacterium, Enterococcus, Lactobacillus, Lactococcus, Leuconostoc, Periococcus, Streptococcus, Tetragenococcus, Vagococcus 등의 병원성과 비병원성 미생물의 heterogeneous group 등이 이 범주에 속한다고 할 수 있다(Pot et al., 1994).

LAB에 의해서 생산된 젖산은 다른 미생물에 항균효과를 나타내는데, 바로 이점 때문에 유제품, 육제품, 야채, 음료, 사료 등에 오래전 부터 적용되어 왔다. LAB가 생산하는 항균성 물질에는 젖산과 같은 유기산, 이산화탄소, diacetyl, hydrogen peroxide 그리고 bacteriocin을 들 수 있다.

LAB bacteriocin은 소화계의 여러 단백질 분해효소에 의해 분해되므로 인체에 무해하고 잔류성이 없으며, plasmid나 chromosome으로부터 직접 생합성 되어 직접적인 유전자 조작 등에 의한 생물공학적인 응용이 쉽다는 장점이 있다. 또한 기존의 화학적 식품보존제를 대체할 수 있는 새로운 생물학적 보존제로서의 가능성이 제시되어 왔으며, 국내외적으로 이미 많은 LAB bacteriocin들이 연구되어 그 성질과 구조, 그리고 유전자 정보들이 밝혀졌다(Ahn and Stile, 1990; Kim, 1993; Klaenhammer, 1993). 그러나 실제 식품에의 적용에 있어서는 nisin을 제외하고는 매우 한정적으로 시도되고 있는 실정이다.

본 논문은 아직까지 식품첨가물로 인정받지 못한 다수의 Class II bacteriocin에 대하여 응용 한계를 극복하고자 신규 3종의 bacteriocin에 대한 특성을 고찰하였다.

## II. 유산균이 생산하는 Class II Bacteriocin

Tagg 등(1976)과 Klaenhammer(1993)는 bacteriocin을 "생산균주와 근접한 species에 항균작용을 하는 단백질성 화합물"로 정의되었다. 유전학적 및 생화학적 지식의 발전에 힘입어 이 정의는 bacteriocin의 특성을 명백하게 설명해 주었으나, 어떤 bacteriocin은 생산균과 좀더 거리가 먼 박테리아종에게도 항균효과가 있어 이 정의에 적용되지

Table 1. Classification of bacteriocins produced by Lactic acid bacteria

Classes	Characteristics
Class I	Lantibiotics, small membrane-active peptide (<5 kDa) containing the unusual amino acids lanthionone, $\beta$ -methyl lantionine and dehydrated residues.
Class II	Small heat-stable, non lantionine-containing, membrane active peptides (<10 kDa).
Class III	Large heat-labile proteins (>30 kDa).

Table 2. Subgroups of the Class II bacteriocins

Subgroup	References
Class IIA	Acidocin A Bavaricin A Carnobacteriocin B2/BM1 Divercin V41 Leucocin A Mesentericin Y105 Pediocin AcH Pediocin PA-1 Piscicocin V1 Sakacin A/Aakacin P Kanatani et al., 1995 Larsen & Norrung, 1993 Quadri et al., 1994 Pilet et al., 1995 Hastings et al., 1991 Maftah et al., 1993 Bhunia et al., 1991 Marugg et al., 1992 Pilet et al., 1995 Holck et al., 1992; Tichaczek et al., 1992
Class IIB	Lactacin F Lactococcin G Lactococcin M Plantaricin A Allison et al., 1994 Nissen-Meyer et al., 1992 van Belkum et al., 1991 Nissen-Meyer et al., 1993
Class IIC	Lactococcin B Venema et al., 1993
Class IID	Carnobacteriocin A Lactococcin A Acidocin 30SC Colicin V Worobo et al., 1994 van Belkum et al., 1991 Oh et al., 2000 Gilson et al., 1990

않는 예도 있는 것이 사실이다. 현재까지 다양한 원천에서부터 많은 수의 유산균 bacteriocin이 분리 동정되어 그 특성들이 규명되었고 이중 일부는 실제적인 식품에서도 이용이 가능한 것으로 보고되었다(Ahn and Stile, 1990; Kim, 1993; Montville, 1993).

Bacteriocin의 분류 역시 학자마다 다소 차이가 있는 것이 사실이며 크게 3가지로 나누는 것이 무리가 없는 것 같다(Table 1).

Bacteriocin 중에서 가장 많이 연구되어온 Nisin은 Class I에 속하며 *Lactococcus lactis*가 생산하는 대표적인 bacteriocin이다. Nisin은 34개의 amino acid로 이루어져 있으며 기존의 항생 peptide와 구별되는 lanthionine ring을 가지고 있고 활성도에 있어서 다른 peptide에 비하여 약 1000배 정도의 강한 활성을 보인다. Nisin은 vancomycin 내성균주에 대한 대안으로 여겨지고 있는 유용한 bacteriocin이다(Delves-Broughton, 1990). 이러한 장점에도 불구하고 약산성 혹은 중성의 pH에서 용해성이 낮고 phospholipid에 대한 흡착력이 있어 쉽게 불활성화 된다는 것과, Nisin에 저항성이 있는 미생물의 출현으로 그 응용 가능성이 제한되고 있는 실정이다. Nisin의 단점을 극복하기 위하여 *Pediococcus acidilactici*가 생산하는 Pediocin PA-1, *Lactobacillus palnatrum*이 생산하는 Plantaricin A 등과 같은 Class II bacteriocin들이 연구되었다.

Class II 박테리오신은 일반적 특성이 Nisin과 유사하지만 cleavage site가 Nisin의 경우 Pro-Arg sequence 다음에 해당되지만 Class II bacteriocin 의 경우 Gly-Gly motif 다음이다. 또한 항균 범위역시 Nisin보다 다소 제한적인 것이 단점이라 하겠다.

Table 2에 기술한 바와 같이 Class II bacteriocin은 특성상 다시 A, B, C, D 4종류로 세분될 수 있다.

Class IIA는 Tyr-Gly-Asn-Gly-Val-Xaa-Cys(YGNGVXC)의 sequences 또는 이와 유사한 sequence 를 지니는 것이 특징으로 antilisteria 활성을 가지고 있다. Pediocin PA-1, Pediocin AcH, Sakacin A, 와 P, Leucocin A,

Mesentericin Y105 등과 같이 대부분의 Class II bacteriocin들이 여기에 속하며 가장 많이 연구되어진 bacteriocin들이다. Fig 1에서 보는 바와 같이 YGNGVXC region은 cell membrane의 receptor에 결합하여 bacteriocin이 cell에 부착된다. 그러나 bacteriocin이 세포에 부착되기 위해서 receptor가 반드시 필요한 것은 아닌 것 같다. Class IIA bacteriocin들의 N-말단 부분은 구조적으로 높은 유사성이 있는데 세포 표면이 negative charge를 띄기 때문에 cationic 특성을 지닌 bacteriocin이 정전기적 결합을 하는 것으로 추정되고 있다(Ennahar et al., 2000).

Class IIB는 항균활성을 나타내기 위해서는 두개의 서로 다른 peptide를 필요로 하는 것이 특징으로 Lactococcin G, M, Lactacin F, Plantaricin A 등이 여기에 속한다.

Class IIC bacteriocin은 항균활성에 환원된 cysteine이 필요하기 때문에 thiol activated peptides라고도 한다. 이 subgroup에는 Lactococcin B가 대표적이다.

A,B,C의 subgroup에 속하지 않은 bacteriocin을 Class IID로 분류되며 Carnobacteriocin A, Lactococcin A, Acidocin 30SC 등을 들 수 있다.

한가지 분명한 사실은 Class II bacteriocin들의 분류가 편이상 작용기전(mode of action), 항균 spectrum, 일반적 특성 등에 기인된 것으로 앞으로 regulation, immunity, maturation, secretion 등에 관한 새로운 연구결과가 밝혀지면 bacteriocin의 분류는 변화한다는 점이다.

Carnobacteriocin B2, Lactococcin A,B 및 M, Plantaricin A, Sakacin A 등을 포함한 많은 Class II bacteriocin 들은 Nisin의 polycistronic operon과 유사한 유전자를 가지고 있으며 two-component regulation system, ATP binding cassette(ABC) translocator 그리고 accessory protein을 가지고 있다. 또한 69에서 154 아미노산을 지닌 immunity protein을 만드는 immunity gene을 지니고있다. Immunity protein 사이에는 아미노산 혹은 nucleotide sequence에서 어떠한 유사성이 없으며 단지, lipoprotein이라는 점만이 공통점인 것 같다. 그러나 이 범주에 속하는 bacteriocin들의 regulatory gene의 경우 서로간에 유사점이 많다(Allbright et al., 1989; Stock et al., 1989).

일반적으로 regulatory system은 response regulator와 histidine protein kinase를 가지고 있는데 Nisin에 있어서

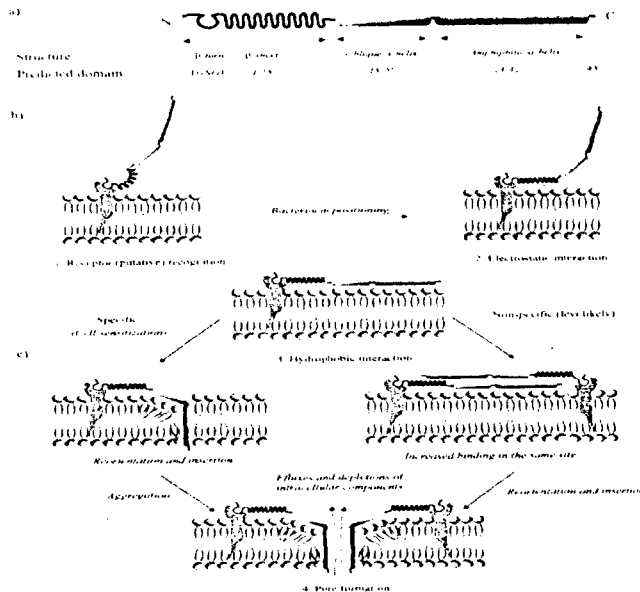


Fig. 1. Schematic diagram of the structure of a model classIIA bacteriocin: (a) bacteriocin predicted structural domains; (b) possible interactions of each domain with membrane surface; (c) bacteriocin insertion and formation of hydrophilic pores (Source from Ennahar et al., 2000).

Table 3. Inhibitory activity of bacteriocin from *Lactococcus* sp. CU216 against Gram- positive and Gram-negative bacteria

Bacteria	Media	°C	Inhibition	Source
<b>Gram-positive</b>				
<i>Alicyclobacillus acidoterrestris</i> VF	PD	45	+	ref. (48)
<i>Alicyclobacillus acidoterrestris</i> IPC	PD	45	+	ref. (48)
<i>Alicyclobacillus acidoterrestris</i> WAC	PD	45	+	ref. (53)
<i>Alicyclobacillus</i> sp. SAC	PD	45	+	ref. (53)
<i>Alicyclobacillus</i> sp. MY	PD	45	+	Lab. isolate
<i>Alicyclobacillus</i> sp. SFR	PD	45	+	Lab. isolate
<i>Bacillus cereus</i> ATCC1 1778	TSB	37	+	ATCC
<i>Bacillus subtilis</i> 1A650	TSB	37	+	ref. (51)
<i>Bacillus subtilis</i> 1A651	TSB	37	+	ref. (51)
<i>Lactobacillus acidophilus</i> 30SC	MRS	37	-	ref. (44)
<i>Lactobacillus acidophilus</i> ATCC 43121	MRS	37	-	ATCC
<i>Lactobacillus casei</i> Y1	MRS	37	+	Lab. isolate
<i>Lactobacillus casei</i> Y2	MRS	37	+	Lab. isolate
<i>Lactobacillus casei</i> 911	MRS	37	+	ref. (44)
<i>Lactobacillus casei</i> subsp. <i>rhamnosus</i> ATCC 7469	MRS	37	+	ATCC
<i>Lactobacillus delbruekii</i> subsp. <i>lactis</i> ATCC 4797	MRS	37	+	ATCC
<i>Lactobacillus fermentum</i> ATCC 11931	MRS	37	+	ATCC
<i>Lactobacillus helveticus</i> 1213	MRS	37	+	Lab. isolate
<i>Lactobacillus plantarum</i>	MRS	37	+	Lab. isolate
<i>Leuconostoc</i> sp. K2	MRS	37	+	Lab. isolate
<i>Listeria innocua</i>	TSB	37	+	Lab. isolate
<i>Listeria ivanovii</i>	TSB	37	+	Lab. isolate
<i>Listeria monocytogenes</i>	TSB	37	+	Lab. isolate
<i>Staphylococcus aureus</i>	TSB	37	+	Lab. isolate
<i>Streptococcus faecalis</i>	M17	37	+	Lab. isolate
<b>Gram-negative</b>				
<i>E. coli</i> O157 ATCC 43889	LB	37	-	ATCC
<i>E. coli</i> O157 ATCC 43893	LB	37	-	ATCC
<i>E. coli</i> O157 ATCC 43894	LB	37	-	ATCC
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	TSB	30	-	Lab. isolate
<i>Salmonella typhimurium</i>	TSB	37	-	Lab. isolate
<i>Yersinia enterocolitica</i>	TSB	37	-	Lab. isolate

ATCC, American Type Culture Collection; LB, Luria Bertani broth; TSB, Tryptic Soy broth; PD, Potato Dextrose (pH 5.0); MRS, de Man Rogosa Sharpe .

+, Inhibited by crude bacteriocin; - not inhibited.

*nisR*과 *nisK*에 해당되는 것이다(Engelke et al., 1994). 이 system은 bacteriocin의 transcription을 조절하는 sensor에 의존하는데 외부의 환경 즉 영양상태, 온도 등에 따라 response regulator의 phosphorylation에 따라 Bacteriocin의 합성이 좌우된다. 그러나 regulation system의 sensor 물질들에 대해서는 아직 명확하게 밝혀진 것은 없다(Saucier et al., 1995). Class II bacteriocin은 Class I 또는 Class III와 많은 유사점이 있는 것 또한 사실이다.

이제부터는 본 연구팀이 사용목적에 따라 분리 정제된 3종의 신규 Class II bacteriocin에 대하여 간단히 고찰하도록 하겠다.

### III. *Lactococcin* CU216

*Lactococcus* sp. CU216이 생산하는 bacteriocin은 포자를 형성하며 열과 산에 저항성이 매우 높은 *Alicyclobacillus*의 생육 억제에 이용하고자 디자인 되었다(Oh et al., 1999).

미생물에 의한 식품의 품질 저하는 식품산업에 경제적으로 큰 손실을 가져오기 때문에 많은 기술들이 부패성 미생물의 제거에 그 초점이 맞추어져 왔다. 열처리하는 식품의 위해 요소를 감소시키기 때문에 많이 사용하는 방법중의 하나이지만, 열에 내성이 강한 미생물들이 살아남아 식품의 변패 및 식중독을 일으켜 왔다(Johnson et al., 1982).

특히 *Alicyclobacillus*와 같이 열에 내성이 강하며 낮은 pH에 생육이 가능한 미생물은 비록 식중독을 일으키지는 않으나 식품의 유통중에 생육하여 최근 미국과 유럽에서 많은 경제적 손실을 야기시켜 왔다(Yamazaki et al., 1992;

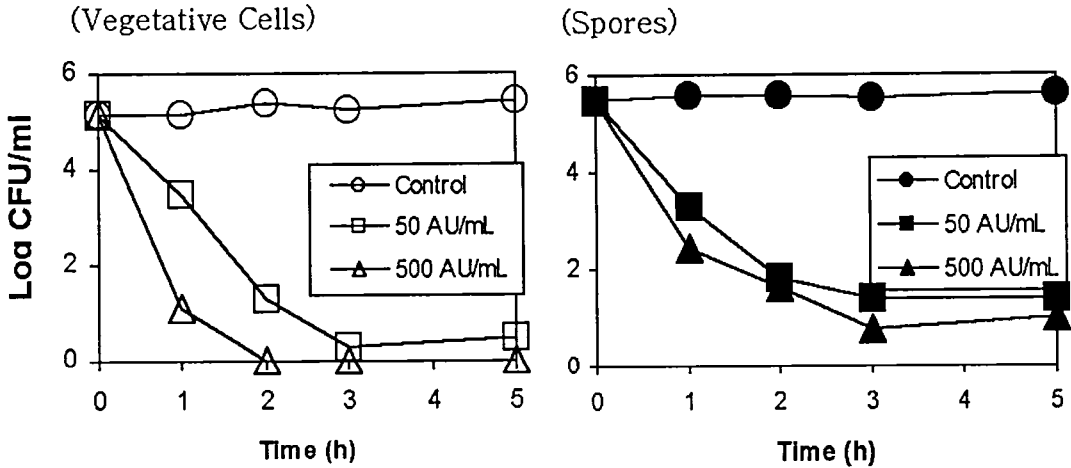


Fig. 2. Effect of lactococcin CU216 on the viable cells of *Alicyclobacillus acidoterrestris* VF in sterile distilled water at 45°C.

Splittstoesser et al., 1994). *Alicyclobacillus*는 포자를 형성하며 상업적 멸균 조건에서 사멸하지 않으며 24-60°C에서 생육이 가능하다. 이 미생물은 pH 3미만의 산성 조건에서 생육할수 있으며 일반적인 생육 pH 범위는 pH 2.5-6이다(Pontius et al., 1998; Splittstoesser et al., 1998).

Nisin 과 Class II bacteriocin 중 일부는 산성의 조건에서 높은 항균 활성으로 보이기 때문에 *Alicyclobacillus*의 억제에 효과적으로 사용이 가능하다.

Table 4는 *Alicyclobacillus*에 대한 항균활성을 측정 한 것으로 포자와 균체 모두 Lactococcin CU216에 의해서 생육이 억제 됨을 알 수 있었다. 본 실험에 사용한 *Alicyclobacillus* 균주들은 변패제품에서 직접 분리 및 동정한 것이다.

Fig 2는 Lactococcin CU216을 *Alicyclobacillus acidoterrestris* VF의 균체와 포자에 각각 처리하였을때의 생균수를 측정 한 것이다. Lactococcin CU216을 500AU/ml 첨가한 경우 *Alicyclobacillus* 균체는 배양 2시간에 전부 사멸하는것으로 나타난 반면 포자는 배양 5시간 까지 4 log 감소를 보였다.

또한 산업적인 이용성을 조사하기 위하여 사과주스에 *Alicyclobacillus acidoterrestris* VF를 접종한 다음 Lactococcin CU216을 농도별로 첨가하여 저장중의 *Alicyclobacillus*의 생육을 관찰해보았다. *Alicyclobacillus*는 저장중에 모두 사멸하는 것으로 나타났으며, 포자 상태의 경우가 다소 Lactococcin CU216에 저항성이 있는것으로 확인되었다(Table 5). 첨가되는 Lactococcin CU216의 농도는 배지상에서 실험한 경우에는 500 AU/ml 정도면 효과가 나타났으나, 사과주스에서는 이보다 높은 12800 AU/ml 이상을 첨가해야 균체가 모두 사멸하는것으로 나타났다. 이와 같은 결과는 Lactococcin CU216이 높은 소수성을 지니기 때문에 사과 주스에 함유된 poly phenol 계통의 성분들과 결합하는 것으로 추정되었으나 정확한 기작은 추가적인 실험으로 해명되어야 할 것이다.

Table 4. Inhibitory activity against *Alicyclobacillus* strains

	Vegetative cell (AU/ml)*	Spore (AU/ml)
<i>Alicyclobacillus acidoterrestris</i> VF	6400	6400
<i>Alicyclobacillus acidoterrestris</i> IPC	3200	6400
<i>Alicyclobacillus acidoterrestris</i> WAC	6400	6400
<i>Alicyclobacillus</i> sp. SAC	6400	12800
<i>Alicyclobacillus</i> sp. MY	6400	6400
<i>Alicyclobacillus</i> sp. SFR	3200	3200

The inhibitory activity was determined by the spot-on-lawn method.

\*Arbitrary units per ml of active crude lactococcin CU216.

Table 5. Effect on lactococcin CU216 on the growth of Alicyclobacillus acidoterrestris VF in apple juice

Initial Population	Storage Time at 20°C (days)	Bacteriocin Level (AU/ml)		
		Control	12800	25600
<b>Vegetative cells</b>				
3.34 × 10 <sup>2</sup>	1	2.61 × 10 <sup>2</sup>	< 10 <sup>0</sup>	< 10 <sup>0</sup>
	3	2.40 × 10 <sup>2</sup>	< 10 <sup>0</sup>	< 10 <sup>0</sup>
	7	2.90 × 10 <sup>2</sup>	< 10 <sup>0</sup>	< 10 <sup>0</sup>
	10	3.39 × 10 <sup>2</sup>	1	< 10 <sup>0</sup>
	14	2.43 × 10 <sup>2</sup>	< 10 <sup>0</sup>	< 10 <sup>0</sup>
9.4 × 10 <sup>3</sup>	1	6.3 × 10 <sup>3</sup>	< 10 <sup>0</sup>	< 10 <sup>0</sup>
	3	5.1 × 10 <sup>3</sup>	1	1
	7	7.4 × 10 <sup>3</sup>	< 10 <sup>0</sup>	< 10 <sup>0</sup>
	10	6.1 × 10 <sup>3</sup>	< 10 <sup>0</sup>	< 10 <sup>0</sup>
	14	3.53 × 10 <sup>3</sup>	< 10 <sup>0</sup>	< 10 <sup>0</sup>
<b>Spores</b>				
8.8 × 10 <sup>2</sup>	1	8.9 × 10 <sup>2</sup>	< 10 <sup>0</sup>	< 10 <sup>0</sup>
	3	1.23 × 10 <sup>3</sup>	< 10 <sup>0</sup>	< 10 <sup>0</sup>
	7	1.19 × 10 <sup>3</sup>	< 10 <sup>0</sup>	< 10 <sup>0</sup>
	10	1.02 × 10 <sup>3</sup>	1	< 10 <sup>0</sup>
	14	1.35 × 10 <sup>3</sup>	< 10 <sup>0</sup>	< 10 <sup>0</sup>
2.20 × 10 <sup>4</sup>	1	2.50 × 10 <sup>4</sup>	109	1
	3	2.94 × 10 <sup>4</sup>	24	< 10 <sup>0</sup>
	7	3.11 × 10 <sup>4</sup>	3	< 10 <sup>0</sup>
	10	4.8 × 10 <sup>4</sup>	4	< 10 <sup>0</sup>
	14	6.3 × 10 <sup>4</sup>	2	< 10 <sup>0</sup>

Lactococcin CU216을 정제하여 그 특성을 조사하였는데, Fig 3은 Octyl-sepharose CL-4B column을 이용하여 Lactococcin CU216을 분획한 것으로 항균 분획은 50% ethanol에서 용출된 2개의 peak로 분획되었다. 2개의 분획 간에는 분자량 및 기타 특성의 차이가 없는것으로 나타났다. 이 분획을 tricine-SDS-PAGE를 수행한 결과 분자량 약 3.5 kDa로 추정되었다(Fig 4). N-terminal amino acid sequencing을 한 결과 2번째부터 8번째까지 7개의 amino acid만이 판독되었는데 NH<sub>2</sub>-Xaa-Tyr-Tyr-Gly-Asn-Gly-Val-His으로 나타나 전형적인 Class IIA 박테리오신임을 확인할 수 있었다.

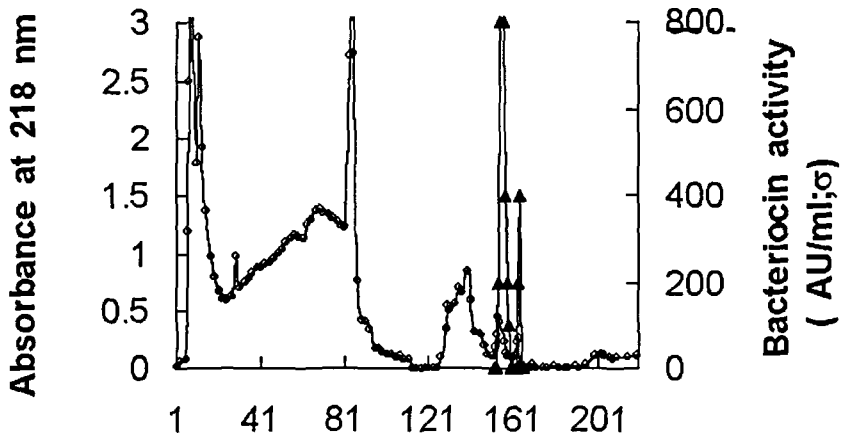


Fig 3. Separation of lactococcin CU216 by octyl-Sepharose CL4B column chromatography

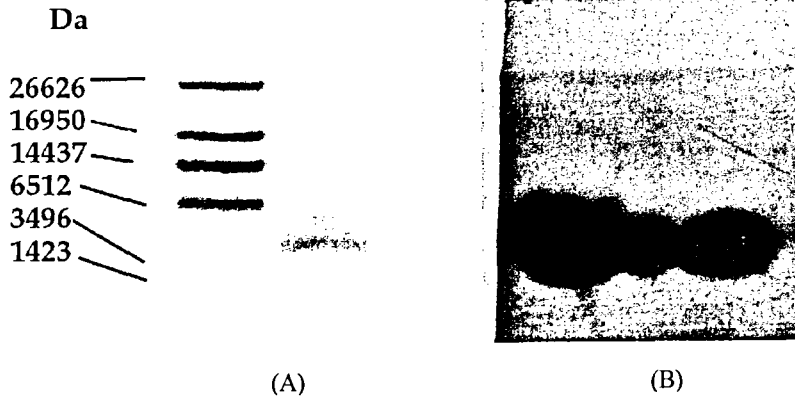


Fig 4. Coomassie blue-stained and inhibition on tricine-SDS-PAGE of purified lactococcin CU216. (A) PVDF membrane stained with Coomassie blue stain: lane 1, low molecular mass protein standards (Bio-Rad, USA); lane 2, lactococcin CU216. (B) gel overlaid with cells of *Lactobacillus casei* Y2 inoculated in MRS soft agar: lane 1, lactococcin CU216 (5 μl); lane 2, lactococcin CU216 (1 μl); lane 3, lactococcin CU216 (3 μl).

#### IV. Acidocin 30SC

LAB가 장내에서 유익한 역할을 수행하기 위해서는 갖추어야 할 조건들이 있다. 먼저 장내에 정상적으로 존재하는 균주이어야 하며, 장내에서 증식 또는 정착할수 있어야 한다. 또한 식품의 품질에 손상을 주어서는 안되며, 생산과 저장중에 활력을 유지하여야 한다. 이와 같은 조건을 갖춘 균주라고 하더라도 인체에 적용하기 위해서는 인체 내 소화기관의 환경을 먼저 고려해야 한다(Naidu et al., 1999). 인체 및 동물의 소화기관에는 미생물이 생존하기에 열악한 요인이 많이 존재한다. 이러한 요인으로는 위액, 각종 소화효소, 담즙, 장의 연동운동, immune response, 및 낮은 표면장력 등을 들수 있다. 그밖에 유기산, 지방산, hydrogen sulfide, lecithin, 항생제 등도 LAB의 생존을 저해하는 요인으로 알려져 있다. 그중 위액은 미생물의 생존을 가장 심각하게 위협하는 요인으로 염산에 의한 낮은 pH는 외부 미생물이 좀처럼 위를 통과 할수 없다. 위에서 생존하여 통과 했을지라도 장내에 서식하기 위해서는 담즙에 대한 내성이 있어야 한다. 담즙은 담낭에서 십이지장에서 분비되는 일종의 계면활성제로서 사람의 경우

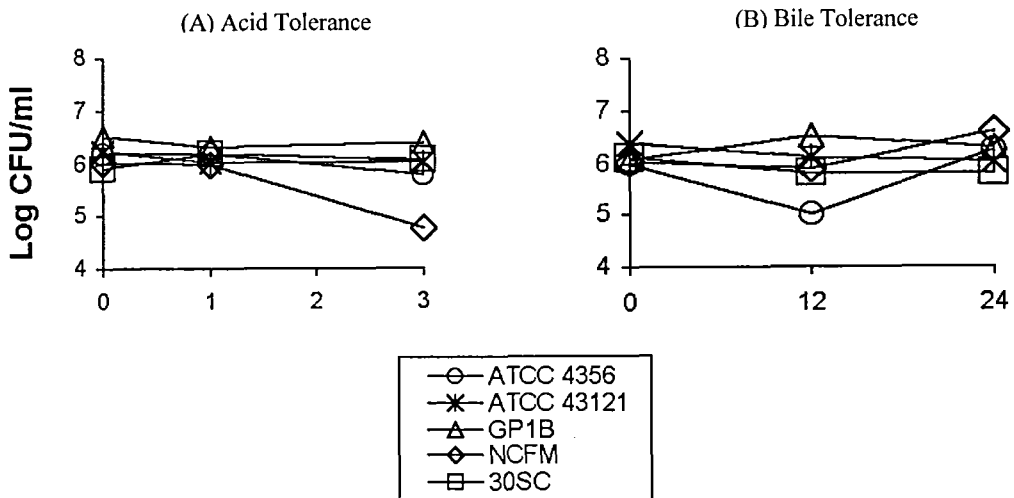


Fig. 5. Acid and bile tolerances of *Lactobacillus acidophilus* strains.

deoxycholic acid, cholic acid 등이 주성분이다. 장에서 분리된 LAB중에서 *L. acidophilus*, *L. casei*, *L. fermentum* 및 *L. plantarum* 등은 담즙에 대한 내성이 있으나, 장에서 분리되지 않은 유산균은 0.15%의 oxgall이 함유된 배지에서 잘 자라지 못한다(Naidu et al., 1999).

지금까지 언급한 바와 같이 LAB가 probiotics로서의 효과를 나타내려면 위와 장을 살아서 통과해야 하며 장에 정착해야만 한다. 장내정착을 쉽게 하기위한 요인들은 아직 구명되지 않았으나, Bacteriocin을 생산하는 유산균은 장내 서식이 보다 용이할수 있을것이다. *Lactobacillus acidophilus*는 대표적인 probiotics에 속하는 유산균으로 현재 상업적으로 이용이 널리되고 있는 미생물이며 *L. acidophilus* group은 DNA homology를 통해서 *L. crispatus*, *L. amylovorus*, *L. gallinarum*, *L. gasseri*, *L. johnsonii*, *L. acidophilus*의 6개의 group으로 구분된다(Hammes and Vogel, 1995).

Lactacin F는 분자생물학적으로 잘 연구되어진 bacteriocin중의 하나이며 나중에 *L. johnsonii*로 재명명되었다. 최근까지 *L. acidophilus*의 bacteriocin에 대하여 연구가 수행되었는데 acidocin 8912, acidocin J1132, acidociphilin 801등을 들수 있다(Muriana and Klaenhammer, 1991; Tahara et al., 1996; Zamfir et al., 1999).

*Lactobacillus acidophilus*는 probiotic 유산균의 범주에 속하는 LAB로 낙농제품의 중균을 포함하여 상업적으로 널리 이용되는 미생물이다. 본 연구에서는 probiotics으로 이용이 가능한 *L. acidophilus*를 선발한 후 여기서 bacteriocin 생성 유무를 평가하여 그 bacteriocin의 특성을 규명하였다.

현재 요구르트에 사용하고 있는 *L. acidophilus* NCFM 균주를 포함하여 5종의 *L. acidophilus* 균주들의 내상성과 담즙산 내성을 평가한 결과 *L. acidophilus* 30SC는 내상성과 담즙산 매성이 다른 *L. acidophilus* 균주들보다 유사한 것으로 나타났다(Fig. 5).

Table 6은 Acidocin 30SC의 항균 범위를 나타낸 것으로 그람 음성균에는 활성이 나타나지 않았고 *Bacillus cereus*, *B. subtilis*, *Staphylococcus aureus*, *Listeria innocua* 등 그람 양성 병원성 미생물과 일부 유산균에 대하여 항균활성이 있었다.

Table 6. Inhibitory activity of Acidocin 30SC against Gram- positive and Gram-negative bacteria

Bacteria	Media	°C	Inhibition	Source
<b>Gram-positive</b>				
<i>Bacillus cereus</i> ATCC1 1778	TSB	37	+	ATCC
<i>Bacillus subtilis</i> 1A650	TSB	37	+	ref. (51)
<i>Bacillus subtilis</i> 1A651	TSB	37	+	ref. (51)
<i>Lactobacillus acidophilus</i> ATCC 43121	MRS	37	-	ATCC
<i>Lactobacillus casei</i> Y2	MRS	37	+	Lab. isolate
<i>Lactobacillus delbruekii</i> subsp. <i>lactis</i> ATCC 4797	MRS	37	+	ATCC
<i>Lactobacillus fermentum</i> ATCC 11931	MRS	37	+	ATCC
<i>Lactobacillus helveticus</i> 1213	MRS	37	-	Lab. isolate
<i>Lactobacillus plantarum</i>	MRS	37	+	Lab. isolate
<i>Lactococcus lactis</i> ATCC 1145	MRS	37	-	ATCC
<i>Lactococcus</i> sp. CU216	MRS	37	-	Lab. isolated
<i>Leuconostoc</i> sp. K2	MRS	37	+	Lab. isolate
<i>Listeria innocua</i>	TSB	37	-	Lab. isolate
<i>Listeria ivanovii</i>	TSB	37	+	Lab. isolate
<i>Listeria monocytogenes</i>	TSB	37	-	Lab. isolate
<i>Staphylococcus aureus</i>	TSB	37	+	Lab. isolate
<i>Streptococcus faecalis</i>	M17	37	-	Lab. isolate
<b>Gram-negative</b>				
<i>E. coli</i> O157 ATCC 43889	LB	37	-	ATCC
<i>E. coli</i> O157 ATCC 43893	LB	37	-	ATCC
<i>E. coli</i> O157 ATCC 43894	LB	37	-	ATCC
<i>Salmonella typhimurium</i>	TSB	37	-	Lab. isolate
<i>Yersinia enterocolitica</i>	TSB	37	-	Lab. isolate

ATCC, American Type Culture Collection; LB, Luria Bertani broth; TSB, Tryptic Soy broth; PD, Potato Dextrose (pH 5.0); MRS, de Man Rogosa Sharpe .

+, Inhibited by crude bacteriocin; - not inhibited.



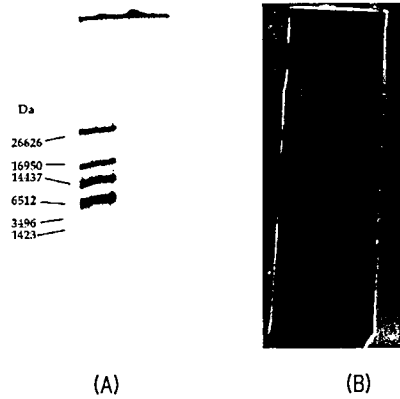


Fig. 6. Tricine-SDS-PAGE and detection of antimicrobial activity of the purified *Lactobacillus acidophilus* 30SC bacteriocin. (A) gel stained with Coomassie blue stain; lane 1, low molecular mass protein standards (Bio-Rad, USA); lane 2, purified *L. acidophilus* 30SC bacteriocin. (B) gel overlayed with cells of *Leuconostoc* sp K2 inoculated in MRS soft agar.

Acidocin 30SC는 열처리에 대해서도 매우 안정한것으로 나타났는데 95°C 20분 처리하에서도 항균활성의 변화가 없었고 121°C 20분 처리에서는 50%의 활성 감소를 보였다. pH에 대해서도 pH 3-10까지 최초 활성의 50%를 유지하는 것으로 나타났다.

Hydrophobic interaction chromatography, C18 column을 이용한 reverse-phase chromatography, 및 tricine SDS-PAGE를 수행한 결과 Acidocin 30SC는 단일 물질로 되어 있음을 확인 할수 있었다.

N-terminal amino acid sequencing을 분석한 결과 23개의 amino acid가 다음과 같이 판독되었다 : NH<sub>2</sub>-Ile-Gln-Gln-Leu-Gly-Phe-Gly-Phe-Met-Leu-Glu-Gly-Glu-Ala-Xaa-Gly-Ile-Gly-Pro-Glu-Xaa-Xaa-Phe.

*L. acidophilus*가 생산하는 박테리옌진중 일부는(Acidocin LF 221) 2종류의 peptide로 구성되어 있다. 그러나 Acidocin 30SC는 단일 peptide로 구성되어 있음을 확인하였고 lantibiotics를 포함하지 않는 Class II bacteriocin임을 알 수 있었다.

## V. Leucocin W65

30년 전까지만 해도 *Listeria monocytogenes*, *Campylobacter jejuni*, *Aeromonas hydrophila*, *Plesiomonas*

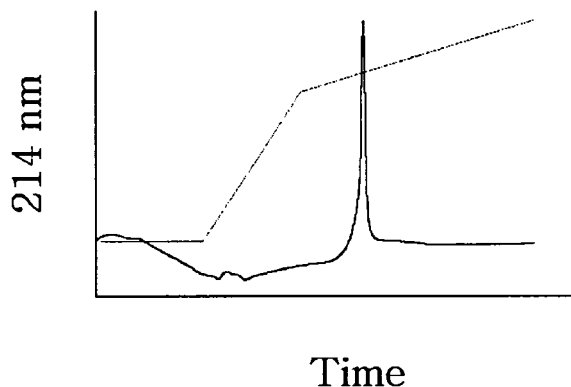


Fig. 7. Elution profile of acidocin 30SC on reverse-phase chromatography using RPC column.

shigelloides, *Vibrio parahaemolyticus*, *Yersinia enterocolitica* 등은 그다지 잘 알려진 미생물은 아니었다. 그러나 오늘날에는 많이 연구되어진 병원성 미생물로 우리가 필히 정복해야 할 미생물들이다. *Listeria*균은 1970년대 이래로 식중독 미생물로 인식되어온 대표적 미생물이다. *Listeria*균은 낮은 온도 및 pH, 높은 염농도에서도 생육이 가능하며 발효제품에서도 발견되고 있다(Bahk and Marth, 1990; Foster, 1997).

많은 Class II bacteriocin은 좁은 범위의 활성으로 인하여 주로 *Listeria*, *Clostridium*, *Bacillus* 등의 생육억제에 그 초점이 모아져 왔다(Harris et al., 1989). 이들 pathogen들은 식중독을 일으키는 다른 Gram 음성균에 못지 않게 보건학적으로 중요한 미생물들이다. 위에서 언급한 Class IIA bacteriocin과같이 anti-*Listeria* site가 존재하는 하여 *Listeria*의 생육을 억제하지만 *Listeria* region이 없는 bacteriocin 또한 *Listeria*에 대하여 효과가 있는 bacteriocin이 보고되고 있다(Muriana, 1996). Nisin은 현재까지 FDA에서 허가된 유일한 bacteriocin이지만 *Listeria monocytogenes*에 대한 내성균의 발견은 아직까지 실제 식품제조에 적용되지 않은 많은 박테리오신에 영향을 주어 보다 체계적인 연구 수행이 요구되고 있는 실정이다(Lasen and Norrung, 1993; Ming and Daeschel, 1993; Jack et al., 1995; McAuliffe et al., 1999).

본 연구는 *Listeria monocytogenes*를 지시균으로 하여 antilisteria bacteriocin을 규명할 목적으로 수행되었다.

Leucocin W65 생산균주인 *Leuconostoc* sp. W65는 *peperoni*에서 분리 동정하였으며 병원성 미생물에 대한 생육 억제활성을 조사한 결과 *Listeria monocytogenes*, *Listeria innocua*, *Listeria ivanovii*에만 억제효과를 보였다. Leucocin W65는 bacteriolytic 활성으로 보이며 bacteriocin 생산은 온도에 의존적인 것이 그 특징이다.

Hydrophobic interaction chromatography와 tricine SDS-PAGE를 수행한 결과 분자량 약 5 kDa 정도의 이동도를 보였고 단일물질로 이루어져 있음을 확인할 수 있었다. Amino acid composition을 통하여 분자량을 추정해본 결과 총 56개의 아미노산으로 이루어져 있으며 분자량은 5.7 kDa로 추정되었고 N-terminal amino acid sequencing을 한 결과 NH<sub>2</sub>-XGXAGVXPXGGQQPXVPLXYP 만이 판독되었다.

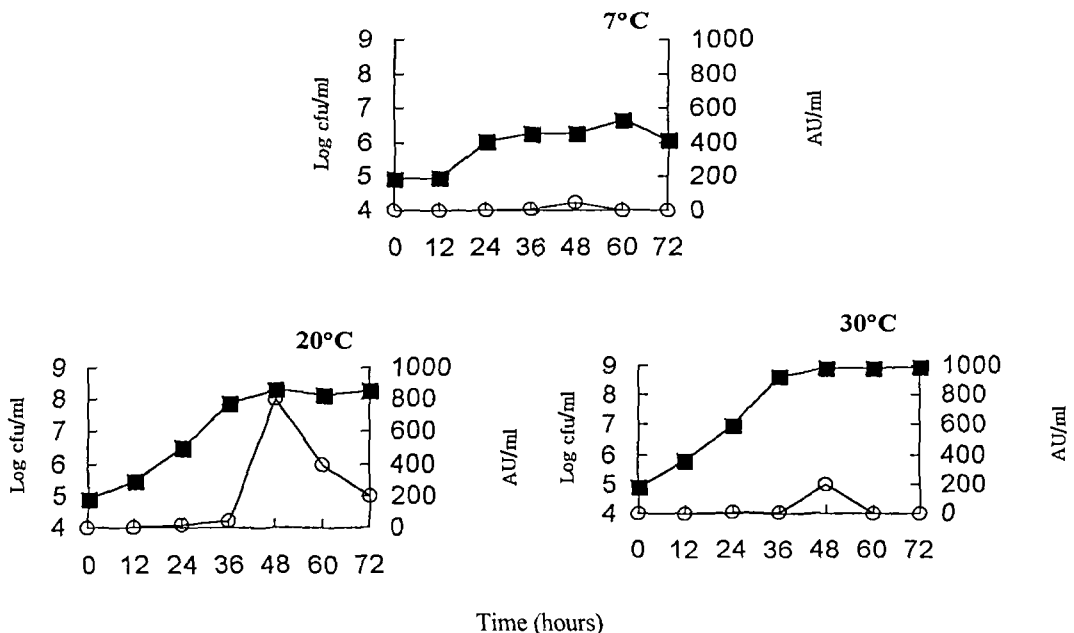


Fig. 8. Changes in viable cells and bacteriocin production during growth of *Leuconostoc* sp. W65 at 7, 20 and 30°C: (■), log numbers of viable cells; (○) bacteriocin activity.

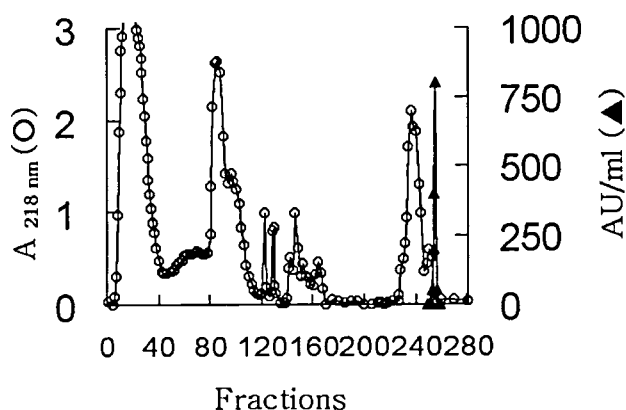


Fig. 9. Separation of leucocin W65 by octyl-sepharose CL4B column chromatography.

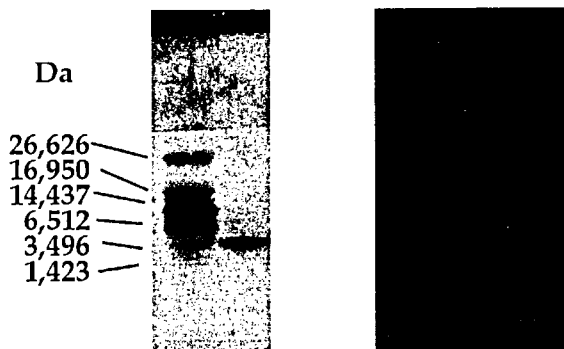


Fig. 10. Silver-stained and growth inhibition on tricine-SDS-PAGE of purified bacteriocin by *Leuconostoc* sp. W65. (A) gel stained with silver stain: lane 1, low molecular mass protein standards (Bio-Rad, USA); lane 2, purified bacteriocin. (B) gel overlaid with cells of *Listeria ivanovii* inoculated Tryptic soy agar: lane 1 1  $\mu$ g, lane 2 3  $\mu$ g.

Table 7. Amino acid composition of leucocin W65.

Amino acid	pmole	No. of residue*
Asp	129.8	4
Glu	182.4	6
Ser	164.6	5
Gly	275.9	8
His	33.1	1
Arg	59.1	2
Thr	90.5	3
Ala	223.9	7
Pro	127.5	4
Tyr	48.1	1
Val	106.2	3
Met	22.3	1
Ile	63.8	2
Leu	115.6	4
Phe	69.5	2
Lys	90.7	3
Total	1803	56

\*Calculated number of residue per molecule

## VI. 결 론

지금까지 유산균이 생산하는 3종의 신규 bacteriocin에 대하여 고찰해 보았다. 지난 20년 동안 LAB bacteriocin에 대한 유전학적, 분자생물학적 기초하에 집중적인 연구를 수행되어 온 결과, 식품 및 사료의 보존에 있어서 LAB는 다양한 항균 물질을 생산한다는 점 때문에 그 잠재성을 인정 받게 되었다. Bacteriocin 이외에 유기산, diacetyl, hydrogen peroxide, reuterin( $\beta$ -hydroxypropionaldehyde) 등도 항균물질의 범주에 속할 수 있으나, 열과 pH에 안정하기 때문에 식품제조시 적용 가능한 장점이 있고 Nisin에 대한 여러 문제점을 상호 보완할 수 있는 특성을 지니고 있기 때문에 class II bacteriocin에 대한 중요성이 인식되고 있다. 그러나 높은 소수성 때문에 식품원료에 결합해서 그 활성이 소실될 수 있다는 점과 좁은 범위의 항균활성은 앞으로 극복해야 할 과제라 생각된다. 비록 항생제보다 그 활성이 낮지만 오랫동안 섭취해온 유산균이 생산한다는 점과 식품에 직접적으로 응용이 가능한 점에서 bacteriocin의 유용성을 찾을 수 있지 않나 생각되는 바이다.

## 감사의 글

본 발표내용 중 일부 내용은 보건복지부 보건의료기술연구개발사업(HMP-97-F-3-0010) 및 United States Federal Hatch Project(NYG-623500)의 지원에 의하여 수행된 결과로 이에 감사를 드린다.

## VII. 참고문헌

1. Ahn, C., and Stiles, M. E. : Antibacterial activity of lactic acid bacteria isolated from vacuum-packaged meats. *J. Appl. Bacteriol.* 69:302-310(1990).
2. Allbright, L. M., Huala, E., and Ausubel, F. M. : Prokaryotic signal transduction mediated by sensor and regulator protein pairs. *Annu. Rev. Genet.* 23:311-336(1989).
3. Allison, G. E., Fremaux, S., and Klaenhammer, T. R. : Expansion of bacteriocin activity and host range upon complementation of two peptides encoded within the lactacin F operon. *J. Bacteriol.* 176:2235-2241(1995).
4. Bahk, J. and Marth, E. H. : Listeriolysin and *Listeria monocytogenes*. In *Foodborne diseases* ed. Cliver, D. O. pp. 247-257. Academic Press, Inc. New York(1990).
5. Bhunia, A. K., Johnson, M. C., and Ray, B. : Purification, characterization and antimicrobial spectrum of a bacteriocin produced by *Pediococcus acidilactici* H. *J. Appl. Bacteriol.* 65:261-268(1988).
6. Bogovic-Matijasic, B, Rogeli, I., Nes, I. F. and Holo, H. : Isolation and characterization of two bacteriocins of *Lactobacillus acidophilus* LF221. *Appl. Microbiol. & Biotechnol.* 49:606-612(1998).
7. Brunia, A. K., Johnson, M. C., Ray, B., and Kalchayanand, N. : Mode of action of pediocin AcH from *Pediococcus acidilactici* H on sensitive bacterial strains. *J. Appl. Bacteriol.* 70:25-33(1991).
8. Brackett, R. E., Marth, E. H., Doyle, M. P., Lovett, J. and Schlech, W. F. : *Listeria monocytogenes*: A foodborne pathogen (symposium). *Food Technology* 42, 61-178(1988).
9. Daba, H., Pandian, S., Gosselin, J. F., Simard, R. E., Huang, J. and Lacroix, C. 1991. Detection and activity of bacteriocin produced by *Leuconostoc mesenteroides*. *Appl. Environ. Microbiol.* 57:3450-3455(1991).
10. Degnan, A. J., Yousef, A. E. and Luchansky, J. B. : Use of *Pediococcus acidilactici* to control *Listeria monocytogenes* in temperature-abused vacuum-packaged wieners. *J. Food Protect.* 55:98-103(1992).
11. Delves-Broughton, J. : Nisin and its uses as a food preservative. *Food Technol.* 44:100-117(1990).
12. Engelke, G., Gutowski-Eckel, Z., Kiesau, P., Siegers, K., Hammelmann, M., and Entian, K. D. : Regulation of nisin biosynthesis and immunity in *Lactococcus lactis* 6F3. *Appl. Environ. Microbiol.* 60:814-825(1994).

13. Ennahar, S., O. Assobhei, and C. Hasselman. : Inhibition of *Listeria monocytogenes* in a smear-surface soft cheese by *Lactobacillus plantarum* WHE 92, a Pediocin AcH producer. *J. Food Prot.* 61:186-191(1998).
14. Ennahar, S., Sashihara, T., Sonomoto, K., and Ayaaki, I. : Class Iia bacteriocins: biosynthesis, structure and activity. *FEMS Microbiol. Rev.* 24:85-106 (2000).
15. Foster, E. M. (1997) Historical overview of key issues in food safety. *Emerging Infection Diseases* 3(4), 481-482.
16. Gao, F. H., T. Abee, and W. N. Konings. 1991. Mechanism of action of the peptide antibiotic nisin in liposome and cytochrome C oxidase-containing proteoliposomes. *Appl. Environ. Microbiol.* 57:2164-2170.
17. Garcera, M. J. G., M. G. L. Elferink, A. J. M. Driessen, and W. N. Konings. 1993. In vitro pore-forming ability of the lantibiotic nisin, role of proton-motive force and lipid composition. *Eur. J. Biochem.* 212:417-422.
18. Gilson, L., Mahanty, H. K., and Kolter, R. > 1990. Genetic analysis of an MDR like export system: the secretion of colicin V. *EMBO J.* 9:3875-3884.
19. Green, G., L. M. T. Dicks, G. Bruggeman, E. J. Vandamme, and M. L. Chikindas. 1997. Pediocin PD-1, a bactericidal antimicrobial peptide from *Pediococcus damnosus* NCFB 1831. *J. Appl. Microbiol.* 83:127-132.
20. Hammes W. P. and Vogel, R. F. (1995) The genus *Lactobacillus*. In *The lactic acid bacteria; vol 2. The genera of lactic acid bacteria* ed. Wood B. J. B. and Holzapfel, W. H. pp. 19-53. Aspen Publisher Inc.
21. Harris, L. J., Saeschel, M. A., Stiles, M. E. and Klaenhammer, T. R. (1989) Antimicrobial activity of lactic acid bacteria against *Listeria monocytogenes*. *Journal Food Protection* 52, 384-387.
22. Hastings, J. W., Sailer, M., Johnson, K., Roy, K. L., Venderas, J. C., and Stiles, M. E. (1991) Characterization of leucocin A-UAL187 and cloning of the bacteriocin gene from *Leuconostoc gelidum*. *J. Bacteriol.* 173:7491-7500.
23. Holck, A., Axelsson, L., Birkeland, S.-E., Aukrust, T., and Blom, H. 1992. Purification and amino acid sequence of sakacin A, a bacteriocin from *Lactobacillus sake* Lb706. *J. Gen. Microbiol.* 138:2715-2720.
24. Jack, R. W., J. R. Tagg, and B. Ray. 1995. Bacteriocins of Gram-positive bacteria. *Microbiological Rev.* 59:171-200.
25. Johnson, K. M., C. L. Nelson, and F. F. Busta. 1982. *Germination and heat resistance of Bacillus cereus spores from strains associated with diarrheal and emetic food-borne illness.* *J. Food Sci.* 47:1268-1271.
26. Kanatani, K., Tahara, T., Yoshida, K., Miura, H., Sakamoto, M. and Oshimura, M. (1992) Plasmid-associated bacteriocin production by and immunity of *Lactobacillus acidophilus* TK8912. *Bioscience Biotechnology Biochemistry* 56, 648-651.
27. Kim, W. J. : Bacteriocins of lactic acid bacteria: Their potentials as food biopreservative. *Food Rev. Intl.* 9:299-313(1993).
28. Klaenhammer, T. R. (1993) *Genetics of bacteriocins produced by lactic acid bacteria.* *FEMS Microbiology Reviews* 12, 39-86.
29. Komitopoulou, E., I. S. Boziaris, E. A. Davis, J. D. Broughton, and M. R. Adams. 1999. Alicyclobacillus acidoterrestris in fruit juices and its control by nisin. *International J Food Sci & Technol.* 34:81-85.
30. Larsen, A. G., and Norrung, B. 1993. Inhibition of *Listeria monocytogenes* by bavaricin A, a bacteriocin produced by *Lactobacillus bavaricus* MI401. *Lett. Appl. Microbiol.* 17:132-134.
31. Leer R. J., van der Vossen, J. M. B. M., van Giezen, M., van Noort, J. M. and Pouwel, P. H. (1995) Genetic analysis of acidocin B, a novel bacteriocin produced by *Lactobacillus acidophilus*. *Microbiology* 141, 1629-1635.
32. Maftah, A., Renault, D., Vignoles, C., Héchar, Y., Bressollier, P., Ratinaud, M. H., Centatiempo, Y., and Julien, R. 1993. Membrane permeabilization of *Listeria monocytogenes* and mitochondria by the bacteriocin mesentericin Y105. *J. Bacteriol.* 175:3232-3235.
33. Marugg, J. D., Gonzalez, C. F., Kunka, B. S., Ledebøer, A. M., Pucci, M. J., Toonen, M. Y., Walker, S. A., Zoetmulder, L. C. M., and Vandenberg, P. A. : Cloning, expression, and nucleotide sequence of genes involved in production of pediocin PA-1, a bacteriocin from *Pediococcus acidilactici* PAC1.0. *Appl. Environ. Microbiol.* 58:2360-2367 (1992).
34. McAuliffe, O., Hill, C. and Ross, R. P. (1999) Inhibition of *Listeria monocytogenes* in cottage cheese manufactured with a lactacin 3147-producing starter culture. *Journal of Applied Microbiology* 86, 251-256.

35. McCormick, J. K., Poon, A., Sailer, M., Gao, Y., Roy, K. L., McMullen, L. M., Venderas, J. C., Stiles, M. E. and Van Belkum, M. J. (1998) Genetic characterization and heterologous expression of Brochocin-C, an antibiotoxic, two-peptide bacteriocin produced by *Brochothrix campestris* ATCC 43754. *Applied and Environmental Microbiology* 64, 4757-4766.
36. McCormick, J. K., R. W. Worobo, and M. E. Stiles. 1996. Expression of the antimicrobial peptide Carnobacteriocin B2 by a signal peptide-dependent general secretory pathway. *Appl. Environ. Microbiol.* 62:4095-4099.
37. Ming, X. and Daeschel, M. A. (1993). Nisin resistance of foodborne bacteria and the specific resistance responses of *Listeria monocytogenes* Scott A. *Journal of Food Protection* 56, 944-948.
38. Montville, T. J., and A. L. Kaiser. 1993. Antimicrobial proteins: classification, nomenclature, diversity, and relationship to bacteriocins, p. 1-22. In D. G. Hoover and L. R. Steenson (ed.), *Bacteriocins of lactic acid bacteria*. Academic Press, New York.
39. Muriana, P. M. (1996) Bacteriocins for control of *Listeria* spp. in food. *Journal of Food Protection*. Supplement, 54-63.
40. Muriana, P. M., and Klaenhammer, T. R. 1991. Purification and partial characterization of lactacin F, a bacteriocin produced by *Lactobacillus acidophilus* 11088. *Appl. Environ. Microbiol.* 57:114-121.
41. Naidu, A. S., Bidlack, W. R. and Clemens, R. A. (1999). Probiotic spectra of lactic acid bacteria. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* 38, 13-126.
42. Nissen-Meyer, J., Holo, H., Hå varstein, L. S., Sletten, K., and Nes, I. F. : A novel lactococcal bacteriocin whose activity depends on the complementary action of two peptides. *J. Bacteriol.* 174:5686-5692 (1992).
43. Nissen-Meyer, J., Laesen, A. G., Sletten, K., Daeschel, M., and Nes, I. F. : Purification and characterization of plantaricin A; a *Lactobacillus plantarum* bacteriocin whose activity depends on the action of two peptides. *J. Gen. Microbiol.* 139:1973-1978 (1993).
44. Oh, S., Kim, S. and Worobo. R. W. : Characterization and purification of a bacteriocin produced by *Lactobacillus acidophilus* 30SC: Human isolate for potential use as a probiotic strains. *J. Dairy Sci.* 83:2747-2752(2000).
45. Parish, M. E., and D. P. Higgins. 1989. Yeast and molds isolated from spoiling citrus products and by-product. *J. Food Prot.* 52:261-263.
46. Paynter, M. J. B., Brown, K. A. and Hayasaka, S. S. (1997) Factors affecting the production of an antimicrobial agent, plantaricin F, by *Lactobacillus plantarum* BF001. *Letters in Applied Microbiology* 24, 159-165.
47. Pilet, M-F., Dousset, X., Barre, R., Novel, G., Desmazeaud, M., and Piard, J-C. : Evidence for two bacteriocins produced by *Carnobacterium piscicola* and *Carnobacterium divergens* isolated from fish and active against *Listeria monocytogenes*. *Appl. Environ. Microbiol.* 58:256-262(1995).
48. Pontius, A. J., J. E. Rushing, and P. M. Foegeding. 1998. Heat resistance of *Alicyclobacillus acidoterrestris* spores as affected by various pH value and organic acids. *J. Food Prot.* 61:41-46.
49. Pot, B., Ludwig, W., Kersters, K., and Schleifer, K.-H. : Taxonomy of lactic acid bacteria. In *Bacteriocins of lactic acid bacteria*. De Vuyst, L., and Vandamme, E. J. (ed) Chapman and Hall, London. P.13-90(1994).
50. Quadri, L. E. N., Sailer, M., Roy, K. L., Vendera, J. C., and Stiles, M. E. : Chemical and genetic characterization of bacteriocins produced by *Carnobacterium piscicola* LV17B. *J. Biol. Chem.* 269:12204-12211(1994).
51. Roncero, M. I. G. 1983. Genes controlling xylan utilization by *Bacillus subtilis*. *J. Bacteriol.* 156:257-263.
52. Schleifer, K. H., and Ludwig, W. : Physiogenetic relationships of lactic acid bacteria. In *The genera of lactic acid bacteria*. Wood, J. B., and Saito, H.(ed) Blackie Academic and Professional, Chapman and Hall, London.(1995).
53. Splittstoesser, D. F., C. Y. Lee, and J. J. Churey. 1998. Control of *Alicyclobacillus* in the juice industry. *Dairy, Food and Environ. Sanitation* 18:585-587.
54. Splittstoesser, D. F., J. J. Churey, and C. Y. Lee. 1994. Growth characteristics of aciduric sporeforming bacteria isolated from fruit juices. *J. Food Prot.* 57:1080-1083.
55. Stock, J. B., Ninfa, A. J., and Stock, A. M. : Protein phosphorylation and regulation of adaptive responses in bacteria.

Microbiol. Rev. 53:450-490(1989).

56. Tahara, T., Yoshioka, S., Utsumi, R. and Kanatani, K. (1996) Isolation, partial characterization and mode of action of acidocin J1132, a two-component bacteriocin produced by *Lactobacillus acidophilus* JCM 1132. *Applied and Environmental Microbiology* 62, 892-897.
57. Tagg, J. R., Dajani, A. S., and Wannamaker, L. W. 1976. Bacteriocins of gram-positive bacteria. *Bacteriol. Rev.* 40:722-756.
58. Tichaczek, P. S., Nissen-Meyer, J., Nes, I. F., Vogel, R. F., and Hammes, W. P. : Characterization of the bacteriocins curvacin A from *Lactobacillus curvatus* LTH1174 and sakacin P from *L. sake* LTH673. *System. Appl. Microbiol.* 15:460-468(1992).
59. van Belkum, M. J., Hayema, B. J., Jeeninga, R. E., Kok, J., and Venema, G. : Organization and nucleotide sequences of two lactococcal bacteriocin operons. *Appl. Environ. Microbiol.* 57:492-498(1991).
60. Venema, K., Abee, T., Haandrinkman, A. J., Leenhouts, K. j., Kok, J., Konings. W. N., Venema, G. : Mode of action of Lactococcin B, a thiol-activated bacteriocin from *Lactococcus lactis*. *Appl. Environ. Microbiol.* 59:1041-1048(1993).
61. Worobo, R. W., van Belkum, M. J., Sailer, M., Roy, K. L., Venderas, J. C. and Stiles, M. E. (1995). A signal peptide secretion-dependent bacteriocin from *Carnobacterium divergens*. *Journal of Bacteriology* 177, 3143-3149.
62. Yamazaki, K., H. Teduka, and H. Shinano. 1992. Isolation and identification of *Alicyclobacillus acidoterrestris* from acidic beverage. *Biosci. Biotech. Biochem.* 60:543-545.
63. Zamfir, M., Callewaert, R., Cornea, P. C., Savu, L., Vatafu, I. and De Vuyst, L. (1999) Purification and characterization of a bacteriocin produced by *Lactobacillus acidophilus* IBB 801. *Journal of Applied Microbiology* 87, 923-931.