

乳酸菌의 抗生作用에 關한 研究

金 東 伸

慶北大學校 農科大學 酪農學科

Studies on Antibacterial Activity of Lactics

Kim, Dong Shin

Dept. of Dairy Science, Coll. of Agric., Kyungpook Natl. Univ.

Summary

1. At selected time intervals, viable cell plate counts were run. After the 12 hours incubation the number of viable cells was maximum.
2. The morphology of *L. acidophilus* in tomato juice was thicker rods than those of in milk media.
3. In the assay of antimicrobial activity;
 - ① The antimicrobial activity of acidophilus tomato juice showed bigger inhibitory zone than acidophilus milk in the well-cup assay technique.
 - ② The inhibitory zone against *Shigella dysenteriae* was the biggest among the other pathogenic organisms in the disc assay.
4. The antimicrobial activity of sephadex G-50 gel filtration chromatography showed in the 5th fraction.
5. The spectra of ultraviolet absorption exhibited around maximum peak at 270nm.

緒 論

Elie Metchnikoff²¹⁾가 Balkan 사람들이 醃 酵乳를 많이 마시기 때문에 장수한다는 그의 학설은 최초로 醃 酵乳의 抗生의 效果를 시사 하였던 것이다. Oxford²²⁾는 *S. cremoris* 와 유사한 균주의 칼처에서 항생물질을 추출하여 Diplococcin이라고 명명하였다. Mattick 등^{18,19,20)}은 *S. lactis*의 칼처로부터 항생물질을 농축하였으며 그것을 Nisin 이라고 하였다. Nisin의 분말정제는 수개월동안 안정성을 지

속하며 1ℓ의 *S. lactis*칼처로부터 16~20mg의 Nisin을 얻을수 있었다. 이것은 광범위한 항생효과를 지녔다. Mather등¹⁷⁾은 *Streptococcus citrovorus*의 칼처를 cottage cheese에 사용하여 부패균의 억제를 시도 하였으며 Pinherio등^{23,24)}은 *Leuconostoc cremoris*칼처로부터 항생물질을 추출하여 121℃에서 15분간 열처리하여도 영향을 받지 않았음을 보고 하였다. 1972년 Daly등^{8,9)}은 *Str. diacetylac-tis*등에 의하여 여러미생물의 억제에 대한 기전을 발표하였다. Kavasnikov등¹⁵⁾은 *Lactobacillus brevis*로부터 항생물질 Lac-

tobacillin을 추출하였다. Branen등¹¹⁾은 *Leuconostoc citrovorum*과 *Streptococcus diacetylactis*로부터 저분자 항생물질을 정제하였다. Hamdan등¹²⁾은 *Lactobacillus acidophilus*로부터 항생물질 Acidolin을 추출하였다. 이 Acidolin은 121°C에서 15분간 열처리 하여도 항생력에 영향이 없으며 4°C에서 30일간 저장하여도 어떤 항생력이 감소하지 아니하였다. 그리고 항생효과 분석에 *Salmonella*, *E. Coli*등에 좋은 항생효과를 보였다. Shahani등^{13,14)}은 *Lactobacillus acidophilus*로부터 항생물질 Acidophilin을 정제하였다.

지금까지 유산균으로 부터 얻어지는 모든 항생물질들은 모두 우유배지로부터 추출된 것이다.

본 연구는 발효 Tomato Juice로부터 항생물질을 추출하고 각종 부패균과 병원균에 대한 항생효과의 분석을 하므로써 계속될 식품항생물질의 구조 및 다량생산의 연구에 한 기초적 자료를 제공하고자 한다.

材料 및 方法

칼처 및 培養條件 (cultures and cultural conditions) *Lactobacillus acidophilus*는 미국위스칸주 Great Lakes Biochemical 회사에서 구입되었다. 칼처는 300ml의 탈지유(全固形分: 11%)를 Autoclave에 넣고 Lyophilized culture를 넣어서 잘 섞은 다음 37°C에서 12~16시간 培養시켰다. 다음 滅菌乳 100ml에 1%씩의 칼처를 넣어 반복 3회 하여서 Tomato Juice에 넣을것을 냉장(5°C)에 보관하여 사용하였다.

成長 및 形態

*Lactobacillus acidophilus*는 우유의 진고형 성분 11%가 되도록 造製한 스킵밀크를 121°C에서 15분간 滅菌처리하여 38°C로 冷却시킨 것에 3%의 칼처를 접종하여 37°C에서 培養하였다. 배양후 選擇된 시간마다 培養샘플을 따내어 Plate count로 生菌數를 測定하였다.

이것을 위하여 Tomato Juice Agar(Difco)가 사용되었으며 Plate는 37°C에서 48시간 배양한 후 集落을 조사하여 成長速度를 보았다.

이 과정에서 成長한 菌을 染色하여 ×1000 현미경으로 관찰하였다.

Tomato Juice (토마토주스)

토마토주스를 배지로 사용하기 위하여 6월중에 生産된 색깔이 빨간 完熟된 토마토를 市場에서 購入하였다.

애시도필러스 토마토주스(*Acidophilus Tomato Juice*)는 토마토를 끓는물에 1~2分間 열처리한 후 그 外皮를 벗겨 버리고 믹샤에 넣어 3분간 회전시켜 토마토 주스-스를 만든다. 1000ml의 토마토 주스-스는 95°C에서 30분간 열처리하여 38°C로 냉각시켜 *Acidophilus* 칼처 1%를 접종 받았다. 接種된 토마토 주스-스는 37°C에서 48시간 培養되었다.

이렇게 醱酵된 토마토주스-스를 *Acidophilus* 토마토 주스-스라고 한다. 이 *Acidophilus* 토마토 주스-스가 계속 연구하는데 사용될 샘플인 것이다.

成長抑制 分析 (Assay of Growth Inhibition)

*Acidophilus Tomato Juice*가 試驗菌 *Bacillus subtilis*에 미치는 抑制效果를 보기 위하여 Sabin¹⁵⁾의 方法을 따랐다. 10ml의 액상 Nutrient Agar를 菌乾燥된 Petri dish에 붓고 固形化시킨다. 다른 또 하나의 액상 Nutrient Agar는 45°C의 온도로 맞추고 1%의 *Bacillus subtilis*칼처(液狀)을 넣어 섞은 것으로서 固形化된 Agar위에 4~6 ml의 양을 부어서 二重層이 되도록 한다. 직경이 10 mm되는 멸균 처리된 시험관의 입을 二重층으로 固形化된 Agar表面을 눌러 밀바닥유리까지 닿게 한 다음 잘려진 Agar부분을 멸균된 Loop로 들어내어 샘(Well) 또는 컵(Cup) 모양을 만든다. *Bacillus*가 混合되지 아니한 Nutrient Agar를 샘(Well)에 두방울 떨어뜨린 다음 응고케 하므로써 밀바닥이 Agar로

된 샘플이 되는 것이다. 이 샘플에 Acidophilus Tomato Juice, 非酸酵토마토 주스, 그리고 Acidophilus Culture(우유배지)를 채워서 이들의 항생효과를 보기 위하여 4℃의 온도에 2시간 방치한 후 20~22℃의 培養器에 넣어 14~16시간 배양후 Bacillus subtilis가 자라지 못한 抗生帶를 측정하였다.

抗生効果의 分析(Assay for Antimicrobial Activity)

Methanol-Acetone 抽出物(M-A extract)을 Sephadex G-50를 걸러서 정제되었으며 이것을 M-A 抽出物이라고 한다. M-A 抽出物은 Pseudomonas fluorescens, Proteus vulgaris, Escherichia Coli, Shigella dysenteriae 그리고 Bacillus subtilis 등의 試驗菌들을 利用하여 抗生効果를 分析하였다. Bacillus subtilis 칼처를 만들기 위하여 Streptomycin Assay Broth를 121℃에서 15분간 멸균 처리하여 22℃로 냉각시키고 Bacillus subtilis를 接種시킨 다음 22℃에서 18~24시간 培養시켜 만들었다. 이 칼처의 1%를 45~47℃의 Nutrient Agar에 넣어 잘 혼합시키고 이것의 8ml를 멸균된 Petri dish에 넣어 固形化 시켰다. 5mm 직경의 여과지 디스크를 M-A 抽出物에 적시어 固形化된 Agar 위에 놓는다. 그후 5℃의 냉장고에 디스크가 놓여진 petri dish를 넣어 2시간동안 방치하여 M-A 抽出物이 Agar에 충분히 스며들도록 한다. 이 petri dish는 22℃의 온도에서 16~18시간 배양시킨다. 培養后 디스크 주위에 생긴 抗生帶(Inhibition Zone)를 측정했다.

B. subtilis의 병원성균들은 Nutrient Agar 위에 Loop로 접종되고 32℃에 배양하여 똑같은 방법으로 抗生효과를 分析하였다.

抗生物質의 抽出(Extraction of Antimicrobial Compound)

1000ml의 滅菌된 토마토 주스에 1%의 Acidophilus 칼처를 넣어 37℃에서 48시간 배양된 Acidophilus 토마토 주스-샘(Well) 방법으로 抗生효과를 分析하여 우유 배지의 Acidophilus Culture의 抗生효과와 比較하였

다. 샘플(Well) 분석으로 좋은 抗生효과를 나타낸 Acidophilus Tomato Juice를 抗生物質 抽出用으로 選擇하였다. 이 선택된 Acidophilus 토마토 주스-샘은 Shahani 등³³⁾과 Hamdan 등¹²⁾이 記述한 方法을 使用하여 抗生物質을 抽出하였다. 그림 VI에서 도시한 것처럼 Acidophilus Tomato Juice는 凍結乾燥를 받는다. 이 過程에서 얻어진 모든 粉末은 5℃에 冷却된 1000ml의 Methanol에 넣어져 잘 散布되도록 휘저어서 1시간동안 방치한다. 이것은 固形物質을 제거하기 위하여 16,300R. C. F에서 원심분리되었다. 그 上層物은 收集되어 계속 연구용으로 남겨 두며 沈澱物은 두번 더 같은 方法으로 抽出하여 上層物을 한테 모아 3,000ml의 上層物을 얻고 沈澱物을 버린다. 3,000ml의 Methanol 抽出物은 黃褐色의 더이상 증발되지 않은 점도성 물질이 될 때까지 40~50℃의 眞空 상태에서 濃縮된다. 이 黃褐色의 Methanol 濃縮物을 Methanol 抽出物(M-extract)라고 한다. 이 Methanol 抽出物은 100ml의 증류수에 溶解되고 다시 5℃로 冷却된 1,000ml의 Acetone에 휘석되어 30分間 휘젓는다. 沈澱된 固形成分을 分離하기 위하여 36,000R. C. F에서 15분간 遠心分離하였다. 上層物은 계속 연구 샘플로 수집하고 沈澱物은 두번 더 같은 方法으로 Acetone 抽出을 하여 3,000ml의 上層物을 얻고 固形殘有物을 버린다. 이 상층물을 Methanol-Acetone 抽出物(M-A extract)이라고 부르며 3,000ml의 M-A 抽出物은 다시 40~50℃의 眞空狀態에서 증발되었다. 濃縮된 M-A 抽出物은 역시 黃褐色의 粘度性 있는 物質로서 더이상 증발되지 않은 것이다. 이렇게 된 M-A 추출물에 증류수를 첨가하여 100ml 양이 되도록 한다. 이 100ml의 M-A 추출물중에서 10ml를 32cm×2.5cm의 Sephadex G-50의 칼럼위에 붓는다. Sephadex column은 0.1M NaCl - 0.02N HCl (pH 2.5)의 용액에 12g의 乾燥 Gel을 산포하여 만들고 Chromatography를 할때 0.1M NaCl - 0.02N HCl 용액을 使用하여 한 分溜당 50ml로 하

여 15分溜를 얻었다. 이들 15分溜를 각 50℃의 眞空狀態에서 증발시켜 4~5 ml로 농축한다. 이 濃縮된 모든 分溜는 *Bacillus subtilis*의 試驗菌에 依하여 抗生分析을 받았다.

分溜 4, 5 그리고 6에서 抗生 效果를 보였으며 이것을 모두 합하여 各種 病原菌들의 抗生效果를 分析하였다. 그리고 分溜 6은 다음 研究에서 HVE나 TLC등으로 더 精製할 것을 기대한다. 紫外線 스펙트럼은 Shimazu double beam, Spectrophotometer UV-200으로 측정하였다.

흡광도 275mm에서 Sephadex G-50column Chromatography를 11ml씩 分溜하여 UV 흡광도와 分溜의 抗生效果를 調査하였다.

結果 및 考察

L. acidophilus의 成長 및 形態

L. acidophilus를 牛乳培地에서 37℃의 온도로 培養시킨 結果 그림 I 과 같은 成長 커브를 보였다.

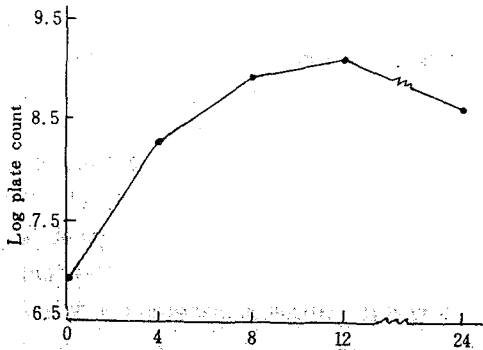


Fig. I. Growth curve for *L. acidophilus* at 37°C in milk.

接種後 12時間에 가장 많은 生菌數를 나타낸 것은 Hamdan등¹²⁾이 發表한 것과 매우 유사한 수치를 나타내었다. 이 菌株의 形態는 그림 II에서 보여주는 것처럼 토마토 주스 배지에서는 약간 굵은 形態를 보였다. 培地の 相異함에 따라 乳酸菌의 顯微鏡의 形態가 다르게 나타났다.

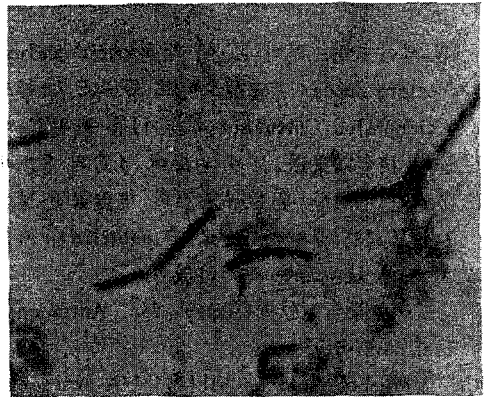
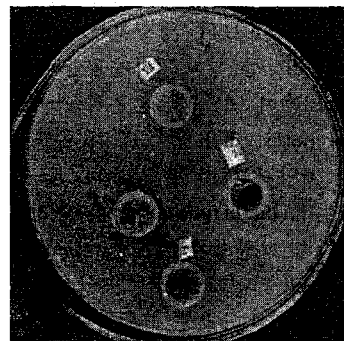


Fig. II. Morphology of *L. acidophilus* in Tomato Juice at 37°C

成長抑制 分析

Acidophilus Tomato Juice가 *Bacillus subtilis*에 대한 抑制 效果는 그림 III에서 보여준 것처럼 Acidophilus Milk Culture와 Acidophilus Tomato Juice Culture가 共に 抗生帶를 보이고 있지만 Acidophilus Tomato Juice가 훨씬 더 강한 抗生帶를 보여주고 있다. 이것은 매우 중요한 의미를 갖고 있다. 그 이유는 많은 研究者들이 오직 牛乳를 培地로 하여 만든 칼처를 材料로 하여 抗生物質을 抽出하여 그 抗生效果를 보았기 때문이다.^{1,2,3,4,5,8,9,10,13,14,27,28,33)}



Tf: 발효 토마토주스
M: 발효우유
T: 비발효 토마토주스

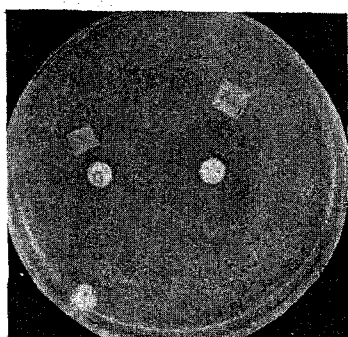
Fig. III. Antimicrobial activity of nonfermented tomato juice, fermented tomato juice and fermented milk with *L. acidophilus*

抗生效果의 分析

Acidophilus Tomato Juice를 그림 IV 처럼 M-A 抽出하여 Sephadex G-50의 Gel로 여과시켜 얻은 M-A 추출물의 抗生效果는 표 I 과

Table 1. Antimicrobial activity of methanol-acetone extract from acidophilus tomato juice

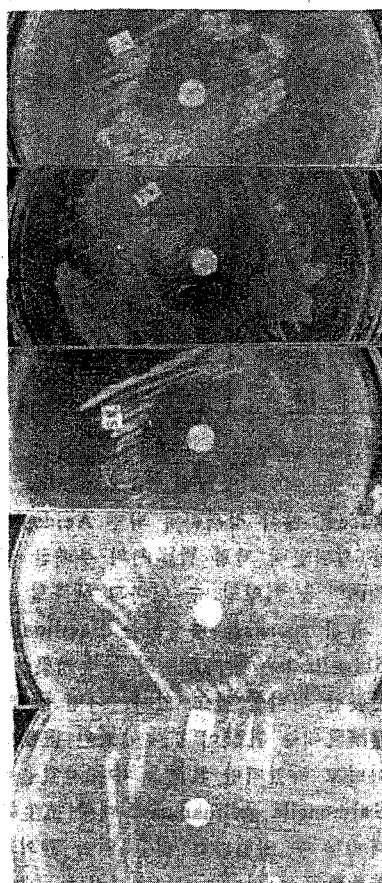
No. Test organism	Strain	Diameter of zone of inhibition(mm)
1. <i>Bacillus subtilis</i>	ATCC	30
2. <i>Pseudomonas fluorescens</i>	KFCC	30
3. <i>Proteus vulgaris</i>	CU	32
4. <i>Shigella dysenteriae</i>	CU	35
5. <i>Escherichia Coli</i>	ATCC	26
6. <i>Staphylococcus aureus</i>	ATCC	30



MA: 메타놀
아세톤추출물
M: 메타놀
추출물

Fig. IV. Assay for Antimicrobial activity against *Bacillus subtilis*

그림 IV와 V에서 보여주고 있다. 표 1에서 보는 바와 같이 설사병을 일으키는 병원균 *Shigella dysenteriae*가 35mm의 抗生帶를 形成하여 가장 강한 抗生帶를 나타내 보이고 *Bacillus subtilis*, *Pseudomonas fluorescens* 그리고 *Staphylococcus aureus* 등은 똑같이 抗生帶의 直徑이 30mm이며 *Proteus vulgaris* 는 32cm 그리고 *E. Coli* 은 가장 작은 26mm의 抗生帶를 나타내었다. 이 結果는 Pulusani²⁶⁾ 등이 *Streptococcus thermophilus*로부터 생산된 抗生劑의 抗生效果와 매우 비슷하며 Branen^등⁵⁾ 이 *Streptococcus diacetylactis* 와 *Leuconostoc citrovorum* 에 의하여 生産된 抗生劑의 것 과도 비슷한 結果를 보였으며 Hamdan^등 이 *Lactobacillus acidophilus* 로부터 抽出한 抗生劑의 效果와 매우 비슷한 結果를 보이며 Shahani ^등^{31, 32)} 이 발표한 것 과도 비슷한 抗生效果를 나타내 보이고 있다.



Es: *Escherichia coli*
Ps: *Pseudomonas*
St: *Staphylococcus*
Pr: *Proteus*

Fig. V. Assay for antimicrobial activity against *Pseudomonas*, *proteus*, *Shigella*, *E. coli*, and *Staphylococcus*.

Table 2. Sephadex G-50 gel column chromatography of M-A extract at 275nm.

Fraction	activity	U.V.(275nm)	Fraction	activity	U.V.(275nm)
1	-	0.025	20	-	1.805
2	-	0.024	21	-	0.797
3	-	0.026	22	-	0.624
4	-	0.025	23	-	0.610
5	-	0.029	24	-	0.482
6	-	0.031	25	-	0.301
7	-	0.045	26	-	0.290
8	-	0.087	27	-	0.248
9	-	0.283	28	-	0.180
10	-	0.555	29	-	0.132
11	-	2.772	30	-	0.101
12	++	2.773	31	-	0.077
13	++	2.772	32	-	0.064
14	+++	2.772	33	-	0.065
15	+	2.772	34	-	0.062
16	-	2.773	35	-	0.058
17	-	2.773	36	-	0.055
18	-	2.773	37	-	0.058
19	-	2.772	38	-	0.053

그러므로 발효된 *Acidophilus* Tomato Juice를 많이 섭취하게 되면 *Acidophilus* milk를 섭취할때처럼 胃腸内の 부패균 및 病原性菌²⁴⁾을 억압할 수 있다고 예측할 수 있다.

특히 spores를 형성하는 *Bacillus*菌과 *Shigella*같은 腸内細菌의 抗生効果는 매우 중요한 의미를 갖고 있다. 어떤 研究者들은 醱酵乳에는 乳酸이 抗生効果의 重要한 物質이라고 하였지만 乳酸을 中和시켰을때도 *Salmonella gallinarum*에 대한 抗生効果를 배제할 수 없었다는 것은 역시 酸외에 다른 抗生物質이 있다는 점을 시사해 주는 것이다.¹⁰⁾

Daly등⁹⁾은 *S. aureus*의 培地에 乳酸과 초산을 *S. diacetylactis*가 生産한 정도만큼 넣어도 抗生効果는 유산균 발효칼쳐의 항생효과보다 낮은 정도를 보인것은 역시 有機酸外 다른 어떤 抗生効果를 지닌 物質이 있음을 확신케 하였던 것이다. Methanol Acetone 抽

출은 *L. acidophilus*에 의하여 生産되는 抗生物質을 精製하는데 이용되는 좋은 방법이었다.¹⁰⁾ M-A 抽出物은 Gel 칼럼을 통하여 한층 더 정제되었다. 그림 V에서 보여 주는것처럼 Sephadex G-50의 5번 分溜가 좋은 抗生帶를 보이고 있다. 이 抗生帶를 *Acidophilus* Tomato Juice의 抗生帶와 比較해 보면 30배 더 강한 効果를 나타내고 있다. 과산화수소 (H_2O_2) 역시 抗生効果를 나타내는 것으로 알려져 있으나^{7,25)} 본 실험과정중 진공상태에서의 증발은 모든 휘발성 物質을 排除할수 있기 때문에 과산화수소 (H_2O_2)의 抗生効果는 기대할 수 없다. M-A 抽出物을 UV spectrophotometer 로 조사한 결과 그림 VI에서 보는 바와 같이 240~300nm에서 흡광도가 크게 나타나므로 275nm에서 Gel chromatography로 11ml씩 分溜한 결과 分溜 12~15에서 抗生効果를 보였다(표 2)

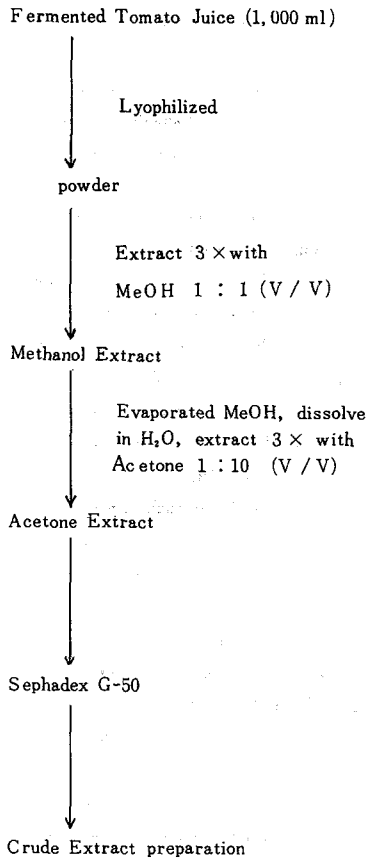


Fig. VI. Flow diagram of the procedure for the preparation of the crude extract

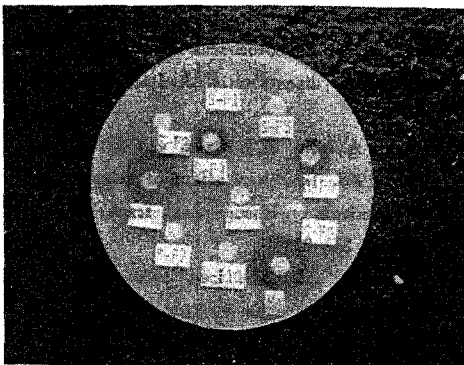


Fig. VII. Antimicrobial activity of M-A extract and sephadex fraction

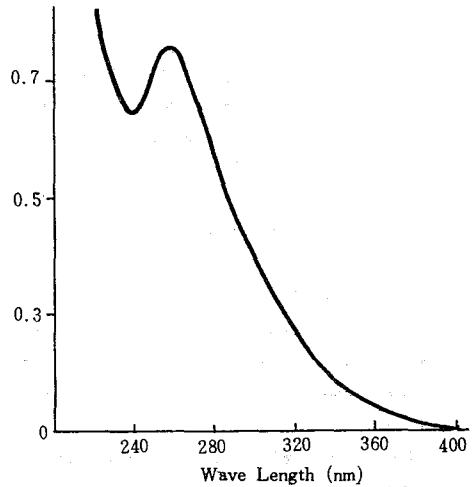


Fig. VIII. Ultra violet absorption for M-A extract

摘 要

1. *L. acidophilus*의 成長을 본 결과 접종후 12시간에 가장 높은 生菌數를 測定하였다.
2. 牛乳培地에서 成長한 *L. acidophilus*와 Tomato Juice 의 것과 비교할때 Tomato Juice에서 成長한 菌이 弱게 보였다.
3. 抗生效果의 分析은
 - ① Well 方法에서 *Acidophilus* Tomato Juice가 *Acidophilus* milk 보다 더 強한 抗生帶를 보였다.
 - ② 디스크 方法에서 *Shigella dysenteriae* 病原菌에 대하여 가장 強한 抗生帶를 보였으며 그의 다른 病原性에 대하여서도 모두 抗生作用을 보였다.
4. Sephadex G-50 Gel 여과 크로마토그래피의 제 5 번째 分溜가 抗生效果를 가장 크게 나타냈다.
5. UV 흡광 스펙트라에서 약 270nm에서 최고 피크를 보였다.

引 用 文 獻

1. Baribo, L. E., and E. M. Foster. 1951. Some characteristics of the growth inhibitor produc-

- ed by a lactic Streptococcus. *J. Dairy sci.* 34; 1128.
2. Baribo, L.E., and E. E. M. Foster. 1951. The production of a growth inhibitor by lactic Streptococci. *J. Dairy sci.* 34; 1136.
 3. Berridge, N.J. 1947. Further purification of nisin. *Lancet* 253: 7
 4. Berridge, N.J. 1949. Preparation of the antibiotic nisin. *Biochem. J.* 45; 486.
 5. Branen, A.L., H.C. Go, and R.P. Genske. 1975. Purification and properties of antimicrobial substances produced by *Streptococcus diacetylactis* and *Leuconostoc citrovorum*. *J. Food sci* 40;446.
 6. Collins, E.B. 1961. Domination among strains of Lactic Streptococci with attention to antibiotic production. *Appl. Microbiol.* 19; 200.
 7. Dahiya, R.S. and H.L. Speck. 1968. Hydrogen Peroxide formation by Lactobacilli and its effect on *Staphylococcus aureus*. *J. Dairy sci.*, 51; 1568.
 8. Daly, C., W.E. Sandine, and P.R. Elliker. 1970. Associative growth and inhibitory properties of *Streptococcus diacetylactis*. *J. Dairy sci.* 53; 637.
 9. Daly, C., W.E. Sandine, and P.R. Elliker. 1972. Interactions of food starter cultures and food-borne Pathogens; *Streptococcus diacetylactis* versus food Pathogens. *J. Milk Food Technol.* 35: 349.
 10. Genske, R.P., and L.A. Branen. 1973. Properties of antimicrobial substances with *Streptococcus diacetylactis*; and *L. citrovorum*. *Modern Dairy* 52 (7/8): 12
 11. Gilliland, S.E., and M.L. Speck. 1972. Interaction of food starter cultures and food borne pathogens; Lactic streptococci versus staphylococci and salmonellae. *J. Milk Food Tech.*, 35; 307
 12. Hamdan, I.Y. and E. M. Mikolajcik. 1975. *Lactobacillus acidophilus*. 1: Growth characteristics and Metabolic Products. *Cul. Dairy prod. J.*
 13. Hirsch, A. 1951. Growth and nisin production of a strain of *Streptococcus lactis*. *J. Gen. Microbiol.* 5; 208
 14. Juffs, H.S., and F.J. Babel. 1975. Inhibition of psychrotrophic bacteria by lactic cultures in milk stored at low temperature. *J. Dairy sci.* 58; 1612.
 15. Kavasnikov, E.I. and V. I. Sudenko. 1967. Antibiotic properties of *Lactobacillus brevis*. *Microbiol. Zh, Kyyiv.* 29(2): 146 [Cited Dairy sci. Abstr. 29; 3972(1967)]
 16. Kodama, R. 1952. Studies on lactic acid bacteria. II. Lactolin, new antibiotic substance produced by lactic acid bacteria. *J. Antibiotic substance produced by lactic acid bacteria*
 17. Mather, D.W., and F.J. Babel. 1959. Inhibition of certain types of bacterial spoilage in creamed cottage cheese by the use of a creaming mixture prepared with *Streptococcus citrovorus*. *J. Dairy sci.* 42; 1917
 18. Mattick, A.T.R., and A. Hirsch. 1944. A powerful inhibitory substance produced by group N streptococci. *Nature (London)* 154: 551
 19. Mattick, A.T.R. and A. Hirsch, 1947. Further observations on an inhibitory substance (nisin) from lactic streptococci. *Lancet* 253: 5
 20. Mattick, A.T.R. and A. Hirsch, 1949. The streptococci and antibiotics. *Intern. Dairy Congr.* 2; 546
 21. Metchnikoff, E. 1908. Prolongation of life. Published by G.P. Putnam's sons. New York.
 22. Oxford, A.E. 1944. Diplococcin an antibacterial protein elaborated by certain milk streptococci. *Biochem. J.* 38; 178.
 23. Pinherio, J. J. R. and C.E. Parmelee. 1968. Properties of substances inhibitory to *Pseudomonas fragi* by *Streptococcus Citrovorus* and *Streptococcus diacetylactis*. *J. Dairy sci.* 51; 183.
 24. Pinherio, A.J.R., B.J. Liska, and C. E. Parmelee, 1968. Inhibitory effect of selected organic chemicals on *Pseudomonas fragi*. *J. Dairy sci.* 51; 223
 25. Price, R.J., and J. S. Lee. 1970. Inhibition of pseudomonas species by hydrogen peroxide producing lactobacilli. *J. Milk Food Technol.*, 33; 13
 26. Pulusani, S.R., D.R. Rao, and G.R. Sunki. 1979. Antimicrobial activity of Lactic cultures;

- Partial purification and characterization of antimicrobial compounds produced by *Streptococcus thermophilus*. *J. Food sci.* 44; 575.
27. Radich, R., W.E. Sandine, and P.R. Elliker. 1969. Inhibition of *Staphylococcus aureus* by *Streptococcus diacetylactis* in milk and cream filling. *J. Dairy Sci.* 52; 880.
 28. Rogers, L.A. 1928. The inhibition effect of *Streptococcus lactis* on *Lactobacillus bulgaricus*. *J. Bacteriol.* 16; 321.
 29. Sabine, D.B. 1963. An antibiotic-like effect of *Lactobacillus acidophilus*. *Nature*, 199; 811.
 30. Shahani, K.M., Vakil, J.F. and A. Kilara. 1976. Natural antibiotic activity of *Lactobacillus acidophilus* and *bulgaricus*. *Cult. Dairy Prod. J.* 11; 14.
 31. Shahani, K.M., J.F. Vakil, and A. Kilara. 1977. Natural Antibiotic activity of *Lactobacillus acidophilus* and *bulgaricus* 2. Isolation of Acidophilin from *L. acidophilus*. *Cult. Dairy prod. J.* 12 8
 32. Shahani, K.M., J.F. Vakil, and R.C. Chandan. 1972. Antibiotic acidophilin and process of preparing the same. U.S. Patent Number 3,689,640. 1972.
 33. Scott, V.N., and S.L. Taylor. 1981. Effect of nisin on the out growth of *Clostridium botulinum* spores. *J. Food sci.* 46; 117
 34. Sorrells, K.M., and M.L. Speck. 1970. Inhibition of *Salmonella gallinarum* by culture filtrates of *Leuconostoc citrovorum*. *J. Dairy sci.*, 53; 239.
 35. Vincent, J.G., R.C. Veomett and R. F. Riley. 1959. Antibacterial activity associated with *Lactobacillus acidophilus*. *J. Bact.* 78; 477.
 36. Wheeler, D.M., A. Hirsch, and A.T.R. Mattick. 1952. Possible identity of lactobacillin with hydrogen peroxide Produced by *Lactobacilli*. *Nature*, 170; 623.