

Bacteriocin을 생산하는 *Lactococcus* sp. HY 449의 분리와 항균특성

김상교* · 이상준 · 백영진 · 박연희¹

한국야쿠르트연구소, ¹아주대학교 공과대학 생물공학과

Isolation of Bacteriocin-Producing *Lactococcus* sp. HY 449 and Its Antimicrobial Characteristics

Kim, Sang-Kyo*, Sang-Jun Lee, Young-Jin Baek and Yun-Hee Park¹

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

¹Department of Biotechnology A-Jou University, Suwon, 441-749, Korea

Abstract — A bacteriocin-producing lactic acid bacteria was isolated from contaminated milk products, which was identified by using the API 50 CH kit as *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* with reliability of 98%. Fatty acid analysis of the cell membrane showed that this strain contained same fatty acids profiles as type strain, *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* ATCC 19435. The bacteriocin of *Lactococcus* sp. HY 449 showed relatively wide range of inhibition spectrum against gram positive and some gram negative bacteria such as *Escherichia coli* and maintained the inhibitory activity between pH 2.0 and pH 9.0. The thermostability of this bacteriocin was higher in acidic solution than in distilled water and was stable at 60°C for 1 hour.

유산균은 대표적인 저장식품인 요구르트, 버터, 치즈 같은 유제품 및 김치등의 발효과정에서 식품의 맛을 개선하는 풍미(flavor)를 부여함과 동시에 식품의 부패를 방지하고 항균물질을 생성하여 유해세균을 억제하므로써 식품의 저장성 및 안전성을 갖게 한다. 지금까지 밝혀진 항균성 물질중에는 젖산, 과산화수소, diacetyl, bacteriocin등이 있으며 bacteriocin은 여러가지 특성에서 일반 항생물질과는 구분이 되는 것으로 그 대부분이 저 분자량의 단백질로 구성되어 있으며 유사한 종에만 작용을 한다고 알려져 있다. 유제품 및 기타 발효식품에 이용되고 있는 유산균의 여러 종류가 각종의 bacteriocin을 생산하는 것으로 알려져 있다. 예를 들면 *Lactobacillus* spp.가 생산하는 bacteriocin 중에는 Upreti 등(1)이 *L. helveticus* LP27에서 분리해 명명한 lactocin 27은 단백질과 당지질이 결합된 복합체로 SDS 존재하에서 해리되어 작은 당 단백질의 부분(molecular weight 12,400)에서 항균활성을 확인하였고 *L. acidophilus*와 *L. helveticus*에 대해서만 항균활성을 나타냈다. 그 외에도 *L. acidophilus*에 의해 생산되는 lactacin B(2)와 *L. casei* B80이 생산하는 caseicin 80(3) 및 *L. sake* L45(4)가 생산하는

lactosin S등이 있다.

1951년 Hirsh 등(5)이 *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*가 생산하는 항균물질 'Nisin'을 발견해 상업화에 성공하면서 *Lactococcus* spp.가 생산하는 bacteriocin인 nisin, diplococcin, lactococcin에 대해 많은 연구가 이루어져 왔다. 그 중에서도 가장 잘 알려진 nisin은 아미노산 34개로 구성된 폴리펩타이드로 섭취되었을 때 인체내의 효소에 의해 분해되어 독성이 없으므로 식품보존제로 그 적용이 확대되어 왔고 영국, 미국, 프랑스, 이탈리아등 여러 나라에서 식품에 첨가를 허용하고 있다.

Diplococcin(6)은 Whitehead에 의해 우유 유래의 streptococci가 치즈 생산용 스타터의 활력을 억제함이 처음 보고되었고 1944년 Oxford가 *St. cremoris*에서 diplococcin을 분리하고 그 특징에 대해 보고했다. 그밖에 *Lc. lactis* subsp. *cremoris* LMG2130이 생산하는 lactococcin A(7)가 알려져 있다.

Leucocin(8), mesenterocin(19), leuconocin(20)은 *Leuconostoc* spp.가 생산하는 bacteriocin으로 이들 중 *Leu. paramesenteroides*로부터 분리된 leuconocin S(8)는 bacteriostatic action을 보이며 amylase에 의해 활성이 억제된다고 보고되었다. Sausage의 발효에 중요한 역할을 하는 *Pediococcus* 균주에서도 단백질성 항균물질이 발견되었는데 *P. acidilactici* PAC1이 생

Key words: *Lactococcus* sp., bacteriocin, identification, inhibition spectrum

*Corresponding author

산하는 pediocin PA-1(9)이 대표적인 예다.

본 연구에서는 bacteriocin 생산균주를 선발해 균주의 생화학적 특성 및 항균 spectrum을 조사했고 생산된 bacteriocin의 특성을 살펴 보았다.

재료 및 방법

균주

실험에 사용된 bacteriocin 생산 균주는 유제품에서 분리하여 동정한 *Lactococcus* sp. HY449이며 항균 활성 측정용 균주는 *Lactobacillus fermentum* IFO 3023이었고, 항균 spectrum 측정용 균주는 Table 1에 나타냈다.

항균 spectrum의 측정

Lactococcus sp. HY 449 균주를 M17G broth에서 하루밤 배양한 후 4°C, 10,000×g로 원심분리(Dupont, Sorvall RC 28S, GSA rotor)하여 상등액을 얻는다. MRS hard agar를 미리 부어 굳힌 배양접시에 억제 여부 시험균을 1% 접종한 MRS soft agar 2 ml을 부어 표면을 미리 건조시킨 다음 위의 상등액을 5 μl 점적하여 하루밤 배양한 후 억제환 생성 여부로 판정하였다.

당 발효성 시험

API 50 CHL kit를 사용해 49개 당 이용성을 조사,

비교함으로써 균주를 동정했다.

지방산 조성의 GC 분석

Sasser(10)의 방법을 변형한 것으로 scraper를 이용해 agar plate에서 균락을 긁어 0.5 N NaOH/Methanol 8 ml에 현탁시킨 후 5분간 끓여서 saponification을 했다. 여기에 14% BF₃/methanol(Sigma) 9 ml를 넣어 3분간 끓여 methylation을 한 다음 hexane 3 ml를 넣어 2분간 끓여 추출했고 상온까지 냉각했다. 포화 NaCl 용액을 검화 flask에 가득 넣은 후 hexane층을 분리하여 GC 분석을 했다. 이 때 GC 조건은 다음과 같다.

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

항균활성의 측정 : Toba 등(11)의 방법을 변형하여 사용하였다. 즉 96 well micro-dilution plate를 사용하여 2배씩 희석한 bacteriocin 시료액 100 μl에 growth indicator 균을 약 10⁷ 농도로 접종한 MRS broth 200 μl를 넣어 37°C에서 6시간 배양한 후 ELISA rea-

Table 1. Test strains and conditions for determination of antimicrobial activity

Test organism	temp(°C)	growth medium
<i>Lactobacillus casei</i>	37	MRS agar ¹
<i>Lactobacillus casei</i> ATCC 4646	37	MRS agar
<i>Lactobacillus fermentum</i> IFO3023	37	MRS agar
<i>Lactobacillus helveticus</i> IAM 1042	37	MRS agar
<i>Lactobacillus delbrueckii</i> IFO 3202	37	MRS agar
<i>Lactobacillus brevis</i> IFO 3029	37	MRS agar
<i>Lactobacillus jugurti</i> IFO 3048	37	MRS agar
<i>Leuconostoc mesenteroides</i> KFCC 11324	30	MRS agar
<i>Bacillus substilis</i> ATCC 6633	30	TSA ²
<i>Escherichia coli</i> A2	37	TSA
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	30	TSA
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	30	TSA
<i>Staphylococcus aureus</i>	37	TSA
<i>Staphylococcus epidermidis</i> KFCC 35494	37	TSA
<i>Salmonella typhimurium</i> ATCC 14028	37	TSA
<i>Listeria monocytogenes</i> ATCC 15313	37	TSA
<i>Hansenula anomala</i>	30	Polydextrose agar

¹Lactobacillus MRS agar, ²Trypticase soy agar.

der(Titertek Multiskan, Labsystem, Finland)를 사용하여 620 nm에서의 OD값을 측정하였다. Bacteriocin 시료액 대신 멸균 증류수를 사용한 것을 대조구로 하여 대조구의 절반에 해당하는 흡광도값을 나타내는 희석배수를 구하여 희석배수에 200을 곱한 값을 bacteriocin unit(BU)로 표시하였다.

효소처리에 의한 항균활성의 변화 : β -amylase, cellulase는 30 mM sodium acetate buffer(pH 5.0), α -amylase, lipase, mutanolysin은 0.1 M sodium phosphate buffer(pH 7.0), 기타 효소는 50 mM tris-HCl (pH 8.0)에 2 mg/ml이 되도록 녹인 다음 활성 측정용 시료액 ml당 1 ml을 첨가하였고 대조구로는 효소대신 멸균 증류수를 동량 첨가한 후 37°C 에서 2시간 반응시켜 활성의 변화를 관찰하였다.

pH의 영향 : M17G broth에서 HY449 균주를 하루밤 배양한 후 원심분리한 cell free supernatant에 $(NH_4)_2SO_4$ 를 60% 포화 농도로 첨가하여 얻은 침전물을 MWCO 1,000 투석막(Spectra/por, Specturm, USA)을 이용하여 24시간 투석한 것을 1 N NaOH와 HCl 용액을 사용하여 pH를 2.0, 3.0, 4.0, 5.0, 6.0, 7.0, 8.0, 9.0, 10, 11, 12로 조정한 후 활성을 측정하였다.

열처리의 영향 : 항균 활성 측정용 시료를 증류수와 0.02 N HCl에 녹인 후 60, 100, 121°C 에서 시간별로 활성의 변화를 관찰했다.

Dissociating agent의 영향 : 항균 활성 물질에 4 M urea, 1% mercaptoethanol, 1% SDS를 단독, 조합해 처리한 후 활성의 변화를 관찰했다.

결과 및 고찰

항균물질 생산 균주의 동정

API 50 CH kit를 사용하여 당 발효 실험을 한 결과는 Table 2와 같다. 일반적인 *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* strain과 비교할 때 선발 균주는 lactose가 음성, sucrose, salicine이 양성인 점에서 차이가 있었다. API 동정 program을 이용해 분석한 결과 98% 신뢰도로 *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*로 동정되었고 세포막의 지방산 조성 분석 결과(Fig. 1) *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* type strain과 지방산의 종류는 일치하였고 구성 성분들간의 정량적인 차이만을 나타냈다.

이 균주가 생산하는 항균물질은 배양상등액의 pH를 조정하고, 열처리 및 catalase 처리를 하여도 활성이 유지되어 박테리오신임을 알 수 있었다.

Table 2. Results of carbohydrate fermentation of *Lactococcus* sp. HY 449 strain

Characteristics	Results
Glycerol	—
Erythritol	—
D-Arabinose	—
L-Arabinose	—
Ribose	+
D-xylose	—
L-Xylose	—
Adonitol	—
β Methyl-xylose	—
Galactose	+
D-Glucose	+
D-Fructose	+
D-Mannose	+
L-Sorbose	—
Rhamnose	—
Dulcitol	—
Inositol	—
Mannitol	+
Sorbitol	—
α -Methyl-D-mannoside	—
α -Methyl-D-glucoside	—
N-AcetylGlucosamin	+
Amygdalin	—
Arbutin	+
Esculine	+
Salicine	+
Cellobiose	+
Maltose	+
Lactose	—
Melibiose	—
Saccharose	+
Trehalose	—
Inuline	—
Melezitose	—
D-Raffinose	—
Amidon	+
Glycogene	—
Xylitol	—
β -Gentiobiose	+
D-Turanose	—
D-Lyxose	—
D-Tagatose	—
D-Fucose	—
L-Fucose	—

+: Fermented, -: Not fermented.

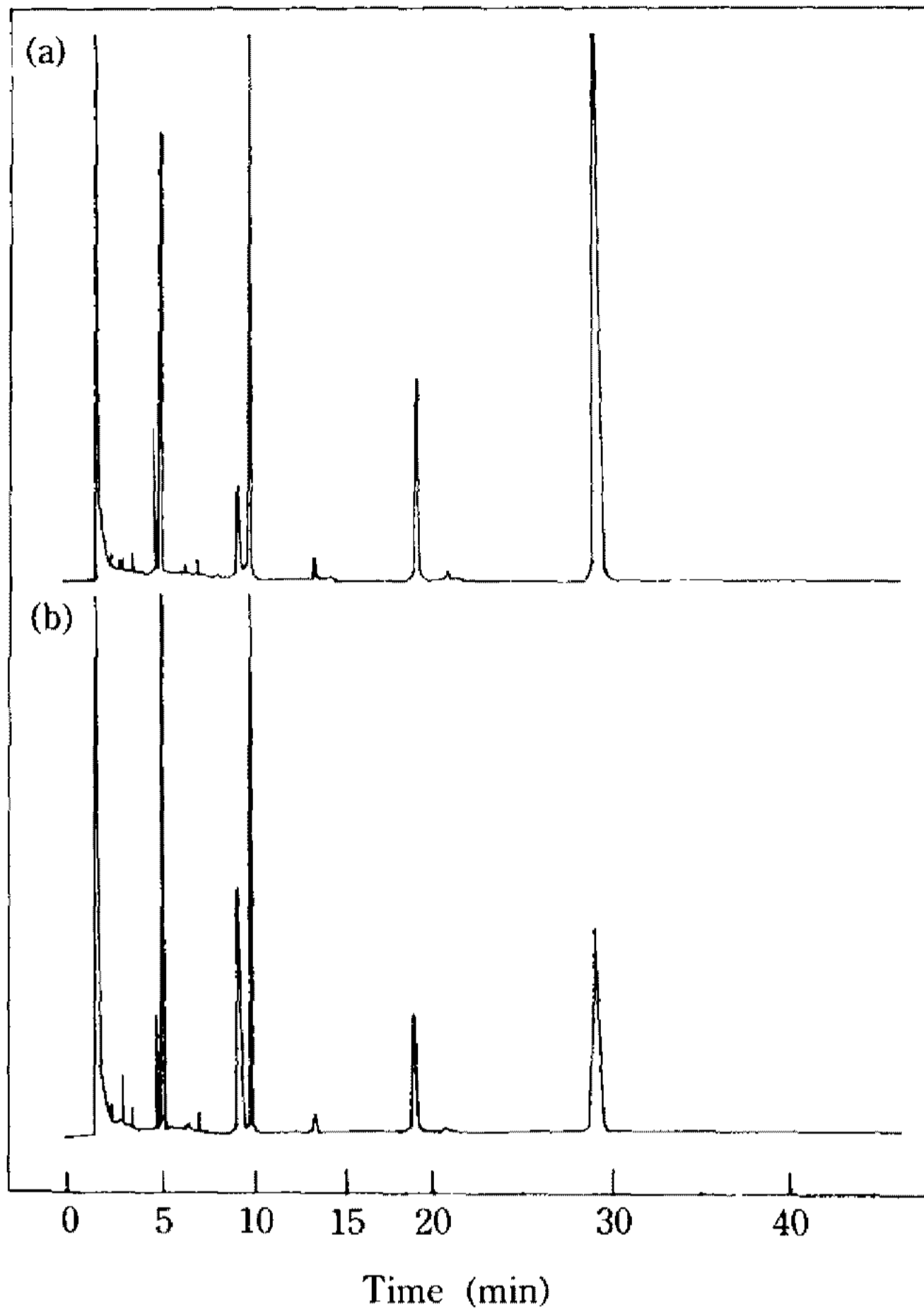


Fig. 1. Gas-liquid chromatographic profiles of fatty acid methyl esters from *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* ATCC 19435 and *Lactococcus* sp. HY449. (a) type strain, (b) HY 449

항균 spectrum

MRS agar 배지에서 효모를 포함해 18개의 그람 양성균주와 3개의 그람 음성균주에 대한 항균 spectrum을 조사한 결과는 Table 3에 나타내었다. *Lactococcus* sp. HY449는 *Lactobacillus* spp., *Leuconostoc* spp., *Lactococcus* spp., *Staphylococcus epidermidis*, *Listeria monocytogenes* 등 그람 양성균 뿐 아니라 그람 음성균인 *Pseudomonas fluorescens*, *Escherichia coli* HB 101, *Escherichia coli* A₂에 대해서도 억제환을 나타내었다. 그러나 포자를 형성하는 *Bacillus substilis* ATCC 6633, 그람 음성균인 *Salmonella typhimurium* 및 효모에 대해서는 억제환을 나타내지 않았다.

pH의 영향

Lactococcus sp. HY449 배양 상등액의 부분 정제물에 1 N HCl과 1 N NaOH로 pH 2~12까지 조정된 후 상온에서 1시간 정치한 다음 항균활성을 측정하였다. bacteriocin은 pH 11부터 급격한 활성 감소를 보여 pH 12에서는 거의 모든 활성이 소실되었지만

Table 3. Inhibition spectrum of bacteriocin produced by *Lactococcus* sp. HY449

Microorganism tested	Inhibition
<i>Lactobacillus delbrueckii</i> IFO 3202	+
<i>Lactobacillus fermentum</i> IFO 3023	+
<i>Lactobacillus brevis</i> IFO 3029	+
<i>Lactobacillus jurguti</i> IFO 3048	+
<i>Lactobacillus helveticus</i> IAM 1042	-
<i>Lactobacillus plantarum</i> ATCC 8014	-
<i>Lactobacillus casei</i> YIT 9018	-
<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i> ML3	+
<i>Leuconostoc mesenteroides</i> KFCC 11324	+
<i>Streptococcus faecalis</i> IFO 3971	+
<i>Bacillus subtilis</i> ATCC 6633	-
<i>Escherichia coli</i> HB 101	+
<i>Escherichia coli</i> A ₂	+
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	+
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 15442	+
<i>Staphylococcus aureus</i>	+
<i>Staphylococcus epidermidis</i> KFCC 35494	+
<i>Salmonella typhimurium</i> ATCC 14028	-
<i>Listeria monocytogenes</i> ATCC 15313	+
<i>Listeria monocytogenes</i> ATCC 35152	+
<i>Klebsiella aerogenes</i>	-
<i>Hansenula anomala</i>	-

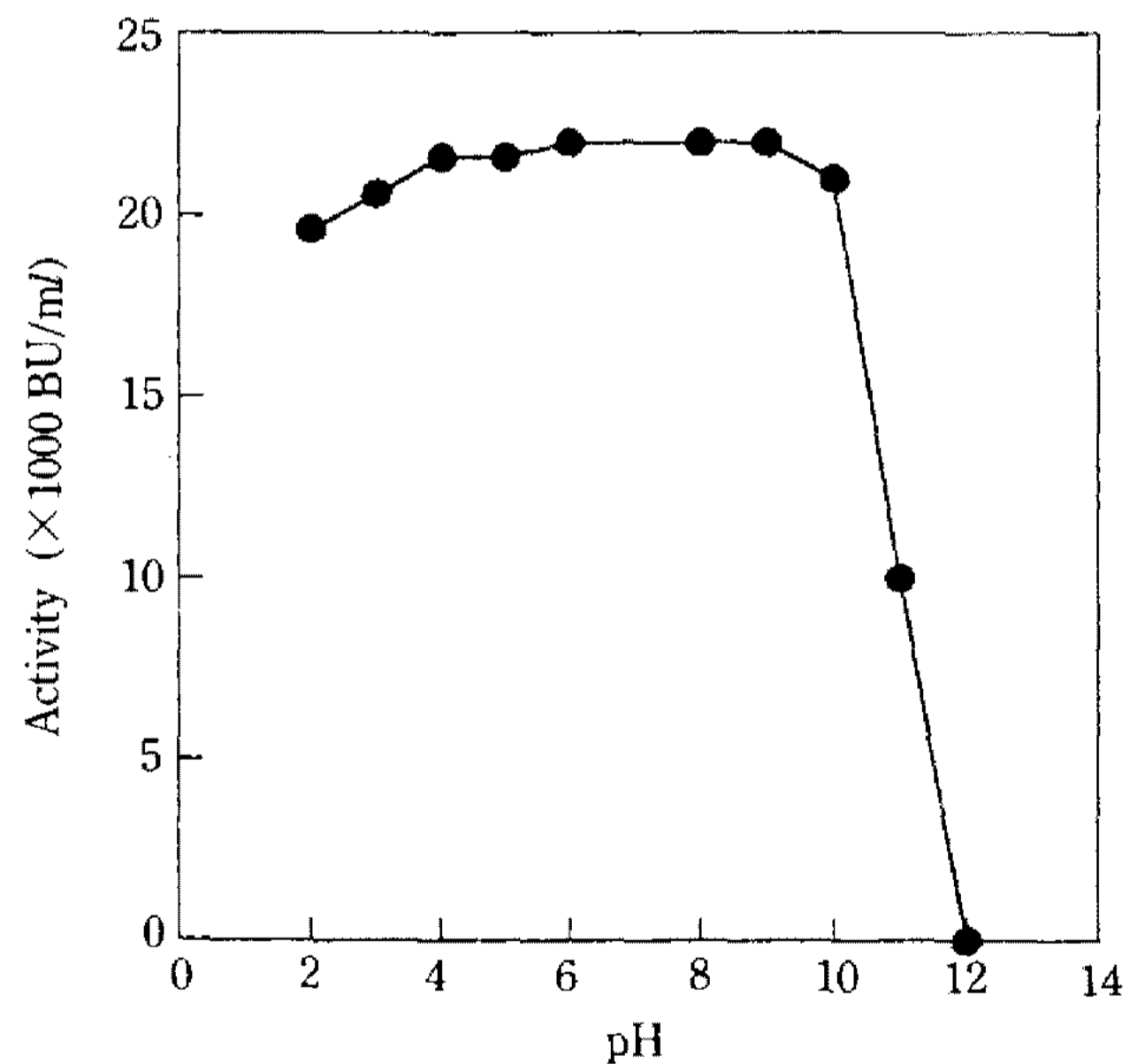


Fig. 2. Effect of pH on the activity of bacteriocin produced by *Lactococcus* sp. HY 449.

(Fig. 2), pH 3.0와 10 사이에서는 일정하게 유지되어 광범위한 pH 안정성을 보였다.

Daeschel 등(12)이 보고한 *L. plantarum* C-11이 생산하는 plantaricin A는 pH 4~6.5 사이의 좁은 범위

에서만 활성을 나타냈으며, nisin의 경우에도 pH 2에서의 용해성이 57 mg/ml인 반면 pH 8~12에서는 0.25 mg/ml의 낮은 용해성을 보여 알칼리 영역에서의 불안정성이 보고된 바 있다(13). 한편 높은 pH에서 항균 활성이 떨어지는 것은 항균 물질이 pH가 높을 경우 불안정해 변성되거나 화학적 변형이 일어나기 때문이라 생각된다. Gross 등(14)은 pH가 높을 경우 hydroxide ions, deprotonated amines, deprotonated hydroxyl group같은 nucleophile이 dehydro residue와 반응하여 분자간 혹은 분자내 cross-linkage를 형성해 화학적 변형을 일으킨다고 보고했다. dehydro 잔기가 존재하는 nisin의 경우에도 위와 같은 반응이 일어나 여러 종류의 반응산물이 생성되고 nisin의 항균력은 급격하게 소실됐다고 Leu 등(13)이 보고했다. 반면 *Lactobacillus casei*가 생산하는 bacteriocin인 caseicin 80(3)의 경우엔 pH 3~9의 범위에서도 활성을 유지하였고 *Lactobacillus carnis*가 생산하는 bacteriocin(15)도 pH 2~11의 넓은 범위에서도 안정하다고 보고하였다. *Lactococcus* sp. HY 449가 생산하는 bacteriocin도 pH 3~9 사이에서 안정하며 활성이 거의 일정하다는 점에서 위의 보고와 일치하였다.

열 처리의 영향

항균 물질을 증류수와 0.02 N HCl에 각각 녹여 열처리를 했을 때 활성의 변화를 Fig. 3에 나타내었다. 60°C 에서 60분 열처리 시의 활성은 그대로 유지되었고 100°C 에서는 HCl에 녹아 있는 항균 물질의 활성이

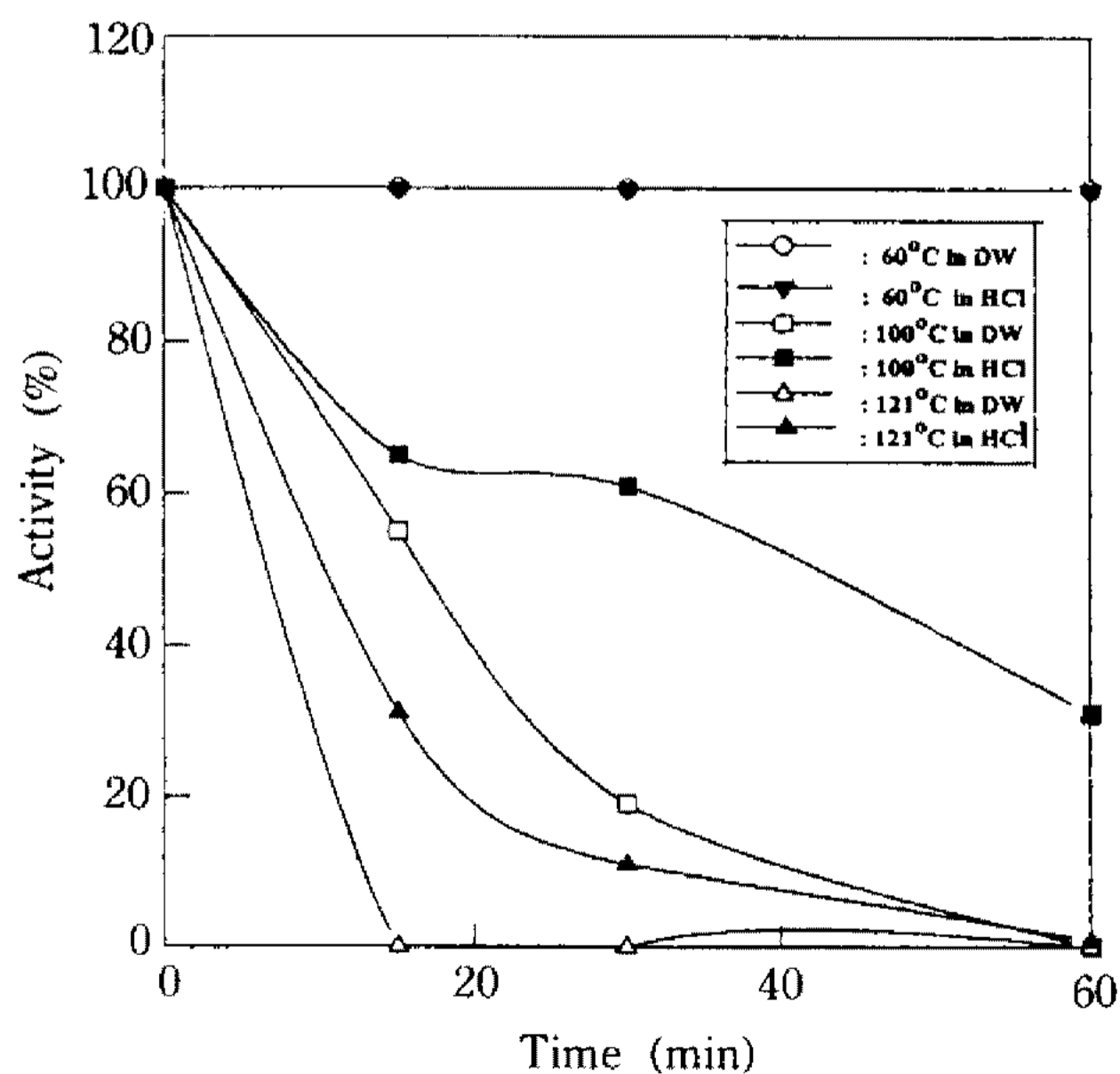


Fig. 3. Effect of heating temperature and time on the activity of bacteriocin produced by *Lactococcus* sp. HY 449 strain.

더 높게 나타났다. 100°C, 60분 열처리 시 증류수에 녹아 있는 항균 물질의 활성은 모두 소실되었으나 HCl에 녹인 항균 물질의 활성은 65% 소실되었다. 또한 121°C, 15분 열처리 시 증류수에 녹인 항균물질은 활성이 완전히 소실되었으나 HCl의 경우는 69% 소실되었다. 이상의 결과로부터 항균 물질은 낮은 pH에서 열 안정성이 높게 나타났다.

지금까지 알려진 bacteriocin의 열안정성은 종류에 따라 차이가 커서 bacteriocin S50(16)과 plantaricin A(12)는 100°C 에서 각각 60분과 30분 열처리 시에도 안정하여 내열성이 크게 나타난 반면 Kato등(17)이 *Ent. faecium*에서 생산한 bacteriocin은 끓는 물에서 열처리한 결과 5분 경과시까지의 활성에 영향이 없었지만 10분 후에는 50%가 30분 후에는 거의 모든 활성이 사라짐을 보고한 바 있고, helveticin V-1829 (18)는 50°C 에서 30분만에 불활성화되어 열에 아주 민감한 것으로 보고되었다. 이와 비교할 때 *Lactococcus* sp. HY 449가 생산하는 bacteriocin은 열안정성이 비교적 높은 것으로 나타났다.

Dissociating agent의 영향

항균 물질이 aggregated form으로 존재하는지 알아보기 위해 여러 종류의 dissociating agent를 처리했다. 음이온 계면활성제인 SDS의 경우 0.01% 농도일 때는 지시균에 아무런 영향이 없었고 항균 물질의 활성도 그대로 유지되었다. 그러나 0.1% 농도일 때는 SDS가 지시균에 대해 항균력을 나타냈고 SDS를 처리한 항균 물질은 대조구보다 오히려 항균력이 증가했는데 이는 항균 물질이 SDS에 의해 영향을 받지 않음을 의미

Table 4. Effect of dissociating agents on the activity of bacteriocin

Dissociating agents	Activity(BU/ml)	
	dissociating agents control	dissociating agents with bacteriocin
Control	0	0
Bacteriocin		1600
4 M urea	100	800
1% Mercaptoethanol	0	1600
1% SDS	3200	6400
0.1% SDS	600	3200
0.01% SDS	0	1600
4 M urea+mercaptoethanol	100	400
4 M urea+1% SDS	3200	4500
1% SDS+1% mercaptoethanol	3200	4500

Table 5. Effect of various enzymes on the activity of bacteriocin purified by ion exchange chromatography

Enzyme	Results
protease IV	-
α -chymotrypsin	+
trypsin	+
lipase	+
protease v ⁸	+
Mutanolysin	+
carboxypeptidase A	+
α -amylase	v ¹
β -amylase	-
cellulase	-
elastase	+

¹variable, Enzyme concentration: 1 mg/ml buffer, Incubated at optimal temperature for 2 hrs.

하며 SDS 처리로 항균 효과가 증가하기 때문이다. 수소 결합을 파괴하는 urea를 처리했을 때 항균력이 크게 소실되는 것으로 보아 펩타이드 분자의 conformation은 s-s결합보다 오히려 수소 결합에 의존하고 있음을 알 수 있다. 1% mercaptoethanol 처리했을 때 활성의 변화가 없는 사실이 이를 뒷받침해 주고 있다.

효소처리의 영향

CM-Sepharose CL6B를 사용해 ion exchange를 한 후 활성 분획을 모아 냉동 건조하여 효소 처리를 위한 부분 정제물로 사용했다.

Bacteriocin 부분 정제물을 녹인 완충 용액에 각 효소를 1 mg/ml이 되도록 첨가해 최적 온도에서 2 시간 반응시킨 후 활성을 측정된 결과는 Table 5와 같다. 실험에 사용된 단백질 분해효소중 protease IV에 의해서만 bacteriocin이 분해되어 활성이 없어졌고 trypsin, α -chymotrypsin, protease V8, carboxypeptidase, elastase는 bacteriocin에 영향을 주지 못했다. β -amylase, cellulase와 같은 carbohydrate 분해 효소에 의해 활성이 소실되었는데 이 결과로 미루어 *Lactococcus* sp. HY 449가 생산하는 bacteriocin은 탄수화물을 포함하고 있는 복합 단백질이라고 추측할 수 있었다.

요 약

1. Bacteriocin 생산 균주를 유제품으로부터 분리하여 당발효성 시험 결과 98% 신뢰도로 *Lactococcus*

lactis subsp. *lactis*로 동정되었고 세포막의 지방산을 분석해 본 결과 *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* ATCC 19435 type strain과 같은 조성을 나타냈다. 그러나 lactose가 음성이고 salicine, sucrose가 양성인 점이 일반적인 *Lactococcus* spp.와 일치하지 않으므로 *Lactococcus* sp. HY449로 명명했다.

2. *Lactococcus* sp. HY449는 그램양성균에 대해 넓은 항균력을 나타냈으며 그램음성의 *Escherichia coli*에 대해서도 항균력을 나타냈다. 균주의 항균력은 생장에 비례하는 패턴을 보였고 32°C의 M17G 배지에서 10시간 배양했을 때 최대의 항균 활성을 나타냈다.

3. *Lactococcus* sp. HY 449가 생산하는 bacteriocin은 pH 4.0과 9.0 사이에서 최대 활성을 보였고 pH 12에서는 활성이 완전 소실되었다. 열안정성의 경우 중성 pH보다는 산성 pH에서 높게 나타나 100°C, 30분 열처리시 60% 활성이 잔존하는 것으로 나타났다.

참고문헌

1. Upreti, G.C. and R.D. Hinsdill. 1975. Production and mode of action of lactocin 27: bacteriocin from a homofermentative *Lactobacillus*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 7: 139-145.
2. Barefoot, S.F. and T.R. Klaenhammer. 1984. Purification and characterization of the *Lactobacillus acidophilus* bacteriocin, lactacin B. *Antimicrobial Agents and chemotherapy* 26: 328-334.
3. Rammelsberg, M., E. Muller, and F. Radler. 1990. Caseicin 80: purification and characterization of a new bacteriocin from *Lactobacillus casei*. *Arch. Microbiol.* 154: 249-252.
4. Mortvedt, C.L., J. Nissen-Meyer, K. Sletten, and I.F. Nes. 1991. Purification and amino acid sequence of lactocin S, a bacteriocin produced by *Lactobacillus sake* L45. *Appl. Environ. Microbiol.* 57: 1829-1834.
5. Hirsch, A. 1951. Growth and nisin production of a strain of *Streptococcus lactis*. *J. Gen. Microbiol.* 5: 208-221.
6. Whitehead, H.R. 1933. A substance inhibiting bacterial growth produced by certain strains of lactic streptococci. *Biochem. J.* 27: 1793-1800.
7. Holo, H., O. Nilssen, and I.F. Nes. 1991. Lactococin A, a new bacteriocin from *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris*: isolation and characterization of the protein and its gene. *J. Bacteriol.* 173: 3879-3887.
8. Lewus, C.B., S. Sun, and T.J. Montville. 1992. Production of an amylase-sensitive bacteriocin by an atypical *Leuconostoc paramesenteroides* strain.

- Appl. Environ. Microbiol.* **58**: 143-149.
9. Pucci, M.J., E.R. Vedamuthu, B.S. Kunka, and P.A. Vandenberg. 1988. Inhibition of *Listeria monocytogenes* by using bacteriocin PA-1 produced by *Pediococcus acidilactici* PAC 1.0. *Appl. Environ. Microbiol.* **54**: 2349-2353.
 10. Sasser, M. 1990. Identification of bacteria by gas chromatography of cellular fatty acids. MIDI Technical Note #101. MIDI. 115.
 11. Toba, T., S.K. Samant, and T. Itoh. 1991. Assay system for detecting bacteriocin in microdilution wells. *Letters in Appl. Microbiol.* **13**: 102-104.
 12. Daeschel, M.A., M.C. Mckenny, and L.C. McDonald. 1990. Bacteriocidal activity of *Lactobacillus plantarum* C-11. *Food Microbiol.* **7**: 91-98.
 13. Leu, Wei, and Hansen J. Norman. 1990. Some chemical and physical properties of nisin, a small-protein antibiotics produced by *Lactococcus lactis*. *Appl. Environ. Microbiol.* **56**: 2551-2558.
 14. Gross, E. and J.L. Morell. 1971. Peptide with alpha, beta-unsaturated acids, Pp. 356-360. In E. Scoffone(ed). *Peptides*.
 15. Schillinger, U. and F.K. Holzapfel. 1990. Antibacterial activity of carnobacteria. *Food Microbiol.* **7**: 305-307.
 16. Kojic, M., J. Svircevic, A. Banina, and L. Topisirovic. 1991. Bacteriocin-producing strain of *Lactococcus lactis* subsp. *diacetylactis* S50. *Appl. Environ. Microbiol.* **57**: 1835-1837.
 17. Kato, T., T. Matsuda, Y. Yoneyama, H. Kato, and R. Nakamura. 1993. Isolation of *Enterococcus faecium* with antibacterial activity and characterization of its bacteriocin. *Biosci. Biotech. Biochem.* **57**: 551-556.
 18. Vaughan, E.E., C. Daly, and G.F. Fitzgerald. 1992. Identification and characterization of helveticin V-1829, a bacteriocin produced by *Lactobacillus helveticus* 1829. *J. Appl. Bacteriol.* **73**: 299-308.
 19. Mathieu, M., S. Suwandhi, N. Rekhif, J.B. Milliere, and G. Lefebvre. 1993. Mesenterocin 52, a bacteriocin produced by *Leuconostoc mesenteroides* ssp. *mesenteroides* FR 52. *J. Appl. Bacteriol.* **74**: 372-379.
 20. Lewus, C.B., S. Sun, and T.J. Montville. 1992. Production of an amylase-sensitive bacteriocin by an atypical *Leuconostoc paramesenteroides* strain. *Appl. Environ. Microbiol.* **58**: 143-149.

(Received March 28, 1994)