

돼지분변에서 분리한 *Lactobacillus* sp. KJ-5의 항균특성

*박 경 준 · †유 연 우

아주대학교 공과대학 생물공학과, *한국 바이엘화학 주식회사

Antibacterial Activity of *Lactobacillus* sp. KJ-5 Isolated from Pig Feces

Kyong-Jun Park* and Yeon-Woo Ryu†

Department of Biotechnology, College of Engineering, Ajou University, Suwon 441-749, Korea

*Bayer Vetchem(Korea), Ltd.

ABSTRACT

A lactic acid bacteria producing antibacterial substance was isolated from pig feces. This strain was identified as a genus *Lactobacillus*, through its morphological, cultural and physiological characteristics. *Lactobacillus* sp. KJ-5 isolated showed the strong inhibitory effect on the growth of *Salmonella paratyphi*. The production of antibacterial substance was growth associated form during the batch culture of *Lactobacillus* sp. KJ-5 and the maximum production was obtained at the culture temperature of 37°C as well as optimum temperature of cell growth. The antibacterial activity of the filtrate of culture broth was decreased by adjusting the pH 6.2 and was not affected by catalase treatment. The antibacterial substance was partially purified by methanol and acetone extraction, which exhibited three spots in the thin-layer chromatography and one of them showed an antibacterial activity. This substance also showed the maximum absorption of UV at 270nm and an antibacterial activity was completely inactivated by the treatment of proteolytic enzymes.

서 론

유산균에 의한 병원성 세균의 생육억제 기작은 유산균이 생산하는 유산이나 유기산에 의한 pH 저하와 과산화수소의 생성에 의한 것으로 알려져 왔다(1). 그러나 최근에는 bacteriocin를 비롯한 항균성 물질의 생성에 의한 것으로도 밝혀지고 있으며, 이를 이용한 유가공식품, 발효식품 및 냉동육의 부패 방지에 이용하기 위한 많은 연구들이 보고되고 있다(2-4). 또한 이들 유산균은 항균효과 뿐만아니라 장

내 세균총의 정상화에도 관여하여 각종 세균성 장내 질병의 예방 및 가축의 성장촉진에도 효과가 있는 것으로 보고되고 있다(5-7).

유산균에 의하여 생성되는 항균성 물질에 대한 연구에는 Davey 등(8)과 Zajdal 등(9)에 의하여 *Streptococcus cremoris*로 부터 열에 안정하고 protease 및 phospholipase A에 의하여 분해되며 감수성 세균의 세포벽에 작용하는 항균성 물질을 분리하여 보고하였다. 특히 Pulusani 등(10)은 *Streptococcus thermophilus*에서 열에 안정하고 분자량이 700 정도인 peptide 종류의 bacteriocin을 분리하였으며, Kuhnlen 등(11)은 *Streptococcus faecalis* var li

† Corresponding Author

quefaciens K4로 부터 aspartate와 lysine 등이 포함된 분자량 2,000 정도의 LTQ4라는 항균성 물질을 분리 정제하였다. 또한 Reddy 등(12)은 *Lactobacillus bulgaricus*로 부터 병원성 및 비병원성 세균의 생육을 억제하는 bulgarican이라는 열에 안정한 항균물질을 분리하였다. 국내에서는 김(13)에 의하여 *Lactobacillus acidophilus*로 부터 분자량이 약 264로 추정되는 항균물질을 분리하였으며, 강 등(14)도 *Bifidobacterium longum*으로 부터 열에 안정하고 분자량이 120 정도인 Bifilong라는 항균물질을 분리하였다. 또한 박 등(15)은 김치에서 분리한 *Lactobacillus plantarum* Lp2로 부터 gram-negative 균주들에 대하여 강한 생육억제력을 나타내는 물질을 분리하였다. 최근에 조 등(16)은 김치발효에 관련된 일부 젖산균들이 *E. coli*의 생육을 억제하는 항균물질을 생성한다고 보고하였으며, Ha 등(17)은 김치로부터 넓은 범위의 bacteria에 대하여 항균효과를 갖는 bacteriocin을 생성하는 젖산균들을 분리하였다는 보고가 있었다. 또한 김 등(18, 19)은 오염된 유제품으로부터 bacteriocin을 생성하는 *Lactococcus* sp.를 분리하였으며, 특히 이 bacteriocin은 젖산균인 *Lactobacillus fermentatum*의 세포벽에 손상을 주어 생육을 억제한다는 보고를 하였다.

일부 항생제들을 사료에 첨가할 경우 가축의 성장이 촉진된다는 보고(20)에 의하여 가축의 성장촉진제로서 항생제가 많이 이용되어 왔으나, 최근 전세계적으로 식육에의 항생물질 잔류문제, 내성균의 발현 등에 의하여 가축 위생학적 측면에서 항생물질의 사용이 규제되고 있는 현실이다(21). 국내에서도 돼지의 세균성 설사증 치료는 주로 항생제에만 의존하였으나 병원성 세균의 항생제 내성의 증가로 가축위생 및 공중보건상 심각한 문제점으로 대두되고 있다. 이러한 이유에서 최근에는 국내의 축산업분야에서도 돼지의 세균성 설사병에 대한 예방과 성장촉진의 목적으로 항생제 대신 유산균의 이용에 많은 관심을 기울이고 있다(22).

따라서 본 연구에서는 돼지의 설사증 치료제의 개발을 목적으로 어린 돼지의 분변으로부터 돼지 장내의 유해 세균에 대한 생육억제 활성을 나타내는 균주를 분리하고, 분리한 균주가 생성하는 항균물질의 이화학적 특성에 대한 연구를 수행하였다.

실험재료 및 연구방법

균주의 분리 및 배지

균주는 경기도 소재 농장에서 장질환은 물론 항생제 등의 약제투여 경험이 없는 생후 3개월된 어린돼지의 분변으로부터 분리하였다. 균주분리용 배지는 MRS 배지(23)에 agar 1.5%를 첨가하여 사용하였으며, 균주의 분리는 배양학적 특성이 서로 상이한 colony를 선발하여 MRS 고체배지로 제조한 slant에 접종하여 37°C의 배양기에서 24시간 배양한 후 4°C에 보관하고, 2주마다 계대배양하면서 사용하였다. 접종용 균주는 MRS 액체배지에 균을 접종한 후 37°C에서 18시간 배양하여 사용하였으며, 접종량은 1%(v/v)로 하였다. 항균물질의 생성 및 특성 검토를 위한 배양배지로는 MRS 액체배지를 사용하였다. 피검균의 증식용 배지는 nutrient medium과 trypticase soy medium(24)을 사용하였다.

항균물질 생산균주의 선발 및 선발 균주의 동정

분리한 각각의 colony를 MRS 액체배지에 접종하여 37°C에서 24시간 동안 GasPark anaerobic jar (4~7% CO₂ generator, BBL Microbiology Systems Co.)에서 혐기배양한 배양상등액을 agar diffusion법(25)으로 피검균들에 대한 항균활성을 측정하였다. 균주의 동정은 선발한 균주의 형태학적, 배양학적 및 생리학적 특성들을 *Lactobacillus plantarum*과 비교·검토하여 동정하였다.

항균활성 측정

분리균주의 배양상등액 및 분리정제물의 항균활성은 *S. paratyphi* ATCC 11511를 피검균으로 사용하여 cylinder plate법(26)을 이용하여 측정하였다. 즉 trypticase soy agar plate에 1%(v/v)의 피검균액과 0.8% agar가 함유된 동일배지를 4ml씩 중층한 후 plate의 표면에 stainless steel로 된 cup (내경 6mm, 외경 8mm, 높이 10mm)을 올려놓았다. 원통안에 NaOH를 이용하여 pH를 6.2로 조정된 시료를 0.3ml씩 주입한 다음 4°C에서 1시간 방치한 후 37°C에서 18시간 동안 피검균을 배양하였다. 이때 항균활성(antibacterial activity)은 형성된 생육억제환의 직경(mm)으로 나타내었다. 배양시간에 따른 항균활성은 MRS 액체배지 100ml에 균을 접종하고 37°C로 혐기배양하면서 4시간 간격으로 배양액을 취하여 여과(0.2μm membrane filter)한 후 항균활성을 측정하였다. 배양온도에 따른 항균활성은 MRS 액체배지 20ml에 균을 접종하고 각각의 배양온도에서 24시간 동안 혐기배양한 후 항균활성을 측정하였다.

Catalase 처리효과의 검토는 horse radish catalase를 1mg/ml이 되도록 0.05M phosphate buffer (pH 7.0)에 녹여 membrane filter(0.2 μ m)로 여과한 다음 배양액에 300unit/ml가 되도록 첨가하여 30 $^{\circ}$ C에서 1시간 동안 방치한 후 항균활성을 측정하였다. pH에 따른 항균효과의 검토는 배양액의 pH를 NaOH 및 lactic acid로 조정하여 항균활성을 측정하였다.

항균물질의 분리 및 특성

항균물질의 분리는 항균물질 배양액을 원심분리하여 얻은 상등액에 동일한 부피의 methanol을 가하여 30분간 교반한 후 여과하였다. 이 여액을 rotary evaporator를 이용하여 methanol 혼합액을 완전히 제거하고, 다시 methanol 10ml에 녹여 여과하였다. 여과액에 동일 부피의 acetone을 가하여 30분간 교반하고 여과한 후 여과액을 rotary evaporator를 사용하여 acetone 혼합액을 완전히 제거하여 부분정제한 항균물질로 실험에 사용하였다.

Thin-layer chromatography는 부분정제된 항균물질을 10ml 증류수에 용해시킨 시료를 silica gel plate (Merck, silica gel 160 F254)에 점적하고 n-butanol : acetic acid : water를 4 : 1 : 5로 혼합한 용매계를 사용하여 전개시킨 후 ninhydrin액을 분무하여 spots를 관찰하였다. 또한 동일한 시료의 UV absorption spectrum은 Shimadzu Double Beam spectrophotometer UV-200S를 이용하여 측정하였다. 단백질 분해효소에 의한 항균활성의 변화를 검토하기 위하여 protease (*Bacillus thermoproteolyticus*, Sigma Co.), α -chymotrypsin (Bovine pancrease, Sigma Co.)을 200unit/ml의 농도로 부분정제된 항균물질 시료에 첨가하여 37 $^{\circ}$ C에서 30분간 반응시킨 후 항균활성을 측정하였다.

결과 및 고찰

항균물질 생성 균주의 분리 및 선발

어린패지의 분변시료로부터 254주의 혐기성 세균을 분리하여 항균활성을 측정하였다. 항균활성 측정을 위한 피검균주로 nutrient 배지에서 성장시킨 *E. coli* NIJH 및 *Bacillus subtilis* ATCC 6633과 trypticase soy 배지에서 성장시킨 *Salmoella paratyphi* ATCC 11511 및 *Staphylococcus aureus* ATCC 6538-P를 이용하여 실험을 수행한 결과 항균활성을 나타내는 43개의 균주를 선발하였다. 선발

Table 1. Morphological and cultural characteristics of strain KJ-5 and *Lactobacillus plantarum*.

Characteristics	Strain KJ-5	<i>L. plantarum</i>
Free cell		
Cell shape	Rod	Rod
Arrangement	Single	Single or short chain
Size(μ m)	0.5~0.7 \times 3~4	0.9~1.2 \times 3~8
Gram stain	+	+
Motility	-	-
Spore formation	-	-
Colony on MRS agar		
Form	Circular	Circular
Color	White	White
Elevation	Convex	Convex
Margin	Entire	Entire
Opacity	Opaque	Opaque

한 대부분의 균주들은 *E. coli*에 대하여 항균활성을 나타내었으며, 이 중에서 Strain KJD1-10과 KJD2-5가 강한 활성을 나타내었다. 반면 *S. paratyphi*, *S. aureus* 및 *B. subtilis*에 대하여 항균활성을 나타내는 균주는 각각 1개, 8개 및 3개가 분리되었다. 그러나 *S. aureus*와 *B. subtilis*에 대한 항균활성 정도는 매우 낮았으며, 단지 Strain KJ-5만이 *S. paratyphi*에 대하여 생육억제환의 크기가 크게 나타났다. 따라서 본 연구에서는 장내 병원성균으로 알려진 *S. paratyphi*에 생육억제환의 크기가 크게 나타난 KJ-5 균주를 최종적으로 선발하여 이 균주의 동정과 항균활성 및 항균물질의 부분적인 특성연구에 이용하였다.

균주의 동정

*S. paratyphi*에 강한 항균활성을 나타내는 Strain KJ-5의 동정을 위한 형태학적 및 배양학적 특성들을 *L. plantarum*과 비교한 결과를 Table 1에 나타내었다. 실험결과에서 strain KJ-5는 *L. plantarum*과 동일하게 gram 양성균의 간균으로 포자를 형성하지 않으며 운동성이 없고, colony는 백색의 원형으로 표면은 광택이 없었다. 반면 cell size는 *L. plantarum* 보다 약간 작았다.

Strain KJ-5의 생리학적 특성 및 당발효 특성을 Bergey's manual(27)로부터 얻은 *L. plantarum*의 특성과 비교한 실험결과를 Table 2와 Table 3에 나타내었다. 실험결과에서 KJ-5 균의 생육온도와 pH 범위는 각각 15 $^{\circ}$ C~45 $^{\circ}$ C와 pH 3.5~pH 9.5 였으

Table 2. Physiological characteristics of strain KJ-5 tested and *L. plantarum* of Bergey's manual.

Characteristics	Strain KJ-5	<i>L. plantarum</i>
Temperature range for growth	15°C~45°C	No growth at 45°C
pH range for growth	3.5~9.5	NT
NaCl tolerance for growth	≤8%	NT
Gas from glucose	-	-
Catalase test	-	-
Milk reaction	-	-
Reduction	+	+
Peptonization	-	-
Acid curd	+	+
Hydrolysis of gelatin	-	-
Nitrate reduction	-	-
Formation of indole	-	-

NT : No tested

Table 3. Fermentation of sugars by strain KJ-5 and *L. plantarum* of Bergey's manual.

Sugars	Strain KJ-5	<i>L. plantarum</i>
Arabinose	+	d
Cellobiose	+	+
Fructose	+	+
Galactose	+	+
Gluconate	+	+
Glucose	+	+
Lactose	+	+
Maltose	+	+
Mannitol	+	+
Mannose	+	+
Raffinose	-	+
Rhamnose	-	-
Ribose	+	+
Sorbitol	-	+
Starch	+	NT
Sucrose	+	+
Xylose	-	d

NT : No tested. d : 11~89% strain positive.

+ : Positive reaction. - : Negative reaction.

며, 8% (w/v)의 NaCl 농도까지는 생육이 정상적이었으나 그 이상의 농도에서는 생육이 억제되었다. Catalase 반응은 음성이고, glucose로부터 gas 생

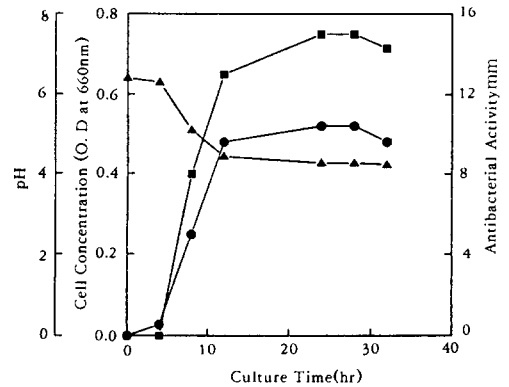


Fig. 1. Profiles of cell growth (●), pH (▲) and antibacterial activity (■) during the batch culture of *Lactobacillus* sp. KJ-5 on MRS liquid medium.

성이 없었다. 이러한 생리적인 특성도 *L. plantarum* 과 거의 유사하였다. 당발효 실험결과에서 strain KJ-5는 실험한 당들중에서 raffinose, rhamnose, sorbitol 및 xylose를 제외한 모든 당으로부터 유기산이 생성되었으며, *L. plantarum*과의 비교에서는 raffinose와 sorbitol을 발효하지 못하는 것 이외는 모두 동일하였다. 또한 MRS 액체배지에서 배양시간에 따른 strain KJ-5의 세포성장상과 pH 변화에 대한 실험에서 pH는 세포 성장에 비례적으로 감소하는 결과를 얻었다(Fig. 1). 즉 이러한 결과는 glucose가 유기산, 특히 젖산으로 생성되었기 때문으로 사려된다.

이상과 같이 strain KJ-5의 생태학적, 배양학적 및 생리학적 특성들을 비교 검토한 결과 strain KJ-5가 *Lactobacillus* 속으로 판단되기에 분리균주를 *Lactobacillus* sp. KJ-5로 명명하였다.

분리 균주의 항균활성

MRS 액체배지에서 배양시간에 따른 *Lactobacillus* sp. KJ-5의 세포성장, pH 및 항균활성의 변화를 Fig. 1에 나타내었다. 균주의 성장은 배양 24시간부터 정지기에 도달하였으며, 항균활성도 정지기인 24시간 이후에 최대를 나타내었다. 또한 pH도 세포 성장에 따라 감소하여 정지기 이후 부터는 pH가 4.3으로 유지되었다. 따라서 항균활성 물질의 생산은 세포 성장에 대하여 거의 growth associated form을 나타내었다. 이러한 결과는 정 등(28)에 의한 *L. acidophilus*로부터의 bacteriocin 생성이 대수증식기

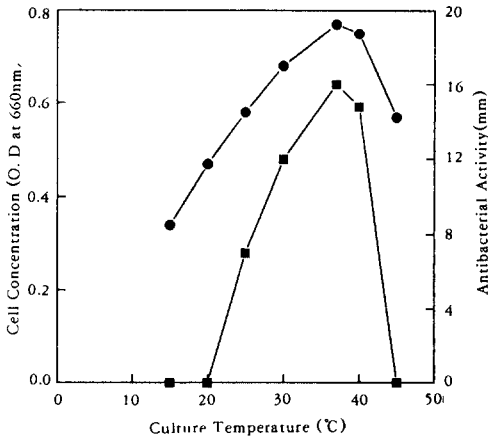


Fig. 2. The cell growth(●) and antibacterial activity(■) after 24 hours culture under various culture temperatures.

에 최대를 나타낸 후 대수증식기 말기 혹은 정지기에 급속히 항균활성이 감소한다는 보고와는 다른 결과를 나타내었으나, 김 등(29)이 *L. lactis* ML8로부터 nicin의 생성이 정지기에 최대 활성을 나타낸다는 보고와는 동일하였다.

배양온도에 따른 균체의 성장과 항균활성의 변화를 Fig. 2에 나타내었다. 실험결과 생육 최적온도인 37°C에서 최대의 항균활성을 나타낸 반면 20°C 이하와 45°C 이상에서는 항균활성이 없었다. 이러한 결과는 단지 20°C 이하에서는 항균물질이 생성되지 않고 45°C 이상에서는 생성된 항균물질이 열에 의하여 불활성화 되는 것으로 추정된다.

Gilliland 등(4)은 *L. bulgaricus* NCS1이 생성하는 H₂O₂가 psychrotrophic bacteria에 대하여 항균활성을 나타내고, 또한 *L. acidophilus*도 H₂O₂를 생성하여 *Pseudomonas fragi*의 생육을 저해시킨다는 보고가 있다(30). 이러한 경우에 배양여과액에 catalase를 처리하면 항균활성이 거의 없어지는 것으로 보고되었다(4, 30). 본 실험에서도 *Lactobacillus* sp. KJ-5의 항균활성이 배양중에 생성되는 H₂O₂ 또는 pH 저하에 의한 것인지를 검토하기 위하여 배양여과액을 catalase로 처리한 것과 pH를 6.2로 조정하는 것에 대한 항균활성을 측정하여 Fig. 3에 나타내었다. 실험결과에서 pH를 6.2로 조정하는 경우 pH가 4.3인 배양여과액 보다 항균활성이 약간 감소하였으므로 pH의 저하가 항균활성에 일부 관여함을 알 수 있었다. 반면 catalase 처리에 의해서는 전혀 항

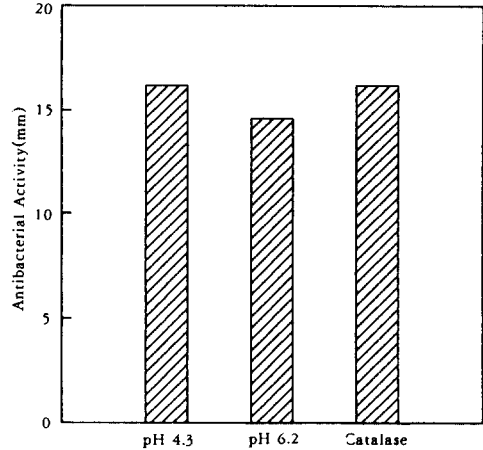


Fig. 3. Effect of pH and catalase treatment of culture filtrate on the antibacterial activity.

균활성의 감소가 없었으므로 H₂O₂의 생성에 의한 항균활성 효과는 없었다. 따라서 *Lactobacillus* sp. KJ-5의 항균활성은 배양중 생성된 산에 의한 pH 저하와 H₂O₂ 이외의 다른 물질에 의한 것으로 판단된다.

항균물질의 분리 및 특성

배양여과액으로부터 methanol과 acetone으로 추출하여 부분정제한 항균물질은 노란색을 나타내었으며, 부분정제된 항균물질을 물에 용해시켜 *S. paratyphi*에 대한 항균활성을 측정하여 Fig. 4에서와 같이 항균활성을 나타내었다. 또한 trypticase soy broth에 부분정제된 항균물질을 첨가하여 *S. paratyphi*를 배양한 결과 Fig. 5에서와 같이 *S. paratyphi*가 거의 성장하지 못하였다.

부분정제된 항균물질을 n-butanol : acetic acid : water(4 : 1 : 5)의 용매계를 이용한 thin-layer chromatography를 행한 후 ninhydrin 액에 반응시킨 결과 Fig. 6과 같이 3개의 spots이 나타났다. 각각의 spot을 분리하여 물에 용해시킨 후 여과하여 항균활성을 측정하여 두번째 spot에서 항균활성이 나타났다. 부분 정제된 항균물질의 UV spectrum은 240~320nm에서 흡수대를 나타내었고 270nm에서 최대 흡광도를 나타내었다. 단백질 분해 효소인 *Bacillus thermoproteolyticus*의 protease와 bovine pancreatic α-chymotrypsin을 부분 정제한 항균활성 물질에 처리한 결과(Table 4) 항균활성이 모두 소실되었다. 이러한 결과는 Barefood 등(31)이 *L. acidophilus*에서 생성된 lactacin B가 prote-

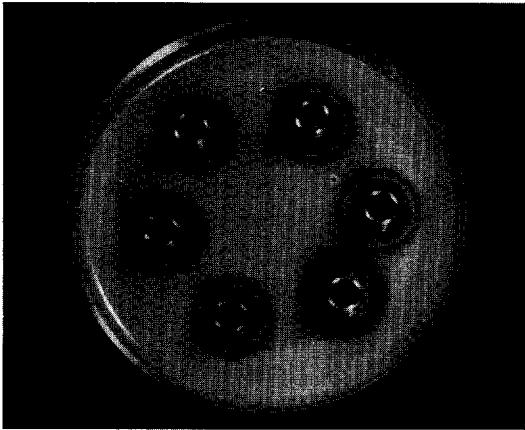


Fig. 4. Photography of inhibition zone of *S. paratyphi* by the partially purified antibacterial substance.

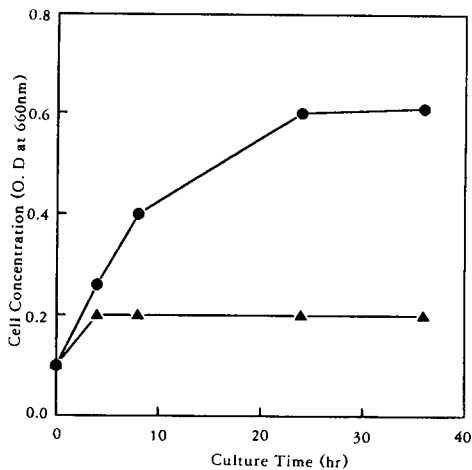


Fig. 5. The growth of *S. paratyphi* in trypticase soy broth medium without(●) and with(▲) the partially purified antibacterial substance.

ase에 의하여 항균활성이 소실된다고 보고한 것과 Kim 등(32)이 *L. plantarum*에 의하여 생성되는 항균물질이 α -chymotrypsin 과 trypsin에 의하여 불활성화 된다는 보고와 동일하였다. 또한 유 등(33)이 원유로부터 분리한 *Lactococcus* sp.의 배양액으로부터 methanol과 acetone의 추출에 의하여 부분정제된 물질의 UV 흡수대가 230~290nm 이고 분자량이 5,900 정도의 단백질로 추정하는 항균물질과

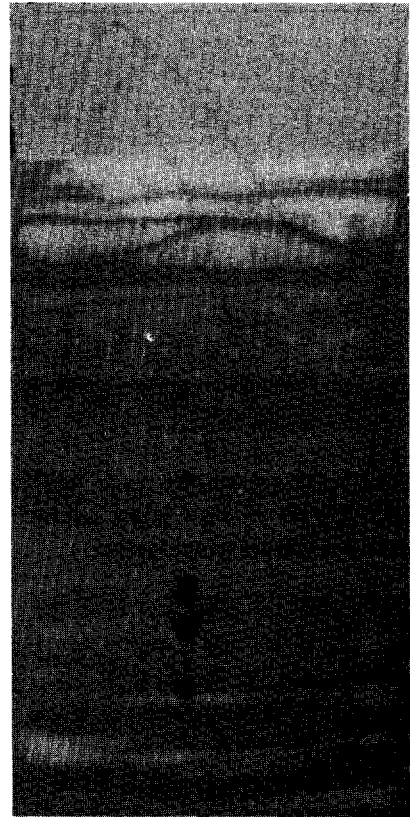


Fig. 6. Thin-layer chromatogram of the partially purified antibacterial substance.

Table 4. Effect of the treatment of proteolytic enzymes on the antibacterial activity of partially purified antibacterial substance.

Proteases	Control	Bacterial Protease	α -chymotrypsin
Activity(mm)	16.2	0	0

도 유사하였다. 이와 같이 *Lactobacillus* sp. KJ-5가 생성하는 항균물질의 이화학적 특성도 다른 많은 유산균들이 생성하는 bacteriocin의 일반적인 특성과 매우 유사한 결과를 얻었으며, 항균물질은 저분자량의 단백질일 것으로 추정된다. 따라서 항균물질의 특성에 대한 연구를 더 수행하여 어떠한 종류의 물질인가를 확인해야 하지만, 단지 *Lactobacillus* sp. KJ-5가 생성한 부분정제된 항균물질이 장내 병원성

균으로 알려진 *S. paratyphi*에 생육억제 효과가 매우 크므로 돼지의 장내 세균성 질병의 예방에 이용할 수 있는 가능성을 보여주고 있다.

요 약

어린돼지의 분변으로부터 *Salmonella paratyphi*에 강한 항균활성을 나타내는 균주를 분리하여, 이 균주를 *Lactobacillus* sp. KJ-5로 동정하였다. *Lactobacillus* sp. KJ-5 배양액의 항균활성은 균주의 성장에 비례하여 증가하여 정지기에서 최대를 나타냈으며, 최적 항균활성을 위한 배양온도는 37°C로서 균주의 최적 성장온도와 동일하였다. *Lactobacillus* sp. KJ-5 배양액의 pH를 6.2로 조정할 경우 항균활성이 약간 감소하였으나, catalase 처리에 의해서는 항균활성에 아무런 영향이 없었으므로 배양중에 생성된 산이나 H₂O₂ 이외의 물질이 항균활성에 관여함을 알 수 있었다. 배양액으로부터 methanol과 acetone 추출에 의하여 *S. paratyphi*에 항균활성을 나타내는 항균물질을 부분정제하였다. 부분정제된 항균물질은 thin-layer chromatography에서 3개의 물질로 분리되었으며, 이중에 하나가 항균활성을 나타내었다. 또한 부분정제된 항균물질은 270nm에서 최대 UV 흡광도를 나타내었으며, 단백질 가수분해 효소의 처리에 의하여 완전히 불활성화 되었다. 따라서 *Lactobacillus* sp. KJ-5가 생성하는 항균물질은 저분자량의 단백질일 것으로 추정된다.

감 사

본 연구는 한국과학재단 지정 농업생물신소재 연구센터의 일부 연구비 지원에 의하여 수행되었으며, 이에 감사드립니다.

참 고 문 헌

1. C. William, H. Haines and L. G. Haramon (1973), *Appl. Microbiol.*, **25**, 436.
2. M. Raccach, R. C. Baker, J. M. Regenstien and E. J. Mulnix (1979), *J. Food Sci.*, **44**, 43.
3. 송현주, 박연희 (1992), *산업미생물학회지*, **20**, 219.
4. S. E. Gilliland and M. L. Speck (1975), *J. Food Sci.*, **40**, 903.
5. 백인기 (1989), *Kor. J. Anim. Nutr. Feed*, **13**, 175.
6. L. Blomberg, A. Henriksson and P. L. Conway (1993), *Appl. Environ. Microbiol.*, **59**, 34.
7. M. L. Johansson and G. Molin (1993), *Appl. Environ. Microbiol.*, **59**, 15.
8. G. P. Davey and B. C. Richardson (1981), *Appl. Environ. Microbiol.*, **41**, 84.
9. J. K. Zajdel, P. Ceglowski and W. T. Dobrzanski (1985), *Appl. Environ. Microbiol.*, **49**, 969.
10. S. R. Pulusani, D. R. Rao and G. R. Sunki (1979), *J. Food Sci.*, **44**, 575.
11. E. Kuhnen, H. G. Sahl and H. Brandis (1985), *J. Gen. Microbiol.*, **131**, 1925.
12. G. V. Reddy, K. M. Shahani, B. A. Friend and R. C. Chandan (1983), *Cultured Dairy Prod. J.*, **18**, 15.
13. 김동신 (1984), *대한수의학회지*, **24**, 149.
14. 강국희, 신현정, 박연희, 이택수 (1989), *한국낙농학회지*, **11**, 204.
15. 박연희, 송현주 (1991), *산업미생물학회지*, **19**, 637.
16. 조재신, 정성제, 김영목, 진역한 (1994), *산업미생물학회지*, **22**, 700.
17. D. H. Ha, D. S. Cha and S. G. Han (1994), *J. Microbiol. Biotechnol.*, **4**, 305.
18. 김상교, 이상준, 백영진, 박연희 (1994), *산업미생물학회지*, **22**, 259.
19. 김상교, 이상준, 백영진, 박연희 (1994), *산업미생물학회지*, **22**, 266.
20. H. Eyssen and De. Somer (1963), *J. Exp. Med.*, **117**, 127.
21. R. Fuller (1989), *J. Appl. Bacteriol.*, **66**, 365.
22. 백영진, 배형석 (1988), *산업미생물학회지*, **16**, 111.
23. J. C. Deman, M. Rogosa and M. E. Sharpe (1960), *J. Appl. Bacteriol.*, **23**, 13.
24. American Public Health Association (1981), *Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater*, 15th Ed.
25. H. William and S. Viencent (1989), *Theory and Application of Microbiology Assay*.
26. J. G. Cappuccino and N. Sherman (1975), *Microbiology Laboratory Manual*, Benjamin and

Cummings, CA, USA.

27. O. Kandler and N. Weiss (1984), *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology* (P. A. Sneath, Ed), Vol. 2, 1208.
28. 정영건, 안장연, 권오진, 강주희 (1989), 산업미생물학회지, 17, 94.
29. 김등양, 이형주 (1991), 산업미생물학회지, 19, 619.
30. E. B. Collins and K. Aramaki (1980), *J. Dairy Sci.*, 63, 353.
31. S. F. Barefoot and T. R. Klaenhammer (1983), *Appl. Environ. Microbiol.*, 45, 1808.
32. K. J. Kim, D. H. Ha and B. Ray (1991), *J. Microbiol. Biotechnol.*, 1, 96.
33. 유진영, 이인선, 정건섭, 남영중 (1991), 산업미생물학회지, 19, 8.