

Enterococcus faecium 19-46-4에 의한 Cholic Acid의 생산

정은영 · 김명수¹ · 이철훈² · 김병홍*

한국과학기술연구원 환경연구센터, ¹한국과학기술연구원 도핑콘트롤센터,

²제일제당(주) 종합연구소

Cholic Acid Produced by *Enterococcus faecium* 19-46-4. Eun-Young Chung, Myung-Soo Kim¹, Chul-Hoon Lee² and Byung-Hong Kim*. Environmental Research Center, Korea Institute of Science and Technology, ¹Doping Control Center, Korea Institute of Science and Technology, 39-1 Hawolgok-dong, Sungpook-ku, Seoul 136-791, Korea, ²R and D Center, Cheiljedang Co. 522-1, Dokpyong-Ri, Majang-Myun, Ichon-Si, Kyonggi-do 467-810, Korea - A facultative anaerobe *Enterococcus faecium* 19-46-4 was used to study the production of an antimicrobial substance in anaerobic conditions. Major part of the antibiotic activity was found in the culture filtrate of the bacterium. The active compound was extracted by an equal volume of iso-butanol and concentrated in vacuo (at 50°C) before purification by C-18 liguid column chromatography and HPLC. A chromatographically pure compound was obtained by two passages of HPLC columns, The compound appeared as a pale-yellow powder. The yield was about 2.5 mg l⁻¹ culture filtrate. The compound was named as KIST 194. KIST 194 were identified as cholic acid (3 α , 7 α , 12 α -trihydroxy-5 β -cholan 24-oic acid) based on its physico-chemical properties determined by UV, IR, ¹H-NMR, ¹³C-NMR, EI-MS and LC-MS.

Penicillin이 발견된 이후 호기성 미생물에서 많은 종류의 항생물질이 발견되어 의약용을 비롯하여 다양한 용도로 이용되고 있다. 지금까지 알려진 대부분의 항생물질에 대한 내성균이 출현함에 따라 신규 항생물질을 개발해야 할 필요성이 높다. 혐기성 대사에서 발생하는 ATP의 수율이 호기성 대사에 비해 낮기 때문에 혐기성 미생물에 의한 이차 대사 산물의 생산성이 낮을 것이라는 점과 혐기성 미생물의 분리 배양이 까다롭기 때문에 항생물질 탐색에 혐기성 미생물이 많이 연구되지 않았다. 활성물질 탐색에서 제외되었던 혐기성 미생물을 대상으로 할 경우 보다 새로운 생체활성물질을 발견할 수 있는 가능성이 높다고 판단되고 있다(1).

Clostridium 속, 젖산균(lactic acid bacteria) 등 여러 종류의 혐기성 미생물에서 항 세균성이 있는 peptide인 bacteriocin이 많이 알려지고 있다(2). Clostridia의 bacteriocin인 boticin, perfringocin, butyricin 등은 활성 spectrum이 매우 좁아 *Clostridium* 속의 다른 species나 일부의 그람 양성 세균에 대해서만 항균활성을 나타낸다(3). 식품의 보존제로 이용되는 nisin(4) 외에도 젖산균이 생산하는 bacteriocin으로 *Lactobacillus acidophilus*의 acidolin 등이 많이 알려지고 있다(5-11).

젖산균의 일종인 *Enterococcus faecium*에서도 bacteriocin의 생산이 보고되었다. Janda(12)는 *E. faecium*이 항 미생물성 화합물을 생산하여 *Plesiomonas shigelloides*의 생육을 저해한다고 하였고, Laukova(13)는 *E. faecium*이 bacteriocin과 유사한 물질을 생산하여 rumen

bacteria의 생육을 저해한다고 보고하였다. Kramer와 Kenes(14)도 *E. faecium*이 bacteriocin을 생산한다고 하였고, Cavallo 등(15)은 *E. faecium* SF 68이 병원성 장내세균에 대해 길항작용을 보인다고 보고하였다. Aymerich(16) 등은 *E. faecium*에서 enterocin A라는 새로운 antilisterial bacteriocin을 분리하고, enterocin A가 *Lactobacillus*, *Pediococcus*, *Leuconostoc*, *Carnobacterium* 속의 젖산균에서 분리한 pediocin 계열의 bacteriocin과 매우 유사하다고 보고하였다.

본 연구에서는 본 연구실에서 토양으로부터 강한 항균 활성을 보이는 균주를 선별하는 일련의 실험(17)에서 비교적 활성이 강한 젖산균 *Enterococcus faecium* 19-46-4이 생산하는 항 세균성 물질이 peptide 계통이 아닌 것으로 판단하여 이 항균성 물질을 정제하여 그 이화학적 특성을 조사하여 구조를 결정하였다.

재료 및 방법

균주 및 배양

토양에서 분리하여 본 연구실에서 분리, 동정한 *Enterococcus faecium* 19-46-4를 사용하였다(17). Table 1의 조성으로 만든 C-SPY 배지를 serum vial(Wheaton Co., NJ, USA)이나 anaerobic pressure tube(Bellco Glass Co., NJ, USA)에 혐기적 (17)으로 만들어 사용하였다.

대량 배양

C-SPY 배지를 10 l로 채운 13 l carboy를 121°C에서 30분간 멸균한 다음 filter를 통하여 질소가스로 계속 치환하면서 냉각시켰다. *E. faecium* 19-46-4의 2일간

*Corresponding author.

Key words: *Enterococcus faecium*, cholic acid, antibacterial substances, lactic acid bacteria

Table 1. Composition of the modified C-SPY medium used for the antibiotic production by strain 19-46-4

Components	Quantities
Bacto-peptone	15.0 g
Yeast extract	10.0 g
Glucose	4.0 g
Soluble starch	1.0 g
Maltose	1.0 g
MOPS	10.0 g
Lactose	1.0 g
K ₂ HPO ₄	1.0 g
NH ₄ Cl	0.5 g
Salt soln II*	1.0 ml
Cysteine-HCl	0.5 g
Vitamin soln**	1.0 ml
D.W up to 1 l	Adjust pH to 7.2

*Salt solution II: nitrilotriacetic acid 1.5 g, FeSO₄·7H₂O 0.1 g, MnCl₂·H₂O 0.1 g, CoCl₂·6H₂O 0.17 g, ZnCl₂ 0.1 g, CaCl₂·2H₂O 0.1 g, H₃BO₃ 0.01 g, Na₂MoO₄ 0.01 g, Na₂SeO₃ 0.017 g, NiSO₄·6H₂O 0.026 g and NaCl 1.0 g per 1 liter distilled water.

**Vitamin solution: biotin 0.002 g, folic acid 0.002 g, pyrimidine-HCl 0.01 g, thiamine HCl 0.005 g, riboflavin 0.005 g, nicotinic acid 0.005 g, pantothenic acid 0.005 g, cyanocobalamin 0.0001 g, p-aminobenzoic acid 0.005 g and lipoic acid 0.005 g per 1 liter distilled water.

배양한 전 배양액을 5% 접종하고 35°C에서 5일간 배양하였다. 이 때 산소의 영향을 보기 위한 실험에서는 냉각 중에 질소 대신 공기를 주입하였으며, 배양 중에는 공기를 공급하지 않았다.

항미생물 활성 측정

그람 양성 세균, 그람 음성 세균, 식물병원성 곰팡이균 등(17)을 검정균(Table 2)으로 사용하여 paper disc법으로 항균 활성을 측정하여 clear zone 크기(mm)로 나타내었다. 항 미생물성 물질의 활성 검색을 위해 세균은 LB 고체 배지(증류수 1l중 tryptone 10 g, yeast extract 5 g, NaCl 5 g, 한천 15 g 함유), 곰팡이는 PS 고체 배지(증류수 1l중 potato starch 20 g, sucrose 30 g, yeast extract 1 g, peptone 1 g, 한천 20 g 함유, pH 6.5)를 준비한 후 검정균주의 배양액을 섞어 항생물질 활성 측정용 평판배지를 만들었다. 항균물질의 정제과정 중 활성 물질은 *Escherichia coli* BE1186을 검정균으로 활성을 측정하여 추적하였다.

항생물질의 정제

배양 상등액 40l를 동량의 iso-butanol로 3번 반복 추출한 다음 감압으로 약 3.5l 정도로 농축하였다. 여기에 증류수를 가하여 현탁액을 만들고 계속 농축하면서 용매를 완전히 제거하였다. 용매를 완전히 제거한

Table 2. Antimicrobial spectrum of the partial purified compound of Enterococcus faecium 19-46-4

Test organism	Inhibition diameter (mm)
<i>Alternaria mali</i> IFO 8984	0
<i>Bacillus subtilis</i>	11.5
<i>Botryosphaeria dothydea</i>	15
<i>Escherichia coli</i> AB	0
<i>Escherichia coli</i> BE	20
<i>Fusarium solani</i>	0
<i>Mycobacterium phlei</i>	17.4
<i>Penicillium chrysogenum</i>	11
<i>Phytophthora paracitica</i>	0
<i>Salmonella typhrium</i>	25
<i>Staphylococcus aureus</i> R-209	11

Test organisms are described in ref. (18)

현탁액을 Lichroprep RP-18(3.9×33 cm, particle size 40~63 μm) column에 load 하여 증류수로 충분히 세척한 다음 40~100% methanol로 용출, 활성이 있는 85% methanol 용출액을 모았다. 활성분획은 preparative HPLC 용 역상 Waters RCM column(2.5×20 cm)을 사용하여 분리하였다. 용출액은 gradient maker를 이용하여 5~100%의 acetonitrile 용액을 만들어 20 ml/min 속도로 사용 하였다. 용출액의 흡광도를 224 nm에서 측정하고 항균 활성이 있는 분획을 모았다. 1차 HPLC로 정제한 활성분획을 Waters C-18 Bondapak column(7.8×300 mm)을 사용하여 35% acetonitrile을 4 ml/min의 속도로 용출하면서 210 nm의 흡광도를 측정하여 활성분획을 모아 감압농축하여 최종적으로 엷은 황색의 시료를 얻었다. 정제의 상세한 과정을 Fig.1에 도식하였다.

이화학적 특성조사 및 구조 결정

용해도 정제된 물질의 methanol, ethanol, acetone, benzene, ether, chloroform 등에 대한 용해도를 조사 하였다.

TLC R_f Value 및 발색반응 n-hexane : n-propanol(1 : 1)과 methanol : n-butanol(2 : 3)의 전개 용매와 silica gel plate(E. Merck Co., Darmstadt, Germany)를 이용하여 정제된 물질을 전개하여 R_f 값을 측정하였다. 정제된 물질의 화학적 특성을 조사하기 위해 TLC로 전개한 다음 여러 종류의 시약(Table 3)을 골고루 분무하여 발색 여부를 관찰하였다.

구조 규명을 위한 기기분석 UV spectrum은 분리된 항생물질인 KIST 194를 methanol에 녹여 Beckman DU-7(Berchman Co., San Diego, USA)로 측정하였으며, IR spectrum은 Bruker IFS 120HR(Bruker Inc., Billerica, USA)를 사용하여 KBr pellet 형태로 측정하

였다. 분자량결정은 EI-MS(Hewlett-Parkard Co., CA, USA)와 LC-MS(Hewlett-Parkard Co., CA, USA)를 사용하여 조사하였고, $^1\text{H-NMR}$ spectrum과 $^{13}\text{C-NMR}$ spectrum은 Varian 600 MHz NMR(Varian Co., CA, USA)를 사용하였는데, 이때 표준물질은 3-trimethylsilyl-propanesulfonic acid sodium salt을 사용하였고

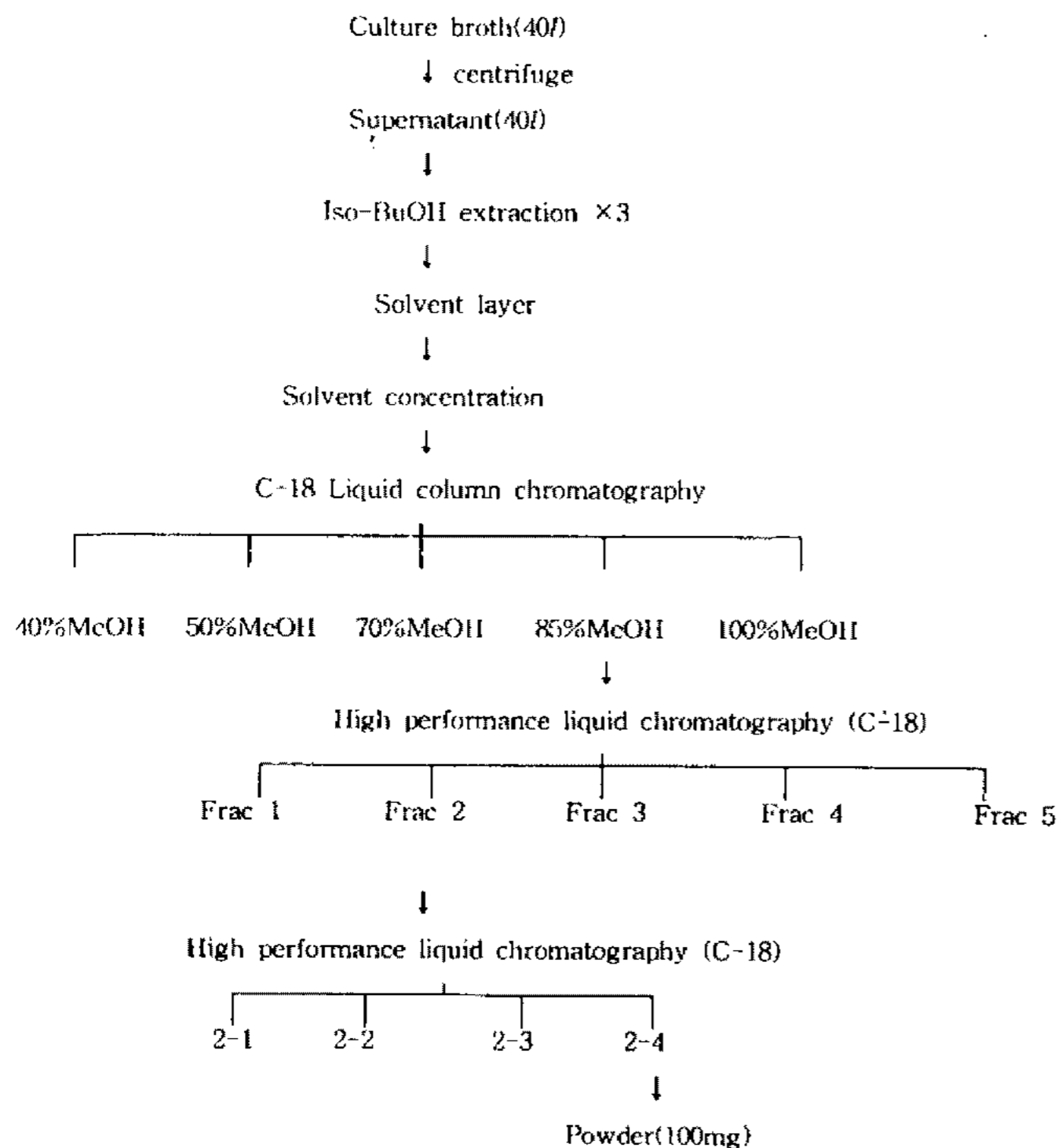


Fig. 1. Purification procedure of antibiotic compound, KIST 194.

Table 3. Physico-chemical properties of the KIST 194 produced by *Enterococcus faecium* 19-46-4

Appearance	Pale-yellow powder
Solubility	
Soluble	Methanol & ethanol
Slightly Soluble	Acetone
Insoluble	Benzene, ether, chloroform & water
R_f value	
<i>n</i> -hexane : <i>n</i> -propanol (1 : 1)	0.16
methanol : <i>n</i> -butanol (2 : 3)	0.61
Melting point	198°C
$[\alpha]_D^{20}$	+35.65 (C 0.6, EtOH)
Color reaction	
Positive	10~20% H_2SO_4 Anisaldehyde- H_2SO_4
Negative	Ninhydrin, aniline phthalate Ferric chloride, rhodamine B

deuterated methanol(CD_3OD)를 용매로 하여 측정하였다. 고유 광회전도 측정은 autopol III automatic polarimeter(Jasco Co., Tokyo, Japan)를 사용하여 조사하였다.

결과 및 고찰

항생물질의 생산

E. faecium 19-46-4를 C-SPY 배지에서 혐기적 조건과 공기에 노출된 조건에서 배양하면서 측정된 균의 생육, *Escherichia coli* BE1186에 대한 항균활성의 변화를 Fig. 2에 나타내었다. 초기 용존 산소를 제거하지 않고 배양한 실험에서도 세균의 생장은 혐기 상태에서와 비슷하였으나, 항균 활성은 혐기적 조건에서 배양할 때에만 생산되었다. 혐기적 배양에서 항균활성은 배양 120시간에 최고 치에 달하였다. 배지의 pH는 배양 1일만에 pH 5.2로 떨어진 후 거의 일정하게 유지되는 양상을 보였다. 항균 활성이 균의 생육이 끝난 다음에도 계속 증가하는 것으로 보아 이차 대사 산물로 생각된다. *E. faecium*는 내기성의 편성 혐기성 세균으로 산소를 전자수용체로 이용하지 못하지만 이에 대한 내성을 갖는다. 산소가 이차 대사 산물인 항균 활성 물질의 생산을 저해하는 기작은 알 수 없으나, 유제품, 포유동물의 장내 등 영양이 풍부한 혐기 생태계에서 다른 세균의 생장을 억제하는 역할이 있을 것으로 판단할 수 있다. 항생물질 생산을 목적으로 *E. faecium* 19-46-4를 5일 동안 배양하는 것이 가장 좋다고 판단되었다.

항균 spectrum

배양 상등액을 *iso*-butanol로 추출하여 35배로 농축한 시료의 항균활성 스펙트럼을 조사한 결과를 Table 2로 표시하였다. 이 균이 생산하는 항생물질은 그람 양성

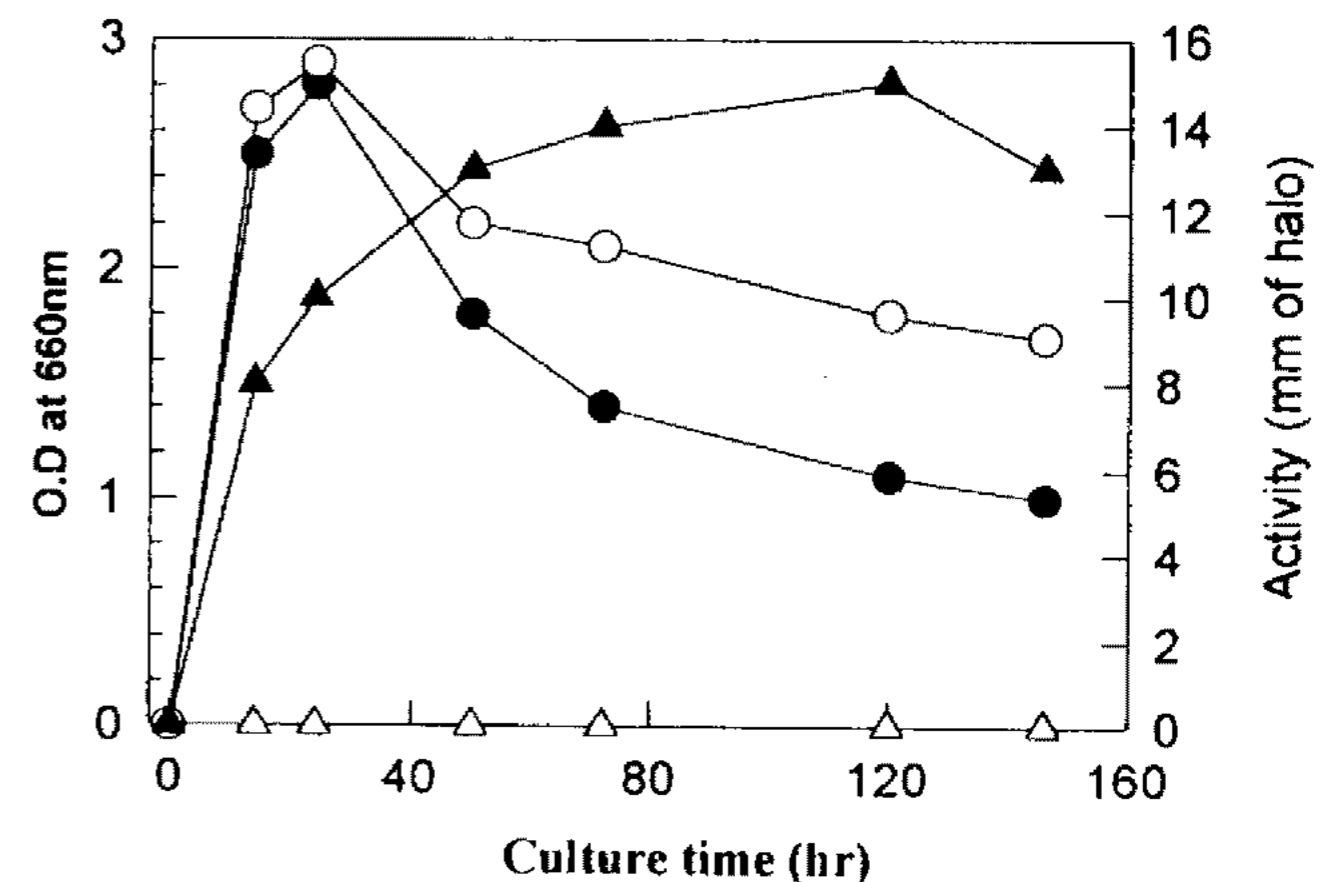


Fig. 2. Growth and antibiotic production of *E. faecium* 19-46-4 isolated from soil. Activity was tested by using *E. coli* BE 1186 as test microorganism

aerobic cultivation: ○ growth △ antibiotic activity
anaerobic cultivation: ● growth ▲ antibiotic activity

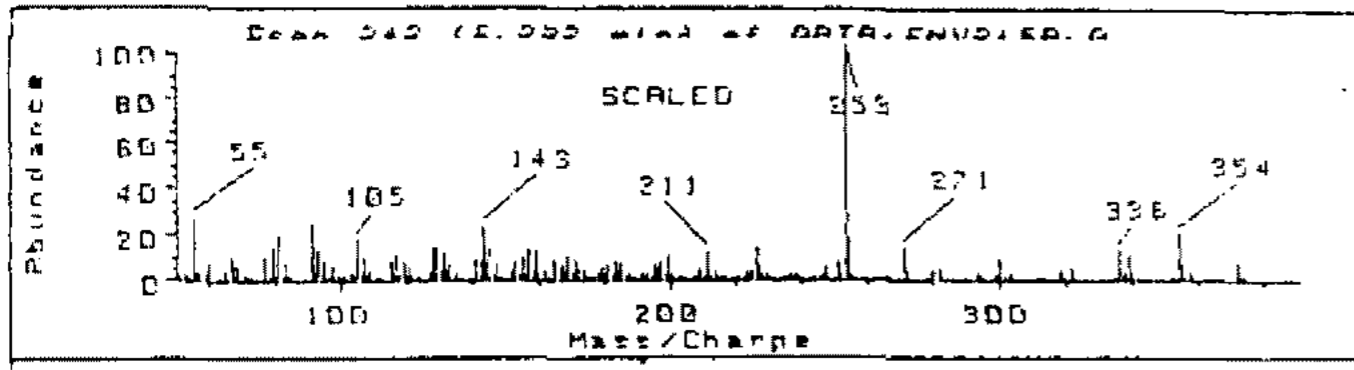


Fig. 3. EI-mass spectrum of the compound, KIST 194.

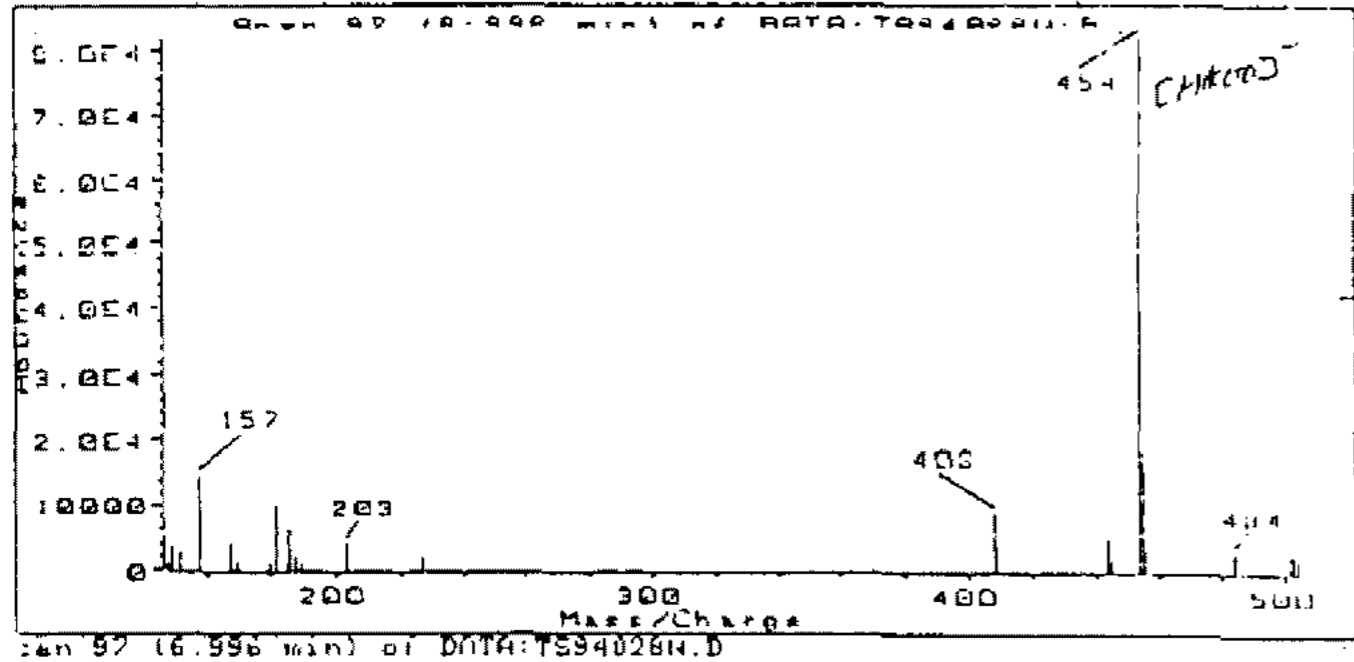


Fig. 4. LC-mass spectrum of the compound, KIST 194.

세균과 그람 음성 세균에 광범위한 활성이 있으며, 주로 그람 양성 세균보다는 그람 음성 세균에 항균활성이 더 강하게 나타났고, 또한 진핵세포인 곰팡이에도 작용을 하는 것을 알 수 있었다.

항생물질의 정제

40l의 배양 상등액을 Fig. 1과 같은 정제과정을 거쳐 최종적으로 물질을 순수분리하여 약 100 mg의 옅은 황색의 분말로 정제된 것을 KIST 194로 명명하였다.

구조결정

항균물질 KIST 194에 대한 이화학적 특성은 Table 3에 나타난 바와 같이 미황색의 분말로 melting point는 198°C였으며, UV 225.1 nm, 276.9 nm에서 흡수과장을 보였다. Methanol과 ethanol에 잘 용해되며, benzene, ether, chloroform, water에는 거의 용해되지 않았다. TLC 발색반응에서 ninhydrin 반응과 aniline phthalate 반응에서 음성을 나타내어 아미노기 또는 이미노기가 없음을 확인할 수 있었고, 10~20% H₂SO₄ 반응에서 양성을 나타내어 유기 화합물이며, anisaldehyde-H₂SO₄ 반응에서 양성을 나타내어 steroid 계통의 물질임을 시사하였다. 전개용매 methanol : n-butanol(2 : 3)의 전개 용매에서 R_f치가 0.61을 나타내므로 극성기를 갖는 물질임을 시사해 주었다. Fig. 3과 Fig. 4의 mass spectrum으로부터 base peak는 253, molecular ion peak는 408임을 확인하였다. KIST 194의 IR spectrum은 Fig. 5와 같으며 3429 cm⁻¹의 peak는 -OH bond를 보여주며, 2939 cm⁻¹, 2868 cm⁻¹의 peak는 CH₃, CH₂ bond, 1709 cm⁻¹의 peak는 C=O group의 존재를 알 수 있었다. 1375~1042 cm⁻¹은 finger print 지역으로 명확한 관능

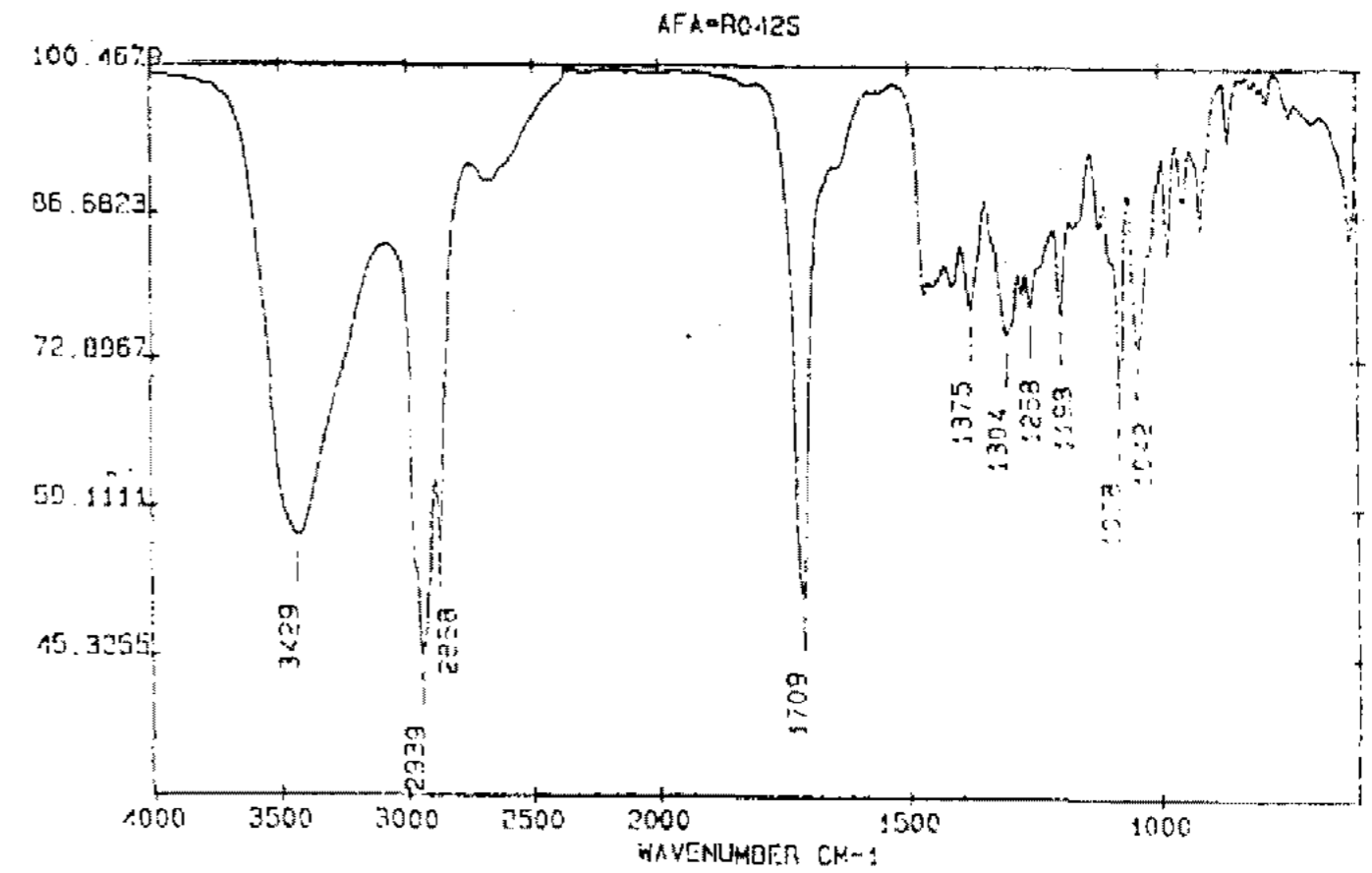


Fig. 5. IR spectrum of the compound, KIST 194.

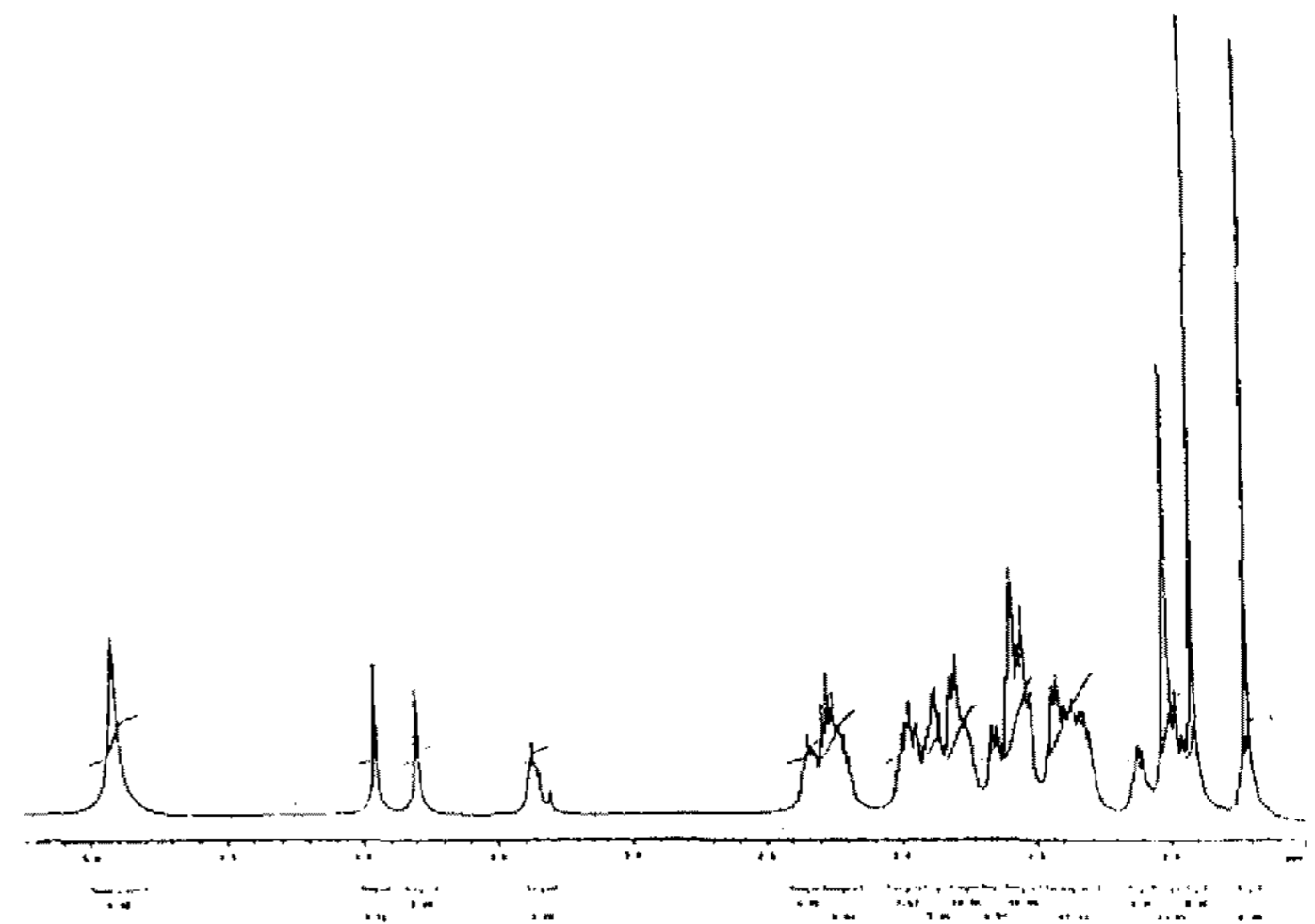


Fig. 6. ¹H-NMR spectrum of the compound, KIST 194.

기의 존재는 확인할 수 없었다.

¹H-NMR의 spectrum은 Fig. 6과 같으며, 0.4 ppm은 18번 탄소의 CH₃, 0.9 ppm은 19번 탄소의 CH₃, 1~2.5 ppm은 methylene과 methine, 3.4 ppm은 3번 탄소, 3.8 ppm은 7번 탄소, 3.95 ppm은 12번 탄소의 proton으로 각각 추정되었다. Fig. 7에 나타난 ¹³C-NMR spectrum 상에서는 KIST 194의 분자의 탄소 수가 24개임을 알 수 있었다. 14 ppm은 18번 탄소, 18 ppm은 21번 탄소, 24 ppm은 19번 탄소, 25 ppm은 15번 탄소, 28 ppm은 9번 탄소, 29 ppm은 16번 탄소, 30 ppm은 11번 탄소, 32 ppm은 2번 탄소, 33 ppm은 23번과 22번 탄소, 37 ppm은 6번 탄소, 38 ppm은 1번과 20번 탄소, 41 ppm은 4번과 8번 탄소, 43 ppm은 5번과 14번 탄소, 49 ppm은 13과 17번 탄소, 70 ppm은 7번 탄소, 73 ppm은 3번 탄소, 74 ppm은 12번 탄소를 표기하였고, 120~140 ppm은 peak가 없으므로 double bond가 없음을 나타내며, 180 ppm은 24번 탄소를 나타내는 것으로 동정되었다.

이상에서 열거한 이화학적 특성 및 기기분석 결과

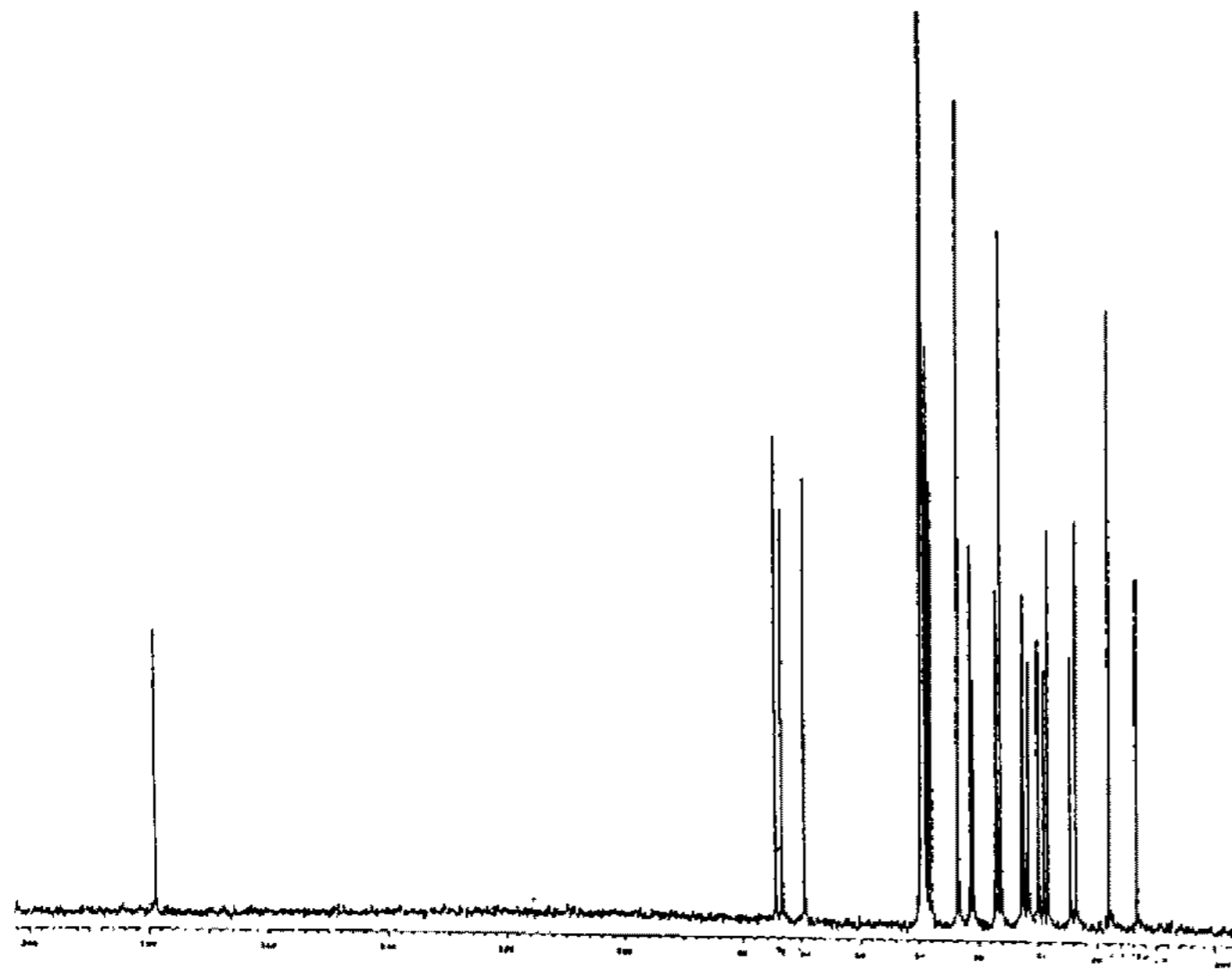


Fig. 7. ^{13}C -NMR spectrum of the compound, KIST 194.

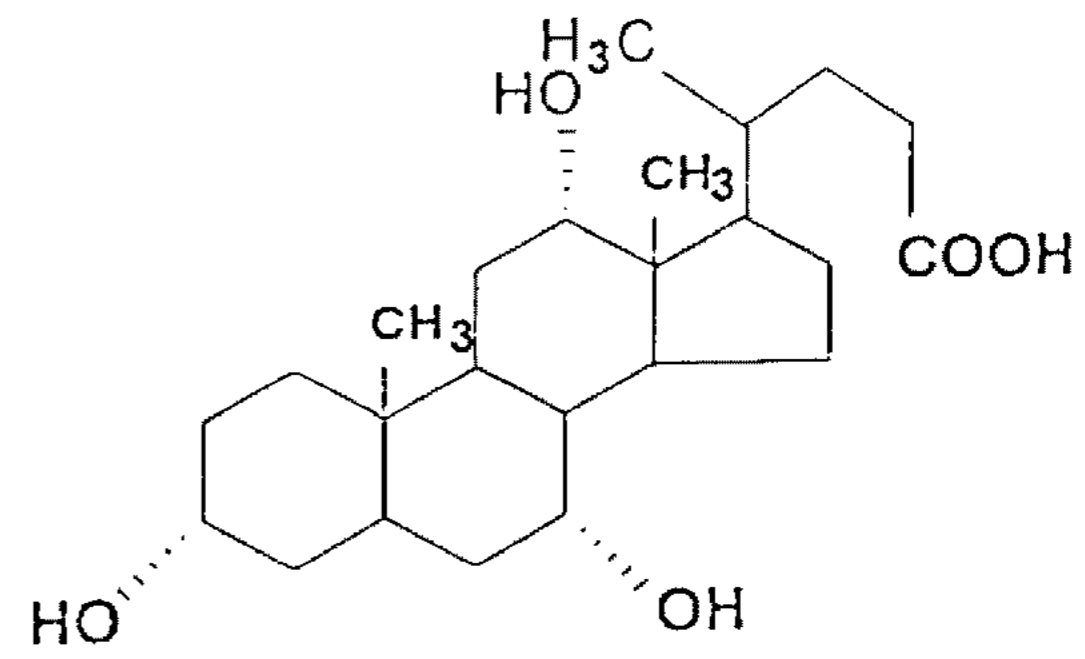


Fig. 8. Structure of cholic acid.

정제된 cholic acid가 배지 성분으로 공급된 것이 직접 또는 다른 steroid계 화합물이 세균에 의해 전환된 것으로 생각되지 않는다.

요 약

항균활성을 갖는 혐기성 미생물에 대한 탐색연구에서 항균활성이 강한 *Enterococcus faecium* 19-46-4를 선발하여 혐기적 배양으로 이 균주가 생산하는 항생물질의 분리, 정제 및 이화학적 특성 및 구조분석을 행하였다. 40l 균배양액으로부터 iso-butanol extraction, C-18 liquid column chromatography, HPLC등을 통해 약 100 mg의 항균물질을 분리정제하여 KIST 194로 명명하였고. KIST 194를 UV, IR, ^1H -NMR, ^{13}C -NMR, EI-MS와 LC-MS 등의 기기분석을 한 결과 cholic acid(3 α , 7 α , 12 α -trihydroxy-5 β -cholan 24-oic acid)로 동정하였다.

참고문헌

1. Bull, A.T., D.C. Ellwood and C. Ratledge. 1979. The changing scene in microbial technology. Pp. 1-28. In A.T. Bull, D.C. Ellwood and C. Ratledge (eds.), *Microbial Technology: Current state, future prospects*. Cambridge University Press, Cambridge.
2. Lindgren, S.E. and W.J. Dobrogosz. 1990. Antagonistic activities of lactic acid bacteria in food and feed fermentations. *FEMS. Microbiol. Rev.* **87**: 149-154.
3. Mahony, D.E., M.E. Butler, and R.G. Lewis. 1971. Bacteriocins of *Clostridium perfringens*. 2. Studies on mode of action. *Can. J. Microbiol.* **17**: 1435-1442.
4. Stevens, K.A., B.W. Sheldon, N.A. Klapes, and T.R. Klaenhammer. 1991. Nisin treatment for inactivation of *Salmonella* species and other gram (-) bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* **57**: 3613-3615.
5. Hamdan, I.Y. and E.M. Mikolajcik. 1974. Acidolin, An antibiotic produced by *Lactobacillus acidophilus*. *J. Antibiot.* **27**: 631-636.
6. Barefoot, S.F. and T.R. Klaenhammer. 1983. Detection and activity of lactin B, a bacteriocin produced by *Lactobacillus acidophilus*. *Appl. Environ. Microbiol.* **45**:

들을 종합하여 볼 때, KIST 194는 $\text{C}_{24}\text{H}_{40}\text{O}_5$ 화학식을 가지는 분자량이 408.56인 cholic acid(3 α , 7 α , 12 α -Trihydroxy-5 β -cholan 24-oic acid)로 동정하였고 Fig. 8에 그 구조를 나타내었다. 항균물질 KIST 194가 cholic acid임을 확인하기 위해 고유 광회전도를 측정된 결과 정제 시료가 $[\alpha]_D^{20} = +35.65$ (C 0.6, EtOH)이고, 표준 시료로 구입한 cholic acid(Fluka Co., Buchs, Switzerland)는 $[\alpha]_D^{20} = +38.48$ (C 0.6, EtOH)이었다. 토양에서 분리한 항균물질 KIST 194는 OH기들이 β 형이 아닌 α 형으로 cholic acid(3 α , 7 α , 12 α -Trihydroxy-5 β -cholan 24-oic acid)와 동일한 물질로 판정할 수 있었다. Cholic acid는 담즙산의 구성성분으로 콜레스테롤로부터 간에서 합성되는 물질로 알려져 있는데(19), 지금까지 알려진 cholic acid의 생산은 미생물에서 합성되어 생산되기보다는 고등동물의 체내에 존재하는 결합된 형태의 담즙산이 장내세균에 의해 생물변환되어 생산된다고 알려져 있다(20).

토양에서 분리한 *E. faecium* 19-46-4가 생산하는 항균물질 KIST 194는 생산 균주와 관련이 없는 그람 양성, 음성 세균과 곰팡이에 대해 항균활성을 나타내며 Kramer와 Kenes(14)가 보고한 *E. faecium*이 생산하는 bacteriocin과 Aymerich(16) 등이 최근에 연구한 *E. faecium*이 생산하는 enterocin A와 비교하여 지금까지 알려진 기존의 bacteriocin과는 다른 물질인 cholic acid임을 확인할 수 있었다. 또한 *E. faecium* 19-46-4가 호기적 배양시는 생산되지 않고 혐기적 배양시만 생산되는 항균성의 cholic acid에 대한 연구로 cholic acid가 미생물에서 생산됨을 처음 확인하였기에 의의가 있다고 판단된다. 배양에 사용한 배지 성분에서 steroid 계통의 화합물을 함유하는 성분은 yeast extract 뿐이다. 효모 균체에서 알려진 steroid계 화합물은 ergosterol로 그 양이 극히 적으며, 수용성도 낮아 본 연구에서 분리

- 1808-1815.
7. Harris, L.J., M.A. Daeschel, M.E. Stiles, and T.R. Klaenhammer. 1989. Antimicrobial activity of lactic acid bacteria against *Listeria monocytogenes*. *J. Food Prot.* **52**: 384-387.
 8. Hardie, J.M. 1986. Genus *Streptococcus*. Pp. 1043-1068. In Sneath, P.A., Mair, N.S., Sharpe, M.E. and Holt, J.G. (eds), *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, Vol. 2, Williams and Wilkins Co., Baltimore.
 9. Piard, J.C., P.M. Muriana, M.J. Desmazeaud, and T.R. Klaenhammer. 1992. Purification and partial characterization of Lacticin 481, a lanthionine-containing bacteriocin produced by *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* CNRZ 481. *Appl. Environ. Microbiol.* **58**: 279-284.
 10. Lewis, 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.
 11. Paik, H.D. and D.W. Oh. 1996. Purification, characterization, and comparison of bacteriocins. *J. Microbiol. Biotechnol.* **6**: 151-161.
 12. Janda, J.M. 1987. Effect of acidity and antimicrobial agent-like compounds on viability of *Plesiomonas shigelloides*. *J. Clin. Microbiol.* **25**: 1213-1215.
 13. Laukova, A. 1993. Antagonistic activity of the rumen bacteria, *Enterococcus faecium* and *Staphylococcus warneri*. *Vet. Med. Praha.* **38**: 267-274.
 14. Kramer, J., J. Keness, and H. Brandis. 1983. Transfer of a miniplasmid determining bacteriocin production and bacteriocin immunity in *Streptococcus faecium*. *FEMS Microbiol. Lett.* **20**: 385-389.
 15. Cavallo, G., P. Martinetto, M.R. Gismondo, G. Chisari, and G. Nicoletti. 1990. Mixed culture of *Enterococcus faecium* SF 68 with pathogenic intestinal bacterial strains. *G. Bacteriol. Virol. Immunol.* **83**: 150-155.
 16. Aymerich, T., H. Holo, L.S. Havarstein, M. Hugas, M. Garriga, and I.F. Nes. 1996. Biochemical and genetic characterization of enterocin A from *Enterococcus faecium*, a new antilisterial bacteriocin in the pediocin family of bacteriocins. *Appl. Environ. Microbiol.* **62**: 1676-1682.
 17. 정은영, 김병홍. 1996. 항생물질을 생산하는 혐기성 세균의 탐색. *한국산업미생물학회지* **24**: 636-639.
 18. 이인경. 1989. 한국에서 분리한 *Streptomyces parvullus*의 균주 특성 및 항고추역 병성 항생물질에 관한 연구. 서울여자대학교 석사학위 논문.
 19. Bateup, J.M., M.A. McConnell, H.F. Jenkinson, and G.W. Tannock. 1995. Comparison of *Lactobacillus* strains with respect to bile salt hydrolase activity, colonization of the gastrointestinal tract, and growth rate of the murine host. *Appl. Environ. Microbiol.* **61**: 1147-1149.
 20. Feighner, S.D. and M.P. Dashkevicz. 1987. Subtherapeutic levels of antibiotics in poultry feeds and their effects on weight gain, feed efficiency, and bacterial cholytaurine hydrolase activity. *Appl. Environ. Microbiol.* **53**: 331-336.

(Received 5 September 1996)