J. Fd Hyg. Safety 20(4), 211-216 (2005)

메주에서 분리된 *Enterococcus faecium* MJ-14가 생산하는 박테리오신의 부분정제

이종갑 · 이군자 · 임성미†
동명대학 호텔조리과

Partial Purification of Bacteriocin Produced by *Enterococcus faecium* MJ-14 Isolated from *Meju*

Jong-Gab Lee, Goon-Ja Lee, and Sung-Mee Lim†
Department of Hotel Culinary Arts, Tongmyong College, Busan 608-740, Korea
(Received August 12, 2005; Accepted November 30, 2005)

ABSTRACT – The bacteriocin produced by *E. faecium* MJ-14 was precipitated with 50% saturated ammonium sulfate in MRS broth and then the precipitated protein was dissolved in 20 mM sodium phosphate buffer (pH 6.0). The crude bacteriocin was purified by CM-sepharose CL 6B and Sephacryl S-100 column chromatography. In this case, the purification fold of the bacteriocin was 114, therefore, its activity was 127,293 BU/mg of specific activity. Result from SDS-PAGE of the purified bacteriocin, it was obtained two protein bands of 4.3 kDa and 5.8 kDa having antilisterial activity.

Key words: *Enterococcus faecium* MJ-14, bacteriocin, purification

유산균이 생산하는 박테리오신의 항균 기작은 균체 표면에 있는 특이적인 수용체에 흡착한 후 세포막에 침투하여 세포의 DNA나 리보솜을 파괴함으로써 세균을 사멸시킨다. 또한 박테리오신 분자가 transmembrane helix를 형성하여 세포막의 수송단백질과 결합함으로써 단백질 분자의 기질 특이성을 파괴하거나 세포내 주요 성분을 유출시켜 세포의 에너지 대사와 생리적 기능 상실을 초래한다[1-4]. 박테리오신의 항균 범위는 매우 광범위하여 부패균 · 식중독균 · 전염병균이나 포자형성균 및 충치원인균의 증식을 억제하거나 사멸시키고, 또한 치즈 제조 시에 *La. buchneri*에 의한 histamine의 과도한 생성을 억제하는 것에도 효과적인 것으로 보고되고 있다[5-9].

항생제와는 달리 박테리오신은 단백질로 구성되어 있기 때문에 소화기관 내에서 단백질 가수분해 효소에 의해 쉽게 분해되어 인체에 무독성이고 잔류성도 없다. 또한 항생제는 2차 대사산물인데 반하여 박테리오신은 자신의 유전자로부터 직접 생합성 되므로 분자생물공학적으로 응용이 가능하다. 1970년대 lactacin F에 대한 연구를 시작으로 유산균의 박테리오신에 관한 연구는 활발하게 이루어지고 있으며, 새로운 박테리오신의 검색, 유전자 구조와 표현 및 조절 기작 규명, 특정 아미노산 잔기를 다른 아미노산으로 치환하여 변종의 박테리오신을 생산하고 박테리오신의 대량 생산 기술을 개발하는 등 산업적 적용에 관한 연구가 계속적으로 이루어지고 있다[10,11].

박테리오신은 다양한 분자량과 생화학적 특성을 나타내므로 박테리오신의 종류에 따라 황산암모늄 침전법, 겔 여과, 이온 교환 크로마토그래피, 소수성 작용 크로마토그래피 및 역상 HPLC 등을 이용하여 박테리오신을 정제하는 것으로 보고되고 있다. 한편 pediocin AcH, nisin, sakacin A 및 leuconocin 등은 pH 6.0~6.5에 맞추어 박테리오신을 생산균주의 세포 표면에 흡착시킨 후 pH 2.0로 낮추어 흡착된 박테리오신을 선택적으로 분리할 수 있으며, 그 외에도 등전점을 이용하거나 면역친화성 크로마토그래피를 이용하여 분리하는 방법도 알려져 있다[12].

본 연구에서는 전통 발효식품의 원료인 메주로부터 분리한 *Enterococcus faecium* MJ-14가 생산하는 박테리오신을 황산암모늄 침전법, 이온 교환 크로마토그래피, 겔 크로마토그래피 및 SDS-PAGE를 이용하여 정제한 후 박테리오신의 분자량을 측정하고자 한다.

†Author to whom correspondence should be addressed.

재료 및 방법

박테리오신 생산 균주의 배양

전보[13]에서 보고된 바와 같이 메주에서 분리한 *E. faecium* MJ-14 균주의 전 배양액을 MRS 액체배지에 접종하여 37°C에서 12시간 동안 본 배양한 후, 원심분리 (10,000 rpm, 20 min, 4°C)하여 얻어진 배양 상등액은 1 N NaOH를 사용하여 pH 7.0으로 조정한 후에 membrane filter (0.45 μm pore size)로 여과한 것을 정제 시료로 사용하였다.

박테리오신의 활성 측정

전보[13]에서 보고된 바와 같이 박테리오신 용액의 항균 활성은 critical dilution method로 측정하였다. 즉, 정제된 박테리오신 용액은 2진법으로 희석한 후 50 μL씩 paper disk (Toyo, ø 8 mm)에 loading하였다. Paper disk는 *L. monocytogenes* KCTC 3569 배양액 100 μL(약 107 CFU/mL)가 접종된 BHI 평판배지 위에 중층한 뒤 37°C에서 18시간 배양하여 paper disk 주위에 저해환을 생성한 최대 희석배수의 역수에 20을 곱한 값을 bacteriocin unit (BU)/mL로 표시하였다.

황산암모늄 침전법

배양 상등액 2 L에 50% 농도의 황산암모늄을 천천히 교반하면서 첨가하여 4°C에서 12시간 염석한 후, 원심분리 (10,000 rpm, 20 min, 4°C)하였다. 침전물만을 회수하여 20 mM sodium phosphate buffer (pH 6.0) 200 mL에 현탁하고 spectra-por dialysis membrane (molecular weight cut-off, 1,000; Spectrum Medical Industries, Inc., CAL, USA)에 넣어 4°C에서 동일한 buffer로 12시간 동안 투석시켜 항균 활성을 확인하였다.

이온교환 크로마토그래피

황산암모늄 염석한 조박테리오신 용액을 양이온 교환수지인 carboxy-methyl sepharose CL-6B (CM-Sepharose CL-6B, Pharmacia Biotech., Uppsala, Sweden)을 사용하여 1차 정제를 시도하였다. 즉, 20 mM Na-phosphate buffer (pH 6.0)로 평형화 시킨 CM sepharose CL-6B column (1.6 × 23 cm)에 조박테리오신 용액 4 mL를 주입하고 1 M Na-phosphate buffer (pH 6.0)를 사용하여 linear salt gradient 방법으로 수지에 흡착된 단백질을 용출시켰다. 이때, 유속은 24 mL/hr 이었으며, 용출액은 4.5 mL씩 분획하여 214 nm에서의 흡광도를 측정하고 단백질 획분을 모아 항균 활성을 확인하였다.

겔 크로마토그래피

이온교환 크로마토그래피에서 얻어진 활성 분획물 2 mL를 20 mM Na-phosphate buffer (pH 6.0)로 평형화시킨 HiPrep 16/60 Sephacryl S-100 column (2.6 × 60cm, Pharmacia, Sweden)으로 2차 정제를 시도하였다. 즉, 150 mM Na-phosphate buffer (pH 6.0)를 사용하여 12 mL/hr 유속으로 용출시켜 5 mL씩 분획하였다. 214 nm에서 흡광도와 항균 활성을 조사하여 활성 획분을 확인하였다.

SDS-PAGE

CM sepharose CL-6B와 HiPrep 16/60 Sephacryl S-100에 의해 정제한 박테리오신 분획물의 정제도를 확인하기 위하여 Laemmli[14]의 방법을 일부 변형하여 Mini-PROTEIN II electrophoresis system (Bio-Rad Laboratories, Inc., Hercules, USA)으로 전기영동을 실시하였다.

정제한 박테리오신 용액 50 μL와 sample buffer 50 μL을 혼합하고 95°C에서 3분간 가열한 후 가볍게 원심분리하여 준비하였다. Running gel (2 M Tris-HCl, 30% acrylamide, 0.8% bisacrylamide, 20% SDS, 10% Ammonium persulfate, TEMED)와 stacking gel (0.25 M Tris-HCl, 30% acrylamide, 1.5% bisacrylamide, 20% SDS, 10% ammonium persulfate, TEMED) 각각을 조제한 후 전기영동 장치에 장착한 다음 전개 완충용액 (0.025 M Tris-HCl, 0.192 M glycine, 0.1% SDS)을 붓고, gel의 well에 protein marker와 준비된 시료 20 μL을 loading 한 뒤 80 V의 일정한 전압에서 3시간 전개시켰다. 전기영동 종료 후 영동판으로부터 gel을 분리하여 coomassie brilliant blue R 250으로 2시간 염색하고 나서 2시간 탈색시켰다. 전기영동한 gel을 20% (vol/vol) iso-propanol과 10% (vol/vol) glacial acetic acid solution에 담군 후 상온에서 2시간 고정시키고 나서 증류수로 30분마다 교체하면서 2시간 동안 세척하였다. 세척한 gel은 *L. monocytogenes* KCTC 3569 (약 10^6 CFU/mL)가 중층된 BHI 평판배지 위에 올려 놓고 37°C에서 24시간 동안 배양하여 항균 활성을 확인하였다. 이때 단백질 분자량 측정을 위한 표준물질로는 Protein Molecular Weight Markers (TEFCO, Technical frontier, Co., Japan)를 사용하였다.

결과 및 고찰

황산암모늄 침전법

고순도의 박테리오신을 조제하기 위하여 *E. faecium* MJ-14의 배양 상등액 중의 단백질을 황산암모늄 침전법으로 염석시킨 후 이온교환크로마토그래피와 겔크로마토그래피를 순

Table 1. The result of purification of the bacteriocin produced by

Purification step	Cell-free supernatant	Ammonium sulfate	Ion exchange chromatography	Gel filtration chromatography
Bacteriocin activity (BU/mL)	640	3,840	4,160	7,680
Total volume (mL)	2,000	200	126	60
Total activity (BU)	1,280,000	768,000	524,160	460,800
Total protein (mg)	1,147	54	13.2	3.6
Specific activity (BU/mg)	1,116	14,216	39,860	127,293
Purification fold	1	12.7	35.7	114.1
Yield (%)	100	60	41	36

차적으로 실시하여 정제한 결과는 Table 1과 같다. *E. faecium* MJ-14를 MRS 액체배지에서 37°C, 12시간 배양한 후 원심분리하여 얻은 배양 상등액의 박테리오신 활성은 640 BU/mL이었고, 여기에 황산암모늄 50% 포화상태로 첨가하여 4°C에서 하룻밤 방치한 다음 얻어진 pellet을 20 mM Na-phosphate buffer (pH 6.0)에 녹여 투석한 황산암모늄 획분의 박테리오신 활성은 3,840 BU/mL으로 나타나 배양 상등액에 비해 약 6배 증가되었고 회수율은 약 60%였다.

Ennahar *et al.*[15]에 의하면, *E. faecium* WHE81에 의해 생산된 박테리오신인 enterocin A와 B는 70%의 황산암모늄으로 침전시켰고, 전체 박테리오신의 활성은 pellet에서 모두 회수되었다고 하였으며, 침전 후 박테리오신의 활성은 배양 상등액 보다 약 4배 증가되었다고 하여 본 결과의 정제도보다 다소 낮은 수준이었다. 한편 Herranz *et al.*[16]에 의하면 *E. faecium* A13과 *E. faecium* G16이 생산한 박테리오신은 40%의 황산암모늄으로 포화되어 이들의 비활성은 각각 181 BU/mg와 151 BU/mg이고 회수율은 86%와 55%를 나타내었다고 하였다. 이러한 연구 결과와 비교해 볼 때, *E. faecium* MJ-14의 배양 상등액 중의 박테리오신은 50% 황산암모늄 염석에 의해 비교적 효율적으로 회수된 것으로 볼 수 있다.

이온교환 크로마토그래피

황산암모늄 획분을 Na-phosphate buffer (pH 6.0)에 녹여 CM-Sepharose CL-6B에 흡착시켜 크로마토그램한 결과는 Fig. 1과 같다. 황산암모늄 획분을 컬럼에 흡착시킨 후 1 M Na-phosphate buffer (pH 6.0)으로 용출시키면, resin에 흡착되지 않은 단백질 peak가 용출되었는데 이들은 항균 활성을 가진 peak와는 완전히 분리되었다. 이후에 NaCl 농도 구배 (0~1 M NaCl)에 의해 컬럼으로부터 결합된 단백질을 용출시켰다. 최대 활성을 나타내는 획분은 67번이었으며, 이는 0.45 M NaCl 농도에 해당하였다. 용출된 획분 중 48~76번째 획분에서 항균 활성이 나타났으며, 이온교환 크로마토그래

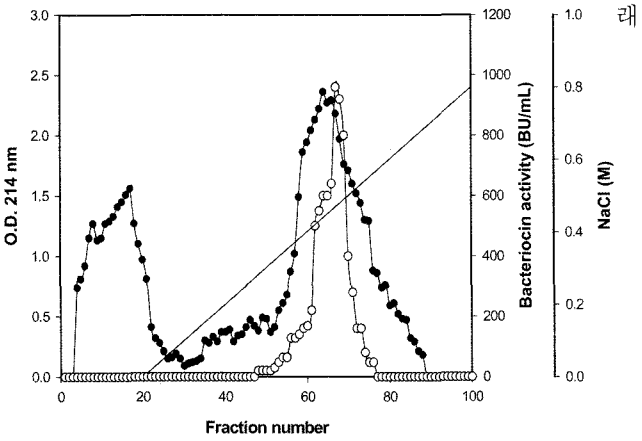

Fig. 1. The elution profile of the bacteriocin on CM-sepharose CL 6B column chromatography. -●-, O.D. 214 nm; -○-, bacteriocin activity; ---, NaCl gradient; Fraction volumn, 4.5 mL/EA.

피하여 얻은 용출물의 비활성은 35.7배 증가하였고, 회수율은 약 41%였다.

Moon *et al.*[17]에 의하면, *Enterococcus* sp. T7의 박테리오신은 본 결과와는 달리 50 mM Tris-HCl 완충용액으로 평형화된 음이온 교환 수지인 DEAE-Sephacel 컬럼 중에 흡착되지 않고, 컬럼 washing 동안에 용출되어 비활성은 9.4×10^4 AU/mg으로 15.2배 정제되었다고 보고한 바 있다. 또한 Ennahar *et al.*[15]은 *E. faecium* WHE 81에 의해 생산된 박테리오신인 enterocin A와 B는 양이온교환 크로마토그래피에 의해 비활성은 2.0×10^5 AU/mg으로 32%의 회수율을 얻었다. 정 등[18]이 *Enterococcus* sp.의 박테리오신은 CM-sepharose CL-6B에 의해 약 14.2배 정제되었으며, Galvez *et al.*[19]에 의하면 *E. faecalis* EJ97은 양이온교환 크로마토그래피에 의해 정제도는 약 21배 증가하였고, 회수율도 62%에 이르렀다고 보고한 바 있다.

겔 크로마토그래피

이온교환 크로마토그래피에서 얻은 항균 활성 획분

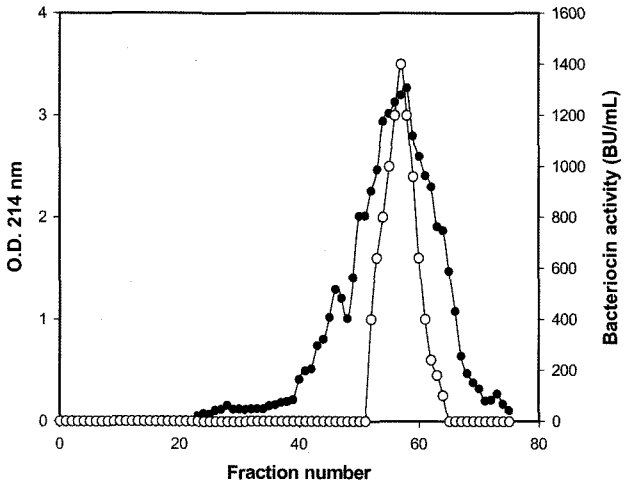

Fig. 2. The elution profile of partially purified the bacteriocin with Sephacryl S-100 column chromatography. -●-, O.D.; -○-, bacteriocin activity; Fraction volumn, 5 mL/EA.

(48~76번)을 모아 증류수에 하룻밤 동안 투석 (MWCO 1,000)한 후 Sephacryl S-100 HR 컬럼으로 정제한 결과는 Fig. 2와 같다. 용출된 단백질 peak 중에서 53~64번 획분에서 박테리오신 활성이 나타났으며, 비활성은 127,293 BU/mL로 크게 증가하였으며, 활성 회수율은 36%였다.

정 등[18]은 *Enterococcus* sp.의 배양 상등액을 최종 겔 크로마토그래피한 경우 비활성은 461.4 AU/mg으로 배양 상등액에 비해 약 35.8배 정제되었다고 보고하였고, Moon et al.[17]은 *Enterococcus* sp. T7을 Sephadex G-25에 의해 겔 크로마토그래피한 결과 비활성은 약 23배 증가하였고 이때 회수율은 28%라고 보고하였다. 한편 김[20]은 *Lactococcus* sp. HY449가 생산하는 박테리오신도 역시 당이 결합된 단백질로 구성되었는데, 겔 크로마토그래피한 경우 112배 정제도가 증가하였고, 회수율은 7.3%로 나타났다고 보고하였다. 따라서 *E. faecium* MJ-14가 생산하는 박테리오신은 황산암모늄 침전법, 이온교환수지 및 겔 크로마토그래피를 통해 비교적 높은 정제도와 회수율을 얻을 수 있었다.

SDS-PAGE

정제된 박테리오신의 순도를 확인하기 위해 전기 영동한 결과는 Fig. 3과 같다. 15% SDS-PAGE 결과 뚜렷하게 분리된 4개의 밴드가 나타났다. 전기 영동된 4개의 밴드를 *L. monocytogenes*가 접종된 평판배지에 올리고 37°C에서 배양한 결과 2개의 밴드에서 항균 활성이 나타났으며, 이들 각각의 분자량은 5.8 kDa과 4.3 kDa이었다. 따라서 *E. faecium* MJ-14가 생산하는 박테리오신은 2종류인 것으로 추정할 수 있었다.

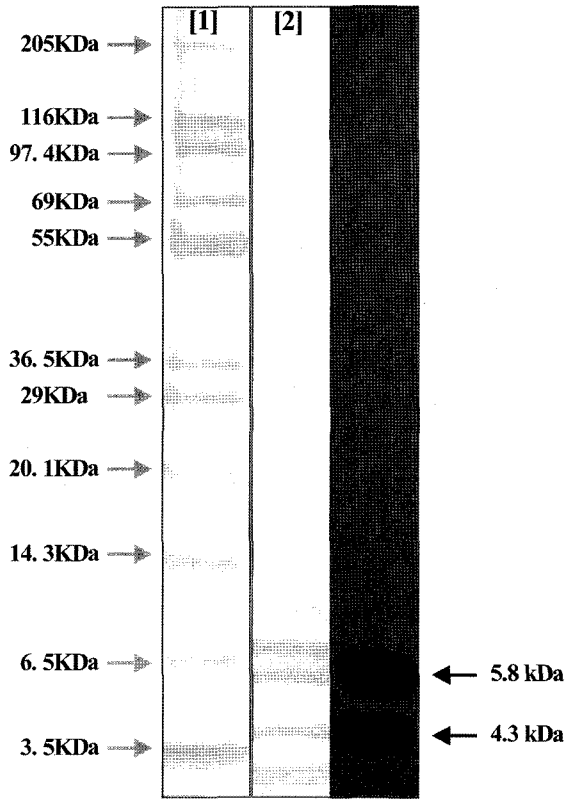

Fig. 3. The molecular weight of the bacteriocin produced by *E. faecium* MJ-14. 1. Marker materials made by TEFCO. 2, Purified the bacteriocin bands staining with coomassie blue. 3, A gel overlaid with cells of *L. monocytogenes* embedded in BHI agar.

2종류의 박테리오신을 생산하는 유산균으로는 *La. plantarum* LPCO 10은 plantaricins S와 T를 생산한다고 보고한 바 있고,[21] 발효 소시지에서 분리한 *E. faecium* P21[22]과 *E. faecium* T136[23]도 enterocin A와 enterocin B를 동시에 생산하며, *E. faecium* EK13[24]은 enterocin A와 enterocin P를 생산하는 것으로 알려져 있다. Aymerich *et al.*[28]은 *E. faecium*에서 분리된 enterocin A의 분자량은 4.829 kDa이었고, Moon *et al.*[17]에 의하면, *Enterococcus* sp. T7가 생산한 박테리오신의 분자량은 6.5 kDa이라고 보고한 바 있다. 한편, Lyon *et al.*[25]은 *E. faecium*의 enterocin EL1 분자량은 대략 2.3 kDa이었고, Ohmomo *et al.*[26]은 *E. faecium* NIAI 157의 enterocin ON-157 분자량은 2.5 kDa이었으며, enterocin 012는 3.4 kDa[27]인 것으로 나타났는데, *E. faecium* MJ-14의 박테리오신은 이들의 박테리오신보다 다소 크기가 큰 것을 알 수 있었다.

국문요약

E. faecium MJ-14 균주의 배양 상등액에 50% 황산암모늄을 처리한 결과, 박테리오신 활성은 3,840 BU/mL으로 배양 상등액에 비해 6배 증가되었고 회수율은 약 60%에 이르렀다. 이온교환크로마토그래피에 의해 용출된 획분 중 48~76번에서 항균 활성이 나타났으며, 용출물의 비활성은 35.7배 증가하였고, 회수율은 약 41%였다. 그리고 겔 크로마토그래피에 의해 비활성 127,293 BU/mg인 박테리오신 단백질을 정제하였으며, 이 때 정제도는 114배, 수율은 36%였다. 정제된 박테리오신 단백질을 SDS-PAGE한 결과, 항균 활성을 나타내는 4.3 kDa과 5.8 kDa의 분자량을 확인하였다.

참고문헌

1. Bruno, M. E., Kaiser, A. and Montville, T. J.: Depletion of proton motive force by nisin in *Listeria monocytogenes* cells. *Appl. Environ. Microbiol.*, **58**, 2255-2259 (1992).
2. Christensen, D. P. and Hutkins, R. W.: Collapse of the proton motive force in *Listeria monocytogenes* caused by a bacteriocin produced by *Pediococcus acidilactici*. *Appl. Environ. Microbiol.*, **58**, 3312-3315 (1992).
3. Holzapfel, W. H., Geisen, R. and Schillinger, U.: Biological preservation of foods with reference to protective cultures, bacteriocins and food-grade enzymes. *Int. J. Food Microbiol.*, **24**, 343-362 (1995).
4. Cleveland, J., Montville, T. J., Nes, I. F. and Chikindas, M. L.: Bacteriocins: safe, natural antimicrobials for food preservation. *Int. J. Food Microbiol.*, **71**, 1-20 (2001).
5. Joosten, H. M. L. J. and Manuel, N.: Prevention of histamine formation in cheese by bacteriocin-producing lactic acid bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.*, **62**, 1178-1181 (1996).
6. Laukova, A. and Czikkova, S.: The use of enterocin CCM 4231 in soy milk to control the growth of *Listeria moncytogenes* and *Staphylococcus aureus*. *J. Appl. Microbiol.*, **87**, 182-186 (1999).
7. Meghrous, J., Lacroix, C. and Simard, R. E.: The effects on vegetative cells and spores of three bacteriocins from lactic acid bacteria. *Food Microbiol.*, **16**, 105-114 (1999).
8. 김혜정, 이나경, 조상문, 김기태, 백현동: 젓갈 유래 박테리오신 lacticin NK24에 의한 식품부패 및 병원성 세균의 생육 저해. *한국식품과학회지*, **31**, 1035-1043 (1999).
9. Oh, S. J., Lee, J. H., Kim, G. T., Shin, J. G. and Baek, Y. J.: Anti-cariogenic activity of a bacteriocin produced by *Lactococcus* sp. HY 449. *Food Sci. Biotechnol.*, **12**, 9-12 (2003).
10. 안 철, 유진영: 유용 박테리오신 생산의 분자유전학과 산업적 응용. *한국미생물생명공학회*, **8**, 44-56 (1995).
11. 이헌주: 김치에서 분리한 *Lactococcus* sp. H-559가 생산하는 박테리오신의 정제 및 특성. *서울대학교 박사학위논문*, (1997).
12. Parente, E. and Ricciardi, A.: Production, recovery and purification of bacteriocins from lactic acid bacteria. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **52**, 628-638 (1999).
13. Lim, S. M., Park, M. Y. and Chang, D. S.: Characterization of bacteriocin produced by *Enterococcus faecium* MJ-14 isolated from *Meju*. *Food Sci. Biotechnol.*, **14**, 49-57 (2005).
14. Laemmli, U. K.: Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, **227**, 680-685 (1970).
15. Ennahar, S., Asou, Y., Zendo, T., Sonomoto, K. and Ishizaki, A.: Biochemical and genetic evidence for production of enterocin A and B by *Enterococcus faecium* WHE 81. *Int. J. Food Microbiol.*, **70**, 291-301 (2001).
16. Herranz, C., Mukhopadhyay, S., Casaus, P., Martinez, J. M., Rodriguez, J., Nes, I. F., Cintas, L. M. and Hernandez, P. E.: Biochemical and genetic evidence of enterocin P production by two *Enterococcus faecium*-like strains isolated from fermented sausages. *Curr. Microbiol.*, **39**, 282-290 (1999).
17. Moon, G. S., Jeong, J. J., Ji, G. E., Kim, J. S. and Kim, J. H.: Characterization of a bacteriocin produced by *Enterococcus* sp. T7 isolated from human. *J. Microbiol. Biotechnol.*, **10**, 507-513 (2000).
18. 정건섭, 양은석, 이국진, 고현정, 정병문: *Enterococcus* sp. 가 생산한 bacteriocin의 정제 및 특성에 관한 연구. *한국미생물생명공학회*, **26**, 523-528 (1998).
19. Galvez, A., Valdivia, E., Abriouel, H., Camafeita, E., Mendez, E., Martinez-Bueno, M. and Mendez, M.: Isolation and characterization of enterocin EJ97, a bacteriocin produced by *Enterococcus faecalis* EJ97. *Arch. Microbiol.*, **171**, 59-65 (1998).
20. 김상교: *Lactococcus* sp. HY 449가 생산하는 박테리오신에 관한 연구. *아주대학교 박사학위논문*, (1994).
21. Jimenez-Diaz, R., Rios-Sanchez, R. M., Desmazeaud, M., Ruiz-Barba, J. L. and Piard, J. C.: Plantaricins S and T, two new bacteriocins produced by *Lactobacillus planarum* LPCO10 isolated from a green olive fermentation. *Appl.*

Environ. Microbiol., **59**, 1416-1424 (1993).

22. Herranz, C., Casaus, P., Mukhopadhyay, S., Martinez, J. M., Rodriguez, J. M., Nes, I. F., Hernadez, P. E. and Cintas, L. M.: *Enterococcus faecium* P21: a strain occurring naturally in dry-fermented sausages producing the class II bacteriocins enteriocin A and enterocin B. *Food Microbiol.*, **18**, 115-131 (2001).
23. Casaus, P., Nilsen, T., Cintas, L. M., Nes, I. F., Hernandez, P. E. and Holo, H.: Enterocin B, a new bacteriocin from *Enterococcus faecium* T136 which can act synergistically with enterocin A. *Microbiol.*, **143,** 2287-2294 (1997).
24. Marekova, M., Laukova, A., DeVuyst, L., Skaugen, M. and Nes, I. F.: Partial characterization of bacteriocins produced by environmental strain *Enterococcus faecium* EK13. *J. Appl. Microbiol.*, **94**, 523-530 (2003).
25. Lyon, W. J., Olson, D. G. and Murano, E. A.: Isolation and purification of enterocin EL1, a bacteriocin produced by a strain of *Enterococcus faecium. J. Food Prot.*, **58**, 890-898 (1995).
26. Ohmomo, S., Murata, S., Katayama, N., Nitisinprasart, S., Kobayashi, M., Nakajima, T., Yajima, M. and Nakanishi, K.: Purification and some characteristics of enterocin ON-157, a bacteriocin produced by *Enterococcus faecium* NIAI157. *J. Appl. Microbiol.*, **88,** 81-89 (2000).
27. Jennes, W., Dicks, L. M. T. and Verwoerd, D. J.: Enterocin 012, a bacteriocin produced by *Enterococcus gallinarum* isolated from the intestinal tract of ostrich. *J. Appl. Microbiol.*, **88**, 349-357 (2000).
28. Aymerich, T., Holo, H., Havarstein, L. S., Hugas, M., Garriga, M. and Nes, I. F.: 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 (1996).