

스테비아 추출물 발효액에서 분리된 유효 미생물들의 동정 및 항미생물 활성

이태형 · 박수상¹ · 이용억*

동국대학교 과학기술대학 생명공학과, ¹(주)엽록 스테비아

Received July 24, 2006 / Accepted August 17, 2006

Identification of Effective Microorganisms Isolated from Fermented Stevia Extract and Their Antimicrobial Activity. Tae Hyeong Lee, Su-Sang Park¹ and Yong-Eok Lee*. Department of Biotechnology, Dongguk University, Kyongju, Kyongbuk 780-714, Korea. ¹Yeouprock Stevia Co., Kyongju, Kyongbuk 780-914, Korea. — *Stevia rebaudiana* Bertoni is a sweet herb of the Asteraceae family originally derived from South America. Twenty three bacterial strains and ten yeast strains were isolated from fermented Stevia extract and identified by general taxonomic methods and molecular genetic method. Isolated strains from fermented Stevia extract include ten species of bacteria which belong to five genus and one species of yeast. Based on 16S and 18S rDNA sequence analysis, phylogenetic trees were constructed. Antimicrobial activity of the isolated strains was examined against various bacteria and plant-pathogenic fungi. Among them, *Lactobacillus paracasei* SB13 showed strong antibacterial activity towards a wide range of bacteria. These results may be useful to develop environmentally friendly microbial agent for soil improvement.

Key words — Stevia, effective microorganisms, identification, antimicrobial activity

서 론

스테비아 (*Stevia rebaudiana* Bertoni)는 국화과의 여러해살이풀로 원산지는 남미 브라질과 파라과이의 국경지역에 인접한 고산지대이며, 하천이나 습지대 주변에서 자생하는 감미식물이다[6,12]. 스테비아의 줄기와 잎에는 감미물질인 스테비오사이드(stevioside)와 레바우디오사이드(rebaudioside)가 함유되어 있다. 스테비오사이드는 감미도가 설탕의 약 300배이며 열에 안정하고 칼로리가 낮아 허브차, 건강 보조 식품, 술이나 청량음료의 천연감미료로 사용되고 있다 [7,14,24]. 스테비아는 또한 강력한 항산화 작용 및 선택적 살균효과, 환경 호르몬 및 유해물질의 분해효과 때문에 친환경 농자재로도 이용되고 있다. 최근 Tomita 등[28]은 스테비아 추출물 발효액이 장관출혈성대장균 및 다른 식품병원균에 대한 살균효과를 가지고 있다고 보고하였고, Takahashi 등 [26]은 스테비아추출물 발효액이 human rotavirus (HRV)의 복제에 대한 억제활성을 나타낸다는 것을 보고하였다.

스테비아의 잎과 줄기 추출물을 농축, 발효시킨 스테비아 추출물 발효액은 각종 야채나 과일의 당도 및 고유의 풍미를 높이고 보존기간을 향상시키는 효과를 나타내며 땅속의 농약이나 다이옥신과 같은 환경 호르몬에 대한 분해작용이 뛰어나 친환경농법을 위한 토양미생물제제로도 사용되고 있다 [10,13]. 스테비아추출물 발효액의 농작물 및 토양정화의 효율에 대한 많은 보고에도 불구하고 스테비아추출물 발효액

의 어떤 성분이 이러한 효과를 나타내는지는 아직 밝혀져 있지 않다. 스테비아추출물 발효액에는 여러 종류의 유효 미생물 (effective microorganism, EM)이 존재하는데 아마도 이들 EM, 또는 EM의 대사산물이 이러한 효과들을 나타내는데 일부 기여하고 있으리라 추측되고 있다. 스테비아에 존재하는 미생물에 대한 연구는 스테비아 분말로부터 질산환원과 암모늄 형성 능력을 가지고 있는 4종류의 고온균을 분리하여 그들의 특성을 연구한 Okamoto와 Satou[19]의 논문이 유일하다. 스테비아추출물 발효액에 존재하는 EM에는 바실러스균과 효모류가 있는 것으로 알려져 있으나 종(species) 수준의 정확한 동정은 아직 이루어지지 않고 있다. 스테비아추출물 발효액의 우수한 효과를 규명하기 위해서는 이들 미생물들에 대한 연구가 필수적이다. 본 연구에서는 스테비아추출물 발효액에 존재하는 유효 미생물들을 분리하여 동정하고 순수 배양된 유효 미생물들의 항미생물 활성을 측정하였다.

재료 및 방법

균주 및 배지

본 연구의 재료로는 (주)엽록 스테비아에서 제조된 스테비아추출물 발효액을 사용하였다. Ribosomal DNA (rDNA)의 클로닝을 위한 숙주세포로는 *Escherichia coli* DH5α를 사용하였고, 항균활성 측정을 위한 공시균들은 생명공학연구소 유전자원 센터 (Korean Collection for Type Cultures, KCTC)와 서울대학교 미생물연구소 미생물균주센터 (Institute of Microbiology, Seoul National University, IMSNU)에서 분양받아 본 실험실에서 보관하고 있던 균주들을 사용하였다. 항

*Corresponding author

Tel : +82-54-770-2226, Fax : +82-54-770-2226

E-mail : yelee@mail.dongguk.ac.kr

진균 실험에 사용한 작물병원성 진균은 농촌진흥청 농업생명공학연구원 한국농업미생물지원센터 (Korean Agricultural Culture Collection, KACC)에서 분양받아 사용하였다.

Bacillus 속들의 배양을 위해서는 Nutrient broth (Difco, Detroit, USA)를, 젖산균류를 위해서는 MRS broth (Difco)를 사용하였다. 효모균은 YPG (0.5% yeast extract, 1.0% peptone, 2.0% glucose) 배지에서 배양하였다. 고체배지를 위해서는 각각의 배지에 1.5% (w/v) agar를 첨가하였다. 진균의 배양을 위해서는 Potato dextrose agar (Difco) 배지를 사용하였다.

균주의 분리 및 일차 동정

스테비아추출물 발효액을 멸균된 생리식염수로 희석하여 Nutrient agar, MRS, YPG 평판배지 위에 각각 도말한 후 배양기에 넣어 30°C의 온도에서 이틀간 배양하였다. 얻어진 콜로니들의 모양 및 색깔, 크기를 기준으로 한 육안판정으로 균주들을 선별하여 여러 번 고체배지에 계대 배양하여 순수 배양된 균주들을 얻었다. 순수 배양된 균주들은 15%의 glycerol이 첨가된 액체배지에 넣어 -70°C에서 보관하였다.

순수 배양된 분리균들의 동정을 위한 형태적, 생화학적 특성들은 미생물학실험서[4]에 기술되어있는 방법에 준하여 조사하였으며 얻어진 결과를 Bergey's manual of determinative bacteriology[9]에 기술되어있는 기준에 알려진 균주들의 특징과 비교하여 1차적인 동정을 실시하였다. 분리된 효모들의 1차적인 동정을 위해서는 API 20C AUX kit (BioMerieux, France)를 사용하였다.

DNA 추출 및 ribosomal DNA의 PCR 증폭

순수 배양된 세균들로부터 염색체 DNA를 분리하기 위하여 액체배지에서 배양한 세포를 원심분리로 회수하였다. 회수된 세포로부터의 염색체 DNA는 G-Spin™ Genomic DNA Extraction Kit for Bacteria (iNtRON Biotechnology, Inc., Korea)를 사용하여 분리한 후 agarose gel 전기영동으로 확인하였다. 효모의 염색체 DNA는 Molecular Cloning[21]에 기술된 방법에 의해 분리하였다.

분리세균의 16S rDNA 조각은 박테리아 특이적인 27f (5'-AGAGTTGATCCTGGCTCAG-3')와 685r (5'-TCTACG CATTACCGCTAC-3')의 두 primer[3]를 이용하여 중합효소 연쇄반응 (PCR)으로 증폭하였다. PCR 반응은 94°C에서 5분간 DNA를 변성시킨 후, 94°C에서 1분간, 58°C에서 1분간, 72°C에서 2분간의 단계를 35회 반복하여 실시하고 72°C에서 10분간 최종 증폭하였다. 효모의 18S rDNA 조각의 증폭을 위해서는 NS1 (5'-GTAGTCATATGCTTGCTC-3')과 NS2 (5'-GGCTGCTGGCACCAGACTG-3')의 두 primer[29]를 사용하였고 위와 동일한 조건으로 PCR증폭을 실시하였다. 증폭된 PCR산물들은 1.0% agarose gel에서 전기영동하여 확인

하였다.

rDNA의 염기서열 분석 및 계통분류

증폭된 PCR산물들은 GENEALL™ PCR Purification Kit (generalbiosystem, Korea)를 사용하여 정제한 후 pGEM-T Easy vector (Promega, Madison, USA)에 삽입시켜 *E. coli* DH5a에 형질전환하였다. 클로닝된 rDNA의 염기서열은 Basestation (MJResearch, Watertown, USA) 장비를 사용하여 dideoxy chain termination 방법[22]으로 결정하였다. 결정된 rDNA 유전자 조각의 염기서열은 BLAST 프로그램[1]을 이용하여 National Center for Biotechnology Information (NCBI)의 database에 있는 알려진 염기서열들과 비교하여 종 (species) 수준의 분류를 시행하였다. 순수 배양된 유효 미생물들의 분류학적 위치를 결정하기 위한 계통수 (phylogenetic tree)를 작성하기 위해서는 CLUSTAL W 프로그램(version 1.81)[5]과 neighbor-joining method[20]를 이용하였다.

분리균의 항균 및 항진균 활성의 측정

스테비아추출물 발효액에서 분리된 세균들과 효모균의 항균 및 항진균 활성을 측정하기 위해서는 agar well diffusion 방법[2]을 사용하였다. 항미생물 실험을 위한 시료로는 스테비아추출물 발효액에서 분리된 균주들의 배양액을 원심분리로 세포들을 제거한 후 사용하였다. 바실러스속의 균주들과 *Moraxella*속의 균주는 Nutrient broth에서, 젖산균류는 MRS broth에서, 효모는 YPG 배지에서 배양하였고, 모두 30°C에서 24시간 배양하였다. 길항작용 검색에 사용한 공시균들은 각 균주를 위한 액체배지에 접종하여 하룻밤 배양한 후 동일한 고체배지에 0.2 ml씩 도말하였다. 배지를 말린 후 배지 위에 직경 6 mm의 구멍을 뚫고, 여기에 시료를 각각 50 µl씩 첨가한 다음 4°C에서 2시간 방치하여 확산 시킨 후, 각 공시균들의 성장에 적당한 온도에서 하룻밤 키워 형성된 억제환의 크기(mm)로 항균력을 측정하였다. 작물병원성 진균들의 균사생장 억제력은 PDA 평판배지에서 자란 진균의 균사체와 포자를 멸균된 생리식염수를 이용해 회수하여 고체배지에 도말하여 말린 후 위와 동일한 방법으로 분리균의 배양액을 접종하여 5~7일간 배양하면서 구멍주위의 균사생장 억제정도를 관찰하였다.

결과 및 고찰

유효 미생물의 분리 및 1차 동정

스테비아추출물 발효액에서 분리된 균주들의 콜로니 형태를 바탕으로 한 육안 판정으로 세균 23균주와 효모 10균주를 1차 선별하였다. 선별된 분리세균 23균주를 대상으로 형태학적, 배양학적, 생화학적 특성을 조사하였다(Table 1). 그 결과 SB08을 제외하고는 모두 그람 양성균이었으며 주로 바실러

Table 1. Taxonomic characteristics of the bacterial strains isolated from fermented Stevia extract

Strain	Cell Shape	Gram stain	Catalase	Oxidase	Citrate	Nitrate reduction	ONPG	Urase	VP	Mannitol	Optimum temp.(°C)	5% NaCl
SB01	Rod	+	+	-	+	-	+	-	-	+	35	-
SB02	Rod	+	+	-	+	-	+	-	+	+	30	-
SB03	Rod	+	-	-	-	-	-	-	-	-	30	-
SB04	Rod	+	-	-	-	-	-	-	-	-	30	-
SB05	Coccus	+	+	+	-	-	-	-	-	-	35	-
SB06	Rod	+	+	+	-	-	-	-	-	+	30	+
SB07	Rod	+	+	-	-	-	-	-	-	-	30	+
SB08	Rod	-	+	+	-	+	-	-	-	-	30	-
SB09	Rod	+	-	-	-	-	-	-	-	-	30	-
SB10	Rod	+	-	-	-	-	-	-	-	-	30	-
SB11	Rod	+	+	-	+	-	+	-	-	+	35	-
SB12	Rod	+	-	-	-	-	-	-	-	-	30	-
SB13	Rod	+	-	-	-	-	-	-	-	-	30	-
SB14	Rod	+	-	-	-	-	-	-	-	-	30	-
SB15	Rod	+	-	-	-	-	-	-	-	-	30	-
SB16	Rod	+	-	-	-	-	-	-	-	-	30	-
SB17	Coccus	+	+	-	-	+	-	+	-	-	25	-
SB18	Rod	+	+	+	+	+	-	-	+	+	30	+
SB19	Rod	+	+	+	-	-	-	-	-	+	30	+
SB20	Rod	+	+	+	-	-	-	-	-	+	30	+
SB21	Rod	+	+	-	+	-	+	-	+	+	30	-
SB22	Rod	+	+	+	+	+	-	-	+	+	30	+
SB23	Rod	+	+	+	-	-	-	-	-	-	35	-

Symbol: +, growth or positive; -, no growth or negative.

스와 젖산균 계통의 세균이 많이 존재하는 것으로 나타났다. 대부분이 간균이었고 SB05와 SB17만이 구균이었다. 최적 성장온도는 대부분이 30~35°C 이었고 45°C 이상에서 자라는 고온균은 발견되지 않았다. 스테비아추출물 발효액에서 분리된 효모들은 API 20C AUX kit를 사용하여 1차 동정을 실시하였다. 그 결과 모두 거의 유사한 결과를 나타내었고 kit에 포함된 동정표에 나타나있는 효모들과 일치하는 균주는 없었다 (data not shown).

rDNA 염기서열 분석에 의한 동정 및 계통분류

분자생물학적 기술은 균주를 동정하는데 큰 도움이 되고 있다. 특히 진화적 상관관계를 알아내기 위해 PCR로 증폭된 rDNA 유전자의 염기서열을 분석하는 것은 미생물 분류의 중요한 도구가 되었다. 종 (species) 수준까지의 정확한 동정을 위하여 분리세균들은 16S rDNA의 염기서열을, 효모들은 18S rDNA의 염기서열을 결정하여 BLAST (version 2.2.14) 프로그램을 이용하여 분석하였다. 그 결과 스테비아추출물

발효액에서 분리된 세균 23균주에는 *Bacillus*속 6종, *Lactobacillus*, *Micrococcus*, *Moraxella*, *Staphylococcus*속 각 1종씩 모두 5속 10종의 세균이 존재하는 것으로 확인되었다. 분리된 효모 10균주는 모두 동일한 *Pichia membranifaciens*인 것으로 나타났다(Table 2). 일반 분류학상으로 97% 이상의 rDNA 염기서열 상동성을 나타내는 균주들의 경우 하나의 종으로 정의할 수 있다. 스테비아추출물 발효액으로부터 분리된 유효 미생물들의 분석 결과 모두 98% 이상의 상동성을 나타내었다. 스테비아추출물 발효액에서 분리된 세균들 중에서는 *Lactobacillus paracasei*가 우점종인 것으로 나타났다.

스테비아추출물 발효액으로부터 순수 배양된 10종의 분리 균들의 계통발생학적 연관관계를 측정하기 위해 16S rDNA 유전자 조각의 염기서열을 결정하여 알려진 서열들과 CLUSTAL W 프로그램을 이용하여 비교하였고 그 결과를 계통수로 나타내었다(Fig. 1). 분리된 효모의 18S rDNA 유전자 조각의 염기서열을 동일한 방법으로 분석하여 *Pichia*속에 속하는 효모들과의 계통발생학적 연관관계를 조사하였다(Fig. 2).

Table 2. Identification of effective microorganisms isolated from fermented Stevia extract

	Name	Strain ^a
Bacteria	<i>Bacillus aquimaris</i>	SB07
	<i>Bacillus fusiformis</i>	SB23
	<i>Bacillus megaterium</i>	SB01 , SB11
	<i>Bacillus pumilus</i>	SB02, SB21
	<i>Bacillus subtilis</i>	SB18, SB22
	<i>Bacillus vietnamensis</i>	SB06, SB19 , SB20
	<i>Lactobacillus paracasei</i>	SB03, SB04, SB09, SB10, SB12, SB13 , SB14, SB15, SB16
	<i>Micrococcus luteus</i>	SB05
	<i>Moraxella osloensis</i>	SB08
	<i>Staphylococcus pasteurii</i>	SB17
Yeast	<i>Pichia membranifaciens</i>	SY01, SY02, SY03, SY04, SY05 , SY06, SY07, SY08, SY09, SY10

^a Strains in bold are used for antimicrobial activity test and phylogenetic analysis.

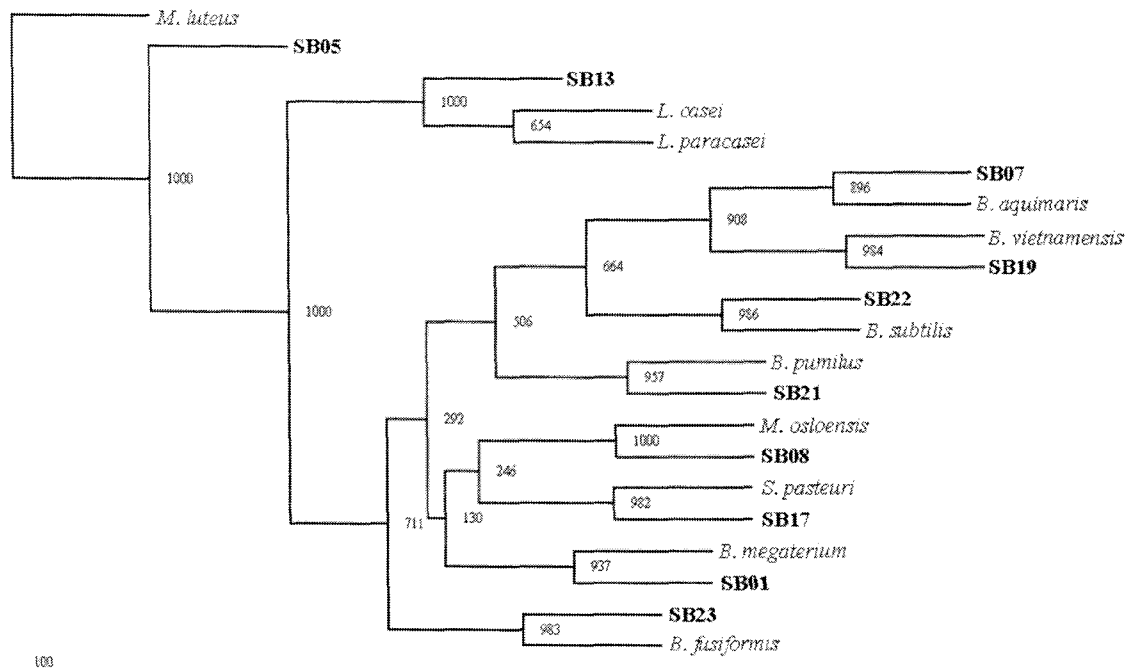


Fig. 1. Phylogenetic tree based on 16S rDNA sequences of bacterial strains isolated from fermented Stevia extract. Numbers at nodes indicate bootstrap values obtained with 1,000 resamplings. Scale bar represents 100 nucleotide substitution per site.

유효 미생물들의 항균 및 항진균 활성

스테비아추출물 발효액으로부터 분리되어 순수 배양된 유효 미생물 11종의 항균 및 항진균 활성을 측정한 결과 젖산균인 *L. paracasei* SB13이 가장 높은 항균 활성을 나타내었다. 이 균주는 8종의 그람양성균과 8종의 그람음성균에 대한 광범위한 항균 활성을 나타내었고 진균인 *Rhizoctonia solani*에 대해서도 항진균 활성을 나타내었다(Table 3). 젖산균인 *L. paracasei*는 nisin과 같은 천연 항균물질인 박테리오신(bacteriocin)을 생산하는 것으로 알려져 있다. 박테리오신은

작은 분자량의 펩티드로 인체에 무해하며 특정 미생물들을 선택적 저해한다[11,15]. 스테비아추출물 발효액에서 분리된 젖산균인 *L. paracasei* SB13의 항균활성도 이 박테리오신에 의한 것으로 사료된다.

*Bacillus pumilus*로 동정된 SB21은 *Listeria ivanovii*에 항균 활성을 나타냈으며 SB21과 *B. subtilis* SB22 두 균주는 작물병원성 진균인 *Collectotricum coccodes*와 *Ophiostoma ulmi*에 대한 항진균 활성을 나타내었다(Table 3). *Bacillus*속이 생산하는 항진균물질들은 종에 따라 다양한데 *B. subtilis*가 생산하

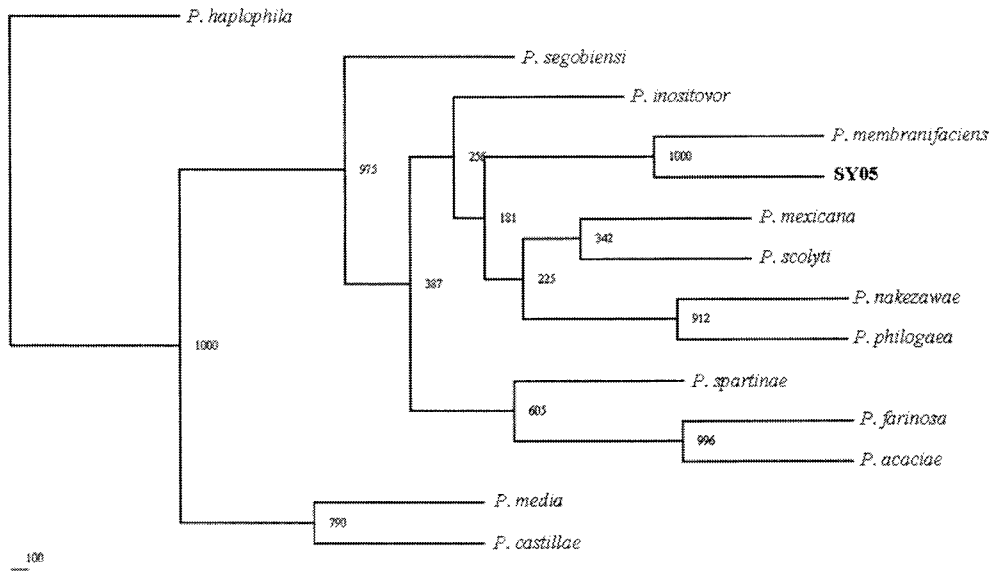


Fig. 2. Unrooted phylogenetic tree constructed by the neighbor-joining method, showing the positions of yeast strain SY05 and other *Pichia* species. Numbers at nodes indicate bootstrap values obtained with 1,000 resamplings. Scale bar represents 100 nucleotide substitution per site.

Table 3. Antimicrobial activity of culture broth of effective microorganisms isolated from fermented Stevia extract against various bacteria and plant-pathogenic fungi

Indicator strain	Zone of inhibition (mm) ^a							
	SB01	SB07	SB08	SB13	SB19	SB21	SB22	SY05
<i>Bacillus cereus</i> KCTC 1012	- ^b	-	-	15	-	-	-	-
<i>Bacillus macerans</i> IMSNU 10028	-	-	-	11	-	-	-	-
<i>Bacillus megaterium</i> KCTC 3007	-	-	-	15	-	-	-	-
<i>Bacillus polymyxa</i> IMSNU 12071	-	-	-	15	-	-	-	-
<i>Bacillus pumilus</i> KCTC 3348	-	-	-	15	-	-	-	-
<i>Bacillus subtilis</i> KCTC 1028	-	-	-	13	-	-	-	-
<i>Corynebacterium xerosis</i> KCTC 3435	8	10	-	13	-	-	-	-
<i>Listeria ivanovii</i> KCTC 3444	-	-	-	-	-	13	-	-
<i>Staphylococcus epidermidis</i> KCTC 1917	-	-	-	11	-	-	-	-
<i>Klinsiella pneumoniae</i> KCTC 2208	-	-	-	11	-	-	-	-
<i>Proteus mirabilis</i> KCTC 2566	-	-	-	12	-	-	-	-
<i>Proteus vulgaris</i> KCTC 2512	-	-	-	13	-	-	-	-
<i>Pseudomonas fluorescens</i> IMSNU 10205	-	-	-	13	-	-	-	-
<i>Salmonella typhimurium</i> KCTC 1925	-	-	-	12	-	-	-	-
<i>Serratia marcescens</i> IMSNU 10257	-	-	-	10	-	-	-	-
<i>Shigella dysenteriae</i> KCTC 1026	-	-	-	22	-	-	-	-
<i>Shigella sonnei</i> KCTC 2009	-	-	-	10	-	-	-	-
<i>Botrytis cinerea</i> KACC 40574	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Helicobasidium mompa</i> KACC 40169	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Collectotrichum coccodes</i> KACC 40009	-	-	-	-	13	14	13	12
<i>Ophiostoma ulmi</i> KACC 40252	-	10	-	-	-	11	13	-
<i>Phyophthora capsici</i> KACC 40177	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Pythium aphanidermatum</i> KACC 40156	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Rhizoctonia solani</i> KACC 40142	-	-	10	12	-	-	-	-
<i>Rosellinia necatrix</i> KACC 40168	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Sclerotium rolfsii</i> KACC 40832	-	-	-	-	-	-	-	-

^a wall size (6 mm) is included.

^b -, no inhibition.

는 것에는 bacillomycin, fungistatin, iturin, mycosubtilin 등이 있으며[25], *B. pumilus*도 비단백질 성분의 항진균물질을 생산한다[18]. *Moraxella osloensis*는 grey garden slug를 죽이는 내독소를 생산하는 것으로 알려져 있으나[27] 스테비아추출물 발효액에서 분리된 *M. osloensis* SB08이 이러한 활성을 가지고 있는지는 조사하지 못하였다. 그 밖의 분리균들 중에는 *B. megaterium* SB01과 *B. aquimaris* SB07이 그람양성균인 *Corynebacterium xerosis*에 대한 항균활성을 나타내었고 *B. vietnamensis* SB19가 *C. coccodes*에 대한 항진균 활성을 나타내었다. 분리균들 중 *B. fusiformis* SB23, *M. luteus* SB05, *S. pasteurii* SB17은 길항작용을 나타내지 않았다.

효모의 일종인 *Pichia membranifaciens*는 음식과 관련된 환경에서 흔히 발견되는 효모로[8] 발효 중인 올리브 연분에서 높은 비율로 발생한다[16]. 이런 환경에서 발견된 분리균주 중 하나인 *P. membranifaciens* CYC1106는 내염성 효모로 *Botrytis cinerea*와 같은 작물병원성 진균에 대한 길항작용을 나타내는 killer toxin을 생산한다[17,23]. 스테비아추출물 발효액에서 유일하게 분리된 효모인 *P. membranifaciens* SY05는 세균류에는 항균활성을 나타내지 않았고 작물병원성 진균들 중에서도 고추탄저병의 원인균인 *C. coccodes*에만 항진균 활성을 나타내었다(Table 3).

요 약

스테비아(*Stevia rebaudiana* Bertoni)는 남미가 원산지인 국화과의 감미식물이다. 스테비아추출물 발효액으로부터 세균 23균주와 효모 10균주를 분리하여 일반적인 분류학적 방법과 분자유전학적 방법으로 동정하였다. 스테비아추출물 발효액에서 분리된 균주들은 5속 10종의 세균과 1종의 효모균에 속하는 것으로 나타났다. 16S와 18S rDNA 염기서열 분석에 근거하여 계통수를 작성하였다. 분리균들의 항미생물 활성을 여러 세균과 식물병원성 진균들에 대해 조사하였다. 분리균들 중에서는 *Lactobacillus paracasei* SB13이 광범위한 세균들에 대해서 강한 항균활성을 나타내었다. 이들 결과는 토양개량을 위한 친환경적 미생물 제제를 개발하는데 도움을 줄 것이다.

감사의 글

본 연구는 2005년도 산학연공동기술개발사업(중소기업청, 경상북도지원) 과제로 수행되었으며, 이에 감사를 드립니다.

참 고 문 헌

1. Altschul, S. F., T. L. Madden, A. A. Schaffer, J. Zhang, Z. Zhang, W. Miller and D. J. Lipman. 1997. Gapped BLAST and PSI-BLAST: A new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res.* **25**, 3389-3402.
2. Barefoot, S. F. and T. R. Klaenhammer. 1983. Detection and activity of lactacin B, a bacteriocin produced by *Lactobacillus acidophilus*. *Appl. Environ. Microbiol.* **45**, 1808-1815.
3. Brosius, J., T. J. Dull, D. D. Sleeter and H. F. Noller. 1981. Gene organization and primary structure of a ribosomal RNA operon from *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **148**, 107-127.
4. Cappuccino, J. G. and N. Sherman. 1992. *Microbiology: A Laboratory Manual*, 3rd ed. The Benjamin/Cummings Publishing Co., Redwood.
5. Clustal, W., J. D. Thompson, D. G. Higgins and T. J. Gibson. 1994. Improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Res.* **22**, 4673-4680.
6. Darise, M., H. Kohda, K. R. Mizutani and O. Tanaka. 1983. Chemical constituent of flower of *Stevia rebaudiana* bertoni. *Agric. Biol. Chem.* **47**, 133-141.
7. Geuns, J. M. C. 2003. Stevioside. *Phytochem.* **64**, 913-921.
8. Heard, G. M. and G. H. Fleet. 1987. Occurrence and growth of killer yeasts during wine fermentations. *Appl. Environ. Microbiol.* **51**, 539-545.
9. Holt, J. G., N. R. Krieg, P. H. A. Sneath, J. T. Staley and S. T. Williams. 1994. *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*, 9th ed. The Williams and Wilkins Co., Baltimore.
10. Hong S.-P., H.-S. Jeong, E.-J. Jeong, D.-Y. Jeong, P.-H. Jeong and D.-H. Shin. 2005. Quality characteristics of strawberry cultivated with foliar application of stevia (*Stevia rebaudiana* B.) extract. *Kor. J. Food Sci. Technol.* **37**, 893-897.
11. Jack, R. W., J. R. Tagg and B. Ray. 1995. Bacteriocins of gram-positive bacteria. *Microbiol. Rev.* **59**, 171-200.
12. Kennelly, E. J. 2002. Sweet and non-sweet constituents of *Stevia rebaudiana* Bertoni. pp. 68-85, In Kinghorn, A. D. (Ed.), *Stevia, the Genus Stevia. Medicinal and Aromatic Plants-Industrial Profiles*, Vol. 19, Taylor and Francis, London and NY.
13. Kim, B.-E., M.-K. Kim, K.-T. Kim, R.-W. Chang, J. W. Lim and Y. G. Kim. 2001. Study on the degradation of dioxins by the Stevia extract. *Organohalogen Compounds* **54**, 251-254.
14. Kim, J., Y. H. Choi and Y.-H. Choi. 2002. Use of stevioside and cultivation of *Stevia rebaudiana* in Korea. pp. 196-202, In Kinghorn, A. D. (Ed.), *Stevia, the Genus Stevia. Medicinal and Aromatic Plants-Industrial Profiles*, Vol. 19, Taylor and Francis, London and NY.
15. Klaenhammer, T. R. 1988. Bacteriocins of lactic acid bacteria. *Biochimie* **70**, 337-349.
16. Marquina, D., C. Peres, F. V. Caldas, J. F. Marques, J. M. Peinado and I. Spencer-Martins. 1992. Characterization of the yeast populations in olive brines. *Lett. Appl. Microbiol.* **14**, 279-283.
17. Masih, E. I., S. Slezack-Deschaumes, I. Marmaras, E. A. Barka, G. Vernet, C. Charpentier, A. Adholeya and B.

- Paul. 2001. Characterisation of the yeast *Pichia membranifaciens* and its possible use in the biological control of *Botrytis cinerea*, causing the grey mould disease of grapevines. *FEMS Microbiol. Lett.* **202**, 227-232.
18. Munimbazi, C. and L. B. Bullerman. 1998. Isolation and partial characterization of antifungal metabolites of *Bacillus pumilus*. *J. Appl. Microbiol.* **84**, 959-968.
 19. Okamoto, K. and N. Satou. 2006. Isolation, identification and characterization of effective bacteria on bioremediation from the waste parts of *Stevia rebaudiana* berutoni. *Enzyme Microbial Technol.* **39**, 407-413.
 20. Saitou, N. and M. Nei. 1987. The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol. Biol. Evol.* **2**, 406-425.
 21. Sambrook, J. and D. W. Russell. 2001. *Molecular Cloning*, 3rd eds. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York.
 22. Sanger, F., S. Nicklen and A. R. Coulson. 1977. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **74**, 5463-5467.
 23. Santos, A. and D. Marquina. 2004. Killer toxin of *Pichia membranifaciens* and its possible use as a biocontrol agent against grey mould disease of grapevine. *Microbiology* **150**, 2527-2534
 24. Soejarto, D. D., A. D. Kinghorn and N. R. Farnsworth. 1982. Potential sweetening agents of plant origin. III. Organoleptic evaluation of *Stevia* leaf herbarium samples for sweetness. *J. Natural Products* **45**, 590-599.
 25. Stein, T. 2005. *Bacillus subtilis* antibiotics: structure, syntheses and specific functions. *Mol. Microbiol.* **56**, 845-857.
 26. Takahashi, K., M. Matsuda, K. Ohashi, K. Taniguchi, O. Nakagomi, Y. Abe, S. Mori, N. Sato, K. Okutani and S. Shigeta. 2001. Analysis of anti-rotavirus activity of extract from *Stevia rebaudiana*. *Antiviral Res.* **49**, 15-24.
 27. Tan, L. and P. S. Grewal. 2002. Endotoxin activity of *Moraxella osloensis* against the grey garden slug, *Deroceras reticulatum*. *Appl. Environ. Microbiol.* **68**, 3943-3947.
 28. Tomita, T., N. Sato, T. Arai, H. Shiraishi, M. Sato, M. Takeuchi and Y. Kamio. 1997. Bactericidal activity of a fermented hot-water extract from *Stevia rebaudiana* towards enterohemorrhagic *Escherichia coli* 157:H7 and other food-borne pathogenic bacteria. *Microbiol. Immunol.* **41**, 1005-1009.
 29. White, T. J., T. Bruns, S. Lee and J. Taylor. 1990. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics, pp. 315-322, In Innis, M. A., D. H. Gelfand, J. J. Sninsky and T. J. White (eds.) *PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications*, Academic Press. London.