

# 발효배양액에서 *Streptococcus parauberis* Z49균주가 생산하는 Bacteriocin의 간편한 추출

박홍제<sup>1</sup> · 강용호<sup>2\*</sup>

<sup>1</sup>제니스 대구대학교 산학협력단, <sup>2</sup>영남대학교 생명공학부

## Simple and Rapid Extraction of a Bacteriocin Produced by *Streptococcus parauberis* Z49 from Fermented Cultures

Hongje Park<sup>1</sup> and Yongho Khang<sup>2\*</sup>

<sup>1</sup>Zenith, Daegu University, Gyeongsan 712-714, Republic of Korea

<sup>2</sup>School of Biotechnology, Yeungnam University, Gyeongsan 712-749, Republic of Korea

(Received August 5, 2010/Accepted September 7, 2010)

A novel bacteriocin produced by *Streptococcus parauberis* Z49 strain was characterized and efficiently extracted from fermented cultures by use of aqueous two-phase systems. The nisin-like bacteriocin, which was active even after a heat treatment at 121°C for 15 min and in the broad pH range from 2 to 12, showed inhibition of bacterial growth of *Micrococcus luteus*, *Lactobacillus* spp., *Lactobacillus fermentum*, *Enterococcus faecium*, *Listeria monocytogenes*, and *Pseudomonas fluorescens*. Optimal conditions of PEG 600/Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> aqueous two-phase systems for the simple and rapid extraction of a novel bacteriocin were determined to be PEG 600 15%, Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 30%, and NaCl 8%, where the bacteriocin was concentrated in PEG layer.

**Keywords:** aqueous two-phase system, bacteriocin, extraction, nisin, *S. parauberis*

국내의 어류 양식업에서는 *Vibrio anguillarum* (2), *Edwardsiella tarda* (10) 등과 같은 병원성 미생물 감염에 의한 집단 폐사를 방지하기 위하여 항생제를 다량으로 살포하고 있다. 이와 같은 양식업에서의 항생제 다량 살포는 어류의 내장에서 항생제 내성균 출현을 유도하며, 이들의 내성균이 식품의 유통과정을 통하여 인체에 전이될 수 있기 때문에 항생제를 대체할 수 있는 친환경적인 항균물질의 개발이 필요하다. 어류 양식업에서 항생제 내성 미생물의 증가에 따른 문제점을 극복하기 위하여 생균제를 이용하는 방법이 연구되었다(9). 그러나 생균제는 항생제와 같이 단시간 내에 항균효과를 나타내지 못하기 때문에 생균제를 사용하는 것보다는 생균제가 만들어내는 bacteriocin을 사용하는 것이 더 효과적일 것이다. Bacteriocin은 신속하게 항균활성을 보이면서도 내성균을 생성하지 않기 때문에 항생제 대체물질로 사용하는 것이 가능하다.

유산균인 *Lactococcus lactis*가 만들어내는 nisin은 소규모의 아미노산으로 구성된 단백질성 물질이며, 고온이나 넓은 범위의 pH에서 세균의 증식을 억제하는 항균활성을 보이면서도 인체에는 무해하기 때문에 식품보존제로서 활용되고 있다(11).

그러나 nisin 같은 bacteriocin은 분자량이 2-6 kDa 정도로 작고 균체 밖으로 분비되기 때문에 발효배양액에 존재하는 bacteriocin을 간편하면서도 경제적으로 분리하는 방법은 잘 알려져 있지 않다.

Bacteriocin은 분자량이 작아서 ammonium sulfate에 의한 침전방법 대신, pH를 조절하여 균체에 흡착시키거나(12), chloroform, phenyl-methyl silicone oil 같은 유기용매를 사용하거나(1, 4), polyethylene glycol (PEG)/salt와 같은 수성 이상계를 사용하여 분리하는 방법들이 소개되고 있다(5, 13). 그러나 배양액의 pH를 조절하여 bacteriocin을 균체에 흡착시켜서 분리하는 방법은 pH 조절 이외에도 가열, 고속원심분리(29,000×g), 투석 등의 복잡한 분리과정이 필요하고(12), 유기용매의 사용은 bacteriocin에 잔류할 수 있는 유기성분 때문에 어류 양식업과 같이 식품에 관계된 분야에서는 바람직하지 않다. 한편, PEG/salt 수성 이상계에 의한 분리방법은 비교적 간편하며, 잔류 유기성분이 없고, 분자량이 큰 단백질뿐만 아니라 분자량이 작은 물질도 효과적으로 분리할 수 있다(6-8). 그러므로 발효배양액에 존재하는 bacteriocin을 분리하기 위해서는 PEG/salt 수성 이상계를 사용하는 것이 경제적이면서도 환경 친화적이라고 할 수 있다.

\* For correspondence. E-mail: yhkhang@ynu.ac.kr; Tel: +82-53-810-3051; Fax: +82-53-810-4769

**Table 1.** Antibacterial activity of bacteriocin produced by *S. parauberis* Z49

KCTC No.	Strain	Activity
13588	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	-
1666	<i>Bacillus subtilis</i>	-
3520	<i>Brochothrix campestris</i>	-
13225	<i>Enterococcus faecium</i>	+
1682	<i>Escherichia coli</i>	-
3112	<i>Lactobacillus fermentum</i>	++
1120	<i>Lactobacillus</i> sp.	+
13064	<i>Listeria monocytogenes</i>	+
5343	<i>Propionibacterium thoenii</i>	-
12028	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	+
1925	<i>Salmonella enterica</i> subsp. <i>enterica</i>	-

Diameter of clear zone by growth inhibition (paper disc diameter=8 mm):

++, ≥12 mm; +, ≥9 mm; -, no activity

본 연구는 국내 양식업에서 항생제를 대체하기 위한 새로운 bacteriocin의 개발을 위하여 넙치의 내장에서 분리한 *Streptococcus parauberis* Z49 균주가 생산하는 bacteriocin의 물리화학적 특성과 항균활성의 범위를 조사하고, PEG/salt 수성 이상계를 활용하여 발효배양액에 있는 bacteriocin을 간편하게 추출하기 위한 최적조건을 조사하였다.

Bacteriocin 생산 균주는 넙치의 내장에 있는 균주를 MRS (Difco) 배지를 사용하여 평판배양한 다음 각각의 콜로니의 항균활성을 조사하여 선별하였다. 각 콜로니를 MRS 액체배지에 접종하고, 28°C에서 24시간 배양한 다음 배양액을 원심분리 (20,000×g)로 회수한 상등액의 일부를 membrane filter (0.2 µm pore size, Millipore, USA)로 제균하였다. 제균한 상등액(100 µl)을 지시균주인 *Micrococcus luteus*를 도말한 agar plate 위에 직경이 8 mm인 paper disc에 접종하고 28°C에서 24시간 배양한 다음, paper disc 주변에 투명환이 생성되는 면적을 기준으로 하여 항균생성력이 우수한 균주를 선별하였다.

배양액에 있는 bacteriocin의 활성은 international activity units (IU)로 표시한 상업용의 nisin (Sigma Chemical Co., 10<sup>6</sup> IU/g) 20 mg을 증류수 20 ml에 용해하여서 1000, 500, 250, 125, 62.5 IU/ml 용액이 되도록 희석하여 표준곡선을 만들어서 분석하였다. 표준곡선은 paper disc에 의한 투명환의 면적을 R (cm<sup>2</sup>), nisin의 농도를 C (IU/ml)라 할 때  $R=a+b \cdot \log C$ 의 수식을 사용한 결과 log C와 R의 수치는 직선의 상관관계가 있었다( $a=-4.3643$ ,  $b=3.762$ ,  $r^2=0.9945$ ).

균주를 선별하면서 항균생성력이 가장 우수한 균주의 16S rRNA 염기서열을 판독하여 미국의 NCBI (The National Center

for Biotechnology Information) 사이트에서 blast search (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>)를 한 결과 *Streptococcus parauberis* 염기서열과 일치하여 균주 이름을 *Streptococcus parauberis* Z49로 명명하였다.

*S. parauberis* Z49가 생산하는 bacteriocin은 nisin 생산 균주로 알려진 *Lactococcus lactis* KCTC2013 (한국생명공학연구원 균주은행)을 대조균으로 사용하여 그 생산량을 비교하였다. MRS (Difco) 액체배지에서 *S. parauberis* Z49와 *L. lactis* KCTC2013을 28°C에서 16시간 배양하였을 때 발효액에 분비된 두 균주의 bacteriocin 활성은 75±10 IU/ml이었으며 두 균주의 bacteriocin의 생산량은 유의한 차이가 없었다(P-value> 0.05).

*S. parauberis* Z49가 생산하는 bacteriocin의 항균활성 범위를 알아보기 위하여 KCTC에서 11종의 미생물 균주를 구입하여 조사하였다(Table 1). 균주의 배양을 위하여 *Brochothrix campestris*, *Escherichia coli*, *Salmonella enterica* subsp. *enterica*, *Propionibacterium thoenii*, *Bacillus amyloliquefaciens*, *Pseudomonas fluorescens*, *Bacillus subtilis*는 nutrient (Difco) 배지를 사용하였고, *Enterococcus faecium*, *Lactobacillus* spp., *Lactobacillus fermentum*는 MRS (Difco) 배지를 사용하였고, *Listeria monocytogenes*는 BHI (Difco) 배지를 사용하였다.

*S. parauberis* Z49가 생산하는 bacteriocin의 항균활성은 발효배양액을 membrane filter (0.2 µm, Millipore, USA)로 제균한 다음, 각 균주를 대상으로 agar diffusion assay로 항균활성을 분석한 결과 *Lactobacillus* spp., *L. fermentum*, *E. faecium*, *L. monocytogenes*, *P. fluorescens*의 생육이 저해됨을 확인하였다(Table 1). 이와 같이 제한적인 균주들에 대하여 항균활성을 보이는 bacteriocin이라 하더라도 어류 양식업에 관련된 병원성 미생물들은 다양하기 때문에 향후 산업적으로 활용할 수 있도록 생산을 위한 기초연구가 필요하다.

*S. parauberis* Z49의 bacteriocin 구성 성분을 파악하기 위하여 각종 효소에 의한 영향을 조사하였다. 완충용액 Tris-HCl buffer (50 mM, pH7.5)에 각종 효소농도가 20 mg/ml이 되도록 제조한 다음, *S. parauberis* Z49가 생산한 bacteriocin 용액과 혼합하였다. 효소반응액은 proteinase K는 45°C, 다른 효소는 37°C에서 3시간 동안 반응시킨 후 지시균주로 *M. luteus*를 사용하여 agar diffusion assay 법으로 분석하였다. *S. parauberis* Z49의 bacteriocin은 *L. lactis* KCTC2013의 nisin과 같이 catalase, carboxylase, α-amylase, lysozyme에 의해서는 항균활성에 큰 영향을 받지 않았으나, proteinase K에 의해서는 항균활성이 완전히 상실되었다(Table 2). 따라서 *S. parauberis* Z49이 생산하는 bacteriocin은 nisin과 같이 아미노산으로 구성

**Table 2.** Effect of various enzymes on the antibacterial activity of bacteriocins produced by *S. parauberis* Z49 and *L. lactis* KCTC2013

	Bacteriocin activity (IU/ml)				
	Catalase	Carboxylase	α-Amylase	Lysozyme	Proteinase K
<i>S. parauberis</i> Z49	52±3	46±2	33±2	33±2	ND
<i>L. lactis</i> KCTC2013	55±3	43±2	33±2	35±2	ND

Data indicate means of three independent tests with their standard errors. ND, Not Detected.

**Table 3.** Effect of temperature and pH on the antibacterial activities of bacteriocin produced by *S. parauberis* Z49 and nisin produced by *L. lactis* KCTC2013, respectively

(A) Thermal stability

Bacteriocin	Activity (IU/ml) at 100°C					Activity at 121°C for 15 min
	0 min	10 min	20 min	30 min	60 min	
<i>S. parauberis</i> Z49	75±2	69±2	58±2	58±2	58±2	40±2
<i>L. lactis</i> KCTC2013	72±2	69±2	69±2	58±2	58±2	40±2

Data indicate means of three independent tests with their standard errors

(B) pH stability

Bacteriocin	Activity (IU/ml)					
	pH 2	pH 4	pH 6	pH 8	pH 10	pH 12
<i>S. parauberis</i> Z49	79±3	82±2	88±2	89±3	88±2	89±3
<i>L. lactis</i> KCTC2013	82±2	89±3	89±3	82±3	89±3	89±3

Data indicate means of three independent tests with their standard errors

된 단백질성 물질임을 확인하였다.

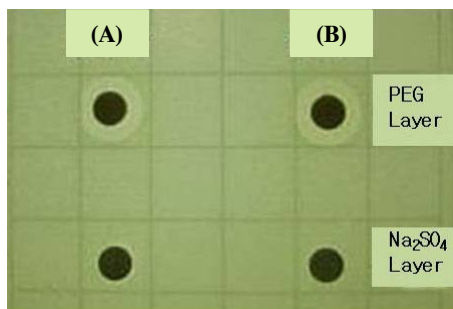
*S. parauberis* Z49의 bacteriocin은 상온(25°C)을 기준으로 할 때 100°C에서 30분 처리한 후에는 활성이 약 23% 감소하였으며, 멸균조건인 121°C에서 15분간 처리한 후에는 활성이 약 47% 정도 감소하였으나 항균활성이 완전히 소멸되지는 않았다(Table 3). 또한 넓은 범위의 pH (pH 2-12)에서 안정하여 pH 변화에 따른 항균활성에 유의한 차이가 없었다(P-value> 0.05). 결과적으로 *S. parauberis* Z49가 생산하는 bacteriocin은 *L. lactis* KCTC2013가 생산하는 nisin과 물리화학적인 특성은 비슷하였으나, 항균활성은 nisin과는 달리 *P. fluorescens* 같은 그람음성균의 생육을 억제하였다.

*S. parauberis* Z49의 bacteriocin을 경제적인 방법으로 생산하기 위해서는 발효배양액에 있는 bacteriocin을 간편하게 분리할 수 있는 연구가 필요하다. 실험실 규모에서는 *S. parauberis* Z49 배양액에 있는 bacteriocin을 다량의 ammonium sulfate에 의한 염침전법과 투석, 그리고 CM-Sephadex 양이온교환수지에 흡착하여 1 M NaCl과 ethanol 20%가 들어간 용출액으로 분리 또는 정제를 할 수 있었다(자료 미제시). 그러나 이런 방법은 시험공장 규모에서는 많은 양의 ammonium sulfate를 첨가해야 하고 또 복잡하게 투석하는 과정도 거쳐야 하기 때문에 bacteriocin을 생산하기 위한 경제적인 분리방법이 아니다. 따

라서 단백질분리를 위하여 많이 사용하는 ammonium sulfate에 의한 침전과 크로마토그래피에 의한 분리방법 대신 PEG/Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 수성 이상계에 의한 추출방법을 조사하였다.

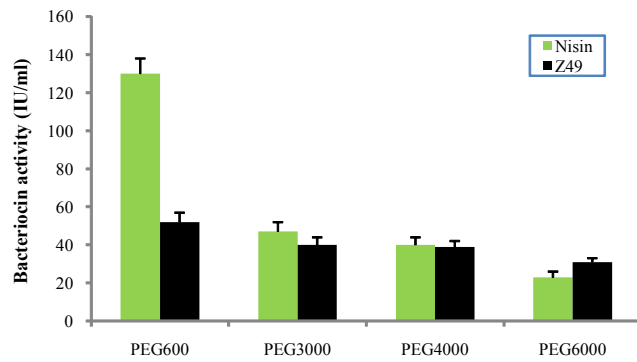
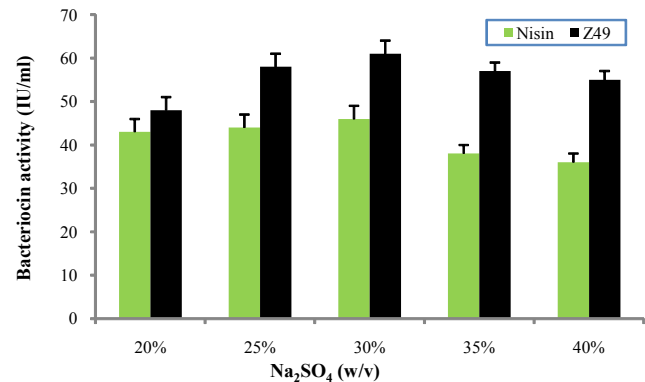
PEG/Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 수성 이상계의 초기조건은 문헌에서 nisin을 분리하기 위해서 사용한 PEG 4000/Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 수성 이상계의 최적조건을 참고로 하여 PEG농도를 15% (w/w), Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 농도를 20% (w/w)로 사용하였다(5). 발효배양액으로 PEG/Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 수성 이상계를 만들었을 때, 배양액에 있는 *S. parauberis* Z49의 bacteriocin은 모두 상층부인 PEG층으로 이동하였으며, 미생물 균체는 하층부인 Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 용액에 남아있었다. 원심분리(20,000×g, 30분)로 균체를 사전에 제거한 배양액으로 만든 수성 이상계와, 균체를 제거하지 않은 배양액으로 만든 수성 이상계에서의 bacteriocin 추출 결과는 유의할 만한 차이가 없었다(Fig. 1). 문헌에 의하면 배양액에 있는 bacteriocin은 균체 표면에 흡착될 수도 있기 때문에(12), *S. parauberis* Z49의 발효배양액(pH 4)을 pH 2 이하로 낮춘 다음, PEG/Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 수성 이상계로 bacteriocin을 추출하여 보았으나 역시 유의할 만한 차이가 없었다(자료 미제시). 따라서 발효가 종료된 배양액에 있는 *S. parauberis* Z49의 균체를 제거하지 않은 배양액을 그대로 사용하여 PEG/salt 수성 이상계의 최적조건을 조사하였다.

PEG/salt 수성 이상계는 추출하고자 하는 물질의 종류에 따라 PEG의 분자량, salt의 종류 및 농도 등이 분리력에 큰 영향을 주고 있다(3, 5, 8, 13). 지금까지 PEG/salt로 수성 이상계를 만들 때는 대부분 분자량이 높은 PEG 1540 (8), PEG 4000 (5), PEG 20000 (7) 등이 사용되었다. *S. parauberis* Z49의 bacteriocin을 추출하기 위한 최적의 PEG 분자량을 조사하기 위하여 PEG 600, PEG 3000, PEG 4000, PEG 6000을 사용하여 PEG층에 있는 bacteriocin의 활성을 분석하였다. 실험결과 PEG 분자량이 클수록 소수성이 높아서 수성 이상계의 층분리는 신속하게 일어났으나, 표준시료인 nisin (Sigma)과 *S. parauberis* Z49의 bacteriocin의 추출은 모두 PEG의 분자량이 낮은 PEG 600에서 가장 우수한 분리효과를 보였다(Fig. 2). PEG 600은 상온(25°C)에서 액상이기 때문에 농도를 15% (v/v)를 유지하고 Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>의 최적농도를 조사하였다. *S. parauberis* Z49의 bacteriocin의 항균활성은 Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 30% (w/w)일 때 가

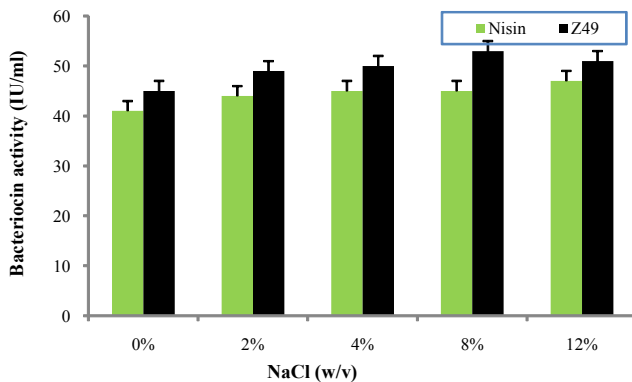


**Fig. 1.** Results of the agar diffusion assays with *S. parauberis* Z49 bacteriocin extracted in PEG 600 (top layer)/Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (bottom layer) aqueous two-phase systems, which were made (A) in the absence of bacterial cells removed by centrifugation and (B) in the presence of bacterial cells.

## (A) Polyethylene glycol (PEG)

(B) Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>

## (C) NaCl



**Fig. 2.** Optimal conditions for bacteriocin extraction with parameters of (A) PEG, (B) Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, and (C) NaCl in PEG/salt aqueous two-phase systems. Nisin was a commercial product (Sigma N5764) and Z49 was a bacteriocin produced by *S. parauberis* Z49 strain. Graph indicates means of three independent tests with their standard errors.

장 높게 나타났으며, 다른 농도에서의 평균활성 결과와 비교할 때 유의한 차이가 있었다(P-value<0.05).

다른 문헌에서도 발효 배양액에 있는 bacteriocin을 수성 이상계로 추출하기 위하여 PEG 4000 15% (w/w)과 Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 20% (w/w)을 사용한 바 있으나(5), 본 연구에서는 PEG 4000 대신 PEG 600으로 대체하고, Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 농도를 20%에서 30%로 변경한 결과 박테리오신의 추출량을 30% 이상 증진시킬 수 있었다(Fig. 2).

문헌에 의하면 PEG/salt 수성 이상계에서 전해질 물질인 NaCl을 첨가하면 단백질의 추출율이 개선되는 효과가 있었다(8). 그러므로 NaCl 첨가에 따른 bacteriocin의 추출 효과를 파악하기 위하여 PEG 600 15% (v/v)와 Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 30% (w/w)의 조건하에서 NaCl의 최적농도를 조사하였다. PEG 층으로 추출되는 *S. parauberis* Z49의 bacteriocin 평균활성은 NaCl 농도가 증가할수록 높게 나타났으나, NaCl 8% (w/w) 이상의 농도에서는 유의할 만한 차이가 없어서(P-value>0.05) 최적농도는 NaCl 8% (w/w)로 선정하였다(Fig. 2).

*S. parauberis* Z49 발효배양액(5 L)에 bacteriocin 추출을 위한 최적조건인 PEG 600 15% (v/v), Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 30% (w/w), NaCl 8% (w/w) 농도가 되도록 각 재료를 첨가하여 잘 혼합한 다음, 상온(25°C)에서 1시간 이상 정치하면 배양액에 있는

bacteriocin이 상층부인 PEG 층으로 이동하면서 층분리가 발생하였다. 이때 상층부인 PEG 층의 부피는 전체 용액부피의 약 25% 정도이어서 배양액에 있는 bacteriocin은 PEG 층으로 이동하면서 자연스럽게 농축이 되었다. 결과적으로 PEG 600/Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 수성 이상계에 의한 *S. parauberis* Z49의 bacteriocin 추출방법은 배양액의 pH를 조절하거나, 원심분리로 균체를 제거하는 등의 분리공정을 불필요하게 만들었으며, 또한 ammonium sulfate 염이나 ultramembrane filter 등을 사용하지 않고도 배양액에 있는 bacteriocin을 간편하게 농축하여 분리하는 것을 가능하게 만들었다. PEG 층으로 추출된 bacteriocin은 spray-drying 방법으로 건조를 하거나, chloroform이나 ethanol 등의 유기용매로 재추출하거나, hydrophobic chromatography에 의한 분리 등으로 정제할 수 있다(1, 8, 11).

## 적요

*Streptococcus parauberis* Z49가 생산하는 새로운 bacteriocin의 특성을 조사하고 수성 이상계를 사용하여 발효배양액에서 효율적으로 추출하였다. Nisin과 유사한 *S. parauberis* Z49의 bacteriocin은 121°C에서 15 min 열처리해도 활성이 있었으며, 넓은 범위의 pH (pH 2-12)에서 안정하며, *M. luteus*,

*Lactobacillus* sp., *L. fermentum*, *E. faecium*, *L. monocytogenes*, and *P. fluorescens*의 생육을 억제하였다. *S. paruberis* Z49의 발효배양액에 있는 bacteriocin을 간편하게 분리하기 위한 PEG 600/ Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 수성 이상계의 최적조건은 PEG 600 15%, Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 30%, NaCl 8% 이었으며, bacteriocin은 PEG층에서 농축이 되었다.

### 감사의 말

본 연구는 한국해양수산기술진흥원의 2009년도 수산중소벤처기업기술개발을 위한 연구비의 지원을 받았습니다. 본 연구의 실험을 도와준 영남대학교 응용미생물학과 학생들에게 감사드립니다.

### 참고문헌

- Burianek, L.L. and A.E. Yousef. 2000. Solvent extraction of bacteriocins from liquid cultures. *Lett. Appl. Microbiol.* 31, 193-197.
- Gram, L., J. Melchiorson, B. Spanggaard, I. Huber, and T.F. Nielsen. 1999. Inhibition of *Vibrio anguillarum* by *Pseudomonas fluorescens* AH2, a possible probiotic treatment of fish. *Appl. Environ. Microbiol.* 65, 969-973.
- Hatti-Kaul, R. 2001. Aqueous two-phase systems. A general overview. *Mol. Biotechnol.* 19, 269-277.
- Kim, W.S. 1997. Nisin production by *Lactococcus lactis* using two-phase batch culture. *Lett. Appl. Microbiol.* 25, 169-171.
- Li, C., J. Bai, W. Li, Z. Cai, and F. Ouyang. 2001. Optimization of conditions for bacteriocin extraction in PEG/Salt aqueous two-phase systems using statistical experimental designs. *Biotechnol. Prog.* 17, 366-368.
- Lee, J.H., N.H. Loc, T.H. Kwon, and M.S. Yang. 2004. Partitioning of recombinant human granulocyte-macrophage colony stimulating factor (hGM-CSF) from plant cell suspension culture in PEG/sodium phosphate aqueous two-phase systems. *Biotechnol. Bioprocess Eng.* 9, 12-16.
- Li, C., F. Ouyang, and J. Bai. 2000. Extractive cultivation of *Lactococcus lactis* using a polyethylene glycol/MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O aqueous two-phase system to produce nisin. *Biotechnol. Lett.* 22, 843-847.
- Miranda, M.V., H.M. Fernandez Lahore, and O. Cascone. 1995. Horseradish peroxidase extraction and purification by aqueous two-phase partition. *Appl. Biochem. Biotechnol.* 53, 147-154.
- Ninawe, A.S. and J. Selvin. 2009. Probiotics in shrimp aquaculture: avenues and challenges. *Crit. Rev. Microbiol.* 35, 43-66.
- Pirarat, N., T. Kobayashi, T. Katagiri, M. Maita, and M. Endo. 2006. Protective effects and mechanisms of a probiotic bacterium *Lactobacillus rhamnosus* against experimental *Edwardsiella tarda* infection in tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Vet. Immunol. Immunopathol.* 113, 339-347.
- Taylor, T.M., P.M. Davidson, and Q. Zhong. 2007. Extraction of nisin from a 2.5% commercial nisin product using methanol and ethanol solutions. *J. Food. Prot.* 70, 1272-1276.
- Yang, R., M.C. Johnson, and B. Ray. 1992. Novel method to extract large amounts of bacteriocins from lactic acid bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* 58, 3355-3359.
- Yankov, D.S., J.P. Martin Trusler, B.Y. Yordanov, and R.P. Stateva. 2008. Influence of lactic acid on the formation of aqueous two-phase systems containing poly(ethylene glycol) and phosphates. *J. Chem. Eng. Data* 53, 1309-1315.