

보 문

Lactobacillus paracasei BK57 균주로 발효시킨 프레쉬 치즈의 항리스테리아 활성

임은서^{1*} · 이은우²

¹동명대학교 식품영양학과, ²동의대학교 생명응용학과

Antilisterial activity of fresh cheese fermented by *Lactobacillus paracasei* BK57

Eun-Seo Lim^{1*} and Eun-Woo Lee²

¹Department of Food Science & Nutrition, Tongmyong University, Busan 48520, Republic of Korea

²Department of Life Science and Biotechnology, Donggwi University, Busan 47340, Republic of Korea

(Received November 26, 2015; Accepted December 17, 2015)

ABSTRACT: This study is focused on establishing the optimal conditions to enhance the production of antilisterial substances by *Lactobacillus paracasei* BK57 isolated from Baikkimchi. In addition, the growth and *in situ* lactic acid and bacteriocin production of this strain were investigated during the manufacture of fresh cheese. And then the efficacy of using *Lactobacillus* starter as a protective culture to improve the safety of fresh cheese against *Listeria monocytogenes* KCTC 3569 was estimated. Maximum growth rate and activity of antibacterial substances were obtained in Lactobacilli MRS broth at 37°C with controlled pH 6.0 after 30 h of incubation under aerobic condition. However, the growth rate and antimicrobial activity of bacteriocin produced in whole milk supplemented with yeast extract (2.0%) as a substrate were lower than those obtained in MRS broth. Live cells and cell-free culture supernatant of BK57 strain were effective in the suppression of *L. monocytogenes* in milk, whereas the inhibitory of the bacteriocin obtained from BK57 strain was higher in BHI broth than in milk. During storage at 4°C and 15°C for 6 days, no significant difference was found in the cell viability and antimicrobial activity of BK 57 strain in fresh cheese. In samples held at two temperatures, there was at least a 15% reduction in the numbers of the pathogen in fresh cheese artificially contaminated with approximately 10⁵ CFU/ml of *L. monocytogenes* within 6 days. Our results demonstrated the usefulness of *L. paracasei* BK57 having antilisterial activity as a biopreservative in the cheese making process.

Key words: *Lactobacillus paracasei*, *Listeria monocytogenes*, antimicrobial activity, bacteriocin, cheese

유산균은 발효유제품, 육가공품 및 채소가공품 제조용 스타터로서 식품 산업에 다양하게 적용되는데 이들은 항균물질을 분비하여 부패균의 증식을 억제함으로써 저장기간을 연장시키고, 각종 효소를 생산하여 고분자 물질을 분해하며, 향미 성분을 생성하여 식품에 독특한 풍미를 부여한다. 유산균은 체내 유해 독소를 감소시키고 올리고당이나 비타민 B군 등의 유용한 성분을 생산함으로써 식품의 영양학적 가치를 높인다는 기능성도 밝혀졌을 뿐만 아니라, 항산화, 항암이나 항콜레스테롤 활성 등 우리의 건강을 이롭게 하는 다양한 생리활성을

가진 유용한 프로바이오틱 균주로서 이에 대해 많은 관심이 집중되고 있다. 이러한 유용한 균을 활용하기 위해 강산의 조건 하에서도 생존 가능한 캡슐제조 기술 및 박테리오파아지에 저항성이 있는 균주 개발 등 유산균의 다양한 기능성 발휘를 위한 제조 기술 및 적용 범위를 확대하기 위한 산업적 응용 기술이 날로 발전하고 있다(Rattanachaikunsopon and Phumkhachorn, 2010).

이제까지 밝혀진 많은 생리활성 중에서 유산균은 식품에 오염된 식중독균 제어에 효과적일 뿐만 아니라, 위장 질환의 원인균인 *Helicobacter pylori*의 증식을 억제시켜 위염이나 위암 발생 위험을 낮추고, 대장 내 각종 유해균의 증식을 억제하

*For correspondence. E-mail: limsm020@tu.ac.kr;
Tel.: +82-51-629-1714; Fax: +82-51-629-1709

여 장내 환경을 개선함으로써 장 건강에 도움을 주는 것으로 알려져 있다(De Vuyst and Leroy, 2007). 이들의 항균활성은 발효과정 중 생성되는 유기산, 디아세틸, 과산화수소 및 박테리옌 등 기인하며, 이러한 항균 물질에 의해 식품 내 부패균이나 식중독균의 증식을 억제하고 사멸시켜 식품의 품질을 향상시킨다(Lindgren and Dobrogosz, 1990).

유산은 유산균이 당을 발효하는 과정 중에 생산되어 식품에 신맛을 부여하고 pH를 조절해 주며, 미네랄을 보강할 뿐 아니라 유해균의 증식을 억제하여 식품의 안전성과 보존성을 향상시킨다(Wee *et al.*, 2006). 유산 이외에도 유산균이 생산하는 항균물질로써는 천연 단백질성 물질인 박테리옌이 있다. 박테리옌은 생산균주의 유전자로부터 리보솜에 의해 직접 생합성되며 생산 균주는 이 물질에 저항하는 면역력이 있으나, 주로 그람 양성균의 병원성균에 대해 항균활성을 나타낸다(Klaenhammer, 1988). Klaenhammer (1993)은 분자량, 열이나 효소에 대한 안정성, 번역후 변형 아미노산의 존재 유무 및 항균 작용 범위에 따라 4개의 class로 분류하였다. 즉, class I 박테리옌(lantibiotic)은 표적 세포막을 전압 의존형으로 파괴시키는 펩타이드로서 alanine-S-alanine의 lanthionine ring을 가지고 있다. Class II 박테리옌은 10 kDa 이하의 분자량이 작고 열에 안정하며 세포막의 이온 불균형과 유기 인산 화합물의 유출시켜 항리스테리아 활성을 나타낸다. Class III 박테리옌은 helveticin과 같이 30 kDa 이상의 분자량이 큰 반면, 60°C의 온도에서 불활성화되어 열에 약하며 주로 *Lactobacillus* 속이 생산한다. Class IV는 lactocin27 및 lactrepcin 등과 같이 주성분인 단백질 분자에 탄수화물 및 지질 분자와 결합되어 있는 복합 박테리옌이다.

박테리옌은 단백질 분해효소에 의해 분해되어 체내에 축적되지 않고, 광범위한 pH나 온도에서도 비교적 안정하며, 장내 균총에는 악영향을 주지 않으면서 유해세균에 대한 항균효과를 나타내는 등 Generally Recognized As Safe (GRAS)로서 미 FDA에 의해 식품첨가물로 사용이 허가된 물질이다(Gálvez *et al.*, 2007). 현재 허용된 박테리옌인 nisin은 식육 및 가공육 가공품, 어육 가공품, 채소 가공품 혹은 유기농품 등 광범위한 가공식품에 생물학적 보존제로 이용되고 있다(Gálvez *et al.*, 2008). 박테리옌을 식품에 적용할 경우 변질을 막아 저장성을 높이며, 제조나 저장 중 식중독균의 오염 위험을 감소시키며, 부패된 식품 폐기율을 낮춰 경제적 손실을 최소화할 수 있다. 또한 독성의 위험이 높은 화학합성 보존제의 사용을 줄일 수 있으며, 미생물 제어를 위한 높은 온도에서의 가열 처리를 박테리옌이 대체함으로써 식품의 향미성분 손실을 막고 열에 약한 비타민 등의 영양소 파괴를 억제할 수 있으므로

식품산업에 있어 박테리옌의 이용 가치는 매우 높다(Gálvez *et al.*, 2007).

강산이나 단백질 분해효소에 대해 저항성이 있고 유해균에 대한 항균력을 발휘하는 프로바이오틱 균주를 가공 식품 제조 과정 중에 이용하거나, 우리가 섭취하여 체내에 유입되었을 때에도 유산균의 생존율이 높아서 박테리옌의 항균활성이 유지될 수 있을 것이다. 본 연구에서는 전보(Lim, 2014)에서 프로바이오틱의 기본 요건을 일부 충족하고, *H. pylori* ATCC 43504, *Listeria monocytogenes* KCTC 3569 및 *Salmonella enteritidis* ATCC 13706에 대한 항균력을 확인한 바 있는 *Lactobacillus paracasei* BK57 균주를 치즈 제조용 스타터로 활용하기 위하여 배양용 액체배지와 우유 배지 내에서의 유산균수, 유산 및 박테리옌 생산량을 비교하였다. 또한 우유 배지에서 실험 균주의 증식과 항균물질 생산량을 측정된 결과를 토대로 실험 균주로 치즈를 제조한 후 저장하는 동안 항균물질의 생성량과 *L. monocytogenes*에 대한 항균력을 조사하였다.

재료 및 방법

사용 균주

백김치로부터 분리된 *L. paracasei* BK57 균주는 *Lactobacilli* MRS broth (Difco)에 접종한 후 37°C에서 24시간 배양한 다음 농축하여 20% (v/v) 글리세롤 용액에 넣어 -80°C에 보관하였다. 지시 균주인 *L. monocytogenes* KCTC 3569는 Korean Collection for Type Cultures (KCTC)로부터 분양 받은 후 Brain Heart Infusion (BHI) broth에 접종한 다음 호기적 조건하에 37°C, 24시간 배양하여 얻은 배양액은 글리세롤과 혼합하여 최종농도 20% (v/v)로 하여 보관하였다.

배양조건에 따른 유산균수 및 항균물질 생성량 측정

MRS broth와 효모추출물 2.0% (w/v)가 함유된 우유(지방 3.4% 함유) 배지(YEM) 내에서의 유산균의 증식 정도와 항균물질 생산에 대한 배양 조건의 영향을 살펴보았다. 초기 균수의 영향을 살펴보기 위해 유산균을 MRS broth에서 배양한 후 원심분리하여 세포를 회수한 다음, 1.0×10^5 , 10^6 , 10^7 및 10^8 CFU/ml로 조정된 세포 현탁액(1%, v/v)을 MRS broth 및 YEM에 각각 접종하고 37°C, 24시간 호기적 조건하에서 배양하였다. 배지의 초기 pH에 대한 영향을 살펴보기 위해, MRS와 YEM의 초기 pH를 5.0, 6.0, 7.0 및 8.0으로 조정된 다음 유산균(1.0×10^7 CFU/ml) 배양액 1%를 MRS broth 및 YEM에

각각 접종하고 37°C, 24시간 호기적 조건하에서 배양하였다. 배양 중 공기 조성의 영향을 살펴보기 위해 유산균(1.0×10^7 CFU/ml)을 pH 6.0으로 조정된 MRS broth와 YEM에 접종하여 37°C, 24시간 동안 호기성, 미호기성(85% N₂, 5% O₂, 10% CO₂) 및 혐기성(85% N₂, 10% H₂, 5% CO₂) 조건 하에서 배양하였다. 배양 온도의 영향을 살펴보기 위해 유산균(1.0×10^7 CFU/ml)을 pH 6.0으로 조정된 MRS broth와 YEM에 접종하여 25, 30, 37 및 45°C에서 24시간 호기적 조건으로 배양하였다. 배양 시간의 영향을 살펴보기 위해 유산균(1.0×10^7 CFU/ml)을 pH 6.0으로 조정된 MRS broth와 YEM에 접종하여 37°C, 24-48시간 동안 호기적 조건 하에서 배양하였다. 염 농도에 대한 영향을 살펴보기 위해 pH 6.0으로 조정된 MRS broth와 YEM에 0.5, 1.0 및 2% (w/v)의 NaCl을 첨가한 다음 유산균(1.0×10^7 CFU/ml)을 접종하여 37°C, 24시간 동안 호기적 조건 하에서 배양하였다. 각각의 조건 하에서 배양한 다음 무균적으로 배양액을 채취하여 생균수, 유산 생성량 및 박테리옌 활성을 측정하였고, *L. monocytogenes* KCTC 3569에 대한 저해율을 조사하였다.

유산균수, 향균물질 생성량 및 향균력 측정

배양 후 얻어진 배양액은 심진희석법으로 희석한 다음 MRS agar (Difco) 배지 상에서 표준 평판배양법으로 유산균의 생균수를 측정하였다. 배양액 내 유산 양을 측정하기 위해 배양액을 회수하여 원심분리(7,000 × g, 10분, 4°C) 하여 배양 상등액을 모은 다음 0.22 μm membrane filter (Millipore)로 여과 제거한 뒤 HClO₄ (1 M)를 첨가하여 단백질을 침전시켰다. High-pressure liquid chromatography (HPLC, Shimadzu)의 컬럼은 Aminex HPX-87H (300 × 7.8 mm: Bio-Rad)이며, 검출기는 refractive index (GBC Scientific Equipment Pty Ltd.), 이동상은 H₂SO₄ (5 mM), 유속은 0.5 ml/min이었고, 컬럼 온도는 35°C 하에서 분석하였다. 220 nm에서 흡광도를 측정하여 표준용액의 검량곡선으로부터 유산 함량을 정량하였다. 한편, 박테리옌 용액 제조를 위해 1 N NaOH를 이용하여 배양 상등액의 pH를 6.5으로 조정하였으며, 과산화수소에 대한 영향을 배제하기 위해 카탈라아제(1 mg/ml, Sigma-Aldrich)를 처리하였다. 배양 상등액에 50% (w/v) 황산암모늄을 처리한 후 4°C 내에서 교반한 다음 원심분리(12,000 × g, 30분, 4°C)하여 얻어진 침전물은 20 mM PBS (pH 6.5)에 현탁시켰다. 그런 다음 4°C, 24시간 동안 동일한 buffer 내에서 투석막(molecular weight cut-off = 1,000 Da, Spectrum Medical Industries, Inc.)으로 투석시키고 난 다음 0.22 μm membrane filter로 여과 제거하여 박테리옌 용액을 조제하였다. 박테리옌 용액의 활

성은 *L. monocytogenes* KCTC 3569을 대상으로 microtiter plate 방법(Hole *et al.*, 1991)으로 측정하였다. *L. monocytogenes*는 BHI broth 내에서 37°C, 48시간 배양 후 원심분리(7,000 × g, 10분, 4°C)하여 세포만을 모은 다음 PBS (pH 7.0)로 2회 세척하였다. *L. monocytogenes*의 세포수는 1.0×10^5 CFU/ml로 맞추었고, 일정한 비율로 희석한 박테리옌 용액을 혼합한 후 microtiter plate well (Falcon)에 가한 다음 37°C에서 24시간 배양하였다. Microplate reader (BioTek, Inc.)를 통해 600 nm에서 흡광도를 측정하여 박테리옌 용액 대신 buffer를 처리한 대조구에 비해 혼탁도가 50% 저해된 최대 희석배수의 역수를 측정하여 박테리옌 활성(arbitrary units, AU/ml)으로 환산하였다. 한편, 향균력 측정을 위해 BHI broth 내에서 배양된 *L. monocytogenes*를 회수하여 원심분리(7,000 × g, 10분, 4°C)한 후 PBS (pH 7.0)로 2회 세척하고 난 다음 1×10^5 CFU/ml로 균수를 조정하였다. BHI broth에 *L. monocytogenes* 세포 현탁액 1% (v/v)를 접종하고, MRS broth와 YEM에서 각각의 배양조건으로부터 얻은 유산균 배양 상등액(0.5%, v/v)을 첨가한 다음 37°C에서 24시간 배양하고 난 후 무균적으로 배양액을 적당히 희석한 다음 Oxford agar (Difco) 상에서 표준 평판배양법으로 생균수를 측정하여 향균물질에 의한 *L. monocytogenes*의 저해율(%)를 조사하였다.

향균물질의 농도에 따른 향리스테리아 활성 측정

유산균을 MRS broth (pH 6.0)에서 37°C, 24시간 동안 호기적 조건 하에서 배양하여 얻은 배양액을 원심분리(7,000 × g, 10분, 4°C)한 후 PBS (pH 7.0)로 2회 세척하였고, 원심분리한 배양액으로부터 상등액과 박테리옌 용액을 각각 조제하였다. 한편, BHI broth 내에서 배양된 *L. monocytogenes*를 회수하여 원심분리(7,000 × g, 10분, 4°C)한 후 PBS (pH 7.0)로 2회 세척하여 생균만을 모았다. BHI broth와 멸균 우유(지방 3.4% 함유)에 *L. monocytogenes* 세포 현탁액(1×10^5 CFU/ml) 1% (v/v)를 접종한 다음 유산균 세포 현탁액(1×10^5 , 10^6 및 10^7 CFU/ml) 1% (v/v), 배양 상등액(1, 2, 3%) 및 박테리옌 용액(100, 200, 300 AU/ml)을 각각 첨가하였다. 37°C, 24시간 동안 호기적인 조건 하에서 배양한 후 Oxford agar 상에서 평판 배양하여 *L. monocytogenes*의 균수를 조사하여 대조구(생균 및 향균물질 무첨가구)에 대한 균수 감소율(%)을 계산하였다.

프레쉬 치즈 제조 및 향균물질에 의한 저장성 향상 효과

프레쉬 치즈는 Coelho 등(2014)의 방법을 일부 변형하여 제조하였다. 즉, 시판 우유(지방 3.4% 함유)에 CaCl₂ (0.02%)과 NaCl (1.0%)을 첨가하여 초기 균수 10^7 CFU/ml로 조정된 유

산균 배양액(1%, v/v)을 접종하였다. 그런 다음 렌넷(0.02%)을 첨가하여 35°C에서 배양하였다. 이 때 대조구는 균주 배양액을 제외한 첨가물을 실험구와 동일하게 혼합하였다. 약 20시간 경과 후 pH 4.5 부근에 도달하면 커드는 $2 \times 2 \text{ cm}^3$ 의 크기로 자르고 40°C로 온도를 올려 가끔씩 저어주면서 약 1시간 정도 방치하여 유청을 배출한 후 멸균된 치즈틀에 담아 압착하고 4°C와 15°C에서 6일간 저장하는 동안 유산균수와 유산 생성량 및 박테리오신 활성을 측정하였다. 치즈 내에 함유된 유산의 양은 Ong 등(2006)의 방법에 따라 측정하였는데, 시료(5g)는 0.009 N 황산(25 ml)과 15.5 N 질산(70 μl)을 혼합하여 처리한 다음 10,000 rpm의 속도로 균질화하였다. 50°C 항온수조 내에서 1시간 방치한 후 원심분리(4,000 \times g, 20분, 4°C)하여 상등액(지방)과 침전물(카제인) 사이 중간층의 용해성 분획물(1.5 ml)를 회수하였다. 0.22 μm membrane filter로 여과 제균한 다음 HPLC로 유산양을 측정하였다. 박테리오신 활성을 측정하기 위해 시료(5g)를 채취하여 4,500 \times g, 4°C에서 10분간 원심분리하여 상등액을 얻었고, 이를 PBS (0.5 M, pH 7.0)으로 중화시킨 다음 여과 제균하고 앞서 언급한 microtiter plate method에 따라 *L. monocytogenes* 배양액(1.0×10^5 CFU/ml)에 대한 박테리오신의 활성을 측정하였다(Coelho et al., 2014).

한편, *L. monocytogenes* KCTC 3569는 BHI broth 내에서 37°C, 24시간 배양한 배양액을 모아 원심분리(7,000 \times g, 10분, 4°C)하여 세포만을 회수하고 PBS (pH 7.0)로 2회 세척하였다. 제조된 치즈에 *L. monocytogenes* 세포 현탁액(1.0×10^5 CFU/ml, 1% [v/v])을 접종하고 각각의 온도대에서 저장하였다. 일정한 시간 간격으로 시료(10 g)를 무균적으로 채취한 다음 9배의 PBS (pH 7.0)을 첨가하여 약 2분간 균질화(KMC-133V, Vision Scientific)하고 적당한 단계로 희석한 다음 앞서 언급한 방법에 따라 Oxford agar 상에서 배양 후 생성된 집락수를 계수하여 초기 균수에 대한 *L. monocytogenes*의 감소율(%)을 조사하였다.

통계처리

모든 실험은 총 3회 실시 후 측정값은 평균 \pm 표준편차로 나타내었고, 통계분석은 SPSS Ver. 12.0 package program (SPSS)을 이용하여 군간의 차이 유무를 one-way ANOVA로 분석한 뒤 $P < 0.05$ 에서 유의한 차이가 있을 경우 Duncan's multiple range test로 사후 검정하였다.

결과 및 고찰

유산균 증식과 항균물질 생산에 대한 배양 조건의 영향

MRS broth와 YEM 내에서 *L. paracasei* BK57의 증식과 항균물질 생산에 대한 배양 조건의 영향을 살펴본 결과는 Table 1과 같다. MRS broth 내에 초기 균수를 10^5 CFU/ml 접종한 경우는 37°C에서 24시간 배양 후 10^8 CFU/ml에 도달했으나, 10^6 CFU/ml 이상인 경우는 10^9 CFU/ml에 이르렀다. YEM에서 배양한 경우는 초기 균수가 증가할수록 배양 후 최종 균수도 높았으나, MRS broth에 비해 최종 균수가 약 1 log cycle 정도 낮게 나타났다. 유산 생성량은 초기 균수가 높을수록 많았고, MRS 내에서 생성된 유산의 양이 YEM 내에서 생성된 양보다 유의하게 높았다. *L. monocytogenes* KCTC 3569에 대한 박테리오신 활성은 MRS broth 내에서 10^6 CFU/ml 이상의 균수 접종에 의해 520 AU/ml에 이르렀으나, YEM 배지 내에서는 MRS broth에서 생성된 양의 절반(260 AU/ml) 수준 정도였다. 배양 상등액 0.5% 첨가에 의한 *L. monocytogenes* KCTC 3569의 저해율을 조사한 결과, YEM 보다 MRS broth로부터 얻은 배양 상등액의 저해율이 유의하게 더 높았다. 따라서 BK57은 MRS와 YEM에서 초기 균수가 최소 10^6 CFU/ml 이상인 경우 유산균수는 최대에 이르고 이에 따라 항균물질 생산량도 높았는데, 그 중에서도 10^7 CFU/ml인 경우 유산량과 박테리오신 활성이 다소 높았기 때문에 최적의 접종 균수임을 확인하였다. MRS broth와 YEM의 초기 pH를 5.0-8.0으로 각각 조정하면 다음 BK57의 초기 균수를 10^7 CFU/ml 접종하여 37°C, 24시간 동안 호기적인 조건에서 배양한 결과, 배지의 pH가 5.0과 8.0인 경우는 pH 6.0과 7.0에 비해 유산균수와 항균물질 생산량이 유의하게 낮게 나타났다. 특히 유산균수와 유산의 생성량은 pH 6.0과 7.0에서 유의한 차이가 없었으나, MRS broth 내에서 생성된 박테리오신 양은 pH 7.0보다 6.0에서 더 높게 나타났다. 그러나 pH 6.0과 7.0인 YEM에서 생성된 박테리오신 활성에는 차이가 없었다. 따라서 BK57 균주의 증식과 항균물질 생산을 위한 배지의 최적 pH는 6.0임을 확인하였다. 공기 조성에 대한 영향을 살펴보기 위해 MRS broth와 YEM의 초기 pH를 6.0으로 조정하면 다음 BK57의 초기 균수 10^7 CFU/ml를 접종한 다음 37°C, 24시간 동안 호기적, 미호기적 및 혐기적 조건 하에서 배양한 결과, 호기와 미호기적인 조건 하에서는 유산균수와 항균물질 생산량에 유의한 차이가 없었으나, 혐기적인 조건 하에서는 이보다 유의하게 낮은 값이 나타났다. 비록 YEM에서 생산된 박테리오신의 양은 호기와 미호기적 배양 하에서 동일하게 나타났으나, MRS broth 상에서 박테리오신 생산량은 미호기적 조건(520 AU/ml) 보다는 호기적 조건(550

Table 1. Effect of culture conditions on the growth and the production of antilisterial substances of *L. paracasei* BK57 strain

Parameters	Conditions	Viable cell counts (CFU/ml)		Lactic acid (mM)		Bacteriocin activity (AU/ml)		Inhibition (%)	
		MRS	YEM	MRS	YEM	MRS	YEM	MRS	YEM
Initial cell counts (CFU/ml)	10 ⁵	2.5±1.3×10 ^{8a}	3.8±0.6×10 ^{6a}	96.6±4.4 ^a	68.3±6.1 ^a	450	150	24.1±0.3 ^a	13.3±5.3 ^a
	10 ⁶	5.5±0.7×10 ^{9b}	6.5±1.5×10 ^{7a}	115.6±10.0 ^b	71.3±2.5 ^a	520	190	26.8±0.9 ^{ab}	16.5±4.9 ^a
	10 ⁷	6.0±0.5×10 ^{9b}	2.1±1.0×10 ^{8a}	124.3±2.8 ^b	88.6±3.7 ^b	520	260	28.9±1.5 ^c	16.0±4.2 ^a
	10 ⁸	4.7±3.0×10 ^{9b}	9.5±2.4×10 ^{8b}	118.3±4.0 ^b	85.3±5.1 ^b	520	260	28.4±0.9 ^{bc}	16.7±3.7 ^a
Initial pH	5.0	7.3±0.4×10 ^{7a}	4.5±2.4×10 ^{7a}	52.8±5.4 ^a	32.9±3.7 ^a	ND	ND	5.3±0.1 ^a	1.1±0.3 ^a
	6.0	7.5±2.1×10 ^{9b}	4.0±0.8×10 ^{8c}	126.3±4.0 ^c	83.4±1.5 ^b	550	260	29.2±0.3 ^c	20.1±2.5 ^c
	7.0	6.3±4.1×10 ^{9b}	2.4±0.3×10 ^{8b}	122.3±3.6 ^c	81.5±8.9 ^b	520	260	28.2±0.9 ^c	17.4±3.1 ^c
	8.0	5.5±1.6×10 ^{8a}	2.0±0.5×10 ^{7a}	72.6±11.0 ^b	41.3±2.3 ^a	230	80	14.3±0.4 ^b	7.6±0.8 ^b
Atmosphere composition	Aerobic	7.5±2.1×10 ^{9a}	4.0±0.8×10 ^{8b}	126.5±4.3 ^b	85.8±0.9 ^b	550	260	28.3±0.8 ^b	20.2±2.4 ^b
	Microaerobic	1.9±1.5×10 ^{9b}	2.7±0.3×10 ^{8b}	124.5±10.0 ^b	83.8±7.2 ^b	520	260	28.0±0.2 ^b	15.3±4.9 ^{ab}
	Ananerobic	2.5±2.0×10 ^{8b}	3.1±0.9×10 ^{7a}	85.3±3.5 ^a	66.4±8.4 ^a	380	120	15.7±0.3 ^a	9.6±1.0 ^a
Incubation temperature (°C)	25	2.4±1.4×10 ^{8a}	3.5±0.4×10 ^{7a}	96.7±5.6 ^a	67.4±4.7 ^a	420	200	16.8±1.1 ^a	10.9±1.5 ^a
	30	6.2±1.8×10 ^{9b}	2.7±0.7×10 ^{8b}	121.8±6.5 ^b	80.3±7.4 ^b	550	260	28.3±1.2 ^b	21.6±1.8 ^b
	37	7.5±2.1×10 ^{9b}	4.0±0.8×10 ^{8c}	126.2±4.5 ^b	85.5±1.4 ^b	550	260	27.9±2.0 ^b	20.1±2.5 ^b
	45	2.2±1.9×10 ^{8a}	4.1±2.6×10 ^{7a}	90.5±7.2 ^a	69.2±5.1 ^a	390	170	15.4±0.6 ^a	10.0±0.6 ^a
Incubation time (h)	24	7.5±2.1×10 ^{9c}	4.0±0.8×10 ^{8b}	126.1±4.8 ^a	85.8±0.9 ^a	550	260	28.0±0.1 ^b	20.1±2.5 ^a
	30	3.9±0.4×10 ^{9b}	3.3±0.2×10 ^{8b}	124.9±11.1 ^a	89.0±8.5 ^a	520	220	27.6±0.7 ^b	17.8±6.3 ^a
	36	7.7±3.5×10 ^{8a}	4.5±1.8×10 ^{8b}	129.0±8.7 ^a	90.5±4.2 ^a	480	220	27.0±1.0 ^b	15.2±7.0 ^a
	48	3.3±0.6×10 ^{8a}	2.9±0.7×10 ^{7a}	132.8±12.4 ^a	94.5±6.5 ^a	420	220	15.1±0.2 ^a	16.5±2.5 ^a
NaCl concentration (%)	0	7.5±2.1×10 ^{9a}	4.0±0.8×10 ^{8a}	126.1±4.8 ^a	85.8±0.9 ^a	550	260	28.6±0.3 ^a	20.1±2.5 ^a
	0.5	2.6±1.1×10 ^{9a}	5.0±0.3×10 ^{8a}	119.6±7.6 ^a	82.5±4.6 ^a	550	280	29.2±0.5 ^a	22.4±3.0 ^a
	1.0	5.5±0.2×10 ^{9a}	3.4±0.1×10 ^{8a}	126.8±9.2 ^a	89.4±6.3 ^a	550	280	29.5±0.4 ^a	19.6±5.2 ^a
	2.0	6.9±3.5×10 ^{9a}	4.8±1.1×10 ^{8a}	123.8±5.6 ^a	86.9±3.0 ^a	550	280	29.0±0.9 ^a	20.8±2.9 ^a

Data are means ± standard deviation (SD) from triplicate determinations and the significant difference of means was estimated by Duncan's multiple range test. Means with different superscript letters indicate statistically significant differences as determined by ANOVA ($P < 0.05$).

AU/ml)에 다소 높게 나타났으며, 이에 따라 *L. monocytogenes*에 대한 저해율도 높게 나타났으므로 호기적인 조건하에서 배양한 것이 적합함을 확인하였다.

한편, 배양 온도의 영향을 살펴본 결과, MRS broth (pH 6.0)에서 25°C와 45°C에서 24시간 동안 호기적으로 배양했을 때 균수는 10⁸ CFU/ml 정도로 30°C와 37°C에 비해 1 log cycle 이상 낮게 나타났고, 유산과 박테리옌 생성량도 유의하게 낮게 나타났다. 이러한 경향은 YEM에서도 나타나 30°C와 37°C가 유산균 증식과 항균물질 생산에 최적 온도이나, 균수와 유산량이 유의한 차이는 없었지만 30°C 보다는 37°C에서 약간 더 높게 나타났다. 배양 시간의 영향을 살펴보기 위해 초기 pH 6.0인 MRS broth와 YEM에 BK57의 초기 균수 10⁷ CFU/ml를 접종하고 37°C에서 호기적으로 배양한 결과, 배양 24시간 만에 MRS와 YEM에서 각각 10⁹과 10⁸ CFU/ml에 이르렀으며 이들의 최고 균수는 30시간에도 유지되었다. 하지만 MRS broth

에서는 36시간 이후, YEM에서는 48시간 이후에 균수가 감소되어 각각 약 1 log cycle 낮은 균수가 측정되었다. 유산의 생성량은 배양 24시간만에 최대에 이르러 48시간 배양에도 비슷한 수준의 양이 검출되었다. 하지만 박테리옌의 경우 MRS broth와 YEM에서 24시간 배양했을 때 각각 최대 활성 550 AU/ml와 260 AU/ml이 측정되었으나, 배양 시간이 경과할수록 활성이 서서히 감소되어 48시간 배양했을 때에는 MRS broth에서 420 AU/ml로 낮아졌다. 하지만 YEM 배지 내에서 48시간만에 생성된 박테리옌은 비록 24시간 때보다는 낮아졌지만 30시간 배양에서 생성된 활성과 동일한 수준으로 일정하게 유지되었다. *L. monocytogenes*에 대한 저해율은 YEM보다 MRS broth에서 높게 나타났고, MRS broth에서 24-36시간 배양하여 얻은 배양액의 항균활성에는 유의할 만한 차이가 없었으나, 48시간 배양액 내에서는 박테리옌 활성 감소로 인하여 항균력이 크게 감소되었다. 하지만 YEM 배양액의

항균력은 배양시간 동안 거의 일정한 수준으로 나타났다. 배지 내 NaCl의 함량에 대한 영향을 살펴본 결과, MRS broth에 NaCl을 첨가하지 않는 경우와 최대 2%를 첨가한 경우에는 유산균수와 항균물질 생산량 및 배양 상등액의 *L. monocytogenes*에 대한 저해율에 유의적인 차이가 없었으므로 최대 2% 농도의 NaCl은 BK57균주의 성장과 항균물질 생산에 큰 영향을 미치지 않는 것으로 확인되었다. 그러나 YEM에 NaCl을 첨가했을 때 유산균수와 유산량 및 항균력에는 유의할만한 차이가 없었으나, NaCl을 0.5% 이상 첨가했을 때는 첨가하지 않았을 때에 비해 박테리오신 활성이 다소 증가되었다.

이상의 결과에서 볼 때 BK 57 균주는 NaCl농도 0.5-2.0%와 pH 6.0인 배지에 초기 균수 10^6 CFU/ml 이상 접종하여 37°C에서 24시간 동안 호기적인 조건 하에서 배양할 경우 유산균의 증식이 최대에 이르렀고, 균수가 증가할수록 항균물질 생산량도 비례적으로 증가하였으며, 이에 따라 *L. monocytogenes*에 대한 저해율도 증가됨을 알 수 있었다. 하지만, BK57 균주는 중균 배지인 MRS broth 보다 YEM에서 균 증식도와 항균물질 생산량이 낮게 나타났는데 이는 배지 내 영양성분의 차이에 기인하는 것으로 사료된다.

pH 6.5인 MRS broth와 우유 내에서 7종의 *Lactobacillus* 유산균의 성장과 대사산물 및 박테리오신 생산량을 측정 한 결과, MRS broth에서 *Lactobacillus casei*는 *Lactobacillus acidophilus*에 비해 증식률이 높았으나, 박테리오신은 *L. acidophilus*에 의해 더 많은 양이 생산되었다. 그리고 우유 배지에 효모추출물을 첨가했을 때 *Lactobacillus johnsonii* La1과 *Lactobacillus gasseri* K7의 성장률이 증가하였고, 대부분의 유산균은 0.3-1.0%의 효모추출물에 의해 균 증식뿐만 아니라 박테리오신 생산량도 증가되었다(Avonts *et al.*, 2004). 유산균 배양용 배지 내에서 lacticin 3147은 MRS에서 가장 높은 활성을 나타내었고, 전유(whole milk) 내에서는 MRS 내에 생성된 활성의 90% 정도 수준이었다(Ryan *et al.*, 1996). *Enterococcus faecium* DPC 1146이 생산하는 박테리오신(enterocin 1146)은 배양용 배지에 비해 우유 내에서 급격하게 감소되었으나(Parente and Hill, 1992), *E. faecium* 7C5의 증식과 박테리오신 생산을 위해선 우유가 가장 적합하다고 밝혀본 연구 결과와 상이하였다(Giraffa *et al.*, 1995). *L. johnsonii* La1과 같이 우유 배지 내에서 낮은 증식을 보이는 것은 우유에 유리아미노산 및 저분자의 펩타이드 함량이 낮기 때문으로 효모추출물이나 알라닌, 세린, 이소루신 및 시스테인 등의 아미노산 혼합물을 첨가함으로써 균수를 증가시킬 수 있다고 보고하였다(Elli *et al.*, 1999).

Lactobacillus 속들의 유산 생산에 대한 배지의 영향을 살펴

본 결과, 배지 종류에 따라 유산의 생성량에 차이가 있었으며, 그 중에서 가장 많은 양의 유산은 MRS broth 상에서 나타난 반면, 탈지유에서 생성량이 가장 낮았다고 하였다(Zalán *et al.*, 2010). Gänzel 등(1999)에 따르면, 박테리오신 생산은 공기 조성, pH, 배양 온도 및 생산 균주의 성장 단계에 영향을 받는다 고 하였으며, 박테리오신 생산량과 유산균수는 비례하여 증가한다고 알려져 있다(De Vuyst *et al.*, 1996). 또한 박테리오신 생산량은 배지 성분에 따라 크게 달라지는데 배지 내 탄소원, 질소원, 인산염, 양이온, 계면활성제 및 저해제의 종류와 양에 영향을 받는다(Parente and Ricciardi, 1999). 하지만 모든 균주들이 반드시 최적의 성장단계에서 가장 높은 활성의 박테리오신을 생산하는 것은 아니다. pH, 온도 및 수분활성도와 같은 환경적 조건도 박테리오신 생산량에 영향을 줄 뿐만 아니라 이러한 배양적 조건은 박테리오신 활성의 안정성에도 영향을 미친다(Leroy and De Vuyst, 1999). 박테리오신 생산을 위한 최적의 pH는 5.5-6.0인 반면 최대의 성장을 위해선 이보다 높은 pH가 요구되므로 균 성장과 박테리오신 생산을 위한 최적의 pH가 반드시 일치하지는 않는다(Meghrouss *et al.*, 1992). Mataragas 등(2003)도 가장 높은 박테리오신 활성은 균의 최적 성장보다 낮은 배양온도와 pH에서 나타났다고 하였다. pH가 낮으면 생산 균주에 대한 박테리오신 분자의 흡착력이 감소되어 박테리오신 활성이 증가된다(Yang *et al.*, 1992). 한편, 호기적인 조건과 혐기적인 조건 하에서 *L. paracasei* LA07은 균 증식과 박테리오신 생산량에 유의한 차이가 없었다고 하여 본 결과와 다소 차이가 있었다. 일반적으로 유산균은 적당한 양의 산소 존재 하에서나 혹은 제한된 조건하에서 박테리오신을 생산하는 것으로 알려져 있다(Abbasiliassi *et al.*, 2011). 적절히 조정된 배양온도와 pH는 박테리오신 생산량을 증가시키는 반면, 3% 이상의 NaCl의 첨가는 생산량이 감소된다고 보고하였다(De Vuyst and Leroy, 2007). 특히 배양온도는 유산균 세포의 반응속도에 영향을 주어 결국 박테리오신 생산량에도 영향을 미치게 되는데, 치즈에서 분리된 *L. paracasei* subsp. *tolerans*의 박테리오신은 배양 온도 35°C, NaCl 0.2% 첨가된 초기 pH 7.0인 배지 내에서 28시간 배양 후 최대량을 생산하였다(Malini and Savitha, 2012). Lactocin 705의 활성은 MRS broth에 3% NaCl을 첨가하여도 감소되지 않았다(Vignolo *et al.*, 1995).

박테리오신은 생산 균주의 주요 대사산물로써 대수증식에 생산되기 시작하여 정지기 초반에 생산을 멈추는 것으로 보고되고 있다(Parente *et al.*, 1997). 박테리오신 생산량 감소는 생산 균주 세포 표면에 흡착되거나 특이적 혹은 비특이적 단백질 분해효소에 의해 분해되기 때문인 것으로 알려져 있다

(Meghrouh *et al.*, 1992). 일반적으로 박테리옌은 발효 식품 내에서 생산될 때 보다 최적의 배양용 배지 내에서 더 많은 양을 생산하는 것으로 알려져 있는데, 이는 식품 내에 존재하는 박테리옌 분비 억제 인자 및 단백질 분해 효소 등에 영향을 받거나 박테리옌이 식품 입자에 흡착되어 생산량이 상대적으로 낮게 나타난다고 하였다(Leroy and De Vuyst, 2000). MRS broth와 비교했을 때 *Lactobacillus* 유산균은 효모추출물을 첨가한 우유 배지 내에서 박테리옌 생산량이 낮았는데 그 이유로는 낮은 균 증식과 카제인 등 우유 성분에 박테리옌 분자가 결합하여 검출이 어려울 수 있으며, 우유 내에서 박테리옌 활성이 발효 후반에 생산되기 때문이다. 게다가 박테리옌 분해도 두 배지 사이에 차이 있었는데, MRS broth에서는 정지기 초반부터 박테리옌이 빠르게 분해되기 시작하여 발효 종료시점에는 거의 완전히 분해된 반면 효모추출물을 첨가한 우유 배지 내에서는 박테리옌의 활성이 비교적 안정하였다. 우유 배지 내에서 박테리옌 활성이 안정한 이유는 정확하게 밝혀지진 않았지만, MRS broth에서와는 달리 특별한 우유 구성성분들이 유산균 세포에 박테리옌 분자가 흡착되는 것을 방해하는 것으로 추정된다고 보고하였다(Avonts *et al.*, 2004).

항균물질 농도에 따른 *L. monocytogenes*에 대한 항균 활성

BHI broth와 생 우유에 *L. monocytogenes* (10^5 CFU/ml)를 접종한 다음 MRS broth에서 배양한 BK57의 생균과 항균물질이 포함된 배양 상등액 및 박테리옌 용액을 농도별로 첨가하고 37°C에서 24시간 배양한 후 *L. monocytogenes*의 증식 저

해 정도를 측정된 결과는 Table 2와 같다. BHI broth 내에서 12시간 배양 후 *L. monocytogenes*는 BK57의 박테리옌 100 AU/ml 하에서 가장 낮은 저해율($18.6 \pm 0.4\%$)이 나타난, 반면 배양 상등액 3% 첨가에 의해선 $42.4 \pm 2.3\%$ 의 가장 높은 저해율을 나타내었다. BK57의 생균수와 첨가된 항균물질의 농도가 높을수록 항균력은 비례적으로 증가하였으며, 배양 12시간 보다는 24시간 배양했을 때 항균력은 다소 증가하였으나, 36시간에는 일부 조건에서 오히려 감소하는 것으로 나타났다. 반면, 우유에 존재하는 *L. monocytogenes*의 균수는 유산균의 생균과 배양 상등액 처리에 의해 BHI broth 내에서 보다 더 낮게 검출되어 저해율이 더 높게 나타난 반면, 박테리옌의 항균력은 우유 내에서 더 낮게 나타났다. BK57의 생균 10^7 CFU/ml 첨가에 의해선 배양 36시간 만에 $43.8 \pm 0.7\%$ 감소되었고, 배양 상등액 3%와 박테리옌 용액 300 AU/ml 첨가에 의해서는 각각 $49.8 \pm 1.0\%$ 와 $21.0 \pm 0.9\%$ 저해되었다. 이상의 결과에서 볼 때 BHI broth 보다 우유 배지 내에서 유산균과의 혼합배양에 의해 항균력이 더 높게 나타난 것은 BHI broth 내에 *L. monocytogenes*의 증식에 유리한 다양한 영양원이 함유되어 유산균의 항균활성에 대한 저항성이 증가된 것으로 추정한다. 하지만 박테리옌의 항균활성이 우유 내에서 감소된 것은 우유 단백질인 카제인 미셀과 같은 입자에 박테리옌 분자가 흡착되었기 때문이라고 보고한 Maisnier-Patin 등 (1992)의 결과와 일치하는 것으로 간주된다.

이미 보고된 연구 결과에 따르면, *Lactobacillus sakei* Lb674와 *Lactobacillus curvatus* LTH1174 등 많은 lactobacilli 유산균과 Enterococci가 생산한 박테리옌(enterocin)은 *L. monocytogenes*를 효과적으로 저해하는 것으로 알려져 있다(Kučerová

Table 2. Antibacterial activity of the viable cells, lactic acid, and bacteriocin obtained from *L. paracasei* BK57 against *L. monocytogenes* KCTC 3569 growth in BHI broth and whole milk

Antimicrobial substances	Concentration	Inhibition of <i>L. monocytogenes</i> (%)					
		BHI			Milk		
		12 h	24 h	36 h	12 h	24 h	36 h
Viable cells of <i>L. paracasei</i> BK57 (CFU/ml)	1.0×10^5	22.1±2.1 ^b	28.7±2.0 ^c	29.5±1.5 ^c	30.1±1.7 ^d	33.5±0.2 ^d	34.7±2.1 ^d
	1.0×10^6	32.3±1.0 ^c	35.0±1.5 ^d	33.8±2.0 ^d	38.5±0.3 ^{ef}	41.4±0.7 ^c	39.8±0.6 ^c
	1.0×10^7	35.7±1.5 ^d	38.9±1.4 ^e	39.8±0.7 ^f	39.1±0.6 ^f	42.4±1.4 ^{ef}	43.8±0.7 ^f
Cell-free culture supernatants (%)	1.0	33.3±1.9 ^{cd}	35.1±0.5 ^d	30.3±1.3 ^c	35.8±1.4 ^d	38.7±2.0 ^d	37.8±1.6 ^{de}
	2.0	38.3±0.9 ^e	40.4±1.6 ^e	41.2±3.0 ^f	40.2±0.2 ^f	44.0±1.7 ^f	43.6±0.3 ^f
	3.0	42.4±2.3 ^f	45.6±0.7 ^f	48.9±0.7 ^g	48.7±1.0 ^g	48.9±0.9 ^g	49.8±1.0 ^g
Bacteriocin solution (AU/ml)	100	18.6±0.4 ^a	19.2±0.1 ^a	17.9±1.4 ^a	10.5±2.0 ^a	14.1±0.5 ^a	15.0±0.8 ^a
	200	23.6±0.9 ^b	26.0±1.3 ^b	24.2±0.5 ^b	12.9±1.6 ^b	17.2±0.8 ^b	18.7±1.4 ^b
	300	32.5±1.1 ^c	30.8±2.4 ^c	36.8±1.3 ^e	26.7±0.7 ^c	28.4±1.2 ^c	21.0±0.9 ^c

Data are means ± SD from triplicate determinations and the significant difference of means was estimated by Duncan's multiple range test. Means with different superscript letters indicate statistically significant differences as determined by ANOVA ($P < 0.05$).

et al., 2009). McAuliffe 등(1999)에 따르면, 초기 균수 5.0×10^4 CFU/ml의 *L. monocytogenes* Scott A에 *Lactococcus lactis* DPC4275가 생산한 lacticin 3147 (2,000 AU/ml)을 처리한 결과 2시간 후에 약 4.5 log cycle 감소되었다고 하였다. Nisin과 리스테리아균의 세포막 사이의 반응은 nisin의 아미노산 잔기와 세포막 인지질의 지방산 사이의 소수성 상호반응에 의해 유발된다(Henning et al., 1986). 또한 nisin 분자와 인지질의 음전하 사이의 정전기적 인력이 항리스트테리아 활성에 관여한다고 알려져 있다(Sahl and Bierbaum, 1998). 일반적으로 알려진 박테리오신의 항균메커니즘은 표적 미생물의 세포벽 합성 저해, 세포막 투과성 변화, 세포막 전위나 pH 농도 구배 고갈 혹은 세포막을 파괴하여 세포질 내 성분이 유출되면서 결국 세포는 사멸하게 된다(Cleveland et al., 2001). 유산의 항균메커니즘은 세포막 전위 유지를 방해하고 능동수송을 저해하며 세포질 내 pH를 감소시켜 세포의 대사 기능을 저하시킴으로써 증식 억제를 유도한다(Ross et al., 2002). Aguilar 등(2011)은 우유에 박테리오신을 생산하는 *Lactobacillus plantarum*과 *L. monocytogenes*를 혼합 배양한 경우 유산균의 균수는 대조구와 거의 비슷한 수준이었으나, 병원성 세균의 균수가 약 5 log cycle 감소되었다고 하였다.

BK57 균주로 제조한 치즈 내 항균물질 생성량 및 *L. monocytogenes*에 대한 항균 활성

BK 57의 균주를 이용하여 프레쉬 치즈를 제조한 후 4°C와 15°C 온도 대에서 6일간 저장하는 동안 유산균수, 유산량과 박테리오신 활성 및 *L. monocytogenes*에 대한 항균력을 측정 한 결과는 Table 3과 같다. 치즈 제조 직후 BK57 균수는 약 10^8 CFU/g 정도이며, 이는 4°C와 15°C 온도에서 6일 동안 비슷한

수준을 유지하였다. 치즈 내 유산의 생성량(80 mM 이하)은 YEM (Table 1)에서 보다 다소 낮아졌으나, 4°C와 15°C의 온도에서 저장하는 동안에는 유의한 차이가 없었다. 박테리오신 활성(240 AU/ml)도 YEM 내에서 생산된 양보다 낮게 나타났으나, 각각 온도에서 6일 동안에는 활성에 변화가 없었다. 이와 같이 유산균의 증식과 항균물질 생산량이 YEM보다 치즈에서 낮게 나타난 이유는 YEM 내에 첨가된 yeast extract의 영향과 치즈 제조에 첨가된 렌벳이나 CaCl₂가 항균물질 생산에 영향을 미치는 것으로 추정되었다. 따라서 yeast extract의 영향을 살펴본 결과, 효모추출물 2% 첨가에 의해 유산균의 증식과 항균물질 생산에 유의한 차이가 있는 정도로 증가되었으나, 렌벳(0.002%)과 CaCl₂(0.02%)는 BK57 균주의 증식과 항균물질 생산에 영향을 거의 미치지 않았다(결과 미제시). 한편, YEM에서 보다 유산균수와 항균물질의 양이 낮아져 치즈에 접종한 *L. monocytogenes* KCTC 3569에 대한 항균력도 다소 감소하였다. *L. monocytogenes* (10^5 CFU/ml)를 치즈에 접종하여 4°C에서 저장한 경우 2일 후 약 18.7±1.1% 정도 감소되었고 6일까지 저해율은 비슷한 수준을 유지하였다. 하지만 15°C에서 2일간 저장한 후 저해율은 15.7±1.3%으로 4°C보다 낮게 나타났는데 이는 *L. monocytogenes*가 저온성 세균이므로 15°C의 온도에서는 항균물질에 대한 내성이 있는 것으로 추정하였다.

Ryan 등(1996)에 의하면, lacticin 3147을 생산하는 유산균은 체다 치즈 제조에 적합한 균주로서 제조된 치즈의 pH는 5.2에 이르고, 숙성에 소요되는 최대 6개월 동안에도 유효한 박테리오신 활성이 검출되었다고 하였다. 또한 치즈 제조 시에 박테리오신 생산 균주를 이용한다면 제조하는 동안 충분한 양의 항균물질을 생산해야 하고 항균활성을 제조 및 저장하는 동안

Table 3. Production of the antilisterial substances in fresh cheese manufactured by *L. paracasei* BK57 and the growth inhibition of *L. monocytogenes* KCTC 3569 during six days of storage at 4°C and 15°C

	Storage temperature (°C)							
	4				15			
	0	2	4	6	0	2	4	6
Viable cell counts of BK57 (CFU/g)	2.0±1.2×10 ^{8a}	2.8±0.6×10 ^{8a}	3.1±2.4×10 ^{8a}	1.9±1.2×10 ^{8a}	2.2±0.4×10 ^{8a}	3.2±1.6×10 ^{8a}	3.5±1.7×10 ^{8a}	3.8±0.8×10 ^{8a}
Lactic acid (mM)	76.4±3.7 ^a	78.5±1.9 ^a	77.1±2.5 ^a	73.9±4.5 ^a	79.2±7.2 ^a	75.3±5.5 ^a	74.1±6.0 ^a	75.0±4.1 ^a
Bacteriocin activity (AU/ml)	240	240	240	240	240	240	240	240
Inhibition against <i>L. monocytogenes</i> (%)	NT	18.7±1.1 ^b	18.9±0.8 ^b	18.4±0.4 ^b	NT	15.7±1.3 ^a	15.4±0.5 ^a	15.0±0.6 ^a

Data are means ± SD from triplicate determinations and the significant difference of means was estimated by Duncan's multiple range test. Means with different superscript letters indicate statistically significant differences as determined by ANOVA ($P < 0.05$).

NT, Not tested.

에도 유지할 수 있어야 한다고 하였다. 치즈 숙성하는 동안 유산균수는 10^7 - 10^8 CFU/g 정도이며, 이들은 우유 단백질 분해에 중요한 역할을 하고 치즈의 풍미 향상에 기여한다고 보고하였다.

박테리오신(enterocin CRL35)을 *L. monocytogenes*가 인위적으로 접종된 치즈에 첨가한 경우, enterocin 성분이 치즈 숙성 과정 중에 검출되지 않았으나, 리스테리아균의 성장을 효과적으로 억제하였다. 실제 치즈 내에 박테리오신이 항균 활성을 발휘하였으나, 지방이나 단백질 등의 치즈 성분에 흡착되어 검출되지 않았다고 밝혔다(Farias *et al.*, 1999). Coelho 등(2014)은 *L. lactis*와 *Enterococcus faecalis*의 유산균으로 제조한 프레쉬 치즈의 박테리오신 활성을 측정할 결과, 제조 직후부터 저장 72시간까지 *L. monocytogenes*에 대한 항균 활성은 일정하게 유지되었다고 하였다. 게다가 유산균을 첨가하지 않은 대조구에 *L. monocytogenes*의 초기 균수 10^5 CFU/ml는 4°C, 7일 동안 서서히 증가하여 10^8 CFU/ml에 도달하였으나, 유산균으로 배양한 치즈 내에서 *L. monocytogenes*는 유의하게 감소되었다. 특히 *L. lactis*에 의해선 약 2 log cycle 감소되었으나, *E. faecalis*에 의해선 약 3-4 log cycle 감소되어 *L. lactis*보다 *E. faecalis*의 항균 효과가 더 높게 나타났다고 하였으며, 유산균 혼합에 의해 제조한 치즈가 단독으로 제조한 치즈에 비해 항균 효과가 월등하게 높았다고 보고하였다.

McAuliffe 등(1999)에 따르면, lacticin 3147을 생산하는 *L. lactis* DPC4268로 제조한 코타지 치즈에 *L. monocytogenes* Scott A (10^4 CFU/g)을 접종하여 4°C에서 저장한 결과, 24시간 만에 약 1 log cycle 감소된 후 저장기간 동안 서서히 감소하여 5일 후에는 생균이 검출되지 않았다고 하였다. 또한 제조한 치즈의 pH와 박테리오신 활성을 측정할 결과, 약 pH 5.2 정도였고 이는 저장하는 동안 거의 변함이 없었으며, lacticin 3147의 활성은 약 2,560 AU/ml였고 저장하는 동안 일정하게 유지하여 본 실험 결과의 박테리오신 활성과 항균력보다는 높은 것으로 확인되었다. 게다가 저장 온도가 높아짐에 따라 소르빈산의 항균 효과가 감소된 것에 반해 lacticin 3147의 항리스테리아 활성은 4°C 뿐만 아니라 18°C와 30°C에서도 높게 나타났다고 하였다. Hicks와 Lund (1991)은 4°C에 저장한 치즈 내에 *Listeria*균수 감소는 치즈 스타터로 사용한 유산균의 증식에 따라 pH가 감소하기 때문이라고 하였다. Benkerroum과 Sandine (1988)은 nisin도 코타지 치즈 내에 존재하는 *L. monocytogenes*을 효과적으로 저해하였으나, 치즈의 부패에 관여하는 기타 저온 세균, 그람 음성균, 효모 및 곰팡이에 대한 항균 효과는 나타나지 않았다고 하였다. Giraffa 등(1995)에 의하면, *L. monocytogenes*에 대한 항균 활성이 있는 박테

리오신을 생산하는 *E. faecium* 균주를 탈레지오 치즈 제조과정 중에 첨가한 경우 치즈 제조 스타터의 활성에 영향을 주지 않고, 박테리오신의 활성도 안정하게 유지되어 치즈 숙성 후 중 오염 발생률도 현저하게 낮아졌다고 하였다. 한편, *L. monocytogenes*에 오염된 모짜렐라 치즈에 박테리오신을 생산하는 *L. lactis*를 처리한 경우 *L. monocytogenes*의 초기 균수가 유의하게 감소되었고, 5°C에서 2-3주간 저장하는 동안에도 대조구에 비해 훨씬 낮은 *L. monocytogenes* 균수를 유지하였다(Stecchini *et al.*, 1995). Buyong 등(1998)의 보고에 따르면, 프로테아제와 펩티다아제의 작용에 의해 체다 치즈의 숙성 기간 동안 6개월 만에 pediocin의 활성은 64,000 U/g에서 2,000 U/g으로 감소하였다고 보고하였다. 또한 염농도가 증가할수록 유산균의 증식이 억제되었으며 그에 따라 박테리오신 생산량도 감소되어 *L. monocytogenes*에 대한 항균력이 감소되었다(Hugas *et al.*, 2002).

유산균이 생산하는 박테리오신의 활성은 생산 균주의 종류에 따라 다양하며 식품 제조에 적용할 경우 식품의 물리적 조건이나 화학적 구성성분에 따라 활성이 다르게 나타난다고 알려져 있다. 즉, 식품의 성분에 박테리오신이 결합되거나 단백질이나 세포에 흡착될 경우뿐만 아니라 단백질 분해효소 등에 영향을 받아 항균물질의 활성이 낮아지게 된다(Schillinger *et al.*, 1996). 한편, 박테리오신은 식품의 pH나 온도 등 제조 및 저장 조건에 의해서도 영향을 받게 되는데, nisin은 산성 조건 하에서 최대의 안정성을 나타내었으므로 이는 산성 식품에 사용될 때 활성이 증가하는 경향을 나타낸다. 그러므로 nisin은 식품의 제조와 저장 동안에 만족스러운 용해성과 안정성을 얻기 위해선 pH 7.0 이하에서 적용하는 것이 효과적이라고 밝히고 있다(Balciunas *et al.*, 2013). Leroy와 De Vuyst (1999)에 따르면, 온도가 높을수록 프로테아제의 활성은 증가되고 반면 박테리오신의 활성은 감소한다고 하였다. 게다가 박테리오신의 항균 활성은 식품 내에 제어하고자 하는 유해 세균의 균수에도 영향을 받으므로 초기 균수가 지나치게 많으면 박테리오신의 항균 효과를 기대하기 어렵다고 하였다(Rilla *et al.*, 2004).

E. faecium FAIR-E 198 균주로 치즈를 제조했을 때 유산균의 증식과 *in situ* 상에서의 박테리오신 생산량은 유당, 염 및 렌넷 등의 첨가량에 영향을 받는다고 알려졌다. 포도당 대신 유당을 첨가한 경우 유산균의 성장과 박테리오신 생산량이 감소되었고, NaCl (2.0%)에 의해서도 생산량이 낮아졌다. FAIR-E 198의 박테리오신은 탈지유(10%) 내에서 생산되지 않았으나, 탈지유에 펩톤(1%)과 효모추출물(0.5%)을 첨가한 경우에는 최대 양의 박테리오신(100 AU/ml)이 생산되었다. 또한 0.02 mg/ml 농도의 렌넷을 처리했을 때 6시간 배양 후 박테리오신

이 검출되지 않았으나, 0.002 mg/ml 농도 하에서는 대조구(렌넷 무침가구)의 활성과 동일하게 측정되었다(Sarantinopoulos *et al.*, 2002). 렌넷에 의해 박테리오신의 활성이 저해될 수 있다는 보고도 있지만(Villani *et al.*, 1993), 그 영향이 크지 않다고 밝힌 연구 결과도 있다. 왜냐하면 대부분의 렌넷은 유청 제거 과정 중에 거의 유출되고 우유에 첨가된 양의 3-6% 정도만 커드 내에 존재하는 것으로 알려져 있어 박테리오신 활성이 렌넷에 큰 영향을 받지 않는다고 하였다(Fox, 1989).

유산균이 생산하는 유산의 70% 정도는 요구르트나 치즈 등 유제품 제조에 이용된다. 특히 치즈 제조에 있어 유산 생산의 결과로 pH가 감소되면 우유 단백질인 카제인 미셀의 응집을 유발하며, 독특한 풍미를 부여하고, 항균물질 생산에 따른 유해 미생물의 증식 위험을 감소시킨다(Martinez *et al.*, 2013). 생물학적 보존제로 이용할 수 있는 발효스타터 유산균의 주요 항균활성은 유산과 박테리오신에 기인하며, 이로 인해 유해 미생물로부터 식품의 안전성을 확보하며 이취를 생산하는 부패미생물의 성장을 막아 품질을 향상시킬 수 있다(Šušković *et al.*, 2010). 현재 산업적으로 nisin과 pediocin 등의 박테리오신은 저장성을 향상시키는 목적으로 발효식품이나 가공식품에 생물학적 보존제로 이용되고 있다. 하지만 발효식품 스타터로서 박테리오신 생산 유산균을 적용할 경우 식품 성분들간의 상호작용에 의해 박테리오신 분비가 어렵고 식품 내에서 박테리오신을 정량하기 어렵기 때문에 박테리오신 생산 균주의 *in situ* 기능성에 관한 *in vitro* 연구가 이루어지고 있다(Leroy and De Vuyst, 2005).

본 연구에서는 치즈 내 리스테리아균을 제어할 수 있는 유산균의 항균물질 생산을 배양 조건에 따라 측정함으로써 유산균의 증식 및 유산과 박테리오신 생산량이 초기 균수, 배지 초기 pH, 공기 조성, 배양시간 및 온도와 염 농도에 따라 달라짐을 확인하였다. 비록 우유 배지 내에서 *L. paracasei* BK57 균주의 성장 및 항균물질 생성량이 MRS broth 내에서 보다는 낮았으나, 우유 배지에서 생산된 항균물질에 의해서도 유의할만한 수준의 *L. monocytogenes* KCTC 3569 제균 효과가 나타났으므로 BK57 균주는 식품 내 환경에서 성장이 양호하였고 그에 따라 항균활성도 높아서 식품 제조 가공 시스템에 적용이 가능할 것으로 판단된다. 이러한 결과를 바탕으로 우유를 원료로 한 발효식품인 치즈 제조 시에 BK57 균주로 발효시킨 후 4°C와 15°C에서 6일간 저장하는 동안 항리스트리아 활성을 조사한 결과, 치즈 내에 존재하는 리스테리아균을 효과적인 제어할 수 있는 정도의 항균물질을 생산하였고 저장하는 동안에도 일정한 수준으로 항균력이 유지됨을 확인하였다. 따라서 *L. paracasei* BK57 균주를 발효 스타터로 사용할 경우 치즈의

저장 기간을 연장시키고 리스테리아균수를 감소시킴으로써 식중독의 발생 위험을 저감화할 수 있을 것으로 기대된다. 향후 연구에서는 다양한 식중독 및 부패균에 대한 BK57 균주로 제조한 치즈의 항균스펙트럼을 조사하고, 치즈의 관능검사 및 *in vivo* 상의 안전성 평가를 실시하여 식품의 품질과 안전성을 향상시키기 위한 유산균의 생물학적 보존제로서의 이용 가치를 높이고자 한다.

적 요

본 연구는 백김치로부터 분리된 *Lactobacillus paracasei* BK57의 항균물질 생산을 위한 최적의 배양 조건을 검색하고, BK57 유산균으로 프레쉬 치즈를 제조한 후 균주의 활성과 유산 및 박테리오신 생산량을 측정하여 *Listeria monocytogenes* KCTC 3569에 대한 항균 활성을 조사하였다. 최대의 균 증식과 항균 물질 생산량은 pH 6.0으로 조정된 MRS broth에서 37°C, 24시간 동안 호기적인 조건으로 배양했을 때 나타났다. 하지만, 효모추출물(2.0%)을 첨가한 전유 내에서 생성된 항균물질의 양과 유산균의 증식률은 MRS broth에서 보다는 다소 낮았다. 우유 내에서 *L. monocytogenes*의 저해율은 BK57 균주의 생균과 배양 상등액에 의해 높게 나타났으나, 유산균이 생산한 박테리오신에 의한 저해율은 우유 보다는 BHI broth 내에서 더 높게 나타났다. BK57 균주로 발효시킨 프레쉬 치즈를 4°C와 15°C에서 6일간 저장하는 동안 유산균수, 유산 생성량 및 박테리오신 활성은 유의한 변화가 없었다. 제조 직후 프레쉬 치즈에 인위적으로 접종한 *L. monocytogenes* (10^5 CFU/ml)의 균수는 각각의 온도대에서 6일 이내에 최소 15% 이상 감소되는 효과가 나타났으므로 BK57 균주를 발효유제품 제조에 이용할 경우 리스테리아균을 제어할 수 있는 생물학적 보존제로서의 가치를 확인하였다.

References

- Abbasiliasi, S., Ramanan, R.N., Ibrahim, T.Z.T., Mustafa, S., Mohamad, R., Daud, H.H., and Ariff, A.B. 2011. Effect of medium composition and culture condition on the production of bacteriocin-like inhibitory substances (BLIS) by *Lactobacillus paracasei* LA07, a strain isolated from budu. *Biotechnol. Biotechnol. Eq.* **25**, 2652-2657.
- Aguilar, C., Vanegas, C., and Klotz, B. 2011. Antagonistic effect of *Lactobacillus* strains against *Escherichia coli* and *Listeria monocytogenes*. *J. Dairy Res.* **78**, 136-143.

- Avonts, L., Van Uytven, E., and De Vuyst, L. 2004. Cell growth and bacteriocin production of probiotic *Lactobacillus* strains in different media. *Int. Dairy J.* **14**, 947-955.
- Balciunas, E.M., Martinez, F.A.C., Todorov, S.D., De Melo Franco, B.D.G., Converti, A., and De Souza Oliveira, R.P. 2013. Novel biotechnological applications of bacteriocins: A review. *Food Control* **32**, 134-142.
- Benkerroum, N. and Sandine, W.E. 1988. Inhibitory action of nisin against *Listeria monocytogenes*. *J. Dairy Sci.* **71**, 3237-3245.
- Buyong, N., Kok, J., and Luchansky, J.B. 1998. Use of a genetically enhanced, pediocin-producing starter culture, *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* MM 217 to control *Listeria monocytogenes* in Cheddar cheese. *Appl. Environ. Microbiol.* **64**, 4842-4845.
- Cleveland, J., Montville, T.J., Nes, I.F., and Chikindas, M.L. 2001. Bacteriocins: safe, natural antimicrobials for food preservation. *Int. J. Food Microbiol.* **71**, 1-20.
- Coelho, M.C., Silva, C.C.G., Ribeiro, S.C., Dapkevicius, M.L.N.E., and Rosa, H.J.D. 2014. Control of *Listeria monocytogenes* in fresh cheese using protective lactic acid bacteria. *Int. J. Food Microbiol.* **191**, 53-59.
- De Vuyst, L., Callewaert, R., and Crabbe, K. 1996. Primary metabolite kinetics of bacteriocin biosynthesis by *Lactobacillus amylovorus* and evidence for stimulation of bacteriocin production under unfavourable growth conditions. *Microbiol.* **142**, 817-827.
- De Vuyst, L. and Leroy, F. 2007. Bacteriocins from lactic acid bacteria: production, purification, and food applications. *J. Mol. Microbiol. Biotechnol.* **13**, 194-199.
- Elli, M., Zink, R., Reniero, R., and Morelli, L. 1999. Growth requirements of *Lactobacillus johnsonii* in skim and UHT milk medium. *Int. Dairy J.* **9**, 507-513.
- Farias, M.E., De kairuz, M.N., Sesma, F., Palacios, J., De Ruiz Holgado, A.P., and Oliver, G. 1999. Inhibition of *Listeria monocytogenes* by the bacteriocin enterocin CRL35 during goat cheese making. *Milchwissenschaft* **54**, 30-32.
- Fox, P.F. 1989. Proteolysis during cheese manufacture and ripening. *J. Dairy Sci.* **72**, 1379-1400.
- Gálvez, A., Abriouel, H., Lopez, R.L., and Omar, N.B. 2007. Bacteriocin-based strategies for food biopreservation. *Int. J. Food Microbiol.* **120**, 51-70.
- Gálvez, A., Omar, N.B., and Abriouel, H. 2008. Application of bacteriocins in the control of foodborne pathogenic and spoilage bacteria. *Crit. Rev. Biotechnol.* **28**, 125-152.
- Gänzel, M., Weber, S., and Hammes, W. 1999. Effect of ecological factors on the inhibitory spectrum and activity of bacteriocins. *Int. J. Food Microbiol.* **46**, 207-217.
- Giraffa, G., Picchioni, N., Neviani, E., and Carminati, D. 1995. Production and stability of an *Enterococcus faecium* bacteriocin during Taleggio cheesemaking and ripening. *Food Microbiol.* **12**, 301-307.
- Henning, S., Metz, R., and Hammes, W.P. 1986. Studies on the mode of action of nisin. *Int. J. Food Microbiol.* **3**, 121-134.
- Hicks, S.J. and Lund, B.M. 1991. The survival of *Listeria monocytogenes* in cottage cheese. *J. Appl. Bacteriol.* **70**, 308-314.
- Hole, H., Nilssen, O., and Nes, I.F. 1991. Lactococcin A, a new bacteriocin from *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris*: Isolation and characterization of the protein and its gene. *J. Bacteriol.* **173**, 3879-3887.
- Hugas, M., Garriga, M., Pascual, M., Aymerich, M.T., and Monfort, J.M. 2002. Enhancement of sakacin K activity against *Listeria monocytogenes* in fermented sausages with pepper or manganese as ingredients. *Food Microbiol.* **19**, 519-528.
- Klaenhammer, T.R. 1988. Bacteriocins of lactic acid bacteria. *Biochimie* **70**, 337-349.
- Klaenhammer, T.R. 1993. Genetics of bacteriocins produced by lactic acid bacteria. *FEMS Microbiol. Rev.* **12**, 39-85.
- Kučerová, K., Korbová, I., Horáčková, S., Šviráková, E., and Pločková, M. 2009. Influence of enterococci and Lactobacilli on *Listeria*. *Czech. J. Food Sci.* **27**, 12-17.
- Leroy, F. and De Vuyst, L. 1999. The presence of salt and a curing agent reduces bacteriocin production by *Lactobacillus sakei* CTC 494, a potential starter culture for sausage fermentation. *Appl. Environ. Microbiol.* **65**, 5350-5356.
- Leroy, F. and De Vuyst, L. 2000. Sakacins. In Naidu, A.S. (ed.), Natural food antimicrobial systems, pp. 589-610. CRC Press LLC, Boca Raton, USA.
- Leroy, F. and De Vuyst, L. 2005. Simulation of the effect of sausage ingredients and technology on the functionality of the bacteriocin-producing *Lactobacillus sakei* CTC 494 strain. *Int. J. Food Microbiol.* **100**, 141-152.
- Lim, S.M. 2014. Anti-*Helicobacter pylori* activity of antimicrobial substances produced by lactic acid bacteria isolated from Baikkimchi. *J. Kor. Soc. Appl. Biol. Chem.* **57**, 621-630.
- Lindgren, S.E. and Dobrogosz, W.J. 1990. Antagonistic activities of lactic acid bacteria in food and feed fermentations. *FEMS Microbiol. Rev.* **87**, 149-163.
- Maisnier-Patin, S., Deschamps, N., Tatini, S.R., and Richard, J. 1992. Inhibition of *Listeria monocytogenes* in Camembert cheese made with a nisin-producing starter. *Lait* **72**, 249-263.
- Malini, M. and Savitha, J. 2012. Heat stable bacteriocin from *Lactobacillus paracasei* subsp. *tolerans* isolated from locally available cheese: An *in vitro* study. *J. Biotechnol. Pharm. Res.* **3**, 28-41.
- Martinez, F.A.C., Balciunas, E.M., Salgado, J.M., Gonzalez, J.M.D., Converti, A., and De Souza, Oliveira, R.P. 2013. Lactic acid properties, applications and production: A review. *Trends Food Sci. Tech.* **30**, 70-83.
- Mataragas, M., Metaxopoulos, J., Galiotou, M., and Drosinos, E.H. 2003. Influence of pH and temperature by *Leuconostoc mesenteroides* L124 and *Lactobacillus curvatus* L442. *Meat Sci.* **64**, 265-271.
- McAuliffe, O., Hill, C., and Ross, R.P. 1999. Inhibition of *Listeria monocytogenes* in cottage cheese manufactured with a lacticin 3147-producing starter culture. *J. Appl. Microbiol.* **86**, 251-256.
- Meghrou, J., Huot, M., Quittelier, M., and Petitdemange, H. 1992.

- Regulation of nisin biosynthesis by continuous cultures and by resting cells of *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*. *Res. Microbiol.* **143**, 879–890.
- Ong, L., Henriksson, A., and Shah, N.P.** 2006. Development of probiotic Cheddar cheese containing *Lactobacillus acidophilus*, *Lb. casei*, *Lb. paracasei* and *Bifidobacterium* spp. and the influence of these bacteria on proteolytic patterns and production of organic acid. *Int. Dairy J.* **16**, 446–456.
- Parente, E., Brienza, C., Ricciardi, A., and Addario, G.** 1997. Growth and bacteriocin production by *Enterococcus faecium* DPC1146 in batch and continuous culture. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* **18**, 62–67.
- Parente, E. and Hill, C.** 1992. A comparison of factors affecting the production of two bacteriocins from lactic acid bacteria. *J. Appl. Bacteriol.* **73**, 290–298.
- Parente, E. and Ricciardi, A.** 1999. Production, recovery and purification of bacteriocins from lactic acid bacteria. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **52**, 628–638.
- Rattanachaiksompon, P. and Phumkhachorn, P.** 2010. Lactic acid bacteria: their antimicrobials compounds and their uses in food production. *Ann. Biol. Res.* **4**, 218–228.
- Rilla, N., Martínez, B., and Rodríguez, A.** 2004. Inhibition of a methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strain in Afuega'l Pitu cheese by the nisin Z producing strain *Lactococcus lactis* IPLA 729. *J. Food Protect.* **67**, 928–933.
- Ross, R.P., Morgan, S., and Hill, C.** 2002. Preservation and fermentation: past, present and future. *Int. J. Food Microbiol.* **79**, 3–16.
- Ryan, M.P., Rea, M.C., Hill, C., and Ross, P.R.** 1996. An application in Cheddar cheese manufacture for a strain of *Lactococcus lactis* producing a novel broad-spectrum bacteriocin, lacticin 3147. *Appl. Environ. Microbiol.* **62**, 612–619.
- Sahl, H.G. and Bierbaum, G.** 1998. Lantibiotics: biosynthesis and biological activities of uniquely modified peptides from Gram-positive bacteria. *Ann. Rev. Microbiol.* **52**, 41–79.
- Sarantinopoulos, P., Leroy, F., Leontopoulou, E., Georgalaki, M.D., Kalantzopoulos, G., Tsakalidou, E., and De Vuyst, L.** 2002. Bacteriocin production by *Enterococcus faecium* FAIR-E 198 in view of its application as adjunct starter in Greek Feta cheese making. *Int. J. Food Microbiol.* **72**, 125–136.
- Schillinger, U., Geisen, R., and Holzapfel, W.H.** 1996. Potential of antagonistic microorganisms and bacteriocins for the biological preservation of foods. *Trends Food Sci. Tech.* **7**, 158–164.
- Stecchini, M.L., Aquili, V., and Sarais, I.** 1995. Behavior of *Listeria monocytogenes* in Mozzarella cheese in presence of *Lactococcus lactis*. *Int. J. Food Microbiol.* **25**, 301–310.
- Šuškić, J., Kos, B., Beganović, J., Pavunc, A.L., Habjanič, K., and Matošić, S.** 2010. Antimicrobial activity – The most important property of probiotic and starter lactic acid bacteria. *Food Technol. Biotechnol.* **48**, 296–307.
- Vignolo, G.M., De Kairuz, M.N., De Ruiz, Holgado, A.A.P., and Oliver, G.** 1995. Influence of growth conditions on the production of lactocin 705, a bacteriocin produced by *Lactobacillus casei* CRL 705. *J. Appl. Bacteriol.* **78**, 5–10.
- Villani, F., Salzano, G., Sorrentino, E., Pepe, O., Marino, P., and Coppola, S.** 1993. Enterocin 226 NWC, a bacteriocin produced by *Enterococcus faecalis* 226, active against *Listeria monocytogenes*. *J. Appl. Bacteriol.* **74**, 380–387.
- Wee, Y.J., Kim, J.N., and Ryu, H.W.** 2006. Biotechnological production of lactic acid and its recent applications. *Food Technol. Biotechnol.* **44**, 163–172.
- Yang, R., Johnson, M.C., and Ray, B.** 1992. Novel method to extract large amounts of bacteriocins from lactic acid bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* **58**, 3355–3359.
- Zalán, Z., Hudáček, J., Štětina, J., Chumchalová, J., and Halász, A.** 2010. Production of organic acids by *Lactobacillus* strains in three different media. *Eur. Food Res. Technol.* **230**, 395–404.