

한국환자유래의 S형 Pyocin 생성균주 *Pseudomonas aeruginosa* 90-2-2205의 분리 및 pyocin 생산

김란숙 · 이정미 · 김병오 · 박영덕 · 진익렬*

경북대학교 자연과학대학 미생물학과

Isolation of *Pseudomonas aeruginosa* 90-2-2205 Producing the S-type Pyocin from Korean Patients and the Pyocin Production

Kim, Ran-Sook, Jung-Mi Lee, Byung-O Kim,
Young-Duck Park and Ingyol Jin*

Department of Microbiology, College of Natural Sciences,
Kyungpook National University, Taegu 702-701, Korea

Abstract — The s-type pyocin, one kind of bacteriocins, is a bactericidal substance of protein nature produced by certain *Pseudomonas aeruginosa* and is active against some other strains of the same or closely related species. Among many *Pseudomonas aeruginosa* strains collected from the patients at the Hospitals in Seoul and Taegu cities, some *Pseudomonas aeruginosa* pyocinogeny were determined by pyocin typing. As a result, *Pseudomonas aeruginosa* 90-2-2205 was selected as the S-type pyocin producing microorganism due to its highest antimicrobial and protease sensitivity. The optimum pH and temperature for the pyocin production were pH 7.5 and 37°C, respectively. The optimum medium for its production was a composition of 0.5% glucose, 2% sodium glutamate, 0.3% trypton, 0.55% Na₂HPO₄, 0.25% KH₂PO₄, and a trace of salt mixture. The pyocin was produced by the induction of mitomycin C (2 µg/ml) just in 3 hours of growth, followed by the 4 hour or more cultivation for harvest.

Bacteriocin은 같은 종 혹은 극히 근연종 중에서 특이적인 receptor을 가진 균만을 죽이는 단백질(1, 2)이라는 사실은 Andre Gratia(1925)가 최초로 보고했다. Bacteriocin은 모든 균이 생산할 수 없고, bacteriocin-encoding plasmid나 유전자를 가진 균이 특정 상태에서 용균됨으로써 생성된다. 생성된 bacteriocin은 그 종류에 따라 cell membrane, rRNA 또는 ribosome의 작용을 저해하거나 peptidoglycan, lipid, DNA의 합성을 저해(3)하는 등의 각기 다른 작용으로 target cell을 죽인다. Bradley(4)는 bacteriocin을 trypsin 감수성이고, 열에 안정한 저분자 bacteriocin과 trypsin 저항성이고 열에 불안정한 고분자 bacteriocin으로 분류하였다. 지금까지 알려진 bacteriocin은

colicin, alveicins, cartovoricins, arizonacins, cloacins, marcescins, neumocins, aerocins, pyocins, fluocins, pesticins, megacins, monocins, cerecins, enterococins, staphylocins 등(5)이 있으며, 이 중에서 colicin에 대한 연구가 가장 많이 보고되어 있다(6-12).

녹농균(*Pseudomonas aeruginosa*)은 병원내 환자의 집단감염등 임상적인 관심으로부터 phage나 bacteriocin의 생산성, 감수성 등에 의한 분류가 되어져 있고, 그의 대부분이 얼마간의 bacteriocin을 생산하고 있다고 알려져 있다(22-24). 녹농균이 생산하는 bacteriocin을 pyocin이라고 한다. pyocin은 대별해서 3가지 형으로 (R형, F형, S형)으로 분류된다(13). 앞의 2가지 (R형, F형)은 phage의 꼬리 모양 구조를 가지고 있고, 혈청학적으로 근연인 phage가 존재하는 것으로 보아서 defective phage 혹은 phage의 조상형과 같은 것으로 생각되어진다(14-18).

Key words: Bacteriocin, pyocin, *Pseudomonas aeruginosa* mitomycin C, induction, pyocinogeny

*Corresponding author

한편 S형 pyocin은 저분자량이고, 구조가 간단한, trypsin감수성이다(14). 그러나 S형 pyocin에 관한 연구보고는 적다. PML 28 균주는 분자량 10만 이하의 S형 pyocin(S1)을 생산하는 것으로 알려져 있고(14), PAO주가 생산하는 pyocin S2가 정제되어 그 성질이 조사되어져 있다. pyocin S2는 분자량 7.2-7.8만의 단백질이고 감수성균의 인지질 생합성을 저해하는 것으로 보고되어 있다(2, 25, 26). 또, Holloway 등에 의해서 PAF주는 PAO주에 관계하는 pyocin인 pyocin AP41(이들은 aeruginocin AP41이라고도 불리워지고 있음)을 생산한다고 보고되어 있고(27), 감수성균의 고분자 합성에 미치는 영향 등이 조사되어져 있고 정제는 최근에야 성공했다(2). 또, 이들 S형 pyocin의 생산인자에 관해서도 최근 조사되어졌다(2).

그런데, 이와같은 저분자량의 bacteriocin은 녹농균 이외에도 존재하는 걸로 알려져 있다. 대장균이 생산하는 Colicin E1, E2, E3, K, Ia, Ib 등과 *Enterobacter cloacae*가 생산하는 cloacin DF13은 그 생화학적 성질과 작용 기작, 작용인자 등에 관한 연구가 진행되고 있다(7-9, 28). Colicin E1, K, Ia가 ionophore로서 작용하여 세포막에 장애를 주고 능동수송을 저해한다는 것(28), E2는 감수성균 DNA의 붕괴를 야기시키고, 그 물질적 본체는 DNase와 그 inhibitor인 것(7-10), E3는 ribosome을 실활시켜 단백질합성을 저해시키고, 그 본체는 RNase와 그 inhibitor로부터 만들어진다는 것(11) 등 그들의 분자구조와 기능의 관계가 명확하게 밝혀지고 있다. 또 생산인자에 관해서는 모두 plasmid상에 존재한다고 알려지게 되었다(12).

극히 제한된 범위에만 활성을 갖는 항균성물질을 생산한다는 사실은 bacteria에 있어서 도대체 어떠한 의미를 가지는 것일까? 종의 보존이라는 관점에서 생각하면 그 작용범위가 꽤 한정되어 있고, 그만큼 가치가 있다고는 생각되어지지 않는다. selfish DNA (19, 29)와 같이 생물에 있어서 무용지물과 같기도 생각된다. 왜 하필이면 bacteria는 얼핏보아 이처럼 무용지물과 같은 것을 생산하도록 되어 있는 것일까? 저자들이 bacteriocin에 대한 연구를 시작한 동기는 이처럼 다양한 형질의 발현과 제어에 관한 흥미를 갖고 있는 때문이기도 하지만, 이와같은 bacteriocin의 유래 또는 기원을 명확하고 확실하게 알고 싶은 때문이다. 이와같은 관심에서 새로운 type의 항균작용을 나타내는 가능성도 포함해서 그 구조, 기능 및 유전자 level에서의 해명을 목표로 비교적 정보가 적은 S형 pyocin에 관한 연구에 착수했다.

Table 1. Composition of media for culture and pyocin production

Medium for culture*	
Nutrient broth or Nutrient agar	
Polypeptone	1.0%
Meat extract	1.0%
NaCl	0.1%
Agar	1.5%
pH	7.0
Medium for pyocin production*	
Sodium glutamate	2.0%
Glucose	0.5%
Na ₂ HPO ₄	0.56%
KH ₂ PO ₄	0.25%
Casamino acid	0.2%
Salt mixture**	20 ml/L
pH	7.5

*All media were autoclaved at 121°C for 20 min.

**Composed of 0.75% Nitritotriacetic acid, 1.5% MgSO₄, 0.3% CaCl₂ and 0.01% FeSO₄.

Bacteriocin에 대한 연구는 우리나라의 경우는 거의 없고 가장 최근 식물병원균에 대한 생물학적 방제에 이용했다는 보고가 유일하다(30, 31).

이 연구를 위하여 저자들은 이미 서울과 대구 등지의 종합병원에서 분리동정한 녹농균을 분양받아, s type pyocin 생성균주들중 가장 우수한 활성을 가진 균주 90-2-2205를 선별할 수 있었고, pyocin 생성을 유도한 뒤, pyocin 생성에 대한 배양조건을 조사했기에 우선 이를 보고하고자 한다.

재료 및 방법

사용 균주 및 배지

서울과 대구에 있는 종합병원의 환자에게서 채취하여 녹농균 *Pseudomonas aeruginosa*로 동정된 균주들을 연세대 의대 임상병리학실, KIST 유전자 은행실 및 경북대 의대 미생물학실로부터 분양받아 이 실험에 사용하였다.

배지조성은 다음의 Table 1과 같다(19).

Pyocin 검정

Pyocin 생산의 유무 판정은 1차적으로 Gillies 와 Govan의 방법(20)에 따라 nutrient agar에 특정균을 세로로 그어 배양하고 chloroform을 15분 처리하여

취발시킨 뒤, 다른 몇개의 균을 가로로 그어 30°C 에서 18시간 배양시켜 가로로 그은 균의 생육 유무를 조사하였고, 2차적으로는 Seiga Ito의 방법(14)으로 nutrient agar에 4개의 각기 다른 균을 spotting하여 배양한 후, U.V를 70 cm 거리에서 1분 동안 조사시킨 뒤 배지위에 다른 균을 함유한 45°C, 0.5% agar 배지를 부어 굳힌 후 균의 생육유무를 조사하였다.

균의 생육도 측정

균의 생육도는 Spectrophotometer로 600nm의 흡광도로 나타내었다.

Pyocin의 항균 활성 측정

Pyocin의 항균 활성은 critical dilution 방법(21)으로 측정하였다. 항균력 측정시 희석 buffer로써 0.2 M NaCl과 0.01% gelatin을 함유한 10 mM Tris-Cl(pH 7.5) buffer를 dilution buffer solution(이하 DBS로 약함)으로 사용하였다(2). 피검균이 함유된 lawn plate는 45°C 의 nutrient agar에 피검균을 2% 접종한 후, petri dish에 동량씩 분주하여 만들고, pyocin sample은 DBS로 2배씩 연속적으로 희석하여 피검균이 함유된 lawn plate상의 paper disc에 50 µl씩 떨어뜨려 37°C 에서 6시간 배양한 후, 피검균의 생육을 저해시키는 가장 높은 희석정도를 활성unit로 사용하였다.

Mitomycin C에 의한 pyocin 생성의 유도

Table 1의 pyocin 생성 기본배지에 pyocin 생성균을 접종하여 37°C 에서 24시간 배양한 후, 동일한 배지로

100배 희석하여 37°C 에서 3시간(log phase) 배양하고, pyocin 생성을 유도시키기 위해 화학적 mutagen인 mitomycin C(2 µg/ml)을 첨가한 다음 계속해서 4시간 배양하였다. 여기에 DNaseI(1 µg/ml)과 chloroform을 첨가하여 1시간 반응시킨 뒤 10,000 rpm에서 10분 동안 원심분리한 상등액을 crude pyocin sample로 사용하였다(19).

결과 및 고찰

S-type pyocin 생성 균주의 선별

Pyocin 검정을 한 결과(Fig. 1, 2), 11균주가 같은 종(species)의 생육을 저해하였으며, 그 중에서 열에

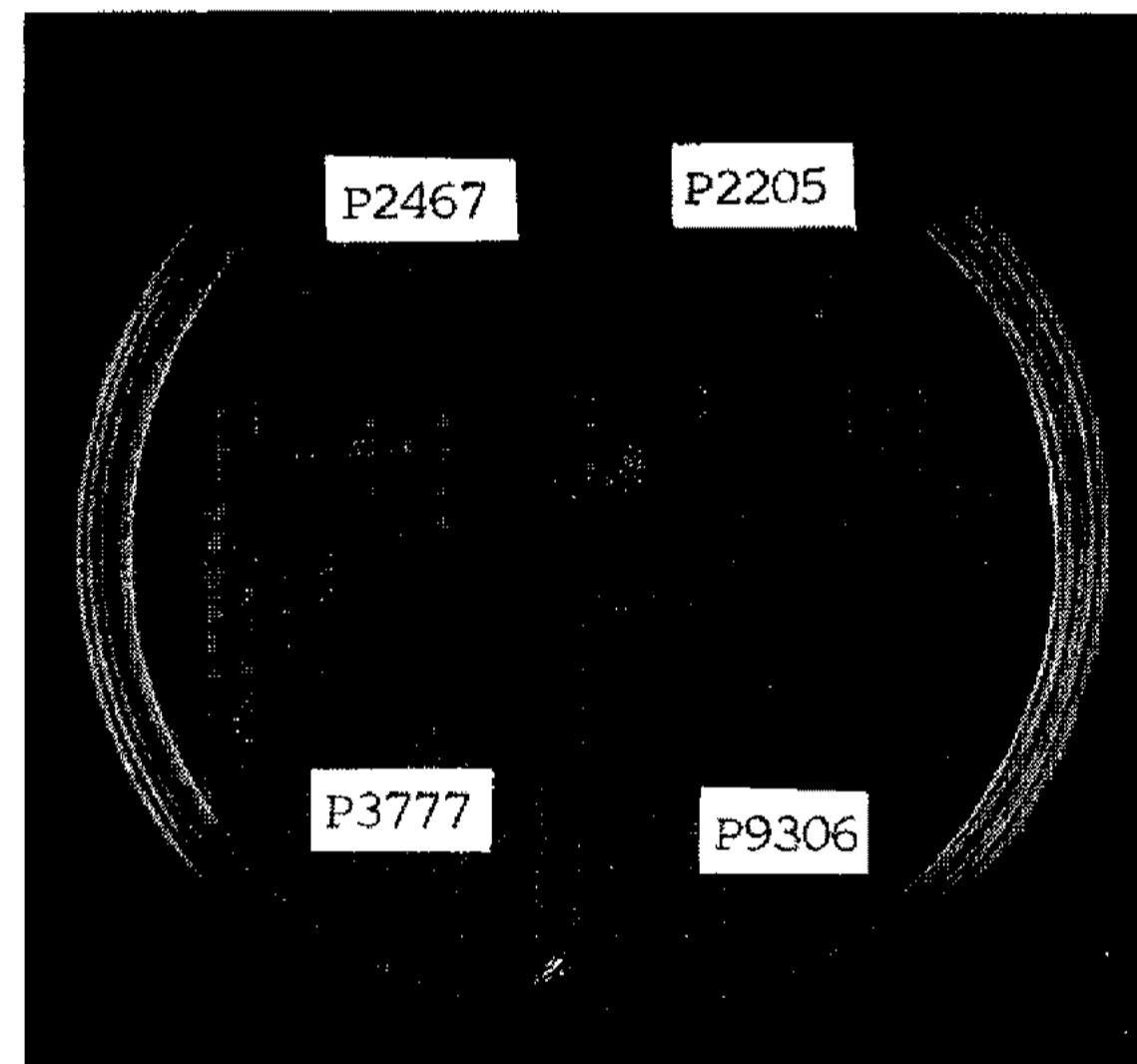


Fig. 2. Pyocin typing plate by the S. Ito method. The indicator was *P. aeruginosa* 90-1-566.

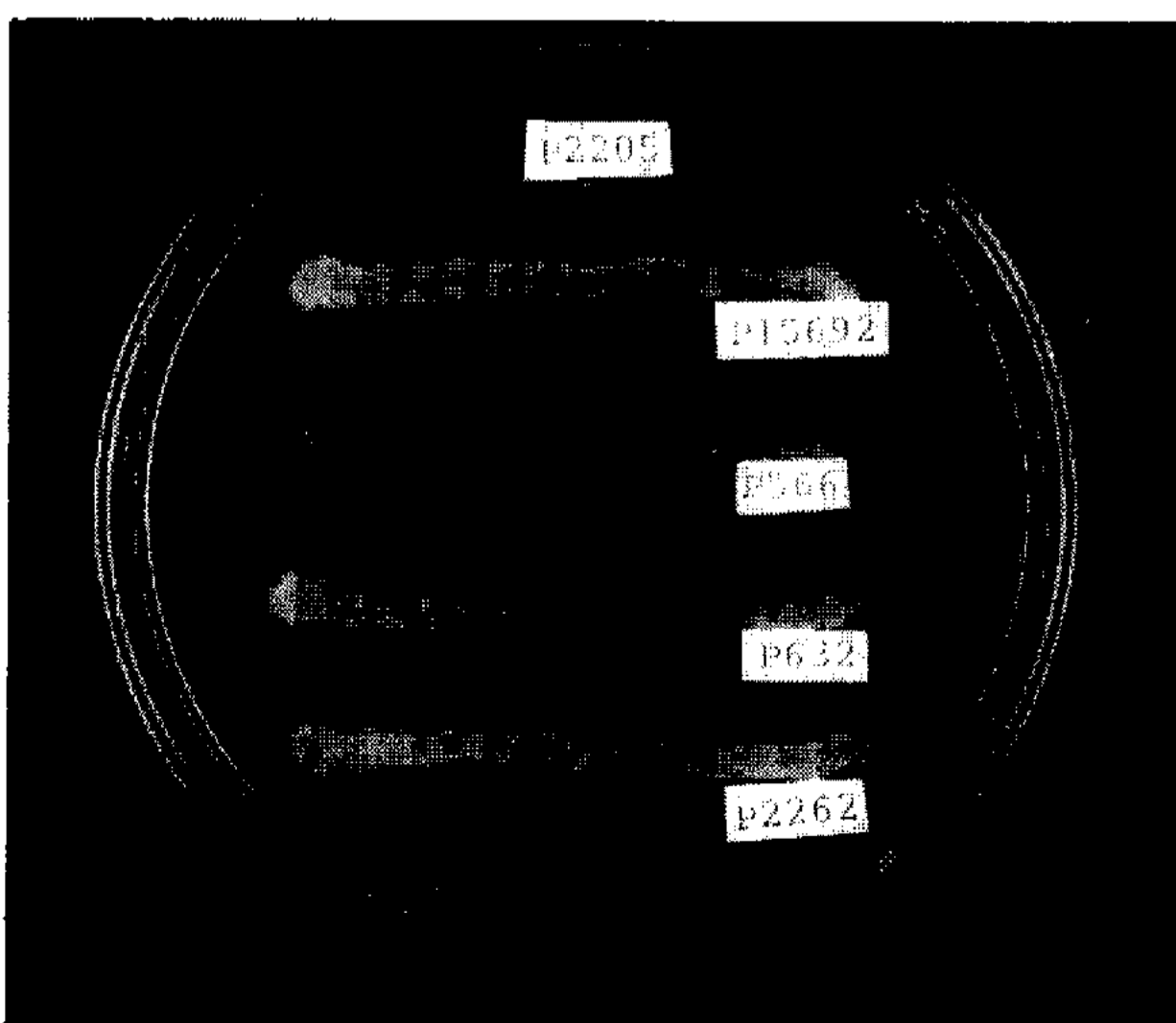


Fig. 1. Pyocin typing plate by the Gillies-Govan method.

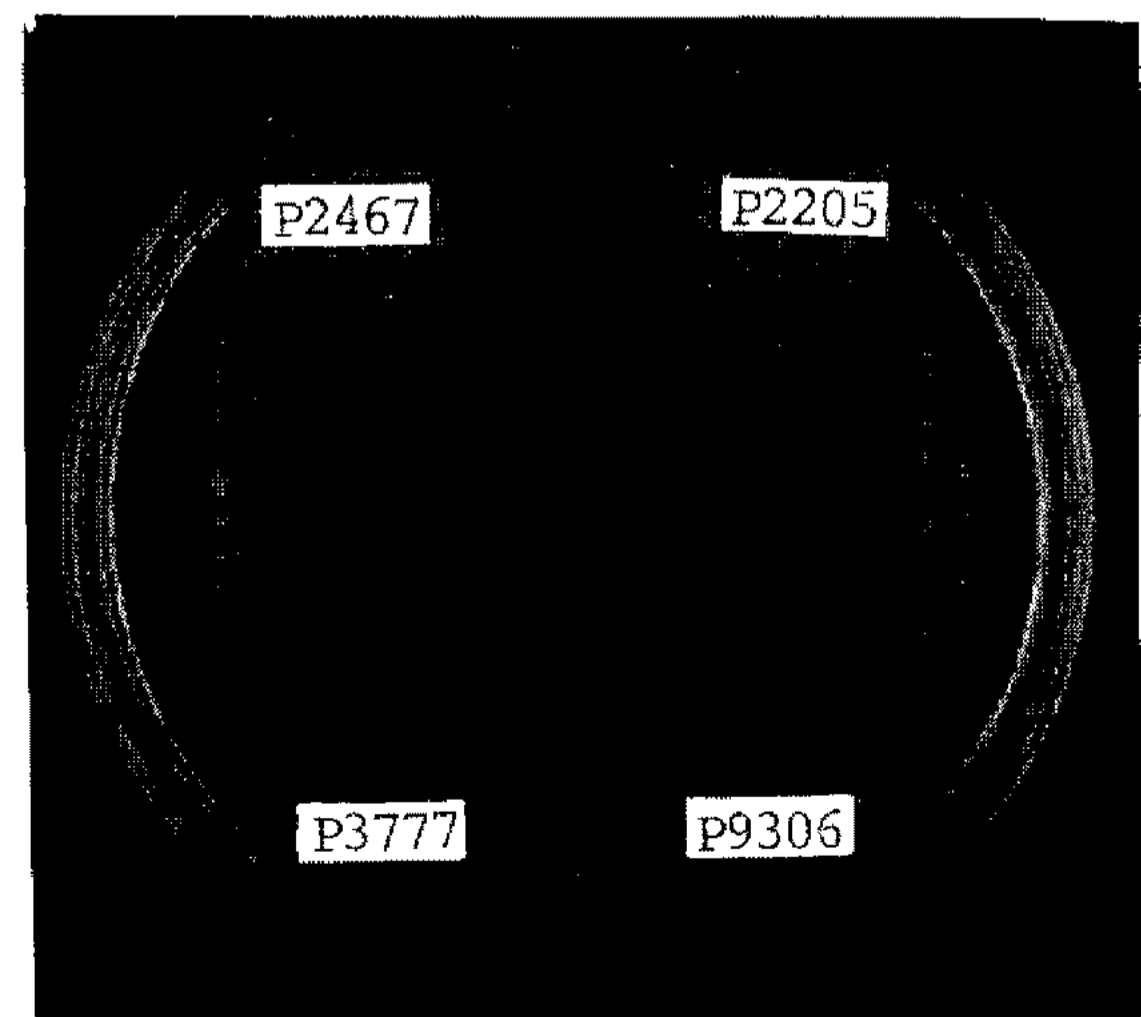


Fig. 3. Pyocin typing plate containing trypsin. The indicator was *P. aeruginosa* 90-1-566.

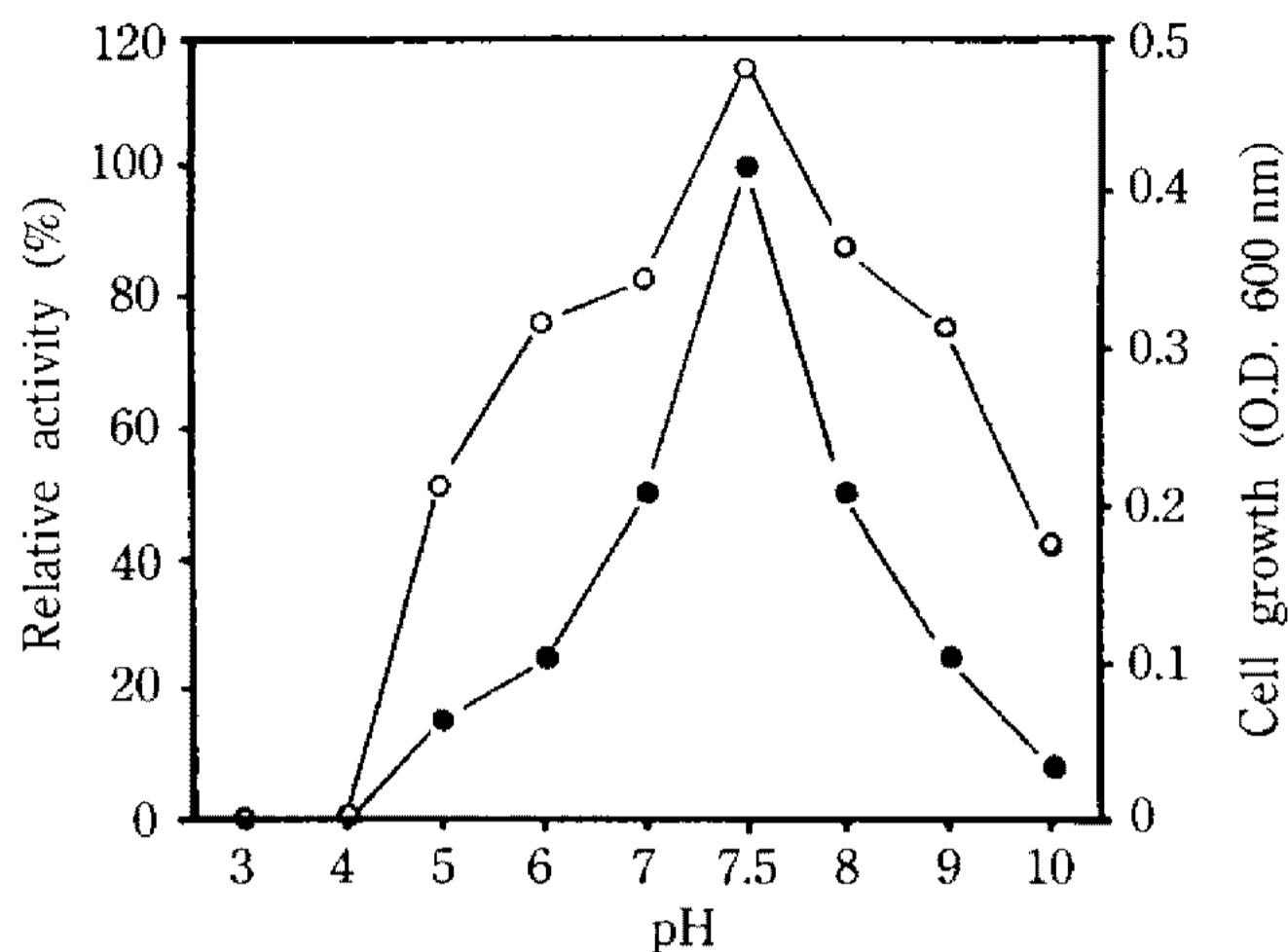


Fig. 4. Effect of pH on the pyocin production. ○, cell growth in the buffer of corresponding pH value; ●, pyocin activity

안정하고 trypsin 함유배지에서 피검균의 생육을 저해하지 못한 균주 몇(Fig. 3)를 S형 pyocin 생성균주로 선별하였다(14). 이들의 항균활성을 측정하여 활성이 가장 높은 *Pseudomonas aeruginosa* 90-2-2205 균주를 최종선별하였고, 선별균주가 생산하는 pyocin은 trypsin에 대해 감수성이고, 열(70°C)에 안정한 점으로 봐서 pyocin 분류상 S형에 속함을 확인할 수 있었고, 같은 종인 *Pseudomonas aeruginosa* 90-1-566의 생육을 저해하였다. 이러한 결과는 S형 pyocin에 대한 I. Ohkawa 등(2)의 S2, S. Ito 등(14)의 S1, Y. Sano 등(19)의 AP41 등의 보고와 일치했다.

Pyocin의 최적생성을 위한 배양온도 및 초기 pH의 조건

균이 pyocin을 생성하는데 미치는 배양온도 및 초기 pH의 영향을 조사하기 위하여 pyocin 생성배지를 0.5 M HCl과 0.3 M NaOH로써 pH 3에서 pH 10까지 조절하여 90-2-2205 균주를 접종하여 배양한 후, 균의 생육상태와 항균활성을 조사한 결과, Fig. 4와 같이 pH 7.5에서 균의 생육과 활성이 가장 높은 것으로 나타났다.

한편, 이 균이 pyocin을 생성하는데 미치는 배양온도의 영향을 조사하기 위하여 Temperature Gradient Incubator에서 배양한 결과, 이 균이 사람의 체내에서 분리한 때문인지 Fig. 5와 같이 37°C에서 균의 생육과 pyocin 항균활성이 가장 높았다. 그러나 그외의 온도에서는 균의 생육이 급격히 떨어졌고, 50°C 이상에서는 균이 거의 자라지 못했다.

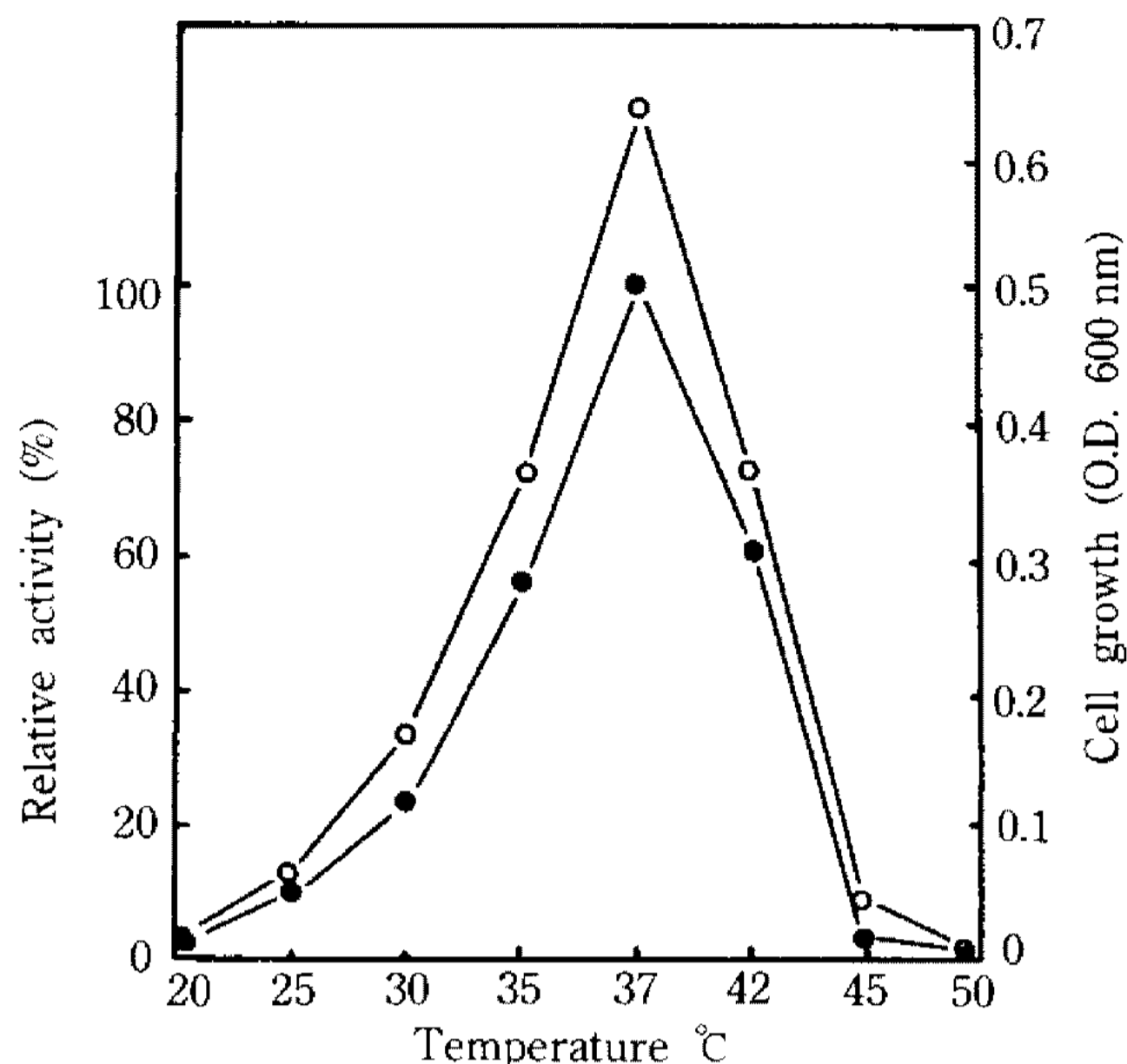


Fig. 5. Effect of temperature on the pyocin production. ○, cell growth; ●, pyocin activity

Table 2. Effect of carbon sources in pyocin production

Carbon sources (2%)	Growth (OD _{600 nm})	Relative Activity (%)
None	0.15	34
Sucrose	0.25	58
Starch	0.25	60
Lactose	0.28	63
Dextrose	0.28	64
Sodium glutamate(SG)	0.33	75
SG + Sucrose	0.36	82
SG + Starch	0.42	92
SG + Lactose	0.38	86
SG + Dextrose	0.44	100

Each carbon source(2%) was added to the basal medium containing 0.2% casamino acid, 0.56% Na₂HPO₄, 0.25% KH₂PO₄ and salt mixture.

Pyocin 생성에 미치는 탄소원의 영향

이 균이 pyocin을 생성하는데 미치는 탄소원의 영향을 조사하기 위하여 pyocin 생성 기본배지에 glucose와 sodium glutamate를 포함한 각종 탄소원을 2% 첨가하여 배양한 결과, Table 2와 같이 sodium glutamate를 넣었을 때 다른 탄소원의 첨가보다 균의 생육이 좋았고, 2% sodium glutamate와 0.5%의 다른 탄소원을 함께 넣어 배양한 결과, 하나의 탄소원만 넣었을 때보다 균의 생육이 모두 좋았으며, 그 중 원래

Table 3. Effect of nitrogen sources in the pyocin production

Nitrogen sources (0.2%)	Growth (OD _{600 nm})	Relative Activity (%)
None	0.02	10
Yeast extract	0.26	88
Casamono acid	0.16	52
Tryptone	0.31	100
Asparagine	0.08	27
Urea	0.06	31
(NH ₄) ₂ SO ₄	0.03	13
NH ₄ H ₂ PO ₄	0.02	8
NH ₄ Cl	0.05	17
KNO ₃	0.06	21

Each nitrogen sources(0.2%) was added to the basal medium containing 2% sodium glutamate, 0.75% dextrose, 0.56% Na₂HPO₄, 0.25% KH₂PO₄ and Salt mixture.

pyocin생성 기본배지의 구성성분이었던 glucose와 함께 넣었을 때가 균의 생육과 pyocin 활성이 가장 높았다. 그리고 glucose와 sodium glutamate 농도를 달리하여 균의 생육도와 활성을 조사한 결과, 0.5~1% glucose와 2% sodium glutamate 농도에서 균의 생육과 pyocin의 항균활성이 가장 좋았다.

Pyocin 생성에 미치는 질소원의 영향

이 균이 pyocin을 생성하는데 미치는 질소원의 영향을 조사하기 위하여, pyocin 생성 기본배지에 casamino acid를 포함한 각종 질소원을 0.2% 농도로 첨가하여 배양한 결과, Table 3과 같이 무기질소원의 첨가시 균의 생육이 좋지 않았고, 유기 질소원인 tryptone과 yeast extract의 첨가시 생육이 좋았다. 이 중에서 tryptone을, 농도별 조사결과 0.3% 농도로 첨가시, 균의 생육과 항균활성이 가장 높았다.

Pyocin생성에 미치는 인산염의 영향

이 균이 pyocin을 생성하는데 미치는 Na₂HPO₄ 농도의 영향을 조사하기 위하여 pyocin생성 기본배지에 각기 다른 농도(0.4~0.7%)의 Na₂HPO₄를 첨가하여 균의 생육도를 조사한 결과, 인산염의 첨가에 따른 pH 변화는 별로 없었으며, 균의 생육과 활성은 0.45%에서 가장 높았다. Na₂HPO₄를 첨가하지 않았을 때보다 0.7% 첨가시 균의 생육이 떨어지는 것으로 보아 너무 높은 인산염은 균의 증식을 억제함을 알 수 있었다. 그러나 Y. Sano(19) 등은 0.56%에서 최

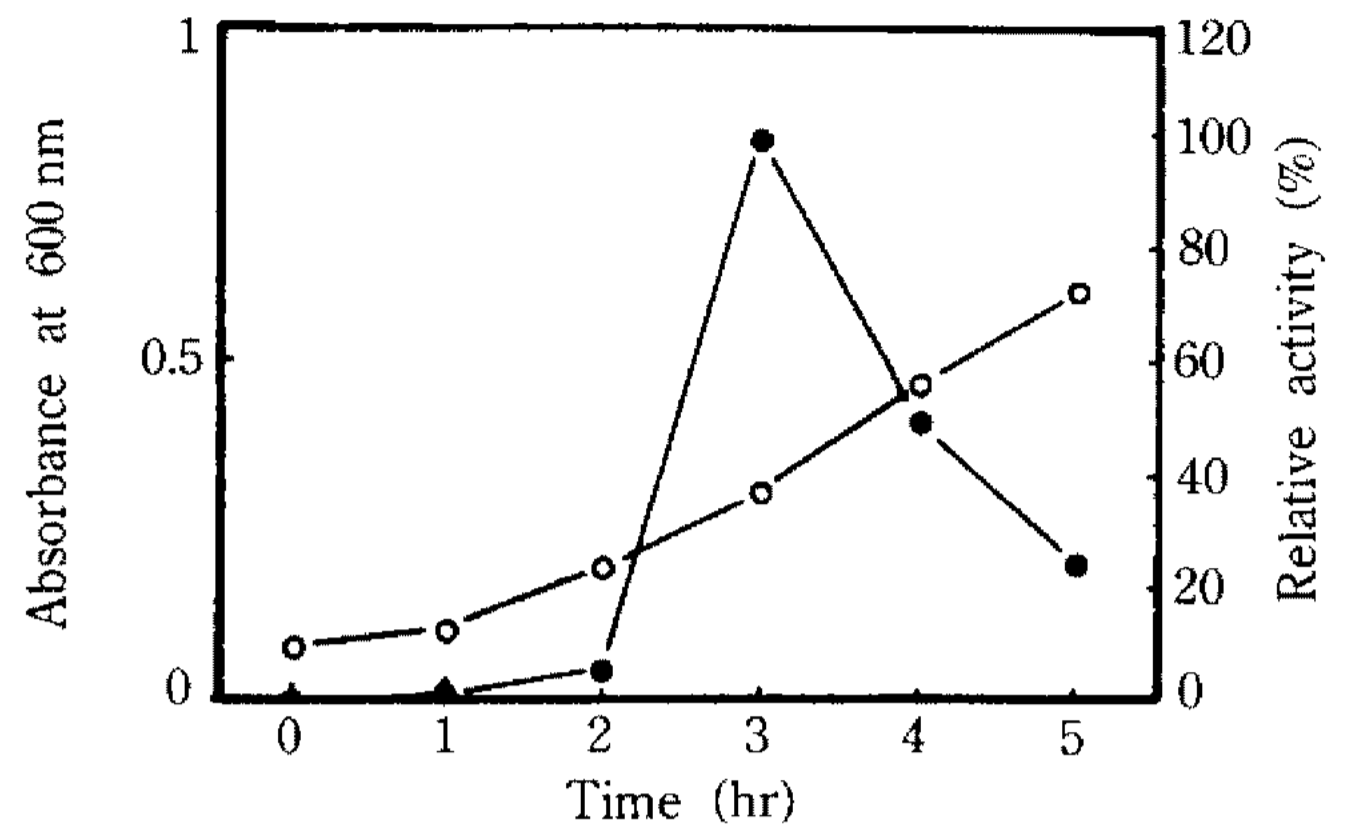


Fig. 6. Determination of preinduction culture time for the best pyocin production.

After a 10² dilution of overnight culture cells was cultured for the given time (hr), it was exposed to mitomycin C(2 µg/ml) for induction of pyocin biosynthesis, resulting in lysis. The pyocin activity of lysate was assayed. -○-, control with no induction; -●-, the activity of pyocin inducibly synthesized by mitomycin C.

고의 활성을 갖는다고 보고했다.

Pyocin 생성에 미치는 금속염의 영향

다양한 salt의 첨가에 따른 pyocin 생성과 균의 생육도를 조사하기 위하여, salt mixture를 제외한 pyocin 생성 기본배지에 각각의 금속염을 10⁻⁴ M 농도로 첨가한 결과, 단일 salt로는 KCl과 MnCl₂을 첨가하였을 경우 균의 생육과 pyocin 활성이 비교적 높았으며, FeSO₄와 NaCl의 경우는 균의 생육에 아무런 영향을 주지 못했고, ZnSO₄를 첨가하였을 때는 균의 생육이 저해되었다. 그러나 원래 pyocin 생성 기본배지(Table 1)의 구성성분이었던 salt mixture가 pyocin 생성에는 가장 우수했다.

균의 생육 및 항균 활성에 미치는 mitomycin C의 영향

이 연구에서는 pyocin의 유도를 위해서 mitomycin C(2 µg/ml)을 사용하였다. 배양시간에 따른 균의 생육과 pyocin 생성 정도를 조사하기 위하여 log phase의 말기, 또는 초기 stationary phase에 접어든 균을 최적 배지에 100배 희석하여 mitomycin C 유도전 배양시간에 따른 균의 생육 및 항균 활성을 조사한 결과, Fig. 6과 같이 3시간 배양후 pyocin 유도시 가장 항균 활성이 높았으며, 3시간 이상 배양하여 pyocin을 유도했을 때는 균의 생육은 좋았으나, 항균활성은 떨어졌다. 그리고 mitomycin C 유도 후 배양

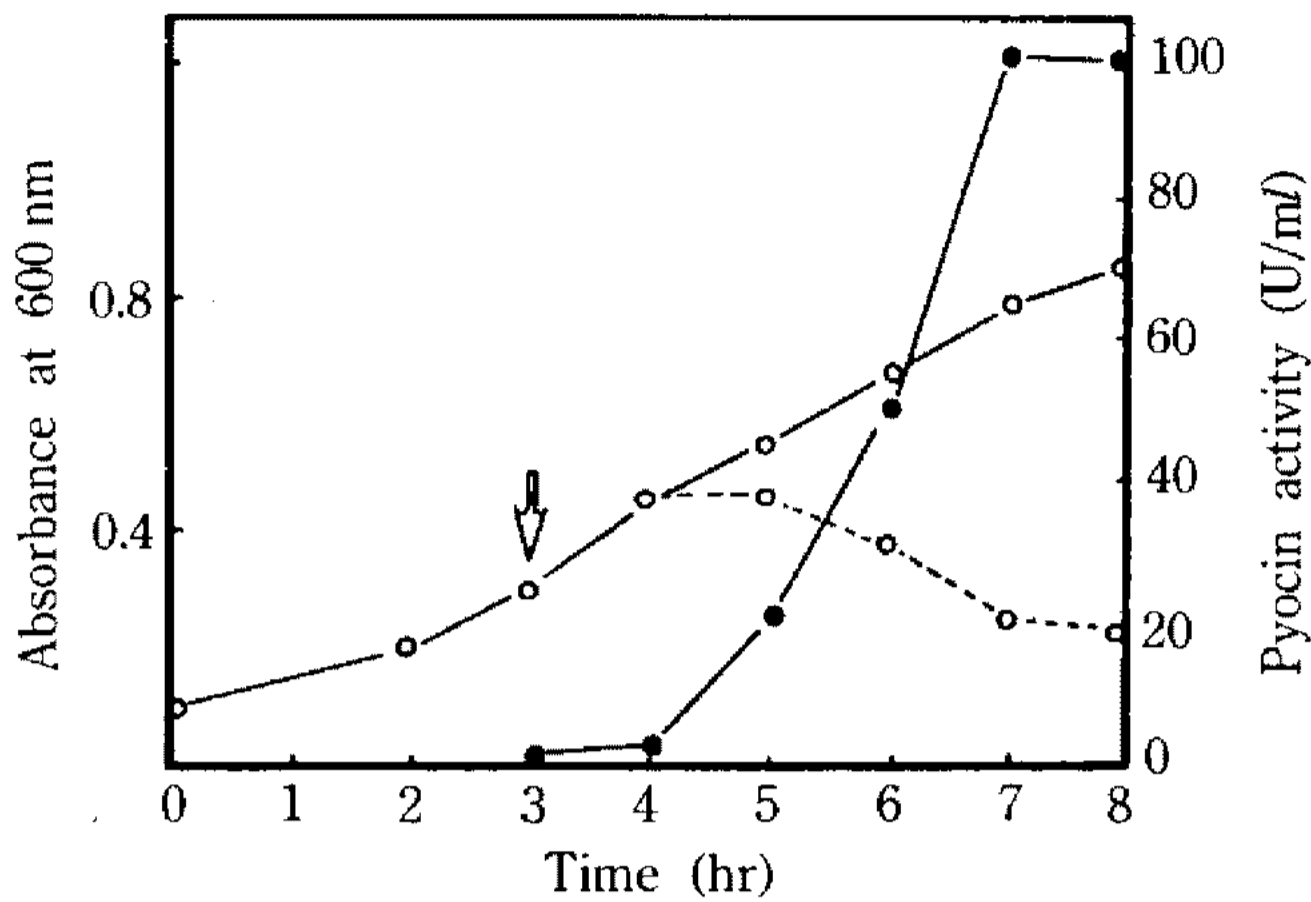


Fig. 7. Induction of pyocin production.
At the time indicated by arrow, mitomycin C (2 $\mu\text{g}/\text{ml}$) was added. \circ - \circ , control with no mitomycin induction; \circ - \cdots - \circ , induced with mitomycin C; \bullet - \bullet , pyocin activity

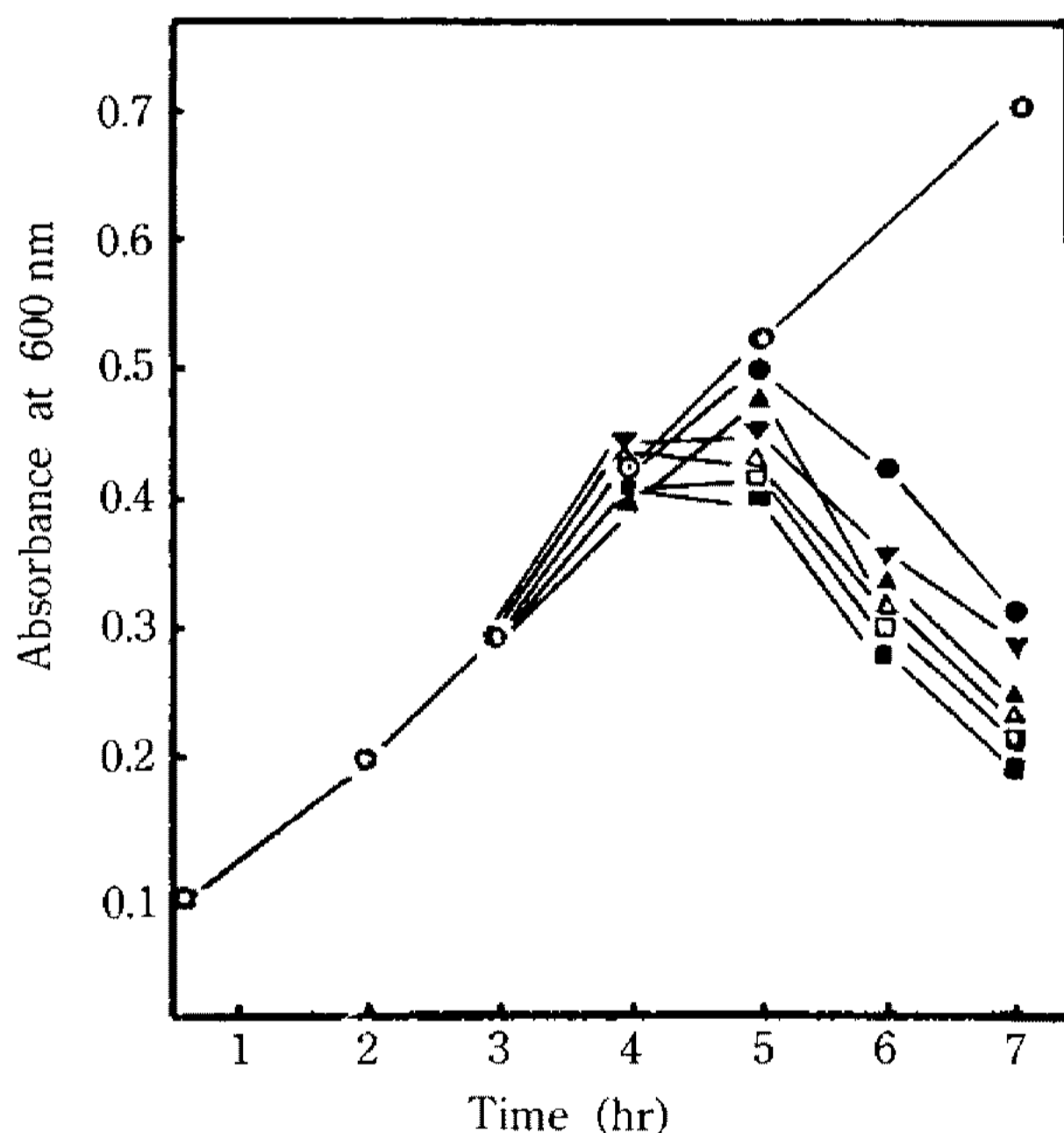


Fig. 8. Effect of mitomycin C concentration on the pyocin production.

Various amounts of mitomycin C were added at the early log phase indicated by arrow.

\circ , control with no addition; \bullet , 0.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$; \blacktriangle , 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$; \triangle , 1.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$; \blacksquare , 2 $\mu\text{g}/\text{ml}$; \square , 2.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$; \blacktriangledown , 3 $\mu\text{g}/\text{ml}$

시간에 따른 균의 생육과 항균활성을 조사한 결과(Fig. 7), 유도 후 배양 4시간이상 배양하였을 때 활성이 높았다. 균의 생육은 mitomycin C 첨가 1시간 후부터 점차 감소하는 것으로 볼 때 mitomycin C에 의해 pyocin이 유도됨과 동시에 균이 lysis됨을 알 수 있었다. 한편 mitomycin C를 농도별로 첨가한 뒤, 시간에 따른 균의 생육을 흡광도 600 nm에서 측정된 결과는 Fig. 8

과 같이 2 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 첨가했을 때 가장 흡광도가 낮았고, 이 농도 첨가시 pyocin이 가장 많이 생성됨을 알 수 있었다.

요 약

Bacteriocin은 Jacob 등이 명명한 것과 같이 penicillin이나 streptomycin 등의 항생물질과는 달리 오직 동일 또는 유사한 종에만 항균작용을 가지는 단백질이다. 이 연구에서 사용한 녹농균 *Pseudomonas aeruginosa*은 병원내 환자에게서 직접 채취 동정한 것을 분양받았으며 2가지 pyocin 검정방법으로 pyocin 생성 유·무를 확인하였고, trypsin에 대한 감수성과 저항성으로 분류하였다. 그 중에서 trypsin에 대해 감수성이고 항균활성이 가장 높은 *Pseudomonas aeruginosa* 90-2-2205 균주를 S형 pyocin 생성균주로 최종 선별하였다. 이 균의 pyocin의 최적 생성조건을 조사한 결과, 0.5% glucose, 2% sodium glutamate, 0.3% tryptone, 0.45% Na_2HPO_4 , 0.25% KH_2PO_4 , salt mixture을 함유한 배지(pH 7.5)에 37°C에서 3시간 배양한 후 chemical mutagen인 mitomycin C(2 $\mu\text{g}/\text{ml}$)을 첨가하여 그의 생성을 유도한 다음, 계속해서 4시간 더 배양했을 때 pyocin의 생성은 최고이었다.

감사의 말씀

이 연구를 위해 균주를 기꺼이 분양해 주신 연세대의대 임상병리학실의 정윤섭 교수님, KIST 유전자는행실의 이정숙님과, 많은 정보와 조언을 주신 경북대의대 미생물학실의 설성용 교수님께 진심으로 감사를 드립니다.

참고문헌

1. Foulds, J. 1972. Purification and partial characterization of a bacbacteriocin from *Serratia marcescens*. *J. Bacteriol.* **110**: 1001-1009.
2. Ohkawa, I., M. Kageyama and F. Egami. 1973. Purification and Properties of pyocin S2. *J. Biochem.* **73**: 281-289.
3. Reeves, P. 1972. Mode of action, Pp. 46-80. In *The Bacteriocins*, Springer-Verlag Berlin, Heidelberg, New York.
4. Bradley, D.E. 1967. Ultrastructure of bacteriophages and bacteriocins. *Bacteriol. Rev.* **31**: 230-314.
5. Reeves, P. 1965. The Bacterions. *Bacteriol. Rev.* **29**:

- 24-45.
6. 今堀和友, 高木康敬, 別府輝彦. 1979. バクテリオシン, Pp. 727-860. 共立出版(株), 東京.
 7. Holland, E.M. and I.B. Holland. 1972. Kinetics of colicin E2-induced solubilization and fragmentation of *Escherichia coli* DNA *in vivo*. *Biochem. Biophys. Acta.* **281**: 179-191.
 8. Obinata, M. and D. Mizuno. 1970. Mechanism of colicin E2-induced DNA degradation in *Escherichia coli*. *Biochem. Biophys. Acta.* **199**: 330-339.
 9. Ringrose, P.S. 1970. Sedimentation analysis of DNA degradation products resulting from the action of colicin E2 on *Escherichia coli*. *Biochem. Biophys. Acta.* **213**: 320-334.
 10. Schaller, K. and M. Nomura. 1976. Colicin E2 is a DNA endonuclease. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **73**: 3989-3993.
 11. Jakes, K.S. and N.D. Zinder. 1974. Highly purified colicin E3 contains immunity protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **71**: 3380-3384.
 12. Hardy, K.G. 1975. Colicinogeny and related phenomena. *Bacteriol. Rev.* **39**: 464-515.
 13. Holloway, B.W. and Krishnapillai, V. 1975. Bacteriophages and bacteriocins, Pp. 99-132. In *Genetics and Biochemistry of Pseudomonas*. John Wiley, London.
 14. Ito, S., M. Kageyama and F. Egami. 1970. Isolation and characterization of pyocin from several strains of *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Gen. Appl. Microbiol.* **16**: 205-214.
 15. Kageyama, M. 1964. Studies of a pyocin. I. Physical and chemical properties. *J. Biochem. (Tokyo).* **55**: 49-53.
 16. Kageyama, M., T. Shinomiya, Y. Aihara and M. Kobayashi. 1979. Characterization of a bacteriophage related to R-type pyocins. *J. Virol.* **32**: 951-957.
 17. Kuroda, K. and M. Kageyama. 1979. Biochemical properties of a new flexuous bacteriocin, pyocin F1, produced by *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Biochem. (Tokyo).* **85**: 7-19.
 18. Kuroda, K., R. Kageyama and M. Kageyama. 1983. Isolation and characterization of a new bacteriophage, KF1, immunologically crossreactive with F-type pyocins. *J. Biochem. (Tokyo).* **93**: 61-71.
 19. Sano, Y. and M. Kageyama. 1981. Purification and properties of an S-type pyocin AP41. *J. Bacteriol.* **146**: 733-739.
 20. Gillies, R.R. and J.R.W. Govan. 1966. Typing of *Pseudomonas pyocyanea* by pyocin production. *J. Pathol. Bacteriol.* **91**: 339-345.
 21. J.R.W. Govan. 1978. Pyocin typing of *Pseudomonas aeruginosa*, Pp. 61-91. In *Method in microbiology*, Vol. 10, Academic Press.
 22. Govan, J.R.W. and R.R. Gillies. 1969. Further study on the pyocin typing of *Pseudomonas pyocyanea*. *J. Med. Microbiol.* **2**: 17-25.
 23. Holloway, B.W. 1960. Grouping *Pseudomonas aeruginosa* by lysogenicity and pyocinogenicity. *J. Path. Bacteriol.* **80**: 448-450.
 24. Kageyama, M. 1975. Bacteriocins and bacteriophages in *Pseudomonas aeruginosa*. Pp. 291-305. in S. Mitsuhashi and H. Hashimoto (eds.), *Microbial drug resistance*. University of Tokyo Press.
 25. Ohkawa, I., B. Maruo and M. Kageyama. 1975. Preferential inhibition of lipid synthesis by the bacteriocin pyocin S2. *J. Biochem. (Tokyo).* **78**: 213-223.
 26. Ohkawa, I., S. Shiga and M. Kageyama. 1979. An esterase on the outer membrane of *Pseudomonas aeruginosa* for the hydrolysis of long chain acyl esters. *J. Biochem. (Tokyo).* **86**: 643-656.
 27. Holloway, B.W., H. Rossiter, D. Burgess and J. Dodge. 1973. Aeruginocin tolerant mutants of *Pseudomonas aeruginosa*. *Genet. Res.* **22**: 239-253.
 28. Konisky, J. and H. Tokuda. 1979. Mode of action of colicin Ia, E1, K. *Zbl. Bakt. Hyg. I. Abt. Orig.* **A244**: 105-120.
 29. S. Ito, M. Kageyama and F. Egami. 1970. Isolation and characterization of pyocin from strains of *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Gen. Appl. Microbiol.* **16**: 205-214.
 30. Yoo, J.Y., I.S. Lee, K.S. Chung and Y.J. Nam. 1991. Isolation properties of bacteriocin-producing microorganisms. *Kor. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.* **19**: 8-13.
 31. Choi, S.Y., S.H. Lee, I.S. Lee, J.Y. Yoo, K.S. Chung and Y.J. Koo. 1991. Purification and properties of bacteriocin produced by *Lactococcus* sp. 1112-1. *Kor. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.* **19**: 209-214.

(Received February 8, 1993)