

Enterococcus sp.가 생산하는 Bacteriocin의 정제 및 특성에 관한 연구

정건섭* · 양은석 · 이국진 · 고현정 · 정병문
연세대학교 생물자원공학과

Purification and Characterization of Bacteriocin Produced by *Enterococcus* sp. Chung, Kun-Sub*, Eun-Seok Yang, Kook-Jin Lee, Hyun-Jung Koh, and Byung-Moon Jung. Department of Biological Resources and Technology, Yonsei University, Wonju 220-710, Korea - We isolated microorganism secreting antimicrobial substance from tomato and identified as *Enterococcus faecium*. This substance was completely inactivated by protease treatment and retained activity after catalase treatment. This result indicated that the antimicrobial activity of this substance was due to proteinaceous substance known as bacteriocin. The bacteriocin inhibited growth of Gram positive bacteria, such as *Listeria monocytogenes*, *Leuconostoc mesenteroides*, *Lactobacillus plantarum*, *Streptococcus agalactiae*, *Streptococcus pyrogenes*, and Gram negative bacteria, such as *Pseudomonas aeruginosa*. Purification of the bacteriocin was achieved by ethanol precipitation, ion exchange chromatography on CM Sepharose CL-6B, and gel filtration on Sephacryl S-100 HR. After these purification steps, the specific activity of the bacteriocin was increased 35.8 fold compared with culture broth. Purified bacteriocin was shown single band on SDS-PAGE and molecular weight was estimated 51 kDa. The residual activity of this bacteriocin was 3.3% at 100°C for 60 min, and this bacteriocin was stable at pH 2~7.

Key words: *Enterococcus* sp., bacteriocin, purification, *Leuconostoc mesenteroides*, *Streptococcus pyrogenes*, *Listeria monocytogenes*

Bacteriocin에 대한 연구는 Gratia가 1925년에 *Escherichia coli*가 생산하는 항균성 단백질을 발견하고, 이 단백질을 colicin이라고 명명한 것이 최초이며, 일반적으로 bacteriocin은 항균물질 생산균주 자신과 계통, 분류학적으로 근접한 균종으로 제한된 좁은 항균 범위를 나타내며, 항생물질과 유사한 특성을 가지고 있다[1]. Bacteriocin은 단백질성 물질로 이루어져 섭취하게 되면 단백질을 분해효소에 의해 분해되어 잔류독성이 적어 화학합성보존제를 대체할 수 있을 것으로 기대되고 있으며 *Lactobacillus*[16], *Lactococcus*[3], *Leuconostoc*[6], *Pediococcus*[4] 및 *Enterococcus*속의 미생물이 생산하는 bacteriocin에 대한 보고가 있다.

이중 *Enterococcus*속이 생산하는 bacteriocin에 대한 연구로는 1992년에 Parente와 Hill[15]이 *Listeria*에 항균력이 있는 bacteriocin을 보고하였고, 1996년 Franz등[8]이 열 및 pH에 안정하며 *Listeria monocytogenes*를 포함하는 *Listeria* spp. 및 *Lactobacillus sake*, *Clostridium butyricum*에도 항균력을 가지는 bacteriocin을 분리하였다. 또한 Maisnier등[14]이 치즈로부터 분리한 enterococcin은 *Staphylococcus aureus*에 항균력을 보였으며, 1997년 Luis등[12]은 Gram 양성 병원성 세균에

항균력을 보이며 열과 pH에 매우 안정한 bacteriocin을 보고하였다. 한편 1998년 Laukova와 Czikkova[13]는 반추위로부터 분리한 enterococcin이 *E. coli*에도 항균력이 있음을 보고한 바가 있다.

본 연구는 토마토에서 분리한 bacteriocin 활성균주인 *Enterococcus* sp.가 생산하는 bacteriocin을 분리하여 정제 및 물질 특성에 대하여 조사하였기에 보고하고자 한다.

재료 및 방법

사용 균주

본 실험에 사용된 균주는 토마토에서 분리한 T39를 bacteriocin 생산균주로 사용하였으며, 항균력 측정을 위하여 사용된 피검균은 Gram 양성 세균인 *Bacillus subtilis* KCCM 35424, *Lactobacillus plantarum* KCCM 11322, *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* KCCM 32406, *Leuconostoc mesenteroides* KCCM 11324, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Streptococcus agalactiae* KCCM 11957, *Streptococcus pyrogenes* ATCC 19615, *Listeria monocytogenes* KCCM 40307과 Gram 음성 세균인 *Salmonella typhimurium* ATCC 19585, *Escherichia coli* O157:H7 ATCC 35150, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Yersinia enterocolitica* ATCC 27729와 곰팡이인 *Aspergillus fumigatus* KCTC 6145, *Penicillium*

*Corresponding author
Tel. 82-371-760-2252, Fax. 82-371-763-4323
E-mail: kschung@dragon.yonsei.ac.kr

digitatum KCTC 60140과 효모인 *Candida albicans* KCTC 7965, *Saccharomyces cerevisiae* ATCC 9763 등이었다.

균주 배양

분리 균주인 T39 배양에는 MRS broth 배지(Merck Co.)를 사용하여 37°C에서 20~24시간 정치배양하였다. 그밖의 피검균종 *Lactobacillus plantarum*, *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*, *Leuconostoc mesenteroides*는 MRS 배지로 37°C에서 배양하고 *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus agalactiae*, *Streptococcus pyrogenes*, *Listeria monocytogenes*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Yersinia enterocolitica*는 BHI배지(Difco Co.)로 37°C에서 배양하였다. 그리고, *Salmonella typhimurium*, *Escherichia coli* O 157:H7는 Nutrient배지(Difco Co.)로 37°C에서 배양하였고, *Aspergillus fumigatus*, *Penicillium digitatum*, *Candida albicans*, *Saccharomyces cerevisiae*는 PDA배지(Difco Co.)로 25°C에서 배양하였다.

분리균주 동정

분리균주의 동정을 위하여 Gram 염색후 현미경 관찰, catalase test, 포자형성 유무관찰 등을 하였고, 생화학적 특성을 조사하기 위하여 API 20 STREP. kit(bio-Merieux Vitek, Inc.)를 사용하였다.

항균력 측정

항균력 측정은 paperdisk(8 mm, thick, Toyo Roshi Kaisha, Ltd)를 사용하는 확산법으로 행하였다. 피검균을 액체 배양한 후 각 한천배지에 0.1%(v/v) 첨가하여 petridish에 분주하여 굳힌 후 이 고체 배지 위에 시료용액을 적신 paperdisk를 올려놓고 24시간 배양하여 투명한 크기로 항균력을 비교하였다. 곰팡이의 경우는 고체배지상에서 형성된 포자를 따로 수집하여 포자현탁액을 만들어 한천배지에 일정량 첨가하여 사용하였다. 항균력은 나타낸 투명한 면적에서 paperdisk의 면적을 빼준 면적으로 1 mm²를 1 AU로 정의하여 표현하였다.

Bacteriocin 정제

분리균주 T39의 배양액을 원심분리하여 상등액을 취한 후 미리 냉각한 ethanol을 상등액의 4배 첨가하여 -30°C에서 12시간 방치하였다. 이를 원심분리(10,000 g/15분)하여 얻어진 침전물을 동결건조시킨 후 적당량의 50 mM acetate buffer(pH5.0)에 녹여 이를 crude bacteriocin 용액으로 사용하였다.

이온교환 chromatography[17]는 CM Sepharose CL-6B(Sigma Co.) 수지를 사용하였으며 50 mM acetate buffer(pH5.0)에 NaCl을 0~0.5M 농도 구배로 첨가하

여 용출시켰다.

Gel filtration은 Sephacryl S-100 HR(Pharmacia Co.)를 사용하였으며 50 mM acetate buffer(pH5.0)로 용출하였다. 이때 각 분획의 단백질 함량을 UV-Vis spectrophotometer(Shimadzu Co.)를 사용하여 280 nm에서 측정하였고, 동시에 피검균으로 *Leu. mesenteroides*를 사용하여 항균력을 측정하였다.

단백질 정량

단백질의 농도측정은 Lowry법[7]으로 행하였으며 이때 검량곡선 작성을 위해 표준단백질로는 bovine serum albumin(Sigma Co.)을 사용하였다.

전기영동

SDS-polyacrylamide gel은 Laemmli[11]의 방법에 따라 조제하였다. 전기영동시 표준단백질로는 Sigma Marker Low Range(albumin(66 kDa), ovalbumin(45 kDa), glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase(36 kDa), carbonic anhydrase(29 kDa), trypsinogen(24 kDa), trypsin inhibitor(21 kDa), α -lactalbumin(14.2 kDa), aprotinin(6.5 kDa))을 사용하였다. 전기영동 후 gel은 Coomassie brilliant blue(Sigma Co.)로 염색하였다.

열 안정성 및 pH안정성

Crude bacteriocin 용액을 각 온도에서 60분간 열처리한 후 항균력을 측정하여 열에 대한 안정성을 검토하였으며, 각 pH별 용액(pH 2.0, 4.0, 6.0, 7.0, 8.0, 10.0)에 항균물질을 녹인 다음 25°C에서 48시간 방치한 후 항균력을 측정하여 pH에 대한 안정성을 검토하였다.

결과 및 고찰

항균물질의 확인

토마토에서 분리된 T39의 항균 spectrum을 조사한 결과, Gram 양성세균인 *Listeria monocytogenes*, *Leuconostoc mesenteroides*, *Lactobacillus plantarum*, *Streptococcus agalactiae*, *Streptococcus pyrogenes*와 Gram 음성세균인 *Pseudomonas aeruginosa* 등의 균주에 대하여 항균력을 보였다.

Franz등[8]은 black olive로부터 분리한 *Enterococcus faecium*이 생산하는 bacteriocin이 *Listeria monocytogenes*를 포함하는 *Listeria* spp. 및 *Lactobacillus sake*, *Clostridium butyricum*에 항균력을 가진다고 보고하였다. Cintas등[12]이 건조소시지로부터 분리한 *Enterococcus faecium* P13이 생산하는 bacteriocin인 enterocin P는 *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus*, *Clostridium perfringens*, *Clostridium botulinum*과 같은 Gram

Table 1. Biochemical results of API 20 STREP test for isolate T39

Reaction	Result	Reaction	Result
Acetoin production	+	Ribose acidification	+
Hydrolysis of hippurate	+	L-Arabinose acidification	+
β-Glucosidase	+	Mannitol acidification	+
Pyrrolidonylarylamidase	+	Sorbitol acidification	-
α-Galactosidase	-	Lactose acidification	+
β-Glucosidase	-	Trehalose acidification	+
β-Galactosidase	-	Inulin acidification	-
Alkaline phosphatase	-	Raffinose acidification	-
Leucine acrylamidase	+	Starch acidification	+
Arginine dihydrolase	+	Glycogen acidification	+
		Hemolytic reaction	-

양성 병원성세균에 항균력이 있으나 *Leuconostoc*이나 Gram 음성세균인 *Pseudomonas fluorescens*등에는 항균력이 없었다. Laukova와 Czikkova[13]는 반추위로부터 분리한 enterocin CCM 4231은 *E. coli*에도 항균력이 있음을 보고한 바가 있다. 분리균주인 T39가 생산하는 항균물질은 유사한 다른 균주와 비교하여 식중독 미생물인 *Listeria*에 대한 항균력은 비슷하였고, 젖소의 유방염을 유발하는 *Streptococcus agalactiae*, *Streptococcus pyogenes*에도 항균력을 보였다.

또한 T39의 항균물질 확인을 위하여 proteinase K (Sigma Co.) 처리시 항균활성이 소실되는 반면, catalase 처리시에는 활성을 보이는 것으로 보아 단백질성 물질임을 확인할 수 있었다.

분리균주의 동정

항균물질을 생산하는 분리균주 T39의 동정을 위하여 Gram염색 후 현미경 관찰한 결과 Gram 양성, 구균으로 확인되었고, catalase test 및 포자생성 유무 test에서 catalase음성, 포자형성을 하지 않는 균주로 확인되었다. API 20 STREP kit의 생화학적 검사결과는 Table 1에서 보는 바와 같았으며 이로부터 얻어진 7 digit profile은 7 147 513 으로 bioMerieux 사의 computer service를 통하여 *Enterococcus faecium*으로 잠정 동정하였다.

***Leuconostoc mesenteroides*에 대한 분리 bacteriocin의 작용특성**

분리균주가 생산하는 bacteriocin의 작용특성을 알아보기 위하여 피검균인 *Leu. mesenteroides*를 MRS broth에서 18시간 배양한 후 다른 효소의 영향력을 제거하기 위하여 멸균 생리식염수로 세척하였다. 이를 새로운 MRS broth에 1.0×10^6 CFU/ml 되도록 접종하고, crude bacteriocin을 4%(w/v) 첨가한 후 37°C에서 배양하면서 1시간 간격으로 *Leu. mesenteroides* 생육을 조사하였다. Fig. 1에서와 같이 *Leu. mesenteroides*는 4시간 후 완전 사

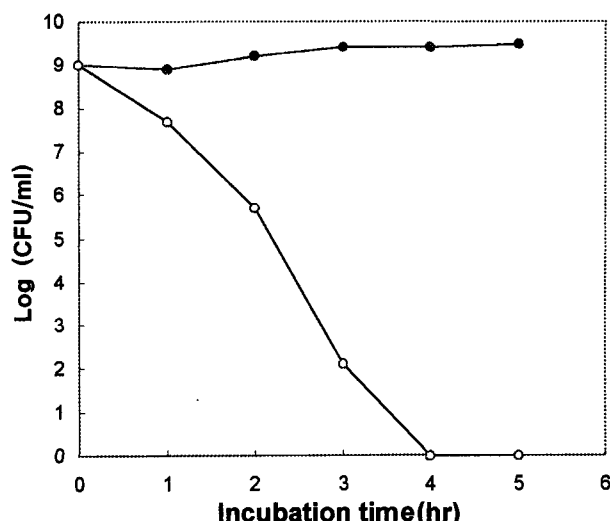


Fig. 1. Mode of action of crude bacteriocin from isolate T39 against *Leuconostoc mesenteroides* KCCM11324.

● : *Leuconostoc mesenteroides* KCCM11324. ○ : *Leuconostoc mesenteroides* KCCM11324 added crude bacteriocin (40 mg/ml).

멸되므로 분리균주의 bacteriocin은 피검균에 대한 bacteriocidal 작용[5]을 나타내는 것으로 추정되었다.

Bacteriocin의 안정성

분리 bacteriocin의 열 및 pH에 대한 안정성을 조사하였다. Bacteriocin의 열안정성 조사를 위하여 crude bacteriocin을 50 mM acetate buffer(pH5.0)에 녹인 다음 25, 50, 70, 100°C의 각 온도에서 60분간 방치한 후 냉각시켜 항균력을 측정한 결과 Table 2와 같았다. 25°C에서 처리하였을 때에 비하여 50°C에서는 84.6%, 70°C 57.1%, 100°C 3.3%의 잔존활성을 보였다. pH에 대한 안정성 조사를 위하여 crude bacteriocin을 pH2.0, 4.0, 6.0, 7.0, 8.0, 10.0의 용액에 녹여 25°C에서 48시간 방치한 후 항균활성을 측정하였다. Table 3에서와 같이 pH2에서 pH7 사이에서는 항균력이 거의 유지되었고 알카리 쪽으로 갈수록 잔존활성이 줄어드는 것으로 나타났다.

Franz 등[8]이 black olive로부터 분리한 *Enterococcus faecium* CTC492에서 생산된 bacteriocin은 121°C에서

Table 2. Effect of heat treatment on the antimicrobial activity of the crude bacteriocin^a

Temperature (°C)	Clear zone size ^b (mm ²)	Relative activity (%)
25	148.4	100
50	125.6	84.6
70	84.8	57.1
100	4.9	3.3

^a The bacteriocin was treated at each temperature for 60 min.

^b Clear zone size = total clear zone size - paper disk size.

Table 3. Effect of pH on the antimicrobial activity of the crude bacteriocin^a

pH	Clear zone size ^b (mm ²)	Relative activity (%)
2.0	125.6	100
4.0	125.6	100
6.0	125.6	100
7.0	104.4	83.1
8.0	84.8	67.5
10.0	50.2	40.0

^a The bacteriocin was treated at each pH, 25°C for 48 hr.
^b Clear zone size = total clear zone size - paper disk size.

15분의 열처리에 활성도가 유지되었고, Cintas등[12]이 보고한 건조소시지에서 분리한 균주가 생산하는 enterocin P는 pH 2에서 pH 11까지 넓은 범위에서 항균력이 있었다. 이와 비교할 때 분리 bacteriocin은 열과 pH에 대한 안정성이 비교적 낮은 것으로 생각되었다.

Bacteriocin의 정제

배양액을 4배의 ethanol로 침전시켜 동결건조하여 얻은 crude bacteriocin을 정제하기 위하여 양이온 교환수지인 CM Sepharose CL-6B를 이용하여 column chromatography를 하였다. Fig. 2에서 보는 바와 같이 분리 균주가 생산하는 항균성물질은 NaCl농도 0.25M 부근에서 용출되었다. 항균활성분획을 모아 동결건조시켜 농축한 다음 50 mM acetate buffer(pH5.0)로 평형화시킨 Sephacryl S-100 HR을 사용하여 gel filtration을 행하였다. Gel filtration 결과는 Fig. 3에서 보는 바와 같이 두 개의 단백질 peak중 앞 peak에 해당하는 7, 8번 분획

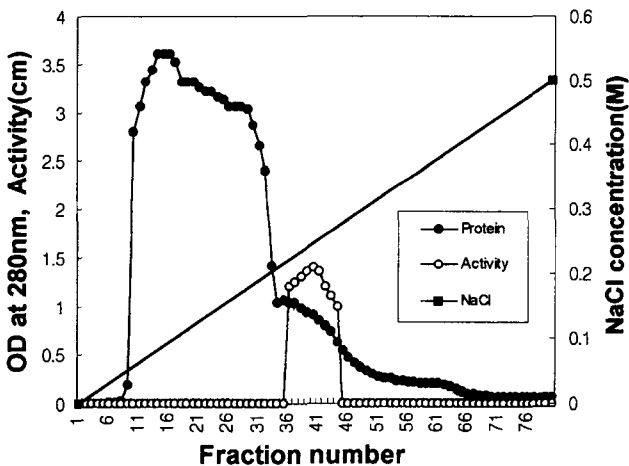


Fig. 2. Elution profile of the crude bacteriocin on CM-Sepharose CL-6B column chromatography.
 Column size: 1.5 cm×50 cm. Elution buffer: 50 mM acetate buffer (pH 5.0) with 0~0.5 M NaCl linear gradient. Flow rate: 0.3 ml/min. Fraction volume: 2 ml.

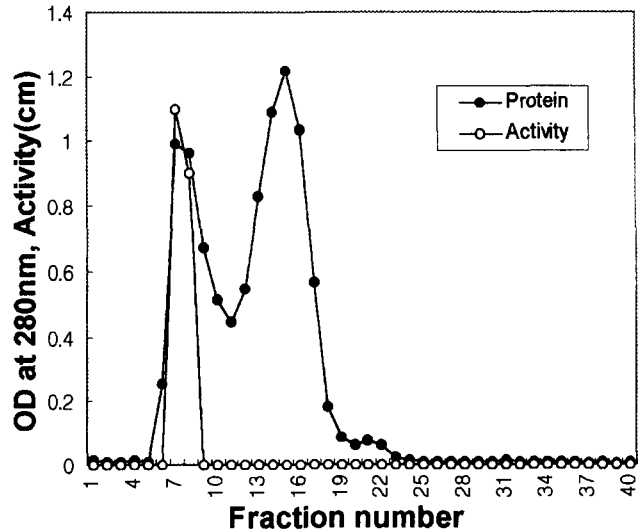


Fig. 3. Elution profile of the purified bacteriocin on Sephacryl S-100 HR gel filtration.
 Column size: 1.5 cm×50 cm. Elution buffer: 50 mM acetate buffer (pH 5.0). Flow rate: 0.3 ml/min. Fraction volume: 2 ml.

Table 4. Summary of purification of bacteriocin from isolate T39

	Total Activity (AU)	Total Protein (mg)	Specific activity (AU/mg)	Fold of purity
Culture broth	565,200	43,902	12.9	1.0
EtOH precipitate	86,513	842	102.7	8.0
Ion exchange chromatography	31,798	174	182.7	14.2
Gel filtration	5,537	12	461.4	35.8

에서 bacteriocin 활성을 나타내었다. 이상의 bacteriocin 정제 결과를 요약해보면 Table 4와 같이 최종 gel filtration하였을 때 초기 배양액에 비교하여 35.8배 정제됨을 보였다.

전기영동

Gel filtration에서 얻어진 항균물질의 순도를 검정하기 위해 13% SDS-polyacrylamide gel을 사용하여 전기영동 하였을 때 약 51 kDa 부근에 단일 band를 보임으로써(Fig. 4) 분리균주가 생산하는 bacteriocin은 CM Sepharose CL-6B와 Sephacryl S-100 HR column chromatography의 정제과정을 거치면서 순수하게 정제됨을 알 수 있었으며, 표준단백질과 비교한 분자량 측정에서 약 51 kDa 정도로 추정되었다.

Aymerich등[2]의 보고에 따르면 *Enterococcus faecium*에서 분리된 enterocin A는 SDS-PAGE에 의해 분자량을 측정한 결과 4,829 Da이었고 Kato등[9]의 enterocin 100은 분자량이 200 kDa이나 되는 것으로 보고

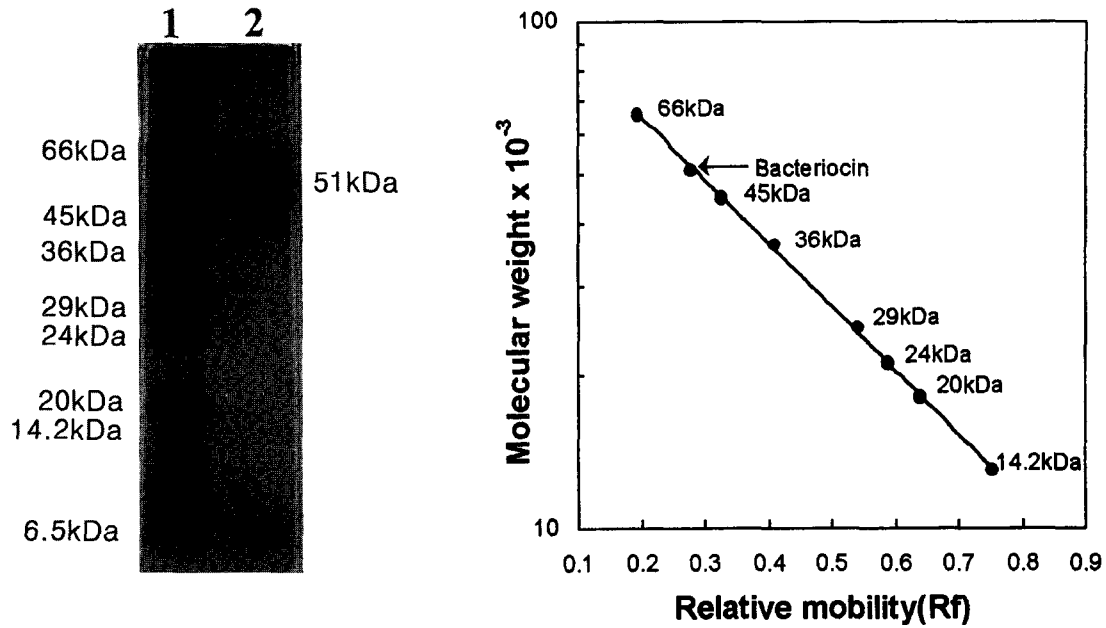


Fig. 4. SDS-polyacrylamide gel electrophoresis of purified bacteriocin from isolate T39. SDS-PAGE was performed on a 13% polyacrylamide gel. Lane 1, protein molecular weight markers: albumin (66 kDa), ovalbumin (45 kDa), glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (36 kDa), carbonic anhydrase (29 kDa), trypsinogen (24 kDa), trypsin inhibitor (20 kDa), α -lactalbumin (14.2 kDa), aprotinin (6.5 kDa); Lane 2, bacteriocin sample.

하였다. Klaenhammer[10]의 bacteriocin 분류방식에 따르면 열에 불안정하고 분자량이 비교적 큰 bacteriocin을 Class III로 구분하였는데 본 실험에서 분리한 bacteriocin은 이 group에 속하는 것으로 생각되었다.

요 약

본 연구에서는 토마토에서 bacteriocin 생산균주를 분리하여 균주동정 및 bacteriocin 정제를 행하였다. 분리균주는 Gram 염색, catalase test, 포자생성유무, API 20 STREP. kit 등을 통하여 *Enterococcus faecium*으로 잠정 동정하였다. 분리균주가 생산하는 항균성물질은 Gram 양성 세균인 *Listeria monocytogenes*, *Leuconostoc mesenteroides*, *Lactobacillus plantarum*, *Streptococcus agalactiae*, *Streptococcus pyrogenes*, Gram 음성 세균인 *Pseudomonas aeruginosa* 등에 대해서 항균력을 나타내었다. 단백질 분해 효소인 proteinase K에 의해서 그 활성이 소실되고, catalase에 의해서는 항균력이 유지되므로 단백질성 bacteriocin임을 확인할 수 있었다. Bacteriocin 정제를 위하여 ethanol침전, CM Sepharose CL-6B 양이온교환 chromatography, Sephacryl S-100 HR gel filtration의 순으로 정제하여 초기 배양액의 bacteriocin 활성 대비 35.8배의 정제도를 얻었다. 13% SDS-polyacrylamide gel 전기영동을 통하여 단일 band를 확인할 수 있었으며 분자량은 약 51 kDa 정도로 추정되었다. Crude bacteriocin의 열

안정성은 100℃에서 1시간 처리하였을 때의 잔존활성이 3.3%로 비교적 낮았으며, pH에 대해서는 pH2~7에서 비교적 안정하였다. Bacteriocin의 항균작용을 알아보기 위하여 피검균인 *Leu. mesenteroides*를 초기농도 1.0×10^9 CFU/ml로 접종한 배지에 bacteriocin을 첨가하여 배양하였을 때 4시간 이후에 완전히 사멸되므로 bacteriocidal 작용을 하는 것으로 추정되었다.

감사의 글

본 연구는 1997년도 과학기술부 생명공학기술개발사업 과제(97-N1-04-01-A-02) 1차년도 연구비에 의해 수행된 연구로서 이에 감사드립니다.

REFERENCES

1. Ahn, C. and M. E. Stites. 1990. Plasmid-associated bacteriocin production by a strain of *Carnobacterium piscicola* from meat. *Appl. Environ. Microbiol.* **56**: 2503-2510.
2. Aymerich, T., H. Holo, L. S. Havarstein, M. Hugas, M. Garriga, and I. F. Nes. 1996. Biochemical and genetic characterization of enterocin A from *Enterococcus faecium*, a new antilisterial bacteriocin in the pediocin family of bacteriocin. *Appl. Environ. Microbiol.* **62**: 1676-1682.
3. Broughton, J. D. 1990. Nisin and its uses as a food preser-

- vative. *Food Technology* **11**: 100–112.
4. Bhunla, A. K., M. C. Johnson, and B. Ray. 1998. Purification, characterization and antimicrobial spectrum of a bacteriocin produced by *Pediococcus acidilactici*. *J. Appl. Bacteriol.* **65**: 261–268.
 5. Barrena-Gonzalez, E., C. Huot, and H. Petitedemange. 1996. Mode of action of a bacteriocin (J46) produced by *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* J46. *J. Food Protec.* **59**: 955–962.
 6. Daba, H., S. Pandian, J. F. Gosselin, R. E. Simard, J. Huang, and C. Lacroix, 1991. Detection and activity of a bacteriocin produced by *Leuconostoc mesenteroides*. *Appl. Environ. Microbiol.* **57**: 3450–3455.
 7. Daniel, M. B. and S. J. Edelstein. 1991. *Protein Methods* (3rd ed.), pp. 46–160. Wiley-Liss, Inc.
 8. Franz, C. M., U. Schillinger, and W. H. Holzapfel. 1996. Production and characterization of enterocin 900, a bacteriocin produced by *Enterococcus faecium* BFE 900 from black olives. *Int. J. Food. Microbiol.* **29**: 255–270.
 9. Kato, T., T. Matsuda, Y. Yoneyama, H. Kato, and K. Nakamura. 1993. Isolation of *Enterococcus faecium* with antibacterial activity and characterization of its bacteriocin. *Biosci. Biotech. Biochem.* **57**: 551–556.
 10. Klaenhammer, T. R. 1993. Genetics of bacteriocins produced by lactic acid bacteria. *FEMS Microbiol. Rev.* **12**: 39–86.
 11. Laemmli, U. K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**: 680–685.
 12. Cintas, L. M., P. Casaus, L. S. Havarstein, P. E. Hernandez, and I. F. Nes. 1997. Biochemical and genetic characterization of enterocin P, a novel sec-dependent bacteriocin from *Enterococcus faecium* P13 with a broad antimicrobial spectrum. *Appl. Environ. Microbiol.* **62**: 4321–4330.
 13. Laukova, A. and S. Czikkova. 1998. Inhibition effect of enterocin CCM 4231 in the rumen fluid environment. *Lett. Appl. Microbiol.* **26**: 215–218.
 14. Maisnier, P. S., E. Forni, and J. Richard. 1996. Purification, partial characterization and mode of action of enterococin EFS2, an antilisterial bacteriocin produced by a strain of *Enterococcus faecalis* isolated from a cheese. *Int. J. Food Microbiol.* **30**: 255–270.
 15. Parente, E. and C. Hill. 1992. Inhibition of *Listeria* in a buffer, broth, and milk by enterocin 1146, a bacteriocin produced by *Enterococcus faecium*. *J. Food Protect.* **55**: 503–508.
 16. Rammelsberg, M., E. Muller, and F. Radler. 1990. Caseicin 80 purification and characterization of a new bacteriocin from *Lactobacillus casei*. *Arch. Microbiol.* **154**: 249–252.
 17. Scopes, R. K. 1994. *Protein Purification: Principles and Practice* (3rd ed.), pp. 146–236. Springer-Verlag New York, Inc.

(Received October 22, 1998)