

## Bacillus subtilis cx1이 생산하는 박테리오신의 특성

김수인 · 장지윤 · 김인철<sup>1</sup> · 장해춘\*  
조선대학교 식품영양학과, <sup>1</sup>목포대학교 식품공학과

**Characterization of Bacteriocin from *Bacillus subtilis* cx1.** Kim, Soo In, Ji Yoon Chang, In Cheol Kim<sup>1</sup>, and Hae Choon Chang\*. Department of Food and Nutrition, Chosun University, Kwangju 501-759, <sup>1</sup>Department of Food Engineering, Mokpo National University, Mokpo 534-729, Korea – A new bacteriocin produced by *Bacillus subtilis* cx1, was partially purified and characterized. The bacteriocin from *B. subtilis* cx1 was stable in the range of pH 2.5-9.5. *B. subtilis* cx1 retained its antimicrobial activity to long-term exposure at -20°C and -70°C. However, *B. subtilis* cx1 was inactivated completely within 15 min over 60°C and lost 50% of its antimicrobial activity within 15 min at 50°C. *B. subtilis* cx1 was inactivated by protease, trypsin, proteinase K and carboxypeptidase, which indicates its protein nature. Direct detection of the antimicrobial activity on Tricine-SDS-PAGE suggested an apparent molecular mass of about 9,500 dalton.

**Key words:** *Bacillus subtilis* cx1, bacteriocin

세균이 생산하는 항균물질인 박테리오신은 세포 외로 분비되는 peptides나 단백질로써 생산균주와 근연관계의 미생물을 죽이거나 생육을 저해하는 물질이라 알려지고 있다. 기존의 항생제가 2차 대사산물인데 반하여 박테리오신은 자신의 유전자로부터 직접 생합성(ribosomal translation)되며, 단백질이나 peptide분자로 이루어져 인체의 소화기관내의 단백분해효소에 의해 분해됨으로써 인체에 무독성이고 잔류성이 없다는 특징이 있다[21,23]. 위와 같은 특징 때문에 식품에서의 생물학적인 보존제 뿐만 아니라, 더 나아가서 식물병원균을 저해하는 식물체의 무독성 생체 농약이나 가축의 질병 예방 등에 이용되어질 수 있어서 그 잠재적인 이용가능성은 막대하다 할 수 있다[19].

세균으로부터의 항균물질에 대한 연구는 1925년 Gratia가 *E. coli* 유래의 colicin을 보고하면서부터 시작이 되었고 1947년 Mattick과 Hirsch에 의하여 유산균이 생산하는 nisin을 발견함으로써 가속화되어졌다[14,17]. 지금까지 알려진 세균으로부터의 항균물질의 종류로는 이외에도 subtilin, bacilysin, alveicins, cartovoricins, arizonacins, marcescins, pneumocins, aerocins, pyocins, fluocins, pesficins, megacins, monocins, cerecins, enterococcins, staphylococin 등이 있다[7, 17,23]. 산업적으로 가장 관심의 대상이 되고 있는 항균물질인 박테리오신은 주로 유산균 유래의 박테리오신들로서 [10] 그 대표적인 예가 nisin이며, 생화학적 유전학적 측면

에서의 많은 연구들이 수행되어져 왔다[6,17]. 1988년 4월 FDA에서 nisin이 GRAS(Generally Recognized As Safe)로 공식승인을 획득한 이후 현재 세계 50여 개국에서 nisin 사용이 허용되어 치즈, 발효유, 발효알코올음료, 통조림 산업 등에서 집중적으로 사용되고 있을 뿐 아니라 발효육, 사료산업에서의 응용도 시도되고 있다. 그러나 nisin은 영국 Aplin Barrete사에서 독점 생산되고 있으므로 고가로 공급된다는 점과 pH 안정성이 떨어진다는 점이 문제점으로 지적될 수 있다. 즉 nisin은 pH 2에서는 안정하나 pH 5에서는 40%의, pH 6.8에서는 90%의 역가 손실이 있어[6] 이 pH 범위를 벗어난 식품에서의 활용이 제한된다는 것이다. 식품산업에서 nisin과 같은 항균물질의 응용성을 넓히기 위해서는 많은 연구가 진행되고 있는 nisin이나 유산균 유래의 박테리오신에서 더 폭을 넓혀 기존의 박테리오신의 특성을 보강할 수 있는 연구 개발이 필요한 실정이며, 이는 박테리오신의 응용범주를 보다 넓게 확대시키는 결과를 가져올 것이다.

*Bacillus*속의 대부분은 비병원성으로, 산업적으로 특히 발효산업에서 유용하게 널리 이용되어온 균종이다[2]. 오늘날 상업적으로 생산되고 있는 *Bacillus* 발효산물로는 각종효소, 항생제, 아미노산, 살충제 등을 들 수 있다[9]. *Bacillus subtilis*가 생산하는 항균물질들(subtilin, botrycin, fengycin, iturin, rhizocitocins, surfactin)에 대해서는 이들이 거의 대부분 peptide antibiotics라고 알려져 있으며 이 물질들의 생화학·분자 생물학적 특성에 관한 많은 보고들이 있다[23].

본 연구팀은 *B. subtilis*, *Lactobacillus mesenteroides*, *Staphylococcus aureus*, 그리고 *S. faecalis* 등의 그람양성균과 그람음성균인 *Pseudomonas aeruginosa*에 대하여도 항균 활성을 나타내는 등 비교적 넓은 항균 spectrum을 나타

\*Corresponding author  
Tel. 82-62-230-7345, Fax. 82-62-234-4326  
E-mail: hcchang@mail.chosun.ac.kr

내는 *B. subtilis* cx1을 분리·동정하여 그 미생물학적 특성을 보고한 바 있다[25]. 전보에서 *B. subtilis* cx1이 생산하는 항균물질은 subtilin을 생성하는 *B. subtilis* ATCC 6633[4, 11]에 대해 강력한 항균활성을 나타내며, ATCC 6633과 cx1의 생균교차 배양에서 cx1이 자라는 부위에는 ATCC 6633이 생육하지 못하므로 subtilin은 cx1에 대해 항균활성을 나타내지 못함을 확인하여 보고하였다[25].

따라서 본 연구에서는 *B. subtilis* cx1이 생산하는 항균물질을 분리·정제하여 그 특성을 규명하였기에 이를 보고하고자 한다.

## 재료 및 방법

### 항균물질의 부분정제

본 실험에 사용된 항균물질은 다음의 방법에 의하여 부분 정제하여 조항균물질 상태로 준비하였다. 하룻밤 동안 전배양된 *B. subtilis* cx1을 250 mL LB 액체배지에 1% 접종하고, 다시 30°C에서 15 시간 동안 배양 한 후 4°C에서 24시간 보관하였다. 4°C에서 24시간 냉장 보관된 배양액을 원심분리(5,000×g, 25 min, 4°C)하여 균체를 제거하고, 회수한 상청액을 membrane filter(0.45 μm pore size, Millipore)로 제균하였다. 회수한 상청액은 -20°C에서 냉각된 acetone을 75%(v/v)첨가한 후, 원심분리(12,000×g, 15 min, 4°C)하여 분획침전시킨 후 농축물을 제조하였다. 진공펌프로 침전물에 잔존하는 소량의 acetone을 완전히 제거한 후, 침전물을 25 mL의 10 mM phosphate(pH 7.0) 완충용액에 녹여서 조항균물질로 사용하였다. 동시에 분리균주의 배양액을 원심분리(5,000×g, 25 min, 4°C)하고 얻어진 상청액을 methanol과 3차 증류수로 미리 soaking된 소수성 column인 C<sub>18</sub> Sep-pak(Waters Co., Massachusetts, USA)에 흡착시킨 후 3차 증류수로 수세하여 acetonitrile로 용출시켰다. Acetonitrile에 녹아있는 분획은 Speed Vac concentrator(RVT400-120, Savant Inc. NY, USA)를 이용하여 acetonitrile 용매를 감압하에 완전히 제거하고, 다시 10 mM phosphate 완충용액(pH 7.0)에 25 mL로 녹여서 사용하였다. 준비된 조항균 물질들은 50~100 μL씩 취하여 항균활성을 측정하였다.

### 항균활성의 검증

본 실험에서의 항균력 측정은 paper disk method[3]에 의해 시행하였다. *B. subtilis* cx1에 대해 강한 감수성을 나타내는 *B. subtilis* ATCC6633을[25] 하룻밤 동안 전배양하고 이를 새로운 배지에서 3시간 정도 배양하여 대수기 초기 상태의 세포로 준비하여 LB평판배지에 도말 한 후, 8 mm 직경의 paper disk를 올리고 항균력 측정을 위한 시료를 일정량 가하여 30°C에서 하룻밤 배양하여 지시균주에 대한 생육저지환을 관찰하였다.

### 항균활성의 온도영향

온도에 의한 영향을 알아보기 위하여 항균물질을 -70, -20, 20, 37, 40, 50, 60°C에서 처리하였다. 각 온도에서 15분, 30분, 그리고 30분 이후부터는 매 30분 또는 1시간 간격으로 12시간 동안 항균물질을 열처리한 후 잔존하는 항균력을 측정하였다.

### 항균활성의 pH영향

항균물질의 활성이 pH에 의하여 변화되는지를 알아보기 위하여 pH 2.5(50 mM glycine-HCl), pH 4.5 (50 mM sodium acetate), pH 6.0(50 mM sodium citrate), pH 9.5 (50 mM glycine-NaOH) 완충액을 1 N HCl과 1 N NaOH로 보정하여 만든 다음 부분정제된 항균물질 농축물을 각각의 완충액에 용해시켜 25°C에서 36시간 동안 4시간마다 그 상대활성을 측정하였다.

### 항균활성의 각종 효소 영향

Trypsin(Sigma EC 3.4.21.4 type I), lipase (Sigma EC 3.1.1.3 type VII), protease(Sigma, type I), lysozyme을 50 mM Tris-HCl buffer(pH 7.5), pepsin(Sigma EC 3.4.23.1 type I)은 10 mM citrate buffer(pH 6.0), proteinase K(Sigma EC 3.4.21.64)는 1 M Tris-HCl, α-amylase (Sigma EC 3.2.1.1 type VIII-A)는 0.1 M sodium phosphate buffer (pH 7.0), carboxypeptidase A(Sigma EC 3.4.17.1 type II)는 50 mM Tris-HCl(pH 8.0)에 20 mg/mL가 되도록 준비하였다. 조항균 물질에 준비된 각종효소를 최종 2 mg/mL 농도로 37°C에서 2시간 30분 동안 반응시켜 활성의 변화를 관찰하였다. Carboxypeptidase는 37°C에서 4시간 30분 동안 반응시켰다. 효소의 활성은 *B. subtilis*의 저해한 직경으로 나타내었다. Aminopeptidase I(Sigma A9934)은 0.2 M Tris-HCl (pH 8.0) buffer를 이용하여 효소를 1 unit/mL 농도가 되도록 녹인 다음 25°C에서 12 시간 동안 작용시킨 후 활성을 측정하였다. 대조구로는 모든 동일한 조건에서 효소액만 빼고 처리한 것으로 사용하였다.

### Tricine-SDS-PAGE를 통한 분자량 결정

Acetone 침전법에 의해 부분 정제한 시료로부터 항균활성을 나타내는 물질의 분자량을 Tricine-SDS PAGE (sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis)방법을 통하여 결정하였다[8]. Gel 조성은 discontinuous gel로 4% stacking gel과 16.5% separating gel을 사용하였다. 이 때 표준 분자량물질로는 polypeptide standards marker(Bio-Rad)와 low range standards marker Bio-Rad)를 사용하였다. 전기영동 후 항균물질을 나타내는 물질의 band 확인은 direct detection 방법[3]에 의하여 Tricine-SDS-PAGE상에서 직접 그 항균활성을 측정하여 확인하였다.

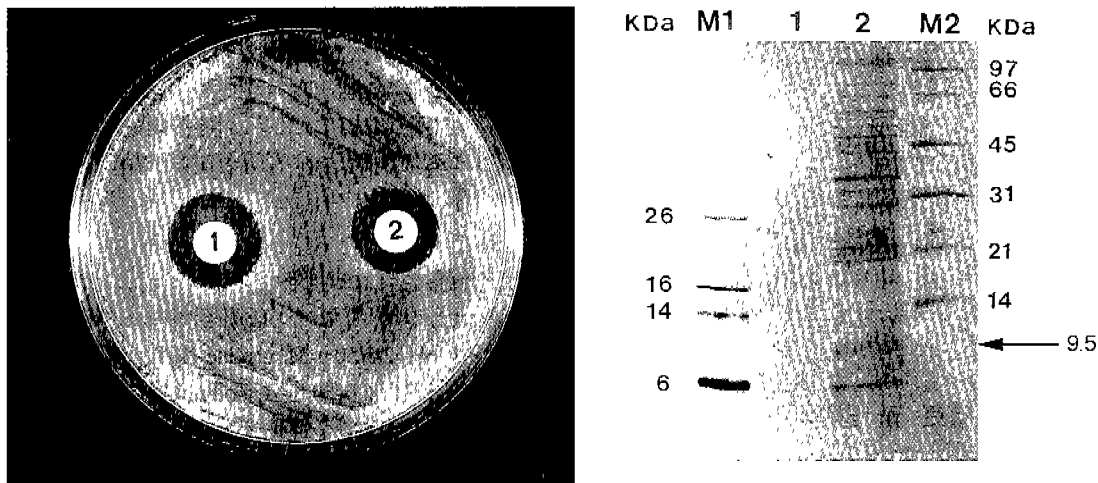


Fig. 1. Comparison of antimicrobial activity from *B. subtilis* cx1 by two different preparation methods.

Left: Paper disk method showing antimicrobial activity from *B. subtilis* cx1 against indicator *B. subtilis* ATCC 6633. Each disk contained 100  $\mu$ l of crude antimicrobial agent prepared by two different methods(1, sep-pak column adsorption; 2, acetone precipitation). Right: Tricine-SDS-PAGE gel showing proteins present in the antimicrobial samples; sep-pak column adsorption (lane 1) and acetone precipitation (lane 2). Lane M1 contained polypeptide standard marker (Bio-Rad) and lane M2 contained low range standard marker (Bio-Rad). The arrow indicates the location of antimicrobial agent.

### 결과 및 고찰

#### 분리정제 방법에 따른 항균 활성

Acetone과 acetonitrile을 이용하여 항균물질의 부분 정제 시 acetone을 이용한 분획침전물과 소수성 Sep-pak column에 흡착하였다가 acetonitrile로 용출하여 얻은 항균물질이 지시균주에 대한 각각의 항균활성을 Fig. 1에 비교하여 나타내었다. 동일한 배양액에서 같은 배율(100배)로 농축시켜 얻어진 항균물질의 부분 정제 시, 사용된 두 가지 방법 중 조항균물질을 C<sub>18</sub> Sep-pak에 흡착하였다가 acetonitrile로 용출하여 얻은 항균물질이 acetone 분획침전을 이용하여 얻은 항균물질보다 더 강한 항균활성을 나타내었을 뿐 아니라, 조항균물질의 정제도 더 높은 것을 알 수 있었다(Fig. 1). 본 결과에 따르면 *B. subtilis* cx1으로부터의 항균물질은 C<sub>18</sub> Sep-pak column에 흡착시킨 후 acetonitrile로 용출시켜 부분정제 하는 방법이 기존에 보편적으로 사용되는 acetone 분획침전을 이용하는 경우보다 더 효과적인 항균물질 회수 방법임을 알 수 있었다. 이로부터 본 항균물질을 이루는데는 소수성 아미노산이 상당부분 포함되어 있음을 짐작 할 수 있었다. 이후의 항균물질 제반 특성에 관한 실험은 Sep-pak column을 통한 부분정제 방법에 따라 준비된 조항균물질로 시행하였다.

#### 항균물질의 열처리 영향

부분 정제한 항균물질을 열처리하였을 때 나타나는 항균 활성변화를 Fig. 2에 나타내었다. 본 항균물질은 60°C 이상에서는 15분만에 그 활성이 소멸되었다. 50°C 처리에서는

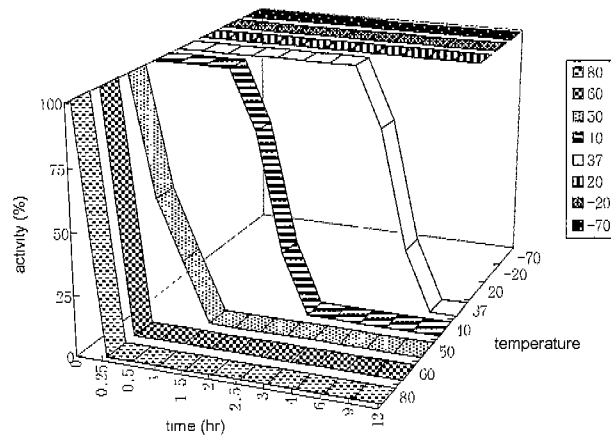
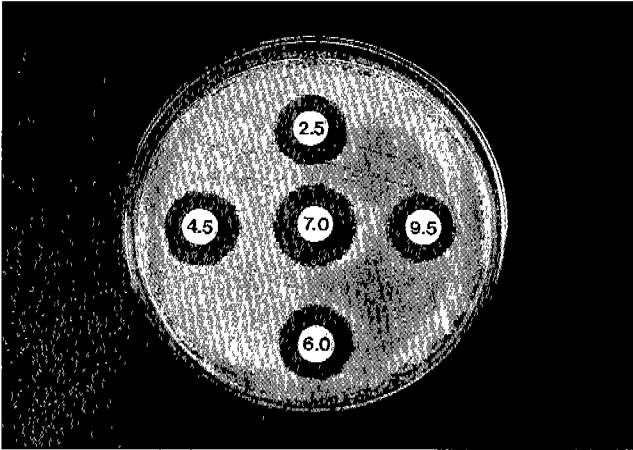


Fig. 2. Effect of heat treatment on antimicrobial activity of *B. subtilis* cx1.

The sample was treated at different temperatures (-70°C~60°C) for 0.25-12hrs. Residual antimicrobial activity was measured with *B. subtilis* ATCC 6633 as a sensitive strain.

반응 15분 이후부터 급격히 항균활성이 감소하기 시작하여 반응 1시간만에 활성이 완전히 상실되었다. 40°C에서는 반응 1시간까지는 항균활성에 별 차이가 없었으나 1시간 이후부터 급격히 감소하기 시작하여 반응 2시간 30분에는 항균 활성이 완전히 상실되었다. 37 °C 처리 시에는 반응 3시간 이후부터 항균활성이 감소하기 시작하여 반응 9시간만에 활성이 완전히 상실되었다. 이에 반해 20°C이하의 저온에는 안정하여 20°C, -20°C, 그리고 -70°C에서는 반응 후 12시간까지 항균력이 그대로 유지되었으며 -20°C~70°C에서도



**Fig. 3. Effect of pH on antimicrobial activity of BSCX1.**  
The sample was treated under pH 2.5~9.5 for 36hrs at 25°C. Residual antimicrobial activity was measured with *B. subtilis* ATCC 6633 as a sensitive strain.

수개월 동안에도 안정하였다.

미생물로부터의 항균물질은 대부분 저분자의 단백질자로써 일반적으로 열에 안정한 것으로 알려지고 있다. 그 예로써 *Lactobacillus acidophilus*가 생산하는 lactacin B[20]은 120°C에서 60분 동안 열처리하여도 그 활성에는 변화가 없었으며, *Lactococcus lactis* subsp. *diacetylactis*의 bacteriocin S50[12]과 *Lactobacillus plantatum* LPC010의 plantaricin S[18]도 100°C에서 각각 60분과 30분 열처리 시 안정하여 내열성이 크게 나타났다.

반면, 열에 안정하지 못한 항균물질에 대한 보고서로는 *Lactobacillus helveticus* 균주로부터 helveticin V-1829는 60°C에서 불활성 되기 시작하여 100°C에서는 30분 안에 활성을 잃어 열에 민감한 것으로 보고되고 있다[22]. *L. acidophilus* AC1으로부터의 항균물질은 분자량 5,200의 저분자의 단백질로서 실온이나 냉장온도(4~8°C)에서는 안정하나 50°C처리에서는 20분 안에 항균활성의 대부분이 상실된다고 보고되었다[15]. 본 실험에서 *B. subtilis* cx1으로부터의 항균물질은 50°C에서 1시간 안에 항균활성이 완전히 상실되어 열 안정성이 상당히 낮은 것으로 나타났다.

#### pH영향

항균물질의 활성에 대한 pH영향을 알아보기 위해 부분정제된 항균물질 농축액을 pH 2.5에서 pH 9.5의 범위에서 25°C에서 36시간 동안 방치하면서 상대활성을 측정하였다. 그 결과 Fig. 3과 같이 pH 2.5~pH 9.5까지 36시간동안 활성의 변화가 없었으므로 넓은 pH 구간에서 매우 안정하였다. 기존의 보고에 의하면 nisin을 비롯한 대부분의 미생물 유래의 항균물질이 일정 pH 범위내에서만 안정한 것으로 알려지고 있는데, pH에 의하여 항균물질이 활성을 상실하는 이유는 pH가 높을 경우 hydroxides ions, deprotonated

**Table 1. Effect of various enzymes on the antimicrobial activity of *B. subtilis* cx1**

Treatment	Activity
proteinase K	-
protease I	-
pepsin	+++
trypsin	-
$\alpha$ -amylase	+++
lipase	+++
lysozyme	+++
aminopeptidase I	+++
carboxypeptidase <sup>+</sup>	-

Degree of clarity of clear zone by growth inhibition 1.61.7 cm : +++

A little turbidity zone of inhibition diameter 1.6~1.7 cm : ++

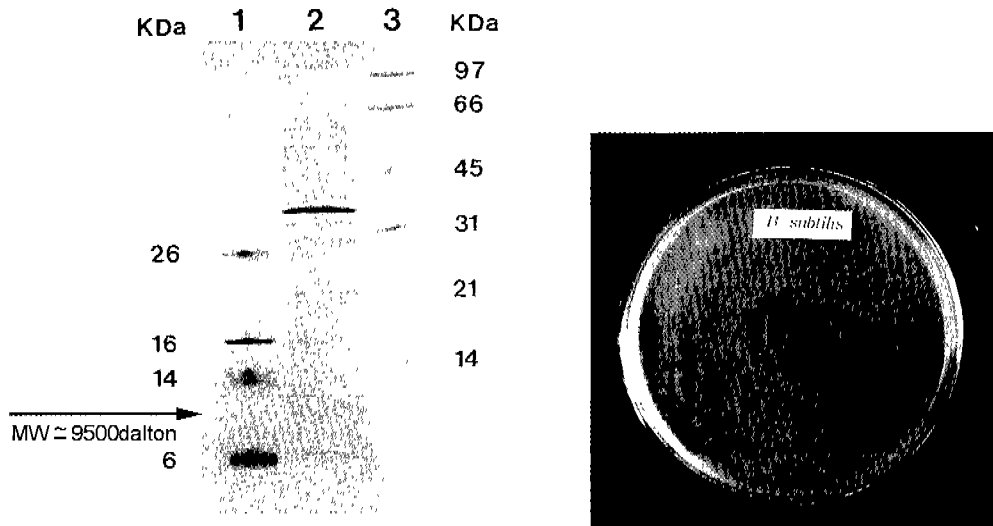
A lot of turbidity zone of inhibition diameter 1.6~1.7 cm : +

No clear zone : -

amines, deprotonated hydroxyl group과 같은 nucleo-ophile은 dehydro residue와 반응하여 분자간 혹은 분자 내 cross-linkage를 형성하여 화학적 변형을 일으킨다고 보고하였다 [13]. Dehydro잔기가 존재하는 nisin의 경우에도 이와 같은 반응이 일어나 여러 종류의 반응물이 생성되면서 nisin의 항균력은 급격히 손실되었다고 보고되었으며 nisin은 pH 2.0에서의 용해성이 57 mg/mL인 반면 pH 8~12에서는 0.25 mg/mL의 낮은 용해성을 보여 알칼리 영역에서의 불안정성이 보고되었고[13], *L. plantarum* C-11이 생산하는 plantaricin A는 pH 4~6.5사이의 좁은 범위에서만 활성을 나타내었다[5]. 이에 반해 소수에 불과하나 넓은 pH범위내에서 비교적 안정한 항균물질에 관한 보고들도 있는데, *Carnobacterium piscicola*[1]가 생산하는 항균물질은 pH 2에서 11에 걸쳐 항균력을 손실하지 않았고, *B. cereus*[16]가 생산하는 항균물질도 pH3~12까지에서 항균활성을 갖고 있는 것으로 보고되고 있다. 본 항균물질도 거의 전 pH영역에서(pH2.5~9.5) 30시간 이상동안에도 그 활성을 잃지 않아 후자의 보고들[16]과 유사한 pH 안정성을 보였다. 항균물질들간의 이러한 안정성 차이는 구조적인 차이나 cofactor 등에 의한 작용으로 사료되며 보다 정확한 이유는 이 두 항균물질들의 구조적 기능적 특이성의 비교 연구에 의하여 규명되어야 할 것이다.

#### 항균물질의 각종효소 영향

부분 정제한 항균물질에 각 효소를 2 mg/mL이 되도록 첨가하여 37°C에서 2시간 30분 동안 반응시킨 후 항균물질의 잔존활성을 측정된 결과는 Table 1와 같다. Protease와 trypsin 같은 peptide결합을 절단하는 endo-peptidase에 가수분해되고 carboxypeptidase와 같은 exopeptidase에도 가수분해되었으며 proteinase K와 같은 단백질 가수분해 효소에 의해서도 활성을 잃는 것으로 보아 이 물질은 lysine 혹은



**Fig. 4. Determination of molecular weight of BSCX1 by Tricine-SDS-PAGE.** Several bands were cut and were pretreated according to direct detection method (2), and were applied onto LB plate with spready of *B. subtilis* ATCC 6633. Only one band (at 9.5 KDa) showed antimicrobial activity against *B. subtilis* ATCC 6633; Other bands did not show antimicrobial activity.

arginine을 peptide bond의 carboxyl기 측에 지나는 아미노산을 함유한 peptide일 가능성을 나타내었다. 한편  $\alpha$ -amylase나 lipase를 처리한 경우에는 활성이 그대로 유지되어 항균활성을 나타내는 물질에는 당이나 지질 결합이 크게 영향을 미치지 않는 것으로 추정할 수 있었다.

**Tricine-SDS-PAGE를 통한 분자량 측정**

부분 정제된 시료는 16.5% Tricine-SDS-PAGE상에서 몇 개의 주된 band들을 나타내었고 이 중 어느 band가 항균활성을 나타내는지의 확인은 direct detection 방법[3]에 따라 각 band를 잘라 *B. subtilis* ATCC6633을 도말한 배지 위에서 직접 그 항균활성을 측정하였다.

이 band들 중 분자량 9,500을 나타내는 band에서만 항균활성이 뚜렷이 나타나(Fig. 4) *B. subtilis* cx1으로부터의 항균물질의 분자량은 약 9,500정도임을 확인하였다.

**요 약**

*B. subtilis* cx1이 생산하는 박테리오신(BSCX1)을 부분 정제하고 특성을 규명하였다. BSCX1은 pH 안정성 실험에서 pH 2.5~9.5 구간에서도 안정되게 항균활성을 유지하였다. 각종 효소에 대한 안정성 실험에서는 protease, trypsin, proteinase K, 그리고 carboxypeptidase로 처리하였을 때는 완전히 항균활성이 사라졌고  $\alpha$ -amylase, lipase, aminopeptidase는 항균활성에 영향을 미치지 못하였다. 이상의 결과로 본 항균물질이 단백질 계열의 물질이며 당이나 지질 결합은 항균활성에 큰 영향을 미치지 않는 것으로 추정되었다.

그러나 열에는 불안정하여 60°C이상에서는 15분 안에 완전히 그 항균활성을 상실하였으며 50°C에서는 15분만에 역가의 50%가 실패 되었다. 이에 반하여 저온에서는 무척 안정하여 -20°C와 -70°C에서 수개월간 보관하여도 여전히 항균활성을 그대로 유지하였다.

Tricine-SDS-PAGE를 통하여 BSCX1의 분자량은 약 9,500 dalton으로 확인되었다. BSCX1은 pH2.5에서 9.5에 이르는 넓은 pH 영역에서 그 활성을 유지하므로, 기존에 개발된 nisin이나 유산균 유래의 항균물질이 pH 안정성이 떨어진다는 단점을 보완할 수 있는 생물학적 식품보존제로서의 개발 가능성을 높이 시사하였다.

**감사의 글**

본 연구는 1998년도 조선대학교 교내 학술 연구 조성비에 의하여 수행되었으므로 이에 감사 드립니다

**REFERENCES**

1. Ahn, C. and M. E. Stiles. 1990. Plasmid-associated bacteriocin production by a strain of *Carnobacterium piscicola* from meat. *Appl. Environ. Microbiol.* **56**: 2503-2510.
2. Arbig, N. V., B. A. Bulthuis, J. Schultz, and D. Crabb. 1993. Fermentation of *Bacillus*. pp 871-895. In Sonenshein, A. L., Hoch, J. A., and Losick, R.(ed). *Bacillus subtilis* and other gram-positive bacteria: biochemistry, physiology and molecular genetics. *American Society for Microbiology*.
3. Arun, K. B., M. C. Johnson, and B. Ray. 1987. Direct detec-

- tion of an antimicrobial peptide of *Pediococcus acidilactici* in sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis. *J. Ind. Microbiol.* **2**: 319–322.
4. Banerjee, S. and J. N. Hansen. 1988. Structure and expression of a gene encoding the precursor of subtilin, a small protein antibiotic. *J. Biol. Chem.* **5263**: 9508–9514.
  5. Daeschel, M. A. and M. C. Mckenney. 1990. Bacteriocidal activity of *Lactobacillus plantatum* C-11. *Food Microbiol.* **7**: 91–98.
  6. Delves-Broughton, J. 1990. Nisin and its uses as a food preservative. *Food Technol.* **44**: 100–117.
  7. Gerhardt, P., R. G. E. Murray, R. N. Costilow, E. W. Nester, W. A. Wood, N. R. Keieg, and G. B. Phillips. 1981. Manual of Methods for General Bacteriology. American Society for Microbiology(ed).
  8. Hermann, S. and G. V. Jagow. 1987. Tricine-sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis for the separation of proteins in the range from 1 to 100KDa. *Anal. Biochem.* **166**: 368–379.
  9. Katz, E. and A. L. Demain. 1977. The peptide antibiotics of *Bacillus*: Chemistry, biogenesis, and possible function. *Bact. Rev.* **41**: 449–474.
  10. Klaenhammer, T. R. 1988. Bacteriocins of lactic acid bacteria. *Biochimie* **70**: 337–349.
  11. Klein, C. and K. D. Entian. 1994. Gene involved in self protection against the lantibiotic subtilin produced by *Bacillus subtilis* ATCC 6633. *Appl. Environ. Microbiol.* **60**: 2793–2801.
  12. Kojic, M., J. Svircevic, and A. Banina. 1991. Bacteriocin producing strain of *Lactococcus lactis* subs. *diacitilactis* S 50. *Appl. Environ. Microbiol.* **57**: 1853–1837.
  13. Liu, W. and J. N. Hansen. 1990. Some chemical and physical properties of nisin, a small-protein antibiotic produced by *Lactococcus lactis*. *Appl. Environ. Microbiol.* **56**: 2551–2558.
  14. Mattick, A. T. R. and A. Hirsch. 1947. Further observation on an inhibitory substance(nisin) from *Lactic streptococci*. *Lancet* **2**: 5–12.
  15. Mehta, A. M., K. A. Patel, and D. J. Dave. 1983. Purification and properties of the inhibitory protein isolated from *Lactobacillus acidophilus* AC1. *Microbiol.* **38**: 73–81.
  16. Naclerio, G. and E. Ricca. 1993. Antimicrobial activity of a newly identified bacteriocin of *Bacillus cereus*. *Appl. Environ. Microbiol.* **59**: 4313–4316.
  17. Ralph, W. J., J. R. Tagg, and K. Bibek. 1995. Bacteriocins of gram-positive bacteria. *Microbiol. Rev.* **59**: 171–200.
  18. Ruiz-Barba, J. L., D. P. Cathcart, P. L. Wamer, and R. Jimenez-Daiz. 1994. Use of *Lactobacillus plantarum* LPCO 10, a bacteriocin producer, as a starter culture in spanish-style green olive fermentations. *Appl. Environ. Micro.* **60**: 2059–2064.
  19. Schillinge, R. U., R. Geisen, and W. H. Holzapfel. 1996. Potential of antagonistic microorganisms and bacteriocins for the biological preservation of foods. *Trends in Food Sci Technol.* **7**: 158–164.
  20. Susan, F. B. and T. R. Klaenhamer. 1983. Detection and activity of lactacin B, a bacteriocin produced by *Lactobacillus acidophilus*. *Appl. Environ.* **45**: 1808–1815.
  21. Tagg, G. R., A. S. Dajani, and L. W. Wannamarker. 1976. Bacteriocin of Gram-positive bacteria. *Bacteriol. Rev.* **40**: 772–756.
  22. Vaughan, E. E., C. Daly, and G. F. Fitzgerald. 1992. Identification and characterization of helveticin V-1829, a bacteriocin produced by *Lactobacillus helveticus* 1829 *J. Appl. Bacteriol.* **73**: 299–308.
  23. Zuber, P., M. M. Nakano, and M. A. Marahiel. 1993. Peptide antibiotics. pp. 897-916. In Sonenshein, A. L., Hoch, J. A. and Losick, R.(ed). *Bacillus subtilis* and other gram-positive bacteria: biochemistry, physiology and molecular genetics. *American Society for Microbiology*.
  24. Kim, K. C., C. S. Yuk, and D. H. Do. 1990. Molecular Cloning of Bacteriocin Gene and Biological control of Plant Pathogen. *Kor. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.* **18**: 98–102
  25. Kim, S. I., I. C. Kim, and H. C. Chang, 1999. Isolation and Identification of Antimicrobial Agent Producing Microorganisms and Sensitivie Strain from Soil. *J. Korean Soc. Food Sci, Nutr.* **28**: 526–333.

(Received Jan. 2, 2001/Accepted Mar. 7, 2001)