

# 식중독균 생육에 대한 *Enterococcus faecalis* MJ-231의 박테리오신과 소르빈산칼륨의 혼합처리 효과

임성미

동명대학교 식품공학과

## Synergistic Effect of Combined Treatment of Bacteriocin Produced by *Enterococcus faecalis* MJ-231 and Potassium Sorbate on Growth of Food-Borne Pathogenic Bacteria

Sung-Mee Lim

Department of Food Science and Technology, Tongmyong University, Busan 608-735, Republic of Korea

(Received February 22, 2010/Accepted March 31, 2010)

The alone and combined effects of bacteriocin produced from *Enterococcus faecalis* MJ-213 and potassium sorbate against the food-borne pathogenic bacteria were studied. Bacteriocin minimal inhibitory concentration (MIC) values for *Staphylococcus aureus* ATCC 6538 and *Salmonella enteritidis* ATCC 13076 were 50 and 100 µg/ml, respectively. Bacteriocin (100 µg/ml) alone was active against *S. aureus* and *S. enteritidis*, but it was lower in antimicrobial effectiveness than the combination of bacteriocin (100 µg/ml) with potassium sorbate (100 µg/ml), which reduced initial counts (6 log cycle) of *S. aureus* and *S. enteritidis* by 1 and 3 log cycle, respectively. The bactericidal activity of bacteriocin of *E. faecalis* MJ-213 heated at 100°C for 30 min or 121°C for 15 min was markedly decreased as compared with the control. Moreover, the activity of bacteriocin was completely abolished by pepsin or protease II, but not affected by  $\alpha$ -amylase or lipase. The activity of bacteriocin adjusted to pH 6.0-8.0 showed almost the same inhibition ratio compared with the bacteriocin unadjusted pH, and though the inhibition ratio against pathogenic bacteria was reduced than the control, the bacteriocin was stable at pH 4.0 or 10.0, relatively. Furthermore, the combined treatment of bacteriocin and potassium sorbate than the alone treatment of bacteriocin significantly decreased ( $p<0.05$ ) the viable cell counts of *S. aureus* or *S. enteritidis* inoculated on grind beef during storage at 4°C.

**Keywords:** antibacterial activity, bacteriocin, *E. faecalis*, food-borne microorganism, potassium sorbate

오염된 식품의 섭취에 의해 연간 미국인 4명 당 1명은 식중독에 걸린 경험이 있으며, 해마다 미국 내에서는 식중독 환자 발생으로 인한 막대한 생산성 손실과 의료비용이 최대 350억 달러에 달하는 것으로 보고되고 있다(28, 29). 경제적 수준의 향상에도 불구하고 우리나라 뿐만 아니라 전 세계적으로 해마다 식중독 사고건수가 꾸준히 증가하는 이유로는 해외여행과 국제무역이 활발해지면서 오염된 식품의 이동 범위와 섭취 대상이 확대되고 있으며, 식습관의 변화로 가열처리 하지 않는 육회나 생선회를 즐겨먹는 사람이 많아지고, 외식산업의 발달과 단체급식의 기회가 증가됨에 따라 환자수가 폭발적으로 발생하는 추세이다. 식품 제조 공정 기술 발달로 인해 다양한 식

품에서 여러 경로를 통하여 발생되고 식중독의 원인균의 종류도 예전보다 훨씬 다양해지고 있다(15, 18).

미생물학적 위해요인들의 혼입을 방지하고 효과적으로 제어하여 양질의 식품 제조와 위생적인 안전성 확보를 위해서 보다 과학적이고 체계적인 위생관리시스템인 HACCP (Hazard Analysis Critical Control Point)을 적용한 제품생산의 필요성이 대두되고 있으며 이러한 기술은 현재 유가공품, 수산가공품 및 육류가공품 제조에 많이 활용되고 있다(30, 41).

한편 식품의 품질에 악영향을 주는 부패균이나 병원성균의 저해를 위해 한가지의 방법만을 사용하는 것이 아니라 여러 가지 장애요인을 혼용 처리하여 미생물을 사멸시키거나 생육을 억제시키는 일명 장애물 기술(hurdle technology)법도 시도되고 있다. 적용되고 있는 장애물로서는 냉장이나 냉동저장, 가

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

열처리, 수분활성도, 산화환원전위 및 pH 조절, CA저장, 방사선조사, 천연 항균물질이나 화학합성품 사용 등의 방법을 조합하여 위해요인을 제어하고 있다. 이러한 복합적인 장애요인의 상호작용으로 인해 항균작용의 상승효과를 얻을 수 있으며 처리 과정 중 식품성분 변화가 적어 관능적으로나 영양학적으로 우수한 제품 생산이 가능하고, 특히 독성으로 인해 소비자들이 기피하고 있는 화학보존료의 사용량을 줄일 수 있으므로 식품의 안전성을 크게 향상시킬 수 있다(5, 19, 22).

화학보존료에 의해 야기되는 급만성 독성, 발암, 돌연변이 등의 위해를 최소화하기 위하여 천연항균성 물질 탐색에 관한 연구가 활발히 진행되고 있으며, 화학보존료와 천연물질과의 혼합처리에 의한 상승효과도 알려지고 있다(6, 8, 9, 16, 42). Molinos 등(31)의 연구에 따르면, *Listeria monocytogenes*에 대한 항균효과는 *Enterococcus faecalis* A-48-32가 생산한 박테리오신인 enterocin AS-48과 화학보존료를 혼합 처리한 경우 상승효과가 나타났다고 보고하였다(13).

본 연구에서는 전보(24)에서 보고된 *E. faecalis* MJ-213이 생산하는 박테리오신의 단독처리 혹은 화학보존료(소르빈산칼륨)와의 혼합처리 시 식중독균(*Salmonella enteritidis*, *Staphylococcus aureus* 및 *Vibrio parahaemolyticus*)에 대한 항균력의 상승효과를 조사하여 안전한 식품보존료로서의 사용 가능성을 알아보고자 한다.

## 재료 및 방법

### 실험 균주의 배양조건

전보(24)에 보고한 것과 같이 박테리오신을 생산하는 *E. faecalis* MJ-213 균주는 재래식 메주에서 분리되었고 Lactobacilli MRS (Difco, USA) 배지에서 37°C, 24시간 3회 계대배양한 후 사용하였다. 항균시험에 사용된 *S. enteritidis* ATCC 13076은 Nutrient Agar (NA, Difco), *S. aureus* ATCC 6538은 Tryptic Soy Agar (TSA, Difco), *V. parahaemolyticus* KCTC 2471은 Marine Agar (MA, Difco) 배지에서 각각 계대배양하여 사용하였다.

### 항균물질 용액 조제

박테리오신 용액은 *E. faecalis* MJ-213을 MRS 배지에서 37°C, 18시간 동안 본 배양한 배양액으로부터 얻어진 상등액에 50% 황산암모늄을 첨가한 후 투석 및 여과 제균하여 조제하였다(24). 한편 소르빈산칼륨(Sigma, USA)은 증류수에 녹여 조제한 후 여과 제균하여 냉장보관 하면서 실험에 사용하였다. *E. faecalis* MJ-213가 생산한 항균물질 중 유기산이나 과산화수소에 의한 항균활성을 배제하기 위해 배양액으로부터 얻어진 상등액은 6 N NaOH를 사용하여 pH 7.0으로 조정하였고 10 mM potassium phosphate (pH 7.0)에 용해시킨 catalase (1 mg/ml)와 37°C에서 1시간 반응시킨 후 실험에 사용하였다.

### 박테리오신의 최소증식억제농도(Minimum Inhibition Con-

### centration, MIC) 측정

박테리오신의 단독처리와 소르빈산칼륨의 혼합처리에 의한 항균활성은 microtitre plate assay (11)에 따라 측정하였다. 즉 48 well (BD Falcon, USA)에 각각의 배지에서 37°C, 24시간 배양한 *S. aureus* ATCC 6538, *S. enteritidis* ATCC 13076, *V. parahaemolyticus* KCTC 2471 균주 배양액(약 10<sup>6</sup> CFU/ml)과 박테리오신 용액을 농도별로 첨가하여 37°C에서 12시간 배양한 후 enzyme linked immunosorbent assay (ELISA) reader (Spectrocount, Packard Instruments, USA)로 660 nm에서 흡광도를 측정하였다. 이때 대조구(박테리오신 무첨가) 흡광도의 90% 이상인 경우 +++, 70-89%인 경우 ++, 50-69%인 경우 +로 나타내었고, 49% 이하인 경우는 -으로 표시하였다.

### 박테리오신과 소르빈산칼륨의 혼합처리에 의한 항균효과

*S. aureus* ATCC 6538은 Tryptic Soy Broth (TSB, Difco) 배지 내에서 37°C, 24시간 배양하였고, *S. enteritidis* ATCC 13076은 Nutrient Broth (NB, Difco) 배지에서 37°C, 24시간 배양하여 얻은 배양액을 7,000×g, 20분간 원심분리하여 세포만을 회수하여 인산완충용액으로 3회 세척하였다. 식중독균의 세포수를 약 10<sup>6</sup> CFU/ml에 맞춰 각각의 배지에 접종한 뒤 박테리오신 100 µg/ml 단독첨가, 박테리오신 100 µg/ml와 소르빈산칼륨 100 µg/ml 혼합첨가 및 박테리오신 50 µg/ml와 소르빈산칼륨 100 µg/ml 혼합첨가하여 37°C에서 24시간 배양하는 동안 3시간 간격으로 배양액을 채취하여 *S. enteritidis* ATCC 13076은 Salmonella-Shigella (SS, Difco) agar 상에서 배양하였고, *S. aureus* ATCC 6538은 *Staphylococcus* 110 medium (Difco)을 사용하여 37°C에서 24시간 배양한 후 집락수를 측정하였다. 시간별 식중독 균수는 모두 3회 반복하여 측정된 균수의 평균값을 나타내었다.

### 물리화학적 처리한 박테리오신의 항균활성

TSB 배지에서 배양한 *S. aureus* ATCC 6538와 NB 배지에서 배양한 *S. enteritidis* ATCC 13076의 균수를 약 10<sup>6</sup> CFU/ml로 맞춘 후 가열 처리하지 않은 박테리오신 100 µg/ml 만을 처리한 실험구와 100°C에서 30분 혹은 121°C에서 15분 가열 처리한 박테리오신 100 µg/ml 단독 처리구 및 각 온도 내에서 가열처리한 박테리오신 100 µg/ml와 소르빈산칼륨 100 µg/ml의 혼합 첨가 후 24시간 배양하여 감소된 균수를 비교하였다.

6 N HCl이나 NaOH를 사용하여 pH 2.0-12.0으로 각각 조정된 후 37°C에서 1시간 방치한 다음 pH 7.0으로 재조정된 박테리오신(100 µg/ml)을 *S. aureus* ATCC 6538과 *S. enteritidis* ATCC 13076의 세포에 처리한 후 잔존하는 항균활성을 조사하였다. 또한 각각의 buffer에 녹여 최종 농도 1 mg/ml로 맞춘 α-amylase (50 mM sodium acetate, pH 6.0), protease II (50 mM Tris-HCl, pH 7.5), pepsin (10 mM citrate, pH 2.0) 및 lipase (50 mM Tris-HCl, pH 7.5)를 박테리오신 용액과 37°C에서 1시간 반응시킨 다음 80°C에서 10분간 가열하여 효소를 불활성화 시켰다. 각각의 최적배지에서 배양한 식중독균(약 10<sup>6</sup> CFU/ml)에 효소 처리한 박테리오신 단독 처리구와 이들을

소르빈산칼륨과 혼합 처리하여 37°C에서 24시간 배양한 다음 대조구와 항균활성을 비교하였다. 물리화학적 처리 전후의 박테리오신에 의한 저해율은 다음 식을 이용하여 계산하였다.

$$\text{저해율 (\%)} = \frac{\text{박테리오신 처리 (전 균수 - 후 균수)}}{\text{박테리오신 처리 전 균수}} \times 100$$

### 우유에 첨가한 박테리오신과 소르빈산칼륨의 혼합처리 효과

부산시내에 소재하고 있는 식육류 판매점에서 구입한 미국산 같은 쇠고기를 구입하여 각 배지에서 배양한 식중독균을 각각 인위적으로 접종하고(약  $10^6$  CFU/g) 여기에 박테리오신과 소르빈산칼륨을 일정한 농도로 첨가한 후 밀봉하여 4°C에서 6일간 저장하면서 3일 간격으로 식중독균의 균수 변화를 조사하였다. 저장한 시료 30 g에 인산완충용액 270 ml를 첨가하여 5분간 마쇄한 다음 1 ml 시료용액을 채취하여 각각의 최적 배지와 혼합한 후 37°C에서 24시간 배양하여 균수의 변화를 조사하였다.

### 통계처리

실험을 통해 얻어진 측정값의 통계처리는 SPSS (version 12.0) 프로그램의 일원배치 분산분석법을 이용하였고, 평균간 유의성 검정은 Duncan's multiple range test를 사용하여  $p < 0.05$  수준에서 물리화학적 처리전후의 박테리오신 단독 처리구와 소르빈산칼륨과의 혼합 처리간의 유의적 차이를 분석하였다.

## 결과 및 고찰

### 식중독균에 대한 *E. faecalis* MJ-213 박테리오신의 MIC 측정

Enterococci 균주는 우유, 치즈, 야채, 청국장, 육류 및 그 가공품 등 다양한 식품 내에 분포하는 것으로 알려져 있으며, enterocin이라고 하는 박테리오신을 생산하여 병원성균에 대한 항균효과가 있어 생균제로 널리 이용되고 있다(11, 39, 43). 본 실험에서 사용된 *E. faecalis* MJ-213은 우리나라 전통 발효식품인 메주에서 분리되었고 이미 *L. monocytogenes*에 대한 증식억제 효과가 있는 것으로 보고되었다(24). 한편, 우리나라 식중독 발생의 주요 원인균인 *S. aureus*, *S. enteritidis* 및 *V. parahaemolyticus*에 대한 *E. faecalis* MJ-213이 생산하는 박테리오신 용액의 MIC를 측정한 결과는 Table 1과 같다.

*S. aureus* ATCC 6538에 대한 *E. faecalis* MJ-213이 생산한 박테리오신의 MIC는 50 µg/ml이었고, *S. enteritidis* ATCC 13076에 대한 MIC는 100 µg/ml이었으나, 박테리오신 농도

400 µg/ml에 의해서도 *V. parahaemolyticus* KCTC 2471의 증식억제 효과는 나타나지 않았다.

Park 등(35)의 보고에 따르면, *E. faecium* JCM 5804의 박테리오신은 *Lactobacillus* sp., *Enterococcus* sp., *Clostridium* sp. 및 *L. monocytogenes*의 증식억제 효과는 있었으나, 그람음성균이나 *S. aureus*의 저해효과는 나타나지 않았다고 하여 본 결과와 다소 차이가 있었다. 그러나 사람의 분변으로부터 분리된 *Enterococcus* sp. T7의 박테리오신은 그람음성균의 저해효과는 없었으나, *Staphylococcus* sp.의 항균효과는 나타난 것으로 보고하였다(32). 또한 *E. faecalis* A-48-32이 생산하는 enterocin AS-48은 *S. aureus*, *Bacillus cereus* 및 *B. coagulans* 등의 병원성균에 대하여 광범위한 살균효과를 나타내는 것으로 잘 알려져 있다(12, 26, 33). 한편 *S. enteritidis*나 *Escherichia coli*와 같은 그람음성균에 대한 항균력을 나타내는 일부의 *Enterococcus* sp.는 *entA*, *entB*, *entL50AB* 혹은 *cytL* 유전자를 가지는 것으로 알려졌다(38).

Piper 등(36)에 따르면, methicillin에 내성이 있는 *S. aureus*에 대한 lacticin 3147의 MIC는 1.9-15.4 mg/L이었고, nisin의 MIC는 0.5-4.1 mg/L인 것으로 보고되었으나, *E. faecalis* MJ-213의 박테리오신의 항균활성은 이보다는 다소 낮은 수준이었는데 이는 사용된 박테리오신 용액이 완전하게 순수 정제되지 않은 상태에서 측정하였으므로 활성이 낮게 나타난 것으로 여겨진다. 한편 유아의 분변으로부터 분리된 *E. faecium* GM-1이 생산한 박테리오신은 *L. monocytogenes*, *S. aureus*, *S. typhimurim* 뿐만 아니라 *Vibrio* sp. 균주에 대해서도 항균효과가 있는 것으로 나타난 것으로 보고되어 *E. faecalis* MJ-213의 박테리오신 항균스펙트럼에는 다소 차이가 있었다(17).

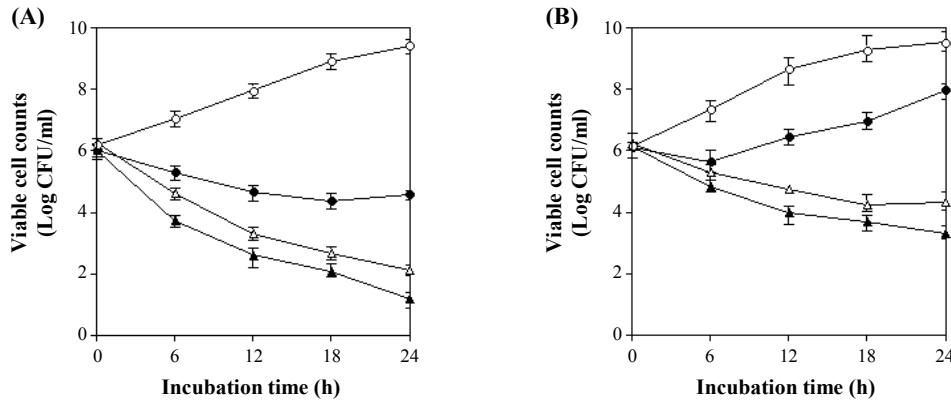
### *E. faecalis* MJ-213의 박테리오신과 소르빈산칼륨의 혼합 처리에 의한 항균효과

*E. faecalis* MJ-213이 생산하는 박테리오신의 단독 처리와 소르빈산칼륨과의 혼합 처리에 의한 *S. aureus* ATCC 6538과 *S. enteritidis* ATCC 13076의 균수 변화를 나타낸 결과는 Fig. 1과 같다. 식품첨가물 공전 상 식육가공품 내 소르빈산칼륨 사용기준은 소르빈산으로서 2.0 g/kg 이하이므로 본 실험에서는 100 µg/ml 사용하였고, 이와 동량의 박테리오신 용액을 첨가하여 박테리오신 단독 처리와 혼합 처리의 효과를 살펴보았다. *S. aureus* ATCC 6538의 초기 균수를 약  $10^6$  CFU/ml에 맞춘 다음 박테리오신 100 µg/ml 만을 처리한 경우 24시간 배양 후 초기 균수가 약 4 log cycle 감소되었고, 박테리오신 100 µg/ml 와 소르빈산칼륨 100 µg/ml을 혼합 처리한 경우는 단독 처리

**Table 1.** Minimum inhibitory concentration of bacteriocin produced by *E. faecalis* MJ-213 against foodborne poisoning bacteria

Foodborne poisoning bacteria	Concentration of bacteriocin of <i>E. faecalis</i> MJ-213 (µg/ml)						
	6.25	12.5	25	50	100	200	400
<i>S. aureus</i> ATCC 6538	+++	+++	+	-	-	-	-
<i>S. enteritidis</i> ATCC 13076	+++	+++	++	+	-	-	-
<i>V. parahaemolyticus</i> KCTC 2471	+++	+++	+++	+++	+++	++	++

-, <50%; +, 50-69%; ++, 70-90%; +++, >90% of the control's OD value



**Fig. 1.** Effects of bacteriocin produced by *E. faecalis* MJ-213 alone or in combination with potassium sorbate against *S. aureus* ATCC 6538 (A) and *S. enteritidis* ATCC 13076 (B) during incubation in medium. Values represent the means of three experiments±SD (error bars). (○) control; (●) bacteriocin (50 µg/ml)+potassium sorbate (100 µg/ml); (△) bacteriocin (100 µg/ml); (▲) bacteriocin (100 µg/ml)+potassium sorbate (100 µg/ml).

구 보다 더 높은 항균효과를 나타내어 약 5 log cycle 감소되었다. 하지만 박테리오신 50 µg/ml와 혼합 처리한 경우에는 박테리오신 단독 처리한 경우 보다 더 낮은 균수 감소효과를 나타내었다.

한편, *S. enteritidis* ATCC 13076에 대한 항균효과 역시 박테리오신 100 µg/ml을 단독 처리한 경우보다 소르빈산칼륨 100 µg/ml과 혼합처리 했을 때 더 높은 항균효과를 나타내었다. 하지만 박테리오신 50 µg/ml와 소르빈산칼륨을 혼합 처리한 경우는 24시간 배양 후 초기 균수보다 약 2 log cycle 증가되어 박테리오신 100 µg/ml 단독 처리했을 때보다 균수 감소 효과가 더 낮게 나타났다. 따라서 박테리오신 단독처리 때보다 소르빈산칼륨과 혼합 처리 했을 때 식중독균 감소에 대한 상승 효과가 나타났고, *E. faecalis* MJ-213의 박테리오신에 대한 항균활성은 *S. enteritidis* ATCC 13076 보다는 *S. aureus* ATCC 6538에 대해 더 높은 것으로 확인되었다.

Lim과 Mustapha (25)에 따르면, *E. coli* O157:H7, *L. monocytogenes* 및 *S. aureus* 등의 효과적인 제균을 위해선 소르빈산칼륨의 농도가 0.1% 이상 필요하다고 보고한 바 있다. 한편 Garcia 등(10)에 의하면 *L. monocytogenes* CECT 4032에 대한 *E. faecalis* EJ97이 생산한 enterocin EJ97의 항균활성은 sodium benzoate, sodium acetate, NaCl 혹은 sodium tripolyphosphate의 첨가에 의해서 변화가 없었으나, potassium

nitrate나 sodium nitrite에 의해서 항리스테리아 효과가 상승하였다고 보고하였다. 또한 *E. faecium* MJ-14가 생산하는 박테리오신은 sodium lactate 500 µg/ml, sodium nitrate 25 µg/ml 혹은 potassium nitrate 50 µg/ml와의 혼합 처리했을 때 박테리오신 단독 처리구보다 유의할 만한 *L. monocytogenes*의 균수를 감소시킬 수 있었다고 보고하였다(23).

**물리화학적 처리에 대한 *E. faecalis* MJ-213 박테리오신의 안정성**

*E. faecalis* MJ-213이 생산하는 박테리오신 용액을 100°C에서 30분간 혹은 121°C에서 15분 동안 가열한 후 단독 처리 혹은 소르빈산칼륨과 혼합 처리 했을 때 항균활성의 변화를 관찰한 결과는 Table 2와 같다.

*S. aureus* ATCC 6538과 *S. enteritidis* ATCC 13076에 대하여 가열처리 하지 않은 박테리오신 100 µg/ml 단독처리 했을 때 각각 65.61±0.42%와 30.90±0.56% 감소되었으나, 100°C에서 30분 가열처리한 박테리오신만을 첨가한 경우에는 43.84±0.71%와 16.62±0.94%였으며, 121°C에서 15분 가열처리한 박테리오신의 균수 감소율은 단지 9.36±0.58% 및 3.71±0.24%로 크게 감소되었으므로 *E. faecalis* MJ-213의 박테리오신은 고온에서 실패 되었음을 알 수 있었다. 한편, 가열처리한 박테리오신과 소르빈산칼륨의 혼합처리에 의한 항균효과는 소르빈산칼

**Table 2.** Effects of heated or non-heated bacteriocin of *E. faecalis* MJ-213 alone or in combination with potassium sorbate against *S. aureus* ATCC 6538 and *S. enteritidis* ATCC 13076

Concentration of (non)heated bacteriocin and potassium sorbate	Relative inhibition (%)	
	<i>S. aureus</i> ATCC 6538	<i>S. enteritidis</i> ATCC 13076
Non-heated bacteriocin 100 µg/ml	65.61±0.42 <sup>a</sup>	30.90±0.56 <sup>a</sup>
Heated (100°C, 30 min) bacteriocin 100 µg/ml	43.84±0.71 <sup>b</sup>	16.62±0.94 <sup>b</sup>
Heated (100°C, 30 min) bacteriocin 100 µg/ml + potassium sorbate 100 µg/ml	56.45±1.33 <sup>c</sup>	27.26±0.37 <sup>c</sup>
Heated (121°C, 15 min) bacteriocin 100 µg/ml	9.36±0.58 <sup>d</sup>	3.71±0.24 <sup>d</sup>
Heated (121°C, 15 min) bacteriocin 100 µg/ml + potassium sorbate 100 µg/ml	29.02±0.25 <sup>e</sup>	18.27±0.48 <sup>e</sup>

Values are Mean±SD of triplicate determinations.

<sup>a-e</sup> Means with the different letters in the same column are significantly different (*p*<0.05) as determined by Duncan's multiple range test.

**Table 3.** Effects of bacteriocin of *E. faecalis* MJ-213 (un)adjusted to various pH alone or in combination with potassium sorbate against *S. aureus* ATCC 6538 and *S. enteritidis* ATCC 13076

Concentration of bacteriocin (un)adjusted pH and potassium sorbate	Relative inhibition (%)	
	<i>S. aureus</i> ATCC 6538	<i>S. enteritidis</i> ATCC 13076
Bacteriocin (unadjusted pH) 100 µg/ml	65.61±0.42 <sup>a</sup>	30.90±0.52 <sup>a</sup>
Bacteriocin (pH 2.0) 100 µg/ml	11.24±0.63 <sup>b</sup>	4.61±0.46 <sup>b</sup>
Bacteriocin (pH 2.0) 100 µg/ml + potassium sorbate 100 µg/ml	19.75±0.94 <sup>c</sup>	13.79±0.19 <sup>c</sup>
Bacteriocin (pH 4.0) 100 µg/ml	48.11±0.39 <sup>d</sup>	17.60±0.53 <sup>d</sup>
Bacteriocin (pH 4.0) 100 µg/ml + potassium sorbate 100 µg/ml	65.62±0.78 <sup>a</sup>	31.57±0.30 <sup>a</sup>
Bacteriocin (pH 6.0) 100 µg/ml	66.45±0.36 <sup>a</sup>	29.11±0.78 <sup>a</sup>
Bacteriocin (pH 6.0) 100 µg/ml + potassium sorbate 100 µg/ml	82.73±0.53 <sup>e</sup>	45.90±0.25 <sup>e</sup>
Bacteriocin (pH 8.0) 100 µg/ml	64.26±0.54 <sup>a</sup>	29.93±0.84 <sup>a</sup>
Bacteriocin (pH 8.0) 100 µg/ml + potassium sorbate 100 µg/ml	81.32±1.29 <sup>e</sup>	41.16±0.75 <sup>f</sup>
Bacteriocin (pH 10.0) 100 µg/ml	47.33±0.71 <sup>d</sup>	19.36±0.61 <sup>g</sup>
Bacteriocin (pH 10.0) 100 µg/ml+ potassium sorbate 100 µg/ml	64.13±0.27 <sup>a</sup>	29.70±0.93 <sup>a</sup>

Values are Mean±SD of triplicate determinations

<sup>a-g</sup> Means with the different letters in the same column are significantly different ( $p<0.05$ ) as determined by Duncan's multiple range test.

를에서 기인하는 항균력으로 인해 가열처리한 박테리오신 단독 처리구에 비해선 저해율이 높게 나타났으나, 가열처리하지 않은 박테리오신 단독 처리구 보다는 유의할 만한 수준( $p<0.05$ )으로 항균효과가 감소되었다. 전보(24)의 결과 *E. faecalis* MJ-213이 생산하는 박테리오신은 100°C에서 20분간 가열처리 시에는 항균활성이 비교적 안정하였으나, 100°C에서 30분 이상 가열처리에 의해선 유의적으로 활성이 감소되었다.

pH 2.0-10.0으로 조정된 박테리오신(100 µg/ml)의 단독처리와 소르빈산칼륨(100 µg/ml)과의 혼합처리에 의한 균수 감소를 나타낸 결과는 Table 3과 같다. pH 조정하지 않은 박테리오신 단독 처리에 의한 *S. aureus* ATCC 6538 저해율(65.61±0.42%)은 pH 6.0 혹은 8.0으로 조정된 박테리오신 처리구와 유의적인 차이는 없었다. pH 4.0이나 10.0으로 조정된 박테리오신의 항균력은 대조구에 비해 다소 낮은 수준이었으나, 45% 이상의 저해율을 나타내어 *E. faecalis* MJ-213의 박테리오신은 광범위한 pH 하에서 안정함을 알 수 있었다. 또한, *S. enteritidis* ATCC 13076에 대한 pH를 조정하지 않은 박테리오신의 항균력(30.90±0.52%)은 pH 6.0과 8.0으로 조정된 박테리오신만을 처리했을 때와 pH 4.0 혹은 10.0으로 조정된 박테리오신과 소

르빈산칼륨을 혼합 처리했을 때의 저해율과 거의 비슷한 수준을 나타내었다.

한편, 다양한 효소를 처리한 박테리오신과 소르빈산칼륨과의 혼합처리 의한 항균활성은 Table 4에 나타내었다.  $\alpha$ -Amylase와 lipase를 처리한 경우 박테리오신의 활성은 감소되지 않았으나, protease II와 pepsin 처리에 의해선 활성이 크게 감소되었다. 또한 trypsin과 chymotrypsin 처리에 의해 박테리오신 활성은 거의 완전하게 소실된 반면 catalase 처리에 의해선  $\alpha$ -amylase와 lipase의 처리와 마찬가지로 활성에 변함이 없었다(자료 미 제시). 따라서 *E. faecalis* MJ-213이 생산한 박테리오신은 단백질 성분임을 알 수 있었다.

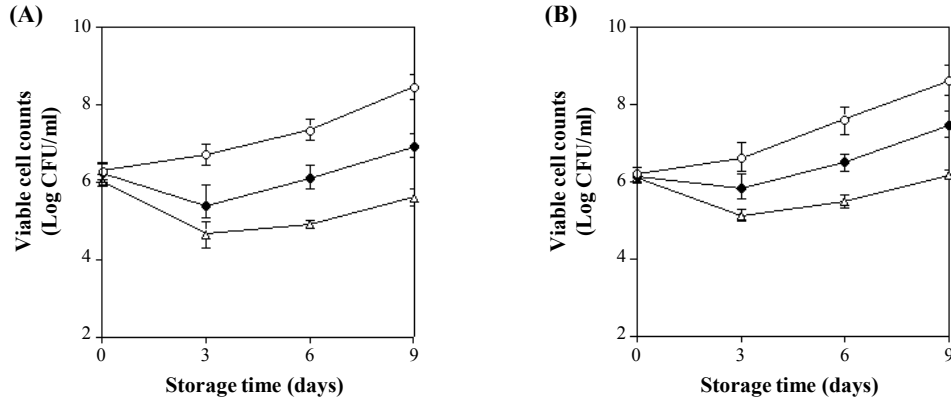
건조발효소시지에서 분리된 *E. faecium* P21이 생산한 박테리오신은 80-100°C에서 20분간의 가열 처리와  $\alpha$ -amylase와 lipase 처리에서도 안정하였으나, pepsin, trypsin 및 protease II의 처리에 의해선 활성이 완전히 소실되었다고 보고하여 *E. faecalis* MJ-213의 박테리오신과 유사한 물리화학적 안정성을 나타내었다(13). 또한 *E. faecium* JCM 5804의 박테리오신은 pH 2.0-10.0 범위 내에서와 100°C에서 30분간의 가열 처리에서는 비교적 안정하였으나, 121°C, 15분의 가열 처리에서는 활

**Table 4.** Effects of bacteriocin of *E. faecalis* MJ-213 (un)treated with various enzymes alone or in combination with potassium sorbate against *S. aureus* ATCC 6538 and *S. enteritidis* ATCC 13076

Concentration of bacteriocin (un)treated with enzyme and potassium sorbate	Relative inhibition (%)	
	<i>S. aureus</i> ATCC 6538	<i>S. enteritidis</i> ATCC 13076
Bacteriocin (untreated enzyme) 100 µg/ml	65.61±0.42 <sup>a</sup>	30.90±0.52 <sup>a</sup>
Bacteriocin ( $\alpha$ -amylase) 100 µg/ml	66.15±0.29 <sup>a</sup>	31.23±0.23 <sup>a</sup>
Bacteriocin ( $\alpha$ -amylase) 100 µg/ml + potassium sorbate 100 µg/ml	83.28±0.62 <sup>b</sup>	44.25±0.91 <sup>b</sup>
Bacteriocin (protease II) 100 µg/ml	1.18±0.03 <sup>c</sup>	1.01±0.07 <sup>c</sup>
Bacteriocin (protease II) 100 µg/ml + potassium sorbate 100 µg/ml	19.47±0.20 <sup>d</sup>	14.33±0.25 <sup>d</sup>
Bacteriocin (pepsin) 100 µg/ml	0.72±0.09 <sup>e</sup>	0.87±0.08 <sup>e</sup>
Bacteriocin (pepsin) 100 µg/ml + potassium sorbate 100 µg/ml	18.65±0.14 <sup>d</sup>	13.77±0.16 <sup>d</sup>
Bacteriocin (lipase) 100 µg/ml	64.15±0.43 <sup>a</sup>	29.38±0.57 <sup>a</sup>
Bacteriocin (lipase) 100 µg/ml+ potassium sorbate 100 µg/ml	84.25±1.15 <sup>b</sup>	40.63±0.81 <sup>f</sup>

Values are Mean±SD of triplicate determinations.

<sup>a-f</sup> Means with the different letters in the same column are significantly different ( $p<0.05$ ) as determined by Duncan's multiple range test.



**Fig. 2.** Effects of bacteriocin produced by *E. faecalis* MJ-213 alone or in combination with potassium sorbate against *S. aureus* ATCC 6538 (A) and *S. enteritidis* ATCC 13076 (B) inoculated on grind beef during storage at 4°C. Values represent the means of three experiments±SD (error bars). (○) control; (●) bacteriocin (100 µg/ml); (△) bacteriocin (100 µg/ml)+potassium sorbate (100 µg/ml).

성을 완전히 잃게 되었고 단백질 분해 효소인 proteinase K, trypsin, papain 등에 의해서도 분해되었다고 하였다(26).

**우유에 처리한 *E. faecalis* MJ-213 박테리옌신과 소르빈산칼륨의 항균효과**

같은 쇠고기 내에 배양한 *S. aureus* ATCC 6538 혹은 *S. enteritidis* ATCC 13076의 균수를 약 10<sup>6</sup> CFU/ml로 조정하여 인위적으로 접종한 다음 박테리옌신 100 µg/ml 단독처리와 박테리옌신 100 µg/ml와 소르빈산칼륨 100 µg/ml을 혼합처리한 후 밀봉하여 4°C 저장하는 동안 균수 변화를 관찰한 결과는 Fig. 2와 같다.

박테리옌신 단독으로 처리한 경우 *S. aureus* ATCC 6538의 균수는 저장 6일 동안은 초기 균수의 수준을 유지하였으나, 그 이후에는 균수가 서서히 증가하는 경향을 나타내었다. 하지만 박테리옌신과 소르빈산칼륨을 혼합 처리한 경우 3일간 저장하는 동안에는 초기 균수보다 약 1 log cycle 이상 감소되었고 그 이후에도 초기 균수보다 낮은 균수를 유지하였다. 한편, *S. enteritidis* ATCC 13076에 박테리옌신 단독 처리한 경우 9일 저장 후 초기 균수보다 약 1 log cycle 이상 증가된 반면, 박테리옌신과 소르빈산칼륨을 혼합 처리했을 때에는 초기 균수를 유지하는 수준이었다.

샐러드 내에 존재하는 *L. monocytogenes*의 균수는 enterocin AS-48 (30 µg/g)과 식품보존제의 혼합 처리에 의해 현저하게 감소된 바 있다고 보고하였다(27). 또한 Ananou 등(3)에 따르면, enterocin AS-48을 20-60 µg/g 처리한 경우 햄 속에 있는 *L. monocytogenes* 증식 억제에 효과적이었으나, 5°C 혹은 15°C에서 60일 저장하는 동안 리스테리아균의 재성장을 억제 하기에 충분하지는 않았다. 그러나 enterocin AS-48 (40 µg/g)과 nitrite/nitrate, pentasodium tripolyphosphate, sodium benzoate 혹은 potassium sorbate와 혼합 처리한 경우 항리스테리아 효과가 향상되었으며 이 중에서 nitrite/nitrate (0.007%)와의 혼합 처리 효과가 가장 높았으며, 이러한 항균효과는 *S. aureus* 보다는 *L. monocytogenes*에 더 효과적이었다고 보고하였다. 한

편, 돈육에 접종한 *L. monocytogenes*에 nisin (5,000 IU/ml)을 단독 처리하여 4°C에서 120일 저장한 결과 10일 동안은 정균 효과가 나타났으나, 그 이후에는 균수가 급속히 증가하였다. 하지만 sodium diacetate 3-5 g/100 ml 혹은 potassium benzoate 3 g/100 ml 처리한 경우 90일까지는 균 증식을 억제할 수 있었다고 하였다(37).

Figure 1의 결과와 비교해 볼 때 박테리옌신과 소르빈산칼륨의 혼합처리에 의한 항균효과는 배지 내에서보다 우유에 적용한 경우 다소 낮게 나타났는데, Aasen 등(1)에 따르면, 식품에 첨가된 박테리옌신의 80% 이상은 식품 성분 중 단백질에 신속하게 흡착되어서 가열처리하지 않은 경우 단백질 가수분해효소에 의해 분해되어 항균활성이 감소되는 반면, 첨가 후 가열처리한 경우에는 가수분해효소가 불활성화 되어 박테리옌신의 활성이 안정하게 유지되었다고 보고한 바 있다. 또한 식품 내에 함유된 지방의 함량도 박테리옌신의 활성에 영향을 주는 것으로 알려져 있는데 Zapico 등(44)에 의하면 *L. innocua*에 대한 nisin의 항균활성은 우유 내의 지방 함유량이 증가함에 따라 감소되었다고 하였고, Davies 등(7)은 소시지에 첨가된 nisin의 활성은 지방 함량이 높은 것보다 낮을 때 더 효과적이라고 보고하였다.

화학합성품과는 달리 천연 항균성 물질인 박테리옌신 중에서 인체 내 장내세균이나 소화효소에 의해 쉽게 분해되고 독성이 없는 것으로 알려져 있는 nisin은 현재 약 47개국에서 식품 첨가물로 지정되어 육류가공품이나 알코올 음료 등에 사용되고 있다(14). 이미 밝혀진 박테리옌신 생산 균주로는 많은 유산균들을 비롯하여 *E. coli*의 colicin (20), *Bifidobacterium infantis*의 bifidin (2), *B. licheniformis* (4), *Bacterioides fragilis* (34) 및 *Propionibacterium thoenii* (40) 등 다양한 미생물로부터 생산되고 있다. 향후 미생물로부터 분리한 박테리옌신들은 일반 급만성 독성시험 이외에도 발암성, 변이원성, 유전독성시험 등의 안전성 평가를 통해 generally recognized as safe (GRAS) 물질로 지정할 수 있는 박테리옌신 개발에 관한 연구가 필요하다고 사료된다. 이온교환이나 겔 크로마토그래피 등

으로 순수 정제하여 박테리오신의 항균활성을 높여 단독 처리하는 방법도 물론 유용하지만 이러한 정제과정을 거치는 동안 생산 단가가 높아지게 되므로 순도가 다소 낮은 조박테리오신 용액을 항균력 있는 물리화학적 방법과 혼합 처리하는 일명 hurdle technology 방법으로도 상승효과를 얻을 수 있으므로 이러한 기술을 통해 식품의 저장성을 향상시키고 식중독 사고의 위험을 줄일 수 있을 것으로 여겨진다. 또한 축산업계에서 생산 수율 향상을 위해 무분별하게 사용되고 있는 항생제의 대체물질로서 박테리오신의 활용이 보고(21) 된 바 있어 가축 사료에 박테리오신을 직접 첨가하거나 생균제(probiotic)에 박테리오신 생산 유전자를 도입하여 생리 활성을 높일 수 있는 기능성 동물 사료 개발에도 유용할 것으로 기대된다.

## 적용

식중독균에 대하여 *Enterococcus faecalis* MJ-213이 생산하는 박테리오신과 소르빈산칼륨의 혼합처리에 의한 항균효과를 조사하였다. *Staphylococcus aureus* ATCC 6538에 대한 박테리오신의 MIC는 50 µg/ml, *Salmonella enteritidis* ATCC 13076에 대한 MIC는 100 µg/ml이었으나, 400 µg/ml의 농도 하에서도 *Vibrio parahaemolyticus* KCTC 2471의 증식억제 효과는 나타나지 않았다. *S. aureus* ATCC 6538과 *S. enteritidis* ATCC 13076 ( $10^6$  CFU/ml)에 박테리오신 100 µg/ml 단독 처리 후 24시간 만에 초기 균수가 각각 약 4 log와 2 log cycle 감소되었고, 박테리오신 100 µg/ml와 소르빈산칼륨 100 µg/ml을 혼합 처리한 경우는 박테리오신만을 처리할 때 보다 유의적( $p<0.05$ )으로 더 높은 항균효과가 나타났다. 121°C에서 15분간 가열한 박테리오신 단독처리에 의한 *S. aureus*과 *S. enteritidis*의 저해율은 각각  $9.36\pm 0.58\%$ 와  $3.71\pm 0.24\%$ 로 가열처리 하지 않은 박테리오신의 항균력 보다 크게 감소하였다. pH 조정하지 않은 박테리오신 단독 처리에 의한 *S. aureus*의 저해율( $65.61\pm 0.42\%$ )은 pH 6.0 혹은 8.0으로 조정한 박테리오신 처리구와 유의적인 차이가 없었으나, 그 외의 pH로 조정된 박테리오신의 항균력은 유의할 만한 수준으로 감소되었다. 박테리오신 활성은  $\alpha$ -amylase와 lipase 처리에 영향을 받지 않았으나, protease II와 pepsin 처리에 의해서 활성이 거의 소실되었다. 또한 같은 쇠고기 내에 접종된 *S. aureus*와 *S. enteritidis*의 균수도 박테리오신 단독처리시보다 소르빈산칼륨과 혼합처리에 의해 4°C에서 저장하는 동안 유의적( $p<0.05$ )으로 더 낮은 균수를 유지하였다.

## 참고문헌

- Aasen, I.M., S. markussen, T. Moretro, T. Katla, L. Axelsson, and K. Naterstad. 2003. Interactions of the bacteriocins sakacin P and nisin with food constituents. *Int. J. Food Microbiol.* 87, 35-43.
- Ahmad, C., C. Natascha, C. Haiqin, Z. Jianxin, T. Jian, Z. Hao, and C. Wei. 2010. Bifidin I-A new bacteriocin produced by *Bifidobacterium infantis* BCRC 14602: purification and partial amino acid sequence. *Food Control* 21, 746-753.
- Ananou, S., A. Banos, M. Maqueda, M. Martinez-Bueno, A. Galvez, and E. Valdivia. 2010. Effect of combined physico-chemical treatments based on enterocin AS-48 on the control of *Listeria monocytogenes* and *Staphylococcus aureus* in a model cooked ham. *Food Control* 21, 478-486.
- Anthony, T., T. Rajesh, N. Kayalvizhi, and P. Gunasekaran. 2009. Influence of medium components and fermentation conditions on the production of bacteriocin(s) by *Bacillus licheniformis* AnBa9. *Biores. Technol.* 100, 872-877.
- Chawla, S.P., R. Chander, and A. Sharma. 2006. Safe and shelf-stable natural casing using hurdle technology. *Food Control* 17, 127-131.
- Cleveland, J., T.J. Montville, I.F. Nes, and M.L. Chikindas. 2001. Bacteriocins: safe, natural antimicrobials for food preservation. *Int. J. Food Microbiol.* 71, 1-20.
- Davies, E.A., C.F. Milne, H.E. Bevis, R.W. Potter, J.M. Harris, G.C. Williams, L.V. Thomas, and J. Delves-Broughton. 1999. Effective use of nisin to control lactic acid bacterial spoilage in vacuum-packed Bologna-type sausage. *J. Food Prot.* 62, 1004-1010.
- Ferrand, C., F. Marc, P. Fritsch, P. Cassand, and G.D. Blanquat. 2000. Mutagenicity and genotoxicity of sorbic acid-amine reaction products. *Food Addit. Contam.* 17, 895-901.
- Fyfe, L., F. Armstrong, and J. Stewart. 1998. Inhibition of *Listeria monocytogenes* and *Salmonella enteritidis* by combinations of plant oils and derivatives of benzoic acid: the development of synergistic antimicrobial combinations. *Int. J. Antimicrob. Agents* 9, 195-199.
- Garcia, M.T., M.M. Canamero, R. Lucas, N.B. Omar, R.P. Pulido, and A. Galvez. 2004. Inhibition of *Listeria monocytogenes* by enterocin EJ97 produced by *Enterococcus faecalis* EJ97. *Int. J. Food Microbiol.* 90, 161-170.
- Gomes, B.C., C.T. Esteves, I.C.V. Palazzo, A.L.C. Darini, G.E. Felis, L.A. Sechi, B.D.G.M. Franco, and E.C.P. De Martinis. 2008. Prevalence and characterization of *Enterococcus* spp. isolated from Brazilian foods. *Food Microbiol.* 25, 668-675.
- Grande, M.J., R. Lucas, H. Abriouel, E. Valdivia, N.B. Omar, M. Maqueda, M. Martinez-Bueno, M. Martinez-Canamero, and A. Galvez. 2006. Inhibition of toxicogenic *Bacillus cereus* in rice-based foods by enterocin AS-48. *Int. J. Food Microbiol.* 106, 185-194.
- Herranz, C., P. Casaus, S. Mukhopadhyay, J.M. Martinez, J.M. Rodriguez, I.F. Nes, P.E. Hernandez, and L.M. Cintas. 2001. *Enterococcus faecium* P21: a strain occurring naturally in dry-fermented sausages producing the class II bacteriocins enterocin A and enterocin B. *Food Microbiol.* 18, 115-131.
- Hurst, A. 1981. Nisin. *Adv. Appl. Microbiol.*, 27, 85-123.
- Jo, S.H., H.J. Kim, E.J. Choi, and S.D. Ha. 2009. Trends analysis of food-borne outbreaks in United States of America, Japan and Korea. *Safe Food* 4, 3-14.
- Jo, S.B., Y.U. Lee, and J.H. Kim. 1998. A study on synergistic effect of chitosan and sorbic acid on growth inhibition of *Escherichia coli* O157:H7 and *Staphylococcus aureus*. *J. Food Hyg. Safety* 13, 112-120.
- Kang, J.H. and M.S. Lee. 2005. Characterization of a bacteriocin produced by *Enterococcus faecium* GM-1 isolated from an infant. *J. Appl. Microbiol.* 98, 1168-1176.
- Kleter, G.A. and H.J.P. Marvin. 2009. Indicators of emerging hazards and risks to food safety. *Food Chem. Toxicol.* 47, 1022-1039.
- Ku, J.Y., S.J. Choi, S.Y. Kim, and B.S. Noh. 2000. Inactivation of ascorbate oxidase by hurdle technology with heat, pH and

- ultrasound. *Food Sci. Biotechnol.* 9, 372-377.
20. Lazdunski, C.J. 1988. Pore-forming colicins: synthesis, extracellular release, mode of action, immunity. *Biochimie* 70, 1291-1296.
  21. Lee, N.K., J.Y. Lee, H.G. Kwak, and H.D. Paik. 2008. Perspectives for the industrial use of bacteriocin in dairy and meat industry. *Kor. J. Food Sci. Ani. Resour.* 28, 1-8.
  22. Leistner, L. 2000. Basic aspects of food preservation by hurdle technology. *Int. J. Food Microbiol.* 55, 181-186.
  23. Lim, S.M. 2005. Synergistic effect of physico-chemical treatment and bacteriocin produced by *Enterococcus faecium* MJ-14. *J. Food Hyg. Safety* 20, 217-224.
  24. Lim, S.M. 2009. Combined effects of bacteriocin of *Enterococcus faecalis* MJ-213 and organic acid on *Listeria monocytogenes* inactivation. *Kor. J. Microbiol.* 45, 41-47.
  25. Lim, K. and A. Mustapha. 2004. Effects of cetylpyridinium chloride, acidified sodium chlorite, and potassium sorbate on populations of *Escherichia coli* O157:H7, *Listeria monocytogenes*, and *Staphylococcus aureus* on fresh beef. *J. Food Prot.* 67, 310-315.
  26. Lucas, R., M.J. Grande, H. Abriouel, M. Maqueda, N.B. Omar, E. Valdivia, M. Martinez-Canamero, and A. Galvez. 2006. Application of the broad-spectrum bacteriocin enterocin AS-48 to inhibit *Bacillus coagulans* in canned fruit and vegetable foods. *Food Chem. Toxicol.* 44, 1774-1781.
  27. Martinez-Bueno, M., A. Galvez, E. Valdivia, and M. Maqueda. 1990. A transferable plasmid associated with AS-48 production in *Enterococcus faecalis*. *J. Bacteriol.* 172, 2817-2818.
  28. McCabe-Sellers, B.J. and S.E. Beattie. 2004. Food safety: emerging trends in foodborne illness surveillance and prevention. *J. Am. Diet Assoc.* 104, 1708-1717.
  29. Mead, P.S., L. Slutsker, V. Dietz, L.F. McCaig, J.S. Bresee, and C. Shapiro. 1999. Food-related illness and death in the United States. *Emerg. Infect. Dis.* 5, 607-625.
  30. Meng, J. and M.P. Doyle. 2002. Introduction. Microbiological food safety. *Microb. Infect.* 4, 395-397.
  31. Molinos, A.C., H. Abriouel, R.L. Lopez, N.B. Omar, E. Valdivia, and A. Galvez. 2009. Enhanced bactericidal activity of enterocin AS-48 in combination with essential oils, natural bioactive compounds and chemical preservatives against *Listeria monocytogenes* in ready-to-eat salad. *Food Chem. Toxicol.* 47, 2216-2223.
  32. Moon, G.S., J.J. Jeong, G.E. Ji, J.S. Kim, and J.H. Kim. 2000. Characterization of a bacteriocin produced by *Enterococcus* sp. T7 isolated from humans. *J. Microbiol. Biotechnol.* 10, 507-513.
  33. Munoz, A., S. Ananou, A. Galvez, M. Martinez-Bueno, A. Rodriguez, M. Maqueda, and E. Valdivia. 2007. Inhibition of *Staphylococcus aureus* in dairy products by enterocin AS-48 produced *in situ* and *ex situ*: Bactericidal synergism with heat. *Int. Dairy J.* 17, 760-769.
  34. Papastathopoulou, A., E. Bezirtzoglou, and N.J. Legakis. 1997. *Bacterioides fragilis*: production and sensitivity to bacteriocins. *Anaerobe* 3, 203-206.
  35. Park, S.H., K. Itoh, and T. Fujisawa. 2003. Characteristics and identification of enterocins produced by *Enterococcus faecium* JCM 5804. *J. Appl. Microbiol.* 95, 294-300.
  36. Piper, C., L.A. Draper, P.D. Cotter, R.P. Ross, and C. Hill. 2009. A comparison of the activities of lacticin 3147 and nisin against drug-resistant *Staphylococcus aureus* and *Enterococcus* species. *J. Antimicrob. Chemother.* 64, 546-551.
  37. Samelis, J., G.K. Bedie, J.N. Sofos, K.E. Belk, J.A. Scanga, and G.C. Smith. 2005. Combinations of nisin with organic acids or salts to control *Listeria monocytogenes* on sliced pork bologna stored at 4°C in vacuum packages. *Lebensm. Wiss. Technol.* 38, 21-28.
  38. Theppangna, W., T. Murase, N. Tokumaru, H. Chikumi, E. Shimizu, and K. Otsuki. 2007. Screening of the enterocin genes and antimicrobial activity against pathogenic bacteria in *Enterococcus* strains obtained from different origins. *J. Vet. Med. Sci.* 69, 1235-1239.
  39. Valenzuela, A.S., N. Omar, H. Abriouel, R.L. Lopez, K. Veljovic, M.M. Canamero, M.K.L. Topisirovic, and A. Galvez. 2009. Virulence factors, antibiotic resistance, and bacteriocins in enterococci from artisan foods of animal origin. *Food Control* 20, 381-385.
  40. Van der Merwe, I.R., R. Bauer, T.J. Britz, and L.M.T. Dicks. 2004. Characterization of thoeniicin 447, a bacteriocin isolated from *Propionibacterium thoenii* strain 447. *Int. J. Food Microbiol.* 92, 153-160.
  41. Vanne, L., M. Karwoski, S. Karppinen, and A.M. Sjöberg. 1996. HACCP-based food quality control and rapid detection methods for microorganisms. *Food Control* 7, 263-276.
  42. Walker, R. 1990. Nitrates, nitrites and N-nitroso compounds: a review of the occurrence in food and diet and the toxicological implications. *Food Addit. Contam.* 7, 717-768.
  43. Yoon, M.Y., Y.J. Kim, and H.J. Hwang. 2008. Properties and safety aspects of *Enterococcus faecium* strains isolated from *Chungkukjang*, a fermented soy product. *LWT.* 41, 925-933.
  44. Zapico, P., M. de Paz, M. Medina, and M. Nunez. 1999. The effect of homogenization of whole milk, skim milk and milk fat on nisin activity against *Listeria innocua*. *Int. J. Food Microbiol.* 46, 151-157.