

Research Note

신선 과채류에 존재하는 박테리오신 유사 활성을 지니는 유산균의 분포와 다양성

박영서* · 장재권¹ · 최영진² · 정명수³ · 박훈⁴ · 심건섭⁵

*경원대학교 식품생물공학과, ¹청강문화산업대학 식품공학과, ²서울대학교 식품생명공학전공, ³이화여자대학교 식품공학과, ⁴선문대학교 식품공학과, ⁵(주)그린바이오

Distribution and Biodiversity of Lactic Acid Bacteria Having Bacteriocin-like Activity from Fresh Fruits and Vegetables

Young-Seo Park*, Jae Kweon Jang¹, Young Jin Choi², Myong-Soo Chung³, Hoon Park⁴, and Kun-Sub Shim⁵

*Department of Food Science and Biotechnology, Kyungwon University

¹Department of Food Science, Chungkang College of Cultural Industries

²Department of Agricultural Biotechnology, Seoul National University

³Department of Food Science and Engineering, Ewha Womans University

⁴Department of Food Science, Sunmoon University

⁵Greenbio Co., Ltd.

Abstract

From the 25 fresh fruits and vegetable products, 1,250 isolates grown on MRS agar media were screened for the inhibitory activity on the growth of *Escherichia coli* 0157:H7, *Listeria monocytogenes*, and *Bacillus cereus* as well as *Lactobacillus plantarum*, *L. casei*, and *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*. Among them, 607 isolates (49% of total isolates) from 23 different foods produced growth inhibitory activity on the *E. coli* 0157:H7, *L. monocytogenes*, or *B. cereus*. When these isolates were screened for the inhibitory activity on the growth of *L. plantarum*, *L. casei*, and *Lactococcus lactis* subsp., 24 isolates (3% of total isolates) from 7 food samples showed bacteriocin-like activity. These isolates had typical physiological characteristics of lactic acid bacteria, which indicated these isolates were strains of lactic acid bacteria. The inhibitor from 3 out of 24 revealed as nicin. From the RAPD-PCR profiles, 24 strains was classified and it was also indicated that most of the strains isolated from same produce showed similar phylogenetic profile.

Key words: lactic acid bacteria, bacteriocin-like activity, fruits and vegetables, biodiversity

서 론

식품 안전은 소비자뿐만 아니라 식품제조업자에게도 중요한 문제로 부각되고 있다. 최근의 식품 소비경향을 보면, 최소가공식품(minimally processed food), 즉석편의식품(ready-to-eat food), 냉장 또는 냉동식품, 신선 과채류 등의 소비가 증가하는 반면에 화학 보존제의 사용이 감소하는 추세에 있다. 이러한 식품들은 소비의 편의성과 관능적 특

성이 우수하다는 장점이 있는 반면 가열 살균을 최소화하는 가공 공정상의 본질적인 문제로 인해 식중독균의 오염 기회가 증가하는 단점을 지니고 있다. 따라서 즉석편의식품이나 신선 과채류에서의 미생물 오염을 최소화하여 유통 기간을 연장시키고자 하는 연구가 다양하게 이루어지고 있다(Ohlsson, 1994).

이들 식품에서 식중독 미생물의 오염을 감소시키기 위한 방법 중의 하나는 박테리오신(bacteriocin)을 생산하는 유산균 등과 같은 천연 항균제를 포함하는 미생물 배양액을 사용하는 것이다. 최근까지 새로운 박테리오신을 생산하는 유산균을 탐색하는 많은 연구들이 진행되어 왔고, 많은 종류의 박테리오신들의 특성이 규명되고 있으며(Klaenhammer, 1993), 이러한 유산균을 식품가공에 적용하고자 하는 시도가 진행되고 있다(Hanlin & Evancho,

Corresponding author: Young-Seo Park, Department of Food Science and Biotechnology, Kyungwon University, San 65, Bokjeong-dong, Sujeong-gu, Seongnam-si, Gyeonggi-do 461-701, Korea
Tel: +82-31-750-5378; Fax: +82-31-750-5273
E-mail: ypark@kyungwon.ac.kr
Received December 8, 2008; revised January 4, 2009; accepted January 15, 2009

1995, Holzapfel et al., 1995). 그러나 박테리옌 생산균주의 주요 분리원인 소시지나 가공육제품을 제외하고는 최소 가공식품에 존재하는 박테리옌 생산균주의 분포에 대한 연구는 거의 보고된 바 없다(Garriga et al., 1993). 따라서 본 연구에서는 박테리옌 생산균주를 지니고 있는 신선 과채류를 탐색하고 이들 식품에 존재하는 박테리옌 생산균주의 분포도와 다양성에 대하여 조사하였다.

재료 및 방법

사용균주와 배지

박테리옌 유사 활성을 지니는 균주 분리를 위한 유산균 검정균주로는 *Lactobacillus plantarum* KCCM 12116, *L. casei* KCCM 12452와 nicin 생산균주인 *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* KCCM 40104를 사용하였다. 항생물질 생산균주 분리를 위한 식중독균의 검정균주로는 *Escherichia coli* 0157:H7, *Listeria monocytogenes* KCCM 40307과 *Bacillus cereus* KCCM 11204를 사용하였다.

L. plantarum, *L. casei*와 *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*는 MRS 배지를 사용하여 37°C에서 혐기적 조건에서 배양하였으며 *E. coli*, *L. monocytogenes*, *B. cereus*는 trypticase soy broth를 사용하여 37°C에서 배양하였다. 생육저해실험은 MRS 한천 고체배지를 이용하여 수행하였다(Biswas et al., 1991).

과채류로부터 균주분리

본 실험에 사용한 25종류의 신선 과채류는 2008년 8-9월에 시중 슈퍼마켓에서 구입하였다. 구입한 각각의 신선 과채류용 각변이 2 cm인 정육면체가 되도록 칼로 절단한 후 10 g을 취하여 90 mL의 멸균된 Ringer 용액(Oxoid, Basingstoke, England)에 첨가한 후 homogenizer(HP-93F, Taitec Co., Tokyo, Japan)를 이용하여 1,000 rpm으로 2분간 파쇄하였다. 파쇄액을 10진 희석법에 의해 10⁹까지 희석한 후 MRS 한천 고체배지에 도말하였으며 37°C에서 혐기적 조건에서 3일간 배양하여 균체를 생육하였다.

분리 유산균에 의한 검정균의 생육저해 조사

신선 과채류의 파쇄액을 도말한 각각의 MRS 한천 고체배지에서 생육한 colony를 무작위적으로 과채류 종류 당 50개씩 취하여 새로운 MRS 한천 고체배지에 옮긴 후 37°C에서 18시간동안 혐기적 조건에서 배양하였다. 그 후 하룻밤 배양한 검정균주 배양액 100 µL를 5 mL의 1.5%(w/v) 한천 용액에 접종한 후 MRS 한천 고체배지위에 중층하여 37°C에서 배양하면서 6시간과 24시간 후에 colony 주변에 생육 저해환이 형성되었는지 관찰하였다. 저해환을 나타내는 colony는 새로운 한천배지에 도말하여 순

수배양하였다.

생육저해물질의 단백질 가수분해효소 저항성과 열안정성

분리 유산균이 생산하는 미생물 생육저해물질의 단백질 가수분해효소에 대한 저항성을 조사하기 위해서는 pH를 7.0으로 조정한 분리 유산균의 배양 상등액 50 µL에 25 µL의 trypsin 용액(1 mg/mL, Sigma Chemicals Co., St. Louis, MO, USA) 또는 α-chymotrypsin 용액(10 mg/mL, Sigma Chemicals Co.)을 첨가한 다음 37°C에서 1시간 반응시켰다. 이 반응액 25 µL를 검정균인 *L. casei*를 도말한 한천 고체배지위에 spotting한 후 37°C에서 18시간 배양하여 저해환의 직경을 측정하였다.

열 안정성을 측정하기 위해서는 분리 유산균의 배양 상등액을 pH 2와 7로 조정한 후 100°C에서 10분간 가열한 다음 25 µL를 취하여 검정균인 *L. casei*를 도말한 한천 고체배지위에 spotting한 후 37°C에서 18시간 배양하여 저해환의 직경을 측정하였다.

RAPD-PCR

Random amplified polymorphic DNA-polymerase chain reaction(RAPD-PCR)을 위한 유산균으로부터 염색체 DNA의 분리는 Bioneer사(Seoul, Korea)의 AccuPrep Genomic DNA Extraction Kit를 이용하였으며 oligonucleotide random primer는 primer 239 (5'-CTGAAGCGGA-3')를 사용하였다. RAPD-PCR은 최종 부피가 25 µL이 되도록 하였으며 PCR 프로그램은 다음과 같이 구성하였다: 94°C에서 4분, 1 cycle; 94°C에서 2분, 39°C에서 2분, 72°C에서 2분, 2 cycle; 94°C에서 30초, 39°C에서 30초, 72°C에서 1분, 35 cycle. PCR 산물은 1.5%(w/v) agarose gel 전기영동을 100 V의 정전압으로 수행한 후 0.5 µg/mL ethidium bromide 용액으로 염색한 다음 자외선 하에서 관찰하였다. RAPD-PCR 패턴의 분석은 Molecular Analyst Software PC Fingerprint Plus ver 1.6(Bio-Rad, Hercules, CA, USA) 프로그램을 사용하였다.

결과 및 고찰

본 연구에서는 총 25 종류의 신선 과채류를 사용하였는데 모든 과채류에서 유산균 선택배지인 MRS 한천고체배지에서 colony를 형성하였으며 시료 1 g 당 10⁴-10⁷ CFU의 유산균이 존재하는 것으로 확인되었다(Table 1). 유산균이 가장 많이 존재하는 식품은 파로서 1.68×10⁷ CFU/g의 유산균을 지니고 있었다. 한편 복숭아는 조사한 과채류 중에서 가장 적은 유산균수를 지니고 있었는데 1.03×10⁴ CFU/g의 생균수를 나타내어 과채류의 종류에 따라 유산균수가 10² 정도 차이가 남을 알 수 있었다. 본 연구는 8-9

Table 1. Viable cell number of isolates from food samples on MRS plates and viable cell number of isolates which showed growth inhibition activity on food pathogens

Food sample	CFU/g	<i>E. coli</i> O157:H7			<i>L. monocytogenes</i>			<i>B. cereus</i>		
		0 *	< 20	≥ 20	0	< 20	≥ 20	0	< 20	≥ 20
Green onion	1.68×10 ⁷	2	32	16	2	28	20	2	13	35
Sweet pumpkin	1.02×10 ⁶	1	44	5	2	34	14	1	35	14
Peach	1.03×10 ⁴	1	45	4	1	41	8	1	41	8
Radish	1.14×10 ⁶	3	41	6	0	46	4	1	41	8
Lettuce	5.13×10 ⁵	14	35	1	12	35	3	24	13	13
Parsley	3.31×10 ⁴	7	42	1	7	37	6	35	12	3
Pumpkin leaf	2.83×10 ⁶	9	38	3	10	38	2	13	32	5
Grape	1.61×10 ⁴	29	21	0	43	7	0	34	14	2
Pumpkin	6.98×10 ⁵	43	7	0	50	0	0	50	0	0
Water melon	5.48×10 ⁶	3	36	11	2	37	11	1	38	11
Banana	3.76×10 ⁵	0	46	4	0	38	12	0	39	11
Carrot	1.55×10 ⁴	12	38	0	21	29	0	20	28	2
Mushroom	5.24×10 ⁶	1	49	0	1	37	12	0	46	4
Bean sprout	1.30×10 ⁵	8	40	2	6	41	3	6	43	1
Green pepper	5.85×10 ⁶	15	34	1	11	35	4	15	21	14
Leek	1.80×10 ⁶	0	46	4	0	39	11	0	43	7
Garlic	9.43×10 ⁶	0	45	5	2	41	7	0	34	16
Cabbage	6.11×10 ⁵	33	17	0	41	9	0	50	0	0
Potato	3.12×10 ⁵	47	3	0	47	3	0	50	0	0
Sweet potato	1.13×10 ⁵	49	1	0	44	6	0	49	0	1
Cucumber	1.74×10 ⁵	49	1	0	46	4	0	50	0	0
Tomato	4.69×10 ⁵	50	0	0	49	1	0	50	0	0
Eggplant	4.02×10 ⁴	50	0	0	50	0	0	50	0	0
Pepper	1.31×10 ⁵	50	0	0	50	0	0	50	0	0
White cabbage	6.33×10 ⁴	37	13	0	38	12	0	37	13	0

* Diameter of inhibition zone (mm)

월에 시료를 수집하여 실험한 것으로 계절에 따라 또는 산지에 따라 유산균 수에 차이가 있을 것으로 예상된다. 그러나 계절 또는 산지에 따른 유산균수는 본 연구범위에 속하지 않으며 계절별, 산지별, 구입처별 유산균의 분포도는 별도의 연구를 통해 이루어져야 할 것으로 본다.

25종류의 과채류에서 분리된 유산균 중에서 각 식품시료당 50균주를 무작위적으로 선정하여 총 1,250주의 유산균에 대하여 식중독 세균에 대한 생육저해활성을 측정된 결과 가지와 고추를 제외한 23종류의 과채류에서 분리한 균주 중에서 607주의 유산균이 항균활성을 나타내었다. 이로 부터 본 실험에 사용된 과채류로부터 분리된 균주의 49%가 식중독균에 대한 항균활성을 지니고 있는 것으로 확인되었으며 대부분의 과채류는 연구에 사용된 3종류의 식중독 세균 중에서 2가지 이상의 식중독 세균에 대한 항균활성을 지니고 있는 것을 알 수 있었다.

과의 경우 *E. coli* O157:H7에 대하여 항균활성을 나타내지 않는 균주는 2주(조사 균주 50주의 4%)인데 반하여 저해환이 20 mm 이하인 항균활성을 지니고 있는 균주는 32주(조사 균주 50주의 64%)이었으며 20 mm 이상의 강한 항균활성을 지니고 있는 균주도 16주(조사 균주 50주의

32%) 존재하는 것으로 확인되었다.

호박에서 분리한 유산균주는 7균주가 *E. coli* O157:H7에 대하여 저해환이 20 mm 이하인 항균활성을 지니고 있었으며 *L. monocytogenes* 또는 *B. cereus*에 대해서는 항균활성을 지니는 균주가 존재하지 않았다. 토마토에서 분리한 유산균주 중에서는 단 1균주만 *L. monocytogenes*에 대한 항균활성을 지니고 있었으며 *E. coli* O157:H7이나 *B. cereus*에 대해서는 항균활성을 지니는 균주가 존재하지 않았다.

항균활성을 나타내는 607 균주를 대상으로 박테리오신의 생산 여부를 조사하기 위하여 *L. plantarum*과 *L. casei*, 그리고 nisin을 생산하는 *Lactococcus lactis*를 검정균주로 하여 생육저해활성을 조사한 결과 흰 양배추, 포도, 마늘, 무, 버섯, 피망, 호박 등 7종류의 과채류로부터 분리된 24주의 모든 유산균이 *L. casei*에 대한 항균활성을 나타내었으며 nisin을 생산하는 *Lactococcus lactis*에 대해서는 항균활성을 나타내지 않았다. 또한 이들 24 균주의 배양 상등액을 α -chymotrypsin으로 처리하였을 때 모든 균주에서 항균활성이 완전히 저해되어 박테리오신을 생산하는 균주의 특성과 일치하는 결과를 나타내었다(Table 2). 이 결과로부터

Table 2. Bacteriocin-like activity, heat stability, and protease sensitivity of culture supernatant of isolates

Sample	Colony No.	Growth inhibition						
		<i>L. plantarum</i>	<i>L. casei</i>	<i>Lactococcus lactis</i>	Boiling at pH 2	Boiling at pH 7	Trypsin treatment	α -Chymotrypsin treatment
White cabbage	43	_*	_*	_*	_*	_*	_*	_*
Grape	13	-	+	-	-	-	-	-
	15	-	++	-	-	-	-	-
Garlic	36	+	+	-	-	-	-	-
Radish	33	-	+	-	-	-	-	-
	1	-	++	-	-	-	-	-
Mushroom	2	-	+	-	-	-	+	-
	28	-	+	-	-	-	+	-
	30	-	+	-	+	-	+	-
	36	-	+	-	+	-	+	-
	39	-	+	-	+	+	+	-
	43	-	+	-	-	-	+	-
	19	-	++	-	+	-	+	-
	20	-	++	-	-	-	+	-
	21	-	++	-	-	-	+	-
	30	+	++	-	-	-	+	-
Green pepper	31	-	++	-	-	-	+	-
	35	-	++	-	-	-	+	-
	38	-	++	-	-	-	+	-
	39	+	++	-	-	-	+	-
	41	-	++	-	-	-	+	-
Pumpkin	45	-	++	-	-	-	+	-
	3	+	++	-	-	-	+	-
	7	+	++	-	-	-	+	-

*, Not detected; +, < 10 mm in diameter; ++, \geq 10 mm in diameter of inhibition zone.

**, No growth inhibition activity; +, show growth inhibition activity.

본 연구에 사용된 총 1,250균주의 2.9%인 24주가 박테리옌 유사활성을 나타냄을 알 수 있었다. 이는 과채류에 존재하는 유산균의 약 3%가 박테리옌 유사활성을 지닌다는 것을 의미한다. 한편 본 연구에 사용한 25종류의 과채류 중에서 7종류의 과채류가 박테리옌 유사활성을 지니는 유산균을 지니고 있어 28%의 과채류에서 박테리옌 유사활성을 나타내는 유산균이 존재함을 알 수 있었다.

이들 균주에 대하여 Gram 염색, 포자염색, catalase 활성, gelatinase 활성, 운동성 등을 조사한 결과 모든 균주가 전형적인 유산균의 특성을 지니고 있었으며 현미경을 통하여 관찰한 결과 24 균주 모두 구균으로 확인되었다(결과 미제시).

24 균주의 배양 상등액을 이용하여 항균물질의 내열성과 단백질 가수분해효소에 대한 저항성을 조사한 결과 버섯 유래 30, 36, 39번 균주와 피망 유래 19번 균주 등 4 균주의 배양 상등액이 pH 2의 조건에서 100°C에서 10분간 가열하였을 때 항균활성을 유지하였으며 19균주의 배양 상등액은 trypsin 처리에 대하여 저항성을 나타내었다. 박테리옌 중에서 nisin은 pH 7에서는 열안정성이 없으나 pH 2에서는 안정성이 있고 trypsin에 대한 저항성이 있다(Javis & Mahoney, 1969). 버섯 유래 39번 균주는 pH 7에서 열

안정성이 있었기 때문에 이상의 결과로부터 버섯유래 30, 36번 균주와 피망 유래 19번 균주가 nisin을 생산하는 균주로 확인되었다.

박테리옌 유사활성을 지니는 24 균주들의 다양성을 조사하고 분류하기 위하여 이들 균주의 염색체 DNA와 유산균 분류용 random primer인 primer 239를 이용하여 RAPD-PCR을 실시한 후 전기영동을 수행한 결과를 Fig. 1에 나타내었다. 포도 유래 13번 균주와 15번 균주는 RAPD-PCR 패턴이 동일한 것으로 확인되었고, 피망 유래 31번과 38번 균주, 피망 유래 21번과 41번 균주, 버섯 유래 30번과 36번 균주, 버섯 유래 2번 균주와 39번 균주, 버섯 유래 1번 균주와 28번 균주, 피망 유래 19번과 39번 균주도 각각 동일한 패턴을 나타내어 분류학적으로 유사성이 매우 높음을 확인하였다. 전체적인 패턴을 분석할 경우 동일한 과채류로부터 분리된 균주들은 RAPD-PCR 상에서 유사성이 상당히 높은 것으로 확인되어 특정 과채류 내에 존재하는 박테리옌 유사활성을 지니는 유산균들은 분류학적으로 유사성이 매우 높은 것을 알 수 있었다.

반면에 다른 종류의 과채류에 존재하는 유산균들은 RAPD-PCR 패턴이 상이하게 나타나 과채류의 종류에 따

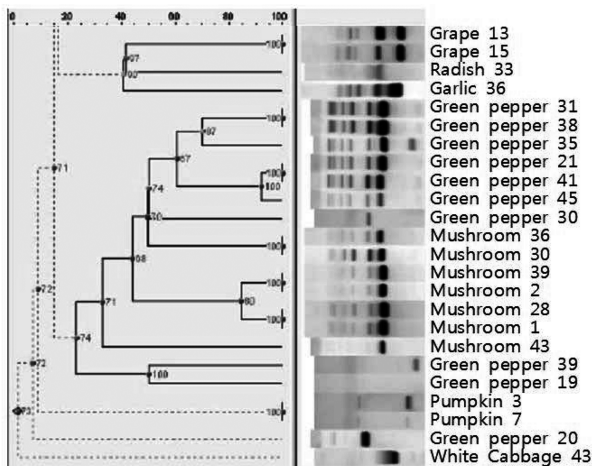


Fig. 1. RAPD-PCR profile of isolates which showed bacteriocin-like activity.

라 각각의 특징적인 유산균 군총을 이루고 있음을 알 수 있었다(Fig. 1). Kelly et al.(1996)은 즉석편의식품에서 유산균을 분리하여 박테리옌 생산여부를 확인한 결과 41종류의 식품시료 중에서 34%인 14 시료에서 박테리옌 생산 유산균을 확인하여 본 연구 결과와 유사하였다. Garver & Muriana (1993)의 연구에서도 *Lactobacillus delbruekii*와 *Pediococcus*를 검정균으로 사용하였을 경우 148종의 식품시료 중 18%에서 박테리옌 생산 유산균을 확인한 바 있다. 식품시료 중에 존재하는 박테리옌 생산균주의 분포도는 사용한 검정균의 종류와 수에 따라 어느 정도의 차이가 있을 것으로 판단되나 본 연구결과와 다른 연구자들의 연구결과로 볼 때 과채류와 같은 신선식품에는 박테리옌 생산 유산균이 일정 수준 이상으로 분포하고 있어 식품의 안전한 섭취에 기여한다고 볼 수 있다.

Uhlman et al.(1992)은 과일류로부터 유산균을 분리하여 동정할 결과 nisin 유사 활성을 지니는 *Lactococcus lactis* 임을 확인한 바 있다. Holzapfel et al.(1995)은 *Listeria monocytogenes*의 오염을 방지하기 위하여 즉석 샐러드에 유산균을 첨가하기도 하였다. 또한 Garver & Muriana(1993)는 다양한 종류의 식품으로부터 유산균을 분리하여 19주의 박테리옌 생산균주를 분리하였으며, 이 중에서 같은 소고기로부터 분리한 *Lactobacillus curvatus*로부터 curvaticin FS47이라는 새로운 박테리옌을 발견한 바 있다(Garver & Muriana, 1994). 한편 Vaughan et al.(1994)은 유가공식품, 육류 및 식물유래 식품으로부터 항균활성을 지니는 유산균을 분리하였는데 박테리옌을 생산하는 유산균은 확인하지 못하였다.

본 연구의 목적은 신선 과채류에 박테리옌 유사활성을 지니고 있는 유산균이 어느 정도 분포되어 있는지 조사하기 위함이었으며 본 연구결과로부터 모든 과채류에는 유산

균이 존재하며 박테리옌 유사활성을 지니고 있는 유산균은 약 3% 정도의 분포로 상재하고 있음을 확인하였다.

요 약

25 종류의 신선 과채류로부터 MRS 한천 고체배지에서 생육하는 1,250주의 유산균을 분리한 후 식중독 세균인 *Escherichia coli* 0157:H7, *Listeria monocytogenes*, *Bacillus cereus*와 유산균인 *Lactobacillus plantarum*, *L. casei*, *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*에 대한 생육저해활성을 조사하였다. 조사한 1,250 균주 중에서 23 종류의 과채류에 존재하는 607 균주(총 조사균주의 49%)가 *E. coli* 0157:H7, *L. monocytogenes* 또는 *B. cereus*에 대한 항균활성을 나타내었다. 이 균주들의 *L. plantarum*, *L. casei*, *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*에 대한 항균활성을 측정할 결과, 7 종류의 과채류에 존재하는 24 균주(총 균주의 3%)가 박테리옌 유사활성을 나타내었으며, 이 균주들의 생리적 형태학적 특징을 조사한 결과 전형적인 유산균의 특징을 지니고 있었다. 24 균주 중에서 3 균주는 nisin을 생산하는 것으로 판단되었으며, RAPD-PCR 분석을 통하여 동일한 과채류에 존재하는 균주들은 유사한 분류학적 특징을 지니고 있는 것으로 확인되었다.

감사의 글

본 연구는 농림부 농림기술개발사업의 지원에 의해 이루어진 것임

참고문헌

- Garriga M, Hugas M, Aymerich T, Monfort JM. 1993. Bacteriocinogenic activity of lactobacilli from fermented sausages. J. Appl. Bacteriol. 75: 142-148.
- Garver KI, Muriana PM. 1993. Detection, identification and characterization of bacteriocin-producing lactic acid bacteria from retail food products. Int. J. Food Microbiol. 19: 241-258.
- Garver KI, Muriana PM. 1994. Purification and partial amino acid sequence of curvaticin FS47, a heat-stable bacteriocin produced by *Lactobacillus curvatus* FS47. Appl. Environ. Microbiol. 60: 2191-2195.
- Hanlin JH, Evancho GM. 1994. The beneficial role of microorganisms in the safety and stability of refrigerated foods. In: Chilled Foods: A Comprehensive Guide. Dennis C and Stringer M (eds). Ellis Horwood, New York, pp. 229-259.
- Holzapfel WH, Geisen R, Schillinger U. 1995. Biological preservation of foods with reference to protective cultures, bacteriocins and food-grade enzymes. Int. J. Food Microbiol. 24: 343-362.
- Javis B, Mahoney RR. 1969. Inactivation of nisin by alpha-chymotrypsin. J. Dairy Sci. 52: 1448-1450.

- Kelly WJ, Asmundson RV, Huang CM. 1996. Isolation and characterization of bacteriocin-producing lactic acid bacteria from ready-to-eat food products. *Intl. J. Food Microbiol.* 33: 209-218.
- Klaenhammer TR. 1993. Genetics of bacteriocins produced by lactic acid bacteria. *FEMS Microbiol. Rev.* 12: 39-86.
- Ohlsson T. 1994. Minimal processing-preservation methods of the future: an overview. *Trends Food Sci. Technol.* 5: 341-344.
- Uhlman L, Schillinger U, Rupnow JR, Holzapfel WH. 1992. Identification and characterization of two bacteriocin-producing strains of *Lactococcus lactis* isolated from vegetables. *Int. J. Food Microbiol.* 16: 141-151.
- Vaughan EE, Caplice E, Looney R, O'Rourke N, Coveney H, Daly C, Fitzgerald GF. 1994. Isolation from food sources, of lactic acid bacteria that produced antimicrobials. *J. Appl. Bacteriol.* 76: 118- 123.