pISSN 1229-1153 / eISSN 2465-9223 *J. Food Hyg. Saf.*
Vol. 37, No. 2, pp. 97~106 (2022)
https://doi.org/10.13103/JFHS.2022.37.2.97

Journal of Food Hygiene and Safety
Available online at http://www.foodhygiene.or.kr

김치에서 분리한 *Lactococcus lactis* 균주의 항리스테리아 활성 및 부분 정제된 박테리오신의 특성

손나연[1] · 김태운[2] · 육현균[1]*
[1]한국교통대학교, [2]세계김치연구소

Anti-listeria Activity of *Lactococcus lactis* Strains Isolated from Kimchi and Characteristics of Partially Purified Bacteriocins

Na-Yeon Son[1], Tae-Woon Kim[2], Hyun-Gyun Yuk[1]*
[1]*Department of Food Science and Technology, Korea National University of Transportation, Jeungpyeong, Korea*
[2]*Technology Innovation Research Division, World Institute of Kimchi, Gwangju, Korea*

(Received January 11, 2022/Revised February 14, 2022/Accepted March 4, 2022)

ABSTRACT - *Listeria monocytogenes* (*L. monocytogenes*) is one of gram-positive foodborne pathogens with a very high fatality rate. Unlike most foodborne pathogens, *L. monocytogenes* is capable of growing at low temperatures, such as in refrigerated foods. Thus, various physical and chemical prevention methods are used in the manufacturing, processing and distribution of food. However, there are limitations to the methods such as possible changes to the food quality and the consumer awareness of synthetic preservatives. Thus, the aim of this study was to evaluate the anti-listeria activity of lactic acid bacteria (LAB) isolated from kimchi and characterize the bacteriocin produced by *Lactococcus lactis* which is one of isolated strains from kimchi. The analysis on the anti-listeria activity of a total of 36 species (*Lactobacillus*, *Weissella*, *Lactobacillus*, and *Lactococcus*) isolated from kimchi by the agar overlay method revealed that *L. lactis* NJ 1-10 and NJ 1-16 had the highest anti-listeria activity. For quantitatively analysis on the anti-listeria activity, NJ 1-10 and NJ 1-16 were co-cultured with L. monocytogenes in Brain Heat Infusion (BHI) broth, respectively. As a result, *L. monocytogenes* was reduced by 3.0 log CFU/mL in 20 h, lowering the number of bacteria to below the detection limit. Both LAB strains showed anti-listeria activity against 24 serotypes of *L. monocytogenes*, although the sizes of clear zone was slightly different. No clear zone was observed when the supernatants of both LAB cultures were treated with proteinase-K, indicating that their anti-listerial activities might be due to the production of bacteriocins. Heat stability of the partially purified bacteriocins of NJ 1-10 and NJ 1-16 was relatively stable at 60°C and 80°C. Yet, their anti-listeria activities were completely lost by 60 min of treatment at 100°C and 15 min of treatment at 121°C. The analysis on the pH stability showed that their anti-listeria activities were the most stable at pH 4.01, and decreased with the increasing pH value, yet, was not completely lost. Partially purified bacteriocins showed relatively stable anti-listeria activities in acetone, ethanol, and methanol, but their activities were reduced after chloroform treatment, yet was not completely lost. Conclusively, this study revealed that the bacteriocins produced by NJ 1-10 and NJ 1-16 effectively reduced *L. monocytogenes*, and that they were relatively stable against heat, pH, and organic solvents, therefore implying their potential as a natural antibacterial substance for controlling *L. monocytogenes* in food.

Key words: Biopreservation, *Lactococcus lactis*, Anti-listeria activity, *Listeria monocytogenes,* Bacteriocin

*Correspondence to: Hyun-Gyun Yuk, Department of Food Science and Technology, Korea National University of Transportation, Jeungpyeong 27909, Korea
Tel: +82-43-820-5244, Fax: +82-43-820-5240
E-mail: yukhg@ut.ac.kr

Copyright © The Korean Society of Food Hygiene and Safety. All rights reserved. The Journal of Food Hygiene and Safety is an Open-Access journal distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial License(http://creativecommons.org/licenses/by-nc/3.0) which permits unrestricted non-commercial use, distribution,and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

*Listeria monocytogenes*는 그람양성의 대표적인 식중독균 중 하나로 치명률이 대단히 높은 편이며 대부분의 식중독균과 달리 저온에서도 생육 할 수 있어, 냉장 보관된 식품에서도 식중독 사고를 일으킬 수 있다[1]. *L. monocytogenes*에 의해 발생하는 식품매개질환인 리스테리아증(listeriosis)은 특히 임산부, 신생아 및 노인 등과 같이 면역력이 저하된 사람들에게 쉽게 발병되며, 임산부의 경우 중증일 때 유산, 사산 등을 유발할 수 있다[2]. *L. monocytogenes*는 매우 다양한 식품에 오염될 수 있는데, 원재료인 축산물에 존재하기도 하고, 별다른 조리 없이 즉시 섭취할 수 있는 ready-to-eat (RTE) 식품의 가공과정 도중에 오염되어 유통되기도 한다[3]. 최근에는 마트에서 판매하는 훈제연어제품과 미국으로 수출한 국내산 팽이버섯에서 *L. monocytogenes*가 검출되어 즉석섭취식품과 농산물을 통한 리스테리아증 발생에 대한 우려 또한 높아졌다[4]. 이러한 식중독균의 증식을 억제하여 식품의 안전성을 확보하는 방안으로 식품 보존제가 많이 사용되고 있다. 하지만, 산업적으로 사용되는 대부분의 보존제는 화학적인 공정에 의해 합성된 제품으로 과도하게 사용할 경우, 발암 및 돌연변이 유발과 같은 문제점이 발생할 가능성이 있는 것으로 알려지면서 최근 합성보존제에 대한 안전성 문제가 심각하게 인식되고 있다[5]. 따라서 식품 보존제를 남용함으로 인해 발생할 수 있는 부작용 및 잔류성 문제를 해결하고, 이와 동시에 유해 미생물의 증식으로 인해 발생할 수 있는 식중독의 발병을 감소시킬 수 있는 천연보존제가 필요한 실정이다[6].

Lactic acid bacteria (LAB)는 자연계에 광범위하게 분포하며, 전통적으로 다양한 발효식품에 이용되어 왔고, 일반적으로 안전하다고 인식되는 미생물(GRAS, generally recognized as safe)로서 특히, 박테리오신을 생산하여 항균능력이 뛰어난 특성을 가지고 있다[7,8]. 박테리오신은 양전하를 띄는 물질로서, 음전하를 띄는 인지질 이중층으로 구성된 세포막을 파괴하여 그 활성을 나타내는 천연 항균단백질이며 박테리오신을 생산하는 미생물과 형태 및 계통학적으로 유사한 균종에 대하여 항균작용을 가지고 있다[5,9]. 또한 사람의 소화기관에 존재하는 단백질 가수분해효소에 의하여 분해, 흡수되어 인체에 무독하고 잔류성이 없어 안전할 뿐만 아니라, 식품 산업에 있어서 최소의 열처리와 저온 유통으로 식품의 안전성을 확보할 수 있는 천연보존제로 인식되고 있다[10]. 가장 잘 알려진 박테리오신은 *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*에서 생산되는 nisin이며, 미국의 FDA (Food and Drug Administration)에서도 GRAS 품목으로 인정하여 유제품을 포함한 다양한 식품의 천연보존제로서 활용되고 있고[5,11], 국내에서는 nisin의 첨가가 가공치즈에만 250 mg/kg 이하의 농도로 허용되고 있다[12]. 아직까지도 다양한 미생물에 항균활성을 나타내는 박테리오신을 생산하는 균주를 탐색하고 박테리오신 생산성과 물리화학적 특성을 증진시키기 위한 기초연구가 활발하게 진행되고 있다[13]. Lee 등[14]은 김치로부터 분리한 *Lactobacillus paraplantarum* C7가 생산하는 박테리오신을 분석한 결과 *Enterococcus faecalis*에 대하여 항균활성을 나타내는 type Ⅱ의 신규 박테리오신인 paraplantaricin C7을 보고하였으며, Han 등[15]에서는 *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* KC24 균주가 생산하는 *L. monocytogenes*에 대하여 높은 항균활성을 나타내는 박테리오신인 bacteriocin KC24을 보고하였다.

따라서 본 연구에서는 기존의 합성보존제를 대체할 수 있는 생물학적 보존제의 개발을 위한 목적으로 우리나라 전통발효식품인 김치로부터 분리한 *L. lactis* 균주의 항리스테리아활성을 평가하고, 항균물질의 특성을 규명하고자 하였다.

Materials and Methods

사용균주 및 배양

본 연구에서 사용된 총 36종(*Lactobacillus brevis*; 12균주, *Weissella confuse*; 8균주, *Lactobacillus plantarum*; 14균주, *Lactococcus lactis*; 2균주)의 LAB은 김치로부터 분리되었으며, 세계김치연구소 김치미생물자원은행(Korean Collection for Kimchi Microorganisms, KCKM) (Gwangju, Korea)에서 분양 받아 본 연구에 사용되었다. *L. monocytogenes*는 총 24종(serotype 1/2a; 6균주, 1/2b; 7균주, 3a; 3균주, 4b; 8균주)이 사용되었으며, 항리스테리아 활성에 대한 시험균주로는 *L. monocytogenes* BAA-679 (serotype 1/2a)를 사용하였다. *L. monocytogenes* BAA-679는 미국균주은행(American type culture collection, ATCC, Manassas, VA, USA)에서 구입하였으며, 그 외 균주는 모두 훈제연어에서 분리된 균을 사용하였다[16]. 동결 보관된 LAB과 *L. monocytogenes*균주를 각각 Lactobacilli MRS Broth (MRS; Difco, Sparks, MD, USA) 및 Tryptic Soy Broth (TSB; Difco)에서 37℃에서 24-48시간 동안 배양하여 활성화 시킨 뒤 같은 조건에서 최소 2번 이상 계대배양 한 후 각 실험에 사용하였다.

LAB의 항리스테리아 활성 스크리닝

LAB 36종의 항리스테리아 활성 여부를 Turner 등[17]에 따라 agar overlay 방법을 사용하여 스크리닝하였다. Soft GM17 agar [0.7% agar; 5% glucose를 보충한 M17배지 (Difco)] 10 mL에 *L. monocytogenes*를 10 μL (약 10^5 CFU/mL) 혼합한 다음 15 mL의 Brain Heart Infusion (BHI) agar (1.4% agar) (KisanBio, Seoul, Korea)를 중층 하였다. 약 30분간 실온에서 배지를 굳힌 후 고체배지 표면에 각 LAB 균주 100 μL를 spot하여 접종한 다음 37°C에서 24시간 동안 배양하여 생성된 생육 저해환(clear zone)의 직경(mm)을 측정하여 가장 효과적인 항리스테리아 활성을 나타내는 LAB 균주를 선별하였다.

BHI에서의 정량적 분석

선별된 LAB 균주에 대한 항리스테리아 활성을 정량적으로 분석하기 위해 Iulietto 등[18]의 방법으로 BHI broth에서 배양하여 각 LAB 균주와 *L. monocytogenes*의 생육을 관찰하였다. LAB 균주를 MRS broth에서 37°C에서 24시간, *L. monocytogenes*를 TSB에서 37°C에서 48시간 배양한 후 각각 초기균수가 10^6 CFU/mL과 10^4 CFU/mL이 되도록 배양액 100 μL를 9 mL의 BHI broth에 다음과 같이 각각 접종했다: (i) LAB, (ii) LAB + *L. monocytogenes*, (iii) *L. monocytogenes*균 접종 후 37°C에서 24시간 동안 배양했으며, 일정한 시간 동안 배양액을 phosphate buffered saline (PBS, Biosesang, Seongnam, Korea)로 10배수 계열 희석법을 이용하여 적절히 희석시킨 후 100 μL를 취하여 유산균은 MRS agar (Difco)에, *L. monocytogenes*는 PALCAM (Oxoid, Basingstoke, UK) 배지에 도말하여 37°C에서 24시간 동안 각각 배양한 후 균수를 계수하였다.

항균 스펙트럼 조사

*L. monocytogenes*는 총 13개의 혈청형이 있으며, 특히 혈청형 3종(serotype 1/2a, 1/2b, 4b)은 주요한 식중독균으로 알려져 있어 공중보건학적으로 문제가 되고 있다[19,20]. 따라서 각 혈청형 별로 3-8균주 총 24균주의 *L. monocytogenes*를 대상으로 상기에 기술한 agar overlay방법을 이용하여 선별된 LAB균주의 항균활성 범위를 조사하였다.

박테리오신의 부분정제

선별된 LAB균주로부터 생산된 박테리오신을 부분정제하기 위해 Americh 등[21]에 제시된 황산암모늄 침전법을 이용하였다. 각 LAB균주를 MRS broth에서 약 24시간 배양한 다음 원심분리(2,947 ×g, 10 min, 4°C) (Micro 17TR, HANIL Science Co., Ltd., Daejeon, Korea) 및 membrane filter (0.20 μm pore size, HYUNDAI MICRO, Seoul, Korea)로 제균하여 cell-free supernatant (CFS)를 회수하였다. 얻어진 CFS에 황산암모늄(DUKSAN, Ansan, Korea) 0.4 g/mL를 서서히 녹여 포화시킨 후, 0°C에서 45분 동안 염석하여 원심분리(9,809 ×g, 30 min, 4°C)하였다. 침전물을 회수하여 Buffer solution (pH 7.0, DAEJUNG, Siheung, Korea)으로 용해시키고 80°C에서 10분간 열처리하였다.

박테리오신 검출 및 활성 확인

박테리오신의 항균활성은 well-diffusion assay를 사용하여 확인하였다. Well-diffusion assay는 Turner 등[17]의 agar overlay 방법을 변형하여 soft GM17 agar에 *L. monocytogenes*를 약 10^5 CFU/mL 혼합하여 BHI agar (1.4% agar)위에 중층 하여 완전히 굳힌 후, 멸균된 tip을 이용하여 직경 6 mm의 well을 만들고 선별된 LAB균주의 CFS 100 μL를 well 내부에 주입하였다. 그런 다음, 배지를 37°C에서 약 24시간 배양하여 well 주위에 나타나는 생육 저해환의 생성 여부를 확인하였다. 저해환을 생성하는 각 LAB균주의 항리스테리아 활성 메커니즘을 확인하기 위해 부분 정제된 박테리오신에 proteinase-K (20 mg/mL, QIAGEN, Hilden, Germany)를 처리하였다. Buffer solution (pH 7.0)으로 최종 농도 4 mg/mL로 맞춘 proteinase-K를 부분 정제된 박테리오신 용액과 1:1의 비율로 혼합하여 45°C에서 12시간 반응시킨 다음[22], 100°C에서 5분간 가열하여 효소를 불활성화 시켰다[23]. 효소처리 및 처리하지 않은 박테리오신 용액을 well-diffusion assay를 통해 항리스테리아 활성을 조사하여 항균활성 물질의 유기산 또는 단백질성 여부를 확인하였다.

박테리오신 안정성 조사

박테리오신 안정성 조사는 Jung 등[10] 및 Moon 등[23]의 방법에 따라 선별된 LAB균주가 생산하는 박테리오신의 특성을 파악하기 위해서 부분 정제된 박테리오신에 다양한 조건의 열, 유기용매, pH를 처리하여 well-diffusion assay을 통해 안정성을 측정하였다.

1) 열 안정성

박테리오신의 열에 대한 안정성을 조사하기 위하여 부분 정제된 박테리오신 용액을 60°C, 80°C, 100°C에서 각각 15분, 30분, 60분 그리고 121°C에서 15분 동안 처리한 후 잔존하는 항리스테리아 활성을 측정하였다.

2) pH 안정성

다양한 pH에서의 박테리오신 안정성을 조사하기 위하여 pH 4.01, pH 7.0, pH 10.01의 완충용액(DAEJUNG)과 부분 정제된 박테리오신 용액을 1:1의 비율로 혼합하여 상온(25°C)에서 24시간 방치한 후 잔존하는 박테리오신의 항리스테리아 활성을 측정하였다.

3) 유기용매 안정성

유기용매 처리가 박테리오신 활성에 미치는 영향을 조사하기 위하여 부분 정제된 박테리오신 용액과 유기용매를 1:1의 비율로 혼합한 후, 용매의 최종 농도를 50%(v/v) 맞추고 37°C에서 2시간 동안 반응시킨 다음 잔존하는 박테리오신의 항리스테리아 활성을 측정하였다. 이때 사용한 유기용매의 종류는 ethanol, methanol, chloroform, acetone (SAMCHUN, Pyeongtaek, Korea)이며, membrane filter (0.20 μm)로 여과 멸균하여 사용하였다.

통계분석

각 데이터는 실험을 독립적으로 3회 반복 실시하여 얻어진 측정값으로 평균 ± 표준편차로 나타내었고, SPSS Statistics software v.25.0 (IBM Co., Armonk, NY, USA)을

이용하여 통계분석을 실시하였다. 시료 평균값간의 통계적 유의성은 분산분석(ANOVA)으로 분석하였고, 또한 $P<0.05$ 수준에서 Duncan's Multiple Range Test를 이용하여 사후 검증하였다.

Results and Discussion

LAB의 항리스테리아 활성 스크리닝

김치로부터 분리한 총 36종(*Lactobacillus*속, *Weissella*속, *Lactobacillus*속, *Lactococcus*속)의 LAB균주를 대상으로 agar overlay 방법을 이용하여 *L. monocytogenes*에 대한 항균력을 검토한 결과, 총 36종 중 30종에서는 항리스테리아 활성이 전혀 나타나지 않았으며 6균주(*W. confuse* KCKM 0189, *W. confuse* KCKM 0333, *W. confuse* KCKM 0336, *W. confuse* KCKM 0448, *L. lactis* NJ 1-10, *L. lactis* NJ 1-16)에서는 항리스테리아 활성이 나타났다(data not shown). 그 중에서도 *L. lactis* NJ 1-10과 *L. lactis* NJ 1-16의 항리스테리아 활성이 가장 우수하게 나타났다. 따라서 *L. monocytogenes*에 대하여 강한 항리스테리아 활성을 보인 *L. lactis* NJ 1-10, *L. lactis* NJ 1-16을 선정하여 본 연구에 사용하였다.

BHI에서의 정량적 분석

L. lactis NJ 1-10과 NJ 1-16에 의한 *L. monocytogenes* 생육 감소 효과를 분석한 결과는 Fig. 1과 같다. 본 연구에 사용된 NJ 1-10과 NJ 1-16(10^6 CFU/mL) 및 *L. monocytogenes* (10^4 CFU/mL)를 BHI broth에서 단독 배양 시 24시간 동안 약 8.0–9.0 log CFU/mL까지 생육하였다. 이와 달리 공동 배양한 결과, NJ 1-10은 단독 배양과 마찬가지로 24시간 동안 약 9.0 log CFU/mL까지 생육한 반면, *L. monocytogenes*의 균수는 배양 4시간 이후부터 점차 감소하더니 20시간 이후부터는 검출한계(1.0 log CFU/mL) 이하까지 감소하여 초기균수와 비교했을 때 약 3.0 log CFU/mL만큼 감소하였다(Fig. 1A). NJ 1-16의 경우도 NJ 1-10과 유사하게 공동 배양 시 24시간 동안 9.0 log CFU/mL 까지 생육하였으나, *L. monocytogenes* 균수는 점차 감소하여 20시간 이후부터는 검출한계 이하까지 감소하였다(Fig. 1B). Silvina 등[24]의 연구에 따르면, 초기균수가 각각 10^6 CFU/mL과 10^4 CFU/mL인 *Leuconostoc citreum*와 *L. monocytogenes*를 skim milk배지에서 공동 배양한 결과, 50시간까지 *L. monocytogenes*의 생육을 억제하지 않았다고 보고하였고, lulietto 등[18]은 *Lactococcus* : *Lactobacillus* : *Enterococcus faecium* UBEF-41를 2:1:1 비율로 혼합한 균주와 *L. monocytogenes*를 BHI broth에서 30°C에서 공동 배양했을 때, 120시간 만에 *L. monocytogenes*가 1.3 log CFU/mL까지 감소했다고 보고하여 본 실험과 많은 차이가 있었는데 이는 LAB균주 별로 생산하는 박테리오신의 종류가 달라 항리스테리아 활성 및 항균스펙트럼의 범위가 다르기 때문으로 여겨진다[23]. 따라서 BHI broth에서 20시간 만에 *L. monocytogenes*를 검출한계 이하까지 감소시킨 NJ 1-10과 NJ 1-16의 항리스테리아 활성은 비교적 효과적임을 알 수 있다.

항균 스펙트럼 조사

NJ 1-10과 NJ 1-16균주가 다양한 혈청형의 *L. monocytogenes*에 대한 항균효과가 있는지를 검증하기 위해 총 24종(serotype 1/2a, 1/2b, 3a, 4b)의 *L. monocytogenes* 균주를 이용하여 두 LAB균주의 항리스테리아 활성을 확인한 결과, Table 1에서 보는 바와 같이 항균활성의 정도는 다르지만, NJ 1-10과 NJ 1-16 모두 24종의 *L. monocytogenes*에 대해서 항균활성을 나타냈으며, *L. monocytogenes* 균주 중에서도 *L. monocytogenes* 혈청형 4b에 대해 NJ 1-10과 NJ 1-16 모두 가장 강력한 항균활성을 나타내었다. 또한 *L. monocytogenes* 3a SSA184균주를 제외하고 대체적으로 혈청형 1/2a 균주에 대한 NJ 1-10과 NJ 1-16의 항균활성은 낮은 것으로 평가되었다. 이러한 결과는 *L. monocytogenes*

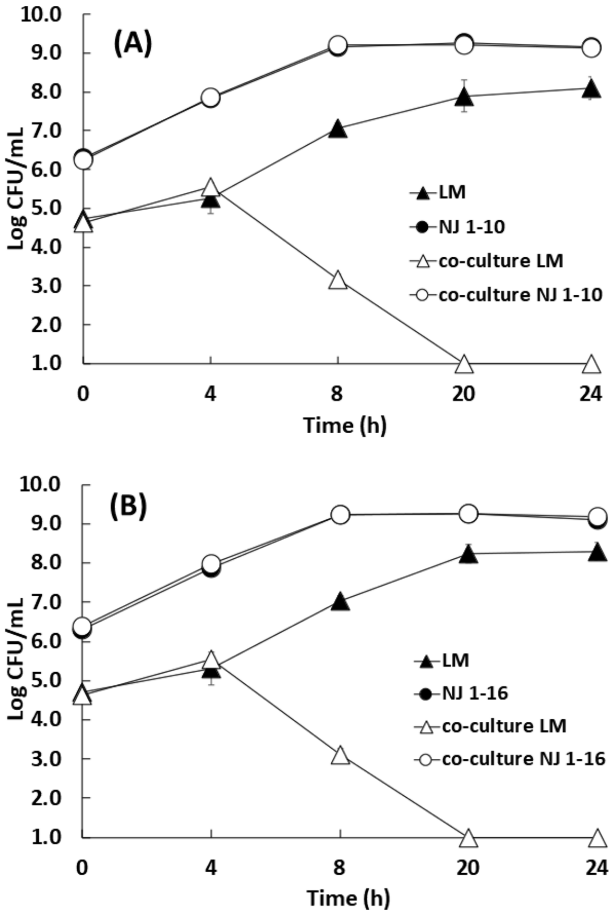


Fig. 1. Anti-listeria activity of *Lactococcus lactis* NJ 1-10(A) and NJ 1-16(B) in Brain Heart Infusion broth at 37°C for 24 h.

Table 1. Evaluation of anti-listeria spectrum of *Lactococcus lactis* NJ 1-10 and NJ 1-16 by agar overlay method

Serotype	Zones of growth inhibition in mm[1)]	
	NJ 1-10	NJ 1-16
Listeria monocytogenes 4b LM10	8.4±0.5^{a}	7.7±0.1^{a}
Listeria monocytogenes 4b LM12	8.1±0.2^{ab}	8.0±0.2^{a}
Listeria monocytogenes 4b LM52	7.5±0.4^{ab}	7.4±0.4^{a}
Listeria monocytogenes 4b LM2	7.8±0.4^{ab}	7.8±0.1^{a}
Listeria monocytogenes 4b LM3	8.1±0.1^{ab}	7.9±0.2^{a}
Listeria monocytogenes 4b LM24	8.1±0.2^{ab}	8.3±0.4^{a}
Listeria monocytogenes 4b 13932	4.6±0.8^{cdef}	5.0±0.7^{bc}
Listeria monocytogenes 4b LM5	4.0±0.3^{ab}	3.7±0.2^{a}
Listeria monocytogenes 1/2a SSA81	3.3±0.4^{efgh}	3.8±0.9^{def}
Listeria monocytogenes 1/2a SSA83	3.6±0.4^{h}	3.4±0.5^{def}
Listeria monocytogenes 1/2a SSA151	3.7±0.9^{h}	3.3±0.2^{ef}
Listeria monocytogenes 1/2a LM29	3.4±0.6^{fgh}	3.2±0.6^{f}
Listeria monocytogenes 1/2a LM35	3.9±0.5^{h}	4.1±0.6^{f}
Listeria monocytogenes 1/2a BAA-679	4.6±0.1^{fgh}	4.7±0.5^{cdef}
Listeria monocytogenes 1/2b LM13	5.2±0.3^{cdef}	4.6±0.6^{bcd}
Listeria monocytogenes 1/2b SSA156ae	7.4±0.6^{c}	7.4±0.3^{bcd}
Listeria monocytogenes 1/2b LM4	4.2±0.2^{b}	4.3±0.3^{a}
Listeria monocytogenes 1/2b LM7	5.1±0.2^{defgh}	4.6±0.3^{bcde}
Listeria monocytogenes 1/2b LM18	4.9±0.2^{cd}	5.2±0.3^{bcd}
Listeria monocytogenes 1/2b LM21	4.2±0.1^{cde}	4.3±0.2^{b}
Listeria monocytogenes 1/2b BAA-839	3.6±0.3^{defgh}	3.8±0.1^{bcde}
Listeria monocytogenes 3a LM8	4.6±0.1^{gh}	4.1±0.2^{def}
Listeria monocytogenes 3a LM44	4.1±0.1^{cdefg}	3.2±0.9^{cdef}
Listeria monocytogenes 3a SSA184	2.7±0.6^{efgh}	2.7±0.6^{f}

[1)]Different letters (a-h) within the same column for each strain indicate significant difference (n=6; P<0.05).

혈청형 4b 분리주가 혈청형 1/2a 분리주보다 박테리오신(Lb 265, Lb 706)에 더 민감한 경향이 있다고 보고한 Buncic 등[25)]의 연구와 유사하였다. 반면, Henderson 등[26)]은 nisin을 처리했을 때, *L. monocytogenes* 혈청형 4b 균주가 혈청형 1/2a 균주에 비해 더 낮은 감수성을 보였다고 보고하여 본 연구결과와 차이가 있었는데, 이는 박테리오신에 대한 *L. monocytogenes* 분리주의 반응은 혈청형 내에서 다양하며, 박테리오신 감도에 대한 균주 다양성이 존재하기 때문일 것으로 사료된다[27)].

박테리오신의 검출 및 활성 확인

LAB의 항균력은 주로 배양 중에 생성되는 유기산에 의한 것이나, 이 외에도 박테리오신, 과산화수소, diacetyl 등에 의한 것으로 알려져 있다[28)]. 따라서 본 연구에서는 NJ 1-10과 NJ 1-16의 항리스테리아 활성을 나타내는 항균물질을 명확하게 규명하기 위해 부분 정제된 박테리오신을 pH 7.0으로 조절하고 proteinase-K를 처리하여 *L. monocytogenes*의 생육저해를 well-diffusion assay를 이용하여 확인하였다(Fig. 2). 그 결과, pH 7.0의 proteinase-K 처리구에서는 항리스테리아 활성이 전혀 관찰되지 않았는데, 이는 NJ 1-10과 NJ 1-16에 의해 생성되는 항균물질이 단백질이나 peptide분자로 이루어져 단백질분해효소인 proteinase-K에 의해 분해되는 박테리오신인 것으로 추정되며[29)], 또한 저해환이 전혀 나타나지 않는 것으로 보아 과산화수소나 다른 항균물질은 존재하지 않는 것으로 판단된다. 반면, 아무것도 처리하지 않은 CFS (대조군)에 비해 pH만 조절한 실험군(pH 7.0)의 저해환 크기가 더 작은 것이 확인되어 젖산과 같은 유기산의 생성이 어느 정도 항리스테리아 활성에 영향을 미치는 것으로 생각된다.

Jung 등[30)]의 연구에서는 7종류(*L. monocytogenes, E. faecalis, Staphylococcus aureus, Escherichia coli, Salmonella* Typhimurium, *S.* Enteritidis, *Yersinia enterocolitica*)의 지표균

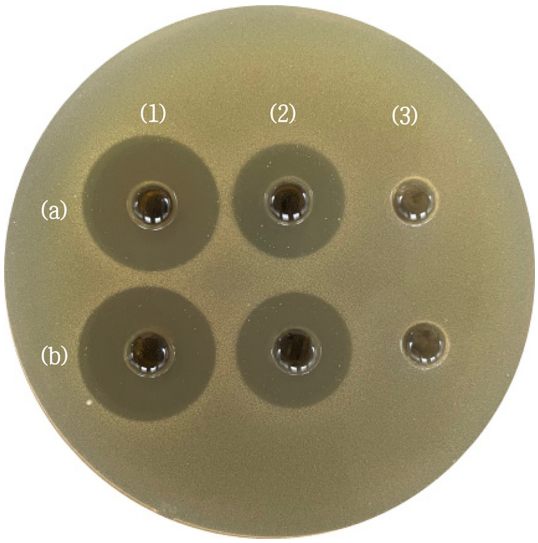


Fig. 2. Changes in anti-listeria activity of partially purified bacteriocins from *Lactococcus lactis* NJ 1-10(a) and NJ 1-16(b) after pH adjustment and proteinase K treatment. (1) cell free supernatant (CFS), (2) partially purified bacteriocin at pH 7.0, (3) partially purified bacteriocin treated with proteinase-K at pH 7.0.

주에 대한 시판 생막걸리에서 분리한 LAB (*Lactobacillus casei, L. plantarum, L. brevis, Pediococcus pentosaceus)*의 항균활성은 발효 중 젖산의 생성에 의한 pH의 저하 때문인 것으로 보고한 반면에, Moon 등[23]은 *E. faecium* CJNU2008은 *L. monocytogenes*에 대한 항균활성이 있으며, protease처리 후에는 항균활성이 완전히 소실되는 것을 확인하여 *E. faecium* CJNU2008 균주가 생산하는 항균물질이 단백질성의 박테리오신임을 증명하였다. 따라서 본 연구에서도 NJ 1-10과 NJ 1-16의 항리스테리 활성은 주로 박테리오신에 의한 것으로 여겨진다.

박테리오신 안정성 조사

본 연구에서는 또한 NJ 1-10과 NJ 1-16 균주가 생산하는 박테리오신이 열, pH, 및 유기용매 등 다양한 환경에서 어느 정도 안정성이 있는지 검토하였다.

1) 열 안정성

Table 2는 열처리에 따른 부분 정제된 박테리오신의 안정성을 평가한 결과로, NJ 1-10과 NJ 1-16의 박테리오신

Table 2. Stability of the partially purified bacteriocin produced from *Lactococcus lactis* NJ 1-10 and NJ 1-16 after heat treatments

Strain	Treatment	Time (min)	Residual activity (mm)[1)]
NJ 1-10	Control		8.6±0.4[a]
	60°C	15	8.5±1.2[a]
		30	8.7±1.1[a]
		60	8.4±0.6[a]
	80°C	15	7.7±0.2[a]
		30	6.9±0.7[ab]
		60	5.0±1.8[bc]
	100°C	15	4.9±0.7[bc]
		30	2.8±1.3[c]
		60	-[2)]
	121°C	15	-
NJ 1-16	Control		8.5±0.4[a]
	60°C	15	8.3±1.4[a]
		30	8.4±1.6[a]
		60	8.6±1.2[a]
	80°C	15	7.9±0.7[a]
		30	7.0±0.0[ab]
		60	5.1±1.8[bc]
	100°C	15	4.8±0.6[bc]
		30	2.7±1.2[c]
		60	-
	121°C	15	-

[1)]Different letters (a-c) for each strain indicate significant difference (n=6; $P<0.05$).
[2)] '-' indicates that no clear zone was observed.

모두 비열처리군과 비교하여 볼 때 60°C 및 80°C에서 30분간 열처리 시까지 항리스테리아 활성이 비교적 안정하게 유지되었으나, 80°C에서 60분, 100°C에서 15분과 30분간 처리 시 그 활성이 점차 감소하다가 100°C에서 60분과 121°C에서 15분 처리 시 항리스테리아 활성이 완전히 소실되어 고온 및 멸균살균 보다 저온살균으로 가공되는 식품에 적용이 가능할 것으로 사료된다. 일반적으로 각종 LAB이 생산하는 박테리오신의 열 안정성은 그 종류에 따라 상이한 것으로 알려져 있다[31]. Lee 등[32]의 연구에서는 *Leuconostoc mesenterioides* CK0122 균주가 생산하는 박테리오신의 경우 121°C에서 15분간 열처리에 의해서도 항리스테리아 활성이 감소가 되지 않은 반면에, Vaughan 등[33]에서는 *Lactobacilus helvericus* 1829의 CFS는 50°C에서 15분간 열처리했을 경우 항리스테리아 활성이 약 50% 정도 감소되었고, 60°C에서 15분간 열처리했을 때 그 활성이 완전히 소실되었다고 보고하였다.

2) pH 안정성

pH에 따른 NJ 1-10과 NJ 1-16의 박테리오신 안정성을 평가하기 위해 각 pH별 완충용액과 부분 정제된 박테리오신 용액을 1:1의 비율로 혼합하여 항리스테리아 활성을 확인한 결과, NJ 1-10과 NJ 1-16이 생산하는 박테리오신 모두 활성이 pH가 증가함에 따라 항리스테리아 활성이 급격하게 감소하는 경향을 나타내었다(Table 3). 예를 들면, NJ 1-10의 경우 대조군과 비교했을 때 pH 4.01에서는 약 5 mm, pH 7.0에서는 6 mm, pH 10.01에서는 8 mm만큼 저해환의 직경이 감소하였으며, NJ 1-16은 pH 4.01에서는 약 5 mm, pH 7.0에서는 5 mm, pH 10.01에서는 7 mm만큼 감소하는 경향을 나타내었으나, 활성이 완전하게 소실되지는 않았다. Shin 등[34]이 보고한 *Lactobacillus salivarius* LCH1227가 생산하는 박테리오신의 경우 pH 2.0-12.0의 광범위한 영역에서 항균활성을 그대로 유지했다고 보고한 반면, Park[35]의 연구에서는 *L. mesenteroides* PH1과 PH2가 생산하는 박테리오신은 pH 6.0-7.0에서만 활성이 안정하고 pH 4.0-5.0과 pH 11.0 구간에서는 활성이 불안정하다고 보고되었다. LAB균주들이 생산하는 박테리오신은 낮은 pH에서 활성을 보이거나, 국한된 범위의 pH에서만 안정한 것으로 보고되었으나[36], 본 연구에 선정된 NJ 1-10과 NJ 1-16에 의해 생산되는 박테리오신은 넓은 pH영역에서도 항리스테리아 활성이 소실되지 않았고, 산성영역에서 비교적 안정하였기 때문에 pH가 낮은 식품에서의 활용가능성도 기대할 수 있을 것이라고 판단된다.

3) 유기용매 안정성

일반적으로 미생물의 배양여액에는 여러 가지 단백질이 함유되어 있어, 산업적으로 이용할 때 가능한 한 불순 단백질을 제거하는 것이 유리하므로[37] 박테리오신 부분 정제시 불순단백질의 제거에 유용한 유기용매를 알아보기 위한 안정성 실험을 진행하였다. 유기용매는 acetone, ethanol, methanol, chloroform을 사용하였고 부분 정제된 박테리오신 용액을 동량 혼합하여, 37°C에서 2시간 방치한 후 잔존 활성을 확인하였다(Table 4). 그 결과, NJ 1-10의 박테리오신은 acetone, ethanol, methanol 처리 시 대조군과의 저해환 직경 차이가 약 0.5-1.1 mm 만큼 확인되어 활성이 안정적으로 유지된 반면 chloroform 처리 시에는 약 3 mm의 차이가 확인되어 활성이 상대적으로 감소한 것으로 나타났다. NJ 1-16의 박테리오신의 경우 acetone, ethanol, methanol 처리 시 약 1-3 mm로 큰 차이가 없었으나, chloroform 처리 시 약 4 mm의 차이가 나타나 NJ 1-10이 생산하는 박테리오신과 유사한 안정성을 보였다. 박테리오신은 주로 양이온 및 양친매성의 생화학적 성질을 가지고 있는데, 박테리오신 분자의 소수성 영역이 목적균의 세포막과의 소수성 상호작용을 통해 결합하게 되면[38]

Table 3. Stability of the partially purified bacteriocin produced from *Lactococcus lactis* NJ 1-10 and NJ 1-16 at various pHs

Strain	Treatment	Residual activity (mm)[1)]
NJ 1-10	Control	12.5±0.8^{a}
	pH 4.01	7.1±0.2^{b}
	pH 7.0	6.0±0.8^{bc}
	pH 10.01	4.9±0.1^{c}
NJ 1-16	Control	12.1±0.3^{a}
	pH 4.01	7.3±0.5^{b}
	pH 7.0	6.9±0.2^{b}
	pH 10.01	5.2±1.8^{c}

[1)]Different letters (a-c) for each strain indicate significant difference (n=6; P<0.05).

Table 4. Stability of the partially purified bacteriocin produced from *Lactococcus lactis* NJ 1-10 and NJ 1-16 in various solvents

Strain	Treatment[1)]	Residual activity (mm)[2)]
NJ 1-10	Control	8.5±0.7^{a}
	Acetone	7.4±0.7^{a}
	Ethanol	7.5±0.4^{a}
	Methanol	8.0±0.8^{a}
	Chloroform	5.3±0.5^{b}
NJ 1-16	Control	9.0±0.8^{a}
	Acetone	6.1±1.5^{ab}
	Ethanol	7.2±0.7^{abc}
	Methanol	7.2±1.2^{bc}
	Chloroform	5.0±0.4^{c}

[1)]The final concentration of each solvent was 50%(v/v).
[2)]Different letters (a-c) for each strain indicate significant difference (n=6; P<0.05).

그 생리적 기능을 파괴함으로서 세포의 에너지 대사와 물질 이동을 저해하는 것으로 알려져 있다[39]. 따라서 박테리오신 함유 상등액에 유기용매를 처리할 경우 박테리오신은 양극성의 유기용매와의 소수성 상호작용을 하게 되어 활성 능력이 감소 할 수 있다. *Lactobacillus gasseri* G2가 생산하는 박테리오신의 유기용매 내성을 측정한 Kim 등[40]의 연구에서는 acetone, methanol, ethanol, butanol의 다양한 유기용매에 대해 항균 활성 소실이 전혀 없이 매우 우수한 안정성을 보여준 반면에, Kim 등[41]의 연구에서는 *Pseudomonas putida*에서 생성되는 박테리오신이 헥산과 에탄올을 제외한 methanol, toluene, chloroform, acetone, methyl chloroform 등의 유기용매에 의해 활성이 현저하게 저하되었다고 보고했다. 또한 Pasteris 등[37]은 *L. lactis* CRL 1584의 상등액에 유기용매를 처리했을 때, hexadecane과 ethyl acetate는 박테리오신의 활성을 변형시키지 않은 반면, 10% 및 20%(v/v)의 chloroform을 처리했을 경우에는 활성을 각각 29% 및 43% 감소시켰다고 보고하여 본 연구결과와 유사하였는데 이는 chloroform의 소수성 상호작용의 힘이 다른 유기용매에 비해 크기 때문에 박테리오신의 활성에 더 크게 영향을 미친 것으로 보이며, 불순단백질의 제거에 유용한 유기용매로 적합하지 않은 것으로 사료된다.

본 연구결과, 김치에서 분리된 총 36종의 LAB균주 중 *L. lactis* NJ 1-10과 *L. lactis* NJ 1-16이 가장 효과적인 항리스테리아 활성을 나타냈으며, 또한 다양한 혈청형에서도 항리스테리아 활성이 확인되었다. 단백질분해효소를 처리한 배양액에서 항리스테리아 활성이 감소하는 것으로 보아 주요 항리스테리아 활성은 박테리오신에 의한 것임을 확인할 수 있었다. 또한 부분 정제된 박테리오신은 80°C의 열처리에도 안정하였으며, 대조군에 비해 산성의 pH에서 항리스테리아 활성이 감소되지만 알카리성 pH에 비해 상대적으로 높은 항리스테리아 활성을 보여주었다. 유기용매에 대한 안정성을 검토한 결과, chloroform을 제외한 대부분의 유기용매에도 항리스테리아 활성을 유지하는 것으로 보아 식품에 존재하는 *L. monocytogenes*를 제어하기 위한 천연항균제로서의 가능성이 있음을 보여주었다. 따라서 본 연구결과는 *L. lactis* NJ 1-10과 NJ 1-16균주가 생산하는 항균물질은 가공육제품 및 RTE식품 등에 오염되어 *L. monocytogenes*의 제어를 위해 사용 가능할 것으로 여겨지며, 향후 *L. lactis* NJ 1-10과 *L. lactis* NJ 1-16으로 부터 생산되는 박테리오신 규명 및 *L. monocytogenes* 오염 식품에 직접 적용하여 천연항균제로서의 가능성을 확인할 예정이다.

Acknowledgement

이 논문은 2021년도 정부(교육부)의 재원으로 한국연구재단의 지원을 받아 수행된 기초연구사업(No. 2021R1A6A1A03046418)이며, 본 연구에 사용된 모든 김치 유래 LAB 균주는 세계김치연구소로부터 제공 받았으며, 이에 감사드립니다.

국문요약

*L. monocytogenes*는 그람양성의 대표적인 식중독균 중 하나로 치명률이 대단히 높으며 대부분의 식중독균과 달리 저온에서도 생육 가능하여 냉장 보관된 식품에서도 식중독을 발생시킬 수 있다. 이에 따라 식품의 제조, 가공 및 유통과정에서 다양한 물리, 화학적 방법이 사용되고 있지만, 이러한 방법은 식품의 품질 변화를 초래하고 합성 보존제에 대한 소비자의 인식 등으로 적용에 한계가 있을 수 있다. 따라서 본 연구에서는 식품의 미생물적 안전성 향상을 위해 김치에서 분리된 LAB의 항리스테리아 활성을 분석하여 천연항균제로서 활용 가능성을 평가하였다. Agar overlay 방법으로 김치에서 분리된 총 36종(*Lactobacillus*속, *Weissella*속, *Lactobacillus*속, *Lactococcus*속)의 유산균에 대한 항리스테리아 활성을 분석한 결과 *L. lactis* NJ 1-10과 NJ 1-16이 가장 항리스테리아 활성이 높은 것으로 나타났다. 항리스테리아 활성을 정량적으로 분석하기 위해 NJ 1-10과 NJ 1-16을 각각 *L. monocytogenes*와 BHI broth에서 공동 배양한 결과, 20시간 만에 *L. monocytogenes*를 3.0 log CFU/mL 감소시켜 검출한계 이하까지 균수가 감소하였다. 두 LAB균주 모두 24개의 *L. monocytogenes* 혈청형에 대해 저해환의 크기는 조금씩 다르지만 모두 항리스테리아 활성을 보였다. NJ 1-10과 NJ 1-16의 부분 정제된 박테리오신 모두 proteinase-K 처리에서 항리스테리아 활성이 소실되어 항균물질이 단백질의 박테리오신임을 확인하였다. 부분 정제된 박테리오신의 열에 대한 안정성은 NJ 1-10과 NJ 1-16 모두 60°C 및 80°C에서 비교적 안정했지만, 100°C에서 60분과 121°C에서 15분 처리로 활성이 완전히 소실되었다. pH의 안정성의 경우, pH 4.01에서 활성이 가장 안정하였고 pH가 높아질수록 그 활성이 감소하는 경향을 나타내었으나, 활성이 완전하게 소실되지는 않았고, 유기용매 안정성은 acetone, ethanol, methanol에 비교적 안정한 활성을 보였으나 chloroform 처리 시 활성의 정도가 감소하였지만 완전히 소실되지는 않았다. 따라서 본 연구의 결과, NJ 1-10과 NJ 1-16이 생산하는 박테리오신은 *L. monocytogenes*를 효과적으로 저감시켰으며, 열, pH, 유기용매에 대해 비교적 안정하여 식품에 존재하는 리스테리아균 제어를 위한 천연항균제로서의 잠재적인 가능성이 있음을 확인하였다.

Conflict of interests

The authors declare no potential conflict of interest.

ORCID

Na-Yeon Son https://orcid.org/0000-0003-1953-4603
Tae-Woon Kim https://orcid.org/0000-0001-8722-9980
Hyun-Gyun Yuk https://orcid.org/0000-0001-9841-7899

References

1. Hong, Y.K., Yoon, W.B., Huang, L., Yuk, H.G., Predictive modeling for growth of non-and cold-adapted *Listeria monocytogenes* on fresh-cut cantaloupe at different storage temperatures. *J. Food Sci.*, **79**, M1168-M1174 (2014).
2. Jin, Y.h., Ryu, S.H., Kwak, J.E., Kim, R.R., Choi, Y.H., Lee, M.S., Hwang, I.S., Prevalence, virulence characteristics and antimicrobial resistance of *Listeria monocytogenes* isolated from salmon products. *Korean J. Food Sci. Technol.,* **53**, 495-500 (2021).
3. Han, S.R., Hyeon, J.Y., Kim, H.Y., Park, J.S., Heo, S., Shin, H.C., Seo, K.H., Evaluation of conventional culture methods and validation of immunoassays for rapid detection of *Listeria monocytogenes* in dairy and processed foods. *Food Sci. Anim. Resour.,* **28**, 616-622 (2008).
4. Kim, S.R., Kim, W.I., Yoon, J.H., Jeong, D.Y., Choi, S.Y., Hwang, I.J., Rajalingam, N., Growth survival of *Listeria monocytogenes* in enoki mushroom (*Flammulina velutipes*) at different temperature and antilisterial effect of organic acids. *J. Food Hyg. Saf*., **35**, 630-636 (2020).
5. Hong, S.W., Bae, H.J., Chang, J.H., Kim, S.Y., Choi, E.Y., Park, B.Y., Kun, S.C., Oh, M.H., Isolation and identification of bacteriocin-producing lactic acid bacteria. *Korean J. Dairy Sci. Technol.,* **31**, 153-159 (2013).
6. Ryu, B.H., Sim, G.S., Choi, H.Y., Ha, W.K., A study on the natural preservative(Lactobacillus-fermented antimicrobial solution), fermented with plant originated lactic acid bacteria. *Food Sci. Ind*., **44**, 45-51 (2011).
7. Kim, S.Y., Kim, J.D., Son, J.S., Lee, S.K., Park, K.J., Park, M.S., Biochemical and molecular identification of antibacterial lactic acid bacteria isolated from kimchi. *Korean J. Food Sci. Technol*., **43**, 446-452 (2011).
8. Sharma, B.R., Halami, P.M., Tamang, J.P., Novel pathways in bacteriocin synthesis by lactic acid bacteria with special reference to ethnic fermented foods. *J. Food Sci. Biotechnol*., **31**, 1-16 (2021).
9. Hyun, I.K., Kim, M.Y., Kim, S.Y., Lee, J.S., Choi, A.R., Kang, S.S., Functional properties of yogurt fermented by bacteriocin-producing *Pediococcus acidilactici. J. Dairy Sci. Biotechnol*., **38**, 154-160 (2020).
10. Jung, S.Y., Choi, J.I., Joo, W.H., Suh, H.H., Na, A.S., Cho, Y.K., Moon, J.Y., Ha, K.C., Paik, D.H., Kang, D.O., Characterization and purification of the bacteriocin produced by *Bacillus licheniformis* isolated from soybean sauce. *J. Life Sci*., **19**, 994-1002 (2009).
11. Jung, D.S., Lee, Y.K., Development of fermented isotonic beverage with anticariogenic activity using bacteriocin-producing lactic acid bacteria. *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.,* **31**, 399-404 (2002).
12. Chung, J.H., Bae, Y.S., Kim, Y.J., Lee, J.H., Characteristic of bacteriocin produced by a *Lactobacillus plantarum* strain isolated from kimchi. *Kor. J. Microbiol. Biotechnol*., **4**, 481-485 (2010).
13. Ham, S.H., Choi, N.S., Moon, J.Y., Baek, S.H., Lee, S.M., Kang, D.O., Characterization of bacteriocin produced from isolated strain of *Bacillus* sp. *J. Life Sci*., **27**, 202-210 (2017).
14. Lee, K.H., Park, J.Y., Jeong, S.J., Kwon, G.H., Lee, H.J., Chang, H.C., Chung, D.K., Lee, J.H., Kim, J.H., Characterization of paraplantaricin C7, a novel bacteriocin produced by *Lactobacillus paraplantarum* C7 isolated from kimchi. *J. Microbiol. Biotechnol*., **17**, 287-296 (2007).
15. Han, E.J., Lee, N.K., Choi, S.Y., Paik, H.D., Bacteriocin KC24 produced by *Lactococcus lactis* KC24 from kimchi and its antilisterial effect in UHT milk. *J. Dairy Sci*., **96**, 101-104 (2013).
16. Chua, M.L., Aung, K.T., Hapuarachchi, H.C., Lee, P.S.V., Lim, P.Y., Kang, J.S.L., Ng, Y., Yap, H.M., Yuk, H.G., Gutiérrez, Ng, L.C., Microbial survey of ready-to-eat salad ingredients sold at retail reveals the occurrence and the persistence of *Listeria monocytogenes* sequence types 2 and 87 in pre-packed smoked salmon. *BMC Microbiol.*, **17**, 46 (2017).
17. Ho, V.T.T., Dong, A., Lo, R., Turner, M.S., Isolation and evaluation of anti-Listeria *Lactococcus lactis* from vegetal sources. *Methods. Mol. Biol.*, **2220**, 243-257 (2021).
18. Iulietto, M.F., Sechi, P., Cella, E., Grispoldi, L., Ceccarelli, M., Al Ani, A. R., Işıklar, B., M. Anuk, Haluk., Cenci-Goga, B.T., Inhibition of *Listeria monocytogenes* by a formulation of selected dairy starter cultures and probiotics in an *in vitro* model. *Ital. J. Anim. Sci*., **17(4)**, 845-850 (2018).
19. Nho, S.W., Abdelhamed, H., Reddy, S., Karsi, A., Lawrence, M.L., Identification of high-risk *Listeria monocytogenes* serotypes in lineage I (serotype 1/2a, 1/2c, 3a and 3c) using multiplex PCR. *J. Appl. Microbiol*., **119**, 845-852 (2015).
20. Kim, S.H., Seo, K.H., Detection methods, occurrence, and control of *Listeria monocytogenes* in domestic and foreign animal products. *Safe Food*., **13**, 14-23 (2018).
21. Aymerich, T., Rodríguez, M., Garriga, M., Bover-Cid, S., Assessment of the bioprotective potential of lactic acid bacteria against *Listeria monocytogenes* on vacuum-packed cold-smoked salmon stored at 8ºC. *Food Microbiol*., **83**, 64-70 (2019).
22. Jung, S.Y., Park, C.S., Choi, N.S., Yang, H.J., Kim, C.Y., Yoon, B.D., Kim, M.S., Kang, D.O., Ryu, Y.W., Characteristics of bacteriocin produced by *Lactococcus lactis* ET45 isolated from kimchi. *Korean J. Microbiol*., **47**, 74-80 (2011).
23. Seo, S.J., Yang, J.M., Moon, G.S., Characterization of the bacteriocin from *Enterococcus faecium* CJNU 2008. *J. Food Hyg. Saf*., **33**, 516-520 (2018).
24. Pujato, S.A., del L Quiberoni, A., Candioti, M.C., Reinheimer, J.A., Guglielmotti, D.M., *Leuconostoc citreum* MB1 as biocontrol agent of *Listeria monocytogenes* in milk. *J.*

Dairy Res., **81**, 137-145 (2014).
25. Buncic, S., Avery, S.M., Rocourt, J., Dimitrijevic, M., Can food-related environmental factors induce different behaviour in two key serovars, 4b and 1/2a, of *Listeria monocytogenes*? *Int. J. Food Microbiol*., **65**, 201-212 (2001).
26. Henderson, L.O., Erazo Flores, B.J., Skeens, J., Kent, D., Murphy, S.I., Wiedmann, M., Guariglia-Oropeza, V., Nevertheless, she resisted–role of the environment on *Listeria monocytogenes* sensitivity to nisin treatment in a laboratory cheese model. *Front. microbiol.*, **11**, 635 (2020).
27. Dimitrijević, M., Teodorović, V., Baltić, M.Ž., Karabasil, N., Different sensitivity of various serotypes of *Listeria monocytogenes* to lactic acid bacteria bacteriocins. *Acta veterinaria.*, **54**, 201-208 (2004).
28. Jun, L.S., Jang, S.S., Kang, D.K., Probiotic properties of *Lactobacillus salivarius* CPM-7 isolated from chicken feces. *Korean. J. Microbiol*. *Biotechnol*., **35**, 98-103 (2007).
29. Chang, J.Y., Lee, H.H., Kim, I.C., Chang, H.C., Characterization of a bacteriocin produced by *Bacillus licheniformis* cy2. *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.,* **30**, 410-414 (2001).
30. Jung, S.E., Kim, S.H., Probiotic properties of lactic acid bacteria isolated from commercial raw makgeolli. *Korean J. Food Sci. Technol.,* **47**, 44-50 (2015).
31. Shin, Y.R., Lim, K.B., Chae, J.P., Kang, D.K., Characterization of anti-listerial substance produced by *Lactobacillus salivarius* LCH1227. *Food Sci. Anim. Resour.,* **31**, 609-616 (2011).
32. Lee, K.H., Lee, J.H., Characterization of the bacteriocin produced by a *Leuconostoc mesenteroides* strain inhibiting the growth of *Lactobacillus sakei*. *Korean J. Microbiol. Biotechnol.,* **39**, 390-396 (2011).
33. Vaughan, E.E., Daly, C., Fitzgerald, G.F., Identification and characterization of helveticin V-I 829, a bacteriocin produced by *Lactobacillus helveticus* 1829. *J. Appl. Microbiol.,* **73**, 299-308 (1992).
34. Shin, Y.R., Lim, K.B., Chae, J.P., Kang, D.K., Characterization of anti-listerial substance produced by *Lactobacillus salivarius* LCH1227. *Food Sci. Anim. Resour.,* **31**, 609-616 (2011).
35. Park, Y.J., Isolation and characterization of kimchi lactic acid showing antibacterial activity. *J. Hum Ecol.*, **26**, 547-558 (2017).
36. Lee, J.Y., Choi, N.S., Chun, S.S., Moon, J.Y., Kang, D.O., Purification and characterization of the bacteriocin produced by *Lactococcus* sp. KD 28 isolated from kimchi. *J. Life Sci*., **47**, 74-80 (2015).
37. Yuk, H.G., Lee, S.C., Hwang, Y.I., Recovery yields of protopectinase depending on treatments of organic solvents. *J. Appl. Biol. Chem*., **40**, 107-111 (1997).
38. Pasteris, S.E., Pingitore, E.V., Ale, C.E., Nader-Macías, M.E.F., Characterization of a bacteriocin produced by *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* CRL 1584 isolated from a *Lithobates catesbeianus* hatchery. *World J. Microbiol. Biotechnol.*, **30**, 1053-1062 (2014).
39. Kang, T.J., (2009 August 5). Efficacy and use of lactic acid bacteria. Retrieved from http://bric.postech.ac.kr/webzine/
40. Kim, J.H., Lee, E.S., Kim, B.M., Ham, J.S., Oh, M.H., Evaluation of stability and antimicrobial properties for a bacteriocin from a newly isolated *Lactobacillus gasseri* G2. *Food Eng. Prog.*, **24**, 327-335 (2020).
41. Kim, E.J., Kim, K.M., Han, H.K., Kim, Y.H., Kwon, K.S., Bea D.H., Selection and characteristics of bacteriocin-producing microorganism to utilize in anti-bacterial rice brain protein film production. *J. Appl. Biol. Chem*., **46**, 285-290 (2003).