

## Lactobacillus acidophilus가 생산한 抗菌物質에 관한 研究

金 東 伸

慶北大學校 農科大學 酪農學科

(1984.10.4 接受)

### Studies on Antimicrobial Agent Produced by *Lactobacillus acidophilus*

Dong-shin Kim

Department of Dairy Science, College of Agriculture, Gyeongsang National University

(Received October, 1984)

**Abstract:** The research was conducted (1) to confirm the agent(s) responsible for the antimicrobial activity contained in the fermented tomato juice with *L. acidophilus* (2) to extract and purify the antimicrobial agent(s) (3) to find the biological, physical and chemical properties of the agent(s).

The following results were obtained and summarized as followings;

1. The agent responsible for the inhibitory activity was confirmed by both well assay method using fermented tomato juice with *L. acidophilus* and turbidimetric technique using the cell-free filtrate or neutralized filtrate of tomato acidophilus culture and found exerted antimicrobial agent other than lactic acid.

2. The procedures of purification: The isolation and purification of antimicrobial agent from the lyophilized acidophilus tomato culture were carried out by (1) methanol extraction (2) acetone extraction, (3) Sephadex G-50 gel filtration (4) paper chromatography and (5) thin layer chromatography.

3. The biological, physical and chemical properties of antimicrobial agent: The biological, physical, chemical properties of the purified antimicrobial agent were: (1) The antimicrobial activity was strong against test organisms; *Bacillus subtilis* (ATCC 6633), *Escherichia coli* (ATCC 25922), *Staphylococcus aureus* (ATCC 167), *Pseudomonas fluorescens* (KFCC 32394), *Proteus vulgaris* and *Shigella dysenteriae*. (2) The pH value of the agent was 2.0 and the inhibitory activity was lost when it was neutralized at 7.0 of pH and the agent was heat stable at 121°C for 60 minutes. (3) The ultraviolet light absorption spectra of methanol-acetone extract and TLC fraction exhibited a maximum absorption at 260nm and 224nm respectively. (4) The most purified agent from TLC plate increased about 130-fold in activity. (5) The agent isolated from TLC plate was free from H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> or lactic acid.

4. Bioautographic assay: By means of bioautography of the agent on silica gel of TLC plate a strong inhibitory activity against *B. subtilis* was demonstrated.

5. Mass spectrometry: The agent obtained from TLC plate was analyzed by mass spectrometry which show the parent peak at m/e 264 suggesting the molecular weight of the compo-

und and molecular group such as  $[C_2H_4^+]$ ,

$[CO]$ ,  $[CH=NH]$ ,  $[C_3H_7^+]$ ,  $[CH_3-C \begin{smallmatrix} O \\ || \end{smallmatrix}]$ ,  $[C_6H_{11}^+]$ ,  
 $[C_5H_{11}^+]$  and  $[C_5H_7-C \begin{smallmatrix} O \\ || \end{smallmatrix}]^+$  were suggested.

## 緒 論

Metchnikoff<sup>21)</sup>와 Moro<sup>20)</sup> 이후 乳酸菌醱酵乳에 있는 乳酸菌에 대한 흥미와 研究가 활발하여 *Lactobacillus acidophilus* (*L. acidophilus*)의 抗菌効果에 관한 많은 논문이 발표되었다<sup>2~5, 14~18, 27~29)</sup>. 그리고 lactobacillus culture나 그 濾液에 細菌이 생산한 抗菌物質이 포함되어 있다는 것은 Kodama<sup>13)</sup>에 의하여 알려졌다. 그후 乳酸菌의 醱酵牛乳에서 分離된 抗菌物質로 lactolin<sup>13)</sup>, lactobrebin<sup>22)</sup>, lactocidin<sup>23)</sup>, lactobacillin<sup>24)</sup>, diplococcin<sup>25)</sup> 및 nicin 등<sup>20)</sup>이 알려졌다. 최근에 Mikolajcik과 Hamdan<sup>22, 23)</sup>은 *L. acidophilus*의 우유 culture로부터 病原性 腸內細菌과 芽胞形成細菌에 대한 抗菌效果를 보여준 acidolin이라는 低分子 耐熱性物質을 정제하였으며, Shahani 등<sup>32~34)</sup>도 역시 *L. acidophilus*의 우유 culture로부터 methanolacetone 抽出方法을 利用하여 Gram陽性 및 Gram陰性菌 등에 대하여 廣範圍한 抗菌力을 갖고있는 低分子量의 抗菌物質인 acidophilin을 정제하였다.

이상과 같은 抗菌物質은 모두 우유배지나 또는 우유성분이 들어있는 배지를 이용하여 얻어졌으며, *L. acidophilus*를 tomato culture하여 얻은 것은 아니다.

本 研究에서는 *L. acidophilus*가 tomato culture에서 生成한 抗菌物質을 抽出하고 精製하였으며 아울러 그것의 各種細菌에 대한 抗菌効果와 理化學的 性狀을 調査하였다.

## 材料 및 方法

### 1. 細菌 및 培養

(가) *L. acidophilus*: 미국 Wisconsin 주에 있는 Great Lake Biochemical 會社로부터 粉末 culture를 購入하였다.

粉末 culture는 調劑脫脂乳(T.S 11%)를 培地로 하여 37°C에서 18~24時間 培養하였다. 그러나 粉末 culture로부터 使用할 수 있는 mother culture는 새로운 調劑脫脂乳(T.S. 11%)에 1%의 culture를 接種하여 연달아 3회 이상 계대 培養하였다. 이와 같이 培養한

mother culture를 tomato juice에 接種材料로 使用하였다.

抗菌物質 感受性 試驗細菌: 各種 細菌에 대한 抗菌物質의 抗菌力을 測定하기 위하여 使用한 細菌은 다음과 같다.

*Bacillus subtilis* ATCC 6633 (*B. subtilis*), *Escherichia coli* ATCC 25922 (*E. coli*), *Staphylococcus aureus* ATCC 167 (*Sta. aureus*) 등은 American Type Culture Collection 會社로부터 購入하였다. *Pseudomonas fluorescens* KFCC 32394 (*Ps. fluorescens*)는 韓國 種菌協會에서 *Proteus vulgaris* (*Pr. vulgaris*)와 *Shigella dysenteriae* (*S. dysenteriae*)는 中央大學校 醫科大學에서 분양받았다. 이 細菌들의 培養에는 streptomycin assay agar와 nutrient agar 등을 使用하였다.

(나) Tomato acidophilus culture: 6월 중순에 市場에서 完熟한 빨간색의 토마토를 購入하여 끓는 물에 2~3分間 넣어 가열처리한 다음 그것의 껍질을 벗긴후 믹사에 넣어 토마토주스를 만들었다. 이 토마토주스는 121°C에서 15分間 滅菌處理하였다.

우유배지에 培養한 *L. acidophilus*를 토마토주스에 接種하고 37°C에서 72時間 培養하였다. 이와같이 培養한 토마토주스를 tomato acidophilus culture라 하였다. 이것을 새로운 토마토주스 배지에 옮겨 37°C에서 72時間씩 두번계대 培養한 tomato acidophilus culture를 抗菌物質 分離材料로 利用하였다.

(다) 發育曲線: *L. acidophilus*의 發育曲線을 만들기 위하여 調劑脫脂乳(T.S. 11%) 培地에 細菌을 接種하여 37°C에서 培養하면서 接種後 2시간 間隔으로 試料를 採取하여 生菌檢査하였다.

生菌數檢査는 tomato juice agar (Difco) 培地를 使用하였으며, 接種된 petri dish는 37°C에서 48時間 이상 培養하여 集落이 충분히 나타나게 하여 發育曲線을 만들었다.

### 2. 發育抑制試驗

(가) Well法: 細菌에 대한 *L. acidophilus*의 抗菌效果測定은 Sabin<sup>31)</sup>의 方法에 準하였다. well法에 使用한 液狀試料는 醱酵한 tomato acidophilus culture, 우유에 시도필리스칼치 및 對照인 非醱酵 토마토주스 등이다. 細菌은 *B. subtilis*로써 그것의 streptomycin assay broth를 液狀培地로 使用하였고 nutrient agar (Difco)도 使用하였다.

nutrient agar 10ml를 滅菌한 petri dish에 붓고 굳힌다음 agar표면 위에 다시 *B. subtilis* culture 1%로 接種한 nutrient agar 6ml를 부어서 고르게 2重層을

단들었다. 上層 nutrient agar가 固形化되었을 때 滅菌된 直徑 8mm되는 well cutter로 아가표면을 눌러 well을 만들었다. well 밑바닥에 溶解된 agar 2방울을 떨어뜨려 固形化함으로써 그 well의 밑바닥을 만들어 액상칼처가 쉽게 petri dish의 유리위로 퍼지지 못하게 하였다. 그 well에 tomato acidophilus culture 0.1ml와 非酸性 토마트류스 0.1ml를 주입한 다음 4°C에서 1~2時間 동안 靜置한 후 細菌의 適正發育溫度에서 16時間 培養하였다.

나) 濁度測定: *L. acidophilus*의 culture 여과물의 細菌에 대한 抗菌効果を 調査할 目的으로 細菌의 發育에 따르는 吸光度를 測定하였다.

첫째, *L. acidophilus*를 토마트류스에서 72時間 培養後 얻은 濾液 0.5ml와 Elliker broth 4.5ml를 混合하여 滅菌한 cuvette에 넣고 여기에 다시 *E. coli*부유액 0.1ml를 接種하여 37°C에서 培養하면서 2時間 間隔으로 試料를 採取하여 Spectronic 20으로 시간에 따른 吸光度를 計測하였다.

둘째, culture濾液을 10N NaOH로 pH 6.7이 되도록 中和하고 첫번째와 같은 對照區로서 Elliker broth에 culture濾液이나 酸을 添加하지 않고 *E. coli*를 接種 培養한 후 吸光度를 計測하였다.

### 3. 抗菌物質의 抽出 및 精製

가) 抗菌物質의 methanol-acetone抽出<sup>10,32)</sup>: *L. acidophilus*를 調劑脫脂乳(T.S. 11%)에서 48時間 培養한 다음 그것을 토마트류스에 接種하고 37°C에서 72時間 醱酵시켰다. 이것을 3회 이상 토마트류스에 계대배양하여 tomato acidophilus culture를 만들었다.

滅菌處理한 토마트류스 1,000ml에 tomato acidophilus culture 50ml를 接種하고 잘 混合한 후 37°C에서 72時間 培養하였다.

培養한 tomato acidophilus culture 1,000ml는 凍結 乾燥하였다. 이 凍結乾燥物은 4~10°C로 冷却한 methanol 1,000ml에 넣어서 1時間 동안 방치하여 충분히 methanol이 작용할 수 있도록 유리봉으로 용해하였다. 이것을 5°C 高速遠心分離器에서 12,000 r. p. m., 10분간 원침하여 上層液을 모았다. 沈澱物은 다시 두번 반복하여 methanol로 抽出하고 그 上層液 3,000ml를 모았다. 遠心分離로 沈澱되는 固形成分은 버렸다. 收集한 3,000ml의 methanol 抽出物은 40~50°C의 로타리 증발기에 넣어 적당한 減壓狀態에서 농축하였다. 더이상 蒸發이 일어나지 않는 黃褐色 抽出物은 蒸溜水를 添加하여 100ml量이 되도록 하였다. 그 100ml의 methanol 抽出物을 4~10°C acetone 1,000ml에 넣고 약 30분 후 15,000 r. p. m.에서 15분간 원침하였다. 上層

液은 모아두고 沈澱物은 두번 더 acetone 抽出하여 모두 3,000ml의 上層液을 취하고 나머지 沈澱物은 버렸다.

收集한 上層液은 여과지(Whatman 1mm filter)로 濾過하고 40~50°C의 로타리 증발기에서 그 量이 더이상 減少하지 않을 때까지 減壓농축시켰다. 그 結果 褐色의 粘稠한 液狀物을 얻었다. 그것을 methanol acetone 抽出物(M-A extract), 또는 粗抗菌物이라고 하고 여기에 蒸溜水를 添加하였다. 粗抗菌物 抽出의 과정은 Fig. 1과 같다.

#### Acidophilus tomato juice

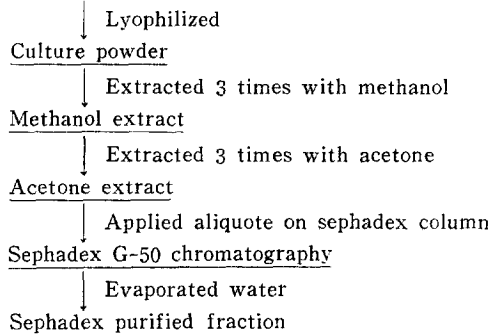


Fig. 1. Diagram of the procedures for the preparation of the sephadex purified fraction of acidophilus tomato juice

#### 나) Methanol-acetone抽出 抗菌物質의 精製

(1) Sephadex G-50 chromatography<sup>10,32)</sup>: methanol acetone抽出物 5ml를 Sephadex G-50 chromatography column에 부어넣고 분획하였다. 이때 gel濾過 column (32cm×2.5cm)은 5°C로 冷却한 0.1M NaCl-0.02N HCl(pH 2.5) 溶液에 15g의 Sephadex G-50을 가하였다. 分液은 靜水壓을 이용하여 유출속도를 매분 0.6ml로 하고 11ml씩 38개의 分液을 얻었다(Uvicord II, UV spectrophotometer). 38개 分液의 吸光度를 UV spectrum으로 測定하였으며 각 分液의 抗菌效果를 조사하기 위하여 그들을 각각 濃縮하여 少量의 蒸溜水로 희석하였다. 이 濃縮한 分液의 抗菌效果를 *B. subtilis*로 檢査하였다. 이들 중 抗菌效果가 있는 分液은 모두 混合하여 각종 細菌에 대한 抗菌效果를 檢査하였다.

(2) Paper chromatography<sup>32)</sup>: sephadex chromatography에서 얻어진 抗菌作用이 있는 分液은 다시 paper chromatography로 展開하였다. 溶媒로는 chloroform-methanol(90:10)을 사용하였으며 Whatman # 3여지에 10時間 전개하였다. 發色劑로는 iodine을 使用하였다.

(3) Thin layer chromatography<sup>10, 82)</sup>: sephadex G-50의 分液 10ml를 silica gel sheel(No. 6061, Eastman Kodak Co.)에 밴드모양으로 塗布하였다. 塗布物이 乾燥된 후 TLC판을 chloroformmethanol(90:10) 溶媒에서 展開하였다. 展開된 TLC판은 공기건조 또는 드라이어로 약하게 공기를 불어서 methanol을 제거한 다음 波長 253.7nm인 UV線 아래서 吸光帶를 찾았다. Rf가 다른 吸光帶 物質을 각각 다른 用器에 吸取하여 acetone으로 세척하여 gel은 遠心沈澱시켜 버리고 上層液 acetone을 증발시키고 나서 少量의 증류수를 添加하여 4°C에 보관하였다.

#### 4. 抽出 및 精製物의 理化學的 性狀

가) 非乳酸性: sephadex處理物로 하여 TLC판에 전개하였을 때 乳酸은 bromecresol green 發色劑에 黃綠色으로 나타나기 때문에 식별할 수 있다. sephadex處理物中の 抗菌效果를 나타내는 TLC板의 分離物質은 high performance liquid chromatography(HPLC)로 투입하여 分板한 結果 標準乳酸의 것과 相異하였다.

나) pH: methanol-acetone 抽出物, sephadex 處理物 그리고 TLC 分離物質 등의 pH는 pH paper 또는 pH meter 등으로 測定하였다.

다) UV吸收스펙트럼: UV吸收스펙트럼은 抗菌效果를 나타내는 抽出物을 蒸溜水에 희석하여 모델 200 double beam spectrophotometer로 測定하였다.

라) Mass spectrometry: TLC法으로 分離한 抗菌效果를 나타내는 物質을 acetone에 용해시켜 mass spectrometer로 分析하였다. mass spectra는 모델 Varian MAT 212 spectrometer를 壓力  $4 \times 10^{-7}$ 톤, 260°C 溫度에서 그리고 3KV추진 전압으로 조정하여 測定하였다.

마) 耐熱性: sephadex 處理物을 26°C, 40°C, 50°C, 100°C 및 121°C에서 0~60분간 열처리한 후 抗菌作用의 變化를 調査하였다. disc法에 의하여 *Bacillus subtilis*로 試驗하였다.

#### 5. 抽出 및 精製物의 抗菌試驗

가) Disc法<sup>82)</sup>: disc法은 culture, methanol-acetate 抽出物 또는 sephadex 處理物 등의 각종 細菌에 對한 抗菌效果를 調査하는데 적용하였다. 試驗細菌으로는 *B. subtilis*, *E. coli*, *Pr. vulgaris*, *Sta. aureus*, *S. dysenteriae*, *Salmonella typhi* 및 *Ps. fluorescens*를 사용하였다. 滅菌한 nutrient agar를 44~47°C로 恒溫水槽에서 액상으로 유지한 후 이미 만들어진 18~24時間 培養한 細菌의 液體 culture를 nutrient agar의 1%가 되도록 接種하고 잘 混合하였다. 이 nutrient agar

8ml를 취하여 petri dish(20×2.2cm)에 붓고 固形化시켰다. methanol-acetone 抽出物, sephadex 處理物 및 TLC의 分離物들을 각각 12.7mm 여과지에 스며들게 한 후 petri dish의 培地위에 놓았다. 그리고 나서 5~10°C에서 1~2時間 靜置하여 試料가 디스크로부터 培地에 충분히 스며들게 하였다. 그 후 適正發育溫度에서 16時間 培養하였다. 培養이 끝난후 細菌에 對한 發育抑制帶의 直徑을 測定하였다.

나) Bioautography: TLC板에서 分離한 매우 적은 量의 抗菌物質을 檢출하기 위하여 生物學的自叙法을 적용하였다. 즉 細菌을 接種한 nutrient agar 위에 濾過紙를 놓고 UV光線아래 抗菌效果가 있는 TLC의 吸光帶物을 잘라서 gel 부분이 濾過紙에 닿도록 놓았다. 그 petri dish를 5°C에서 2時間 두어 TLC gel에서 抗菌物質이 충분히 培地에 스며들게 하였다. 다음에는 TLC 吸光帶物片을 濾過紙에서 떼내어 버리고 22°C에서 16時間 培養하였다. 한편 agar 위에 濾過紙를 놓지 않고 TLC吸光帶物에 해당하는 gel을 吸取하여 agar 위에 놓고 같은 방법으로 培養하여 그것의 抗菌效果를 調査하였다.

## 結 果

*L. acidophilus*로 醱酵한 토마토주스에 生産된 抗菌物質을 抽出하고 精製하여 이의 理化學的 性狀과 細菌에 對한 抗菌效果를 調査하여 다음과 같은 性적을 얻었다.

#### 1. *L. acidophilus*의 培養特性

가) 形態: *L. acidophilus* 粉末 culture를 우유배지

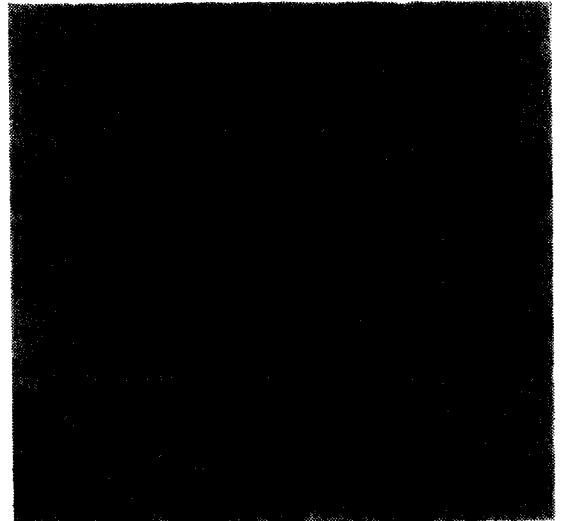


Fig. 2. Morphology of *L. acidophilus* in tomato juice medium(x 1000).

에 培養한 *L. acidophilus*는 끝모양이 둥근 桿菌으로서 單獨 또는 두개 이상의 連鎖狀을 보였다(Fig. 2).

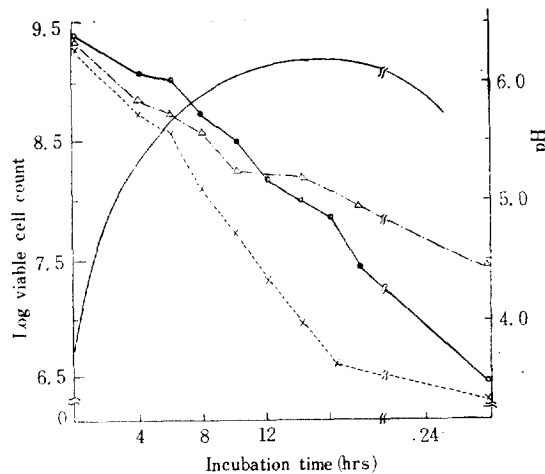
나) 發育狀態: *L. acidophilus*의 發育을 調査하기 위하여 調劑脫脂乳(T.S. 11%)에 細菌을 接種하고 37°C에서 배양하였다. 培養期間中 生菌數를 2時間 간격으로 試料를 채취하여 42時間에 걸쳐 generation time을 계산하였다(Table 1).

**Table 1.** Generation time of *L. acidophilus* in skin milk culture

Incubation time(hr)	Generation time(min)
4	47
8	69
12	94
24	276

*L. acidophilus*는 4시간 배양할때 47분의 가장 짧은 generation time을 보였다. 그후 시간이 경과함에 따라 generation time은 점점 길어져서 接種後 24時間에는 276분이었다.

Fig. 3은 *L. acidophilus*의 發育曲線을 나타낸것으로서 *L. acidophilus*를 接種한후 8時間까지는 對數期를 그리고 12時間 경에는 細胞數가 가장 많은 停止期에 도달하였다(Fig. 3).



**Fig. 3.** Growth curve and pH changes by *L. acidophilus* in skin milk culture (X-X: 42°C, ●-●: 37°C, △-△: 27°C).

다) 培養溫度에 따른 培地의 pH變化: *L. acidophilus*를 調劑脫脂乳에 27°C, 37°C 및 42°C에서 培養하였다. *L. acidophilus*는 培養溫度 27°C에서 매우 완만한 pH의 變化를 보였으며, 37°C에서는 8時間이후에 급격히 pH가 떨어지고 42°C에 배양할때는 4~8時間 사이에

급속한 pH저하를 보였다(Fig. 3).

## 2. *L. acidophilus* culture의 細菌發育 抑制效果

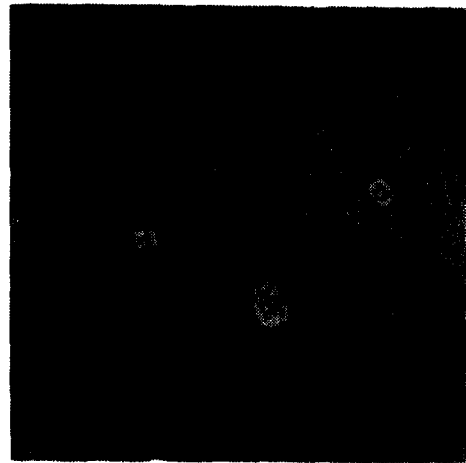
*L. acidophilus*로 만든 우유 culture와 토마토발효 culture의 細菌에 대한 發育抑制作用을 조사하였다. 그러기 위하여 culture의 여액을 사용하여 well法과 濁度法에 의하여 細菌抑制效果를 관찰하였다.

가) Well法에 의한 發育抑制帶: *L. acidophilus* culture의 細菌에 대한 發育抑制를 評價하기 위하여 직경 8mm의 寒천공을 만들어 그속에 *acidophilus* tomato culture, *acidophilus* milk culture 및 非醱酵토마토주스를 넣어 培養하고 寒천공 주위에 나타난 細菌發育抑制帶의 직경을 측정하였다(Table 2).

**Table 2.** Antibacterial effect of the agent produced by *L. acidophilus* in tomato juice medium at different incubation time

Incubation time(hr)	Inhibition zone against <i>B. subtilis</i> (mm)
0	0
4	0
12	0
24	16
48	19
72	20

*acidophilus* tomato juice는 우유칼치보다 더 뚜렷한 抑制帶를 보였으며, 對照區인 非醱酵토마토주스는 發育抑制帶가 전혀 나타나지 않았다(Fig. 4). *acidophilus* tomato juice의 培養時間에 따른 culture의 억제효과는 토마토주스에 *L. acidophilus*를 接種하고 12시간까



**Fig. 4.** Antibacterial effects of fermented tomato juice(Tf) and fermented milk(Mf) by *L. acidophilus*(T: nonfermented tomato juice culture).

지는 抑制帶를 볼 수 없었다. 그러나 24시간부터는 抑制帶가 보이기 시작하여 72시간에는 抑制帶가 20mm에 이르렀다(Table 2).

나) 濁度法에 의한 發育抑制效果: 濁度法으로 culture tomato濾液이 지나는 細菌에 대한 發育抑制效果가 있는지를 조사한 결과 다음과 같은 성적을 얻었다(Fig. 5).

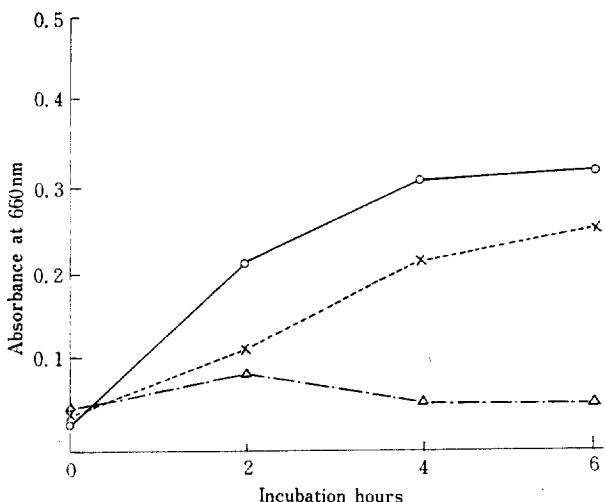


Fig. 5. The effect of cell-free filtrate of tomato juice medium on the growth of *E. coli* in Elliker broth: (0-0 : control, x-x : neutralized cell-free filtrate, △-△ : cell-free filtrate).

*L. acidophilus* culture의 여액을 첨가한 실험군에서는 *E. coli*의 發育에 따른 培地의 吸光度가 거의 증가되지 않았다.

이 사실은 위의 여액이 *E. coli*의 發育을 抑制하였음을 의미한다. 이 여액의 pH가 酸性이기 때문에 酸에 의한 *E. coli*의 發育抑制可能性을 배제하기 위하여 culture 용액을 中和하여 배지에 첨가하고 吸光度를 측정하였으나 culture 여액만 첨가한 實驗群보다는 높은 吸光度를 보였으나 첨가하지 않은 對照群에 대하여는 낮았다.

### 3. *L. acidophilus*가 tomato juice medium에서 生産한 細菌發育抑制物質의 抽出 및 精製

*Lactobacillus acidophilus*를 培養한 tomato juice medium에는 細菌의 發育을 抑制하는 物質이 生産되었음이 밝혀졌다. 여기에서는 그 細菌發育抑制物質의 性状을 밝히려는 목적에서 그 物質을 抽出하고 精製한다음 細菌發育抑制 效果를 조사하였다.

實驗에 사용한 發育抑制物質로는 methanol-acetone 抽出物, gel Sephadex G-50 分液, paper chromato-

Table 3. Antibacterial activity on *B. subtilis* by methanol-acetone extract of *L. acidophilus* culture prepared from tomato juice medium

Methanol-acetone extract (%)	Water (%)	Diameter of inhibition zone (mm)	Units* (unit/ml)
0	100	0	0
10	90	15	17
20	80	18	20
40	60	20	23
50	40	24	27
80	20	28	32
100	0	42	48

\* One unit was arbitrarily defined as the amount of extract giving 25mm diameter of inhibition zone from a disc of 12.7mm diameter.

graphy 處理物 및 thin layer chromatography 精製物의 4가지를 사용하였다.

가) Methanol-acetone 抽出物의 細菌發育抑制效果: methanol-acetone 抽出物의 濃度를 달리하여 抗菌效果를 분석한 성적은 Table 3과 같다.

methanol-acetone 抽出物에 물 90%를 넣어 희석했을 때 抗菌帶는 매 ml당 17 unit로 나타났다. 20%의 희석액은 32 unit로 그리고 전연 물을 첨가하지 않은 抽出物은 48 unit를 보였다. methanol-acetone 抽出物의 各種細菌에 대한 抗菌效果는 Fig. 6 및 Table 4와 같다.

즉 *B. subtilis*, *Ps. fluorescens*, *Pr. vulgaris*, *S. dysenteriae* 및 *Sta. aureus* 등에 대한 抗菌效果에 있어서 *S. dysenteriae*에 대하여는 35mm로서 가장 큰 發育抑制帶를 보였고 다른 細菌에 對하여는 30mm 정도의 發育抑制帶를 보였다. methanol-acetone 抽出物에 함유한 乳酸의 抗菌作用을 배제하기 위하여 실험을 하였다. pH 2.0의 methanol-acetone 抽出物 및 토마토주스에 10N NaOH 용액 또는 1N HCl로 pH 2.5, 4.4

Table 4. Antimicrobial activity of methanol-acetone extract prepared from acidophilus tomato juice medium against 6 different organisms

Test organisms	Strains	Diameter of inhibition zone (mm)
<i>B. subtilis</i>	ATCC 6633	30
<i>Ps. fluorescens</i>	KFCC 32394	30
<i>Pr. vulgaris</i>	CU	32
<i>S. dysenteriae</i>	CU	35
<i>E. coli</i>	ATCC 25922	26
<i>Sta. aureus</i>	ATCC 6538	30

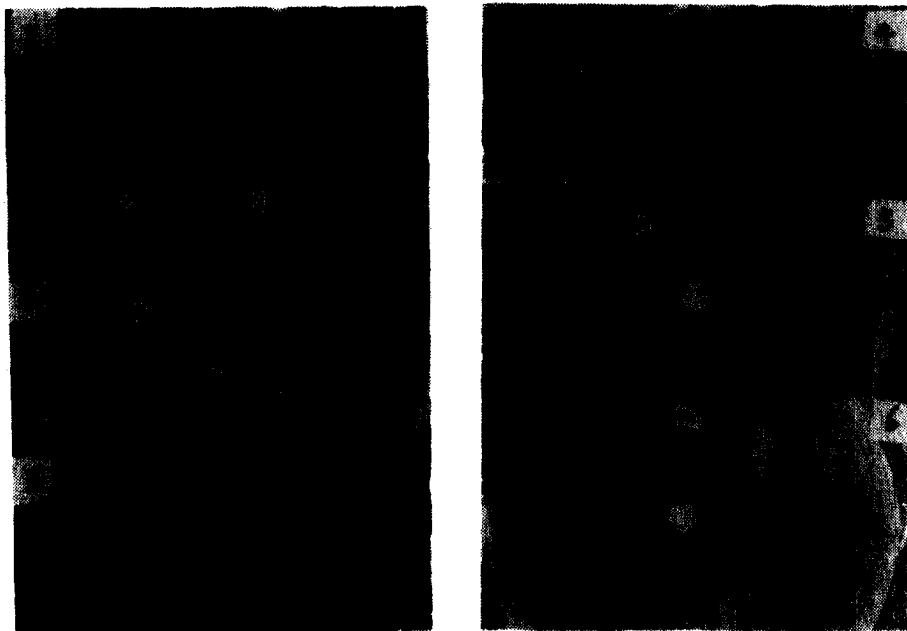


Fig. 6. Inhibition zones of bacteria by methanol-acetone extract of *L. acidophilus* culture of tomato juice medium(1 : *B. subtilis*, M : Methanol extract, MA : methanol-acetone extract, 2 : *E. coli*, 3 : *Ps. fluorescens*, 4 : *Sta. aureus*, 5 : *Pr. vulgaris* 6 : *S. dysenteriae*.)

Table 5. The effect of pH on the antibacterial activity of different preparations of tomato juice medium with or without *L. acidophilus*

pH adjusted	Zone of inhibition(mm)		
	Methanol-acetone extract	Tomato juice acidified by lactic acid	Nonfermented tomato juice
2.5	41	26	0
4.4	18	0	0
7.0	0	0	0

및 7.0으로 각각 조절하고 disc분석법으로 抗菌效果를 비교한 성적은 Table 5와 같다. pH 2.5에서는 모두 抗菌效果가 있었으나 pH 4.4에서는 methanol-acetone 抽出物만이 抗菌效果가 있었다.

나) Gel(Sephadex G-50) 精製物의 細菌發育抑制效果 : methanol-acetone 抽出物은 Sephadex G-50을 이용하여 精製한 分液의 抗菌效果는 다음과 같이 실험하였다. 즉 methanol-acetone 抽出物을 濃縮한 것 5ml를 Sephadex G-50 column에 넣어 38分液을 얻어서 각 分液의 吸光度와 抗菌性有無를 조사하였다(Table 6).

이렇게 해서 얻은 精製物은 주로 12~15 시험관 分液에서만 抗菌效果가 있었다.

다) Paper chromatography 精製物의 細菌發育抑

制效果 : methanol-acetone 抽出物을 Sephadex G-50 column에서 精製한 抗菌物質을 paper chromatography 하여 iodine으로 發色한다음 더욱 精製하였다(Fig. 7).

이 實驗에서 Sephadex G-50 精製物은 네개의 成分(PC<sub>1</sub>, PC<sub>2</sub>, PC<sub>3</sub>, PC<sub>4</sub>)으로 分離되었는데 이 成分은

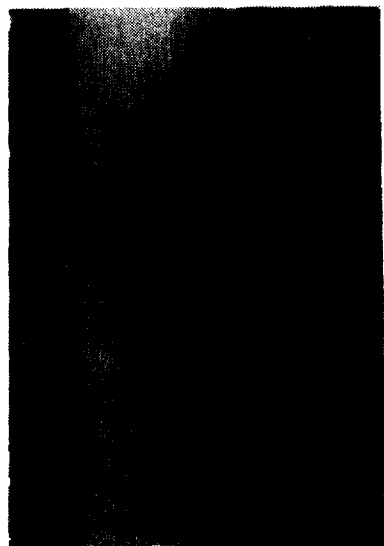


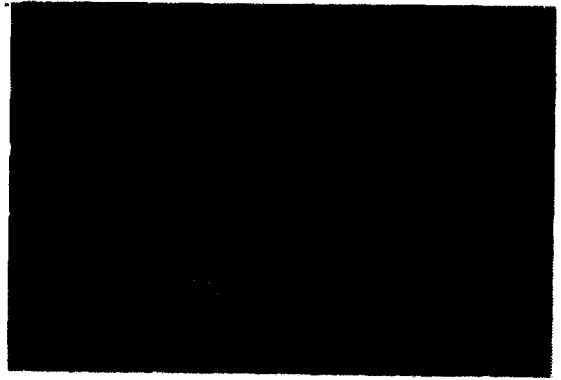
Fig. 7. Paper chromatographic separation, visualized by iodine vapor, of the Sephadex G-50 fraction. Paper chromatographic spot 2(PC<sub>2</sub>) was positive in antibacterial activity.

**Table 6.** Antimicrobial activity of fraction eluates, prepared by *L. acidophilus* in tomato juice medium, fractionated through Sephadex G-50

Fraction number	Inhibition	Absorbance at 275nm
1	--	0.025
2	--	0.024
3	--	0.026
4	--	0.025
5	--	0.029
6	--	0.031
7	--	0.045
8	--	0.189
9	--	0.283
10	--	0.553
11	--	0.283
12	+	2.773
13	+	2.772
14	+	2.772
15	+	2.772
16	--	2.773
17	--	2.773
18	--	2.773
19	--	2.772
20	--	1.805
21	--	0.797
22	--	0.624
23	--	0.610
24	--	0.482
25	--	0.301
26	--	0.290
27	--	0.248
28	--	0.180
29	--	0.132
30	--	0.101
31	--	0.077
32	--	0.064
33	--	0.065
34	--	0.062
35	--	0.058
36	--	0.055
37	--	0.058
38	--	0.053

UV로 照射한 결과 螢光으로 나타나 그 部位를 확인할 수 있었다. 그리고 이들 성분중 paper chromatography spot PC<sub>2</sub>단이 *B. subtilis*에 대한 抗菌효과가 陽性이었다 (Fig. 8).

라) Thin layer chromatography 精製物の 細菌發

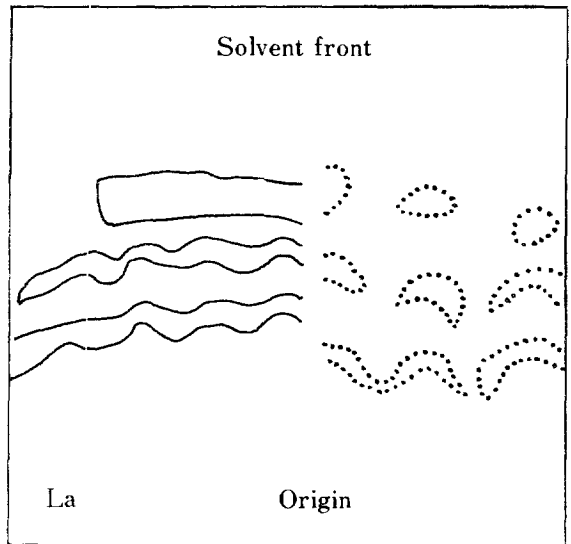


**Fig. 8.** Inhibitory activity of methanol-acetone extract of *L. acidophilus* tomato juice medium, MA : methanol-acetone extract PC<sub>1-4</sub> : The spots from the paper chromatography from Fig. 8.

育抑制効果 : Sephadex G-50 精製物 10~15 $\mu$ 를 TLC 板에 올려 chloroform-methanol 溶媒로 展開한 다음 bromecresol green으로 發色하였다. 한편 展開가 끝난 TLC板을 253.7nm의 UV線 아래서 관찰하였다.

bromecresol green으로 發色된 것에서 酸은 黃綠色으로 보여 抗菌性 有效成分과 구분되었다. UV線에서 는 Rf가 서로 다른 세 가지 吸光帶를 나타내었는데 이들 세가지 吸光帶 中 原點에서 가장 먼쪽의 것(Rf 0.44)이 抗菌효과를 보였으며, 酸의 位置는 原點에서 가장 가까운 쪽에 있었다(Fig. 9).

TLC抽出物을 100배로 희석하여 disc法으로 分析한 결과(Table 7) 細菌에 대하여 20 unit 이상의 抗菌효과



**Fig. 9.** Ultraviolet absorption band of antimicrobial active components developed on TLC and detected at 253.7nm, and lactic acid detected by bromecresol green staining.



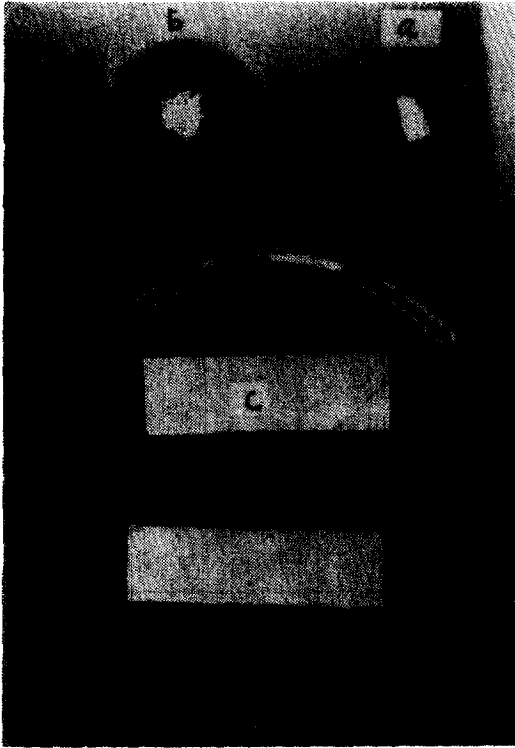


Fig. 10. Bioautography on agar plate seeded with *B. subtilis* of thin layer chromatographic preparations made from tomato juice medium cultured with *L. acidophilus* (a : piece of TLC, b : gel of TLC, c : Bioautography paper).

Table 7. Antimicrobial activity of TLC preparation of *L. acidophilus* culture in tomato juice medium

Test organisms	Strains	Inhibition zone (mm) (dilution 1/100)
<i>B. subtilis</i>	ATCC 6633	25
<i>Ps. fluorescens</i>	KFCC 32394	24
<i>Pr. vulgaris</i>	CU	24
<i>S. dysenteriae</i>	CU	28
<i>E. coli</i>	ATCC 25922	21
<i>Sta. aureus</i>	ATCC 6538	27

를 보였는데 그 중 *E. coli*가 가장 큰 抵抗力을 보였으며 *S. dysenteriae*가 높은 感受性を 보였다(Table 7).

TLC法으로 분리되는 抗菌物質은 매우 少量이어서 精製物의 bioautography로 抗菌效果를 관찰할 수 있었다. Fig. 11의 (a)는 TLC板을 잘라서 그 조각을 한천배지 위에 놓은 것이며, (b)는 TLC板의 gel을 끊어 모아서 한천배지 위에 놓은 것으로서 (b)의 抗菌帶가 (a)의 抗菌帶보다 크게 나타났다. 그리고 (c)는 二重

Table 8. Effect of temperature on antimicrobial activity of methanol-acetone extract of *acidophilus* tomato juice

Temperature (°C)	Zone of inhibition(mm)			
	Exposure time(min)			
	0	20	40	60
25	30	32	32	30
40	32	35	33	31
50	32	34	30	28
100	34	31	32	28
121	32	33	31	31

의 透明한 抗菌帶가 나타났다.

#### 4. *L. acidophilus*가 tomato juice medium에서 生成한 細菌發育抑制物質의 理化學的 性狀

이 실험에서는 *L. acidophilus*를 tomato juice medium에 심고 培養한 다음 培養 여과물로부터 얻은 細菌發育抑制物質의 理化學的 性狀을 규명하였다. 試驗物質로는 methanol-acetone 抽出物과 gel(sephadex G-50) 精製物을 대상으로 하였다.

가) pH에 대한 影響 : Methanol-acetone 抽出物, Sephadex G-50 精製物 및 TLC 精製物은 모두 pH 2.0 이었으며 pH가 상승함에 따라 抗菌效果가 저하하였다. methanol-acetone 抽出物은 pH 7.0에서 抗菌效果를 상실하였다(Table 5).

나) 熱에 대한 影響 : methanol-acetone 抽出物은 熱에 대한 높은 安定性を 보였다. 즉 25°C부터 121°C 사이에서 60분간 열처리하여도 抗菌效果는 변하지 않았다(Table 8).

다) UV吸光 spectrum : methanol-acetone 抽出物과 TLC精製物의 UV吸光 spectrum을 측정하였다. 이 실험에서 methanol-acetone 抽出物은 260nm에서 最高吸光度를 나타내었고, TLC精製物은 最高吸光度를 224nm에서 나타내었다(Fig. 11).

라) Mass spectrum : TLC精製物의 分子量과 構造를 알기 위하여 mass spectrum으로 분석하였다. TLC에서 分離된 試料를 total ion current chromatography에 투여한 결과 단일 피크를 나타내었다(Fig. 12). 다시 그것을 mass spectrometer로 분석한 결과(Fig. 13)는 모피크가 m/e 264로 나타났으므로 이것을 抗菌物質의 分子量으로 推定하였다.

Fig. 14에서 보는바와 같이 分子量은 264로 하고 각 피크를 분석하면 m/e 236과 m/e 264의 차이는 28로서 (C<sub>2</sub>H<sub>4</sub><sup>+</sup>), (CO) 또는 OH=NH)로 생각되며, m/e 193과 m/e 236의 차이는 43으로 (C<sub>3</sub>H<sub>7</sub><sup>+</sup>)과 (CH<sub>3</sub>-

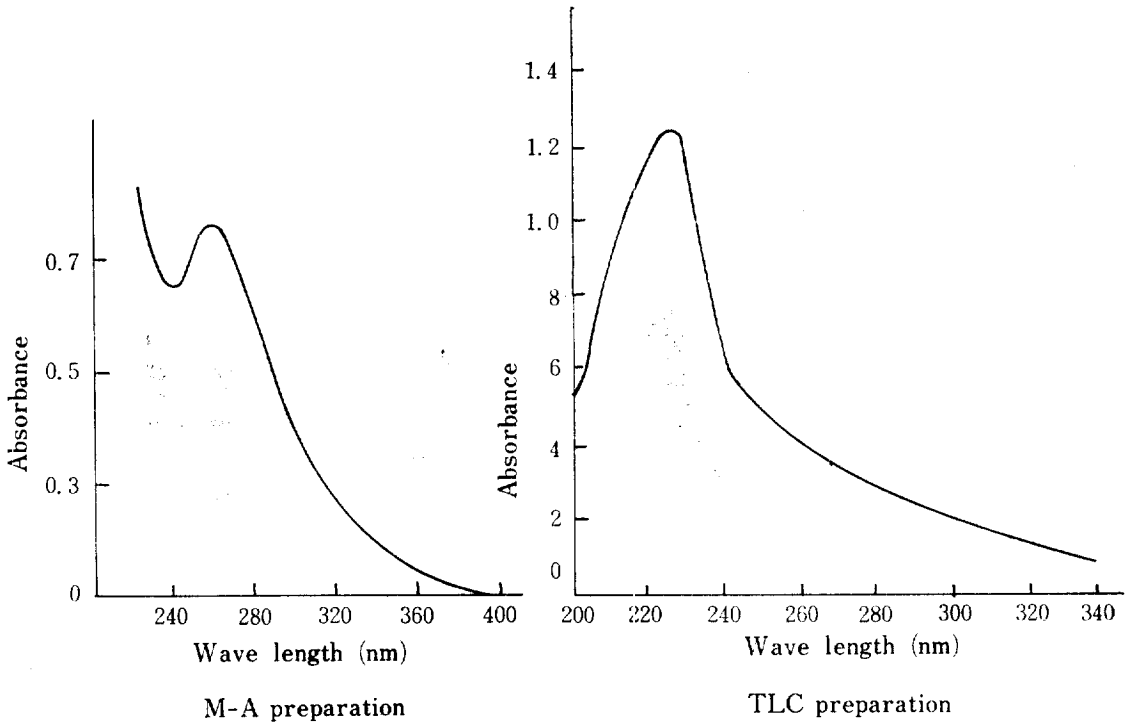


Fig. 11. Ultraviolet absorption spectra of methanol-acetone extract and TLC preparations of tomato juice medium cultured with *L. acidophilus*.

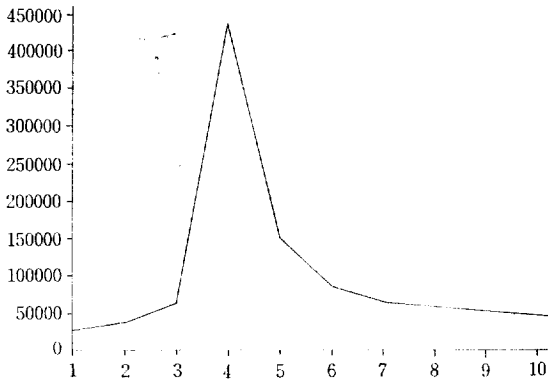


Fig. 12. Total ion current chromatogram of the thin layer chromatographic preparation of tomato juice medium cultured with *L. acidophilus*.

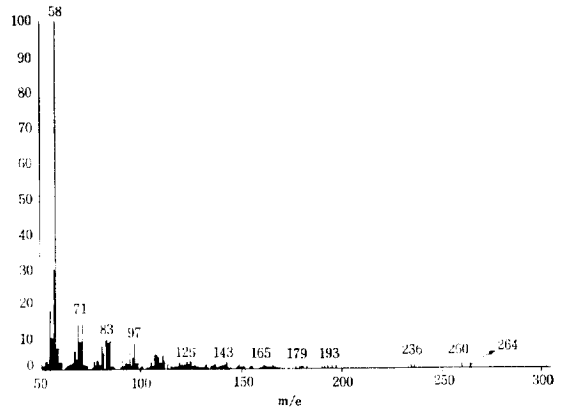


Fig. 13. Mass spectrum of the antimicrobial compound prepared by thin layer chromatography from tomato juice medium cultured with *L. acidophilus*.

$\begin{array}{c} \text{O} \\ \parallel \\ \text{C}^+ \end{array}$ 
 로 추정된다 또 m/e 83은  $(\text{C}_6\text{H}_{11}^+)$ 으로 m/e 71은  $(\text{C}_5\text{H}_{11}^+)$ 이나  $(\text{C}_5\text{H}_7-\text{C}^+)$ 으로 생각되고 m/e 58은 용매인 acetone에 의한 피크로 생각된다.

### 考 察

토마토주스 배지에서 成長한 *L. acidophilus*의 形態는 끝모양이 둥근 桿菌이며 單獨 또는 두개 이상의 連鎖狀으로 되어 있었다. 이것은 牛乳培地에서 관찰한

*L. acidophilus*의 形態와 細胞의 配列 등이 비슷한 것으로 보아<sup>32)</sup> 토마토 주스에 배양하여도 우유에서 배양한 것과 形態學的으로 유사하였다.

tomato acidophilus culture와 우유에서도 필러스 culture의 抗菌작용을 well法으로 측정된 결과 두 cultures가 만든 抗菌帶의 차이는 없으므로 우유배지와 같이<sup>10)</sup> 토마토 주스에서도 *L. acidophilus*가 잘 발육한다는 것을 알 수 있었다.

culture의 항균성은 12시간 培養에서는 나타나지 않았으나 24시간 이후에 나타났다. 이러한 현상은 停止期를 지나서 많은 細胞가 죽은 24시간 이후에 나타남으로서 항균성은 증식기에 생산한 항생물질과 산성환경<sup>1,35)</sup> 및 細胞의 분해 등에 의한 것이라고 생각된다. culture 여과액이 抗菌성을 갖고 있는 것은 두가지 면에서 고려될 수 있다. 첫째는 *L. acidophilus*의 대사물질인 過酸化水素<sup>6)</sup>와 乳酸<sup>11,36)</sup>을 들 수 있고 둘째는 세균이 생산한 抗菌物質인 것이다.

*L. acidophilus*는 성장 초기에 상당한 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>를 생산한다. 물론 이 균은 catalase음성균이다. culture 속에 함유되어 있는 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>는 다른 미생물에 대하여 상당한 수준으로 抗菌作用을 한다<sup>20)</sup>. 그러나 본 연구의 실험과정에서 過酸化水素는 잔존할 수 없다. 저기압상태에서 강한 증발실험과정은 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>와 같은 휘발성 물질이 남아 있을 수 없다. 또한 분리한 抗菌物質이 고온에서 안정하고 抗菌效果를 잃지 않고 있는 것은 過酸化水素와 상관하지 않는 물질이 있음을 증명하는 것이다. 이러한 내열성 抗菌物質은 Shahani<sup>32)</sup>의 acidophilin이나 Hamdan<sup>10)</sup>의 acidolin에서 볼 수 있는 공통적인 특징이다.

culture 여과액의 증화에 의한 결과는 유산외에 다른 어떤 抗菌效果를 나타내는 물질이 있음을 확실히 하였다. lactobacillus culture의 유산 생산은 抗菌物質 생산과 관련<sup>1)</sup>이 있으므로 *L. acidophilus*의 酸 생산은 중요한 의미를 가지고 있다. 그러나 유산균이 생산한 강한 산미는 유제품의 맛을 나쁘게 한다<sup>22)</sup>. Gilliland와 Speck<sup>9)</sup>는 lactic streptococci 배양물을 증화시켜도 *Salmonella gallinarum*에 대한 抗菌作用을 계속 유지했다고 보고하였다.

Daly 등<sup>7)</sup>은 *Sta. aureus*의 성장배지, *S. diacetylactis*의 培養濾液을 첨가하여 *Sta. aureus*를 배양한 결과 발육이 억제되었다고 한다. 또 *S. diacetylactis*의 培養濾液에 함유한 유산과 초산의 양에 해당하는 초산과 유산을 첨가하여 *Sta. aureus*의 發育抑制作用을 보았다.

그 결과 *S. diacetylactis*의 培養濾液을 첨가한 것이

초산과 유산을 첨가한 것 보다 *Sta. aureus*의 發育抑制作用이 강하였다. 이 결과로 培養濾液에는 유산이나 초산 외의 抗菌性物質이 있음을 시사하는 것이다.

본 연구는 유산외에 항균력을 지니고 있는 抗菌物質을 추출하고 정제하기 위하여 alcohol-acetone 추출법을 이용하였다.

alcohol-acetone 추출법은 Kodama<sup>13)</sup>, Mikolajcik<sup>23)</sup> 및 Shahani 등<sup>32)</sup>에 의하여 성공적으로 수행되었는데 즉 *L. acidophilus*를 脫脂乳에 배양하고 이 배양물로부터 항균물질의 추출을 시도하였다. 그러나 본 연구는 *L. acidophilus*의 培地는 脫脂乳가 아닌 토마토 주스이며 이러한 식물성배지를 이용하여 항균물질을 추출한 연구는 없는 것으로 안다. 粗抽出物(M-A extract)에는 유산도 함유되어 있기 때문에 그것도 항균력에 영향을 미친다고 볼 수 있다. 그러나 그것을 증화할 때 pH 4.4에서 계속 항균력을 나타내고 있지만 직접 유산을 첨가한 試料은 pH 4.4에서 항균력이 완전히 사라졌다. 유산은 비배리상태에서는 항균력을 나타내지 않는 것이 해리하면 항균력을 잃어버린다는 Minor와 Marth<sup>24)</sup>의 보고와 일치하는 것이다. 粗抽出物로부터 유산을 제거한 抗菌物質을 精製하는 것은 매우 긴요한 과정이라고 볼 수 있다. 粗抽出物은 gel filtration chromatography를 통하여 더욱 精製되었다. 그러나 역시 그것도 유산이 소량 포함되어 있었다. gel 여과액은 silica gel의 TLC板에서 分離精製되었으며, 이것은 순수한 抗菌物質로서 발효토마토 주스의 항균력보다 125배의 효과가 있었다. sephadex gel 여과물을 TLC板에 전개하여 bromocresol green으로 염색하면 黃綠色으로 염색된 부분에서 언제나 유산이 분리되었으며, 이것을 HPLC로 분석한 結果 표준유산에서와 동일한 결과로 나타났다. 그러나 bromocresol green에 염색되지 않고 UV광선의 吸光帶 중 가장 위의 것(Rf 0.44)은 항균력을 보였으며, 또한 HPLC로 정제한 것으로부터는 유산은 검출되지 않았다. Rf 0.44의 物質이 바로 *L. acidophilus*가 생산한 抗菌物質이다. Hamdan<sup>10)</sup>이 *L. acidophilus*의 脫脂乳 배양물로부터 항생물질 acidolin을 분리할 때 TLC로부터 유산이 없는 것을 얻은 것과 Shahani 등<sup>32)</sup>이 *L. acidophilus*의 우유배지로부터 抗菌物質 acidophilin를 분리할 때 TLC를 응용하여 순도높은 精製物을 얻은 것은 본 연구에서와 같다.

生物自叙法에 의하여 나타나는 抗菌帶는 배양시간이 경과함에 따라 相異한 二重의 透明度를 나타내었다. 그것은 petri dish를 5°C에 두었을 때 TLC板 조각으로부터 抗菌物質이 스며나와 一次的으로 그 부위의 세균

을 억제하여 透明한 抗菌帶를 이루고, 培養(22°C)이 시작되어 細胞가 急速히 分裂하면서 뒤늦게 스며든 抗菌物質에 의하여 二次的으로 발육이 억제되어 약간 不透明한 抗菌帶가 나타난 것으로 생각된다. *Streptococcus lactis*가 생산한 nisin은 細胞벽의 peptidoglycan의 合成을 방해하여 細菌을 溶解하는 抗菌物質로 알려져 있다<sup>40)</sup>.

精製한 抗菌物質이 disc分析에서 *B. subtilis*나 *S. dysenteriae* 등에 대하여 抑制作用을 나타내는 것은 Hamdan의 acidolin이나 Shahani의 acidophilin의 抗菌物質과 유사한 効果를 보였다. 또 실험한 각종 세균에 대한 抗菌効果는 다른 연구자들<sup>30,36,37)</sup>이 보고한 광범위한 항생물질과 유사한 結果로 나타났다.

이 물질은 acetone과 ethanol에 파괴되는 lactocidin<sup>38)</sup>이나 chloroform에 눈지않은 lactolin<sup>13)</sup>과도 다른 물질이라고 생각된다. mass spectrum의 분석으로 分子量이 264로 추정되었으며, 이것은 acidolin의 분자량 198과 acidophilin의 분자량 286에 비하여 볼때 각각 相異なる 分子量으로서 이들은 모두 低分子 化合物에 속한 것이다.

앞으로 본 연구에서 分離한 抗菌物質이 어떤 기질으로서 細菌의 發育을 抑制하는가에 대하여, 또 본 抗菌物質의 動物體內에서의 抗生作用에 관하여 더 研究할 問題이다.

## 結 論

本 研究는 *Lactobacillus acidophilus*를 토마토 배지에서 培養하고 그 培養液에 (1) 抗菌抑制物質이 있는가를 확인하고 (2) 그 抗菌物質을 抽出 및 精製하였으며, (3) 生物學的, 理化學的 性質을 구명하여 그 結果를 다음과 같이 要約한다.

1. **Tomato acidophilus culture의 發育抑制作用:** *L. acidophilus*의 토마토 culture는 well法으로 抗菌作用이 있음을 증명하였으며, 그 culture의 濃液 및 그것의 酸中和濃液은 濁度法에 의하여 *E. coli*의 發育을 抑制하였으므로 乳酸이외의 抗菌物質이 存在함을 확인하였다.

2. **精製試驗:** Tomato acidophilus culture를 동결건조하여 metanol-acetone extraction, Sephadex G-50 gel filtration, paper chromatography 및 thin layer chromatography法으로 活性도가 높은 抗菌物質을 精製하였다.

3. **精製抗菌物質의 生物學的, 理化學的 性狀:** 精製한 抗菌物質의 生物學的, 理化學的 性狀調査에서 다음과 같은 性적을 얻었다.

1) 抗菌物質은 *B. subtilis*(ATCC 6633), *E. coli*(ATCC 25922), *Sta. aureus*(ATCC 167), *Ps. fluorescens*(KFCC 32394), *Pr. vulgaris* 및 *S. dysenteriae*의 發育을 抑制하였다.

2) 抗菌物質은 pH 2.0이었으며 pH 7.0의 조건하에 서는 抗菌作用을 상실하였으며, 121°C에서 60분간 안정하였다.

3) Methanol-acetone 抽出物은 최고 UV吸光波長이 260nm이며 TLC精製物은 224nm이었다.

4) TLC法으로 精製한 抗菌物質은 抗菌作用이 약 130 배로 증가하였다.

5) TLC法으로 精製한 抗菌物質은 抗菌작용을 나타내는 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>나 乳酸을 함유하지 아니하였다.

4. **生物學的自叙法:** TLC板에 나타난 UV光線 吸光帶에 있는 물질은 *B. subtilis*에 대하여 生物學的自叙法으로 실험한 結果 강력한 抗菌作用이 있었다.

5. **Mass spectrometer分析:** TLC法으로 精製한 抗菌物質은 mass spectrometer分析에서 分子量이 264로 推定되었으며, 그 물질의 構成分子團으로서 (C<sub>2</sub>H<sub>4</sub><sup>+</sup>),

(CO), (CH=NH), (C<sub>3</sub>H<sub>7</sub><sup>+</sup>), (CH<sub>3</sub>-C<sup>O</sup>), (C<sub>6</sub>H<sub>11</sub><sup>+</sup>), (C<sub>5</sub>H<sub>11</sub><sup>+</sup>) 및 (C<sub>3</sub>H<sub>7</sub>-C<sup>O</sup>)로 추정되었다.

## 參 考 文 獻

1. Baribo, L.B. and Foster, E.M.: Some characteristics of the growth inhibitor produced by a lactic Streptococcus. J. Dairy Sci. (1951) 34 : 1128.
2. Berridge, N.J.: Further purification of nisin. Lancet(1947) 253 : 7.
3. Cheplin, H.A. and Wiseman, J. I.: Observations on the effect of Lactobacillus acidophilus milk upon cases of chronic constipation. Boston M. & S. Jour(1921) 185 : 627.
4. Cheplin, H.A., Post, C.D. and Wiseman, J. R.: Bacillus Aacidophilus milk and its therapeutic effects. Boston M & S. Jour(1923) 189 : 405.
5. Cheplin, H.A.: Further studies on the clinical value of B. acidophilus milk, with special reference to basis of selection of strains for therapeutic purposes. Boston M. & S. Jour. (1927) 197 : 460.

6. Dahiya, R.S. and Speck, H.C. : Hydrogen peroxide formation by Lactobacilli and its effect on Staphylococcus aureus. J. Dairy Sci. (1968) 51 : 1568.
7. Daly, C., Sandine, W.E. and Elliker, P.R. : Interaction of Food starter cultures and food-borne pathogens: Streptococcus diacetylactis versus food pathogens J. Milk Food Tech. (1972) 35 : 347.
8. Genske, R.P. and Branen, A.L. : Properties of antimicrobial substances with S. diacetylactis and L. citrovorum. Modern Dairy(1973) 52(7/8) : 12.
9. Gilliland, S.E. and Speck, M.L. : Interactions of food starter cultures and food-borne pathogens: Lactic streptococci versus staphylococci and salmonellae. J. Milk Food Tech. (1972) 35: 307.
10. Hamdan, L.Y. and Mikolajcik, E.M. : Acidolin An Antibiotic produced by Lactobacillus acidophilus. J. Antibiotic. (1974) 27 : 631.
11. Kao, C.T. and Prazeir, W.C. : Effect of lactic acid bacteria on growth of staphylococcus aureus. Appl. Microbiol. (1966) 14 : 251.
12. Kavasnikov, E.I. and Studenko, V.I. : Antibiotic properties of Lactobacillus brevis. Microbiol. zh. kyyiv. 29(2) : 146 Cited from Dairy Sci. abs. (1967) 29 : 3972.
13. Kodama, R. : Studies on lactic acid bacteria. 2. Lactolin new antibiotic substance produced by lactic acid bacteria. (1952).
14. Kopeloff, N. : Clinical results obtained with Bacillus acid ophilus. Archt. Int. Med. (1924) 33 : 47.
15. Kopeloff, N. : Permanence of results obtained by L. acidophilus therapy. Proc. soc. Exp. Biol. & Med. (1925) 22 : 393.
16. Kopeloff, N. and Beerman, L.F.L. : acidophilus vs. L. bulgaricus milk feeding. Proc. soc. Exp. Biol. & Med. (1925) 22 : 318.
17. Kopeloff, N. : "Lactobacillus acidophilus". Published by Williams & Wilkins Co., Baltimore, Md., 1926.
18. Kulp, W.L. and Rettger, L.F. : A comparative study of Lactobacillus acidophilus and Lactobacillus bulgaricus, J. Bact. (1924) 9 : 357.
19. Maro, E. : Ueber die noch Gram Garbbaren Bacillen der saugling stuhles. wien. klin. Wchnschr. (1900) 5 : 114.
20. Mattick, A.T.R. and Hirsch, A. : Further observations on an inhibitory substance(nisin) from lactic streptococci, Lancet(1947) 253 : 5.
21. Metchnikoff, E. : Prolongation of life, published by G.P. Putnams Song. New York. 1908.
22. Mikolajcik, E.M. and Hamdan, I.Y. : Lactobacillus acidophilus I. Growth characteristics and metabolic products. cultured Dairy prod. (1975a) 10 : 10.
23. Mikojcik, E.M. and Hamdan, I.Y. : Lactobacillus acidophilus, 2. Antimicrobial agents. Cultured Dairy Prod. (1975b) 10 : 18.
24. Minor, T.E. and Marth, E.H. : Loss of viability by staphylococcus aureus, in acidified media. J. Milk Food Tech. (1972) 35 : 191.
25. Oxford, A.E. : Diplococcin, an antibacterial protein elaborated by certain milk streptococci. Biochem. J. (1944) 38 : 178.
26. Price, R.J. and Lee, J.S. : Inhibition of Pseudomonas species by hydrogen peroxide producing lactobacilli, J. Milk Food Technol. (1970) 33 : 13.
27. Rettger, L.F. and Cheplin, H.A. : Treatise on the transformation of the intestinal flora, with the special reference to the implantation of Bacillus acidophilus. Yale Unive. press, New Haven Conn. 1921a.
28. Rettger, L.F. and Cheplin, H.A. : Therapeutic application of Bacillus acidophilus. Proc. soc. Exp. Biol & Med. (1921) 19 : 72.
29. Rettger, L.F. : Some aspects of intestinal bacteriology in relation to health, Am. Jour. Publ. Health. (1929) 19 : 771.
30. Sabin, D.B. : Antibiotic effect of Lactobacillus acidophilus. Nature. (1963a) 199 : 811.
31. Sabin, D.B. : An antibiotic-like effect of Lactobacillus acidophilus. Nature. (1963b) 199 : 811.
32. Shahani, N.M., Vakil, J.R. and Chandan, R. C. : Antibiotic acidophilin and Process of preparing the same. U.S. patent No. 3. (1972) 689. 640.

33. Shahani, K.M., Vakil, J.F. and Kilara, A. : Natural antibiotic activity of *Lactobacillus acidophilus* and *bulgaricus*. *Cultured Dairy Prod. J.* (1976) 11 : 14.
34. Shahani, K.M., Vakil, J.F. and Kilara, A. : Natural antibiotic activity of *Lactobacillus acidophilus* and *bulgaricus*. 2. Insolation of Acidophilin from *L. acidophilus*. *Cult. Dairy Prod. J.* (1977) 12 : 18.
35. Sorrells, K.M. and Speck, M.L. : Inhibition of *Salmonella gallinarum* by culture filtrates of *Leuconostoc citrovorum*, *J. Dairy Sci.* (1970) 53 : 239.
36. Tramer, J. : Inhibitory effect of *Lactobacillus acidophilus*. *Nature.* (1966) 211 : 204.
37. Vicek, A. and Kneifl, J. : On experiments on normalization of disordered intestinal flora in infants. II. Clinical experiments with omniflora in premature infants. *Z. Kinderheilk.* 89(4) : 155, 1964. Cited in *Dairy Sci. Abst.* (1965) 27 : 2834.
38. Vincent, J.G., Vecmett, R.C. and Riley, R. F. : Antibacterial activity associated with *Lactobacillus acidophilus*. *J. Bact.* (1959) 78 : 477.
39. Wheeler, D.M., Hirsch, A. and Mittick, A. T.R. : Lactobacillin. An antibiotic from lactobacilli. *Nature*(1951) 168 : 659.
40. Woodbine, M. : *Antibiotics and Antibiosis in Agriculture*. Published by Butterworths, London-Boston. (1977)p.109.