

김치로부터 항진균 활성 *Lactobacillus plantarum*의 분리 및 특성 규명

양은주 · 장해춘*
조선대학교 식품영양학과

Antifungal Activity of *Lactobacillus plantarum* Isolated from Kimchi. Yang, Eun Ju and Hae Choon Chang*. Department of Food and Nutrition, Chosun University, Gwangju 501-759, Korea – A lactic acid bacterium having antifungal activity was isolated from kimchi. It was identified as *Lactobacillus plantarum* based on its morphological and biochemical properties, and 16S rRNA sequence, and designated as *Lb. plantarum* AF1. This isolate inhibited the growth of *Aspergillus flavus* ATCC 22546, *A. fumigatus* ATCC 96918, *A. petrakii* PF-1, *A. ochraceus* PF-2, *A. nidulans* PF-3, *Epicoccum nigrum* KF-1, and *Cladosporium gossypicola* KF-2 under a dual culture overlay assay. Also, the antimicrobial activity was found to be active against various species of Gram-positive and Gram-negative bacteria. The antifungal activity was found to be stable after heat (121°C, 15 min) and proteolytic enzyme treatment, but it was unstable over pH 5.0. The antifungal compound(s) was estimated to have a low molecular mass (below 3,000 Da).

Key words: Antifungal activity, kimchi LAB, *Lactobacillus plantarum*

서 론

인체에 유해한 미생물 중 곰팡이는 많은 종류의 식품에서 부패를 일으키며 이취나 변색 등 식품의 품질저하를 일으킨다. 그러나 곰팡이의 오염으로 인한 가장 큰 문제는 곰팡이 독소(mycotoxin)의 생성으로, 곰팡이 독소는 인체에 여러 가지 만성적 또는 급성적인 영향을 미치며 연간 수백만 달러의 피해를 입혀 농산물을 폐기 처분하게 만든다[8]. FAO (Food and Agriculture Organization)에서는 전 세계 농산물의 25%가 곰팡이 독소로 오염되었음을 추정하였으며, 세계 식품 생산의 5~10%가 곰팡이의 오염으로 상당한 경제적 손실을 초래하고 있음을 보고하였다[2, 5]. 식품에서 곰팡이의 오염을 억제하기 위하여 다양한 항생제와 보존료를 사용하고 있으나 최근에는 내성을 가지는 곰팡이들이 점점 증가하면서 심각한 문제로 대두되고 있다[4, 18].

현재 식품보존을 위한 방법으로는 여러 가지 물리적 방법과 화학 첨가물을 이용하는 화학적 방법 등이 있으나, 물리적 처리로 인한 식품 질의 저하와 영양적인 손실, 화학 보존제 사용에 대한 소비자들의 거부감과 미생물의 내성 문제 등으로 새로운 식품보존 방법에 대한 요구가 증가하고 있다. 이러한 문제들을 해결할 수 있는 식품보존의 방법으로 천연물 유래의 식품보존제에 대한 개발 필요성과 함께 기존의 식품보존 방법을 보완하거나 대체할 수 있는 새로운 생물학적 보존제의 개발이 요구되고 있다[6].

유산균은 동서양의 발효채소류, 발효유제품에 활용되어온 균주로서 발효식품의 풍미증가와 함께 식품보존 작용을 지닌다. 유산균의 식품보존 기능은 유산균이 생산하는 유기산에 의한 pH 저하와 함께 H₂O₂, CO₂, diacetyl, bacteriocin 등 다양한 항균 물질들을 생산하여 유해 미생물들을 저해하기 때문으로 알려져 있다[11, 21]. 유산균은 오랜 시간동안 인류가 발효식품과 함께 섭취한 GRAS(generally recognized as safe) 균주로서 최근 건강기능성 식품으로서도 활용되고 있다. 이와 같은 유산균의 특성 때문에 천연 식품보존제를 개발하는데 유산균이 가장 적합한 균주라는 인식과 함께, 상업적으로 활용 가능한 보다 강력한 천연 식품보존제 개발에 관심이 집중되고 있다. 이에 따라 유산균의 항미생물 활성(antimicrobial activity)과 관련된 수많은 연구들이 이루어지고 있으나 대부분의 연구들이 유산균의 항세균 활성(antibacterial activity)과 항세균 물질(박테리오신)에 집중되고 있다[11, 21]. 유산균에서는 실제 강력한 항진균 활성(antifungal activity)을 지니는 경우가 많지 않아, 항진균 활성에 대한 연구는 극히 미흡한 실정이다[19]. 보고된 연구들도 대부분이 단순히 항진균 활성을 지니는 유산균에 대한 보고에 그치고 있으며, 항진균 물질이나 항진균 활성 기작에 대한 연구들은 극히 소수에 불과하다[19]. 그러나 실제 식품산업에서 식품보존제로 활용되기 위해서는 항세균 활성보다는 항진균 활성까지 포괄적으로 작용되는 것이 요구된다.

우리나라의 전통 발효 식품인 김치는 숙성 중에 다양한 김치 유산균이 증식하여 발효에 관여하므로 유용 유산균의 훌륭한 보고가 될 수 있다[13]. 김치 유산균의 항균 활성 및 항균 물질에 대한 연구들이 활발히 이루어지고 있으나 현재 김치 유산균의 항진균 활성에 대한 연구는 단 1편에 불과하

*Corresponding author

Tel: 82-62-230-7345, Fax: 82-62-222-8086

E-mail: hcchang@mail.chosun.ac.kr

다[9].

본 연구에서는 김치로부터 항진균 활성을 가진 유산균을 분리·동정하고 분리 균주의 항미생물 활성 범위를 조사하였다. 또한 분리 균주가 생산하는 항진균 물질의 특성을 조사하여 세균뿐만 아니라 인체에 유해한 곰팡이를 억제할 수 있는 강력한 천연 식품보존제의 개발을 위한 기초자료를 제공하고자 하였다.

재료 및 방법

항진균 활성 균주 및 감수성 곰팡이의 분리

광주광역시와 전라남도 등지에서 잘 익은 배추김치를 수집하여 김치 내용물 전체를 마쇄한 후에 멸균거르로 여과하였다. 김치 여과액을 멸균수를 이용하여 단계적으로 희석한 후에 100 μ L를 취하여 CaCO₃가 2%(w/v) 첨가된 MRS (Difco Laboratories, MI, U.S.A.) 한천배지(1.5% agar, w/v)에 도말하였다. 30°C에서 평판배양하면서 투명환을 나타내며 집락을 형성하는 균주들 중 곰팡이에 대한 저해활성을 보이는 균주와 이에 감수성을 나타내는 곰팡이를 동시에 분리하였다. 분리 균주는 MRS 액체배지에 접종하여 30°C에서 24시간 동안 배양하였으며, 분리 곰팡이는 PDA(potato dextrose agar, Difco Laboratories) 평판배지에 접종하여 25°C에서 5일 동안 배양한 후 실험에 사용하였다.

분리 균주의 동정

항진균 활성을 나타내는 분리 균주의 동정을 위하여 일차적으로 형태학적, 생화학적 특성을 조사하였다. 그람 염색 및 현미경 관찰과 API 50 CHL system(BioMerieux, Marcy l'Etoile, France)을 이용하여 당 발효능을 조사한 후에 균주 동정 프로그램(<http://apiweb.biomerieux.com>)을 이용하여 균주를 동정하였다. 최종적인 동정을 위하여 분리 균주의 16S rRNA 염기서열을 결정하여 알려진 균주들과 비교하였다. 분리 균주의 16S rRNA sequencing은 Palmcycler(Corbett Research, Australia)를 사용하여 다음과 같은 방법으로 수행하였다. 분리 균주의 chromosomal DNA를 Wizard genomic DNA purification kit(Promega, Madison, WI, U.S.A.)를 이용하여 분리한 후에 LeuP-F(5'-GCGGCGTGCCTAATACATGCAAGTCG-3')와 LeuP-R(5'-GACCCGGGAACGTATTCACCGCGGC-3') primer를 사용하여 1차 PCR을 수행하였다. 16S rRNA의 complete sequence 분석을 위한 2차 PCR은 Lb.p-F(5'-ATTAATTTGAGAGTTTGATCCTGGCTCAGGAC-3')와 Lb.p-R(5'-AAAAAGAAAGGAGGTGATCCAGCCGAGGTT-3') primer를 사용하였다. 1, 2차 PCR 산물은 각각 pGEM-T vector(Promega)에 cloning한 후 ABI PRISM 3730 DNA Analyzer(Applied Biosystems, Foster City, CA, U.S.A.)를 이용하여 염기서열을 분석하였다. 그 결과를 BLASTN 프로그램을 이용하여 GenBank의

ribosomal RNA gene sequence와 비교분석하였다.

감수성 곰팡이의 동정을 위한 ITS-5.8S rDNA sequencing은 다음과 같은 방법으로 수행하였다. 곰팡이의 균사체를 saline solution(0.8% NaCl, 0.0125% tween 20)에 현탁한 후에 원심분리를 통하여 균사체를 획득하였다. 얻어진 균사체에 lysis buffer(0.05 M EDTA, pH 8.0, 0.3% SDS)를 가하여 10분간 방치한 후에 멸균된 glass bead를 이용하여 균사체를 파쇄하였다. 원심분리(13,900 \times g, 3 min)후 상정액을 취하여 동일 부피의 isopropanol을 가하여 genomic DNA를 침전시켰다. 원심분리에 의해 얻어진 genomic DNA는 70% ethanol을 이용하여 세척하였다. 얻어진 genomic DNA는 미량의 멸균수를 첨가하여 현탁하고, 60°C에서 1시간 처리한 후 PCR에 사용하였다. PCR은 universal primer인 ITS1(5'-TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3')과 ITS4R(5'-CAGACTT(G/A)TA(C/T)ATGGTCCAG-3') primer를 사용하여 수행하였다. 증폭된 PCR 산물은 Wizard SV Gel and PCR clean-up system(Promega)을 이용하여 정제한 후에 ABI PRISM 3730 DNA Analyzer를 이용하여 염기서열을 분석하였다. 그 결과는 BLASTN 프로그램을 이용하여 GenBank의 ribosomal RNA gene sequence와 비교하였으며, sequence의 상동성은 Clustal X program을 이용하여 분석하였다.

분리 균주의 항진균 활성 측정

항진균 활성 측정 실험에 사용한 감수성 곰팡이 중 *Aspergillus flavus* ATCC 22546, *Aspergillus fumigatus* ATCC 96918, *Penicillium roqueforti* ATCC 10110은 American Type Culture Collection(ATCC, Manassas, VA, U.S.A.)으로부터 구입하였으며, *Aspergillus petrakii* PF-1, *Aspergillus ochraceus* PF-2, *Aspergillus nidulans* PF-3, *Cladosporium gossypicola* KF-2는 본 실험실에서 메주(PF-1~3)와 김치(KF-2)로부터 분리한 곰팡이로서 본 실험에 사용하였다. 항진균 활성 측정은 dual culture overlay assay 방법[14]을 변형하여 다음과 같이 시행하였다. 24시간 동안 배양된 분리 균주의 배양액 10 μ L(7.8×10^9 cfu/mL)를 micropipette을 이용하여 MRS 평판배지의 중앙에 3 cm 길이로 그어주었다. 감수성 곰팡이는 potato dextrose 또는 malt extract(Difco Laboratories) soft agar(0.7% agar) 10 mL에 1×10^6 곰팡이 포자를 첨가하여 분리 균주가 접종된 MRS 평판배지 위에 부어주었다. 분리 균주와 곰팡이가 접종된 평판배지들은 30°C에서 24시간 배양한 후 각 곰팡이의 생육 온도에서 배양하면서 생육 저해환의 생성 여부를 관찰하였다.

조항균 물질의 준비

본 실험에 사용된 항균 물질은 다음의 방법에 의하여 준비하였다. 분리 균주를 5 mL MRS 액체 배지에 접종하여

30°C에서 24시간 동안 정치하면서 전배양하였다. 100 mL MRS 액체 배지에 1%의 전배양액을 접종하고 30°C에서 24시간 동안 본배양한 후 배양액을 4°C에서 원심분리(9,500×g, 15 min)하여 얻은 상정액을 0.45 µm membrane filter (Advantec MFS, Inc., Japan)로 제균하였다. 제균된 상정액을 동결 건조(freeze dry system, SFDSM12, Samwon Co., Korea)한 후에 20 mM sodium acetate(pH 4.0) 완충액에 5배 농축 배율로 녹여 항미생물 활성 실험에 사용하였다.

항균 물질에 의한 항미생물 활성

분리 균주가 생산하는 항균 물질에 의한 그람 양성균과 음성균, 유산균 및 곰팡이에 대한 항미생물 활성을 paper disk method[10]를 사용하여 조사하였다. 실험에 사용한 감수성균 중 ATCC 균주는 ATCC로부터 구입하였으며, KFRI 균주는 한국식품연구원(Korea)으로부터 분양받아 사용하였다. 감수성균으로 사용한 곰팡이들은 MEA(malt extract agar, Difco Laboratories) 또는 PDA 배지 20 mL를 멸균하여 식힌 후에 곰팡이 포자를 5×10^4 cfu/mL로 첨가하여 petri dish에 부은 후에 균으면 실험에 사용하였다. 감수성균으로 사용한 세균들은 LB(1% bacto-tryptone, 0.5% yeast extract, 1% NaCl) 평판배지에 1×10^6 cfu/plate로 도말하여 준비하였다. 곰팡이 포자가 첨가된 평판배지 또는 세균이 도말된 평판배지위에 8 mm 직경의 paper disk(Advantec, Toyo Roshi Kaisha, Ltd., Japan)를 놓고 조항균 물질을 100 µl씩 일정하게 가한 후에 감수성 세균은 37°C에서 24시간 동안 배양하고, 감수성 곰팡이는 25°C 또는 30°C에서 24~96시간 동안 배양하여 분리 균주가 생산하는 항균 물질에 의한 생육 저지환 생성 여부를 관찰하였다. 생육 저지환은 digimatic caliper(CD-15CPX, Mitutoyo Co., Japan)를 사용하여 지름을 측정하였다.

생육시기에 따른 항진균 활성

분리 균주를 30°C에서 0~120시간 동안 정치배양하면서 600 nm(Ultrospec 2100 pro, Amersham Biosciences, Uppsala, Sweden)에서 흡광도를 측정하여 생육곡선을 그리고, 생육에 따른 배양액의 pH(pH meter, M545, Corning Inc., NY, U.S.A.)를 측정 후 이때의 항진균 활성을 측정하였다. 항진균 활성은 2배 희석법을 사용하여 spot-on-the lawn test 방법[7]으로 측정하였다. 감수성 곰팡이인 *A. fumigatus* ATCC 96918의 포자를 PDA 배지 20 mL에 5×10^4 cfu/mL로 첨가하여 petri dish에 부은 후에 균으면 조항균 물질 20 µL를 배지 위에 spotting하여 30°C에서 48시간 배양한 후 항진균 활성을 측정하였다. 항진균 활성 역가는 항균 물질을 순차적으로 2배씩 희석하여 저해환을 형성하는 최대 희석배수의 역을 취하고, 이 값에 1 mL에 대해서 환산해주는 환산계수를 곱하여 AU(activity unit)/mL로 나타내었다.

항진균 물질의 안정성

항진균 물질의 pH, 온도 및 각종 효소처리에 대한 안정성을 조사하였다. pH에 대한 영향을 알아보기 위하여 분리 균주의 배양상정액을 5 N HCl과 5 N NaOH를 사용하여 pH 3.0~7.0으로 조정하여 37°C에서 2시간 동안 처리하였다. pH-renaturation 실험에서는 균주의 배양상정액을 pH 3.0~7.0에서 2시간 동안 처리 후 5 N HCl과 5 N NaOH를 사용하여 원래의 배양액 pH인 pH 3.9로 조정하여 항진균 활성을 측정하였다. 온도에 의한 영향을 알아보기 위하여 조항균 물질을 30°C, 50°C, 70°C에서 24시간, 100°C에서 30분, 121°C에서 15분간 열처리한 후에 잔존활성을 측정하였다. 각종 효소에 대한 영향을 알아보기 위하여 조항균 물질에 proteinase K(EC 3.4.21.64, Sigma Co., U.S.A.), protease (type I, Sigma), pepsin(EC 3.4.23.1, Sigma), trypsin(EC 3.4.21.4, Sigma), α -chymotrypsin(EC 3.4.21.1, type I-S, Sigma), lysozyme(EC 3.2.1.17, Sigma), α -amylase(EC 3.2.1.1, Type VIII, Sigma), lipase(EC 3.1.1.3, type VII, Sigma)는 2 mg/mL, aminopeptidase I(EC 3.4.11.22, Sigma)는 1 unit/mL의 농도로 처리한 후에 잔존하는 항진균 활성을 측정하였다. 항진균 활성 역가는 spot-on-the lawn test 방법을 사용하여 AU(activity unit)/mL로 나타내었으며, 감수성 곰팡이로는 *A. fumigatus* ATCC 96918을 사용하였다.

항진균 물질의 분자량

항진균 활성 분리 균주를 100 mL MRS 액체 배지에서 30°C, 24시간동안 정치배양한 후, 4°C에서 원심분리(9,500×g, 15 min)하여 회수한 상정액을 0.45 µm membrane filter로 제균하였다. 제균된 상정액을 Centriprep YM-3(Millipore Co., Billerica, MA, U.S.A.)를 이용하여 원심분리(3,000×g)하여 분자량 3,000 Da 이상과 이하의 분획으로 각각 나누어 동결 건조한 후에 20 mM sodium acetate(pH 4.0) 완충액에 녹여 5배 농축 배율로 준비하였다. 이때 균체배양을 하지 않은 MRS 액체 배지에 분리 균주 AF1이 생산하는 lactic acid와 동일한 양의 lactic acid를 첨가한 후, 이 후 항진균 활성 측정용 AF1 배양상정액과 동일한 과정으로 처리한 시료를 대조구로 사용하였다. 유산균의 항진균 활성 측정 시 유산균의 산생성에 의한 활성은 대조구의 활성 값으로 하여 이를 측정된 항진균 활성 값에서 빼주었다. 분리 균주가 생산하는 lactic acid의 농도는 D-Lactic acid/L-Lactic acid kit(Roche, R-Biopharm AG, Germany)를 사용하여 측정하였다. 준비한 항진균 물질과 대조구는 각각 100 µL씩 취하여 *A. fumigatus* ATCC 96918에 대한 항진균 활성을 paper disk method를 사용하여 측정하였으며, 항진균 활성 역가는 spot-on-the lawn test 방법을 사용하여 AU(activity unit)/mL로 나타내었다.

결과 및 고찰

항진균 활성 균주 및 감수성 곰팡이의 분리 및 동정

숙성된 김치로부터 유산균을 분리하기 위하여 김치 여과액을 2% CaCO₃가 첨가된 MRS 평판배지에 도말하여 30°C에서 배양하면서 형성되는 미생물의 집락을 관찰하였다. 김치 여과액이 도말된 MRS-CaCO₃ 고체 배지 상에서 산생성에 따른 투명환을 형성하는 균주의 집락들과 함께 하얗게 균사를 형성하면서 자라는 곰팡이 1종이 관찰되었다(Fig. 1). 곰팡이에 대한 뚜렷한 저해 활성을 보이는 균주 1종과 이에 감수성을 나타내는 곰팡이를 각각 분리하였으며, 항진균 활성을 나타내는 균주는 AF1으로, 이에 대해 감수성을 나타내는 곰팡이는 KF-1으로 각각 명명하였다.

항진균 활성을 나타내는 분리 균주는 그람 염색 후 현미경 관찰 결과 그람 양성균의 간균이며, API 50CHL system을 이용하여 당 이용성 조사를 통한 균주 동정 결과 *Lactobacillus plantarum*으로 판정되었다(data not shown). 16S rRNA 염기서열 결정을 위하여 AF1 균주의 genomic DNA를 이용하여 1차 PCR을 시행한 결과 1,277 bp의 염기서열을 결정하였으며, 이를 GenBank에 등록된 다른 균주들과 염기서열을 비교한 결과 *Lactobacillus plantarum* WCFS1 (ATCC BAA-793)의 16S rRNA 염기서열 일부(541 bp)와 16S rRNA upstream의 일부 서열(636 bp)을 포함한 genomic DNA 단편과 높은 상동성(99%)을 보였다. AF1 균주의 16S rRNA 전체 염기서열을 결정하기 위하여 2차 PCR을 시행한 결과 1,571 bp의 AF1 16S rRNA 염기서열을 결정하였다. 1, 2차 PCR 결과로부터 결정된 AF1의 염기서열(2,207 bp)은 *Lb. plantarum* WCFS1 genomic DNA 단편(AL935255; nt 184,528~186,735, 2,208 bp)과 99% 상동성을 보였으며, 이 중 16S rRNA 서열 부분(nt 637~2,207, 1,571 bp)은 *Lb. plantarum* WCFS1의 16S rRNA 서열과 100% 상동성을 나

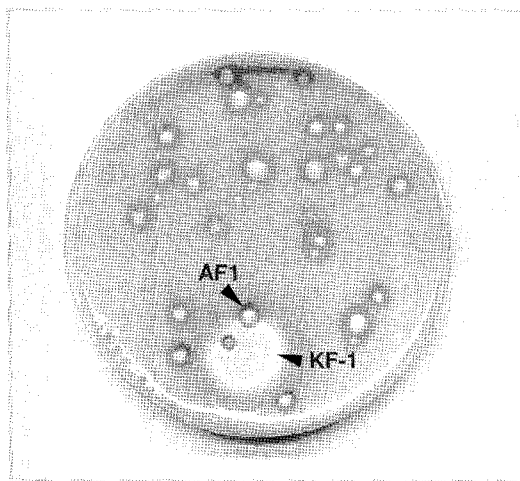


Fig. 1. Isolation of antifungal lactic acid bacterium and its sensitive mold from kimchi.

타내었다. 따라서 항진균 활성을 나타내는 본 균주는 *Lb. plantarum*으로 부분 동정되었으며 *Lb. plantarum* AF1으로 명명하였고, 그 16S rRNA 염기서열은 GenBank에 등록하였다(FJ386491).

Lb. plantarum AF1에 감수성을 나타내는 곰팡이의 균주 동정을 위하여 ITS-5.8S rRNA gene sequencing을 시행하여 염기 서열을 비교한 결과 *Epicoccum nigrum* AF455455와 99%의 상동성을 나타내었다. 감수성 곰팡이는 최종 *E. nigrum* KF-1으로 명명하였으며, 항진균 활성 실험을 위한 감수성 균주로 사용하였다.

분리 균주의 항진균 활성

Dual culture overlay assay를 통하여 식품을 부패시키거나 인체에 유해한 곰팡이들에 대한 *Lb. plantarum* AF1의 생육 저해 활성을 관찰하였다(Fig. 2).

Lb. plantarum AF1은 인체에 피부질환을 일으키는 *Epicoccum nigrum*과 알레르기나 염증성 폐렴에 관여하는 *Cladosporium gossypiiicola*의 병원성 곰팡이에 강한 저해 활성을 나타내었다. 또한 식품과 사료를 오염시키며 인체에 aspergillosis를 유발하는 *Aspegillus fumigatus*와 식품과 사료에서 저장기간 중에 부패를 일으키며 독소를 생성하는 곰팡이인 *A. ochraceus*와 *A. nidulans*에 대해서도 강한 생육 저해 활성을 나타내었다. 이들보다 활성이 다소 약하긴 하지만 간암 유발 물질인 aflatoxin을 생성하는 *A. flavus*와 독소를 생성하는 곰팡이 종류인 *A. petrakii*에도 뚜렷한 생육 저해환을 형성하였으며, 저온저장 식품에서 변패를 일으키는 *Penicillium roqueforti*에 대해서는 강한 생육 저해환을 나타내지는 않았으나 *Lb. plantarum* AF1의 균체 주변으로 포자 형성이 억제되는 현상을 관찰할 수 있었다. 항진균 활성 실험에서 대조군으로 사용한 *Lb. gasseri* ATCC 33323은 어떠한 곰팡이에도 생육 저해 활성을 나타내지 않았다(Fig. 2).

Magnusson 등[15]은 여러 곳에서 분리한 유산균 42종의 항진균 활성을 dual culture overlay assay 방법으로 실험하였다. 42종의 유산균에는 *Lb. coryniformis*, *Pediococcus pentosaceus*, *Lb. plantarum*, *Lb. sakei* 등이 주로 포함되어 있으며, 실험결과 *A. fumigatus*, *A. nidulans*, *Fusarium sporotrichioides*, *P. commune* strain의 곰팡이들과 *Rhodotorula mucilaginosa* strain의 효모는 대체로 잘 저해한 반면, *P. roqueforti* strain 곰팡이와 *Pichia anomala*, *Kluyveromyces marxianus* strain의 효모에 대해서는 실험에 사용된 어떤 유산균도 저해 활성을 나타내지 않았다. Bello 등[3]은 overlay method를 이용한 항진균 활성 실험결과 *Lb. plantarum* FST 1.7 균주가 *A. niger*와 *Fusarium* 속 곰팡이들에 저해 활성을 나타내며 *P. roqueforti* strain에는 항진균 활성을 나타내지 않음을 보고하였다.

동일 환경 내 미생물 길항작용에 의한 항진균 활성 실험에서 기존에 보고된 항진균 활성 유산균과 비교 시 본 연구

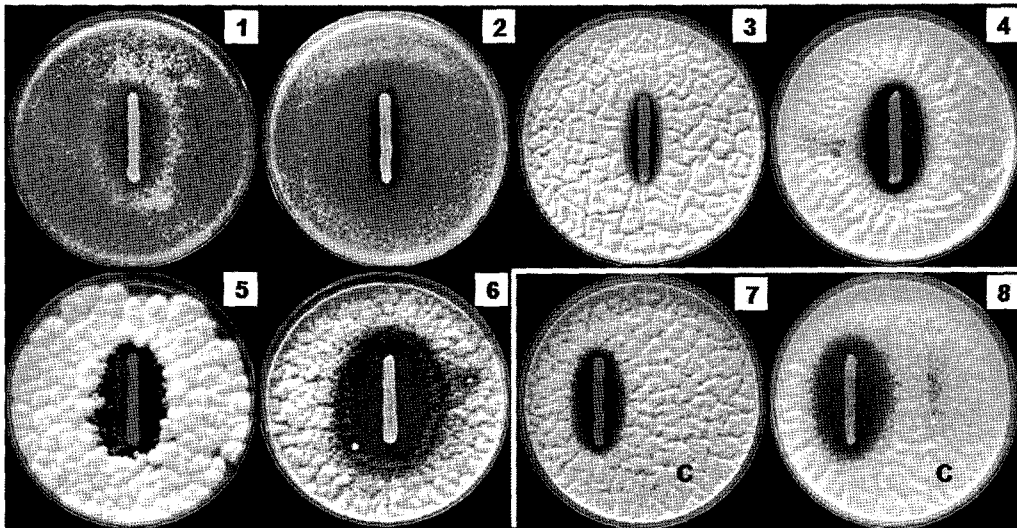


Fig. 2. Antifungal activity of *Lactobacillus plantarum* AF1. Sensitive strains: 1, *P. roqueforti* ATCC 10110; 2, *A. flavus* ATCC 22546; 3, *A. petrakii* PF-1; 4, *A. nidulans* PF-3; 5, *E. nigrum* KF-1; 6, *C. gossypiicola* KF-2; 7, *A. fumigatus* ATCC 96918; 8, *A. ochraceus* PF-2. *C. Lb. gasseri* ATCC 33323 was used as a control (no antifungal activity).

의 *Lb. plantarum* AF1의 항진균 활성 범위가 비교적 크고 그 활성도 커서 실제 발효식품에 적용 시 발효식품 내에서 오염미생물(곰팡이)의 제어 능력이 우수함을 시사한다.

분리 균주가 생산하는 항균 물질에 의한 항미생물 활성
항진균 활성 측정에 사용한 곰팡이 8종과 유산균을 포함

한 그람 양성균 및 음성균 14종을 대상으로 *Lb. plantarum* AF1이 생산하는 항균 물질에 의한 항미생물 활성을 paper disk method를 통하여 조사하였다(Table 1).

곰팡이에 대한 실험에서는 감수성균으로 사용한 모든 곰팡이를 저해하였으며 *A. fumigatus* ATCC 96918에 대하여 가장 강한 저해 활성을 나타내었고 나머지 곰팡이에 대해서

Table 1. Inhibitory spectrum of *Lactobacillus plantarum* AF1.

Microorganisms	Sensitive strains	Antimicrobial activity
Molds	<i>Aspergillus flavus</i> ATCC 22546	++
	<i>Aspergillus fumigatus</i> ATCC 96918	+++
	<i>Aspergillus petrakii</i> PF-1	++
	<i>Aspergillus ochraceus</i> PF-2	++
	<i>Aspergillus nidulans</i> PF-3	++
	<i>Epicoccum nigrum</i> KF-1	++
	<i>Cladosporium gossypiicola</i> KF-2	++
	<i>Penicillium roqueforti</i> ATCC 10110	++
Gram-positive bacteria	<i>Bacillus subtilis</i> ATCC 6633	++++
	<i>Micrococcus luteus</i> ATCC 13513	++++
	<i>Streptococcus mutans</i> ATCC 25175	++
	<i>Staphylococcus aureus</i> subsp. <i>aureus</i> ATCC 29213	++++
	<i>Enterococcus faecalis</i> ATCC 29212	++++
	<i>Listeria monocytogenes</i> ATCC 19113	+++
Gram-negative bacteria	<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	+++
	<i>Escherichia coli</i> O157:H7 ATCC 43895	+++
	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853	++++
	<i>Salmonella enterica</i> serovar Typhi ATCC 19430	+++
Lactic acid bacteria	<i>Lactobacillus plantarum</i> KFRI 464	++
	<i>Lactobacillus plantarum</i> KFRI 236	+++
	<i>Leuconostoc mesenteroides</i> KFRI 218	+++
	<i>Lactobacillus acidophilus</i> KFRI 150	++++

Activity was expressed as the diameter of inhibition zone against each sensitive strain. Degree of clarity of clear zone by growth inhibition: -, no inhibition zone; +, below 10.0 mm; ++, 10.0~14.0 mm; +++, 14.0~18.0 mm; +++++, above 18.0 mm.

는 유사한 항진균 활성을 나타내었다(Table 1). 그람 양성균과 그람 음성 세균들에 대한 항균 활성 실험에서는 대체로 강한 저해 활성을 나타내었으며, 특히 *Bacillus subtilis* ATCC 6633, *Micrococcus luteus* ATCC 13513, *Enterococcus faecalis* ATCC 29212, *Staphylococcus aureus* subsp. *aureus* ATCC 29213, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Lb. acidophilus* KFRI 150 균주들에 강한 항세균 활성을 보였다(Table 1).

Okkers 등[17]이 보고한 여성의 질에서 분리된 *Lb. pentosus* TV35b가 생산하는 pentocin TV35b는 *C. albicans*들에 대한 항진균 활성 외에도 *Cladosporium*, *Lactobacillus*, *Listeria*, *Propionibacterium* 속 균주들에 대한 항세균 활성을 나타내었다. Atanossova 등[1]의 보고에서 치즈에서 분리된 *Lb. paracasei* subsp. *paracasei* strain M3가 생산하는 단백질성 항균 물질은 *Candida* 속과 *S. cerevisiae*의 효모들에 대한 항진균 활성과 *B. subtilis*, *Lb. delbrueckii*, *H. pylori*에 대한 항세균 활성을 나타내었다.

Lb. plantarum AF1이 생산하는 항미생물 물질은 식품에 부패를 일으키며 인체에 유해한 곰팡이뿐만 아니라 식중독을 일으키는 세균들에 강한 생육 저해 활성을 나타내었다. 이러한 결과는 *Lb. plantarum* AF1이 생산하는 항미생물 물질이 항진균 활성과 항세균 활성을 동시에 나타낼 수 있는 강력한 천연식품보존제로서 활용이 가능함을 시사한다.

생육시기에 따른 항진균 활성

Lb. plantarum AF1의 생육곡선과 생육에 따른 항진균 활성을 조사하였다(Fig. 3). *Lb. plantarum* AF1은 생육 8~12 시간 사이에 대수기 중반을 지나 20시간 정도에 생육 정지기에 이르렀으며, 생육에 따라 pH도 점점 감소하여 생육 정지기 때 pH 3.9에 이르러 이후 pH 3.9를 그대로 유지하였다. 생육에 따른 *A. fumigatus* ATCC 96918에 대한 항진균 활성은 생육 곡선과 함께 증가하기 시작하여 생육 정지기에

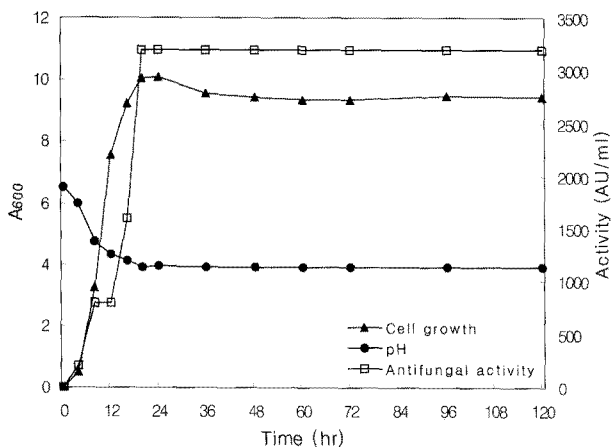


Fig. 3. Growth, pH, and antifungal activity of *Lb. plantarum* AF1.

들어선 20시간 후부터 최대 활성(3,200 AU/mL)을 나타내었으며, 생육 120시간까지도 활성이 감소되지 않고 유지되었다.

기존에 보고된 유산균이 생산하는 항진균 활성 물질로서 *Lb. coryniformis* subsp. *coryniformis* Si3이 생산하는 단백질성 항진균 물질은 정지기 초기인 생육 40시간 정도에 최대 활성을 나타내었으며 이후 서서히 활성이 감소되었다[14]. *C. albicans*에 항진균 활성을 나타내는 bacteriocin-like peptide인 pentocin TV35b를 생산하는 *Lb. pentosus* TV35b는 대수기 말기인 12시간 이후에 최대 활성을 나타내기 시작하여 32시간까지 활성을 유지하다가 36시간 이후에는 활성이 감소되었다[17]. 반면 항진균 활성이 있는 phenyllactic acid와 4-hydroxy-phenyllactic acid를 생산하는 *Lb. plantarum* 21B는 정지기에 이른 48시간부터 항진균 활성을 나타내기 시작하여 균이 사멸기에 접어든 이후에도 10일까지 활성을 그대로 유지하였다[12]. 또한 항진균 활성을 가진 3-hydroxy fatty acids를 생산하는 *Lb. plantarum* MiLAB 14의 생육에 따른 항진균 물질 생성을 관찰한 결과 대수기에 항진균 물질들의 생성이 증가되기 시작하여 정지기 초기에 최대 생성량을 보였으며, 이 후에도 물질량은 감소되지 않았다[20].

이와 같은 현상은 항진균 활성을 가진 균주가 생산하는 항진균 물질이 단백질인 경우는 세포의 사멸과 함께 세포 내외의 단백질분해효소 작용으로 항진균 단백질을 분해하므로 항진균 활성이 감소하는 결과를 나타내지만, 비단백질인 경우에는 단백질분해효소의 영향을 받지 않으므로 세포의 사멸에 영향을 받지 않고 항진균 물질 또는 활성이 그대로 유지되기 때문이다. *Lb. plantarum* AF1이 생산하는 항진균 물질은 생육에 따른 영향을 받지 않으므로 비단백질성 물질이거나, 세포의 사멸에 따른 단백질분해효소의 영향을 받지 않는 특성을 지닌 어떤 물질임을 추정할 수 있다.

항진균 물질의 안정성

Lb. plantarum AF1이 생산하는 항진균 물질의 pH에 대한 영향을 실험한 결과 pH 3.0과 4.0에서는 본래의 활성(3,200 AU/mL)을 유지하였으나 pH 5.0~7.0 구간에서는 활성을 급격히 상실하였다. 그리고 pH 처리 후(pH 3.0~7.0) 이를 다시 균체 배양 후의 배양액 pH인 pH 3.9로 복원시켰을 때 pH 처리 전구간에서(pH 3.0~7.0) 상실된 항진균 활성이 100% 회복되었다(Table 2). 온도에 대한 안정성 실험에서 항진균 활성은 30°C, 50°C, 70°C에서 24시간, 100°C에서 30분, 121°C에서 15분간 열처리한 후에도 활성을 100% 유지하여(Table 2) 온도에 매우 안정한 물질임을 알 수 있었다. 각종 효소에 대한 영향을 살펴본 결과 항진균 활성은 peptidase와 단백질가수분해효소를 비롯하여 lysozyme, α -amylase, lipase 등의 어떠한 효소에도 영향을 받지 않았다(Table 2). 따라서 항진균 물질은 비단백질성 물질이거나 단백질가수분해효소에 영향을 받지 않는 물질이며, 당이나 지질의 결합이 항진균 활성에 영향을 주지 않음을 알 수 있었다.

Table 2. Effect of pH, heat, and enzyme treatment on the antifungal activity of *Lb. plantarum* AF1.

Treatment		Antifungal activity (AU/mL)
pH	3.0	3,200
	4.0	3,200
	5.0	800
	6.0	200
	7.0	200
pH- renaturation	3.0 → 3.9	3,200
	4.0 → 3.9	3,200
	5.0 → 3.9	3,200
	6.0 → 3.9	3,200
	7.0 → 3.9	3,200
Heating	30°C, 24 h	3,200
	50°C, 24 h	3,200
	70°C, 24 h	3,200
	100°C, 30 min	3,200
	121°C, 15 min	3,200
Enzyme	Proteinase K	3,200
	Protease	3,200
	Pepsin	3,200
	Trypsin	3,200
	α-Chymotrypsin	3,200
	Aminopeptidase I	3,200
	Lysozyme	3,200
	α-Amylase	3,200
	Lipase	3,200

The antifungal activity was measured by the spot-on-the lawn test. *A. fumigatus* ATCC 96918 was used as a sensitive strain. AU, activity unit.

비단백질성 항진균 물질인 benzoic acid, 5-methyl-2,4-imidazolidinedione, tetrahydro-4-hydroxy-4-methyl-2H-pyran-2-one, 그리고 3-(2-methylpropyl)-2,5-piperazinedion 등을 생산하는 *Lb. plantarum* VTT E-78076의 항진균 활성은 120°C에서 15분 동안 열처리한 후에도 안정하였으며 단백분해효소 처리에 영향을 받지 않았다[16]. Phenyllactic acids를 생산하는 *Lb. plantarum* 21B의 배양액(pH 3.7)을 pH 5~7로 조정하였을 때 활성이 감소하였으나 원래의 pH로 복원시킬 경우 항진균 활성도 회복되었으며, 100°C에서 15분간 열처리한 후에도 항진균 활성을 유지하였다[12].

반면 단백질성 항진균 물질인 pentocin TV35b는 121°C에서 15분간 열처리한 후에 50%의 활성을 상실하였으며 papain과 proteinase K의 단백분해효소 처리 후에 활성을 상실하였으나, pH 1~10으로 처리한 후에 중화(pH 7)하여 항진균 활성을 측정하였을 때 활성에 영향을 받지 않았다[17]. *Lb. coryniformis* subsp. *coryniformis* Si3가 생산하는 항진균 단백질은 pH 4.5 이상에서 활성이 감소하였으나 원래의 pH(pH 3.6)로 복원시킬 경우 활성이 회복되었으며, 121°C에서 15분간 열처리한 후에도 활성을 유지하였으나 proteinase

K와 trypsin 처리에는 활성을 상실하였다[14]. 이상과 같은 연구들에서 항진균 물질에 따라 pH 안정성과 열 안정성은 비교적 다르게 나타나지만 단백질성 항진균 물질의 경우 단백분해효소 처리에 의한 활성 상실이 명백히 관찰되었다. 따라서 단백분해효소 처리에 영향을 받지 않은 AF1 항진균 물질은 비단백질성 물질로 추정되며 이는 생육시기에 따른 항진균 활성 실험에서 추정된 결과와 동일하다.

항진균 물질의 분자량 추정

유산균이 생산하는 항진균 활성 물질로는 유기산, H₂O₂, diacetyl, 항진균 활성 단백질, 그리고 reuterin, 지방산, phenyllactic acid, cyclic dipeptides 등과 같은 저분자 물질들로 보고되고 있다[19]. 지금까지 보고된 항진균 활성 유산균의 원인물질(antifungal compound)을 정제하여 물질의 구조와 분자량이 결정된 연구는 극히 미진한 실정이다. 이 중 단백질성 항진균 물질에 관한 보고로는 *Lb. pentosus*가 생산하는 3.9 kDa의 펩타이드 TV35b[17], *Lb. coryniformis* subsp. *coryniformis* Si3가 생산하는 약 3 kDa의 항진균성 펩타이드[14], 그리고 43 kDa의 분자량을 가지고 있는 *Lb. paracasei* subsp. *paracasei* M3가 생산하는 항진균성 단백질[1] 등 단 3건에 불과하다.

그 외에 비단백질성의 항진균 활성 물질에 관한 보고는 10여건으로 *Lb. plantarum* VTTE-78076이 생산하는 benzoic acid(MW: 122.1), 5-methyl-2,4-imidazolidinedione (methylhydantoin, MW: 114), tetrahydro-4-hydroxy-4-methyl-2H-pyran-2-one(mevalonolactone, MW: 130.1), 3-(2-methylpropyl)-2,5-piperazinedion(cyclo(Gly-L-Leu), MW: 170)[16], *Lb. plantarum* MiLAB 393이 생산하는 3-phenyllactic acid(MW: 166), cyclo(L-Phe-L-Pro)(MW: 244), cyclo(L-Phe-trans-4-OH-L-Pro)(MW: 262)[22], *Lb. plantarum* MiLAB 14가 생산하는 hydroxy fatty acids(MW: 188~244)[20] 등이 있다. 이들은 모두 분자량 1,000 이하의 저분자 물질이라는 특징이 있다.

Lb. plantarum AF1이 생산하는 항진균 물질의 분자량을 추정하기 위하여 배양 상정액을 분자량 3,000 Da 이하의 분획으로 나누어 *Aspegillus fumigatus* ATCC 96918에 대한 항진균 활성을 paper disk method로 측정하였다. 실험 대조구로는 MRS 액체배지에 AF1 배양액의 lactic acid와 동일한 양(183 mM)을 첨가하고 AF1 배양액의 pH(pH 3.9)로 조정한 후 Centriprep YM-3을 사용하여 3,000 Da 이상과 이하의 분획을 나누어 사용하였다. 본 실험 결과 *Lb. plantarum* AF1의 항진균 활성은 분자량 3,000 Da 이하의 분획에서만 항진균 활성이 관찰되어(3,200 AU/mL) 항진균 물질은 분자량 3,000 Da 미만의 물질임을 알 수 있었다(Fig. 4). 대조구의 항진균 역가는 약 400 AU/mL로 나타나 *Lb. plantarum* AF1의 역가는 단순한 pH 저하에 의한 현상뿐만 아니라 lactic acid 외에 항진균 활성을 나타내는 다른 물질

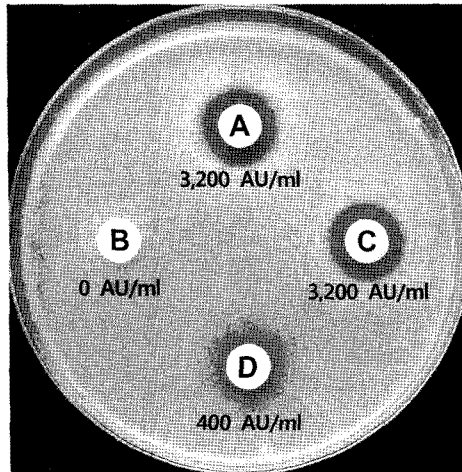


Fig. 4. Fractionation of antifungal compound(s) from the culture supernatant of *Lb. plantarum* AF1 using a Centriprep YM-3. **A**, unfractionated culture supernatant of *Lb. plantarum* AF1 (pH 3.9); **B**, the fraction with molecular masses higher than 3,000 Da; **C**, the fraction with molecular masses lower than 3,000 Da; **D**, MRS broth containing lactic acid (183 mM, pH 3.9).

에 의한 작용임을 알 수 있다(Fig. 4).

이상의 실험 결과를 통하여 *Lb. plantarum* AF1이 생산하는 항진균 물질은 분자량 3,000 Da 이하의 비단백질성 물질 또는 단백질분해효소의 영향을 받지 않는 구조의 물질로 추정된다. 현재 천연 식품보존제로서의 활용이 기대되는 유산균의 항진균 활성과 항진균 물질에 대한 연구보고는 많지 않다. 특히 기능성 유산균의 보고로 부각되고 있는 우리나라 전통 발효식품인 김치로부터 분리한 유산균의 항진균 활성에 대한 보고는 단 1건으로 단순히 그 활성을 보고하는데 그치고 있으며[9] 항진균 물질의 특성 규명에 관한 연구는 전무하다. *Lb. plantarum* AF1은 김치에서 분리한 유산균으로 유해 곰팡이에 대한 항진균 활성뿐만 아니라 식중독 균주 등에 대한 항세균 활성을 포함하여 넓은 범위의 항미생물 활성을 나타내므로, 발효식품의 종균 형태로 활용 가능할 뿐만 아니라 AF1이 생산하는 항미생물 물질은 식품이나 사료의 보존에 사용할 수 있는 항균 및 정균 재제를 포함한 천연 식품보존제의 강력한 후보 물질이 될 수 있다. 본 실험실에서는 현재 항진균 활성 물질의 분리, 정제 및 분석을 통하여 AF1 항진균 물질의 특성을 규명하는 연구들이 수행되고 있다. 향후 정제된 AF1 항진균 물질의 항진균 활성 기작에 대한 연구들이 수행될 것이며, 천연 식품보존제로서 실제 식품에 적용시킬 수 있는 응용 방법들에 대한 연구들이 이루어져야 할 것이다.

요 약

숙성된 김치로부터 항진균 활성을 나타내는 균주 1종과 감수성을 나타내는 곰팡이 1종을 분리하였다. 분리된 균주

는 형태학적, 생화학적 특성 조사와 16S rRNA 염기서열 결정을 통한 균주 동정결과 *Lactobacillus plantarum* AF1으로 명명하였고, 감수성 곰팡이는 ITS-5.8S rRNA 염기서열 분석을 통하여 *Epicoccum nigrum* KF-1으로 명명하였다. Dual culture overlay assay를 통한 *Lb. plantarum* AF1의 항진균 활성 실험 결과 *A. ochraceus*, *A. fumigatus*, *C. gossypicola* 등 식품 부패 곰팡이 및 병원성 곰팡이에 강한 생육 저해 활성을 나타내었다. 또한 항균 물질에 의한 항미생물 활성 범위를 측정된 결과 항진균 활성 외에도 식중독 균주를 포함한 그람 양성 및 음성 세균들에 강한 저해 활성을 나타내어 *Lb. plantarum* AF1은 넓은 항미생물 활성 범위를 가지는 것을 알 수 있었다. *Lb. plantarum* AF1의 생육에 따른 항진균 활성을 측정된 결과 항진균 활성은 배양 20 시간부터 최대 활성(3,200 AU/ml)을 나타내어 120시간까지 활성이 감소되지 않고 유지되었다. 항진균 물질의 안정성 실험을 통하여 AF1 항진균 물질은 산성의 pH(pH 3.0~4.0)와 열에 안정한 물질이며, 단백질분해효소 처리에 영향을 받지 않으므로 비단백질성 물질이거나 단백질분해효소의 영향을 받지 않는 구조의 물질임을 추정하였다. AF1 항진균 물질의 분자량을 예측하기 위하여 *Lb. plantarum* AF1의 배양액을 3,000 Da 이상과 이하의 분획으로 나누어 항진균 활성을 측정된 결과 AF1 항진균 물질은 분자량 3,000 Da 미만의 물질임을 확인하였다. 본 실험에서 분리한 김치유산균인 *Lb. plantarum* AF1은 넓은 범위의 항진균 활성 및 항세균 활성을 나타내므로 강력한 천연 식품보존제 및 사료보존제로서 활용이 기대된다.

감사의 글

본 연구는 산업자원부 지방기술혁신사업에 의한 연구비로 수행된 것으로 이에 감사드립니다.

REFERENCES

- Atanossova, M., Y. Choiset, M. Dalgalarondo, J. M. Chobert, X., Dousset, I. Ivanova, and T. Haertlé. 2003. Isolation and partial biochemical characterization of proteinaceous anti-bacteria and anti-yeast compound produced by *Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei* strain M3. *Int. J. Food Microbiol.* **87**: 63-73.
- Aziz, N. H. and L. A. A. Moussa. 2002. Influence of gamma-radiation on mycotoxin producing moulds and mycotoxins in fruits. *Food Control* **13**: 281-288.
- Bello, F. D., C. I. Clarke, L. A. M. Ryan, H. Ulmer, T. J. Schober, K. Ström, J. Sjögren, D. van Sinderen, J. Schnürer, and E. K. Arendt. 2007. Improvement of the quality and shelf life of wheat bread by fermentation with the antifungal strain *Lactobacillus plantarum* FST 1.7. *J. Cereal Sci.* **45**: 309-318.

4. Brul, S. and P. Coote. 1999. Preservative agents in foods. Mode of action and microbial resistance mechanisms. *Int. J. Food Microbiol.* **50**: 1-17.
5. Galvano, F., A. Piva, A. Ritieni, and G. Galvano. 2001. Dietary strategies to counteract the effects of mycotoxins: A review. *J. Food Prot.* **64**: 120-131.
6. Gould, G. W. 2001. New processing technologies: an overview. *Proc. Nutr. Soc.* **60**: 463-474.
7. Hoover, D. G. and S. K. Harlander. 1993. Screening methods for detecting bacteriocin activity, pp. 23-39. In Hoover, D. G. and L. R. Steenson. (eds.), *Bacteriocins of Lactic Acid Bacteria*. Academic Press, Inc., San Diego, U.S.A.
8. Hussein, H. S. and J. M. Brasel. 2001. Toxicity, metabolism, and impact of mycotoxins on humans and animals. *Toxicol.* **167**: 101-134.
9. Kim, J.-D. 2005. Antifungal activity of lactic acid bacteria isolated from Kimchi against *Aspergillus fumigatus*. *Mycobiol.* **33**: 210-214.
10. Kim, S. I., I. C. Kim, and H. C. Chang. 1999. Isolation and identification of antimicrobial agent producing microorganisms and sensitive strain from soil. *J. Kor. Soc. Food Sci. Nutr.* **28**: 526-533.
11. Klaenhammer, T. R. 1988. Bacteriocin of lactic acid bacteria. *Biochim.* **70**: 337-349.
12. Lavermicocca, P., F. Valerio, A. Evidente, S. Lazzaroni, A. Corsetti, and M. Gobetti. 2000. Purification and characterization of novel antifungal compounds from the sourdough *Lactobacillus plantarum* strain 21B. *Appl. Environ. Microbiol.* **66**: 4084-4090.
13. Lee, H.-J., J.-H. Baek, M. Yang, H.-U. Han, Y.-D. Ko, and H.-J. Kim. 1993. Characterizations of lactic acid bacterial community during kimchi fermentation by temperature downshift. *Kor. J. Microbiol.* **31**: 346-353.
14. Magnusson, J. and J. Schnürer. 2001. *Lactobacillus coryniformis* subsp. *coryniformis* strain Si3 produces a broad-spectrum proteinaceous antifungal compound. *Appl. Environ. Microbiol.* **67**: 1-5.
15. Magnusson, J., J. Strömgren, and J. Schnürer. 2003. Broad and complex antifungal activity among environmental isolates of lactic acid bacteria. *FEMS Microbiol. Lett.* **219**: 129-135.
16. Niku-Paavola, M. L., A. Laitila, T. Mattila-Sandholm, and A. Haikara. 1999. New types of antimicrobial compounds produced by *Lactobacillus plantarum*. *J. Appl. Microbiol.* **86**: 29-35.
17. Okkers, D. J., L. M. T. Dicks, M. Silvester, J. J. Joubert, and H. J. Odendaal. 1999. Characterization of pentocin TV35b, a bacteriocin-like peptide isolated from *Lactobacillus pentosus* with a fungistatic effect on *Candida albicans*. *J. Appl. Microbiol.* **87**: 726-734.
18. Sanglard, D. 2002. Resistance of human fungal pathogens to antifungal drugs. *Curr. Opin. Microbiol.* **5**: 379-385.
19. Schnürer, J. and J. Magnusson. 2005. Antifungal lactic acid bacteria as biopreservatives. *Trends Food Sci. Technol.* **16**: 70-78.
20. Sjögren, J., J. Magnusson, A. Broberg, J. Schnürer, and L. Kenne. 2003. Antifungal 3-hydroxy fatty acids from *Lactobacillus plantarum* MiLAB 14. *Appl. Environ. Microbiol.* **69**: 7554-7557.
21. Stiles, M. E. 1996. Biopreservation by lactic acid bacteria. *Antonie van Leeuwenhoek* **70**: 331-345.
22. Ström, K., J. Sjögren, A. Broberg, and J. Schnürer. 2002. *Lactobacillus plantarum* MiLAB 393 produces the anti-fungal cyclic dipeptides cyclo(L-Phe-L-Pro) and cyclo(L-Phe-trans-4-OH-L-Pro) and phenyl lactic acid. *Appl. Environ. Microbiol.* **68**: 4322-4327.

(Received Oct. 14, 2008/Accepted Dec. 1, 2008)