

## 항균성 미강 단백질 필름 개발을 위한 Bacteriocin 생성균주의 선별 및 특성

김은정 · 김경미 · 한혜경 · 김영호 · 권기성<sup>1</sup> · 배동호\*

건국대학교 응용생물화학학과, <sup>1</sup>한국식품의약품안전청 식품규격과

(2003년 5월 27일 접수, 2003년 7월 3일 수리)

경제성과 항균력을 갖춘 미강단백질 필름을 개발하기 위한 연구의 일환으로 미강배지에서 bacteriocin을 생성할 수 있는 균주를 선별하고 그 특성을 조사하였다. 그 결과, *Pseudomonas aeruginosa* 9027에 대한 항균효과를 지닌 *Pseudomonas putida* 21025를 선별하였으며, 이 균이 생성한 bacteriocin은 쌀에 존재하는 미생물 및 토양미생물에 대하여 넓은 항균활성을 갖는 것으로 나타났다. 지금까지 이용되고 있는 미강단백질 추출 조건에 대한 적합성을 알아보기 위해 bacteriocin의 특성을 조사하였다. *Pseudomonas putida* 21025에서 생성되는 bacteriocin은 50°C 이상에서는 한 시간 후 활성이 저하되었으며, 핵산과 에탄올을 제외한 메탄올, 톨루엔, 클로로포름, 아세톤, 메틸 클로로포름 등의 유기용매에서 활성이 현저하게 저하되었다. 그러나, 이 bacteriocin은 pH 6.0-9.0에서 2시간 동안 안정하였고, 50°C 이하에서 안정하였으며, 에탄올에 대하여 3시간 동안 안정한 특성을 가지고 있는 것으로 나타났다. 또한 부분정제한 bacteriocin의 분자량은 약 21.6 kDa로 비교적 작은 분자량을 나타내었다.

**Key words:** 미강, 필름, Bacteriocin, *Pseudomonas* sp.

### 서 론

현재 식품단백질을 이용한 식이성 필름 개발에 관한 연구가 다양하게 진행되고 있으나, 식품 포장재로 실용화되지 못하고 있는 대표적인 문제점으로는 기존의 합성수지 포장재보다 약한 물성, 경제성, 그리고 저장성 등을 들 수가 있다. 이중, 약한 물성을 해결하기 위하여 chemical modification,<sup>1)</sup> 기능성물질 첨가<sup>2)</sup> 등의 다양한 시도가 이루어지고 있으며, 경제적 문제를 해결하기 위하여 폐자원 단백질을 이용한 단백질 필름개발<sup>3)</sup>이 이루어지고 있다. 그러나, 단백질 필름의 저장성 향상을 위한 시도는 전혀 이루어지지 않고 있다. 이에 본 연구에서는 단백질 필름 포장재에 항균력을 부과하여 저장성을 향상시키고자 bacteriocin을 적용하였다.

Bacteriocin에 대한 연구는 Gratia가 1925년 *Escherichia coli*가 생산하는 항균성 단백질을 발견하고, 이 항균성 단백질을 Colicin이라 명명한 것이 최초였다.<sup>3)</sup> Bacteriocin은 colicins, alveicins, cartovoricins, arizonacins, cloacins, marcescins, pneumocins, aerocins, pyocins, fluocins, pesticins, megacins, monocins, cerocins, enterococcins, staphylococcins 등과 같이 여러 가지 세균에 의하여 생성되며, 항균물질 생산균주 자신과 계통, 분류학적으로 근접한 균종으로 제한된 좁은 항균범위를 나타내며, 항생물질과 유사한 특성을 가지고 있다.<sup>4,5)</sup>

많은 종류의 항생물질들은 세포질내에서 만들어지나 bacteriocin은 폴리펩타이드성 항생물질로 리보솜에서 생산된다는 점이 타의 항생물질 생합성 장소와 큰 차이점이라 할 수 있

다. Bacteriocin 크기는 작은 펩타이드에서 지방 또는 탄수화물과 결합된 단백질까지 다양하다. 분자량이 작은 bacteriocin은 그 소수성 때문에 다른 세포 단백질과 결합하여 같이 존재하므로 순수한 bacteriocin의 정제를 어렵게 한다.<sup>6,8)</sup>

또한 많은 연구<sup>4,8)</sup>에서 보고된 바, 비교적 고온에서 불활성화되지 않으며 광범위한 pH영역에서 안정성을 가지며 무독, 무색, 무취이므로 화학합성방부제를 대체할 수 있는 천연방부제로서의 광범위한 용도개발이 기대되고 있으나, bacteriocin의 추출에 따른 경제성이 문제시 되고 있다.

따라서 본 연구에서는 경제성 문제를 해결하고 저장성과 항균력을 갖춘 미강 단백질 필름 포장재를 개발하는 연구의 일환으로 bacteriocin의 추출없이 bacteriocin이 생산된 미강으로부터 직접 단백질을 추출하여 필름으로 가공하고자 미강에서 생성 가능한 bacteriocin 중 항균활성이 크고 일반 식품에 번식되는 세균에 광범위한 항균활성을 가지는 bacteriocin을 선별하여 그 특성을 연구하고자 하였다. 또한, 단백질 필름 가공 중에 bacteriocin의 활성을 유지할 수 있는 bacteriocin이 배양된 미강으로부터 필름용 단백질의 최적추출조건을 조사하고자 하였다.

### 재료 및 방법

#### 사용 균주 및 배지

**사용균주.** 미강 배지에서 bacteriocin 생성이 가능한 균주를 선별하고자, 쌀에 존재하는 *Bacillus* sp.와 *Pseudomonas* sp. 균주인 등 9개 균주 *Pseudomonas aeruginosa* ATCC9027, *Pseudomonas putida* ATCC21025, *Pseudomonas methanolica* ATCC21960, *Bacillus subtilis* ATCC6633, *Micrococcus luteus* ATCC9341 등을 ATCC에서 분양받아 사용하였으며, *Escherichia coli* KCTC1039, *Bacillus macerans* KCTC1822, *Bacillus*

\*연락처

Phone: 82-2-450-3756; Fax: 82-2-456-7011

E-mail: donghoya@konkuk.ac.kr

*cereus* KCTC2744, *Bacillus magaterium* KCTC2178, *Pseudomonas fluorescens* KCTC1767 등을 KCTC에서 분양 받아 사용하였다.

**배지.** 시험균 배양 및 modifide deferred<sup>9)</sup> 방법에 미강배지(3%의 미강 함유) 및 미강 고체배지(3%의 미강과 1.5%의 agar 함유)를 이용하였다. 미생물 배양 및 spot-on-lawn<sup>9)</sup> 방법에 Tryptic soy borth(Soybean-casein digest agar dehydrated, Difco Inc., USA)를 이용하였다.

**Bacteriocin 생성 균주 탐색 및 선발.** 쌀에 존재하며 토양 미생물인 균주의 bacteriocin 활성은 Ahn과 Stites<sup>3)</sup>의 방법을 변형한 modified deferred 방법을 이용하여 미강 고체 배지에 시험균에 대한 항균활성을 실험하였다. 미강 고체 배지에 균주를 백균선으로 접종하여 30°C에서 48시간(6시간마다) 배양한 후 시험균 10<sup>7</sup> cell을 포함한 0.75% soft Tryptic soy agar(TSA, Difco) 4 ml를 분주하여 30°C에서 24시간 배양하여 억제환 생성 여부를 관찰하였다.

억제환 생성균주 중 세포 밖으로 항균성 물질을 분비하는 균주를 선발하고 spot-on-lawn 방법을 이용하여 분석하였다. 시험균 10<sup>7</sup> cell을 포함한 0.75% soft TSA 4 ml를 1.5% TSA에 분주하였다. 0.75% soft TSA가 굳어지면 30°C에서 48시간(6시간마다) 미강 액체배지에서 배양한 후 원심분리(6,500 rpm, 20 min)하여 상등액을 취해 0.45 µm Cellulose acetate syringe filter를 통과시켜 균을 제거한 후 항생물질 검정용 여지(paper disc)에 100 µl를 분주하여 30°C에서 12시간 배양 후 억제환 생성 여부를 관찰하였다. Phages에 의한 가능성은 flip-plate assay 방법<sup>10)</sup>과 improved deferred 'sandwich' 방법<sup>11)</sup> 또는 희석하여 spot-on-lawn 방법으로 억제환이 감소하는 것을 확인함으로써 배제할 수 있으므로 배양상등액을 10 mM 인산염 완충용액으로 2배 희석하여 phages에 의한 가능성을 조사하였다.

**Bacteriocin 활성 분석.** *Pseudomonas putida* 21025의 항균 활성은 modified deferred 방법을 이용하여 미강 고체 배지로 시험균에 대한 항균활성을 실험하였다. 미강 고체 배지에 *Pseudomonas putida*를 접종하여 30°C에서 33시간 배양한 후 시험균 10<sup>7</sup> cell을 포함한 0.75% soft TSA 4 ml를 *Pseudomonas putida*를 접종한 미강 고체 배지에 분주하여 30°C에서 12시간 배양하여 억제환을 관찰하였다. 항균 활성의 크기는 억제환의 지름(mm)으로 나타내었으며 결과는 2회 반복하여 나타내었다.

**항균 활성 측정.** Bacteriocin 활성은 spot-on-lawn 방법을 이용하여 분석하였다. 시험균 10<sup>7</sup> cell을 포함한 0.75% soft TSA 4 ml를 1.5% TSA에 분주한다. Soft TSA가 굳으면 *Pseudomonas putida* 21025를 미강 액체배지에 30°C, 33시간 배양한 배양액을 6,500 rpm으로 4°C, 20분간 원심분리하여 상등액을 0.45 µm Cellulose acetate syringe filter로 여과하여 제균한 배양액을 항생물질 검정용 여지에 100 µl를 흡수시켜 30, 37°C에서 12시간 후 억제환을 관찰하였다. 항균활성(activity units, AU)은 bacteriocin을 2배씩 희석하여 계산하여, 결과는 2회 반복하여 나타내었다.

**pH, 온도, 유기용매에 대한 안정성.** 미강 단백질 추출시 우려되는 bacteriocin의 활성 소실을 고려하기 위하여 각 추출조

건에 대한 bacteriocin의 안정성을 조사하였다.

pH에 따른 bacteriocin의 안정성을 고찰하고자, 0.45 µm syringe filter로 여과한 배양액을 1 N NaOH 용액과 1 N HCl 용액으로 pH 2.0에서 pH 10.0까지 조절한 용액과 bacteriocin 배양액을 1:1로 하여 4°C에서 3시간 동안 bacteriocin의 활성도를 측정하였다. 대조군으로 10 mM 인산염 완충용액(pH 7.0)을 이용하였다. Bacteriocin의 열 안정성을 조사하고자, 제균한 배양 상등액을 25~100°C에서 20분간격으로, 1시간까지 증탕하여 활성을 측정하였다. 그리고 autoclave를 이용하여 121°C, 15분 처리하여 활성을 측정하였다.

단백질 추출용매에 따른 bacteriocin의 안정성을 고찰하고자, 제균한 배양 상등액을 동량의 에탄올, 메탄올, 톨루엔, 메틸 클로로포름, 헥산, 아세톤을 가하여 1분간 vortex한 후 상온에서 3시간 방치하였다. Turbo Vap LV Evaporator(Zymark Inc., USA)를 사용하여 20°C, 1시간 건조시킨 후 동량의 10 mM 인산염 완충용액(pH 7.0)에 다시 녹여 bacteriocin의 활성도를 측정하였다. 대조군은 Turbo Vap LV Evaporator에 의한 영향을 고려하기 위해 용매처리하지 않고 제균한 배양 상등액을 사용하였다.

**Bacteriocin의 부분정제.** Bacteriocin의 부분정제는 *Pseudomonas putida* 21025를 미강 액체배지에 36시간 배양한 배양액을 6,500 rpm으로 4°C, 20분간 원심분리한 상등액을 황산암모늄에 의한 염석법을 이용하였다. Bacteriocin 유도 용균액에 황산암모늄을 20% 포화시켜 4°C에서 2시간 정치한 후 10,000 rpm에서 20분간 원심분리하였다.

원심분리한 상등액만을 다시 취하여 황산암모늄을 50% 포화되게 서서히 저으면서 넣고 4°C에서 2시간 정치 후 10,000 rpm에서 20분간 원심분리하여 침전물을 얻었다. 침전물을 소량의 10 mM 인산염 완충용액(pH 7.0)에 용해시킨 후, Spectra-Por no. 3 dialysis tubing(molecular weight cut off 3,500, Spectrum Medical Industries, USA)을 이용하여 4°C에서 48시간 투석하였다. 투석한 시료는 동결건조한 후, 10 mM 인산염 완충용액(pH 7.0)으로 용해시켜 사용하였다.

**Bacteriocin의 SDS-polyacrylamide gel 전기영동.** 부분정제된 bacteriocin의 순도 및 분자량을 조사하기 위해 Weber 등<sup>12)</sup>의 방법에 따라 10% polyacrylamide gel을 사용하였다.

제균한 배양액을 시료 완충용액으로 전처리하여, 10 µl씩 주입하여 150 Volts로 1시간 반 동안 전기영동하였다. 전기영동 후, comassie brilliant blue R-250으로 염색하고, 10% 메탄올, 7% 아세트산의 용액으로 탈색하였다. 분자량 표준 단백질로 Prestained SDS-PAGE standards broad range, (BIO-RAD Inc., USA)을 사용하였다.

## 결 과

**Bacteriocin 생성균주 탐색 및 선발.** 쌀에 존재하는 *Bacillus* sp.와 *Pseudomonas* sp. 9종을 spot-on-lawn 방법을 이용하여 항균 활성을 조사한 결과, 9종 중 8종이 항균 활성을 보였으며 그 중 *Pseudomonas aeruginosa*, *Pseudomonas putida*, *Pseudomonas methanolica*, *Pseudomonas fluorescens*,

Table 1. Antimicrobial spectrum of *Pseudomonas putida*

Organism	Culture medium	Incubation temp	Modified-deferred method	Spot-on-lawn method
			Inhibition zone diameter (mm)	Inhibition
<b>Gram-negative bacteria</b>				
<i>Escherichia coli</i>	TSB <sup>a</sup>	37°C	13	+ (19 mm)
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	TSB	37°C	24	+ (16 mm)
<i>Pseudomonas methanolica</i>	TSB	26°C	19	
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	TSB	26°C	13	+
<b>Gram-positive bacteria</b>				
<i>Bacillus subtilis</i>	TSB	30°C		+ (27 mm)
<i>Bacillus macerans</i>	TSB	30°C		+
<i>Bacillus cereus</i>	TSB	30°C	14	+ (19 mm)
<i>Bacillus megaterium</i>	TSB	30°C		
<i>Micrococcus luteus</i>	TSB	30°C	12	+ (12 mm)

<sup>a</sup>TSB; Tryptic soy broth

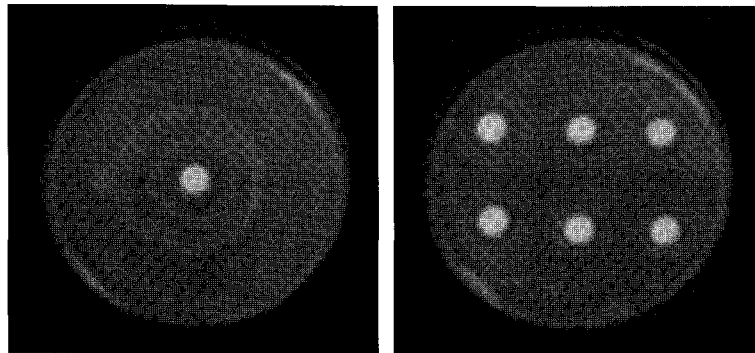


Fig. 1. Antimicrobial activity of *Pseudomonas putida* by the spot-on-lawn assay.

*Bacillus macerans* 등 5종이 광범위한 항균 활성을 나타내었으며, 특히 *Pseudomonas putida*와 *Bacillus macerans*이 광범위하면서도 강한 항균활성을 보였다. 이들 5종의 균주를 다시 modified deferred 방법에 의해 bacteriocin 활성을 조사하였다. 그 결과 *Pseudomonas putida*를 제외한 균주들은 미강 고체 배지에 30, 36°C에서 33시간 배양했을 경우 잘 자라지 않으며 48시간 배양 시 낮은 항균력을 보였다.

Kim<sup>13)</sup>은 *Pseudomonas aeruginosa* 90-2-2205가 Nutrient agar 배지를 이용한 modified deferred 방법에서 항균활성을 보인다고 보고하였으나 본 실험에서는 *Pseudomonas putida*를 제외한 *Pseudomonas* sp.는 미강 고체 배지에서 항균활성을 보이지 않았다.

De Vuyst와 Vandamme<sup>14)</sup>은 젖산균 중 bacteriocin 생산 균주의 빈도가 연구자마다 크게 다른 것에 대해 이러한 불일치는 bacteriocin 생산 균주의 확인이 전적으로 시험균에 달려있기 때문이라고 했다. 따라서 본 연구에서 bacteriocin 활성 조사를 위한 시험균의 선정시 미강 단백질 코팅제의 저장성 향상을 위한 bacteriocin 선별임을 감안하여 실패 존재하며, 토양에 오염될 수 있는 시험균을 선정하였다. Bacteriocin은 항균물질 생성 균주 자신과 계통, 분류학적으로 근접한 균종으로 항균 활성을 나타내는 것과 같이 modified deferred 방법으로 실험한 결과는 *Pseudomonas* sp.에 모두 항균력을 나타내었다.

Spot-on-lawn 방법으로 실험한 결과 *Pseudomonas methanolica*를 제외한 *Pseudomonas* sp.에 항균력을 보이며, *Bacillus* sp.에도 항균 활성을 나타내며, 특히 *Bacillus subtilis*에 27 mm로 큰 항균활성을 나타내었다(Table 1). 이러한 대상 균주에 대한 항균 효과가 modified-deferred 방법과 spot-on-lawn 방법으로 실험한 결과가 차이를 보이는 것은 본 연구의 *Pseudomonas putida* 21025가 생산하는 항균물질이 bacteriocin 외에도 bacteriophage나 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>와 같은 물질이 항균 효과에 기여하기 때문이라 판단된다. 따라서 광범위하면서도 강한 항균활성을 나타내는 *Pseudomonas putida*를 시험균로 선정하였으며 *Bacillus cereus*를 대상균주로 선정하여 modified-deferred 방법과 spot-on-lawn 방법을 이용하여 항균 활성을 조사하여 Fig. 1, 2에 나타내었다.

**생성균주에 대한 Bacteriocin 생성의 초기 pH의 영향.** 균주가 bacteriocin을 생성하는데 있어 pH의 영향을 조사하기 위하여 미강 액체배지를 1 N NaOH와 1 N HCl을 이용하여 pH 3.0에서 pH 9.0까지 조절하였다. *Pseudomonas putida* 21025 균주를 접종하여 30°C, 33시간 배양한 후 균의 생육과 항균활성을 조사하였다. 결과 Fig. 3과 같이 pH 5 이상에서부터 균이 증식하여 pH 6.0과 pH를 조절하지 않은 pH 6.48의 미강 액체 배지에서 균의 생육과 활성이 가장 높았고 pH 7.0~8.0에서 균의 증식이 반으로 감소하였다. pH 3.0과 pH 9.0에서의

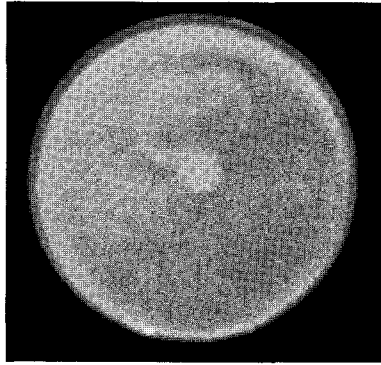


Fig. 2. Bacteriocin activity of *Pseudomonas putida* by the modified-deferred method.

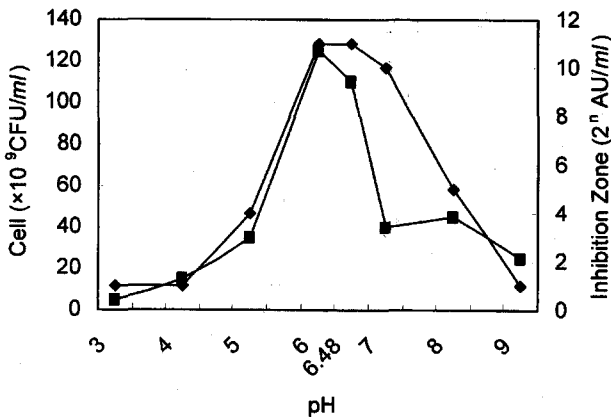


Fig. 3. Effects of initial pH on bacteriocin production. -■-, cell number; -◆-, bacteriocin

bacteriocin의 항균 활성은 2<sup>n</sup>은 항균환이 크게 나타나지만 2<sup>n</sup>부터 항균환이 보이지 않는 것으로 보아 항균력이라기 보다는 pH에 의한 균의 활성 저하로 보인다. 또한 선발 균주 성장에 따른 미강 배지의 pH를 측정된 결과 6.40~6.89로 큰 변화를 보이지 않았다.

Kim<sup>13)</sup>의 *Pseudomonas aeruginosa* 90-2-2205에 대한 보고에서는 pH 5.0 이상에서부터 균이 증식하여 pH 7.5에서 균의 생육과 활성이 가장 높았고 pH 7.0과 pH 8.0에서 균의 증식이 반으로 줄어들어 pH에 대한 생육과 활성이 특징적으로 좁은 경향을 볼 수 있었다. 본 연구에서는 Kim의 연구결과에 비해 pH 6.0~7.0까지 비교적 넓은 범위의 pH에서 생육과 활성이 높은 것으로 나타났으며, 이는 미강의 pH를 생각할 때 바람직하다고 볼 수 있다.

***Pseudomonas putida*의 증식에 따른 항균 활성.** 배양시간에 따른 균체량과 bacteriocin 생성 정도를 조사하기 위한 방법으로 미강 액체 배지 부유물질 때문에 spectrophotometer를 이용할 수 없어 생균수 측정법을 사용하였다. Fig. 4과 같이 33시간 배양 후 bacteriocin의 항균 활성이 가장 높았으며, 24시간 배양 후 균의 생육이 좋았다. Kim,<sup>13)</sup> Yoo, Paik 등<sup>15-17)</sup>의 연구에서의 공시 균주들은 TSB 또는 MRS 액체배지에서 배양시 12~24시간 이내에 bacteriocin을 생성하나 본 연구의 미강 배지에서는 33시간 배양 후 bacteriocin을 생성하였으며 36시간 이

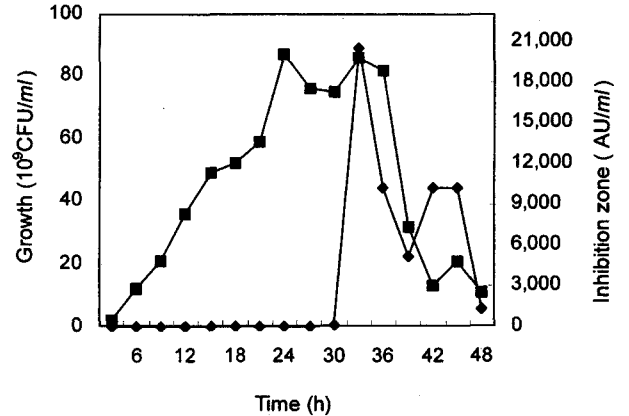


Fig. 4. Growth of *Pseudomonas putida* 21025 and production of bacteriocin. -■-, cell number; -◆-, bacteriocin

후 bacteriocin의 활성이 반으로 감소하는 것을 볼 수 있었다. 거칠게 마쇄한 미강 사용 시 48시간 이후에 bacteriocin을 생성하였고 곱게 마쇄한 미강 사용 시 33시간 이후 bacteriocin을 생성하였다. 이는 미강 안에 들어있는 균이 생육하기 위한 탄소원과 질소원 등이 액체배지에 용출되는 속도가 느리기 때문이라고 생각된다.

**온도, pH, 유기용매에 대한 bacteriocin의 안정성.** 제균한 배양액에 있는 항균성물질인 bacteriocin의 열에 대한 안정성을 조사하기 위해 각각의 온도에서 시간에 따른 잔존 활성을 측정하였다. 제균한 배양액은 25, 30, 40°C에서는 안정하였고 50~70°C에서는 1시간동안 활성이 다소 떨어졌으며 90°C 이상에서는 활성이 나타나지 않았다. Paik 등<sup>16-17)</sup>의 연구에서도 bacteriocin의 활성이 40°C에서는 안정하나 40°C 이상부터는 활성이 감소하는 것으로 나타났다. 그러나 Hyronimus<sup>18)</sup>의 연구에서는 각각의 온도에서 15분간 처리시 60°C까지 활성이 일정하게 나타났다. 제균한 배양액의 pH에 대한 안정성을 조사하기 위하여 pH가 각각 다른 용액을 첨가하여 4°C에서 3시간 정치하여 항균 활성을 측정하였다. 1시간 저장시에는 활성이 안정하나 3시간 이상 배양시 pH 3.0~5.0에서 활성이 떨어지는 것을 볼 수 있었다. 그러나 활성이 큰 폭으로 떨어지는 것은 아니므로 pH에 대한 영향은 크게 받지 않는 것으로 보인다.

제균한 배양액이 용매에 대한 안정성을 조사하기 위하여 각각의 용매를 가하여 4°C에서 3시간 정치하여 항균활성을 측정하였다. hexan과 에탄올에서는 안정하나 톨루엔과 클로로포름에서는 활성이 크게 감소하였다. Paik 등<sup>15)</sup>의 *Bacillus* sp.에서 생성된 bacteriocin에 대한 연구에서는 톨루엔에서 안정하며 다른 용매에서 활성이 감소한다고 보고하였고, Hyronimus<sup>18)</sup>의 연구에서는 모든 용매에 안정한 것으로 보고하였다. 본문에서는 Table로 나타내지 않았다.

**Bacteriocin의 SDS-polyacrylamide gel 전기영동.** 부분정제된 bacteriocin의 순도 및 분자량을 조사하기 위해 시료를 전기영동하였다. 실험결과 Fig. 5와 같이 약 21.6kDa로 작은 분자량을 나타내었다. 이는 *Pseudomonas* sp.가 생성하는 bacteriocin을 조사한 결과 Ohkawa 등<sup>19)</sup>이 보고한 pyocin S2의 분자량 12 kDa, Sano 등<sup>20)</sup>이 보고한 pyocin AP41의 분자량 9

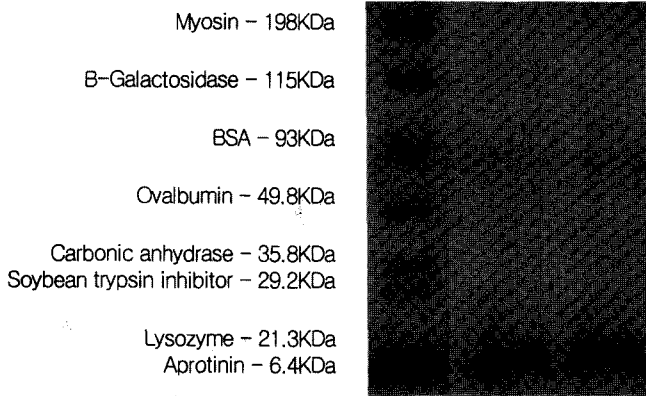


Fig. 5. SDS-PAGE of partially purified bacteriocin for determination of molecular weight.

kDa보다 큰 21.6 kDa로 추정되었다. 그러나 Ito<sup>21)</sup>와 Kim 등<sup>13)</sup>은 pyocin의 분자량을 각각 100 kDa, 180 kDa로 거대한 분자로 보고하였다.

본 실험에 사용한 *Pseudomonas putida* 21025가 생성하는 bacteriocin의 특성을 고려하여, bacteriocin 배양 후, 필름 가공 시에는 중성 및 염기성 pH에서 한 시간 이내로 교반하여, 상온 하에서 필름 포장재를 제조하면 포장식품의 shelf life를 연장시킬 수 있는 미강단백질 필름 포장재가 개발될 수 있을 것으로 기대한다.

### 감사의 글

본 논문은 2001년도 농림기술개발 자유공모과제(101029-02-2-SB010)의 연구비에 의하여 연구된 결과의 일부입니다. 본 연구를 지원해주신 농림부에 감사드립니다.

### 참고문헌

1. Lee, B. I., Vergano, P. J., Lindsay, L., Zhang, H. and Park, H. J. (1998) Silicate modification of corn protein films. *J. Materials Sci. Lett.* **17**, 359-361.
2. Hwang, K. T., Park, H. J., Jung, S. T., Ham, K. S., Yoo, Y. K. and Cho, K. S. (1999) Controlling molecular weight and degree of deacetylation of chitosan and its characteristics in film formation. *Korea J. Packaging Sci. Tech.* **5**, 47-55.
3. Ahn, C. and Stites, M. E. (1988) Plasmid-associated bacteriocin production by a strain of *Carnobacterium piscicola* from meat. *Appl. Environ. Microbiol.* **56**, 2503-2510.
4. Reeves, P. (1965) Bacteriological Review. *Bacteriological Review.* **29**, 25-45.
5. Chung, K. S., Yang, E. S., Lee, K. J., Koj, H. J. and Jung, B.

- M. (1998) Purification and characterization of bacteriocin produced by *Enterococcus* sp. *Korean Food Appl. Microbiol. Biotechnol.* **26**, 523-528.
6. Jack, R. W., Tagg, J. R. and Ray, B. (1995) Bacteriocins of gram-positive bacteria. *Microbiol. Rev.* **59**, 171-200.
7. Said, E., Toshihiro, S., Kenji, S. and Ayaaki, I. (2000) Class IIa bacteriocins: biosynthesis, structure and activity. *FEMS Microb. Rev.* **24**, 85-106.
8. Scott, S. C. and John, J. I. (1997) Exploiting the unique biophysical properties of bacteriocins to purify Bac1829 from *Staphylococcus aureus* KSI1829. *Prot. Expr. Purif.* **9**, 228-232.
9. Harris, L. J., Daeschel, M. A., Stiles, M. E. and Klaenhahammer, T. R. (1989) Antimicrobial activity of lactic acid bacteria against *Listeria monocytogenes*. *J. Food Prot.* **52**, 384-387.
10. Kekessy, D. A. and Piguert, J. D. (1970) New method for detection bacteriocin production. *Appl. Microbiol.* **20**, 282-283.
11. Hechard, Y., Dherbomez, M., Cenatiempo, Y. and Letellier, F. (1990) Antagonism of lactic acid bacteria from goats' milk against pathogenic strains assessed by the 'sandwich method'. *Lett. Appl. Microbiol.* **11**, 185-188.
12. Weber, K., Pringle, J. R. and Psborn, M. (1972) *Methods Enzymol.* **26**, 3.
13. Kim, N. S. (1991) Purification and characterization of the bacteriocin produced by *Pseudomonas aeruginosa* 90-2-2205. M.S. Thesis, Kyungpook University, Korea.
14. De Vuyst, L. and Vandamme, E. J. (1992) Influence of the carbon source on Nisin production in *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* batch fermentations. *J. Gen. Microbiol.* **138**, 571-578.
15. Yoo, J. Y., Lee, I. S., Chung, K. S. and Nam, Y. J. (1991) Isolation and properties of bacteriocin-producing microorganisms. *Kor. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.* **19**, 8-13.
16. Paik, H. D., Koo, K. M. and Lee, N. K. (2000) Identification and partial characterization of *Lactococcus lactis* SA72, a bacteriocin produced by *Lactococcus lactis* SA72 isolated from Jeot-gal. *J. Microbiol. Biotechnol.* **10**, 488-495.
17. Paik, H. D. and Lee, N. K. (2000) Identification and partial characterization of Cerein BS229, a bacteriocin produced by *Bacillus cereus* BS229. *J. Microbiol. Biotechnol.* **10**, 195-200.
18. Hyronimus, B. 1998. Coagulin, a bacteriocin-like inhibitory substance produced by *Bacillus coagulans* 14. *J. Appl. Microbiol.* **85**, 42-50.
19. Ohkawa, I., Kageyama, M. and Egami, F. (1973) purification and proterties of pyocin S2. *J. Biochem.* **73**, 281-2889.
20. Sano, Y., Kageyama. (1981) Purification and proterties of an S-type pyocin, pyocin AP41. *J. Bacteriol.* **146**, 733-739.
21. Ito, S., Kageyama, M. and Egami, F. (1970) Isolation and characterization of pyocin from strains of *Pseudomonas aeruginasa*. *F. Gen. Appl. Microbiol.* **16**, 205-214.

---

**Selection and Characteristics of Bacteriocin-Producing Microorganism to Utilize in Anti-Bacterial Rice Bran Protein Film Production**

Kim Eun Joung, Kim Kyung Mi, Han Hye Kyung, Kim Young Ho, Kwon Ki Sung<sup>1</sup> and Bea Dong Ho\*  
(Department of Applied Biology and Chemistry, Kunkuk University, Seoul 143-701, Korea; <sup>1</sup>Korea Food & Drug Administration, Seoul 122-704, Korea)

**Abstract:** This study was conducted to select the bacteriocin-producing microorganism cultivated in the rice bran culture and to characterize the produced bacteriocin for the further purpose of economical and anti-bacterial rice bran protein film. *Pseudomonas putida* 21025 was cultivated from rice bran and identified as a producer of a bacteriocin which showed bactericidal activity against *Pseudomonas aeruginosa* 9027. Bacteriocin produced by *Pseudomonas putida* 21025 showed a broad spectrum of activity against spoilage and soil bacteria. The activity of the bacteriocin produced by *Pseudomonas putida* 21025 decreased after 1 hr of staying at the temperature of 50°C and with the presence of some organic solvents, except hexane and ethanol. However, the bacteriocin activity was stable throughout the pH ranges of 6-9 for 2 hrs, at the temperature lower than 50°C, and with the presence of ethanol for 3 hrs. The bacteriocin was partially purified by 50% ammonium sulfate precipitation followed by subsequent dialysis. Direct detection of the partially purified bacteriocin on SDS-PAGE suggested that it had an apparent molecular mass of about 21.6 kDa.

---

Key words: rice bran, film, Bacteriocin, *Pseudomonas* sp.

\*Corresponding author