

## *Pseudomonas putida* 21025가 생성하는 bacteriocin을 이용한 항균성 미강 단백질 필름의 저장성 향상

김은정 · 김경미 · 배동호\*  
건국대학교 응용생물화학과

### Improvement in Stabilities of Rice Bran Protein Film Containing Bacteriocin Produced by *Pseudomonas putida* 21025

Kim Eun Joung, Kim Kyung Mi and Bae Dong Ho\*

Department of Applied Biology and Chemistry, Kunkuk University, Seoul, 143-701 Korea

#### Abstract

An effort was attempted to utilize an under-utilized protein source, rice bran protein, in coating or wrapping food material for the purpose of protection them from oxidation and bacterial infection. However, the utilization of rice bran protein as a food coating material is limited because the rice bran protein coating material itself can be spoiled by a bacterial infection. Therefore, this study was conducted to produce the economical and antibacterial rice bran protein film by utilizing rice bran and bacteriocin-producing microorganism. Bacteriocin produced by *Pseudomonas putida* 21025 was partially purified after 33h of shaking incubation at 30°C. The amount of amino-type nitrogen did not increase in the rice bran protein film containing the bacteriocin any more after gradual increase upto the content of 0.22% for 8 days, while that without the bacteriocin increased continuously, implying that application of the bacteriocin to the rice bran had positive effects on prolonging the shelf-life of not only film itself but also the foods wrapped by this film.

Key words : *Pseudomonas putida* 21025, rice, protein, protein film, *Bactreriocin*

## 서 론

수분 및 미생물로부터 식품의 변질을 막기 위해 다양한 방법을 이용하고 있다. 가열, 동결건조, 자연건조 등의 물리적 방법과 미생물발효에 의한 방법, 염장법, 당장법, 훈연법, 대기환경을 조절하는 MA포장, CA저장, 화학 합성방부제 첨가 등의 방법을 사용하였다. 그러나 이러한 방법은 모든 식품에 적용되지 못하며, 화학합성방부제의 경우 식품에 대한 사용량이 제한되어져 있다. 소비자들의 식품의 안전성에 대한 관심이 커지면서 인공방부제나 식품첨가물에 대한 기피 현상을 보이고 있어 그 사용을 줄일 수 있는 보다 효율적인 대체방안이 필요하다(1-7).

이러한 곡물과 견과류 식품의 수분흡수 및 산화를 방지하기 위한 목적으로 사용되어지고 있는 식이성 필름은 식품포장의 개봉 후 흡습, 탈습, 산소와의 접촉, 향기성분의 손실을 막아 식품의 품질을 유지하기 위한 목적으로 최근 많이

연구 개발되고 있으며 식이성 혹은 생분해성 코팅 및 포장재는 일반포장재의 남용도 감소시킴으로써 환경보호에 큰 도움이 될 가능성도 제시된 바 있다.

단백질 포장 및 필름으로는 콜라겐, 젤라틴 필름과 함께 옥수수 제인 필름은 우수한 산소, 수분, 유지 차단효과가 있어 상업적으로 다양한 식품의 포장재로 사용되고 있다. 그러나 식품부산물인 미강과 찜깨박 단백질을 화학적으로 변형하여 개발한 식이성 필름은 실용화되기에는 필름의 열수에 대한 높은 용해도와 원료가 단백질인 것에서 오는 짧은 저장기간의 문제점을 해결해야 한다(8-11).

Bacteriocin은 미생물이 생산하는 천연의 무독성 방부제로 주목받고 있는 항균성 단백질로 인체에 섭취되면 소화기관의 단백질 가수분해 효소에 의해 분해되므로 인체에 무독하고 잔류성이 없으며 기존의 항생제가 미생물의 2차 대사산물인데 비해 유전자로부터 직접 생합성되므로 직접적인 유전자조작 등에 의한 생물공학적 응용이 쉽다는 측면에서 기존의 화학적 보존제를 대체할 수 있는 새로운 생물학적 보존제로서 식품 등의 천연방부제로서의 효용성이 증대되고 있다(12).

실제 식품산업에 응용되고 있는 bacteriocin은 Nisin으로 유제품 및 육류의 품질보존, 통조림 제품의 살균 등에 많이

Corresponding author : Dong-Ho Bae, Department of Applied Biology and Chemistry Kunkuk University, Seoul, 143-701 Korea  
E-mail : donghoya@konkuk.ac.kr

이용되고 있고(13-16) 이미 구미에서는 긍정적으로 인정한 사례가 있다. 이외에 식물병원균을 방제하기 위하여 사용되는 화학농약은 그 사용범위가 상당히 넓으나 인체에 유해하고 저항성을 가진 병원균이 증가하고 있어서 사용 숙주범위가 좁지만 이러한 결점을 보완할 수 있는 생물학적 방부제로서의 bacteriocin 연구(17)가 보고되어 있다.

본 연구에서는 식품부산물인 미강 단백질 필름 포장재를 이용한 식품의 저장시, 미강 단백질 필름의 짧은 저장기간의 문제점을 해결하기 위한 방법으로 미강배지에서 bacteriocin을 생산할 수 있는 *Pseudomonas putida* 21025를 직접 미강에 배양하여 bacteriocin이 배양된 미강으로부터 플룸용 단백질을 추출하고 필름 포장재로 가공함으로써 필름의 저장성뿐만 아니라 항균 기능이 부여된 포장재를 개발하고자 하였다.

## 재료 및 방법

### 재료 및 균주

본 연구는 *Pseudomonas putida* ATCC21025를 ATCC에서 분양 받아 사용하였다. 또한 미강 배지에서 bacteriocin 생성 가능한 *Pseudomonas putida* ATCC21025의 항균력 및 활성범위를 조사하고자, 쌀에 존재하며 토양미생물인 *Bacillus* sp.와 *Pseudomonas* sp. 균주 등 9개 균주 *Escherichia coli* KCTC1039, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC9027, *Pseudomonas putida* ATCC21025, *Pseudomonas methanolica* ATCC21960, *Pseudomonas luorensis* KCTC1767, *Bacillus subtilis* ATCC6633, *Bacillus nacerans* KCTC1822, *Bacillus cereus* KCTC2744, *Bacillus nagaterium* KCTC2178, *Micrococcus luteus* ATCC9341를 ATCC와 KCTC에서 분양 받아 사용하였다. 배지는 미강배지와 TRYPTIC SOY BORTH, SOYBEAN- CASEIN DIGEST AGAR DEHYDRATED (DIFCO Inc., USA)를 이용하였다.

미강의 일반성분은 수분 13.5%, 단백질 13.2%, 지방 18.3%, 당질 38.3%, 섬유소 7.8%, 회분 8.9%이며 bacteriocin 생성 균주는 탄소원으로 당질, 질소원으로 단백질을 이용하므로 다른 성분을 첨가하지 않고 미강 액체배지를 그대로 사용하였다.

### Bacteriocin 활성 분석

*Pseudomonas putida* 21025의 항균활성은 modified deferred 방법을 이용하여 미강 고체 배지로 지시균주에 대한 항균활성을 실험하였다.

미강 고체 배지에 *Pseudomonas putida*를 접종하여 30°C에서 33시간 배양한 후 지시균주를  $10^7$  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. 지시균주를  $10^7$  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 6500 rpm으로 4°C, 20분간 원심분리하여 상등액을 0.45 µm Cellulose Acetate syringe filter로 여과하여 제균한 배양액을 항생물질 검정용 여지에 100 µl를 분주하여 30°C, 37°C에서 12시간 후 억제환을 관찰하였다. Bacteriocin을 2배씩 희석하여 항균활성(activity units, AU)을 계산하였다. 결과는 2회 반복하여 나타내었다.

### Bacteriocin의 부분정제

Bacteriocin의 부분정제는 *Pseudomonas putida* 21025를 미강 액체배지에 36시간 배양한 배양액을 6500 rpm으로 4°C, 20분간 원심분리한 상등액을 황산암모늄에 의한 염석법을 이용하였다.

Bacteriocin 유도 용균액에 황산암모늄을 20% 포화되게 서서히 저으면서 넣고 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)에 용해시킨 후, Spectra-Por no.3 dialysis tubing(molecular weight cutoff 3,500, Spectrum Medical Industries, U.S.A.)을 이용하여 4°C에서 48시간 투석하였다.

투석한 시료는 동결건조한 후, 10 mM 인산염 완충용액(pH 7)으로 용해시켜 사용하였다.

### Bacteriocin에 의한 미강 단백질 필름의 저장성

미강 단백질 필름의 저장에 따른 부패도를 실험하기 위해 아미노태 질소량을 측정하였다.

Bac와 Jang(9)의 미강에서의 단백질 추출법을 이용하여 미강을 pH 9.4에서 10% 에탄올로 추출하였다.

미강 추출액을 가온 교반기를 사용하여 교반하면서 80°C에 이를 때까지 가열하여 가소제로 글리세롤 2%를 첨가한다. 80°C에 이르면 2분 더 가열한 후 방냉하고, 40°C에 이르면 각각  $10^5$  cell을 포함한 지시균,  $10^5$  cell을 포함한 지식균과 제균한 배양액 5%,  $10^5$  cell을 포함한 지식균과 제균한 배양액 10%를 첨가하여 25°C에서 24시간 건조한 단백질 필름의 부패도를 조사하기 위해 아미노태 질소량을 측정하였다.

식품의약품안전청 식품공전에 제시된 포르몰법을 이용하여(18), 부패도에 따른 아미노태 질소량 측정을 위해 각각의 필름에 지시균과 제균한 배양액을 첨가하였다. 미강 단백질 필름 1 g을 250 ml의 증류수에 녹인 후 0.1N NaOH 용액을 이용하여 pH 8.5로 적정하였다.

회석한 시료 25 ml에 pH 8.5 포르말린액을 20 ml 가하여 혼합용액에 페놀프탈레인 지시약을 약 2방울 가하여 0.1N NaOH 용액으로 pH 8.5가 될 때까지 적정하였다(18-21).

$$\text{Amino Nitrogen (mg\%)} = \frac{(A-B) \times F \times 1.4}{S} \times 100 \times \text{dilution factor}$$

- A : 0.1N NaOH 소비 ml
- B : 공시험 0.1N NaOH 소비 ml
- F : Factor of 0.1N NaOH
- S : 시료 채취량(mg)

### Bacteriocin 함유 단백질 포장재의 식품에 대한 항균

Bacteriocin을 함유한 단백질 포장재의 식품의 방부효과를 조사하기 위해 슬라이스 햄을 포장한 bacteriocin 함유 단백질 포장재 표면에 지시균을 접종하여 포장된 햄의 미생물 번식 정도를 조사하였다.

대조군은 슬라이스 햄 약 3 g에 지시균주를 직접 접종하였으며, 시료는 지시균주가 접종된 슬라이스 햄 약 3 g에 미강 단백질 포장재와 bacteriocin 함유 미강 단백질 포장재로 포장하여 균증식도를 비교하였다.

## 결과 및 고찰

### *Pseudomonas putida*가 생성하는 bacteriocin의 항균력

*Pseudomonas putida*가 생성하는 bacteriocin의 항균력 및 활성을 조사하기 위해 쌀에 존재하는 미생물과 토양미생물 *Bacillus* sp.와 *Pseudomonas* sp. 등 9종을 spot-on-lawn과 modified deferred 방법을 이용하여 항균 활성을 조사하였다(Table 1). 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 큰 항균 활성을 나타내었다(Fig1, Table 1). 그러나 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 추정된다.

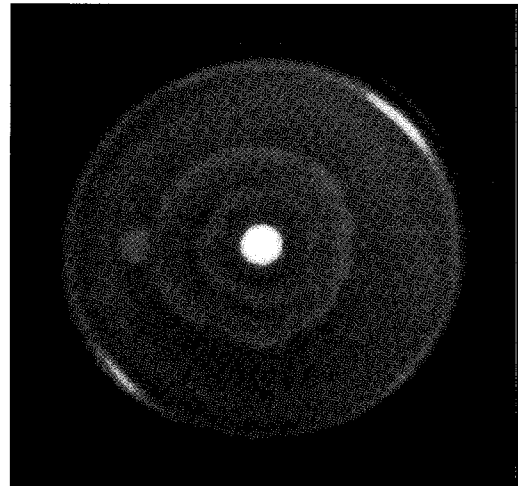


Fig. 1. Antimicrobial activity of *Pseudomonas putida* by the spot-on-lawn assay.

Table 1. Antimicrobial spectrum of *Pseudomonas putida*

Organism	Modified-deferred method	Spot-on-lawn method
	Inhibition zone diameter(mm)	Inhibition
<b>Gram-negative bacteria</b>		
<i>Escherichia coli</i> KCTC1039	13	+
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC9027	24	+
<i>Pseudomonas putida</i> ATCC21025	16	+
<i>Pseudomonas methanolica</i> ATCC21960	19	
<i>Pseudomonas fluorescens</i> KCTC1767	13	+
<b>Gram-positive bacteria</b>		
<i>Bacillus subtilis</i> ATCC6633		++
<i>Bacillus macerans</i> KCTC1822		+
<i>Bacillus cereus</i> KCTC2744	14	+
<i>Bacillus megaterium</i> KCTC2178		
<i>Micrococcus luteus</i> ATCC9341	12	+

+ Zone of inhibition was more than a 10mm

++ Zone of inhibition was more than a 20mm

### Bacteriocin의 특성 및 미강 단백질 필름 제조

현재 미강 단백질 필름의 생산은 Bea(12)의 연구에 따라 미강 단백질 추출의 극대화를 위해 미강에 5배의 10% 에탄올을 넣고 저어주면서 pH 9.4로 맞추어 후 3시간 교반하여 미강 단백질을 추출하며, 필름의 물리화학적 성질을 고려하여 80℃로 가열한 후 2분간 유지, 25℃에서 건조시키는 조건으로 필름이 제조되고 있다.

그러나 *Pseudomonas putida* 21025가 생성하는 Bacteriocin은 40℃에서는 안정하나 80℃, 20분 가열시 활성이 감소하는 것을 볼 수 있으며 pH 9에서는 3시간후 활성은 큰 감소

보이지 않았으며 에탄올에 대해 3시간 동안 안정하였다 (Table 2).

미강 필름에 사용시 bacteriocin을 직접 배양한 미강을 이용하여 미강 단백질 필름을 생성할 경우 80℃로 가열한 후 건조시켜야 하므로 bacteriocin의 활성이 감소할 것으로 보인다. 그러므로 20분 이내의 가열이 bacteriocin의 안정성을 위하여 권장된다. 또한 25℃에서의 활성실험은 미강 단백질 필름 건조시 온도를 고려하려 행하였으며 활성이 안정한 것으로 볼 수 있었다. 또한 미강 단백질을 추출할 경우 pH 9.0~9.5로 적정할 경우 bacteriocin에 큰 영향을 주지 않을 것으로 보여지며 단백질 추출시 이용되는 10% 에탄올에는 안정할 것으로 보인다.

그러나, 필름의 저장성을 고려한 bacteriocin 배양 후, 필름 가공시에는 bacteriocin의 생산과 안정성을 고려하여 pH 9.4로 조절한 후 한 시간 이내 교반, 80℃로 가열 후 2분간 유통의 총시간을 20분 이내로 하는 조건으로 제조할 것을 권장한다.

Table 2. Effect of pH, heat, and organic solvents on partially purified bacteriocin

pH	Residual activity(AU/ml)	Heat	Residual activity(AU/ml)	Organic solvent	Residual activity(AU/ml)
control	10240	control	20480	control	20480
3	640	40℃	20480	Hexanes	20480
4	2560	50℃	5120	Ethanol	20480
5	1280	60℃	2560	Methanol	320
6	5120	70℃	2560	Toluene	80
7	5120	80℃	640	Chloroform	0
8	1280	90℃	80	Acetone	1280
9	2560	100℃	2	Methyl	320
		121℃	0	Chloroform	

† treatment for 3hr  
 ‡ heat treatment for 20min  
 § autoclave for 15min  
 ¶ organic solvent treatment for 3hr

**bacteriocin에 의한 미강 단백질 필름의 저장성**

미강 단백질 필름의 저장성을 조사하기 위하여 지시균과 bacteriocin을 첨가하여 저장시 단백질의 부패도를 보기 위해 아미노태 질소함량을 측정하였다.(Fig 2)

10% bacteriocin을 첨가한 필름은 8일째부터 아미노태 질소함량이 증가하지 않았으며, 5% bacteriocin은 12일째부터 아미노태 질소함량이 증가하지 않았다. 또한 bacteriocin을 첨가하지 않은 필름은 10% bacteriocin을 첨가한 필름에 비해 20일 저장시, 90mg% 증가를 나타내었다. 따라서 bacteriocin을 첨가한 미강 단백질 필름의 단백질 부패도가 감소하는 것으로 보아 단백질 필름의 짧은 저장성을 보완할 수 있을 것으로 보인다.

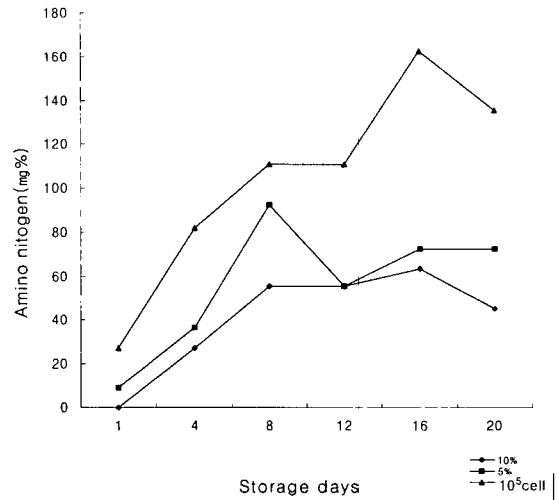


Fig. 2. Changes in amino type nitrogen content in bacteriocin-containing film during storage.

**Bacteriocin 함유 단백질 포장재의 식품의 방부효과**

햄을 이용하여 필름과 20% bacteriocin을 함유한 필름의 방부효과를 조사하기 위해 햄에 임의적으로 균을 접종하여 그 균의 번식도를 조사하였다(Fig 3).

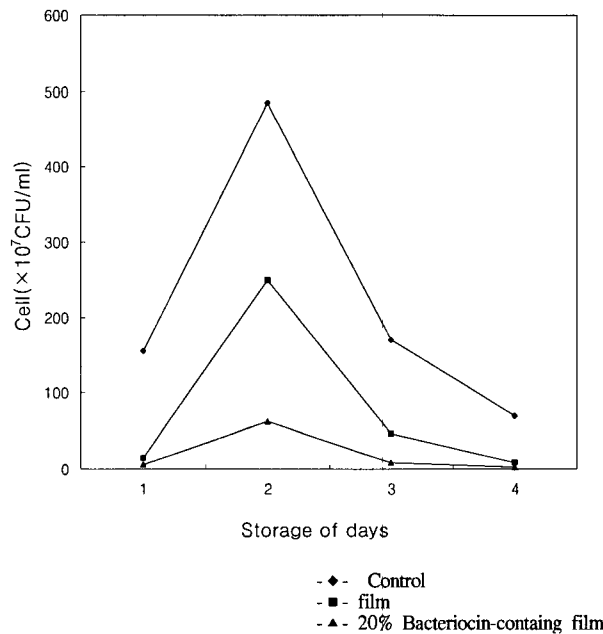


Fig. 3. Effect of bacteriocin-containing film on the bacterial growth in wrapped ham during storage.

필름포장재를 사용하지 않은 대조군은 균수가 급증하는 것에 비해 20% bacteriocin 함유 필름포장재를 사용한 햄에서는 균수의 증가율이 20%정도 증가현상을 보였다. Bacteriocin을 함유하지 않은 필름에 포장된 햄 또한 균수의 증가율이

50%정도 급증하는 결과를 나타내었다. 따라서 Bacteriocin을 함유한 필름포장재는 지시균에 대해 항균력을 지닌 것으로 나타내었다.

4일 이후에 모든 시료의 균수가 감소한 것은 또한 햄의 완전 코팅방법을 고안하지 않고 공기중 수분과 오염물질만을 차단하여 실험한 결과 햄자체의 수분이 증발하여 3일째 햄의 건조에 의해 균수가 감소한 것으로 보여진다. 따라서 미강 단백질 필름의 사용시 식품고유의 품질을 유지할 수 있는 코팅방법의 고안이 필요할 것으로 보인다.

## 요 약

쌀에 존재하며 토양미생물인 *Pseudomonas putida* 21025를 미강에 배양하여 생성되는 bacteriocin을 미강 필름에 첨가하여 미강필름의 저장성향상을 조사하였다. *Pseudomonas putida* 21025를 접종한 미강 액체배지는 초기배지 pH 6.48로 자연 그대로의 미강 액체배지를 이용하여 항은 배양기에 30℃, 150 rpm으로 33시간 배양하여 bacteriocin을 생성하였다. bacteriocin 첨가 후, 필름 가공시에는 bacteriocin의 생산과 안정성을 고려하여 pH 9.4로 조절한 후 한 시간 이내 교반, 80℃로 가열 후 2분간 유지의 총시간을 20분 이내로 하여 미강 단백질 필름을 제조하였다. 이러한 방법으로 제조한 미강 단백질 필름의 아미노태 질소함량을 조사한 결과 20% bacteriocin을 첨가한 미강 단백질 필름이 첨가하지 않은 단백질 필름 보다 아미노태 질소함량이 낮은 것으로 나타났다. 따라서 bacteriocin이 미강 단백질 필름 코팅재의 저장기간 향상에 도움을 줄 것으로 보인다.

## 참고문헌

1. Montville, T.J. and Kaiser, A.L. (1993) Antimicrobial proteins : Classification, nomenclature, diversity, and relationship to bacteriocins. In *Bacteriocins of Lactic Acid Bacteria*, Hoover, D.G. and Steenson, L.R. (Ed.), Academic press, San Diego, USA p. 1-22
2. Paik, H.D. and Hur, J.W. (1997) Screening of novel bacteriocins produced by isolates of various food and feed sources. *Daesan Nonchong*, 5, 145-153
3. Kim, K.T. and Cho, S.M. (1999) Inhibition of Spoilage and Pathogenic Bacteria by Lacticin NK24, a bacteriocin produced by *Lactococcus lactis* NK24 form fermented fish food. *Korean J. Food Sci. Technol.*, 31, 1035-1043
4. Ji, G.E. and Kim, J.S. (1997) Isolation of bacteriocin producing lactic acid bacteria from human intestines and

- the characteristics of their bacteriocins. *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.*, 26, 1228-1236 (1997)
5. Kwon, H.F. and Hong, G.P. (1998) Effect of precooling and films packing on shelf-life in celery. *RDA Journal of Horticulture Science(I)*, 40, 37-43
6. Pack, H.Y. (1997) *Development of new functional MA packaging methods for freshness extension of agricultural produce*. Rural Development Administration National Horticultural Research Institute. p. 155
7. Ahn, Y.S. and Shin, D.H. (2000) Studies on oyster mushroom (*Pleurotus ostreatus*) packed in various environmental friendly trays. *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.*, 29, 85-92
8. Bae, D.H., Kim, W.J., Jang, I.S. (2000) Properties of biodegradable film produced from rice bran and roasted sesame meal through chemical modifications. *Agric. Chem. Biotechnol.*, 43, 79-85
9. Bae, D.H. and Jang, I.S. (1999) Development of new food protein through chemical modification of rice bran proteins. *Agric. Chem. Biotechnol.*, 42, 180-185
10. Jang, I.S. (1999) Changes in physical functionality of roasted sesame protein upon chemical modification. *M.S. thesis*, Kon-kuk University, Korea
11. Park, H.J. (1999) Preservation characteristics of apple and mandarin coated with edible film. Paper presented at *Storage and distribution of agricultural commodities and their engineering Approach*. Seoul, Korea p. 45-57
12. Lee, H.J. (1997) Purification and characterization of the bacteriocin produced by *Lactococcus sp.* H-559 isolated from Kimchi. *M.S. Thesis*. Seoul National University, Korea
13. Hurst, A. (1981) *Adv. Appl. Microbiol.*, 27, 85-123
14. Rayman, M.K., Aris, B. and Hurst, A. (1981) Nisin: a possible alternative or adjunct to nitrite in the preservation of meats. *Appl. Environ. Microbiol.*, 41, 375-380
15. Gupta, R.K. and Prasad, D.N. (1988) Incorporation of Nisin in stirred yogurt. I. Effect on lactic and Non-lactic organism during storage. *Cultured Dairy Products J.*, 8, 17-18
16. 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
17. Broaghton, J.B. (1990) Nisin and its uses as a food preservative. *Food Technol.*, 44, 100-117
18. KFDA (2000) The General method. In *Food Code*, Korea Food & Drug Administration p. 13-15
19. Lee, S.H., Kim, Y.T. Shon, M.S., Sung, C.K. and Park, S.K. (2001) Quality properties of fermented Tofu prepared with different molds and coagulants. *J. Korean Soc. Food*

- Sci. Nutr., 30, 617-622
0. Jeon, M.S. (2001) Color characteristics and antioxidizing ability of Korean traditional soy sauces with different aging periods and jar types. *M.S. Thesis*, Yonsei University, Korea
21. Lee, H.Y. (1998) Studies an the utilization of rice bran as food staff. Agricultural R&D Promotion Center, p. 50-51
- 
- (접수 2003년 6월 8일, 채택 2003년 8월 20일)