

博士學位論文

제주연안에서 분리된 해양유래 방선균의
다양성 및 미생물 2차대사산물의
생리활성 탐색

The logo of Jeju National University is a large, faint watermark in the background. It features a stylized flame or wave shape in blue, green, and grey, with a purple 'J' shape to the right. Below the graphic, the text 'JEJU 1952' is visible. The full name 'JEJU NATIONAL UNIVERSITY 1952' is written in a circular path around the central graphic. At the bottom of the logo, the Korean name '제주대학교' is written in a curved path.

濟州大學校 大學院

水産生命醫學科

金萬喆

2010年 2月

제주연안에서 분리된 해양유래 방선균의
다양성 및 미생물 2차대사산물의
생리활성 탐색

指導教授 許 文 洙

金 萬 喆

이 論文을 理學 博士學位 論文으로 提出함

2010年 2月

金萬喆의 理學博士 學位論文을 認准함

審査委員長 송 춘 복 (印)

委 員 최 광 식 (印)

委 員 이 제 희 (印)

委 員 여 인 규 (印)

委 員 허 문 수 (印)

濟州大學校 大學院

2010年 2月

Diversity of Marine Actinomycetes Isolated from in
the Jeju Island Coastal and Screening of Biological
Activities from Microorganisms
Secondary Metabolites

Man-Chul Kim

(Supervised by professor Moon-Soo Heo)

A thesis submitted in partial fulfillment of the requirement for the
degree of DOCTOR OF PHILOSOPHY

Department of Aquatic Life Medicine

GRADUATE SCHOOL

CHEJU NATIONAL UNIVERSITY

2010. 02

목 차

GENERAL ABSTRACT	VII
LIST OF FIGURES	XIV
LIST OF TABLES	XIX
 PART I. 제주 연안에서 분리된 해양방선균의 다양성 및 특성	
1. 서론	2
2. 재료 및 방법	16
2.1. 연구지 (Sampling site)개황	16
2.2. 해양유래 방선균주 분리 및 보관.....	19
2.3. 환경요인 분석	20
2.4. 종속영양세균 분석	20
2.5. 분리 미생물의 형태 및 생리.화학적 특성조사.....	21
2.5.1. Gram 염색, Oxidase 및 Catalase 시험.....	21
2.5.2. 성장, 온도 및 염분실험.....	21
2.5.3. 색소특성	21
2.5.4. 생화학 및 생리학적 특성.....	22
2.5.4.1. Casein 가수분해 시험.....	22
2.5.4.2. Starch 가수분해 시험.....	22
2.5.4.3. Urease 가수분해 시험.....	23
2.5.4.4. Nitrate 환원효소 시험.....	24
2.5.5. 분리균주의 탄소원 이용능.....	24
2.5.6. Tween 40 및 80 가수분해 시험.....	25
2.5.7. 분리방선균의 색소 스펙트럼.....	25
2.6. 16S rRNA 염기서열 분석	26
2.7. 16S rRNA 계통 분석	27
3. 결과 및 고찰	28
3.1. 채집 시료	28
3.2. 환경요인 분석.....	28
3.2.1. 수온, pH, 염분.....	28
3.2.2. 용존산소 및 화학적 산소요구량.....	29

3.2.3. 영양염류 측정.....	29
3.2.4. 종속영양세균.....	30
3.3. 분리균주의 특성.....	32
3.3.1. 색소형성 해양 방선균 배양학적 특성.....	32
3.3.2. 분리균주의 생화학적 특성.....	37
3.3.3. 분리균주의 색소스펙트럼.....	42
3.4. 16S rRNA 염기서열분석 및 계통분석.....	44
3.5. 신종 가능성 미생물.....	60
4. 요약.....	62

PART II. 신규 후보 해양 미생물의 분리 및 특성

해양에서 분리된 *Glaciecola siphonariae* sp. nov., 및 *Oceanisphaera laurenciae* sp. nov.,의 분류학적 연구 및 특성

1. 서론	66
1.1. 신규 미생물자원의 중요성.....	66
1.2. 미생물의 진화 및 분류 (Evolution and taxonomy of microbial).....	69
1.2.1. 미생물의 진화.....	69
1.2.2. 미생물의 분류 (Microbial taxonomy).....	72
1.3. 신규미생물 자원 확보를 위한 분자생물학적 접근.....	78
1.4. Phylum Proteobacteria.....	79
1.5. Proteobacteria; Gammaproteobacteria; <i>Altermonadales; Alteromonadaceae; Glaciecola</i> <i>Aeromadales; Aeromonadaceae; Oceanisphaera</i>	82
2. 재료 및 방법	84
2.1. 표현형적 특성 분석(Phenotypic characterization).....	84
2.1.1. 일반적인 표현형적 특성 분석.....	84
2.1.1.1. 신종 후보 미생물 분리지역(Sampling site).....	84
2.1.1.2. 해양미생물의 분리 및 보관 (Isolation and storage).....	85

2.1.1.3. 참조균주 (Reference strains).....	85
2.1.1.4. Gram 염색, Oxidase 및 Catalase 시험.....	85
2.1.1.5. 성장 온도 및 pH 실험.....	86
2.1.1.6. 염분 실험	86
2.1.1.7. API kit을 이용한 생리, 생화학적 특성 조사	86
2.1.1.8. Agar, DNA 그리고 Starch 분해 실험.....	86
2.1.1.9. Casein 가수분해 실험.....	87
2.1.1.10. Cellulose 가수분해 그리고 Flexirubin 색소 생산 실험.....	87
2.1.1.11. Chitin, Tweens 20, 40 그리고 80 가수분해 실험	87
2.2. 전자현미경 관찰 (SEM)	88
2.3. Fatty acid methyl ester analysis (FAME)	90
2.4. G+C contents (mol%)	92
2.5. 16S rRNA 염기서열 분석	93
2.6. 16S rRNA 계통 분석	93
3. 결과 및 고찰	95
3.1. 분리균주 JJM10 ^T 와 JJM57 ^T 의 표현형적 특성 분석.....	95
3.2. 전자현미경 관찰 (SEM).....	100
3.3. Fatty acid methyl ester analysis	102
3.4. G+C contents (mol%)	108
3.5. 16S rRNA 염기서열 및 계통 분석	111
4. 요약	117

PART III. 색소생성 해양방선균의 배양특성 및 생리활성 연구

1. 서론	121
1.1. 수산양식산업의 동향 및 해산어류 질병 발생 동향.....	121
1.2. 항생제 대체제의 필요성 및 효과.....	122
1.2.1. 항생제 사용 및 규제현황.....	122
1.2.2. 항생제 대체제.....	123
1.3. 해양 유래 방선균의 항생제 대체제로서의 응용 가능성.....	123

1.4. 연구의 필요성.....	124
2. 재료 및 방법	126
2.1. 생리활성 물질 생산 균주의 분리 및 동정	126
2.1.1. 사용 방선균주 분리 및 배양조건.....	126
2.1.2. 방선균 배양액의 메탄올 추출물 제조.....	126
2.1.3. 균주 선별을 위한 배양액 메탄올 추출물의 항균 및 항산화활성	127
2.1.3.1. 배양액 메탄올 추출물의 항균활성 측정.....	127
2.1.3.2. 배양액 메탄올 추출물의 전자공여능 측정.....	128
2.1.4. 분리방선균의 동정.....	129
2.1.4.1. 전자현미경(SEM)을 이용한 형태학적 분석	129
2.1.4.2. 생화학적 특성 분석	129
2.1.4.3. 세포 지방산 분석 (CFA).....	130
2.1.4.4. ISP(International Streptomyces Project)배지에서의 배양특성 확인	130
2.1.4.5. 16S rRNA 염기서열 분석	132
2.1.4.6. 종속 계통적 분석	132
2.2. 선발균주의 최적배양조건 확립	133
2.2.1 분리균주의 최적배양조건	133
2.2.1.1. 분리균주의 온도, pH, NaCl에 대한 생육도 및 항산화활성	133
2.2.1.2. 탄소원 종류에 따른 균주의 생육도 및 항산화 활성	133
2.2.1.3. 질소원 종류에 따른 배양액의 항산화 활성	134
2.3. 방선균 배양액 추출물의 생리활성 평가.....	135
2.3.1. 분리 방선균주 메탄올 추출물 농도별 생리활성 평가.....	135
2.3.1.1. 농도별 항균활성 측정 (Disk method).....	135
2.3.1.2. MIC (Minimum Inhibition Concentration) 측정.....	135
2.3.1.3. 시험균주에 대한 항생제 감수성 테스트.....	135
2.3.1.4. 농도별 항산화활성 측정.....	136
2.3.1.4.1. ESR spectrometer를 이용한 DPPH 라디칼 소거활성(RSA)	136
2.3.1.4.2. ESR spectrometer를 이용한 Hydroxyl 라디칼 소거활성(HSA)	136
2.3.1.4.3. ESR spectrometer를 이용한 Alkyl 라디칼 소거활성(ARS).....	137
2.3.2. 분리방선균 유기용매 Fraction별 분획물 생리활성 평가.....	138
2.3.2.1. 유기용매 분획물 제조.....	138

2.3.2.2. 분획물별 항균활성 측정.....	138
2.3.2.3. 분획물별 항산화활성 측정.....	139
2.4. 방선균 추출물을 이용한 양식어류 생물접촉 실험.....	140
2.4.1. 메탄올 추출물을 이용한 사료첨가제의 제조	140
2.4.2. 넙치 사육조건 및 사육기간	140
2.4.3. 사육수조의 이화학적 특성조사	142
2.4.4. 성장도 조사.....	142
2.4.5. 혈액분석을 통한 면역활성 능력 평가.....	142
2.4.5.1. 혈액분석기를 이용한 혈액분석.....	142
2.4.5.2. 어류식세포의 활성산소 측정	143
2.4.5.3. 혈청의 Lysozyme 활성 측정	143
2.4.6. 어류 병원성 세균을 이용한 인위감염에 의한 생존율 실험.....	143
3. 결과 및 고찰	144
3.1. 생리활성 물질 생산 균주의 분리 및 동정.....	144
3.1.1. 사용 방선균 균주 및 배양조건.....	144
3.1.2. 균주 선별을 위한 항균활성 및 항산화 활성	144
3.1.2.1. 분리 방선균주의 1차 스크리닝.....	144
3.1.2.2. 선별 방선균주 메탄올 추출물의 항균 및 항산화활성 평가.	146
3.1.2.3. 방선균주 선정.....	149
3.1.3. 분리방선균의 동정	150
3.1.3.1. 전자현미경(SEM)을 이용한 형태학적 분석.....	150
3.1.3.2. 배지상에서의 형태학적 분석.....	150
3.1.3.3. 분리균주의 생화학적 특성.....	155
3.1.3.4. ISP 배지에서의 배양학적 특성.....	158
3.1.3.5. 세포 지방산 분석 (CFA).....	161
3.1.3.6. 16S rDNA 염기서열 및 종족 계통적 분석.....	164
3.2. 분리균주의 최적배양조건 및 항산화 활성 측정.....	169
3.2.1. 분리균주 <i>Streptomyces</i> sp. ACT-1의 최적배양조건.....	169
3.2.1.1. 탄소원에 대한 생육도 및 항산화활성 평가.....	169
3.2.1.2. 질소원에 대한 생육도 및 항산화활성 평가.....	169
3.2.2. 분리균주 <i>Nocardiosis</i> sp. ACT-11의 최적배양조건.....	172
3.2.2.1. 배양시간 및 배양온도에 따른 배양특성.....	172
3.2.2.2. pH에 대한 영향.....	172
3.2.2.3. NaCl 농도에 대한 영향.....	174

3.2.2.4 탄소원 및 질소원에 대한 영향	176
3.2.3. 분리균주 <i>Streptomyces</i> sp. ACT-18의 최적배양조건.....	179
3.2.3.1. 탄소원에 대한 생육도 및 항산화활성 평가.....	179
3.2.3.2. 질소원에 대한 생육도 및 항산화활성 평가.....	179
3.3. 방선균 배양액 추출물의 생리활성 평가.....	182
3.3.1. 배양액 메탄올 추출물 농도별 생리활성 평가.....	182
3.3.1.1. 농도별 항균활성.....	182
3.3.1.2. 농도별 항산화활성	185
3.3.2. 분리 방선균 유기용매 분획물별 생리활성 평가.....	189
3.3.2.1. 분획물별 항균활성 측정.....	189
3.3.2.2. 분획물별 항산화활성 측정.....	191
3.3.3.2.1. DPPH 라디칼 소거활성 (RSA).....	191
3.3.3.2.2. Hydroxyl 라디칼 소거활성 (HRS).....	192
3.3.3.2.3 Alkyl 라디칼 소거활성 (ARS).....	194
3.4. 방선균 추출물을 이용한 양식어류 생물접촉 실험.....	196
3.4.1. 사육수조의 수질의 이화학적 특성 및 넙치의 성장도 조사.....	196
3.4.2. 혈액분석을 통한 면역활성 능력 평가.....	197
3.4.3. 어류식세포의 활성산소 측정.....	200
3.4.4. 혈청의 Lysozyme 활성 측정.....	201
3.4.5. <i>Streptococcus iniae</i> 를 이용한 인위감염실험.....	203
4. 요약	204
중합요약	208
참고문헌	215
감사의 글	228

GENERAL ABSTRACT

A total 145 strains of marine actinomycetes were isolated from marine sources in Jeju island. They were characterized by determining morphological and physio-biochemical properties, the API kit. They were investigated by molecular methods including partial sequencing of 16S rRNA. The phylogenetic relationship of the domain bacteria was investigated by performing a comparative sequence analysis of PCR-amplified 16S ribosomal RNAs in organism of intertidal zone, Jeju island.

Cultivated microorganisms isolated from marine organism sample and investigated analysis of 16S rRNA sequence. The 16S rRNAs were amplified by using oligonucleotide primer (27F-1492R) complementary to 16S rRNA genes. Phylogenetic diversity and taxonomic position of the isolated marine actinomycetes. Isolated 145 strains of marine actinomycetes, since they grew in the various range of NaCl, pH and temperature. A neighbor-joining tree of partial 16S rRNA sequences divided the 145 isolates into 2 major groups, gram positive bacteria/ *Actinobacteria* / *Actinomycetales*(order)/ *Streptomycineae* (suborder)/ *Streptomycetaceae*(family)/ *Streptomyces*(93.1%), *Streptosporangineae*(suborder)/ *Nocardiopsaceae*(family)/ *Nocardiopsis*(6.9%).

Additionally, 11 candidates of new species were suggested based on the similarity of the 16S rRNA sequences to the previously published species.

A taxonomic study was carried out on an isolated, strain JJM10^T, from marine invertebrate *Siphonaria sirius* (Mollusca: Basommatophora) collected from the Aewol, Jeju island, Republic of Korea. Comparative 16S rRNA gene sequence studies showed that strain belonged to the *Gammaproteobacteria* and was most closely related to *Glaciecola nitratireducens* KCTC 12276^T and *Glaciecola pallidula* LMG 21427^T (96.1 and 95.43% 16S rRNA gene sequence similarity, respectively). The isolated was Gram-negative, aerobic

and slightly halophilic and grew in 1~10% NaCl and at 10~37°C. Does not utilize citrate, phenylacetate. produces cytochrome oxidase, but not ornithine decarboxylase, lysine decarboxylase, urease or H₂S. Positive in tests for the fermentation of inositol, sorbitol, rhamnose, melibiose and amygdalin. Strain JJM10^T shared some physiological and biochemical properties with *Glaciacola nitratreducens* KCTC 12276^T and *Glaciacola pallidula* LMG 21427^T. The G+C content of the genomic DNA of strain JJM10^T was mol 49.81%. Strain JJM10^T possessed C_{16:0}, summed feature 4 (C_{16:1} w7c and/or iso-C15:0 2-OH) and summed feature 7 (C_{18:1}w9c/w12t/w7c) as the major cellular fatty acids. DNA-DNA relatedness data indicated that strain JJM10^T represents a distinct species that is separate from *G. nitratreducens* and *G. pallidula*.

On the basis of morphological, physiological and chemotaxonomic characteristics, together with data from 16S rRNA gene sequence comparisons described above, strain JJM10^T(=KCTC 22368^T) represent a novel species, for which the name *Glaciacola siphonariae* sp. nov. is proposed.

Strain JMM57^T was isolated from of a specimen of the marine plant *Laurencia* sp., collected from intertidal zone in the Jeju island, Republic of Korea. Comparative 16S rRNA gene sequence studies showed that strain belonged to the *Gammaproteobacteria* and was most closely related to *Oceanisphaera litoralis* DSM 15406^T and *Oceanisphaera donghaensis* KCTC 12522^T(98.02 and 97.70 % 16S rRNA gene sequence similarity, respectively). Cells are gram-negative, oxidase-positive, catalase-positive. They occur singly and are 1.0~1.2 μm in diameter. Contains a single polar flagellum. moderately halophilic and grows in 1.0~11% NaCl at 4~37°C. The type strain, JJM57^T, requires Na⁺ for growth, reduces nitrate, utilizes malate and citrate and is negative for arginine dihydrolase, gelatin and utilization of glycerol, succinate, L-valine and L-tyrosine. No acid is produced from galactose, glucose, arabinose, mannose, N-acetylglucosamine, maltose, gluconate, adipate or sucrose. The G+C content of the genomic DNA of strain JJM57^T

was mol 61.94%. Strain JJM10^T possessed C_{16:0}, C_{18:1} w7c and summed feature 3 (C_{15:0} iso 2-OH/C_{17:0} iso 3-OH/C_{16:1} ω7c.) as the major cellular fatty acids.

On the basis of morphological, physiological and chemotaxonomic characteristics, together with data from 16S rRNA gene sequence comparisons described above, strain JJM57^T represent a novel species, for which the name *Oceanisphaera laurenciae* sp. nov. is proposed.

We went through primary antimicrobial and antioxidation experiment with 145 kinds of actinomycetes strains isolated from sea sources, and then isolated 21 (ACT 1~21) of bacterial strains. With methanol extraction from culture liquid of isolated bacterial strain, antimicrobial experiment was performed against 10 bacterials causing diseases for fishes and human beings. And after measuring DPPH radical scavenging activities using ESR spectrometer and then evaluated activation of antioxidation. As the result, finally, strains of ACT-1, ACT-11, ACT-18 are able to be selected, and behaviors of ACT-1, ACT-18 were found be most similar to *Streptomyces* species. Finally they were named *Streptomyces* sp. ACT-1 and *Streptomyces* sp. ACT-18. And strain ACT-18 has shown most similar biochemical and genetic characteristics to *Nocardiopsis dassonvillei*, therefore, it was named *Nocardiopsis* sp. ACT-18. Isolated strains ACT-1, ACT-18 and ACT-18 was verified for cultivating characteristics, they showed the best growth and antioxidation under temperature of 25°C~30°C, pH of 6.8~8.4 and NaCl of 2~5%. And after checking the best cultivating condition for strain of *Streptomyces* sp. ACT-1. it showed Maltose(1%) for carbon source and Yeast extract(0.5%) for nitrogen source, and strain of *Nocardiopsis* sp. ACT-11 showed Galactose(1%) for carbon source and Yeast extract(0.5%) for nitrogen source. And *Streptomyces* sp. ACT-18 showed Mannitol(1%) for carbon source and Yeast extract for nitrogen source indicating that it has the highest growth and antioxidation activation with addition of experimental bacillus.

After checking optimized cultivating condition for growing bacterial strain and producing physiological activation substance, and physiological activation for extraction of cultivated substance was evaluated. Methanol extraction in bacterial strain culture liquid was produced for evaluating physiological activation and antimicrobial and antioxidation activation are verified. As the result, methanol extraction from culture liquid of *Streptomyces* sp. ACT-1 was verified to be very high antimicrobial activation depending on density with *Streptococcus parauberis* (>100 $\mu\text{g/ml}$), *Streptococcus iniae* (>100 $\mu\text{g/ml}$). And it showed very high antimicrobial sensitivity (>100 $\mu\text{g/ml}$) against *Exiguobacterium oridotokrans*(Wild Type). However, sensitivity for bacterials causing vibriosis showed almost nothing and *Edwardsiella tarda* causing showed a little bit of sensitivity for a little higher density of *Edwardsiella tarda* (>500 $\mu\text{g/ml}$) but it showed rarely sensitivity at low density. Methanol extraction of *Nocardioopsis* sp. ACT-11 had almost no sensitivity against pathogen bacterials other than *Vibrio salmonicida*, *Flavobacteriaceae bacterium* causing fish diseases. Methanol extraction of *Streptomyces* sp. ACT-18 in its cultivated liquid showed overall high sensitivity against *S. iniae*, *S. parauberis* (>200 $\mu\text{g/ml}$) and vibriosis causing bacteria (>100 $\mu\text{g/ml}$) and gliding bacterial disease (>100 $\mu\text{g/ml}$) and it showed no sensitivity against edward syndrome causing bacteria.

As the result for measuring antioxidation activation for each density of methanol extraction from isolated strains broth, DPPH radical scavenging activation(RSA) was found to be 46% for SBME-1 (Streptomyces Broth Methanol Extract ACT-1) 100 $\mu\text{g/ml}$, 53% for 500 $\mu\text{g/ml}$, 53% for 1,000 $\mu\text{g/ml}$ and 67% for 1,000 $\mu\text{g/ml}$. Although there is no meaningful difference for NBME-11 (Nocardioopsis Broth Methanol Extract ACT-11), SBME-18 (Streptomyces Broth Methanol Extract ACT-18) showed the highest radical scavenging activation(RSA) of 74% against SBME-18 (Streptomyces Broth Methanol Extract ACT-18). As the result of hydroxyl radical scavenging activity, it showed antioxidation

activities of 46% for addition of NBME-11 (100 $\mu\text{g/ml}$) and 38% for addition of NBME-11 (100 $\mu\text{g/ml}$), whereas it showed higher antioxidation activation of 84% for SMBE-1 and 81% for SBME-18 at more than 500 $\mu\text{g/ml}$ of density. As the result of Alkyl radical scavenging activity, all experimental bacteria showed increase of antioxidation activation depending on density and addition of 100 $\mu\text{g/ml}$ showed low radical scavenging activation (30~40%). Extraction of SBME-18 at experimental of 1,000 $\mu\text{g/ml}$ showed the highest radical scavenging activation of 74%. In addition, antimicrobial and antioxidation activation are measured for separated substance of strains for each organic solvent fraction. As the result, antimicrobial activation of separated from *Streptomyces* sp. ACT-1 showed no significance against polaric water solvent, but it showed antimicrobial activation against solvent of chloroform, n-hexan. Experiment of fraction hexane and chloroform showed antimicrobial activation significantly against bacteria causing streptococcosis and it showed overall weak antimicrobial activation against vibrio disease-causing bacteria. As the result of measuring antimicrobial activation for each *Streptomyces* sp. ACT-18 fraction, it showed strong antimicrobial activation for most of disease-causing bacteria in chloroform fraction, but it showed strong antimicrobial activation against *S. iniae*, *S. parauberis* in n-hexan fraction but it showed weak one against vibrio and no sensitivity for wild type *Exiuobacterium oridotokrans*. As the result of antioxidation activation, it showed the highest DPPH radical scavenging activation for *Streptomyces* sp. ACT-1 chloroform fraction and it showed very high radical scavenging activation of 89% at density of 1 mg/ml. DPPH radical scavenging activation of *Streptomyces* sp. ACT-18 fraction showed the highest radical scavenging activation at chloroform fraction. As the result of Hydroxyl radical scavenging activity it showed the highest scavenging activity at *Streptomyces* sp. ACT-1 n-butanol fraction with radical scavenging activation of 58, 69 and 74% for *Streptomyces* sp. ACT-18 hexane fraction. As the result of alkyl radical scavenging activation, it shows the highest radical scavenging activation at *Streptomyces* sp. ACT-1

ethyl acetate fraction and showed scavenging activation of 66% at density of 0.5 mg/ml. Alkyl radical scavenging activation for each density of *Streptomyces* sp. ACT-18 fraction was highest for hexane fraction and showed 35.4, 60, 76.1% at 0.1, 0.5, 1 mg/ml respectively.

Experiment of bio-contact for cultivating fishes was performed using extracted substance from *Streptomyces* sp. ACT-1, *Streptomyces* sp. ACT-18 which is marine actinomycetes strain. As the result, growth rate for *Paralichthys olivaceus* was found to be 154.4 g during its cultivating period at control of no addition of actinomycetes extract. And it was found to be 174.3 g with addition of feeding material of SBME-18 of 1%. In order to check effects for biological condition of *Paralichthys olivaceus* from addition of feed of actinomycetes extract, variations of glutamic oxalacetic transaminase (GOT), glutamic pyruvic transaminase (GPT), Total protein, Glucose, Phosphorus, Triglycerides, Hemoglobin was examined.

As the result of this examination from comparison of GOT in blood, a little low enzyme was found at experimental control with addition. And it has no meaningful difference after comparing with comparison control. And GPT enzyme had no meaningful differences either, thus there was no damage of internal organ from addition of feeding substance. The content of Glucose tended to be increased at comparison control, and it showed lowed content of Glucose at experimental control with addition of feeding substance, and Total protein, TG (Triglyceride), Phosphorus had no meaningful difference. Hemoglobin was found to be increased at experimental control with addition of feeding material. After measuring secretion of LDH enzyme, there was no meaningful difference at all experimental controls (Not shown data).

As the result of measuring oxygen free radical in phagocyte of fishes, phagocyte activation was found to be higher at all experimental controls with addition of feeding material from actinomycetes extract than controls with general feeding materials, and it was very high at experimental controls with lactic acid bacteria of 2%. Lysozyme was found to be high lysozyme activation at control with addition *Streptomyces* sp. ACT-1

extract 2%. 15 days accumulated mortality rate for *Paralichthys olivaceus* was checked after healthy *Paralichthys olivaceus* during 13 weeks with addition of feeding actinomycetes extract is forced infected with fish pathogen bacteria *Streptococcus iniae*. As the result, death occurred in control with general feeding material at day 2 since forced infection and it continuously increased showing death rate of 80% at day 10. Mortality rate of 60% was shown at experimental control with addition of ACT-1 of 2%, and it showed reduction of 20%, and overall death rate of 15~20% was shown.



LIST OF FIGURES

PART I

- Fig. 1. Phylogenetic relations of Gram positive bacteria by oligonucleotide catalog method.
- Fig. 2. Jeju island current chart.
- Fig. 3. The map for an organisms collection in Jeju Island, Korea. The dotted circle in the map indicates the sampling site.
- Fig. 4. Presents the visible spectrum of light. This spectrum displays the various types of visible light based upon their different wavelengths (www.citruscollege.edu/apps/comm.asp).
- Fig. 5. Neighbor-joining tree of 16S rRNA sequence of marine actinomycetes isolated from group I (site A, B). The sequences were collected from 12 actinomycetes isolated in this study and representative species selected from ribosomal database (<http://rdp.cme.msu.edu/html/>).
- Fig. 6. Neighbor-joining tree of 16S rRNA sequence of marine actinomycetes isolated from group II (site C, D). The sequences were collected from 18 actinomycetes isolated in this study and representative species selected from ribosomal database.
- Fig. 7. Neighbor-joining tree of 16S rRNA sequence of marine actinomycetes isolated from group III (site E, F, G). The sequences were collected from 28 actinomycetes isolated in this study and representative species selected from ribosomal database.
- Fig. 8. Neighbor-joining tree of 16S rRNA sequence of marine actinomycetes isolated from group IV (site H, I). The sequences were collected from 18 actinomycetes isolated in this study and representative species selected from ribosomal database.
- Fig. 9. Actinomyces groups in Jeju marine.

Fig. 10. Major *Streptomyces* species groups isolated in Jeju marine sources.

Fig. 11. Nacardiopsis species groups in Jeju marine sources.

PART II

Fig. 1. National ranking of new species bacteria announcement in 2006.

Fig. 2. Universal phylogenetic tree.

Fig. 3. Bacteria phylogenetic tree.

Fig. 4. G-C (or guanine-cytosine content) contents.

Fig. 5. DNA-DNA hybridization.

Fig. 6. Proposed taxonomic groupings based upon DNA homology data.

Fig. 7. Taxonomic resolution of some of the currently used technique.

Fig. 8. The map for an organisms collection in Jeju-si, Jeju Island. The dotted circle in the map indicates the sampling site.

Fig. 9. System for the analysis of cellular fatty acid.

Fig. 10. Scanning electron micrograph of cell of strain JJM10^T; bar, 100 nm.

Fig. 11. Scanning electron micrograph of cell of strain JJM57^T; bar, 1 μ m.

Fig. 12. Fatty Acid Methyl Ether (FAME) profile of JJM10^T

Fig. 13. Fatty Acid Methyl Ether (FAME) profile of JJM57^T

Fig. 14. HPLC chromatogram of 4 type of nucleosides from genome of strain JJM10^T.

Fig. 15. HPLC chromatogram of 4 type of nucleosides from genome of strain JJM57^T.

Fig. 16. Neighbour-joining phylogenetic tree based on 16S rRNA gene sequences showing the position of strain JJM10^T within the radiation of the genus *Glaciecola*. The tree was constructed from evolutionary distance matrix by using neighbour-joining method.

Fig. 17. Neighbour-joining phylogenetic tree based on 16S rRNA gene sequences showing the position of strain JJM57^T within the radiation of the genus *Oceanisphaera*. The tree was constructed from evolutionary distance matrix by using neighbour-joining method.

PART III

- Fig. 1. Fractionation of Bacterial cell and cultured broth of actinomycetes.
- Fig. 2. DPPH radical scavenging activity of isolated strains methanol extract by ESR spectrometer.
- Fig. 3. Scanning electron micrograph of Strain ACT-1, ACT-8, ACT-17 and ACT-18. Cell were grown on MA at 25°C for 10days.
- Fig. 4. Scanning electron micrograph of reference strain.
(A, *Streptomyces* sp; B, *S. coelicolor* C, *Nocardioopsis dassonvillei*)
- Fig. 5. Aerial mycelia cultural characteristics of isolate strain ACT-1~ACT-21. Cell were grown on MA at 25°C for 10days.
- Fig. 6. Substrate mycelia cultural characteristics of isolate strain ACT-1~ACT-21. Cell were grown on MA at 25°C for 10days.
- Fig. 7. Cellular fatty acid profile of the strain ACT-1. Fatty acid methyl esters (FAME) mixtures were analysed by capillary GC using a Hewlett Packard model 5898A GC run by Microbial Identification software (Microbial ID).
- Fig. 8. Cellular fatty acid profile of the strain ACT-11. Fatty acid methyl esters (FAME) mixtures were analysed by capillary GC using a Hewlett Packard model 5898A GC run by Microbial Identification software (Microbial ID).
- Fig. 9. Cellular fatty acid profile of the strain ACT-18. Fatty acid methyl esters (FAME) mixtures were analysed by capillary GC using a Hewlett Packard model 5898A GC run by Microbial Identification software (Microbial ID).
- Fig. 10. Neighbour-joining tree based on nearly complete 16S rDNA sequences, showing relationships between strain ACT-1 and member of the *Streptomyces* sp.. Number at the nodes are levels of bootstrap support (%), based on neighbour-joining analyses of 1000

resampled database. Soil actinomycete, *Kitasatospora arboriphila*, *Streptomyces heteromorphus* was used as an outgroup. Bar, 0.005 nucleotide substitution per position.

Fig. 11. Neighbour-joining tree based on nearly complete 16S rDNA sequences, showing relationships between strain ACT-11 and member of the *Streptomyces* sp.. Number at the nodes are levels of bootstrap support (%), based on neighbour-joining analyses of 1000 resampled database.

Fig. 12. Neighbour-joining tree based on nearly complete 16S rDNA sequences, showing relationships between strain ACT-18 and member of the *Streptomyces* sp.. Number at the nodes are levels of bootstrap support (%), based on neighbour-joining analyses of 1000 resampled database.

Fig. 13. Effect of various carbon sources on the growth and radical scavenging activity (RSA) of *Streptomyces* sp. ACT-1 supernatant.

Fig. 14. Effect of various nitrogen sources on the growth and radical scavenging activity (RSA) of *Streptomyces* sp. ACT-1 supernatant.

Fig. 15. Effect of various temperature on the growth and radical scavenging activity (RSA) of *Nocardiosis* sp. ACT-11 supernatant.

Fig. 16. Effect of various pH on the growth and radical scavenging activity (RSA) of *Nocardiosis* sp. ACT-11 supernatant.

Fig. 17. Effect of various NaCl concentration on the growth and radical scavenging activity (RSA) of *Nocardiosis* sp. ACT-11 supernatant.

Fig. 18. Effect of various carbon sources on the growth and radical scavenging activity of *Nocardiosis* sp. ACT-11 supernatant.

Fig. 19. Effect of various nitrogen sources on the growth and radical scavenging activity of *Nocardiosis* sp. ACT-11 supernatant.

Fig. 20. Effect of various carbon sources on the growth and radical scavenging activity of *Streptomyces* sp. ACT-18 supernatant.

- Fig. 21. Effect of various nitrogen sources on the growth and radical scavenging activity of *Streptomyces* sp. ACT-18 supernatant.
- Fig. 22. Antibacterial activity against various fish pathogenic bacteria.
- Fig. 23. DPPH radical scavenging activity (RSA) of actinomycetes methanol extract by ESR (Electron Spin Resonance) spectroscopy.
- Fig. 24. Hydroxyl radical scavenging (HRS) activity of actinomycetes methanol extract by ESR (Electron Spin Resonance) spectroscopy.
- Fig. 25. Alkyl radical scavenging (ARS) activity of actinomycetes methanol extract by ESR (Electron Spin Resonance) spectroscopy.
- Fig. 26. DPPH radical scavenging activity (RSA) of organic solvent fractions from actinomycetes.
- Fig. 27. Hydroxyl radical scavenging (HRS) activity of organic solvent fractions from actinomycetes.
- Fig. 28. Alkyl radical scavenging (ARS) activity of organic solvent fractions from actinomycetes.
- Fig. 29. ESR spectrum observed during incubation of AAPH with 4-POBN at various concentrations of distilled water extracts from *Streptomyces* sp. ACT-18.
- Fig. 30. Superoxide anion production observed on NBT assay of the olive flounder control group (C) and after administration with actinomycetes extracts containing diet group (T, treated). The observed values were expressed as mean \pm SD (n=6). Statistical differences (P<0.005) from the control group of same species are indicated by asterisks.
- Fig. 31. Superoxide anion production observed on NBT assay of the olive flounder control group (C) and after administration with actinomycetes extracts containing diet group (T, treated). The observed values were expressed as mean \pm SD (n=6). Statistical differences (P<0.005) from the control group of same species are indicated by asterisks.
- Fig. 32. Cumulative mortality (%) of olive flounder after 12 day feeding incremental levels after challenge with *Streptococcus iniae*.

LIST OF TABLES

PART I

- Table 1. Proposed hierarchic classification system of the order actinomycetales based on the phylogenic analysis of the 16S rDNA/rRNA sequence data.
- Table 2. Number of bioactive compounds produced from major actinomycetes.
- Table 3. Structure classification of bioactive compounds from microorganisms.
- Table 4. Composition of Marine agar.
- Table 5. Composition of casein hydrolysis test medium.
- Table 6. Composition of Starch hydrolysis test medium.
- Table 7. Composition of urease hydrolysis test medium.
- Table 8. Composition of nitrate broth.
- Table 9. Analysis of environmental factor and bacterial count in intertidal zone, Jeju Island.
- Table 10. List of actinomyces strain isolated in site A, B and C.
- Table 11. List of actinomyces strain isolated in site D and E.
- Table 12. List of actinomyces strain isolated in site F and G.
- Table 13. List of actinomyces strain isolated in site H and I.
- Table 14. General physiological characteristics of isolated marine actinomycetes.
- Table 15. Culturable marine actinomycetes identified on the basis of 16S rRNA sequence(Group I).
- Table 16. Culturable marine actinomycetes identified on the basis of 16S rRNA sequence(Group II).
- Table 17. Culturable marine actinomycetes identified on the basis of 16S rRNA sequence(Group III).
- Table 18. Culturable marine actinomycetes identified on the basis of 16S rRNA sequence(Group IV).
- Table 19. Culturable bacteria identified on the basis of 16S rRNA sequence.

PART II

- Table 1. Culturability determined as a percentage of culturable bacteria in composition with total cell counts.
- Table 2. Characteristics differentiating strain JJM10^T from nine recognized species of the genus *Glaciecola*.
- Table 3. Characteristics differentiating strain JJM57^T from nine recognized species of the genus *Oceanisphaera*.
- Table 4. Fatty acid compositions of strain JJM10^T and type strains of recognized strain *Glaciecola* species.
- Table 5. Fatty acid compositions of strain JJM57^T and type strains of recognized strain *Oceanisphaera* species.
- Table 6. 16S rRNA gene sequence of *Glaciecola siphonariae* JJM10^T. The EMBL nucleotide sequence database accession number for the 16S rRNA gene sequence of strain JJM10^T is AM983541.
- Table 7. 16S rRNA gene sequence of *Oceanisphaera laurenciae* JJM57^T. The EMBL nucleotide sequence database accession number for the 16S rRNA gene sequence of strain JJM57^T is AM983543.
- Table 8. Similarity matrix based on 16S rRNA gene sequence comparisons.
- Table 9. Similarity matrix based on 16S rRNA gene sequence comparisons.

PART III

- Table 1. List of strains and growth conditions used for antibacterial experiments.
- Table 2. List of International Streptomyces project (ISP) media.
- Table 3. Electron spin resonance condition for antioxidant activity measurement of actinomycetes extracts.
- Table 4. Formulation and chemical composition (g/100 g) of diets for olive flounder.
- Table 5. Methanol extract yields of isolate strain ACT-1~ACT21.

- Table 6. Antibacterial activities of the liquid culture broth methanol extract of marine actinomycetes.
- Table 7. Comparison of physiological and biochemical characteristics of the isolated ACT-1 and ACT-18.
- Table 8. Comparison of physiological and biochemical characteristics of the isolated ACT-11(S-1).
- Table 9. Cultural characteristics of the isolated ACT-1 and ACT-18 cultured in International *Streptomyces* Project medium.
- Table 10. Cultural characteristics of the isolated ACT-11 cultured in International *Streptomyces* Project medium.
- Table 11. 16S rRNA sequence analysis results of strain ACT-1~ACT-21.
- Table 12. Antibacterial activities of strain ACT-1, ACT-11, and ACT-18 broth methanol extract against the growth of various pathogenic bacteria.
- Table 13. Antibacterial activity of antibiotics against various pathogenic bacteria.
- Table 14. Inhibitory effect of *Streptomyces* sp. ACT-1 broth Fraction against the growth of various pathogenic bacteria.
- Table 15. Inhibitory effect of *Streptomyces* sp. ACT-18 broth Fraction against the growth of various pathogenic bacteria.
- Table 16. Result of weight gain, feed efficiency and survival of Olive flounder, *Paralichthys olivaceus*.
- Table 17. Blood analysis of olive flounder, *Paralichthys olivaceus* fed on bacteria broth extract supplemented feeds.
- Table 18. Blood analysis of olive flounder fed on Bacteria broth extract supplemented feeds.

PART I

제주 연안에서 분리된 해양방선균의 다양성 및 특성

Diversity and Characterization of Marine
Actinomycetes Isolated from in the Jeju Island Coastal

1. 서론

1.1 방선균의 분류학적 개념

방선균이라는 용어는 본래 형태로부터 방사상이 발달한 균사를 갖는 미생물이라는 의미로 만들어졌으며 또한 영어의 Actinomycetes도 그리스어의 akitis, aktinus=ray와 mykes=fungus에서 나온 말로서 방사상의 곰팡이를 의미한다.

방선균은 일반적으로 균사상의 형태를 취하는 특징 때문에 하등생물인 곰팡이로 간주 되거나 혹은 곰팡이와 세균의 중간적인 미생물로 간주되는 일도 있었다. 물론, 현재는 세포학적 의견이나 균체 구성성분 등의 많은 증거로 인하여 이 미생물군을 진정 세균중의 그람양성 세균으로 생각하는 것에 대해 전혀 의심의 여지가 없다. 그러나 이 미생물군의 대다수가 갖고 있는 고도로 발달한 형태 분화와 배양특성의 다양성 때문에 혹은 항생물질을 시작으로 하는 여러 가지 생리활성 물질의 생산균이라고 하는 실용적인 면 때문에 방선균은 다른 일반 세균과는 달리 취급되는 경우가 많다. 대다수의 경우 방선균이라는 말은 관용명으로서 막연하게 이용되어지고 있지만 그것을 분류학적으로 정의를 내리는 것은 오늘날에 있어서도 결코 간단한 것은 아니다. 방선균은 형태학적으로 3군으로 대별해서 생각할 수 있다. 첫 번째 그룹은 신장한 균사가 분단되어 간균 혹은 구균상의 모양이 되는 Nocardioform 세균으로서, Actinomyces, Oerskovia, Nocardia, Rhodococcus, Mycobacterium등이 이 그룹에 들어간다. 균사의 분지 시기나 기균사의 형성유무는 균주에 따라서 차이가 나며, 분지시기가 빠르고 기균사를 형성하지 않는 것은 일반세균과 거의 구별이 불가능한 것도 있다.

두 번째 그룹은 형태분화가 상당히 발달하고 여러 가지 양식의 포자를 형성하는 포자 형성 방선균(Sporoactinomycetes)으로서, Streptomyces를 시작으로 하는 소위 일반적인 방선균을 말할 수 있다. 이 그룹의 포자는 그 착생양식이 상당히 다채로운 특성을 가지고 있다 (Gottlieb, 1974). 세 번째 그룹은 Dermatophilus와 Geodermatophilus로 대표되는 multilocular sporangia라고 칭해지는 그룹으로서, 균사가 장축방향에 대해 횡방향 뿐만 아니라 종방향으로도 분할하는 것을 특

정으로 하고 있다. 이와 같은 형태적 특징을 토대로 방선균을 Gottlieb가 논한 것 같이 「생육이 있는 단계에서 균사를 형성하는 세균」, 또는 「분지하는 사상의 세균으로서, 어떤 과(family)에서는 균사를 형성 한다」 라고 정의 내리는 것이 가장 보편적이었다 (Gottlieb, 1973). 그러나 Nocardioform 세균 중(ex. *Mycobacterium*)에는 배양초기에는 짧은 균사를 보이는 것과 전혀 균사가 형성되지 않는 것이 있으며, 또한 *Actinomyces*, *Rothia* 등의 Actinomycetaceae과와 *Rhodococcus*속(genus)의 어떤 것은 균사형성을 어느 한정된 시기에서만 하고, 그 후 분단되어 간균 모양(또는 구균상)의 형태를 대부분 취하게 된다. *Nocardia* 속은 이들 보다는 안정한 균사 형태를 취하지만, 균주에 따라서는 콜로니 표면에 기균사를 형성하고 전형적인 방선균의 형태를 취하지만, 역시 배양 후기에는 기생균사가 분단되어 지그재그 모양으로 배열된 간균 모양이 된다. 이와 같이 형태학적 특징을 기초로한 방선균과 일반 세균과의 경계는 상당히 불분명하다.

방선균의 분류에 있어서 형태가 중요 시 되어 온 것에 비해서는 비교적 빠른 시기에 화학적 분류가 도입되어졌다. 예를 들면 Cummis와 Harris(1985)가 *Actinomyces*, *Streptomyces*, *Mycromonospora* 등에 대해 세포벽을 구성하는 아미노산과 당 조성의 다양성 및 분류 지표로서의 가능성을 시사했다. 그 후 이러한 연구에 착목한 Lechevalier (1970)은 광범위한 방선균 및 관련 세균에 관한 연구를 추진해서, 세포벽과 전균체 환원당의 조성을 토대로 한 분류 체계를 구축했다. 그러나 이러한 균체 지방산이나 인지질에서도 방선균으로서의 어떤 특성의 경향을 보이지만, 이러한 특징은 또한 반드시 모든 경우에 꼭 맞아떨어지는 것이 아니다. 따라서 이와 같은 화학분류학적 데이터는 방선균이 명백한 Gram 양성세균의 일원이라는 것을 나타낼 뿐이다.

앞에서도 언급했듯이 세균의 형태나 균체 성분 등의 표현형질을 지표로 한 분류학은 과거의 "균주의 식별" 차원에서 중점을 둔 것이기 때문에 미생물의 동정 및 진화론적으로 접근했을 때 많은 어려움을 접하게 된다.

한편 분자유전학이나 집단유전학이 진보와 더불어, 생물진화를 분자수준에서 논하는 분자진화학이 최근 급속히 발전하여 미생물 분류학분야에서도 그것이 상당히 빨리 도입되어졌다. 세균에서는 현재 16S rRNA 분자가 가장 많이 이용되고 있는데 이는 대상이 되는 전 생물에 상동한 유전자이며, 염기치환 속도가

비교적 낮고, 정보량과 취급이 용이하기 때문이다.

카다로그법은 16S rRNA의 염기서열 정보를 부분적으로 이용하여 그것을 토대로 균주간의 차이를 논하는 방법으로서 rRNA-DNA 교잡법보다는 한 단계 앞선 계통 분류학적 방법이라고 말할 수 있다. 이러한 카다로그법을 방선균 및 그 외의 다른 균주에서도 본격적인 연구가 이루어졌다. 이 카다로그법에 의하면 그람 양성세균은 진정세균 안에 하나의 커다란 크러스터를 형성하며 또한 Fig. 1-1에서 나타내고 있는 것과 같이 그 안에서 GC함량이 높은 그룹(약 55%이상)과 낮은 그룹(약 50%이하)으로 나뉘어진다고 (Stackebrandt and Schleifer, 1984). 높은 GC함량 그룹은 또한 방선균, *Bifidobacterium* 및 *Propionibacterium*의 3개의 그룹으로 나뉘어지며, 방선균에 S_{AB} 가 약 0.5이상으로 *Coryneform*이나 *Micrococcus*등도 여기에 포함된다 (Goodfellow, 1989). 이 분류법에 의하면 *Micrococcus*나 *Coryneform* 세균(*Arthrobacter*, *Brevibacterium*, *Aureobacterium*등, 단 *Corynebacterium*속 제외)은 *Actinomyces*나 *Oerskovia*등 형태적으로 원시적인 몇 개의 방선균과 함께 「Actinobacteria」라고 불리는 Cluster를 형성하며, 또한 *Actinoplanes*나 *Micromonospora* 그룹은 다른 포자 형성 방선균보다도 이 Actinobacteria나 *Corynebacterium*, *Nocardia*등의 그룹에 가까운 것으로 나타났다. 또한 *Dermatophilus*속도 역시 Actinobacteria의 일원으로 분류되어 졌으며, 형태적으로 유사한 *Geodermatophilus*와는 전혀 다른 그룹인 것으로 나타났다. 이와 같이 카다로그법을 토대로 Goodfellow와 Cross는 방선균의 정의를 형태적인 지표를 완전히 배제하고, 「DNA의 높은 GC함량(55%이상), 16S rRNA 올리고뉴클레티드의 염기서열과 핵산의 교잡으로부터 계통적인 상동성을 보이는 Gram 양성세균」으로 내리고 있다. 오늘에 있어서는 아직 보고되지 않는 미생물 및 방선균에 대해서도 16S rRNA의 염기서열 데이터가 상당히 축적되어 있으므로 이것을 이용하여 분자계통을 논의할 수 있게 되었다.

최근 발간된 *Int. J. Syst. Bac.*의 논문(Stackebrandt *et al.*, 1997)에서 제안된 16S rDNA/rRNA 염기서열을 기초한 새로운 방선균 분류체계를 보면 Actinobacteria 강(Class)을 *Acidimicrobiales*, *Rubrobacterales*, *Coriobacterales*, *Sphaerobacterales*, *Actinomycetales*, *Bifidobacteriales*의 6개의 목(order)으로 나누고, *Actinomycetales* 목을 다시 *Actinomycineae*, *Micrococcineae*, *Corynebacterineae*, *Micromonosporineae*,

Propionibacterineae, *Pseudonocardineae*, *Streptomycineae*, *Streptosporangineae*, *Frankineae*, *Glycomycineae* 등 10개의 아목(suborder)으로 나누고 있다. 각 suborder에 속한 family와 genus를 살펴보면, Table 1과 같이 *Thermoactinomyces* 속은 제외시키고 있으며, *Streptomyces* 속을 제외한 대부분의 속에 있어서는 예전 분류와는 차이가 있음을 확인할 수 있었다.

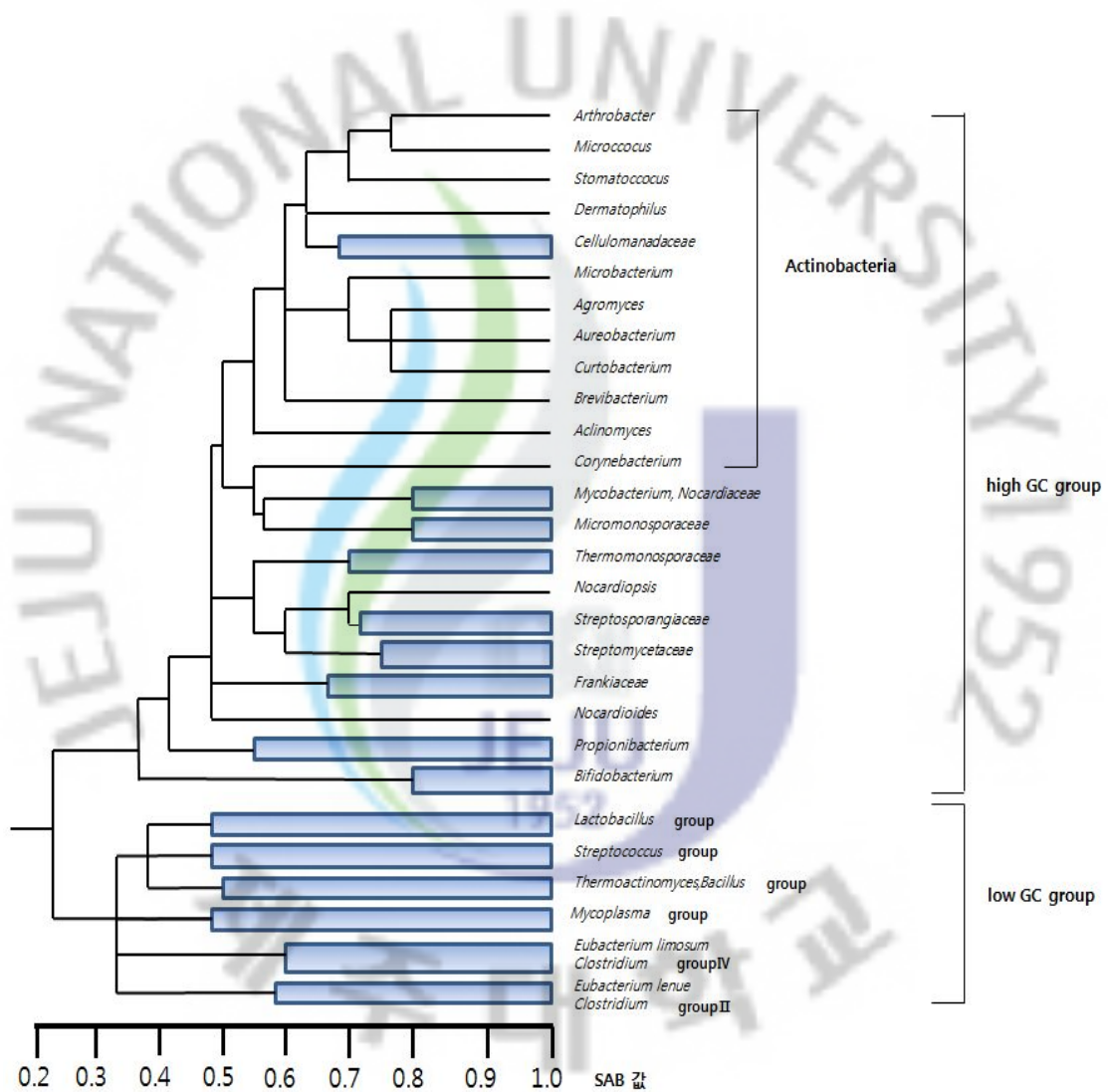


Fig. 1. Phylogenetic relations of Gram positive bacteria by oligonucleotide catalog method. (Stackebrandt, E. and Schleifer, K. H. 1984; Goodfellow, M. 1989)

Table 1. Proposed hierarchic classification system of the order Actinomycetales based on the phylogenetic analysis of the 16S rDNA/rRNA sequence data.

Order Actinomycetales									
Suborder									
<i>Actinomycineae</i>	<i>Micrococceinae</i>	<i>Corynebacteineae</i>	<i>Micromonosporineae</i>	<i>Propionibacterineae</i>	<i>Pseudonocardineae</i>	<i>Streptomycineae</i>	<i>Streptosporangineae</i>	<i>Frankineae</i>	<i>Glycomycineae</i>
Family/Genus									
<i>Actinomycetaceae/</i> <i>Actinomyces</i> <i>Mobiluncus</i> <i>Arconobacterium</i>	<i>Micrococccaceae/</i> <i>Arthrobacte</i> <i>Kocuria</i> <i>Nesterenkonia</i> <i>Renibacterium</i> <i>Rothia</i> <i>Stomatococcus</i>	<i>Corynebacteriaceae/</i> <i>Corynebacterium</i> <i>Turicella</i>	<i>Micromonosporaceae/</i> <i>Micromonospora</i> <i>Actinoplanes</i> <i>Catenulplanes</i> <i>Dactyosporangium</i> <i>Pilimelia</i>	<i>Propionibacteriaceae/</i> <i>Propionibacteriub</i> <i>Luteococcus</i> <i>Microlunatus</i> <i>Propioniferax</i>	<i>Pseudoocardiaceae/</i> <i>Pseudonocardia</i> <i>Actinopolyspora</i> <i>Actinosynnema</i> <i>Amycolatopsis</i> <i>Kibdelosporangium</i> <i>Kutzneria</i> <i>Lentzea</i> <i>Saccaromonospora</i> <i>Saccharopolyspora</i> <i>Saccharothrix</i> <i>Streptoalloteichus</i> <i>Thermocrispum</i>	<i>Streptomycetaceae/</i> <i>Streptomyces</i> <i>Kitasatospora</i>	<i>Streptosporangiaceae/</i> <i>Streptosporangium</i> <i>Herbidospira</i> <i>Microtetraspora</i> <i>planobispora</i> <i>Planomonospora</i>	<i>Frankiaceae/</i> <i>Frankia</i>	<i>Glycomycetaceae/</i> <i>Glycomyces</i>
	<i>Brevibacteriaceae/</i> <i>Brevibacterium</i>	<i>Dietziaceae/</i> <i>Dietzia</i>		<i>Nocardiodaceae/</i> <i>Nocardioides</i> <i>Aeromicrobium</i>			<i>Nocardiopsaceae/</i> <i>Nocardiopsis</i> <i>Streptomonospora</i>	<i>Acidothermaceae/</i> <i>Acidothermus</i>	
	<i>Cellulomonadaceae/</i> <i>Cellulomonas</i> <i>Oerskovia</i>	<i>Gordoniaceae/</i> <i>Gordonia</i>					<i>Thermomonosporaceae/</i> <i>Thermomonospora</i> <i>Actinomadura</i> <i>Spirillospora</i>	<i>Geodermatophilaceae/</i> <i>Geodermatophilus</i> <i>Blastococcus</i>	
	<i>Dermabacteraceae/</i> <i>Dermabacter</i> <i>Brachybacterium</i>	<i>Mycrobacteriaceae/</i> <i>Mycobacterium</i>							
	<i>Dermatophilaceae/</i> <i>Dermatophilus</i> <i>Kytococcus</i> <i>Dermacoccus</i>	<i>Nocardiaceae/</i> <i>Nocardia</i> <i>Rhodococcus</i>							
	<i>Intrasporangiaceae/</i> <i>Intrasporangium</i> <i>Sanguibacter</i> <i>Terrabacter</i>	<i>Tsakamurellaceae/</i> <i>Tsakamurella</i>							
	<i>Janesiaceae/</i> <i>Janesia</i>								
	<i>Microbacteriaceae/</i> <i>Microbacterium</i> <i>Agrococcus</i> <i>Agromyces</i> <i>Aurebacterium</i> <i>Clavibacter</i> <i>Curtobacterium</i> <i>Rathayibacter</i>								
	<i>Promicromonosporaceae/</i> <i>Promicromonospora</i>								

1.2 항생물질 생산의 보고로서 방선균

자연은 임상에서 유용하게 이용되는 항생제, 항암제, 면역 억제제 뿐만 아니라 가축용이나 농업에 이용되는 성장촉진제, 살충제, 제초제, 구충제 등을 포함하여, 경이로울 정도로 무수한 생물학적 활성을 지니는 화합물들을 창조해내고 있으며, 현재까지는 식물체를 비롯한 천연자원 및 미생물로부터 생리활성물질을 탐색하기 위하여 많은 연구가 이루어지고 있다 (Okami *et al.*, 1988; Okazaki, 1987). 방선균은, 오랜 역사를 갖고 있는 알콜이나 초산발효등과 같은 식품관련 산업과는 달리, 주로 현대의약품의 개발과 함께 그 응용성과 중요성이 인식되어 현재까지 가장 중요하게 다루어지고 있는 유용한 산업 미생물군이라 할 수 있다. 방선균은 토양 속에 다양하게 존재하는 미생물의 일종으로 그람양성 진정세균에 속하며, 항생물질로 대표되는 이차대사산물, 생리활성물질, 비타민등의 저분자물질을 생산하는 등 산업적인 응용범위가 매우 넓다 (Beppu *et al.*, 1991; Jones, 1985). 이러한 생리활성물질을 생산하는 미생물 중 여전히 75% 이상은 방선균에 의한 것이며, 이러한 이유로 방선균은 항생물질로 대표되는 다양한 생리활성물질을 생산하는 천연유기화합물의 보고로서 신물질의 탐색 및 생합성 기작에 대해 깊이 연구되어 왔다. 실제적으로 최근 20년간 보고된 생리활성물질이 항암제인 경우에는 방선균 유래가 82% 이상으로 절대 다수를 차지하고 있다고 보고되었다. 그러나 신규 생리활성물질 탐색과정에서 이미 밝혀진 물질이 재차 분리되는 악순환이 계속되면서, 그 경제성과 효용성이 현격하게 떨어지고 있기 때문에 신규 생리활성물질 탐색의 효용성을 높이는 다양한 노력이 이루어지고 있다. 그러한 일례로 희귀방선균을 탐색하거나 target-directed screening, 발효조건 등에 변화를 주는 연구도 진행되고 있다. 최근, 분자생물학적 연구방법이 발달하면서 생리활성물질 생산균주에 대한 생합성 효소와 그 유전자들의 발현기작에 대한 연구가 고전적인 생리활성물질의 스크리닝 방법과 더불어 새로운 생리활성물질의 생합성 유전자들이 분리되고 분자유전학 수준에서 이들의 생합성 과정을 예측할 수 있게 되면서 생리활성물질 생합성 효소들 사이에 연관관계가 높다는 사실을 알게 되었다.

이러한 방선균 유래의 화합물 분리 성과는 일본(45%)과 미국(23%)의 연구자가

많은 공헌을 하고 있다. 또한 임상에 이용되고 있는 화합물(120~150)의 약 60%는 방선균유래의 화합물이다 (Bycroft, 1988). Table 2는 방선균의 대표적인 종에 속하는 균주가 생산하는 화합물로서 서로 구조가 상이한 활성물질의 수를 표기하고 있다. 이들은 구조상의 특징에 따라 Table 3과 같이 β -lactam, peptide, 아미노 배당체, macrolide, polyene, tetracycline, quinone, polyether, ansamycin, 핵산염기, 고분자, 그 외에 세균과 방선균이 생산하는 대표적인 화합물(ex. chloramphenicol, cycloheximide, antimycin 등)로 분류되어진다.

Table 2. Number of bioactive compounds produced from major actinomycetes.

Production actinomycetes	Number of bioactive compounds
<i>Streptomyces griseus</i>	187
<i>Streptomyces hygroscopicus</i>	286
<i>Streptomyces lavendulae</i>	129
<i>Streptomyces antibioticus</i>	95
<i>Streptomyces fradiae</i>	76
<i>Micromonospora spp.</i>	385
<i>Nocardia spp.</i>	270

Table 3. Structure classification of bioactive compounds from microorganisms.

Structure group	Number of Compounds			
	Actinomycetes			Fungi
	<i>S. griseus</i>	<i>S. hygroscopicus</i>	<i>Nocardia</i> spp.	<i>Aspergillus</i> <i>Penicillium</i> spp.
Nucleotide	2	5	5	2
β -lactam	2	8	7 ^{a)}	2
Quinone	16	3	13	8
Peptide	17	20 ^{b)}	12	55
Sugar peptide	1	2	22	0
Macrolide	11	77 ^{c)}	10	4
Amino glycoside	7 ^{d)}	22 ^{e)}	18	0
Ansamycin	1	5	72 ^{f)}	0
Polyether	1	45 ^{g)}	5	0
Terpenoid	0	0	0	21
Besides	112	80	55	190
Total	170	264	219	282

a) Nocardicin; b) Bialaphos; c) Platenomycin, Milbemycin, Azalomycin; d) Streptomycin; e) Validamycin; f) Rifamycin, Maytansin; g) Nigericin. (Tanaka *et al.*, 1990)

1.3 해양미생물 유래 항생물질 탐색의 필요성

인간을 포함한 지구상에 존재하는 모든 생물체들은 각각 적자생존의 경쟁 속에서 생존 및 보호를 위하여 체내의 생화학적 반응으로 생성된 다양한 대사산물을 수없이 생산하고 있다. 인간은 이러한 대사물질들을 풍요로운 삶을 영위하기 위하여 이러한 천연물에 관련하여 고대에서부터 지금까지 꾸준히 연구하여 왔다. 현재 천연물 관련 연구는 화학분야와 생명공학에 중요한 부분을 차지하고 있으며 제약, 생물 산업 등 고부가가치를 창출하는데 있어 필수적이라 할 수 있으며, 어느 분야를 막론하고 가장 기대효과가 큰 분야라 할 수 있으며 이에 따른 경제적 파급효과 또한 매우 크다고 본다.

지금까지 천연물로부터 생리활성을 가진 천연물질의 연구는 주로 육상자원을 대상으로 하여 왔지만 다년간의 연구를 통하여 새로운 원천이 고갈되는 양상을 보여 경제성이 떨어지고 있는 추세이다. 이에 선진국들은 해양생물 유래 천연물에 집중적인 연구를 하고 있으며 그 결과 현재까지 해양생물에서 약 5500여종의 신물질이 개발 되었다. 이들은 의약품, 건강보조제, 화장품 등으로 경쟁적으로 개발되고 있으며 의약품 용도로 약 40여 물질이 특허를 내었으며 그 중 5종이 상품으로 개발 중이다(Faulkner, 1993).

미생물 자원은 고부가가치 의약품 단백질 생산, 생리활성 물질, 효소 등의 균주로서 산업적 가치가 매우 높고 현재 우리나라의 경우 바이오산업의 60% 이상을 미생물 관련 산업이 차지하고 있다. 그러나 현재 알려진 미생물은 전체 미생물 종의 불과 1% 미만에 불과하고 특히 미생물 중 생명공학 분야에서 가장 많이 이용되는 박테리아의 경우 자연계에 수백만 종이 존재할 것으로 추정되지만, 현재까지 발견된 종은 8천여 종에 불과하다. 따라서 생명공학 분야 국가 경쟁력 제고에 있어 이러한 미지의 미생물 자원의 적극적인 확보와 활용이 보다 강조되고 있다.

해양생물 중 해양미생물은 거대해양생물에 비해 실험실내에 보전이 수월하고 분리된 균주의 대량배양이 가능하다는 장점이 있다. 또한 해양은 지구면적의 70%를 차지하고 있을 뿐 아니라 조간대에서 심해저까지 열대에서 극한지 까지 다양한 물리적 환경조건을 가지고 있으며, 육상과 다른 환경조건인 고염, 저온, 마그네슘, 칼륨, 철 등의 무기물이 풍부한 환경이며 물을 매질로 하는 환경이기

에 육상 생물과는 전혀 다른 생리적 대사과정, 적응기작 등의 특이성을 통해 유용한 천연물의 생산에 있어 유리하다 할 수 있다. 또한 이들도 육상 미생물과 마찬가지로 상호간에 격심한 생존경쟁을 하며 그 수단으로 생리활성 물질을 생산하는 것이 알려져 있으며(Fenical, 1993; Kobayashi, 1993), 이들 중 다수는 고유한 해양 미생물 (Obligate Marine Microorganism)로서 오랜 기간 천연물 연구의 대상이 되어왔던 육상미생물과는 다른 종들로서 생리활성 효과를 가진 신물질을 생산할 가능성이 매우 높으며, 해양환경에 능동적으로 적응한 육상 미생물 (Facultative Marine Microorganisms)도 다수 서식하고 있다. 이들의 천연물의 생성은 종 특이적인 것이 아니라 균주가 특이적이며 동일균주라도 서식조건에 따라 다른 천연물을 합성하는 예가 많으므로 연구가치가 크다 할 수 있다 (Stierle, 1992; Pathirana, 1992; Tapiolas, 1991; Nakamura, 1977; Sato, 1978).

또한 새로운 속들의 해양 박테리아들은 천연물질을 생산하는데 있어서 커다란 보고가 될 것이다. 페니실린으로 시작된 현대 항생물질들의 발견은 20세기에 있어서 가장 중요한 의학적 진보였으며, 많은 사람들이 감염 질병에 대해서 걱정을 덜게 되었다. 그 이래로 과학자들은 대부분 Actinomycete과에 속하는 흙에서 분리한 미생물로부터 생산되는 Streptomycin, Vancomycin 등과 같은 수많은 천연 항생물질들을 분리하였다. 그러나 잘 알려진 바와 같이 항생물질들은 증가하는 항생물질에 대해 내성을 지닌 병원균들에 대해 효율성을 잃기 시작했다. 흙에서 새로운 미생물의 발견 속도는 느려지고 있으며, 연구자들은 질병에 대응할 수 있는 새로운 성분들을 생산하기 위해 조합기술이나 분자설계에 관심을 돌리고 있다. 최근까지 과학자들은 대부분 바다에 존재하는 수많은 잠재성이 있는 미생물에 대해 별로 관심을 갖고 있지 않았다. 그러나 열대지방의 깊은 바다속의 침전물에서 항생 및 항암물질 성분을 생산하는 새로운 속이 Actinomycetes 박테리아의 발견은 천연 항생물질의 생산에 있어서 새로운 시대가 열리고 있음을 예고하고 있을지도 모른다.

여러 해양 학자들은 새로운 해양 미생물들을 찾는데 열중하고 있으며, 해양 유래의 새로운 구조들을 가진 천연물들을 생산하는 미생물들이 수없이 많을 것으로 기대하고 있다. 또한 해양 박테리아는 배양하기가 까다롭기 때문에 약 10%만이 연구된 것으로 생각되고 있으며, 또한 접근하기가 쉽지 않은 광대한 지역의

해양 환경이 아직도 남아있다. 여전히 해양미생물 학자들은 미래에 더 많은 흥미로운 결과를 얻을 수 있을 것으로 전망하고 있다. 미생물학자들이 해양 환경에서 박테리아와 균류의 다양성에 집중하기 시작할 때 모든 새로운 종류의 미생물들 및 흥미로운 물질들을 찾을 수 있을 것으로 사료된다.



1.4 해양미생물자원의 생산을 위한 제주연안지역의 환경 및 생물학적 조건

제주도 주변 해역은 서로 다른 특성을 갖는 여러 가지 이질 수괴가 복합된 양상으로 나타나 해황의 계절적인 변화가 심할 뿐 아니라, 화산지형으로 이루어진 해안선 부근에서는 용천수가 곳곳에 분포하며, 강우기에는 다량의 육수 유입과 특이한 바람 등에 의하여 제주도 연안에 접근한 외해수는 천해역에서 크게 변질되어 제주도 특유의 연안수를 형성한다(Youn and Jung, 1997). 또한 해안선이 단순한 형태지만 해안에 다양한 형태의 기질이 존재하고 있으며, 대마난류 영향을 크게 받지만 다른 여러 수괴의 영향도 동시에 받고 있어 생물다양성이 높을 수 있는 여건을 갖추고 있다. 또한 열대와 아열대 생물인자를 온대해역으로 수송하는 쿠로시오의 지류인 대마난류의 영향권에 위치함에 따라 한반도의 해안과는 다른 종 조성을 가지고 있다. 이런 점에서 우리나라 해안 생태계에서 제주도 해안생태계가 가지는 중요성이 입증되고 있으며 온대와 아열대 및 열대 생물이 공존하는 곳으로서 특이한 생물 지리적 특성을 가지고 있다. 또한, 제주도 해안가는 암반 조간대가 대부분을 차지하고 있기 때문에 조수웅덩이가 주기적으로 생성될 수 있는 조건을 갖추고 있으며, 크기 또한 다양하여 주변의 해양환경과 육상 환경 조건에 따라 독특한 생태적 특성을 보이고 있다(Lee *et al.*, 2001; Lee *et al.*, 2002; Choa and Lee, 2000).

이러한 제주도의 해안 생태계의 중요성과 특이성 때문에 상대적으로 많은 연구진들이 제주도 해양생물 조사를 시도하였다. 특히 저서동물에 대한 조사가 많았으며, 조사를 통해서 해양생태계의 보전의 필요성이 제기됨에 따라 보호지역 지정을 위한 조사들도 수행되었으며, 수행된 연구들 거의가 조간대 및 조수 웅덩이에 분포하는 미세조류 군집, 저서 대형무척추동물의 종 다양성 및 생물 생태학적 연구가 대부분이다(Moon, 2009). 일반적으로 연안의 해양 생물의 분포는 주위 환경과 밀접한 관계를 맺고 있다. 특히 조간대 지역은 조석간만의 차, 일기의 변화, 지역적 특성, 염분농도, pH 등의 물리 화학적 요인과 해조류, 먹이, 포식동물의 분포 등의 생물학적 요인이 다양한 미생물에 생존을 가능케 한다. 또한 조간대의 형태와 구조, 각 생물의 갖고 있는 생리적 저항성으로 인하여 조간대의 생물군집은 매우 다양하고 독특한 양상을 나타내고 있다(Moon, 2009; Dayton,

1971; Connell, 1975).

해양 생태계는 생물과 환경의 상호관계에 의하여 이루어지는 복잡한 구조물로서 환경의 다양성을 폭넓게 보유하고 있다. 특히 제주도 주변해역에서는 서로 다른 특성을 갖는 대마난류, 황해 냉수, 남해안 연안수 및 중국대륙의 연안수 등이 계절적으로 복잡하게 영향을 미치고 있고, 제주 연안에는 강우기에 주변에서 유입되는 육수와 연중 계속되는 용천수로 인하여 해양학적으로 특수한 환경을 이루고 있다.

생태계의 다양성은 생물군집의 양상과 상호 작용하는 시스템의 차이로 구분되며, 일반적으로는 특정 서식지의 특성으로 대변된다. 또한 물질과 에너지의 순환, 시스템의 재생력 등 생태계의 평형유지기능을 하나의 통합된 개념으로서 정의한다. 따라서 생태계 다양성은 정적 상태이기보다는 시·공간적인 동적 상태로 이해해야 할 것이다. 특히 연안이나 하구 같은 생태계에 서식하는 미생물들은 물질순환에 아주 중요한 역할을 맡고 있으며 환경의 지속적인 보전에 기여하고 있다. 위에 언급하였듯이 이러한 제주도의 지역적 환경 특성 때문에 생물 분포에 직접적인 영향을 주는 요인들이 지역에 따라 상이하기 때문에 조건대를 중심으로 한 생물분포에 관련되는 연구가 많은 학자들에 의하여 이루어지고 있다. 또한 미생물은 해수, 해저퇴적층, 갯벌, 부유물질의 표면, 해양생물 표피나 내부기관에는 다양한 형태와 생리적 특성을 지닌 해양미생물들이 존재하고 있다. 그러나 제주도 같은 해양환경과 육상 환경 조건에 따라 독특한 생태적 특성을 보이는 곳에서 서식하는 생물자원 및 해수로부터 분리되어진 미생물에 대한 연구는 현재까지 미비한 실정이다. 그렇지만 차후 유용미생물자원의 산업적 이용 및 응용 가능성 때문에 더 많은 미생물 그 중에서도 현재까지 그 특성이 보고되지 않은 미생물에 대한 연구가 점차 활발해 질 것이다. 그러므로 생물자원의 확보가 결국은 생명공학 산업에서 있어서 원천기술의 확보로 연결이 될 것이다.

그렇기 때문에 결과적으로 제주도뿐만 아니라 우리나라에서만 서식하는 고유 미생물 자원을 확보하고 유용한 미생물자원의 생리, 생화학적 특성과 분자생물학적 정보를 확보하는 것이 대한민국 생명공학 산업을 다른 나라보다 앞서 나아갈 수 있을 것이라 본다. 그러나 아직까지 전체 해양 미생물 중 극히 일부분만이 연구된 실정이며, 미생물의 생리활성 물질을 이용한 산업적 응용 및 종 다양성이나

유전체 연구에서도 크게 주목받지 못하고 있다. 따라서 앞으로 해양미생물을 이용하기 위해서는 이들의 생물다양성을 확보하고 유전자원을 분리하며 이용 가능한 방법을 찾는 기술의 개발이 절대적으로 필요하다.

1.5 연구 목적

지금까지 미생물 자원을 이용한 연구 및 산업적 응용은 거의 모두 육상 자원 유래의 미생물들을 이용해왔다. 방선균 및 방선균 유래 항생물질 대부분이 육상에서 토양에서 분리된 균주를 가지고 연구가 되어져 왔으며, 현재까지 사용되고 있는 거의 모든 항생물질들이 육상자원을 이용하여 생산되어져 왔다. 그렇지만 해양미생물 및 방선균에 관하여서는 아직까지 거의 연구되지 않은 분야이다. 미생물의 서식지로서 해양의 환경조건은 육상과 현저한 차이가 있기 때문에 해양에 있어서 방선균의 microflora는 육상과는 상당히 다를 것으로 생각되어지며, 또한 연안 해역에 존재하는 방선균 중에는 육상에서 유입된 담수 등으로 인하여 육상의 토양으로부터 유래된 방선균도 많은 것으로 알려지고 있다. 이들 중에는 해양이라고 하는 특이한 환경에 적응한 결과 대사계가 변화되어 새로운 2차 대사산물을 생산하는 균주도 있을 것으로 기대되며 해양은 새로운 생리활성물질 생산 균주의 탐색원으로써 지극히 흥미로운 분야라고 말할 수 있다.

또한 제주도 같은 해양환경과 육상 환경 조건에 따라 독특한 생태적 특성을 보이는 곳에서 서식하는 생물자원 및 해수로부터 분리되어진 방선균을 포함한 미생물에 대한 연구는 현재까지 미비한 실정이다.

따라서 본 연구는 제주도의 천연적 환경조건을 갖추고 있는 제주도 연안 해역에서 분리된 해양 유래 미생물 및 방선균의 다양성을 연구하였으며, 분리된 해양미생물 자원의 신종 균주로서의 이용가능성 및 해양방선균의 생리활성 평가와 생물접촉 실험을 통한 산업적인 응용가능성을 연구하였으며, 제주도 해양미생물 연구 기초 자료를 제공하고자 한다.

2. 재료 및 방법

2.1. 연구지(Sampling site) 개황

제주도(Fig. 2)는 제3기말 플라이오세에 화산활동이 시작된 이후 제4기에 완성된 대륙붕 위의 화산섬이다. 동경 126° 09'~127° 00', 북위 33° 10'~34° 05'의 범위에 위치하며 섬의 면적은 1,845.36 km²이며 해안선의 길이는 306.3 km이다. 섬의 모양은 타원형이며, 장축의 방향은 동북동~서남서이다. 제주도의 지형은 한라산을 중심으로 동서사면은 3°~5°의 매우 완만한 경사이며, 남북사면은 5° 정도로 약간 급한 경사를 이루고 있다.

제주도의 지질은 퇴적암층(sedimentary rock)과 현무암(Basalt), 조면질안산암(trachyandesite-hawaiite), 조면암(trachyte) 등의 화산암류와 기생화산에서 분출한 화산쇄설암(phroclastic rocks) 등으로 구성되어 있으며, 일부 지방의 점사질 토양을 제외하면 대부분이 흑갈색의 화산회토(volcanic ash soil)로 덮여 있다(www.encykorea.com/encykorea). 제주도는 연중 온난하고 기온의 연교차도 적은 해양성 기후를 나타내는데 제주시 지역은 연평균 기온이 14.7°C, 1월 평균기온 4.8°C, 8월 평균기온 25.8°C인 데 비하여 서귀포시 지역은 연평균 기온이 15.6°C, 1월 평균기온 6.0°C, 8월 평균기온 27.6°C이다(www.encykorea.com/encykorea).

제주도는 한반도로부터 멀리 떨어진 고도로서 해양환경이 한반도 해안과는 많은 차이가 있다. 이러한 차이는 제주해역에 존재하는 독특한 특성을 가진 다양한 수괴에 기인한 것이다(고, 1998). 제주도의 바다는 각각 독특한 특성을 지닌 해류들이 섞이는 곳이라는 점에서 우리나라의 주변 해역과 많은 차이를 보인다. 지하에서 솟아나는 담수, 황해 저층에 있는 차가운 바닷물, 중국 양쯔강으로부터 유입되는 엄청난 양의 담수가 섞인 바닷물, 따뜻한 해류인 쓰시마 난류가 함께 섞인다. 쓰시마 난류는 연중 수온이 섭씨 15°C 이상으로 열대해역에서 발원하여 북상하는 쿠로시오로부터 일본 규슈 남쪽에서 분리되어 주로 제주도 남쪽 바다로 흘러오다가 대한해협으로 간다. 이런 다양한 해류들이 섞이는 곳이기 때문에 열대 그리고 아열대 생물들이 생태계를 이루고 있는 것이다(Fig. 1-4).

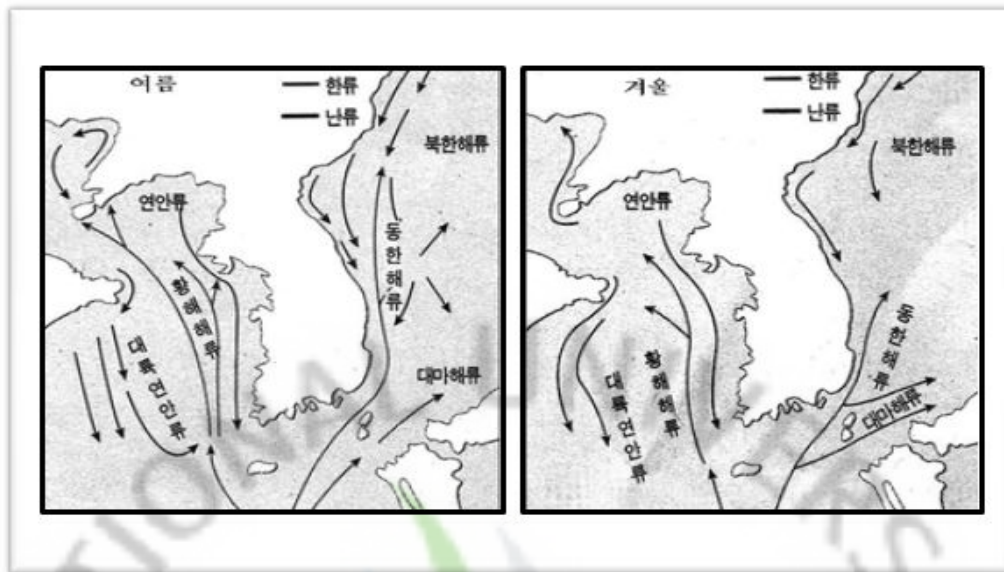


Fig. 2. Jeju island current chart

생물들마다 살아가는 방식이 다르기 때문에 그들 각자에게 적합한 서식지가 다양하게 있어야 한다. 제주 바다에는 실로 다양한 종류의 서식지가 있다. 서식지를 모래해안, 바위해안, 자갈해안 그리고 절벽해안으로 구분할 수 있는데, 모래해안도 파도의 영향을 직접 받는 해안, 작지만 하천 입구에 있으면서 모래갯벌 형태를 띤 해안, 모래와 바위가 혼재되어 있는 해안, 하천 입구에 펄이 있는 해안, 모래가 아닌 석회조류로 이루어진 해안 등이 있다. 자갈해안과 바위해안은 모래해안보다 훨씬 더 다양하다. 작은 자갈로 된 해안, 둥글고 큰 바위로 된 해안, 큰 암반으로 된 해안, 여러 형태의 바위가 함께 흩어져 있는 해안 등 다양하다. 수직암벽으로 이루어진 해안은 제주도 남쪽 해안에서 많이 발견된다. 또한 경사가 완만한 바위지역이 있고 수중동굴도 있다. 이와 같은 다양한 서식지의 수심에 따라 서로 다른 다양한 생물들이 또한 살아가고 있다.

이 연구를 수행하기 위해 해수 및 생물 시료를 채집한 지역은 제주도 해수욕장 해안가를 중심으로 제주시 지역과 서귀포시 지역으로 나누어 제주시 지역은 동부(신촌, 함덕)와 서부지역(애월, 한림)으로 서귀포시 지역 또한 서부 지역(성산, 표선, 위미)과 동부(하모, 중문) 지역으로 구분하여 각 지역 마다 형성된 암반 조건대에서 시료를 채집 하였다(Fig. 3).

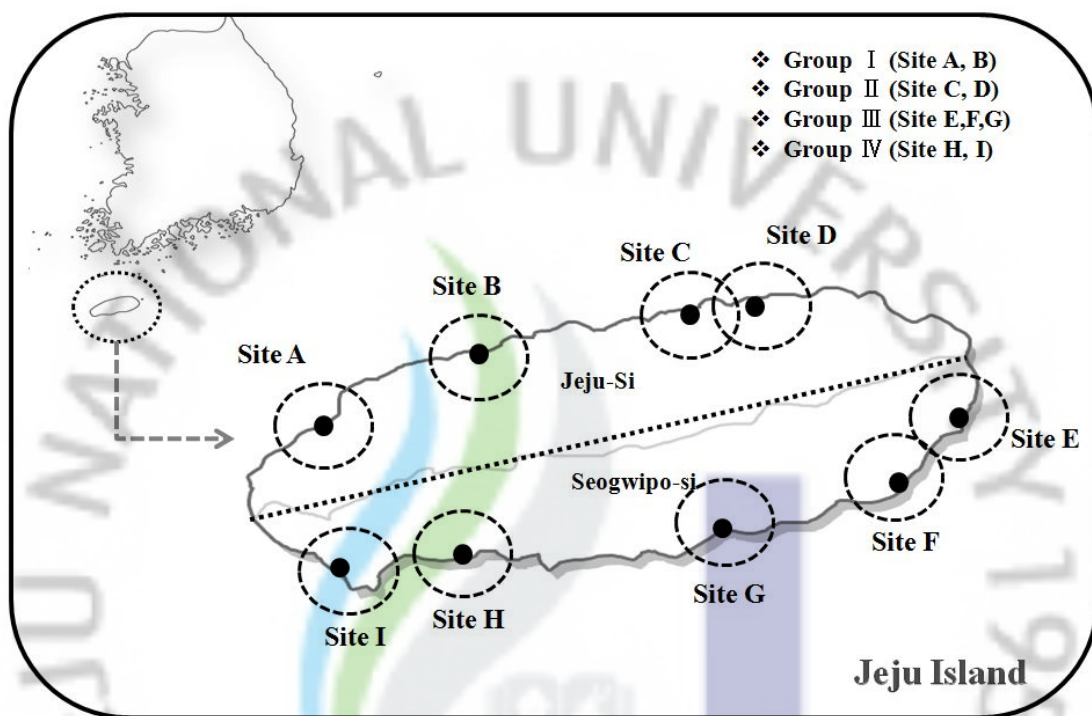


Fig. 3. The map for an organisms collection in Jeju Island, Korea. The dotted circle in the map indicates the sampling site.

Site A, Han-lim; Site B, Ae-wol Site; C, Sin-chon; Site D, Ham-deok; Site E, Sung-san; Site F, Pyo-sun; Site G, Wi-mi; Site H, Jung-mun; Site I, Ha-mo.

2.2 해양유래 방선균주 분리 및 보관

균주의 샘플링을 위해서 제주도 9 지역 (제주시권 : 한림, 애월, 신촌, 함덕; 서귀포시권 : 성산, 표선, 위미, 중문, 하모)의 해수욕장을 중심으로 해수, 생물시료, 해조류를 각각 채취하여 방선균 분리용 시료로 사용하였다. 해수 시료인 경우 샘플링 지역에서 다양하게 채취되었다. 해양 방선균 분리용 배지로 Marine agar (MA, Difco)와 ISP 2 (Difco. Co. USA)를 사용하였으며, 균주의 보존을 위해서 성장이 확인된 배지의 액체 배지를 이용하여 보관하였다.

방선균의 분리를 위해서 멸균 생리식염수에 해수는 $10^{-2} \sim 10^{-3}$ 배로 희석하여 0.1 ml를 배지에 도말 한 후 배양되었으며, 생물시료나 해조류 같은 경우에는 homogenizer를 사용하여 잘게 분쇄하여 멸균 해수에 희석한 후, MA 및 ISP 2 배지에 도말하여 25~30°C에서 7~15일간 배양하여 배지상에서 나타나는 방선균의 균사체의 형태학적 모습을 관찰하여 방선균을 분리하였다

Table 4. Composition of Marine agar.

Marine Agar (per liter)		ISP Medium 2 (per liter)	
Peptone	5.0 g		
Yeast extract	1.0 g	Yeast extract	4.0 g
Ferric citrate	0.1 g	Malt extract	10.0 g
Sodium chloride	19.45 g	Dextrose	4.0 g
Magnesium chloride	8.8 g	Agar	20.0 g
Sodium sulfate	3.24 g		
Calcium chloride	1.8 g	Final pH	7.2
Potassium chloride	0.55 g		
Sodium bicarbonate	0.16 g		
Potassium bromide	0.08 g		
Agar	15.9 g		
Strontium chloride	34.0 mg		
Boric acid	22.0 mg		
Sodium silicate	4.0 mg		
Sodium fluoride	2.4 mg		
Ammonium nitrate	1.6 mg		
Disodium phosphate	8.0 mg		
pH	7.0		

2.3. 환경요인 분석

수온 및 염분, pH는 YSI 600QS를 이용하여 현장에서 측정하였으며, 용존산소(DO)는 현장에서 DO meter를 사용하여 측정하는 방법과 산소병에 고정하여 실험실로 옮긴 후 Winkler-Azide 방법을 병행하여 측정하였다 (APHA, AWWA, WPCF, 1993). 화학적 산소요구량(COD)은 Carberg (1972)방법에 따라 분석하였다. 그리고 총질소(T-N)는 암모니아성 질소($\text{NH}_3\text{-N}$), 질산성 질소($\text{NO}_3\text{-N}$), 아질산성 질소($\text{NO}_2\text{-N}$)의 합으로 나타냈고, 측정방법은 Strickland와 Parson (Strickland & Parsons, 1972) 및 환경오염공정시험방법에 따라 분석하였다. 또한 인산염 인($\text{PO}_4\text{-P}$)과 부유물질(SS) 측정도 위 방법에 의해 분석하였다.

2.4. 중속영양세균 분석

조간대 주변 해수에 분포되어 있는 중속영양세균을 조사하기 위해 각 조사 지역에서 만조시 해수를 채수하여 도말 평판법 (spread plate method)으로 간접적으로 계수하였다. 채수한 해수를 무균적으로 4°C 를 유지하여 실험실로 옮긴 후 10 단계 희석법을 이용하여 0.85% 멸균생리식염수에 희석한 후 MA에 도말하여 25°C 에서 2일간 배양한 후 자란 colony를 계수하였다. 배지상에 출현한 집락수 (Colony Forming Unit; CFU)를 평판계수법에 따라 계수하였다.

2.5. 분리 미생물의 형태 및 생리·생화학적 특성조사

2.5.1. Gram 염색, Oxidase 및 Catalase 시험

Gram 염색은 Buck(1982)의 방법으로 염색약을 사용하지 않고 3 % KOH 시약을 이용하여 측정하였다. 대조균주로는 그람양성인 *Bacillus subtilis* IAM 12188^T와 그람음성인 *E. coli* KCTC 1116을 이용하였다. Oxidase 활성은 Bactident-Oxidase test strips(Merck)을 이용하여 측정하였다. 대조균주로는 양성은 *Pseudomonas aeruginosa* KCTC 1750^T를 음성은 *E. coli* KCTC 1116을 이용하였다. Catalase 활성은 3% H₂O₂를 이용하여 측정하였는데 3% H₂O₂를 1-2 방울 적하 하였을 때 기포가 발생하는 것을 양성으로 판단하였다. 대조균주로는 *E. coli* KCTC 1116을 이용하였다.

2.5.2. 성장 온도 및 염분 실험

실험균주의 성장 온도의 범위를 알아보기 위해서 (4, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40°C) Marine agar(MA, BD)와 Marine broth(MB, BD)을 이용하여 조사하였으며, 실험균주 성장에 미치는 염분 농도 및 절대 해양성 미생물인지를 알아보기 위해 염분이 첨가되어 있지 않은 Nutrient broth (NB, BD)(beef extract 3.0 g, peptone 5.0 g) 및 2%의 NaCl이 첨가된 MB를 이용하여 실험을 실시하였으며, NaCl 0%와 1% 첨가구는 NB를 이용하였으며 그이상의 NaCl 농도 (2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12%)에서는 MB를 이용하여 균주 성장을 조사하였다.

2.5.3. 색소특성

방선균주의 배양시 나타나는 색소의 특성을 확인하기 위해서 MA와 MB를 사용하여 모든 균주를 전 배양하였다. 방선균 균사체의 기증균사 및 기질균사의 색소 특성을 확인하기 위해서 MA에서 25°C 배양기에서 10일간 배양되었으며, 색소특성을 확인하였다. 또한 방선균의 용해성 색소를 확인하기 위해서 MB 배지에 균

주를 접종하여 25°C Shaking incubator에서 10일간 배양하였다.

2.5.4. 생화학 및 생리학적 특성

분리균주의 생화학적 특성을 확인하기 위해서 Casein, Starch, Urea의 가수분해능을 조사하였으며, Nitrate 환원능을 확인하였다.

2.5.4.1 Casein 가수분해 시험

본 실험은 균주들의 단백질 가수분해능을 조사하는 방법중에 하나로서 Skim milk에 함유된 락토오스가 발효되면서 생성된 산에 의해서 Casein 분해가 저해될수 있는 원리를 이용한 방법이다. 제조된 배지에 세균을 백금으로 도말하고 약 14일간 배양한 후 균체 주위에 투명환이 나타나는지 조사한다. 그 후 10% HgCl₂ (Disolved 20% HCl)를 평판에 가하여 투명환이 사라지면 카제인이 분해된 것이 아니다.

Table 5. Composition of casein hydrolysis test medium

Nutrient agar	23 g
Skim milk	50 g
D·W	1000 ml

Mixed equality of 10% skim milk and two times concentration nutrient agar

2.5.4.2 Starch 가수분해 시험

많은 세균들은 Starch를 분해할 수 있으며, 이러한 방법을 이용한 실험은 광범위하게 이용되어지고 있다. Starch molecule은 크게 amylose와 amylopectin으로 구성되어져 있다. 세균이 Starch를 hydrolysis 시키기 위해서는 amylase가 필요하며, 이 amylase는 maltose, glucose, 그리고 dextrin을 만들어낸다.

Starch 배지에 균주를 접종하고 4일 동안 배양 한 후, Gram's iodine을 소량 적

하 하였을 때 생성되는 투명환의 유무로 판단한다. 투명환이 생성되면 양성으로 판명한다.

Table 6. Composition of Starch hydrolysis test medium

Peptone	5.0 g
Yeast extract	3.0 g
Soluble starch	2.0 g
Agar	15.0 g
Adjust to pH	7.0
D·W	1000 ml

2.5.4.3 Urease 가수분해 시험

Urea 분해능이 있는 세균의 검정법으로 Urea가 분해되어 생성되는 암모니아를 지시약으로 검출하는 방법이다. Urease는 기질에 의하여 유도되는 효소가 아니며, 특히 이 방법은 Urea를 빨리 분해하는 Genus *Proteus*의 동정법으로 중요하게 이용되는 방법이다. Christensen 배지에 균을 접종하고, 37℃에서 24시간 배양한 후 배지색의 변화를 관찰한다. Urea가 분해되어 암모니아가 생성되면 노란색의 배지가 분홍색으로 변한다.

Table 7. Composition of urease hydrolysis test medium

Peptone	1.0 g
Glucose	1.0 g
Sodium chloride	5.0 g
Monopotassium phosphate	2.0 g
Phenol red	0.012 g
Agar	20.0 g
Yeast extract	0.1 g
Adjust to pH	6.8~6.9
D·W	1000 ml

2.5.4.4 Nitrate 환원효소 시험

세균에 의해서 일어나는 Nitrate의 환원과정은 Nitrate가 Nitrate와 Ammonia를 거쳐 아미노산 또는 질소질의 세포 구성물질로 합성되는 과정과, 혐기 조건하에서 Nitrate를 Oxygen 대신 Terminal electron receptor로 이용하는 무기호흡의 두가지로 나눌 수 있다. 본 실험에서는 Potassium nitrate 배지에서 Potassium nitrate를 환원하여 Nitrate 또는 Nitrogen gas로 생성하는 균의 능력을 검사한다.

Nitrate broth에 Durham tube를 넣고 실험대상 세균을 접종한 후, 2~3일 정도 배양을 실시한다. 배양된 세균 배양액에 Detection solution (0.5% α -Naphthylamine, 0.8% sulfanilic acid)을 10 drop 떨어뜨린 후, 1~2 분내에 분홍색 또는 진한 적색으로 나타났을 시 양성으로 간주하며 Durham tube에 기체 포집시 Nitrogen gas 또는 Hydrogen gas로 판단할 수 있다.

Table 8. Composition of nitrate broth

Peptone	10.0 g
Sodium nitrate	1.0 g
Adjust to pH	7.2
D·W	1000 ml

2.5.5 분리균주의 탄소원 이용능

탄소원 이용성 배지 (ISP No.9)를 살균하여 60°C으로 냉각시키고 Milipore filter로 살균한 탄소원(D-glucose, D-Manitol, D-Xylose, D-Galactose, L-rhamnose)을 1% 혼합하여 평판배지를 제조한 후, 균주를 접종하여 2주간 배양한 후, 생육도가 좋은 것들을 양성으로 판명하였다.

2.5.6. Tween 40 및 80 가수분해 시험

Tween 40, 80 가수분해 실험은 지질분해효소인 lipase에 의한 지질분해능 (lipolytic activity)을 관찰하는 것이다. Tween 40, 80이 함유된 한천배지(heart infusion agar)에 균을 접종하고 30 °C에서 24시간 배양한 후 colony 주위에 혼탁환(opaquehalo)이 나타나는데 이것을 Tween 40, 80이 가수분해 된 것으로 판단한다.

2.5.7. 분리방선균의 색소 스펙트럼

분리된 방선균주들을 Marine broth에 접종하고 25 °C에서 10일간 배양한 후, 집균하여 메탄올과 아세톤(7:2) 1 ml 첨가하여 원심분리 한 후 어두운 곳에서 상등액을 새로운 tube에 옮겨 UV/VIS Spectrophotometer(survey scan)로 350 ~900 nm에서 측정하고 peak를 확인하여 Carotenoid 또는 Bacteiochlorophyll의 유무를 확인하였다.

2.6. 16S rRNA 염기서열 분석

분리된 미생물의 16S rRNA 염기서열분석은 각각 1.5% NaCl이 첨가된 MB(Difco, USA) 배지 5 ml에 접종하여 Shaking incubator를 이용하여 25 °C에서 200 rpm으로 24시간 배양한 배양액을 1.5 ml microcentrifuge tube로 옮겨서 16,000 xg에서 1분간 원심분리하고 상등액을 제거한 후 모아진 박테리아 균체를 수집하여 Wizard® Genomic DNA Purification Kit (Promega, USA)을 사용하여 genomic DNA를 분리 한 후, Unicam UV/VIS Spectrophotometer (Unicam Ltd, United Kingdom)를 사용하여 파장 260 nm에서 DNA농도를 측정하였다.

PCR 반응은 bacterial genomic DNA 100 ng, 1 µM에 universal primer pairs (27F forward primer; 5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3', 1492R reverse primer; 5'-GGTTACCTTGTTACGACTT-3'), 10 mM dNTPs, 10X PCR buffer, 5 Unit Taq polymerase (TAKARA, Japan) 혼합액에 멸균된 증류수를 첨가하여 최종부피를 50 µl로 맞추고, PTC-150 Minicycler (MJ Research)를 사용하여 증폭하였다. 증폭 과정은 94°C predenaturation 2분, 94°C denaturation 45초, 55°C annealing 45초, 72°C extension 1분의 반응을 30회 동안 수행하였고, 마지막 72°C에서 5분간 extension을 실시하였으며 증폭된 PCR product는 1% agarose(Agarose LE, Promega Co.) gel을 0.5 µg/ml ethidium bromide로 염색하여 확인하였다. 증폭이 확인된 PCR product는 (주)솔젠타사(Dajeon, Korea)에 의뢰하여 ABI prism™ Bigdye™ terminator cycle sequencing Ready reaction kit V.3.1 (Fluorescent dye terminators method)와 ABI 3730XL capillary DNA Sequencer를 사용하여 PCR product의 염기서열 분석을 수행하였다. 분석된 염기서열은 NCBI (National Center for Biotechnology Information)의 염기서열 분석 프로그램인 BLASTN programs 이용하여 분리되어진 미생물을 가장 근연속이나 종으로 나타나는 것을 확인하였다.

2.7. 16S rRNA 계통 분석

염기서열간의 유사도를 확인하기 위해 BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) search program을 이용하여 NCBI (National Center for Biotechnology Information)의 Genbank와 EMBL Nucleotide Sequence Database에서 유사한 염기서열을 비교하여 가장 근연속이나 종으로 나타나는 서열을 확인하였다. 또한 미국 미시간주립대의 Ribosomal Database Project II (RDP II) (<http://rdp.cme.msu.edu/html/>)내에 저장되어 있는 bacteria 16S rRNA 서열과 비교하였다. Clone의 결정된 염기서열과 database에 얻어진 염기서열은 PHYDIT program (ver 3.2; <http://plaza.snu.ac.kr/~iphydit/phydit>)을 이용하여 Clustal W multiple alignment로 정렬하였으며, 염기서열 분석은 CLUSTAL X software (Thompson *et al.*, 1997)를 이용하여 Neighbor-joining(Saitou and Nei, 1987) 방법에 의해 Bootstrap 분석 시 1,000회 반복하여 tree topology의 평가 기준으로 사용하여 계통수를 작성하였으며, 염기서열 간 유전적 거리는 Jukes & Cantor (Jukes and Cantor, 1969) 모델을 이용하여 계산하였다.

3. 결과 및 고찰

3.1. 채집 시료

해양 방선균 분리를 위해 채집된 시료는 제주도 해수욕장을 중심으로 총 9지역 (Site A~Site I)에서 채집하였다. 기본적으로 해수욕장의 모래시료 및 해수를 집중적으로 샘플링 하였으며, 해수시료는 샘플링 지역 내 여러 구역에서 샘플링을 실시하였다. 이외에도 해양동물인 경우 자포동물문의 말미잘류 1종, 연체동물문의 고둥류 10종, 균부류 2종, 극피동물문의 해삼류 1종, 불가사리류 1종, 절지동물문의 갑각류 2종, 해면동물문의 해면류 2종을 채집하였으며, 해조류인 경우 녹조식물 2종, 홍조식물 5종, 갈조식물 2종, 녹조식물을 각각 채집하여 해양 방선균 분리를 위한 시료로 사용하였다.

3.2. 환경요인 분석

시료를 채집한 지역(Site A~Site I) 해수의 이화학적 특성 결과를 Table 9에 나타내었다.

3.2.1. 수온, pH 그리고 염분

해양유래 방선균주를 분리하기 위해 생물 시료를 채집한 지역의 수온, pH 그리고 염분을 조사해 본 결과 수온은 25.8~28.6 °C로 각 지역별로 아주 큰 차이를 보이고 있지는 않았다. pH는 8.15~8.56 범위로 측정이 되었는데 전반적으로 약 알칼리성을 나타내었다. 염분농도는 일반적으로 담수의 유입정도와 강우량, 증발량 등의 영향을 받는다. 평균적인 해수의 염분농도는 32.5~34.3 ‰ 정도인데 조사지역은 31.4~32.88 ‰ 사이로 큰 변화를 나타내지는 않았다.

3.2.2. 용존산소와 화학적 산소요구량

용존산소(DO) 농도를 조사지역 별로 살펴보면 최저 농도는 Site I에서 6.72 mg/ml를 나타냈으며 최고는 Site E에서 7.9 mg/ml를 나타냈다. 화학적 산소요구량(COD)은 BOD와 더불어 주로 유기물질의 농도를 간접적으로 나타내는 지표이다. 일반적으로 $KMnO_4$, $K_2Cr_2O_7$ 와 같은 산화제를 이용하여 수중의 피 산화물을 이용하여 산소량을 나타내는 것으로 해수 같이 무기물질을 함유하고 있을 경우 BOD 측정이 불가능할 경우 COD를 측정한다. 화학적 산소요구량은 Site A, F, H에서 0.48 mg/ml로 가장 낮은 농도를 나타냈으며, Site B에서 가장 높은 0.91 mg/ml의 농도를 나타냈다.

3.2.3. 영양염류측정

수중의 용존 물질이나 현탁입자(세균이나 플랑크톤을 포함하는 미립자로 이루어진 유기물질)들을 부유물질(SS)이라 하는데 이들은 어패류의 호흡을 방해하고, 물의 투명도를 저하시켜 광합성을 방해함으로써 수중의 광합성생물의 기초생산력을 저하시키는 원인으로 작용한다. 조사지역의 SS는 최저 0.89 mg/ml에서 최고 3.9 mg/ml 농도를 나타내고 있다. 해역 수질 환경기준 I등급 즉 수산생물 서식, 양식 및 산란에 적합한 수질 기준으로 부유물질은 10 mg/ml로 규정되어 있는데, 본 연구에서 조사된 9개 조사지역 표층의 SS 평균값이 I등급 기준으로 조사되었다.

해수에서 총 질소는 암모니아성 질소(NH_3-N), 질산성 질소(NO_3-N), 아질산성 질소(NO_2-N)의 합으로 나타내는데, 주로 암모니아성 질소와 질산성 질소가 대부분을 차지한다. 조사결과 총 질소값은 0.629~0.954 mg/ml 농도로 나타났다.

해수의 인산염 인 농도는 해양에 존재하는 생물체의 생산력을 제한하는 인자로 작용하는데 저 농도의 경우 플랑크톤 수의 증가를 억제함으로써 바다의 생산력을 제한하는 것으로 알려져 있다. 조사지역의 인산염 인 농도는 0.01~0.074 mg/ml 농도로 나타났다.

3.2.4. 종속영양세균

수환경내의 종속영양세균은 해당 수역내의 유기물 양과 아주 밀접한 상관관계를 가지고 있다. 과량의 유기물이 유입되면 일시적으로 종속영양세균의 밀도가 급증하게 되어 순간적인 조류의 번식과 더불어 용존산소의 양이 줄어들어 심각한 혐기적 상태를 일으킬 수가 있다(Brock, 1997). 이렇듯 환경적인 면이나 생물학적인 면에서 미치는 영향이 크므로 이들의 밀도를 조사, 분석하면 수질환경을 판정할 때 지표로 쓰일 뿐만 아니라 수환경의 변화를 예측, 판단하는 자료로 활용할 수가 있다.

종속영양세균의 개체수에 의한 수서환경의 영양화 정도를 비교함에 있어서 개체수가 10^2 cfu/ml 이하이면 빈영양역, $10^3 \sim 10^4$ cfu/ml이면 부영양역, $10^4 \sim 10^5$ cfu/ml 이면 과영양역 그리고 10^5 cfu/ml 이상이면 폐수역으로 구분한 하 등(1978)의 기준에 따르면 본 연구에서 조사한 9 지역은 $2.0 \times 10^5 \sim 5.0 \times 10^5$ CFU/ml 로 나타나 과영양역에 속하는 것으로 나타났다.

Table 9. Analysis of environmental factor and bacterial count in intertidal zone, Jeju Island.

Factor	Tem (°C)	Salinity (‰)	pH	DO (mg/mL)	COD (mg/mL)	SS (mg/mL)	TIN (mg/mL)	T-P (mg/mL)	Bacterial count (CFU/ ml)
Site A	26.23	32.88	8.34	6.78	0.48	1.03	0.743	0.018	2.0×10^5
Site B	28.6	32.4	8.35	6.87	0.91	3.2	0.954	0.065	5.0×10^5
Site C	27.6	31.4	8.25	6.83	0.87	3.9	0.954	0.065	4.0×10^5
Site D	28.6	32.4	8.15	6.83	0.88	3.5	0.932	0.074	3.6×10^5
Site E	25.82	32.72	8.23	7.9	0.56	0.89	0.629	0.021	3.0×10^5
Site F	26.9	32.57	8.21	7.29	0.48	1.01	0.693	0.01	2.5×10^5
Site G	27.38	32.65	8.22	7.04	0.62	2.11	0.72	0.012	5.0×10^5
Site H	26.23	32.88	8.24	6.78	0.48	0.98	0.68	0.01	4.0×10^5
Site I	27.12	32.32	8.18	6.72	0.53	2.14	0.73	0.009	3.0×10^5

3.3. 분리균주의 특성

제주도 해수욕장을 중심으로 시료 (해수, 해양동물 및 해조류)를 채취하여 배양된 배지상에서 방선균의 배양특성을 보이는 균주 총 145 균주를 분리하였으며, 분리된 방선균의 색소 생성을 확인하기 위해서 액체배양을 실시하였다. 그 결과 해양유래 방선균 145 균주 중 101종이 색소를 생성하는 것으로 확인되었다.

3.3.1 색소형성 해양 방선균 배양학적 특성

제주도 조간대 4개 지점 9개 지역에서 분리된 미생물 중 해양유래 방선균주 총 145 균주를 분리하였는데 그 중 색소를 형성하는 방선균주 101종을 분리하였다. 분리된 균주들의 배지상에서 자랐을 때 기중균사체 색상은 White, Gray, Creamy, Yellow, Green, pink 등으로 다양했으며, 기질균사체 색상은 Yellow, Orange, Pink, Red, Violet, Purple, Green, Brown등 아주 화려한 색을 나타내었다. 이러한 균사체의 색상 등은 일반적으로 보고되고 있는 육상 방선균의 균사체와의 색소 비교를 해본 결과 해양유래 방선균들의 균사체의 색이 매우 화려한 것을 확인할 수 있었다. 분리 되어진 대부분의 균주들 성장 온도 범위는 4℃ ~ 40℃까지 범위에서 성장이 가능하였으며, 10~35℃ 범위에서 좋은 성장을 보였다. 염 농도 실험에서는 다양한 염분 농도에서도 성장이 가능하였다. 최저 0%에서 최대 12.0%의 염 농도에서도 성장이 가능한 광염성 미생물(14종)과 초기 생육 배지내에 염분(>1%)이 있어야만 성장이 가능한 호염성 미생물(50종)이 존재하였다. 이러한 염분농도에 대한 성장실험결과는 방선균이 육상에서 해양으로 유입이 되어서 적응을 하면서 생존을 한 종들과 그러한 종들이 오랜 시간 진화를 거듭하면서 해양미생물로서의 양상을 보여주는 중요한 자료가 된다. 이 결과로 해양에서 분리된 방선균은 다양한 온도와 높은 염 농도에서도 성장이 가능하다는 것을 확인 할 수가 있었다(Table 10~13).

Table 10. List of actinomyces strain isolated in site A, B and C.

Isolation Site	Strain No.	Aerial mycelium	Substrate mycelium	Soluble Color	Growth at	
					NaCl(%)	Temp.(°C)
Site A	JJA-1	White	Orange to red	Red	0~8	10~35
	JJA-2	White to pink	Dark pink	Yellow	0~9	10~35
	JJA-3	Gray	Dark yellow	Beige	0~9	10~40
	JJA-4	Creamy	Dark orange	Beige	0~12	4~40
	JJA-5	White to pink	Beige	Green	0~12	4~40
	JJA-6	White to pink	Dark orange	Dark orange	0~12	10~40
	JJA-7	Creamy	Yellow green	Dark green	0~10	10~40
	JJA-8	Creamy	Orange	Light red	0~5	4~40
	JJA-9	Gray	Orange	Brown	0~10	4~40
	JJA-10	White	Dark green	Dark green	0~10	4~40
	JJA-11	Creamy	Brown	Dark brown	0~5	4~40
	JJA-12	White	Light green	Dark green	4~10	4~40
	JJA-13	Light pink	Dark yellow	Yellow	1~10	10~40
	JJA-14	White	White yellow	Yellow	0~11	10~40
Site B	JJB-1	White to green	Dark yellow	Dark brown	0~7	4~40
	JJB-2	White	Beige	Beige	0~7	4~40
	JJB-3	Light pink	White to beige	Dark beige	0~12	10~40
	JJB-4	White	Brown	Light beige	0~12	4~40
	JJB-5	White to pink	Beige	Dark beige	0~7	4~40
	JJB-6	Pink white	Beige	Light brown	0~12	10~40
	JJB-7	White	Dark orange	Beige	0~12	10~40
	JJB-8	Yellow	Dark yellow	Yellow	3~12	4~40
	JJB-9	Light yellow	Yellow	Yellow	0~9	4~40
	JJB-10	Creamy	Ogange	Brown	1~8	4~40
Site C	JJC-1	Gray	Orange	Brown	0~9	25°C
	JJC-2	Creamy	Red	Purple	0~9	10~35
	JJC-3	Light pink	Dark orange	Dark brown	0~9	10~40
	JJC-4	Green	Dark brown	Colorless	0~12	4~40
	JJC-5	Gray	Orange	Brown	0~10	4~40
	JJC-6	Dark white	White pink	Creamy	0~12	10~40
	JJC-7	Creamy	Orange	Brown	1~10	10~40
	JJC-8	Gray	Orange	Dark brown	0~5	4~40
	JJC-9	White	Brown to black	Brown	1~10	4~40
	JJC-10	White	White	light pink	1~10	4~40
	JJC-11	Creamy	Dark brown	Brown	0~5	10~40
	JJC-12	White to pink	Orange	Dark brown	0~5	10~40
	JJC-13	White	Yellow	Light brown	0~5	10~40
	JJC-14	Creamy	Dark yellow	Dark green	1~8	4~40
	JJC-15	Creamy	Dark yellow	Brown	3~12	10~30

Table 11. List of actinomycetes strain isolated in site D and E.

Isolation Site	Strain No.	Aerial mycelium	Substrate mycelium	Soluble Color	Growth at	
					NaCl(%)	Temp.(°C)
Site D	JJD-1	Gray	Orange	Light brown	0~6	4~35
	JJD-2	White	Dark brown	Dark brown	2~12	10~35
	JJD-3	White	Light yellow	Beige	0~10	10~40
	JJD-4	White to green	Dark brown	Dark purple	0~8	4~40
	JJD-5	White	Brown	Dark green	0~12	10~35
	JJD-6	White	Brown to black	Dark blue	0~6	10~40
	JJD-7	Creamy	Yellow	Light brown	0~10	10~40
	JJD-8	Light yellow	White green	Colorless	0~10	4~40
	JJD-9	White	White	Beige	0~5	4~40
	JJD-10	Creamy	Creamy	Colorless	1~10	4~40
	JJD-11	Creamy	Dark yellow	Light brown	1~10	10~40
	JJD-12	Light green	Yellow	Light brown	0~5	10~35
	JJD-13	White	White	Light beige	3~9	10~40
Site E	JJE-1	Beige	Orange	Light green	0~9	10~40
	JJE-2	Yellow	Dark green	Dark green	0~6	10~35
	JJE-3	White	White	Pink to red	0~7	10~40
	JJE-4	Creamy	Green yellow	Dark brown	0~12	4~40
	JJE-5	Pink white	Light brown	Light beige	0~10	4~40
	JJE-6	White to pink	Orange	Dark purple	0~10	10~40
	JJE-7	Gray	Dark green	Dark Green	0~7	10~40
	JJE-8	White	White	Colorless	0~10	10~35
	JJE-9	Creamy	Yellow	Beige	0~10	4~40
	JJE-10	Light yellow	Dark white	Light brown	0~10	4~40
	JJE-11	White	White	Colorless	2~10	10~35
	JJE-12	Creamy	Yellow	Light brown	0~10	10~40
JJE-13	Creamy	Yellow	Light brown	0~10	10~35	
JJE-14	Light green	Purple	Purple	3~12	4~40	
JJE-15	White	Yellow	Colorless	0~8	10~40	
JJE-16	Creamy	Beige	Light Beige	0~12	10~40	
JJE-17	Creamy	Beige	Colorless	0~5	4~40	
JJE-18	Light green	Dark green	Dark green	0~10	4~40	
JJE-19	White	Orange	Red to orange	0~10	4~40	
JJE-20	White	light brown	Brown	0~5	10~35	
JJE-21	Creamy	White red	Light red	3~12	10~40	
JJE-22	White	Beige	Colorless	1~10	10~40	
JJE-23	Light yellow	Dark orange	Brown	0~6	4~40	
JJE-24	Creamy	Dark white	Green	1~10	4~40	

Table 12. List of actinomycetes strain isolated in site F and G.

Isolation Site	Strain No.	Aerial mycelium	Substrate mycelium	Soluble Color	Growth at	
					NaCl(%)	Temp.(°C)
Site F	JJF-1	Creamy	Dark yellow	Dark beige	0~8	10~35
	JJF-2	White to yellow	Violet	Violet	0~6	10~35
	JJF-3	Dark white	Dark beige	Dark green	0~8	10~40
	JJF-4	White	Orange	Dark purple	0~10	10~40
	JJF-5	Creamy	White green	Light beige	0~10	4~25
	JJF-6	Creamy	White green	Beige	0~12	10~40
	JJF-7	Creamy	Gray brown	Brown	0~10	10~40
	JJF-8	Light yellow	Orange	Ligh brown	1~12	10~40
	JJF-9	White	White	Colorless	0~7	10~35
	JJF-10	White to pink	Yellow	Light pink	4~10	4~40
	JJF-11	Creamy	Dark yellow	Beige	2~8	10~30
	JJF-12	Light green	Yellow	Dark green	1~10	4~35
	JJF-13	White	Beige	Colorless	0~6	10~40
	JJF-14	White	Beige	Colorless	0~10	10~40
	JJF-15	Creamy	Orange	Dark Brown	1~12	10~40
	JJF-16	Gray	Yellow	Beige	0~5	10~40
	JJF-17	Creamy	Purple	Red	1~6	10~40
	JJF-18	White	White yellow	Beige	3~7	10~40
	JJF-19	Dark white	Beige	Beige	3~8	4~35
Site G	JJG-1	Yellow	Dark orange	Dark yellow	0~9	10~40
	JJG-2	Creamy	Dark beige	Brown	0~8	10~35
	JJG-3	Gray	Orange	Dark orange	0~8	10~40
	JJG-4	White	Beige	Green	0~9	4~40
	JJG-5	White green	Dark beige	Dark beige	0~7	10~40
	JJG-6	Pink brown	Dark brown	Beige	0~6	10~40
	JJG-7	White	White	Colorless	0~3	10~40
	JJG-8	Creamy	Dark yellow	Brown	0~3	10~40
	JJG-9	Light yellow	Dark green	Dark green	1~10	10~35
	JJG-10	White	White	Colorless	0~5	10~35
	JJG-11	Creamy	Yellow	Colorless	0~10	10~40
	JJG-12	Creamy	Yellow	Colorless	0~10	10~40
	JJG-13	Light green	Dark brown	Drk brown	0~5	4~35
	JJG-14	Dark white	Orange	Brown	4~12	10~40
	JJG-15	Light yellow	Dark yellow	Yellow	0~10	10~40

Table 13. List of actinomycetes strain isolated in site H and I.

Isolation Site	Strain No.	Aerial mycelium	Substrate mycelium	Soluble Color	Growth at	
					NaCl(%)	Temp.(°C)
Site H	JJH-1	Beige creamy	Light brown	Creamy	0~12	10~40
	JJH-2	Creamy	White green	Beige	0~6	10~35
	JJH-3	White to yellow	Light brown	Light beige	0~7	10~40
	JJH-4	White	Orange	Dark brown	0~3	4~40
	JJH-5	White	Orange to red	Purple	1~10	10~35
	JJH-6	White to pink	Dark beige	Yellow	1~9	10~40
	JJH-7	Dark white	Light Black	Dark green	0~7	4~40
	JJH-8	White to pink	White	Light pink	1~10	4~40
	JJH-9	Gray	Dark gray	Yellow	3~10	10~40
	JJH-10	White	White	Colorless	0~5	10~40
	JJH-11	Gray	Light yellow	Light brown	0~5	4~40
	JJH-12	White	White	Yellow	1~10	4~30
	JJH-13	White	Dark Yellow	Yellow	1~10	4~40
	JJH-14	Creamy	Light green	Beige	0~5	4~40
	JJH-15	White to pink	Yellow	Yellow	1~7	4~40
	JJH-16	White	White	Colorless	1~10	10~35
	JJH-17	Light green	Light brown	Brown	1~10	4~40
	JJH-18	White to yellow	Dark yellow	Light brown	4~12	4~40
Site I	JJI-1	Creamy	Dark beige	Brown	0~8	4~40
	JJI-2	White pink	Beige	Light beige	2~9	10~35
	JJI-3	Green creamy	Brown	Brown	0~5	10~40
	JJI-4	Light green	Dark Creamy	Dark green	1~10	4~40
	JJI-5	White	Yellow	Yellow	1~9	4~40
	JJI-6	White	Dark Pink	Light pink	0~7	10~40
	JJI-7	Creamy	Dark pink	Brown	1~10	10~40
	JJI-8	Creamy	Dark creamy	Yellow	3~12	4~40
	JJI-9	White	Dark green	Brown	1~7	4~40
	JJI-10	White	Dark creamy	Dark green	1~9	4~40
	JJI-11	White	Dark yellow	Yellow	1~10	10~40
	JJI-12	Gray	Yellow	Colorless	1~10	4~40
	JJI-13	White	White	Light pink	0~5	4~40
	JJI-14	Yellow	White green	Dark green	1~10	4~40
	JJI-15	Dark white	Dark green	Light brown	1~10	4~35
	JJI-16	Gray	Yellow	Light yellow	0~5	10~40
	JJI-17	Gray	Orange	Light red	3~9	4~35

3.3.2 분리균주의 생화학적 특성

분리균주를 대상으로 생화학적 특성을 다음과 같이 Table 14에 나타내었다. 세균의 동정을 위해서는 생리·생화학적 특성, 형태 및 배양학적 특성을 조사해야 한다. 그런데 형태적, 배양학적 특성에서는 주로 속(Genus)만을 동정(Identification)할 수 있으며, 종(Species)까지 최종적으로 규명하기 위해서는 생리·생화학적 특성 조사가 필요하다. 이러한 생화학적 특성을 가지고 종을 규명하기에는 많은 한계를 가지고 있지만 참고균주와의 생화학적 특성을 비교하면서 종을 동정하는 방법은 지금까지도 많이 이용되어지고 있다.

분리균주의 Casein 단백질의 가수분해능을 확인 해본 결과 총 145 균주 중 양성 반응 (+, +/-, -/+)을 나타낸 균주가 122 종으로 확인되었다. 또한 Starch 가수분해능 실험에서는 총 145 균주 중 118 균주에서 양성반응, 37 균주에서 음성반응을 보였으며, 이러한 결과는 양성반응을 보인 균주들은 amylase를 생산하는 것으로 사료되며, 고분자의 당성분을 maltose, glucose 및 dextrin과 같은 당을 생산한다는 것을 유추할 수 있다. Urease 가수분해능 실험에서는 시험균주 중 63 균주에서 음성반응을 나타냈다. Tween 40과 Tween 80 가수분해능 실험에서는 참고균주의 생화학적 특성이 많이 보고되지 않아서 균주의 유의적인 차이점을 발견 할 수 없었다. 그리고 질산염 환원효소 실험에서는 시험균주 중 75 균주에서 양성반응을 확인할 수 있었다.

시험균주를 대상으로 5종류의 당 이용능 실험결과를 Table 11에 나타내었다. 그 결과 일부를 제외한 거의 모든 균주들이 Glucose 및 Mannitol을 이용하는 것으로 나타났으며, Xylose 및 Rhamnose를 이용하지 않는 균주들도 많이 존재하고 있었다. 이러한 생화학적 테스트를 기본으로 참고 방선균주들과 비교해 본 결과 종단위에서 많은 차이점이 있는 것으로 나타났으며, 지금까지 밝혀진 방선균주들 대부분이 육상유래의 방선균의 생화학적 특성을 기본으로 작성되어진 데이터이기 때문에 해양유래 방선균의 생리 및 생화학적 특성과는 많은 차이점을 보일 수 있다고 사료된다.

Table 14. General physiological characteristics of isolated marine actinomycetes.

Strain No.	Hydrolysis					Nitrate reductase	Utility				
	Casein	Starch	Urea	Tween 40	Tween 80		Glu ^a	Man ^b	Xyl ^c	Gal ^d	Rha ^e
JJA-1	+	+/-	+/-	ND	ND	+	+	+	+	+	+
JJA-2	+	-	-	ND	ND	+	+	+	+/-	+	+
JJA-3	+	-	+	+	+	-	+/-	-/+	-	-	-
JJA-4	-	-	+	-	-	-	+	+	+	-	-
JJA-5	-	+	-	-	-	-	+	+	+	+/-	+/-
JJA-6	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+
JJA-7	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+	-
JJA-8	-/+	-	-/+	ND	-	+	+	+	+	+	-
JJA-9	+	+	-	-	-	+	+	+	+	+	+
JJA-10	+/-	-	+	-	+	-	+	+/-	+	+/-	-/+
JJA-11	+	-/+	-/+	-	-	+	+	+	+	+	-/+
JJA-12	+	+	+	ND	-	-	+/-	-	-	+/-	-
JJA-13	+	+	-/+	-	-	-	+	+/-	+	+	+
JJA-14	+	+	-	ND	+	-	+	+	+/-	+/-	-/+
JJB-1	+/-	+	-	-	-	+	+	+	+/-	+/-	+
JJB-2	+/-	+	+	-	-	-	+	+	+	+	+
JJB-3	+	-	-	+	+	-	+	+/-	+	+	+
JJB-4	+	+	-	-	-	+	+	+	+	+	+
JJB-5	+/-	-/+	+/-	+	-	-	+	+	+	+	+
JJB-6	+	-/+	-	-	+	+	+	+	+/-	+	+
JJB-7	+/-	+	+/-	-	-	-	+	+/-	+/-	+/-	-/+
JJB-8	+	-	+/-	-	-	-	+	+	+	+	+
JJB-9	+/-	+	+	ND	+	-	+	+	-/+	-/+	+
JJB-10	+	-	-	-	-	-	+	+/-	-	+	-
JJC-1	+	+	-	ND	-	+	+	+/-	+	+	+
JJC-2	+	-	-	+	+	+	+	+	-	-/+	+
JJC-3	+	+	+	+	-	-	+	+/-	-	-	-
JJC-4	+	+	-	ND	-	+	+	+	+	+/-	+
JJC-5	+	-/+	+	+	+	+	+	+/-	+	+	+
JJC-6	+	+	-	+	-	-	+	+/-	+	+	+
JJC-7	+	-/+	-	-	-	+	+	+	-	-	-
JJC-8	+	+	+/-	-	+	+	+	-/+	-/+	-/+	-/+
JJC-9	+	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+
JJC-10	+	+	-	+	+	+	+	+	-	-	-
JJC-11	+	-	+	+	+	-	+	+	+/-	+	+
JJC-12	+	+	-	+	-	+	+	+	+	+	+/-
JJC-13	+	+/-	-	-	+	-	+	+	+	+/-	+/-
JJC-14	+	-	+	-	-	+	+	-	-/+	-/+	-/+
JJC-15	+	+	-	ND	-	+	+	+	+	+	+

Table 14. Continue

Strain No.	Hydrolysis					Nitrate reductase	Utility				
	Casein	Starch	Urea	Tween 40	Tween 80		Glu ^a	Man ^b	Xyl ^c	Gal ^d	Rha ^e
JJD-1	+	+	-/+	ND	+	+	+	+	+/-	+/-	-
JJD-2	+	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+
JJD-3	-	-	+	-	+	-	+	+/-	+	-	-
JJD-4	+	+	-	ND	ND	-	+	+	+	+	+
JJD-5	-	+/-	-	-	+	+	+	+/-	+	-	-
JJD-6	+	+	+	ND	ND	-/+	+	+/-	+	-	-
JJD-7	+	-	-/+	-	-	-	+	+	-	-	-
JJD-8	+	+	+	ND	ND	-/+	+	+	-	-	-
JJD-9	+	-	+	+	+	-/+	+	+	+	+	+
JJD-10	+	+	+	+	+	-	+	+/-	+/-	+/-	-
JJD-11	-	-/+	-	-	ND	+	+	+	+/-	+	-/+
JJD-12	+	+	-	-/+	-/+	+	+	+/-	+	-	+
JJD-13	+	-	-	+	+/-	+	+	+	+	+	+
JJE-1	+	-	-	-	-	+	+	+/-	+	-	+
JJE-2	+	+	+	+	+/-	-	+	+	+/-	-/+	-
JJE-3	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+
JJE-4	+/-	+	-	+	+	-	+	+/-	+	+/-	-
JJE-5	+/-	-	+	-/+	-/+	-/+	+	+	+	+	-
JJE-6	+	+	-/+	ND	-	+/-	+	+	+	+	-
JJE-7	+	-/+	+	-	-	-	+	+	+	+	-
JJE-8	+/-	+	-	-	-	-	+	+	+	-	-
JJE-9	+	+/-	+	+	+	+	+	+	-	+	+
JJE-10	+/-	+	-	+	+	+	+	+	+	+	-
JJE-11	+/-	-	+	ND	+	+	+	+	+	+	+
JJE-12	+	+	-	+	+	-	+	+	+	-	+
JJE-13	-	-/+	-	+/-	+/-	+	+	+/-	-	-	-
JJE-14	-	-	+	-	-	+	+	+/-	+	+	-
JJE-15	+	+	-	+	+	-	+	+	-	+	+
JJE-16	+	-	-	-	-	+	+	+	+	-	+
JJE-17	+/-	+	-	-	-	-	+	+	+	+	+
JJE-18	+/-	+/-	-	-	-	+	+	+	+	+	+
JJE-19	-	+	+	+/-	+/-	-	+	-	-/+	-	-
JJE-20	+	-/+	-	+/-	+/-	-	+	+	+	-/+	+
JJE-21	-	-/+	+	-	-	-	+	-/+	+	-/+	-
JJE-22	-	+	-	+	-	+/-	+/-	+	-	-	+
JJE-23	+	-/+	+	+	+	+	+	+	-	+	-
JJE-24	-/+	+	-	+	+	+	+	-/+	-	-/+	+

Table 14. Continue

Strain No.	Hydrolysis					Nitrate reductase	Utility				
	Casein	Starch	Urea	Tween 40	Tween 80		Glu ^a	Man ^b	Xyl ^c	Gal ^d	Rha ^e
JJF-1	+/-	+	-/+	+	+/-	-	+/-	+/-	+	+	-
JJF-2	+/-	-	+	ND	+	+	+	+	-	-	+/-
JJF-3	+	+	-	-	-/+	-	+	+	-/+	+/-	+
JJF-4	-	-	+	-	+	+	+	+	+/-	-	-/+
JJF-5	-	+	-	+	-	+	+/-	+	-/+	-/+	-
JJF-6	+	-	+	ND	ND	+	+	+/-	-/+	-/+	-/+
JJF-7	-	+	-	-	ND	-	+	+/-	+	+	+
JJF-8	-	-	+	-	-/+	+	+	+	-	+	-
JJF-9	+	+	+/-	-	+	-	+/-	+	+	+	+
JJF-10	-	+	+	+	+	-	+	+	+	-	+
JJF-11	+	+	-	+	+	+	+	+	-	-	+/-
JJF-12	-	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+
JJF-13	+	+	-	+/-	-	-	+	+	+	+	-
JJF-14	-	+	+	+	-	+/-	+	+	-	+	+
JJF-15	-	+	-	+/-	-	+	+	+	+	-	+/-
JJF-16	+	+	+/-	-	-	+	+	+	+	+	+
JJF-17	-	-	-	ND	ND	-	+	+/-	+	+/-	-
JJF-18	+	-	+	ND	ND	-	+	-/+	-	+	-
JJF-19	-	+	-	+	-	-	+	+	+	+	+
JJG-1	-	-	+	+	-	+/-	-/+	+	-/+	-/+	-/+
JJG-2	+	+	-	-	ND	+/-	+	+	+	+	+
JJG-3	-	+	+	ND	-	-	+	+/-	+	-	+
JJG-4	+	-	-	-	-	+/-	+	+	+	+	-
JJG-5	-	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+
JJG-6	+	+	-	+/-	+/-	+/-	+	+	-	-	+
JJG-7	-	-	-/+	+	-	-	+	+/-	+	-	-
JJG-8	-	-	+	+/-	+/-	+	+	+	+/-	+	+/-
JJG-9	+	+	-	-	-	-	+	+	+	-	-
JJG-10	-	+/-	-	+	-	+	-/+	+	-	+	+
JJG-11	+	+	+	+	-	-	ND	ND	ND	ND	ND
JJG-12	-/+	+	-	-	ND	+	+	-/+	+	+	+/-
JJG-13	+	+	+	+	+/-	-	+	+	+	-	-
JJG-14	+/-	-/+	+/-	-	-	+	+	+	+/-	+	+
JJG-15	+	+/-	-	+	+/-	-	+	+	+	-	+/-

Table 14. Continue

Strain No.	Hydrolysis					Nitrate reductase	Utility				
	Casein	Starch	Urea	Tween 40	Tween 80		Glu ^a	Man ^b	Xyl ^c	Gal ^d	Rha ^e
JJH-1	-/+	+	+	-	-	+	+	+	+	+	-/+
JJH-2	+	-/+	+	+	+	-	+	+/-	-	-	-
JJH-3	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+	-
JJH-4	-	+	-/+	+	+	-	+	+	+	-	+
JJH-5	+	+	+	-	-/+	+/-	+	-	+	-	+
JJH-6	+	+	-/+	-	-	-	+	+	+	+	-
JJH-7	+	+	-	+	-	+	+	+/-	+	+/-	+/-
JJH-8	+	+	+	-	+	-	+	+	+	+	+
JJH-9	-	+/-	-	+	-	+	+	+	+	+	+/-
JJH-10	+	+	-	-	+	+	+	+	+	-	-
JJH-11	+	+	+	ND	ND	-	+	+	+	+/-	+/-
JJH-12	-	+	-/+	-	-	+/-	+	-/+	+	+	-
JJH-13	+	+/-	+	+	-	-	+	+	+	+	+
JJH-14	+	+	-/+	-	-/+	-	+	+/-	+	-	+
JJH-15	+	+/-	+	+	+/-	+	+	+	+	+	-
JJH-16	+/-	+	-	+	-	-	+	+	+	+	+
JJH-17	+	+/-	+	+	ND	+	+/-	+	+	+	-
JJH-18	-	+	-	-/+	-/+	-	-	-	+	-	-
JJI-1	+	+/-	+	-	-	+	ND	ND	ND	ND	ND
JJI-2	-	+	-	+	+	-	-/+	+	-	+	-
JJI-3	+	-	+	-	-/+	+	+	+	-	-	+/-
JJI-4	+	+	-	+	+	-	ND	ND	ND	ND	ND
JJI-5	+	-	+	ND	ND	+/-	+	+	-	-	+/-
JJI-6	-	+	+	-/+	-/+	+/-	+	+	-	+	-
JJI-7	+	-/+	-	+	-	-	+	-	+	+	+
JJI-8	+	+	-	-/+	-/+	+	+	+	-	-	-
JJI-9	+	-/+	+	+	-	+	+	+	-	+	+
JJI-10	+	+	-	ND	ND	-	+	+	+	+	-
JJI-11	+/-	+	-/+	+	+	+/-	+	+	-	+	+
JJI-12	+	-	+	-	-	-	+/-	+	+	-	-
JJI-13	+	+	-/+	+	-	-	+	+/-	+	+	+
JJI-14	-/+	-/+	+	+	-	-	+	-	-	-	+
JJI-15	-	-	+	+	+	+/-	ND	ND	ND	ND	ND

^aGlucose; ^bMannitol; ^cXylose; ^dGalactose; ^eRhamnose; +, Positive; -, Negative; ND, +/-, middle growth; -/+, little growth; not determined.

3.3.1.1. 분리 균주의 색소 스펙트럼

분리된 균주를 액체배지(MB, Difco. Co. Ltd)상에서의 배양액 색상을 기준으로 색소를 형성하는 101균주를 분리하였다. 이는 일반적인 미생물 배양 중 생성되는 색상인 beige, Creamy 색상을 제외하였으며, 분리된 101균주를 앞서 언급한 방법으로 그들의 색소를 추출한 후, Spectrophometer로 330~710 nm, 20 nm 간격으로 측정하고 흡광도 값이 최고 peak를 확인하여 carotenoid 또는 bacteriochlorophyll의 유무를 확인하였다. 본 연구에서 분리된 색소 생성 해양 유래 방선균 중 총 83균주가 carotenoid의 흡광도 측정 범위인 350~540 nm에서 peak를 범위에 있었지만 주요 peak들이 380~400 nm에 존재하기 때문에 Chlorophyll a와 겹치는 부분이 많았다. 이는 생산된 색소성분들이 겹치면서 나타나는 현상이라고 사료된다(Fig. 4). 카로티노이드는 자연계에서 가장 광범위하게 존재하는 색소군으로 노란색, 오렌지색, 빨간색 등을 나타낸다. 본 연구에서도 배양액의 색을 관찰해 보았을 때 카로티노이드 계열의 색소를 확인할 수 있었다. 카로티노이드는 전형적으로 C₄₀ 탄화수소 골격으로 이루어져 있으며 그 중에는 산소를 포함하고, 이 관능기로 인해 cyclic 또는 acyclic의 xanthophyll을 형성하기도 한다. 미생물에 있어서, carotenoid는 호기성 또는 비호기성의 광합성 세균과 조류, 그리고 많은 균류 등에 존재한다. Carotenoid는 비타민 A의 전구물질로 작용을 하며, 또한 최근에 유해 활성 산소를 제거하는 항산화 효과가 기존에 알려진 비타민 E 보다 500배 뛰어난 것이 밝혀지면서 카로티노이드의 연구가 최근 활발히 진행되고 있다. 현재까지는 몇 종의 몇몇 카로티노이드 (β -carotene, lycopene, astaxanthin, canthaxanthin, β -apo-8-carotenal, β -apo-8-carotenal-ester)만이 화학적으로 합성 또는 발효를 통해 생산되고, 자연계에서는 단지 적은 개체에서만 추출되어 상업적으로 생산되어 왔다.

반면 Chlorophyll은 중앙에 마그네슘(Mg)이 있는 사이클릭 테트라피롤(cyclic tetrapyrrole)구조이며 막 단백질과 비공유적으로 연결되어 있다. Cyanobacteria의 chlorophyll은 chlorophyll a로서 고등식물과 같은 진핵의 광합성 생물체에서 발견되는 것과 같다. 예를 들어 광합성 세균 중 Purple 및 green bacteria는 다른 진핵의 광합성 생물체에는 나타나지 않는 bacteriochlorophyll이라는 것을 가

지고 있다. 미생물 배양액의 색상을 육안으로 확인해보았을 때 chlorophyll a생성이 의심되는 균주는 24종(Carotenoid 계열 83종)으로 확인되었다. 일반적으로 배양액 색이 초록색을 띄는 종들은 chlorophyll 생성을 의심할 수 있으며, Phycoerythrin이 존재하지 않는다고 보고하고 있다. 배양액 색이 보라색, 거의 흑색을 띄는 종들은 Phycoerythrin이 존재한다는 것을 의미한다. 본 연구에서도 배양액 색이 보라색 및 검은색에 가까운 균주도 3종으로 확인되었다.

Bacteriochlorophyll은 화학적 구조에 따라 a, b, g와 c, d, e의 두 클래스(class)로 나눌 수 있다. Purple bacteria는 종에 따라 bacteriochlorophyll a(700~800 nm)나 bacteriochlorophyll b중 한가지 형태만을 가지고 있다. 이 중 일부는 pigment antenna에 존재하고, 나머지는 reaction center에 존재한다. 본 해양유래 방선균의 색소 특성에서는 bacteriochlorophyll의 파장 범위는 나타나지 않았다.

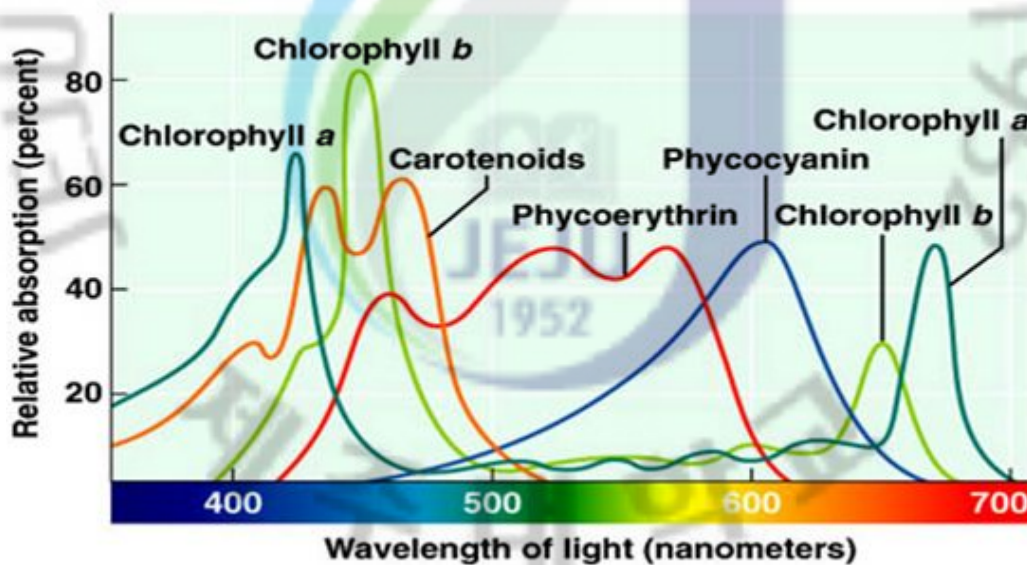


Fig. 4. Presents the visible spectrum of light. This spectrum displays the various types of visible light based upon their different wavelengths (www.citruscollege.edu/apps/comm.asp).

3.3.1.2. 16S rRNA 염기서열 분석 및 계통분석

제주도 해양에서 분리된 방선균 145균주의 분석되어진 16S rDNA 염기서열은 염기서열간의 유사도를 확인하기 위해 BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) search program을 이용하여 NCBI (National Center for Biotechnology Information)의 Genbank와 EMBL Nucleotide Sequence Database에서 유사한 염기서열을 비교하였다. Clone의 결정된 염기서열과 database에 얻어진 염기서열은 PHYDIT program (ver 3.2; <http://plaza.snu.ac.kr/~iphydit/phydit>)을 이용하여 Clustal W multiple alignment로 정렬하였으며, 염기서열 분석은 CLUSTAL X software를 이용하여 Neighbor-joining 방법에 의해 Bootstrap 분석 시 1000회 반복하여 tree topology의 평가 기준으로 사용하여 계통수를 작성하였으며, 염기서열 간 유전적 거리는 Jukes & Cantor 모델을 이용하여 계산하였다.

분리된 방선균의 16S rRNA 염기서열 분석을 통하여 계통 분류학적으로 어떤 division에 속하는지를 확인 하여 본 결과 제주도 제주시 동부지역(Group I, Site A, B) 해양에서 분리된 방선균 24균주는 Gram positive bacteria(divission)/ *Actinobacteria*(class)/ *Actinomycetales*(order)/ *Streptomycineae*(suborder)/ *Streptomycataceae*(family)/ *Streptomyces*(genus)에 22 균주 (JJA-1, JJA-2, JJA-4, JJA-5, JJA-6, JJA-7, JJA-8, JJA-9, JJA-10, JJA-11, JJA-12, JJA-13, JJA-14, JJB-1, JJB-2, JJB-3, JJB-4, JJB-5, JJB-6, JJB-7, JJB-8, JJB-9), *Actinomycetales*(order)/ *Streptosporangineae*(suborder)/ *Nocardiopsaceae*(family)/ *Nocardiopsis*(genus)에 2 균주(JJA-3, JJB-10)가 분리되었다(Table 15, Fig. 5). Table 14에 나타낸 similarity는 blast search때 나타난 가장 근연속과 종에 대한 값이다. JJA-2, JJA-4, JJA-6, JJA-11, JJB-4은 type strain인 *Streptomyces champavatii* (DQ026642)와 각각의 16S rRNA 염기서열을 Jukes & Cantor 모델을 이용하여 similarity를 계산하였을 때 99.39, 99.85, 99.85, 99.23, 99.69%를 나타내었으며, JJA-7, JJB-3, JJB-7은 *Streptomyces fluvorobeus* (AJ781331)와 99.77, 98.88, 99.20%의 similarity를 보였다. JJA-1, JJB-9은 *Streptomyces albogriseolus* (AJ494865)와 98.24, 98.87%, JJA-5, JJA-13은 *Streptomyces parvus* (EF063462)와 99.54,

99.34%의 similarity 값을 나타내었다. 이외에도 *Streptomyces* 속에서는 type strain *S. globisporus* (AB249937)와 JJA-8, JJA-14 균주가 99.37, 99.48%, *S. sampsonii* (D63871)와 JJA-9 균주가 98.76%, *S. flavofungini* (EF571003)와 JJA-10 균주가 99.12%, *S. vinaceus* (EU048541)와 JJA-12, JJB-1 균주가 98.45, 99.37%, *S. pactum* (AB184398)과 JJB-2, JJB-8 균주가 99.85, 99.78%, *S. olivaceus* (AB184793)와 JJB-5 균주가 98.55%의 similarity 값을 각각 나타내었다. *Nocardiopsis* 속 균주 JJA-3 균주는 type strain *N. listeri* (X97887)와 98.78%, JJB-10 균주는 *N. alba* (X97884)와 98.38%의 similarity 값을 나타내었다. 이러한 계통학적 분석을 기초로하여 최종적으로 Site A, B (Group I)에서는 *Streptomyces* 속 균주 10종(species) *Nocardiopsis* 속 균주 2 종을 최종적으로 확인하였다.

Table 15. Culturable marine actinomycetes identified on the basis of 16S rRNA sequence(Group I).

Isolation site	Strain No.	The closest species	Similarity (%)	Strain No.	The closest species	Similarity (%)
A	JJA-1	<i>Streptomyces albogriseolus</i>	98.24	JJA-8	<i>Streptomyces globisporus</i>	99.37
	JJA-2	<i>Streptomyces champavatii</i>	99.39	JJA-9	<i>Streptomyces sampsonii</i>	98.76
	JJA-3	<i>Nocardiopsis listeri</i>	98.78	JJA-10	<i>Streptomyces flavofungini</i>	99.12
	JJA-4	<i>Streptomyces champavatii</i>	99.85	JJA-11	<i>Streptomyces champavatii</i>	99.23
	JJA-5	<i>Streptomyces parvus</i>	99.54	JJA-12	<i>Streptomyces vinaceus</i>	98.45
	JJA-6	<i>Streptomyces champavatii</i>	99.85	JJA-13	<i>Streptomyces parvus</i>	99.34
	JJA-7	<i>Streptomyces fulvorobeus</i>	99.77	JJA-14	<i>Streptomyces globisporus</i>	99.48
B	JJB-1	<i>Streptomyces vinaceus</i>	99.37	JJB-6	<i>Streptomyces parvus</i>	99.24
	JJB-2	<i>Streptomyces pactum</i>	99.85	JJB-7	<i>Streptomyces fulvorobeus</i>	99.20
	JJB-3	<i>Streptomyces fluvorobeus</i>	98.88	JJB-8	<i>Streptomyces pactum</i>	99.78
	JJB-4	<i>Streptomyces champavatii</i>	99.69	JJB-9	<i>Streptomyces albogriseolus</i>	98.87
	JJB-5	<i>Streptomyces olivaceus</i>	98.55	JJB-10	<i>Nocardiopsis alba</i>	98.38

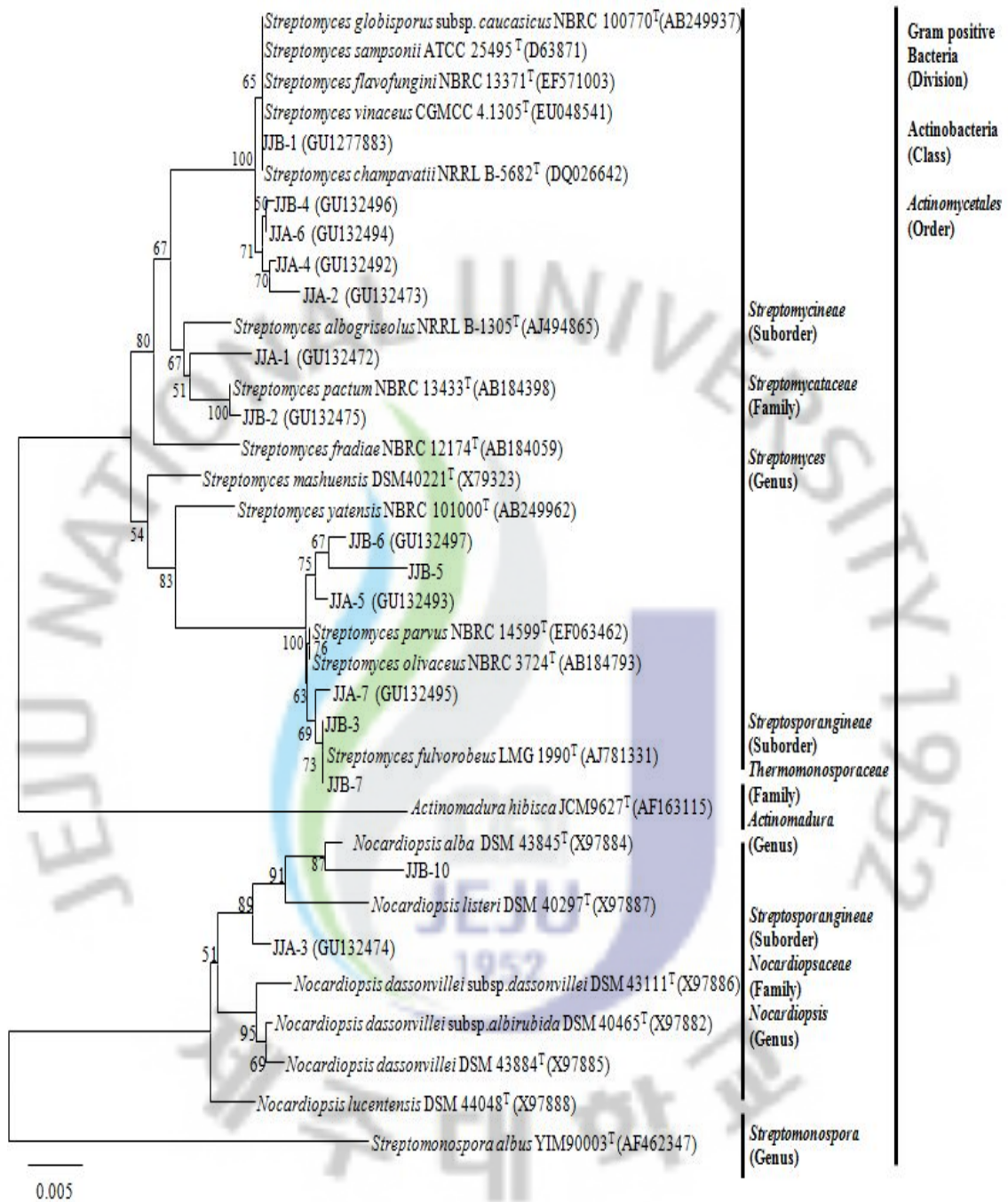


Fig. 5. Neighbor-joining tree of 16S rRNA sequence of marine actinomycetes isolated from group I (site A, B). The sequences were collected from 14 actinomycetes isolated in this study and representative species selected from ribosomal database (<http://rdp.cme.msu.edu/html/>).

제주서 서부지역 (Group II, Site C, D) 해양에서 분리된 방선균 28균주는 Gram positive bacteria(division)/Actinobacteria(class)/Actinomycetales(order)/Streptomycineae(suborder)/Streptomycataceae(family)/Streptomyces(genus)에 27 균주 (JJC-1, JJC-2, JJC-3, JJC-4, JJC-5, JJC-6, JJC-7, JJC-8, JJC-9, JJC-10, JJC-11, JJC-12, JJC-13, JJC-14, JJC-15 JJD-1, JJD-3, JJD-4, JJD-5, JJD-6, JJD-7, JJD-8, JJD-9, JJD-10, JJD-11, JJD-12, JJD-13), Actinomycetales(order)/ Streptosporangineae(suborder)/Nocardiopsaceae(family)/Nocardiopsis(genus)에 1 균주(JJD-2)가 분리되었다(Table 16, Fig. 6).

Table 15에 나타낸 similarity는 blast search때 나타난 가장 근연속과 종에 대한 값이다. JJC-2, JJC-10, JJD-13은 type strain인 *Streptomyces olivaceus* (AB249920)와 각각의 16S rRNA 염기서열의 similarity를 계산하였을 때 98.76, 98.92, 98.34%로 각각 나타났으며, JJC-1, JJD-3은 *Streptomyces griseus* (AY094371)와 99.56, 99.85%의 similarity를 보였다. *Streptomyces macrosporus* (Z68099)와 JJC-8, JJC-13, JJD-10은 97.05, 97.34, 99.01%의 similarity를 보였다. 또한 JJC-5, JJC-6은 *Streptomyces carnosus* (AB184263)와 96.09, 96.24%로 분석결과가 나타나 신종 후보종으로 분리되었으며, 이외에 *Streptomyces* 속에서는 *Streptomyces coeruleofuscus* (AB184840) (JJC-3, 98.45%), *Streptomyces caelestis* (X80824)(JJC-4, 97.28%), *Streptomyces somaliensis* (AJ007403)(JJC-7, 97.94%), *Streptomyces thermodiastaticus* (Z68101) (JJC-9, 98.83%), *Streptomyces longisporus* (AJ399475)(JJC-11, 98.34; JJD-8, 98.09%), *Streptomyces scabies* (AB026199)(JJC-12, 99.21%; JJD-12, 98.76%), *Streptomyces cheonanensis* (AY822606)(JJC-14, 99.10%), *Streptomyces ochraceiscleroticus* (AB184236)(JJC-15, 98.53%)으로 나타났다. 그리고 균주 JJD-1, JJD-6은 *Streptomyces flavus* (AB184082)와 100%의 similarity를 보여 동일한 균주임을 확인할 수 있었으며, JJD-2균주는 *Nocardiopsis dassonvillei* (X97885)와 99.35%의 유사도를 보였다.

최종적으로 Site C, D (Group II)에서는 *Streptomyces* 속 균주 17종(species) *Nocardiopsis* 속 균주 1 종을 최종적으로 확인하였다.

Table 16. Culturable marine actinomycetes identified on the basis of 16S rRNA sequence(Group II).

Isolation site	Strain No.	The closest species	Similarity (%)	Strain No.	The closest species	Similarity (%)
	JJC-1	<i>Streptomyces griseus</i>	99.56	JJC-9	<i>Streptomyces thermodiastaticus</i>	98.83
	JJC-2	<i>Streptomyces olivaceus</i>	98.76	JJC-10	<i>Streptomyces olivaceus</i>	98.92
	JJC-3	<i>Streptomyces coeruleofuscus</i>	98.45	JJC-11	<i>Streptomyces longisporus</i>	98.34
	JJC-4	<i>Streptomyces caelestis</i>	97.28	JJC-12	<i>Streptomyces scabies</i>	99.21
C	JJC-5	<i>Streptomyces carnosus</i>	96.09	JJC-13	<i>Streptomyces macrosporus</i>	97.34
	JJC-6	<i>Streptomyces carnosus</i>	96.24	JJC-14	<i>Streptomyces cheonanensis</i>	99.10
	JJC-7	<i>Streptomyces somaliensis</i>	97.94	JJC-15	<i>Streptomyces ochraceiscleroticus</i>	98.53
	JJC-8	<i>Streptomyces macrosporus</i>	97.05			
	JJD-1	<i>Streptomyces flaveus</i>	100	JJD-8	<i>Streptomyces longisporus</i>	98.09
	JJD-2	<i>Nocardiopsis dassonvillei</i>	99.35	JJD-9	<i>Streptomyces mashuensis</i>	97.87
	JJD-3	<i>Streptomyces griseus</i>	99.85	JJD-10	<i>Streptomyces macrosporus</i>	99.01
D	JJD-4	<i>Streptomyces flavolimosus</i>	96.26	JJD-11	<i>Streptomyces cellulosa</i>	98.72
	JJD-5	<i>Streptomyces flavolimosus</i>	96.39	JJD-12	<i>Streptomyces scabies</i>	98.76
	JJD-6	<i>Streptomyces flaveus</i>	100	JJD-13	<i>Streptomyces olivaceus</i>	98.34
	JJD-7	<i>Streptomyces alboflavus</i>	98.31			

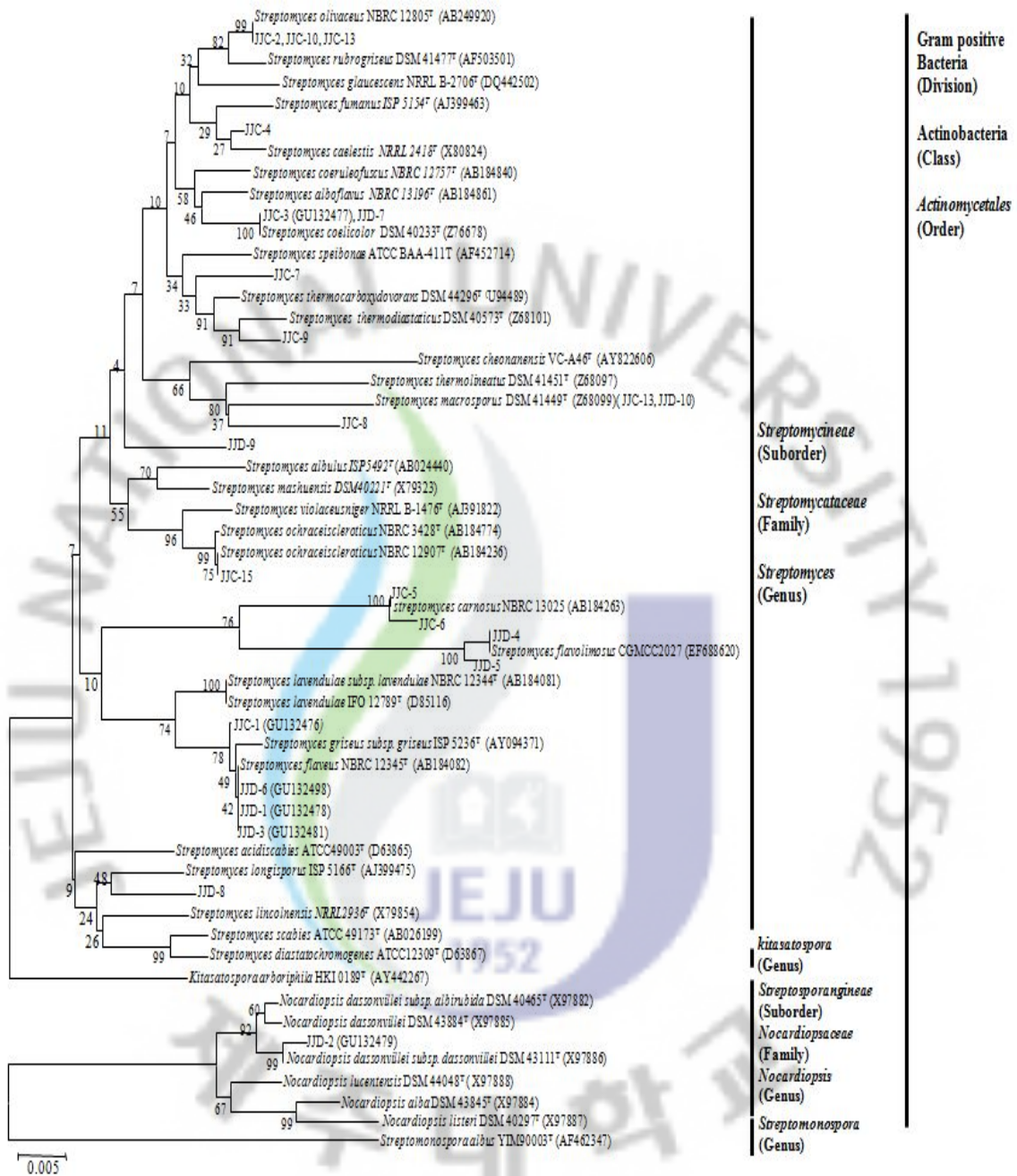


Fig. 6. Neighbor-joining tree of 16S rRNA sequence of marine actinomycetes isolated from group II (site C, D). The sequences were collected from 14 actinomycetes isolated in this study and representative species selected from ribosomal database (<http://rdp.cme.msu.edu/html/>).

제주도 서귀포 동부지역 (Group III, Site E, F, G) 해양에서 분리된 방선균 총 58균주로서 가장 높은 방선균 분리율을 나타낸 지역이다. 분리된 해양 방선균들은 Gram positive bacteria(divission)/Actinobacteria(class)/Actinomycetales(order)/Streptomycineae (suborder)/Streptomycataceae(family)/Streptomyces(genus)에 51 균주, Actinomycetales(order)/Streptosporangineae(suborder)/Nocardiopsaceae (family)/ Nocardiopsis(genus)에 7 균주가 분리되었다(Table 17, Fig. 7).

분리지역 Site-E 지역에서는 Streptomyces 속 균주들이 모두 분리되어졌으며, 24 균주의 분리율을 보였으며, Site-F 지역에서는 Nocardiopsaceae 속 균주가 4 종이 분리되었다. Table 16에 나타낸 similarity는 blast search때 나타난 가장 근연속과 종에 대한 값이다. Group III(Site E, F, G)에서 분리된 균주들의 type strain과의 similarity를 확인한 결과 Streptomyces(genus)에서는 Streptomyces microflavus (DQ442519)와 JJE-2, JJE-4, JJF-3 균주와 각각 99.92, 99.76, 100%의 similarity를 보였으며, Streptomyces sindenensis (EF422787)와 JJE-6, JJE-12, JJF-7, JJF-17, JJG-10, JJG-12 균주는 98.40, 99.92, 98.27, 98.72, 99.24, 99.67%, JJF-1, JJF-4, JJG-4, JJG-6 균주는 Streptomyces tricolor (EU273534)와 100, 100, 99.92, 99.60%의 similarity값을 보였으며, 균주 JJF-1과 JJF-4는 동일한 종으로 확인되었다. JJE-3, JJF-16, JJF-18 균주는 Streptomyces niger (AJ621607)와 92.75, 99.92, 99.02%로 나타났으며, 균주 JJE-3은 type strain과 비교해보았을 때 similarity가 92.75%로 신종균주로서의 가능성을 확인하였다. 차후 type strain을 확보한 후 비교실험을 거쳐 신종박테리아로 등록할 예정에 있다.

균주 JJF-9과 JJF-10은 type strain인 Streptomyces lydicus (Y15507)와 similarity를 확인한 결과 99.92%로 나타나 동일한 종으로 확인되었으며, 이외에 균주 JJE-17과 JJE-18은 Streptomyces sioyaensis (DQ026654)와 98.68%로 나타나 동일한 종으로 최종 확인되었다. 또한 균주 JJE-22와 JJE-23도 Streptomyces kasugaensis(AB024441)와 99.92%, Streptomyces flavolimosus (EF688620)와 균주 JJE-9, JJF-15, JJG-15, 99.92%로 나타나 동일한 종으로 최종 결론을 내렸다.

Nocardiopsis(genus)에는 총 7균주가 분리되어졌으며, type strain과 similarity

분석 결과 JJF-5, JJF-6은 *Nocardiopsis alba* (X97884)와 98.28, 99.62%를 JJF-13, JJF-14, JJG-9는 *Nocardiopsis lucentensis* (X97888)와 98.34, 99.76, 99.24%, JJG-2 균주는 *Nocardiopsis dassonvillei* (X97886)와 99.82%, JJG-14는 *Nocardiopsis listeri* (X97887)와 98.04%의 similarity를 나타냈다.

이외에 Group III 지역에서 분리된 해양방선균들은 *Streptomyces praecox* (AB184293)(JJE-1, 99.92%), *Streptomyces flavogriseus* (DQ442531)(JJE-5, 99.60%), *Streptomyces anulatus* (DQ026637)(JJE-7, 99.24%; JJE-14, 99.28%), *Streptomyces macrosporus* (JJE-8, 99.98%), *Streptomyces griseocarneus* (X99943)(JJE-10, 98.48; JJF-15, 98.02%), *Streptomyces hygrosopicus* (AJ391820)(JJE-11, 98.80; JJF-8, 98.80), *Streptomyces cattleya* (JJE-20, 99.24; JJE-24, 99.45%), *Streptomyces rhizosphaericus* (AB249941)(JJE-21, 99.92%), *Streptomyces catenulae* (AJ621613)(JJE-19, 97.74%) *Streptomyces javensis* (AJ391833)(JJF-2, 99.28%), *Streptomyces rimosus* (AB045883)(JJF-12, 98.02; JJG-11, 98.98%), *Streptomyces sampsonii* (D63871)(JJG-1, 99.92%), *Streptomyces sclerotialus* (AJ621608)(JJG-4, 98.24%), *Streptomyces fimicarius* (AB184269)(JJG-5, 99.44%), *Streptomyces sparsogenes* (JJG-7, 98.42; JJG-13, 97.54%), *Streptomyces mediolani* (EU196529)(JJG-8, 98.74%)로 나타났다. 또한 Fig. 7에서는 균주 *Streptomyces cattleya* (JJE-20, JJE-24), *Streptomyces sparsogenes* (JJG-7, JJG-13)이 근연관계가 너무 차이가 있어서 계통도 작성시 균주를 제외하여 작성되었다.

최종적으로 Group III에서는 *Streptomyces* 속 24종(51균주 중)의 방선균을 분리하였으며, *Nocardiopsis* 속 4종을 분리하였다.

Table 17. Culturable marine actinomycetes identified on the basis of 16S rRNA sequence(Group III).

Isolation site	Strain No.	The closest species	Similarity (%)	Strain No.	The closest species	Similarity (%)
E	JJE-1	<i>Streptomyces praecox</i>	99.92	JJE-13	<i>Streptomyces cattleya</i>	99.62
	JJE-2	<i>Streptomyces microflavus</i>	99.92	JJE-14	<i>Streptomyces anulatus</i>	99.28
	JJE-3	<i>Streptomyces niger</i>	92.75	JJE-15	<i>Streptomyces griseocarneus</i>	98.02
	JJE-4	<i>Streptomyces microflavus</i>	99.76	JJE-16	<i>Streptomyces rhizosphaericus</i>	98.84
	JJE-5	<i>Streptomyces flavogriseus</i>	99.60	JJE-17	<i>Streptomyces sioyaensis</i>	98.68
	JJE-6	<i>Streptomyces sindenensis</i>	98.40	JJE-18	<i>Streptomyces sioyaensis</i>	98.68
	JJE-7	<i>Streptomyces anulatus</i>	99.24	JJE-19	<i>Streptomyces catenulae</i>	97.74
	JJE-8	<i>Streptomyces macrosporus</i>	99.98	JJE-20	<i>Streptomyces cattleya</i>	99.24
	JJE-9	<i>Streptomyces flavolimosus</i>	99.92	JJE-21	<i>Streptomyces rhizosphaericus</i>	99.92
	JJE-10	<i>Streptomyces griseocarneus</i>	98.48	JJE-22	<i>Streptomyces kasugaensis</i>	99.92
	JJE-11	<i>Streptomyces hygrosopicus</i>	98.80	JJE-23	<i>Streptomyces kasugaensis</i>	99.92
	JJE-12	<i>Streptomyces sindenensis</i>	99.92	JJE-24	<i>Streptomyces cattleya</i>	99.45
F	JJF-1	<i>Streptomyces tricolor</i>	100	JJF-11	<i>Streptomyces macrosporus</i>	99.78
	JJF-2	<i>Streptomyces javensis</i>	99.28	JJF-12	<i>Streptomyces rimosus</i>	98.02
	JJF-3	<i>Streptomyces microflavus</i>	100	JJF-13	<i>Nocardiopsis lucentensis</i>	98.34
	JJF-4	<i>Streptomyces tricolor</i>	100	JJF-14	<i>Nocardiopsis lucentensis</i>	99.76
	JJF-5	<i>Nocardiopsis alba</i>	98.27	JJF-15	<i>Streptomyces flavolimosus</i>	99.92
	JJF-6	<i>Nocardiopsis alba</i>	99.62	JJF-16	<i>Streptomyces niger</i>	99.92
	JJF-7	<i>Streptomyces sindenensis</i>	98.27	JJF-17	<i>Streptomyces sindenensis</i>	98.72
	JJF-8	<i>Streptomyces hygrosopicus</i>	98.80	JJF-18	<i>Streptomyces niger</i>	99.02
	JJF-9	<i>Streptomyces lydicus</i>	99.92	JJF-19	<i>Streptomyces macrosporus</i>	99.45
	JJF-10	<i>Streptomyces lydicus</i>	99.92			
G	JJG-1	<i>Streptomyces sampsonii</i>	99.92	JJG-9	<i>Nocardiopsis lucentensis</i>	99.24
	JJG-2	<i>Nocardiopsis dassonvillei</i>	99.82	JJG-10	<i>Streptomyces sindenensis</i>	99.23
	JJG-3	<i>Streptomyces tricolor</i>	99.92	JJG-11	<i>Streptomyces rimosus</i>	98.98
	JJG-4	<i>Streptomyces sclerotialis</i>	98.24	JJG-12	<i>Streptomyces sindenensis</i>	99.67
	JJG-5	<i>Streptomyces fimicarius</i>	99.44	JJG-13	<i>Streptomyces sparsogenes</i>	97.54
	JJG-6	<i>Streptomyces tricolor</i>	99.60	JJG-14	<i>Nocardiopsis listeri</i>	98.04
	JJG-7	<i>Streptomyces sparsogenes</i>	98.42	JJG-15	<i>Streptomyces flavolimosus</i>	99.92
	JJG-8	<i>Streptomyces mediolani</i>	98.74			

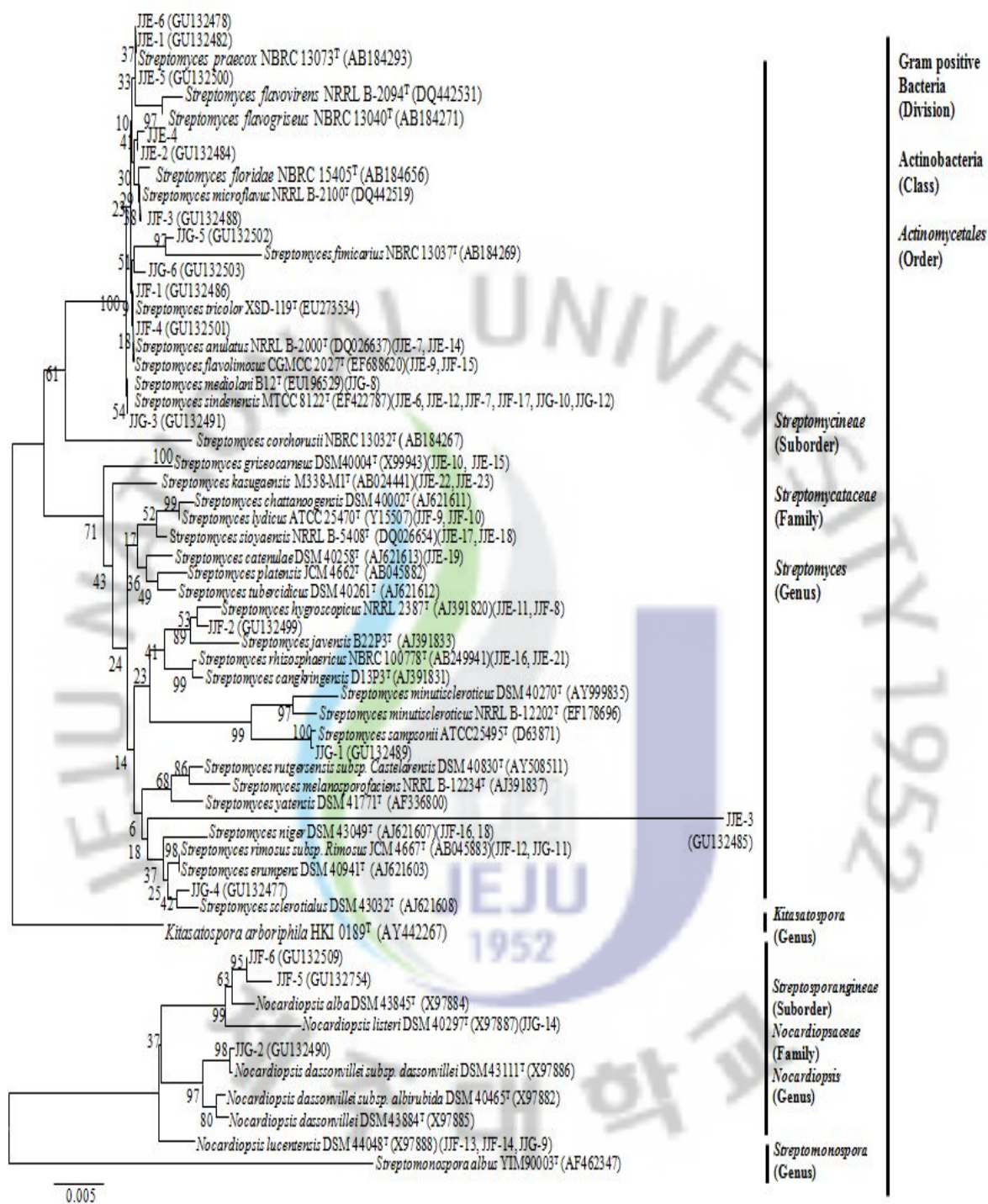


Fig. 7. Neighbor-joining tree of 16S rRNA sequence of marine actinomycetes isolated from group III(site E, F, G). The sequences were collected from 14 actinomycetes isolated in this study and representative species selected from ribosomal database (<http://rdp.cme.msu.edu/html/>).

서귀포 서부지역 (Group IV, Site H, I)해양에서 분리된 방선균 35 균주는 모두 Gram positive bacteria(divission)/Actinobacteria(class)/Actinomycetales(order)/Streptomycineae(suborder)/Streptomycataceae(family)/Streptomyces(genus)에 분류학적으로 포함되었다(Table 18, Fig. 8).

Table 17에 나타낸 similarity는 blast search때 나타난 가장 근연속과 종에 대한 값이다. JJH-2, JJH-3, JJH-17, JJI-1균주는 type strain인 *Streptomyces flaveus* (AB184082)와 각각의 16S rRNA 염기서열의 similarity를 계산하였을 때 99.77, 98.47, 99.62, 99.77%로 각각 나타났으며, JJH-6, JJI-10, JJI-13 균주는 *Streptomyces lincolnensis* (X79854)와 99.18, 99.24, 98.86%의 similarity를 보였다. JJH-4, JJI-2 균주는 type strain *Streptomyces champavatii* (DQ026642)와 각각 100, 100%의 similarity를 보여 동일종임을 확인할 수 있었으며, JJH-5, JJI-7 *Streptomyces viridochromogenes*(AB184089)와 100% 일치하여 동일종임을 확인하였다. JJH-8, JJI-5, JJI-16 균주는 *Streptomyces sparsogenes* (AJ391817)와 99.82, 99.42, 99.76% 일치하였기 때문에 Fig. 8에는 각각의 균주를 type strain에 임의적으로 붙여넣었다. JJH-11, JJH-12, JJI-17 균주는 *Streptomyces lavendulae* (AB184081)와 100% 일치해 phylogenic tree상에서는 같은 라인에 넣었다. JJH-7, JJH-9, JJH-13 균주는 *Streptomyces albulus* (AB024440)와 99.75, 99.24, 98.23% 일치하는 것으로 확인되었다. 균주 JJI-6와 JJI-8은 *Streptomyces fimbriatus* (AB184659)와 98.32%로 동일한 similarity를 보여 동일한 종으로 최종 판명하였다. JJH-14, JJH-16 균주는 *Streptomyces acidiscabies* (D63865)와 98.97, 98.24%, JJI-11, JJI-15 균주는 *Streptomyces coeruleofuscus* (AB184840)와 98.74, 98.23%, JJI-12 균주는 *Streptomyces mahuensis* (X79323)와 99.12% 일치하는 결과를 얻을 수 있었다.

최종적으로 Site H, I (Group IV)에서는 *Streptomyces* 속 균주 18종(species)을 최종적으로 확인하였다.

Table 18. Culturable marine actinomycetes identified on the basis of 16S rRNA sequence(Group IV).

Isolation site	Strain No.	The closest species	Similarity (%)	Strain No.	The closest species	Similarity (%)
H	JJH-1	<i>Streptomyces flavolimosus</i>	91.98	JJH-10	<i>Streptomyces alboflavus</i>	99.98
	JJH-2	<i>Streptomyces flaveus</i>	99.77	JJH-11	<i>Streptomyces lavendulae</i>	100
	JJH-3	<i>Streptomyces flaveus</i>	98.47	JJH-12	<i>Streptomyces lavendulae</i>	100
	JJH-4	<i>Streptomyces champavatii</i>	100	JJH-13	<i>Streptomyces albulus</i>	98.23
	JJH-5	<i>Streptomyces viridochromogenes</i>	100	JJH-14	<i>Streptomyces acidiscabies</i>	98.97
	JJH-6	<i>Streptomyces lincolnensis</i>	99.18	JJH-15	<i>Streptomyces alboflavus</i>	99.77
	JJH-7	<i>Streptomyces albulus</i>	99.75	JJH-16	<i>Streptomyces acidiscabies</i>	98.24
	JJH-8	<i>Streptomyces sparsogenes</i>	99.82	JJH-17	<i>Streptomyces flaveus</i>	99.62
	JJH-9	<i>Streptomyces albulus</i>	99.24	JJH-18	<i>Streptomyces alboflavus</i>	98.98
I	JJI-1	<i>Streptomyces flaveus</i>	99.77	JJI-10	<i>Streptomyces lincolnensis</i>	99.24
	JJI-2	<i>Streptomyces champavatii</i>	100	JJI-11	<i>Streptomyces coeruleofuscus</i>	98.74
	JJI-3	<i>Streptomyces rimosus</i>	99.98	JJI-12	<i>Streptomyces mashuensis</i>	99.12
	JJI-4	<i>Streptomyces olivaceus</i>	98.84	JJI-13	<i>Streptomyces lincolnensis</i>	98.86
	JJI-5	<i>Streptomyces sparsogenes</i>	99.42	JJI-14	<i>Streptomyces violascens</i>	97.64
	JJI-6	<i>Streptomyces fimbriatus</i>	98.32	JJI-15	<i>Streptomyces coeruleofuscus</i>	98.23
	JJI-7	<i>Streptomyces viridochromogenes</i>	100	JJI-16	<i>Streptomyces sparsogenes</i>	99.76
	JJI-8	<i>Streptomyces fimbriatus</i>	98.32	JJI-17	<i>Streptomyces lavendulae</i>	100
	JJI-9	<i>Streptomyces pactum</i>	97.84			

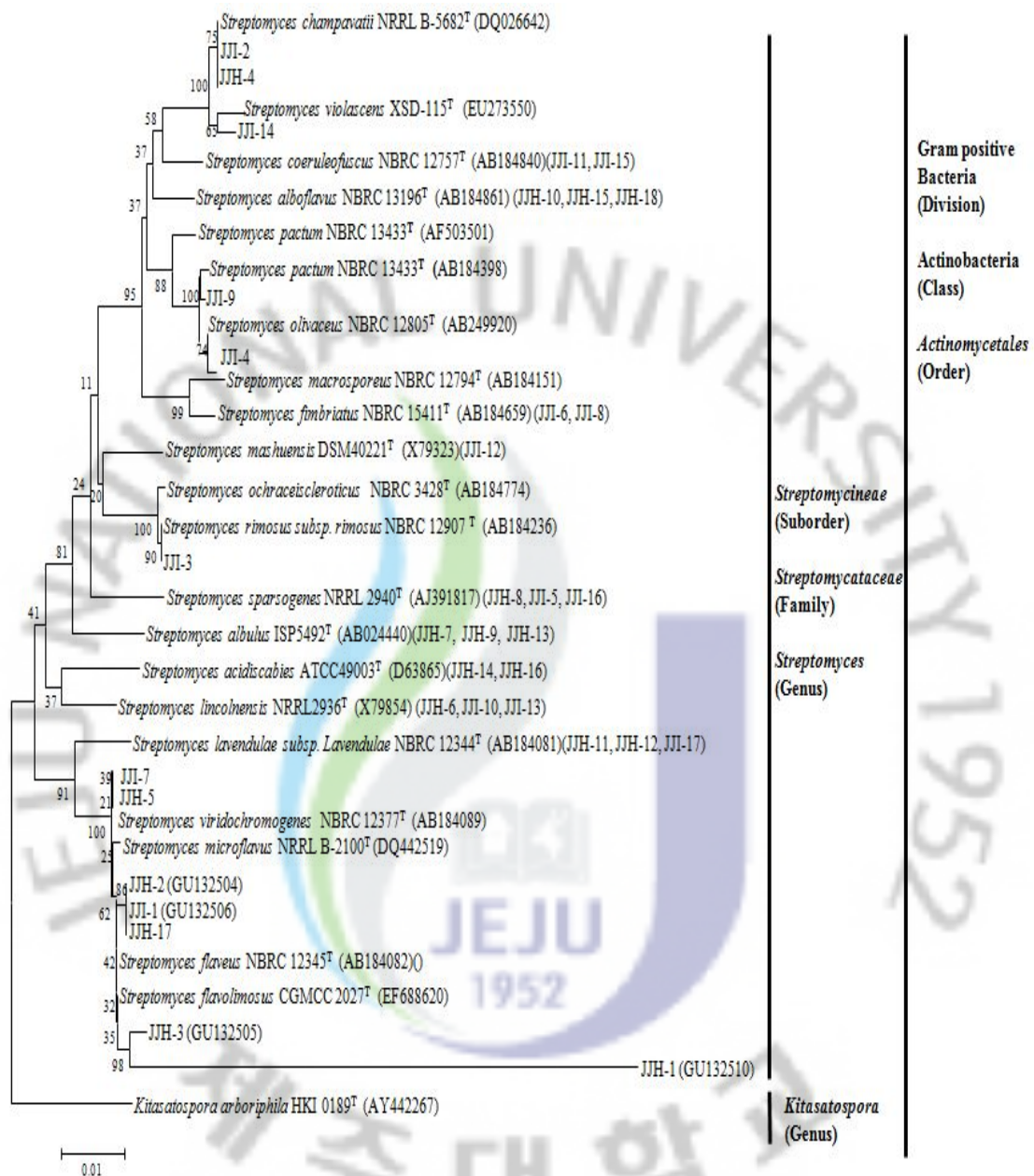


Fig. 8. Neighbor-joining tree of 16S rRNA sequence of marine actinomycetes isolated from group IV(site H, I). The sequences were collected from 14 actinomycetes isolated in this study and representative species selected from Ribosomal Database (<http://rdp.cme.msu.edu/html/>).

제주도 해양에서 분리 되어진 해양방선균의 16S rRNA 염기서열 정보를 BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) search program을 이용하여 NCBI (National Center for Biotechnology Information)의 Genbank와 EMBL Nucleotide Sequence Database에서 유사한 염기서열을 비교하여 가장 근연속이나 종으로 나타나는 것을 확인하였다. 또한 미국 미시간주립대의 Ribosomal Database Project II (RDP II) (<http://rdp.cme.msu.edu/html/>)내에 저장되어 있는 bacteria 16S rRNA 서열과 비교하였다. Clone의 결정된 염기서열과 database에 얻어진 염기서열은 PHYDIT program을 이용하여 그룹별로 Fig. 9에 나타내었다.

제주도 해안 4개 지역 9개 지점에서 분리되어진 145개의 해양 방선균 대부분의 미생물은 Gram positive bacteria/ *Actinobacteria* / *Actinomycetales*(order)그룹 (100%)에 속하였으며 다음으로 *Streptomyicineae*(suborder)/ *Streptomycetaceae*(family)/ *Streptomyces*(genus) 그룹(93.1%), *Streptosporangineae*(suborder)/ *Nocardiopsaceae*(family)/ *Nocardiopsis*(genus)(6.9%)로 나타났다.

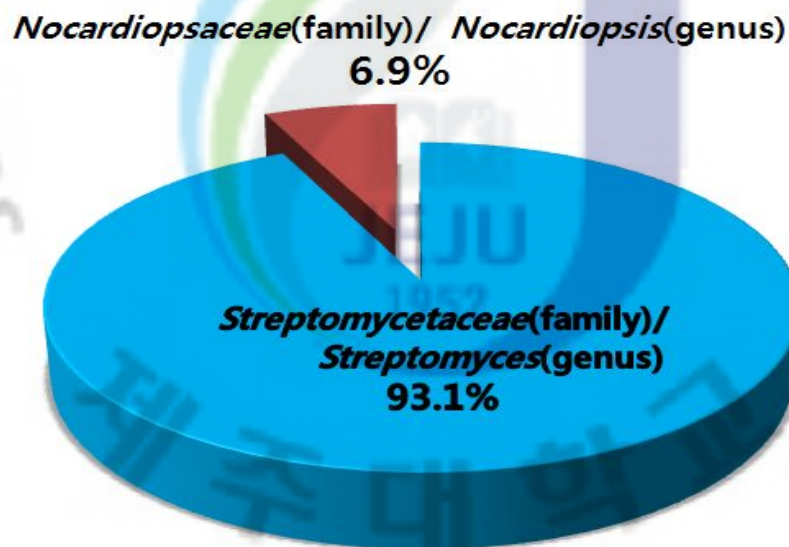


Fig. 9. Actinomyces groups in Jeju marine

각각의 분류 그룹을 genus 별로 나누어 보면 다음과 같이 나누어 볼 수 있다. 이번 연구에서 분리되어진 해양방선균이 가장 많은 균주가 분리(93.1 %) 되어진 *Streptomycineae*(suborder)/ *Streptomycetaceae*(family) 그룹 내에서는 *Streptomyces* 속이 100%를 차지하며, *Streptomyces* 속을 종(species)단위로 분류해보면 Fig.10 과 같다. *Streptomyces* 속 총 135 균주 중 51종(species)이 분리되어졌으며, Fig. 10에는 3균주이상 분리되는 (Major) 종들만을 나타내었다. 가장 많이 분포하고 있는 종은 *Streptomyces champavatii*, *Streptomyces macrosporus*, *Streptomyces flaveus*, *Streptomyces flavolimosus*, *Streptomyces sindenensis*으로 확인되었으며, 총 18종이 우점종으로 조사되었다.

이외에도 2균주 이상 분리되어진 종들은 *S. albogriseolus*, *S. globisporus*, *S. sampsonii*, *S. vinaceus*, *S. griseus*, *S. carnosus*, *S. longisporus*, *S. scabies*, *S. mashuensis*, *S. anulatus*, *S. griseocarneus*, *S. hygroscopicus*, *S. rhizosphaericus*, *S. sioyaensis*, *S. kasugaensis*, *S. lydicus*, *S. viridochromogenes*, *S. fimbriatus*, *S. acidiscabies*으로 19종으로 나타났다.

그리고 *S. flavofungini*, *S. caelestis*, *S. somaliensis*, *S. thermodiasticus*, *S. chenanensis*, *S. cellulose*, *S. praecox*, *S. catenulae*, *S. javensis*, *S. sclerotialis*, *S. fimicarius*, *S. mediolani*, *S. mashuensis*, *S. violascens*는 각각 1종씩 총 14종 (Species)이 분리되었다.

Streptosporangineae(suborder)/ *Nocardiopsaceae*(family)/ *Nocardiopsis*(genus)은 총 분리균주 145 중 10균주(6.9%)를 차지하고 있었으며, *Nocardiopsis dassonvillei*, *Nocardiopsis listeri*, *Nocardiopsis alba*, *Nocardiopsis lucentensis* 총 4종이 분리되었다 (Fig. 11).

최종적으로 해양에서 분리된 방선균 145 균주 중 유전적 유사도(similarity)가 가까워 동일한 종일 가능성이 높은 균주를 제외하고 Site A~Site I까지 총 55 종 (Species)이 조사되었다. 55종 중 *Streptomyces* (genus)에 51종이 속하였으며, *Nocardiopsis* (genus)에 4종이 포함되었다.

***Streptomyces* sp.**

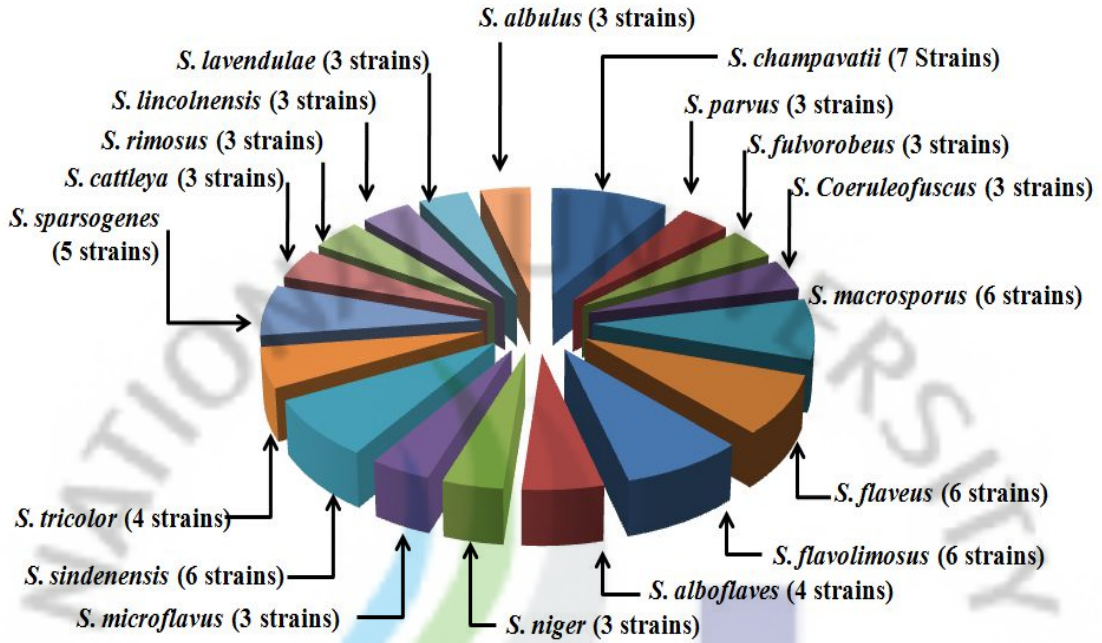


Fig. 10. Major *Streptomyces* species groups isolated in Jeju marine sources

***Nocardiosis* sp.**

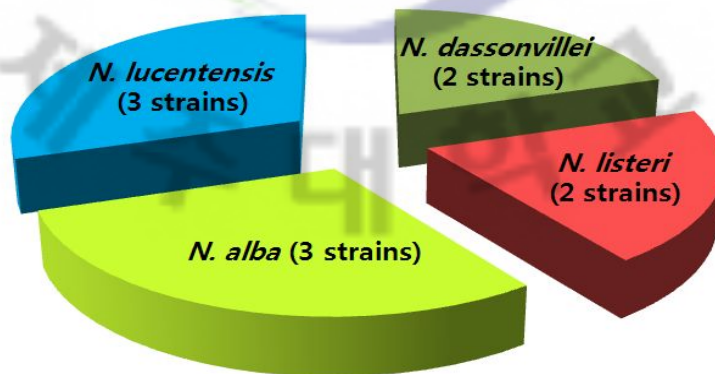


Fig. 11. Nacardiopsis species groups in Jeju marine sources.

3.4. 신종 후보 미생물

제주도 해수욕장을 중심으로 해안에서 분리 되어진 해양미생물 및 해양 방선균의 16S rRNA 염기서열을 NCBI (National Center for Biotechnology Information)의 BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) search program을 이용하여 분석하여 보았을 때 97 %미만으로 유사도를 보이는 균주들을 Genbank와 EMBL Nucleotide Sequence Database에서 유사한 염기서열을 검색하여 database에 얻어진 염기서열은 PHYDIT program을 이용하여 Clustal W multiple alignment로 정렬하였으며, 염기서열 분석은 CLUSTAL X software를 이용하여 Neighbor-joining 방법에 의해 Bootstrap 분석 시 1,000회 반복하여 tree topology의 평가 기준으로 사용하여 계통수를 작성하였으며, 염기 서열간 유전적 거리는 Jukes & Cantor 모델을 이용하여 계산하여 하였다(Table 21). Table 21에 나타내었듯이 분리된 해양 방선균 및 미생물 중 총 11균주가 새로운 종일 가능성이 매우 높게 나타났다. 이들에 대해서는 앞으로 근연속의 근연종 즉 type strain을 분양받아 배양 특성, 형태적 특성, 생리·생화학적 특성, 화학적 특성, 분자생물학적 특성을 비교 분석할 필요가 절실히 요구된다.

Table 19. Culturable bacteria identified on the basis of 16S rRNA sequence.

Strain No.	The closest species	16S rRNA sequence similarity (%)
JJC-5	<i>Streptomyces carnosus</i> (AB184263)	96.09
JJC-6	<i>Streptomyces carnosus</i> (AB184263)	96.24
JJE-3	<i>Streptomyces sclerotialis</i> (AJ621608)	92.69
	<i>Streptomyces cuspidosporus</i> (AB184090)	92.74
JJH-1	<i>Streptomyces microflavus</i> (DQ445795)	91.33
	<i>Streptomyces tricolor</i> (EU273534)	91.47
JJM-10	<i>Glaciecola nitratreducens</i> (AY787042)	96.00
	<i>Glaciecola pullidula</i> (U85854)	95.43
JJM-25	<i>Glaciecola punicea</i> (U85853)	93.63
	<i>Shewanella baltica</i> (AJ000214)	97.02
JJM-33	<i>Shewanella gaetbuii</i> (AY190533)	92.30
JJM-39	<i>Pseudoalteromonas haloplankis</i> (X67024)	97.05
	<i>Oceanisphaera litoralis</i> (AJ500470)	97.70
JJM-57	<i>Oceanisphaera donghaensis</i> (DQ190414)	97.02
	<i>Donghaeana dokdonensis</i> (DQ017015)	95.00
JJM-84	<i>Donghaeana dokdonensis</i> (DQ017015)	95.00
JJM-137	<i>Pseudoalteromonas luteoviolacea</i> (AY217773)	93

4. 요약

본 연구에서는 제주도 해안을 중심으로 해양에 서식하는 생물, 해조류 및 모래를 채집하여 그로부터 분리되어지는 해양유래 방선균의 다양성을 연구하였다. 연구를 수행하기 위해 시료를 채집한 지역은 제주도 해안가를 중심으로 제주시 지역과 서귀포시 지역으로 나누어 제주시 지역은 동부와 서부지역으로 서귀포시 지역 또한 서부 지역과 동부 지역으로 구분하여 각 지역 마다 형성된 암반 조건대에서 시료를 채집 하여 미생물을 분리하였다. 해양유래 방선균을 분리하기 위해 생물 시료를 채집한 지역의 환경요인을 조사해 본 결과 수온, 염분농도, 용존산소, 화학적 산소요구량, 영양염류는 평균값과 큰 차이를 나타내지 않았으며 해수의 pH는 약 알칼리성을 나타내었다. 채취된 시료로부터 해양유래 방선균주 145종을 분리하였으며, 분리균의 생화학적 특성 및 16S rRNA 분석을 통하여 분리균의 계통학적 분석을 한 결과 제주도 해안 4개 지점 9개 지역에서 분리된 해양유래 방선균은 총 145균주를 분리하였는데 그 중 색소를 형성하는 방선균은 129 균주를 분리하였다. 분리 되어진 대부분의 균주들의 성장 온도 범위는 4 °C~40 °C까지 범위에서 성장이 가능하였으며, 10~35°C 범위에서 좋은 성장을 보였다. 염 농도 실험에서는 다양한 염분 농도에서도 성장이 가능하였다. 최저 0 %에서 최대 12.0 %의 염 농도에서도 성장이 가능한 광염성 미생물(11종)과 초기 생육 배지내에 염분이 있어야만 성장이 가능한 호염성 미생물(48종)이 존재하였다. 이러한 염분농도에 대한 성장실험결과는 방선균이 육상에서 해양으로 유입이 되어서 적응을 하면서 생존을 한 종들과 그러한 종들이 오랜 시간 진화를 거듭하면서 해양미생물로서의 양상을 보여주는 중요한 증거 자료가 된다. 분리되어진 방선균 배양액 색상은 yellow, red, orange, brown, green, pink, violet 등으로 육상 방선균주 배양액들과 비교해 보았을 때 매우 다양한 색소를 생산했으며 대체적으로 aerial mycelium의 creamy, white, gray, yellow, green 계열의 색상을 나타냈다.

분리된 101균주의 색소를 추출한 뒤 carotenoid 또는 bacteiochlorophyll의 유무를 확인한 결과 83균주가 carotenoid의 흡광도 측정 범위인 350~540 nm에서

peak를 나타내었다. 반면 bacteriochlorophyll에 상응하는 파장범위에서는 흡광도 peak를 나타내는 균은 없었다.

제주도 제주시 동부지역(Group I, Site A, B) 해양에서 분리된 방선균 24균주는 Gram positive bacteria(divission)/ *Actinobacteria*(class)/ *Actinomycetales*(order)/ *Streptomycineae*(suborder)/ *Streptomycataceae*(family)/ *Streptomyces*(genus)에 22 균주, *Actinomycetales*(order)/ *Streptosporangineae*(suborder)/ *Nocardiopsaceae*(family)/ *Nocardiopsis*(genus)에 2 균주가 분리되었다. 분리균주 염기서열을 type strain과 비교한 결과 제주시 동부지역에서는 *Streptomyces* 속 균주 10종(species), *Nocardiopsis* 속 균주 2 종을 확인하였다.

제주시 서부지역 (Group II, Site C, D) 해양에서 분리된 방선균 28균주는 Gram positive bacteria(divission)/*Actinobacteria*(class)/*Actinomycetales*(order)/ *Streptomycineae*(suborder)/*Streptomycataceae*(family)/*Streptomyces*(genus)에 27 균주, *Actinomycetales*(order)/ *Streptosporangineae*(suborder)/ *Nocardiopsaceae*(family)/ *Nocardiopsis*(genus)에 1 균주가 분리되었으며, 최종적으로 *Streptomyces* 속 균주 17종(species), *Nocardiopsis* 속 균주 1 종을 확인하였다.

제주도 서귀포 동부지역 (Group III, Site E, F, G) 해양에서 분리된 방선균 총 58균주로서 가장 높은 방선균 분리율을 나타낸 지역이다. 분리된 해양 방선균들은 Gram positive bacteria(divission)/*Actinobacteria*(class)/*Actinomycetales*(order)/ *Streptomycineae* (suborder)/*Streptomycataceae*(family)/*Streptomyces*(genus)에 51 균주, *Actinomycetales*(order)/*Streptosporangineae*(suborder)/*Nocardiopsaceae* (family)/ *Nocardiopsis*(genus)에 7 균주가 분리되었으며, Group III에서는 *Streptomyces* 속 24종(51균주 중), *Nocardiopsis* 속 4종을 분리하였다.

서귀포 서부지역 (Group IV, Site H, I)해양에서 분리된 방선균 35 균주는 모두 Gram positive bacteria(divission)/*Actinobacteria*(class)/*Actinomycetales*(order)/ *Streptomycineae*(suborder)/*Streptomycataceae*(family)/*Streptomyces*(genus)에 분류학적으로 포함되었으며, Site H, I (Group IV)에서는 *Streptomyces* 속 균주 18종(species)을 확인하였다.

제주도 해안 4개 지역 9개 지점에서 분리되어진 145개의 해양 방선균 대부분의 미생물은 Gram positive bacteria/ *Actinobacteria* / *Actinomycetales*(order)그룹

(100%)에 속하였으며 다음으로 *Streptomycineae*(suborder)/ *Streptomycetaceae*(family)/ *Streptomyces*(genus) 그룹(93.1%), *Streptosporangineae*(suborder)/ *Nocardiopsaceae*(family)/ *Nocardiopsis*(genus)(6.9%)로 나타났다.

최종적으로 해양에서 분리된 방선균주 145 균주 중 유전적 유사도(similarity)가 가까워 동일한 종일 가능성이 높은 균주를 제외하고 Site A~Site I까지 총 55 종 (Species)이 조사되었으며, 55종 중 *Streptomyces* (genus)에 51종이 속하였으며, *Nocardiopsis* (genus)에 4종이 포함되었다.

본 연구에서 제주도 해양에서 분리 되어진 방선균 및 미생물의 16S rRNA 염기서열을 분석하여 본 결과 총 11균주(방선균주 4종, 해양미생물 7종)가 새로운 종일 가능성이 매우 높게 나타났다. 이들에 대해서는 앞으로 근연속의 근연종 즉 type strain을 분양받아 미생물의 배양 특성, 형태적 특성, 생리·생화학적 특성, 화학적 특성, 분자생물학적 특성을 비교 분석할 필요가 절실히 요구된다.

PART II

신규 후보 해양 미생물의 분리 및 특성

해양에서 분리된 *Glaciecola siphonariae* sp. nov., 및
Oceanisphaera laurenciae sp. nov.,의
분류학적 연구 및 특성

Taxonomic research and Characterization of new species
Glaciecola siphonariae sp. nov., and *Oceanisphaera*
laurenciae sp. nov., isolated from marine sources

1. 서론

1.1. 신규 미생물 자원의 중요성

미생물은 지구에 생명체가 존재했을 때부터 지금까지 지구상의 어떤 환경에서도 존재하고 있다. 다른 생물은 살 수 없는 혹한의 남극 얼음 속에도, 뜨거운 온천수나 심해저의 열수구에서도, 엄청나게 높은 압력이 미치는 심해저에서도, 빛이 전혀 없는 동굴 속과 토양, 바다 속에도 미생물은 살고 있다. 또한 높은 방사능에 노출되어도, 높은 농도의 염분이나 강산성 또는 알칼리 용액에서도, 무기물만이 유일한 영양공급원인 환경에서도 곳곳하게 살아가는 미생물이 있다. 연안의 경우에도 해수, 해저퇴적층, 갯벌, 부유물질의 표면, 해양생물 표피나 내부기관에는 다양한 형태와 생리적 특성을 지닌 해양미생물들이 존재하고 있다. 해양에서 새로운 미생물들이 발견되고 또 새로운 대사물질이 발견됨에 따라 해양 미생물의 종 다양성뿐만 아니라 생태계의 다양성은 새로운 물질의 탐색 대상으로서 깊은 관심을 받게 되었다. 생태계의 다양성은 생물군집의 양상과 상호 작용하는 시스템의 차이로 구분되며, 일반적으로는 특정 서식지의 특성으로 대변된다. 또한 물질과 에너지의 순환, 시스템의 재생력 등 생태계의 평형유지기능을 하나의 통합된 개념으로서 정의한다. 따라서 생태계 다양성은 정적 상태이기보다는 시·공간적인 동적 상태로 이해해야 할 것이다. 특히 연안이나 하구 같은 생태계에 서식하는 미생물들은 물질순환에 아주 중요한 역할을 맡고 있으며 환경의 지속적인 보전에 기여하고 있다. 그러나 미생물은 생명공학에 있어 중심적인 역할을 함에도 불구하고 미생물의 실제 다양성에 대하여는 알려진 것이 많지 않다 (Moon, 2009).

미생물은 고부가가치 의약품 단백질 생산, 생리활성물질, 효소 등의 생산균주로서 또한 전통적 발효산업에 사용되는 등 산업적 가치가 매우 높아 선진국도 경쟁적으로 눈독을 들이고 있는 분야이다. 또한 국내 바이오 벤처의 50%이상은 미생물을 기반으로 사업을 전개하고 있는 실정이다. 하지만 아직까지 미생물의 99%가 미 발견 상태로 자연계에 존재하는 것으로 추정되고 있다 (Cowan,

2000). 특히 세균은 현재 생명공학 분야에서 가장 많이 이용되고 있는 미생물로 자연계에 많게는 수백만 종이 존재할 것으로 추정되고 있으나 현재까지 발견된 종은 7천여 종에 불과하다.

현재까지 식물 및 동물 종의 약 50% 그리고 동물 중 곤충의 경우 약 20%(약 80만종) 정도가 알려져 있는 것에 비하면 미생물 다양성이나 자원에 대한 연구는 비교적 매우 뒤쳐져있는데, 이러한 원인 중 가장 큰 문제점으로서 대부분의 미생물이 우리가 지금까지 알고 있는 방법으로는 배양이 불가능하다는 점에 기인한다. 배양하기 어려운 미생물을 체계적으로 이용하고자 하는 연구는 선진국을 중심으로 최근 본격적으로 수행되고 있다. 또한 지구상의 생명체의 질량으로서 전 생물종의 약 60%를 차지하고 있는 미생물은 유전적 다양성과 기능적 다양성의 중요성으로 인해 지구 생태계의 핵심적인 위치를 차지하고 있을 뿐 아니라 인류에게 없어서는 안 될 엄청난 경제적 가치를 제공하고 있다. 미생물은 고부가 가치 자원으로 생명공학산업의 핵심소재 중의 하나이므로 현재 이용할 수 있는 미생물뿐만 아니라 앞으로 더욱 우수한 경제적 잠재력을 보유하고 있을 미지의 유용미생물자원을 개발하는 것은 생명공학분야의 혁신적 발전 기틀을 마련하게 할 것이다.

선진국 등에서는 이러한 단점을 보완하기 위해 자연 생태계로부터 배양을 거치지 않고 직접 DNA를 분리하고, 이로부터 현재 미생물 분류의 토대가 되고 있는 16S ribosomal RNA 유전자(16S rDNA)를 확보하여 시료 내 종 다양성을 연구하여 미생물 자원을 파악하려는 방법이 많이 사용되고 있다(Tiedje and Zhou, 1996). 다양한 환경에서 행해진 이들 연구에 의하면 현재까지 알려져 있지 않은 미생물이 존재하며, 대부분의 경우 이들이 미생물 군집구성에 있어서 대다수를 차지하고 있는 것을 알 있다. 예를 들면, 미국 Yellowstone의 열천수에서 수행된 연구에 의하면, 이곳 한곳에서만 12개의 새로운 Bacteria 문(division)을 발견하였는데(Hugenholtz *et al.* 1998), 이는 그 전까지 발견된 문의 수의 50%에 해당되는 숫자이다. 또한 우리나라에서도 미생물 자원의 중요성을 인지하여 신종 미생물 자원의 개발을 위해서 꾸준한 노력을 기울이고 있으며, 이에 따라서 2006년도에는 박테리아 신종 발표 국가별 순위에서 1위를 차지하고 있으며 (Fig. 1), 분리원의 지역명 명칭을 인용해서 '동해', '갯벌', '독도' 등으로 명명됐고 이런 이

름들이 현재는 국제 학회에서 통용되고 있다.

자연계는 우리의 추측이나 상상을 초월할 정도의 다양성으로 구성된 생물체 및 이들의 생명현상으로 유지 진화되고 있다고 밝혀진 바 있다. 따라서 자연생태계에 대한 기초적/근본적인 연구 역시 여러 가지 분자적 요소와 세포 수준의 요소 및 이들의 상호관계로 구성된 생명현상, 생명현상의 통합체로서 개체, 각 개체군들이 모여 형성되는 군집들로 이루어진 이 생태계를 체계적으로 이해하기 위한 관점이 필수적이며 선진국에서 이러한 과학적 배경 아래 생물 및 미생물 자원의 수집과 확보에 많은 노력을 기울이고 있다. 미생물자원은 생물 산업은 물론, 화학 산업, 제지, 펄프, 식품분야, 사료, 피혁 및 에너지 산업분야에 폭넓게 활용되어 미래 생물 산업의 근간을 이룰 것으로 기대된다.

따라서 배양 가능한 미생물이나 배양 불가능한 미생물이 가지고 있는 고유한 유전자원은 그 다양성, 대사능력 및 산업적 응용가능성이 매우 크기 때문에 인류 복지를 위한 활용가치는 무궁무진하다고 할 수 있다.

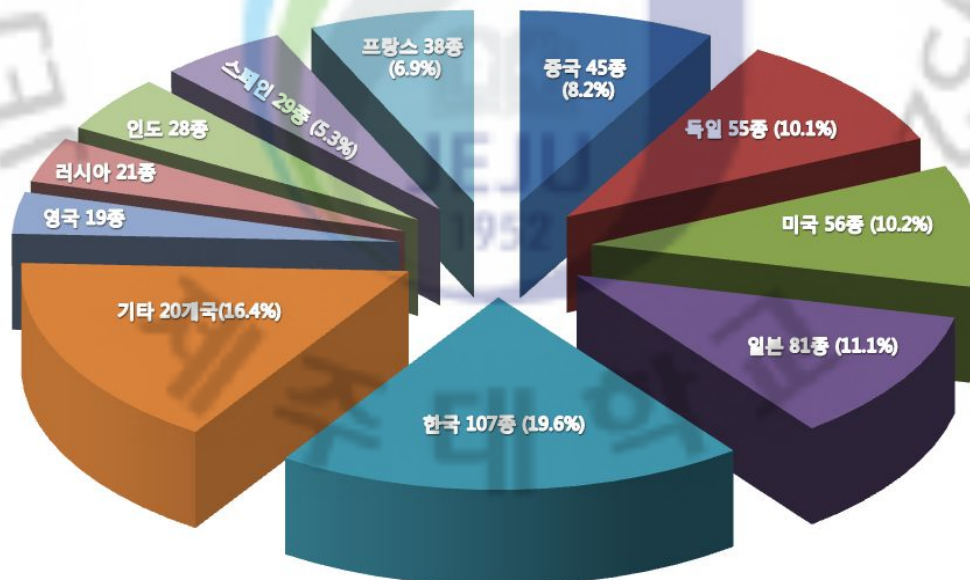


Fig. 1. National ranking of new species bacteria announcement in 2006

1.2. 미생물의 진화 및 분류 (Evolution and Taxonomy of Microbial)

1.2.1 미생물의 진화

진화(evolution)는 생물학에서 생물 집단이 여러 세대를 거치면서 변화를 축적하여 집단 전체의 특성을 변화시키고 나아가 새로운 종의 탄생을 야기하는 과정을 가리킨다(Gould, 2002). 오늘날의 모든 종은 공통조상, 즉 공통의 유전자 풀에서 점진적으로 분화된 것이다(Futuyma, 2005). 진화는 세대에서 세대로 유전형질이 전달되는 도중에 일어나는 유전자의 변화가 누적된 결과이다. 유전자 변화가 일어나는 요인은 돌연변이와 유성생식에 의한 유전자 재조합 등이다. 진화가 일어나는 주요 작동 기제는 생물 집단과 환경의 상호관계에 의해 유전형질이 선택되는 자연선택과 집단 안에서 이루어지는 유전자 부동이다. 자연선택으로 인해 생물 집단이 환경에 적응하는데 유리한 유전형질은 다음 세대로 전달되고 불리한 형질은 사라지게 된다(Lande and Arnold, 1983). 한편, 유전자 부동은 독립적인 유전형질들이 생존하고 재생산할 수 있는 기회를 지속적으로 제공한다(Ayala, 2007). 이러한 진화과정을 거쳐 생물들은 환경에 적응하여 새로운 종들로 분화한다. 생물 간의 상호작용에 의한 진화의 결과로는 공진화와 공생이 있다. 급격한 환경의 변화 등은 생물의 멸종으로 이어지기도 한다.

생물학자들의 이전에는 생물계를 다섯 개의 계(kingdom), 즉, 식물(plants), 동물(animals), 균류(fungi), 원생생물(protoists) 그리고 모네라(monera) [원핵생물(prokaryotes)]로 그룹 지었다. 그러나 분자계통학에 이 다섯 개의 계는 다섯의 주요 진화계열을 나타내는 것이 아니라는 사실이 밝혀졌다.

지구상의 세포 생명체는 도메인(domain)이라 불리우는 3가지 주요 계통을 따라 진화하였으며, 그 중 둘은 오직 오직 미생물과 원핵세포로만 구성되어 있다. 세 번째 계통에 진핵생물이 포함되며, 모네라를 제외한 원래의 다섯 계를 모두 포함하고 있다. 두 원핵 그룹은 세균(Bacteria)과 고세균(Archaea)이며, 진핵 도메인은 진핵생물(Eukarya)이라 불린다. 이들 용어는 생물의 3개 도메인을 정의하며 도메인은 가장 상위의 생물 분류군이다. 따라서 식물, 동물, 균류, 원생생물은 모두 진핵생물 도메인내의 계(kingdom)에 속한다.

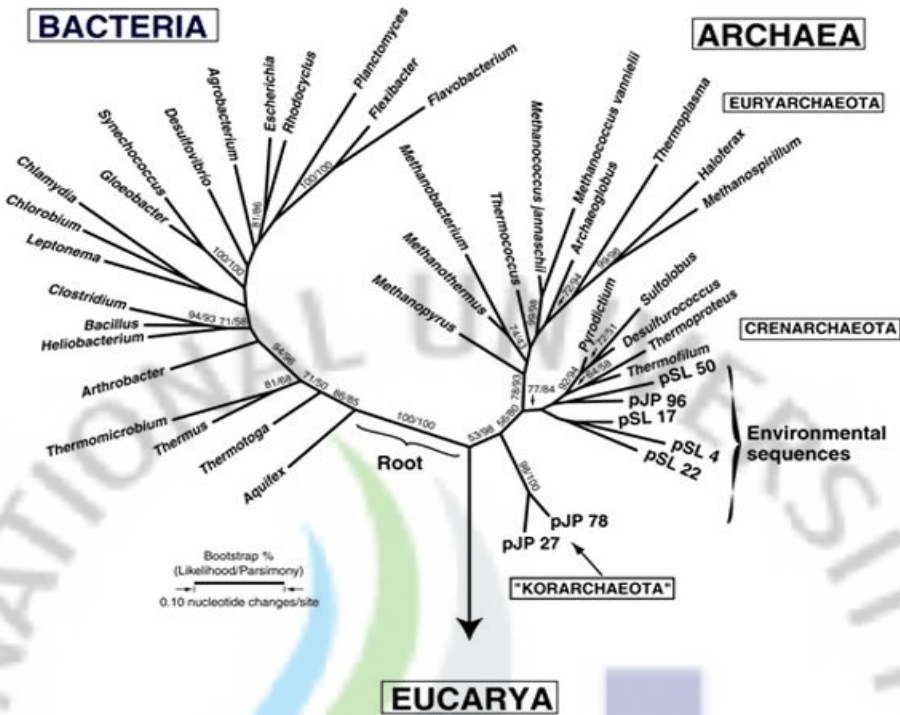


Fig. 2. Universal phylogenetic tree

세균(Bacteria) 도메인에는 적어도 40개의 문 (phyla라 하며, 단수는 phylum)이 이제까지 발견되었으며 몇몇의 중요한 세균문이 세균계통수에 나타나있다. 많은 세균 문들이 오직 환경시료의 염기서열 만으로 정의되어 있다(Fig. 2) (<http://rdp.cme.msu.edu>).

세균(Bacteria) 도메인에 있는 일부계통은 형태나 생리와 같은 표현형적으로 일관성이 결여된 종들로 구성된다. Proteobacteria가 좋은 예인데, 이 그룹의 세균들이 가지고 있는 생리적 특징은 지금까지 알려진 미생물들의 온갖 특징을 가지고 있다. 이것은 미생물의 생리적 특성과 계통발생은 반드시 연관성이 있는 것이 아니라는 것은 보여준다. 진핵생물의 소기관은 분명히 세균(Bacteria)의 주요 그룹인 Proteobacteria, 구체적으로 Rhizobium과 Rickettsias와 같은 세균으로부터 발생하였다. 흥미롭게도 이 생물들은 미토콘드리아처럼 세포내에서 생존하거나 혹은 식물 혹은 동물의 세포내에서 산다. 시안세균과 엽록체 모두가 산소 발생형

광합성을 하는데서 예측 할 수 있듯이, 엽록체는 시안세균 문(phylum)에서 발생하였다. 적어도 세균의 18가지 주요 계통(문)이 실험실 배양의 연구로부터 알려져 있으며, 자연 서식처로부터 리보솜 RNA 유전자의 회수 및 서열분석을 통해 많은 것들이 확인되고 있다. Fig. 3은 세균의 계통학적 개요를 보여주고 있다 (Michael, T. Madigan and John M. Martinko. 2006). 이 계통수는 세포질에 있는 리보솜의 소단위(small subunit, SSU)에서 얻어진 16S rRNA 염기서열을 바탕으로 만들어진 것이다.

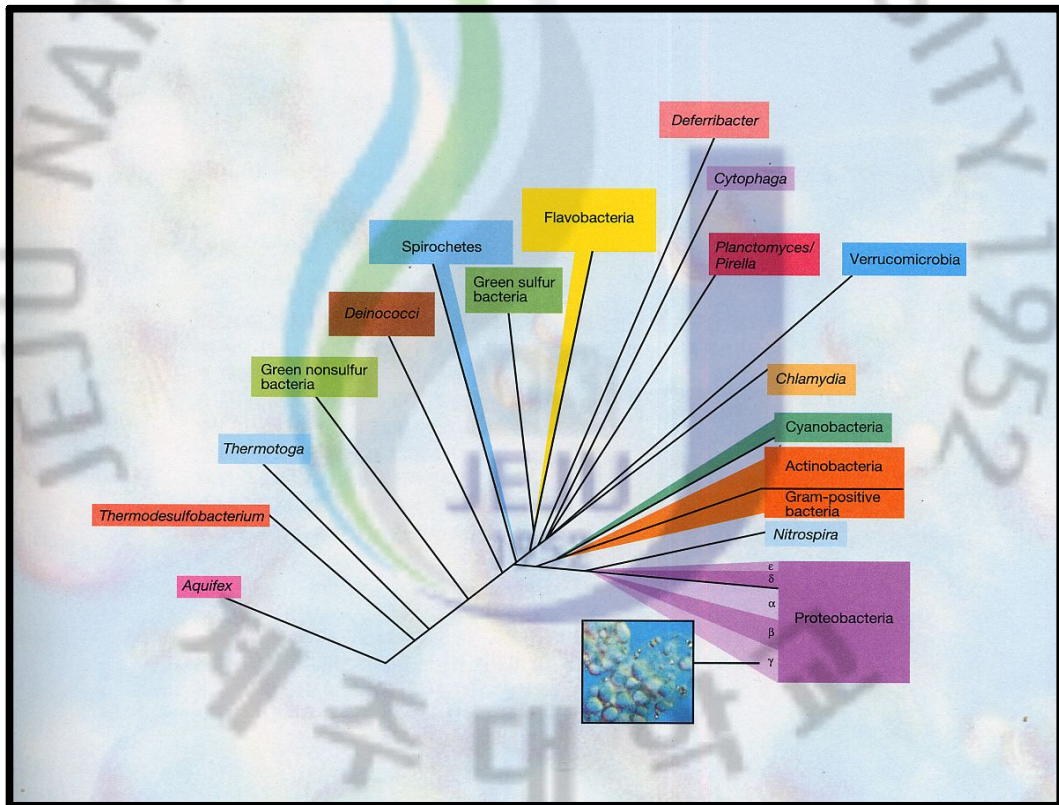


Fig. 3. Bacteria phylogenetic tree.

1.2.2 미생물 분류(Microbial Taxonomy)

미생물을 분류(classification) 혹은 분류학(taxonomy)은 미생물학의 주요 분야이다. 학자들은 분류를 통하여 서로 다른 미생물간의 유연관계를 비교하고, 미생물의 명명을 위한 체계적인 절차를 개발한다. 분류학은 분류에 관한 학문으로 동정(identification)과 명명(nomenclature)의 두 주요 분과로 나뉜다. 분류학(taxonomy)을 계통학(phylogeny)과 구분하는 것은 매우 중요하다. 분류학과 계통학 이 두 용어에 의미가 사실은 다르기 때문이다.

미생물을 분류하는 방법은 전통적으로 표현형(phenotypic)의 분석에 의존하며, 여기에는 미생물의 모양, 에너지 대사, 효소 그리고 다른 여러 가지 특징들이 포함된다. 이를 고전적 분류법(classical taxonomy)이라 한다.

고전적 분류(classical taxonomy)에는 여러 가지 표현형적 특징들을 분석하고 그 데이터를 종(species)에서 도메인(domain)까지 분류 계급으로 생물들을 그룹 짓는데 사용한다. 이때 널리 사용되는 분류학적 특징들에는 형태, 영양, 생리, 서식지가 포함된다. 즉, 미생물을 분류하기 위해서는 일반적인 것에서 특수한 것까지 여러 가지 표현형적인 특징들을 분석하여야 한다. 이렇듯 고전적 분류는 단일적 분류(monothetic classification)로 분류 체계가 복잡하게 이루어져 있다. 그리고 이에 대한 정보량도 적으며 돌연변이나 시험 오차(test error)에 의한 균주 변화(strain variation)를 쉽게 수용 할 수 없다는 단점을 가지고 있다(Sneath, 1962). 그러나 표현형의 분석을 미생물의 동정과 분류에 있어서 여전히 중요한 역할을 하고 있다. 하지만 고전적 분류의 문제점을 해결하기 위해 몇 가지의 분류방법이 개발되었다. 많은 미생물들을 동등한 중요도(weight)가 부여된 여러 단위형질(unit character)에 대해 시험하고 컴퓨터를 이용해 수리적으로 분류하는 수리 분류법(unmerical taxonomy), 세포나 세포 분획물을 화학적으로 분석하여 얻은 정보를 분류 및 동정에 이용하는 화학적 분류법(chemotaxonomy), 16S rRNA의 염기서열을 비교하거나 rDNA-DNA hybridization 등의 방법을 이용하여 분자간의 유사도를 비교분석하여 미생물의 유연관계를 분석하는 분자생물학적 분류(molecular systematics) 등이 최근에 미생물의 분류에 이용되고 있다.

수리 분류법(unmerical taxonomy)은 1950년대에 이르러 컴퓨터의 발전에 따라 미생물의 형태적 특성, 생리 생화학적 특성, 분해능, 생육조건, 탄소원 및 질소원

요구성 등 다양한 특성을 조사하여 얻어진 결과를 컴퓨터를 이용하여 미생물들의 유사성을 기초로 하여 군집화 혹은 분류하는 방법(Sneath, 1978) 으로 고전적 분류법보다 객관적이고 안정적인 분류를 할 수 있다. 수리 분류는 분류 대상 생물(Operational Taxonomic Unit, OTU)에 대해 많은 형질(Characteristics)을 관찰 측정하고, 수치처리나 통계적 처리를 하여 분류군을 찾아내는 작업이다. 통계처리에는 OTU의 수와 형질의 종류가 충분하게 많은 것이 바람직하며, 일단 OTU로서 50종류 이상, 형질의 종류로서는 100종류 이상이 기준이 된다(Sneath, 1973). 수리 분류를 적용하는 전단계로서, 집단의 규모뿐만 아니라 집단의 질에도 유의할 필요가 있다. 해석 대상의 OTU에는 신규 미생물뿐만 아니라, 분류 체계상 정의되어 있는 표준균주나 참조균주를 포함 시킬 필요가 있다. 이들 미생물은 일반적으로 세계 각국에 있는 미생물 보존기관에서 입수할 수 있다. 또한, 분석결과에 신뢰성을 평가하기 위해서 동일 균주를 중복해서 분석하는 것이 바람직하다(Sneath, 1972). 분석하려는 형질은 colony, 형태, 생육조건, 생화학적 특성, 탄소나 질소원의 이용도, 혈청, 화학적 분류 지표, 유전학적 특성 등에서 폭 넓게 서로 상관이 없는 독립형질을 선택한다. 또한 데이터가 집단 내에서 적절히 분산하고 있는 형질이 바람직하지만, 중복하여 시험한 동일 OTU의 데이터가 빈번히 달라 재현성이 떨어지는 분석항목은 분석 대상에서 제외하여야 한다. 기존의 분류 체계를 염두에 두면, 분류의 기준이 될 것 같은 형질에 미리 무게를 두고 싶어지지만 수리분류의 제일 단계에서는 모든 형질에 대해 중요도를 평가하지 않는다. 즉 각 형질을 등가로 취급하여, 분류군을 식별하는데 유용한 형질을 수리적으로 구하는 쪽이 보다 객관적인 결론을 얻을 수 있다.

화학적 분류법(chemotaxonomy)은 1970년대 이르러 생리 생화학적 분석 방법이 발전함에 따라 어떤 특정 균체 성분 (세포나 세포 분획물)에 대하여 생화학적, 분자생물학적 방법을 이용하여 그 구성 성분을 비교함으로써 미생물간의 유연성을 비교, 분류하는 방법이다. 따라서 분류의 지표가 되는 균체 성분은 대상 미생물에 널리 존재하면서 편차가 풍부하여야 한다. 즉, 미생물의 생명현상의 근간이 되면서 환경변화 등에 대하여 영향을 받지 않는 안정한 것이 좋다. 현재 미생물의 화학적 분류 지표로 많이 활용되어지고 있는 것으로는 세포벽 성분, 세포 내 당, 균체 지질, 단백질의 아미노산 조성 등이 있다. 화학적 분류 방법은 기존

의 형태적 분류방법과 비교하여 신속, 정확하며 분자 유전학적 방법에 비하여 경제적이다.

분자생물학적 분류(molecular systematics, molecular biological classification)는 생물의 진화를 분자 수준에서 연구하는 분자진화학 (molecular phylogeny)이 급속하게 발전하면서 현존하는 미생물이 어떤 경로를 통하여 과거로부터 현재에 이르게 되었는지에 관심을 갖게 되면서 핵산 분석 자료들 즉 GC content, DNA-DNA pairing, 16S 및 5S rRNA 분석 자료들을 이용하여 미생물의 분류 및 동정 그리고 계통관계 (진화학적 관계)를 규명하고자 하는 방법이다(Fox and Stackbrandt, 1987). 세균의 세포질 내에는 유전정보를 가지고 있는 DNA와 단백질 합성에 필요한 RAN가 있는데 G-C contents (G-C mol%)은 세균의 genome을 구성하는 DNA의 전 염기량에 대한 Guanine과 Cytosine의 합계의 비율로서 Tm (Melting Temperature)법, 염화세슘(CsCl)을 사용한 밀도 균배 원심 침전법, PI-nuclease를 사용한 HPLC법 등으로 측정할 수 있다. 대체적으로 세균의 DNA G-C contents는 25~75% 범위 내에 있고 그 값은 각각의 균주에서 일정하다(Fig. 4). G-C contents가 10% 이상 다른 균주는 유전학적으로 동일종이라고 할 수 없다. 그러나 유전학적 유의도가 높은 두 균주 간에 G-C contents가 비슷하다고 해서 두 균주의 DNA 염기배열이 같다고는 보장할 수 없다.

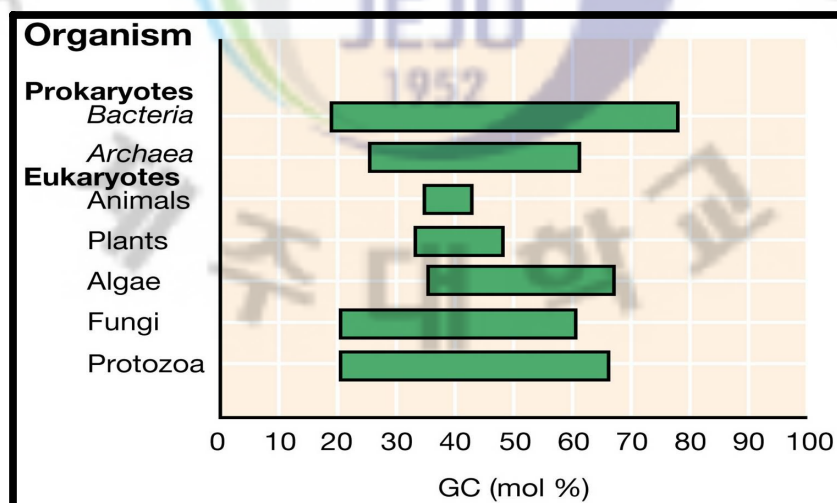


Fig. 4. G-C (or guanine-cytosine content) contents

따라서 DNA 염기배열의 상동성을 알아보기 위해 DNA-DNA hybridization을 하게 된다(Fig. 5). DNA hybridization 연구는 균종의 개념을 명확하게는 하였으나 동일 균종으로 간주하기 위한 DNA 상동치의 하한선을 어디로 할 것인가를 확정지을 수는 없다. 그러나 1987년 국제 세균 분류 명명 위원회의 특별부 회의에서 미생물 분류학상의 종 (species)에 대하여 “종은 현재 계통적으로 정의가 가능한 분류학상의 유일한 단위이며, 정량적 DNA 상동성의 결과 70% 혹은 그 이상의 균주를 포함 한다”라고 정의 하였다. 대조적으로 두 생물을 같은 속 (genus)으로 주장하기 위해서는 적어도 25% 이상의 상동성 값을 가져야 한다 (Fig. 6)(Johnson, 1973). RNA 상동치는 rRNA가 생물간의 계통을 나타내는데 유용하게 이용되어지는데 그 이유는 rRNA는 세포질 무게의 대부분을 차지하여 모든 생물로부터 쉽게 분리해 낼 수 있고 단백질 합성 기작 요소로서 모든 생물에 있어서 매우 중요하며 구조가 conservative하여 그 크기에 따라 쉽게 분리해 낼 수 있다. 뿐만 아니라 conservative한 rRNA 특성으로 인하여 다양한 생물의 비교가 가능하며 통계학적으로 비교할 수 있을 정도의 염기배열을 가지고 있다는 점이다. 특히 rRNA 중 5S rRNA 와 16S rRNA가 계통분류에 주로 사용되어지고 있다.

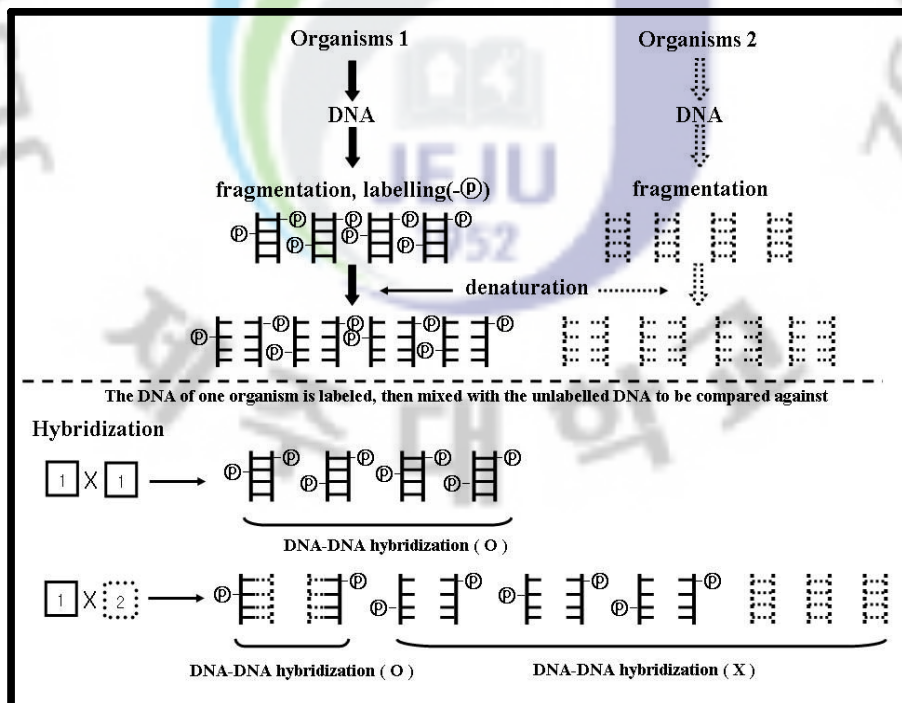


Fig. 5. DNA-DNA hybridization

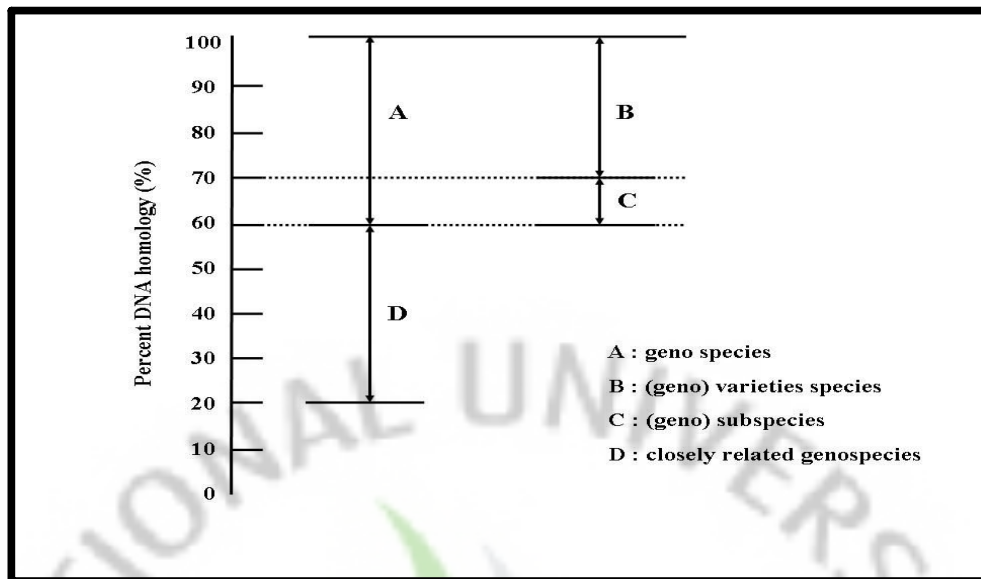


Fig. 6. Proposed taxonomic groupings based upon DNA homology data.

Phylogenetic tree(계통수, 계통진화구조)는 시간을 기준으로 하여 많은 세균의 진화적 분포관계를 기록한 것으로 Neighbor-joining (Saitou & Nei, 1987), least squares (Maidak *et al.*, 1996) maximum parsimony method (Kluge & Farris, 1969) 연산법을 사용하여 만들며 이를 토대로 미지의 미생물 특성을 예측할 수 있다. Neighbor-joining은 전통적인 cluster analysis에서 유래하나 각 계통이 동일한 속도로 진화했다는 가정을 두지 않으며, 가장 근연연관계가 가까운 종부터 묶어나가는 방식으로 계통수(Tree)를 만든다.

하지만 생물 또는 미생물을 한 측면에서 판단하여 식별하는 것은 위험하다. 분류체계는 하나라도 더 많은 독립된 특성을 조합하고 특성간의 연관성을 고려하여 구축해야 한다. 유전자 profile도 예외가 아니며 다면적으로 사고함으로써 분류의 확실성을 높이고, 기존의 개념에 들어가지 않는 신규 미생물을 발견할 기회도 증가한다. 다상분류학(polyphasic taxonomy)의 개념은 Colwell(1970)에 의해 제안되었고, 최근 Vandamme(1996)에 의해 다시 사용되기 시작하였다. Fig. 7에 나타낸 바와 같이 분류학적 특징은 분류계급과도 대응하여 그 유용성을 나타내고 있어 신속 동정법 개발에도 다상 분류학의 개념을 활용할 수 있다. 유전자를 이용한 분석 기술을 빠르게 진보되고 있으며, 게다가 최근의 분자유전학 및 분자생물학적 방법들도 점점 분류학에 이용되고 있다. 이와 병행하여 방대한 데이터

처리 기술 기술과 국제적인 데이터베이스의 구축은 유전자를 이용한 해석 기술의 보급에 크게 공헌하고 있다.

한편 자연계에 존재하는 모든 미생물 중에 비하면, 분리되어 인간이 확보하고 있는 것은 불과 몇 퍼센트라고 알려져 있다(Hawksworth, 1991). 분류 기술의 진보는 새로운 미생물의 탐색 기술과 병행하여, 미생물의 잠재력을 끌어내는 출구로서 점차 기대가 높아지고 있다.

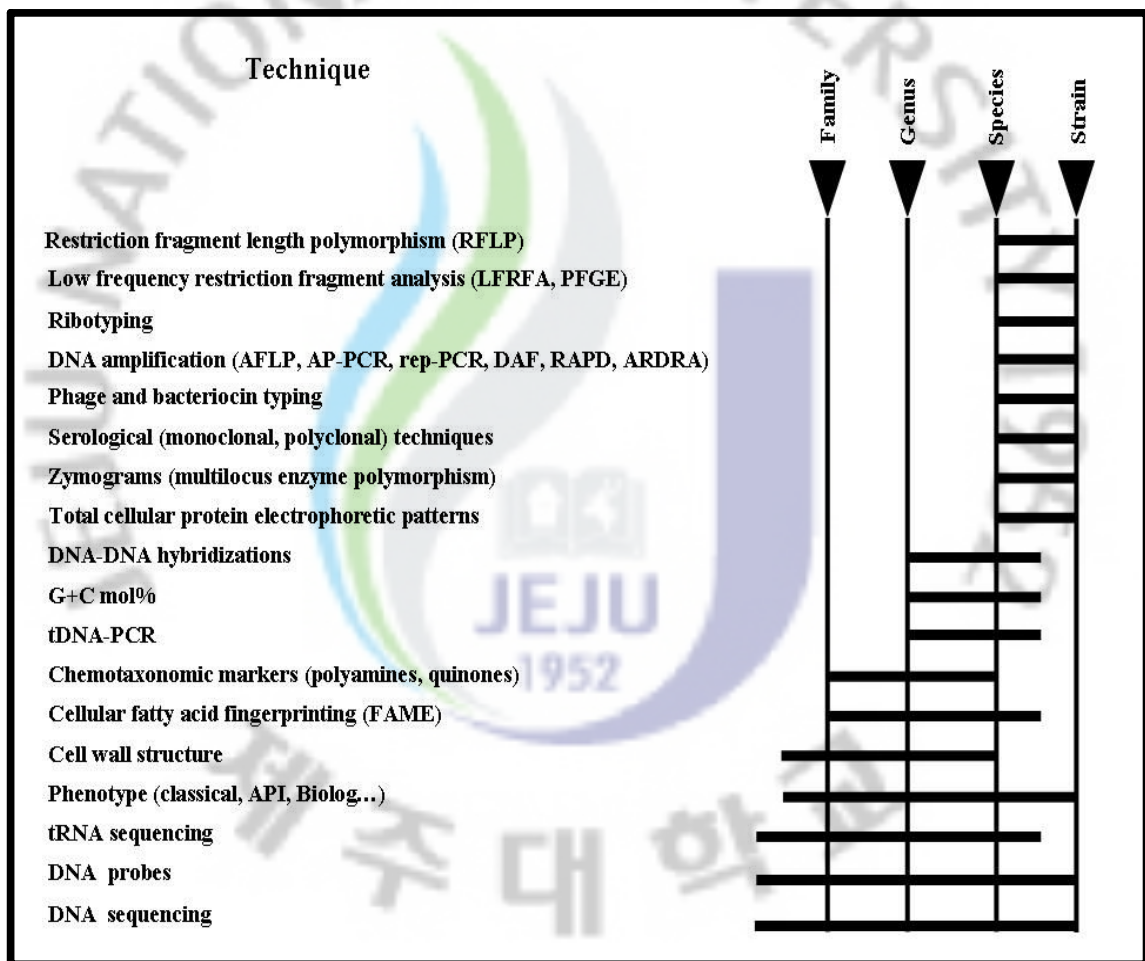


Fig. 7. Taxonomic resolution of some of the currently used technique.

1.3. 신규미생물 자원 확보를 위한 분자생물학적 접근

자연 생태계 내에 존재하는 미생물은 0.001%~3% 정도만 배양이 가능한 정도이며 (Table 1), 97~99% 이상의 미생물들이 전통적인 방법으로는 배양될 수 없어 자연 상태의 미생물 군집 구조 및 다양성에 대한 충분한 정보를 제시하지 못하고 있다(Amann *et al.*, 1995; Gray and Herwig 1996; Snaidr *et al.*, 1997). 따라서 최근에는 배양하지 않고 자연 생태계 내의 미생물 군집을 연구하는 방법들이 개발되고 있으며, 특히 핵산을 이용한 분자 생물학적 방법의 널리 이용되고 있다(Liobert-Bross *et al.*, 1998). 그 중 주로 small subunit (SSU) rRNA분자에 대한 연구가 많이 이루어지고 있다. rRNA는 단백질 합성에 관여하며, 바이러스를 제외한 세포로 이루어진 모든 생물체에 존재하기 때문에 널리 이용되고 있다. 그 중 16S rRNA 염기서열 분석을 통하여 다른 미생물과의 연관성을 밝히고, 계통분류학적 위치를 결정하여 진화 관계를 추정할 수 있다 (Giovannoni and Rappe, 2000). 또한 Ribosomal Database Project (RDP)와 Genbank 등에 등록되어 있는 16S rRNA database는 계통 분류학적 관점에서 비교가 가능하도록 정리되어 있어서 이를 이용하여 다양한 환경에 존재하는 미생물 군집을 규명하는데 유용하게 이용되고 있다.

Table 1. Culturability determined as a percentage of culturable bacteria in composition with total cell counts (Amann *et al.*, 1995).

Habitat	Culturability (%) ^a
Sea water	0.001 - 0.1
Fresh water	0.25
Mesophilic lake	0.1 - 1
Unpolluted estuarine waters	0.1 - 3
Activated sludge	1 - 25
Sediments	0.25
Soils	0.3

^a Culturable bacteria are measured as CFU

1.4. Phylum Proteobacteria

Proteobacteria는 이름도 형태를 다양하게 변화시킬 수 있는 성질 때문에 그리스의 신 Proteus에서 유래하게 되었다. Bergey's Manual of Systematic Bacteriology Vol, 2/2e (Part B) 전체가 종종 홍색세균이라고 불리우는 Proteobacteria에 관한 내용이다. 이는 자색의 광합성을 하는 세균이 여러 소그룹(subgroup)에 널리 퍼져 분포하기 때문이다. 즉, Proteobacteria는 가장 크고 가장 다양한 세균 그룹이다(Madigan and Martinko, 2005) 16S rRNA 연구에 의해 서로 계통 발생학적으로 연관관계가 있다는 것이 밝혀지긴 했지만 Proteobacteria는 여러 측면에서 서로 현저하게 다르다(Lansing *et al.*, 2003). 이들 그람 음성균의 모양은 짧은 간균이나 구균인 것에서부터 prosthecate나 싹눈, 심지어 자실체를 갖는 것까지 매우 다양하다. 또한 이들 세균은 형태학적, 생리학적으로도 매우 다양하다. 광독립영양생물(Photoautotrophy), 화학무기영양생물(Chemolithotroph), 화학중속영양생물(Chemoheterotroph) 등이 모두 존재한다. Proteobacteria의 대사방식, 형태, 생식방식에는 전반적으로 뚜렷한 양상이 없다. Proteobacteria는 세균 계통수 상에서 마지막 문(phylum)이다. 이 그룹은 현재까지 모든 세균의 가장 큰 그룹이다. 16S rRNA 염기서열을 비교해 보면 Proteobacteria에는 5개의 세부 강(class)으로 구성되는데 각 강(class)에는 α -Proteobacteria, β -Proteobacteria, γ -Proteobacteria, δ -Proteobacteria, ϵ -Proteobacteria가 있고 그 안에 40개의 목(order), 94개 과(family), 627개 속(genus) 그리고 557개의 종(species)이 분포한다.

Class : α -Proteobacteria

α -Proteobacteria는 대부분이 영양부족생물(영양분이 적은 상태에서 자랄 수 있는 생물)이다. 어떤 종류는 특별한 대사 방식을 갖는다. 예를 들면 *Methylobacterium*의 경우 메탄올 산화하는 세균인데 형태학적으로 매우 다양하며 메탄올 외에 탄소 함유 산화 가능 물질을 에너지 발생에 필요 전자공여체로 이용한다. methane monooxygenase 보유하고 있어서 methane을 methanol로 산화시킨다. *Nitrobacter*의 경우에는 화학무기영양생물(Chemolithotroph)이고, *Rhizobium*

같은 경우는 질소를 고정하는 능력을 갖는다. *Rickettsia*나 *Brucella* 같은 경우는 병원성 미생물이다. 실제로 *Rickettsia*는 절대 세포내 기생 미생물이다. α -Proteobacteria 강(class)에는 8개의 목(order), 21개의 과(family), 197개 속(genus) 그리고 167개의 종(species)이 분포한다(Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, 2001).

Class : β -Proteobacteria

β -Proteobacteria의 대사는 α -Proteobacteria의 대사와 유사한 면이 있지만 서식처의 혐기성 지역에서 유기물의 부패되면서 흘러나오는 물질을 사용하는 경향이 있다. β -Proteobacteria에 속하는 몇몇 종의 세균은 수소, 암모니아, 메탄, 방향성 지방산과 유사한 물질을 사용한다. α -Proteobacteria처럼 상당히 다양한 종류의 대사과정을 가지고 있다. β -Proteobacteria에는 화학독립영양생물(Photoautotrophs), 광무기영양생물(Photolithoautotrophy), 메탄올산화세균(*Methylobacterium*), 화학무기영양생물(Chemolithotroph)이 있다. 그리고 *Neisseria* 속(genus)과 *Bordetella* 속(genus) 같은 사람 병원체도 포함하고 있다. β -Proteobacteria 강(class)에는 7개의 목(order), 12개의 과(family), 120개 속(genus) 그리고 80개의 종(species)이 분포한다(Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, 2001).

Class : γ -Proteobacteria

γ -Proteobacteria는 무척 다양한 생리학적 유형을 가지고 있는 Proteobacteria의 가장 큰 소그룹이다. 많은 주요 속(genus)이 화학유기영양생물(Chemolithotroph)이며 조건부혐기성(Facultative anaerobe)이다. DNA-DNA hybridization 실험결과에 의하면 γ -Proteobacteria는 몇 종류의 가지(branch)가 깊은 그룹으로 구성되어 있다. 한 그룹에는 홍색유황세균(purple sulfur bacteria)이 포함되어 있고 두 번째 그룹에는 세포내 기생생물인 *Legionella*와 *Coxiella*가 속한다. 가장 큰 두 그룹에는 광합성을 하지 않는 다양한 속이 속한다. 리보솜 RNA superfamily I을 대표하는 과(family)는 *Vibrionaceae*, *Enterobacteriaceae*, *Pasteurellaceae* 과이다. 이들 세균은 당분해 대사와 5탄당 인산경로(Pentose Phosphate Pathway)를 이용해 탄수화물을 이용한다. 대부분이 조건부혐기성 생물이다. 리

보존 RNA superfamily II에는 대부분이 혐기성세균(anaerobe bacteria)이 포함되어 있는데 이들은 Entner-Doudoroff Pathway(EDP)와 5탄당 인산경로를 이용해 여러 종류의 많은 유기분자를 사용한다. *Pseudomonas*, *Azotobacter*, *Moraxella*, *Xanthomonas*와 *Acinetobacter*가 superfamily에 속한다. γ -Proteobacteria 강(class)에는 15개의 목(order), 35개의 과(family), 220개 속(genus) 그리고 275개의 종(species)이 분포한다 (Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, 2001).

Class : δ -Prpteobacteria

δ -Prpteobacteria는 여러 속(genus)이 포함되는 큰 그룹은 아니지만 그럼에도 불구하고 형태학적 또는 생리학적으로 다양성이 상당히 존재한다. 이들 세균은 대개 일반적인 그룹으로 나눌 수 있는데 모두가 화학유기영양생물(Chemolithotroph)이다. *Bdellovibrio*와 *Myxobacteria*와 같은 속은 먹이를 포식하는 포식자이다. 다른 것은 혐기성으로 유기영양분을 산화하는 동안 황하물에서 황과 황산염을 만들어낸다. δ -Prpteobacteria 강(class)에는 8개의 목(order), 22개의 과(family), 74개 속(genus) 그리고 19개의 종(species)이 분포한다(Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, 2001).

Class : ϵ (epsilon)-proteobacteria

ϵ -proteobacteria는 5개의 Proteobacteria 강(class)에서 가장 작다. 이 그룹에 속하는 모든 세균이 가느다란 그람 음성 간균으로 곧은 모양이거나 굽은 모양, 나선형 모양인 것도 있다. ϵ -proteobacteria에는 *Camphylobacteraceae*와 *Nautiliales*라는 2개의 목(order), 4개의 과(family), 16개 속(genus) 그리고 14개의 종(species)이 분포 한다. 그 중 2개의 가장 중요한 속인 *Campylobacter*와 *Helicobacter*라는 미세호기성이며 운동성이 있는 나선형 또는 간균이 있다.

1.5. Proteobacteria; Gammaproteobacteria;

Alteromonadales; Alteromonadaceae; Glaciacola

Aeromonadales; Aeromonadaceae; Oceanisphaera

최근 몇 년 동안 Proteobacteria 하위 분류인 Gammaproteobacteria에 속하는 새로운 해양 미생물에 대한 분리 및 보고가 증가하고 있으며 이렇게 분리되어진 새로운 미생물들은 계통 발생학적으로 Alteromonadaceae 및 Aeromonadaceae family group과 관련이 있었다. *Glaciacola* 속은 Proteobacteria 5개 강 중 Gammaproteobacteria 강에 속하는 14개의 목(order) 중 Alteromonadales 목에 있는 Alteromonadaceae 과(Family)에 속한다. Alteromonadaceae 과에는 *Alteromonas* 속, *Alishewanella* 속, *Colwellia* 속, *Ferrimonas* 속, *Glaciacola* 속, *Idiomarina* 속, *Marinobacter* 속, *Marinobacterium* 속, *Microbulbifer* 속, *Moritella* 속, *Pseudoalteromonas* 속, *Psychromonas* 속, *Shewanella* 속 총 13개의 속으로 이루어져 있다. *Glaciacola* 속은 Bowman (1998)에 의해서 처음으로 보고되어졌으며, 2009년 현재까지 밝혀진 종들은 *Glaciacola punicea*, *Glaciacola pallidula*, *Glaciacola mesophila*, *Glaciacola polaris*, *Glaciacola nitratireducens*, *Glaciacola psychrophila*, *Glaciacola chathamensis*, *Glaciacola agarilytica* 총 9종이 있다.

Oceanisphaera 속은 Proteobacteria 5개 강 중 Gammaproteobacteria 강에 속하는 14개의 목(order) 중 Aeromonadales 목에 있는 Aeromonadaceae 과(Family)에 속한다. Aeromonadaceae 과에는 *Aeromonas* 속, *Oceanimonas* 속, *Oceanisphaera* 속, *Tolumonas* 속 총 4개의 속이 존재하며, Aeromonadaceae에 속하는 *Aeromonas* 속을 제외하고는 많은 종류의 종들이 밝혀지지 않았다. *Oceanisphaera* 속은 Romanenko (2003)에 최초로 보고되어 졌으며, 지금까지 *Oceanisphaera litoralis*와 *Oceanisphaera donghaensis* 총 2종류만이 보고되었다. 본 연구에서는 분리균주와 가장 근접한 유전적인 차이를 보이는 참고균주(*Oceanisphaera* 속)가 2종 밖에 없어서 유전학적 근연관계 비교를 위해서 *Oceanimonas* 속 4종, *Aeromonas* 속 2종, *Tolumonas* 속 1종을 참고하였다.

이번 연구에서 발견된 해양 미생물 2종은 제주도 애월 해안가 무척추동물 및 신선촌 해안가 해양식물로 부터 분리되었는데 NCBI BLAST search를 해 본 결과 *Glaciecola nitrareducens*와 98.6%, *Oceanisphaera litoralis*와 98.02%가 일치하여 새로운 종일 가능성이 나타나 고전적 분류(classical taxonomy)에 속하는 미생물의 형태학적 특성, 영양, 생리, 생화학적인 특성등과 화학적 분류법(chemotaxonomy)인 세포벽 지방산 분석 등 그리고 분자생물학적 분류 특성인 G-C mol%, 16S rRNA sequence 분석 등을 종합하여 본 결과 새로운 종으로 밝혀졌다.



2. 재료 및 방법

2.1. 표현형적 특성 분석 (Phenotypic Characterization)

2.1.1. 일반적인 표현형적 특성 분석

2.1.1.1. 신종 후보 미생물 분리 지역 (Sampling Site)

이번 연구에서 분리된 JJM10^T(AM 983541)은 제주시 애월읍 해안도로에 위치한 조간대(Fig. 8)에 서식하는 해양 무척추동물 *Siphonaria sirius* (Mollusca: Basommatophora)에서 분리되어졌으며, JJM57^T(AM 983543)은 제주시 조천읍 신촌리에 서식하는 해양식물 *Laurencia* sp.에서 분리되었다.

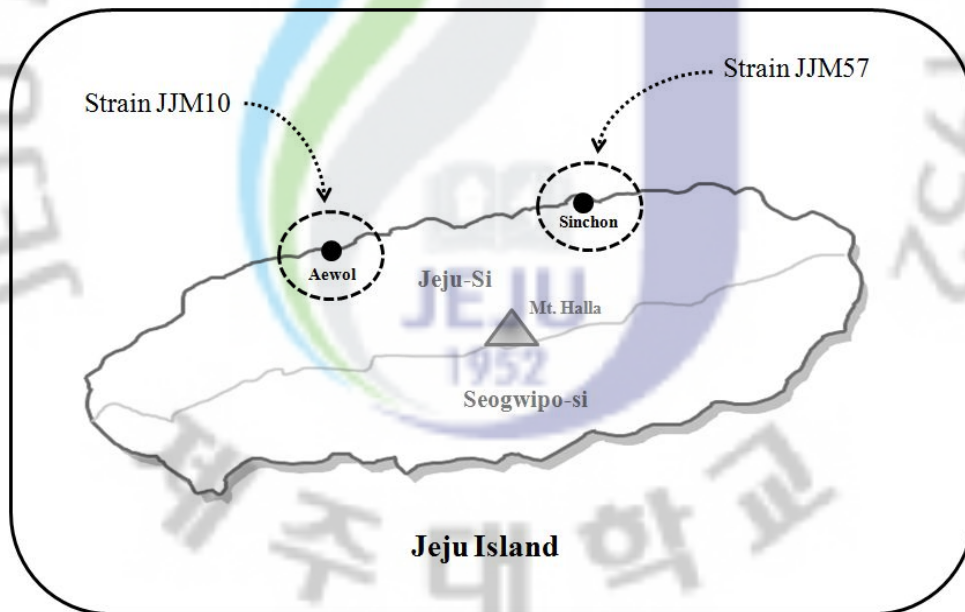


Fig. 8. The map for an organisms collection in Jeju-si, Jeju Island. The dotted circle in the map indicates the sampling site

2.1.1.2. 해양 미생물의 분리 및 보관 (Isolation and Storage)

채집된 동물 및 식물 시료를 homogenizer를 사용하여 분쇄한 후, 시료 1 g을 0.85% 멸균생리식염수를 이용해 희석하여 Marine agar 2216 (MA, Difco, USA)에 도말하여 25℃에서 2일간 배양 후 분리하였다. 분리된 균주 JJM85는 Marine broth 2216 (MB, Difco, USA)에 배양한 후 20% (v/v) glycerol 용액에 현탁하여 -80 ℃에 보관하면서 실험에 이용하였다.

2.1.1.3. 참조균주 (Reference Strain)

분리균주 JJM10은 *Glaciecola* 속의 다음과 같이 발표 되어진 논문을 참고 인용하였다. *Glaciecola punicea*, *Glaciecola pallidula*는 Bowman *et al.*, (1998), *Glaciecola mesophila* (Romanenko *et al.*, 2003), *Glaciecola polaris* (Trappen *et al.*, 2004), *Glaciecola nitratireducens* (Baik *et al.*, 2006), *Glaciecola psychrophila* (Zhang *et al.*, 2006), *Glaciecola chathamensis* (Matsuyama *et al.*, 2006), *Glaciecola agarilytica* (Yong *et al.*, 2007)의 논문을 참고하였으며, 분리균주 JJM57은 *Oceanisphaera* 속의 다음과 같이 발표 되어진 논문을 참고 인용하였다. *Oceanisphaera litoralis* (Romanenko *et al.*, 2003), *Oceanisphaera donghaensis* (Park *et al.*, 2006)에 논문을 참고하였다.

2.1.1.4. Gram staining, Oxidase and Catalase test

Gram staining은 Buck(1982)의 방법으로 염색약을 사용하지 않고 3% KOH 시약을 이용하여 측정하였다. Oxidase 활성은 Bactident-Oxidase test strips (Merck)을 이용하여 측정하였다. Catalase 활성은 3% H₂O₂를 이용하여 측정하였다.

2.1.1.5. 성장 온도 및 pH 실험

실험균주 JJM10^T(AM 983541)와 JJM57^T(AM 983543)의 성장 온도를 확인하기 위해 MA에 균주를 접종한 후 4, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40°C에서 각각 배양되었으며, 균주의 성장을 위한 pH 범위 (4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12)를 확인하기 위해 MB에 접종한 후 배양되었으며, 배양 후 성장 유무를 확인하였다.

2.1.1.6. 염분 실험

실험균주 (JJM10^T, JJM57^T) 성장에 미치는 염분 농도 및 절대 해양성 미생물 인지를 알아보기 위해 염분이 첨가되어 있지 않은 Nutrient agar(NA, BD)(beef extract 3.0 g, peptone 5.0 g, agar 15.0 g)에 NaCl을 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14%를 첨가하여 균주 성장을 조사하였다.

2.1.1.7. API kit을 이용한 생리, 생화학적 특성 조사

분리된 균주 (JJM10^T, JJM57^T)의 biochemical test, assimilation test 그리고 fermentation test를 하기 위해 API 20NE, API 50CH, API ZYM microtest system(bioMerieux)을 이용하여 생리, 생화학적 특성을 조사하였다.

2.1.1.8. Agar, DNA 그리고 Starch 분해 실험

분리된 균주 (JJM10^T, JJM57^T)의 agar, DNA 그리고 starch 분해 실험은 Smibert & Krieg (1994) 방법을 사용하였다.

2.1.1.9. Casein 가수분해 실험

분리된 균주의 casein 가수분해 실험은 Norris *et al.* (1985) 방법을 사용하였다.

2.1.1.10. Cellulose 가수분해 그리고 Flexirubin pigment 생산 실험

분리된 균주의 Cellulose 가수분해 그리고 Flexirubin pigment 생산 실험은 Bowman (2000) 방법을 사용하였다.

2.1.1.11. Chitin, Tweens 20, 40 그리고 80 가수분해 실험

분리된 균주의 Chitin, Tweens 20, 40 그리고 80 가수분해 실험은 Baumann & Baumann (1981) 방법을 사용하였다.

2.2. Scanning Electron Microscopy (SEM)

현재 이용하고 있는 미생물 전 처리법은 대표적으로 고행배지에서의 시료 전 처리법, 액상배지에서의 시료 전 처리법 2가지 방법이 있다. 이 2가지 대표적인 방법은 각각 시료의 손상, 전 처리시간, 시료의 오염 등의 많은 문제를 가지고 있다. 따라서 새로운 실험법 혹은 변형된 실험 기법을 확립하여 기존은 전 처리에 따른 오류를 줄여줌으로 해서 DATA의 신뢰성을 높일 수 있다. 고행배지에서의 전 처리는 고행배지에서 배양된 미생물 균체를 고행배지와 함께 잘라서 전 처리를 하는 방법을 사용하고 액체배지에서의 전 처리법은 원심분리법을 통하여 전 처리하는 방법을 사용한다. 이러한 전 처리법은 많은 문제점을 가지고 있다. 고행배지에서의 전 처리법은 액체배지 상에서 행하는 방법보다는 시료의 손실 없이 적은 양의 시료로도 빠르게 시료를 처리 할 수 있으나, 수분 함량이 많은 한천을 사용함으로 탈수 과정 및 건조과정에서 배지가 극단적으로 위축이 이루어져 전 처리에 많은 에러가 발생한다. 또한 액체배지의 전 처리에서는 각 처리 과정에서 시료의 회수가 용이하지 않아 반드시 원심 분리를 통해서 시료를 회수하여야 함으로 많은 시간과 원심 분리로 인한 cell의 물리적 손상을 피할 수 없을 뿐만 아니라 배지성분 및 미생물의 대사산물로 인한 cell의 오염으로 깨끗한 이미지의 사진을 얻을 수 없다. 기존의 고행배지·액상배지에서의 전 처리법을 보완한 고행 배지의 장점만 이용한 전 처리법의 응용으로 고행 배지에 직접 세균을 증식시키지 않고, 고행 배지위에 filter paper나, Membrane filter(유기용 매에 견딜 수 있는)를 얹어서 필터위에서 증식을 시키거나, 필터페이퍼에 직접 배지를 흡수하게 하여, filter paper 자체를 배지로 사용하여 필터위에 증식된 세균(필터에 부착된 세균)을 취해서 전 처리를 수행하므로 시료의 오염, 탈수과정에서의 시료의 위축, 건조과정에서의 건조불량 및 시료의 비틀림 등을 해소함으로 보다 쉽고, 보다 빠르고, 깨끗한 이미지를 얻으므로 해서 질적으로 우수한 결과물을 얻을 수 있다고 사료되어 이 방법을 이용하였다.

SEM 관찰에 전체적인 순서는 다음과 같다. 시료채취 - 고정 - 탈수 - 임계건조 - 코팅 - 전자현미경 관찰 순이다.

1) 시료 채취(Sampling)는 균주가 배양된 filter를 가능한 한 작게 잘라서 (1×1×0.5cm) 신속히 고정액에 담근다.

2) 고정(Fixation)에는 전 고정과 후 고정이 있는데 전 고정은 2.5% glutaraldehyde (0.1 M phosphate buffer solution)에서 2시간 동안 냉장 온도에서 고정 후 완충액으로 10~20분(shaking 2회) 간격으로 3회 수세한다. 후 고정액: 용기 내에 1 g OsO₄ 앰플을 넣고 깨뜨린 후 증류수 50 ml를 넣어 녹여서 2% stock solution을 제조하여 냉장 보관한다. 사용 시 같은 양의 2% OsO₄ 용액과 완충액을 섞어서 최종 0.05 M phosphate buffer의 1% OsO₄ 용액으로 제조하여 1~2시간(2시간을 절대 초과하지 않음) 동안 냉장온도에서 고정 후 역시 완충액으로 10~20분 간격으로 3회 수세한다.

3) 탈수는 조직의 성질과 크기 등에 따라 다르나 가능한 한 짧은 시간 내에 실시하여야 한다. 그 이유는 탈수시간이 너무 길면 조직으로부터 물질의 유출(extraction)과 조직의 수축증이 일어날 수 있기 때문이다. ethylalcohol -50%, 5~20분, 1~2회, -60%, 5~20분, 1~2회, -70%, 5~20분, 1~2회, -90%, 5~20분, 1~2회, -100%, 5~20분, 3회 탈수 시킨다.

4) 임계점 건조(CPD, Critical Point Drying)는 탈수시킨 filter를 isoamyl acetate에 담근 후, 액체 CO₂로 isoamyl acetate를 날려 건조시킨다.

5) 금박 코팅(Au Coating)은 시료에 조사되는 전자빔은 일부 에너지가 2차전자 및 X-선 등을 방출하는데 사용되고 나머지 대부분의 에너지는 열이나 과잉의 전자 형태로 외부로 대전되어야 하므로 Au coating을 한다.

6) 주사전자 현미경(SEM): Jeol, JSM-6300 (or Hitachi S-2500C)을 사용하여 이미지화 시킨다.

2.3. Fatty acid methyl ester analysis (FAME)

표준균주 및 분리주의 균체를 적정한 배지에 배양한 후, 회수 한 후 다음과 같은 방법으로 분석한다(Fig 11).

1) Saponification

회수한 균체 약 100 mg (wet weight) Teflon-lined screw cap tube (13 x 100mm, pyrex)에 옮긴 후, reagent 1을 1 ml 첨가하여 5-10 초간 vortex 한 후 100 °C에서 5분간 증탕한 다음 다시 vortex(5-10 초) 한 후 100 °C에서 25 분간 증탕 한다.

2) Methylation

1에 reagent 2를 2 ml 첨가한 후 80 °C에서 10분간 증탕 한 후 냉각시킨다.

3) Extraction

2에 reagent 3을 1.25 ml 첨가한 후 10분간 혼합하여 실온에 방치하여 반응액이 2개의 층으로 분리되면 하층액을 제거한다.

4) Base wash

3에 reagent 4를 3 ml 첨가하여 5분간 혼합한다. 그리고 난 후 2000 rpm에서 3분간 원심분리 하여 상층액의 2/3를 GC sample vial tube에 옮긴 후 MIDI 분석 전까지 4 °C에서 보관한다.

Fatty acid methyl ester analysis (FAME)는 Sherlock Microbial Identification System인 HP 5890 II & MIDI(Hewlett-Packard Co., USA)을 사용하여 분석하였다.

© **Reagent 1** : Saponification reagent (NaOH in aqueous methanol)

Sodium hydroxide 45 g

Methanol 150 ml

Deionized distilled water 150 ml

Add NaOH pellets to water and methanol

while stirring. Stir until pellets are dissolved.

© **Reagent 2** : Methylation reagent

(Hydrochloric acid in aqueous methanol)

6 N Hydrochloric acid 325 ml

Methanol 275 ml

Add acid to methanol while stirring.

© **Reagent 3** : Extraction solvent (Hexane / MTBE)

Hexane (HPLC grade) 200 ml

Methyl-tert Butyl Ether (MTBE) 200 ml

Add MTBE to hexane and stir.

© **Reagent 4** : Base wash (Dilute NaOH)

Sodium hydroxide 10.8 g

Deionized distilled water 900 ml

Add pellets to water while stirring.

Stir until pellets are dissolved.

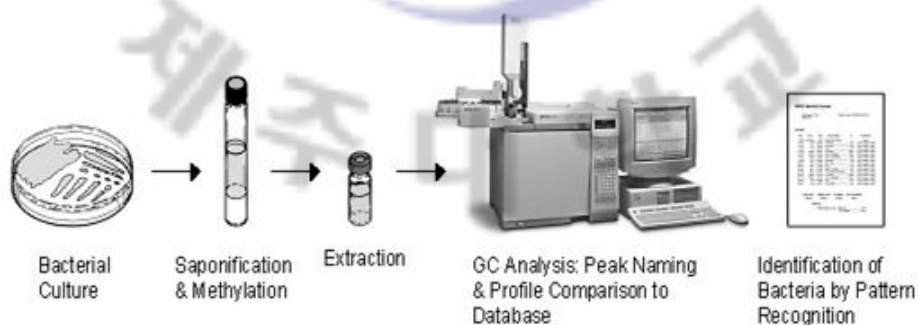


Fig. 9. System for the analysis of cellular fatty acid.

2.4. G+C contents (mol/%)

분리균주 JJM10^T와 JJM57^T의 DNA G+C 함량 측정은 Mesbah *et al.*, (1989) 및 Shin *et al.*, (1996)에 기술되어 있는 HPLC method을 사용하였다. DNA는 adenine(A), cytosine(C), guanine(G), thymine(T)의 4종류의 염기로 구성되어 있고, 그 서열에 의해 유전정보가 기록되어 있다. DNA는 A와 T, G와 C의 수소 결합에 의해 이중 나선을 형성하고 있으므로, A와 T, C와 G는 각각 같은 mole로 존재하게 된다. DNA 염기 조성은 보통 mol % G+C로 표기하며, 미생물의 전체 DNA 염기 조성에서 guanine(G)과 thymine(T)이 차지하는 상대적 비율을 나타낸다. 미생물은 각각 고유의 DNA 염기 조성을 가지고 있으므로 분류학적 특징 중 하나로서 사용되며, 미생물의 속(genus)과 종(species)을 기술하는 최소 요건 중의 하나로 이용되어지고 있다. 보통 세균에서는 DNA 염기 조성이 24~76 mol %의 차이를 보여 준다. 일반적으로 DNA 염기 조성의 G+C 함량의 차이가 5 % 이상이면 다른 종으로, 10 % 이상이면 다른 속으로 간주되어진다 (Mesbah *et al.*, 1989).

실험을 위해 분리균주의 DNA 용액을 Microtube에 취해 14000 rpm에서 5분간 원심분리 한 후, 상등액을 취해서 새 Microtube에 옮긴 후 100°C에서 5분간 DNA를 변성시켰다. 그 후 Cooling과정을 거쳐서 P1 nuclease 10 µl(1 unit/µl)를 넣고 50°C에서 3시간 반응시킨다.

그 후 Alkaline phosphatase(buffer 10 µl, phosphatase 5 µl)를 넣고 37°C에서 overnight 시킨 후, 14000 rpm에서 5분간 원심분리를 거쳐서 HPLC (Young Lin SP9300. Co. LTD. Korea)분석을 실시하였다. Detector (Young Lin. Co. LTD. Korea) 및 Chromatograph data system Autochro-2000(Young Lin. Co. LTD. Korea)를 이용하여 균주의 G+C 함량을 최종적으로 분석하였다. 실험에 사용된 컬럼은 Water Symmetry C18, 용출액은 12% methanol, 유속은 0.5 ml/min, 검출과장은 254 nm의 조건으로 실험을 실시하였다.

2.5. 분리균주의 16S rRNA 염기서열 분석

분리된 미생물의 16S rRNA 분석은 각각 1.5% NaCl이 첨가된 MB(Difco, USA) 배지 5 ml에 접종하여 Shacking incubator를 이용하여 25 °C에서 200 rpm으로 24시간 배양한 배양액을 1.5 ml microcentrifuge tube로 옮겨서 16000 xg에서 1분간 원심분리 하여 상등액을 제거한 후 모아진 bacteria pellet을 수집하여 Wizard® Genomic DNA Purification Kit (Promega, USA)을 사용하여 genomic DNA를 분리 한 후, Unicam UV/VIS Spectrophotometer (Unicam Ltd, United Kingdom)를 사용하여 파장 260 nm에서 DNA농도를 측정하였다. PCR 반응은 bacterial genomic DNA 100 ng, 1 µM에 universal primer pairs (27F forward primer; 5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3', 1492R reverse primer; 5'-GGTTACCTTGTTACGACTT-3'), 10 mM dNTPs, 10 X PCR buffer, 5 Unit Taq polymerase (TAKARA, Japan)) 혼합액에 멸균된 증류수를 첨가하여 최종부피를 50 µl로 맞추고, PTC-150 Minicycler (MJ Research)를 사용하여 증폭하였다. ISR 증폭 과정은 94 °C predenaturation 2분, 94 °C denaturation 45초, 55 °C annealing 45초, 72 °C extension 1분의 반응을 29회 동안 수행하였고, 마지막 72 °C에서 5분간 extension을 실시하였다. 증폭된 PCR 반응 산물은 (주)솔젠트사 (Dajeon, Korea)에 의뢰하여 16S rRNA 염기서열을 분석하였다(Yoon *et al.*, 1998). 분석된 염기서열은 NCBI (National Center for Biotechnology Information)의 염기서열 분석 프로그램인 BLASTN programs 이용하여 분리되어진 미생물을 분석, 동정하였다.

2.6. 16S rRNA 계통 분석

염기서열간의 유사도를 확인하기 위해 BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) search program을 이용하여 NCBI (National Center for Biotechnology Information)의 Genbank와 EMBL Nucleotide Sequence Database에서 유사한 염

기서열을 비교하였다. Clone의 결정된 염기서열과 database에 얻어진 염기서열은 PHYDIT program (ver 3.2; <http://plaza.snu.ac.kr/~iphydit/phydit>)을 이용하여 Clustal W multiple alignment로 정렬하였으며, 염기서열 분석은 CLUSTAL X software (Thompson *et al.*, 1997)을 이용하여 Neighbor-joining(Saitou and Nei, 1987) 방법에 의해 Bootstrap 분석 시 1000회의 resampling을 적용하여 tree topology의 평가 기준으로 사용하여 계통수를 작성하였으며, 염기서열간 유전적 거리는 Jukes & Cantor(Jukes and Cantor, 1969) 모델을 이용하여 계산하였다. 그리고 분리균의 염기서열은 EMBL Nucleotide Sequence Database에 등록하였다.

분리균주(JJM10^T)와 대조균주의 16S rDNA 염기는 다음과 같이 GenBank accession number를 가지고 있다:

JJM10^T (AM983541), *Glaciecola agarilytica* NO2^T (DQ784575), *Glaciecola chathamensis* S18K6^T (AB247623), *Glaciecola mesophila* LMG 21855^T (AJ548479), *Glaciecola polaris* LMG 21854^T (AJ548478), *Glaciecola psychrophila* 170^T (DQ007436), *Glaciecola nitratireducens* KCTC 12276^T (AY787042), *Glaciecola pallidula* LMG 21427^T (U85854), *Glaciecola punicea* ACAM611^T (U85853), *Aestuuriibacter halophilus* DSM 15266^T (AY207503), *Alteromonas marina* SW-47^T (AF529060) 그리고 out group으로 *Colwellia aestuarii* SMK-10^T (DQ055844)를 정하였다.

분리균주 (JJM57^T)와 대조균주의 16S rDNA 염기는 다음과 같이 GenBank accession number를 가지고 있다:

JJM57^T (AM983543), *Oceanimonas baumannii* ATCC 700832^T (AF168367), *Oceanimonas smirnovii* 31-13^T (AY538714), *Oceanimonas doudoroffii* DSM 7028^T (AB019390), *Oceanimonas denitrificans* F13-1^T (DQ097665), *Oceanisphaera litoralis* DSM 15406^T (AJ550470), *Oceanisphaera donghaensis* BL1^T (DQ190441), *Aeromonas schubertii* ATCC 43700^T (X74682), *Aeromonas salmonicida* ATCC 33658^T (X74681), *Tolumonas auensis* DSM 9187^T (X92889) 그리고 out group으로 *Vibrio alginolyticus* ATCC 17749^T (X56576).

3. 결과 및 고찰

3.1. 분리균주 JJM10^T와 JJM57^T의 표현형적 특성 분석

분리균주 JJM10^T의 표현형적 특성을 참고균주인 *Glaciecola punicea*, *Glaciecola pallidula* (Bowman *et al.*, 1998), *Glaciecola mesophila* (Romanenko *et al.*, 2003), *Glaciecola polaris* (Trappen *et al.*, 2004), *Glaciecola nitratireducens* (Baik *et al.*, 2006), *Glaciecola psychrophila* (Zhang *et al.*, 2006), *Glaciecola chathamensis* (Matsuyama *et al.*, 2006) 그리고 *Glaciecola agarilytica* (Yong *et al.*, 2007)와 비교 분석한 결과 다음과 같이 나타났다 (Table 2).

분리균주 JJM10^T은 해양생물인 *Siphonaria sirius*의 외피조직에서 분리되어졌으며, 그람 음성, aerobic, psychrophilic, 색소생산 및 성장에 있어서 해수를 필요로 하는 특성을 갖고 있는 것으로 나타났다. 또한 MA배지에서 자라는 colony 형태는 circular형을 나타내며 노란색을 나타낸다. 성장 온도는 4~37°C 범위에서 자랐으며, 40°C에서는 성장을 하지 않았다. 또한 pH 범위는 5.0~11.0에서 성장을 하였으며, pH 7.0~7.5에서 최적으로 성장하였다. 염분농도 실험에서는 1~10%까지 광범위한 농도에서 성장하였고 최적 범위는 2~5%이며, NaCl 농도 12% 이상에서는 성장하지 않았으며, 이러한 결과로 보았을 때 분리균주 JJM10^T은 절대 호염성 세균인 것으로 확인되었다.

Catalase와 oxidase 테스트 결과 양성으로 나타났으며, nitrate reduction에서는 참고균주와는 다른 양상인 양성인 결과가 확인되어졌다. 그리고 Glucose fermentation에서 음성, Sucrose에서는 양성을 나타내었으며, N-Acetylglucosamine, Citrate, Maltose 이용능에서는 음성, D-Mannitol, D-Mannose, Arabinose에서는 양성을 나타냈다.

Gelatin 및 Aesculin을 가수분해 하였으며, Urea는 음성을 나타내었다. 또한 Cychrome oxidase를 생산하였으며, Ornithine decarboxylase, Lysine decarboxylase, Urease 및 H₂S를 생산하지 않는 것으로 확인되었다. 당 발효실험에서는

Inositol, Sorbitol, Rhamnose, Melibiose 및 Amygdalin에서 양성으로 나타났다. Alkaline phosphatase, Esterase (C4), Esterase lipase (C8), Leucine arylamidase, Valine arylamidase, Cystine arylamidase, α -chymotrypsin, Acid phosphatase, Naphthol-AS-BI-phosphohydrolase, Trypsin, α -glucosidase와 N-acetyl- β -glucosaminidase에서는 양성반응이 나타났지만, Lipase (C14), β -glucuronidase, β -glucosidase, α -mannosidase 및 α -fucosidase에서는 음성으로 확인되었다.

hydrogen sulfide production, arginine dihydrolase, indole production 그리고 VogesProskauer 반응에서는 음성을 나타냈다. Nutrient agar와 trypticase soy agar에서는 성장을 하지 않았다. Aesculin을 가수분해 하였고 Agar, DNA, Starch, Tween 80, tyrosine과 urea 분해 실험에서는 음성 반응을 보였다. API ZYM strips으로 분석한 효소 이용실험에서는 alkaline phosphatase, leucine arylamidase, trypsin에 대해서는 강한 활성을 나타내었으며 esterase (C4), esterase lipase (C8), lipase (C14), valine arylamidase, cystine arylamidase, acid phosphatase, α -chymotrypsin, naphthol-AS-BI-phosphohydrolase, β -galactosidase 그리고 N-acetyl- β -glucosaminidase 반응에서는 약한 활성을 나타내었다. 그러나 α -galactosidase, β -glucuronidase, α -glucosidase, β -glucosidase, α -mannosidase 그리고 α -fucosidase 음성 반응을 나타내었다.

Table 2. Characteristics differentiating strain JJM10^T from nine recognized species of the genus *Glaciecola*.

Taxa: 1, Strain JJM10^T; 2, *Glaciecola punicea*; 3, *Glaciecola pallidula*; 4, *Glaciecola mesophila*; 5, *Glaciecola polaris*; 6, *Glaciecola nitratireducens*; 7, *Glaciecola psychrophila*; 8, *Glaciecola chathamensis*; 9, *Glaciecola agarilytica*.

Data taken from Bowman *et al.* (1998), Romanenko *et al.* (2003), Trappen *et al.* (2004), Baik *et al.* (2006), Zhang *et al.* (2006), Matsuyama *et al.* (2006), Yong *et al.* (2007) and this study. +, Positive –, negative W, weakly; ND, not determined, Y, yellow; P-r, Pink-red; P-p, pale pink; V, variable reaction depending on strain. All strains were Gram-negative. All strains were positive for the following tests: motility, sodium ion requirement for growth, oxidase, catalase, growth at 4~15°C. All strains were negative for growth at 40°C, indole reaction, chitin hydrolase.

Characteristic	1	2	3	4	5	6	7	8	9
Motility	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Colony colour	Y	P-r	P-p	-	-	-	-	-	-
Temperature range for growth (°C)	4-37	0-25	0-20	7-35	5-30	15-30	4-15	4-30	7-30
Nitrate reduction	+	-	-	-	-	+	-	-	-
Hydrolysis of:									
Urea	-	-	-	-	-	-	-	-	ND
Gelatin	+	-	-	-	-	+	-	-	ND
Aesculin	+	+	-	W	+	-	-	+	+
β-Galactosidase	-	+	+	+	+	-	+	+	-
Acid from									
D-Glucose	-	W	W	W	-	-	-	+	-
Sucrose	+	-	-	W	-	-	-	+	-
Utilization of:									
N-Acetylglucosamine	-	-	-	-	-	+	-	-	ND
Citrate	-	-	-	+	-	-	-	-	-
Maltose	-	-	-	+	+	+	+	+	-
D-Mannitol	+	-	-	+	+	-	-	+	+
D-Mannose	+	-	-	W	+	+	-	+	W
Arabinose	+	-	-	+	-	+	-	-	-
DNA G+C content (mol%)	49.81	44-46	40	44.8	44	44	42.9	44.8	45

+; positive reaction, -; negative reaction, W; weak reaction, ND; not detection, V; variation reaction

분리균주 JJM57^T의 표현형적 특성을 참고균주인 *Oceanisphaera litoralis* (Romanenko *et al.*, 2003)와 *Oceanisphaera donghaensis* (Park *et al.*, 2006) 비교 분석한 결과 다음과 같이 나타났다 (Table 3).

분리균주 JJM57^T은 제주시 애월읍 해안도로에 인접한 조간대 해양식물인 *Laurencia* sp.로부터 분리되어졌으며, Gram negative, aerobic, moderately halophilic, 운동성이 있는 특성을 갖고 있는 것으로 나타났다.

또한 MA배지에서 자라는 colony 형태는 circular형을 나타내며 규칙적인 가장자리의 모양을 하고 있다. 성장 온도는 4~37 °C의 범위를 갖고 있으며, 균주의 생육을 위한 Na⁺를 필요로 하는 절대 호염성세균으로 확인되었으며, 1.0~11%까지 성장이 가능한 것으로 나타났다. Catalase와 oxidase 테스트 결과 양성, Malate 및 Citrate를 이용해서 산을 생성하는 것으로 확인되었으며, Arginine, dihydrolase, Gelatin 반응에서는 음성으로 나타났다.

또한 Galactose, Glucose, Arabonose, Mannose, N-acetylglucosamine, Maltose, Gluconate, Adipate 및 Sucrose로부터 산 생성 반응에서는 음성으로 확인되었다.

분리균주의 API ZYM strips kit을 이용하여 효소활성 실험 결과 Alkaline phosphatase, Esterase (C4), Esterase lipase (C8), Leucine arylamidase, Cystine arylamidase, α-chymotrypsin, Acid phosphatase, Naphthol-AS-BI-phosphohydrolase, Trypsin 및 N-acetyl-β-glucosaminidase에서 양성반응을 보였으며, Lipase (C14), Valine arylamidase, α-chymotrypsin, β-glucuronidase, α-glucosidase, β-glucosidase, α-mannosidase 및 α-fucosidase에서는 음성반응을 보였다.

분리균주 JJM57^T와 참고균주인 *Oceanisphaera litoralis* 및 *Oceanisphaera donghaensis* 표현형적 특성을 비교해보았을 때 공통적으로 4~35°C 범위에서 모두 성장하며, 성장을 위해 높은 농도의 Na⁺를 필요로 하는 것으로 확인되었으며, Nitrate reduction, Malate 및 Citrate 이용능에서 양성반응을 보였다.

또한 Arginine dihydrolase, Gelatin, Caprate, Glucose, mannose, N-acetylglucosamine, Maltose, Gluconate, Adipate, L-leucine 반응에서는 음성으로 나타났다.

Table 3. Characteristics differentiating strain JJM57^T from tree recognized species of the genus *Oceanisphaera*.

Taxa: 1, Strain JJM57^T; 2, *Oceanisphaera litoralis*; 3, *Oceanisphaera donghaensis*. Data taken from Romanenko et al. (2003), Park et al. (2006) and this study. Symbols: +, Positive –, negative W, weak or delayed, All strains grow at 4–35°C and are coccoid bacteria. All strains are positive for oxidase, catalase, Na⁺ growth requirement, nitrate reduction, and malate and citrate utilization. All strains are negative for arginine dihydrolase, gelatin and utilization of caprate, glucose, mannose, *N*-acetylglucosamine, maltose, gluconate, adipate, L-leucine.

Characteristic	1	2	3
Cell morphology	Coccoid	Coccoid	Coccoid
Cell size (µm)	6.0	1.0-1.2	0.5-1.5
Motility	+	+	+
Colony colour	Yellowish	Yellow	Yellow
Temperature range for growth (°C)	4-37	4-42	4-42
NaCl range for growth (%)	1.0-11	0.5-10	0.5-8.0
Hydrolysis of:			
Urease*	-	+	-
Aesculin	+	-	-
Tween 80	+	W	W
Production of acid from			
Citrate*	+	+	+
Malate*	+	+	W
Utilization of:			
Phenylacetate*	-	+	-
L-Glutamate	+	W	+
L-Proline	+	-	+
L-Alanine	+	-	+
Ethanol	+	-	+
Phenol**	W	W	-
DNA G+C content (mol%)	61.94	56.4	56.6

* Determined by API 20NE tests (this study and Romanenko *et al.*, 2003; Park *et al.*, 2006). ** Phenol concentration 4 mM.

3.2. Scanning Electron Microscopy (SEM)

분리균주 JJM10^T 및 JJM57^T의 형태학적 특성을 관찰하기 위해 MA배지에서 25 °C 조건으로 이틀 동안 배양한 후, SEM을 통해 관찰하였다.

균주 JJM10^T는 간균의 형태를 보였으며 길이는 1.55~1.8 μm, 폭은 0.6~0.7 μm로 나타났다(Fig. 12). 이러한 결과는 기존의 보고된 *Glaciecola punicea*, *Glaciecola mesophila*, 및 *Glaciecola pallidula*의 Cell size 인 폭 0.5~0.6 길이 1.0~1.5와 큰 차이는 없는 것으로 나타났다.

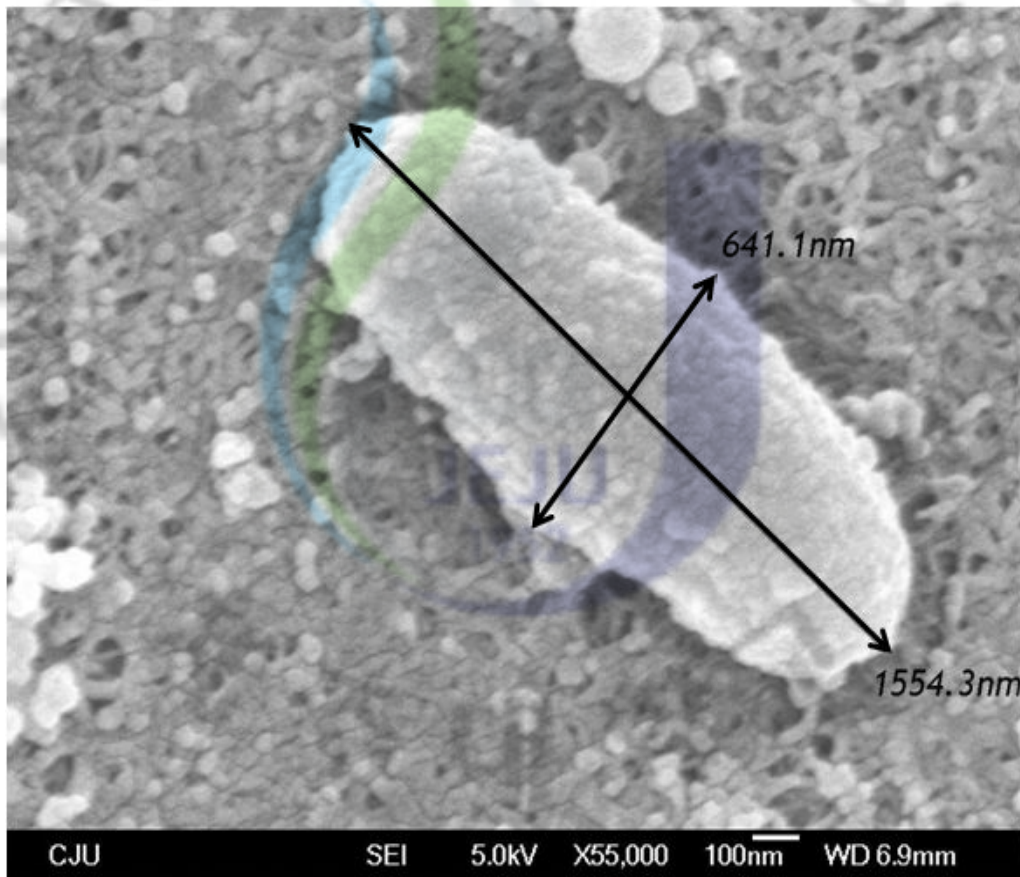


Fig. 10. Scanning electron micrograph of cell of strain JJM10^T; bar, 100 nm

균주 JJM57^T은 거의 공모양에 가까운 구균 형태를 보였으며, 특이하게도 세포 사이즈가 매우 큰 형태를 보였다. 기존의 보고된 *Oceanisphaera litoralis* (Romanenko *et al.*, 2003) 및 *Oceanisphaera donghaensis* (Park *et al.*, 2006) 의 균주 형태를 보면 구균의 1~1.5 μm 정도의 사이즈를 갖고 있는 반면 균주 JJM10^T은 폭과 길이가 거의 같은 구균 형태로 6 μm 정도의 Cell size를 갖고 있었다.(Fig. 13).

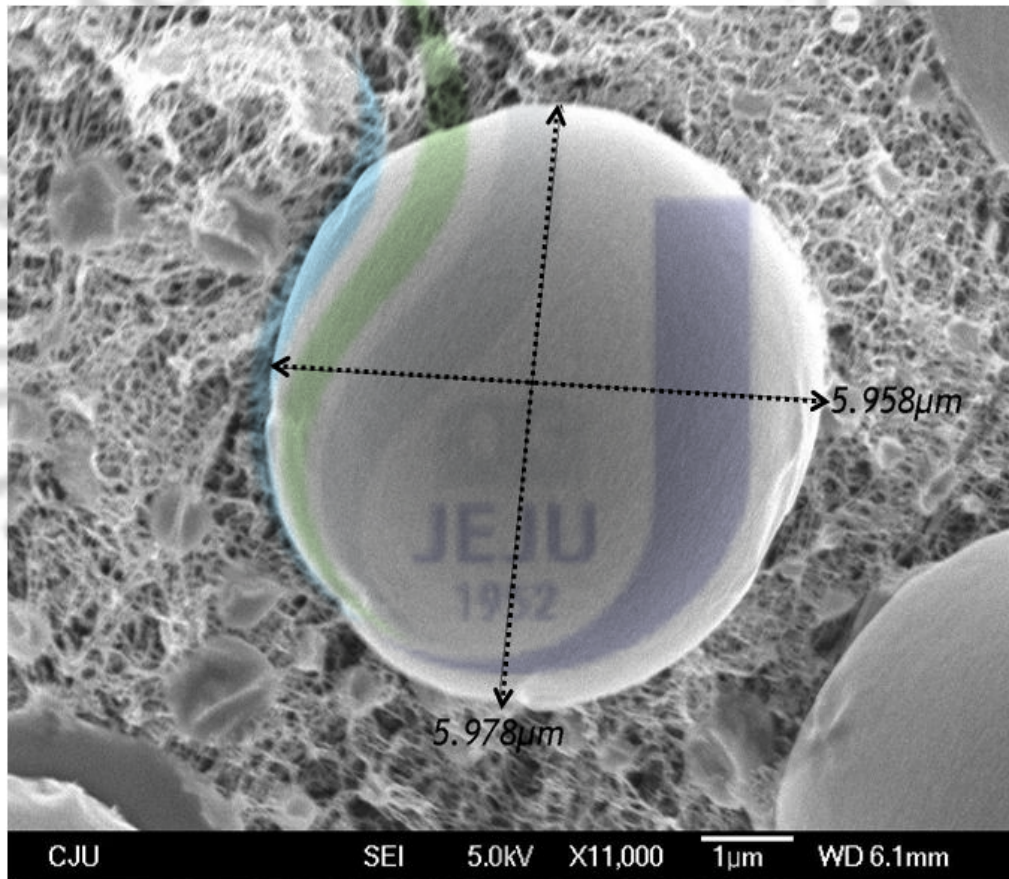


Fig. 11. Scanning electron micrograph of cell of strain JJM57^T; bar, 1 μm .

3.3. Fatty acid methyl ester analysis

분리균주 JJM10^T를 비롯한 대상균주들의 세포 지방산 분석(Fig. 14) 결과는 Table. 4에 나타내었다. 균주 JJM10^T과 참고균주인 *Glaciecola* 종(Species)들의 주요 지방산 특징을 살펴보면 palmitic acid (C_{16:0}), cis-vaccenic acid (C_{18:1} ω7c), Summed feature 3 (C_{15:0} iso 2-OH, C_{17:0} iso 3-OH and/or C_{16:1} ω7c)이 전체 지방산 중 80%에 가까운 함량을 보였다. 또한 *Glaciecola* 종들은 palmitic acid (C_{16:0}) 함량이 9.4~33%까지의 범위에서 광범위하게 존재하는 것으로 나타났다으며, cis-vaccenic acid (C_{18:1} ω7c)의 함량은 5.2~16.3%, Summed feature 3 (C_{15:0} iso 2-OH, C_{17:0} iso 3-OH and/or C_{16:1} ω7c)함량은 가장 높은 비율로 33.58~60.7%로 나타났다. 그리고 분리균주 JJM10^T은 특이하게도 다른 참고균주들에게는 없는 Summed feature 2 (C_{12:0} aldehyde, C_{16:1} iso I, C_{14:0} 3-OH and/or unknown 10.928)를 5.59%를 가지고 있었다. 최종적으로 분리 균주 JJM10^T와 가장 유사한 세포지방산 특성을 보이는 균주는 *Glaciecola nitratireducens*로 확인이 되었다.

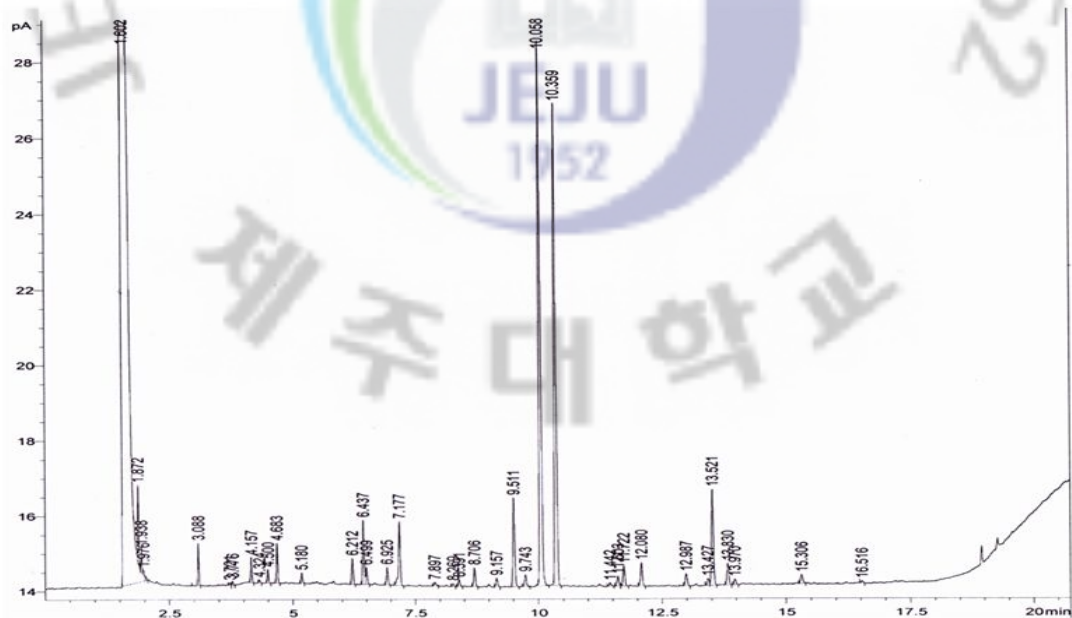


Fig. 12. Fatty Acid Methyl Ether (FAME) profile of JJM10^T

Table 4. Fatty acid compositions of strain JJM10^T and type strains of recognized strain *Glaciecola* species.

Taxa: 1, Strain JJM10^T 2, *Glaciecola punicea*; 3, *Glaciecola pallidula*; 4, *Glaciecola mesophila*; 5, *Glaciecola polaris*; 6, *Glaciecola nitratireducens*; 7, *Glaciecola psychrophila*; 8, *Glaciecola chathamensis*

Fatty acid	1	2	3	4	5	6	7	8
Saturated fatty acids:								
C10:0	1.67							
C12:0	1.86	ND	ND	2.6	3.1	1.6		4.6
C14:0	4.03	1.2	3.6	1.2	4.1	7.0	5.4	2.0
C15:0	1.11	1.0	1.6	tr	2.0	1.0		2.8
C16:0	29.44	10.0	9.4	33.0	23.3	20.5	13.5	27.2
C17:0	1.51	tr	1.3	2.1	ND	1.5		4.1
C18:0	1.42	tr	tr	1.9	ND	1.9		1.2
Branched fatty acids:								
Iso-C16:0	0.75	1.8	2.5	2.3	ND	1.0		
Anteiso-C17:0	0.62	ND	ND	2.0	ND	tr		
Unsaturated fatty acids:								
C14:1w7c		tr	3.7	tr	ND	ND		
C15:1w87		tr	3.4	tr	ND	tr		
C16:1w5c								9.5
C16:1w7c		ND	ND	ND	ND	ND	38.3	22.7
C17:1w6c								1.6
C17:1w8c	1.27	4.6	5.0	3.2	2.6	2.6	2.7	8.3
C18:1w5c								1.6
C18:1w7c	6.24	16.3	12.6	5.2	4.8	7.6	6.2	14.6
C18:1w9c		tr	tr	tr	ND	tr		
Hydroxy fatty acids:								
C10:0 3-OH	1.15							
C11:0 3-OH	0.53							
C12:0 3-OH	3.42	ND	ND	tr	5.5	2.8		
C12:1 3-OH	1.39						6.4	
C16:0 2-OH		ND	ND	ND	1.7	ND		
C16:1 2-OH		ND	ND	ND	2.0	ND		
Methyl fatty acids:								
C18:0 10-methy		ND	ND	ND	1.4	ND		
C18:1w7c 11-methyl		ND	ND	ND	ND	1.4		
Summed feature 2*	5.59							
Summed feature 3*	33.58	60.7	54.2	43.0	41.7	38.2		
Unknown fatty acid 11.799(ECL)		ND	ND	ND	ND	4.2	ND	

*Summed features consist of one or more that could not be separated by the Microbial Identification System. Summed feature 2: C_{12:0} aldehyde, C_{16:1} iso I, C_{14:0} 3-OH and/or unknown 10.928. Summed feature 3: C_{15:0} iso 2-OH, C_{17:0} iso 3-OH and/or C_{16:1} ω7c.

JJM57^T를 비롯한 대상균주들의 세포 지방산 분석(Fig. 15) 결과는 Table. 5에 나타내었다.

균주 JJM57^T과 참고균주인 *Oceanisphaera* 종(Species)들의 주요 지방산 특징을 살펴보면 lauric acid(C_{12:0}), palmitic acid (C_{16:0}), cis-vaccenic acid (C_{18:1} ω7c), Summed feature 2 (C_{16:1} iso I and/or C_{14:0} 3-OH), Summed feature 3 (C_{15:0} iso 2-OH, C_{17:0} iso 3-OH and/or C_{16:1} ω7c)이 전체 지방산 중 90% 이상의 함량을 보였다. 모든 균주에서 공통적으로 Summed feature 3 (C_{15:0} iso 2-OH, C_{17:0} iso 3-OH and/or C_{16:1} ω7c) 함량이 45% 이상으로 가장 높은 비율을 보이는 것으로 확인되었다.

Oceanisphaera 종들은 공통적으로 lauric acid 함량이 6~10%, palmitic acid 함량이 15.92~22.47%, cis-vaccenic acid 함량이 14.01~18.66%, Summed feature 2 함량이 5.13~8.23%, Summed feature 3 함량이 41.03~46.20%의 특성을 보였다.

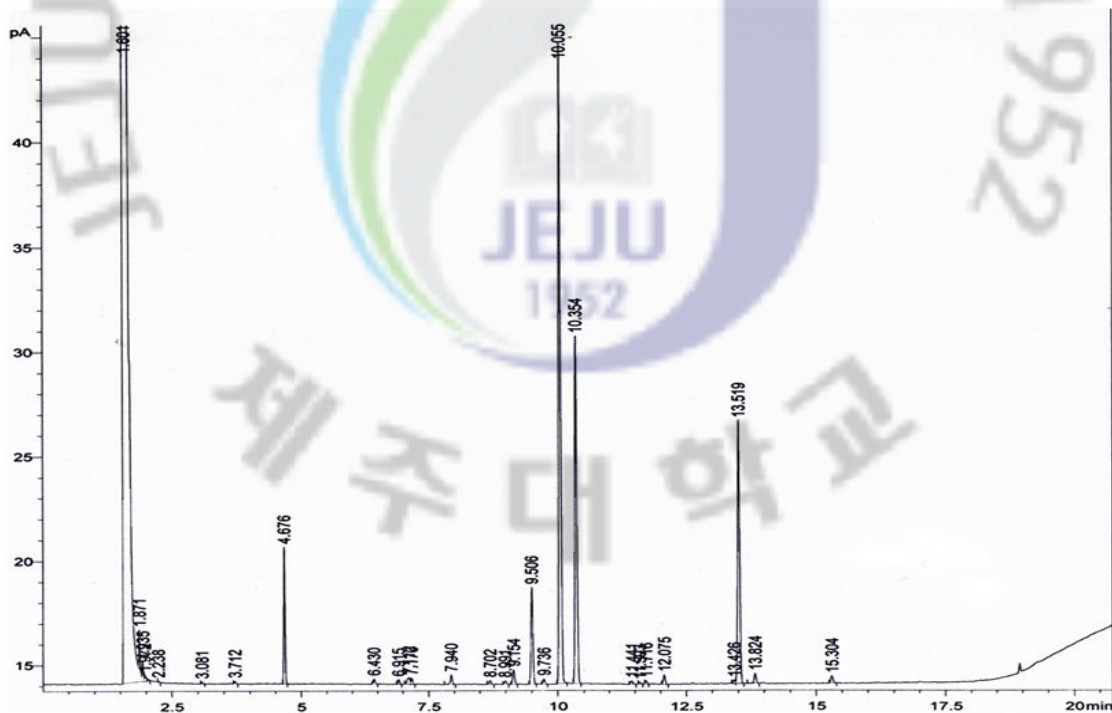


Fig. 13. Fatty Acid Methyl Ether (FAME) profile of JJM57¹

Table 5. Fatty acid compositions of strain JJM57^T and type strains of recognized strain *Oceanisphaera* species.

Texa: 1, Strain JJM57^T; 2, *Oceanisphaera litoralis*; 3, *Oceanisphaera donghaensis*.
Data taken from Romanenko *et al.* (2003), Park *et al.* (2006) and this study
Fatty acids representing less than 0.3 % in all strains were omitted. ND, Not detected; ECL, equivalent chain-length.

Fatty acid	1	2	3
Saturated fatty acids:			
C12:0	6.75	10.31	6.09
C14:0	0.35	1.00	0.30
C15:0		0.46	1.01
C16:0	22.47	16.45	15.92
C17:0	0.67	0.30	0.53
C18:0	0.71	ND	0.31
Branched fatty acids:			
Iso-C16:0	0.34	0.65	1.85
Iso-C17:0		ND	0.36
Unsaturated fatty acids:			
C17:1 ω 8c		0.39	0.68
C18:1 ω 7c	17.79	14.01	18.68
Summed feature 2*	6.40	8.23	5.13
Summed feature 3*	41.03	45.08	46.20
Summed feature 7*	0.52	ND	0.68
Unknown fatty acid 13.957(ECL)	0.63	ND	ND
Unknown fatty acid 14.502(ECL)	0.70	0.64	0.62

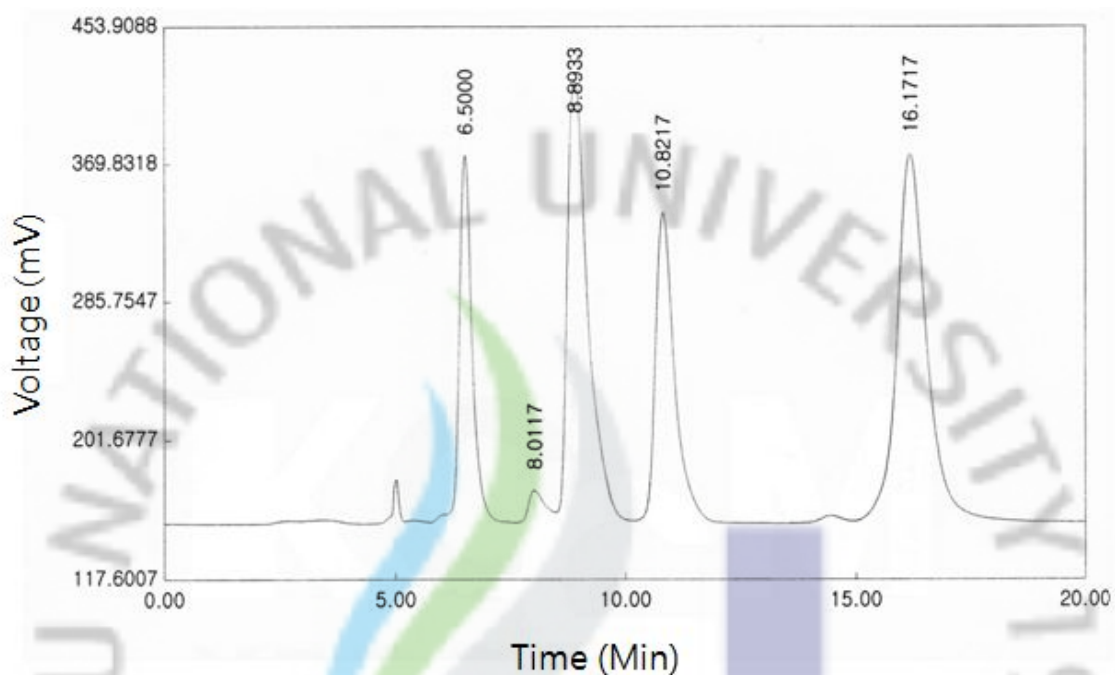
*Summed features consist of one or more that could not be separated by the Microbial Identification System. Summed feature 2: C_{12:0} aldehyde, C_{16:1} iso I, C_{14:0} 3-OH and/or unknown 10.928. Summed feature 3: C_{15:0} iso 2-OH, C_{17:0} iso 3-OH and/or C_{16:1} ω 7c. Summed feature 7: C_{19:1} ω 6c and/or unknown 18.846.

3.4. G+C contents (mol%)

JJM10^T과 균주들의 G+C 함량을 조사한 결과 JJM10^T은 49.81 (48~51) mol% (Fig. 16)로 나타났다. 이는 비교 균주인 *Glaciecola punicea* (44~46 mol%), *Glaciecola pallidula* (40 mol%), *Glaciecola mesophila* (44.8 mol%), *Glaciecola polaris* (44 mol%), *Glaciecola nitratireducens* (44 mol%), *Glaciecola psychrophila* (42.9 mol%), *Glaciecola chathamensis* (44.8 mol%), *Glaciecola agarilytica* (45 mol%)보다도 높은 값으로 나타났다. 이러한 결과를 바탕으로 비교균주 중에 G+C 함량이 제일 높은 균주인 *Glaciecola agarilytica* (45 mol%) 보다도 약 5 mol% 정도가 차이가 있는 것으로 보아 기존의 보고된 종(Species)들과는 다른 종 (Species)일 확률이 높아졌으며, *Glaciecola* 종들은 40~50 정도의 범위의 DNA base composition 양을 보이는 것으로 유추할 수 있다.

JJM57^T과 균주들의 G+C 함량을 조사한 결과 JJM57^T은 61.94 (61~62) mol% (Fig. 16)로 나타났다. 이는 비교 균주인 *Oceanisphaera litoralis* (56 mol%), *Oceanisphaera donghaensis* (56.6 mol%) 보다도 높은 G+C 함량을 보였다. 이러한 결과는 비교균주보다 약 5 mol% 정도가 차이가 있는 것으로 보아 기존의 보고된 종(Species)들과는 다른 종 (Species)일 확률이 높아졌으며, *Oceanisphaera* 종들은 다른 종의 균주들보다도 높은 G+C 함량을 가졌으며, 56~60 정도의 범위의 DNA base composition 양을 보이는 것을 확인 할 수 있었다.

Analysis: HPLC
 Injection Volume: 10

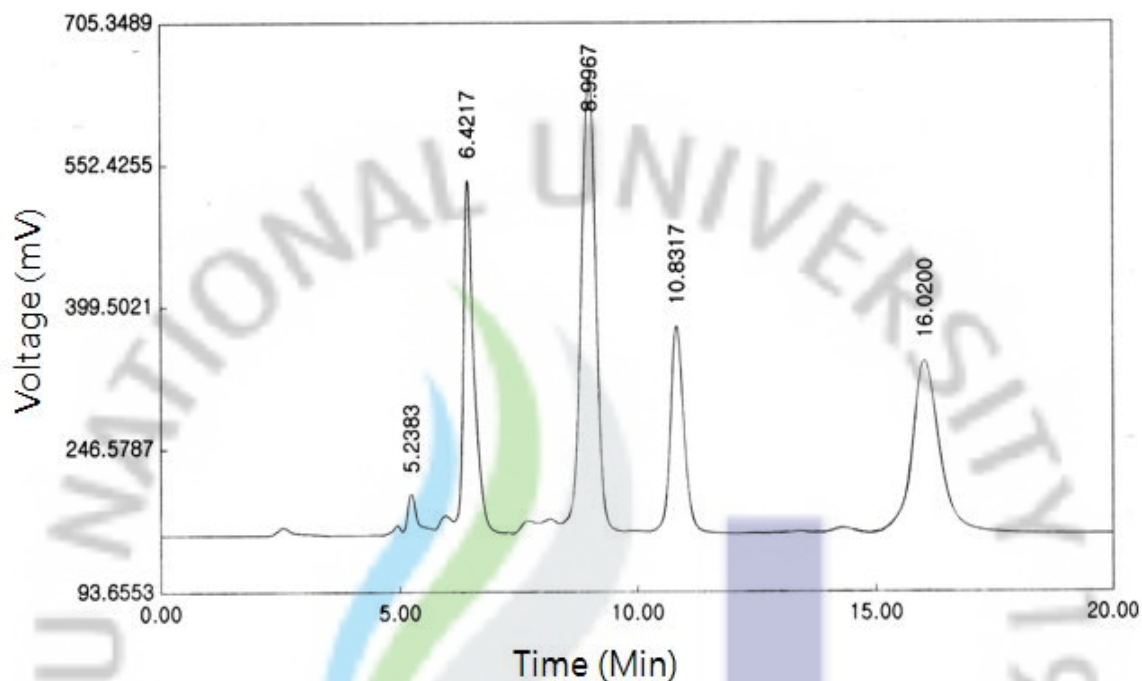


Detector 1-254 nm

Number	RT(Min)	Area(mV*s)	Form	Width(s)	Area(%)
1	6.3983	4320.22	BB	64.8000	14.7391
2	7.8583	539.38	BB	50.0000	1.8402
3	8.7717	9041.46	VB	79.9000	30.8464
4	10.7133	5655.46	BB	88.7000	19.2945
5	15.9033	9754.71	BB	158.9000	33.2798
Total		29311.23			100

Fig. 14. HPLC chromatogram of 4 type of nucleosides from genome of strain JJM10^T.

Analysis: HPLC
 Injection Volume: 10



Detector 1-254 nm

Number	Retention Time (Min)	Area (mV*s)	Form	Width(s)	Area(%)
1	5.2383	628.09	BB	40.8000	2.1747
2	6.4217	5923.22	VB	63.5000	20.5089
3	8.9967	10565.90	BB	77.7000	36.5839
4	10.8317	4351.76	BB	80.5000	15.0678
5	16.0200	7412.28	BB	148.5000	25.6647
Total		28881.25			100

Fig. 15. HPLC chromatogram of 4 type of nucleosides from genome of strain JJM57^T.

3.5. 16S rDNA 염기서열 및 계통 분석

Type strain JJM10^T의 16S rRNA 염기서열(1413 bp)은 Table 5에 나타내었다. 염기서열은 EMBL Nucleotide Sequence Database에 등록하여 accession number를 부여 받았다. 균주 JJM10^T의 accession number는 AM983541이다.

Table 6. 16S rRNA gene sequence of *Glacielola siphonariae* JJM10^T. The EMBL Nucleotide Sequence Database accession number for the 16S rRNA gene sequence of strain JJM10^T is AM983541.

```
CACATGCAAGTCGAACGGAAACATGTCTAGCTTGCTAGATGATGTTCGAGTGGCGG
ACGGGTGAGTAATGCCTGGGAATTTGCCTTTGCGAGGGGGATAACCATTGGAAAC
GATGGCTAATACCGCATAATACCTACGGGTCAAAGGGGGGACTAGTTCCTCCCGCG
TGAAGAGAAGCCCAGGTGAGATTAGCTAGTTGGTGGGGTAAAGGCTCACCAAGGC
GACGATCTCTAGCTGTTCTGAGAGGAAGATCAGCCACACTGGAAGTGGAGACACGG
TCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGCACAATGGGGGAACCTGT
ATGCAGCCATGCCGCGTGTGTGAAGAAGGCCTTCGGGTTGTAAAGCACTTTCAGT
TGTGAGGAAAGGTGCGTAGTTAATACCTGCGCACTGTGACGTTAGCAACAGAAGA
AGCACCGGCTAACTCCGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGGAGGGTGCAAGCGTTAA
TCGGAATTACTGGGCGTAAAGCGCACGCAGGCGGTTTGTAAAGCTAGATGTGAAA
GCCCCGCGCTCAACGTGGGATGGTCATTTAGAAGTGGCAGACTAGAGTTTTGGAG
AGGGGAGTGGAATTCCAGGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGATATCTGGAGGAACAT
CAGTGGCGAAGGCGACTCTCTGGCCAAAGACTGACGCTCATGTGCGAAAGTGTGGG
TAGCGAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACACCGTAAACGCTGTCTACTAGC
TGTTTGTGGATATAATCCGTGAGTAGCGAAGCTAACGCGCTAAGTAGACCGCCTG
GGGAGTACGGCCGAAGGTTAAACTCAAATGAATTGACGGGGGCCCGCACAAGCG
GTGGAGCATGTGGTTTAATTCGATGCAACGCGAAGAACCTTACCTACTCTTGACA
TACTGAGAAGTCTAGCAGAGATGCTTTGGTGCCTTCGGGAGCTCAGATACAGGTGC
TGATGGCTGTCGTCAGCTCGTGTCGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGC
GCAACCCTTGTCCTTAGTTACCAGCATTAAAGTTGGGTACTTTAAGGAGACTGCCG
GTGACAAACCGGAGGAAGGTGGGGACGACGTCAAGTCATCATGGCCCTTACGAGT
AGGGCTACACACGTGCTACAATGGTAAGTACAGAGGGAAGCGAACTTGTGAGAGT
AAGCGGACCCCTTAAAGCTTATCGTAGTCCGGATTGGAGTCTGCAACTCGACTCCA
TGAAGTCGGAATCGCTAGTAATCGCAGGTCAGCATACTGCGGTGAATACGTTCCC
GGGCCTTGTTACACACCGCCCGTACACCATGGGAGTGGGATGCAAAAAGAAGTAGCT
AGTCTAACCTTTAGGAGGACGGTTACCACT
```

Type strain JJM57^T의 16S rRNA 염기서열(1323 bp)은 Table 6에 나타내었다. 염기서열은 EMBL Nucleotide Sequence Database에 등록하여 accession number를 부여 받았다. 균주 JJM57^T의 accession number는 AM983543이다.

Table 7. 16S rRNA gene sequence of *Oceanisphaera laurenciae* JJM57^T. The EMBL Nucleotide Sequence Database accession number for the 16S rRNA gene sequence of strain JJM57^T is AM983543.

```

TAACACATGCAAGTCGAGCGGTAACACAAGGGAGCTTGCTCCTGAGGTGACGAGCG
GCGGACGGGTGAGTAAGGCTTGGGTATCTGCCAGTCGAGGGGATAACCATTGG
AAACGATGGCTAATACCGCATAACGCCCTACGGGGAAAGCAGGGGACCTTCGGGCC
TTGCGCGATTGGATGAGCCCAAGTGAGATTAGCTAGTTGGTGAGGTAATGGCTCA
CCAAGGCGACGATCTCTAGCTGGTCTGAGAGGATGACCAGCCACACTGGGACTGAG
ACACGGCCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGCACAATGGGGGAA
ACCCTGATGCAGCCATGCCGCGTGTGTGAAGAAGGCCTTCGGGTTGTAAAGCACTT
TCAGTGGTGAGGAAAGGTGAACGGCGAATACCCGTTTACTGTGACGTTAACCACA
GAAGAAGCACCGGCTAACTCCGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGGAGGGTGCAAGC
GTTAATCGGAATGACTGGGCGTAAAGCGCACGCAGGCGGTTTGTTAAGCCAGATG
TGAAAGCCCCGAGCTCAACTCGGGAAGTGCATTTGGAAGTGGCAAAGTACAGTCT
TGTAGAGGGGGGTAGAAATTTCCAGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGATTGGAAGG
AATACCAGTGCGAAGGCGGCCCCCTGGACAAAGACTGACGCTCAGGTGCGAAAGC
GTGGGGAGCAAACAGGATTAGATACCCGGTAGTCCACGCTGTAAACGATGTCAA
CTTGGAGTCTGTGCCTTAGAGCGTGGGTTCCGGAGCTAACGCATTAAGTTGACCGC
CTGGGGAGTACGGCCGCAAGGTTAAAAGTCAAATGAATTGACGGGGGCCCGCACAA
GCGGTGGAGCATGTGGTTTAAATTCGATGCAACGCGAAGAACCTTACCTACCCTTG
ACATACAGCGAACTTGGCAGAGATGCCTTGGTGCCTTCGGGAACGCTGATACAGG
TGCTGCATGGCTGTCGTCAGCTCGTGTGTCGAGATGTTGGGTTAAGTCCCAGCAACG
AGCGCAACCCTTATCCTTTGTTGCCAGCGATTCCGGTCGGGAAGTCAAAGGAGACTG
CCGGTGATAAACCAGGAGGAAGGTGGGGACGACGTCAAGTCATCATGGCCCTTACGG
GTAGGGCTACACACGTGCTACAATGGCGCGTACAGAGGGCAGCCAACTCGCGAGAG
TGAGCGAATCCCAAAAAGCGCGTCGTAGTCCGGATCGGAGTCTGCAACTCGACTCC
GTGAAGTCGGAATCGCTAGTAATCGTGGATCAGAATGCCAC

```

JJM10^T 16S rDNA 염기서열을 NCBI Blast를 통해 검색한 결과 Fig. 18에서처럼 JJM10^T과 가장 가까운 속과 종은 *Glaciecola nitratreducens*으로 blast 상에서 96 %의 유사도를 나타내어 JJM10^T이 *Glaciecola* 속에 새로운 종일 가능성을 나타냈다. 그래서 *Glaciecola* 속에 보고되어진 균주들의 염기서열을 NCBI Gene Bank database에서 찾아 JJM10^T 염기서열과 비교분석하였다. 다음은 *Glaciecola* 속 균주의 accession unumber이다:

Glaciecola nitratreducens KCTC 12276^T (AY787042), *Glaciecola pallidula* LMG 21427^T (U85854), *Glaciecola punicea* ACAM 611^T (U85853), *Glaciecola agarilytica* NO2^T (DQ784575), *Glaciecola chathamensis* S18K6^T (AB247623), *Glaciecola mesophila* LMG 21855^T (AJ548479), *Glaciecola polaris* LMG 21854^T (AJ548478), *Glaciecola psychrophila* 170^T (DQ007436).

Clone의 결정된 염기서열과 database에 얻어진 염기서열은 PHYDIT program을 이용하여 Clustal W multiple alignment로 정렬하여, CLUSTAL X software (Thompson *et al.*, 1997)를 이용하여 서열을 분석하였다.

Neighbor-joining(Saitou and Nei, 1987) 방법에 의해 Bootstrap 분석 시 1000회의 resampling을 적용하여 tree topology의 평가 기준으로 사용하여 계통수를 작성하였으며, 염기서열간 유전적 거리는 Jukes & Cantor 모델을 이용하여 계산하였다. *Glaciecola* 속 내 각 표준균종과 선별균주들간의 유사도를 조사한 결과 *Glaciecola nitratreducens* KCTC 12276^T (95.78), *Glaciecola pallidula* LMG 21427^T (95.13), *Glaciecola punicea* ACAM 611^T (93.25), *Glaciecola agarilytica* NO2^T (94.25), *Glaciecola chathamensis* S18K6^T (94.47), *Glaciecola mesophila* LMG 21855^T (93.66), *Glaciecola polaris* LMG 21854^T (93.89), 그리고 *Glaciecola psychrophila* 170^T (92.73)로 나타났다 (Table 8)(Fig. 18). 그 중 *Glaciecola nitratreducens* KCTC 12276^T 와 가장 높은 유사도의 염기서열 상동성을 보여 주었다.

Table 8. Similarity matrix based on 16S rRNA gene sequence comparisons.

Strain	1	2	3	4	5	6	7	8	9
1	100								
2	95.78	100							
3	95.13	97.47	100						
4	93.25	93.41	93.05	100					
5	94.53	94.78	93.98	93.47	100				
6	94.47	94.71	94.06	93.56	99.86	100			
7	93.66	94.92	95	94.21	98.99	99.13	100		
8	93.89	95.14	93.92	93.13	98.26	98.41	98.27	100	
9	92.73	93.34	93.56	93.21	95.8	95.95	96.82	96.53	100

1, JJM10^T; 2, *Glaciecola nitratireducens* KCTC 12276^T (AY787042); 3, *Glaciecola pallidula* LMG 21427^T (U85854); 4, *Glaciecola punicea* ACAM 611^T (U85853); 5, *Glaciecola agarilytica* NO2^T (DQ784575); 6, *Glaciecola chathamensis* S18K6^T (AB247623); 7, *Glaciecola mesophila* LMG 21855^T (AJ548479); 8, *Glaciecola polaris* LMG 21854^T; 9, *Glaciecola psychrophila* 170^T (DQ007436).

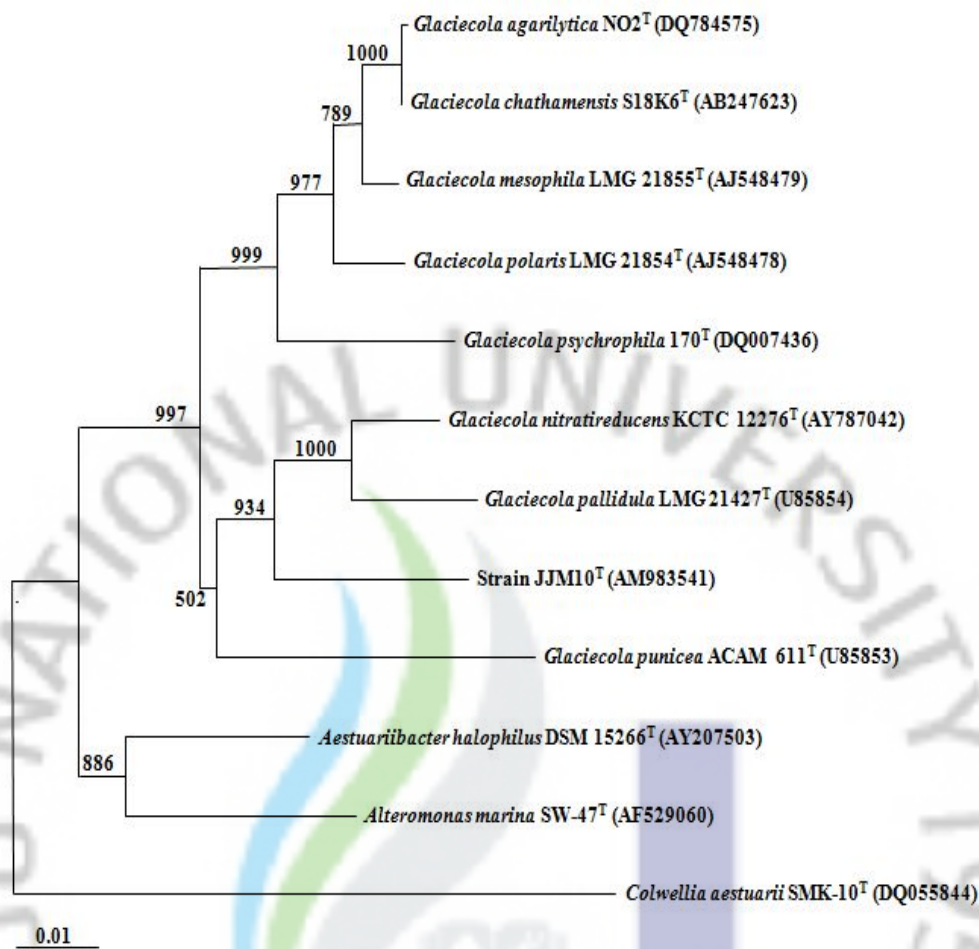


Fig. 16. Neighbour-joining phylogenetic tree based on 16S rRNA gene sequences showing the position of strain JJM10^T within the radiation of the genus *Glaciecola*. The tree was constructed from evolutionary distance matrix by using neighbour-joining method (Saitou & Neil, 1987). The sequence of *Colwellia aestuarii* SMK-10^T(DQ055844) was used as an outgroup. Asterisks represent the branches also found in both maximum-likelihood (Fitch, 1971) and maximum-parsimony (Felsenstein, 1981) trees. Bootstrap percentages (from 1000 replications) >50% are shown at branch points. Bar, 0.01 substitutions per nucleotide position.

JJM57^T 16S rDNA 염기서열을 NCBI Blast를 통해 검색한 결과 Fig. 19에서처럼 JJM10^T과 가장 가까운 속과 종은 *Oceanisphaera litoralis* 으로 blast 상에서 97.70%의 유사도를 나타내어 JJM57^T이 *Oceanisphaera* 속에 새로운 종일 가능성을 나타냈다. 그래서 *Oceanisphaera* 속 및 *Oceanimonas* 속에 보고되어진 균주들의 염기서열을 NCBI GenBank database에서 찾아 JJM57^T 염기서열과 비교 분석하였다. 그런데 *Oceanisphaera* 속에 속한 종들이 2종류 밖에 보고되지 않아서 가장 유사한 속인 *Oceanimonas* 속의 종들을 참고균주로 사용하였다.

다음은 *Oceanisphaera* 속 *Oceanimonas* 속 균주의 accession unnumber이다:

Oceanisphaera litoralis DSM 15406^T (AJ550470), *Oceanisphaera donghaensis* BL 1^T (DQ190441), *Oceanimonas doudoroffii* DSM 7028^T (AB019390), *Oceanisphaera baumannii* ATCC 700832^T (AF168367), *Oceanimonas smirnovii* 31-13^T (AY538714), *Oceanimonas denitrificans* F13-1^T (DQ097665), *Aeromonas salmonicida* ATCC 33658^T (X92889), *Tolumonas auensis* DSM 9187^T (X92889), *Aeromonas achubertii* ATCC 43700^T (X74682), *Vibrio alginolyticus* ATCC 17749^T (X56576).

Clone의 결정된 염기서열과 database에 얻어진 염기서열은 PHYDIT program을 이용하여 Clustal W multiple alignment로 정렬하여, CLUSTAL X software 를 이용하여 서열을 분석하였다. Neighbor-joining 방법에 의해 Bootstrap 분석 시 1000 회의 resampling을 적용하여 tree topology의 평가 기준으로 사용하여 계통수를 작성하였으며, 염기서열 간 유전적 거리는 Jukes & Cantor모형을 이용하여 계산하였다. *Oceanisphaera* 속 내 각 표준균종 및 *Oceanimonas* 속 내 각 표준균종과 선별균주(JJM57^T)간의 유사도를 조사한 결과 *Oceanisphaera litoralis* DSM 15406^T (97.44), *Oceanisphaera donghaensis* BL 1^T (97.13), *Oceanimonas doudoroffii* DSM 7028^T (96.20), *Oceanisphaera baumannii* ATCC 700832^T (95.97), *Oceanimonas smirnovii* 31-13^T (95.63), 그리고 *Oceanimonas denitrificans* F13-1^T (95.50)로 나타났다 (Table 9)(Fig. 19). 그 중 *Oceanisphaera litoralis* DSM 15406^T와 가장 높은 유사도의 염기서열 상동성을 보여 주었다.

Table 9. Similarity matrix based on 16S rRNA gene sequence comparisons.

Strain	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
1	100										
2	97.44	100									
3	97.13	97.83	100								
4	96.20	96.75	96.52	100							
5	95.97	95.67	95.43	98.45	100						
6	95.63	95.56	95.94	98.13	98.52	100					
7	95.50	95.67	95.12	96.45	95.44	96.26	100				
8	91.38	91.32	91.63	91.87	92.03	92.36	91.95	100			
9	91.27	90.59	91.13	91.84	92.08	92.49	90.99	93.47	100		
10	90.92	90.55	91.09	91.72	92.03	92.44	91.8	97.84	93.16	100	
11	90.58	90.44	91.06	90.76	90.85	91.24	89.29	89.37	89.4	89.76	100

1, JJM57^T; 2, *Oceanisphaera litoralis* DSM 15406^T (AJ550470); 3, *Oceanisphaera donghaensis* BL 1^T (DQ190441); 4, *Oceanimonas doudoroffii* DSM 7028^T (AB019390); 5, *Oceanisphaera baumannii* ATCC 700832^T (AF168367); 6, *Oceanimonas smirnovii* 31-13^T (AY538714); 7, *Oceanimonas denitrificans* F13-1^T (DQ097665); 8, *Aeromonas salmonicida* ATCC 33658^T (X92889); 9, *Tolumonas auensis* DSM 9187^T (X92889); 10, *Aeromonas achubertii* ATCC 43700^T (X74682); 11, *Vibrio alginolyticus* ATCC 17749^T (X56576).

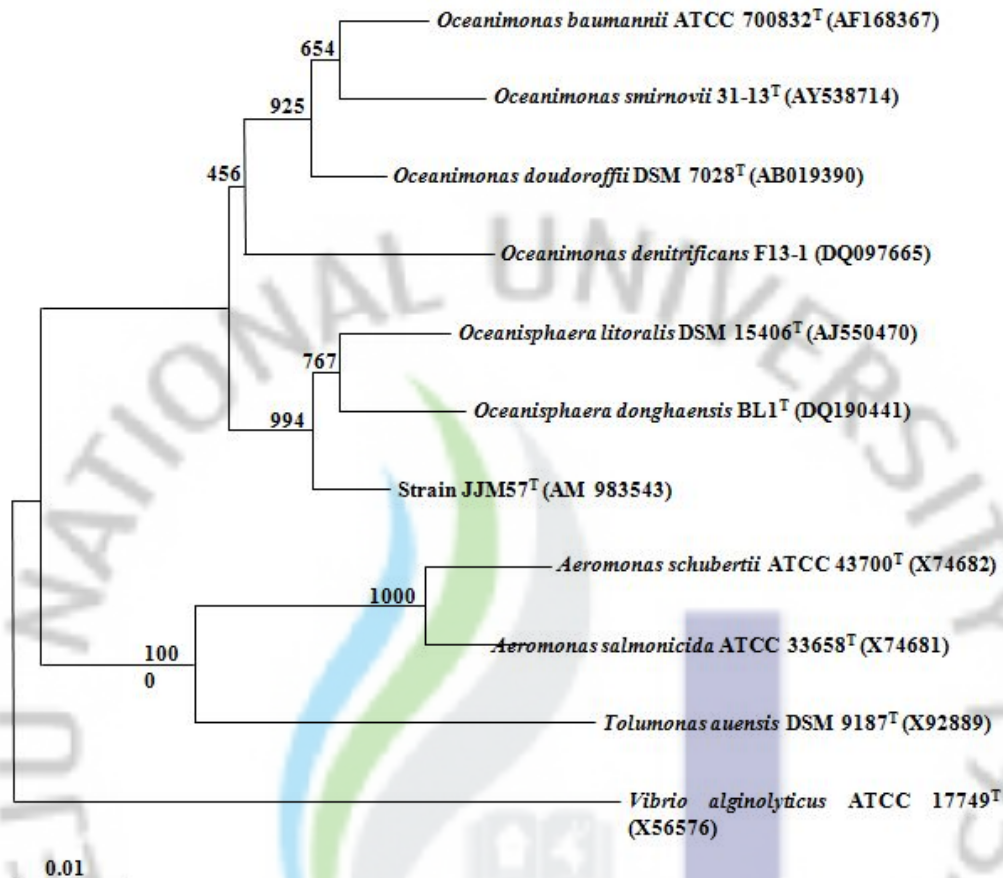


Fig. 17. Neighbour-joining phylogenetic tree based on 16S rRNA gene sequences showing the position of strain JJM57^T within the radiation of the genus *Oceanisphaera*. The tree was constructed from evolutionary distance matrix by using neighbour-joining method (Saitou & Neil, 1987). The sequence of *Vibrio alginolyticus* ATCC 17749^T(X56575) was used an outgroup. Asterisks represent the branches also found in both maximum-likelihood (Fitch, 1971) and maximum-parsimony (Felsenstein, 1981) trees. Bootstrap percentages (from 1000 replications) >50% are shown at branch points. Bar, 0.01 substitutions per nucleotide position.

분리균주(JJM10^T 및 JJM57^T)의 형태학적, 생리 생화학적 특성 실험 및 16S rRNA 염기서열 분석을 통한 유사도 분석, 계통분석, 세포지방산 그리고 G+C 함량분석 결과를 종합해 본 결과 JJM10^T와 JJM57^T 균주는 신종임을 확인할 수 있었다. 이에 JJM10^T을 *Glaciacola siphonariae*로 JJM57^T를 *Oceanisphaera laurenciae* 라고 각각 명명하여 국내 생물자원센터인 KCTC (Korean Collection for Type Culture)에 균주를 기탁하여 각각 균주 등록 번호를 받았다 (KCTC 22368^T, KCTC 22371^T).

4. 요약

1. Description of *Glaciacola siphonariae* sp. nov.

Glaciacola siphonariae (si.pho.na'ri.ae. N.L. gen. n. *siphonariae* pertaining to genus *Siphonaria*, as the type strain was isolated from *Siphonaria sirius*).

Glaciacola siphonariae sp. nov.

균주 JJM10^T은 제주도 애월 해수욕장의 해양무척추동물인 *Siphonaria sirius* (Mollusca: Basommatophora)로부터 분리되어졌으며, 16S rRNA 유전자 염기서열을 비교해본 결과 *Gammaproteobacteria*의 *Glaciacola nitratireducens* KCTC 12276^T과 *Glaciacola pallidula* LMG 21427^T(96.1 and 95.43 % 16S rRNA gene sequence similarity)와 가장 유사하였다. 분리균주는 그람 음성, 호기성 및 약 호염성 세균으로서 염 농도 1~10% 및 배양온도 10~37°C에서 성장한다. Citrate 및 phenylacetate을 이용하지 않으며, produces cytochrome oxidase를 생산하는 특성을 가지고 있다. 그러나 Ornithine decarboxylase, lysine decarboxylase, urease 및 H₂S 생산하지 않았다. Inositol, sorbitol, rhamnose, melibiose 및 amygdalin 발효실험에서 양성을 나타냈다.

Alkaline phosphatase, Esterase (C4), Esterase lipase (C8), Leucine arylamidase, Valine acrylamidase, Cystine arylamidase, α-chymotrypsin, Acid phosphatase, Naphthol-AS-BI-phosphohydrolase, Trypsin, α-glucosidase

와 N-acetyl- β -glucosaminidase에서는 양성반응이 나타났지만, Lipase (C14), β -glucuronidase, β -glucosidase, α -mannosidase 및 α -fucosidase에서는 음성으로 확인되었다.

최종적으로 균주 JJM10^T은 *Glaciecola nitratireducens* KCTC 12276^T 및 *Glaciecola pallidula* LMG 21427^T와 가장 유사한 생리 및 생화학적 특성을 보였다. 분리균주 JJM10^T의 G+C 함량은 49.81 mol%로 나타났으며, 주요 세포지방산은 C_{16:0}, Summed feature 4 (C_{16:1} w7c and/or iso-C_{15:0} 2-OH) 및 Summed feature 7 (C_{18:1} w9c/w12t/w7c)로 분석되었다. DNA-DNA 근연관계 데이터를 바탕으로 JJM10^T은 *G. nitratireducens*과 *G. pallidula* 종에서 분리되어 졌다는 것을 확인할 수 있었다.

The type strain is JJM10^T (=KCTC 22368^T), was isolated from *Siphonaria sirius* of Jeju Island, Republic of Korea.

2. Description of *Oceanisphaera laurenciae* sp. nov.

Oceanisphaera laurenciae (lau.ren'ci.ae. N.L. gen. n. *Laurenciae* pertaining to genus *Laurencia*, marine plant which the type strain was isolated).

Oceanisphaera laurenciae sp. nov.

균주 JJM57^T은 제주도 신촌 해안가의 해양식물인 *Laurencia* sp.,로부터 분리되어졌으며, 16S rRNA 유전자 염기서열을 비교해본 결과 *Gammaproteobacteria*의 *Oceanisphaera litoralis* DSM 15406^T 및 *Oceanisphaera donghaensis* KCTC 12522^T (98.02 and 97.70 % 16S rRNA gene sequence similarity)와 가장 유사하였다. 균주는 Gram 음성, Oxidase 및 Catalase 양성의 완벽한 구형 형태로 6 μ m의 큰 세포로 운동성을 가지고 있다. 중호염성 세균으로서 염 농도 1.0~11%, 배양온도 4~37°C, 성장에 있어서 Na⁺를 필요로 하였다. Malate와 Citrate를 이용하였으며 arginine dihydrolase와 gelatin은 음성반응을 glycerol, succinate, L-valine 및 L-tyrosine은 양성반응을 보였다. galactose, glucose, arabinose,

mannose, N-acetylglucosamine, maltose, gluconate, adipate 및 sucrose를 이용하여 산을 생성하지 않았으며, API ZYM strips kit을 이용하여 효소활성 실험 결과 Alkaline phosphatase, Esterase (C4), Esterase lipase (C8), Leucine arylamidase, Cystine arylamidase, α -chymotrypsin, Acid phosphatase, Naphthol-AS-BI-phosphohydrolase, Trypsin 및 N-acetyl- β -glucosaminidase 에서 양성반응을 보였으며, Lipase (C14), Valine arylamidase, α -chymotrypsin, β -glucuronidase, α -glucosidase, β -glucosidase, α -mannosidase 및 α -fucosidase에서는 음성반응을 보였다. 또한 JJM57^T의 G+C 함량은 61.94 mol%로 나타났으며, 균주의 주요 지방산 분석 결과 C_{16:0}, C_{18:1} w7c and Summed feature 3 (C_{15:0} iso 2-OH/C_{17:0} iso 3-OH/C_{16:1} ω 7c.)로 나타났다. 균주의 형태학적, 생리, 생화학적 및 16S rRNA 유전자 염기서열을 분석해본 결과 최종적으로 균주 JJM57^T는 신종일 가능성이 높아 *Oceanisphaera laurenciae* sp. nov.라고 명명하였다.

The type strain is JJM57^T (=KCTC 22371^T), isolated from marine plant of the Jeju Island, Republic of Korea.

PART III

색소생성 해양방선균의 배양특성 및 생리활성 연구

Cultural Characterization and Bioactive Research of
Pigment Producing Marine Actinomycetes

1. 서론

1.1 수산 양식 산업의 동향 및 해산어류 질병 발생 동향

양식 수산물 소비는 지속적으로 증가하고 있는 가운데, 해면 어획 수산물의 생산량은 정체되고 있고 일부 지역에서는 생산 한계에 도달한 지역도 있어 세계 양식 산업의 중요성은 더해 가고 있다. 그리고 최근에는 세계적으로 양식 산업의 생산 체계를 집중화 다각화 시키면서 새로운 어종을 지속적으로 개발하고 있으며, 양식 생산 체계에 대한 관리 및 규제 중요성이 강조되면서 생산관리체계에 대한 관심도 증가하고 있다. 수산어류는 최근 웰빙 (Well-being) 식품을 선호하는 국민수준의 향상과 더불어서 그 수요가 크게 늘어나고 있다. 또한 식생활이 점차 서구화 되면서 동물성 육류로부터 영양분의 섭취가 높은 비율을 차지하게 되었다. 그 결과 동맥경화증, 심장병이나 비만과 같은 여러 가지 성인병 발병의 원인이 증가하게 되면서, 등 푸른 생선들을 비롯한 고도불포화지방산을 많이 함유하고 있는 어류 쪽으로 그 소비의 방향을 바꾸어 가고 있다.

이러한 소비 패턴의 변화에 맞춰 어류 양식 산업이 발전하여 전국적으로 양식업체의 수와 규모가 증가하였다. 특히 제주도는 1996년부터 종묘생산 기술개발을 계기로 육상 수조식 양식이 시작되었는데, 현재는 양식업체의 수가 급격히 증가하여 2007년 약 300여개의 양식업체가 생겼으며 연간 수입이 2,000억원으로 제주도내의 1차산업 중 가장 중요한 부분을 차지하고 있다.

현재 제주도 같은 경우는 넙치와 돌돔이 양식의 주 대상이 되고 있는데, 어종에 따라 발병하는 세균성 질병에 종류가 약간에 차이가 있으나, 비브리오증, 연쇄구균증, 에드워드증, 활주세균증 등에 의한 피해사례가 해마다 보고되고 있다. 비브리오병의 원인균인 비브리오속 세균들은 최근에 17종이 더 보고되어 현재는 37종이 되었는데 양식어류에 있어 계절에 상관없이 많은 피해를 준다. 또한, 최근에 들어 세균성 질병의 발병이 특정 세균에 단독 감염이 아닌 2가지 이상 세균에 혼합감염으로 인한 발병 빈도가 높아지고 있다. 그리고 양식장에서는 저수온 기인 겨울철에는 가온에 의한 사육이 지속적으로 이루어지고 있기 때문에 양식

어류의 질병발생빈도는 계절적인 추이변동이 없이 연중 발병하고 있다.

양식어류는 사육조건상 같은 수역 내에서 고밀도로 사육되기 때문에 전염성 질병이 발생 하였을 때는 다른 어류로 쉽게 전염이 되어 군집적으로 그 증상을 나타내므로 질병 관리에 어려움이 있다.

1.2 항생제 대체제의 필요성 및 효과

플레밍(Alexander Fleming)에 의해 1928년 발견된 항생제는 인류에게 질병과 싸우는데 있어 가장 중요한 역할을 해오고 있는 것과 마찬가지로 가축에서도 질병 예방과 치료 목적으로 사용되어 왔다. 1940년대 후반 Chlortetracycline의 축산업에 대하여 성장촉진에 대한 효과가 발견된 이후, 축, 수산업에서 없어서는 안 될 중요한 성분으로 자리 잡아 왔으며, 전 세계적으로 유럽에서 연간 약 10,000톤, 미국 약 25,000톤 등의 항생제가 사용되며, 이중 약 50% 정도가 가축에 사용되기에 이르렀다. 하지만, 인체에 사용하는 항생제를 가축에 사용해서는 안 된다는 주장을 담은 영국의 Swann Report(1968년 발간)는, 항생제 내성의 위험과 이로 인한 인류와 동물 건강에 대한 위협에 대해 관심을 촉발 시켰다. 그 후, 내성 박테리아의 인체 전이에 대한 염려가 커져 갔고, 이는 항생제의 가축사료 첨가에 대한 재평가 및 항생제 사용의 금지에까지 이르게 되었다.

1.2.1 항생제 사용 및 규제 현황

국내의 경우, 축/수산 분야에서 사용되는 항생제의 양이 2001년을 기준으로 매년 점차적으로 줄어들고 있는 추세이지만, 전체적으로 축산용 항생제의 사용량이 축산 선진국의 사육규모에 비해 약 2~10배정도 많이 사용하고 있는 실정이다. 그러나 국립수의과학검역원의 2003~2004년 대장균, 장구균 및 살모넬라균을 대상으로 한 항생제 내성균 조사결과 Tetracycline에 약 80~90%에 이르는 내성을 보였으며, Enrofloxacin, Ciprofloxacin등의 퀴놀론계 항생제에 약 50% 이상의 내성률을 보였다. 이에 따라서 정부에서도 항생제의 과다사용을 억제하기 위해 가축 사육 환경 개선, 배합사료에 혼합할 수 있는 항생제 종류의 대폭 축소(53

종→25종), 안전사용기준 순회교육 등을 추진해 오고 있다.

또한 외국의 경우 스웨덴에서는 1986년부터 성장촉진용 항생제 사용을 전면 금지했으며, 이는 항생제 사용을 절반으로 줄여주었다. 1997년 EU는 Vancomycin 과 연관된 항생제들의 사료첨가제로의 사용금지, Verginiamycin, Bacitracin, Tylosin 및 Spiramycin등의 사용을 금지하였다, EU 전반에 걸쳐 위생과 관리상의 문제점들을 보충해 주던 성장촉진 항생제의 사용금지 결과, 축산환경개선 및 항생제 대체 물질의 개선을 가져왔다. 미국에서는 EU와는 대조적으로 페니실린, 스트렙토마이신 등을 포함한 성장 촉진 항생제가 많이 사용되고 있다. 이는 대부분이 치료목적이 아닌 열악한 사육환경을 보충하기 위한 질병 예방 및 성장 촉진용으로 사용되고 있으며, 이에 대하여 300여개가 넘는 단체들, 미국의약협회, 미국공중보건협회 등이 항생제 사용금지를 촉구하고 있는 실정이다.

1.2.2 항생제 대체제

항생제의 내성 문제가 대두되면서 국내는 물론, 전 세계 축산업계는 항생제 없이 가축의 생산성을 높이기 위한 대책 마련에 고심하고 있다.

항생제의 사료 첨가로 인한 주요 효과로는 다음과 같다.

- ① 장내 소화 장애방지 ② 사료 효율 개선 ③ 동물의 성장 촉진 및 소화율 개선
- ④ 생산비 감소 및 환경오염 감소

항생제는 대략 3~5%의 소화율 개선, 3~8%의 성장 촉진을 개선, 2~5%의 사료 효율 개선 효과가 있다고 알려져 있다.

이러한 항생제를 대체해 환경 친환경(ECO)적이고, 인류 건강에 대한 거대한 위협인 내성 박테리아에 대처하기 위한 대체제로는 미네랄, 올리고당, 효소제, 생균제, 유/무기산제, 식물추출물 등의 물질들이 있다.

1.3 해양 유래 방선균의 항생제 대체제로서의 응용 가능성

방선균은, 오랜 역사를 갖고 있는 알콜이나 초산발효등과 같은 식품관련 산업과는 달리, 주로 현대의약품의 개발과 함께 그 응용성과 중요성이 인식되어 현재까

지 가장 중요하게 다루어지고 있는 유용한 산업 미생물군이다. 방선균은 항생물질로 대표되는 이차대사산물, 생리활성물질, 비타민등의 저분자물질을 생산할 뿐만 아니라 소염제, 소화제, 세제, 공업용 효소 등으로 이용되는 다양한 종류의 생체효소와 같은 고분자물질을 생산하는 등 산업적인 응용범위를 열거하기는 불가능할 정도이다.

미생물의 대사산물로부터 발견된 10,000여 종의 항생물질 가운데 74% 이상이 방선균에 의해서 생산되며, 그 중 75%는 *Streptomyces* genus로부터 생산된 것이다. 지금도 방선균으로부터 새로운 항생물질 등 다양한 생리활성물질을 탐색하기 위해 많은 연구가 부단히 이루어지고 있다. 방선균은 생리활성물질의 탐색원으로서 많은 주목을 받고 있는 미생물이지만 현재까지 이용되어온 균주의 대부분은 육상의 토양에서 분리된 것들이고, 해양유래 방선균에 대해서는 아직까지 거의 연구되어 있지 않은 실정이다.

또한 방선균 유래 활성물질은 항균제, 항암제, 항진균제, 살충제, 구충제, 면역조절제 등으로 한정되어 있으며 항산화 물질관련 연구는 거의 이루어지고 있지 않다. 그리고 미생물의 서식지로서 해양의 환경조건은 육상과 현저히 다르기 때문에 해양에 있어서 방선균의 microflora는 육상과는 상당히 다를 것으로 생각되어지며, 또한 연안 해역에 존재하는 방선균 중에는 육상에서 유입된 담수 등으로 인하여 육상의 토양으로부터 유래된 방선균도 많은 것으로 알려지고 있다.

또한 제주도의 기호는 전반적으로 온화하며, 한라산 정점으로부터 해안가까지 좁은 지역에 비교적 다양한 기후 및 토양 분포를 가지고 있어 다양한 방선균이 서식하고 있을 것으로 예상되며, 이들 중에는 해양이라고 하는 특이한 환경에 적응한 결과 대사계가 변화되어 새로운 2차 대사산물을 생산하는 균주도 있을 것으로 기대되며 해양은 새로운 생리활성물질 생산균주의 탐색원으로 지극히 흥미로운 분야라고 말할 수 있다.

1.4 연구의 필요성

우리나라의 연간 양식 생산량은 해마다 증가하고 있는 실정이다. 특히 200해리 경제 수역 등 우리가 생산할 수 있는 어족 자원의 양이 감소하는 반면 고단백질

공급원으로서 소비가 증가하고 있어 어류 양식은 지속적으로 발전해 나갈 것이다. 특히 제주도는 지리적, 환경적 여건이 우수하여 해산 어류 양식산업이 1차 산업 중에서도 가장 높은 소득원이 되고 있다. 최근 들어 우리나라를 포함한 전세계적으로 어류 양식에 대한 관심이 높아지면서 어류 양식에 따른 문제점에 대해서도 관심이 높아지고 있는데, 특히 어류질병에 대한 관심이 높아지고 있다. 지금까지의 양식어류에 발생하는 어류질병세균에 대한 치료로써 수많은 항생제들이 사용되어 왔던 것이 사실이다. 특히 양식어류는 사육특성상 병이 발병하면 집단발병이 되고 또한 치료가 어려워 단시간에 집단으로 폐사되는 확률이 높다. 이렇듯 양식 어류의 질병이 발병 되었을 때 완벽하게 치료가 안 되는 이유에 대한 심각성은 사육특성에도 문제가 있지만, 어류질병세균 감염균의 등장에 있다. 또한 이러한 항생제를 예방 차원에서 무분별하게 사용하여 2차적으로 수질오염이나 생태계에 악영향을 미치고 있다. 이처럼 생태적, 경제적 문제를 갖고 있는 항생제를 대체할 수 있는 어류질병 치료제에 대한 연구가 절실하다고 할 수 있겠다.

현재 제주도의 식물자원이나 동물, 곤충자원, 해양자원에 대해서는 어느 정도의 현황 및 가능성이 밝혀진 것들이 많이 있지만, 해양 미생물 자원 같은 경우는 체계적인 연구가 진행되지 않아 현황이 정확히 파악되지 못하고 있다. 따라서 앞으로 청정한 제주도에 다양한 미생물 자원 (특히 해양 미생물 자원)이 존재하고 산업적 활용가치가 높다고 평가되고 있다.

일반적으로 방선균은 토양중의 각종 유기물을 분해, 특히 난 분해성 유기물 분해에 중요한 역할을 하며, 또한 스트렙토마이신이나 테트라사이클린 등과 같은 항생물질을 생산해 다른 미생물을 지배하는 것으로 보고되고 있다. 그렇지만 현재 보고 되고 있는 방선균은 거의 대부분이 육상유래 방선균이 대부분으로 해양 유래 방선균에 대한 연구는 거의 없는 실정이다.

그러므로 제주도의 환경적인 특성, 즉 해양 환경의 특성을 고려해 볼 때 다양한 특성을 갖고 있는 미생물자원이 풍부 할 것으로 사료되며, 체계적인 연구를 통해 근년에 활발하게 이루어지고 있는 해양 유래 신 물질 탐색, 새로운 치료제 개발 및 친환경적 양어사료첨가제 개발 등의 측면에서 그 연구적 의의는 크다고 사료된다.

2. 재료 및 방법

2.1 생리활성 물질 생산 균주의 분리 및 동정

2.1.1 사용 방선균주 및 배양조건

생리활성 물질 생산 해양유래 방선균의 1차적인 선별을 위해서 145종의 방선균주를 가지고 배양액의 항균 및 항산화 활성을 측정하였다. 항균 및 항산화 활성 측정을 위하여 순수 분리된 방선균주를 Marine agar에 5일간 계대배양하고 오염도 확인 과정을 거쳐서 50 ml Marine broth (MB, Difco. USA)가 첨가된 250 ml 플라스크에 접종한 후, 25 °C shaking incubator에서 2주간 진탕배양 하였다. 배양 후, 원심분리를 통하여 균체와 배양액을 분리하여 배양상등액을 가지고 생리활성을 테스트 하였다. 방선균주 1차 스크리닝을 위해서 항균활성 평가는 Disk paper법을 사용하였으며, 항산화 활성을 확인하기 위하여 DPPH법 (Kang *et al.*, 1996)을 사용하였으며, 전자공여능 (EDA, Electron Donating Ability)은 4×10^{-4} M DPPH 용액 2 ml와 방선균 배양 상청액 1 ml를 혼합한 후, 흡광광도계로 525 nm에서 흡광도를 측정했으며, 대조구로는 합성항산화제인 BHA, BHT는 0.05%의 농도로 제조한 후, DPPH 용액과 대조구에 1 ml씩을 혼합하여 측정하였다.

2.1.2 방선균 배양액의 메탄올 추출물 제조

1차 균주 선별 단계에서 배양액의 항균 및 항산화 활성이 좋은 방선균주를 분리하여 균체 추출물 및 배양액의 메탄올추출물을 제조하였다. 생리활성 물질 생산 후보 균주들을 250 ml 삼각플라스크에 MB(Marine Broth, Difco. Co. USA)를 100 ml 분주한 후, 접종하여 Shaking incubator에서 25°C에서 120 rpm으로 2주간 배양하였다. 배양 후, 원심분리를 통하여 균체 및 배양액을 분리하였으며, 동량의 Methanol 용액을 첨가하여 Over night 시킨 후, 감압 농축기를 이용하여

유기용매 성분들을 모두 날려버린 후, 각각의 수율을 측정하였다. 차후 방선균주 메탄올 추출물은 항균활성 및 항산화활성 평가를 위해서 실험에 이용되었다.

2.1.3 균주 선별을 위한 배양액 메탄올 추출물의 항균 및 항산화 활성 측정

2.1.3.1 배양액 메탄올 추출물의 항균활성 측정

항균실험에 사용된 균주는 Table. 1과 같이 어류질병유발세균 5종 (*Vibrio anguillarum* KCTC 2711, *Vibrio mimicus* KCTC 2737, *Vibrio salmonicida* KCCM 41663, *Streptococcus iniae* KCTC 3657, *Streptococcus parauberis* KCTC 3651) 인체 유해균 5종 (*Propionibacterium acnes*, KCCM 41747; *Staphylococcus aureus*, KCTC 1916; *Streptococcus mutans*, KCCM 40105; *Candida albicans*, KCTC 7270; *Pityrosporum ovale*, KCCM 11894) 총 10종을 항균실험에 사용하였으며, 실험에 사용된 균들은 생물자원센터 (KCTC) 혹은 한국미생물 보존센터 (KCCM)에서 분양받아 사용하였다. 병원성 균주의 생육을 위해 각각의 균주별로 Table. 1에 명시된 배지로 24시간에서 120시간 배양하여 사용하였다.

1차 스크리닝 과정에서 방선균 배양액의 활성이 검증된 후보 방선균주에 대하여 250 ml 삼각플라스크 배양을 통하여 메탄올 추출물을 제조하였으며, 후보균주의 메탄올 추출물 항균활성 측정은 Paper disk diffusion법에 따라 항균스펙트럼을 탐색하였으며, 시험균주를 전 배양하여 활성화 시킨 후, 멸균생리식염수를 이용하여 McFaland No. 0.5 농도로 균 현탁액을 제조한 후, Muller Hinton agar plate (Difco, Co. USA)에 골고루 도말 한다. Sample disk의 제조는 메탄올 추출물의 경우 기본적으로 Disk paper에 추출물의 최종 농도가 1000 $\mu\text{g/ml}$ 가 되게 제조하였다.

Table 1. List of strains and growth conditions used for antibacterial experiments.

	Strain	Growth conditions
Gram negative bacteria	<i>Vibrio anguillarum</i> KCTC 2711	Marine Agar (Difco 0979), 25°C
	<i>Vibrio mimicus</i> KCTC 2737	Nutrient Agar (Difco 0001) 37°C
	<i>Vibrio salmonicida</i> KCCM 41663	Trypticase Soy Agar with 1% NaCl, 26°C
Gram positive bacteria	<i>Propionibacterium acnes</i> KCCM 41747	Brain Heart Infusion Agar (Difco 0418), 37°C
	<i>Staphylococcus aureus</i> KCTC 1916	Trypticase soy broth (BBL 11768), 37°C
	<i>Streptococcus mutans</i> KCCM 40105	Brain Heart Infusion Agar (Difco 0418), 37°C
	<i>Streptococcus iniae</i> KCTC 3657	BHI (Medium 3) + 0.5 % Glucose Medium, 37°C
Fungi	<i>Streptococcus parauberis</i> KCTC 3651	Trypticase Soy Yeast Extract Medium, 37°C
	<i>Candida albicans</i> KCTC 7270	YM Agar, 24°C
	<i>Pityrosporum ovale</i> KCCM 11894	Pityrosporum Medium, 30°C

2.1.3.2 배양액 메탄올 추출물의 전자공여능 측정

DPPH 라디칼 소거활성은 Nanjo (1996)의 방법에 의하여 측정하였다. 60 µl 시료 용액에 DPPH (60 µM) 용액을 첨가하여 10초 동안 교반한 다음 혼합용액을 quartz capillary tube에 옮긴 후 2분 후에 ESR (Electron Spin Resonance) Spectrometer로 측정하였다. ESR 측정에 대한 조건은 Table 1에 나타내었다. 스펙트럼은 scan time : 30s, field : 336 ± 5 mT, time constant : 0.3s, power : 5 mW, amplitude : 1×500의 조건으로 기록하였다. 항산화시료에 대한

DPPH 라디칼 소거활성은 아래의 식을 이용하여 계산하였다.

DPPH free radical scavenging activity (%) =

$$[1 - (\text{ESR signal intensity for medium containing the additives of concern} / \text{ESR signal intensity for the control medium})] \times 100$$

2.1.4 분리방선균의 동정

분리 선발된 균의 1차 동정은 형태학적, 배양학적, 및 생화학적 특성을 Manual of method for general bacteriology와 Biochemical tests for identification of medial bacteria에 준하여 검토하고, Bergey's Manual of Systematic Bacteriology에 의하여 제안된 방법에 의해 분석하였다.

2.1.4.1 형태학적 분석

SEM(Scanning Electron Microphotography, JSM-6700F JEOL Ltd)를 통해 형태학적 특성을 관찰하였다. 0.2 μm filter를 멸균 후, 배지에 올려 그 위에 균을 접종하고 균이 성장하면 filter를 차가운 2.4% glutaraldehyde에 담구어 고정 시킨 후, 0.1 M phosphate buffer로 2회 이상 세척하였다. 이를 ethylalcohol 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100%로 각각 1 hr 동안 탈수 시켰다. 탈수시킨 filter를 isoamyl acetate에 담근 후, 액체 CO₂로 isoamyl acetate를 날리고, 금박을 입혀 전자현미경으로 관찰, 이미지화 시켰다.

2.1.4.2 생화학적 특성 분석

분리균주의 생화학적 성상 시험은 표준생화학 검사법에 따라 시험하였고 균주의 생화학적 성상을 확인하기 위하여 Bergey's Manual of Systematic Bacteriology에 기재된 균주와 비교하여 나타내었다.

2.1.4.3 Cellular Fatty acid 분석

대부분의 지질성분은 고등생물의 경우에 조성이 단순하고, 광범위하게 동일한 성분을 갖기 때문에 분류지표로 활용하기 어렵지만, 세균의 경우에는 다양성이 풍부하여 매우 유효한 지표로 이용되고 있다. 균주의 세포 지방산 분석을 위해 25°C 일주일간 배양한 균체의 지방산을 Miller and Berger(1985)의 방법에 준하여 Methyl ester화 시켰다. 요약하면 1 ml의 알칼리 감화액을 첨가한 후, 100°C에서 30분간 반응시켜 saponified시킨다. 이를 냉각시키고 methylation reagent 2 ml을 첨가하여 80°C에서 10분간 반응시킨 후, 수층을 조심스럽게 제거하고 지질층에 추출용 용매 1.25 ml을 첨가하여 10분간 천천히 저어 섞는다. 하층부의 물은 피펫으로 제거하고 남은 용매층에 세정액 약 3 ml을 넣어 5분간 교반하여 이렇게 만들어진 용매층의 2/3을 덜어내어 gas chromatograph (GC)용 시료로 한다. 전처리된 Fatty acid methyl esters (FAME) mixtures를 gas chromatograph (Hewlett Packed model 5898A GC)로 Microbial Identification software (MIDI)의 지침에 따라 분석하였다.

2.1.4.4 ISP (International Streptomyces Project)배지에서의 배양특성 확인

분리균주는 기본적으로 Shirling과 Gottlieb (1966)에 의한 International Steptomycetes Project(ISP)의 방법과 Bergey's Manual of Systematic Bacteriology에 수록된 방법 그리고 Williams등의 방법에 따라 배양학적 특성을 확인하였다. 배지 제조 및 구성성분을 다음과 같이 Table 2에 나타내었다.

Table 2. List of International Streptomyces project (ISP) media

International Streptomyces Project					
Media	Composition		Media	Composition	
ISP No. 1	Tryptone	5.0 g	ISP NO. 5	Glycerine	10.0 g
	Yeast extract	3.0 g		L-asparagine	1.0 g
	Distilled water	1000 ml		K ₂ HPO ₄	1.0 g
	pH	7.0~7.2		Distilled water	1000 ml
ISP No. 2	Yeast extract	4.0 g	ISP NO. 6	Mineral solution	1 ml
	Malt extract	10.0 g		Agar	15~20 g
	Glucose	4.0 g		Peptone	15.0 g
	Distilled water	100 ml		Proteose-peptone	5.0 g
	Agar	15~20.0 g		Ferric Ammonium Citrate	0.5 g
	pH	7.3		K ₂ HPO ₄	1.0 g
				Na ₂ S ₂ O ₃	0.08 g
ISP No. 3	Oatmeal	20.0 g	ISP NO. 7	Agar	15.0 g
	Distilled water	1000 ml		Yeast extract	1.0 g
	Mineral solution	1.0 ml		Distilled water	1000 ml
	FeSO ₄ ·7H ₂ O	0.1 g		Glycerine	15.0 g
	MnCl ₂ ·4H ₂ O	0.1 g		L-Tyrosine	0.5 g
	ZnSO ₄ ·7H ₂ O	0.1 g		L-asparagine	1.0 g
	Distilled water	100 ml		K ₂ HPO ₄	0.5 g
	pH	7.2		MgSO ₄ ·7H ₂ O	0.5 g
ISP NO. 4	Solution I		ISP NO. 9	NaCl	0.5 g
	Soluble starch	10.0 g		FeSO ₄ ·7H ₂ O	10.0 mg
	Distilled water	500 ml		Distilled water	1000 ml
	Solution II			Mineral solution	1 ml
	K ₂ HPO ₄	1.0 g		Agar	15~20 g
	MgSO ₄ ·7H ₂ O	1.0 g		pH	7.2~7.4
	NaCl	1.0 g		(NH ₄) ₂ SO ₄	2.64 g
	(NH ₄) ₂ SO ₄	2.0 g		KH ₂ PO ₄	2.38 g
	CaCO ₃	2.0 g		K ₂ HPO ₄	5.65 g
	Distilled water	500 ml		MgSO ₄ ·7H ₂ O	1.0 g
	Mineral solution	1 ml		Distilled water	1000 ml
	Agar	15~20 g		Mineral solution	1 ml
		CuSO ₄ ·5H ₂ O	0.64 g		
		FeSO ₄ ·7H ₂ O	0.11 g		
		MnCl ₂ ·4H ₂ O	0.79 g		
		ZnSO ₄ ·7H ₂ O	0.15 g		
		Distilled water	100 ml		

2.1.4.5 16S rRNA 염기서열 분석

분리된 해양 유래 방선균의 16S rRNA 염기서열을 분석하기 위하여 250 ml flask에 MB 50 ml를 분주한 후, 분리균주를 접종하여 25°C에서 200 rpm으로 5일간 배양하였다. 배양액은 1.5 ml microcentrifuge tube에 옮겨 10,000 rpm에서 1분간 원심분리하고 상청액을 제거한 후, 모아진 bacteria pellet을 수집하였다. *Accuprep* Genomic DNA Extraction Kit(Bioneer, Korea)를 사용하여 genomic DNA를 분리하고 Bioneer사에서 제조한 eubacteria의 Universal Primer 27F forward primer와 1522R reverse primer를 이용하여 PCR을 수행하였다. 증폭된 PCR 반응 산물은 *Accuprep* PCR Purification Kit를 이용하여 정제한 후, 염기서열을 분석에 사용하였다.

2.1.4.6 종족 계통적 분석

ABI 3730XL capillary DNA Sequencer를 이용하여 염기서열을 분석하였으며, 염기조성, 상호비교(pairwise comparisons)를 위한 염기치환 양상, codon usage 및 각 개체·개체군의 유전자 차이는 MEGA 3.0 프로그램으로 계산되었으며, 미생물 군집 분석에 이용된 계통수는 distance 방법으로 MEGA 3.0(9) 프로그램의 Pair-distance를 이용하여 작성하였다. 결정된 염기서열을 NCBI BLAST를 이용하여 GenBank에 보고된 균주와의 상동성을 조사하였다.

2.2 선발균주의 최적배양조건 확립

2.2.1 분리균주의 최적배양조건

2.2.1.1 분리균주의 온도, pH, NaCl에 대한 생육도 및 항산화 활성

분리균주의 온도에 의한 배양액의 항산화 활성능에 대한 영향을 알아보기 위해 다양한 온도조건 4, 16, 20, 25, 30, 35, 40°C에서 50 ml MB가 들어있는 250 ml 삼각플라스크에 균주를 접종하여 10일 동안 배양하였으며, 분리균주의 pH에 대한 생육도 및 항산화 활성에 대한 영향을 알아보기 위해 pH 6, 6.8, 7.6, 8, 8.4, 9.2에서 기본배지로 MB를 사용하면서 배양되었다. 또한 균주의 NaCl에 대한 영향을 알아보기 위하여 배양배지의 NaCl농도를 0, 1, 2, 2.5, 3, 3.5, 4, 5, 7, 10%로 맞춘 후, 배양기에 배양되었다. 분리 방선균의 생육도를 확인하기 위하여 배양 균사체의 건조중량(Dry weight)를 측정하였으며, 균주 배양액의 항산화 활성(RSA)은 배양액을 원심분리 하여 얻은 상청액 1 ml를 DPPH 용액 2 ml에 첨가하여 525 nm에서 나타내는 흡광도로 전자공여능을 측정하였다.

2.2.1.2 탄소원 종류에 따른 균주의 생육도 및 항산화 활성

배지조건의 최적화 과정에서 탄소원의 종류에 따른 균주의 생육도를 균체 건조중량을 이용하여 측정하였으며, 배양액의 항산화 활성 측정은 DPPH법에 의한 전자공여능으로 측정하였다. 균주 배양은 기본배지인 Marine broth를 기본 배지로 하여 D-Mannose, Starch, Sucrose, Xylose, Glycerine, D-Fructose, Lactose, Dextrose, Mannitol, Maltose, Galactose를 각각 1% (w/v)로 첨가하여 초기 pH를 7.8로 동일하게 조정된 후, 전 배양된 분리균주를 각각 2% (v/v)로 접종하여 25°C에서 10일간 배양한 후, 원심분리를 통한 균사체를 확보하고 건조중량을 측정하면서 생육도 측정하였으며, 배양액을 원심분리하고 얻은 상등액을 가지고 항산화 활성을 측정하였다.

2.2.1.3 질소원 종류에 따른 배양액의 항산화 활성

분리균주의 질소원 종류에 따른 생육도를 균체 건조중량을 이용하여 측정하였으며, 배양액의 항산화 활성 측정은 DPPH법에 의한 전자공여능으로 측정하였다. 균주 배양은 기본배지인 Marine broth 배지에 최적탄소원인 Galactose를 1% 농도로 첨가한 후, Peptone, Yeast extract, Tryptone, NaNO_3 , $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$, Malt extract, NH_4NO_3 , KNO_3 를 각각 0.5% (w/v)의 농도로 각각 첨가하였으며, 전 배양된 분리균주를 각각 2% (v/v)로 접종하여 초기 pH를 동일하게 7.8로 조정 한 후, 25°C에서 10일간 배양한 후, 균체의 건조중량을 측정하여 생육도를 확인하였으며, 배양액을 원심분리하고 얻은 상등액을 이용하여 항산화 활성을 측정하였다.

2.3 방선균 배양액 추출물의 생리활성 평가

2.3.1 분리 방선균주 메탄올 추출물 농도별 생리활성 평가

2.3.1.1 농도별 항균활성 측정 (Disk Method)

항균활성이 높게 나타난 실험구는 농도별(100, 200, 500 $\mu\text{g/ml}$) 실험을 위해 disk를 제조하였다. 항균 활성측정은 앞에서 제시되었던 Disk diffusion method를 사용하였다. 농도별로 제조된 disk를 균액이 도말 된 배지 위에 올려놓고 각각의 균주배양온도에 맞추어서 24시간 배양하여 disk 주위의 생육 저해 환 유무를 확인하였다.

2.3.1.2 MIC (Minimum Inhibition Concentration) 측정

최소억제농도(Minimum Inhibition Concentration, MIC)는 높은 활성을 보였던 균주를 대상으로 Microtitre plate assay를 통하여 확인하였다. MIC 측정은 microtitre plate에 각각의 피검균에 따른 배지를 200 μl 씩 채운 후 제공된 배양액과 활성이 높았던 추출액, 분획물을 2배 희석법으로 희석 혼합한 후, McFaland No. 0.5 농도의 피검균의 현탁액을 2 μl 씩 접종하여 24, 48시간 배양한다. 이에 660 nm의 흡광도 값을 통해 최소억제농도(MIC) 및 억제정도를 가늠하였으며, 각 희석단을 plate에 접종하여 피검균의 생육유무를 통해 최소억제농도(MIC)를 확정하였다.

2.3.1.3 시험균주에 대한 항생제 감수성 테스트

23종의 병원성 미생물 균주의 항생제 감수성 시험을 통해 방선균 후보물질들의 항균력을 비교하였으며 사용된 항생제는 Ampicilline, Chloramphenicol, Oxytetracyclin, Erythromycin, Neomycin, Norfloxacin 총 6종에 대하여 실시했다.

2.3.1.4 농도별 항산화활성 측정

방선균 배양액 메탄올 추출물 항산화활성이 높게 나타난 실험구에 대해서 농도별(100, 500, 1000 $\mu\text{g/ml}$) 항산화활성을 측정하였다. 항산화활성 측정은 ESR (Electron Spin Resonance) spectrometer를 이용하여 측정하였다.

2.3.1.4.1 ESR spectrometer를 이용한 DPPH 라디칼 소거활성 (RSA)

각 sample의 DPPH 라디칼 소거활성은 Nanjo등의 방법에 의하여 측정하였다. 60 μl 시료용액에 DPPH (60 μM) 용액을 첨가하여 10초 동안 교반한 다음 혼합용액을 quartz capillary tube에 옮긴 후 2분 후에 ESR (Electron Spin Resonance) Spectrometer로 측정하였다. ESR 측정에 대한 조건은 Table 1에 나타내었다. 스펙트럼은 scan time : 30s, field : 336 ± 5 mT, time constant : 0.3s, power : 5 mW, amplitude : 1×500 의 조건으로 기록하였다. 항산화시료에 대한 DPPH 라디칼의 소거활성은 아래의 식을 이용하여 계산하였다.

2.3.1.4.2 ESR spectrometer를 이용한 Hydroxyl 라디칼 소거활성 (HSA)

Sample의 Hydroxyl 라디칼 소거활성은 Rosen (1984)등의 방법에 의하여 측정하였다. 20 μl 시료용액에 0.3 M DMPO 20 μl , 10 mM FeSO_4 20 μl , 10 mM H_2O_2 20 μl 을 혼합한 다음 quartz capillary tube에 옮긴 후 2.5분 후에 ESR (Electron Spin Resonance) Spectrometer로 측정하였다. ESR 측정에 대한 조건은 Table 1에 나타내었다. 스펙트럼은 scan time : 30s, field : 336 ± 5 mT, time constant : 0.3s, power : 1 mW, amplitude : 1×100 의 조건으로 기록하였다. 항산화시료에 대한 Hydroxyl 라디칼의 소거활성은 아래의 식을 이용하여 계산하였다.

2.3.1.4.3 ESR Spectrometer를 이용한 Alkyl 라디칼 소거활성 (ARS)

각 추출물의 Alkyl 라디칼 소거활성은 Hiramoto (1993)의 방법에 의하여 측정하였다. 20 µl의 시료용액에 D.W 20 µl, 40 mM 2,2'-Azobis (2-amidinopropane) dihydrochloride (AAPH) 20 µl, 40 mM alpha-(4-pyridyl 1-oxide)-N-tert-butylnitron (POBN) 20 µl를 혼합한 다음 37°C에서 30분 방치한 후 quartz capillary tube에 옮긴 후 ESR로 측정하였다. ESR 측정에 대한 조건은 Table 1에 나타내었다. 스펙트럼은 scan time : 30s. field : 336 ± 5 mT, time constant : 0.3s, power : 7 mW, amplitude : 1×100의 조건으로 기록하였다. 항산화시료에 대한 Alkyl 라디칼의 소거활성은 아래의 식을 이용하여 계산하였다.

Radical scavenging activity (%) =

$$[1 - (\text{ESR signal intensity for medium containing the additives of concern} / \text{ESR signal intensity for the control medium})] \times 100$$

Table 3. Electron spin resonance condition for antioxidant activity measurement of actinomycetes extracts

ESR Measurement Condition					
DPPH radical		Hydroxyl radical		Alkyl radical	
Central field	3475	Central field	3475	Central field	3475
Modulation frequency	100 kHz	Modulation frequency	100 kHz	Modulation frequency	100 kHz
Modulation amplitude	2 G	Modulation amplitude	2 G	Modulation amplitude	2 G
Microwave power	5 mW	Microwave power	1 mW	Microwave power	10 mW
Gain	6.3×10^5	Gain	6.3×10^5	Gain	6.3×10^5
Temperature	298 K	Temperature	298 K	Temperature	298 K

2.3.2 분리방성균 유기용매 분획물 생리활성 평가

2.3.2.1 유기용매 Fraction별 분획물 제조

항균 및 항산화활성이 확인된 해양 유래 방선균주 *Streptomyces* sp. ACT-1과 *Streptomyces* sp. ACT-18을 MB (Marine Broth, Difco. Co. USA)에 접종하여 Shaking incubator에서 25°C에서 120 rpm 조건으로 3일간 전 배양한 후, 2% (v/v) 비율로 3 L fermentor에 동일조건으로 2주간 배양하였다. 배양액은 균체와 배양액을 분리하기 위해 원심분리 (8,000 rpm, 15~20 min, 4°C) 한 후, 균체는 증류수로 2회 씻어 낸 후 동결건조기를 이용하여 건조하고 배양액의 경우도 동결건조기를 이용하여 분말로 만들어 사용한다. 추출용매는 Methanol용액을 사용하였으며, 용매 100 ml에 건조된 균체 및 배양액 1 g을 넣어 25°C에서 48 시간 동안 추출하여 여과 후, 이를 실험에 사용하였다.

분획물의 조제는 에탄올 추출액을 감압 농축하고, 이것을 적정량의 증류수로 분산시킨 후, Fig. 1과 같은 방법으로 순차적으로 분획하였다. 즉 분획갈때기에서 3배량의 diethyl ether를 가한 후, 2회씩 추출, 농축하여 분획을 얻었고, 계속해서 같은 방법으로 순차적으로 물층을 chloroform, ethyl acetate, n-butanol로 순차적으로 추출, 농축하여 각각의 분획 및 최종 물층을 농축한 분획을 동결건조하여 얻은 분말을 본 실험에 사용하였다. 또한 배양액의 분획은 배양액을 동량의 용매를 이용하여 같은 방법으로 실시하였다.

2.3.2.2 분획물별 항균활성 측정

총 21종의 후보 방선균주 메탄올추출물의 항균활성 평가에서 해양병원성 세균 및 질병유발세균에 대한 항균활성이 높게 나타난 균주에 대하여 2차적인 스크리닝 단계를 거쳐서 총 2균주를 분리하였으며, 최종적으로 분획물을 제조하였다.

분획물별 항균활성 평가 또한 메탄올 추출물의 항균활성 측정방법과 동일한 방법인 paper disk diffusion법에 의해서 실험을 실시하였으며, 분획물인 경우 기본적으로 disk의 추출물 농도를 100 µg/ml에 맞추어서 실험을 실시하였다.

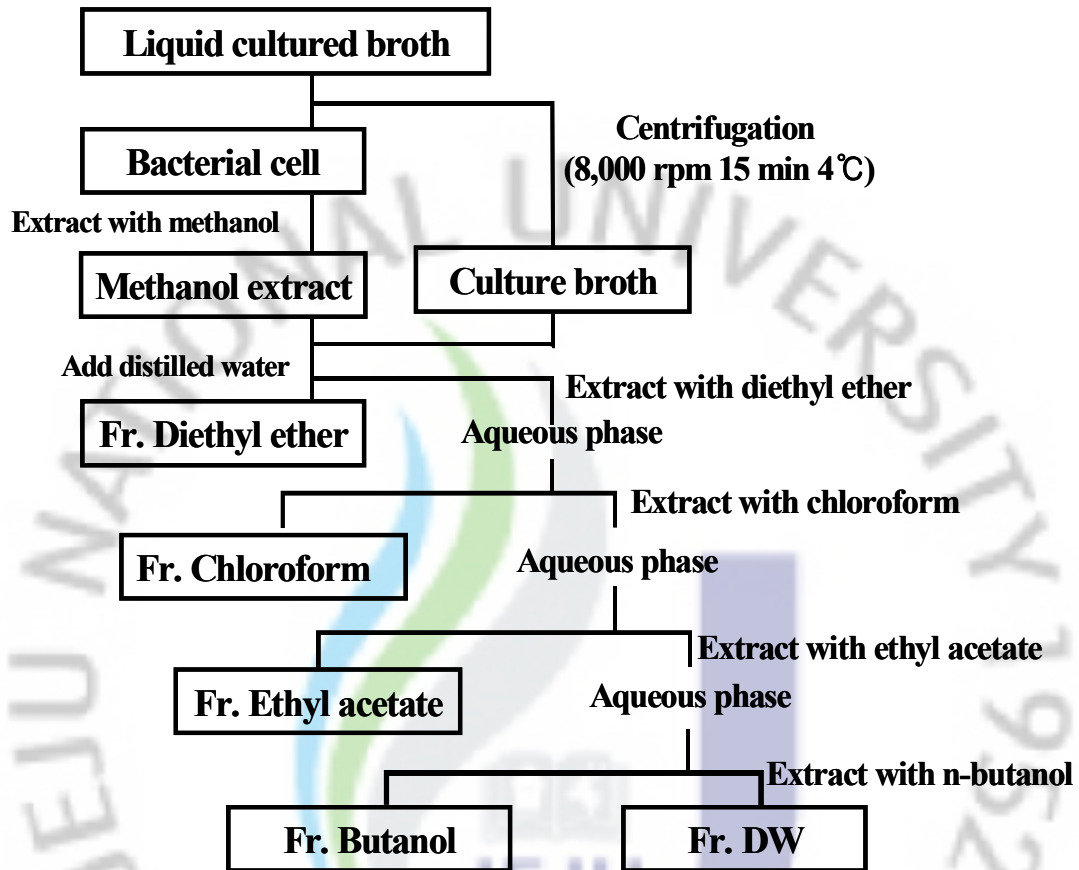


Fig. 1. Fractionation of bacterial cell and cultured broth of actinomycetes

2.3.2.3 분획물별 항산화활성 측정

Fraction sample의 DPPH free radical, Hydroxyl radical, Alkyl radical 소거활성은 위에 기술되어 있는 방법을 사용하였다.

2.4 방선균 추출물을 이용한 양식어류 생물접촉 실험

2.4.1 메탄올 추출물을 이용한 사료첨가제의 제조

양식넙치의 사료첨가제를 제조하기 위하여 분리 방선균 *Streptomyces* sp. ACT-1과 *Streptomyces* sp. ACT-18을 fermentor(5L)를 이용하여 3 L씩 각각 배양하였다. 배양 후, 원심분리를 통하여 균체와 배양액을 분리한 후, 배양액에 Methanol를 2배 (v/v) 첨가한 후, 24시간 shaking 조건에서 메탄올 추출물을 확보하였으며, 추출물의 메탄올 성분을 제거하기 위해서 감압 농축기를 이용해 메탄올을 제거한 후, 동결건조 과정을 거쳐서 최종 추출 분말을 확보하였다. 사료첨가제로서의 사용을 위해서 총 사료량의 추출분말을 증류수에 1%, 2%농도로 각각 녹인 후, 첨가하여 dry oven 50°C에서 10시간 건조 되었으며, 본 시료를 넙치 사료로서 사용하였다. 그리고 사료 급이는 총 어체중의 2%를 하루 기준으로 투여하였다.

2.4.2 넙치 사육조건 및 사육기간

생물 접촉 실험을 위해서 제주도 조천읍 함덕리에 위치한 제주대학교 부설연구소인 해양과환경연구소에서 실험을 실시하였으며, 실험어는 제주도내 양식장에서 사육되고 있는 양식넙치를 구입한 후, 각 실험구마다 50마리씩 배치하였다. 또한 연구소 환경에 적응시키기 위해 2주 동안 기초사료를 공급하였으며, 처음 넙치의 평균 무게는 평균 140.47 g, 전장은 평균 22.46 cm였다. 총 실험기간은 2008년 8월 8일부터 2008. 11.21일까지 총 15주간 실험을 실시하였으며, 실험시작일 사육수조 내 수온은 20.4~20.67°C, pH는 8.38~8.54, DO는 7.01~8.01, 염분농도는 33.16~33.59 ‰였다.

Table 4. Formulation and chemical composition (g/100 g) of diets for olive flounder

Ingredients	Concentration (%)
Fish meal	49
Soy bean meal	7
Wheat flour	10
Defated rice bran	8
α -potato starch	5
α -cellulose ¹	0.5
Squid liver oil ²	4
Blood meal	2
Dextrin	2
Casein ¹	3
EPA+DHA ²	0.5
Vitamin premix ^a	4
Minerals premix ^b	3
<i>Additions to standard diet</i>	
Actinomycetes extract	1~2
Approximate composition (% wet weight)	
Crude protein	51.6
Crude fat	12.5
Crude starch	18.4
Crude ash	12.3

¹United States Biochemical (Cleveland, OH)44122.

²E-Wha oil, Pusan, Korea.

^aContains (as g/100 g premix): DL-calcium pantothenate, 0.5; choline bitartrate, 10; inositol, 0.5; menadione, 0.02; niacin, 0.5; pyridoxine-HCl, 0.05; riboflavin, 0.1; thiamine mononitrate, 0.05; DL- α -tocopheryl acetate, 0.2; retinyl acetate, 0.02; biotin, 0.005; folic acid, 0.018; B₁₂,0.0002; Cholecalciferol,0.008; α -cellulose,85.0.

^bContains (as mg/100 g premix): Al, 0.12; Ca, 500; Cl, 10; Cu, 0.5; Co, 0.9; Na, 0.125; Mg, 50; P, 5000; K, 425; Zn, 0.3; Fe, 4; I, 0.45, Se, 0.02; Mn, 0.9.

2.4.3 사육수조의 이화학적 특성조사

사육수조내의 온도, pH, 염분농도, 용존산소량(DO)의 변화량을 측정하기 위하여 YSI 556 MPS (Multi-probe system)의 probe module를 사육수조 내에 직접 담그고 그 측정값을 확인하였다. 사육수조내의 이화학적 특성조사는 실험 시작일 기준으로 2주 간격으로 측정되었다.

2.4.4. 성장도 조사

실험어의 성장도조사는 2주 간격으로 실시하였으며, 측정 24시간 전에 절식시킨 후, 2-phenoxyethanol (Sigma. USA)로 마취시켜 측정하였다. 성장도 조사방법은 각 실험구에서 무작위로 20마리를 선발하여 실험어의 무게를 측정하여 평균을 내었다.

2.4.5 혈액분석을 통한 면역활성 능력 평가

2.4.5.1 혈액분석기를 이용한 혈액분석

실험어의 채혈은 실험시작과 종료일 기준으로 총 2회 실시하였으며, 측정 24시간 전에 절식시킨 후 2-phenoxyethanol (Sigma. USA)로 마취시켜 측정하였다. 각 수조당 3마리씩 무작위로 선발하여 미부에서 혈액을 채혈한 후, 항응고제가 처리되지 않은 원심 분리관에 넣고 실온에 30분간 방치 후에 3,000 rpm에서 10분간 원심 분리하여 분석하였다. 혈청성분은 자동 혈액 분석 장치 (Ch100 plus, Deawang meditecq., KOREA)를 사용하여 Glutamic oxaloacetic transaminase(GOT), Glutamic pyruvic transaminase(GPT), Total protein, Glucose, LDH, Phosphorus, Triglycerides, Hemoglobin 를 측정하였다.

2.4.5.2 어류식세포의 활성산소 측정

어류 식세포 작용을 알아보기 위하여 respiratory burst activity를 Anderson과 Siwicki (1994)의 실험방법에 따라 분석하였다. 실험어의 미부에서 채취한 전혈을 1.5 ml 마이크로튜브에 넣고 0.2% Nitroblue tetrazolium (NBT, Sigma) 를 전혈과 1:1(v/v)로 처리하여 30분간 상온에서 반응시킨 후, 1 ml dimethyl foramide 를 넣고 반응을 정지시킨다. 그런 다음 2000 rpm에서 5분간 원심분리 한 후 상층액을 수거하여 540 nm에서 micro-reader (Packard Spectrocount™)로 흡광도 값을 측정한다. Blank 는 dimethyl foramide 로 하고, 대조구는 NBT 시약을 사용하였다.

2.4.5.3 혈청의 Lysozyme 활성 측정

혈청의 Lysozyme 활성 측정은 Kumari의 방법(1984)에 따라서 분석하였다. Lysozyme 활성을 측정하기위해 각각의 실험구 미부에서 채혈한 혈액의 혈청 50 μ l와 0.05 M sodium phosphate buffer (pH 6.2)에 *Micrococcus lysodeikticus* (0.2 mg/mL)를 부유시킨 solution 1 mL을 96 well plate에 혼합시킨다. 20 $^{\circ}$ C 조건에서 micro-reader를 이용하여 530 nm에서 0.5분과 4.5분에 흡광도를 측정하였다. Lysozyme의 활성 단위는 분당 0.001의 흡광도 감소를 나타내는 효소의 양으로 정의하였다.

2.4.6 어류 병원성 세균을 이용한 인위감염에 의한 생존율 실험

사료첨가제 투여가 넙치의 항병력에 미치는 영향을 알아보기 위하여 현재 양식장에 발병 빈번도가 가장 높은 그람양성 세균인 *Streptococcus iniae* (KCTC 3657)를 이용하여 공격실험을 실시하였다. 균액은 10⁸ CFU/ml의 농도가 되도록 멸균 생리식염수에 현탁한 후, 공격 실험용액으로 사용하였다. 공격실험은 실험 종료일을 기준으로 실시하였으며 대조구를 비롯하여 실험구에서 무작위로 30마리씩 선정하여 700 L수조에 각각 배치하였다. 1 ml 주사기를 이용하여 각 마리당 200 μ l씩 복강 주사한 후, 12일 동안 누적 폐사율을 조사하였다.

3. 결과 및 고찰

3.1 생리활성 물질 생산 균주의 분리 및 동정

3.1.1 사용 방선균 균주 및 배양조건

2006년도 제주도내 9지역의 해수욕장을 중심으로 해수, 생물시료, 해조류시료로부터 최종적으로 방선균 및 방선균 유사균주로 의심되는 균주 145 종을 분리하였다. 본 실험에서는 순수 분리된 균주를 이용하여 MA 배지에서 계대배양한 후, Marine broth (MB, Difco, USA)에 접종하여 25°C shaking incubator에 2주간 배양되었다.

3.1.2 균주 선별을 위한 항균활성 및 항산화 활성

3.1.2.1 분리 방선균주의 1차 스크리닝

해양에서 분리된 방선균주 및 후보균주 총 145종을 가지고 생리활성이 가장 높은 균주를 선별하기 위해서 항균 및 항산화활성 측정하였다.

생리활성 물질 생산 후보 균주들을 MB 배지 50 ml 첨가된 250 ml 삼각플라스크에 2주간 배양된 후, 원심분리를 통하여 얻어진 배양 상등액을 가지고 항균 및 항산화 실험을 실시하였다. 항균활성을 측정을 위하여 Disk paper 방법을 사용하였으며, 항균활성 측정에 사용된 균주는 일반적으로 어류질병 유발 세균들 위주로 측정되었으며, *Vibrio anguillarum*, *Streptococcus iniae*, *Edwardsiella tarda*에 감수성이 보이는 균주를 우선적으로 선별하였다.

그리고 배양액의 항산화 활성을 확인하기 위하여 DPPH법을 사용하였는데, 전자공여능은 4×10^{-4} M DPPH 용액 2 ml와 방선균 배양 상청액 1 ml를 혼합한 후, 흡광광도계로 525 nm에서 흡광도를 측정되었으며, 전자공여능이 높은 결과를 기준으로 하여 후보균주를 선별하였다 (Not shown data).

최종적으로 생리활성 물질 생산 방선균 후보균주들의 항균 및 항산화 활성이 높은 균주 총 21종류의 후보균주를 선정할 수 있었으며, 생리활성 물질을 생산하는 균주를 각각 ACT-1~ACT-21라 명명하였다. 또한 분리된 방선균주 총 21종을 대상으로 플라스크 배양을 통해서 생산된 균체와 배양액을 원심분리를 통해서 분리하였으며, 유기용매인 메탄올을 이용하여 24시간동안 추출되었다. 그 후 감압 농축기를 이용해서 유기용매를 모두 제거한 후, 실험시료로 사용되었다. 그 결과 분리균주 배양액 성분의 메탄올 추출물 총 21종을 제조하였으며, 추출물에 대한 수율을 Table 5에 나타내었다.

Table 5. Methanol extract yields of isolate strain ACT-1~ACT21.

Strain Number	Methanol Extract Yield	Strain Number	Methanol Extract Yield
ACT-1	149 mg/ml	ACT-11	265 mg/ml
ACT-2	180 mg/ml	ACT-12	169 mg/ml
ACT-3	104 mg/ml	ACT-13	159 mg/ml
ACT-4	161 mg/ml	ACT-14	358 mg/ml
ACT-5	151 mg/ml	ACT-15	97 mg/ml
ACT-6	153 mg/ml	ACT-16	268 mg/ml
ACT-7	140 mg/ml	ACT-17	126 mg/ml
ACT-8	169 mg/ml	ACT-18	141 mg/ml
ACT-9	174 mg/ml	ACT-19	146 mg/ml
ACT-10	158 mg/ml	ACT-20	242 mg/ml
		ACT-21	126 mg/ml

3.1.2.2 선별 방선균주 메탄올 추출물의 항균 및 항산화활성 평가

선정된 21종 방선균주 (ACT-1~ACT-21) 배양액 메탄올추출물에 대한 항균 활성 평가를 위해서 수산어류의 연쇄구균증을 일으키는 균인 *Streptococcus parauberis*, *S. iniae*, 비브리오증을 일으키는 *Vibrio mimicus*, *V. anguillarum* 식중독을 일으키는 균인 *V. salmonicida*, 인체질병유해세균인 *Staphylococcus aureus*, *Candida albicans*, *Streptococcus mutans*, *Propionibacterium acnes*, *Pityrosporum avale* 총 10종에 대하여 항균활성을 테스트 하였다. 그 결과를 Table 6에 나타내었다. 수산양식어류인 넙치, 돌돔 등의 연쇄구균증을 일으키는 세균인 *Streptococcus parauberis*, *Streptococcus iniae*에 대해서는 BMEA-1, BMEA-10, BMEA-14, BMEA-15, BMEA-18 시료에서 가장 높은 감수성을 보였으며, 비브리오증을 유발시키는 *Vibrio anguillarum*, *Vibrio mimicus*에서는 거의 모든 시료에서 감수성이 없는 것으로 확인되었지만 BMEA-1, BMEA-2에서는 감수성이 있는 것으로 나타났다. 또한 인체질병유발세균들인 *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus mutans*, *Propionibacterium acnes*, *Pityrosporum avale*에 대한 항균감수성 결과 *S. aureus*에서는 BMEA-14, BMEA-15과 BMEA-18에서 높은 항균활성을 보였으며, *Candida albicans*에서는 BMEA-9과 BMEA-19에서만 활성을 나타내었다. *S. mutans*에서는 BMEA-2, BMEA-10, BMEA-11, BMEA-13, BMEA-14, BMEA-15, BMEA-17, BMEA-18, BMEA-20에서 높은 항균활성을 확인할 수 있었다. 또한 무좀질병 유발세균인 *Propionibacterium acnes*, *Pityrosporum avale*에 대한 항균활성에서는 BMEA-1, BMEA-14과 BMEA-18에서 좋은 항균활성을 나타내었다.

메탄올 추출물의 항균활성을 종합해보면 BMEA-1, 10, 11, 13, 14, 15, 18에서 전체적으로 병원성 균주에 감수성이 있는 것으로 확인되었다. 이러한 결과들을 바탕으로 차후 인체질병유발세균 및 어류질병유발세균에 대한 대체 항생제의 자원으로 응용이 가능할 것으로 사료되어진다. 본 연구에서는 수산양식동물을 대상으로 실험을 실시하기에 최종적으로 항균활성 테스트에서는 인체질병유발세균에 대한 분석결과를 배제하고 연쇄구균증 유발세균이나 비브리오증 유발세균에 대하여 최종적인 스크리닝을 실시하였다.

Table 6. Antibacterial activities of the liquid culture broth methanol extract of marine actinomycetes.

	<i>S. parauberis</i>	<i>S. iniae</i>	<i>S. aureus</i>	<i>Candida albicans</i>	<i>S. mutans</i>	<i>P. acnes</i>	<i>P. avale</i>	<i>V. mimicus</i>	<i>V. salmonicida</i>	<i>V. anguillarum</i>
BMEA-1	24	21			15.1	16.2	19.82			15
BMEA-2		10			19.72				11.36	18.2
BMEA-3										
BMEA-4	13.90	10.64	15.90					10	39.14	
BMEA-5		12.2								14.2
BMEA-6		10.12					13.52			
BMEA-7		9.23			13.20		9.30			13
BMEA-8					12.55					9.6
BMEA-9	10			15.92			19.20		19.07	
BMEA-10	21.31	16.64	12.37		25.67		15.04		12.87	
BMEA-11	13.1	13.3			28.79	13.42	9.30			10.68
BMEA-12							14.06		13.08	
BMEA-13	18.06	14.42	11.15		21.31	9.30	13.02		13.08	
BMEA-14	31.36	30.21	22.52		27.98	24.96	25.93		29.27	
BMEA-15	19.64	16.54	15.74		26.77	16.17	14.50		10.40	
BMEA-16		8.6								13.6
BMEA-17	10.62	11.41			18.67		9.30		15.49	
BMEA-18	25.74	26.18	23.13		27	23.95	26.36		29.88	
BMEA-19		9.8		20.34			9.30			9.2
BMEA-20		9.2			25.98	12.70	9.30			10.8
BMEA-21		11.2			11.90					10.12

Cells were grown on MHA plate for 24h at 26, 37°C after 1000 µg/ml of broth methanol extract was absorbed into paper disc (8 mm in diameter) and then the diameter (mm) of the growth inhibition zone was measured. Each value represents the average of three independent experiments. BMEA, Broth Methanol Extract ACT.

총 21종류의 방선균 배양액 메탄올 추출물을 시료로 하여 ESR spectrometer를 이용하여 DPPH 라디칼 소거활성을 확인하였으며, 결과를 Fig. 2에 나타내었다. ACT-1, ACT-11, ACT-18, ACT-21 시료의 메탄올 추출물 500 $\mu\text{g/ml}$ 의 농도에서 50%이상의 라디칼 소거활성을 보였으며, 대부분의 시료에서 1,000 $\mu\text{g/ml}$ 의 농도일 때 농도 의존적으로 활성의 증가를 확인할 수 있었다. 따라서 본 항산화 실험에서는 ACT-1, ACT-11, ACT-18, ACT-21 균주를 선정하게 되었다.

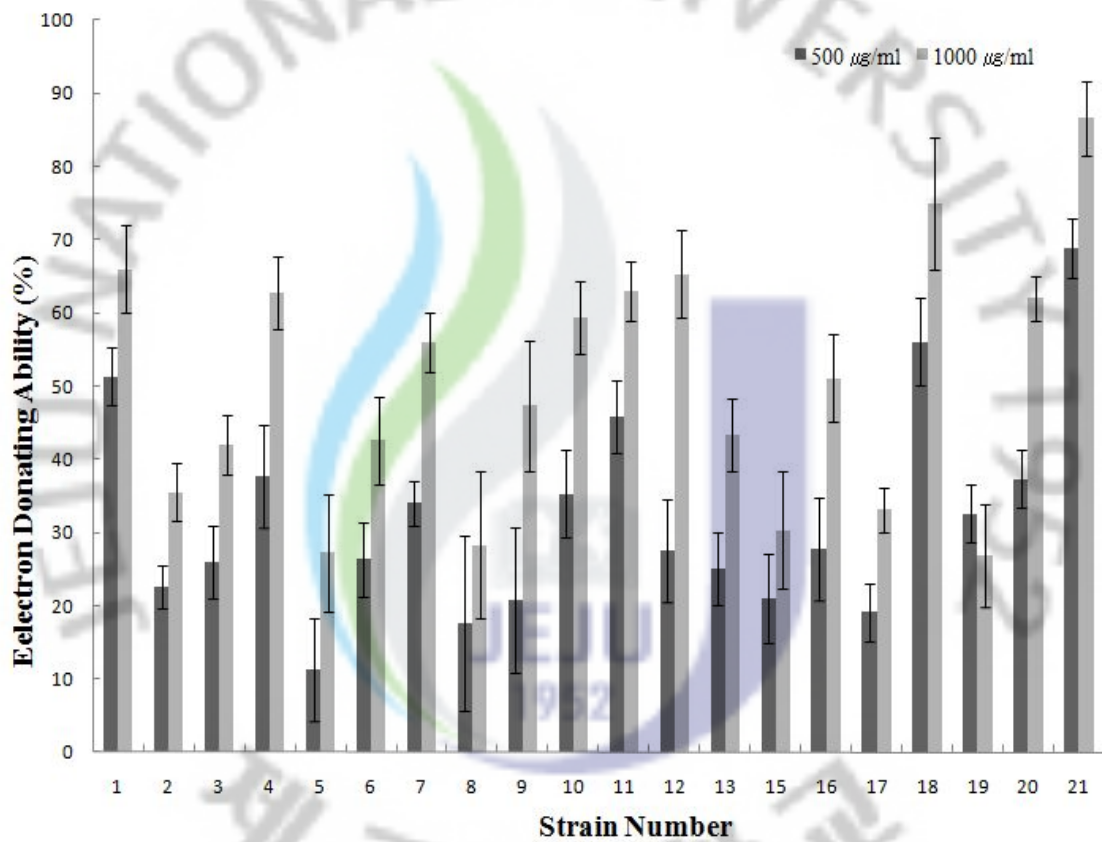


Fig. 2. DPPH radical scavenging activity of isolated strains methanol extract by ESR spectrometer.

3.1.2.3 방선균주 선정

21종의 배양액 메탄을 추출물의 항균 및 항산화 활성을 확인해 측정해 본 결과 항균활성에서는 ACT-1, ACT-4, ACT-10, ACT-11, ACT-13, ACT-14, ACT-15, ACT-17, ACT-18, ACT-20에서 전체적으로 병원성 세균에 대한 항균활성이 높게 나타났으며, 어류질병 유발세균에 대한 항균활성에서는 ACT-1, ACT-10, ACT-11, ACT-14, ACT-15, ACT-18에서 높은 활성을 나타내었다.

항산화실험에서는 ACT-1, ACT-11, ACT-18, ACT-21에서 라디칼 소거활성이 가장 높게 나타났다.

최종적으로 균주 ACT-1, ACT-11, ACT-18을 선정하여 다음 실험들을 진행하였다.



3.1.3 분리 방선균의 동정

3.1.3.1 SEM을 이용한 형태학적 분석

분리균주(ACT-1, ACT-11, ACT-18)의 형태학적 관찰을 위하여 SEM (Scanning Electron Microphotography, JSM-6700F JEOL Ltd)를 통해 형태학적 특성을 관찰했으며, 결과를 Fig. 3에 나타내었다. 분리균주 ACT-1, ACT-18은 전형적인 방선균주인 *Streptomyces* 종들과 유사한 형태학적 성상이 확인되었다. 기본적으로 단간균의 형태로 길이는 약 0.5~1.0 μm 폭은 약 0.4~0.5 μm 였으며, 균사체들이 연쇄적으로 이어져 있는 모습을 하고 있었다. 이러한 형태적인 특성은 방선균주들이 일반적으로 갖고 있는 형태적인 특징으로서 이러한 성상들을 기본적으로 방선균주임을 알 수 있는 단적인 결과로 사료된다.

균주 ACT-11은 *Streptomyces* 종들과는 다른 형태학적 특성을 확인할 수 있었다. 길이는 약 6~10 μm 로 사상균의 형태를 띄며, 폭은 0.3~0.4였다. 다른 방선균주와는 다르게 균사체가 떨어져나가는 모습이 아니라 균사체에서 나뭇가지가 형태로 분화가 이루어지는 특성을 관찰할 수 있었다.

3.1.3.2 배지상에서의 형태학적 분석

MA배지상에서의 균사체의 배양학적 특성을 확인해본 결과 ACT1~ACT21균주에서 거의 Light gray, White, Dark Gray, White pink 등의 White, Gray 계열의 Aerial mycelia의 특성을 확인할 수가 있었으며(Fig. 5), MA배지 상에서 colony 성상 또한 매우 유사하게 관찰되었다. 이러한 특징들 모두 방선균주들이 갖고 있는 배양학적 특성과 매우 유사한 결과라고 사료되어진다.

그리고 MA배지 상에서의 Substrate mycelia의 형태학적 관찰을 해본 결과 Mycelia의 색깔들이 Aerial mycelia의 색깔과는 ACT-15균주를 제외하고는 Mycelia의 다른 양상을 확인할 수 있었다. 대부분이 Red계열, Yellow계열, Dark White, Purple, Orange 등의 화려한 색상들이 많았으며, 기존의 배지색깔과는 거의 다른 색소를 생산하는 것으로 확인되었다. 그리고 분리 균주들의 Mycelia는

성장을 하면서 점차적으로 색이 짙어지는 양상을 보였으며, 균사체 바깥쪽으로 갈수록 어두워지는 특성을 보였다 (Fig. 6). 이러한 양상은 액체배양을 통한 실험을 수행할 경우 유용한 색소 및 생리활성 물질들의 생산가능성이 높다는 것을 단면적으로 나타나는 결과라고 볼 수 있으며, 그래서 분리균주 ACT-1~ACT-21을 MB배지를 이용한 액체배양을 실시하여 액체배양 상태에서의 형태학적 관찰을 실시하였다 (Not Shown Data). 균주들의 배양특성을 확인해 본 결과 대부분의 균주들이 배양 3일 이상부터 색소들을 생산하는 양상을 확인할 수 있었으며, 고체배양 시 생산되었던 색소 특유의 색깔과 거의 똑같은 결과를 얻을 수 있었다. 일반적으로 미생물의 생산하는 색소에는 많은 종류의 생리활성물질을 함유하고 있는 것으로 보고되어지고 있으며, 또한 유용한 성분들 역시 색소와도 많은 연관이 있다고 알려 지고 있다. 본 연구결과에서는 스크리닝 단계에서의 항균 및 항산화 활성을 기초적으로 하여 21종류의 방선균주를 대상으로 배양학적 특성을 관찰하였지만, 더욱더 다양하고 특이한 해양유래 방선균주를 확보할 수 있었으며, 차후 해양유래 방선균 관련 연구에 있어서 많은 도움이 될 것으로 사료된다.

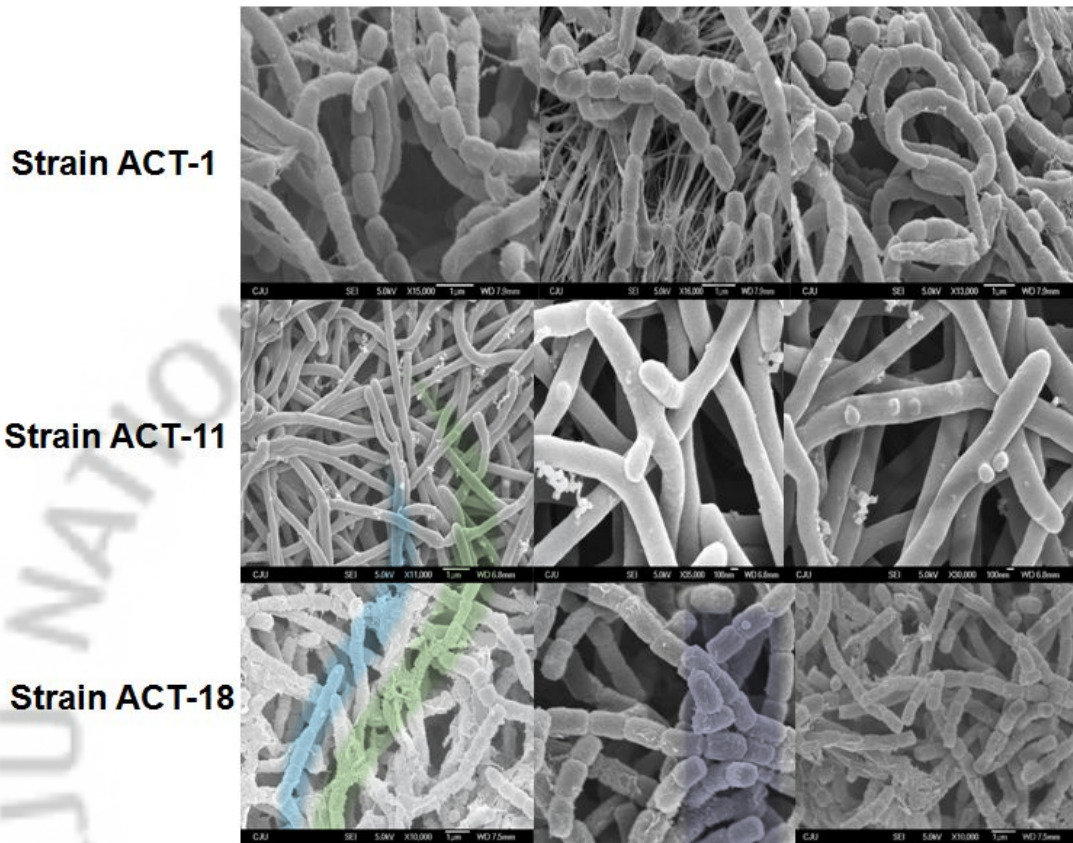


Fig. 3. Scanning electron micrograph of Strain ACT-1, ACT-11, and ACT-18. Cell were grown on MA at 25°C for 10days.

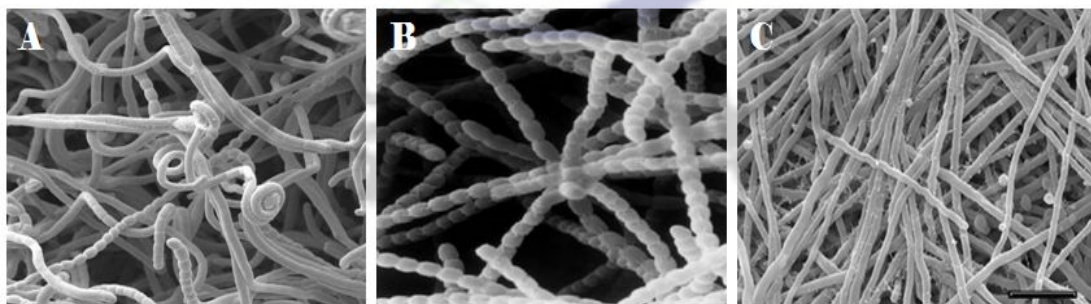


Fig. 4. Scanning electron micrograph of reference strain (A, *Streptomyces* sp; B, *S. coelicolor* C, *Nocardioopsis dassonvillei*)



Fig. 5. Aerial mycelia cultural characteristics of isolate strain ACT-1~ACT-21. Cell were grown on MA at 25°C for 10days.

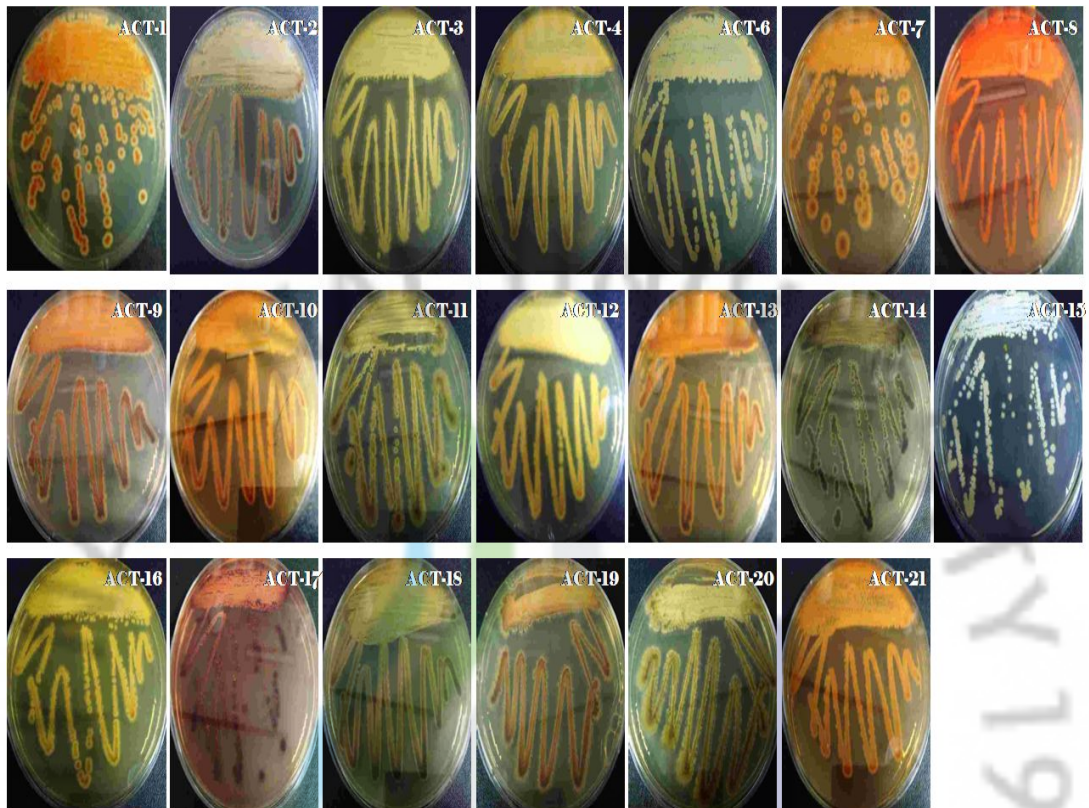


Fig. 6. Substrate mycelia cultural characteristics of isolate strain ACT-1~ACT-21. Cell were grown on MA at 25°C for 10days.

3.1.3.3 분리균주의 생화학적 특성

일반적으로 세균을 동정함에 있어서 생리, 생화학적 특성 및 배양학적 특징을 조사한 후, 참고균주와의 특성을 비교 분석하게 된다. 또한 동정에만 한정되지 않고 그 균주의 기질분해나 성장조건 등의 특성을 파악할 수 있어 미지의 균주의 동정에 필수적이라고 할 수 있다. 그 결과 분리균주 ACT-1, ACT-11(S-1), ACT-18은 그람염색을 통하여 그람양성으로 판명되었으며, 해양유래미생물로서 성장을 위해서 Na^+ 을 필요로 하는 것으로 확인되었다. 분리균주 ACT-1은 호기성조건에서 성장하며, 방선균의 주요 특성인 포자의 운동성은 없는 것으로 확인되었다.

이러한 결과는 방선균의 일반적인 생화학적 특성과 일치하는 것으로 확인되었다. 또한 MA 배지 상에서의 기중균사체 (Aerial mycelium) 색소특성은 하얀색에서 약간 어두워지면서 회색을 띠는 것으로 확인되었으며, 기질균사체(Substrate mycelium)의 색소관찰결과 오렌지와 빨간색을 띠는 것으로 확인되었다. 균주성장기에 있어서 pH는 7~8, NaCl 2.5%를 필요로 하였으며, 당이용능을 확인해본결과 Fructose, Galactose, Glucose, Sucrose, Xylose를 이용하는 것으로 확인되었다 (Table 7).

분리균주 ACT-18은 방선균주의 일반적인 생화학적 성상과 거의 일치하게 나타났으며, MA 배지상에서의 기중균사체 색소분석결과 균사체의 노란색의 회색을 확인할 수 있었으며, 기질균사체는 짙은 초록색으로 최종 판명되었다. 분리균주 ACT-1과 ACT-18은 *Streptomyces* 종들과 거의 유사한 생화학적 특성을 확인할 수 있으며, 비교균주와의 연관성을 찾을 수는 없었지만 전형적인 방선균주의 생화학적 특성을 확인할 수 있었다.

균주 ACT-11(S-1)은 혐기적 조건에서는 성장하지 않았으며, 포자의 운동성이 없는 것으로 나타났다. 이러한 특징은 참고균주와의 성상과 일치하는 것으로 나타났다 (Table 8). 또한 배지상에서의 기중균사체의 색깔을 비교해본 결과 White 또는 Gray 색상을 보였으며, 배지상에서의 기질균사체는 Dark Brown의 색상을 보였는데, 이러한 결과는 *N. dassonvillei*와 *N. antarcticus*와 가장 유사한 결과로 확인되었다. 최적 pH는 분리균주 및 참고균주 모두다 7~8 정도의 범위를 보였

으나 *N. alborubida*와는 다른 특성을 보이는 것으로 확인되었다. Xylose, Cellobiose, Rhamnose, Sucrose를 이용하는 특성을 나타내었다. 이러한 특성을 종합해 볼 때 *N. dassonvillei*와 가장 유사한 생화학적 특성을 확인할 수 있었다.

Table 7. Comparison of physiological and biochemical characteristics of the isolated ACT-1 and ACT-18.

Character	Species					
	Strain ACT-1	Strain ACT-18	<i>S.</i> <i>champavatii</i>	<i>S.</i> <i>globosus</i>	<i>S. olivaceiscl</i> <i>eroticus</i>	<i>S.</i> <i>albosporeus</i>
Growth under anaerobic condition	-	-	-	-	-	-
Gram reaction	+	+	+	+	+	+
Motile spores	-	-	-	-	-	-
Color of aerial mycelium	White to Grayish	Yellow Gray	Yellow	gray	gray	Red
Color of substrate mycelium	Orange to Red	Dark Green	Dark Green	ND	Grayish yellow to olive brown	Yellow Red Violet
Optimum pH for growth	7~8	7.6	ND	8	ND	ND
Optimum NaCl for growth	2.5%	2.5%	ND	ND	ND	ND
Growth on						
L-Arabinose	ND	ND	+	+	+	+
D-Fructose	+	+	+	+	+	+
D-Galactose	+	+	+	+	ND	+
D-Glucose	+	+	+	+	+	+
Sucrose	+	ND	-	+	+	ND
D-Xylose	+	+	+	+	+	+

+, positive; -, negative; ND, no data; V, variable results of test. ^aData compiled from references 10, 15, 17, and 26. Carbohydrate utilization was determined by growth on carbon utilization medium (ISP medium No. 9) supplemented with 1% carbon sources at 25°C. NaCl and pH range for growth was determined on inorganic salts starch agar medium (MA).

Table 8. Comparison of physiological and biochemical characteristics of the isolated ACT-11(S-1).

Character	Species				
	Strain S-1	<i>N. dassonvillei</i>	<i>N. alborubida</i>	<i>N. antarcticus</i>	<i>N. listeri</i>
Growth under anaerobic conditions	—	—	—	—	—
Gram reaction	+	+	+	+	+
Motile spores	—	—	—	—	—
Color of aerial mycelium	White to grayish	White to grayish	Gray	Gray	White on HT agar
Color of substrate mycelium	Dark brown	Yellowish to brownish	Yellow to orange	Dark brown	Yellow
Optimum pH for growth	7~8	7	10	8	8
Optimum NaCl for growth(w/v)	2.5%	ND	ND	ND	ND
Growth on:					
Xylose	+	+	+	+	+
Melezitose	ND	—	+	—	—
Cellobiose	+	+	—	ND	+
Rhamnose	+	+	+	—	+
Sucrose	+	+	+	+	+
Adonitole	ND	—	+	—	—
Inositole	ND	—	+	—	—

+, positive; —, negative; ND, no data; V, variable results of test. ^aData compiled from references 10, 15, 17, and 26. Carbohydrate utilization was determined by growth on carbon utilization medium (ISP medium No. 9) supplemented with 1% carbon sources at 25°C. NaCl and pH range for growth was determined on inorganic salts starch agar medium (MA).

3.1.3.4 ISP 배지에서서의 배양학적 특성

Table 9는 분리균주 ACT-1과 ACT-18의 ISP(International Streptomyces Project)배지 상에서의 배양학적 특성을 나타낸 표이다. 먼저 분리균주 ACT-1은 ISP NO.1, 2, 4, 7 및 Marine agar에서 양호한 성장을 보였으며, 각 배지상에서의 균사체의 색의 차이를 확인할 수 있었다. Tryptone yeast agar에서는 성장 균사체 (Vegetative mycelia)의 색깔이 베이지색을 띄었으며, 기중균사체의 색은 White색을 나타냈다. Yeast malt배지에서는 성장균사체에서는 선명한 빨간색, 기중균사체는 하얀색에 가까운 회색의 색을 보였으며, 무기염 한천배지상에서는 성장균사체의 색이 노란색에 가까웠다. 또한, Pridoham-Gottlieb 배지상에서는 좋은 성장을 보이지도 않았으며, 균사체의 색 또한 뚜렷하게 나타나지 않았다. 또한 분리균주 ACT-18의 ISP(International Streptomyces Project)배지 상에서의 배양학적 특성을 살펴보면 ISP NO.1, 2, 4, 7 및 Marine agar에서 양호한 성장을 보였으며, 각 배지상에서의 균사체의 색의 차이를 확인할 수 있었다. Tryptone yeast agar에서는 성장균사체의 색깔이 회색의 초록색을 띄었으며, 기중균사체의 색은 베이지색을 나타냈다. Yeast malt배지에서는 성장균사체에서는 짙은 초록색, 기중균사체는 베이지색에 가까운 색을 보였으며, 무기염 한천배지상에서는 성장균사체의 색이 하얀색에서 베이지에 가까웠으며, Pridoham-Gottlieb 배지상에서는 좋은 성장을 보이지도 않았으며, 균사체의 색 또한 뚜렷한 색을 보이지 않았다. 그리고 본 결과에서는 분리균주가 Nutrient agar (NA, Difco, USA)에서는 좋지 않은 성장을 보였다. NA 배지성분에는 Na^+ 성분이 들어가 있지 않는데, 성장에 있어서 영향을 준 것으로 사료된다. 분리균주 모두가 해수에서 분리되었기 때문에 성장에 있어서 Na^+ 성분이 매우 중요하다는 것을 나타내는 결과이다.

Table 10은 분리균주 ACT-11의 ISP (International Streptomyces Project)배지 상에서의 배양학적 특성을 나타낸 표이다. 모든 배지상에서 양호한 성장을 보이는 것으로 확인 되었지만, Nutrient agar에서 배양시에는 좋지 않은 성장을 보였다. 이는 배지 성분에 NaCl 성분이 첨가되지 않았기 때문으로 사료되며 이러한 결과는 균주가 Na^+ 성분에 대하여 성장에 있어서 의존성이 있는 것으로 사료

된다. Glycerol tyrosine 배지상에서 Vegetative mycelia의 색은 노란색에 가까웠으며, Aerial mycelia의 색은 하얀색에 가까웠다. Peptone yeast extract 배지상에서 Vegetative mycelia는 어두운색의 yellow, Aerial mycelia는 밝은 노란색을 확인할 수 있었다. 거의대부분의 배지상에서 Vegetative mycelia는 밝은 노란색을 보였으며, Aerial mycelia는 어두운색의 하얀색 또는 회색을 보였다.

Table 9. Cultural characteristics of the isolated ACT-1 and ACT-18 cultured in International *Streptomyces* Project medium

Medium	Characteristics					
	Strain ACT-1			Strain ACT-18		
	Growth	Vegetative Mycelia	Aerial Mycelia	Growth	Vegetative Mycelia	Aerial Mycelia
Tryptone yeast agar (ISP NO. 1)	G	White to Beige	White	G	Gray to Green	White to beige
Yeast malt agar (ISP NO. 2)	G	Pink to Red	White to Gray	G	Dark Green	Beige
Inorganic salt-Starch agar (ISP NO. 4)	G	Yellow	White to Gray	G	White to beige	White to Beige
Tyrosine agar (ISP NO. 7)	G	Orange to Red	White to yellow	G	Dark Gray	Dark Beige
Pridoham-Gottlieb agar (ISP NO. 9)	M	Gray	Gray	M	White	Beige
Nutrient Agar	P	White	White	P	White	White
Marine Agar	G	Red	White	G	Dark Green	Whiteto Beige

G, growth; M, Moderate; P, Poor

Table 10. Cultural characteristics of the isolated ACT-11 cultured in International *Streptomyces* Project medium.

Midium	Characteristics				
	Growth	Vegetative mycelia	Aerial mycelia	Spore	Soluble pigment
Glycerol tyrosine agar	G	G, Yellow	Abundant, white	Poor	Brown
Peptone yeast extract agar	M	M, Dark white yellow	M, white yellow	Poor	Dark brown
Oatmeal agar	M	M, Yellow White	Abundant, white	M	Yellow brown
Glycerol asparagine agar	M	M, Yellow white	M, light gray	Poor	Yellow brown
Starch agar	M	M, Dark white	M, dark white	M	Yellow brown
Tryptone yeast glucose agar	G	G, Dark white brown	M, gray	M	Dark
Nutrient agar	P	P, Dark white	M, white	M	Dark brown
Marine agar	G	G, Dark white	Abundant, white	M	Yellow brown

G, growth; M, Moderate; P, Poor

3.1.3.5 Cellular Fatty Acid 분석

Fig. 7은 분리균주 ACT-1의 Gas Chromatography(GC)를 이용한 지방산 분석 결과이다. 분리균주의 주요 Major Peak는 Iso-C_{15:0}(13-methyltetradecanoic acid) 11.40%, Anteiso-C_{15:0}(12-methyltetradecanoic acid) 31.84%, Iso-C_{16:0}(hexadecanoic acid) 11.34%, C_{16:0}(Palmitic acid) 9.50%로 나타났으며, 본 결과는 *Streptomyces halstedii*와 *S. scabies*균주와 가장 가까운 세포지방산 함량을 나타내었다. 방선균주 *Streptomyces* 속 균주들은 기본적으로 13-methyltetradecanoic acid, 12-methyltetradecanoic acid 및 Palmitic acid 함량이 전체적으로 높게 나타나는 특징을 확인할 수 있었다.

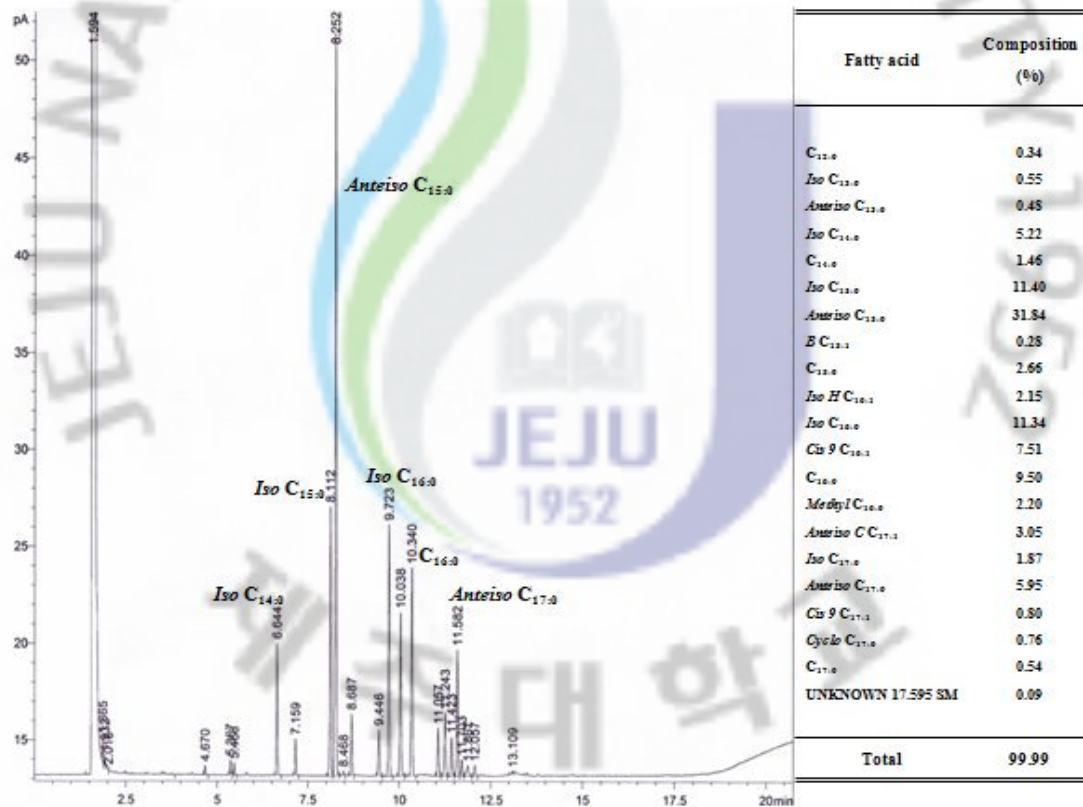


Fig. 7. Cellular fatty acid profile of the strain ACT-1. Fatty acid methyl esters (FAME) mixtures were analysed by capillary GC using a Hewlett Packard model 5898A GC run by Microbial Identification software (Microbial ID).

Fig. 8은 분리균주 ACT-11의 주요 Major Peak는 Iso-C_{16:0} (hexadecanoic acid) 26.82%, Anteiso-C_{17:0} (heptadecanoic acid) 23.42%, Cis9-C_{18:1} (Oleic acid) 21.01%로 나타났으며, 본 세포지방산 분석 결과는 *Nocardopsis dassonvillei* 균주와 매우 일치하는 결과를 얻을 수 있었다. 그리고 분리균주의 지방산 분석 결과는 일반적인 방선균주 *Streptomyces* 종들과는 다른 지방산 함량을 보였으며, heptadecanoic acid와 Oleic acid 함량이 매우 높은 것으로 보아 *Nocardopsis* 종들에게서 특이적으로 많이 존재하는 지방산인 것으로 확인되었다.

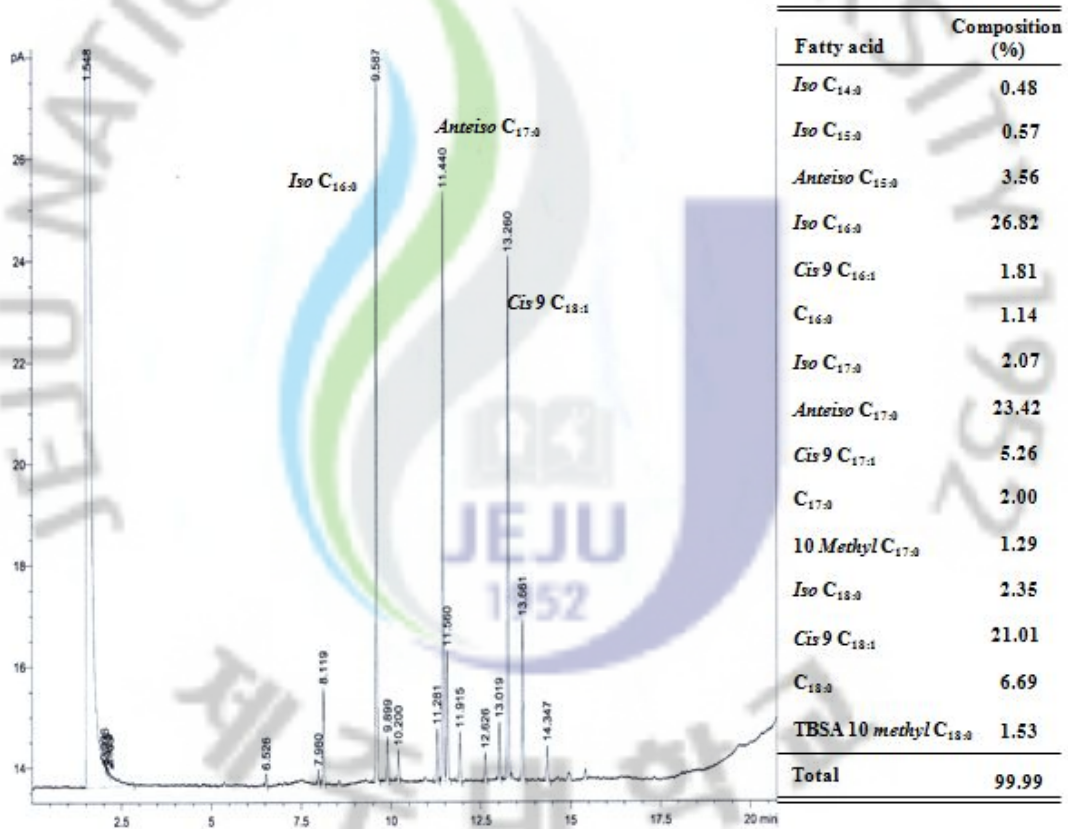


Fig. 8. Cellular fatty acid profile of the strain ACT-11. Fatty acid methyl esters (FAME) mixtures were analysed by capillary GC using a Hewlett Packard model 5898A GC run by Microbial Identification software (Microbial ID).

Fig. 9는 분리균주 ACT-18의 세포지방산 분석결과이다. 분리균주의 Major Peak는 Anteiso-C_{15:0}(12-methyltetradecanoic acid) 39.33%, Cis 9-C_{16:1}(Palmitoleic acid) 11.96%, C_{16:0}(Palmitic acid) 13.08%, Anteiso-C_{17:0}(Heptadecanoic acid)10.99%로 나타났으며, 본 결과는 *Streptomyces* 종들과 유사한 세포지방산 함량을 나타내었다. 그리고 분리균주는Anteiso-C_{15:0}(13-methyltetradecanoic acid) 함량이 40% 정도의 매우 높은 함량을 보여 다른 균주와는 다른 특성을 보였다.

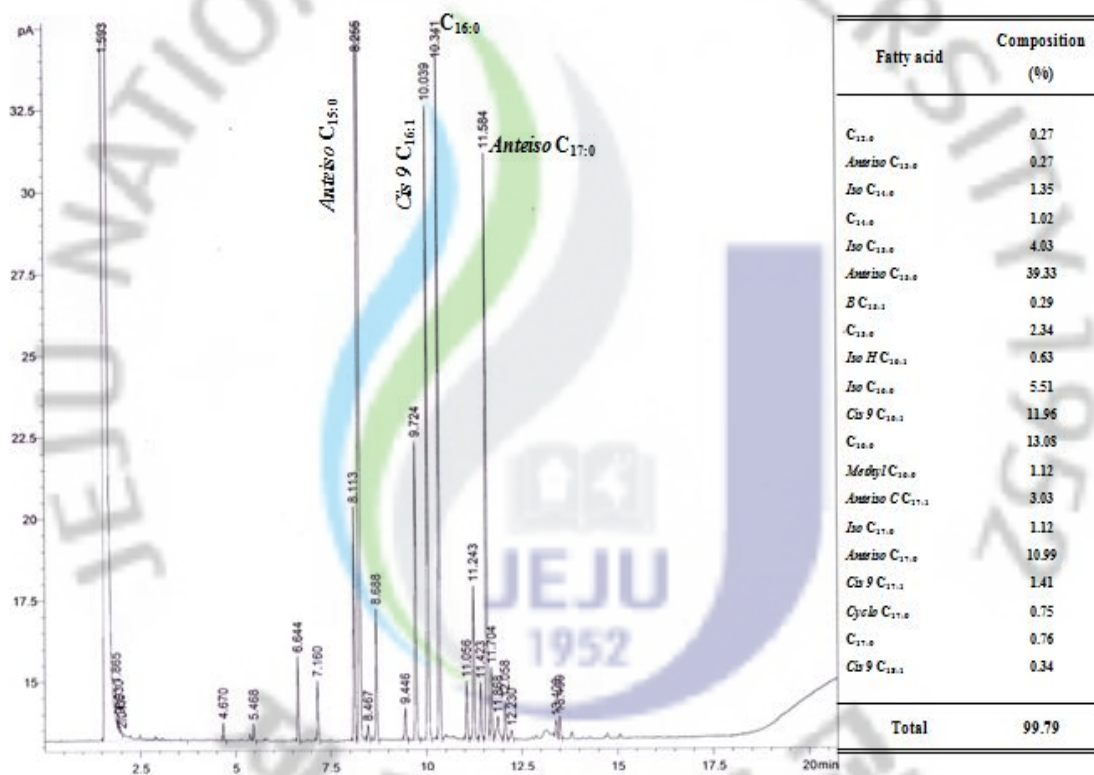


Fig. 9. Cellular fatty acid profile of the strain ACT-18. Fatty acid methyl esters (FAME) mixtures were analysed by capillary GC using a Hewlett Packard model 5898A GC run by Microbial Identification software (Microbial ID).

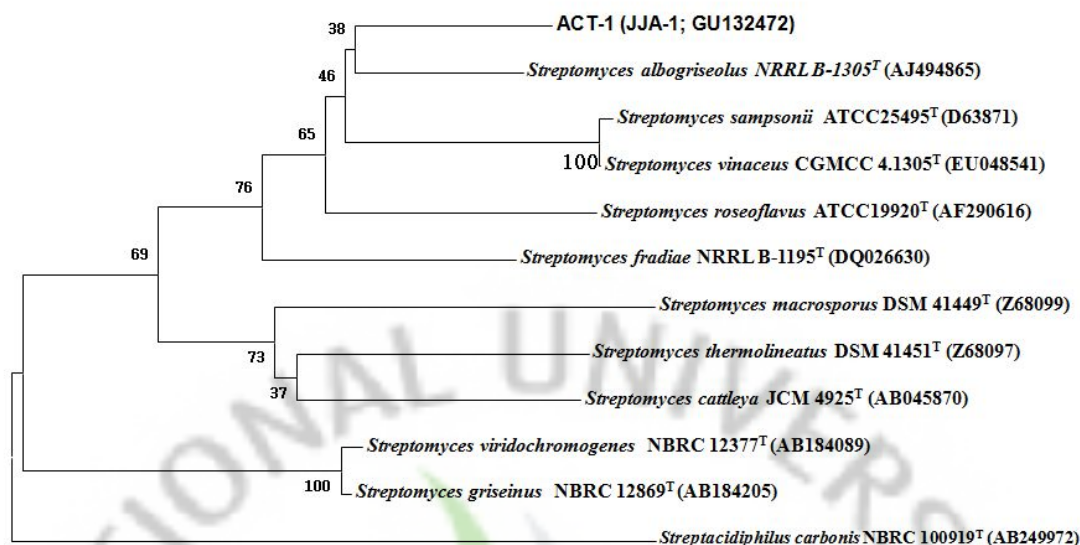
3.1.3.6 16S rRNA 염기서열 및 종속 계통적 분석

일반적으로 리보솜 RNA(rRNA)는 전 생물에 보편적으로 존재하는 보존성이 높은 핵산분자이며, 미생물의 진화계통의 연구에 가장 유용한 분자마커로 이용되고 있다. 특히 범용성이 높은 분자는 small subunit rRNA(AAU rRNA)로서 분류에 이용되는 16S 및 16S 유사(18S) rRNA가 이에 속한다. 현재 미생물의 분류체계는 SSU rRNA의 정보를 근거로 재구축되어 있으며, 이 방법은 미생물 분류학에 필수적인 것으로 인식되기에 이르렀다. 특히 미지의 분리균주의 계통학적 위치를 알기위한 최초의 실험단계에서 SSU rRNA 분석은 필수적이다. 생리활성을 나타내는 균주 총 21종을 대상으로 16S rRNA 염기서열을 분석한 결과 *Streptomyces* 종이 17종으로 가장 많이 분리되었으며, *Pseudonocariaceae* 1종, *Microbacterium* sp. 1종, *Nocardiopsis dassonvillei* 1종, *Actinomycetales bacterium* 1종으로 최종적으로 동정되었으며 (Table. 11), NCBI에 등록된 분리균주와 가장 유사한 염기서열을 가진 참고균주와의 계통도 (Phylogenic tree)를 작성하였으며, 항균 및 항산화 활성이 가장 높게 나타난 균주 ACT-1, ACT-11과 ACT-18를 대상으로 작성되어졌다. 계통수는 거리(Distance)에 근거한 방법으로 작성되었으며, Fig. 10, Fig. 11, Fig. 12에 나타내었다. 분리균주 ACT-1은 NCBI에 등록된 참고균주(9종)와의 계통학적 분석결과 *Streptomyces albogriseolus*(AJ494865), *Streptomyces sampsonii* (D63871), *S. vinaceus* (EU048541)와 가장 근연관계에 있는 것으로 확인되었으며, 균주들과의 similarity를 조사한 결과 98.25, 97.52, 97.59%를 각각 보여 최종적으로 분리균주 ACT-1을 *Streptomyces* sp. ACT-1이라고 명명되었다. 분리균주 ACT-11의 염기서열 분석 결과 참고균주 *Nocardiopsis dassonvillei* (X97886, X97885, X97882) 가장 근연관계에 있는 것으로 확인되었으며, 균주간에 99%이상의 상동성을 보였다. 또한 비교균주인 *N. lucentensis* (X97888), *N. alba* (X97884), *N. listeri* (X97887)와 similarity를 확인한 결과 98.63, 98.05, 97.76%의 상동성을 확인할 수 있었다. 따라서 분리균주는 *Nocardiopsis* sp. 균주들과 거의 일치하는 양상을 보여 최종적으로 *Nocardiopsis* sp. ACT-11로 명명되었다. 분리균주 ACT-18의 계통학적 분석결과는 총 9개의 참고균주와의 염기서열 분석 비

교를 통하여 이루어 졌으며, 참고균주인 *Streptomyces microflavus* (DQ442519)와 가장 근연관계에 있는 것을 확인할 수 있었으며, 염기서열 분석결과 similarity가 100% 일치하는 결과를 얻을 수 있었다. 또한 *Streptomyces albovinaceus* (AY999759), *S. cyaneofuscatus* (AB184860), *S. funicularius* (AB184269) 참고균주들과도 근연관계에 있는 것을 확인 할 수 있었으며, 99.84%의 염기서열 상동성을 확인할 수 있었다. 다른 비교균주들과 99%이상의 상동성을 확인할 수 있었으며, 최종적으로 분리균주 ACT-18을 *Streptomyces* sp. ACT-18로 명명되었다. 이러한 방선균주들의 염기서열 정보를 바탕으로 균주 동정을 실시한 결과 다른 육상 및 해양 미생물과는 확연하게 다른 결과를 얻을 수 있었다. 일반적으로 미생물에서 분리균주와 참고균주간의 염기서열 similarity가 99% 정도의 값을 나타내면 같은 종으로 판명을 하였으나 (종간의 특성을 배제하고) 방선균 같은 경우에는 종간의 유전적인 차이가 거의 없음에도 다른 종으로 판명되는게 많았다. 이러한 결과를 바탕으로 방선균의 동정에 있어서는 유전학적 분석기법을 기초로해서 생리학적 및 형태학적 분석이 동반되어야 할 것으로 사료된다.

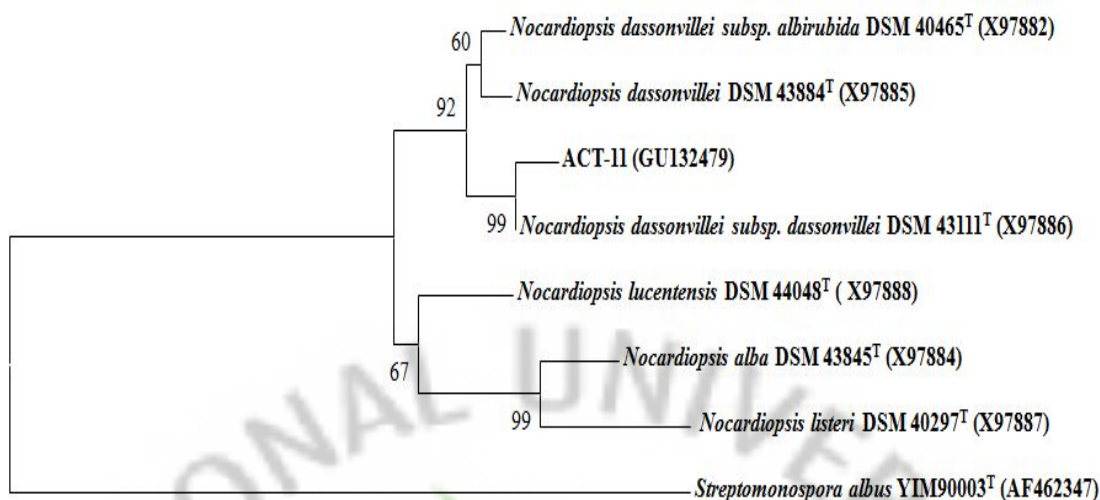
Table 11. 16S rRNA sequence analysis results of strain ACT-1~ACT-21.

Strain	Analysis Result	Strain	Analysis Result
ACT-1	<i>Streptomyces albogriseolus</i>	ACT-11	<i>Nocardiopsis dassonvillei</i>
ACT-2	<i>Streptomyces sampsonii</i>	ACT-12	<i>Streptomyces anulatus</i>
ACT-3	<i>Prauseria</i> sp (Pseudonocardiaceae)	ACT-13	<i>Streptomyces flaveus</i>
ACT-4	<i>Streptomyces</i> sp	ACT-14	<i>Streptomyces microflavus</i>
ACT-5	<i>Microbacterium</i> sp (<i>M. lacticum</i>)	ACT-15	<i>Streptomyces</i> sp.
ACT-6	<i>Streptomyces pactum</i>	ACT-16	<i>Streptomyces lavendulae</i>
ACT-7	<i>Streptomyces parvus</i>	ACT-17	<i>Streptomyces</i> sp.
ACT-8	<i>Streptomyces</i> sp.	ACT-18	<i>Streptomyces microflavus</i>
ACT-9	<i>Streptomyces flavofunqini</i>	ACT-19	<i>Streptomyces violascens</i>
ACT-10	<i>Streptomyces tricolor</i>	ACT-20	<i>Actinomycetales bacterium</i> (<i>Nocardiopsis</i> sp)
		ACT-21	<i>Streptomyces parvus</i> (<i>Prauserella</i> sp.)



	ACT-1	AB184089	AB184205	Z68097	Z68099	AB045870	AJ494865	D63871	EU048541	DQ026630	AF290616	AB249972
Actt-1	---											
AB184089	95.85	---										
AB184205	95.92	99.85	---									
Z68097	96.35	95.56	95.78	---								
Z68099	95.84	94.76	94.83	96.65	---							
AB045870	95.84	96.07	96.29	97.38	96.94	---						
AJ494865	98.25	95.71	95.78	96.43	96.14	96.43	---					
D63871	97.52	95.34	95.41	95.78	95.56	96	97.74	---				
EU048541	97.59	95.41	95.48	95.85	95.63	95.92	97.82	99.93	---			
DQ026630	97.16	96.21	96.14	95.99	96.36	96.29	97.45	97.02	97.09	---		
AF290616	97.3	97.02	97.23	95.85	94.97	95.85	97.45	97.16	97.23	97.08	---	
AB249972	94.35	95.39	95.6	95.39	94.21	94.95	94.51	94.44	94.51	94.44	94.21	---

Fig. 10. Neighbour-joining tree based on nearly complete 16S rDNA sequences, showing relationships between strain ACT-1 and member of the *Streptomyces* sp.. Number at the nodes are levels of bootstrap support (%), based on neighbour-joining analyses of 1000 resampled database. *Streptacidiphilus carbonis* was used as an outgroup. Bar, 0.005 nucleotide substitution per position.



0.005

	X97882	X97885	Act11	X97886	X97884	X97887	X97888	AF462347
X97882	—							
X97885	99.71	—						
ACT-11	99.28	99.35	—					
X97886	99.43	99.5	99.78	—				
X97884	98.28	98.28	98.05	98.21	—			
X97887	97.85	97.99	97.76	97.92	98.78	—		
X97888	98.85	98.71	98.63	98.78	98.56	98.13	—	
AF462347	94.33	94.12	93.87	94.05	93.69	93.33	94.19	—

Fig. 11. Neighbour-joining tree based on nearly complete 16S rDNA sequences, showing relationships between strain ACT-11 and member of the *Streptomyces* sp.. Number at the nodes are levels of bootstrap support (%), based on neighbour-joining analyses of 1000 resampled database. *Streptomonospora albus* (AF462347) was used as an outgroup. Bar, 0.005 nucleotide substitution per position.

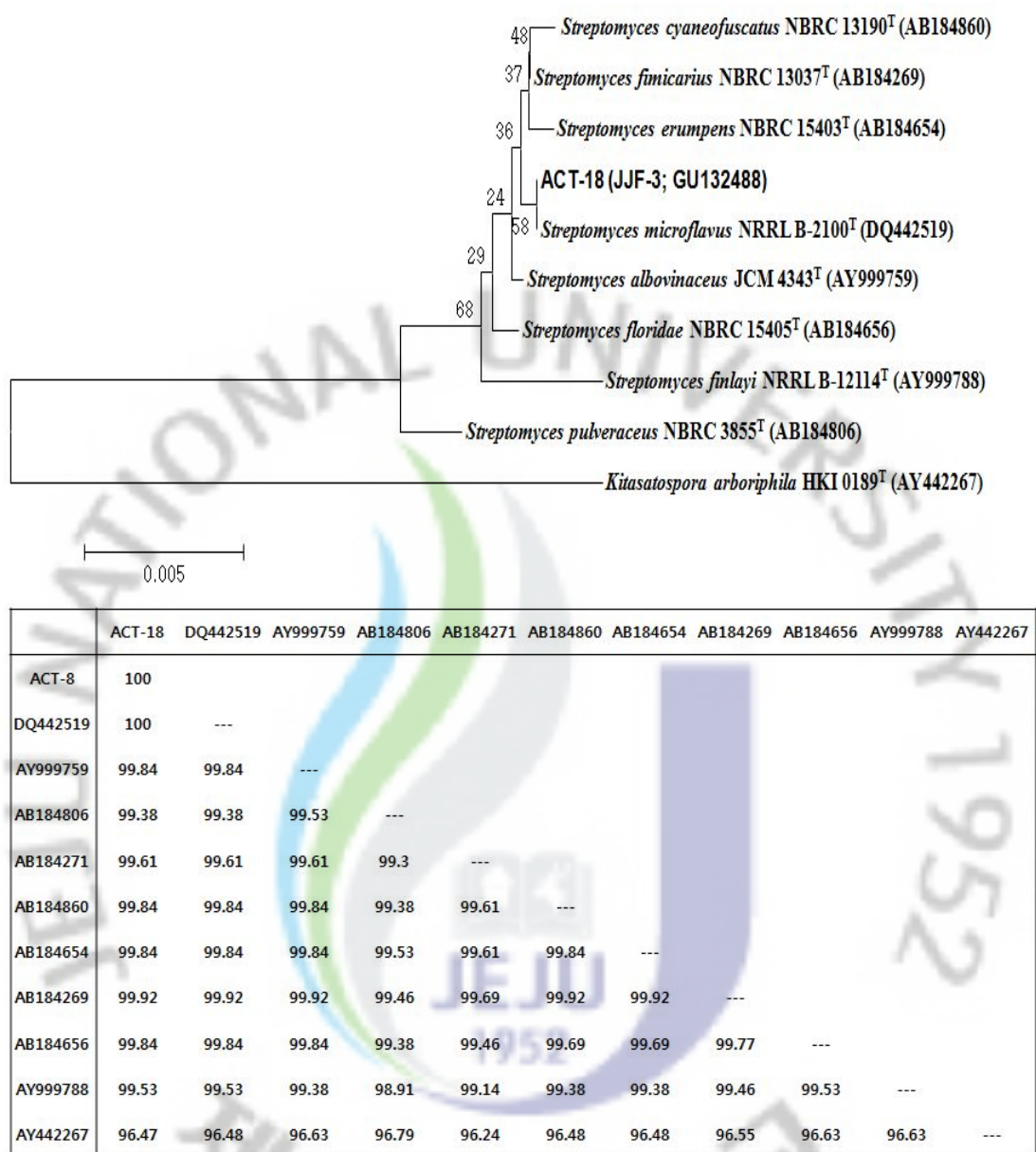


Fig. 12. Neighbour-joining tree based on nearly complete 16S rDNA sequences, showing relationships between strain ACT-18 and member of the *Streptomyces* sp.. Number at the nodes are levels of bootstrap support (%), based on neighbour-joining analyses of 1000 resampled database. *Kitasatospora arboriphila* (AY442267) was used as an outgroup. Bar, 0.005 nucleotide substitution per position.

3.2 분리균주의 최적배양조건 및 항산화 활성 측정

3.2.1 분리균주 *Streptomyces* sp. ACT-1의 최적배양조건

3.2.1.1 탄소원에 대한 생육도 및 항산화 활성 평가

분리균주 *Streptomyces* sp. ACT-1의 항산화물질 생성을 위한 배양배지 상에서의 최적 영양조건을 확인하기 위해 탄소원의 영향을 알아보았다. 기본배지로 MA를 사용하였으며, 총 11개 종류의 탄소원을 각각 1%씩 첨가하여 균주를 접종한 후, Shaking Incubator에 2주간 배양하였다. 배양 후, 원심분리를 통하여 모아진 균체의 건조중량을 측정하여 균 생육도를 측정하였으며 배양상등액을 가지고 라디칼 소거활성을 확인하였다. 그 결과 균의 생육도는 Maltose를 첨가한 실험구에서 가장 높게 나왔으며, Dextrose 첨가 실험구에서 가장 낮은 생육도를 확인할 수 있었으며, 라디칼 소거활성은 Glycerine, Mannitol, Maltose, Galactose 첨가 실험구에서 50%이상의 소거활성을 나타냈다. 본 실험에서 Maltose를 첨가한 실험구에서 가장 높은 생육도와 라디칼 소거활성을 확인할 수 있었다 (Fig. 13).

3.2.1.2 질소원에 대한 생육도 및 항산화 활성 평가

분리균주 *Streptomyces* sp. ACT-1의 항산화물질 생성을 위한 질소원의 영향을 알아보기 위하여 기본배지로 MA를 사용하였으며, 탄소원으로는 가장 활성이 우수했던 Maltose를 1% 첨가하였으며, 9종류의 질소원을 각각 0.5%씩 첨가하여 균주를 접종한 후, 25°C Shaking Incubator에 2주간 배양하였다. 배양 후, 원심분리를 통하여 모아진 균체의 건조중량을 측정하여 균 생육도를 측정하였으며, 배양 상등액을 가지고 라디칼 소거활성을 확인하였다. 그 결과 균의 생육도는 Yeast extract 첨가 실험구에서 5.722 g으로 가장 높은 건조중량을 확인할 수 있었으며, KNO₃ 첨가 실험구에서 4.112 g으로 가장 낮은 건조중량을 나타내었다. 전체적으로 유기질소원 첨가구에서는 균의 생육도가 높게 나온 반면 무기질

소원에서는 낮은 균의 생육도를 확인할 수 있었다. 또한 항산화활성은 Yeast extract 첨가 실험구에서 78%로 가장 높게 나왔으며, KNO₃ 첨가 실험구에서 61%로 가장 낮게 나타났다 (Fig. 14). 이는 탄소원만을 첨가했을 경우보다 낮은 생육도와 항산화활성을 보인 것으로 무기질소원 첨가가 균의 생육을 억제할 수 있을 가능성을 보여주는 결과로 사료된다.

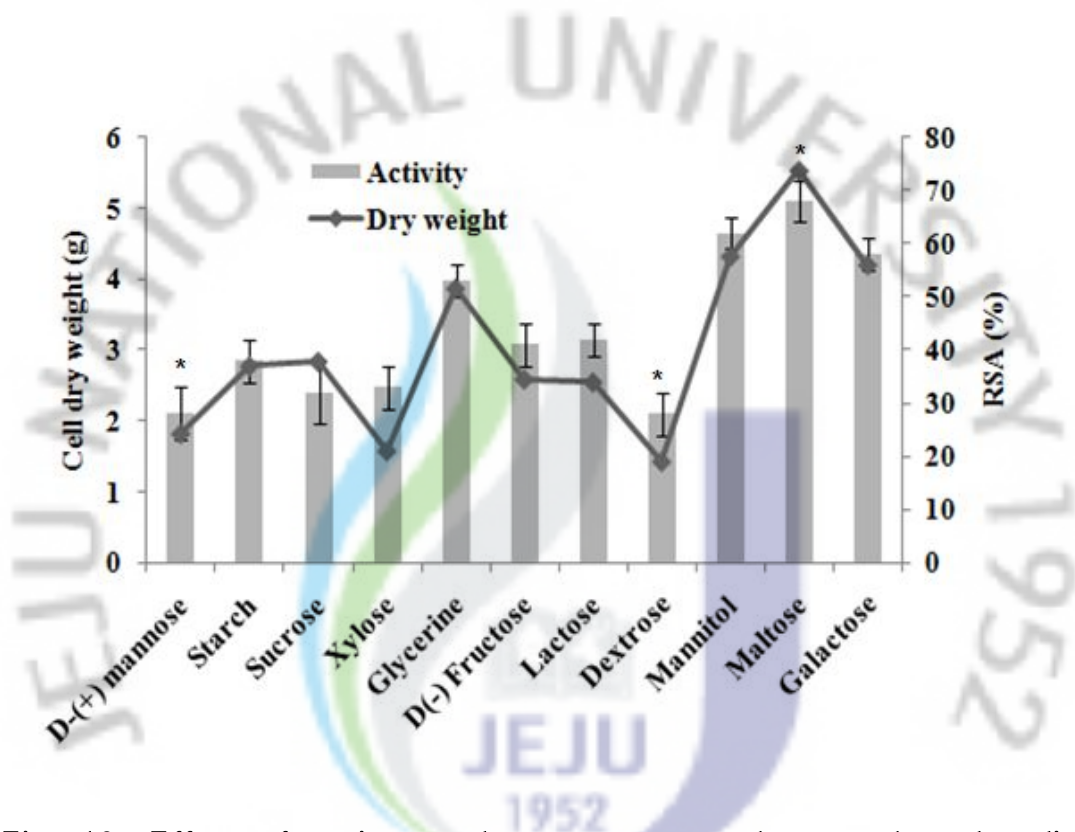


Fig. 13. Effect of various carbon sources on the growth and radical scavenging activity (RSA) of *Streptomyces* sp. ACT-1 supernatant.

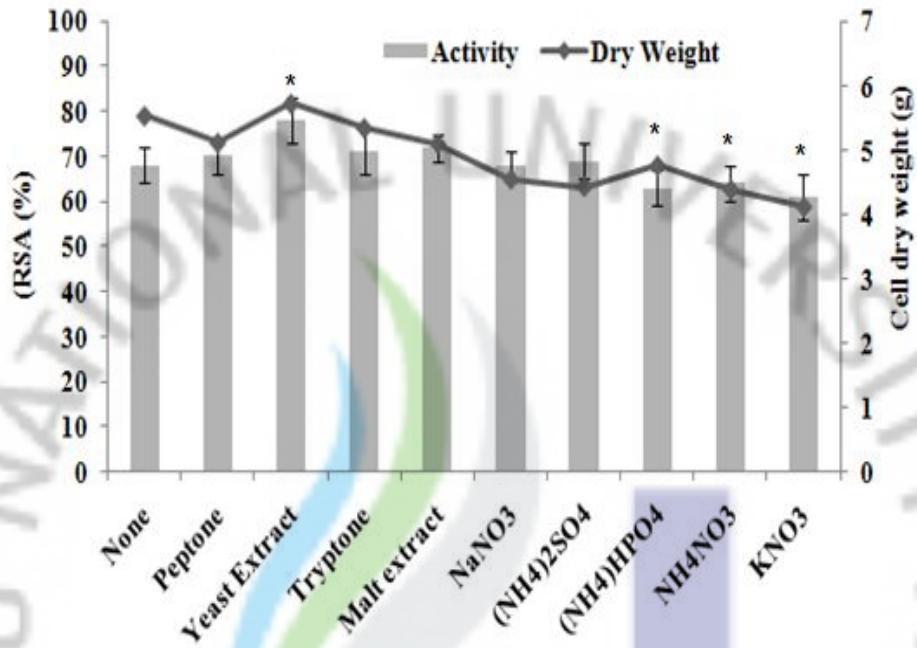


Fig. 14. Effect of various nitrogen sources on the growth and radical scavenging activity (RSA) of *Streptomyces* sp. ACT-1 supernatant.

3.2.2 분리균주 *Nocardiosis* sp. ACT-11의 최적배양조건

3.2.2.1 배양시간 및 배양온도에 따른 배양특성

배양온도는 균주의 생육 및 이차대사산물의 생성에 있어 중요한 요인 중에 하나이다. 특히 미생물은 보통 단세포이므로 외부온도에 따라 세포온도가 그대로 변하므로 온도에 특히 민감하다. 일반적으로 온도가 상승하면 효소촉매반응의 속도가 높아져서 성장률이 증가하며 이에 따라 생화학반응속도가 증가되어 전체적인 대사활동이 활발히 일어나 일반적인 미생물은 높은 온도에서 빨리 자란다. 하지만 특정온도를 넘어서면 성장속도가 저해되고 아주 높은 고온에서는 일반적으로 세포의 구조와 기능에 손상을 입히며, 저온에서는 화학적 조성 및 구조에는 영향을 끼치지 않지만 세포의 기능이 떨어짐에 기인한다. 따라서 분리균주의 성장도 및 향산화활성에 미치는 배양온도의 영향을 조사하기 위해서 4~40℃의 온도 범위에서 2주간 배양하여 측정하였다. 본 실험에 사용된 *Nocardiosis* sp. ACT-11의 경우 16℃이상의 온도에서는 균체성장이 이루어졌으며, 25℃와 30℃ 실험구에서 가장 높은 생육도 및 향산화 활성을 확인할 수 있었다 (Fig. 15). 이러한 결과는 해양 세균은 저온 미생물(psycrotroph)로서 20~30℃ 부근에서 잘 성장하는 것으로 보고된 것과 일치하는 결과라고 할 수 있다.

3.2.2.2 pH에 대한 영향

배양액의 pH는 다양한 영양분, 성장인자 등의 세포막 이동속도에 영향을 미치면서 외부의 pH가 변하면 영양 물질분자의 이온화 경향이 달라져 물질 흡수 능력이 감소하므로 미생물의 성장과 이차대사산물의 생산에 중요한 역할을 한다. 분리균주의 최적 pH 조건을 확인 해 본 결과 6.8~8.4까지 범위 내에서 가장 좋은 균 생육도 및 향산화 활성을 보였으며, pH가 높아짐에 따라 생합성량의 감소가 현저히 나타나는 것으로 확인되었다 (Fig. 16). 이러한 결과는 해수의 pH의 범위와도 거의 일치하는 경향으로 pH 조건이 10 이상의 알칼리상태에서는 성장을 하지 못할 것으로 사료된다. 이러한 결과를 통해 pH가 높아질수록 향산화 활성

또한 약하게 나타난다는 것을 추측해 볼 수 있는데 이는 효소와 막 수송단백질이 활성이 억제되어 세포가 손상되기도 하며 영양 물질분자의 이온화경향변화에 의한 물질 흡수 능력이 떨어져 생합성 과정 중 효소의 생산이 저해 된 것으로 추측해 볼 수 있다. 이러한 pH의 효과는 항산화물질 생산에 관여할 것으로 사료되며, 다른 Strain 또한 비슷한 결과를 갖고 있을 것으로 추측되어 추후 연구를 수행할 계획이다.

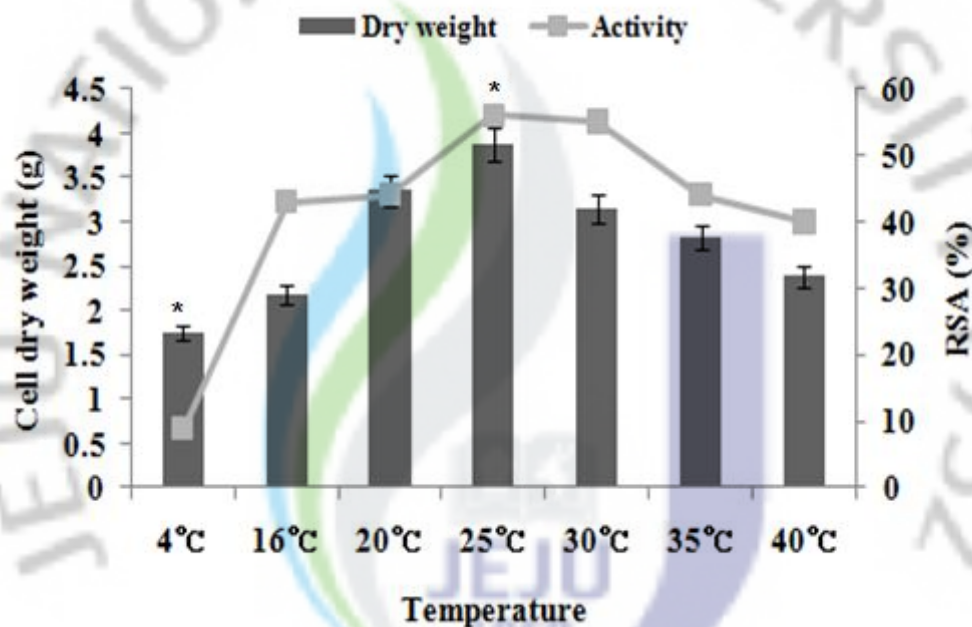


Fig. 15. Effect of various temperature on the growth and radical scavenging activity (RSA) of *Nocardiosis* sp. ACT-11 supernatant.

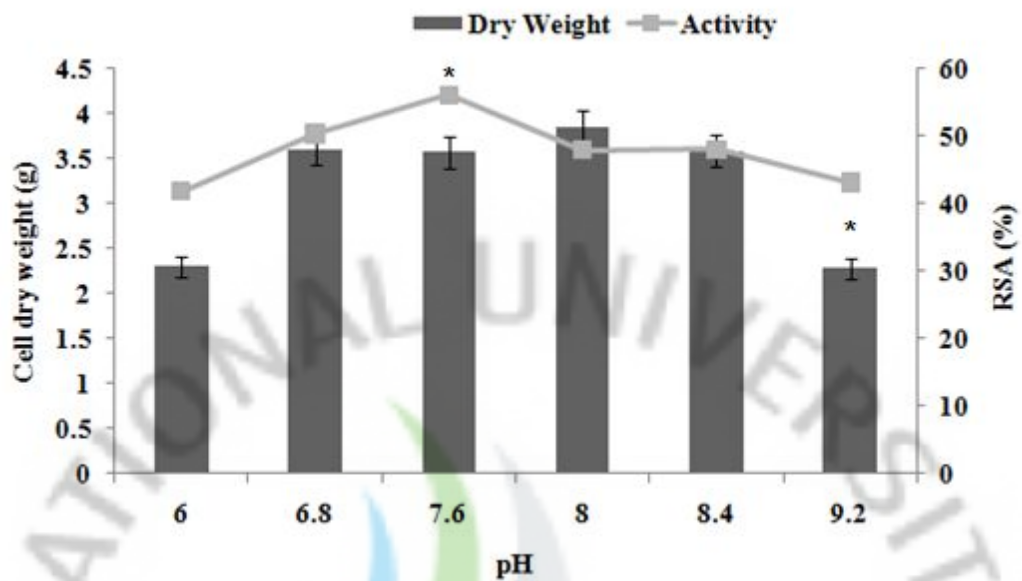


Fig. 16. Effect of various pH on the growth and radical scavenging activity (RSA) of *Nocardioopsis* sp. ACT-11 supernatant.

3.2.2.3 NaCl 농도에 대한 영향

일반적으로 해수에는 약 3.0% (w/v)의 NaCl이 함유되어 있으므로 NaCl에 따른 균체성장 및 이차대사산물의 생합성의 미치는 영향을 조사하였다. NaCl 농도를 0~10% (w/v)까지 조절한 NB (Nutrient Broth, Difco. USA)와 MB (Marine Broth)배지에서 배양한 후, 성장도 및 항산화 활성을 측정하였다. NaCl 0% 첨가구는 기존의 Marine agar에 Na⁺ 성분이 포함되어 있어서 Nutrient agar (NA, Difco. Co. USA)를 기본배지로 해서 NaCl 0% 첨가구를 만들었으며, 1% 첨가구는 NA 배지에 NaCl를 1% 첨가해서 제조했다. 2% 첨가구는 MA를 그대로 사용하였다. 그 결과 NaCl 2~5% 첨가구에서 좋은 생육도를 확인할 수 있었으며, NaCl 0% 첨가구에서는 균 생육도 및 활성이 가장 나빴으며, NaCl 10% 첨가구에서도 성장이 되었으나 활성이 낮은 결과를 확인할 수 있었다(Fig.

17). 균 생육도 및 항산화활성은 2.5% NaCl 첨가구에서 가장 높게 나타났으며, NaCl 2~5% 배양조건에서 가장 좋은 결과를 얻을 수 있었다. 기본적인 실험결과들을 종합해 볼 때 최종적으로 본 균주는 해양유래 방선균으로서 세포막이 안전성과 효소의 활성화를 위해 Na⁺의 배지내의 존재가 필수적인 것으로 보여 절대호염세균(Obligate halophile)으로 사료된다.

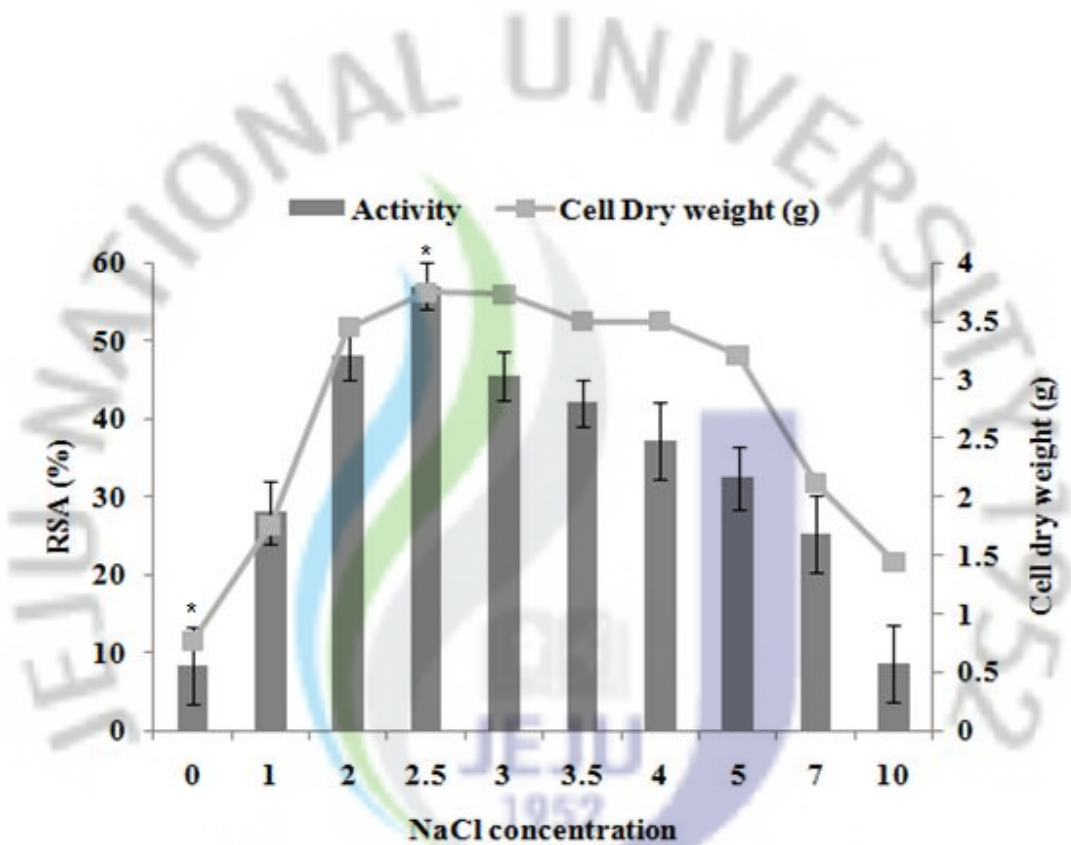


Fig. 17. Effect of various NaCl on the growth and radical scavenging activity (RSA) of *Nocardiopsis* sp. ACT-11 supernatant.

3.2.2.4 탄소원 및 질소원에 대한 영향

분리균주 *Nocardiopsis* sp. ACT-11의 향산화물질 생산과 성장도에 미치는 탄소원의 영향을 확인하기 위해 MB(Marine Broth, Difco, USA)를 기본배지로 하여 Mannose, Starch, Sucrose, Xylose, Glycerin, Fructose, Lactose, Dextrose, Mannitol, Maltose, Galactose를 각각 1%씩 첨가하여 균체성장 및 향산화활성을 측정하였다. 그 결과 균체의 성장은 Galactose 첨가 실험구에서 가장 높은 생육도를 확인할 수 있었으며, Xylose, Dextrose 첨가 실험구에서는 가장 생육도가 낮게 나타난 결과로서 기본배지로 MB만을 사용했을 때보다 생육도 및 향산화활성이 낮게 나타나는 것으로 보아 생육 및 향산화물질 생산을 억제하는 결과를 얻을 수 있었다. 모든 실험구에서 생육도 및 향산화활성의 증가를 나타내지는 않았지만 Glycerin, Mannitol, Galactose 첨가 실험구에서는 좋은 증가 효과를 확인할 수 있었다 (Fig. 18).

이러한 결과들을 토대로 균주는 특히 Sucrose, Xylose, Fructose, Dextrose 등의 탄소원들에 대하여 생장이 억제되어진다고 사료된다. 이는 일반적으로 glucose와 같이 쉽게 이용 가능한 기질은 그 자체가 이차대사산물의 생합성 관련 효소들을 저해할 뿐만 아니라 발효에서도 과량의 기질이 존재할 때 pyruvic acid 및 α -ketoglutaric acid 등의 축적(Aoyagi, 1990; Tanaka, 1992)으로 이들에 의한 간접적인 저해효과도 초래할 수 있는 것과 관련이 있다고 생각된다.

질소원은 미생물의 대사증식에 결정적인 영향을 미치는 성분으로 알려져 있다. 본 실험에서는 *Nocardiopsis* sp. ACT-11의 향산화물질 생산과 성장도에 미치는 최적 질소원의 영향을 확인하기 위해 MB(Marine Broth, Difco, USA)를 기본배지로 하여 1%의 Galactose를 첨가한 후, 각각의 유기질소원 Peptone, Yeast extract, Tryptone, Malt extract와 NaNO_3 , $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, $(\text{NH}_4)\text{HPO}_4$, NH_4NO_3 , KNO_3 의 무기질소원 0.5%씩 첨가하였다. 그 결과 모든 실험구에서 높은 균주의 생육도를 관찰 할 수 있었다 (Fig. 19).

본 결과에서 무기질소원보다 유기질소원에서 향산화활성이 높게 나타나는 것을 확인할 수 있었으며, 생육도는 큰 차이를 보이지는 않았지만, Yeast extract 첨가 실험구에서는 효과적인 생육도를 보였으며, Galactose만 첨가했을 때

보다도 12% 증가한 항산화활성을 확인할 수 있었다. 이러한 결과는 미생물이 효소를 이용하여 각각의 질소원을 기질로 이용하여 분해과정을 통해 아미노산들을 생산하게 되는 것과 관련이 있다고 사료되어지며, 배지내의 풍부한 아미노산의 조성은 생물체의 단백질합성 및 효소활성의 증대를 야기할 수 있어 균체성장을 촉진된다는 보고와도 일치하는 양상을 확인 할 수 있었다(Lim, 1977). 본 연구에서는 탄소원의 최적 농도를 확인 하지는 않았지만 이전 유사한 결과들을 토대로 보통 탄소원은 1~2%, 질소원은 0.5~1%의 농도가 적정하다는 결과들이 보고되고 있기 때문에 적정 농도를 탄소원은 1%, 질소원은 0.5%라고 정하였으며, 배양 시 이와 같은 농도를 기준으로 대량 배양 실험을 실시하였다.

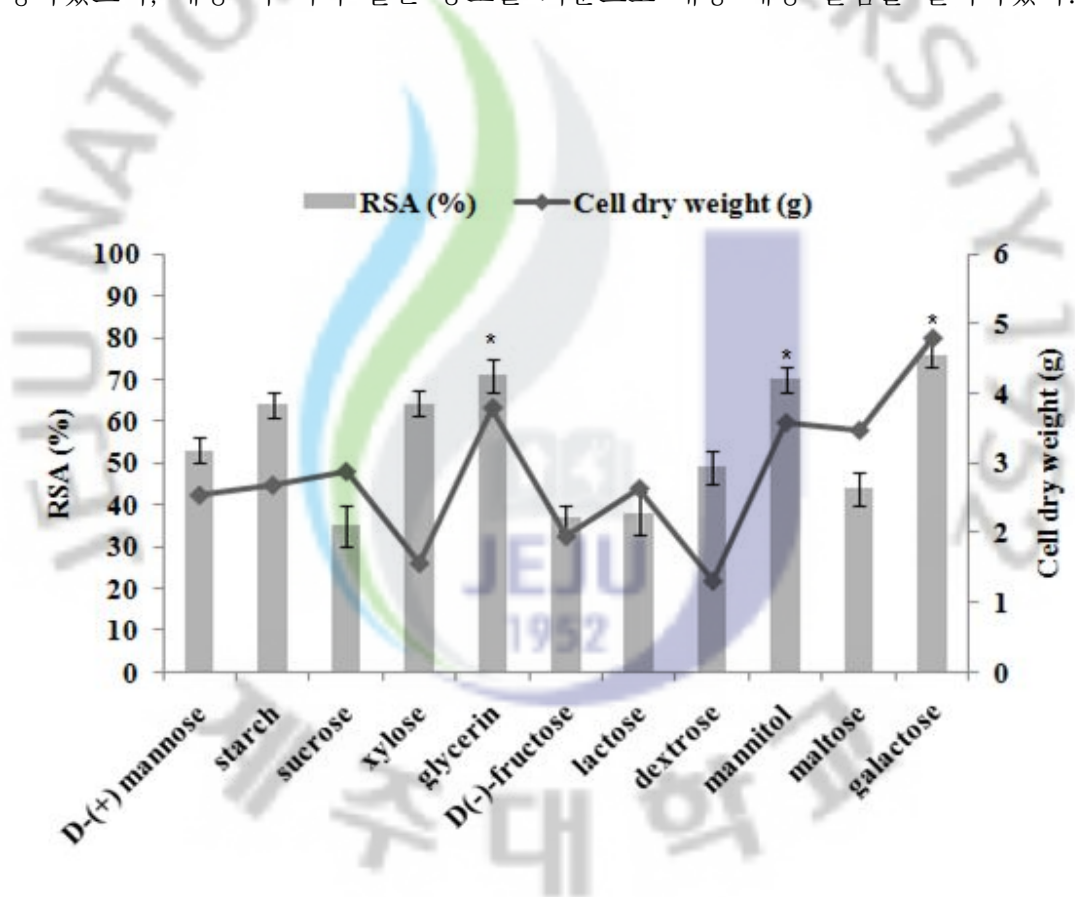


Fig. 18. Effect of various carbon sources on the growth and radical scavenging activity of *Nocardiosis* sp. ACT-11 supernatant.

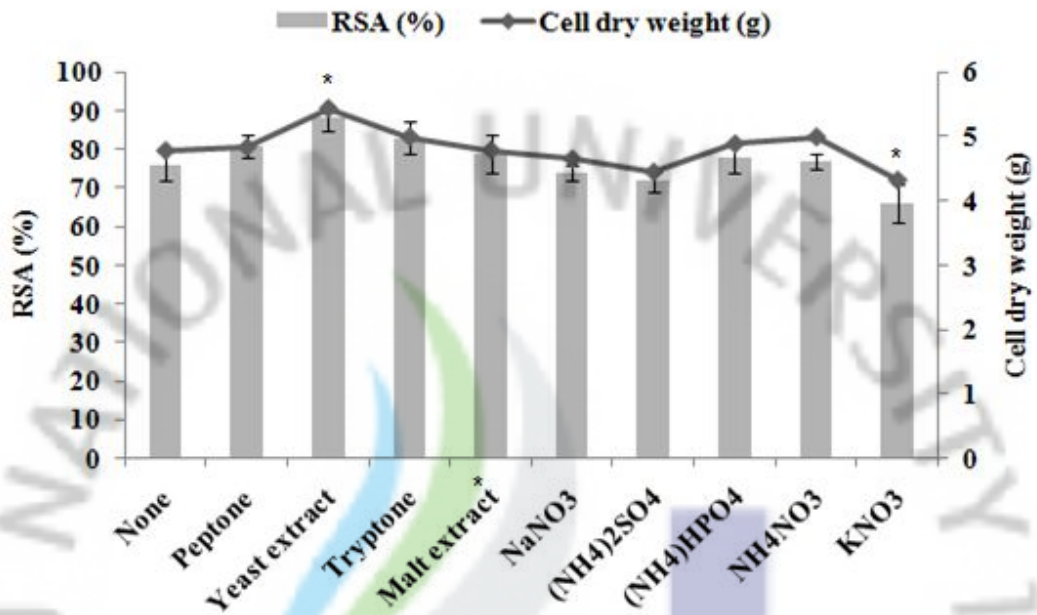


Fig. 19. Effect of various nitrogen sources on the growth and radical scavenging activity of *Nocardiosis* sp. ACT-11 supernatant.

3.2.3 분리균주 *Streptomyces* sp. ACT-18의 최적배양조건

3.2.3.1 탄소원에 대한 생육도 및 항산화활성 평가

분리균주 *Streptomyces* sp. ACT-18의 항산화물질 생성을 위한 탄소원의 영향을 알아보기 위하여 기본배지로 MB를 사용하였으며, 총 11개 종류의 탄소원을 각각 1%씩 첨가하여 균주를 접종한 후, Shaking Incubator에 2주간 배양하였다. 배양 후, 원심분리를 통하여 모아진 균체의 건조중량을 측정하여 균 생육도를 측정하였으며 배양상등액을 가지고 라디칼 소거활성을 확인하였다. 그 결과 균의 생육도는 Mannitol를 첨가한 실험구에서 가장 높게 나왔으며, Sucrose, Dextrose 첨가 실험구에서 가장 낮은 균 생육도를 보였다. 또한 Xylose, Dextrose 첨가 실험구에서는 탄소원을 첨가하지 않은 기본배지(MB)에서 보다 낮은 항산화활성을 확인할 수 있었으며, Glycerine, Galactose 첨가 실험구에서 70% 정도의 높은 소거활성을 보였다. 그리고 78%의 높은 활성을 나타낸 Mannitol 첨가구는 농도별 (1~10, Not shown data) 실험결과에서는 균체의 성장에 있어서 3~4%에서는 좋은 결과를 얻었지만 라디칼 소거능이 감소하는 양상을 보였다 (Fig. 20). 이는 과도한 기질에 의한 저해 효과라고 사료되며, 발효과정에서 생산되는 항산화물질의 생합성을 저해하는 catabolite repressor로 작용한 것으로 사료된다.

3.2.3.2 질소원에 대한 생육도 및 항산화활성 평가

분리균주 *Streptomyces* sp. ACT-18의 항산화물질 생성을 위한 질소원의 영향을 알아보기 위하여 기본배지로 MB에 탄소원으로 Mannitol를 1% 첨가하였으며, 9종류의 질소원(유기질소원 4종, 무기질소원 5종)을 각각 0.5%씩 첨가하여 균주를 접종한 후, Shaking Incubator에 2주간 배양하였다. 배양 후, 원심분리를 통하여 모아진 균체의 건조중량을 측정하여 균 생육도를 측정하였으며, 배양 상등액을 가지고 라디칼 소거활성을 확인하였다. 그 결과 균의 생육도는 Yeast extract 첨가 실험구에서 가장 높은 생육도를 확인할 수 있었으며, KNO₃ 첨가

실험구에서 가장 낮은 균 생육도를 나타내었다. 전체적으로 유기질소원 첨가구에 서는 균의 생육도가 높게 나온 반면 무기질소원에서는 낮은 균의 생육도를 확인 할 수 있었다. 또한 항산화활성은 Yeast extract 첨가 실험구에서 약 90% 정도로 가장 높게 나왔으며, 질소원 무첨가구와 비교해 보았을 때 약 8%의 라디컬 소거활성능이 증가하는 양상을 보였다. 그리고 무기 질소원인 KNO_3 첨가 실험구 에서 가장 낮은 라디컬 소거활성을 보였다 (Fig. 21). 이는 탄소원만을 첨가했을 경우보다 낮은 생육도와 항산화활성을 보인 것으로 무기질소원 첨가가 균의 생 육을 억제할 수 있을 가능성을 보여주는 결과로 사료된다.

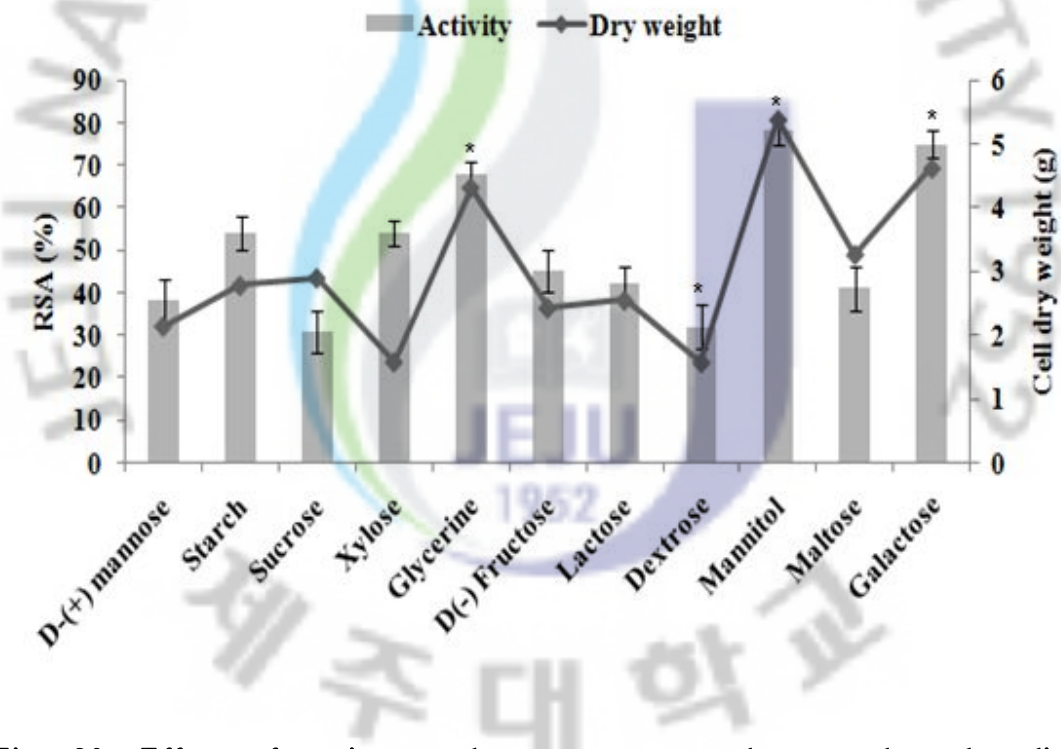


Fig. 20. Effect of various carbon sources on the growth and radical scavenging activity of *Streptomyces* sp. ACT-18 supernatant.

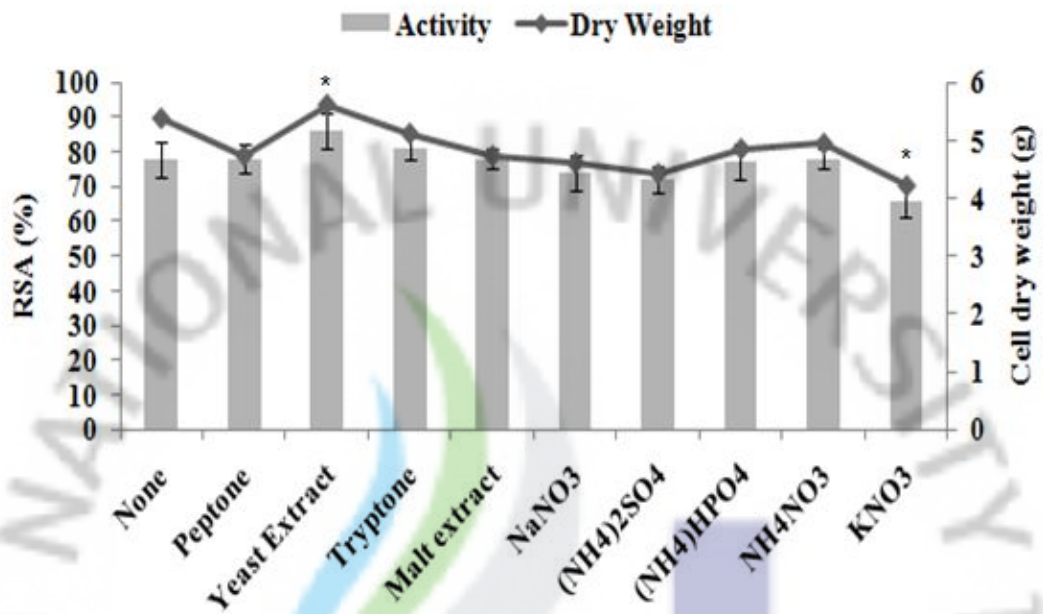


Fig. 21. Effect of various nitrogen sources on the growth and radical scavenging activity of *Streptomyces* sp. ACT-18 supernatant.

3.3 방선균 배양액 추출물의 생리활성 평가

3.3.1 분리방선균주 메탄올 추출물 농도별 생리활성 평가

3.3.1.1 농도별 항균활성

최종 선정된 분리균주 *Streptomyces* sp. ACT-1, *Nocardiopsis* sp. ACT-11, *Streptomyces* sp. ACT-18의 메탄올 추출물 농도별 항균활성을 확인하였다. 본 실험에서는 총 17종류의 병원성 균주를 사용하였으며, 육상수조식 양식장에서 가장 많이 발생하고 있는 대표적인 세균성 질병 원인균들을 대상으로 실험을 실시하였다. 에드워드증 원인균인 *Edwardsiella tarda* 1종, 연쇄구균증 유발세균 2종, 어류 비브리오증 유발세균 9종, 패류 비브리오증 유발세균 2종, 양식장 병어로부터 분리된 활주세균증 원인균 3종 총 17종을 사용하였다. 본 실험에서는 추출물의 농도를 각각 100, 200, 500 $\mu\text{g/ml}$ 의 농도로 맞추어 후 Disk를 제작하였으며, 앞에서 언급된 실험방법과 동일한 방법을 사용하였다. 농도별 항균활성에 대한 결과를 Table 12 및 Fig. 22에 나타내었다. 먼저 *Streptomyces* sp. ACT-1의 메탄올 추출물은 연쇄구균증 원인균인 *S. parauberis*, *S. iniae*에 대하여 매우 높은 항균활성을 확인하였으며, 양식장에서 분리된 활주세균증 유발 유사 세균인 *Exiguobacterium oridotokrans*(Wild Type)에 매우 높은 항균 감수성을 보였다. 그러나 비브리오증을 유발시키는 균들에 대한 감수성은 거의 관찰되지 않았으며, 에드워드병 유발세균인 *Edwardsiella tarda*에 대해서는 높은 농도였을 때 약간의 감수성이 관찰되었지만 낮은 농도에서는 거의 감수성이 없는 것으로 확인되었다. *Nocardiopsis* sp. ACT-11의 메탄올 추출물은 일부 어류 질병 병원성 세균인 *Vibrio salmonicida*, *Flavobacteriaceae bacterium*를 제외하고는 다른 병원성 세균에 대한 감수성이 거의 없었다. *Streptomyces* sp. ACT-18의 메탄올 추출물은 연쇄구균증 유발세균, 비브리오증 유발세균, 활주세균증 유발세균에 대하여 전체적으로 높은 감수성을 보였으며, 에드워드증 유발세균에 대해서는 감수성이 없는 것으로 확인되었다. 또한 항생제에 대한 병원성세균들에 대한 감수성 결과를 Table 13에 나타내었다.

Table 12. Antibacterial activities of strain ACT-1, ACT-11, and ACT-18 broth methanol extract against the growth of various pathogenic bacteria.

Strain	ACT 1 Extract ($\mu\text{g/ml}$)			ACT 11 Extract ($\mu\text{g/ml}$)			ACT 18 Extract ($\mu\text{g/ml}$)		
	100	200	500	100	200	500	100	200	500
<i>Edwardsiella tarda</i>	-	*	*	-	*	**	-	-	*
<i>Streptococcus iniae</i>	**	***	****	-	*	*	*	**	***
<i>Streptococcus parauberis</i>	**	***	****	-	-	**	*	**	***
<i>Vibrio mimicus</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Vibrio salmonicida</i>	-	-	-	*	*	**	**	**	***
<i>Vibrio ichthyenteri</i>	-	-	*	-	-	*	-	-	*
<i>Vibrio rotiferianus</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Vibrio fluvialis</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Vibrio vulnificus</i>	*	*	**	-	-	-	*	**	***
<i>Vibrio anguillarum</i>	-	-	*	-	*	*	*	*	**
<i>Vibrio harveyi</i>	-	*	**	-	-	-	*	*	**
<i>Vibrio tapetis</i>	-	-	-	-	-	-	**	**	***
<i>Vibrio tasmaniensis</i>	-	-	*	-	-	-	-	-	-
<i>Flavobacteriaceae bacterium</i>	-	*	**	*	**	**	-	-	-
<i>Exiguobacterium oridotokrans</i>	**	**	***	-	*	**	**	***	***
<i>Flavobacterium frigidarium</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-

-, Not activity; *, 9~12; **, 13~20; ***, 21~30; ****, 31~50.

Cells were grown on MHA plate for 24h at 26, 37°C after broth methanol extract (100, 200, 500 $\mu\text{g/ml}$) was absorbed into paper disc (8 mm in diameter) and then the diameter (mm) of the growth inhibition zone was measured. Each value represents the average of three independent experiments.

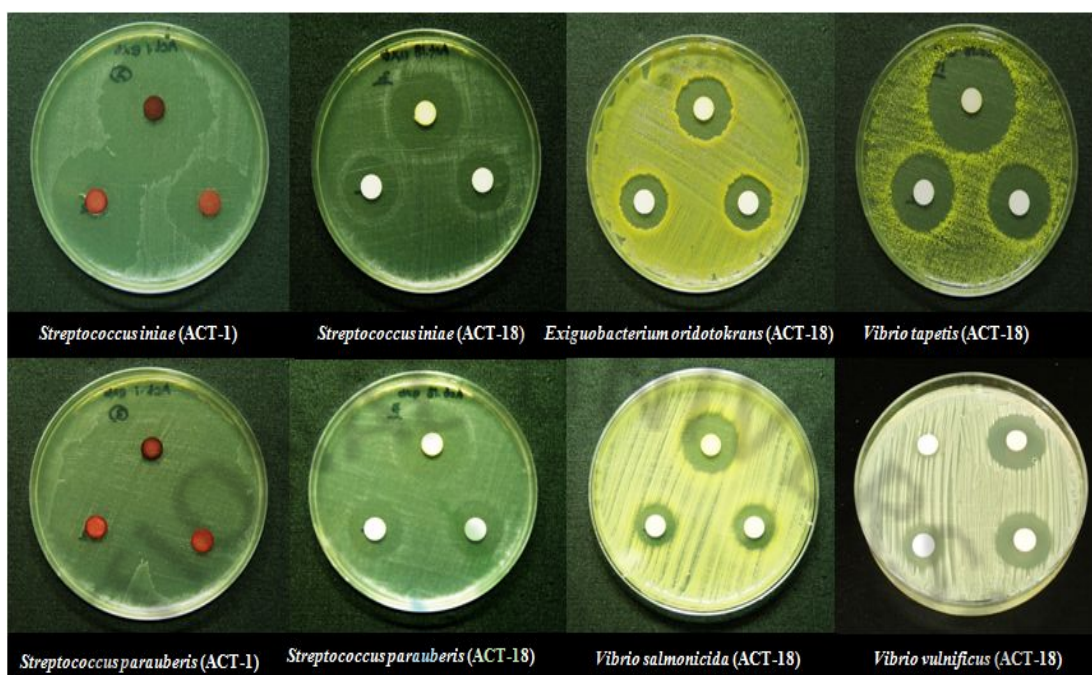


Fig. 22. Antibacterial activity against various fish pathogenic bacteria.

Table 13. Antibacterial activity of antibiotics against various pathogenic bacteria.

Antibiotics	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	
A	****	****	****	**	***	-	FULL	****	****	**	**	*	***	-	-	FULL	*	*	-	-	***	**	**	
C	***	****	***	***	***	-	FULL	-	****	****	**	****	****	****	-	FULL	****	****	****	****	****	****	****	-
T	****	****	****	**	-	-	-	-	***	****	-	****	****	****	-	FULL	***	****	****	****	****	****	****	-
E	****	****	****	*	-	-	FULL	***	****	***	**	-	***	****	-	FULL	***	****	***	***	*	***	-	
N	***	**	***	***	*	-	-	***	***	***	****	***	****	***	-	FULL	**	**	***	***	***	**	**	
NOR	***	***	***	****	*	-	-	****	***	****	-	***	****	****	**	FULL	***	****	****	****	****	****	****	

-, Not activity; *, 9~12; **, 13~20; ***, 21~30; ****, 31~50.

A, Ampicilline; C, Chloramphenicol; T, Oxytetracyclin; E, Erythromycin; N, Neomycin; NOR, Norfloxacin.

1, *S. parauberis*; 2, *E. tarda*; 3, *S. aureus*; 4, *Salmonella typhimurium*; 5, *Listeria monocytogenes*; 6, *C. albicans*; 7, *S. mutans*; 8, *Propionibacterium acnes*; 9, *Pityrosporum ovale*; 10, *V. mimicus*; 11, *V. salmonicida*; 12, *V. furnisi*; 13, *V. rotiferianus*; 14, *V. alginolyticus*; 15, *V. logei*; 16, *V. ichthyoenteri*; 17, *V. fluvialis*; 18, *V. anguillarum*; 19, *V. campbellii*; 20, *V. parahaemolyticus*; 21, *V. vulnificus*; 22, *V. cholerae*; 23, *Proteus mirabilis*.

3.3.1.2 농도별 항산화 활성 측정

항산화 활성을 측정하는 방법에는 여러 가지가 있으나 그중에 DPPH 라디칼 소거 활성법은 비교적 간단하고 널리 사용되는 방법이다. 이는 시료중의 항산화 물질이 전자적으로 불안정한 상태인 DPPH와 전자를 공여하여 안정한 상태를 만들 수 있는 능력을 측정하는 방법으로 기존에는 분광학적으로 측정하였으나 본 실험에서는 ESR (electron spin resonance spectrometry)를 이용하여 더욱 정밀도를 높였으며 색소에 의한 오차를 줄일 수 있는 방법이라 할 수 있겠다. ESR spectroscopy에 의한 측정방법은 가장 유망한 방법 중의 하나로써, 방사선 조사 시 입사된 에너지의 일부가 분자결합을 붕괴시켜 방출된 자유 라디칼이나 이온들을 측정할 수 있는 것으로 시료준비가 간편하고 신속하며 시료준비가 간편하고 신속하며 시료에 손상을 주지 않는 검지기술로 알려져 있다(Janzen, 1987; Kadiiska, 2002). 하지만 이러한 장점에 불구하고 국내에서는 유해산소의 검지방 법으로 이용한 경우가 드물다. 분리균주 ACT-1, ACT-11 및 ACT-18의 메탄올 추출물 농도별 항산화 활성을 측정하기위해 DPPH 라디칼, Hydroxyl 라디칼, Alkyl 라디칼 소거활성을 ESR (Electron Spin Resonance) spectroscopy 측정방법을 이용하여 평가하였다. 각 시료의 농도는 각각 100, 500, 1000 $\mu\text{g/ml}$ 였다. 먼저 ACT-1, ACT-11 및 ACT-18의 ESR을 이용한 DPPH 라디칼 소거활성에 대한 결과를 Fig. 23에 나타내었다. 그 결과 모든 실험구에서 농도 의존적인 활성특성을 보였으며, SBME-1 (Streptomyces Broth Meyhanol Extract ACT-1) 100 $\mu\text{g/ml}$ 농도 실험구에서는 46%, 500 $\mu\text{g/ml}$ 에서는 53% 1000 $\mu\text{g/ml}$ 에서는 67%의 DPPH 라디칼 소거 활성 (RSA)을 관찰할 수 있었다. NBME-11 (Nocardiosis Broth Methanol Extract ACT-11) 실험구에서도 유의적인 차이는 없었지만 SBME-18 (Streptomyces Broth Meyhanol Extract ACT-18) 실험구에서는 가장 높은 74% 활성을 보였다.

Hydroxyl 라디칼($\cdot\text{OH}$)은 산소종 중 반응성이 매우 강하며 지질 산화를 개시하고 DNA 손상 및 돌연변이를 유발하는 물질로 알려져 있다. 또한 Hydroxyl 라디칼은 생체의 대사과정에서 생성되는 지질의 과산화물이나 H_2O_2 가 Fe^{2+} 나 Cu^{2+} 이온의 존재하에서 생성되며 가장 독성이 강한 자유 라디칼이므로 이 라디칼을

소거하는 정도를 측정하였다 (Evans *et al.*, 2001).

방선균주 배양액 추출물에 대한 Hydroxyl 라디칼 소거활성측정 결과를 Fig. 24에 나타내었으며, 그 결과 모든 실험구에서 농도 의존적인 라디칼 소거활성특성을 보였으며, SBME-1과 NBME-11 100 $\mu\text{g/ml}$ 투여 실험구에서는 각각 46%, 38%의 낮은 항산화활성을 보인 반면 500 $\mu\text{g/ml}$ 농도 이상의 실험구에서는 SBME-1에서는 84%, SBME-18 처리구에서는 81%의 높은 항산화활성을 확인할 수 있었다.

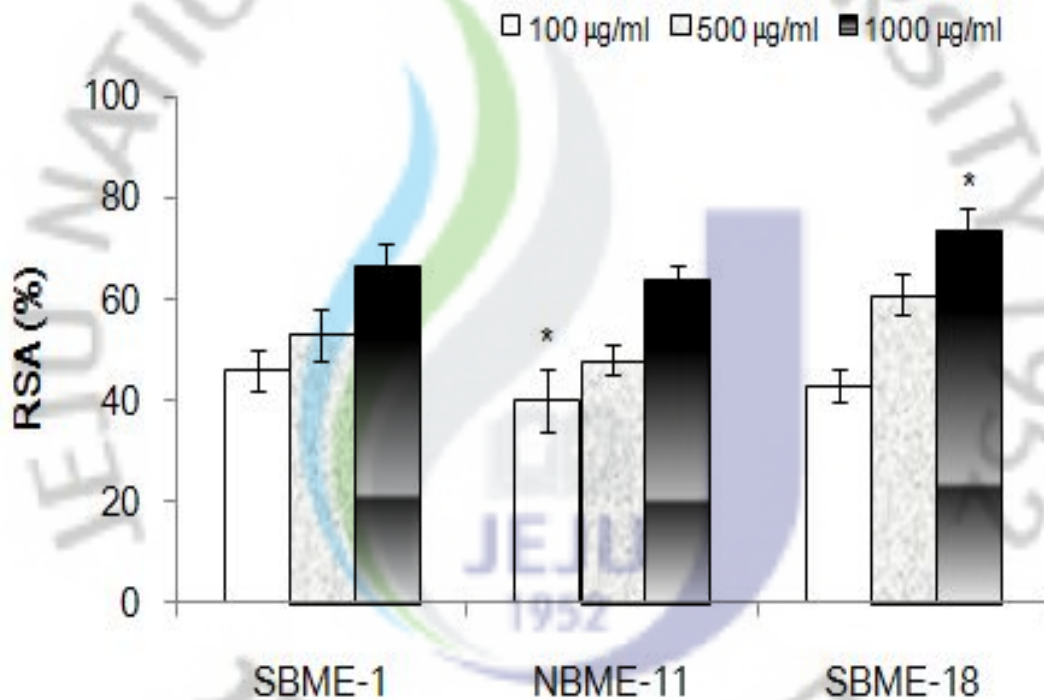


Fig. 23. DPPH radical scavenging activity (RSA) of actinomycetes methanol extract by ESR (Electron Spin Resonance) spectroscopy.

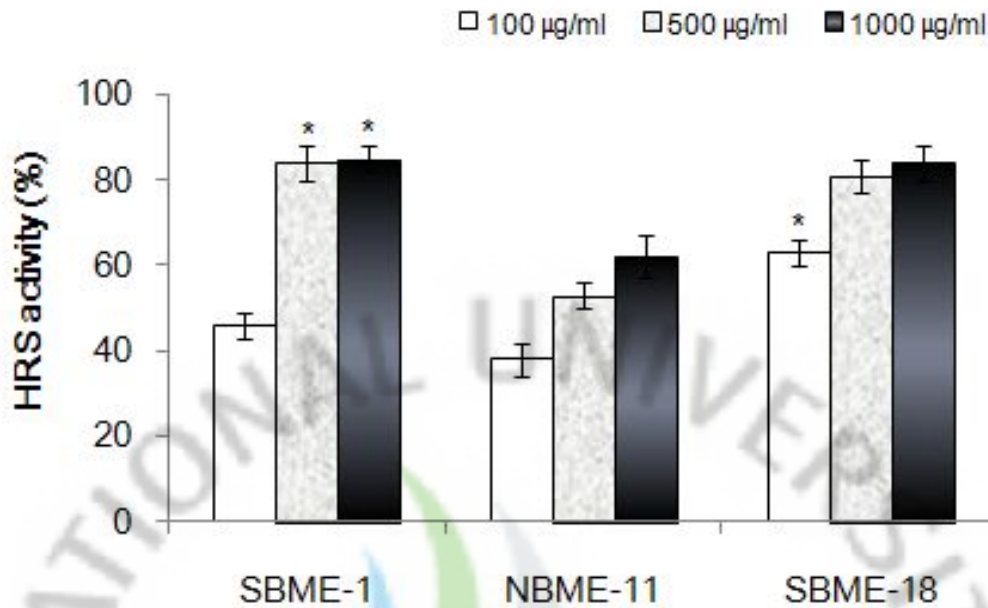


Fig. 24. Hydroxyl radical scavenging (HRS) activity of actinomycetes methanol extract by ESR (Electron Spin Resonance) spectroscopy.

Alkyl 라디칼은 hydrocarbon reaction에서 초기 반응 생성물로 많이 형성된다. 이는 불포화지방산이 산소에 노출되면 지질과산화가 일어나면 이는 자유(free) 라디칼에 의해 불포화지방산의 methylene(-CH₂)기로부터 수소원자(H·)가 탈취함에 따라 개시(initiation)된다. 이를 흔히 일으키는 라디칼로는 ·OH, RO·, ROO·, HO₂· 등이 있고 O₂⁻과 H₂O₂는 그 자체로는 그런 능력이 없다. 수소탈취에 의해 생긴 alkyl 라디칼(R·)은 분자재구성을 통해 diene형태로 바뀌고 이것이 다시 산소와 결합하여 peroxy 라디칼을 형성한다. peroxy 라디칼은 다시 다른 불포화지방산으로부터 수소를 탈취함으로써 일종의 연쇄반응이 진행될 수 있다. Peroxyl 라디칼은 또한 분자재구성을 통해 여러 형태의 과산화물로 전환된다. 지질과산화물은 그 자체로는 상당히 안정되나 전이금속의 존재 하에서는 분해가 촉진된다. 지질과산화물의 분해산물은 다양하며 많은 종류의 carbonyl 화합물을 포함한다. 생체막에는 다량의 불포화지방산을 포함하고 있다. 따라서 지질과산화

로 인해 지질분자의 구조적 변화가 넓은 범위에 걸쳐 일어나면 생체막 fluidity의 감소, membrane potential의 감소, 이온투과성의 증가, 세포소기관 내용물의 누출 등이 예상되고 결국은 세포기능의 저하와 세포의 죽음을 초래할 수 있다. 지질과산화물과 그것의 분해산물 중에는 생체에 유해한 성분들이 있으며 대식세포 기능의 억제, 단백질합성 억제, 효소의 실활, thrombin 과다생산등과 같은 유해 작용들이 보고되고 있다.

Fig. 25는 방선균추출물의 Alkyl 라디칼 소거활성에 대한 결과를 나타낸 것으로서 농도 의존적으로 항산화활성이 증가하는 양상을 보이고 있었으며, 100 $\mu\text{g/ml}$ 투여 실험구에서는 낮은 라디칼 소거활성을 보였다. SBME-18 1000 $\mu\text{g/ml}$ 처리구에서 가장 높은 74%의 라디칼 소거활성을 보였으며, 전체적으로 균주들의 메탄올 추출물의 Alkyl 라디칼 소거활성은 유의적인 차이가 없는 것으로 확인되었다.

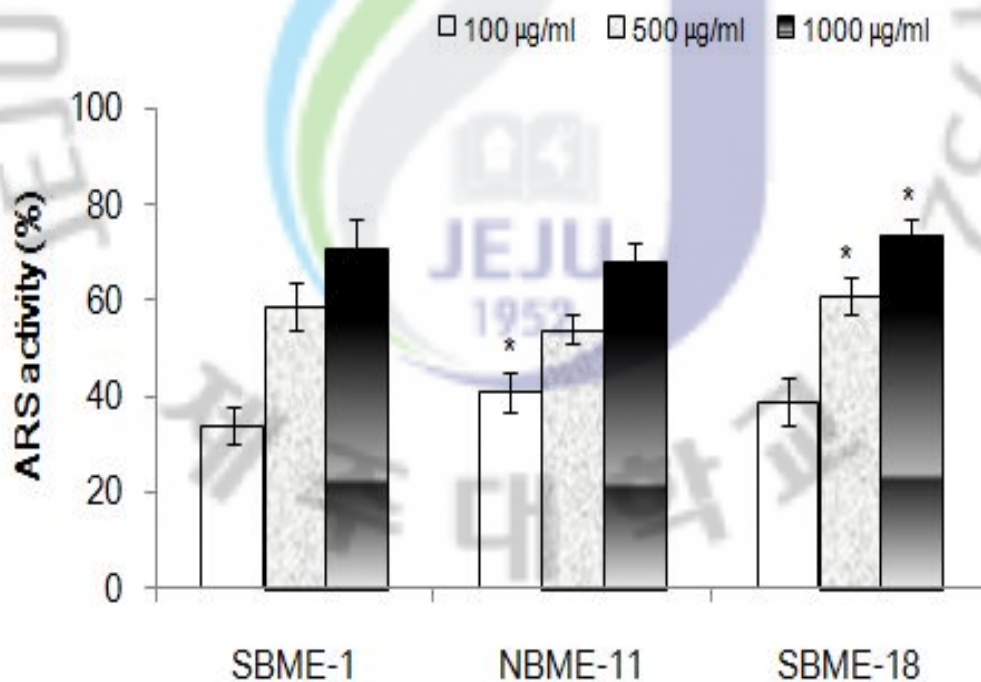


Fig. 25. Alkyl radical scavenging (ARS) activity of actinomycetes methanol extract by ESR (Electron Spin Resonance) spectroscopy.

3.3.2 분리 방선균 유기용매 분획물 생리활성 평가

3.3.2.1 분획물별 항균활성 측정

Streptomyces sp. ACT-1이 생산하는 이차대사산물을 용매별 추출하여 항균활성을 확인하여 Table 14에 나타내었다. Disc에 loading한 추출물의 양은 건조중량이 100 μg /ml이 되도록 하였으며, 그 결과 폭넓은 항균활성을 확인 할 수 있었다. 극성인 물을 용매로한 실험구들의 경우 항균활성이 미비한 결과를 보였으나 Chloroform, n-Hexan의 용매에서는 항균활성을 보이고 있었다. Fraction Hexane과 Chloroform 처리구에서는 연쇄구균증을 유발 세균에 대한 항균활성이 뚜렷하게 나타났으며, 비브리오증유발 세균들에게 전체적으로 약한 활성을 확인하였다. 이러한 결과들은 전체적으로 Methanol 추출물의 항균결과와 비교해 보았을 때 항균활성이 낮게 나타나는 경향을 보였다. 이러한 결과로 볼 때 항균물질들 대부분들이 Methanol 층에 녹는 것을 확인할 수 있었다.

Table 14. Inhibitory effect of *Streptomyces* sp. ACT-1 broth fraction against the growth of various pathogenic bacteria.

Strain	SBFr (100 $\mu\text{g}/\text{ml}$)				
	Hexane	Chloroform	E. acetate	Butanol	Water
<i>Edwardsiella tarda</i>	-	-	-	-	-
<i>Streptococcus iniae</i>	25.5	18.11	-	10.34	-
<i>Streptococcus parauberis</i>	25.6	21.48	-	9.1	-
<i>Vibrio mimicus</i>	-	-	-	-	-
<i>Vibrio salmonicida</i>	-	-	-	9.18	-
<i>Vibrio ichthyenteri</i>	-	8.89	9.81	-	9.12
<i>Vibrio rotiferianus</i>	-	-	-	-	-
<i>Vibrio fluvialis</i>	-	-	-	-	-
<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	-	-	-	-	-
<i>Vibrio vulnificus</i>	11	10.32	10.32	-	-
<i>Vibrio anguillarum</i>	-	-	-	-	-
<i>Vibrio harveyi</i>	-	-	-	-	-
<i>Vibrio tapetis</i>	-	-	-	10.97	-
<i>Vibrio tasmaniensis</i>	8.32	11.1	10.67	-	9.15
<i>Flavobacteriaceae bacterium</i>	-	-	-	-	-
<i>Exiguobacterium oridotokrans</i>	22	18	-	-	-
<i>Flavobacterium frigidarium</i>	-	-	-	-	-
<i>Rosebacter gallaeciensis</i>	-	-	-	-	-

Streptomyces sp. ACT-18이 생산하는 이차대사산물을 분획 추출하고 항균활성을 확인하여 Table 15에 나타내었다. 극성인 물을 용매로한 실험구들의 경우 항균활성이 미비한 결과를 보였으나 Chloroform용매에서는 대부분의 병원성 균주에 대하여 강한 항균활성을 보이고 있었으며, n-Hexan fraction에서는 연쇄구균증 유발세균인 *S. iniae*, *S. parauberis*에 대하여 강한 활성을 보인 반면 비브리오에는 약한 활성을 보였으며, Wild type 활주세균에 대한 감수성은 관찰되지 않았다. Ethyl acetate 분획물이나 Butanol 분획물에서는 약한 항균활성이 관찰되었다.

Table 15. Inhibitory effect of *Streptomyces* sp. ACT-18 broth Fraction against the growth of various pathogenic bacteria.

Strain	SBFr (100 µg/ml)				
	Hexane	Chloroform	E. acetate	Butanol	Water
<i>Edwardsiella tarda</i>	-	-	-	-	-
<i>Streptococcus iniae</i>	20.3	22.04	12.52	14.25	9.32
<i>Streptococcus parauberis</i>	23.6	21.03	-	9.34	-
<i>Vibrio mimicus</i>	-	-	-	-	-
<i>Vibrio salmonicida</i>	9.56	11	-	10.21	-
<i>Vibrio ichthyenteri</i>	-	-	-	-	-
<i>Vibrio rotiferianus</i>	-	-	-	-	-
<i>Vibrio fluvialis</i>	-	-	-	-	-
<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	-	-	-	-	-
<i>Vibrio vulnificus</i>	9.35	11.03	-	-	-
<i>Vibrio anguillarum</i>	-	12.05	-	11.07	-
<i>Vibrio harveyi</i>	-	13.85	9.43	12.08	-
<i>Vibrio tapetis</i>	13.75	14.9	11.08	-	-
<i>Vibrio tasmaniensis</i>	8.32	-	-	-	-
<i>Flavobacteriaceae bacterium</i>	-	-	-	-	-
<i>Exiguobacterium oridotokrans</i>	-	14.86	12.95	-	9.54
<i>Flavobacterium frigidarium</i>	-	-	-	-	-
<i>Rosebacter gallaeciensis</i>	-	-	-	-	-

3.3.2.2 분획물별 항산화활성 측정

3.3.2.2.1 DPPH 라디칼 소거활성 (RSA)

균체의 메탄올 추출물을 용매별(Hexane, chloroform, ethyl acetate, n-butanol, distilled water) 분획을 통해 항산화 활성을 띠는 물질의 극성 및 비극성계열의 화합물인지 확인해 보았다. 그 결과 분리균주 *Streptomyces* sp. ACT-1 및 *Streptomyces* sp. ACT-18 용매 분획물의 DPPH 라디칼 소거활성능을 다음과 같이 Fig. 26에 나타내었다.

Streptomyces sp. ACT-1 메탄올 추출물 Chloroform 분획물에서 가장 높은 DPPH 라디칼 소거활성 (RSA)을 보였으며, 1 mg/ml의 농도였을 때 89%의 매우 높은 라디칼 소거활성을 확인할 수 있었다. 또한 분획물들은 농도 의존적으로 활성을 나타냈으며, 대부분이 비극성인 물질에서 활성이 높게 나타나는 양상을 보여 비극성물질이 포함되어있음을 확인할 수 있었다. 그리고 *Streptomyces* sp. ACT-1 Ethyl acetate (Fr. A) 분획물에서 1 mg/ml의 농도에서도 80%이상의 라디칼 소거활성을 보였으며, 물추출물에서는 높은 농도에서도 거의 활성이 나타나지 않았으며, n-Butanol 추출물 실험구에서도 약한 활성을 보이는 것으로 확인되어 활성물질은 극성보다는 비극성에 가깝다는 결과를 얻을 수 있었으며, 이를 종합해 볼 때 균 배양액 성분에서는 비극성 물질 중에 항산화능을 가진 물질이 존재할 것이라 사료된다.

또한 분리균주 *Streptomyces* sp. ACT-18 용매별 분획물의 DPPH 라디칼 소거활성은 Chloroform 분획물에서 가장 높은 DPPH 라디칼 소거활성능을 보였으며, 0.1 mg/ml 농도 투여구서는 43.4%의 라디칼 소거활성, 0.5 mg/ml 농도에서는 71%, 1 mg/ml 농도에서는 89.1%의 높은 라디칼 소거활성을 확인할 수 있었다. 또한 Hexane 분획물, Ethyl acetate 분획물에서는 1 mg/ml 농도이상일 때 70% 이상의 라디칼 소거활성을 확인 할 수 있었다. 그렇지만 n-Butanol 분획물이나 물추출물의 실험구에서는 *Streptomyces* sp. ACT-1의 실험구와 거의 유사한 양상을 보이고 있었으며, 본 물질 또한 비극성의 물질일 것으로 추측해보며, n-Butanol 추출물과 물추출물의 경우 라디칼 소거활성이 거의 나타나지 않아서

본 물질이 비극성이 물질일 가능성이 높다는 판단을 하게 되었으며, 이를 종합해 볼 때 균 배양액 성분에서는 비극성 물질 중에 항산화작용을 하는 물질이 존재할 것이라 사료된다.

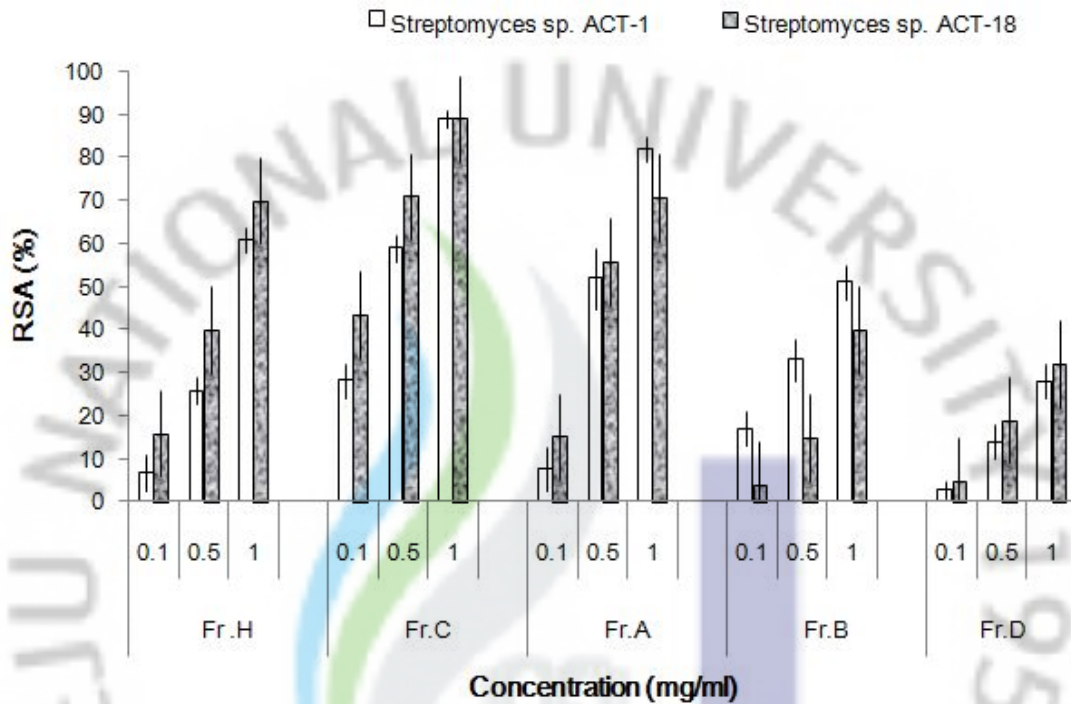


Fig. 26. DPPH radical scavenging activity (RSA) of organic solvent fractions from actinomycetes

3.3.2.2.2 Hydroxyl 라디칼 소거활성 (HRS)

Fig. 27은 분리균주 *Streptomyces* sp. ACT-1 및 *Streptomyces* sp. ACT-18 용매별 분획물의 농도별 Hydroxyl 라디칼 소거활성에 대한 결과를 나타낸 것이다. 본 실험에서는 n-Butanol 분획물에서 가장 높은 라디칼 소거활성을 확인할 수 있었으며, 0.1, 0.5, 1 mg/ml 모든 농도에서 75%이상의 라디칼 소거활성을

확인하였다. 이외에 *Streptomyces* sp. ACT-1 Hexane 분획물에서도 73.1, 77, 83.9%의 라디칼 소거활성을 보였으며, *Streptomyces* sp. ACT-18 Hexane 분획물에서는 58, 69, 74%의 라디칼 소거활성을 보였다. Chloroform 분획물에서도 0.5 mg/ml 이상의 농도에서는 70%이상의 라디칼 소거활성을 보였다. Ethyl acetate 분획물에서는 농도의존적인 활성을 보이지는 않았지만 0.1 mg/ml의 낮은 농도에서도 70% 이상의 라디칼 소거활성을 보였다. 이러한 분획물들은 모두 비극성인 물질에서 효과를 보이기 때문에 비극성물질로 추측된다.

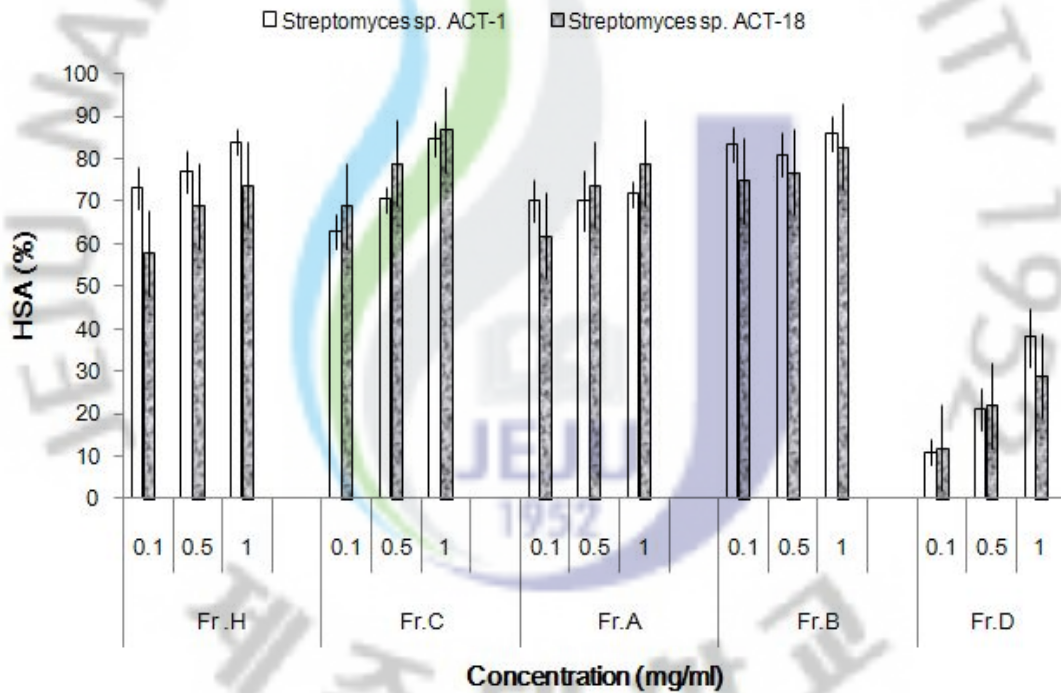


Fig. 27. Hydroxyl radical scavenging (HRS) activity of organic solvent fractions from actinomycetes

3.3.2.2.3 Alkyl 라디컬 소거활성 (ARS)

Fig. 28은 균주 *Streptomyces* sp. ACT-1 및 *Streptomyces* sp. ACT-18 용매별 분획물의 농도별 Alkyl 라디컬 소거활성에 대한 결과를 나타낸 것으로서, 그림에서와 같이 *Streptomyces* sp. ACT-1 ethyl acetate 분획물에서 가장 높은 라디컬 소거활성을 보였으며, 0.5 mg/ml 농도구에서는 66%의 소거활성을 보였다. n-Butanol 분획물에서는 0.5 mg/ml 농도 이상일 때는 60% 이상의 라디컬 소거활성을 보였지만 Hexane 분획물이나 물 분획물에서는 거의 항산화활성을 확인 할 수 없었다. 이러한 결과는 본 용매에 녹아있는 물질의 극성 또는 비극성 물질인지 확인할 수 있는 단적인 예로 본 실험에서는 비극성물질일 가능성이 높게 나타나고 있다. 위에서 언급한 DPPH 소거활성능 테스트와 거의 유사한 결과를 보였으며, Alkyl 라디컬에 효과적인 물질 또한 DPPH 라디컬에 직접적인 영향을 주는 물질로 추측할 수 있다.

Streptomyces sp. ACT-18 용매별 분획물의 농도별 Alkyl 라디컬 소거활성은 모든 실험구 농도 1 mg/ml에서 50% 이상의 라디컬 소거활성을 확인하였다. 또한 Hexane fraction에서 Alkyl 라디컬 소거활성이 가장 높았으며, 0.1, 0.5, 1 mg/ml에서 각각 35.4, 60, 76.1%로 나타났다. 또한 지금까지와는 대조적으로 물 fraction에서도 0.1, 0.5, 1 mg/ml에서 각각 27.3, 50, 74.5%로 나타났으며, 이러한 결과들은 DPPH 라디컬 소거능과는 대조적으로 극성용매추출물이 비교적 강한 소거활성을 보였다. Ethyl acetate, n-Butanol, Chloroform 분획물에서도 높은 농도에서 활성을 보였지만, 대부분이 약한 활성을 보였다. 이러한 결과들을 바탕으로 극성물질일 가능성을 확인할 수 있는 결과라고 사료된다.

최종적으로 본 연구에서는 이러한 추출물을 이용하여 항산화 활성 및 항균활성을 테스트 하였으며, 추출물들의 활성이 매우 좋다는 것을 확인할 수 있었으며, 차후 활성물질들의 화학적 분석기법을 통하여 최종적인 물질 규명이 되어야 할 것으로 사료되며, 연구를 진행 중에 있다.

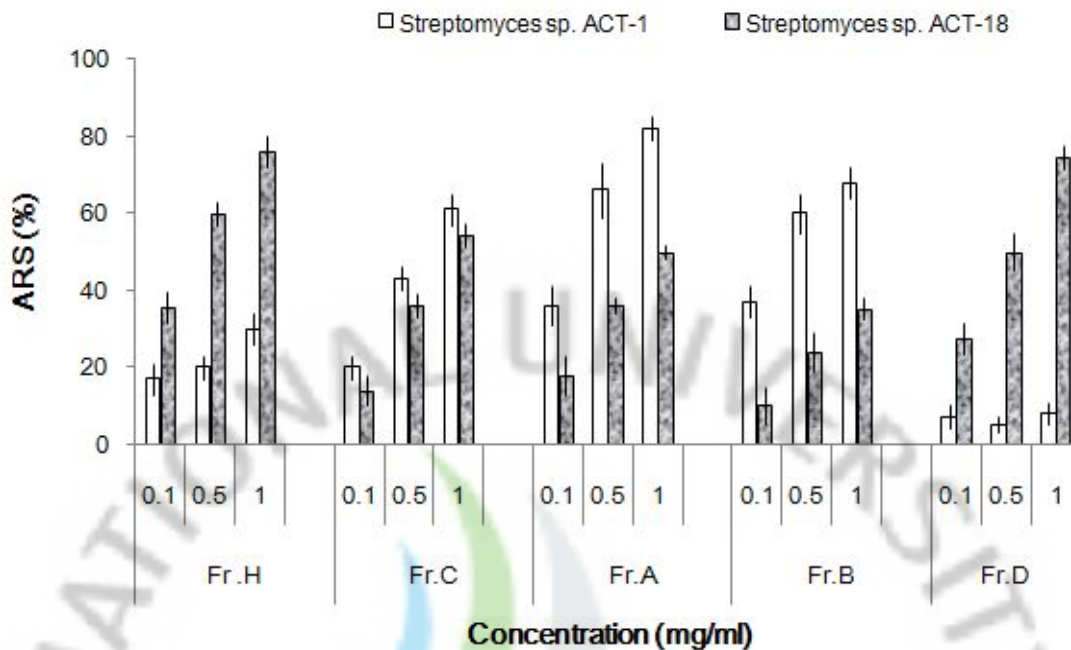


Fig. 28. Akyl radical scavenging (ARS) activity of organic solvent fractions from actinomycetes.

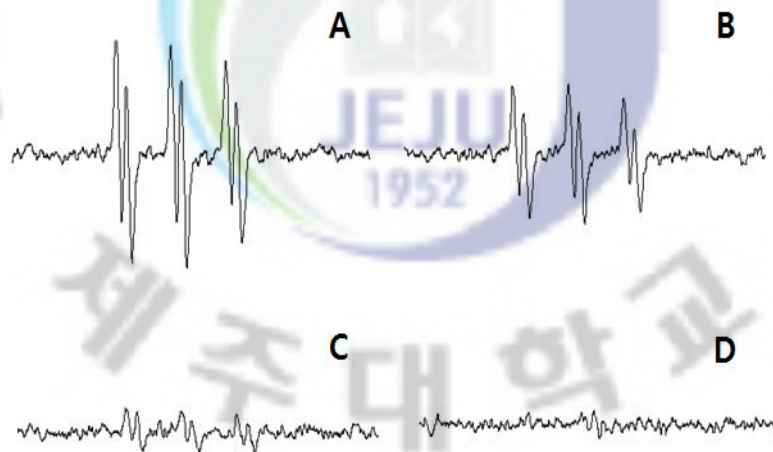


Fig. 29. ESR spectrum observed during incubation of AAPH with 4-POBN at various concentrations of distilled water extracts from *Streptomyces* sp. ACT-18.

(a) control; (b) 0.1 mg/ml; (c) 0.5 mg/ml; (d) 1.0 mg/ml.

3.4 방선균 추출물을 이용한 양식어류 생물접촉 실험

3.4.1 사육수조 수질의 이화학적 특성 및 넙치의 성장도 조사

사육수조내의 이화학적 특성을 조사해본 결과 수온은 2008년 8월 20일경에 26°C안팎으로 가장 높은 수치를 보였으며, 실험종료일 기준으로 11월 22일에 가장 낮은 18~19°C의 수온 변화를 보였다. 사육수조 내 염분농도는 큰 변화는 없었지만 8월 및 9월 초순까지 낮은 값을 보였는데, 이는 강수량의 증가로 인한 연안 해역의 염분농도가 일시적으로 낮아졌던 것으로 사료되며, 본 연구소에서는 해수를 직접 바다에서 공급받아서 사용하기 때문에 이러한 날씨상황에서도 변화가 보이는 것으로 해석된다.

또한 용존산소량 수치는 실험 기간내에 거의 일정하게 조사가 되었으며, 수조내의 용존산소량 조사결과 양호한 결과들을 얻을 수 있었다. pH 수치 또한 실험기간 내에 거의 일정한 값을 보여주고 있었다. 이러한 결과들은 어류들이 생존에 있어서 큰 문제가 없었다는 것을 단편적으로 보여주는 결과들이었다.

넙치의 성장도 조사결과를 다음과 같이 Table 16에 나타내었다. 방선균 추출물이 첨가되지 않은 대조구(Control)에서는 사육기간 동안 중증량이 154.4 g으로 나타났으며, 사료첨가제가 투여된 실험구에서는 SBME-18 1% 첨가구에서 가장 높은 174.3 g으로 확인되었으며, positive control로 사용된 *Lactobacillus sakei* 2% 첨가구에서는 가장 낮은 150.2 g으로 조사되었다. 사료효율은 거의 비슷하게 나타났으며, 생존율에 있어서는 사료첨가제가 들어가지 않은 대조구보다 실험구에서 모두 높은 양상을 확인 할 수 있었다. SBME-18 2%첨가 실험구에서는 대조구와 비교해 보았을 때, 20% 정도의 생존율의 증가를 확인 할 수 있었다. 이러한 결과가 사료첨가제로 인하여 면역력의 증가로 인해서 생존율이 증가했는지는 확인 할 수 없지만, 대부분의 실험구에서 높은 생존율을 확인할 수 있었다. 그리고 각 수조에서 폐사어를 조사해 본 결과 현미경 검경 시 스쿠티카충들이 많이 확인이 되었으며, 스쿠티카충에 의한 아가미괴사, 표피의 괴사, 지느러미괴사 및 근육괴사 등의 증상들이 확인이 되었다. 일반적인 어류질병 진단법에 이용하여 검사해 본 결과 비브리오증 등과 같은 세균성 질병에 의한 폐사는 거의 일

어나지 않았다. 대부분의 폐사어들이 사육수조내의 산소과잉공급으로 인한 질식 및 넙치 밀식으로 인한 상처 및 스트레스 등으로 폐사가 일어난 것으로 최종 확인이 되었다. 그렇지만 스키테카층에 대한 효과적인 구제효과는 찾아볼 수가 없었다.

Table 16. Result of weight gain, feed efficiency and survival of Olive flounder, *Paralichthys olivaceus*.

Group	IW (g)	FW (g)	WG (g)	FE (%)	Survival (%)
Control	140.9±7.2	295.3±10.8	154.4	82.3	52
SBME-1 1%	148.6±13.3	317±11.0	168.4	84.3	64
SBME-1 2%	147.5±12.2	304±11.3	156.5	83.2	70
SBME-18 1%	134.7±14.1	309±12.9	174.3	85.1	68
SBME-18 2%	133.3±17.1	301±18.1	167.7	83.3	72
L. Sakei 2%	137.8±14.1	288±17.1	150.2	81.9	62

IW, initial weight; FW, final weight; WG, weight gain; FE, feed efficiency. The observed values were expressed as mean±SD (n=6). Statistical differences (P<0.005) from the control group of same species are indicated by asterisks.

3.4.2 혈액분석을 통한 면역활성 능력 평가

방선균 배양 추출물 첨가 사료 투여가 넙치의 생리 상태에 미치는 영향을 조사하기 위해 Glutamic oxalacetic transaminase (GOT), Glutamic pyruvic transaminase (GPT), Total protein, Glucose, Phosphorus, Triglycerides, Hemoglobin의 변화를 지표로 하여 조사하였으며, 그 결과를 Table 17, 18에 나타내었다.

GOT (Glutamic oxalacetic transaminase)란 생체의 여러 가지 장기 세포 가운데

있는 효소로 몸의 중요 구성 요소인 아미노산을 형성하는 작용을 한다. GOT는 장기의 세포가 파괴되면 대량으로 존재하고 이 효소가 특히 많은 곳은 심장, 간, 근육, 적혈구이다. 그러므로 이러한 장기들의 손상은 혈청 GOT가 상승한다는 것을 의미하는 것이다 (Smith and Romos *et al.*, 1980). 본 연구결과 혈청내의 GOT를 비교해 본 결과 첨가물을 투여한 실험구에서 약간 낮은 효소를 존재를 확인할 수 있었으며, 대조구와 비교해 본 결과 크게 유의적 차이는 보이지 않았다. 또한 GPT는 혈장 전이효소로서 이 효소의 활성은 오염물질에 의한 간, 심장 및 근육 등의 조직 손상의 지표로 이용되고 있으며, 일반적으로 오염물질에 의해 증가하는 경향을 나타낸다. 본 결과에서도 대조구와 실험구들의 GPT 효소의 존재를 확인해 본 결과 큰 유의적 차이는 없는 것으로 확인이 되어 사료첨가제의 장기손상 여부는 거의 없는 것으로 확인이 되었다.

Table 17. Blood analysis of olive flounder, *Paralichthys olivaceus* fed on Bacteria broth extract supplemented feeds.

Group	GOT (U/L)		GPT (U/L)		Glucose (mg/dL)		T-protein (g/dL)		
	Initial	Final	Initial	Final	Initial	Final	Initial	Final	
Con	15.0±2	27.0±2	5.0±2	4.5±1.5	31.5±0.5	36.5±0.5	6.7±0.1	5.7±0.1	
A	13.5±0.5	20.0±1	4.5±1.5	1.0±1	18.5±0.5	16.5±1.5	5.6±0.1	4.3±0.1	
Olive flounder	B	13.5±1.5	11.0±2	13.5±2.5	3.5±1.5	25.0±1.0	21.5±0.5	4.6±0.2	5.2±0.2
	C	14.5±0.5	11.5±6.5	6.5±0.5	5.5±2.5	13.0±0	15.5±4.5	4.75±0.1	4.9±0.3
	D	22.0±1	14.5±0.5	4.5±2.5	6.0±1	17.0±1.0	14.0±1.0	5.7	4.5±0.5
	E	13.0±1	8.5±1.5	7.5±0.5	11.0	21.0±1.0	24.5±3.5	5.7±0.1	4.3±0.2

A, SBME-1 1% ; B, SBME-1 2% ; C, SBME-18 1% ; D, SBME-18 2%.

The observed values were expressed as mean±SD (n=6). Statistical differences (P<0.005) from the control group of same species are indicated by asterisks.

Table 18. Blood analysis of olive flounder fed on Bacteria broth extract supplemented feeds.

Group	Phosphorus (mg/dl)		Triglycerides (mg/dl)		Hemoglobin (g/dl)	
	Initial	Final	Initial	Final	Initial	Final
Con	8.75±0.15	10.5±1.4	2.0±0	2.5±0.5	0.125±0.025	1.32±0.07
A	3.4±0.2	8.35±0.05	1.0±0	1.5±0.5	0.135±0.005	0.9±0.03
B	4.7±1.0	6.85±0.05	2.0±0	2.5±0.5	0.18±0.05	1.0±0.01
C	4.95±0.65	10.3±1.3	2.0±0	2.5±0.5	0.28±0.01	0.93±0.01
D	2.7±0.3	6.7±0.7	2.0±0	2.0±0	0.25±0.01	0.94±0.03
E	9.0±0.2	4.2±1.4	3.0±0	3.0±0	0.26±0.01	0.73±0.03

A, SBME-1 1% ; B, SBME-1 2% ; C, SBME-18 1% ; D, SBME-18 2%.

The observed values were expressed as mean±SD (n=6). Statistical differences (P<0.005) from the control group of same species are indicated by asterisks.

혈액내의 Glucose와 Cortisol의 농도는 생체의 2차 스트레스 지표로 사용되어지고 있으며, glucose의 경우 외인성 화합물질과 같은 독성물질에 대하여 증가하는 경향을 나타내는데 이것은 아드레날린의 과분비에 의해서 과혈당 조건을 유발할 수 있으며 체내 glycogen을 분해하여 혈장 glucose가 증가한다 (Gupta, 1974). 이 연구에서는 일반사료를 첨가한 대조구에서 Glucose 농도가 증가하는 양상을 보였으며, 박테리아 배양액 사료첨가제 투여 실험구에서는 Glucose 농도가 낮아지는 결과를 나타냈으며, 유산균 첨가 사료 투여구에서는 유의적으로 약간 증가하는 양상을 확인 할 수 있었다.

Total protein의 측정 결과 대조구와 사료첨가제 투여구 모두에서 유의적인 차이를 보이지는 않았다. 이는 세포의 항상성을 유지하는 역할을 하고 있는 혈청 내 단백질의 농도 변화가 없다는 것으로 생리적으로 넙치에게 부정적인 영향을 주지 않는 것으로 사료된다.

TG는 Triglyceride라는 콜레스테롤, 인지질, 유리지방산과 같이 혈중 지질의 주체를 이루고 있으며 간장에 저장된 TG는 에너지원으로서 이용되는데 본 연구에

서는 전체적으로 대조구와 실험구가 비슷한 수치를 나타내고 있다.

Phosphorus 측정 결과 대조구와 실험구에서는 큰 유의적 특징을 확인할 수는 없었으며, Hemoglobin 수치는 사료첨가제 투여구에서 증가하는 양상을 확인할 수 있었다. 또한 LDH 효소 분비를 측정하였지만 모든 실험구에서 유의적 차이를 확인할 수는 없었다 (Not shown data). LDH는 lactate dehydronase라는 당 분해 과정의 마지막 단계에 작용하는 효소의 이름이다. 이 LDH는 간, 근육, 골격, 뇌, 신장, 적혈구, 심장 등에 많이 분포하는 효소이기 때문에 이러한 장기에 염증이거나 세포파괴 시 LDH가 올라갈 수 있다. 이러한 혈액학적 분석을 통해서 나타난 결과들을 토대로 방선균 추출물 투여 사료첨가제가 세포의 손상이나 혈액 내의 생리 기능에 부정적인 영향을 주지 않는 것으로 확인되었다.

3.4.3 어류식세포의 활성산소 측정

두신 식세포의 살균 작용의 지표로 널리 이용되고 있는 활성산소(O_2^-) 생성능을 조사하여 식세포 활성을 알아보았다. 식세포는 병원체가 침입하여 자극하면 활성산소 (O_2^-)와 같은 reactive oxygen species(ROS)를 생산하는데, 이 물질들이 강력한 살균 효과가 있는 것으로 알려져 있다. 방선균 배양 추출물 첨가 사료를 투여한 모든 실험구에서 일반 사료를 투여한 대조구보다 높은 식세포활성을 확인할 수 있었으며, 유산균주 2% 투여한 실험구보다 매우 높은 식세포 활성을 확인할 수 있었다. 또한 *Streptomyces* sp. ACT-1 배양액 추출물을 첨가한 실험구에서 가장 높은 활성을 보였으며, 2%로 투여한 실험구에서는 대조구와 비교했을 때 보다 약 60% 이상의 활성증가를 확인할 수 있었다 (Fig. 30). 방선균 배양액 추출물 첨가 사료를 투여한 실험구에서 식세포의 높은 활성이 나타난 것으로 보아 배양액에 함유되어 있는 생리활성물질 성분이 어류의 비특이적 세포성 면역기능 증강에 중요한 역할을 한 것으로 사료되며, 이와 유사한 결과들로 버섯균사체 배양액의 첨가가 마크로파아지와 호중구수가 증가한다는 보고도 있으며, 생리활성물질 첨가로 인한 turbot에서도 NBT의 활성 향상, *Lactobacillus rhamnosus*을 투여하여 식세포 활성 결과 미첨가구보다 유산균 첨가구가 높은 활성

을 보인다는 보고도 있다 (Kim *et al.*, 2003; Kwon *et al.*, 1999). 이러한 결과들로 미루어 볼 때, 차후 본 생리활성물질의 특성을 확인해야 할 것으로 사료되며, 사료첨가제로서의 이용가능성이 매우 크다는 것을 시사해 주는 결과라고 사료된다.

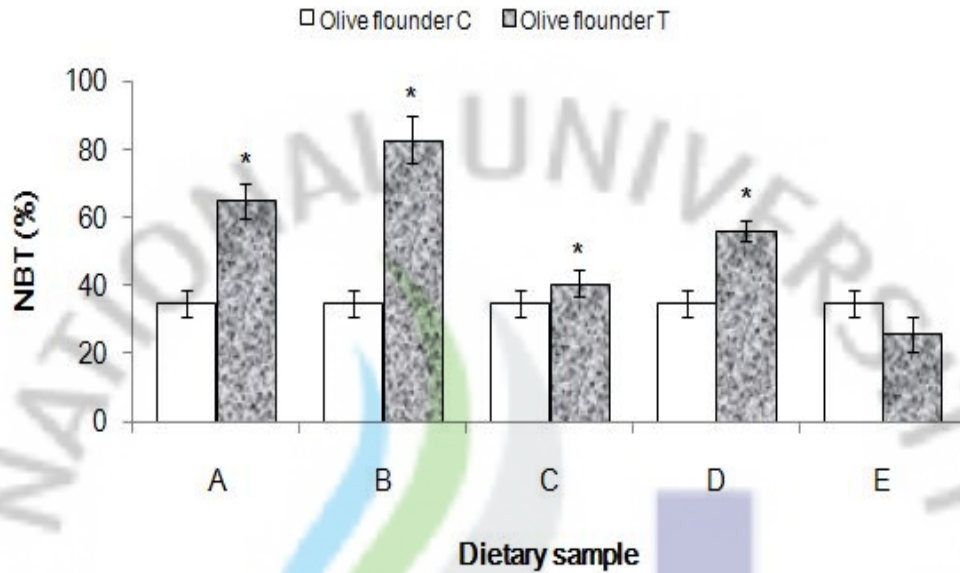


Fig. 30. Superoxide anion production observed on NBT assay of the olive flounder control group (C) and after administration with actinomycetes extracts containing diet group (T, treated). The observed values were expressed as mean \pm SD (n=6). Statistical differences (P<0.005) from the control group of same species are indicated by asterisks.

A, SBME-1 1%; B, SBME-1 2%; C, SBME-18 1%; D, SBME-18 2%; E, *Lactobacillus sakei* (Wild type) broth 2%.

3.4.4 혈청의 Lysozyme 활성 측정

Lysozyme은 비 특이적 방어기작들 중에 대표적인 것으로 자연계에 넓게 분포하는 효소로서, 세균벽의 peptidoglycan층의 N-acetylmuramic acid와 N-acetylglucosamine 사이의 β -1,4 결합을 분해하여 세균을 사멸시키는 효소이며, 이외에도 옹소닌,

항바이러스, 항암작용 등에도 관여를 하는 것으로 보고되고 있다 (Jhon *et al.*, 2009). 본 실험에서 라이소자임 활성을 측정해 본 결과 박테리아 배양액 추출물 첨가 사료를 투여한 실험구에서는 크게 유의적 차이를 볼 수는 없었지만 *Streptomyces* sp. ACT-1 배양액 추출물 2% 첨가구에서 매우 높은 라이소자임 활성을 확인 할 수 있었다. 다른 실험구에서도 배양액 추출물의 농도를 1%로 첨가했을 때 보다 2%로 첨가했을 때 라이소자임 활성이 증가하는 양상을 보이고 있었다 (Fig. 31). 이는 배양액내의 생리활성성분들의 증가함에 따라서 어류 면역체계가 증가하는 결과라고 사료되어지며, 차후 최적 사료투여 농도를 확인 해 볼 필요가 있다고 사료되어진다.

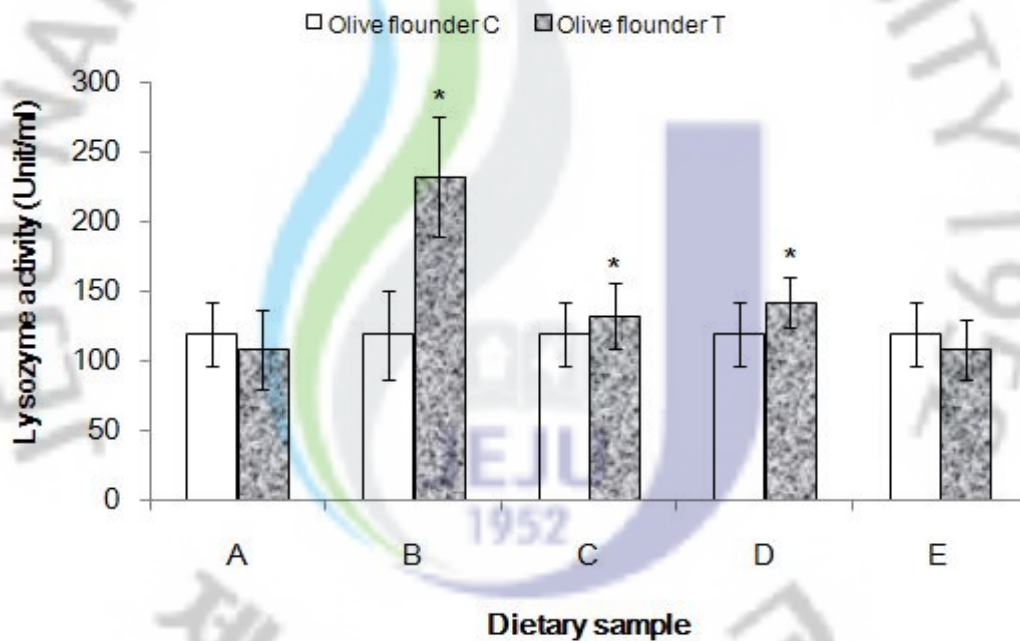


Fig. 31. Lysozyme activity of the olive flounder control group (C) and after administration with actinomyceyes extracts containing diet group (T, treated). The observed values were expressed as mean \pm SD (n=6). Statistical differences (P<0.005) from the control group of same species are indicated by asterisks.

A, SBME-1 1%; B, SBME-1 2%; C, SBME-18 1%; D, SBME-18 2%; E, *Lactobacillus sakei* (Wild type) broth 2%.

3.4.5 *Streptococcus iniae*를 이용한 인위감염실험

방선균 배양 추출물 첨가사료를 13주 동안 투여한 질병이 없는 건강한 넙치에 어류 병원성 세균인 *Streptococcus iniae*를 인위 감염 시킨 후, 15일 동안에 누적 폐사율을 조사한 결과를 Fig. 32에 나타내었다. 그 결과 일반사료를 투여한 실험구에서는 인위감염 2일째부터 폐사가 일어났으며, 지속적으로 증가하다가 10일째 80%의 폐사율을 보였다. 또한 사료첨가제를 투여한 실험구에서는 전체적으로 비슷한 양상의 폐사율을 보였으며, ACT-1 2%첨가 실험구에서 60%의 폐사율을 보여 20%정도의 감소량을 확인할 수 있었으며, 전체적으로 5~20%의 폐사율 감소를 확인할 수 있었다. 이러한 결과는 박테리아 배양액에 포함된 성분이 넙치의 비 특이적 면역계 중 세포성 면역을 담당하는 식세포의 활성화와 체액성 면역계를 담당하는 라이소자임 활성화에 영향을 준 것으로 사료된다. 이러한 사료첨가제의 효과에 대해서는 많은 부분 연구가 이루어지고 있으며, 다당류의 성분들의 첨가로 인한 백혈구의 탐식능, 라이소자임의 활성화, 화학발광의 증가와 백혈구의 유주능 및 활성산소의 생성 증가 등과 같은 비 특이적 방어인자의 활성을 증가시킨다는 보고 (Kim *et al.*, 2003)가 있다.

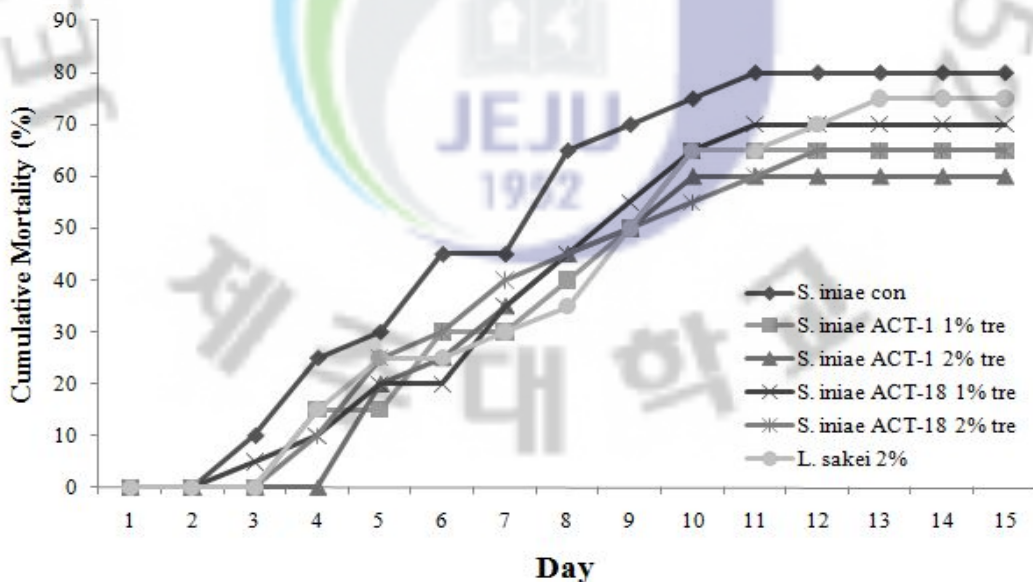


Fig. 32. Cumulative mortality (%) of olive flounder after 15 day feeding incremental levels after challenge with *Streptococcus iniae*.

4. 요약

해양에서 분리된 방선균주 총 145종을 가지고 1차적인 항균 및 항산화 실험을 거쳐서 생리활성이 우수한 균주 21종(ACT 1~21)을 분리하였다. 분리된 균주 배양액의 메탄올 추출물을 이용하여 어류 및 인체질병유발 세균 10종을 이용하여 항균실험을 실시하였으며, ESR spectrometer를 이용하여 DPPH 라디칼 소거 활성을 측정한 후, 항산화 활성을 평가하였다. 그 결과 최종적으로 균주 ACT-1, ACT-11, ACT-18 균주를 선정할 수 있었으며, 균주 동정 결과 ACT-1, ACT-18은 *Streptomyces* 종(Species)들과 가장 유사한 특성을 보였으며, 최종적으로 *Streptomyces* sp. ACT-1 및 *Streptomyces* sp. ACT-18이라고 각각 명명하였다. 그리고 균주 ACT-18은 *Nocardopsis dassonvillei* 종과 가장 유사한 생화학적 및 유전학적 특성을 보여 *Nocardopsis* sp. ACT-18이라고 명명하였다. 분리균주 ACT-1, ACT-18 및 ACT-18의 배양학적 특성을 확인한 결과 배양온도는 25°C~30°C, pH 범위는 6.8~8.4, NaCl 2~5% 첨가구에서 가장 좋은 생육도 및 항산화활성을 보였다. 그리고 균주 *Streptomyces* sp. ACT-1의 최적배양조건을 확인한 결과 탄소원으로 Maltose(1%), 질소원은 Yeast extract(0.5%)로 나타났으며, 균주 *Nocardopsis* sp. ACT-11은 탄소원으로 Galactose(1%), 질소원으로는 Yeast extract(0.5%), *Streptomyces* sp. ACT-18은 탄소원으로는 Mannitol(1%), 질소원으로는 Yeast extract 첨가 실험구에서 가장 높은 생육도 및 항산화활성을 보였다. 균주의 생육 및 생리활성물질 생산을 위한 최적배양조건을 확인한 후, 배양 추출물의 생리활성을 평가하였다. 생리활성 평가를 위해 균주 배양액 메탄올 추출물을 제조하였으며, 항균 및 항산화 활성을 확인하였다. 그 결과 *Streptomyces* sp. ACT-1 배양액 메탄올 추출물은 연쇄구균증 원인균인 *Streptococcus parauberis* (>100 µg/ml), *Streptococcus iniae*(>100 µg/ml)에 대하여 농도 의존적으로 매우 높은 항균활성을 확인하였으며, 활주세균증 유발 유사 세균인 *Exiguobacterium oridotokrans*(Wild Type)에 매우 높은 항균 감수성(>100 µg/ml)을 보였다. 그러나 비브리오증을 유발시키는 균들에 대한 감수성은 거의 관찰되지 않았으며, 에드워드병 유발세균인 *Edwardsiella tarda*에 대해

서는 높은 농도(>500 $\mu\text{g/ml}$)였을 때 약간의 감수성이 관찰되었지만 낮은 농도에서는 거의 감수성이 없는 것으로 확인되었다. *Nocardiosis* sp. ACT-11 배양액 메탄올 추출물은 일부 어류 질병 병원성 세균인 *Vibrio salmonicida*, *Flavobacteriaceae bacterium*를 제외하고는 다른 병원성 세균에 대한 감수성이 거의 없었다. *Streptomyces* sp. ACT-18 배양액 메탄올 추출물은 연쇄구균증 유발세균(*S. iniae*; *S. parauberis*, >200 $\mu\text{g/ml}$), 비브리오증 유발세균(>100 $\mu\text{g/ml}$), 활주세균증 유발세균(>100 $\mu\text{g/ml}$)에 대하여 전체적으로 높은 감수성을 보였으며, 에드워드증 유발세균(>500 $\mu\text{g/ml}$)에 대해서는 감수성이 없는 것으로 확인되었다. 분리균주 배양액 메탄올 추출물의 농도별 항산화 활성을 측정한 결과 SBME-1 (Streptomyces Broth Methanol Extract ACT-1) 100 $\mu\text{g/ml}$ 농도 실험구에서는 46%, 500 $\mu\text{g/ml}$ 에서는 53% 1,000 $\mu\text{g/ml}$ 에서는 67%의 DPPH 라디칼 소거 활성(RSA)을 관찰할 수 있었다. NBME-11 (Nocardiosis Broth Methanol Extract ACT-11) 실험구에서도 유의적인 차이는 없었지만 SBME-18 (Streptomyces Broth Meyhanol Extract ACT-18) 실험구에서는 가장 높은 74%의 라디칼 소거활성(>1,000 $\mu\text{g/ml}$)을 보였다. Hydroxyl radical 소거활성 결과 SBME-1(100 $\mu\text{g/ml}$)과 NBME-11(100 $\mu\text{g/ml}$) 투여 실험구에서는 각각 46%, 38%의 낮은 항산화활성을 보인 반면 500 $\mu\text{g/ml}$ 농도 이상의 실험구에서는 SBME-1에서는 84%, SBME-18 처리구에서는 81%의 높은 항산화활성을 확인할 수 있었다. Alkyl radical 소거활성 측정 결과 모든 실험구에서 농도 의존적으로 항산화활성이 증가하는 양상을 보이고 있었으며, 100 $\mu\text{g/ml}$ 투여 실험구에서는 낮은 라디칼 소거활성(30~40%)을 보였다. 1,000 $\mu\text{g/ml}$ 처리구에서는 SBME-18 추출물에서 가장 높은 74%의 라디칼 소거활성을 보였다. 또한 분리균주의 유기용매 분획별의 항균 및 항산화활성을 측정하였으며, 그 결과 균주 *Streptomyces* sp. ACT-1의 분획물의 항균 활성은 극성인 물을 용매로한 실험구들의 경우 항균활성이 미비한 결과를 보였으나 Chloroform, n-Hexan의 용매에서는 항균활성을 보이고 있었다. Hexane 분획물과 Chloroform 처리구에서는 연쇄구균증을 유발 세균에 대한 항균활성이 뚜렷하게 나타났으며, 비브리오증유발 세균들에게 전체적으로 약한 활성을 확인하였다. *Streptomyces* sp. ACT-18 분획별 항균활성 측정 결과 Chloroform용매에서는 대부분의 병원성 균주에 대하여 강한 항균활성을

보였으며, n-Hexan 분획에서는 *S. iniae*, *S. parauberis*에 대하여 강한 활성을 보인 반면 비브리오는 약한 활성을 보였으며, Wild type 활주세균에 대한 감수성은 관찰되지 않았다. 항산화활성 측정 결과 *Streptomyces* sp. ACT-1 Chloroform 분획에서 가장 높은 DPPH 라디칼 소거활성 (RSA)을 보였으며, 1 mg/ml의 농도였을 때 89%의 매우 높은 라디칼 소거활성을 확인할 수 있었다. 분리균주 *Streptomyces* sp. ACT-18 분획 농도별 DPPH radical 소거활성은 Chloroform Fraction에서 가장 높은 라디칼 소거활성을 보였다. Hydroxyl 라디칼 소거활성 결과 *Streptomyces* sp. ACT-1 n-Butanol 분획에서 가장 높은 라디칼 소거활성을 확인할 수 있었으며, *Streptomyces* sp. ACT-18 Hexane 분획에서는 58, 69, 74%의 라디칼 소거활성을 보였다. Alkyl 라디칼 소거활성 결과 *Streptomyces* sp. ACT-1 Ethyl acetate 분획에서 가장 높은 라디칼 소거활성을 보였으며, 0.5 mg/ml 농도구에서는 66%의 소거활성을 보였다. *Streptomyces* sp. ACT-18 분획 농도별 Alkyl 라디칼 소거활성은 Hexane 분획에서 Alkyl 라디칼 소거활성이 가장 높았으며, 0.1, 0.5, 1 mg/ml에서 각각 35.4, 60, 76.1%로 나타났다.

해양방선균주 *Streptomyces* sp. ACT-1, *Streptomyces* sp. ACT-18 추출물을 이용한 양식어류 생물접촉 실험을 실시하였다. 그 결과 넙치의 성장도는 방선균 추출물이 첨가되지 않은 대조구 (Control)에서는 사육기간 동안 중증량이 154.4 g으로 나타났으며, 사료첨가제가 투여된 실험구에서는 SBME-18 1% 첨가구에서 가장 높은 174.3 g으로 확인되었다. 방선균 배양 추출물 첨가 사료 투여가 넙치의 생리 상태에 미치는 영향을 조사하기 위해 Glutamic oxalacetic transaminase (GOT), Glutamic pyruvic transaminase (GPT), Total protein, Glucose, Phosphorus, Triglycerides, Hemoglobin의 변화를 지표로 하여 조사하였다. 본 연구결과 혈청내의 GOT를 비교해 본 결과 첨가물을 투여한 실험구에서 약간 낮은 효소를 존재를 확인할 수 있었으며, 대조구와 비교해 본 결과 크게 유의적 차이는 보이지 않았으며, GPT 효소 또한 유의적 차이는 없는 것으로 확인이 되어 사료첨가제의 장기손상 여부는 거의 없는 것으로 확인이 되었다.

대조구에서 Glucose 농도가 증가하는 양상을 보였으며, 사료첨가제 투여 실험구에서는 Glucose 농도가 낮아지는 결과를 나타냈으며, Total protein, TG(Triglyceride),

Phosphorus는 유의적 차이가 없었다. Hemoglobin 수치는 사료첨가제 투여구에서 증가하는 양상을 확인할 수 있었다. 또한 LDH 효소 분비를 측정하였지만 모든 실험구에서 유의적 차이를 확인할 수는 없었다 (Not shown data).

어류식세포의 활성산소 측정결과 방선균 배양 추출물 첨가 사료를 투여한 모든 실험구에서 일반 사료를 투여한 대조구보다 높은 식세포활성을 확인할 수 있었으며, 유산균주 2% 투여한 실험구보다 매우 높은 식세포 활성을 확인할 수 있었으며, Lysozyme 활성은 *Streptomyces* sp. ACT-1 배양액 추출물 2% 첨가구에서 매우 높은 라이소자임 활성을 확인할 수 있었다.

방선균 배양 추출물 첨가사료를 13주 동안 투여한 질병이 없는 건강한 넙치에 어류 병원성 세균인 *Streptococcus iniae*를 인위 감염 시킨 후, 15일 동안에 누적 폐사율을 조사하였다. 그 결과 일반사료를 투여한 실험구에서는 인위감염 3일째부터 폐사가 일어났으며, 지속적으로 증가하다가 10일째 80%의 폐사율을 보였다. ACT-1 2%첨가 실험구에서 60%의 폐사율을 보여 20%정도의 감소량을 확인할 수 있었으며, 전체적으로 5~20%의 폐사율 감소를 확인할 수 있었다.

중 합 요약

본 연구에서 시료를 채집한 제주도 해안의 특성은 대부분 용암류가 바다에 접하면서 형성된 전형적인 화산해안이다. 제주도의 지질분포를 보면 화산암이 전체 면적의 95% 이상을 차지하며, 서귀포 일대를 제외하면 해안에는 주로 현무암이 분포하고 있다. 비록 해안선이 단순하지만 해안에 다양한 형태의 기질이 존재하고 있으며, 열대와 아열대 생물인자를 온대해역으로 수송하는 쿠로시오의 지류인 대마난류의 영향권에 위치함에 따라 한반도의 해안과는 다른 종 조성을 가지고 있다. 이런 점에서 우리나라 해안 생태계에서 제주도 해안생태계가 가지는 중요성이 입증되고 있으며 온대와 아열대 및 열대 생물이 공존하는 곳으로서 특이한 생물 지리적 특성을 가지고 있다. 또한, 제주도 해안가는 암반 조건대가 대부분을 차지하고 있기 때문에 조수웅덩이가 주기적으로 생성될 수 있는 조건을 갖추고 있으며, 크기 또한 다양하여 주변의 해양환경과 육상 환경 조건에 따라 독특한 생태적 특성을 보이고 있다. 이러한 제주도의 해안 생태계의 중요성과 특이성 때문에 상대적으로 많은 연구진들이 제주도 해양생물 조사를 시도하였다. 본 연구에서는 제주도 해안을 중심으로 해양에 서식하는 생물, 해조류 및 해수와 모래를 채집하여 그로부터 분리되어지는 해양유래 방선균의 다양성을 연구하였다. 연구를 수행하기 위해 시료를 채집한 지역은 제주도 해안가를 중심으로 제주시 지역과 서귀포시 지역으로 나누어 제주시 지역은 동부와 서부지역으로 서귀포시 지역 또한 서부 지역과 동부 지역으로 구분하여 각 지역 마다 형성된 암반 조건대에서 시료를 채집 하여 미생물을 분리하였다. 해양유래 방선균을 분리하기 위해 생물 시료를 채집한 지역의 환경요인을 조사해 본 결과 수온, 염분농도, 용존산소, 화학적 산소요구량, 영양염류는 평균값과 큰 차이를 나타내지 않았으며 해수의 pH는 약 알카리성을 나타내었다. 채취된 시료로부터 해양유래 방선균주를 분리하였으며, 분리균의 생화학적 특성 및 16S rRNA 분석을 통하여 분리균의 계통학적 분석을 한 결과 제주도 해안 4개 지점 9개 지역에서 분리된 해양유래 방선균은 총 145균주를 분리하였는데 그 중 색소를 형성하는 방선균은 101 균주를 분리하였다. 해양에서 분리 되어진 대부분의 방선균주들은 성장 온도 범위는 4

℃~40℃까지 범위에서 성장이 가능하였으며, 10~35℃ 범위에서 좋은 성장을 보였다. 염 농도 실험에서는 다양한 염분 농도에서도 성장이 가능하였다. 최저 0%에서 최대 12.0%의 염 농도에서도 성장이 가능한 광염성 미생물(11종)과 초기 생육 배지내에 염분이 있어야만 성장이 가능한 호염성 미생물(48종)이 존재하였다. 이러한 염분농도에 대한 성장실험결과는 방선균이 육상에서 해양으로 유입이 되어서 적응을 하면서 생존을 한 종들과 그러한 종들이 오랜 시간 진화를 거듭하면서 해양미생물로서의 양상을 보여주는 중요한 증거 자료가 된다. 분리되어진 방선균 배양액 색상은 yellow, red, orange, brown, green, pink, violet 등으로 육상 방선균주 배양액들과 비교해 보았을 때 매우 다양한 색소를 생산했으며 대체적으로 aerial mycelium의 creamy, white, gray, yellow, green 계열의 색상을 나타냈다. 분리된 101균주의 색소를 추출한 뒤 carotenoid 또는 bacteriochlorophyll의 유무를 확인한 결과 83균주가 carotenoid의 흡광도 측정 범위인 350~540 nm에서 peak를 나타내었다. 반면 bacteriochlorophyll에 상응하는 파장범위에서는 흡광도 peak를 나타내는 균은 없었다.

제주도 제주시 동부지역(Group I, Site A, B) 해양에서 분리된 방선균 24균주는 Gram positive bacteria(divission)/ *Actinobacteria*(class)/ *Actinomycetales*(order)/ *Streptomycineae*(suborder)/ *Streptomycataceae*(family)/ *Streptomyces*(genus)에 22 균주, *Actinomycetales*(order)/ *Streptosporangineae*(suborder)/ *Nocardiopsaceae*(family)/ *Nocardiopsis*(genus)에 2 균주가 분리되었으며, 분리균주 염기서열을 type strain 과 비교한 결과 제주시 동부지역에서는 *Streptomyces* 속 균주 10종(species), *Nocardiopsis* 속 균주 2 종을 확인하였다.

제주시 서부지역 (Group II, Site C, D) 해양에서 분리된 방선균 28균주는 Gram positive bacteria(divission)/*Actinobacteria*(class)/*Actinomycetales*(order)/ *Streptomycineae*(suborder)/*Streptomycataceae*(family)/*Streptomyces*(genus)에 27 균주, *Actinomycetales*(order)/ *Streptosporangineae*(suborder)/ *Nocardiopsaceae*(family)/ *Nocardiopsis*(genus)에 1 균주가 분리되었으며, 최종적으로 *Streptomyces* 속 균주 17종(species), *Nocardiopsis* 속 균주 1 종을 확인하였다.

제주도 서귀포 동부지역 (Group III, Site E, F, G) 해양에서 분리된 방선균 총 58균주로서 가장 높은 방선균 분리율을 나타낸 지역이다. 분리된 해양 방선균들은

Gram positive bacteria(divission)/Actinobacteria(class)/Actinomycetales(order)/Streptomycineae (suborder)/Streptomycataceae(family)/Streptomyces(genus)에 51 균주, Actinomycetales(order)/Streptosporangineae(suborder)/Nocardiopsaceae (family)/ Nocardiopsis(genus)에 7 균주가 분리되었으며, Group III에서는 Streptomyces 속 24종(51균주 중), Nocardiopsis 속 4종을 분리하였다.

서귀포 서부지역 (Group IV, Site H, I)해양에서 분리된 방선균 35 균주는 모두 Gram positive bacteria(divission)/Actinobacteria(class)/Actinomycetales(order)/Streptomycineae(suborder)/Streptomycataceae(family)/Streptomyces(genus)에 분류학적으로 포함되었으며, Site H, I (Group IV)에서는 Streptomyces 속 균주 18종(species)을 확인하였다.

제주도 해안 4개 지역 9개 지점에서 분리되어진 145개의 해양 방선균 대부분의 미생물은 Gram positive bacteria/ Actinobacteria / Actinomycetales(order)그룹(100%)에 속하였으며 다음으로 Streptomycineae(suborder)/ Streptomycetaceae(family)/ Streptomyces(genus) 그룹(93.1%), Streptosporangineae(suborder)/ Nocardiopsaceae(family)/ Nocardiopsis(genus)(6.9%)로 나타났다. 최종적으로 해양에서 분리된 방선균주 145 균주 중 유전적 유사도(similarity)가 가까워 동일한 종일 가능성이 높은 균주를 제외하고 Site A~Site I까지 총 55 종 (Species)이 조사되었으며, 55종 중 Streptomyces (genus)에 51종이 속하였으며, Nocardiopsis (genus)에 4종이 포함되었다. 본 연구에서 제주도 해양에서 분리 되어진 방선균 및 미생물의 16S rRNA 염기서열을 분석하여 본 결과 총 11균주(방선균주 4종, 해양미생물 7종)가 새로운 종일 가능성이 매우 높게 나타났다. 이들에 대해서는 앞으로 근연속의 근연종 즉 type strain을 분양받아 미생물의 배양 특성, 형태적 특성, 생리·생화학적 특성, 화학적 특성, 분자생물학적 특성을 비교 분석할 필요가 절실히 요구된다.

신종 후보 균주 JJM10^T은 제주도 애월 해수욕장의 해양무척추동물인 *Siphonaria sirius* (Mollusca: Basommatophora)로부터 분리되어졌으며, 16S rRNA 유전자 염기서열을 비교해본 결과 *Gammaproteobacteria*의 *Glaciecola nitratreducens* KCTC 12276^T과 *Glaciecola pallidula* LMG 21427^T(96.1 and 95.43 % 16S rRNA gene sequence similarity)와 가장 유사하였다. 분리균주는 그람 음성, 호기성 및 약호염성 세균으로서 염 농도 1~10% 및 배양온도 10~37°C에서 성장한다.

Citrate 및 phenylacetate을 이용하지 않으며, produces cytochrome oxidase를 생산하는 특성을 가지고 있다. 그러나 Ornithine decarboxylase, lysine decarboxylase, urease 및 H₂S 생산하지 않았다. Inositol, sorbitol, rhamnose, melibiose 및 amygdalin 발효실험에서 양성을 나타냈다.

최종적으로 신종후보 균주 JJM10^T은 *Glaciecola nitratreducens* KCTC 12276^T 및 *Glaciecola pallidula* LMG 21427^T와 가장 유사한 생리 및 생화학적 특성을 보였다. 분리균주 JJM10^T의 G+C 함량은 49.81 mol%로 나타났으며, 주요 세포지방산은 C_{16:0}, Summed feature 4 (C_{16:1} w7c and/or iso-C_{15:0} 2-OH) 및 Summed feature 7 (C_{18:1}w9c/w12t/w7c)로 분석되었다. DNA-DNA 근연관계 데이터를 바탕으로 JJM10^T은 *G. nitratreducens*과 *G. pallidula* 중에서 분리되어졌다는 것을 확인할 수 있었다.

신종후보 균주 JJM57^T은 제주도 신촌 해안가의 해양식물인 *Laurencia* sp.,로부터 분리되어졌으며, 16S rRNA 유전자 염기서열을 비교해본 결과 *Gammaproteobacteria*의 *Oceanisphaera litoralis* DSM 15406^T 및 *Oceanisphaera donghaensis* KCTC 12522^T(98.02 and 97.70 % 16S rRNA gene sequence similarity)와 가장 유사하였다. 균주는 Gram 음성, Oxidase 및 Catalase 양성의 완벽한 구형 형태로 6 μm의 큰 세포로 운동성을 가지고 있다. 중호염성 세균으로서 염 농도 1.0~11%, 배양온도 4~37°C, 성장에 있어서 Na⁺를 필요로 하였다. Malate와 Citrate를 이용하였으며 arginine dihydrolase와 gelatin은 음성반응을 glycerol, succinate, L-valine 및 L-tyrosine은 양성반응을 보였다. galactose, glucose, arabinose, mannose, N-acetylglucosamine, maltose, gluconate, adipate 및 sucrose를 이용하여 산을 생성하지 않았으며, G+C 함량은 61.94 mol%로 나타났으며, 균주의 주요 지방산 분석 결과 C_{16:0}, C_{18:1} w7c and Summed feature 3 (C_{15:0} iso 2-OH/C_{17:0} iso 3-OH/C_{16:1} w7c.)로 나타났다. 균주의 형태학적, 생리, 생화학적 및 16S rRNA 유전자 염기서열을 분석해본 결과 최종적으로 균주 JJM57^T는 신종일 가능성이 높아 *Oceanisphaera laurenciae* sp. nov.라고 명명하였다.

해양에서 분리된 방선균주 총 145종을 가지고 1차적인 항균 및 항산화 실험을 거쳐서 생리활성이 우수한 균주 21종(ACT 1~21)을 분리하였다. 분리된 균주 배양액의 메탄올 추출물을 이용하여 어류 및 인체질병유발 세균 10종을 이용하여 항균실험을 실시하였으며, ESR spectrometer를 이용하여 DPPH 라디칼 소거

활성을 측정 한 후, 항산화 활성을 평가하였다. 그 결과 최종적으로 균주 ACT-1, ACT-11, ACT-18 균주를 선정할 수 있었으며, 균주 동정 결과 ACT-1, ACT-18은 *Streptomyces* 종(Species)들과 가장 유사한 특성을 보였으며, 최종적으로 *Streptomyces* sp. ACT-1 및 *Streptomyces* sp. ACT-18이라고 각각 명명하였다. 그리고 균주 ACT-18은 *Nocardioopsis dassonvillei* 종과 가장 유사한 생화학적 및 유전학적 특성을 보여 *Nocardioopsis* sp. ACT-18이라고 명명하였다. 분리균주 ACT-1, ACT-18 및 ACT-18의 배양학적 특성을 확인한 결과 배양온도는 25°C~30°C, pH 범위는 6.8~8.4, NaCl 2~5% 첨가구에서 가장 좋은 생육도 및 항산화활성을 보였다. 그리고 균주 *Streptomyces* sp. ACT-1의 최적배양조건을 확인한 결과 탄소원으로 Maltose (1%), 질소원은 Yeast extract (0.5%)로 나타났으며, 균주 *Nocardioopsis* sp. ACT-11은 탄소원으로 Galactose (1%), 질소원으로는 Yeast extract (0.5%), *Streptomyces* sp. ACT-18은 탄소원으로는 Mannitol(1%), 질소원으로는 Yeast extract (0.5%) 첨가 실험구에서 가장 높은 생육도 및 항산화 활성을 보였다. 균주의 생육 및 생리활성물질 생산을 위한 최적배양조건을 확인한 후, 배양 추출물의 생리활성을 평가하였다. 생리활성 평가를 위해 균주 배양액 메탄올 추출물을 제조하였으며, 항균 및 항산화 활성을 확인하였다. 그 결과 연쇄구균증 원인균인 *Streptococcus parauberis* (>100 µg/ml), *Streptococcus iniae*(>100 µg/ml)에 대하여 농도 의존적으로 매우 높은 항균활성을 확인하였으며, 활주세균증 유발 유사 세균인 *Exiguobacterium oridotokrans* (Wild Type)에 매우 높은 항균 감수성(>100 µg/ml)을 보였다. 그러나 비브리오증을 유발시키는 균들에 대한 감수성은 거의 관찰되지 않았으며, 에드워드병 유발세균인 *Edwardsiella tarda*에 대해서는 높은 농도(>500 µg/ml)였을 때 약간의 감수성이 관찰되었지만 낮은 농도에서는 거의 감수성이 없는 것으로 확인되었다. 분리균주 배양액 메탄올 추출물의 농도별 항산화 활성을 측정 한 결과 SBME-1 100 µg/ml 농도 실험구에서는 46%, 500 µg/ml에서는 53% 1,000 µg/ml에서는 67%의 DPPH 라디칼 소거 활성 (RSA)을 관찰할 수 있었다. NBME-11 실험구에서도 유의적인 차이는 없었지만 SBME-18 실험구에서는 가장 높은 74%의 라디칼 소거활성 (>1,000 µg/ml)을 보였다. Hydroxyl 라디칼 소거활성 결과 SBME-1(100 µg/ml)과 NBME-11(100 µg/ml) 투여 실험구에서는 각각 46%, 38%의 낮은 항산

화활성을 보인 반면 500 $\mu\text{g/ml}$ 농도 이상의 실험구에서는 SBME-1에서는 84%, SBME-18 처리구에서는 81%의 높은 항산화활성을 확인할 수 있었다. Alkyl 라디컬 소거활성 측정 결과 모든 실험구에서 농도 의존적으로 항산화활성이 증가하는 양상을 보이고 있었으며, 100 $\mu\text{g/ml}$ 투여 실험구에서는 낮은 라디컬 소거활성(30~40%)을 보였다. 1,000 $\mu\text{g/ml}$ 처리구에서는 SBME-18 추출물에서 가장 높은 74%의 라디컬 소거활성을 보였다. 또한 분리균주의 유기용매 분획물의 항균 및 항산화활성을 측정하였으며, 그 결과 균주 *Streptomyces* sp. ACT-1의 분획물의 항균 활성은 극성인 물을 용매로한 실험구들의 경우 항균활성이 미비한 결과를 보였으나 Chloroform, n-Hexan의 용매에서는 항균활성을 보이고 있었다. Hexane과 Chloroform 분획물에서는 연쇄구균증을 유발 세균에 대한 항균활성이 뚜렷하게 나타났으며, 비브리오증유발 세균들에게 전체적으로 약한 활성을 확인하였다. *Streptomyces* sp. ACT-18 분획물별 항균활성 측정 결과 Chloroform 용매에서는 대부분의 병원성 균주에 대하여 강한 항균활성을 보였으며, n-Hexan 분획에서는 *S. iniae*, *S. parauberis*에 대하여 강한 활성을 보인 반면 비브리오에는 약한 활성을 보였으며, Wild type 활주세균에 대한 감수성은 관찰되지 않았다. 항산화활성 결과 *Streptomyces* sp. ACT-1 Chloroform 분획에서 가장 높은 DPPH 라디컬 소거활성 (RSA)을 보였으며, 1 mg/ml의 농도였을 때 89%의 매우 높은 라디컬 소거활성을 확인할 수 있었다. 분리균주 *Streptomyces* sp. ACT-18 분획물 농도별 DPPH 라디컬 소거활성은 Chloroform 분획에서 가장 높은 라디컬 소거활성을 보였다. Hydroxyl 라디컬 소거활성 결과 *Streptomyces* sp. ACT-1 n-Butanol 분획에서 가장 높은 라디컬 소거활성을 확인할 수 있었으며, *Streptomyces* sp. ACT-18 Hexane 분획에서는 58, 69, 74%의 라디컬 소거활성을 보였다. Alkyl 라디컬 소거활성 결과 *Streptomyces* sp. ACT-1 Ethyl acetate 분획에서 가장 높은 라디컬 소거활성을 보였으며, 0.5 mg/ml 농도구에서는 66%의 소거활성을 보였다. *Streptomyces* sp. ACT-18 분획물 농도별 Alkyl 라디컬 소거활성은 Hexane 분획에서 Alkyl 라디컬 소거활성이 가장 높았으며, 0.1, 0.5, 1 mg/ml에서 각각 35.4, 60, 76.1%로 나타났다.

해양방선균주 *Streptomyces* sp. ACT-1, *Streptomyces* sp. ACT-18 추출물을 이용한 양식어류 생물접촉 실험을 실시하였다. 그 결과 넙치의 성장도는 방선균

추출물이 첨가되지 않은 대조구 (Control)에서는 사육기간 동안 중증량이 154.4 g으로 나타났으며, 사료첨가제가 투여된 실험구에서는 SBME-18(*Streptomyces Broth Methanol Extract* ACT-18) 1% 첨가구에서 가장 높은 174.3 g으로 확인되었다. 방선균 배양 추출물 첨가 사료 투여가 넙치의 생리 상태에 미치는 영향을 조사하기 위해 Glutamic oxalacetic transaminase (GOT), Glutamic pyruvic transaminase (GPT), Total protein, Glucose, Phosphorus, Triglycerides, Hemoglobin의 변화를 지표로 하여 조사하였다. 본 연구결과 혈청내의 GOT를 비교해 본 결과 첨가물을 투여한 실험구에서 약간 낮은 효소를 존재를 확인할 수 있었으며, 대조구와 비교해 본 결과 크게 유의적 차이는 보이지 않았으며, GPT 효소 또한 유의적 차이는 없는 것으로 확인이 되어 사료첨가제의 장기손상 여부는 거의 없는 것으로 확인이 되었다. 대조구에서 Glucose 농도가 증가하는 양상을 보였으며, 사료첨가제 투여 실험구에서는 Glucose 농도가 낮아지는 결과를 나타냈으며, Total protein, TG(Triglyceride), Phosphorus는 유의적 차이가 없었다. Hemoglobin 수치는 사료첨가제 투여구에서 증가하는 양상을 확인할 수 있었다. 또한 LDH 효소 분비를 측정하였지만 모든 실험구에서 유의적 차이를 확인할 수 없었다 (Not shown data). 어류식세포의 활성산소 측정결과 방선균 배양 추출물 첨가 사료를 투여한 모든 실험구에서 일반 사료를 투여한 대조구보다 높은 식세포활성을 확인할 수 있었으며, 유산균주 2% 투여한 실험구보다 매우 높은 식세포활성을 확인할 수 있었으며, Lysozyme은 *Streptomyces* sp. ACT-1 배양액 추출물 2w% 첨가구에서 매우 높은 라이소자임 활성을 확인할 수 있었다.

방선균 배양 추출물 첨가사료를 13주 동안 투여한 질병이 없는 건강한 넙치에 어류 병원성 세균인 *Streptococcus iniae*를 인위 감염 시킨 후, 15일 동안에 누적 폐사율을 조사하였다. 그 결과 일반사료를 투여한 실험구에서는 인위감염 3일째 부터 폐사가 일어났으며, 지속적으로 증가하다가 10일째 80%의 폐사율을 보였다. ACT-1 2%첨가 실험구에서 60%의 폐사율을 보여 20%정도의 감소량을 확인할 수 있었으며, 전체적으로 5~20%의 폐사율 감소를 확인할 수 있었다.

본 연구를 통해서 제주도내 해양방선균의 다양한 분포의 확인, 해양미생물의 생리학적 특성 및 신종 후보균주들을 분리, 분리된 해양미생물의 생리활성을 확인하였으며, 좋은 결과를 얻을 수 있었으며, 차후 생리활성물질의 분리, 정제를 통한 물질의 동정 과정이 필요하며, 확보된 미생물 균주들의 응용방안에 대한 연구를 수행할 예정에 있다.

참고문헌

- Amann, R., W. Ludwig, and K. H. Schleifer. 1995. Phylogenetic identification and in situ detection of individual microbial cells without cultivation. *Microbiol. Rev.* **59**, 143–169.
- Anderson, D. P. and A. K. Siwicki. 1994. Duration of protection against *Aeromonas salmonicida* in brook trout immunostimulated with glucan or chitosan by injection or immersion. *Progressive Fish-Culturist.* **56**, 258–261.
- Aoyagi, T., M. Ishizuka, T. Takeuchi, and H. Umezawa. 1977. Enzyme inhibitors in relation to cancer therapy. *J. Antibiot.* **30**, 121–132.
- APHA, AWWA, WPCF. 1993. Standard methods for the examination of water and waste water(18th ed.). APHA Washington, D.C. 1134pp.
- Ayala, F. J. 2007. Darwin's greatest discovery: design without designer. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **104(1)**, 8567–8573.
- Baik, K. S., Y. D. Park, C. N. Seong, E. M. Kim, K. S. Bae, and J. S. Chun. 2006. *Glaciecola nitrareducens* sp. nov., isolated from seawater. *Int J Syst Evol Microbiology.* **56**, 2185–2188.
- Baumann, P. and L. Baumann. 1981. The marine gram-negative eubacteria: genera *Photobacterium*, *Beneckea*, *Alteromonas*, *Pseudomonas* and *Alcaligenes*. In *The Prokaryotes*, vol. pp. 1331. Edited by M. P. Starr, H. Stolp, H. G. Trüper, A. Balows & H. Schlegel. Berlin: Springer.
- Beppu, T. and S. Horinouchi. 1991. Molecular mechanisms of the A-factor-dependent control of secondary metabolism in *Streptomyces*. *Planta Medica.* **57**, S44–S47.
- Bowman, J. P., S. A. McCammon, J. L. Brown, and T. A. McMeekin. 1998. *Glaciecola punicea* gen. nov., sp. nov. and *Glaciecola pallidula* gen. nov., sp. nov.: psychrophilic bacteria from Antarctic sea-ice habitats.

- Int J Syst Bacteriology*. **49**, 1213–1222.
- Bowman, J. P. 2000. Description of *Cellulophaga algicola* sp. nov., isolated from the surfaces of Antarctic algae, and reclassification of *Cytophaga uliginosa* (ZoBell and Upham 1944) Reichenbach 1989 as *Cellulophaga uliginosa* comb. nov. *Int J Syst Evol Microbiol*. **50**, 1861–1868.
- Buck, J. D. 1982. Nonstaining (KOH) method for determination of Gram reactions of marine bacteria. *Appl Environ Microbiol* **44**, 992–993.
- Bycroft, B. W. 1988. Dictionary of antibiotics and related substances, (10–18), Chapman and Hall.
- Carberg, S. R. 1972. International council for the exploration of the sea Charlottenland Denmark. pp. 305–315.
- Choa, J. H. and J. B. Lee. 2000. Bioecological characteristics of coral habitats around Moonsom, Jeju island, Korea: 1. Environment properties and community structures of phytoplankton. *Journal of the Korean Society of Oceanography*. **5**, 59–69.
- Connell, J. H. 1975. Some mechanisms producing structure in natural communities: a model and evidence from field experiments In: Ecology and evolution of communities (ed. by Cody, M. and Diamond, J.). pp. 460–490. Harvard Univ. Press.
- Colwell, P. R. 1970. Polyphasic taxonomy of bacteria. Iizuka, H. Hasegawa, T. (ed) Proc. First Int. Conf. Culture Collections. University of Tokyo Press. Tokyo. pp 421–436.
- Cowan. 2000. Microbial genomes—The untapped resource. *Trends Biotechnol*. **18**, 14–16.
- Cummins, C. S. and H. Harris. 1958. Studies of the cell–wall composition and taxonomy of Actinomycetales and related groups. *J. Gen. Microbiol*. **18**, 173.
- Dayton, P. K. 1971. Competition, distribution and community organization: The provision and subsequent utilization of space in a rocky intertidal

- community. *J. Ecol. Monography*. **41**, 351–389.
- Evans, P. and B. Halliwell. 2001 Micronutrients : oxidant/antioxidant status. *British J. Nutr.* **85**, S67–S74.
- Faulkner, D. J. 1993. Marine natural product. *Nat. Prod. Rep.* **10**, 497–539.
- Felsenstein, J. 1981. Evolutionary trees from DNA sequences: a maximum likelihood approach. *J. Mol Evol.* **17**, 368–376.
- Fenical, W. 1993. Chemical studies of marine bacteria: Developing a new resource. *Chem. Rev.* **93**, 1673–1683.
- Fernsdez, J. A., F. Mohedano, M. J. Polanco, M. Medina, and M. Nunez. 1996. Purification and characterization of an extracellular cysteine proteinase produced by *Micrococcus* sp. INIA 528. *J. Appl. Microbiol.* **81**, 27–34.
- Fox, G. E. and E. Stackerbrandt. 1987. The applicability of 16S and 5S rRNA sequencing in bacterial systematics. In "Methods in Microbiology" Vol. 19, pp. 405–418. Academic Press, London.
- Fukushima, J., S. Yamamoto, K. Morihara, Y. Atsumi, H. Takeuchi, S. Kawamoto, and K. Okuda. 1989. Structural gene and complete amino acid sequence of *Pseudomonas aeruginosa* IFO 3455 elastase. *J. Bacteriol.* **171**, 1698–1704.
- Futuyma, D. J. 2005. Evolution. Sunderland, Massachusetts: Sinauer Associates, Inc.
- George M. G., W. Matthew, and B. S. Denise. 2001. Bergey's Manual of Systematic Bacteriology Vol, 2/2e.
- Giovannoni, S. and M. Rappe. 2000. Evolution, diversity, and molecular ecology of marine prokaryotes. pp. 48. In Kirchman, D. L.. Microbial ecology of the oceans. Wiley–Liss Co., Canada.
- Goodfellow, M. 1989. Bergey's manual of systematic bacteriology, vol. 4 (eds. S. T. Williams *et al.*), pp. 2333–2339, Williams & Wilkins,

Baltimore.

- Goodfellow, M. and T. Cross. 1984. The biology of the actinomycetes (eds. M. Goodfellow et al.), pp. 7–164, Acad. Press, London.
- Gottlieb, D. 1973. Actinomycetales (eds. G. Sykes & F. A. Skinner), pp. 1–10, Acad. Press, London.
- Gottlieb, D. 1974. Bergey's manual of determinative bacteriology, 8th ed. (eds. R.E. Buchanan & N.E. Gibbons), pp. 657–881, The Williams & Wilkins Co., Baltimore.
- Gould, S. J. 2002. The Structure of Evolutionary Theory. Cambridge: Belknap Press (Harvard University Press).
- Gray, J. R. and R. P. Herwig. 1996. Phylogenetic Analysis of the bacterial communities in marine sediments. *Appl. Environ. Microbiol.* **62**, 4049–4059.
- Gustafson, K., M. Roman, and W. Fenical. 1989. The macrolactins, a novel class of antiviral and cytotoxic macrolides from a deep-sea meraine bacterium. *J. Am. Chem. Soc.* **111**, 7519–7524.
- Hawksworth, D. L. 1991. The fungal dimension of biodiversity: Magnitude, significance and conservation. *Mycol. Res.* **95**, 641–655.
- Hiramoto K., H. Johkoh, K. I. Sako, and K. Kikugawa. 1993. DNA breaking activity of the carbon-centered radical generated from 2,2'-azobis(2-amidinopropane) hydrochloride (AAPH). *Free Radical Res.* **19**, 323–332.
- Honrichsen, L. L., M. C. Montel, and R. Talon. 1994. Proteolytic and lipolytic activities of *Micococcus roseus*, *Halomonas elongata* and *Vibrio* sp. isolated from Danish bacon curing brines. *Int. J. Food Microbiol.* **22**, 115–126.
- Horikoshi, K. 1971. Production of alkaline enzymes by alkalophilic microorganisms, Part I, alkaline protease produced by *Bacillus* No. 221. *Agric. Biol. Chem.* **36**, 1407–1414.
- Hugenholtz, P., C. Pitulle, K. L. Hershberger, and N. R. Pace. 1998. Novel

- division level bacterial diversity in a Yellowstone hot spring. *J. Bacteriol.* **180**, 366–376.
- IUCN, 1993, Towards the Wise Use of Wetlands, Ramsar Convention Bureau.
- Ivanova, E. P., J. P. Bowman, A. M. Lysenko, N. V. Zhukova, N. M. Gorshkova, A. F. Sergeev, and V. V. Mikhailov. 2005. *Alteromonas addita* sp. nov. *Int J Syst Evol Microbiol* **55**. 1065–1068.
- Jhon, B. K., M. C. Kim, Y. H. Kim, and M. S. Heo. 2009. Effects of the culture broth of lactic acid bacteria cultured in herb extracts on growth promotion and nonspecific immune responses of aquacultured fish. *Journal of Life Science.* **19(1)**, 87–93.
- Johnson, F. H. and I. V. Shunk. 1936. An interesting new species of luminous bacteria. *J Bacteriol.* **31**. 585–592.
- Johnson, J. L. 1973. Use of Nucleic-Acid Homologies in the Taxonomy of Anaerobic Bacteria. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **23**, 308–315.
- Jones, G. H. 1985. Regulation of phenoxazinone synthase expression in *Streptomyces* antibiotics. *J. Bacteriol.* **163**, 1215–1221.
- Janzen, E. G., D. L. Towner, and D. L. Haire. 1987. Detection of free radical generated from the *in vitro* metabolism of carbon tetrachloride using improved ESR spin trapping techniques. *Free Radical Res.* **3**, 357–364.
- Jukes, T. H. and C. R. Cantor. 1969. Evolution of protein molecules. In *Mammalian Protein Metabolism*, pp. 21–132. Edited by H. N. Munro. New York: Academic Press.
- Kadiiska, M. B. and R. P. Masom. 2002. *In vivo* copper-mediate free radical production: an ESR spin-trapping study. *Spectrochim Acta A.* **58**, 1227–1239.
- Kang, M. H., Y. K. Park, and G. D. Lee. 1996. The nitrite scavenging and electron donating ability of phenolic compounds. *Kor. J. Food Sci.*

- Technol.* **48**, 4873–4879.
- Kim, J. H., S. M. Lee, J. M. Baek, J. K. Cho, and D. S. Kim. 2003. Effect of dietary lipid level and herb mixture on growth of parrot fish, *Oplegnathus fasciatus*. *J. Kor. Fish. Soc.* **36**, 113–119.
- Kim, T. H. 1997. Coastal landform on the Jeju island. *Tamla culture.* **18**, 381–397.
- Kloos, W. E. and K. H. Schleifer. 1986. Genus *Staphylococcus*, in Bergey's manual of systematic bacteriology, Vol. II, Sneath, P. H., N. S. Mair, M. E. Sharpe, and J. C. Holt. Eds., Williams and Wilkins, Baltimore. 1013.
- Kludge, A. G. and F. S. Farris. 1969. Quantitative phyletics anurans. *Syst. Zool.*
- Kobayashi, J. and M. Ishibashi. 1993. Bioactive metabolites of symbiotic marine microorganisms. *Chem. Rev.* **18**, 1–32.
- Kothary, M. H. and A. S. Kreger. 1985. Production and partial characterization of an elastolytic protease of *Vibrio vulnificus*. *Infect. Immun.* **50**, 534–540.
- Kronberg, I. 1988. Structure and adaptation of the fauna in the black zone (littoral fringe) along rocky shores in northern Europe, *Mar. Ecol. Prog. Ser.* **49**, 95–106.
- Kumai, H. 1984. Biological studies on culture of the Japanese parrot fish, *Oplegnathus fasciatus* (Temminck et Schlegel). *Bull. Fish. Lab. Kinki Univ.* **2**, 93–108.
- Kurahashi, M. and A. Yokota. 2004. *Agarivorans albus* gen. nov., sp. nov., a gamma-proteobacterium isolated from marine animals. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **54**, 693–697.
- Kwon, M. G., Y. C. Kim, Y. C. Kim, Y. C. Shon, and S. I. Park. 1999. The dietary supplementing effects of Kugija, *Lycium chinense*, on immune responses of Nile tilapia, *Oreochromis niloticus*, to *Edwardsiella tarda*. *J. Fish pathol.* **5**, 87–92.

- Kwon, Y. T., H. H. Lee, and H. M. Rho. 1993. Cloning, expression and sequencing of the minor protease encoding gene from *Serratia marcescens* ATCC 21074. *Gene* **125**, 75–80.
- Labrenz, M., M. D. Collins, P. A. Lawson, B. J. Tindall, G. Braker, and P. Hirsch. 1998. *Antarctobacter heliothermus* gen. nov., sp. nov., a budding bacterium from hypersaline and heliothermal Ekho lake. *Int J Syst Bacteriol.* **48**, 1363–1372.
- Labrenz, M., M. D. Collins, P. A. Lawson, B. J. Tindall, P. Schumann, and P. Hirsch. 1999. *Roseovarius tolerans* gen. nov., sp. nov., a budding bacterium with variable bacteriochlorophyll *a* production from hypersaline Ekho lake. *Int J Syst Bacteriol.* **49**, 137–147.
- Labrenz, M., B. J. Tindall, P. A. Lawson, M. D. Collins, P. Schumann, and P. Hirsch. 2000. *Staleyia guttiformis* gen. nov., sp. nov. and *Sulfitobacter brevis* sp. nov., α -3-*Proteobacteria* from hypersaline, heliothermal and meromictic antarctic Ekho lake. *Int J Syst Evol Microbiol.* **50**, 303–313.
- Lande, R. and S. J. Arnold. 1983. The measurement of selection on correlated characters. *Evolution.* **37**, 1210–1226.
- Lansing, M. P., P. H. John, and A. K. Donald. 2002. *Microbiology*, 5th Edn., McGraw Hill Publication, 5, 445–472.
- Lau, S. C. K., M. M. Y. Tsoi, X. Li, I. Plakhotnikova, M. Wu, P. K. Wong, and P. Y. Quin. 2004. *Loktanella hongkongensis* sp. nov., a novel member of the α -*Proteobacteria* originating from marine biofilms in Hong Kong waters. *Int J Syst Evol Microbiol.* **54**, 2281–2284.
- Lechevalier, M. P. and H. Lechevalier. 1970. Chemical composition as a criterion in the classification of aerobic actinomycetes. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **20**, 435–443.
- Lee, J. B., B. Shyn, and M. H. Lee. 2001. Seasonal dynamics of microalgal assemblage at tidepools in the southern intertidal zone of Jeju island, Korea. *Algae.* **16**, 197–207.

- Lewis, J. R. 1964. The ecology of rocky shores. Hodder and Stoughton, London. 323 pp.
- Lee, J. B., J. H. Choa, D. W. Kang, Y. B. Go, and B. C. Oh. 2002. Bioecological characteristics of coral habitats around Moonsom, Jeju island, Korea: 2. Community dynamics of phytoplankton and primary productivity. *Algae*. **15**, 37–47.
- Le Roux, F., Goubet, A., Thompson, F. L., Faury, N., Gay, M., Swings, J. and Saulnier, D. 2005. *Vibrio gigantis* sp. nov., isolated from the haemolymph of cultured oysters (*Crassostrea gigas*). *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **55**. 2251–2255.
- Lee, S. H., S. Y. Lee, and B. C. Park. 2005. Cell Surface Display of Lipase in *Pseudomonas putida* KT2442 Using OprF as an Anchoring Motif and Its Biocatalytic Applications. *Appl. Environ. Microbiol.* **71**. 8581–8586.
- Lee, S. O., J. Kato, K. Nakashima, A. Kuroda, T. Ikeda, N. Takiguchi, and H. Ohtake. 2002. Cloning and characterization of extracellular metal protease gene of the algicidal marine bacterium *Pseudoalteromonas* sp. strain A28. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **66**, 1366–1369.
- Lee, S. O., J. Kato, N. Takiguchi, A. Kuroda, T. Ikeda, A. Mitsutani, and H. Ohtake. 2000. Involvement of an extracellular protease in algicidal activity of marine bacterium *Pseudoalteromonas* sp. strain A28. *Appl. Environ. Microbiol.* **66**. 4334–4339.
- Lee, S. W., K. H. Won, H. K. Lim, J. C. Kim, G. J. Choi, and K. Y. Cho. 2004. Screening for novel lipolytic enzymes from uncultured soil microorganisms. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **65**. 720–726.
- Lim, D. V., S. M. H. Qadri, C. Nichols, and R. P. Willams 1977 Biosynthesis of prodigiosin by nonproliferating wild-type *Serratia marcescens* and mutant deficient in catabolism of alanine, histidine and proline. *J. Bacteriol.* **129**, 124–129

- Llobet-Brossa, E., R. Rossello-Mora, and R. Amann. 1988. Microbial community composition of Wadden sea sediments as revealed by fluorescence in situ hybridization. *Appl. Environ. Microbiol.* **64**, 2691–2696.
- Lovejoy, C., J. P. Bowman, and G. M. Hallegraeff. 1998. Algicidal effects of a novel marine *Pseudoalteromonas* isolate (class Proteobacteria, gamma subdivision) on harmful algal bloom species of the genera *Chattonella*, *Gymnodinium*, and *Heterosigma*. *Appl. Environ. Microbiol.* **64**, 2806–2813.
- Madigan, M. T., J. M. Martinko, and J. Parker. 2003. Brock biology of microorganisms. 10th Ed., p.553–535, Prentice Hill, USA.
- Maidak, B. L., G. J. Olsen, N. Larsen, R. Overbeek, M. J. MaCaughey, and C. R. Woese. 1996. The Ribosomal Database Project (RDP). *Nucleic acids Res.* **24**, 82–85.
- Martens, T., T. Heidorn, R. Pukall, M. Simon, B. J. Tindall, and T. Brinkhoff. 2006. Reclassification of *Roseobacter gallaeciensis* Ruiz-Ponte *et al.* 1998 as *Phaeobacter gallaeciensis* gen. nov., comb. nov., description of *Phaeobacter inhibens* sp. nov., reclassification of *Ruegeria algicola* (Lafay *et al.* 1995) Uchino *et al.* 1999 as *Marinovum algicola* gen. nov., comb. nov., and emended descriptions of the genera *Roseobacter*, *Ruegeria* and *Leisingera*. *J. Syst. Evol. Microbiol.* **56**, 1293–1304.
- Matsuyama, H., T. Hirabayashi, H. Kasahara, H. Minami, T. Hoshino, and I. Yumoto. 2006. *Glaciecola chathamensis* sp. nov., a novel marine polysaccharide-producing bacterium. *Int J Syst Evol Microbiology.* **56**, 2883–2886.
- Mesbah, M., U. Premachandran, and W. B. Whitman. 1989. Precise measurement of the G+C content of deoxyribonucleic acid by high-performance liquid chromatography. *Int J Syst Bacteriol.* **39**, 159–167.
- Michael, T. M. and John M. M. 2006. Brock Biology of Microorganisms 11th. World Science.

- Miller, L. and T. Berger. 1985. Bacterial identification by gas chromatography of whole cell fatty acid. Hewlett–Packard Application Note 228–241. Hewlett–Packard Co., Avondale, Pa.
- Moon, Y. G. 2009. Diversity of marine microorganisms isolated from intertidal zone in the summer season of Jeju island. Ph. D, Thesis. Jeju University. Jeju. Korea.
- Nakamura, H., Y. Iitaka, T. Kitahara, T. Okazaki, and Y. Okami. 1977. Structure of aplasmomycin. *J. antibiot.* **30**, 714–719.
- Nanjo, F., K. Goto, R. Seto, M. Suzuki, M. Sakai, and Y. Hara. 1996. Scavenging effects of tea catechins and their derivatives on 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl radical. *Free Radical Bio. Med.* **21**, 895–902.
- Norris, J. R., D. W. Ribbons, and A. K. Varma. 1985. Methods in Microbiology, vol. 18. London: Academic Press.
- Okami, Y, and K. Hotta. 1988. Search and discovery of new antibiotics. pp. 33–67. In M. Goodfellow (ed.), Actinomycetes in biotechnology. Academic Press. London.
- Okazaki, T. 1987. Rare actinomycetes, new breed of actinomycetes. *J. microorgainsm.* **3**, 453–461.
- Park, S. J., C. H. Kang, Y. D. Nam, J. W. Bae, Y. H. Park, Z. X. Quan, D. S. Moon, H. J. Kim, D. H. Roh, and S. K. Rhee. 2006. *Oceanisphaera donghaensis* sp. nov., a halophilic bacterium from the East Sea, Korea. *Int J Syst Evol Microbiology.* **56**, 895–898.
- Pathirana, C., P. R. Jensen, and W. Fenical. 1992. Marinone and debromomarinone: antibiotic sesquiterpenoid naphthoquinones of a new structure class from a marine bacterium. *Tetrahedron Lett.* **33**, 7663–7666.
- Romanenko, L. A., P. Schumann, N. V. Zhukova, M. Rohde, V. V. Mikhailov, and E. Stackebrandt. 2003. *Oceanisphaera litoralis* gen. nov., sp. nov., a novel halophilic bacterium from marine bottom sediments. *Int J Syst Evol Microbiology.* **53**, 1885–1888.

- Romanenko, L. A., N. V. Zhukova, M. Rohde, A. M. Lysenko, V. V. Mikhailov, and E. Stackebrandt. 2003. *Glaciecola mesophila* sp. nov., a novel marine agar-digesting bacterium. *Int J Syst Evol Microbiology*. **53**, 647–651.
- Rosen, G. M. and E. J. Rauckman. 1984. Spin trapping of superoxide and hydroxyl radicals. In L. Packer (Ed.) *Methods in enzymology*, vol 105. Academic Press, Orlando, FL. pp 198–209.
- Ryu, B. H. and M. J. Kim. 2000. Production of red pigment from marine bacterium utilizing colloidal chitin. *Kor. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.* **28**, 264–269.
- Saitou, N. and M. Nei. 1987. The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol Biol Evol.* **4**, 406–425.
- Sato, K., T. Okazaki, K. Maeda, and Y. Okami. 1978. New antibiotics, aplasmomycins B and C. *J. Antibiot.* **31**, 632–635.
- Shin, Y. K., J. S. Lee, H. J. Kim, W. H. Joo, J. D. Lee, and Y. H. Park. 1996. Microbial DNA base composition(G+C mol%) and its taxonomic implications. *Korean J. Life Science.* **6(1)**, 72–77.
- Shirling, E. B. and D. Gottlieb. 1966. Methods for characterization of *Streptomyces* species. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **16**, 313–340.
- Smibert, R. M. and N. R. Krieg. 1994. Phenotypic characteristics. In *Methods for General and Molecular Biology*, pp.654. Edited by P. Gerhardt, R.G. E. Murray, W. A. Wood & N. R. Krieg. Washington: American Society for Microbiology.
- Smith, A. C. and F. Romos. 1980. Automated chemical analysis in fish health assessment. *J. Fish Biol.* **17**, 445–450.
- Snidr, J. R., I. Amann, W. Huber, Ludwing, and K. H. Schleiger. 1997. Phylogenetic analysis and in situ identification of bacteria in activated sludge. *Appl. Environ. Microbiol.* **63**, 2884–2896.

- Sneath, P. H. A. 1962. The construction of taxonomy group, *symposia of the society of Gen. Microbiol.* **12**, 289–297.
- Sneath, P. H. A. 1978. Classification of microorganisms. In "Essays in Microbiology", pp. 1–31. ed. by Norris. J. R. and M. H. Richmond, Wilye; Chichester.
- Sneath, P. H. A. 1973. Numerical Taxonomy, Freeman, London.
- Sneath, P. H. A. 1972. The influence on numerical taxonomy similarities of errors in microbiological tests. *J. Gen. Microbiol.* **72**, 377–392.
- Stackerbrandt, E., F. A. Rainey, and N. L. Ward–Rainey. 1997. Proposal for a new hierarrchic classification system, *Actinobacteria* classis nov., *Int. J. Syst. Bacteriol.* **47(2)**, 479–491.
- Stackebrandt, E. and K. H. Schleifer. 1984. Biological, biochemical, and biochemical aspects of actinomycetes (eds. L. Ortiz–Ortiz et al.), pp. 485–504, Acad. Press, Orlando.
- Stierle, D. B. and A. A. Stierle. 1992. Psudomonic acid derivatives from a marine bacterium. *Cellular and Molecular Life Sciences.* **48**, 1165–1169.
- Strickland, J. D. H. and T. R. Parsons. 1972. A practical handbook of sea water analys is Bull. Fish. Res. Bd. Con. No. 167. Fisheries Reserch Borad of Canada, Qtawa. pp. 1–311.
- Tanaka, S. 1992. Fermentation processes in screening for new bioactive substances. p. 303–326. In S. Omura (ed.). The search for bioactive compound from microorganism. Springer–Verlag, New York.
- Tanaka, Y. and S. Omura. 1990. Metabolism and products of actinomycetes– An introduction. *Actinomycetologica.* **4**, 13–14.
- Tapiolas, D. M., M. Roman, W. Fenical, T. J. Stout, and J. Clardy. 1991. Octalactins A and B: cytotoxic eight–membered ring lactones from a marine bacterium *Streptomyces* sp. *J. Am. Chem. Soc.* **113**, 4682–4683.
- Thompson, J. D., T. J. Gibson, F. Plewniak, F. Jeanmougin, and D. G.

- Higgins. 1997. The CLUSTAL-X windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. *Nucleic Acids Res.* **24**, 48764882.
- Tiedje, J. M. and J. Zhou. 1996. Analysis of nonculturable bacteria. pp. 53–65. In *Methods for the examination of organismal diversity in soils and sediments*. Geoffrey S. Hall (ed). CAB International.
- Trappen, S. V., T. L. Tan, J. Yang, J. Merhaert, and J. Swings, 2004. *Glaciecola polaris* sp. nov., a novel budding and prosthecate bacterium from the Arctic Ocean, and emended description of the genus *Glaciecola*. *Int J Syst Evol Microbiology.* **54**, 1765–1771.
- Vandamme, P., B. Pot, M. Gillis, P. D. Vos, K. Kersters, and J. Swings. 1996. Polyphasic taxonomy, a consensus approach to bacterial systematics. *Microbiol. Rev.* **60**, 407–438.
- Yong, J. J., Park, S. J. Kim, H. J. and Rhee, S. K. 2007. *Glaciecola agarilytica* sp. nov., an agar-digesting marine bacterium from the East Sea, Korea. *Int J Syst Evol Microbiology.* **57**, 951–953.
- Yoon, J. H., S. T. Lee, and Y. H. Park. 1998. Inter- and intraspecific phylogenetic analysis of the genus *Nocardioides* and related taxa based on 16S rDNA sequences. *Int J Syst Bacteriol.* **48**, 187–194.
- Youn, J. S. and D. S. Jung. 1997. Characteristics of submarine environment of coastal fishing ground the Cheju island(I) – The sedimentary environment of coastal region adjacent to Cheju harbor. *Journal. Korean Earth Science Society.* **18(5)**, 387–400.
- Zhang, D. C., Y. Yu, B. Chen, H. X. Wang, H. C. Liu, X. Z. Dong, and P. J. Zhou. 2006. *Glaciecola psychrophila* sp. nov., a novel psychrophilic bacterium isolated from the Arctic. *Int J Syst Evol Microbiology.* **56**, 2867–2869.

감사의 글

8년이라는 결코 짧지 않는 시간을 실험실에서 보내고 박사학위논문이라는 마지막 목적지에 도착해서 돌이켜보니 많은 아쉬움과 후회가 남습니다. 학업적 성취에 있어서의 아쉬움이 아닌 고마운 많은 분들께 감사의 말씀을 제대로 전하지 못하기에 더욱 그러한 것 같습니다. 지면을 빌어 감사의 글을 전하게 된 점 진심으로 죄송스럽게 생각합니다. 먼저 대학 3학년부터 지금까지 8년 동안 연구실 생활을 하면서 많은 시련의 기로에 서있을 때마다 스승이자 인생의 선배로서 격려와 조언을 아끼지 않으시고 삶의 길을 바로 잡아주신 허문수 교수님께 진심으로 감사드립니다.

또한 바쁘신 가운데서도 논문심사를 도와주신 최광식 교수님과 학부시절부터 지금까지 끊임없는 관심과 사랑으로 지도해주신 송춘복 교수님, 이제희 교수님, 여인규 교수님, 전유진 교수님께 진심으로 감사드립니다.

그리고 우리 해양미생물연구실의 정신적 지주이신 진창남 소장님, 자원연구소의 강봉조 연구사님, 김필연 연구사님, 양병규 연구사님, 장연환 연구사님, 연구실에 유일한 친구 창식이, 동료이자 형님으로서 나에게 많은 큰 버팀목이 되어준 문영건 박사님에게 진심으로 감사의 말씀을 드립니다. 또한 연구실 출신으로서 많은 도움을 준 철영이형, 태원이, 민주, 수미, 윤범, 봉근, 동민이 그리고 친형처럼 믿고 의지할 수 있었던 휴엔에이 양문휴 사장님, 허수진 박사님, 나의 대학친구 길남, 상규, 석훈, 태형, 현우, 현필에게도 감사의 말을 전합니다. 또한 하늘에서 항상 지켜보고 있는 사랑하는 현식이에게도 진심으로 감사의 말을 전합니다.

그리고 든든한 후배이자 동료로서 많은 도움을 준 주상이, 항상 나의 짜증을 잘 받아준 용재, 나의 샌드백이 되어준 익수, 아무런 불만없이 모든 일을 잘 처리해 준 창영에게 진심으로 고맙다는 말 전하고 싶고 준석, 정용, 동휘, Harikrishnan 연구실 식구들에게 진심으로 감사하다는 말 전하고 싶습니다. 그리고 인생선배로서 많은 조언을 아끼지 않으셨던 해양과환경연구소의 송영보 박사님, 이치훈 박사님, 박창범 박사님, 광동제약 오영빈 지점장님에게도 지면을 빌어 감사의 말씀

을 전합니다.

대학 4학년에 나란 인간을 만나 대학원 박사과정에 결혼해서 뒷바라지 하느라 너무나도 많은 고생을 시킨 사랑하는 나의 아내 은숙에게 진심으로 고맙다는 말을 전하고 싶고, 이 세상에 태어나 우리 부부의 희망과 행복을 전해준 우리 딸 연희에게도 정말로 감사하다고 전하고 싶습니다.

마지막으로 지금껏 살아오면서 저를 만들어주고 지원을 아끼지 않으셨던 사랑하는 부모님, 항상 옆에서 힘이 되어주시고 격려해주신 장모님, 감민 형님, 지선 형수, 진민 처남, 동생 상철, 철갑, 하경이, 그리고 나를 믿고 지금까지 도와주신 모든 친지 가족분들에게도 지면을 빌어 감사의 말을 전합니다.

정말로 많은 분들의 도움을 받아서 이렇게 박사학위논문을 완성할 수가 있었습니다. 일일이 고마움을 전하고 싶지만 지면을 빌어 고마움을 전하게 된 점 진심으로 죄송스럽게 생각하며 많은 분들의 지대를 저버리지 않고 인생 살아가면서 조금씩 모두 갚아갈 수 있도록 노력하겠습니다. 감사합니다.

2010. 새해 첫날 연구실에서