

碩士學位論文

해양미생물 *Phaeobacter inhibens*
KJ-2의 분리 동정 및 이차대사산물의
항균 활성 탐색



濟州大學校 大學院

水產生命醫學科

金胤範

2009年 2月

해양미생물 *Phaeobacter inhibens* KJ-2
의 분리 동정 및 이차대사산물의 항균
활성 탐색

指導教授 許文洙

金胤範

이 論文을 理學 碩士學位 論文으로 提出함

2009 年 2 月

金胤範의 理學碩士 學位論文을 認准함

審査委員長 여인규 (印)

委 員 이경준 (印)

委 員 허문수 (印)

濟州大學校 大學院

2009 年 2 月

Isolated and Identification of Marine Bacteria
Phaeobacteria inhibens KJ-2 and Screening
for Antimicrobial activity from Bacterial
Secondary Metabolites

Yun – Beom Kim

(Supervised by professor Moon – Soo Heo)

A thesis submitted in partial fulfillment of the requirement
for the degree of Master of Science

Department of Aquatic life medicine

GRADUATE SCHOOL

CHEJU NATIONAL UNIVERSITY

February, 2009

목 차

목 차	I
Abstract	IV
List of Tables	VI
List of Figures	VII
I. 서 론	1
II. 재료 및 방법	4
1. 균주의 분리 및 배양	4
1-1. 시료의 채취	4
1-2. 항균물질 생산균주의 분리 및 선별	4
1-3. 항균 활성 측정	4
2. 항균 물질 생산 균주 동정	5
2-1. 형태학적 분석	5
2-2. 16S rRNA 염기서열 분석	6
2-3. 종속 계통적 분석	6
2-4. 생화학적 특성분석	6
3. <i>Phaeobacter inhibens</i> KJ-2의 항균활성 특성	7
3-1. 배양조건에 따른 균의 생육도와 항균물질의 생산능	7
3-2. <i>Phaeobacter inhibens</i> KJ-2의 신호물질 (AHL) 탐색	7
3-3. 다른 <i>Vibrio</i> spp.에 대한 저해능 검토	8
4. <i>Phaeobacter inhibens</i> KJ-2의 항균 물질 생산에 미치는 인자	9
4-1. 배양온도에 따른 영향	9
4-2. pH의 영향	9
4-3. NaCl의 영향	9

4-4. 탄소원의 영향	9
4-5. 질소원의 영향	10
4-6. 무기염류의 영향	10
4-7. Aeration의 영향	10
5. <i>P. inhibens</i> KJ-2 antibiotic 제조	10
6. 항균 스펙트럼	11
7. <i>P. inhibens</i> KJ-2 antibiotic의 특성 조사	12
7-1. 열안정성	12
7-2. pH 안정성	12
7-3. <i>P. inhibens</i> KJ-2 antibiotic 첨가에 따른 항균 기작 검토	12
III. 결과 및 고찰	13
1. 항균 물질 생산 균주의 분리 및 동정	13
1-1. 형태학적 특성	14
1-2. 16S rRNA 염기서열	16
1-3. 생화학적 분석	20
2. <i>Phaeobacter inhibens</i> KJ-2의 항균 활성 특성	22
2-1. 배양조건에 따른 균의 생육도와 항균 물질 생산능	22
2-2. 다른 <i>Vibrio</i> spp. 에 대한 억제능 검토	27
3. <i>Phaeobacter inhibens</i> KJ-2의 항균 물질 생산에 미치는 인자	28
3-1. 배양온도에 따른 영향	28
3-2. pH의 영향	29
3-3. NaCl의 영향	30
3-4. 탄소원의 영향	31
3-5. 질소원의 영향	32
3-6. 무기염류의 영향	35
3-7. Aeration의 영향	36
4. 항균스펙트럼	36
5. <i>P. inhibens</i> KJ-2 antibiotic의 생물학적 특성	38

5-1. 열안정성	39
5-2. pH 안정성	39
5-3. <i>P. inhibens</i> KJ-2 antibiotic 첨가에 따른 항균 기작 검토	41
IV. 요약	42
V. 참고 문헌	44
감사의 글	



Abstract

This study was conducted to investigate the possible use of probiotics in fish farming by evaluating the in vitro antagonism of antimicrobial strain *Phaeobacter inhibens* KJ-2 strain against the fish-pathogenic bacterium *Vibrio anguillarum*. A bacterial strain that showed ability to produce antimicrobial compound was isolated from marine organism Sea hare eggs.

Identified bacterial strain was named as *Phaeobacter inhibens* KJ-2 based on the biochemical characterization and 16S rRNA sequence analysis. Phenotypic classification results showed that *Phaeobacter inhibens* KJ-2 could be classified as a aerobic, Gram-negative, motile bacteria that forms brown-pigmented colonies. Production of antimicrobial compound and higher growth of *P. inhibens* KJ-2 were observed at 20°C for 24 hours.

Production of antimicrobial compound was determined in concordance with acylated homoserine lactones (AHLs) production. Therefore, it could be suggested that production of *P. inhibens* KJ-2 antimicrobial compound is regulated by Quorum sensing. The identified *P. inhibens* KJ-2 bacteria showed potent antibacterial activity against pathogenic bacteria including *Vibrio logei*, *Vibrio campbellii*, *Vibrio mimicus*, *Vibrio vulnificus*, *Vibrio salmonicida*. Additionally, we identified that *V. anguillarum* cell wall was damaged after 3h incubation of *P. inhibens* KJ-2 antibiotic compound using the scanning electron microscope.

Optimum conditions for production antimicrobial compound of *P. inhibens* KJ-2 were determined as media containing 1.5% sorbitol, 0.8% NH₄NO₃ 4% NaCl with pH 6.0 and temperature at 20°C. However, production of antimicrobial compound was inhibited by mineral sources. An antimicrobial compound of *P. inhibens* KJ-2 was stable within the pH range from 3~10 and temperature ranging from 40~121°C. However, antimicrobial activity was decreased pH range from 9~10. Therefore, our results confirmed that

antibiotic compound isolated from *P. inhibens* KJ-2 has provided a potential biological agent for controlling fish pathogenic bacteria.



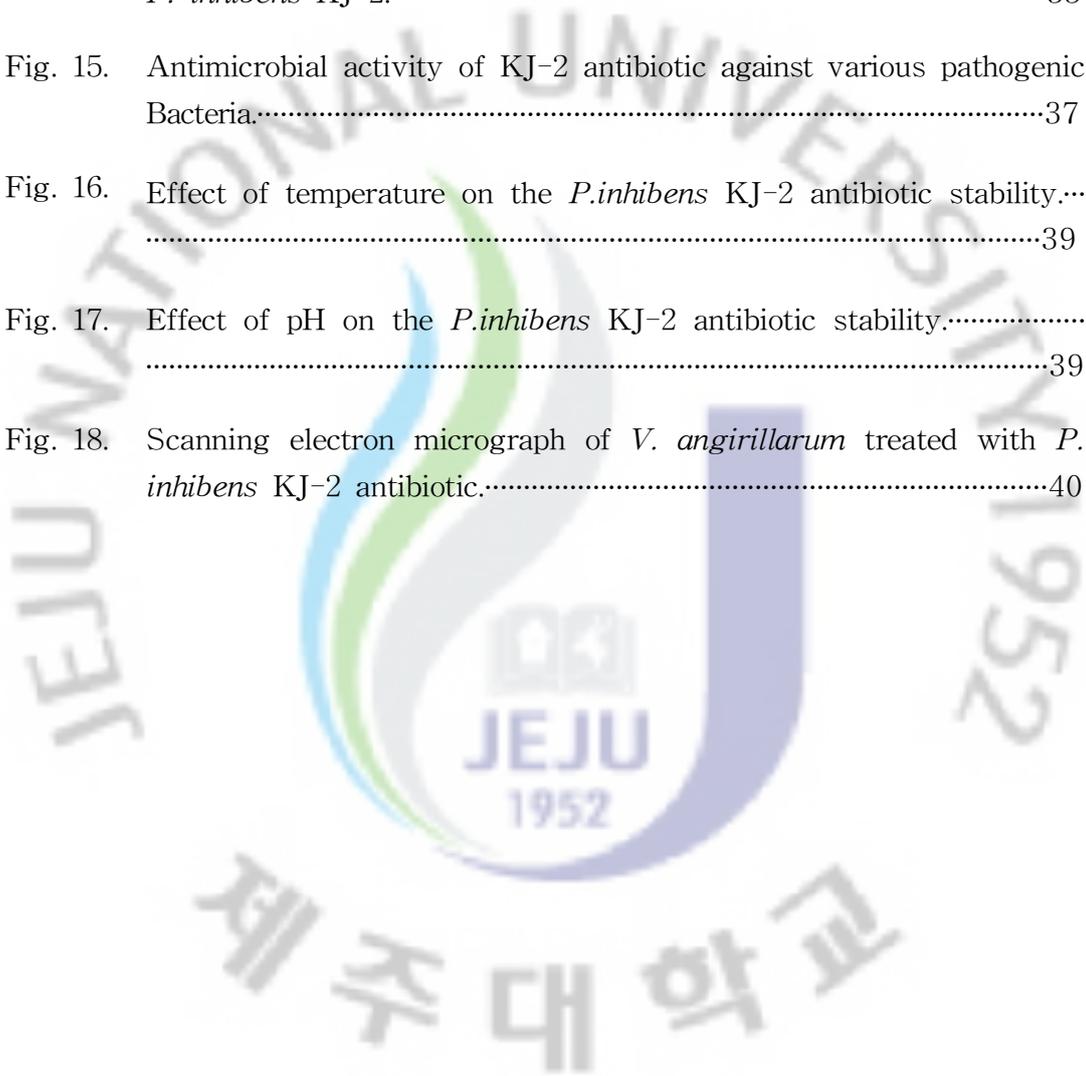
List of Tables

Table. 1.	Autoinducer bioassay(AB) minimal medium for <i>Agrobacterium tumefaciens</i> NT1(pDCI4IE33):.....	7
Table. 2.	List of strains and growth conditions used for antibacterial experiments:.....	10
Table. 3.	Morphological and culture characteristics of <i>Phaeobacter inhibens</i> KJ-2:.....	14
Table. 4.	Physiological characteristics of <i>Phaeobacter inhibens</i> KJ-2:.....	20
Table. 5.	Comparison of antibiotics against <i>V. anguillarum</i> KCTC 2711:.....	25
Table. 6.	Comparison of antimicrobial activity on <i>Vibrio</i> spp. by <i>P. inhibens</i> KJ-2:.....	26
Table. 7.	Effect of carbon source on the growth and antimicrobial activity:.....	32
Table. 8.	Effect of nitrogen source on the growth antimicrobial activity:....	33
Table. 9.	Effect of mineral sources on the growth antimicrobial activity:...	34
Table. 10.	Antimicrobial activities of the supernatant of KJ-2 antibiotics:.....	36

List of Figures

Fig. 1.	Inhibition activity of <i>Phaeobacter inhibens</i> KJ-2 against <i>Vibrio anguillarum</i> KCTC 2711.	12
Fig. 2.	Morphological and culture characteristics of <i>Phaeobacter inhibens</i> KJ-2.	14
Fig. 3.	Alignment of 16S rRNA sequence of the isolated Strain KJ-2.	16
Fig. 4.	Neighbour-joining tree based on nearly complete 16S rDNA sequences, showing relationships between strain KJ-2 and member of the α - <i>Proteobacteria</i> . Numbers at the nodes are levels of bootstrap support (%), based on neighbour-joining analyses of 1,000 resampled datasets.	18
Fig. 5.	Effect of cell growth and antimicrobial activity of <i>P. inhibens</i> KJ-2.	22
Fig. 6.	Detection of acylated homoserine lactones(AHLs) from <i>P. inhibens</i> KJ-2.	22
Fig. 7.	Bioassay of <i>P. inhibens</i> KJ-2 by using <i>Agarobacterium tumefaciens</i> NT1(pDCI4IE33) monitor strain.	23
Fig. 8.	Growth inhibition of <i>P. inhibens</i> KJ-2 supernatant on <i>V. anguillarum</i> KCTC 2711.	24
Fig. 9.	Effect of temperature of the cell growth and antimicrobial activity of <i>P. inhibens</i> KJ-2.	28
Fig. 10.	Effect of pH of the cell growth and antimicrobial activity of <i>P. inhibens</i> KJ-2.	29
Fig. 11.	Effect of NaCl concentration of the cell growth and antimicrobial activity of <i>P.inhibens</i> KJ-2.	30

Fig. 12.	Effect of sorbitol concentration on the antimicrobial activity.....	32
Fig. 13.	Effect of NH_4NO_3 concentration on the antimicrobial activity.....	33
Fig. 14.	Effect of aeration of the cell growth and antimicrobial activity of <i>P. inhibens</i> KJ-2.....	35
Fig. 15.	Antimicrobial activity of KJ-2 antibiotic against various pathogenic Bacteria.....	37
Fig. 16.	Effect of temperature on the <i>P.inhibens</i> KJ-2 antibiotic stability... ..	39
Fig. 17.	Effect of pH on the <i>P.inhibens</i> KJ-2 antibiotic stability.....	39
Fig. 18.	Scanning electron micrograph of <i>V. angirillarum</i> treated with <i>P. inhibens</i> KJ-2 antibiotic.....	40



I. 서론

우리나라의 어류 양식 산업은 1990년대 이후 급격히 발전하였고, 수산물이 식량 자원 공급원으로써 가치가 높아지고 있다. 또한 최근 근해 어업 현황은 여러 가지 요인에 의하여 감소 추세에 있으며 수요에 비해 생산량이 적어 대체 방안의 하나인 어류 양식 어업에 대한 기대는 더욱 커져가고 있는 실정이다.

어류 양식 산업의 급격한 성장과 생산량 증대로 인해 해마다 어류질병에 의한 피해는 날로 증가하고 하고 있으며, 국내 주요 양식 어종인 광어, 참돔, 볼락 및 농어 등은 생육단계에 상관없이 총사육량의 25~30% 정도가 질병으로 폐사 하고 있다. 이런 어류 질병 발생의 주된 원인은 수산생물의 생산량을 늘리기 위한 과밀식 사육, 잉여먹이에 의한 부유물질 및 배설물로 인한 사육수의 환경변화, 사료 및 어장 기구에 의한 병원균의 감염 등으로 발생한다. 이들 병원성균은 대부분 그람 음성균으로서 비브리오병(*Vibrio* sp.), 연쇄상구균증(*Streptococcus* sp.), 활주세균증(*Flexibacter* sp.), 에드워드병(*Edwardsiella* sp.)등을 유발한다. 최근에는 계절에 상관없이 연중 다양한 병원체가 혼합감염 형태로 질병을 일으키고 있어 심각한 문제로 대두되고 있다(Kim, 2006).

이런 어류 질병 치료를 위해 많이 쓰이는 방법으로 항생제를 처리하고 있으나, 이런 항생제의 사용은 양식 어업인들에게 경제적 부담이 되고 있으며, 항생제의 지속적인 사용으로 인해 내성균 출현과 약품잔류로 인한 문제가 되고 있다. 또한 백신을 처리하여 어류질병을 예방하는 방법이 있지만 이는 광범위한 질병제어가 어렵고, 백신투여과정이 번거로울 뿐더러 혼합 감염에 대한 효과적 백신이 없어 예방 및 치료를 위한 대책으로는 한계가 있다(Bruhn, 2005).

이러한 문제를 해결하기 위한 방법으로 최근 친환경적인 방법을 찾고 있으며, 그 방법이 하나로 어류질병의 생물학적 제어에 대한 관심이 증가하고 있다. 현재 이를 위해 어류질병 세균에 대해 항균성을 갖는 세균을 탐색하여 이용하고자 하는 연구가 다양하게 이루어지고 있으며, 실제로 항균활성을 갖는 많은 해양 세균들이 해수, 해조류, 플랑크톤 등 광범위한 해양 서식지로 부터 분리되고 있다(Burgess, 1999 ; Long, 2001). 이런 해양 환경으로부터 분리 몇몇 해양세균은 항균활성에 대한 연구를 통해 어병균의 생물학적 제어에 대한 가능성이 입증되고

있다. 이 중 어류질병 세균을 제어하는 균으로 *Aeromonas salmonicida*의 성장을 억제하는 *Pseudomonas fluorescens*가 어류로부터 분리되었으며, Channel catfish의 Sarprolegniosis의 치료 및 예방을 위하여 이용 가능하다고 알려져 있다 (Simith, 1993 ; Bly, 1997). 이 밖의 *Vibrio ordalii* 등에 의한 질병을 예방하기 위하여 *V. alginolyticus*를 생물 전구체(Probiotic strain)로 이용 가능하다고 알려져 있으며(Austin, 1995), 많은 항균물질을 생산하거나 생육저해물질을 갖고 있는 세균을 생물방제 및 수산양식분야에 이용하고자 하는 연구가 진행되고 있다.

그 중에 본 연구에서 분리된 *Roseobacter* 속은 녹조류 표면으로부터 *Roseobacter litroalis*와 *Roseobacter denitrificans*가 처음 분리되었으며(Shiba, 1991), 풍부하고 다양한 해양 서식지에 분포하고 있다. 또한 해양 세균총에서 중요한 속으로 알려져 있으며(Gonzalez, 2000 ; Selje, 2004), 호기성 세균으로 해양의 황(sulfur)순환에 중요한 역할을 담당하고 있다(Moran, 2003).

최근 몇몇 *Roseobacter* 종이 다른 종의 미생물의 생육을 저해한다고 알려져 있으며, *Roseobacter gallenciensis* strain BS107, *Roseobacter* strain T⁵(최근 두 종은 *Phaeobacter* 속으로 재분류 됨 Martens, 2006)을 이용한 연구에서 입증되었다.(Ruiz-Ponte, 1998 ; Brinkhoff, 2004) 이 종은 대부분 turbot 유생, 미세조류, 양식 수조의 벽면 등에서 분리 되어졌으며, *Vibrio*종에 대하여 강한 항균 활성을 나타낸다고 보고되었다.(Hjelm, 2004) 이런 항균 활성은 *Roseobacter* 종의 분리원에서 알 수 있듯이 주로 해양 환경내의 표면과 관련이 있으며, 우수한 biofilm 형성능, 표면의 우점종 형성 등의 특성들이 항균활성에 영향을 끼친다는 연구가 보고되었다(Dang, 2000). 실제로 *Phaeobacter* sp. 27-4의 항균물질 생산은 배양조건에 따라 많은 영향을 받았으며, 정치배양시에만 항균 활성과 우수한 biofilm 형성능을 나타내었다(Bruhn, 2005; Bruhn, 2006).

어류질병의 주요 병원체인 *Vibrio anguillarum*은 Bergman에 의해 발견되었으며, 발틱 해 연안의 뱀장어에서 처음 분리되었다(Bergman, 1909). 그람음성의 호염성 통성혐기성 세균으로서 해양에 널리 상재하고 있으며, 전 세계적으로 해산어와 담수어를 막론하고 널리 감염되고 있다.

*Vibrio anguillarum*은 독성 미생물로 알려져 있으며, 질병의 양상은 특별한 외

부증상 없이 폐사 하거나, 안구돌출, 지느러미, 체표와 내장 등에 출혈성 궤양을 나타내는 등 다양한 증상과 병리 소견을 나타내고 있다. 이러한 비브리오병은 우리나라 대표적인 양식어종인 넙치를 비롯하여, 참돔, 돌돔, 농어 등 모든 어종에서 발병하고 있다.

본 연구에서는 어류질병을 예방하고 control 하기 위한 생물전구체(Probiot)의 개발에 목적을 두었으며, 양식업에 막대한 손실을 주는 세균성 질병인 *Vibrio anguillarum*에 항균력을 갖는 균주를 제주도 연안에 서식하는 균소 알로부터 분리 하였으며, 분리균주의 생육 특성 및 항균물질의 생산 특성을 검토하였다.



II. 재료 및 방법

1. 균주의 분리 및 배양

1-1. 시료채취

시료는 제주 연안에 서식하고 있는 군소알을 샘플수거용 위생백인 Polypropylene bag(DAIHAN, KOREA)을 이용하여 무균적으로 채집하여 4℃를 유지하면서 실험실로 운반하여 실험에 사용하였다.

1-2. 항균물질 생산균주의 분리 및 선별

채취한 군소알 약 1 g을 멸균된 PBS(Phosphate Buffered Saline)에 단계 희석법을 통하여 희석 한 후 각 희석단을 Marine Agar(MA, Difco. Co. USA)에 100 μ l 접종, 도말 한 후 25℃, 30℃에서 5~7일간 배양하였다. 배양 후 특징적으로 형성된 colony를 선별하여 순수 분리 하였다. 순수 분리된 균주들은 Marine Broth(MB, Difco. Co. USA)에 배양한 후 배양액과 멸균된 glycerol 이 비율이 1:4 v/v가 되도록 혼합 한 후 -70℃에서 보관 하며 실험에 사용 하였다.

1-3. 항균 활성 측정

선별된 미생물을 대상으로 *Vibrio anguillarum* KCTC 2711을 피검균으로 하여 항균활성을 나타내는 균을 선별 하였다. 즉, Muller Hinton agar(Difco. Co. USA)에 전 배양 하여 활성화 시킨 *Vibrio anguillarum* KCTC 2711를 도말한 후, 순수 분리 되어진 균의 집락을 접종하여 25℃에서 배양한 후, 생육저지대(clear zone)를 형성하는 균을 1차선별 하였다. 2차선별은 Agar well diffusion assay을 이용하였다. 미리 Muller Hinton broth(Difco. Co. USA)를

사용하여 25 °C에서 24시간 배양 한 피검균을 멸균 생리 식염수를 이용하여 MacFland No. 0.5 농도로 균 현탁액을 제조한 후 MHA 배지에 골고루 도말한다. 여기에 직경 6 mm의 cork borer를 이용하여 배지에 well을 만들고 분리된 균의 배양액을 well에 70 μ l을 접종한 후 25°C에서 12~24시간 배양한 후, 형성된 생육저지대(Clear zone)의 크기를 측정하였다. 균의 배양액은 원심분리(12,000 rpm, 4°C, 15 min)하여 pellet은 버리고 얻어진 supernatant는 0.2 μ m pore size filter를 통해 제균 시킨 후, 사용하였다.

2. 항균 물질 생산 균주의 동정

최종 선발된 균의 동정은 형태학적, 유전학적 및 생화학적 특성을 Manual of method for general bacteriology (Gerhardt, 1994)와 Biochemical tests for identification of medical bacteria (Macfaddin, 1980)에 준하여 수행하였고, Bergey's manual of Systematic bacteriology (Kreig and Holt. 1989)를 참고로 하여 분류, 동정 하였다.

2-1. 형태학적 분석

분리균주의 집락의 형태, 크기, 색깔 등은 MA 배지를 통해 관찰 하였으며, 균주의 정밀한 형태를 관찰하기 위해서 SEM(Scanning Electron Microphotography, JSM-6700F JEOL Ltd.)를 통해 관찰하였다. 즉 멸균된 0.2 μ m fliter를 배지에 올려 그 위에 균을 접종하고, 균이 성장하면 filter를 차가운 2.4% glutaraldehyde에 담구어 전 고정시킨 후, 0.1 M phosphate buffer로 2~3회 이상 세척하였다. 이를 2% osmium tetroxide 용액에 1시간 동안 방치 하여 고정 시킨 후 ethylalcohol 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100%의 순서로 각각 1 hr 동안 탈수 시킨다. 탈수 시킨 filter를 isoamyl acetate를 첨가하여 1시간 동안 시료를 치환시켰다. 액체 CO₂로 isoamyl acetate를 날리고, 금박을 입혀 전자 현미경으로 관찰하였다.

분리균주의 운동성은 0.3 %의 agar를 첨가한 MB의 반유동고체배지에 집락을

접종하여 운동성 유무를 관찰하였다.

2-2. 16S rRNA 염기서열 분석

16S RNA 분석은 DNA Extract kit (Bioneer, Korea)를 사용하여 chromosomal DNA를 분리 하였으며 Bacterial 16S rDNA universal primer를 이용하여 16S rDNA를 증폭시켰다. 합성된 oligonucleotides의 각각의 primer는 forward primer (27F): 5'-AGAGTTTGTATCCTGGCTCAG-3' reverse primer (1492R): 5'GGTTACCTTGTACGACTT-3'의 염기서열로 구성되었다. 각각의 0.5 μ M primer, 200 μ M deoxynucleoside triphosphate, Taq DNA polymerase(Bioneer, Korea) 3 μ l를 사용하여 PCR을 수행하였다. PCR 반응조건은 30cycle 동안 94 $^{\circ}$ C에서 45초 denaturation, 50 $^{\circ}$ C에서 45초 annealing, 72 $^{\circ}$ C 45초간 extension 하였으며 증폭된 PCR product는 1% agarose (Agarose LE, Promega co.) gel을 0.5 μ g/ml ethidium bromide로 염색하여 확인하였다. 이를 ABI prismTM terminator cycle sequencing Ready reaction kit V.3.1 (Fluorescent dye terminators method)와 ABI 3730XL, capillary DNA Sequencer를 사용하여 PCR Product의 염기 서열 분석을 수행 하였으며, 밝혀진 염기서열은 NCBI(National Center Biotechnology Information)의 Basic Local Aligment Search Tool (BLAST)을 사용하여 분석하였다.

2-3. 종속 계통적 분석

분리균주의 16S rDNA 염기서열과 함께 유사성이 높았던 *Phaeobacter* 속과 몇몇 다른 관련된 분류군의 16S rDNA 유전자 염기서열과 함께 Clustal W software를 사용하여 배열하였다. 계통도는 distant의 근간을 neighbor-jointing 방법을 이용하여 설계하였다.

2-4 생화학적 특성 분석

그람 염색, Catalase, Amylase, Gelatinase, Tweenase, DNase, Citrate test는 “Method for General and Molecular Bacteriology”(Smibert & Krieg, 1994)에 준하여 수행하였으며 일부 실험은 API 20NE Kit(Bio Merieux SA, France)을 사용하여 분석 하였다.

색소 생성능은 MA에 0.5%의 starch를 첨가하여 7일 동안 배양하여 집락의 색과 확산성을 관찰하였다.

3. *Phaeobacter inhibens* KJ-2의 항균활성 특성

3-1. 배양조건에 따른 균의 생육도와 항균물질의 생산능

Phaeobacter inhibens KJ-2 균주를 전배양하여 활성화 시킨 후 MB 100 ml에 접종한 후, 20℃에서 120시간 동안 각각 진탕배양과 정지배양을 하였다. 배양 중 배양액의 일부를 취하여 660 nm에서 Optical density(OD)을 측정하여 생육도를 관찰하였으며, 배양액을 원심분리한 후 상등액을 취하여 항균활성을 측정 하였다. 또한 가장 높은 항균 활성을 보인 배양 조건으로 배양 한 후 Agar well diffusion assay를 이용하여 항균 활성을 측정 하였고, *V. anguillarum* KCTC 2711에 대한 농도에 따른 생육저해 활성을 측정하였다. 농도에 따른 생육저해 활성 측정은 10 ml의 MB배지에 supernatant의 농도를 2배 희석법을 사용하여 희석 한 후 접종하여 25℃에서 배양하면서 0, 4, 8, 12, 16, 24시간이 되는 때에 660 nm에서 microplate reader를 사용하여 측정 하였다. 또한 *P. inhibens* KJ-2 supernatant가 어류질병치료제로의 가능성을 가늠해보기 위하여 기존 항생제와의 활성을 비교하였다. 기존 항생제 활성은 *Vibrio anguillarum* KCTC 2711에 대한 항생제 감수성 test를 통하여 억제환을 측정 한 후, *P. inhibens* KJ-2 supernatant의 억제환과 비교하여 알아 보았다. 항생제는 Chloramphenicol외 15종을 사용하였다.

3-2. *P. inhibens* KJ-2로부터 신호물질 (AHL) 탐색

P. inhibens KJ-2의 신호물질을 탐색하기 위하여, bioassay법을 사용하였다. 신호물질 탐색 균주 *Agrobacterium tumefaciens* NT1(pDCI4IE33)은 부산대학교로부터 분양받아 사용하였으며, 배지는 AB minimal medium(ABMM)을 사용하였다(Table 1). *Agrobacterium tumefaciens* NT1(pDCI4IE33)균주에는 gentamicin 15 µg/ml을 첨가 하였으며, X-gal은 20 mg/ml stock으로 하여 최종 농도를 40 µg/ml로 사용하였다.

즉, *Agrobacterium tumefaciens* NT1을 0.2 % mannitol이 함유된 ABMM에서 30℃에서 액체 배양 후 AB minimal soft agar(0.75% agar)에 균을 희석하고, 여기에 X-gal (40 µg/ml)을 넣어, AB minimal agar(1.5% agar) plate에 overlay하였다. Plate가 굳은 다음 hole을 만든 후 *P. inhibens* KJ-2 supernatant을 60 µl loading 하였다.

Table 1. Autoinducer bioassay(AB) minimal medium for *Agrobacterium tumefaciens* NT1(pDCI4IE33)

PO ₄ (20X) ¹	50ml
Salts (20X) ²	50ml
Manitol 0.2%	2g
Distilled water	990ml

¹PO₄(K₂HPO₄ 60g, NaH₂PO₄ 20g)/L, ²Salts (NH₄Cl 20g, MgSO₄·7H₂O 6g, KCl 3g, CaCl₂ 0.2g, FeSO₄·7H₂O 50mg)/L, pH 7.0

3-3. 다른 *Vibrio* spp. 에 대한 저해능 검토

Vibrio anguillarum 외에 병원균으로 알려져 있는 *V. parahaemolyticus* KCCM 11965, *V. logei* KCCM 12281, *V. vulnificus* KCTC 2962, *V.*

campbellii KCCM 41986, *V. mimicus* KCCM 42257, *V. salmonicida* KCCM 41663 등 다른 *Vibrio*속에 대한 *P. inhibens* KJ-2의 항균 활성을 검토하였다.

4. *Phaeobacter. inhibens* KJ-2의 항균 물질 생산에 미치는 인자

4-1. 온도의 영향

MB 배지 100 ml에 전배양액 1%(v/v)씩 접종하여, 배양온도를 4℃에서 50℃까지 조정하여 진탕 배양 후, 각 배양온도의 생육도 및 항균 활성을 측정 하였다. 생육도는 spectrophotometer(Biochrom Libra S22, UK)를 이용하여 660 nm에서 OD로 측정 하였으며, 항균활성은 Agar well diffusion assay를 이용하여 측정하였다. 또한 색소는 배양 상등액을 여과하여 398 nm에서 측정 하였다(Bruhn, 2005).

4-2. pH의 영향

항균물질 생산을 위한 최적 pH를 검토하기 위하여 기본배지의 pH를 1 N HCl과 1 N NaOH를 이용하여 각각 조정하였다. 그리고 전배양액을 1.0%(v/v)씩 접종하고 균의 생육도와 항균 활성, 색소량을 측정 하였다.

4-3. NaCl농도의 영향

본 균주의 생육 및 항균 물질 생산에 미치는 NaCl의 농도에 따른 영향을 알아보기 위하여 NaCl의 농도를 0%~10%로 조정하여 배양하면서 생육도 및 항균 활성 및 색소량을 측정하였다.

4-4. 탄소원의 영향

탄소원에 따른 생육도 및 항균 물질 생산을 조사하기 기본배지에 1.0%(w/v)

의 탄소원 (lactose, manitol, glucose, mannose, raffinose, rhamnose, sucrose, galactose, maltose, sobitol, soluble starch)을 첨가하여 균의 생육도 및 항균 활성을 측정하였다. 또한 최적 탄소원으로 결정된 탄소원의 농도를 달리하여 탄소원의 농도에 따른 영향도 조사 하였다.

4-5. 질소원의 영향

각종 유기 및 무기 질소원(peptone, malt extract, yeast extract, tryptone, soybean, KNO₃, (NH₄)₂HPO₄, (NH₄)₂SO₄, NH₄NO₃, NaNO₃, NH₄Cl)을 1.0%(w/v)로 첨가하여 배양 한 후 균의 생육도 및 항균 활성을 측정 하였고, 최적 질소원에 대한 농도별 영향도 측정 하였다.

4-6. 무기염류의 영향

기본배지에 각종의 무기염류(BaCl₂·2H₂O, ZnCl₂, NiCl₂·6H₂O, K₂HPO₄, KCl, CaCl₂, CuSO₄·5H₂O CoCl₂·6H₂O, MgCl₂·6H₂O)들을 각각 0.1%(w/v)씩 첨가하고 전배양액을 1.0%(v/v) 접종하여 배양한 후 균의 생육도와 항균 활성을 측정 하였다.

4-7. Aeration의 영향

250 ml 삼각플라스크를 이용하여 배지의 양을 25~150 ml까지 넣은 후 150 rpm의 회전속도로 배양하여 각각 생육도 및 항균활성 및 색소량을 측정 하였다.

5. *P. inhibens* KJ-2 antibiotic 제조

P. inhibens KJ-2를 전배양액을 1 ℓ의 MB에 접종 한 후 20℃에서 24시간 동안 150 rpm으로 진탕배양 하였다. 배양액은 원심분리(5000 rpm, 4℃) 하여

균체를 제거하고 상등액을 취하였고, 농축기를 이용하여 10배 농축한 다음 0.2 μm pore size filter로 제균하여 antibiotic을 제조하였다.

6. 항균 스펙트럼

P. inhibens KJ-2 antibiotic의 광범위한 항균 활성을 알아보기 위하여 Table 2와 같이 어류질병 3종, 인체 유해균 7종을 생물자원센터 (KCTC) 혹은 한국 미생물 보존 센터 (KCCM)에서 분양받아 사용하였다. *Edwardsiella tarda*는 병에 걸린 넙치에서 직접 분리하여 사용하였다.

배양액 항균활성 측정은 Agar well diffusion assay법을 이용하여 항균 스펙트럼을 탐색하였다.

Table 2. List of strains and growth conditions used for antibacterial experiments.

	Strain	Growth conditions
Gram negative bacteria	<i>Escherichia coli</i> KCCM 40880	Nutrient Agar (Difco 0001), 37°C
	<i>Edwardseilla tarda</i> Wild type	Brain Heart Infusion Agar(Difco 0418) with 1.5% NaCl, 25°C
	<i>Salmonella thyphimurium</i> KCCM 40820	Nutrient Agar (Difco 0001), 30°C
Gram positive bacteria	<i>Propionibacterium acnes</i> KCCM 41747	Brain Heart Infusion Agar (Difco 0418), 37°C
	<i>Bacillus subtilis</i> KCCM 40820	Nutrient Agar (Difco 0001), 30°C
	<i>Listeria monocytogenes</i> KCCM 40307	Brain Heart Infusion Agar (Difco 0418), 37°C
	<i>Staphylococcus aureus</i> KCTC 1916	Trypticase soy broth (BBL 11768), 37°C
	<i>Serratia marsence</i> KCCM 21204	Nutrient Agar (Difco 0001), 26°C
	<i>Streptococcus iniae</i> KCTC 3657	BHI (Medium 3) + 0.5 % Glucose Medium, 37°C
	<i>Streptococcus parauberis</i> KCTC 3651	Trypticase Soy Yeast Extract Medium, 25°C
Fungi	<i>Candida albicans</i> KCTC 7270	YM Agar, 24°C
	<i>Pityrosporum ovale</i> KCCM 11894	Pityrosporum Medium, 30°C

7. *P. inhibens* KJ-2 antibiotic의 특성 조사

7-1. 열안정성

열에 대한 antibiotic의 안정성을 검토하기 위하여 40℃, 50℃, 60℃, 70℃, 80℃, 90℃에서 30분, 100℃와 121℃에서 15분간 열처리한 다음 열처리하지 않은 것을 대조구로 하여 *Vibrio anguillarum* KCTC 2711에 대한 항균 활성을 측정 하였다.

7-2. pH안정성

pH에 대한 안정성을 알아보기 위하여 antibiotic 시료에 1 N HCl과 1 N NaOH를 사용하여 pH를 3~10까지 맞춘 후 상온에서 2시간 동안 방치 한 후 각각 pH에서의 항균 활성을 측정 하였다.

7-3. *P. inhibens* KJ-2 antibiotic 첨가에 따른 항균 효과 검토

V. anguillarum KCTC 2711에 대한 *P. inhibens* KJ-2 antibiotic의 항균효과를 살펴보기 위하여 antibiotic을 첨가한 후 주사전자현미경(SEM)을 통하여 세포형태 변화를 관찰 하였다.

Ⅲ. 결과 및 고찰

1. 항균 물질 생산 균주의 분리 및 동정

본 연구에서는 제주도 연안에 서식하는 군소알을 채집하여 단계희석법을 통해 평판 도말법으로 MA 평판배지에 접종하여 20℃, 25℃에서 5~7일간 배양한 후 30여 종의 특징적인 집락을 갖는 균주를 선별하였다. 선별된 미생물을 *Vibrio anguillarum*(KCTC 2711)을 피검균으로 1차, 2차 선별과정을 통해 항균 활성을 나타내는 1종의 균을 최종 선별 하였다(Fig. 1.) 최종 선별된 균주는 갈색계열의 집락을 갖는 KJ-2 균주였다.

최종 선정된 균주를 실험방법에 명시된 방법을 통해 실험한 결과 Bacteria: Proteobacteria: Alphaproteobacteria: Rhodobacterales: Rhodobacteraceae: Phaeobacter로 확인 되었으며, 분리균주를 *Phaeobacter inhibens* KJ-2라고 명명하였다. 분리된 균주 *Phaeobacter inhibens* KJ-2의 형태학적, 생리생화학적, 16S rRNA 염기서열 분석 결과 분석은 다음과 같다.

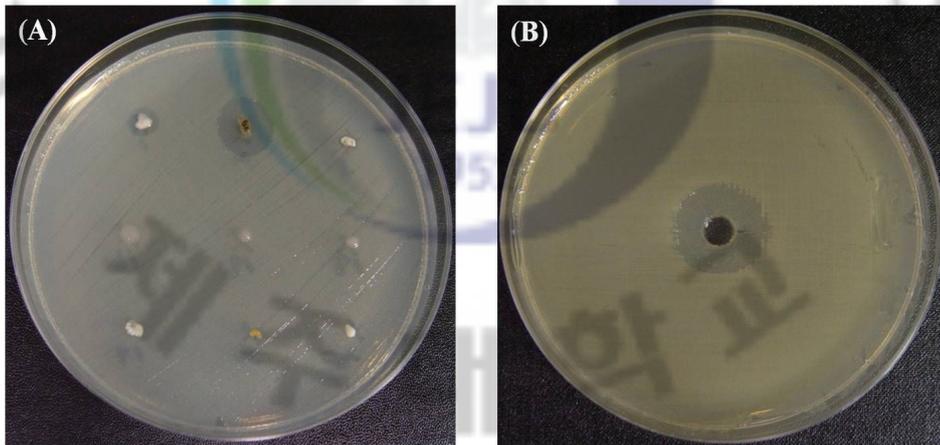


Fig. 1. Inhibition activity of *Phaeobacter inhibens* KJ-2 against *Vibrio anguillarum* KCTC 2711.

(A) First detected inhibition zone

(B) Final detected inhibition zone

1-1. 형태학적 분석

P. inhibens KJ-2의 형태학적 특성은 고체 배지에서 집락형태와, 주사 현미경 (SEM)을 통한 방법으로 관찰 하였다. 고체 배지에서 형성된 집락의 특성을 관찰한 결과는 Table 3.에서 보는 바와 같다. 형성된 집락의 형태는 원형이었고, 볼록한 돔형태였으며, 가장자리는 규칙적이고 매끄러운 특성을 나타내었다 (Fig. 2. (A)). 집락의 색깔은 갈색이었으며, 배양시간이 길어질수록 집락의 색깔은 어두운 갈색을 띄었다(Fig. 2. (B)) 위와 같은 특성은 Martens 등의(2006) 연구 결과와 일치하는 결과이다. 주사현미경(SEM)을 이용하여 형태학적 특성을 관찰한 결과 균의 형태를 보였으며 길이는 0.8~1.0 μm 폭은 0.4~0.6 μm 로 나타났다. (Fig. 2. (C))

Table 3. Morphological and culture characteristics of *Phaeobacter inhibens* KJ-2

Contents	Characteristics
Cell shape	Rod with rounded ends
Cell size (μm)	0.8~1.0 and 0.4~0.6 μm
Motility	Motile
Colony shape	Circular
Colony elevation	Convex
Colony margin	Entire
Colony surface	Smooth

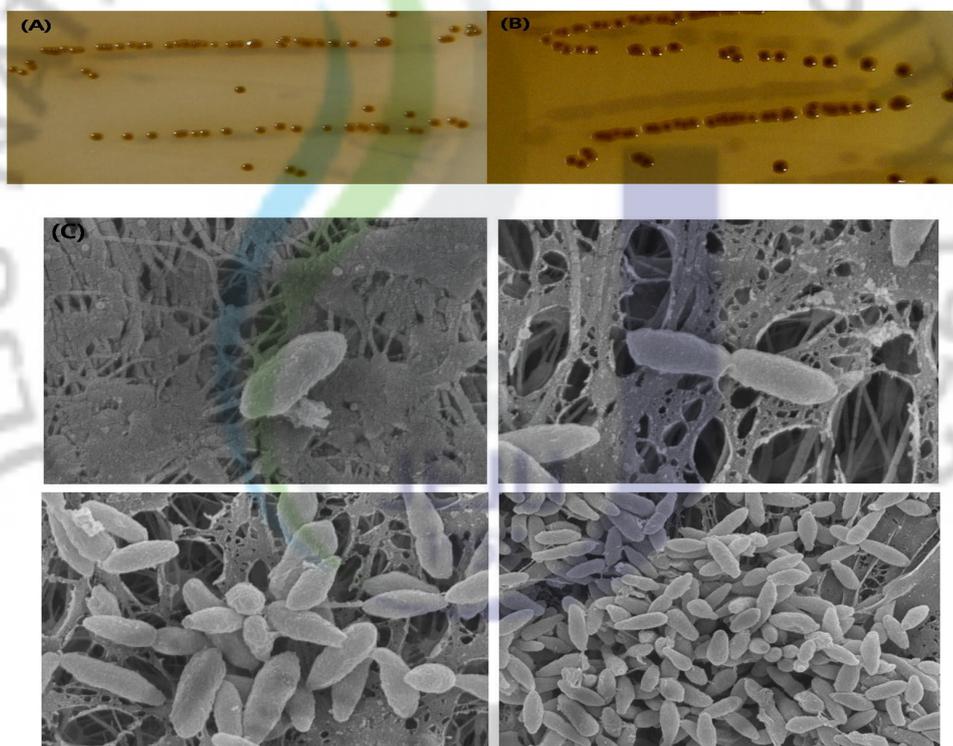


Fig. 2. Morphological and culture characteristics of *Phaeobacter inhibens* KJ-2.

(A) Colony shape of *Phaeobacter inhibens* KJ-2. (2 days)

(B) Colony shape of *Phaeobacter inhibens* KJ-2. (4 days)

(C) Scanning electron micrograph of *Phaeobacter inhibens* KJ-2.

1-2. 16S rRNA 염기서열

16S rRNA 유전자는 세균들을 종 수준으로 구분할 수 있는 정보를 담고 있으며, 이 중 일부는 균종별로 보존되어 있고 다른 부분은 균종별로 염기서열이 다르기 때문에 세균의 16S rRNA의 염기서열 분석은 균 분류체계에 필수적이다. 분리균주 KJ-2의 16S rRNA PCR 증폭을 통해 얻은 1340 bp 염기서열들을 National center Biotechnology information(NCBI)의 Basic Local Alignment Search Tool(BLAST)을 이용하여 분석한 결과 *Roseobacter gallaeciensis* partial 16S rRNA gene, isolate X20, *Phaeobacter inhibens* 16S ribosomal RNA gene, partial sequence와 각각 99%의 상동성을 보였으며, 이들을 alignment 한 결과를 으로 나타내었다(Fig. 3.).

계통수는(Phylogenetic tree)는 거리(distance)에 근거한 방법으로 작성하였으며, KJ-2의 16S rRNA 서열과 *α-Proteobacteria* 9종의 유전자 data를 이용하여 Neighbor-Joining 방법에 의해 계통수를 나타내었다(Fig. 4.). 분리 균주 KJ-2는 계통수의 진화적 관계를 분석 한 결과 *Phaeobacter*속에 포함되었으며, *Phaeobacter inhibens*와 매우 가까운 진화적 거리를 나타내어 동일종으로 사료 된다.

KJ-2 AY177712 Y13244	CGGACGGGTTAGTAACGCGTGGGAACGTGCCCTTCTCTAAGGAATAGCCACTGGAACCGG CGGACGGGTTAGTAACGCGTGGGAACGTGCCCTTCTCTAAGGAATAGCCACTGGAACCGG CGGACGGGTTAGTAACGCGTGGGAACGTGCCCTTCTCTAAGGAATAGCCACTGGAACCGG *****
KJ-2 AY177712 Y13244	TGAGTAATACCTTATACGCCCTTCGGGGAAAGATTTATCGGAGAAGGATCGGCCCGCGT TGAGTAATACCTTATACGCCCTTCGGGGAAAGATTTATCGGAGAAGGATCGGCCCGCGT TGAGTAATACCTTATACGCCCTTCGGGGAAAGATTTATCGGAGAAGGATCGGCCCGCGT *****
KJ-2 AY177712 Y13244	TAGATTAGATAGTTGGTGGGTAACGGCTACCAAGTCTACGATCTATAGCTGGTTTTAG TAGATTAGATAGTTGGTGGGTAACGGCTACCAAGTCTACGATCTATAGCTGGTTTTAG TAGATTAGATAGTTGGTGGG-TAACGGCTACCAAGTCTACGATCTATAGCTGGTTTTAG *****
KJ-2 AY177712 Y13244	AGGATGATCAGCAACACTGGGACTGAGACACGGCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTG AGGATGATCAGCAACACTGGGACTGAGACACGGCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTG AGGATGATCAGCAACACTGGGACTGAGACACGGCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTG *****
KJ-2 AY177712 Y13244	GGGAATCTTGGACAATGGCGCAAGCCTGATCCAGCCATGCCGCGTGAGTGATGAAGGCC GGGAATCTTGGACAATGGCGCAAGCCTGATCCAGCCATGCCGCGTGAGTGATGAAGGCC GGGAATCTTGGACAATGGCGCAAGCCTGATCCAGCCATGCCGCGTGAGTGATGAAGGCC *****
KJ-2 AY177712 Y13244	TTAGGGTCGTAAGCTCTTTCGCCAGAGATGATAATGACAGTATCTGGTAAAGAAACCCC TTAGGGTCGTAAGCTCTTTCGCCAGAGATGATAATGACAGTATCTGGTAAAGAAACCCC TTAGGGTCGTAAGCTCTTTCGCCAGAGATGATAATGACAGTATCTGGTAAAGAAACCCC *****
KJ-2 AY177712 Y13244	GGCTAACTCCGTGCCAGCAGCCGGTAATACGGAGGGGTTAGCGTTGTTGGGAATTAC GGCTAACTCCGTGCCAGCAGCCGGTAATACGGAGGGGTTAGCGTTGTTGGGAATTAC GGCTAACTCCGTGCCAGCAGCCGGTAATACGGAGGGGTTAGCGTTGTTGGGAATTAC *****
KJ-2 AY177712 Y13244	TGGCGGTAAGCGCACGTAGGCGGATCAGAAAGTTGGGGTGAAATCCCGGGGCTCAACC TGGCGGTAAGCGCACGTAGGCGGATCAGAAAGTTGGGGTGAAATCCCGGGGCTCAACC TGGCGGTAAGCGCACGTAGGCGGATCAGAAAGTTGGGGTGAAATCCCGGGGCTCAACC *****
KJ-2 AY177712 Y13244	CT-GGAACTGCCTCCAAA-CTCCTGGTCTTGAGTTCGAGAGAGGTGAGTGGAATCCGA CT-GGAACTGCCTCCAAA-CTCCTGGTCTTGAGTTCGAGAGAGGTGAGTGGAATCCGA CC-GGAACTGCCTCCAAA-CTCCTGGTCTTGAGTTCGAGAGAGGTGAGTGGAATCCGA * *****
KJ2 AY177712 Y13244	GTGTAGAGGTGAAATTCGTAGATATTCGGAGGAACACAGTGCGGAAGCGGCTCACTGG GTGTAGAGGTGAAATTCGTAGATATTCGGAGGAACACAGTGCGGAAGCGGCTCACTGG GTGTAGAGGTGAAATTCGTAGATATTCGGAGGAACACAGTGCGGAAGCGGCTCACTGG *****

Fig. 3. Aligment of 16S rRNA sequence of the isolated Strain KJ-2.
AY177712: *Phaeobacter inhibens*, Y13244: *Phaeobacter gallaeciensis*

KJ2 CTGATACTGACGCTGAGGTGCGAAAGTGTGGGAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTA
 AY177712 CTGATACTGACGCTGAGGTGCGAAAGTGTGGGAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTA
 Y13244 CTGATACTGACGCTGAGGTGCGAAAGTGTGGGAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTA

KJ2 GTCCACACCGTAACGATGAATGCCAGTCGTCAGCAAGCATGCTTGTGGTGACACACCT
 AY177712 GTCCACACCGTAACGATGAATGCCAGTCGTCAGCAAGCATGCTTGTGGTGACACACCT
 Y13244 GTCCACACCGTAACGATGAATGCCAGTCGTCAGCAAGCATGCTTGTGGTGACACACCT

KJ2 AACGGATTAAGCATTCCGCCTGGGAGTACGGTCGCAAGATAAAACCAAAGGAATTGA
 AY177712 AACGGATTAAGCATTCCGCCTGGGAGTACGGTCGCAAGATAAAACCAAAGGAATTGA
 Y13244 AACGGATTAAGCATTCCGCCTGGGAGTACGGTCGCAAGATAAAACCAAAGGAATTGA

KJ2 CGGGGGCCCGCACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTAATTCGAAGCAACGCGCAGAACCTTA
 AY177712 CGGGGGCCCGCACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTAATTCGAAGCAACGCGCAGAACCTTA
 Y13244 CGGGGGCCCGCACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTAATTCGAAGCAACGCGCAGAACCTTA
 **** * *****

KJ2 CCAACCCTTGACATC---CTAGGACCGCCAGAGAGATTTGGCTTTCACTTCGGTGACCT
 AY177712 CCAACCCTTGACATC---CTAGGACCGCCAGAGAGATTTGGCTTTCACTTCGGTGACCT
 Y13244 CCAACCCTTGACATC---CTAGGACCGCCAGAGAGATTTGGCTTTCACTTCGGTGACCT

KJ2 AGTGACAGGTGCTGCATGGCTGTCGTGAGTGTGGTAAAGTCCGG
 AY177712 AGTGACAGGTGCTGCATGGCTGTCGTGAGTGTGGTAAAGTCCGG
 Y13244 AGTGACAGGTGCTGCATGGCTGTCGTGAGTGTGGTAAAGTCCGG

KJ2 CAACGAGCGCAACCCACATCCTTAGTTGCCAGCAGTTCGGCTGGGCACTCTAGGGAAACT
 AY177712 CAACGAGCGCAACCCACATCCTTAGTTGCCAGCAGTTCGGCTGGGCACTCTAGGGAAACT
 Y13244 CAACGAGCGCAACCCACATCCTTAGTTGCCAGCAGTTCGGCTGGGCACTCTAGGGAAACT

KJ2 GCCCGTGATAAGCGGGAGGAAGGTGTGGATGACGTC AAGTCCCTCATGGCCCTTACGGGTT
 AY177712 GCCCGTGATAAGCGGGAGGAAGGTGTGGATGACGTC AAGTCCCTCATGGCCCTTACGGGTT
 Y13244 GCCCGTGATAAGCGGGAGGAAGGTGTGGATGACGTC AAGTCCCTCATGGCCCTTACGGGTT

KJ2 GGGCTACACACGTGCTACAATGGCAGTGACAATGGGTTAATCCCAAAAAACTGTCTCAGT
 AY177712 GGGCTACACACGTGCTACAATGGCAGTGACAATGGGTTAATCCCAAAAAACTGTCTCAGT
 Y13244 GGGCTACACACGTGCTACAATGGCAGTGACAATGGGTTAATCCCAAAAAACTGTCTCAGT

KJ2 TCGGATTGGGGTCTGCAACTCGACCCCATGAAGTCGGAATCGCTAGTAATCGCGTAACAG
 AY177712 TCGGATTGGGGTCTGCAACTCGACCCCATGAAGTCGGAATCGCTAGTAATCGCGTAACAG
 Y13244 TCGGATTGGGGTCTGCAACTCGACCCCATGAAGTCGGAATCGCTAGTAATCGCGTAACAG

KJ2 CATGACGCGGTGAAT
 AY177712 CATGACGCGGTGAAT
 Y13244 CATGACGCGGTGAAT

Fig. 3. Continued.

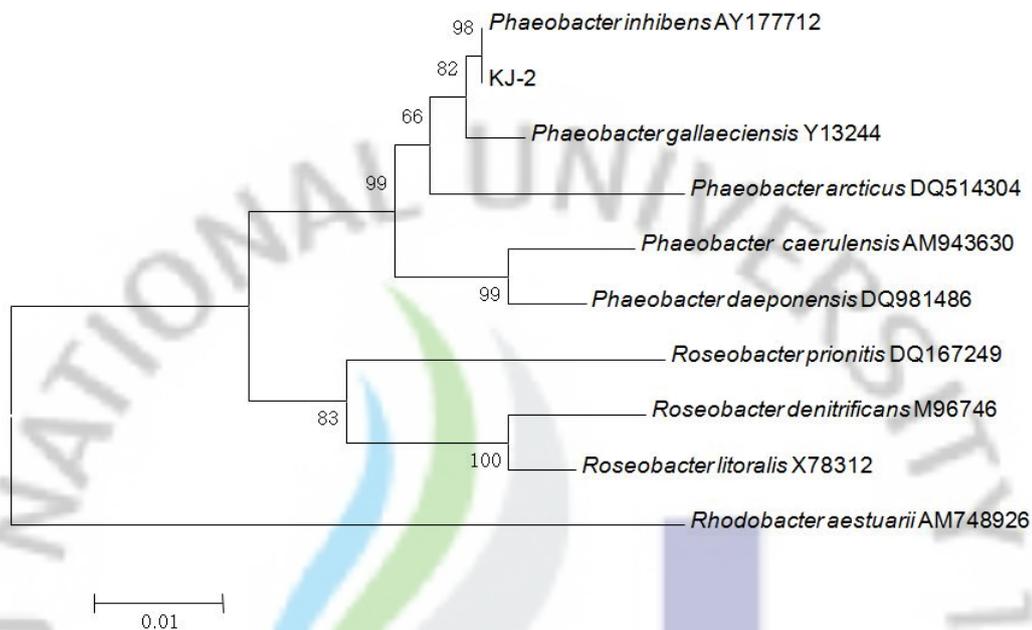


Fig. 4. Neighbour-joining tree based on **nealy** complete 16S rDNA sequences, showing relationships between strain KJ-2 and member of the α -*Proteobacteria*. Numbers at the nodes are levels of bootstrap support (%), based on neighbour-joining analyses of 1,000 resampled datasets. *Rhodobacter aestuarii* (AM748926) was used as an outgroup. Bar, 0.1 nucleotide substitutions per position.

1-3. 생화학적 분석

분리 균주 KJ-2의 생화학적 특성을 *P. inhibens* sp. nov T5^T 와 비교 검토한 결과는 Table 4. 에서 보는바와 같다. KJ-2는 그람 염색을 통해 그람 음성균임을 확인 하였으며, 갈색의 색소를 띄었고, Bacteriochlorophyll a는 생산하지 않았다. 또한 KJ-2는 D-glucose, D-mannose, D-manitol, malate, L-arabinose, N-acetyl-glucosamine를 이용 가능한 특성을 나타내었다.

P. inhibens sp. nov T5^T의 생화학적 특성을 비교한 결과 유사한 부분이 많았고, catalase productions, D-maltose, L-arabinose 이용능의 차이를 보였다.



Table 4. Physiological characteristics of *Phaeobacter inhibens* KJ-2.

Characteristic	KJ-2	<i>P. inhibens</i> sp. nov T5 ^T
pigmentation	Brown	Brown [§]
Bchl <i>a</i>	-	-
Temperature range for growth	15°C ~ 30°C	4~36°C
pH range for growth	6.0~10.0	6.0~9.5 [§]
Na ⁺ requirement	2~9%	0.5~9% [§]
Arginine Hydrolysis	-	-
Catalase production	-	+ [§]
starch hydrolysis	-	- [§]
skin milk hydrolysis	-	-
tween 80 hydrolysis	-	- [§]
Gelatin hydrolysis	-	- [§]
Nitrate reduction	-	- [§]
Urease	-	-
DNase	-	-
Utilization of		
Citrate	-	- [§]
D-Glucose	+	+ [§]
D-mannose	+	+ [§]
D-Manitol	+	+ [§]
D-Maltose	-	+ [§]
N-acetyl-glucosamine	+	-
Malate	+	-
L-arabinose	+	- [§]

[§] Data from Martens, 2006

2. *Phaeobacter inhibens* KJ-2의 항균 활성 특성

2-1. 배양조건에 따른 균의 생육도와 항균물질의 생산능

Phaeobacter inhibens KJ-2의 배양 조건에 따른 항균 물질 생산능을 검토한 결과는 Fig. 5. 와 같다. 생육도를 측정한 결과 진탕 배양의 경우 20시간 까지 대수기적 성장을 보인 후 48시간 이후 둔화 되어 정지기에 도달 한 것을 알 수 있었다. 정지 배양의 경우는 24시간 이후 대수기적 성장을 하였으며, 120시간 이후 부터 정지기로 들어가는 것을 관찰 할 수 있었다.

진탕 배양과 정지배양 모두 접종 후 4시간 후부터 항균 활성 억제 환이 나타났으며, 진탕배양의 경우 24시간째, 정지배양의 경우 96시간째에 활성이 가장 좋게 나타났다. 대부분의 미생물들은 대수 증식기나 정지기에 이차대사산물을 생산한다고 알려져 있다. 따라서 *Phaeobacter inhibens* KJ-2의 성장도 위와 비슷한지 조사한 결과 *Phaeobacter inhibens* KJ-2는 대수증식기 이전부터 항균 활성을 나타내는 것을 알 수 있었으며, 정지기까지 활성이 증가 하였다. 이런 결과는 Brinkhoff 등(2004)의 보고와 일치하며, 몇몇 해양세균의 이차대사산물 생산은 다른 요소 즉, 다른 미생물과의 영양학적 경쟁이나 고체 표면에서의 생육 등에서 증대될 수 있다고 보고하고 있다(Long et al. 2003).

몇몇 세균의 항균물질 생산은 미생물의 신호전달방법의 하나인 세포의 밀도 인식을 통한 특정 유전자의 발현이 유도되는 Quorum-sensing(QS)에 의해 제어 된다고 보고되고 있으며, 실제로 *Roseobacter*종에서 QS signal이 검출되었다(Bruhn, 2006). 이런 연구 결과를 바탕으로 QS signal인 Autoinducer Type중이 하나인 AHL(acylated-homoserine lactone) monitor strain을 가지고 항균 물질 생산과 관련이 있는지 검토한 결과 Fig. 6, 7.과 같았다. 진탕배양시 배양 20~24 시간째에 AHL이 가장 높은 생성능을 나타내었으며, 24시간 이후부터 점점 감소 되었다. 정지 배양의 경우 배양 4시간째에 가장 높은 AHL생성능을 보였으며 점점 증가하다고 감소하는 양상을 나타내었다. 이런 AHL생성능은 항균 활성과 거의 일치함을 알 수 있었으며, 분리균주 KJ-2의 경우에도 항균 물질 생산에 QS가 관련이 있을 것으로 사료된다.

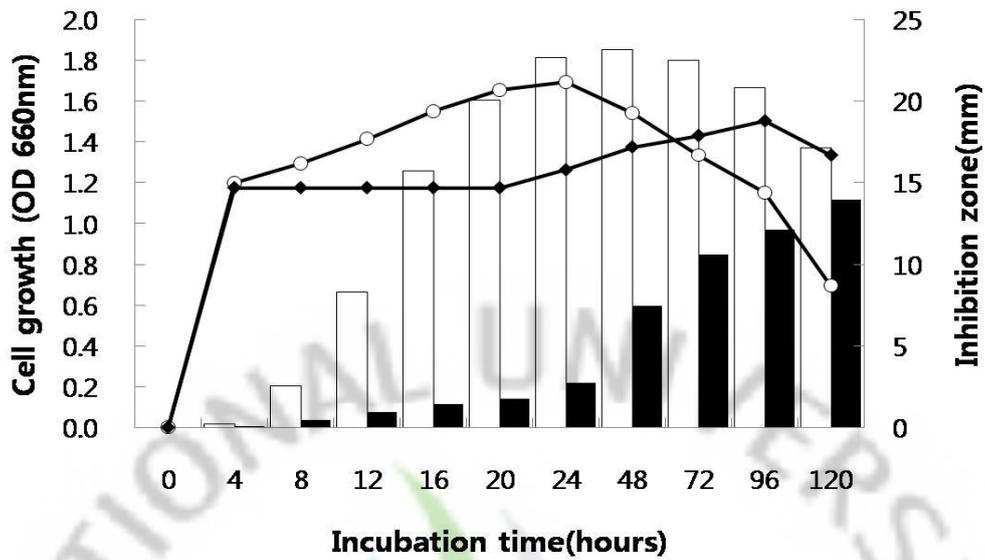


Fig. 5. Effect of cell growth and antimicrobial activity of *P. inhibens* KJ-2. (\square : Cell growth of shaking culture, \blacksquare : Cell growth of static culture, ; \circ : Inhibition zone of shaking culture, \blacklozenge : inhibition zone of static culture)

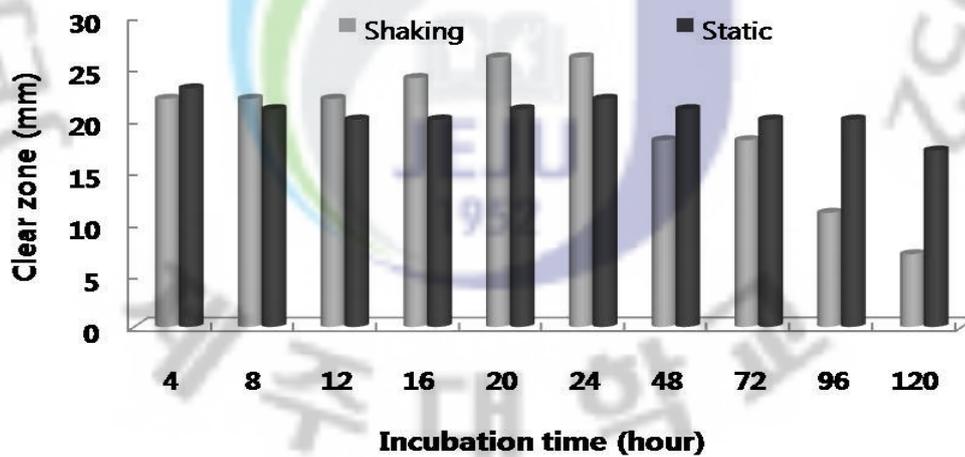


Fig. 6. Detection of acylated homoserine lactones(AHLs) from *P. inhibens* KJ-2.

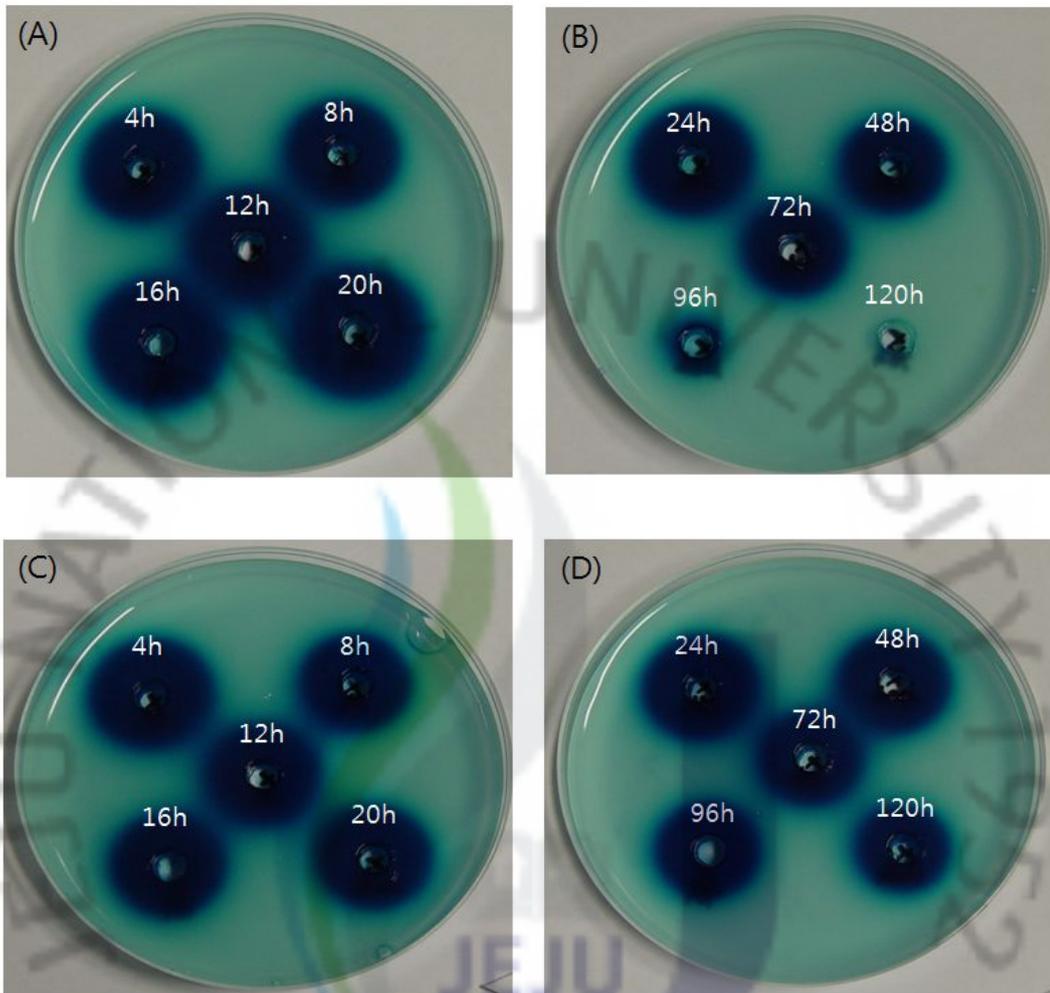


Fig. 7. Bioassay of *P. inhibens* KJ-2 by using *Agarobacterium tumefaciens* NT1(pDCI4IE33) receptor stain.

또한 배양조건에 따른 생육도와 항균 활성 측정 후 가장 높은 항균 활성을 보인 배양 24시간째의 배양 상등액을 가지고 2배 희석법을 통해 농도에 따른 생육저해 효과와 Agar well diffusion을 이용하여 항균 활성을 측정한 결과 Fig. 8과 같이 나타내었다.

P. inhibens KJ-2 supernatant농도에 따른 *V. anguillarum* KCTC 2711의 생육저해 효과를 검토한 결과 *P. inhibens* KJ-2 supernatant를 첨가하지 않은 대조

구의 경우 배양후 4시간 후부터 급속한 균의 증식을 볼 수 있었고, *P. inhibens* KJ-2 supernatant의 농도를 6.25~50% 첨가하였을 경우 균의 증식이 없이 24시간까지 억제됨을 알 수 있었다. 하지만 *P. inhibens* KJ-2 supernatant의 6.25% 이하의 첨가농도에서는 4시간 이후부터 균의 증식이 관찰 되어 *V. anguillarum* KCTC 2711 생육억제 효과를 나타내지 않았다. 따라서 위의 생육저해효과 실험에서 나타난 가장 낮은 첨가농도인 6.25%를 최소억제농도로 정하였다.

Agar well diffusion assay를 이용한 실험에서도 10%, 20%, 50%, 100%의 농도를 첨가 하였을시 *V. anguillarum* KCTC 2711에 대한 억제환이 점점 넓게 나타나 항균활성이 증가함을 알 수 있었고, 위의 생육저해 효과에서의 첨가농도와 거의 일치하는 것을 알 수 있었다.

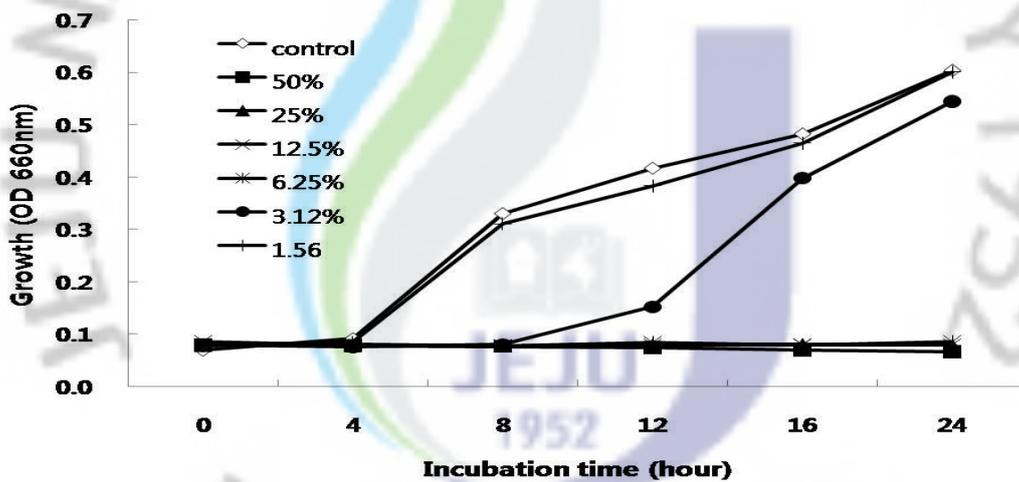


Fig. 8. Growth inhibition of *P. inhibens* KJ-2 supernatant on *V. anguillarum* KCTC 2711.

어병치료제로서의 가능성을 가늠해 보기 위하여 *Vibrio angurillraum*에 대한 기존항생제와 *P. inhibens* KJ-2의 생산하는 항균물질의 항균 활성을 비교 검토한 결과는 다음과 같다(Table 6.). 몇 종류의 항생제를 제외하고는 기존항생제에 비해 항균활성이 떨어지는 것을 알 수 있었다. 하지만 본 연구에서는 배양액만을 처리하여 사용하였기 때문에 항균 물질이 정제가 되거나 고농도로 사용할 경우 활성은 더욱 증가 할 것으로 보이며, 현재 양식장에서 주로 사용되고 있는 Oxytetracycline, Doxycycline 등과 비슷하거나 높은 활성을 나타낼 것으로 사료 된다.

Table 6. Comparison of antibiotics against *V. angurillraum* KCTC 2711.

Antibiotics	Inhibition zone(mm)
Chloramphenicol 30	32
Oxytetracycline 30	27
Neomycin 30	19
Doxycycline 30	25
Gentamycine 10	18
Norfloxacin 10	33
Ofloxacin 5	35
Flumequine 12	35
Cephalothin 30	0
Kantamycin 9	17
Specinomycin 10	0
Minocycline 30	27
Novobiocin 5	24
Sulfisoxazole 30	31
Lincomycin 2	0
Erythromycin 5	21
<i>P.inhbens</i> KJ-2	22

2-2. 다른 *Vibrio* spp. 에 대한 억제능 검토

Phaeobacter inhibens KJ-2의 다른 *Vibrio* spp.에 대한 생육 억제능을 Agar well diffusion을 사용하여 검토한 결과는 Table 5.와 같다.

Vibrio parahaemolyticus 와 *Vibrio fluvialis*를 제외한 나머지 5종에 대하여 저해능을 보였으며, 특히 , *Vibrio campbellii*, *Vibrio mimicus*에 대해 높은 저해능을 나타내었다.

Table 5. Comparison of antimicrobial activity on *Vibrio* spp. by *P. inhibens* KJ-2.

<i>Vibrio</i> spp.	Inhibition zone(mm)
<i>Vibrio logei</i> KCCM 12281	11
<i>Vibrio parahaemolyticus</i> KCCM 11965	-
<i>Vibrio fluvialis</i> KCTC 2473	-
<i>Vibrio vulnificus</i> KCTC 2962	17
<i>Vibrio campbellii</i> KCCM 41986	18
<i>Vibrio salmonicida</i> KCCM 41663	10
<i>Vibrio mimicus</i> KCCM 42257	17

3. *P.inhibens* KJ-2의 항균 물질 생산에 미치는 인자

3-1. 배양온도에 따른 영향

균주의 생육과 항균물질 생산에 미치는 배양온도의 영향을 검토한 결과는 Fig. 9와 같다. 그 결과 20℃~30℃에서 균체의 생육이 높았으며, 20℃에서 가장 높은 항균 활성을 보였다. 생육도와 대부분 일치하지 않는 *P.inhibens* KJ-2의 항균물질 생산은 생육도 외에 다른 요소가 관여하는 것으로 생각되어, 색소를 측정하여 결과 항균 활성과 매우 유사한 경향을 관찰 할 수 있었다. Porsby 등(2008)은 *Phaeobacter* sp.는 정확한 기작은 밝혀지지 않았지만 항균 활성을 나타내는 원인이 여러 다른 요소 즉 색소생산, 부착능 등의 영향이 있을 수 있다고 보고하고 있으며 이러한 연구내용과 일치하는 결과이다. 또한 20℃~30℃ 부근에서 생육도가 가장 높았는데 일반적으로 해양세균이 저온 미생물로써 20℃~30℃ 부근에서 잘 성장하는 것과는 유사한 결과를 나타내었다(Kang, 2004; Choi, 2002).

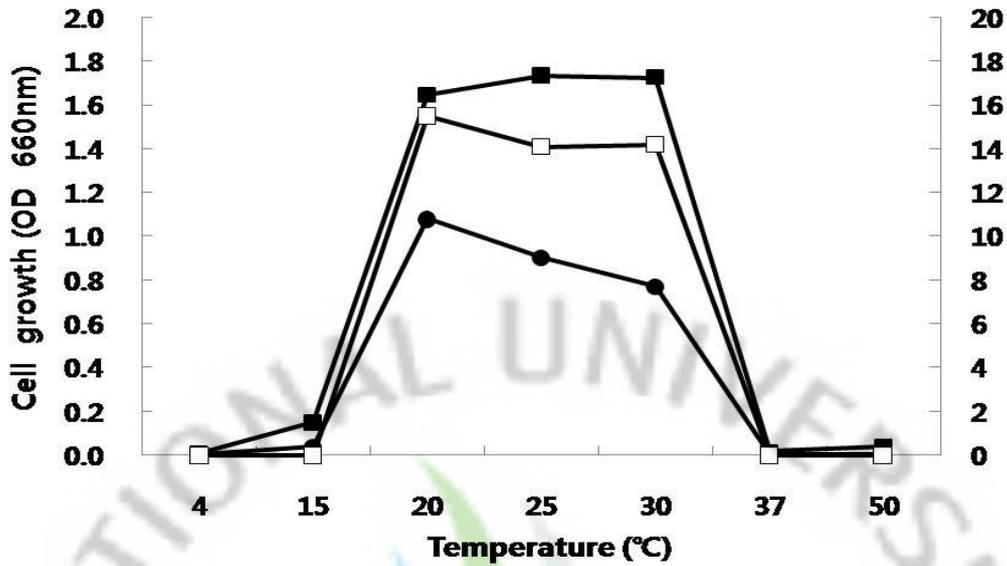


Fig. 13. Effect of temperature of the cell growth and antimicrobial activity of *P. inhibens* KJ-2. (■ : Cell growth, □ : Inhibition zone, ● : Pigment)

3-2. pH의 영향

pH를 4-10까지 단계별로 조절한 기본배지에 *P. inhibens* KJ-2의 생육도 및 항균 활성을 측정한 결과 pH 7~9에서 생육도가 좋았으며, 항균 활성은 pH 6에서 가장 좋은 것으로 나타났다(Fig. 10). 위와 마찬가지로 항균 활성은 생육도와 관련이 적었으며, 색소량 측정값과 일치하는 것을 관찰 할 수 있었다. 이런 색소생산은 Quorum sensing과 관련이 깊으며, 앞서 수행 되어진 결과에서와 같이 QS(quorum sensing)signal인 AHLs의 항균물질 생산과 관련이 있다고 사료된다. 또한 AHLs은 pH 8.0이상의 약알칼리조건 하에서는 쉽게 가수분해되지만, 약산성조건하에서는 비교적 안정한 것으로 알려져 있는데 (Leadbetter, 2000) 아래의 그림에 보는 것과 같이 약산성조건인 pH 6.0에서 항균 활성이 좋았으며, 약알칼리 조건으로 갈수록 항균 활성이 낮아지는 것을 관찰 할 수 있었다.

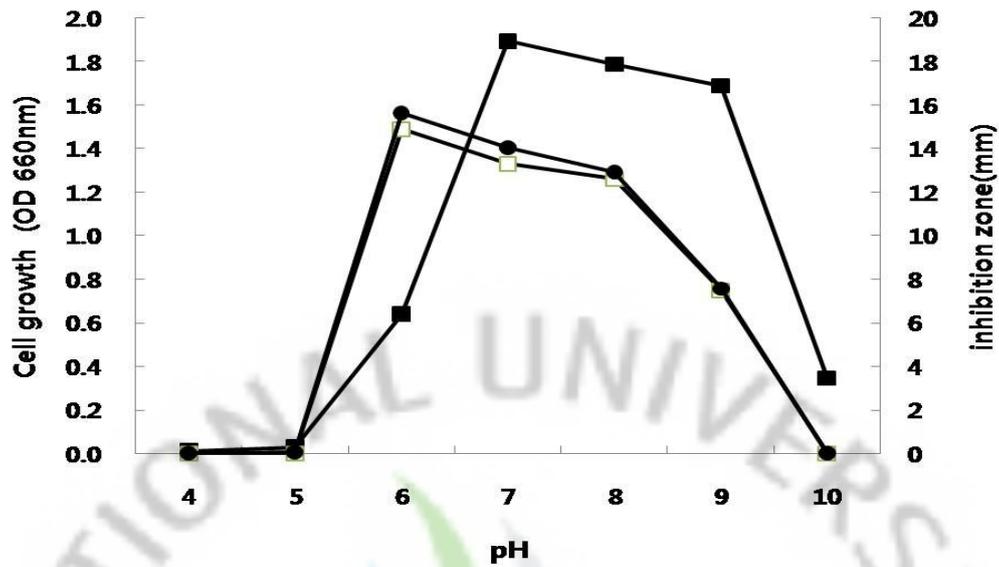


Fig. 14. Effect of pH of the cell growth and antimicrobial activity of *P. inhibens* KJ-2. (■- : Cell growth, □- : Inhibition zone, ●- : Pigment)

3-3. NaCl농도의 영향

NaCl 농도를 0~10%(w/v)까지 조절한 배지에서 배양한 후 생육도와 항균 활성을 측정 한 결과 2~4%에서 높은 생육도를 보였으며, 4%에서 생육도와 항균 활성이 가장 높게 나타났다(Fig. 11.). 또한 4%이상에서 균의 생육은 감소하였지만 항균 활성은 일정 수준 나타나는 것을 관찰 할 수 있었다. 이것은 위의 pH, 온도의 영향에서와 같은 경향을 보였고, 색소 측정값과 유사한 결과이다.

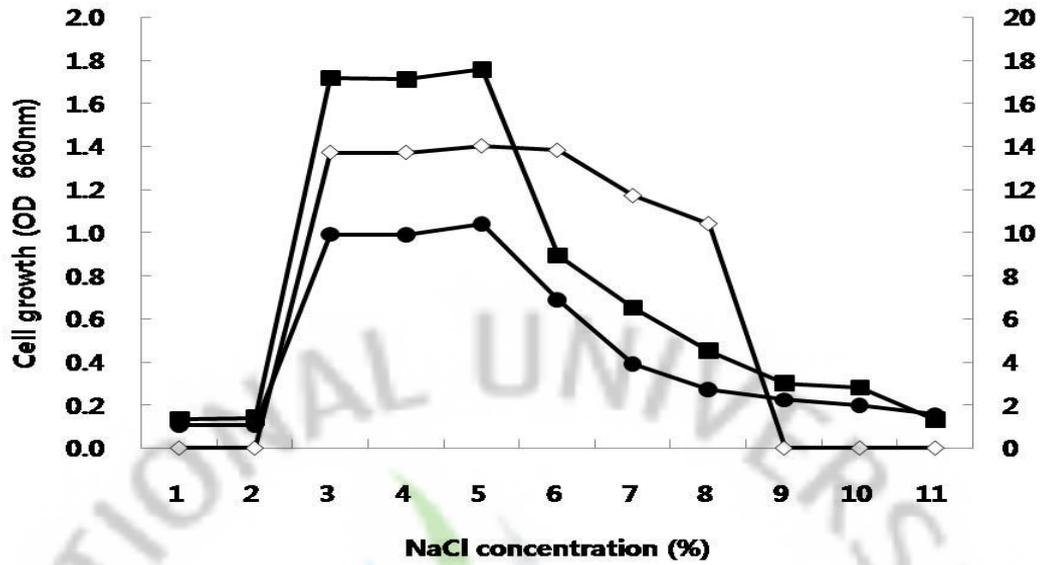


Fig. 15. Effect of NaCl concentration of the cell growth and antimicrobial activity of *P.inhibens* KJ-2.

(-■- : Cell growth, -□-: Inhibition zone, -●-: Pigment 398 nm)

3-4. 탄소원의 영향

KJ-2의 항균물질 생산에 미치는 각종 탄소원의 영향을 검토하기 위하여 MB(marine broth, Difco. USA.)를 기본배지에 1%의 각각의 탄소원을 첨가하여 균체 성장 및 항균활성을 측정하였다(Table 7.). Sorbitol 첨가시 가장 좋은 항균활성을 나타내었으며, 나머지 탄소원은 생육은 좋았으나 항균 활성은 저해되었다. Sobitol 농도를 0.2~3%로 조절하여 항균 활성을 측정한 결과 Fig. 12.와 같이 1.5% 첨가시 가장 높은 활성을 나타내었고, 그 이상의 농도에서는 감소하는 것을 볼 수 있었다.

3-5. 질소원의 영향

질소원에 따른 항균 물질 생산을 알아보기 위하여 미생물의 대사증식에 결정적인 영향을 미치는 성분으로 알려져 있는 peptone, malt extract, yeast

extract, tryptone, soybean의 유기 질소원과 $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$, KNO_3 , $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, NH_4NO_3 , NaNO_3 , NH_4Cl 의 무기 질소원을 첨가하여 실험하였다(Table 8). 표에서 보는 바와 같이 유기질소원에서는 malt extract가 항균 활성이 높았으며, 무기질소원에서는 $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ 를 제외한 모든 질소원에서 항균 활성이 높게 나타나어 항균 물질 생산에 무기질소원이 효과적인 것을 알 수 있었다. 무기질소원 NH_4NO_3 을 각각의 농도별로 실험한 결과 0.8%에서 가장 높은 활성을 나타내었다(Fig. 13).



Table 7. Effect of carbon source on the growth and antimicrobial activity.

Carbon source	Growth(OD 660 nm)	Inhibition zone(mm)
Lactose	1.850	14.1
Manitol	2.347	13.5
Glucose	1.731	13.9
Mannose	1.874	11.6
Raffinose	1.845	12.8
Rhamnose	1.696	11.6
Sucrose	2.299	9.5
Galactose	1.925	9.3
Maltose	1.486	11.5
Sorbitol	2.043	16.1
Slouble starch	1.925	11.3

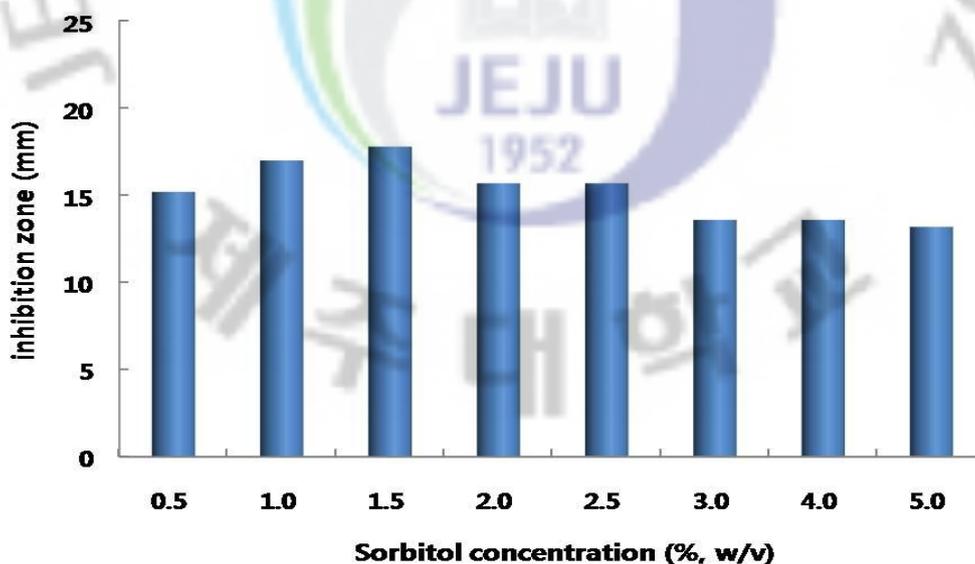


Fig. 12. Effect of sorbitol concentration on the antimicrobial activity.

Table 8. Effect of nitrogen source on the growth antimicrobial activity.

Nitrogen source	Growth (OD 660 nm)	inhibition zone(mm)
Peptone	2.320	13.4
Malt extract	2.440	19.0
Yeast extract	0.809	12.4
Tryptone	2.437	10.3
Soybean	1.869	9.7
KNO ₃	1.207	20.1
(NH ₄)SO ₄	0.720	18.8
NH₄NO₃	1.309	20.9
NaNO ₃	1.599	16.5
NH ₄ Cl	0.755	20.0

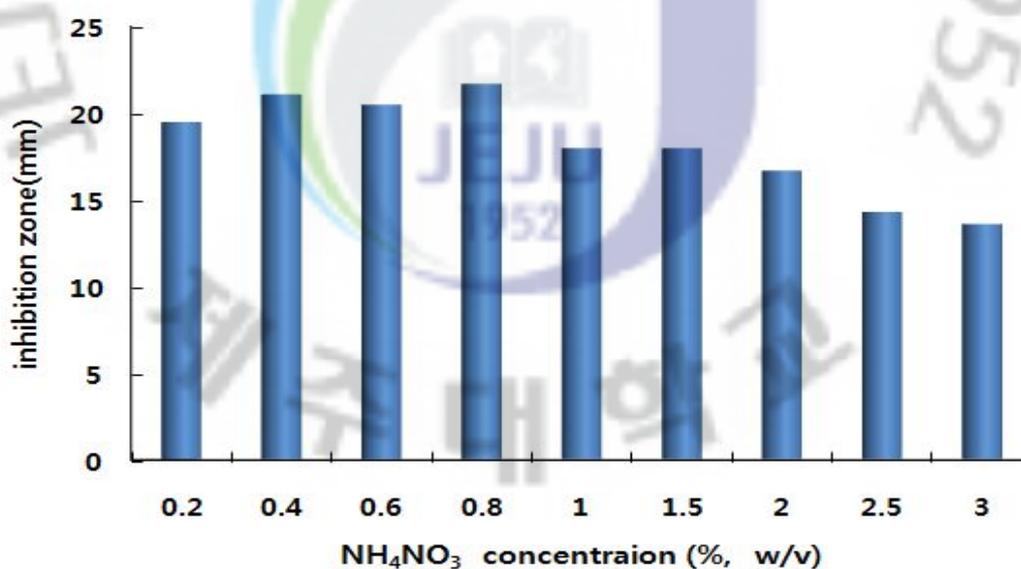


Fig. 13. Effect of NH₄NO₃ concentration on the antimicrobial activity.

3-6. 무기염류의 영향

기본배지에 각종의 무기염류($\text{BaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, ZnCl_2 , $\text{NiCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, K_2HPO_4 , KCl , CaCl_2 , $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$)들을 각각 0.1%(w/v)씩 첨가하고 전배양액을 접종하여 배양한 후 균의 생육도와 항균물질 생산에 미치는 영향을 검토한 결과 ZnCl_2 , $\text{NiCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, CaCl_2 , $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 에서는 균의 성장이 이루어지지 않았다(Table 9). $\text{BaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, K_2HPO_4 , KCl , $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 에서 균의 성장과 항균 활성을 나타내었는데 대조구보다 성장 및 활성 모두 낮게 관찰 되었다. 따라서 *P. inhibens* KJ-2의 무기염류의 영향은 오히려 성장과 항균물질 생산에 저해요소로 작용하는 것으로 사료된다.

Table 9. Effect of mineral sources on the growth antimicrobial activity.

Mineral	Growth (OD 660 nm)	inhibition zone(mm)
$\text{BaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0.489	13.3
ZnCl_2	0.003	-
$\text{NiCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	0.018	-
K_2HPO_4	0.735	11.2
KCl	0.396	10.2
CaCl_2	0.015	-
$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	0.012	-
$\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	0.023	-
$\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	1.750	9.5

3-7. Aeration의 영향

250ml 삼각 플라스크를 이용하여 배지의 양을 25~150ml까지 조정하여 배양한 후 생육도 및 항균 활성을 관찰하였다(Fig. 14). 그 결과 삼각 플라스크 내 배양액 양이 많을수록 높은 생육도를 보였으나, 항균 활성은 배지의 양을 50ml를 첨가했을 때 높은 활성을 나타냈다. 이런 결과는 색소 측정 결과 거의 일치하는 결과이며, 온도, pH, NaCl의 영향에서 나타난 양상과 거의 일치하는 결과이다.

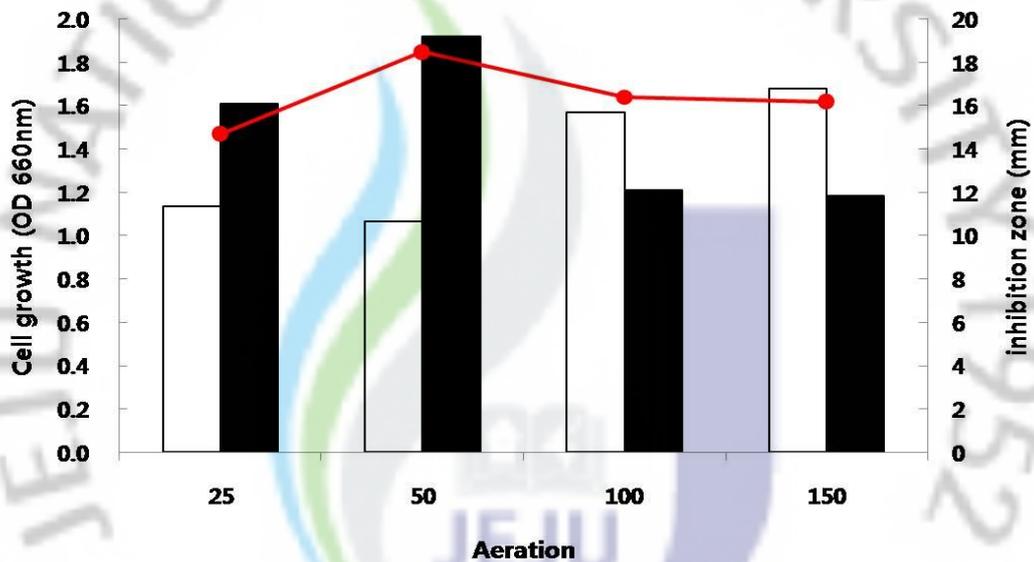


Fig. 18. Effect of aeration of the cell growth and antimicrobial activity of *P. inhibens* KJ-2.

(■: Inhibition zone, □: Cell growth, -●-: Pigment 398 nm)

4. 항균 스펙트럼

광범위한 항균 활성을 알아보기 위해 KJ-2 antibiotics을 제조하여 사용하였으며, 어류질병 3종, 인체 유해균 7종, 진균 2종에 대하여 활성을 검토한 결과 그람 음성, 양성균에 걸쳐 폭넓은 항균 활성을 나타내었고, 진균류에는 활성을 나타내지 않았다(Table 10.).

KJ-2 antibiotics은 앞서 검토한 *Vibrio sp.* 외에도 양식업에 많은 피해를 주고 있는 *Streptococcus iniae*, *Edward tarda*, *Streptococcus parauberis*에도 높은 활성을 나타내어 어류질병에 대한 광범위한 항생제로서 이용가능성이 있다고 사료되며, 특히 인체 유해균 중 여드름 유발균인 *Propionibacterium acnes*는 supernatant의 모든 농도의 처리구에서 높은 저해환을 관찰 할 수 있어 앞으로 연구 가치가 있다고 생각된다.

Table 10. Antimicrobial activities of the supernatant of KJ-2 antibiotics.

	Strain	Inhibition zone (mm)			
		100%	50%	20%	10%
Gram negative bacteria	<i>Escherichia coli</i>	17	14	11	9
	<i>Edwardsiella tarda</i>	21	20	16	14
	<i>Salmonella thyphimurium</i>	0	0	0	0
Gram positive bacteria	<i>Propionibacterium acnes</i>	27	24	22	20
	<i>Bacillus subtilis</i>	19	18	15	13
	<i>Listeria monocytogenes</i>	13	0	0	0
	<i>Staphylococcus aureus</i>	19	15	13	10
	<i>Serratia marsences</i>	0	0	0	0
	<i>Streptococcus iniae</i>	20	18	16	13
	<i>Streptococcus parauberis</i>	15	13	10	10
Fungi	<i>Candida albicans</i>	0	0	0	0
	<i>Pityrosporum ovale</i>	0	0	0	0

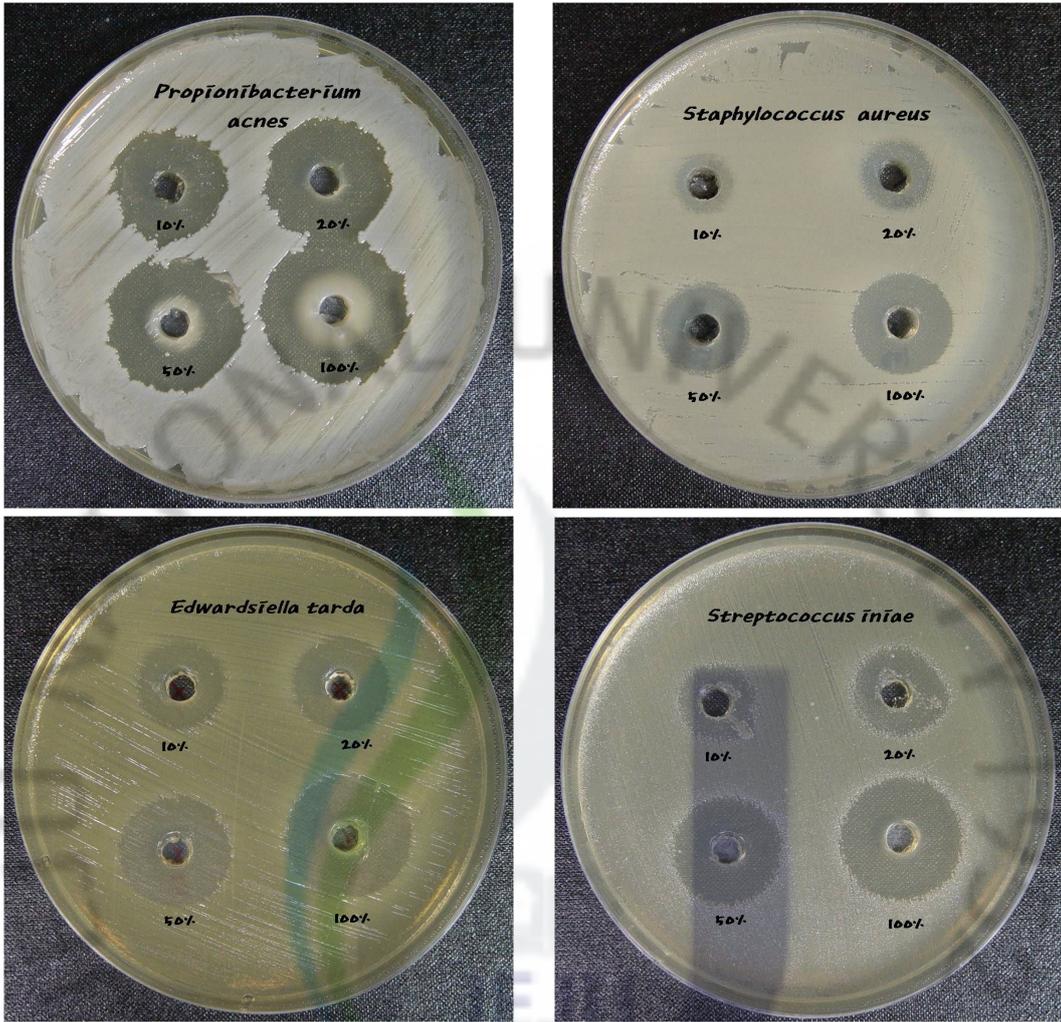


Fig. 15. Antimicrobial activity of KJ-2 antibiotic against various pathogenic Bacteria.

5. *P. inhibens* KJ-2 antibiotics의 생물학적 특성

5-1. 열안정성

P. inhibens KJ-2 antibiotics 항균물질의 열에 대한 영향을 알아보기 위하여 온도를 40~121℃까지 달리하여 항균 활성을 검토한 결과를 Fig. 16.에 나타내었다. 그림에서 서 보는 것과 같이 온도에 따른 항균 활성의 변화는 관찰 되지 않았으며, 특히 121℃에서 15분간 고압 열처리를 하여도 활성을 유지한 것으로 나타나 열에 매우 안정한 것으로 나타났다.

5-2. pH 안정성

P. inhibens KJ-2 antibiotics의 pH에 대한 안정성은 KJ-2 antibiotics를 1 N HCl과 1 N NaOH를 이용하여 pH 3~10까지 조정하고 이를 2시간동안 실온에 방치 한 후 항균 잔존 활성 측정을 통해 검토 하였다(Fig. 17.).

KJ-2 antibiotics는 pH 3, 4, 5, 6, 7, 8에서 비교적 안정한 반면, pH 9이상에서 잔존 활성이 다소 감소하는 것을 알 수 있었다. 전체적으로 pH의 모든 범위내에서 일정 수준의 항균 잔존 활성을 나타내었다. 이런 결과는 Bruhn 등 (2005)이 보고한 *Phaeobacter* 속의 생산하는 항균물질이 pH에 안정하다는 결과와 일치하는 것을 알 수 있었다.

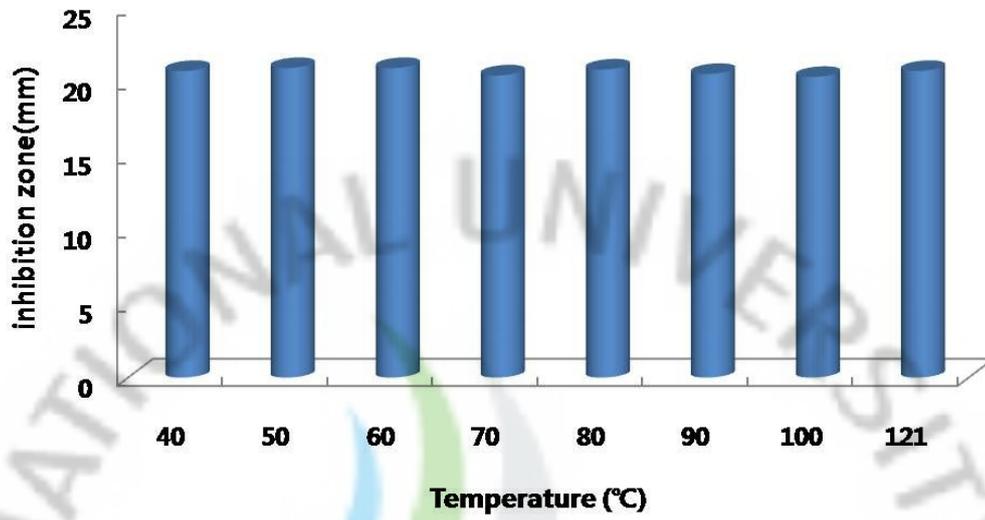


Fig. 16. Effect of temperature on the *P.inhibens* KJ-2 antibiotic stability.

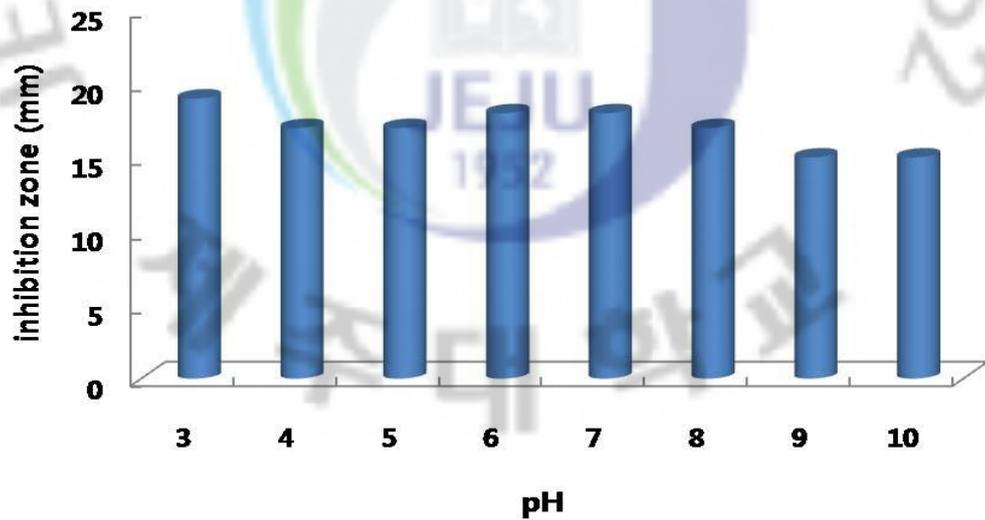


Fig. 17. Effect of pH on the *P.inhibens* KJ-2 antibiotic stability.

5-3. *P. inhibens* KJ-2 antibiotic 첨가에 따른 항균 효과 검토

V. anguillarum KCTC 2711에 대한 *P. inhibens* KJ-2 antibiotic의 효과를 살펴보기 위하여 antibiotic을 첨가한 후 3시간 방치한 후 주사전자현미경(SEM)을 통하여 *V. anguillarum* KCTC 2711의 세포형태변화를 관찰한 결과는 다음과 같다(Fig. 18.).

P. inhibens KJ-2 antibiotic을 처리하지 않은 *V. anguillarum* 세포를 관찰한 결과 균체의 표면이 매끄러운 정상적인 형태를 관찰 할 수 있었고(Fig. 18. A), *P. inhibens* KJ-2 antibiotic을 처리한 경우 세포 표면에 여러 구멍이 생기고 세포벽이 붕괴되는 현상을 관찰 할 수 있었다(Fig. 18. B).

이는 본 균주가 생산하는 항균 물질은 유산균의 그람 음성균과 양성균에 대한 항균활성은 세포벽을 파괴함으로써 나타난다는 보고(Kang 1998)와 allyl isothiocyanate와 초산 등이 *L. monocytogenes*에 대하여 미생물의 세포막을 파괴하여 내용물의 유출되어 항균효과를 나타낸다는 보고와 유사한 현상으로 사료된다(Ahn 2001).

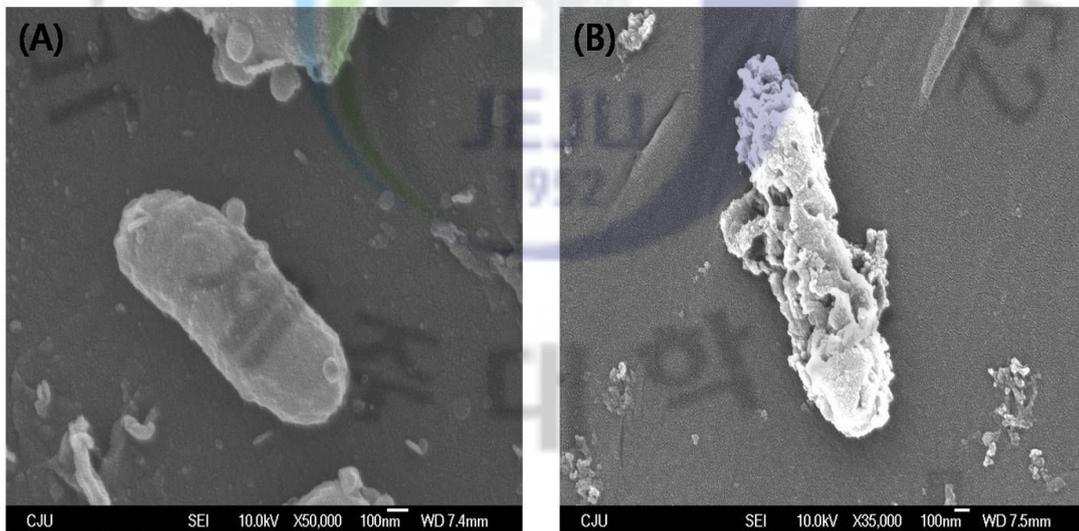


Fig. 18. Scanning electron micrograph of *V. anguillarum* treated with *P. inhibens* KJ-2 antibiotic. (A) Untreated, (B) Treated.

IV. 요약

어류 양식 산업의 급격한 성장과 증대로 인해 해마다 어류질병에 의한 피해는 날로 증가 하고 있으며, 이를 치료하기 위한 무분별한 항생제의 사용으로 내성균의 출현과 어체내 약품 잔류로 문제가 되고 있다. 이러한 문제를 해결하기 위하여 다각적인 방법을 모색 하고 있으며, 그 중 생물학적 제어에 관한 관심이 증가 하고 있다. 최근 항균물질을 생산하거나 경제적 피해를 유발하는 세균이 검출되고 있으며, 많은 연구가 진행 중에 있다.

본 연구는 양식업에 막대한 경제적인 손실은 가져다주는 세균성 어류질병인 *Vibrio anguillarum*을 예방하고 control 하기 위한 생물 전구체(Probiotic)의 개발에 목적을 두고, 해양생물 균소알로부터 특징적인 균주를 분리 하였다. 이를 형태학적 관찰, 염기서열 분석, 생화학적 특성을 통해 균을 동정하여 *Phaeobacter inhibens* KJ-2로 명명하였다. *P. inhibens*는 최근 항균물질의 황을 함유한 tropodithietic acid(TDA)로 알려졌다.

KJ-2 균주는 비브리오에 대해 강한 항균 활성을 갖고 있다는 연구에 따라 잠재적인 어류질병예방 및 치료제로서 가치가 있어 항균물질의 생산특성을 배양조건에 따라 검토하였으며, 그 결과 20℃에서 24시간 배양 후 항균활성이 최대였고, 배양 4시간 후부터 생육도는 낮았으나 항균물질생산을 시작하였다. 생육도가 거의 없는데도 불구하고 항균물질이 생산이 이루어졌는데, 이는 QS(quorum sensing)의 신호 물질인 AHLs과 관련이 있다고 사료되며, AHLs의 생성능은 항균 활성과 거의 일치함을 알 수 있었다.

이런 배양특성을 바탕으로 항균 활성을 검토한 결과 *V. anguillarum*에 대해 강한 항균활성을 보였으며, 다른 *Vibrio* spp.에 대해서도 항균활성을 나타내었다. 특히 *Vibrio vulnificus*, *Vibrio campbellii*, *Vibrio mimicus*에 대해 높은 저해능을 나타내었다. *P. inhibens* KJ-2의 항균물질 생산을 위한 조건은 1.5% sorbitol, 0.8% NH₄NO₃, 4% NaCl이며, pH 6, 최적 온도는 20℃이었다. 하지만 무기염류를 첨가 했을시 몇몇 무기염류를 제외하고 생육 및 항균물질 생산을 저해 하였다. 위의 항균물질 생산에 미치는 영향에 일반적인 미생물과 달리 항균물질의 생산

의 항균 물질 외에 다른 요소가 작용하는 것을 관찰 할 수 있었다. 즉 색소, AHLs의 생성과 항균활성은 대부분 일치 하였으며, 따라서 *P. inhibens* KJ-2의 항균물질 생산에 QS가 관련이 있다고 사료된다.

P. inhibens KJ-2 antibiotic을 제조하여 항균활성 및 안정성 등을 조사하였다. KJ-2 antibiotic은 어류질병 및 인체 유해균 등에 대해 강한 항균 활성을 나타내었으며, 121℃에서 15분간 고압열처리를 하여도 항균활성을 유지 하였고, pH에 대한 안정성은 약알칼리성에서 다소 항균활성이 감소했지만 대부분 안정하였다.

P. inhibens KJ-2 antibiotic의 *V. anguillarum*에 대한 항균 기작을 검토하기 위해 주사전자현미경(SEM)을 통하여 세포변화를 관찰 하였으며, *P. inhibens* KJ-2의 항균물질은 초산이나 유산균 같이 세포벽을 붕괴시킴으로써 생육을 억제하는 것으로 관찰되었다.

따라서 *P. inhibens* KJ-2는 어류질병을 예방하거나 치료 할 수 있는 생물 전구체(Probiot)로써 이용이 가능할 것으로 판단되며, 본 균주의 항균 물질 생산에 관여하는 다양한 요소들에 대한 연구가 필요할 것으로 보인다. 또한 생물접촉 실험 등을 통하여 생물전구체로써의 이용 가능성을 충분히 검증 할 필요가 있다고 생각 된다.

V. 참고 문헌

- Austin, B., Stuckey, L. F., Robertson, P. A. W., Effendi, I. and Griffirh, D, R.: A probotic strain of *Vibrio alginolyticus* effective in reducing diseases caused by *Aeromonas salmonicida*, *Vibrio anguillarum* and *Vibrio ordaili*. J. Fish Dis., 18: 93–96, 1995.
- Bruhn, J. B., K. F. Nielsen, M. hjelm, M. Hansen, J. Bresciani, S. Schulz, and L. Gram. 2005. Ecology , Inhibitory Activity, and Morphogenesis of a Marine Antagonistic Bacterium Belonging to the *Roseobacter clade*. Appl. Environ. Microbiol. 71:7263–7270
- Bergman A. M. 1909. Die rolle bealenkrank heit des aals. Ber. K. Bayer. Versuchsstn. 2:10–54.
- Bly, J. E., Quiniou, S, M–A., Lawson, L. A. and Clem L. W.: Inhibition of Saprolegnia pathogenic for fish by *Pseudomonas fluorescens*. J. Fish Dis., 20: 35–40, 1997
- Brinkhoff, T., G. Bach, T. Heidorn, L. F. Liang, A. Schlingloff, and M. Simon. 2004. Antibiotic production by a Roseobacter clade–affiliated species from the German Wadden Sea and its antagonistic effects on indigenous isolates. Appl. Environ. Microbiol. 70:2560–2565
- Bruhn, J. B., J. A. J. Haagenzen, D. Bagge–Ravn, and L. Gram. 2006. Culture conditions of Roseobacter strain 27–4 affect its attachment and biofilm formation as quantified by real–time PCR. Appl. Eviron, Microbiol. 72:3011–3015.
- Burgess, J. G., E. M. Jordan, M. Bregu, A. Mearns–Spragg, and K. G. Boyd. 1999. Microbial antagonism: a neglected avenue of natural products reserch. J. Biotechnol. 70:27–32

- Choi, H. J., M. J. Jung and Y. K. Jeong. 2002 Optimization of the production of an immunostimulant from a marine bacterium. *Kor. J. Life Sci.* 12: 759–764.
- Dang, H. Y., and C. R. Lovell. 2000. Bacterial primary colonization and early succession on surfaces in marine waters as determined by amplified rRNA gene restriction analysis and sequence analysis of 16S rRNA genes. *Appl. Environ. Microbiol.* 66:467–475.
- Gerhardt, P., R. G. E. Murray, R. N. Costilow, E. W. Nester, W. A. Wood, N. R. Krieg and G. B. Phillips. 1981. *Manual of methods for general bacteriology.* American Society for Microbiology, Washington, D. C.
- Gonzalez, J. M., R. Simo, R. Massana, J. S. Covert, E. O. Casamayor, C. Pedros–Alio, and M. A. Moran. 2000. Bacterial community structure associated with a dimethylsulfoniopropionate–producing *Noth* Atlantic algal bloom. *Appl. Environ. Microbiol.* 66:4237–4276.
- Hjelm, M., Q. Bergh, A. Rianza, J. Nielsen, J. Melchiorson, S. Jensen, H. Duncan, P. Ahrens, H. Birkbeck, and L. Gram. 2004. Selection and identification of autochthonous potential probiotic bacteria from turbot larvae (*Scophthalmus maximus*) rearing units. *Syst. Appl. Microbiol.* 27:360–371.
- Kang, J. H. and M. S. Lee. 1998. Mode of action of the bacteriocin from *Latobacillus* sp. GM7311 against gram positive bacteria. *J. Korean Fish. Soc.*
- Kang, S. I., Y. M. Kim, Y. B. Jang, D. J. Lim and J. Y. Kong. 2004 The optimal culture condition for the collagenolytic protease production from *Vibrio vulnificus* CYK279H. *Kor. J. Biotechnol. Bioeng.* 19: 295–300.
- Kim, J.W., S. H. Jung, M. A. Park, J. W. Do, D. L. Choi, B. Y. Jee, M. Y.

- Cho, M. S. Kim, J. S. Lee, C. H. Lee, J. D. Bang, M. S. Park and J. S. Seo. 2006. Monitoring of pathogens in cultured Fish of Korea for the Summer Period from 2000 to 2206. *J. Fish Pathol.* 19(3): 207–214
- Kreig, N. R. and J. G. Holt. 1989. *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, Vol. 1, Williams & Wilkins, Baltimore, Maryland. 31(4): 560–566.
- Leadbetter, J. R., and E. P. Greenberg. 2000. Metabolism of acyl-homoserine lactone quorum-sensing signals by *Variovorax paradoxus*. *J. Bacteriol.* 182:6921–6926.
- Long, R. A., and F. Azam. 2001. Antagonistic interactions among marine pelagic bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* 67:568–576.
- Long, R. A., A. Qureshi, D. J. Faulkner, and F. Azam. 2003. 2-*n*-Pentyl-4-Pentyl produced by a marine *Alteromonas* sp. and its potential ecological and biogeochemical roles. *Appl. Environ. Microbiol.* 69:568–576
- Macfaddin, J. F. 1980. *Biochemical Tests for Identification of Medical Bacteria*. The Williams & Wilkins Co., Baltimore, Maryland.
- Martens, T, Heidorn, T, Pukall, R, Simon, M, Tindall, BJ, Brinkhoff, T. 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 description of the genera *Roseobacter*, *Ruegeria* and *Leisingera*. *Int J Syst Evol Microbiol* 56: 1293–1304.
- Moran, M. A., J. M. Gonzalez, and R. P. Kiene. 2003. Linking a bacterial taxon to sulfur cycling in the sea: studies of the marine *Roseobacter* group. *Geomicrobiol. J.* 20:375–388.

- Porsby, C. H., K. F. Nielsen and L. Gram. 2008. *Phaeobacter* and *Ruegeria* Species of the *Roseobacter* Clade Colonize Separate Niches in a Danish Turbot(*Scophthalmus maximus*)–Rearing Farm and Antagonize *Vibrio anguillarum* under Different Growth Conditions. *Appl. Environ. Microbiol.* 74:7356–7364.
- Ruiz–Ponte, C., V. Cilia, C. Lambert, and J. L. Nicolas. 1998. *Roseobacter gallaeciensis* sp. nov., a new marine bacterium isolated from rearing and collectors of the scallop *Pecten maximus*. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 48:537–542.
- Selje, N., M. Simon, and T. Brinkhoff. 2004. A newly discovered *Roseobacter* cluster in temperate and polar oceans. *Nature* 427:445–44
- Shiba, T. 1991. *Roseobacter litoralis* gen. nov., sp. nov., and *Roseobacter denitrificans* sp. nov., aerobic pink–pigmented bacteria with contain bacteriochlorophyll *a*. *Syst Appl Microbiol* 14: 140–145.
- Smith, P. and Davey, S. 1993. Evidencer for the competitive exclusion of *Aeromonas salmonicida* from fish with stress–inducible furunculosis by a fluorescent pseudomonas. *J. Fish Dis.*, 16: 521–524.

감사의 글

제가 미생물에 관심이 많아 해양미생물 실험실에서 공부한지도 어느덧 3년이라는 시간이 흘렀습니다. 3년이라는 시간동안 앞만 보고 달려 왔기에 잃은 것, 놓친 것도 많았지만 얻은 것도 많은 시간들이었습니다. 사람은 항상 도전해야 할 시기가 찾아온다고 합니다. 저에게는 지난 3년은 이런 인생의 도전의 시간이었습니다. 그래서인지 많은 기대와 의욕을 갖고 시작했지만 많은 부족함에 한때 좌절해보기도 하고, 다시 꺾꽂하게 일어나 새롭게 시작해보기도 하며 짧은 시간이지만 제 자신을 한 단계 성숙 시킬 수 있었던 아주 소중한 시간이었습니다.

먼저 부족한 저를 언제나 믿어주시고 논문이 완성 될 수 있도록 항상 지도해주신 허문수 교수님께 머리 숙여 감사의 말씀을 드리고 싶습니다. 또한 바쁘신 가운데도 논문을 검토하고 심사해주신 여인규 교수님과 이경준 교수님께도 깊은 감사를 드립니다. 학부 및 대학원 생활 동안 늘 관심을 가져주시고 조언을 해주신 송춘복 교수님, 이제희 교수님, 전유진 교수님, 정준범 교수님께도 진심으로 감사드립니다.

대학원 생활 동안 많은 관심과 격려를 해주신 진창남 소장님, 고대희 계장님, 강봉조 연구사님께 감사드리며, 졸업 후에도 항상 마음을 써주신 병규형, 영환이형, 철영이형께도 감사의 마음을 전합니다.

가족보다 많은 시간을 같이하며 친동생처럼 아껴주신 영건이형, 만철이형, 태원이형, 주상이형, 창식이형 그리고 논문이 완성되기까지 많이 도와주고 고생한 용재, 익수, 창영, 동민이 모두에게 고맙다는 말을 전합니다. 또한 대학원 생활을 동고동락하며 큰 힘이 되 주었던 동기 석천, 영득, 성명, 선희, 긴내, 민주 후배지만 나를 잘 따라주고 같이 고생했던 봉근, 민석이에게도 고맙고 수고했다는 말을 전하고 싶습니다. 지금은 제 곁에 없지만 항상 서로 의지하며 열심히 했던 실험실 동기 현식이에게 고맙다는 말과 함께 이 논문을 바칩니다.

선배로써 후배들을 챙겨주신 해양생물자원이용공학 실험실 수진형, 길남이형, 분자유전육종학 실험실에 맹진형, 분자유전학실험실 철홍이형과 바로 윗 선배로써 항상 관심 갖고 응원해주신 경주형, 승홍형, 송헌이형에게도 감사드립니다. 여기에서 언급은 못했지만 부족한 저에게 항상 관심과 격려를 해주신 모든 분들

께 감사드리며, 긴 시간 동안 옆에서 힘이 되어주고 용기를 준 사랑하는 진희에게도 고맙다는 말을 전하고 싶습니다.

마지막으로 긴 대학 생활과 대학원 생활동안 뒷바라지 해주시고 지금 저를 이 자리에 있게 만들어주신 영원한 후원자이신 사랑하는 부모님, 누나와 매형들, 조카 민지, 태은, 수은, 지우, 지연이에게 이 세상 누구보다도 감사하고 사랑한다고 전하고 싶고, 논문을 마칠 수 있도록 도움을 주신 모든 분들에게 이 논문을 바칩니다.

