



저작자표시-비영리-변경금지 2.0 대한민국

이용자는 아래의 조건을 따르는 경우에 한하여 자유롭게

- 이 저작물을 복제, 배포, 전송, 전시, 공연 및 방송할 수 있습니다.

다음과 같은 조건을 따라야 합니다:



저작자표시. 귀하는 원저작자를 표시하여야 합니다.



비영리. 귀하는 이 저작물을 영리 목적으로 이용할 수 없습니다.



변경금지. 귀하는 이 저작물을 개작, 변형 또는 가공할 수 없습니다.

- 귀하는, 이 저작물의 재이용이나 배포의 경우, 이 저작물에 적용된 이용허락조건을 명확하게 나타내어야 합니다.
- 저작권자로부터 별도의 허가를 받으면 이러한 조건들은 적용되지 않습니다.

저작권법에 따른 이용자의 권리는 위의 내용에 의하여 영향을 받지 않습니다.

이것은 [이용허락규약\(Legal Code\)](#)을 이해하기 쉽게 요약한 것입니다.

[Disclaimer](#)

碩士學位論文

해양에서 분리된 방선균을 이용한 항생제
내성균의 항균활성에 관한 연구



濟州大學校 大學院

海洋生命科學科

韓 龍 在

2011 年 2 月

해양에서 분리된 방선균을 이용한 항생제
내성균의 항균활성에 관한 연구

指導教授 許文洙

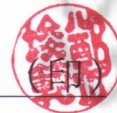
韓龍在

이 論文을 理學 碩士學位 論文으로 提出함

2011 年 - 2 月

韓龍在의 理學碩士 學位論文을 認准함

審査委員長 정준범



委員 이승헌



委員 허문수



濟州大學校 大學院

2011 年 2 月

Isolation and Identification of Marine
Actinomycetes and Antibiotic-Resistance
Pathogenic Bacteria for Antimicrobial
activity

Yong-Jae Han

(Supervised by professor Moon-Soo Heo)

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

Department of Marine life science

GRADUATE SCHOOL

JEJU NATIONAL UNIVERSITY

February, 2011

목 차

목차	i
List of Tables	iii
List of Figures	iv
Abstract	vi
I. 서 론	1
II. 재료 및 방법	8
1. 해양유래 방선균의 분리 및 보관	8
2. 분리 균의 생리학적 특성	9
2-1. 그람염색, 산화환원효소시험	9
2-2. 성장 온도 및 염분 실험	10
3. 분리된 방선균의 생화학적 특성	10
3-1. 카제인 가수분해 시험	10
3-2. 전분 가수분해 시험	11
3-3. 우레아제 가수분해 시험	11
3-4. 질산염 환원효소 시험	12
3-5. Tween 40 및 Tween 80 가수분해 실험	13
4. 항균물질 생산균주의 분리	13
4-1. 인체질병 유발 항생제 내성 병원균 선별	14
5. 항균물질 생산 균주의 API 50 CHB 시험	15
6. 항균물질 생산 균주의 16S rRNA 염기서열 분석	15
7. 16S rRNA 계통 분석	16
8. 분리균주의 최적배양조건	16
8-1. 분리균주의 온도, pH에 대한 생육 및 항균활성 측정	16
8-2. 탄소원 종류에 따른 균주의 생육 및 항균활성 측정	17
8-3. 질소원 종류에 따른 균주의 생육 및 항균활성 측정	17
9. 양식어류 질병 유래 항생제 내성 <i>Streptococcus parauberis</i> 선별	17
10. 분리 균의 항균물질 추출 및 항생제 내성균 최소 억제 농도 측정	19
10-1. 항균물질의 추출	19
10-2. 최소저지농도(MIC) 측정	19

11. 농도별 항산화활성 측정	19
11-1. DPPH radical 소거활성	20
11-2. Hydroxyl radical 소거활성	20
11-3. Alkyl radical 소거활성	21
III. 결과 및 고찰	22
1. 방선균 분리	22
2. 분리 균의 배양학적 특성	22
3. 분리 균의 생리학적 및 생화학적 특성	26
4. 항균물질 생산 균주의 분리	29
5. 16S rRNA 계통 분석	31
6. 분리 균주의 API 50 CHB 시험	33
7. 분리균주의 최적배양조건	37
7-1. 분리균주의 온도에 대한 생육 및 항균활성 측정	37
7-2. 분리균주의 pH에 대한 생육 및 항균활성 측정	39
7-3. 탄소원 종류에 따른 균주의 생육 및 항균활성 측정	41
7-4. 질소원 종류에 따른 균주의 생육 및 항균활성 측정	43
8. 양식어류 질병 유래 항생제 내성 <i>Streptococcus parauberis</i> 분리 및 항생제 내성 평가	45
9. 분리 균의 항균물질 추출 및 항생제 내성균 최소 억제 농도 측정	50
9-1. 최소저지농도(MIC) 측정	50
10. 농도별 항산화 활성 측정	52
IV. 고찰	56
V. 참고 문헌	59

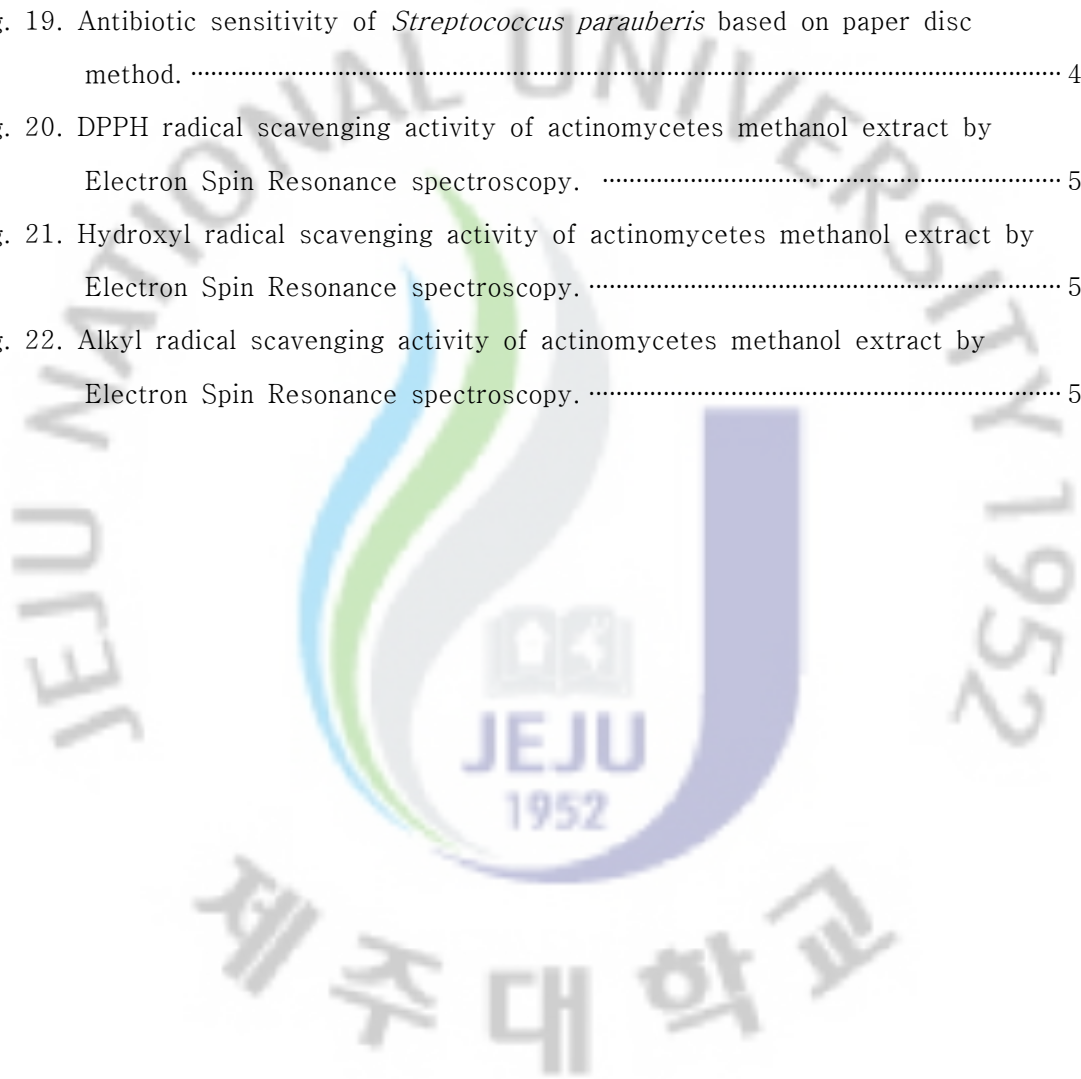
List of Tables

Table 1. Number of bioactive compounds produced from major actinomycetes.	6
Table 2. Structure classification of bioactive compounds from microorganisms.	6
Table 3. Composition of Medium.	8
Table 4. Composition of Medium.	9
Table 5. Composition of casein hydrolysis test medium.	10
Table 6. Composition of Starch hydrolysis test medium.	11
Table 7. Composition of ucase hydrolysis test medium.	12
Table 8. Composition of nitrate broth.	12
Table 9. Composition of Medium.	13
Table 10. List of strains and growth conditions used for antibacterial experiments. ...	14
Table 11. Criteria for determination of antibiotics sensitivity by inhibition zone based on paper disc method.	18
Table 12. Electron spin resonance condition for antioxidant activity measurement of Actinomycetes extracts.	21
Table 13. The culture characteristics of Actinomycetes.	24
Table 14. The culture characteristics of Actinomycetes.	25
Table 15. General physiological characteristics of isolated marine actinomycetes.	27
Table 16. General physiological characteristics of isolated marine actinomycetes.	28
Table 17. Antibacterial activities of the liquid culture broth methnol extract of marine actinomycetes.	30
Table 18. Culturable marine actinomycetes identified on the basis of 16S rRNA sequence.	32
Table 19. The biochemical characteristics of strain HK-A13 by API 50 CHB test. ...	34
Table 20. The biochemical characteristics of strain HK-A43 by API 50 CHB test. ...	35
Table 21. The biochemical characteristics of strain HK-A44 By API 50 CHB test. ...	36
Table 22. 16S sequence analysis results of strain <i>Streptococcus parauberis</i>	46
Table 23. Antibiotics sensivity of <i>Streptococcus parauberis</i> based on paper disc method.	47
Table 24. The minimum inhibitory concentration of actinomycetes methanol extract. ·	52

List of Figures

Fig. 1. Antibiotics-Resistance Bacteria by Korea.	2
Fig. 2. Substrate mycelia cultural characteristics of isolate strain HK-A01~HK-A44 Cell were grown on MA at 25°C for 10days.	23
Fig. 3. Aerial mycelia cultural characteristics of isolate strain HK-A01~HK-A44 Cell were grown on MA at 25°C for 10days.	23
Fig. 4. Neighbor-joining tree of 16S rRNA sequence of HK-A13. The sequences were collected from 14 actinomycetes isolated in this study and representative species selected from Ribosomal Database.	32
Fig. 5. Neighbor-joining tree of 16S rRNA sequence of HK-A43, HK-A44. the sequences were collected from 14 actinomycetes isolated in this study and representative species selected from Ribosomal Database.	33
Fig. 6. Effect of various temperature on the growth and antibacterial activity of HK-A13 supernatant.	38
Fig. 7. Effect of various temperature on the growth and antibacterial activity of HK-A43 supernatant.	38
Fig. 8. Effect of various temperature on the growth and antibacterial activity of HK-A44 supernatant.	38
Fig. 9. Effect of various pH on the growth and antibacterial activity of HK-A13 supernatant.	40
Fig. 10. Effect of various pH on the growth and antibacterial activity of HK-A43 supernatant.	40
Fig. 11. Effect of various pH on the growth and antibacterial activity of HK-A44 supernatant.	40
Fig. 12. Effect of various carbon sources on the growth and antibacterial activity of HK-A13 supernatant.	42
Fig. 13. Effect of various carbon sources on the growth and antibacterial activity of HK-A43 supernatant.	42
Fig. 14. Effect of various carbon sources on the growth and antibacterial activity of HK-A43 supernatant.	42
Fig. 15. Effect of various nitrogen sources on the growth and antibacterial activity of HK-A13 supernatant.	44

Fig. 16. Effect of various nitrogen sources on the growth and antibacterial activity of HK-A43 supernatant.	44
Fig. 17. Effect of various nitrogen sources on the growth and antibacterial activity of HK-A44 supernatant.	44
Fig. 18. Antibiotic resistant and sensitive pattern of <i>Streptococcus parauberis</i> isolated from Olive flounder, <i>Paralichthys olivaceus</i> by paper disc method.	48
Fig. 19. Antibiotic sensitivity of <i>Streptococcus parauberis</i> based on paper disc method.	49
Fig. 20. DPPH radical scavenging activity of actinomycetes methanol extract by Electron Spin Resonance spectroscopy.	55
Fig. 21. Hydroxyl radical scavenging activity of actinomycetes methanol extract by Electron Spin Resonance spectroscopy.	55
Fig. 22. Alkyl radical scavenging activity of actinomycetes methanol extract by Electron Spin Resonance spectroscopy.	55



ABSTRACT

43 strains of marine actinomycetes were isolated from marine soil sources in Jeju island. They were characterized by morphological and physio-biochemical properties, and the API 50CHB test. They were further confirm by molecular methods including partial sequencing of 16S rRNA. The phylogenic relationship and taxonomic position of the domain bacteria was investigated by performing a comparative sequence analysis of PCR-amplified 16S ribosomal RNA. A neighbor-joining tree of partial 16S rRNA sequences divided in to 3 isolated HK-A13, HK-A43, HK-A44 of bacterial strains. major are, Gram positive bacteria/ *Actinobacteria* / *Actinomycetales*(order)/ *Streptomycineae* (suborder)/ *Streptomycetaceae*(family)/ *Streptomyces*(100%). All the 43 strains of Actinomycetes, were grew in the various range of NaCl, pH and temperature. As the result, three strains of HK-A13, HK-A43, HK-A44 were for most similar to *Streptomyces* were named as *Streptomyces* sp. HK-A13 and *Streptomyces* sp. HK-A43, *Streptomyces* sp. HK-A44. HK-A13, HK-A43 and HK-A44 strains were showed that best growth on temperature between 20°C~40°C, and pH between 6~7. *Streptomyces* sp. HK-A13. showed 1% sucrose for carbon source and 1% ammonium nitrate for nitrogen source, and *Streptomyces* sp. HK-A43 showed 1% sucrose for carbon source and 1% yeast extract for nitrogen source, and *Streptomyces* sp. HK-A44 showed 1% lactose for carbon source and ammonium chloride or malt extract for nitrogen source indicating that it has the highest growth. As the Minimum Inhibition Concentration (MIC) result, methanol extraction from culture liquid of *Streptomyces* sp. HK-A13 was verified sp. *Streptomyces* sp. HK methanol extracts very high antimicrobial activation depending on density with *Streptococcus parauberis* SP-001, 003, 015, 044, 048, 060, 063, 065, 066, *Proteus rettgeri* CCARM 0263, *Bacillus anthracis* CCARM 0217, *Streptococcus faecium* CCARM 0210, *Klebsiella pneumoniae* CCARM 10258, *Pseudomonas aeruginosa* CCARM 0225 at 50mg/ml, *Micrococcus luteus* CCARM 0022, *Staphylococcus aureus* CCARM 0201, *Enterobacter*

cloacae CCARM 0253 at 25mg/ml, *Burkholderia cepacia* CCARM 0226 at 6.3mg/ml. Methanol extraction of *Streptomyces* sp. HK-A43 had no sensitivity against human and fish diseases antibiotic-resistance bacteria other than *Streptococcus parauberis* SP-066, *Micrococcus luteus* CCARM 0022, *Burkholderia cepacia* CCARM 0226, *Streptococcus faecium* CCARM 0210, *Enterobacter cloacae* CCARM 0253 causing human pathogen and fish diseases antibiotic-resistance bacteria. Methanol extraction of *Streptomyces* sp. HK-A44 in showed high sensitivity against *Streptococcus parauberis* SP-015, 044, 066, *Micrococcus luteus* CCARM 0022, *Burkholderia cepacia* CCARM 0226, *Streptococcus faecium* CCARM 0210 at 50 mg/ml and vibriosis causing fish diseases antibiotic-resistance bacteria *Streptococcus parauberis* SP-003, 063, 065 at 25 mg/ml. The antioxidation activation of (DPPH radical scavenging activation) for each density of methanol extraction from isolated strains broth, was 1.4% HK-A13 at 0.05mg/ml, 14% for 0.25mg/ml, 25% for 0.5mg/ml and 93% for 0.5mg/ml. (HK-A44 showed the RSA was 20%). Although there is no meaningful difference for *Streptomyces* broth methanol extract HK-A43. The antioxidation activities of 23% for addition of *Streptomyces* Broth methanol Extract HK-A13 way 0.25mg/ml and 12 % 2.5mg/ml, and 83% 80% at 2.5mg/ml of density. The result of Alkyl radical scavenging activity all tested bacterial showed significantly increased antioxidation activity at 0.25mg/ml. Extraction of HK-A13 atrain at 2.5mg/ml showed the highest radical scavenging activation of 86%.

I. 서론

항생제의 발견과 항생제 내성균의 발생

항생제란 유기물에서 추출하여 다른 미생물의 성장을 억제하거나 사멸시키는 물질을 말한다. 1928년에 페니실린이 처음 발견된 이후 거의 모든 종류의 병원성 세균을 죽일 수 있었으며, 페니실린을 시작으로 4천여 가지 이상의 항생제가 발견되었고, 현재 약50여종의 항생제가 사용되어 지고 있다. 하지만 1960년도에 전 세계적으로 내성균이 출현하기 시작하여, 새로운 항생제의 개발이 요구되어지고 있다. 특히 황색포도상구균에 의한 다제다성약물에 대한 내성이 심각한 문제로 대두되고 있으며, 1997년에는 반코마이신에도 감수성을 나타내지 않는 내성균이 출현 하였다. 이러한 항생제 내성균은 신종 감염 질병의 발명 위협과 함께 세계적으로 증가하고 있으며, 항생제 내성균의 빠른 확산은 어느 나라에서나 큰문제가 되고 있는 실정이며, 우리나라의 경우 과도한 항생제 처방으로 인해 내성균이 현저하게 증가하여, 항생제 내성률 세계 1위 국가로 각종 세균 감염질환 치료 상 큰 난관에 봉착해 있다(Fig. 1). 이에 따라 내성균을 억제할 수 있는 새로운 물질의 분리에 대한 연구가 중요시 되고 있다. 특히 산업적 측면에서 관찰시 전 세계 의약품 시장은 약 910조원으로 추산되는데 항생제 시장은 50% 이상으로 가장 큰 품목이기 때문에 전 세계의 선진 연구진은 새로운 항생물질을 개발하고자 기존에 사용되고 있는 항생물질의 약효를 증가시키고 아울러 그 독성을 감소시키는 신 유도체의 개발과 해양에서의 해양 생물을 이용한 새로운 물질 탐색이 활발히 진행되고 있다. 때문에 항생물질의 오남용으로 인하여 각종 항생제에 대하여 내성을 지니는 병원균이 출현되어 새로운 항생물질의 개발은 언제나 중요한 과제로 인식되어지고 있다.

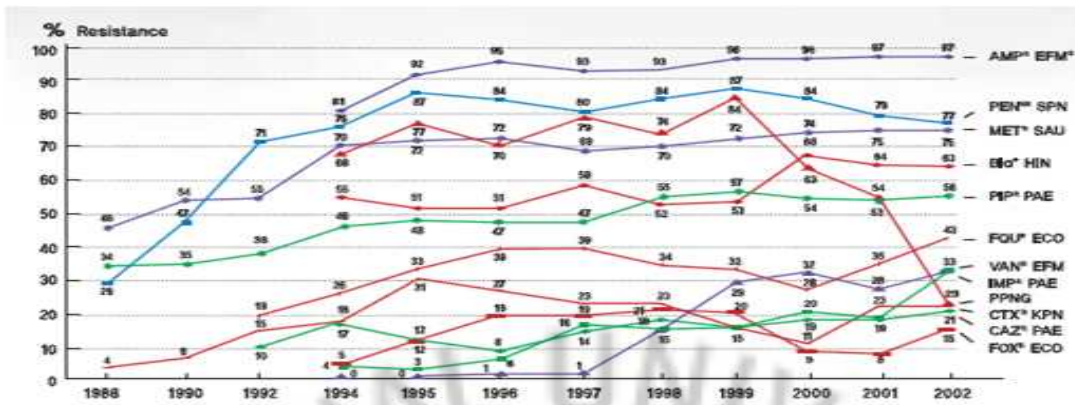


Fig. 1. Antibiotics-Resistance Bacteria by Korea.

강창수, 항생제 내성과 대응방안 연구

AMP^R EFM, ampicillin-resistant *E. faecium* PEN^{NS} SPN, penicillin-nonsusceptible *S. pneumoniae* MET^R SAU, methicillin-resistant *S. aureus* Bla⁺ HIN, β-lactamase-producing *H. influenzae* PIP^R PAE, piperacillin-resistant *P. aeruginosa* FQU^R ECO, fluoroquinolone-resistant *E. coli* VAN^R EFM, vancomycin-resistant *E. faecium* IMP^R PAE imipenem-resistant *P. aeruginosa* PPNG, penicillinase-producing *N. gonorrhoea* CTX^R KPN, cefataxime-resistant *K. pneumoniae* CAZ^R PAE, cefazidime-resistant *P. aeruginosa* FOX^R ECO, ceftioxin-resistant *E. coli*

2. 항생제의 사용과 규제현황

1940년대 후반 Chlortetracycline의 축산업에 대하여 성장촉진에 대한 효과가 발견된 이후, 축, 수산업에서 없어서는 안 될 중요한 성분으로 자리 잡아 왔으며, 전세계적으로 유럽에서 연간 약 10,000톤, 미국 약 25,000톤 등의 항생제가 사용되며, 이중 약 50% 정도가 가축에 사용되기에 이르렀다. 하지만, 인체에 사용하는 항생제를 가축에 사용금지 주장을 담은 영국의 Swann Report은, 항생제 내성의 위험과 이로 인한 인류와 동물 건강에 대한 위협에 대해 관심을 촉발 시켰다. 그 후, 내성 박테리아의 인체 전이에 대한 염려가 커져갔고, 이는 항생제의 가축사료 첨가에 대한 재평가 및 항생제 사용의 금지에까지 이르게 되었다. 국내의 경우, 축/수산 분야에서 사용되는 항생제의 양이 2001년을 기준으로 매년 점차적으로 줄어들고 있는 추세이지만, 전체적으로 축산용 항생제의 사용량이 축산 선진국의 사육 규모에 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 Quinone계 항생제에 약 50% 이상의 내성률을 보였다. 이에 정부에서도 항생제의 과다사용을 억제하기 위해 가축 사육 환경 개선, 배합사료에 혼합할 수 있는 항생제 종류의 대폭 축소, 안전사용기준 순회교육 등을 추진해 오고 있다. 외국의 경우 스웨덴에서는 1986년부터 성장촉진용 항생제 사용을 전면 금지했으며, 이는 항생제 사용을 절반으로 줄여주었다. 1997년 EU는 Vamcomycin과 연관된 항생제들의 사료첨가제로의 사용금지, 버지니아마이신, 바시트라신, 타일로신 및 스피라마이신등의 사용을 금지하였다. EU 전반에 걸쳐 위생과 관리상의 문제점들을 보충해 주던 성장촉진 항생제의 사용금지 결과, 축산환경개선 및 항생제 대체물질의 개선을 가져왔다. 미국에서는 EU와는 대조적으로 페니실린, 스트렙토마이신등을 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.

미생물의 산업적 중요성

지구 생물량의 약 60%를 차지하는 미생물은 지구상에 출현한 최초의 생물이며, 이 지구를 서식지로 하여 35억년이상 생존해 오고 있다. 자연계에 존재하는 미생물은 약 1% 미만만이 현재의 기술로서 배양이 가능한 것으로 알려져 있다. 아직 밝혀지지 않은 미생물들은 대부분 통상적인 조건에서 배양할 수 없는 것들로서, 특히 유용한 미생물이 많이 서식하는 것으로 알려진 극한 환경의 경우에는 난배양성 미생물이 더 많은 비율을 차지할 것으로 알려지고 있다. 미생물 종수는 현재 약 300,000에서 1,000,000종으로 추정되고 있으며, 1995년까지 학계에서 인정되고 있는 미생물은 4,000종을 약 상회하고 있는 것으로 밝혀진바 있다. 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 뒤쳐져 있는데 이러한 원인 중 가장 큰 문제점으로서 대부분의 미생물이 우리가 지금까지 알고 있는 방법으로는 배양이 불가능하다는 점에 기인한다. 다양한 환경에서 행해진 이들 연구에 의하면 현재까지 알려져 있지 않은 미생물이 존재하며, 대부분의 경우 이들이 미생물 군집구성에 있어서 대다수를 차지하고 있는 것을 알 수 있다.

예를 들면, 미국 Yellowstone의 열천 수에서 수행된 연구에 의하면 이곳에서만 12개의 새로운 Bacteria 문(division)을 발견하였는데 이는 그 전까지 발견된 문의 수의 50%에 해당되는 숫자이다. 이러한 미생물 자원은 생물 산업은 물론, 화학 산업, 제지, 펄프, 식품분야, 사료, 피혁 및 에너지 산업 분야에 폭넓게 활용되어 미래 생물 산업의 근간을 이룰 것으로 기대된다. 이러한 배양 가능한 미생물이나 배양 불가능한 미생물이 가지고 있는 고유한 유전자원은 그 다양성과 대사능력이 무한히 크기 때문에 인류 복지를 위한 활용가치는 무궁무진하다고 할 수 있다.

해양 미생물의 생리활성 물질 탐색

해양생물은 특이한 구조의 화합물을 포함하고 있으며 다양한 생리활성을 포함하고 있어 다양한 유용한산업적물질 개발에서 중요한 위치를 차지하고 있다. 항암제 개발 분야의 경우 균체명계류에서 분리된 cyclic peptide류 인 didmenin B, 명계류에서 분리된 ecteinascidin, 해면에서 분리된 halichondrin B 등이 항암제로 개발되었다. 소염제로는 manoalide, 항생제로는 isatamycin, aplasmomycin 등이 개발되어 상용화 되었다. 해양생물인 해면, 산호, 말미잘, 이끼벌레 등의 생물은 자신을 방어하기 위해 여러 가지 독소를 생산하는데 이러한 방어물질은 항균, 항암, 항바이러스, 항진균, 콜레스테롤 합성저해제, 효소 등 다양한 생리활성을 지니고 있는데 최근에 이러한 생리활성물질들이 공생하는 미생물에 의해 생산되는 것으로 밝혀짐에 따라 해양공생미생물은 생리활성물질의 생산자라는 보고들에 근거하여 공생미생물을 배양하여 이용할 경우, 생리활성 물질을 경제적이고 안정적으로 생산할 수 있다는 점에서 최근 해양공생미생물에 관한 연구가 급속히 증가하고 있다. 또한 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 환경이기에 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, 이들 중 다수는 고유

한 해양 미생물 (Obligate Marine Microorganism)로서 오랜 기간 천연물 연구의 대상이 되어왔던 육상미생물과는 다른 종들로서 생리활성 효과를 가진 신 물질을 생산할 가능성이 매우 높으며, 해양환경에 능동적으로 적응한 육상 미생물 (Facultative Marine Microorganisms)도 다수 서식하고 있다. 이들의 천연물의 생성은 종 특이적인 것이 아니라 균 특이적하며 동일 균주라도 서식조건에 따라 다른 천연물을 합성하는 예가 많으므로 연구가치가 크다 할 수 있다. 하지만 해양미생물로부터 보고된 천연물은 1978년에서 1985년의 기간에 보고된 물질이 전체 해양 천연물의 1%도 달하지 못하고 있으며, 현재까지 약 5,500여개의 전체 해양 천연물에 6%에 미치지 못하고 있다.

방선균의 생리활성물질

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 곰팡이와 유사한 형태의 균사를 형성하므로 과거 곰팡이로 분류된 적도 있었으나 1970년대에 이르러서 생리생화학적 분석방법이 발전됨에 따라, “세포내의 GC함량이 높고 분화하는 성질을 지닌 원핵미생물”로 인식되고 있다. 1960년대 이전에는 종명을 결정하는데 있어서 형태적 특징이 중요시되었으며, *Streptomyces* 속 균주가 주 연구 대상이었다. 그리고 신물질을 생산하는 방선균은 신종 균주로 보고되기도 하는 혼란한 시기였다. 이에 국제적인 조정 작업의 필요성이 인정되었고, Gottlieb와 Shirling이 주축이 되어 International Streptomyces Project를 수행하여 방선균 분류에 통일성을 기하게 되었으며, 1980년에는 세균 학명 승인 목록이 발표되었다. 최근 발간된 Int. J. Syst. Bac.의 논문의 16S rDNA/rRNA 염기서열을 기초한 새로운 방선균 분류체계를 보면 Actinobacteria 강을 *Acidimicrobiales*, *Rubrobacterales*, *Coriobacteriales*, *Sphaerobacterales*, *Actinomycetales*, *Bifidobacteriales*의 6개의 목으로 나누고, *Actinomycetales* 목을 다시 *Actinomycineae*, *Micrococcineae*, *Corynebacterineae*, *Micromonosporineae*, *Propionibacterineae*, *Pseudonociodineae*, *Streptomycineae*, *Streptosporangineae*, *Frankineae*, *Glycomycineae*의 10개의 아목으로 나누고 있

다. 방선균은 특히 지금까지 미생물로부터 발견된 10,000여종의 생리활성물질 가운데 약 2/3가 방선균으로부터 유래하였다. 이러한 이유로 방선균은 생리활성물질을 생산하는 천연유기화합물의 보고로서 신물질의 탐색 및 생서 기작에 대해 깊이 연구되어 왔다. 실제적으로 최근 20년간 보고된 생리활성물질이 항암제인 경우에는 방선균 유래가 82% 이상으로 절대 다수를 차지하고 있다고 보고되었다. 이러한 방선균 유래의 화합물 분리 성과는 일본 (45%)와 미국(23%)의 연구자가 많은 공헌을 하고 있다. 또한 임상에 이용되고 있는 화합물(120~150)의 약 60%는 방선균 유래의 화합물이다. (Table. 1)은 방선균의 대표적인 종에 속하는 균주가 생산하는 화합물을 나타내고 있으며, 이들은 구조상의 특징에 따라(Table. 2)와 같이 β -lactam, peptide, 아미노 배당체, macrolide, polyene, tetracycline, quinone, polyether, ansamycin, 핵산염기, 고분자, 그 외에 세균과 방선균이 생산하는 대표적인 화합물(chloramphenicol, cycloheximide, antimycin)등으로 분류되어진다.

Table 1. 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</i> spp.	385
<i>Nocardia</i> spp.	270

Table 2. 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)

연구 목적

현재 미생물 자원을 이용한 산업적 응용은 대부분 육상 자원 유래의 미생물들을 이용해왔다. 방선균 유래 항생물질의 대부분이 육상에서 토양에서 분리된 균주를 가지고 연구가 되어져 왔으며, 현재까지 사용되고 있는 대부분의 항생물질들이 육상자원을 이용하여 생산되어져 왔다. 아직까지 해양미생물 및 방선균에 관하여서는 연구가 미미한 실정이다. 미생물의 서식지로서 해양의 환경조건은 육상과 현저한 차이가 있기 때문에 해양이라고 하는 특이한 환경에 적응한 결과 대사계가 변화되어 새로운 2차 대사산물을 생산하는 균주도 있을 것으로 추측된다.

따라서 본 연구에서는 해양에서 분리한 방선균의 항균활성 물질 탐색에 목적을 두었으며, 더불어 항생제 내성을 나타내어 인체에 질병을 야기하는 세균과 제주도 내에 넓치 양식장에서 분리한 항생제 내성 *Streptococcus parauberis*에 대한 항균성의 특성과 분리균주의 생육 특성에 대하여 검토하였다.

II. 재료 및 방법

1. 해양유래 방선균의 분리 및 보관

균주의 샘플링을 위해서 제주도의 해양 지질을 채취하여 방선균 분리용 시료로 사용하였다. 해양 방선균 분리용 배지로 Marine agar (MA, Difco)와 ISP Medium 2, ISP Medium 4 (Difco. Co. USA), Actinomycete Isolation Agar (AIA, Difco)를 사용하였다. 방선균의 분리를 위해서 지질을 85℃ 건조기에서 1시간 건조후 멸균 생리식염수에 해수는 10^{-3} ~ 10^{-4} 배로 희석하여 0.1 ml를 배지에 도말 하여 25℃에서 10~30일간 배양하여 배지 상에서 나타나는 방선균의 균사체의 형태학적 모습을 관찰하여 방선균을 분리하였다(Table. 3~4).

Table 3. Composition of Medium.

Marine Agar (per liter)		Actinomycete Isolation Agar (Per liter)	
Peptone	5g	Sodium caseinate	2g
Yeast extract	1g	Asparagine	0.1g
Ferric citrate	0.1g	Sodium propionate	4g
Sodium chloride	19.45g	Dipotassium phosphate	0.5 g
Magnesium chloride	8.8g	Magnesium sulfate	0.1 g
Sodium sulfate	3.24g	Ferrous sulfate	1mg
Calcium chloride	1.8g	Agar	15g
Potassium chloride	0.55g	Glycerol	5g
Sodium bicarbonate	0.16g	pH	8.1
Potassium bromide	0.08g	Sea water	1000 ml
Agar	15.9g		
Strontium chloride	34.0mg		
Boric acid	22.0mg		
Sodium silicate	4mg		
Sodium fluoride	2.4mg		
Ammonium nitrate	1.6mg		
Disodium phosphate	8mg		
pH	7.0		
Sea water	1000ml		

Table 4. Composition of Medium.

ISP Medium 2 (per liter)		ISP Medium 4 (per liter)	
Yeast extract	4g	Soluble starch	10g
Malt extract	10g	Dipotassium phosphate	1g
Dextrose	4.0g	Magnesium sulfate USP	1g
Agar	20.0g	Sodium chloride	1g
pH	7.2	Ammonium sulfate	2g
Sea water	1000ml	Calcium carbonate	2g
		Agar	20g
		Ferrous sulfate	1.0mg
		Manganous chloride	1.0mg
		Zinc sulfate	1.0mg
		pH	7.2
		Sea water	1000ml

2. 분리 균의 생리학적 특성조사

2-1. 그람 염색, 산화환원 효소 시험

항균활성에 최종적으로 분리된 방선균은 그람양성과 음성의 판단을 위해 Buck(1982)의 방법으로 염색약을 사용하지 않고 3% KOH 시약을 사용하여 측정하였다. 대조균주로 그람양성인 *Bacillus subtilis* IAM 12188^T와 그람음성인 *E. coli* KCTC 1116을 이용하였으며, 산화효소 활성은 Bactident-Oxidase test strips(Merck)을 이용하여 측정하였다. 대조균주로는 양성균은 *Pseudomonas aeruginosa* KCTC 1750^T를 음성균은 *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.

2-2. 성장 온도 및 염분 실험

실험균주의 성장 온도의 범위를 알아보기 위해서 (15, 20, 25, 30, 35, 40°C) Marine agar(MA, 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 3.0g, peptone 5.0g) 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.

3. 분리 균의 생화학적 특성

분리균주의 생화학적 특성을 확인하기 위해서 카제인, 전분, 우레아제의 가수분해능을 조사하였으며, 나이트레이트 환원능을 확인하였다.

3-1. 카제인 가수분해 시험

실험 균주들의 단백질 가수분해능을 조사하는 방법중에 하나로서 Skim milk에 함유된 락토오스가 발효되면서 생성된 산에 의해서 카제인 분해가 저해 될수 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).

Table 5. Composition of casein hydrolysis test medium.

Nutrient agar	23g
Skim milk	50g
Sea water	1000ml

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

3-2. 전분 가수분해 시험

많은 세균들은 전분을 분해할 수 있으며, 이러한 방법을 이용한 실험은 광범위하게 이용되어지고 있다. 전분분자는 크게 아밀로스과 아밀로펙틴으로 구성되어져 있다. 세균이 전분을 가수분해 시키기 위해서는 아밀라제가 필요하며, 아밀라제는 엿당, 포도당, 그리고 덱스트린을 만들어낸다. 전분 배지에 균주를 접종하고 4일 동안 배양 한 후, 그람 요오드를 소량 적하 하였을 때 생성되는 투명환의 유무로 판단한다. 투명환이 생성되면 양성으로 판명한다(Table. 6).

Table 6. Composition of Starch hydrolysis test medium.

Peptone	5g
Yeast extract	3g
Soluble starch	2g
Agar	15g
Adjust to pH	7.0
Sea water	1000ml

3-3. 우레아제 가수분해 시험

우레아제 분해능이 있는 세균의 검정법으로 우레아제가 분해되어 생성되는 암모니아를 지시약으로 검출하는 방법이다. 우레아제는 기질에 의하여 유도되는 효소가 아니며, 특히 이 방법은 우레아를 빨리 분해하는 Genus *Proteus*의 동정법으로 중요하게 이용되는 방법이다. Christensen 배지에 균을 접종하고, 37°C에서 24시간 배양한 후 배지색의 변화를 관찰한다. Urea가 분해되어 암모니아가 생성되면 노란색의 배지가 분홍색으로 변한다(Table. 7).

Table 7. Composition of urease hydrolysis test medium.

Peptone	1g
Glucose	1g
Sodium chloride	5g
Monopotassium phosphate	2g
Phenol red	0.012g
Agar	20g
Yeast extract	0.1g
Adjust to pH	6.8~6.9
Sea water	1000ml

3-4. 질산염 환원효소 시험

세균에 의해서 일어나는 질산염의 환원과정은 질산염이 질산염과 암모니아를 거쳐 아미노산 또는 질소질의 세포 구성물질로 합성되는 과정과, 혐기 조건하에서 질산염을 산소 대신 최종전자수용체로 이용하는 무기호흡의 두 가지로 나눌 수 있다. 본 실험에서는 질산칼륨 배지에서 질산칼륨을 환원하여 질산염 또는 질산가스로 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 10방울 떨어뜨린 후, 1~2 분내에 분홍색 또는 진한 적색으로 나타났을 시 양성으로 간주하며 Durham tube에 기체 포집 시 질산가스 또는 수소가스로 판단할 수 있다(Table. 8).

Table 8. Composition of nitrate broth.

Peptone	10g
Sodium nitrate	1g
Adjust to pH	7.2
Sea water	1000ml

3-5. Tween 40 및 Tween 80 가수분해 실험

Tween 40 및 Tween 80의 가수분해 실험은 지질분해효소인 lipase에 의한 지질 분해능을 관찰하는 것이다. Tween 40, 80이 함유된 한천배지(heart infusion agar)에 균을 접종하고 30℃에서 24시간 배양한 후 colony 주위에 혼탁환(opaquehalo)이 나타나는데 이것을 Tween 40, Tween 80이 가수분해 된 것으로 판단한다.

4. 항균물질 생산균주의 분리

본 실험에 사용한 방선균의 항생물질 생산을 위한 배지로는 G·S·S medium을 기본으로 실험 하였다(Table. 9).

Table 9. Composition of Medium.

G·S·S medium	
Souble starch	10g
Glucose	20g
Soybean meal	25g
Beef extract	1g
Yeast extract	4g
NaCl	2g
K ₂ HPO ₄	0.25g
CaCO ₃	2g
D·W	1,000ml
pH	7.2

4-1. 인체질병 유발 항생제 내성 병원균 선별

본 실험에 사용한 인체에 질병을 야기하는 항생제에 내성을 띄는 균주는 (Table. 10)와 같이 *Staphylococcus aureus* CCARM 0201, *Proteus rettgeri* CCARM 0263, *Bacillus anthraxis* CCARM 0217, *Pseudomonas aeruginosa* CCARM 0225, *Enterobacter cloacae* CCARM 0253, *Klebsiella pneumoniae* CCARM 10258, *Burkholderia cepacia* (*P. cepacia*) CCARM 0226, *Streptococcus faecium* CCARM 0210, *Micrococcus luteus* CCARM 0022, *Streptococcus agalactiae* CCARM 4502 을 항생제 내성균주 은행으로부터 분양 받아 사용하였다. 각각의 피검균은 121℃, 15분간 멸균된 최적의 배지에 1백금이 접종하여 37℃ Shaking incubator에서 배양 후 0.5 McFarland 표준 탁도 (1.5×10^8 cfu/ml)로 실험에 사용하였다. 분리된 방선균의 항균 물질 생산을 알아보기 위해 Mueller Hinton broth(Difco)를 사용하여 유해미생물의 각 배양온도에서 24시간 배양 후 Mueller Hinton broth(Difco) 위에 멸균 면봉으로 도말한 후, 직경 6mm의 cork borer를 이용하여 배지에 well을 만들고 분리균주의 상등액을 40 μ l 적하하여 각 배양온도에서 24시간 배양한 후 투명환을 측정하여 항균 활성을 측정 하여 항균 물질 생산 균주를 선별하였다.

Table 10. List of strains and growth conditions used for antibacterial experiments.

Strain	Growth conditions
<i>Staphylococcus aureus</i> (CCARM 0201)	BHIA & NA (37℃)
<i>Proteus rettgeri</i> (CCARM 0263)	BHIA & NA (37℃)
<i>Bacillus anthraxis</i> (CCARM 0217)	BHIA & NA (37℃)
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> (CCARM 0225)	BHIA & NA (37℃)
<i>Enterobacter cloacae</i> (CCARM 0253)	BHIA & NA (37℃)
<i>Klebsiella pneumoniae</i> (CCARM 10258)	LB & Mac & NA (37℃)
<i>Burkholderia cepacia</i> (CCARM 0226)	BHIA & NA (37℃)
<i>Streptococcus faecium</i> (CCARM 0210)	BHIA & NA (37℃)
<i>Micrococcus luteus</i> (CCARM 0022)	BHIA & NA (30℃)
<i>Streptococcus agalactiae</i> (CCARM 4502)	Todd-hewitt broth & Trpticase soy agar with 5% sheep blood (37℃, 5%CO ₂)

5. 항균물질 생산 균주의 API 50 CHB 시험

분리된 방선균주를 동정하기 위하여 50여종의 당 이용성을 알아보기 위해 API 50 CHB kit (Bio Merieux, France)를 사용하여 당 이용도를 조사 하였다.

6. 항균물질 생산 균주의 16S rRNA 염기서열 분석

16S ribosomal RNA 분석은 Gnomix DNA Extraction kit (Bioneer, Korea)를 사용하여 Chromosomal DNA를 분리한 후, Bacterial 16S rDNA universal primer를 이용하여 16S rDNA를 증폭시켰다. 합성된 oligonucleotides의 각각의 primer는 forward primer(27F) : 5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3' reverse primer(1492R) : 5'-GGTTACCTTGTTACGACTT-3'의 염기서열로 구성되었으며, 각각의 0.5 μ M primer, 200 μ M deoxynucleoside triphosphate, Taq DNA polymerase(Bioneer, Korea) 3 μ l를 사용하여 PCR을 수행하였다.

PCR 반응조건은 94 $^{\circ}$ C에서 5분 predenaturation, 30cycle 동안 94 $^{\circ}$ C에서 45초 denaturation, 50 $^{\circ}$ C에서 45초 annealing, 72 $^{\circ}$ C에서 45초간 extention하였으며, 다시 72 $^{\circ}$ C에서 5분간 extention하였다. 증폭된 PCR product는 ethidium bromide가 첨가된 상태에서 전기영동하여 1% agarose (Agarose LE, promega CO.) gel에서 확인하였다. 이후, AccuprepTM PCR purification kit (Bioneer, Korea)을 이용하여 PCR product에 남아있는 primers, nucleotides, polymerase, salts를 제거하여 정제하고 30 μ l에 elution buffer (10 mM Tris-Cl, pH 8.5)로 DNA를 elution하였다. 이를 ABI prismTM BigdyeTM terminator cycle sequencing Ready reaction kit V.3.1 (Fluorescent dye terminators method)와 ABI 3730XL capillary DNA sequencer를 사용하여 PCR product의 염기서열을 분석하였다.

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 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 을 이용하여 Neighbor-joining(Saitou and Nei, 1987) 방법에 의해 Bootstrap 분석 시 1000 회의 resampling을 적용하여 tree topology의 평가 기준으로 사용하여 계통수를 작성하였으며, 염기서열 간 유전적 거리는 Jukes & Cantor(Jukes and Cantor, 1969) 모델을 이용하여 계산하였다.

8. 분리균주의 최적배양조건

미생물의 최적 배지성분의 검토는 glucose 0.5%, yeast extract 0.1%, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.02% 배지를 함유한 GY배지를 사용하였으며, 항균물질의 생산을 측정하였다. 항균물질의 측정은 agar spotted method을 실시하였다. 대조균은 *Streptococcus faecium* CCARM 0210 균주에 대한 항균 활성을 측정 하였다.

8-1. 분리균주의 온도, pH에 대한 생육 및 항균활성 측정

분리균주의 온도에 의한 배양액의 항산화 활성에 대한 영향을 알아보기 위해 다양한 온도조건 15, 20, 25, 30, 35, 40°C에서 50 ml MB가 들어있는 250 ml 삼각플라스크에 균주를 접종하여 10일 동안 배양하였으며, 분리균주의 pH에 대한 생육도를 알아보기 위해 pH 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9에서 기본배지로 MB를 사용하면서 배양되었다. 분리 방선균의 생육특성을 확인하기 위하여 배양 균사체의 건조중량을 측정하였고, 항균물질의 측정은 agar spotted method을 실시하였다.

8-2. 탄소원 종류에 따른 균주의 생육 및 항균활성 측정

배지조건의 최적화 과정에서 탄소원의 종류에 따른 균주의 생육특성을 균체 건조중량을 이용하여 측정하였으며, 균주 배양은 기본배지인 GY배지를 기본 배지로 하여 D-만노오스, 전분, 자당, D-과당, 젓당, 소르비톨, 라피노오스, 포도당을 각각 1% (w/v)로 첨가하여 25°C에서 10일간 배양한 후, 원심분리를 통한 균사체를 확보하고 건조중량을 측정하면서 생육도 측정하였고, 항균물질의 측정은 agar spotted method을 실시하였다.

8-3. 질소원 종류에 따른 균주의 생육 및 항균활성 측정

분리균주의 질소원 종류에 따른 생육특성을 균체 건조중량을 이용하여 측정하였으며, 균주 배양은 기본배지인 GY배지에 최적탄소원인 Galactose를 1% 농도로 첨가한 후 펩톤, 효모추출물, 트립톤, 맥아추출물, 질산암모늄, 염화암모늄, 황산암모늄, 질산 칼륨을 각각 1% (w/v)의 농도로 각각 첨가하였으며, 25°C에서 10일간 배양한 후, 균체의 건조중량을 측정하여 생육특성을 확인하였고, 항균물질의 측정은 agar spotted method을 실시하였다.

9. 양식어류 질병 유래 항생제 내성 *Streptococcus parauberis* 선별

균주 분리는 제주도내 넙치 양식장 중에서 질병발생이 보고된 양식장의 넙치에 대하여 체색흑화, 피부궤양, 지느러미 출혈, 안구 돌출 및 탈장 등 외부소견 상 연쇄구균에 감염된 것으로 추정되는 병어(data not shown)을 무균 적으로 해부하여 간 또는 신장 조직을 1.5% NaCl이 첨가된 Brain Heart Infusion Agar(BD, USA)에 도말하여 25±1°C, 24~48시간 배양하였다.

배양된 세균은 16S rRNA 염기서열 분석을 수행하여 *Streptococcus parauberis* 를 분리 하였으며, 항생제 내성을 알아보기 위해 Baucer *et al.*(1996)의 disc 확산 법을 이용하여 NCCLS(National Committee for Clinical Laboratory Standards)의 기준에 따라 항생제 감수성 시험을 하였다.

1.5% NaCl이 첨가된 Mueller Hinton Agar(BD, USA)에 도말 한 후 Oxoid 사의 항생제 disc 중, amoxycillin (10 μ g), ampicillin (10 μ g), ciprofloxacin (5 μ g), gentamicin (10 μ g), doxycycline(30 μ g), erythromycin (15 μ g), flofenicol (30 μ g), neomycin (10 μ g), nalidixic acid (30 μ g), oxolinic acid (2 μ g), oxytetracycline (30 μ g), penicillin G (10unit), tetracycline (30 μ g), Flumequine (30 μ g)을 처리한 총 14 개의 디스크를 사용하여, 분리된 연쇄구균의 항생제 감수성 시험에 사용 하였으며, 항생제 디스크에 대한 감수성 판단기준은 (Table. 11)에 제시하였다.

Table 11. Criteria for determination of antibiotics sensitivity by inhibition zone based on paper disc method.

Antibiotics	Concentrations (μ g)	Diameter of inhibition zone (mm)		
		Resistant	Weakly sensitive	Sensitive
Amoxycillin (AML)	10	≤ 13	14~17	18 \geq
Ampicillin (AMP)	10	≤ 13	14~16	17 \geq
Ciprofloxacin (CIP)	5	≤ 15	16~20	21 \geq
Gentamicin (GN)	10	≤ 12	13~14	15 \geq
Doxycycline (DO)	30	≤ 12	13~15	16 \geq
Erythromycin (E)	15	≤ 13	14~22	23 \geq
Flofenicol (FFL)	30	≤ 12	13~17	18 \geq
Neomycin (N)	10	≤ 12	13~16	17 \geq
Nalidixic acid (NA)	30	≤ 13	14~18	19 \geq
Oxolinic acid (OA)	2	≤ 9	10~11	12 \geq
Oxytetracycline (OTC)	30	≤ 14	15~18	19 \geq
penicillin G (P)	10unit	≤ 19	20~27	28 \geq
Tetracycline (TE)	30	≤ 14	15~18	19 \geq
Flumequine (UB)	30	≤ 15	16~20	21 \geq

10. 분리 균의 항균물질의 추출 및 항생제 내성균의 최소 억제 농도 측정

15-1. 항균물질의 추출

항생물질의 추출은 G·S·S Medium에서 균주를 배양한 후 80% 메탄올을 이용한 유기용매 추출을 통하여 배양액으로부터 항균물질을 추출하였다. 먼저 배양액을 원심 분리(12,000 rpm, 4°C, 25 min)하여 균체를 제거한 다음, 상등액과 용매를 넣어 추출, 여과한 후 농축기를 이용하여 감압상태에서 용매를 제거하였다. 용매가 제거된 플라스크에 100% 메탄올을 서서히 가하여 용출시키고 활성부분을 모아 농축기를 이용, 감압 농축하여 용매를 제거 한 후, 각 추출물의 농도를 측정하였다. 농도가 측정된 추출물을 50 또는 10 mg/ml 농도로 희석하여 agar spot method를 이용하여 항균활성을 측정하였다.

15-2. 최소저지농도(MIC) 측정

최소억제농도(MIC)는 높은 활성을 보였던 균주를 대상으로 Microtitre plate assay를 통하여 확인하였다. MIC 측정은 microtitre plate에 각각의 피검균에 따른 배지를 100 μ l씩 채운 후 제공된 배양액과 활성이 높았던 추출액, 분획물을 2배 희석법으로 희석 혼합한 후, McFaland No. 0.5농도의 피검균의 현탁액을 2 μ l씩 접종하여 24~48시간 배양한다. 이에 660nm의 흡광도 값을 통해 MIC 및 억제정도를 가늠하였으며, 각 희석단을 plate에 접종하여 피검균의 생육유무를 통해 MIC를 확정하였다.

11. 농도별 항산화활성 측정

방선균 배양액 메탄올 추출물 항산화활성이 높게 나타난 실험구에 대해서 농도별 항산화활성을 측정하였다. 항산화활성 측정은 ESR (Electron Spin Resonance) spectrometer를 이용하여 측정하였다.

11-1. DPPH radical 소거활성

각 샘플의 DPPH free radical 소거활성은 Nanjo 등의 방법에 의하여 측정하였다. 60 μ l 시료용액에 DPPH (60 μ M) 용액을 첨가하여 10초 동안 교반한 다음 혼합용액을 quartz capillary tube에 옮긴 후 2분 후에 ESR Spectrometer로 측정하였다. ESR 측정에 대한 조건은 (Table. 12)에 나타내었다. 스펙트럼은 scan time : 30s, field : 336 \pm 5 mT, time constant : 0.3s, power : 5 mW, amplitude : 1 \times 500의 조건으로 기록하였다. 항산화시료에 대한 DPPH radical의 소거활성은 아래의 식을 이용하여 계산하였다.

$$\text{DPPH free radical scavenging activity (\%)} = [1 - (\text{ESR signal intensity for medium containing the additives of concern} / \text{ESR signal intensity for the control medium})] \times 100$$

11-2. Hydroxyl radical 소거활성

Sample의 Hydroxyl radical 소거활성은 Rosen (1984)등의 방법에 의하여 측정하였다. 20 μ l 시료용액에 0.3M DMPO 20 μ l, 10mM FeSO₄ 20 μ l, 10mM H₂O₂ 20 μ l을 혼합한 다음 quartz capillary tube에 옮긴 후 2.5분 후에 ESR Spectrometer로 측정하였다. 스펙트럼은 scan time : 30s, field : 336 \pm 5 mT, time constant : 0.3s, power : 1 mW, amplitude : 1 \times 100의 조건으로 기록하였다. 항산화시료에 대한 Hydroxyl radical의 소거활성은 아래의 식을 이용하여 계산하였다.

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

11-3. Alkyl radical 소거활성

각 추출물의 Alkyl radical 소거활성은 Hiramoto (1993)의 방법에 의하여 측정하였다. 20 μ l의 시료용액에 D.W 20 μ l, 40mM AAPH 20 μ l, 40mM POBN 20 μ l를 혼합한 다음 37°C에서 30분 방치 후 quartz capillary tube에 옮긴 후 ESR로 측정하였다. 스펙트럼은 scan time : 30s, field : 336 \pm 5 mT, time constant : 0.3s, power : 7 mW, amplitude : 1 \times 100의 조건으로 기록하였다. 항산화시료에 대한 Alkyl radical의 소거활성은 아래의 식을 이용하여 계산하였다.

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

Table 12. 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

Ⅲ. 결과 및 고찰

1. 방선균 분리

해양 방선균 분리를 위해 채집된 해양 지질은 제주도 연안에서 채집하여, 60℃에서 건조 시킨 후 다른 미생물의 선별을 위해 85℃ 건조 오븐에서 1시간 동안 처리 하였다. 배지 상에서의 방선균의 배양특성을 보이는 균주 총 43 균주를 분리하였으며, 분리된 방선균의 형태학적 성상을 확인하였다.

2. 분리 균의 배양학적 특성

제주도 연안의 해양지질에서 분리된 미생물 중 해양유래 방선균주 총 43 균주를 분리하였는데 분리된 균주들의 MA 배지상에서 배양학적 특성을 확인해본 결과 기중균사 색상은 크림색, 노랑색, 하얀색, 회색, 녹색, 분홍색등으로 확인 하였으며, 기질균사 색상은 빨강색, 보라색, 자주색, 노랑색, 주황색, 분홍색, 녹색, 갈색등의 색을 나타내었다.(Fig. 2~3). 이러한 균사체의 색상 등은 일반적으로 보고되고 있는 육상 방선균의 균사체와의 비교 해본 결과 해양유래 방선균들의 균사체의 색이 다양한 것을 확인할 수 있었다. 대부분의 균주들이 배양 3일 이상부터 색소들을 생산하는 양상을 확인할 수 있었다. 일반적으로 미생물의 생산하는 색소에는 많은 종류의 생리활성물질들을 함유하고 있는 것으로 보고되어지고 있으며, 또한 유용한 성분들 역시 색소와도 많은 연관이 있다고 알려져 지고 있다. 또한 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(종)과 초기 생육 배지내에 염분(>1%)이 있어야만 성장이 가능한 호염성 미생물(종)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. 13~14).



Fig. 2. Substrate mycelia cultural characteristics of isolate strain HK-A01~HK-A44. Cell were grown on MA at 25°C for 10days.



Fig. 3. Aerial mycelia cultural characteristics of isolate strain HK-A01~HK-A44. Cell were grown on MA at 25°C for 10days.

Table 13. The culture characteristics of Actinomycetes.

Strain No.	Aerial mycelium	Substrate mycelium	Soluble Color	Growth at	
				NaCl(%)	Temp.(°C)
HK-A01	White	Orange to red	Red	0~8	10~35
HK-A02	White to pink	Dark pink	Yellow	0~9	10~35
HK-A03	Gray	Dark yellow	Beige	0~9	10~40
HK-A04	White to green	Dark yellow	Dark brown	0~7	4~40
HK-A05	White	Beige	Beige	0~7	4~40
HK-A06	Gray	Orange	Brown	0~9	25°C
HK-A07	Creamy	Red	Purple	0~9	10~35
HK-A08	Light pink	Dark orange	Dark brown	0~9	10~40
HK-A09	Gray	Orange	Light brown	0~6	4~35
HK-A10	White	Dark brown	Dark brown	2~12	10~35
HK-A11	White	Light yellow	Beige	0~10	10~40
HK-A12	Beige	Orange	Light green	0~9	10~40
HK-A13	Yellow	Dark green	Dark green	0~6	10~35
HK-A14	White	White	Pink to red	0~7	10~40
HK-A15	Creamy	Dark yellow	Dark beige	0~8	10~35
HK-A16	White to yellow	Violet	Violet	0~6	10~35
HK-A17	Yellow	Dark orange	Dark yellow	0~9	10~40
HK-A18	Creamy	Dark beige	Brown	0~8	10~35
HK-A19	Gray	Orange	Dark orange	0~8	10~40
HK-A20	Creamy	Dark orange	Beige	0~12	4~40
HK-A21	White to pink	Dark orange	Dark orange	0~12	10~40

Table 14. The culture characteristics of Actinomycete.

Strain No.	Aerial mycelium	Substrate mycelium	Soluble Color	Growth at	
				NaCl(%)	Temp.(°C)
HK-A22	Creamy	Yellow green	Dark green	0~10	10~40
HK-A23	White	Brown	Light beige	0~12	4~40
HK-A24	White to pink	Beige	Dark beige	0~7	4~40
HK-A25	Pink white	Beige	Light brown	0~12	10~40
HK-A26	White	Dark orange	Beige	0~12	10~40
HK-A27	Green	Dark brown	Colorless	0~12	4~40
HK-A29	Dark white	White pink	Creamy	0~12	10~40
HK-A30	White to green	Dark brown	Dark purple	0~8	4~40
HK-A31	White	Brown	Dark green	0~12	10~35
HK-A32	White	Brown to black	Dark blue	0~6	10~40
HK-A33	Pink white	Light brown	Light beige	0~10	4~40
HK-A34	White to pink	Orange	Dark purple	0~10	10~40
HK-A35	White	Orange	Dark purple	0~10	10~40
HK-A36	Creamy	White green	Light beige	0~10	4~25
HK-A37	Creamy	White green	Beige	0~12	10~40
HK-A38	White	Beige	Green	0~9	4~40
HK-A39	White green	Dark beige	Dark beige	0~7	10~40
HK-A40	Pink brown	Dark brown	Beige	0~6	10~40
HK-A41	Beige creamy	Light brown	Creamy	0~12	10~40
HK-A42	Creamy	White green	Beige	0~6	10~35
HK-A43	White to yellow	Light brown	Light beige	0~7	10~40
HK-A44	Creamy	Dark beige	Brown	0~8	4~40

3. 분리 균의 생리학적 및 생화학적 특성

분리균주를 대상으로 생화학적 특성을 다음과 같이 나타내었다(Table. 15~16).

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 카제인 단백질의 가수분해능을 확인 해본 결과 총 43 균주 중 양성 반응 (+, +/-, -/+)을 나타낸 균주가 34 종으로 확인되었다. 또한 전분 가수분해능 실험에서는 총 43 균주 중 29 균주에서 양성반응, 14 균주에서 음성반응을 보였으며, 이러한 결과는 양성반응을 보인 균주들은 아밀라제를 생산하는 것으로 사료되며, 고분자의 당성분을 엿당, 포도당 및 텍스트린과 같은 당을 생산한다는 것을 유추할 수 있다. 우레아제 가수분해능 실험에서는 시험균주 중 25 균주에서 양성반응을 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 26균주에서 양성반응을 확인할 수 있었다.

Table 15. General physiological characteristics of isolated marine actinomycetes.

Strain No.	Hydrolysis					Nitrate reductase
	Casein	Starch	Urea	Tween 40	Tween 80	
HK-A01	+	+/-	+/-	ND	ND	+
HK-A02	+	-	-	ND	ND	+
HK-A03	+	-	+	+	+	-
HK-A04	+/-	+	-	-	-	+
HK-A05	+/-	+	+	-	-	-
HK-A06	+	+	-	ND	-	+
HK-A07	+	-	-	+	+	+
HK-A08	+	+	+	+	-	-
HK-A09	+	+	-/+	ND	+	+
HK-A10	+	-	-	-	-	-
HK-A11	-	-	+	-	+	-
HK-A12	+	-	-	-	-	+
HK-A13	+	+	+	+	+/-	-
HK-A14	-	-	-	-	-	-
HK-A15	+/-	+	-/+	+	+/-	-
HK-A16	+/-	-	+	ND	+	+
HK-A17	-	-	+	+	-	+/-
HK-A18	+	+	-	-	ND	+/-
HK-A19	-	+	+	ND	-	-
HK-A20	-	-	+	-	-	-
HK-A21	+	+	+	+	-	+

Table 16. General physiological characteristics of isolated marine actinomycetes.

Strain No.	Hydrolysis					Nitrate reductase
	Casein	Starch	Urea	Tween 40	Tween 80	
HK-A22	+	+	-	-	+	+
HK-A23	+	+	-	-	-	+
HK-A24	+/-	-/+	+/-	+	-	-
HK-A25	+	-/+	-	-	+	+
HK-A26	+/-	+	+/-	-	-	-
HK-A27	+	+	-	ND	-	+
HK-A29	+	+	-	+	-	-
HK-A30	+	+	-	ND	ND	-
HK-A31	-	+/-	-	-	+	+
HK-A32	+	+	+	ND	ND	-/+
HK-A33	+/-	-	+	-/+	-/+	-/+
HK-A34	+	+	-/+	ND	-	+/-
HK-A35	-	-	-	-	+	+
HK-A36	-	+	-	+	-	+
HK-A37	+	-	+	ND	ND	+
HK-A38	+	-	-	-	-	+/-
HK-A39	-	+	+	+	-	-
HK-A40	+	+	-	+/-	+/-	+/-
HK-A41	-/+	+	+	-	-	+
HK-A42	+	-/+	+	+	+	-
HK-A43	+	+	+	+	-	-
HK-A44	+	+/-	+	-	-	+

+, Positive; -, Negative; ND, +/-, middle growth; -/+, little growth; not determined.

4. 항균물질 생산 균주의 분리

분리된 방선균 43균주 중 항균 활성 평가를 위해 인체에 식중독 및 질병을 야기하는 항생제에 내성을 띄는 균주 *Staphylococcus aureus* CCARM 0201, *Proteus rettgeri* CCARM 0263, *Bacillus anthraxis* CCARM 0217, *Pseudomonas aeruginosa* CCARM 0225, *Enterobacter cloacae* CCARM 0253, *Klebsiella pneumoniae* CCARM 10258, *Burkholderia cepacia* (*P. cepacia*) CCARM 0226, *Streptococcus faecium* CCARM 0210, *Micrococcus luteus* CCARM 0022, *Streptococcus agalactiae* CCARM 4502 총 10종에 대하여 항균활성 테스트를 실시하였다. 그 결과를 (Table. 17)에 나타내었다. 항균감수성 결과 *Staphylococcus aureus*는 HK-A01, HK-A01, HK-A22, HK-A41, HK-A43, HK-A44에서 항균 활성을 보였으며, HK-A01에서 가장 좋은 항균 활성을 보였다. *Bacillus anthraxis*는 HK-A04, HK-A12, HK-A13, HK-A22, HK-A27에서 활성을 나타내었다. *Pseudomonas aeruginosa*는 HK-A13, HK-A22, HK-A43, HK-A44에서 항균 활성을 확인할 수 있었다. 또한 *Streptococcus faecium*에 대한 항균활성에서는 HK-A22, HK-A41, HK-A43, HK-A44에서 좋은 항균활성을 나타내었으며, *Micrococcus luteus*에서는 HK-A21, HK-A22, HK-A25, HK-A39, HK-A41, HK-A42, HK-A43, HK-A44에서 항균활성이 나타났고, *Streptococcus agalactiae*에서는 HK-A01, HK-A13, HK-A22, HK-A37에서 항균활성을 나타내는 것을 확인할 수 있었다.

이러한 결과들을 바탕으로 차후 인체질병유발세균 대한 대체 항생제의 자원으로써 응용이 가능할 것으로 사료되어진다. 43종의 배양액의 항균 활성을 확인해 측정해 본 결과 항균활성에서 HK-A01, HK-A04, HK-A12, HK-A13, HK-A21, HK-A22, HK-A25, HK-A27, HK-A37, HK-A39, HK-A41, HK-A42, HK-A43, HK-A44에서 병원성 세균에 대한 항균활성이 나타났으며, 최종적으로 높은 항균 활성과 항균 범위가 넓은 HK-A13, HK-A43, HK-A44을 선정하여 다음 실험들을 진행하였다.

Table 17. Antibacterial activities of the liquid culture broth methnol extract of marine actinomycetes.

	0201	0263	0217	0225	0253	10258	0226	0210	0022	4502
HK-A01	28	-	-	-	-	-	-	-	-	30
HK-A02	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
HK-A03	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
HK-A04	-	-	8	-	-	-	-	-	-	-
HK-A05	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
HK-A06	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
HK-A07	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
HK-A08	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
HK-A09	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
HK-A10	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
HK-A11	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
HK-A12	-	-	12	-	-	-	-	-	-	-
HK-A13	13	-	12	17	-	-	-	-	-	15
HK-A14	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
HK-A15	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
HK-A16	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
HK-A17	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
HK-A18	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
HK-A19	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
HK-A20	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
HK-A21	-	-	-	-	-	-	-	-	9	-
HK-A22	12	-	12	12	-	-	-	10	8	11
HK-A23	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
HK-A24	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
HK-A25	-	-	-	-	-	-	-	-	10	-
HK-A26	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
HK-A27	-	-	7	-	-	-	-	-	-	-
HK-A29	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
HK-A30	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
HK-A31	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
HK-A32	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
HK-A33	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
HK-A34	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
HK-A35	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
HK-A36	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
HK-A37	-	-	-	-	-	-	-	-	-	7
HK-A38	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
HK-A39	-	-	-	-	-	-	-	-	14	-
HK-A40	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
HK-A41	8	-	-	-	-	-	-	12	9	-
HK-A42	-	-	-	-	-	-	-	-	13	-
HK-A43	9	-	-	8	-	-	-	12	9	-
HK-A44	13	-	-	10	-	-	-	14	15	-

Cells were grown on MHA plate for 24h at 30, 37°C after broth was absorbed into well (6 mm in diameter) and then the diameter (mm) of the growth inhibition zone was measured.

0201: *Staphylococcus aureus* CCARM 0201, 0263: *Proteus rettgeri* CCARM 0263, 0217: *Bacillus anthracis* CCARM 0217, 0225: *Pseudomonas aeruginosa* CCARM 0225, 0253: *Enterobacter cloacae* CCARM 0253, 10258: *Klebsiella pneumoniae* CCARM 10258, 0226: *Burkholderia cepacia* (P. cepacia) CCARM 0226, 0210: *Streptococcus faecium* CCARM 0210, 0022: *Micrococcus luteus* CCARM 0022, 4502: *Streptococcus agalactiae* CCARM 4502

5. 16S rRNA 계통 분석

해양 지질에서 분리된 방선균 총 43균주 중 최종적으로 선발된 HK-A13, HK-A43, HK-A44 균주의 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 1000회의 리샘플링을 적용하여 tree topology의 평가 기준으로 사용하여 계통수를 작성하였으며, 염기서열간 유전적 거리는 Jukes & Cantor 모델을 이용하여 계산하였다(Table. 18).

분리된 방선균의 16S rRNA 염기서열 분석을 통하여 계통 분류학적으로 어떤 division에 속하는지를 확인 하여 본 결과 해양 지질에서 분리된 방선균 3균주는 Gram positive bacteria(division)/ *Actinobacteria*(class)/ *Actinomycetales*(order)/ *Streptomycineae*(suborder)/ *Streptomycataceae*(family)/ *Streptomyces*(genus)에 속하였으며, HK-A13은 type strain인 *Streptomyces microflavus* (DQ442519)와 99.92%의 similarity를 보였으며, HK-A43 균주와 HK-A44균주는 type strain *Streptomyces flaveus* (AB184082)와 각각의 16S rRNA 염기서열의 similarity를 계산하였을 때 98.47, 99.77%로 나타났다(Fig. 4~5).

Table 18. Culturable marine actinomycetes identified on the basis of 16S rRNA sequence.

Strain No.	The closest species	Similarity (%)
HK-A13	<i>Streptomyces microflavus</i> (DQ442519)	99.92
HK-A43	<i>Streptomyces flaveus</i> (AB184082)	98.47
HK-A44	<i>Streptomyces flaveus</i> (AB184082)	99.77

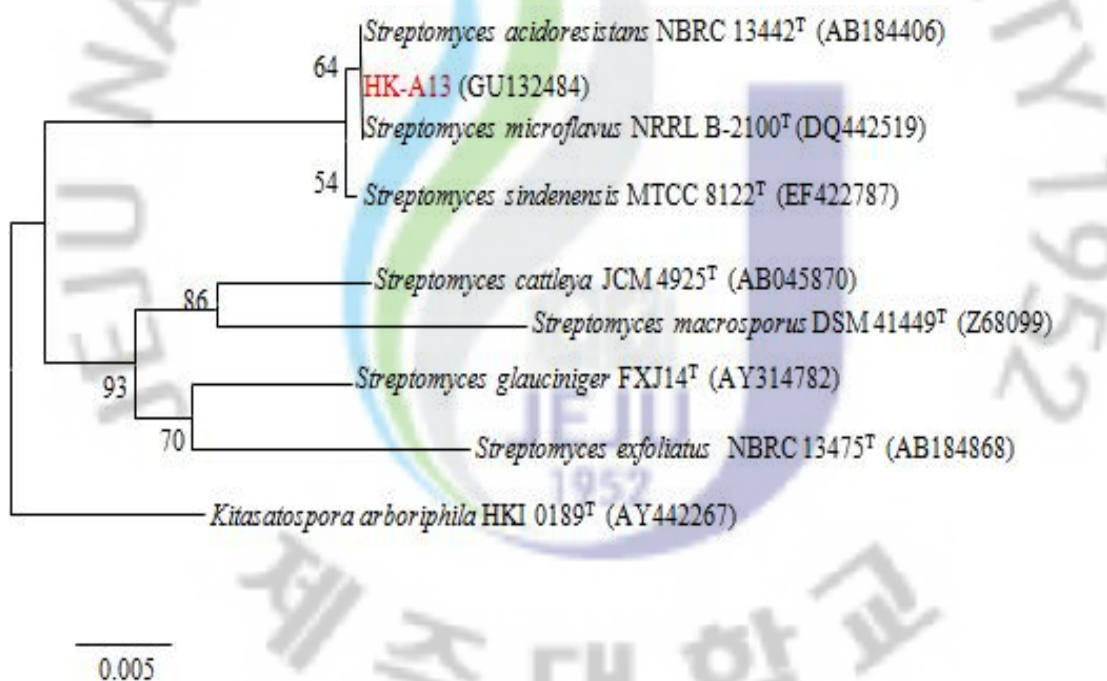


Fig. 4. Neighbor-joining tree of 16S rRNA sequence of HK-A13. The sequences were collected from 14 actinomycetes isolated in this study and representative species selected from Ribosomal Database.

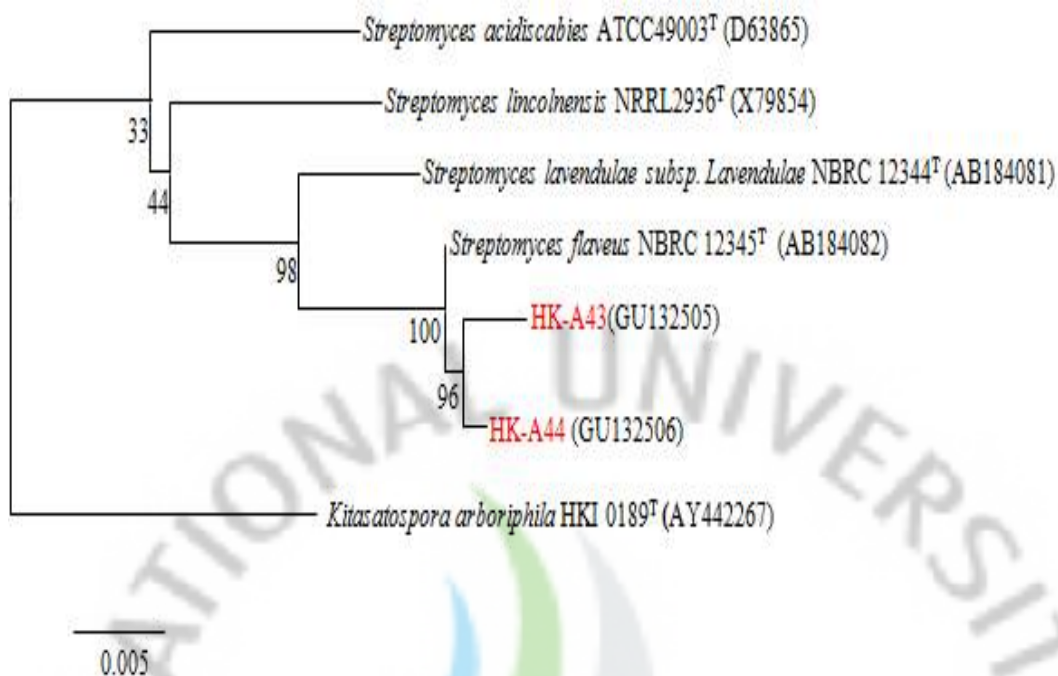


Fig. 5. Neighbor-joining tree of 16S rRNA sequence of HK-A43, HK-A44. The sequences were collected from 14 actinomycetes isolated in this study and representative species selected from Ribosomal Database.

6. 분리 방선균주의 API 50 CHB 시험

분리균주의 생리학적 특성을 검토한 결과는 미생물 동정용 kit인 API 50 CHB kit (Biomérieux, France)을 이용하여 실험한 후 그 결과를 판독 하였으며, (Table. 19~21)에 나타냈다. 실험한 결과 HK-A13 균주에서는 Erythritol, D-arabinose, Methyl-β D-xylopyranoside, L-sorbose, DULcitol, INOsitol, D-Sorbitol, Methyl-α D-glucopyranoside, Amygdalin, Salicin, D-lactose(bovine origin), D-Melibiose, D-saccharose(sucrose), Inulin, D-melezitose, D-raffinose, Xylitol, D-Turanose, D-lyxose, D-tagatose, L-arabitol, 2-Keto gluconate 23 가지의 당을 이용하지 못하였다. HK-A43 분리 균주의 결과 Erythritol, D-arabinose, Methyl-β D-xylopyranoside, L-sorbose, DULcitol, INOsitol, D-Sorbitol, Methyl-α D-glucopyranoside, Amygdalin, D-lactose(bovine origin), D-Melibiose, D-saccharose(sucrose), Inulin, D-melezitose,

D-raffinose, Xylitol, D-Turanose, D-lyxose, D-tagatose, L-arabitol, 2-Keto gluconate 21 가지의 당에서 음성이 나타났으며, HK-A44 균주에서는 2-Keto gluconate 1가지의 당에서만 음성을 나타내었다. 이 상의 실험결과로 분리 균주와 유사 상호 균주와의 동정에 추후 연구를 수행할 계획이다.

Table 19. The biochemical characteristics of strain HK-A13 by API 50 CHB test.

Carbohydrate source	HK-A13	Carbohydrate source	HK-A13
Glycerol	+/-	Salicin	-
Erythritol	-	D-celiobiose	+
D-arabinose	-	D-maltose	+/-
L-arabinose	+	D-lactose (bovine origin)	-
D-ribose	+/-	D-Melibiose	-
D-xylose	+/-	D-saccharose(sucrose)	-
L-xylose	+/-	D-TREhalose	+/-
D-adonitol	+/-	Inulin	-
Methyl-β D-xylopyranoside	-	D-melezitose	-
D-galactose	+/-	D-raffinose	-
D-glucose	+	Amidon(starch)	+
D-fructose	+	Glycogen	+
D-mannose	+	Xylitol	-
L-sorbose	-	Gentiobiose	+
L-rhamnose	+/-	D-Turanose	-
DULcitol	-	D-lyxose	-
INOsitol	-	D-tagatose	-
D-mannitol	+/-	D-Fucose	+
D-Sorbitol	-	L-Fucose	+/-
Methyl-α D-mannopyranoside	+/-	D-arabitol	+/-
Methyl-α D-glucopyranoside	-	L-arabitol	-
N-AcetylGlucosamine	+	Potassium Gluconate	+/-
Amygdalin	-	2-Keto gluconate	-
Arbutin	+/-	5-keto gluconate	+/-
Esiculin ferric citrate	+		

Table 20. The biochemical characteristics of strain HK-A43 by API 50 CHB test.

Carbohydrate source	HK-A43	Carbohydrate source	HK-A43
Glycerol	+	Salicin	+/-
Erythritol	-	D-celiobiose	+
D-arabinose	+/-	D-maltose	+/-
L-arabinose	+	D-lactose (bovine origin)	-
D-ribose	+	D-Melibiose	-
D-xylose	+/-	D-saccharose(sucrose)	-
L-xylose	-	D-TREhalose	+
D-adonitol	-	Inulin	-
Methyl-β D-xylopyranoside	-	D-melezitose	+/-
D-galactose	+/-	D-raffinose	-
D-glucose	+	Amidon(starch)	+
D-fructose	+/-	Glycogen	+
D-mannose	+	Xylitol	-
L-sorbose	-	Gentiobiose	+
L-rhamnose	+/-	D-Turanose	+
DULcitol	-	D-lyxose	+
INOsitol	-	D-tagatose	+
D-mannitol	+/-	D-Fucose	+
D-Sorbitol	-	L-Fucose	+
Methyl-α D-mannopyranoside	-	D-arabitol	+
Methyl-α D-glucopyranoside	-	L-arabitol	+
N-AcetylGlucosamine	+	Potassium Gluconate	-
Amygdalin	-	2-Keto gluconate	+/-
Arbutin	+/-	5-keto gluconate	+
Esiculin ferric citrate	+		

+ : positive, - : negative, +/- : middle

Table 21. The biochemical characteristics of strain HK-A44 By API 50 CHB test.

Carbohydrate source	HK-A44	Carbohydrate source	HK-A44
Glycerol	+/-	Salicin	+
Erythritol	+/-	D-celiobiose	+/-
D-arabinose	+/-	D-maltose	+
L-arabinose	+	D-lactose (bovine origin)	+/-
D-ribose	+	D-Melibiose	+/-
D-xylose	+	D-saccharose(sucrose)	+/-
L-xylose	+/-	D-TREhalose	+/-
D-adonitol	+/-	Inulin	+/-
Methyl- β D-xylopyranoside	+/-	D-melezitose	+/-
D-galactose	+/-	D-raffinose	+/-
D-glucose	+	Amidon(starch)	+/-
D-fructose	+	Glycogen	+
D-mannose	+	Xylitol	+/-
L-sorbose	+	Gentiobiose	+/-
L-rhamnose	+	D-Turanose	+
DULcitol	+/-	D-lyxose	+/-
INOsitol	+/-	D-tagatose	+/-
D-mannitol	+/-	D-Fucose	+/-
D-Sorbitol	+	L-Fucose	+/-
Methyl- α D-mannopyranoside	+/-	D-arabitol	+/-
Methyl- α D-glucopyranoside	+/-	L-arabitol	+/-
N-AcetylGlucosamine	+	Potassium Gluconate	+/-
Amygdalin	+	2-Keto gluconate	-
Arbutin	+	5-keto gluconate	+/-
Esiculin ferric citrate	+		

+ : positive, - : negative, +/- : middle

7. 분리균주의 최적배양조건

분리 균주의 최적 증식을 위하여 요구되는 영양원을 탄소원, 질소원으로 나누어서 균생육도를 측정하였다. 또한 최적 배양조건을 온도와 pH를 다르게 하여 균의 생육을 검토하였다. 온도와 pH에 대한 균의 생육을 나타내기 위한 배지로는 Marine broth (BD, USA)을 사용하였으며, 탄소원과 질소원의 최적 배지성분 검토는 포도당 0.5%, 효모 추출물 0.1%, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.02%를 함유한 GY배지를 사용하였고, 항균물질의 생산을 측정하였다. 항균물질의 측정은 agar spotted method을 실시하였다. 대조균은 *Streptococcus faecium* (CCARM 0210) 균주에 대한 항균 활성을 측정 하였다.

7-1. 분리균주의 온도에 대한 생육 및 항균활성 측정

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 항산화활성에 미치는 배양온도의 영향을 조사하기 위해서 15~40°C의 온도 범위에서 2주간 배양하여 측정하였다. 본 실험에 사용된 HK-A13균주의 경우 15°C이상의 온도에서 균체성장이 이루어졌으며, 모든 온도에서 큰 유의적인 차이는 나타나지 않았으며, 항균 활성 결과 15°C 을 제외한 모든 온도에서 항균 활성이 나타났다. HK-A43균주와 HK-A44균주의 결과 20~40°C의 온도에서 고르게 증식하였고, 항균 활성 또한 고르게 나타났다(Fig. 6~8). 이러한 결과는 해양 세균은 저온 미생물로서 20~30°C 부근에서 잘 성장하는 것으로 보고된 것과 일치하는 결과라고 사료된다.

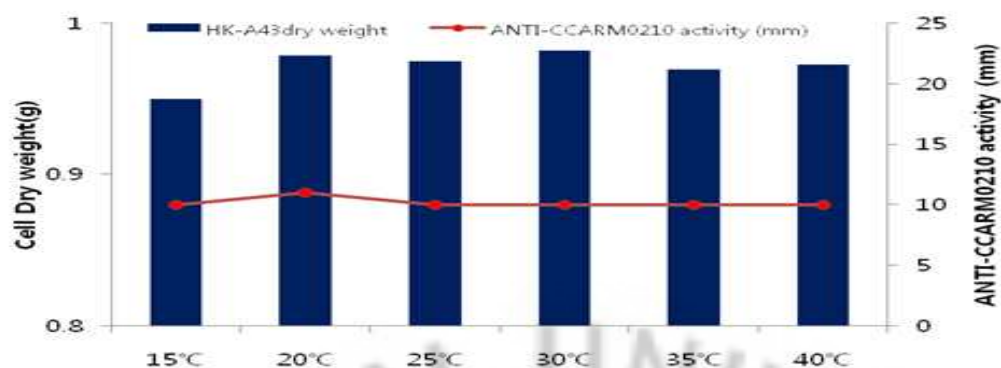


Fig. 6. Effect of various temperature on the growth and antibacterial activity of HK-A13 supernatant.

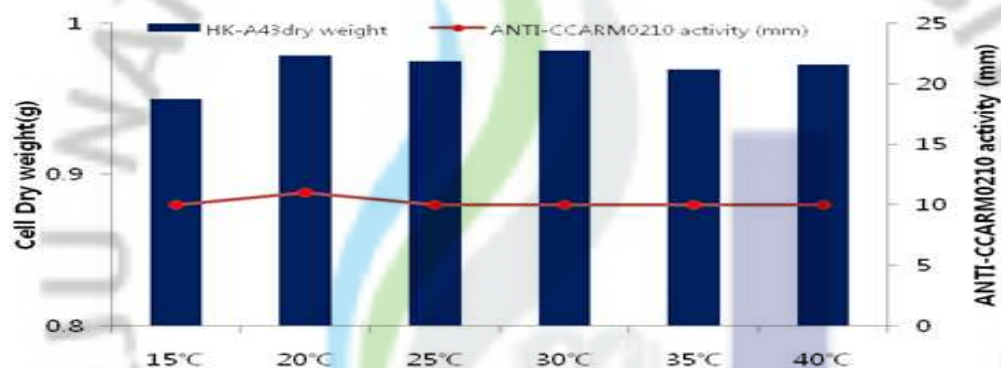


Fig. 7. Effect of various temperature on the growth and antibacterial activity of HK-A43 supernatant.

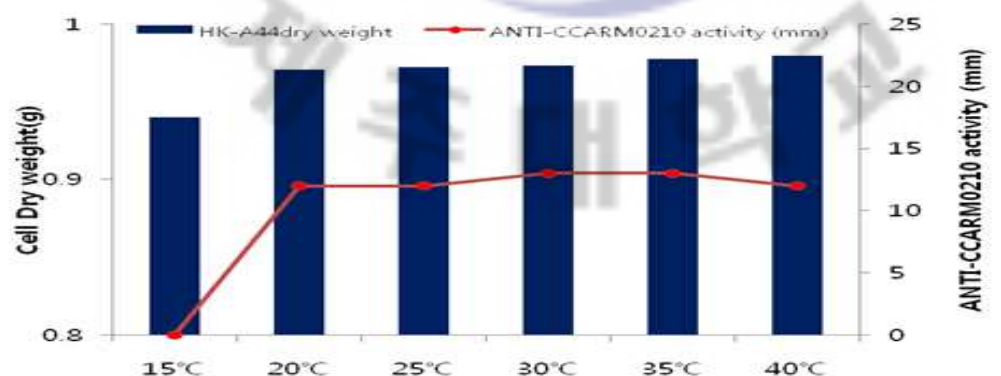


Fig. 8. Effect of various temperature on the growth and antibacterial activity of HK-A44 supernatant.

7-2. 분리균주의 pH에 대한 생육 및 항균활성 측정

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. 분리된 3균주의 최적 pH 조건을 확인 해 본 결과 6~7까지 범위 내에서 가장 좋은 균 생육도를 보였으며, pH가 높아짐에 따라 생합성량의 감소가 현저히 나타나는 것으로 확인되었다. 또한 항균활성 결과 HK-A13 와 HK-A43균주의 경우 pH 조건 7~8 범위에서 가장 높은 항균 활성 범위가 나타났고, HK-A44균주의 경우 높은 항균 활성이 나타나지 않았지만 마찬가지로 pH 7~8범위에 가장 높은 항균 활성이 나타났다 (Fig. 9~11). 이러한 결과는 해수의 pH의 범위와도 거의 일치하는 경향으로 pH 조건이 10 이상의 알칼리상태에서는 성장을 하지 못할 것으로 사료된다. 이러한 결과를 통해 pH가 높아질수록 미생물의 생리활성 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 과정에서 효소의 생산이 저해 된 것으로 추측해 볼 수 있다.

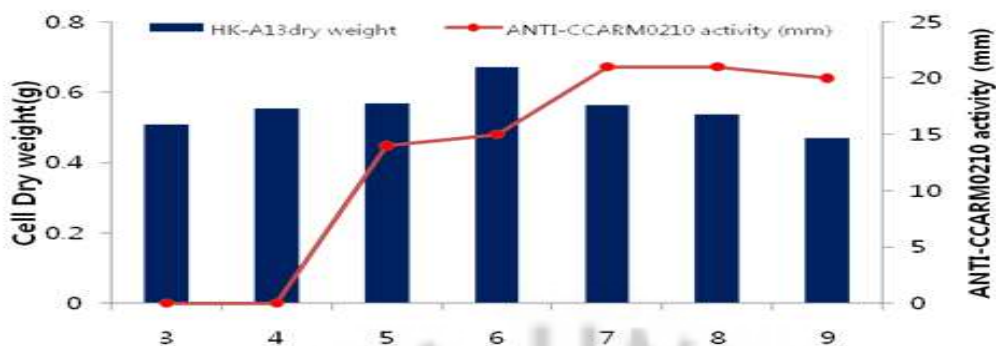


Fig. 9. Effect of various pH on the growth and antibacterial activity of HK-A13 supernatant.

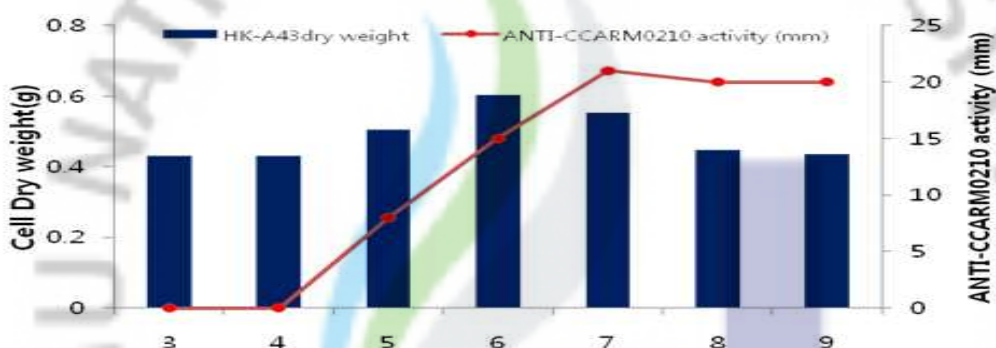


Fig. 10. Effect of various pH on the growth and antibacterial activity of HK-A43 supernatant.

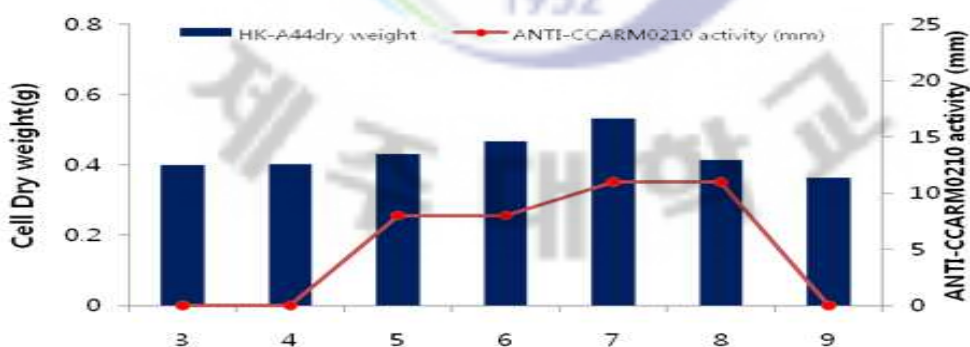


Fig. 11. Effect of various pH on the growth and antibacterial activity of HK-A44 supernatant.

7-3. 탄소원 종류에 따른 균주의 생육 및 항균활성 측정

분리균주의 배양배지 상에서의 최적 영양조건을 확인하기 위해 탄소원의 영향을 알아보았다. 기본배지로 GY를 사용하였으며, 총 8 종류의 탄소원을 각각 1%씩 첨가하여 균주를 접종한 후, 진탕 배양기에 2주간 배양하였다. 배양 후, 원심분리를 통하여 모아진 균체의 건조중량을 측정하여 균의 생육특성을 측정하였다. 그 결과 HK-A13 균주에서는 자당 첨가 시 가장 높게 나타났으며, 그 외의 7가지 탄소원에서는 비슷한 생육특성을 보였다. 항균활성 결과 자당, 젓당, 라피노스, 포도당 첨가 시 항균활성이 나타나는 것을 확인 할 수 있었다(Fig. 12). 또한 HK-A43, HK-A44 균주의 생육특성 실험 결과 8가지의 탄소원에 대해 크게 유의적인 차이는 보이지 않았으며, HK-A43균주의 결과(Fig. 13) 자당, 젓당, 포도당 첨가 시 항균활성이 나타났으며, HK-A44균주의 결과 젓당, 포도당 첨가 시 항균활성이 나타난 것을 확인 할 수 있었다(Fig. 14).

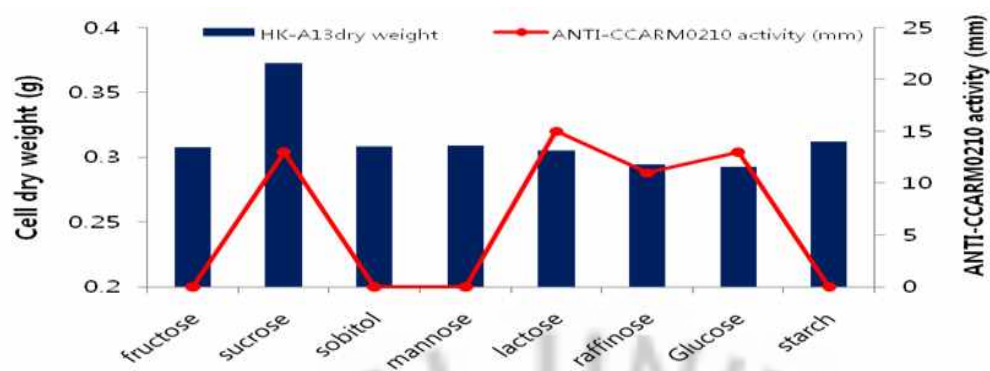


Fig. 12. Effect of various carbon sources on the growth and antibacterial activity of HK-A13 supernatant.

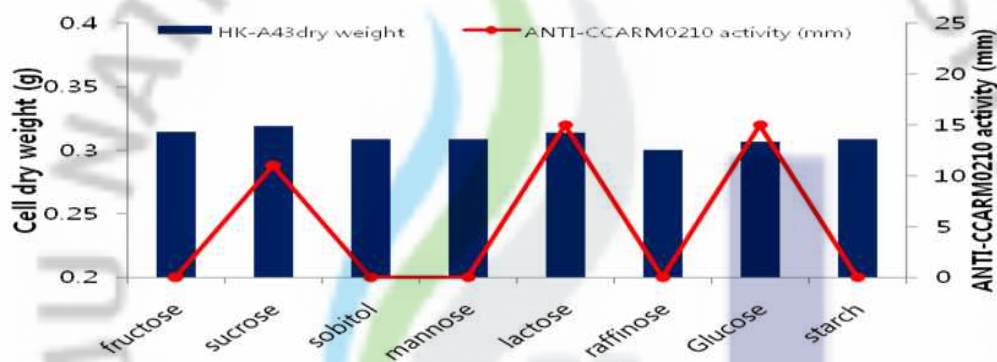


Fig. 13. Effect of various carbon sources on the growth and antibacterial activity of HK-A43 supernatant.

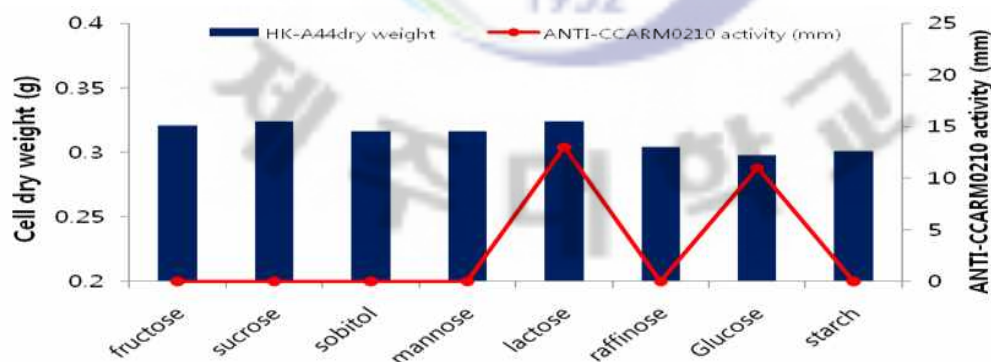


Fig. 14. Effect of various carbon sources on the growth and antibacterial activity of HK-A44 supernatant.

7-4. 질소원 종류에 따른 균주의 생육 및 항균활성 측정

분리균주의 배양배지 상에서 최적 질소원의 영향을 알아보기 위하여 기본배지로 GY배지를 사용하였으며, 8종류의 질소원을 각각 1%씩 첨가하여 균주를 접종한 후, 25°C 진탕 배양기에 2주간 배양하였다. 배양 후, 원심분리를 통하여 모아진 균체의 건조중량을 측정하여 균의 생육특성을 측정하였다. 그 결과 HK-A13균의 생육특성은 질산암모늄 첨가 실험구에서 가장 높은 건조중량을 확인 할 수 있었으며, 트립톤 첨가 실험구에서 가장 낮은 건조중량을 나타내었다. 항균 활성 결과 맥아추출물, 질산암모늄, 황산암모늄, 질산칼륨 첨가 시에 항균 활성이 나타났다(Fig. 15). HK-A43균주의 생육 시험 결과 염화암모늄과 맥아추출물 첨가 실험구에서 가장 높은 중량을 확인 하였으며, 효모추출물 첨가 실험구에서 가장 낮은 중량을 확인 하였지만 다른 질소원과 크게 차이가 나타나진 않았다. 항균 활성 결과 트립톤, 맥아추출물, 염화암모늄, 질산칼륨 첨가 시에 항균 활성이 나타났다(Fig. 16). HK-A44 균주의 생육 시험 결과 HK-A43 균주와 달리 효모추출물 첨가 실험구에서 가장 좋은 생육특성을 확인 하였으며, 펩톤 첨가 실험구에서 가장 낮은 생육특성을 확인 할 수 있었다. 항균 활성 결과 효모추출물, 맥아추출물, 염화암모늄, 질산칼륨 첨가 시에 항균 활성이 나타났다(Fig. 17).

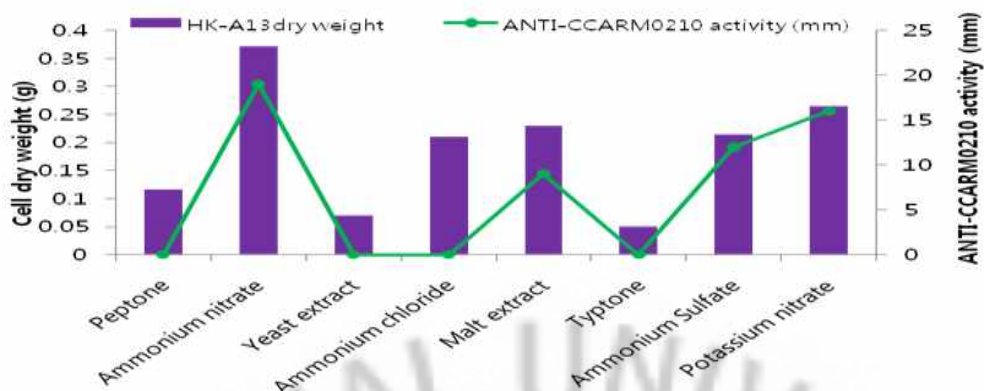


Fig. 15. Effect of various nitrogen sources on the growth and antibacterial activity of HK-A13 supernatant.

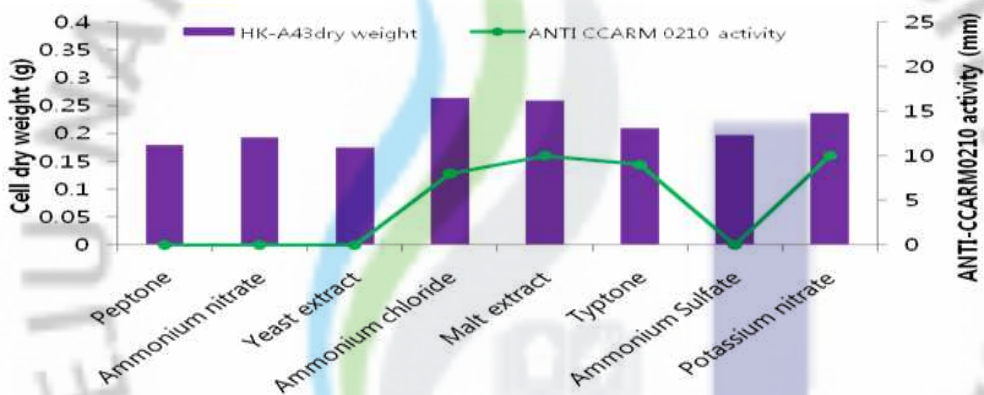


Fig. 16. Effect of various nitrogen sources on the growth and antibacterial activity of HK-A43 supernatant.

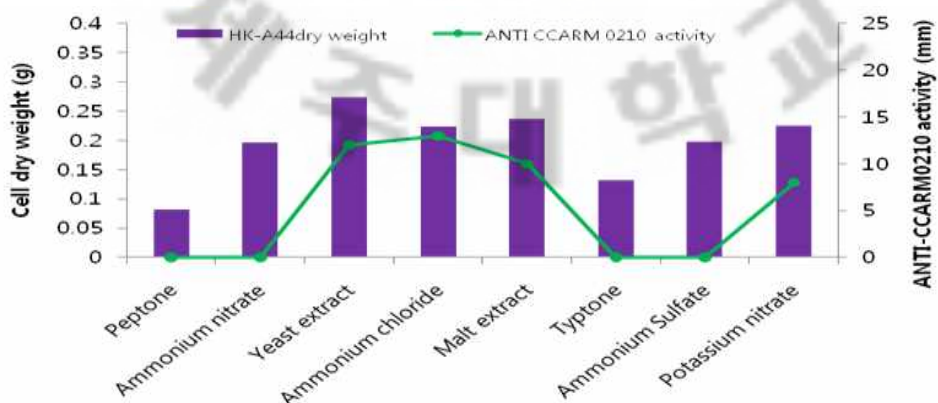


Fig. 17. Effect of various nitrogen sources on the growth and antibacterial activity of HK-A44 supernatant.

8. 양식어류 질병 유래 항생제 내성 *Streptococcus parauberis* 분리 및 항생제 내성 평가

폐사된 양식 넙치로부터 간과 신장에서 백금을 이용하여, 1.5% NaCl이 첨가된 Brain Heart Infusion Agar (BD, USA) 평판 배지에 25℃, 48시간 동안 배양 후, 순수 분리한 후 단일 콜로니의 형태, 크기, 색등 균주의 형태를 확인하고 16S rRNA 염기서열을 BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) search program을 이용하여 NCBI (National Center for Biotechnology Information)의 Genbank와 EMBL Nucleotide Sequence Database에서 유사한 염기서열을 비교 분석한 결과 *Streptococcus parauberis*와 99% 이상의 상동성이 나타났으며, 총 43종을 최종적으로 동정하여 본 실험에 사용하였다(Table. 22).

Table 22. 16S sequence analysis results of strain *Streptococcus parauberis*.

NO.	Accession NO.	Species	Identities
FPS-001	FJ009631.1	<i>Streptococcus parauberis</i> strainJJI51	100%
FPS-002	FJ009631.1	<i>Streptococcus parauberis</i> strainJJI51	100%
FPS-003	FJ009631.1	<i>Streptococcus parauberis</i> strainJJI51	100%
FPS-004	FJ009631.1	<i>Streptococcus parauberis</i> strainJJI51	100%
FPS-005	FJ009631.1	<i>Streptococcus parauberis</i> strainJJI51	99%
FPS-006	FJ009631.1	<i>Streptococcus parauberis</i> strainJJI51	99%
FPS-007	FJ009631.1	<i>Streptococcus parauberis</i> strainJJI51	99%
FPS-008	FJ009631.1	<i>Streptococcus parauberis</i> strainJJI51	100%
FPS-009	FJ009631.1	<i>Streptococcus parauberis</i> strainJJI51	99%
FPS-010	FJ009631.1	<i>Streptococcus parauberis</i> strainJJI51	100%
FPS-012	FJ009631.1	<i>Streptococcus parauberis</i> strainJJI51	100%
FPS-013	AY942570.1	<i>Streptococcus parauberis</i> strain349	100%
FPS-014	FJ009631.1	<i>Streptococcus parauberis</i> strainJJI51	100%
FPS-015	FJ009631.1	<i>Streptococcus parauberis</i> strainJJI51	99%
FPS-016	FJ009631.1	<i>Streptococcus parauberis</i> strainJJI51	100%
FPS-017	FJ009631.1	<i>Streptococcus parauberis</i> strainJJI51	99%
FPS-018	AY942570.1	<i>Streptococcus parauberis</i> strain349	100%
FPS-040	AY942570.1	<i>Streptococcus parauberis</i> strain349	99%
FPS-041	AY942570.1	<i>Streptococcus parauberis</i> strain349	99%
FPS-042	AY942570.1	<i>Streptococcus parauberis</i> strain349	99%
FPS-043	AY942570.1	<i>Streptococcus parauberis</i> strain349	99%
FPS-044	AY942570.1	<i>Streptococcus parauberis</i> strain349	99%
FPS-045	AY942570.1	<i>Streptococcus parauberis</i> strain349	99%
FPS-046	AY942570.1	<i>Streptococcus parauberis</i> strain349	99%
FPS-047	AY942570.1	<i>Streptococcus parauberis</i> strain349	99%
FPS-048	AY942570.1	<i>Streptococcus parauberis</i> strain349	99%
FPS-050	AY942570.1	<i>Streptococcus parauberis</i> strain349	100%
FPS-055	AY942570.1	<i>Streptococcus parauberis</i> strain349	100%
FPS-056	AY942570.1	<i>Streptococcus parauberis</i> strain349	99%
FPS-057	AY942570.1	<i>Streptococcus parauberis</i> strain349	99%
FPS-058	AY942570.1	<i>Streptococcus parauberis</i> strain349	99%
FPS-060	AY942570.1	<i>Streptococcus parauberis</i> strain349	99%
FPS-061	AY942570.1	<i>Streptococcus parauberis</i> strain349	99%
FPS-063	AY942570.1	<i>Streptococcus parauberis</i> strain349	99%
FPS-064	AY942570.1	<i>Streptococcus parauberis</i> strain349	99%
FPS-065	FJ009631.1	<i>Streptococcus parauberis</i> strainJJI51	100%
FPS-066	FJ009631.1	<i>Streptococcus parauberis</i> strainJJI51	100%
FPS-067	FJ009631.1	<i>Streptococcus parauberis</i> strainJJI51	100%
FPS-068	FJ009631.1	<i>Streptococcus parauberis</i> strainJJI51	99%
FPS-069	FJ009631.1	<i>Streptococcus parauberis</i> strainJJI51	99%
FPS-070	FJ009631.1	<i>Streptococcus parauberis</i> strainJJI51	100%
FPS-071	FJ009631.1	<i>Streptococcus parauberis</i> strainJJI51	100%
FPS-072	AY942570.1	<i>Streptococcus parauberis</i> strain349	99%

항생제 감수성 시험에 사용된 균주는 *Streptococcus parauberis*로 분리된 균주중 43종을 시험한 결과를 (Table. 23)에 나타내었고 시험한 결과를 백분율로 계산하여 비교해본 결과 Neomycin, Nalidixic acid, Oxolinic acid, Flumequine에 대해 100%의 내성을 나타내었으며, Gentamicin에서는 55.8% Oxytetracycline과 Tetracycline에서 27.9% Erythromycin에서 18.6% Doxycycline에서 4.7% Ciprofloxacin, penicillin G에서 각각 2.3%의 내성을 나타냈다. Amoxycillin, Flofenico에서 100% 감수성을 나타내었으며, Ampicillin, Ciprofloxacin, penicillin G에서 97.7% 의 감수성을 나타내었고, Doxycycline에서 76.7%, Erythromycin에서 74.7%, Oxytetracycline과 Tetracycline에서 72.1%, Gentamicin에서 39.5%의 항생제에 대한 감수성을 나타내는 것을 확인하였다(Fig. 18~19).

Table 23. Antibiotics sensivity of *Streptococcus parauberis* based on paper disc method

Antibiotics	<i>Streptococcus parauberis</i> (43)		
	Resistant	Weakly sensitive	Sensitive
Amoxycillin (AML)	0	0	43
Ampicillin (AMP)	0	1	42
Ciprofloxacin (CIP)	1	0	42
Gentamicin (GN)	24	1	17
Doxycycline (DO)	2	7	33
Erythromycin (E)	8	3	32
Flofenicol (FFL)	0	0	43
Neomycin (N)	43	0	0
Nalidixic acid (NA)	43	0	0
Oxolinic acid (OA)	43	0	0
Oxytetracycline (OTC)	12	0	31
penicillin G (P)	1	0	42
Tetracycline (TE)	12	0	31
Flumequine (UB)	43	0	0

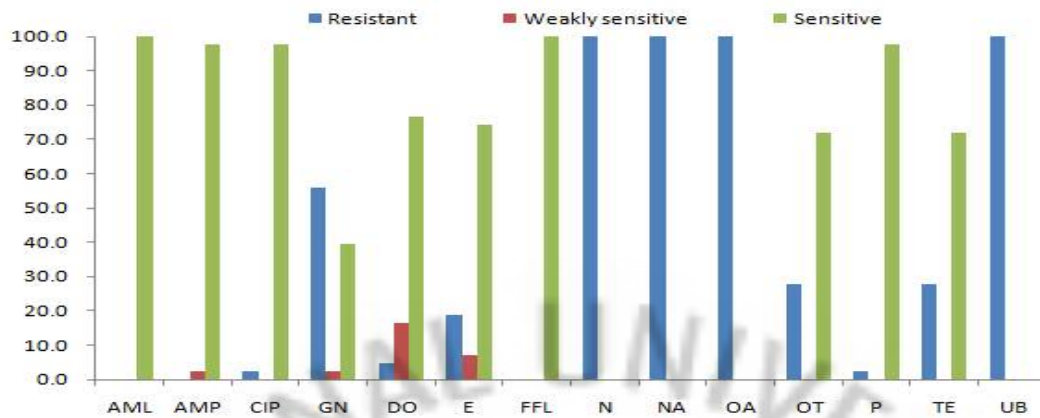


Fig. 18. Antibiotic resistant and sensitive pattern of *Streptococcus parauberis* isolated from Olive flounder, *Paralichthys olivaceus*. by paper disc method.

AML: Amoxycillin, AMP: Ampicillin, CIP: Ciprofloxacin, GN: Gentamicin, DO: Doxycycline, E: Erythromycin, FFL: Flofenicol, N: Neomycin, NA: Nalidixic acid, OA: Oxolinic acid, OT: Oxytetracycline, P: penicillin G, TE: Tetracycline, UB: Flumequine

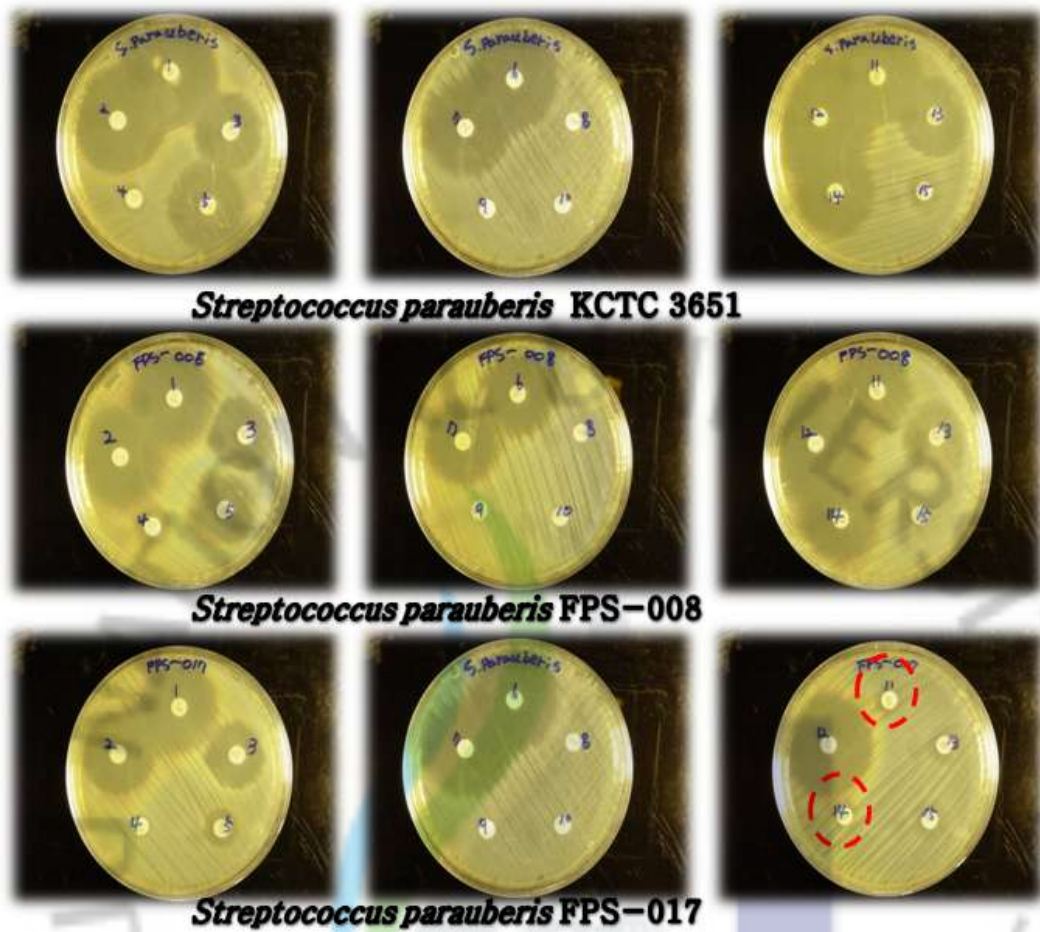


Fig. 19. Antibiotic sensitivity of *Streptococcus parauberis* based on paper disc method.

1: Amoxicillin, 2: Ampicillin, 3: Ciprofloxacin, 4: Gentamicin, 5: Doxycycline, 6: Erythromycin, 7: Flofenicol, 8: Neomycin, 9: Nalidixic acid, 10: Oxolinic acid 11: Oxytetracycline, 12: penicillin G, 14: Tetracycline, 15: Flumequine

9. 분리 균의 항균물질 추출 및 항생제 내성균 최소 억제 농도 측정

1차 스크리닝 과정에서 방선균 배양액의 활성이 검증된 방선균주에 대하여 500ml 삼각플라스크 배양을 통하여 메탄올 추출물을 제조하였으며, 후보균주의 메탄올 추출물 항균활성 측정은 Agar well diffusion법에 따라 항균스펙트럼을 재 스크리닝 하였으며, 본 실험에서 사용한 병원성 시험균주는 인체 유해 항생제내성균 9종과 양식 어류에서 분리한 항생제 내성 *Streptococcus parauberis* 총 43종 가운데 Erythromycin, Oxytetracycline, Tetracycline에 내성이 있으며, 다제 내성이 있는 균주 총 10종을 선별하여 전 배양하여 활성화 시킨 후, 멸균생리식염수를 이용하여 McFaland No. 0.5 농도로 균 현탁액을 제조한 후, 1.5% NaCl이 첨가된 Muller Hinton broth (Difco, Co. USA)에 배양 후 실험에 사용 하였다. Sample의 제조는 메탄올 추출물의 경우 최종 농도가 50 mg/ml가 되게 제조하였다.

9-1. 최소저지농도(MIC) 측정

최종적으로 분리된 3종의 해양 방선균의 메탄올 추출물의 병원성 세균의 최소억제 농도를 측정한 결과를 (Table. 24)에 나타냈다. HK-A13 균주의 메탄올 추출물 결과 SP-017 균주를 제외한 모든 시험 균주에서 항균활성을 나타냈으며, *Burkholderia cepacia*의 균주에서 6.3mg/ml의 낮은 농도에서도 항균활성을 확인 할 수 있었으며, 추후 해양 유래 방선균의 항균 물질 생산에 대한 추가 연구가 필요할 것으로 생각된다. HK-A43 균주의 메탄올 추출물의 결과 *Streptococcus parauberis* SP-066, *Micrococcus luteus* CCARM 0022, *Burkholderia cepacia* CCARM 0226, *Streptococcus faecium* CCARM 0210에서 50mg/ml의 농도에서 최소 억제 농도가 나타났으며, *Enterobacter cloacae* CCARM 0253의 균주에선 25 mg/ml의 농도에서 항균 활성이 나타났다. HK-A44 균주의 추출물의 시험 결과 *Streptococcus parauberis* SP-015, *Streptococcus parauberis* SP-044, *Streptococcus parauberis* SP-066, *Micrococcus luteus* CCARM 0022, *Burkholderia cepacia* CCARM 0226, *Enterobacter cloacae* CCARM 0253의 균주에 50mg/ml의 농도에서 항균 활성을 나타냈으며, *Streptococcus parauberis*

SP-003, *Streptococcus parauberis* SP-063, *Streptococcus parauberis* SP-065의 균주에선 25mg/ml의 농도에서 병원균의 증식을 억제 하였다. 천연물을 이용한 병원성 미생물 억제에 대한 연구는 활발히 이루어지고 있으며, 본 균주보다 저농도에서 병원성 미생물을 저해하는 물질에 대한 연구가 진행되어 지고 있다. 하지만 이들의 대부분은 순수물질을 분리하여 측정한 결과로 본 실험에 사용된 분리 방선균주의 Supernatant 및 추출물의 경우 순수 물질이 아님에도 항생제 내성 병원성 세균에 대해 항균력을 나타내고 있으며 추후 정제과정을 통해 순수 물질을 얻는다면 더욱 효과적인 항균 물질을 얻을 수 있을 것이라고 사료된다.



Table 24. The minimum inhibitory concentration of actinomycetes methanol extract.

Microorganism	Minimum Inhibitory Concentration (mg/ml)		
	HK-A13	HK-A43	HK-A44
<i>Streptococcus parauberis</i> SP-001	50	—	—
<i>Streptococcus parauberis</i> SP-003	50	—	25
<i>Streptococcus parauberis</i> SP-015	50	—	50
<i>Streptococcus parauberis</i> SP-017	—	—	—
<i>Streptococcus parauberis</i> SP-044	50	—	50
<i>Streptococcus parauberis</i> SP-048	50	—	—
<i>Streptococcus parauberis</i> SP-060	50	—	—
<i>Streptococcus parauberis</i> SP-063	50	—	25
<i>Streptococcus parauberis</i> SP-065	50	—	25
<i>Streptococcus parauberis</i> SP-066	50	50	50
<i>Micrococcus luteus</i> CCARM 0022	25	50	50
<i>Burkholderia cepacia</i> CCARM 0226	6.3	50	50
<i>Proteus rettgeri</i> CCARM 0263	50	—	—
<i>Staphylococcus aureus</i> CCARM 0201	25	—	—
<i>Bacillus anthraxis</i> CCARM 0217	50	—	—
<i>Enterobacter cloacae</i> CCARM 0253	25	25	50
<i>Streptococcus faecium</i> CCARM 0210	50	50	—
<i>Klebsiella pneumoniae</i> CCARM 10258	50	—	—
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> CCARM 0225	50	—	—

—: NO activity

10. 농도별 항산화 활성 측정

항산화 활성을 측정하는 방법에는 여러 가지가 있으나 그중에 DPPH radical 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 spectrometry를 이용하여 더욱 정밀도를 높였으며 색소에 의한 오차를 줄일 수 있는 방법이라 할 수 있겠다. ESR spectroscopy에 의한 측정방법은 가장 유망

한 방법 중의 하나로써, 방사선 조사시 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. 하지만 이러한 장점에 불구하고 국내에서는 유해산소의 검지방법으로 이용한 경우가 드물다. 분리균주 HK-A13, HK-A43, HK-A44의 메탄올 추출물 농도별 항산화 활성을 측정하기 위해 DPPH radical, Hydroxyl radical, Alkyl radical 소거활성을 ESR spectroscopy 측정방법을 이용하여 평가하였다. 각 시료의 농도는 DPPH radical (0.05 및 0.25, 0.5mg/ml) 그리고 Hydroxyl radical, Alkyl radical은 각각 0.25, 1.25, 2.5mg/ml였다. 먼저 HK-A13, HK-A43, HK-A44의 ESR을 이용한 DPPH 소거활성에 대한 결과를 (Fig. 20)에 나타내었다. 그 결과 모든 실험구에서 농도 의존적인 활성특성을 보였으며, HK-A43 0.05mg/ml 농도 실험구에서는 7%, 0.25mg/ml에서는 18%, 0.5mg/ml에서는 93%의 DPPH 라디칼 소거 활성을 관찰할 수 있었다. HK-A13, HK-A44 실험구에서는 낮은 활성을 나타내었다. Hydroxyl radical은 산소중 중 반응성이 매우 강하며 지질 산화를 개시하고 DNA 손상 및 돌연변이를 유발하는 물질로 알려져 있다. 또한 Hydroxyl radical은 생체의 대사과정에서 생성되는 지질의 과산화물이나 H_2O_2 가 Fe^{2+} 나 Cu^{2+} 이온의 존재하에서 생성되며 가장 독성이 강한 free radical이므로 이 라디칼을 소거하는 정도를 측정하였다.

방선균주 배양액 추출물에 대한 Hydroxyl radical 소거활성 측정 결과를 (Fig. 21)에 나타내었으며, 그 결과 모든 실험구에서 농도 의존적인 라디칼 소거활성특성을 보였으며, HK-A13, HK-A43, HK-A44 0.25mg/ml 투여 실험구에서는 각각 23% 및 12%, 33%의 낮은 항산화활성을 보인 반면 1.25mg/ml 농도 이상의 실험구에서는 각각 74%, 62%, 55%로 농도 의존적으로 증가 하였으며, 2.5mg/ml에서는 83%, 80%, 78%의 높은 항산화활성을 확인할 수 있었다.

Alkyl radical은 hydrocarbon reaction에서 초기 반응 생성물로 많이 형성된다. 이는 불포화지방산이 산소에 노출되면 지질과산화가 일어나면 이는 free radical에 의해 불포화지방산의 methylene기로부터 수소원자가 탈취함에 따라 개시(initiation)된다. 수소탈취에 의해 생긴 alkyl radical(R·)은 분자재구성을 통해 diene형태로 바뀌고 이것이 다시 산소와 결합하여 peroxy radical을 형성한다. peroxy radical은 다시 다른 불포화지방산으로부터 수소를 탈취함으로써 일종의 연쇄반응이 진행될 수 있다. Peroxy radical은 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 지질과산화로 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 대식세포기능의 억제, 단백질 합성 억제, 효소의 실활, thrombin 과다생산등과 같은 유해 작용들이 보고되고 있다. (Fig. 22)는 방선균추출물의 Alkyl radical 소거활성에 대한 결과를 나타낸 것으로서 HK-A13의 실험 결과 2.5mg/ml의 농도에서 가장 높은 86%의 활성이 나타났으며, 1.25mg/ml에서는 79%, 0.25mg/ml에서는 70%의 활성을 나타내었다. HK-A43의 실험 결과 농도 의존적으로 항산화활성이 증가하는 양상을 보이고 있었으며, 0.25mg/ml 투여 실험 결과에서 낮은 라디컬 소거활성을 보였다. HK-A44의 메탄올 추출물 실험 결과 2.5mg/ml에서 가장 높은 73%의 라디컬 소거활성을 보였으며, 크게 유의적인 차이가 없는 것으로 확인되었다.

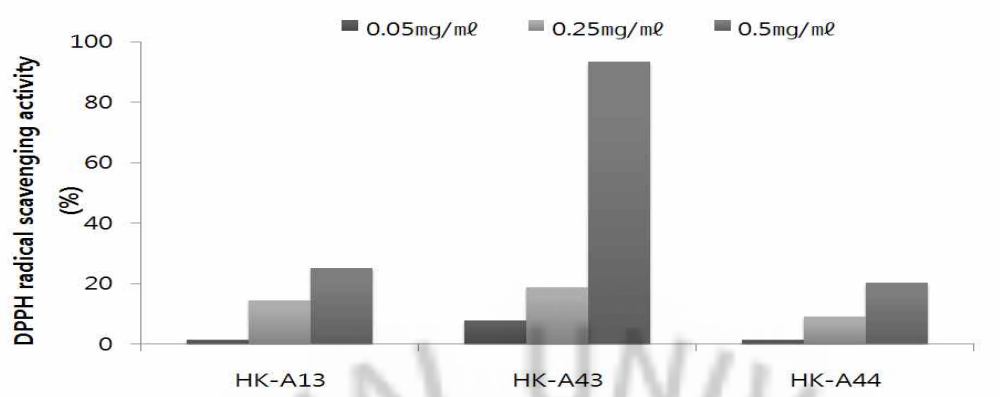


Fig. 20. DPPH radical scavenging activity of actinomycetes methanol extract by ESR spectroscopy.

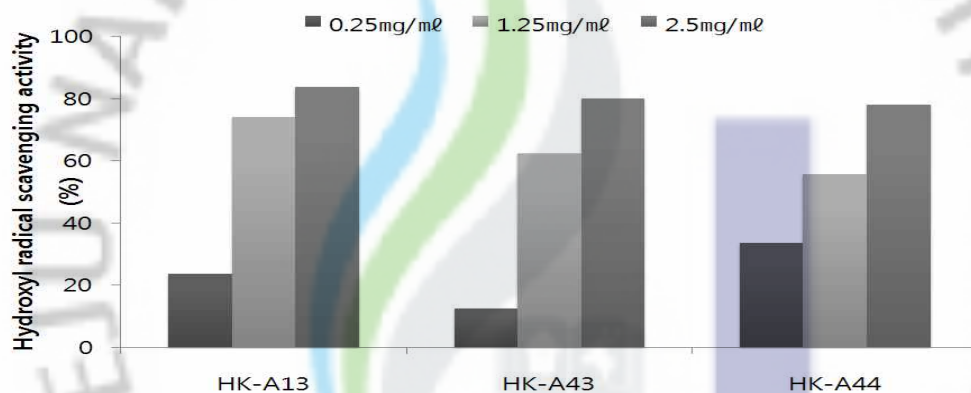


Fig. 21. Hydroxyl radical scavenging activity of actinomycetes methanol extract by ESR spectroscopy.

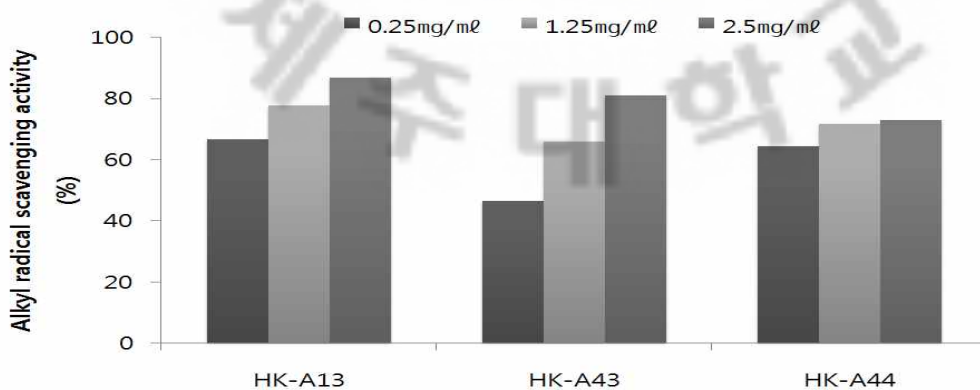


Fig. 22. Alkyl radical scavenging activity of actinomycetes methanol extract by ESR spectroscopy.

IV. 고찰

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. 이러한 제주도의 해안 생태계의 중요성과 특이성 때문에 상대적으로 많은 연구진들이 제주도 해양생물 조사를 시도하였다. 본 연구에서는 제주도 해안을 중심으로 해양에 서식하는 모래를 채집하여 그로부터 분리되어지는 해양유래 방선균의 다양성을 연구하였다.

분리된 해양유래 방선균은 총 43 균주를 분리하였다. 해양에서 분리 되어진 대부분의 분리균주들의 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 미생물과 초기 생육 배지내에 염분이 있어야만 성장이 가능한 호염성 미생물이 존재하였다. 분리되어진 방선균 배양액 색상은 노랑색, 빨강색, 주황색, 갈색, 녹색, 분홍색, 보라색 등으로 육상 방선균주 배양액들과 비교해 보았을 때 매우 다양한 색소를 생산했으며 대체적으로 기중균사체의 크림색, 하얀색, 회색, 노란색, 녹색 계열의 색상을 나타냈다. 해양에서 분리된 방선균주 총 43종을 가지고 1차적인 항균 실험을 거쳐서 항균 활성이 우수한 균주 3종을 분리하였다. 분리된 균주 배양액의 메탄올 추출물을 이용하여 항생제 내성 인체질병유발 세균 10종을 이용하여 항균 활성을 평가하여, 그 결과 최종적으로 균주 HK-A13, HK-A43, HK-A44 균주를 선정할 수 있었으며, 균주 동정 결과 HK-A13, HK-A43, HK-A44은 *Streptomyces* 종(Species)들과 가장 유사한 특성을 보였으며, 최종적으로 *Streptomyces* sp. HK-A13 및 *Streptomyces* sp. HK-A43, *Streptomyces* sp. HK-A44 이라고 각각 명명하였다. 분리균주 HK-A13, HK-A43 및 HK-A44의 배양학적 특성을 확인한 결과 배양온도는 20°C~40°C, pH범위는 6~8에서 가장 좋은 생육도 및 항균활성을 보였다. 그리고 균주 *Streptomyces* sp. HK-A13의 최적배양조건을 확인한 결과 탄소원으로 자당, 질소원은 질산암모늄 첨가 시에 가장 좋은 생육을 나타냈었으며, 균주 *Streptomyces* sp. HK-A43은 탄소원 첨가 시 생육에 큰 차이가 나타나지 않았으며, 질소원으로는 맥아추출물, *Streptomyces* sp. HK-A44은 탄소원은 *Streptomyces* sp. HK-A43과 마찬가지로 생육에는 큰차이가 나타나지 않았으며, 질소원으로는 효모추출물 첨가

실험구에서 가장 높은 생육도 및 항균활성을 보였다. 균주의 생육 및 생리활성물질 생산을 위한 최적배양조건을 확인한 후, 배양 추출물의 생리활성을 평가하였다. 생리활성 평가를 위해 균주 배양액 메탄올 추출물을 제조하였다. 또한 제주도내 넉치 양식장에서 폐사한 넉치를 해부하여 연쇄구균증 원인균인 *Streptococcus parauberis*을 분리 하였으며, 분리된 *Streptococcus parauberis*는 15종의 항생제 디스크를 사용하여 항생제에 내성을 나타내는 43종의 균주를 분리하였으며, 그 중 Erythromycin, Oxytetracycline, Tetracycline에 내성이 있으며, 다제 내성이 있는 균주 총 10종을 선별하여 항생제 내성 인체 유해 세균 10종과 함께 최소 억제농도를 측정 하였으며, 그 결과 K-A13 균주의 메탄올 추출물 결과 SP-017 균주를 제외한 모든 시험 균주에서 항균활성을 나타냈으며, *Burkholderia cepacia*의 균주에서 6.3 mg/ml의 낮은 농도에서도 항균활성을 확인 할 수 있었으며, HK-A43 균주의 메탄올 추출물의 결과 *Streptococcus parauberis* SP-066, *Micrococcus luteus* CCARM 0022, *Burkholderia cepacia* CCARM 0226, *Streptococcus faecium* CCARM 0210에서 50 mg/ml의 농도에서 최소 억제 농도가 나타났고, HK-A44 균주의 추출물은 *Streptococcus parauberis* SP-015, *Streptococcus parauberis* SP-044, *Streptococcus parauberis* SP-066, *Micrococcus luteus* CCARM 0022, *Burkholderia cepacia* CCARM 0226, *Enterobacter cloacae* CCARM 0253의 균주에 50mg/ml의 농도에서 항균 활성을 나타냈다. 항산화활성 결과 *Streptomyces* sp. HK-A43 메탄올 추출물에서 가장 높은 DPPH radical 소거활성을 보였으며, 0.5 mg/ml의 농도였을 때 93%의 매우 높은 라디컬 소거활성을 확인할 수 있었다. Hydroxyl radical 소거활성 결과 모든 실험구에서 농도 의존적인 라디컬 소거활성 특성을 보였으며, 2.5mg/ml에서는 83%, 80%, 78%의 높은 항산화활성을 확인할 수 있었다. Alkyl radical 소거활성 결과 *Streptomyces* sp. HK-A13 메탄올 추출물에서 가장 높은 라디컬 소거활성을 보였으며, 2.5mg/ml 농도구에서는 86%의 소거활성을 보였다. *Streptomyces* sp. HK-A43 메탄올 추출물의 실험 결과 농도 의존적으로 항산화활성이 증가하는 양상을 보이고 있었으며, 0.25mg/ml 투여 실험 결과에서 낮은 라디컬 소거활성을 보였다. *Streptomyces* sp. HK-A44 메탄올 추출물의 실험 결과 2.5mg/ml에서 가장 높은 73%의 라디컬 소거활성을 보였으며, 크게 유의적인 차이가 없는 것으로 확인되었다. 천연물을 이용한 병원성 미생물 억제에 대한 연구는 활발히 이루어지고 있으며, 본 균주보다 저농도에서 병원성 미생물을 저해하는

물질에 대한 연구가 진행되어 지고 있다. 하지만 이들의 대부분은 순수물질을 분리하여 측정된 결과로 본 실험에 사용된 분리 방선균주의 상층액 및 추출물의 경우 순수 물질이 아님에도 항생제 내성 병원성 세균에 대해 항균력을 나타내고 있으며 추후 정제과정을 통해 순수 물질을 얻는다면 더욱 효과적인 항균 물질을 얻을 수 있을 것이라고 사료되며, 본 연구를 통해서 제주도내 해양방선균의 생리학적 특성 및 분리된 해양미생물의 생리활성을 확인하였으며, 본 실험에 사용된 균주의 좀더 자세한 항생제 내성 세균을 억제하는 항균 물질 생산에 관여하는 다양한 요소들에 대한 연구가 필요하다고 판단되며, 추가적으로 생물 접촉 실험 등을 통하여 생물전구체로서의 이용 가능성을 검증 할 필요가 있다고 사료 된다.



V. 참고문헌

- 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., Park, Y. D. Seong, C. N. Kim, E. M. Bae, K. S. and Chun, J. S. 2006. *Glaciecola nitratireducens* sp. nov., isolated from seawater. *Int J Syst Evol Microbiology*. 56, 2185–2188.
- Beppu, T. and S. Horinouchi. 1991. Molecular mechanisms of the A-factor-dependent control of secondary metabolism in *Streptomyces*. *Planta Medica*. 57, S44–S47.
- Buck, J. D. 1982. Nonstaining (KOH) method for determination of Gram reactions of marine bacteria. *Appl. Environ Microbiol.* 44, 992–993.
- 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.

- Fernsnde, J. A., Mohedano, F., Polanco, M. J., Medina, M. and Nunez, M. 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 Stackerbrandt, E. 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., Yamamoto, S. Morihara, K. Atsumi, Y. Takeuchi, H. Kawamoto, S. and Okuda, K. 1989. Structural gene and complete amino acid sequence of *Pseudomonas aeruginosa* IFO 3455 elastase. *J. Bacteriol.* 171, 1698–1704.
- George M. G., Matthew, W. and Denise B. S. 2001. Bergey's Manual of *Systematic Bacteriology*. Vol, 2–2.
- Giovannoni, S. and Rappe, M. 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 Cross, T. 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.
- Gray, J. R. and Herwig, R. P. 1996. Phylogenetic Analysis of the bacterial communities in marine sediments. *Appl. Environ. Microbiol.* 62, 4049–4059.
- Gustafson, K., Roman, M. and W. Fenical. 1989. the macrolactins, a novel class of antiviral and cytotoxic macrolides from a deep-sea marine bacterium. *J. Am. Chem. Soc.* 111, 7519–7524.
- Honrichsen, L. L., Montel, M. C. and Talon, R. 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.
- Jones, G. H. 1985. Regulation of phenoxazinone synthase expression in *Streptomyces* antibiotics. *J. Bacteriol.* 163, 1215–1221.
- Janzen, E. G., Towner, D. L., Haire, D. L. 1987. Detection of free radical generated from the *in vitro* metabolism of carbon tetrachloride using improved ESR spin trapping techniques. *Free Radical Res Commun.* 3, 357–364.
- Kim, M. C. 2010. Diversity of Marine Actinomycetes Isolated from in the Jeju island Coastal and Screening of Biological Activities from Microorganisms Secondary Metabolites. *Jeju Nat Uni.* pp. 7–13.

- Kim, T. H. 1997. Coastal landform on the Jeju island. *Tamla culture*. 18, 381–397.
- Kobayashi, J. and M. Ishibashi. 1993. Bioactive metabolites of symbiotic marine microorganisms. *Chem. Rev.* 18, 1–32.
- Lechevalier, M. P. and Lechevalier, H. 1970. Chemical composition as a criterion in the classification of aerobic actinomycetes. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 20, 435–443.
- Lovejoy, C., Bowman, J. P. and Hallegraeff, G. M. 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.
- Matsuyama, H., Hirabayashi, T. Kasahara, H. Minami, H. Hoshino, T. and Yumoto, I. 2006. *Glaciecola chathamensis* sp. nov., a novel marine polysaccharide-producing bacterium. *Int J Syst Evol Microbiology.* 56, 2883–2886.
- Moon, Y. G. 2009. Diversity of marine microorganisms isolated from intertidal zone in the summer season of Jeju island. *Jeju Nat Uni.* pp. 8–11.
- Norris, J. R., Ribbons, D. W. and Varma, A. K. 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.
- Sato, K., T. Okazaki, K. Maeda, and Y. Okami. 1978. New antibiotics, aplasmomycins B and C. *J. Antibiot.* 31, 632-635.
- Shirling, E. B. and Gottlieb, D. 1966. Methods for characterization of *Streptomyces* species. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 16, 313-340.
- Tanaka, Y. and Omura, S. 1990. Metabolism and products of actinomycetes— An introduction. *Actinomycetologica.* 4, 13-14.
- Tapiolas, D. M., Roman, M., Fenical, W., Stout, T. J. and Clardy, J. 1991. Octalactins A and B: cytotoxic eight-membered ring lactones from a marine bacterium streptomyces sp. *J. Am. Chem. Soc.* 113, 4682-4683.
- Tiedje, J. M. and Zhou, J. 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.

감사의 글

어느덧 제가 실험실에서 공부한지 5년이라는 시간이 지났습니다. 부족하고 모자랐던 제가 실험실에 들어와서 많은 실수도 하였고, 말썽도 피웠지만 어느덧 석사 학위 까지 졸업을 하게 되었습니다. 이곳 실험실에서 저는 많은 것을 배웠으며, 그중에서도 사람을 알게 되었으며, 이곳에서 많은 일들이 저를 더욱 강하고, 성숙하게 만들어 주었습니다. 고향을 떠나 홀로 정이 부족했던 저에게 실험실은 집이었고, 실험실원들은 가족과 같은 곳 이었습니다. 이제 이곳을 떠나야 한다고 생각하니 그동안 못한 것들이 너무 많아서 미안하고, 어색하고, 서운한 감정만 남습니다.

방황하던 저를 올바르게 잡아주시고 잘못하면 아버지처럼 꾸짖어 주시고 이끌어 주신 허문수 교수님의 지도에 진심으로 감사 말씀 드립니다.

또한 바쁘신 가운데에도 논문을 검토하고 심사해주신 정준범 교수님과 이승현 교수님과 저의 학부생활과 대학원 생활 동안 많은 가르침을 주시고, 조언을 해주시는 송춘복 교수님, 이제희 교수님, 전유진 교수님, 여인규 교수님, 이경준 교수님, 김기영 교수님께도 진심으로 깊은 감사의 말씀을 드립니다.

먼저 제가 정말 사랑하고 존경하는 만철이형, 정말 에이스 이자 때론 친구처럼 저를 이끌어 주신 주상이형 덕분에 인생이 즐거웠습니다. 그리고 항상 도움 받기만 했던 사기꾼 익수, 초심 잃은 영민이, 대천에서 온 동휘, 못난 선배 만나서 정말 많이 고생한 우리 민선이, 경미, 리나 이렇게 우리 식구들에게 정말 감사의 말씀을 드립니다.

그리고 제가 열심히 할 수 있게 도움 주시고 관심을 가져주신 진창남 소장님, 양병규 선배님, 장영환 선배님, 김필연 선배님, 강철영 선배님, 문영건 선배님, 고창식 선배님, 장태원 선배님, 김민주 선배님, 김윤범 선배님, 전봉근 선배님, 강선경 선배님, 그리고 친구 같은 우리 동민이랑 창영이에게도 감사의 말씀을 드립니다.

2년 동안 논문 쓰느라고 가치 고생한 우리 동기 진우, 유철이, 주영이, 경필이, 민철이, 숙경이, 아람이에게도 감사의 말을 드리며, 또한 어류분자생리학 실험실원, 해양자원이용공학 실험실원, 분자유전학 실험실원, 유전육종실험실원에게도 감사드립니다.

그밖에도 저를 도와주신 많은 분들께 진심으로 감사드립니다.

마지막으로 제주도에서 못난 아들 대학생들과 대학원 생활동안 뒷바라지 해주시고 고생하신 아버지, 할머니께 그리고 때론 형처럼 든든한 동생 석재, 멀리서 저를 챙겨주시고 걱정해 주시는 외할머니, 이모, 작은 삼촌, 친삼촌께 너무나 죄송하고 감사합니다. 하늘나라에서 저를 보살펴 주시는 엄마 언제나 미안하고 너무나 감사하고 평생 사랑합니다.

