



## 저작자표시 2.0 대한민국

이용자는 아래의 조건을 따르는 경우에 한하여 자유롭게

- 이 저작물을 복제, 배포, 전송, 전시, 공연 및 방송할 수 있습니다.
- 이차적 저작물을 작성할 수 있습니다.
- 이 저작물을 영리 목적으로 이용할 수 있습니다.

다음과 같은 조건을 따라야 합니다:



저작자표시. 귀하는 원저작자를 표시하여야 합니다.

- 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

*Lactobacillus rhamnosus* CY-1의  
동정과 배양학적 특성에 따른  
항균물질 생산; Probiotic의 영향

濟州大學校 大學院

海洋生命科學科

宋昶英

2013年 2月

*Lactobacillus rhamnosus* CY-1의 동정과  
배양학적 특성에 따른 항균물질 생산;  
Probiotic의 영향

指導教授 許 文 洙

宋 昶 英

이 論文을 理學 碩士學位 論文으로 提出함

2013 年 2 月

宋昶英의 理學 碩士學位 論文을 認准함

審査委員長 \_\_\_\_\_이 경 준\_\_\_\_\_ (인)

委 員 \_\_\_\_\_김 기 영\_\_\_\_\_ (인)

委 員 \_\_\_\_\_허 문 수\_\_\_\_\_ (인)

濟州大學校 大學院

2013 年 2 月

Isolation and Cultural Conditon  
Characterization of Antibacterial  
Substance produced bacterium,  
*Lactobacillus rhamnosus* CY-1;  
its Probiotic effect

Chang-Young Song  
(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, 2013

# 목 차

목 차.....	i
List of Tables.....	iii
List of Figures.....	iv
Abstract.....	vi
I. 서 론.....	1
II. 재료 및 방법.....	3
2-1. Probiotic 균주의 분리 및 선정.....	3
2-1-1. 미생물의 분리 .....	3
2-1-2. 분리균주의 항균활성 측정.....	4
2-1-3. 인공 위액 및 인공 담즙산에 대한 내성, 내염성, 내열성, 용혈성..	5
2-1-4. 공시균주의 선정.....	6
2-2. <i>Lactobacillus rhamnosus</i> CY-1의 동정.....	7
2-2-1. 형태학적 특성.....	7
2-2-2. 생리학적 특성.....	7
2-2-3. 16S rRNA 염기서열 분석.....	8
2-3. 조건에 따른 <i>Lactobacillus rhamnosus</i> . CY-1의 생육과 항균활성	
검토.....	9
2-3-1. 탄소원의 배지조성.....	9
2-3-2. 질소원의 배지조성.....	10
2-3-3. 무기염의 배지조성.....	10
2-3-4. 최적 pH, 온도에 따른 성장과 항균물질 생산.....	10
2-3-5. 배양시간에 따른 항균물질의 생산.....	11
2-4. <i>Lactobacillus rhamnosus</i> CY-1의 첨가에 따른 양식넙치의	
성장과 병저항성 .....	12
2-4-1. 실험어 사육관리.....	12
2-4-2. 실험사료 제작 및 투여방법.....	12
2-4-7. 어병세균에 의한 공격실험.....	13
2-4-8. 사료 첨가 내 사용된 공시 균주의 장내 확인 .....	13
2-4-9. 통계처리.....	13

### III. 결 과

3-1. Probiotic 균주의 분리 및 선정 .....	14
3-1-1. 미생물의 분리 .....	14
3-1-2. 분리균주의 항균활성 측정 .....	15
3-1-3. 인공 위액 및 인공 담즙산에 대한 내성, 내염성, 내열성, 용혈성 .....	17
3-1-4. 공시균주의 선정 .....	18
3-2. <i>Lactobacillus rhamnosus</i> CY-1의 동정 .....	19
3-2-1. 배양학적, 형태학적 특성 .....	19
3-2-2. 생리학적 특성 .....	21
3-2-3. 16S rRNA 염기서열 분석 .....	23
3-3. 조건에 따른 <i>Lactobacillus rhamnosus</i> CY-1의 생육과 항균활성 검토 .....	25
3-3-1. 탄소원의 영향 .....	25
3-3-2. 질소원의 영향 .....	27
3-3-3. 무기염의 영향 .....	29
3-3-4. 최적 온도, pH의 따른 생육과 항균물질 생산 .....	31
3-3-5. 배양시간에 따른 항균물질의 생산 .....	33
3-4. <i>Lactobacillus rhamnosus</i> CY-1의 .....	35
사료 첨가에 따른 양식넙치의 성장과 병저항성 .....	
3-4-1. 성장도 조사 .....	35
3-4-6. 어병세균에 의한 공격실험 .....	37
3-4-7. 사료 첨가 내 사용된 공시 균주의 장내 확인 .....	38
IV. 요 약 .....	39
V. 감사의 글 .....	40
VI. 참고 문헌 .....	41

## List of tables

Table 1. List of strains used of antibacterial experiment .....	4
Table 2. Isolated strains and isolation condition .....	14
Table 3 . Antimicrobial activity of isolates .....	16
Table 4. Biochemical properties of isolates .....	17
Table 5. Physiological characteristic of Strain CY-1 .....	22
Table 6. Optimum medium compositions and culture conditions for antibiotic production by <i>Lactobacillus rhamnosus</i> CY-1 .....	34
Table 7. Detection of <i>Lactobacillus rhamnosus</i> CY-1 in the intestines of <i>Lactobacillus rhamnosus</i> CY-1 fed the control diet and <i>Lactobacillus rhamnosus</i> CY-1 containing diets at $10^3$ , $10^5$ , and $10^7$ colony-forming units (cfu)(kg diet) <sup>-1</sup> by plate counting on MRS agar .....	39

## List of figures

- Fig. 1. Cultural characterization of Strain CY-1. Cells were grown at 30°C for 24 hours (A) MRS agar (B) Blood plate agar ..... 20
- Fig. 2. Scanning electron micrograph of Strain CY-1. Cells were grown at 30°C for 24 hours. .... 20
- Fig. 3. Neighbour-joining phylogenetic tree based on 16S rRNA gene sequences showing the position of strain CY-1 within the radiation of the genus *Lactobacillus*. Bootstrep percentage (from 1000 replications)>50% are shown at branch points. Bar, 0.01 substitutions per nucleotide position. .... 24
- Fig. 4. Effect of various carbone source on cell growth and antibacterial activity of culture broth of the isolated *Lactobacillus rhamnosus* CY-1. .... 26
- Fig. 5. Effect of concentrations of Rhamnose on cell growth and antibacterial activity of culture broth of the isolated *Lactobacillus rhamnosus* CY-1. .... 26
- Fig. 6. Effect of various nitrogen sources on cell growth and antibacterial activity of culture broth of isolated *Lactobacillus rhamnosus* CY-1. .... 28
- Fig. 7. Effect of concentration of yeast extract on cell growth and antibacterial activity of culture broth of the isolated *Lactobacillus rhamnosus* CY-1 ..... 28
- Fig. 8. Effect of various inorganic salts on cell growth and antibacterial activity of the isolated *Lactobacillus rhamnosus* CY-1 ..... 30
- Fig. 9. Effect of concentration of FeSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O cell growth and antibacterial activity of culture broth of the isolated *Lactobacillus rhamnosus* CY-1 ..... 30



Fig. 10. Effect of temperature on cell growth and antibacterial activity of <i>Lactobacillus rhamnosus</i> CY-1 .....	32
Fig. 11. Effect of pH on cell growth and antibacterial activity of <i>Lactobacillus</i> <i>rhamnosus</i> CY-1 .....	32
Fig. 12. Effect of culture time on cell growth and antibacterial activity of <i>Lactobacillus rhamnosus</i> CY-1 .....	34
Fig. 13. Weight (g) of Olive flounder that was fed with probiotic and non-mixed control diet for 10 weeks and weithed every 2 weeks .....	36
Fig. 14. Size (g) of Olive flounder that was fed with probiotic and non-mixed control diet for 10 weeks and weithed every 2 weeks .....	36
Fig. 15. Cumulative mortality (%) after intraperitoneal injection of <i>Streptococcus</i> <i>parauberis</i> in Olive flounder .....	37

## Abstract

The purpose of this experiment was to select useful probiotic strains with antibacterial activity and acid resistance against a broad range of bacteria causing fish diseases to prevent bacterial diseases of fishes or improve their immune system for the efficiency of farming industry.

Five kinds of strains extracted from olive flounder intestine were used to study their antibacterial activity, bile resistance, and acid resistance, and *Lactobacillus rhamnosus* CY-1 was finally selected to examine their cultural, morphological, genetic, and physiological characteristics. In result of identification, *Lactobacillus rhamnosus* CY-1 was identified as *Lactobacillus rhamnosus* and named *Lactobacillus rhamnosus* CY-1. In result of reviewing the optimal culturing conditions for maximum production of antibacterial materials, the source of carbon was 3% Rhamnose; the source of nitrogen was 3% Yeast extract; the inorganic salt was 3%  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ; the culturing temperature was 35°C; the initial pH of culture medium was 8; and the culturing time was 96 hours.

The strains were added to the feed in the concentration of 10<sup>3</sup>, 10<sup>5</sup>, and 10<sup>7</sup> CFU/kg and 2% of fishes were given the feed twice a day (9 AM and 5 PM) for 4 weeks. The mortality test performed by artificial infection using *S.parauberis*, a pathogenic bacterium, after the completion of this study also showed over 40% greater survival rate in all test samples. Based on the above findings, it was concluded that *Lactobacillus rhamnosus* CY-1 in the feed improved farmed flatfish's immune system and resistance against diseases as the probiotic. Also, the physiological indicators discovered by this study would be useful for identifying the mechanisms of probiotics.

## I. 서론

우리나라의 양식 산업은 1990년대 이후 급격한 발전하였으며, 수산물이 식량자원 공급원으로써 가치가 높아지고 있다. 국내 넙치 양식 산업은 1984년 국립수산과학원에서 인공종묘 생산 기술을 개발한 이후, 양식 산업이 급격히 발전한 1990년대 초반부터 본격적으로 생산되기 시작하였다.

제주도는 넙치 양식에 최적의 조건을 갖추고 있는데 2005년도인 경우 전국 양식넙치 생산량의 50%를 상회하는 20,370톤을 생산하였으며, 5,300톤의 활 넙치가 일본으로 수출되어 외국 시장에서도 품질을 인정받고 있다(해양수산부, 2006; 제주특별자치도, 2006).

그렇지만 어류 양식 산업의 급격한 성장과 생산량 증대로 인해 해마다 어류질병에 의한 피해는 날로 증가하고 있으며, 국내 양식 산업에서도 총사육량의 25~30% 정도가 질병으로 폐사하고 있으며, 주로 세균성 질병과 기생충성 질병이 많이 발병되고 있다(진, 2002). 양식넙치에 감염되는 세균성 질병으로는 대부분 그람 음성균으로서 비브리오병(*Vibrio* sp.), 연쇄상구균증(*Streptococcus* sp.), 활주세균증(*Flexibacter* sp.), 에드워드병(*Edwardsiella* sp.), 등을 유발한다(Kim et al., 2001; Heo et al., 2001; Kim and kim, 2003; Baeck et al., 2006).

현재까지 제주도 육상수조식 넙치 양식장에서 연쇄구균(*Streptococcus* sp.)이 주요 폐사의 원인균으로 보고되고 있다(Lee et al., 1991). 그 이외에 *Lactococcus garviae*(Lee et al., 2001), *Enterococcus faecalis*(Song et al., 2003), *Streptococcus iniae*(Jung et al., 2004) 등이 넙치에 대한 병원성과 관련되어 보고되어지고 있으며, *S. iniae*가 연쇄구균증의 주요 병원체로 알려져 왔다(Woo et al., 2006). 하지만 최근에는 *S. praruberis*가 새로운 양식넙치의 폐사 원인체로 분리되어지고 있다(Baeck et al., 2006).

이런 어류 질병 유발 세균에 의한 질병 예방 및 치료를 위한 가장 일반적인 방법에는 항생제 투여 등의 화학적인 방법과 백신요법이 있는데 (Newman, 1993; Eldar, 1995), 항생제의 경우 오남용으로 인한 체내잔류(Karunasagar 등, 1994; Witte 등, 1999), 내성균의 출현(Smith 등, 1994)과 같은 문제를 유발하고 있으며 그 사용이 규제되고 있는 실정이다 (Aoki 등, 1990). 또한 백신을 처리하여 어류질병을 예방하는 방법이 있지만 이는 광범위한 질병제어가 어렵고, 백신 투여 과정이 번거러울뿐더러 혼합 감염에 대한 효과적 백신이 없어 예방 및 치료를 위한 대책으로 한계가 있다 (Bruhn, 2005). 이러한 문제를 해결하기 위한 방법으로 최근 친환경적인 방법을 찾고 있으며, 그 방법의 하나인 Probiotic 요법에 대한 관심이 많아지고 있다.

Probiotics이란 항생물질(antibiotics)에 대비되는 말로서 살아있는 미생물 군체를 섭취함으로써 미생물이 분비하는 효소, 유기산, 비타민 및 무독성 항균 물질 등에 의한 장내 균총의 정상화는 물론 장질환 치료를 통해 신체기능 개선을 목적으로 생산된 제품을 말한다 (Paik et al., 2002).

Probiotics로서 많이 이용되는 미생물로는 *Bacillus* sp.(Sugita, 1998), *Carnobacterium* sp.(Joborn, 1997; Stoffels, 1992), *Lactobacillus* sp.(Ashenafi, 1991;Chateau 등, 1993; Gildberg 등, 1997), *Pseudomonas flourescense*(Gram 등, 1999), *Vibrio alginolyticus*(Austin 등, 1995; Gatesoupe, 1989)등이 있다.

Probiotics로 산업적으로 응용하기 위해서는 위산과 담즙산에 대한 내성이 있어 위 장관에서 서식할 수 있어야 하소 위장관의 상피세포에 정착하여 증식하면서 유해세균에 대한 길항력이 있어야 한다 (Mainville et al., 2005; pinto et al., 2006; Schillinger et al, 2005).

따라서 본 연구에서는 양식 생산성을 높이고 양식 환경 개선에 도움이 되며, 넙치 양식장 환경 개선용 생균제 균주를 개발하기 위해 넓은 항균 스펙트럼을 갖고 있으면서 pH 내성 및 열안정성, 내염성 등을 갖고 있는 probiotic 균주를 어류의 장내에서 선별한 후, 생리 화학적, 배양학적, 형태학적인 특성을 조사하고 분리된 probiotics를 각기 다른 농도로 사료에 첨가하여 양식 현장에 사용하였을 때 나타나는 양식넙치의 성장과 병 저항상을 조사하여 사료첨가제로써의 응용성을 확인 하고자 하였다.

## II. 재료 및 방법

### 2-1. Probiotic 균주의 분리 및 선정

#### 2-1-1. 미생물의 분리

Probiotic 균주의 분리를 위하여 넙치의 장을 사용 하였다. 넙치는 함덕 해양과 환경연구소에 사육하는 넙치를 사용하였다. 채취한 샘플은 생리식염수로 단계 희석하여 사용하였으며, 0~10%의 식염이 첨가된 Mann, Rogosa and Sharpe 배지(MRS, Difco)에 희석액을 100 $\mu$ l 유리 도말봉으로 도말하고 20, 25, 30, 35 $^{\circ}$ C에서 48시간 배양하여 미생물을 분리 하였다. 분리한 미생물을 후보 Probiotic균으로 선발하기 위하여 인공위액 및 인공담즙산 내성조사, 병원성 미생물에 대한 항균활성 조사, 열안정 및 pH 내성조사 순으로 선발하였다.

## 2-1-2. 분리균주의 항균활성 측정

실험에 사용된 균주는 어류 질병 미생물로 한국유전자은행인 KCTC (Korean Collection for Type Culture) 또는 KCCM (Korean Culture Center of Microorganisms)에서 분양 받았고, *Streptococcus iniae*, *Streptococcus parauberis*, *Edwardsiella tarda*는 Wild Type을 사용하였으며(Table 1)  $-70^{\circ}\text{C}$  Deep freezer에서 보관 (50% glycerol 및 10% DMSO)하여 실험에 사용하였다. 생균제 후보 균주로 분리된 미생물과 분양 받은 미생물은 각각의 알맞은 배지에서 보관하였고 분리 균주가 생산하는 배양액의 병원성 세균에 대한 억제 효과를 조사 위한 항균활성 실험은 McFarland No. 0.5로 희석된 각각의 세균 현탁액을 멸균된 면봉을 사용하여 준비되어진 Muller Hitone Agar(MHA) plate에 골고루 도말하고, 건조 후 멸균된 paper disc (직경 8mm, Advantec, Japan)에 분리된 균주의 배양액  $50\ \mu\text{l}$ 을 접종하여 각 배양온도에 맞춰 24시간 배양하여 clear zone을 caliper로 측정하였다. caliper로 측정된 clear zone은 paper disc의 직경도 포함 하였다.

Table 1. List of strains used of antibacterial experiment

Bacteria name	Strain No.
<i>streptococcus iniae</i>	Wild type
<i>Streptococcus parauberis</i>	Wild type
<i>Edwardsiella tarda</i>	Wild type
<i>Vibrio campbellii</i>	KCCM 40864
<i>Vibrio harvei</i>	KCCM 40866
<i>Vibrio alinolyticus</i>	KCCM 40513
<i>Vbrio ichtyoenteri</i>	KCCM 40870
<i>Vibrio anguillarum</i>	KCTC 2711

### 2-1-3. 인공 위액 및 인공 담즙산에 대한 내성, 내염성, 내열성, 용혈성

인공 위액에 대한 내성 조사는 분리된 각각의 미생물을 이용하여 0.005M sodium phosphate buffer를 HCl로 보정하여 만든 pH 2.0~7.0의 Nutrient Broth(NB)에 각 균주 ( $10^8$ cfu/ml)를 10배 희석하여 접종하여 30℃에 30분 방치한 후 NA에 도말하여 균수를 측정하여 생존율이 10배 이상 낮아지지 않는 것을 양성으로 판정하였다.

인공 담즙산에 대한 내성 조사는 분리된 각각의 미생물을 이용하여 1~3% bile salt가 포함된 NB 배지에 각 균주 ( $10^8$ cfu/ml)를 10배 희석하여 접종하여 30℃에 30분 방치한 후 NA에 도말하여 균수를 측정하여 생존율이 10배 이상 낮아지지 않는 것을 양성으로 판정하였다.

내염성에 대한 조사는 분리된 각각의 미생물을 이용하여 0~50 ppt (part per thousand)의 NaCl이 포함된 NB 배지에 각 균주 ( $10^8$ cfu/ml)를 10배 희석하여 접종하여 30℃에 30분 방치한 후 NA에 도말하여 균수를 측정하여 생존율이 10배 이상 낮아지지 않는 것을 양성으로 판정하였다.

내열성 조사는 각각의 미생물 ( $10^8$ cfu/ml)을 saline에 10배 희석하여 접종한 다음 60℃ 항온수조에 30분 방치한 후 NA에 도말하여 균수를 측정하여 생존율이 1/10배 이하로 낮아지지 않는 것을 양성으로 판정하였다.

용혈인자(Hemolysin) 활성 조사는 면양 적혈구를 5% 첨가한 평판에(Hanil Komed, Korea) 균을 도말한 후 30℃에서 48시간 배양하였을 때 나타나는 용혈환의 유무로 확인하였다.

#### 2-1-4. 공시균주의 선정

항균활성 및 위액과 담즙산에 대한 내성, 내염성, 내열성, 용혈성, 항생제 감수성 테스트를 통해 생균제가 가져야할 특성을 확인한 후 활성이 가장 뛰어난 *Lactobacillus rhamnosus* CY-1 균주를 본 연구를 위해 선발하였다.



## 2-2. *Lactobacillus rhamnosus* CY-1의 동정

### 2-2-1. 형태학적 특성

SEM (Scanning Electron Microphotography, JSM-6700JEOL Ltd.)을 통해 미생물의 형태학적 특성을 관찰하였다. 고체배지에 Membrain filter(Adventech)를 올려 그 위에 백금을 이용하여 균을 도말하였다. 균의 성장 특성에 따라 집락이 나타나기 이전에 전처리를 행하였다. 먼저 filter를 0.5× 0.5cm 되도록 절한 한 뒤, 2.5% glutaraldehyde 용액에 담구어 1시간 고정시킨다. 그 다음 1 M phosphate buffer로 2회 세척한다. 이를 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100%의 ethylalcohol로 각각 1시간동안 탈수시킨다. 탈수시킨 filter를 isoamylacetate와 100% EtOH가 1:1로 혼합된 용액에 1시간 담근 후, 100% isoamyl acetate 용액에 1시간 방치한다. 마지막으로 CO<sub>2</sub> gas를 이용해 건조시키고 백금을 처리하여 전자현미경으로 관찰하였다.

### 2-2-2. 생리학적 특성

공시균주의 동정을 위해 그람염색, catalase test, 포자유무, 운동성, 전자현미경 관찰 등 형태학적 특성을 관찰 하였고 당 발효능과 같은 생화학적 성상은 API 50CHB(Biomerieux, France)을 이용하여 분석법에 따라 시행하였다.

### 2-2-3. 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'-AGAGTTTGGATCCTGGCTCAG-3' reverse primer(1492R): 5'-GGTTACCTTGTTACGACTT-3'의 염기서열로 구성되었으며 각각의 0.5  $\mu$ M primer, 200  $\mu$ M deoxynucleoside triphosphate, Taq DNA polymerase(Bioneer, Korea) 3 $\mu$ l를 사용하여 PCR을 수행하였다. PCR 반응조건은 94 $^{\circ}$ C에서 5분 pre-denaturation, 30cycle 동안 94 $^{\circ}$ C에서 45초 denaturation, 50 $^{\circ}$ C에서 45초 annealing, 72 $^{\circ}$ C에서 45초간 extension 하였으며, 다시 72 $^{\circ}$ C에서 5분간 extension 하였다. 증폭된 PCR product는 ethidium bromide가 첨가된 상태에서 전기영동하여 1% agarose(promega CO., USA) gel에서 확인하였다. 이후 Accuprep<sup>TM</sup> PCR purification kit(Bioneer, Korea)을 이용하여 PCR product에 남아있는 primers, nucleotides, polymerase, salts를 제거하여 정제하고 30 $\mu$ l에 elution buffer(10mM Tris-Cl, pH 8.5)로 DNA를 elution하였다. 이를 ABI prism<sup>TM</sup> BigDye<sup>TM</sup> terminator cycle sequencing Ready reaction kit V.3.1 (Fluorescent dye terminators method)와 ABI 3730XL capillary DNA sequencer를 사용하여 PCR product의 염기서열을 분석하였다. DNA 염기서열의 homology 분석은 BLAST online program (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast>)를 이용하였다. 그 다음 ClustalW software를 사용하여 염기서열을 배열한 후 MEGA3 program (Ver 3.0)을 이용하여 phylogenetic tree를 작성하였다.

## 2-3. 조건에 따른 *Lactobacillus rhamnosus* CY-1의 생육과 항균활성 검토

미생물의 최적 배지성분의 검토는 glucose 0.5%, yeast extract 0.1%, MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 0.02% 배지를 함유한 GY(glucose 0.5%, yeast extract 0.1%)배지를 사용하였다. 항균물질의 생산의 측정은 paper disc 확산법, agar spotted method 등 liquid culture method를 병행하여 실시하였다.

Liquid culture method는 피검균 배양액을 10 ml MHB(Difco, USA)에 2% 접종하고, 공시균주 배양액을 3500 rpm에서 15분간 한 후, 0.45 μm pore size filter(Adventec, USA)로 제균하였다. 이 배양 상등액을 다시 2% 첨가하여 25℃ 6시간 배양하고 피검균의 생육도를 660 nm에서 측정하여 다음과 같은 방법으로 저해율을 계산하였다.

$$\text{Inhibition rate(\%)} = (C_0 - C) / C_0 \times 100$$

(C<sub>0</sub>: 대조구 O.D. ; C: 항균물질 처리 후 배양한 O.D.)

### 2-3-1. 탄소원의 배지조성

배지의 탄소원으로 GY배지에 glucose, sorbitol, mannitol, soluble starch, xylose, lactose, fructose, raffinose, rhamnose, mannose 등을 각각 1% 첨가하여 30℃, 150rpm으로 24시간 배양 한 후 배양액의 탁도를 660 nm에서 측정하였으며 Liquid culture method를 시행하여 항균물질의 생산을 알아보았다. 대조구는 glucose가 첨가되지 않은 배지를 사용하였다.

### 2-3-2. 질소원의 배지조성

질소원은  $\text{NH}_4\text{Cl}$ ,  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ,  $\text{NH}_4\text{Cl}$ , malt extract, yeast extract, peptone 등을 0.5% 첨가하여 30℃, 150rpm으로 24시간 배양 한 후 배양액의 탁도를 660 nm에서 측정하였으며 Liquid culture method를 시행하여 항균물질의 생산을 알아보았다. 대조구는 GY배지에서 yeast extract가 첨가되지 않은 배지를 사용하였다.

### 2-3-3. 무기염의 배지조성

무기염은  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ ,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ,  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ,  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ,  $\text{NaCl}$ , 등을 0.1%첨가하여 30℃, 150rpm으로 24시간 배양한 후 배양액의 탁도를 660 nm에서 측정하였으며 Liquid culture method를 시행하여 항균물질의 생산을 알아보았다. 대조구는 GY 배지에서  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 가 첨가되지 않은 배지를 사용하였다.

### 2-3-4. 최적 pH, 온도에 따른 성장과 항균물질 생산

공시균주의 최적 배양조건은 250 ml 삼각플라스크에 150 ml의 액체배지를 넣고 0.1 N HCl 과 0.1 N NaOH 용액으로 배지의 초기 pH를 4~9의 범위로 조적하여 121℃, 15분 동안 멸균하였다. 제조한 액체배지에 최종 선정균주의 전배양액을 1% 접종하고 30℃, 150 rpm에서 24시간 배양한 후, 660 nm에서 배양액의 탁도를 측정하였으며 항균물질 생산을 검토하였다. 최적 배양온도는 20~50℃의 범위에서 조건을 확인 하였으며, pH 영향은 최적 배양온도 방법과 동일하게 검토하였다.

### 2-3-5. 배양시간에 따른 항균물질의 생산

배양시간이 항균물질의 생산에 미치는 영향은 공시균주의 전배양액을 최적배지에 최적온도에 24시간 배양한 뒤, 6시간 간격으로 시료를 채취하여 4000 rpm에서 원심 분리하여 상등액을 0.45  $\mu\text{m}$  pore size filter(Adventec, USA)로 여과하여 항균활성 측정시료로 사용하였다. 측정법은 agar spotted method를 이용하였다. MHA(Difco)에 각 dbgoaltodafn을 50  $\mu\text{l}$ 씩 접종하고 무균적으로 배지에 구멍을 내어 항균활성 측정시료를 100  $\mu\text{l}$  씩 떨어뜨려 30 $^{\circ}\text{C}$  24시간 배양하여 투명환의 직경 (mm)을 측정하였다.

## 2-4. *Lactobacillus rhamnosus* CY-1의 첨가에 따른 양식넙치의 성장과 병저항성

### 2-4-1. 실험어 사육관리

본 실험은 제주도 함덕리에 위치한 해양과환경연구소에서 수행하였고, 실험어로 사용된 넙치는 제주도 위미리에 위치한 (주)금강수산에서 분양을 받았다. 실험 시작 전에 사용한 넙치는 실험 환경에 적응시키기 위해 약 2주일 동안 기초사료를 공급하여 순치 시켰으며, 실험 시작 전 넙치의 평균 무게는  $50 \pm 13$  g 이었다. 사육 수조는 1000L 원형수조를 사용하였고, 각 수조당 100마리씩 수용하였으며, 사육수량은 1일 3회 환수, 충분한 산소 공급을 위하여 통기 하였다. 실험 기간 중의 수온, 용존 산소(dissolved oxygen, DO), pH, 염분을 매일 측정하였으며, YSI(YSI-556MPS)를 사용하였다. 실험 기간 중 사육 온도는 12.8-21℃, 염분은 31.34-36.22‰, pH는 7.54-8.59, DO는 6.54-9.64 이었다. 사료는 1일 2회 (오전 9시, 오후 5시) 어체 중의 2%씩 공급 하였으며, 실험 사육은 총 4주 동안 수행 하였다.

### 2-4-2. 실험사료 제작 및 투여방법

사료 제작을 위하여 시판하고 있는 넙치용 배합사료에 (조단백질 52%, 조지방 11%, 조섬유 3%, 조회분 14%, 인 2.7%, 칼슘 1.5%, Suhyup Co, KOREA) 대량 배양 된 분리균주인 *Lactobacillus rhamnosus* CY-1( $1 \times 10^9$  CFU/ml)을 각각 첨가하여  $10^3$ ,  $10^5$ ,  $10^7$  CFU/kg 실험 사료를 제작 하였다. 대조구에는 유용미생물을 첨가하지 않은 일반 사료를 투여 하였으며 실험이 시작 된 후부터 사료 투여는 1일 2회 (오전 9시, 오후 5시) 어체중의 2%씩 공급 하였으며, 실험 사육은 총 4주 동안 수행 하였다.

#### 2-4-7. 어병세균에 의한 공격실험

넙치의 항병력에 미치는 영향을 알아보기 위하여 현재 양식장에 발병 빈번도가 높은 그람양성 세균인 *Streptococcus Parauberis* 이용하여 공격실험을 실시하였다. 균액은  $10^6$ CFU/ml의 농도가 되도록 멸균 생리식염수에 현탁 한 후, 공격 실험용액으로 사용하였다. 공격실험은 사료투여 후 4주 후에 실시하였으며 대조구를 비롯하여 실험구에서 무작위로 20마리씩 선정하여 1ml 주사기를 이용하여 각 마리당  $200 \mu\text{l}$ 씩 복강 주사한 후 29일 동안 누적 폐사율을 조사하였다.

#### 2-4-8. 사료 첨가제 내 사용된 공시 균주의 장내 확인

사료 첨가제로 사용된 *Lactobacillus rhamnosus* CY-1의 장 내 생존을 확인하기 위해 2주마다 각각의 실험구의 실험어 장을 분리하여 MRS 배지에 단계희석을 통해 확인하였다.

#### 2-4-9. 통계처리

해양연구소에서 사육한 넙치의 성장 및 분석 결과의 통계처리는 SPSS (SPSS INC., Version 12.0) program을 이용하여 독립 검정을 실시하여 t-test ( $P < 0.05$ )로 평균간의 유의성을 검정하였다. 결과 값은 평균값 $\pm$ 표준편차 (mean $\pm$ S.D)로 나타내었고 백분율 값은 arcsine 변형 값으로 계산하여 통계분석 하였다

### Ⅲ. 결과 및 고찰

#### 3-1. Probiotic 균주의 분리 및 선정

##### 3-1-1. 미생물의 분리

넙치의 장에서 분리한 균주는 총 5종을 분리 하였다. (Table 2). 25~30℃의 배양 온도에서 MRS agar에서 생육이 빠르며 뚜렷한 단일 집락을 형성하였다.

Table 2. Isolated strains and isolation condition.

Strain name	Isolation source	Isolation temperature	Isolation medium
CY-1	Flounder intestine	25℃	MRS (0%(v/v)NaCl
CY-2	Flounder intestine	25℃	MRS (0%(v/v)NaCl
CY-3	Flounder intestine	25℃	MRS (0%(v/v)NaCl
CY-4	Flounder intestine	30℃	MRS (2%(v/v)NaCl
CY-5	Flounder intestine	30℃	MRS (2%(v/v)NaCl



### 3-1-2. 분리균주의 항균활성 측정

분리균주 중에서 skim milk 평판배지에서 뚜렷한 환을 형성하고 생육속도가 빠른 균주를 2차 분리하였다. (Table 3). CY-1, CY-2, CY-5는 다른 두 균주에 비해 생육속도가 빠르며 뚜렷한 환을 형성하였으며, 어류질병 발생 원인균으로 알려진 8균주에 대해 항균활성이 높게 나타났다. 그 중 CY-1은 피검균인 8균주에 대하여 모두 항균활성이 나타났으며, 특히, *Streptococcus parauberis*에 대하여 가장 큰 항균활성을 나타내었다. skim milk 첨가배지에서 투명환이 뚜렷한 균주의 선별은 목적으로 하는 유해미생물의 균체 단백질을 용해시키는 역할을 조사하기 위함으로 투명환이 뚜렷하고 넓을수록 protease 활성이 높다고 할 수 있다. 따라서 공시균주 CY-1, CY-2, CY-5를 이용하여 사료 첨가 내 가능성을 확인 하였다.

Table 3 . Antimicrobial activity of isolates

Strain	Growth rate <sup>1)</sup>	Protease activity <sup>2)</sup>	Inhibitory zone(mm)							
			E1 <sup>3)</sup>	E2	E3	E4	E5	E6	E7	E8
CY-1	++	+++	2.1	3.2	3.5	5	6.1	3.1	6.2	8.2
CY-2	++	+++	1.6	1.9	2.3	3.2	1.8	1.5	-	2.6
CY-3	++	++	2.1	-	3.7	-	4.2	-	1.8	-
CY-4	++	++	-	2.9	4.5	2.9	-	-	1.6	-
CY-5	++	+++	1.2	2.6	-	2.6	2.7	-	1.6	3.1

1)Growth rate: + slow, ++ medium, +++ fast. 2)Protease activity was expressed as the diameter of inhibition zone on skim milk agar : + 8~10mm, ++ 10~12mm, +++ 12~15mm 3)Tested strains = E1: *Edwardsiella tarda* KCTC 12267, E2: *V. campbellii* KCCM 40864, E3: *V. harvei* KCCM 40866, E4: *V. alinolyticus* KCCM 40513, E5: *V. ichthyenteri* KCCM 40870, E6: *V. anguillarum* KCTC 2711 , E7: *S. iniae* KCTC 3657, E8: *S. parauberis* KCTC 3651

### 3-1-3. 인공 위액 및 인공 담즙산에 대한 내성, 내염성, 내열성, 용혈성

Skim milk 평판배지 투명환 형성능과 생육속도, 그리고 어류질병 발생 원인균에 대한 항균활성 결과를 토대로 3개의 공시균주 후보로 선정하였다. 3개의 후보 균주를 그람염색, Catalase, 성장세포 상에서의 60°C 열 안정성, hemolysin 생산성 여부, 담즙산 내성 및 인공위액 내성, 내염성을 확인하였다. (Table 4).

우선 그람 염색 결과 CY-1과 CY-2균주는 양성을 CY-5균주는 음성을 나타내었고 Catalase 확인 결과 모두 양성을 나타내었다. 인공위액 1%와 인공 담즙산 3%에 대한 내성을 보였으며, 인체에 대한 안정성을 확인하기 위해 실시한 hemolysin 결과 모두 음성반응으로 안정성을 확인하였다.

Table 4. Biochemical properties of isolates

Characteristics	CY-1		CY-2		CY-5	
	Flounder	intestine	Flounder	intestine	Flounder	intestine
Source						
Gram staining	+		+		-	
Catalase activity	+		+		+	
Heat stability	+		+		+	
Hemolysin activity	-		-		-	
Bile tolerance (3%)	+		+		-	
Artificial gastric juice tolerance(1%)	+		+		-	
Salinity (50ppt)	+		+		+	

#### 3-1-4 공시균주의 선정

항균활성 및 위액과 담즙산에 대한 내성, 내염성, 내열성, 용혈성 테스트를 통해 생균제가 가져야할 특성을 확인한 후 활성이 가장 뛰어난 *Lactobacillus rhamnosus* CY-1 균주를 본 연구를 위해 선발하였다.

## 3-2. *Lactobacillus rhamnosus* CY-1의 동정

### 3-2-1. 배양학적, 형태학적 특성

공시균주 CY-1의 고체배지의 colony 성상을 Fig. 1에 나타내었다. (A)는 MRS 배지에서 생육한 사진인데, MRS상에서 콜로니는 하얀색을 띠었으며, (B)는 CY-1를 면양혈청배지에 도말한 그림으로 비용혈성을 나타내었다.

공시균주의 형태학적 특성은 30℃에서 MRS 배지에서 배양한 후 SEM을 통해 관찰하였다(Fig. 2). 형태는 단간균의 형태를 보였으며, 길이는 1.5~3.0  $\mu\text{m}$  폭은 0.5~0.7  $\mu\text{m}$ 로 나타났다.

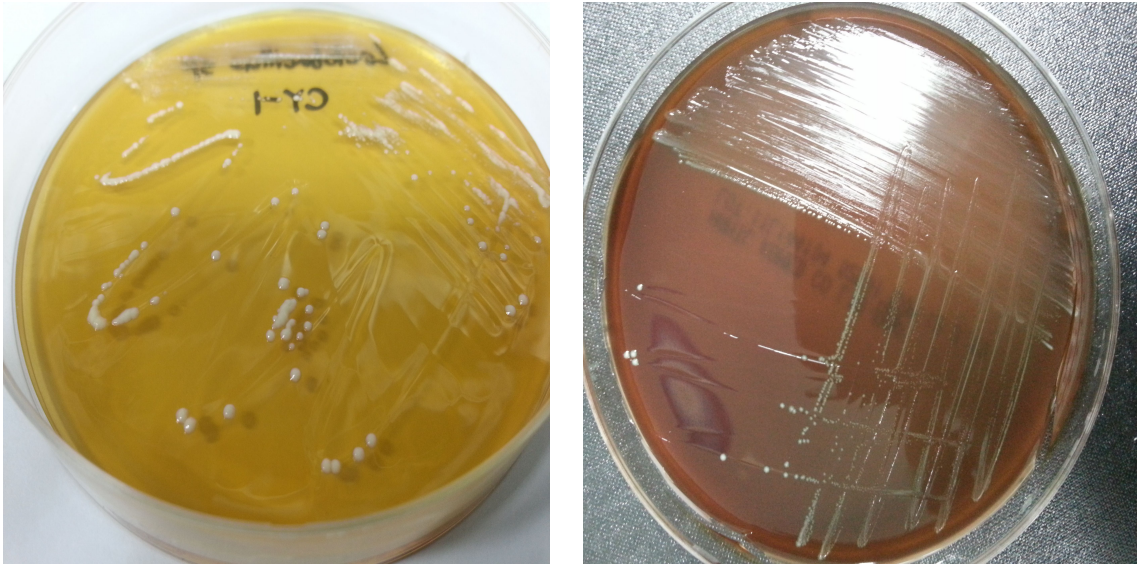


Fig. 1. Cultural characterization of Strain CY-1. Cells were grown at 30°C for 24 hours (A) MRS agar (B) Blood plate agar

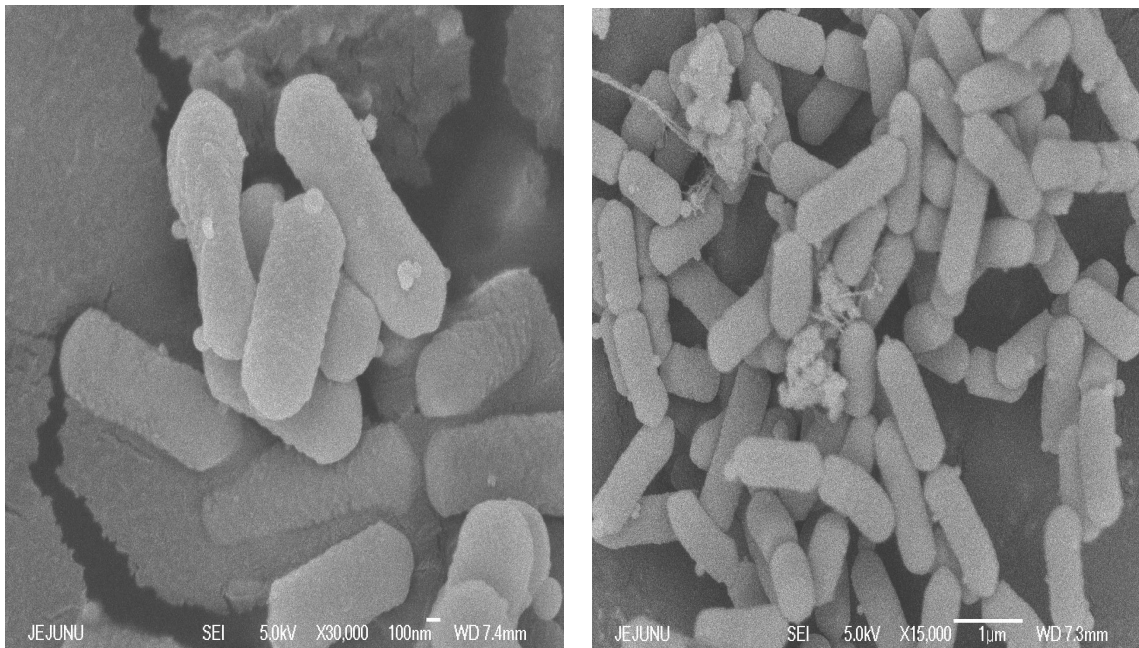


Fig. 2. Scanning electron micrograph of Strain CY-1. Cells were grown at 30°C for 24 hours.

### 3-2-2. 생리학적 특성

공시균주의 생리학적 특성을 검토한 결과는 Table 5과 같다. 생육온도의 범위는 20 ~ 40℃이었고, 생육 pH 범위는 5 ~ 10이었으며, 염농도 7%까지 생육이 가능하였다. 또한 미생물 동정용인 kit인 API 50CHB(Biomerieux, France)을 이용하여 실험한 후 그 결과를 판독하였다.

Table 5. Physiological characteristic of Strain CY-1.

Strip Tube	Substrate	result (+/-)
0	Control	-
1	Glycerol	-
2	Erythritol	-
3	D ARAbinose	-
4	L Arabionse	-
5	RIBose D-RIBose	+
6	D XYlose D-XYlose	-
7	L XYlose L-XYlose	-
8	ADOnitol D-ADOnitol	-
9	Methyl-BD-Xylopyranside	-
10	D-GALactose	+
11	D-GLUcose	+
12	D-FRUctose	+
13	D-MaNnosE	+
14	L-SorBosE	-
15	RHAMnose	+
16	DULcitol	-
17	INOsitoI	-
18	MANnitroI	+
19	SORbitol	+
20	$\alpha$ -Methyl-D-Mannoside	-
21	$\alpha$ -Methyl-D-Mannoside	+
22	N-Acethyl-Glucosamine	+
23	AMYgdalin	+
24	ARButin	+
25	Esculin	+
26	SALicin	+
27	CELLobiose	+
28	MALtose	+
29	LACTose	+
30	MELibiose	-
31	Sucrose	-
32	TREhalose	+
33	INULin	-
34	MeLeZitose	-
35	RAFinose	+
36	starch	-
37	GLYcogen	-
38	XyLiToI	-
39	GENTiobiose	+
40	D TURanose	+
41	D LYXose	-
42	D TAGatose	+
43	D FUCose	-
44	L FUCose	-
45	D ArabitoL	-
46	L Arabitol	-
47	GlucONaTe	-
48	2-keto-Gluconate	-
49	5-Keto-Gluconate	-



### 3-2-3. 16S rRNA 염기서열 분석

공시균주 CY-1의 16S ribosomal RNA PCR 증폭을 통해 얻은 1459bp 염기서열을 NCBI (National Center Biotechnology Information)의 Basic Local Alignment Search Tool (BLAST)를 이용하여 분석한 결과 *Lactobacillus rhamnosus*와 100% 상동성을 보였다. *Lactobacillus* 속에서 분리균(CY-1)과 가장 근연종으로 나타난 type strain(*Lactobacillus rhamnosus*) 16S rRNA 염기서열과 *Lactobacillus*속의 type strain 16S rRNA 염기서열을 갖고 계통수를 작성하였다(Fig. 3). 결과적으로 분리된 *Lactobacillus rhamnosus* CY-1는 위 균주와 동일종으로 판단 할 수 있다.

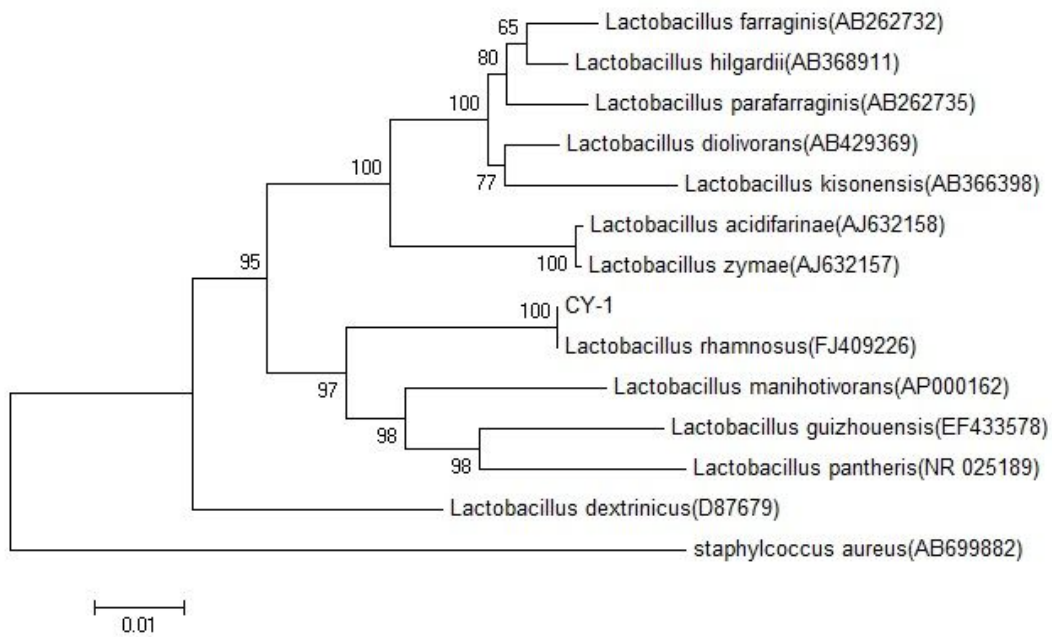


Fig. 3. Neighbour-joining phylogenetic tree based on 16S rRNA gene sequences showing the position of strain CY-1 within the radiation of the genus *Lactobacillus*. Bootstrap percentage (from 1000 replications) >50% are shown at branch points. Bar, 0.01 substitutions per nucleotide position.

### 3-3. 조건에 따른 *Lactobacillus rhamnosus* CY-1의 생육과 향균활성 검토

*Lactobacillus rhamnosus* CY-1가 최적으로 분비할 수 있는 향균물질 생산을 위하여 요구되는 영양원을 탄소원, 질소원, 무기염으로 나누어서 균 생육과 향균활성을 측정하였으며, 최적 배양 조건을 온도와 pH를 다르게 하여 균 생육과 향균활성을 검토하였다. 최적 배지성분 검토는 glucose 0.5%, yeast extract 0.1%, MgSO<sub>7</sub>H<sub>2</sub>O 0.02%를 함유한 GY배지를 사용하였다.

$$\text{Inhibition rate(\%)} = (C_0 - C) / C_0 \times 100$$

(C<sub>0</sub>:대조구 O·D. ; C: 향균물질 처리 후 배양한 O·D)

#### 3-3-1. 탄소원의 영향

배지성분은 향균물질 생산에 중요한 것으로 알려져 있기 때문에 탄소원 종류가 미생물의 생육에 미치는 영향을 조사하여 Fig. 4에 나타내었으며 대조구는 GY배지에 탄소원을 제외시킨 배지를 사용하였다.

*Lactobacillus rhamnosus* CY-1은 탄소원 중에서 glucose, mannose 및 Rhamnose 등의 첨가 순으로 잘 이용 하였으나 xylose, raffinose의 순서로 생육에 영향을 미치지 않는 것으로 나타났다. 그리고 *Streptococcus parauberis*에 대한 향균활성을 조사한 결과 glucose, manitol, rhamnose등을 첨가한 시험구에서 높게 나타났다. 따라서 위의 결과로 *Lactobacillus rhamnosus* CY-1의 향균활성은 균의 생육과 관계가 깊은 것으로 판단되었으며, 최종적으로 최적 탄소원은 rhamnose로 결정하였다.

*Lactobacillus rhamnosus* CY-1의 생육 및 향균활성에 가장 효과적인 rhamnose의 최적 첨가 농도를 검토한 결과(Fig. 5) 1% 첨가가 생육이 가장 좋았으며 농도가 높아 질수록 생육이 감소하였다. 하지만 향균활성은 3%에서 가장 높았으며 이 역시 그 이상에서는 감소함을 보였다. 그래서 결과적으로 향균활성이 가장 좋은 3%을 최적 첨가농도로 결정하였다.

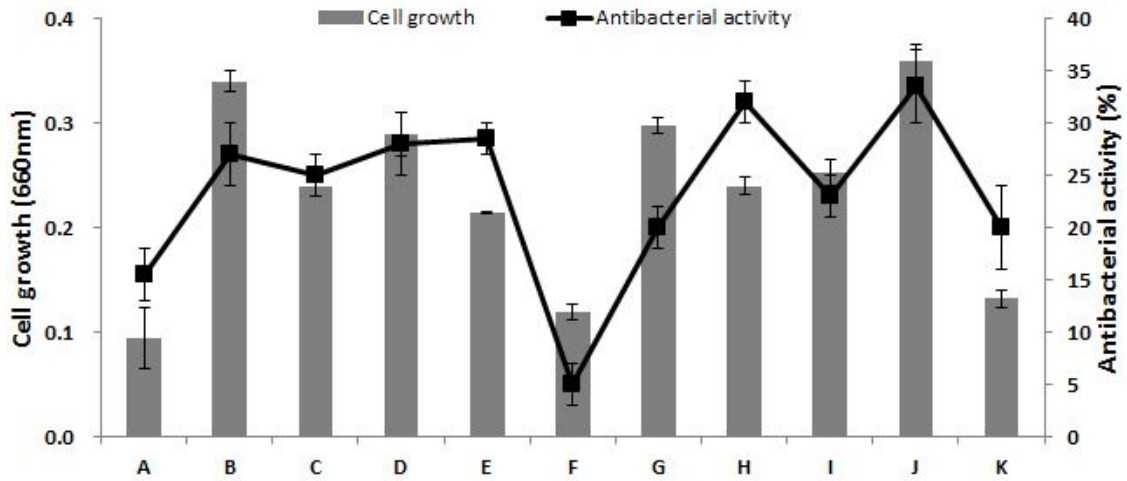


Fig. 4. Effect of various carbone source on cell growth and antibacterial activity of culture broth of the isolated *Lactobacillus rhamnosus* CY-1.

A: Control, B: Glucose, C: Sorbitol, D: Manitol, E: Starch, F: Xylose, G: Mannose, H: Fructose, I: Lactose, J: Rhamnose, K: Raffinose

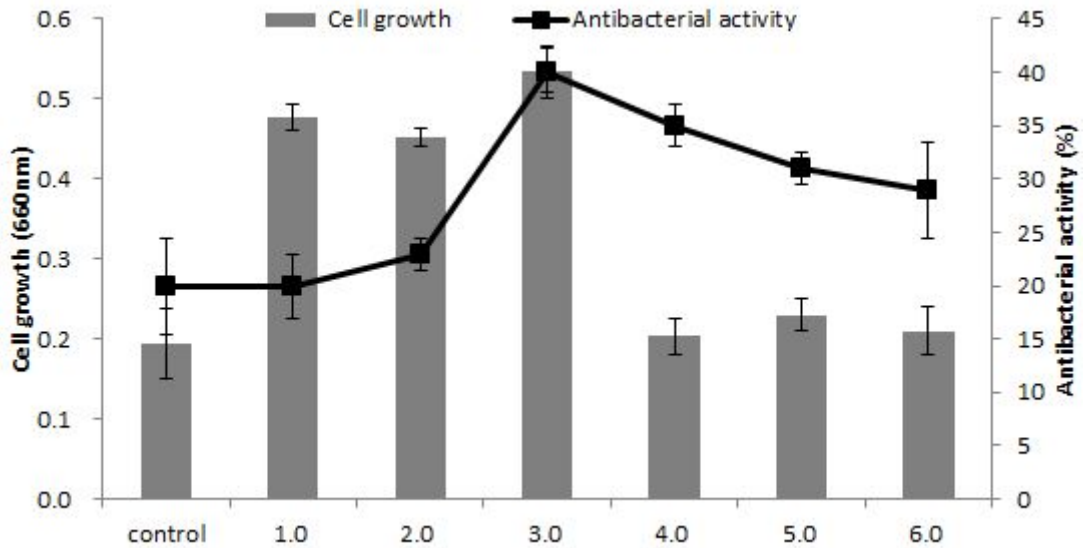


Fig. 5. Effect of concentrations of Rhamnose on cell growth and antibacterial activity of culture broth of the isolated *Lactobacillus rhamnosus* CY-1.

### 3-3-2. 질소원의 영향

*Lactobacillus rhamnosus* CY-1 균주의 생육에 미치는 질소원의 영향을 검토하여 Fig. 8에 나타내었다. 대조구는 GY배지에 1% soluble starch를 첨가하고 질소원을 제외한 배지를 사용하였다. 균주의 생육은 Yeast extract, Peptone 첨가 순으로 성장이 높은 것을 확인하였으며, 항균활성은 대조구와  $\text{NH}_4\text{NO}_3$ 를 제외하고 모든 실험구에서 25~30%의 항균활성을 나타내었으며 특히, Yeast extract에서 가장 높은 항균 활성을 나타내었다. 따라서 생육과 항균활성에 있어 가장 높게 나타난 Yeast extract를 질소원으로 선정 하였으며, 질소원 Yeast extract를 첨가하여 최적농도를 조사하였다(Fig. 7). 그 결과 Yeast extract를 3.0%를 첨가한 배지에서 가장 높은 항균활성을 나타내었으며 균 생육 또한 양호한 것으로 조사되었다. 이상의 결과로 *Lactobacillus rhamnosus* CY-1 균주를 배양할 때 질소원으로는 Yeast extract를 각각 3.0% 혼합하여 첨가하였다.

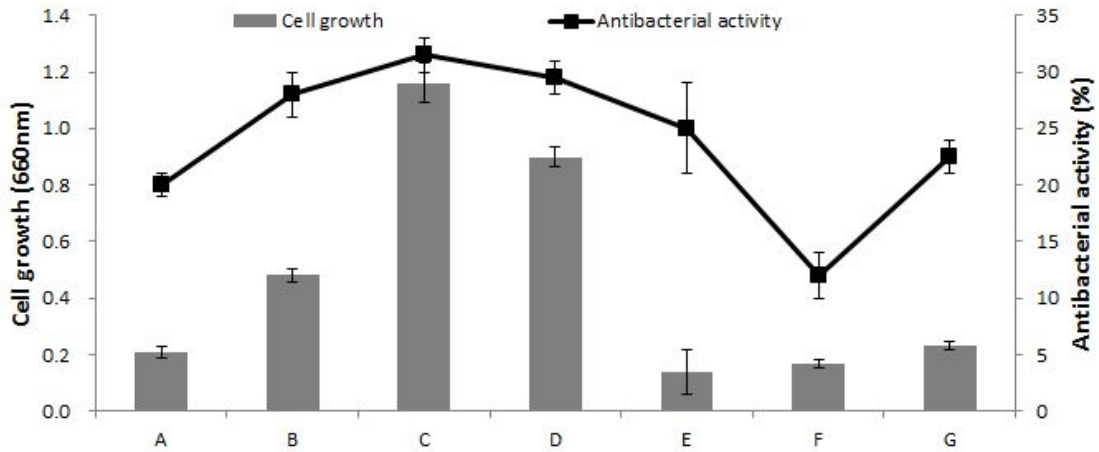


Fig. 6. Effect of various nitrogen sources on cell growth and antibacterial activity of culture broth of isolated *Lactobacillus rhamnosus* CY-1.

A: Control, B: Malt extract, C: Yeast extract, D: Peptone, E:  $\text{NH}_4\text{Cl}$ , F:  $\text{NH}_4\text{NO}_3$ , G:  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$

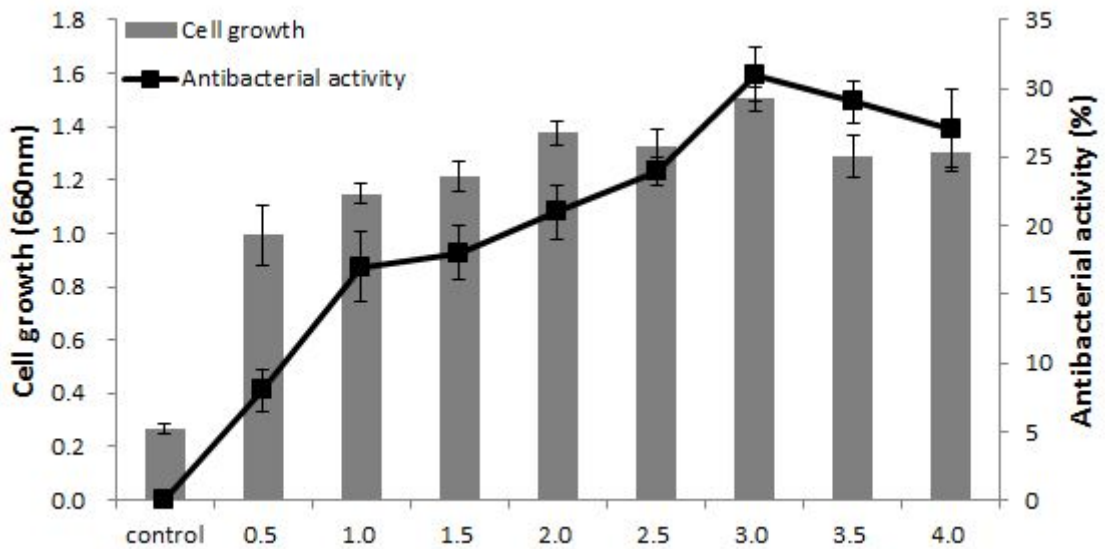


Fig. 7. Effect of concentration of yeast extract on cell growth and antibacterial activity of culture broth of the isolated *Lactobacillus rhamnosus* CY-1.

### 3-3-3. 무기염의 영향

무기염의 영향은 soluble starch 1% , malt extract 0.5% 및  $\text{NaNO}_3$  0.5%를 각각 첨가한 후 각종무기염의 농도를 0.1% 농도로 첨가하여 검토하였다(Fig. 8). 균생육은  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  등을 첨가한 실험구 순으로 균주의 생육이 높았으며 다른 실험구는 생육이 크게 억제 되었다. 또한 항균활성도  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 에서 가장 높은 활성을 나타내었다. 따라서 균주생육과 항균활성이 양호했던  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 을 *Lactobacillus rhamnosus* CY-1의 무기염으로 선정하였으며,  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 의 각기 다른 비율을 첨가하여 최적농도를 검토하였다(Fig. 9). 그 결과  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 를 첨가한 실험구 중 3.0% 첨가한 배지에서 가장 높은 항균활성과 생육을 나타내었다. 이상의 결과로 *Lactobacillus rhamnosus* CY-1균주를 배양할 때 무기염으로는  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 를 3.0% 씩 첨가하였다.

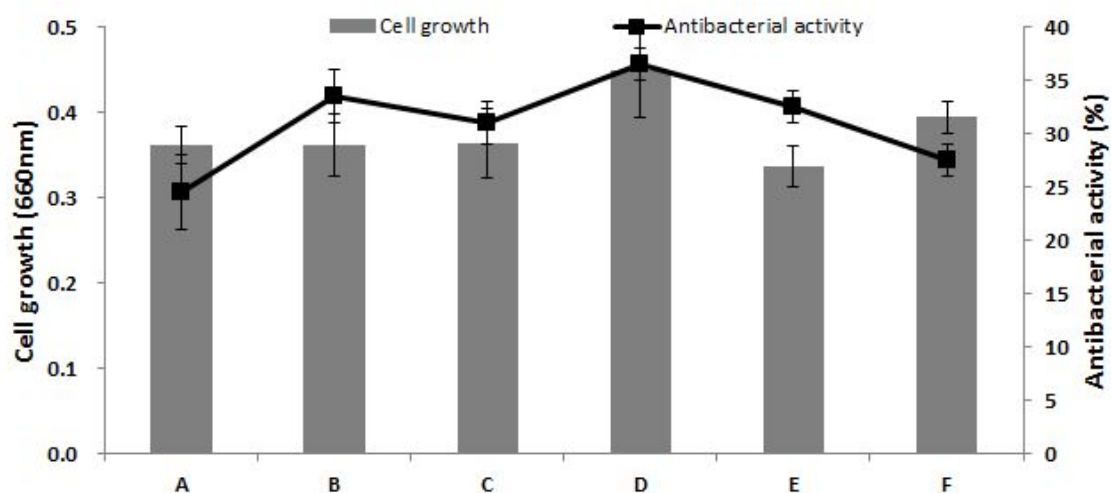


Fig. 8. Effect of various inorganic salts on cell growth and antibacterial activity of the isolated *Lactobacillus rhamnosus* CY-1.

A: Control, B:  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ , C:  $\text{K}_2\text{HPO}_4$ , D:  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , E:  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , F: NaCl

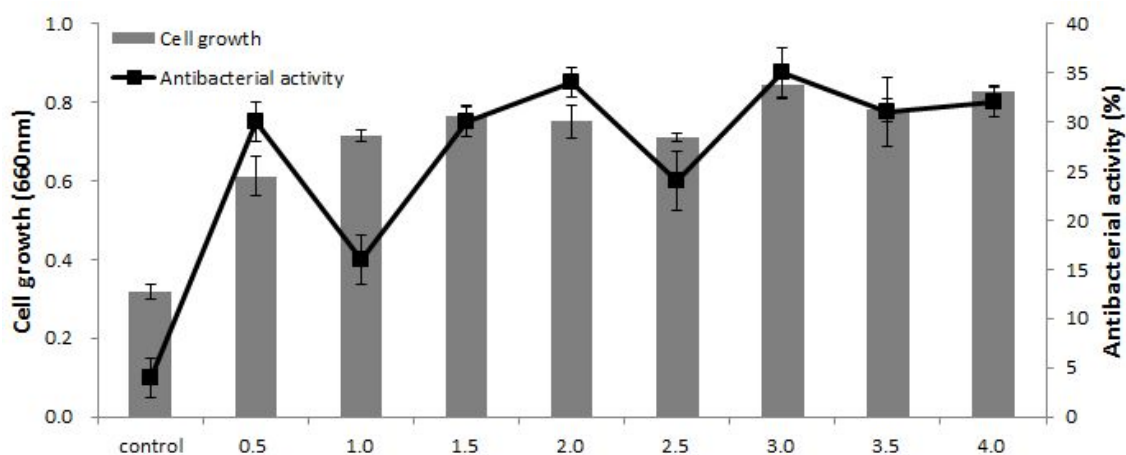


Fig. 9. Effect of concentration of  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  cell growth and antibacterial activity of culture broth of the isolated *Lactobacillus rhamnosus* CY-1.



#### 3-3-4. 최적 온도, pH의 따른 생육과 항균물질 생산

배양온도가 *Lactobacillus rhamnosus* CY-1의 생육 및 항균물질 생산에 미치는 영향을 검토하여 Fig. 10에 나타내었다. 배양온도를 15 ~ 40°C의 범위로 변환시키면서 배양한 결과 30 ~ 40°C 사이에서 생육이 왕성하였다. *Streptococcus parauberis*에 대한 항균활성은 30~35°C 범위에서 높게 나타났으나, 그에 반해 생육이 좋았던 40°C 실험구에서는 항균활성이 떨어지는 결과를 보였다. 따라서 *Lactobacillus rhamnosus* CY-1이 생육하는데 최적온도를 35°C로 결정하였다.

*Lactobacillus rhamnosus* CY-1이 생육하는데 pH에 대한 영향을 조사하여 Fig. 11에 나타내었다. 배지의 pH를 4 ~ 10으로 조절하고 35°C에서 24시간 배양한 결과 pH 7~9의 범위에서 균 생육은 왕성하게 일어났지만, *S. parauberis*에 대한 항균활성은 pH 8에서 높게 나타났다. 이 결과를 토대로 *Lactobacillus rhamnosus* CY-1 균주의 생육 및 항균물질 생산을 위한 배지의 pH는 pH 8로 결정 하였다.

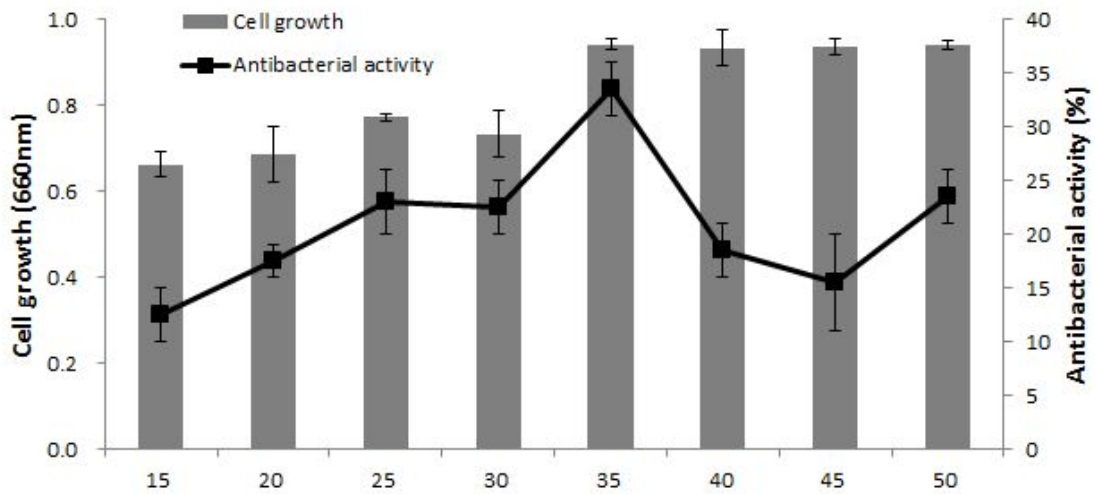


Fig. 10. Effect of temperature on cell growth and antibacterial activity of *Lactobacillus rhamnosus* CY-1

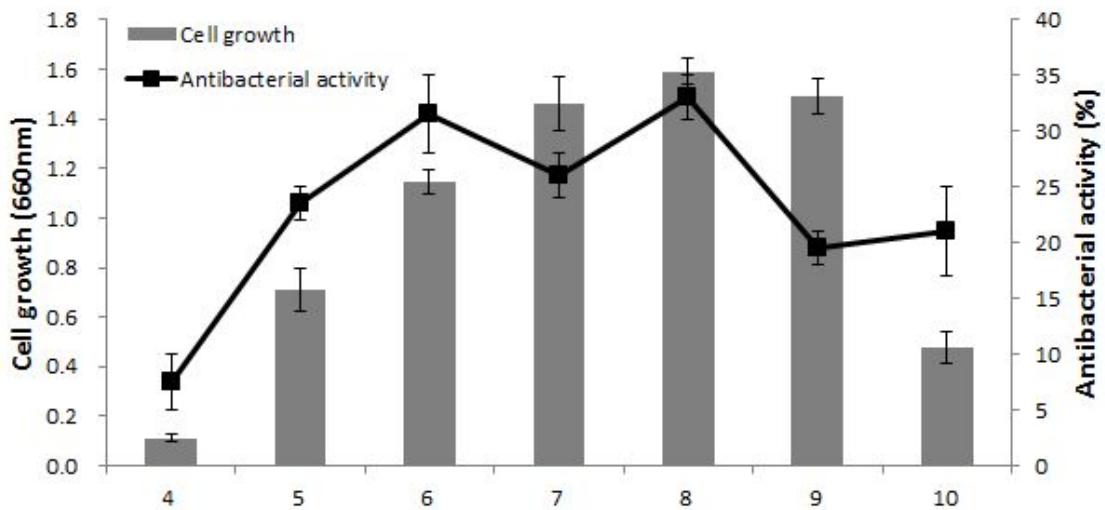


Fig. 11. Effect of pH on cell growth and antibacterial activity of *Lactobacillus rhamnosus* CY-1

### 3-3-5. 배양시간에 따른 항균물질의 생산

*Lactobacillus rhamnosus* CY-1를 배양할 때 배양시간에 따른 균생육과 항균물질의 생산에 미치는 영향을 검토하여 Fig. 12에 나타내었다. 균생육은 96 시간까지 완만하게 증가하다가 균 생육이 더 이상 증가하지 않았으며 점차적으로 감소함을 보였다. *S. parauberis*의 항균활성은 12시간이 지난 후부터 나타나기 시작하여 서서히 증가하다 96시간째에 가장 높은 항균활성을 보였다. 이상의 결과를 바탕으로 균생육과 항균활성이 가장 높은 96시간을 *Lactobacillus rhamnosus* CY-1의 배양시간으로 결정하였다.

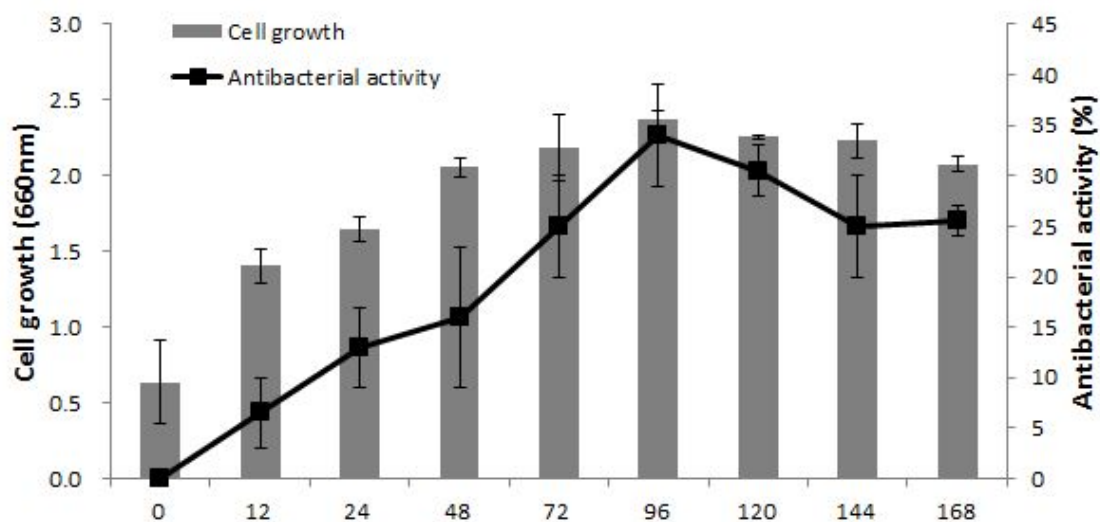


Fig. 12. Effect of culture time on cell growth and antibacterial activity of *Lactobacillus rhamnosus* CY-1

Table 6. Optimum medium compositions and culture conditions for antibiotic production by *Lactobacillus rhamnosus* CY-1

Ingredient	Concentration (w/v, %)
Rhamnose	3.0
Yeast extract	3.0
FeSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	3.0
<b>Temperature : 35°C, pH : 8.0, Culture time : 96 hours</b>	

### 3-4. *Lactobacillus rhamnosus* CY-1의 첨가에 따른 양식넙치의 병저항성

#### 3-4-1. 성장도 조사

4주 동안 각기 다른 농도의 Probiotic을 첨가한 실험구와 Probiotic을 첨가하지 않은 대조구의 양식 어류의 체중변화에 대한 결과를 Fig. 13에 나타내었다. 결과를 보면, Probiotic을 첨가한 사료를 급이한 넙치와 Probiotic을 첨가하지 않은 일반 사료를 급이한 넙치는 사육 3주 동안 비례적으로 성장하였다. 하지만 마지막 4주 성장 실험 후 최종 어체의 평균 무게를 측정한 결과  $10^7$  cfu/kg<sup>-1</sup>를 첨가한 사료로 급이한 실험구에서 대조구와  $10^3$  cfu/kg<sup>-1</sup> 실험구에 비해 약 5%정도 높게 나타났다. 양식 어류의 어체길이의 변화에 대한 결과를 Fig. 14에 나타내었다. 양식넙치의 어체길이는 어체중과 마찬가지로 3주까지 비례적인 성장을 보이다 마지막 4주에  $10^7$  cfu/kg<sup>-1</sup>를 첨가한 사료로 급이한 실험구에서 대조구와  $10^3$  cfu/kg<sup>-1</sup> 실험구에 비해 5%정도 높게 나타났다.

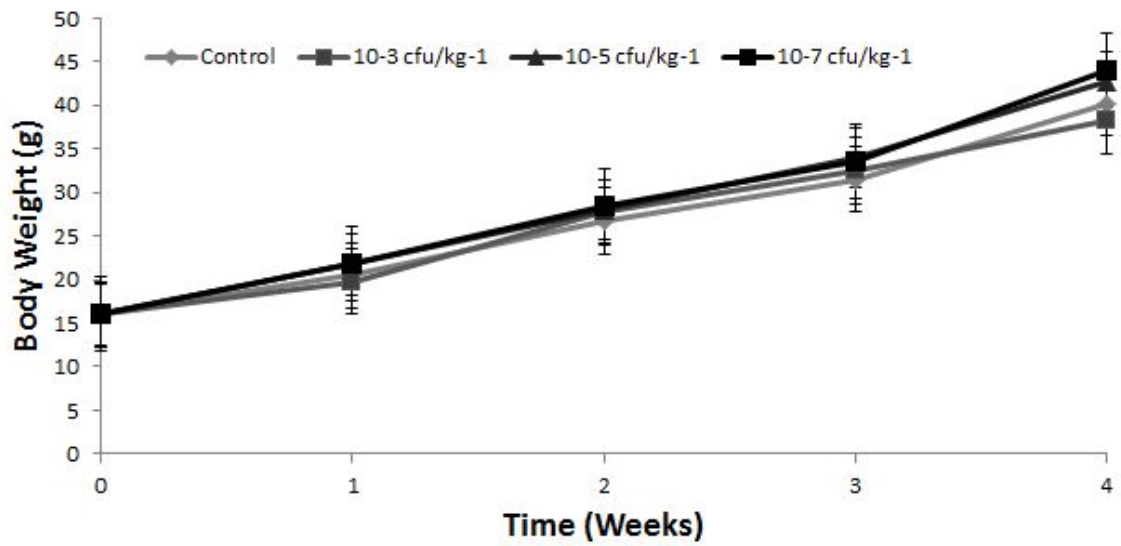


Fig. 13. Weight (g) of Olive flounder that was fed with probiotic and non-mixed control diet for 10 weeks and weighed every 2 weeks

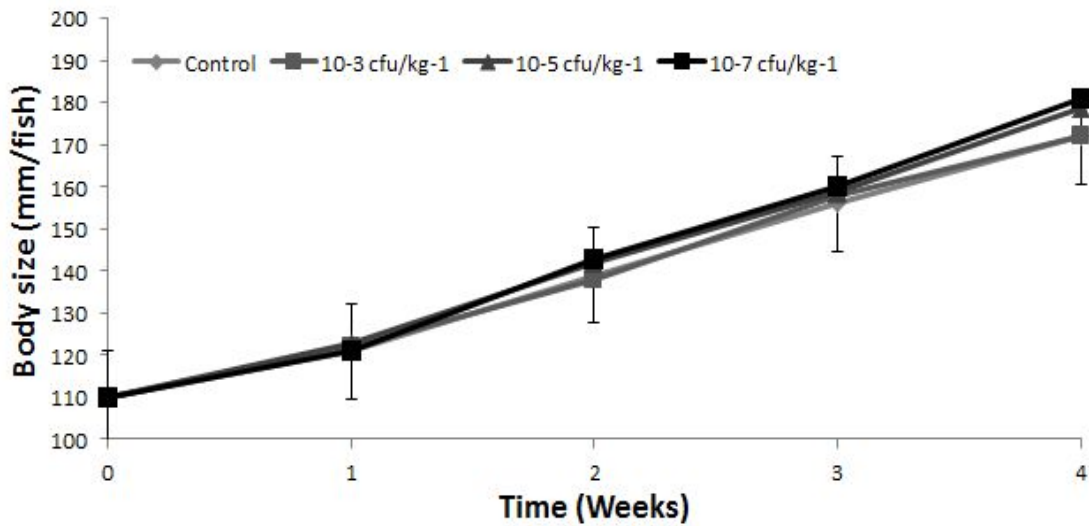


Fig. 14. Size (g) of Olive flounder that was fed with probiotic and non-mixed control diet for 10 weeks and weighed every 2 weeks

### 3-4-6. 어병세균에 의한 공격실험

생균제를 첨가한 사료를 투여한 실험구와 대조구의 어병세균에 대한 공격실험의 결과를 Fig. 19에 나타내었다.  $10^5$ CFU/ml의 농도로 조정된 *S. Parauberis* 모든 실험이 종료된 시기에 접종하여 29일 동안 누적 폐사율을 확인 하였는데 9일 째부터 대조구에서 폐사가 시작되었으며, 최종적으로 대조구에서는 50%,  $10^3$ cfu/kg<sup>-1</sup> 실험구에서는 45%의 폐사율을  $10^5$ cfu/kg<sup>-1</sup> 실험구에서는 15%의 폐사율을 나타냈으며,  $10^7$ cfu/kg<sup>-1</sup> 실험구에서는 10%의 폐사율을 보여 Control에 비해 많게는 40% 상대 생존율을 확인하였다.

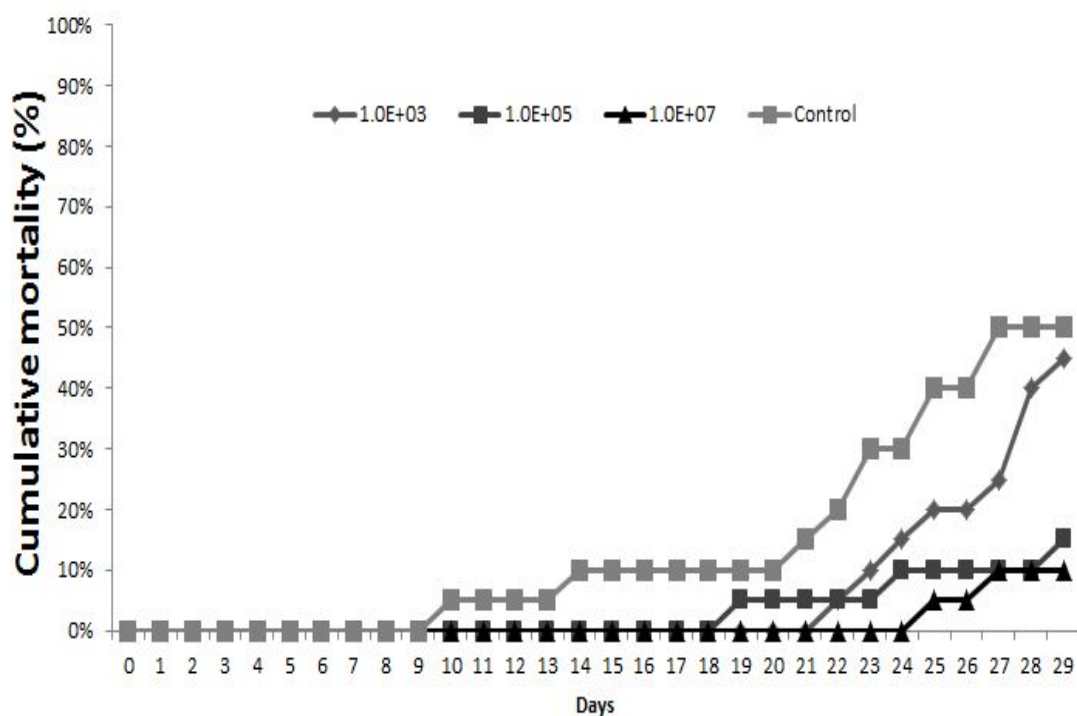


Fig. 15. Cumulative mortality (%) after intraperitoneal injection of *Streptococcus parauberis* in Olive flounder.

### 3-4-7. 사료 첨가 내 사용된 공시 균주의 장내 확인

사료 섭이를 시작한 후 1주마다 Control 사료를 급여한 대조구와 각각의 실험사료를 급여한 실험구 내의 실험어 장을 분리하여 MRS배지 단계희석을 통해 균을 재분리하였다. 일반 사료를 급여한 Control구에서는 *Lactobacillus rhamnosus* CY-1이 재분리 되지 않았으며, 모든 실험구에서는 *Lactobacillus rhamnosus* CY-1이 재분리되었다. (Table 8.) 특히, 최종 4주에  $10^5\text{cfu/kg}^{-1}$ 과  $10^7\text{cfu/kg}^{-1}$  실험구에서 가장 높은 균의 농도를 확인 할 수 있었다.

Table 7. Detection of *Lactobacillus rhamnosus* CY-1 in the intestines of *Lactobacillus rhamnosus* CY-1 fed the control diet and *Lactobacillus rhamnosus* CY-1 containing diets at  $10^3$ ,  $10^5$ , and  $10^7$  colony-forming units (cfu)(kg diet) $^{-1}$  by plate counting on MRS agar.

Number of <i>Lactobacillus rhamnosus</i> CY-1 (CFU/g-1)	Control	$10^3\text{CFU/kg-1}$	$10^5\text{CFU/kg-1}$	$10^7\text{CFU/kg-1}$
0 week	ND	ND	ND	ND
1 week	ND	$1.0 \times 10^3$	$4.2 \times 10^3$	$4.3 \times 10^4$
2 week	ND	$8.2 \times 10^3$	$1.9 \times 10^4$	$3.0 \times 10^5$
3 week	ND	$7.0 \times 10^3$	$2.5 \times 10^6$	$2.2 \times 10^6$
4 week	ND	$3.5 \times 10^3$	$3.1 \times 10^6$	$5.1 \times 10^6$



## IV. 요약

5종의 후보 균주를 양식 넙치의 장에서 분리된 후보 균주를 이용하여 항균활성, 내담즙성, 내산성 등을 조사하여 최종적으로 *Lactobacillus rhamnosus* CY-1를 선발하여 배양학적 특성, 형태학적 특성, 유전학적 특성, 생리학적 특성을 확인하였다. 공시균주 *Lactobacillus rhamnosus* CY-1를 동정하여 본 결과 *Lactobacillus rhamnosus*로 동정이 되어 *Lactobacillus rhamnosus* CY-1로 명명하였으며, 항균물질을 최대 생산하기 위한 최적 배양조건을 검토한 결과 탄소원은 Rhamnose 3%, 질소원은 Yeast extract 3%, FeSO<sub>4</sub> ·7H<sub>2</sub>O 3%, 무기염은 FeSO<sub>4</sub> ·7H<sub>2</sub>O 3%로 조사되었고, 배양온도는 35°C, 배지의 초기 pH는 8, 배양시간은 96시간으로 조사되었다.

분리 균주를 사료 내 첨가하여 103, 105, 107 CFU/kg의 농도로 제작하여 1일 2회 (오전 8시, 오후 5시) 어체 중의 2%씩 총 4주 동안 투여하여, 양식넙치의 성장을 확인한 결과 컨트롤에 비해 실험구에서 많은 성장을 보이 않았으나 최종적으로 확인하였을시 107 CFU/kg 실험구에서 가장 높은 성장을 확인 할 수 있었습니다. 실험이 종료된 시점에서 실시한 병원균인 *S.parauberis*를 이용한 인위감염에 의한 폐사율 측정에서 역시 모든 실험구에서 대조구 보다 많게는 40% 이상의 높은 생존율을 보였다. 또한 probiotic를 급이한 어류 장 내에 정착 확인을 위해 plate counting을 수행한 결과 대조구를 제외한 모든 실험구에서 *Lactobacillus rhamnosus* CY-1를 확인할 수가 있었다. 이상의 결과를 종합하여 볼 때 사료 내 첨가된 *Lactobacillus rhamnosus* CY-1인 probiotic가 양식 넙치의 어류 질병에 대한 저항성 증강에 효과가 있는 것으로 사료된다. 또한 향후 probiotics의 기작규명에 있어서도 본 연구결과의 생리학적 설정 지표가 유용하게 활용 될 수 있을 것이라 사료된다.

## V. 감사의 글

제가 실험실 생활을 한지 어느덧 4년 흘렀는데 그동안 모자른 저에게 많은 조언과 격려를 해 주신 허문수 교수님께 진심으로 감사하다는 말씀을 올립니다. 그리고 학부생부터 지금까지 많은 가르침을 주신 송춘복 교수님, 최광식교수님, 전유진 교수님, 이경준 교수님, 이제희 교수님, 김기영 교수님, 정준범 교수님, 이승헌 교수님, 정석근 교수님, 박상률 교수님께도 진심으로 감사하다는 말씀을 전하고 싶습니다.

실험을 진행함에 있어 많은 도움을 준 주상이형, 익수형, 그리고 실험실 후배인 승현, 동휘, 민선, 경미, 지운, 다예, 지현, 향실에게도 고맙다는 말을 전하고 싶습니다.

그리고 제가 이 실험을 끝까지 할 수 있게 도와준 진우형에게도 감사하다는 말을 전하고 싶습니다.

마지막으로 지금까지 저를 낳아주시고 보살펴주신 우리 사랑하는 부모님, 언제나 나의 편이 되어주는 사랑하는 우리 누나와 매형, 그리고 저에게 있어 가장 소중한 존재이기도한 우리 조카 시현이에게도 감사하다는 말을 전하고 싶습니다.

## VI. 참고 문헌

- Aoki, T., K. Tamaki. and T. Kitao. 1990. Spread of drug-resistant strains of *Streptococcus* sp. in yellowtail farms. 2nd Asian Fish. Forum, Tokyo, 17-22. 697-699.
- Arima, K., A. Kakinuma, and G. Tamura. 1968. Sufactin, a crystalline peptidelipid surfactant produced by *Bacillus subtilis*: Isolation, characterization and its inhibition of fibrin clot formation. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 31: 488-494
- Ashenafi, M. 1991. Growth of *Listeria monocytogenes* in fermenting tempeh made of various beans and its inhibition by *Lactobacillus plantarum*. *Food Microbiol.* 8: 303-310.
- Austin, B., L. F. Stuckey, P. A. W. Robertson, I. Effendi and D. R. W. Griffith. 1995. A probiotic strain of *Vibrio alginolyticus* effective in reducing diseases caused by *Aeromonas salmonicida*, *Vibrio anguillarum* and *Vibrio ordalii*. *J. Fish Dis.* 18:93-96.
- Baeck, G. W., J. H. Kim, D. K. Gomez, and S. C. Park, 2006. Isolation and characterization of *Streptococcus* sp. from diseased flounder (*Paralichthys olivaceus*) in Jeju Island. *J. Vet. Sci.*, 7:53-58
- Barefoot, S. F. and C. G. Nittle. 1993. Antibiosis revisited bacteriocin produced by dairy starter culture. *J. Dairy Sci.* 76: 2366
- Barefoot, S. F. and C. G. Nittle. 1993. Antibiosis revisited bacteriocin produced by dairy starter culture. *J. Dairy Sci.* 76 : 2366
- Bauer, A. W., W. M. Kirby, J. C. Sherris, M. Turck, 1996 Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disk method. *Am J. Clin. Pathol.* 5(4):439-496
- Bruno, M. E. C. and T. J. Montville. 1993. Common mechanistic action of bacteriocins from lactic acid bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* 59: 3003-3010.
- Chateau, N., I. Castellanos, and A. M. Deschamps. 1993. Distribution of pathogen

- inhibition in the *Lactobacillus* isolates of a commercial probiotic consortium. *J. Appl. Bacteriol.* 74: 36-40.
- Chio, H. J., C. J. Cheigh, S. B. Kim, and Y. R. Pyun, 2000. Production of a nisin-like bacteriocin by *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* A164 isolated from Kimchi. *J. Appl. Microbiol.* 88 : 563-571
- Choi, H. J., H. S. Lee, S. Her, D. H. Oh, and S. S. Yoon. 1999. Partial characterization and cloning of leuconocin J, a bacteriocin produced by *Leuconostoc* sp. J2 isolated from the Korean fermented vegetable Kimchi. *J. Appl. Microbiol.* 86: 175.
- Chun, J. Y., I.H. Ryi, S. U. Lee, and K. S. Lee, 2000. Purification and properties of anticaries microbial agent by *Bacillus alkalophilus* JY-827. *Korean J. Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 28 : 270-278
- Cirigliano, M. C. and G. M. Carman, 1984. Isolation of a bioemulsifier from *Candida lipolytica*. *Appl. Environ. Microbiol.* 48 : 747-750.
- Collins, M. D. and G. R. Gibson. 1999. Probiotics, prebiotics, and synbiotics: approaches for modulating the microbial ecology of the gut. *Am. J. Clin. Nutr.* 69(5): 1052-1057.
- Conway, P. L., 1996. Development of intestinal microbiota. In: Mackie, R. I., B. A. White, R. E. Isaacson. Eds. *Gastrointestinal Microbiology*. Vol. 2.
- Cooper, D. G., C. R. MacDonald, S. J. B. Duff, and N. Kosaric, 1981. Enhanced production of Surfactin from *Bacillus subtilis* by continuous product removal and metal cation additions. *Appl. Environ. Microbiol.* 42 : 408-412
- Corsetti, A., M. Gobbetti, and E. Smacchi. 1996. Antimicrobial activity of sourdough lactic acid bacteria: isolation of a bacteriocin-like inhibitory substance from *Lactobacillus sanfrancisco* C57. *Food Microbiol.* 13: 447-456.
- Corsetti, A., M. Gobbetti, J. Rossi, and P. Damiani. 1998. Antimould activity of sourdough lactic acid bacteria: identification of a mixture of organic acids produced by *Lactobacillus sanfrancisco* CB1. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 50 :

253-256.

Deng-Yu, T., P. H. HO, S. Y. Huang and Chun-Hung Liu, 2008 Enhancement of immunity and disease resistance in the white shrimp, *Litopenaeus vannamei*, by the probiotic, *Bacillus subtilis* E20. *Fish&shellfish immunology* 26(2) ; 339-344

Deziel, E., G. Papuette, R. Villemuer, f. Lepine, and F, F, Bisailon, 1996 Biosurfactant production by a soil *Pseudomonas* strain growing on polycyclic aromatic hydrocarbons. *Appl. Environ. Microbiol.* 62 : 1908-1912.

Eldar, A., O. Shapiro, Y. Bejerano, and H. Bercovier. 1995. Vaccination with whole cell vaccine and bacterial protein extract protects tilapia against *Streptococcus difficile* meningo encephalitis. *Vaccine.* 13: 867-870.

Fiechter, A. 1992. Biosurfactant: moving towards industrial application. *Trends Biotechnol.* 10 : 208-217.

Fuller, R., 1989. Probiotics in man and animal. *J. Appl. Bacteriol.* 66 : 365-378.

*Gastrointestinal Microbes and Host Interactions.* Chapman & Hall Microbiology Series, Chapman & Hall, New York. 3-38.

Gatesoupe, F.J., T. Arakawa, and T. Watanabe. 1989. The effect of bacterial additives on the production rate and dietary value of rotifers as food for Japanese flounder, *Paralichthys oliaceus*. *Aquaculture.* 83: 39-44.

Georgiou, G., S. C. Lim, and M. M. Sharma. 1992. surface-active compounds from microorganisms. *Bio/technology* 10 : 60-65

Gildberg, A., H. Mikkelsen, E. Sandaker, and E. Ringo. 1997. Probiotic effect of lactic acid bacteria in the feed on growth and survival of fry of Atlantic cod *Gadus morhua*. *Hydrobiologia.* 352: 279-285.

Gram, L., J. Melchiorson, B. Spanggaard, I. Huber, and T. F. Nielsen. 1999. Inhibition of *Vibrio anguillarum* by *Pseudomonas fluorescens* strain AH2-a

- possible probiotic treatment of fish. *Appl. Environ. Microbiol.* 65: 969-973.
- Harris, L. J., M. A. Daechsel, M. E. Stiles, and T. R. Klaenhammer. 1989. Antimicrobial activity of lactic acid bacteria against *Listeria monocytogenes*. *J. Food Prot.* 52: 384-387.
- Heo, M. S., C. B. Song, J. H. Lee, I. K. Yeo, Y. J. Jeon, J. J. Lee, S. C. Chung, K.W. Lee, S Rho, K. S. Choi, and Y. D. Lee, 2001. Characteristics of *B-Streptococcus* spp. isolated in cultured flounder( *paralichthys olivaceus*) of jeju island. *J Korean Fish. Soc.* 34(4) :365-369.
- Hiramoto, K. ,H. Johkoh, K. I. Sako, and K. Kikugawa, 1993. DNA breakingactivity of the carbon-centered radical generated from 2,2'-azobis(2-amidinopropane) hydrochloride (AAPH). *Free Radical Research and Communication*, 19:323-332
- Hiraoka, A., T. Ano, and M. Shoda, 1992. Molecular cloning of a generesponsible for the biosynthesis of the lipopeptide antibiotics iturin and surfactin. *J. Ferment. Bioeng.* 74 : 323-326
- Hiraoka, H., O. Asaka, T. Ano, and M. Shoda, 1992. Characterization of *Bacillus subtilis* RB14, coproducer of peptide antibiotics iturin A and surfactin. *J. Gen. Appl. Microbiol.* 38:635-640.
- Hyronimus, B., C. Le marrec, and M. C. Urdaci, 1998. Coagulin, a bacteriocin-like inhibitory substanceproduced by *Bacilluscoagulans*I4. *J. Appl. Microbiol.* 85:42-50
- Holck, A., L. Axelsson, S. E. Birkeland, T. Aukrust, and H. Bloom. 1992. Purification and amino acid sequence of sakacin A, a bacteriocin from *Lactobacillus sakei* LB 706. *J. Gen. Microbiol.* 138: 2715-2720.
- Hugas, M., F. Pages, M. Garriga, and J. M. Monfort. 1998. Application of the bacteriocinogenic *Lactobacillus sakei* CTC494 to prevent growth of *Listeria monocytogenes* in fresh and cooked meat products packed with different atmospheres. *Food Microbiol.* 15(6): 539-650.
- Hudault, S., V. Lievin, M. F. Bernet-Camard, and A. L. Servin. 1997.

Antagonistic activity exerted in vitro and in vivo by *Lactobacillus casei*(strain GG) against *Salmonella typhimurium* C5 infection. *Appl. Environ. Microbiol.* 63: 513-518

Hwang K. A., J. R. Lee, S. J. Kim, Y. S. Kim, and H. J. Ahn, 1999. Surface-activity and environmental characteristics of biosurfactant produced by *Pseudomonas aeruginosa* JRT-4. *Kor. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.* 27(2):159-165

Jack, R. W., J. R. Tagg, and B. Ray. 1995. Bacteriocin of gram-positive bacteria. *Microbiol. Rev.* 59 : 171-200.

Jay, J. M. 1982. Effect of a milk product, fermented by *Lactobacillus acidophilus* and with fructo-oligosaccharides added, on blood lipids in male volunteers. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 38:17-22

Jhon, W. M. and J. B. Mulders, 1991. Identification and characterization of the antibiotic nisin variant. *Eur. J. Biochem.*, 201:581-584.

Joborn, A., C. Olsson, A. Westerdahl, P. L. Conway, and S. Kjellberg. 1997. Colonization in the fish intestinal tract and production of inhibitory substances in intestinal mucus and faecal extracts by *Carnobacterium* sp. strain K. *J. Fish Dis.* 20: 383-392.

Joo, G. J., and J. H. Kim, Optimization of large scale culture conditions of *Bacillus ehimensis* YJ-37 antagonistic to vegetables Damping-off fungi. *Korean J. Life Sci.*, 2(3) : 242-249.

Jung, H. K. and S. D. Kim, Purification and Characterization of an antifungal antibiotic from *Bacillus megaterium* KL 39, a biocontrol agent of red-papper phytophthora blight disease. *Kor. J. Microbiol. Biotechnol.* 31(3) : 235-241.

Kang, K. H. 1996. Bioindustry. *Korean J. Appld. Microbial. Bioeng.* 9(3) : 41-67.

Kang, S. M., C. S. Lee, and Y. C. Kim, 1996. Isolation of biosurfactant-producing yeast *Rhodotorula* Sp. G-1 and the biosurfactant production. *Kor. J. Appl*

Microbiol. Biotechnol. 24(2) : 185-190

Kang, J. H. and M. S. Lee. 1998. Mode of action of the bacteriocin from *Lactobacillus* sp. GM7311 against gram positive bacteria. J. Korean Fish. Soc. 31(4): 560-566.

Karunasagar, I., R. Pai, G. R. Malathi, and I. Karunasagar. 1994. Mass mortality of *Penaeus monodon* larvae due to antibiotic resistant *Vibrio harveyi* infection. Aquaculture. 128: 203-209.

Kim, S. A., Y. G. Lee, Y. L. Choi, C. W. Hwang, Y. K. Jeong, and W. H. Joo, 2007. Physiological characteristics of biosurfactant-producing *Bacillus subtilis* TBM 3101. J. Korean Soc. Appl. Biol. Chem. 50(1) : 12-17.

Kim, S. H., S. C. Lee, I. H. Park, J. S. Yoo, W. H. Joo, C. W. Hwang, and Y. L. Choi, 2005. Isolation and characterization of biosurfactant from *Bacillus atrophaeus* DYL-130. J. Life Sci. 15(5) : 679-684.

Kim, S. H., S. C. Lee, J. S. Yoo, W. H. Joo, S. Y. Chung, and Y. L. Choi, 2004. Characterization of oil-degradation biosurfactant produced by *Bacillus* sp. TBM40-3. J. Korean Soc. Appl. Biol. Chem. 47(2) : 170-175.

Klein, C., C. Kaletta, and K. D. Entian. 1993. Biosynthesis of the antibiotic subtilin is regulated by a histidine kinase/response regulator system. Appl. Environ. Microbiol. 59:296-303.

Kluge, B., J. Vater, J. Salnikow, and K. Eckart. 1998. Studies on the biosynthesis of surfactin, a lipopeptide antibiotic from *Bacillus subtilis* ATCC 21332. FEBS Lett. 231 : 107-110

Klaenhammer T. R. 1988. Bacteriocin of lactic acid bacteria. Biochem. 70(3) : 337-349

Kratzschmar, J., M. Krause, and M. A. Marahiel, 1980. Gramicidin biosynthesis operon containing the structural genes *grsA* and *arsB* has an open reading frame encoding a protein homologous to fatty acid thioesterases. J. Bacteriol. 171 : 5422-5429.



Laemmli UK. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 277 : 680-685

Lee, C. H. and D. S. Ha, 1991. A streptococcal Disease of Cultured Flounder, *Paralichthys olivaceus*. *J. Fish Pathol.* 4 : 71-77.

Lee, D. K., J. I. Lee, C. I. Park, and S. I. Park, 2001. The study on the causal agent of Streptococciosis (*Lactococcus garvieae*), isolated from cultured marine fishes. *J. Fish Pathol.*, 14(2) : 71-80.

Lee, S. B. and S. H. Choi, 2006. Isolation and identification of probiotic actobacillus isolates for calf meal supplements. *Korean J. Food Sci. Ani. Resour.* 26(1) : 106-112

Maget-Dana, R. and F. Peypoux. 1994. Iturins, a special class of pore-forming lipopeptides: biological and physicochemical properties. *Toxicology.* 87 : 151-174.

Mittenhuber, G., R. Weckermann, and M. A. Marahiel, 1989. Gene cluster containing the genes for tyrocidine synthetase 1 and 2 from *Bacillus brevis*: evidence for an operon. *J. Bacteriol.* 171 : 1881-1887

Montville, T. J. and M. E. C. Bruno. 1994. Evidence that dissipation of protein motive force is a common mechanism of action for bacteriocins and other antimicrobial proteins. *Inter. J. Food Microbiol.*, 24 : 53-74.

Muller, H. E., 1995. Detection of hydrogen peroxide produced by microorganism on ABTS-peroxidase medium *Zentralbl. Bakteriol. Microbiologie and Hygiene*, 259 : 151-158

Nakano, M. M. and P. Zuber. 1990. Molecular biology of antibiotic production in *Bacillus*. *Biotechnol.* 10 : 223-240.

Nanjo, F., K. Goto, R. Seto, M. Suzuki, M. Sakai, and Y. Hara, 1996.

- Scavenging effects of tea catechins and their derivatives on 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl radical. *Free Radical Biology and Medicine*, 21 : 895-902.
- Newman, S. G. 1993. Bacterial vaccines for fish. *Annu. Rev. Fish Dis.* 3: 145-185.
- Nissen-Meyer, J., H. Holo, L. S. Havarstein, K. Sletten, and I. F. Nes. 1992. A novel lactococcal bacteriocin whose activity depends on the complementary action of two peptides. *J. Bacteriol.* 174: 5685-5692.
- Olsson, J. C., A. Westerdahl, P. L. Conway, and S. Kjelleberg. 1992. Intestinal colonization potential of turbot *Scophthalmus maximus* and dab *Limanda limanda*-associated bacteria with inhibitory effects against *Vibrio anguillarum*. *Appl. Environ. Microbiol.* 58: 551-556.
- Park, S. K., Y. S. Cho, M. Y. Shon, S. W. Gal, and S. W. Lee, 2007. Isolation and cultural characterization of antibacterial substance producing microbes. *Korean J. Food Preserv.*, 14(2) : 194-200.
- Piard, J. C. and M. Desmazeaud. 1992. Inhibiting factors produced by lactic acid bacteria. 2. Bacteriocins and other antibacterial substances. *Lait.* 72: 113-142.
- Ramasamy harikrishnan., M. C Kim, J. S. Kim and M. S Heo, 2011. Immunomodulatory effect of probiotics enriched diets on *Uronema marinum* infected olive flounder. *Fish & Shellfish immunology.*, 30(3) : 964-971
- Ringo, E. and F. J. Gatesoupe. 1998. Lactic acid bacteria in fish: a review. *Aquaculture.* 160: 177-203.
- Roberts, M. S., L. K. Nakamura, and F. M. Cohan, 1996. *Bacillus vallismortis* sp. nov., a close relative of *Bacillus subtilis*, isolated from soil in Death Valley, California. *Int. J. Syst. Bacteriol.*, 46(2) : 470-475.
- Rosenquist, H. and A. Hansen. 1998. The antimicrobial effect of organic acids,ourdough and nisin against *Bacillus subtilis* and *B. licheniformis* isolated from wheat bread. *J. Appl. Microbiol.* 85: 621- 631.

- Prapar, H. D. and R. P. Bird, 1984. *J. Agric. Food Chem.* 32 : 433
- Ryu, H. S., M. Y. Shon, S. J. Cho, S. K. Park, and S. W. Lee, 2007. Characterization of antibacterial substance-producing *Bacillus subtilis* isolated from traditional Doenjang. *J. Korean Soc. Appl. Biol. Chem.* 50(2) : 87-94.
- Salminen, S., A. C. Ouwehand, Y. Benno, and Y. K. Lee. 1999. probiotics: how should they be defined *Trends. Food Sci. Technol.* 10: 107-110.
- Schillinger, U. and F. K. Lucke. 1989. Antibacterial activity of *Lactobacillus sakei* isolated from meat. *Appl. Environ. Microbiol.* 55: 1901-1906.
- Shin Y. J., M. J. Jung, and Y. K. Jeong, 2000. Optimization of the production of a heat-stable antifungal antibiotic. *Korean J. Biotechnol. Bioeng.*, 15(6) :584-588.
- Shomura, T., N. Nishizawa, M. Iwata, J. Yoshida, M. Ito, and S. Aman, 1983. Studies on a new nucleoside antibiotic, Dapiramicin. *J. Antibiot.*, 36 : 1300-130
- Smith, P., M. P. Hiney, and O. B. Samuelson. 1994. Bacterial resistance to antimicrobial agents used in fish farming: a critical evaluation of method and meaning. *Annu. Rev. Fish Dis.* 4: 273-313.
- Song, J. K., J. H. Kim, and E. H. Kim, 2003. Comparison of RAPD profiles and phenotypical characters of *Streptococcal* strains. *J. Fish Pathol.*, 16(1) : 51-59.
- Stoffels, G., I. F. Nes, and A. Gudmundsdottir. 1992. Isolation and properties of a bacteriocin-producing *Carnobacterium piscicola* isolated from fish. *J. Appl. Bacteriol.* 73: 309-316.
- Suma. K., M. C. Misra, and M. C. Varadaraj. 1998. Plantaricin LP84, a broad spectrum heat-stable bacteriocin of *L. plantarum* NCIM 2084 produced in a simple glucose broth medium. *Int. J. Food Microbiol.* 40: 17-25
- Sugita, H., Y. Hirose, N. Matsue, and Y. Degudri. 1998. Production of

antibacterial substance by *Bacillus* spp. strain NM12, an intestinal bacterium of Japanese coastal fish. *Aquaculture*. 165: 269-280.

Tagg, G. R., A. S. Dajani, and L. W. Wannamarker. 1976. Bacteriocin of gram-positive bacteria. *Bacteriol. Rev.* 40 : 772-756.

Van Belkum, M. J., J. Kok, G. Venema, H. Holo, I. F. Nes, W. N. Konings and T. Abee. 1991. The bacteriocin lactococcin A specifically increases permeability of lactococcal cytoplasmic membranes in avoltage-independent, protein-mediated manner. *J. Bacteriol.*, 173(24), 7934-7941

Vanittanakom, N., W. Loettler, U. Koch, and G. Jung. 1986. Fengycin-a novel antifungal lipopeptide antibiotic produced by *Bacillus subtilis* F-29-3. *J. Antibiot.* 39 : 881-901.

Verschuere L., G. Rombaut, P. Sorgeloos and W. Verstraete. 2000. probiotic bacteria as biological control agents in aquaculture. *Microbiol. & Molecular Biology Reviews*. 64: 655.

Witte, W., I. Klare, and G. Werner. 1999. Selective pressure by antibiotics as feed additives. *Infection*. 27: 35-38.

Woo, S. H., H. J. Kim, J. S. Lee, J. W. Kim, and S. I. Park, 2006. Pathogenicity and classification of streptococci isolated from cultured marine fishes. *J. Fish Pathol.* 19 : 17-33

Yoo, J. H., 1994 Studies on the antifungal antibiotic produced by *Bacillus* sp. SY-414. Kangwon National Univ.

Yoon, J. H., W. D. Lee, J. H. Kang, J. S. Lee, and M. S. Lee, 2003. Manufacture of Squid - Jeogal by the improved process. *J. Kor. Fish. Soc.* 36 : 333-339.

Yoon, S. H., J. B. Kim, Y. H. Lim, S. R. Hong, J. K. Song, S. S. Kim, S. W. Kwon, I. C. Park, S. J. Kim, Y. S. Yeo, and B. S. Koo. 2005. Isolation and Characterization of three kinds of lipopeptides produced by *Bacillus subtilis* JKK238 from Jeot-kal of Korean traditional fermented fishes. *Kor. J. Microbiol. Biotechnol.* 33(4) : 295-301

국립수산진흥원 2000. 건강어류 생산을 위한 어병예방 및 치료대책