



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

제주 연안에서 분리한 해양유래 방선균  
*Streptomyces carpaticus* MK-01의  
형태학적·생화학적 동정 및  
어류질병균주에 대한 항균활성탐색



濟州大學校 大學院

海洋生命科學科

金 旻 宣

2015年 02月

제주 연안에서 분리한 해양유래 방선균  
*Streptomyces carpaticus* MK-01의  
형태학적·생화학적 동정 및  
어류질병균주에 대한 항균활성탐색

指導教授 許文洙

金 旻 宣

이 論文을 理學 碩士學位 論文으로 提出함



2015年 2月

朴昭炫의 理學 碩士學位 論文을 認准함

審査委員長 \_\_\_\_\_진 창 남\_\_\_\_\_ (인)

委 員 \_\_\_\_\_김 만 철\_\_\_\_\_ (인)

委 員 \_\_\_\_\_허 문 수\_\_\_\_\_ (인)

濟州大學校 大學院

2015年 2月

Isolation and anti-bacterial effect of  
marine-derived actinomycete -  
*Streptomyces carpaticus* MK-01, coast of Jeju  
Island, against fish pathogenic bacteria.

Min-Seon Kim  
(Supervised by professor Moon-Soo Heo)

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

Department of Marine life science

GRADUATE SCHOOL

JEJU NATIONAL UNIVERSITY

February, 2015

# 목 차

목 차 .....	i
List of Tables .....	iii
List of Figures .....	iv
Abstract .....	vi
I. 서 론 .....	1
II. 재료 및 방법 .....	2
2.1. 해양 유래 방선균 분리 및 균주 선정 .....	5
2.1.1. 균주 분리 .....	5
2.2. 분리 방선균의 형태학적 및 생화학적 동정 .....	7
2.2.1. 그람염색(Gram staining) .....	7
2.2.2. Casein hydrolysis test .....	7
2.2.3. Starch hydrolysis test .....	8
2.2.4. Urease hydrolysis test .....	8
2.2.5. Catalase test .....	9
2.2.6. Nitrate reduction test .....	9
2.2.7. Gelatin hydrolysis test .....	10
2.2.8. Cellulose hydrolysis test .....	11
2.2.9. Hemicellulose hydrolysis test .....	11
2.2.10. Tween 20, 80 hydrolysis test .....	12
2.2.11. Chitin hydrolysis test .....	12
2.2.12. hemolysis test .....	13
2.3. 항균작용을 갖는 방선균의 분리 .....	14
2.3.1. 어류질병균주에 대한 항균활성 탐색 .....	14

2.4. 선발균주의 형태학적 및 생화학적 2차 스크리닝 .....	15
2.4.1. SEM (Scanning electron microscope) .....	15
2.4.2. 선발균주의 탄수화물 대사능 및 효소활성 실험 .....	15
2.4.3. 선발균주의 16S rRNA 염기서열 분석 .....	16
2.5. <i>Streptomyces carpaticus</i> MK-01의 최적 배양조건과 항균활성 측정 .....	17
2.5.1. 온도별 최적배양조건 탐색 및 항균활성 측정 .....	17
2.5.2. pH별 최적배양조건 탐색 및 항균활성 측정 .....	17
2.5.3. NaCl 첨가별 최적배양조건 탐색 및 항균활성 측정 .....	17
2.5.4. 탄소원 배지조성에 따른 생육검토 및 항균활성 측정 .....	18
2.5.5. 질소원 배지조성에 따른 생육검토 및 항균활성 측정 .....	19
2.5.6. 무기염 배지조성에 따른 생육검토 및 항균활성 측정 .....	19
2.6. <i>Streptomyces carpaticus</i> MK-01의 분획물의 항균활성 평가 .....	20
2.6.1. 유기용매 분획 .....	20
2.6.2. 최소억제농도(MIC) 측정 .....	20
2.6.3. 최소살균농도(MBC) 측정 .....	21
2.7. <i>Streptomyces carpaticus</i> MK-01의 분획물의 항산화 활성 측정 .....	21
2.7.1. Hydroxyl radical 소거활성 .....	21
2.7.2. DPPH radical 소거활성 .....	22
2.8. <i>Streptomyces carpaticus</i> MK-01의 농도별 사료 첨가에 따른 양식넙치의 비특이적 면역반응 실험 .....	23
2.8.1. 실험어 사육관리 .....	23
2.8.2. 혼합 사료 제작 및 투여 .....	24
2.8.3. Lysozyme activity .....	24
2.8.4. Phagocytosis activity .....	24
III. 결과 및 고찰 .....	25

3.1. 해양 유래 방선균 분리 .....	25
3.2. 분리 방선균의 배양학적 특성 .....	25
3.3. 분리 방선균의 형태학적 및 생화학적 동정 .....	27
3.4. 어류 질병 세균에 대한 항균활성 결과 .....	30
3.4.1. 항균물질 생산 방선균주 선정 .....	30
3.5. 선발균주 MK-01의 형태학적·생화학적 2차 스크리닝 .....	32
3.5.1. MK-01의 Scanning electron microscope .....	33
3.5.2. MK-01의 탄수화물 대사능 및 효소 활성 .....	33
3.5.3. 16S rRNA염기서열 분석 .....	36
3.6. <i>Streptomyces carpaticus</i> MK-01의 최적배양조건 탐색 및 항균활성 측정 · 37	
3.6.1. 온도별 최적 배양조건 탐색 및 항균활성 .....	37
3.6.2. pH별 최적 배양조건 탐색 및 항균활성 .....	38
3.6.3. NaCl첨가별 최적 배양조건 탐색 및 항균활성 .....	39
3.6.4. 탄소원 배지조성에 따른 생육 검토 및 항균활성 .....	40
3.6.5. 질소원 배지조성에 따른 생육 검토 및 항균활성 .....	41
3.6.6. 무기염 배지조성에 따른 생육 검토 및 항균활성 .....	42
3.7. <i>Streptomyces carpaticus</i> MK-01 분획물의 항균활성 평가 .....	43
3.7.1. 최소억제농도(MIC) .....	43
3.7.2. 최소살균농도(MBC) .....	44
3.8. <i>Streptomyces carpaticus</i> MK-01 분획물의 항산화 활성 측정 .....	45
3.8.1. Hydroxyl radical 소거활성 .....	45
3.8.2. DPPH radical 소거활성 .....	46

3.9. <i>Streptomyces carpaticus</i> MK-01의 농도별 사료 첨가에 따른 양식넙치의 비특이적 면역반응 실험 .....	47
3.9.1. Lysozyme activity .....	47
3.9.2. Phagocytosis activity .....	48
IV. 요약 .....	50
V. 참고 문헌 .....	39
VI. 감사의 글 .....	40



## List of tables

Table 1. Composition of isolated actinomycetes medium .....	6
Table 2. Composition of casein hydrolysis test medium .....	8
Table 3. Composition of urease hydrolysis test medium .....	9
Table 4. Composition of nitrate reduction test medium .....	10
Table 5. Composition of gelatin hydrolysis test medium .....	10
Table 6. Composition of cellulose hydrolysis test medium .....	11
Table 7. Composition of Hemicellulose hydrolysis test medium .....	12
Table 8. Composition of Chitin hydrolysis test medium .....	13
Table 9. List of fish pathogens and growth conditions used for antibacterial activity experiments .....	14
Table 10. The culture characteristics of isolated marine actinomycetes .....	26
Table 11. General physiological characteristics of isolated marine actinomycetes .....	28,29
Table 12. The antibacterial activity comparison with the isolated strain about fish pathogens .....	31

Table 13. The biochemical characteristic of actinomycete MK-01 by API 50 CHB kit test .....	34
Table 14. The biochemical characteristics of actinomycete MK-01 by API ZYM kit test .....	35
Table 15. The minimum inhibitory concentrations(MIC) of fish disease bacteria according to the fractions of <i>Streptomyces carpaticus</i> MK-01. ....	44
Table 16. The minimum bactericidal concentrations(MBC) of fish disease bacteria according to the fractions of <i>Streptomyces carpaticus</i> MK-01. ....	44

## List of figures

Fig. 1. Scanning electron microscope of isolated actinomycete MK-01 .....	32
Fig. 2. Phylogenetic analysis of 16S rRNA sequence of <i>Streptomyces carpaticus</i> MK-01 .....	36
Fig. 3. Effect of temperature on cell growth and antibacterial activity of <i>Streptomyces carpaticus</i> MK-01 .....	37
Fig. 4. Effect of pH on cell growth and antibacterial activity of <i>Streptomyces carpaticus</i> MK-01 .....	38
Fig. 5. Effect of NaCl(%) on cell growth and antibacterial activity of <i>Streptomyces carpaticus</i> MK-01 .....	39
Fig 6. Effect of various carbon souce on the growth and antibacterial activity of <i>Streptomyces carpaticus</i> MK-01 .....	40
Fig 7. Effect of various nitrogen souce on the growth and antibacterial activity of <i>Streptomyces carpaticus</i> MK-01 .....	41
Fig 8. Effect of various mineral souce on the growth and antibacterial activity of <i>Streptomyces carpaticus</i> MK-01 .....	42
Fig. 9. Hydroxyl radical scavenging activity of fractions of methanol and Ehtyl acetate .....	45

Fig. 10. DPPH radical scavenging activity of fractions of methanol and Ehtyl acetate ..... 46

Fig. 11. Lysozyme activity in serum of Olive flounder that was fed with supernatant 3% and 5% of *Streptomyces carpaticus* MK-01 for 4 weeks. .... 48

Fig. 12. Phagocytosis activity in serum of Olive flounder that was fed with supernatant 3% and 5% of *Streptomyces carpaticus* MK-01 for 4 weeks. .... 49

## Abstract

In this study, actinomycetes were isolated from seawater collected from Daejeong-coast of Jeju Island, to evaluate its antibacterial activity against fish pathogens. About 24 actinomycetes strains were isolated and identified using physiological, biochemical and molecular tools. Light microscopic observation of MK-01 strains shows gray spores bearing dark brown mycelia colony which produce purple pigment. MK-01 strain was found to have extensive antibacterial activity against *S. iniae*, *S. parauberis*, *V. anguillarum*, *E. tarda*. The optimum culture condition such as temperature, pH and NaCl(%) concentration required pH 6~7, 30°C and 2% respectively.

The results of biochemical and physicochemical studies revealed that the best carbon source, organic nitrogen source and mineral source for cell growth and antibacterial activity are dextrose, tryptone, and  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$  respectively. Ethyl acetate and Methanol treated fractions of MK-01 culture supernatant were used for the antibacterial assay.

Minimum inhibitory concentration (MIC) of Methanol and Ethyl acetated fractions were about 31.25  $\mu g/ml$ , 32.5  $\mu g/ml$ , 1000  $\mu g/ml$  in the *S. iniae*, *S. parauberis* and *V. anguillarum* respectively while the minimum bacterial concentration (MBC) were found to be 250  $\mu g/ml$ , 500  $\mu g/ml$ , 1000  $\mu g/ml$  for *S. iniae*, *S. parauberis* and *V. anguillarum*

Phylogenetic analysis based on 16S rDNA sequences of the strain MK-01 shows the high similarity to *Streptomyces carpaticus* (97.63%).

DPPH radical scavenging activity of different methanol fraction of MK-01 culture showed 31.25  $\mu g/ml$  for 13%, 62.5  $\mu g/ml$  for 15%, 125  $\mu g/ml$  for 19%, 250  $\mu g/ml$  for 22%, 500  $\mu g/ml$  for 23% and 1000  $\mu g/ml$  for 29% and Ethyl acetate fraction showed 31.25  $\mu g/ml$  for 9%, 62.5  $\mu g/ml$  for 11%, 125  $\mu g/ml$  for 19%, 250  $\mu g/ml$  for 20%, 500  $\mu g/ml$  for 21.12% and 1000  $\mu g/ml$  for 26% Hydroxyl radical scavenging activity for methanol fraction showed 31.25  $\mu g/ml$  for 13%, 62.5  $\mu g/ml$  for 16.68%, 125  $\mu g/ml$  for 23.87%, 250  $\mu g/ml$  for 38.2%, 500  $\mu g/ml$  for 42.9% and 1000  $\mu g/ml$  for 58.8% and for Ethyl acetate fraction showed 31.25  $\mu g/ml$  for 9.32%, 62.5  $\mu g/ml$  for 14.68%, 125  $\mu g/ml$  for 20.78%, 250  $\mu g/ml$  for 29.2%, 500  $\mu g/ml$  for 39.8% and 1000  $\mu g/ml$  for 49.9%

Dietary effect of MK-01 supernatant on non-specific immune response such as Lysozyme activity and Phagocytic activity of Olive flounder was assessed with 3% of supernatant mixed flounder feed.

## I. 서론

최근 몇 년 동안 어업분야는 전 세계적으로 빠르게 성장하였다. 하지만 수요가 늘어나면서 고밀도 사육으로 인한 수질저하와 어류의 스트레스 등으로 인하여 폐사량이 급격히 증가하고 있다. 이러한 문제점으로 인해 생산량은 감소하게 되고 결과적으로 경제적 손실을 일으키게 된다(통계청,2013 어류양식동향조사).

주요 어류질병체인 세균성, 진균성, 바이러스성, 기생충성 질병 중 특히 세균성 질병은 양식 어류 폐사율의 상당한 많은 비중을 차지한다(Jeyasekaran *et al.*, 2001). 다양한 세균성 질병의 치료를 위해 항생제 투여 및 백신과 같은 화학적 요법을 사용하게 된다(Newman, 1993). 하지만 항생제의 무분별한 사용은 어체 내 항생제 잔존량을 높여 인체에 유해한 작용을 일으키고, 항생제 내성균주가 증가하는 등 여러 부작용을 일으키게 한다. 그러므로 이런 문제점을 해결하기 위해 새로운 메커니즘을 갖는 천연 항생물질의 개발이 주목을 받고 있다(Kim *et al.*, 2014).

육상 미생물에서 분리되는 대사산물과 다양한 생물학적 과정은 잘 알려져 있으며 수없이 보고되었다. 하지만 1980년 이후 육상의 미생물로부터 분리되는 항생물질의 발견은 꾸준히 감소하고 있는 실정이다(Adinarayana G *et al.*,2006). 이는 기존 육상 생물자원이 제한적인 시료와 반복적인 탐색으로 인해 같은 물질을 번번이 재발견되는 비효율이 생겨나기 때문이다(Lam, 2006). 새로운 기작의 천연물의 개발을 위해 최근 육상과는 전혀 다른 환경의 해양에 대한 관심이 높아지며 그 중요성이 부각되고 있다.

지구 표면적의 70% 이상을 차지하고 있는 해양은 고염분, 저온, 친압성, 빈영양성, 마그네슘, 칼륨, 철 등의 다양한 무기물이 풍부한 특성을 갖고 있는 환경이기에 육상의 미생물과는 전혀 다른 형태학적 특성과 생리학적 특성을 갖고 있다(Han, 2011; Riyanti *et al.*, 2009).

해양유래 미생물은 항바이러스, 항암제, 항균작용을 갖는 강력한 항생물질을 만들어낸다(Bernan *et al.*, 1997). 그러나 이전 연구 결과에 따르면 이는 해양생물과 공생하는 미생물들에 의해 생산되는 대사산물인 것으로 밝혀졌다. 이런 연구 결과를

토대로 해양 유래 미생물을 이용할 경우, 새로운 천연 항생물질을 생산할 수 있다는 점에서 해양 미생물에 관한 연구가 급속히 증가하고 있다. 전체 해양 유래 천연물 중 현재까지 해양 미생물로부터 보고된 천연물질은 약 17%로 작은 비중을 차지하고 있다(Fenical *et al.*, 2006). 이렇듯 해양 환경에서 성장하는 해양 미생물의 다양성과 대사산물에 대한 연구는 아직도 미비하기 때문에 새로운 항균물질 발견의 가능성을 기대할 수 있다.

다양한 해양 미생물 중에서 해양 방선균은 생물학적으로 굉장히 중요하며 천연 항생물질의 자원으로 많은 관심을 받고 있다. 방선균은 분류상으로 원핵세포 생물에 속하는 세균으로, 방사상균(放射狀菌)이라고 한다. 이들은 일반적으로 독특한 형태의 집락을 형성 하며 단세포체로, 운동성은 없으며 대부분 실 모양의 균사체(Mycelia)형태로 성장하고 분생포자(Conidiospore)를 생성한다. 곰팡이의 균사처럼 실 모양으로 연결되어 증식하고 끝에 포자를 형성한다. 균사의 폭은 보통 직경 0.5~1 $\mu$ m 정도의 미세한 사상세균으로 생육온도는 25~38 $^{\circ}$ C로 폭이 넓다. 일반적으로 방선균은 배지 속으로 성장하는 1차 균사인 영양균사와 공기 중으로 신장하는 2차 균사인 기균사로 되어 있다. 이들 균사는 속의 특징에 따라 연쇄상으로 되거나 단독으로 분생포자 또는 포자낭을 형성하기도 한다. 그리고 구아닌과 시토신 (G:C)의 함량이 69~78%로 많은 편으로 열에 대한 안전성이 있고 DNA 변성이 어렵다 (Dharmaraj S, 2010).

방선균은 광합성 세균이 만들어 내는 아미노산 등을 받아들이고 유기물을 분해함으로써 다양한 2차 대사산물, 생리활성 물질, 비타민 등의 저분자 물질을 생성한다 (Sivakumar *et al.*, 2007). 항균물질을 생성하여 곰팡이, 병원성 세균의 증식을 억제하여 유용 미생물을 위해 살기 좋은 환경으로 만든다(Beppu *et al.*, 1992). 지금까지 미생물로부터 발견된 23,000여 종의 생리활성 물질 중 10,000여 종이 방선균에서 발견되었다(Olano *et al.*, 2009). 최근 20년간 보고된 면역 조절제, 항암제, 항균제 등 다양한 생리활성물질의 경우 방선균 유래가 82% 이상을 차지한다(Lofti, 2005) 이런 점을 미루어보아 방선균의 생리활성 물질의 응용성은 매우 중요하게 인식되지만, 방선균으로부터 분리되는 항생물질의 발견이 점차 감소하고 있는 실정이다. 따라서 규명되지 않은 새로운 기작의 항생물질의 발견을 위해 지속적인 연구가 필요하다.

해양 방선균은 전혀 다른 환경에서 서식하는 점과 염분, 온도와 같은 다양한 환경적 요소들에 의해 육상 방선균과는 전혀 다른 생태학적 특성, 유전학적 배경을 가지고 있어 새로운 구조를 가진 천연물이 분리될 가능성이 매우 높게 평가되고 있다 (Olano *et al.*, 2009; Okami, 1986).

1960년대에 해양 퇴적층으로부터 해양 방선균이 분리 보고 되어졌으며, 해양 방선균이 육상 방선균과 전혀 다른 화학적 특성을 보이고 독립적인 특이성을 갖는 다는 것이 밝혀진 것은 비교적 최근의 일이다. 특히 근해 퇴적층에서 분리한 방선균은 대부분 육상에서 유입된 종이나(Lu, 2009), 해양환경에 능동적으로 적응한 동일 균주 일지라도, 서식조건에 따라 신진대사에도 영향을 미치기 때문에 다른 천연물을 생성하는 예가 많음으로 연구가치가 크다 할 수 있다(Mohanraj *et al.*, 2013).

최근 해양 방선균은 어류, 무척추동물, 해면, 해조류, 해수, 해양퇴적층, 맹그로브 숲과 같은 다양한 환경에서 분리되었다(Peela *et al.*, 2005; Palani selvan *et al.*, 2012; Zheng *et al.*, 2000; Jesen *et al.*, 2005; Lee, 2006; Gandhimathi *et al.*, 2008; Riyanti *et al.*, 2009). 현재까지 분리된 해양 방선균의 대표적인 속으로 *actinomadura*, *Actinosynnema*, *Amycolatopsis*, *Arthrobacter*, *Aeromicrobium*, *Blastococcus*, *Brachy bacterium*, *Corynebacterium*, *Dietzia*, *Frankia*, *Frigoribacterium*, *Gordonia*, *Geodermatophilus*, *Kitasatospora*, *Marinophilus*, *Micromonospora*, *Nonomuraea*, *Rhodococcus*, *Saccharomonospora*, *Saccharopolyspora*, *Slinispora*, *Streptomyces*, *Solwaraspora*, *Tsukamurella*, *Truicella*, *Williamsia*, *Verrucosispora* 등이 있다(Starch *et al.*, 2004; Jesen *et al.*, 2007).

그 중에서도 *Streptomyces* 속은 해양 방선균으로부터 유래된 항생제에 80% 이상을 차지할 정도로 많은 비중을 차지하며 항생작용 또한 매우 광범위 하다. *Streptomyces* 속은 효소 억제제, 색소생산, 항균, 항암작용을 유도하는 2차 대사산물의 다양한 종류를 생산한다(Pati *et al.*, 2001; Adinarayana *et al.*, 2006; You *et al.*, 2005; Steven *et al.*, 2005).



## <연구목적>

해양 유래 방선균의 천연 항생물질을 높게 평가하여 실험적으로 검증하고자 한다. 본 실험에서는 제주의 연안으로부터 해양 유래 방선균을 분리·배양하여 형태학적 및 생화학적 동정 하고, 가장 넓은 항균 스펙트럼을 갖고 있는 방선균을 선별한 후, 양식넙치를 대상으로 조추출물을 사료에 첨가하여 사용하였을 때 비 특이적 면역반응을 확인하여 유용성을 확인하고자 하였다.



## II. 재료 및 방법

### 2.1. 해양 유래 방선균 분리 및 균주 선정

#### 2.1.1 균주 분리

해양유래 방선균을 분리하기 위해 시료는 제주도 제주시 대정읍 인근 연안의 해수를 멸균된 채수병에 채취하여 4℃에 보관 운송 하였다. 채취된 시료는 멸균된 0.85% 생리식염수에 1 ml를 넣고  $10^{-1}$ ~ $10^{-5}$ 배로 희석하였으며 방선균 분리 배지인 ISP2 medium, ISP4 medium, Actinomycetes isolation agar 와 Marine agar에 1%씩 염을 첨가하여 배지를 제조하였으며, 0.1 ml씩 도말하여 28℃에서 21일간 배양하였다. 배지상에서 나타나는 방선균의 균사체의 형태학적 모습을 관찰하여 분리하였으며 분리된 균주는 24% (v/v) glycerol에 현탁 하여 -85℃에 보관 하였다.



Table 1. Compositions of isolated actinomycetes medium

media	comporiton(/L)		media	comporiton(/L)		
Marine agar	Peptone	5g	ISP4	Slouble Starch	10g	
	Yeast extract	1g		Dipotassium Phosphate	1g	
	Ferric Citrate	0.1g		Magnesium sulfate USP	1g	
	Sodium Chloride	19.45g		Sodium Chloride	1g	
	Magnesium Chloride	5.9g		Ammonium sulfate	2g	
	Magnesium sulfate	3.24g		Calcium carbonate	2g	
	Calcium Chloride	1.8g		Agar	20g	
	Potassium Chloride	0.55g		Ferrous sulfate	0.001g	
	Sodium Bicarbonate	0.16g		Zinc sulfate	0.001g	
	Potassium Bromide	0.08g		Manganous Chloride	0.001g	
	Strontium Chloride	34mg		Actinomycete Isolation agar	Sodium Caseinate	2g
	Boric Acid	22mg			Asparagine	0.1g
	Sodium Silicate	4mg			Sodium Propionate	4g
	Sodium Fluoride	2.4mg			Dipotassium Phosphate	0.5g
	Ammonium Nitrate	1.6mg			Magnesium sulfate	0.1g
	Disodium Phosphate	8mg			Ferrous sulfate	0.001g
	Agar	20g			Agar	15g
Agar	20g					
ISP2	Yeast extract	4g	Starch casein agar	Casein	10g	
	Malt extract	10g		Starch	100g	
	Dextrose	4g		Sea water	370ml	
	Agar	20g		Distilled water	630ml	

## 2.2. 분리 방선균의 형태학적 및 생화학 동정

분리된 총 24균주의 해양 유래 방선균의 그람염색, hemolytic test, casein, starch, nitrate 환원 실험, oxidase test, catalase, urease, protease, Tween 20, 80, Chitin, Cellulose, Hemicellulose 분해능 등 생화학적 조사를 실시하였고, 어류질병세균에 대하여 가장 뛰어난 항균활성을 나타내어 선발균주의 형태학적 동정을 위해 Scanning electron microscope(JSM-6700F, JEOL Ltd., Japan) 촬영하여 cell의 형태 및 크기를 확인하였다, API 50 CH Kit, API ZYM Kit (BIOMERIEUX, USA)를 사용하여 효소활성과 당 자화능을 조사하였다.

### 2.2.1. 그람 염색(Gram Staining)

총 24균주의 해양 방선균의 세포벽에 따른 그람양성과 그람음성의 판단을 위해 그람 염색 실험을 실시하였다. 제조사(BBL, Difco, USA)의 방침에 따라 아래와 같이 수행하였다. 슬라이드 클라스에 0.85% 생리식염수와 피검균을 고루 문혀 Crystal Violet용액을 사용하여 1분간 염색한 후 세척한 뒤 매염제인 Iodine용액을 떨어뜨려 1분간 흡착시킨다. 다시 세척 후 95% Ethanol을 떨어뜨려 30초간 탈색한 뒤 Safranin용액을 1분간 처리하여 대조염색의 과정을 거친다. 그 뒤 현미경으로 관찰하여 그람양성과 그람음성을 판단한다.

### 2.2.2. Casein hydrolysis test

미생물의 단백질 가수분해능을 조사하는 방법중의 하나이다. Skim milk에 함유된 젖당(Lactose)이 발효되면서 생성된 산에 의해서 카제인 분해가 저해 될 수 있는 원리를 이용한 방법이다. 제조된 배지에 피검균을 도말하고 약 14일간 배양한 후 균체 주위에 투명환이 나타나는지 조사하여 판단한다.

**Table 2. Composition of casein Hydrolysis test medium.**

composition(g/L)	
Nutrient agar	23g
Skim milk	50g
Distilled water	1000ml

### 2.2.3. Starch hydrolysis test

미생물 중 Amylase 생산능이 있는 것은 녹말을 분해할 수 있다. 녹말은 화학적으로 Amylose와 Amylopectin의 두가지 성분으로 구성된다. 미생물들은 녹말을 가수분해하는 효소인 Amylase를 분비하여 녹말에서 Maltose, Glucose, Dextrin를 분해할 수 있다. 미생물에 의한 녹말의 가수분해 현상을 알아보기 위해서는 Gram's Iodine과 녹말 한천평판 배양체가 준비되어야 한다. Iodine은 녹말 배지상에 분비된 Amylase의 작용을 검증하는데 이용된다. Starch 배지에 균주를 도말하여 최대 일주일 동안 배양 한 후, 소량의 Iodine을 적하한다. 가수분해되지 않은 부분은 Iodine-Starch 반응의 결과인 보라색이 나타나 음성으로 판단하며 가수분해된 부분은 투명하게 나타나 양성으로 판단한다.

### 2.2.4.. Urease hydrolysis test

Urease는 요소 분자로부터  $\text{NH}_4$ 를 제거하는 역할을 한다. Urease는 기질에 의하여 유도되는 효소가 아니다. Urease배지는 yeast extract와 요소가 첨가된 용액이며 여기에 pH 지시액으로 Phenol red를 첨가하게 된다. Urease 배지에 피검균을 접종하고  $30^\circ\text{C}$ 에서 최소 24시간 배양한다. 해당 배지에서 미생물이 Urease를 생산하면 생성된  $\text{NH}_4$ 에 의하여 pH가 상승하게 된다. pH가 상승하므로 Phenol red는 황색(pH 6.8)에서 자주빛(pH 8.1 이상)으로 바뀌게 된다.

**Table 3. Composition of Urease Hydrolysis test medium.**

composition(g/L)	
Urease	20g
NaCl	5g
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	2g
Peptone	1g
Glucose	1g
Phenol red	12mg
Distilled water	1,000ml

### 2.2.5. Catalase test

과산화수소는 산소호흡에 의해 당이 분해될 때 생성되는 산화산물로 환원형의 flavoprotein이 산소와 반응하여 생성되는 유독성 산물이다. 이와 같은 맹독성 과산화 수소를 물과 산소로 분해할 수 있는 catalase는 보결분자족[heam prosthetic group]으로 가지고 있는 효소로써 cytochrome을 갖는 호기성 또는 대부분의 조건적 혐기성 세균에 존재하게 된다. 피검균이 배양된 고체 평판배지 colony 위에 3% 과산화수소[3% hydrogen peroxide] 몇 방울을 떨어뜨리고 기포 발생 여부를 관찰한다. 과산화수소를 가한 후 바로 기포가 발생할 시에는 강한 양성 반응, 5분 후에 발생하면 약한 양성 반응, 10분후에 발생하거나 아니하면 음성으로 판정한다.

### 2.2.6. Nitrate reduction test

세균에 의해서 일어나는 질산염의 환원과정은 질산염이 아질산염과 암모니아를 거쳐 아미노산 또는 질소질의 세포 구성물질로 합성되는 과정과, 혐기 조건하에서 질산염을 산소 대신 최종 전자 수용체(terminal electron receptor)로 이용하는 무기호흡의 두 가지로 나뉜다. 본 실험에서는 질산칼륨(potassium nitrate) 배지에서 질산칼륨을 환원하여 아질산염 또는 질소 가스로 생성하는 균의 능력을 검사한다.

Nitrate broth를 이용하여 피검균을 접종한 후 28℃에서 최대 2주간 배양한다. 그 후 배양액에 Reagent A와 Reagent B 각 1ml를 넣어 분홍색 또는 적색의 변화로 NO<sub>2</sub><sup>-</sup>를 검출 및 판단한다.

**Table 4. Composition of nitrate reduction test medium.**

composition(g/L)	
Nitrate Broth	100g
Peptone	5g
Meat extract	3g
Potassium nitrate	1g
Sulfanic acid = Reagent A	100g
N,N-Dimethyl-1-naphthylamine = Regant B	10 ml
Zinc	1g

### 2.2.7. Gelatin hydrolysis test

많은 미생물이 젤라틴을 분해할 수 있는 gelatinases 효소를 갖고 있다. 피검균의 gelatin 분해 여부를 관찰하기 위해 실험을 수행하였다.

PY배지에 glucose 0.2%, gelatin 12%가 되게 가한 후 110℃에서 15분간 멸균한다. 충분히 식혀준 다음, 각각 gelatin 배지에 피검균을 접종한 뒤 30℃에서 14일간 배양한다. 그 뒤 30분간 냉장보관 시 control에 비해 응고되지 않고 액화될 때 gelatin 액화능을 양성으로 판단한다.

**Table 5. Composition of gelatin Hydrolysis test medium.**

composition(g/L)	
Glucose	20g
Peptone	5g
Beef extract	3g
Gelatin	120g

### 2.2.8. Cellulose 분해능 실험

Cellulose 이용은 두 가지 효소를 생산하는 미생물의 능력에 달려있다. C<sub>1</sub> 효소는 결정 cellulose가 C<sub>x</sub> 효소 반응에 민감하도록 만드는데 작용한다. C<sub>1</sub>과 C<sub>x</sub> 효소를 생산하는 방선균의 계수, 분리를 위해서는 녹지 않는 cellulose를 함유한 배지를 사용한다. 추천배지에서 cellulose 분해능은 최소 7일부터 최대 28일동안 배양 시, 배지에 투명환을 나타내며 이를 양성으로 판정한다.

**Table 6. Composition of Cellulose Hydrolysis test medium.**

composition(g/L)	
Cellulose Powder	20g
Yeast extract	5g
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	2g
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	1g
NaCl	1g
MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	12mg
MnSO <sub>4</sub> ·4H <sub>2</sub> O	1,000ml
Agar	10g



### 2.2.9. Hemicellulose 분해능 실험

Hemicellulose는 균류의 세포벽을 구성하는 다당류 중 셀룰로오스(cellulose) 이외의 불용성 다당류의 총칭으로써, 헥소오스(hexose) 혹은 펜토오스(pentose)로 되어 있으며 분해하는 다당의 종류에 따라서 자일라나아제(xylanase), 갈락타나아제(galactanase), 만나나아제(mannanase), 아라비나아제(arabinose)로 분류된다.



**Table 7. Composition of Hemicellulose Hydrolysis test medium.**

composition(g/L)	
Xylan	10g
NaNO <sub>3</sub>	2g
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	1g
MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	0.5g
KCl	0.5g
FeSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	0.5g
Agar	15g

### 2.2.10. Tween 20, 80 가수분해 실험

Tween 20 및 Tween 80의 가수분해 실험은 지질분해효소인 lipase에 의한 지질 분해능을 관찰하는 것이다. Brain Heart Infusion Agar(Difco, USA)에 1%씩 Tween 20, 80을 첨가한 뒤 피검균을 접종하여 28℃에서 일주일간 배양한 후 자라난 colony 주위에 혼탁환이 나타나는데 이것을 가수분해능이 있다는 것으로 판단한다.



### 2.2.11. Chitin 가수분해 실험

키틴(chitin)은 많은 균류의 세포벽을 형성하며 chitinase와 chitobiase의 복합 활성화에 의해 분해된다. 본 실험은 Chitin 배지에 피검균을 도말하여 콜로니 주위에 수 mm의 선명한 대를 나타내면 양성으로 판정한다. Chitin의 첨가농도가 0.4% (w/v) 또는 그 이상에서 가장 분명한 대를 나타내지만 0.2%, 0.8%를 첨가할 때에 가장 많은 수의 방선균이 분리된다.

Table 8. Composition of Chitin Hydrolysis test medium.

composition(g/L)	
Chitin	4g
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0.7g
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0.3g
MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	0.5g
FeSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	0.01g
ZnSO <sub>4</sub>	0.001g
MnCl <sub>2</sub>	0.001g

### 2.2.12. 용혈성(hemolysis) 실험

Blood agar medium(혈액한천배지)에 접종하여 피검균의  $\beta$ -hemolysis의 분해능력을 확인하였다. 28℃에서 48시간 배양 후, 배지 단면을 확인했을 때 colony 주변과 배지색이 투명해질 경우 용혈성이 있다고 판단한다.



## 2.3. 항균작용을 갖는 방선균의 분리

### 2.3.1 어류질병균주에 대한 항균활성 탐색

분리된 해양유래 방선균주에서 어류 질병 세균에 대한 항균활성을 탐색하기 위해 Disc diffusion method를 이용하여 실험을 수행하였다. 실험에 사용된 어류 질병 세균은 넙치의 대표 질병 원인균으로 그람 양성2종(Gram-positive: *Streptococcus iniae* KCTC 3757, *Streptococcus parauberis* KCTC 3651), 그람음성 2종(Gram-negative: *Vibrio anguillarum* KCTC 2711, *Edwardsiella tarda* KCTC 12267)으로 생물자원센터 KCTC (Korean Collection for type Culture)으로부터 분양 받았다. 분양 받은 병원균은 각각 알맞은 배지에 접종하여 적정 온도에서 24시간 배양하였다. 배양액을 0.85% 생리식염수로 희석하여 0.4 McFaland 탁도로 맞춘 뒤 멸균된 면봉으로 Mueller Hinton Agar (MHA, Difco, USA)에 도말 하였다. 분리된 24균주를 Marine Broth (MB, Difco, USA)에 배양한 후, 원심분리기(Micro 17TR, Hanil, Korea)를 사용하여 12000rpm, 10분간 원심 하여 분리한 상층액을 8 mm paper disc에 50  $\mu$ l를 적하하여 충분히 건조 시켰다. 그 뒤 병원균이 도말된 MHA에 일정간격으로 올려놓고 적정온도에서 24시간 배양 후 형성된 억제존(Clear zone)의 지름(mm)을 측정하였다.

**Table 9.** List of fish pathogens and growth conditions used for antibacterial activity experiments.

	strain	medium	temp
Gram positive	<i>Streptococcus iniae</i> (kctc 3757)	1.5% NaCl + BHIA	25°C
	<i>Streptococcus parauberis</i> (kctc 3651)	1.5% NaCl + BHIA	25°C
Gram negative	<i>Edwardsiella tarda</i> (kctc12267)	1.5% NaCl + BHIA	25°C
	<i>Vibrio anguillarum</i> (kctc 2711)	Marine agar	28°C

## 2.4. 선발균주의 형태학적·생화학적 2차 스크리닝

### 2.4.1. SEM (Scanning electron microscope)

Scanning electron microscope (JSM-6700F, JEOL Ltd., Japan) 기기를 이용하여 Cell의 형태와 size를 확인하였다. 피검균의 전처리는 다음과 같다. Plate상 배양된 피검균의 colony 주변으로 0.5 \* 0.5cm가 되도록 배지와 함께 절단한 뒤 2.5% glutaraldehyde 용액에 담가놓고 실온에서 2시간 방치한다. 그 뒤 1X PBS buffer로 5분씩 2번 반복 세척한 뒤 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100% EtOH로 각각 1시간씩 탈수시킨다. 그 후 isoamyl acetate : 100% EtOH = 0.5 : 1.5 비율로 섞어 만든 용액에 1시간, 1 : 1 비율로 섞어 만든 용액에 1시간, 마지막으로 1.5 : 0.5 비율로 섞어 만든 용액에 1시간 처리한다. 그 뒤 바이알병에 옮겨담아 100% isoamyl acetate 용액에 1시간 이상 보관한 후 CO<sub>2</sub> gas로 충분히 건조시켜 금박처리를 하여 촬영 하였다.



### 2.4.2. 선발균주의 탄수화물 대사능 및 효소활성 실험

선발 균주 MK-01의 탄수화물 대사능과 효소 활성을 알아 보기 위해 API 50CH, API ZYM kit(Biomerieux, France)을 사용하여 제조 업체의 지침에 따라 수행하였다.

### 2.4.3. 선발균주의 16S rRNA 염기서열 분석

선발 균주 MK-01의 DNA는 Genomic DNA Extraction Kit (Bioneer, USA)를 사용하여 제조업체 지침에 따라 진행하여 genomic DNA 분리 및 추출하였다. 균주의 16S rDNA 유전자 염기서열 증폭을 위해 primer는 27 Forward primer(5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3')와 1492 Reverse primer(5'-GGTTACCTTGTTACGACTT-3')를 사용하였다. 추출된 genomic DNA 1 $\mu$ l와 10 pmol/primer를 각각 1 $\mu$ l씩, 1Mm dNTPs, 10X PCR buffer, 5 unit Taq polymerase(TAKARA, Japan), Bioneer D.W를 혼합하여 최종부피를 20 $\mu$ l로 맞추어 수행하였다. PCR 조건은 95 $^{\circ}$ C에서 초기 변성단계 5분, 94 $^{\circ}$ C에서 변성단계 1분, 55 $^{\circ}$ C에서 결합단계 1분, 72 $^{\circ}$ C에서 합성단계 1분으로 총 30 cycle을 반복 수행 하였으며 최종 합성단계로 72 $^{\circ}$ C에서 5분간 PCR (US/MYGein32, MJ RESEARCH, USA)을 실시하였다. 증폭된 PCR 산물은 1.5% agarose gel에서 0.5 $\mu$ g/ml ethidium bromide로 염색한 뒤 전기영동 하여 확인하였다. 그 뒤 DNA 염기서열의 계통학적 분석을 위해 (주)솔젠트 (Daejeon, Korea)에 의뢰하여 염기서열을 분석 하였다. 분석된 염기서열은 Ez Taxon-e (<http://eztaxon-e.ezbiocloud.net/>)의 database를 사용하여 유사한 염기서열을 비교 분석 하였으며 가장 근연속 또는 종으로 나타나는 서열을 확인하였다. 결정된 염기서열과 database에서 확인한 표준 미생물 염기서열을 ClustalW software로 multiple alignment를 수행하여 염기서열을 배열한 뒤 Mega 5.0 software 프로그램을 이용하여 phylogenetic tree를 작성하였다.

## 2.5. Streptomyces carpaticus MK-01의 최적 배양조건과 항균활성 측정

### 2.5.1. 온도별 최적배양조건 탐색 및 항균활성 측정

선정된 피검균 MK-01의 성장온도의 범위 및 최적 생육온도를 알아보기 위해 온도를 각각 설정하여 실험을 수행하였다. 기본 배양배지인 MB를 사용하였으며 피검균을 접종하여 5°C 간격으로 15 ~ 40°C 범위로 각각 설정하여 최소 7일 동안 배양하여 660nm에서 생육도를 측정하였다. 배양액을 12,000rpm, 4°C에서 5분간 원심을 돌려 상등액을 취한 후 항균실험은 디스크 확산법(disc diffusion method)를 실시하였으며 대조균은 아무것도 접종하지 않은 MB 배지를 사용하였다.

영양원에 따른 MK-01균주의 최적 배지성분의 검토를 알아보기 위해 GY배지 (Glucose 0.5%, yeast extract 0.1%,  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$  0.02%)를 사용하였으며 탄소원, 질소원, 무기염을 일정량씩 첨가하여 비교하였다.

### 2.5.2.. pH별 최적배양조건 탐색 및 항균활성 측정

선정된 MK-01의 pH에 따른 성장범위 및 최적 생육 pH를 알아보기 위해 MB를 사용하였으며 배지에 pH를 각각 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12으로 설정하여 최소 7일 동안 배양하여 660nm에서 생육도를 측정하였다. 배양액을 12,000rpm, 4°C에서 5분간 원심을 돌려 상등액을 취한 후 항균실험은 디스크 확산법(disc diffusion method)를 실시하였으며 대조균은 아무것도 접종하지 않은 MB 배지를 사용하였다.

### 2.5.3. NaCl 첨가별 최적배양조건 탐색 및 항균활성 측정

해양으로부터 분리한 MK-01의 NaCl 첨가 농도별에 따른 성장범위 및 최적 생육 조건을 알아보기 위해 실험을 수행하였다. 분리시 사용되었던 MB를 사용하였으며 NaCl을 각각 1%, 2%, 3%, 4%, 5%, 6%, 7%, 8%, 9%, 10%, 11%, 12% 첨가하여 피검균을 접종 후 최소 7일 동안 배양한 후 660nm에서 생육도를 측정 하였다. 배양액을 12,000rpm, 4℃에서 5분간 원심을 돌려 상등액을 취한 후 항균실험은 디스크 확산법(disc diffusion method)를 실시하였으며 대조균은 아무것도 접종하지 않은 MB 배지를 사용하였다.

### 2.5.4. 탄소원 배지조성에 따른 생육 검토 및 항균활성 측정

배지의 탄소원으로 GY배지에 fructose, sucrose, sorbitol, lactose, glucose, dextrose, starch 및 ramosus를 각각 1%씩 첨가하여 제조 하였다. 피검균을 접종하고 28℃ 에서 130rpm 으로 최소 48시간 배양한 후 배양액의 탁도를 600nm에서 측정하였다. 대조구는 GY배지에서 glucose가 첨가되지 않은 배지를 사용하였다. 항균실험은 디스크 확산법(disc diffusion method)를 실시하였으며 배양액을 12,000rpm, 4℃에서 5분간 원심을 돌려 상등액을 취한 후 사용하였고 대조균은 아무것도 접종하지 않은 탄소원 GY배지를 사용하였다.

### 2.5.5. 질소원 배지조성에 따른 생육 검토 및 항균활성 측정

배지의 질소원으로 GY배지에 yeast extract, peptone, malt extract, Typtone,  $\text{NH}_4\text{NO}_3$ (=Ammonium nitrate),  $\text{NH}_4\text{Cl}$ (=Ammonium chloride),  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (=Ammonium sulfate),  $\text{KNO}_3$ (=Potassium nitrate)를 각각 0.5%씩 첨가하여 제조 하였다. 피검균을 접종하고 28℃ 에서 130rpm 으로 최소 48시간 배양한 후 배양액의 탁도를 600nm에서 측정하였다. 대조구는 GY배지에서 yeast extract가 첨가되지 않은 배지를 사용하였다. 항균실험은 디스크 확산법(Disc diffusion method)을 실시하였으며 배양액을 12,000rpm, 4℃에서 5분간 원심을 돌려 상등액을 취한 후 사용하였고 대조군은 아무것도 접종하지 않은 질소원 GY배지를 사용하였다.

### 2.5.6. 무기염 배지조성에 따른 생육 검토 및 항균활성 측정



배지의 무기염으로 GY배지에  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  (=Magnesium sulfate),  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  (=Iron(II) sulfate hepta hydrate),  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  (=Potassium phosphate dibasic anhydrous),  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$  (=Copper(II) sulfate),  $\text{ZnCl}_2$  (=Zinc chloride),  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  (=Potassium dihydrogen phosphate),  $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  (=Cobalt(II) chloride hexahydrate),  $\text{NaCl}$  (=Sodium chloride)를 각각 0.1%씩 첨가하여 제조 하였다. 피검균을 접종한 뒤 28℃ 에서 130rpm 으로 최소 48시간 배양한 후 배양액의 탁도를 600nm에서 측정하였다. 대조구는 GY배지에서  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 가 첨가되지 않은 배지를 사용하였다. 항균실험은 디스크 확산법(Disc diffusion method)을 실시하였으며 배양액을 12,000rpm, 4℃에서 5분간 원심을 돌려 상등액을 취한 후 사용하였고 대조군은 아무것도 접종하지 않은 무기염 GY배지를 사용하였다.



## 2.6. *Streptomyces carpaticus* MK-01의 분획물의 항균활성 측정

### 2.6.1. 유기용매 분획

*Streptomyces carpaticus* MK-01을 MB broth 1,000ml 에 접종하고 30℃에서 120rpm으로 14일간 진탕배양 하였다. 그 다음 12000rpm에서 20분간 원심 하여 상등액을 필터로 여과한 후 회전감압농축기(HS-2001N, HAHN SHIN, Korea)를 사용 농축하여 동결건조 시켰다. 분말형태의 농축물을 멸균된 3차 증류수와 충분히 섞어 준 뒤 동량의 ethyl acetate, methanol를 넣고 2회 반복하여 분획 및 추출하였다. 추출물은 동결건조 하여 분말형태로 만든 뒤 수율측정 하였다. 추출물질은 추후 항균활성과 물질분석 실험에 사용하였다.

### 2.6.2 최소억제농도(MIC) 측정



분획물을 이용하여 최소억제농도(MIC)를 다음과 같이 측정하였다. 우선 분획물을 농도별(125, 250, 500, 1000, 1500  $\mu\text{g}/\text{ml}$ )로 제조한 뒤 96well plate에 피검균에 따른 알맞은 배지 100 $\mu\text{l}$ 와 혼합하였다. McFaland No. 0.5 농도의 어류질병균주의 현탁액을 20 $\mu\text{l}$ 씩 접종하여 24시간 배양한다. 그 뒤 660nm에서 흡광도를 측정하여 어류질병균주의 성장이 나타나지 않는 최소 농도를 정하였다.

### 2.6.3. 최소살균농도(MBC) 측정

최소살균농도(MBC)는 Palani selvan의 방법을 참고하여 수행하였다(Palan, 2012). 이전 MIC 24 well plate으로부터 배양액 100ul을 각각 알맞은 배지에 도말하여 최대 48시간 동안 배양하였다. 그 뒤 한천배지상 병원체 미생물의 성장을 방지하는 가장 낮은 농도를 측정하였다.

## 2.7. 추출물의 항산화 활성 측정

### 2.7.1 Hydroxyl radical 소거활성



분획물의 Hydroxyl radical 소거활성 실험은 다음과 같이 수행하였다. 실험관에 10mM FeSO<sub>4</sub> / EDTA 용액 0.2ml, 10mM 2-deoxyribose 0.2ml, 시료액 0.2ml, 0.1M phosphate buffer 1ml과 10mM hydrogen peroxide 0.2ml을 넣어 37℃ 항온수조에서 4시간 동안 반응 시킨다. 그 후 2.8% TCA (Trichloroacetic acid) 1ml을 넣어 반응을 중지 시키고 1.0% TBA (Thiobarbituric acid) 1ml을 넣은 뒤 100℃에서 10분간 가열을 시켜준다. 그 다음 ice에 급속냉각 후 532nm에서 흡광도를 측정하였다. 추출물질에 대한 hydroxyl radical의 소거활성은 아래의 식을 이용하여 계산하였다.

Hydroxyl radical scavenging activity (%) = [1-(ESR signal intensity for medium containing the additivs of concern/ ESR signal intensity for the control medium)] X 100

## 2.7.2. DPPH radical 소거활성

분획물의 DPPH free radical 소거활성 실험은 다음과 같이 수행하였다. 0.2mM DPPH 용액과 시료를 1:1 (v/v) 동량을 넣은 다음 30분간 실온방치 후 517nm에서 흡광도를 측정하였다. 대조구는 ~ (노트참고)를 사용하였고 blank는 DPPH 100  $\mu$ l과 methanol 100  $\mu$ l를 혼합하여 비교하였다. 추출물에 대한 DPPH radical 소거활성은 아래의 식을 이용하여 계산하였다.

DPPH free radical scavenging activity (%) = [1-(ESR signal intensity for medium containing the additives of concern/ ESR signal intensity for the control medium)] X 100



## 2.8. *Streptomyces carpaticus* MK-01의 농도별 사료 첨가에 따른 양식 넙치의 비특이적 면역반응 실험

양식넙치의 비특이적 면역능을 알아보기 위해 실험어의 성장도와 채혈은 1주 간격으로 실시하였다. 각 수조에서 무작위 3마리를 선별하여 신장과 무게를 측정하여 평균값을 내었고, 혈액학적 분석을 위해 미부정맥으로부터 혈액을 채취 하였다. 채취된 혈액을 12000rpm 에서 10분간 원심분리하여 혈청을 분리하였고 낮은 온도를 유지시켜주면서 Lysozyme, Phagocytosis activity와 같은 비특이적 면역활성 평가실험에 바로 사용하였다.


### 2.8.1. 실험어 사육관리

본 실험에 사용된 넙치는 제주도 제주시 조천읍에 위치해 있는 양식장으로부터 분양을 받았다. 실험에 사용된 넙치의 평균 신장은 185mm 이었으며 평균 무게는 50±15g 정도 였다. 각 수조[120 L]당 15마리씩 사육하였다. 실험 기간 동안 사육수의 수온은 18.05 ~ 19.80℃, 염분은 해수와 같은 34.57‰ , pH 8.14 ~ 8.30 , 용존산소량(dissolved oxygen)은 7.2 ~ 8.1ppm 으로 유지시켰다. 실험을 시작하기에 앞서 환경적응을 위해 약 1주일 동안 기본 사료를 공급하며 순치 시켰다.

## 2.8.2. 혼합 사료 제작 및 투여

사료는 (주)수협으로부터 5호 사이즈의 기존 배합사료(조단백질 52.0%, 조지방 8.0%, 조섬유 3.0%, 조회분 14.0%, 칼슘 1.5%, 인 2.7%, 보그락, Suhyup Co., Korea)를 구했다. 기존 상업사료에 100g당 1%씩 혼합하여 제조하였다. 첫번째 그룹은 3%의 분리균주의 상등액을 혼합하였고 두번째 그룹은 5%의 분리균주의 상등액을 혼합하여 지급 하였다. 대조구는 아무것도 첨가되지 않은 일반 기존 상업사료를 지급하였다. 사료는 넙치의 무게에 2% 해당하는 만큼 지급하였으며, 1일 2회(오전 9시, 오후6시) 지급하였다.

## 2.8.3. 혈청 내 Lysozyme 활성 측정

 Micrococcus lysodeikticus(sigma, USA)를 0.02M sodium citrate buffer에 0.2mg/ml의 농도로 solution을 제조한다. 96 well plate에 serum 15 $\mu$ l을 분주한 후 즉시 *M. lysodeikticus* solution(0.2mg/ml) 150 $\mu$ l 을 넣고 24 $^{\circ}$ C에서 30초, 4분 뒤 반응 뒤 microplate reader (Synergy HTX multi-mode reader, BioTek, USA)를 사용하여 450nm에서 흡광도를 측정하였다. 결과는 분당 0.001 unit의 흡광도 감소치를 라이소자임의 활성1로 표시하였다.

## 2.8.4. 어류의 식세포 작용 측정

넙치의 미부정맥으로부터 채취한 혈액을 1.5ml microtube에 0.2% NBT(nitroblue tetrazolum)과 1:1 비율로 동일한 양을 넣어 30분간 실온반응을 시킨 뒤 dimethyl formide 1ml을 넣어 반응을 정지 시키고 2000rpm에서 5분간 원심분리 하여 상층액을 수거하여 microplate reader를 사용하여 540nm에서 흡광도를 측정하였다. Control은 dimethyl formide, NBT 시약을 사용하였다.

### Ⅲ. 결과 및 고찰

#### 3.1. 해양 유래 방선균 분리

제주도 서귀포시 대정 연안에서 채취된 해수 sample을 MA배지와 방선균 분리 배지인 ISP2, ISP4, ACT, SCA 배지에 도말하여 배양한 후 배지 상에서의 방선균의 배양특성을 보이는 균주 총 24균주를 분리하였으며, 분리된 방선균의 형태학적 특성을 확인하였다.

#### 3.2. 분리 방선균의 배양학적 특성

대정 연안의 해수로부터 분리된 미생물 중 해양 방선균은 총 24균주였다. 각각 분리 배지상에서 자라난 배양학적 특성을 확인하였다(Table 9.). 기중균사는 한천배지 상 위로 뻗어 자라난 균사로 회색, 하얀색, 노란색, 베이지, 적색, 갈색, 분홍색, 카키색 및 검은색 매우 다양하였다. 기저 균사는 배지 표면 내부에 들어가면서 신장하는 균사의 경우로 회색, 하얀색, 마젠타 외 대개 어두운 계열의 색상을 나타내었다. 분리된 방선균 중 MK-01, MK-23의 경우는 배양한지 2일만에 콜로니 주위 색소를 생성하는 양상을 보이기도 했다.

분리배지에 따라 비교를 해본 결과, 일반 증식배지인 MA와 선택적 방선균 분리배지인 ISP2 배지에서는 포자 형성이 잘 되었으나 반면, ISP4 배지는 해양 유래 방선균 분리배지로서는 적절한 배지가 아니며, SCA, ACT배지 경우 분리원에 따라 차이를 보이는 선택배지라고 판단된다.

**Table 10.** The culture characteristics of isolated marine actinomycetes.

Strain No.	Aerial mycelium	Substrate mycelium	soluble color	Medium
MK-01	Gray	Dark Brown	Violet	MA, ISP2
MK-02	White	Gray	Beige	MA, ISP2
MK-03	Yellow	Beige	Orange	MA, ISP2
MK-04	Right red	Orange	Light orange	MA,ACT
MK-05	White to beige	Yellow	Orange	MA,ACT
MK-06	Gray	Beige	Light beige	ISP2
MK-07	Orange	Orange	Yellow	ISP2
MK-08	White	Gray	Light gray	ISP2
MK-09	Beige	White	Yellow	ISP4
MK-10	Orange	Dark red	Beige	MA,ISP2
MK-11	Black	Dark khaki	khaki	ISP2
MK-12	White	Beige	White to beige	MA,ACT
MK-13	Gray	Dark Pink	Black	ISP2
MK-14	Black	Black	Dark Brown	ISP2
MK-15	Khaki	Dark Brwon	Black	ISP2
MK-16	Light pink	Light red	White to beige	ISP2
MK-17	Yellow	Beige	White	MA,ISP2
MK-18	Dark begie	Dark gold	Light brown	MA,SCA
MK-19	Gray	Magenta	Light Pink	SCA
MK-20	Black	Dark brown	Khaki	SCA
MK-21	Dark orange	Beige	white	ISP2
MK-22	Gray	Dark red	Dark brwon	ISP2
MK-23	Black	Dark brown	Dark purple	ISP2
MK-24	White	White	Light gray	MA,ACT

### 3.3. 분리 방선균주의 형태학적 및 생화학적 동정

미생물은 기질에 따라 탄수화물 분해 효소, 단백질 분해 효소, 지질 분해 효소 등을 생산한다. 이들은 세포외 효소(Exoenzymes)로써 미생물의 세포벽 밖으로 효소를 분비하여 기질을 가수분해 하는 작용을 하게 된다. 이러한 미생물의 생화학적 특성을 이용하여 미생물을 동정하는데 많은 도움이 된다.

분리된 총 24균주의 해양 방선균을 대상으로 생화학적 동정결과 다음과 같이 나타내었다(Table. 10). Catalase 가수분해능을 확인해 본 결과 총 24균주 중 양성반응이 20균주, 음성반응이 4균주로 대개 모든 균주가 유독물질인 Hydrogen peroxide를 분해능을 갖는 것으로 나타났다. Casein, Gelatin의 경우 단백질 분해능을 알아보는 실험으로 Casein의 경우 양성반응이 14균주, Gelatin의 경우 10균주가 양성반응을 나타내어 대개 절반의 균주가 아미노산과 펩티드의 혼합물을 생성할 수 있는 것으로 생각할 수 있다. 전분의 가수분해능의 경우, 11균주가 양성반응을 나타내었는데 이는 Amylase를 생산하여 Maltose, Glucose 및 Dextrin등 당의 생성능을 갖고 있으며, Urease의 경우 총 7균주가 요소의 생성능을 갖고 있었다. Tween 40, 80의 경우 총 11균주가 지질 가수분해능을 갖는 것으로 나타났다. 13균주 경우 Nitrate의 환원과정을 일으켜 Nitrate 또는 Nitrogen gas 생성능을 가지고 있는 것으로 나타났다. 반면 Oxidase와 용혈성은 모두 음성 반응을 나타내었다.

그리고 세포벽의 주요 구성성분인 3가지 탄수화물 분해능 테스트 중, 총 6 분리균주가 Cellulose를 분해하는 효소의 생성능을 나타내었다. 반면 전혀 다른 총 4균주가 Hemicellulose 분해효소를 생성능을 나타내었다. 다음 총 5균주가 Chitin의 가수분해 효소인 chitinase를 생성하여 콘드로이틴과 글리콜 키틴 가수분해능을 나타내었다.



**Table 11.** General physiological characteristics of isolated marine actinomycetes

Strain No.	Hydrolysis						
	Gram	catalase	casein	starch	Urease	Tween40	Tween80
MK-01	+	-	+	-	-	-	-
MK-02	+	+	+	+	-	+	+
MK-03	+	+	+	+	+	+	+
MK-04	+	+	-	-	+	+	+
MK-05	+	+	-	-	-	-	-
MK-06	+	+	-	+	+	+	+
MK-07	+	+	-	+	-	+	+
MK-08	+	+	-	-	-	-	-
MK-09	+	+	-	+	+	-	-
MK-10	+	-	+	+	+	+	+
MK-11	+	+	+	+	+	+	+
MK-12	+	+	+	+	+	+	+
MK-13	+	+	+	-	+	-	-
MK-14	+	+	-	+	-	-	-
MK-15	+	+	+	-	-	+	+
MK-16	+	+	+	+	-	-	-
MK-17	+	+	+	-	-	+	+
MK-18	+	+	+	+	-	-	-
MK-19	+	+	+	+	-	-	-
MK-20	+	-	+	-	-	+	+
MK-21	+	-	-	-	-	-	-
MK-22	+	+	+	-	-	-	-
MK-23	+	+	+	+	-	-	-
MK-24	+	+	+	-	-	-	-

Strain No.	Hydrolysis						
	Haemolytic	Gelatin	Oxidase	Cellulose	Hemicellulose	Nitrate reduction	Chitin
MK-01	-	+	-	+	-	+	+
MK-02	-	+	-	-	-	-	-
MK-03	-	-	-	-	-	+	+
MK-04	-	-	-	-	-	-	-
MK-05	-	-	-	-	-	+	+
MK-06	-	-	-	-	+	-	-
MK-07	-	-	-	+	-	+	+
MK-08	-	-	-	-	+	+	-
MK-09	-	+	-	-	+	+	-
MK-10	-	+	-	+	-	-	-
MK-11	-	+	-	-	-	+	-
MK-12	-	-	-	+	-	+	-
MK-13	-	+	-	-	+	-	+
MK-14	-	-	-	-	-	+	-
MK-15	-	+	-	-	-	-	-
MK-16	-	-	-	-	-	-	-
MK-17	-	+	-	-	-	-	-
MK-18	-	-	-	+	-	+	-
MK-19	-	+	-	-	-	+	-
MK-20	-	-	-	-	-	+	-
MK-21	-	+	-	+	-	-	-
MK-22	-	-	-	-	-	+	-
MK-23	-	-	-	-	-	-	-
MK-24	-	-	-	-	-	+	-



### 3.4. 어류 질병 세균에 대한 항균활성 결과

#### 3.4.1 항균물질 생산 방선균주 선정

넙치의 대표 어류질병균주인 *Streptococcus iniae* KCTC 3757, *Streptococcus parauberis* KCTC KCTC 3651, *Vibrio anguillarum* KCTC 2711, *Edwardsiella tarda* KCTC 12267 에 대하여 분리 방선균의 항균활성 테스트 결과는 다음과 같이 나타내었다(Table. 11). 총 24균주 중 16균주가 활성을 나타냈다.

대부분의 분리 방선균은 비교적 그람음성에 비해 그람양성 질병균주에 대하여 항균활성을 갖는 것으로 나타났다. 그람음성 질병균주의 경우 MK-23 균주가 2균주 모두 항균활성이 가장 높게 나타났으나 그람양성 질병균주에는 전혀 나타나지 않았다. 반면 MK-01균주는 그람양성 질병균주 *S. iniae*에 대하여 가장 뛰어난 항균활성을 나타냄과 동시에 그람음성 질병균주에 대해서도 좋은 항균활성을 띄었다. MK-03, MK-12의 경우 그람양성과 그람음성에 대해 항균활성을 갖는 것으로 나타났지만 MK-01보다 비교적 낮으며 범위가 매우 국한적이다.

이러한 결과를 바탕으로 최종적으로 항균 범위가 넓으며 가장 뛰어난 항균활성을 갖는 MK-01을 선정하였고 추후 실험을 진행하였다.

**Table 12.** The antibacterial activity comparison with the isolated strain about fish pathogens.

Strain No.	fish disease bacteria (inhibition zone (mm))			
	Gram positive (+)		Gram negative (-)	
	<i>S. iniae</i>	<i>S. parauberis</i>	<i>E. tarda</i>	<i>V. anguillarum</i>
MK-01	30	26	19	21
MK-02	-	-	-	-
MK-03	20	-	9	-
MK-04	23	-	-	-
MK-05	-	-	17	-
MK-06	-	-	-	-
MK-07	14	-	-	-
MK-08	-	-	-	-
MK-09	9	-	-	-
MK-10	-	-	-	-
MK-11	-	12	-	-
MK-12	15	-	18.7	14
MK-13	17	-	-	-
MK-14	12	-	-	-
MK-15	-	-	-	-
MK-16	-	-	-	-
MK-17	15	10	-	-
MK-18	8	11	-	-
MK-19	-	-	14	-
MK-20	-	-	-	-
MK-21	13	-	-	-
MK-22	-	-	-	-
MK-23	-	-	28	21
MK-24	11	12	-	-

### 3.5. 해양유래 방선균 MK-01의 2차 스크리닝

#### 3.5.1. 균주의 형태학적 동정 (Scanning electron microscope)

어류질병균주에 대해 가장 뛰어난 항균활성을 갖는 MK-01 균주를 실험균주로 선정하여 형태학적 조사 결과 그림양성으로 나타났으며 전형적인 방선균의 균사 형태를 나타내었다. 균사의 폭과 길이는 대략 500 ~ 600 nm, 10 ~ 12  $\mu\text{m}$ 로 일반 *streptomyces* sp.와 비슷했다(Fig 1.).

Fig 1. Scanning electron microscope of isolated actinomycete MK-01



### 3.5.2.. 탄수화물 대사능 및 효소 활성 동정

분리된 MK-01 균주의 탄수화물 대사능은 API 50CH Kit를 사용하여 실험 후 결과를 다음과 같이 나타냈다(Table. 13). 결과 MK-01은 Eryhritol을 포함한 15개의 당을 분해할 수 없었으나, Glucose, Fructose 및 Mannose을 포함하여 총 34개의 탄수화물 기질로부터 산을 생성할 수 있었다. API ZYM kit를 사용하여 효소 활성 확인 결과, Alkaline phosphatase, Lipase, Leucine aminidase, Acid phosphatase, Naphthol-AS-BI-Phosphohydrolase,  $\beta$ -galactosidase,  $\alpha$ -glucosidase,  $\beta$ -glucosidase,  $\alpha$ -mannosidase,  $\alpha$ -fucosidase의 효소 이용능을 가졌다(Table. 14).



**Table 13.** The biochemical characteristics of actinomycete MK-01 by API 50CHB kit test.

Carbohydrate source	strain	
	MK-01	
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-βD-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-αD-mannopyranoside	-	D-arabitol +
Methyl-αD-glucopyranoside	+	L-arabitol -
N-AcetylGlucosamine	+	potassium Gluconate +
Amygdalin	+	2-Keto gluconate +
Arbutin	+	5-Keto gluconate -
Esiculin ferric citrate	+	

**Table 14.** The biochemical characteristics of actinomycete MK-01 by API ZYM kit test.

Enzyme	Strain
	MK-01
Alkaline phosphatase	+
Esterase (C4)	-
Esterase Lipase(C8)	-
Lipase (C14)	+
Leucine arymidase	+
Valine arylamidase	-
Crystine arylamidase	-
Trypsin	-
$\alpha$ -chymotrypsin	-
Acid phosphatase	+
Naptol-AS-BI-phosphohydrolase	+
$\alpha$ -galactosidase	-
$\beta$ -galactosidase	+
$\beta$ -glucuronidase	-
$\alpha$ -glucosidase	+
$\beta$ -glucosidase	+
N-acetyl- $\beta$ -glucosaminidase	-
$\alpha$ -mannosidase	+
$\alpha$ -fucosidase	+



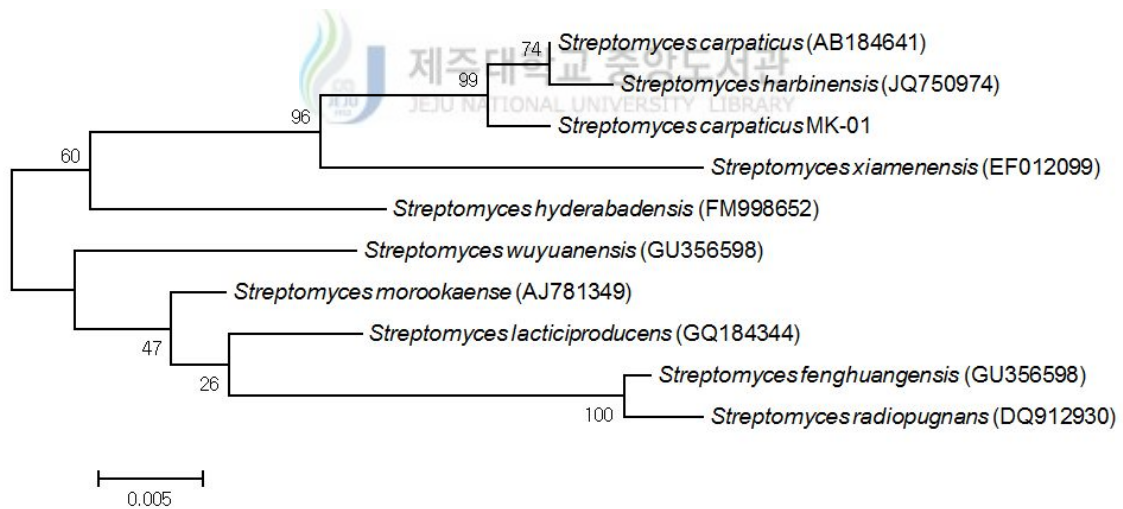


### 3.5.3. 16S rRNA 염기서열 분석

어류질병균주에 항균활성을 갖는 해양유래 방선균 MK-01 균주의 PCR 증폭을 통해 얻은 16S rRNA 염기서열을 Ez-taxon (EzBio Cloud; www.ezbiocloud.net)의 database를 이용하여 유사성이 높은 염기서열을 분석하였다. MK-01의 염기서열과 유사성이 높은 하위 균주의 염기서열은 Bio edit program을 사용하여 Clustal W multiple alignment로 염기서열 재 배열 후 MEGA 6.0 program을 사용하여 계통수를 작성하였다(Fig. 2). 결과, MK-01균주는 *Streptomyces carpaticus* (AB184641)와 97.63%의 가장 높은 유사성을 가졌다.

**Fig. 2.** Phylogenetic analysis of 16S rRNA sequence of

*Streptomyces carpaticus* MK-01.



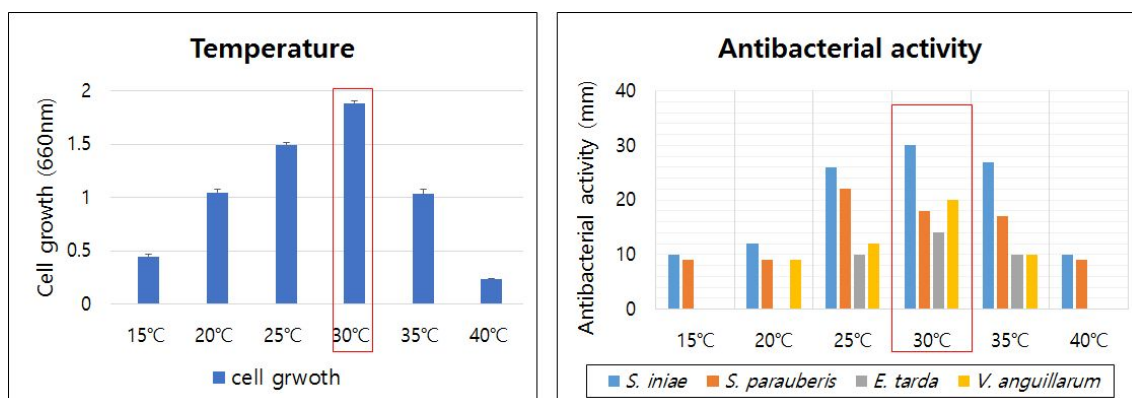
Neighbour-joining phylogenetic tree based on 16S rRNA gene sequences showing the position of strain *Streptomyces carpaticus* MK-01. Bootstrap percentage (from 1000 replications) >50% are shown at branch points.

### 3.6. 최적배양조건 탐색 및 항균활성 측정

#### 3.6.1. 온도별 최적 배양조건 탐색 및 항균활성

*Streptomyces carpaticus* MK-01의 성장에 있어 온도별 최적 생육 조건과 항균활성 측정 결과는 다음과 같이 그래프로 나타내었다(Fig. 3). 온도별 생육 검토 결과 15°C ~ 35°C 생육범위를 나타냈으며 30°C에서 가장 높은 생육도를 나타냈다. 총 4 어류질병균주에 대한 항균활성 결과, 그람양성의 모든 온도범위에서 항균활성을 띄었으며 25°C에서 가장 높은 항균활성을 나타내었다. 반면 그람음성의 경우 비교적 온도는 20°C ~ 35°C의 범위에서 항균활성을 나타내었다.

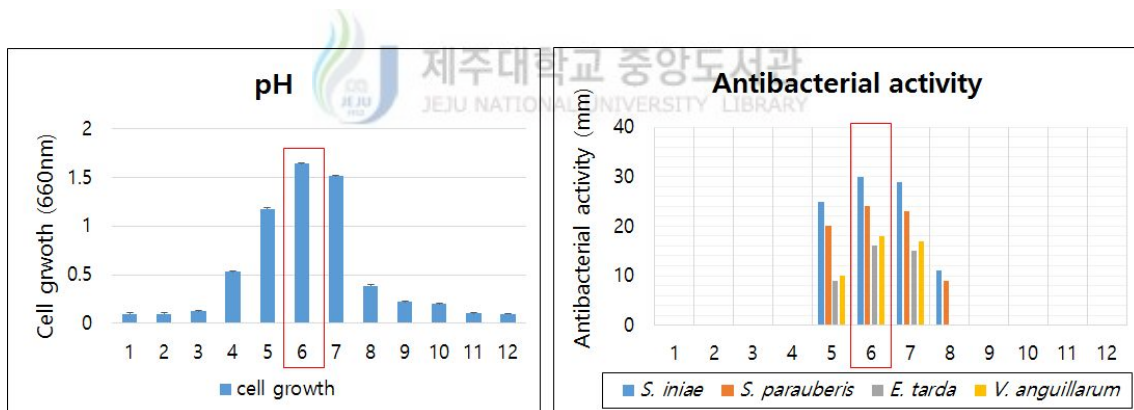
Fig. 3. Effect of temperature on cell growth and antibacterial activity of *Streptomyces carpaticus* MK-01.



### 3.6.2. pH별 최적 배양조건 탐색 및 항균활성

pH에 따른 생육 조건과 항균활성 측정 결과는 다음과 같이 그래프로 나타내었다 (Fig. 4). pH 4 ~ pH 10까지 생육이 가능하였으며, 최적의 pH는 6으로 나타났다. 어류질병균주에 대한 항균활성 결과 모든 균주의 항균활성의 범위는 pH 5 ~ pH 8로 나타났으며 pH 6~ pH 8에서 가장 높은 항균활성을 나타내었다. 생육, 항균활성에 있어 pH 8부터 값이 급격하게 떨어지는데, 이는 보통 미생물은 pH 8 이상으로 높아질 경우 세포막에 손상을 입게 되며 원활하지 못한 대사과정으로 인한 생육저하로 인한 것이다.

**Fig. 4.** Effect of pH on cell growth and antibacterial activity of *Streptomyces carpaticus* MK-01.

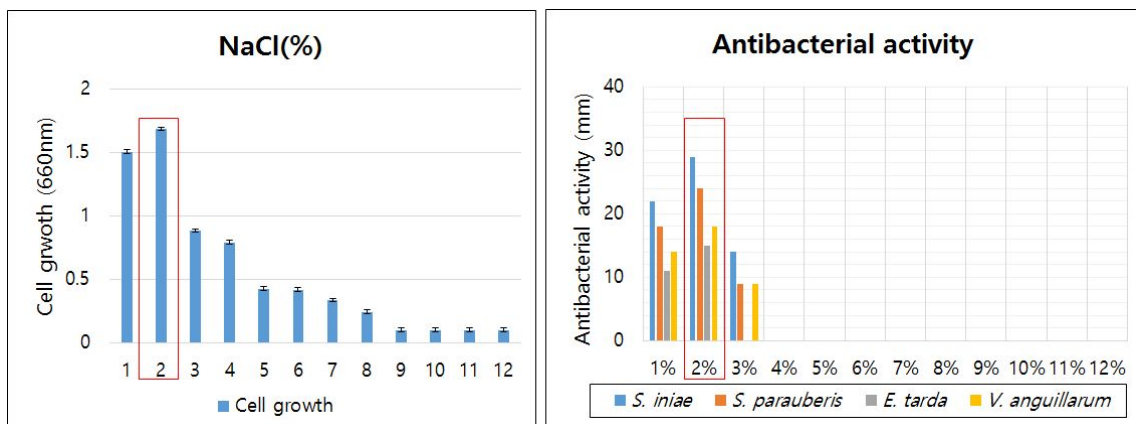


### 3.6.3. NaCl첨가별 최적 배양조건 탐색 및 항균활성

NaCl 첨가에 따른 생육조건과 항균활성 측정 결과는 다음과 같이 그래프로 나타내었다(Fig. 5). 1%부터 최대 8%까지 생육이 가능했다. 이는 분리원이 해양인 만큼 비교적 내염성을 갖고 있는 것을 뜻하며, 최적의 염농도는 2%로 나타났다. 3종의 어류질병균주에 대하여 갖는 항균범위는 최대 3%까지로 나타났으며 4% 이상에선 활성을 보이지 않았다.

이는 해양이 분리원인 해양 유래 미생물의 경우 해수에 용해된 NaCl의 농도만큼의 환경에서 가장 높은 생육을 보이고 많은 대사산물을 생성하게 되는데, NaCl의 농도에 따라 삼투압이 형성되고 이로 인해 미생물의 생육에 큰 영향을 끼치게 되고 결국 대사과정이 원활치 못하게 되는 밀접한 관련이 있기 때문인 것으로 알려졌다. 항균활성 또한 생육도와 같이 2%에서 가장 높게 나타났다. 이전 연구 결과 2%의 NaCl 농도에서 해양 유래 미생물의 생육과 대사과정은 활발히 이루어진다고 보고된 바 있으며 본 연구의 *Streptomyces carpaticus* MK-01의 결과와 유사하게 나타났다.

**Fig. 5.** Effect of NaCl(%) on cell growth and antibacterial activity of *Streptomyces carpaticus* MK-01.

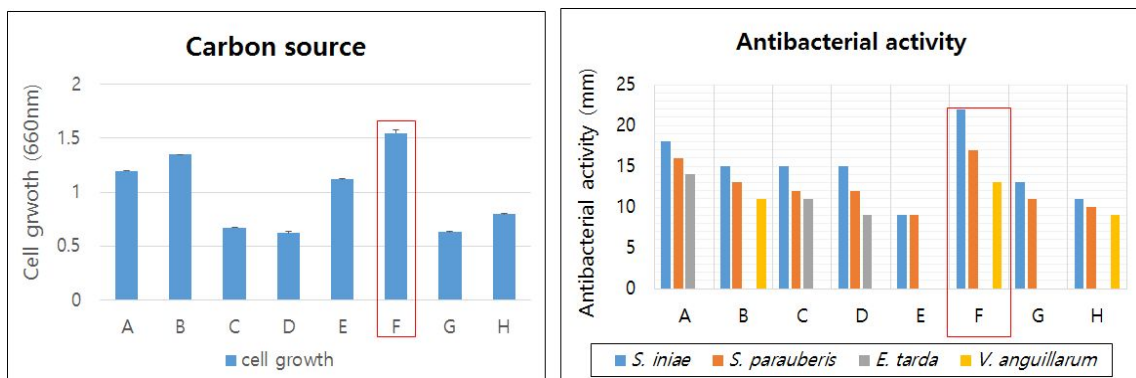


### 3.6.4.. 탄소원 배지조성에 따른 생육 검토 및 항균활성

탄소원이란 미생물의 생육을 위한 에너지원과 세포 구성성분의 합성을 위한 원료로 작용되는 물질이다. 총 8종류의 탄소원 배지조성에 따른 생육검토와 항균활성 측정 결과는 다음과 같이 그래프로 나타내었다(Fig. 6). 결과 Dextrose를 첨가하였을 때 가장 높은 생육도를 나타내었으며, 그 외 Sucrose, Fructose, Glucose와 같은 단당류에서 많은 생육도를 보였다. 총 4종의 어류질병균주에 대하여 항균활성 검토 결과, 생육도가 높았던 탄소원들을 따라 첨가된 배지의 배양 상등액으로부터 높은 항균활성을 나타내는 양상을 보였으며, 모든 탄소원들을 첨가한 배지에서 많은 항균능력을 갖는 것으로 보아, 탄소원은 *Streptomyces carpaticus* MK-01가 분비하는 물질의 대사과정에 중요한 영양원인 것을 알 수 있다.



**Fig. 06.** Effect of various carbon source on the growth and antibacterial activity of *Streptomyces carpaticus* MK-01.

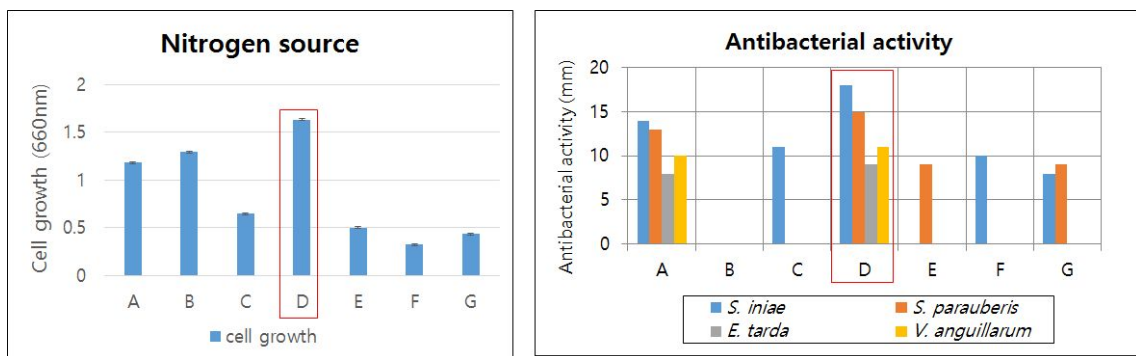


Carbon source: A: Fructose, B: Sucrose, C: sobitol, D: Lactose, E: Rhamnose F: Dextrose, G: starch, H: Control

### 3.6.5. 질소원 배지조성에 따른 생육 검토 및 항균활성

질소원이란 미생물 생육을 위한 에너지원이며 단백질, DNA, RNA의 합성 원료물질로 대사증식에 가장 중요한 영향을 미치는 성분이다. 총 7종류의 유, 무기 질소원 배지조성에 따른 생육검토와 항균활성 측정 결과는 다음과 같이 그래프로 나타내었다(Fig. 7). 결과 Trytone을 첨가하였을 때 가장 높은 생육도를 나타내었다. Yeast extract와 Peptone을 비롯한 유기질소원이 높은 생육도를 나타내었다. 총 4종의 어류질병균주에 대한 항균활성 검토 결과 마찬가지로 생육도가 높았던 Trytone이 첨가된 배지의 배양 상등액은 그람양성과 그람음성에 모든 항균활성을 나타냈다. 하지만 생육도가 높았던 Peptone에서 항균활성이 나타나지 않았는데 이는, 배지성분 속 Peptone의 양이 필요치 이상으로 많아 질수록 미생물로부터 생성된 산을 완충하는 작용이 있으므로 영향이 미쳐 대사산물의 생산이 저해 된 것이다.

**Fig.7.** Effect of various nitrogen source on the growth and antibacterial activity of *Streptomyces carpaticus* MK-01.

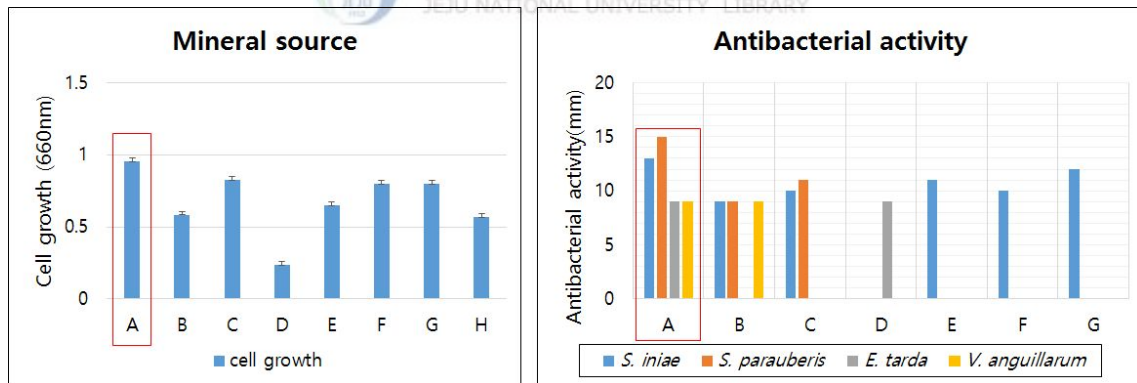


Nitrogen source: A: Yeast extract, B: Peptone C: Malt extract, D: Trytone E: NaNO<sub>3</sub>(=sodium nitrate), F:(NH<sub>4</sub>)SO<sub>4</sub>(=Ammonium sulfate), G: Control.

### 3.6.6. 무기염 배지조성에 따른 생육 검토 및 항균활성

무기염은 미생물 세포의구성성분이며 세포 내 삼투압 조절 및 유지와 각종 대사과정의 조효소로 작용하는 아주 중요한 성분이다. 총 8종류의 무기염 배지조성에 따른 생육검토와 항균활성 측정 결과는 다음과 같이 그래프로 나타냈다(Fig. 8). 생육검토 결과  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 을 첨가하였을 때 가장 높은 생육도를 가졌다. 항균활성 검토 결과  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 가 첨가된 배지에서 4균주 모두 항균활성을 나타낸 반면,  $\text{ZnCl}_2$ , F:  $\text{K}_2\text{HPO}_4$ ,  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 가 첨가된 배지에선 그람음성균주에 대한 항균활성만 띄었다. 결과를 토대로 MK-01균주의 항균물질의 대사과정에 제일 중요한 무기염 영양원은  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  인 것을 알 수 있었다.

**Fig. 8** Effect of various mineral source on the growth and antibacterial activity of *Streptomyces carpaticus* MK-01.



Mineral source: A:  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (=Iron(II) sulfate heptahydrate), B: NaCl(=Sodium chloride), C:  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (=Magnesium sulfate). D:  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ (=Potassium dihydrogen phosphate) E:  $\text{ZnCl}_2$ (=Zinc chloride), F:  $\text{K}_2\text{HPO}_4$ (=Dipotassium phosphate), G:  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ (=Copper(II)sulfate), H: Control

### 3.7. 분리 방선균 분획물의 항균활성 평가

가장 우수한 항균활성을 나타낸 *Streptomyces carpaticus* MK-01 배양액 1,000 ml을 4°C, 12,000rpm에서 20분간 원심하여 상등액을 분리한 후, Ethyl acetate와 Methanol 분획물을 제조하였다. 분획물의 항균활성은 총 4종의 어류질병균주 *Streptococcus iniae*, *Streptococcus parauberis*, *Edwardsiella tarda*, *Vibrio anguillarum*에 대하여 측정하였으며 용매별 분획물을 농도별로 (1000, 500, 250, 125, 62.5, 31.25 µg/ml) 제조하여 최소저지농도(MIC) 그리고 최소살균농도(MBC) 실험에 사용하였다.

#### 3.7.1. 최소억제농도(MIC) 결과

용매에 따른 농도별로 최소억제농도(MIC) 결과를 다음과 같이 나타냈다(Table. 15). 결과 Methanol의 분획물이 모든 실험 질병 균주에 대하여 Ethyl acetate 분획물보다 저농도로 나타났다. *S. iniae* 경우 Methanol 추출물은 31.25 µg/ml로 가장 낮은 농도를 나타냈으며, 이는 해조류로부터 분리된 *streptomyces atrovirens* PK288-21의 정제된 물질인 Compound B2 (60 µg/ml) (Cho, 2012) 보다 2배나 더 낮은 농도로 나타났다. 이러한 결과를 토대로 MK-01의 분획물은 친소수성을 띄는 물질임을 나타냈다.

**Table. 15.** The minimum inhibitory concentrations(MIC) of fish disease bacteria according to the fractions of *Streptomyces carpaticus* MK-11 strain.

Fish disease bacteria	Minimum Inhibitory Concentration (MIC) (ug/ml)	
	Ethyl acetate	Methanol
<i>S. iniae</i>	125	31.25
<i>S. parauberis</i>	1000	62.5
<i>E. tarda</i>	ND	ND
<i>V. anguillarum</i>	1000	1000



### 3.7.2. 최소살균농도(MBC)

용매에 따른 농도별로 최소살균농도(MBC) 결과를 다음과 같이 나타냈다(Table. 16). 결과, MIC와 같이 Methanol의 분획물이 모든 실험 질병 균주에 대하여 Ethyl acetate 분획물보다 저농도로 나타났다. *S. iniae*에 대하여 가장 저 농도를 나타내었고 그람양성균주에 모두 반응이 나타났다. 하지만 그람음성 질병균주의 증식을 억제하지 못하였으며 이는 MK-01의 분획물이 그람양성에는 뛰어난 항균활성을 나타내나 어류질병균주에 미비한 항균활성은 세포벽 구조에 영향을 미치는 기작의 항균 물질을 지닌 것으로 나타났다.

**Table. 16.** The minimum bactericidal concentrations(MBC) of fish disease bacteria according to the fractions of *Streptomyces carpaticus* MK-11 strain.

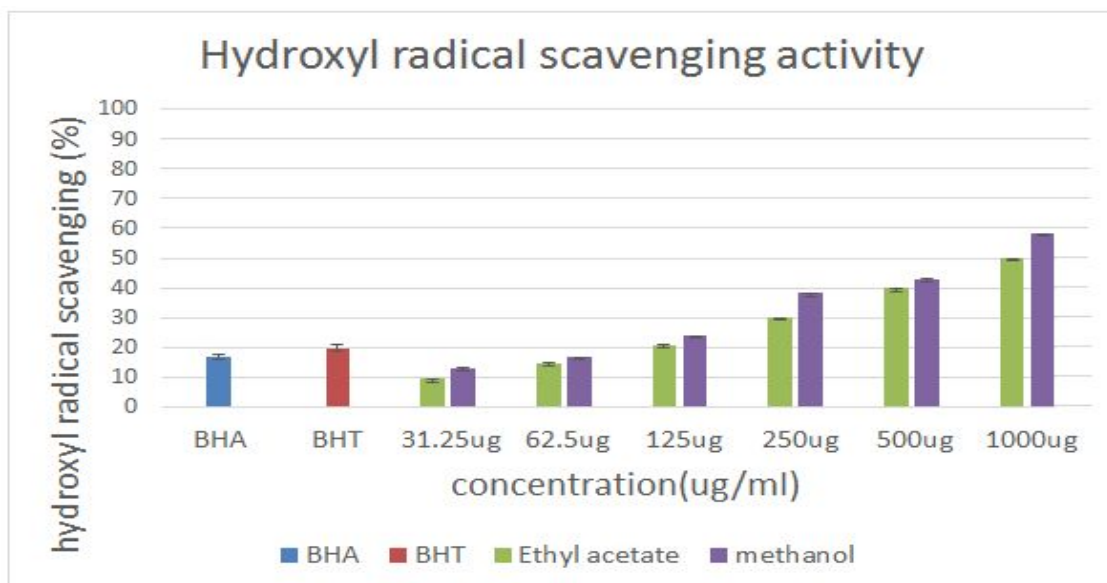
Fish disease bacteria	Minimum bactericidal concentration (MBC) (ug/ml)	
	Ethyl acetate	Methanol
<i>S. iniae</i>	500	250
<i>S. parauberis</i>	1000	500
<i>E. tarda</i>	ND	ND
<i>V. anguillarum</i>	ND	1000

### 3.8. 분획물의 항산화 활성 측정

#### 3.8.1. Hydroxyl radical 소거활성

과산화 수소에 또 다른 하나의 전자가 들어가게 되면 산소-산소 결합이 끊어지며 수산화이온(OH<sup>-</sup>)과 Hydroxyl radical이 만들어지게 된다. Hydroxyl radical은 가장 반응성이 크고 돌연변이를 생성하는 위험한 활성산소로 각종 성인병은 물론 암과 노화를 일으키는 주범이다. *Streptomyces carpaticus* MK-01의 분획물에 대한 hydroxyl radical 소거활성측정 결과는 다음과 같이 나타내었다(Fig. 9). 용매별 분획물의 농도는 31.25, 62.5, 125, 250, 500 최대 1000 ug/ml로 조제 후 실험하였다. 결과 Ethyl acetate, Methanol 의 비교 경우 큰 유의적인 차이가 없었다. 두 용매 전부 농도가 높아질수록 항산화소거활성 또한 높아졌다. 이런 점을 미루어 볼 때 분획물의 농도 의존성을 나타냈으며, 두 용매 전부 1000  $\mu\text{g/ml}$ 에서 가장 높은 소거활성을 나타냈으며, 작은 농도의 분획물로도 현재 시판되고 있는 Positive control인 BHA, BHT와 유사한 20% 정도의 소거활성을 보였다. 이러한 점을 생각하고 좀 더 이상의 농도의 시료로 측정을 하게되면 높은 항산화 활성을 기대할 수 있다.

**Fig. 9.** Hydroxyl radical scavenging activity of fractions of Methanol and Ethyl acetate.

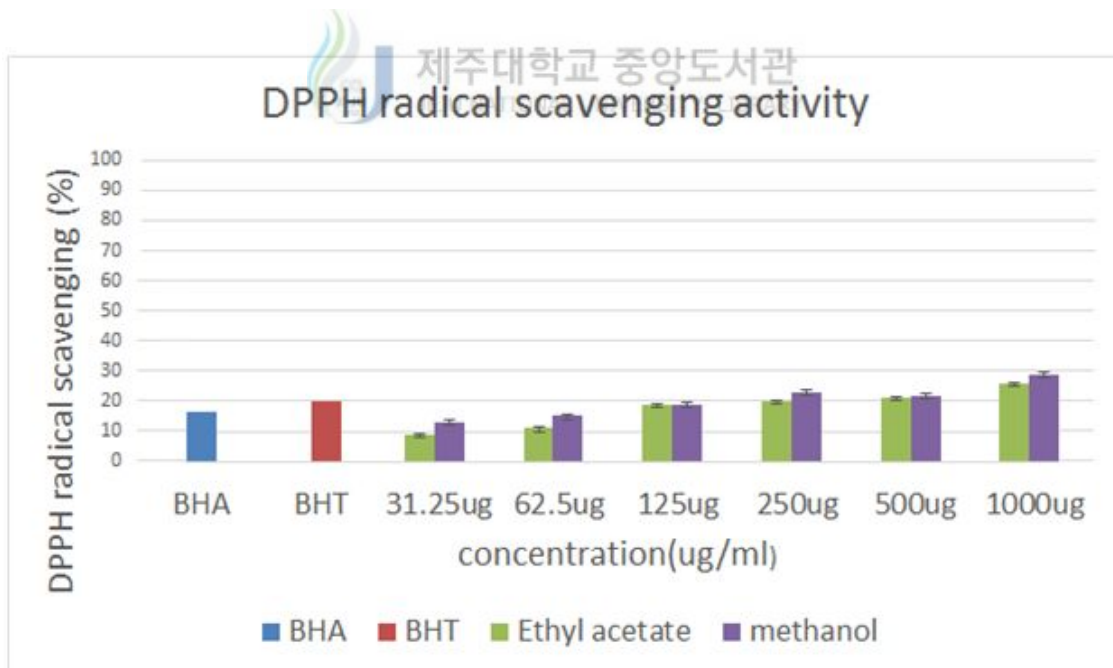


\* Positive control ; BHT(Bibutyl hydroxytoluene), BHA(Butylh ydroxyanisol),

### 3.8.2. DPPH radical 소거활성

*Streptomyces carpaticus* MK-01의 배양 상등액으로부터 분획물에 대한 DPPH radical 소거활성측정 결과는 다음과 같이 나타났다(Fig. 10). 용매별 분획물의 농도는 31.25, 62.5, 125, 250, 500 최대 1000  $\mu\text{g/ml}$ 로 조제 후 실험하였다. 결과, Ethyl acetate의 경우 최대 1000  $\mu\text{g/ml}$  농도에서 26%의 활성을 나타내었고 Methanol은 최대 1000  $\mu\text{g/ml}$ 에서 보다 더 높은 29%의 활성을 나타내었다. Ethyl acetate와 Methanol의 분획물은 농도가 높아질수록 자유 라디칼소거활성 또한 같이 증가하였으므로 hydroxyl과 똑같이 농도 의존성을 나타냈다.

**Fig. 10.** DPPH radical scavenging activity of fractions of Methanol and Ethyl acetate.



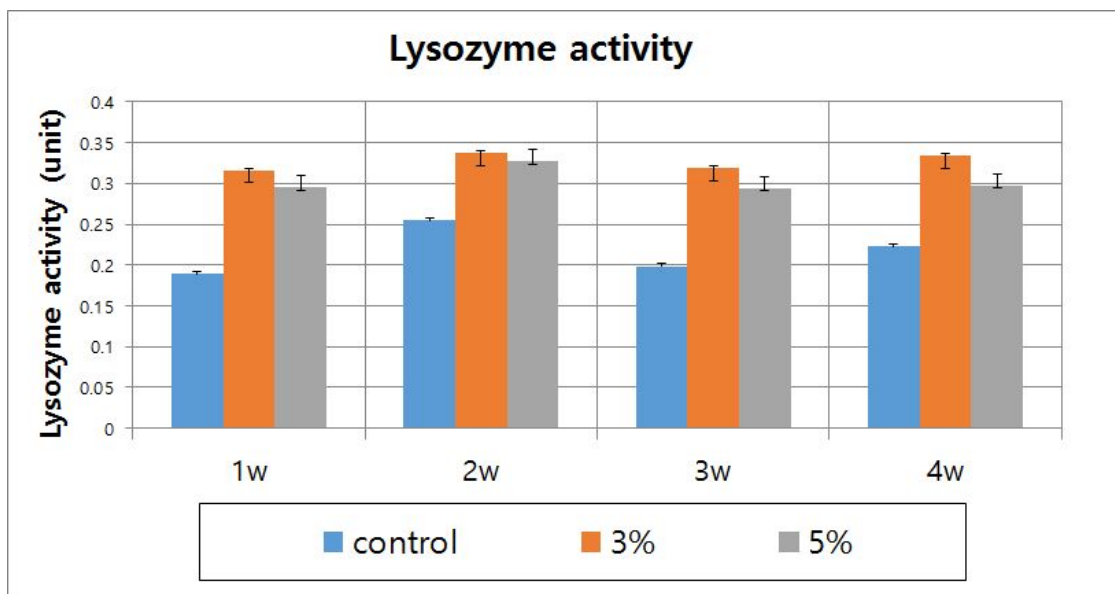
\* Positive control ; BHT(Bibutyl hydroxytoluene), BHA(Butyl hydroxyanisole)

### 3.9. 넙치 혈액을 통한 비특이적 면역능 측정

#### 10-1. Lysozyme 활성

라이소자임이란 비특이적 면역인자로 점액다당류 따위를 가수분해함으로써 세균의 감염을 막는 역할을 한다. 그람양성균 및 일부 그람음성균(대장균, 살모넬라균)의 세포벽에 들어있는 다당류 속 N-acetylmuramic acid(NAM)과 N-acetylglucosamine(NAG) 사이의  $\beta$ -1, 4-glycosidic bond(무라미드 결합)을 가수분해하여 세포벽을 용해키는 작용을 하며 항균성 효소로 무라미다아제라고 한다. 그람 양성균의 세포벽을 구성하는 아미노당을 함유하는 다당류 분자를 기질로 하여 특이적으로 분해하고, 일부 그람 음성균(일반 대장균, *salmonella* sp.)의 세포벽도 분해한다. 본 실험은 기존 배합사료에 상등액을 3%, 5%를 혼합제조 후, 지급하여 1주일 간격으로 채혈하여 다음과 같은 결과를 나타냈다(Fig. 11). 본 실험의 경우 실험시간동안 모든 실험구가 컨트롤구에 비해 높은 활성을 가졌다. 3% 실험구의 넙치로부터 가장 높은 라이소자임 활성을 나타냈다. 3주까지는 5%를 혼합한 그룹과 수치가 유사하게 높게 나타났지만 마지막 4주에서도 가장 높은 활성을 나타냈다.

Fig. 11. Lysozyme activity in serum of Olive flounder that was fed with supernatant 3%, 5% of MK-1 strains and control diet for 4 weeks.

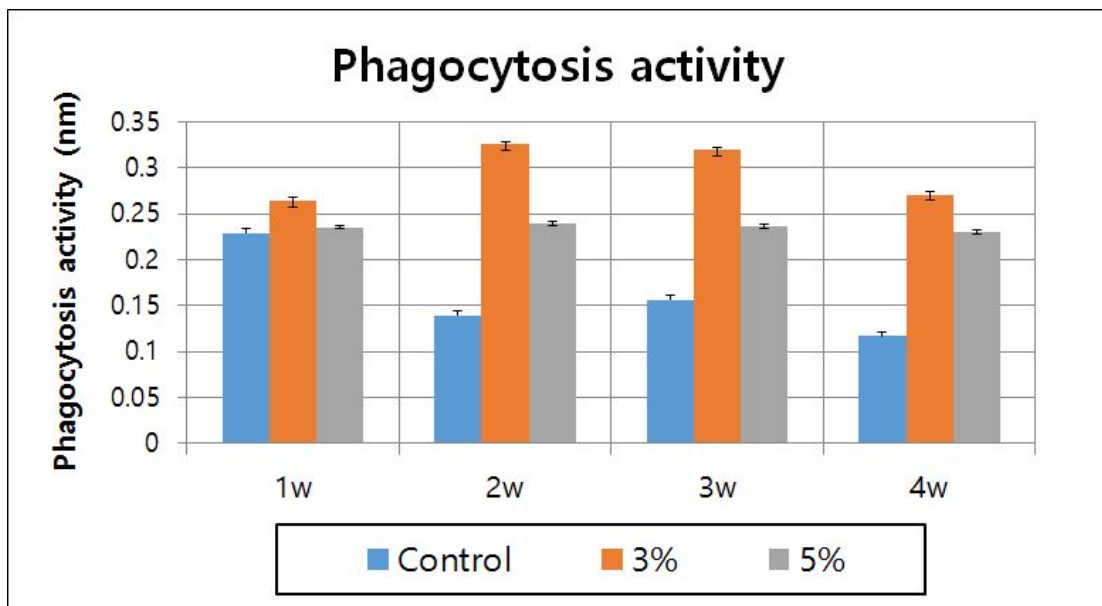


### 3.9.2. Phagocytosis activity

식세포는 외부로부터 침입한 유해병원균 등을 세포내로 잡아들여 세포내에서 분해 작용을 일으켜 선천면역장치들 중에서도 우리 몸을 보호하는데 가장 효과적인 수단이다. 주로 백혈구의 호중구(neutrophil), 대식세포(macrophage), 수지상세포(dendritic cell) 등이 있다. 피검균의 추출물질을 사료에 첨가하여 섭취하였을 때 어류의 식세포 작용에 얼마나 영향을 미치는지 알아보기 위하여 실험을 수행하였다. 본 실험은 일반 배합사료에 상등액을 3%와 5%로 각각 혼합제조 및 지급하여 1주일 간격으로 채혈하여 실험 후 다음과 같은 결과를 나타냈다(Fig. 12). 실험기간 중 1주를 제외한 모든 주에서 모든 실험구는 컨트롤 보다 높은 수치를 나타내었다. 실험구 중 5%는 큰 변화가 없었지만 2~3주 차 에는 3% 그룹에서 더 높은 활성을 나타냈다.



Fig. 12. Phagocytosis activity in serum of Olive flounder that was fed with supernatant 3%, 5% of MK-1 strains and control diet for 4 weeks.



## IV. 요약

본 연구에서는 새로운 메커니즘을 갖는 항균물질을 탐색 및 발견하기 위해 육상과는 전혀 다른 환경인 해양 유래 방선균에 대하여 연구하였다. 제주도 대정읍 연안을 중심으로 해수를 채집하여 총 24균주의 방선균을 분리하였다. 분리된 24균주는 10 ~ 40°C까지의 폭 넓은 성장 온도 범위를 보였으며 대개 해수의 수온과 비슷한 15~30°C 범위에서 가장 좋은 성장을 보였다. 염 농도에 따른 성장에 있어서도 염이 추가 되지않은 일반 분리 배지에서도 자라났으며 최대 3%의 염 농도에서도 성장이 가능한 것으로 보아 어느정도의 내염성과 호염성을 띤다. 분리된 방선균의 배양액은 노란색, 분홍색, 갈색, 녹색, 보라색, 자주색, 검은색 등으로 매우 다양한 색소를 생산했으며 대체적으로 회색, 노란색, 녹색, 자주색 계열의 색상을 나타냈다.

이렇게 분리된 총 24균주의 방선균 중 주요어류질병세균에 대하여 항균활성을 평가한 결과, 그람 양성과 그람 음성 모든 실험 병원균주에 대하여 광범위 하면서 높은 항균활성을 나타낸 MK-01균주를 선발하였다.

MK-01균주의 기증균사는 회색, 기저균사는 검갈색을 띄며 자라났으며, 콜로니 주위 바이올렛 색소를 생성하였다. 생화학적 특성으로 Catalase, Gelatin, Cellulose, Chitin의 분해능을 가졌으며, Nitrate 환원능도 나타났다. 이는 이전 해수퇴적층으로부터 분리된 *Streptomyces carpaticus* NBRC15390(Haritha *et al*, 2012)와는 Gelatin을 제외한 모든 분해능에서 다른 양상을 나타냈다.

MK-01의 탄수화물 대사능을 분석한 결과 Glucose, Fructose, Mannose를 포함한 단당류의 기질로부터 산을 생성하였으며, 효소 활성의 경우 Lipase를 비롯 여러 효소 이용능을 나타냈다. 16S rDNA 염기서열을 분석한 결과 *Streptomyces carpaticus* 와 97.63%로 가장 높은 유사도를 나타내었다. 형태학적 및 생화학적 특성 또한 *Streptomyces* 속들의 반영되었다. 영양원에 따른 최고 배양 생육도와 항균활성은 30°C, pH 6.0, 2% NaCl의 조건과 탄소원은 Dextrose, 유기질소원 peptone, 무기염 MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O으로 나타났다.

*Streptomyces carpaticus* MK-01의 추출물의 최소 억제농도를 측정한 결과 그람 양성균에 대하여 낮은 억제농도를 나타내었으며, 그 중 Methanol 분획물은 *S. iniae*



에 대하여 31.25 µg/ml 로 나타났다. 항산화 활성 결과 hydroxyl radical의 경우 MK-01의 Methanol, Ethyl acetate 분획물 모두 농도가 높아지면서 소거활성률도 높아지는 것으로 보아 농도의존성을 갖고 있으며, 1000 µg/ml의 농도일 때 Positive control보다 2배나 높은 소거활성을 가졌다. 가장 높은 DPPH radical 소거활성을 보였으며 농도에 따라 높은 라디칼 소거활성결과를 나타내었다.

in vitro 실험의 결과를 바탕으로 MK-01의 상등액을 농도별로 사료에 혼합하여 넙치에 지급하여 비특이적 면역활성을 알아본 결과 Lysozyme 활성, Phagocytic 활성 모두 실험기간 동안 3%, 5% 첨가 실험구가 컨트롤구에 비해 높은 면역활성을 나타내었으므로 병 저항성 또한 크게 증가하였다. 하지만 실험구 중 고농도인 5%보다 3%에서 비특이적 면역이 더 높은 활성을 나타내었으므로, 아무리 고 농도라고 해도 활성도가 그에 비례하지 않는 것으로 나타났다. 결과, 넙치의 비특이적 면역능 향상에는 3%의 농도가 가장 적절한 것으로 나타났다.

추후 *Streptomyces carpaticus* MK-01의 항균물질을 순수물질로 정제하여 항균 작용기전, 항균물질의 독성에 대한 안전성 연구를 진행하여 양식산업에 적용하여 항생물질로서의 이용 가능성을 평가하고자 한다.

## V. 참고 문헌

- Adinarayana, G., Venkateshan, M.R., Bpiraju, V.V., Sujatha, P., Premkumar, J., Ellaiah, P, and Zeeck, A. 2006. Cytotoxic compounds from the marine actinobacterium. *Bio Org Khim* **32**, 328-334
- Arasu, M. V., Duraipandiyan, V. and Ianacimuthu, S. 2013. Antibacterial and antifungal activities of polyketide metabolite from *marine streptomyces* sp. AP-123 and its cytotoxic effect. *Chem* **90**, 479-487
- Bernan, V.S., Greenstein, M. and Maiese, W.M. 1997. Marine Microorganisms as a source of New Natrual Products. *Adv Appl Microbiol* **43**, 57-90
- Beppu, T.H, and Horinouchi S.H. 1992. AUTOGEGULATORY FACTORS AND COMMUNCATION IN ACTINOMYCETES. *Annu Rev Microbiol* **46**, 377-398
- Dharmaraj, S. 2010. Marine *streptomyces* as a novel source of bioactive substances. *World J Microbiol biotechnol* **26**, 2123-2139
- Fenical, W, and Jensen, P.R. 2006. Developing a new resource for drug discovery: marine atinomycete bacteria. *Nat Chem Biol* **2**, 666-673
- Gandhimathi, R., Arunkumar, M., Selvin, J., Thangavelu, T., Sivaramakrishnan, S., Kiran, G.S., Shanmughapriya, S. and Natarajaseenivasan, K. 2007. Antimicrobial potential of sponge associated marine actinomycetes. *J Mycol Med* **18**, 16-22

- Grein, A. and Meyers, S. P. 1958. Growth characteristics and antibiotic production of actinomycetes isolated from littoral sediments and materials suspended in sea water. *J bacteriol* **76**, 457-463
- Han, Y. J. 2011. Isolation and Identification of Marine Actinomycetes and Antibiotic-Resistance Pathogenic Bacteria for Antimicrobial activity. M.D. dissertation, Jeju National University, JeJu, Korea
- Han, Y., Yang, B.G., Zhang, F.L, and Miao, X.L. 2009. Characterization of antifungal Chitinase from Marine *Streptomyces* sp. Da11 Associated with south china sea sponge *craniella australiensis*. *Mar Biotechnol* **11**, 132-140
- Haritha, R., SivaKumar, K., Swathi, A., Jagan Mohan, Y. S. Y. V. and Ramana, T. 2012. Charactetization of Marine *Streptomyces carpaticus* and Optimization of Conditions for Production of Extracellular Protease. *Microbiol. J* **2** 23-25
- Jesen, P.R., Williamas, Ph.G., Oh, D.C., Zeigler, L.S. and Fenical, W.A. 2007. Species-Specific Secondary Metabolite Production in Marine Actinomycetes of the Genus *Salinispora*. *Appl. Environ. Microbiol.* **73**, 1146-1152
- Jesen, P.R., Gontang, E., Mafnas, C., Mincer, T.J. and Fenical, W. 2005. Culturable marine actinomycete diversity from tropical Pacific Ocean sediments. *Environ Microbiol* **7**, 1039-1048
- Jeyasekaran, G., Patil, R., Shanmugam, S.A, and Jeya Shakila, R. 2001. Control of bacterial pathogens, associated with fish disease, by antagonistic marine actinomycetes isolated from marine sediments. *INDIAN J* **30**, 264-267

- Kim, M. C. 2010. Diversity of Marine Actinomycetes Isolated from in the Jeju Island Coastal and Screening of Biological Acitivity from Microorganisms Secondary Metabolites. Ph.D. dissertation, Jeju National University, Jeju, Korea
- Kim, M.S., Park, S.H., Kim, D.H. and Heo, M.S. 2014. The antibacterial activity Against Fish Pathogen of *Paenibacillus* sp. MK-11 isolated from jeju coast. *Kor. J. Life Sci* **24**, 880-886
- Lam, K.S. 2006. Discovery of novel metabolites from marine actinomycetes. *Curr. Opin. Microbiol* **9**, 245-251
- Lee, S.D. 2006. *Phycococcus jejuensis* gen. nov., sp. nov., an actinomycete isolated from seaweed. *Int J Syst Evol Microbiol* **56**, 2369-2373
- Lofti, M. 2005. Purification and structure elucidation of antifungal and antibacterial activities of newly isolated *streptomyces* sp. Strain US80. *J resmic* **156**, 341-347
- Lu, Y.J., Dong, X., Liu, S. and Bie, X.M. 2009. Characterization and Identification of a Novel Marine *Streptomyces* sp. Producted Antibacterial Substance. *Mar Biotechnol* **11**, 717-724
- Moon, Y. G. 2009. Diversity of Marine Microorganisms Isolated from Intertidal Zone in the Summer Season of Jeju Island. Ph.D. dissertation, Jeju National University, Jeju, Korea
- Mohanraj, G. and Sekar, T. 2013. ISOLATION AND SCREENING OF ACTINOMYCETES FROM MARINE SEDIMENTS FOR THEIR POTENTIAL TO PRODUCE ANTIMICROBIALS. *Int J LifieSc Bt &*

*Pharm Res* **2**, 115-126

- Newman, S. G. 1993. Bacterial vaccines for fish. *Annu. Rev. Fish. Dis.* **3**, 145-185
- Okami, Y.S. 1986. Marine Microorganisms as a Source of Bioactive Agents. *Microb Ecol* **12**, 65-78
- Olano, C.L., Mendezand, C.M, and Salas, J.A. 2009. Antitumor compounds from Marine Actinomycetes. *Mar. Drugs* **7**, 210-248
- Palani Selvan, G., Ravikumar, S., Neelakandan, P, and Ramu, A. 2012. Antagonistic acitivity of marine sponge associated *Streptomyces* sp. against isolated fish pathogens. *Asian Pac J Trop Dis* **2**, S724-S728
- Patil, R., Jeyasekaran, G., Shanmugam, S. A. and Shakila, R. jeya. 2001. Control of bacterial pathogens, associated with fish disease, by antagonistic marine actinomycete isolated from marine sediments. *IJMS* **30**, 264-267
- Peela, S.J., Bapiraju Kurada, V.V.S.N. and Terili, R.M. 2005. Studies on antagonistic marine acitinomycetes from the Bay of Bengal. *World J. Microbiol. Biotechnol* **21**, 583-585
- Reddy, N. G., Ramakrishna, D.P.N. and Raja Gopal S. V. 2011. A Morphological, Physiological and Biochemical Studies of Marine *Streptomyces rochei* (MTCC 10109) Showing Antagonistic Activity Against Selective Human Pathogenic Microorganisms. *Asian J. Biol. Sci* **4**, 1-14
- Riyanti., Widada, J. and Radjasa, O.K. 2009. Isolation and Screening of Antimicrobial Producing-Actinmycetes Symbionts in Nudibranch. *Indones J*

*Biotechnol* **14**, 1132-1138

Sivakumar, K., Sahu, M.K., Thangaradjou, T. and Kannan, L. 2007. Research on marine actinobacteria in India. *Indian J. Microbiol* **47**, 186-196

Starch, J.E.M., Maldonado, L.A., Ward, A.C., A.T. and Goodfellow, M. 2004. *Williamsia maris* sp. nov., a novel actinomycete isolated from the Sea of Japna. *Int J Syst Evol Microbiol* **54**, 191-194

Steven, G., Lanen, V. and Shen, B. 2005. Anticancer Agents from Natural Products, pp. 671-698, 2nd ed., CRC Press, LD, UK.

Yoon, Y.J., Kim, H.Y., Lee, T.S. and Kim, J.W. 2008. Isolation and Characterization of a *Paenibacillus incheonsis* YK5 with antimicrobial Activity against MRSA. *Kor. J. Microbiol* **44**, 326-332

You, J., Cao, LX., Liu, GF., Zhou, SN., Tan, HM, and Lin, YC. 2005. Isolation and characterization of actinomycetes antagonistic to pathogenic *Vibrio* spp. From nearshore marine sediments. *World J Microbiol Biotechnol* **21**, 679-682

Zheng, Z.H., Zeng, W., Huang, Y.J., Yang, Z.Y., Li, J., Cai, H.R. and Su, W.J. 2000. Detection of antitumor and antimicrobial activities in marine organism associated actinomycetes isolated from the Taiwan Strait, China, *FEMS Microbiol. Lett* **188**, 87-91

통계청 2014. 통계정보. 어류양식동향조사

## 감사의 글

2010년 3월 봄부터 어느 덧 졸업을 앞둔 2014년의 12월, 실험실 생활을 시작한지 벌써 4년이라는 시간이 흘렀습니다. 정말 대학생활에 있어 가장 뜻 깊고 소중한 시간이었습니다. 이젠 또 다른 하나의 가족과도 같은 우리 실험실 사람들, 매일 보다 이제 자주 못 본다 생각하니 너무 섭섭하고 차마 발길이 떨어지지 않습니다.

아무것도 모른 부족한 저를 제자로 받아주시고 항상 조언과 가르침을 아끼지 않으셨던 존경하는 허문수 교수님께 정말 감사의 말씀 드립니다.

그리고 저의 논문이 완성되기 까지, 바쁘신 와중에도 저의 학위졸업논문을 심사해 주신 진창남 소장님과 김만철 선배님께 정말 감사의 말씀 드립니다.

그리고 학부시절부터 대학원까지 많은 가르침을 주신 송춘복 교수님, 최광식 교수님, 이경준 교수님, 이철희 교수님, 전유진 교수님, 여인규 교수님, 김기영 교수님, 정준범 교수님, 이승현 교수님, 정석근 교수님, 박상율 교수님께도 진심으로 감사의 말씀을 전합니다.

그리고 사랑하는 우리 실험실 가족. 학부 3학년 무작정 들어와 아무것도 모르던 저를 기초부터 하나씩 가르쳐주시고 친 동생처럼 챙겨주시던 이젠 가족이나 다름없는 든든하신, 나의 롤모델인 만철오빠, 하나하나 짚어가며 가르쳐주시던 주상오빠, 아무것도 모르는 부족한 후배, 이끌어 주셨던 익수오빠, 나의 영원한 사수이자 나의 멘토이신 용재오빠, 항상 나에게 감동을 안겨주시는 창영이형, 추억이 많은 영민이형, 친 오빠 같은 동민이 오빠, 항상 저희 걱정 뿐이었던 정 많은 승현이오빠, 그리고 신사 Dharan 모두 감사하고 사랑합니다.

그리고 항상 제 일처럼 먼저 도와주시던, 정말 감사한 마음 뿐인 동휘오빠와 소현 언니(뭐라 말씀드려야 할지.. 오빠와 언니겐 너무 받기만 했어요. 많이 가르쳐주시고, 정말 아무것도 모르고 무작정 뛰어난 석사생활에 오빠와 언니가 있어 너무나 든든했어요. 정말 감사하고 사랑합니다. 오빠 언니!)

우선 고등학교 때부터 대학원까지, 어찌보면 가족보다 더 많이 본 내 정신적 지주이자 하나뿐인 사랑하는 내 친구 경미(넌 정말 다 잘됐으면 좋겠다. 너의 앞길이 탄탄대로 하길 내가 두손 모아 기도하고 응원할게! 진심이야.). 그리고 혼자 타지에 내려와서 고생 많았을 우리 지운이(언니가 그 동안 잘 챙겨주지 못해서 미안해. 앞

으로 더 많은 시간 갖지 못해 아쉽다. 앞으로 모든 일이 다 잘됐음 좋겠다 진심이야. 앞으로 연락도 자주하자.), 그리고 진국이(동갑친구, 많이 친해지지 못하고 많이 함께하지 못해서 아쉽다. 남은 학부생활 열심히 하고 앞으로 무슨 일이든 파이팅!) 이제 석사에 들어갈 우리 하리(언니가 많이 못가르쳐주고 가서 미안해. 하지만 잘할 수 있을거야~ 파이팅!)

제 삶의 버팀목인 하나뿐인 소중한 사랑하는 나의 가족, 항상 우리 가족을 위해 밤낮없이 애쓰시는 존경하는 우리 아버지와 매일 자식 걱정에 잠 못 이루시는 어머니, 그리고 항상 무슨 일이든 응원해주는 나의 하나뿐이자 제일 믿을 수 있는, 어찌면 오빠같은 든든한 동생 민재, 그리고 항상 날 친 자식처럼 챙겨주시는 이모와 친 동생과 다름없는 경환이, 경현이, 민정이, 정아 모두 다 감사하고 사랑합니다. 가족의 지지와 격려가 없었더라면 부족하나마 이러한 논문이 나올 수 없었을 것입니다. 다시 한 번 깊이 감사를 전합니다. 앞으로 더 잘하겠습니다.

그리고 우리 2013년 대학원 동기들 혜인이, 지운이, 혜나, 서영이, 현수오빠, 은성이오빠, 원보오빠, 모두 수고했고 지금까지 고생하고 열심히 해온 만큼 모두 잘됐으면 좋겠습니다.



모두들 감사합니다. 앞으로 더 열심히 하겠습니다.