

발 간 등 록 번 호

11-1541000-000783-01

무항생 양어를 위한 bacteriocin 제제의 개발
(Development of Bacteriocin Products for Non-antibiotics
Aquaculture)

제 니 스

농 립 수 산 식 품 부

보안과제(), 일반과제(○) 과제번호

무항생 양어를 위한 bacteriocin 제제의 개발
(Development of Bacteriocin Products for Non-antibiotics
Aquaculture)

넙치양어를 위한 박테리오신 제제 개발
(Development of bacteriocin products for
flatfish aquaculture)

제 니 스

농 립 수 산 식 품 부

제 출 문

농림수산식품부 장관 귀하

이 보고서를 “농림수산식품부” 과제(세부과제 “무항생 양어를 위한 박테리오신 제제 개발”)의 보고서로 제출합니다.

2010년 11월 30일

주관연구기관명 : 제 니 스

주관연구책임자 : 박 홍 제

세부연구책임자 : 박 홍 제

연 구 원 : 김 병 극

연 구 원 : 김 규 태

연 구 원 : 강 태 월

연 구 원 : 곽 경 숙

연 구 원 : 권 대 준

연 구 원 : 강 지 혜

협동연구기관명 : 영남대학교 미생물생명공학

협동연구책임자 : 조 윤 래

협동연구책임자 : 강 용 호

연 구 원 : 조 윤 환

연 구 원 : 성 호 선

연 구 원 : 이 영 아

연 구 원 : 최 욱 한

연 구 원 : 김 재 국

연 구 원 : 김 현 정

연 구 원 : 박 혜 립

연 구 원 : 김 나 연

보고서 요약서

I. 제 목

무항생 양어를 위한 박테리오신 제제 개발에 관한 연구

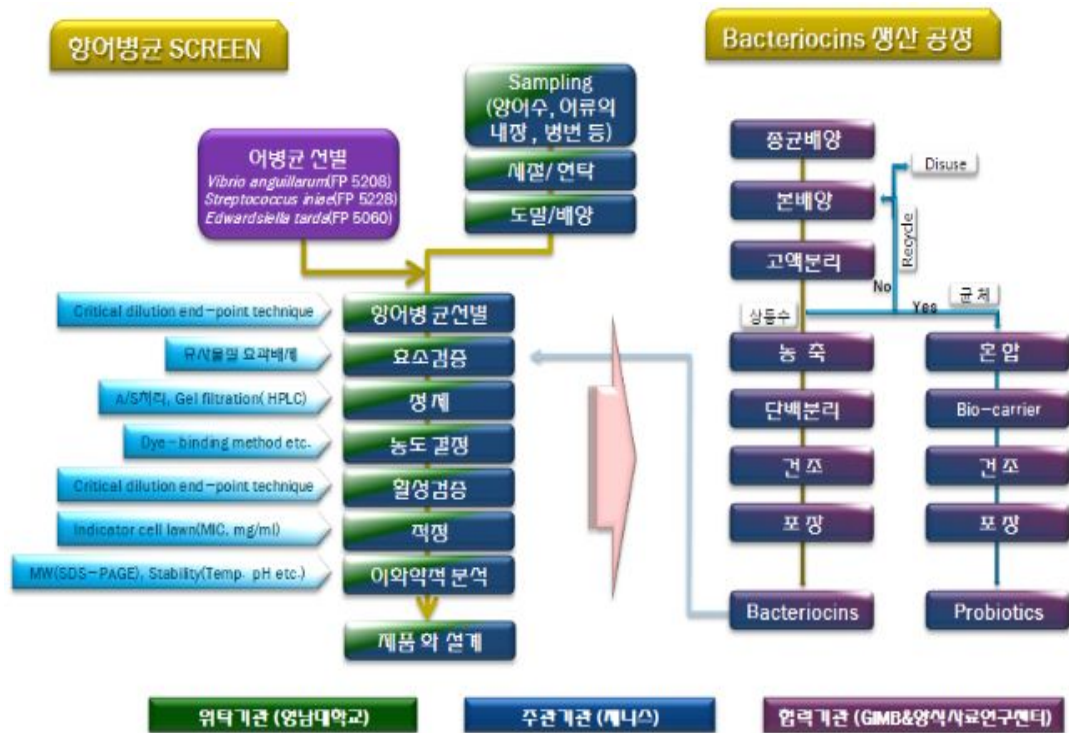
II. 연구개발의 목적 및 필요성

양식 산업은 오늘날 급속히 성장하는 수산업의 한 분야로서, 최근 고단백 및 기능성 지방산 등 건강에 대한 인식의 전환에 따라 수산물의 수요가 지속적으로 증가하여 경제적인 중요성이 커지고 있다. 우리나라는 삼면이 바다여서 연안 대부분의 면적이 바다 양식업으로 이용되고 있으며, 내륙에도 많은 수가 분포하고 있어 내수면 양식업에도 관심이 모아지고 있다. 그러나 양식은 제한된 구역에서 고밀도로 사육하므로 수질환경의 악화로 인해 양식 어류의 면역력이 저하되고, 병원성 세균이나 기생충에 의한 감염이 쉬운 환경의 경우가 많다. 이러한 이유로 현재 양식 산업과 수산물 거래에서 가장 큰 문제점이 바로 질병 및 질병발생 원인 어병균을 치료하고 통제할 수 있는 방안에 대한 중요성이 대두되고 있다. 이러한 이유로 수산양식에서 항생제 사용이 점차 증가하고 있으나 수산물에 대한 규제나 규격이 결정되거나 정해져 있지 않은 상황이며, 사용되는 항생제는 양어장 내에서 다 소비되지 않고 잔류하여 양식장 바깥으로 흘러나와 주변 수계로 유입 된다. 마땅한 대안이 없는 무분별한 항생제의 남용으로 최근들어 각종 병원성 세균들이 항생제에 대한 내성이 생기는 문제가 우려수준을 넘고 있어 심각한 상태이다. 인간에게 의약품으로 사용되는 것과 관련된 항생제를 어병균에 대한 예방목적으로 사용하거나 교차내성이 있는 것으로 알려진 항균제의 사용은 인간의 건강에 매우 중대한 위협이 될 수 있어 이에 대한 방침이 조속히 정립되어야 할 것이다.

따라서 항생제 남용을 억제하고 질병을 예방 할 수 있는 bacteriocin(10)의 개발이 항생제의 남용과 이로 인한 문제를 해결할 수 있는 하나의 대안이 될 수 있을 것이다. Bacteriocin은 사람 또는 동물에 대해 장내 균종의 성질을 개선 시켜 숙주에게 유익한 효과를 주는 살아있는 미생물이 생성하는 물질의 단독 또는 혼합 물질을 의미하며 여러 산업분야에서 응용되고 있다. 이러한 bacteriocin을 생산하는 대표적인 미생물은 유산균으로 *Pediococcus*, *Enterococcus*, *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Leuconostoc*, *Bifidobacterium* 등이 알려지고 있으며 *Lactobacillus* 종이 생산하는 bacteriocin 중에는 그람 양성, 음성 세균에 대해 넓은 항균 스펙트럼을 가지고 있는 것도 보고되고 있다.

본 연구에서는 *Streptococcus aureus*, *Listonella anguillarum*(*Vibrio anguillarum*) 및 *Edwardsiella tarda* 등 어병 유발세균에 대한 특이성이 강한 bacteriocins 제제 개발을 통해 항생제와 화학 약품 대체를 위한 산업화 요구를 충족시키고자 한다.

III. 연구개발 내용 및 범위



1. Bacteriocin 생성균주 선발 및 분리

본 연구에서는 양식 어종 중 대표종에 속하는 넙치에서 발병율이 높은 연쇄상구균증, Vibrio병 및 에드워드병(*Edwardsiella tarda*)을 유발하는 병원균을 대상으로 해수 및 물고기 내장으로부터 항균력을 bacteriocin 생산 균주를 선발하고, 이들의 특성을 확인 하였다.

2. Bacteriocin 생성균주 생산성 조사

최종 선별된 균주를 형태학적, 생리학적, 생화학적 방법으로 동정을 실시하고 이 균주의 박테리옌 생산에 관한 발효 특성을 조사하여 최적 생산성에 관여하는 요소를 조사하였다.

3. Bacteriocin 생산 균주의 발효 기술 확보 및 최적조건 확보

최종 선별된 균주 중 병원균에 대한 항균활성이 인정된 균주들의 성장에 영향을 주는 탄소, 질소 및 미네랄들을 선택적으로 적용함으로써 각 균주의 최대 성장 및 항생기능성물질의 생산성에 미치는 영향을 조사하여 최적발효 조건 및 배지를 선정하였다.

4. Bacteriocin의 정제 기술 확보

최종 선별된 균주로부터 박테리옌을 순수 분리정제하고 그 특성을 조사하였다.

- PEG & Sodium sulfate를 이용한 1차 농축, 2차 UF10,000-UF1,000 Filtration
- pH-mediated adsorption & desorption 방법을 이용한 cell 흡착 분리 정제

5. Bacteriocin의 활성 분석

Lab. scale test : 양어수 수질조건(염도 25~28‰-포항북부해수, 온도 18℃에 병원균 투여한 후 시제품 단위량(2mg/ml)을 주입하여 Limited dosage(LD)₅₀값 결정하였다.

6. 조정제된 bacteriocin의 filed Test

- 조정제된 시제품에 대한 생체안정성을 위하여 생쥐를 대상으로 경구투여 및 복강주입을 통하여 시제품의 독성실험을 실시하여 하였다.
- 조정제된 시제품을 넙치(7-12cm)에 적용한 현장실험을 실시하였다.

IV. 연구개발결과

1. 남해 및 동해안 일대의 해수 및 어류의 내장으로 부터 1차, 37여주의 균을 분리하여 그 중 항균활성을 나타내는 균주를 선별하였고, 2차와 3차에 걸쳐 항균활성 물질을 분비하는 31균주로 부터 병원균에 넓은 항균활성을 보이는 ZEN5, ZEN49, ZEN2013, ZEN102, VK24, LK7 균주를 최종적으로 선별하였다.

2. 선별 균주의 형태학적, 배양학적, 생리학적 특성을 조사하여 *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* ZEN64, *Streptococcus (Para)uberis* ZEN49, *Aerococcus* sp. LK7, *Vagococcus* sp. VK24, *Lactococcus lactis*. ZEN102 로 동정하였고, bacteriocin은 대수증식기에서 생산되는 1차 대사 산물임을 확인하였으며, 배양 온도가 30℃에서 가장 안정적으로 생산됨을 알 수 있었다.

3. 선별한 ZEN5, ZEN49, ZEN2013, ZEN102, VK24, LK7 균주가 생산하는 박테리옌은 병원성 세균인 연쇄상구균증(*Streptococcus aureus*), Vibrio병(*Listonella anguillarum*) 및 에드워드병(*Edwardsiella tarda*)에 대해 항균성을 보였으며, 넓은 pH 안정성과 열 안정성을 갖는 것으로 나타나 bacteriocin을 이용한 제제개발의 적합성을 확인하였다.

4. 최적 발효조건 분석 및 배지선정을 통하여 비용 절감 효과 가능성을 확보하였다.

L. lactis & *S. parauberis* : MRS → BPG medium - cost down : 57%

Lactobacillus sp. : NB → YGS medium - cost down : 50%

5. 항균물질 정제 공정은 PEG & Sodium sulfate를 이용한 1차 농축, 2차 UF10,000-UF1,000 Filtration에서 항균활성물질 농축 및 정제가 용이함을 확인하여 공정에 대한 논문을 게재한 바 있고, 더 나아가 대량생산체제를 구축하기 위해서 scale up 공정 연구에서 pH에 따른 흡탈착을 통한 박테리옌 정제 방법을 변형 응용함으로 발효 배양액에서 간편하게 분리할 수 있는 방법을 도출하였다.

6. pH에 따른 흡탈착 정제법을 이용하여 확보한 조정제 항균물질을 이용한 생쥐 독성실험 결과 25g/kg 이상에서도 죽지 않아 생체독성은 없는 것으로 판단할 수 있었다.

7. 현장실험에서 넙치 500마리에 병원균과 대조구를 두고 각 실험구에 따라 공격실험을 실시한 결과 대조구의 1% 미만의 생존율과는 달리 50~63%까지의 생존율을 보여 산업화 가능성을 확인할 수 있었다. 따라서 향후 본 과제에서 개발된 bacteriocin의 산업화와 병행하여 순도를 높여 고부가가치의 상품으로 상품성을 재고할 수 있을 것으로 판단된다. 특히 bacteriocin의 높은 특이성에 따른 한정된 항균활성을 극대화 할 수 있는 복합 제제화를 시도하여 기존의 항생제와 같은 적용 스펙트럼을 확보할 수 있는 제품을 출시하고자 한다.

8. 따라서 향후 본 과제에서 개발된 bacteriocin의 산업화와 병행하여 순도를 높여 고부가가치의 상품으로 상품성을 재고할 수 있을 것으로 판단된다. 특히 bacteriocin의 높은 특이성에 따른 한정된 항균활성을 극대화 할 수 있는 복합 제제화를 시도하여 기존의 항생제와 같은 적용 스펙트럼을 확보할 수 있는 제품을 출시하고자 한다.

V. 연구성과 및 성과활용 계획

본 과제에서 수계의 특성으로 그 적용에 한계가 있는 양식분야의 항생제와 화학약품을 대체할 수 있는 유용자원인 Bacteriocins의 개발을 통해 미래 wellbeing 산업에 기여하는 기업이 되고자합니다.

① Bacteriocin 생성균주 screen(어병균에 대한 특이성 규명 및 분석)

- Antibiotics와는 달리 Bacteriocins은 같은 genus, family 간의 경쟁적 항균물질이 많다.
- 항생제에 대한 대안제제로서의 개발 가능성이 크다
- 연쇄상구균증을 유발하는 *streptococcus sp.*에 특이성을 가진 균종의 확보
- 확보된 넙치, 장어, 조피볼락, 붕장어 유래의 특허균주: KACC 91328P를 비롯한 출원 중인 균주 KACC91336P, KACC91337P의 산업적 적용시도(활성이 나타나는 분리균주 ZEN5, ZEN49, ZEN102, VK24, LK7의 특허등록 준비)
- 특히 넙치에서 발병빈도가 높은 연쇄상구균증(병원체:β-용혈성 *Streptococcus sp.*, - 안구 돌출, 복부팽만, 눈가장자리의 출혈, 안구백타, 체색 흑화, 체표점액과다분비, 지느러미가 붉어지면서 붕과 탈락)뿐만 아니라 gram-negative에 속하는 에드워드병(병원체: *Edwardsiella tarda* - 체색이 흑화, 지느러미 및 복부발적, 충혈, 탈장), 비브리오패혈증(병원체: *Vibrio anguillarum*) 등의 병원체에 대한 특이성 antimicrobial peptide를 screen하기 위해서 2010년 1월~5월까지 남해안(부산-진해-창원-통영)을 따라 200여 POINT의 sample를 활용한 활성균주 screen에서 *Streptococcus sp.*, *Vibrio anguillarum* 등에 공통적으로 항균활성을 갖는 3종의 균주를 더 확보함으로써 보다 높은 특이적 적용 범위를 높일 수 있을 것이다.

② 대량생산을 위한 발효기술의 확보(최적 발효조건 분석 및 배지선정)

- 높은 가격의 MRS에 비해 생육 및 향균활성이 동등하거나 보다 우수한 대체 배지원료 선정을 통해 경제성 확보 -> 가격 경쟁력 확보

L. lactis & *S. parauberis* : MRS → BPG medium - cost down : 57%

Lactobacillus sp. : TYS → YGS medium - cost down : 30%

- 향후 고가의 배지를 대체할 수 있는 두부청 등 부산물 media 접목함으로 cost 절감
- 확보된 유용 균주의 이화학적 특성조사를 통해 새로운 저분자 조절물질(촉매인자 등)을 첨가함으로 생산효율을 높이고자함
- Bacteriocin을 구성하는 아미노산의 성분을 배지 내에 적정수준 이상 혼합한 배지를 통해 Bacteriocin 생성률 135~150% 향상(특허준비 중)
- Bacteriocin의 생합성 특성을 고려한 탄소원과 질소원 및 미네랄 최적 합성배지 조성

③ 정제기술의 확보(Protein 농축 및 정제의 scale up 공정 연구)

- 간편한 Peptide 및 Protein 대량 농축 기술의 확보를 통한 산업화의 효율성 증대
- PEG 수성이상계를 적용한 농축 및 UF system의 정제기술 접목을 통한 경제성 확보

④ Bacteriocins의 활성분석(Lab.& field test scale up)

- 면역저항성을 높여 예방제제로서의 Probiotics와는 차별화된 제제로 양어장에 감염된 병원균의 예방차원이 아닌 치료제제로서 병원균을 살균 처리할 수 있음(ZEN102 배양액 상태에서 *Staphylococcus iniae* : LD₅₀ 28,000AU(Nisin으로 약 3.1ug/ml), 그리고 VK 24 배양액 상태에서는 *E. tarda* : LD₅₀ 120,000AU
- 국내 양식 대표어종(넙치, 우럭 등)에 감염빈도가 높은 연쇄상구균증을 비롯한 다양한 질환 유발 병원균을 대상으로 한 향균활성을 통한 상품화 가능성 확보
- 단계적으로 상품화 검증을 위해 field에 적용을 늘이는 한편 제품생산 체제구축
- 지금까지의 data를 종합하여 보다 전문적 접근법으로 어병 향균활성 균주 검토 및 공인기관 검증 획득과 특허권 확보.
- 해양수산과학원 산하기관인 포항 월포양식사료연구소와 긴밀한 협력체계를 구축하는 한편 지속적인 screen으로 새로운 유용세균의 선별 및 상품균의 다변화 모색
- 차후 양어수내에서 일정량 지속적으로 diffusion됨으로 양어수 교환에 구애되지 않는 향균제제화를 위해 고정화기법을 적용한 최상의 어병원의 방제 및 예방제제로 그 효과성을 인정받는 제품을 개발하여 산업적 고부가 가치를 창출하고 이를 통해 경제적인 성과 획득을 이루고자 노력하고자 합니다.
- Bacteriocins은 식품의 원료단계에서 부터 항생제 노출빈도를 감소시켜 식생활건강에 이바지할 수 있는 항생제제의 대안제제로 물고기의 외부 스트레스에 대한 저항력과 면역력 증진에 기여하여 항생제 및 농약 남용의 대안마련과 양식업의 고부가가치 창출 및

경쟁력 확보에 기여할 수 있는 제제로 상품가치가 매우 높다 할 수 있다.

- 따라서 우리 회사는 미래지향적으로 항생제와 화학농약의 남용을 막고, 보다 안전한 식생활 환경 구축을 위한 노력의 일환으로 수계 양식을 위한 Bacteriocins의 개발에 앞장서고, 다양한 물고기들의 생육과정에 미치는 영향인자를 분석하여 이를 기초한 upgrade 제품의 지속적 출시가 가능한 여건을 마련하여 넙치뿐만 아니라 우럭과 참돔 그리고 장어 등의 다양한 양식어종 전반으로 확대할 수 있는 전문 기업으로 성장하고자 합니다.

요 약 문

남해, 동해안 일대의 해수 및 어류의 내장으로 부터 37여주의 균을 분리하여 그 중 항균 활성을 띠는 균주 3개를 선별하고, 배양액으로 bacteriocin을 생산하는 균주로 2차, 3차로 31개의 균주를 선정 하였다. 그리고 이들 선정균주 중에서 3종의 지시균에 넓은 항균범위를 보이는 ZEN5, ZEN49, ZEN2013, ZEN102, VK24, LK7 균주를 최종적으로 선발하였다. 선발 균주의 형태학적, 배양학적 및 생리학적 특성을 조사하여 *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* zen64, *Streptococcus (Para)uberis* zen49, *Aerococcus* sp. LK7, *Vagococcus* sp. VK24, *Lactococcus lactis* ZEN102로 5종 모두 cocci type으로 동정하였고, 이들이 생산하는 bacteriocin은 대수증식기에서 생산되는 1차대사 산물임을 확인하였으며, 배양 온도가 30℃에서 가장 안정적으로 생산됨을 알 수 있었다. 또한 단백질 분해 효소인 protease와 proteinase K에 대해 특이적 저해를 받는 것으로 보아 단백질로 이루어진 bacteriocin을 확인 하였다. 선발한 ZEN5, ZEN49, ZEN2013, ZEN102, VK24, LK7 균주가 생산하는 bacteriocin은 병원성 세균인 연쇄상구균 (*Streptococcus aureus*), Vibrio병(*Listonella anguillarum*) 및 에드워드병(*Edwardsiella tarda*)에 대해 항균성을 보였으며, 넓은 pH 안정성과 열 안정성을 갖는 것으로 타나나 산업적 응용 가능성을 보였다. 이들 균주의 대량배양을 위한 최적 발효조건 및 배지선정을 통하여 탄소원 및 질소원에 대한 bacteriocin 생산 특성을 분석한 결과 자체 조성을 변경한 BPG medium의 효율이 가장 좋게 나타났다. 또한 BPG 배지를 각각의 균주 특성에 따라 변형 적용함으로써 각 균주별 특성을 최적화 할 수 있었다. 대량배양을 통해 생산된 bacteriocin의 정제 효율성을 높이기 위해 산업응용성이 높은 PEG를 이용한 층분리, pH에 따른 metrix 흡탈착 특성을 이용한 간편한 Protein 농축 및 정제 방법을 적용하여 대량생산을 위한 scale up 공정에 응용하였다. 상기의 변형 농축 정제법을 통해 확보한 조정제 bacteriocin이 SDS-전기영동을 통하여 3,500~3,800KDa 부근에서 활성을 가지는 bacteriocin을 확인할 수 있었다.

또한 조정제 bacteriocin을 이용한 생쥐 독성실험 결과 25g/kg 이상에서도 죽지 않아 생체독성은 없는 것으로 판단할 수 있었다. Field에서의 적용실험에서 넙치 500마리에 병원균과 대조균을 두고 실험군에 따라 공격실험을 실시하여 실험의 대조균의 1% 미만의 생존율과는 달리 50~63%까지의 생존율을 보여 산업화 가능성을 확인할 수 있었다. 따라서 향후 본 과제에서 개발된 bacteriocin의 산업화와 병행하여 순도를 높여 고부가가치의 상품으로 상품성을 재고할 수 있을 것으로 판단된다. 특히 bacteriocin의 높은 특이성에 따른 한정된 항균활성을 극대화 할 수 있는 복합 제제화를 시도하여 기존의 항생제와 같은 적용 스펙트럼을 확보할 수 있는 제품을 출시하고자 한다.

SUMMARY

37 strains were isolated from seawater and intestines of marine fish at the south and east coast, 3 strains producing antimicrobial agent were selected. 31 strains producing bacteriocin were selected from culture fluid with research process 2nd and 3th.

And, ZEN5, ZEN49, ZEN2013, ZEN102, VK24 and LK7 strains with wide inhibition zone against 3 standard pathogenic bacterias were finally selected.

The selected strains were identified as the *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* zen64, *Streptococcus (Para)uberis* zen49, *Aerococcus* sp. LK7, *Vagococcus* sp. VK24, *Lactococcus lactis*. ZEN102 on the basis of its morphological, physiological and cultural characteristics. Produced bacteriocin on log phase was confirmed as a primary metabolite, it was produced stably at 30°C.

Produced bacteriocin of the selected strains, ZEN5, ZEN49, ZEN2013, ZEN102, VK24 and LK7 strains was showed antibacterial activity against *Streptococcus aureus*, vibriosis(*Listonella anguillarum*) and edwardsiellosis(*Edwardsiella tarda*) associated with disease in fishes. And it was confirmed applicable material in marine aquaculture by wide range pH stability and thermostability. And also, antimicrobial activity of bacteriocin was lost or unstable after treatment with protease and proteinase K.

Growth characteristics of bacteriocin producing strains were analyzed to confirm applicable cost saving with the optimal fermentation condition and medium.

For the purification of bacteriocin, scale up process was studied on mass-produced system, method of protein ultrafiltration and purification were studied for easy by using a PEG.

And purified bacteriocin with using cell adsorption method was confirmed molecular weight as 3.5KDa by SDS-PAGE.

The mouse toxicity test was determined negative by over 25g/kg of bacteriocin.

Industrialization possibility was confirmed by field test that exposure flatfish to pathogenic bacteria. In this test, flatfish of less than 1% as a control group were survived with none-treatment, but flatfish of 50%~63% were survived with bacteriocin.

Therefore, marketability of developed bacteriocin in this study was supposed to be higher value-added product with industrialization and high-purity purification.

Specially, limited antimicrobial activity of bacteriocin's high specificity can maximize by development of combined products. Through this research, we expect to launch a products of broad spectrum as traditional antibiotics.

CONTENTS

Chapter 1. Resume of research and development project	1
Chapter 2. Technical developments at domestic and overseas	5
1. Construction	5
1-1. Technology of the concepts	5
1-2. Technology of the Construction	10
1-2-1. Domestic study	13
1-2-2. Overseas study	14
2. Problem	16
Chapter 3. Research and development of information and results	18
1. Research background and introduction	18
2. Research Materials and method	19
2-1. Materials and methods	19
2-2. Isolation and identification of bacteriocin- producing strains	19
2-3. Antivacterial activity of selected strains	22
2-4. Characteristics of bacteriocin produced by LK7 and Vk24	22
2-5. Concentration and Purification of bacteriocin	24
2-6. Molecular weight determination of bacteriocin	24
2-7. Measurement of the lactic acid producing strains of bacteriocin	25
2-8. Antimicrobial activity of bacteriocin- producing strains by flat fish	25
2-9. Toxicity test using a prototype(Riocin)	27
3. Conduct research information and Result	29
3-1. Screening of microorganisms producing antimicrobial substances	29
3-2. Antimicrobial activity	36
3-3. Verification of Antimicrobial activity of antibiotics and Nisin	39
3-4. Determination of Antimicrobial activity	40
3-5. Isolation and identification of activity strains	41

3-6. Production of antibacterial substances optimum review	55
3-7. Effect of Skim milk of antimicrobial activity	59
3-8. Optimal conditions of antimicrobial	60
3-9. Effect of pH on the stability of antimicrobial	64
3-10. Effect of temperature on the stability of antimicrobial	67
3-11. Effect of antimicrobial activity with enzyme	71
3-12. Effect of other stability of antimicrobia	75
3-13. Concentration and Purification of protein	80
3-14. Screening of other useful strains	94
3-15. Selected experimental production medium	95
3-16. Collection of Antimicrobial in culture experimrnts	112
3-17. Pilot plant(Prelimunary prosscuss for industrial production)	117
3-18. Antimicrobial activity of the Freeze dry powder	118
3-19. Antimicrobial activity of bacteriocin- producing strains by flat fish	120
3-20. Toxiciy test using a prototype(Riocin)	130
4. Discussion	140
Chapter 4. Contribution of Goal attainment and Related areas	142
Chapter 5. Plans for research and development result and performance	148
Chapter 6. The International scientific and technical information collected in the course of research and development	158
Chapter 7. References	161

목 차

제 1 장 연구개발 과제의 개요	1
제 2 장 국내외 기술개발 현황	5
제 1 절 현황	5
1. 기술의 개념	5
2. 기술의 현황	10
가. 국내시장	13
나. 국외시장	14
제 2 절 문제점	16
제 3 장 연구개발수행 내용 및 결과	18
제 1 절 연구수행 배경 및 서론	18
제 2 절 연구수행 재료 및 방법	19
1. 실험재료	19
2. Bacteriocin생산 균주의 분리 및 동정	19
3. 선발균주에 의한 항균 활성	22
4. LK7과 VK24균주가 생산하는 bacteriocin의 특성	22
5. Bacteriocin의 농축 및 정제	24
6. Bacteriocin의 정량 및 분자량 확인	24
7. 박테리오신 생산 균주의 유기산(Lactic acid) 측정	25
8. 넵치를 이용한 제품의 활성 실험	25
9. 시제품의 독성 실험	27
제 3 절 연구수행 내용 및 결과	29
1. 항균물질 생산 미생물의 탐색	29
2. 항균활성	36
3. 항생제와 Nisin의 antimicrobial activity 검증	39
4. 항균성 검증	40

5. 활성균주의 분리 및 동정	41
6. 향균물질 생산 최적 조건 검토	55
7. 배양시 첨가물(Skim milk)에 따른 향균물질의 활성	59
8. 향균물질의 최적 조건	60
9. 향균물질의 pH 안정성	64
10. 향균물질의 열 안정성	67
11. 효소에 대한 안정성	71
12. 기타 안정성 검사	75
13. Protein 농축 및 정제	80
14. 기타 유용균주의 Screening	94
15. 생산배지 선정 실험	95
16. 배양액 내의 항생물질의 간편 회수실험	112
17. Pilot plant(산업적 생산을 위한 예비 공정)	117
18. Freeze dry powder의 활성실험	118
19. 넵치를 이용한 제품의 활성 실험	120
20. 시제품을 이용한 독성 실험	130
제 4 절 맷 음 말	140
제 4 장 목표달성도 및 관련분야에의 기여도	142
제 5 장 연구개발 성과 및 성과활용 계획	148
제 6 장 연구개발과정에서 수집한 해외과학기술정보	158
제 7 장 참고문헌	161

List of Figure

Fig. 1. Comparison of the selected strain growth and total protein production ..	32
Fig. 2. Antimicrobial activity against pathogens	33
Fig. 3. Antimicrobial activity against pathogens	34
Fig. 4. Antimicrobial activity against pathogens	36
Fig. 5. Antimicrobial activity with concentration of nisin	36
Fig. 6. Antimicrobial activity of nisin against <i>Micrococcus luteus</i>	37
Fig. 7. Colony counting with dilution rate of pathogens	38
Fig. 8. Antimicrobial activity of nisin against pathogens	39
Fig. 9. Antimicrobial activity of nisin and ampicillin	39
Fig. 10. Antimicrobial activity against <i>Edwardsiella tarda</i>	40
Fig. 11. Antimicrobial activity of strain LK7 against <i>Listonella anguillarum</i> . ..	41
Fig. 12. Antimicrobial activity of strain LK7 with various conditions.	41
Fig. 13. Antimicrobial activity of strain VK24 against <i>L. anguillarum</i>	42
Fig. 14. Antimicrobial activity of ZEN102 against <i>Micrococcus luteus</i>	43
Fig. 15. Electron micrograph of the strain <i>Aerococcus</i> sp. LK7	44
Fig. 16. 16S rDNA gene sequence analysis of strain <i>A. sp.</i> LK7	45
Fig. 17. Phylogenetic tree of strain <i>A. sp.</i> LK7	45
Fig. 18. Electron micrograph of the strain <i>V. sp.</i> VK24	46
Fig. 19. 16S rDNA gene sequence analysis of strain <i>V sp.</i> VK24	47
Fig. 20. Phylogenetic tree of strain <i>V. sp.</i> VK24	47
Fig. 21. Electron micrograph of the strain ZEN102	48
Fig. 22. 16S rDNA gene sequence analysis of strain ZEN102	48
Fig. 23. Phylogenetic tree of strain ZEN102, ZEN49 and ZEN64.	50
Fig. 24. API 50CHL test result of strain ZEN102	50
Fig. 25. API 20strep test result of strain ZEN102	51
Fig. 26. ZEN102 activity and Colony(CFU/ml) at time	53
Fig. 27. Antimicrobial activity of strain ZEN102	53
Fig. 28. Agarose gel electrophoresis of purified plasmid	55
Fig. 29. Growth curve of antimicrobial strain and amount of total protein	56
Fig. 30. Antimicrobial activity of selected strains	56
Fig. 31. Cell growth curve and clearzone size of <i>A. sp.</i> LK7	57
Fig. 32. Cell growth curve and clearzone size of <i>V. sp.</i> VK24	58

Fig. 33. ZEN102 growth and production lactic acid content	58
Fig 34. Antimicrobial activity and growth rate with concentration of skim milk	59
Fig 35. Antimicrobial activity and growth rate with pH	61
Fig. 36. Growth of <i>A. sp.</i> LK7 with various pH	61
Fig. 37. Growth of <i>V. sp.</i> VK24 with various pH	62
Fig. 38. Growth of <i>A. sp.</i> LK7 with various temperature	62
Fig. 39. Growth of <i>V. sp.</i> VK24 with various temperature	63
Fig. 40. Growth of <i>A. sp.</i> LK7 with culture method	63
Fig. 41. Growth of <i>V. sp.</i> VK24 with culture method	64
Fig. 42. Effect of pH on the stability of bacteriocin from <i>A. sp.</i> LK7.	65
Fig. 43. Effect of pH on the stability of bacteriocin from <i>V. sp.</i> VK24.	65
Fig. 44. Effect of pH on the stability of ZEN102	66
Fig. 45. Effect of pH on the stability of bacteriocin ZEN102	67
Fig 46. Effect of temperature on the stability of antimicrobial agent	67
Fig 47. Thermostability with autoclaving	68
Fig. 48. Effect of temperature on the stability of bacteriocin from <i>A. sp.</i> LK7. .	69
Fig. 49. Effect of temperature on the stability of bacteriocin from <i>V. sp.</i> VK24.	69
Fig. 50. Effect of temperature on the stability of ZEN102.	70
Fig. 51. Effect of temperature on the stability of bacteriocin ZEN102.	70
Fig 52. Stability of antimicrobial agent with enzymes	71
Fig. 53. Effect of antimicrobial activity with Proteinase K & Trypsin for bacteriocin <i>A. sp.</i> LK7.	73
Fig. 54. Effect of antimicrobial activity with Proteinase K for bacteriocin from <i>V. sp.</i> VK24	74
Fig. 55. Effect of antimicrobial activity with enzyme	75
Fig. 56. MIC(minimum inhibitory concentration) of bacteriocin produced by <i>A. sp.</i> LK7	77
Fig. 57. MIC(minimum inhibitory concentration) of bacteriocin produced by <i>V. sp.</i> VK24.	77
Fig. 58. MIC of antimicrobial agent from strain ZEN102 against <i>M. luteus</i>	78
Fig. 59. MIC of antimicrobial agent from strain ZEN102 against <i>S. aureus</i>	78
Fig. 60. MIC of antimicrobial agent from strain ZEN102	79
Fig. 61. Standard curve of lactic acid and 0.1N NaOH concentration	79
Fig. 62. Lactic acid concentration and growth rate of ZEN102	80
Fig. 63. Growth curve and protein of strains(a)ZEN5, (b)ZEN49	80

Fig. 64. Antimicrobial activity with total protein	81
Fig. 65. Protein concentration with ammonium sulfate	81
Fig. 66. Optimal amount of ammonium sulfate for protein concentration	82
Fig. 67. Antimicrobial activity with various amount of ammonium sulfate	83
Fig. 68. Gel filtration of ZEN49 strain	84
Fig. 69. SDS-PAGE of antimicrobial agent from strain ZEN49	85
Fig. 70. Adsorption of bacteriocin onto producing cell	85
Fig. 71. Antimicrobial activity of adsorbed bacteriocin against <i>Listonella anguillarum</i>	86
Fig. 72. Dissociation of bacteriocin onto producing cell	86
Fig. 73. Antimicrobial activity of dissociated bacteriocin against <i>Listonella anguillarum</i>	86
Fig. 74. DEAE-cellulose column chromatography of antimicrobial fractions from <i>V. sp.</i> VK24.	88
Fig. 75. Purification of antimicrobial agent from strain ZEN102 by pH-mediated adsorption & desorption method	89
Fig. 76. BSA standard curve	90
Fig. 77. SDS-polyacrylamide gel electrophoresis system	90
Fig. 78. Antimicrobial activity of extracted bacteriocin against <i>Listonella anguillarum</i>	91
Fig. 79. Molecular weight determination of bacteriocin from <i>A.sp.</i> LK7 by SDS-polyacrylamide gel electrophoresis.	91
Fig. 80. SDS-PAGE of bacteriocin from strain <i>V. sp.</i> VK24.	92
Fig. 81. Molecular weight determination of bacteriocin from ZEN102 by SDS-polyacrylamide gel electrophoresis.	93
Fig. 82. Molecular weight determination of bacteriocin from ZEN102 by SDS-polyacrylamide gel electrophoresis and activity	93
Fig. 83. Antimicrobial activity of nisin against gram negative bacteria	94
Fig. 84. Antimicrobial activity of deep sea water	94
Fig. 85. Growth rate of strain ZEN49 in MRS, MRS&YG, YG Broth	95
Fig. 86. Growth curve and Protein content of strain ZEN49 in MRS, MRS&YG, YG Broth	95
Fig. 87. Effects of carbon source	96
Fig. 88. Effects of nitrogen source	97
Fig. 89. Effect of mineral	98

Fig. 90. Growth of strain ZEN49 with optimal medium	99
Fig. 91. Cultivation of strain ZEN49 with optimal medium	99
Fig. 92. Growth and antimicrobial activity of <i>A. sp.</i> LK7 with various mediums	100
Fig. 93. Growth and antimicrobial activity of strain ZEN102 with various mediums	101
Fig. 94. Antimicrobial activity of strain ZEN102 with various mediums	101
Fig. 95. Effect of Sodium acetate and nitrogen sources for the growth and antimicrobial activity of the <i>A. sp.</i> LK7	102
Fig. 96. Effect of Sodium acetate and nitrogen sources for the growth and antimicrobial activity of the <i>V. sp.</i> VK24	103
Fig. 97. Effect of carbon sources on the growth and activity of ZEN102	103
Fig. 98. Effect of carbon source(Lactose) on the growth and activity of ZEN102	104
Fig. 99. Effect of carbon source on the growth and activity of ZEN102 (1)	105
Fig.100. Effect of carbon source on the growth and activity of ZEN102 (2)	105
Fig.101. Effect of carbon source on the growth and activity of ZEN102 (3)	106
Fig.102. Effect of MRS medium source on the growth and activity of ZEN102	106
Fig.103. Effect of carbon and mineral source on the growth and activity of ZEN102	107
Fig.104. Growth rate with jeotgal(salted-fermented fish products) for bacteriocin ZEN102.	109
Fig.105. Effect of antimicrobial activity with jeotgal(salted-fermented fish products) for bacteriocin ZEN102.	109
Fig.106. Effect of growth rate with jeotgal(salted-fermented fish products) for ZEN102.	110
Fig.107. Effect of growth rate and activity with jeotgal concentration for ZEN102.	111
Fig.108. Effect of growth rate and activity with jeotgal medium combine for ZEN102.	111
Fig.109. Antimicrobial acitivity of nisin	112
Fig.110. Antimicrobial acitivity of nisin with PEG	113
Fig.111. Antimicrobial acitivity of antimicrobial agent from strain ZEN49 with PEG	113

Fig. 112. Antimicrobial activity of nisin with sodium sulfate	114
Fig. 113. Antimicrobial activity of antimicrobial agent from strain ZEN49 with sodium sulfate	114
Fig. 114. Antimicrobial activity of NaCl concentration	115
Fig. 115. Antimicrobial activity of antimicrobial agent from strain ZEN49 with sodium sulfate	116
Fig. 116. Antimicrobial activity of antimicrobial agent from strain ZEN49 with centrifugation	116
Fig. 117. Powder type from strain ZEN49	117
Fig. 118. Comparison of antimicrobial activity with freeze dry and spray dry powder	118
Fig. 119. Antimicrobial activity of pilot plant product	119
Fig. 120. Antimicrobial activity of antimicrobial agent against pathogens	123
Fig. 121. Antimicrobial activity against pathogens	124
Fig. 122. Survival rate of flatfish with antimicrobial agents	125
Fig. 123. Antimicrobial activity of prototype and nisin	131
Fig. 124. Antimicrobial activity of prototype content(1)(2)	132
Fig. 125. Antimicrobial activity of prototype content(3)	133
Fig. 126. Antimicrobial activity of prototype content against <i>M. luteus</i>	133
Fig. 127.. Antimicrobial activity of prototype(1)	134
Fig. 128. Antimicrobial activity of prototype(2)	134
Fig. 129. Antimicrobial activity of prototype content against <i>M. luteus</i>	135
Fig. 130. Biological toxicity test : 1st	136
Fig. 131. Biological toxicity test : 2nd	137
Fig. 132. Growth test of mouse with antimicrobial agent	138
Fig. 133. White blood cell counting of mouse	138

List of Table

Table 1. Medium composition for LK7 strain.	20
Table 2. Composition of TCBS medium for selection of VK24 strain.	20
Table 3. Composition of MRS/NSS medium for growth of VK24 strain.	21
Table 4. Schedule of flatfish survival rate test	27
Table 5. Selection strains	29
Table 6. Selection medium for antimicrobial strains	32
Table 7. Screening of antimicrobial strains against pathogens	35
Table 8. Medium composition for LK7 strain.	42
Table 9. Medium composition for <i>Lactococcus lactis</i> ZEN102	43
Table 10. Characteristics of the strain <i>A. sp.</i> LK7	44
Table 11. Characteristics of the strain <i>V. sp.</i> VK24.	46
Table 12. COMPOSITION OF THE STRIP (API 50CHL) ZEN102	49
Table 13. Antimicrobial activity of <i>A. sp.</i> LK7 for other strains.	52
Table 14. Antimicrobial activity of <i>V. sp.</i> VK24 for other strains.	52
Table 15. Effect of various chemical inhibitors on the activity of bacteriocin from <i>A. sp.</i> LK7	72
Table 16. Effect of various chemical inhibitors on the activity of bacteriocin from <i>V. sp.</i> VK24	72
Table 17. Effect of antimicrobial activity with Proteinase K and Trypsin for bacteriocin <i>A. sp.</i> LK7	73
Table 18. Effect of antimicrobial activity with Proteinase K for bacteriocin from <i>V. sp.</i> VK24.	74
Table 19. Effect of antimicrobial activity with enzyme	75
Table 20. Effect of various metal ions on the activity of bacteriocin from <i>A. sp.</i> LK7.	76
Table 21. Effect of various metal ions on the activity of bacteriocin from <i>V. sp.</i> VK24.	76
Table 22. Antimicrobial activity of strain ZEN5 and ZEN49 against <i>M. luteus</i>	83
Table 23. Yeild of antimicrobial agent	83
Table 24. Antimicrobial activity(%) of fractions of ammonium sulfate saturation	87
Table 25. The composition of medium	101

Table 26. Effect of carbon and nitrogen sources on the growth of <i>V. sp.</i> VK24	102
Table 27. Medium composition : carbon source	104
Table 28. Medium composition : carbon source	105
Table 29. Manufacture MRS medium composition	107
Table 30. The medium composition of jeotgal combine	108
Table 31. Inhibition size with jeotgalfor bacteriocin ZEN102.	109
Table 32. The composition of jeotgal combine medium	110
Table 33. Result of flatfish challenge test	128
Table 34. Analysis of prototype 1	129
Table 35. Analysis of prototype 2	129
Table 36. Analysis of prototype 3	129
Table 37. Analysis of prototype 4	130
Table 38. Antimicrobial activity of prototype and nisin	132
Table 39. Mouse toxicity test ; serum analysis	139

제 1 장 연구개발 과제의 개요

○ 생물자원은 의식주와 의약품 등 인류의 삶 전반에 걸쳐 다양한 물질소재들을 공급해 왔다.

- 미국에서는 약 처방의 25%가 식물 추출물에서 얻어지고, 약 3,000종의 항생제가 미생물에서 추출되고 있으며
- 개도국 인구의 80%는 동식물에게서 의약품을 얻고 있고, 동양 전통 의학에서는 5,100여종에 달하는 의약품을 역시 동식물에서 얻고 있다.
- 더 나아가 생물자원의 가치는 환경오염물질의 대기 및 물의 정화 그리고 토양 비옥도의 유지, 기후 조건 유지 등에 이르기까지 다양한 기능을 발휘하여 역시 인간 삶의 질을 높여주는 역할을 수행하고 있다.

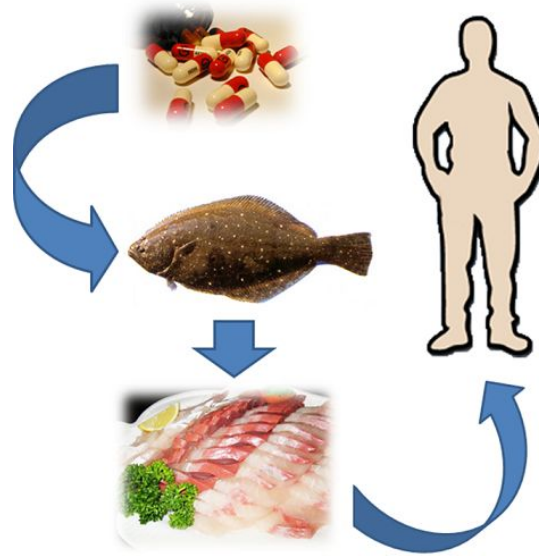
○ 그러나 지나친 자원의 남용과 무분별한 사용으로 세계 각처의 재해발생 빈도가 높아지고, 식량위기와 자원고갈 및 심각한 환경오염에 직면해 있는 상태라 할 수 있다.

- 특히 인류 건강과 직접적으로 연관된 항생제와 농약의 남용으로 병원성 세균의 약물 내성균 주 발생빈도가 높아져 세계 보건위생의 심각한 위기 상황을 초래하였다.
- 항생제에 의한 피해는 오늘날 병원과 약국에 대한 불신으로 이어져 인류의 건강과 생존에 대한 우려를 확산시키고
- 자원의 무분별한 남용에 따른 역효과를 실감하고 이에 대한 경각심을 일깨운 측면도 없지 않으나 무엇보다 이에 대한 대책마련이 시급한 실정이다.

○ 항생제 남용은 이미 식량 및 의약분야뿐만 아니라 거의 모든 분야에서 지적되고 있다.

- 항생제는 양식사업에 있어서 성패를 좌우하는 핵심소재로 자리 매김한 상태이다.
- 양식사업은 어떤 매개체보다 전염성이 빠르고 치명적인 수계에 의존된 수계 산업의 특성 때문에 오염속도가 빠르고, 질병이 발생할 경우 치명적이기 때문이다.
- 물론 항생제뿐만 아니라 독성 화학물질(농약 등)을 양식수에 혼합 투여되는 빈도 역시 계속 늘어 최근 수입 어류의 환경호르몬 및 중금속 오염에 대한 우려 역시 항생제 남용 못지않게 대두되고 있는 상황이다.
- 이러한 부분은 국내에서도 예외일 수 없는데, 국내 양식업계에서도 암유발 가능성이 있는 화학약품(멜라카이트 그린)이 검출되어 소비자들에게 실망감을 안겨주었고 관련 업계 전반에 엄청난 타격을 입혔으나 아직 마땅한 대안이 없는 관계로 단속에도 한계가 있는 것이 사실이다.
- 국내의 양식업계의 경제적 여건과 산업기반의 낙후성은 이와 같은 항생제나 독성화학물질의

대안을 독자적으로 해결할 수 없는 상황으로 이에 대한 정부적인 차원에서 투자와 연구가 절실히 요구되고 있다.



○ 항생제와 화학약품의 남용에 대한 대안 연구가 각 분야에서 진행되고 있다. 그 중 이미 인간과 축산분야에서 일부 응용되고 있는 생균제제인 probiotics(프로바이오틱스)는 숙주의 장 내에 서식하면서 병원(病原)에 대한 저항성을 부여하고, 병원성 미생물의 활성을 저해하거나 제거할 수 있어, 숙주의 질병에 대한 일차적인 저항성과 나아가 면역력의 증진에 기여하는 유용미생물군이라 할 수 있다. 이러한 유용미생물을 선별하고 육종하여 의약 및 산업전반에 응용하는 기술을 통칭하여 probiotics라 한다.

- Probiotics는 살아있는 배양균을 이용한 항생제를 뛰어넘은 또 다른 대안이다. 이 생균체는 병원체의 숙주 내에서의 군체 형성에 대하여 공생, 경쟁, 억제 또는 간섭 역할을 하며, 항생제 또는 박테리옌을 생산할 수도 있다. 본질적으로 약을 생체내(in vivo)뿐만 아니라 정위치(in situ)에 가져다 놓을 수 있어, 치료제제의 체내 투여 시의 잠재적인 부작용을 방지할 수 있다.

- Probiotics 기법을 이용하여 많은 유용 미생물을 찾아내고 동시에 잠재적으로 위험한 미생물의 임의적인 조절을 가능하게 할 수 있는 이 분야의 연구가 미래의 축양산업 특히 양어/식업계의 관심을 집중시키고 있다.

- 이미 선진국에서는 바이오농약이 급성장하고 있으며 최근, 미국의 메인/뉴 햄프셔의 그랜트 연구원에서는 스티브존스와 조지나디에 의해 유해 미생물을 제거하는데 아주 색다른 방법을 시도한 연구가 발표되어 주목을 끌고 있다. 이들 연구팀은 양식으로 섬머 플라운더(summer flounder, 가자미목 물고기)의 장속에 사는 유익한 미생물과 유해 미생물을 각각 분리하고 물고기 내에서 미생물의 생태관찰을 통해, 어떤 미생물이 독성이 있는지 알아내어, 사전에 예방할 수 있는 방법과, 유익한 미생물을 이용해 물고기의 건강과 질병에 대한 저항성을 향상시키

는 연구를 진행하고 있다.

- 이미 이러한 연구는 세계적으로 많은 성과를 나타냈고, 국내에서도 유사한 제품이 생산되어 시판되고 있다.

- 이 방법은 단순히 항생제 치료의 대체방법일지도 모르지만, 항생제 남용 시 유발되는 유해 미생물의 항생제 내성 돌연변이 현상과는 반대로 시간이 지나면 유해 미생물에 대한 물고기의 저항성을 더욱 증강시켜 물고기의 활동력과 육질 개선효과를 기대할 수 있고, 항생제 사용으로 인한 주변수역의 생태계파괴를 막을 수 있다는 점에서 미래의 식량과 의약분야뿐만 아니라 환경 분야에서도 관심이 집중되고 있는 영역이다.

* 보완되어야 할점

- 그러나 probiotics 기술은 항생제나 화학약품과는 달리 살아있는 생명체를 이용하게 되므로 생존율, 보존성, 안정성, 급이성, 가공성, 적용성, 안전성, 보관성, 유통성 등의 너무나 많은 변수가 관여되어 있어 상품으로서의 효과성과 합리성에서 아직까지는 보완되어야 할 점들이 많은 것이 사실이다.

- 또한 probiotics는 인간(요구르트, 김치, 젓갈 등)이나 축산업(생균제제)에서의 적용성과는 달리 양식에서는 수계에 직접 노출되므로 수계전체로 확산되는 문제까지 해결해야 하므로 양식어류에 적용 시 나타나는 총체적인 변수관리가 필요하며 이런 점들을 극복하기 전까지는 상업성이 낮다고 할 수 있을 것이다.

- 최근 이를 개선하기 위해서 bio-carrier system을 결합한 probiotics의 산업화가 시도되고 있으나, 기존의 양식 어가들의 항생제나 화학약품 등에서 가지는 간편성, 신속성 등의 인식전환 역시 probiotics의 상업성을 저하시키는 요인으로 작용하고 있다.

○ 박테리오신(Bacteriocin)은 천연의 무독성 방부제라 할 수 있다. 많은 그람양성세균과 그람음성세균에 의해 상호 생육경쟁을 위해 생산되는 단백질 또는 단백질과 탄수화물의 복합체로 구성되어 있는 항균성단백질이다.

▷ Class I bacteriocins

- small peptide inhibitors(include nisin)

▷ Class II bacteriocins

- small heat-stable proteins.

Class IIa : seems to involve disruption of mannose transport into target cells.

Class IIb bacteriocins form pores in the membranes of target cells and disrupt the proton gradient of target cells. Other bacteriocins can be grouped together as

Class IIc. These have a wide range of effects on membrane permeability, cell wall formation and pheromone actions of target cells.

▷ Class III bacteriocins

- Large, heat-labile protein bacteriocins.

- 박테리오신은 고온에서 활성을 유지하며 광범위한 pH에서 안정하고 무독, 무색, 무취이다.
- 박테리오신과 항생제의 차이점은 항생제가 2차대사 산물인 데 반해 박테리오신은 자기의 유전자로부터 생합성 되는 것이므로 유전자분석 및 조작을 통하여 분자적 수준에서 생산량을 최대화 하는 데 쉬울 뿐만 아니라 분자적 변이를 통하여 더욱 우수한 박테리오신을 합성할 수 있다는 점이다.
- 최근 식품 및 약품분야 등에서 probiotics를 대량 배양을 통한 bacteriocin의 최적 생합성과 대량생산조건을 연구하고 상품화를 통해 항생제와 화학약품의 대안 제제화를 시도하고 있다.
- 천연 단백질인 박테리오신은 식품에 있어서 최소의 열처리와 저온 유통으로 안정성을 확보할 수 있는 수단으로 인식되고 있으며 발효유, 발효 알콜 음료의 저장성 향상, 통조림 제품의 저장성 향상, 냉장 및 냉동 제품의 저장성 향상, 고추장, 된장, 두부, 유산균 발효 제품 등의 저장성 향상, 전통 식품(김치, 약주, 탁주 등)의 산패 및 변질 방지, 어패류의 신선도 유지, 과실 및 야채류의 저장성 향상에 응용할 수 있다.

* 본 과제 of 개발의 필요성

- 항생제와 유사한 기능을 가지고 있으면서 응용성이 높은 새로운 제제의 개발이 절실히 요구되고 있다.
- 항생제는 사람에게 투여 시 부작용이 있다는 단점이 있으나 박테리오신은 인체에 섭취되면 단백질 가수분해효소에 의해 분해되므로 인체에 무독하고 잔류성이 없다는 이유로 식품 등의 생물학적 보존제(biopreservative) 및 발효식품의 생물 제어제(bioregulator)로서 이용이 증대되고 있다.
- 또한 박테리오신의 응용으로 인한 기대 효과는 신선 식품의 저장성 향상과 화학 보존제에 대한 소비자 불안감 해소, 가축 질병 예방으로 생산성 향상, 고품질 신제품 개발이 가능할 수 있다는 것이다.

○ 따라서 본 과제를 통해 항생제 남용에 따른 가축 및 양어/식 산업에서 더 이상의 경쟁력 약화를 막고, 항생제 교차내성으로 인한 보건 환경적 피해를 최소화 하여 보다 건강한 식생활 환경을 이루는데 일익을 다하고자 한다.

제 2 장 국내외 기술개발 현황

제 1 절 현황

1. 기술의 개념

○ 동물 축양에서 발생하는 대부분의 질병은 부정적인 환경에서 발생하는 스트레스에 의해 저항성 약화에서 비롯된다. 무엇보다 스트레스는 같은 공간 내의 물고기와 포집망, 세균, 기생충, 유해화학물질, 유기성 찌꺼기뿐만 아니라 혼탁도, 염, 놀램, 이동, 과밀사육, 부적절한 영양공급, 온도, 압력 등 매우 다양한 인자들이 관여되어 있다.

○ 일반적으로 동물들은 자체 면역체계에서 불리한 외부환경으로 부터의 저항 작용이 있어 세균이 체내로 침투하는 것을 방어할 수 있다. 더욱이 건강한 물고기는 생태학적으로 비교적 고등한 기생충까지도 물리칠 수 있다. 그러나 불리한 환경에서 지속적인 스트레스에 노출된 경우는 세균의 침입에 상대적으로 약할 수밖에 없다.

- 스트레스를 받게 된다면 면역력이 급격하게 약화되어 세균들의 체내 침투로 병들게 된다. 그러나 유익한 미생물이 장내에 우점화되어 있을 경우 숙주의 면역체계와는 무관하게 체내로 유입된 유해세균에 대한 상호 경쟁관계를 유지하여 숙주의 질병을 예방할 수 있게 된다. 이와 같은 역할을 하는 미생물집단을 probiotics라 한다.

- 이 때 Probiotics들이 분비하는 물질이 bacteriocins이다. 이 물질은 항생제와 동일한 기능을 가진 항균성물질들로 최근 생체에 유해할 수 있는 방부제와 항생제를 대신하여 식품 및 의약산업에서 새로운 대안물질로 그 응용영역이 확대되고 있다.

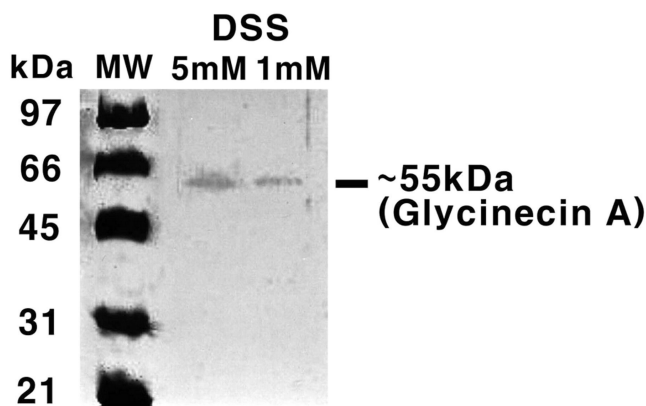
- 이미 이러한 항균성물질들은 식품방부제 등에 사용되어 왔고, 최근에는 구취제거제 등으로 응용상품의 개발도 시도되고 있다.

- 건강한 동물의 경우 일반적으로 상대적으로 비병원성의 호기성과 혐기성 세균에 의해 우점화 되어있고, 이들의 일부는 잠재적인 병원균들(potential pathogens)의 성장을 방해하는 능력을 가졌다. 이런 현상을 세균의 방해(bacterial interference)라고 한다. 이들 세균들이 분비하는 물질들은 다른 세균을 죽일 수 있는 항세균성 단백질(peptide)들로서 bacteriocin으로 알려져있다.

- 최근까지 연구되어 보고되고 있는 bacteriocins에는 “Glycinecin A”[1], “Weissellicin 110”[2], “lactococcal bacteriocin[3], Antimicrobial Activities of Lactic Acid”, “two bacteriocins produced by *Pediococcus acidilactici*” 등이 있고 이들 외에도 산업적으로 이미 응용되었다.

- *Lactococcus lactis* LMG 2081에서 유래된 lactococcin G이 발견되었고 이 lactococcin G의 활성은 세 개의 peptide group이 연관되어 활성을 나타내는 것으로 조사되었다. 이들 peptides은 각각 α_1 :4,376Da, α_2 :4,110Da, β :4,109으로 약 35~39개의 amino acid로 구성되었다(Norway, 1992).

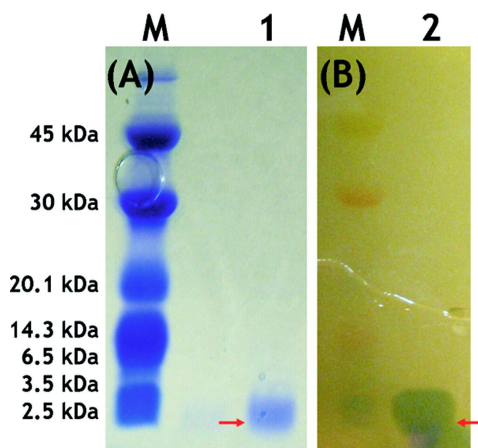
- [1]. Sunggi Heu,¹ Jonghee Oh,² Youngsung Kang,² Sangryeol Ryu,² Somi K. Cho,³ Youngsup Cho,¹ and Moonjae Cho⁴. 2001 *gly* Gene Cloning and Expression and Purification of **Glycinecin A**, a Bacteriocin Produced by *Xanthomonas campestris* pv. *glycines* 8ra



Glycinecin A forms heterodimers in solution.

Purified glycinecin A was cross-linked by treatment with DSS as described in Materials and Methods. After cross-linking, each reaction product was analyzed by SDS-PAGE followed by silver staining.

- [2]. Sirinat Srionnual,¹ Fujitoshi Yanagida,¹ Li-Hsiu Lin,² Kuang-Nan Hsiao,² and Yi-sheng Chen¹ **Weissellicin 110**, a Newly Discovered Bacteriocin from *Weissella cibaria* 110, Isolated from Plaa-Som, a Fermented Fish Product from Thailand



SDS-PAGE analysis of purified bacteriocin from *W. cibaria* 110.

(A) CBB-stained gel. (B) Gel placed onto MRS agar surface overlaid with *L. sakei* JCM 1157⁷. Lanes M, low-molecular-mass standards; lanes 1 and 2, purified bacteriocin from *W. cibaria* 110.

Inhibition spectrum of the bacteriocin produced by *W. cibaria* 110

Indicator strain	Medium	Incubation temp (°C)	Diam (mm) of zone of inhibition ^a
<i>Lactobacillus sakei</i> JCM 1157 ^T	MRS	30	13
<i>L. sanfranciscensis</i> JCM 5668 ^T	MRS	30	10
<i>L. homohiochii</i> JCM 1199 ^T	MRS	30	10
<i>L. coryniformis</i> subsp. <i>coryniformis</i> JCM 1164 ^T	MRS	30	11
<i>L. acetotolerans</i> JCM 3825 ^T	MRS	30	12
<i>W. kandleri</i> JCM 5817 ^T	MRS	30	10
<i>W. halotolerans</i> JCM 1114 ^T	MRS	37	10
<i>W. paramesenteroides</i> JCM 9890 ^T	MRS	30	13
<i>Leuconostoc lactis</i> JCM 6123 ^T	MRS	30	11

^a Wells (8 mm in diameter) were filled with 100 µl of supernatant from the *W. cibaria* culture. -, no inhibitory zone observed. ^b PBN broth (pH 7.3) included the following components: 0.5% peptone, 0.3% beef extract, and 0.8% NaCl.]

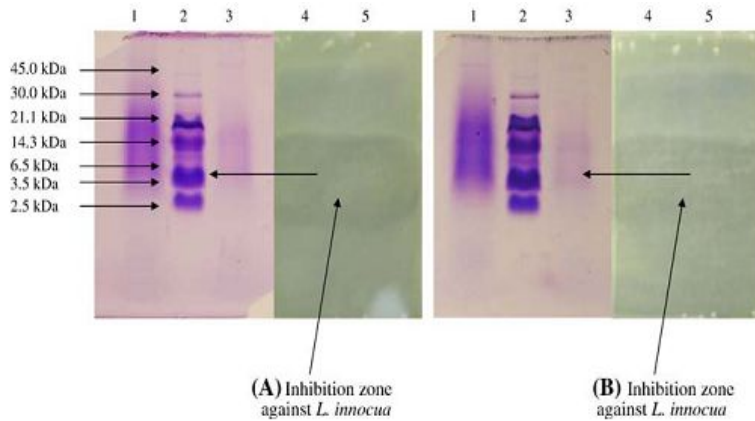
- 항세균활성을 가진 lactic acid bacteria 균주를 Burkina Faso Fermented Milk에서 분리했다. *Lactobacillus fermentum*, *Pediococcus spp.*, *Leuconostoc mesenteroides subsp. meseteroides*, *Lactococcus*. 들에서 분리했고 이들 균주들은 아래 table에서와 같이 병원성 균주에 대한 항균성 clear zone을 형성하였다.

Table 1: Inhibition of various indicator organisms by bacteriocin produced by our lactic acid bacteria

Lactic acid bacteria strains	Indicator organisms inhibited	Diameter of inhibition (mm)
S1	<i>Enterococcus faecalis</i> 103907 CIP	12
S2	<i>Bacillus cereus</i> 13569 LMG	10
S3	<i>Enterococcus faecalis</i> 103907 CIP	9
	<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25293	9
	<i>Escherichia coli</i> 105182 CIP	9
S4	<i>Enterococcus faecalis</i> 103907 CIP	10
S5	<i>Enterococcus faecalis</i> 103907 CIP	8
	<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC25293	10
	<i>Escherichia coli</i> 105182 CIP	8
S6	<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25293	9
S7	<i>Enterococcus faecalis</i> 103907 CIP	9
S8	<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25293	10

- [3] Jon Nissen-Meyer,¹ Helge Holo,¹ Leivsigve Havarstein, Knut Slett1En,² And Ingolf F. Nes¹1992 A novel lactococcal bacteriocin whose activity depends on the complementary action of two peptides. *Journal of Bacteriology*, Sept.p. 5686-5692

-Characterization of two bacteriocins produced by *Pediococcus acidilactici* isolated from "Alheira", a fermented sausage traditionally produced in Portugal



Tricine-SDS-PAGE of bacteriocins HA-6111-2(A) and HA-5692-3(B).

Lane1: peptide bands stained with Coomassie BlueR 250(40% ammonium sulphate saturated); lane2: molecular mass marker; lane3: peptide bands stained with Coomassie Blue R250(60% ammonium sulphate saturated); lane4: zone of growth inhibition, corresponding to the position of

of the peptide bands in lane1; lane5: zone of growth inhibition, corresponding to the position of the peptide bands in lane3. The gel in lanes4 and 5 was covered with viable cells of *L. innocua* N27(approx.10 CFU/ml), imbedded in BHI agar. Incubation was at37°C for 24h.

○ Bacteriocin은 probiotics와는 달리 적용상의 편리성과 보존성과 안정성이 뛰어난 장점이 있다. 특히 probiotics의 경우 유통과정에서의 생존율이 매우 낮아 안전한 유통을 위해서는 엄격한 관리가 필요하지만 bacteriocin의 경우 일반 항생물질과 같은 소량의 pakasge 유통이 가능하고 사용상의 편리성도 항생제와 다르지않다.

○ Probiotics의 장점과는 달리

- 기존의 Probiotics의 한계성을 극복(대부분의 사료에 혼용-효모에 국한)
- 기존의 Porbiotics들은 양어수에 직접 살포되는 것들로 양어수질의 개선을 통해
- 전염병 발병률은 낮출 수 있으나 물고기 장내까지 도달하는 확률이 극히 낮아
- 직간접적인 전염병 발병 시 저항성이 없어 쉽게 전염 된다.
- 역시 직접 수중에 뿌려지는 액체성제제로 일부는 물고기의 먹이가 되지만 대부분 성장하여
- 양어수 산소소모를 높여 물고기 성장을 방해하고 주변수역의 생태계 교란 요인이 됨
- 기존의 Probiotics의 Upgrade(제재를 고정화함으로)
- 부유성에 의한 급여량 조절 가능, 합리적 섭취율 증가, 장내 이동 안정성 확보
- 병원에 대한 저항성 향상과 육질 및 고 기능성을 통한 부가가치를 높이고, 수입 대응 및 수출

따라서 유용미생물들은 유해미생물들이 생체 내에서 기생하면서 유발할 수 있는 스트레스와 질병들을 미연에 방지하게 함으로 숙주에게 가중될 수 있는 스트레스를 막아 질병에 대한 저항성을 높이게 된다. 이러한 메카니즘으로 외부의 환경이 악화되어도 장내에 유익한 미생물이 많은 물고기는 큰 스트레스를 받지 않고 오히려 질병 및 기생에 대한 방어 활성이 높게 된다.

반면에 체내에 침투한 유해 미생물을 물고기 스스로 적절하게 배출시키거나 농도를 감소시킬 수 없을 경우 물고기는 엄청난 스트레스를 받게 되고 면역체계는 급격하게 쇠약해지며 나아가 내장이나 피부의 기생충이 번식하게 되어 결국은 죽게 된다. 특히 자연상태에서는 매우 적은 수의 기생충만이 새로운 숙주를 발견할 수 있는 반면, 수조는 공간적으로 제한되어 있으

므로 기생충과 그 유생들이 자연 상태보다 더욱 쉽게 숙주인 물고기를 발견할 수 있다. 따라서 많은 기생충들이 동일한 물고기나 새로운 숙주를 공격하게 되어 추가적인 스트레스를 받게 하므로 면역체계는 거의 무방비 상태라고 해도 과언이 아니다. *Ichthyophthirius multifiliis* 나 아가미 벌레의 발생과정에서 알 수 있듯이 이들은 기생충에 비해서 발생의 제약 조건이 적어 물고기가 병들거나 스트레스를 더욱 증가시켜 물고기의 대사작용이 마비되어 죽을 때 까지 면역체계를 약화시키는 질병으로 알려지고 있다.

동물의 장내에서 자연적으로 유익한 미생물을 우점화 시키기는 현실적으로 매우 어려우나, 이를 해결하여 장내에 유용한 미생물을 다량 확보할 수 있다면 물고기의 면역력 회복과 어병 극복에 매우 좋은 방안이 될 수 있을 것이다. 그러나 일반적으로 물고기의 소화기관을 통과하면서 위산 및 소화액에 의해 자발적 섭취 혹은 인위적으로 급여되는 미생물의 활성이 쉽게 파괴 되는 문제점과 이를 극복할 대안에 대한 기술적인 개념의 미정립으로 최근까지 항생제 및 농약 등과 같은 직접적인 화학적 처방에 의존하고 있는 실정이다.

그러나 최근 점진적인 기술의 발전과 화학물질의 남용에 대한 위협성이 가시화됨에 따라 축산계를 비롯한 농업전반에서 바이오농약에 대한 관심과 연구가 급속히 확산되고 있는 것은 매우 고무적인 일이라 할 수 있다. 인간에게는 정장제 혹은 유산균식품으로 불리어지고, 가축에게는 동물사료첨가제 혹은 면역제재로 불리어지는 생균제재인 probiotics가 이미 개발되어 일부에서는 시판되어 축산농가에서 그 실효를 얻고 있다. 반면 수산업계에서는 수계의 특성으로 말미암아 필요성이 더욱 절실함에도 불구하고 probiotics의 역할뿐만 아니라 그 적용법도 신중히 고려되어야 하는 문제로 인하여 아직까지 효과적인 제품이 나타나지 않고 있는 상태이다.

어류의 관찰 실험에서 스트레스에 계속 노출된 물고기는 그 장기의 변화와 내부 점막의 손상이 발견된다. 물론 소화기관으로 침투한 병원균은 거의 없어지지만 신장과 비장에서 백혈구의 생성이 손상되어 체내로 침투한 병원균에 대하여서는 저항력이 약해지거나 없어지게 된다. Pters의 스트레스 실험에서 *Aeromonas hydrophila* 병원균을 두 군의 물고기 무리에 살포시키고 그 변화를 관찰한 실험에서 투여 11시간 경과 후 수조 물고기의 혈액과 세포조직은 연못의 물고기보다 박테리아의 감염이 심하게 진행된 것으로 나타났다. 성어뿐만 아니라 치어에서도 수조의 경우 보다 높은 박테리아 밀도를 나타내었다. 따라서 스트레스 발생요인을 제거하는 것뿐만 아니라 스트레스를 낮출 수 있는 방법이 우선 조사되어 물고기 자체의 면역력과 병행하게 함으로 저항성을 높이게 해야 할 것이다.

이러한 부분에서 대안으로 관심을 모우고 있는 것 중에 하나가 생체 내에서 숙주의 생육과 대사에 유익한 역할을 하면서 면역력 증진에 관여하는 유용미생물을 찾고 이를 제재화하는 probiotics 기술이다. 최근 세계적으로 probiotics에 대해 많은 관심과 연구가 진행되고 있다. 특히 Antibiotics와 대비되는 개념이라 할 수 있으며 항생제 남용을 막고 보다 자연친화적인 농업으로의 전환을 촉구하는 매개체로 불리어지고 있다. 그러나 아직까지는 대부분의 probiotics 제재들이 기술과 경제성 문제로 미생물 생균제재 상태로 사료에 혼용하는 방법으

로 적용되고 있어, 동물의 위를 거치는 동안 불활성화 되어 실효를 얻기 힘든 것이 사실이다. 물론 돼지의 경우 소화율이 약 70% 수준이기 때문에 위에 머무는 시간이 상대적으로 짧아 생균제재의 활성을 유지한 상태로 장까지 도달할 수 있는 확률이 높기 때문에 특히 양돈산업에 많이 보급되고 있는 실정이다. 이러한 양돈산업의 효과에 따라 최근 가축에 대한 probiotics 적용이 점차 확대되어 국내외적으로 큰 시장을 형성하게 되었고, 이와 병행하여 천연약제를 통한 무항생기술 분야가 만들어지고 양계 및 양돈 농장에 적용시키는 사례가 보고되고 있다. 그러나 전염병이나 질병 발병 시 주변 환경과 가축 자체의 면역력이 증강되지 않고서는 거의 치료가 불가능하고, 오히려 더 치명적인 것이 학계의 일반적인 견해이다. 이는 엄밀하게 말하면 최근 시도되고 있는 천연약제에서 추출한 물질을 항생제 대안으로 제시하고 있으나 항생제 역시 자연계에서 추출된 물질인 바와 같이, 어떤 시점에서 이들 물질 역시 세균들의 돌연변이 원인으로 작용할 수 있어 세균에게는 항생제와 다를 바 없게 되는 문제점을 지적하고 있는 것과 같다.

특히 양어/식 산업은 수계의 특성으로 인하여 항생제의 남용이 다른 산업보다 더 심각한 부분에 속하여 probiotics의 보급이 더 시급한 실정임에도 불구하고 물고기의 생육환경 및 생리적 특성에 대한 연구의 어려움과 이에 따른 probiotics의 Screening의 제약 그리고 특히 양식수의 수질에 따른 물고기의 생육과 대사에 미치는 영향 등으로 probiotics에 대한 개념이 타 가축들보다 폭넓게 다뤄져야 하는 특징이 있어 아직까지 양어/식 산업에 쉽게 적용되어지지 않고 있는 요인으로 작용하고 있다.

2. 기술의 현황

최근 국내에서 제재화되어 시판되고 있는 probiotics 중 대하양식에 사용된 생균제재들은 대부분 가두리 양식보다는 육지수조에서 그 효과가 높았다는 결과를 보고하고 있다. 이는 *Sacchalomyces cervisiae*와 *Bacillus subtilis* 등을 사료에 흡착하여 양식장에 투여함으로써 성장 촉진에 기여한 바가 인정되었기 때문이다. 반면 같이 투여된 기타 생균제재(유산균과 같은 일반적인 생균제재)들은 대하의 생육에 직접적인 효과가 없거나 미미한 결과를 나타냈다고 보고하고 있다. 이 결과는 일부의 생균제재들에서 대하의 생육에 미친 영향은 사료에 흡착된 생균제재들이 대하의 생체내로 흡수되지 않고 탈리되어 양식수의 유기물 및 영양염류를 분해 처리함에 따라 수질을 개선시키게 됨에 따라 대하생육에 미친 간접적 영향으로 분석하고 있다. 이는 양식수의 용존산소와 플랑크톤 조성 등의 변화가 매우 낮은 것과 투여된 생균제재의 일부가 대하의 분비물 혹은 사료찌꺼기를 분해 제거하므로 양식수 혼탁을 막아 유해미생물의 성장을 원초적으로 차단시킨 바에 대한 분석자료로 증명되었다.

이 실험에서 특히 폐쇄 순환식 양식장의 경우 일반양식장에 비해 바이러스 감염률이 낮았으며, 생존율은 1.22배, 단위면적당 생산량은 1.25배 높게 나타난 것은 시험전의 패색현상과는

상반된 결과를 나타내는 것으로 실내 사육시설의 양어수질의 오염에 대한 정확력을 높이는데, 투여된 생균제재의 역할이 매우 큰 것을 의미하고 있다. 그리고 주목할 만한 것은 상기 연구 결과에서 구멍갈파래와 잎파래 추출물을 100mg/kg B.W./day 농도로 공급한 결과, 바이러스에 감염된 대하의 생존율이 50% 향상되어 바이러스 발병 억제에 효과가 있는 것으로 확인되었다. 이 결과는 생균제가 물고기의 체내로 흡수되어 면역력의 증가효과에 영향을 미친 것이 매우 미미했음을 반증하는 결과로 파래추출물에 의한 억제효과가 실질적으로 생균제의 효과보다 더 큰 것을 나타내고 있다.

국내에서는 지금까지 대하 양식장에서 대량 폐사 유발 요인으로 바이러스 감염, 기생충, 세균성 질병 및 용존산소 부족 등을 비롯한 수질오염을 개선하기 위하여 화학약품과 항생제를 사용하여 왔다. 그러나 화학제품의 부정적인 인식과 어류에 대한 직접적인 독성으로 생육저해와 생체내부의 독성성분의 축적 등에 대한 개선책으로 probiotics를 적용한 연구 사례가 있었다. 그 연구결과 실질적으로 virus감염에 대한 치료는 이루어지지 않았으나 폐사율을 줄이고, 단위면적당 생산성을 향상시킨 것으로 나타났다('99-'01, 서해연구소). 이 연구는 일종의 환경 유용미생물의 우점종 변이 유도로 양어수 수질개선 효과라 할 수 있다. 즉 probiotics는 실제적으로 항생제를 대체할 수 있는 일종의 건강보조제 및 강장제 역할을 하는 것으로 인간에게 있어 요구르트라 할 수 있는 것이며, 더 구체적으로 유산균과 같은 유용 장내세균을 통칭하는 것이다. 이를 유용 생균제로 명명할 수 있으며 생체 내에 들어가 생체의 면역력을 증강시켜 병에 대한 내성을 높이는 목적을 가진다고 할 수 있다. 그러나 상기의 대하양식장에 적용된 probiotics는 *Lactobacillus* sp. 외 일부에 지나지 않고, 먹이 섭취 시 소화되지 않고 생존하여 장까지 도달하기 어려워 이에 대한 면역력의 증강부분에 관여할 수 없기 때문이다. 이 실험에서 미생물제재의 효과는 양식어의 배설물에 의해 발생하는 유기물과 영양염류의 분해처리와 독성성분의 중화에 의해 양식수 내의 병원성 미생물의 번식을 억제함에 따른 수질개선 효과라 보고하고 있으며 실질적으로도 그 개연성이 인정된다. 따라서 상기의 연구에서는 이미 발생한 병원에 대한 치유효과와 양어 생체내의 면역력의 증강효과는 기대할 수 없으나, 양식어의 단위면적당 생산량을 증진한 긍정적인 측면은 인정된다. 이러한 긍정적 측면은 수질 개선에 의한 병원의 발생빈도와 확산속도를 감소시킨 것이 주요했다고 할 수 있다.

그러나 액체성 생균제재인 probiotics를 적용할 경우 대하를 제외한 양식어들은 플랑크톤을 먹이로 하는 것들이 대부분이라 미생물은 아가미에서 걸러지지 않고 양어수로 빠져나오게 되므로 물고기가 직접적으로 섭취할 수 없고, 일부 사료에 붙어 체내로 들어가도 낮은 산도를 가진 위액이나 소화액에 사멸되어 장까지 도달할 수 없다. 뿐만 아니라 이러한 미생물은 수중의 물고기의 배설물 및 사료찌꺼기와 같은 풍부한 먹이를 통해 신진대사가 이루어져 우점화를 이루게 됨으로 양어수 내의 병원성 미생물의 밀도를 낮추는 긍정적인 역할을 하지만 그 밀도가 증가함에 따라 양어수의 용존산소를 소모시키는 주원인이 되기도 한다.

세계적으로 해양수산자원에 대한 관심이 더욱 집중되고 있는 상황에서 해양수산부는 국내 양식사업에 대하여 이미 '환경 친화적 해산어 양식 사료 개선'과 '환경 친화적 양식업 육성을

위한 양식사료 개발 및 실용화' 그리고 이미 2002년부터 '사료기계 부가가치세 영세율 적용 등 어업인 지원사업 확대' 등의 방안을 마련하여 양식산업의 경쟁력 향상과 환경 친화적 양식산업 육성을 위해 관련제도 정비와 어업인 지원확대 등을 포함하는 양식사료 이용을 개선해 오고 있다. 동 대책에 따르면 현재 양식장은 생사료 위주의 습사료를 사용하고 있으나, 이는 양식 경영, 양식장 자가오염, 수산자원 등에 문제가 있어 이를 저오염, 고품질 배합사료를 이용토록 개선, 현재 20%의 배합사료 소비량을 2011년에는 80%까지 확대하여 양식업을 환경친화적 산업으로 자리매김할 계획을 세우고 있다. 이와 같이 환경에 대한 관심이 커지면서 수질오염 뿐만 아니라 항생제 남용에 의한 자연 생태계의 교란을 막기 위해 항생제를 대체할 수 있는 방안의 연구가 뒷받침되어야 한다. 특히 세계무역 장벽은 날로 높아져서 유해물질 항목을 정해놓고 이에 해당하는 물질을 제품에 포함한 경우 수입금지조치(RoSH)하고 있어 친환경적인 양어/식 산업 육성이 미래 해양수산업의 경쟁력을 확보할 수 있는 길임을 지적하고 있다.

그러나 아직까지는 배합사료에 혼합되는 항생제 농도를 줄이고, 질병에 노출된 농가에서 항생제의 사용을 중단한다는 것은 매우 어려운 여건이다. 따라서 빠른 시간 내에 양어/식 어류에 대한 항생제 투여를 대체할 수 있는 대안을 마련하지 않고서는 일반소비자들의 구매 수요를 높이는 힘들 것으로 판단된다. 현재 시판되고 있는 probiotics들 역시 양어/식장의 수질개선에 초점을 맞추고 있으나 수질개선 효과는 간접적이지만 질병에 대한 간접적인 방제효과가 있는 것은 분명하고 이에 따라 항생제의 양을 줄일 수 있을 것이다. 그러나 양을 감소하여 투여한 항생제 역시 수질개선용 probiotics의 활성에 대한 저해작용이 있어 양어수내에서 probiotics의 사체로 수질오염부하를 높이게 될 것이다. 그렇지 않고 probiotics가 수질개선을 통해 생육할 경우에서도 양어수내의 용존산소를 소모시켜 물고기의 생육을 저해할 수 있어 이에 대한 대책 역시 간구되어야 할 것이다.

임시적인 대안보다는 배합사료에 혼합되는 항생제와 농가들이 농약과 함께 투여하는 항생제를 근본적으로 대체할 수 있는 probiotics의 개발과 이를 직접적으로 양어/식 어류에 적용하여 활성을 이룰 수 있는 연구가 이루어지지 않고서는 항생제 남용에 대한 심각한 피해를 막을 수 없을 것이다. 그러나 현재 국내외적으로 시판되고 있는 Probiotics 제제들은 대부분 수질개선용 미생물제제들로 엄격히 Probiotics라기 보다는 환경개선제제 수준에 머물고 있는 것이 현실이다. 이와 같이 양어/식업에서는 probiotics의 적용 환경의 특수성 때문에 적용 및 실효성에 대한 결과 도출이 매우 어려워 연구개발에 한계가 있고, 특히 수계의 특성을 극복하고 질병에 대한 면역력 증강을 유도할 수 있는 probiotics의 효능을 양식어에 직접 전달하는 방법 및 기술이 미흡하여 지금까지 개발된 우수한 상품(probiotics)이 수질개선제제에 머무르고 있는 실정이다. 그러나 다행스러운 변화는 이러한 어려운 문제들을 해결하기 위해 최근 학계와 양식업 종사자 그리고 관련단체 및 산하연구기관에서 지속적으로 관심을 기울이고, 연구가 추진되고 있는 점이다.

상기와 같이 양어/식 산업에 항생제와 농약 남용에 대한 문제 해결과 그 대안마련을 위해서는 먼저 양어/식에 사용될 수 있는 probiotics는 수계 의존성 산업의 많은 한계성 중에서 물

속에서 탈리되지 않고 물고기의 아가미에 걸려져 체내로 흡수되는가 하는 문제의 고려가 우선 되어야 하며, 물고기 역시 위를 가지고 있는 동물이므로 위산의 위협에 대한 안전성이 고려되어야 효과적인 probiotics가 될 것이다. 따라서 probiotics의 직접적인 섭취율을 높이게 함으로, 수질개선을 통한 간접적인 측면이 아닌 근본적인 생체면역력을 증진시킬 수 있는 대안을 마련하고, 지금까지 양식업에서 사용된 각종 제재비용에 따른 경제적인 부담과 양식어의 항생제에 대한 소비자 반감 심리 변화를 유도하여 양어/식 어류에 대한 소비심리 높여 관련 산업의 경쟁력 고수에 노력해야 할 것이다. 이를 위해 당사는 이미 다양한 시도와 연구가 이루어졌으며 그 성과가 있어 이를 제품화함으로 보다 효과적이고 활성화된 양식 산업의 지향에 일익을 담당할 수 있다고 확신하고 있다.

가. 국내시장

어류양식은 1964년 동해안 포항, 감포, 삼척 등지에서 가두리에 의한 축양시험이 실시되고 남해안의 통영군 한산도와 삼덕 등지에서 방어, 문어, 복어 등의 산업적 축양시험이 시도된 이후, 국립수산진흥원 여수분소에서 각종 수출대상어와 고급어에 대한 축양기술을 개발하기 위하여 1968년부터 1970년까지 여수시 장군도 근해에서 가두리에 의한 방어, 돔, 문어 및 멸치 축양시험을 실시한 것이 시초였다(수산청, 1996).

그러나 기술적인 제반문제와 국내 활어시장의 불리한 여건으로 일시 정체하였다가 1975년부터 남해안의 여수, 충무 등 일부 지역에서 방어, 돔, 자주복 등과 같은 고급어류에 대한 단기축양이 성행되면서 국립수산진흥원에서 어류양식의 기술향상과 양식용 종묘의 안정적 확보를 위해서 1977년부터 2년간 여수를 중심으로 돔, 방어의 축양시험과 표류하는 해조를 따라 이동하는 각종 치어의 출현시기와 분포조사 및 채포된 방어 치어의 사육방법을 연구하였다(수산청, 1996).

1980년대 이후 경제발전에 따른 국민소득의 향상에 따라 고급어에 대한 급격한 수요 증가로 어류양식에 대한 중요성이 인식되어 양식장이 증가하고 산업적 규모로 확대 발전하였다. 그러나 당시 양식 주종이었던 방어는 온수성 어류였기 때문에, 월동장 개발을 위한 많은 노력에도 불구하고, 6개월 이상 양식할 수 없어 월동기 이전에 판매하거나 일본에 중간종묘로 수출해야하는 불완전한 단기 양식에 불과하였다.

넙치 종묘생산은 1986년에 국립수산진흥원의 거제 시험장에서 거제주변 수역에서 채포한 넙치를 육상수조에 수용 관리하여 자연산란을 시키고 종묘를 대량 생산한 것이 기술 확립의 시초이다. 인공종묘생산 기술이 개발됨에 따라 새로운 양식방법인 육상수조식 양식장이 시설되기 시작하였으며, 또 같은 시기에 넙치 수정란을 일본에서 도입하여 많은 량의 넙치 종묘를 생산 공급할 수 있게 되어 육상수조식 넙치 양식이 활성화되기 시작하였다. 1990년 초부터 방어 치

어의 채포 부진으로 방어 양식이 침체되면서 해상가두리의 사육시설을 넙치 사육에 적합하도록 고안하여 넙치를 해상가두리에서도 사육하였으나, 점차 조피볼락 양식이 확대되면서 육상수조의 넙치와 함께 해상가두리의 조피볼락이 양식의 주종이 되었다.

이러한 어류양식 사업은 점차 고급화되고 대량생산체제로 발전되고 있으나 이를 위해서 발생하는 병충해 부분은 대부분은 화학물질 및 항생제에 의존되고 있는 실정이다. 최근 들어 생약제재 추출물을 일부 적용하고 있으나 생약성분 역시 일종의 화학물질이므로 시간이 지나 내성이 생기는 부분에 대한 고려도 있어야 한다는 일부의 시각도 존재한다.

<표> 양식어류 생산현황

(단위 : 톤)

구분	계	조피볼락	넙치	참돔	돌돔	농어	방어	기타
1999년	94,589 (100.0%)	37,284 (39.4%)	39,903 (42.2%)	1,361 (1.4%)	824 (0.9%)	5,034 (5.3%)	3,005 (3.2%)	7,178 (7.6%)
2000년	93,704 (100.0%)	39,148 (41.8%)	39,932 (42.6%)	1,720 (1.8%)	573 (0.6%)	5,023 (5.4%)	2,096 (2.2%)	5,212 (5.6%)
2001년	91,585 (100.0%)	40,775 (44.5%)	40,066 (43.7%)	2,482 (2.7%)	623 (0.7%)	4,487 (4.9%)	482 (0.5%)	2,670 (2.9%)

※ 자료: 해산어류양식 발전방향의 정립에 관한 연구(한국해양수산개발원, 182pp. 김성귀 등, 2002).

나. 국외시장

중국은 2002년에 양식 생산량이 29,069천톤에 달하여 세계 양식 총생산량 45,652천톤의 63%에 이르는 비약적인 발전을 이룩하였다. 그러나 급속한 확대발전은 양식 생산물의 품질과 안전성의 저하는 물론 일부 품종에서 생산 저하 현상이 나타나기 시작하여 지속적인 양식발전의 전망을 어둡게 하고 있다.

<표> 중국 수산물 생산량

(단위: 만톤)

년도	수산물합계	해양수산물합계	해면어업어획량	해면양식생산량
1990	1237.05	713.30	500.89	162.41
1992	1557.57	933.69	691.23	242.46
1994	2646.41	1241.50	895.89	345.80
1996	3288.12	2012.88	1248.97	763.90
1998	3906.65	2356.72	1496.68	860.04
2000	4278.99	2538.73	1477.45	1061.28

자료: 수산증양식 연구개발의 현황과 앞으로의 방향(제13회 해양수산자원배양에 관한 연구자 협의회, 2002. 11.7~11. 8, 부산, 한국조(2002)).

중국의 양식이 직면하고 있는 주요문제는, 첫째 해면 양식해역과 내수면의 환경오염이 심각한 수준이며, 적조발생이 빈발하며, 양식장의 자가 오염마저 심화되어 환경문제는 양식발전을 저해하는 가장 중요한 요인이 되고 있다.

<표> 일본의 해면 및 내수면 양식업의 생산량·생산액

구분	어 종	생산량(천톤)	생산액(억엔)
해면양식	합 계	1,197.03	4,894
어류	방 어	137	1,431
	참 돔	82	661
	은연어	13	54
	넙 치	7	132
	복 어	5	142
	줄무늬전갱이	3	47
	전갱이	3	27
패류	굴 類	221	371
	가리비	211	375
갑각류	보리새우	2	105
해조류	김 類	392	1,058
	다시마	54	107
	미 역	67	92
진주양식		0.03	292
내수면양식	합 계	59	477
어류	뱀장어	24	254
	송 어	15	102
	잉 어	11	32
	은 어	9	89

자료: 反町稔, 2002. 수산증양식 연구개발의 현황과 앞으로의 방향(제13회 해양수산자원배양에 관한 연구자 협의회, 2002. 11.7~11. 8, 부산, 한국).

둘째 전염병 질병의 발생은 확대되고 있으나 조기진단과 치료 및 예방대책의 연구가 미흡하다. 셋째 양식종묘는 현재까지 야생상태를 벗어나지 못하여 성장률과 질병 및 환경내성과 품질이 바람직하지 못하므로 양식품종을 가어화(家魚化) 할 수 있는 육종기술과 종묘생산기술 및 시설의 개발이 필요하다. 넷째 양식과 가공, 수송 과정에서 발생하는 약제와 항생제의 남용으로 수출이 억제되고 있다. 이러한 문제를 해결하기 위하여, 첫째 연구를 확대하여 건강 양식기술을 보급하여 경제적, 생태적 이익을 향상시켜야하며, 둘째 고품질, 고효율 사료를 개발하고, 셋째 수산약제의 사용을 표준화 하여야 하며, 넷째 질병과 양식환경 내성이 강한 새로운 양식품종의 개발과 다섯째 양식품질 관리시스템을 강화하며, 여섯째 유통체계의 개선과, 일곱째 규제강화가 필요한 실정이다(Technical selection for the development of healthy

aquaculture in China. 2003' Forum on Fishery Science and Technology, Sep. 22~25, 2003. Guangzhou, China, 110pp. Zhao, 2003).

일본의 증양식 현황을 소개한 反町(2002)에 의하면, 일본의 양식생산이 감소하는 이유로 가격의 저하, 환경의 악화, 수입수산물과의 경쟁, 사료비 등 생산원가의 지속적인 상승 등을 들었으며, 그 개선책으로 식품안전성 확보, 새로운 기술개발에 의한 효율적인 양식의 추진, 건강한 종묘의 생산과 병해방제 및 양식생산물 품질의 향상을 해야 한다고 하였다.

제 2 절 문제점

어류양식의 가장 큰 취약점은 단백질을 주성분으로 하는 생사료나 어분을 주성분으로 만든 배합사료를 공급해야 한다는 점과 어류양식의 발전과 규모 확대에 의해 질병 발생에 의한 양식어류의 피해라 할 수 있다. 1980년대에는 어류질병이 고수온기에 세균성 및 기생충성 질병의 단독감염이 주를 이루었으나, 1990년대 들어와서는 연중 발생하고 있으며, 발생 질병의 종류도 전염성 바이러스 질병 및 세균·기생충, 세균·바이러스 등의 혼합감염이 증가하는 추세이다. 발병률은 1990년대 전반에는 5% 미만에 불과하였으나 1990년대 후반부터는 15% 내외로 증가하고 있다(김영규, 2003; 박, 2003a; 안, 2003). 특히 최근에는 국외로부터 양식용 종묘의 수입증가로 인하여 외래 전염병의 유입 위험이 더욱 증대되고 있다. 1990년대말에는 신종 이리도 바이러스에 의해 양식 돌류에 심각한 피해를 유발하였으며, 최근에는 일본에서 발생하여 피해를 주고 있는 넵치 빈혈증에 대해 우려하고 있다. 어류질병에 대해 선진외국은 면역강화에 의한 예방적 방역체계(probiotics)로 전환하고 있으나, 우리나라는 현재까지 치료위주로 대처하게 되므로 항생제의 오남용으로 인한 약제내성균 증가로 점차 치료효과가 저하되고 있다. 또한 양식어류에 항생제의 잔류를 우려하는 소비자들의 불신이 증대하여 결과적으로 소비감소에 의한 양식경영 악화를 초래하고 있다(해면어류양식 및 질병대책. 국립수산과학원, 내부자료, 24pp. 박, 2003a).

국내의 probiotics에 대한 부분은 매우 제한적이고 아직 초보단계이며 특히, 기존의 항생제를 대체하기보다는 환경개선에 주력하는 생균제재들이 주를 이루고 있다. 그리고 무엇보다도 섭취를 유도한다고 해도 생균 상태로 소화기를 통과할 수 있는 확률을 높이는 기술이 선행되어야 하는 것 또한 probiotics 개발에 있어 해결해야 할 큰 과제라 할 수 있다.

항생제를 남용하는 것은 양식어에 축적되어 자연 생태계로 순환되는 것뿐만 아니라 항생제를 양식수에 무작위적으로 투여함으로 양어에 섭취되지 않고 양식수에 잔류되어 배출되는 항생제로 인한 주변수역의 오염은 정작 자정작용에 관여되는 많은 미생물의 활성을 저해함으로 생태계를 마비시키는 원인이 될 수 있다. 점차 인간에 대한 문제에 국한된 대책에 머물지 않고 자연계의 심각한 문제로 이어질 수 있다는 개념으로 받아들이지 않는다면 추진되는 모든

대책은 임시방편이 되어 자칫 근본적인 위협요인으로 작용할 수 있을 것이다.

이러한 부분에서 매우 바람직한 현상은 국내에서도 초보단계의 probiotics 시장이지만 점차 확대되고 있고, 가축사육은 물론이고 양어/식산업 등에서 항생제를 대체할 수 있는 고기능성을 갖춘 probiotics의 개발이 급속도로 진전되고 있다. 특히 probiotics 산업은 무엇보다 미래 식량산업과 연계된 것으로 고단백질을 공급하는 양식업의 경쟁력을 높이고, 나아가 국민의 건강 증진의 차원에서 보다 적극적인 자세로 연구개발에 노력해야 할 부분이다.

이를 위해 우선적으로 항생제를 대체할 수 있는 자연친화적인 원료물질의 개발과 이를 상품화할 수 있는 기초 연구가 절실히 요구되고 있다. 따라서 본 과제를 통해 우리의 양식업에서 가장 문제꺼리 중에 하나인 항생제 남용에 대한 근본적인 대책을 마련하고, 보다 고기능성을 충족시킬 수 있는 제품화로 이어질 수 있는 기초를 마련하고 자한다.

제 3 장 연구개발수행 내용 및 결과

제 1 절 연구수행 배경 및 서론

양식 산업은 오늘날 급속히 성장하는 수산업의 한 분야로서, 건강에 대한 인식의 전환에 따라 수산물의 수요가 지속적으로 증가하여 경제적인 중요성이 인정되고 있다. 우리나라는 삼면이 바다로서 연안의 대부분의 면적이 바다 양식업으로 이용되고 있으며, 내륙에도 많은 수계가 분포하고 있어 내수면 양식업에도 관심이 모아지고 있다. 양식은 제한된 구역에서 고밀도로 사육하거나 수질환경의 악화 등으로 양식 어류의 면역력이 저하되고 병원성 세균이나 기생충에 의한 감염이 쉬운 환경에 직면하는 경우가 많다. 현재 양식 산업과 수산물 거래에서 가장 큰 문제점인 질병 및 질병발생 원인 어병균을 치료 및 통제할 수 있는 방안이 그 어느 때 보다 시급하게 요망되고 있다. 이러한 이유로 수산양식에서 항생제나 화학적인 방법을 사용하고 있으나(2), 수산물에 대한 규제나 규격이 결정되거나 정해져 있지 않은 상황이며 사용되는 항생제는 다 소비되지 못하고 남아 양식장 바깥으로 흘러나와 다른 수계로 들어가 퍼지게 된다. 또한 무분별한 항생제의 남용으로 각종 병원성 세균이 항생제에 대한 내성(11)이 생기게 하여 문제는 더욱 더 심각한 상태이며 인간에게 의약품으로 사용되는 것과 관련된 항생제를 어병균에 대한 예방목적으로 사용하거나 교차내성이 있는 것으로 알려진 항균제의 사용은 인간의 건강에 매우 중대한 위험이 될 수 있다(8).

따라서 항생제 남용을 억제하고 질병을 예방 할 수 있는 bacteriocin(10)의 개발이 필수적으로 대두되고 있다(12). bacteriocin은 사람 또는 동물에 대해 장내 균종의 성질을 개선 시켜 숙주에게 유익한 효과를 주는 살아있는 미생물의 단독 또는 혼합 배양물을 의미하며 여러 산업분야 에서 널리 응용되고 있다(5, 14).

bacteriocin으로서 널리 이용되고 있는 대표적인 미생물은 유산균으로 *Pediococcus*, *Enterococcus*, *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Leuconostoc*, *Bifidobacterium* 등이 있으며 *Lactobacillus* 종이 생산하는 bacteriocin은 그람 양성, 음성 세균에 대해 넓은 항균 스펙트럼을 가지고 있는 것으로 보고되고 있다.

그러나 어류에 질병을 일으키는 *Listonella anguillarum*(*Vibrio anguillarum*), *Edwardsiella tarda* 균주에 대한 bacteriocin 생산에 대한 연구는 미비한 실정이다.

본 연구에서는 어류에 질병을 일으키는 *Listonella anguillarum*(*Vibrio anguillarum*), *Edwardsiella tarda* 균주에 대한 bacteriocin 생산 균주를 선별하고, 특성을 확인하였다.

제 2 절 연구수행 재료 및 방법

1. 실험재료

경산 지역을 비롯한 경주, 대구 등지의 마트나 어시장 등에서 채취한 생선 내장으로부터 *Listonella anguillarum*에 대한 항균활성을 가진 균주를 분리하였으며, 어병균으로는 제니스에서 분양받은 *Listonella anguillarum*과 *Edwardsiella tarda*를 사용하였다.

2. Bacteriocin생산 균주의 분리 및 동정

가. Bacteriocin생산 균주의 분리

(1) ZEN49 및 ZEN102균주의 분리

일반적으로 장내세균 및 유산균 배양배지로 보편적으로 사용되는 MRS broth(proteose peptone 10g/L, beef extract 10g/L, yeast extract 5g/L, dextrose 20g/L, polysorbate80 1g/L, ammonium citrate 2g/L, sodium acetate 5g/L, K_2HPO_4 2g/L, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.1g/L, $MnSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.05g/L, pH 6.5± 0.2)를 사용하여 본 연구과정에서 선별된 미생물의 이화학적 특성을 관찰하였다. 계대배양용 배지는 1.5%의 agar를 포함한 MRS agar 배지를 만들어 계대 및 stock 배지로 이용하였다. 또 유산생성활성을 분석하기 위해 0.01% Bromocresol green을 MRS agar 배지에 혼합하여 선별배지로 사용하였다.

(2) LK7 균주의 분리

각 채취한 생선 내장 시료를 멸균 증류수로 현탁한 후 상등액 1ml를 취해 10^{-3} 까지 희석하여 $50\mu\text{l}$ 의 *L. anguillarum*과 함께 LB배지(Table 1)에 $50\mu\text{l}$ 씩 도말하였다. 30°C 에서 3일간 배양하여 얻은 colony 중에서 inhibition zone을 나타내는 colony를 분리하였다(20). 분리한 균주는 3차 희석법을 통해 순수 분리한 후 Toothpick 방법을 통해 *L. anguillarum*에 대한 항균활성을 재확인 하였으며, 분리한 균주의 배양액을 이용해 가장 큰 항균활성을 가지는 균주를 최종 선택하였으며 LK7 strain 분리를 위한 배지 조성은 Table 1과 같다.

Table 1. Medium composition for LK7 strain.

Nutrients	Contents(%)
Tryptone	1
NaCl	0.5
Yeast extract	0.5

-Agar powder was added with concentration of 1.5%.

-The medium was sterilized for 15min at 121℃.

(3) VK24 균주의 분리

각 채취한 어류 내장 시료를 멸균 증류수로 10^0 , 10^{-1} , 10^{-2} 까지 희석하여 TCBS배지(6)에 100 μ l씩 도말하여 25℃에서 24시간 배양한 후 생성된 colony를 *L. anguillarum*이 도말된 고체 LB 배지에 Toothpick을 실시하여 inhibition zone을 나타내는 colony를 분리하였다. 분리한 균주는 3차 희석법을 통해 순수 분리한 후 분리한 균주의 배양액을 이용해 가장 큰 항균활성을 가지는 균주를 최종 선택하였다.

VK24 strain 분리를 위한 배지 조성은 Table 2와 같다.

Table 2. Composition of TCBS medium for selection of VK24 strain.

Nutrients	Contents(%)
Yeast extract	0.5
Proteose Peptone	1
Oxgall	0.8
Sodium Citrate	1
Sodium Thiosulfate	1
Sucrose	2
Sodium Chloride	1
Thymol Blue	0.004
Ferric Citrate	0.1
Bromthymol Blue	0.004

-Agar powder was added with concentration of 1.5%.

-The medium was sterilized for 15min at 121℃.

나. Bacteriocin 생산 균주의 동정

최종 선발된 균주의 동정을 위해 전자현미경(Transmission Electron Microscope ; TEM)에 의한 형태학적 관찰과 생리학적, 생화학적 및 영양적 특성 등을 조사하였다. 균주의 동정은 "Bergey's Manual of Systematic Bacteriology"(1986년도 volume. 2)에 따랐으며, 16S rRNA의 sequence을 분석하기 위해서 16S rRNA Sequence primer을 중합효소 연쇄반응(PCR)에 의해 증폭하였다. 본 분석에서는 16S ribosomal RNA를 위한 Primer sequence는 SolGent's primers 중 **27F**(16S rRNA(5'→3') : AGA GTT TGA TCC TGG CTC AG)와 **1492R**(16S rRNA(5'→3') : GGT TAC CTT GTT ACG ACT T) 를 사용하였다. 이는 세균의 16S rRNA 유전자의 보편적 지역의 염기 서열 5'-GAGTTTGATCCTGGCTCAG-3'(염기서열 위치 9~27 지역), 5'GGTTACCTTGTTACGACTT-3'(염기서열 위치 1523~1542 지역)이다. 각각의 분리균으로부터 획득한 총 염색체 DNA를 주형으로 사용하였다. 16s rDNA sequencing의 결과를 통해, BLAST search하여 상동성을 비교하여 동정하였다.

다. Bacteriocin 생산 균주의 계대배양 및 보존

본 실험에 사용된 균주 *Aerococcus* sp. LK7의 계대는 LB 배지를 사용하여 30℃에서 24시간 배양한 후 실험에 사용하였고, *Vagococcus* sp. VK24의 계대는 MRS/NSS 배지(Table 3.)를 사용하여 25℃에서 24시간 배양한 후 실험에 사용하였다. 그리고 ZEN49, ZEN102 및 기타균주는 MRS배지에 30℃에서 배양하여 실험에 사용하였다. 균주의 장기 보관을 위하여 15% glycerol 을 첨가하여 -70℃에서 동결 보관하였다.

Table 3. Composition of MRS/NSS medium for growth of VK24 strain.

Nutrients	Contents(%)
Peptone	1
Beef extract	1
Yeast extract	0.5
Dextrose	2
Ammonium citrate	0.2
Sodium acetate	0.5
Magnesium sulfate	0.01
Manganese sulfate	0.005
K ₂ HPO ₄	0.2
NaCl	1.76
Na ₂ SO ₄	0.147
NaHCO ₃	0.008
KCl	0.025
KBr	0.004
MgCl ₂ · 6H ₂ O	0.187
CaCl ₂ · 2H ₂ O	0.041
SrCl ₂ · 6H ₂ O	0.0008
H ₃ BO ₃	0.0008

3. 선발균주에 의한 항균 활성

가. Bacteriocin 생산 균주의 생육 특성

균주의 생육도 측정은 Spectrophotometer(HITACHI U-2000, Japan) 및 Microplate reader(Emax-Molecula Devices) 사용하여 각각 600nm, 595nm에서 측정한 흡광도로 나타냈다. pH 측정은 pH METER(HORIBA, F-55)기를 사용하여 실시하였다. pH 측정은 pH METER (ISFETCOM S2K712, Japan)을 사용하여 실시하였다.

나. Bacteriocin 생산 균주의 항균 활성 측정

균주의 항균 활성 측정을 위해 *M. luteus*, *E. tarda*, *S. aureus*, *L. anguillarum*이 도말되어 있는 LB배지에 bacteriocin 생산 균주의 배양액 80-100 μ l를 paper disk(Advantec, Toyo Roshi Kaisha, Ltd, Japan) 혹은 배양액 20-30 μ l를 ϕ 5mm hall에 접종하여 각 병원균의 생육 저해 clear zone의 크기를 측정하여 확인하였다.

4. LK7과 VK24균주가 생산하는 bacteriocin의 특성

가. Bacteriocin의 생산

(1) Bacteriocin생산균주의 배양 및 배양조건

LK7균주의 bacteriocin생산은 LB(triptone 1%, NaCl 0.5%, Yeast extract 0.5%)에서 30 $^{\circ}$ C, 24시간 180rpm으로 진탕배양하였고, VK24균주는 NSS solution이 첨가된 MRS배지에 접종하여 30 $^{\circ}$ C에서 24시간 정지배양하였다.

ZEN102 균주의 박테리오신 생산은 BHI, MRS 배지와 BPG배지(Glucose 10g/L, Proteose Peptone 10g/L, Beef extract 5g/L, Yeast extract 5g/L, K₂HPO₄ 5g/L, MgSO₄.7H₂O 0.3g/L, CuSO₄ 5H₂O 0.01g/L)를 이용하여 30 $^{\circ}$ C, 24시간 동안 배양하여 박테리오신을 유도하였다.

(2) Bacteriocin의 활성 측정

Bacteriocin이 포함되어 있는 배양액을 7,000-12,000rpm에서 20분 동안 원심분리에 의한 상등액을 100 $^{\circ}$ C에서 10-20분간 열처리하고 0.2-0.45 μ m의 필터를 사용하여 균체를 완전히 제거한 다음 그 상등액을 *M. luteus*, *E. tarda*, *S. aureus*, *L. anguillarum*이 도말되어 있는 LB배지와 BHI 배지에 paper disk 혹은 ϕ 5mm hall에 접종을 통해서 clear zone을 확인하였다.

나. Bacteriocin의 특성

(1) pH 안정성

pH에 대한 안정성을 검토하기 위해서 각 균주 배양액 100 μ l에 pH 2.0에서 pH11.0까지로 조

정한 buffer를 1:1로 첨가하여 4℃에서 12시간 전처리한 다음 잔존 항균활성을 측정하였다. 이때 pH 2.0(1M HCl), pH 3.0~6.0은 100mM citric acid buffer로, pH 6.0~8.0은 100mM sodium phosphate buffer로, pH 그리고 pH 9.0~11.0은 100mM sodium carbonate buffer를 이용하였다.

(2) 온도 안정성

Bacteriocin의 열에 대한 안정성을 검토하기 위하여 10℃- 100℃에서 30분-3시간 , 121℃에서 15분의 범위에서 각각 열처리한 다음 잔존 항균활성을 측정하였다(4).

(3) 금속이온에 대한 영향

Bacteriocin의 금속이온에 대한 영향을 알아보기 위하여 각종 금속이온을 bacteriocin에 첨가하여 금속이온의 최종농도를 $1 \times 10^{-3}M$ 으로 맞추고 4℃에서 12시간 전처리 후 항균활성을 측정하여 금속이온에 대한 영향을 검토하였다.

(4) 효소 저해제에 대한 영향

Bacteriocin의 효소 저해제에 대한 영향을 알아보기 위하여 효소저해제를 첨가하여 저해제의 최종농도를 $1 \times 10^{-3}M$ 으로 조정된 후 4℃에서 12시간 전처리 후 잔존 항균활성을 측정하여 효소저해제가 항균활성에 미치는 영향을 검토하였다.

(5) Bacteriocin의 최소 저해 농도

Bacteriocin의 최소억제농도(MIC)를 결정하기 위해 bacteriocin 생산 균주의 배양액을 멸균 증류수로 희석하여 병원균과 1:1 비율로 25℃에서 24시간 반응 시킨 후 LB 고체배지에 도말하여 25℃에서 24시간 배양하고 나타난 *L. anguillarum*의 colony 수를 비교 확인하여 bacteriocin의 최소 저해 농도를 검토하였다.

또한 조정제된 박테리오신에 대한 MIC를 결정하기 위해서 일정($160 \mu\text{l}/\text{ml}$)농도에서부터 증류수로 2배 희석법으로 각각 $80-0 \mu\text{l}/\text{ml}$ 의 농도 수준에서 병원균과 1:1($100 \mu\text{l} : 100 \mu\text{l}$)로 반응 시킨 후 96well plate에서 흡광도(OD: 595nm)를 측정하여 최소 저해농도를 확인하였다.

(6) 단백질 분해효소에 대한 영향

Bacteriocin의 단백질 분해 효소에 대한 영향을 알아보기 위하여 10% proteinase K와 20% trypsin을 첨가하여 50℃, 37℃에서 각각 4시간 전처리 후 잔존 항균활성을 측정하여 단백질 분해효소의 항균활성에 미치는 영향을 검토하였다.

조정제된 박테리오신의 효소에 대한 저해 영향을 조사하기 위해서 단백질 가수분해 효소인 pepsin, trypsin, protease와 탄수화물 분해 효소 catalase, α -amylase 그리고 세포벽 분해 효소 lysozyme을 $20\text{mg}/\text{ml}$ 농도로 맞추어 박테리오신 정제액과 1:1로 혼합하여 37℃에서 1시간 이상

반응 시키고 효소 불활성을 위해 다시 5분간 100℃에서 열처리 후 박테리오신의 효소에 대한 활성 저해도를 조사하였다.

5. Bacteriocin의 농축 및 정제

가. VK24균주가 생산하는 bacteriocin의 농축

(1) 배양액 농축

VK24 균주를 배양하고 배양액 1L를 6,000rpm, 30분, 4℃로 원심분리하여 그 상등액을 동결 건조하여 200ml로 농축하였다.

(3) Ammonium sulfate saturation

농축 배양액을 Ammonium sulfate 60%, 80%, 100% 포화농도에서 bacteriocin을 침전시켰다.

나. Bacteriocin의 정제

(1) Cell adsorption method를 이용한 bacteriocin의 정제

Peptide의 세포벽 흡착 특성을 이용하여 각 균주의 적정 pH에 따른 최적 균체 흡착효율을 결정하므로 배양액내의 bacteriocins의 농축 정제를 시도하였다(16). 먼저 균체가 포함되어 있는 배양액의 pH를 pH6.0-7.0으로 조정하여 생산된 bacteriocins을 각 균체의 세포벽에 흡착 시키고 원심분리를 통해 bacteriocins이 흡착되어 있는 균체를 회수 한 다음 1M NaCl(pH2.0 by H₂PO₄)을 이용하여 peptide를 균체에서 탈리시켜 bacteriocins을 회수하고 SDS 전기영동을 통해 각각의 분자량을 확인하였다.

(2) DEAE-cellulose column chromatography

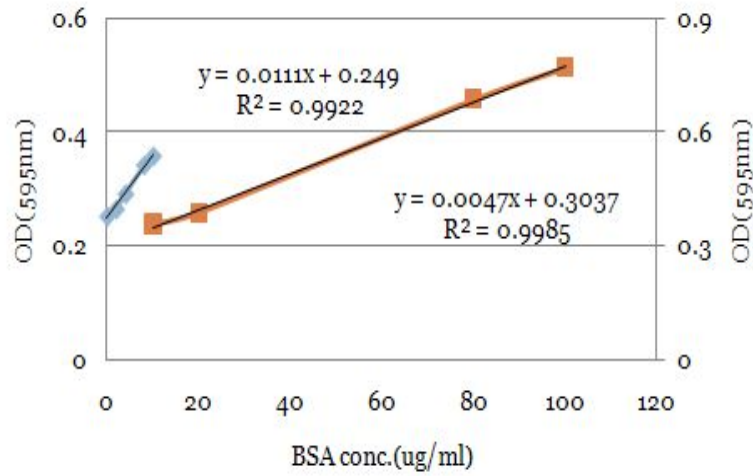
Ammonium sulfate 80% 포화농도에서 침전된 bacteriocin을 20mM phosphate buffer용액 (pH7.0) 15ml로 용해시킨 후, 이를 phosphate buffer (pH7.0)으로 평형화시킨 DEAE-cellulose column에 0.1M, 0.2M NaCl을 stepwise로 증가시키면서 0.34ml/min의 유속으로 fraction당 5ml 씩 용출시켰다. 이들 중 효소활성이 있는 분획을 모아 동결건조를 통해 농축을 실시하였다.

6. Bacteriocin의 정량 및 분자량 확인

가. Bacteriocin 정량

단백질 정량은 BSA(bovine serum albumin)을 표준단백질로 사용한 Lowry protein assay의 방법에 의해 행하였다. BSA를 표준단백질로 하여 각각 농도를 100, 80, 40, 60, 20, 10, 8, 6, 4, 2, 0 $\mu\text{g/ml}$ 농도라 하여 96well plate에 10 μg 취하여 B.f solution를 200 μg 넣고 5분간 반응 후, microplate reader기로 595nm에서 측정하여 검량선을 작성하였다. 작성한 단백질 검

량 곡선에 박테리오신 항균 물질의 상등액도 동일한 방법으로 OD값을 측정하여 단백질 함량을 계산 하였다.



BSA standard curve

나. SDS-polyacrylamide gel electrophoresis

정제된 bacteriocin의 SDS-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE)는 Laemmli의 방법에 따라 15% gel을 사용하여 9mA로 1시간 30분 동안 전기영동 하였다. 전기영동한 후 gel은 0.05% Coomassie brilliant blue R-250으로 염색하여 탈색시켰다.

7. 박테리오신 생산 균주의 유기산(Lactic acid) 측정

식품중 유기산 측정 방법을 약간 변형하여 박테리오신 항균 물질을 생산하는 ZEN102 strain의 lactic acid 생산량을 알아 보았다.

0.1N NaOH 와 lactic acid 와의 역정적을 통해 lactic acid 함량 그래프를 작성 하였다. 0.1 NaOH 소량 과 0.1%페놀프탈레인 용액을 만들어 발색후 발색된 시료를 0, 4.5, 9, 18, 27, 36 μ l를 취하여 96well plate에 넣고 총 볼륨이 216 μ l이 되도록 증류수를 가하여 OD(495nm)에서 측정 한다.

ZEN102를 배양하여 시간대별로 얻은 각 sample에 5배 희석하여 우리가 이미 알고 있는 0.1N NaOH 36 μ l를 첨가후 OD(495nm)값을 측정 한다. 측정된 시료의 OD값을 환산하여 lactic acid 검량선에 대입하여 유기산 함량을 측정 하였다.

8. 넘치를 이용한 제품의 활성 실험

가. 해수와 박테리오신 균주의 항균력 예비 실험

해수 sample을 채취하여 1000 μ l에 농축 및 정제한 박테리오신을 1% 첨가하여 해수와 반응

후 100 μ l 취하여 plate에 도말하여 colony를 확인하였다.

나. 넙치 준비 및 분배

넙치는 “포항시 남구 구룡포읍 석병리에 위치한 영동수산” 넙치 축양장으로 부터 치어(6~8cm)를 500마리 분양 받았다(2010. 08. 18.). 이후 넙치를 수조에서 키우면서 2주일 동안 환경 적응 기간을 가졌다. 적응 기간이 끝난 후 넙치를 대조구 및 시험구로 구분하여 생존실험을 실시 하였다.

다. 병원균 저해 실험을 통한 박테리오신 투여량 설정

(1) 박테리오신 농축액에 따른 병원균의 저해 실험

지시균으로 *Micrococcus luteus*, *Streptococcus aureus*, *Listonella anguillarum*, *Edwardsiella tarda* 를 사용하였다. 농축액은 ZEN102, ZEN49, LK7, VK24를 3 ℓ 배양하여 300ml가량 농축하여 0.45 μ l filter로 여과 후 농축액으로 사용 하였다. 96well plate에 Total volum 200 μ l로 하여 지시균 50 μ l(OD 595nm: 0.2 수준)을 취하고, 여기에 각 농축액을 총 용량 200 μ l에 대해 0, 5, 10, 20, 30, 50 % 수준으로 각각 주입하였다. 이후 시간에 따라 OD값을 측정하여 균의 생육저해를 알아보았다.

(2) 병원균의 농도에 따른 박테리오신 농축액의 활성 실험

상기에서와는 달리 농축액을 50 μ l을 취하고, 여기에 각 지시균(OD 595nm: 0.2 수준)을 200 μ l에 대해 0, 1, 3, 5, 13, 25, 50, 75, 100 % 수준으로 각각 혼합하였다. 이후 시간에 따라 OD값을 측정하여 지시균의 농도에 따라 각 박테리오신 농축액의 활성 정도를 알아보았다.

(3) 투여량 설정

앞 실험을 통하여 선별 균주의 농축액에 대한 접종량을 유추하였다.

	농축액 첨가량%						
	5	10	15	20	30	50	60
<i>M. luteus</i>	49/102/77	24			77		
<i>S. aureus</i>		49/24/77				102	
<i>L. anguillarum</i>				49		24	102/77
<i>E. tarda</i>		49/24/77				102	

넙치에 대한 항균력 시험을 위해 사용할 지시균은 *L. anguillarum* 과 *E. tarda*를 이용하였다. 그리고 투여량은 Table 29와 같이 설정하였다.

2010년 9월 9일 1차 2차 접종량은 Table 4와 같이 하였고 9월 13일 수조의 물을 1/2을 교체한 후 병원균을 각각의 실험구에 투여 하여 공격실험을 실시하였다.

Table 4. Schedule of flatfish survival rate test

날자	내 용	ZEN49	ZEN102	ZEN24	ZEN77	
9월 9일	농축액 접종 1차 (ml)	10	20	20	30	
9월13일	농축액 접종 1차 (ml)	5	10	10	15	
9월13일	공격실험	<i>L. anguillarum</i> (1ml)	0	0	0	0
		<i>E. tarda</i> (1ml)	0	0	0	0

9. 시제품의 독성 실험

가. 실험 재료

해양바이오산업연구원 GMB 실험동의 500L 발효기를 이용하여 ZEN49 균주를 배양 후 그 상등액을 동결건조하여 0.5g/개 tablet 형태로 성형하여 실험에 사용하였다.

나. 실험 방법

(1) 시제품의 항균력 검증

시제품을 1, 2, 3, 4개(0.5g/개)을 증류수 30ml에 녹여 얻은 상등액을 paper disk 방법으로 지시균(*M. luteus*)에 대한 저해환을 측정하여 확인하였다.

시제품의 안정성 검정은 상온에 방치한 상태에서 주기적으로 활성측정을 함으로 항균력 지속 여부를 확인하였다.

다. 시제품의 항균활성 실험

(1) 시제품의 활성도 측정

Nisin 함량에 따른 시제품의 활성도를 비교하였다. 시제품(zen49) 0.1g/ml 농도로 조제하여 원심분리(8,000rpm. 20분)하여 얻은 상등액을 취하여 0.2 μ l filter로 여과 후 실험에 적용하였다. 여과액 100, 10, 5, 2.5, 1.7, 1.3, 1.0, 0.7, 0.5 μ l를 각각 취하여 지시균(*M. luteus*)를 100 μ l 취하여 멸균증류수를 이용하여 최종 volume이 1ml되도록 하여 30분간 30 $^{\circ}$ C 항온기에서 반응을 시켰다. 반응 후 0.7% BHI soft agar에 100 μ l 취하여 vortex 하여 plate에 균히고 30 $^{\circ}$ C에서 12시간 이상 배양 후 생성되는 colony 수를 측정하여 저해 여부를 판단하였다

(2) 시제품 함량에 따른 활성

시제품을 0.0, 0.5, 1.0g 무게를 취하여 10ml에 녹인 후 원심분리를 통해 상등액을 취하여 실험을 하였다. 각 농도별로 녹인 물질에 따른 지시균(*M. luteus*)를 생육 cololy 수를 측정 하여 활성도를 측정하였다.

라. 시제품의 독성 실험

시제품의 생체독성 실험을 위하여 암·수 생쥐를 각 20마리씩 구매하여 대조구와 시험구로 나누어 시험을 준비하였다. 초기 일주일간 환경 적응 기간을 가진 뒤 1차, 2차로 기간을 나누어 시제품을 투여 하였다. 시제품을 투여 후 일주일간 상태를 지켜보았으며, 독성 여부를 판단하였다. 독성판단은 쥐의 정맥혈에서 혈액을 채취하여 백혈구 및 혈청 성분을 분석하여 비교구와의 차이로 결정하였다. 이 실험을 위해서 경북대학교 수의대학병원 혈액분석실의 도움을 받았다.

- 투여량 결정(생쥐 평균 무게 20g)

투여기준 : $0.14\text{mg} \times 20\text{g} = 2.8\text{mg}/\text{개체}$

경구투여량 : 2.5mg/50ul 농도로 주사기를 이용하여 경구 주입

복강주사 : 5.0mg/100ul 농도로 주사기를 이용하여 복강에 직접 주입

실험은 총 30일간 실험을 하였고 적응기 일주일 이후 경구투여와 복강주사를 일주일간격으로 주입하고 2주일간 경과를 지켜보았다.

제 3 절 연구수행 내용 및 결과

1. 항균물질 생산 미생물의 탐색

가. 1차 미생물 탐색

균주 탐색을 위해서 경북 인근 해안 및 남해안의 해수 및 해산물 중 붕장어(아나고), 광어, 오징어, 우럭, 밀치, 돌광어, 놀래미의 내장 채취 등을 통해서 다양한 균종을 분리해 내고 이들의 이화학적 특성을 관찰하여 선별하였다.

우선 경북 포항 해안과 인근 죽도 해산물의 내장을 채취하여 9ml 생리식염수 + 1g내장을 파쇄하여 현탁 후 BCP, LA 배지에 50 μ l도말하고 25 $^{\circ}$ C에서 18h 시간 배양 후 BCP배지에서 노란색으로 변하는 colony들을 순수분리한 결과 37종의 colony를 얻었다.

확보된 colony의 배양을 위해서 일반적으로 장내세균 및 유산균 배양배지로 보편적으로 사용되는 MRS broth를 사용하여 본 연구과정에서 선별된 미생물의 이화학적 특성을 관찰하였다. 계대배양용 배지는 1.5%의 agar를 포함한 MRS agar 배지를 만들어 계대 및 stock 배지로 이용하였다. 또 유산생성활성을 분석하기 위해 0.01% Bromocresol green을 MRS agar 배지에 혼합하여 선별배지로 사용하였다.

또 항균력 측정을 위하여 어류 병원미생물의 배양은 1% NaCl이 첨가된 Mueller Hinton Broth 혹은 Brain heart infusion(BHI) medium을 이용하여 배양하였다. 선별된 미생물의 항균력 측정 배지는 1% NaCl이 첨가된 MRS 한천배지를 사용하였다.

균주의 분리 선별 방법

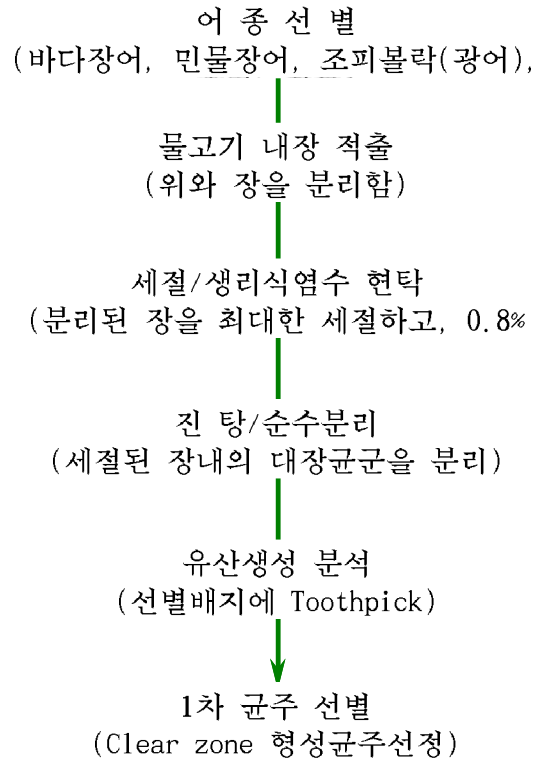
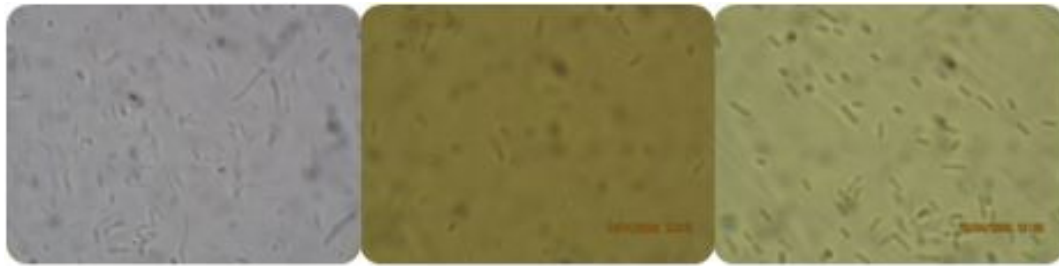
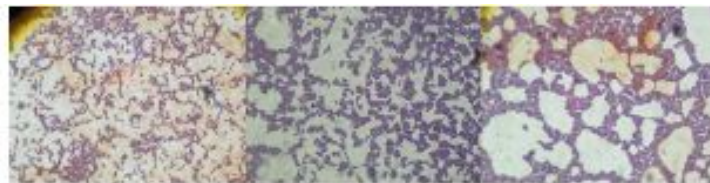


Table 5. Selection strains(37colony).

Fish	Colony name
놀래미(Greenling)	LN1, LN2, LN3
오징어(squid)	LO1, LO2, LO3, O2, O1
광어(Flatfish)	K1, K3, K2, LK1, LK2
우럭(Jacopever)	LW1, LW2, LW3
붕장어(conger),	LA1, LA2, LA3, LA4, LA5
돌광어(Stone Flatfish)	LS1, LS2, LS3, LS4, S1-a, S1-b, S2, S3, S4, S5-a, S5-b, 6, S7, S8
밀치(참승어)	M1, M2



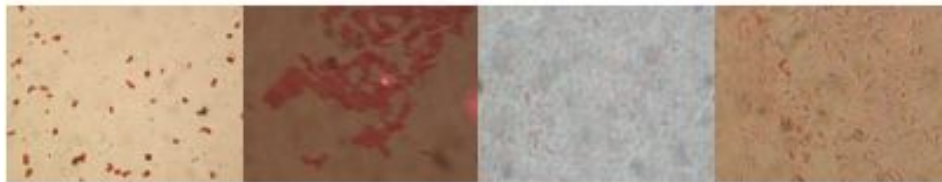
<병원균>



#2013
Lactococcus

#49
Streptococcus

#5
Lactococcus



Micrococcus luteus

Listonella anguillarum

Edwardsiella tarda

Vibrio vulnificus

일반적으로 양식어류의 질병으로 알려진 종들 한국수산과학원 어류방역센터에서 분양을 받아 사용하였다.

Vibrio ichthyenteri (FP4004) - Gram negative

Listonella anguillarum (FP5208) - Gram negative

Streptococcus iniae (FP5228) - Gram positive

Edwardsiella tarda (FP5060) - Gram negative

Staphylococcus aureus - Gram positive

Micrococcus luteus (ATCC10240), - Gram positive

어병원균(*E. tarda*, *V. ichthyenteri*, *S. iniae*, *L. anguillarum*)을 1% NaCl BHI agar plate 배지에 200 μ l씩 도말한다. 각 분리된 균주를 약 12시간 배양 후 배양액 1ml 취하여 원심분리(10,000rpm, 2min.)한 후 상등액을 취하여 각 상등액을 Paper disk(#8mm)에 100 μ l 투여하여 25 $^{\circ}$ C에서 배양시킨 후 형성되는 clear zone의 크기를 비교하여 활성유무를 확인하였다.

이렇게 활성이 인정되는 colony에 대하여는 16S rRNA의 염기서열을 분석하여 분류학적 상동성을 분석하여 유전학적 유의성을 분석하였다. 선별된 균주에 대하여 16S rRNA의 sequence을 분석하기 위해서 16S rRNA Sequence primer을 중합효소 연쇄반응(PCR)에 의해 증폭하였다.

본 분석에서는 16S ribosomal RNA를 위한 Primer sequence는 SolGent's primers 중 27F(16S

rRNA(5'→3') : AGA GTT TGA TCC TGG CTC AG)와 1492R(16S rRNA(5'→3') : GGT TAC CTT GTT ACG ACT T) 를 사용하였다. 이는 세균의 16S rRNA 유전자의 보전적 지역의 염기서열 5'-GAGTTTGATCCTGGCTCAG-3'(염기서열 위치 9~27 지역), 5'GGTTACCTTGTTACGACTT-3'(염기서열 위치 1523~1542 지역)이다. 각각의 분리균으로 부터 획득한 총 염색체 DNA를 주형으로 사용하였다. PCR 반응액 조성과 반응조건은 하기의 표에서 설명된 조건과 동일하게 사용하였다.

※ Sequencing contents

Sequencing reaction	ABI prism™ Bigdye™ terminator cycle sequencing Ready reaction kit V.3.1(Fluorescent dye terminators method)
Sequencing product purification	Millipore사 제품 - montage dye remove kit
Sequencing product running	ABI 3730XL capillary DNA Sequencer (36cm capillary)

※ Sequencing preparing

Template concentration	: please prepare below by each template ① plasmid : 150-200ng/μl ② PCR product : 15-20ng/μl ③ BAC, Fosmid, cosmid : 600ng-800ng/μl ④ Bacterial chromosomal DNA : 600ng-800ng/μl
Primer concentration	1) Dilution of primer We use 5 pmoles per reaction. 2) Primer design Tm of primer should be above 50°C.

(1) 분리된 31개 균주에 대한 항균성 검증

분리·확보된 31개 균주에서 항균활성을 알아보는 실험에서 Gram positive strain *Streptococcus iniae*와 *Micrococcus luteus*에 대해 저해환을 형성하는 것이 관찰되었다. 또한 *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* KCTC2013균주와 비교 실험에서 *S. iniae*, *M. luteus*에 저해환이 관찰되었다. 이후 대부분의 실험에서 *S. iniae*에 비하여 저해환이 선명하게 구분 되는 *M. luteus*를 이용하여 활성 및 역가 등의 실험을 진행하였다.

Table 2에서는 균종에 따른 배지 특이성 검증실험을 실시하였다. MRS와 Hinton 배지를 대상에서 1%NaCl 첨가유무에 따라 최적 배지를 선정하였다. 각 특성의 배지에서 배양 후 상등액의 항균활성을 비교하였다. 그리고 Fig 1에서는 9종의 균주가 *Streptococcus iniae*와 *Vibrio ichthyenteri* 둘 중 하나 혹은 둘 다에 효과가 있어, 선별하여 성장성과 protein 생성에 대한 비교실험을 실시하였다.

Table 6. Selection medium for antimicrobial strains

Strain NO.	Strain name	Acidity	최적배지 검사				적합배지
			MRS	1%NaCl MRS	Hinton	1%NaCl Hinton	
zen01	<i>Pediococcus pentosaceus</i>	yes	suitability	suitability	x	x	1%NaCl MRS
zen02	<i>Weissella viridescens</i>	yes	suitability	suitability	x	x	1%NaCl MRS
zen05	<i>Lactococcus lactis</i>	yes	suitability	suitability	x	x	1%NaCl MRS
zen06	<i>Lactococcus lactis</i>	yes	Slow	Slow	x	x	1%NaCl MRS
zen10	<i>Leuconostoc pseudomesenteroides</i>	yes	suitability	suitability	x	x	1%NaCl MRS
zen13	<i>Kocuri rhizophila</i>	yes	suitability	suitability	x	x	1%NaCl MRS
zen14	<i>Carnobacterium maltaromaticum</i>	yes	Slow	x	x	x	MRS
zen16	<i>Leuconostoc pseudomesenteroides</i>	yes	suitability	suitability	x	x	MRS
zen17	<i>Lactococcus lactis</i>	yes	suitability	suitability	x	x	1%NaCl MRS
zen19	<i>Carnobacterium maltaromaticum</i>	yes	Slow	x	x	x	MRS
zen21	<i>Carnobacterium maltaromaticum</i>	yes	Slow	x	x	x	MRS
zen22	<i>Carnobacterium maltaromaticum</i>	yes	Slow	x	x	x	MRS
zen23	<i>Carnobacterium maltaromaticum</i>	yes	Slow	x	x	x	1%NaCl Hinton
zen24	<i>Carnobacterium maltaromaticum</i>	yes	Slow	x	x	x	MRS
zen28	<i>Lactococcus lactis</i>	yes	suitability	suitability	x	x	1%NaCl Hinton
zen32	<i>Carnobacterium maltaromaticum</i>	yes	Slow	x	x	x	MRS
zen33	<i>Carnobacterium maltaromaticum</i>	yes	Slow	x	x	x	MRS
zen34	<i>Carnobacterium maltaromaticum</i>	yes	Slow	x	x	x	MRS
zen35	<i>Carnobacterium maltaromaticum</i>	yes	Slow	x	x	x	MRS
zen36	<i>Carnobacterium maltaromaticum</i>	yes	Slow	x	x	x	MRS
zen37	<i>Carnobacterium divergens</i>	yes	x	x	x	Slow	1%NaCl Hinton
zen38	<i>Carnobacterium maltaromaticum</i>	yes	Slow	x	x	x	MRS
zen39	<i>Carnobacterium maltaromaticum</i>	yes	Slow	x	x	x	MRS
zen49	<i>Streptococcus parauberis</i>	yes	suitability	suitability	suitability	suitability	MRS
zen50	<i>Kocuri rhizophila</i>	yes	suitability	suitability	suitability	suitability	1%NaCl Hinton
zen51	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	yes	suitability	suitability	x	x	MRS
zen52	<i>Kocuri rhizophila</i>	yes	suitability	suitability	suitability	suitability	1%NaCl Hinton
zen61	<i>Enterococcus pseuvium</i>	yes	suitability	x	x	x	MRS
zen62	<i>Enterococcus pseuvium</i>	yes	suitability	x	x	x	MRS
zen63	<i>Streptococcus parauberis</i>	yes	suitability	suitability	x	x	MRS
zen64	<i>Lactococcus lactis</i>	yes	suitability	suitability	x	suitability	1%NaCl Hinton

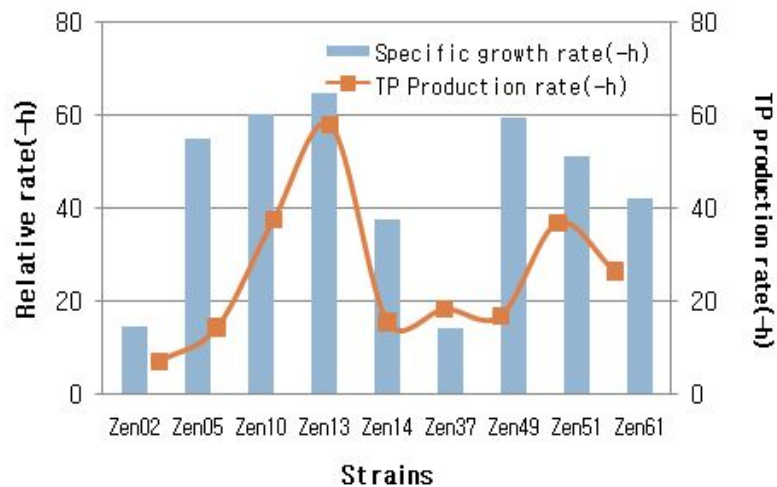


Fig. 1. Comparison of the selected strain growth and total protein production

균주명	특 성		비고	사용배지
	균주환경	Origin	균주번호	
<i>Weissella viridescens</i>	바다	f*	zen02	1%NaCl MRS
<i>Lactococcus lactis</i>	바다	j	zen05	1%NaCl MRS
<i>Leuconostoc psedomesenteroides</i>	바다	j	zen10	1%NaCl MRS
<i>Kocuria rhizophila</i>	바다	j	zen13	1%NaCl MRS
<i>C.maltaromaticum</i>	바다	j	zen14	MRS
<i>Carnobacterium divergens</i>	민물	e	zen37	1%NaCl Hinton
<i>Streptococcus (para)uberis</i>	민물	e	zen49	MRS
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	민물	e	zen51	MRS
<i>Enterococcus pseudoavium</i>	바다	f	zen61	MRS

Note: * f : Flatfish, e : Japanese eel, j : Jacopever

Fig 2. 에서보듯이 항균작용이 일어날 경우 paper disk 주변에 clear zone이 형성되는데 ZEN49 균주의 경우 *streptococcus iniae*에 작용한 *streptococcus parauberis*이다. 이와 같이 일반적인 antibiotics와는 달리 bacteriocins의 경우 같은 genus 혹은 family에서 상호 견제하기 위한 물질로 그들 그룹속에서 찾는 것이 보다 빠른 방법이라 할 수 있을 것이다.

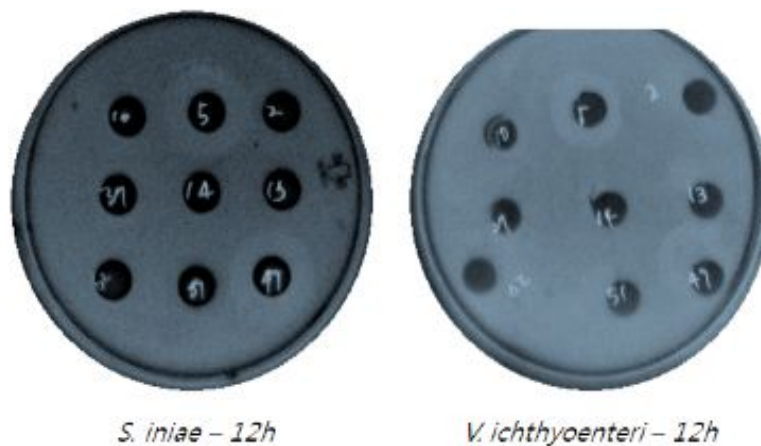


Fig. 2. Antimicrobial activity against pathogens

나. 2차 미생물탐색

부산에서 진해, 창원, 통영까지 남해안 일대의 해수를 sampling하여 MRS 배지에서 배양 후 상등액에 대하여 병원균의 생육 저해 활성을 검증하여 활성균을 선별하였다.

실험은 확보된 sample 108개를 MRS 배지에서 배양시켜 배양된 sample의 상등액을 원심분리 후 100℃에서 20분간 끓인 후 1% NaCl BHI 배지에 전배양한 병원균 1ml(7.8x10⁸)를 fresh한 1% NaCl BHI 배지에 접종한 후 완전히 섞은 후 초기 2시간 미리 적응배양을 진행하여 병원균의 성장이 이루어지는 것을 관찰한 후 108개의 각각 sample을 병원균 배양액 volume 비율로 1:2(v/v)로 혼합하여 단위시간별 병원균의 성장에 미치는 영향을 관찰하였다.

일차적으로 부산 진해 앞바다의 96point를 대상으로 실험을 실시하였고 또한 12개의 sample도 동일한 방법으로 실험을 진행하였다. 실험에서는 Fig 3에서 보는 바와 같이 5종의 병원균에 대한 sample의 병원균 성장 저해정도를 수치화하여 나타냈다.

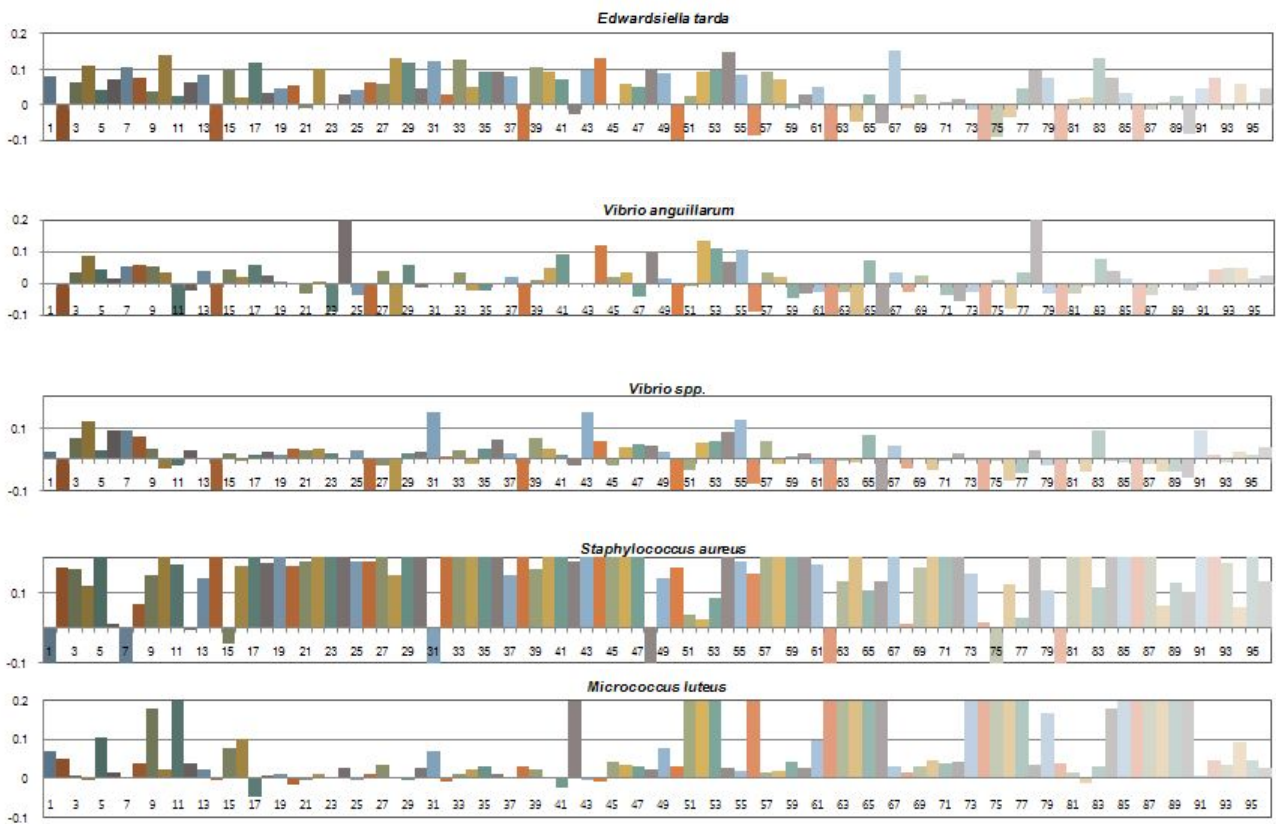


Fig. 3. Antimicrobial activity against pathogens

실험에서 각 병원균의 생육 저해가 나타나는 sample 번호들을 정리하여 나타내었다. 이들 선별된 sample은 다시 MRS agar plate에 도말하여 나타나는 colony들을 순수분리하고 -70℃에서 동결 보존하여 실험에 사용하였다.

Table 7. Screening of antimicrobial strains against pathogens

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22				
<i>E</i>	+		+	+		+	+	+		+		+	+		+		+					+				
<i>L</i>																										
<i>V</i>			+	+		+	+	+																		
<i>S</i>			+	+	+				+	+				+		+	+	+	+	+	+	+				
<i>M</i>		+	+	+		+	+	+		+																
	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36	37	38	39	40	41	42	43	44				
<i>E</i>				+	+	+	+		+		+		+	+			+	+	+		+	+				
<i>L</i>		+																								
<i>V</i>									+					+			+				+	+				
<i>S</i>	+	+	+	+	+	+	+	+		+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+				
<i>M</i>	+	+	+	+	+	+	+	+		+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+				
	45	46	47	48	49	50	51	52	53	54	55	56	57	58	59	60	61	62	63	64	65	66				
<i>E</i>		+		+	+			+	+	+	+		+	+												
<i>L</i>																										
<i>V</i>			+					+	+	+	+		+	+							+	+				
<i>S</i>	+	+	+		+					+	+	+	+	+	+	+	+		+	+	+	+				
<i>M</i>	+	+	+	+	+					+	+	+	+	+	+	+	+		+	+	+	+				
	67	68	69	70	71	72	73	74	75	76	77	78	79	80	81	82	83	84	85	86	87	88				
<i>E</i>	+											+	+				+	+								
<i>L</i>																										
<i>V</i>																										
<i>S</i>	+	+	+	+	+	+	+			+	+	+	+		+	+	+	+	+	+	+	+				
<i>M</i>	+	+	+	+	+	+	+			+	+	+	+		+	+	+	+	+	+	+	+				
	89	90	91	92	93	94	95	96																		
<i>E</i>				+		+																				
<i>L</i>																										
<i>V</i>			+			+																				
<i>S</i>	+	+	+	+	+		+	+																		
<i>M</i>		+	+	+	+		+	+																		
															<i>Edwardsiella tarda</i>		42ea									
															<i>Vibrio anguillarum</i>		19ea									
															<i>Vibrio sp.</i>		19ea									
															<i>Staphylococcus aureus</i>		77ea									
															<i>Micrococcus luteus</i>		63ea									

Edwardsiella tarda 42ea, *Vibrio anguillarum* 19ea, *Vibrio sp.* 19ea, *Staphylococcus aureus* 77ea, *Micrococcus luteus* 63ea가 각기 혹은 중복적으로 병원균에 저해를 일으키는 것을 관찰할 수 있었다.

창원 앞바다 sample : 또한 상기의 방법으로 12종의 sample에 5종의 병원균에 대하여 실험을 실시하였다. 그 결과 *Streptococcus iniae*에 활성이 나타나는 sample들이 많았고, 다음으로 *Micrococcus luteus* 7종, *Listonella anguillarum*에 4종이 존재하였다. 그밖에 *Vibrio sp.*와 *Edwardsiella tarda*에 효과를 나타내는 sample은 1~2 sample로 그 활성정도도 미약하였다. 이 sample들 역시 각각을 도말한 다음 colony를 순수분리하고 -70℃에 보관하여 다음 실험에 사용하였다.

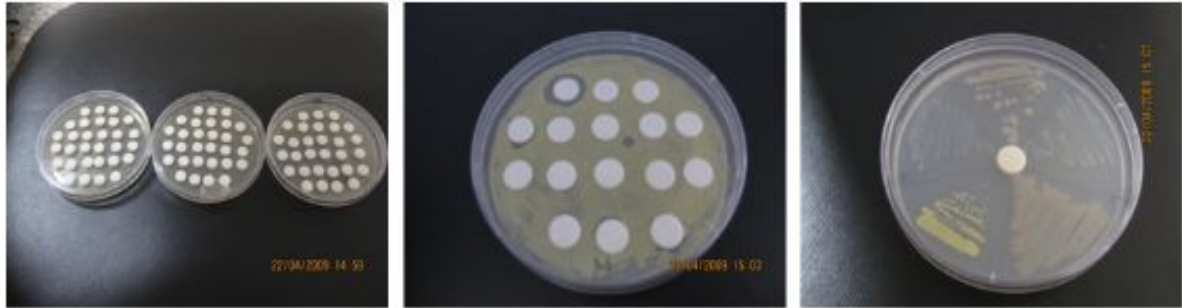
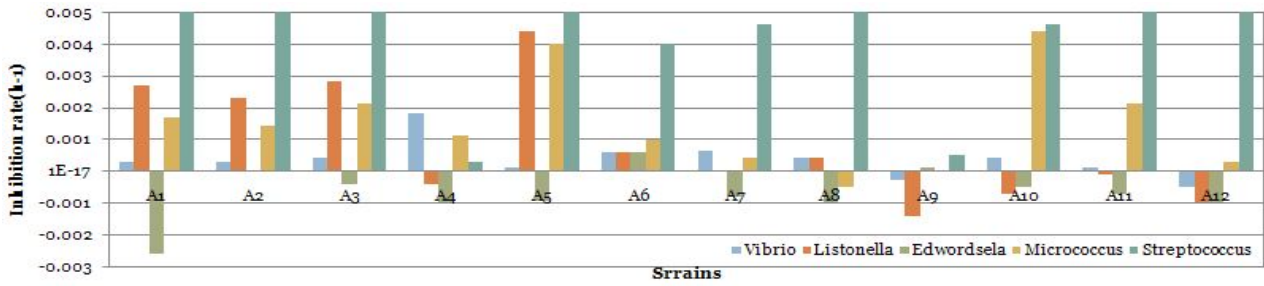


Fig 4. Antimicrobial activity against pathogens

다. 3차 미생물탐색

경산 지역을 비롯한 경주, 대구 등지의 마트나 어시장 등에서 채취한 생선 내장으로 부터 *Listonella anguillarum*에 대한 항균활성을 가진 균주를 분리하였으며, 어병균으로는 제니스에서 분양 받은 *Listonella anguillarum*과 *Edwardsiella tarda*를 사용하였다.

2. 항균활성

- 항균활성 실험을 위해서 공시시료를 선정하고 표준 data를 얻는 실험을 실시하였다.
- Nisin의 항균 범위 조사

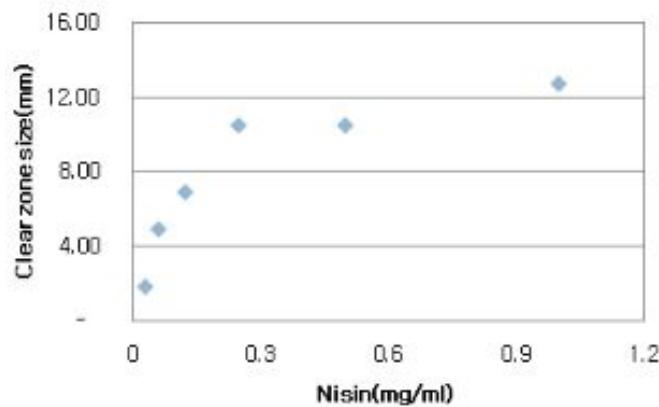


Fig 5. Antimicrobial activity with concentration of nisin

표준 박테리오신으로 Sigma의 Nisin($\geq 1,000,000$ per IU/g, 2.5% (balance sodium chloride

and denatured milk solids))을 이용하여 항균활성의 확인범위를 알아보았다. Fig. 22에서와 같이 clear zone size의 변화는 0.3mg/ml 수준에서 거의 변화가 없는 것을 알 수 있었다.

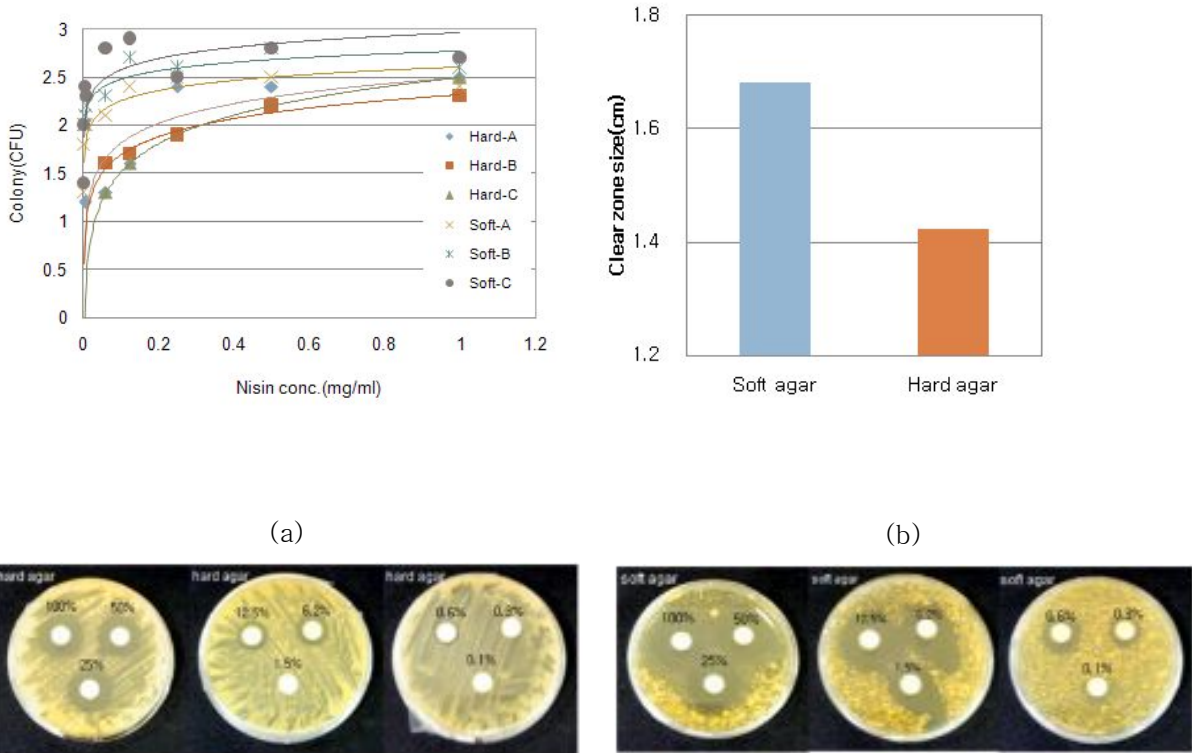
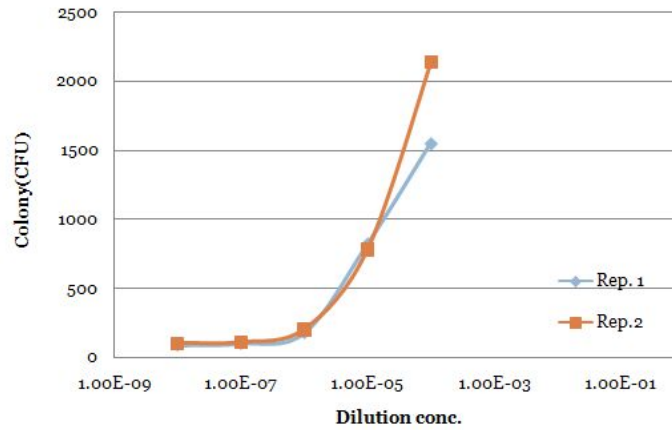


Fig 6. Antimicrobial activity of nisin against *Micrococcus luteus*

(a) hard agar (b) soft agar(1mg/ml, 0.5mg/ml, 0.25mg/ml 0.125mg/ml, 0.062mg/ml, 0.015mg/ml)

실험은 Hard agar와 soft agar의 diffusion에 따른 차이를 규명하는 실험을 실시하였다. Clear zone size의 민감성은 활성균의 선별에 가장 큰 영향을 주는 factor이기 때문이다. 우선 1.5% Hard agar diffusion method는 Nisin의 농도가 0.6mg/ml까지 저해환을 관찰할 수 있었지만 0.7% soft agar diffusion method에서는 0.06mg/ml까지 저해환을 관찰할 수 있어 nisin의 농도 수준에서 약 10배의 차이가 나는 것으로 나타났다. 따라서 초기 선별과정에서 생육이 느린 균종의 활성구분을 위해서는 soft agar의 사용이 필수적이라 생각된다.

또한 병원균의 항균물질과 반응시간 그리고 적정밀도에 따른 변수값들을 최소화하기 위한 실험에서 우선 병원균을 10^{-8} 까지 희석하여 plate 안에 병원균을 도말하여 가장 명확한 결과 값을 도출할 수 있는 희석배율에 대한 값을 항균활성 실험에 적용하고자 실험을 실시하였다.



Pathogen dilution conc.	10 ¹	10 ²	10 ³	10 ⁴	10 ⁵	10 ⁶	10 ⁷	10 ⁸
Rep. 1	>3000	>3000	>3000	1553	823	179	101	89
Rep. 2	>3000	>3000	>3000	2139	784	204	109	103

(10¹~10³까지는 균이 너무 작고 많아 colony수를 counting 불가능.)

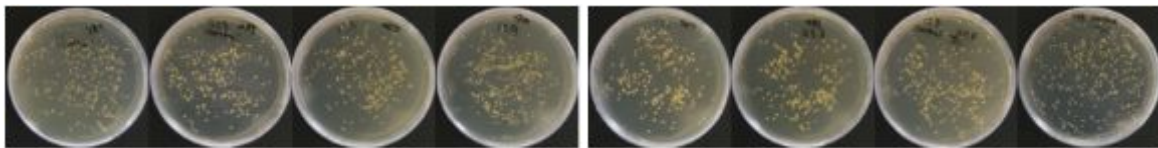


Fig 7. Colony counting with dilution rate of pathogens

결과는 Figure 7에서와 같이 10⁻⁶ 희석배율에서 가장 절절한 colony의 밀도를 보였고, 이 희석배율에서 colony 수가 300개 이하가 되어 적정 Nisin 농도를 투여 시 저해반응은 즉각적으로 일어나는 것으로 나타났다. 따라서 단위 시간 당 잔존 병원균 확인 실험을 통해 반응종결 시점 및 최적 농도 결정을 실시하였다. Fig. 8에서 보듯이 30분경과 시 3ppm(mg/L)에서 병원균이 완전히 사멸하였으나 반복 실험에서 6ppm에서 2개의 colony가 나타났다. 그런데 60분경과 시 3ppm에서 두 실험에서 각각 8개 4개의 colony가 검출되어 30분경과시보다 활성이 낮게 나타났다. 그러나 120분경과 후에는 30분경과 시와 같이 3ppm에서 완전 저해를 하는 것으로 나타났고 1ppm에서 평균 12colony가 나타나 최소한 3~6ppm의 농도에서 완전한 혼합이 이루어지지 않은 관계로 일부 colony가 생존하였으나 시간이 경과됨에 따라 diffusion된 nisin에 의해서 완전히 사멸됨을 알 수 있었다.

결과적으로 1.5% Hard agar diffusion method는 Nisin의 농도가 0.6mg/ml까지 저해환이 관찰되었으나 0.7% soft agar diffusion method에서는 0.06~0.1mg/ml까지 저해환이 관찰되어 Clear zone size 측정을 통한 활성분석은 agar분자의 밀도가 항생물질의 diffusion에 상당수준의 영향을 미치는 것으로 나타났다. 그러나 용존상태에서의 반응에서는 이러한 agar

diffusion 저해 현상을 최소화할 수 있어서 인 듯 Nisin 함량 최소 3~6ug/ml(ppm)에서까지 병원균(최소 약 300CFU/ml)의 완전한 사멸까지 유도할 수 있는 것으로 관찰되었다.

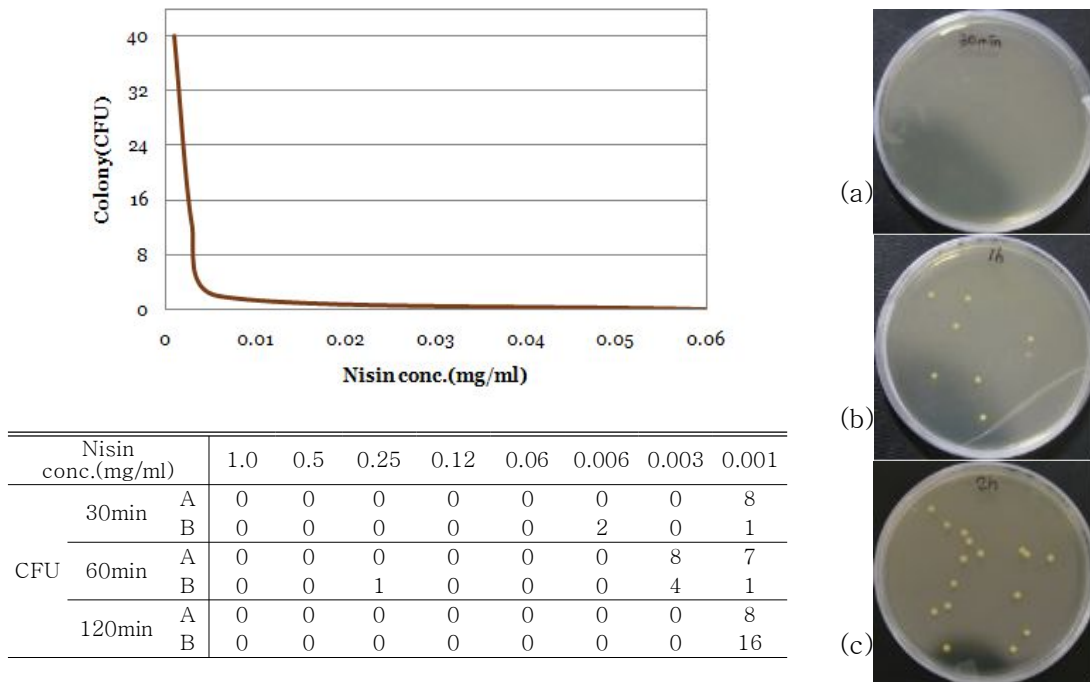


Fig 8. Antimicrobial activity of nisin against pathogens

(a) 30min(3ppm, nisin), (b) 60min(3ppm, nisin), (c) 120min(1ppm, nisin)

3. 항생제와 Nisin의 antimicrobial activity 검증

Bacteriocin의 항생효과 수준을 알기 위해서 일반적으로 가장 널리 사용되고 있는 항생제 중 ampicillin의 항생효과와 비교한 실험을 실시하였다. 항생제에 비해 특이성이 강한 bacteriocin이기 때문에 대상 병원균종의 선정에 있어서 다양한 항생제제의 선정에서 있었어도 그 비교 정도가 달라질 수 있으나 여기서는 배제하였다. 실험결과 nisin의 항생효과는 항생제 ampicillin의 항생효과에 비해서 약 70% 수준으로 나타났다. 이밖에 다양한 항생제제와 비교실험을 실시하였으나 병원균특이성에서 상당한 차이가 있어서 data로 제시하기 힘들었다.

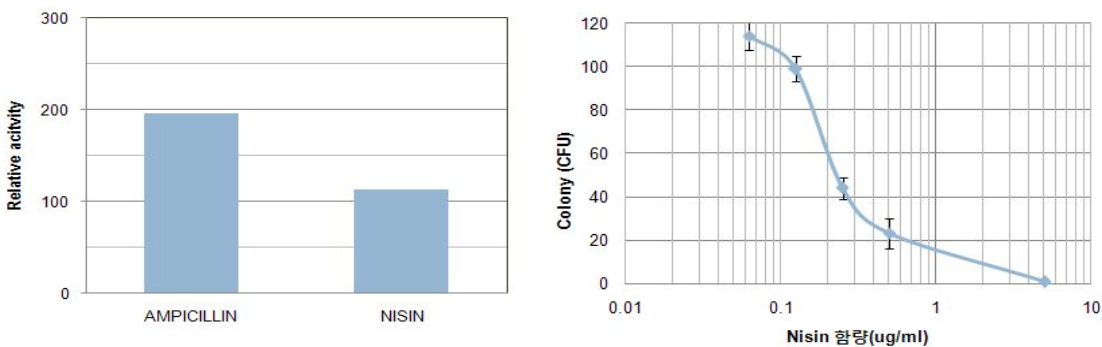


Fig 9. Antimicrobial activity of nisin and ampicillin

이 실험에서 항생제 ampicillin에 대한 효과에 약 60% 수준으로 나타났으나 soft agar에서 이루어진 실험으로 항생제의 크기가 peptide로 구성된 bactericin의 크기보다 작은 것을 고려할 경우 약간의 차이라도 agar network의 조건에 따른 차이는 있을 수 있다. 그럼에도 불구하고 nisin의 antimicrobial activity는 약 3~4 log 수준으로 매우 높게 나타났다.

4. 항균성 검증

가. *Edwardsiella tarda* 병원균에 대한 항균성

Edwardsiella tarda 병원균에 대한 선별된 항균성을 검증하기 위해서 한국남동부해안에서 선별·분리된 ZEN01 균주의 MRS 배양액을 NB medium 20ml에 seed culture 된 *Edwardsiella tarda* 1ml 접종한 후 Figure 10의 표에서와 같은 조합을 통해서 실험을 실시하였다. 4시간 단위로 sample을 채취하여 분석하였다. 시료로 혼합된 12시간 배양된 ZEN01 균주의 배양액은 MFS-25 filter를 이용하여 제균한 후 혼합하여 항균활성에 생균에 대한 영향을 배제하였다. 이와 같은 방법으로 Total volume에 대한 영향을 배제하기 위하여 다음 조건으로 재실험하여 두 결과를 비교하였다.

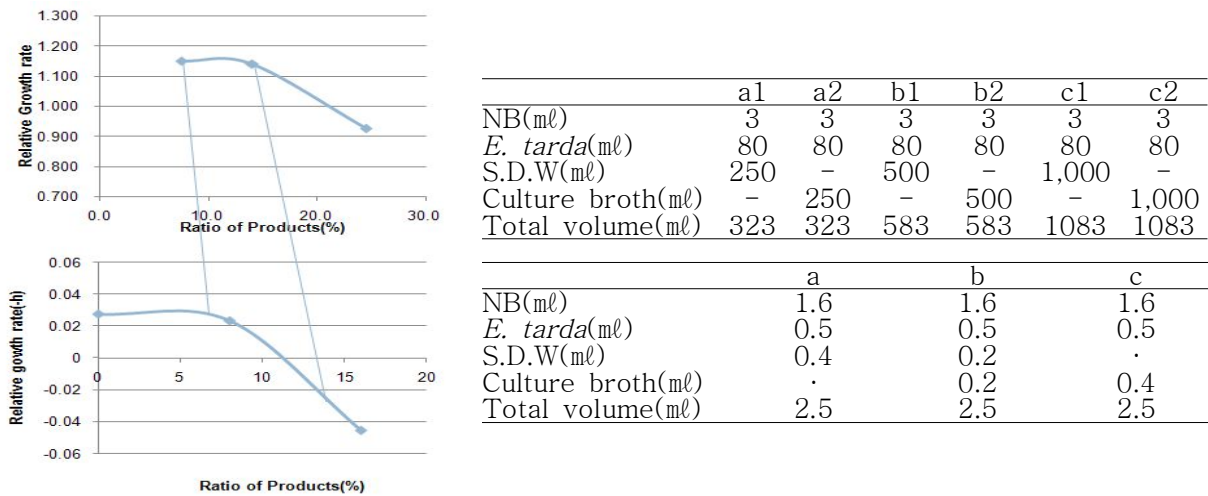


Fig 10. Antimicrobial activity against *Edwardsiella tarda*

상기의 실험에서 *Edwardsiella tarda* 병원균에 대한 항균활성 실험에서 실험 총 부피에 따라 차이는 있었으나 culture broth 양이 어느 적정 수준 이상 첨가될 경우 항균력이 강하게 나타남을 알 수 있었다.

5. 활성균주의 분리 및 동정

가. LK7 균주의 분리

각각 채취한 생선 내장 시료를 멸균 증류수로 현탁한 후 상등액 1ml를 취해 10^{-3} 까지 희석하여 $50\mu\text{l}$ 의 *L. anguillarum*과 함께 LB배지(Table 4)에 $50\mu\text{l}$ 씩 도말하였다. 30°C 에서 3일간 배양하여 얻은 colony 중에서 inhibition zone을 나타내는 colony를 분리하였다. 분리한 균주는 3차 희석법을 통해 순수 분리한 후 Toothpick 방법을 통해 *Listonella anguillarum*에 대한 항균 활성을 나타낸 2개의 colony를 획득하였다.(Fig. 11) 그 중 먼저 분리된 EK1 균주의 경우 균체의 항균활성은 나타내었으나 배양액의 상등액에서는 *L. anguillarum*에 대한 항균 활성을 나타내지 않았다. 이후 분리된 LK7 균주는 균체뿐만 아니라 배양액의 상등액에서도 항균 활성을 나타내었으며 *L. anguillarum*에 대한 항균 활성균주로 최종 선별, 분리되었다.(Fig. 12)

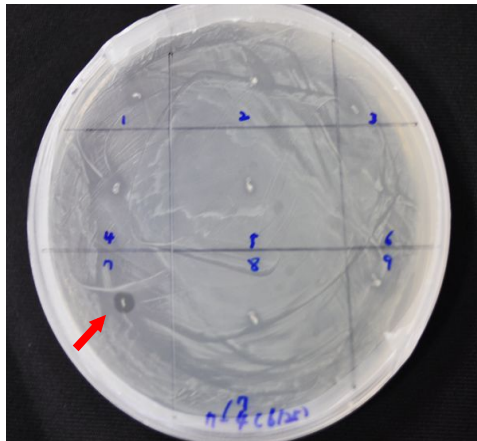


Fig. 11. Antimicrobial activity of strain LK7 against *Listonella anguillarum*.

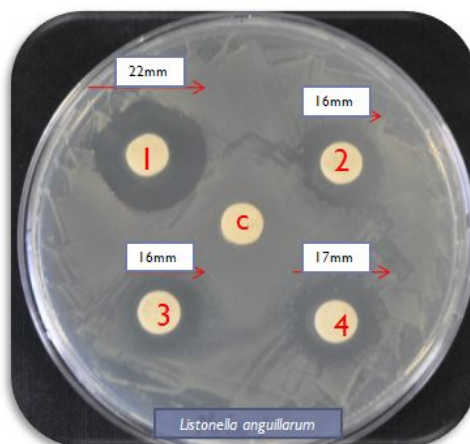


Fig. 12. Antimicrobial activity of strain LK7 with various conditions.

c : ddH₂O, 1 : culture broth before filtering, 2 : culture broth after filtering,
3 : culture broth with heating(100°C, 10min), 4 : culture broth adjusted pH 7

Table 8. Medium composition for LK7 strain.

Nutrients	Contents(%)
Tryptone	1
NaCl	0.5
Yeast extract	0.5

Agar powder was added with concentration of 1.5%.
The medium was sterilized for 15min at 121°C.

나. VK24 균주의 분리

각각 채취한 어류 내장 시료를 멸균 증류수로 10^0 , 10^{-1} , 10^{-2} 까지 희석하여 TCBS배지에 $100\mu\text{l}$ 씩 도말하여 25°C에서 24시간 배양한 후 생성된 colony를 *L. anguillarum*이 도말된 고체 LB 배지에 Toothpick을 실시하여 inhibition zone을 나타내는 colony를 분리하였다. 분리한 균주는 3차 희석법을 통해 순수 분리한 후 Vibrio선택배지인 TCBS배지에 나타난 34균주 중 항균 활성이 있는 한 균주를 분리하였다. (Fig. 13)

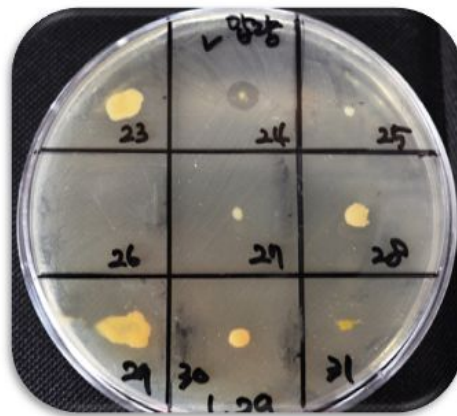


Fig. 13. Antimicrobial activity of strain VK24 against *L. anguillarum*.

(3) ZEN102 균주의 분리

부산에서 진해, 창원, 통영까지 남해안 일대의 해수를 sampling하여 MRS 배지에서 배양 후 상등액에 대하여 병원균의 생육 저해 활성을 검증하여 활성균을 선별하였다. 항균 활성 균주는 기존 2009년 2차 미생물 탐색균 중에서 screening 하였으며, 항균력을 알아보는 지시균으로써 *Micrococcus luteus*, *Streptococcus aureus*, *Listonella anguillarum*, *Edwardsiella tarda* 를 사용하였다. 선별한 균주를 30°C에서 24시간 동안 배양하여 다시 병원균에 대해 항균작용을

하는 균주를 선발하였다. 형성된 균락은 미리 만들어진 BHI 한천 배지에 이식하여 30℃에서 균락이 형성 될때까지 배양한 후 지시균이 함유된 연한천 배지를 중층하고 지시균을 적정배양 조성에서 배양 후, 생육 저지대를 형성한 균주를 1차적으로 선발하였다.

1차 선발 균주를 BHI액체 배지에 접종하여 하룻밤 정치 배양한 후 원심분리하여 균체는 제거하고 상정액만 취하여 0.22 μ l 여과막(membrane filter)으로 잔존 균체를 완전히 제거한 후 지시균이 함유된 BHI 한천배지를 부어 건조시킨 후 배양 상정액 70 μ l를 paper disc에 떨어뜨려 배양하여 저해환을 검토한 결과 저해환이 가장 큰 유산균 ZEN102를 선발하였다.

이후 분리한 ZEN102의 항균 활성(Fig.14)과 열처리와 pH조정 등을 거친 여러 조건 하에서의 항균 활성을 확인하였다. 여러 조건에서 활성을 보였기 때문에 최종 선발 균주로 확정하였다.

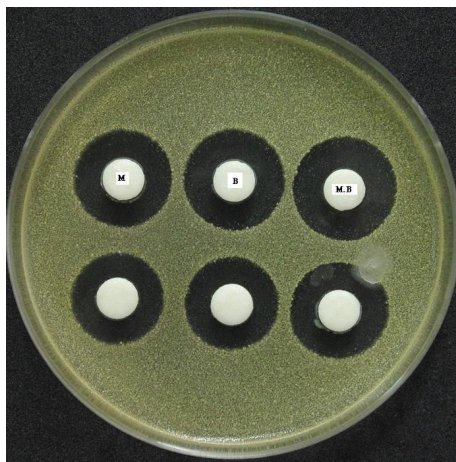


Fig.14. Antimicrobial activity of ZEN102 against *Micrococcus luteus*.

Table 9. Medium composition for *Lactococcus lactis* ZEN102

Nutrients	Contents(%)
BHI	100
MRS	100
MRS : BHI	50:50

The medium was sterilized for 15min at 121℃.

(4) Bacteriocin 생산 균주의 동정: LK7, VK24, ZEN102

최종 선발된 균주의 동정을 위해 전자현미경(Transmission Electron Microscope ; TEM)에 의한 형태학적 관찰과 생리학적, 생화학적 및 영양적 특성 등을 조사하였다. 균주의 동정은 “Bergey’s Manual of Systematic Bacteriology”에 따랐으며, 16s rDNA sequencing의 결과를 통해, BLAST search하여 상동성을 비교하여 동정하였다.

LK7 균주의 전자현미경(Transmission Electron Microscope ; TEM)에 의한 특성은 Fig. 15와

같고, 생리학적, 생화학적 특성 등에 의한 결과는 Table 10과 같다. 분리된 균주는 Gram 양성 구균으로 운동성은 없는 것으로 확인되었다. 16rDNA gene sequence 분석결과(Fig.16) *Aerococcus* sp.와 높은 상동성을 보임으로써 *Aerococcus viridans*의 근연종으로 동정하였고 (Fig. 17), *Aerococcus* sp. LK7로 명명하였다. VK24 균주의 전자 현미경에 의한 특성은 Fig. 18과 같고, 생리학적, 생화학적 특성 등에 의한 결과는 Table .11과 같다. 16rDNA gene sequence 분석(Fig. 19)결과 *Vagococcus* sp.와 97%상동성을 보였다.(Fig.20) 따라서 분리한 균주를 *Vagococcus* sp. VK24로 명명하였다.

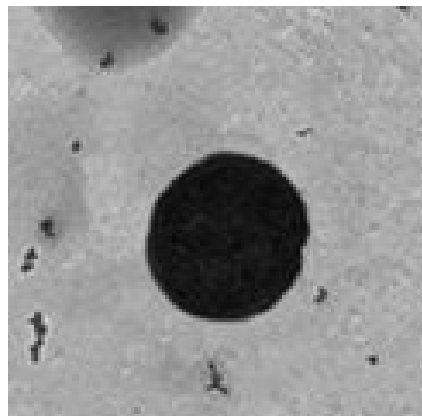


Fig. 15. Electron micrograph of the strain *Aerococcus* sp. LK7 (x3000)

Table 10. Characteristics of the strain *A. sp.* LK7

Test	<i>Aerococcus</i> sp. LK7	<i>Aerococcus</i> <i>viridans</i> NCTC8251
Cell shape	cocci	cocci
Gram stain	+	+
Catalase test	-	-
VP test	-	-
Motility	-	-
Greening on blood agar	-	+
Growth in NaCl 6.5%	+	+
Growth at 45°C	-	-

1 GTG ACG TTA GCG GCG AAC GGG TGA GTA ACA CGT AAG GAA TCT ACC TAT AAG CGG GGG ATA ACA TTC GGA AAC GGG TGC
 79 TAA TAC CGC ATA ATA TCT TCT TCC GCA TGG AAG AAG ATT GAA AGA CGG CTC TGC TGT CAC TTA TAG ATG ACC TTG CGG
 157 TGC ATT AGT TAG TTG GTG GGG TAA TGG CCT ACC AAG ACG ATG ATG CAT AGC CGA CCT GAG AGG GTG ATC GGC CAC ATT
 235 GGG ACT GAG ACA CGG CCC AAA CTC CTA CGG GAG GCA GCA GTA GGG AAT CTT CCG CAA TGG GCG AAA GCC TGA CGG AGC
 313 AAT GCC GCG TGA GTG AAG AAG GCC TTC GGG TCG TAA AAC TCT GTT ATA AGA GAA GAA CAA ATT GTA GAG TAA CTG CTA
 391 CAG TCT TGA CGG TAT CTT ATC AGA AAG CCA CGG CTA ACT ACG TGC CAG CAG CCG CGG TAA TAC GTA GGT GGC AAG CGT
 469 TGT CCG GAT TTA TTG GGC GTA AAG GGA GCG CAG GTG GTT TCT TAA GTC TGA TGT GAA AGC CCA CGG CTT AAC CGT GGA
 547 GGG TCA TTG GAA ACT GGG AAA CTT GAG TAC AGA AGA GGA ATG TGG AAC TCC ATG TGT AGC GGT GGA ATG CGT AGA TAT
 625 ATG GAA GAA CAC CAG TGG CGA AGG CGA CAT TCT GGT CTG TTA CTG ACA CTG AGG CTC GAA AGC GTG GGG AGC AAA CAG
 703 GAT TAG ATA CCC TGG TAG TCC ACG CCG TAA ACG ATG AGT GCT AGG TGT TGG AGG GTT TCC GCC CTT CAG TGC CGC AGT
 781 TAA CGC ATT AAG CAC TCC GCC TGG GGA GTA CGA CCG CAA GGT TGA AAC TCA AAG GAA TTG ACG GGG ACC CGC ACA AGC
 859 GGT GGA GCA TGT GGT TTA ATT CGA AGC AAC GCG AAG AAC CTT ACC AAG TCT TGA CAT CCT TTG ACC ACC CTA GAG ATA
 937 GGG CTT TCC CTT CGG GGA CAA AGT GAC AGG TGT GCA TGG NTT GTC GTC AGC TCG TGT CGT GAG ATG TGG GTN AGT CCC
 1015 GCA ACG AGC GCA CCC CTA TTA TAG TTG CAG CAT TTA GTG GGC ACT CTA ATG AGA CTG CNN NAC AAN CGG AAG GNN NNN
 1093 MNA TGA ACG TCA NTC AGC ATT GCC CTN ATG ACT TNG GCC TAA MNM ACN NNN NCT N

Fig. 16. 16S rDNA gene sequence analysis of strain *A. sp.* LK7

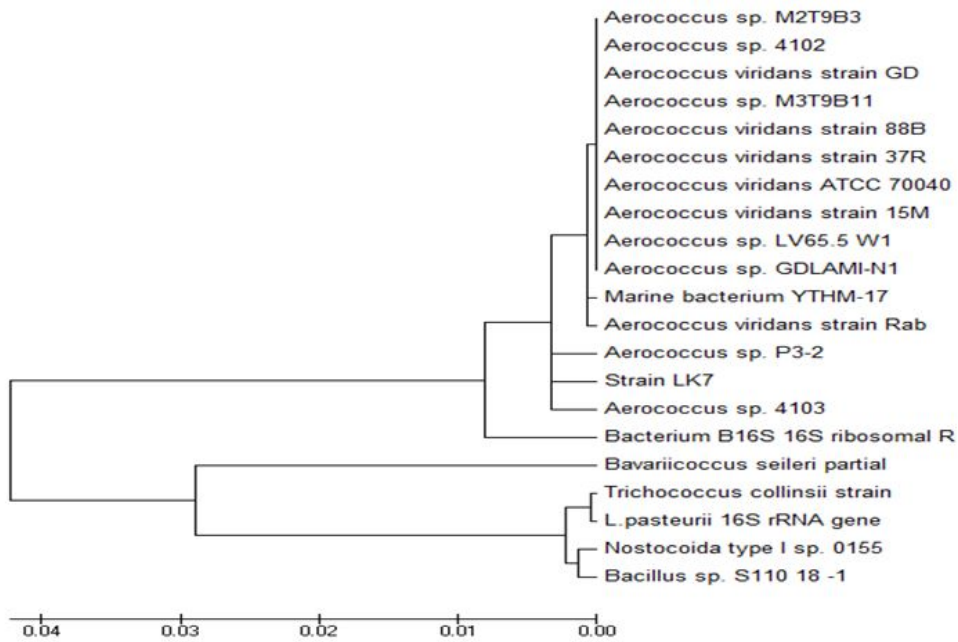


Fig. 17. Phylogenetic tree of strain *A. sp.* LK7

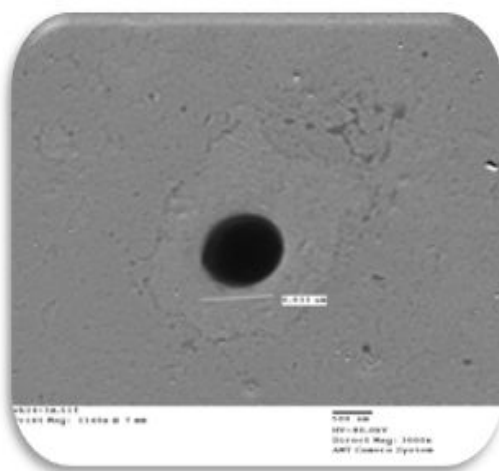


Fig. 18. Electron micrograph of the strain *V. sp.* VK24 (x3000)

Table 11. Characteristics of the strain *V. sp.* VK24.

Test	<i>Vagococcus sp.</i> VK24	<i>Vagococcus fluvialis</i> ATCC 49515
Cell shape	cocci	cocci
Gram stain	+	+
Aerobic	-	-
Catalase test	-	-
Oxidase test	-	-
Endospore	-	-
Motility	-	-
Antibiotic resistant		
Kanamycin 100 μ l/ml	+	+
Streptomycin 100 μ l/ml	+	+
Plasmid	-	ND
MR test	+	ND
VP test	-	-

+, Positive; -, Negative; ND, No Data.

```

1 |NNN NNN NNN GNN GCT ATA NTG CAG TCG AAC GCT TTG ATT TTC ACC GGA GCT TGC TCC ACC
61 |GAA AAT CAA AGA GTG GCG GAC GGG TGA GTA ACA CGT GGG CAA CCT GCC CAA CAG AGG GGG
121 |ATA ACA CTT GGA AAC AGG TGC TAA TAC CGC ATA ATT TGT TTT CCC GCA TGG GAG AAT AAT
181 |AAA AGA CGC TTC GGT GTC ACT GTT GGA TGG GCC CGC GCI GCA TTA GTT AGT TGG TGG GGT
241 |AAT GGC CTA CCA AGA CCG TGA TGC ATA GCC GAC CTG AGA GGG TGA TCG GCC ACA CTG GGA
301 |CTG AGA CAC GGC CCA GAC TCC TAC GGG AGG CAG CAG TAG GGA ATC TTC GGC AAT GGA CGA
361 |AAG TCT GAC CGA NCA ACG CCG CGT GAG TGA AGA AGG TTT TCG GAT CGT AAA ACT CTG TTG
421 |TTA GAG AAG AAC AAG TGG GAG AGT AAC TGT TCC CAC CTT GAC GGT ATC TAA CCA GAA AGC
481 |CAC GGC TAA CTA CGT GCC AGC AGC CGC GGT AAT ACG TAG GTG GCA AGC GTT GTC CGG ATT
541 |TAT TGG GCG TAA AGC GAG CGC AGG CGG TTT CTT AAG TCT GAT GTG AAA GCC CTC GGC TCA
601 |ACC GAG GAA GGT CAT TGG AAA CTG GGG AAC TTG AAT GCA GAA GAG GAG AGT GGA ATT CCA
661 |TGT GTA GCG GTG AAA TGC GTA GAT ATA TGG AGG AAC ACC AGT GGC GAA GGC GAC TCT CTG
721 |GTC TGT AAT TGA CGC TGA GGC TCG AAA GCG TGG GGA GCA AAC AGG ATT AGA TAC CCT GGT
781 |AGT CCA CGC CGT AAA CGA TGA GTG CTA AGT GTT GGA GGG TTT CCG CCC TTC AGT GCT GCA
841 |GTT AAC GCA TTA AGC ACT CCG CCT GGG GAG TAC GGC CGC AAG GCT GAA ACT CAA AGG AAT
901 |TGA CGG GGG CCC GCA CAA GCG GTG GAG CAT GTG GTT TAA TTC GAA GCA ACG CGA GAA CCT
961 |TAC CNN NCT TGA CAT CCT TTG ACC NCT CTA GAG ATA GAG CTT TCC CTT CGG NAC NAA GTG
1021 |ACN NGT GGN GCA TNN NTC GTC AGC TCG TGT CGT GNN ATG TNG NNA GTC CCG NAN GAG CGC
1081 |NNC NTT NNN NTT ANT GCA TCA TCA NNG GNA CTC TAN NNN ACT GCN NNG ANA NNN AGA GNN
1141 |GGA TGA CGT CAA TCA TCA TGC CTT NGA CTG NNN ACA CGN NNN NNG NNC GNN NAN NNN NTC
1201 |NNG GAG NAN NNC C

```

Fig.19. 16S rDNA gene sequence analysis of strain *V. sp.* VK24

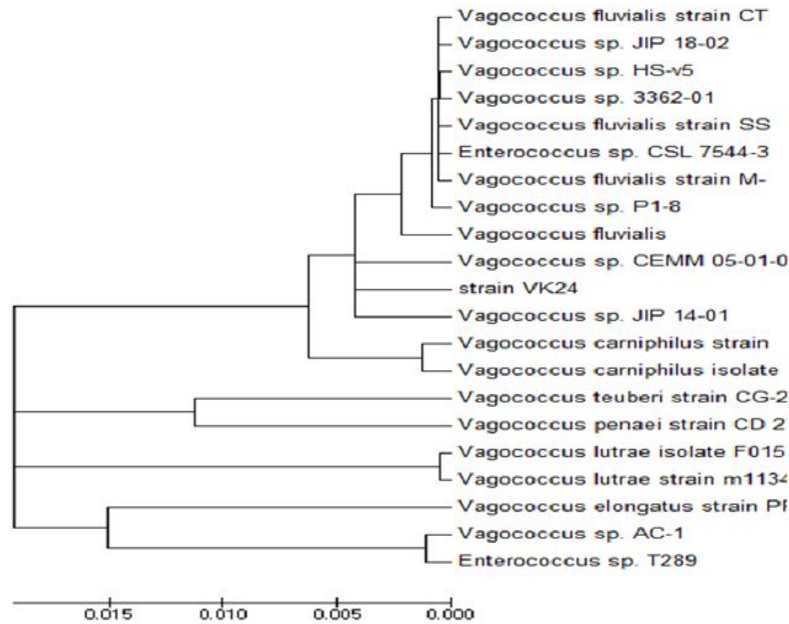


Fig. 20. Phylogenetic tree of strain *V. sp.* VK24

최종 선발된 박테리옌 생산 균주 ZEN102의 전자현미경(Transmission Electron Microscope ; TEM)에 의한 특성은 Fig. 21과 같다. 분리된 균주는 Gram 양성 균으로 편모가 없는 구균이었다. API 분석결과 *Lactococcus lactis*와 비교했을 때 비슷한 특성을 나타내어 *Lactococcus lactis*로 동정하였고, 또한 솔젠트사에 16rDNA gene sequence 분석(Fig. 22)을 의뢰한 결과와 그 결과를 토대로 유전학적 트리(Fig. 23.)를 그린 결과로 최종적으로 동정한 결과 *Lactococcus lactis* 와 높은 상동성을 보임으로써 *Lactococcus lactis*의 근연종으로 동정하였고, *Lactococcus lactis*. ZEN102로 명명하였다.(Table.12, Fig.24, Fig. 25)

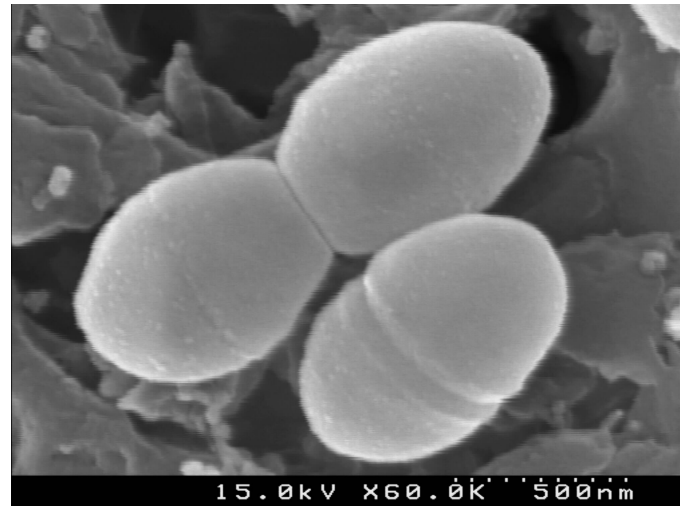


Fig. 21. Electron micrograph of the strain ZEN102

NNNGNNGTGGCGCAGCTATAATGCAGTTGAGCGCTGAGGTTGGTACTTGTACCGACTGGATGAGCAGCGAACGGGTGAGT
AACCGCTGGGAATCTGCCTTTGAGCGGGGACAACATTTGGAAACGAATGCTAATACCGCATAACAACCTTTAAACACAA
GTTTTAAGTTTGAAGATGCAATTGCATCACTCAAAGATGATCCCGCTTGATTTAGCTAGTTGGTGAGGTAAAGGCTCA
CCAAGCGATGATACATAGCCGACCTGAGAGGGTGATCGCCACATTTGGGACTGAGACACGGCCAAAACCTCCTACGGGAG
GCAGCAGTAGGGAATCTTCGGCAATGGACGAAAGTCTGACCAGCAACGCCCGTGAGTGAAGAAGGTTTTCGGATCGTA
AAACTCTGTTGGTAGAGAAGACGTTGGTGAGAGTGGAAAGCTCATCAAGTGACGGTAACTACCCAGAAAAGGACGGCTA
ACTACGTGCCAGCAGCCCGGTAATACGTAGGTCCCAGCGTTGTCCGGATTTATTGGGCGTAAAGCGAGCGCAGGTGGT
TTATTAAGTCTGGTGTAAAAGGCAGTGGCTCAACCATTGTATGCATTGGAAACTGGTAGACTTGAGTGCAGGAGAGGAGA
GTGGAATTCCATGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGATATATGGAGGAACACCGGTGGCGAAAGCGGCTCTCTGCCTGTAAAC
TGACACTGAGGCTCGAAAGCGTGGGAGCAAACAGGATTAGATACCCCTGGTAGTCCACGCCGTAAACGATGAGTGTAGA
TGTAAGGAGCTATAAGTTCTCTGTATCGCAGCTAACGCAATAAGCACTCCGCCTGGGGAGTACGACCAGCAAGGTTGAAAC
TCAAAGGAATTGACGGGGCCCGCAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAAATTCGAAGCAACGCGAAGAACCTTACCAGGTC
TTGACATACTCGTGCTATTCCTAGAGATAGGAAGTTCCTTCGGGACACGGGGATACAGGTGGTGCATGGTTGTCTCAGC
TCGTGTCTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCCEAACGAGCGCACCCCTATTGTANTGCCATCATTAGTTGGGCACTCTAACG
AGACTGGCGNNATAACCGGAGANGTGGNATGACGTCAATCATCATGCCCNATGACCTNNNNTACNACNNGCCTACCAT
TGGAATGGNAACAANNNNANNNCGCCGGAGG

Fig. 22. 16S rDNA gene sequence analysis of strain ZEN102

Table 12. COMPOSITION OF THE STRIP (API 50CHL) ZEN102

STRIP 0-9 tube / substrate		STRIP 0-9 tube / substrate		STRIP 0-9 tube / substrate		STRIP 0-9 tube / substrate		STRIP 0-9 tube / substrate	
0 CONTROL	-	10 GALactose	+	20 α -Methyl-D-Mannoside	-	30 MELibiose	-	40 D TURanose	-
1 GLYcerol	-	11 GLUcose	+	21 α -Methyl-D-Glucoside	-	31 Sucrose	+	41 D LYXose	-
2 ERYthritol	-	12 FRUctose	+	22 N-Acetyl-Glucosamine	+	32 TREhalose	+	42 D TAGatose	-
3 D ARAbinose	-	13 MaNnosE	+	23 AMYgdalin	+	33 INUlin	-	43 D FUCose	-
4 L ARAbinose	+	14 SorBosE	-	24 ARButin	+	34 MeLeZitose	-	44 L FUCose	-
5 RIBose	+	15 RHAmnose	-	25 ESCulin	+	35 RAFfinose	-	45 D ARabitoL	-
6 D XYLose	+	16 DULcitol	-	26 SALicin	+	36 Starch	+	46 L ARabitoL	-
7 L XYLose	-	17 INOsitol	-	27 CELlobiose	+	37 GLYcoGen	-	47 GlucoNaTe	+
8 ADOnitol	-	18 MANnitroL	+	28 MALtose	+	38 XyLiToL	-	48 2-Keto-Gluconate	-
9 β Methyl-D-Xyloside	-	19 SORbitol	-	29 LACtose	+	39 GENtiobiose	+	49 5-Keto-Gluconate	-

=> *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* 1 99,8%ID

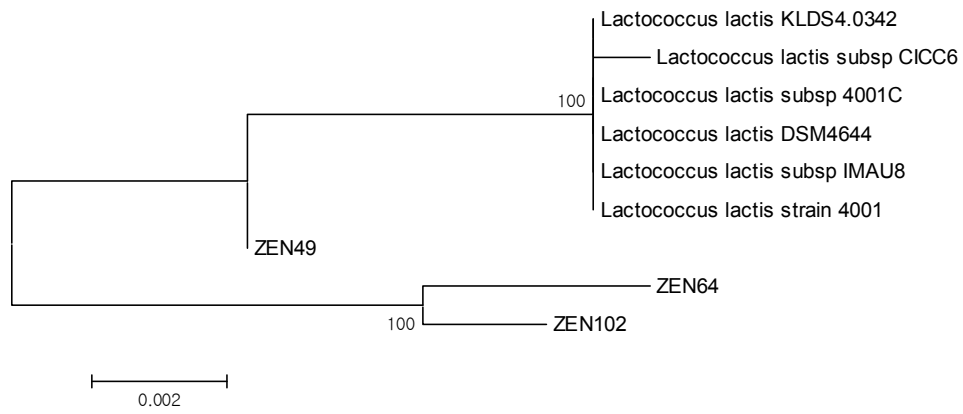


Fig. 23. Phylogenetic tree of strain ZEN102, ZEN49 and ZEN64.



Fig. 24. API 50CHL test result of strain ZEN102



Fig. 25. API 20strep test result of strain ZEN102

(5) Bacteriocin 생산 균주의 계대배양 및 보존

(가) 균주 LK7, VK24

본 실험에 사용된 균주 *Aerococcus* sp. LK7의 계대는 LB 배지를 사용하여 30°C에서 24시간 배양한 후 실험에 사용하였고, *Vagococcus* sp. VK24의 계대는 MRS(NSS) 배지를 사용하여 25°C에서 24시간 배양한 후 실험에 사용하였다. 균주의 장기 보관을 위하여 15% glycerol을 첨가하여 -70°C에서 동결 보관하였다.

(나) 균주 ZEN102

실험에 사용된 균주 *Lactococcus lactis* ZEN102의 계대는 BHI 배지를 사용하여 30°C에서 16시간 이상 배양한 후 실험에 사용하였고, 장기 보관을 위하여 BHI 배지에서 24시간 배양한 후 50% glycerol을 첨가하여 냉동보관 하여 보관하였다.

(6) 박테리옌 생산 균주의 항균력 특성 조사

(가) 균주 LK7, VK24

Bacteriocin이 포함되어 있는 배양액을 12,000rpm에서 20분 동안 원심분리 하여 얻은 상등액을 100°C에서 10분간 열처리하고 0.45µm의 필터를 사용하여 균체를 완전히 제거한 다음 그상등액을 *L. anguillarum*이 도말 되어 있는 LB배지에 paper disk를 사용하여 clear zone을 확인하였다.

LK7균주와 VK24균주가 생산하는 bacteriocin의 항균범위를 측정하기 위하여 몇몇 균주에 대한 항균 활성 실험을 실시한 결과, LK7균주가 생산하는 bacteriocin은 *L. anguillarum*외에도 *Pseudomonas putida*, *Escherichia coli* JM109와 *Bacillus cereus* KCTC1012에서도 항균활성을 나타내었으며 VK24균주가 생산하는 bacteriocin은 *L. anguillarum*외에도 *Edwardsiella tarda*, *Agrobacterium tumefaciens* GV3101, *Escherichia coli* JM109와 *Bacillus cereus* KCTC1012에서도 항균활성을 나타내는 것을 확인하였다(Table 13, 14).

Table 13. Antimicrobial activity of *A. sp.* LK7 for other strains.

Strains	Activity(1x)	Activity(10x)
<i>Listonella anguillarum</i> ATCC19264	+	+++
<i>Edwardsiella tarda</i>	-	-
<i>Pseudomonas putida</i>	-	+
<i>Sphaerotilus natan</i> ATCC15291	-	-
<i>Agrobacterium tumefaciens</i> GV3101	-	-
<i>Escherichia coli</i> JM109	+	++
<i>Bacillus cereus</i> KCTC1012	-	+

Inhibitor zone ; -: negative, + : weak positive, ++ : positive , +++ :strong positive

Table 14. Antimicrobial activity of *V. sp.* VK24 for other strains.

Strains	Antimicrobial activity
<i>Listonella anguillarum</i> ATCC19264	+++
<i>Edwardsiella tarda</i>	++
<i>Pseudomonas putida</i>	-
<i>Sphaerotilus natan</i> ATCC15291	-
<i>Agrobacterium tumefaciens</i> GV3101	++
<i>Escherichia coli</i> JM109	+
<i>Bacillus cereus</i> KCTC1012	++

: Inhibitor zone ; -: negative, + : weak positive, ++ : positive , +++ :strong positive

(나) 균주 ZEN102

지시균으로써 *Micrococcus luteus*(OD595nm : 0.27)를 250ml flask(BHI 배양액 200m)에 1ml 접종한 후 0분, 30분, 60분, 90분, 120분 시간대별로 ZEN102 상등액을

1ml 접종하여 시간별 생균수를 측정하였다.

그 결과 지시균 *M. Luteus* 을 접종 후 ZEN102를 첨가하여 시간대 반응이 일어나는데 최초 10분 이내에 최초 colony수가 약 83% 감소하였다. 또한 ZEN102균이 30분 이상 반응하는 동안 98%의 *M. Luteus* 균의 감소가 나타남을 알 수 있다. 이는 ZEN102의 활성은 최초 첨가 후 30분 내외에 98%의 항균력을 가진다는 것을 알 수 있었다(Fig. 26, 27).

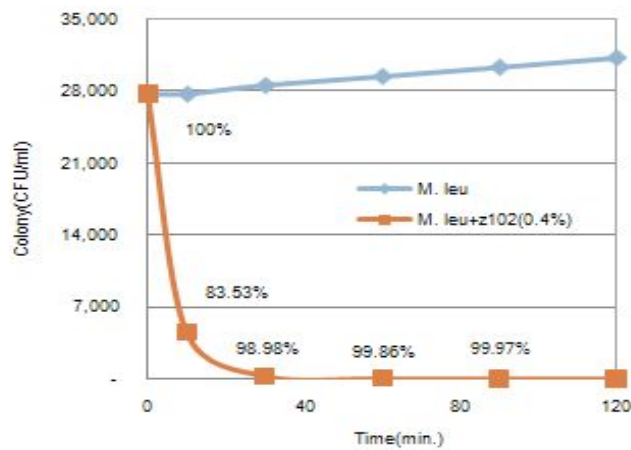


Fig. 26 ZEN102 activity and Colony(CFU/ml) at time

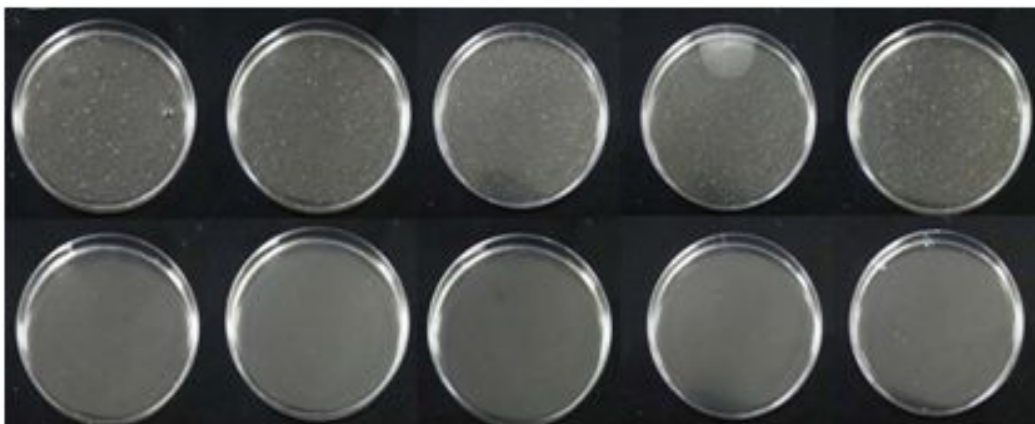


Fig. 27. Antimicrobial activity of strain ZEN102

나. Bacteriocin 생산 균주의 생육 특성 조사

(1) 균주 LK7, VK24

균주의 생육도 측정은 Spectrophotometer(HITACHI U-2000, Japan)를 사용하여 600 nm에서 측정한 흡광도로 나타냈다. pH 측정은 pH METER (ISFETCOM S2K712, Japan)을 사용하여 실시하였다.

(2) 균주 ZEN102

균의 생육도 측정은 microplate reader(Emax-Molecula Devices)기를 사용하여 595 nm에서 측정한 흡광도로 나타냈다. pH 측정은 pH METER(HORIBA, F-55)기를 사용하여 실시하였다.

다. Bacteriocin 생산 균주의 항균 활성 측정

(1) 균주 LK7, VK24

균주의 항균 활성 측정을 위해 *L. anguillarum*이 도말 되어 있는 LB배지에 bacteriocin 생산 균주의 배양액 100 μ l를 paper disk를 이용하여 *L. anguillarum*의 생육이 저해 되어 나타나는 clear zone의 크기를 측정하여 확인하였다.

(2) 균주 ZEN102

균의 항균 활성 측정은 먼저 *M. luteus* 이 도말 되어 있는 BHI 배지에 paper disk 방법으로 균의 생육이 저해 되어 나타나는 Clear zone을 확인하여 측정 하였다.

라. 내재 plasmid 확인

일부 bacteriocin의 경우 내재 plasmid에서 발현되었다는 연구보고를 토대로(19) LK7과 VK24균주에 대해 alkali lysis method를 이용하여 plasmid를 정제한 결과 두 균주 모두 plasmid를 내재하고 있지 않은 것으로 확인되었다. (Fig. 28)

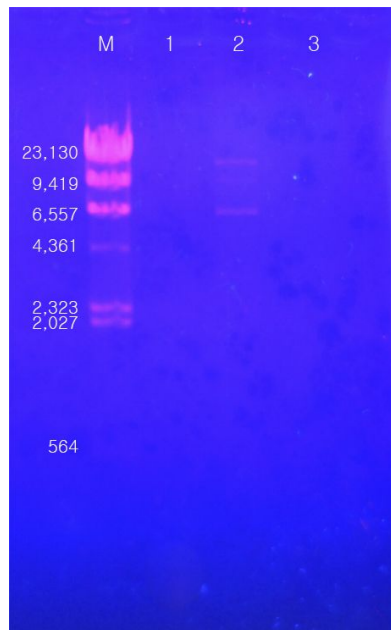


Fig. 28. Agarose gel electrophoresis of purified plasmid

- M : λ DNA/HindIII marker
- 1 : *A. sp.* LK7 (none)
- 2 : *E. coli* BL21 + pET28a
- 3 : *V. sp.* VK24 (none)

6. 항균물질 생산 최적 조건 검토

가. 선발균주의 최적 배양조건

(1) 균주 ZEN5, ZEN49

초기 유용미생물의 탐색에서 확보된 다수의 균종 중 Gram positive 균인 연쇄상구균증을 유발하는 *straptococcus iniae*의 활성을 저해할 수 있는 ZEN5, ZEN49의 균주를 대상으로 항균물질의 생산 최적화 시도를 하였다. 이를 위한 실험에서 비교균주로는 KCTC2013균주를 사용하였다.

각 균주의 성장에서 5h부터 증식기가 시작되고 10h부터 안정기에 도달하였다. 또한 단백질 정량분석은 접종 전 배지 내의 질소원에 속하는 peptone의 양이 많은 관계로 단백질 간섭현상이 있어 균이 생성하는 단백질에 대한 구분은 뚜렷하지 않았으나 초기 단백질량이 소폭 감소하다가 다시 증가되고 또 급격한 감소를 반복하는 현상을 보여주어 단백질 총량의 뚜렷한 구별은 힘들었다.

Soft agar를 이용한 시간별 항균활성 검증에서는 ZEN5, ZEN49, ZEN2013 세 균주들은 30시간 이후 그 활성이 떨어졌으나 80시간 이후까지도 배양액 내의 활성이 있는

것으로 나타났다. 특히 ZEN2013균주의 경우 다른 두 균주에 비하여 활성이 높게 나타났다는데 이는 다른 균주에 비해 균성장이 빨라 배양액 내의 균 밀도가 높은 이유로 판단된다. 이에 반해 ZEN5 strain은 균 생육이 다른 두 균주에 비해 매우 느린 것으로 나타났다.

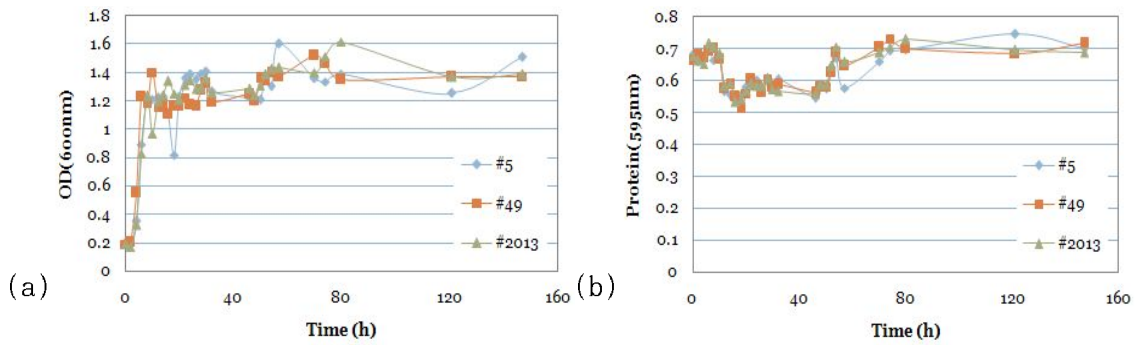


Fig. 29. Growth curve of antimicrobial strain and amount of total protein

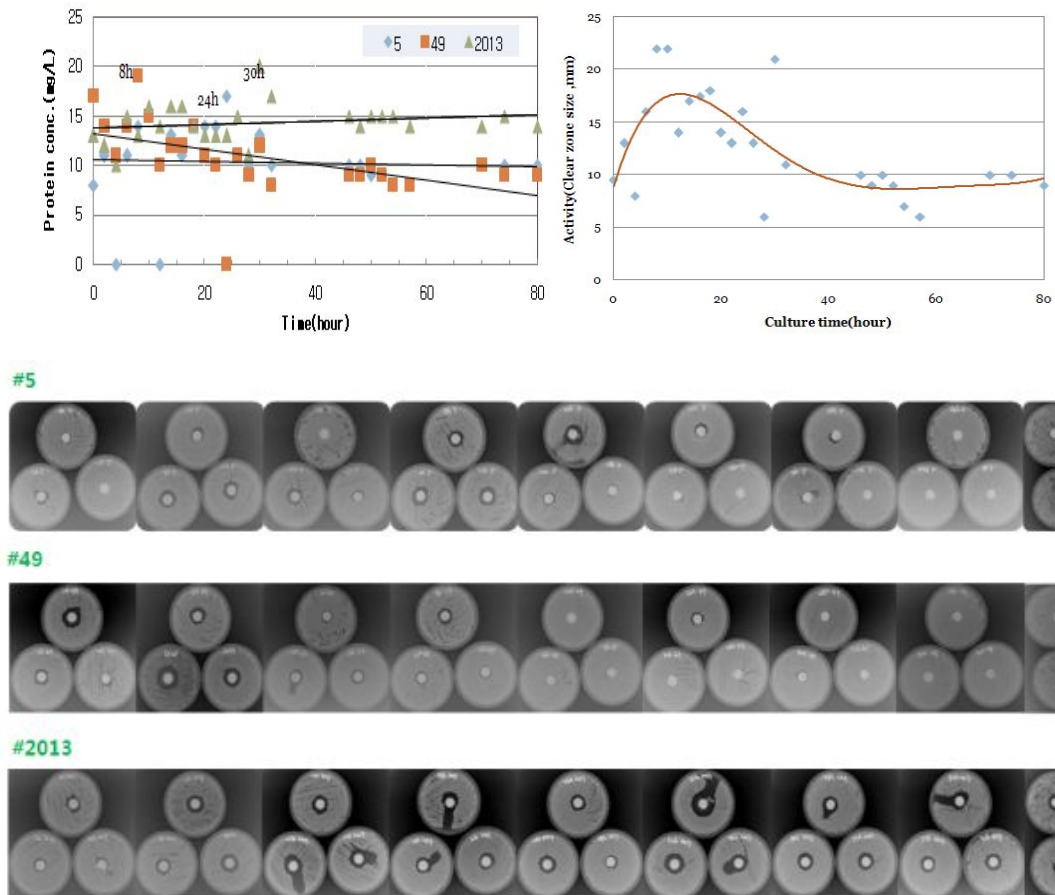


Fig. 30. Antimicrobial activity of selected strains

(2) 균주 LK7, VK24

LK7균주의 bacteriocin생산은 LB(triptone 1%, NaCl 0.5%, Yeast extract 0.5%)에서 30℃, 24시간 180rpm으로 진탕배양하였고, VK24균주는 NSS solution(NaCl 1.76%, Na2SO4 0.147%, NaHCO3 0.008%, KCl 0.025%, KBr 0.004%, MgCl2·6H2O 0.187%, CaCl2·2H2O 0.041%, SrCl2·6H2O 0.0008%, H3BO3 0.0008%)이 첨가된 MRS 배지에 접종하여 30℃에서 24시간 정지배양하였다.

LK7 균주를 LB 액체 배지에 접종하여 30℃에서 24시간 배양한 결과는 Fig. 31과 같이, 배양 후 10시간이 지나면서부터 정지기에 접어들었다.

bacteriocin 생산은 접종 후 균성장과 함께 생산되었으며, 배양 10시간째 최대 항균활성을 나타내었으며 배양 24시간까지 유지되다가 차츰 감소하는 것으로 나타났다. 또한 VK24 균주를 NSS MRS 액체 배지에 접종하여 30℃에서 배양한 결과는 Fig. 32과 같이, 배양 후 20시간이 지나면서부터 정지기에 접어드는 것으로 나타났다. bacteriocin 생산은 접종 후 8시간 이후부터 생산되었으며, 배양 18시간에서 최대 항균활성을 나타내었다.

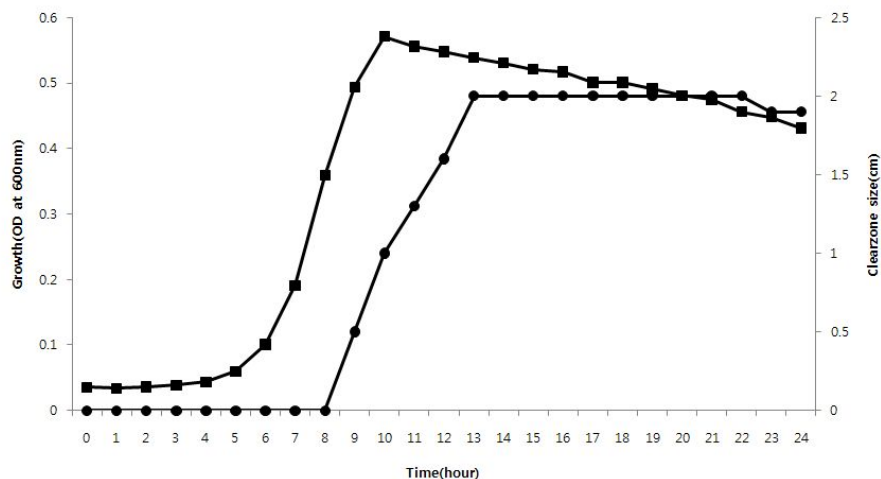


Fig. 31. Cell growth curve and clearzone size of *A. sp.* LK7

■ : cell growth curve, ● : clearzone size

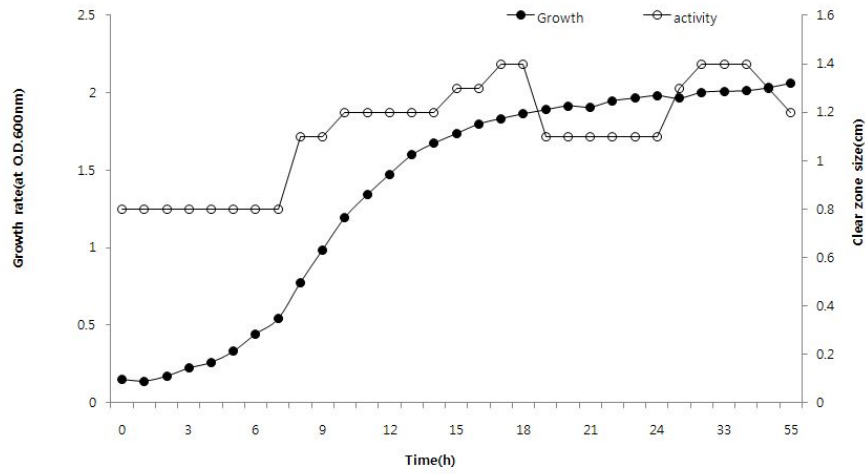


Fig. 32. Cell growth curve and clearzone size of *V. sp.* VK24

(3) 균주 ZEN102

ZEN102 균주의 박테리오신 생산은 BHI, MRS배지(1L제조량 1/3 수준)에서 30℃, 24 시간 동안 정체 배양하여 박테리오신을 생산하였다. BHI 배지에 접종하여 30℃에서 배양한 결과는 Fig.33과 같았다. 균체 증식은 배양 8시간이 지나면서부터 정지기에 들어가는 것으로 나타났다. 박테리오신 생산은 접종 후 2시간후 생산되어 8시간만에 최대 생산량을 나타내었으며 2시간 동안 유지되다가 시간이 지나면서 감소하는 경향을 나타냈었다.

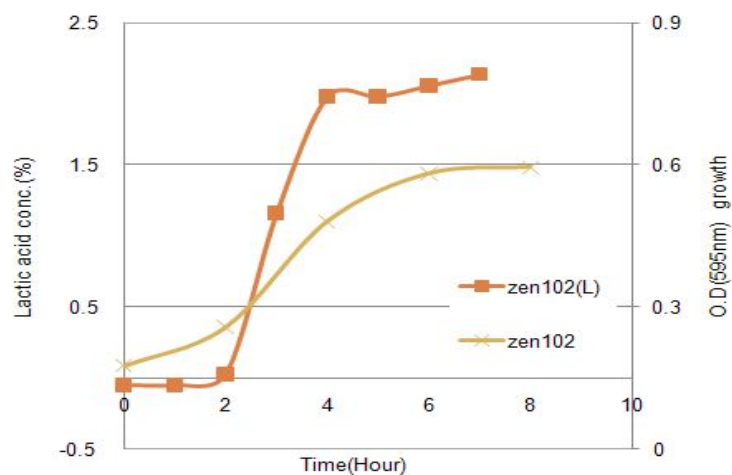


Fig. 33. ZEN102 growth and production lactic acid content

7. 배양시 첨가물(Skim milk)에 따른 항균물질의 활성

유산균의 특성에 따른 배지 첨가물질의 영향 유무를 판단하기 위해서 ZEN5, ZEN49, ZEN2013 균주에 Skim milk를 혼합 배양하여 그에 따른 생육도 및 항균반응 실험을 실시하였다. 배양 균주는 ZEN5, ZEN49, ZEN2013를 over night seed culture 한 후 MRS Broth에 Skim milk 0%, 1%, 2%, 10% 각각 첨가하여 71시간까지 다른 배지의 첨가없이 batch 배양하면서 각 단위 시간별 1ml씩 sample을 50배 희석하여 650nm에서 OD를 측정하여 균의 생육도를 관찰하였다. 또한 항균실험을 위해서 1% 병원균을 soft agar에 분주하여 시간별 상등액 50 μ l의 활성을 paper disk 법으로 실험을 동시에 진행하였다.

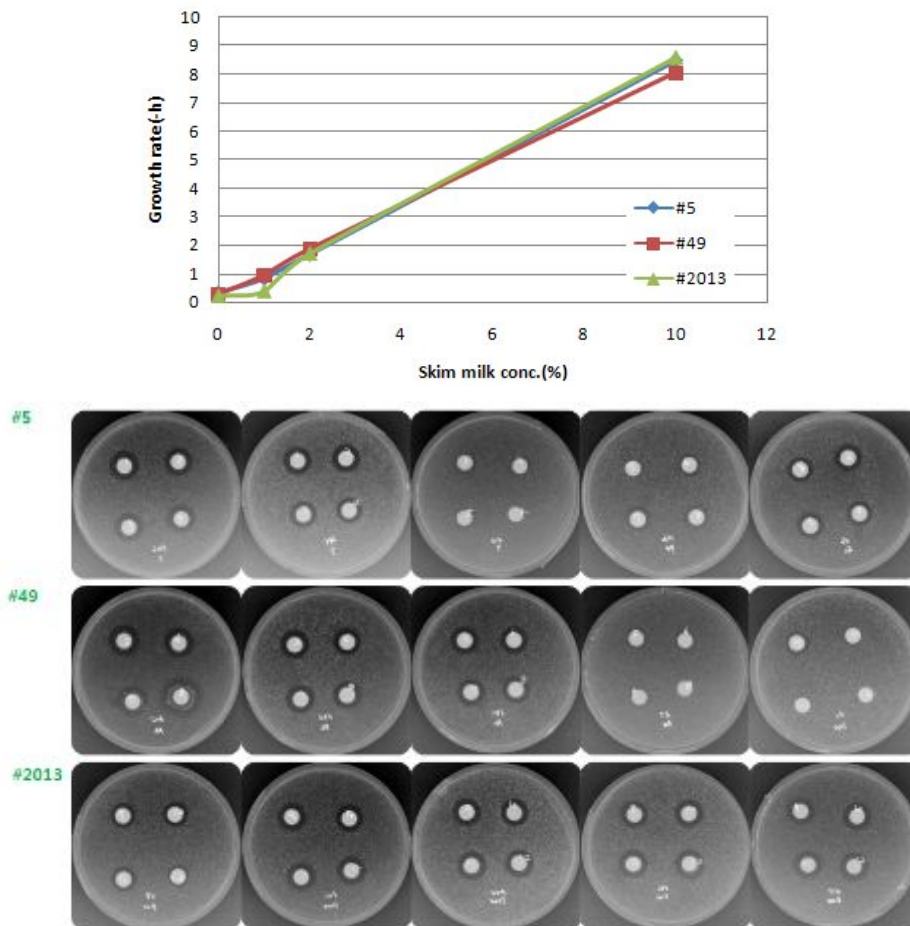


Fig 34. Antimicrobial activity and growth rate with concentration of skim milk

(ZEN5, ZEN49, ZEN2013 : ①skim milk 0%, ②:ZEN2013+skim milk 1%,
③:ZEN2013+skim milk 2%, ④:ZEN2013+skim milk 10%)

그 결과 Skim milk 첨가에 따라 균성장율에는 영향을 미치지 않지만 항균활성에는 영향을 미치는지 뚜렷한 결과는 얻지 못했다. 따라서 초기 skim milk의 적정투입을 통해 균의 생육을 높여 전체적인 배양시간을 단축시키는 효과는 기대할 수 있을 것으로 판단된다. 단, 각 균의 특성에서 배양시간이 길어질수록 배양액 내의 항균물질의 활성 감퇴가 일어나는 것으로 나타나 균주에 따른 최적 배양시간의 결정이 필요할 것 같다. ZEN5, ZEN49의 경우 배양 시간 28시간이 지난 후 활성이 감소되었으나 ZEN2013의 경우 71시간이 경과한 후에도 활성이 나타나는 것으로 관찰되었다. 그러나 대체적으로 활성 정도의 차이는 크게 나타나지 않아 12~24시간 내에 배양시간을 결정함이 경제적인 것으로 판단된다. 단, 항균활성의 지속적 안정성면에서는 상당한 역할을 하고 있는 것으로 판단된다.

8. 항균물질 생산의 최적 조건

가. pH에 대한 영향

(1) 균주 ZEN25

항균물질의 생성에서 특히 유산생성균의 경우 산도가 높아지므로 항균물질의 생성이 낮아지는 것으로 보고되어 본 실험에서도 pH에 대한 영향을 조사하였다. 온도조건은 25℃로 결정하고 pH조건을 sodium phosphate buffer를 이용하여 각각 달리 조성하여 ZEN49번균주에 대하여 실험을 실시하였다. 실험결과 초기 배지의 pH를 가장 높게 한 pH는 7.0 배양액의 항균활성이 가장 높게 나타났고 지속력 또한 23시간 이후 더 큰 차이를 보이는 것으로 나타났다.

(2) 균주 LK7, VK24

LK7 균주와 VK24 균주의 생육에 미치는 pH의 영향을 조사하기 위해 배지의 pH를 3.0에서 11.0까지 단계별로 조정하여 배양한 결과 Fig. 36와 Fig. 37에서와 같이 LK7 균주의 경우 균 성장은 pH 7.0~9.0의 범위에서 가장 좋게 나타났고, pH 6.0이하와 10.0이상에는 균 성장이 저해 되는 것으로 나타났으며 VK24 균주의 균 성장은 pH 6.0~9.0의 범위에서 가장 좋게 나타났고, pH 6.0이하에서는 균 성장이 저해 되는 것으로 나타났다.

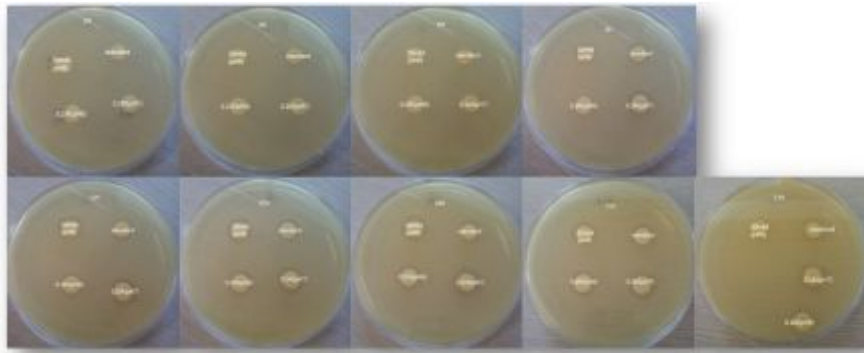
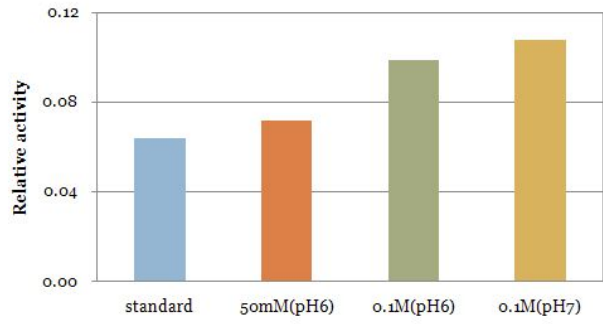


Fig 35. Antimicrobial activity and growth rate with pH

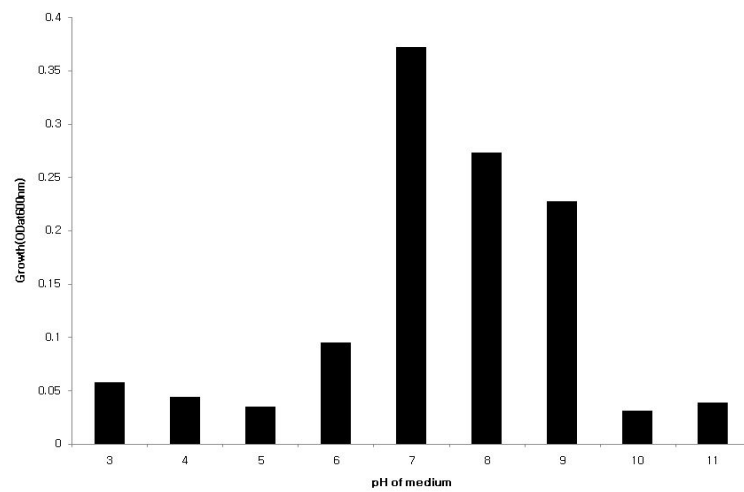


Fig. 36. Growth of *A. sp. LK7* with various pH.

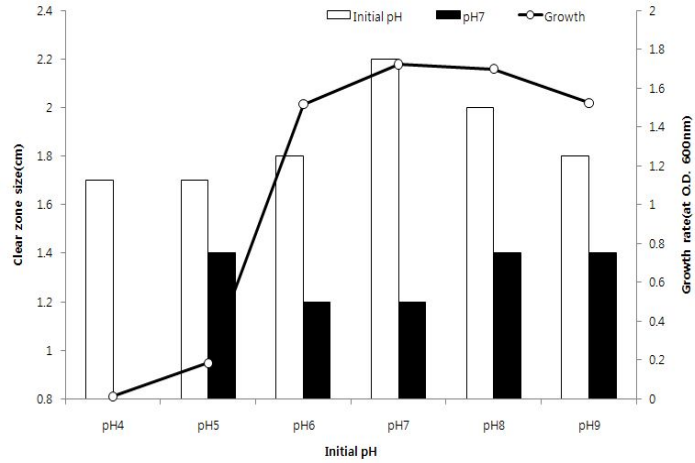


Fig. 37. Growth of *V. sp.* VK24 with various pH.

(3) 배양온도에 따른 영향

(가) 균주 LK7, VK24

LK7 균주와 VK24 균주의 생육 최적온도를 조사하기 위해 20℃~60℃ 온도에서 각각 균을 배양하여 균 성장을 조사한 결과 두 균주 모두 30℃에서 가장 높은 성장을 나타내었다(Fig. 38, 39).

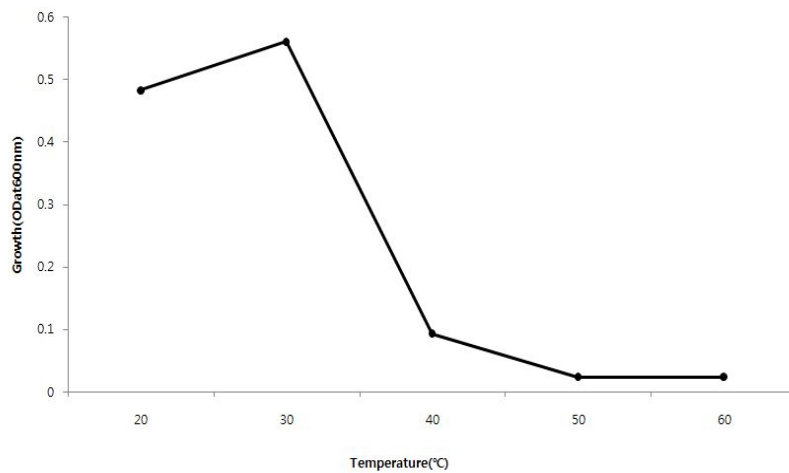


Fig. 38. Growth of *A. sp.* LK7 with various temperature.

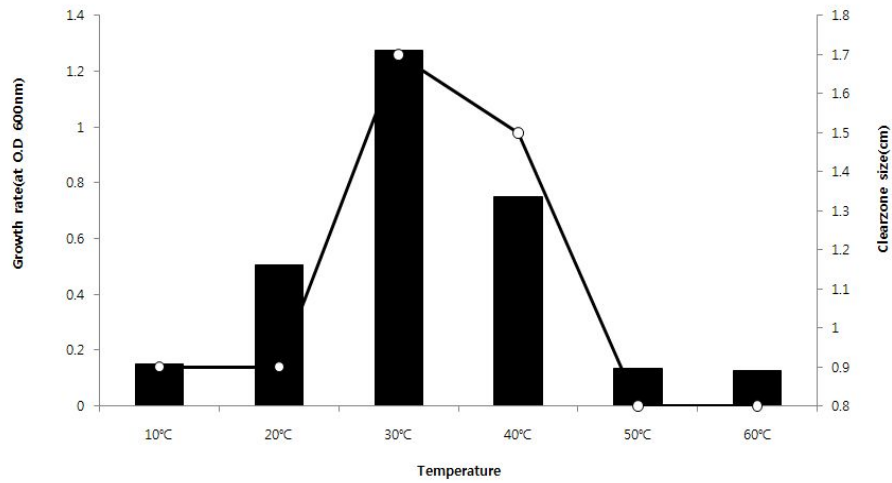


Fig. 39. Growth of *V. sp. VK24* with various temperature.

Symbol: ■, growth: —, antimicrobial activity(cm)

(4) 배양 조건의 영향

(가) 균주 LK7, VK24

배양조건에 따른 균의 성장을 알아보기 위해 정치배양과 진탕배양으로 나누어 실험한 결과 LK7 균주의 경우 Fig. 40에서와 같이 정치배양보다는 진탕 배양에서 높은 성장을 확인하였으며, VK24균주의 경우에는 Fig. 41에서와 같이 진탕 배양보다는 정치 배양에서 더 높은 성장을 확인하였다.

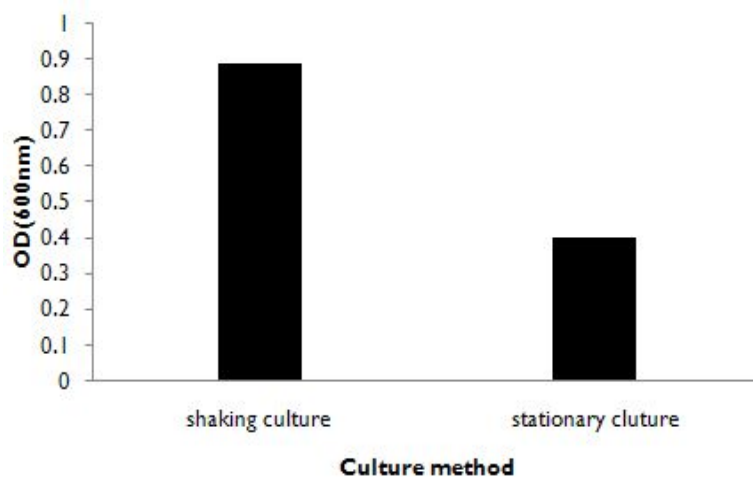


Fig. 40. Growth of *A. sp. LK7* with culture method.

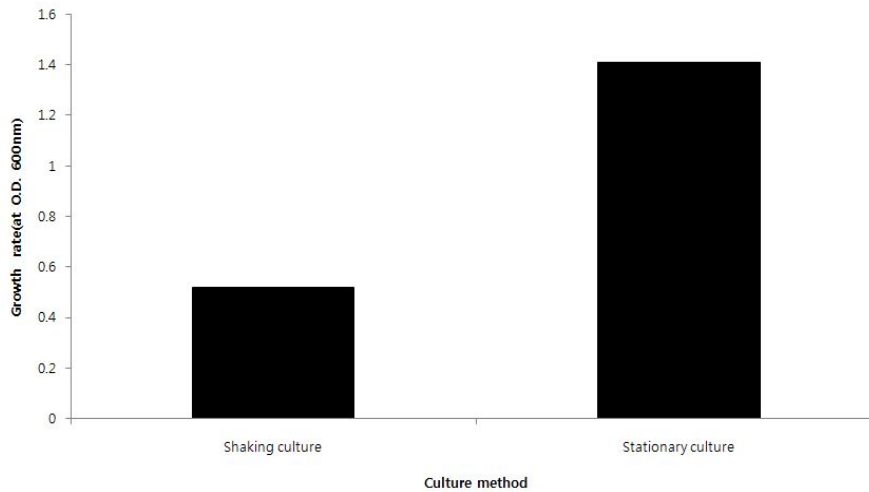


Fig. 41. Growth of *V. sp.* VK24 with culture method.

9. 향균물질의 pH 안정성

가. pH 안정성

(1) 균주 LK7, VK24

pH에 대한 안정성을 검토하기 위해서 bacteriocin 100 μ l에 pH 3.0에서 11까지로 조정된 buffer를 1:1로 첨가하여 4 $^{\circ}$ C에서 12시간 전처리한 다음 잔존 향균활성을 측정하였다. 이때 pH 3.0~6.0은 100mM citric acid buffer로, pH 6.0~8.0은 100mM sodium phosphate buffer로, pH 그리고 pH 9.0~11.0은 100mM sodium carbonate buffer를 이용하였다.

그 결과 LK7의 경우 pH8.0 이상에서 향균활성이 점차 감소되었으나 pH 7.0이하에서는 향균활성이 소실되지 않는다는 것을 확인 할 수 있었다(Fig. 42). 또한 VK24의 경우 모든 범위의 pH에서 70%이상의 잔존 향균활성을 나타내었으며, pH6.0과 7.0 사이에서 최대 향균활성을 나타내었다(Fig. 43).

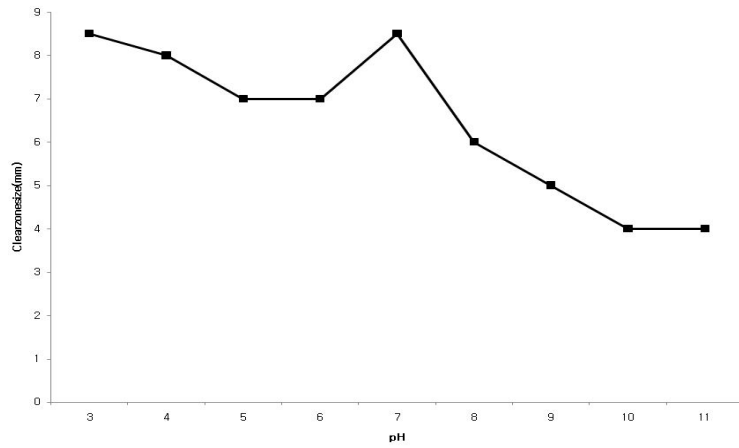


Fig. 42. Effect of pH on the stability of bacteriocin from *A. sp.* LK7.

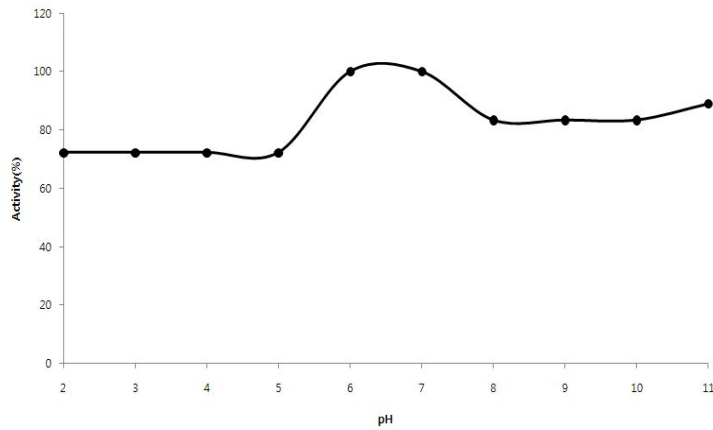


Fig. 43. Effect of pH on the stability of bacteriocin from *V. sp.* VK24.

(2) 균주 ZEN102

pH 안정성 실험을 위해 pH condition : 1M Potassium phosphate(pH 보정: 4.23, 5.02, 6.00), 1N-NaOH(pH 보정 : 5.05, 6.16, 8.0)로 보정하였으며, 대상균주로써 *M. luteus*, *L. anguillarum*, *S. arueus*를 사용 하여 paper disk법 방법을 이용하여 저해환을 확인하였다.(Fig. 44)



Fig. 44. Effect of pH on the stability of ZEN102

(3) 균주 ZEN102 : 정제 박테리오신

pH에 대한 안정성을 검토하기 위해서 부분 정제된 박테리오신을 pH 2.0에서 11.0 까지 완충용액(1M HCl, 1N-NaOH)으로 혼합하여 pH를 고르게 한 후 잔존하는 활성을 측정하였다.

그 결과(Fig. 45) pH2.0에서도 활성이 그대로 유지되었으나 pH 7이상에서는 부분적으로 활성이 소실되었으며 pH10 에서는 항균 활성이 완전히 소실되었다. 따라서 본 박테리오신은 pH가 낮은 조건에서 안정성이 증가하는 것으로 나타났다.

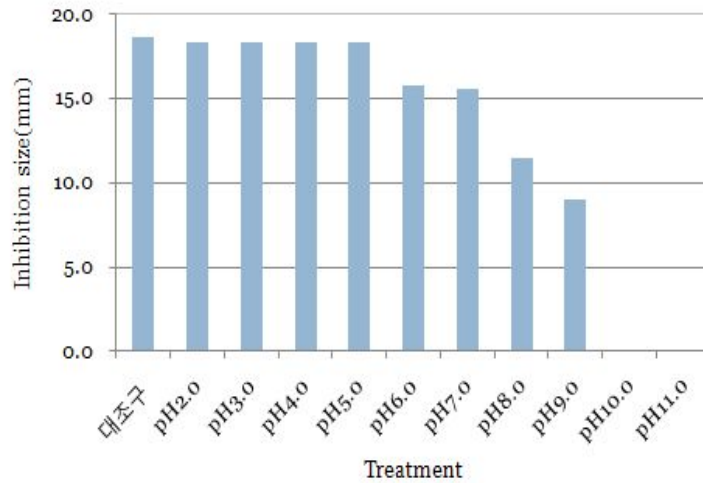


Fig. 45. Effect of pH on the stability of bacteriocin ZEN102

10. 항균물질의 열 안정성

가. 균주 ZEN5, ZEN49, ZEN2013

100℃ 열처리에서 시간의 경과에 따른 안정성 실험에서 Nisin에 비해서 culture broth 내에는 약 1mg/ml nisin의 70%에 속하는 약 0.6~0.8mg/ml 농도의 항균물질이 존재하는 것으로 추측할 수 있었고, 이 농도는 시간의 변화에 따라 nisin의 활성과 비례적인 효과를 나타내는 것으로 관찰되었다. 이에 따라서 ZEN5, ZEN49, ZEN2013 균주 모두 일반적인 가온하의 열안정성이 우수한 항균물질을 생산하는 것을 알 수 있었다.

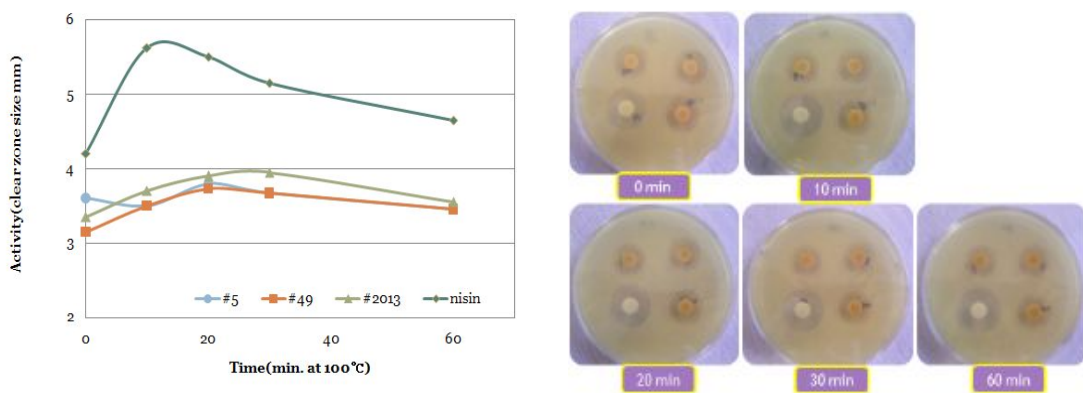


Fig 46. Effect of temperature on the stability of antimicrobial agent

이에 따라서 121°C에서 15min 멸균조건을 거친 경우에도 활성이 나타나는 거의 여부를 알기위해서 실험을 하였고, 이 결과 역시 ZEN5, ZEN49, ZEN2013 균주는 각각 100°C 20min. 의 활성 효율과 비교하였을 때 약 25%, 26%, 24% 그리고 nisin(sigma)은 15%의 활성감소만 있었을 뿐 활성이 유지되는 것으로 나타났다. 여기서 같은 조건하임에도 Nisin에 비하여 활성감소의 차이가 나타나는 것은 순수한 정제상태가 아닌 culture media가 공존하고 있고 기타 protein들이 함유되어 있어 그 영향을 받고 있기 때문으로 판단된다.

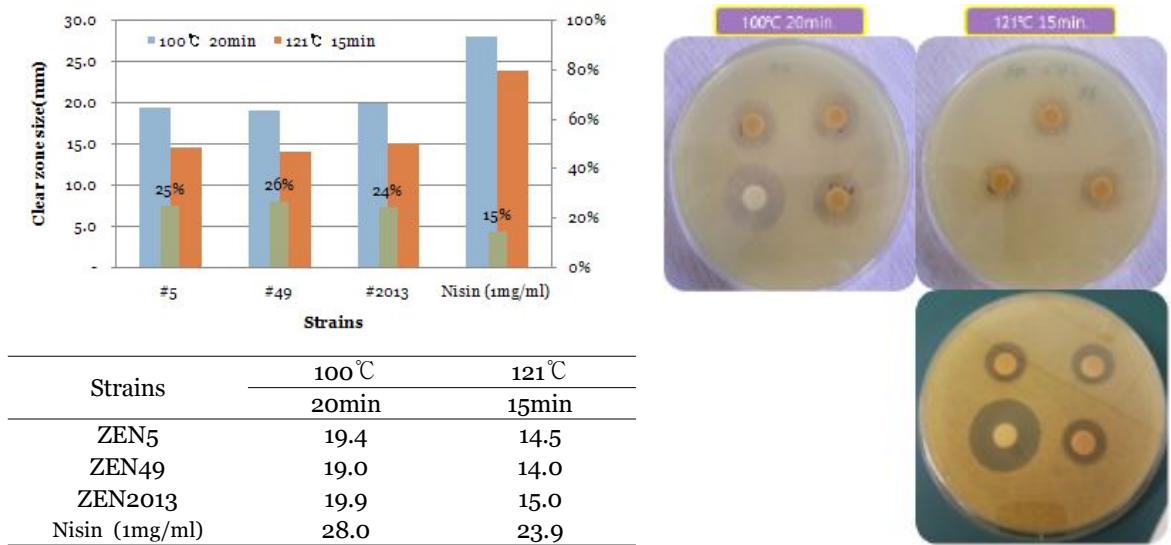


Fig 47. Thermostability with autoclaving

나. 균주 LK7, VK24

Bacteriocin의 열에 대한 안정성을 검토하기 위하여 10°C, 20°C, 30°C, 40°C, 50°C, 60°C, 70°C, 80°C 90°C, 100°C에서 3시간 동안 각각 열처리한 다음 잔존 항균 활성을 측정하였다

그결과, LK7균주가 생산한 bacteriocin의 경우 (Fig. 48) 60°C까지는 활성을 그대로 유지 하였으며 70°C 이후부터 항균활성이 감소되는 것을 확인 할 수 있었다. 또한 VK24의 경우 10°C~100°C까지 모두 항균활성을 나타냈으며, 넓은 범위의 온도에서 ZEN102 안정한 것으로 확인되었다(Fig. 49).

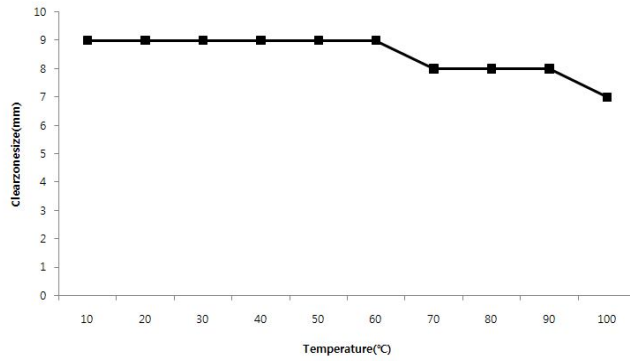


Fig. 48. Effect of temperature on the stability of bacteriocin from *A. sp.* LK7.

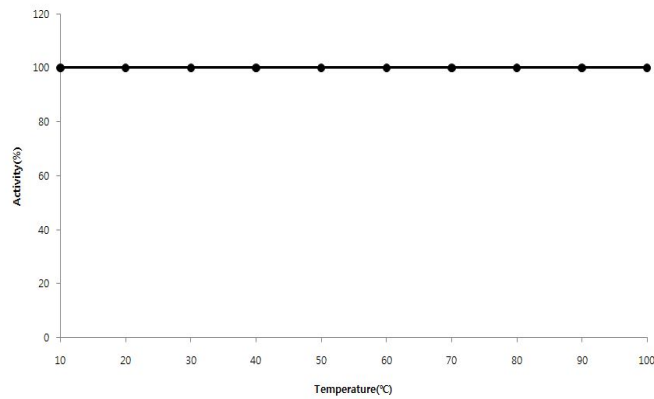


Fig. 49. Effect of temperature on the stability of bacteriocin from *V. sp.* VK24.

다. ZEN102 균주의 배양액

Bacteriocin 포함된 배양액이 열에 대한 안정성을 검토하기 위하여 100°C에서 10분간 가열하여 대상균주로써 *M. luteus*, *L. anguillarum*, *S. arueus*에 대하여 잔존 항균력을 측정하였다.



Fig. 50. Effect of temperature on the stability of ZEN102.

라. ZEN102 균주의 정제 박테리오신

정제된 박테리오신 물질의 열에 대한 안정성을 검토하기 위하여 40℃, 50℃, 60℃, 70℃, 80℃, 90℃, 100℃에서 30분간, 121℃에서 15분간 열처리한 다음 지시균으로 *M. luteus* 정제된 박테리오신 용액을 열처리하여 잔존 활성을 측정하는 결과는 Fig. 51 과 같았다. 90℃에서 30분간 열처리하였을 때까지는 활성의 변화가 없었으며, 80℃에서 130분간 열처리를 하였을 때 활성이 부분적으로 소실되었다. 121℃에서도 15분간 열처리를 하였을 때는 활성이 나타나지 않았다. 이상의 결과로 미루어 볼 때 박테리오신은 열에 대하여 안정한 것으로 판단되었다. *M. luteus*, *L. anguillarum*, *S. aureus*을 사용하여 잔존활성을 측정하였다.

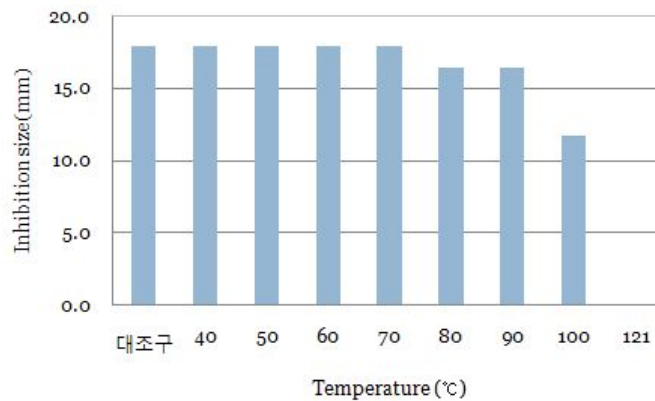


Fig. 51. Effect of temperature on the stability of bacteriocin ZEN102.

11. 효소에 대한 안정성

가. 균주 ZEN5, ZEN49, ZEN2013

각종 소화효소에 및 protein enzyme에 따른 활성저해를 알아보기 위하여 7종의 효소(Catalase, Carboxylase, α -amylase, Trypsin, Protease, Lysozyme, Proteinase K)를 이용하여 ZEN5, ZEN49, ZEN2013 균주가 생산하는 항균성 물질이 효소에 대하여 활성 저해현상을 비교 관찰하였다. 7종의 효소 중 proteinase K를 제외한 모든 효소에서는 활성 저해가 일어나지 않는 것으로 나타나 효소 특이성을 가진 peptide 성 물질임을 알 수 있었다.(Fig. 52)

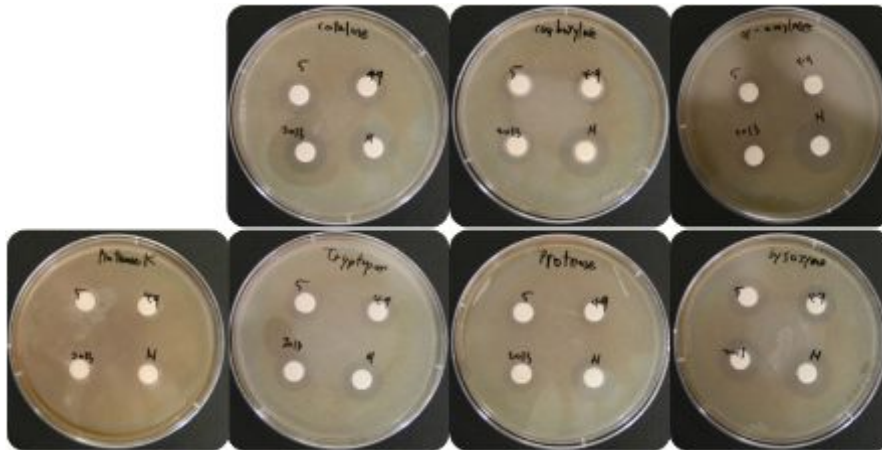


Fig 52. Stability of antimicrobial agent with enzymes

나. 균주 LK7, VK24가 생산하는 bacteriocin에 대한 효소 저해제에 대한 영향

bacteriocin의 효소 저해제에 대한 영향을 알아보기 위하여 효소저해제의 최종농도를 $1 \times 10^{-3} M$ 으로 조정한 후 각 균주 배양액 $180 \mu l$ 에 첨가하여 $4^{\circ}C$ 에서 12시간 전처리 후 잔존 항균활성을 측정하여 효소저해제가 항균활성에 미치는 영향을 검토한 결과 LK7이 생산하는 bacteriocin의 경우 Urea 첨가시에는 항균활성이 200% 증가되었고, Sodium azide, Triton X-100 첨가시에는 50% 실패되었으며, EDTA 첨가시에는 항균활성이 완전히 실패되는 것을 확인하였다.(Table 15) 또한 VK24가 생산하는 bacteriocin의 경우 Sodium azide 첨가시에는 항균활성에 영향을 받지 않았으며, Triton X-100, Tween 80 첨가시에는 88%의 잔존활성이 확인하였고, SDS, EDTA, Urea 첨가시에는 76%이상의 잔존활성을 확인하였다.(Table 16)

Table 15. Effect of various chemical inhibitors on the activity of bacteriocin from *A. sp.* LK7

Chemicals	Residual activity(%)
SDS	100
EDTA	0
Sodium azide	50
Urea	200
Tween 80	60
Triton X-100	50

Final concentration of salts is 10^{-3} M.

The enzyme solution was incubated at various chemical inhibitors at 4°C for 12h and the remaining activity was measured.

SDS : Sodium dodecyl sulfate,

EDTA : ethylenediaminetetraacetic acid,

Table 16. Effect of various chemical inhibitors on the activity of bacteriocin from *V. sp.* VK24.

Chemicals	Residual activity(%)
SDS	76
EDTA	76
Sodium azide	100
Urea	76
Tween 80	88
Triton X-100	88

Final concentration of salts is 10^{-3} M.

The enzyme solution was incubated at various chemical inhibitors at 4°C for 12h and the remaining activity was measured.

SDS : Sodium dodecyl sulfate,

EDTA : ethylenediaminetetraacetic acid,

다. 단백질 분해효소에 대한 영향

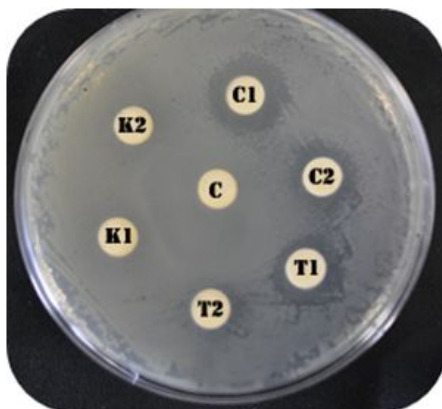
(1) 균주 LK7, VK24

Bacteriocin의 단백질 분해 효소에 대한 영향을 알아보기 위하여 10% proteinase K와 20% trypsin을 첨가하여 50℃, 37℃에서 각각 4시간 전처리 후 잔존 항균활성을 측정하여 단백질 분해효소의 항균활성에 미치는 영향을 검토하였다.

Bacteriocin 농축액에 단백질 가수분해 효소인 protease K, trypsin을 최종 농도 100ug/ml이 되게 하고 50℃에서 5시간 반응시킨 후 잔존 항균활성을 측정한 결과 LK7균주가 생산하는 bacteriocin은 protease K에 의해서는 활성이 100% 소실되었으며 trypsin에 의하여서는 각각 75%, 50%씩 활성이 소실되었으며(Table 17)(Fig. 53), VK24균주가 생산하는 bacteriocin은 protease K에 의해서는 활성이 100% 소실되었으나 trypsin에 의하여서는 저해되지 않는다는 것을 확인하였다.(Table 18)(Fig. 54) 이것으로 각각 균주로부터 생산된 bacteriocin은 단백질성 물질임을 확인할 수 있었다.

Table 17. Effect of antimicrobial activity with Proteinase K and Trypsin for bacteriocin *A. sp.* LK7.

Compounds	Clear zone size(mm)
Bacteriocin	20
Bacteriocin+ddH ₂ O	15
trypsin(10%)	15
trypsin(20%)	10
proteinase k(10%)	0
proteinase k(20%)	0



- C : ddH₂O
- C1 : Bacteriocin
- C2 : Bacteriocin + ddH₂O
- T1 : Bacteriocin + trypsin(10%)
- T2 : Bacteriocin + trypsin(20%)
- K1 : Bacteriocin + proteinase k(10%)
- K2 : Bacteriocin + proteinase k(20%)

Fig. 53. Effect of antimicrobial activity with Proteinase K & Trypsin for bacteriocin *A. sp.* LK7.

Table 18. Effect of antimicrobial activity with Proteinase K for bacteriocin from *V. sp.* VK24.

	None treatment		Proteinase K treatment	
	Normal	Adjust pH7.0	Normal	Adjust pH7.0
Antimicrobial activity(%)	100%	100%	0%	0%



Fig. 54. Effect of antimicrobial activity with Proteinase K for bacteriocin from *V. sp.* VK24.

- 1: Concentrate
- 2: Concentrate treated with proteinase K
- 3: Concentrate adjusted with pH7.0
- 4: Concentrate adjusted with pH7.0 and treated with proteinase K

(2) ZEN102 : 정제 박테리오신

정제된 박테리오신 물질의 단백질 및 탄수화물 분해 효소에 대해 저해 영향을 받는지 알아보기 위하여 단백질 가수분해 효소인 pepsin, trypsin, protease 및 탄수화물 분해 효소 catalase, α-amylase 그리고 세포벽 분해 효소 lysozyme을 20mg/ml 농도로 맞추어 박테리오신 정제액과 1:1 로 혼합하여 37°C에서 1시간 이상 반응 후 100°C에서 열처리 5분간 하여 잔존 효소활성을 종결 후 박테리오신 정제액에 대한 효소 활성 영향을 검토하였다.

표15 에 나타난 바와 같이 pepsin, trypsin에 대해서는 크게 변화가 없었지만 protease와 proteinase-K에 대해서는 각각 100%와 43% 실패 된 것으로 나타나 조정제 된 물질은 단백질로 구성된 것으로 여겨진다. (Table 19.)(Fig. 55)

Table 19. Effect of antimicrobial activity with enzyme

효소처리	<i>M. luteus</i>
대조구	100%
pepsin	88%
trypsin	60%
protease	0%
proteinase-K	57%
catalase	93%
α -amylase	93%
Lysozyme	93%

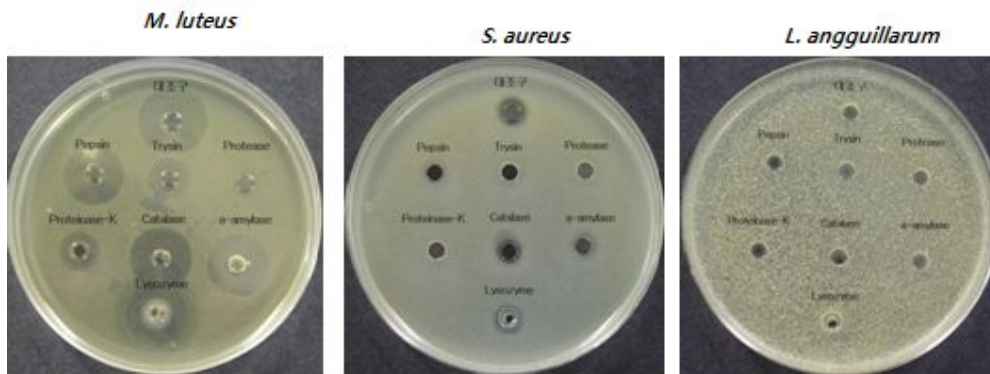


Fig. 55. Effect of antimicrobial activity with enzyme

12. 기타 안정성 검사

가. 금속이온에 대한 영향

(1) 균주 LK7, VK24

Bacteriocin의 금속이온에 대한 영향을 알아보기 위하여 각종 금속이온의 최종농도를 $1 \times 10^{-3} M$ 으로 조정 한 후 각 균주 배양액 $180 \mu l$ 에 첨가하여 $4^{\circ}C$ 에서 12시간 전처리하여 금속이온의 항균활성에 미치는 영향을 검토하였다. 그 결과 LK7이 생산하는 bacteriocin의 경우 $AgNO_3$, $CoCl_2$ 의 첨가에 대해서는 영향을 받지 않았으며, $MnSO_4$ 첨가시에는 50% 실패되었고, $FeSO_4$, $CaCl_2$, $MgSO_4$, $SnCl_2$, $BaCl_2$, $CuSO_4$, $ZnSO_4$ 첨가시에는 항균활성이 완전히 실패 되는 것을 확인하였다. (Table 20) 또한 VK24이 생산

하는 bacteriocin의 경우 AgNO₃ 첨가시에는 115% 항균활성이 증가되었고, BaCl₂, CoCl₂ 첨가시에는 영향을 받지 않았으며, FeSO₄, CaCl₂, MnSO₄, MgSO₄, SnCl₂, CuSO₄, ZnSO₄의 첨가에 대해서는 70%이상의 잔존항균활성을 확인하였다. (Table 21)

Table 20. Effect of various metal ions on the activity of bacteriocin from *A. sp. LK7*.

Metal ions	Residual activity(%)
FeSO ₄	0
CaCl ₂	0
AgNO ₃	100
MnSO ₄	50
MgSO ₄	0
SnCl ₂	0
BaCl ₂	0
CoCl ₂	100
CuSO ₄	0
ZnSO ₄	0

The enzyme solution was incubated at various chemical metal ions at 4°C for 12h and the remaining activity was measured.

Table 21. Effect of various metal ions on the activity of bacteriocin from *V. sp. VK24*.

Metal ions	Residual activity(%)
FeSO ₄	70
CaCl ₂	75
AgNO ₃	115
MnSO ₄	85
MgSO ₄	85
SnCl ₂	75
BaCl ₂	100
CoCl ₂	100
CuSO ₄	75
ZnSO ₄	70

나. Bacteriocin의 최소 저해 농도 MIC(**minimum inhibitory concentration**)

(1) 균주 LK7, VK24

Bacteriocin의 최소억제농도(MIC)를 결정하기 위하여 배양액을 멸균 증류수로 희석하여 실험을 진행하였다. LK7의 결과는 Fig. 56와 같았으며, LK7의 배양액을 5×10^{-2} 이상으로 첨가시켰을 때 *L. anguillarum*의 성장이 저해 되는 것을 확인 할 수 있었다. MIC결과를 바탕으로 활성 단위(activity unit, AU)는 1ml 당 $LD_{50}(5 \times 10^{-2})$ 으로 나타낸 결과 100,000 AU/ml로 나타낼 수 있었다. 또한 VK24의 결과는 Fig. 57과 같았으며 VK24의 배양액을 4.5×10^{-2} 이상으로 첨가시켰을 때 *L. anguillarum*의 MIC를 확인할 수 있었다. MIC결과를 바탕으로 활성 단위(activity unit, AU)는 1ml 당 $LD_{50}(6.8 \times 10^{-2})$ 으로 나타낸 결과 136,000 AU/ml로 나타낼 수 있었다.

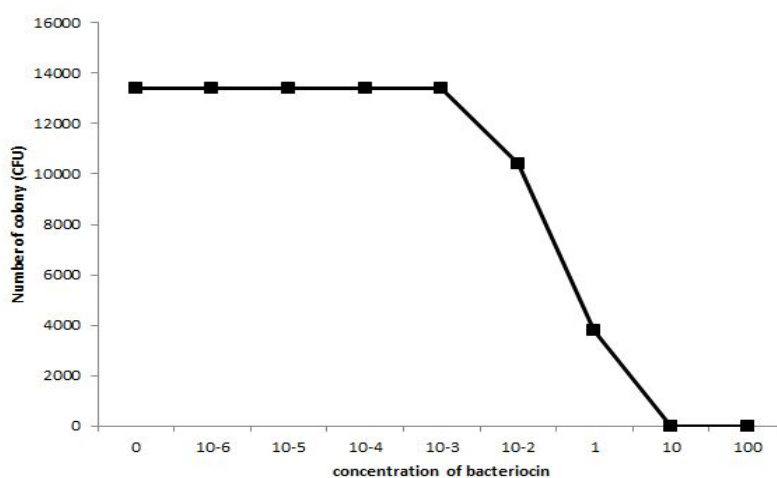


Fig. 56. MIC(minimum inhibitory concentration) of bacteriocin produced by *A. sp.* LK7

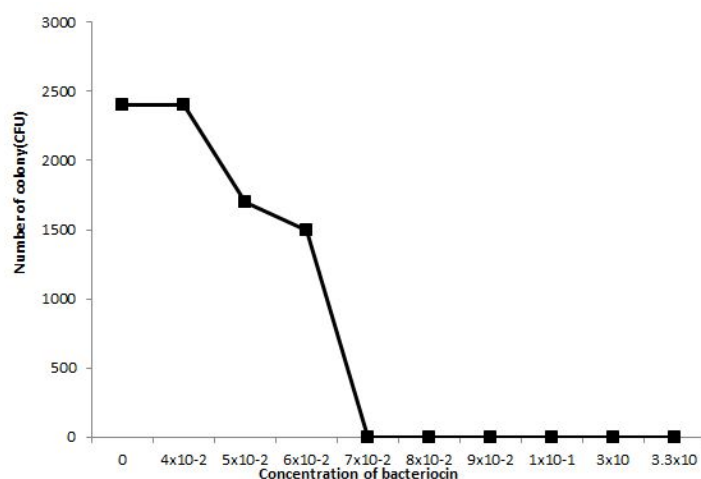


Fig. 57. MIC(minimum inhibitory concentration) of bacteriocin produced by *V. sp.* VK24.

(2) ZEN102 : 정제 박테리오신

최소억제농도(MIC)는 정제된 박테리오신 물질을 일정($160\mu\text{l/ml}$)농도에서부터 증류수로 2배 희석법으로 각각 $80\mu\text{l/ml}$, $40\mu\text{l/ml}$, $20\mu\text{l/ml}$, $10\mu\text{l/ml}$, $5\mu\text{l/ml}$, $1\mu\text{l/ml}$, $0.5\mu\text{l/ml}$, $0.1\mu\text{l/ml}$, $0.05\mu\text{l/ml}$, $0.01\mu\text{l/ml}$, $0\mu\text{l/ml}$ 의 농도 수준에서 지시균 (*Micrococcus luteus*)과 1:1($100\mu\text{l}$: $100\mu\text{l}$)로 반응 시킨 후 96well plate에서 흡광도(OD: 595nm)를 측정하여 최소 저해농도를 확인하였다. 그 결과는 Fig. 58, 59, 60과 같으며, MIC는 *M. luteus* 에 대해 855BU, *S. aureus* 에 대해 4427BU였다.

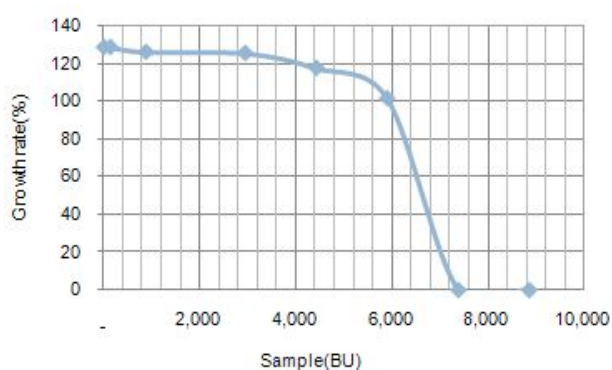


Fig. 58. MIC of antimicrobial agent from strain ZEN102 against *M. luteus*

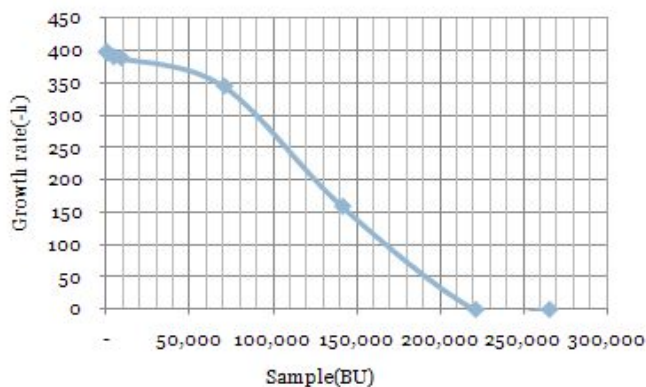


Fig. 59. MIC of antimicrobial agent from strain ZEN102 against *S. aureus*

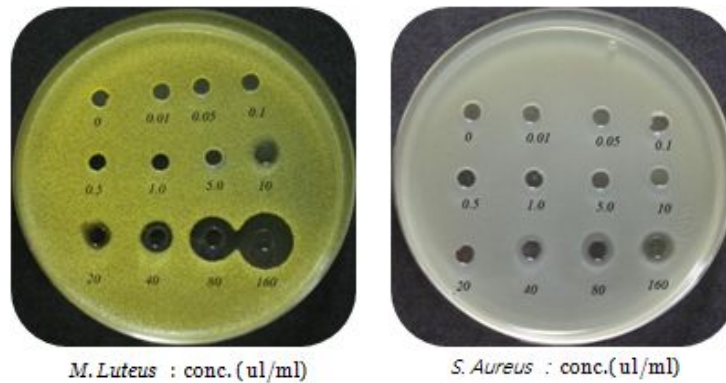


Fig. 60. MIC of antimicrobial agent from strain ZEN102

다. 박테리오신 생산 균주의 유기산(Lactic acid) 측정

(1) 균주 ZEN102

식품중 유기산 측정 방법을 약간 변형하여 박테리오신 항균 물질을 생산하는 ZEN102 strain의 lactic acid 생산량을 알아보았다.

0.1N NaOH 와 lactic acid 와의 역정적을 통해 lactic acid 함량 그래프를 작성 하였다. 0.1 NaOH 소량 과 0.1%페놀프탈레인 용액을 만들어 발색 후 발색된 시료를 0, 4.5, 9, 18, 27, 36 μ l를 취하여 96well plate에 넣고 총 볼륨이 216 μ l이 되도록 증류수를 가하여 OD(495nm)에서 측정 한다.(Fig. 61)

ZEN102를 배양하여 시간대별로 얻은 각 sample에 5배 희석하여 우리가 이미 알고 있는 0.1N NaOH 36 μ l를 첨가 후 OD(495nm)값을 측정 한다. 측정된 시료의 OD값을 환산하여 lactic acid 검량선에 대입하여 유기산 함량을 측정 하였다.

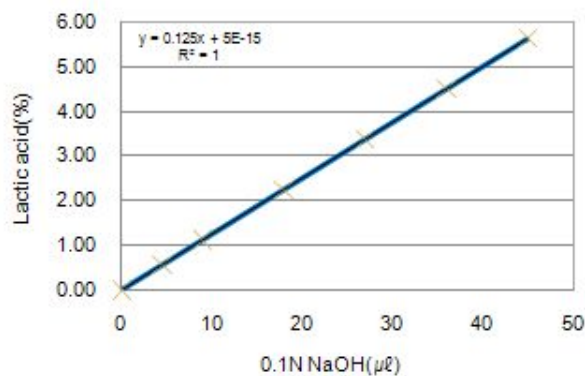


Fig. 61. Standard curve of lactic acid and 0.1N NaOH concentration

그 결과 Fig. 62와 같이 나타났다. lactic acid는 ZEN102균주가 자라기 시작하면서 서서히 양이 증가 하면서 균이 최대 성장을 이루었을 때 latic aid 함량은 2.0 ~ 2.1%정도 함유하고 있는 것으로 측정 되었다.

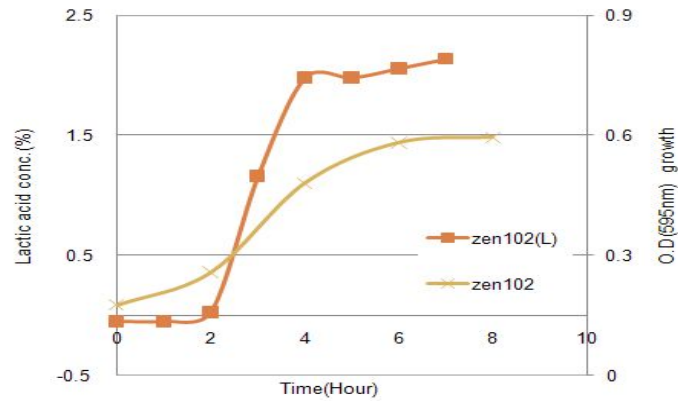


Fig. 62. Lactic acid concentration and growth rate of ZEN102

13. Protein 농축 및 정제

가. 시험균주의 선별

실험 균주 ZEN5, ZEN49, ZEN2013 균주 중 배양액 내의 총 단백질 농도 대비 활성력이 가장 좋은 균주를 선별하기 위하여 실험하였다. 그 결과 ZEN49번 균주가 가장 우수한 값을 나타냈으나, Fig. 63에서와 같이 다른 균주와의 큰 차이는 보이지 않았다. 두 균주 모두 초기 배지성분의 간섭 때문에 Protein의 측정치는 후반부에서 안정되었다.

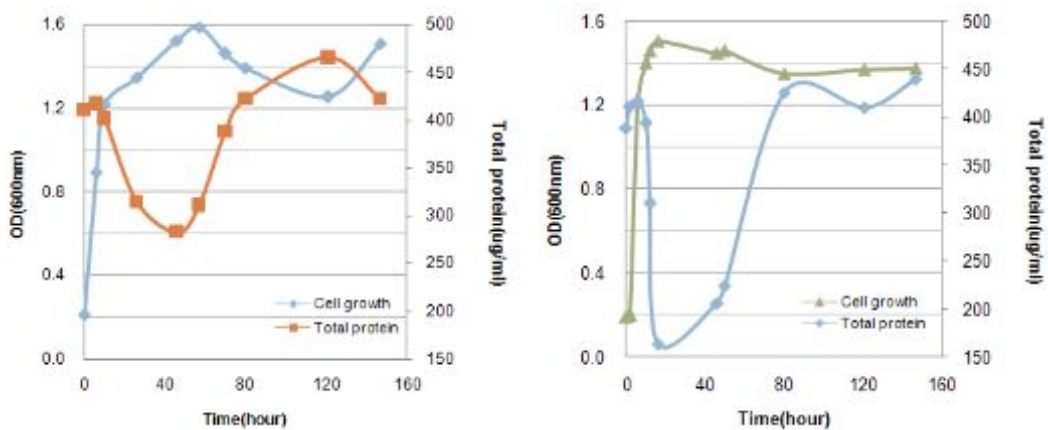


Fig. 63. Growth curve and protein of strains(a)ZEN5, (b)ZEN49

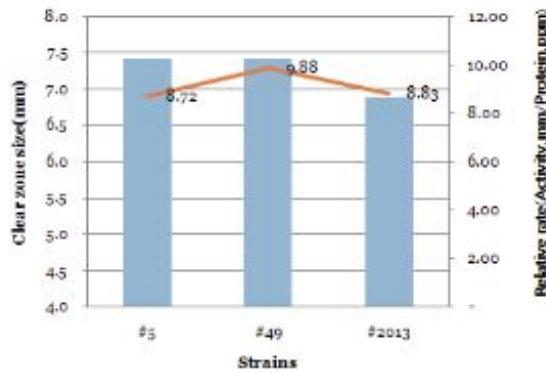


Fig. 64. Antimicrobial activity with total protein

나. 황산암모늄 분획

(1) 실험 방법

5L MRS Broth + Starter 50ml → 96h 배양 (30°C, 150rpm) 후 고액분리(Centrifuge - 30min, 8000rpm, 4°C) 그 후 암모늄 침전(고액분리 상등액 1L에 Ammonium sulfate 30%(176g) 넣은 후 Centrifuge 30min, 8,000rpm, 4°C- pellet 따로 보관), → 다시 상등액에 total Ammonium sulfate 70%(+273g) 되게 하여 Centrifuge 30min, 12000rpm, 4°C-상등액 따로 보관 → Pellet에 10mM tris-HCl buffer(pH.8.0)를 이용하여 Cellulose membrane에 넣어 over night 투석한다. → 투석 후 약 100ml volume의 products를 Membrane에 넣은 상태로 탈습제로 감싸고 over night하여 최종 30ml 확보하였으나 최종 활성은 농축량에 비례하게 나타나지는 않았다.

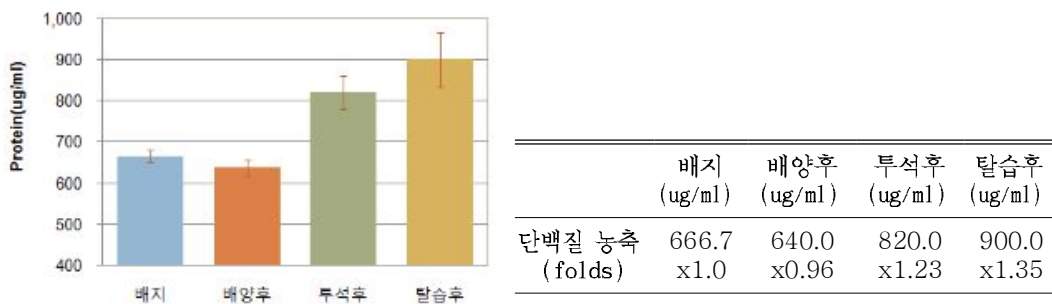
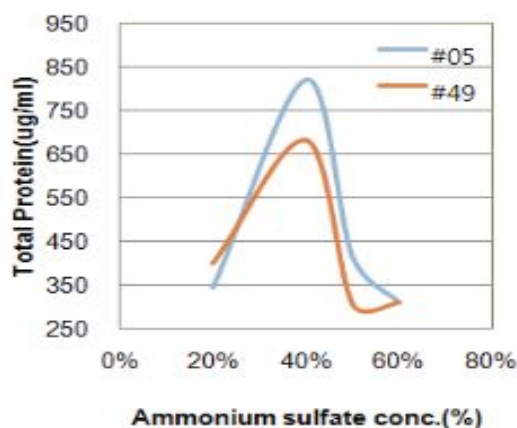


Fig. 65. Protein concentration with ammonium sulfate

(2) 최적 황산암모늄 농도 결정

Ammonium sulfate에 의한 배양액 내의 단백질을 농축하기 위하여 각 농도별

protein 농축 농도를 조사하였다. 그 결과 그림에서와 같이 40%의 ammonium sulfate 첨가에서 가장 높은 protein 농도를 얻었다. 그리고 60% 이상의 농도에서는 단백질 농축이 거의 일어나지 않는 것으로 나타나 최종 40~60%(최적농도 약 50%)의 ammonium sulfate 농도범위에서 농축하는 것이 효율적으로 나타났다.



		20%	40%	50%	60%	Total
ZEN 5	Protein($\mu\text{g}/\text{ml}$)	71.0	728.5	171.0	26.0	996.5
	Dialysis(ml)	28.0	37.0	50.0	50.0	165.0
	Final Protein(μg)	1,988.0	26,954.5	8,550.0	1,300.0	38,792.5
ZEN 49	Protein($\mu\text{g}/\text{ml}$)	148.5	538.5	22.2	28.5	737.8
	Dialysis(ml)	27.0	43.0	30.0	45.0	145.0
	Final Protein(μg)	4,009.5	23,155.5	667.5	1,282.5	29,115.0

Fig 66. Optimal amount of ammonium sulfate for protein concentration

상기의 실험에서 얻은 결과 값을 통해 농축된 protein을 투석하여 여액을 이용한 항균활성실험을 실시하였다. 그 결과 아래의 그림에서와 같이 역시 높은 농축 값을 가진 40%에서 활성이 가장 높게 나타났다. 이 결과 통해 ZEN5은 20%~50%의 농축 pellet에 항균물질을 가장 많이 포함하고 있고, ZEN49은 40%~60%의 농축 pellet에 항균물질의 함량이 높게 포함되어 있음을 알 수 있었다. 이 실험 결과로 비추어 ZEN5, ZEN49 균주의 항균활성을 나타내는 물질이 역시 ammonium sulfate 농축에서 확보할 수 있는 단백질 혹은 그 유사물질의 물성을 띠고 있음을 간접적으로 확인할 수 있었다.

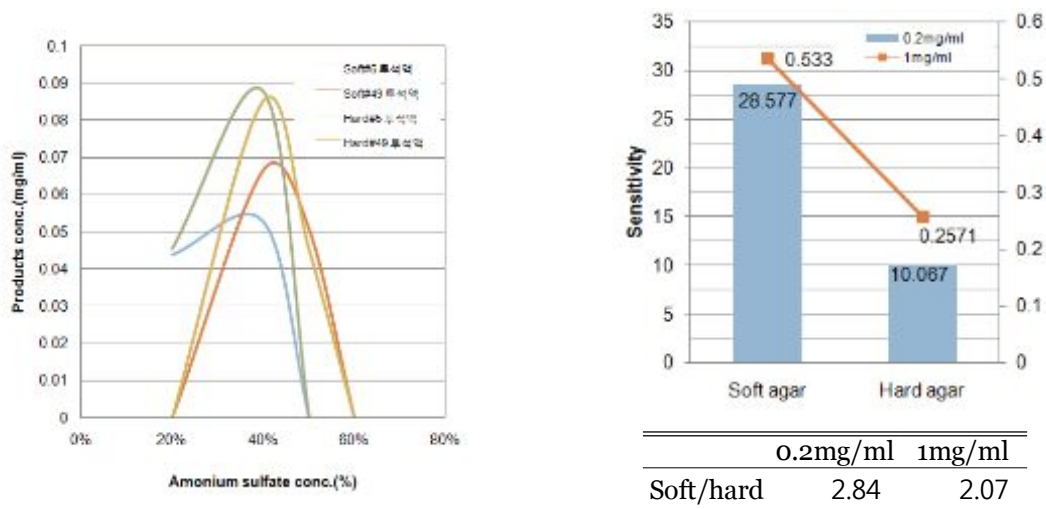


Fig. 67. Antimicrobial activity with a various amount of ammonium sulfate

Table 22. Antimicrobial activity of strain ZEN5 and ZEN49 against *M. luteus* (cm)

투석액ZEN5	20%	40%	50%	60%
A	2.2	2.3	1.2	0.0
B	1.8	2.2	1.2	0.0
C	1.8	2.1	1.2	0.0
ZEN49 투석액	20%	40%	50%	60%
A	0.0	2.2	1.9	1.1
B	0.0	2.5	2.0	1.1
C	0.0	2.6	2.3	1.2

상기의 실험과 동일한 조건으로 실험하여 ZEN5, ZEN2013균주들의 Protein정제도 진행하였다. 그 결과 table 23에서 나타난 것과 같이 각 균주별 회수율을 얻을 수 있었다. 실험에 대한 오차는 있을 수 있으나 차후의 산업적 생산에서는 회수율을 상당 수준 높이는 것이 경쟁력 부분에 상당한 힘을 실어줄 듯하다.

Table 23. Yeild of antimicrobial agent

	Strains	vol(ml)	protein(mg/ml)	lac1(mg/ml)	activity	total Lac 1(mg)	회수율
배양액	ZEN5	983.3	0.539	0.090	1.300	88.333	
	ZEN49	991.5	0.580	0.097	1.300	95.845	
	ZEN2013	988.6	0.573	0.096	1.250	94.411	
투석후	ZEN5	94.9	5.230	0.820	11.700	83.341	88.1%
	ZEN49	95.6	5.880	0.884	12.300	91.021	88.2%
	ZEN2013	91.2	5.784	0.879	11.900	85.008	84.9%

다. Gel filtration

Sephadex G-100 Column(10mM sodium phosphate buffer)으로 ZEN5, ZEN49, ZEN2013 농축 후 투석한 Sample을 3ml 투입하여 Total fraction 40fraction을 채취하였다. 각 Fraction tube는 4ml volume으로 assay는 260nm or 280nm UV absorbance 측정으로 일차 측정하고 다시 각 fraction tube에 대하여 Total protein 분석과 환 실험, 생균항균활성 실험을 실시하였다.

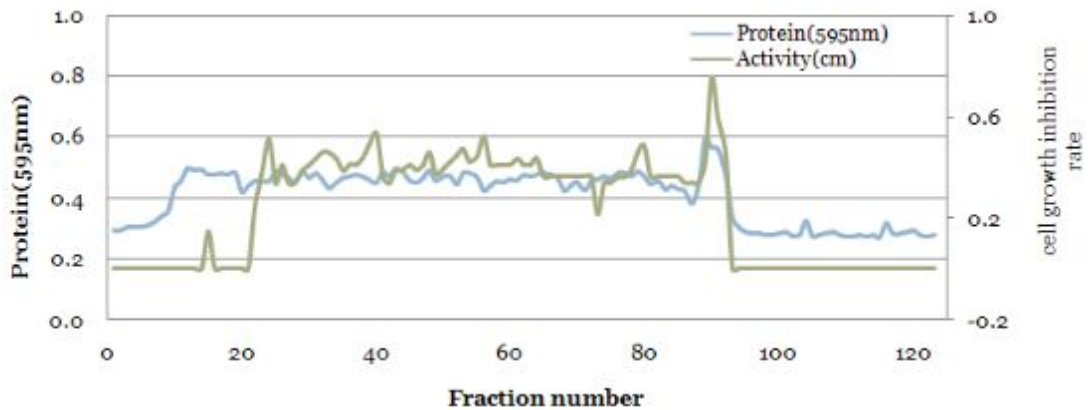


Fig. 68. Gel filtration from ZEN49 strain

실험에서 초기 20fraction에서 clear zone이 형성된 반면 직접적인 생균활성 실험에서는 초기 7번 fraction부터 이미 활성이 나타나기 시작했다. 이 시점부터 역시 Protein이 증가되어 더 이상 cm-sephadex에 protein의 흡착이 일어나지 않는 것으로 추측할 수 있었다. 그 후 80fraction에서 elution이 시작된 후 87fraction에서 protein량이 급격히 증가하는 것으로 나타났으며 이 fraction에서 역시 활성도도 높게 나타나 cm-sephadex에 흡착되는 단백질 혹은 peptide성 물질임을 알 수 있었다.

이 실험을 통해 column을 이용한 semi continue 방법으로 products를 얻을 수 있는 가능성을 타진할 수 있었고 나아가 산업적 응용에서 보다 효율성을 높일 수 있을 것으로 기대된다.

라. 정제된 lacI의 SDS-PAGE

우선적으로 ZEN49의 정제된 products를 이용하여 Protein 전기영동을 실시하였다. Fig. 69에서와 같이 marker 1.7kDa과 4.6kDa에서 LacI으로 추정되는 물질이 나타났다. 분자량이 작아서 특별히 ion chromatography를 생략한 상태임에도 비교적 독립

적인 size 영역을 가지는 것을 알 수 있었다. 이 물질은 약 3,800Da의 크기로 추정되며 보다 명확한 특성을 알기위해서 보다 순수한 수준까지 정제하는 실험을 계속 진행하고 있다.

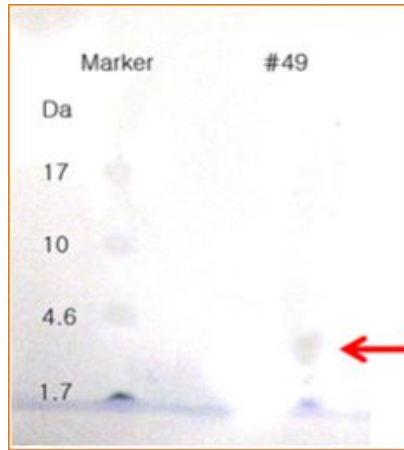


Fig. 69. SDS-PAGE of antimicrobial agent from strain ZEN49

마. Bacteriocin 물질의 정제

(1) LK7균주가 생산하는 bacteriocin의 정제

LK7균주가 생산하는 bacteriocin의 정제를 위해 pH에 따라 bacteriocin을 균체에 흡착시키고 떼어내는 방법을 이용하여 진행하였다. 먼저 균체가 포함되어 있는 배양액의 pH6.0으로 조정하여 생산되어 있는 bacteriocin을 LK7균체에 흡착 시킨다.(Fig. 70, 71) 그 후 원심분리를 통해 균체를 회수 한 다음 1M NaCl(pH2.0)에 현탁시켜 균체에 흡착되어 있던 bacteriocin을 회수하였다.(Fig. 72, 73)

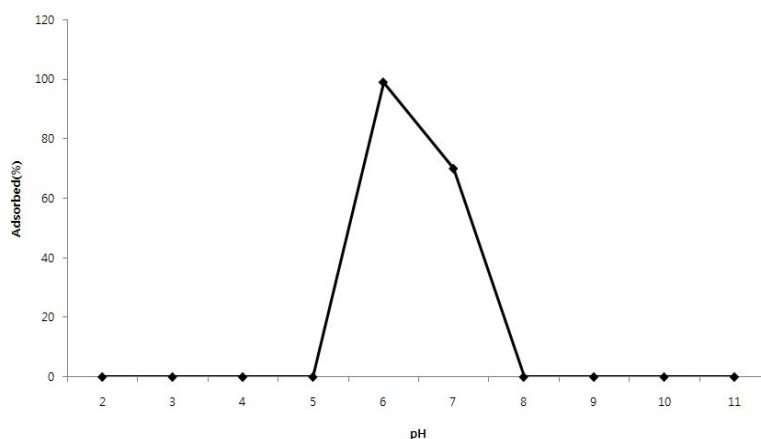


Fig. 70. Adsorption of bacteriocin onto producing cell.

Bacteriocin was adsorbed to the cells at pH 6.0

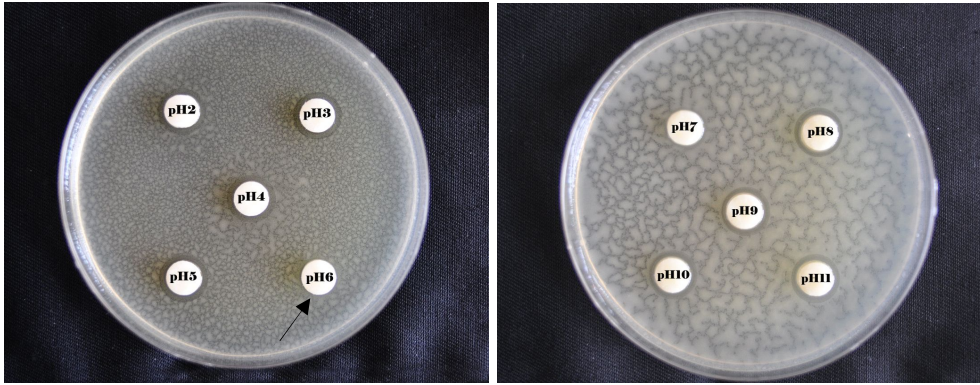


Fig. 71. Antimicrobial activity of adsorbed bacteriocin against *Listonella anguillarum*.

Bacteriocin was adsorbed to the cells at pH 6,0

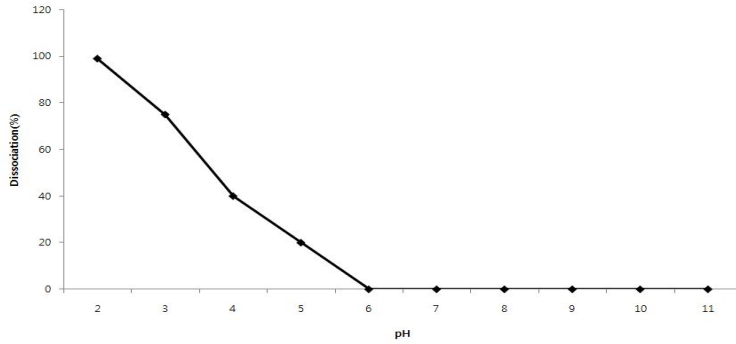


Fig. 72. Dissociation of bacteriocin onto producing cell.

Bacteriocin was released to the cells at pH 2,0

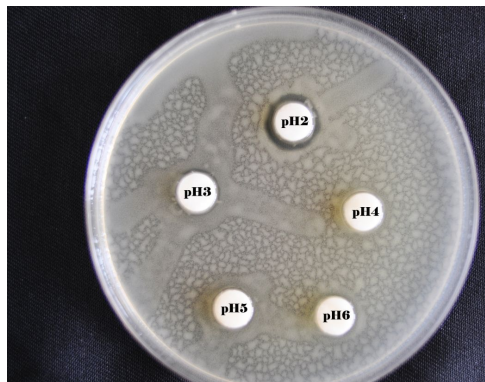


Fig. 73. Antimicrobial activity of dissociated bacteriocin against *Listonella anguillarum*.

Bacteriocin was released from the cells at pH 2,0

(2) VK24균주가 생산하는 bacteriocin의 정제

(가) 배양액 농축

VK24 균주를 배양하고 배양액 1L를 6,000rpm, 30분, 4℃로 원심분리하여 그 상등액을 동결건조하여 농축하였다.

(나) Ammonium sulfate saturation

11L 배양액을 200ml로 5배 농축하여 Ammonium sulfate 60%, 80%, 100%의 포화농도에서 항균활성물질을 침전시켰다. Table .24에서와 같이 80% 포화농도에서 가장 높은 항균활성을 확인하였다.

Table 24. Antimicrobial activity(%) of fractions of ammonium sulfate saturation.

(NH ₄) ₂ SO ₄	Normal		Adjust pH7.0	
	ppt	sub	ppt	sub
none	200		158	
60%	162.5	150	106.25	125
80%	162.5	137.8	112.5	100
100%	112.5	137.5	100	100

$$\text{Antimicrobial activity(\%)} = \text{Clear zone size(mm)} / \text{Paper disk size(mm)} \times 100$$

(다) DEAE-cellulose column chromatography

동결건조된 효소단백질을 최소량의 20mM phosphate buffer-용액(pH7.0)으로 용해시킨 후, 이를 phosphate buffer (pH7.0)으로 평형화시킨 DEAE-cellulose column에 0.1M, 0.2M NaCl을 stepwise로 증가시키면서 0.34ml/min의 유속으로 1fraction당 5ml씩 용출시켰다. 이들 중 효소활성이 있는 분획을 모아 동결건조를 통해 농축을 실시하였다.

VK24균주가 생산하는 항균활성물질의 정제를 위해 DEAE-cellulose와 CM-cellulose에 대해 특성을 조사한 결과 VK24균주가 생산하는 항균활성물질은 CM-Cellulose에는 결합하지 않고 DEAE-cellulose에 결합되는 것을 확인하였다. 이들 분획 중 항균활성이 있는 분획을 조사한 결과 Fig. 74에서와 같이 41번째 분획에서 항균활성을 나타내었다.

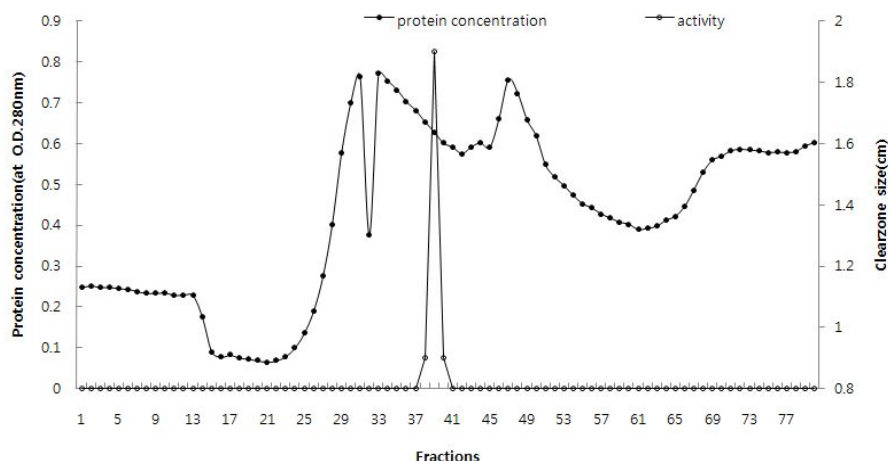


Fig. 74. DEAE-cellulose column chromatography of antimicrobial fractions from *V. sp.* VK24.

(3) ZEN102균주가 생산하는 bacteriocin의 정제

(가) Bacteriocin의 정제

ZEN102균주가 생산하는 Bacteriocin의 정제를 위해 Yang, R. 등 에서 연구한 pH-mediated adsorption & desorption 방법에 준하여 실험을 하였다. bacteriocin의 정제는 3L MRS/BHI 배지(1/3수준)에 ZEN102 균을 1% 접종하여 16시간 이상 배양 후 배양 후 10배 농축하여 정제 실험에 사용하였다. 이후 pH-mediated adsorption & desorption방법을 이용하여 항균물질(bacteriocin)을 정제하였다. 80℃에서 균체를 사멸시킨 후 5N- NaOH로 농축액의 pH를 6.5로 맞추어 30분간 반응 후 7000rpm × 20min 간 원심분리 후 상정액을 덜어내고 균체를 얻었다. 이 균체에 5mM -sodium phosphate buffer 로 1회 세척하였다. 이후 100mM NaCl(5% H3PO4 로 pH 2.0 보정)를 균체양에 상등하는 양을 넣고 균체에서 박테리오신이 분리되도록 1시간 shaking 후 다시 원심분리하여 얻은 상정액을 박테리오신 정제액으로 사용하였다.(Fig. 75)

(나) pH변화에 따른 ZEN102 정제 실험

앞의 pH에 따른 흡탈착에 의한 박테리오신 정제법을 바탕으로 각각의 pH에서 ZEN102가 생산하는 항균물질이 분리되는지 알아보기 위해 pH 단계별 정제 실험을 실시 하였다. pH를 2.0, 4.0, 6.0, 7.0, 8.0, 10.0과 같이 조절하여 1차 상등액과 1차 세척액 및 최종 상등액의 protein을 측정 하였다. 이후 최종 산물에서 얻은 박테리오신 정제 물질간의 저해환은 지시균 *M. luteus*을 이용하여 비교하였다.

(4) 단백질 정량 : VK24, LK7, ZEN102

단백질 정량은 BSA(bovine serum albumin)을 표준단백질로 사용한 Lowry protein assay의 방법에 의해 행하였다. BSA를 표준단백질로 하여 각각 농도를 100, 80, 40, 60, 20, 10, 8, 6, 4, 2, 0 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 농도라 하여 96well plate에 10 μg 취하여 B.f solution를 200 μg 넣고 5분간 반응 후, microplate reader기로 595nm에서 측정하여 검량선을 작성하였다. (Fig. 76) 작성한 단백질 검량 곡선에 박테리오신 항균 물질의 상등액도 동일한 방법으로 OD값을 측정하여 단백질 함량을 계산 하였다.

(가) 균주 VK24

Lowry protein assay를 이용하여 조정제된 VK24가 생산한 항균활성물질에 대한 단백질 정량을 실시한 결과 10mg/ml의 농도를 확인하였다.

(나) 균주 LK7

Lowry protein assay를 이용하여 조정제된 LK7이 생산한 항균활성물질에 대한 단백질 정량을 실시한 결과 15mg/ml의 농도를 확인하였다.

(다) 균주 ZEN102

Lowry protein assay를 이용하여 조정제된 ZEN102가 생산한 항균활성물질에 대한 단백질 정량을 실시한 결과 약 40 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 농도를 확인하였다.

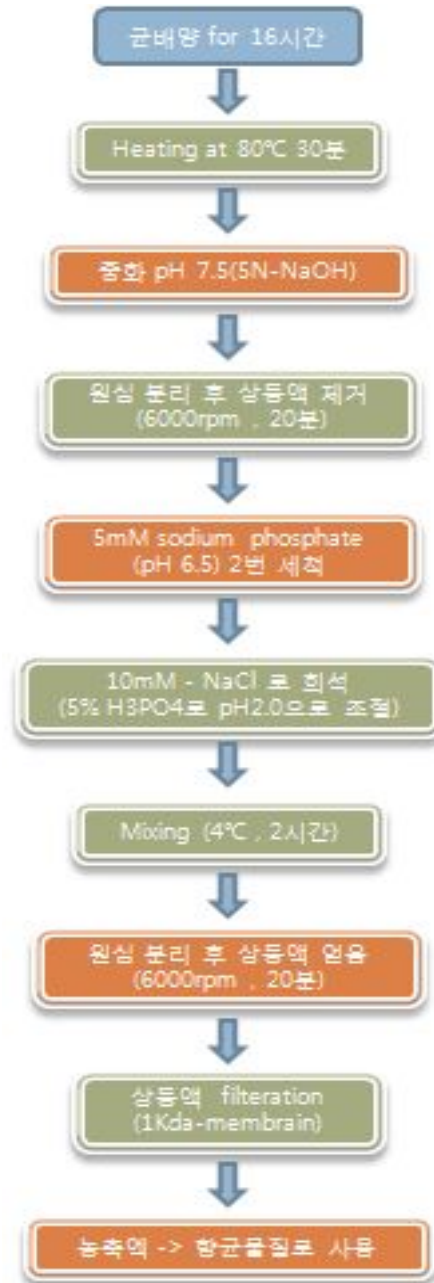


Fig. 75. Purification of antimicrobial agent from strain ZEN102 by pH-mediated adsorption & desorption method

(5). 전기영동 : VK24, LK7, ZEN102

조정제된 효소 단백질의 SDS-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE)는 Laemmli의 방법에 따라 15% gel을 사용하여 9mA로 1시간 30분 동안 전기영동 하였다. 전기영동한 후 gel은 0.05% Coomassie brilliant blue R-250으로 염색하여 탈색시켰다. (Fig. 77)

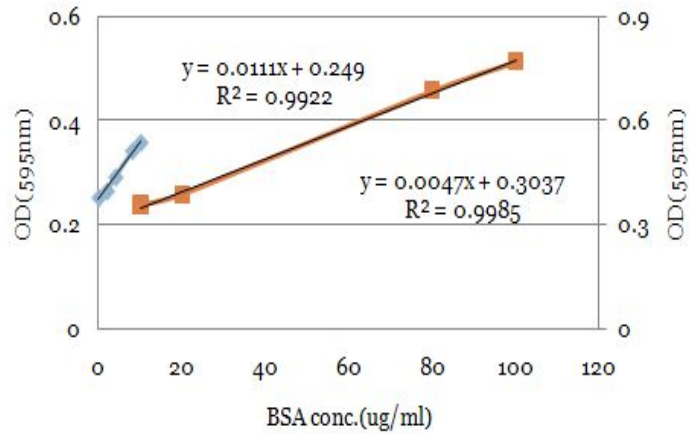


Fig. 76. BSA standard curve

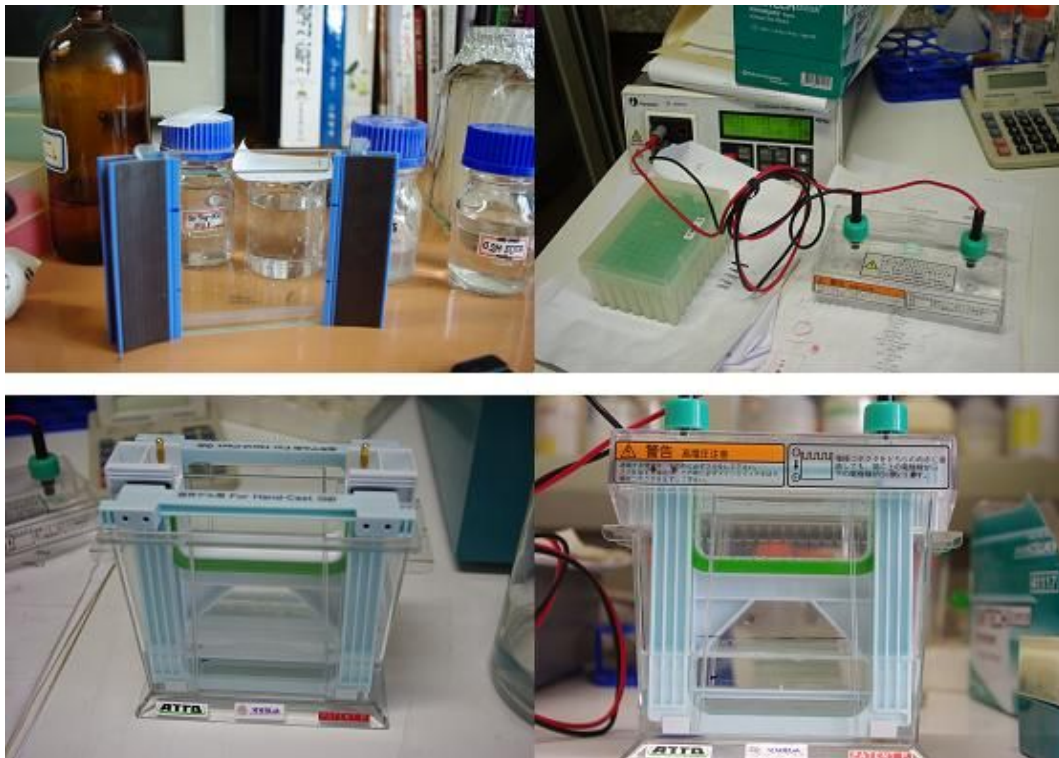


Fig. 77. SDS-polyacrylamide gel electrophoresis system

(가) 균주 Lk7

회수한 bacteriocin을 SDS 전기영동을 통해 분자량을 측정해 보았다. 그 결과 흡착의 경우 pH 6.0에서 100%의 흡착된 결과를 나타내었으며, pH2.0에서 균체로부터 떨어져 나온 bacteriocin에 의해 항균활성이 가장 크게 나타났으며(Fig. 78) 정제된 bacteriocin의 분자량은 3.5kDa으로 확인되었다.(Fig. 79)

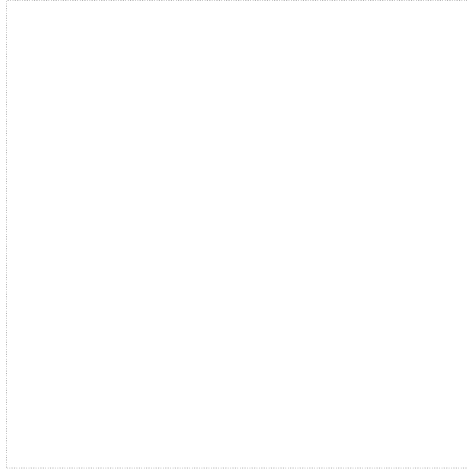
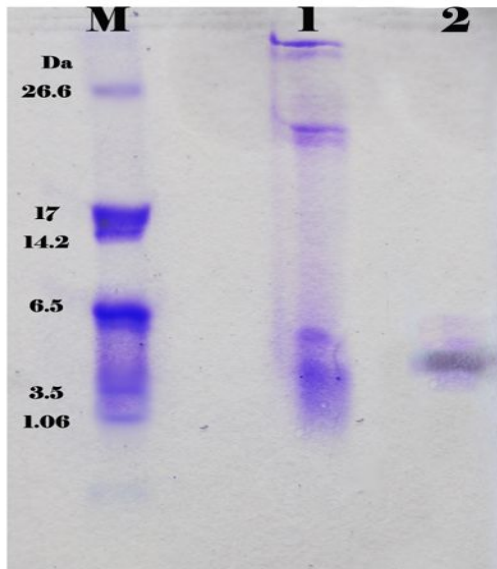


Fig. 78. Antimicrobial activity of extracted bacteriocin against *Listonella anguillarum*.

1: Extracted bacteriocin from *A. sp.* LK7 by cell adsorption
2: Supernatant of culture broth



M : molecular mass makers
1 : purified bacteriocin from ZEN102
2 : purified bacteriocin from LK7

Fig. 79. Molecular weight determination of bacteriocin from *A. sp.* LK7 by SDS-polyacrylamide gel electrophoresis.

(나) 균주 VK24

DEAE-cellulose를 통해 조정제된 VK24균주의 bacteriocin을 15% SDS-PAGE를 실시하였다. 그 결과 조정제된 bacteriocin은 nisin(MW; 3,354.07) 분자량과 유사하다는 것을 확인할 수 있었다.(Fig. 80)

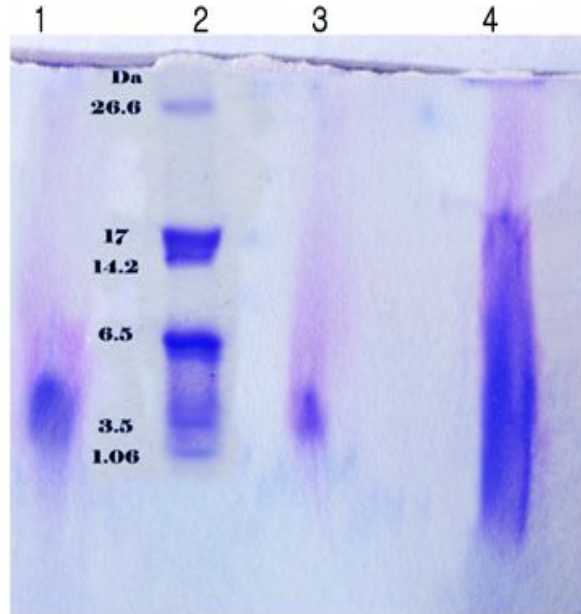


Fig. 80. SDS-PAGE of bacteriocin from strain *V. sp.* VK24.

Lane 1 : nisin (1mg/ml)

Lane 2 : Molecular Weight Marker

Lane 3 : Purified bacteriocin by DEAE-cellulose from VK24 strain

Lane 4 : Ultrafiltered Sample by Millipore ultrafiltration membrane

(다) 균주 ZEN102

정제된 물질을 통하여 SDS-PAGE를 수행하여 활성을 측정한 결과, 단일 band와 일치하는 부위에서 투명환이 생겼으며, 따라서 *Lactococcus lactis*에서 생산되는 bacteriocin의 분자량이 대략 3.5kDa임을 알 수 있었다.(Fig. 81, 82)

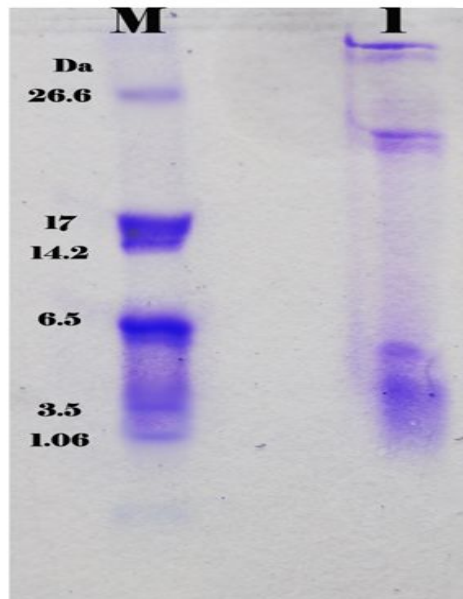


Fig. 81. Molecular weight determination of bacteriocin from ZEN102 by SDS-polyacrylamide gel electrophoresis.

M : molecular mass makers, 1 : purified bacteriocin from ZEN102

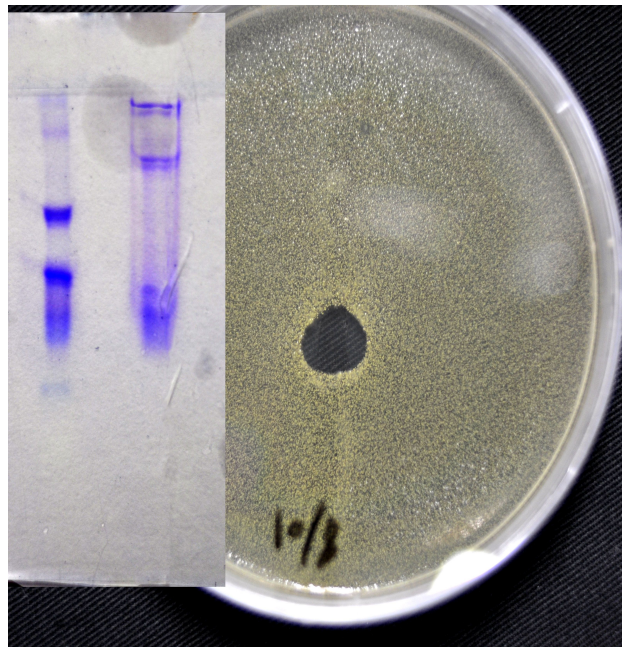
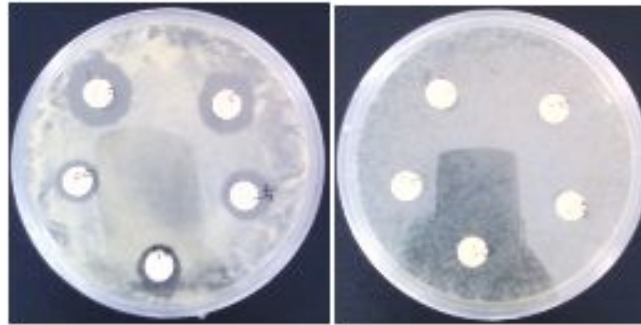


Fig. 82. Molecular weight determination of bacteriocin from ZEN102 by SDS-polyacrylamide gel electrophoresis and activity

14. 기타 유용균주의 Screening

가. Gram 음성균에 대한 항균활성

E. tarda, *L. anguillarum*, *V. ichthyenteri*에 대한 항균활성이 뚜렷하게 나타나지 않았다. EDTA 처리한 Gram 양성균과 Gram 음성균의 대조실험을 위해 *M. luteus*와 *V. ichthyenteri*를 준비하였다. 위 실험과 같이 반응시킨 후 paper disc위에 Nisin을 희석비율별로 실험한 결과 *M. luteus*에서만 항균활성이 나타나고 *V. ichthyenteri*에서는 항균활성이 나타나지 않았다.



M. luteus *V. ichthyenteri*

Fig. 83. Antimicrobial activity of nisin against gram negative bacteria

나. 심층수의 항균활성실험

Vibrio sp., *L. anguillarum*, *E. tarda* 3종의 지시균주를 24시간 전배양 액 1%를 접종 후 6시간 동안 심층수를 filtration 한 것과 filtration 하지 않은 것을 각각 3ml씩 주입하여 cell growth 와 protein 함량을 통해 항균활성을 분석 하였다. 그 결과 filtration된 심층수 내의 지시균에 의한 성장 저해는 반응 초기 24시간까지 관찰되지 않았다. 48시간 반응 후 역시 항균활성이 거의 관찰되지 않았으나 *L. anguillarum* 의 경우 filtration 하지 않은 심층수를 사용한 반응구에서 성장저해가 확인되어 차후 조사와 실험이 필요할 것 같다.

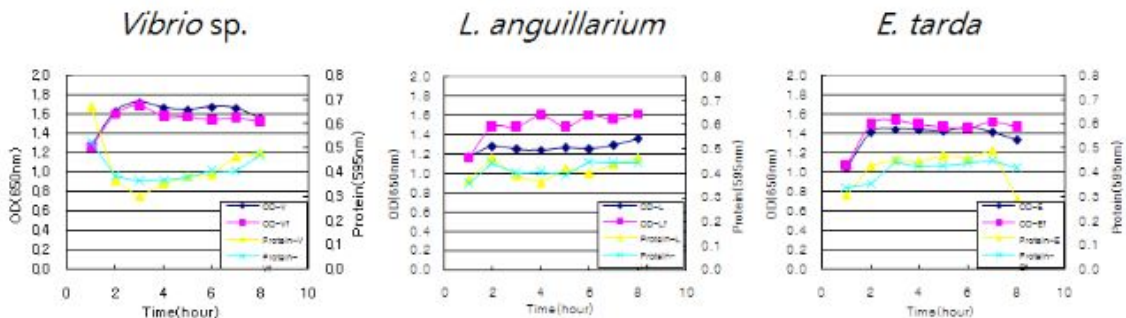


Fig. 84. Antimicrobial activity of deep sea water

15. 생산배지 선정 실험

가. 균주 ZEN49

(1) MRS 기본 배지에 탄소원과 질소원의 변화에 따른 생산성 검증

ZEN49 strain을 MRS 100%와 MRS와 YG 각각 50% 혼합배지 그리고 YG100%의 배지에 각각 배양하여 그 차이를 실험하였다. YG 배지는 Glucose 50g/L, Yeast Extract 20g/L, KH_2PO_4 4g/L, MgSO_4 3g/L, NaCl 0.5g/L, 를 만들어 176ml 분

주하여 사용하고 FeSO_4 0.01g/L, MnSO_4 0.1g/L, CuSO_4 0.01g/L는 금속착화합물 반응을 방지하기 위해 따로 만든 후 2ml, 20ml, 2ml를 각각 넣어 사용하였다.

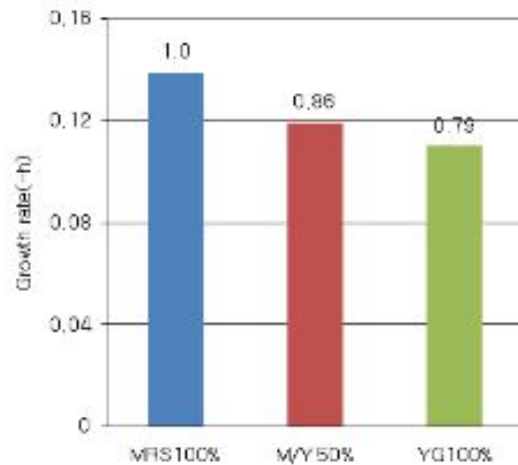


Fig. 85. Growth rate of strain ZEN49 in MRS, MRS&YG, YG Broth

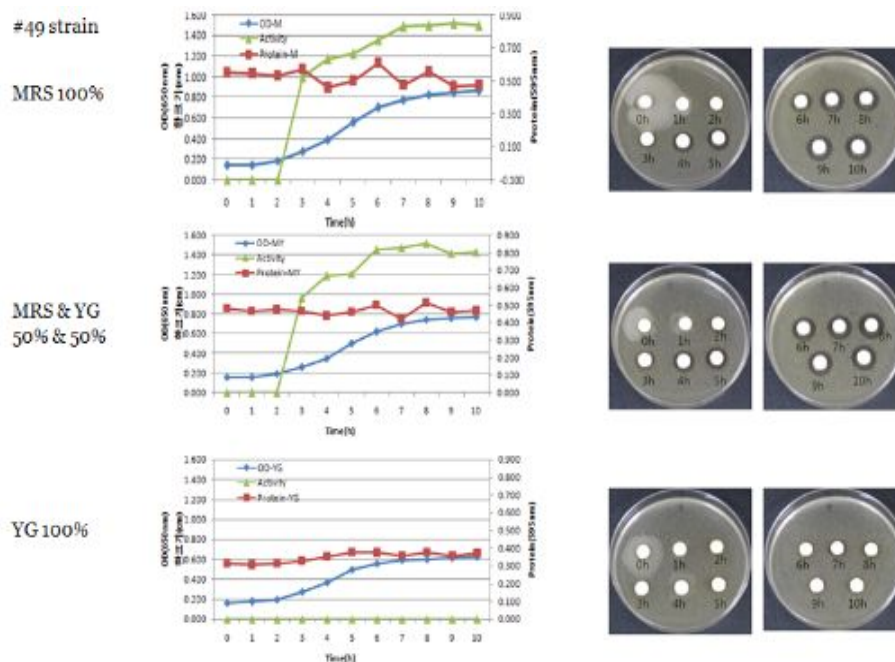


Fig. 86. Growth curve and Protein content of strain ZEN49 in MRS, MRS&YG, YG Broth

실험 결과 MRS 100% 배지에서 성장 및 항균활성이 가장 높게 나타났다. MRS와 YG

각각 50% 혼합한 배지가 거의 MRS 100%의 배지와 90%의 성장률과 95%의 항균활성도를 나타낸 반면 YG 100%배지에서는 성장률이 가장 낮았으며 항균활성도 거의 나타나지 않았다.

이러한 결과에서 확인할 수 있듯이 가격이 높은 MRS배지만을 사용하여 bacteriocin을 생산하는 것과 비교하여 MRS50%와 YG50%배지를 사용할 경우 거의 동일한 성장률과 항균활성도 나타내었으나(Fig. 85, 86) 가격을 고려한 경제적인 부분에서 약 30%의 비용절감을 얻을 수 있을 것으로 조사하였다.

(2) 탄소원에 따른 생산성

경제적인 부분에서 산업화를 위한 원가절감의 가장 효율적인 최적 배지 선정실험을 실시하였다. 대량 발효를 위한 최적배지에서 우선 탄소원에 따른 성장 차이를 비교분석하였다. 탄소원으로 Glucose, Fructose, Sucrose, D-mannitol, Starch, Maltose, Mannose, Lactose, Galactose 총 9종의 당류를 20mg/ml Nutrient Broth를 nitrogen source로 한 후 각 탄소원을 20mg/ml 식 넣고 25°C에서 18시간 배양 후 그 이화학적 분석을 하여 비교하였다. 실험분석은 시간별 OD를 측정하여 CFU/ml로 환산하여 나타냈다.

Fig. 87에 나타난 결과와 같이 탄소원으로 Glucose가 상대적으로 높은 성장률을 보였다. 이에 glucose의 농도를 달리하여 균성장에 대한 최적 glucose 농도를 결정하였다. 그 결과 약 30mg/ml의 균성장에 대한 영향을 확인하였다. 그러나 초기 접종 후 glucose 10mg/ml의 농도에서부터 완만한 균주증가율을 나타내고 있기 때문에 18시간까지의 배양 system에서 glucose의 농도를 20mg/ml으로 결정하는 것이 효율성 면에서 가장 적합할 것으로 판단된다.

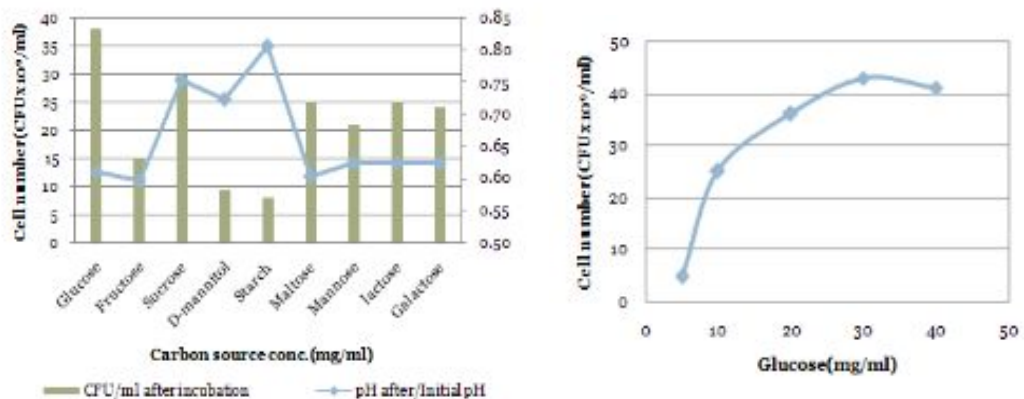


Fig. 87. Effects of carbon source

(3) 질소원에 따른 생산성

대량배양에서는 효율성과 경제성이 모두 중요한 factor이다. 따라서 탄소원 뿐만 아니라 질소원에 따라서도 많은 영향을 받기 때문에 최적 질소원선정 실험을 하였다. 특히 최종 products가 peptide이기 때문에 배지내에 products를 쉽게 생산할 수 있는 peptide가 풍부한 배지의 공급이 무엇보다 중요할 것이다. 이 실험을 위해서 yeast extract, Peptone, Proteose peptone, Soytone, Tryptone, Tryptose, NZ-amine, Beef extract 이상 8종의 nitrogen source를 10mg/ml 식 glucose 20mg/ml을 고정된 배지에 혼합하여 배양하였다. 그림에서와 같이 nitrogen source의 경우 Proteose peptone이 가장 우수한 결과를 나타냈다. 그리고 tryptone와 tryptose 그리고 yeast extract 순으로 균의 생육에 영향을 미치는 것으로 나타났다. 따라서 Proteose Peptone의 양을 달리한 실험에서 Proteose peptone의 가격이 높은 관계로 beef extract와 2:1비율로 혼합한 nitrogen source를 자체적으로 만들어 혼합 nitrogen source를 glucose 20g과 각각 혼합하여 배지를 만들어 실험하였다. Proteose 혼합 nitrogen source의 양이 20mg/ml이상에서 성장률이 거의 일정하게 유지되는 것으로 나타나 최적 농도는 15~20mg/ml 수준에서 결정하는 것이 바람직할 것으로 판단되어 배양시간을 고려할 경우 15mg/ml가 가장 적합한 것으로 결정했다.

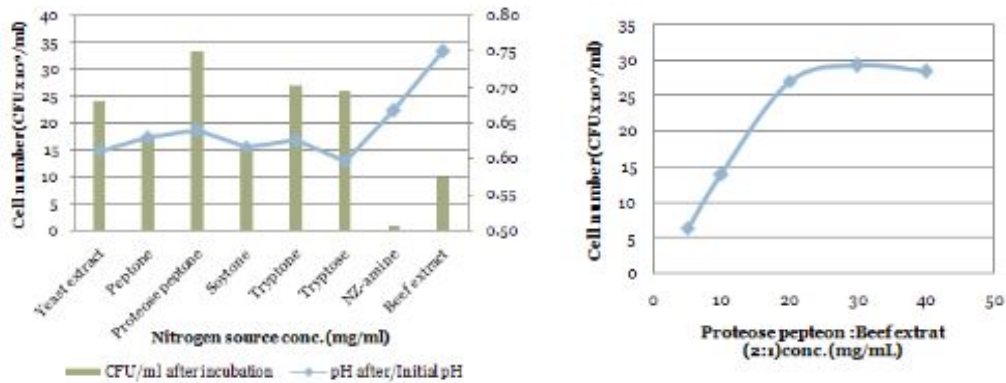


Fig. 88. Effects of nitrogen source

(4) 미량원소에 따른 생산성

미량원소에 따른 생산성 차이도 실험하였다. 실험을 위해서 탄소원으로 glucose 20mg/ml, 질소원으로 proteose/beef extract 혼합 질소원 15mg/ml를 기본적으로 만들고 각 미량원소를 넣은 것과 넣지않은 것에 대한 생산성 변화를 비교하였다.

그 결과 Fig. 89에서와 같이 KH_2PO_4 , $\text{MgSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$, CaCO_3 에 대한 영향이 높게 나타났다. 그러나 다른 선행연구 및 유사 실험에서 CaCO_3 에 대한 영향이 크지 않은 것으로 나타나 이 부분에 대하여는 좀 더 연구를 진행한 후 결정하고자 하였다.

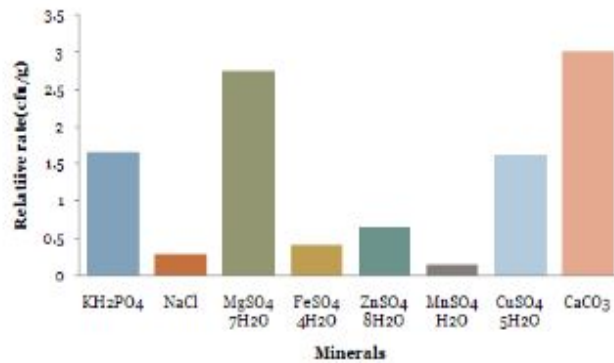


Fig. 89. Effect of mineral

(5) 최적 배지

앞의 실험에서 탄소원, 질소원 그리고 미량원소를 조합하여 최적 배지를 조성하였다(이 배지를 BPG 배지로 명명하였다. MRS의 단가의 약 43% 수준, 이하 대량생산 공정에는 BPG배지를 이용하였다.).

Medium	단위사용량	규격	시약 단가	원/Liter
Glucose	10 g/L	5,000 g	34,000 원	68.0
Proteose Peptone	10 g/L	5,000 g	1,075,000 원	2,150.0
Beef extract	5 g/L	5,000 g	1,017,000 원	1,017.0
Yeast extract	5 g/L	25,000 g	1,175,000 원	235.0
K_2HPO_4	5 g/L	1,000 g	11,000 원	55.0
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0.3 g/L	500 g	2,700 원	1.62
$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	0.01 g/L	500 g	4,600 원	0.09
	32.01 g/L			3,526.7

최적 배지에서 yeast extract의 5g/L 수준의 첨가는 yeast extract 역시 상당수준의 성장에 관여하는 부분으로 인정되어 첨가를 결정하였다. 상기의 최적 배지 조성을 이용하여 ZEN49균주를 배양한 결과 기존의 MRS에 비하여 stationary phase까지 이르는 시간이 매우 짧아진 것을 알 수 있었다.

최적 배지선정 실험의 결과를 바탕으로 24시간, 50시간, 75시간에서 fresh media를 초기 배양 부피의 10%를 공급하여 약 150시간 배양실험을 실시한 결과 ZEN5, ZEN49, ZEN2013 세 균주 모두 초기부터 빠른 성장을 나타내었으며 150시간동안 dead phase로 접어들지 않는 것으로 나타났다. 배양 초기 Protein의 약간 감소하였으나 10시간 경과 후 급격한 protein의 감소가 나타났는데 이 현상은 3균 모두 같

은 pattern을 보여주었다.

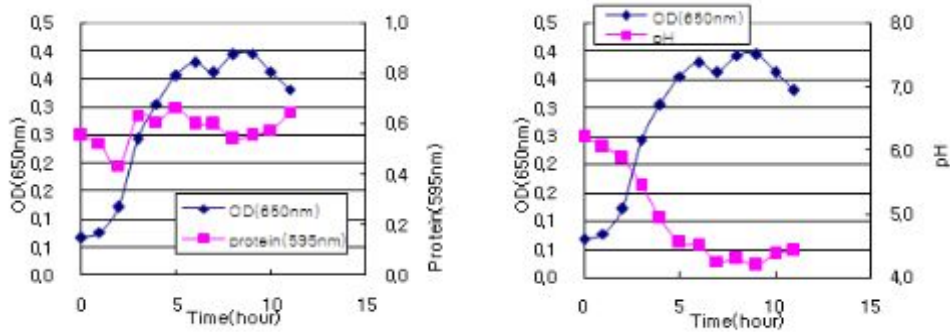


Fig. 90. Growth of strain ZEN49 with optimal medium

이 현상은 Proteose peptone 등의 배지성분에 함유된 질소원의 감소가 나타난 때문으로 판단된다. 그 후 다시 급격히 증가하는 데 실험오차일수도 있으나 이후 지속되는 것으로 나타나 좀 더 세부적인 연구가 필요할 것 같다.

이상의 최적배지선정 실험 결과를 통해 생산배지로서 가능성이 충분히 인정되었다.

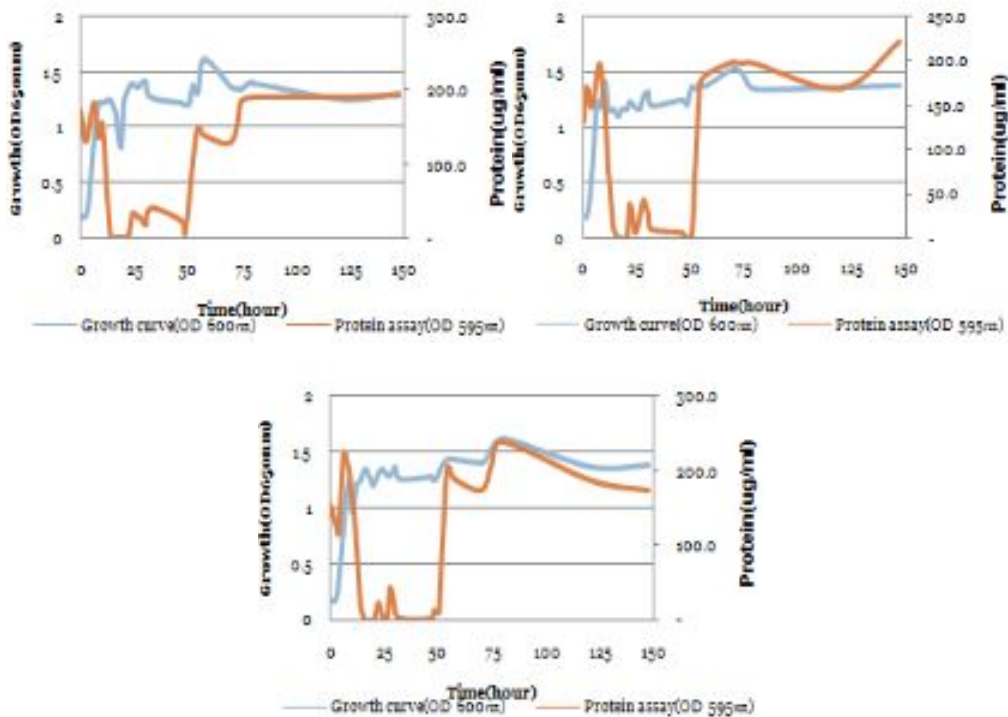


Fig. 91. Cultivation of strain ZEN49 with optimal medium

나. Bacteriocin생산 균주의 특성

(1) 각종 배지에서의 성장

(가) 균주 LK7, VK24

LK7 균주가 생산하는 bacteriocin의 생산성을 알아보기 위한 최적 배양배지를 조사하였다. 여러 종의 배지, 배양 시간을 달리하여 균주를 배양하였으며 균체량과 bacteriocin 활성을 측정하였다. 배지로는 MRS/NSS 배지에서 균체 증식과 bacteriocin 활성이 가장 높게 나타났으나 LB배지에서의 항균활성 또한 비슷한 수준으로 나왔기 때문에 LB배지를 기본 배지로 하여 실험을 진행하였다(Fig. 92).

(나) 균주 ZEN102

ZEN102가 생산하는 박테리오신의 생산성을 알아보기 위한 최적 배양배지를 조사하였다. Table. 25 과 같이 조성을 달리하여 균주를 배양하였으며, 균생장과 박테리오신 활성을 측정하였다. 배지로는 BHI+MRS혼합 배지에서 균체 증식과 박테리오신 활성이 가장 높게 나타났으나 BHI배지에서의 활성 또한 높은 수준으로 나왔기 때문에 BHI배지를 기본 배지로 하여 실험을 진행하였다.(Fig. 93)

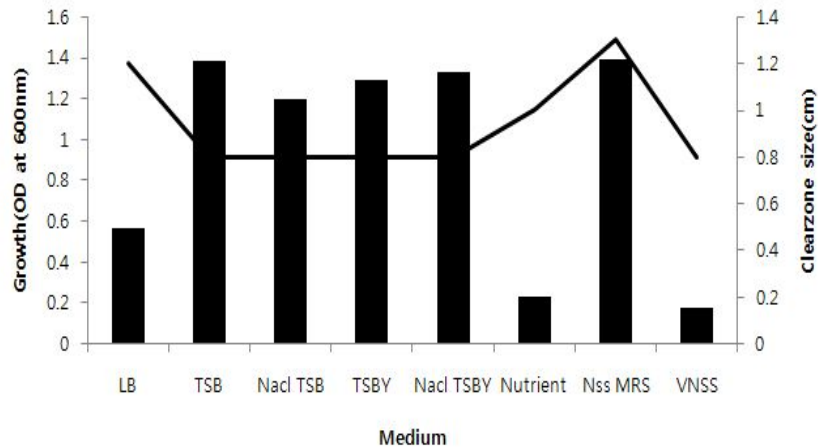


Fig. 92. Growth and antimicrobial activity of *Aerococcus* sp. LK7 with various mediums

Symbol: ■, growth; —, antimicrobial activity(cm)

Table 25. The composition of medium for ZEN102 strain

구분	MRS	BHI	MRS+BHI
BHI(g/L)	0	37	18.5
MRS(g/L)	55	0	27.5

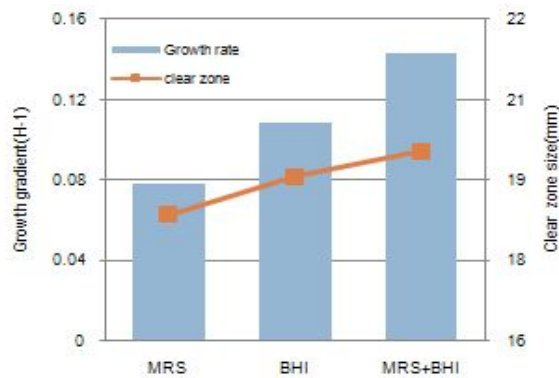


Fig. 93. Growth and antimicrobial activity of strain ZEN102 with various mediums

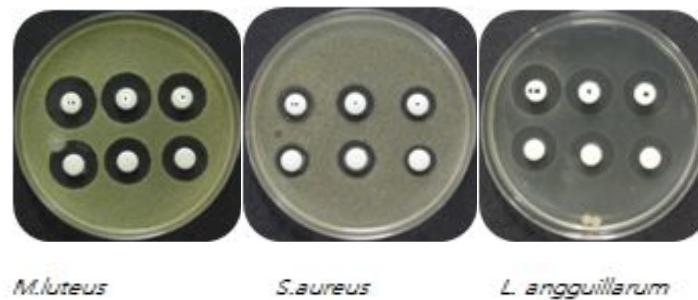


Fig. 94. Antimicrobial activity of strain ZEN102 with various mediums

(2) 생산배지 선정 시험

(가) 탄소원과 질소원의 영향 LK7과 VK24

Bacteriocin 생산 균주인 *Aerococcus* sp. LK7의 성장과 bacteriocin 생산에 영향을 미치는 탄소원과 질소원의 영향을 알아보기 위해 50%의 LB 배지가 포함된 배지에 glucose와 peptone를 포함한 각종 탄소원과 질소원을 각각 1%가 되도록 첨가한 후 30℃에서 24시간동안 진탕 배양하여 성장률과 항균활성을 검토하였다(Fig. 95). 그

결과 Table. 26과 같이 탄소원으로는 sodium acetate, 질소원으로 malt extract에서 가장 우수한 성장과 항균활성을 나타내었다. 또한 VK24균주의 경우 MRS 1/10 배지가 포함된 배지 각각에 glucose와 peptone를 포함한 각종 탄소원과 질소원을 각각 1%가 되도록 첨가한 후 30℃에서 24시간동안 정지 배양하여 성장률과 항균활성을 검토하였다(Fig. 96). 그 결과 Table 22. 와 같이 MRS 1/10배지에서는 탄소원으로 sodium citrate, 질소원으로 yeast extract에서 가장 우수한 성장을 하였으나 탄소원으로 sodium acetate, 질소원으로 beef extract에서 강한 항균활성을 나타내었다.

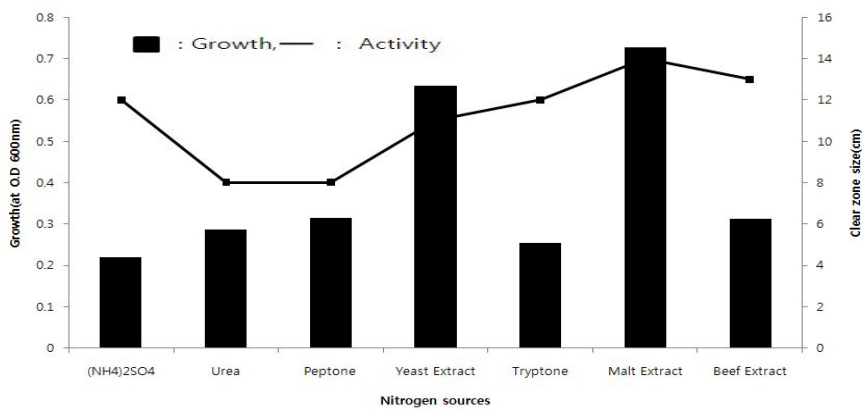


Fig. 95. Effect of Sodium acetate and nitrogen sources for the growth and antimicrobial activity of the *A. sp.* LK7

Table 26. Effect of carbon and nitrogen sources on the growth of *V. sp.* VK24 (O. D. 600nm)

C Sources \ N Sources	C Sources						
	Glucose	Lactose	Maltose	Sodium acetate	Sodium citrate	Soluble starch	Sucrose
(NH4)2SO4	0.292	0.319	0.318	0.682	0.768	0.171	0.301
Peptone	0.532	0.560	0.562	0.833	0.836	0.752	0.542
Tryptone	0.785	0.870	0.857	0.941	0.907	0.953	0.851
Yeast extract	0.788	0.840	0.868	1.074	1.410	0.932	0.811
Malt extract	0.313	0.330	0.323	0.641	0.913	0.729	0.315
Beef extract	0.756	0.803	0.781	0.654	0.793	0.904	0.742
Urea	0.031	0.016	0.102	0.060	0.003	0.329	0.014

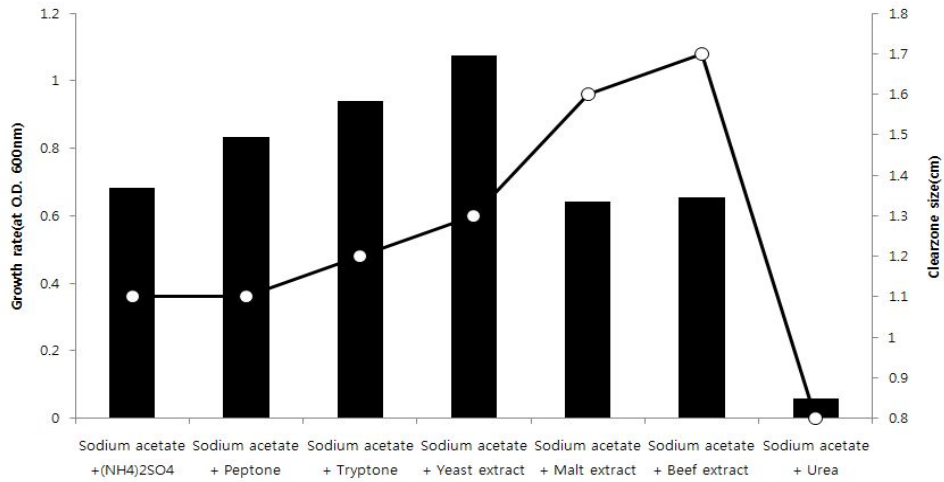


Fig. 96. Effect of Sodium acetate and nitrogen sources for the growth and antimicrobial activity of the *V. sp. VK24*

Symbol: ■, growth; —, antimicrobial activity(cm)

(나) 탄소원과 질소원의 영향 ZEN102

① 탄소원에 따른 생산성

경제적인 부분에서 산업화를 위한 원가절감의 가장 효율적인 최적 배지 선정실험을 실시하였다. 대량 발효를 위한 최적배지에서 우선 탄소원에 따른 성장 차이를 비교 분석하였다. 박테리오신 생산

균주인 *Lactococcus lactis*. ZEN102의 성장과 활성에 영향을 미치는 탄소원 영향을 알아보기 위해 glucose와 lactose를 이용하여 비교 실험을 수행하였다. Table. 23과 같이 glucose와 lactose를 MRS 배지에 넣고 성장과 활성을 비교분석 하였다. (Fig. 97) 그림과 같이 조제한 MRS에 glucose와 lactose를 넣은 sample에서 생육 및 활성이 가장 좋게 나타났다.

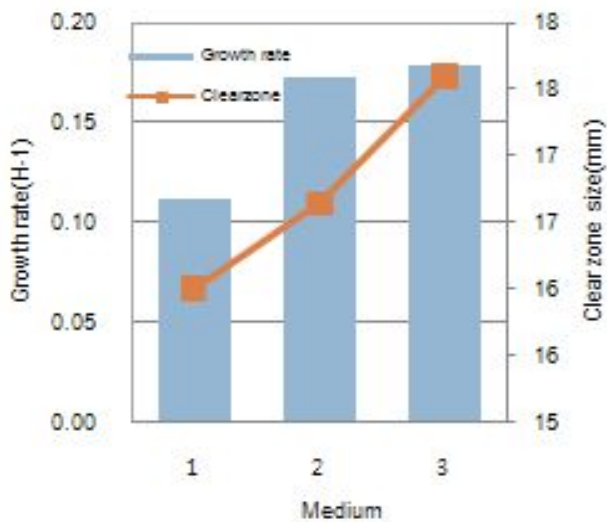


Fig. 97. Effect of carbon sources on the growth and activity of ZEN102

Table 27. Medium composition : carbon source

Medium composition				
1	MRS(Difco)			
2	M-MRS	Glucose	0.80%	
3		Glucose	0.50%	+ Lactose 0.5%

앞선 실험을 바탕으로 Lactose 의 함량을 각각 0.5, 1.0, 1.5, 2.0% 수준에서 균의 성장과 활성을 확인하였다. Fig. 98에서 보는 것과 같이 ZEN102 의 생장율은 Lactose의 함량이 1.5% 수준에서 가장 높게 나타났으며, lactose의 함량을 1.5% 이상 농도를 높여도 생육에는 큰 영향을 미치지 않는 것으로 나타났다. 이 실험을 바탕으로 lactose양을 1.5% 로 고정하고 glucose양을 달리하여 생장을 확인시험을 수행할 것이다.

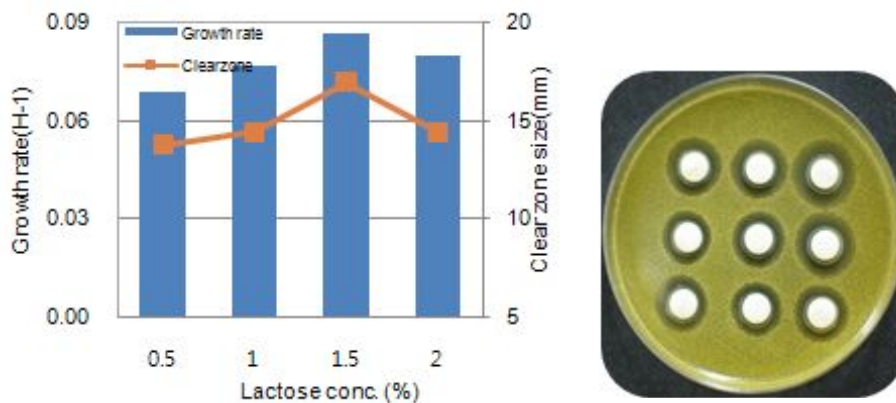


Fig. 98. Effect of carbon source(Lactose) on the growth and activity of ZEN102

glucose 함량을 달리하여 균 생육에 미치는 영향을 알아보기 위해 Table. 28에서 보는 것과 같이 배지조성을 통해 생육 및 활성의 비교 분석 실험을 수행 하였다. 생육면에서는 glucose 0.5% lactose 0.5%에서 가장 좋았으며, 또한 glucose 함량 0.8% 수준에서 최고 생육을 나타내었지만 활성에서는 glucose 0.6% 수준과 비슷하였다. glucose를 일정량 첨가하여도 생육은 크게 변화지 않는 것으로 판단된다. Fig. 99을 통하여 glucose 함량은 0.65% 수준으로 정하여 실험을 추가로 재설정 하였다.

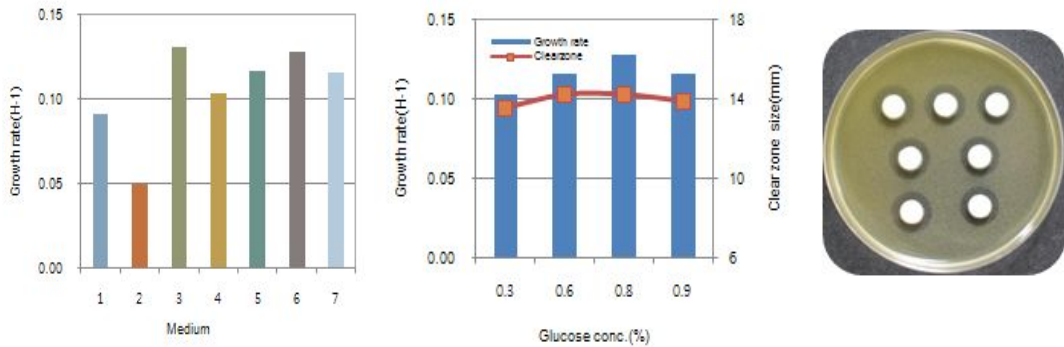


Fig. 99. Effect of carbon source on the growth and activity of ZEN102 (1)

Table 28. Medium composition : carbon source

Medium composition				
1	MRS(Difco)			
2	M-MRS	Lactose	0.8%	Lactose 0.5%
3		Glucose	0.5%	
4			0.3%	
5			0.6%	
6			0.8%	
7			0.9%	

앞의 실험을 바탕으로 Glucose 함량을 0.65%로 고정하여 lactose 함량을 0.3, 0.6, 0.9% 수준으로 하여 균의 성장을 확인하였다. lactose 함량이 0.3%에서 활성이 가장 높게 나타났다. 이는 lactose 함량을 0.3% 이상 첨가하여도 성장에는 큰 영향을 미치지 않는 것으로 판단된다. (Fig. 100) 이 시험을 바탕으로 최적 배지의 함량은 glucose 0.65% 와 lactose 0.3% 비율로 배합하는 것이 가장 적합하다고 판단된다.

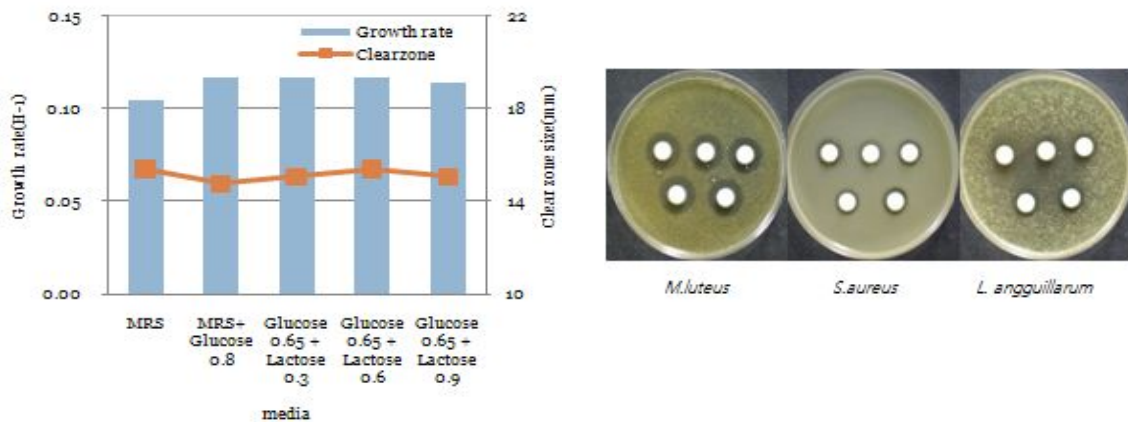


Fig. 100. Effect of carbon source on the growth and activity of ZEN102 (2)

MRS성분과 동일한 조성으로 조제된 MRS배지에 대하여 조제 MRS비율에 따른 생육 및 활성을 알아 보았다. (Fig. 101)시판되는 MRS에 비해 조제된 M1배지에서 생육은 높았으나 활성은 시판되는 MRS에 비해 약 6% 낮게 나타났다. 즉 균의 생육은 MRS에 대한 영향을 많이 받는다. 따라서 MRS 각각의 조성 성분에 대한 개별적인 균 생육의 영향을 받는지 실험할 필요가 있다.

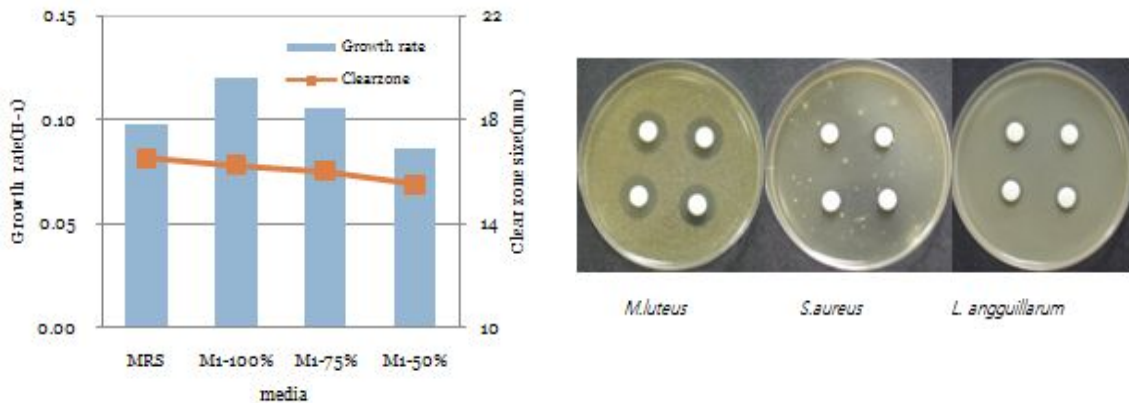


Fig. 101. Effect of carbon source on the growth and activity of ZEN102 (3)

*M1 : MRS(Difio)와 동일한 조성을 가지며 Glucose 0.65% Lactose 0.5%를 함유

㉔ MRS배지 성분에 따른 생육 및 활성 영향

앞의 실험을 바탕으로 우리는 MRS배지의 각 성분이 ZEN102균의 생육 및 활성에 미치는 영향을 주는 것으로 판단하고 이를 알아보기 위하여 Table. 29 와 같이 배지를 조성하여 실험을 수행하였다. 실험 결과는 Fig. 102와 같다.

초기 배지 성분 중 생육에 미치는 성분들에는 peptone, beef extract, Dipotassium phosphate가 두드러진 역할을 하는 것으로 보인다. 그러나 증반 생육에서 beef extract외에는 영향이 줄어들고 대신에 ammonium sulfae, sodium sulfat 및

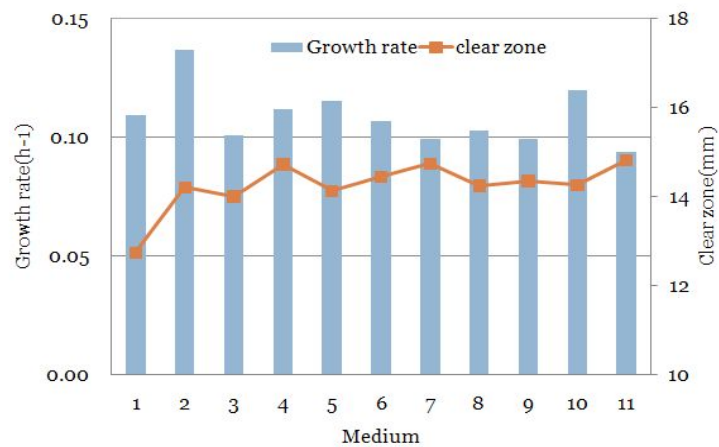


Fig. 102. Effect of MRS medium source on the growth and activity of ZEN102

Mg, Mn-sulfate의 영향이 높게 나타나 MRS 배지 각 성분이 균의 생육 시간별 적정하게 관여하고 있는 것으로 판단된다. 그러나 생산배지 선정을 위해서 products의 최종 생산을 위한 배양시간등을 고려하여 MRS + GL 1/2배지 Peptone, beef extract, Dipotassium phosphate를 더 첨가한 혼합배지를 조성하여 생육 특성을 비교함으로써 최적 배지 가능성을 조사하고자 한다.

Table 29. Manufacture MRS medium composition

Medium		조성 조건	
1	M	MRS (Difio)	
2	M1	MRS 배지 조성성분과 동일 Detrose 제외 Glucose 0.65% Lactose 0.5% 는 고정	
3	M1 (1/2)		M1 - 50%
4	MF1		Peptone 0.15g
5	MF2		Beef Extract 0.15g
6	MF3		Yeast Extract 0.075g
7	MF4		Polysorbate80 0.015g
8	MF5		Ammonium citrate 0.03g
9	MF6		sodium Acetate 0.075g
10	MF7		Dipotassium Phosphate 0.03g
11	MF8		Magnesium sulfate 0.0015g Manganese sulfate 0.0075g

위의 실험을 바탕으로 최적 Glucose함량 0.6%와 lactose 0.5% 로하여 MRS 및 MRS에 Peptone, beef, Yeast, K2HP04를 추가로 첨가하여 생육을 확인한 결과 MRS+ glucose 0.65, Lactose 0.5%에서 가장 좋은 성장률을 나타내었다.

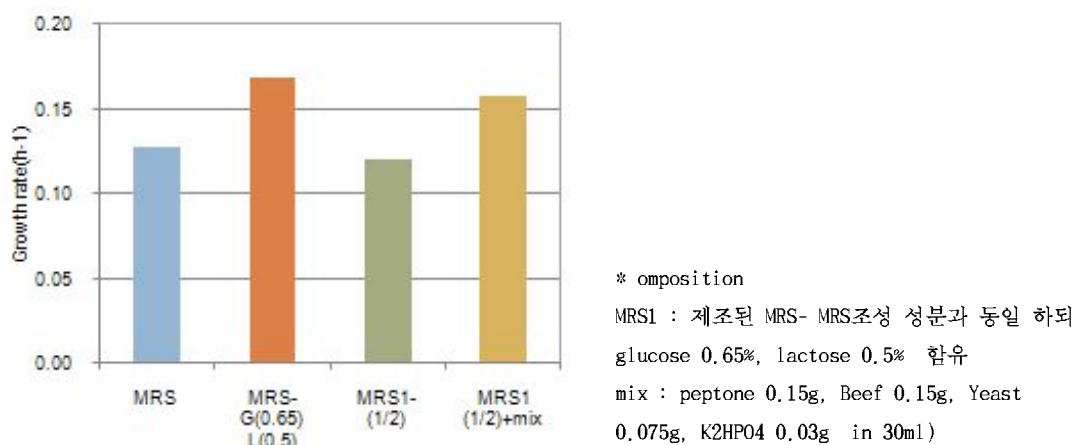


Fig. 103. Effect of carbon and mineral source on the growth and activity of ZEN102

② 질소원에 따른 생산성

㉑ 젓갈 추출액의 배지 사용 가능성 조사

경제적인 부분에서 산업화를 위한 원가절감의 가장 효율적인 최적 배지 선정실험을 실시하였다. 대량 발효를 위한 최적배지에서 우선 질소원에 따른 성장 차이를 비교 분석하였다.

박테리오파지 생산 균주인 *Lactococcus lactis*, ZEN102 의 성장과 활성화에 영향을 미치는 질소원의 영향을 알아보기 위해 시판되는 명태, 새우, 창란, 멸치액젓을 이용하여 배지를 조사하여 ZEN102의 생육을 조사하였다. 시판되는 명태 새우, 창란, 멸치액을 구입하여 일정량 덜어내어 열처리하여 기타균을 제거 후 영양분으로 사용하기 위해 육즙을 얻었다. 육즙은 0.45 μ filter를 이용하여 배지의 영양분으로 이용하였다. 배지의 조성은 Table. 30 과 같이하여 질소원을 첨가한 후 30℃에서 24시간동안 정제 배양하여 성장률과 항균성을 검토하였다. 그 결과 Fig. 104과 같이, 젓갈 추출액의 배지 사용 가능성 조사하기 위해 시판되는 명태, 새우, 창란, 멸치액젓을 이용하여 생육 및 활성도를 측정된 결과 생육측면에서는 명태만 첨가한 경우에 비해 멸치, 창란, 새우의 생육도는 낮았으나, 개별적인 활성화에서 명태와 멸치, 새우를 각각 혼합한 sample 의 활성화도는 유사하게 나타났다.(Table 31, Fig. 105) 이 실험에서 나타난 결과를 바탕으로 젓갈류의 배지첨가에서도 균의 생육 활성이 유지되어 차후 생산배지로 활용 가능할 것으로 판단된다.

Table 30. The medium composition of jeotgal combine

구 분		Salt concentration
Anchovy		0.5
		1
		1.5
Sauced intestine		0.5
		1
		1.5
Shrimp		0.5
		1
		1.5
Pollack (protein 161mg/L)		100%
		50%
		25%
Pollack (50%)	A	0.5
	SI	0.5
	S	0.5

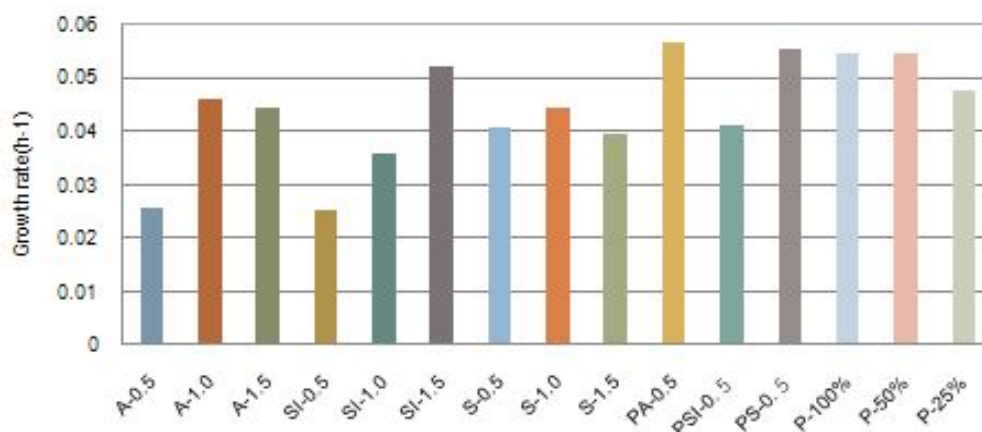


Fig. 104. Growth rate with jeotgal(salted-fermented fish products) for bacteriocin ZEN102.

* A: Anchovy, SI: Sauced intestine, S: shrimp P: Pollack PA: Pollack & Anchovy, PSI: ollack & sauced intestine, PS: Pollack & shrimp

Table 31. Inhibition size with jeotgalfor bacteriocin ZEN102.

strains	Clear zone size(mm)								
	A	SI	S	PA-0.5	PSI-0.5	PS-0.5	P	P1/2	P1/4
M.L	17.0	17.1	19.0	20.0	18.5	18.8	19.1	18.8	18.8
S.aru	12.1	13.1	11.5	11.7	11.4	12.9	13.5	12.9	12.9
L.ang	10.1	9.8	9.6	11.4	11.1	9.2	10.2	9.8	8.9

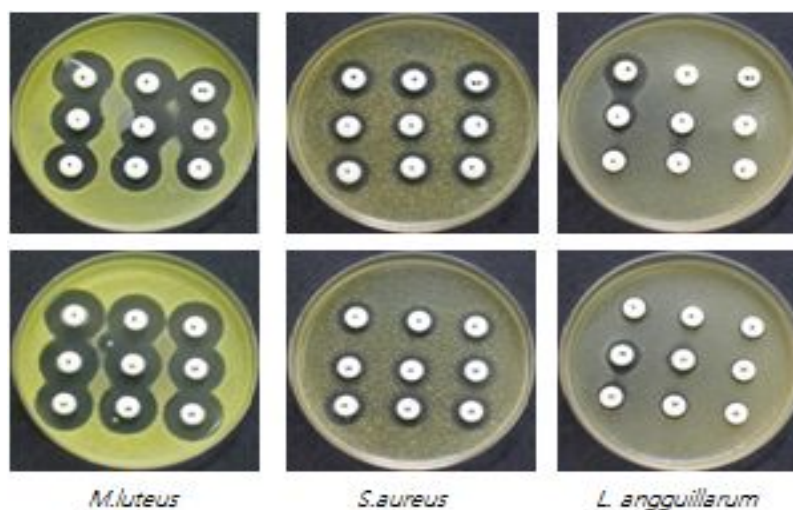


Fig. 105. Effect of antimicrobial activity with jeotgal (salted-fermented fish products) for bacteriocin ZEN102.

㉔ MRS, BHI 배지와 젓갈 혼합배지에 대한 zen012의 생육 및 활성

젓갈 추출액과 MRS, BHI 배지를 Table. 32과 같이 혼합된 조성비율에 따라 생육 및 활성을 측정하였다.

그 결과 Fig. 106 에서 보는것과 같이 MRS, BHI 혼합배지에서 가장 높은 활성을 보였으며, 이에 비해 mix4과 mix1+MRS 조성은 단인 MRS, BHI 배지를 사용한 것에 비해 약간 높은 생장을 나타내었다. 따라서 mix1+MRS에 대한 배지조성을 좀더 최적화함으로써 MRS+BHI 배지를 대체할 수 있는 생산배지로 활용 가능성을 나타내고 있다.

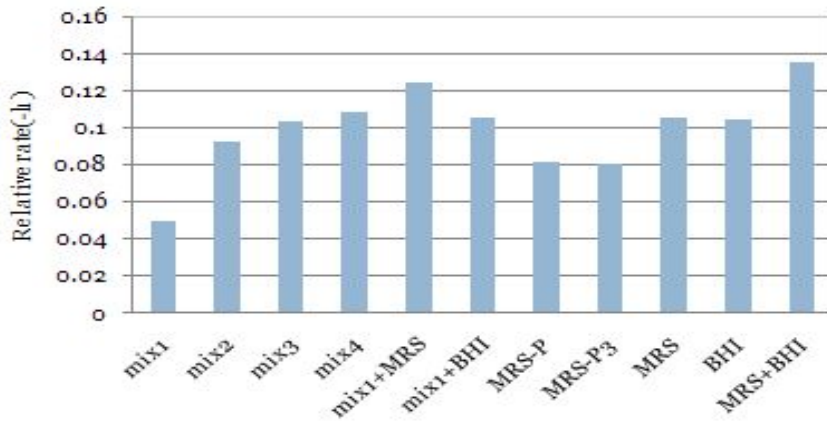


Fig. 106. Effect of growth rate with jeotgal(salted-fermented fish products) for ZEN102.

Table 32 .The composition of jeotgal combine medium

	P	S	SI	A	Glucose (1.5%)	K2HPO4 (0.5%)	Yeast extrat (0.5%)	peptone (0.5%)	MRS	BHI
mix1	o	o	o	o	o	o	x	x	x	x
mix2	o	o	o	o	o	o	o	x	x	x
mix3	o	o	o	o	o	o	x	o	x	x
mix4	o	o	o	o	o	o	o	o	x	x
mix1+MRS(50%)	o	o	o	o	o	o	x	x	o	x
mix1+BHI(50%)	o	o	o	o	o	o	x	x	x	o
MRS	x	x	x	x	x	x	x	x	o	x
BHI	x	x	x	x	x	x	x	x	x	o
MRS(50%)+BHI(50%)	x	x	x	x	x	x	x	x	o	o
MRS-P	MRS + peptone									
MRS-P3	MRS + proteose peptone NO.3									

A: Anchovy(salt 0.5%), SI: Sauced intestine(salt 0.5%), S: shrimp(salt 0.5%), P: Pollack(protein 161mg/L)

㉔ 젓갈류 추출액 농도에 따른 균 생육 및 활성

젓갈류 추출액(protein 1.2g/L)농도를 달리하여 ZEN102균 생육 및 활성을 측정하였다. 젓갈 추출액 약 17% 혼합시 가장 생육이 좋았으며, 항균 활성은 추출액 33%까지는 증가하였다. (Fig. 107)

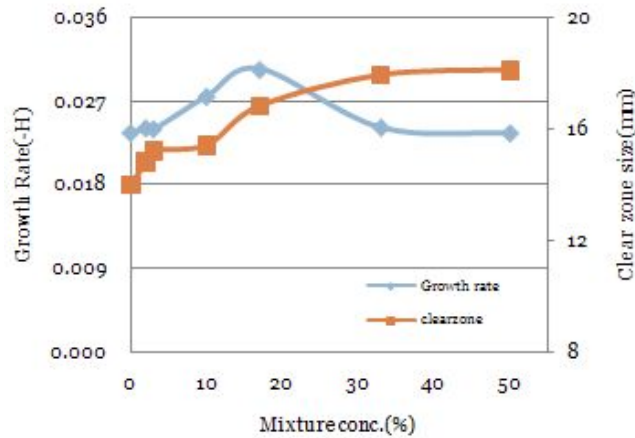


Fig. 107. Effect of growth rate and activity with jeotgal concentration for ZEN102.

㉔ 젓갈 추출액(2%, protein 1.8g/L) 과 MRS혼합배지에서의 생육 및 활성

젓갈 추출액을 3%로 고정하고 MRS 양을 달리하여 배지를 조합하여 균 생육 및 활성을 확인 하였다. 젓갈 추출액 3%와 MRS- 2.3g/L 혼합배지에서 MRS 100%의 성장률을 보였다. 항균활성의 경우 MRS에 비해 약 94%정도의 활성을 보였다.

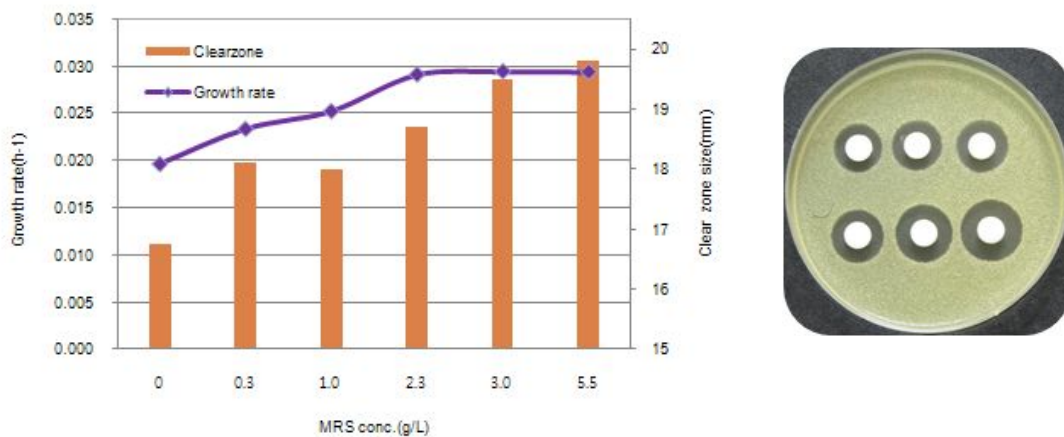


Fig. 108. Effect of growth rate and activity with jeotgal medium combine for ZEN102.

16. 배양액 내의 항생물질의 간편 회수실험

대량배양 및 생산 system 하에서 배양액 내의 small peptide를 분리해내는 문제는 매우 중요한 부분에 속한다. 기존의 방법으로는 ammonium sulfate법을 이용한 침전 및 투석을 통한 농축법이 주로 이용되었다. 그러나 원심분리를 통한 침전과 분획에서 경제적 시간적인 제약이 많이 따르는 관계로 산업적 적용에 많은 문제점을 야기할 것으로 판단된다. 그리고 이를 개선할 수 있는 방법으로 최근 UF system를 산업적으로 적용하는 사례가 늘고 있다. 이 방법은 기존의 ammonium sulfate법에 비해서는 연속적이 system을 구축할 수 있어 획기적 개선법으로 이용되어지고 있으며, 미래 산업적 응용에 꼭 필요한 system이라 할 수 있다. 그러나 현재까지는 막 기공의 막힘현상(fouling)이 완전히 해결되지 않아 비용이 높게 나타나게 되므로 원가 상승의 요인으로 작용되고 있는 점이 극복해야할 단점으로 지적된다.

본 실험에서는 이러한 문제점을 해결할 수 있는 방법으로 Polyethylen glycol (PEG)를 이용한 수성이상계를 이용한 배양액 내 small peptide 및 protein의 간편 분리법을 연구하였다.

이 실험을 위해서 우선 Nisin을 이용한 병원균에 대한 Clear zone size를 확인하는 실험을 통해서 수성이상계의 선택성을 분석을 시도하였다.

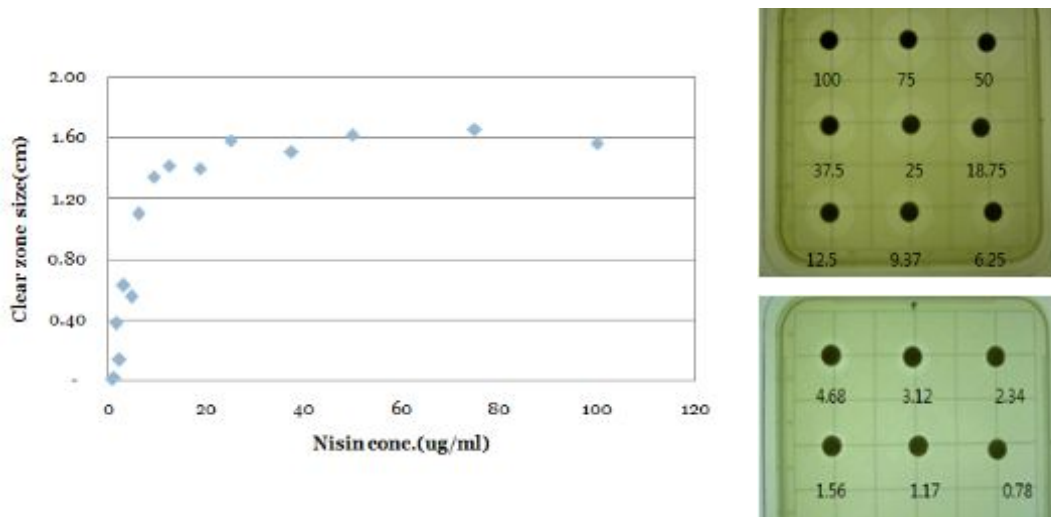


Fig. 109. Antimicrobial activity of nisin

Nisin 농도에 대한 병원균 clear zone size standard를 실험한 결과, 최적배지인 MRS100%배지에 배양한 ZEN49의 항균활성물질의 병원균에 대한 활성은 Nisin standard와 비교한 결과 Nisin 4.68mg/ml ~ 6.25mg/ml에서의 clear zone의 크기와 유사하다는 것을 알 수 있다.

PEG 종류에 따른 수성이성계 형성의 차이를 알아보기 위해서 PEG600, PEG3000, PEG4000, PEG6000, PEG8000을 각각 15% 되게 하고 Na₂SO₄ 20%되게하여 층구분을 유도하였다.

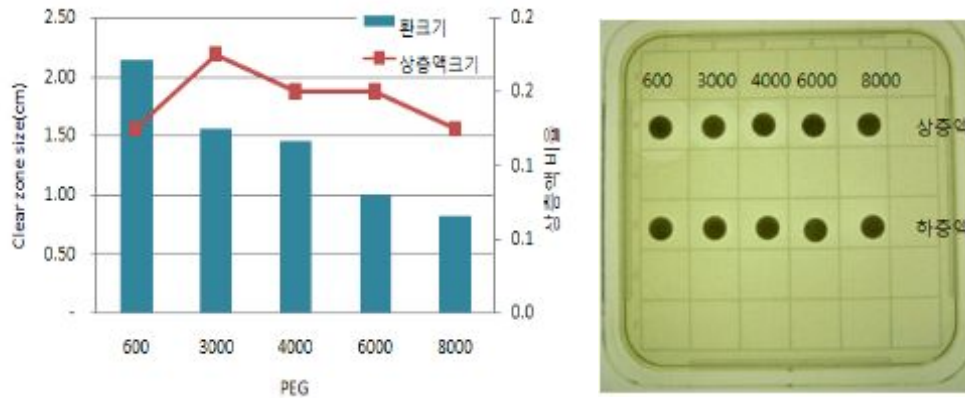


Fig. 110. Antimicrobial acitivity of nisin with PEG

그 결과 상층액에서의 항균활성물질이 검출되었고 그 활성은 PEG 600이 가장 높게 나타났다. 특히 층의 크기역시 PEG 600과 PEG 8000이 가장 작게 형성되어 배양액 내의 protein 농축에 매우 효과적일 것으로 판단된다.

PEG 종류에 따른 실험결과를 바탕으로 ZEN49 균주의 배양액에 적용한 실험을 실시하였다. 그 결과 PEG 600이 역시 가장 좋은 결과를 나타내었다. 결과적으로 PEG 종류 중에서 PEG 600이 점성면에서 가장 묽어 사용상의 편리성뿐만 아니라 배양액 내의 Small peptide의 분리에도 매우 우수한 것으로 판단된다.

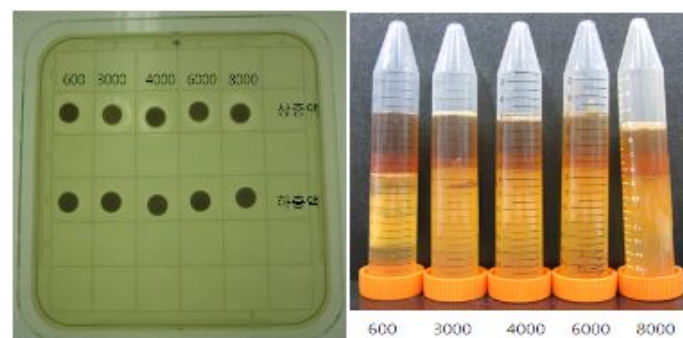


Fig. 111. Antimicrobial acitivity of antimicrobial agent from strain ZEN49 with PEG

실험에서와 같이 PEG600의 활성이 가장 우수한 반면 층의 크기가 다른 것에 비하여 비교적 크게 나타나 이를 줄일 수 있는 방안이 필요한 것 같다. Sodium sulfate

농도에 따라 수성이성계 층의 크기 영향을 받는다는 보고가 있어 이에 대한 특성을 알아보기 위해서 15% PEG600에 Sodium sulfate양을 달리하여 층구분을 시도하여 층의 크기를 비교하였다.

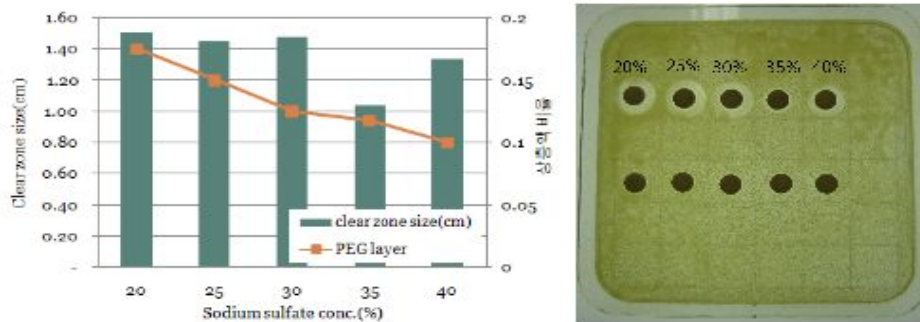


Fig. 112. Antimicrobial activity of nisin with sodium sulfate

실험에서 보듯이 Sodium sulfate 20%에서 40%까지 단계적으로 PEG층의 크기가 축소되는 것을 알 수 있었다. 그러나 sodium sulfate의 양이 상대적으로 많이 들어가는 문제점을 함께 가지고 있어 층의 축소에 너무 큰 비중을 두어서는 안 될 것으로 판단된다. ZEN49 배양액을 통해서 확정 실험을 실시하였다.

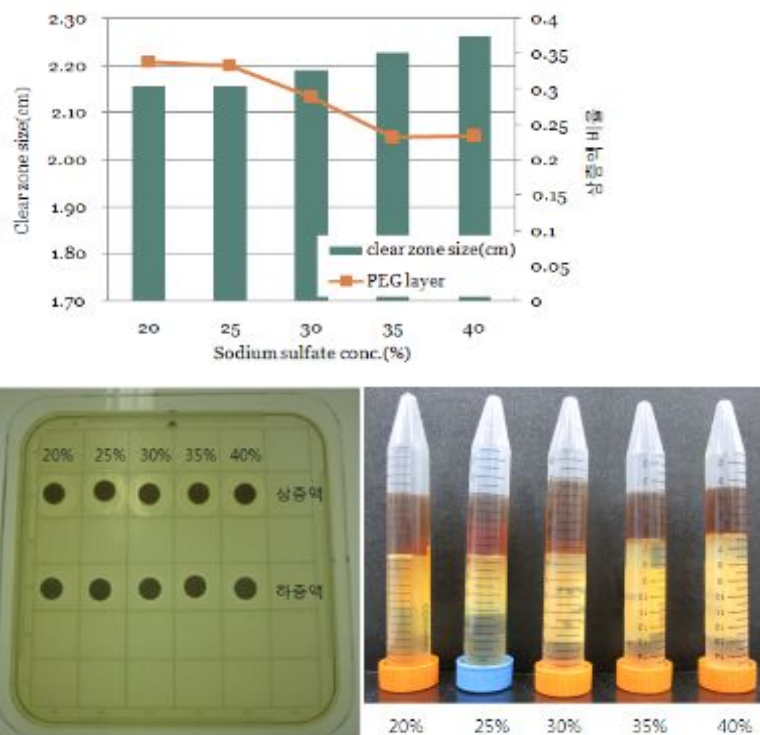


Fig. 113. Antimicrobial activity of antimicrobial agent from strain ZEN49 with sodium sulfate

ZEN49 배양액에 PEG600을 15%(v/v)를 투여하고 Na_2SO_4 를 농도별로 투여하여 수성

이상계를 만든 다음, 상층액과 하층액에서 bacteriocin의 활성을 분석하였다. 표준 시료인 Nisin을 이용하여 분석한 결과와는 다소 다르게 Na_2SO_4 의 농도가 20~40% 범위에서 bacteriocin의 활성이 유사하게 나타났다. Na_2SO_4 의 농도변화에 따라 박테리 오신의 활성이 큰 차이가 없게 나타남으로 재료비의 절감을 위하여 Na_2SO_4 20%의 농도를 선택하고 다음 실험을 수행하였다.

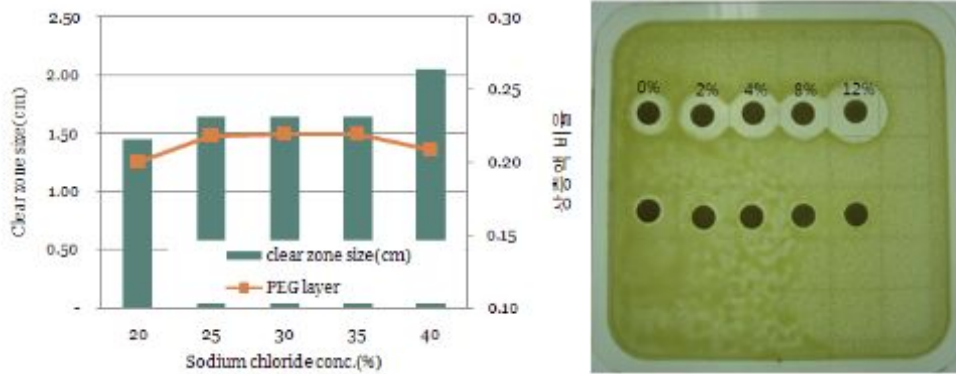
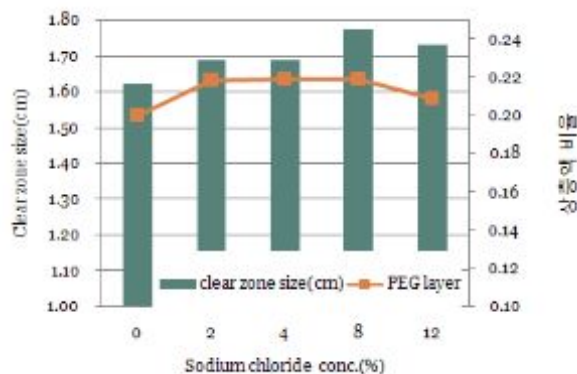


Fig. 114. Antimicrobial activity of NaCl concentration

NaCl 농도에 따른 층 구분 및 활성도에 대한 차이를 확인하였다. NaCl의 농도를 0%, 2%, 4%, 8%, 12%로 하여 15%PEG와 20% Na_2SO_4 에 혼합하여 층 구분을 유도하였다. 그 후 활성분석을 하였다.

역시 nisin으로 한 실험에서 12% NaCl에서 가장 활성이 우수하였다. ZEN49 배양액을 통해 검증실험을 실시하였다. 그 결과 NaCl의 농도가 높을수록 활성도가 높아지는 것을 알 수 있었다.



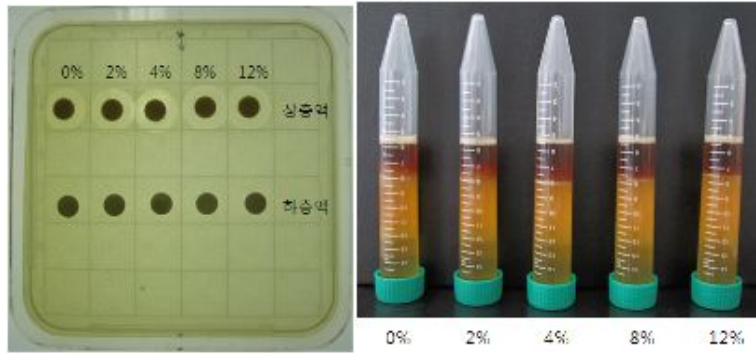


Fig. 115. Antimicrobial activity of antimicrobial agent from strain ZEN49 with NaCl

PEG600의 농도를 15%(v/v), Na_2SO_4 농도를 20%(w/v)으로 고정하고 NaCl의 농도를 0~12%로 변화시키면서 상층액에 올라가는 ZEN49 배양액에 있는 bacteriocin의 활성을 측정하였다. 표준시료인 Nisin에서의 결과와는 달리 배양액에서는 NaCl의 농도가 증가하여도 상층에 있는 bacteriocin의 활성은 크게 증가하지 않았다. 이런 결과는 배양액 속에 있는 다른 물질 때문에 bacteriocin의 이동이 영향을 받는 것으로 추측된다. 따라서 NaCl의 농도 2%(v/v)를 첨가하므로 NaCl에 의한 효과를 일부 받으면서 원가 절감 및 공정의 간편화를 기대하였다.

층분리에서 원심분리의 유무에 따른 경비적 측면도 무시할 수 없어 이에 대한 실험을 실시하였다.

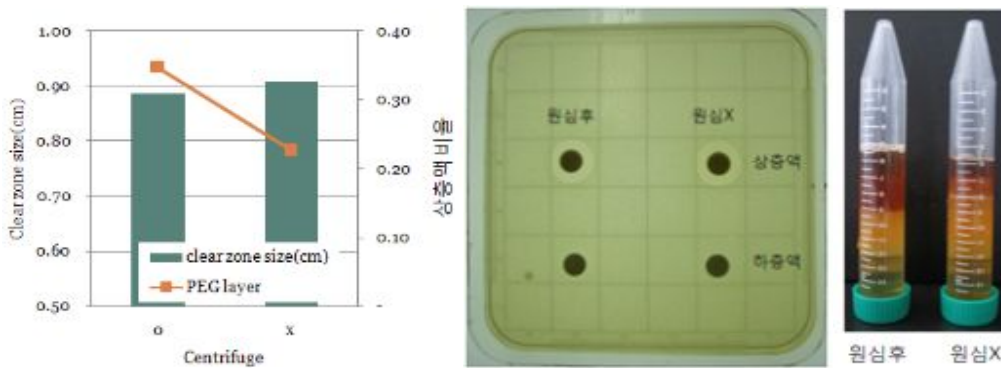


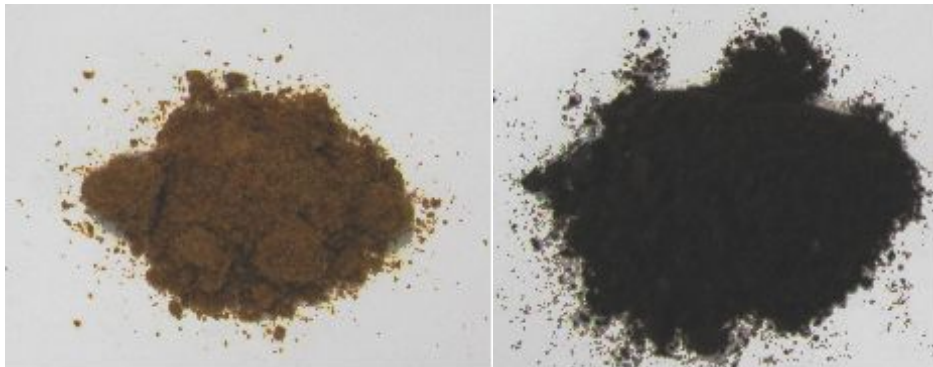
Fig. 116. Antimicrobial activity of antimicrobial agent from strain ZEN49 with centrifugation

위에서 정해진 각 농도 PEG600 15%(v/v), Na_2SO_4 20%(w/v), NaCl 2%(w/v)로 원심분리 한 것과 하지 않은 것의 차이를 비교분석하였다. 실험은 MRS 배지에서 12시간 배양한 배양액을 원심분리(10,000rpm, 30분)를 하여 균체를 제거한 것과, 원심분리

하지 않고 균체가 있는 상태에서 그대로 층분리를 하여 상층액에서 올라오는 bacteriocin의 활성을 비교하였다. 균체를 제거하는 과정 없이 배양액에서 bacteriocin 만을 쉽게 분리할 수 있다면 분리정제공정이 단순화되어서 대량생산 시에는 원가절감 효과가 매우 클 것이다. 그림에서와 같이 배양액을 원심분리 한 것에서의 bacteriocin 활성이 원심분리하지 않은 배양액보다 크게 개선되지 않았다. 따라서 원심분리에 따른 노동력 및 손실을 고려하지 않으므로 경제적인 분리가 될 것으로 판단된다.

17. Pilot plant(산업적 생산을 위한 예비 공정)

앞에서의 실험을 토대로 대량생산을 위한 최적 배지로는 BPG배지를 선정하였다. Glucose 10g/L, Proteose Peptone 10g/L, Beef extract 5g/L, Yeast extract 5g/L, K_2HPO_4 2g/L, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.3g/L, $CuSO_4 \cdot 5H_2O$ 0.01g/L 각각을 정량하여 경북바이오산업연구원 Pilot plant fermenter 30L에서 1차 배양을 하였다. 배양 후 고액분리하여 상등액을 분무건조와 동결건조를 통해 Powder를 만들어 각 성분의 항균활성을 측정하였다.



Freeze dry powder

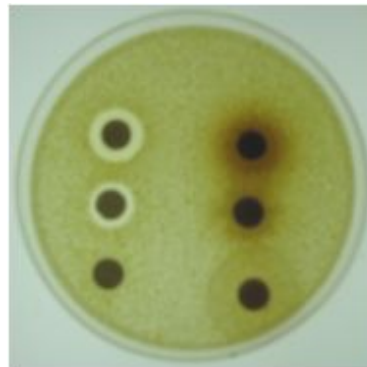
Spray dry powder

Fig. 117. Powder type from strain ZEN49

Pilot plant fermentation GIMB의 fermenter 를 이용하여 ZEN49을 BPG배지에서 배양한 후 병원균에 대한 LD_{50} 값을 확인하였다. 정제를 거치지 않은 상태임에도 Freeze dry 가공의 경우 2.96mg/ml 수준에서 0.5mg/ml의 nisin의 농도를 얻었다. 10L fermentation에서 Freeze dry 575g, Spray dry 122g해서 total 697g을 확보했다. 아직 체계화되지 않은 공정 진행단계에서 일정부분 손실이 발생하므로 회수율의 차이가 나타난 것으로 판단된다.

18. Freeze dry powder의 활성실험

각각의 분말을 20ml/ml의 solution을 만들어 활성분석을 시도하였다. Fig. 118에서 나타난 바와 같이 Freeze dry에 비해서 spray dry의 활성 효율이 급격하게 낮은 것을 볼 수 있었다. 순간적인 고온에 노출되어 Peptide가 건조되는 것보다는 타버리는 경향이 나타나 활성이 감소된 것으로 판단된다. 두 dry powder에 대한 병원균 (*M. luteus*)의 LD₅₀ 값은 각각 2.96mg/ml과 10.86mg/ml으로 나타났다. Freeze dry LD₅₀의 수준은 Nisin으로 환산할 경우 0.5mg/ml. nisin 농도와 버금가는 농도라 할 수 있다. 이를 바탕으로 10L 배양액을 기준으로 Nisin 역가로 환산할 경우 Freeze dry의 경우 95.8g(18L)으로 약 16.5%의 nisin이 함유된 값이 나왔다. 이를 다른 손실량을 고려할 경우 10L 기준으로 약 160g이며 항균물질 26g을 얻을 수 있을 것으로 계산된다. 차후 UF이에 대한 순도를 높일 경우 산업화에 큰 어려움이 없을 것으로 판단된다.



Process	LD ₅₀
Freeze dry(FDP)	2.96mg/ml-- 0.5mg/ml.†
Spray dry(SDP)	10.86mg/ml

Fig. 118. Comparison of antimicrobial activity with freeze dry and spray dry powder

Field 예비 실험 : 실험을 위해서 20L 수족관을 준비한 후 포항 북부해수욕장 해저 200m 수심에서 펌핑해 활어차에 공급하는 해수를 받아 실험에 사용하였다.

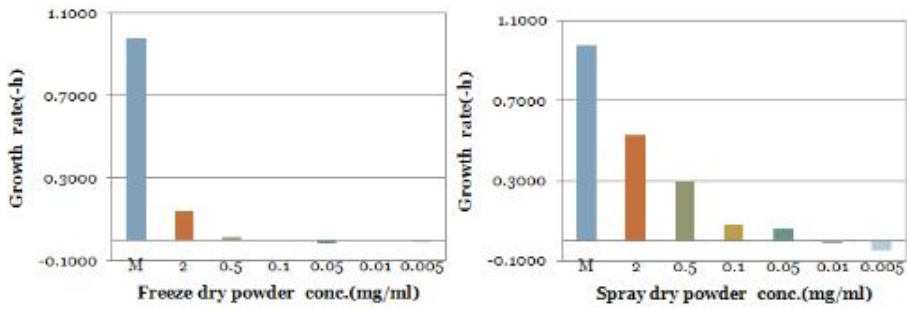
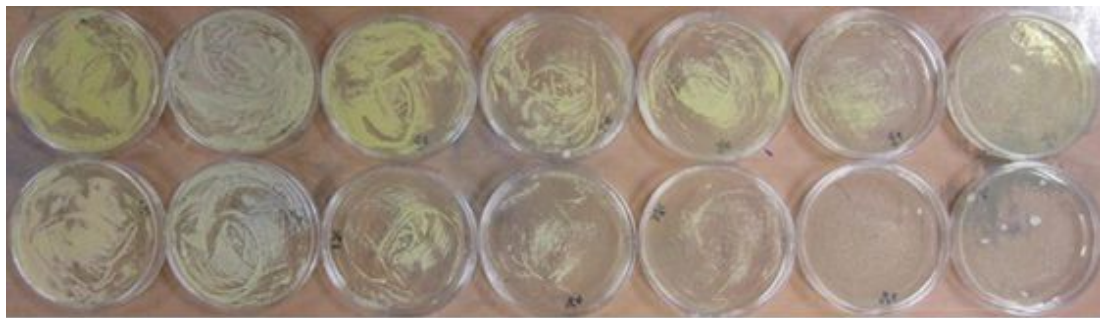


Fig. 119. Pilot plant 배양 후 항생물질의 역가

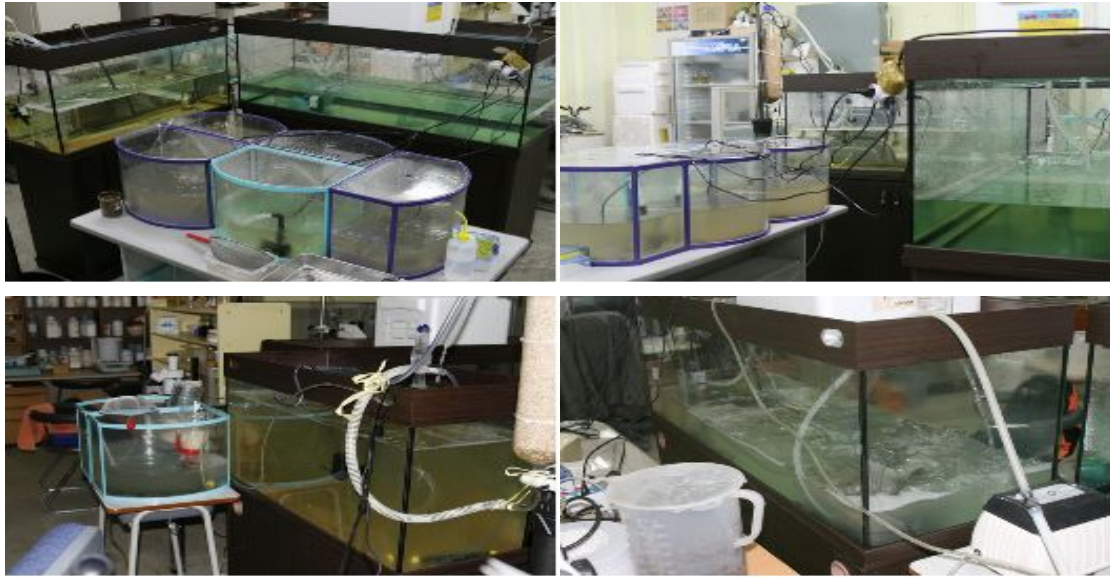
실험방법은 일차적으로 25%의 염분을 함유한 해수에 병원균으로 *M. luteus*($\approx 5.7 \times 10^7/\text{ml}$)와 *S. iniae*($\approx 7.0 \times 10^7/\text{ml}$)를 각각 5ml씩 미리 접종한 후 over night 한 후 FDP를 LD₅₀에 준하는 3mg/ml의 농도에 준하여 20L 수족관에 담긴 10L의 해수에 투여하여 그 변화를 관찰하였다. 실험에서 해수에 병원균만 접종한 대조구를 따로 설정하여 control로 두었다. 또한 해수내의 균 생육은 OD(650nm)에서 해수의 sample을 30분 간격으로 측정하였으며 최종 Cell 확인은 dilution을 통한 hard agar plate 도말법으로 실시하였다.

각 sample 100ul를 BHI agar plate에 말하여 병원균의 성장을 관찰하였다. 시간단위별 균의 밀도가 급격히 낮아지는 것을 볼 수 있었다. 8시간 이후 감소되는 경향이 뚜렷하였다.



배양24h 접종 0h 접종후 2h 접종후 4h 접종후 6h 접종후 8h 접종후10h

실험장치 및 전경



19. 넙치를 이용한 제품의 활성 실험

가. 해수와 박테리옌 균주의 항균력 예비 실험

해수 sample을 채취하여 1000 μ l에 농축 및 정제한 박테리옌을 1%첨가하여 해수와 반응 후 100 μ l 취하여 plate에 도말 하였다. 그 결과 해수와 bacteriocin 생산 균주의 항균력 실험에서 해수와 반응하였을 때 ZEN49의 경우 약간의 감소가 있었으며 다른 균주에서는 plate의 대부분을 덮어 해수에 대한 bacteriocin의 항균력과의 관계를 판단하기 힘들었다.



해수



해수+ zen24



해수+ zen77



해수+ zen49



해수+ zen102

나. 넙치 준비 및 분배

넙치는 포항시 남구 구룡포읍 석병리에 위치한 영동수산 넙치 축양장으로 부터 치어(6~8cm)를 500마리 분양 받았다. 이후 넙치를 수조에서 키우면서 2주간 환경 적응 기간을 가졌다. 적응 기간이 끝난 후 넙치를 대조구 및 시험구로 구분하여 실험 하였다.

1차 항균실험



2차 항균 실험



다. bacteriocin 투여량 결정

(1) bacteriocin 농도에 따른 병원균의 저해 실험

지시균으로 *Micrococcus luteus*, *Streptococcus aureus*, *Listonella anguillarum*, *Edwardsiella tarda* 를 사용하였다. 농축액은 zen102, zen49, LK7, Vk24를 3ℓ 배양하여 300ml가량 농축하여 0.45μl filter로 여과 후 bacteriocin 농축액으로 사용 하였다. 96well plate에 Total volum 200μl로 하여 지시균 50μl(OD 595nm: 0.2 수준)을 취하고, 여기에 각 농축액을 총 용량 200μl에 대해 0, 5, 10, 20, 30, 50 % 수준으로 각각 주입하였다. 이후 시간에 따라 OD값을 측정하여 균의 생육저해를 알아보았다.

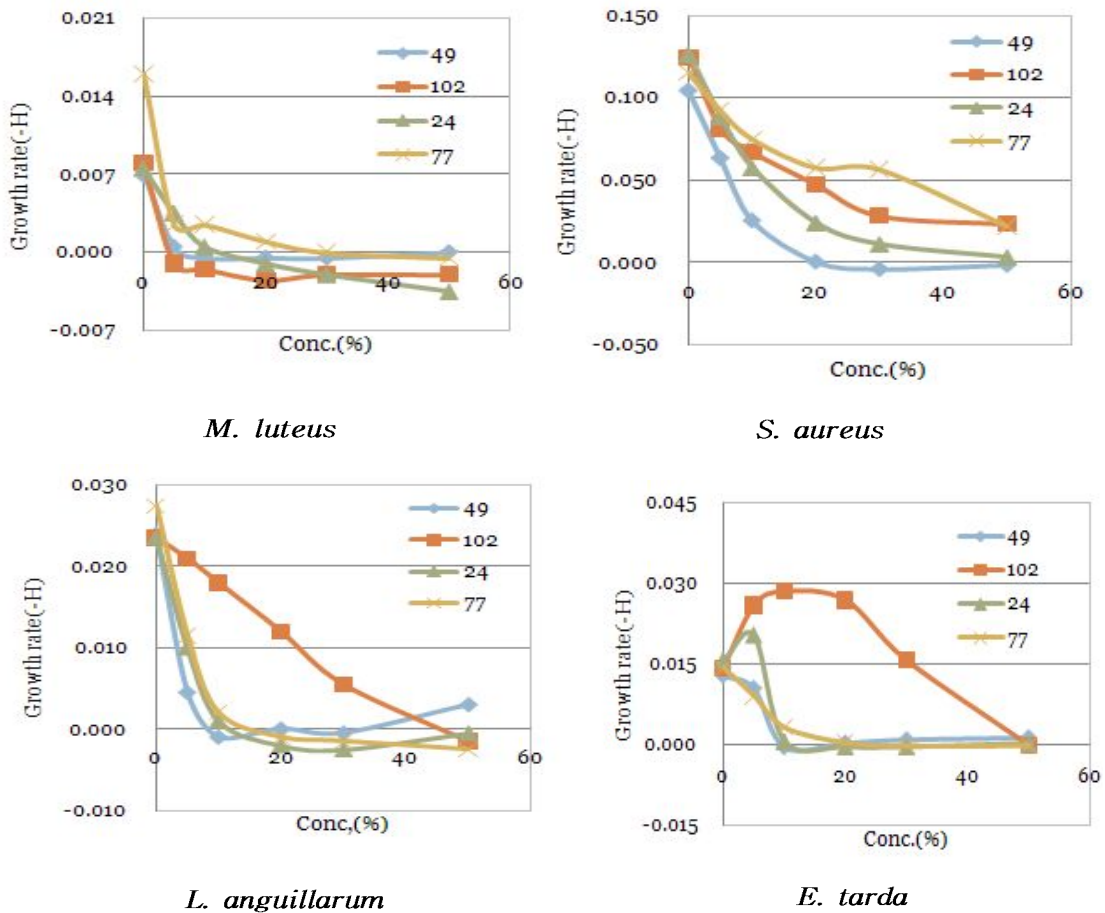


Fig. 120. Antimicrobial activity of antimicrobial agent against pathogens

농축된 항균 물질을 사용한 결과 각각의 지시균에 대하여 저해력이 차이가 나타났다. *Micrococcus luteus* 의 경우 ZEN102, ZEN49, LK7, Vk24 모두 5%, *Streptococcus*

*aureus*에서는 10%, *Listonella anguillarum*에서는 20~60%, *Edwardsiella tarda*는 10% 수준 안에서 저해가 일어남을 알수있었다. ZEN49의 경우 지시균 4가지에 대하여 Vk24, LK7은 3가지 균(*M. luteus*, *S. aureus*, *E. tarda*) 탁월한 항균 효과가 나타났다.(Fig. 120)

(2) 병원균의 농도에 따른 bacteriocin 농축액의 활성 실험

지시균으로 *Micrococcus luteus*, *Streptococcus aureus*, *Listonella anguillarum*, *Edwardsiella tarda*를 사용하였으며, 농축액은 ZEN102, ZEN49, LK7, VK24(3ℓ 배양하여 300ml가량 농축하여 0.45μl filter로 여과)를 박테리오신 농축액으로 사용하였다. 96well plate에 Total volum 200μl로 하여 각각의 농축액을 50μl을 취하고, 여기에 각 지시균(OD 595nm: 0.2 수준)을 200μl에 대해 0, 1, 3, 5, 13, 25, 50, 75, 100 % 수준으로 각각 주입하였다. 이후 시간에 따라 OD값을 측정하여 지시균의 농도에 따라 각 bacteriocin 농축액의 활성 정도를 알아보았다.

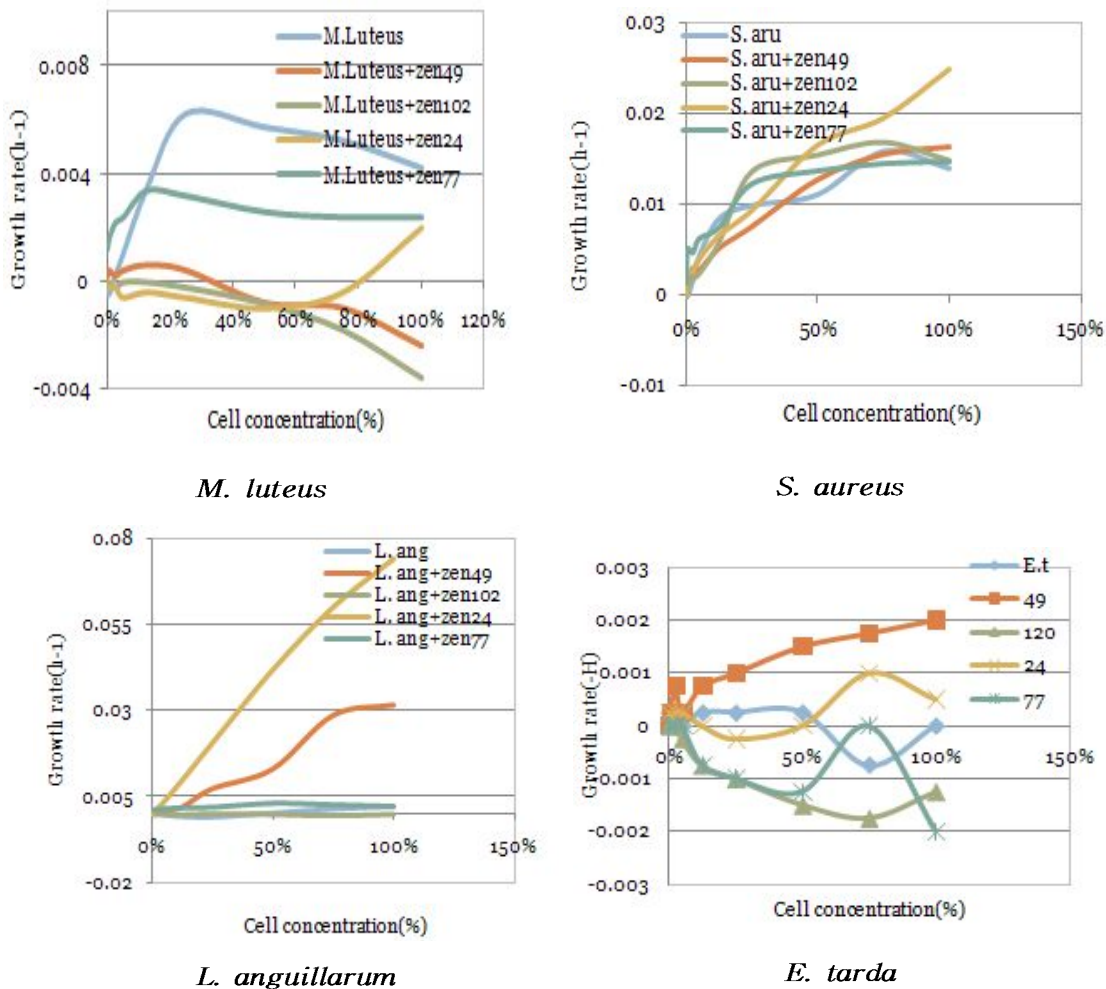


Fig. 121. Antimicrobial activity against pathogens

그 결과 균의 농도에 따른 zen49, zen102, LK7, Vk24 균주의 활성은 Fig. 121과 같이 나타났다. ZEN49, ZEN102, VK24 에는 *M. luteus* 균 농도가 80 %이상 되어도 항균 활성을 나타내어 항균력이 우수함을 알 수 있었다. *S. aureus* 에서는 농도가 높아짐에 따라 균의 항균력이 월등하게 낮게 타났다. ZEN102와 LK7은 *L. anguillarum*에 대하여 뛰어난 항균력을 보여주었다. 마찬가지로 *E. tarda* 균 농도가 높아져도 각 ZEN102, LK7, VK24균주들의 항균 활성 효과를 기대 할 수 있을 것으로 보여 진다.

넙치에 대한 항균력 시험을 위해 사용할 *L. anguillarum* 과 *E. tarda*를 이용하였다. 그리고 투여량은 Table 29와 같이 설정하였다.

2010년 9월 9일 1차 접종 후 4일간 모니터링하고 2차 접종은 양어수 1/2 수준을 물 같이 후 접종하였다. 2차 접종과 동시에 공격실험을 위해 병원균 *L. anguillarum* 과 *E. tarda*를 각 실험구에 투여 상태를 관찰하였다.

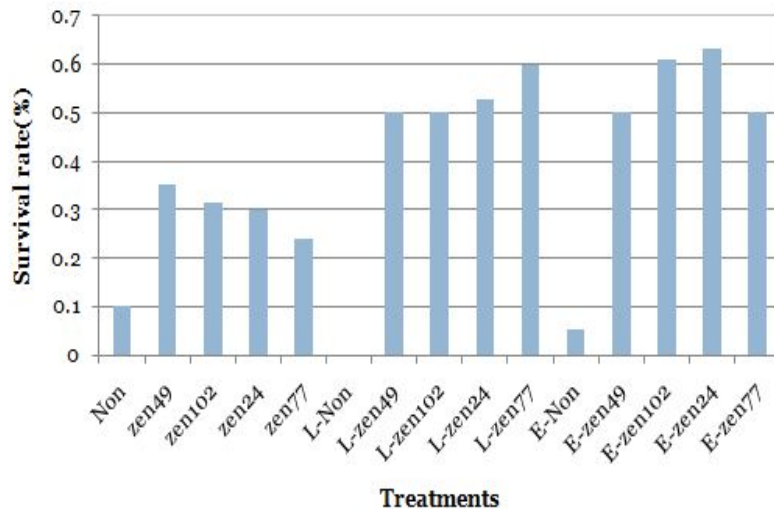


Fig. 122. Survival rate of flatfish with antimicrobial agents

실재의 현장 적용 실험을 위해 넙치 양어환경을 재현한 후 공격 실험을 실시하였다. 그 결과 Table 33과 같이 나타났다. 각 시험구의 생존율을 조사한 결과, Fig. 122에서와 같이 무처리 대조구에 비해 ZEN49, ZEN102, LK7, VK24 처리 실험구의 생존율이 약 2배 높게 나타나 실제 환경 적용에서도 양식 어류의 생존율에 큰 영향을 나타낼 것으로 보여 진다.

특히, 병원균만 넣어준 무처리 대조구 중, *L. anguillarum* 처리구에서는 넙치 19마리 모두 죽은 반면 시제품 처리구의 경우 50~60%의 생존율을 보였다. 또한 *E. tarda* 처리구에서도 시제품을 처리하지 않은 경우 19마리 중 1마리만 생존한 반면 시제품 처리구의 경우 50% 이상의 생존율을 나타내어 효과적인 항균활성을 확인 할 수 있었다.

현장실험에서 물고기들이 생각보다 많이 죽은 것은 적절한 양어환경이 이루어지지 않은 열악한 배양조건 때문으로 판단되어 진다.

1차 시험

E. tarda



L. anguillarum



2차 시험

E. tarda



L. anguillarum



그러나 대조구에 비해 상당한 차이를 보이는 생존율을 가만할 경우 항균효과가 충

분히 인정되며 병원균 감염에 대한 신속하고 효과적인 대처 방안이 될 수 있을 것으로 판단된다. 넙치에 대한 독성 실험 결과 사진에서 보는 것과 *E. tarda* 에 감염된 경우 탈장 및 체색 흑화 현상이 나타났으며, *L. anguillarum* 감염된 경우에는 아가미 퇴색 및 충혈 증세가 나타났다.

라. 조정제 bacteriocin에 대한 성분 분석

Bacteriocin을 생산하는 균주를 seed culture 하여 3ℓ 배양한 다음 감압 농축기를 이용하여 300ml로 농축하고 0.45 μ l filter로 여과한 후 (사)한국단미사료협회에서 성분분석을 의뢰 하였다. (Table34, 35, 36, 37)

분석결과 Mg, Mn, Ca 등의 미량 원소들이 다량 함유 되어 있고 비타민 성분 분석에서는 ZEN102, ZEN49, LK24, LK7 모든 시료에서 비타민 K3와 비타민 D3 성분을 포함하고 있어 제제화 시 항균효과뿐만 아니라 물고기 생육에 좋은 영양요소로 작용할 것으로 판단된다.

비타민 D3는 인산염 흡수를 촉진하여 골격형성에 도움을 주는 물질로 알려져 있고 비타민 K3는 동물 체내에 흡수되면 비타민 K3에서 비타민 K2로 전환되어 혈액응고에 필요한 단백질 합성에 이용된다. 비타민 K3는 비타민 K 보다 2배 정도의 활성이 높다. 또한 열량은 Kg당 약 1,900kcal로서 고열량으로 나타났다. 반면에 펩신에 의한 소화율이 모두 90% 이상인 것으로 분석되어 고단백성 제제로 사료첨가 제제로서의 가능성이 충분할 것으로 판단된다. 그러나 배지성분에 함유된 중금속 성분이 미량이지만 내재되어 있어 이를 배제한 안전한 제제화가 이루어져야 할 것으로 사료된다.

Table 33. Result of flatfish challenge test

	Non treatment					L. anguillarum					E.tarda				
	Non	zen49	zen102	zen24	zen77	L-Non	L-zen4 9	L-zen1 02	L-zen2 4	L-zen7 7	E-Non	E-zen4 9	E-zen1 02	E-zen2 4	E-zen7 7
09월 09일	75	75	75	75	75										
09월 10일	1	1	3	5	2										
09월 11일	7	7	12	15	9										
09월 13일	7	11	7		4										
09월 14일	3	1	1	2	1										
Survival	58	56	55	58	61										
Survival rate(%)	76	75	73	77	81										
09월 14일	20	20	19	20	21	19	18	18	19	20	19	18	18	19	20
09월 15일	2	4	1		2	4	6	4	3	4	2	5	4	2	4
09월 16일	5	1	3	4	1	1		1	1	1	1			3	1
09월 17일	1		2	1	2			1	1		5	1	1		
09월 18일		1	1	3	3	3	2	2			2				1
09월 19일	1			1		4			2		5	1		1	2
09월 20일		3	2	1	1	3			1	2	2		1		
09월 21일		1		1	1	4					1	1			
09월 22일															
09월 24일					2										
09월 25일	1				1										
09월 26일			2												1
09월 27일													1		
09월 28일				1	1				1						
09월 29일	2		1												
09월 30일		1					1								
10월 1일	1													1	1
10월 2일	2		1												
10월 3일		1		1								1			
10월 4일	3				2			1		1					
10월 5일		1													
10월 6일				1											
Survival	2	7	6	6	5	0	9	9	10	12	1	9	11	12	10
Survival rate(%)	10	35	31.5	30	23.8	0	50	50	52.6	60	0.52	50	61.1	63.1	50

Table 34. Analysis of prototype 1

성분명	단위	zen49	zen102	zen24	zen77
수분(135, 2H)	%	92.19	90.73	92.68	93.65
조단백질	%	5.78	9.54	6.63	6.32
조지방(E.E)	%	0.02	0.02	0.01	0.01
조지방(산분해법)	%	0.44	0.49	0.11	0.08
조섬유	%	0.06	0.07	0.07	0.07
조회분	%	4.66	2.55	2.75	2.63

Table 35. Analysis of prototype 2

성분명	단위	zen49	zen102	zen24	zen77
K	%	0.46	0.58	0.16	0.22
Mg	ppm	89.75	38.83	23.75	33.32
Zn	ppm	2.33	4.13	4.76	4.72
Mn	ppm	43.95	23.71	1.32	1.2
Cu	ppm	불검출	불검출	불검출	불검출
Fe	ppm	6.73	8.82	8.92	7.56
Ca	ppm	420.14	60.2	35.29	33.91
P	ppm	0.2	0.28	0.22	0.21
Pb	ppm	1.59	1.51	1.47	1.55
Cd	ppm	0.64	0.61	0.61	0.67
As	ppm	불검출	불검출	불검출	불검출
Hg	ppm	불검출	불검출	불검출	불검출
Cr	ppm	1.06	1.58	0.4	0.81

Table 36. Analysis of prototype 3

성분명	단위	zen49	zen102	zen24	zen77
비타민 A	IU/L	불검출	723.2	불검출	불검출
비타민 E	IU/L	불검출	불검출	불검출	불검출
비타민 K3	mg/L	20.8	34.92	18.68	22.87
비타민 D3	IU/L	817.62	1020.3	455.34	402.1
산성세제불용섬유(ADF)	%	0.27	0.49	0.56	0.31
중성세제불용섬유(NDF)	%	0.54	0.55	0.63	0.43
0.2% 펩신 소화율	%	96.45	99.86	91.14	97.5
열량	Kcal/kg	1930.95	2095.62	1897.26	1864.72
비중	g/ml	1.05	1.06	1.03	1.04

Table 37. Analysis of prototype 4

성분명		단위	zen49	zen102	zen24	zen77
아미노산 안정계열	트레오닌	%	0.17	0.3	0.28	0.27
	세린	%	0.19	0.35	0.25	0.28
	프롤린	%	0.53	1.1	0.7	0.68
	발린	%	0.22	0.82	0.39	0.37
	이소루신	%	0.16	0.42	0.3	0.29
	루신	%	0.33	0.29	0.53	0.52
	티로신	%	0.11	0.75	0.14	0.14
	라이신	%	0.26	0.17	0.42	0.43
	글라이신	%	0.44	0.01	0.35	0.35
	알라닌	%	0.36	0.89	0.39	0.38
	알기닌	%	0.21	0.59	0.14	0.15
	글루타민산	%	0.72	1.18	1.02	1.02
	아스파틱산	%	0.4	0.72	0.55	0.54
	히스티딘	%	0.15	0.29	0.16	0.17
	페닐알라닌	%	0.17	0.13	0.29	0.29
아미노산 황함유 계열 ทริป토판 계열	메치오닌	%	0.05	0.11	0.09	0.09
	시스틴	%	0.03	0.04	0.04	0.04
	ทริป토판	%	0.03	0.04	0.05	0.5

20. 시제품(Riocin[®])에 대한 독성 실험

가. 실험 재료

ZEN49 균주를 배양하여 정제한 후 그 상등액을 동결 건조하여 기타 부산물과 혼합하고 tablet형태로 조제 한 시제품(Riocin[®])을 이용하여 실험하였다.

나. 실험 방법

(1) 시제품의 항균력 검증

시제품을 1, 2, 3, 4개(0.5g/ea)를 멸균증류수 30ml에 녹여 얻은 상등액을 지시균 (*Micrococcus luteus*)을 도말한 plate에 paper disk 방법으로 6개월 동안 항균활성을 확인하였다.

Size(mm) \ F. 1 개수	1	2	3	4
	inhibition size(mm)			
12월 9일	16.3	19.8	21.5	22.5
03월 08일	18.4	20.9	21.6	22.6
06월 08일	14.7	14.9	18.0	16.9



12월 09일



03월 08일



06월 08일

시제품의 활성 실험 결과, 지시균(*M. luteus*)에 대해 강력한 항균활성을 가진 저해 환이 나타났으며, 시제품 용해 3개월 후에도 99%이상의 항균활성을 가지고 있음을 확인하였다. 이 결과를 토대로 시제품 보관을 용이하게 한다면 그 효능을 오랫동안 유지 할 수 있다고 판단된다.

다. 시제품의 항균활성 실험

(1) Nisin 함량에 따른 시제품의 활성 비교

Nisin 함량에 따라 시제품의 항균활성을 비교하여 얼마만큼의 항균활성을 가지는지 알아보았다.

먼저, 시제품을 0.1g/ml 농도로 조제하고 원심분리(8,000rpm,

20분)하여 상등액을 0.2 μ l filter로 여과한 후 실험에 사용하였다. 100, 10, 5, 2.5, 1.7, 1.3, 1.0, 0.7, 0.5 μ l를 취하여 지시균(*Micrococcus luteus*) 100 μ l를 각각 첨가하고 총 volume이 1ml이 되도록 한 후 30분간 30 $^{\circ}$ C 항온기에서 항균활성반응을 시켰다. 그 후, BHI soft agar배지에 각각 100 μ l 취하여 colony 수를 측정하

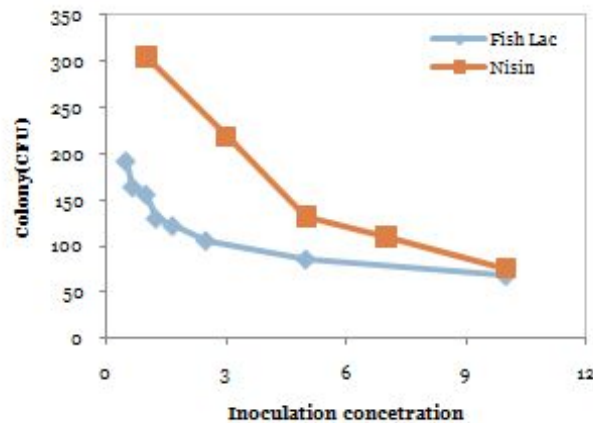


Fig. 123. Antimicrobial activity of prototype and nisin

여 항균활성을 측정하였다.(Fig. 123 , Table 38)

Table 38. Antimicrobial activity of prototype and nisin

nisin(mg/L)	Inoculation concentration								
	100	70	30	10	7	5	3	1	0.5
Colony(CFU)	1	16	29	76	110	132	218	304	442
Fish-Lac(ul)	100	10	5	2.5	1.7	1.3	1.0	0.7	0.5
Colony(CFU)	5	68	86	106	122	130	156	164	192

0.1g/ml의 시제품 10ul를 접종시 nisin 10ppm에 해당하는 활성을 확인하였고, 저농도의 시제품에서도 최대 nisin 활성의 약 2배 이상의 활성을 보여 뛰어난 시제품의 효율성을 확인할 수 있었다.

특히, 저농도 시제품(0.05ppm)에서는 tablet 1mg당 최대 0.06mg 의 nisin 농도와 같은 활성이 확인되었고 nisin 활성 기준으로 tablet 개당 30mg의 nisin을 함유한 것으로 계산되었다.

(2) 시제품 용량에 따른 활성

시제품을 0.0, 0.5, 1.0g의 무게를 취하여 멸균 증류수 10ml에 녹인 후 원심분리하고 그 상등액에 대한 지시균(*M. luteus*)의 저해된 colony 수를 측정하여 실험하였다.

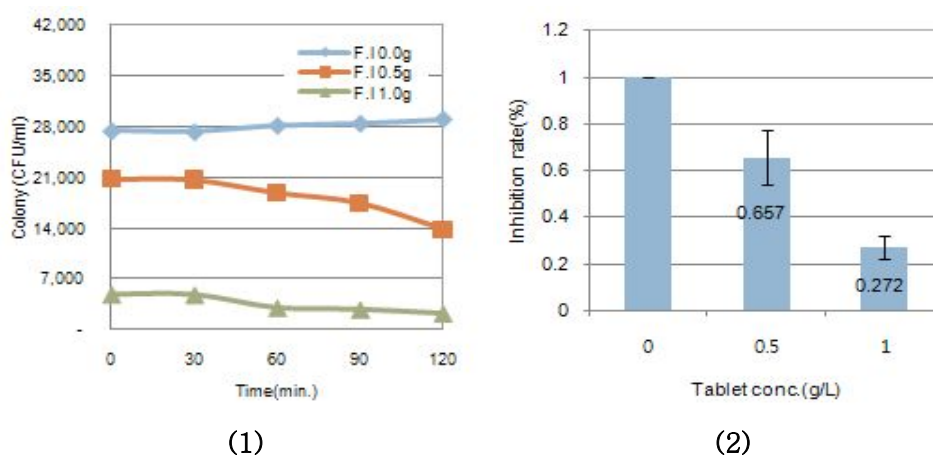


Fig. 124. Antimicrobial activity of prototype content

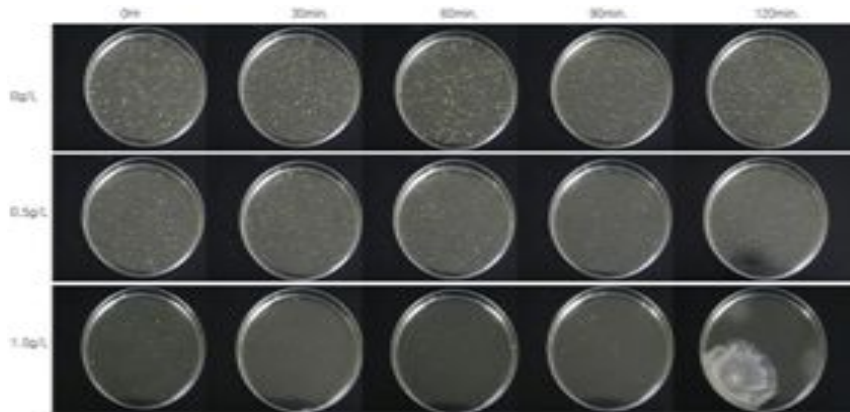


Fig. 125. Antimicrobial activity of prototype content(3)

그 결과 Fig. 124에서 보는 것과 같이 시제품의 투여와 동시에 *M. luteus* 균의 감소가 확연히 나타남을 확인하였다. 시제품을 첨가하지 않은 것에 비해 0.5g의 시제품을 첨가할 경우 *M. luteus*균이 평균 35%, 1.0g의 경우는 72% 저해되어 강력한 항균작용을 확인하였으며 30분이 지난 이후에도 지속적인 항균작용으로 인해 colony수가 감소하는 것을 확인하였다. 따라서 시제품(Riocin[®])의 항균작용은 강력하고 신속하며 지속적이므로 수산 양식장과 같이 넓고 유동적인 지역에서도 적용 가능할 것으로 사료된다.

(3) 시제품 농도에 따른 항균활성

시제품을 0.25%, 0.5% 농도로 조정하여 원심분리하여 획득된 상등액에 대한 지시균(*M. luteus*)의 저해된 colony 수를 측정하여 실험하였다.

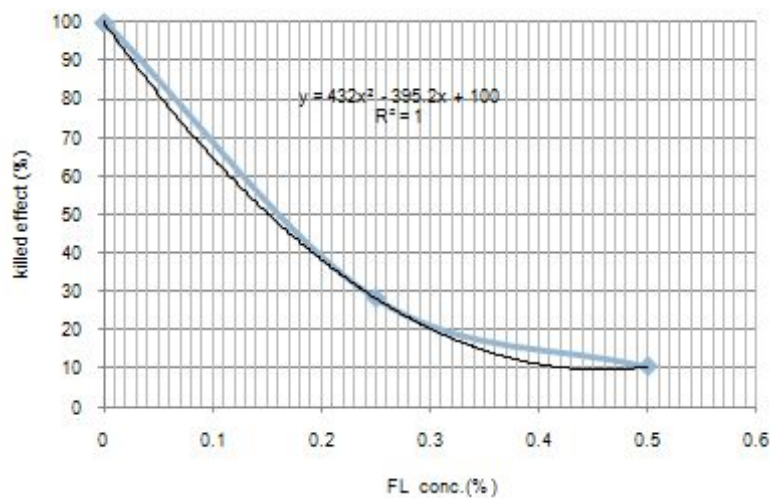


Fig. 126. Antimicrobial activity of prototype content against *M. luteus*

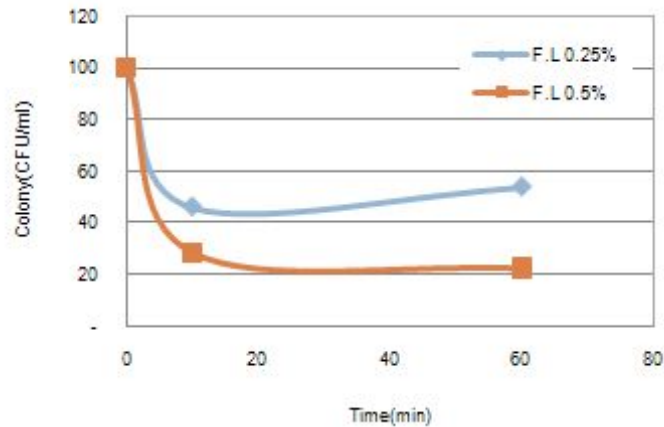


Fig. 127. Antimicrobial activity of prototype (1)

그 결과, 시제품 0.25%, 0.5% 농도에서 *M. luteus*에 대한 항균활성을 각각 71%, 89%로 확인하였으며, *M. luteus*균에 대한 항균력은 시제품과 함께 처리되어 배양 (T0:0시간)되었을 때 빠른 항균을 나타냈으나, 먼저 *M. luteus*균주를 접종하고 배양 1시간 뒤 시제품을 첨가 하여 실험한 결과(T1:1시간), 항균작용이 끝난 후 살아 남은 *M. luteus*가 다시 성장하는 것을 확인하였다. 따라서 병원균 발생 전 예방에 더 큰 효과가 있을 것으로 기대된다.

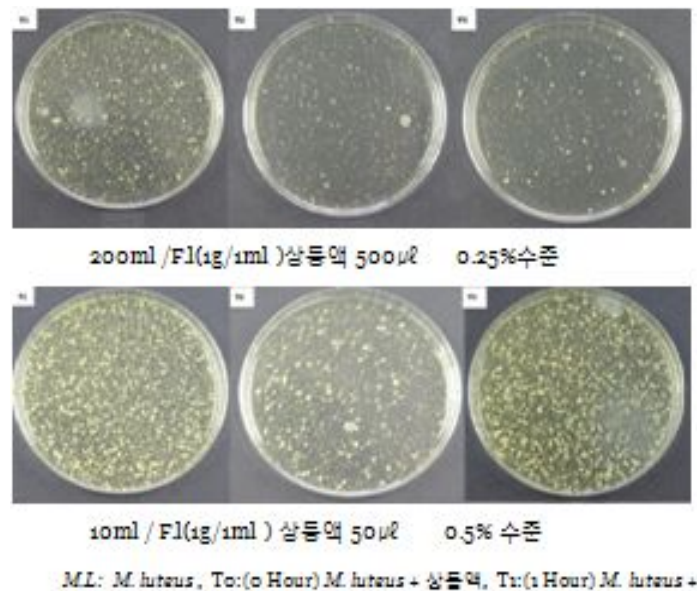


Fig. 128. Antimicrobial activity of prototype (2)

(3) 시제품농도에 따른 LD₅₀값 산출

시제품의 농도에 따른 *M. luteus*균의 colony 수 감소를 확인한 결과 0.14mg/ml 농

도의 시제품을 이용하여 *M. luteus*균 50%를 감소(LD₅₀)시킬 수 있다는 것을 확인 하였다.

0.1g/ml에 3.8 mg-Nisin/ml을 함유한 시제품에는 38mg-Nisin/g이 포함되어 있으며, 시제품 tablet(0.5g)/ea 는 19mg-Nisin/ea 으로 환산된다.

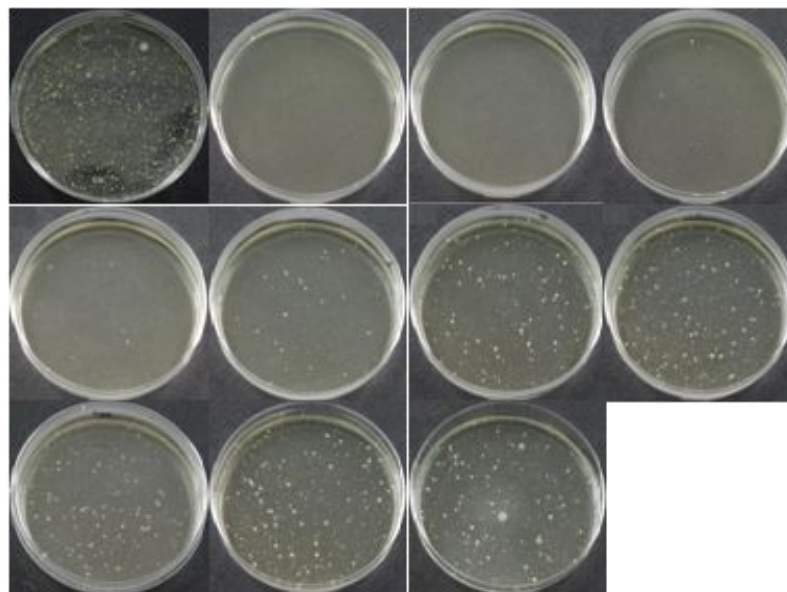
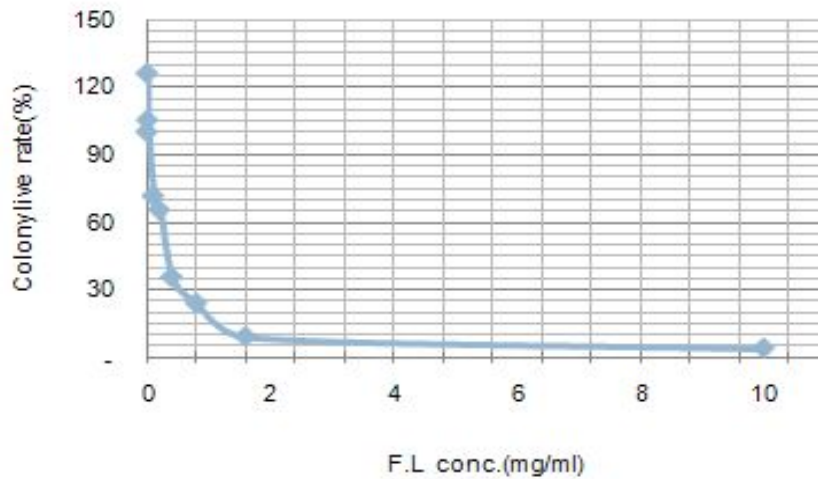


Fig. 129. Antimicrobial activity of prototype content against *M. luteus*

* R(*M. l.* : 9.6E+06CFU/ml), 1000ppm, 500ppm, 160ppm, 80ppm, 40ppm, 20ppm, 10ppm, 5ppm, 0.5ppm, 0.1ppm

라. 시제품에 대한 독성 실험

본 연구에서 조정제된 bacteriocin을 이용하여 제조한 시제품에 대한 독성 실험을 위해 암·수 mouse를 각 10마리씩 준비하여 대조구와 시험구로 나누어 실험하였다.

초기 일주일간 환경 적응 기간을 가진 뒤 1차, 2차로 기간을 나누어 시제품을 투여 하였다. 제품을 투여 후 일주일간 상태를 기록하였으며, 독성의 판단 여부를 알아보기 위하여 쥐의 정맥혈에서 혈액을 채취하여 경북대학교 수의대학병원에서 백혈구 및 혈청 성분을 분석하였다.

투여량 설정 : mouse 평균 무게 weight 20g (1회 투여 $0.14\text{mg} \times 20\text{g} = 2.8\text{mg}/\text{개체}$)

실험기간 : 2010. 04. 09 ~ 2010. 05. 10.

실험 과정 : 일주일기간의 안정기간을 거친 후 시제품의 경구 투여(1차 : 4월 16일) 및 복강 주사(2차: 4월 26일)를 실시하여 관찰하였다.



Fig. 130. Biological toxicity test : 1st



Fig. 131. Biological toxicity test : 2nd

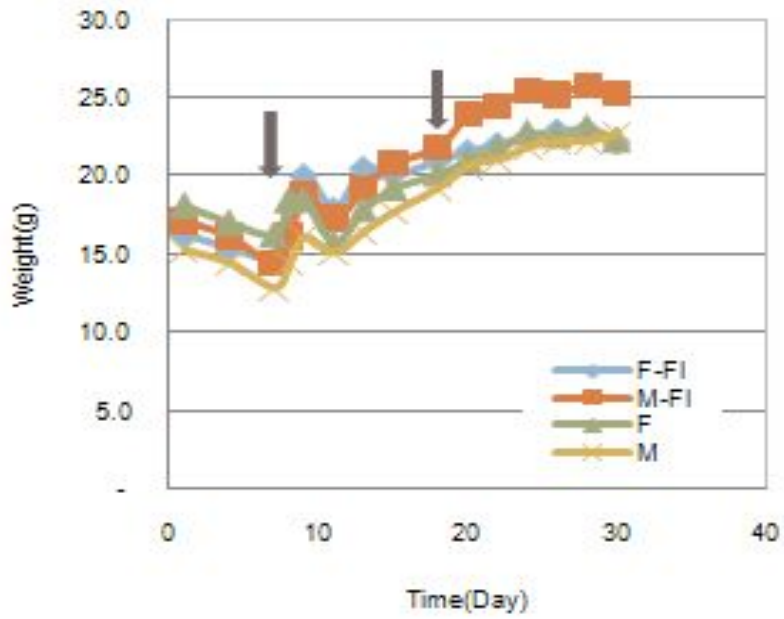


Fig. 132. Growth test of mouse with antimicrobial agent

생육기간동안 큰 변화는 없었으며, 지속적인 체중의 증가가 나타났다. mouse를 이용하여 시제품의 독성 실험 수행 결과, 혈액 및 혈청분석 결과는 다음과 같다. (Fig. 133, Table 39.)

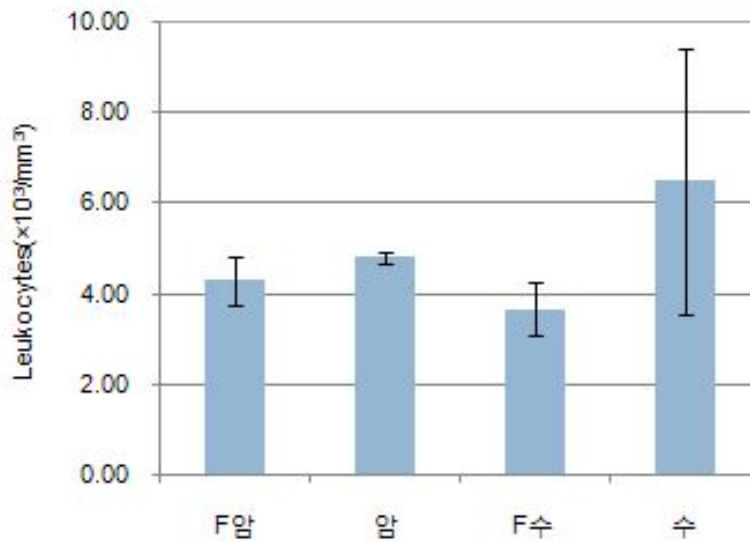


Fig. 133. White blood cell counting of mouse

Table 39. Mouse toxicity test ; serum analysis

분석항목	F암	F수	암	수
GOT(u1/L)	43.3	28.0	45.0	41.5
GPT(u1/L)	26.3	18.0	26.5	19.5
ALP(u1/L)	116.3	125.0	169.0	133.0
BUN(mg. dl)	15.0	17.0	16.0	15.5
Cre(mg. dl)	0.9	0.8	0.7	0.7
Glu(mg. dl)	166.7	187.5	178.5	188.0
T-Cho(mg. dl)	96.0	110.0	77.5	109.0
T-Pro(g. dl)	5.2	5.0	5.0	5.2
Alb(g. dl)	1.7	1.7	1.7	1.8
T-Bil(mg. dl)	0.0	0.0	0.0	0.0

*AST (Aspartate aminotransferase), ALT (Alanine aminotransferase), ALP (Alkaline phosphatase), BUN (Blood urea nitrogen), CRE (Creatinine), GLU (Glucose), CHO (Total cholesterol), PRO (Total protein), ALB (Albumin), BIL (Total bilirubin)

생체내 식작용과 면역작용 및 염증의 정도를 진단 할 수 있는 백혈구의 수를 확인한 결과 대조군에 비하여 백혈구의 수적차이가 소폭 확인되었다. 그러나 시제품을 투여한 군에서 백혈구 수가 대조군에 비해 낮게 나타난 점은 염증 반응이 오히려 면역반응의 강화로 호전되었다는 증거로 볼 수 있다.

생체내의 생리적인 기능의 변화를 관찰하기 위하여 정맥혈에서 채혈 후 혈청을 분리한 후 생화학적 검사를 시행하였다. 생체 내에서 영양원, 삼투압의 유지, 면역반응에 관여하는 혈청단백질인 albumin의 농도를 조사한 결과 대조구와 큰 차이가 없었으므로 정상이라고 판단되었다. 간 대사와 관련되어 있는 ALT, AST, ALP 효소들은 간세포가 괴사되면서 혈액으로 유리되어 나와 증가하게 되고, Bilirubin은 간세포의 장애와 담도폐색으로 황달증상이 나타나게 된다. 실험군의 각 효소나 bilirubin의 측정치는 대조군 보다 낮거나 비슷하게 나타났으므로 간, 비장, 담관에는 영향을 주지 않는다는 것을 알 수 있었다. 신장 기능 장애를 확인하기 위하여 blood urea nitrogen(BUN)과 Creatinine의 수치를 분석한 결과 실험군과 대조군의 차이를 보이지 않았으므로 신장 기능에는 영향을 주지 않는다는 것을 알 수 있

었다. Table 39의 결과에서와 같이 정제된 bacteriocin은 세포독성이 없는 것으로 확인되어 항균활성물질이 인체에서도 독성이 없을 것으로 판단되었다. 이는 항균활성물질을 양식어류에 예방·치료 목적의 방제제로 사용하였을 경우, 사람이 양식어류를 섭취하더라도 인체에 잔류되어 유해한 영향을 미치지 않는다는 것을 확인할 수 있었으며, bacteriocin의 안정성을 실험을 통해 직·간접적으로 확인하였다.

제 4절 맺 음 말

양식 산업에서 항생제의 오남용과 부작용 등을 해결하기 위하여 항생제를 대체할 수 있는 물질에 대한 개발의 필요성이 점차 커지고 있다. 본 연구에서는 어류 내장을 이용하여 여러 어병 세균에 항균 효과를 가지는 균주를 찾아 그 특성을 조사하였다.

LK7균주의 경우 동정 결과 *Aerococcus* sp. LK7로 명명되었고 MRS/NSS배지에서 가장 높은 성장과 활성을 보였지만 비용등의 문제로 인해 항균활성과 성장이 비슷하지만 비용이 저렴한 LB배지를 최적 배지로 정하였다. 또한 LK7균주의 탄소원으로는 sodium acetate, 질소원으로는 malt extract에서 가장 우수한 성장과 항균 활성을 확인할 수 있었다. 배양 온도로는 30℃가 가장 적합하였으며 배지 pH는 7이 가장 적합하였다. 또한 배양 방법으로는 진탕배양이 높은 성장을 보였다. 균체 증식은 배양 10시간이 지나면서부터 정지기에 들어가는 것으로 나타났다. bacteriocin 생산은 접종 후 균체생육과 함께 생산되었으며, 배양 10시간 만에 최대 항균활성을 나타내었으며 배양 24시간까지 유지되다가 차츰 감소하는 경향을 나타내었다.

bacteriocin의 pH 안정성은 pH가 높아질수록 항균활성이 낮아지지만, pH 7이하에서는 활성이 유지되었다. 온도 안정성의 경우 60℃까지는 활성을 그대로 유지 하였지만 70℃ 이후부터는 점차 활성이 줄어드는 것을 확인할 수 있었고 protease K에 의하여 활성이 100% 소실되었으며 trypsin에 의하여서는 75%, 50%씩 활성이 소실되는 것을 볼 수 있었다. bacteriocin의 정제를 위해 균체에 흡착하는 방법을 사용하였는데, 그 결과 pH 6에서 bacteriocin이 쉽게 균체에 흡착되었고 pH2에서 해리되는 것을 볼 수 있었다. 최종적으로 정제해낸 bacteriocin의 크기를 3.5-4kDa으로 정할 수 있었다.

또한 VK24 균주의 경우 동정 결과 *Vagococcus* sp. 와 97%의 상동성을 보였다. VK24는 MRS/NSS배지에서 가장 높은 성장과 활성을 보였고, 또한 VK24의 탄소원으로는 sodium acetate, 질소원으로는 Beef extract에서 가장 우수한 성장과 항균 활성을 확인할 수 있었다. 배양 온도로는 30℃가 가장 적합하였으며 배지 pH는 7이 가장 적

합하였다. 또한 배양 방법으로는 정치배양이 높은 성장을 보였으며, 균체 증식은 배양 20시간이 지나면서부터 정지기에 들어가는 것으로 나타났다. bacteriocin 생산은 접종 후 균체생육과 함께 생산되었으며, 배양 8시간부터 생성되기 시작했으며, 18시간째 가장 높은 활성은 나타내었다. bacteriocin의 pH 안정성은 pH6~7에서 가장 높은 활성을 나타냈다. 온도 안정성의 경우 10℃~100℃까지 활성을 유지하였고 protease K에 의하여 활성이 소실되는 것을 확인하였다. 특히 VK24 균주에 의해서 생산되는 bacteriocin은 *Listonella anguillarum* 뿐 만아니라 *Edwardsiella tarda*에 대한 항균 활성도 가지고 있어 향후 유용도가 높을 것으로 사료된다.

ZEN102균주의 경우 동정 결과 *Lactococcus lactis*와 가장 유사하게 나타났고, MRS, BHI 혼합배지에서 생육 및 활성이 가장 좋았으며, 탄소원과 질소원으로 젓갈을 이용하여 명태, 멸치젓갈 혼합배지에서 가장 좋은 성장을 나타내었다. 또한 glucose와 lactose의 함량에 따른 성장실험 결과 glucose 1.6% , lactose 0.5%에서 가장 생육이 좋았으며 활성 또한 좋았다. 균체의 성장은 8시간 이상 배양시 최대로 균체가 생산되며 활성 또한 증가함을 알 수 있었다. pH와 열에 대하여 광범위한 안정성을 가지며, 121℃이상에서는 활성이 사라졌다. 효소의 처리에 따른 활성 결과 단백질 분해효소인 protease에 대하여 100% 저해를 받으며, proteinase-K에 대해서도 50% 저해를 받았다. 이는 박테리오신 정제 물질을 통하여 얻은 물질이 항생제와 다른 단백질이라 할 수 있다. 기존의 bacteriocin 정제는 bacteriocin 생산 균주의 배양액에서 균체를 제거한 상등액을 통한 정제법을 이용하였지만, 본 실험에서는 pH의 변화에 따른 균체에 bacteriocin 흡탈착법을 이용하여 bacteriocin을 정제하였으며, 그 결과 SDS-PAGE(Sodium Dodecyl-Sulfate PolyAcryamide Gel Electrophoresis)를 실시하여 3.5kDa 부근에서 활성을 가지는 bacteriocin을 확인하였다.

본 연구를 통해 조정제된 bacteriocin은 생체내 세포독성이 없는 것으로 확인되었으며 사람이 양식어류를 섭취하더라도 잔류되어 발생할 수 있는 유해성이 없으므로 사료되며 강력하고 신속한 항균활성을 통해 수산 양식장과 같은 지역에 적용하여 양식어류 질병 예방 및 치료 목적의 제제로 사용가능할 것으로 사료된다.

따라서 향후 본 과제에서 개발된 bacteriocin의 산업화와 병행하여 순도를 높여 고부가가치의 상품으로 상품성을 재고할 수 있을 것으로 판단되며 bacteriocin의 높은 특이성에 따른 한정된 항균활성을 극대화 할 수 있는 복합 제제화를 시도하여 기존의 항생제와 같은 적용 스펙트럼을 확보할 수 있는 제품을 출시하고자 한다.

제 4 장 목표달성도 및 관련분야에의 기여도

1) 연도별 연구목표 및 평가착안점에 입각한 연구개발목표의 달성도

세부연구목표	평가의 착안점 및 척도		비고
○ Bacteriocin 생성균주 screen	양식어류에 발병빈도가 높은 병원균에 대한 항균활성 peptide 생성균의 확보 (ZEN49, ZEN102, ZEN5, VK24, LK7)	양호 (5균주 이상)	목표 3종 이상
○ 발효기술(개별 균주의 최적 생산배지선정)	배지 cost(제품단가와 직결) 및 생산성향상 (300kg fermentation-125만원)	-BPG medium : 57% down -YG medium : 70% down	단가대비 57% 절 약
○ 어병원 방어능 (Bacteriocin의 활성분석)	ZEN49 <i>Streptococcus sp.</i> : LD ₅₀ 28,000AU <i>Edwardsiella tarda</i> : LD ₅₀ 120,000AU ZEN49 <i>M.luteus</i> : LD ₅₀ 6,450AU <i>S.aureus</i> : LD ₅₀ 29,000AU LK7 <i>L. anguillarum</i> : LD ₅₀ 100,000AU VK24 <i>L. anguillarum</i> : LD ₅₀ 136,000AU	양호 Lab. scale test	F i e l d scale test (11월 중 실시)
○ 정제기술의 확보(시제품순도)	-PEG & Sodium sulfate-UF system -Cell 흡착 조정제법(산업적응용가능)	전기영동 확인 (약 3500 ~ 4000Da)	
○ 기타	균주특허등록 2건, 상표등록 1건, 출원 2건(12월 예정), 학술지 논문개재 1건,	양호	

2) 관련분야의 기술발전예의 기여도 등을 기술

1. 학술지 게재

국내학술지

박홍제, 강용호(2010) 발효배양액에서 *Streptococcus parauberis* Z49균주가 생산하는 Bacteriocin의 간편한 추출. the Korean Journal of Microbiology. Vol. 46, No. 3, pp.291-295

2. 학위논문

가. 조윤환 (2011.2) Characterization of the antimicrobials Substance Produced by *Aerococcus* sp. LK7. 영남대학교 대학원.

나. 성호선 (2012.2예정) Production and Characterization of the antimicrobials Substance Produced by *vagococcs* sp. VK24. 영남대학교 대학원

3. 기타 연구 성과

가. *Vagococcus* sp. VK24 균주 기탁 및 특허 출원 예정

나. *Aerococcus* sp. LK7균주 기탁 및 특허 출원 예정

다. PEG-Sodium sulfate 법 : 유산균 배양액에서 수성이상계를 이용한 배양액내 Protein의 간편 분리

4. 학회발표

가. 2009 웰빙바이오 대전(2009) :포스터 발표

박홍제, 김나연, 서혜선, 조경진, 홍수진, 박혜림, 강용호.(2009)

유산균 배양액에서 수성이상계를 이용한 배양액내 Protein의 간편 분리

나. 2010년 한국미생물학회연합 국제학술대회 :포스터 발표

1) Yun-Hwan CHo, Jung-Mig Kim, Hong-Je Park, and Youl-Lae Jo. (2010) Characterization of the antimicrobials Substance Produced by *Aerococcus* sp. LK7. the Korean Journal of Microbiology.

2) Ho-sun Sung, song-lee Jang, Eun-Hee Jung, Hong-Je Park, and Youl-Lae Jo. (2010) Production and Characterization of the antimicrobials Substance Produced by *vagococcs* sp. VK24. the Korean Journal of Microbiology.

3) Han-Hee Ye, In-Seop Jeong, Youl-Lae JO (2010) Purification of bacteriocins from *Aerococcus* sp. LK7 by Cell adsorption 2010년 영남대학교 생명공학 학술대회 (2010.10.27.~10.29)

유산균 배양액에서 수성이상계를 이용한 배양액 내 Protein의 간편한 분리

박종재, 김나연, 최혜선, 조경진, 홍수진, 박해림, 김용호*

경북 경산시 대구대학교 산학협력단 1196 제너시스, 영남대학교 생명공학부*

Nisin과 같은 유산균이 생산하는 박테리오파진은 그 분자량이 3,000Da 정도로 매우 작아서 크로마토그래피에 의한 전통적인 단백질 분리방법으로는 박테리오파진을 대량 생산하는데 있어서 경제적이기 못하다. 본 연구는 박테리오파진과 같은 분자크기가 작은 펩타이드 분질을 경제적인 방법으로 분리하기 위하여 PEG-Na₂SO₄를 이용한 수성이상계를 이용하였다. 실험에는 박테리오파진을 생산하는 *S. paratyphi* 균주를 MRS 배지에서 배양한 다음, 균체를 별도로 분리하지 않은 배양액을 그대로 사용하였다. PEG 분자량 600~800과 Na₂SO₄ 농도 20~40%(w/w)를 사용하여 PEG층에 박테리오파진이 농축되는 효과를 paper disc 방법으로 활성을 조사한 결과, PEG600(1.5%, w/v)-Na₂SO₄(20%, w/v) 조성이 가장 경제적이며 우수한 결과를 보였다. 박테리오파진의 활성은 Na₂SO₄이 첨가된 배양액에서는 전혀 나타나지 않았으며, PEG가 포함된 배양액에서 활성이 나타났다. 이 때 PEG가 있는 배양액의 부피는 배양액 전체의 10% 이하에서 결과적으로 미생물에 의하여 생산된 박테리오파진을 배양액에서 농축시키고자 할 경우에 매우 유용한 방법이며 특히 따로이 균체를 분리할 필요도 없어 효과적인 방법으로 평가된다.

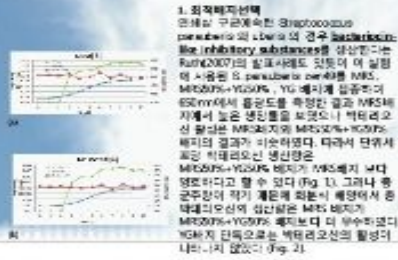


Fig. 1. *S. paratyphi* zen49 culture in (a) MRS, (b) MRS 50% and YG 50%



Fig. 2. The bacteriostatic activity of *Streptococcus paratyphi* zen49 culture in (a) MRS, (b) MRS 50% and YG 50%, and (c) YG media.

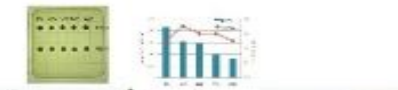


Fig. 3. PEG layer and paper disc assay of PEG's activity. (a) Paper disc assay, (b) bar graph.



Fig. 4. MRS media and paper disc assay of PEG activity. (a) Paper disc assay, (b) bar graph.



Fig. 5. (a) PEG600(1.5%, Na₂SO₄ 20%) and (b) paper disc assay.

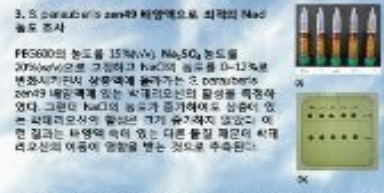


Fig. 6. (a) PEG600, Na₂SO₄(20%) and (b) NaCl.



Fig. 7. (a) Paper disc assay and (b) paper disc assay.



Fig. 8. PEG-Na₂SO₄ and paper disc assay.

1. 최적배양액
본 연구는 균주에 대한 *Streptococcus paratyphi* zen49의 경우 *Streptococcus-like inhibitory substance*를 생산한다는 Rahn(2007)의 발표에 의거하여 이 실험에 사용된 *S. paratyphi* zen49를 MRS, MRS50%+YG50%, YG 배지에 접종하여 650mL에서 활성도를 측정된 결과 MRS 배지에서 높은 활성도를 보였으나 박테리오파진의 활성은 MRS50%와 MRS50%+YG50% 배지의 결과가 비슷하였다. 따라서 단위당 고산 박테리오파진 생산량은 MRS50%+YG50% 배지가 MRS 배지보다 높을 수 있다 (Fig. 1). 그러나 배양 균주의 크기 때문에 최종 배양액에서 고산 박테리오파진 생산량은 MRS 배지가 MRS50%+YG50% 배지보다 더 우수하였다. YG 배지 단독으로는 박테리오파진의 활성이 나타나지 않았다 (Fig. 2).

2. *S. paratyphi* zen49 배양액으로 최적의 Na₂SO₄ 농도 확인
Nisin과 같은 유산균이 생산하는 박테리오파진은 그 분자량이 3,000Da 정도로 매우 작아서 크로마토그래피에 의한 전통적인 단백질 분리방법으로는 박테리오파진을 대량 생산하는데 있어서 경제적이기 못하다. 본 연구는 박테리오파진과 같은 분자크기가 작은 펩타이드 분질을 경제적인 방법으로 분리하기 위하여 PEG-Na₂SO₄를 이용한 수성이상계를 이용하였다. 실험에는 박테리오파진을 생산하는 *S. paratyphi* zen49 균주를 MRS 배지에서 배양한 다음, 균체를 별도로 분리하지 않은 배양액을 그대로 사용하였다. PEG 분자량 600~800과 Na₂SO₄ 농도 20~40%(w/w)를 사용하여 PEG층에 박테리오파진이 농축되는 효과를 paper disc 방법으로 활성을 조사한 결과, PEG600(1.5%, w/v)-Na₂SO₄(20%, w/v) 조성이 가장 경제적이며 우수한 결과를 보였다. 박테리오파진의 활성은 Na₂SO₄이 첨가된 배양액에서는 전혀 나타나지 않았으며, PEG가 포함된 배양액에서 활성이 나타났다. 이 때 PEG가 있는 배양액의 부피는 배양액 전체의 10% 이하에서 결과적으로 미생물에 의하여 생산된 박테리오파진을 배양액에서 농축시키고자 할 경우에 매우 유용한 방법이며 특히 따로이 균체를 분리할 필요도 없어 효과적인 방법으로 평가된다.

나. 2010년 한국미생물학회연합 국제학술대회 (2010.10.14.~10.15)



Characterization of the Antimicrobial Substance Produced by *Aerococcus* sp. LK7

Yun-Hwan Cho¹, Jung-Mi Kim¹, Hong-Je Park², and Youl-Lae Jo^{1,*}

¹Major of Applied Microbiology and Biotechnology, Yeungnam University,
²Environmental Science & Biotechnology Consultants ZENITH

Abstract

The biggest problem of fish culture is fish disease and the bacteria that cause a fish disease. Thus, antibiotic is used for treatment of fish disease until now.

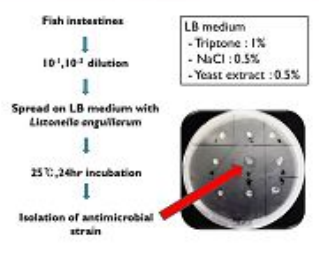
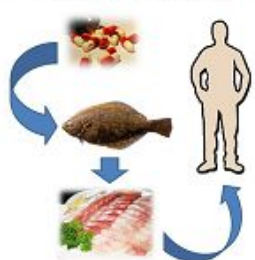
However, increasing of antibiotic usage can occur several pathogenic bacteria's tolerance for antibiotic. Therefore to solve the problem that caused by antibiotic need to develop a new bioproduct such as bacteriocin.

In this study isolation and characterization the bacteriocin-producing bacterium species, *Aerococcus anophagefferens* (Pflanz et al.) that can occur fish disease as vibriosis.

Identification of strain LK7 was performed by 16S rDNA sequencing and confirmed *Aerococcus* sp.

LK7 strain was confirmed gram positive cocci. Optimal medium for the growth of strain LK7 was determined LB medium (Luria-Bertani media). And optimal pH for the growth of strain LK7 was determined pH7. Sodium acetate and malt extract were determined most effective carbon and nitrogen source. Catalase test, Voges-Proskauer (VP) test and motility test was confirmed negative.

Materials & Methods



Results

16S rDNA gene sequence analysis of strain *Aerococcus* sp. LK7 was performed. The sequence was compared with those in GenBank. The results showed that the sequence of strain LK7 was identical to that of *Aerococcus* sp. (Accession No. F510791.1). The phylogenetic tree showed that strain LK7 was closely related to *Aerococcus* sp. (Accession No. F510791.1) and *Aerococcus* sp. (Accession No. F510791.1).

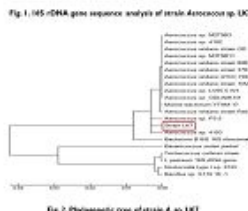


Fig. 2. Phylogenetic tree of strain *A. sp. LK7*

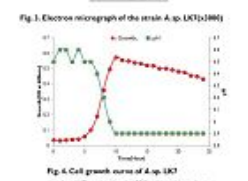


Fig. 3. Electron micrograph of the strain *A. sp. LK7*(100k)

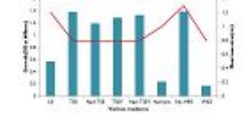


Fig. 4. Cell growth curve of *A. sp. LK7*



Fig. 5. Growth of *A. sp. LK7* with various media

Table 1. Effect of carbon and nitrogen sources for the growth of the *A. sp. LK7* (optical density)

Carbon source	Optical density	Nitrogen source	Optical density
Glucose	0.216	Casein	0.219
Yeast extract	0.200	Casein	0.207
Sodium acetate	0.212	Casein	0.214
Malt extract	0.218	Casein	0.218
Yeast extract	0.224	Casein	0.225
Malt extract	0.226	Casein	0.227
Yeast extract	0.228	Casein	0.229



Fig. 6. Effect of carbon and nitrogen sources for the growth of *A. sp. LK7*

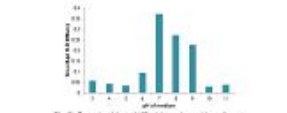


Fig. 7. Growth of *A. sp. LK7* with various pH medium

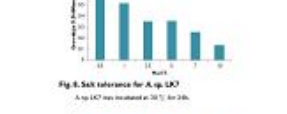


Fig. 8. Salt tolerance for *A. sp. LK7*

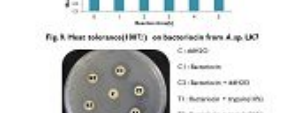


Fig. 9. Heat tolerance (HT) on bacteriocin from *A. sp. LK7*



Fig. 10. Effect of antimicrobial activity with Protease K & Trypsin

Table 2. Characteristics of the strain *A. sp. LK7*

Test	<i>A. sp. LK7</i>	<i>Aerococcus</i> sp.
Cell shape	cocci	cocci
Gram stain	+	+
Aerobic	-	-
Catalase test	-	-
VP test	-	-
Motility	-	-
Growing on blood agar	+	+
Growth in NaCl 6.5%	+	+
Growth at 45°C	-	-



Fig. 11. Antimicrobial activity on various concentration of bacteriocin from *A. sp. LK7*

Conclusions

- LK7 strain was isolated from intestines of marine fish, produced antimicrobial agent against *Listonella anguillarum*.
- On the basis of morphological, physiological and biochemical characters as well as nucleotide sequences analysis of 16S rDNA, LK7 was identified as *Aerococcus* sp.
- Optimal medium for the growth of LK7 was determined LB(Luria-Bertani) medium.
- Optimal pH and temperature for the growth of LK7 was confirmed pH 7 and 37°C.
- Sodium acetate and malt extract were determined most effective carbon and nitrogen source.
- Antimicrobial activity of *A. sp. LK7* remained after being heated to 100 °C for up to 5 hours.
- Antimicrobial activity of *A. sp. LK7* was sensitive to Protease K.

References

D. Ezzari, A. Boudabb, (2002) Characterization of a bacteriocin produced by a newly isolated bacillus sp. Strain 8-A. *Journal of Applied Microbiology* 95, 610-616.

FARIDA KHALID, ROOYIA SIDDIQI, NAJIED MOJGAM (1999) Detection and characterization of a heat stable bacteriocin (Bacteriocin LC-08) produced by a clinical isolate of *Lactobacillus*. *Medical Journal of Islamic Academy of Sciences* 12(3), 87-91.


Rolfe Dezielac, Diane Darke, Nathalie Bourgoin, Benjamin Bell et al., Patrick Le Chevaller and Yannick Flayau (2010) Bacteriocin as Weapons in the Marine Animal-Associated Bacteria: Marine Invertebrate and Potential Applications as an Aquaculture Probiotic. *Mar. Coast. S.* 1153-1177.

R. E. D. WILLIAMS, ANN HIRCH AND S. T. DOWN (1955) *Aerococcus*: A New Bacterial Genus. *J. gen. Microbiol.* 8: 475-480.


SONGLIANG YANG, MONTY C. JOHNSON, AND BRUCE SAYS (1997) Novel Method To Extract Large Amounts of Bacteriocins from Lactic Acid Bacteria. *APPLIED AND ENVIRONMENTAL MICROBIOLOGY*, 3355-3356.

Y. MATSUO, A. J. VAN M. OBBERT, J. DANIELA, J. BOVENDE, (2007) Characterization of *Aerococcus* VIBRIOSIS BACTERIA FROM SWISS CLINICAL SPECIMENS. *JOURNAL OF CLINICAL MICROBIOLOGY*, 3353-3357.

다. 2010년 한국미생물학회연합 국제학술대회 (2010.10.14.~10.15)



Production and Characterization of the Antimicrobial Substance Produced by *Vagococcus* sp. VK24



Ho-Sun Sung¹, Song-Lee Jang¹, Eun-Hee Jung¹, Hong-Je Park², and Youl-Lae Jo^{1,*}

¹Major of Applied Microbiology and Biotechnology, Yeungnam University,
²Environmental Science & Biotechnology consultants ZENITH

Abstract

Keywords is one of the most important and the greatest challenges in aquaculture is waterborne bacterial diseases. *Vagococcus* sp. VK24 strain isolated from bacterial disease fish, produced antimicrobial agent against *Aeromonas hydrophila*. On the basis of morphological, physiological and biochemical characters as well as molecular sequences analysis of 16S rDNA, VK24 was identified as *Vagococcus* sp. VK24. VK24 strain grew better in static culture than in shake culture. The optimum culture and 70 best effect were found to be most favourable to antimicrobial agent production, whereas cells of VK24 from shake cult in 1% sodium chloride and 7% peptone extract medium. The optimum pH and temperature for the growth of VK24 strain were pH 7 and 30°C, respectively. The antimicrobial activity was lost or unstable after treatment with protease K. The activity was stable against pH variations range from pH 5 and pH 9, but the activity reduced to 50% of a pH range from pH 6 to pH 8. The antimicrobial activity was stable of 100% for 30min.

Material & Methods

Media and culture conditions

- Peptone 7%
- Yeast extract 1%
- Yeast extract 0.5%
- Dextrose 2%
- Ammonia sulphate 0.2%
- Sodium chloride 0.5%
- Magnesium sulphate 0.01%
- Potassium sulphate 0.005%
- Dipotassium phosphate 0.1%

Media and culture conditions

- Yeast 1.0%
- Yeast, 0.5%
- Yeast, 0.25%
- Yeast, 0.125%
- Yeast, 0.0625%
- Yeast, 0.03125%
- Yeast, 0.015625%
- Yeast, 0.0078125%
- Yeast, 0.00390625%
- Yeast, 0.001953125%

Results




Fig. 1. Morphological observation of *Vagococcus* sp. VK24. (A) Colony on peptone yeast agar. (B) Colony on peptone yeast agar with 1% sodium chloride and 7% peptone extract medium.




Fig. 2. Cell growth curve and antimicrobial activity of *V. sp.* VK24. (A) Cell growth curve. (B) Antimicrobial activity.




Table 1. Antimicrobial activity against protease K.

Protein	Antimicrobial activity (%)
Control (peptone)	100
Antimicrobial agent (VK24)	100
Antimicrobial agent (K200)	0
Antimicrobial agent (K1000)	0
Agarose (control)	100
Agarose (K200)	0
Agarose (K1000)	0


Conclusions

1. VK24 strain was isolated from diseased fish, produced antimicrobial agent against *Aeromonas hydrophila*.
2. On the basis of morphological, physiological and biochemical characters as well as molecular sequences analysis of 16S rDNA, VK24 was identified as *Vagococcus* sp.
3. VK24 strain grew better in static culture than in shake culture.
4. The antimicrobial activity of *V. sp.* VK24 remained after being treated to 100°C for 10 to 3 hours.
5. The antimicrobial activity of *V. sp.* VK24 was sensitive to protease K.
6. The antimicrobial activity was stable against variations of pH range from pH 5 and pH 9.

References

1. Al-Anbari A, Park J, Kim H, et al. (2008) Characterization of *Vagococcus* sp. VK24 strain isolated from diseased fish with pathogenic factors. *Can Microbiol* 31, 229-234.
2. Al-Anbari A, Park J, Kim H, et al. (2009) Characterization of *Vagococcus* sp. VK24 strain isolated from diseased fish with pathogenic factors. *Can Microbiol* 32, 229-234.
3. Jang S, Jo Y-L (2010) Strategies for the isolation and identification of antimicrobial production. *Biotechnol Bioeng* 111, 1-15.
4. Kim H, Jo Y-L, Park J, et al. (2008) Characterization of *Vagococcus* sp. VK24 strain isolated from diseased fish with pathogenic factors. *J Appl Microbiol* 105, 292-298.
5. Jo Y-L, Kim H, Park J, et al. (2009) Strategies for the isolation and identification of antimicrobial production. *Biotechnol Bioeng* 111, 1-15.
6. Jo Y-L, Kim H, Park J, et al. (2009) Strategies for the isolation and identification of antimicrobial production. *Biotechnol Bioeng* 111, 1-15.
7. Jo Y-L, Kim H, Park J, et al. (2009) Strategies for the isolation and identification of antimicrobial production. *Biotechnol Bioeng* 111, 1-15.

Molecular Microbiology Laboratory & ENBZENITH



라. 2010년 영남대학교 생명공학 학술대회 (2010.10.27.~10.29)



Purification of Bacteriocins from *Aerococcus* sp. LK7 by Cell Adsorption

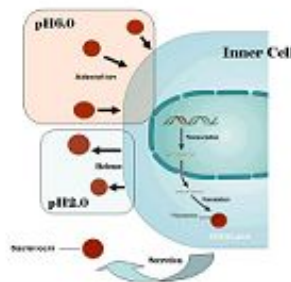
Han-Hee Ye, In-Seop Jeong, Youl-Lae Jo*

Major of Applied Microbiology and Biotechnology, Yeungnam University

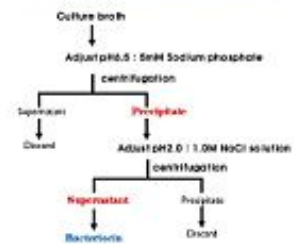
Abstract

Antimicrobial agent, bacteriocin, produced by *Aerococcus* sp. LK7 was adsorbed on the cells of *A. sp.* LK7. pH was a most important factor in determining the degree of adsorption of these antimicrobial agent onto cell surface.
In general, between 90 and 100% of the bacteriocin molecules were adsorbed at pH 4.5, and the lowest (50%) adsorption took place at pH 2.0. On the basis of this property, a novel isolation method was developed for bacteriocin from *A. sp.* LK7. This method produced a higher yield than isolation procedures, which rely on precipitation of the bacteriocin from the cell-free culture supernatant. It is simple and can be used to produce large quantities of bacteriocin from antimicrobial strain so be used as anti-vibriosis agent.

Materials & Methods



Method for bacteriocin adsorption.



Results



Fig. 1. High genetic similarity between *Aerococcus* sp. LK7

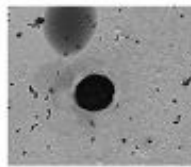


Fig. 2. Transmission electron micrograph of the strain *A. sp.* LK7 (X70K)



Fig. 3. Bacteriocidal activity of adsorbed bacteriocin against *Limnoria angulipes*



Fig. 4. Antimicrobial activity of untreated bacteriocin against *Limnoria angulipes*



Fig. 5. Antimicrobial activity of adsorbed bacteriocin against *Limnoria angulipes*



Fig. 6. Cell adsorption rate of bacteriocin from *A. sp.* LK7.

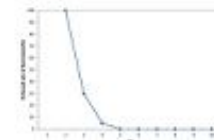


Fig. 7. Reduced rate of bacteriocin from *A. sp.* LK7.

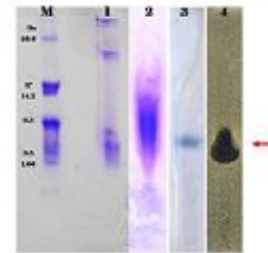


Fig. 8. SDS-PAGE of bacteriocin from cell-associated vesicles

Conclusion

1. Bacteriocin was adsorbed to cells at pH 4.5.
2. Bacteriocin was released from the cells at pH 2.0.
3. The lowest (50%) adsorption took place at pH 2.0.
4. It is simple and can be used to produce large quantities of bacteriocin from antimicrobial strain so be used as anti-vibriosis agent.

References

Anderson RL, Rue DD, Hsu JF, Egan JCH, and Wilson-Paele J (1998) Antigenic similarity of *Limnoria angulipes* C11 and two new two-glycosylated bacteriocins, phorbacin B7 and J1, and the induction factor phorbacin A. *Appl Environ Microbiol* 64: 229A-237J

Panico B, and Koster A. J (1995) Production, recovery and purification of bacteriocins from *Enterococcus faecalis*. *Appl Microbiol Biotechnol* 43: 428-432

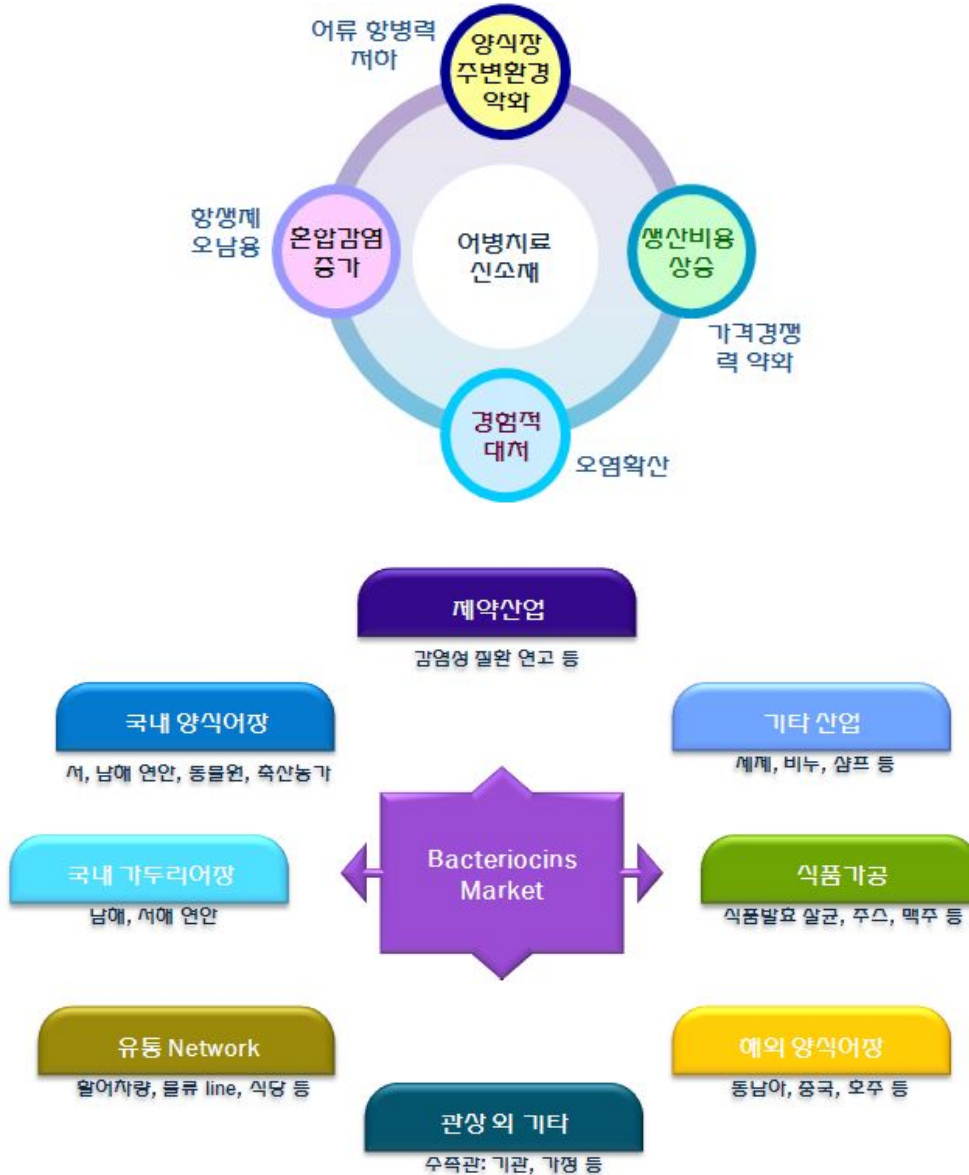
Kangsung Y, Park C, and Park B. J (2002) Novel Method To Extract Large Amounts of Bacteriocins from Lactic Acid Bacteria. *APCCO (KOR) DEVELOPMENTAL MICROBIOLOG* 38: 2229-2239

Su A, Engel W, and Reppel P. (2008) Enhancement of bacteriocin productivity: Central bacteriocin oligopeptide AD in the presence of a bacteriocin-resistant strain. *Central bacteriocin production on J Food Microbiol* 45: 63-67

Yong S, and Cho B. J (1996) Factors affecting production of bacteriocins by lactic acid bacteria. *Food Microbiol* 11: 201-204

제 5 장 연구개발 성과 및 성과활용 계획

1) 성과 활용 계획



- 축양시설 : 국내외 양어장, 동물원, 축산농가 등
- 수산관련 유통 network(항생제 노출방지)
-활어차량, 물류 Line, 식당 등의 수요창출
- 관상용(수족관 : 기관, 가정)
- 해외시장(동남아/유럽/미국)
- 식품가공(발효전 살균, 주스, 맥주, 등의 살균)
- 살균소독제제(세제, 비누, 샴푸, 등)

2) 실용화·산업화 계획(기술실시 등)

- 산업적 응용에서는 일부 인간의 식료품에 국한되어 방부제로 사용하고 있다. 아직 초기단계의 산업적 생산 수준에 머물고 있으나, 이에 대한 기대수준이 높아지고 응용범위도 확대되고 있어 그 수요가 급격히 크질 것으로 거론되고 있다.
- 본 과제에서도 부작용이 없는 양어분야의 세균감염성 질환의 천연 치료제제로 그 응용 spectrum을 넓히는데 일조를 하고자 한다.
- 본 과제를 통해 어류양식에 적용함으로써 약제에 의해 수질오염을 개선할 수 있어 항생제에 의한 생태계교란 및 내성균의 발생을 현격히 줄일 수 있을 것이다.
- Probiotics의 경우 숙주특성이 있어 이에 대한 특이 유용세균의 선정이 필요하지만, bacteriocin의 경우 gram negative 혹은 positive로 크게 구분하여 적용 가능하고 이들 물질 중에서는 antifungal 물질도 획득 가능하여 산업 및 의료분야의 응용성도 가능할 것으로 기대된다.
- 직접적인 물고기의 섭취가 아니어도 수조내에 뿌려만 줘도 효과적으로 병을 예방할 수 있고 특히 생분해가 가능하여 주변수역의 오염도 방지할 수 있어 기존의 항생제를 대체할 수 있다.
- 결과적으로 기존 연구들은 대부분 유산균을 이용한 Probiotics의 개발에 치중하고 있고, 아직까지는 probiotics에서 생성되는 bacteriocin의 연구는 단지 그 물질 규명 수준에 머물고 있으나, 본 과제는 양식어류에 특이성이 강한 probiotics을 대량 배양하고, 이를 통해 bacteriocin의 최적 생산기술을 획득하므로 효용성 측면에서 기존의 항생제와 동급수준 혹은 그 이상으로 높여, 부작용 없고 무해한 신규의 항균물질들을 획득할 수 있는 기술을 개발하였고 이를 산업화 할 수 있는 발판을 마련하였다.

- 위탁 및 협력기관의 상호협력을 통한 제품화
- 포항 양식사료연구센터와 협력을 통해 사료첨가제제의 활용 기초자료 확보
- 초기산업화 : 울진소재 경북해양바이오산업 연구원 GMP 시설활용(Fermenter)
- 자체시설구축 : 5개년 계획(단계적 OEM → 자체생산 Line 구축, 생산체제 확립)
- 경북해양바이오산업연구원 협력업체
- 양식협회 등 수산관련연구기관 : 자문, 협조
- 기존 제약회사와 협력체제 구축
- 양식업자와 공동체 구성
- 해양수산관련연구원과의 협력체제 마련
- 정부산하 기술거래소를 통한 기존의 사료회사 및 항생제제회사와의 기술제휴 및 기술이전 검토

3) 교육·지도·홍보 등 기술확산 계획 등

- 산업화에 따른 새로운 질병발생 및 환경호르몬 등에서 감소된 소비심리를 만회.
- 자연친화적 청정 양식산업에 기여.
- Probiotics에 비해 신속성, 편리성뿐만 아니라 적용성과 응용성이 우수하여 양어 어가의 노동력 절감 및 경쟁력 향상에 기여.
- Probiotics의 질병 예방적 효과와는 달리 치료효과도 갖추고 있다.
- 약제에 의존하는 양식 산업에서 가장 큰 약제 유해성문제에 대한 소비심리 위축을 회복개기 마련
- 양어뿐만 아닌 농축산분야에서도 응용 가능하여 식품수준에서의 항생제와 화학약품에 대한 유해성을 해결
- 기존의 항생제 및 화학약품의 사용량을 감소시킬 수 있어 항생제 내성균의 발생 억제로 보건 환경 안전에 기여
- 미래 수산물의 의존도 상승에 따른 수산자원의 관리 안정화에 기여
- 무작위 살균 및 살균력의 장기화에 따른 자연생태계교란을 줄일 수 있음

4) 특허, 품종, 논문 등 지식재산권 확보계획 등

- Bacteriocin 생성균주 screen과 최적 발효기술의 확보를 통하여 새로운 균주에 대한 우선권을 확보하는 동시에 산업화를 위한 Bacteriocin 생산의 최적 조건 확보와 정제를 통해서 제제화

5) 추가연구, 타 연구에 활용 계획 등

- 이에 따라서 일차적으로 양식어류 중 넙치(조피볼락, 참돔)을 대상으로 시도하여 완성된 기술의 활용성을 높이고,
- 차후 양식어류 전반으로 응용범위를 넓힐 수 있는 특이성 항균 peptide의 복합 적용을 시도한 제품을 양산하고자 한다.
- 나아가 육상동물 및 최종 인체를 대상으로 하는 의약품수준의 제품 생산을 이루는 한편 명실상부한 차세대 항생제 생산의 전문기업으로 성장하고자 한다.

6) 기대효과

○ 기술적 측면

● 국내 기존 Probiotics의 적용현황

- 기 항생제를 제외한 생물제제(Probiotics 등)들은 대부분 돼지나 닭 등 축산분야에 적용됨
- 양식분야에서는 대하양식에 적용된 사례 있으나 액체제제로 수질 개선이 주된 역할
- 기타 기능성보강 물질의 사료첨가 : 한방재료 등
- 구기자, 단삼, 어보산 첨가사료 : 무작위 항균작용에 의한 장내 유용균 총 파괴

- 최근까지 bacteriocin을 이용한 양어 양식사례는 없음
- 기존 Probiotics의 한계성
 - 액체제제로 마이크로 입자인 미생물이 물고기의 아가미에 걸리지 않아 섭취 기회 적다.
 - 양어수 수질개선의 장점은 있으나 용존산소(DO)를 소모시켜 물고기 성장 저해요인
 - 대부분 사료와 혼합 투여함으로 물고기 소화효소에 노출되어 불활성화
 - 양어수에 무작위로 뿌려 섭취를 유도함으로 비합리적이며 효율성이 낮다.
 - 주변수역으로 방류되어 주변수역의 생태계교란 인자
 - 대부분 숙주 특이성을 고려하지 않은 투여로 목적에 부적합하고 소모적이다.
- Probiotics의 개발 방향 → Bacteriocins
 - 숙주 특이성을 가진 유용 생균 확보(개별 물고기 유래 미생물 제제 확보의 어려움, specific episome)
 - 물고기 소화효소 및 위산 담즙 내성 균주 개발(거의 불가능 → 대체 개발)
 - Carrier 접목 : Immobilization(Encapsulation/linkage) - Matrix개발
 - 유통과정 및 숙주의 소화기관에 대한 안정성 및 활성유지를 위한 효율적 접근
 - 기후 온난화로 양식산업의 연중생산, 대량생산체제→병충해 증가→항생제와 농약 남용
 - 생약제제 적용시도→예방 보조사료제제→전염병발병시 : 항생제와 농약에 의존
 - 어병 진단 kit개발 노력→조기진단, 감염축소→결과적 치료는 항생제와 농약에 의존
 - 외국의 사례 : Vaccine, Probiotics, Bacteriocins등 →항생제와 화학농약 대안제로 기대
 - 치료제제: Probiotics의 생존율, 보존성, 안정성, 급이성, 가공성, 적용성, 안전성, 보관성, 유통성 등의 너무나 많은 변수들을 최소화할 수 있다.
 - 내성세균 발생 없음: 항생제와 달리 Peptide로 구성되어 소화효소에 분해
 - 고온 활성 및 광범위한 pH 안정성, 무독, 무색, 무취이다.
 - 대량생산 : 연속발효공정기술 실현으로 경쟁력을 갖춘 대안으로 거론됨
 - Recombinant : 항생제가 2차 대사산물인데 반해 Bacteriocin 은 자기의 유전자로부터 직접 생합성 되므로 유전자 조작으로 생산량 최대화 조절 및 분자적 변이를 통해 더욱 우수한 bacteriocin 합성이 가능함
 - Nisin: 2006년 액란의 보존성을 높이기 위해 유럽식품안전청(ESFA)에서 ≤ 6.25mg/L로 사용허가, 이미 미국, 호주, 남아프리카, 러시아, 인도 등을 포함한 40여

개국

○ 경제·산업적 측면

- 양식기술의 선진화를 통한 양질의 단백질 생산 및 공급으로 양식업과 그 관련업계의 경쟁력 상승 기대.
- 기술의 차별화와 항생제와 농약사용 개선에 따른 상품가치의 상승로 고부가가치 창출
- 생산비증가 : 인건비, 사료비 증가를 보완할 수 있는 고효율사료 개발
- 해수온도 상승에 따른 만연적 어병발생 환경하에서 경제적 어병예방 및 치료기법
- 항생제 등의 사용상의 익숙성과 신속한성에 걸맞는 치료제 개념의 제제의 개발
- 고단백질의 보고인 미래식량산업의 중요성 부각에 따른 수산산업의 친생태적 산업화
- 수산물 소비량 증가와 Wellbeing의 접목을 통한 고소득 어류신품종개발
- 시장잠재력(동남아, 중국) : 복합 항병력제제의 개발
- 환경규제 강화에 따른 친환경 양식기술 보급의 필요성 증폭
- 수산물에 대한 주변국과의 가격 경쟁력 제고 : 유전육종 기법 적용 및 양식환경 개선
- 저가 항생제 범람 : 대량생산 기법 개발의 필요성 증대
- 자연친화적인 조건을 만족하는 식생활 개선으로 국민 의료비 절감효과
- 어민의 소득 증대
- 외국제품의 국내 시장 확대에 따른 수입대체 효과
- 주변수역의 항생제오염에 따른 환경개선 효과
- 관련 기업의 생산 및 연구 활동의 연구방향 제시 효과

○ 사회·문화적 측면

- 친환경적 양식 산업시대 도래
 - 소비 Pattern의 변화 : Well-being, 환경정책강화
 - 항생제 사용규제 : 내성 돌연변이 균의 발생 증가, 보건 및 식생활 환경의 위협
(알레르기성 질환 증가)
 - 주변수역 오염규제강화 : 생태계교란, 산업경쟁력약화 초래
- 수산뿐만 아닌 축산분야와 식품산업 및 의학분야에까지 파급효과 기대
- 어류양식 사업 고도화
 - 양식기반산업의 고도화에 따른 안전한 먹거리 확보

- 항생제 및 농약에 의한 수계 오염을 미연에 방지
- 환경오염뿐만 아니라 생태계의 교란현상을 방지할 수 있다.
- 항생제에 노출된 물고기에 의한 항생제 간접중독 감소
- 항생제에 의한 알레르기성 체질 방지(아토피성 질환).
- 화학약품의 사용을 최소화하여 암과 같은 위해요인 사전 방지.
- 새로운 일자리 마련으로 고용기회 증가

7) 연구성과

가. 논문게재 성과

게재연도	논문명	저자			학술지명	Vol.(No.)	국내외 구분	SCI구분
		주저자	교신저자	공동저자				
2010	발효배양액에서 <i>Streptococcus parauberis</i> Z49 균주가 생산하는 Bacteriocin의 간편한 추출	박홍제	강용호		The Korean Journal of Microbiology	Vol. 46, No. 3 pp.291-295	국내	

나. 특허 성과

출원된 특허의 경우					등록된 특허의 경우				
출원연도	특허명	출원인	출원국	출원번호	등록연도	특허명	등록인	등록국	등록번호
2010	특허	박홍제	한국	12월예정	2009	특허	박홍제	한국	0901190
2010	특허	박홍제	한국	12월예정	2010	특허	박홍제	한국	0969398
					2009	상표	박홍제	한국	0805463

라. 인력양성 효과

지원총인원	지원 대상 (학위별, 취득자)				성별		지역별		
	박사	석사	학사	기타	남	여	수도권	대전	기타지역
2		1		1	1	1			경북

부록 1. 상표 Design 1차 초안



Bacteriocins의 시제품 용기

상표 Design 최종안

디자인초안이 마련되어 이를 토대로 Bacteriocins의 특성을 가장 잘살려 낼 수 있는 최종 design을 선정하여 상표뿐만 아니라 box design, pamphlet 등의 제작 예정

For marine and freshwater fish

Antibiotics-Free Fish!

Explanation

1. Improve Resistance to Disease, Reduces the Spread.
2. Using for Bacterial Infection (in Flatfish, Rockfish, Eel, Bream, etc.).
3. Prevent infection by pathogenic bacteria (*vibrio*, *listonella*, *edwardseilla* and *staphylococcus* etc.).
4. Bactericidal effects, pollution prevention and water quality improvement feature.

Ingredients / Contents
Peptide and peptidoglycan from *lactic acid bacteria*
Balance sodium chloride and dextrin solids

Usage :


1. For regular use : 3~5ppm (add 3~5mg/L of water)
2. 4 week vaccination period (A vaccine according to the changing water cycle)
3. When infection : 10~20ppm (add 10 ~ 20 mg/L of water)

Store at : 4~8°C
Expiry date : 1year
Made in korea

100g

<http://www.ezeniith.co.kr>

Riocin®




PaFree
Pathogen-free

[품질경영 촉진법에 의한 품질표시]

1. 품 명 : Riocin(해수어용)
2. 용 도 : 수질개선용
3. 용 법 : 1liter 물에 3~5mg 사용
4. 장 점 : 병원성세균의 성장억제 및 항균효과로 수질개선
5. 제 조 원 : 제니스
경북 경산시 진량읍 내리 대구대학교
신학림백단 1106 053)857-0075
소비자상담실: 053-857-0075
6. 유통기한 : 표시일로부터 12개월

For Fish Farming
Enhanced Disease Resistance (physiological activity, promote enhanced immune function),
Growth Promotion, Improved Survival rate



For marine and freshwater fish

Antibiotics-Free Fish!

Explanation

1. Improve Resistance to Disease, Reduces the Spread.
2. Using for Bacterial Infection (in Flatfish, Rockfish, Eel, Bream, etc.).
3. Prevent infection by pathogenic bacteria (*vibrio*, *listonella*, *edwardseilla* and *staphylococcus* etc.).
4. Bactericidal effects, pollution prevention and water quality improvement feature.

Ingredients / Contents
Peptide and peptidoglycan from *lactic acid bacteria*
Balance sodium chloride and dextrin solids

Usage :


1. For regular use : 3~5ppm (add 3~5mg/L of water)
2. 1 week vaccination period (A vaccine according to the changing water cycle)
3. When infection : 10~20ppm (add 10~20mg/L of water)

Store at 4~8°C
Expiry date : 1year
Made in korea

30g

<http://www.ezeniith.co.kr>

Riocin®




PaFree
Pathogen-free

[품질경영 촉진법에 의한 품질표시]

1. 품 명 : Riocin(해수어용)
2. 용 도 : 수질개선용
3. 용 법 : 1liter 물에 3~5mg 사용
4. 장 점 : 병원성세균의 성장억제 및 항균효과로 수질개선
5. 제 조 원 : 제니스
경북 경산시 진량읍 내리 대구대학교
신학림백단 1106 053)857-0075
소비자상담실: 053-857-0075
6. 유통기한 : 표시일로부터 12개월

For Fish Farming
Enhanced Disease Resistance (physiological activity, promote enhanced immune function),
Growth Promotion, Improved Survival rate



Host Defence Peptides

Z101001-5g

F Riocin®

Antimicrobial Peptide from lactic acid bacteria
3% balance sodium chloride and dextrin solids

Caution : Substance not yet fully tested.
Product of Korea. For fish and livestock
farming only.
Not for drug, food, household or other

Prevent infection by
pathogenic bacteria(vibrio,
listonella, edwardseilla and
staphylococcus etc.).
Enhanced Disease Resistance
(physiological activity, promote
enhanced immune function),
Growth Promotion, Improved
Survival rate

For marine and freshwater fish

Store at 2-8°C

<http://www.enbzenith.co.kr>

ENB ZENITH

PaFree
Pathogen-free

Riocin®

ENB ZENITH

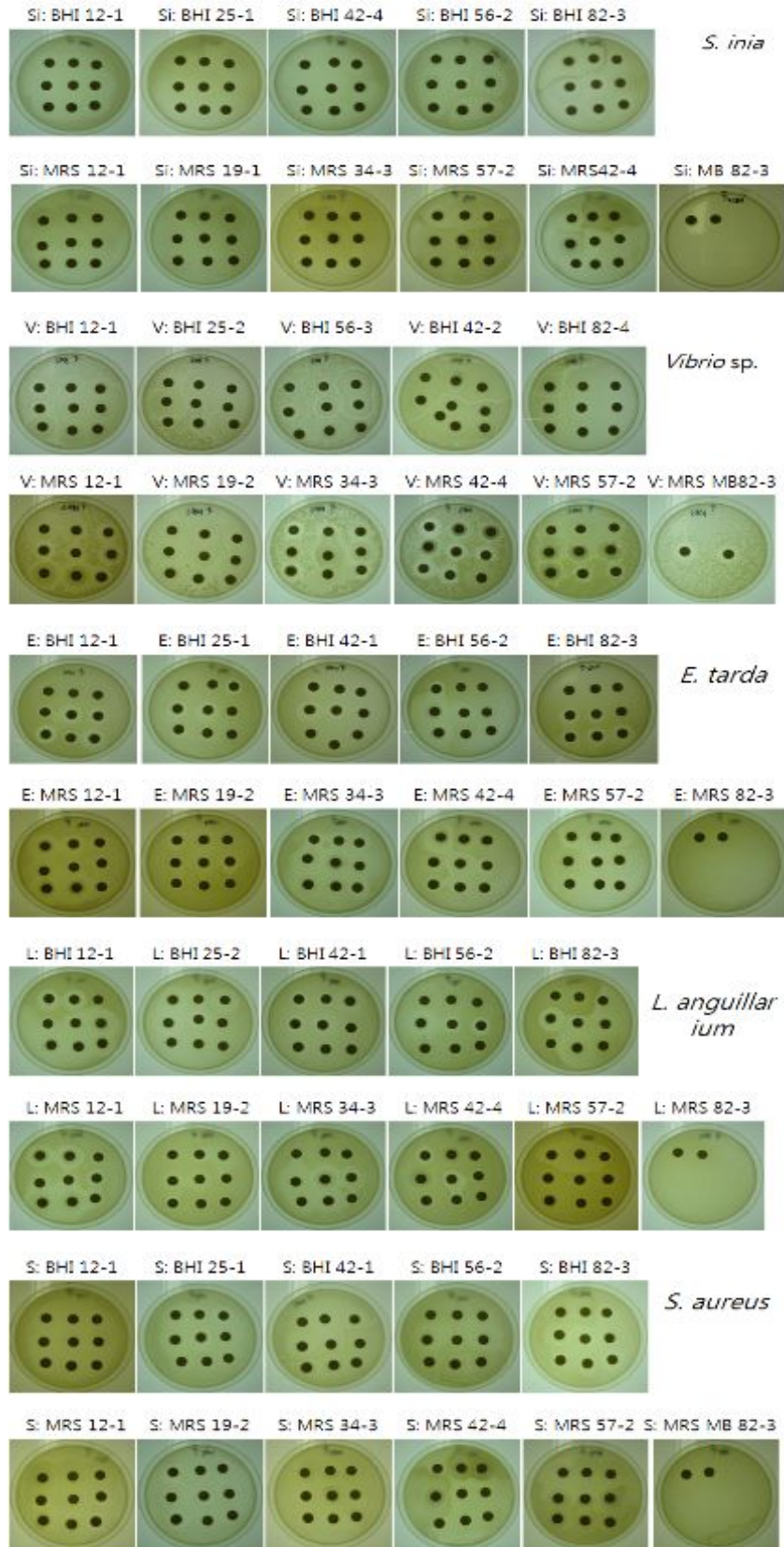
PaFree
Pathogen-free

F Lacticin®

ENB ZENITH



부록. 2. Gram negative에 대한 항균활성 Screen



제 6 장 연구개발과정에서 수집한 해외과학기술정보

=> Mode of action of lactic acid bacteria bacteriocins.

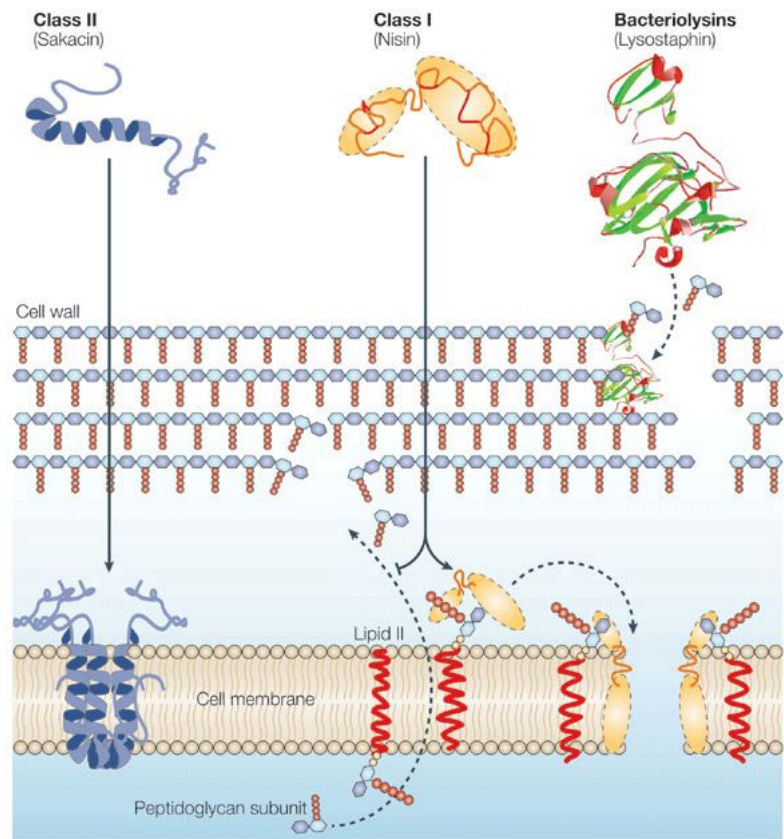
From the following article: Bacteriocins: developing innate immunity for food

Paul D. Cotter, Colin Hill & R. Paul Ross

Nature Reviews Microbiology 3, 777-788 (October 2005)

Lactic acid bacteria (LAB) bacteriocins can be grouped on the basis of structure, but also on the basis of mode of action.

Some members of the class I (or lantibiotic) bacteriocins, such as nisin, have been shown to have a dual mode of action. They can bind to lipid II, the main transporter of peptidoglycan subunits from the cytoplasm to the cell wall, and therefore prevent correct cell wall synthesis, leading to cell death. Furthermore, they can use lipid II as a docking molecule to initiate a process of membrane insertion and pore formation that leads to rapid cell death. A two-peptide lantibiotic, such as lactacin 3147, can have these dual activities distributed



Copyright © 2005 Nature Publishing Group
Nature Reviews | Microbiology

across two peptides, whereas mersacidin has only the lipid-II-binding activity, but does not form pores. In general, the class II peptides have an amphiphilic helical structure, which allows them to insert into the membrane of the target cell, leading to depolarisation and death. Large bacteriolytic proteins (here called bacteriolysins, formerly class III bacteriocins), such as lysostaphin, can function directly on the cell wall of Gram-positive targets, leading to death and lysis of the target cell.

=> Nissen-Meyer, Jon; Oppegard, Camilla; Rogne, Per; Haugen, Helen Sophie; Kristiansen, Per Eugen(2009) Structure and Mode-of-Action of the Two-Peptide

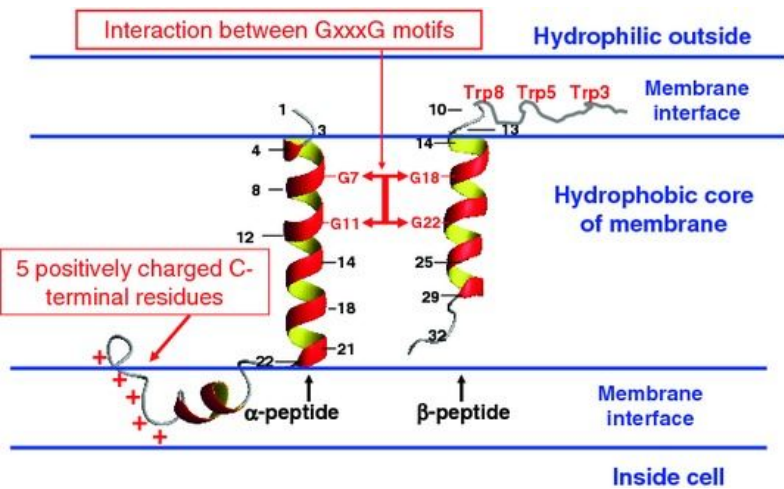
(Class-IIb) Bacteriocins.

Probiotics and Antimicrobial

Proteins Vol. 2 Issue 1

University of Oslo

Cartoon representation of the structural model of lactococcin G and its orientation in target-cell membranes. The two peptides interact through the G7xxxG11-motif in the α -peptide



and the G18xxxG22-motif in the β -peptide and form a trans-membrane helix-helix structure. The highly positively charged and structurally flexible C-terminal end of the α -peptide is forced through the membrane by the trans-membrane potential (negative inside). The tryptophan residues in the structurally flexible N-terminal region of the β -peptide are in or near the outer membrane interface

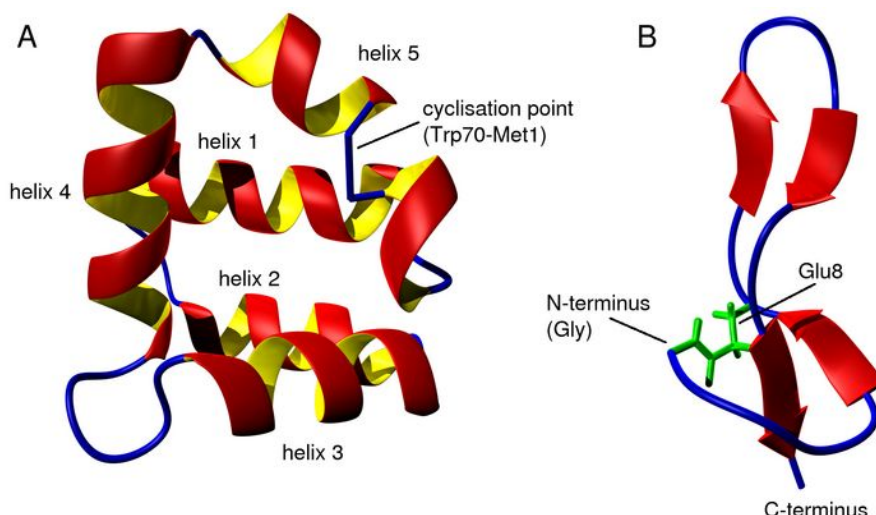
=> Jason Mulvenna 2005-04-24 , the Institute of Molecular Bioscience IMB, Brisbane, Australia.

Cyclic Bacteriocins

The bacteriocins are a heterogeneous group of proteins of microbial origin that are ribosomally produced and secreted extracellularly by many Gram-positive and Gram-negative bacteria. These proteins act mainly against bacteria of closely related species using a variety of inhibitory mechanisms such as inhibition of cell-wall synthesis, permeabilising cell membranes and inhibiting RNase or DNase activity [125]. In recent years a number of bacteriocins have been discovered that possess a head-to-tail cyclic backbone, including AS-48 from *Enterococcus faecalis* [127,126], gassericin A [129,128] from *Lactobacillus gasseri* LA39, and circularin A [131,130] from *Clostridium beijerinckii*. These proteins are between 58 and 70 amino acids in length and are among the largest ribosomally produced cyclic proteins yet discovered.

Figure 1.18: AS-48 and microcin bacteriocins Ribbon diagrams of A AS-48 showing the 5 helix structure and cyclisation point between Trp70 and Met1 and B microcin J25, which was formerly thought to be cyclic but was shown to possess a "noose" structure in which the C-terminus threads a ring formed by a N-terminus to Glu8 sidechain amide bond.

The best characterised of the cyclic bacteriocins, AS-48 is a highly basic 70 amino acid protein that contains a high proportion (49%) of hydrophobic amino acids and lacks cysteines or modified amino acids



[132]. Its solution structure shows that it folds into five α -helices arranged according to the topology shown in Figure 1.18 [133]. Cyclisation occurs between residues Trp70 and Met1 in the middle of helix 5 and cyclisation appears to confer additional stability to the protein with its melting temperature being as high as 102C [134]. Along with gassericin A and circularin A, AS-48 is resistant to a number of proteases [131,136,135] and this could be explained by its compact globular structure. However, AS-48 did lose activity after incubation with trypsin, Glu-C and Lys-C [132,137] suggesting that, unlike the cyclotides, it is susceptible to endoproteases in its native form. The combination of hydrophobic and cationic residues in AS-48 suggests an amphipatic structure and several crystallographic and biochemical studies have shown that it produces its effect via permeabilisation of the cell membrane (see [125] for a recent review).

Gassericin A, circularin A and AS-48 are expressed as larger precursors of 91, 72 and 105 amino acids respectively [131,138,139]. Interestingly, while AS-48 and gassericin A both possess precursors substantially larger than the mature product, the precursor of circularin A is only three residues longer than the mature form. In general bacteriocin production in bacteria is a complex process with additional genes required for the maturation and secretion of the mature peptide. AS-48 is encoded on the pMB2 plasmid [139] and transformation of a large portion of this plasmid into a non-AS-48 producing bacterium resulted in the production of AS-48 in the recipient [140]. Analysis of the region transformed into the recipient revealed nine genes, *as-48BCCDDEFGH*, that are involved in AS-48 production and immunity [141]. The results of these studies suggest that the full complement of enzymes needed for the production of AS-48 is encoded in the pMB2 plasmid.

제 7 장 참고문헌

- 1.대한민국 특허청(KR) 10-2002-0091498
- 2.대한민국 특허청(KR) 10-2004-0110868
- 3.대한민국 특허청(KR) 10-2006-0130854
- 4.대한민국 특허청(KR) 10-2008-0088587
5. 강봉조, 고창식, 김필연, 오덕철, 이창훈. (2007). 제주지역 양식 넙치(*Paralichthys olivaceus*)로부터 분리되는 *Streptococcus iniae*와 *Streptococcus parauberis*의 생물학적 특성. J. Fish Pathol 20(1)33-40
6. 강용진, 김강웅, 배승철, 유광열, 이승형 (2008) 치어기 조피볼락 *Sebastes schlegeli* 사료내 생균제 첨가효과. (2008) . J. Aquaculture Vol. 21(2) ,82-88
7. 강용호, 박홍제. (2010) 발효배양액에서 *Streptococcus parauberis* Z49균주가 생산하는 Bacteriocin의 간편한 추출. the Korean Journal of Microbiology. Vol. 46, No. 3, pp.291-295
8. 구경모, 김진곤, 백현동, 이나경 (2003). 젓갈에서 분리한 *Lactococcus lactis* SA72에 의한 Lacticin SA72의 생산 최적화 . Kor, J. Microbiol. Biotechnol. Vol.31, No. 1 46-50
9. 권현주, 김광현, 김병우, 김영희. 류은주, 신현철, 이은우, 정경태, 정유정,염종화 . *Bacillus amyloliquefaciens* H41이 생산하는 *Vibrio anguillarum* 생육 저해인자의 정제. Journal of Life Science 2008 Vol . 18, No. 6 789-795(2008)
10. 고정림, 김수현, 오명철, 오창경, (2009). 시판 김치 분리 젓산균에 의한 아질산염 소거 . J Korean Soc Food Sci Nutr 38(7) 892-901
11. 김경수, 신명수, 이완규, 지애란, 최지현, 한선경, (2009) 돼지 장관으로부터 분리한 *Lactobacillus* sp. HN 235 균주가 생산하는 항균물질의 특성 . Kor ,J. Microbiol. Biotechnol. Vol .37 , No . 2, 125-132

12. 김경태, 김상교, 박연희, 백영진, 오세중, 이상준, (2001) *Lactococcus* sp. HY449가 생산하는 Bacteriocin의 정제. *Kor. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.* Vol. 29, No. 3, 155-161
13. 김동현, 김성수, 박수진, 백남수, (2006). 유산균을 이용한 발효인삼 제조 및 품질 특성. *J. Ginseng Res* Vol .30, No2, 88-94
14. 김상교, 오세중, 이상준, 백영진, 박연희. (1994). 반응표면 분석에 의한 *Lactococcus* sp. HY 449의 성장 및 Bacteriocin 생산의 최적화. *Kor J. Appl. Microbiol. Biotechnol.* vol 22. NO.5, 522-530.
15. 김영희, 류은주, 정경태, 정영기, 정유정(2006) 어병균 *Vibrio anguillarumb* 생육 저해 인자를 생산하는 *Bacillus amyloliquefaciens* H41 분리. Vol. 16 , No. 4 605-611
16. 김종만,김재명,김현욱,남향미,박여량,박용호,백현동,이나경,임성렬,,정석찬, (2008). *Lactococcus lactis* NK34에 의해 생산된 소 유방염 원인균에 효과가있는 lacticin NK34의 정제 및 특성. *Korean J. Food Sci .Ani. Resour* .Vol. 28, No ,4. pp 457-462
17. 김혜영, 이태수(2009) *Bacillus amyloliquefaciens* IUB158-03이 생산하는 항진균물질의 생화학적 특성 및 독성. *J. Life Science* vol. 19. No. 11. 1672-1678
18. 마채우, 오계현 .(2004) 해양에서 분리한 *Lactobacillus* sp. JK-8에 의한 질병원인 세균의 살균효과 . *Soonchunhyang J. Nat. Sci.* 10(2), 355-360
19. 박승춘, 박치던, 박환희, 이기동, 정희경, 홍주현(2007) . 전통 누룩으로부터 분리된 Killer Toxin 생산 균주 *pichia anomala* K15의 특성. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 1077-1082
20. 백형석, 전홍기, 조영배, 조영임. (1996). 김치에서 분리한 *Streptococcus* sp. J-C1의 bacteriocin 생산 . *Korean J. Life Science* 207-277
21. 양병규, 전유진, 허문수(2003) 어류의 세균성 질병 예방을 위한 Probiotic 균주의 선발 및 특성 *kor. J. Microbiol. biotechnol.* 31, 129-134.
22. 오세중, 이상준, 김경태, 김상교, 박연희, 백영진. (2001). *Lactococcus* sp. HY449가 생산하는 Bacteriocin의 정제. *Kor J. Appl. Microbiol. Biotechnol.* vol 29. NO.3, 155-161.

23. 장해춘, 정지혜 . (2009). 메주로부터 분리한 항진균 및 항세균 활성의 *Bacillus polyfermenticus* CJ9. Kor. J. Microbiol. Biotechnol. Vol. 37, No. 4 , 340-349
24. Al-Ahmad A, Pelz K, Schirrmeister JF, Hellwig E, Pukall B. (2008). Characterization of the first oral *vagococcus* isolate from a root-filled tooth with periradicular lesions. *Curr Microbiol.* 57, 235-238.
25. Avi Eldar, Orna Shapiro, Yitzchak Bejeranof and Herve Bercovier.(1995). Vaccination with whole-cell vaccine and bacterial protein extract protects tilapia against *Streptococcus diffcile* meningoencephalitis. *Vaccine.* 9, 867-870.
26. Beatriz Rojo-Bezares, Yolanda Sáenz, Laura Navarro , Myriam Zarazaga, Fernanda Ruiz-Larrea, Carmen Torres (2007) Coculture - inducible bacteriocin activity of *Lactobacillus plantarum* strain J23 isolated from graoe must. *Food Microbiology* 24 482-491
27. By S. B. BARKER, AND WILLIAM H. SUMMERSON . (1940). THE COLORIMETRIC DETERMINATION OF LACTIC ACID IN BIOLOGICAL MATERIAL . From the New York Hospital and the Departments of Medicine and of Biochemistry, Cornell University Medical College, New York City
28. CATHERINE B. LEWUS, STEPHEN SUN, AND THOMS J. MONTVILLE . (1992) Production of an Amylase- Sensitive Bacteriocis by an Atypical *Leuconostoc paramesenteroides* Strain . APPLIED AND ENVIRONMENTAL MICROBIOLOGY , Vol. 58, No.1 p143-149
29. C. M. A. P. FRANZ, M. DU TORT, A von HOLY, U. SCHILLINGER and W. H.HOLZAPEEL. (1997). Production of nisin-like bacteriocins by *Lactococcus lactis* strains isolated from vegetables. *J. Basic Microdiol.*37(1997)3, 187-196
30. CHUANBIN LIU, BO HU, YAN LIU, AND SHULIN CHEN (2006) . Stimulation of Nisin Production From Whey by a Mixed Culture of *Lactococcus lactis* and *Saccharomyces cerevisiae*. Copyright ©2006 by Humana Press Inc.

31. D. Bizani, A. Brandelli. (2002). Characterization of a bacteriocin produced by a newly isolated *Bacillus* sp. Strain 8 A. *Journal of Applied Microbiology*. 93, 512-519.
32. Eun-Min Choi, Young-Hwa Kim, So-Jin Park, Yun-Im Kim, Yu-Mi Ha and Sung-Koo Kim. (2004). Characterization of Bacteriocin, lacticin th-10, Produced by *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* YH-10 Isolated from Kimchi. Vol. 14, No. 4 683-688
33. Farida Khalid, Roquya Siddiqi, Naheed Mojgani. (1999). Detection and characterization of a heat stable bacteriocin (lactocin LC-09) produced by a clinical isolate of *Lactobacilli*. *Medical Journal of Islamic Academy of Sciences*. 12:3, 67-71.
34. Florie Desriac, Diane Defer, Nathalie Bourgoignon, Benjamin Brill et, Patrick Le Chevalier and Yannick Fleury. (2010). Bacteriocin as Weapons in the Marine Animal-Associated Bacteria Warfare: Inventory and Potential Applications as an Aquaculture Probiotic. *Mar. Drugs*. 8, 1153-1177.
35. F. Yanagida, Y. Chen, T. Onda and T. Shinohara (2005) Durancin L28-1A, a new bacteriocin from *Enterococcus durans* L28-1, isolated from soil. *Letters in Applied Microbiology* 40, 430-435
36. F. Yanagida, Y. Chen, T. Onda and T. Shinohara (2005) Durancin L28-1A, a new bacteriocin from *Enterococcus durans* L28-1, isolated from soil. *Letters in Applied Microbiology* 40, 430-435
37. G. P. Davey and B. C. Richardson. (1981). Purification and Some Properties of Diplococcin from *Streptococcus cremoris* 346. *APPLIED AND ENVIRONMENTAL MICROBIOLOGY*, Vol. 41, No. 1 p 84-89
38. G. Rajaram, P. Manivasagan, B. Thilagavathi, A. Saravanakumar. (2010). Purification and Characterization of a Bacteriocin Produced by *Lactobacillus lactis* Isolated from Marine Environment. *Advance Journal of Food Science and Technology* 2(2): 138-144

39. GRAHAM P. DAVEY. Plasmid Associated with Diplococcin Production in *Streptococcus cremoris*. APPLIED AND ENVIRONMENTAL MICROBIOLOGY, Oct . 1984, Vol 48, No . 4 p.895-896
40. Haijie Xiao, Xiuzhu Chen, Meiling Chen, Sha Tang , Xin Zhao and Liandong Huan .(2004) Bovicin HJ50, a novel lantibiotic produced by *Streptococcus bovis* HJ50 . Microbiology 150.103-108
41. HELGE HOLO, QIVIND NILSSEN ,AND INGOLF F. NES .(1991) (Lactococcin A, a New Bacteriocin from *Lactococcus lactis* subsp. cremoris: Isolation and Characterization of the Protein and Its Gene . JOURNAL OF BACTERIOLOGY, Vol 173, No 12. p 3879-3887
42. H.S. Gong , X. C. Meng , H, Wang . (2010). Plantaricin MG active against Gram-negative bacteria produced by *Lactobacillus plantarum* KLDS1.0391 isolated from " Jiaoke", a traditional fermented cream from China. Food control 21(2010)89-96
43. Hyun-Dong Paik(1996) .Bacteriocins: Assay, Biochemistry, and Mode of Action -Review-. J. Food Sci . Nutr. Vol. 1, No. 2, p 269-277
44. Hidekazu UCHIYAMA. (2000). Distribution of *Vibrio* Species Isolated from Aquatic Environments with TCBS Agar. *Environmental Health and Preventive Medicine*. 4, 199-204.
45. H-J Han, D-H Kim, D-C Lee, S-M Kim and S-I Park. (2006). Pathogenicity of *Edwardsiella tarda* to olive flounder, *Paralichthys olivaceus* (Temminck & Schlegel)Journal of Fish Diseases. 29, 601-609.
46. Jae-Hoon Song, Nam Yong Lee, Satoshi Ichiyama. (1999). Spread of Drug-Resistant *Streptococcus pneumoniae* in Asian Countries: Asian Network for Surveillance of Resistant Pathogens (ANSORP) Study. *Infectious Diseases Society of America*. 1058-4838.
47. J. J. FARMER III. (1972) Epidemiological Differentiation of *Serratia marcescens*: Typing

48. J J Christensen, H Vibits, J Ursing. (1991). *Aerococcus*-like organism, a newly recognized potential urinary tract pathogen. *JOURNAL OF CLINICAL MICROBIOLOGY*. : 1049-1053.
49. Jingfan Xiao, Qiyao Wang, Qin Liu, Xin Wang, Huan Liu & Yuanxing Zhang. (2009). Isolation and identification of fish pathogen *Edwardsiella tarda* from mariculture in China. *Aquaculture Research*. 40, 13-17.
50. JOO, NAMEOK, IL-HAN KIM, JIN-YOUNG YOO, AND YONG-EOK LEE. (2000). Isolation and Characterization of Lacticin 10790, a New Bacteriocin Produced by *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* KFCC 10790. *J. Microbiol. Biotechnol*(2000),10(4) 539-543
51. Kim, S. U., J. W. Lee, S. H. Lee, and S. H. Bok., 1991. Identification of bacteria having antifungal activity isolated from soils and its biological activity. *Kor J. Appl. Microbiol. Biotechnol*. 19, 337-342
52. Koji Yamazaki, Minako Suzuki, Yuji Kawai, Norio Inoue, and Thomas J. Montville. (2005) Purification and Characterization of a Novel Class IIa Bacteriocin, Piscicocin CS526, from *Surimi-Associated Carnobacterium piscicola* CS526 *APPLIED AND ENVIRONMENTAL MICROBIOLOGY*, Jan. 2005, Vol 71, No. 1 p 554-557
53. KOO, KYOUNG-MO, NA-KYOUNG LEE, YONG-IL HWANG, AND HYUN-DONG PAIK.(2000) . Identification and Partial Characterization of Lacticin SA72, a Bacteriocin Produced by *Lactococcus lactis* SA72 Isolated from Jeot-gal. *J. Microbiol. Biotechnol*(2000). 10(4) 488-495
54. L. F. Gibson, J. Woodworth, A. M. GEORGE (1998) Probiotic activity of *Aeromonas media* on the Pacific oyster, *Crassostrea gigas*, when challenged with *Vibrio tubiashii*. *Aquaculture* 169(1998) 111-120
55. Liliana M. Pascual · María B. Daniele · Walter Giordano · María C. Pájaro · Isabel L.

- Barberis. Purification and Partial Characterization of Novel Bacteriocin L23 Produced by *Lactobacillus fermentum* L23 .(2008) *Curr Microbiol* 56:397-402
56. Laurent Verschuere, Geert Rombaut, Patrick Sorgeloos and Willy Verstraete. (2000). Probiotic Bacteria as Biological Control Agents in Aquaculture. *MICROBIOLOGY AND MOLECULAR BIOLOGY REVIEWS* . p. 655-671.
57. Marilyn Monk and R. C. Clowes. (1964). The Regulation of Colicin Synthesis and Colicin Factor Transfer in *Escherichia coli* K 12. *J. gen. Microbiol.* 36, 385-392.
58. M. KOJIC, J. SVIRCEVIC, A. BANINA, AND L. TOPISIROVIC . (1991). NOTES. Bacteriocin- Producing Strain of *Lactococcus lactis* subsp. *diacitilactis* S50. Institute of Molecular Genetics and Genetic Engineering, Vojvode Stepe 283, P. O . Box 794, 11001 Belgrade, Yugoslavia .Vol 57, No 6 p1835-1837
59. Patrizia Messi, Elisa Guerrieri , Moreno Bondi (2003) Bacteriocin - like substance (BLS) production in *Aeromonas hydrophila* water isolates . *FEMS Microbiology Letters* 220 121-125
60. Pot B, Devriese LA, Hommez J, Miry C, Vandemeulebroecke K, Kersters K, Haesebrouck F. (1994). Characterization and identification of *Vagococcus fluvialis* strains isolated from domestic animals. *J Appl Bacteriol.* 77, 362-369.
61. R. E. O. Willams, Ann Hirsch, S. T. Cowan. (1953). *Aerococcus*, a New Bacterial Genus. *J. gen. Microbiol.* 8, 475-480.
62. RONGGUANG YANG, MONTY C. JOHNSON, AND BIBI RAY. (1992) Novel Method To Extract Large Amounts of Bacteriocins from Lactic Acid Bacteria. *APPLIED AND ENVIRONMENTAL MICROBIOLOGY*, Oct.1992, p. 3355~3359.
63. R.-O. Benech, E. E. Kheadr, C. Lacroix, and I. Fliss. (2002) Antibacterial Activities of Nisin Z Encapsulated in Liposomes or Produced In Situ by Mixed Culture during Cheddar Cheese Ripening. *APPLIED AND ENVIRONMENTAL MICROBIOLOGY*,

Nov.2002, p.5607-5619

- 64). Rongguang Yang, Monty C. Johnson, and Bibek Ray. (1992). Novel Method To Extract Large Amounts of Bacteriocins from Lactic Acid Bacteria. *APPLIED AND ENVIRONMENTAL MICROBIOLOGY*. 3355-3359.
65. Ralph W. Jack. John, R. Tagg, and Bibek Ray. (1995). Bacteriocins of Gram-Positive Bacteria. *MICROBIOLOGICAL REVIEWS*. 171-200.
66. SARAH E. BURR, DZUNG B. DIEP , AND J. THOMAS BUCKLEY. Type II Secretion by *Aeromonas salmonicida*: Evidence for Two Periplasmic Pools of Proaerolysin . *JOURNAL OF BACTERIOLOGY* , Oct . 2001, p.5956-5963
67. Teixeira LM, Carvalho MG, Merquior VL, Steigerwalt AG, Brenner DJ, Facklam RR. (1997). Phenotypic and genotypic characterization of *Vagococcus fluvialis*, including strains isolated from human sources. *J Clin Microbiol*. 35, 2778-2781.
68. T. R. Yan and C.S.Lee (1997) Characterization of a partially purified bacteriocin, Fermentcins B, from *Lactobacillus fermentum* . *Biotechnology Letters*, Vol 19, No 8, 741-744
69. V. Martí'n, A. I. Vela, M. Gilbert, J. Cebolla, J. Goyache. (2007). Characterization of *Aerococcus viridans* Isolates from Swine Clinical Specimens. *JOURNAL OF CLINICAL MICROBIOLOGY*. 9, 3053--3057.
70. Yeok-ok, Choi and cheol Ahn. (1997). Plasmid-associated bacteriocin production by *Leuconostoc* sp. LAB 145-3A isolated from kimchi. *Journal of microbiology and biotechnology*. 6,409-416
71. Young Uh, Jeong Seog Son, In Ho Jang, Kap Jun Yoon, Soon Ki Hong. (2002). Penicillin-resistant *Aerococcus viridans* Bacteremia Associated with Granulocytopenia. *J Korean Med Sci* : 113-115.
72. Z. USTUNOL , C. L. HICKS. (1994). Use of an Enzyme- Treated, Whey-Based Medium to Reduce Culture Agglutination. 1994 *J Dairy Sci* 77: 1479-1486

주 의

1. 이 보고서는 농림수산식품부에서 시행한 농림수산식품기술개발사업의 연구보고서입니다.
2. 이 보고서 내용을 발표할 때에는 반드시 농림수산식품부에서 시행한 농림수산식품기술개발사업의 연구결과임을 밝혀야 합니다.
3. 국가과학기술 기밀유지에 필요한 내용은 대외적으로 발표 또는 공개하여서는 아니됩니다.