

碩士學位論文

어류의 세균성 질병 예방을 위한  
probiotic 균주의 선발 및 특성



海洋生物工學科

梁丙圭

2002年 12月

# 어류의 세균성 질병 예방을 위한 probiotic 균주의 선발 및 특성

指導教授 許 文 洙

梁 丙 圭

이 論文을 理學碩士學位 論文으로 提出함



梁丙圭의 理學碩士 論文을 認准함

審査委員長 여 인 규

委 員 전 유 진

委 員 허 문 수


濟州大學校 大學院

2002年 12月

Screening and characterization of probiotic strains  
for prevention of bacterial fish diseases

Byung-Kyoo Yang

(Supervised by professor Moon-Soo Heo)

 제주대학교 중앙도서관  
A THESIS SUBMITTED IN PARTIAL FULFILLMENT  
OF THE REQUIREMENT FOR THE DEGREE OF  
MASTER OF SCIENCE

Department of Marine Biotechnology  
GRADUATE SCHOOL  
CHEJU NATIONAL UNIVERSITY

2002. 12

# 목 차

Abstract .....	iii
I. 서론 .....	1
II. 재료 및 방법 .....	3
1. Probiotic 균주의 분리 및 선정 .....	3
1-1. 유산균의 분리 및 선정 .....	3
1-2. 피검균의 분리 .....	3
1-3. 피검균 길항 유산균의 분리 및 선정 .....	3
1-4. 내산성 유산균의 분리 및 선정 .....	4
1-5. 항생제 내성 유산균의 분리 및 선정 .....	4
2. 공시균주의 선정 및 동정 .....	5
3. <i>L. sakei</i> BK19의 항균 스펙트럼 .....	5
4. <i>L. sakei</i> BK19 supernatant 제조 .....	6
5. Supernatant의 열 및 효소에 대한 안정성시험 .....	6
7. Scanning electron microscope(SEM) 관찰 .....	6
8. <i>L. sakei</i> BK19 균주의 최적 배양조건 .....	7
III. 결과 및 고찰 .....	8
1. Probiotic 균주의 분리 및 선정 .....	8
1-1. 유산균의 분리 및 선정 .....	8
1-2. 피검균 길항 유산균의 분리 및 선정 .....	9
1-3. 내산성 유산균의 분리 및 선정 .....	14
1-4. 항생제 내성 유산균의 분리 및 선정 .....	20
2. 공시균주의 선정 및 동정 .....	21
3. <i>L. sakei</i> BK19의 항균 스펙트럼 .....	25

4. Supernatant의 열 및 효소에 대한 안정성시험.....	30
5. Scanning electron microscope(SEM) 관찰.....	31
6. <i>L. sakei</i> BK19 균주의 최적 배양조건.....	32
IV. 요약.....	38
V. 참고문헌.....	39
감사의 글.....	43



## Abstract

Selection of probiotic strain should have a wide antagonistic spectrum, even if gram negative bacteria, survive in low pH condition and not sensitive by antibiotic agents for applied in probiotic. The purpose of the present study was to screen of effective lactic acid bacteria (LAB), as probiotics from korea traditional fermented foods, which are able to protect aquacultural fish pathogenic bacteria and investigate their characterization.

Twenty strains of lactic acid bacteria were isolated from fish intestine, fermented fish foods and kimchis. These bacteria were screened for antagonistic activity against fish pathogenic bacteria. Seven tested LAB strains were able to inhibit the fish pathogenic bacteria, including *Vibrio anguillarum*, *Edwardsiella tarda* and *Streptococcus* sp..

Of the probiotic candidates, BK19 strain which from fermented pollack viscera indicated the largest inhibition activity. Moreover, this strain showed a resistance over low pH and antibiotic agents. Therefore this probiotic candidate BK19 was finally selected and identified as a probiotic strain. This particular probiotic bacteria was identified as *Lactobacillus sakei* BK19 by biochemical characteristics and 16S rRNA PCR amplification.

*L. sakei* BK19 was able to inhibit the growth of pathogenic bacteria including *V. alginolyticus*, *V. salmonicida*, *V. parahaemolyticus*, *V. harveyii*, *V. mimicus*, *V. vulnificus*.

*L. sakei* BK19 culture supernatants was re-adjusted to pH 6.5 and treated with catalase. Then the antagonistic activity was assayed by agar-well diffusion technique.

A bacteriocin-like inhibitory substance of *L. sakei* BK19 was heat-stable (100°C for 10 min) and not-sensitive to lipase and  $\alpha$ -amylase. However this substance was inactivated by trypsin, pepsin, protease. In the scanning electron microscope observation, *L. sakei* BK19 supernatant treated *V. anguillarum* cell wall had been destroyed incubate after 3 h.

In the study of optimal culture condition, *L. sakei* BK19 was well grown under sucrose, maltose, and saccharose but lactose, mannitol was not be utilized

as a carbon source for their growth and fermentation. Also *L. sakei* BK19 was able to grow at 15 to 45°C culture temperature and 0 to 7% of NaCl concentration.



# I. 서론

지난 10년간 양식산업은 급격히 증가하였으며 식량산업으로써 그 가치가 높아지고 있다. 그러나 생산량을 높이기 위한 밀식과 열악한 사육수 등은 양식어류의 내병성을 약화시켜 어류질병이 빈발하고 있으며 치료나 예방이 매우 힘든 실정이며 이에 따른 경제적 손실이 높아지고 있다(국립수산진흥원, 2000).

양식산업에 있어 어류의 질병예방 및 치료를 위한 가장 일반적인 방법에는 항생제 투여 등의 화학적인 방법과 백신요법이 있는데(Newman, 1993; Eldar, 1995), 항생제요법인 경우 오남용에 따른 내성균의 출현(Smith 등, 1994)과 체내잔류(Karunasagar 등, 1994; Witte 등, 1999) 등 사회적, 생태적으로 심각한 문제를 유발하고 있어 그 사용이 규제되고 있는 실정이다(Aoki 등, 1990). 백신요법인 경우 양식어류는 균집을 대상으로 투여하고 주로 면역력이 약한 자치어를 대상으로 하기 때문에 백신투여가 매우 번거롭고 많은 인력이 필요한 실정이다. 또한 세균성 질병의 복합적인 감염에 따른 효과적인 백신의 개발이 없어 어병예방과 치료를 위한 대책으로서는 한계에 와 있다고 할 수 있다. 따라서 기존의 어병예방 및 치료의 문제점에 대한 대안책으로 친환경적인 probiotic 요법에 대한 관심과 연구가 최근 많아지고 있다(Salminen 등, 1999).

Probiotics란 숙주동물의 장내균총(intestinal microbes)을 개선시킴으로써 숙주에게 유익한 영향을 주는 미생물 첨가제를 말한다(Fuller, 1989). Probiotics의 영향은 유익한 균주를 투여하거나 장내에 정착 시켰을 때 병원성 세균이 장내에 정착하고 증식하는 것을 억제시키고 유익세균의 성장하며 분비하는 여러 대사물질과 효소들에 의해 숙주동물의 소화를 증대시켜 준다.

Probiotics를 이용하기 위한 효과적인 방법은 항균활성이 있는 후보 균주를 성숙한 개체에서 직접 분리하고 같은 종의 비성숙 개체에 대하여 사료 등에 첨가하여 적용하는 것이다.

Probiotics로서 많이 이용되어 온 미생물로는 *Lactobacillus* sp.(Ashenafi, 1991; Chateau 등, 1993; Gildberg 등, 1997), *Bacillus* sp.(Sugita, 1998), *Vibrio alginolyticus*(이하 *V. alginolyticus.*, Austin 등, 1995; Gatesoupe, 1989), *Carnobacterium* sp.(Joborn, 1997; Stoffels, 1992), 및 *Pseudomonas fluorescense*(Gram 등, 1999) 등이 있으며, 그 중 가장 많이 연구되고 이용되어온 미생물은 유산균(lactic acid bacteria, LAB)이다(Ringo 등, 1998; Conway, 1996).



유산균은 그람양성, 비운동성, 비포자성 및 catalase 음성인 세균인데, 발효대사를 통하여 유기산을 생산하는 미생물이며, 형태적으로 간균인 *Lactobacillus* sp. 및 *Carnobacteria* sp. 그리고 구균인 *Lactococcus* sp. 등으로 나눌 수 있다. 이들 다양한 종류의 유산균은 자연계에 널리 분포하고 있을 뿐만 아니라 동물의 장이나 발효식품 등에서도 쉽게 발견된다(Ringo 등, 1998; Bruno 등, 1993).

이들 유산균들이 항균활성 등에 의해 장내균총을 개선시키는 중요한 미생물이라는 것은 이미 많이 알려져 있으며(Conway, 1996), 이러한 유산균의 항균활성 인자는 유기산(Rosenquist, 1998)과 과산화수소 및 bacteriocin(Bruno 등, 1993; Jack 등, 1995; Piard, 1992) 등에 의한다. 또한 유산균은 장내 상피세포에 부착하여 정착함으로써(Joborn 등, 1997) 병원균의 감염과 성장을 억제하게 된다. 유산균의 병원성 세균에 대한 항균활성에 대한 연구는 *Listeria monocytogenes*(Corsetti, 1998; Harris, 1989; Hugas, 1998), *Escherichia coli*(Choi 등, 1999), *Salmonella typhimurium*(Hudault, 1997), *Vibrio anguillarum*(Olsson, 1992) 등의 미생물에 대한 항균활성이 있다고 보고되어있다. 그러나 probiotics로서 유산균은 대부분의 어병세균 및 병원성 세균이 그람음성인데 반하여 그 항균활성은 계통적으로 유사한 그람양성 세균에 대해서만 항균활성을 나타낸다는 한계점이 있다(Suma 등, 1998). 따라서 probiotics 균주로서 산업적으로 응용하기 위해 분리된 균주는 그람양성 세균 뿐만 아니라 그람음성 세균의 성장까지도 저해할 수 있는 넓은 항균 스펙트럼을 갖고 있어야 한다. 또한 probiotics의 지속적인 항균작용과 유익한 효과를 갖기 위해서는 pH가 낮은 위와 담즙 그리고 여러 가지 소화효소 등의 환경 조건에서도 생존하여야 하며, 어병치료를 위한 항생제 투약 시기에도 생존하여야 한다. 즉, probiotics 균주가 갖추어야 할 또 다른 중요한 조건은 내산성 및 내담즙성 그리고 항생제에 대한 적절한 내성을 갖고 있어야 한다는 점이다(Verschuere 등, 2000).

따라서 본 논문은 넓은 항균 스펙트럼을 갖고 있으면서 pH 내성 및 항생제 내성 등을 갖고 있는 probiotics 균주를 어류의 장내와 한국의 전통 발효식품인 김치와 젓갈 등에서 선발하여 어류의 세균성 질병 예방 혹은 치료를 함으로써 양식산업의 효율성을 증대시키고자 한다.

## II. 재료 및 방법

### 1. Probiotic 균주의 분리 및 선정

#### 1-1. 유산균의 분리 및 선정

김치 및 각종 젓갈류는 생리식염수로 단계 희석시켜 사용하였고 양식어류는 장내를 생리식염수로 세척 후 단계 희석시킨 후 배양하여 20여종의 유산균을 분리하였다. 유산균 배양배지로는 1%의 CaCO<sub>3</sub>를 첨가한 mann, rogosa and sharpe broth 및 agar(MRS, Difco)를 사용하였다. 분리된 균은 면양 혈청배지에 도말하여 용혈성을 확인하여 비용혈성 유산균을 선택하였다.

#### 1-2. 피검균의 분리

어병세균인 *Vibrio anguillarum* KCTC 2711(이하 *V. anguillarum*) 는 한국유전자은행(The Korean Collection for Type Cultures)에서 분양 받아 사용하였고, *Edwardsiella tarda*(이하 *E. tarda*) 및 *Streptococcus* sp는 병에 걸린 넙치의 두신 및 비장에서 직접 분리하였다. 병원세균의 배양은 *V. anguillarum* 인 경우 trypticase soy broth(TSB, Difco), *E. tarda* 및 *Streptococcus* sp.인 경우 brain heart infusion broth(BHIB, Difco)를 이용하여 32℃에서 배양하였으며, 장기보관을 위해 모든 균주는 30% glycerol를 첨가하여 -70℃에 보관하였고 2회 계대 배양하여 사용하였다.

#### 1-3. 피검균 길항 유산균의 분리 및 선정

유산균의 1차 선발을 위해 유기산에 의한 항균활성을 MRS agar상에서 agar spotted method를 이용하여 *V. anguillarum*, *Edwardsiella tarda* 및 *Streptococcus* sp.에 대한 길항능을 확인하여 후보균주로서 선발하였다.

1차로 선발된 유산균 중 bacteriocin 유사물질에 의한 항균활성을 갖고 있는 균주를 선발하기 위하여 nutrient agar(NA, Difco) 배지상에서 spotted method 및 agar well-diffusion assay로 검토하였다(Corsetti 등, 1996; Schillinger 등, 1989).

Agar spotted method인 경우 전 배양된 probiotic 후보균주 5~10  $\mu$ l를 NA 한천배지 표면에 적하시킨 후 37℃에서 24시간 배양하여 집락이 형성된 표면에 10<sup>5</sup>

CFU/ml의 피검균이 첨가된 연 한천배지(0.7% agar) 10 ml를 증충하여 4℃에서 4시간 방치한 후 32℃에서 24시간 배양하여 저지환을 확인함으로써 항균활성을 측정하였다.

Agar well-diffusion assay인 경우 muller hinton agar(MHA, Difco) 위에  $10^5$  CFU/ml의 피검균이 첨가된 연 한천배지(0.7% agar) 10 ml를 증충한 후 직경 8 mm의 구멍을 뚫어 전배양된 각 후보균주의 supernatant를 중화한 후 100  $\mu$ l씩 well에 첨가한 후 위의 방법과 같이 저지환을 확인하였다.

#### 1-4. 내산성 유산균의 분리 및 선정

Probiotic의 조건 중 내산성은 생균을 사료와 함께 투여하였을 때 pH가 낮은 장기인 위에서도 생존해야 활성을 유지할 수 있기 때문에 매우 중요한 요소 중 하나이다. 내산성 probiotic 균주를 선발하기 위하여 10 ml의 MRS broth에 4 M의 HCl로 첨가하여 pH 4에서 pH 9까지 조절한 후 1차로 선발된 probiotic 후보균주에 대하여 pH 조건에 따른 성장을 확인하였다. pH를 조절한 각각의 배양액에  $10^5$  CFU/ml 농도의 균액 100  $\mu$ l를 접종하여 4, 6, 8, 12, 24 시간 배양 후 probiotic균의 성장을 흡광도( $OD_{630nm}$ )를 측정하여 확인하였다.

#### 1-5. 항생제 내성 유산균의 분리 및 선정

양식장의 어류 질병 치료시 항생제 처리 기간에도 probiotic 균주는 장내에서 정착 및 생존해야 하기 때문에 항생제 감수성 또한 probiotic 균주의 선별에 있어서 매우 중요한 요소이다.

항생제 감수성 실험은 agar disc diffusion assay를 통하여 확인하였다.  $1.5 \times 10^5$  CFU/ml 농도의 균액 100  $\mu$ l를 MHA 배지 위에 도말 한 후 항생제 disc를 배지표면 위에 부착시켜 상온에서 10분간 방치한 후 32℃, 24시간 배양하여 저지환을 확인하였다.

시험에 사용된 항생제는 Amoxicillin(AMC), Tetracycline(TE), Oxytetracycline(T), Chloramphenicol(C), Cephalothin(CF), Nalidixic acid(NA), Ciprofloxacin(CIP), Novobiocin(NB), Doxycycline(D), Sulfadiazine(SD), Neomycin(N), Erythromycin(E) 등 12종의 항생제를 본 시험에 사용하였다.

## 2. 공시균주의 선정 및 동정

상기 실험에서 사용된 총 20종의 probiotic 후보균주 중에서 항균활성, 내산성 및 항생제 내성 등의 시험에서 가장 우수한 BK19를 최종적으로 선발하였다. BK19의 동정을 위해 그람염색, 포자유무, 운동성, 전자현미경 관찰 등 형태학적 특성을 확인하였고 당 발효능과 같은 생화학적 성상은 Api 50CHL(Biomerieux, France)을 이용하여 상법에 따라 시행하였다.

BK19의 16S rRNA PCR을 통한 동정은 전 배양된 균액을 원심분리 하여 (8000×g, 1분) 세균 균체를 모은 후 QIAamp DNA Mini Kit(QIAGEN Inc.)을 이용하여 상법에 따라 BK19의 total DNA를 분리하여 TE buffer에 희석시킨 후 PCR 반응을 하였다.

PCR 반응은 총 부피 50  $\mu$ l에 genomic DNA 3  $\mu$ l, *Taq* DNA polymerase (Bioneer, Korea) 2.5  $\mu$ l, 10×reaction buffer 5  $\mu$ l, deoxy nucleoside triphosphates 2  $\mu$ l, TE buffer 32.5  $\mu$ l, 각각의 primer(forward primer 5'-GCC GCG TGA GTG AAT AAG G-3' 와 reverse primers 5'-ACA TGC TCC ACC GCT TGT G-3') 2.5  $\mu$ l를 첨가하여 반응하였다. 증폭은 프로그래밍 된 DNA minicycler (PTC-150, MJ Research, USA)에서 수행하였다.

PCR 반응 조건은 먼저 94°C에서 5분간 denaturation하고, 30주기 동안 94°C에서 45초 denaturation, 50°C에서 45초 annealing, 72°C에서 45초간 extention 하여 마지막으로 72°C에서 10분간 extension을 수행하였다. 증폭된 PCR product는 1% agarose(Agarose LE, Promega CO.) gel을 0.5  $\mu$ g/ml ethidium bromide로 염색하여 확인하였다.

## 3. *L. sakei* BK19의 항균 스펙트럼

*L. sakei* BK19의 항균 스펙트럼을 확인하기 위하여 agar spotted method를 이용하였다. 피검균으로는 병원성 세균인 *V. alginolyticus*, *V. mimicus*, *V. parahaemolyticus*, *V. vulnificus*, *V. salmonicida* 및 *V. harveyii*를 10<sup>5</sup> CFU/ml의 농도로 희석시킨 연 한천배지(0.7% agar)를 BK19가 성장해있는 배지 표면에 증충한 후 앞에서 기술한 바와 같이 저지환을 확인하였다. 최소억제농도(minimum inhibition concentration, MIC) 측정은 microtitre plate assay를 통하여 확인하였

다. 피검균에 따라 200  $\mu$ l의 적정 배양액과 supernatant를 2배 희석법으로 희석, 혼합한 후 피검균을  $10^5$  CFU/ml의 농도로 2  $\mu$ l 접종하여 32°C에서 24시간 배양하면서 시간대별(4, 6, 12, 24시간) 흡광도를 630 nm에서 확인하였다.

#### 4. *L. sakei* BK19 supernatant 제조

*L. sakei* BK19를 MRS broth로 37°C에서 24시간 동안 전 배양 한 후 7000×g에서 10 분간 원심 분리하여 세균을 제거하고 유기산과 과산화수소에 의한 항균력을 배제하기 위하여 pH를 6.5로 중화시키고 catalase(5 mg/ml)를 처리한 후 얻어진 supernatant를 evaporator로 5배 농축하였다. 본 실험에 사용된 supernatant는 오염을 방지하기 위하여 0.2  $\mu$ m pore size filter로 제균하여 사용하였다.

#### 5. Supernatant의 열 및 효소에 대한 안정성시험

*L. sakei* BK19 supernatant의 열에 대한 안정성을 확인하기 위해 55°C에서 30 분간, 100°C에서 10분간 처리한 후 agar well-diffusion assay를 통하여 항균활성 변화를 확인하였다. 효소에 의한 항균활성의 변화는 각각의 효소들을 상온에서 2 시간 동안 supernatant에 처리한 후 항균 활성의 변화를 확인하였다. 본 실험에 사용된 효소는 아래와 같다. Trypsin(22 U/mg), pepsin(16 U/mg), protease(45 U/mg), lipase(50 U/mg) 그리고  $\alpha$ -amylase(15 U/mg). 대조구는 효소처리를 하지 않고 agar well-diffusion assay를 통하여 항균활성을 확인하였다.

#### 6. Scanning electron microscope(SEM) 관찰

Supernatant 기작의 확인을 위해 병원균수의 확인 및 병원균의 형태적 변화를 SEM을 통하여 관찰하였다. 각각 *V. anguillarum*과 *V. alginolyticus*를 접종한 BHI broth에 중화시킨 *L. sakei* BK19 supernatant를 첨가한 후 3시간 동안 상온에서 배양한 후 생균수를 확인하고, 원심 분리하여(8000×g, 5분) pellet을 모은 후 인산 완충액(PBS, pH 7.2)으로 15분씩 2회 세척하였다. 모아진 cell은 2.5% glutaraldehyde로 2시간 동안 처리하여 전고정 하고 PBS(pH 7.2)로 15분씩 2회

세척하였다. 후고정을 위해 1시간 동안 1% osmium tetroxide(OsO<sub>4</sub>)로 처리한 후 PBS로 다시 세척하였다. 세척된 cell은 50~100 % 까지 조절된 에탄올에 침적하여 탈수하고 60~100% 까지 조절된 isoamylacetate를 이용하여 치환시키고 critical point dryer(HITACHI, HCP-2, Japan)를 이용하여 CO<sub>2</sub> dry를 하고 gold 코팅(HITACHI, E-1010, 10N sputter, Japan)한 후 전자현미경(HITACHI, S-2460N, Japan)으로 관찰을 하였다.

## 7. *L. sakei* BK19 균주의 최적 배양조건

*L. sakei* BK19의 최적 배양조건을 확인하기 위하여 탄소원, 온도, 염분농도 그리고 pH에 따른 성장을 확인하였다. 탄소원에 따른 *L. sakei* BK19의 성장에 nutrient broth에 mannitol, arabinose, fructose, xylose, glucose, lactose, saccharose 및 maltose 등을 각각 0.1%(w/v)씩 첨가하여 3, 6, 12, 24, 48시간에 따라 성장을 확인하였다.

배양온도에 따른 *L. sakei* BK19의 성장은 MRS broth(1.5% NaCl)에 10<sup>5</sup> CFU/ml 농도의 균액 100  $\mu$ l를 접종하여 배양온도를 5, 15, 25, 35, 45 $^{\circ}$ C로 조절한 후 24시간 동안 배양하면서 성장을 측정하였다.

염분농도에 따른 *L. sakei* BK19의 성장은 NaCl 농도를 0, 1, 3, 5, 7%로 조절한 MRS broth에 10<sup>5</sup> CFU/ml 농도의 균액 100  $\mu$ l를 접종하여 24시간 동안 배양하면서 성장을 측정하였다. pH에 따른 *L. sakei* BK19의 성장측정은 10 ml의 MRS broth에 4 M의 HCl로 첨가하여 pH 4에서 pH 9까지 조절한 후 10<sup>5</sup> CFU/ml 농도의 균액 100  $\mu$ l를 접종하여 4, 6, 8, 12, 24 시간 배양 후 *L. sakei* BK19의 성장을 흡광도 630 nm에서 확인하였다.

### III. 결과 및 고찰

#### 1. Probiotic 균주의 분리 및 선정

##### 1-1. 유산균의 분리 및 선정

20종의 유산균을 Table 1과 같이 김치, 어류의 장 그리고 젓갈류 등에서 분리하였다. 각 시료는 생리식염수로 세척하여 단계희석법으로 1% CaCO<sub>3</sub>를 첨가한 MRS agar 표면에 도말한 후 24시간 동안 35℃에서 배양하면서 투명한이 형성되는 유산균을 분리하였다. 이들 분리균들은 그람양성 및 catalase 음성의 간균 이었으며 *Lactobacillus* sp.로 확인되었다.

Table 1. Isolated strains and isolation source

Strain NO.	Isolation source	Strain NO.	Isolation source
BK1	Kimchi	BK11	Flounder rectum
BK2	Kimchi	BK12	Puffer intestine
BK3	Kimchi	BK13	Rotifer tank
BK4	Flounder intestine	BK14	Fermented octopus
BK5	Flounder esophagus	BK15	Fermented anchovy
BK6	Flounder esophagus	BK16	Fermented shrimp
BK7	Flounder pylorus	BK17	Fermented coralfish
BK8	Flounder pylorus	BK18	Fermented cuttlefish
BK9	Flounder stomach	BK19	Fermented pollack viscera
BK10	Flounder genitals	BK20	Fermented rice wine

## 1-2. 피검균 길항 유산균의 분리 및 선정

분리된 유산균 중 1차 선발을 위해 각각의 균들을 순수분리 한 후 새로운 MRS agar 위에서 병원성 세균인 *V. anguillarum*, *E. tarda* 및 *Streptococcus* sp. 등에 대한 항균활성이 있는 probiotic 후보균주를 선발하였다. 그 결과 Fig. 1과 2에서와 같이 *V. anguillarum*, *E. tarda* 및 *Streptococcus* sp.에 대한 저지환이 확인된 10여종의 후보균주인 BK1, BK2 및 BK3을 김치 시료에서 선발하였고, BK4, BK5 및 BK6 등을 넙치의 장 및 식도 등에서 분리 선발하였으며 BK14(꿀뚜기젓), BK15(멸치젓), BK16(새우젓), BK18(오징어젓), BK19(창란젓) 및 BK20(たく주)등을 전통 발효식품인 젓갈과 탁주 등에서 분리하여 선발하였다.

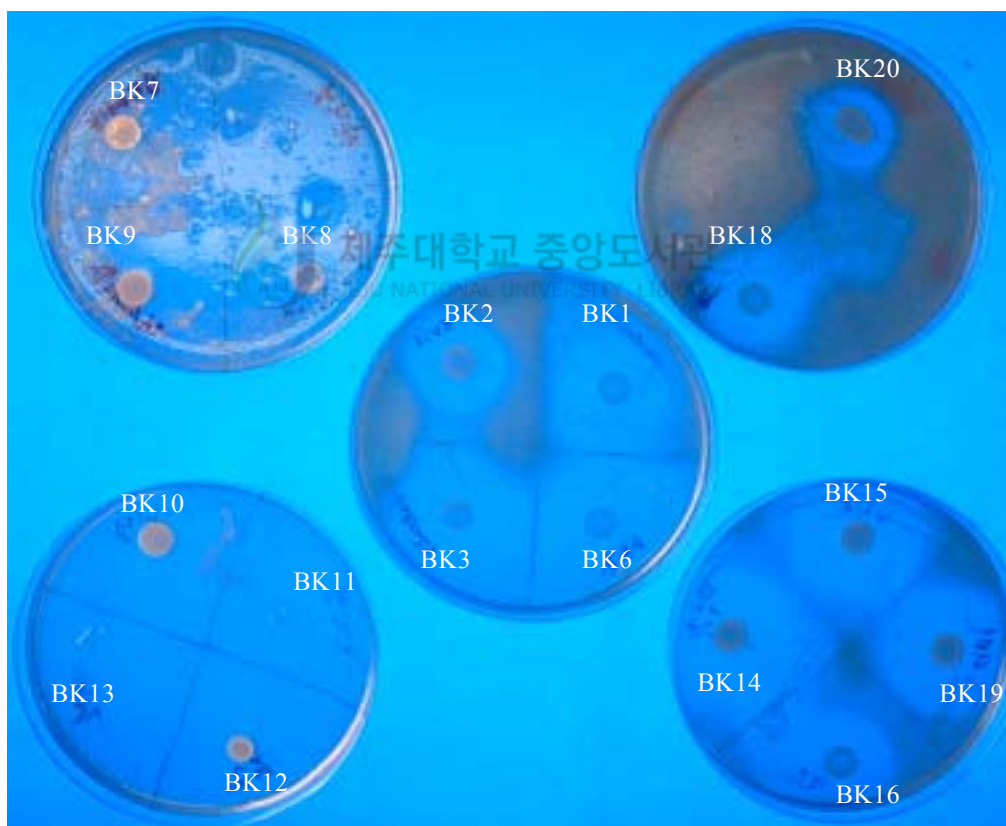


Fig. 1. Antibacterial activity of the isolated LAB against *V. anguillarum*. Overlaid on MRS agar and cultured at 35°C.



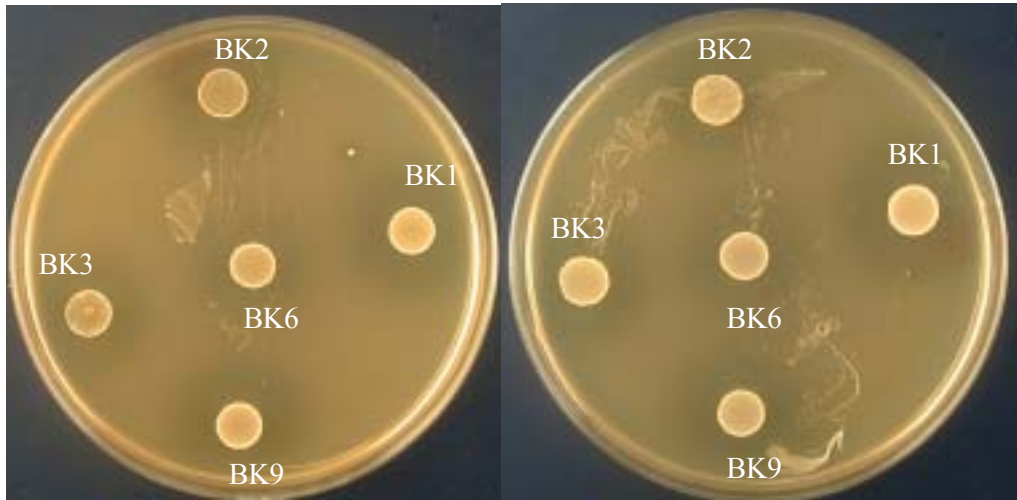


Fig. 2. Antibacterial activity of the isolated LAB against *E. tarda* (left) and *Streptococcus* sp (right)..  
Overlaid on MRS agar and cultured at 35°C.

MRS plate에서 관찰된 모든 후보균주들에서 항균활성이 관찰되었다. 이는 MRS agar 내에 많은 양의 탄소원이 함유되어 있기 때문에 유산균이 발효하는 과정에서 유기산을 생성하여 pH를 저하시키기 때문에 비 특이적인 항균활성을 나타내 Corsetti 등(1998)과 Fuller(1989)의 결과와 일치함을 보였다. 본 실험에서도 probiotic 후보균주들이 발효를 통해 유기산을 생성하는 비특이적 항균활성이 확인되었으며, 병원성 세균인 *V. anguillarum*, *Streptococcus* sp. 및 *E. tarda*는 pH 4.5 이하인 배지에서 성장할 수 없었다(Fig. 3). 전배양된 supernatant를 중화시켰을 때 항균활성이 상실됨으로써 유기산에 의한 비특이적 항균활성을 나타낸다고 추측된다.

1차로 선발된 probiotic 후보균주 중에서 *V. anguillarum*에 대한 항균활성은 BK1(김치), BK4(넙치 장), BK6(넙치 유문수), BK15(멸치젓), BK18(오징어젓) 및 BK19(창란젓)에서 확인되었고(Fig. 4), BK4와 BK19에서는 *Streptococcus* sp에 대한 항균활성이 확인되었다. 그러나 *E. tarda*에 대한 항균활성은 BK19에서만 관찰되었다(Fig. 5).

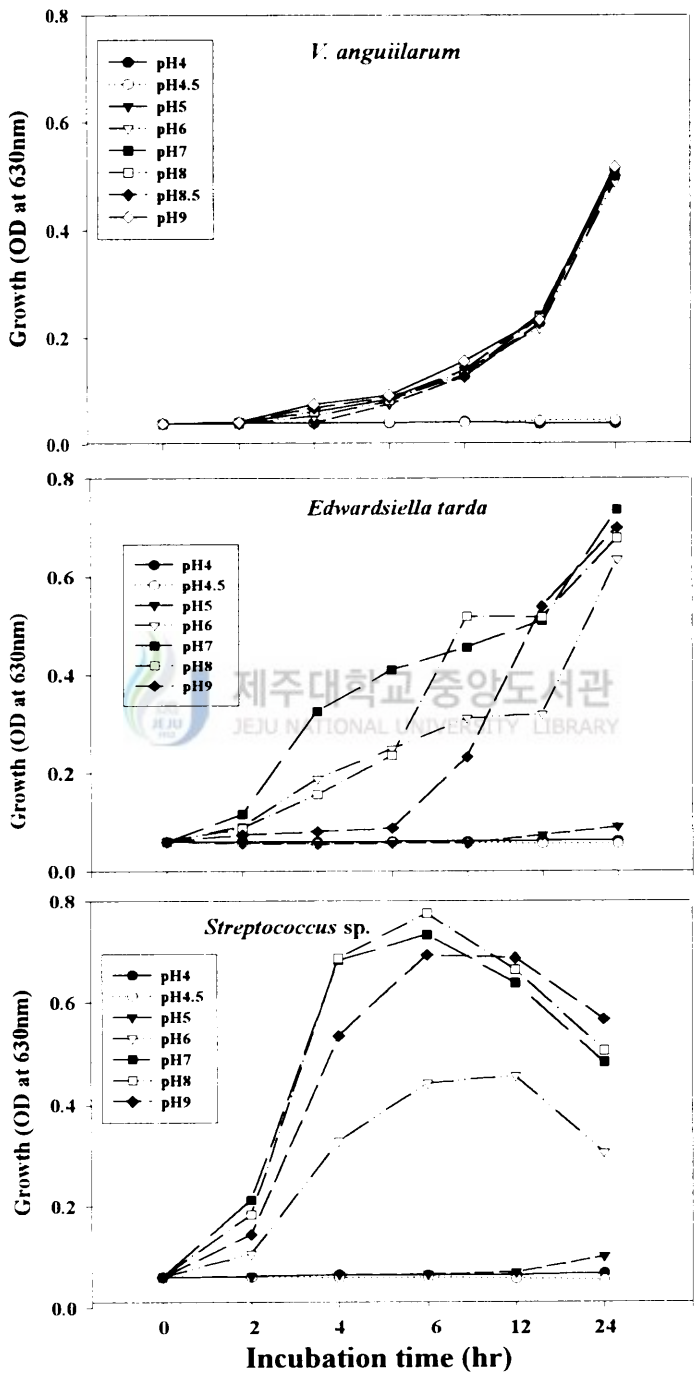


Fig. 3. The growth of pathogenic bacteria at different initial culture pH values.

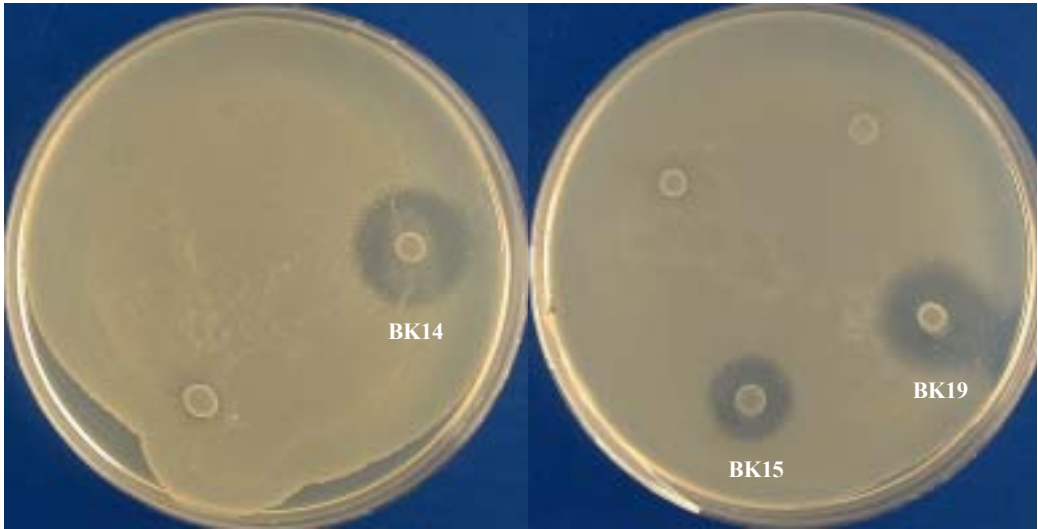


Fig. 4. Antibacterial activity of the isolated LAB against *V. anguillarum*.  
Overlaid on nutrient agar and cultured at 35°C.

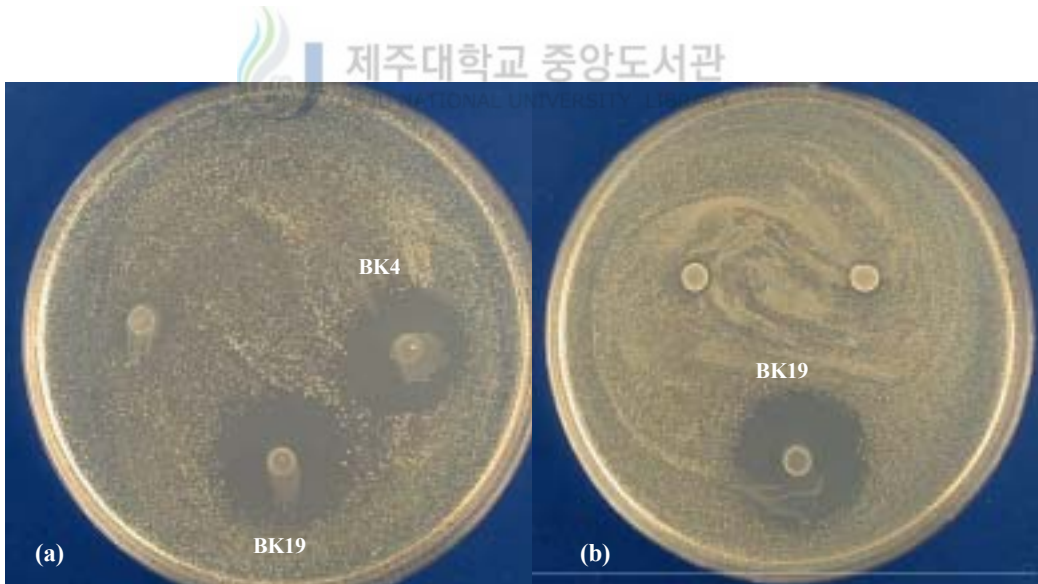


Fig. 5. Antibacterial activity of the isolated LAB against (a) *Streptococcus* sp. and (b) *E. tarda*.  
Overlaid on nutrient agar and cultured at 35°C.

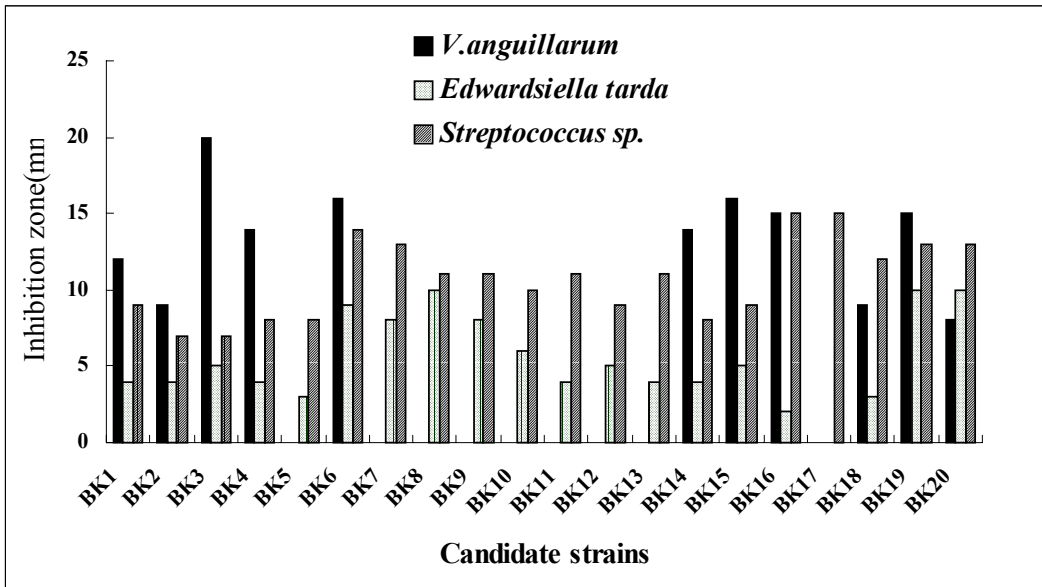


Fig. 6. Inhibitory effect of LAB against the growth of fish pathogenic bacteria when MRS agar was used as a media for LAB growth.

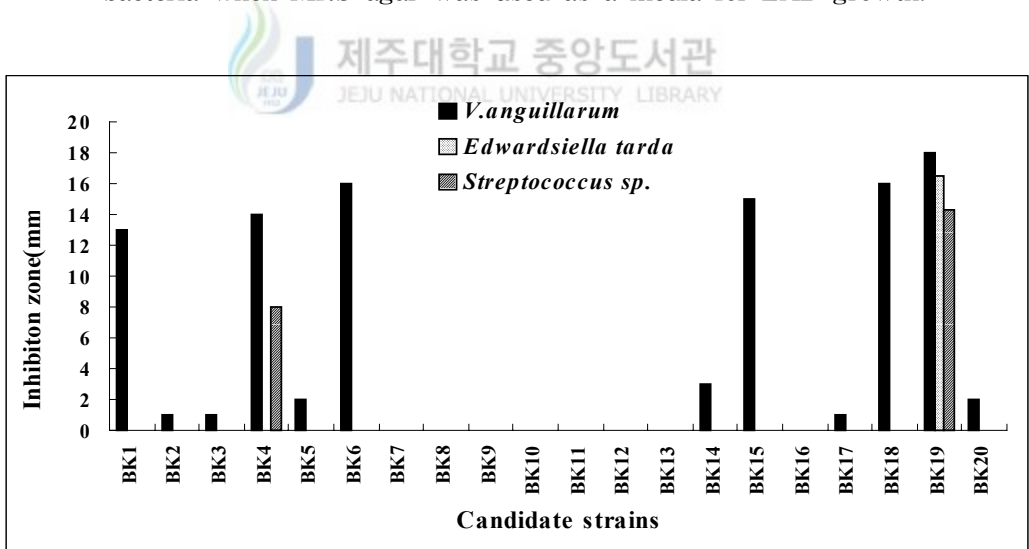


Fig. 7. Inhibitory effect of bacteriocin-like substance from LAB against the growth of fish pathogenic when nutrient agar was used as a media for LAB growth.

Choi 등(1999)의 보고에 의하면 김치에서 분리된 *Pediococcus* 속과 *Leuconostoc* 속 등에서도 *E. coli*에 대한 항균활성이 확인되었다. 그러나 본 실험에서 분리된 김치 유산균의 항균활성은 BK1에서만 *V. anguillarum*에 대한 항균활성이 관찰되었고 BK2 및 BK3에서는 항균활성이 관찰되지 않았다. 그리고 *E. tarda* 및 *Streptococcus* sp에 대한 항균활성은 김치에서 분리된 모든 균주에서 관찰되지 않아 항균 스펙트럼이 좁았다.

NA배지 상에서 관찰된 저지환은 상대적으로 MRS plate상에서 관찰된 저지환보다는 작았으나 병원세균에 대한 특이적 항균활성이 확인되었다(Fig. 6,7). 이는 NA배지의 구성 성분이 단백질원 중심으로 되어있고 발효를 위한 탄소원이 결핍되어 유기산을 생산하지 못하기 때문이며 NA배지 상에서 관찰되는 저지환의 영향은 유기산이 아닌 bacteriocin-like substance에 의한 것이라고 판단된다. 또한 탄소원이 없는 배지에서는 유산균의 성장이 극히 제한되기 때문에 항균성 물질을 분비할 수 없으며 대체적으로 탄소원이 결핍된 조건에서 잘 자랄 수 있는 유산균에 한하여 저지환이 관찰되었다고 판단된다.

대부분의 bacteriocin 생산 유산균들은 좁은 항균 스펙트럼을 갖고 있으며 계통적으로 유사한 그람양성 세균에 대해서만 저해를 하는 것이 대부분이라고 하는 Klaenhammer(1988)의 결과와는 달리 본 실험에서 분리된 probiotic 후보균주 중 BK4 와 BK19는 그람음성 세균인 *V. anguillarum* 및 그람양성 세균인 *Streptococcus* sp.에 대해서도 항균활성을 보여 비교적 항균 스펙트럼이 넓다고 여겨진다. 특히 BK19는 *V. anguillarum*, *E. tarda* 및 *Streptococcus* sp. 등의 어병 세균에 대하여 넓은 항균활성을 보였다(Fig. 7). 항균활성이 탁월한 BK19균을 장내의 세균총 개선을 위한 후보균주로서 양식현장 등에 적용한다면 매우 유익할 것으로 판단되며 이러한 넓은 항균 스펙트럼은 probiotic 균주가 갖추어야 할 가장 중요한 특성중의 하나이며 이것을 적용시키기 위한 장 정착능 실험 또한 앞으로 검토되어야 한다.

### 1-3. 내산성 유산균의 분리 및 선정

Probiotic 후보균주의 초기 pH에 따른 성장을 확인하기 위하여 10 ml의 MRS broth에 4 M의 HCl을 가하여 pH를 4에서 9까지 조절한 후 1차 선발된 7종의 후보균주를 접종하였다.

본 실험에서는 Fig. 8의 결과와 같이 젓갈류에서 분리된 BK14, BK15, BK18 그리고 BK19 균주에서 pH 4~4.5에서도 성장이 확인되어 높은 내산성이 확인된

반면, 김치 및 넙치 장에서 분리된 probiotic 후보균주(BK1, 2 및 BK4)에서는 낮은 pH에 대하여 감수성이 높아 pH 감수성 실험에서는 각각의 후보균주 마다 커다란 유의차가 확인되었고 특히 분리원에 따른 유의차가 크게 나타났다. 양식 넙치에서 분리된 BK4인 경우 비교적 넓은 항균 스펙트럼과 양식 넙치의 상재세균이라는 점에서 probiotic 후보균주로서 사용이 용이하나 pH 4 이하에서의 성장이 확인되지 않았는데 이는 투여된 균이 pH 4 이하인 위에서 생존하기 어렵다는 점에서 양식용 probiotic 균주로 적합하지 않은 것으로 사료된다.



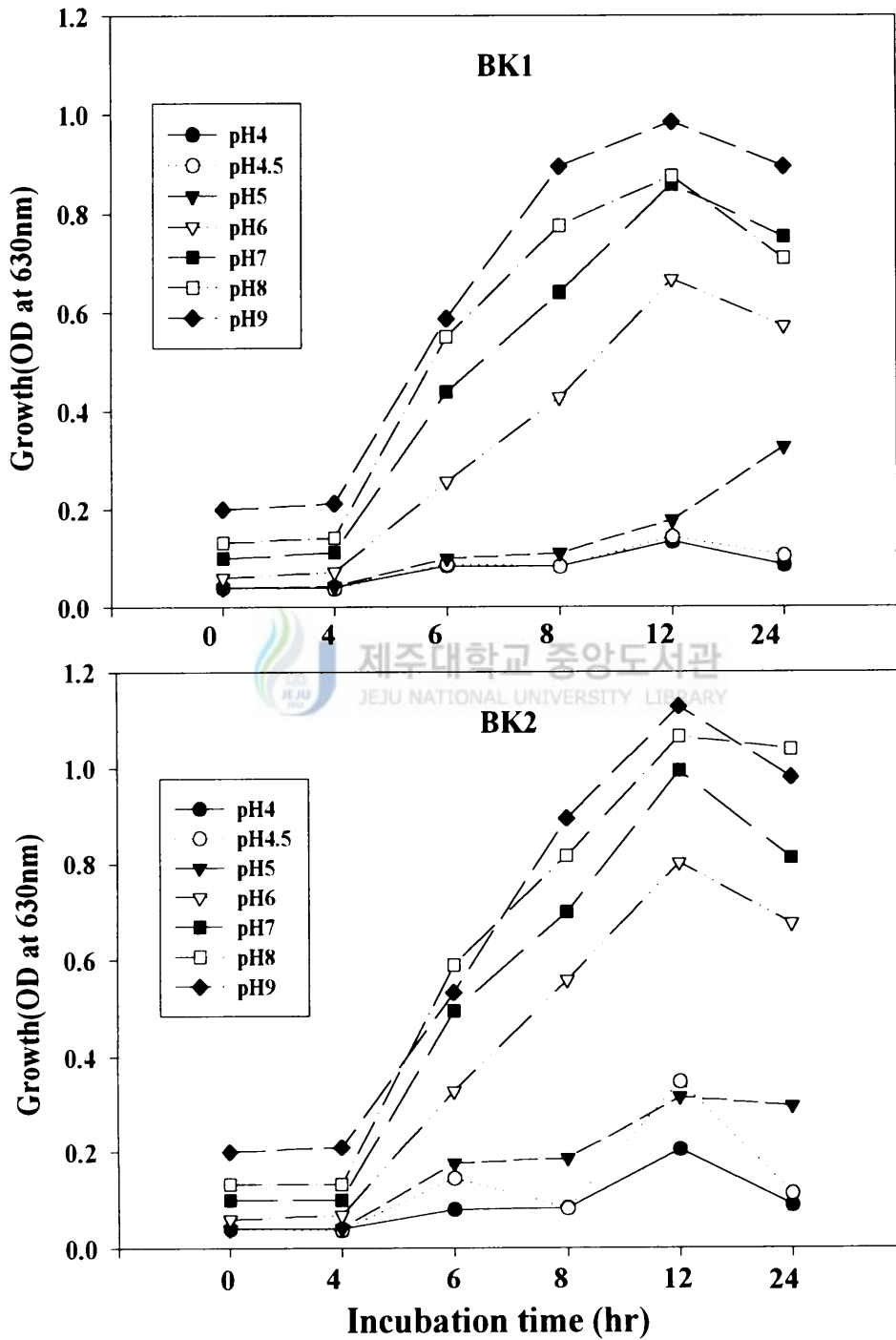


Fig. 8. Growth curves of LAB at different initial culture pH values.

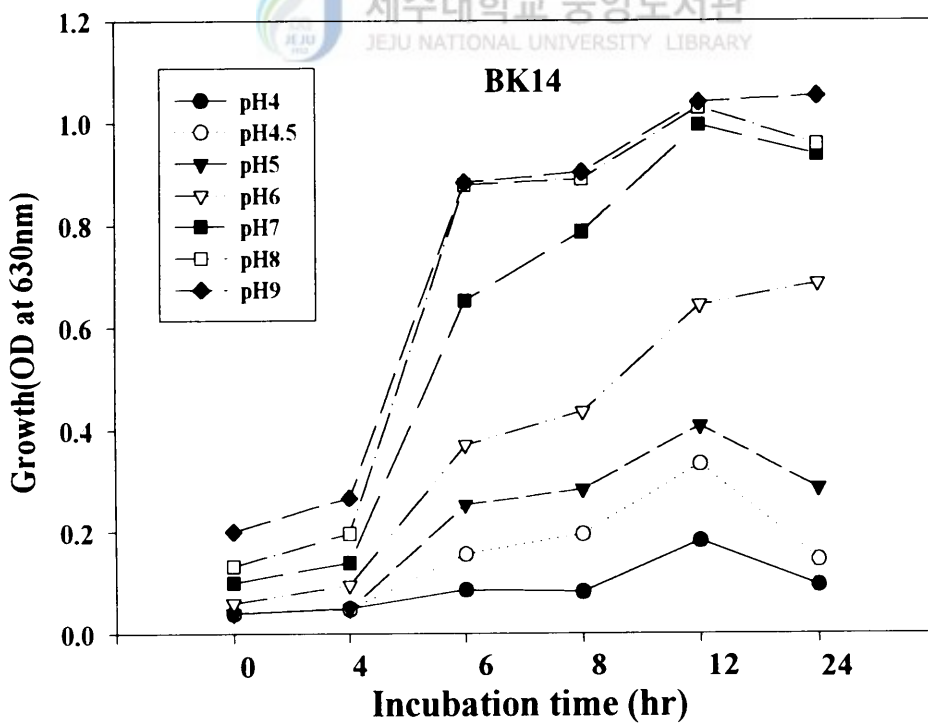
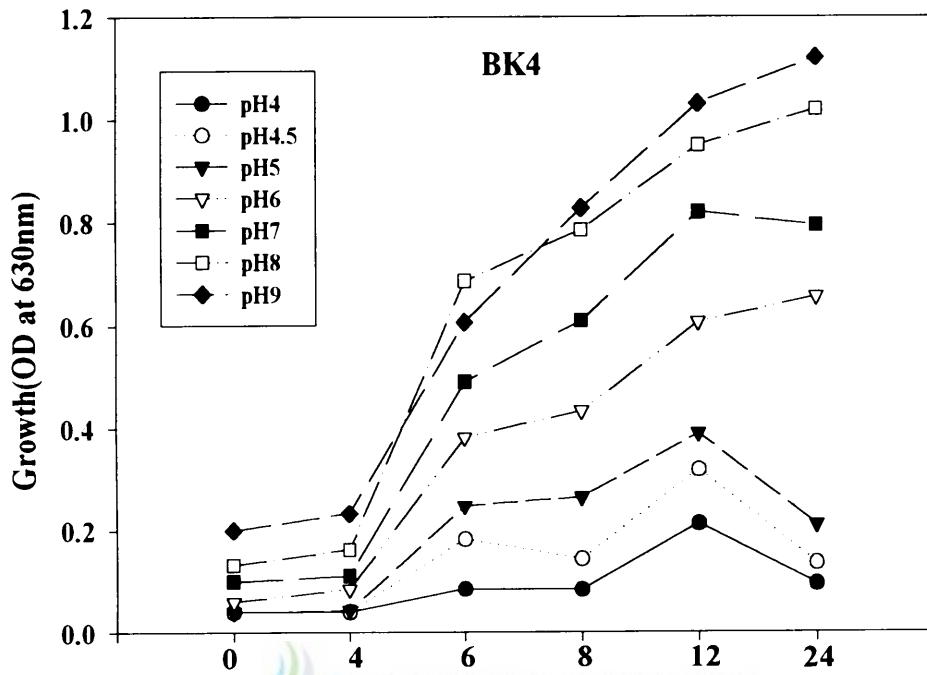


Fig. 8. Continued.



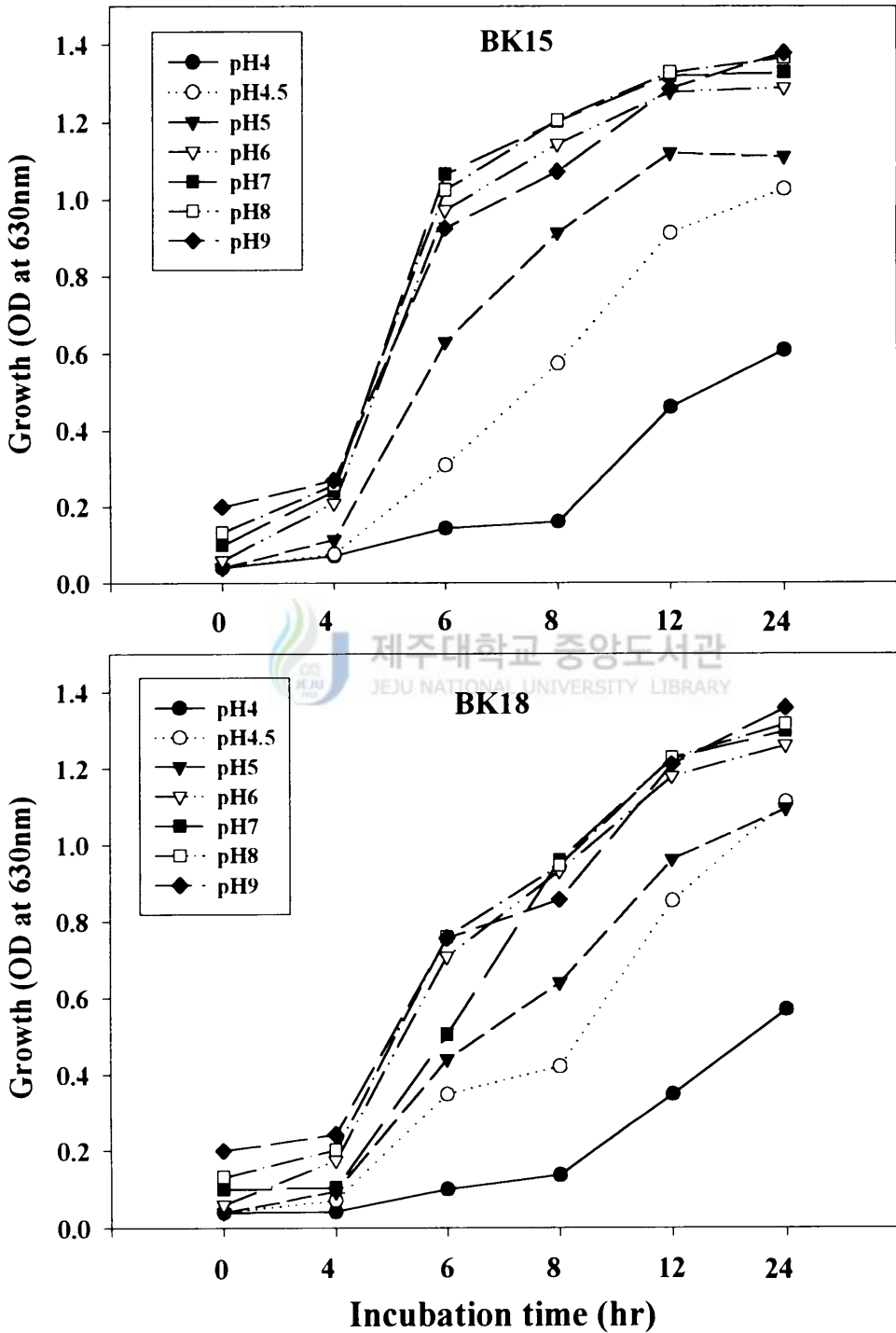


Fig. 8. Continued.

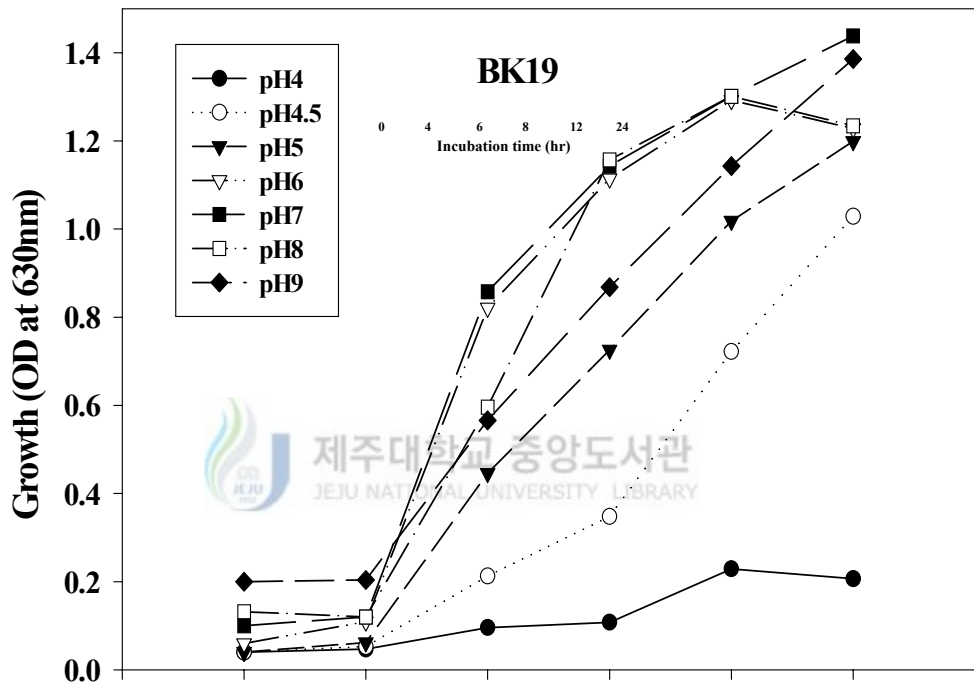


Fig. 8. Continued.

#### 1-4. 항생제 내성 유산균의 분리 및 선정

Probiotic 후보균주의 항생제 감수성 시험은 disc diffusion method를 통하여 12종이 시판용 항생제에 대하여 확인하였다(Table 2).

3종의 후보균주인 BK2, BK17, BK19에서 6종의 항생제에 대해서 내성을 보였으며 BK20에서는 5종에 대하여 항생제 내성이 관찰되었다. 그러나 Chloramphenicol과 Doxycycline에 대하여는 모든 분리 균주에서 감수성이 확인되었다. Barefoot(1993) 등에 의하면 유산균은  $\beta$ -lactam계, aminoglycoside 계, cephalosporin 및 quinolone계에 대하여 내성이 있다고 보고한 바 있지만 BK2, BK17 및 BK19 균주들은 비교적 항생제 내성이 있어 질병 치료를 위한 항생제 처리 기간에도 장내에서 정착하며 생존할 수 있다고 판단되며 사료첨가용 생균제의 적용시 각각의 항생제와의 병용가능성 여부를 판단할 수 있으리라 본다.

Table 2. Antibiotic susceptibility test of probiotic strains and pathogenic *V. anguillarum*

Antibiotics	Inhibition zone(mm)											
	<i>V. anguillarum</i>	BK 1	BK 2	BK 3	BK 4	BK 14	BK 15	BK 16	BK 17	BK 18	BK 19	BK 20
AMC 30	10.15	13.9	10.4	16.5	15.1	16.2	9	0	9	0	8.1	8
TE 30	34.1	32	17.2	30.5	32.3	25.9	20.9	14	0	18.7	17	16.3
T 30	31.3	25.1	22.8	30	16.5	31	22.2	17.6	0	21	17.6	22
C 30	22.3	38.5	24.2	25.2	24.3	26.4	23.3	16.2	27	26.2	26.5	26.4
CF 30	0	14	20.1	10	0	13.2	13.1	14.5	21.6	18.5	16.3	14.2
NA 30	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
CIP 5	19.4	16	0	15.7	16.5	13.5	8	8	0	8	0	0
NB 5	24.6	16	0	12.3	13.2	13.4	8	8	10	9	0	0
D 30	32.9	27.3	28.3	29	27	36	25	21.3	0	22.1	24.9	21.7
SD 25	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
N 30	0	0	0	0	0	0	0	8	20	0	0	0
E 15	10.1	9	0	9	9	15.8	25	17	21	22.1	0	23.5

AMC : Amoxicillin, TE : Tetracycline, T : Oxytetracycline,  
 C : Chloramphenicol, CF : Cephalothin, NA : Nalidixic acid ,  
 CIP : Ciprofloxacin, NB : Novobiocin, D : Doxycycline ,  
 SD : Sulfadiazine, N : Neomycin, E : Erythromycine.

## 2. 공시균주의 선정 및 동정

상기의 결과를 토대로 항균 스펙트럼이 넓고 항균활성이 높으면서 항생제 내성 및 pH 내성이 높은 probiotic 균주로서 적합한 균을 창란젓에서 분리하여 BK19로 간이 명명하고 동정하였다. 창란젓에서 분리된 BK19 균주는 그람양성, 비 운동성, catalase 음성인 유산균으로서 생화학적 성상은 Api 50CHL을 통하여 확인한 결과 Table 3과 같았다. SEM 관찰에서는 직경 2.5~3  $\mu\text{m}$  크기의 *Lactobacillus* sp.임을 확인하였다(Fig. 9). 16S rRNA PCR 증폭을 통한 555 bp의 oligo nucleotides를 sequene하여 GeneBank의 database에 있는 *Lactobacillus* spp와 alignment한 결과(Fig. 10) *Lactobacillus sakei*와 100% 유사하여 본 공시균을 *Lactobacillus sakei* BK19로 명명하였다.

Table 3. Carbohydrate utilization patterns of isolated LAB

Characterization	Strain NO.								Characterization	Strain NO.							
	BK 1	BK 2	BK 3	BK 14	BK 15	BK 18	BK 19	BK 20		BK 1	BK 2	BK 3	BK 14	BK 15	BK 18	BK 19	BK 20
Control									Esculine								
Glycerol									Salicine	+	+	+	+	+	+	+	+
Erythritol									Cellobiose	+	+	+	+	+	+	+	+
D-Arabinose									Maltose	+	+	+	+	+	+	+	+
L-Arabinose	+	+	+	+	+	+	+	+	Lactose	+	+	+	+	+	+	+	+
Ribose	+	+	+	+	+	+	+	+	Melibiose	+	+	+	+	+	+	+	+
D-Xylose	+	+			+		+	+	Saccharose	+	+	+	+	+	+	+	+
L-Xylose									Trehalose	+	+	+	+	+	+	+	+
Adonitol									Inuline								
$\beta$ Methyl-xyloside									Melezitose								
Galactose	+	+	+	+	+	+	+	+	D-Raffinose								+
D-Glucose	+	+	+	+	+	+	+	+	Amidon								
D-Fructose	+	+	+	+	+	+	+	+	Glycogene								
D-Mannose	+	+	+	+	+	+	+	+	Xylitol								
L-Sorbose									$\beta$ Gentiobiose	+	+		+	+	+	+	+
Rhamnose				+		+		+	D-Turanose				+			+	+
Dulcitol									D-Lyxose								
Inositol									D-Tagatose	+	+	+			+	+	+
Mannitol	+	+	+	+		+		+	D-Fucose								
Sorbitol								+	L-Fucose								
$\alpha$ Methyl- D-mannoside					+		+		D-Arabitol								
		+					+		L-Arabitol								
N Acetyl glucosamine	+	+	+	+	+	+	+	+	Gluconate	+	+		+	+	+	+	+
Amygdaline	+	+	+	+	+	+	+	+	2 ceto-gluconate				+		+		+
Arbutine	+	+	+	+	+	+	+	+	5 ceto-gluconate	+		+	+	+			+

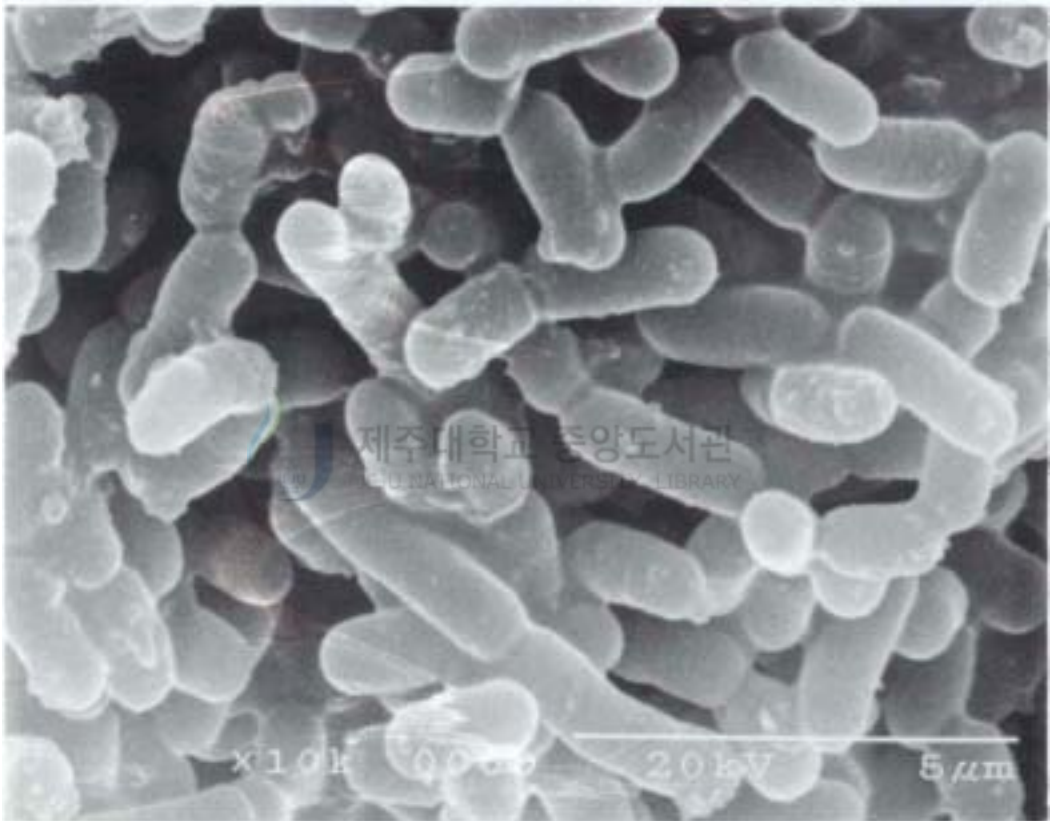


Fig. 9. Scanning electron micrograph (SEM) of the isolate LAB, BK19 from fermented pollack viscera.

```

Bk19      -----GNGTCGCCGCGTGAGTGAAGAAGGTTTTCGGATCGTAAACTCT
Sakei     ACGAAAGTCTGATGGAGCAACGCCGCGTGAGTGAAGAAGGTTTTCGGATCGTAAACTCT
Curvatus ACGAAAGTCTGATGGAGCAACGCCGCGTGAGTGAAGAAGGTTTTCGGATCGTAAACTCT
Plantarum ACGAAAGTCTGATGGAGCAACGCCGCGTGAGTGAAGAAGGTTTTCGGCTCGTAAACTCT
Brevis    ACGAAAGTCTGATGGAGCAATGCCGCGTGAGTGAAGAAGGTTTTCGGCTCGTAAACTCT
Panis     GCGCAAGCCTGATGGAGCAACACCGCCGCGTGAGTGAAGAAGGTTTTCGGCTCGTAAACTCT
          *      *****

Bk19      GTTGTGGAGAAGAATGTATCTGATAGTAACTGATCAGGTAGTGACGGTATCCAACCAGA
Sakei     GTTGTGGAGAAGAATGTATCTGATAGTAACTGATCAGGTAGTGACGGTATCCAACCAGA
Curvatus GTTGTGGAGAAGAACGTATTTGATAGTAACTGATCAGGTAGTGACGGTATCCAACCAGA
Plantarum GTTGTAAAGAAGAACATATCTGAGAGTAACTGTTCAAGGTATTGACGGTATTAACCAGA
Brevis    GTTGTAAAGAAGAACACCTTTGAGAGTAACTGTTCAAGGTTGACGGTATTAACCAGA
Panis     GTTGTGAAGAAGAACGTGCGTGAGAGTAACTGTTTCATGCAGTGACGGTATTAACCAGA
          *****

Bk19      AAGCCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGTGGCAAGCGTTGTCCG
Sakei     AAGCCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGTGGCAAGCGTTGTCCG
Curvatus AAGCCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGTGGCAAGCGTTGTCCG
Plantarum AAGCCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGTGGCAAGCGTTGTCCG
Brevis    AAGCCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGTGGCAAGCGTTGTCCG
Panis     AAGTCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGTGGCAAGCGTTATCCG
          *** *****

Bk19      GATTTATTGGGCGTAAAGCGAGCGCAGGCGGTTTTCTTAAGTCTGATGTGAAAGCCTTCGG
Sakei     GATTTATTGGGCGTAAAGCGAGCGCAGGCGGTTTTCTTAAGTCTGATGTGAAAGCCTTCGG
Curvatus GATTTATTGGGCGTAAAGCGAGCGCAGGCGGTTTTCTTAAGTCTGATGTGAAAGCCTTCGG
Plantarum GATTTATTGGGCGTAAAGCGAGCGCAGGCGGTTTTTTAAGTCTGATGTGAAAGCCTTCGG
Brevis    GATTTATTGGGCGTAAAGCGAGCGCAGGCGGTTTTCTTAAGTCTGATGTGAAAGCCTTCGG
Panis     GATTTATTGGGCGTAAAGCGAGCGCAGGCGGTTGCTTAGTCTGATGTGAAAGCCTTCGG
          *****

Bk19      CTCAACCGAAGAAGTGCATCGGAAACTGGGAAACTTGAGTGCAGAAGAGGACAGTGGAAAC
Sakei     CTCAACCGAAGAAGTGCATCGGAAACTGGGAAACTTGAGTGCAGAAGAGGACAGTGGAAAC
Curvatus CTCAACCGAAGAAGTGCATCGGAAACTGGGAAACTTGAGTGCAGAAGAGGACAGTGGAAAC
Plantarum CTCAACCGAAGAAGTGCATCGGAAACTGGGAAACTTGAGTGCAGAAGAGGACAGTGGAAAC
Brevis    CTTAACCGGAGAAGTGCATCGGAAACTGGGAGACTTGAGTGCAGAAGAGGACAGTGGAAAC
Panis     CTTAACCGAAGAAGTGCATCGGAAACCAGGCGACTTGAGTGCAGAAGAGGACAGTGGAAAC
          ** *****

```

Fig. 10. Alignment of 16S rRNA of the isolated LAB, BK19 from fermented pollack viscera.

Bk19	TCCATGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGATATATGGAAGAACACCAGTGGCGAAGGCGGCTG
Sakei	TCCATGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGATATATGGAAGAACACCAGTGGCGAAGGCGGCTG
Curvatus	TCCATGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGATATATGGAAGAACACCAGTGGCGAAGGCGGCTG
Plantarum	TCCATGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGATATATGGAAGAACACCAGTGGCGAAGGCGGCTG
Brevis	TCCATGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGATATATGGAAGAACACCAGTGGCGAAGGCGGCTG
Panis	TCCATGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGATATATGGAAGAACACCAGTGGCGAAGGCGGCTG
	*****
Bk19	TCTGGTCTGTAAGTACGCTGAGGCTCGAAAGCATGGGTAGCAAACAGGATTAGATACCC
Sakei	TCTGGTCTGTAAGTACGCTGAGGCTCGAAAGCATGGGTAGCAAACAGGATTAGATACCC
Curvatus	TCTGGTCTGTAAGTACGCTGAGGCTCGAAAGCATGGGTAGCAAACAGGATTAGATACCC
Plantarum	TCTGGTCTGTAAGTACGCTGAGGCTCGAAAGTATGGGTAGCAAACAGGATTAGATACCC
Brevis	TCTAGTCTGTAAGTACGCTGAGGCTCGAAAGCATGGGTAGCAAACAGGATTAGATACCC
Panis	TCTGGTCTGCAACTGACGCTGAGGCTCGAAAGCATGGGTAGCAAACAGGATTAGATACCC
	*** *****
Bk19	TGGTAGTCCATGCCGTAACGATGAGTGCTAGGTGTTGGAGGGTTTCCGCCCTTCAGTGC
Sakei	TGGTAGTCCATGCCGTAACGATGAGTGCTAGGTGTTGGAGGGTTTCCGCCCTTCAGTGC
Curvatus	TGGTAGTCCATGCCGTAACGATGAGTGCTAGGTGTTGGAGGGTTTCCGCCCTTCAGTGC
Plantarum	TGGTAGTCCATGCCGTAACGATGAATGCTAAGTGTGGAGGGTTTCCGCCCTTCAGTGC
Brevis	TGGTAGTCCATGCCGTAACGATGAGTGCTAAGTGTGGAGGGTTTCCGCCCTTCAGTGC
Panis	TGGTAGTCCATGCCGTAACGATGAGTGCTAGGTGTTGGAGGGTTTCCGCCCTTCAGTGC
	*****
Bk19	CGCAGCTAACGCATTAAGCACTCCGCCTGGGGA-----
Sakei	CGCAGCTAACGCATTAAGCACTCCGCCTGGGGAGTACGACCGCAAGGTTGAAACTCAAAG
Curvatus	CGCAGCTAACGCATTAAGCACTCCGCCTGGGGAGTACGACCGCAAGGTTGAAACTCAAAG
Plantarum	TGCAGCTAACGCATTAAGCATTCCGCCTGGGGAGTACGACCGCAAGGCTGAAACTCAAAG
Brevis	TGCAGCTAACGCATTAAGCACTCCGCCTGGGGAGTACGACCGCAAGGTTGAAACTCAAAG
Panis	CGAAGCTAACGCATTAAGCACTCCGCCTGGGGAGTACGACCGCAAGGTTGAAACTCAAAG
	* *****

Fig. 10. Continued.

### 3. *L. sakei* BK19의 항균 스펙트럼

Agar spotted method 및 MIC 측정을 통한 *L. sakei* BK19의 항균활성은 앞의 결과와 같이 *V. anguillarum*, *E. tarda* 및 *Streptococcus* sp. 등의 어병세균에 대하여 높은 항균활성을 보였을 뿐만 아니라 다른 병원성 vibrio인 *V. parahaemolyticus*, *V. mimicus*에 대해서도 항균활성이 관찰되었다. 그러나 *V. alginolyticus*, *V. salmonicida*, *V. harveyii* 및 *V. vulnificus*에 대해서는 항균활성이 관찰되지 않았다(Fig. 11). 흡광도( $OD_{630\text{ nm}}$ ) 관찰을 통한 *L. sakei* BK19 supernatant의 최소억제농도(MIC)는 spotted method의 결과와 유사하게 확인되었고 (Fig. 12, 13 및 Fig. 14) *L. sakei* BK19 supernatant 첨가농도 12~25%에서 병원 세균인 *V. anguillarum*, *E. tarda*, *Streptococcus* sp. 및 *V. mimicus*의 성장을 억제하였다(Table 4). *L. sakei*의 항균활성에 대한 많은 연구가 있는데 Holck 등(1992)은 *Serratia marcescens* YSD-23, *Yersinia enterocolitica* ATCC 2772, 그리고 *E. coli* ATCC 25922 등의 병원균에 대한 항균활성을 그리고 *Listeria monocytogenes*에 대한 항균활성을 Hugas 등(1998)은 보고하였다. 본 *L. sakei* BK19도 많은 병원균에 대한 항균활성을 보여주었다.

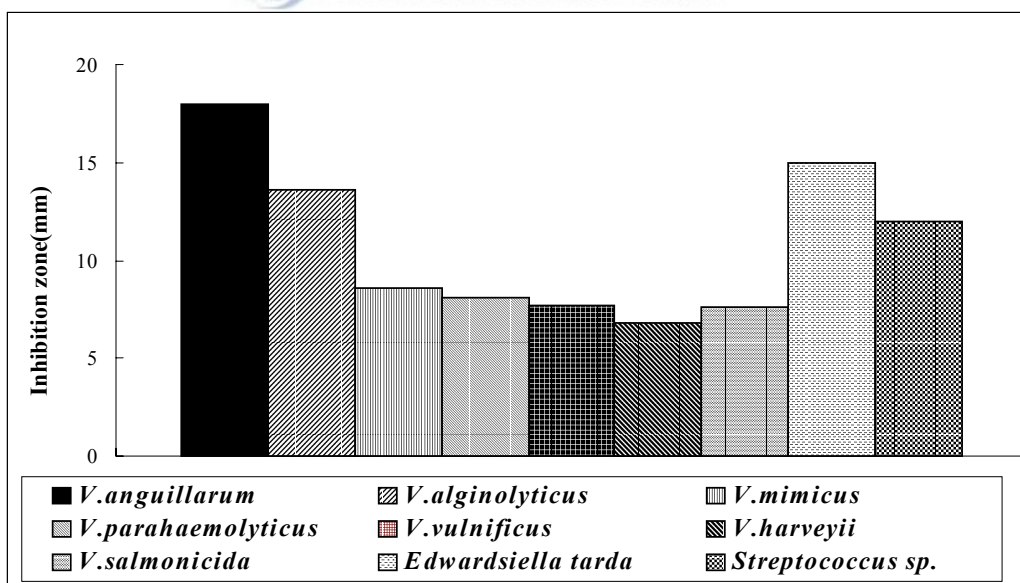


Fig. 11. Inhibitory effect of *L. sakei* BK19 against the growth of various pathogenic bacteria.



Table 4. MIC of *L. sakei* BK19 supernatant against various pathogenic bacteria

Strains	Supernatant concentration(%)							
	100	50	25	12.5	6.2	3.1	1.5	0.7
<i>E. tarda</i>	---	---	--	-	++	+++	+++	+++
<i>Streptococcus</i> sp.	---	---	-	+-	+++	+++	+++	+++
<i>V. anguillarum</i>	---	--	--	++	+++	+++	+++	+++
<i>V. alginolyticus</i>	---	---	+-	++	+++	+++	+++	+++
<i>V. mimicus</i>	---	--	-	+	++	+++	+++	+++
<i>V. parahaemolyticus</i>	--	-	+	+++	+++	+++	+++	+++

---: NO growth, --: <math>10^1</math> CFU/ml, -: <math>10^2</math> CFU/ml, +-: <math>10^3</math> CFU/ml,  
 +: <math>10^4</math> CFU/ml, ++: <math>10^6</math> CFU/ml, +++: >math>10^8</math> CFU/ml.

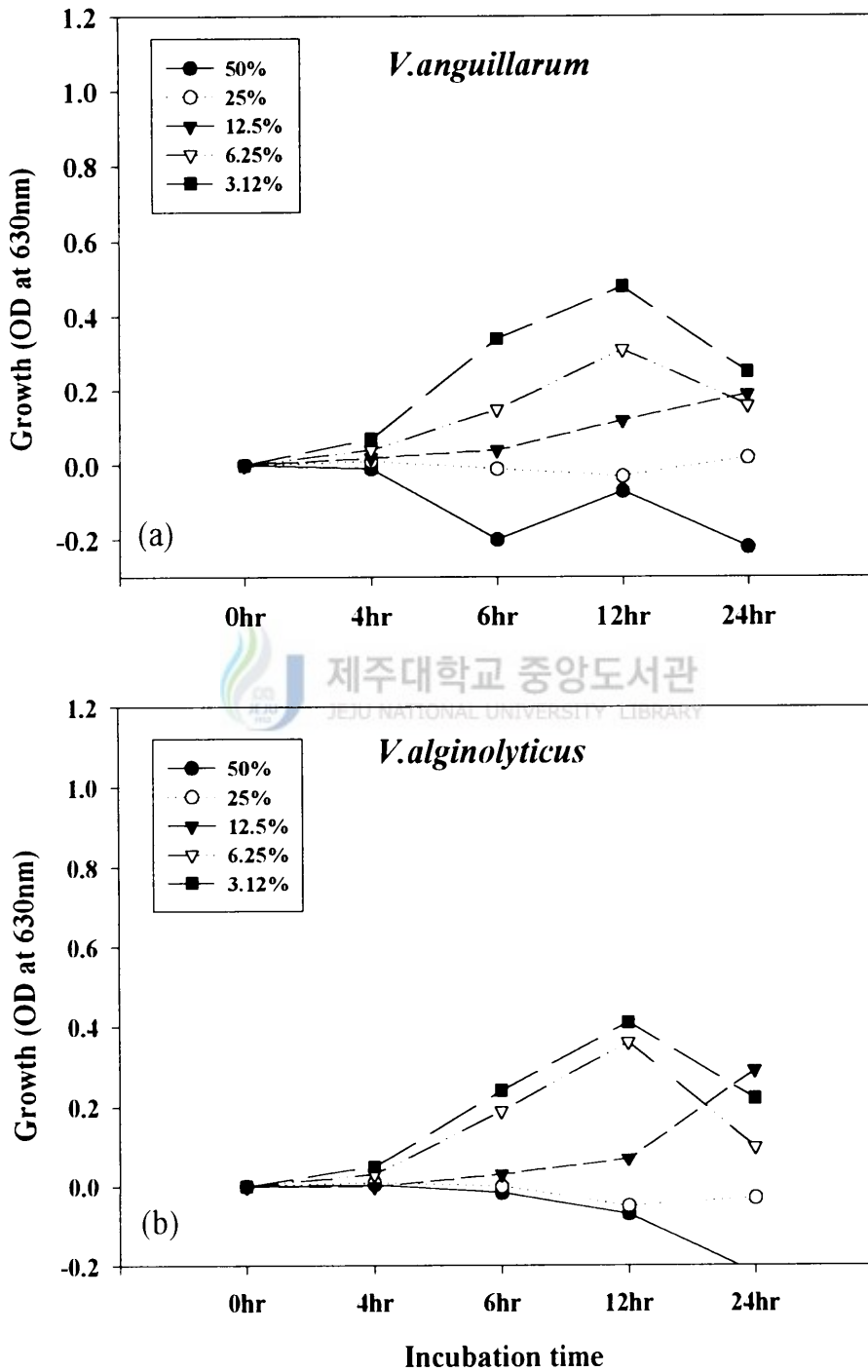


Fig. 12. Growth of pathogenic bacteria by the addition of *L. sakei* BK19 supernatant. (a) *V. anguillarum*, (b) *V. alginolyticus*.

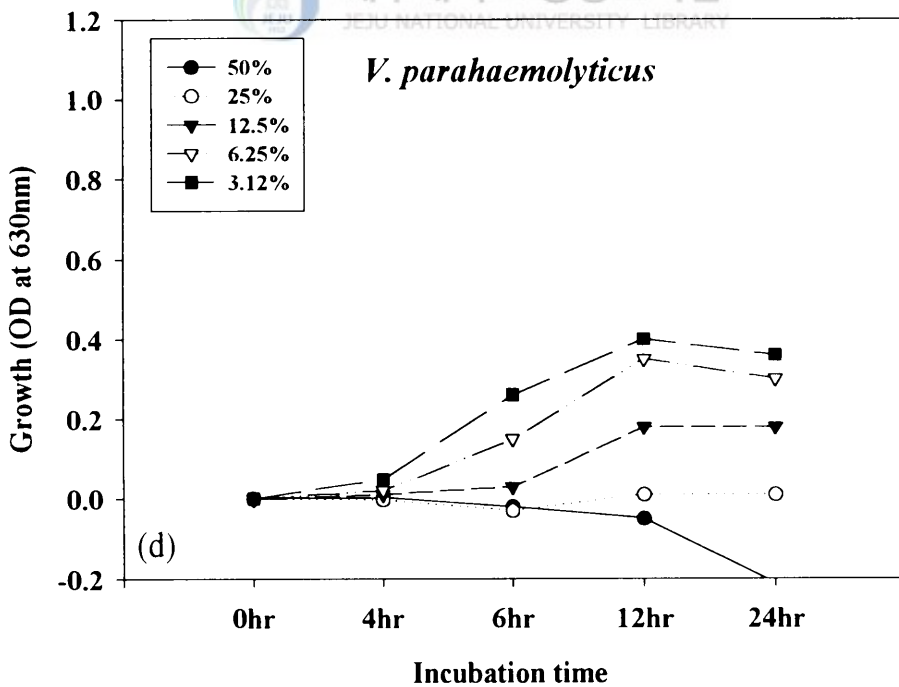
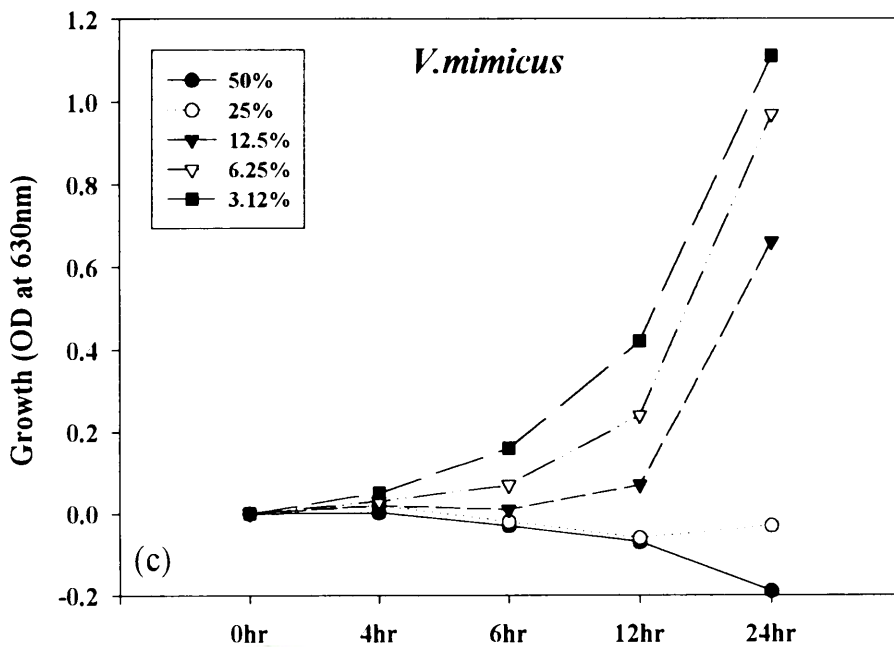


Fig. 13. Growth of pathogenic bacteria by the addition of *L. sakei* BK19 supernatant. (c) *V. mimicus*., (d) *V. parahaemolyticus*..

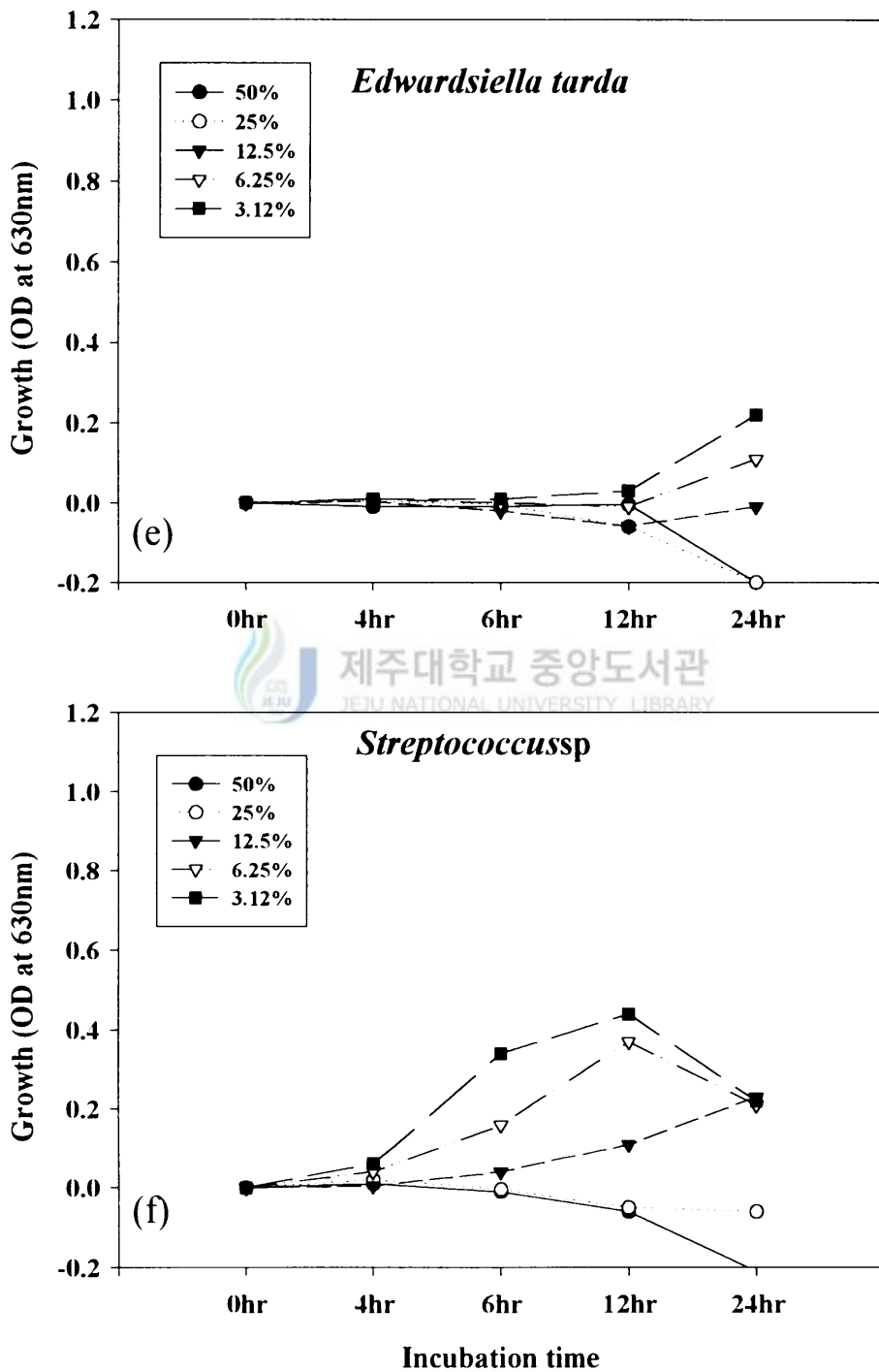


Fig. 14. Growth of pathogenic bacteria by the addition of *L. sakei* BK19 supernatant. (e) *E. tarda*, (f) *Streptococcus* sp..

#### 4. Supernatant의 열 및 효소에 대한 안정성시험

*L. sakei* BK19 supernatant의 열처리 및 효소처리에 대한 항균활성을 agar well diffusion method를 통해 확인하였다(Table 5). 열처리에 의한 *L. sakei* BK19의 항균성 물질도 100℃ 10분간 처리하였을 때 대조구에 비해 10%의 항균력 감소가 확인되었다. 이는 Barefoot 등(2001)의 보고한 바와 같이 *Lactobacillus acidophilus*의 항균성 인자인 lactacin B가 100℃에서 60분간 열 처리 하였을 때에도 항균활성을 유지하였다는 보고와 유사하였다. 효소처리에 의한 항균력 변화를 관찰한 결과 lipase,  $\alpha$ -amylase, catalase 처리에 의해서는 항균력 변화가 없었으나 단백질 분해효소인 trypsin, pepsin, protease에 의해서는 항균활성이 상실되었다. 이러한 결과는 항균활성을 나타내는 항균성 인자가 열에 안정하고 단백질 분해효소에 의해 쉽게 변성하는 peptide성 물질이라는 것을 알 수 있다.

Table 5. The effect of different physical and biochemical treatments on antimicrobial activity of *L. sakei* BK19

Treatment	Inhibition zone(mm)
Control	20
55℃ for 30min	20
100℃ for 10min	18
Trypsin	0
Pepsin	0
Protease	0
Lipase	19
Catalase	19
$\alpha$ -Amylase	20

## 5. Scanning electron microscope(SEM) 관찰

*L. sakei* BK19 supernatant의 항균성 기작은 병원 균수의 확인 및 주사전자현미경(SEM) 관찰을 통하여 관찰하였다. 각각 *V. anguillarum*과 *V. alginolyticus*를 접종한 BHI broth에 *L. sakei* BK19 supernatant를 첨가한 후 세균의 형태와 생균수를 확인한 결과(Fig. 15) *V. anguillarum*인 경우 초기  $1 \times 10^8$  CFU/ml에서 3시간의 supernatant 처리에 의해 그 수가 전멸한 반면, *V. alginolyticus*인 경우  $1 \times 10^7$  CFU/ml의 균수가 확인되어 *V. anguillarum*에 비해 상대적으로 감수성이 낮았다.

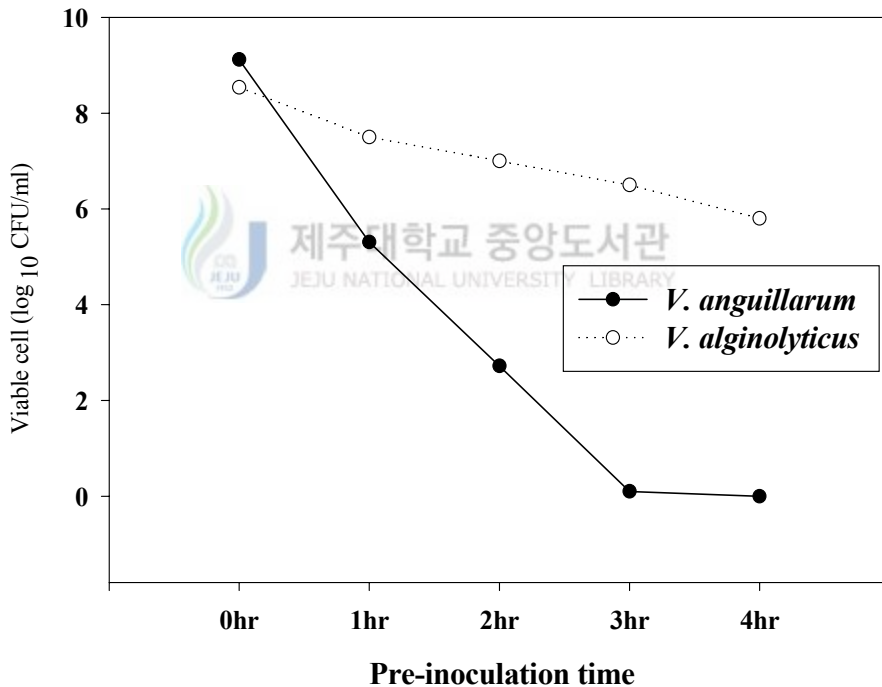


Fig. 15. Viable cells of the indicator strains *V. anguillarum* and *V. alginolyticus* treated with supernatant of *L. sakei* BK19.

형태적 관찰을 통한 항균성 기작은 병원성 세균들의 세포벽이 붕괴됨으로써 항균활성이 확인되었다. 특히, *V. anguillarum*의 세포벽은 3시간의 supernatant 처리에 의해 완전히 붕괴되었다. 반면에 *V. alginolyticus*는 상대적으로 *V. anguillarum*에 비해 생균수의 감소도 적었고 세포벽의 붕괴현상이 없는 세균도 관찰되었다(Fig. 16, 17). 또한 kang 등(1998)에 의하면 유산균의 그람양성 세균과 그람음성 세균에 대한 항균활성은 세포벽을 파괴함으로써 관찰하였다고 보고하고 있어 본 실험과 일치함을 보였다.

Nissen 등(1992)의 보고에 의하면 유산균의 항균성 인자인 10 KDa 미만의 저분자 내열성 bacteriocin은 barrel-stave mechanism을 통하여 cell membrane channel를 형성함으로써 pore-forming toxin으로 작용하는데 *L. sakei* BK19의 항균성 인자 또한 cell membrane과 상호 작용하여 pore형성 및 cell wall을 파괴함으로써 항균활성을 보이는 것으로 사료된다.

## 6. *L. sakei* BK19 균주의 최적 배양조건

탄소원에 따른 *L. sakei* BK19의 성장은 Api 50 CHL kit에 의한 결과와 같이 glucose, maltose 및 saccharose에 의하여 pH의 큰 변화를 보였고 성장은 선택배지인 MRS broth내의 성장속도와 비슷하게 확인되었다(Fig. 18). 그러나 lactose 등의 당에 의해서는 발효대사가 이루어지지 않았으며 pH 변화도 확인되지 않아 유기산의 생성이 없음을 확인할 수 있었다(Fig. 19). 유산균의 성장에 따른 pH 변화는 배양시간 4~8시간에서 급격히 저하되었다.

배양온도에 따른 *L. sakei* BK19는 4~45°C의 온도범위 내에서 성장 실험을 하였는데, 15~45°C에서 *L. sakei* BK19의 성장이 관찰되었다(Fig. 20a). 최적 배양온도는 25°C였으며 양식넙치의 장내체온과 비슷한 15°C에서도 성장이 비교적 양호하여 양식산 probiotics로서 가치가 있는 것으로 사료된다. 염분농도에 따른 *L. sakei* BK19의 성장영향은 0~7%의 NaCl을 첨가한 MRS broth에서 확인하였으며(Fig. 20b) 모든 농도에서 성장이 고르게 나타났으나 *L. sakei* BK19의 최적성장 염분농도는 1%의 NaCl을 첨가하였을 때였다. 이상과 같이 *L. sakei* BK19의 최적 배양조건은 탄소원으로 glucose, maltose 그리고 saccharose를 첨가하였을 때, 그리고 pH 7, 배양온도 25°C, 1% NaCl를 첨가한 조건이었다.

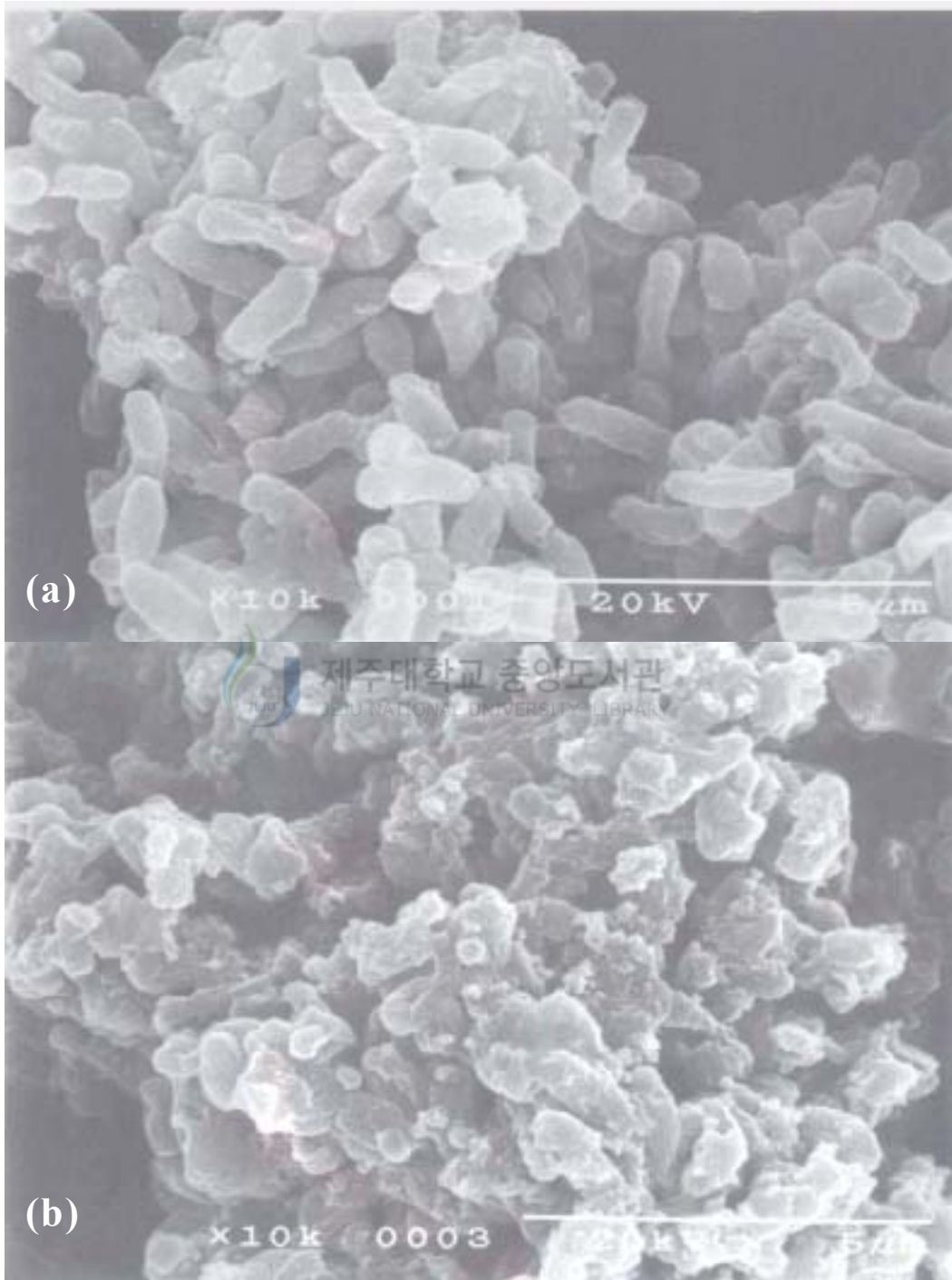


Fig. 16. Scanning electron micrographs of *V. anguillarum* treated with *L. sakei* BK19 supernatant. (a) Untreated, (b) Treated.



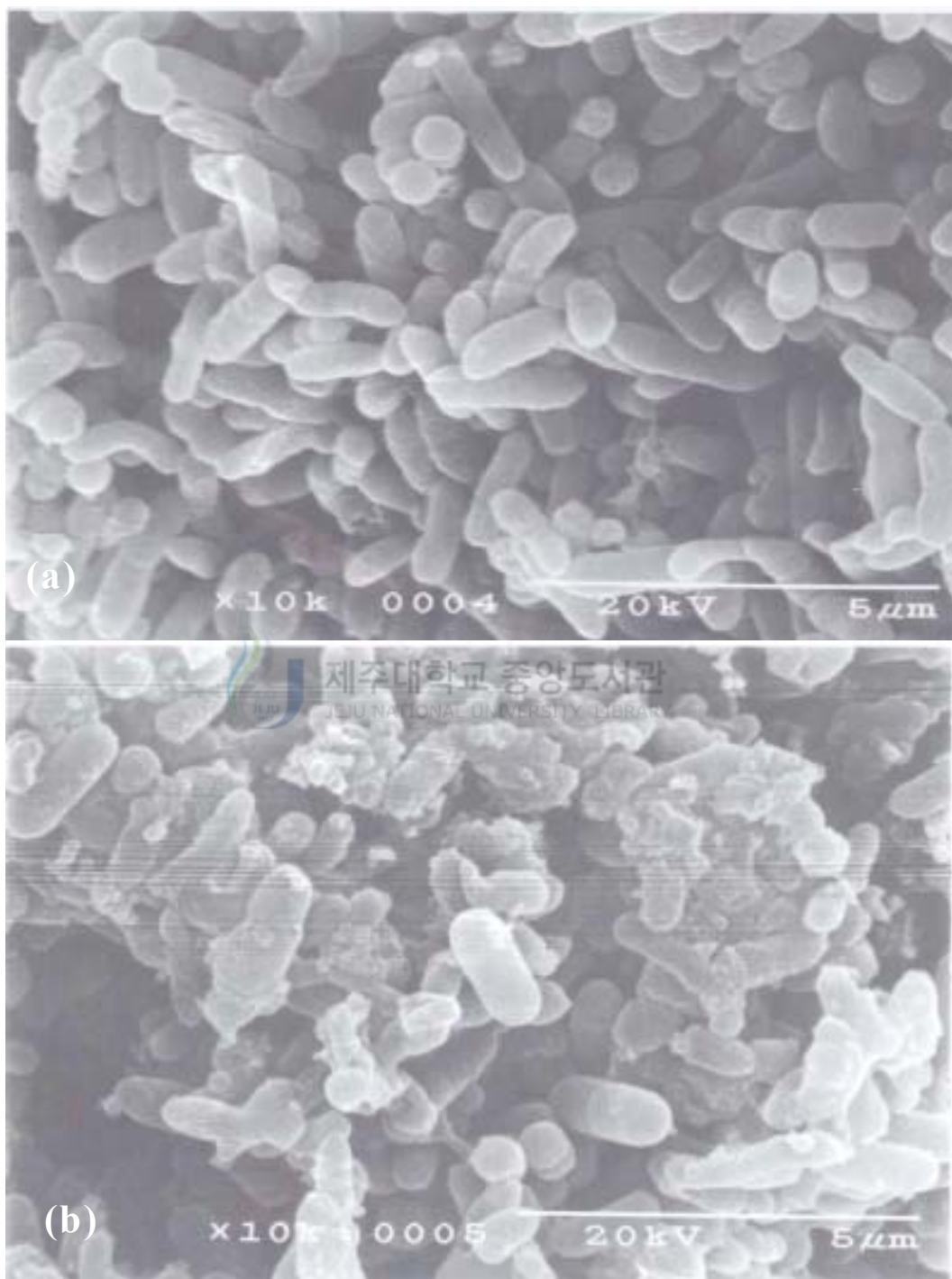


Fig. 17. Scanning electron micrographs of *V. alginolyticus* treated with *L. sakei* BK19 supernatant. (a) Untreated, (b) Treated.

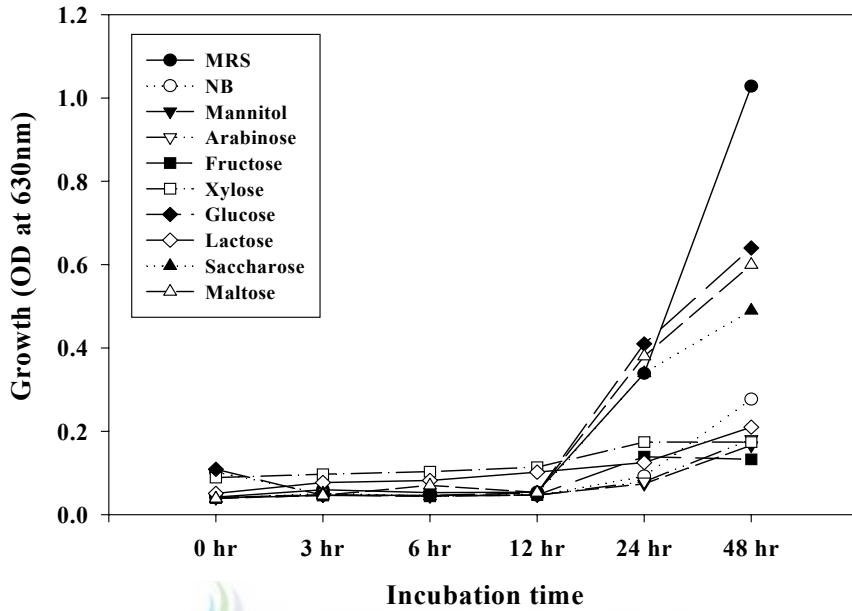


Fig. 18. Growth curve of the *L. sakei* BK19 given by different source of carbohydrate.

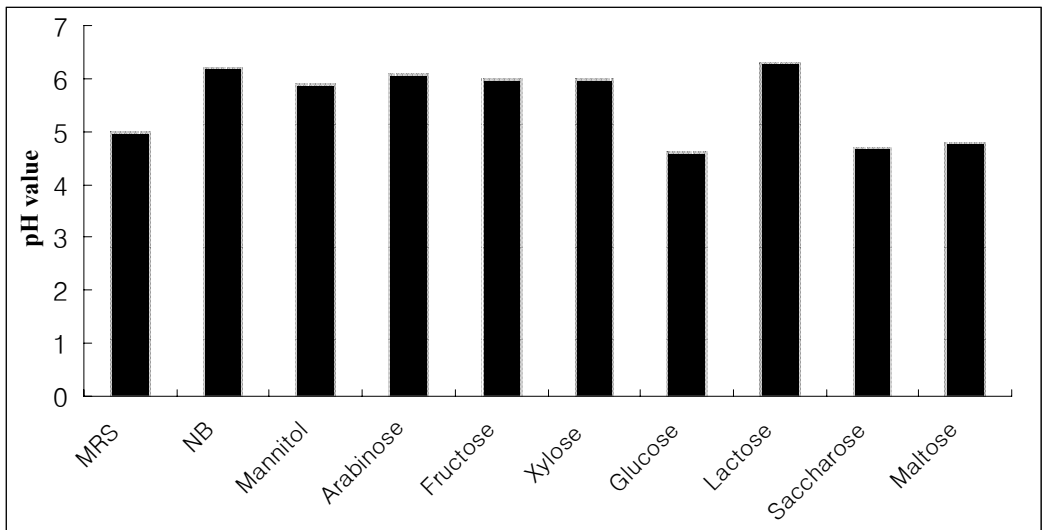


Fig. 19. Effect of sugar on the final pH values of *L. sakei* BK19 growth medium.

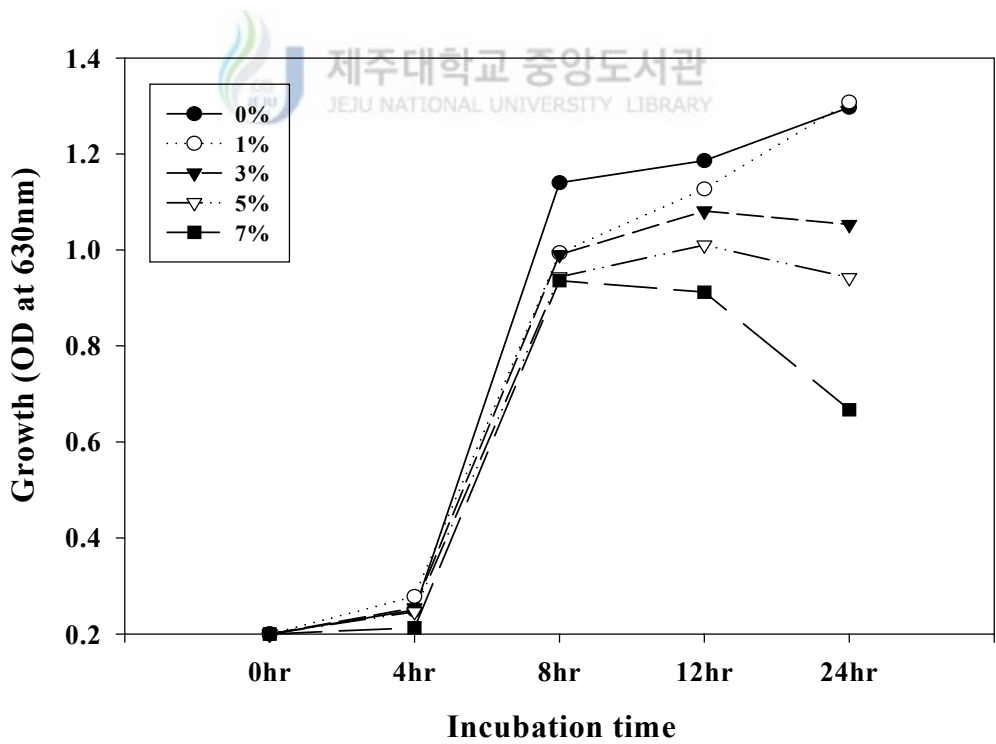


Fig. 20. The growth of *L. sakei* BK19 under different culture conditions of temperature and salinity.(a) temperature, (b) salinity.

Probiotic 효과는 항생제에 의한 항균력에 비해 강도가 약하지만 친환경적이며 내성균 발생에 대한 문제가 없으며 생균제를 이용한 사료화의 가능성도 있기 때문에 그 중요성과 관심이 높아지고 있다. Probiotic의 적절한 이용과 개발은 이미 사람을 포함한 육상동물에서 많이 연구가 되어왔으나 양식어류의 생리적 특성 연구는 미비하여 양식 산업에서의 probiotic 이용은 낮은 실정이다. 따라서 probiotic 효과를 극대화시키기 위해서는 양식어류의 생리적 연구와 토착미생물에 대한 연구가 필요하며, 장내 토착 유익세균의 증식을 향상시킬 수 있는 prebiotic 연구 즉, nondigestible oligosaccharides의 선택(Collins 등, 1999)과 탁월한 내산성, 내담즙성 등을 갖고있는 probiotic starter의 개발이 시급한 실정이다. 본 연구에서 분리된 *L. sakei* BK19는 창란젓에서 분리되었다는 점에서 양식현장의 적용성은 아직 불확실하다. 앞으로 장 정착능에 대한 연구와 장내에 정착하고 있는 상재균에 대한 probiotic 균주의 분리 및 이용이 필요할 것으로 사료된다.



## IV. 요약

본 실험의 목적은 Gram 양성균 뿐만 아니라 어병세균인 Gram 음성세균에 대한 넓은 항균활성 및 내산성 그리고 항생제 내성을 갖고 있는 유용한 probiotic 후보균주를 선발하여 어류의 세균성 질병 예방 혹은 치료를 함으로써 양식산업의 효율성을 증대시키고자 한다.

20종의 유산균을 김치, 양식 넙치의 장 그리고 각종 젓갈류 등에서 분리하여 어류 병원성 세균에 대한 항균능을 MRS agar상에서 agar spotted method에 의해 조사하여 *Vibrio anguillarum*, *Edwardsiella tarda* 그리고 *Streptococcus* sp.에 대해 항균활성이 있는 11종의 균주를 1차 선발을 하였다. pH 및 항생제 내성능을 검토하여 probiotic 균주를 분리하였다. 분리된 후보 균주 창란젓에서 분리된 BK19에서 가장 큰 항균 spectrum과 pH 내성 그리고 항생제에 대한 내성이 확인되어 최종적으로 본 실험의 공시균주로 선발하여 생화학적, 형태학적 특성 및 16S rRNA 분석을 통하여 *Lactobacillus sakei* BK19로 동정하였다.

*L. sakei* BK19 cell free supernatant를 pH 중화 및 catalase 처리한 후 어병세균에 대하여 항균활성을 확인하였다. *L. sakei* BK19의 항균요소로 여겨지는 박테리옌 유사물질은 100°C에서 10분간의 열처리를 하였을 때에도 활성이 유지되었고 지방 분해효소, 탄수화물 분해효소에 의해서도 활성을 잃지 않았다. 그러나 단백질 분해효소에 의해서는 그 활성을 상실하였다. 따라서 이 항균성 물질은 peptide성 물질로 사료된다.

*L. sakei* BK19 supernatant의 *V. anguillarum* 및 *V. alginolyticus*에 대한 항균성 기작은 주사전자현미경 관찰을 통하여 확인하였고 *V. anguillarum*의 세포벽을 붕괴 시킴으로써 성장을 저해하고 사멸시키는 것으로 확인되었다.

*L. sakei* BK19의 최적 배양조건을 확인한 결과 탄소원으로 glucose, maltose, sacchrose를 첨가하였을 때 성장 및 발효가 좋았으나 lactose를 이용한 발효는 확인되지 않았으며 성장에 있어서도 다른 탄소원에 비해 미비하였다. 배양가능 온도는 15°C~35°C 였으며 최적 배양온도는 25°C 였고, 배양가능 염분농도는 0~7% 이고 최적 염분농도는 1% 였다. 그리고 pH 변화에 따른 성장은 pH 4~9에서 성장이 확인되었으며 pH7.0에서 가장 잘 배양되었다.

## V. 참고문헌

- Aoki, T., K. Tamaki. and T. Kitao. 1990. Spread of drug-resistant strains of *Streptococcus* sp. in yellowtail farms. 2nd Asian Fish. Forum, Tokyo, 17-22. 697-699.
- Ashenafi, M. 1991. Growth of *Listeria monocytogenes* in fermenting tempeh made of various beans and its inhibition by *Lactobacillus plantarum*. *Food Microbiol.* 8: 303-310.
- Austin, B., L. F. Stuckey, P. A. W. Robertson, I. Effendi and D. R. W. Griffith. 1995. A probiotic strain of *Vibrio alginolyticus* effective in reducing diseases caused by *Aeromonas salmonicida*, *Vibrio anguillarum* and *Vibrio ordalii*. *J. Fish Dis.* 18: 93-96.
- Barefoot, S. F. and C. G. Nittle. 1993. Antibiosis revisited bacteriocin produced by dairy starter culture. *J. Dairy Sci.* 76: 2366
- Bruno, M. E. C. and T. J. Montville. 1993. Common mechanistic action of bacteriocins from lactic acid bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* 59: 3003-3010.
- Chateau, N., I. Castellanos, and A. M. Deschamps. 1993. Distribution of pathogen inhibition in the *Lactobacillus* isolates of a commercial probiotic consortium. *J. Appl. Bacteriol.* 74: 36-40.
- Choi, H. J., H. S. Lee., S. Her, D. H. Oh, and S. S. Yoon. 1999. Partial characterization and cloning of leuconocin J, a bacteriocin produced by *Leuconostoc* sp. J2 isolated from the Korean fermented vegetable Kimchi. *J. Appl. Microbiol.* 86: 175.
- Collins, M. D. and G. R. Gibson. 1999. Probiotics, prebiotics, and synbiotics: approaches for modulating the microbial ecology of the gut. *Am. J. Clin. Nutr.* 69(5): 1052-1057.
- Conway, P. L., 1996. Development of intestinal microbiota. In: Mackie, R. I., B. A. White., R. E. Isaacson. Eds. *Gastrointestinal Microbiology*. Vol. 2. Gastrointestinal Microbes and Host Interactions. Chapman & Hall Microbiology Series, Chapman & Hall, New York. 3-38.
- Corsetti, A., M. Gobbetti, and E. Smacchi. 1996. Antimicrobial activity of

- sourdough lactic acid bacteria: isolation of a bacteriocinlike inhibitory substance from *Lactobacillus sanfrancisco* C57. *Food Microbiol.* 13: 447- 456.
- Corsetti, A., M. Gobbetti, J. Rossi, and P. Damiani. 1998. Antimould activity of sourdough lactic acid bacteria: identification of a mixture of organic acids produced by *Lactobacillus sanfrancisco* CB1. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 50: 253-256.
- Eldar, A., O. Shapiro, Y. Bejerano, and H. Bercovier. 1995. Vaccination with whole cell vaccine and bacterial protein extract protects tilapia against *Streptococcus difficile* meningo encephalitis. *Vaccine.* 13: 867-870.
- Fuller, R., 1989. Probiotics in man and animal. *J. Appl. Bacteriol.* 66: 365-378.
- Gatesoupe, F.J., T. Arakawa, and T. Watanabe. 1989. The effect of bacterial additives on the production rate and dietary value of rotifers as food for Japanese flounder, *Paralichthys oliaceus*. *Aquaculture.* 83: 39-44.
- Gildberg, A., H. Mikkelsen, E. Sandaker, and E. Ringo. 1997. Probiotic effect of lactic acid bacteria in the feed on growth and survival of fry of Atlantic cod *Gadus morhua*. *Hydrobiologia.* 352: 279-285.
- Gram, L., J. Melchiorson, B. Spanggaard, I. Huber, and T. F. Nielsen. 1999. Inhibition of *Vibrio anguillarum* by *Pseudomonas fluorescens* strain AH2—a possible probiotic treatment of fish. *Appl. Environ. Microbiol.* 65: 969-973.
- Harris, L. J., M. A. Daechsel, M. E. Stiles, and T. R. Klaenhammer. 1989. Antimicrobial activity of lactic acid bacteria against *Listeria monocytogenes*. *J. Food Prot.* 52: 384-387.
- Holck, A., L. Axelsson, S. E. Birkeland, T. Aukrust, and H. Bloom. 1992. Purification and amino acid sequence of sakacin A, a bacteriocin from *Lactobacillus sakei* LB 706. *J. Gen. Microbiol.* 138: 2715-2720.
- Hugas, M., F. Pages, M. Garriga, and J. M. Monfort. 1998. Application of the bacteriocinogenic *Lactobacillus sakei* CTC494 to prevent growth of *Listeria monocytogenes* in fresh and cooked meat products packed with different atmospheres. *Food Microbiol.* 15(6): 539-650.
- Hudault, S., V. Lievin, M. F. Bernet-Camard, and A. L. Servin. 1997. Antagonistic activity exerted in vitro and in vivo by *Lactobacillus casei*

- (strain GG) against *Salmonella typhimurium* C5 infection. *Appl. Environ. Microbiol.* 63: 513-518.
- Jack, R.W., J. R. Tagg, and B. Ray. 1995. Bacteriocins of Gram-positive bacteria. *Microbiol. Rev.* 59 (2): 171-200.
- Joborn, A., C. Olsson, A. Westerdahl, P. L. Conway, and S. Kjellberg. 1997a. Colonization in the fish intestinal tract and production of inhibitory substances in intestinal mucus and faecal extracts by *Carnobacterium* sp. strain K. *J. Fish Dis.* 20: 383-392.
- Kang, J. H. and M. S. Lee. 1998. Mode of action of the bacteriocin from *Lactobacillus* sp. GM7311 against gram positive bacteria. *J. Korean Fish. Soc.* 31(4): 560-566.
- Karunasagar, I., R. Pai, G. R. Malathi, and I. Karunasagar. 1994. Mass mortality of *Penaeus monodon* larvae due to antibiotic resistant *Vibrio harveyi* infection. *Aquaculture.* 128: 203-209.
- Newman, S. G. 1993. Bacterial vaccines for fish. *Annu. Rev. Fish Dis.* 3: 145-185.
- Nissen-Meyer, J., H. Holo, L. S. Havarstein, K. Sletten, and I. F. Nes. 1992. A novel lactococcal bacteriocin whose activity depends on the complementary action of two peptides. *J. Bacteriol.* 174: 5685-5692.
- Olsson, J. C., A. Westerdahl, P. L. Conway, and S. Kjelleberg. 1992. Intestinal colonization potential of turbot *Scophthalmus maximus* and dab *Limanda limanda*-associated bacteria with inhibitory effects against *Vibrio anguillarum*. *Appl. Environ. Microbiol.* 58: 551-556.
- Piard, J. C. and M. Desmazeaud. 1992. Inhibiting factors produced by lactic acid bacteria. 2. Bacteriocins and other antibacterial substances. *Lait.* 72: 113-142.
- Ringo, E. and F. J. Gatesoupe. 1998. Lactic acid bacteria in fish: a review. *Aquaculture.* 160: 177-203.
- Rosenquist, H. and A. Hansen. 1998. The antimicrobial effect of organic acids, sourdough and nisin against *Bacillus subtilis* and *B. licheniformis* isolated from wheat bread. *J. Appl. Microbiol.* 85: 621- 631.
- Salminen, S., A. C. Ouwehand, Y. Benno, and Y. K. Lee. 1999. Probiotics: how should they be defined Trends. *Food Sci. Technol.* 10: 107-110.
- Schillinger, U. and F. K. Lucke. 1989. Antibacterial activity of



- Lactobacillus sakei* isolated from meat. *Appl. Environ. Microbiol.* 55: 1901-1906.
- Smith, P., M. P. Hiney, and O. B. Samuelson. 1994. Bacterial resistance to antimicrobial agents used in fish farming: a critical evaluation of method and meaning. *Annu. Rev. Fish Dis.* 4: 273-313.
- Stoffels, G., I. F. Nes, and A. Gudmundsdottir. 1992. Isolation and properties of a bacterocin-producing *Carnobacterium piscicola* isolated from fish. *J. Appl. Bacteriol.* 73: 309-316.
- Suma, K., M. C. Misra, and M. C. Varadaraj. 1998. Plantaricin LP84, a broad spectrum heat-stable bacteriocin of *L. plantarum* NCIM 2084 produced in a simple glucose broth medium. *Int. J. Food Microbiol.* 40: 17-25
- Sugita, H., Y. Hirose, N. Matsue, and Y. Degudri. 1998. Production of antibacterial substance by *Bacillus* spp. strain NM12, an intestinal bacterium of Japanese coastal fish. *Aquaculture.* 165: 269-280.
- Verschuere L., G. Rombaut, P. Sorgeloos and W. Verstraete. 2000. probiotic bacteria as biological control agents in aquaculture. *Microbiol. & Molecular Biology Reviews.* 64: 655.
- Witte, W., I. Klare, and G. Werner. 1999. Selective pressure by antibiotics as feed additives. *Infection.* 27: 35-38.
- 국립수산진흥원. 2000. 건강어류 생산을 위한 어병예방 및 치료대책.

## 감사의 글

본 논문이 완성되기까지 아낌없는 조언과 지도하여 주신 허문수 교수님께 먼저 깊은 감사를 드리며, 부족한 논문이 틀을 갖추 수 있도록 다듬고 심사해 주신 여인규 교수님, 전유진 교수님, 송춘복 교수님 그리고 이제희 교수님께 깊은 감사를 드립니다. 또한 전자현미경을 촬영하는데 많은 도움을 주었던 생물학과 이화자 교수님과 선지 그리고 해양연구소 강태연 선생님께 감사의 말을 전합니다. 아울러 실험을 하는 동안 여러가지 시약 및 기자재 그리고 실험할 수 있도록 힘들지만 깨끗이 조언해준 강현실, 박영미 이하 유전공학실험실 여러분들에게 감사를 드립니다.

조교를 하는 과정에서 물심양면으로 도와준 우리 해양미생물학 실험실 학생, 정용욱, 강철영, 문창하, 김만철, 김수미, 김민주 등 많은 후배들에게 진심 어린 고마움을 전합니다.

또한 논문을 작성하기까지 힘들 때마다 늘 곁에서 용기를 주었던 어류생리학 실험실 후배님 들에게 심심한 감사의 말을 전합니다.

그리고 같이 공부를 하면서 힘들지만 많은 조언과 용기를 주었던 제주지방 해양청 진창남 계장님과 표선 자원연구소 강봉조 선배님들께도 아울러 감사함을 전합니다.

끝으로 오늘이 있기까지 머나먼 일본에서 고생하시면서 뒷바라지 해주신 사랑하는 아버지, 어머니 그리고 외롭지만 끝없는 노력하며 열심히 살고있는 동생 기혁에게 이 논문을 바칩니다.