

碩士學位論文

젓갈에서 분리한 *Bacillus vallismortis* BK6가  
생산하는 항균 및 계면활성물질의 특성



濟州大學校 大學院

水產生命醫學科

全奉根

2009 年 2 月

젓갈에서 분리한 *Bacillus vallismortis* BK6가  
생산하는 향균 및 계면활성물질의 특성

指導教授 許文洙

全奉根

이 論文을 理學 碩士學位 論文으로 提出함

2009 年 2 月

全奉根의 理學碩士 學位論文을 認准함

審査委員長 전 유 진 ①

委 員 정 준 범 ①

委 員 허 문 수 ①

濟州大學校 大學院

2009 年 2 月

Characterization of Antibacterial and  
Biosurfactant Substance Produced by *Bacillus*  
*vallismortis* BK6 Isolated from Jeot-kal

Bong-Kun Jhon

(Supervised by professor Moon-Soo Heo)

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

Department of Aquatic life medicine  
GRADUATE SCHOOL  
CHEJU NATIONAL UNIVERSITY

February, 2009

# 목 차

목 차	I
Summary	IV
List of Tables	VI
List of Figures	VII
I. 서 론	1
II. 재료 및 방법	4
1. 샘플의 채취	4
2. 미생물의 분리 및 공시균주의 선정	4
1) 미생물의 분리	4
2) 항균활성 측정	4
3) 공시균주의 선정	5
3. 미생물의 동정	5
1) 형태학적 관찰	5
2) 생리학적 특성	6
3) 16S rRNA 염기서열 특성	6
4. 조건에 따른 공시균주의 생육과 항균활성 검토	7
1) 탄소원의 배지조성	7
2) 질소원의 배지조성	7
3) 무기염의 배지조성	8
4) 최적 pH, 온도에 따른 성장과 항균물질 생산	8
5) 배양시간에 따른 항균물질의 생산	8
6) 항균물질의 안정성 검토	9
5. 항균물질의 추출 및 생리활성 측정	9
1) 항균물질의 추출	9
2) 최소저해농도 측정	10

3) 항균물질 첨가에 따른 피검균( <i>S. parauberis</i> )의 세포형태 관찰	10
4) 항산화 활성 측정	10
(1) DPPH free radical scavenging activity	10
(2) Alkyl radical scavenging activity	11
(3) Hydrogen peroxide scavenging activity	11
6. 공시균주의 Biosurfactant 생산검토	12
1) Biosurfactant 조정제 및 생산량 측정	12
2) SDS-PAGE	12
3) 유화활성 및 유화안정성 조사	13
7. 항생제 감수성 실험	13
<b>III. 결과 및 고찰</b>	15
1. 미생물의 분리	15
2. 미생물의 동정	18
1) 공시균주 BK6의 배양학적 특성	18
2) 공시균주 BK6의 형태학적 특성	19
3) 공시균주 BK6의 생리학적 특성	20
4) 16S rRNA 염기서열	20
3. 공시균주 BK6의 생육과 항균활성 검토	27
1) 탄소원의 영향	27
2) 질소원의 영향	29
3) 무기염의 영향	31
4) 최적 온도, pH의 따른 생육과 항균물질 생산	33
5) 배양시간에 따른 항균물질의 생산	33
6) 항균물질의 안정성	37
4. 항균물질 추출에 대한 항균활성	38
5. 항균물질 첨가에 따른 피검균( <i>S. parauberis</i> )의 세포형태관찰	39
6. 항산화 활성	40
1) DPPH radical 소거활성	40
2) Alkyl radical 소거활성	43

3) Hydrogen peroxide 소거활성 .....	45
7. 공시균주 BK6의 Biosurfactant 생산검토 .....	47
1) 유화활성 .....	47
2) 유화안정성 .....	48
3) SDS-PAGE .....	51
8. 항생제 감수성 .....	52
IV. 요약 .....	53
V. 참고문헌 .....	55



## Summary

*Jeot-kal*, a Korean traditional fermentation food in Korea, is usually produced using fish and shellfish. This product is usually fermented using certain types of microorganisms and enzymes. This is not only as a source of protein supply, due to its peculiar flavor, and relative abundance of free amino acid and taste related components, but also a subsidiary material of *Kimchi* or spices.

Six bacterial strains were isolated from several *Jeot-kal* using MRS agar medium. A bacterium which has high activities such as protease and pathogens bacterial species, was isolated from Myungran *Jeot-kal*, which was recorded as *Bacillus valismortis* BK6. It was identified as *Bacillus vallismortis* BK6 as based on the biochemical properties and 16S rRNA gene sequence. The bacterium was Gram-positive, catalase-negative, oxidase-positive, hydrosis of esculin ferric citrate, was rod-shaped, and had dimensions of 0.6~0.7  $\mu\text{m}$  and 1.5~2.0  $\mu\text{m}$ . The strains showed characteristics secrete substance of gooey. When the material was rubbed it was slippery.

Nutritional and cultural conditions for the production of antibacterial substance by this organism under shake-flask conditions have optimized. The optimal medium compositions for production of antibacterial substance in the *B. vallismortis* BK6 were 1%(v/w) of soluble starch, 0.5%(v/w) yeast extract, 0.5%(v/w)  $\text{NaNO}_3$ , 0.05%(v/w)  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  and 0.05%(v/w)  $\text{NaCl}$ . The optimum temperature and pH of the growth of the *B. vallismortis* BK6 was 25°C and pH 8, respectively. The optimal culture time for antibacterial activities of the bacterium were shown to be in the range of 24~36 hour.

The antibacterial activity was found to be stable after heat and various enzyme treatment, and in the pH range of 3.5~10.5. The antibacterial activity was stable in the pH range of 3.5~10.5, but about all of temperature was

lost after 5 min, so it assume that is inactive protein cause by heat. The antibacterial compound was only inactivated by pepsin treatment, its suggesting competitive inhibition of proteinaceous nature.

This study investigated the effect of the antibacterial and antioxidant activity of solvents(ethyl acetate, butanol) from Strain BK6 supernatant. The minimum inhibitory concentrations of solvent extracts 1 mg/ml against *S. parauberis*. The extracts exhibited high scavenging activity on DPPH, alkyl and Hydrogen peroxide radical, and the activity increased with increment of concentration of the extracts.

Scanning electron micrographs observation of *S. parauberis* treated with butanol extract(1 mg/ml) revealed apparent lysis of the cell wall.

Biosurfactants are biological surface-active compounds produced by bacteria and fungi that have a broad range of industrial applications as well as several advantages over chemical surfactants. The genus *Bacillus* is a bacterial group most often studied for production mechanisms of lipopeptides including biosurfactants and antibiotics.

To further advance the study of biosurfactant production in the BK6 strain we investigated emulsification activity and stability. The crude biosurfactant was obtained from supernatant by acid precipitation, solvent extraction and evaporation. The yield of the crude biosurfactant was about 6 g/l by optimum medium. In addition, the crude biosurfactant show high emulsification activity when tributyrin, soybean oil, squalene and kerosene were used as a substrate. Thus, these studies could contribute to the development of biosurfactant beneficial to the environment.

## List of tables

Table 1. Isolated strains and isolation condition. ....	15
Table 2. Comparison of cell growth, clear zone size and antibacterial activities of isolated bacterial strains by agar diffusion method. ....	17
Table 3. Physiological characteristic of Strain BK6. ....	22
Table 4. Optimum medium compositions and culture conditions for antibiotic production by <i>B. vallismortis</i> BK6. ....	36
Table 5. The effect of different physical and biochemical treatments on antibacterial activity of supernatant. ....	37
Table 6. Inhibitory effect of strain BK6 solvent extracts against the growth of <i>S. parauberis</i> . ....	38
Table 7. Stabilization properties of crude biosurfactant. ....	50
Table 8. Antibiotic susceptibility test of <i>B. vallismortis</i> BK6. ....	52

## List of figures

- Fig. 1. Protease activity on skim milk agar. .... 16
- Fig. 2. Cultural characterization of Strain BK6. Cells were grown at 30°C for 24 hour. .... 18
- Fig. 3. Scanning electron micrograph of Strain BK6. Cells were grown at 30°C for 24 hours. .... 20
- Fig. 4. Alignment of 16S rRNA sequence of the isolated Strain BK6. .... 23
- Fig. 5. Neighbour-joining phylogenetic tree based on 16S rRNA gene sequences showing the position of Stain BK6 within the radiation of the genus *Bacillus*. Bootstrep percentage (from 1000 replications) >50% are shown at branch points. Bar, 0.01 substitutions per nucleotide position. .... 26
- Fig. 6. Effect of various carbon sources on cell growth and antibacterial activity of culture broth of the isolated *B. vallismortis* BK6. .... 28
- Fig. 7. Effect of concentrations of soluble starch on cell growth and antibacterial activity of culture broth of the isolated *B. vallismortis* BK6. .... 28
- Fig. 8. Effect of various nitrogen sources on cell growth and antibacterial activity of culture broth of isolated *B. vallismortis* BK6. .... 29

Fig. 9. Effect of concentration of yeast extract plus NaNO <sub>3</sub> (1:1) on cell growth and antibacterial activity of culture broth of the isolated <i>B. vallismortis</i> BK6. ....	30
Fig. 10. Effect of various inorganic salts on cell growth and antibacterial activity of the isolated <i>B. vallismortis</i> BK6. ....	32
Fig. 11. Effect of concentration of K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> plus NaCl(1:1) on cell growth and antibacterial activity of culture broth of the isolated <i>B. vallismortis</i> BK6. ....	32
Fig. 12. Effect of temperature on cell growth and antibacterial activity of <i>B. vallismortis</i> BK6. ....	34
Fig. 13. Effect of pH on cell growth and antibacterial activity of <i>B. vallismortis</i> BK6. ....	34
Fig. 14. Antibacterial activity of the culture broth of <i>B. vallismortis</i> BK6 by liquid culture method. ....	35
Fig. 15. Effect of culture time on cell growth and antibacterial activity of <i>B. vallismortis</i> BK6. ....	35
Fig. 16. Antibacterial activity of the culture broth of <i>B. vallismortis</i> BK6 cultured for 72 hours against <i>S. parauberis</i> . ....	36
Fig. 17. Antibacterial activity of strain BK6 solvent extracts against <i>S. parauberis</i> . ....	39

Fig. 18. Scanning electron micrographs of <i>S. parauberis</i> treated with strain BK6 solvent extracts. A: Untreated, B: Treated. ....	40
Fig. 19. DPPH radical scavenging activity of the strain BK6 solvent extracts. ..	41
Fig. 20. DPPH radical scavenging activity of the supernatant from cultural broth. ....	42
Fig. 21. Crude extracts of diethyl ether, hexane and chloroform by solvents fractions. ....	42
Fig. 22. Alkyl radical scavenging activity of the strain BK6 solvent extracts. ..	44
Fig. 23. Alkyl radical scavenging activity of the supernatant from cultural broth. ....	44
Fig. 24. Hydrogen peroxide scavenging activity of the strain BK6 solvent extracts. ....	46
Fig. 25. Hydrogen peroxide scavenging activity of the supernatant from cultural broth. ....	46
Fig. 26. Emulsification activity of various substrates by crude biosurfactant. ....	48
Fig. 27. Emulsification stability of various substrates by crude biosurfactant. ....	49

Fig. 28. Comparison of the emulsifying activity with distilled water and crude biosurfactant. .... 50

Fig. 29. SDS-PAGE patterns. .... 51



## I. 서론

젓갈은 우리나라 전통 발효 식품 중 하나로 어패류에 소금을 가하여 염장함으로써 부패균의 번식을 억제하고, 발효과정 중 생성된 유리아미노산이나 방향성 성분으로 인해 특유의 감칠맛과 풍미를 지니고 있어 단백질, 지방, 무기질의 공급원으로서 국민 영양 공급 상 중요한 위치를 차지하고 있다(Yoon *et al.*, 2003).

우리나라 전통 발효식품 및 요구르트, 버터, 치즈 같은 유제품에서 분리된 유산균은 각종 동물의 장관 내에 서식하며, 소화관 내에서 점막의 보호 및 장내 이상 발효의 개선, 칼슘의 체내 흡수 촉진 등 여러 가지 유익한 생리작용을 나타내기 때문에 정장제와 같은 의약품과 사료첨가제로도 이용되고 있다(Lee *et al.*, 2006). 또한 유산균에 의한 혈중 콜레스테롤 저하작용, 항암효과(Jay, 1982) 등이 있는 것으로 보고되고 있다(Kang, 1996). 이러한 약리 효능 이외에 병원성 세균에 대한 감염 방어 효과와 항균력을 가지는 것으로도 알려져 있다. 즉, 유산균이 젓산, 초산 등의 유기산의 pH 감소와 과산화수소, diacetyl 및 bacteriocin을 포함한 항균성 물질을 생산하는 것으로 알려져 있다(Choi, 2000)

Bacteriocin은 미생물로부터 생산되는 천연의 무독성 항생물질로서 주목 받고 있는 항균성 단백질이다(Tagg, 1976). 기존의 항생제가 2차 대사산물인데 비해 자신의 유전자로부터 생합성되는 것이 특징이다(Dodd, 1992). 단백질로 이루어져 인체에 섭취되는 즉시 소화기관의 단백질가수분해효소에 의해 분해됨으로서 인체에 무독성이며 잔류성이 없다는 장점을 가지고 있어 유산균 유래의 박테리오신에 관한 연구들이 가장 많이 이루어지고 있다(Barefoot, 1993). 하지만 대부분의 박테리오신 생산 유산균들은 좁은 항균 스펙트럼을 갖고 있으며 계통적으로 유사한 그람 양성 세균에 대해서만 저해를 하는 것이 대부분 이라고 알려져 있다(Klaenhammer, 1988). 주로 그람 양성균의 생육저해를 할 수 있는 유산균 박테리오신과 달리 *Bacillus*가 생산하는 박테리오신은 그 항균 활성의 범위가 매우 넓고 다양한 특성을 지닌다(Jack, 1995; Tagg, 1976). 일반적으로 젓갈의 주 발효 미생물은 Lactic acid 세균으로 알려져 있으나 다수의 다양한 미생물이 존재하며 그 중 항균성을 지닌 *Bacillus* 균이 분리되기도 하며 다양한 구조를 가진 이차대

사산물을 생산하는 특징을 가진다(Yoon *et al.*, 2005). *Bacillus* sp.가 생산하는 antibiotics로는 ribosomal과 nonribosomal antibiotics로 분류할 수 있으며(Nakano, *et al.* 1990), 합성되는 기작에 따라 subtilin, coagulin가 전자에 해당되며, surfactin, iturin, gramicidines, fengcin, tyrocidine 그리고 bacitracin이 nonribosomal antibiotics에 속하며 항진균, 항세균효과가 있다고 보고되어 있다(Klein, 1993; Hyronimus, 1998; Kluge, 1998; Maget-Dana, 1994; Nakano, 1990; Vanittanakom. 1986)

그 중에 surfactin은 *Bacillus subtilis*에서 분비하는 물질로 biosurfactant의 주요 역할을 하고 있다(Arima, *et al.*, 1968, Cooper, *et al.* 1981).

Biosurfactant란 미생물에 의해 세포 표면에 생성되거나 세포외로 분비되는 화합물로서, 친수성인 부분(hydrophilic moieties)과 소수성인 부분(hydrophobic moieties)을 동시에 가지는 양친매성(amphiphiles) 물질이다. biosurfactant는 표면장력(surface tension)과 liquid-liquid(oil-water), liquid-solid(wetting phenomena)간 계면장력(interfacial tension)을 감소시키며 유화 안정성도 우수하다고 알려져 있는 천연 계면활성제라고 알려져 있다.(Fiechter, 1992). 또한 biosurfactant는 기존의 화학 유화제에 비해 독성이 낮고, 미생물에 의해 다양하게 합성되어지며, 온도 및 pH에 안정성이 높을 뿐만 아니라, 폐유나 식물성 유지 등 재생 가능한 원료로 생산이 가능하고, 생체분해능력이 크기 때문에 환경 친화적인 물질이다(Deziel, *et al.*, 1996).

이러한 미생물의 계면활성제의 소수성부분은 당 또는 아미노산으로 구성되며, glycolipids, lipopeptides, lipoproteins, neutral lipids, phospholipids, substitute fatty acids 그리고 lipopolysaccharides 같은 종류들이 있다. *Bacillus* sp.에서 분리된 lipopeptide type의 biosurfactant는 단순 peptide 형태인 gramicidin S (Kratzschmar, *et al.*, 1980)와 tyrocidine(Mittenhuber, *et al.*, 1989), 7개의 amino acid cyclic peptide에  $\beta$ -hydroxy fatty acid가 ester 결합을 하고 있는 surfactin(Hiraoka, *et al.*, 1992), 7개의  $\alpha$ -amino acid와 한 개의  $\beta$ -amino acid 잔기를 갖는 iturin(Hiraoka, *et al.*, 1992)으로 구분할 수 있다.

현재까지 제주도 육상수조식 넙치 양식장에서 연쇄구균(*Streptococcus* sp.)이 주요 폐사의 원인균으로 보고되고 있다(Lee *et al.*, 1991). 그 이외에 *Lactococcus*

*garviae*(Lee *et al* 2001),  $\beta$ -haemolytic *Streptococcus sp.*(Heo *et al.*, 2001), *S. pyogenes* 및 *Enterococcus faecalis*(Song *et al.* 2003), *S. iniae*(Jung *et al.* 2004) 등이 넙치의 대한 병원성과 관련되어 보고되었으며 *S. iniae*가 연쇄구균증의 주요 병원체로 알려져 왔다(Woo *et al.*, 2006). 그러나 최근에는 *S. parauberis*가 새로운 양식넙치의 폐사 원인체로 분리되어지고 있어 (Baek *et al.*, 2006)이에 대한 예방이 요구되고 있다.

따라서 본 연구에서는 것갈에서 분리한 미생물이 생물학적 방제의 적용에 적합한 미생물 자원인지 조사하여 현재 양식장에서 빈번히 발생하고 있는 세균성질병에 대한 저항성을 알아보며, 더불어 분리 균주가 미생물유래의 biosurfactant 생산을 조사하여 계면활성제로의 이용가능성을 살펴보고자 한다.



## II. 재료 및 방법

### 1. 샘플의 채취

유산균을 분리하기 위한 젓갈은 오징어, 명란, 창란, 꼴뚜기 젓갈을 사용하였다. 오징어 젓갈과 명란 젓갈은 서울에 위치한 경동시장에서 구입하였으며, 창란 젓갈과 꼴뚜기 젓갈은 제주시에 위치한 마트에서 구입하였다.

### 2. 미생물의 분리 및 공시균주의 선정

#### 1) 미생물의 분리

젓갈류를 생리식염수로 단계 희석하여 사용하였으며, 0~10%의 식염이 첨가된 Mann, Rogosa and Sharpe 배지(MRS, Difco)에 희석액을 100  $\mu$ l 유리 도말봉으로 도말하고 25, 30, 35 $^{\circ}$ C에서 48시간 배양하여 유산균을 분리하였다.

분리된 균은 sodium chloride 0~10%, yeast extract 0.5%, peptone 1%, skim milk 2%, agar 1.5%로 구성된 Skim milk배지를 사용하여 protease 효소활성이 우수한 미생물을 순수 분리하여 사용하였다. 또한 면양 혈청배지에 도말하여 비용혈성 미생물을 선택하였다.

#### 2) 항균활성 측정

SM배지에서 생육이 빠르고 투명환이 뚜렷한 균주를 선별하여 유해미생물의 항균활성을 간이적으로 agar에 한 백금으로 떨어뜨려 측정하였다.

항균활성을 알아보기 위한 피검균으로 *Streptococcus parauberis* KCTC 3651, *S. iniae* KCTC 3657, *Staphylococcus aureus* KCTC 1927, *Vibrio anguillarum* KCTC 2711, *Vibrio alginolyticus* KCCM 40513, *Vibrio ichthyenteri* KCCM 40870, *Escherichia coli* KCCM 40880 등은 한국유전자은행 (The Korean

Collection for Type cultures)에서 분양 받았으며, *Edwardsiella tarda* 는 병에 걸린 넙치의 신장에서 분리하였다. 모든 균주는 50% glycerol이 첨가된 stock을 만들어 -70℃에 보관하여 사용하였다.

Müller Hinton broth(MHA, Difco, USA)를 사용하여 유해미생물의 각 배양온도에서 24시간 배양한 피검균을 McFarland standard 0.5가 되도록 맞추고 MHA(Difco) 위에 멸균 면봉으로 도말한 후, paper disc(8 mm)에 분리균주의 상등액을 50  $\mu$ l 적하하여 각 배양온도에서 24시간 배양한 후 투명환의 크기를 측정하였다.

### 3) 공시균주의 선정

항균활성이 확인된 분리균주의 항균물질에 가장 큰 감수성을 보인 *Streptococcus parauberis* KCTC 3651을 피검균의 공시균주로 선택하였다. 또한 항균활성에 가장 범위가 넓은 BK6 균주를 공시균주로 사용하였다.

## 3. 미생물의 동정

### 1) 형태학적 관찰

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

## 2) 생리학적 특성

공시균주의 동정을 위해 그람염색, catalase test, 포자유무, 운동성, 전자현미경 관찰 등 형태학적 특성을 관찰 하였고 당 발효능과 같은 생화학적 성상은 API 20NE (Biomérieux, France)을 이용하여 분석법에 따라 시행하였다.

## 3) 16S rRNA 염기서열 분석

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

PCR 반응조건은 94°C에서 5분 predenaturation, 30cycle 동안 94°C에서 45초 denaturation, 50°C에서 45초 annealing, 72°C에서 45초간 extention하였으며, 다시 72°C에서 5분간 extention하였다. 증폭된 PCR product는 ethdium bromide가 첨가된 상태에서 전기영동하여 1% agarose (promega CO., USA) gel에서 확인하였다. 이후, Accuprep<sup>TM</sup> PCR purification kit (Bioneer, Korea)을 이용하여 PCR product에 남아있는 primers, nucleotides, polymerase, salts를 제거하여 정제하고 30  $\mu$ l에 elution buffer (10 mM Tris-Cl, pH 8.5)로 DNA를 elution하였다. 이를 ABI prism<sup>TM</sup> Bigdye<sup>TM</sup> terminator cycle sequencing Ready reaction kit V.3.1 (Fluorescent dye terminators method)와 ABI 3730XL capillary DNA sequencer를 사용하여 PCR product의 염기서열을 분석하였다.

DNA 염기서열의 homology 분석은 BLAST online program (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast>)를 이용하였다. 그 다음 ClustalW software를 사용하여 염기서열을 배열한 후, MEGA3 program (Ver 3.0)을 이용하여 phylogenetic tree를 작성하였다.

#### 4. 조건에 따른 공시균주의 생육과 항균활성 검토

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

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

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

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

##### 1) 탄소원의 배지조성

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

##### 2) 질소원의 배지조성

질소원은 NH<sub>4</sub>Cl, (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub>, NaNO<sub>3</sub>, (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>C<sub>2</sub>O<sub>4</sub>, malt extract, yeast extract, asparagine 및 peptone 등을 0.5% 첨가하여 30℃, 150 rpm으로 24시간 배양한 후 배양액의 탁도를 660 nm에서 측정하였으며 Liquid culture method를 시행하여 항균물질의 생산을 알아보았다. 대조구는 GY배지에서 yeast extract가

첨가되지 않은 배지를 사용하였다.

### 3) 무기염의 배지조성

무기염은  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ ,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ,  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ,  $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ ,  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ,  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ,  $\text{NaCl}$ ,  $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ ,  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  및  $\text{ZnCl}_2$  등을 0.1%첨가하여 30°C 150 rpm으로 24시간 배양한 후 배양액의 탁도를 660 nm에서 측정하였으며 Liquid culture method를 시행하여 항균물질의 생산을 알아보았다. 대조구는 GY 배지에서  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 가 첨가되지 않은 배지를 사용하였다.

### 4) 최적 pH, 온도의 따른 성장과 항균물질 생산

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

### 5) 배양시간에 따른 항균물질의 생산

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

## 6) 항균물질의 안정성 검토

항균물질의 여러 가지 안정성을 검토하기 위한 시료는 공시균주를 액체배양 한 후 그 배양액을 4000 rpm에서 15분간 원심분리 하여 얻은 상등액을 0.45  $\mu$ m pore size filter(Adventec, USA)로 제균하여 사용하였다. 열안정성은 시료를 50, 60, 70, 80, 90, 100 $^{\circ}$ C에서 3분 동안 열처리한 다음 각각의 시료에 잔존하는 항균 활성을 측정하였다. pH 안정성은 원심분리 하여 얻은 시료 용액에 0.1 M NaOH 및 0.1 M HCl을 사용하여 pH 4.5~12까지 조절한 다음 상온에서 교반시키면서 2시간 반응시킨 후에 pH를 다시 pH 8~9로 조정 한 후에 항균활성을 측정하였다.

각종 효소에 대한 안정성 검토는 상등액을 제균시킨 시료를 각각의 효소농도로 처리하여 37 $^{\circ}$ C에서 12시간 반응시킨 후 항균활성을 측정하였다.

분해효소로는 protease (Sigma Co., U.S.A.), trypsin (Sigma Co., U.S.A.), Lipase (Sigma Co., U.S.A.) 및  $\alpha$ -chymotrypsin (Sigma Co., U.S.A.)를 50 mM Tris-HCl 완충액(pH 7.5), pepsin (Sigma Co., U.S.A.)은 50 mM citrate 완충액 (pH 2.0), proteinase K (Sigma Co., U.S.A.)는 10 mM Tris-HCl-50 mM NaCl-5 mM EDTA(pH 7.5), Lysozyme (Sigma Co., U.S.A.) 및  $\alpha$ -amylase (Sigma Co., U.S.A.)는 0.1 M sodium phosphate 완충액(pH 7.0)에 용해시켜, 항균물질에 준비된 각종 효소를 최종 400 U/mg의 농도로 하여 측정하였다. 대조구는 모든 동일한 조건에서 효소액만 빼고 처리한 것으로 사용하였으며 측정법은 agar spotted method를 이용하였다.

## 5. 항균물질의 추출 및 생리활성 측정

### 1) 항균물질의 추출

항생물질의 추출은 최적조건에서 균주를 배양한 후 ethyl acetate(EtOAc) 와 butanol(BuOH)을 이용한 유기용매 추출법을 통하여 배양액으로부터 항균물질을 추출하였다. 먼저 배양액을 원심분리(4000 rpm, 4 $^{\circ}$ C, 25 min)하여 균체를 제거한

다음, 상등액과 동량의 두 용매를 넣어 추출, 여과한 후 농축기를 이용하여 감압 상태에서 용매를 제거하였다. 용매가 제거된 플라스크에 100% 메탄올을 서서히 가하여 용출시키고 활성부분을 모아 농축기를 이용, 감압 농축하여 용매를 제거한 후, 각 추출물의 농도를 측정하였다. 또한 EtOAc와 BuOH을 두배 농축시켜 추출물의 농도를 측정하였다.

농도가 측정된 추출물을 30, 25, 20, 15, 10, 5, 2.5, 1, 0.5, 0.1 mg/ml 농도로 희석하여 agar spot method를 이용하여 항균활성을 측정하였다.

## 2) 최소저해농도 측정

최소저해농도(minimum inhibitory concentration: MIC)는 공시균주의 용매 추출액을 사용하여 실험을 하였다. 농도가 측정된 추출물을 agar spot method를 이용하여 0.1~30 mg/ml 의 농도의 배양추출물을 피검균이  $10^7$  CFU/ml 농도로 MHA에 50  $\mu$ l씩 접종하여 유해미생물의 억제환을 조사하였다. 배양은 30°C, 48시간 시행하였으며 유해미생물의 생육을 억제하는 항균물질의 최소농도를 관찰하였다.

## 3) 항균물질의 첨가에 따른 피검균(*S. paraubris*)의 세포형태 관찰

MHA(Difco, USA)에 *S. paraubris* 균을 접종한 후 항균물질이 최대로 분비되는 시료를 첨가한 후의 피검균의 세포형태 변화를 SEM으로 관찰하였다.

## 4) 항산화활성 측정

### (1) DPPH free radical scavenging activity

각 시료의 DPPH free radical 소거활성은 Nanjo 등(1996)의 방법에 의하여 측정하였다. 60  $\mu$ l 시료용액에 60  $\mu$ l DPPH (60  $\mu$ M) 용액을 첨가하여 10초 동안 교반한 다음 혼합용액을 quartz capillary tube에 옮긴 후 2분 후에 Electron spin

resonance spectrometer (ESR JEOL, Japan)로 측정하였다. 스펙트럼은 scan time : 30 s, filed :  $336 \pm 5$  mT, time constant : 0.3 s, power : 1 mW, amplitude :  $1 \times 500$  의 조건으로 기록하였다. 항산화시료에 대한 DPPH radical의 소거활성은 아래의 식을 이용하여 계산하였다.

DPPH free radical scavenging activity (%) =

(ESR signal intensity for medium containing the additives of concern/ESR signal intensity for the control medium)  $\times$  100.

### (2) Alkyl radical scavenging activity

각 시료의 alkyl radical 소거활성은 Hiramoto 등(1993)의 방법에 의하여 측정하였다. 20  $\mu$ l 시료용액에 멸균증류수 20  $\mu$ l, 40 mM AAPH 20  $\mu$ l, 40 mM POBN 20  $\mu$ l을 혼합한 다음 37°C에서 30분 방치 한 후 quartz capillary tube에 옮긴 후 ESR로 측정하였다. 스펙트럼은 scan time : 30s, filed :  $336 \pm 5$  mT, time constant : 0.3s, power : 7 mW, amplitude :  $1 \times 500$  의 조건으로 기록하였다. 항산화시료에 대한 Alkyl radical의 소거활성은 아래의 식을 이용하여 계산하였다.

Alkyl radical scavenging activity (%) =

(ESR signal intensity for medium containing the additives of concern/ESR signal intensity for the control medium)  $\times$  100.

### 3) Hydrogen peroxide scavenging activity

Hydrogen peroxide 소거활성은 Müller 등(1995)의 방법에 따라 수행하였다. 즉, 0.1 M phosphate buffer (pH 5.0) 100  $\mu$ l와 sample 100  $\mu$ l을 96 well plate에서 혼합시킨 후 다시 20  $\mu$ l의 Hydrogen peroxide를 첨가하고 37 °C에서 5분간 반응시켰다. 반응이 끝난 후 1.25M 2,2'-azino-bis-3-ethylbenzthiozoline-6-sulfonic acid (ABTS, Sigma)와 peroxidase (1 unit/ml, Sigma)를 각각 30  $\mu$ l 첨가하여 최종적으로 37 °C에서 10분간 반응시켜 ELISA reader (Sunrise, Tecan<sup>TM</sup>, Austria)를 사용해 405 nm에서 활성도를 측정하였다.

Hydrogen peroxide scavenging activity (%) =  
[1-(control ab.- sample ab.)/control ab.] × 100

## 6. 공시균주의 Biosurfactant 생산검토

### 1) Biosurfactant 조정제 및 생산량 측정

배양과정을 거친 *B. vallismortis* BK6로부터 생산되는 biosurfactant는 배양액으로부터 원심분리(4000 rpm, 25분)과정을 거쳐 균체를 제거한 배양 상등액으로부터 회수하였다. 배양 상등액을 12 N HCl을 이용하여 pH 2로 조정한 뒤 4°C에서 24시간 반응시켜 침전물을 형성하였다. 이를 다시 원심분리(4000 rpm 25분)하여 침전물을 회수하여 무게를 재어 crude biosurfactant의 생산량으로 하였다. 침전물을 0.5 M phosphate buffer(pH 7.0)으로 현탁시켜 ethyl acetate로 3회 추출과정을 거쳐 활성부분을 모아 농축하면 노란색의 물질이 남게 되는데 이를 다시 phosphate buffer에 녹여 실험에 사용하였다.

### 2) SDS-PAGE

Strain BK6가 생성하는 Biosurfactant의 생성 유무를 확인하기 위해 SDS-PAGE를 통해 crude biosurfactant의 분자량을 확인하였다. crude biosurfactant을 2:1 비율로 2 X Laemmli sample buffer (80 mM Tris-HCl (pH 6.8), 2% SDS, 12% β-mercaptoethanol, 15% glycerol 및 0.012% bromphenol blue)에 용해시켜 90°C 이상의 온도에서 3분간 boiling 한 후 Laemmli (1970)의 방법에 따라 SDS-PAGE를 실시하였다. 10% polyarylamide gel 을 사용하여 250 V, 55 mA로 4시간 동안 전기영동을 실시한 후, 염색액 (0.136% coomassie brilliant blue R-250, 45% methanol 및 10% acetic acid)에서 40분간 염색하고 , 7.5% methanol, 7.5% acetic acid에서 탈색하였다. 분자량 측정용 표준단백질은 myosin (200 kD), β-galactosidase (116 kD), phospholylase b (97 kD), bovine serum albumin (66 kD), ovalbumin (44 kD), carbonic anhydrase (29 kD), soybean trypsin inhibitor (21 k

D), lysozyme (14 kD) 및 aprotinin (6 kD)를 사용하였다.

### 3) 유화활성 및 안정성 조사

공시균주에 의해 생산된 biosurfactant와 일반적으로 사용되는 화학합성 계면활성제의 소수성 탄화수소와 오일성분에 유화활성 및 유화안정성 시험을 Cirigliano와 Carman(1984)의 방법에 따라서 실시하였다.

crude biosurfactant용액 4 ml와 phosphate buffer 4 ml 혼합 후에 기질성분 6 ml를 시험용 튜브 내에서 2분간 교반 한 후 10분간 실온에 방치하여 540 nm에서 혼합물의 현탁도를 측정하였다. 사용된 기질은 경유, kerosene, soybean oil, mineral oil, liquid paraffin, squalene, glycerin 그리고 tributyrin 등을 포함한 8가지 종류의 탄화수소 화합물을 사용하였으며, 화학합성 계면활성제는 Tween 20, 80을 사용하였다.

유화안정성은 유화활성과 동일한 방법으로 처리한 후에, 실온에 방치하면서 60분 동안 10분간으로 540 nm에서 현탁도를 측정하여 로그값으로 환산하여 나타내고, 그 때의 기울기를 유화활성의 안정도 상수  $K_d$ (시간당 붕괴되는 유화력의 기울기 값)으로 나타내었다.

## 7. 항생제 감수성 실험

공시균주에 대한 항생제 감수성 시험을 하기 위해 Bauer 방법(Bauer *et al.*, 1996)에 따른 Paper disc agar diffusion법을 시행하였다. MHA(Difco, USA)에서 24시간 배양된 배양액을 100  $\mu$ l를 접종하여 약제 디스크(Oxoid, BBL, USA)를 일정한 간격으로 얹고, 30 °C에서 24시간 배양하여 형성된 저지대의 지름을 측정하였고 감수성의 정도를 Susceptible, Intermediate 그리고 Resistant로 나타내었다.

실험에 사용된 약제 디스크는 Norfloxacin, Clindamycin, Cephalothin, Ciprofloxacin, Oxolinic acid, Neomycin, Erythromycin, Pefloxacin, Kanamycin, Chloramphenicol, Oxytetracyclin, Flumequine, Ampicillin, Nalidixic acid,

Amoxicillin, Gentamicin, Amikacin, Novobiocin이다.



### III. 결과 및 고찰

#### 1. 미생물의 분리

각종 젓갈류에서 분리한 균주는 총 6종을 1차 분리하였다(Table 1). 오징어 젓갈에서는 2종이 분리되었으며, 명란 젓갈, 꼴뚜기 젓갈 및 창란 젓갈은 각각 1종씩 분리되었다. 분리균주는 25~30℃의 배양온도에서 MRS agar에 생육속도가 빠르고 뚜렷한 단일 집락을 형성하였다.

Table 1. Isolated strains and isolation condition.

Strain Name	<i>Jeotgal</i> source	Isolate temperature	Isolate medium
BK1	Beka squid	25℃	MRS (0% (v/v) NaCl)
BK2	Beka squid	30℃	MRS (0% (v/v) NaCl)
BK3	Squid	30℃	MRS (5% (v/v) NaCl)
BK4	Squid	25℃	MRS (7% (v/v) NaCl)
BK5	Alaska Pollack internals	30℃	MRS (7% (v/v) NaCl)
BK6	Spawn of Pollack	30℃	MRS (1% (v/v) NaCl)

분리균주 중에서 skim milk 평판배지에서 명료하고 뚜렷한 투명환이 생성됨과 동시에 생육속도가 빠른 균주를 2차 분리하였다(Table 2). BK3, 4는 skim milk 배지에서 투명환과 빠른 생육을 보이지 않았으며, 6종의 어류 질병 유발 세균에 대하여 항균활성이 뛰어난 병원균을 피검균으로 선택하였다. *Vibrio alginolyticus*와 *Vibrio ichthyoentery*는 모든 분리균주에서 항균활성을 보이지 않았으며, BK3, 4는 *Staphylococcus aureus*에 대해서만 항균활성을 보였다. 반면에 BK6는 4종의 병원균에 대한 항균활성이 높았다.

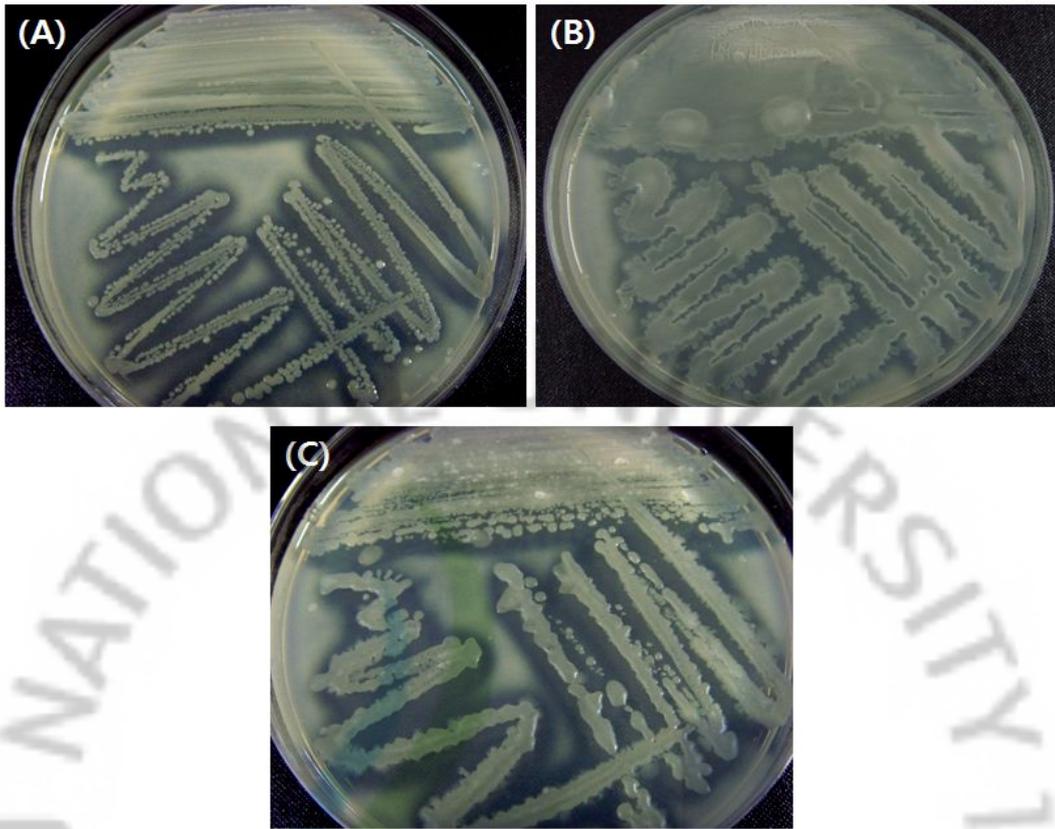


Fig. 1. Protease activity on skim milk agar.

(A) BK2 (B) BK5 (C) BK6

Table 2. Comparison of cell growth, clear zone size and antibacterial activities of isolated bacterial strains by agar diffusion method.

Strains	Growth rate <sup>1)</sup>	Protease activity <sup>2)</sup>	Antibacterial activity (mm)					
			E1 <sup>3)</sup>	E2	E4	E6	E7	E8
BK2	++	+	11	11	-	-	-	-
BK3	-	-	-	-	12	-	-	-
BK4	-	-	-	-	12	-	-	-
BK5	++	++	19	14	16	-	-	14
BK6	+++	+++	20	20	20	-	-	15

<sup>1)</sup>Growth rate: + slow, ++ medium, +++ fast. <sup>2)</sup>Protease activity was expressed as the diameter of inhibition zone on skim milk agar : + 8~10 mm, ++ 10~12 mm, +++ 12~15 mm <sup>3)</sup>Tested strains = E1: *S. parvauberis* KCTC 3651, E2: *S. iniae* KCTC 3657, E4: *Stap. aureus* , E5: *V. alginolyticus* KCCM 40513, E6: *V. ichthyomyxterium* KCCM 40870, E8: *V. anguillarum* KCTC 2711

skim milk 첨가배지에서 투명환이 뚜렷한 균주의 선별은 목적으로 하는 유해미생물의 균체 단백질을 용해시키는 역할을 조사하기 위함으로 투명환이 뚜렷하고 넓을수록 protease 활성이 높다고 할 수 있다. 따라서 공시균주 BK6를 본 연구의 대상으로 최종 선정하였다.

## 2. 미생물의 동정

### 1) 공시균주 BK6의 배양학적 특성

공시균주 BK6의 고체배지의 colony 성상을 Fig. 2에 나타내었다. (A), (B)는 1% NaCl을 첨가한 MRS 배지에서 생육한 사진인데, 집락의 모양은 부정형 (irregular)의 형태를 보였으며, 집락의 주변(margin)은 열편(lobate)형태를 보였다. 또한 집락의 가장자리가 불규칙하고 볼록 솟아 있었으며, 백금이를 취하였을 때 점성(viscosity)을 띄는 특성을 보였다. (D)는 공시균주에 적합한 배지를 agar로 만들어 배양한 사진이다. Screening 때 사용한 MRS배지와 집락 형태가 다른 것을 볼 수 있었지만, 균주의 점성과 집락주변의 형태는 동일하였다. (C)는 BK6를 면양혈청배지에 도말한 그림으로 비용혈성을 나타내었다.

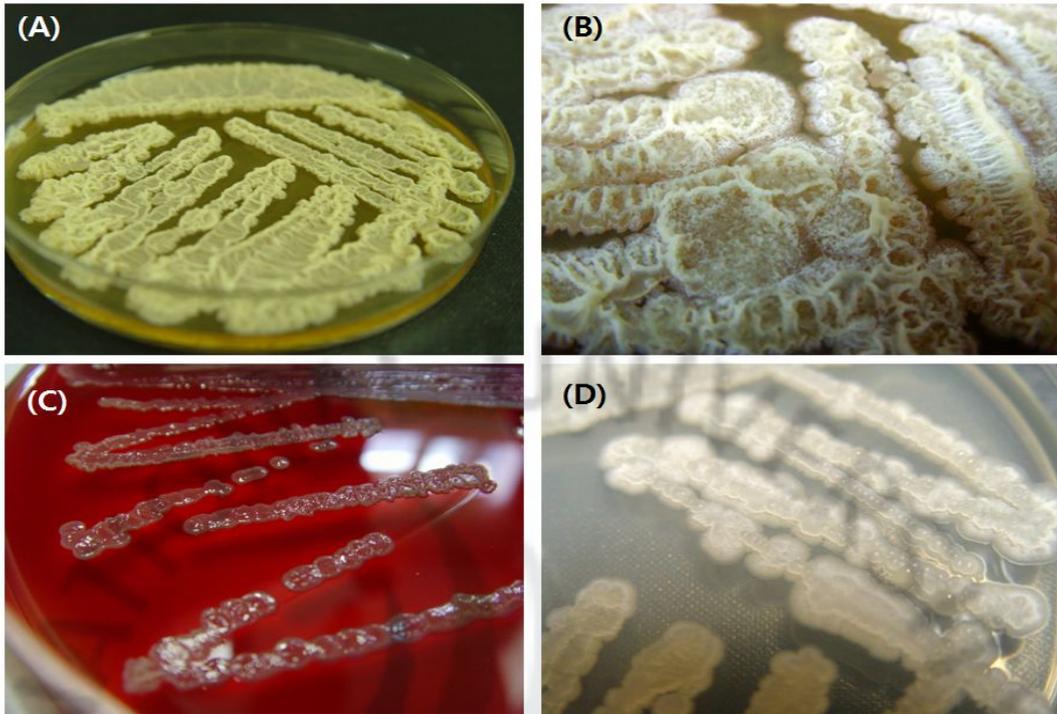


Fig. 2. Cultural characterization of Strain BK6. Cells were grown at 30°C for 24 hour.

(A), (B) MRS agar

(C) Blood plate agar

(D) Optimum agar (starch 1%, yeast extract 0.5%, NaNO<sub>3</sub> 0.5%, K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 0.05%, NaCl 0.05%)

## 2) 공시균주 BK6의 형태학적 특성

공시균주의 형태학적 특성은 30°C에서 MRS 배지에 배양한 후 SEM을 통해 관찰하였다(Fig. 3). 형태는 단간균의 형태를 보였으며, 길이는 1.5~2.0  $\mu\text{m}$  폭은 0.6~0.7  $\mu\text{m}$ 로 나타났다. 또한 균주 세포벽 외부에 점질물질이 생성되는 특징을 볼 수 있었다.

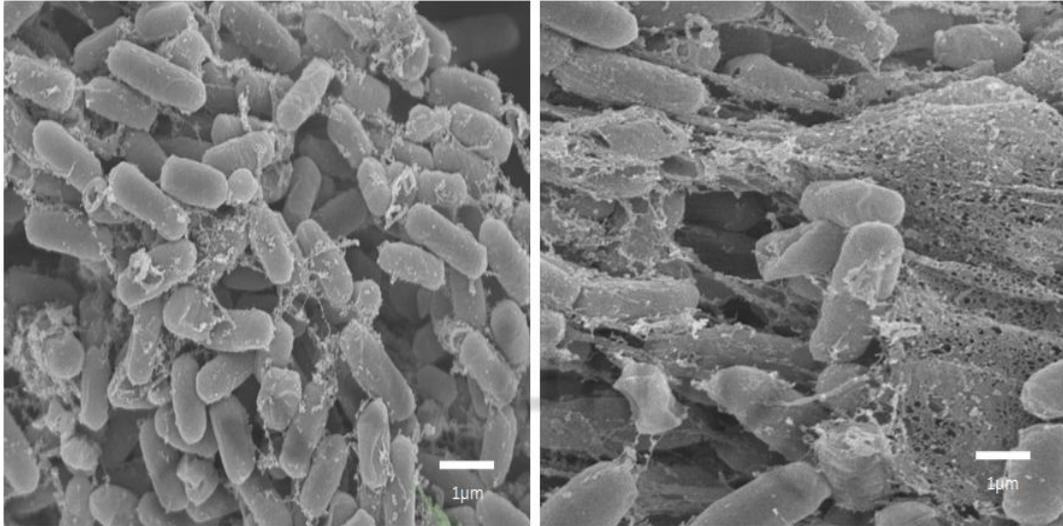


Fig. 3. Scanning electron micrograph of Strain BK6. Cells were grown at 30°C for 24 hours.

### 3) 공시균주 BK6의 생리학적 특성

공시균주의 생리학적 특성을 검토한 결과는 Table 3과 같다. 생육온도의 범위는 20~45°C 이었고, 생육 pH 범위는 6~10이었으며, 염농도 7%까지 생육이 가능하였다. 또한 미생물 동정용 kit인 API 20NE (Biomérieux, France)을 이용하여 실험한 후 그 결과를 판독 하였다.

### 4) 16S rRNA 염기서열

공시균주 BK6의 16S ribosomal RNA PCR 증폭을 통해 얻은 1399bp 염기서열을 NCBI (National Center Biotechnology Information)의 Basic Local Alignment Search Tool (BLAST)를 이용하여 분석한 결과 *Bacillus vallismortis*, *Bacillus amyloliquefacien*, *Bacillus subtilis*, *Bacillus sp.*와 각각 100% 상동성을 보였다. 따라서 이들을 alignment 한 결과를 Fig. 4에 나타내었다.

*Bacillus*속에서 분리균(BK6)과 가장 근연종으로 나타난 type strain(*Bacillus vallismortis*, *Bacillus amyloliquefacien*, *Bacillus subtilis*) 16S rRNA 염기서열과 *Bacillus*속의 type strain 16S rRNA 염기서열을 갖고 계통수를 작성하였다(Fig. 5). 분석결과 *B. vallismortis* BCRC 17183 (EF433404) 99.8%, *B. subtilis* NCDO

1769 (X60648) 99.5%, *B. licheniformis* DSM13 (X68416) 98.3% 와 묶여 있었으며, 공시균주는 *B. vallismortis*와 가장 가까운 근연종으로 나타내었다.

결과적으로 BK6가 16S rRNA 염기서열상 *B. vallismortis*와 가장 가까운 근연종으로 나타나 *B. vallismortis*와 동일종으로 판단 할 수 있다. 그러나 생리·생화학적 분석 결과를 보았을 때 기존에 Death valley soil에서 분리된(Roberts *et al.*, 1996) *B. vallismortis* 생리·생화학적결과와 catalase에서 다른 특성을 나타내었다.

*B. vallismortis*는 *B. subtilis*와 생화학적 성상과 유전적 거리가 매우 가깝다고 보고되고 있기 때문에 세포 지방산분석 및 DNA-DNA hybridization의 추가실험을 통해 Strain BK6를 명명할 필요가 있다. 즉 이번 연구에서 분리된 Strain BK6의 동정결과 *B. vallismortis* BK6로 명명하였다.

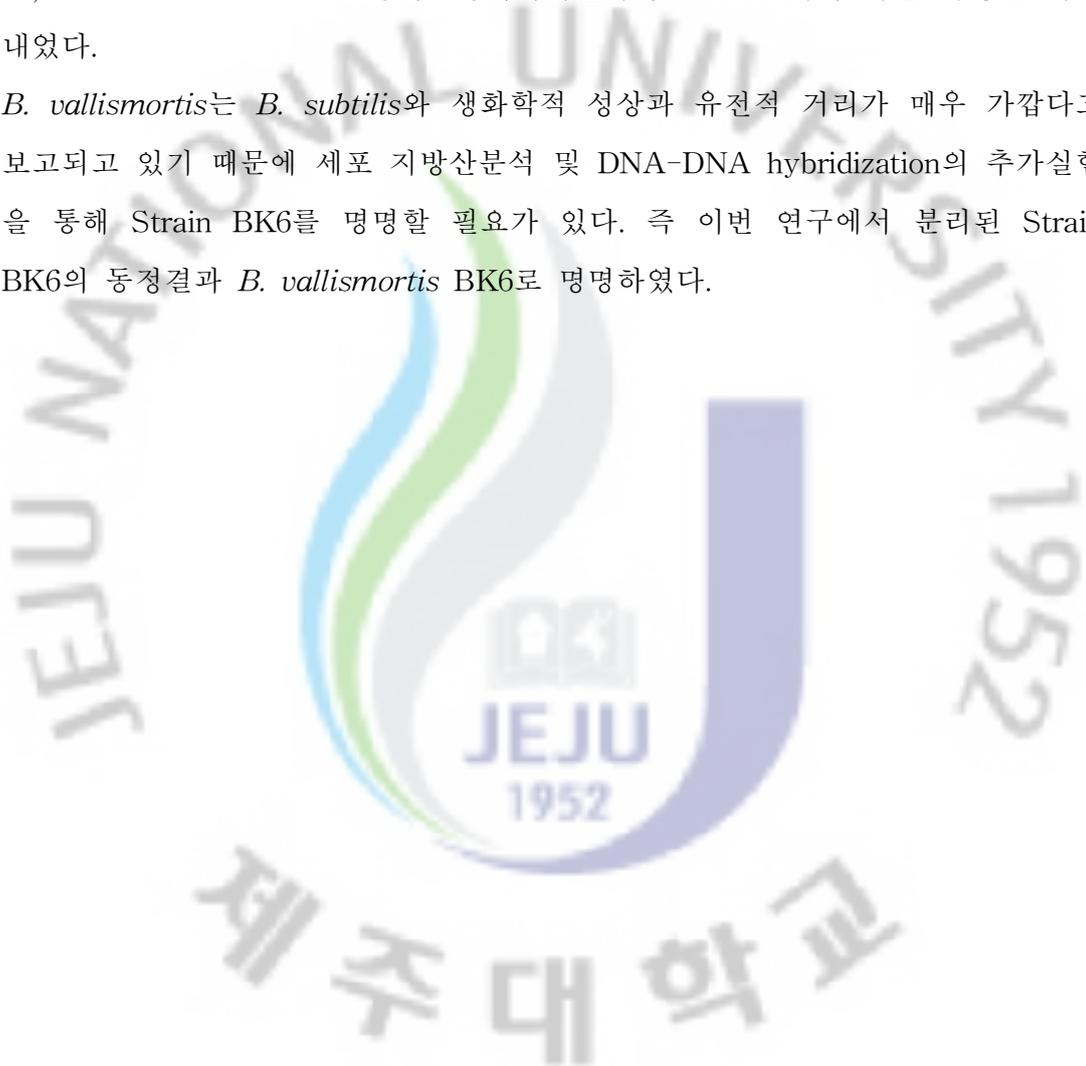


Table 3. Physiological characteristic of Strain BK6.

Characteristics	Reaction
<b>Morphological characterization</b>	
Morphology shape	rod
Gram stain	+
Motility	-
Spore formation	+
<b>Physiological characterization</b>	
Catalase	-
VP-test	+
Starch hydrolysis	+
Casein hydrolysis	+
NaCl 2%	+
NaCl 5%	+
NaCl 7%	+
Growth at 45°C	+
<b>Carbohydrate degradation</b>	
NO <sub>3</sub> potassium nitrate	+
L-tryptophane	-
D-glucose (fermentation)	-
L-arginine	-
Urea	-
Esculin ferric citrate	+
Gelatine (bovine origin)	+
4-nitrophenyl-βD-galactopyranoside	-
D-glucose	+
L-arabinose	+
D-mannose	+
D-mannitol	+
N-acetyl glucosamine	+
D-maltose	+
potassium gluconate	+
Capric acid	-
Adipic acid	-
Malic acid	+
Trisodium citrate	+
Phenylacetic acid	-

```

X60648      GAGAGTTTGATCCTGGCTCAGGACGAACGCTGGCGGCGTGCCTAATACATGCAAGTCGAG 60
X60605      GAGAGTTTGATCCTGGCTCAGGACGAACGCTGGCGGCGTGCCTAATACATGCAAGTCGAG 60
BK6         -----GCA-GTCGAG 9
EF433404    -----CGAACGCTGGCGGCGTGCCTAATACATGCAAGTCGAG 37
                *** *****

X60648      CGGACAGATGGGAGCTTGCTCCCTGATGTTAGCGGCGGACGGGTGAGTAACACGTGGGTA 120
X60605      CGGACAGATGGGAGCTTGCTCCCTGATGTTAGCGGCGGACGGGTGAGTAACACGTGGGTA 120
BK6         CGGACAGATGGGAGCTTGCTCCCTGATGTTAGCGGCGGACGGGTGAGTAACACGTGGGTA 69
EF433404    CGGACAGATGGGAGCTTGCTCCCTGATGTTAGCGGCGGACGGGTGAGTAACACGTGGGTA 97
                *****

X60648      ACCTGCCTGTAAGACTGGGATAACTCCGGGAAACCGGGGCTAATACCGGATGTTGTTTG 180
X60605      ACCTGCCTGTAAGACTGGGATAACTCCGGGAAACCGGGGCTAATACCGGATGTTGTTTG 180
BK6         ACCTGCCTGTAAGACTGGGATAACTCCGGGAAACCGGGGCTAATACCGGATGTTGTTTG 129
EF433404    ACCTGCCTGTAAGACTGGGATAACTCCGGGAAACCGGGGCTAATACCGGATGTTGTTTG 157
                *****

X60648      AACCGCATGGTTCAAACATAAAAGGTGGCTTCGGCTACCACTTACAGATGGACCCGCGGC 240
X60605      AACCGCATGGTTCAAACATAAAAGGTGGCTTCGGCTACCACTTACAGATGGACCCGCGGC 240
BK6         AACCGCATGGTTCCAGACATAAAAGGTGGCTTCGGCTACCACTTACAGATGGACCCGCGGC 189
EF433404    AACCGCATGGTTCAAACATAAAAGGTGGCTTCGGCTACCACTTACAGATGGACCCGCGGC 217
                *****

X60648      GCATTAGCTAGTTGGTGAGGTAACGGCTCACCAAGGCAACGATGCGTAGCCGACCTGAGA 300
X60605      GCATTAGCTAGTTGGTGAGGTAACGGCTCACCAAGGCGACGATGCGTAGCCGACCTGAGA 300
BK6         GCATTAGCTAGTTGGTGAGGTAACGGCTCACCAAGGCGACGATGCGTAGCCGACCTGAGA 249
EF433404    GCATTAGCTAGTTGGTGAGGTAACGGCTCACCAAGGCAACGATGCGTAGCCGACCTGAGA 277
                *****

X60648      GGGTGATCGGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAG 360
X60605      GGGTGATCGGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAG 360
BK6         GGGTGATCGGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAG 309
EF433404    GGGTGATCGGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAG 337
                *****

X60648      GGAATCTTCGCAATGGACGAAAGTCTGACGGAGCAACGCCGCGTGAGTGATGAAGGTTT 420
X60605      GGAATCTTCGCAATGGACGAAAGTCTGACGGAGCAACGCCGCGTGAGTGATGAAGGTTT 420
BK6         GGAATCTTCGCAATGGACGAAAGTCTGACGGAGCAACGCCGCGTGAGTGATGAAGGTTT 369
EF433404    GGAATCTTCGCAATGGACGAAAGTCTGACGGAGCAACGCCGCGTGAGTGATGAAGGTTT 397
                *****

X60648      TCGGATCGTAAAGCTCTGTTGTTAGGGAAGAACAAGTGCCGTTCAAATAGGCGGCACCT 480
X60605      TCGGATCGTAAAGCTNTGTTGTTAGGGAAGAACAAGTGCCGTTCAAATAGGCGGNACCT 480
BK6         TCGGATCGTAAAGCTCTGTTGTTAGGGAAGAACAAGTGCCGTTCAAATAGGCGGCACCT 429
EF433404    TCGGATCGTAAAGCTCTGTTGTTAGGGAAGAACAAGTGCCGTTCAAATAGGCGGCACCT 457
                *****

X60648      TGACGGTACCTAACGAGAAAGCCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTA 540
X60605      NGACGGTACCTAACGAGAAAGCCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTA 540
BK6         TGACGGTACCTAACGAGAAAGCCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTA 489
EF433404    TGACGGTACCTAACGAGAAAGCCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTA 517
                *****

```

Fig. 4. Alignment of 16S rRNA sequence of the isolated Strain BK6.

X60648 : *Bacillus subtilis*, X60605 : *Bacillus amyloliquefacien*

EF433404 : *Bacillus vallismortis*

X60648 GGTGGCAAGCGTTNTCCGGAATTATTGGGCGTAAAGGGCTCGCAGGCGGTTTCTTAAGTC 600  
X60605 GGTGGCNAGCGTTGTCCGGAATTNTTGGGCGTNAAGGGCTCGCAGGCGGTTTCTTNAAGTC 600  
BK6 GGTGGCAAGCGTTGTCCGGAATTATTGGGCGTAAAGGGCTCGCAGGCGGTTTCTTAAGTC 549  
EF433404 GGTGGCAAGCGTTGTCCGGAATTATTGGGCGTAAAGGGCTCGCAGGCGGTTTCTTAAGTC 577  
\*\*\*\*\*

X60648 TGATGTGAAAGCCCCGGCTCAACCGGGGAGGGTCATTGAAACTGGGGAACCTGAGTGC 660  
X60605 TGATGTGAAAGCCCCGGCTCAACCGGGGAGGGTCATTGAAACTGGGGAACCTGAGTGC 660  
BK6 TGATGTGAAAGCCCCGGCTCAACCGGGGAGGGTCATTGAAACTGGGGAACCTGAGTGC 609  
EF433404 TGATGTGAAAGCCCCGGCTCAACCGGGGAGGGTCATTGAAACTGGGGAACCTGAGTGC 637  
\*\*\*\*\*

X60648 AGAAGAGGAGAGTGGAATTCACGTGTNGCGGTGAAATGCGTAGAGATGTGGAGGAACAC 720  
X60605 AGAAGAGGAGAGTGGAATTCACGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGATGTGGAGGAACAC 720  
BK6 AGAAGAGGAGAGTGGAATTCACGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGATGTGGAGGAACAC 669  
EF433404 AGAAGAGGAGAGTGGAATTCACGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGATGTGGAGGAACAC 697  
\*\*\*\*\*

X60648 CAGTGGCGAAGGCGACTCTCTGGTCTGTAAGTACGCTGAGGAGCGAAAGCGTGGGGAGC 780  
X60605 CAGTGGCGAAGGCGACTCTCTGGTCTGTAAGTACGCTGAGGAGCGAAAGCGTGGGGAGC 780  
BK6 CAGTGGCGAAGGCGACTCTCTGGTCTGTAAGTACGCTGAGGAGCGAAAGCGTGGGGAGC 729  
EF433404 CAGTGGCGAAGGCGACTCTCTGGTCTGTAAGTACGCTGAGGAGCGAAAGCGTGGGGAGC 757  
\*\*\*\*\*

X60648 GAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAACGATGAGTGCTAAGTGTAGGGG 840  
X60605 GAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAACGATGAGTGCTAAGTGTAGGGG 840  
BK6 GAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAACGATGAGTGCTAAGTGTAGGGG 789  
EF433404 GAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAACGATGAGTGCTAAGTGTAGGGG 817  
\*\*\*\*\*

X60648 GTTTCGCCCCTTAGTGCTGCAG-TAACGCATTNAGCACTCCGCCTGGGGAGTACGGTGC 899  
X60605 GTTTCGCCCCTTAGTGCTGCAG-TAACGCATTNAGCACTCCGCCTGGGGAGTACGGTGC 899  
BK6 GTTTCGCCCCTTAGTGCTGCAGTAACGCATTNAGCACTCCGCCTGGGGAGTACGGTGC 849  
EF433404 GTTTCGCCCCTTAGTGCTGCAGTAACGCATTNAGCACTCCGCCTGGGGAGTACGGTGC 877  
\*\*\*\*\*

X60648 CAAGACTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGGCC-GCACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTA 958  
X60605 CAAGACTNAAACTCAAAGGAATTGACGGGGGCC-GCACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTA 958  
BK6 CAAGACTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGGCCGACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTA 909  
EF433404 CAAGACTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGGCCGACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTA 937  
\*\*\*\*\*

X60648 ATTCGAAGCAACGCGAAGAACCTTACCAGGTCTTGACATCCTCTGACAATCCTAGAGATA 1018  
X60605 ATTCGAAGCAACGCGAAGAACCTTACCAGGTCTTGACATCCTCTGACAATCCTAGAGATA 1018  
BK6 ATTCGAAGCAACGCGAAGAACCTTACCAGGTCTTGACATCCTCTGACAATCCTAGAGATA 969  
EF433404 ATTCGAAGCAACGCGAAGAACCTTACCAGGTCTTGACATCCTCTGACAATCCTAGAGATA 997  
\*\*\*\*\*

Fig. 4. Continued

X60648 GGACGTC---TTCGGGGGCAGAGTGACAGGTGGTGCATGGTTGTCGTAGCTCGTGTCTG 1075  
X60605 GGACGTC---TTCGGGGGCAGAGTGACAGGTGGTGCATGGTTGTCGTAGCTCGTGTCTG 1075  
BK6 GGACGTCCCCTTCGGGGGCAGAGTGACAGGTGGTGCATGGTTGTCGTAGCTCGTGTCTG 1029  
EF433404 GGACGTCCCCTTCGGGGGCAGAGTGACAGGTGGTGCATGGTTGTCGTAGCTCGTGTCTG 1057  
\*\*\*\*\*

X60648 GAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCTGGATCTTAGTTGCCAGCATTTCAG 1135  
X60605 GAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCTGGATCTTAGTTGCCAGCATTTCAG 1135  
BK6 GAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCTGGATCTTAGTTGCCAGCATTTCAG 1089  
EF433404 GAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCTGGATCTTAGTTGCCAGCATTTCAG 1117  
\*\*\*\*\*

X60648 TTGGGCACTCTAAGGTGACTGCCGGTGACAAACCGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAAT 1195  
X60605 TTGGGCACTCTAAGGTGACTGCCGGTGACAAACCGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAAT 1195  
BK6 TTGGGCACTCTAAGGTGACTGCCGGTGACAAACCGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAAT 1149  
EF433404 TTGGGCACTCTAAGGTGACTGCCGGTGACAAACCGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAAT 1177  
\*\*\*\*\*

X60648 CATCATGCCCCTTATGACCTGGGCTACACACGTGCTACAATGGACAGAACAAGGGCAGC 1255  
X60605 CATCATGCCCCTTATGACCTNGGCTACACACGTGCTACNATGGGCAGAACNAAGGGCAGC 1255  
BK6 CATCATGCCCCTTATGACCTGGGCTACACACGTGCTACAATGGACAGAACAAGGGCAGC 1209  
EF433404 CATCATGCCCCTTATGACCTGGGCTACACACGTGCTACAATGGACAGAACAAGGGCAGC 1237  
\*\*\*\*\*

X60648 GAAACCGCGAGGTTAAGCCAATCCCACAAATCTGTTCTCAGTTCGGATCGCAGTCTGCAA 1315  
X60605 GAAACCGCGAGGTTAAGCCAATCCCACAAATCTATTCTCAGTTCGGATCGCAGTCTGCAA 1315  
BK6 GAAACCGCGAGGTTAAGCCAATCCCACAAATCTGTTCTCAGTTCGGATCGCAGTCTGCAA 1269  
EF433404 GAAACCGCGAGGTTAAGCCAATCCCACAAATCTGTTCTCAGTTCGGATCGCAGTCTGCAA 1297  
\*\*\*\*\*

X60648 CTCGACTGCGTGAAGCTGGAATCGCTAGTAATCGCGGATCAGCATGCCGCGGTGAATACG 1375  
X60605 CTCGACTGCGTGAAGCTGGAATCGCTAGTAATCGCGGATCAGCATGCCGCGGTGAATACG 1375  
BK6 CTCGACTGCGTGAAGCTGGAATCGCTAGTAATCGCGGATCAGCATGCCGCGGTGAATACG 1329  
EF433404 CTCGACTGCGTGAAGCTGGAATCGCTAGTAATCGCGGATCAGCATGCCGCGGTGAATACG 1357  
\*\*\*\*\*

X60648 TTCCCGGGCCTTGTACACACCGCCCGTCACACCACGAGAGTTTGTAAACACC----- 1427  
X60605 TTCCCGGGCCTTGTACACACCGCCCGTCACACCACGAGAGTTTGTAAACACC----- 1427  
BK6 TTCCCGGGCCTTGTACACACCGCCCGTCACACCACGAGAGTTTGTAAACACCCGAAGTCGG 1389  
EF433404 TTCCCGGGCCTTGTACACACCGCCCGTCACACCACGAGAGTTTGTAAACACCCGAAGTCGG 1417  
\*\*\*\*\*

X60648 -----  
X60605 -----  
BK6 TGAGGTAACC----- 1399  
EF433404 TGAGGTAACCTTTTAGGAGCCAGCCGCCGAAGGTGGGACAGATGATTGGGG 1468

Fig. 4. Continued

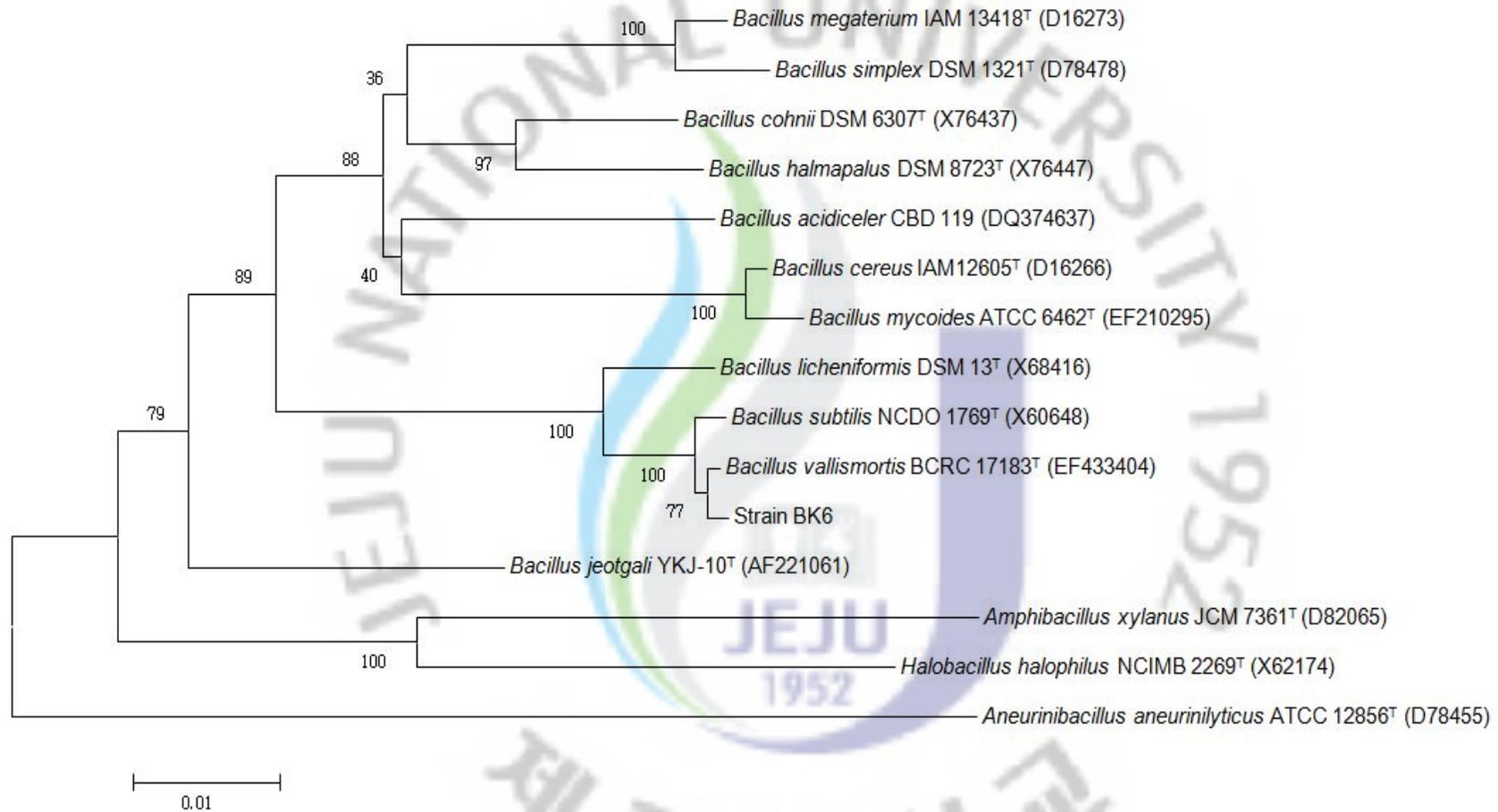


Fig. 5. Neighbour-joining phylogenetic tree based on 16S rRNA gene sequences showing the position of Stain BK6 within the radiation of the genus *Bacillus*. Bootstrap percentage (from 1000 replications) > 50% are shown at branch points. Bar, 0.01 substitutions per nucleotide position.

### 3. 공시균주의 생육과 항균활성 검토

*Bacillus vallismortis* BK6가 최적으로 분비할 수 있는 항균물질 생산을 위하여 요구되는 영양원을 탄소원, 질소원, 무기염으로 나누어서 균생육과 항균활성을 측정하였다. 또한 최적 배양조건을 온도와 pH를 다르게 하여 균생육과 항균활성을 검토하였다. 최적 배지성분 검토는 glucose 0.5%, yeast extract 0.1%, MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 0.02%를 함유한 GY배지를 사용하였다.

#### 1) 탄소원의 영향

각종 배지성분은 항균물질생산에 중요한 것으로 알려져 있기 때문에 탄소원의 종류가 미생물의 생육에 미치는 영향을 조사하여 Fig. 6에 나타내었으며 대조구는 GY배지에 탄소원을 제외시킨 배지를 사용하였다.

*Bacillus vallismortis* BK6는 탄소원 중에서 soluble starch, maltose 및 mannose 등의 첨가 순으로 잘 이용 하였으나 arabinose, rhamnose 및 fructose의 순서로 생육에 영향을 미치지 않는 것으로 나타났다. 그리고 *S. parauberis*에 대한 항균활성을 조사한 결과, soluble starch, mannose 및 rhamnose 등을 첨가한 시험구에서 높게 나타났다. 따라서 위의 결과로 *Bacillus vallismortis* BK6의 항균활성은 균의 생육과 관계가 깊은 것으로 판단되었으며, 최종적으로 최적 탄소원은 soluble starch로 결정하였다. *Bacillus vallismortis* BK6의 생육 및 항균활성에 가장 효과적인 soluble starch의 최적 첨가 농도를 검토한 결과(Fig.7) 1% 첨가가 균생육이 높았으나 2~4%는 1%의 비해 절반에 못 미쳤으며, 5% 첨가구는 2~4% 보다 높은 생육을 보였다. 하지만 항균활성은 1% 첨가구가 가장 높은 것으로 조사되었으며 그 이상의 농도는 완만하게 감소하는 경향을 보였다. 따라서 soluble starch의 최적 첨가농도를 1%로 결정하였다.

기존에 보고에 의하면 (Jhon *et al.*, 1991)은 탄소원으로 glucose가 첨가되었을 때 streptococin A-FF22 생산이 증대되는 반면, streptococin B-74628의 경우에는 감소하는 것으로 보아 항균물질은 미생물의 종류에 따라 최적 탄소원의 종류 또한 다양한 것으로 사료된다.

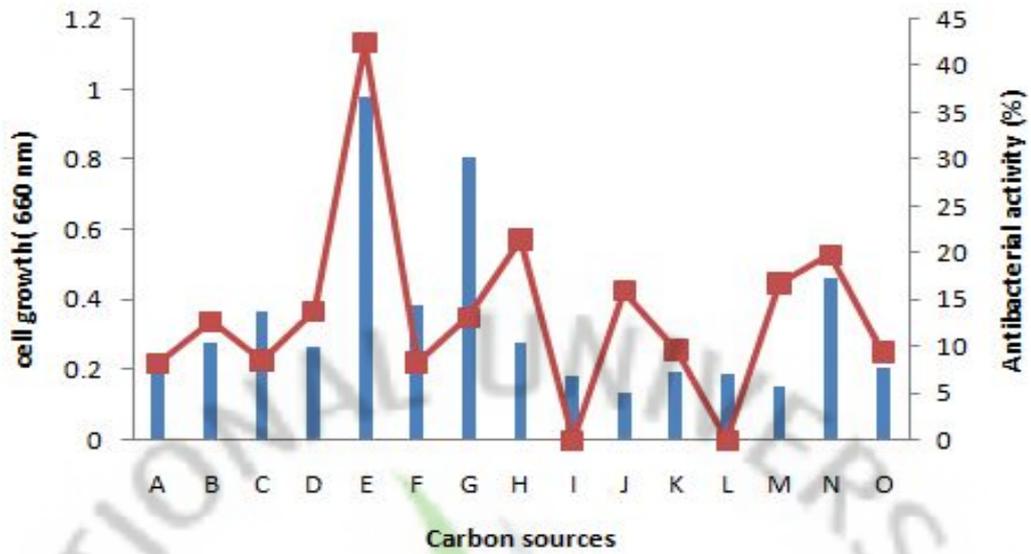


Fig. 6. Effect of various carbon sources on cell growth and antibacterial activity of culture broth of the isolated *B. vallismortis* BK6.

A: Control, B: Glucose, C: Sorbitol, D: Mannitol, E: Soluble starch, F: Xylose, G: Maltose, H: Lactose, I: Fructose, J: Arabinose, K: Raffinose, L: Sucrose, M: Rhamnose, N: Mannose, O: Galactose

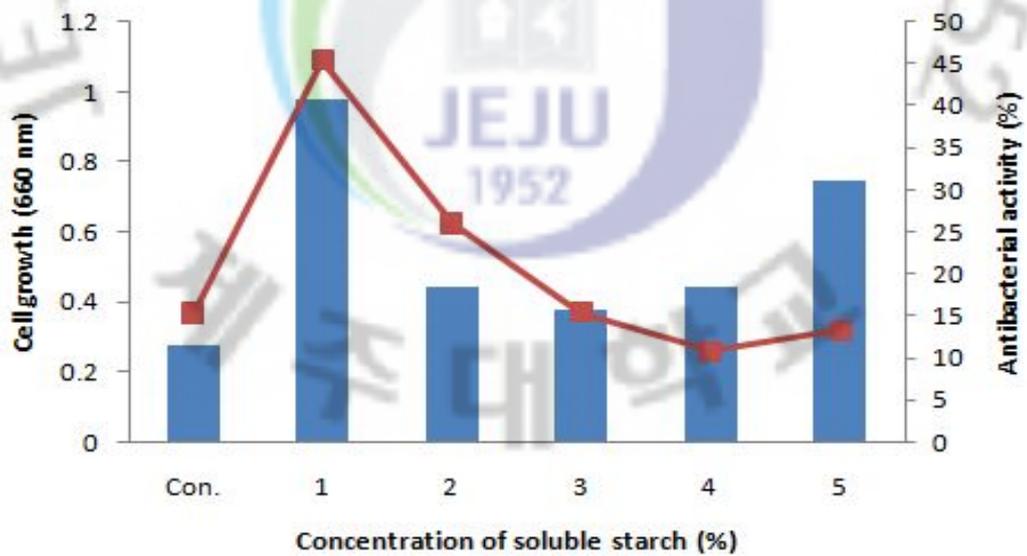


Fig. 7. Effect of concentrations of soluble starch on cell growth and antibacterial activity of culture broth of the isolated *B. vallismortis* BK6.

## 2) 질소원의 영향

*Bacillus vallismortis* BK6 균주의 생육에 미치는 질소원의 영향을 검토하여 Fig. 8에 나타내었다. 대조구는 GY배지에 1% soluble starch를 첨가하고 질소원을 제외한 배지를 사용하였다. 균주의 생육은  $\text{NaNO}_3$ , yeast extract 및 malt extract 첨가 순으로 성장이 높은 것을 확인하였으며, 항균활성은 대조구를 제외하고 모든 실험구에서 35~45%의 항균활성을 나타내었다. 질소원을 전혀 첨가하지 않은 대조구만 보았을 경우 탄소원을 제외한 대조구 배지에서 생육보다 낮은 생육을 보이고 있어 질소원 첨가가 *Bacillus vallismortis* BK6의 생육에 중요한 역할을 한다고 생각된다. 실험구 중에서 비교하였을 경우 yeast extract, peptone 및 malt extract와 같은 유기질소원에서 대체적으로 높은 생육을 보였으며, yeast extract는 45% 가까운 항균활성을 보였다. 또한 무기질소원은  $\text{NaNO}_3$ 가 가장 높은 생육과 항균활성을 나타내었다.

따라서 유기질소원인 yeast extract와 무기질소원인  $\text{NaNO}_3$ 를 질소원으로 선정하였으며, 질소원을 yeast extract :  $\text{NaNO}_3$  (1:1)비율로 첨가하여 최적농도를 조사하였다(Fig.9). 그 결과 yeast extract 및  $\text{NaNO}_3$ 를 단독으로 첨가한 실험구보다 1% (0.5%+0.5%)로 혼합첨가한 배지에서 더 높은 항균활성을 나타내었으며 균생육 또한 양호한 것으로 조사되었다. 이상의 결과로 *Bacillus vallismortis* BK6 균주를 배양할 때 질소원으로는 yeast extract와  $\text{NaNO}_3$ 를 각각 0.5%씩 혼합하여 첨가하였다.

Chun 등(2000)이 *B. alkalophilshaggy* JY-827 균주로부터 Bacteriocin 생산조건을 검토할 때  $\text{KNO}_3$ 를 포함한 무기질소원들 보다 yeast extract를 비롯한 유기질소원들이 효과적이라고 보고하였으며, Shomura 등(1983)은 *Micrommonospora* sp. SF-1927에 의한 항진균성 물질을 생산할 때 yeast extract가 가장 효과적이라는 보고와도 유사하였다. Park 등(2007)과 Ryu 등(2007)이 발표한 논문에는 *Bacillus subtilis*의 질소원 단독첨가보다 두 종류의 혼합첨가가 균생육과 항균활성이 더 양호하다는 결과가 이루어져 본 연구의 질소원 혼합첨가가 더 효과적이라는 점과 일치한다.

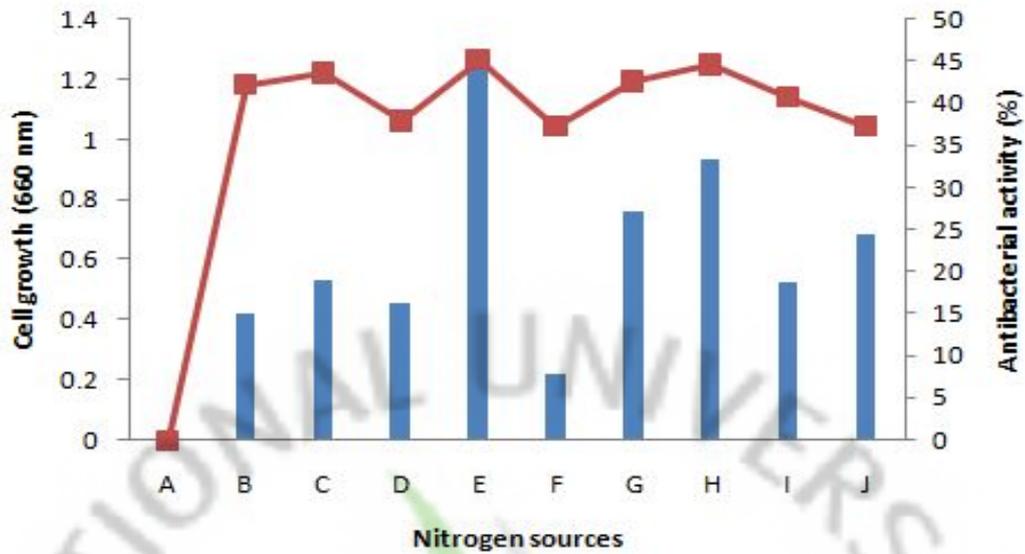


Fig. 8. Effect of various nitrogen sources on cell growth and antibacterial activity of culture broth of isolated *B. vallismortis* BK6.

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

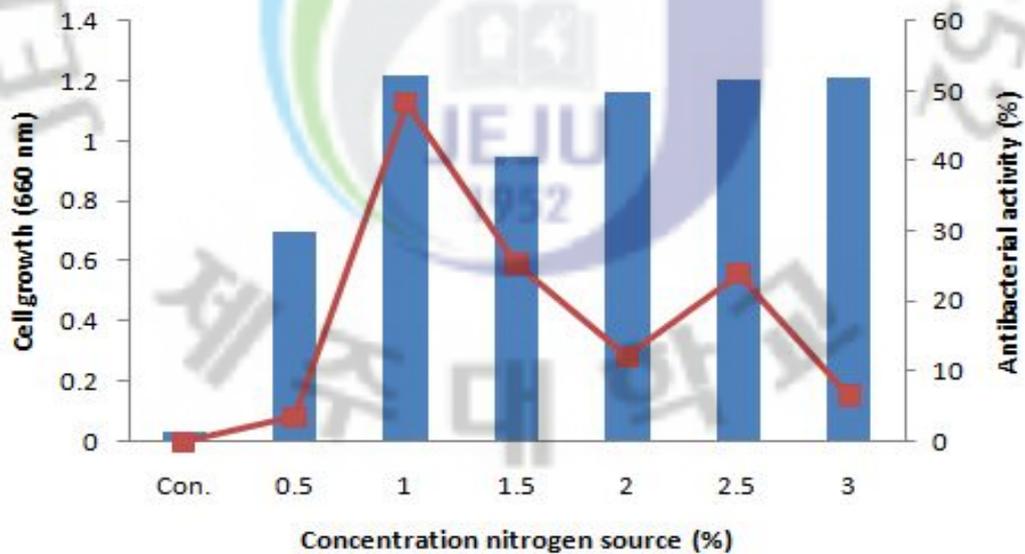


Fig. 9. Effect of concentration of yeast extract plus  $\text{NaNO}_3(1:1)$  on cell growth and antibacterial activity of culture broth of the isolated *B. vallismortis* BK6.

### 3). 무기염의 영향

무기염의 영향은 soluble starch 1%, yeast extract 0.5% 및  $\text{NaNO}_3$  0.5%를 각각 첨가한 후 각종무기염의 농도를 0.1% 농도로 첨가하여 검토하였다(Fig.10). 균생육은  $\text{K}_2\text{HPO}_4$ ,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  및  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 의 등을 첨가한 실험구 순으로 균주의 생육이 높았으며  $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ ,  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$  및  $\text{ZnCl}_2$  등의 금속염을 첨가한 실험구는 생육이 크게 억제되었다. 또한 항균활성은  $\text{K}_2\text{HPO}_4$ ,  $\text{NaCl}$  및  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  순으로 높은 활성을 나타내었다.

따라서 균주생육과 항균활성이 양호했던  $\text{K}_2\text{HPO}_4$ 와  $\text{NaCl}$ 을 *B. vallismortis* BK6의 무기염으로 선정하였으며,  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  :  $\text{NaCl}$  (1:1)비율로 첨가하여 최적농도를 검토하였다(Fig. 11). 그 결과  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  및  $\text{NaCl}$ 를 단독으로 첨가한 실험구보다 0.1% (0.05%+0.05%)로 혼합첨가한 배지에서 양호한 항균활성을 나타내었으며 균생육 또한 양호한 것으로 조사되었다. 이상의 결과로 *Bacillus vallismortis* BK6 균주를 배양할 때 무기염으로는  $\text{K}_2\text{HPO}_4$ 와  $\text{NaCl}$ 를 각각 0.05%씩 혼합하여 첨가하였다.

Chun 등(2000)이 *B. alkalophilshaggy* JY-827 균주로부터 Bacteriocin 생산을 위한 배지의 무기염류를 조사한 결과,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ 를 사용하였을 때 우수한 성능을 보인 반면,  $\text{BaCl}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 를 제외한  $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ,  $\text{CuSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ ,  $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ ,  $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  및  $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  등의 금속염 사용 시 생산능이 저하되었다는 보고와 유사하였다. Yoo 등(1994)의 연구에도  $\text{KCl}$ 을 첨가 하였을 때, 가장 양호한 결과를 보였으나 금속염 첨가에서는 그 생산능이 현격히 감소하였다고 보고하였다.

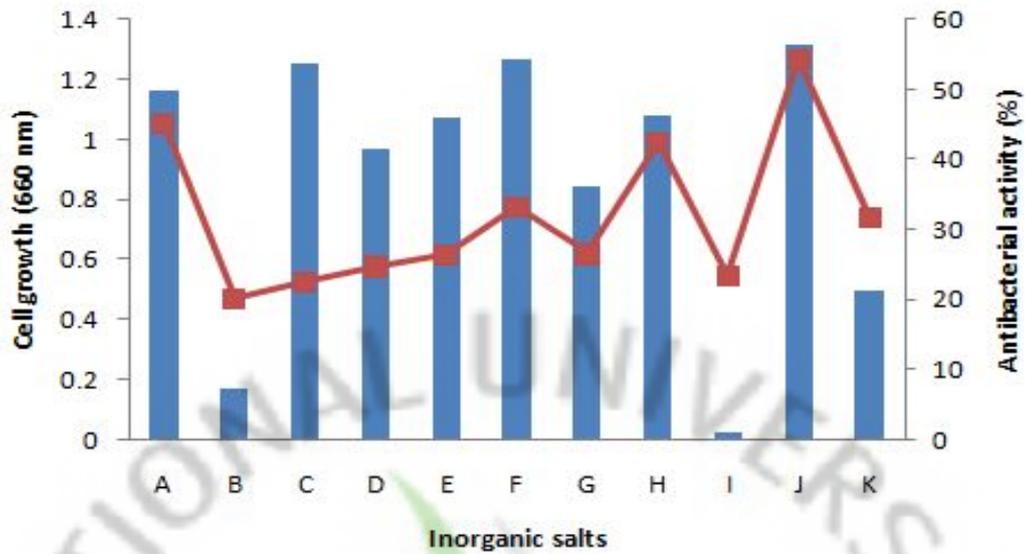


Fig. 10. Effect of various inorganic salts on cell growth and antibacterial activity of the isolated *B. vallismortis* BK6.

A: Control, B:  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ , C:  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , D:  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ,  
 E:  $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ , F:  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , G:  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , H:  $\text{NaCl}$ ,  
 I:  $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ , J:  $\text{K}_2\text{HPO}_4$ , K:  $\text{ZnCl}_2$

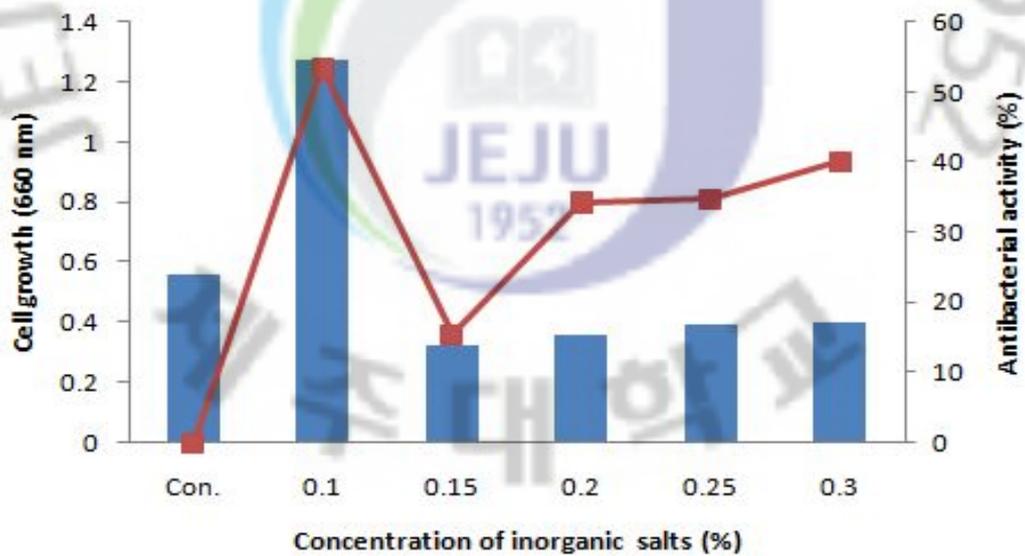


Fig. 11. Effect of concentration of  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  plus  $\text{NaCl}(1:1)$  on cell growth and antibacterial activity of culture broth of the isolated *B. vallismortis* BK6.

#### 4) 최적 온도, pH의 따른 생육과 항균물질 생산

배양온도가 *B. vallismortis* BK6의 생육 및 항균물질 생산에 미치는 영향을 검토하여 Fig. 12에 나타내었다. 배양온도를 20~50의 범위로 변화시키면서 배양한 결과 25~35℃ 사이에 생육이 왕성하였으며, 15, 20, 40℃의 생육은 미미하였다.

유해미생물의 대한 항균활성은 20~30℃범위에서 높게 나타났다. 하지만 균주의 왕성한 생육을 보인 35℃에서는 항균활성이 거의 나타나지 않았다. 따라서 *B. vallismortis* BK6가 생육하는데 최적온도를 25℃로 결정하였다.

Shin 등(2000)은 *Bacillus* sp. 균주의 생육과 항생물질의 생산이 35℃에서 최대가 되었다는 보고가 있어 분리한 Strain BK6와 다른 적온을 나타내었다.

*B. vallismortis* BK6가 생육하는데 pH의 영향을 조사하여 Fig. 13에 나타내었다. 배지의 pH를 4~10 으로 조절하고 25℃에서 24시간 배양한 결과 pH 6~9의 범위에서 균생육은 완성하게 일어났지만, *S. parauberis*에 대한 항균활성은 pH 8~9범위에서 높게 나타났다. 이상의 결과로 *B. vallismortis* BK6 균주의 생육 및 항균물질 생산을 위한 배지의 pH는 pH 8~9로 결정하였다.

Joo 등(2002)과 Jung 등(2003)은 각각 *Bacillus ehimensis*와 *Bacillus megaterium*이 초기 pH 8일 때 항생물질의 생산이 최대가 된다고 보고하여 본 실험 결과와 일치하는 경향을 나타내었다.

#### 5) 배양시간에 따른 항균물질의 생산

*B. vallismortis* BK6를 배양할 때 배양시간에 따른 균생육과 항균물질의 생산에 미치는 영향을 검토하여 Fig. 15.에 나타내었다. 균생육은 36시간까지 완만하게 증가하다가 균생육이 더 이상 증가하지 않는 정지기를 보였다. *S. parauberis*의 항균활성은 3~21시간까지 나타나지 않았으며 24시간부터 36시간까지 서서히 증가하는 경향을 보였다. 36시간부터 72시간까지 항균활성도 균생육과 같이 비슷한 경향을 보였다. 이상의 결과로 균생육과 항균활성이 가장 높은 36시간을 *B. vallismortis* BK6의 배양시간으로 결정하였다.

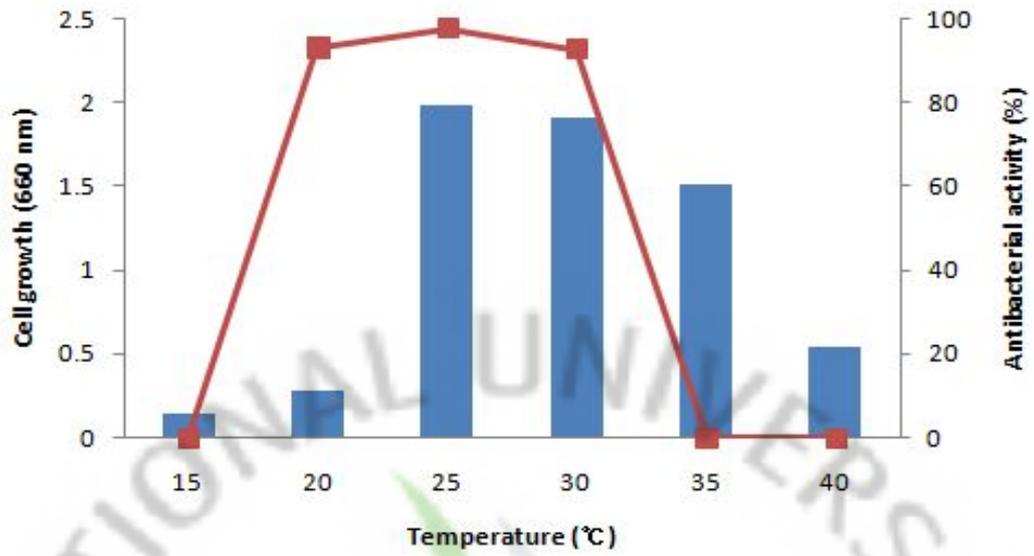


Fig. 12. Effect of temperature on cell growth and antibacterial activity of *B. vallismortis* BK6.

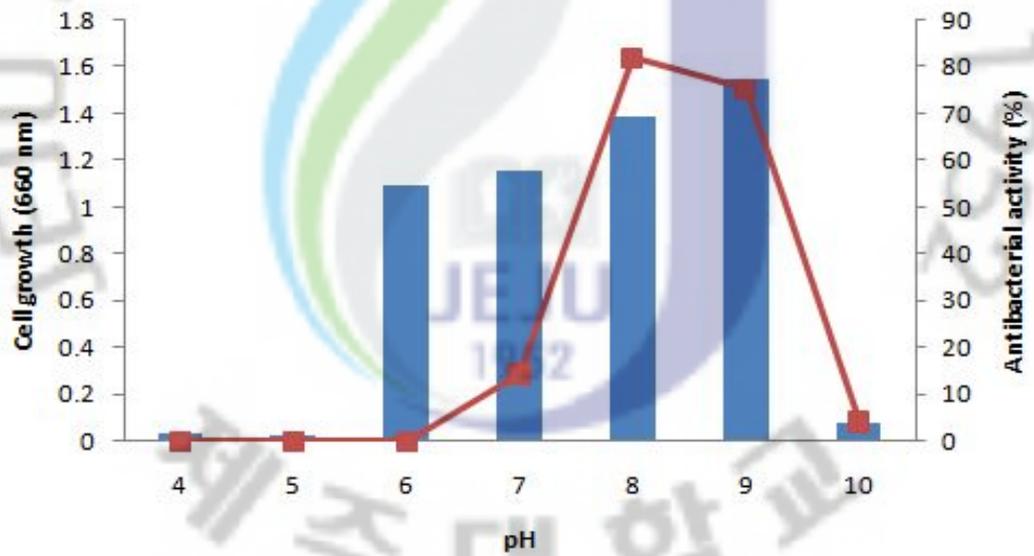


Fig. 13. Effect of pH on cell growth and antibacterial activity of *B. vallismortis* BK6.

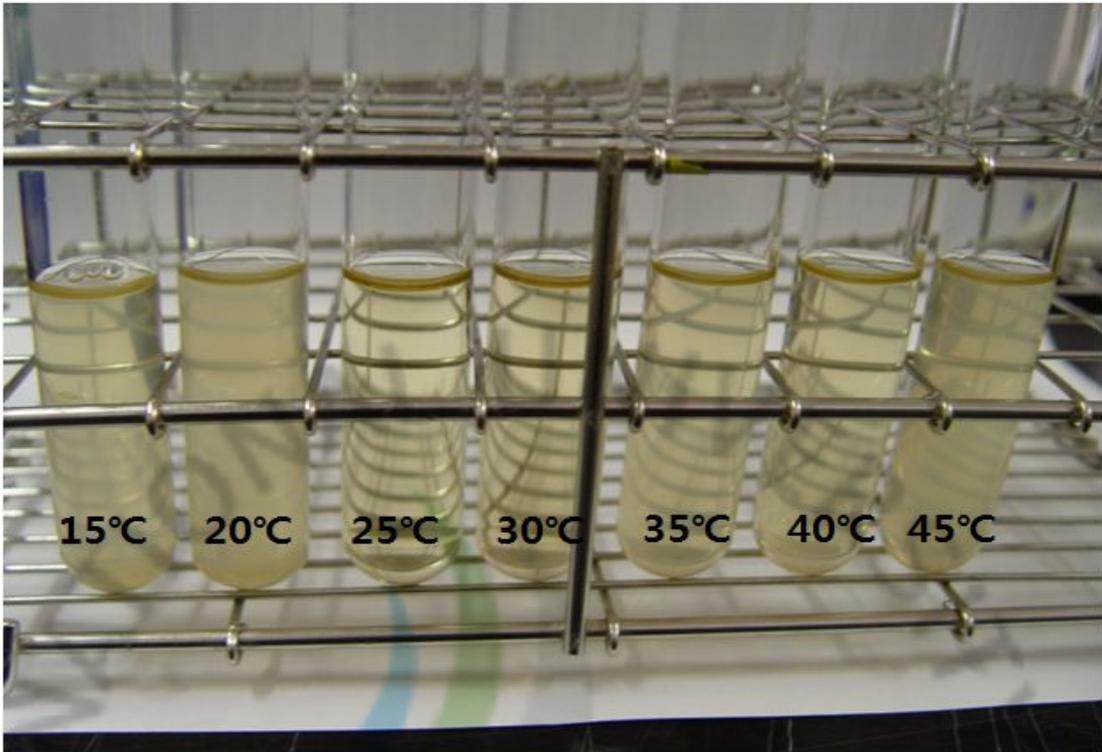


Fig. 14. Antibacterial activity of the culture broth of *B. vallismortis* BK6 by liquid culture method.

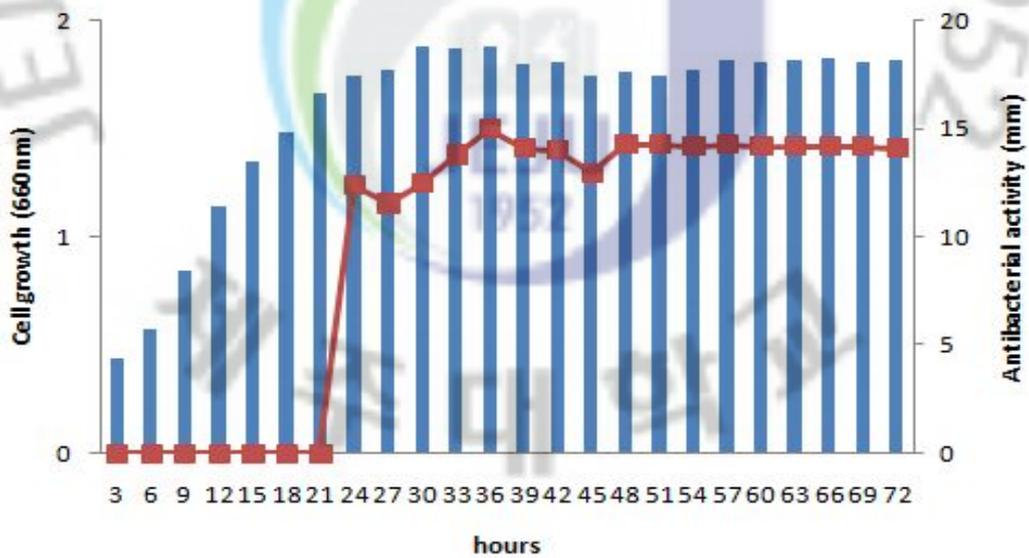


Fig. 15. Effect of culture time on cell growth and antibacterial activity of *B. vallismortis* BK6.

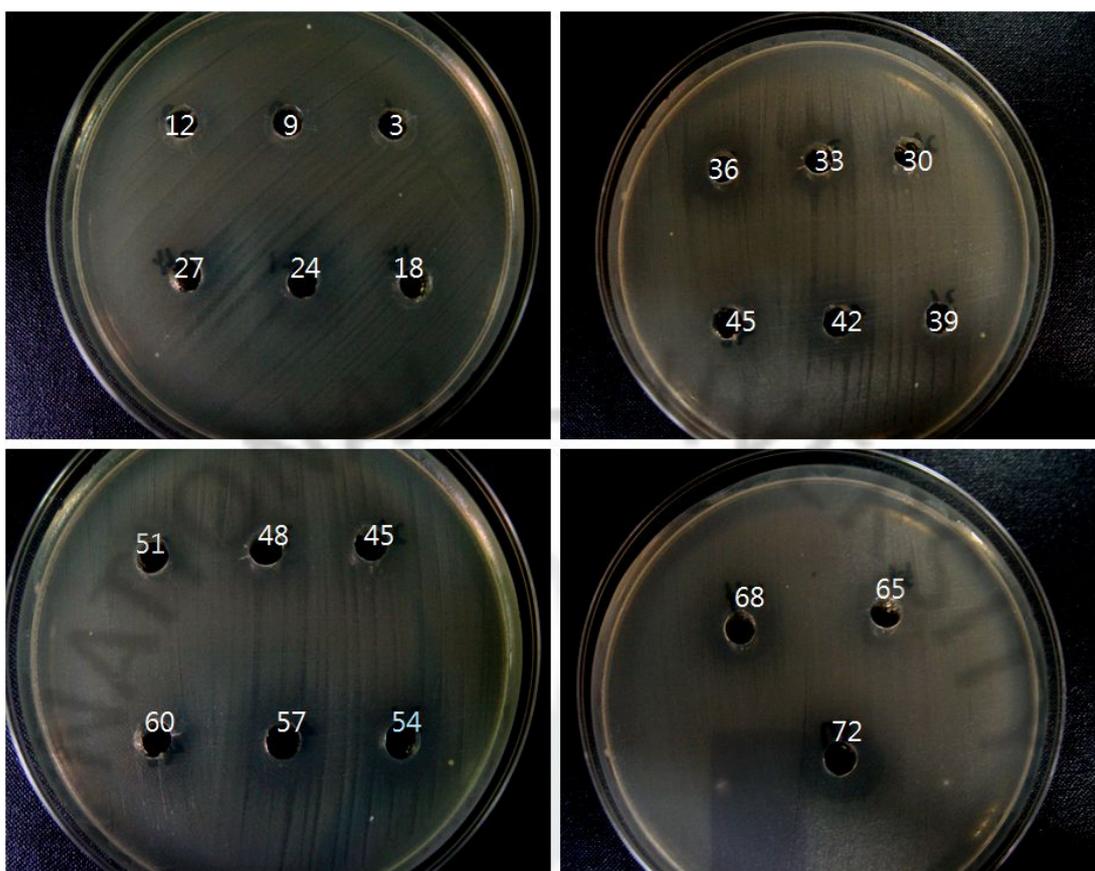


Fig. 16. Antibacterial activity of the culture broth of *B. vallismortis* BK6 cultured for 72 hours against *S. parauberis*.

Table 4. Optimum medium compositions and culture conditions for antibiotic production by *B. vallismortis* BK6.

Ingredient	Concentration (w/v, %)
Soluble starch	1
Yeast extract	0.5
NaNO <sub>3</sub>	0.5
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0.05
NaCl	0.05

Temperature : 25°C, pH : 8.0, Culture time : 36 hours

6) 항균물질의 안정성

*B. vallismortis* BK6 배양 상등액의 열처리, pH 및 효소처리에 대한 항균활성을 agar spotted method를 통해 확인하였다(Table 5). 열처리에 의한 배양 상등액의 항균물질은 모든 열처리구에서 활성을 잃어버리는 결과를 보였다. 효소처리에 의한 항균활성 변화를 관찰한 결과 Trypsin, Protease, Proteinase K, Lipase,  $\alpha$ -chymotrypsin 처리에 의해서는 대조구 보다 약 10% 낮은 항균활성을 보였으며, Lysozyme 과  $\alpha$ -amylase는 이보다 좀 낮은 항균활성을 보였다. Pepsin 처리구는 항균활성이 상실되어 억제환을 보이지 않았다. pH에 의한 안정성은 대조구에 비해 모든 pH에서 양호한 항균활성을 보였다. 낮은 pH와 높은 pH에서 양호한 항균활성을 보인 것은 pH를 각각 조절한 뒤 모든 처리구의 조건을 동일시 하기위해 pH를 8~9로 조정하는 과정에서 HCl과 NaOH의 영향을 받은 것으로 사료된다. 따라서 Strain BK6에 의해 분비되는 주 항균물질은 pepsin과 열처리에 활성을 잃어버리는 구조를 지닌 단백질성 물질이라 추측된다.

Table 5. The effect of different physical and biochemical treatments on antibacterial activity of supernatant.

Treatment	Inhibition zone(mm)	Treatment	Inhibition zone(mm)
Control	15.54	pH 3.5	13.09
Trypsin	13.42	pH 4.5	15.30
Protease	13.03	pH 5.5	11.03
Proteinase K	12.83	pH 10.5	14.34
Lipase	13.10	pH 11.5	15.32
Lysozyme	12.97	50°C for 3min	-
$\alpha$ -amylase	11.41	60°C for 3min	-
$\alpha$ -chymotrypsin	13.34	80°C for 3min	-
Pepsin	-	100°C for 3min	-

#### 4. 항균물질 추출물에 대한 항균활성

*B. vallismortis* BK6의 배양 상등액을 EtOAc와 BuOH로 추출한 결과 노란색의 물질을 얻었으며, 추출 수율은 각각 137.6 mg/ml, 58.8 mg/ml였다. 이 조추출물을 증류수로 30, 25, 20, 15, 10, 5, 2.5, 1, 0.5, 0.1mg/ml 농도로 희석하여 agar spot method를 이용하여 항균활성을 측정하였다(Table 6., Fig. 17). 그 결과 두 조추출물은 농도가 증가 할수록 항균활성이 증가함을 보였으며, *S. parauberis*를 억제하기 위한 최소억제 농도는 1 mg/ml로 조사되었다.

Table 6. Inhibitory effect of strain BK6 solvent extracts against the growth of *S. parauberis*.

Concentration(mg/ml)	Inhibition zone size (mm)	
	EtOAc	BuOH
30	30.45	25.56
25	28.20	20.28
20	27.76	21.87
15	23.31	18.52
10	24.93	18.39
5	21.77	15.84
2.5	21.44	14.31
1	18.84	13.92
0.5	-	-
0.1	-	-

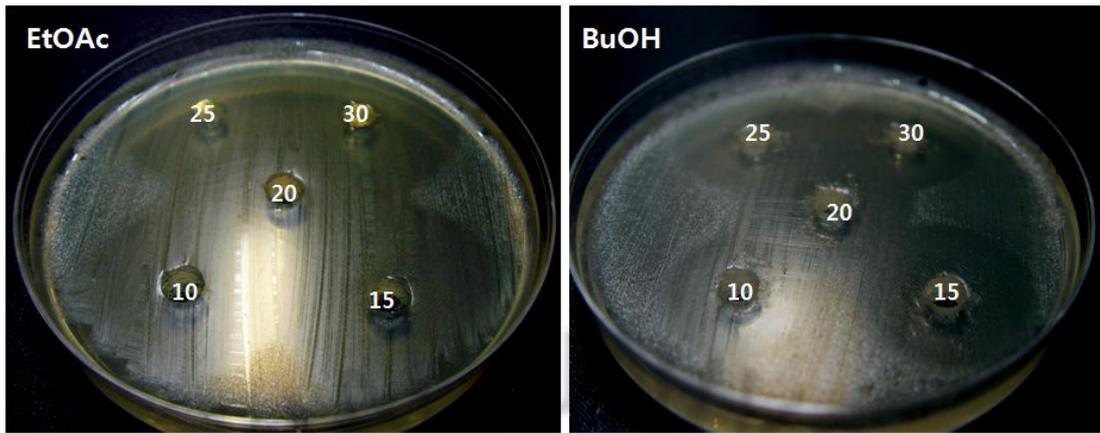


Fig. 17. Antibacterial activity of strain BK6 solvent extracts against *S. parauberis*.

##### 5. 항균물질의 첨가에 따른 피검균(*S. parauberis*)의 세포형태 관찰

SEM사진을 통하여 유기용매에 의해 조 추출된 항균물질이 *S. parauberis*에 대한 항균성 기작을 알아본 결과 피검균의 세포벽이 붕괴되는 현상이 확인 되었다 (Fig. 18). 몇몇 연구에 의하면 Bacteriocin이 활성을 나타내기 위해서는 세포벽과의 반응 필요하며, 여기에 관여하는 것이 세포표면에 존재하는 proteinous receptor라고 보고하였다(Montville and Bruno, 1994; Van belkum *et al.*, 1991). 즉 receptor와 결합하여 항균물질인 bacteriocin이 세포벽에 구멍을 형성하여 세포내 세포질의 용출을 유도 할 수 있다. 하지만 이 기작의 증명은 좀 더 많은 연구가 요구되며, TEM(Transmission electron microscope)를 이용하여 세포벽 파괴에 의한 세포질 용출 및 세포질 물질감소 등의 작용을 파악하여야 항균기작이 세포벽 파괴인지 세포내의 물질 합성 저해인지를 추측할 수 있다.

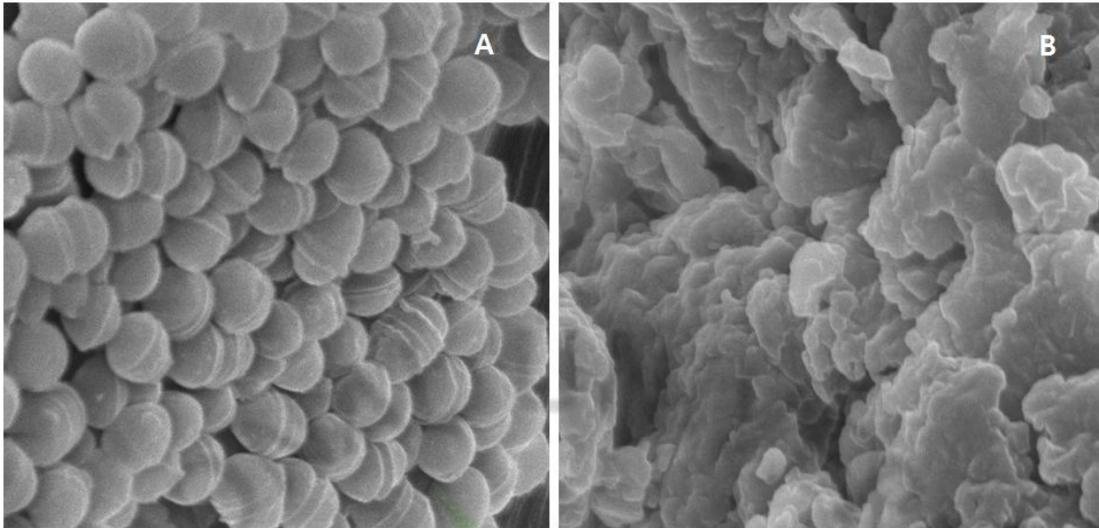


Fig. 18. Scanning electron micrographs of *S. parauberis* treated with strain BK6 solvent extracts. A: Untreated, B: Treated.

## 6. 항산화활성

### 1) DPPH radical 소거 활성

일반적으로 특정 물질에 대한 항산화 활성을 측정하는 방법에는 여러 가지가 있으나 그 중에서 DPPH radical 소거 활성법은 비교적 간단하면서 대량으로 측정이 가능한 방법으로 흔히 이용되고 있다. 항산화 물질은 free radical에 전자나 수소를 공여하여 복합체를 만들고, DPPH는 항산화 물질로부터 전자, 수소를 받아 불가역적으로 안정한 분자를 형성하여, 전자공여능으로부터 항산화 활성을 측정할 수 있다. 전자공여 작용은 활성 radical에 전자를 공여하여 지방질 산화를 억제 시키는 척도로 사용되고 있을 뿐만 아니라 인체 내에서 활성 radical에 의한 노화를 억제하는 작용의 척도로 이용되고 있다. DPPH법은 항산화 활성을 나타내는 생리활성 물질에 의해 환원됨으로서 짙은 자색이 탈색이 되는 정도에 따라 항산화 효과를 전자공여능으로 측정하는 방법이다.

항산화 활성을 측정하기 위한 시료는 EtOAc와 BuOH의 농도별 그리고 시간에 따른 배양 상등액의 활성을 분석하여 Fig. 18, 19에 나타내었다. 두 종류의 유기용매 추출물은 전반적으로 농도 의존적으로 비슷한 활성을 보였으며, 5 mg/ml 이

상의 농도일 때는 두 추출물 모두 50% 이상의 활성을 나타내었다. 또한 배양시간에 따른 배양 상등액의 DPPH 활성은 36시간 까지 50% 이하의 활성을 보이다가 48시간 이후부터 70%가 넘는 활성을 보였다. 따라서 배양시간이 36시간 이상일 때 다량의 전자공여능을 띄는 물질이 균주에서 분비되는 것이라 생각된다.

배양 상등액을 용매별 분획을 통해 물질을 추출하여 활성을 띄는 물질이 극성 및 비극성 물질인지 확인을 시도하였으나 diethyl ether, chloroform 그리고 hexane 층에 추출된 물질이 어떠한 용매에 용해되지 않았기 때문에 본 실험에서 활성실험을 수행하지 못하였다(Data not shown). 차후에 diethyl ether, chloroform 그리고 hexane 층에서 추출된 물질의 분석 및 동정을 조사할 필요가 있다고 사료된다(Fig. 21).

배양시간에 따른 배양 상등액은 평균적으로 약 40 mg/ml의 농도로 조사되었는데 용매 추출물보다 낮은 활성을 나타내었다. 이는 극성용매에서 균주가 생성하는 물질이 더 많이 용해 되었다고 사료되어지며, 용매추출물이 극성물질계열의 화합물이기 때문에 배양액의 배지성분도 용해될 가능성이 있지만 Fig.19, 20를 비교한다면 배지성분이 활성을 나타낸다고 설명하기는 어렵다.

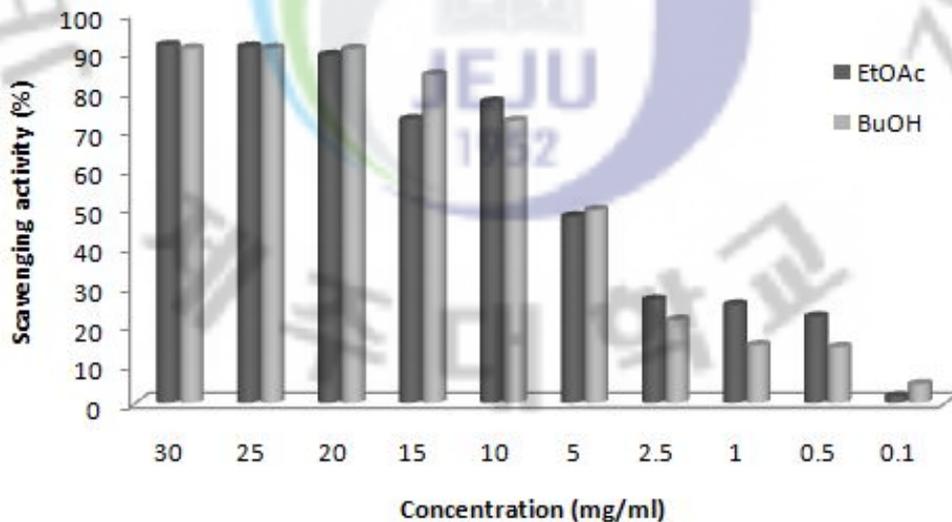


Fig. 19. DPPH radical scavenging activity of the strain BK6 solvent extracts.

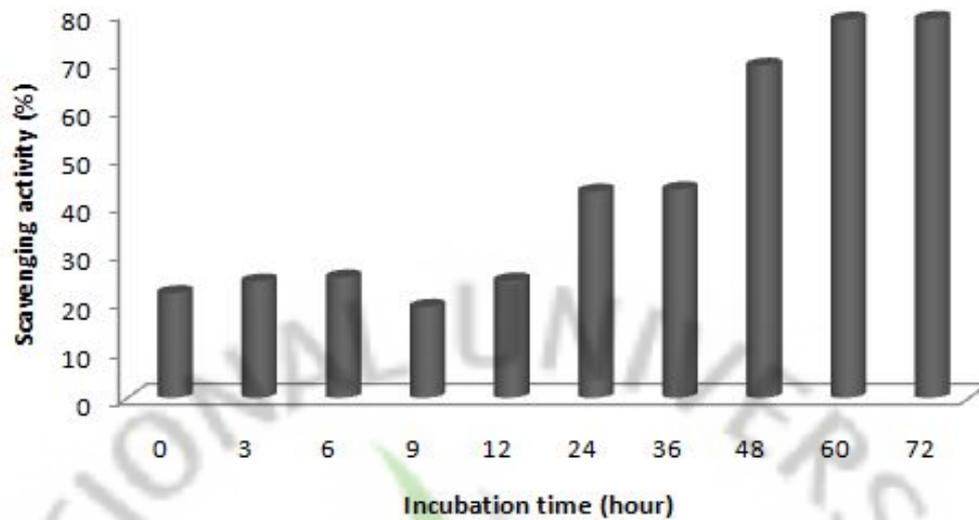


Fig. 20. DPPH radical scavenging activity of the supernatant from cultural broth.

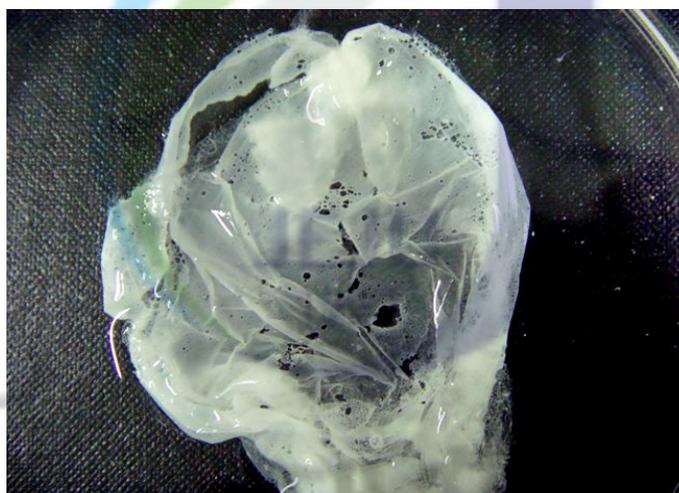


Fig. 21. Crude extracts of diethyl ether, hexane and chloroform by solvents fractions.

## 2) Alkyl radical 소거활성

Alkyl radical은 hydrocarbon reaction에서 초기 반응 생성물로 많이 형성된다. 이는 불포화지방산이 산소에 노출되면 지질과산화이 일어나며 이는 free radical에 의해 불포화지방산의 methylene(-CH<sub>2</sub>-)기로부터 수소원자(H·)가 탈취함에 따라 개시(initiation)된다. 이를 흔히 일으키는 radical로는 ·OH, RO·, ROO·, HO<sub>2</sub>·등이 있고 O<sub>2</sub>-과 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>는 그 자체로는 그런 능력이 없다. 수소탈취에 의해 생긴 alkyl radical (R·)은 분자재구성을 통해 diene형태로 바뀌고 이것이 다시 산소와 결합하여 peroxy radical을 형성한다. Peroxy radical은 다시 다른 불포화지방산으로부터 수소를 탈취함으로써 일종의 연쇄반응(chain reaction)이 진행될 수 있다. Peroxy radical은 또한 분자재구성을 통해 여러 형태의 과산화물로 전환된다. 지질과산화물은 그 자체로는 상당히 안정되나 전이금속의 존재 하에서는 분해가 촉진된다. 지질과산화물의 분해산물은 다양하며 많은 종류의 carbonyl 화합물을 포함한다. 생체막에는 다량의 불포화지방산을 포함하고 있다. 따라서 지질과산화로 인해 지질분자의 구조적 변화가 넓은 범위에 걸쳐 일어나면 생체막 fluidity의 감소, membrane potential의 감소, 이온투과성의 증가, 세포소기관 내용물의 누출 등이 예상되고 결국은 세포기능의 저하와 세포의 죽음을 초래할 수 있다. 지질과산화물과 그것의 분해산물 중에는 생체에 유해한 성분들이 있으며 대식세포기능의 억제, 단백질 합성 억제, 효소의 실활, thrombin 과다생산등과 같은 유해작용들이 보고되어 왔다. 이에 따라 본 실험군주가 지질과산화의 시발점이라 할 수 있는 alkyl radical의 소거활성을 통해 그 생리활성물질로서 가능성을 확인하고자 하였다.

배양 상등액의 추출용매에 따른 소거활성을 확인한 결과(Fig. 22), 두 용매의 모든 농도에서 50%가 넘는 소거활성을 보였다. 다른 radical 소거 활성에 비해 모든 농도에서 활성이 양호하여 극성용매에 alkyl radical 소거활성을 보이는 물질이 녹아져 나온다고 생각된다.

배양시간에 따른 배양 상등액은 36시간에 가장 높은 60%의 소거활성을 보였으며, 6시간부터 72시간까지 일정한 수준을 유지하였다(Fig. 23). 36시간에 소거활성이 균생육과 밀접한 관계를 보인다고 생각되며, Alkyl radical 소거활성 물질이

배양액 내에서 비교적 빠른 시간(9시간)에 분비된다고 생각된다.

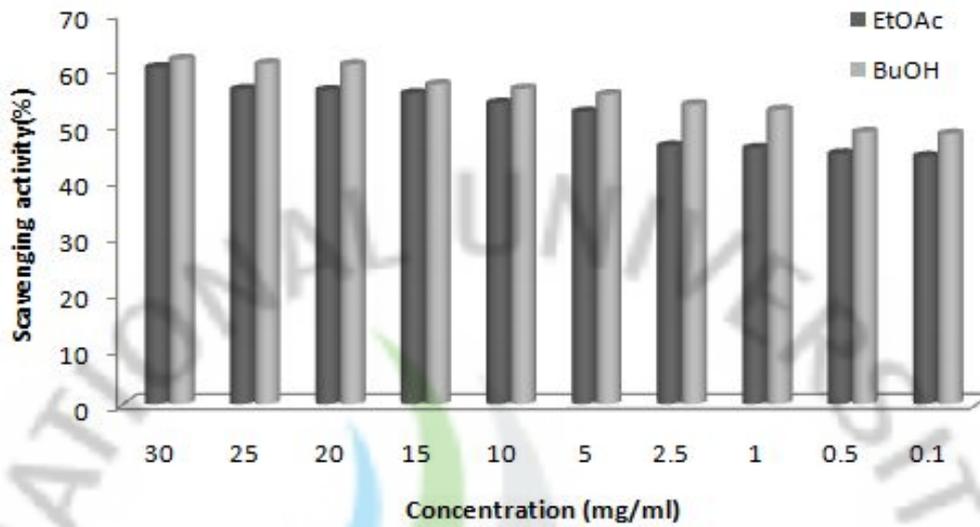


Fig. 22. Alkyl radical scavenging activity of the strain BK6 solvent extracts.

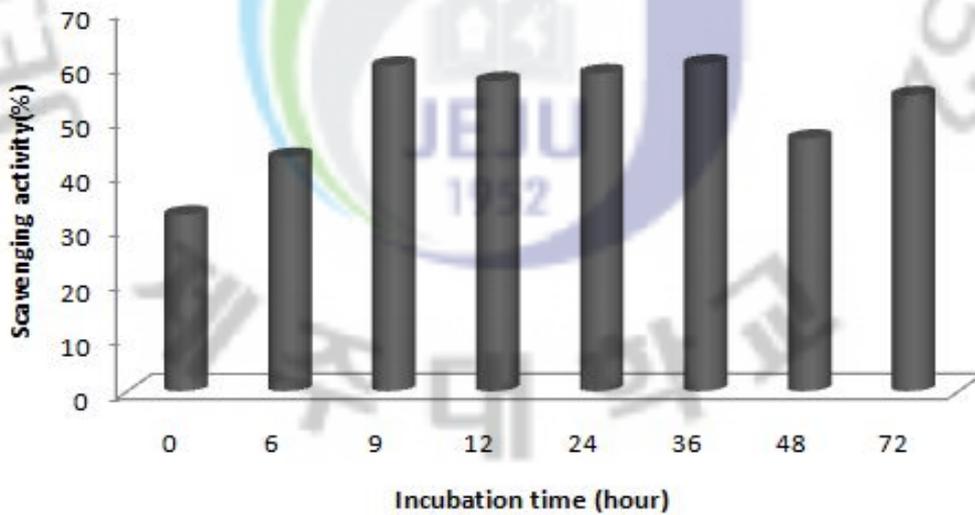


Fig. 23. Alkyl radical scavenging activity of the supernatant from cultural broth.

### 3) Hydrogen peroxide 소거활성

Hydrogen peroxide는 과산화지질의 생성을 촉진하는 것으로 알려져 있으며, 과산화지질은 동맥경화, 뇌졸중, 등의 성인병의 원인이 되고, 간장의 세포막에 과산화지질이 증가하면, 세포의 기능이 저하되어 염증이 유발되며, 그 결과 간경화, 감염을 초래한다고 보고되고 있다. Prepar 등(1984)의 연구결과에 의하며 유해산소들은 DNA에도 손상을 주어 돌연변이를 일으킬 수 있고 나아가서는 종양이나 암의 원인이 될 수 있다는 사실이 밝혀졌다. 즉 DNA를 직접 공격하거나 이를 공격하는 2차적인 다른 radical인 lipid peroxide radical등을 생성한다. Hydrogen peroxide 소거활성의 기작은 발색시약인 ABTS와 hydrogen peroxide가 반응하여 전자 하나를 잃게 되어  $ABTS^+$ 가 되게 된다. 이 때, ABTS 시약은 청색을 띄게 되는데, 추출물이 hydrogen peroxide를 제거해 줌으로서 옅은 청색을 띄게 된다.

배양 상등액의 추출용매에 따른 소거활성을 확인한 결과, BuOH은 10~30 mg/ml의 범위에서 80% 넘는 소거활성을 보였으며, EtOAc는 10~30 mg/ml의 범위에서 70% 넘는 소거활성을 보였다(Fig. 24). 대체적으로 BuOH 추출물이 EtOAc 추출물보다 높은 활성을 보였으며, 50%가 넘는 소거활성을 보인 농도는 각각 1, 5 mg/ml으로 조사되었다. 배양 상등액의 소거활성은 24~48시간대에 90% 이상의 활성을 보였으며, 36시간 배양 상등액이 가장 좋은 활성을 보였다(Fig. 25). Hydrogen peroxide 소거활성 결과는 DPPH 소거활성과 달리 36시간 이후부터 활성이 서서히 감소하였다. 또한 균성장이 이루어지지 않는 0시간에 30%정도의 소거활성을 보였다는 점에서 배지성분이 활성을 나타내었을 것이라 사료된다. 하지만 배양시간이 지남에 따라 균체 증식이 왕성하게 일어나는 36시간대에 소거활성물질이 많이 생성되는 결과를 보이기 때문에 배지성분을 배제하여도 무관할 것이라 사료된다.

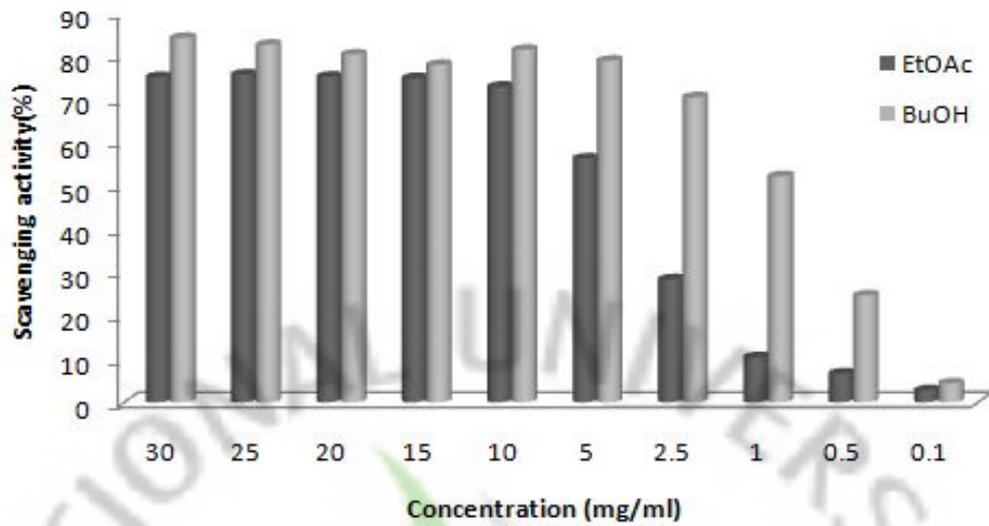


Fig. 24. Hydrogen peroxide scavenging activity of the strain BK6 solvent extracts.

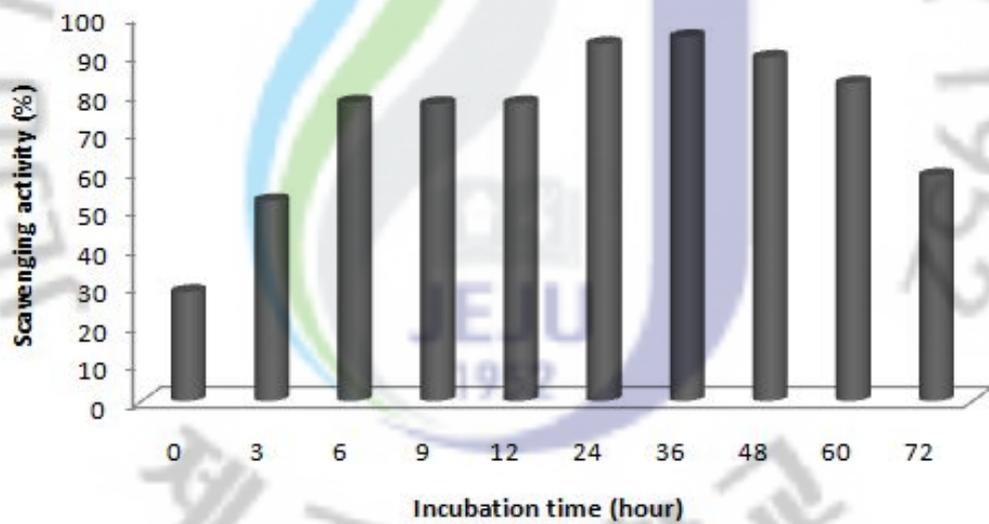


Fig. 25. Hydrogen peroxide scavenging activity of the supernatant from cultural broth.

## 7. 공시균주 BK6의 Biosurfactant 생산검토

*B. vallismortis* BK6 배양 상등액을 acid 침전법에 의해 생산된 biosurfactant의 양을 측정된 결과 약 6 g/l로 조사되었다. 효모인 *Rhodotorula* sp. G-1에서 분리된 Biosurfactant는 15 g/l를 생산한다고 알려져 있으며(Kang *et al.*, 1996), *Torulopsis bombicola*를 배양 탱크에서 생산한 sophorolipid의 90 g/l에 비하면 적은 양이나 이 후 균주의 개량이나 fed-batch 배양 등의 배양방법을 개선함으로써 더 높은 생산성 증대를 얻을 있으리라 생각된다. 또한 공시균주 BK6의 배양은 항균물질을 최대 생산하는 배지로 biosurfactant를 최대 생산하는 배지를 조사한다면 더 많은 생산성을 나타낼 것이다.

### 1) 유화활성

공시균주 BK6의 배양액에 함유된 biosurfactant가 소수성 탄화수소류와 오일류 기질을 유화시키는 특성을 알아 보고자 유화활성을 측정된 결과를 Fig. 26에 나타내었다. 그 결과 *B. vallismortis* BK6가 생산하는 biosurfactant는 tributyrin을 기질로 사용하였을 시 약 2.758로서 가장 높은 유화활성을 보였고, 그 밖에도 olive oil, squalene, kerosene, gasoline에서도 양호한 활성을 보였다. 반면에 mineral oil, glycerin, paraffin(liquid)에서는 낮은 활성을 보였다. *B. subtilis* TBM 3101이 분비하는 계면활성물질은 tributyrin을 기질로 사용하였을 때 약 2.68로서 가장 높은 유화활성을 보였다는 보고와 일치하였다(Kim *et al.*, 2007). Hwang 등(1999)의 보고에 의하면 *Pseudomonas aruginosa* JRT-4에 의해 분비되는 biosurfactant가 paraffin 및 oil류에 높은 활성이 조사되었다는 경우와 상반된 결과를 보였으며, squalene 및 olive oil을 기질로 사용한 결과와는 유사한 결과를 보였다. 또한 kerosene 등의 탄화수소류를 기질로 사용한 결과는 *Bacillus* sp. TBM40-3이 생산하는 계면활성제의 경우와 유사하였다(Kim *et al.*, 2004).

본 실험에서 사용된 기질은 여러 종류의 탄화수소류와 oil류를 사용하지 않았지만, 화장품에 사용되는 oil류 및 원유를 생분해 시키는 가능성이 조사되었다. 따라서 차후에 많은 종류의 기질을 사용하여 유화활성을 조사할 가치가 있다고 사료된다.

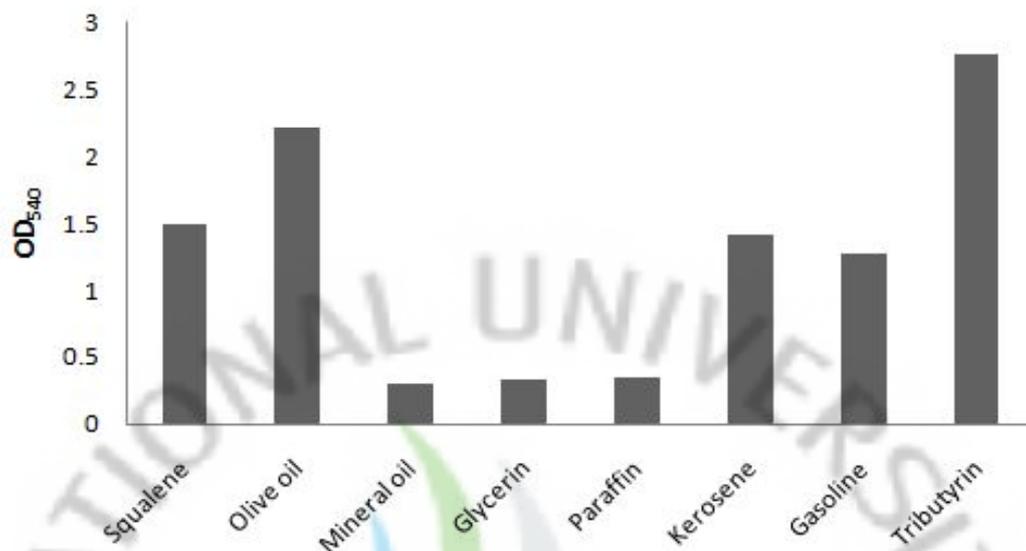


Fig. 26. Emulsification activity of various substrates by crude biosurfactant.

## 2) 유화안정성

공시균주 BK6의 배양액에 함유된 biosurfactant가 소수성 탄화수소류와 오일류 기질로 한 유화안정성을 Fig. 27와 Table 7에 나타내었다. 유화활성의 안정도는 상수  $K_d$ (시간당 붕괴되는 유화력의 기울기 값)로 나타내었으며,  $K_d$ 값이 0에 가까울수록 유화안정성이 우수하다. 그 결과 olive oil을 기질로 사용한 경우 가장 우수한 유화안정성을 나타냈으며, mineral oil, paraffin(liquid), tributyrin을 제외하고 다른 기질로 사용한 경우도 비교적 양호한 유화안정성을 나타냈다. 또한 현재 상용되고 있는 Tween 20을 유화활성이 가장 우수했던 tributyrin을 기질로 사용하여 유화활성과 유화안정성을 조사하였다. 그 결과 유화활성은 2.905로 공시균주 BK6에서 분리된 crude biosurfactant 보다 조금 높은 활성을 보였으며, 유화안정성은 -0.46으로 본 실험의 시료 보다 월등히 높은 안정성을 보였다.

*B. subtilis* TBM 3101과 *Bacillus* sp. TBM40-3에 의해 생성된 biosurfactant가

tributyryn을 기질로 사용했을 때 각각 -1.23, 1.70의 안정성을 보여 -3.19로 조사된 본 sample에 비해 높은 안정성을 보였다. 하지만 유화활성은 본 시료보다 낮았으며, *Bacillus atrophaeus* DYL-130이 분비하는 biosurfactant는 tributyrin을 기질로 하였을 시 1.99의 유화활성과 -9.56의 유화안정성을 보여 공시균주 BK6가 분비하는 crude biosurfactant가 더 우수함을 알 수 있었다(Kim *et al.*, 2005).

따라서 *B. vallismortis* BK6가 분비하는 biosurfactant가 다른 공시균주와 비교하여 볼 때, 상대적으로 낮은 유화안정성을 보였지만 높은 유화활성을 보여 연구할 가치가 있다고 사료되며, biosurfactant의 최적생산을 위한 배지조성을 연구한다면 더 많은 biosurfactant가 생산되어 유화안정성의 단점을 보완할 수 있을 것이라 기대된다.

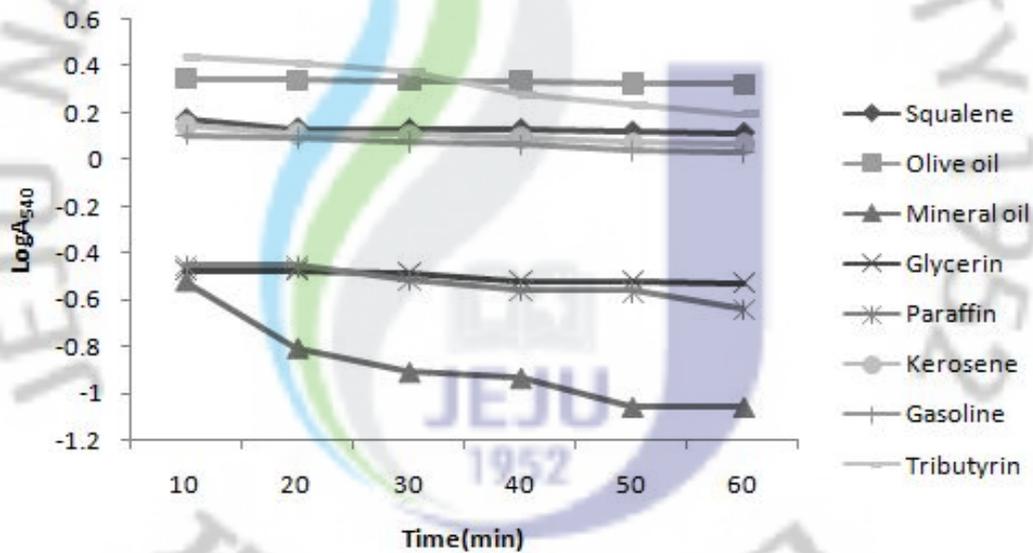


Fig. 27. Emulsification stability of various substrates by crude biosurfactant.

Table 7. Stabilization properties of crude biosurfactant.

Substrates	Decay constant (Kd, 10 <sup>-3</sup> ) <sup>a</sup>
Squalene	-0.6
Olive oil	-0.27
Mineral oil	-5.99
Glycerin	-0.74
Paraffin(liquid)	-2.22
Kerosene	-0.9
Gasoline	-0.91
Tributyryn	-3.19

The log of the absorbance was then plotted versus time and slope(decay constant, Kd) of the line was calculated.

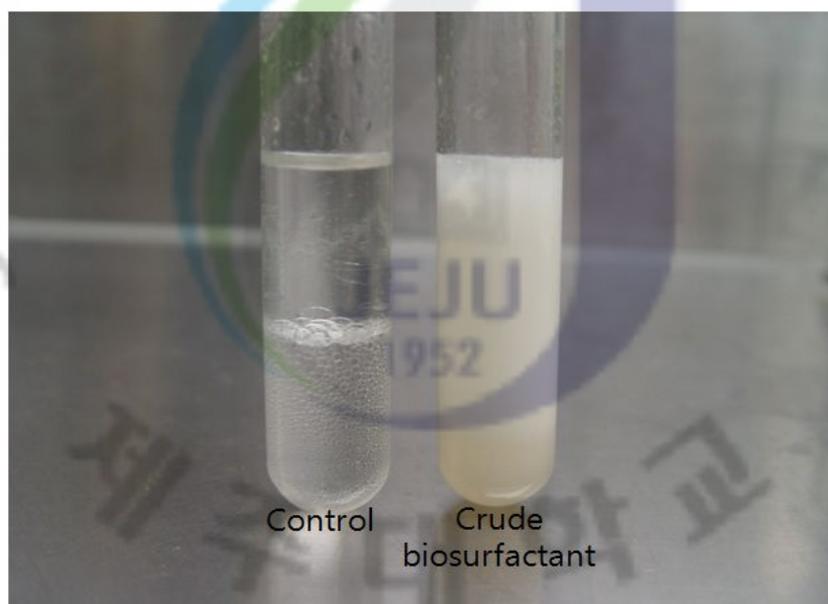


Fig. 28. Comparison of the emulsifying activity with distilled water and crude biosurfactant.

An equal volume of kerosene was added to distilled water, crude biosurfactant and mixed for 2 min.

### 3) SDS-PAGE

공시균주 BK6에서 분리된 crude biosurfactant의 분자량을 확인하였다(Fig. 29). Biosurfactant를 생산하는 *Bacillus* sp.는 일반적으로 저분자군(4kD 이하)에 속하는 lipopeptide의 surfactin을 생성하게 되는데(Georgiou, *et al.*, 1992) Fig. 29와 같이 저분자의 단백질이 확인되었다. Yoon 등(2005)에 의하면 FPLC시스템(AKTA)을 이용하여 surfactin을 분리한 결과 두 그룹에서 1,018 D과 1,036 D의 분자량이 확인되었다. 또한 공시균주 BK6의 crude biosurfactant의 항균실험결과 활성을 보이지 않았던 점(Data not shown)이 surfactin이 단독으로는 항균효과가 없다는 보고와 일치한다(Hiraoka, *et al.*, 1992).

공시균주 BK6가 생성하는 물질이 보고된 논문의 biosurfactant 분자량과 확인하여 같은 물질임이 유력하지만 Thin layer chromatography와 HPLC에 의한 물질의 분석을 정확한 물질 동정이 요구된다. 또한 surfactin 계열의 biosurfactant 이외에 항균·항진균을 나타내는 물질인 iturin 및 fengycin이 밝혀진다면 미생물 제제로서의 가능성을 입증할 것이다.

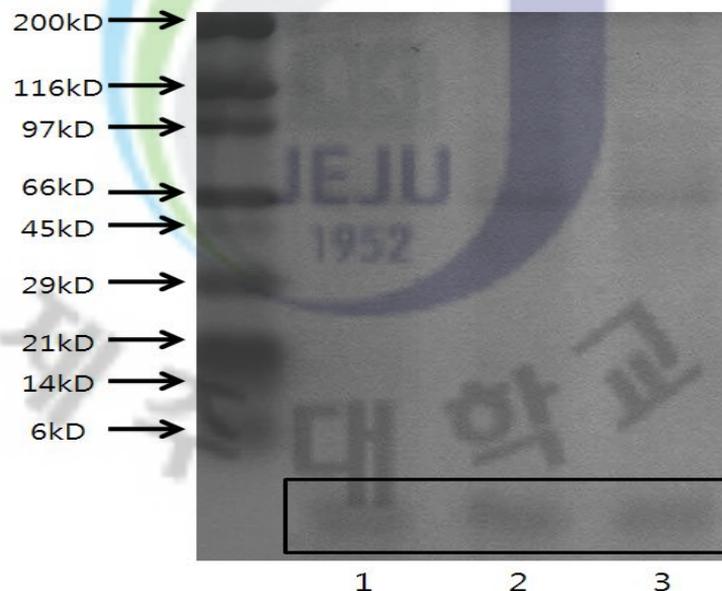


Fig. 29. SDS-PAGE patterns.  
1, 2, 3 Crude biosurfactant.

## 8. 항생제 감수성

공시균주 BK6에 대한 항생제 감수성의 결과를 Table 8에 나타내었다. 그 결과 공시균주 BK6는 모든 항생제에 감수성을 보였다. 그중에 Cephalothin이 39.12 mm로 감수성이 가장 높았으며, Novobiocin이 14.85 mm로 가장 낮은 감수성을 보였다.

이상의 결과로 *B. vallismortis* BK6를 양식동물의 Probiotic과 같은 미생물제제로 사용한다면, Antibiotic의 길항작용으로 Probiotic의 기능을 상실 할 것이라 사료된다. 따라서 배양 상등액의 효과적인 항균물질 생산이 Probiotic이 살아있는 생균이라는 단점을 보완할 수 있는 하나의 장점이라고 생각한다.

Table 8. Antibiotic susceptibility test of *B. vallismortis* BK6.

Antibiotics	Inhibition zone size (mm)
Nofloxacin	21.97
Clindamycin	18.59
Cephalothin	39.12
Ciprofloxacin	31.22
Oxolinic acid	24.66
Neomycin	24.05
Erythromycin	33.66
Pefloxacin	25.25
Kanamycin	20.92
Chloramphenicol	23.5
Oxytetracyclin	16.79
Flumequine	29.32
Ampicilline	18.82
Nalidixic acid	21.1
Amoxicillin	24.72
Gentamicin	23.2
Amikacin	20.05
Novobiocin	14.85

#### IV. 요약

젓갈은 우리나라 전통 발효음식으로 유용미생물이 분리가 되어 Probiotics, 항균제 및 발효식품에 첨가되는 starter로 이용되고 있다. 젓갈에서 분리된 *Bacillus* sp.는 bacteriocin 유사 물질을 분비하게 되는데 합성기작에 따라 ribosomal 물질과 nonribosomal 물질로 나뉘게 되며, subtilin, coagulin 이 전자에 속하며 fengycin, surfactin, bacitracin, iturin group, gramicidins 등이 후자에 속한다. 또한 *Bacillus* sp.는 생물계면활성(Biosurfactant) 물질을 효율적으로 생산한다는 특징을 가지고 있다. 따라서 본 연구는 bacteriocin 작용에 의한 항균활성이 우수한 균주를 젓갈에서 분리하여 항균물질을 추출하여 생리활성을 조사하였으며, 또한 공시균주의 biosurfactant를 추출하여 특성을 연구하였다.

젓갈에서 분리된 균주는 6종으로 분리균주 BK6가 빠른 균생육과 항균활성을 보여 실험대상 공시균주로 선정하였으며 항균활성 감수성이 높은 *Streptococcus parauberis*를 피검균으로 선택하였다.

공시균주 BK6를 동정하여 본 결과 *Bacillus vallismortis*로 동정이 되어 *B. vallismortis* BK6로 명명하였다. 항균물질을 최대 생산하기 위한 최적배양조건을 검토한 결과 탄소원은 soluble starch 1%, 질소원은 yeast extract 0.5%,  $\text{NaNO}_3$  0.5%, 무기염은  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  0.05%, NaCl 0.05%로 조사되었으며, 배양온도는 25°C, 배지의 초기 pH는 8~9, 배양시간은 36시간으로 조사되었다. 항균물질의 열, pH 및 효소 안정성 결과 효소가 첨가되지 않은 대조구에 비해 효소 첨가구에서 15~20% 낮은 항균활성을 보였으며 pepsin 처리구에서 항균활성을 보이지 않았다. 또한 pH에 대해 체적으로 안정하며 열에 항균활성을 나타내지 않았기 때문에 열에 불안정하며 pepsin에만 선택적으로 불활성화 되는 구조를 가진 peptide성 물질이라고 사료된다. 항균물질을 용매 fraction을 통해 추출한 결과 hexane, chloroform 층에서는 물질추출이 이루어지지 않았으며, ethyl acetate, butanol 층에서 추출된 물질을 가지고 생리활성을 측정하였다. 그 결과 최소억제농도는 1mg/ml로 조사되었으며, 피검균에 처리하였을 때 세포벽이 붕괴되는 현상이 나타났다. 또한 항산화활성을 측정하여 1~5 mg/ml 범위에서 50% Inhibition concentration이 조사되었다. 따라서 공시균주

BK6는 항균활성 이외에 항산화활성을 나타내는 균주라고 생각되어진다.

공시균주 BK6의 Biosurfactant의 생산을 조사하여 유화활성과 유화안정성을 검토하여본 결과 tributyrin을 기질로 사용 하였을 때, 가장 높은 유화활성을 보였으며 olive oil, squalene, kerosene 순으로 양호한 유화활성을 나타내었다. 유화 안정성은 olive oil이 가장 높은 안정성을 보였다.

따라서 본 실험의 공시균주는 생리활성 물질로서의 이용가능성과 생물계면활성제가 유류오염방제 및 화장품산업에 유용하게 적용될 것이라 사료되며, 앞으로 실질적으로 적용되는 추가실험을 실시하여야 한다고 생각 된다.



## V. 참고 문헌

- Arima, K., A. kakinuma, and G. Tamura. 1968. Sufactin, a crystalline peptide lipid surfactant produced by *Bacillus subtilis*: Isolation, characterization and its inhibition of fibrin clot formation. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 31 : 488-494.
- Baeck, G. W., J. H. Kim, D. K. Gomez, and S. C. Park, 2006. Isolation and characterization of *Streptococcus* sp. from diseased flounder (*Paralichthys olivaceus*) in jeju island. *J. Vet. Sci.*, 7:53-58.
- Barefoot, S. F. and C. G. Nittle. 1993. Antibiosis revisited bacteriocin produced by dairy starter culture. *J. Dairy Sci.* 76 : 2366.
- Bauer, A. W., W. M. Kirby, JC. Sherris, M. Turck, 1996. Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disk method. *Am. J. Clin. Pathol.* 45(4) : 439-496.
- Choi, H. J., C. J. Cheigh, S. B. Kim, and Y. R. Pyun, 2000. Production of a nisin-like bacteriocin by *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* A164 isolated from Kimchi. *J. Appl. Microbiol.* 88 : 563-571.
- Chun, J. Y., I. H. Ryu, S. U. Lee, and K. S. Lee, 2000. Purification and properties of anticaries microbial agent by *Bacillus alkalophilshaggy* JY-827. *Korean J. Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 28 : 270-278.
- Cirigliano, M. C. and G. M. Carman, 1984. Isolation of a bioemulsifier from *Candida lipolytica*. *Appl. Environ. Microbiol.* 48 : 747-750.

- Cooper, D. G., C. R. MacDonald, S. J. B. Duff, and N. Kosaric, 1981. Enhanced Production of Surfactin from *Bacillus subtilis* by Continuous Product Removal and Metal Cation Additions. *Appl. Environ. Microbiol.* 42 : 408-412.
- Deziel, E., G. Paquette, R. Villemur, F. Lepine, and F. G. Bisailon, 1996. Biosurfactant production by a soil *Pseudomonas* strain growing on polycyclic aromatic hydrocarbons. *Appl. Environ. Microbiol.* 62 : 1908-1912.
- Dodd, H. M., N. Horn, Z. Hao, and M. J. Gasson. 1992. A lactococcal expression system for engineered nisins. *Appl. Environ. Microbiol.* 58 : 3683-3693.
- Fiechter, A. 1992. Biosurfactant: moving towards industrial application. *Trends Biotechnol.* 10 : 208-217.
- Georgiou, G., S. C. Lim, and M. M. Sharma. 1992. Surface-active compounds from microorganisms. *Bio/technology* 10 : 60-65.
- Heo, M. S., C. B. Song, J. H. Lee, I. K. Yeo, Y. J. Jeon, J. J. Lee, S. C. Chung, K. W. Lee, S. Rho, K. S. Choi, and Y. D. Lee, 2001. Characteristics of  $\beta$ -*Streptococcus* spp. isolated in cultured flounder (*Paralichthys olivaceus*) of Jeju island. *J. Korean Fish. Soc.* 34(4) : 365-369.
- Hiramoto, K., H. Johkoh, K. I. Sako, and K. Kikugawa, 1993. DNA breaking activity of the carbon-centered radical generated from 2,2'-azobis(2-amidinopropane) hydrochloride (AAPH). *Free Radical Research and Communication*, 19 : 323-332.

- Hiraoka, A., T. Ano, and M. Shoda, 1992. Molecular cloning of a gene responsible for the biosynthesis of the lipopeptide antibiotics iturin and surfactin. *J. Ferment. Bioeng.* 74 : 323-326.
- Hiraoka, H., O. Asaka, T. Ano, and M. Shoda, 1992. Characterization of *Bacillus subtilis* RB14, coproducer of peptide antibiotics iturin A and surfactin. *J. Gen. Appl. Microbiol.* 38 : 635-640.
- Hyronimus, B., C. Le marrec, and M. C. Urdaci, 1998. Coagulin, a bacteriocin-like inhibitory substance produced by *Bacillus coagulans* I4. *J. Appl. Microbiol.* 85 : 42-50.
- Hwang K. A., J. R. Lee, S. J. Kim, Y. S. Kim, and H. J. Ahn, 1999. Surface-activity and environmental characteristics of biosurfactant produced by *Pseudomonas aeruginosa* JRT-4. *Kor. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.* 27(2) : 159-165.
- Jack, R. W., J. R. Tagg, and B. Ray. 1995. Bacteriocin of gram-positive bacteria. *Microbiol. Rev.* 59 : 171-200.
- Jay, J. M. 1982. Effect of a milk product, fermented by *Lactobacillus acidophilus* and with fructo-oligosaccharides added, on blood lipids in male volunteers. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 38 : 17-22.
- Jhon, W. M. and J. B. Mulders, 1991. Identification and characterization of the antibiotic nisin variant. *Eur. J. Biochem.*, 201 : 581-584.

- Jung, H. K. and S. D. Kim, Purification and Characterization of an antifungal antibiotic from *Bacillus megaterium* KL 39, a biocontrol agent of red-papper phytophthora blight disease. *Kor. J. Microbiol. Biotechnol.* 31(3) : 235-241.
- Joo, G. J., and J. H. Kim, Optimization of large scale culture conditions of *Bacillus ehimensis* YJ-37 antagonistic to vegetables Damping-off fungi. *Korean J. Life Sci.*, 12(3) : 242-249.
- Kang, K. H. 1996. Bioindustry. *Korean J. Appld. Microbial. Bioeng.* 9(3) : 41-67.
- Kang, S. M., C. S. Lee, and Y. C. Kim, 1996. Isolation of biosurfactant-producing yeast *Rhodotorula* Sp. G-1 and the biosurfactant production. *Kor. J. Appl Microbiol. Biotechnol.* 24(2) : 185-190.
- Kim, S. A., Y. G. Lee, Y. L. Choi, C. W. Hwang, Y. K. Jeong, and W. H. Joo, 2007. Physiological characteristics of biosurfactant-producing *Bacillus subtilis* TBM 3101. *J. Korean Soc. Appl. Biol. Chem.* 50(1) : 12-17.
- Kim, S. H., S. C. Lee, I. H. Park, J. S. Yoo, W. H. Joo, C. W. Hwang, and Y. L. Choi, 2005. Isolation and characterization of biosurfactant from *Bacillus atrophaeus* DYL-130. *J. Life Sci.* 15(5) : 679-684.
- Kim, S. H., S. C. Lee, J. S. Yoo, W. H. Joo, S. Y. Chung, and Y. L. Choi, 2004. Characterization of oil-degradation biosurfactant produced by *Bacillus* sp. TBM40-3. *J. Korean Soc. Appl. Biol. Chem.* 47(2) : 170-175.

- Klein, C., C. Kaletta, and K. D. Entian. 1993. Biosynthesis of the antibiotic subtilin is regulated by a histidine kinase/response regulator system. *Appl. Environ. Microbiol.* 59 : 296-303.
- Kluge, B., J. Vater, J. Salnikow, and K. Eckart. 1998. Studies on the biosynthesis of surfactin, a lipopeptide antibiotic from *Bacillus subtilis* ATCC 21332. *FEBS Lett.* 231 : 107-110.
- Klaenhammer T. R. 1988. Bacteriocin of lactic acid bacteria. *Biochem.* 70(3) : 337-349.
- Kratzschmar, J., M. Krause, and M. A. Marahiel, 1980. Gramicidin S biosynthesis operon containing the structural genes *grsA* and *arsB* has an openreading frame encoding a protein homologous to fatty acid thioesterases. *J. Bacteriol.* 171 : 5422-5429.
- Laemmli UK. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227 : 680-685.
- Lee, C. H. and D. S. Ha, 1991. A streptococcal Disease of Cultured Flounder , *Paralichthys olivaceus*. *J. Fish Pathol.* 4 : 71-77.
- Lee, D. K., J. I. Lee, C. I. Park, and S. I. Park, 2001. The study on the causal agent of Streptococciosis (*Lactococcus garvieae*), isolated from cultured marine fishes. *J. Fish Pathol.*, 14(2) : 71-80.
- Lee, S. B. and S. H. Choi, 2006. Isolation and identification of probiotic *Lactobacillus* isolates for calf meal supplements. *Korean J. Food Sci. Ani. Resour.* 26(1) : 106-112.

- Maget-Dana, R. and F. Peypoux. 1994. Iturins, a special class of pour-forming lipopeptides: biological and physicochemical properties. *Toxicology*. 87 : 151-174.
- Mittenhuber. G., R. Weckermann, and M. A. Marahiel, 1989. Gene cluster containing the genes for tyrocidine synthetase 1 and 2 from *Bacillus brevis*; evidence for an operon. *J. Bacteriol.* 171 : 1881-1887.
- Montville, T. J. and M. E. C. Bruno. 1994. Evidence that dissipation of protein motive force is a common mechanism of action for bacteriocins and other antimicrobial proteins. *Inter. J. Food Microbial.*, 24 : 53-74.
- Muller, H. E., 1995. Detection of hydrogen peroxide produced by microorganism on ABTS-peroxidase medium Zentralbl Bakterio. *Microbiologie and Hygiene*, 259 : 151-158
- Nakano, M. M. and P. Zuber. 1990. Molecular biology of antibiotic production in *Bacillus*. *Biotechnol.* 10 : 223-240.
- Nanjo, F., K. Goto, R. Seto, M. Suzuki, M. Sakai, and Y. Hara, 1996. Scavenging effects of tea catechins and their derivatives on 1,1,-diphenyl-2-picrylhydrazyl radical. *Free Radical Biology and Medicine*, 21 : 895-902.
- Park, S. K., Y. S. Cho, M. Y. Shon, S. W. Gal, and S. W. Lee, 2007. Isolation and cultural characterization of antibacterial substance producing microbes. *Korean J. Food Preserv.*, 14(2) : 194-200.
- Prapar, H. D. and R. P. Bird, 1984. *J. Agric. Food Chem.* 32 : 433

- Roberts, M.S., L.K. Nakamura, and F. M. Cohan, 1996. *Bacillus vallismortis* sp. nov., a close relative of *Bacillus subtilis*, isolated from soil in Death Valley, California. *Int. J. Syst. Bacteriol.*, 46(2) : 470-475.
- Ryu, H. S., M. Y. Shon, S. J. Cho, S. K. Park, and S. W. Lee, 2007. Characterization of antibacterial substance-producing *Bacillus subtilis* isolated from traditional *Doenjang*. *J. Korean Soc. Appl. Biol. Chem.* 50(2) : 87-94.
- Shin Y. J., M. J. Jung, and Y. K. Jeong, 2000. Optimization of the production of a thermostable antifungal antibiotic. *Korean J. Biotechnol. Bioeng.*, 15(6) : 584-588.
- Shomura, T., N. Nishizawa, M. Iwata, J. Yoshida, M. Ito, and S. Aman, 1983. Studies on a new nucleoside antibiotic, Dapiramicin. *J. Antibiot.*, 36 : 1300-1304.
- Song, J. K., J. H. Kim, and E. H. Kim, 2003. Comparison of RAPD profiles and phenotypical characters of Streptococcal strains. *J. Fish Pathol.*, 16(1) : 51-59.
- Tagg, G. R., A. S. Dajani, and L. W. Wannamaker. 1976. Bacteriocin of gram-positive bacteria. *Bacteriol. Rev.* 40 : 772-756.
- van Belkum, M. J., J. Kok, G. Venema, H. Holo, I. F. Nes, W. N. Konings and T. Abee. 1991. The bacteriocin lactococcin A specifically increases permeability of lactococcal cytoplasmic membranes in a voltage-independent, protein-mediated manner. *J. Bacteriol.*, 173(24), 7934-7941.

- Vanittanakom, N., W. Loettler, U. Koch, and G. Jung. 1986. Fengycin—a novel antifungal lipopeptide antibiotic produced by *Bacillus subtilis* F-29-3. *J. Antibiot.* 39 : 881-901.
- Woo, S. H., H. J. Kim, J. S. Lee, J. W. Kim, and S. I. Park, 2006. Pathogenicity and classification of streptococci isolated from cultured marine fishes. *J. Fish Pathol.* 19 : 17-33.
- Yoo, J. H., 1994 Studies on the antifungal antibiotic produced by *Bacillus* sp. SY-414. *Kangwon National Univ.*
- Yoon, J. H., W. D. Lee, J. H. Kang, J. S. Lee, and M. S. Lee, 2003. Manufacture of *Squid-Jeogal* by the improved process. *J. Kor. Fish Soc.* 36 : 333-339.
- Yoon, S. H., J. B. Kim, Y. H. Lim, S. R. Hong, J. K. Song, S. S. Kim, S. W. Kwon, I. C. Park, S. J. Kim, Y. S. Yeo, and B. S. Koo. 2005. Isolation and characterization of three kinds of lipopeptides produced by *Bacillus subtilis* JKK238 from Jeot-Kal of Korean traditional fermented fishes. *Kor. J. Microbiol. Biotechnol.* 33(4) : 295-301

## 감사의 글

대학원 석사과정 2년이라는 세월이 학문을 배우기에 매우 짧게만 느껴지는 시간이었습니다. 하지만 주변의 많은 분들의 도움을 받아 이렇게 석사과정을 마치게 되어 감사의 글을 올립니다. 항상 친자식처럼 보살펴 주시고 가르침을 주신 허문수 교수님께 진심으로 감사드립니다. 또한 본 논문을 심사해주시고, 귀중한 조언과 따뜻한 격려를 아끼지 않으셨던 전유진 교수님과 정준범 교수님께 깊은 감사를 드립니다. 그리고 항상 조언과 관심을 가져주셨던 송춘복 교수님, 이제희 교수님, 여인규 교수님께 진심으로 감사드립니다.

실험실생활을 하면서 격려와 조언을 해주신 진창남 소장님, 강봉조 연구사님, 김필연 연구사님 그리고 하나동물약품의 장계환 사장님에게 감사의 마음을 전합니다. 졸업 후에도 바쁘게 직장을 다니시면서 후배를 챙기시는 병규형, 영환이형, 철영이형, 창식이형, 태원이형, 민주누나, 수미누나, 선경이 또한 매일 가족처럼 생활하면서 위로와 격려를 하면서 서로 힘이 되주었던 우리 해양미생물실험실의 제일 만형 영건이형, 듄직한 만철이형, 친절한 주상이형, 두얼굴의 용재, 아부 잘하는 익수, 간지 동민, 거친없는 입담 창영 그리고 지금은 외부에서 열심히 생활하고 있는 민욱, 승현에게 진심으로 감사의 마음을 전합니다. 곁에는 없지만 매일 웃음으로 대하던 현식이형에게 깊은 감사를 전하며, 제주도에 자식을 두었다며 격려와 관심을 주신 현식형 아버지, 어머니 그리고 동생 지현이에게 항상 감사드립니다. 그리고 대학원에 같이 입학을 해서 서로 의지하여 졸업을 하는 윤범이형, 석천이형, 성명이형, 영득이형, 민석이게 고맙다는 말을 전하며, 어류육종 실험실의 맹진이형, 상규형, 송헌이형, 혜영이, 미란이, 분자유전학 실험실의 철홍이형, 경임누나, 마하나마, 차밀라니, 완창, 나둔, 유철이, 숙경이, 영화, 현재, 어류분자생리학 실험실의 문휴형, 정환이형, 태형이형, 경주형, 기정누나, 경필, 병욱, 창수, 한솔, 수아, 해양자원공학 실험실의 수진이형, 영빈이형, 길남이형, 승홍이형, 선희누나, 긴내누나, 지혁이형, 아름답다슬, 혜미, 민철, 인환, 석경 등 이외 실험실원 들에게 감사의 말을 드립니다. 또한 주말에 운동을 같이하여 심신을 달래주던 해남회 식구들과 군대 다녀와서 서먹서먹한 학교 생활을 즐겁게 해주었던 토목과의 상문이형, 상돈이형, 경민이형, 근욱이형, 완종이형, 남호형, 성완, 성윤, 시몬, 안수, 경만, 경환, 재훈, 성오, 홍준에게 고맙다는 말을 전합니다. 또한 제주도에 처음 와서 기숙사에서 외로움을 같이 달래던 종현, 정현, 원영, 용진에게도 감사의 말을 전합니다.

결혼을 해서 한 가정의 가장이라며 학업에만 정진할 수 있게 도와주신 작은 아버지, 어머니, 고모부, 고모, 우주누나 그리고 하늘에서 지켜봐 주시는 장인어른, 너그러운신 장모님, 동훈형님, 영화형수, 영범형님, 민경치형, 길철형님, 수경처형, 만수형님, 혜경처형 외 귀여운 조카들에게 깊은 감사의 마음을 드리고 모두 건강하기를 기원합니다.

마지막으로 서울에서 먼 제주도에 있다며 항상 걱정하시고 도움을 주신 아버지, 어머니 정말 감사드립니다. 또한 공부하는 동안 뒷바라지하며 심적으로 격려를 아끼지 않았던 아내 희경과 저를 닮은 귀여운 아들 진우에게 사랑한다는 말을 전합니다.