

Bacillus amyloliquefaciens H41이 생산하는 Vibrio anguillarum 생육 저해인자의 정제신현철 · 정경태¹ · 김광현 · 김병우 · 권현주 · 이은우 · 염종화¹ · 류은주² · 정유정³ · 김영희*동의대학교 생명융합학과, ¹동의대학교 임상병리학과, ²한서대학교 미용학과, ³이화여자대학교 대학원

Received March 20, 2008 / Accepted April 10, 2008

Purification of *Vibrio anguillarum* Growth Inhibition Factor Produced by *Bacillus amyloliquefaciens* H41.

Hyun-Chul Shin, Kyung-Tae Chung¹, Kwang-Hyun Kim, Byung-Woo Kim, Hyun-Ju Kwon, Eun-Woo Lee, Jong-Hwa Yum¹, Eun-Ju Rhu², Yu-Jeong Jeong³ and Young-Hee Kim*. Department of Life Science and Biotechnology, Dong-eui University, Busan Korea, ¹Department of Clinical Laboratory Science, Dong-eui University, Busan Korea, ²Department of Cosmetology, Hans University, Seo-San City ChungNam Korea, ³Graduate School of Ewha Womans University, Seoul Korea - To study the possible use of probiotics in fish farming, we evaluated antagonism of antibacterial strain *Bacillus amyloliquefaciens* H41 against the fish pathogenic bacterium *Vibrio anguillarum* NCMB1. The purification of growth inhibition factor produced by *B. amyloliquefaciens* H41 was achieved by obtaining supernatant of this bacterium. The growth inhibition factor was purified to homogeneity by 70% ammonium sulfate precipitation, DEAE-sephadex A-50 ion exchange chromatography, sephadex G-200 gel filtration column chromatography, and sephadex G-50 gel filtration column chromatography with 40.8 fold of purification and 2.9% yield. The molecular weight of the purified growth inhibition factor was 48 kDa as determined by sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis. The optimum pH and temperature for the growth inhibition factor were pH 7.5 and 30°C, respectively. The activity of growth inhibition factor was enhanced slightly by some metal ions, such as Mg⁺², Mn⁺², but was inhibited by the addition of Co⁺², Hg⁺², Zn⁺² and Ag⁺². NaCl stability of the growth inhibition factor was observed with 50% residual activity at 3% NaCl concentration. Toxicity test showed that the purified *B. amyloliquefaciens* H41 growth inhibition factor did not affect the live of Japanese flounder (*Paralichthys olivaceus*) and the effectiveness was 78% of residual lethality compared to commercial antibacterial agents.

Key words : *B. amyloliquefaciens* H41, growth inhibition factor, *Vibrio anguillarum*

서 론

세계적으로 양식업에 가장 큰 문제점의 하나가 어류의 병원성 미생물에 의한 질환이라 할 수 있는데 이를 방지하기 위한 방법으로 지금까지 항생물질, 화학 요법제, 백신 등이 사용되어 왔으나 이들 사용에 대한 문제가 제기되어 왔으며, 어류의 모든 질병에 사용되기에는 제한적인 효과, 치어가 만족할만한 반응을 나타내지 못한다는 점, 시간낭비 등을 개선하기 위한 노력들이 진행 중이다[2,10,14]. 오늘날은 양식을 통하여 어자원의 공급을 늘리고 있으며 그 의존도 역시 날로 증가하고 있는 실정이다[1-6]. 동시에 양식 산업에서 경제성을 높이고 효율적인 관리에 대한 관심중 병원성 세균에 의한 질환을 극복하고자 하는 시도가 진행 중이며 지금까지의 화학적인 방제 법에서 벗어나 천연물, 생물학적 방제에 관한 관심이 증가하게 되었다[1-4,7].

따라서 이에 대한 대책으로 최근 어류질병 퇴치의 목적으로 항균 물질을 생산하거나 경쟁적 저해를 유발하는 세균이 검출되었다는 내용이 보고되고 있으며[1,2,12,13], Gram

[4,12] 등이 유산균이나 비 병원성 세균을 어병균의 생물 방제균으로 사용하는 방법 등을 시도하는 단계에 이르렀으며 이러한 방법은 항생 물질이나 화학 요법제를 대체할 수 있는 기반이 될 수 있다는 가능성을 제시하게 되었다[1,3,10-14].

어병균의 주요 병원체인 *Vibrio anguillarum*은 담수어와 해수어에 중요한 독성 미생물로 잘 알려져 있으며[5,6] 질병의 양상은 어류의 지느러미 부분에서 출혈성 궤양을 일으키며 이에 따른 빈혈과 복강내 체액의 유출, 축적 등의 증상을 유발하고 상업적 수산 양식업계에 제한요인이 되어왔다. 지금까지 이 균이 양식업에 막대한 경제적 손실을 야기하기에 병원성 요인들과 그 작용기작에 대해 연구되고 있으나 제한적인 면이 있어 왔다[5,6].

본 연구는 *V. anguillarum*을 예방하기 위한 생물 전구체 (probiotic)의 개발에 목적을 두고[11,12], 어류를 대상으로 어병균 증식에 저해를 나타내는 균을 탐색하는 과정에서 해산어의 장에서 *Bacillus amyloliquefaciens* H41를 분리하게[7] 되었으며 이 균이 *V. anguillarum*의 생육억제 물질을 생산한다는 것을 확인하게 되었다. 앞선 과정에서 이 물질의 생산 특성을 밝혔던 바 본 내용에서는 이 균이 생산하는 생육 저해 물질의 특성을 알아보고자 정제를 시도하여 물리화학적 성상을 검토하여 앞으로 산업적 이용 가능성에 대한 기초자료

***Corresponding author**

Tel : +82-51-890-1535, Fax : +82-51-890-1532

E-mail : yhkim@deu.ac.kr

로 활용하고자 하였다.

재료 및 방법

사용 균주 및 배양

본 연구에서 사용된 균주는 해산어의 장에서 *V. anguillarum* NCMB1의 생육에 억제력을 나타내는 균인 *Bacillus amyloliquefaciens* H41을 분리[7]하게 되어 이를 사용하였다. *V. anguillarum* NCMB1균의 배양에는 peptone 한천배지에 3%의 NaCl을 첨가하여 37°C에서 24시간 배양하였고 *Bacillus amyloliquefaciens* H41균은 앞선 과정에서[7] 밝혀진 저해물질 생성의 최적 조건인 peptone 1%, yeast extract 1.5%, NaCl 1%, sucrose 1%, MgSO₄·7H₂O 0.05%을 사용하였으며, 배양 최적 온도는 35°C, pH 7.5, 배양 시간은 20시간이며 진탕 배양하였다. 배양을 행한 후 활성을 나타내는 배양 상등액을 회수(3,000×g, 10분, 4°C)하여 전체의 정제 과정에 사용하였다.

균 생육도와 저해물질 정량 및 활성 측정

모든 과정에서의 액체배양의 균 생육도는 660 nm에서 분광광도기(Shimadzu UV-160A, Japan)로 흡광도를 측정하였고 생균수 측정으로 CFU (colony forming unit)/ml 을 사용하였고 정제과정에서의 저해물질의 정량은 분광 광도계를 사용하여 280 nm에서 흡광도를 측정하는 방법과 Lowry법 [9]에 의하여 Folin-phenol시약에 의한 유헤청 알부민의 표준곡선을 작성한 다음 시료의 흡광도를 500 nm에서 표준곡선에 의거하여 단백질 양을 산출하였다. 저해물질의 활성은 *V. anguillarum* NCMB1 균주를 24시간 배양한 후 *B. amyloliquefaciens* H41 균주의 각 정제과정의 분획물을 투여하여 반응시킨 후 CFU/ml로 나타내었다. 1 unit의 결정은 CFU 50%로 결정하였다.

조 효소액 제조 및 황산암모늄 분획

저해물질 생산 최적 배지에서 대량 배양한 후 이 배양액을 원심 분리하여 상등액만을 따로 취해 조 효소액으로 다음의 정제 과정에 사용하였다. 배양 상등액에 황산암모늄을 70%로 포화시켜 4°C에서 하루 동안 반응시킨 다음 20분간 저온 원심 분리하여 침전물만 회수하였다. 이 회수된 침전물을 10 mM Tris-HCl (pH 7.5)으로 녹이고 4°C에서 투석(Spectrum, molecularporous membrane tubing)시켰다.

DEAE-sephadex A-50 ion exchange column chromatography

DEAE-sephadex A-50 를 10 mM Tris-HCl (pH 7.5)로 충분히 평형화 시킨 후 투석한 저해물질을 column (2 by 20 cm)에 흡착시키고 0-0.5 M NaCl 농도구배로 흡착된 저해물질을 용출시켰다. 본 과정에서는 용출시 36 ml/hr의 속도로

한 시험관 당 4 ml씩 분획하였다.

Sephadex G-200 gel filtration column chromatography

0.2 M NaCl이 함유된 10 mM Tris-HCl (pH 7.5)로 충분히 평형화시키고 DEAE sephadex A-50과정에서 나온 활성부위만을 sephadex G-200 column (1.6 by 89 cm)에 첨가하여 gel 여과를 행하였다. 전개 액으로는 0.2 M NaCl이 함유된 Tris-HCl (pH 7.5)완충액을 사용하였으며 용출시 속도는 6 ml/hr로 한 시험관 당 2 ml씩 분획하였다.

Sephadex G-50 gel filtration column chromatography

0.2 M NaCl이 함유된 10 mM phosphate 완충액(pH 7.5)으로 충분히 평형화 시키고 Sephadex G-200 과정에서 활성부위만을 Sephadex G-50 column (1.6 by 89 cm)에 첨가하여 gel 여과를 행하였다. 전개 액으로는 0.2 M NaCl이 함유된 Tris-HCl (pH 7.5)완충액을 사용하였으며 용출시 속도는 6 ml/hr로 한 시험관 당 2 ml씩 분획하였다.

SDS-Polyacrylamide gel electrophoresis

전기영동은 Leammli [8]등의 방법에 따라 각기 0.1% SDS가 포함된 12% polyacrylamide (Sigma Co.)농도의 separating gel과 5% polyacrylamide 농도의 stacking gel을 사용하여 행하였다. 전기영동 후 1% coomassie brilliant blue gel 염색에 37°C에서 30분 정도 염색하고 다시 탈색 액으로 gel을 탈색시켰다. 이 과정을 통하여 나온 band의 분자량을 logarithmic graph에 의한 Rf값으로 계산하여 측정하였다. 이때 marker로는 mid-range perfect protein marker (150 kDa, 100 kDa, 75 kDa, 50 kDa, 35 kDa, 25 kDa, 15 kDa: Novagen社)를 사용하였다.

최적 염 농도, 온도 및 pH

최적 염 농도와 염 안정성을 검토하기 위하여 정제 물질을 0-5% 범위 내에서 10분간 반응시킨 다음 각 염 농도에 대한 잔존활성을 측정하였다. 앞서 결정된 최적반응 pH에서 효소의 최적 반응 온도를 결정하기 위하여 정제 효소 액을 30-60°C 범위 내에서 5분간 보정한 다음, 각 온도에 *V. anguillarum* NCMB1 배양액을 시간별로 반응시킨 후 잔존활성을 측정하였다. 앞에서 결정된 최적 반응 조건에서 정제물질의 최적 반응 pH의 측정은 정제 효소 액을 20 mM sodium citrate buffer (pH 3.0, 4.0), 20 mM sodium acetate buffer (pH 5.0), 20 mM potassium phosphate buffer (pH 6.0), 20 mM sodium phosphate buffer (pH 7.0), 20 mM Tris-HCl buffer (pH 8.0), 20 mM sodium carbonate buffer (pH 9.0)을 이용하여 30°C에서 1시간 방치시킨 후 잔존 저해활성의 최

적반응 pH를 비교하였다.

각종 금속이온 및 EDTA의 영향

여러 금속이온 MgSO₄, MnSO₄, CaCl₂, CoCl₂, FeSO₄, HgCl₂, ZnSO₄, CuSO₄, AgNO₃과 EDTA를 5 mM이 되게 조정하여 정제된 저해물질과 동량 혼합한 뒤 30°C에서 10분간 반응시킨 후 잔존 활성을 측정하였다.

화학 처리제와 항생제와의 활성 비교

현재 양식장에서 사용되고 있는 화학 처리제인 Oxolinic acid (Sigma), Flumequine (Sigma)을 10 uM의 농도로 24시간 진탕 배양한 *V. anguillarum* NCMB1에 30°C에서 1시간 반응시켜 잔존 생육도를 측정하였다. 항생제는 penicillin (Serva Co.)과 tetracycline (Sigma Co.)을 100 ppm 농도로 처리하여 30°C에서 1시간 반응시켜 잔존 생육도를 측정하였다. 정제된 저해물질은 위의 반응제와 동량 혼합한 후 30°C에서 1시간 반응시켜 잔존 생육도를 측정하였다.

정제 저해물질의 독성 검사

정제물질이 어류에 미치는 독성검사를 위하여 약 10 cm 크기의 넙치 치어 10마리에 정제된 저해물질을 각각 0.2 ml씩 복강 주사하고, 대조군은 0.65% 생리식염수만을 주사하여 한 달간 관찰하였다. 실험 수조(23°C, 300 l)의 사육수(水)는 실험 종료 시까지 교환하지 않았으며 사료는 투여하지 않았다.

결 과

저해물질의 정제

최적 배양조건에서 배양된 배양액을 원심 분리하고 전체 정제과정은 Table 1에 요약하였다. 먼저 상등액을 회수하고 이를 염석, 투석하여 얻은 조 효소액을 Fig. 1에서 보는 바와 같이 DEAE-sephadex A-50 ion exchange chromatography

Table 1. Purification of *B. amyloliquefaciens* H41 growth inhibition factor

Purification step	Total activity (IU ₅₀)	Total protein (mg)	Specific activity (IU ₅₀ /mg)	Purification (fold)	Yield (%)
Culture broth	3,237	1,637	1.98	1	100
80% ammonium sulfate precipitate	1,532	231	6.63	3.35	47.3
DEAE-sephadex A-50	721	57	12.65	6.38	22.2
Sephadex G-200 gel filtration	335	8	41.87	21.14	10.3
Sephadex G-50 gel filtration	97	1.2	80.83	40.82	2.9

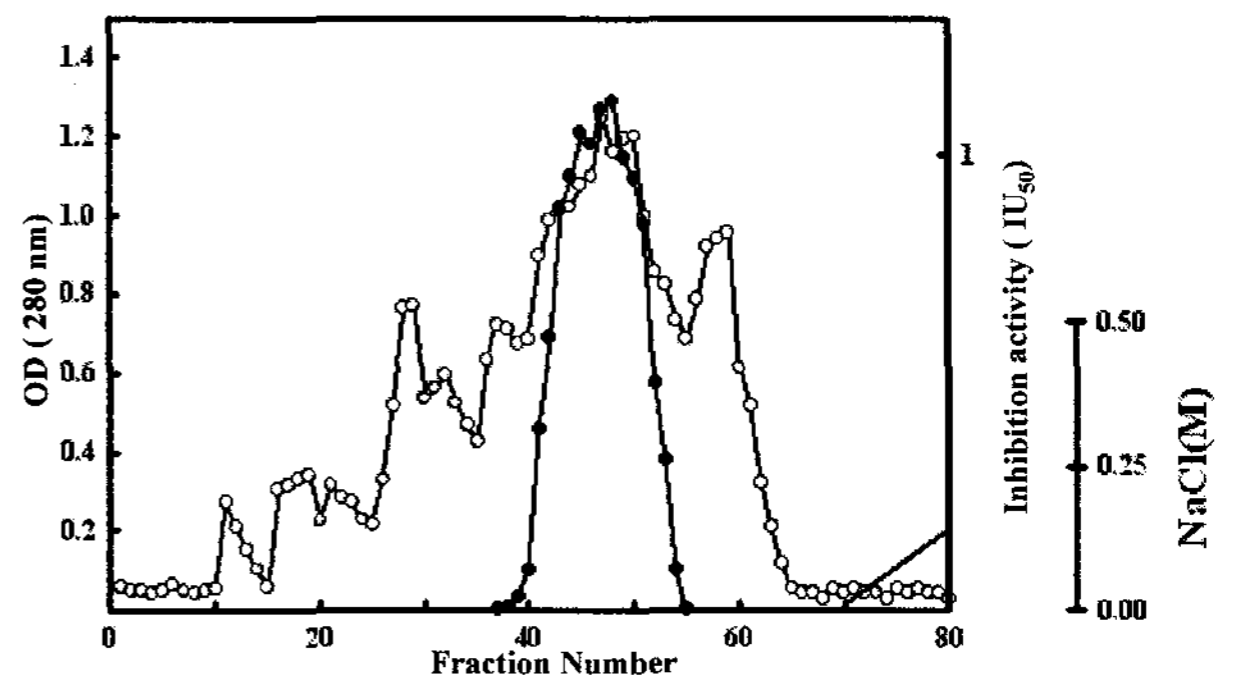


Fig. 1. Elution profile of DEAE-Sephadex A-50 column chromatography of *B. amylolique-faciens* H41 growth inhibition factor. ●: Inhibition activity, ○: Absorbance at 280 nm

를 행하고 활성부위만을 모아, Fig. 2에서 보는 바와 같이 sephadex G-200 gel filtration column chromatography를 행하고 다시 정제도를 높이기 위하여 Fig. 3에서 보는 바와 같이 sephadex G-50 gel filtration column chromatography를 거쳐 최종적으로 2.9%의 수율을 얻을 수 있었으며 40.8배의 정제된 효소를 얻을 수 있었다. 이상의 과정으로 본 생육저해물질이 효소임을 알 수 있었다.

정제물질의 분자량

정제물질을 SDS-PAGE를 이용하여 전기 영동하여 Fig. 4에서 보는바와 같이 단일 band를 확인하였으며, mid-range marker와 저해물질의 gel 상의 이동거리를 이용하여 Rf치를 측정한 결과 분자량은 약 48 kDa으로 확인되었다(Fig. 5).

정제물질의 최적온도, pH와 안정성

정제된 저해물질의 최적 온도는 Fig. 6에서 보는 바와 같이 50°C에서 18%의 잔존활성을 나타내어 급격히 실활 되어 가는 것을 알 수 있었으나 30°C 이하에서는 시간이 지나도 활

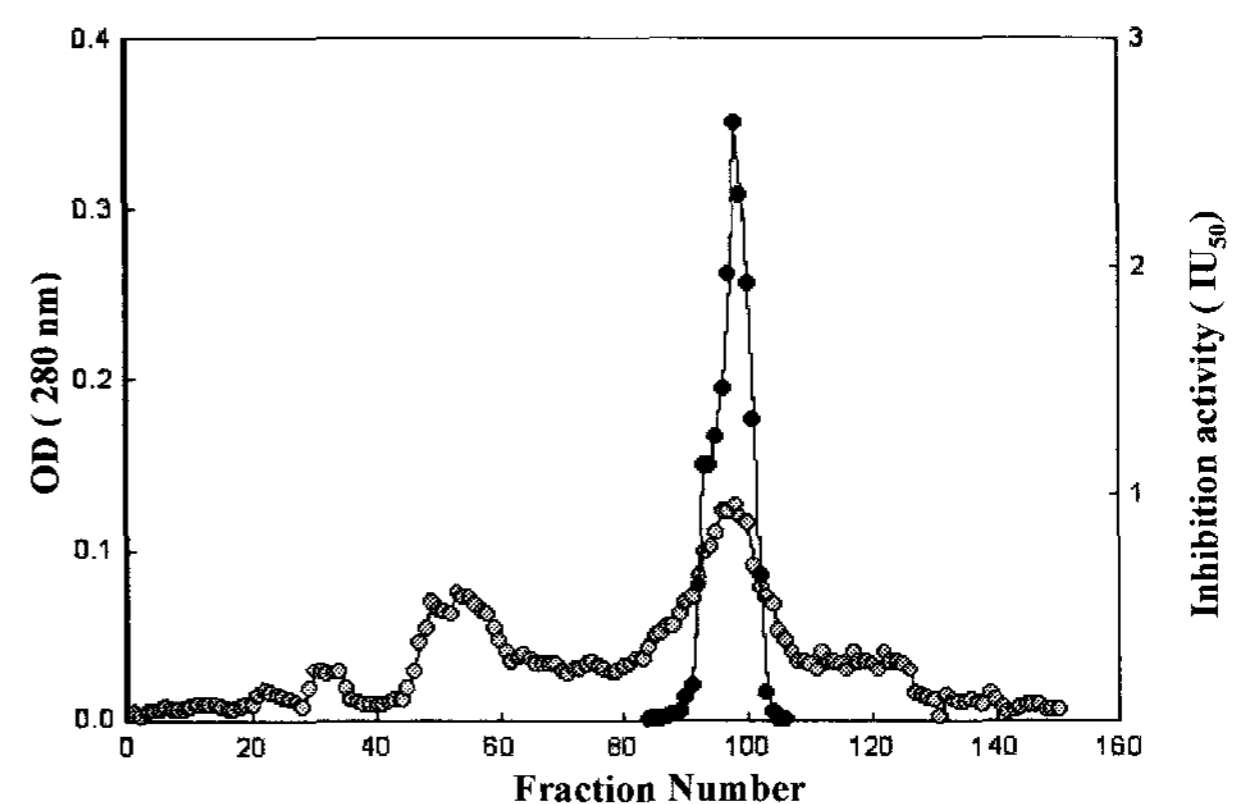


Fig. 2. Elution profile of Sephadex G-200 column chromatography of *B. amyloliquefaciens* H41 growth inhibition factor. ●: Inhibition activity, ○: Absorbance at 280 nm

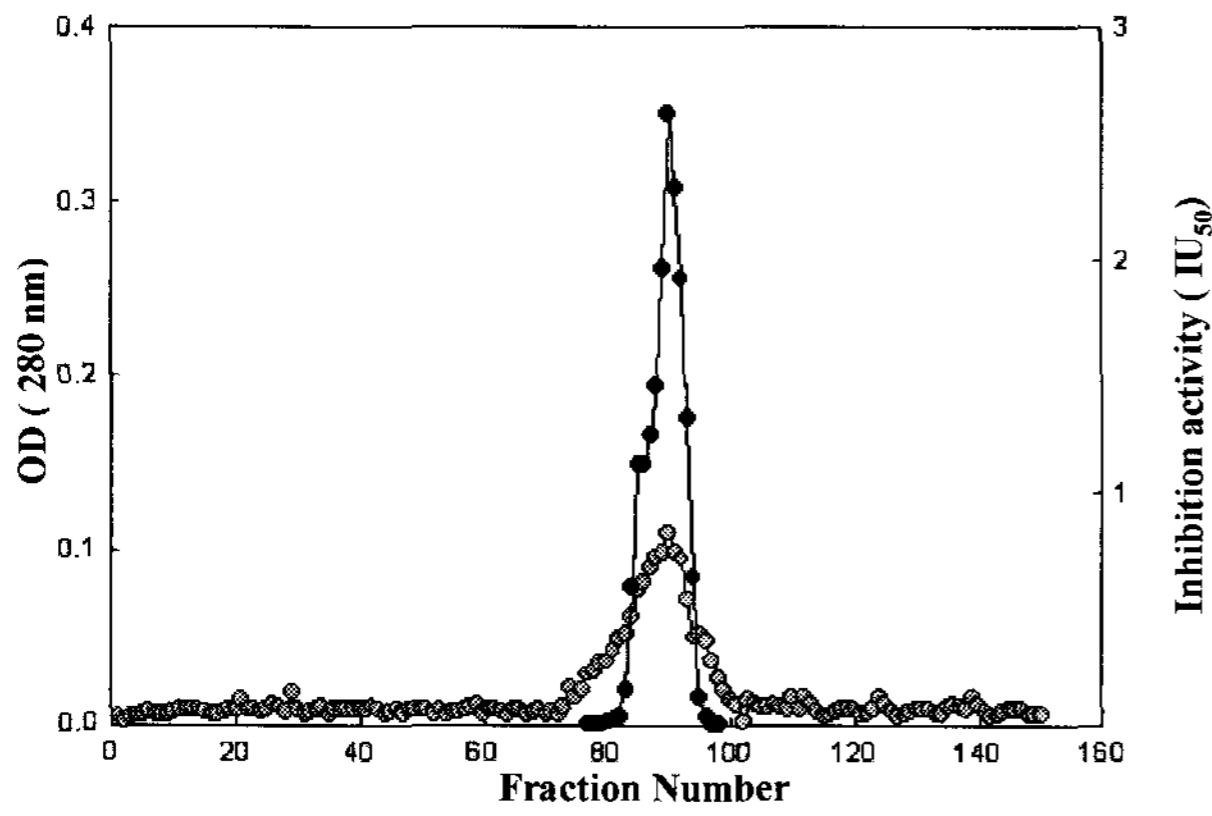


Fig. 3. Elution profile of Sephadex G-50 column chromatography of *B. amyloliquefaciens* H41 growth inhibition factor. ●: Inhibition activity, ○: Absorbance at 280 nm

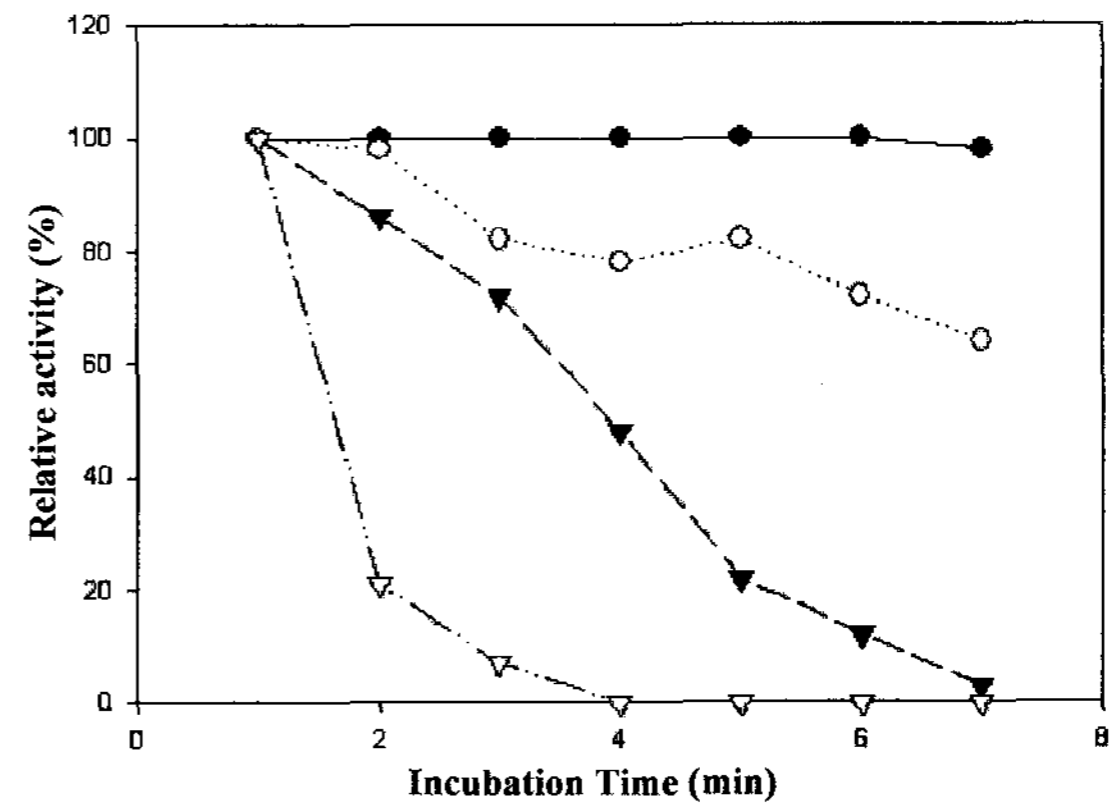


Fig. 6. Optimal temperature of the oxidation and reduction of the purified growth inhibition factor. ●: 30°C, ○: 40°C, ▼: 50°C, ▽: 60°C

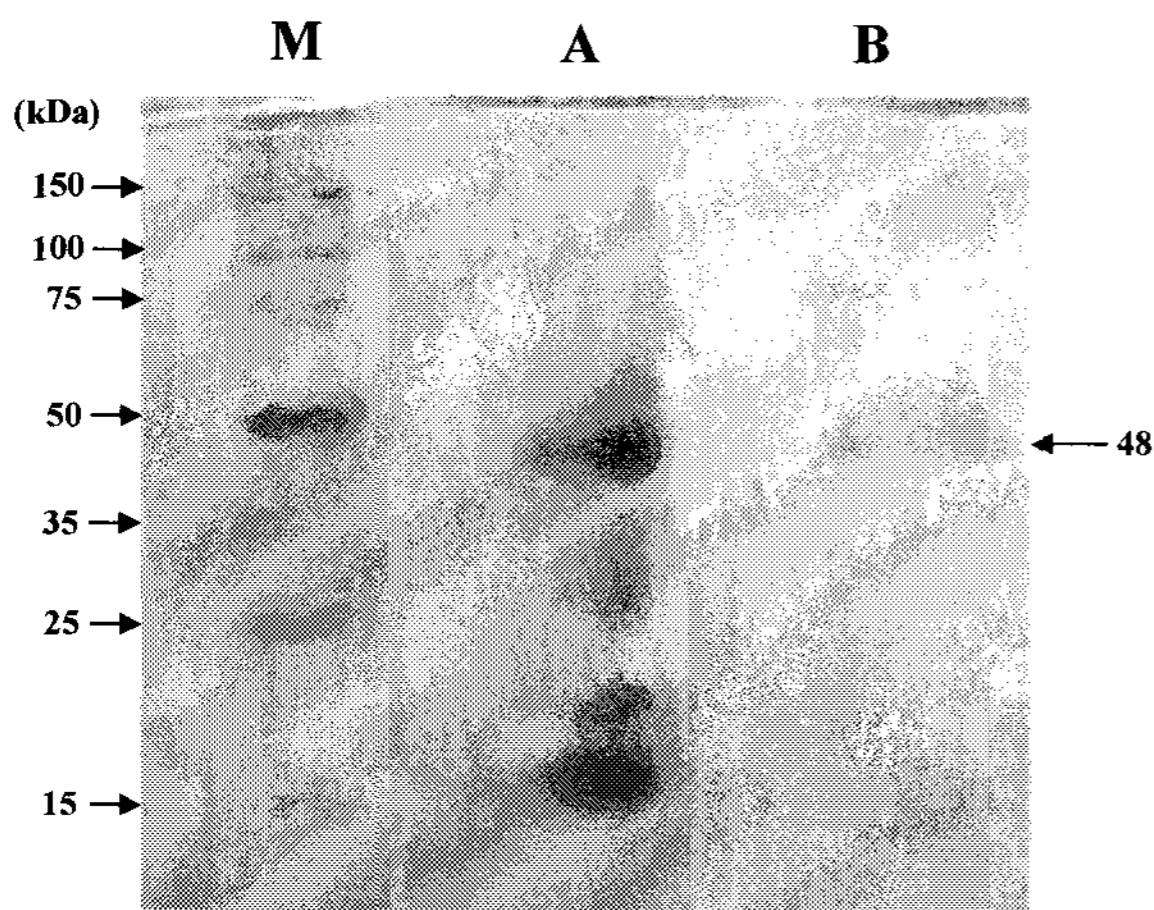


Fig. 4. Molecular weight of purified *B. amyloliquefaciens* H41 growth inhibition factor on SDS-PAGE. M: Mid range Molecular weight marker, A: Culture broth, B: Purified inhibition factor

성이 유지되는 것을 알 수 있었고 저해 반응에 대한 최적 온도는 30°C를 나타내어 반응 최적 온도를 30°C로 결정하였다. *B. amyloliquefaciens* H41 균주가 생산하는 정제물질의 pH에 대한 안정성을 검토한 결과 Fig. 7에서 보는 바와 같이 pH 6.0-8.0까지의 범위에서 비교적 안정하며 활성이 유지되었지만 pH 5미만, pH 9 이상에서는 활성이 급격히 소실되었으며 최적 반응 pH는 8.0이었다.

각종 금속이온 및 EDTA 안정성, 염 농도

여러 가지 금속이온과 EDTA가 정제물질에 미치는 영향을 비교해 본 결과 Fig. 8에서 나타난 바와 같이 대부분의 금속 이온들이 정제물질에 저해를 가져오거나 미미한 효과만 나타내는 것으로 나타났다. 금속이온의 효과에 있어서는 CoCl₂, HgCl₂, ZnSO₄, AgNO₃에서는 저해되는 양상을 나타

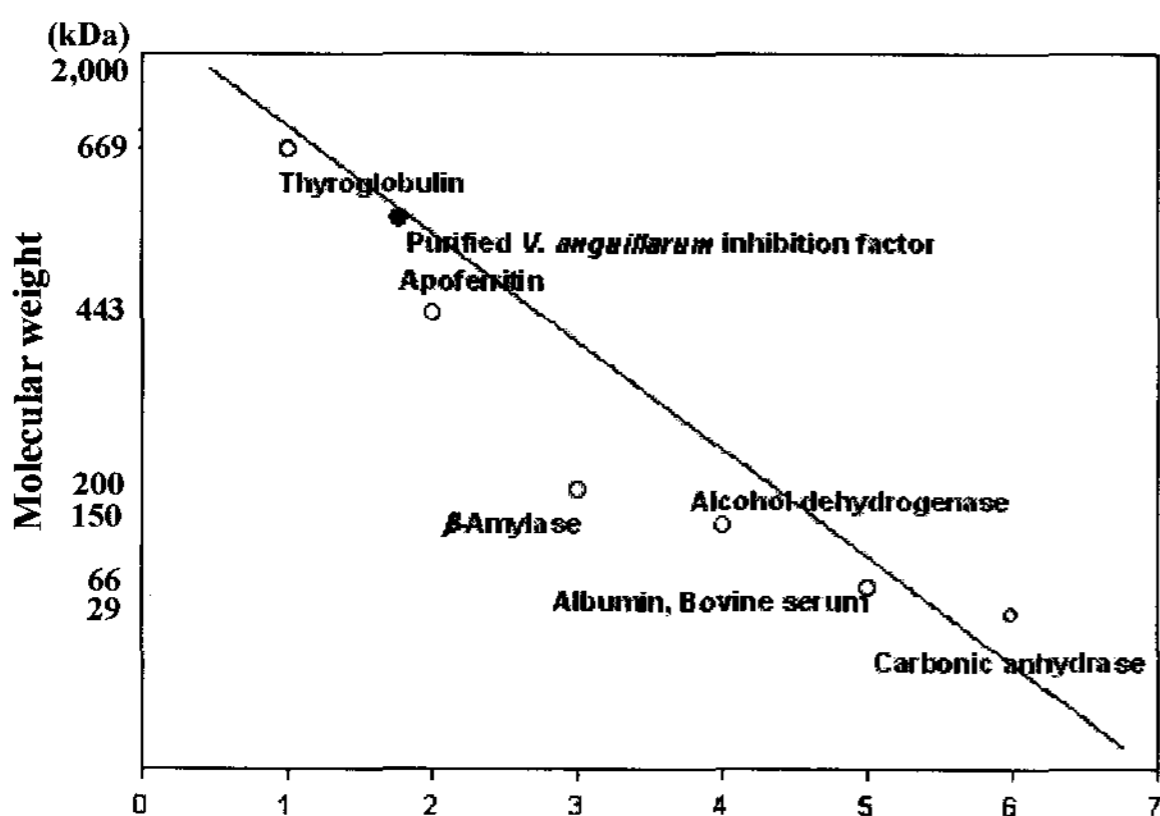


Fig. 5. Estimation of molecular size of the purified *B. amyloliquefaciens* H41 growth inhibition factor on the gel filtration chromatography. ●: Purified growth inhibition factor, ○: Molecular weight marker

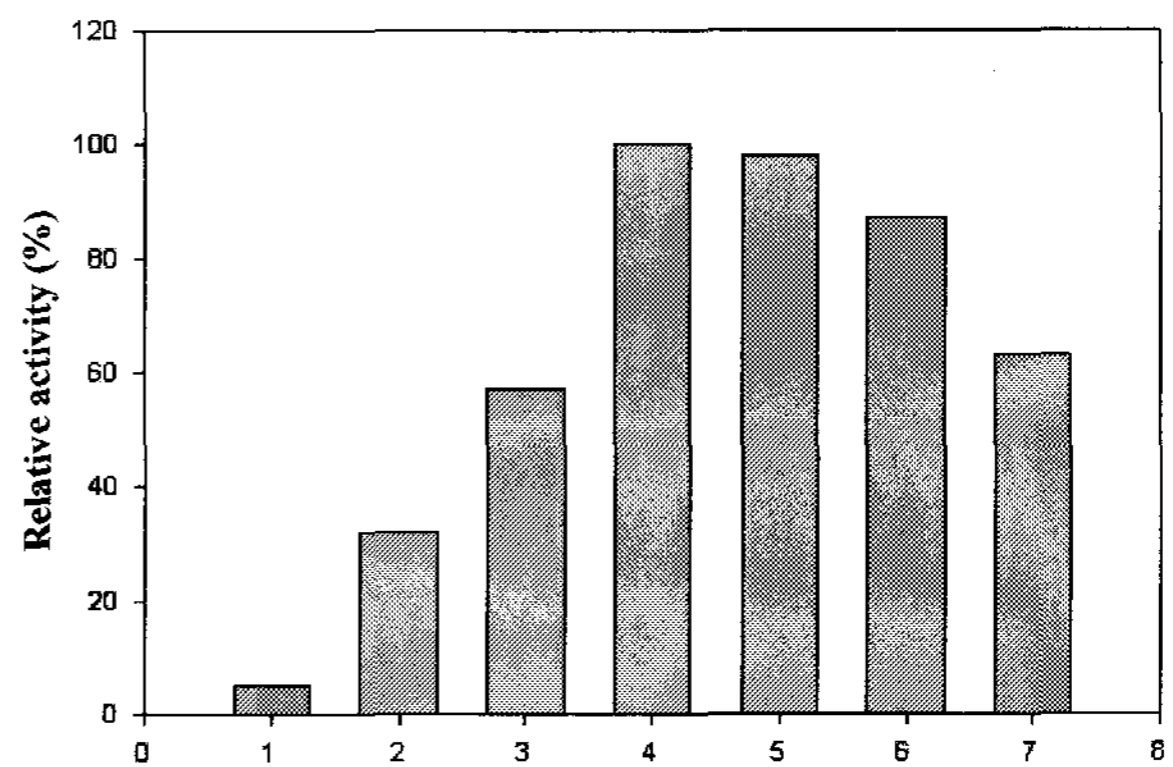


Fig. 7. Optimal pH of the oxidation and reduction of the purified growth inhibition factor. 1, 2: 20 mM sodium citrate buffer (pH 3.0, 4.0), 3: 20 mM sodium acetate buffer (pH 5.0), 4: 20 mM potassium phosphate buffer (pH 6.0), 5: 20 mM sodium phosphate buffer (pH 7.0), 6: 20 mM Tris-HCl buffer (pH 8.0), 7: 20 mM sodium carbonate buffer (pH 9.0)

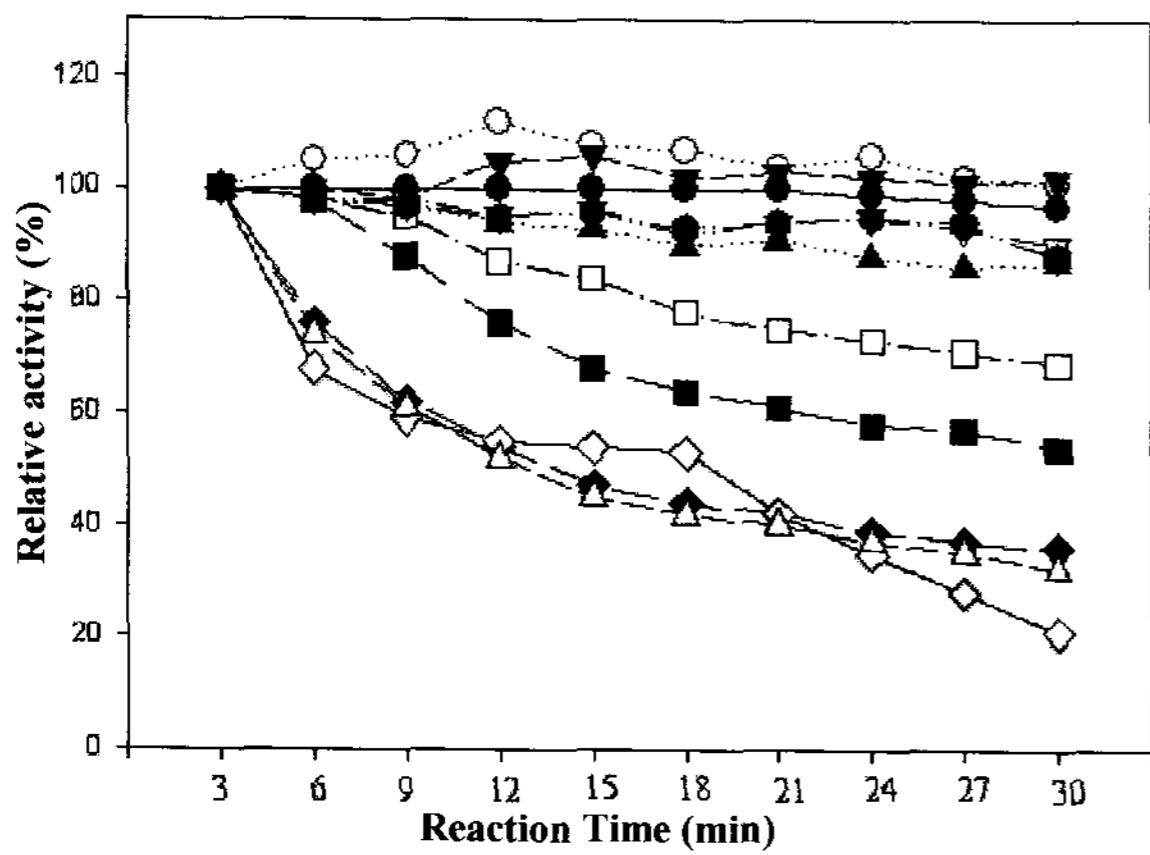


Fig. 8. Effect of metal ions and EDTA on the purified growth inhibition factor. ●: Control, ○: MgSO₄, ▼: MnSO₄, ▽: CaCl₂, ■: CoCl₂, □: FeSO₄, ◆: HgCl₂, ◇: ZnSO₄, ▲: CuSO₄, △: AgNO₃, ◆: EDTA

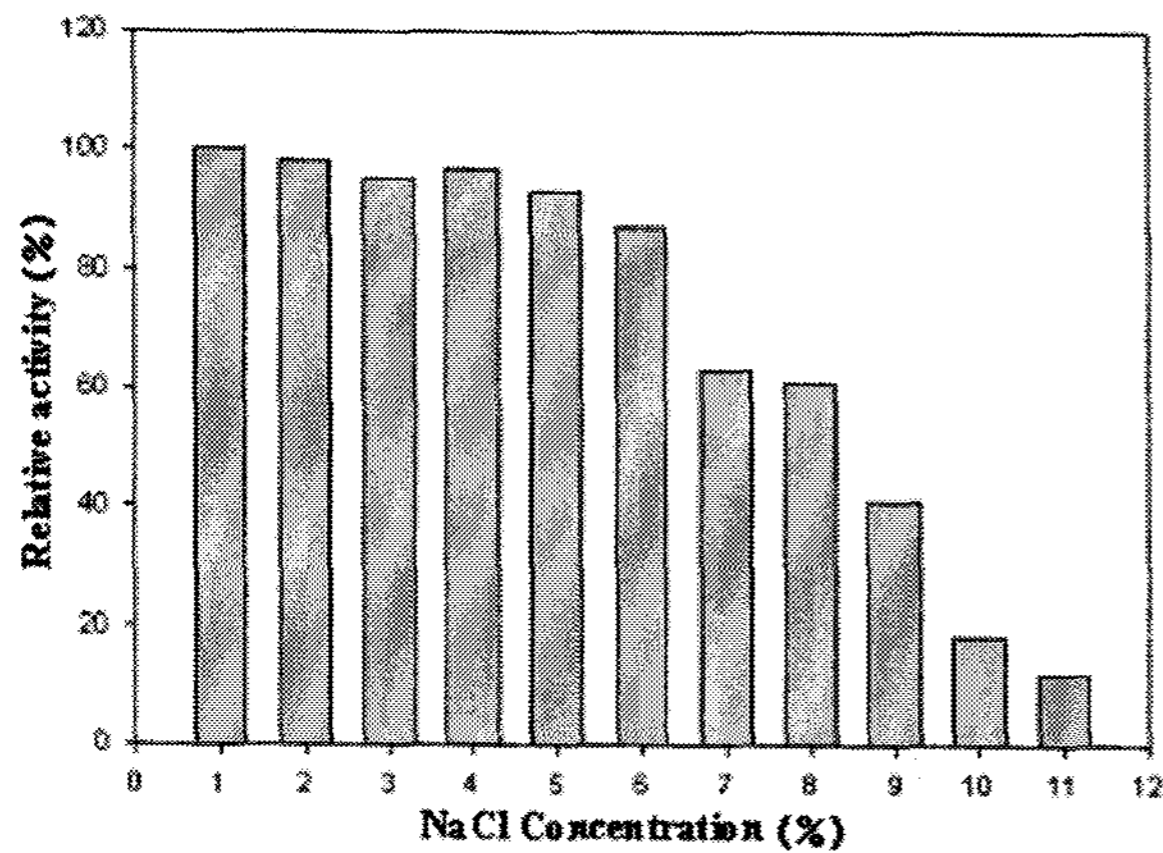


Fig. 9. Effect of NaCl concentration on the purified growth inhibition factor. 1: 0%, 2: 0.5%, 3: 1%, 4: 1.5%, 5: 2%, 6: 2.5%, 7: 3%, 8: 3.5%, 9: 4%, 10: 4.5%, 11: 5%

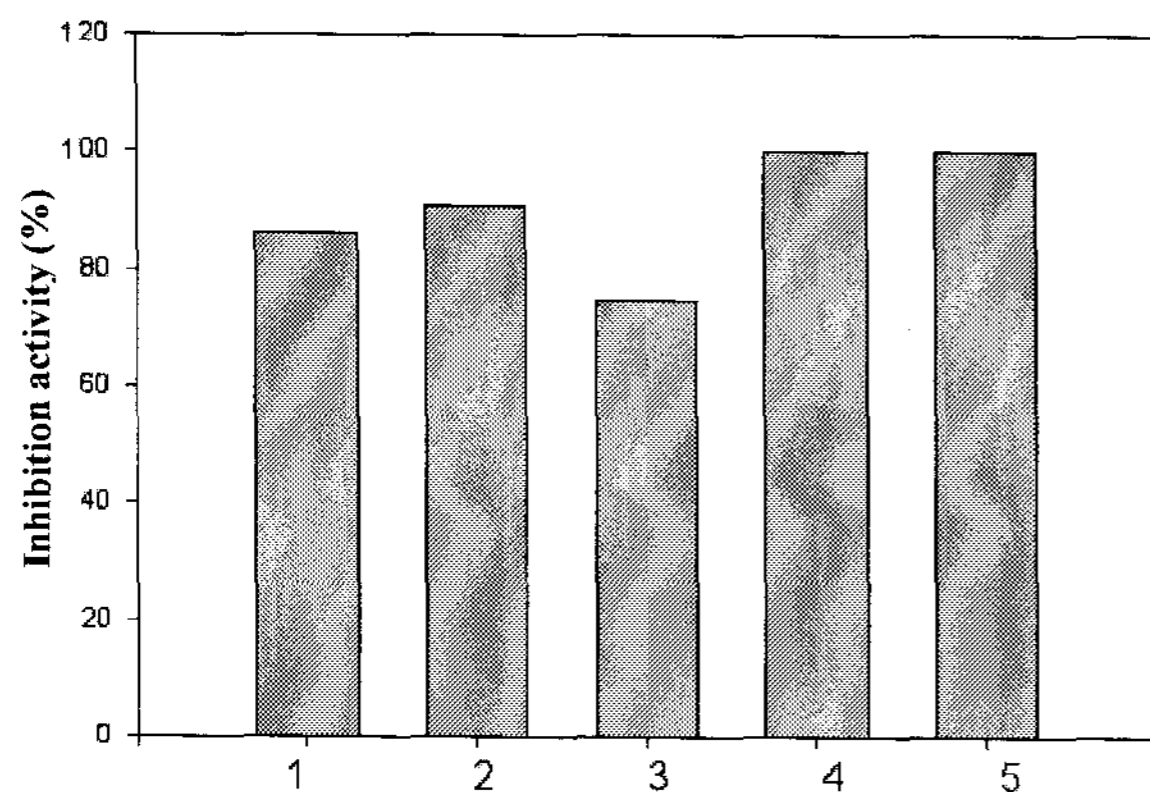


Fig. 10. Comparison of *B. amyloliquefaciens* H41 growth inhibition factor and anti-bacterial agents on *V. anguillarum* NCMB1. 1: Oxolinic acid, 2: Flumequine, 3: *B. amyloliquefaciens* H41 growth inhibition factor, 4: Penicillin, 5: Tetracycline

내었고 MgSO₄, MnSO₄에서 미미한 효소활성의 증가를 나타내었다. Fig. 9에서 보는 바와 같이 염 농도는 2.5% 범위 내에서는 별다른 차이를 나타내지 않았으나 그 이상에서는 활성의 저해를 나타내었다.

정제물질과 화학 처리제, 항생제와의 활성 비교

정제된 저해물질을 현재 상업적으로 사용하고 있는 화학 처리제, 항생제와 함께 효율성을 비교해 보았을 때 Fig. 10에서와 같이 정제된 저해물질은 *V. anguillarum*의 생육을 약 78% 저해 하는 것으로 나타났다.

정제 저해물질의 독성 검사

독성 검사를 위해 정제물질을 투여한 넙치 중 어떤 넙치도 30일 간의 관찰기간 동안 단 한 마리의 폐사도 일어나지 않는 것으로 나타났다.

고 찰

어병균 중 *V. anguillarum*은 여러 종류의 어류에 감염하며 어류의 장이나 여러 부위에 손상을 입히는 균으로 알려져 이를 제어하기 위한 방법이 시도 되었으나 어떤 경로로 어류에 침입하는지는 알 수 없으며 어류의 장에서 증식한다는 것은 실험적으로 감염시킨 경우에 어류의 분변에서 본 균을 검출하거나 감염 후 수개월 뒤 양식장 주변이나 침전물에서 분리함으로써 증명되었다[5,6,11].

해수 세균 중에는 *Vibrio* sp.에 저해능을 가진 균종의 존재가 밝혀져 왔으며 해수 미생물이 항균성 물질을 생산한다는 보고가 있어오에 따라 여러 해양 미생물들이 실용 가능한 항미생물 물질의 보고로 알려지면서 근년에 이르러 해조류, 해산어, 담수어 등에서 이런 물질을 탐색하기에 이르렀다. 해양 환경보다 해산어의 장이나 위 등이 이들 미생물의 서식처로서 장에서 번식하며 장의 점막이 효과적인 방패막이로서의 역할과 영양의 공급처로 제공되며 이들 세균의 정착을 도우는 역할을 하여 다른 유해균의 침략, 성장 억제, 그리고 증식을 막아주는 저해물질들을 생산하여 어류를 보호하는 기능을 수행한다고 하였다[11]. 이미 여러 연구자들이 해양에서 분리된 균에서 항균성 물질을 생산하는 세균을 분리, 보고 하였으며 이들에 의한 어류 보호가 계속됨을 시사하였다[4,12].

본 과정에서도 세균성 어류질병인 *V. anguillarum*균을 예방하기 위한 생물 전구체의 개발에 목적을 두고 어류를 중심으로 어병균 저해물질을 생산하는 균을 탐색하는 과정에서 해산어의 장에서 *B. amyloliquefaciens* H41를 분리하게 되어 [7] 위 내용에 공감하게 되었다. 앞선 과정[8]에서 균의 특성 및 저해물질 생성인자들을 관찰하고 본 내용에서는 *V. anguillarum* 생육을 저해하는 물질을 정제하기에 이르렀다. 배양 상등액을 시작으로 4단계 정제과정을 통하여 최종 회수율

2.9%을 얻을 수 있었으며 40.8배의 정제된 생육 저해물질을 얻을 수 있었으며 분자량은 48 kDa이었다. 정제된 저해물질은 저해정도에 따라 활성을 측정하였으며, 정제물질의 활성을 위한 최적 반응 pH와 온도는 pH 7.5와 30°C로 확인되었다. 금속이온의 효과에 있어서는 CoCl₂, HgCl₂, ZnSO₄, AgNO₃에서는 완전히 저해되는 양상을 나타내었고 MgSO₄, MnSO₄에서 미미한 효소활성의 증가를 나타내었다. 일부 어병균의 경우에 저해활성에 Fe 같은 성분이 영향을 미치는 결과[4]를 보고하였으나 본 균에서는 뚜렷한 차이가 나타나지 않았다. 염에 관한 안정성은 일반 해수 균의 생육가능 농도인 3%의 농도에서 활성을 나타내는 것으로 확인되었다.

정제된 *V. anguillarum* 생육 저해물질을 현재 상업적으로 사용되고 있는 화학 처리제나 항생제와 함께 효율성을 비교해 보았을 때 *V. anguillarum* 생육 저해물질은 약 78%의 저해 활성을 나타내어 시험 항생제에 비해 저해 효율성이 약간의 차이를 나타내는 것을 알 수 있었다. 그러나 환경 친화적인 면에서는 더욱 응용 가치가 있는 것으로 보이며 최근의 생물 방제에 대한 관심이 높은 면에서도 의의가 있을 것으로 보아진다.

분리 균의 독성검사를 위해 정제물질을 해수어에 투여한 결과 30일간의 기간이 지나도 어떤 해수어도 폐사하지 않고 생존하는 것으로 보아 *B. amyloliquefaciens* H41 정제물질이 어류 자체에는 독성을 가지지 않는 것으로 판단되었다.

본 과정에서 분리된 균이 어류의 장에서 분리되어 정상세균의 한 종류로 볼 수도 있겠으나 생물 방제의 균종 다양성 확보 차원에서 지속적인 시도로 많은 균종의 확립이 필요할 것으로 보이며[12], 또한 본 과정에서의 결과로 볼 때 생육 저해 범위가 제한 적인 점으로 보아 다른 어류 병원성 미생물의 생물학적 방제 차원에서의 다각적인 탐색이 요구되는 바이다. 이미 밝혀진 몇몇 균종에 대한 결과로[2,3,4] 봐서도 어류에 따른 질병 양상을 파악하여 응용 가능한 균종의 탐색이나 균주 확보가 필요하다고 보아진다.

본 과정을 통하여 *Bacillus amyloliquefaciens* H41가 분비하는 *V. anguillarum* 생육저해물질이 양식업에 사용 될 수 있는 가능성을 나타내고 있으므로, 산업적 이용을 위한 대량생산, 저해물질의 유전자 검토, 그리고 저해물질의 효과적인 사용 방법 개발 등이 앞으로 남은 과제라고 사료된다.

요 약

어류 질병 치료를 위한 probiont의 개발에 목적을 두고 어병균 *Vibrio anguillarum* NCMB1의 생육에 저해물질을 생산하는 *Bacillus amyloliquefaciens* H41균주를 분리하고 이 물질의 특성을 규명하기 위하여 정제를 시행하였다. 분리 균을 배양한 배양 상등액을 70% 염석, 투석하여 조 효소액으로 제작하고 조 효소액을 DEAE-sephadex, A-50 ion exchange

chromatography, sephadex G-200 gel filtration column chromatography을 통하여 정제하고 SDS-PAGE 를 통하여 단일밴드를 확인하고 최종 회수율 2.9%을 얻을 수 있었으며 40.8배의 정제된 *V. anguillarum* NCMB1 생육저해물질을 얻을 수 있었다. 정제된 저해물질은 저해정도에 따라 단위를 설정하여 활성을 측정하였으며, 분자량은 48 kDa 로 확인되었으며 정제물질의 활성을 위한 최적 반응 pH와 온도는 pH 7.5와 30°C로 확인되었다. 금속이온의 효과에 있어서는 CoCl₂, HgCl₂, ZnSO₄, AgNO₃에서는 완전히 저해되는 양상을 나타내었고 MgSO₄, MnSO₄에서 미미한 효소활성의 증가를 나타내었다. 그리고 염에 관한 안정성은 일반 해수의 농도인 3%의 농도에서도 활성을 나타내는 것으로 확인되었다. 정제된 저해물질을 현재 상업적으로 사용하고 있는 화학처리제나 항생제와 함께 효율성을 비교 해 보았을 때 저해물질은 약 78%의 저해 활성을 나타내는 것을 알 수 있었고 항생제보다는 효율성이 낮았으나 독성검사를 위해 정제물질을 살아있는 어류에 투여하였으나 어떤 해수어도 폐사하지 않는 것으로 보아 어류 자체엔 독성을 나타내지 않는 물질로 나타났다. 따라서 *B. amyloliquefaciens* H41 균주가 생산하는 정제 물질이 *V. anguillarum* 생육에 저해물질로 작용하는 것으로 밝혀졌으며 친환경적인 특성을 가진 물질로 밝혀졌다.

감사의 글

본 논문은 2007학년도 동의대학교 학술 연구비 지원에 의하여 수행되었으며 이에 감사합니다.

References

- Allan, W. J., O. Christer, K. Staffan and L. C. Patrica. 1998. Isolation and characterization of turbot associated bacteria with inhibitory effects against *Vibrio anguillarum*. *Appl. Environ. Microbiol.* **57**, 2223-2228.
- Austin, B., L. F. Stuckey, P. A. W. Robertson, I. Effendi and D. R. Griffith. 1995. A probiotic strain of *Vibrio alginolyticus* effective in reducing diseases caused by *Aeromonas salmonicida*, *Vibrio anguillarum* and *Vibrio ordalli*. *J. Fish Dis.* **18**, 93-96.
- Bly, J. E., S. Quiniou, M. A. Law, L. A. Son and L. W. Clem. 1997. Inhibition of *Saprolegnia* pathogenic for fish by *Pseudomonas fluorescens*. *J. Fish Dis.* **20**, 35-40.
- Gram, L., J. Melchiorson, B. Spanggard, I. Huber and T. F. Nielsen. 1999. Inhibition of *Vibrio anguillarum* by *Pseudomonas flourecence* AH2, a possible probiotic treatment of fish. *Appl. Environ. Micro.* **65**, 969-973.
- Horne, M. T. and A. Baxendale. 1983. The adhesion of *Vibrio anguillarum* to host tissues and its role in pathogenesis. *J. Fish Dis.* **6**, 461-471.
- Kim, Y. H. 1998. Purification of *Vibrio anguillarum* hemolysin. *J. Life Science* **8**, 598-603.

7. Kim, Y. H., Y. K. Jeong, K. T. Chung, E. J. Rhu and Y. J. Jeong. 2006. Isolation of *Bacillus amyloliquefaciens* H41 producing growth inhibition factor against *Vibrio anguillarum*. *J. Life Science* **16**, 605-611.
8. Leammli, U. K. 1970. Cleavage of structure proteins during the assembly of the Bacteriophage T. *Nature* **227**, 680-686.
9. Lowry, O. H., N. J. Rosebrough, A. L. Farr and R. J. Randall. 1951. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* **193**, 265-275.
10. Nakai, T., T. Kanno, E. R. Cruz and K. Muroga. 1987. The effects of iron 19 compounds on the virulence of *Vibrio anguillarum* in Japanese eels and ayu. *Fish Pathol.* **22**, 185-189.
11. Olsson, J. C., A. Westerdahl, P. L. Conway and S. Kjelleberg. 1992. Intestinal colonization potential of turbot and dab-associated bacteria with inhibitory effects against *Vibrio anguillarum*. *Appl. Environ. Microbiol.* **58**, 551-556.
12. Spanggaard, B., I. Huber, J. Nielson, E. B. Sick, C. B. piper, T. Martinussen, W. J. Slierendrecht and L. Gram. 2001. The probiotic potential against vibriosis of the indigenous microflora of rainbow trout. *Environ. Microbiol.* **3**, 755-765.
13. Westerdahl, A., J. C. Olsson, S. Kjelleberg and P. L. Conway. 1991. Isolation and characterization of turbot (*Scophthalmus maximus*)-associated bacteria with inhibitory effects against *Vibrio anguillarum*. *Appl. Environ. Microbiol.* **57**, 2223-2228.
14. Wu, M. and R. E. Hancock. 1999. Improved derivatives of batenecin, a cyclic dodecameric antimicrobial cationic peptide. *Antimicrob. Agents Chemother.* **43**, 1274-1276.