



해양유래미생물 항균 활성 *Bacillus* sp. 2-4 균주의 대량 배양방법

김태완* · 김승민† · 황영민* · 김 철* ·

이다원** · 전려진** · 정준범** · 김영옥*** · 남보혜*** · 이경준****

(†주식회사 우진비앤지 · **제주대학교 · ***국립수산과학원 · ****제주대학교 해양과환경연구소)

Determination of Mass Culture Method of Marine-derived Micro Organism, *Bacillus* sp. 2-4 (KCCMI 11107P) with Antimicrobial Acitivity

Tage-Wan KIM* · Seung-Min KIM† · Yeong-Min HWANG* · Chul KIM* · Da-Won LEE** ·
Lyu-Jin JUN** · Joon-Bum JEONG** · Young-Ok KIM*** · Bo-Hye NAM*** · Kyeong-Jun LEE****

(†Central Research Institute, Woo Gene · **Jeju National University · ***Biotechnology Research Division, National Institute of Fisheries Science · ****Korea Marine and Environmental Research Institute, Jeju National University,)

Abstract

This study provides a method for mass-culture of strains with antimicrobial activity that are able to stably and effectively culture and produce highly functional active substances using the microbial metabolites of strains with antimicrobial activity. This study found that 30°C, pH 7.0, 100 rpm, 0.5 vvm was the optimal culture condition for *Bacillus* sp. 2-4 strains. The formation of optimal medium condition produced by the experiments on carbon source and nitrogen source was confirmed as 2.0% of carbon source (casein hydrolysate and glucose, 3:1) and 3.0 % of nitrogen source (yeast extract and soybean meal, 1:5). Scale-up by using 20 KL on the optimal medium for the optimization of mass culture confirmed that ultimate antibacterial activated materials including crude bacillomycin and crude surfactin were constantly generated.

Key words : Mass-culture, Bacillomycin, Surfactin

I. 서론

지난 20년간 양식 산업은 급격히 증가하였고 식량산업으로써 그 가치가 높아지고 있으나, 양식 도중 발생하는 어류질병이 양식 산업 발전에 심각한 악영향을 미치는 것으로 알려져 있다 (Kim et al., 2016). 일반적으로 육상수조 양식의 경우 단위 면적당 생산량을 극대화시키기 위해

고밀도 사육을 진행하고 있으며, 이러한 고밀도 사육은 각종 질병발생의 원인을 제공하고 어류의 폐사를 일으켜 경제적인 손실을 일으키고 있는 실정이다(Kim et al., 2014).

넙치의 양식과정에서 발생하는 주요 세균성 질병의 원인체로는 *Edwardsiella* sp., *Streptococcus* sp., *Vibrio* sp. 등이 보고되고 있다(Lee et al., 2007). 하지만 우리나라의 어류 양식산업은 어류

† Corresponding author 031-352-0185, everydayok@jejunu.ac.kr

* 이 논문은 해양수산과학기술진흥원 미래해양산업기술개발사업 (과제번호:20150040)으로 수행되었음.

질병의 예방보다는 치료위주의 대책으로 항생제를 사용하고 있으며, 이로 인해 어류의 잔류독성과 항생제에 대한 내성 세균이 출현하여 소비자들에게 불신을 안겨주고 있다(Kim et al., 2016).

지금까지 천연물질로부터 생리활성을 가진 천연물질의 연구는 주로 육상 자원을 대상으로 하여 왔지만 다년간의 연구를 통하여 새로운 원천이 고갈되는 양상을 보여 경제성이 떨어지고 있는 추세이다. 이에 선진국들은 해양 미생물 유래 천연물에 집중적인 연구를 하고 있으며 그 결과 현재까지 해양생물에서 약 5,500여종의 신물질이 개발되었다(Kim et al., 2006; Kim et al., 2011). 해양 유래 미생물의 천연물질 개발은 범세계적이며, 최근 세계적인 제약사들이 화학기반의 항생제 분야에서 생물유래 물질로의 전환 및 미생물을 이용하거나 그의 대사산물을 이용한 항균제 시장 진출 전략을 강화하는 움직임을 보이고 있다.

따라서, 본 실험에서는 항생제를 대처하여 어병세균을 억제할 수 있는 새로운 해양유래 미생물제제를 개발하기 위한 기초연구의 하나로써 어병세균에 항균능력이 우수한 *Bacillus* sp. 2-4 (KCCM11107P)의 대량배양을 위한 배양 조건과 항균활성을 증대시킬 수 있는 탄소원과 질소원을 선별하였다.

II. 재료 및 방법

1. 반응기 제작 및 DO 측정 시스템

본 시험에 사용된 반응기는 외경이 36.9cm, 내경 30.9cm, 높이 67.4cm인 Steel Use Stainless(SUS 316 L)로 된 원통형 50 L 형태로 제작되었다. 내경에 장착할 임펠러는 6개의 날개가 있는 터빈형(Turbine Impeller)과 패들형(Paddle Impeller)을 이용하였다. 터빈임펠러와 패들임펠러의 경우 지름이 15.5cm이고 높이가 10cm로 반응기 내경의 50.1%이었으며, 하층 임펠러와 바닥 사이의 거리

는 15cm로 하였다. 통기 장치는 Microsparger (Mott corporation)로 통기 구멍 크기가 24um로 직경은 외경 2mm, 내경 1.5mm, 길이 10cm를 사용하였다. 제작된 배양기에 Do Probe(Broadley James, USA)를 부착하고, probe로부터 출력되는 신호의 데이터는 컴퓨터를 이용하여 1분 단위로 자동적으로 저장되도록 하였다. 컴퓨터에 전달된 전압 값은 계산식에 의해 용존 산소농도(%)로 환산되어 화면상에 표시되었다. 산소전달계수 (K_L)를 구하기 위해, 일반적으로 많이 쓰이고 있는 Dynamic method를 이용하였다.

2. 실험세균 배양 및 유기용매를 이용한 분획물 조제

강력한 항균활성을 가진 균주로 선발된 *Bacillus* sp. 2-4(KCCM11107P)는 국립수산과학원을 통해 기술이전 받아 산업배지를 이용에 따른 대량배양을 통한 산업화 가능성을 확인하기 위해 사용하였다. 균주 보관용 배지는 tryptic soy agar (TSA, Difco) 배지를 사용하여 30°C에 48시간 조건으로 배양한 후, 국립수산과학원에서 제시한 방법에 따라 유기용매인 아틸아세테이트(ethyl acetate)를 이용하여 추출을 진행하였다(Kim et al., 2017).

3. 용매추출물의 항균활성 조사

산업배지 조성선정을 위해 *Bacillus* sp. 2-4 배양액의 균밀도(bacterial density)는 분광광도계(660 nm)를 이용하였고, 배양액의 항균활성은 paper disk법을 이용하여 비교하였다. 확보한 용매추출물의 항균활성 스펙트럼을 조사하기 위해 어류질병을 일으키는 병원성 세균 3종 (*Edwardsiella tarda*, *Vibrio anguillarum*, *Streptococcus parauberis*)에 대한 항균활성을 다음과 같은 방법을 통해 검사하였다. 먼저 각각의 세균들을 BHIB(Difco, USA)배지에 배양한 후, 1.0 x 10⁸ cfu/ml의 농도를 MHA(Difco, USA)에 도말

하였다. 이어서 직경 0.8cm의 paper disk를 올린 다음, *Bacillus sp.* 2-4 배양액을 50 μ L를 첨가하여 투명한 크기를 측정하여 비교하였다.

4. 지표성분 및 생성량 확인

Bacillus sp. 2-4가 배지내로 생산하는 향균물질을 확인하기 위한 이차대사산물분석은 질량분석기(LC-MS/MS)를 사용하여 진행하였으며, 생성량의 변화를 관찰하기 위해 HPLC 분석을 통해 물질을 분석하였다. 상기 분석장비 및 조건은 국립수산물품질관리원에서 제시한 내용과 동일한 방법으로 진행하였다(Kim et al., 2017).

5. 탄소원(Carbon source) 선정

기본배지에서 나머지 영양분의 변화를 주지 않고, 탄소원만 변화를 주어 *Bacillus sp.* 2-4 균주의 배양 과정에서 탄소원의 영향을 조사하였다. 모든 탄소원(sucrose, mannitol, fructose, glucose, casein, hydrolysate, glycine, cystein, CaCO₃, 효모추출액, tryptone)은 기본 배지의 탄소량과 같은 0.5%를 첨가하였으며, 30 $^{\circ}$ C, 100 ppm의 조건으로 48시간 배양하여 균밀도와 향균능력을 관찰하였다.

6. 질소원(nitrogen source) 선정

기본배지에서 나머지 영양분의 변화를 주지 않고, 질소원(soybean meal, yeast extract, casein peptone, corn steep liquor, malt extract, ammonium sulfate, ammonium nitrate, sodium nitrate, potassium nitrate)만 변화를 주어 *Bacillus sp.* 2-4의 배양과정에서 질소원의 영향을 조사하였다.

7. 온도에 따른 배양 효율 분석

Bacillus sp. 2-4균주의 대량배양을 위한 배양적온 및 적정 배양 시간을 조사하기 위하여 멸균된 15L 배지가 포함된 30L Jar 발효기에 *Bacillus*

sp. 2-4 균주 0.5%를 접종한 후 20 $^{\circ}$ C, 25 $^{\circ}$ C, 30 $^{\circ}$ C, 35 $^{\circ}$ C 및 40 $^{\circ}$ C 온도의 조건에서 배양하였다.

8. 배양적정 pH 조사

산업배지의 초기 pH는 종균의 산업배지에서의 초기 배양속도를 결정하는 중요한 요소이므로 배양을 위한 최적 pH를 선정하기 위해 산업배지로 멸균 후 20% NaOH을 이용하여 종균 접종전의 초기 pH를 pH 5 ~ pH 9로 조절하였고 배양 48시간 경과 후 균밀도 및 향균활성을 분석하였다.

9. 공기 주입량에 따른 배양 효율 분석

배양 시 최적 공기 주입량을 확인하기 위하여 공기 주입량을 0.1 ~ 2.0 vvm으로 조절하여 처리하였고 배양 48시간 경과 후 균밀도 및 향균활성을 분석하였다.

10. 교반속도에 따른 배양 효율 비교

교반속도에 따른 *Bacillus sp.* 2-4균주의 균밀도 및 향균능력의 영향을 관찰하기 위해 교반속도를 50, 100, 150, 200 및 250 rpm으로 각각 조절하여 48시간 동안 배양 후 균밀도 및 향균능력을 조사하였다.

11. 파일럿 플랜트 생산 프로세스의 확립

확립된 산업배지 조성 및 최적배양조건을 바탕으로 *Bacillus sp.* 2-4균주의 파일럿 플랜트(2KL)의 생산 프로세스를 확립하였다. 먼저 스케일업(scale-up) 단계는 *Bacillus sp.* 2-4 앰플 → 50 ml → 10 L → 2 KL의 단계로 진행되었고 각 단계별 접종량은 0.5%로 설정하였다. 단계별 배양 조건 및 배양 시간은 <Table 1>에 표기하였다.

12. 향균물질의 안정적인 대량배양 (20 KL) 기술 확립

2 KL scale의 파일럿 플랜트를 기반으로 산업

적으로 생산단가 감소 및 활성물질의 증가를 위한 20 KL의 대량배양 공정체계에 적용하였다.

<Table 1> Culture conditions and culture time for each step




Process	Volume	Incubation temperature	Seed volume	Incubation time
A unit	ampoule	-80℃	-	-
B unit	50 mL	30℃, 120 rpm	ampoule	8
C unit	10 L	30℃, 120 rpm	50 mL	8
Main	2 KL	30℃, 100 rpm	10 L	48

Ⅲ. 결 과

1. 용매 추출물의 항균활성 조사

어류질병을 일으키는 병원성 세균 3종에 대한 항균활성을 측정된 결과, *E. tarda* 32mm, *V. anguillarum* 15mm, *S. parauberis* 35mm의 클린존이 관찰되었다(<Table 2>).

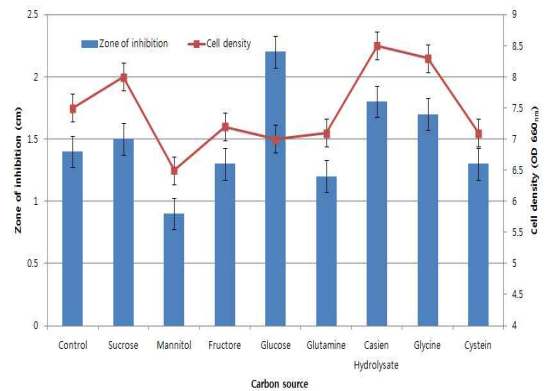
<Table 2> The result of antimicrobial sensitivity test by Bacillus sp. 2-4

Strains	Diameter of inhibition zone (mm)	
<i>E. tarda</i>	32	
<i>V. anguillarum</i>	15	
<i>S. parauberis</i>	35	

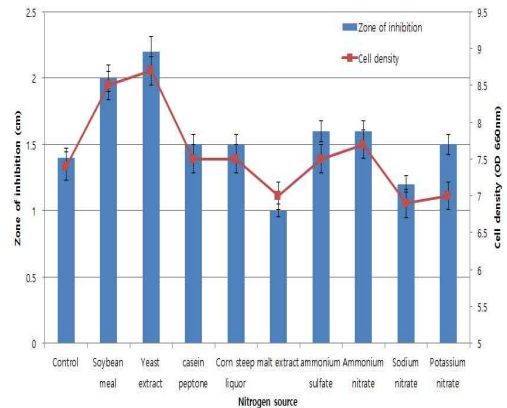
2. 탄소원 및 질소원 선정

탄소원 실험결과, casein hydrolysate를 처리하였을 때, 생균수의 양이 가장 많은 것으로 나타났으며 glucose를 처리 시 항균능력이 가장 높은 것

으로 관찰되었다([Fig. 1]). 또한, 질소원의 경우 yeast extract와 soybean meal에서 균밀도와 항균력이 가장 높은 것으로 확인되었다([Fig. 2]). 본 결과를 통해 탄소원은 casein hydrolysate 및 glucose 질소원은 yeast extract 및 soybean meal로 선정하였다.



[Fig. 1] Effects of various carbon sources on antifungal activity of *Bacillus* 2-4 (KCCM11107P).

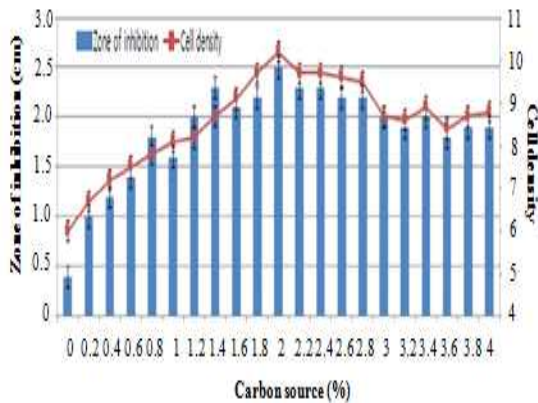


[Fig. 2] Effects of various nitrogen sources on antifungal activity of *Bacillus* 2-4 (KCCM11107P).

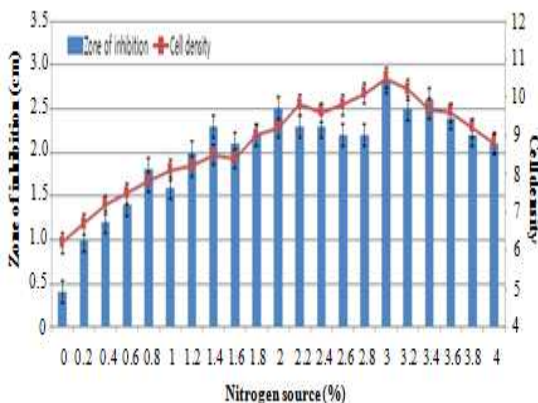
3. 탄소원 및 질소원 농도 선정

탄소원과 질소원의 농도에 따른 균밀도 및 항균능력을 조사하였다. 기본배지에 탄소원, 질소

원, 무기염의 농도를 고정한 상태에서 상기 탄소원(casein hydrolysate 및 glucose)과 질소원(yeast extract 및 soybean meal)을 각각 0~4% 사이의 농도로 탄소원은 3:1, 질소원은 1:5로 혼합하여 처리한 결과, 총 탄소원은 2.0%, 질소원은 3.0%를 함유하였을 때 균밀도의 농도가 가장 높았으며, 가장 강력한 항균능력을 나타내었다 [Fig. 3 & 4]. 또한 상기 결과를 바탕으로 *Bacillus sp.* 2-4의 최적 산업배지 조성을 확립하였다(<Table 23>).



[Fig. 3] Investigation on the bacterial density based on concentrations of carbon source and the antibacterial activity.



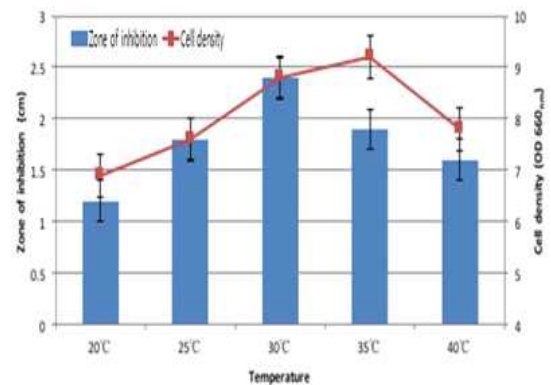
[Fig. 4] Investigation on the bacterial density based on concentrations of nitrogen source and the antibacterial activity.

<Table 3> Content of the growth medium for incubation

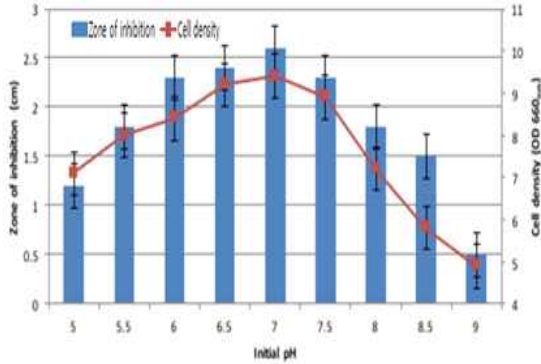
Ingredient	Content
Glucose	1.5
Casein hydrolysate	0.5
Yeast extract	0.5
Soy bean meal	2.5
K ₂ HPO ₄	0.1
NaCl	0.4
(NH ₄) ₂ SO ₄	0.1
CaCl ₂ 2H ₂ O	0.1
MgSO ₄ 7H ₂ O	0.05
MgSO ₄ 5H ₂ O	0.001

4. 배양적정 온도 및 pH 조사

대량배양을 위한 온도 및 pH에 따른 배양 효율 분석 결과, 균밀도는 30℃, 35℃에서 배양 시 가장 높게 나타났으며, 항균능력은 30℃에서 높게 나타나 배양적온을 30℃로 선정하였다(Fig. 5). pH 결과, pH 6~8사이에서 균주의 균밀도 및 항균능력이 뛰어난 것으로 확인되었으며, 특히 pH 7에서 가장 높은 항균능력이 관찰되어 적정 pH를 7로 선정하였다(Fig.6).



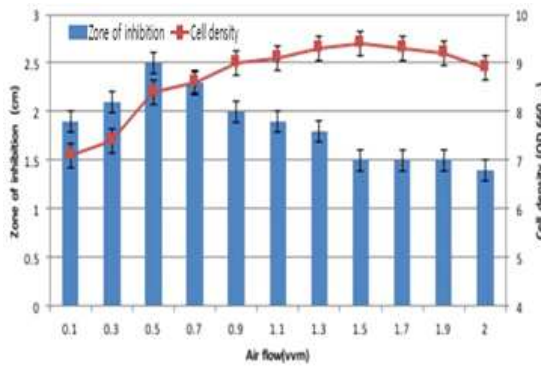
[Fig. 5] Investigation of proper temperature for culture.



[Fig. 6] Investigation of proper pH for culture.

5. 공기 주입량에 따른 배양 효율 분석

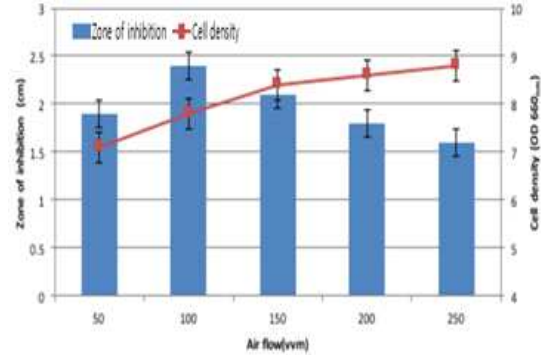
배양 시 최적 공기 주입량을 확인한 결과, 공기 주입량 1.5 vvm까지 공기 주입량이 많을수록 증가하였지만, 0.5 vvm일 때, 항균능력이 가장 높았으나, 공기 주입량이 많을수록 항균 능력이 저하되는 것을 확인하였다([Fig. 7]).



[Fig. 7] Investigation of proper air for culture.

6. 교반속도에 따른 배양 효율 비교

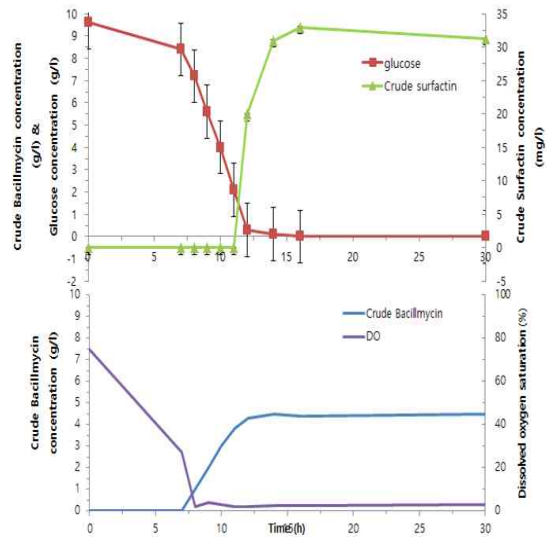
교반속도에 따른 균밀도 및 항균능력을 관찰한 결과, 교반속도가 증가할수록 균밀도가 높아지는 것으로 나타났으며, 100 rpm을 기점으로 교반속도가 증가할수록 항균능력이 저하되는 것으로 확인되었다.



[Fig. 8] Investigation of proper churn speed for culture.

7. 파일럿 플랜트 생산 프로세스의 확립

파일럿 플랜트 (2 KL)의 생산 프로세스 확립 후 배양 및 생산을 진행한 결과, 배지 내 탄소원과 용존산소량의 변화는 배양 6시간 이후 급격하게 나타났고, 항균물질 중 8시간 때 조바실로 마이신(crude bacillomycin), 11시간 이후 조서펙틴(crude surfactin)이 발생하기 시작하였으나, 배양 16시간 이후부터는 항균물질의 함량에 변화가 없는 것으로 나타났다([Fig. 9]).



[Fig. 9] Checking production of substances due to culture production of 2 KL

8. 항균물질의 안정적인 대량배양 (20 KL) 기술 확립

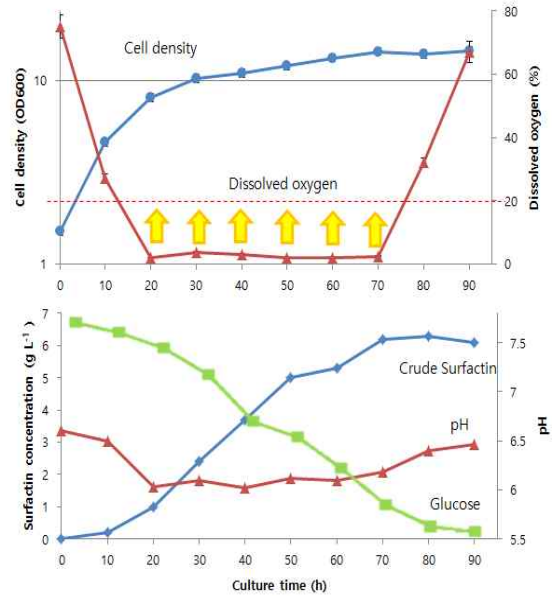
해양 유래 미생물 *Bacillus* sp. 2-4 균주의 대량 배양 공정 체계 (20KL)의 배양적 특성 및 배양 후 공정은 <Table 4>에 나타내었으며, 20 KL의 대량배양 공정체계에 적용한 결과, 조바실로 마이신 및 조서펙틴이 생성되는 것을 확인하였으며, 이를 통해 균밀도 및 항균물질 생산량의 체계를 확립하였다([Fig. 10]).

<Table 4> Cultural characteristics and processes after culture

Main culture	Condition
Temperature	30℃
RPM	100 rpm
Air	0.5 vvm
pH	7.0
Working volume	50%
Internal pressure	0.5 kgf/cm ²
Incubation time	72h
Spray drying	Condition
Centrifugation	× 5 (concentration)
Excipien	Toal 20%

IV. 고 찰

최근 산업화의 급속한 발달과 인구증가는 양식 생물에 피해를 줄 뿐만 아니라 인간의 건강에까지 악영향을 미치고 있다(Heo et al., 2013). 양식 생물에 대한 질병을 제어하기 위하여 각종 항생제를 남용하고 있으며, 그 결과 약제의 내성균까지 출현하였다(Aoki et al., 1973; Blackbum et al., 2010). 항생제가 어류나 최종 소비자인 사람의 체내에 장기간 축적될 경우, 약제 내성은 물론 교대증이나 알레르기 유발 등의 안전성 문제가 발생할 수 있다. 이러한 문제점들을 해결하기 위해 천연물질을 사용하여 항생제물질을 대체하거나 병용 시에 그 효과를 상승시켜 항생제 사용을



[Fig. 10] Checking production of substances due to culture production of 20 KL

감소 할 수 있는 항생제 대체물질의 개발 연구가 시급히 요구되고 있다(Heo et al., 2013)

미생물이 생산하는 대사산물은 화장품, 효소, 식품 및 의약품 산업 등 다양한 분야에서 상업적으로 이용되고 있으며(Choi et al, 2011), 현재도 여러 분야에서 미생물에서 생산하는 새로운 천연물질의 개발을 위한 잠재적인 소재로서 이들의 탐색과 응용을 위한 연구가 지속적으로 이루어지고 있다(Jung et al., 2009). 그 중, *Bacillus* sp. 세균들은 다양한 항균활성을 가지고 있어 광범위하게 많은 연구의 소재로 사용되고 있으며, 특히 *Bacillus* sp.가 생산하는 항진균 및 항균활성 물질에 관한 연구는 꾸준히 진행되고 있다(Choi et al., 2010). 본 연구에서 관찰된 *Bacillus* sp. 2-4균주가 생산하는 조바실로 마이신 및 조서펙틴 등의 항균활성물질에 의해 주요 어병세균에 대한 항균력이 관찰된 것으로 여겨진다.

일반적으로 *Bacillus* sp. 배양 시 glucose를 사용하고 있으며, glucose 양의 농도가 높을수록 인산가용화능력이 높게 나타나 병원균 억제에 효과가

있다고 보고되고 있다(Lee et al., 2013). 이러한 결과는 본 연구결과와 일치하였지만, cell density의 밀도가 상반적으로 수치가 낮아지는 이유는 일정한 세포밀도가 되면 증식이 중지되는 이유와 밀접한 관계가 있을 것으로 판단된다.

Joo and kim(2002)에 따르면 *Bacillus ehimensis*는 2 vvm까지 높은 길항력을 보이다가 3 vvm에서는 길항력이 증가하지 않았다고 보고하였다. 본 연구의 결과, 공기주입량이 1.5 vvm까지 항균능력이 높게 나타났지만, 그 이상에서는 항균능력이 떨어지는 것을 확인할 수 있었다. 이러한 결과는 *Bacillus* sp.에 따라 필요한 공기주입량이 다른 것으로 여겨지며, 항균능력을 높이기 위해서는 *Bacillus* sp.에 맞는 적절한 공기주입량 조사가 필요할 것으로 여겨진다.

일반적으로 교반속도에 따라 산소전달계수값(KLa)이 상승한다고 보고되고 있으며, 그 중, *Bacillus thuringiensis*는 교반속도가 낮을 때가 높을 때보다 KLa값이 더 높은 것을 확인할 수 있었다(Kim et al., 2014). 본 연구진의 결과 100 rpm 이상에서 항균력이 떨어진 수치는 KLa와 연관성이 있는 것으로 추정되며, 추후 다른 종류의 *Bacillus* 배양 시 확인이 필요한 항목으로 여겨진다.

본 연구의 내용을 종합하여 볼 때, *Bacillus* sp. 2-4균주의 최적배양조건으로는 30°C, pH 7.0, 100 rpm, 0.5 vvm이었고, 탄소원, 질소원 실험을 통해 산출한 최적배지의 조성은 탄소원 2.0% (casein hydrolysate 및 glucose, 3:1), 질소원 3.0% (yeast extract 및 soybean meal, 1:5)로 조사되었다. 대량 배양의 최적화를 위해 최적배지를 대상으로 20 KL를 이용하여 scale-up을 수행한 결과, 최종적으로 항균활성 물질인 조바실로 마이신, 조서펙틴이 안정적으로 생성되는 것을 확인하였다.

본 연구에서 사용한 *Bacillus* sp. 2-4는 국립수산물학원 및 제주대학교 해양연구소에서 어류의 증체율 향상 및 어병세균에 대한 저항성을 확인한 균주로서 항생제 대체용으로 그 효과가 입증되었고(Kim et al., 2017), 넓치의 세균성 질병에

방을 위한 친환경적인 사료첨가제 생산에 활용이 가능하다. 또한, 대량생산 산업화에 대한 기초데이터로써 유용하게 사용될 것으로 여겨지며, 앞으로 연속식 배양기법과의 비교연구가 수행되어야 할 것이다.

References

- Aoki, T. · Egusa, S. & Watanabe, T.(1973). Detection of R+ bacteria in cultured marine fish, yellow tails. Japanese Journal of Microbiology. 21, 77~83.
- Blackburn, K. J. · Mitchell, A. M., · Blackburn, H. M. · Curtis, A. & Thompson, A. B.(2010). Evidence of antibiotic resistance in free swimming, top-level marine predatory fishes. Journal of Zoo and Wildlife Medicine. 32, 487~490.
- Choi, H. J. · Ahn, C. S · Jeong, Y. K. · Kim, D. W & Joo, W. H.(2010). Antifungal activity of *Bacillus* sp. BCNU 2003 against the human pathogenic fungi. Journal of Life Science. 20, 269~274.
- Choi, H. J. · Kim, Y. E. · Bang, J. H. · Kim, D. W. · Ahn, C. S. · Jeong, Y. K. & Joo, W. H.(2011). Characterization of an indigenous antimicrobial substance-producing *Paenibacillus* sp. BCNU 5011. Korean Society for Biotechnology and Bioengineering Journal. 26, 100~106.
- Heo, G. J. · Kang, J. H. & Shin, G. W.(2013). Antimicrobial effects of curcumin against pathogenic bacteria in fish. Korean Journal of Veterinary Service. 36, 297~301.
- Jung, J. H & Chang, H. C.(2009). *Bacillus polyfermenticus* CJ9, Isolated from meju, showing antifungal and antibacterial activities. Korean Society for Microbiology and Biotechnology. 37,340~349.
- Joo, G. J · Kim J. H.(2002). Optimization of large scale culture of *Bacillus ehimensis* YJ-37 antagonistic to vegetables damping-off fungi. Korean Journal of life science. 12. 242~249.
- Kim, G. H. · Oh, S. O. · Hur, J. S. · Yum, K. J. & Koh, Y. J.(2006). Optimum cultivation conditions for mass production of an antagonistic bacterium *Bacillus subtilis* BD0310 for development of a

- microbial agent controlling gray blight of tea plants. Korean Society of Plant Pathology. 12, 85~90.
- Kim, T. W. · Kim, T. H. · Yu, Y. M.(2014). Effect on the production of toxin protein of *Bacillus thuringiensis* by culture conditions. The Korean Journal of Pesticide Science. 18, 358~363.
- Kim, S. M. · Jun L. J. · Yeo, I. K · Jeon Y. J · Lee, K. J. Jeong, H. D. & Jeong, J. B.(2014). Effects of dietary supplementation with garlic extract on immune responses and diseases resistance of olive flounder, *Paralichthys olivaceus*. Korean Society of Fish Pathology. 27, 35~45.
- Kim, J. H. · Kim, Y. H. · Kim, S. K. & Kim, B. W.(2011). Properties and industrial applications of seaweed polysaccharides-degrading enzymes from the marine microorganisms. Korean Journal of Microbiology and Biotechnology. 39, 189~199.
- Kim, D. H. · Subramanian, D. · Jang, Y. H. & Heo, M. S.(2016). Inhibitory effect of transition metal gallium [Ga(NO₃)₃] on biofilm formation by fish pathogens. Microbiology and Biotechnology Letters. 44, 535~539.
- Kim, Y. O. · Nam, B. H · An, C. M. · Kim, D. G. · Jeong, H. J & Lee, S. J.(2017). Novel antibacterial composition. Application for a patent (10-2017-0059840).
- Lee, C. H. · Kim, P. Y. · Ko, C. S. Kang, B. J.(2007). Biological characteristics of *Streptococcus iniae* and *Streptococcus parauberis* isolated from cultured flounder, *Paralichthys olivaceus*, in Jeju. Journal of fish pathology. 20, 33~40.
- Lee, Y. S. · Park D. J · Kim, J. H · Kim, H. S · Choi Y. L.(2013). Isolation and characterization of a novel bacterium, *Bacillus subtilis* HR-1019, with insoluble phosphates solubilizing activity. Journal of life science. 23, 242~248.
-
- Received : 24 October, 2017
 - Revised : 04 December, 2017
 - Accepted : 11 December, 2017