

## *Achromobacter* sp. YJ-66에 의한 생물응집제의 생산 특성

우정숙\* · 정준영<sup>1</sup> · 정만재 · 도대홍<sup>2</sup>

충북대학교 식품공학과, <sup>1</sup>농업과학기술원, <sup>2</sup>충청대학 식품공학과

**Production Characteristics of Bioflocculant by *Achromobacter* sp. JY-66.** Woo, Jeong-Sook\*, Jun-Young Jeong<sup>1</sup>, Man-Jae Chung, and Dae-Hong Do<sup>2</sup>. Department of Food Science and Technology, Chungbuk National University, Cheongju 360-763, Korea, <sup>1</sup>National Institute of Agricultural Science and Technology, Suwon 441-707, Korea, <sup>2</sup>Dept of Food Science and Technology Chungcheong Junior College, Cheongwon 363-890, Korea – Among microorganisms isolated from soil, YJ-66 strain was the best producer of flocculant and was examined for flocculating ability in the active carbon and CaCl<sub>2</sub>. YJ-66 strain was identified to be a species belonging to the genus *Achromobacter*. The optimum culture condition for production of bioflocculant with the isolated strain was for 72 hrs at 30°C and pH 7.5. The favorable carbon, nitrogen sources and inorganic salts for production of the flocculant were sucrose, peptone, MgSO<sub>4</sub> and KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, whose optimal concentrations were 2%, 0.067%, 0.1% and 0.1%, respectively. Addition of the carbon and inorganic salts significantly increased the production of flocculant. Compositions of optimized culture medium for bioflocculant production by *Achromobacter* sp. YJ-66 were 2% sucrose, 0.067% peptone, 0.1% MgSO<sub>4</sub> and 0.1% KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> in initial pH 7.5 during at 30°C for 72 hrs.

**Key words :** bioflocculant, *Achromobacter* sp., optimum culture medium

응집제는 가정에서 물을 정화하기 위해 최초로 석회와 명반을 사용한 A.D 1세기 후반부터 사용된 것으로 알려져 있다[2]. 응집제가 본격적으로 산업에 이용된 것은 19세기 초반으로, 이후 다양한 종류의 응집제들이 여러 분야의 산업에서 이용되기 시작하여 현재 유기, 무기 고분자 응집제들이 폐수처리시 전처리 단계의 부유물 침전, 최종단계의 슬러지 회수 및 탈수, 펄프제지 공업에서 현탁물질의 제거에 이르기까지 광범위하게 사용되고 있다[18]. 그러나 현재 널리 사용되고 있는 유기, 무기 응집제는 환경 및 인체에 대한 독성이 문제시 되고 있어 점차 사용에 대한 규제가 강화되고 있다[4,26]. 이와 같은 환경독성을 보완하기 위해 chitosan, guar gum, sodium alginate, gelatin 등과 같은 천연고분자 응집제[7, 28]에 대한 관심이 증가하고 있으나 천연 응집제들은 응집성이 상대적으로 낮고 생산 가격이 높아 실용화에 어려움이 있어 미생물 생산 응집제에 대한 관심이 증가하고 있다[10,17,19]. 지금까지 알려진 미생물 응집제의 종류는 protein[19], peptide[10], polysaccharide [30], lipid[17], DNA[12] 등이 보고되어 있다. 단백질성 응집제의 경우 세포벽의 성분이 mannan과 상호작용을 하는데 carboxyl group 또는 phosphate group 등이 응집에 관여하는 기능기로 작용한다[23]. Lipid에 의한 응집은 이들 lipid성 응집제들이 배당체를 이루고 있으며 methylcne

시슬로 구성되어 있는 것이 밝혀져 세제와 같이 양전하를 띠는 대상물질의 제타 포텐셜을 감소시켜 하전 중화가 일어나 침전을 일으키는 것으로 보고되어 있다[17]. 한편 polysaccharide에 의한 응집은 1956년 미생물이 생산하는 균체의 다당이 응집제로 이용될 수 있는 가능성이 보고[27]된 이래 이를 이용하고자 하는 연구가 진행되어 왔다. 균체 외 다당류의 역할에 대해서는 명확히 규명되어 있지는 않지만 ameba, bacteriophage 등에 대한 보호막 역할과 극히 건조한 환경에서도 장기간 생존이 가능하게 하는 기능 등이 알려져 있으며 전하를 띠는 독성물질이나 금속이온을 중화 또는 착화물을 형성하는 작용이 보고[27]된 바 있다. 한편 미생물 유래의 세포외 다당성 응집제의 생산성은 탄소원, 질소원, 무기염의 종류 및 농도에 따라 영향을 받는 것으로 알려져 있다. 탄소원의 농도는 이들 탄소원이 exopolymer로의 전환효율에 영향을 미치는 인자이며[20], Sutherland[24]에 의하면 질소원은 미생물의 세포외 다당성 exopolymer의 생성에 필요한 인자이나 과량일 때는 세포 외부로의 분비를 감소시킨다고 보고한 바 있다. 무기염류의 경우 Appana 등[1]은 Mn<sup>2+</sup>의 첨가에 의해 균의 증식과 세포외 polysaccharide의 생산이 촉진된다고 보고한 바 있으며, superoxide dismutase의 cofactor로 이용되어 세포외 polysaccharide의 생합성을 증가시키는 것으로 알려져 있다 [6]. 또한 Kang 등[11]에 의하면 Mg<sup>2+</sup>은 세포외 다당류의 합성을 촉진시키며, Kurane 등[15]은 Ca<sup>2+</sup>이온의 경우 배양 중 pH 저하를 억제시킴으로써 응집제의 생산에 영향을

\*Corresponding author

Tel. 82-415-860-1784, Fax. 82-415-864-2665  
E-mail: yunjo@hanimail.com

미친다고 보고한 바 있어 미생물 응집제 생산시 기질의 종류 뿐만 아니라 첨가농도도 응집제 생산에 중요한 요인으로 보인다. 본 연구에서는 새로운 미생물 응집제를 개발하기 위해 응집제 생산능이 우수한 균주를 자연계로부터 분리, 동정한 후 최대 응집제 생산을 위한 배양 조건 및 배지 조성에 대한 연구를 수행하였다.

## 실험재료 및 방법

### 균분리 및 선발

응집활성이 우수한 균주의 선발은 경기도 및 충청도 일원의 표층 5-10 cm 아래의 토양 및 퇴비 약 300 여점을 채취하여 분리배지(glucose 2.0%,  $\text{NH}_4\text{NO}_3$  0.2%,  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  0.1%,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  0.1%,  $\text{MgSO}_4$  0.05%,  $\text{NaCl}$  0.05%, Yeast extract 0.01%, agar 1.5%, pH 7.0)[21]를 사용하여 30°C에서 배양하면서 생장 속도가 빠른 집락을 분리하였다. 분리한 집락들은 동일 온도에서 3일간 진탕 배양한 후 응집활성이 우수한 균주를 선발하였다.

### 응집활성의 측정

응집활성의 측정은 Nakamura 등[18]의 방법을 보완하여 다음과 같이 실험하였다. 0.5% active carbon(Shiny Pure Chemical Co., Japan)현탁액 10 ml에 1.0%  $\text{CaCl}_2$  0.1 ml와 균체를 제거한 배양상등액 0.1 ml를 가하여 10초간 교반한 다음, 실온에서 3분간 정치한 후 상등액을 취해 550 nm에서의 흡광도를 측정하여 계산하였다.

Flocculating activity(unit)=(A-B)/A×100×dilution rate

A : Optical density at 550 nm of reference sample

B : Optical density at 550 nm of reaction mixture

### 균 동정

선발균의 동정은 Gram 염색을 실시하고, LB plate에서 배양한 균체를 0.5% uranyl acetate로 염색하여 150 kV에서 투사형 전자현미경(TEM: transmission electron microscope, Hitachi, H-800)으로 관찰하였다. 동정은 미생물분류 동정장치(Sherlock program, MIDI, USA)를 사용하였으며 그 결과를 Bergey's Manual of Systematic Bacteriology [3]와 비교, 검토하였다.

### 균체량 측정

분리균의 생육을 조사하기 위한 균체량의 측정은 배양액을 4°C에서 10,000 rpm, 20분간 원심분리한 후, 침전물을 모아서 증류수로 2회 세척한 후 90°C의 건조기에서 12시간 건조시켜 균체건조 중량을 조사하였다.

### 응집제 생산을 위한 최적배양 조건

최적 응집제 생산을 위한 배양시간은 분리배지에 전배양

액 1%를 접종하고 30°C에서 소정시간동안 진탕배양하면서 배양시간에 따른 건조균체량과 응집활성을 조사하였다. 초기 최적 pH는 분리배지의 pH를 4에서 10 까지 조절한 후 전배양액 0.1%를 접종하여 30°C에서 최적 배양시간 동안 진탕배양하면서 건조균체량 및 응집활성을 조사하였으며 최적 배양온도의 조사는 최적 배양시간 및 pH 조건에서 배양 온도를 20-40°C 까지 2.5°C 간격으로 변화시켜 조사하였다.

### 응집제 생산을 위한 최적 배지조성

응집제 생산에 가장 효과적인 배지성분과 농도를 조사하기 위하여 다음과 같이 분리배지를 이용 각 성분의 종류와 농도에 따른 응집활성과 건조 균체량을 조사하였다. 탄소원은 glucose를 비롯한 17종의 탄소원중 최적 탄소원을 선택하고, 이의 최적 첨가농도를 조사하였다. 질소원은 최적 탄소원을 첨가한 분리배지에 peptone을 비롯한 유기 및 무기 질소원을 0.2%씩 첨가하여, 무기염류는 최적 탄소원 및 질소원을 첨가한 분리배지에  $\text{MgSO}_4$ 를 비롯한 각 무기염을 0.1%씩 첨가하여 응집활성 및 건조균체량을 조사하였다. 한편 최적 탄소 첨가량에 대한 질소원의 첨가량은 C/N비에 의해 조사하였다.

## 결과 및 고찰

### 균주분리 및 동정

토양으로부터 응집제 생산능이 우수한 균주 YJ-66을 최종 분리하여 투사형 전자현미경으로 형태를 관찰한 결과는 Fig. 1과 같이 간균의 형태로 크기는 약 0.35-0.85×1.0-2.0 μm 였다. 미생물 분류동정장치로 동정한 결과는 Table 1과 같이 *Alcaligenes piechaudii*이거나 그 근연의 종으로 판명되었다. 한편 *Alcaligenes* spp.는 Gram 음성의 간균으로 토양 및 부패된 낙엽, 부식토, 해양등에 존재하며

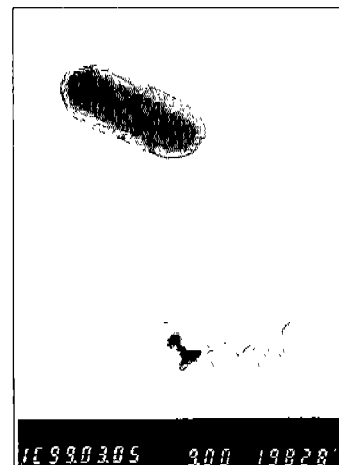


Fig. 1. Transmission electron micrograph of isolated strain YJ-66.

Table 1. Identification with MIDI program of isolated strain

TSBA [Rev 3.90]	Alcaligenes . . . . .	0.655		
	A. piechaudii* . . . . .	0.655		
	A. xylosoxydans . . . . .	0.557		
	A. x. denitrificans* . . . . .	0.557		
	A. x. xylosoxydans* . . . . .	0.424		
Pantoea . . . . .		0.477	(Entb. agglomerans, Erwinia herbicola)	
	P. agglomerans* . . . . .	0.477	(Entb. agglomerans, Erwinia herbicola)	
Serratia . . . . .		0.392		
	S. grimesii . . . . .	0.392		
	S. proteamaculans . . . . .	0.276	(Serratia liquefaciens)	
	S. plymuthica . . . . .	0.204		
CLIN [Rev 3.90]	Burkholderia . . . . .	0.420	(Pseudomonas pickettii)	
	B. pickettii . . . . .	0.420	(Pseudomonas pickettii)	
	Alcaligenes . . . . .	0.267		
	A. faecalis . . . . .	0.267		
	A. xylosoxydans . . . . .	0.160		
	A. x. denitrificans . . . . .	0.160		
	Klebsiella . . . . .	0.254		
	K. terrigena . . . . .	0.254		

그 형태 및 영양 요구성이 다양하여 아직 정확한 동정이 이루어지지 않고 있으며 일부의 종은 계속해서 다른 속으로 편입되고 있다[3]. 특히 Yabuuchi 등[29]은 이 속의 생리적인 특성을 조사하여 *Alcaligenes piechaudii*를 *Achromobacter piechaudii*로 재명명 하였으므로 본 실험에서는 *Achromobacter* sp. YJ-66으로 명명하였다. 한편 분리 균주의 active carbon현탁액에 대한 응집활성을 확인한 결과는 Fig. 2와 같이 3분 이내에 모두 응집된 것으로 나타나 응집 활성이 높음을 알 수 있었다.

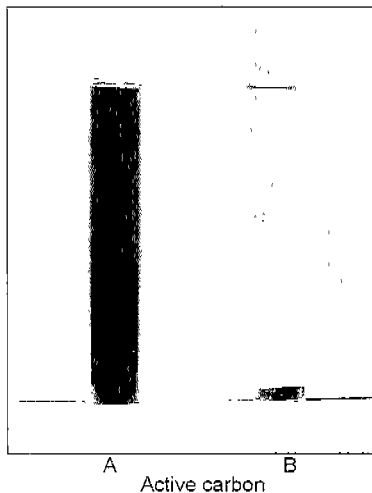


Fig. 2. Photograph of active carbon suspension with a culture broth of the isolated strain YJ-66.

To test bioflocculation activity, 0.5 ml of culture broth and 0.5 ml of 0.1% CaCl<sub>2</sub> were added to 5 ml of active carbon suspension and it was mixed vigorously for 10sec and stood at room temperature for 3min. A suspension without treatment of culture broth was used as a control.

A : Control, B : Culture broth

응집제 생산을 위한 최적배양 조건

분리균의 응집제 생산에 영향을 미치는 최적 배양조건을 검토하기 위해 전 배양액 0.1%를 소정의 조건으로 조절한 분리배지에 접종하여 건조균체량 및 응집활성을 조사한 결과 최적 배양시간은 Fig. 3에서와 같이 배양 72시간에 건조균체량과 응집활성이 각각 약 1.5 g/L, 510 unit로 가장 높았으며 72시간 이후에 전체적으로 서서히 감소하는 경향이였다. 배양온도에 따른 건조균체량과 응집활성을 조사한 결과는 Fig. 4와 같이 30°C에서 가장 우수하였는데 건조균체량은 25-40°C의 온도조건에서 거의 일정 수준을 유지하였다. 한편 응집활성의 경우에는 균체 생육과 밀접한 관계가 없는 것으로 나타났다. 즉 28-35°C의 배양온도에서는 300unit 이상의 응집활성을 나타내었으며 25°C 이하나 38°C 이상의 배양온도에서는 응집활성이 매우 낮았다.

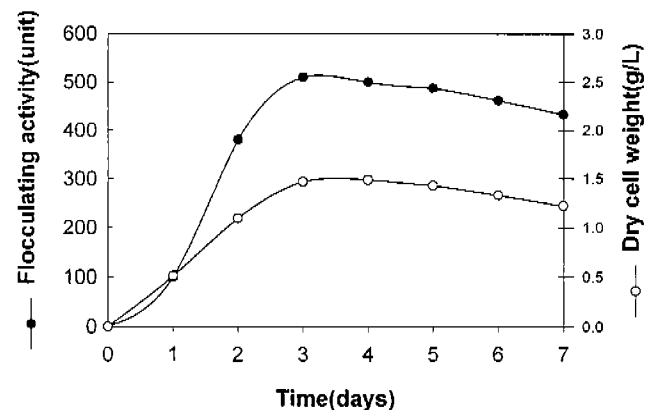
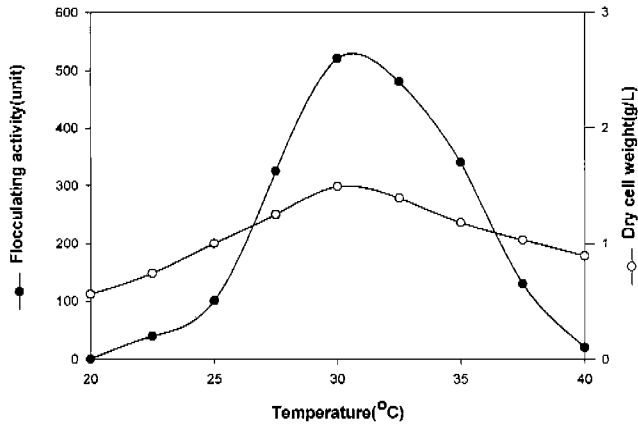


Fig. 3. Dry cell weight and flocculating activity of *Achromobacter* sp. YJ-66 according to the incubation time.

Cells were cultivated with shaking in the isolation medium at 30°C and pH 7.0.



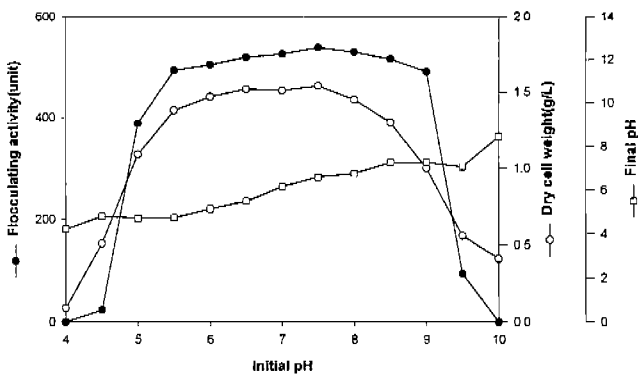
**Fig. 4. Effect of temperature on dry cell weight and flocculating activity of *Achromobacter* sp. YJ-66.**  
Cells were cultivated with shaking in the isolation medium at pH 7.0 for 72 hrs.

응집제 생산을 위한 초기 배양 pH에 따른 건조균체량과 응집활성을 조사한 결과 Fig. 5와 같이 pH 5.5-9.0의 넓은 범위에서 응집제의 생산 및 균의 생육이 우수하였다. 그러나 pH 9.0 이상과 5.0 이하에서는 응집제의 생산 및 균의 생육이 급격히 감소하였다.

**응집제 생산을 위한 최적 배지조성**

**탄소원**

분리 배지에 탄소원을 2% 농도로 첨가하여 응집활성을 조사한 결과 Table 2와 같이 sucrose 첨가시 850 unit 로 가장 높게 조사되었으며 inositol, raffinose 등도 각각 845 unit, 837 unit로 높은 활성을 보였다. 한편 5탄당인 xylose 와 arabinose의 경우 건조균체량이 매우 낮았으며 특히 응집활성이 나타나지 않았다. 6탄당의 경우 fructose에서는 건



**Fig. 5. Effect of initial pH on dry cell weight and flocculating activity of *Achromobacter* sp. YJ-66.**  
Cells were cultivated with shaking in the isolation medium at 30°C for 72hrs.

**Table 2. Effect of carbon sources on dry cell weight and flocculating activity of *Achromobacter* sp. YJ-66**

Carbon sources	Flocculating activity (unit)	Dry cell weight (g/L)
Arabinose	0	0
Galactose	814	1.65
Fructose	0	1.48
Glucose	510	1.24
Xylose	0	0.17
Mannose	795	0.84
Maltose	800	1.43
Lactose	440	0.56
Sucrose	850	1.52
Raffinose	837	1.07
Dextrin	0	0.52
Glycerol	780	1.38
Starch	0	0.29
Inositol	845	1.7
Methanol	110	0.25
Ethanol	0	0.04
Sorbitol	730	0.84
Glucose+fructose	520	1.35
Control*	0	0

Cultivation was carried out with shaking in the isolation medium containing 2% carbon source at 30°C and pH 7.5 for 72 hrs.  
\* Control : No carbon source added.

조균체량은 1.48 g/L로 비교적 높게 나타났으나 응집활성은 없었고 galactose, mannose, glucose의 경우 건조균체량과 응집활성이 모두 비교적 높게 나타났다. Lactose, maltose 등의 이당류와 삼당류인 raffinose는 응집활성과 건조균체량 모두 높게 나타났다. 또한 당알콜인 sorbitol과 inositol 등도 응집활성이 비교적 높게 나타났다. 그러나 탄소원을 제한하였을 경우에는 응집활성이 없는 것으로 조사되어 탄소원들이 응집제 생산을 위한 필수적인 인자인 것으로 생각된다.

Fig. 6은 sucrose의 첨가농도에 따른 건조균체량과 응집활성을 조사한 결과로 2-3% 첨가 농도에서 응집활성이 가장 우수하였다. 응집활성과 건조균체량을 기준으로한 균 생육은 sucrose를 첨가하지 않은 경우를 제외하고는 0.5-5.5% 까지 거의 일정 수준을 유지하였다. 한편 3% 이상의 sucrose의 농도에서는 응집활성에 큰 변화가 없었는데 이는 배양액의 점도가 높아져서 배양액 내부로의 공기공급이 불충분하여 나타난 결과로 생각된다. Kurane 등[16]은 *Alcaligenes cupidus*로 부터의 미생물 응집제 생산에 sucrose, glucose, galactose가, Kim등[13]은 *Bacillus megaterium*에서 2% sucrose, Seo 등[22]이 *Aeromonas hydrophila*에서 2.0% mannitol 첨가시, Takagi 등[25]은 *Paecilomyces* sp.에서 2.0% glucose가 응집제 생산에 가장 우수한 탄소원 및 농도였다고 보고한 바 있으며 거의 대부분의 경우에 최

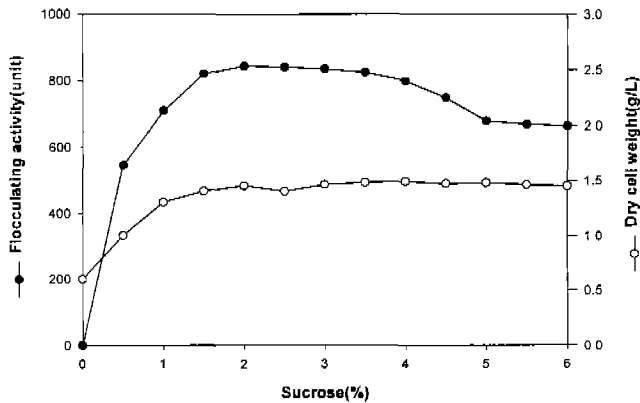


Fig. 6. Effect of sucrose concentration on dry cell weight and flocculating activity of *Achromobacter* sp. YJ-66.

대 응집제 생산을 위한 탄소원 농도는 2-3% 인 것으로 보고되었다.

유기 및 무기 질소원

조사한 질소원 중 Table 3과 같이 peptone 첨가시 855 unit로 가장 우수한 응집활성을 나타내었다. 무기 질소의 경우 NH<sub>4</sub> 태와 NH<sub>2</sub> 태 모두 높은 응집활성을 나타내었으며 유기질소원의 경우 glutamic acid를 제외한 모든 질소원에서 높은 응집활성을 나타내었다. 한편 대부분 응집제 생산 균주들이 이용하는 무기질소원은 ammonium sulfate로 보고 [25]된 바 있으며, 본 실험 결과에서는 ammonium nitrate가 가장 우수한 무기 질소원으로 조사되었다. 한편 무기 및 유기 질소원 첨가에 따른 응집 활성조사 결과 탄소원 및 최적 첨가농도에의 결과와는 달리 질소원의 첨가 효과가 그리 크지 않았다. 이와 같은 결과는 단백질성 응집제의 경우 질소원의 첨가에 의해 응집활성이 현저히 증가하였다고

Table 3. Effect of nitrogen sources on dry cell weight and flocculating activity of *Achromobacter* sp. YJ-66

Nitrogen sources	Flocculating activity (unit)	Dry cell weight (g/L)
Ammonium chloride	816	1.07
Ammonium phosphate	774	1.14
Ammonium sulfate	780	1.11
Ammonium nitrate	840	1.09
Sodium nitrate	767	1.12
Cassamino acid	770	1.30
Casein	822	1.38
Glutamic acid	110	0.46
Tryptone	767	1.34
Peptone	855	1.64
Beef extract	780	1.5
Control*	715	0.55

Cultivation was carried out with shaking in the isolation medium containing 2% sucrose and 0.2% nitrogen sources at 30°C and pH 7.5 for 72 hrs. \* None : No nitrogen source added.

Table 4. Effect of C/N ratio on dry cell weight and flocculating activity of *Achromobacter* sp. YJ-66

C/N ratio	Flocculating activity(unit)	Dry cell weight(g/L)
100	782	1.28
50	794	1.30
40	794	1.32
30	856	1.74
20	788	1.60
15	803	1.54
10	756	1.48
5	664	1.39
3	367	1.60
1	198	1.29

보고된 [15] 바 있는데, 본 실험에서 질소원의 첨가에 의해 응집활성이 현저히 증가되지 않은 것으로 나타나 분리균 *Achromobacter* sp. YJ-66가 생산하는 응집제는 단백질 보다는 다당류 또는 그 유도체인 것으로 생각된다.

탄소원 대 질소원의 비에 의한 균체량과 응집활성의 영향을 검토하기 위해 최적 탄소원 농도로 조사된 2% sucrose를 기준으로 한 질소원의 첨가 농도를 조사한 결과, Table 4와 같이 C/N비 30일 때 가장 우수한 응집활성을 나타내었고, 이때 peptone 첨가농도는 0.067% 였다. 한편 미생물이 생산하는 다당성 expolymer의 경우 최적 C/N비는 10-40 정도로 알려져 있는데 [8] 본 실험 결과 C/N비 1-100에서의 건조균체량은 거의 유사한 정도인 것으로 조사되어 본 균주의 생육에는 C/N 비가 큰 영향을 미치지 않은 것으로 추측된다. 그러나 응집활성의 경우 C/N 비가 10이하로 낮아질 때 즉 질소원의 첨가량이 많아 질수록 응집 활성이 낮아지는 것으로 나타나 분리균 *Achromobacter* sp. YJ-66는 충분한 양의 질소원 존재시 탄소원이 주로 균체의 생육에 사용되어 응집제 생산을 감소시킨 것으로 추측된다 [9].

무기염류

무기염류에 의한 응집 활성 및 건조균체량을 조사한 결과 Table 5와 같이 Mg<sup>2+</sup>(MgSO<sub>4</sub>) 첨가시 응집활성이 850unit로 가장 높았으며 MnSO<sub>4</sub>, MnCl<sub>2</sub>, CaCl<sub>2</sub> 및 Mg SO<sub>4</sub>+ NaCl 에서도 응집활성 및 건조균체량 모두 비교적 높게 나타났다. 한편 CuSO<sub>4</sub> 및 MgSO<sub>4</sub>+ CuSO<sub>4</sub> 첨가시에는 다른 무기염과 비교하여 건조균체량은 큰 차이가 없으나 응집활성은 낮게 조사되었다. Appana 등 [1]은 Mn<sup>2+</sup>의 첨가에 의해 균의 증식과 expolymer의 생산이 촉진된다고 보고한 바 있으며, 또한 Mn<sup>2+</sup>이 superoxide dismutase의 cofactor로 이용되어 expolymer의 생합성을 증가시키는 것으로 보고한 바 있다 [6]. 한편 Kurane 등 [15]은 Ca<sup>2+</sup>의 경우 배양 중 pH 저하를 억제시킴으로써 응집제의 생산에 영향을 미친다고 보고한 바 있다.

**Table 5. Effect of inorganic salts on dry cell weight and flocculating activity of *Achromobacter* sp. YJ-66**

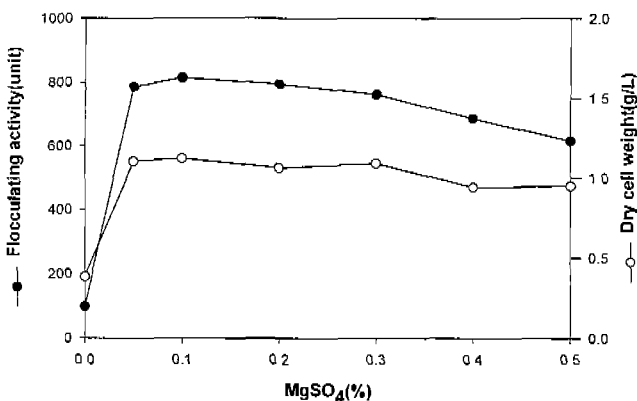
Inorganic salts	Flocculating activity (unit)	Dry cell weight (g/L)
MgSO <sub>4</sub>	850	1.06
MnSO <sub>4</sub>	773	1.21
FeSO <sub>4</sub>	195	1.17
CuSO <sub>4</sub>	115	0.98
ZnSO <sub>4</sub>	425	1.21
CaCl <sub>2</sub>	707	1.03
MnCl <sub>2</sub>	709	1.02
NaCl	700	1.04
MgSO <sub>4</sub> + MnSO <sub>4</sub>	770	1.48
MgSO <sub>4</sub> + NaCl	764	1.45
MgSO <sub>4</sub> + CaCl <sub>2</sub>	458	1.04
MgSO <sub>4</sub> + CuSO <sub>4</sub>	248	1.05
Control*	98	0.83

Cultivation was carried out with shaking in the medium containing 2% sucrose, 0.067% peptone, 0.1% KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, and various inorganic salts of 0.1% concentration at 30°C and pH 7.5 for 72 hrs.

\*Control : No inorganic salt added.

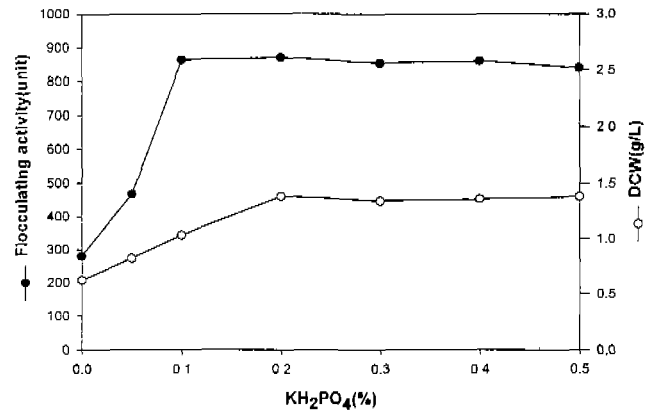
Fig. 7은 2% sucrose, 0.067% peptone을 첨가한 배지에 무기염류중 응집제 생산이 가장 우수한 것으로 조사된 MgSO<sub>4</sub>에 첨가 농도에 따른 건조균체 및 응집활성을 조사한 결과로 0.05-0.2%의 범위에서 높은 응집활성을 나타내었고 특히 0.1% 첨가시 가장 우수한 응집활성을 보였다. 건조균체량으로 조사한 균 생육과 응집활성은 MgSO<sub>4</sub> 첨가시 무첨가와 비교하여 볼 때 크게 증가된 결과로 볼 때 분리균 *Achromobacter* sp. YJ-66에 의한 응집제 생산에 있어 MgSO<sub>4</sub>의 첨가가 필수적인 것으로 추측된다.

인산염 첨가에 따른 응집제 생산에 대한 영향을 조사하기 위해 2% sucrose, 0.067% peptone, 0.1% MgSO<sub>4</sub>를 첨가한 최적배지를 pH 7.5로 조절한 후 KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 첨가 농



**Fig. 7. Effect of MgSO<sub>4</sub> on dry cell weight and flocculating activity of *Achromobacter* sp. YJ-66.**

Cultivation was carried out with shaking in a medium containing 2% sucrose, 0.067% peptone, 0.1% KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> and various concentration of MgSO<sub>4</sub> at 30°C and pH 7.5 for 72 hrs.



**Fig. 8. Effect of KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> on dry cell weight and flocculating activity of *Achromobacter* sp. YJ-66.**

Cultivation was carried out with shaking in a medium containing 2% sucrose, 0.067% peptone, 0.1% MgSO<sub>4</sub> and various concentration of KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> at 30°C and pH 7.5 for 72 hrs.

도에 따른 응집활성과 건조균체량을 조사한 결과는 Fig. 8과 같이 0.1% 첨가시 가장 높은 건조균체량과 응집활성을 나타내었다. Seo 등[22]은 *Aeromonas hydrophila* KH-54의 다당류성 응집제 생산에 있어 MgSO<sub>4</sub>의 첨가에 의해 응집활성이 약 6배 증가하였고 KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 혼합 첨가시 7배가 증가하였다고 보고한 바 있다. 그러나 Kim 등(14)의 *Corynebacterium* sp. K-199의 단백질성 응집제의 경우에는 KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>의 첨가는 응집활성에 큰 영향을 미치지 않는다고 보고하였다. 한편 Evans 등[5]은 인산염이 미생물 증식시 RNA 합성 및 배지중의 pH 완충제로 작용하는 것으로 보고한 바 있는데 본 균주에 있어서도 KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>의 첨가로 균 생육이 촉진되어 응집제 생산이 증가된 것으로 추측된다. 한편 건조균체량으로 조사한 균 생육은 0.2% 첨가농도에서 가장 높은 것으로 조사되었으나 응집활성은 0.1% 이상에서는 첨가 효과가 확인되지 않았다.

### 요 약

자연계로부터 응집제 생산능이 우수한 균주를 분리하여 동정한 결과 *Achromobacter* sp. 로 동정 되었다. 분리균에 의한 응집제 생산을 위한 최적 배지조성을 검토한 결과 탄소원은 2% sucrose로 응집제 생산에 탄소원이 필수적인 성분이었다. 한편 무기 및 유기 질소원의 조사 결과 질소원을 첨가하지 않은 경우의 응집활성은 715 unit, 가장 우수한 질소원으로 조사된 peptone 첨가시에는 865 unit로 응집활성이 증가하였으나 큰 영향은 미치지 않은 것으로 조사되었다. 최적 탄소원 첨가농도에 대한 질소원의 첨가농도를 C/N 비에 의해 조사한 결과, C/N비 30일 때 가장 우수한 응집활성을 나타내었으며 이때의 질소원 첨가 농도는 0.067%였다. 또한 최적 무기염류 및 첨가농도를 조사한 결

과, MgSO<sub>4</sub> 첨가로 응집활성이 약 98 unit에서 약 830unit로 크게 증가되어 응집제 생산에 필수적인 것으로 추측되며 KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>의 첨가에 의해서도 응집제 생산이 촉진되었다. 따라서 *Achromobacter* sp. YJ-66에 의한 응집제 생산은 sucrose 2%, peptone 0.067%, MgSO<sub>4</sub> 0.1 %, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0.1%의 배지를 pH 7.5로 조절한 후 30°C에서 72시간 배양시 가장 우수한 것으로 조사되었다.

## REFERENCES

- Appana, V. D. 1988. Stimulation of exopolysaccharide production in *Rhizobium meliloti* JJ-1 by manganese. *Biotechnol. Lett.* **10**: 205-206.
- Baker, M. N. 1948. The quest for pure water. *American Warwe Works Association*, New York. : 3-4.
- Buchanan, R. E. and Gibbons. 1974. *Bergey's Manual of Systematic Determinative Bacteriology*. The Williams and Wilkins Co., Baltimore.
- Diarfield, K. L. and C. O. Abermathy. 1988. Acrylamide: Its metabolism, developmental and reproduction effects, genotoxicity and carcinogeny. *Mutant Res.* **195**: 45-51.
- Evans, C. G. T., R. G. Yeo, and D. C. Ellwood. 1977. Continuous culture studies on the production of extracellular polysaccharide by *Xantomonas juglandis*, pp.51-68. *Microbial Polysaccharides and Polysaccharase*. Academic Press, New York.
- Gottschalk, G. 1986. *Bacterial Metabolism*. Springer-Verlag, Berlin.
- Guiseley, K. B. 1968. Seaweed colloid in A. Standen, p763 *Encyclopedia of Chemical Technology*. Wiley-Interscience, New York.
- Iwamura, Y., M. Murata, K. Kanamuru, Y. Mikami, and T. Kasaki. 1981. Effect of medium components and culture conditions on the production of polysaccharide by *Porodisuculus pendulus* and mycelium growth. *Agri. Biol. Chem.* **45**: 635-637.
- Jarman, T. R., L. Deavin, S. Slocombe, and R. C. Righelato. 1978. Investigation of the effect of environmental conditions on the rate of exopolysaccharide synthesis in *Azotobacter vinelandii*. *J. Gen. Microbiol.* **107**: 59-64.
- Jun-ichi, K. and T. Minoru. 1991. Synergistic flocculating of the bioflocculant fix extracellularly produced by *Nocardia* sp. *J. Gen. Appl. Microbiol.* **37**: 447-452.
- Kang, K. S. and I. W. Cottrell 1979. pp 417-481. In A. Bull and D. C. Ellwood (eds.), *Microbial Technology*, Vol 1. Academic Press.
- Kazuo, S. and T. Hajime. 1981. DNA as a flocculation factor in *Pseudomonas* sp. *Agri. Biol. Chem.* **45**(12): 2869-2875.
- Kim, K. C. and J. Y. Jeong. 1988. Study on the bioflocculant by *Bacillus megaterium*. *Korea J. Food and NUTR.* **11**(6): 622-628.
- Kim, Y. J., Y. M. Cho, H. Y. Cho, and H. C. Yang. 1996. Proteinous bioflocculant produced by *Corynebacterium* sp. K-199. *Kor. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.* **24**(6): 699-704.
- Kurane, R., K. Takedo, and T. Suzuki. 1986. Screening and characteristic of microbial flocculant, *Agri. Biol. Chem.* **50**: 2301-2307.
- Kurane, R. and Y. Nohata. 1991. Microbial flocculation of waste liquid and oil emulsion by a bioflocculant from *Alcaligenes latus*. *Agri. Biol. Chem.* **55**(4): 1127-1131.
- Kurane, R. 1994. Purification and characterisation of lipid bioflocculant produced by *Rhodococcus erythropolis*. *Biosci. Biotech. Biochem.* **58**(11): 1977-1980.
- Nakamura, J., S. Miyashiro, and Y. Hirose. 1976. Screening isolation and some properties of microbial cell flocculants. *Agri. Biol. Chem.* **40**: 377-383.
- Parker, D. D and C. B. Munn. 1984. Increased cell surface hydrophobicity associated with possession of an additional surface protein by *Aeromonas* sp. *FEMS Microbiol. Lett.* **21**: 233-239.
- Roby, J. F. 1996. Mechanism in the glucansucrase synthesis of polysaccharide and oligosaccharides from sucrose. *Advance in Carbohydrate and Biochemistry* **31**: 133-167.
- Seo, H. H. and M. H. Lee. 1993. Bioflocculant production from *Bacillus* sp. A56. *Kor. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.* **21**: 486-474.
- Seo, H. C. and J. S. Lee. 1998. Optimization of bioflocculant production condition for organic waste water treatment with *Aeromonas hydrophila* KH-54. *Agri. Chem. Biotech.* **41**(6): 465-470.
- Sousa, M. J., J. A. Teixeira, and M. Mota. 1992. Differences in the flocculation mechanism of *Kluyveromyces marxianus* and *Saccharomyces cerevisiae*. *Biotechnol. Lett.* **14**(3): 213-218.
- Sutherland, I. W. 1979. pp.1-34. In R. C. W. Berkeley, G. W. Gooday, and D. C. Ellwood(eds.), *Microbial Polysaccharides and Polysaccharase*. American Press.
- Takagi, H. and K. Kadowaki. 1985. Flocculant production by *Paecilomyces* sp. : Taxonomic studies and culture condition for production. *Agri. Biol. Chem.* **49**(11): 3151-3157.
- Tocda, K. and R. Kurance. 1991. Microbial flocculant from *Alcaligenes cupidus* KT201. *Agri. Biol. Chem.* **55**: 2793-2799.
- Wilkinson, J. F. 1958. The extracellular polysaccharides of bacteria. *Bacteriol. Rev.* **22**: 46-73.
- Wood, P. D., A. G. Ward, and A. Courts. 1977. *Science and Technology of Gelatin*. Academic Press, London.
- Yabuuchi, E., Y. Kawamura, K. Yoshimasa, and T. Ezaki. 1998. Emendation of genus *Achromobacter* and *Achromobacter xylixidans* and proposal of *Achromobacter ruhlandii* comb. nov., *Achromobacter piechaudii* comb. nov., and *Achromobacter xylooxidans* subsp. *denitrificans* comb. nov. *Int. Microbiol. Immunol.* **42**(6): 429-438.
- Yoshitaka, T. 1977. Exocellular mucopolysaccharide closely related to bacterial floc formation. *Appl. Environ. Microbiol.* **34**(3): 308-315.

(Received October 6, 1999)