

*Lactobacillus jensenii* YW-33이 생산하는 생물응집제의 정제 및 특성

서 호 찬\*

국제뇌교육종합대학원대학교 뇌교육학과

Purification and Characterization of Biofloculant Producing from *Lactobacillus jensenii* YW-33

Ho-Chan Seo\*

Department of Brain Education, University of Brain Education, Cheonan 330-841, Korea

**Abstract** – The distribution of flocculating activity of culture broth was examined and the major constituent with flocculating activity was identified. Most of flocculating activity was found in culture broth without cells. As the activity was maintained by the digestion with pronase, it suggests that the activity is due to the polysaccharide. The biofloculant obtained from *Lactobacillus jensenii* YW-33 was precipitated by 60~80% EtOH fractionation (LJ-80). LJ-80 was separated by ion-exchange chromatography using DEAE-Toyopearl 650C and LJ-80-II showed more potent flocculating activity than those of other fractions. The major activity fraction LJ-80-II was further purified on the gel permeation using Sepharose CL-6B to LJ-80-II-1. GPC (Sepharose CL-6B) and HPLC were used to determine whether LJ-80-II-1 has a homogeneity. The molecular weight of purified LJ-80-II-1 was estimated over 800,000 dalton by gel permeation chromatography. Purified LJ-80-II-1 contained 98.4% total sugar, 0.6% protein. Main sugar of purified LJ-80-II-1 was composed of mannose : galactose : glucose with a molar ratio of 1.61 : 0.25 : 1.00.

**Key words** : biofloculant, purification, characterization, polysaccharide

## 서 론

미생물이 생산하는 응집성 고분자 물질은 자연계에서 쉽게 분해가 되며 인체에 무해하며 그 용도에 따라 식품공업, 제약산업에 있어 보형제, 보습제로서 용도가 개발되고 있어서 선진 각국에서는 미생물 유래의 응집성 물질을 탐색, 개발하여 기존 합성 고분자 응집제의 대용으로 사용하려는 연구가 진행되고 있다 (Brierly *et al.* 1985). 미생물 유래의 응집제는 거대분자로서 작용기작

과 응집제를 생산하는 균주의 기원에 따라 분류할 수 있다. 다당류 유래의 응집제는 특유의 점질물질로써 -OH기와 -COOH기들이  $Ca^{2+}$ ,  $Fe^{2+}$ ,  $Mg^{2+}$  등의 2가 이온들과 함께 matrix나 gel을 형성하여 가교작용으로 응집기작을 일으키는 것 (Takagi and Kadowki 1985)으로 알려져 있으며 대표적인 생산균주로는 *Xanthomonas campestris*의 xanthan gum (Souw and Demain 1979) *Azotobacter vinelandii*의 alginate (Deavin *et al.* 1977; Jarman *et al.* 1978), *Leuconostoc mesenteriodes*의 dextran (Cruegerand Crueger 1984), *Azotobacter pullulans*의 curdlan (Desmond *et al.* 1990; McNeil and Kristiansen 1990), *Zoogloea ramigera*의 zooglan (Ander and Enfors 1982; Ikeda *et al.* 1982), *Pullu-*

\* Corresponding author: Ho-Chan Seo, Tel. 041-529-2761, Fax. 041-529-2610, E-mail. hcseobravo@ube.ac.kr

*laria pullulans*의 pullulans (Zajic and Leduy 1973)을 들 수 있다. 이들의 polymer는 균체의 세포벽 주위에 협막 (capsule)을 형성하거나 점질물 (slime)과 같이 균체 외로 생산되며 pH 중성영역의 음이온성 혹은 비이온성의 특성을 가지고 있다.

단백질 유래 응집제는 amino sugar 즉 glucosamine, galactosamine이 결사슬로 치환된 polyelectrolyte 물질 (Takagi and Kadowki 1985)과 carboxyl group 혹은 phosphate group의 기능이 직접적으로 음(-)전하로 하전된 부유물질과 흡착하여 전하를 중화시킴으로써 응집작용을 일으키는 기작 (Parker and Munn 1984)을 가지고 있으며 *Rhodococcus erythropolis* (Kurane *et al.* 1986; Kurane 1994), *Paecilomyces* sp. (Takagi and Kadowaki 1984), *Aspergillus sojae* (Nakamura *et al.* 1976), *Saccharomyces cerevisiae* (Miki *et al.* 1992) 등이 대표적인 생산균주이다. 당 배양체와 methylen 사슬의 구조를 가진 지방 유래의 응집제는 전형적인 양성화합물으로써 계면활성제의 작용과 같이 부유물질의 입자에  $\zeta$ -potential을 감소시켜 응집활성을 일으키는 기작으로 알려져 있으며 생산균주으로써는 *Rhodococcus erythropolis* (Kurane 1994)가 보고되고 있다. 그외 *Nocardia amarae*의 peptide (Koizumi and Takeda 1991), *Staphylococcus aureus* (Cripps and Elizabeth 1967), *Pseudomonas* sp. (Sakka and Takahashi 1981)가 생산하는 DNA 등이 응집활성에 synergist 역할을 한다고 보고되고 있다.

이들 미생물 유래의 응집제는 응집작용에 있어서 pH, 응집제의 농도, 교반속도, 시간 등에 영향을 미치는 것으로 알려져 있으며 또한  $Ca^{2+}$ ,  $Mg^{2+}$ ,  $Mn^{2+}$ ,  $Fe^{2+}$  등의 양이온에 대한 기능이 중요시되고 있고  $Ca^{2+}$  이온은 미생물에 의해 세포외로 분비되는 고분자 물질들과 특이한 친화력을 가짐으로써 가교작용에 의한 응집활성을 촉진시킨다 (Buchs and Mozes 1988).

현재 미생물이 생산하는 응집제의 작용기작에 관한 연구는 활발히 진행되고 있지만 생물응집제에 대한 정제와 구조분석에 관한 연구는 미비한 수준이다.

따라서 본 연구에서는 *Lactobacillus jensenii* YW-33이 생산하는 응집제로부터 활성본체를 규명하고자 응집물질을 분리, 정제하고 그 특성을 검토하고자 하였다.

## 재료 및 방법

### 1. 시약

본 연구에 사용되었던 DEAE-Toyopearl 650C는 Tosoh

사 제품을 Sepharose CL-6B는 Pharmacia사 제품을 구입하여 사용하였다. Standard dextran은 Sigma사 제품을 사용하였으며 그 외 기타 시약은 일급 및 특급시약을 사용하였다.

### 2. 생물응집제의 생산

본 연구에 사용된 *Lactobacillus jensenii* YW-33의 최적 생산배지는 서 등 (1999)의 보고에 따라 실시하였다. 최적 응집제 생산배지 (Glucose 2%, soytone 0.05%,  $CaCl_2$  0.01%,  $KH_2PO_4$  0.05%, Yeast extract 0.05%)를 5 L 용량의 fermentor에서 working volume을 2L로 하고 초기 pH 6.5, 25°C, 30 rpm에서 24시간 배양하였다.

### 3. 균체 배양액의 응집활성 분포

균체 배양액에서 응집활성 분포를 조사하기 위하여 *Lactobacillus jensenii* YW-33를 응집제 최적 생산배지로 배양한 후, 원심분리 (2,000 rpm, 10 min)하여 균체를 회수한 다음 30 mM phosphate buffer (pH 7.0)에 흡광도 (60 nm)값으로 1.0 이상 되게 현탁시켜 균체 자체의 시료를 제조한 후, 균체를 제거한 상등액과 culture broth를 대상으로 각각의 응집활성을 측정하여 비교, 검토하였다.

### 4. Periodate 산화

EtOH에 침전한 응집활성물질 20 mg을 취하여 acetate buffer (pH 4.5, 10 mL)에 용해시킨 후, 50 mM  $NaIO_4$ 를 5 mL 가하여 4°C의 암실에서 3일간 산화시켰다. 이 반응액에 ethylene glycol 5 mL를 가해 1시간 동안 실온에 방치한 후, 투석하여  $NaBH_4$ 의 20 mg을 가해 1시간 교반시켰으며 0.1 M acetic acid로 중화한 후, 투석 및 동결건조하여 응집활성을 검토하였다 (Yamada *et al.* 1984).

### 5. Pronase 처리

EtOH에 침전한 응집활성 물질 20 mg을 취하여 10 mM  $CaCl_2$ 가 함유된 Tris-HCl buffer (pH 7.9) 20 mL에 용해시킨 후, pronase (20 unit)를 가하여 37°C에서 48시간 반응시켰다. 이 반응액을 100°C에서 5분간 가열, 반응을 정지시킨 후 원심분리하여 얻은 상등액을 투석 및 동결건조하여 응집활성을 조사하였다 (Yamada *et al.* 1984).

### 6. 응집활성 본체의 정제

배양액에서 응집활성 본체를 조사하기 위해 Fig. 1과 같은 과정을 거쳐 정제를 실시하였다. 배양액은 15,000×

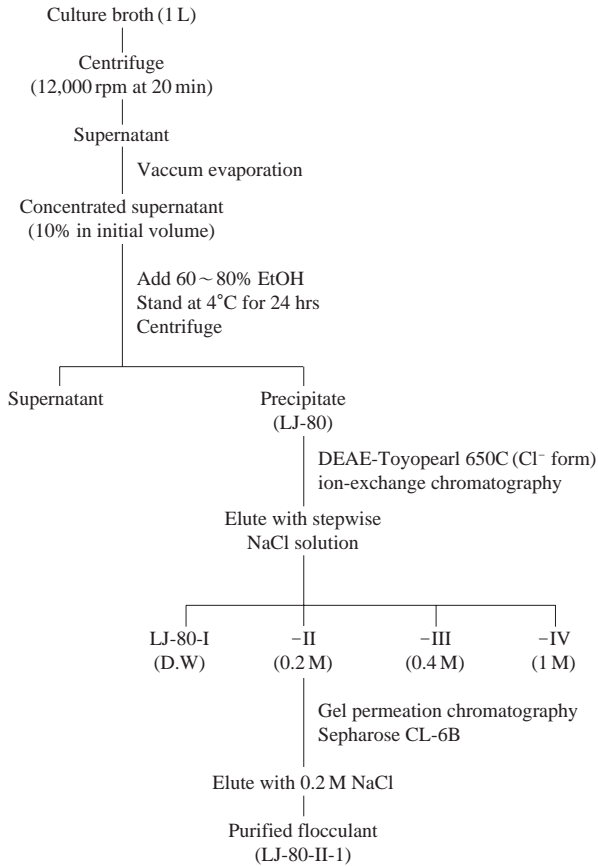


Fig. 1. Purification procedure of crude flocculant.

g에서 10분간 원심분리하여 균체를 제거한 후, 그 상등액을 감압하여 초기 배양액의 10%의 양으로 농축시킨 다음, EtOH를 0~95% 농도로 분획하여 응집제 활성과 건조수율이 높았던 80% 분획(LJ-80) 300 mg의 crude flocculant를 얻었다. Crude flocculant를 증류수에 녹여 2 M NaCl로 평형화시킨 DEAE-Toyopearl 650C column (Cl<sup>-</sup> form, 4.0 × 33 cm)에 흡착시킨 후 증류수, 0.2, 0.4, 1.0 M NaCl용액으로 용출시켜 각 획분을 투석, 농축, 동결건조하여 4개의 획분을 얻었다.

DEAE-Toyopearl 650에 의하여 얻어진 획분 중에서 주요 응집활성 획분인 LJ-80-II를 0.2 M NaCl용액으로 평형화시킨 Sepharose CL-6B column (2.3 × 90 cm)을 사용하여 분당 0.3 mL의 유속으로 4°C에서 겔 여과 크로마토그래피를 행하여 정제를 실시하였다.

7. 정제 다당의 순도 및 분자량 측정

Sepharose CL-6B column에 의해서 단일 peak로 분리된 LJ-80-II-1 획분의 순도를 확인하기 위하여 HPLC (SAMSUNG SLC-2000/RI/Shodex ionpack S-804)를 1 mL

min<sup>-1</sup>의 유속으로 실시하였으며 정제 다당의 분자량은 Dextran T-2000 (M.W.: 2 × 10<sup>6</sup>), T-500 (M.W.: 5 × 10<sup>5</sup>), T-70 (M.W.: 7 × 10<sup>4</sup>), T-40 (M.W.: 4 × 10<sup>4</sup>) 그리고 T-10 (M.W.: 1 × 10<sup>4</sup>)을 표준물질로 사용하여 Sepharose CL-6B column에서 구한 표준곡선과 Kav 값을 비교하여 측정하였다.

8. 일반 성분 분석 및 구성당 분석

총당 함량은 glucose를 표준물질로 하여 phenol-sulfuric acid법 (Dubois et al. 1956)으로 하였으며 단백질 함량은 bovine serum albumin을 표준물질로 하여 Lowry 법 (Lowry 1951)으로 각각 정량하였다. 구성당 분석은 중성당을 alditol acetate 유도체로 전환시켜 gas liquid chromatography (GLC)로 분석하였고 GLC 분석조건은 3% OV-225 chromatosorb WHP 100/120의 packed column이 장착된 Shimadzu GC-14A/FID/Shimadzu GC-R6A chromatopac (column temp. 225°C, inject temp. 250°C, detect temp. 250°C)에서 실시하여 표준 구성당들과 retention time을 비교하여 시료 중의 구성당을 분석하였다. 구성당의 molar ratio는 각 peak들의 면적비와 구성당들의 alditol acetate 유도체의 분자량으로부터 계산하였다.

9. 응집활성 측정

0.5% Kaolin용액 10 mL 1.0% CaCl<sub>2</sub>를 100 μL 첨가하고 응집활성물질을 0.1 mL 가하여 10분 동안 정치한 후 상등액 1 mL를 취해 550 nm에서 흡광도를 측정하고 Nakamura et al. (1976)의 방법에 따라 응집활성을 환산하였다. 대조군은 균을 접종하지 않고 응집제 생산배지를 사용하였다.

Flocculating activity (units mL<sup>-1</sup>)

$$= (A - B) / A \times \text{dilution rate}$$

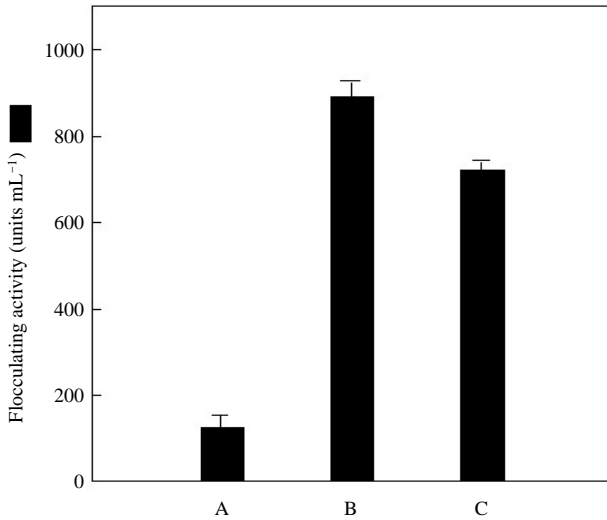
A: Optical density of reference sample

B: Optical density of reaction mixture

결과 및 고찰

1. 배양액의 응집활성 분포

*Lactobacillus jensenii* YW-33을 최적배지로 배양하여 생산된 응집제의 분포를 조사하기 위하여 culture broth를 원심분리 (12,000 rpm, 10 min)한 후 균체를 회수하여 30 mM phosphate buffer (pH 7.0)에 흡광도 (660 nm)값으로 1.0 이상 되게 현탁시켜 균체 자체의 시료를 제조하



**Fig. 2.** Distribution of flocculating activity in cell, filtrate of culture broth and culture broth. A: Cell, B: Filtrate of culture broth, C: Culture broth.

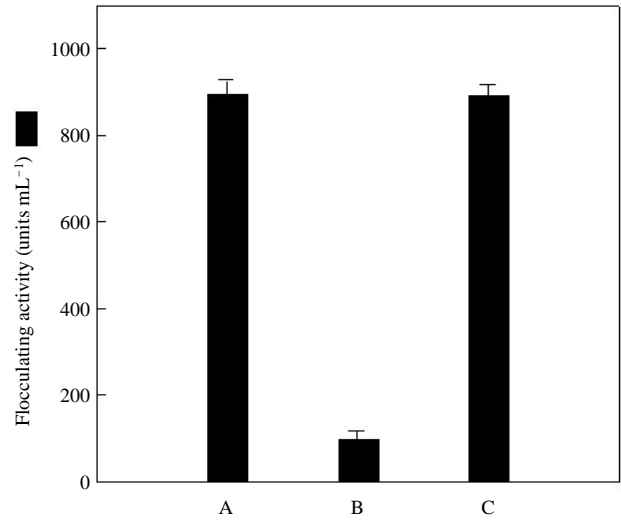
고 균체를 제거한 상등액과 culture broth를 대상으로 각각의 응집활성을 검토한 결과 (Fig. 2) 균체를 제거한 상등액이 균체 자체의 응집활성보다 약 86%가 더 높은 결과를 나타냈다. Norberg *et al.* (1982)은 균체 세포벽의  $\beta$ -(1  $\rightarrow$  4)-linkage를 가진 capsular matrix가 응집활성과 cell의 응집에 관여한다고 보고하였으나 이 결과로 미루어 볼 때 YW-33는 균체의 세포벽 성분보다는 1차 대사 산물에 의한 응집활성이라고 사료되며 이의 결과는 Kurane *et al.* (1986)의 보고와 일치하였다.

## 2. Pronase 처리와 periodate 산화

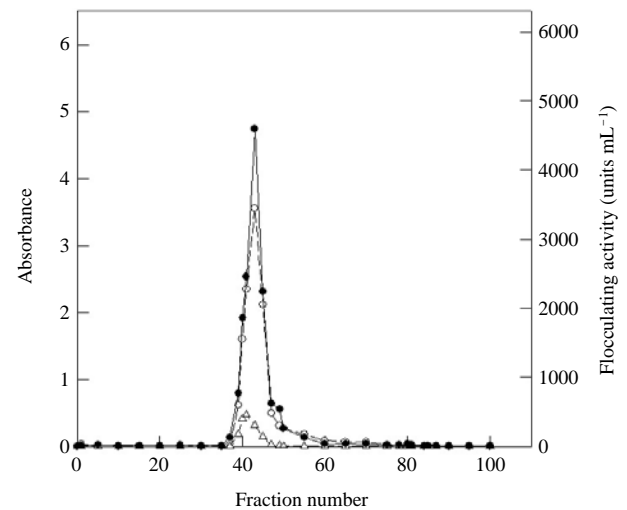
*Lactobacillus jensenii* YW-33가 생산하는 응집활성의 본체를 파악하기 위하여 배양 상등액에 80% EtOH를 가해 얻은 침전물을 pronase에 의해 단백질을 분해하고 periodate를 이용하여 당 부위를 선택적으로 분해한 후 응집활성을 측정하였다. 그 결과 pronase로 처리한 침전물은 무처리군과 비교하여 차이가 없었던 반면 periodate로 산화시킨 침전물은 무처리군에 비해 응집활성이 약 90.7%가 감소함에 따라 YW-33이 생산하는 응집활성의 본체는 다당에 기인함을 알 수 있었다 (Fig. 3).

## 3. 생물응집제의 정제

응집활성 본체를 조사하기 위해 정제를 실시하였다. 배양액을 12,000 rpm에서 10분간 원심분리하여 균체를 제거한 후, 그 상등액을 감압하여 초기 배양액의 10%의 양으로 농축시킨 다음, EtOH 농도를 달리하여 응집활성



**Fig. 3.** Comparison of flocculating activity to periodate oxidate and pronase digest of flocculant. A: Native, B: Periodate oxidate, C: Pronase digest.



**Fig. 4.** Gel permeation chromatogram of LJ-80-II using Sepharose CL-6B. The column (2.3  $\times$  90 cm) of Sepharose CL-6B was eluted with 0.2 M NaCl at flow of 0.3 mL min<sup>-1</sup>. -○-: Total sugar (490 nm), -△-: Total protein (280 nm), -●-: Flocculating activity.

을 조사한 결과 (data not shown) 농도가 높아짐에 따라 응집활성과 수율은 증가되었으며 농도 60~80% (v/v)의 조건에서 300.3 units mL<sup>-1</sup>의 응집활성을 나타낸 LJ-80을 획득했다 (data not shown).

EtOH 농도별 침전 획분 중 가장 활성이 높았던 LJ-80을 2 M NaCl로 평형화된 DEAE-Toyopearl 650C (Cl<sup>-</sup> form, 4.0  $\times$  33 cm)를 이용하여 이온 교환 크로마토그래피를 실시하였다. LJ-80 획분 300 mg을 증류수에 녹여 흡

착, 용출시킨 후 NaCl를 0.2~1.0 M까지 농도구배를 달리하여 이온강도에 따라 비흡착 획분과 흡착 획분으로 분리하여 4개의 획분으로 나누어졌다. 4개의 분획 중, 미흡착 분획에서는 응집활성은 보이지 않았으며 0.2 M NaCl용액으로 용출된 분획에서 가장 높은 응집활성을 나타낸 LJ-80-II분획을 얻었다. DEAE-Toyopearl 650C에 의해 분리된 LJ-80-II를 Sepharose CL-6B column (2.3 ×

90 cm)을 이용하여 0.3 mL min<sup>-1</sup> 속도로 용출하여 2 mL 씩 분취한 결과, 응집활성이 당 peak와 일치하는 결과를 얻었다 (Fig. 4). 이와 같이 EtOH분획, DEAE-Toyopearl 650C, Sepharose CL-6B column chromatography에 의해 응집제를 정제하였으며 이상의 4단계 정제과정에 의해 응집제는 최종적으로 1.3% 회수율과 11배의 정제도를 보였다 (Table 2).

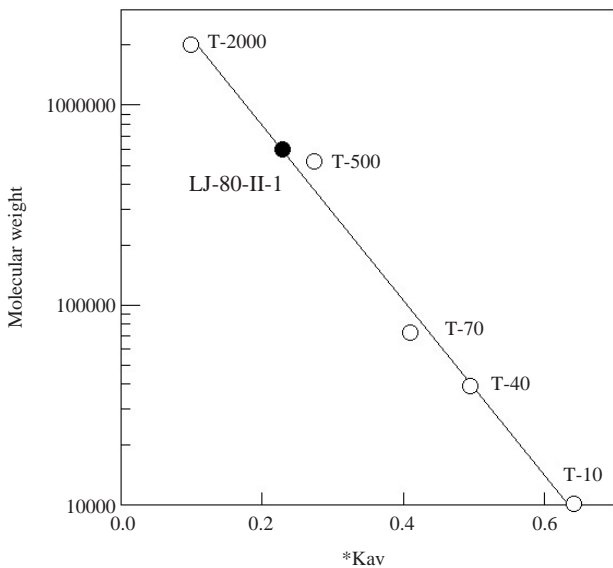


Fig. 5. Estimation of molecular weight of LJ-80-II-1 on Sepharose CL-6B column chromatography.

$$*K_{av} = \frac{V_e - V_o}{V_t - V_o}$$

Vo: Void volume  
Vt: Total volume  
Ve: Elution volume

Table 1. Chemical compositions of purified LJ-80-II-1

LJ-80-II-1	Amount
Total sugar (%)	98.4
Protein (%)	0.6
Sugar composition	Molar ratio
Mannose	1.61
Galactose	0.25
Glucose	1.0

Table 2. Purification steps of flocculant

Purification steps	Total sugar (mg)	Total activity (Units)	Specific activity (Units mg <sup>-1</sup> )	Purification folds	Yields (%)
Cell free-extract	64,673	758,000	11.7	1	100
EtOH precipitation	1,638	90,090	55	4.7	11.9
DEAE-Toyopearl 650C	347	36,476	105	9	4.8
Sepharose CL-6B	78	9,879	126.7	10.8	1.3

#### 4. 정제 다당의 순도 및 분자량 측정

Sepharose CL-6B에 의해 얻어진 LJ-80-II-1 획분의 순도를 확인하기 위해서 HPLC를 실시한 결과 단일 peak로 나타나 순수하게 정제되었음이 확인되었으며 Sepharose CL-6B column (2.3 × 90 cm)을 이용하여 분자량을 표준 dextran들과 비교, 측정된 결과, LJ-80-IIa는 분자량 약 80만 정도를 나타내었다 (Fig. 5). Suzuki *et al.* (1990)은 *Streptomyces* A-6143에서 얻은 응집제의 분자량은 73,000 이라고 보고하였으며 Takagi *et al.* (1985)은 *Paecilomyces* sp.가 생산하는 응집제의 경우 300,000, Toeda and Kurane (1990)는 *Alcaligenes cupidus*의 응집제는 2,000,000이라고 보고하였다.

#### 5. 정제된 생물응집제의 화학적 특성

Sepharose CL-6B column chromatography에 의해 정제된 LJ-80-II-1은 응집활성이 126.7 unit mg<sup>-1</sup>이고 총당 함량이 98.4%이고 단백질은 0.6%를 나타내었다. 정제된 LJ-80-II-1의 구성당을 조사하기 위하여 2 M TFA로 가수분해하여 gas liquid chromatography (GLC)를 이용하여 당조성을 조사한 결과 (Table 1) 응집제 LJ-80-II-1이 함유하고 있는 구성당은 mannose : galactose : glucose 등이 1.61 : 0.25 : 1.00의 mole비로 함유되어 있는 것을 확인할 수 있었다.

정제된 생물응집제의 화학적 특성을 볼 때 본 응집제는 다당의 특성을 가지고 다당 특유의 점성으로 인한 응집기작을 나타내고 응집 후 자연계에서 생분해될 수 있는 생물응집제로 친환경적인 응집제로 이용될 가능성을 시사하고 있다.

## 적 요

*Lactobacillus jensenii* YW-33이 생산하는 생물응집제의 활성본체를 규명하고자 응집물질을 분리, 정제하고 그 특성을 검토하고자 하였다. 생물응집제의 활성 본체를 조사하기 위하여 배양액을 원심분리하여 균체 자체와 균체를 제거한 상등액을 비교한 결과 균체를 제거한 상등액이 86%로 높은 응집활성을 나타냈다. 또한 pronase 처리와 periodate 산화를 행한 결과 pronase로 처리한 시료는 무처리군과 비교하여 차이가 없었던 반면 periodate로 산화시킨 시료는 응집활성이 크게 감소함에 따라 당에 기인되는 것으로 추정되었다.

균체가 제거된 상등액을 감압, 농축하여 EtOH 60~80%의 농도로 분획한 결과 LJ-80을 얻었다. 분리된 LJ-80을 DEAE-Toyopearl 650C chromatography, Sepharose CL-6B chromatography을 이용하여 최종 정제된 LJ-80-II-1을 분리하였으며 HPLC 분석에 의해 순도를 확인했다. 정제된 LJ-80-II-1의 분자량은 약 800,000 이상이며 총당이 98.4%, 단백질이 0.6%으로 mannose : galactose : glucose가 1.61 : 0.25 : 1.00의 molecule ratio을 가지고 있었다.

## 참 고 문 헌

- 서호찬, 최양문, 조홍연, 양한철. 1997. *Lactobacillus jensenii* YW-33이 생산하는 다당류성 생물응집제 및 생산조건. 한국산업미생물학회지. 25:328-334.
- Ander BN and SO Enfors. 1982. Production of extracellular polysaccharide by *Zoogloea ramigera*. Appl. Environ. Microbiol. 44:1231-1237.
- Brierly CL, DP Kelly, KJ Sea and DJ Best. 1985. In Biotechnology, pp. 186-204, Blackwell Scientific Pub., Oxford.
- Cripps RE and W Elizabeth. 1967. The accumulation of extracellular macromolecules by *Staphylococcus aureus* growth in the presence of sodium chloride and glucose. J. Gen. Microbiol. 49:127.
- Crueger W and A Crueger. 1984. Biotechnology : Textbook of Industrial Microbiology. pp. 288-291. Science Tech. Inc. Madison.
- Deavin L, TR Jarman, CJ Lawson, RC Righelato and S Slocomb. 1977. The production of alginic acid by *Azotobacter vinelandii* in batch and continous culture. American Chemical Society Symp. Ser. 45:14-26.
- Desmond PF, F Auer and RJ Seviour. 1990. Influence of varying nitrogen sources on polysaccharide production by *Aureobasidium pullulans* in batch culture. Appl. Microbiol. Biotechnol. 32:63-637.
- Dubios M, KA Hamilton, TK Rebers and F Sonisth. 1956. Colorimetric method for determination of sugar and related substances. Anal. Chem. 28:350.
- Ikeda FH, ST Fukui and T Tomita. 1982. An extracellular polysaccharide produced by *Zoogloea ramigera* 115. Eur. J. Biochem. 123:437-445.
- Jarman TR, L Deavin, S Slocombe and RC Righelato. 1978. Investigation of the effect of environmental conditions on the rate of exopolysaccharide synthesis in *Azotobacter vinelandii*. J. Gen. Microbiol. 107:59-64.
- Jochen B and M Nava. 1988. Cell adsorption control by culture conditions. Appl. Microbiol. Biotechnol. 29:119.
- Kazuo S and H Takahashi. 1981. DNA as a flocculation factor in *Pseudomonas* sp. Agric. Biol. Chem. 45:2869.
- Koizumi JI and M Takeda. 1991. Synergistic Flocculation of the Bioflocculant fix extracellularly produced by *Norcardia Amara*. J. Gen. Appl. Microbiol. 37:447.
- Kurane R. 1994. Production of a bioflocculant by *Rhodococcus erythropolis* S-1 Grown on alcohol. Biosci. Biotech. Biochem. 58:428.
- Kurane R. 1994. Purification and Characterization of Lipid Bioflocculant produced by *Rhodococcus erythropolis*. Biosci. Biotech. Biochem. 58:1977.
- Kurane RK, K Toeda, K Takeda and T Suzuki. 1986. Cultural conditions for production of microbial flocculant by *Rhodococcus erythropolis*. Agr. Biol. Chem. 50:2309-2313.
- Lowry OH, NJ Rosebrough, K Farr and RJ Rindall. 1951. Protein measurement with the folin phenol reagent. J. Biol. Chem. 193:256.
- McNeil B and B Kristiansen. 1990. Temperature effects on polysaccharide formation by *Aureobasidium pullulans* in stirred tanks. Enzyme Micro. Technol. 12:521-526.
- Miki BL, AN Hung, A Poon, P James and VL Seligy. 1992. Possible mechanism for flocculation interaction governed by gene FLO I in *Saccharomyces cerevisiae*. J. Bacteriol. 150:890-899.
- Nakamura J, S Miyashiro and Y Hirose. 1976. Screening, isolation and some properties of microbial cell flocculants. Agr. Biol. Chem. 40:377-382.
- Nakamura J, S Myashiro and Y Hirose. 1976. Conditions for production of polysaccharide from *Pullularia pullulans*. Appl. Microbiol. 25:628-635.
- Norberg AB and S Enfors. 1982. Production of extracellular polysaccharide by *Zoogloea ramigera*. Appl. Environ. Microbiol. 44:1231-1237.
- Parker ND and CB Munn. 1984. Increased cell surface hydrophobicity associated with possession of an additional surface protein by *Aeromonas salmonicida*. FEMS Microbiology

- Letters 21:233.
- Souw P and AL Demain. 1979. Nutritional studies on xanthan production by *Xanthomonas campestris* NRRL B1459. Appl. Environ. Microbiol. 37:1186-1192.
- Suzuki K, N Nakano, Y Nagatomi, H Tominaga, N Nakazono, M Itai, M Uyeda and M Shibata. 1990. HAF hepatoma aggregation factor produced by *Streptomyces* sp. strain No. A-6143. Agric. Biol. Chem. 54:2061-2068.
- Takagi H and K Kadowaki. 1985. Flocculant production by *Paecilomyces* sp. Taxonomic studies and culture conditions for production. Agr. Bio. Chem. 49:3151-3157.
- Takagi H and K Kadowki. 1985. Purification and chemical properties of a flocculant produced by *Paecilomyces* sp., Agr. Biol. Chem. 49:3159-3164.
- Toeda K and R Kurane. 1991. Microbial flocculant from *Alcaligenes cupidus* KT201. Agr. Biol. Chem. 55:2793-2799.
- Yamada H, H Kiyohara, JC Cyong, Y Kojima, Y Kumazawa and Y Otsuka. 1984. Studies of polysaccharide from *Angelica acutiloba*. part I. Fractionation and biological properties of polysaccharides. Planta Med. 50:163-167.
- Zajic JE and A Leduy. 1973. Flocculant and chemical properties of a microbial cell flocculant by *Aspergillus sojae* AJ7002. Agr. Biol. Chem. 40:1341-1347.

Manuscript Received: October 31, 2011  
Revision Accepted: November 11, 2011  
Responsible Editor: Hak Young Lee