

## ***Bacillus megaterium*이 생산하는 응집제에 관하여. 제2보. *Bacillus megaterium*에 의한 응집제 생산 특성**

정준영 · 김도영\* · 도대홍\* · 우정숙\*\*

농업과학기술원, \*충청대학 식품과학부, \*\*충북대학교 식품공학과

### **Study on the Bioflocculant by *Bacillus megaterium*. #2. Characteristic of Production Condition for Bioflocculant by *Bacillus megaterium***

**Jun-Young Jeong, Do-Yung Kim\*, Dae-Hong Do and Jeong-Suk Woo\*\***

*National Institute of Agriculture Sci. and Tech., Suwon, 441-707, Korea,*

*\*Dept of Food Sci. and Tech., Chungcheong Junior College, Cheongwon, 363-890, Korea,*

*\*\*Dept. of Food Sci. and Tech., Chungbuk National Univ., Cheongju, 360-763, Korea*

#### **Abstract**

The purpose of this study was to develop the new microbial bioflocculant available in a food and fermentation industrial. This study was reported the results of the composition for optimum culture medium and elemental characteristic of crude purification bioflocculant following the previous report(I). The maximum production of the flocculant from *Bacillus megaterium* was observed in the culture medium containing 2% sucrose, 0.3% NaNO<sub>3</sub>, 0.01% tryptone, 0.01% beef extract, 0.05% MgSO<sub>4</sub> · 7 H<sub>2</sub>O, 0.005% CaCO<sub>3</sub>. Addition of the sucrose as carbon sources and inorganic salt such as MgSO<sub>4</sub>, CaCO<sub>3</sub> significantly increased the production of flocculant more than nitrogen sources. In the result of color reaction of the crude purified bioflocculant, it was investigated that anthrone was positive and benedict, burette and ninhydrin was negative. These result were indicated that the flocculant produced from *Bacillus megaterium* was a kind of exopolysaccharide.

Key words : *Bacillus megaterium*, bioflocculant, exopolysaccharide, color reaction.

#### **서 론**

우리나라에서의 유기고분자 응집제는 1984년에 처음으로 개발되어 1996년 현재 연간 1만 5천톤 규모로 350억원 정도의 시장 규모를 가지고 있으며 매년 10% 정도의 증가세를 보이고 있다<sup>1)</sup>. 그러나 이들 유기합성 고분자 응집제는 응집효과가 콜로이드 형태에 의존적이며 상징액의 투명도가 낮고 비교적 고가이다. 또한 자연계에서 분해가 잘 되지 않아 2차 환경오염의 원인이 될 뿐만 아니라 분해 과정에서 발생하는 acrylamide 등의 단량체는 신경독 및 강한 발암성 물질로 보고<sup>2)</sup>되어 있어 점차 사용에 대한 규제가 강

화되고 있다. 이와 같은 환경독성을 보완하기 위해 chitosan, guar gum<sup>3)</sup>, sodium alginate<sup>4)</sup>, gelatin<sup>5)</sup> 등과 같은 천연응집제와 미생물 유래의 응집제<sup>6,7)</sup>에 대한 관심이 증가되어 많은 연구가 수행되고 있다. 한편 미생물 유래의 세포외 다당성 응집제는 탄소원, 질소원, 무기염의 종류 및 농도에 따라 영향을 받는 것으로 알려져 있다. 탄소원의 농도는 이들 탄소원이 expolymer로의 전환효율에 영향을 미치는 인자이며<sup>8)</sup> 질소원은 Sutherland<sup>9)</sup>에 의하면 미생물의 세포외 다당성 expolymer의 생성에 필요한 인자이나 질소원이 과량일 때는 세포외부로의 다당성 expolymer의 분비를 감소시킨다고 보고한 바 있다. 또

한 무기염류의 경우 Appana 등<sup>10)</sup>은  $Mn^{2+}$ 의 첨가에 의해 균의 증식과 세포의 polysaccharide의 생산이 촉진된다고 보고한 바 있으며 또한 superoxide dismutase의 cofactor로 이용되어 세포의 polysaccharide의 생합성을 증가시키는 것으로 알려져 있다<sup>11)</sup>. Kang 등<sup>12)</sup>에 의하면  $Mg^{2+}$ 은 세포의 다당류의 합성이 촉진시키며 Kurane 등<sup>13)</sup>은  $Ca^{2+}$  이온의 경우 배양중 pH 저하를 억제시킴으로써 응집제의 생산에 영향을 미친다고 보고한 바 있어 미생물 응집제 생산 시 기질의 종류뿐만 아니라 첨가농도도 응집제 생산에 중요한 요인으로 추측된다. 따라서 저자 등이 전보<sup>14)</sup>에서 보고한 토양에서 분리한 응집제 생산균주인 *Bacillus megaterium*을 이용, 최대 응집제 생산을 위한 탄소원, 질소원 및 무기염의 최적 첨가 농도와 생산 응집제의 성분 규명을 위한 몇가지 실험을 수행하였다.

## 재료 및 방법

### 1. 균주 및 기초배지

본 실험에 사용한 균주는 전보<sup>14)</sup>에서 보고한 *Bacillus megaterium*를 이용하였으며 응집제 생산을 위한 최적 배지 성분을 조사하기 위한 대조 배지로는 정 등<sup>15)</sup>의 (glucose 2%,  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$  0.01%, NaCl 0.01%, agar 1.5%, pH 7.0) 기초배지를 이용하였다.

### 2. 균 생육 및 응집활성 측정

응집활성은 Kurane 등<sup>13)</sup>의 방법을 수정하여 다음과 같이 측정하였다. 배지에서 24시간 동안 배양한 전배양액 0.1ml를 0.1%  $CaCl_2$  0.1ml와 함께 10ml의 0.5% kaolin에 첨가하여 30초 동안 격렬히 교반하고 3분동안 정지한 다음 상징액 2ml를 취해 spectrophotometer(spectronic 20, USA)로 550nm에서 흡광도 측정하였다. 응집활성의 계산은 다음과 같으며 대조구로는 배양액 대신 증류수를 동일농도 첨가하여 수행하였다.

Unit of flocculating activity(FU)

$$= 1/A - 1/B$$

A : Optical density of control at 550nm

B : Optical density of sample at 550nm

한편 균체의 증식은 660 nm에서 배양액의 흡광도를 spectrophotometer(spectronic 20, USA)로

측정하여 조사하였다.

### 3. 응집제 생산을 위한 최적 배지 조성

응집제 생산에 가장 효과적인 배지성분의 첨가 농도를 조사하기 위하여 각 성분의 첨가농도에 따른 응집활성과 균 생육을 기초배를 이용하여 조사하였으며 전보<sup>14)</sup>에서 보고한 최적 배지 성분으로 조사된 각각의 배지성분을 다음과 같이 첨가하여 조사하였다. 즉, sucrose 1~3%,  $NaNO_3$  0.1~0.5%, tryptone과 beef extract 0.01~0.02%,  $MgSO_4$  0.01~0.05%를 첨가하여 pH 7.0, 30°C에서 30시간 동안 배양하여 균생육 및 응집활성을 조사하였다.

### 4. 생산 응집제의 조정제

생산 응집제의 기초적 성분 분석을 위한 조정제는 Toeda 등<sup>16)</sup>의 방법을 보완하여 Fig. 1과 같이 수행하였다.

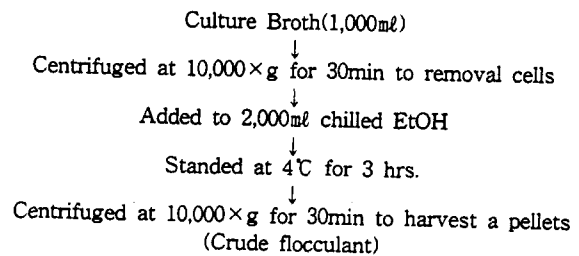


Fig. 1. Procedure of crude purification.

### 5. 정색반응

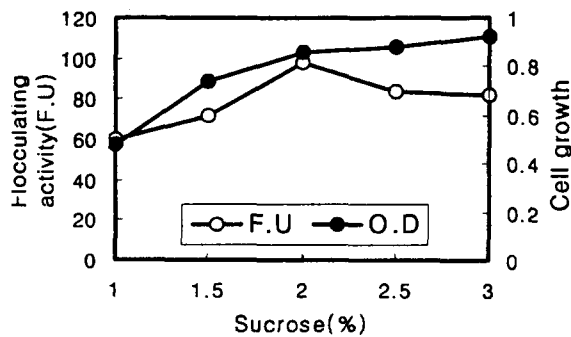
생산 응집제의 기초적 성분 규명을 위한 조정제 시료에 대한 정색반응은 Anthron반응, Molish반응, Benedict반응, Burette반응, Ninhydrin반응법<sup>17)</sup>에 따라 발색시켜 관찰하였다.

## 결과 및 고찰

### 1. 탄소원에 대한 영향

균생육과 응집제 생산을 위한 최적의 탄소원으로 조사된 sucrose 첨가농도에 따른 균 생육과 응집활성을 조사하기 위해 기초배지에 sucrose 첨가농도를 1~3%로 첨가하여 검토한 결과는 Fig. 2와 같다.

응집제 생산에 가장 효과적인 탄소원으로 조사된 sucrose에 대한 최적 첨가농도를 조사하기 위해 분리 배지에 1~3% 농도로 첨가하여 균 생육과 응집활성의 관계를 조사한 결과 Fig. 2와 같이 sucrose의



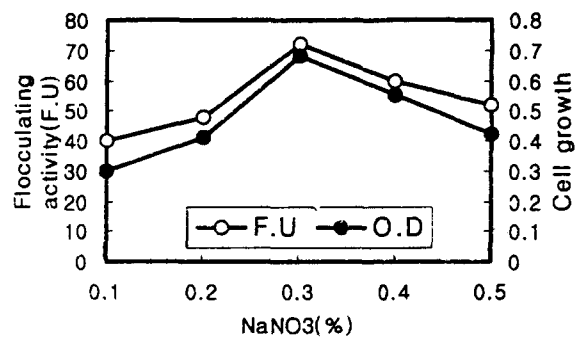
**Fig. 2. Effect of sucrose concentration on cell growth and flocculating activity.** Cells were incubated with shaking in basal medium containing sucrose of each concentration for 30hrs at 30°C.

첨가농도가 높아질수록 균 생육이 증가하는 것으로 나타났다. 한편 응집제 생산은 2% 첨가까지 점차 증가하다가 2% 이상의 농도에서는 오히려 응집제 생산이 완만히 감소하였는데 이와 같은 결과는 2% 이상의 탄소원 존재시 응집제로의 전환 효율이 저하되기 때문인 것으로 추측된다. 한편 Kurane 등<sup>18)</sup>이 *Alcaligenes* sp.로부터의 미생물 응집제 생산에 sucrose, glucose, galactose 등, 서 등<sup>19)</sup>이 *Aeromonas hydrophila*에서 2.0% mannitol 첨가시, Kurane 등<sup>20)</sup>이 *Rhodococcus erythropolis*에서 1.0% fructose가 응집제 생산에 가장 우수한 탄소원 및 농도였다고 보고한 바 있으며 거의 대부분의 경우에 최대 응집제 생산을 위한 탄소원 농도는 2~3%인 것으로 보고되어 있다. 본 실험결과 응집제 활성에 가장 우수한 탄소원으로 조사된 sucrose를 2% 농도로 첨가하여 다음 실험을 수행하였다

**2. 무기질소원에 대한 영향**

균 생육과 응집제 생산을 위한 최적의 무기질소원으로 조사된 NaNO<sub>3</sub>에 대한 최적 첨가농도를 검토하기 위해 0.1~0.5%의 농도로 첨가하여 균 생육과 응집활성을 검토한 결과는 Fig. 3과 같다.

Fig. 3은 최적의 무기 질소원으로 조사된 NaNO<sub>3</sub>의 첨가 농도에 따른 균 생육과 응집활성을 검토한 결과이다. Fig. 3에서와 같이 0.3% 첨가시 가장 우수한 균 생육과 응집활성을 보였으나 0.3% 이상의 농도에서는 균 생육과 응집활성 모두 감소하였다. 본 실험 결과 균 생육과 응집활성에 가장 효과적인 무기질소원으로 조사된 결과 NaNO<sub>3</sub>를 0.3% 첨가 농도로 하여 다음 실험을 수행하였다.

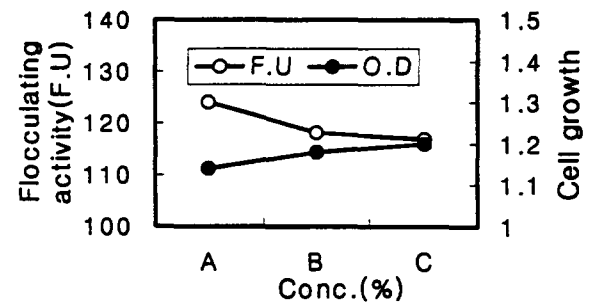


**Fig. 3. Effect of NaNO<sub>3</sub> concentration on cell growth and flocculating activity.** Cells were incubated with shaking in the medium containing sucrose 2%, MgSO<sub>4</sub> · 7H<sub>2</sub>O 0.01%, NaCl 0.01% and NaNO<sub>3</sub> of each concentration for 30hrs at 30°C.

**3. 유기질소원에 대한 영향**

균 생육과 응집제 생산을 위한 최적의 유기질소원으로 조사된 tryptone과 beef extract를 혼합 첨가하기 위해 혼합 첨가 농도에 따른 균 생육과 응집활성을 조사한 결과는 Fig 4와 같다.

Fig. 4는 tryptone과 beef extract 혼합 첨가농도에 따른 균 생육과 응집활성을 조사한 결과로 tryptone과 beef extract를 각 0.01% 첨가시 가장 우수한 응집제 생산을 보였는데 전보<sup>13)</sup>에서 tryptone만을 단독으로 첨가하였을 때보다 응집제 활성이 약 93% 정도 증가하였다. 한편 tryptone과 beef ex-



**Fig. 4. Effect of tryptone and beef extract concentration on cell growth and flocculating activity.** Cells were incubated with shaking in the medium containing sucrose 2%, NaNO<sub>3</sub> 0.3%, MgSO<sub>4</sub> · 7H<sub>2</sub>O 0.01%, NaCl 0.01% and tryptone + beef extract of each concentration for 30hrs at 30°C. A : tryptone+beef extract = 0.01 + 0.01%, B : tryptone+beef extract = 0.015 + 0.015%, C : tryptone+beef extract = 0.02 + 0.02%.

tract를 혼합하여 첨가시 전 시료구에서 tryptone만을 단독으로 첨가하였을 때 보다 균 생육과 응집제 생산이 비교적 높게 조사되었으나 tryptone과 beef extract의 첨가 농도가 각각 0.01% 이상이 되면 응집제 생산에는 큰 영향을 미치지 않는 것으로 조사되었는데 Kurane 등<sup>13)</sup>이 *Rhodococcus erythropolis*를 이용한 응집제 생산을 위한 최적 유기질소원은 yeast extract 였고 최적 첨가 농도가 0.05%였다고 보고한 바 있다.

한편 탄소원과 질소원에 대한 C/N 비 측면에서 응집제 생산을 보면 Fig. 2에서와 같이 탄소원인 sucrose 2%를 기준으로 한 C/N 비는 Fig. 3, 4에서와 무기질소원인 NaNO<sub>3</sub> 0.3%, 유기질소원인 tryptone과 beef extract 각 0.01%(총 질소원 함량 0.32%) 첨가시 본 균주에 의한 응집제 생산을 위한 C/N 비는 6.25:1 였다. Brierley 등<sup>21)</sup>은 일반적으로 질소원은 균체 생산과 다당생산 효소의 합성에 필요하나 과잉 질소원은 기질로부터 다당으로의 전환을 제한하는 인자로 작용하며 균에 따라 차이가 있으나 보통 C/N 비가 10 : 1일 경우에 세포의 다당 생산이 높다고 보고한 바 있는데 본 균주의 경우에도 첨가되는 총 질소원이 0.32% 이상의 농도에서 균생육은 증가하나 응집제 생산이 감소하였다.

한편 본실험 결과 최적 유기질소원으로 조사된 tryptone과 beef extract를 각각 0.01% 씩 첨가하여 무기염류에 대한 영향을 검토하였다.

4. 무기염류의 영향

균 생육과 응집제 생산을 위한 최적 무기염류원으

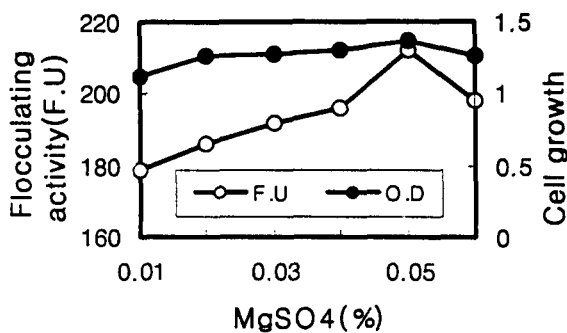


Fig. 5. Effect of MgSO<sub>4</sub> concentration on cell growth and flocculating activity. Cells were incubated with shaking in the medium containing sucrose 2%, NaNO<sub>3</sub> 0.3%, tryptone 0.01%, beef extract 0.01% and MgSO<sub>4</sub> · 7H<sub>2</sub>O of each concentration for 30hrs at 30°C.

Table 1. Effect of MnSO<sub>4</sub>, MgSO<sub>4</sub> and CaCO<sub>3</sub> on cell growth and flocculating activity of *Bacillus megaterium*

Sources	Cell growth	Flocculating activity
MnSO <sub>4</sub> + MgSO <sub>4</sub>	1.28	241.7
MnSO <sub>4</sub> + CaCO <sub>3</sub>	1.24	226.4
MgSO <sub>4</sub> + CaCO <sub>3</sub>	1.31	257.8
MnSO <sub>4</sub> + MgSO <sub>4</sub> + CaCO <sub>3</sub>	1.27	225.8
Control**	1.16	121.9

\* MnSO<sub>4</sub> : 0.01%, MgSO<sub>4</sub> · 7H<sub>2</sub>O : 0.05%, CaCO<sub>3</sub> : 0.005%, \*\* Control : not added to inorganic salt.

로 조사된 MgSO<sub>4</sub>의 첨가 농도를 0.01~0.06% 농도로 첨가하여 균 생육과 응집활성을 검토한 결과는 Fig. 5와 같다.

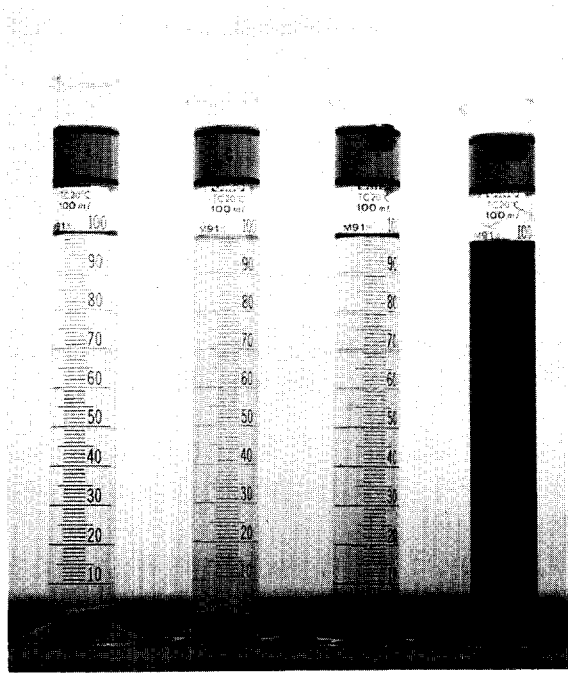
Fig. 5는 MgSO<sub>4</sub> 첨가농도를 달리하였을 때의 균 생육과 응집활성을 조사한 결과로 Mg<sup>2+</sup>의 농도가 증가할수록 균 생육과 응집활성이 점차 증가하여 0.05% 첨가시 가장 우수한 생육과 응집제 생산을 보였는데 Kang 등<sup>12)</sup>에 의하면 Mg<sup>2+</sup>는 세포의 다당류의 합성이 촉진시키는 인자라고 보고한 바 있다. 한편 Mg<sup>2+</sup> 첨가량이 0.05% 이상에서는 오히려 감소하는 경향을 나타내었다.

Table 1은 전보<sup>13)</sup>에서 가장 우수한 응집활성을 나타낸 MgSO<sub>4</sub>, CaCO<sub>3</sub>, MnSO<sub>4</sub>의 혼합 첨가 농도에 따른 균 생육과 응집활성을 조사한 결과로 Table 1과 같이 각 성분들의 복합첨가시 균 생육은 큰 차이가 없었으나 응집활성은 0.05% MgSO<sub>4</sub>와 0.005% CaCO<sub>3</sub> 첨가구에서 257.8 unit로 무첨가구의 121.9 unit에 비해 약 112% 증가되었다. 이와 같은 결과는 Mg<sup>2+</sup>에 의해 세포의 다당 합성의 촉진과 함께 CaCO<sub>3</sub> 첨가에 의해 배양액 중의 pH 저하를 억제시킴으로써 응집제 생산을 촉진시켰기 때문인 것<sup>13)</sup>으로 추측되며 무기염류의 경우 그 종류뿐만 아니라 첨가 농도가 응집제 생산에 큰 영향을 미치는 것으로 추측된다.

한편 이상의 결과로 *Bacillus meraterium*에 의한 응집제 생산은 sucrose 2.0%, NaNO<sub>3</sub> 0.3%, tryptone 0.01%, beef extract 0.01%, MgSO<sub>4</sub> 0.05%, CaCO<sub>3</sub> 0.005% 가 최적 배양배지로 조사되었으며 최적배지에서의 응집활성은 257.8 unit로 기초 배지에 비해 응집활성이 약 161% 증가하였다.

5. 정색반응

조정제 시료의 정색반응에 의한 생산 응집제의 기



**Fig. 6. Photography of flocculated active carbon and kaolin with the optimum culture broth.** It was added 0.1% of the culture broth and 0.1%  $\text{CaCl}_2$  to 100ml of 5,000ppm active carbon and kaolin. And then, it was mixed for 30 sec. and standed for 3 min at room temp. Here, the blank test used added to 0.1% of distilled water, under the same condition.

**Table 2. Color reaction of the crude purified bioflocculant**

Analyzed item	Method	Polymer
Sugar	Anthrone(Molish)	+(+)
Protein	Burette	-
Reducing sugar	Benedict	-
Aminosugar	Ninhydrin	-
Ketose	Seliwanoff	-
Uronic acid	Cabasol	-

초적 성분분석을 수행한 결과는 Table 2와 같다.

생산 응집제를 조정제한 후 정색반응 실험 결과는 Table 2와 같이 Anthrone 반응 양성, 다당류의 환원성을 보는 Benedict 반응은 음성을 나타내어 비환원성 당으로 판명되었고 fructose를 함유한 당의 특유 반응인 Seliwanoff 음성으로 fructose는 함유하지 않은 다당의 일종인 것으로 조사되었다.

또한 Burette 및 Ninhydrin 반응 음성을 나타내어 본 균주가 생산한 응집제는 단백질 및 aminosug-

ar를 포함하지 않는 순수한 당으로 이루어져 있는 것으로 추측되었다.

## 요 약

식품 및 발효공업의 균체 제거에 이용할 수 있는 새로운 미생물 응집제를 개발할 목적으로 토양에서 분리한 *Bacillus megaterium*의 응집제 생산 특성을 조사한 결과 sucrose 2.0%,  $\text{NaNO}_3$  0.3%, tryptone 0.01%, beef extract 0.01%,  $\text{MgSO}_4$  0.05%,  $\text{CaCO}_3$  0.005%가 최적 배양매지로 조사되었으며 최적배지에서의 응집활성은 257.8 unit로 기초배지에 비해 응집활성이 약 161% 증가하였다. 한편 본 균주는 탄소원 및 무기염의 첨가에 의해 응집활성이 크게 영향을 받았으나 질소원의 경우 다른 성분비에 비해 영향이 크지 않은 것으로 조사되어 본 균주가 생산한 응집제는 균체의 다당류의 일종인 것으로 추측된다. 또한 조정제 응집제에 대한 정색반응 결과 생산 응집제를 조정제한 후 정색반응 실험 결과는 비환원성 당으로 fructose를 함유하지 않은 다당의 일종인 것으로 추측되었다.

## 참고문헌

1. 화학경제 연구원 : '98 화학연감(1998).
2. Diarfield, K.L. and Abermathy, C.O.: Acrylamide: its metabolism, developmental and reproduction effects, genotoxicity and carcinogeny, *Mutant Res.*, 195, 45(1988).
3. Goldstein, A.M. and Alter, E.N. Guar Gum in Whistler, R.L. and BeMiller, J.N. eds.: Industrial Gums, Academic Press, Lnc. New York(1959).
4. Guiseley, K.B.: Seaweed colloid in A. Standen, *Encyclopedia of Chemical Technology*, 2nd., 17, Wiley-Interscience, New York, 763(1968).
5. Hiroshi, S. and Ayumu, K.: The production of flocculating substance by *Streptomyces* sp., *Biosci. Biotech. Biochem.*, 60, 3, 498(1996).
6. Junichi, K. and Minoru, T.: Synergistic flocculating of the bioflocculant fix extracellularly produced by *Norcadia* sp., *J. Gen. Appl. Microbiol.*, 37, 447(1991).
7. Kurane, R. and Nohata, Y.: Microbiol flocculation of waste liquid and oil emulsion by a bioflocculant from *Alcalgenes latus*, *Agri. Biol. Chem.*, 55, 4, 1127, (1991).
8. Robyt, J.F.: Mechanism in the glucansucrase synthesis of polysaccharide and oligosaccharides from sucroses, *Advance in carbohydrate and biochemistry* 31, 133-167(1996).

9. Sutherland, I.W.: Microbial polysaccharides and polysaccharase, Berkeley, R.C. W., G.W.Gooday and D.C.Ellwood(eds.). American Press, 1-34 (1979).
10. Appana, V.D.: Stimulation of exopolysaccharide production in *Rhizobium meliloti* JJ-1 by manganese, *Biotechnol. Lett.*, 10, 205~206(1988).
11. Gottschalk, G.: In Bacterial Metabolism, Gottschalk, G. (2nd. eds.) Springer- Verlag, Berlin (1986).
12. Kang, K.S. and I.W.Cottrell,: In Microbial Technology, Bull, A. and D.C.Ellwood (eds.), Academic press, 1, 417~481(1979).
13. Kurane, R., Takedo, K., and Suzuki, T.: Screening and characteristic of microbial flocculant, *Agri. Biol. Chem.*, 50, 2301~2307(1986).
14. Kim, K.C. and Jeong, J.Y.: Study on the Biofloculant by *Bacillus megaterium*, *Korean J. Food and Nutr.*, 11, 622~628(1998).
15. Jeong, J.Y., Kim, K.C. and Do, D.H.: Production of biofloculat by *Agrobacterium* sp. KF-67, *Korea J. Food and Nutr.*, 10, 295~301(1997).
16. Toeda, K. and R. Kurane : Microbial flocculant from *Alcaligenes cupidus* KT201, *Agri. Biol. Chem.*, 55, 2793~2799(1991).
17. Pazur, J.H. : National polysaccharide, 55~96, 1986).
18. Kurane, R., Takedo, K. and Suzuki, T. : Culture condition for production of microbial flocculant by *Rhodococcus erythropolis*, *Agri. Biol. Chem.*, 50, 2309~2313(1991).
19. Seo, H.C and Lee, J.S.: Optimized condition of Bioproduction production from *Aeromonas hydrophila* KH-54, *Agri. Chem. and Biotech.* 41, 6, 465~470(1998).
20. Kurane, R. : Purification and characteristion of lipid biofloculant produced by *Rhodococcus erythropolis*, *Biosci. Biotech. Biochem*, 58, 11, 1977~1980(1994).
21. Brierley, C.L., Kelly, D.P., Seal, K.J. and Best, D.J.: In Biotechnology, Principles and Applications, Blackwell Scientific Pub., Oxford, p187 (1985).

---

(1999년 5월 18일 접수)