

Achromobacter sp. YJ-66가 생산하는 생물응집제의 성분 특성

우정숙* · 정준영 · 도대홍 · 조재민¹
충청대학 식품공학과, ¹충주대학교 식품공학과

Characteristics of Biofloculant Produced by *Achromobacter* sp. YJ-66. Woo, Jeong-Sook*, Jun-Young Jeong, Dae-Hong Do, and Chae-Min Cho¹. Department of Food Science and Technology, Chungcheong Junior college, Cheongwon, 363-890, Korea, ¹Department of Food Science and Technology, Chungju National University, Chungju, 363-702, Korea - To develop biodegradable and safe flocculant. *Achromobacter* sp. YJ-66 were isolated from soil. The purified flocculant was composed of fructose and glucose in an approximate molar ratio of 1 : 24. Molecular weight was approximately 9×10^5 dalton by Sepharose CL-4B gel filtration chromatography. Elemental analysis revealed that the contents of carbon, hydrogen and oxygen were 37.72%, 5.37% and 56.89%, respectively. The presence of O-H stretching, C-H stretching, carboxy ester and C-H bending were confirmed by IR absorption spectrum analysis. We suggest that a biofloculant produced from *Achromobacter* sp. YJ-66 is new and different from other biofloculants.

Key words: Biofloculant, *Achromobacter* sp., polysaccharide, IR spectra, NMR spectrum

다당류의 응집성을 이용한 천연응집제에는 전분, Guar Gum, alginate, 키토산 등이 알려져 있다. 전분의 경우 구성성분 중 아밀로스가 아밀로펙틴이나 전분 그 자체보다 진흙 응집성이 더 강하며, 사용효과와 분산능은 양이온이나 음이온의 첨가에 의해 증가되는 것으로 보고된 바 있다[1]. Guar Gum은 수용성의 고분자 polysaccharide로 1950년대 초반에 상업화가 이루어진 후 많은 분야에 사용되어 온 천연 응집제로, 비이온성이므로 넓은 범위의 pH와 이온강도에서 응집능을 나타내나 상대적으로 수중에서 미생물에 의해 빨리 분해되는 단점을 지니고 있다[2]. Alginate는 polysaccharide를 기본으로 한 응집제의 일종으로, 갈조류를 알칼리 추출하여 만드는데, 응집력이 우수하지 않으나 산업적인 목적에는 주로 sodium alginate가 사용된다[3]. 키토산은 수용성 양이온의 polysaccharide의 일종으로 공업적으로 탈단백, 탈회공정 또는 탈아세틸화로 생산되고 있다[4]. 이와 같은 천연 응집제는 높은 생산 가격 및 제한적인 응집작용으로 인해 미생물 유래의 생물 응집제에 대한 관심이 높아지고 있다. 미생물이 생산하는 다당류는 세포내에서의 기능에 따라, 탄소원 및 에너지원으로 제공되는 저장물질인 poly- β -hydroxybutyrate(PHB)와 글리코겐등의 균체내 다당류, 세포벽의 구성 성분인 G(-) 세균의 lipopolysaccharide나 teichoic acid 등의 구조 다당류, 세포벽의 일부로써 협막을

형성하거나 발효과정에 축적되는 균체외 다당류 등으로 분류되는데[5], 이들 다당을 응집제로 이용하고자 하는 연구가 진행되고 있으며, 보고된 거의 대부분의 응집제 성분은 세포외 다당류로 알려져 있다[6,7,8]. 한편 미생물 유래의 다당성 응집제의 성분을 구명하고자 하는 연구도 수행되어 Yi[9] 등의 *Aspergillus* sp. LAM94-142가 생산하는 응집제의 분자량은 약 90만, Takagi[10] 등의 *Paecilomyces* sp.가 생산하는 응집제의 분자량이 30만, Toeda[11] 등의 *Alcaligenes cupidus* KT201 균주가 생산하는 미생물 응집제는 200만 dalton이라고 보고된 것과 같이, 미생물 응집제는 응집물질에 대한 작용이 특이하고 응집제의 구성성분도 생산균주에 따라 다양하다. 그러나 국내에서 보고된 거의 대부분의 미생물 응집제에 대한 연구는 응집제 생산 균주의 선별 및 최적 생산 조건에 국한되어 생산응집제 성분에 대한 연구는 미미한 실정이다.

따라서 저자 등은 전보[12]에서 분리한 응집제 생산 균주인 *Achromobacter* sp. YJ-66이 생산하는 응집제의 특성 및 구성 성분 조사를 위한 몇 가지 실험을 수행하였다.

재료 및 방법

생산균주 및 균 배양

본 실험에 사용한 응집제 생산균주는 전보[12]에서 분리, 동정하여 보관 중인 *Achromobacter* sp. JY-66를 사용하였다. 응집제 생산 및 배양은 sucrose 2%, peptone 0.067%, MgSO₄ 0.1%, KH₂PO₄ 0.1%의 최적배지를 pH 7.5로 조절한 다음 30°C에서 72시간 배양하였다. 한편 생산 응집제

*Corresponding author

Tel. 82-43-261-2565, Fax. 82-43-271-4412

E-mail: yunjo@hammail.com

의 응집활성은 전보[12]에 준하여 측정하였다.

Pronase 및 Periodate oxidation

생산 응집제의 본체를 파악하기 위하여 배양 상등액을 동결건조한 후, pronase 처리와 periodate 산화를 행한 후 잔존 응집활성을 측정하였다[13].

생산응집제의 정제

생산 응집제의 성분 분석을 위한 정제는 Toeda[11] 등의 방법을 보완하여 Fig. 1과 같이 수행하였다.

정색반응

정제 시료를 그대로 또는 가수분해하여 anthron, molish, benedict, burette, ninhydrin, carbazole, Elson-Morgan반응 등을 Pazur[14]의 방법에 따라 발색시켜 관찰하였다. 가수분해 시료는 1N sulfuric acid와 함께 시험관에 넣고 질소 가스를 충분히 주입한 후 밀봉하여 100°C에서 8-10시간 가수분해한 다음, Ba(OH)₂로 중화하여 원심분리(10,000 × g, 10min.)하고 진공, 농축하여 사용하였다.

구성당 정량 및 분석

응집물질의 구성 당 분석은 Chaplin[15] 등의 방법을 보완하여 Thin layer chromatography와 HPLC로 분석하였다. TLC에 의한 분석은 동결건조한 4 mg의 가수분해 시료를 1 ml의 증류수에 녹여 TLC silica gel plate (Art. 5735, Kieselgel 60 F254, E. Merck AG)에 spotting한 다음, butanol, acetic acid, 증류수가 2:1:1의 비율로 혼합된 전개용매를 사용하여 전개하였다. 전개가 끝난 plate는 diphenylamine/aniline/phosphoric acid reagent를 분무하여 완전히 건조한 후 100°C의 dry oven에서 10분간 방치하여 발색시켰다. 한편 HPLC (Waters, HPLC 600)에 의한 분석은 산으로 가수분해한 정제 시료를 Carbohydrate (4.6 × 250 mm) column을 사용하여 flow speed 1.5 ml/min로 분석하였다.

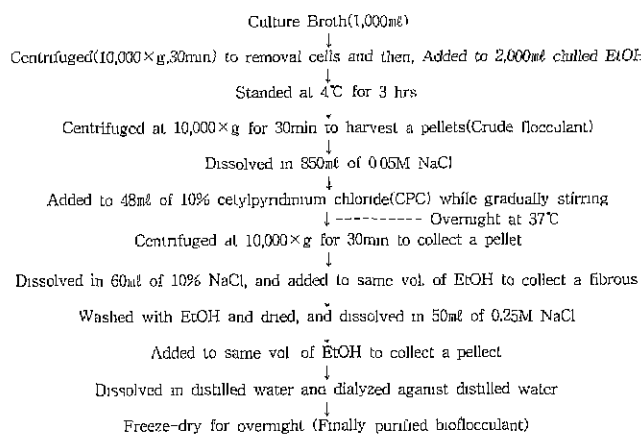


Fig. 1. Procedure of flocculant purification.

분자량 측정

생산 응집제의 분자량 측정은 gel filtration chromatography [16]에 의해 다음과 같이 실시하였다. 즉, 0.4 M NaCl 용액으로 평형화 한 Sepharose CL-4B로 충전한 칼럼 (2.5 × 81 cm)에 시료 및 표준당(분자량 200만, 50만, 7만, 4만의 standard dextran의 3.0%용액) 용액을 각각 흡착시키고, 12 ml/hr의 유속으로 4.0 ml씩 분획하였다. 다음, 각 fraction의 총당 함량을 glucose를 표준 물질로 하여 정량하고, 용출부피(Ve)와 void volume(Vo) 및 gel bead volume(Vx)을 구한 후, 다음의 식을 이용하여 분배계수(Kav)를 계산하였다. 분배계수와 분자량의 대수값을 도시하여 얻은 표준곡선으로부터 응집제의 분자량을 산출하였다.

$$Kav=(Ve-Vo)/Vx$$

$$Vx=Vt-Vo$$

where, Kav; partition coefficient, Vx; gel bead volume
Ve; elution volume, Vt; total volume, Vo; void volume

생산응집제의 원소분석

생산 응집제의 원소 분석은 표준물질로 EDTA (C:49.99%, H:5.52%, N:9.56%)를 사용하여 combustion method[17]에 따라 1050°C에서 Elemental analyser(EA 1110, CE Instrument, Italy)로 분석하였다.

Infra-Red(IR) spectroscopy

생산응집제의 당 결합양식 및 화합물의 구조성분을 추정하기 위하여 KBr pellet 법에 따라 IR spectrophotometer(FTIR, FTS-20/80, Biorad, Digilab. Division, U.S.A)를 사용하여 적외선 흡수 스펙트럼을 조사하였다.

Nuclear Magenetic Resornance(NMR) 분석

NMR에 의한 구성당의 분석은 Chaplin[15] 등의 방법에 따라 정제 응집제의 산가수분해 시료를 D₂O에 녹여 FT 300MHz NMR(DPX 300, Bruker, Germany)로 분석하였다. 이때 내부 표준 물질은 tetramethyl silane(TMS)을 사용하였다.

결과 및 고찰

Pronase 및 Periodate oxidation 특성

생산 응집제의 본체를 파악하기 위해 동결건조한 조정제 시료를 periodate를 이용하여 당부위를 선택적으로 분해하고, pronase 처리로 시료 중의 단백질 부위를 분해하여 잔존 응집활성을 조사한 결과 Fig. 2와 같이, pronase 처리 시료는 응집활성에 변화가 관찰되지 않았고, periodate산화물의 경우는 응집활성이 24.5% 였다. 따라서 분리균이 생산하는 미생물 응집제의 응집능은 단백질보다는 다당류 또는 그 유도체에 의한 것으로 추측된다[7].

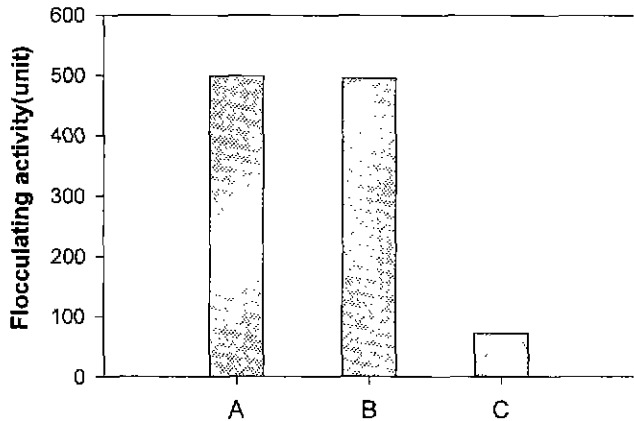


Fig. 2. Flocculating activity of pronase digested and periodate oxidized flocculant.
A: Native, B: Pronase digested, C: Periodate oxidized

정색반응

미생물 응집제의 정색반응 실험 결과는 Table 1와 같이 anthrone, Molish 반응에서 응집본체와 가수분해시료 모두 양성반응을 나타내었다. 환원당을 검출하는 benedict 반응에서는 정제 응집제는 음성을, 가수분해 시료는 양성 반응을 나타내어 환원당을 구성단위로 하는 다당류로 생각된다. 또한, ketose의 검출반응인 Seiliwanoff 시험과 hexose 특유 반응인 phenol-sulfuric acid 시험에 모두 양성을 나타내어, 본 응집제는 구성당으로 6탄당 및 ketose를 포함하고 있는 것으로 추측된다. Uronic acid 함유 여부를 조사한 carbazole 반응 결과는 가수분해 시료와 정제 응집제, 모두에서 음성으로 나타나 uronic acid가 함유되어 있지 않는 것으로 생각된다. 한편, 가수분해물과 정제 응집제 모두 당의 정색반응에서는 양성을 나타냈지만, burette과 Elson-Morgan 반응에서는 음성을 나타내어 단백질 및 아미노당을 포함하지 않는 다당성 응집제인 것으로 추측된다.

구성당 정량 및 분석

생산 응집제의 구성당의 종류를 검토하기 위한 TLC 및

Table 1. Color reactions of the purified and hydrolysate biofloculant

Analyzed items	Method	Polymer	Hydrolysate
Sugar	Anthrone	+	+
	Molish	+	+
Protein	Burette	-	-
Reducing sugar	Benedict	-	+
Aminosugar	Elson-Morgan	-	-
(Hexosamine)	Ninhydrin	-	-
Hexose	Phenol-sulfuric acid	+	+
Ketose	Seliwanoff	+	+
Uronic acid	Carbazole	-	-

HPLC 분석 결과는 Fig. 3, 4와 같다. TLC에서 spot의 발색을 위해 사용된 시약은 aldose는 회색으로, ketose는 주황색으로 발색되어 구성당 중의 성분내의 aldose와 ketose를 구별할 수 있는 것이었는데, 가수분해 시료의 spot가 주황색과 회색으로 발색되어 aldose와 ketose가 모두 포함되어 있는 것으로 추측되었다. 한편 산기수분해 응집물질을 HPLC로 분석한 결과, 응집물질을 구성하는 환원당은 주로 fructose와 glucose로 1:2.4의 몰비로 검출되었다. 한편 서[19] 등은 *Lactobacillus jensemi* YW-33가 생산하는 다당성 응집제 성분을 분석한 결과 fructose:galactose:mannose로 구성되어 있으며, Dermim[20] 등은 *Klebsiella* sp.가 생산하는 산성 다당성 응집제는 galactose:glucose:mannose로 5:2:1의 몰 비였다고 보고한 바 있다.

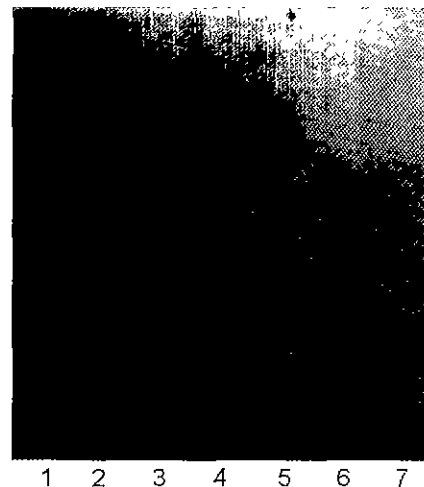


Fig. 3. Thin layer chromatogram of the hydrolysate of purified biofloculant.

1: Mannose, 2,5: hydrolysates of purified biofloculant, 3: Fructose, 4: Glucose, 6: Xylose, 7: Galactose

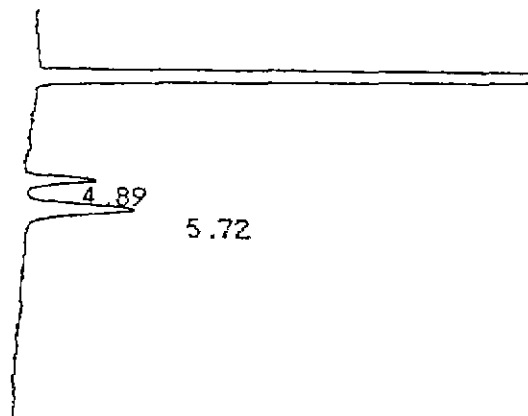


Fig. 4. HPLC chromatogram of the hydrolysate of purified biofloculant.

4.89: Fructose, 5.72: Glucose

분자량 측정

정제 응집제의 분자량을 측정하기 위해, 표준당과 정제 응집제를 Sepharose CL-4B 컬럼(2.5×81 cm)를 이용하여 gel filtration chromatography를 실시한 결과는 Fig. 5과 같이 분자량이 다양한 당들이 혼재 되어 있었으나, 응집활성 측정 결과는 fraction No.30-50까지 응집활성이 높게 나타나 이 범위의 fraction을 모아 증류수로 투석하여 탈염 후, 진공농축하였다. 진공농축한 시료를 2차 gel filtration chromatography를 실시한 결과 Fig. 6과 같이 fraction 30-50에서 단일 peak를 나타내었다. 표준당의 elution volume(Ve)로부터 분배계수(Kav)를 계산하고 분배계수와 분자량의 대수값을 도시하여 얻은 표준곡선으로부터 응집제의 분자량을 산출한 결과는 Fig. 7과 같이 약 9×10^5 dalton으로 추정되었다. 한편 Yi[9] 등의 *Aspergillus* sp. LAM 94-142가 생산하는 응집제의 분자량은 약 90만, Takagi[10] 등의 *Paecilomyces* sp. 가 생산하는 응집제의 분자량이 30만, Toeda[11] 등의 *Alcaligenes cupidus* KT201

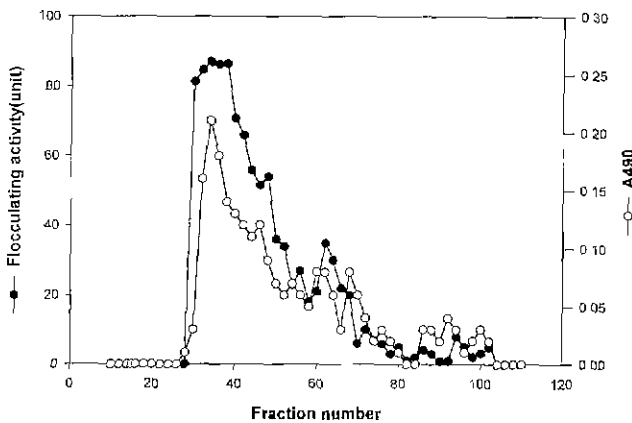


Fig. 5. First Sepharose CL-4B gel filtration chromatogram of purification bioflocculant.

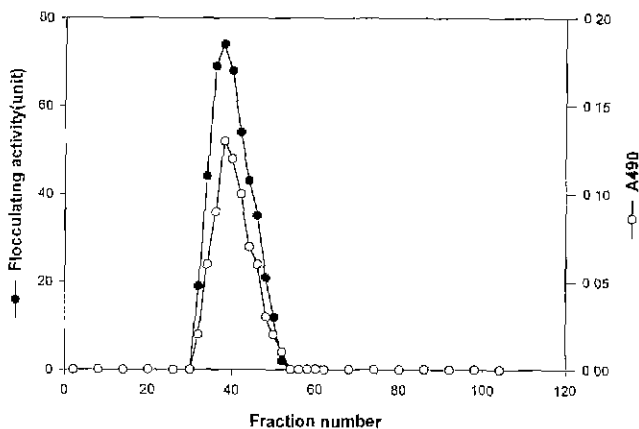


Fig. 6. Second Sepharose CL-4B gel filtration chromatogram of purification bioflocculant.

균주가 생산하는 미생물 응집제는 200만, Dermlim [20] 등의 *Klebsiella* sp.가 생산하는 산성 다당성 응집제는 200만 dalton 이상의 분자량이라고 보고한 바 있다.

생산응집제의 원소분석

생산 응집제의 원소 분석을 실시한 결과, Table 2과 같이 *Achromobacter* sp. YJ-66가 생산하는 응집제는 carbon 37.72%, hydrogen 5.37%, oxygen 56.89%로 조사되었다.

이와 같은 결과는 Table 2에서의 정색반응 실험 결과에서 나타난 것과 같이, 단백질 및 아미노당을 포함하지 않는 환원당을 구성 단위로 하는 다당류임을 확인한 결과인 것으로 생각된다.

Infra-red(IR) spectroscopy

생산응집제의 당 결합양식 및 화합물의 구조성분을 추정하기 위하여, 적외선 흡수 스펙트럼을 조사한 결과 Fig. 8과 같이, 정제된 응집제는 $3,400\text{ cm}^{-1}$ 부근에서 다당류의 전형적인 O-H stretching 흡수 peak를 나타내었고, $2,900\text{ cm}^{-1}$ 에서는 C-H stretching 흡수 peak를 나타냈다. 또한 $1,720\text{ cm}^{-1}$ 의 peak는 aldehyde 또는 ketone 기를 포함하는 화합물 중의 carboxy ester의 흡수에 기인한 것으로 나타났다. 한편 $1,100\text{ cm}^{-1}$ 의 peak는 C-H bending 에 의한 것으로 추정된다.

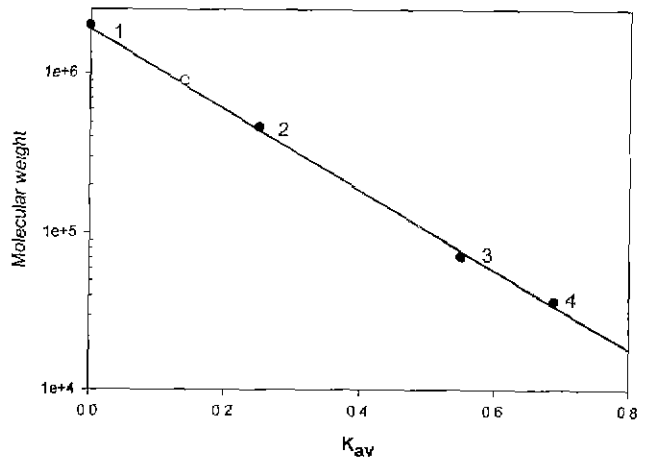


Fig. 7. Estimation curve of molecular weight of purified bioflocculant by Sepharose CL-4B gel filtration chromatography. The column of Sepharose CL-4B was eluted with 0.5 M NaCl solution at flow rate 12ml/hr. 1: standard dextran 2,000,000 dalton molecular weight, 2: 500,000, 3: 70,000, 4: 40,000

Table 2. Elemental analysis of purified bioflocculant

Component	Ratio(%)
Carbon	37.72
Hydrogen	5.37
Oxygen	56.89
Nitrogen	-

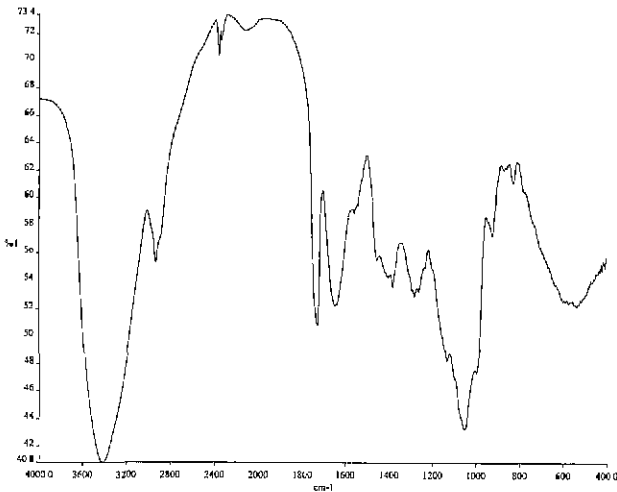


Fig. 8. IR absorption spectrum of purified bioflocculant.

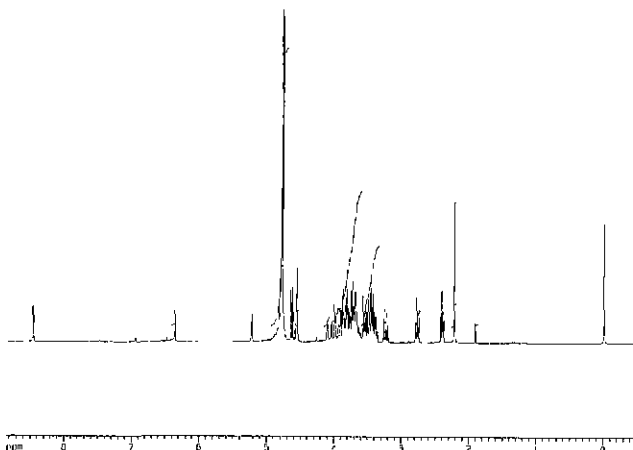


Fig. 9. ¹H-NMR spectrum of purified bioflocculant. Chemical shift(δ, ppm) were expressed relative to that of an internal standard, tetramethyl silane(TMS)

Nuclear Magnetic Resonance(NMR) 분석

정제 응집제의 구성당을 검토하기 위한 NMR 분석 결과는 Fig. 9, 10과 같다. ¹H-NMR spectrum에서 4.8 ppm 부근의 흡수는 HOD에 의한 것으로, 1.9 ppm의 흡수는 케톤기에 인접해 있는 탄소에 결합된 proton의 흡수에 의한 peak로 추측된다. 또한 2-4 ppm부근의 중복된 peak 들은 고리를 이루고 있는 탄소에 결합되어 있는 proton에 의한 흡수 peak로 추측된다. 한편, ¹³C-NMR spectrum의 결과를 carbohydrate library[21]과 비교한 결과 glucose의 고리 구조를 이루는 탄소에 의한 peak와 fructose를 구성하는 탄소에 의한 peak를 60-100 ppm 부근에서 확인할 수 있었다.

요 약

Achromobacter sp. YJ-66가 생산한 미생물 응집제의 정

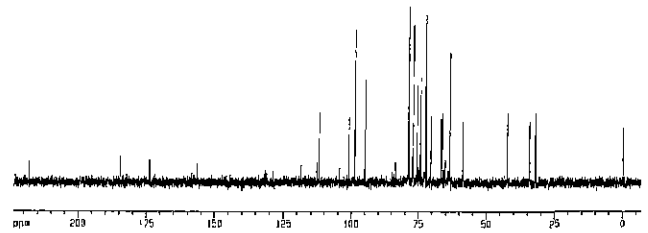


Fig. 10. ¹³C-NMR spectrum of purified bioflocculant. Chemical shift(δ, ppm) were expressed relative to that of an internal standard, tetramethyl silane(TMS)

색반응 실험 결과, 단백질과 아미노당을 포함하지 않는, 환원당을 구성단위로 다당성 응집제로 조사되었다. 생산 응집제의 구성당의 종류를 검토하기 위한 TLC 및 HPLC 분석 결과, fructose와 glucose로 1:2.4의 몰비로 검출되었다. 한편 분자량 측정 결과, 약 9×10⁵ dalton으로 추정되었으며, 원소분석 결과 carbon 37.72%, hydrogen 5.37%, oxygen 56.89%로 조사되었다. Infra-red(IR) spectroscopy 결과, 3,400 cm⁻¹ 부근에서 다당류의 전형적인 O-H stretching 흡수 peak를 나타내었고, 2,900 cm⁻¹에서는 C-H stretching 흡수 peak를 나타냈다. 한편 정제 응집제의 구성당을 검토하기 위한 NMR 분석 결과, glucose의 고리구조를 이루는 탄소에 의한 peak와 fructose를 구성하는 탄소에 의한 peak를 60-100 ppm 부근에서 확인할 수 있었다.

이상의 결과를 종합할 때 *Achromobacter* sp. YJ-66가 생산하는 생물 응집제는 지금까지 보고된 미생물 응집제와는 다른 새로운 응집제인 것으로 생각된다.

REFERENCES

- Hullinger, C. H. and N. H. Yui. 1957. U.S. Pat. 2., *National Starch Products*, Inc, Nov. 12.: 140-144.
- Goldstein, A. M. and E.N. Alter. 1959. Guar Gum in Whistler, pp 45-48. In R. L. and J. N. BeMiller (eds.), *Industrial Gums*, Academic Press. Inc. New York
- Guiseley, K. B. 1968. Seaweed colloid, pp.763-766, In A. Standen, *Encyclopedia of Chemical Technology*, 2nd., Wiley-Interscience, New York.
- Castellanos-Peres, N., V. Maldonado., G. Fernandez-Villagomez, and S. Caffarel- Mendez. 1988. An evaluation of the coagulating ability of chitosans from different *Crustacea* species and *fungi*, pp. 567-571, In *Proceedings of the 4th international conference on chitin and chitosan*.
- Margaritis, A. and G. W. Pace. 1985. *Microbial polysaccharide*, pp. 1005-1009, In *Comprehensive Biotechnology*, 3th, Pergamon Press, New York.
- Akinori, K. 1971. Floc-forming Bacter isolation from activated sludge, *J. Gen. Appl. Microbiol.*, 17: 439-446.
- Yoshitaka ,T. 1977. Exocellular mucopolysaccharide closely

- related to bacterial floc formation, *Appl Environ. Microbiol.*, **34**(3): 308–311.
8. Seo, H. C., Y. M. Choi, H. Y. Cho, and H. C. Yang. 1997. Polysaccharide bioflocculant produced by *Lactobacillus jensenii* YW-33 its production condition, *Kor. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **25**(3): 328–334.
 9. Yi, D. H. and D. S. Ham. 1995. Characterization of a cell aggregation factor from *Aspergillus* sp. LAM94-142, *Kor. J. Appl. Microbiol. Bacteriol.*, **23**(5): 506–512.
 10. Takagi, H. and K. Kadowaki. 1985. Purification and chemical properties of a flocculant produced by *Paecilomyces* sp., *Agri. Biol. Chem.*, **49**(11): 3159–3164.
 11. Toeda, K. and Kurane R. 1991. Microbial flocculant from *Alcaligenes cupidus* KT201, *Agri. Biol. Chem.*, **55**(11): 2793–2799.
 12. Woo, J. S., J. Y. Jeong, D. H. Do, and M. J. Chung. 1999. Characteristics of bioflocculant produced by *Achromobacter* sp. JY-66, *Kor. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **27**(6): 433–439.
 13. Chaplin, M. F. and J. F. Kennedy. 1987. *Carbohydrate analysis*, pp. 71–75, IRL Press, Washington DC.
 14. Chaplin, M. F. and J. F. Kennedy. 1987. *Carbohydrate analysis*, pp. 1–6, IRL Press, Washington DC.
 15. Chaplin, M. F. and J. F. Kennedy. 1987. *Carbohydrate analysis*, pp. 71–75, IRL Press, Washington DC.
 16. Cooper, T.G. 1991. *The tools of biochemistry*, pp. 171–172, John Wiley and Sons, New York.
 17. Biesak, R. C. 1993. Comparison of Kjeldahl method for determination of crude protein in cereal grains and oilseed with Generic combustion method, *J. of AOAC International*, **76**(4): 780–786
 18. Seo, H. C., Y. M. Choi, H. Y. Cho, and H. C. Yang. 1996. Purification and characteristic of bioflocculant produced by *Lactobacillus jensenii* YW-33, pp. 74, *The Korean Society of Agricultural Chemistry and Biotechnology*, 96 Spring Conference.
 19. Seo, H. C., Y. M. Choi, H. Y. Cho, and H. C. Yang. 1996. Purification and characteristic of bioflocculant produced by *Lactobacillus jensenii* YW-33, pp. 74, *The Korean Society of Agricultural Chemistry and Biotechnology*, 96 Spring Conference.
 20. Demmlim, W., P. Prasertsan, and H. Doelle. 1999. Screening and characterization of bioflocculant produced by isolated *Klebsiella* sp., *Applied Microbiol. and Biotechnol.*, **52**(5): 698–703.
 21. Bock, K. and C. Pendersen. 1983. Carbon-13 nuclear magnetic resonance spectroscopy of monosaccharides, *Adv. Carbohydr. Chem. Biochem.*, **41**: 27–66.

(Received April 14, 2000)