

Corynebacterium sp. K-199가 생산하는 단백질성 생물응집제

김영준 · 최양문¹ · 조홍연* · 양한철
고려대학교 생명공학원, ¹고려대학교 생물공학연구소

A Proteinous Bioflocculant Produced by *Corynebacterium* sp. K-199. Young-Jun Kim, Yang-Mun Choi¹, Hong-Yon Cho and Han-Chul Yang*. Division of Food Processing and Bioprocessing Engineering, Graduate School of Biotechnology, Korea University, Seoul 136-701, ¹Institute of Biotechnology, Korea University, Seoul 136-701, Korea - About 600 microorganisms isolated from soil, marsh, compost, etc. were examined for their flocculating ability in the kaolin suspension and swine wastewater. Among them, K-199 was the best producer of flocculant and was identified to be a species belong to the genus *Corynebacterium*. The maximum production of the flocculant from *Corynebacterium* sp. K-199 was observed in culture medium containing 2% glycerol, 0.4% peptone, 0.3% K₂HPO₄, 0.1% CaCO₃, 0.05% NaCl, 0.1% yeast extract, 0.1% MgSO₄·7H₂O and initial pH 7.5 when cultured with rotary shaker controlled at 25°C and 150 rpm. Under the optimal culture condition with jar fermentor, the maximum production was reached to flocculating activity of 780 units/ml after 4 days. From the results of the activity be fully maintained by periodate oxidization, it suggests that the activity is due to the protein.

축산폐기물과 농·수산 가공과정에서 발생하는 폐수는 유기물 함량이 높아 농지 환원시 바람직한 비료원이 될 수 있으나(1), 선결되어야 할 문제는 악취가 완화되고 작물과 토양에 유효한 형태로 전환되어야 하는 점이다. 고농도 유기폐수의 전처리와 슬러지의 응집처리를 위해 현재 사용되고 있는 무기응집제와 합성 고분자응집제들은 처리 후 토양에서 생분해가 되지 않아 2차 오염을 유발하는 점과 돌연변이 유발성 등 인체 독성을 나타냄으로써 고농도 유기폐수의 유기질 비료화에 장애가 되고 있다(2,3).

자연계에서 쉽게 분해되는 천연물 유래의 응집활성 물질에 대한 연구와 함께 최근 미생물로부터 응집제 개발을 위한 노력이 계속되고 있으며 다수의 응집제 생산 균주가 보고되어 있다(4-8). 미생물이 생산하는 생물응집제는 다당류를 비롯하여 단백질, peptide, lipid, DNA 등으로 응집처리와 동시에 양축, 양어용 사료 및 작물의 비료로 자원화할 수 있을 뿐만 아니라 응집물질에 따라서는 사료성과 비료성외에도 치어의 생존율 향상, 생산물의 품질개선, 토양개선 등 부가적 기능성을 나타내기도 한다. 최근에는 미생물 응집제 생산을 위한 합성배지의 대체물질로서 인의 함량이 높은 폐수의 이용에 대한 보고(9)와 저렴한 질소원과 탄소원으로 urea (10,11)와 alcohol류(12)를 자원화하는 응집제 생산균주들이 보고되고 있어 공업적 수준의 실용화 가능성에 관한 연구가 수행되고 있다.

본 연구에서는 고농도 유기폐수처리시 부생하는 슬러지의 자원화를 목적으로 kaolin과 돈분폐수에 대하여 높은 응집활성을 갖는 단백질성 응집물질을 생산하는 균주를 분리, 동정 하고 일부 배양특성을 검토하였다.

재료 및 방법

균주의 분리 및 선별

Glycerol-asparagine agar plate를 사용하여 25°C에서 자연계로부터 분리한 600 여종과 보관균주 100 여종을 기본배지 5 ml에서 시험관 배양한 후, 원심분리(8,000 ×g, 20분)에 의해 얻은 상등액의 응집활성이 100 units/ml 이상을 보인 19 균주를 1차로 선별하였다. 최종균주는 500 ml baffle flask에 기본배지 100 ml를 넣고 25°C, 150 rpm에서 회전진탕배양한 후 kaolin 용액과 돈분폐수에 대하여 배양상등액의 응집활성이 가장 우수한 균주를 선별하였다. 돈분폐수는 J 농장의 폐수로 성상은 전보(13)에서 보고한 바와 같다.

선별균주의 동정

균주의 형태학적 관찰은 정지기의 세포를 주사전자현미경(JEM 100CX-II)을 사용하여 상법에 따라 관찰하였고 세포벽의 구성성분은 Lechevalier 방법(14)에 따라 분석하였으며 생리적 특성은 "Bergey's manual of determinative bacteriology"(15)에 준하여 조사하였다.

*Corresponding author.

Key words: *Corynebacterium* sp. bioflocculant, wastewater

배양조건

배양조건의 검토를 위한 flask 배양은 2.0% glucose, 0.2% peptone, 0.05% yeast extract, 0.1% CaCO₃, 0.1% KH₂PO₄, pH 7.0으로 구성된 기본배지를 사용하였으며 500 ml baffle flask에 100 ml의 배지를 넣고 25°C, 150 rpm에서 4일간 회전진탕배양하였다.

Flocculating activity 측정

0.5% Kaolin 용액 10 ml에 0.1% CaCl₂ 0.1 ml를 첨가하고 배양상등액 0.1 ml를 가하여 30분 동안 정치한 후 상등액 1 ml를 취해 550 nm에서 흡광도를 측정, Nakamura 등(16)의 방법에 따라 환산하였다. Kaolin 용액에 대한 응집활성 측정시 배양여액 첨가량을 표준화하기 위해 표준물질인 0.5% kaolin 용액에 시료를 각 농도별로 첨가하여 standard curve를 작성하고 직선적으로 증가하는 영역에서 응집활성을 측정하였다.

$$\text{Flocculating activity (units/ml)} = \frac{(A-B)}{A} \times 100 \times \text{Dilution rate}$$

A: Optical density at 550 nm of reference sample

B: Optical density at 550 nm of reaction mixture

대상폐수에서의 응집활성 측정

돈분폐수 10 ml에 0.1%의 CaCl₂ 100 μl를 가하고 배양상등액을 동량 첨가하여 vortex한 후 실온에서 12시간 동안 정치한 다음 Nephelometer(Turner TD 40)를 사용하여 상등액의 NTU(Nephelometer turbidity unit) 값을 측정, 다음 식에 따라 NTU 제거효율(%)을 계산하였다.

$$\text{NTU removal efficiency (\%)} = \frac{(A-B)}{(A)} \times 100$$

A: NTU of reference sample

B: NTU of reaction mixture

Periodate 산화

배양상등액을 동결건조한 시료(30 mg)를 50 mM acetate buffer(pH 4.5) 50 ml에 용해시킨 후 Yamada 등(17)의 방법에 준하여 50 mM NaIO₄를 가한 혼합물을 4°C 암소에서 3일간 교반, 방치하였다. 이 반응액에 ethylene glycol 5 ml를 첨가, 잔여 periodate를 제거하고 투석하여 비투석 획분의 농축액에 NaBH₄ 20 mg을 가하여 실온에서 12시간 교반, 환원시킨 후 중화, 투석하고 비투석 획분을 동결건조하여 periodate 산화물을 조제하였다.

Pronase 처리

배양상등액을 동결건조한 시료(30 mg)를 10 mM CaCl₂가 함유된 50 mM Tris-HCl buffer(pH 7.8, 50 ml)에 용해시킨 후 Akinori(18)의 방법에 따라 pronase

(Sigma Co.) 3 mg를 가하여 37°C에서 48시간 동안 반응시키고 5분간 가열 처리한 액을 원심분리(3000×g, 10 min)한 후 투석, 동결건조하였다.

결과 및 고찰

균주선별 및 동정

방선균이 생산하는 돈분폐수처리용 생물응집제를 개발할 목적으로 대표적 분리배지인 glycerol-asparagine agar plate를 사용하여 자연계로부터 600 여종을 순수 분리한 후 보관균주 100 여종과 함께 기본배지에서 1차 시험배양과 2차 flask 배양을 실시하여 응집활성이 가장 우수한 균주 K-199를 선별하였다. K-199의 응집활성은 세포내보다 세포외인 배양상등액에서 90% 이상이 관찰되었으며 Table 1에서와 같이 kaolin 용액과 돈분폐수에 대하여 각각 550 units/ml의 응집활성과 52%의 NTU 제거효율을 나타내었다. 분자량 10,000의 배제능을 갖는 투석막으로 투석한 후에도 K-199의 배양상등액은 86%의 활성을 나타냄으로써 고분자 물질에 의한 응집활성임을 알 수 있었다. 전자현미경을 통해 균체의 형태적 특성을 관찰한 결과(Fig. 1) norcadiform의 방선균이 가지는 특징과 유사하였으나 mycelium을 형성하지 않는 점에서 Norcadia 속과 구분되며 형태는 구형, 직선형 또는 coryneform 간균 등이 관찰되었다. K-199 세포벽 중의 2,6-diaminopimelic acid (DAP)의 분석에서 R_f값 0.18인 meso-form의 DAP, gas liquid chromatography(GLC)에 의한 당분석 결과 galactose와 arabinose가 검출되었으며 K-199의 일부 생리적 성질을 조사한 결과 Table 2에서와 같이 "Bergey's manual of determinative bacteriology"에 보고된 *Corynebacterium*속의 특성과 일치하였다.

탄소원의 영향

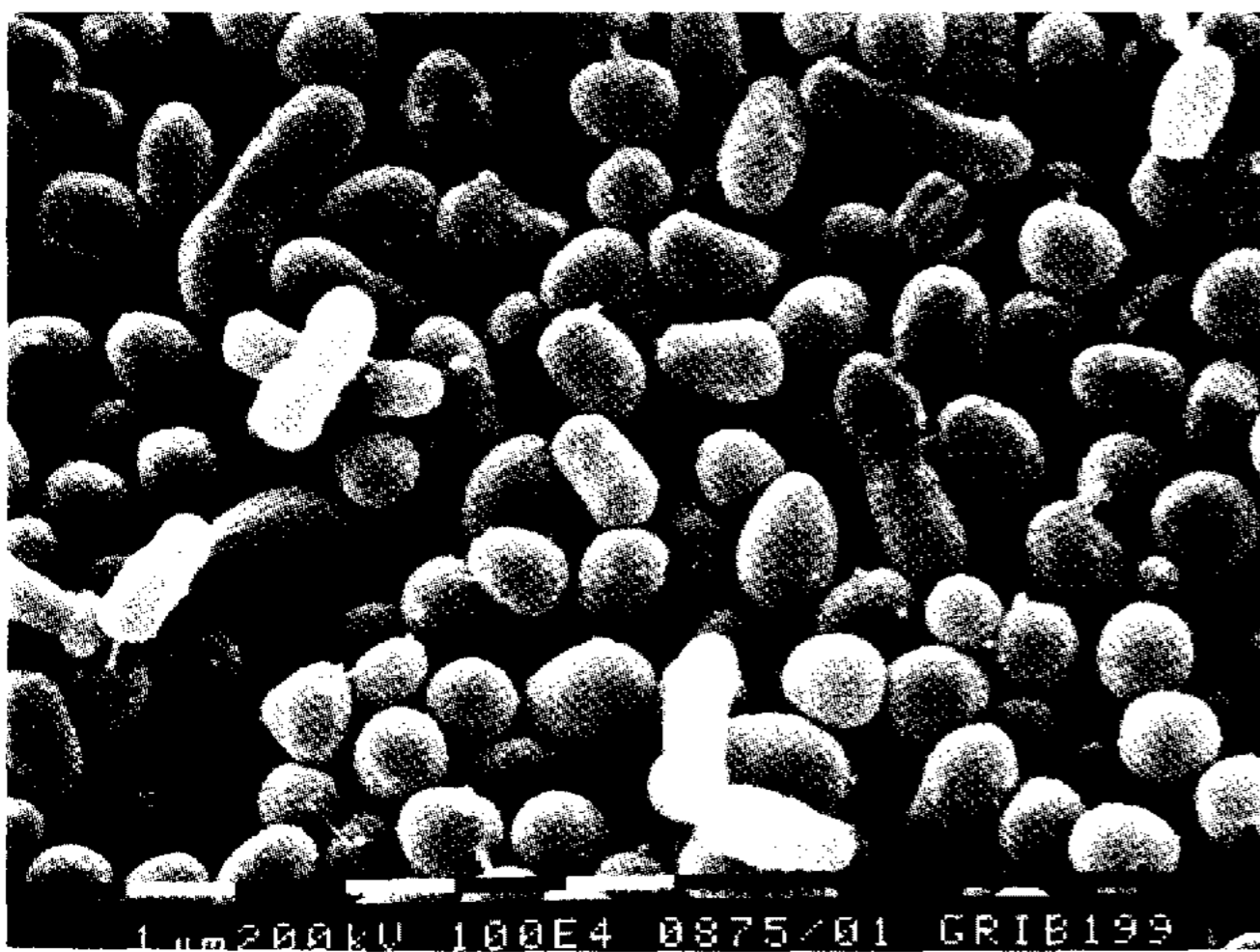
기본배지에 탄소원을 2.0%씩 첨가, kaolin에 대한 응집활성과 돈분폐수의 NTU 제거효율에 미치는 영향을 검토하였다(Fig. 2). Kaolin에 대한 응집활성은 glycerol, sorbitol, maltose의 순으로, 돈분폐수에 대한 NTU 제거효율은 glycerol, fructose, mannose의 순으로 높았다. 가장 우수한 응집활성(580 units/ml)과 NTU 제거효율(58%)을 보인 glycerol은 다른 탄소원에 비해 단가가 저렴하여 본 응집제의 공업적 생산시 경제성을 가질 수 있을 것으로 사료되었다. 응집제 생산 방선균의 단일 탄소원으로서 glycerol 등 당알코올류의 이용은 Kurane 등(12)에 의해 방선균이 생산하는 응집제에 대하여 보고된 바 있다.

질소원의 영향

Fig. 3은 2.0% glycerol을 탄소원으로 첨가한 기본배지에 각 질소원을 0.2%씩 첨가배양하여 응집활성의

Table 1. Flocculating activity and NTU removal efficiency of cell culture fluid by isolated and type culture strains.

Strain	Kaolin solution		Swine wastewater	
	Flocculating activity (units/ml)	NTU	NTU	NTU removal efficiency (%)
Control	0	310		0
K 126	218	206		34.0
K 151	300	240		22.2
K 199	550	149		52.1
K1059	606	253		18.0
K1066	631	204		35.1
K9001	387	298		4.3
K9101	213	280		9.0
K9134	143	215		30.5
K9137	431	236		23.9
K9141	580	221		28.7
<i>Corynebacterium</i> sp.	450	190		38.7
<i>Corynebacterium glutamicum</i>	475	250		19.4
<i>Norcadia amare</i>	550	221		28.7
<i>Norcadia autotropica</i>	242	190		38.7
<i>Norcadia carcaria</i>	294	206		33.9
<i>Norcadia restricta</i>	431	286		7.6
<i>Norcadia rhodrii</i>	394	225		27.4
<i>Rhodococcus erythropolis</i>	231	264		14.8
<i>Streptomyces equinus</i>	437	187		39.7

Fig. 1. Scanning electron microscopy of *Corynebacterium* sp. K-199 ($\times 19,000$).

증감에 미치는 영향을 검토하였다. 돈분폐수의 NTU 제거효율은 peptone, tryptone 등 유기 질소원에서 높게 나타났으나 kaolin에 대한 응집활성은 돈분폐수의 제거효율이 낮았던 무기 질소원인 ammonium chloride, ammonium phosphate 등에서도 균의 생육도는 낮았지만 높은 응집활성을 나타내었다. 상기에서 검토한 glycerol과 질소원 peptone에 대한 농도의 영향을 C/N ratio에 따라 5에서 40까지 조사하였으나 유의적인 경향은 보이지 않았으며 glycerol과 peptone의 각 농도별

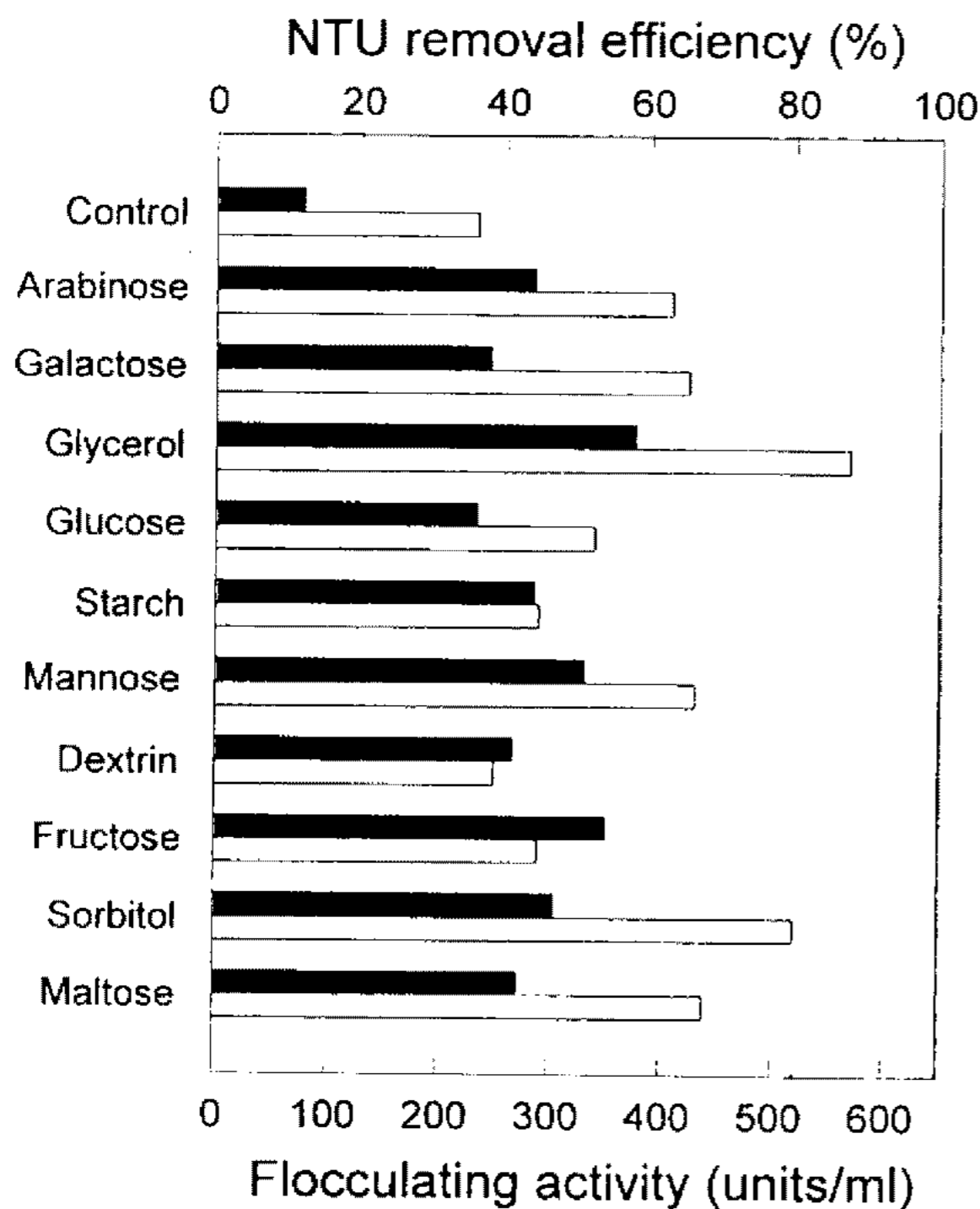
영향은 2%와 0.4% 첨가시 가장 높은 응집활성을 나타내었다. 한편 본 균주는 질소원을 제거할 경우 낮은 응집제 생산능을 보임으로써 poly- β -hydroxybutyrate (PHB)와 같은 비질소 유기저장물질의 세포내 또는 세포외 축적조건과 상치되는 결과를 나타내었고 이는 응집제의 주요성분이 다당류가 아닌 단백질일 가능성을 제시해 주었다. Glycerol 2%, peptone 0.4%로 대체한 기본배지에서 응집활성에 미치는 yeast extract의 농도 영향을 검토한 결과 비교적 높은 농도인 0.1% 첨가시 690 units/ml로 약 20%의 활성증가 현상을 나타내었다. Kurane 등(19)도 *Rhodococcus erythropolis* 배양시 무기 질소원과 더불어 0.05% yeast extract를 첨가함으로써 배양액중 응집제 생산능이 증가함을 보고한 바 있다.

무기염의 영향

Corynebacterium sp. K-199는 질소원 검토시 무기질 소원들에 의해 균체의 생육은 높지 않았으나 그 배양액이 kaolin에 대하여 높은 응집활성을 나타낸 바 있다. Table 3은 응집활성의 증감에 미치는 무기염류와 미량금속이온들의 영향을 검토한 것으로 Mg, Ca, Na, K 등의 첨가에 의해 응집활성이 증가한 반면 Mn, Fe, Cu, Zn 등의 중금속에 의해 감소하는 경향을 나타내었다. 특히 $MgSO_4$ 는 무첨가에 비해 약 73%의 높은 효과를 보임에 따라 활성증가를 나타낸 무기염류들을 중심으로 복합첨가에 의한 활성증가를 검토한 결과 NaCl, $CaCO_3$,

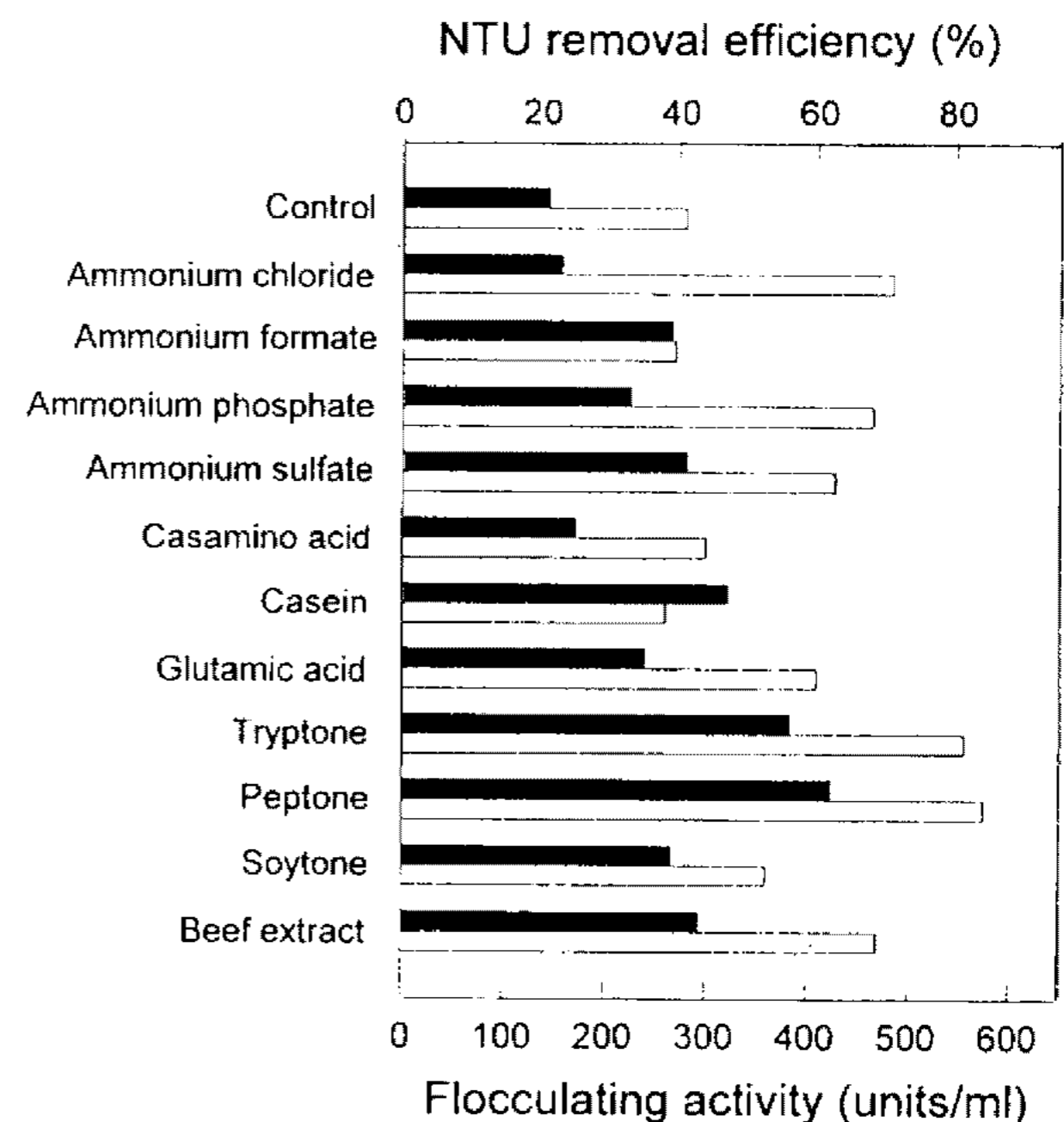
Table 2. Characteristics of *Corynebacterium* sp. K-199.

Characteristics	K-199	<i>Corynebacterium</i> sp.
Shape	cocci, rods (bar or club shaped)	cocci, rods (bar or club shaped)
Size	0.4~0.8×1~3 μm	0.3~0.8×1.0~8.0 μm
Flagella	—	—
Motility	—	—
Pigment	pink	—
Spore	—	—
Mycelium	—	—
Gram staining	+	+
Catalase test	+	+
Gelatin liquefaction	—	—
Nitrate→nitrite	+	+ or —
H ₂ S production	+	+
Indole formation	—	—
Starch hydrolysis	—	—
Cell wall isomer	meso-DAP	meso-DAP
Cell wall sugar component	arabinose, galactose	—

**Fig. 2. Effect of carbon source on flocculating activity and NTU removal efficiency of swine wastewater.**

Cultivation was carried out in 500 ml baffle flask with 100 ml basal medium containing each carbon source of 2.0% with rotary shaker controlled at 25°C and 150 rpm for 3 days. NTU removal efficiency (■) and flocculating activity (□) were measured by the methods described under "Material and Methods".

K₂HPO₄의 순으로 MgSO₄ 단독 첨가시 보다 증가된 응집활성을 보였으며 이들 무기염류들의 농도에 따른 효과는 K₂HPO₄와 CaCO₃, MgSO₄가 비교적 높은 농도인 0.3%와 0.1%, NaCl은 낮은 농도인 0.05%에서 최대

**Fig. 3. Effect of nitrogen source on flocculating activity and NTU removal efficiency of swine wastewater.**

Cultivation was carried out in 500 ml baffle flask with 100 ml basal medium containing 2.0% glycerol and each nitrogen source of 0.2% with rotary shaker controlled at 25°C and 150 rpm for 3 days. NTU removal efficiency (■) and flocculating activity (□) were measured by the methods described under "Material and Methods".

응집활성을 나타내었다.

환경인자들과 배양시간의 영향

상기에서 검토한 응집제 생산의 최적배지조건 이외 본 균주는 초기 pH 7.5, 배양온도 25°C에서 500 ml baf-

Table 3. Effect of salts on flocculating activity and NTU removal efficiency of swine wastewater.

Salt	Flocculating activity (units/ml)	NTU removal efficiency (%)
Control	395	33
CaCO ₃	427	46
NaCl	480	42
K ₂ HPO ₄	441	49
MgSO ₄	685	46
MnSO ₄	323	33
FeSO ₄	250	21
CuSO ₄	288	23
ZnSO ₄	385	27
MgSO ₄ ·7H ₂ O + MnSO ₄	563	39
MgSO ₄ ·7H ₂ O + NaCl	773	62
MgSO ₄ ·7H ₂ O + CaCO ₃	736	54
MgSO ₄ ·7H ₂ O + ZnSO ₄	499	41
MgSO ₄ ·7H ₂ O + K ₂ HPO ₄	720	58

Inorganic salts of 0.1% and metal salts of 0.005% were added to the medium containing 2.0% glycerol, 0.4% peptone and 0.1% yeast extract. Cultivation and measurement of activity were carried out by the same method as the above experiments.

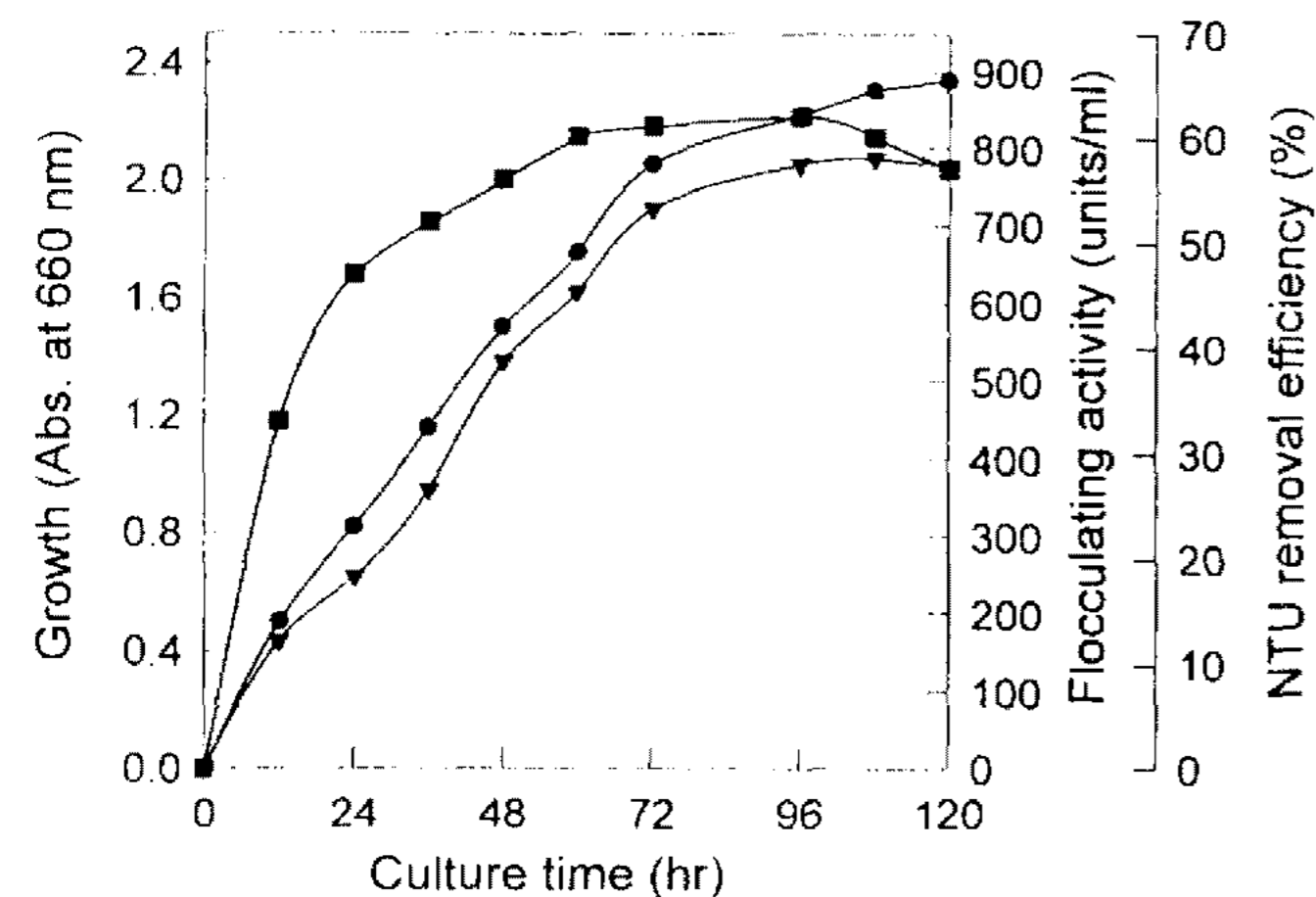


Fig. 4. Time course of *Corynebacterium* sp. K-199 cultured in jar fermentor.

Cultivation was carried out with a 5 l jar fermentor containing 2 l medium under the optimized culture condition. Cell growth (○), flocculating activity (▼) and NTU removal efficiency (■) were measured by the methods described under "Material and Methods".

flask에 100 ml의 배지를 넣고 150 rpm으로 회전진탕배양시 최대 활성을 나타내었다. Jar fermentor를 사용한 결과 Fig. 4에서와 같이 응집활성과 NTU 제거 효율 균의 생육과 함께 증가하여 배양 96시간 부근에서 각각 780 units/ml와 62%로 최대치를 보였으나 균의 생육은 660 nm에서 낮은 흡광도를 나타냄으로써 이

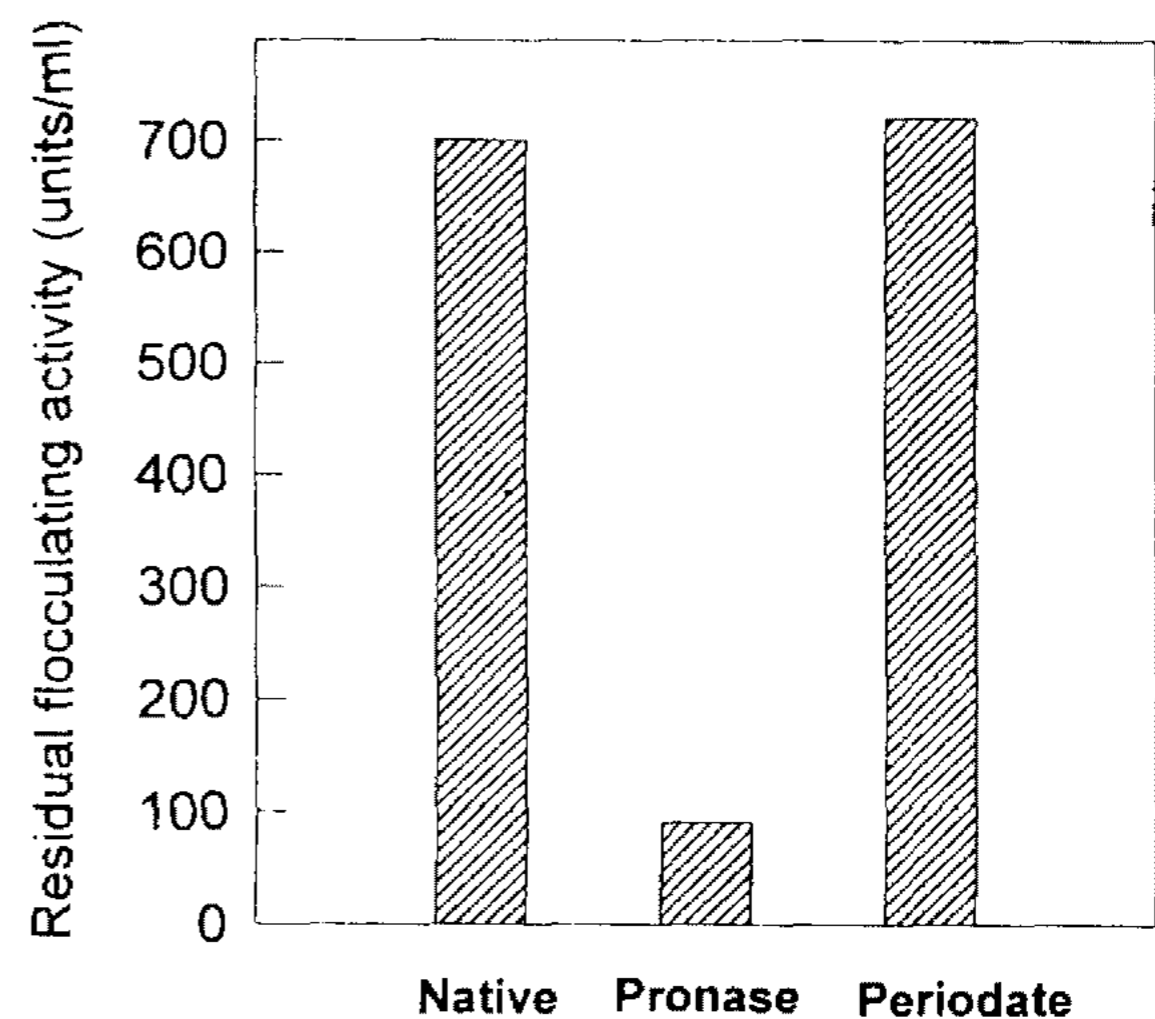


Fig. 5. Residual flocculating activities of materials digested by pronase and oxidized by periodate.

균주를 응집제 생산균주로 이용하기 위해서는 균의 생육을 3~4배 이상 증가시키는 배양조건의 확립이 선행되어야 할 것으로 사료되었다.

응집본체의 확인

현재까지 보고된 미생물 응집제의 구성성분은 주로 polysaccharide(17)로 밝혀져 있으나 일부 protein(20), peptide(21), lipid(22), DNA(23) 등에 대하여도 보고되고 있다. 앞서 기술한 바와 같이 본 균주가 질소원을 제한할 경우 낮은 응집활성을 보인 점과 배양상등액의 건조물중 당과 단백질이 각각 36%와 25%로 일반분석됨에 따라 응집활성의 본체를 확인하고자 하였다. *Corynebacterium* sp. K-199의 배양상등액을 농축, 투석, 동결건조한 후 pronase 처리구와 periodate 산화구를 대조구와 비교한 결과(Fig. 5) 각각 13%와 106%의 응집활성을 보임에 따라 본 균주가 생산하는 응집활성의 대부분이 단백질에 기인함을 알 수 있었다. 또한 이 응집성 단백질은 다당류와 공존 또는 결합시 응집활성이 일부 저하됨을 나타내었으며 본 균주는 단백질외 일부 응집성 다당도 생산함을 알 수 있었다. Himofuruya 등(24)은 단백질성 응집제의 균체들에 대한 응집기작이 균 세포벽의 mannan과 응집제 carboxyl group 간의 상호작용에 의함을 밝힌 바 있으며 가열처리에 의해서도 응집활성이 저해되지 않음으로써 단백질의 4차구조 또는 활성부위와 무관함을 보고한 바 있다.

요 약

미생물응집제를 개발하기 위하여 자연계로부터 방선균 600여 균주와 보관균주를 대상으로 응집활성이 우수한 균주를 선별하고 동정한 결과 *Corynebacterium* 속으로 동정되었다. 응집제 생산을 위한 최적조건은 2%

glycerol, 0.4% peptone, 0.1% yeast extract, 0.3% K₂HPO₄, 0.1% CaCO₃, 0.05% NaCl, 0.1% MgSO₄·7H₂O, pH 7.5의 배지 100 ml을 500 ml baffle flask에 넣고 96시간 회전진탕배양할 때였으며 상기의 조건으로 jar fermentor 배양시 96시간에서 780 units/ml의 응집 활성을 나타내었다. 응집물질은 pronase 처리와 periodate 산화에 의해 각각 무처리구의 13%와 106%의 활성을 나타냄으로써 응집활성은 주로 단백질에 기인함을 알 수 있었다.

감사의 글

본 연구는 농진청 농업특정연구개발사업의 연구비에 의해 수행된 연구의 일부로 연구비 지원에 감사드립니다.

참고문헌

1. 比嘉照夫. 1991. 微生物の農業利用と環境保全. 農文協.
2. Kawamura, S. 1991. Effectiveness of natural polyelectrolytes in water treatment. *J. Am. Water Works Association* **83**: 88-91.
3. Tago, Y. and K. Aida. 1977. Exocellular mucopolysaccharide closely related to bacterial floc formation. *Applied and Environmental Microbiology* **34**: 308-314.
4. Chanasit, V., C. Kienzzle-Sterzer and J.A. Torris. 1988. Formation and characterization of an insoluble polyelectrolyte complex: Chitosan-polyacrylic acid. *Polymer Bulletin*. **19**: 223-226.
5. Tsuji, Y. 1994. 凝集分離: 高分子凝集劑と凝集反應(2). *PPM*. **25**: 72-75.
6. Kage, H., Y. Matsuno and K. Higashitani. 1988. Flocculation of kaolin suspension with cationic polymer. *Can. J. Chemical Eng.* **66**: 728-732.
7. Kerry, L.D. and O. Charles. 1988. Acrylamide: Its metabolism, developmental and reproductive effects, genotoxicity, and carcinogenicity. *Mutation Research*. **195**: 45-50.
8. 전병준. 1993. 실무자를 위한 용·폐수 처리기술, 환경관리 인연합회보. **85**: 40-45.
9. Jochen, B. and M. Nava. 1988. Cell adsorption control by culture conditions. *Appl. Microbiol Biotechnol.* **29**: 119-123.
10. Pörschmamm, S., R. Patz and W. Zirkler. 1991. Production of microbial exopolymers for application as flocculants in wastewater treatment. *Acta Biotechnol.* **11**: 583-589.
11. Robert, H. H. and M. Ralph. 1973. The Role of polymers in microbial aggregation. *Annal Review of Microbiology*. **27**: 27-32.
12. Kurane, R. 1994. Production of a bioflocculant by *Rhodococcus erythropolis* S-1 grown on alcohol. *Biosci. Biotech. Biochem.* **58**: 428-430.
13. 김한수, 오준현, 김혁일, 조홍연, 양한철. 1994. 광합성세균 *Rhodospseudomonas palustris* KK14를 이용한 소규모 축산 폐수처리 공정. *한국농화학회지*, **37**: 303-309.
14. Lechevalier, M.P. 1968. Identification of aerobic actinomycetes of clinical importance. *J. of Laboratory and clinical Medicine*. **71**: 934-944.
15. Locci, R. 1989. Bergey's Manual of Determinative Bacteriology (Williams, S.T. ed.). Williams Wilkins. London. Vol. 4.
16. Nakamura, J., S. Miashiro and Y. Hirose. 1976. Screening, isolating and some properties of microbial cell flocculants. *Agr. Biol. Chem.* **40**: 377-383.
17. Yamada, H., J.C. Cyong, Y. Kojima, Y. Kumazawa, and Y. Otsuka. 1984. Studies of polysaccharides from *Angelica acutiloba*. part I. Fractionation and biological properties of polysaccharides. *Planta Med.* **50**: 163-168.
18. Akinori, K. 1971. Floc-forming bacteria isolated from activated sludge. *J. Gen. Appl. Microbiol.* **17**: 439-451.
19. Kurane, R., K. Toeda Takeda and T. Suzuki. 1986. Cultural conditions for production of microbial flocculant by *Rhodococcus erythropolis*. *Agr. Biol. Chem.* **50**: 2309-2312.
20. Minoru, T. and R. Kurane. 1991. A protein bioflocculant produced by *Rhodococcus erythropolis*. *Agr. Biol. Chem.* **55**: 2663-2664.
21. Junichi, K. and T. Minoru. 1991. Synergistic flocculation of the bioflocculant fix extracellularly produced by *Norcadia Amarae*. *J. Gen. Appl. Microbiol.* **37**: 447-453.
22. Ryuchiro, K., K. Hatamochi and T. Kakuno. 1994. Purification and characterization of lipid bioflocculant produced by *Rhodococcus erythropolis*. *Biosci. Biotech. Biochem.* **58**: 1977-1982.
23. Sakka, K. and T. Hajime. 1981. DNA as a flocculation factor in *Pseudomonas* sp. *Agric. Biol. Chem.* **45**: 2869-2876.
24. Himofuruya, S., K. Ayumu, S. Kohei and T. Tomoki. 1996. The Production of flocculating substance by *Streptomyces griseus*. *Biosci. Biotech. Biochem.* **60**: 498-500.

(Received 11 September 1996)