

Bacillus megaterium 이 생산하는 응집제에 관하여

김 교 창 · 정 준 영*

충북대학교 식품공학과, 농업과학기술원*

Study on the Bioflocculant by *Bacillus megaterium*

Kyo-Chang Kim and Jun-Young Jeong*

Dept. of Food Sci. & Tech., Chungbuk National Univ., Cheongju 360-763, Korea

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

Abstract

Microorganisms isolated from soil were tested for their flocculating activity in kaolin suspension. Identification of the best producing CH-23 strain showed that the strain belonged to the *Bacillus megaterium*. The maximum production of the flocculating from *Bacillus megaterium* CH-23 was observed in the culture medium containing 2% sucrose, 3% NaNO₃, 0.1% K₂HPO₄, 0.5% NaCl, 0.5% MgSO₄ · 7H₂O and 0.01% tryptone at initial pH 7.0 and 25~30°C. Flocculating activity was improved to 57% when the culture medium contained Mn²⁺ (0.01% MnSO₄). In the culture medium containing Mg²⁺ (0.01% MgSO₄ · 7H₂O) and Ca²⁺ (0.01% CaCO₃), flocculating activity were reached to 48% and 33%, respectively.

Key words : *Bacillus megaterium* CH-23, bioflocculant, optimum culture medium.

서 론

발효공업에서 발효액 중의 균체 제거에는 원심분리나 여과법이 주로 사용되고 있다. 유기·무기 고분자 응집제는 응집력이 우수하지만 환경독성이나 인체에 대한 유해성 때문에 폐수나 준설분야에 주로 사용되고 있다.

천연고분자 응집제인 키토산, 구아검 등은 인체에 무해하며 안정성이 높다. 발효공업과 식품공업에서 균체제거에 이용되고¹⁾ 있으나 가격이 비싸서 제한되어 있는 실정이다. 따라서 식품공업이나 발효공업의 균체제거에 이용될 수 있는 값싼 천연응집제가 필요하다. 1956년 Mckinney²⁾가 미생물이 생산하는 균체의 다당이 응집제로 이용될 수 있는 가능성을 관찰한 이래 녹조류³⁾, 토양세균⁴⁾, cyanobacteria⁵⁾ 등 다양한 미생물에서 응집제가 발견되었다. 이들이 생산하는 응집제는 다당류, 단백질, DNA, lipid flocculant 등 다양한 인체에 대한 안전성이 높고 식품공업이나 발효공업에서 균체 제거에 사용하면 경우 원심

분리나 여과과정을 단축시킬 수 있다. 그러나 아직 유기물질에 대한 미생물 응집제에 대한 연구는 국내에서는 많지 않다. 특히 식품이나 발효공업에 적용한 연구보고는 미미하다.

본 연구는 식품산업과 발효공업에 이용할 수 있는 값싸고 효율 좋은 응집제를 얻기 위하여 토양으로부터 균주를 분리·동정하고 응집제 생산을 위한 배양 조건을 조사한 결과이다.

재료 및 방법

1. 균 분리 및 선발

충북 청주시, 청원군, 충남 연기군 토양 150여점을 채취하여 멸균 생리식염수로 현탁한 후 분리배지⁶⁾ (IMA배지; (glucose 2g, NH₄NO₃ 0.2g, K₂HPO₄ 0.1g, NaCl 0.05g, MgSO₄ · 7H₂O 0.05g, yeast extract 0.01g, agar 15g per 1 liter distilled water, pH 7.0)에 도말하여 30°C에서 배양하면서 집락이 크고 점성이 큰 균주를 1차 선발하였다. 1차 선발

Corresponding author : Kyo-Chang Kim

균주는 다시 액체 IMA배지에 접종하여 30℃에서 24시간 동안 진탕 배양한 후 배양액 0.1ml, 0.5% kaolin(Shinyo Pure Chemicals Co., Japan)용액 10ml, 0.1% CaCl₂ 용액 0.1ml와 혼합하여 3분 동안 정치하고 상정액을 취해 흡광도에 의한 응집활성을 조사하여 응집활성이 강한 균주를 2차 선발하였다. 2차 선발균주는 Luria plate(LB배지: tryptone 10g, yeast extract 5g, NaCl 0.5g, agar 15g per 1 liter distilled water, pH 7.0)에서 순수 분리하였다.

2. 배양배지

응집제 생산을 위한 초기 최적온도, 초기 pH 및 탄소원 성분별 영향은 분리배지를 사용하여 조사하였다. 유기와 무기 질소원, 무기염류 및 기타 성분의 종류 및 농도에 따른 활성은 정⁷⁾ 등이 보고한 기초배지를 보완한 배지(BA배지; glucose 2g, MgSO₄ · 7H₂O 0.01g, NaCl 0.01g per 1 liter distilled water, pH 7.0)를 사용하여 조사하였다. 균의 배양은 24시간 동안 분리균을 전 배양한 배양액을 0.1% 접종한 후 30℃에서 50시간 동안 120rpm으로 교반배양하였다.

3. 동 정

분리균을 전자현미경으로 형태를 관찰한 다음 미생물분류동정장치(Sherlock System, MIDI, USA)로 동정하였다. 결과는 Bergey's Manual of Systematic Determinative Bacteriology⁸⁾와 비교, 검토하였다.

4. 전자현미경 관찰

균주는 Campbell⁹⁾ 등의 방법에 따라 주사형 전자현미경(Scanning Electron Microscope, Hitachi-570, Japan)으로 검경하였다.

5. 응집활성 측정

Kurane¹⁰⁾ 등의 방법을 수정하여 다음과 같이 측정하였다. IMA배지에서 24시간 동안 배양한 배양액 0.1ml, 0.1% CaCl₂ 용액 0.1, 0.5% kaolin 용액 10ml를 혼합하여 30초 동안 격렬히 교반하고 3분 동안 정치한 다음 상정액 2ml를 취해 분광광도계(Spectronic 20, USA)로 550nm에서 흡광도를 측정하였다. 응집활성은 다음과 같이 6계산하였다. 대조구는 증류수로 하였다.

$$\text{Unit of flocculating activity(F,U)} = 1/a - 1/b$$

a: Optical density of control at 550nm,

b: Optical density of sample at 550nm

6. 초기 배양온도와 pH

pH 7.0으로 조절한 IMA배지에 전 배양액을 0.1% 접종한 후 20℃에서부터 5℃의 간격으로 40℃까지의 온도에서 30시간 동안 교반 배양하면서 균생육과 응집활성을 측정하였다. 초기 배양 최적 pH는 pH 4에서 9까지 각각 pH를 달리한 분리배지에 전 배양액을 0.1% 접종한 후 30시간 동안 교반 배양하면서 균 생육과 응집활성을 측정하였다.

결과 및 고찰

1. 균 동정 및 응집활성 확인

시료 150여점을 채취하여 응집활성이 가장 강한 CH-23 균주를 분리·선발하고 미생물분류 동정장치(Sherlock System, MIDI)로 동정한 결과는 Table 1과 같고, 전자현미경에 의한 관찰 결과는 Fig. 1과 같이 그 크기는 9~1.2×1.5~3.0µm이었다. 이들 결과를 종합해 볼 때 이 균은 *Bacillus megaterium*으로 동정되었다. Fig. 2에서와 같이 시험균주 배양

Table 1. Identification of isolated strain by Sherlock system(MIDI, USA)

Solvent	Total	Named	%	Total	Nbr	ECL	Ref ECL
Ar	Ar	Ar	Named	Arnt	Ref	Deviation	shift
266493672	84004	80384	95.69	77353	9	0.001	0.002
		TSBA(Rev 3.90) <i>Bacillus</i>					0.944
		<i>B. megaterium</i>					0.944
		<i>B. m.</i> GC subgroup A					0.944
		<i>B. laterosporus</i>					0.803
		CLIN(ReV 3.90) <i>Bacillus</i>					0.639
		<i>B. megaterium</i>					0.639

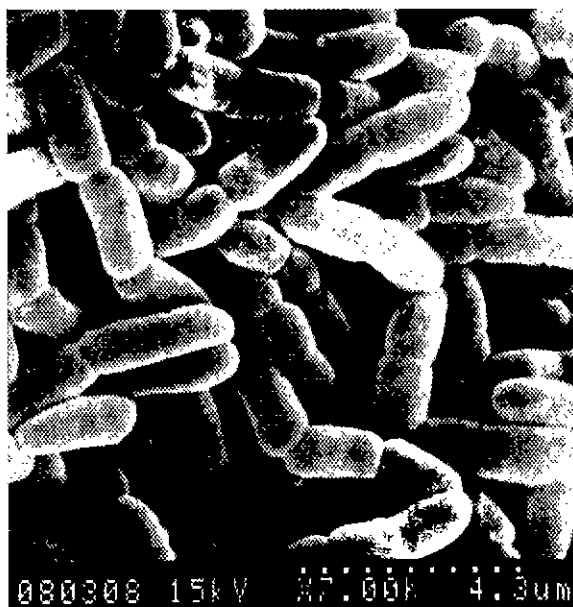


Fig. 1. Scanning electron micrography of isolated strain. The cells were grown for 24hrs at 30°C on LB plate.

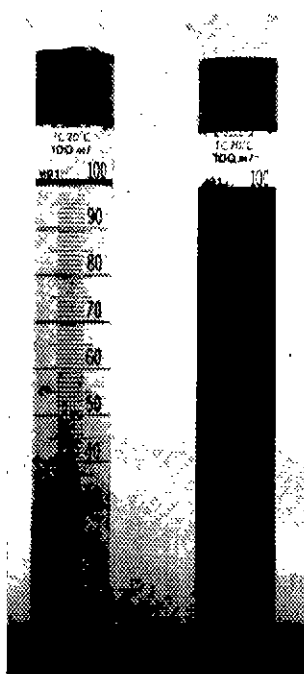


Fig. 2. Photography of active carbon flocculated with isolated strain. It was added 1ml of the culture broth to 100ml of 5,000ppm kaolin clay and active carbon. And then, it was mixed for 30sec. and standed for 3min. at room temp. The blank test used added to 1ml of distilled water, under the same condition. I; culture broth, C; control (distilled water).

액의 응집활성은 활성탄이 3분만에 침강되어 응집제 생산량이 높음을 알 수 있다.

2. 균 생육과 응집활성

분리한 실험균주의 생육과 응집제 생산과의 관계를 검토하기 위하여 전 배양액 0.1%를 IMA배지에 접종하여 30°C에서 소정시간 동안 진탕배양하면서 균 생육과 응집제 생산과의 관계를 조사한 결과는 Fig. 3과 같이 약 5시간의 유도기를 거친 후 30시간까지 대수기를, 30시간 이후부터 실험을 실시한 50시간까지 정상기를 보였다. 한편 응집활성은 배양초기부터 급격히 증가하기 시작하여 정상기 초기까지 활성의 증가가 계속되었다. 균의 생육이 정상기인 0~50시간 사이에서 본 균주의 응집활성은 약간의 감소가 있으나 거의 일정 수준을 유지하였다. Kurane¹⁰⁾ 등은 미생물에 의한 응집제 생산의 경우에 대수기 말기까지 응집제 활성이 증가하다가 정상기 초기부터 급격히 감소되거나 본 결과에서와 같이 정상기 때에도 일정 수준의 응집활성을 나타나는 두 가지 형태가 있다고 보고하였다. 또한 이들¹²⁾은 *Rhodococcus erythropolis*에 의한 미생물 응집제 생산조건 연구에서 후자의

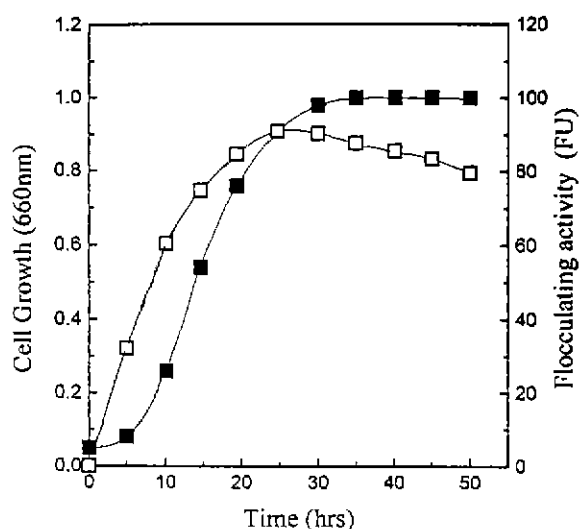


Fig. 3. Cell growth and flocculating activity (F.U) of *Bacillus megaterium* CH-23. Cells were incubated with shaking in the IMA medium (glucose 2g, NH_4NO_3 0.2g, K_2HPO_4 0.1g, NaCl 0.05g, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.05g, yeast extract 0.01g per 1 liter distilled water and initial pH 7.0) at 30°C and pH 7.0. Cell growth (■-■) was measured with optical density (O.D) at 550nm, and flocculant production (□-□) measured with flocculating activity (F.U) in 0.5% kaolin 10ml and 0.1% CaCl_2 1ml suspended mixture.

경우와 같이 응집제 활성이 정상기에도 일정 수준을 유지하는 것은 응집제가 세포의 분해에 의해 생성된 것이 아니라 세포에 의해 생합성되기 때문이라고 하였다. 본 결과도 이들의 보고 내용과 유사한 생합성 응집제로 추정된다.

3. 응집제 생산을 위한 최적온도와 배양 초기 pH

Fig. 4와 같이 균 생육은 35℃에서 가장 활발하였고 30℃, 40℃의 온도에서도 비교적 높은 생육활성을 보였다. 응집활성은 25~30℃에서 가장 높았으며 균 생육이 왕성한 35℃ 이상에서는 급격한 감소를 나타내었다. 본 실험의 응집제 생산을 조건을 위한 실험에서 배양온도는 30℃로 조절하여 수행하였다. 또한 초기 pH를 각각 4에서 9까지 조절한 IMA배지에서 30시간 동안 배양하면서 조사한 결과는 Fig. 5와 같이 pH가 낮을수록 균 생육은 저하되었으며, pH 6 이하에서 서서히 증가하여 pH 7 부근에서 최고를 보인 후 pH 9까지도 일정 수준의 생육을 나타내어 비교적 광범위한 pH 범위에서 생육할 수 있음을 확인하였다. 응집제 활성은 균 생육이 비교적 낮은 pH 6 이하

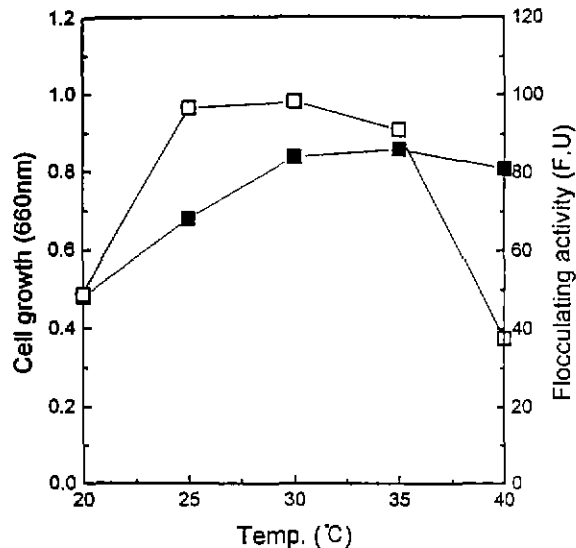


Fig. 4. Effect of temperature on cell growth and flocculating activity of *Bacillus megaterium* CH-23. Cells were incubated with shaking in the IMA medium (glucose 2g, NH_4NO_3 0.2g, K_2HPO_4 0.1g, NaCl 0.05g, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.05g, yeast extract 0.01g per 1 liter distilled water and initial pH 7.0) at 30℃ and pH 7.0. Cell growth (□-□) was measured with optical density (O.D) at 550nm, and flocculant production (■-■) measured with flocculating activity (F.U) in 0.5% kaolin 10ml and 0.1% CaCl_2 0.1ml suspended mixture.

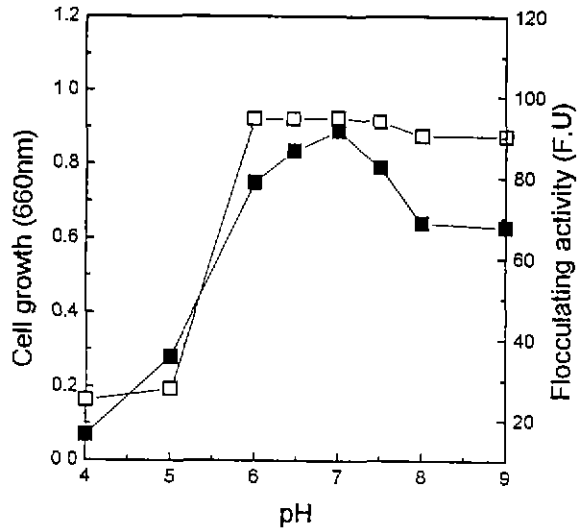


Fig. 5. Effect of initial pH on cell growth and flocculating activity of *Bacillus megaterium* CH-23. Cells were incubated with shaking in the IMA medium (glucose 2g, NH_4NO_3 0.2g, K_2HPO_4 0.1g, NaCl 0.05g, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.05g, yeast extract 0.01g per 1 liter distilled water and initial pH 7.0) at 30℃ and pH 7.0. Cell growth (■-■) was measured with optical density (O.D) at 550nm, and flocculant production (□-□) measured with flocculating activity (F.U) in 0.5% kaolin 10ml and 0.1% CaCl_2 0.1ml suspended mixture.

에서는 낮았으나 pH 6~9까지의 초기 pH 범위에서는 일정한 응집활성을 유지하였다. 이 같이 본 실험군 주는 넓은 초기 pH 범위에서 활성을 나타내었다.

4. 응집제 생산을 위한 최적 배양배지 조성

1) 탄소원

균 생육과 응집제 생산을 위한 최적 탄소원과 농도를 조사하기 위해 IMA배지에 탄소원을 2%씩 첨가하여 초기 pH 7.0으로 조절하고 30℃에서 30시간 동안 교반배양하면서 균 생육과 응집활성을 측정된 결과는 Table 2와 같이 10종류의 탄소원 중 균 생육과 응집제 생산을 위한 최적 탄소원으로는 수크로오스가 가장 우수하였다. 가용성전분, 프룩토오스, 말토오스, 글루코오스 등도 양호한 탄소원으로 나타났다. 그러나 inositol, xylose, 갈락토오스, 락토오스 등의 탄소원은 균 생육과 응집제 생산에 거의 이용하지 못하는 것으로 나타났다. 텍스트란은 탄소원 중에서 균 생육에 가장 우수한 탄소원으로 나타났지만 응집제 생

Table 2. Effect of various carbon source on the flocculant production and cell growth of *Bacillus megaterium* CH-23

Carbon sources	Cell growth (660nm) ^A	Flocculating activity (F.U) ^B
Maltose	0.61	85.2
Glucose	0.60	88.9
Sucrose	1.11	95.4
Soluble starch	0.73	68.0
Inositol	0.24	0
Dextrin	1.35	0
Xylose	0.09	0
Galactose	0.42	4.1
Fructose	0.68	91.7
Lactose	0.32	3.7

Carbon sources of 2% was added to the IMA medium (NH_4NO_3 0.2g, K_2HPO_4 0.1g, NaCl 0.05g, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.05g, yeast extract 0.01g 15g per 1 liter distilled water and initial pH 7.0), A; cell growth was measured with optical density(O.D) at 550nm, B; flocculant production was measured with flocculating activity(F.U=unit of flocculating activity(F.U)=1/a-1/b, a and b; optical density of control(a) and sample(b) at 550nm) in 0.5% kaolin 10 ml and 0.1% CaCl_2 0.1ml suspended mixture.

산성은 매우 낮았다. 김¹¹⁾ 등은 *Corynebacterium* sp. 을 이용한 응집제 생산 연구에서 글리세롤이 가장 우수하였다고 보고하였고, Kurane⁹⁾ 등은 *Rhodococcus erythropolis*를 이용한 응집제 생산에는 글루코오스가 가장 우수하였다고 보고하여 본 실험결과와 차이를 나타내었는데 이는 실험결과의 탄소원 이용성 때문으로 추측된다.

2) 무기질소원

BA배지에 무기질소원 0.3%를 첨가하여 배양하면서 응집활성을 조사한 결과는 Table 3과 같다. 7가지의 무기질소원 중 NaNO_3 가 가장 우수한 응집제 생산성과 균 생육성을 나타내었고 NH_4NO_3 도 비교적 응집제 생산성과 균 생육성이 우수하였다. 그러나 NaNO_3 와 NH_4NO_3 를 제외한 실험구에서는 무기질소원을 첨가하지 않은 대조구와 거의 같은 결과(NH_4Cl , $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$)를 나타내거나 더 낮은($\text{CH}_3\text{COONH}_4$, $(\text{NH}_4)_2\text{H}_2\text{PO}_4$) 결과를 나타내었다. 그러므로 암모니아태의 질소원보다는 질산태 질소원이 응집제 생산에 효과적으로 이용되는 것을 알 수 있었다. 정⁷⁾ 등은 *Agrobacterium* sp.을 이용한 응집제 생산 연구에서 최적의 무기질소원으로 NH_4NO_3 를, 김¹²⁾ 등은 *Corynebacterium* sp.을 이용한 응집제 생산 연구에서 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 를 보고한 바 있다. 이칼아태상 실험

Table 3. Effect of various inorganic nitrogen sources on the flocculant production and cell growth of *Bacillus megaterium* CH-23

Inorganic nitrogen sources	Cell growth (660nm) ^A	Flocculating activity(F.U) ^B
$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	0.24	34.2
$(\text{NH}_4)_2\text{H}_2\text{PO}_4$	0	0
NH_4NO_3	0.43	43.7
$\text{CH}_3\text{COONH}_4$	0	0
NH_4Cl	0.21	31.6
NaNO_3	0.58	54.2
None	0.28	27.9

Each inorganic nitrogen sources of 0.3% was added to the BA medium(glucose 2g, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.01g, NaCl 0.01g per 1 liter distilled water and initial pH 7.0), A; cell growth was measured with optical density(O.D) at 550nm, B; flocculant production was measured with flocculating activity(F.U=Unit of flocculating activity(F.U)=1/a-1/b, a and b; Optical density of control(a) and sample(b) at 550nm) in 0.5% kaolin 10ml and 0.1% CaCl_2 0.1ml suspended mixture.

결과에 따라 응집제 생산을 위한 무기질소원의 이용성이 상당히 차이가 있는 것으로 나타났다.

3) 유기질소원

BA배지 각 유기질소원을 0.01%씩 가하여 탄소원 조사시 같은 배양조건에서 유기질소원들의 이용성을 조사한 결과는 Table 4와 같다.

Table 4. Effect of various organic nitrogen sources on the flocculant production and cell growth of *Bacillus megaterium* CH-23

Organic nitrogen sources	Cell growth (660nm) ^A	Flocculating activity(F.U) ^B
Casamino acid	0.76	91.6
Malt extract	0.41	5.25
Peptone	0.52	91.05
Tryptone	0.79	99.5
Yeast extract	0.62	70.6
Beef extract	0.74	99.5
None	0.61	64.2

Each organic nitrogen source of 0.01% was added to the BA medium(glucose 2g, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.01g, NaCl 0.01g per 1 liter distilled water and initial pH 7.0), A; cell growth was measured with optical density(O.D) at 550nm, B; flocculant production was measured with flocculating activity(F.U=Unit of flocculating activity(F.U)=1/a-1/b, a and b; Optical density of control(a) and sample(b) at 550nm) in 0.5% kaolin 10ml and 0.1% CaCl_2 0.1ml suspended mixture.

그 결과 tryptone이 균 생육과 응집제 생산을 위한 최적 유기질소원으로 나타났고 casamino acid, beef extract 등도 우수한 것으로 나타났다. Peptone은 유기질소원을 첨가하지 않은 대조구보다 균 생육은 낮았으나 응집제 생산능력은 높았다. Malt extract, yeast extract 등은 첨가 효과를 확인할 수 없었다. Takagi¹³⁾ 등은 *Paecilomyces* sp.에 의한 응집제 생산 조건 연구에서 유기질소원으로 polypeptone이, 김¹¹⁾ 등은 *Corynebacterium* sp.을 이용한 응집제 생산에서 peptone이 가장 우수하였다고 보고하였다. 본 결과는 이들과 다소 차이를 나타내고 있다.

4) 무기염류

1 리터에 수크로오스 2g, NaNO₃ 0.3g, tryptone 0.01g, beef extract 0.01g를 함유하는 배지에 무기염류를 0.01%씩 첨가하여 배양한 결과, Table 5와 같이 11 가지의 무기염류 및 미량금속 이온에 대해 균 생육과 응집활성을 나타내었다. Mn²⁺(MnSO₄)의 경우, 균 생육은 대조구에 비해 많이 증가하지 않았으나 응집활성은 대조구가 119.7unit에 비해 187.9unit로 약 57% 증가하여 가장 우수한 것으로 나타났다.

Table 5. Effect of various inorganic salts on the flocculant production and cell growth of *Bacillus megaterium* CH-23

Inorganic salt sources	Cell growth (660nm) ^A	Flocculating activity(F.U) ^B
FeSO ₄	0.42	55.8
CaCO ₃	1.08	158.9
KH ₂ PO ₄	0.76	78.5
ZnSO ₄	0.26	47.9
CoCl ₂	0.24	34.7
MgSO ₄ · 7H ₂ O	1.14	176.8
NaCl	0.31	98.5
CuSO ₄	0.39	25.4
KNO ₃	0.49	64.8
CaCl ₂	0.98	145.8
MnSO ₄	1.28	187.9
None	1.15	119.7

Each inorganic salt sources of 0.01% was added to the BA medium(glucose 2g, MgSO₄ · 7 H₂O 0.01g, NaCl 0.01g per 1 liter distilled water and initial pH 7.0), A; cell growth was measured with optical density(O.D) at 550nm, B; flocculant production was measured with flocculating activity(F.U)=Unit of flocculating activity(F.U)=1/a-1/b, a and b; optical density of control(a) and sample(b) at 550nm) in 0.5% kaolin 10ml and 0.1% CaCl₂ 0.1ml suspended mixture.

또한 무기염과 미량금속 이온들 중에서 Mg²⁺(MgSO₄ · 7H₂O), Ca²⁺(CaCO₃, CaCl₂)도 대조구의 48% 및 33%의 응집활성 증가를 나타내었다.

요 약

미생물-응집제 생산균주를 토양에서 분리하고 응집활성이 가장 높은 CH-23 균주를 분리하여 *Bacillus megaterium* CH-23으로 동정하였다. 분리균의 응집제 생산조건을 조사한 결과 수크로오스 2%, NaNO₃ 3%, K₂HPO₄ 0.1%, NaCl 0.5%, MgSO₄ · 7H₂O 0.5%, tryptone 0.01%의 구성된 배지를 pH 7.0으로 조절하고 25~30℃에서 120rpm으로 배양하였을 때 정상기에서 응집활성이 가장 높았다. 배지에 Mn²⁺(0.01% MnSO₄)을 가하면 약 57%의 응집활성이 증가되었고 Mg²⁺(0.01% MgSO₄ · 7H₂O)와 Ca²⁺(0.01% CaCO₃)도 응집활성을 48%와 33%씩 증가시켰다.

감사의 말

본 연구는 1998년도 충북대학교 학술연구재단 연구비 일부로 수행되었다. 이에 감사드린다.

참고문헌

1. Takagi, H. and Kadowaki, K. F.: Flocculant production by *Paecilomyces* sp. *Agri. Biol. Chem.*, 49, 3151-3158(1985)
2. Mckinney, R. E.: Bio. Treat. Sewage Ind. *Waters*, 1, 88-92(1956)
3. Kaplan, D., Christaen, D. and Arade, S. M.: Chelating properties of extracellular polysaccharidies from *Chlorella* sp., *Appl. Environ. Microbiol.*, 53, 2953-2956(1987)
4. Kurek, E., Francis, A. J. and Bollag, J. M.: Immobilization of calcium by microbial extracellular products, *Arch. Environ. Contam. Toxicol.*, 20, 106-111(1991)
5. Fattom, A., and Shilo, M.: Phorndium J-1 bioflocculant production and activity, *Arch. Microbiol.*, 139, 421-426(1984)
6. Seo, H. H. and Lee, M. H.: Bioflocculant production from *Bacillus* sp.A56, *Kor. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 21, 486-474(1993)
7. Jeong, J. Y., Kim, K. C. and Do, D.H.: Production of bioflocculant by *Agrobacterium* sp. KF-67, *Kor. J. Food and Nutr.*, 10, 295-301(1997)
8. Buchanan, R. E. and Gibbons, V. E.: *Bergy's Ma-*

- nual of Determinative Bacteriology*, The Williams and Wilkins Co. Baltimore, 8th ed. (1974)
9. Campbell, J., Cass, D. D. and Peteya, D. J.: Colonization and penetration of inact canola seeding roots by an opportunistic fluorescent *Pseudomonas* sp. and the response of host tissue, *Phytopathology*, 77, 1166-1173(1987)
 10. Kurane, R., Takedo, K. and Suzuki, T.: Screening and characteristic of microbial flocculant, *Agri. Biol. Chem.*, 50, 2301-2307(1986)
 11. Kurane, R., Takedo, K. and Suzuki, T.: Culture condition for production of microbial flocculant by *Rhodococcus erythropolis*, *Agri. Biol. Chem.*, 50, 2309-2313(1986)
 12. Kim, Y. J., Choi, Y. M., Cho H. Y. and Yang, H. C.: A proteinous bioflocculant produced by *Corynebacterium* sp. K-199, *Kor. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 24, 699-704(1996)
 13. Takagi, H. and Kadowak, K.: Flocculant production by *Paecilomyces* sp. taxonomic studies and culture condition, *Agri. Biol. Chem.*, 49, 3151-3157 (1985)
-
- (1998년 9월 25일 접수)