

*Methylomonas mucosa*에 의한 Exopolysaccharide의 유가식 및 연속 생산

장 호 남 · *권 선 훈 · 심 상 준
한국과학기술원 화학공학과 및 생물공정연구센터
*럭키 바이오텍 연구소

Exopolysaccharide Production in Fed-batch and Continuous Culture by *Methylomonas mucosa*

Ho-Nam Chang, Sun-Hun Kwon* and Sang-Jun Sim

Bioprocess Engineering Research Center and Department of
Chemical Engineering, KAIST, Taejon 305-701, Korea

*Lucky Biotech., Taejon 305-343, Korea

ABSTRACT

The production of extracellular polysaccharide by *Methylomonas mucosa* (NRRL B-5696) was investigated. The microorganism uses methanol as the carbon source for their growth and produces exopolysaccharides. The productivity of exopolysaccharides was investigated under various culture modes: batch, fed-batch and continuous culture. In flask culture the growth of cell mass and the production of polysaccharide were inhibited at above 1% (v/v) methanol. At 1% (v/v) methanol maximum specific growth rate was obtained. As C/N ratio (g methanol/g ammonium sulfate) increased, polysaccharide production increased and cell mass decreased. Magnesium ion was also found to be essential for the polysaccharide production. In batch culture the production of polysaccharides was more affected by the specific growth rate than the cell concentration. In fed-batch culture the concentration of polysaccharide was 4 times higher than that of batch culture, but the yield was lower. The productivity of fed-batch with continuous feeding was higher than that of batch or fed-batch with intermittent feeding. This is due to no methanol limitation or inhibition that used to occur in fed-batch culture with intermittent feeding. In continuous culture pure oxygen was supplied to avoid the oxygen limitation. As the dilution rate increased up to 0.21 h⁻¹, the yield and productivity increased. The solution viscosity of the produced polysaccharide obtained from above increased exponentially with the concentration of polysaccharide.

서 론

미생물 다당류(microbial polysaccharide)는 세포 내에서의 탄소원 및 에너지원 저장을 위한 glycogen 과 같은 세포내 다당류(intracellular polysaccharide), 세포벽을 형성하는 N-acetyl glucosamine, N-acetyl muramic acid와 같은 구조 다당류(struc-

tural polysaccharide), 그리고 세포 밖에 존재하여 유용한 물질로 이용되는 세포외 다당류(extracellular polysaccharide)로 구분된다. 세포 밖에 존재하는 세포외 다당류는 생산하는 미생물의 특성에 따라 세포벽에 캡슐을 형성하기도 하고 세포벽을 빠져나가 발효액에 섞이는 형태도 있다. 물에 잘 녹고 온도와 pH의 변화에 영향을 적게 받으며 낮은 농도에서

도 높은 점도를 나타내기 때문에 유화제, 윤활제, 식품의 응고제, 석유회수 공정에 쓰이고 있다(1). 또한 유전자 조작된 미생물의 발효기술을 통해 새로 제조될 수 있는 우수한 특성의 세포의 다당류는 새로운 산업적 유용성을 가질 것이고 점점 그 용도의 범위가 넓어질 것이다.

세포의 다당류에 있어 가장 유용한 특성인 유변성질을 생산 균주 및 기질의 특성과 발효조건에 따라 구조와 성분에 영향을 받는다. 일반적으로 미생물이 생산하는 다당류는 탄소원/질소원의 비율(C/N ratio)이 높을수록 많이 생산된다. 이것은 세포의 성장에 필요한 질소원이 부족하여 여분의 탄소원이 다당류로 전환된다. 탄소원이 부족하면 세포성장과 유지에만 탄소원의 소비가 편중되어 다당류의 생산이 줄어들거나 발효액의 점도가 떨어지게 된다.

이제까지 상업적으로 잘 알려진 미생물 다당류는 대부분 그 기질로 설탕이나 포도당 등의 값비싼 당을 사용했기 때문에 기존의 화학적 제품이나 자연상태에서 얻어지는 다당류와 비교할 때 상업적인 경쟁력이 약하다. 그러나 메탄올을 기질로 사용하여 다당류를 생산하는 균주들이 발견됨에 따라 경쟁력의 강화가 가능한 것으로 보고되고 있다(2). 또한 메탄올은 낮은 농도에서도 균들의 성장을 저해하기 때문에 다른 미생물에 의해 오염되는 경우가 극히 적고 다루기 쉬운 장점이 있다. 메탄이나 메탄올에서 자랄 수 있는 몇몇 효모나 곰팡이를 제외하고는 대부분이 박테리아로서 이를 methylophilic 박테리아라고 부르며 이들은 그람음성이고 호기성이며 rods, vibrios 및 cocci 형태의 여러 가지 구조를 가지고 있다(3-5). Methylophilic 박테리아중 *Methylomonas mucosa*에 의해 생산되는 다당류는 식품, 의약 산업 또는 석유회수 공정에 이용되고 있으며 중요한 고분자 재료로 크게 각광받고 있으며 최근까지 이에 대한 연구가 활발하게 진행되고 있다(6-10). Lin과 Lim(11)은 이단 연속 발효를 통한 효과적인 다당류의 생산을 성공적으로 수행한 바 있다.

따라서 본 연구는 *Methylomonas mucosa*를 이용하여 보다 효과적인 발효공정 시스템의 개발을 위해 회분식, 유가식, 연속식 배양을 수행하여 생산성을 비교하고 효과적인 배양 조건을 얻고자 하였다.

재료 및 방법

사용 균주 및 보관

본 실험에 사용된 균주는 *Methylomonas mucosa*

(NRRL B-5696)로서 NRRL에서 분양받은 것이다. 균주의 유지를 위해 1.5% agar가 포함된 고체배지에서 서 두 달에 한 번씩 계대배양하였으며 보관을 위해 냉동건조하여 -4°C 의 냉동실에 보관하여 사용하였다.

배지

고체배지와 회분식 및 연속 배양시 사용한 배지의 조성은 Table 1에 나타내었다. 단, 플라스크 배양시 질소원인 황산암모늄은 0.4g/L 이었다. 메탄올을 제외한 배지는 121°C 에서 15분 동안 증기멸균하였고 메탄올은 무균 조작실에서 따로 첨가하였으며 각 배지의 초기 pH는 7.0이었다.

Table 1. Media composition for culture of *M. mucosa*.

Components	Maintenance	Inoculum	Production
KH_2PO_4	3.75	2.5	2.5
$\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$	2.5	1.0	1.0
$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	2.0	1.0	1.0
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0.4	0.4	1.0
NaNO_3	0.25	0.25	0.25
CaCl_2	0.16	0.16	0.16
$\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0.01	0.01	0.01
$\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0.005	0.005	0.005
Methanol, %(v/v)	3	1.5	1

All the units are g/L.

분석방법

세포 농도는 발효액을 채취한 후 적당한 비율(10-200배)로 희석하여 spectrophotometer (Model SPECTRONIC 100, Bausch & Lomb)를 사용하였으며, 525nm에서 흡광도를 측정하여 calibration curve로부터 환산하였다.

세포의 건조중량은 발효액 50ml를 원심분리한 후, 두 번 세척한 다음 105°C 에서 40시간 정도 건조시킨 후 측정하였다.

다당류의 농도는 채취한 발효액을 원심분리하여 세포를 분리한 후 적당한 비율(10-200배)로 희석시켜 Dubois 등(12)의 방법에 따라 phenol-sulfuric method로 발색시켜 spectrophotometer로 490nm에서 흡광도를 측정하여 calibration curve로부터 환산했다.

다당류의 건조중량은 배지 50ml를 5배 희석시켜 원심분리로 세포를 제거한 후 아세톤 250ml로 두

번 침전시켜 침전물을 105℃에서 약 20시간 건조시킨 후 측정했다.

메탄올의 농도는 채취한 발효액을 원심분리하여 세포를 분리한 후 FID gas chromatography(Gow-Mac 750 series FID)를 사용하여 측정하였다. Detector와 injection port의 온도는 190℃로 유지하였고 carrier gas는 helium을 사용하였으며 유량은 25ml/min이었다. 각 채취액에 포함된 메탄올의 농도를 측정하기 위해 1%(v/v) 용액과 비교하였다.

다당류 용액의 점도측정은 채취한 발효액 300ml를 원심분리하여 세포를 제거한 후 viscometer(BROOKFIELD digital viscometer)로 spindle 3번, 12rpm에서 측정했다.

배양방법

Seed culture는 250ml의 Erlenmeyer flask에서 1.5%(v/v) 메탄올을 포함한 50ml의 배지를 진탕배양기에서 250rpm, 30℃로 약 48시간 배양했다.

플라스크 배양은 500ml의 Erlenmeyer flask에서 100ml의 각 배지에 seed culture 3ml를 접종하고 250rpm, 30℃에서 배양했다.

회분식과 유가식 배양은 교반식 발효조(M-100, Tokyo, Eyela)에서 30℃로 조업하였다. Seed culture된 발효액 50ml를 조업부피가 0.5 l 또는 1 l 인 반응기에 접종하고 pH는 2N의 암모니아수를 사용하여 pH controller(FC-1, FCE101-1PB, Tokyo, Eyela)로 유지했다.

공기 유입속도는 1-2vvm이고 교반속도는 disc-turbine impeller에 의해 500rpm으로 유지되었다. 간헐적 유가배양의 경우는 메탄올(10%(v/v)과 황산마그네슘 용액(10g/l)을 주사기로 직접 넣어주

었으며 연속식 유가배양의 경우 peristaltic 펌프(Cole Parmler Co.)로 공급했다.

연속배양 실험은 배양장치의 개괄적 도식을 Fig. 1에 나타냈다. 2 l의 교반식 반응기(M-100, Tokyo, Eyela)를 사용하였고 조업부피는 1 l 이었다. 배지공급은 peristaltic 펌프(Cole Palmer Co., U. S. A.)를 사용했고 거품은 antifoam agent인 Neorin으로 제거하였다.

결과 및 고찰

*Methylomonas mucosa*는 수율이 0.3(생성된 고분자/소비된 메탄올) 정도로 높지만 1.4%(v/v) 이상의 기질(메탄올) 농도에서 성장저해를 상당히 받기 때문에 반응기 조업의 기술이 요구된다. 그러므로 여러 가지 배양방법을 이용하여 각 경우의 최적 조건을 찾고 각각의 생산성을 알아보기 위해 플라스크, 회분식, 유가식 및 연속식으로 배양한 결과를 아래에 열거하였다.

플라스크 배양

세포 농도에 대한 메탄올 농도의 영향을 알아보기 위해 초기 메탄올의 농도를 변화시켜 세포 농도의 변화를 플라스크 배양에서 살펴 보았다(Fig. 2). 메탄올 농도가 0.4%(v/v)와 1.0%(v/v)일 때 성장속도는 저해를 받지 않고 일정하게 유지되었으나 1.4%(v/v) 이상일 때는 세포성장속도가 저해를 받는 것을 알 수 있다. 메탄올의 초기 농도가 0.4%(v/v)일 때는 배지 내의 메탄올이 거의 소모되어 세포의 성장이 낮았고 그 이상의 메탄올 농도에서는 탄소원

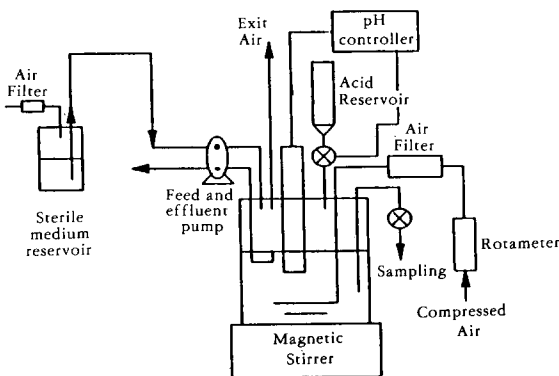


Fig. 1. Schematic diagram of continuous culture system.

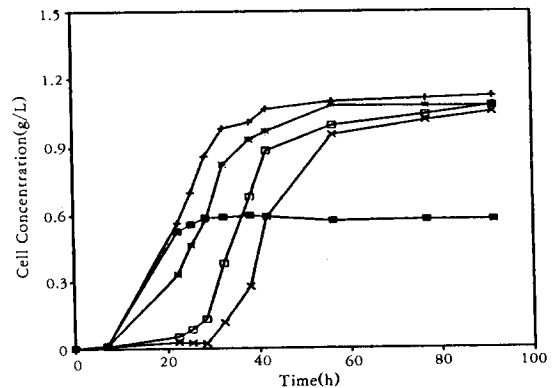


Fig. 2. Growth curve with various initial methanol concentrations. (Methanol concentration; ■:0.4%, +:1.0%, *:1.4%, □:2.0%, ×:3.0%).

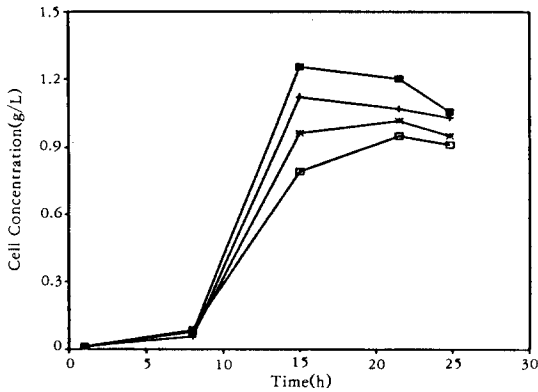


Fig. 3. Growth curve with various initial C/N ratios. (C/N ratio; □:25.0, *:16.7, +:12.5, ■:10.0).

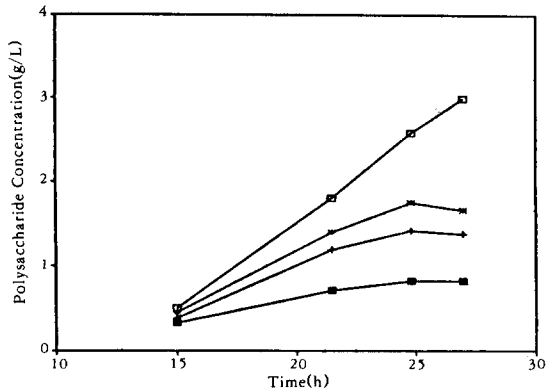


Fig. 4. Production curve with various initial C/N ratios. (C/N ratio; □:25.0, *:16.7, +:12.5, ■:10.0).

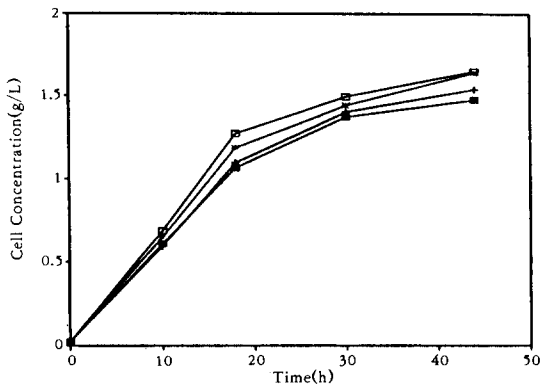


Fig. 5. Growth curve with various initial $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ concentrations. ($MgSO_4 \cdot 7H_2O$ concentration; ■:1.0g/l, +:2.0g/l, *:3.0g/l, □:4.0g/l).

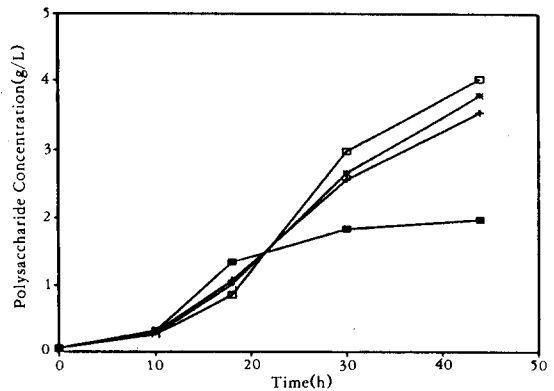


Fig. 6. Production curve with various initial $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ concentration. ($MgSO_4 \cdot 7H_2O$ concentration; ■:1.0g/l, +:2.0g/l, *:3.0g/l, □:4.0g/l).

은 충분했으나 같은 양의 질소원(황산암모늄)이 0.4g/l로 들어갔기 때문에 최종 세포 농도는 거의 비슷한 수준을 보인다고 생각된다.

세포의 성장과 다당류 생산에 대한 황산암모늄의 영향을 알아보기 위해 황산암모늄 농도에 따른 세포의 성장과 다당류 생산을 관찰한 결과를 Fig. 3와 Fig. 4에 나타내었다. 모두 메탄올 농도를 1%로 하여 황산암모늄의 영향을 살펴보았다. C/N 비율이 높을수록 세포의 성장은 저조했으나 다당류의 생산은 빠르게 나타났다. 결과적으로 암모늄 이온은 세포성장에는 필수적이지만 다당류의 생산을 오히려 저해하며 이는 높은 암모늄 이온 농도에서 기질이 세포의 증식에만 이용되어 생산의 감소를 초래하는

것으로 보인다.

Fig. 5와 Fig. 6은 각각 세포내의 효소작용에 중요한 마그네슘 이온 농도에 따른 세포의 성장과 다당류 생산의 변화를 보기 위해 황산마그네슘의 초기 농도에 따른 세포의 성장과 다당류 생산을 나타낸다. 이것은 모두 2g/l 황산암모늄과 2%의 메탄올 농도로 시작한 것으로 마그네슘 이온의 효과만 나타나도록 메탄올을 충분히 넣었다. 세포성장은 마그네슘 농도에 따라 변화가 크지 않지만 다당류 생산량은 변화가 큼을 알 수 있다. 결과적으로 메탄올 2% (v/v)를 넣었을 때 황산마그네슘의 양은 2g/l 이상이 되어야 함을 알았다.

회분식 배양

메탄올 농도와 비성장속도를 Monod 모델에 적용시켜 보기 위해 메탄올 농도를 1%로 시작하여 회분식 배양을 수행한 결과 Fig. 7에 나타났다. Monod 식에서 상수인 μ_{max} 와 K_s 를 구하기 위해 양변에 역수를 취하면 다음의 식(1)이 얻어진다.

$$\frac{1}{\mu} = \frac{K_s}{\mu_{max}S} + \frac{1}{\mu_{max}} \quad (1)$$

여기서 S는 성장제한기질(growth limiting substrate)의 농도이고 μ , μ_{max} 는 각각 비성장속도와 최대 비성장속도를 나타내며 K_s 는 포화상수로서 μ 가 μ_{max} 의 반일 때의 기질농도에 해당한다. Fig. 7의 결과에서 각각의 S에서의 μ 를 계산한 후 $1/S$ 과 $1/\mu$ 를 최소자승법으로 직선관계를 구하면 직선의 기울기가 K_s/μ_{max} 이고 $1/S$ 이 0일 때의 μ 값이 μ_{max} 인 것이다. 여기의 μ_{max} 는 실제의 최대 비성장속도가 아니라 메탄올에 의한 성장저해가 없는 것을 가상했을 때 메탄올 100%에서의 예상치이다. 즉, 이 모델은 메탄올의 농도가 1% 이하일 때 유효하다. Fig. 7의 결과에서 메탄올 농도가 0.85-0.95%(v/v)일 때 가능한 최대 비성장속도($0.23h^{-1}$)가 나타남을 알 수 있었다.

그리고 단위세포농도당 성장속도와 생산속도의 관계를 알기 위해 다음과 같은 Leudeking-Piret식을 적용하였다.

$$\frac{1}{x} \cdot \frac{dP}{dt} = \alpha \cdot \mu + \beta \quad (2)$$

여기서 dP/dt , dX/dt 는 각각 polymer 생산속도

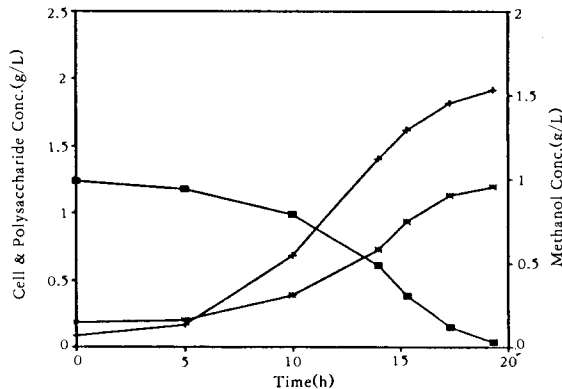


Fig. 7. Profiles of cell growth (+), methanol (■) and polysaccharide concentration (*) during batch culture.

와 세포의 성장속도이며, α , β 는 각각 상수이다. 식 (2)의 의미는 단위세포당의 생산속도 μ 의 상수(α) 배와 상수(β)의 합이 되며 두 상수에 따라 생성물의 생산과 성장속도의 관계를 알 수 있다. Fig. 7로부터 구한 성장속도와 생산속도의 관계로부터 $\alpha(0.16)$ 와 $\beta(0.07)$ 를 얻었다. 이 결과는 다당류의 생산에 있어 세포의 농도보다 세포의 성장속도가 크게 영향을 줌을 말한다.

유가식 배양

초기 조업부피를 500ml로 하여 메탄올 농도가 거의 소모되었을 때 메탄올(10%(v/v))과 황산마그네슘(10g/l)을 간헐적으로 주사기로 주입하여 관찰한 것을 Fig. 8에 나타났다. 세포의 활성 유지를 위해 pH조절용으로 질소원의 효과가 있는 2N 암모니아수를 사용하였으며 기질은 순수한 메탄올을 사용하였고 다당류의 생산이 감소하면 수시로 황산마그네슘을 묽은 염산에 녹여 50ml를 주입했다.

Fig. 9는 기질을 연속 주입하여 조업한 결과이다. 이때 주입되는 기질의 메탄올 농도는 10%(v/v)였고 황산 마그네슘의 농도는 10g/l였다. 공급 기질의 평균유속은 약 10ml/h였다. 이 결과로부터 연속 주입이 간헐적 주입방법보다 효과적임을 알 수 있었다. 그러나 연속식 유가배양의 경우 반응기 내의 기질소비속도와 주입속도의 수지를 맞추기 어려웠기 때문에 메탄올 농도가 1.3%를 넘을 때는 주입을 중단하고 다시 메탄올 농도가 떨어졌을 때 주입을 시작하였다.

간헐적 주입방법이 연속주입보다 효과적이지 못한

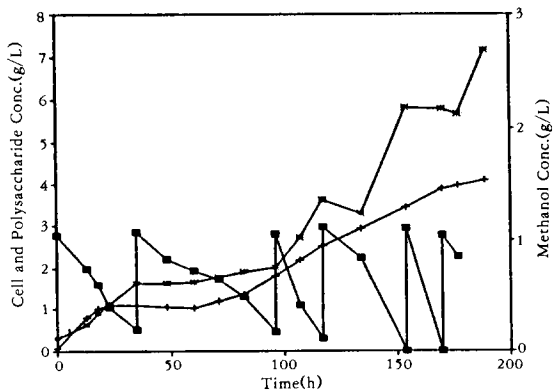


Fig. 8. Profiles of cell growth (+), methanol (■) and polysaccharide concentration (*) during fed-batch culture with intermittent feeding.

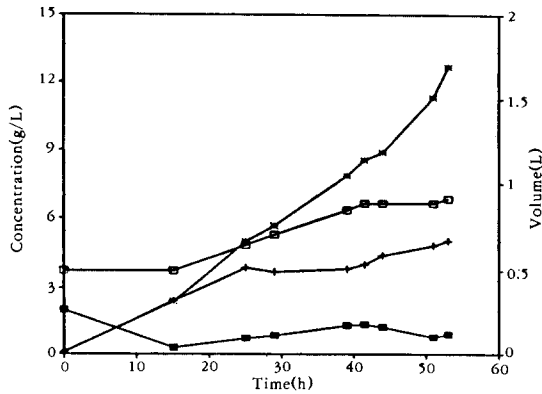


Fig. 9. Profiles of cell growth (+), methanol (■) polysaccharide concentration (*) and volume (□) during fed-batch culture with continuous feeding.

이유는 메탄올 농도가 주입전에 너무 낮고(0.2% 이하) 주입후엔 상대적으로 현저히 높아져서 각 상태에 균주가 적응하는 동안 다당류의 생산활성이 떨어지기 때문으로 사료된다. 이런 이유로 수율은 비슷하지만 생산성은 연속주입이 5배 가량 우수함을 보여주었다.

연속 배양

조업부피를 1ℓ로 하여 연속조업을 수행했다. 유입되는 기질의 메탄올 농도는 2%(v/v)였고 반응기내의 용존산소농도가 너무 낮아 washout이 발생했기 때문에 유입되는 공기에 산소 30%를 섞어서 2vvm으로 유입시켰다. 희석률을 변화시켜서 3-4 batch 정도 지난 후 정상상태에 도달하였음을 확인하고 수율과 생산성을 조사했다. 앞의 회분식 배양의 결과로부터 다당류의 생산은 비성장속도가 높을수록 유리하다는 것을 이용했고 실제로 희석률이 0.21h⁻¹일 때 수율이 최고였다(. 10). 또한 연속조업을 100 batch 이상함으로써 그 안정성을 확인할 수 있었다.

조업방법에 따른 수율과 생산성의 비교

각 조업방법에 따른 수율과 생산성은 Table 2에 나타내었다. 다당류의 수율은 회분식 배양이 가장 우수하였고 생산성은 연속배양이 높았으며 유가식 배양은 생성된 다당류의 농도는 회분식에 비해 간헐적 주입방법보다 2.5배, 연속주입방법보다 3.5배 높일 수 있었으나 수율과 생산성은 모두 다른 조업방

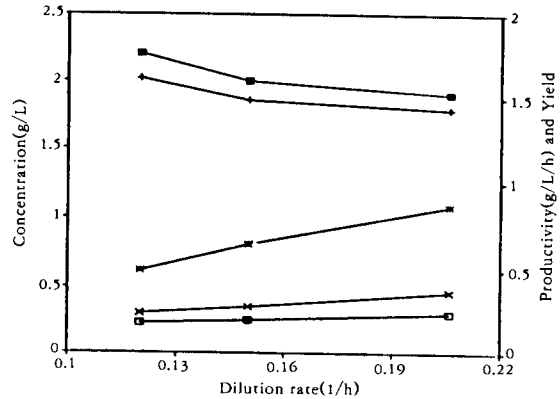


Fig. 10. Results of continuous culture with various dilution rates. (Initial methanol concentration is 1%(v/v)).(■: cell growth, +: polysaccharide, *: methanol, ×: productivity, □: product yield).

법보다 떨어짐을 알 수 있다. 메탄올과 마그네슘 이온의 첨가만으로 효과적인 유가식 배양이 어려운 것은, 세포의 증식이 다당류의 생산에 필수적이라는 앞의 회분식 배양 결과를 확인해 준다. 즉, 유가식 배양에서는 생산활성이 낮은 노후세포가 반응기 내에 계속 축적되어 이들을 유지하는데 다량의 탄소원이 소비되고 단위세포당 다당류의 생산성이 낮아지기 때문일 것이다. 상대적으로, 생산활성이 높은 세포들만 존재하는 연속배양은 생산성이 크게 나타났다.

위의 결과로, 본 균주의 다당류에 대한 생산활성은 세포의 성장과 밀접한 관련이 있음을 알 수 있다.

Table 2. Yield and productivity of *M. mucosa* on various culture modes.

Culture type	Yield ¹	Productivity ²	Cell ³	Polysaccharide ³
Batch	0.29	0.11	1.8	2.3
Fed-batch				
intermittent	0.10	0.03	4.0	5.2
continuous	0.13	0.14	4.3	8.4
Continuous	0.24	0.36	1.9	1.7

1. (g polysaccharide produced/g methanol consumed)
2. (g polysaccharide/L/h)
3. (g/L)

생산된 다당류의 농도에 따른 점도 변화

Fig. 11은 얻어진 다당류의 농도에 따른 수용액의 점도를 관찰한 것으로 농도에 따라 지수적으로 증가함을 볼 수 있었다. 이와 같은 점도의 증가 효과는 생산된 다당류가 drag reducing agent 등으로 사용될 수 있음을 말해주는 것이다.

pH의 변화에 따른 점도 측정 결과, pH가 5일부터 11까지 일정하게 점도를 유지했고 pH가 높을수록 약간씩 증가했으나 5보다 낮은 범위에선 현저히 떨어졌다(미계재 결과). 이로부터 pH에 대한 안정성은 이미 알려져 있는 xanthan gum보다는 다소 떨어진다는 사실을 확인할 수 있었다(13).

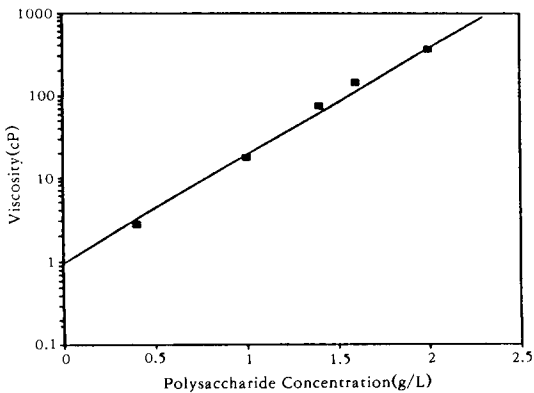


Fig. 11. Viscosity of product solution in water with various concentration.

요 약

*Methylomonas mucosa*를 이용하여 세포의 다당류의 생산을 알아보았다. 본 미생물은 성장을 위해 메탄올을 탄소원으로 이용하여 세포의 다당류를 생산한다. 효과적인 발효 공정 시스템의 개발을 위해 회분식, 유가식, 연속식 배양을 수행하여 각각의 당류에 대한 생산성을 알아보았다.

플라스크 배양에서 메탄올이 약 1% (v/v) 이상에서 다당류의 생산과 세포의 성장은 저해되었다. 1% (v/v)에서 최대 비성장속도를 나타내었고 C/N 비율이 높을수록 다당류의 생산은 많았다. 다당류의 생산에 Mg^{2+} 이온 농도가 크게 영향을 줌을 확인할 수 있었다.

유가식 배양에서는 다당류의 농도가 회분식에 비해 4배 이상 높았으나 수율은 오히려 감소하였다. 연속주입을 통한 유가식 배양은 간헐적 주입방법보

다 생산성이 높았다. 이는 간헐적 주입에서 나타날 수 있는 메탄올에 의한 제한이나 저해가 없었기 때문으로 보여진다.

연속조업은 산소 제한을 피하기 위해 순수산소를 공급하였다. 회석률이 $0.21h^{-1}$ 까지 증가하여도 수율과 생산성은 증가하였다.

생산된 다당류 용액의 점도는 다당류의 증가에 따라 지수적으로 증가하였다.

감사의 글

본 연구는 한국과학재단의 부분적인 연구비 지원에 의해 생물공정연구센터에서 수행되었음을 감사드립니다.

참고문헌

1. A. Margaritis and G. W. Pace(1985), *Comprehensive Biotechnology*, (M. Moo-young, ed.) 3, 1055, Pergamon Press, New York.
2. J. H. Kim, J. H. Choi, D. K. Oh and J. M. Lebeault(1990), *Proc. APBioChEC '90*, 229.
3. U. Faust and P. Prave(1983), *Biotechnology*, (H. Dellweg, ed.) 3, 83, Verlag Chemie GmbH.
4. J. W. Foster and R. H. Davis(1966), *J. Bacteriol.*, 91, 1924.
5. Y. Chalfan and R. I. Mateles, *Appl. Microbiol.*, 2, 135.
6. A. L. Tannahill and R. K. Finn(1975), *U. S. Patent* 3, 878, 045.
7. R. K. Finn, Tannahill and J. E. Laptewicz Jr. (1975), *U. S. Patent* 3, 923, 782.
8. K. T. Tam and R. K. Finn(1977), in *Extracellular Microbial Polysaccharides*(ACS Symposium Series 45), ACS, Washington, DC, 58.
9. N. B. Jansen, K. A. Feldman and G. T. Tsao (1986), *ACS Meeting*, Anaheim, CA, Paper No. 45.
10. S. Jayakumar and H. C. Lim(1989), *J. Biotechnol.*, 12, 21.
11. C. S. Lin and H. C. Lim(1990), *J. Biotechnol.*, 16, 137.

12. M. Dubois, K. A. Gilles, K. Hamilton, P. A. Rebers and F. Smith(1956), *Anal. Chem.*, **28**, 350.
13. Bradshaw, I. J., B. A. Nisbet, M. H. Kerr and I. W. Sutherland(1983), *Carbohydr. Polymers*, **3**, 23-38.