

Bacillus sp. LK-1의 Exopolysaccharides(POL-II) 생산 및 특성

김양호¹ · 안성구 · 서현호 · 김혜자 · 윤병대*

¹한솔제지, 한국과학기술연구원 유전공학연구소 미생물공학연구실

The Production and Properties of Exopolysaccharides(POL-II) by *Bacillus sp.* LK-1

Kim, Yang-Hyo¹, Sung-Ku Ahn, Hyun-Hyo Suh,
Haye-Ja Kim and Byung-Dae Yoon*

¹Han Sol Paper Mfg. Co., Ltd. P.O. Box Suwon 111, 440-600, Korea
Microbial Technology laboratory, Genetic Engineering Research
Institute, Korea Institute of Science and Technology,
P.O. Box 17, Taeduk Science Town, Taejeon 305-606, Korea

Abstract— The strain which produced highly viscous exopolysaccharides (EPS) in liquid culture was selected from soil. The strain was supposed to *Bacillus sp.* from the results of morphological, biochemical and physiological tests. The medium composition for EPS production was trypton 0.75%, sucrose 4%, CaCO₃ 0.01%, Winogradsky's nitrogen free mineral medium 5 ml/l and pH 7.0. In 2-l jar fermenter, the viscosity of culture broth after 120-hr cultivation time was very high (60,000 cps) and the amount of EPS was 6.2 g/l. The EPS was composed of glucose, glucuronate, xylose, mannose(1:2:1:2). The viscosity of the EPS which was named POL-II was very higher than that of xanthan gum and substantially decreased under extreme pH condition, high temperature and salt addition.

다당류는 생분해성이며 인체에 무독하고 구조 및 특성의 다양성으로 gel형성제, 유화 안정제, 표면장력 조절제, 보습제, 점착제, 윤활제 및 film 형성제 등 다양한 용도로 이용되어 왔다(1-5). 지금까지 알려진 주요 다당류 생산 균주(6-10)로는 *Xanthomonas*, *Agrobacterium*, *Azotobacter*, *Bacillus*, *Pseudomonas*, *Arthrobacter*, *Methylomonas*, *Chromobacterium*, *Alkaligenes*, *Aureobasidium*, *Sclerotium*, *Erwinia* 등이 있으며 이들이 생산하는 다당류중 dextran, xanthan, alginate, gellan gum, pullulan, levan 등은 이미 산업적으로 생산되고 있다.

최근 산업의 급속한 발전에 따라 다당류의 용도는 보다 광범위하여 식품, 석유회수 등의 화학 공업뿐만 아니라 폐기물 처리제, 난류 억제제, 광 저항성 제제, 세정제, 생분해성 및 천연 소재, 봉합사 및 인공 생체,

서방제, vaccin, 각종 질병의 예방과 치료 등의 용도로 개발될 수 있는 가능성을 보여주고 있으며 신기능 다당류의 개발에 있어서도 유전공학 및 생물 조절기술에 의한 다당류의 새로운 기능 개발에 biotechnology는 중요한 역할을 담당하고 있다(11, 12).

이러한 사회적 변화는 새로운 우수한 기능을 가지는 신규 다당류의 출현 요구를 더욱 증가시키고 있지만 발견된 다당류에 비해서 실제 산업적으로 생산되는 다당류의 수가 훨씬 적은 것은 이들 기존 다당류의 우수한 물성 및 물성의 공통성에도 기인하지만, 용도 적용과 개발에 대한 연구의 범위가 매우 넓고 신규 다당류 및 그 생산 미생물의 탐색과 이의 응용개발 연구에도 상당한 노력과 시간을 요하고 있기 때문이다.

본 실험실에서는 다양한 특성을 가지는 미생물 다당류의 개발을 위한 기초적인 연구를 수행하고 있으며 본 보에서는 탐색된 미생물 중 액체배양에서 특이하게 높은 점도를 보이는 균주에 대한 균주 동정 및 생산된

Key words: Polysaccharides, *Bacillus sp.*

*Corresponding author

다당류의 물성학적 특성에 관해 검토한 결과를 보고하고자 한다.

재료 및 방법

실험균주 분리 및 선정

전국 각지에서 채취한 토양시료를 희석하여 Czapeck 배지(saccharose : 3%, NaNO_3 : 0.3%, K_2HPO_4 : 0.1%, MgSO_4 : 0.05%, KCl : 0.05%, FeSO_4 : 0.001%)에 0.2% yeast extract 및 0.03 mg/l chloramphenicol과 0.01 mg/l nystatin을 첨가하여 만든 평판 배지에 도말하고 28°C 에서 2일간 배양하여 다당류를 생산하는 colony를 분리하였다. 이 colony를 고체배지에 다시 배양하고 형태학적 특징을 비교하여 각기 다른 특성을 가지는 것으로 생각되는 다당류 생산 균주를 분리하였다. 이렇게 분리된 균주를 0.2% yeast extract를 첨가한 Czapeck 액체배지 100 ml에 접종하여 150 rpm, 28°C 에서 3일간 진탕 배양한 후 점도가 가장 높은 다당류 생산균주(LK-1)을 선별하여 본 연구에 사용하였다.

균주 동정

실험균주의 동정은 Bergey's manual of systematic bacteriology(13)와 Biochemical Tests for Identification of Medical Bacteria(14)의 방법에 준하여 행하였다.

점도 측정

다당류의 점도 측정은 Brookfield viscometer의 Model LVT, spindle No. 3를 사용하여 30 rpm, 25°C 에서 측정하였다.

균의 배양

발효조에서의 배양은 2-l 발효조(B. Braun, Biostat, Germany)를 사용하였으며 이때 사용한 배지조성은 sucrose 4%, tryptone 0.75%, Winogradsky's mineral medium stock solution 5 ml/l, CaCO_3 0.01%, pH 7.0 이고, 배양조건은 working volume 1.5 l, 배양온도 28°C, aeration volume은 1 vvm이었으며 impeller speed는 300 rpm에서 1200 rpm까지 점차 증가시켰다. Seed 배양은 0.2% yeast extract를 첨가한 Czapeck 액체배지에서 24시간 동안 150 rpm, 28°C 에서 진탕 배양하여 본 배양에 5%되게 접종하였다.

다당류의 분리

배양액에 NaOH를 첨가하여 점도를 저하시키고, GS-3 rotor를 사용하여 6000 rpm으로 15°C 에서 30분간 분리(Sovall, Dupont, U.S.A.)하여 균체를 제거한 다음, 상등액을 취하여 중화하고 투석으로 염을 제거한 뒤, ethyl alcohol을 50%되게 첨가하여 다당류를 회수하였다. 회수된 다당류는 70% 및 98% ethyl alcohol로 2회 세척하여 50°C 에서 진공 건조하였다.

구성당의 분석

다당류 5 mg을 2 N H_2SO_4 1 ml에 용해시킨 후 2시간 동안 가수분해하고 $\text{Ba}(\text{OH})_2$ 로 중화시킨 다음 원심분리하여 상등액을 rotary evaporator로 60°C 에서 농축하고 HPLC를 사용하여 분석하였다(15).

DSC의 측정

다당류의 열분해 특성을 조사하기 위해 differential scanning calorimeter(DSC)로 분석하였다. 알루미늄 용기에 건조시료 5.0 mg을 넣은 후 봉합하여 Perkin-Elmer DSC-4(U.S.A.)를 이용하여 분당 15°C 씩 온도를 올리며 25°C 에서 250°C 까지 다당류의 용점 및 흡열되는 열량을 조사하였다.

IR spectrum

다당류 분말과 KBr을 20%로 섞어 마쇄하여 KBr pellet으로 만든 다음, IR spectrophotometer(FTIR, FTS-20/80, Biored, Digilab. Division, U.S.A.)를 사용하여 적외선 흡수 spectrum을 조사하였다.

결과 및 고찰

균주의 분리

분리용 평판 배지상에서 단단한 polymer를 형성하는 colony를 1차로 200여종 분리하고 각 균주를 액체배지에서 배양한 후 가장 점도가 높은 한 균주를 선별하였다. 이균주를 LK-1으로 명명하고 본 실험에 사용하였다.

균주의 동정

균주 LK-1은 0.2% yeast extract를 첨가한 Czapeck 한천배지상에서는 soluble pigment를 생성하지 않았고, yellowish gray를 띄며, 위로 솟아오르는 winkled colony를 형성하였고, colony는 한천 배지상에서 쉽게

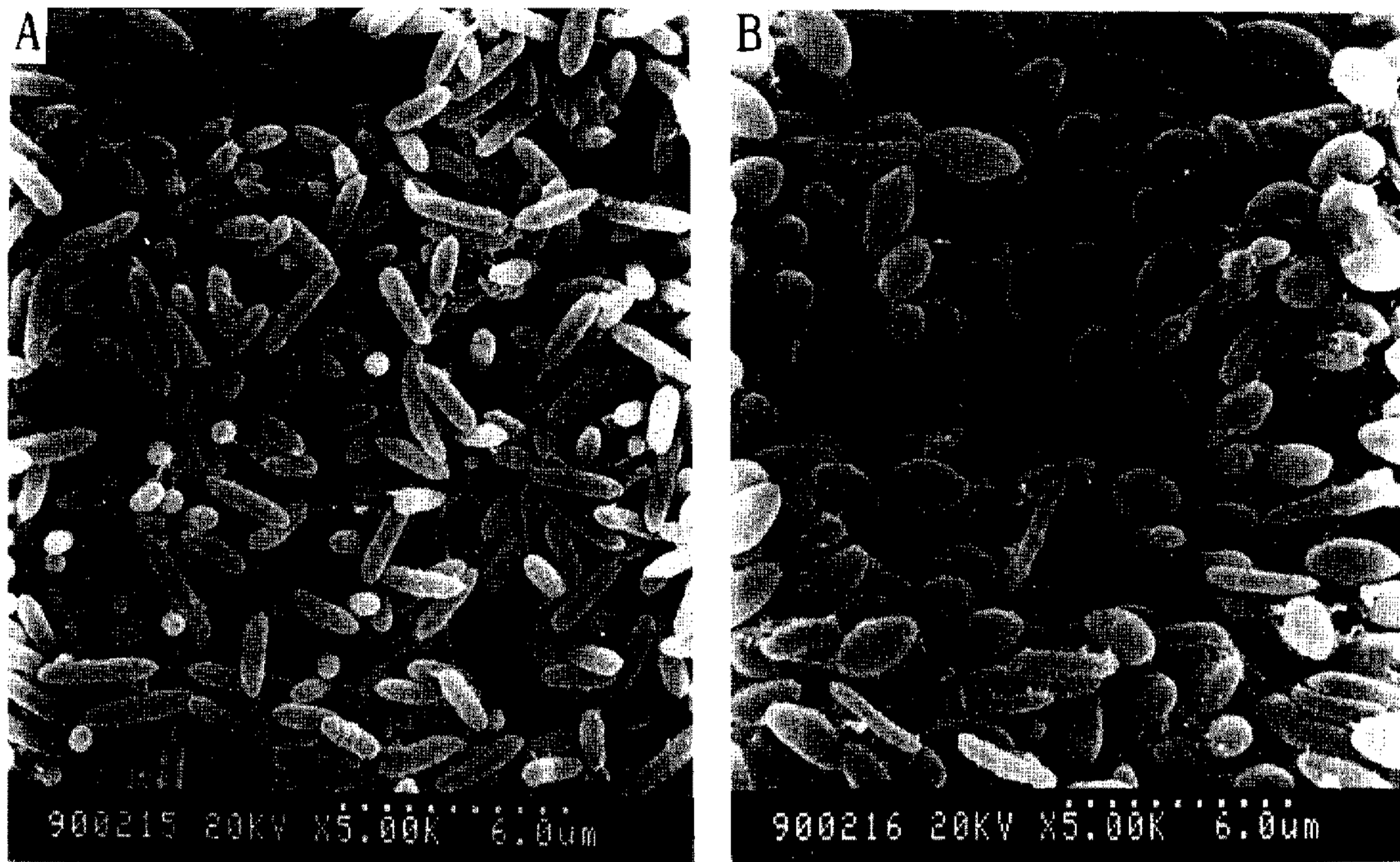


Fig. 1. Morphology of *Bacillus* sp. LK-1. A: Early log phase, B: Mid log phase

분리되지 않을 정도로 단단하였다. 영양세포는 Gram 음성의 간균형으로서 크기는 $1 \times 2.5 \sim 5 \mu\text{m}$ 이었고 배양 2일 후부터는 ellipsoidal cell로 전환되었으며 크기는 $2 \times 3 \mu\text{m}$ 이었다(Fig. 1). 이 ellipsoidal cell은 Gram 음성균에 속하는 *Azotobacter* sp.에 의하여 만들어지는 cyst와 유사하나 violamine에 의해 염색되지 않을 뿐만 아니라 영양세포의 크기에서도 차이가 있다 (16).

분리균주 LK-1의 동정을 위한 생리, 생화학적 검토 결과(Table 1), 이 균은 혐기적 조건에서는 생육하지 않고 편성 호기성 조건에서만 생육하였으며 catalase와 oxidase를 가지고 있었다. 운동성이 있었으며 Voges-Proskaur test와 tryptophan에서 indol 생산은 음성 반응을 보였다. Nitrate를 환원하였고 β -glucosidase와 β -galactosidase의 활성이나 arginine dihydrogenase, lysine decarboxylase, ornithine decarboxylase, urase, tryptophan deaminase의 활성은 없었다. 한편, casein, gelatin, starch 등은 잘 분해하였다. Winogradsky's salt와 0.2% NH_4NO_3 를 질소원으로 사용한 배지에서 당과 유기산의 이용성을 조사한 결과, 당에서는 과량의 산과 gas를 형성하지는 않았으며, glucose, sucrose, mannose, manitol, glycerol, lactose, galactose, maltose, sorbitol, starch 등 대부분의 당을 이용하였으나, xylose, cellulose 등은 이용하지 못하였다. 또한 유기산으로는 acetate, citrate, lactate, gluco-

nate, malate 등을 이용하였으나 propionate, caparate, adipate, phenylactate 등은 이용하지 못하였고 amino sugar인 N-acetylglucosamin을 잘 이용하였다. 균의 생육은 28°C 에서 보다 37°C 에서 더 왕성하였으나 55°C 에서 2일간 배양시는 대부분의 균이 사멸하였다. 여러 pH 조건에서는 pH 5~9까지 생육하였으며 pH 7.0에서 가장 왕성한 생육을 보였다. 배지내의 NaCl 농도는 2%까지는 생육을 하였으나 2% NaCl을 첨가한 배지에서는 NaCl 무첨가 배지에서 보다 생육 정도는 낮았다. 이밖에 지방산, quinone, 세포벽 구성 성분 및 GC 함량의 결과는 *Bacillus*속 세균과 일치하였다.

이상과 같은 LK-1의 형태적, 생화학적, 생리적 특징으로부터 본 분리균주는 *Bacillus*속 세균으로 동정되었으며, Bergey's manual상에서 가장 근접한 균주로는 *Bacillus brevis*였으나 Gram staining에서의 차이와 amino acid의 영양 요구성에서의 차이, rod-type cell의 크기 등에서 LK-1과는 차이를 보여 최종적으로 *Bacillus* sp. LK-1으로 명명하였다. 또한, *Bacillus*속 세균중 대표적인 다당류 생산균으로는 levan과 dextran을 생산하는 *B. subtilis*와 *B. licheniformis*, *B. polymixa* 등이 있으나 LK-1은 이들 *Bacillus*속 세균과 형태적, 생화학적 특징 등에서 큰 차이를 보였으며 다당류의 구성당 종류에 있어서도 큰 차이를 보였으므로 지금까지 보고된 *Bacillus*속 세균의 다당류 생

Table 1. Biochemical and physiological characteristics of *Bacillus* sp. LK-1

Gram staining		Oxidase	Catalase		Motility		O/F	Spore		
+		-	+		+		-	+		
Enzyme Activity										
H ₂ S	VP	Nitrate	Arg	Lys	Orn	Ure	Trp	β-Glu	α10b-Gal	
-	-	+	-	+	-	-	-	+	+	
Hydrolysis				Carbohydrate(Acid/Gas)						
Casein	Gelatin	Starch	Glu.	Man.	Ino.	Sor.	Rha.	Suc.	Sac.	Xyl
+	+	+	-/-	-/-	-	-	-	-/-	-	-/-
Utilization										
Arabinose	Galactose	Glucose	Mannose	Sucrose	Lactose	Maltose				
-	+	+	+	+	+	+				
Cellulose	Starch	Xylose	Glycerol	Mannitol	Sorbitol					
-	+	-	+	-	-					
Acetate	Adipate	Citrate	Caparate	Gluconate	Lactate					
+	-	+	-	+	+					
Propionate	penylactate	N-acetyl-glucosamin								
-	-	+								
Growth at pH				Growth in NaCl(%)				Growth at temp.(°C)		
3	5	7	9	11	2	4	10	28	37	55
-	-	+	+	-	+	-	-	+	+	-
Fatty acid			Quinone			Cell Wall		GC Content(mol%)		
Branched-type			MK-7			meso-DAP		42		

+: Positive, -: Negative

산균주와는 다른 균주로 생각된다.

발효조에서의 배양

2-l 발효조에서 *Bacillus* sp. LK-1을 배양하였을 때 생육은 배양시간 12시간부터 대수 증식기에 접어들어 48시간까지 지속되었으며, 48시간 이후부터는 감소하기 시작하였다. 다당류의 생산은 균의 생육과 비례 관계에 있지 않고 *Acinetobacter calcoaceticus*의 다당류 생산과 *Xanthomonas campestris*에 의한 xanthan gum의 생산처럼 혼합된 형태를 보였다(17, 18). *Bacillus* sp. LK-1의 경우에 있어서는 영양세포가 ellipsoi-

dal cell로 전환하는 48hr에서 가장 왕성한 다당류 생산을 보이는 것으로 생각된다. 한편, 다당류의 생성과 발효조내의 점도는 같은 비율로 증가되었으며 발효 72시간 이후부터는 발효조의 배양액에 dead volume 및 channelling 현상이 발생하였고, 배양액의 점도는 배양 120시간에 60,000 cp까지 도달하였다. 이때 다당류의 생산량은 6.2 g/l였으며 대당 기질의 전환율($Y_{p/s}$)은 0.155였다(Fig. 2).

구성당의 조성

HPLC의 분석 결과에 의하면 *Bacillus* sp. LK-1이

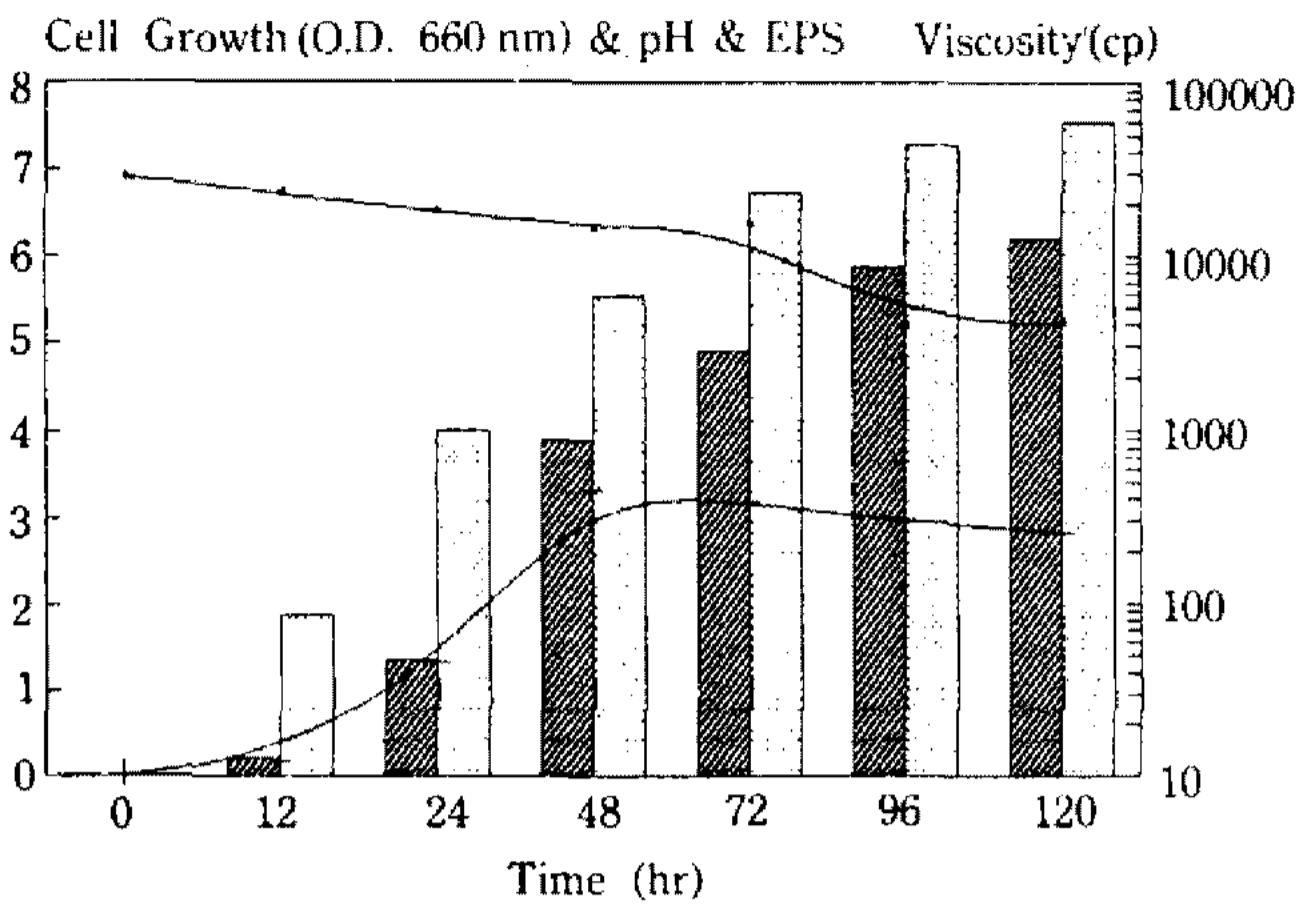


Fig. 2. Growth of *Bacillus* sp. LK-1 and polysaccharides production in jar fermenter.

Jar fermenter type: B. Braun, Biostat, Germany
 Medium composition: sucrose 4%, tryptone 0.75%, Winogradsky's mineral medium stock solution 5 ml/l, CaCO₃ 0.01%, pH 7.0
 Inoculum size: 5%, Working volume: 1.5 l, Temperature: 28°C, Aeration volume: 1 vvm, Impeller speed: 300 rpm~1200 rpm
 Seed culture: Czapeck broth+0.2% yeast extract, 150 rpm, 30°C, 24 hr.
 —•— pH, —: Cell growth, ▨ Viscosity, ▩ EPS

생산하는 다당류는 glucose : glucuronate : xylose : mannose의 구성비가 1 : 2 : 1 : 2로 구성되어 있는 것으로 밝혀졌다(Fig. 3). 이 구성성분은 지금까지 알려진 *Bacillus* sp.의 세균이 생산하는 다당류의 구성 성분과 차이가 있고(19, 20) 신규 다당류일 가능성이 높다. *Bacillus* sp. LK-1이 생산하는 이 다당류를 POL-II로 명명하였다.

POL-II의 물성

다당류의 물성 측정에 사용된 POL-II와 대조 실험으로 쓰인 xanthan gum의 농도는 각각 0.3%로 하였으며 xanthan gum은 food grade(Jungbunzlaur Xanthan Gesellschaft m.b.H., Austria)를 사용하였다.

농도별 점도 : 다당류의 농도를 0.1%에서 1.0%까지 달리하여 측정하였을 때, 동일농도에서 POL-II가 xanthan gum에 비해 높은 점성을 보였으며 xanthan gum 1%는 2,800 cp를 나타낸 반면 POL-II 1%는 31,000 cp를 나타내 상대적으로 10배 이상의 점성을 보였다(Fig. 4). 한편, POL-II는 2%에서 점탄성 및 gel 화가 일어나는 것을 관찰할 수 있었다. 이러한 점도는 Kang 등(21)에 의해 보고된 PS-7, Zanflo 등의 다당류보다 훨씬 높은 점도이다.

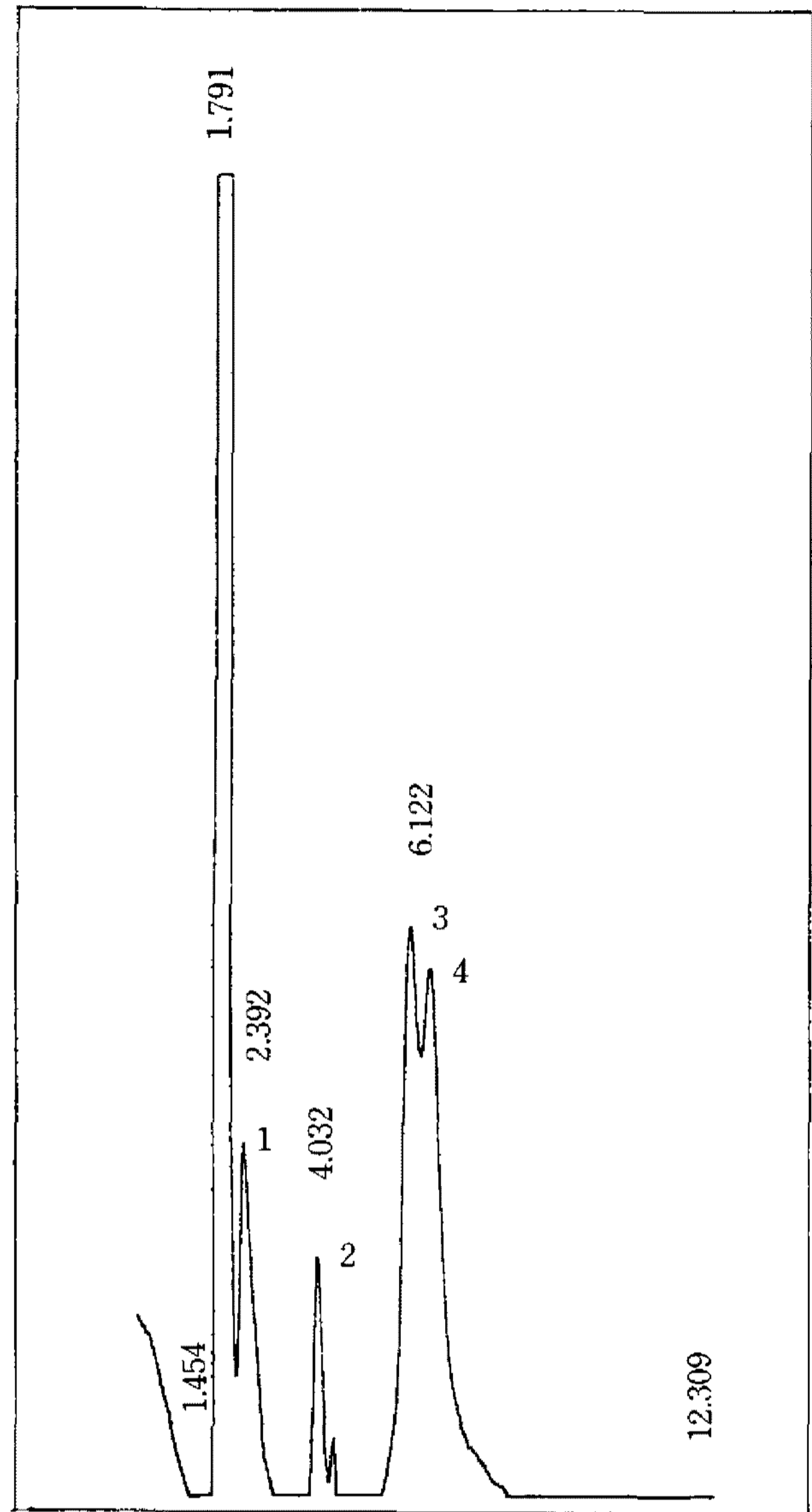


Fig. 3. Sugar component separation of acid hydrolyzed POL-II with HPLC.

HPLC type: Simazu LC-6A, Japan
 Column: μ Bondapak-carbohydrate 0.4 i.d. \times 30 cm
 Elute: water:acetonitrile(15:85) at 2.0 ml/min
 Temperature: 25°C, Detector: RI detector
 1=glucuronic acid; 2=xylose; 3=mannose; 4=glucose

Shear-rate의 변화에 따른 점도변화 : 점도계 spindle의 rpm을 60에서 6까지 달리하여 측정하였을 때, Shear-rate가 감소함에 따라 점도가 증가하는 pseudoplastic한 성질을 보였고 그 경향은 xanthan gum과 유사하였다(Fig. 5).

온도에 따른 영향 : 다당류 용액의 온도를 10°C 에서 80°C 까지 달리하여 측정하였을 때, POL-II 및 xanthan gum은 저온에서는 모두 높은 점도를 나타내었으나 온도가 증가함에 따라 점도는 감소하는 pattern

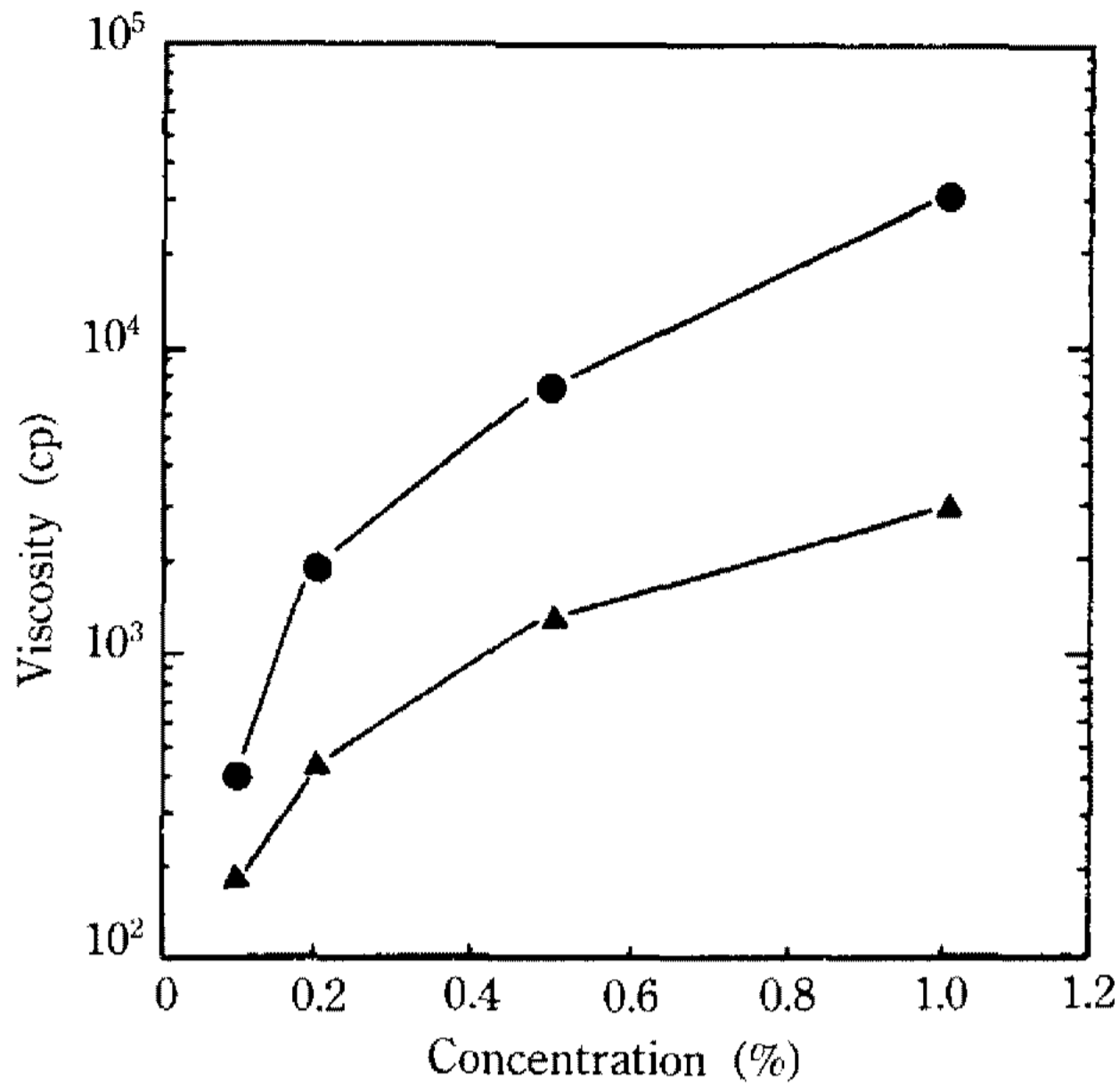


Fig. 4. Comparison of viscosity at different concentration of POL-II and xanthan gum
●: POL-II, ▲: xanthan gum

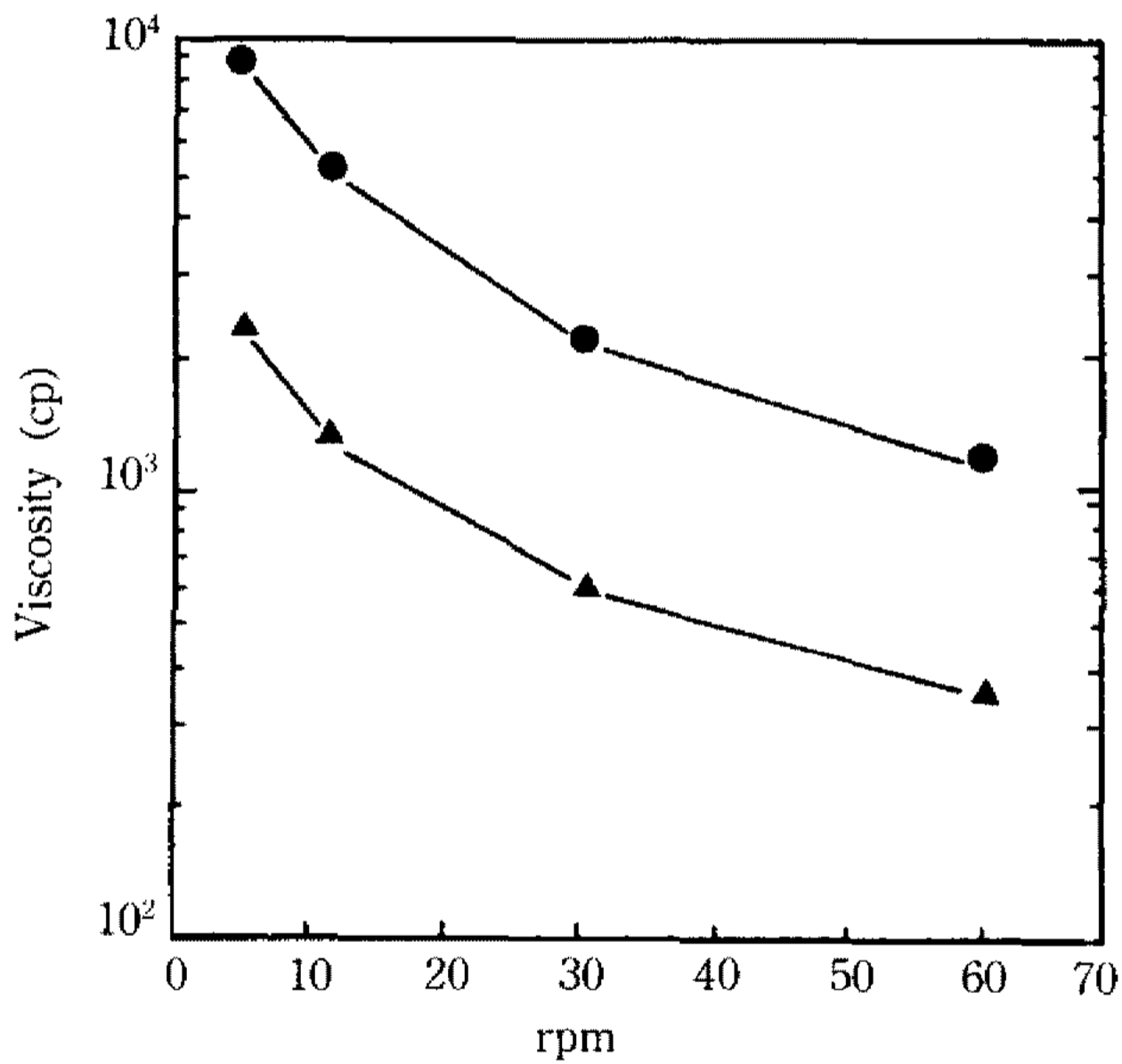


Fig. 5. Effect of shear rate of POL-II viscosity.
●: POL-II, ▲: xanthan gum

(27)을 보였다(Fig. 6).

pH에 의한 영향: 다당류 용액의 pH를 1에서 13까지 달리하여 측정하였을 때, xanthan gum은 전 pH에서 상당한 안정성을 보였으며 POL-II는 pH 7~9 사이에서는 안정하나 그외의 pH 영역에서는 점도가 크게 감소하였다(Fig. 7).

염의 농도에 의한 영향: NaCl의 농도를 0.1%에서 5%까지 달리하여 측정하였을 때 NaCl의 농도 증가에 따라 xanthan gum은 그다지 영향을 받지 않았으나

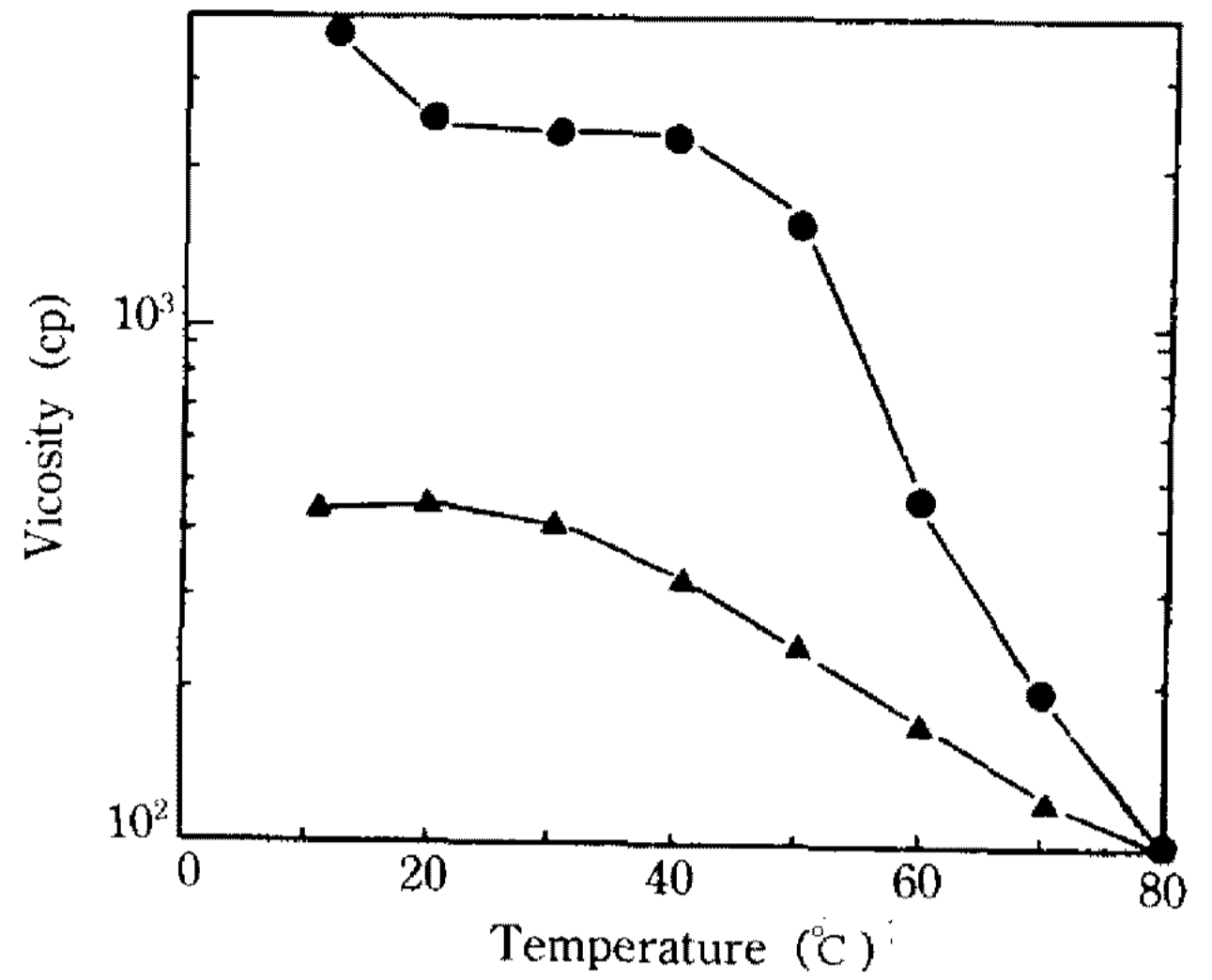


Fig. 6. Effect of temperature on POL-II viscosity.
●: POL-II, ▲: xanthan gum

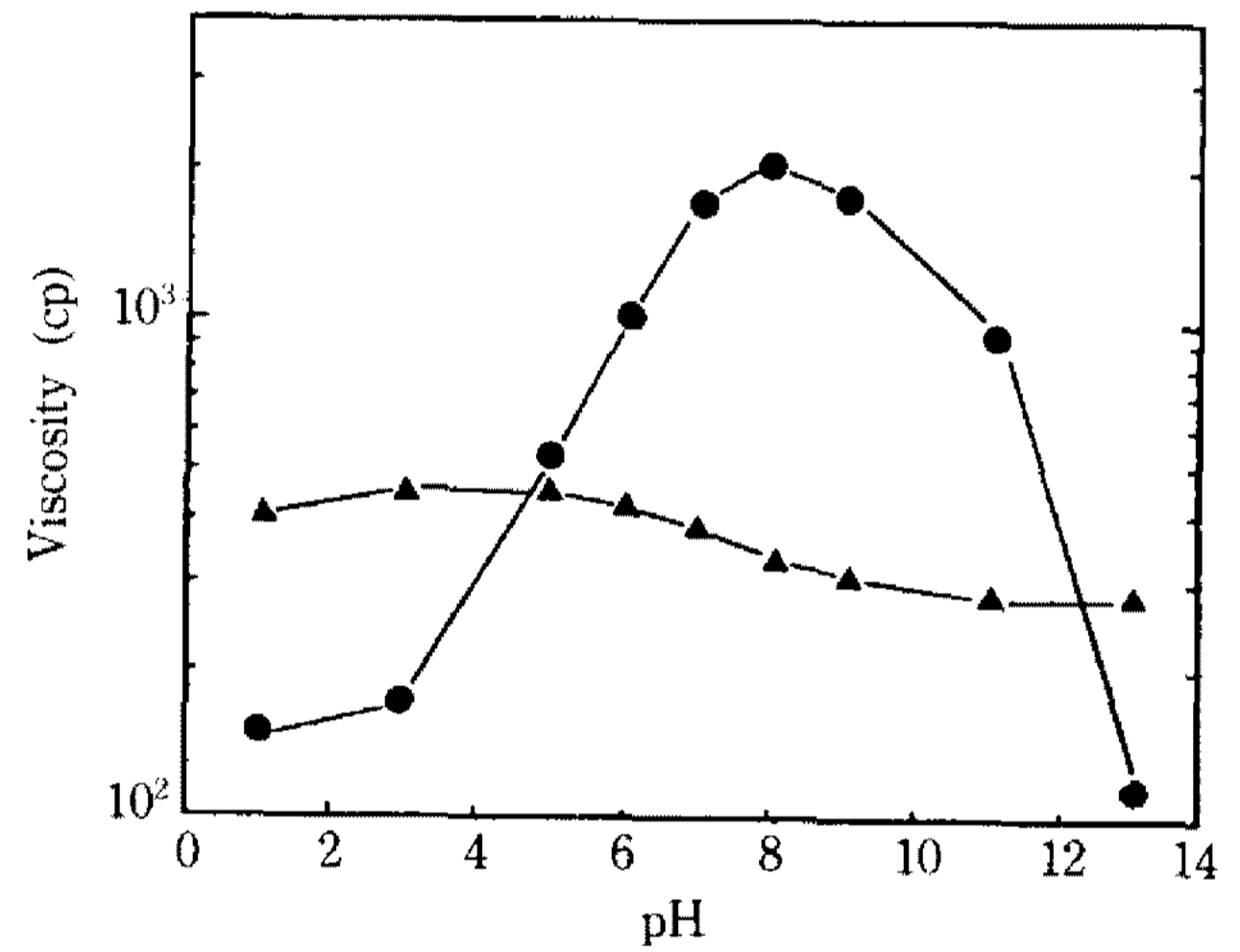


Fig. 7. Effect of pH on POL-II viscosity.
●: POL-II, ▲: xanthan gum

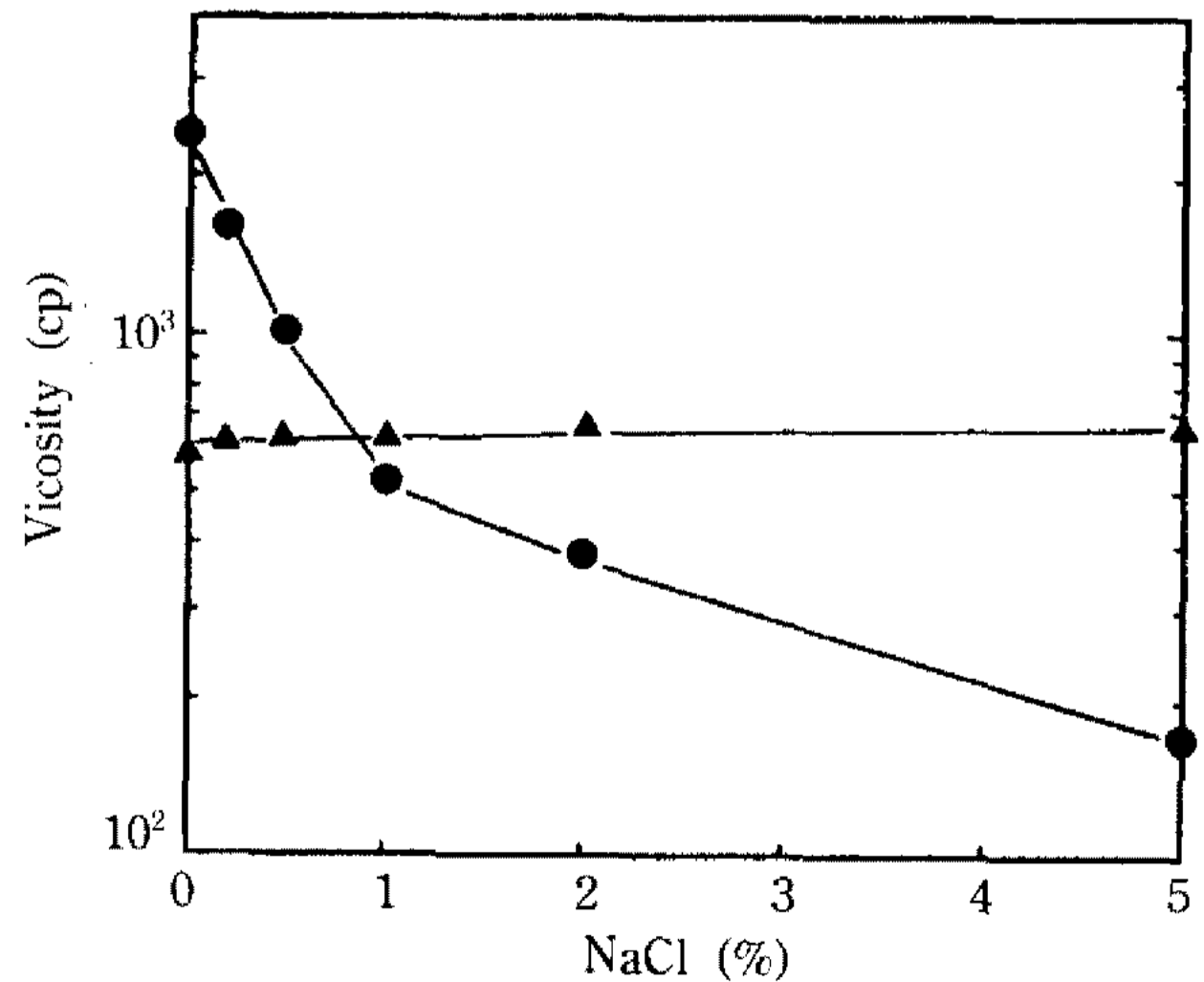


Fig. 8. Effect of NaCl concentration on POL-II viscosity.
●: POL-II, ▲: xanthan gum

POL-II는 NaCl의 농도에 크게 영향을 받는 것으로 나타났다(Fig. 8).

이상의 결과에서 POL-II는 수용액 상태에서 높은 점도를 나타내고 pseudoplastic 경향도 커서 여러가지 용도의 점도 증강제 및 첨가제로서 식품, 화장품, 농업용 등으로 사용될 수 있으며 온도, pH, 염에 대한 점도변화는 현재 시판되고 있는 xanthan gum에 비해 다소 큰 것으로 나타났다.

기타 특성

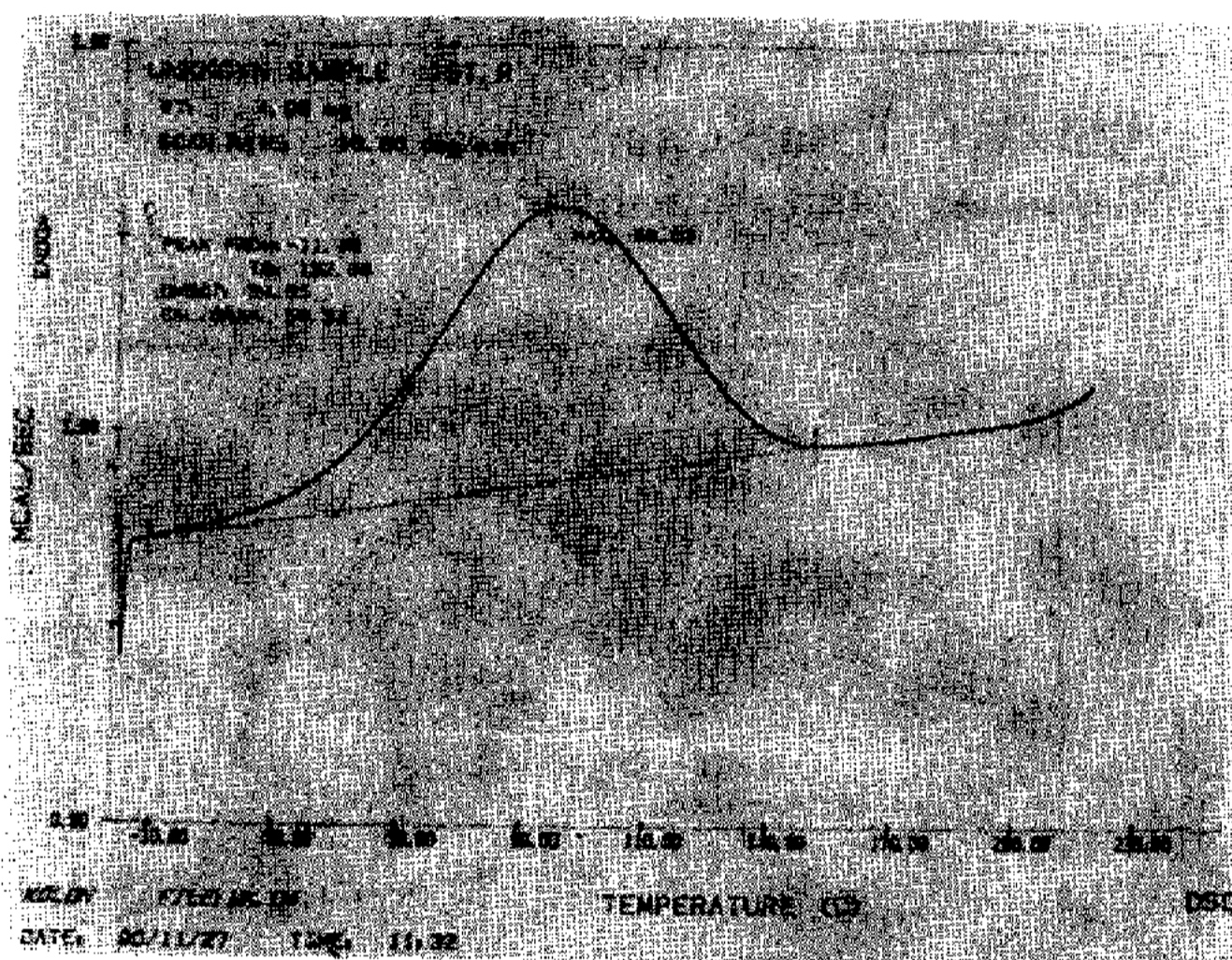


Fig. 9. DSC pattern of POL-II.

DSC thermogram 결과 86°C 부근에서 단일 흡열 peak가 관찰되었고(Fig. 9) POL-II의 IR spectrum은 당류에 전형적인 OH, CH, CO의 stretching bands를 나타냈으며 1734 cm⁻¹에서 gluconate의 ketone group을 나타내었다(Fig. 10). POL-II의 분자량은 80만 dalton 이상인 것으로 나타났다. POL-II는 색소를 가지고 있지 않으며 수용액상에서 투명하고 cetylpyridinium chloride(CPC)와 반응하며 음의 하전을 가진 polyelectrolyte의 특성을 나타내었다.

요 약

토양에서 분리한 고점도 다당류 생산 균주 LK-1을 동정한 결과 *Bacillus* sp.로 추정되어 최종적으로 *Bacillus* sp. LK-1으로 명명하였다. 본 균주가 생산하는 다당류(POL-II)의 발효조에서의 대당 수율은 15.5% (6.5 g/l)였으며 이때 점도는 60,000 cp였다. POL-II의 구성당은 glucose : glucuronate : xylose : mannose이며, 그 구성비는 1 : 2 : 1 : 2이다.

한편, POL-II는 대조구 xanthan gum과의 성질 비교에 있어 xanthan gum보다 훨씬 높은 점도를 보이며 1% 용액에서 xanthan gum에 비해 상대적으로 약 10배의 점도를 나타내었다. 또, extreme pH와 50°C 이상의 온도 및 NaCl의 첨가에 의해서 점도가 감소

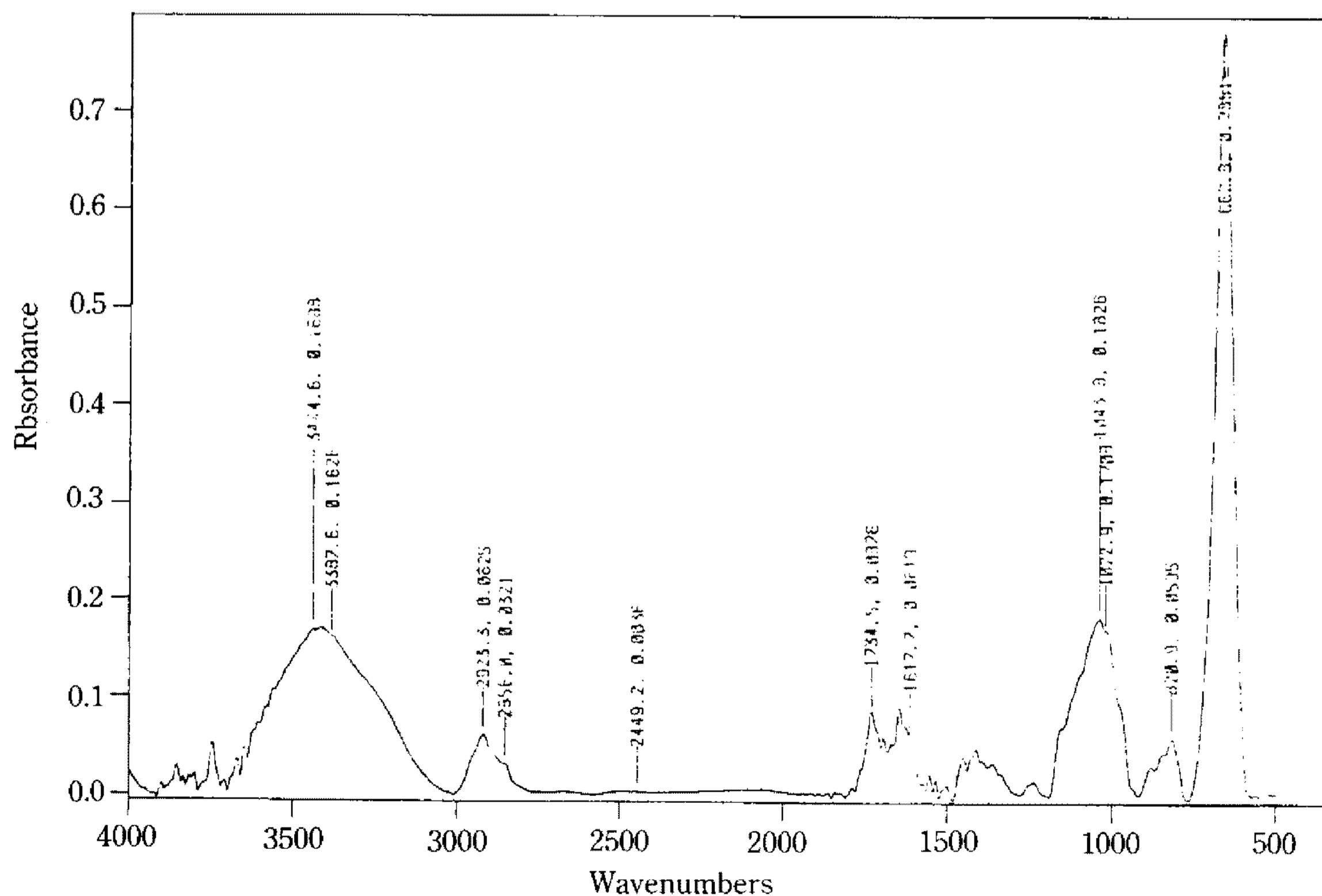


Fig. 10. IR spectrum of Pol-II.

하는 현상을 보였다. DSC와 IR spectrum의 결과에서 독특한 특성을 보였으며 수용액상에서 투명하며 음의 하전을 가진 polyelectrolite의 특성을 가지고 있고 film 형성능이 우수한 것으로 판명되었다.

감 사

다당류의 물성조사에 도움을 주신 코오롱 그룹 중앙연구소 박호진 실장과 연구원들에게 깊이 감사드립니다.

참고문헌

1. Tako, M., A. Sakae and S. Nakamura. 1989. Rheological properties of gellan gum in aqueous media. *Agri. Biol. Chem.* **53**: 771-776.
2. Kanazawa, Y., A. Korceda, A. Harada and T. Harada. 1989. Electron microscopy of the gel-forming ability of polysaccharide food additives. *Agri. Biol. Chem.* **53**: 979-986.
3. Kang, K.S., G.T. Veeder and I.W. Cottrell. 1983. In Progress in industrial microbiology. M.E. Bushell(eds.), Vol. 18. Some novel bacterial polysaccharides of recent development. Pp. 231-253.
4. Rosenberg, E., A. Zuckerberg, C. Rubinovitz and D.L. Gutnick. 1979. Emulsifier of *Athrobacter* RAG-1. Isolation and emulsifying properties. *Appl. Environ. Microbiol.* **37**: 402-408.
5. Neu, T.R., and K. Poralla. 1990. Emulsifying agents from bacteria isolated during screening for cells with hydrophobic surfaces. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **32**: 521-525.
6. Margaritis, A. and J.E. Jajic. 1978. Mixing, mass transfer, and scale-up of polysaccharide fermentation. *Biotechnol. Bioeng.* **20**: 939-1001.
7. Lawson, C.J. 1977. Production of industrially important gum with particular reference to xanthan gum and microbial alginate. *ACS Sym. Ser.* **41**: 282-296.
8. Cottrel, I.W. 1980. Industrial potential of fungi and bacterial polysaccharides. *ACS Sym. Ser.* **126**: 251-270.
9. Slodki, M.E. and M.C. Cadmus. 1978. Production of microbial polysaccharides. *Adv. Appl. Microbiol.* **23**: 19-54.
10. Margaritis, A. and G.W. Pace. 1985. Microbial polysaccharides, (M. Moo-Yoong ed.) Comprehensive Biotechnol. Program press, New York, Vol. 3, Pp. 1005-1044.
11. Sutherland, I.W. and D.C. Ellwood. 1979. In Microbiol Technology. Bull, A.T., D.C. Ellwood and C. Ratledge(eds.), Cambridge University Press, *SGM Symp. Ser.* **29**: 107-119.
12. Glicksman, M. 1982. Food hydrocolloides. Pp. 125-149. CRC Press, Vol. 1.
13. Peter, H.A.S., S.M. Nicholas, M.E. Sharpe and J.G. Holt. 1984. Bergey's manual of systematic bacteriology, Vol. 2. 2nd eds.
14. Macfaddin, J.F. 1984. Biochemical tests for identification of medical bacteria. Williams & Wilkins, 2nd edition. U.S.A.
15. Komagata, K. and K. Suzuki. 1987. In Methods in Microbiology, Vol. 19, R.R. Colwell and R. Grigorova eds. Pp. 161-204, Academic press, U.S.A.
16. Tchan, Y.T. and P.B. New. 1984. In Bergey's manual of Systematic bacteriology Vol. 1, N.R. Krieg and J.G. Holt eds. Pp. 220-229, Williams and Wilkins press, U.S.A.
17. Catly, B.J. 1978. Pullullan synthesis by *Aurobasidium pullulans*. In Microbial polysaccharides and polysaccharides (RCW Berkeley eds.). Academic Press, London.
18. Kaplan, N. and Z. Rosenberg. 1982. Exopolysaccharide distribution and bioemulsifier production by *Acinetobacter calcoaceticus* BD4 and BD413. *Appl. Environ. Microbiol.* **44**: 1335-1441.
19. Sutherland, I.W. 1972. Extracellular polysaccharides. *Adv. Sympo. Ser.* **45**: 40-57.
20. Jarman, T.R., L. Deavin, S. Slocombe and R.C. Righelato. 1976. Investigation of the effect of environmental condition on the rate of exopolysaccharides synthesis in *Azotobacter vinelandii*. *J. Gen. Microbiol.* **107**: 59-64.
21. Kang, K.S. and I.W. Cottrel. 1979. Polysaccharides in Microbial Technology. Vol. 1, 2nd. (H.J. Peppier & D. Periman eds.). Academic Press, U.S.A.

(Received August 4, 1993)