

Metarrhizium anisopliae(Metschn.) Sorok이 생산하는 Biopolymer YU-122의 생산과 그 특성

최용석, 옥승호, 유주현, 배동훈^{1*}

연세대학교 식품생물공학과 및 생물산업소재연구센터,
¹단국대학교 식품공학과 및 생물산업소재연구센터

Production of Biopolymer YU-122 from *Metarrhizium anisopliae* (Metschn.) Sorok. Choi, Yong-Suk, Seung-Ho Ohk, Ju-Hyun Yu and Dong-Hoon Bai^{1*}. Department of Food and Biotechnology, and Bioproduct Research Center, Yonsei University, Seoul, 120-749, Korea, ¹Department of Food Engineering, Dankook University, Chunan, 330-174, Korea - To produce biopolymer, *Metarrhizium anisopliae* (Metschn.) Sorok was cultured in a medium containing glucose 1.0%, sucrose 2.0%, soluble starch 1.0%, yeast extract 0.5%, polypeptone 0.5%, K₂HPO₄ 0.1%, MgSO₄ · 7H₂O 0.02%. The culture broth was centrifuged and the polymer was harvested by adding methanol to the culture supernatant. When three times of methanol was added, the polymer was coagulated and precipitated. Then it was further purified through successive SK-1B, SA-20P, HP-20 column chromatographies. This polymer was designated as Biopolymer YU-122. C:H ratio of this Biopolymer YU-122 was 1:2 and small amount of N is detected by CHN analyzer. Glucose and galactose are main components of this polymer. Average molecular weight of this biopolymer was 1.7 × 10⁶ by Sepharose 4B gel permeation chromatography. Optimal condition for biopolymer production was investigated. When 5% of mannitol was used as a carbon source, and polypepton as a N source, highest productivity of biopolymer was achieved. C/N ratio as nutrient was also a major factor in polymer production and its optimal ratio was 3.

다당류는 젤형성능, 유화 안정성 및 표면장력 등의 조절능력을 가지고 있어 수용액의 물성학적 성질을 크게 변화시키므로 그 특성에 따라 각종 식품 및 화학공업에서 광범위하게 쓰이고 있다(1-9). 그 외에도, 미생물이 생산하는 다당류는 이미 알려진 식물성 다당류나 기타 합성고분자와는 달리 독특한 물성과 생리활성을 나타낸다. 항종양성, 면역증강제, 콜레스테롤 대사, 의료용 접착제 및 drug release carrier로서의 특징이 인정되어 의약품(10, 11)으로서도 주목을 받고 있다.

본 연구는, 토양으로부터 분리한 *Metarrhizium anisopliae*(Metschn.) Sorok이 배양조건에 따라 세포용해효소와 더불어 점질 물질을 생산함을 발견하여, 이 균주가 생산하는 다당류의 특성 및 구성성분을 규명하여 기존 다당류와 비교하였다. 또한, 이 균주를 사용하여 다당류의 생산조건을 확립하여, 미생물이 생산하는 다당류를 발효법에 의한 대량생산을 통하여 산업화의 가능성을 검토하였다.

재료 및 방법

균주의 배양과 Biopolymer의 정제

*Corresponding author
Tel. 82-417-550-3562, Fax. 82-417-554-4769
Key words: Biopolymer, *Metarrhizium anisopliae* (Metschn.) Sorok

PDA medium(Difco) 사면배지에 균체를 접종한 후 30°C에서 7일간 배양하여 포자가 충분히 형성되도록 한 후 살균된 포자 현탁용 용액(0.7% NaCl, 0.07% Tween 80)을 첨가한 다음 vortex mixer를 이용, 포자 현탁액을 제조하였다. 포자의 수는 2 × 10⁵ CFU/ml가 되도록 하였다.

균주를 glucose 1.0%, sucrose 2.0%, starch 1.0%, yeast extract 0.5%, polypepton 0.5%, K₂HPO₄ 0.1%, MgSO₄ · 7H₂O 0.02%, pH 6.6의 조성으로 한 기본배지에 접종하여 8일간 배양하고 배양액을 2배 희석한 후 9,000 × g에서 20분간 원심분리하여 균체를 제거하고, 상등액에 3배 부피의 methanol을 첨가하여 교반봉으로 휘저으면서 침유상의 biopolymer를 얻었다. 이를 메탄올로 세척한 후 물에 녹이고, 다시 메탄올을 첨가하여 침전시키는 처리를 3회 반복한 후 biopolymer를 얻었다. 이것을 다시 물에 녹인 후, SK-1B column chromatography, SA-20AP column chromatography, HP-20 column chromatography를 행하여 불순물을 제거하고 동결건조하여 정제된 biopolymer를 얻었다. 이 건조 biopolymer를 Biopolymer YU-122로 명명하였다.

Biopolymer 생산최적조건은 기본배지 200 ml을 1 L 삼각 플라스크에 넣어 121°C에서 15분간 살균한 다음 포자현탁액을 1%(v/v)가 되도록 접종하여 30°C에서 8일간

배양하여 검토하였으며 균체량은 배양액 100 ml를 취하여 9,000×g에서 20분간 원심분리한 후 상등액을 제거한 pellet의 부피(PMV, Packed Micellium Volume, ml)로 측정하였다.

Polymer의 농도 및 점도측정

배양액중의 biopolymer의 농도에 따라 점도가 증가함(data not shown)을 이용해, 배양액의 점도를 측정함으로써 biopolymer의 농도를 결정하였다. 점도측정은 Viscometer(LV, Brookfield)를 사용하였고 spindle은 SC4-34형을 사용하였으며 물성특성값의 산출은 Power Law 식($\tau=kD^n$)으로 계산하였다(τ =shear stress, D =shear rate, k =consistency index, n =flow behavior index).

Biopolymer의 성분분석

분리된 biopolymer의 단백질 함량을 Bradford(12)법에 의하여 정량 하였고, 총당량은 phenol sulfuric acid법(13)에 의하여 정량 하였다. C, H, N 함량분석은 시료 1 g을 90°C에서 건조시킨 후 CHN Analyzer(CORDER MT-3 Tanaco, Japan)로 분석하였다.

Biopolymer의 구성당분석

Biopolymer YU-122의 구성당 분석은 Sutherland 등(15)의 방법을 변형하여 사용하였다. 2 mg의 polymer에 2 N의 HCl 0.2 ml를 넣은 다음 100°C에서 3시간 가수분해하였다. 이 Biopolymer 가수분해물 5 μ l를 silica gel plate(Sigma Co.)에 spotting하고 전개용매는 buthanol: ethanol: water=2: 2: 1로 하여 5시간 전개시켰으며 phthalic acid 1.66 g, acetone 100 ml, aniline 0.9 ml를 사용하여 발색하고, 표준시료와 Rf값을 비교하여 구성당 성분을 확인하였다. 또한 Biopolymer YU-122의 가수분해물을 Sep-pak(C18 cartridge, Millipore Co.) 및 filter (0.2 m, Millipore Co.)로 여과하고, Waters sugarpack column을 사용하여 HPLC(Waters 600E) 분석에 사용하였다. Degassed H₂O를 전개용매로하여 유속 0.6 ml/min., injection volume은 20 μ l, column temperature는 30°C의 조건으로, RI detector(Waters 410)를 사용하여 표준당류와 용출시간을 비교하여 분석하였다.

Biopolymer의 분자량 측정

분자량 측정을 위해 증류수로 충분히 용출 시킨 Sepharose 4B(Sigma Co., Ltd) column(1×70 cm)을 이용하여 gel permeation chromatography를 하였다. 표준물질로서는 분자량 200만, 58만, 5만 dalton인 dextran(Sigma Co., Ltd)을 각각 0.2%용액으로 하여 1 ml씩 loading한 뒤 시간당 12 ml의 유속으로 4 ml씩 분취하였으며 총 탄수화물의 양은 phenol-sulfuric acid법으

로 측정하였다. 이때 void volume(V_0)은 blue dextran (M.W.: 2,000,000 dalton)을 이용하여 결정하였으며 다당류의 분자량은 V_0 에 대한 표준물질의 elution volume(V_e)의 비율(V_e/V_0)과 log scale의 분자량과의 관계를 표준곡선으로 나타내어 분자량을 결정하였다.

결 과

Biopolymer YU-122의 생산조건

Biopolymer YU-122 생산에 대한 배양온도의 영향 *Metarrhizium anisopliae*(Metschn.) Sorok의 Biopolymer YU-122 생산에 대한 배양온도의 영향을 검토한 결과를 Fig. 1에 나타내었다. 배양온도 20°C에서부터 30°C까지 점차로 균체의 생육과 점도가 모두 증가하였으며, 35°C에서 급격히 감소하여 45°C 이상에서는 균체의 생육이 전혀 불가능하였다. 따라서, *Metarrhizium anisopliae*(Metschn.) Sorok의 생육과 Biopolymer YU-122 생산 최적온도는 30°C이었으며, 일반적으로 균의 생육최적온도와 polymer 생산 최적온도가 거의 비슷하다는 종래의 보고와 같은 양상을 보였다(14).

Biopolymer YU-122 생산에 대한 배양초기 pH의 영향

pH 조절의 결핍 또는 배지 완충작용이 약한 것은 균체의 생육뿐만 아니라 생산물의 수율에도 큰 영향을 미친다. Sutherland 등(15)은 biopolymer 생산 균주에 있어서도 pH의 변화는 biopolymer 생산을 감소시키며 균체의 성장을 멈추게 한다고 보고하였다. 따라서 biopolymer 생산에 대한 배지의 초기 pH의 영향에 대하여 검토한 결과

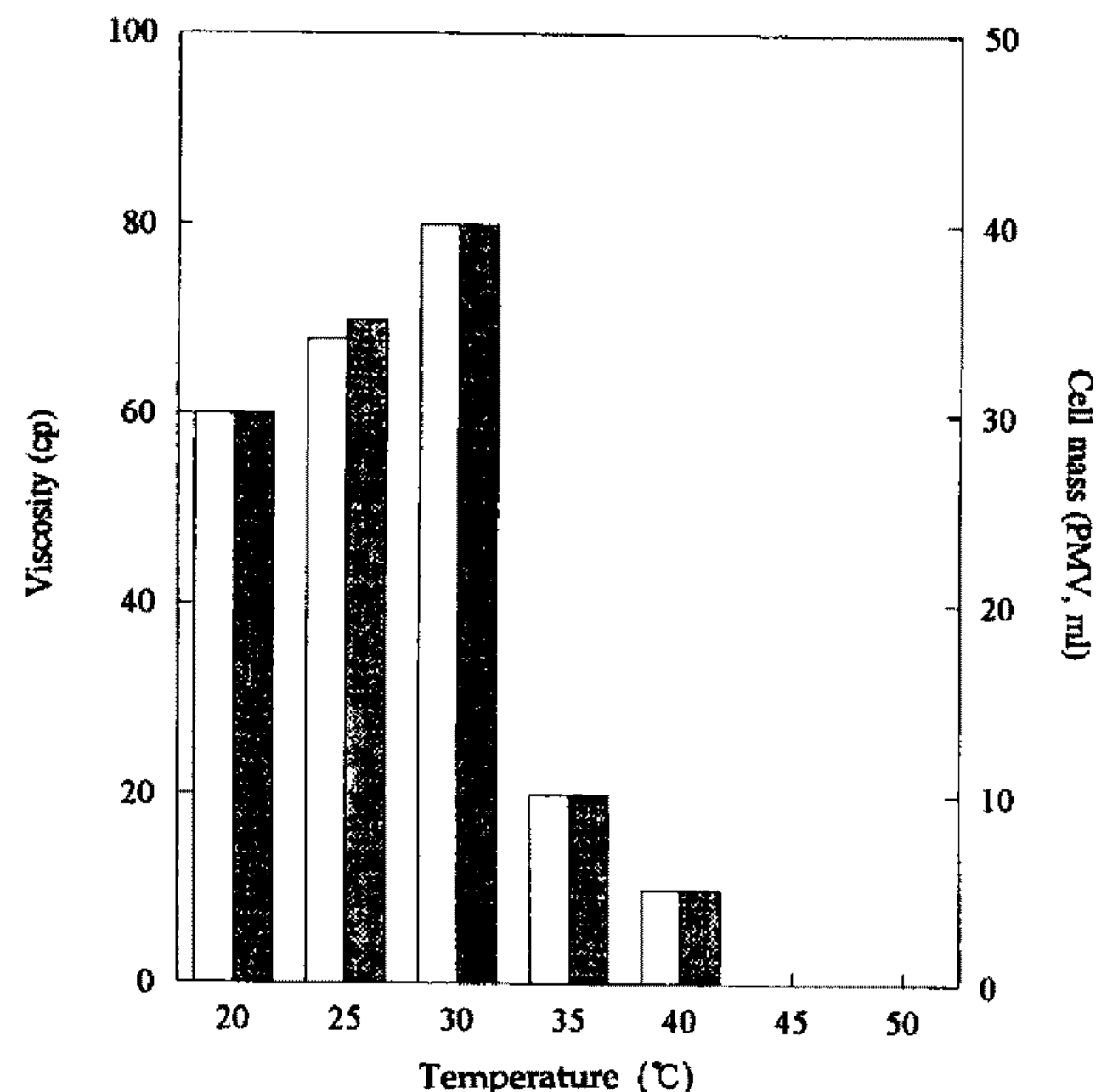


Fig. 1. Effect of temperature on the biopolymer production of *Metarrhizium anisopliae* (Metschn.) Sorok.

□; viscosity, ■; cell mass

pH 5.0에서 최적 생육과 최대의 biopolymer 생산을 나타내었다(Fig. 2). biopolymer의 생산에 대한 적정 pH는 미생물의 종에 따라 많은 차이를 나타내지만 일반적으로 중성의 pH가 많은 것으로 보고되고 있으며, *Rhodotorula glutinis*의 경우는 최적 pH가 2.8인 것으로 보고되고 있으며 알칼리 영역에서 biopolymer를 생산하는 균주도 보고되고 있다(16, 17). 또한 균주의 생육과 biopolymer 생산의 최적 pH가 서로 다른 경우도 보고되고 있다(18).

Biopolymer YU-122 생산에 대한 탄소원의 영향 탄소원은 균체 생육을 위한 필수 영양소일뿐만 아니라 biopolymer를 생산함에 있어서 없어서는 안되는 영양원으로서 탄소원의 종류가 생산되는 biopolymer의 양과 질에 영향을 미치는 것으로 보고되고 있다(19). *Metarrhizium anisopliae*(Metschn.) Sorok이 Biopolymer YU-122를 생산함에 있어서 최적탄소원을 결정하기 위하여 여러 종류의 탄소원을 함유한 배지에서 배양한 결과를 Fig. 3에 나타내었다. *Metarrhizium anisopliae*(Metschn.) Sorok의 경우 sucrose를 탄소원으로 자화하지 못하여 균체의 생육이 전혀 일어나지 않았으며, 다른 모든 경우에는 왕성한 균체의 생육을 보였다. 그러나 biopolymer의 생산에 있어서는 mannitol을 탄소원으로 사용한 경우가 glucose 또는 sorbose를 사용한 경우보다 2배 이상의 배지중 점도를 나타내어 최대이었으며, soluble starch의 경우는 균체의 생육은 왕성하였지만 biopolymer의 생산은 현저하게 감소하였다. 따라서 mannitol의 농도를 변화시키면서 biopolymer의 생산을 검토한 결과 Fig. 4에서와 같이 5%에서 20%까지 모두 점도

가 80 cps 이상으로 최대를 나타냈으나 5% 이상에서는 모두 근소한 차이를 나타내어 biopolymer 생산의 최적농도는 5%로 나타났다.

Biopolymer YU-122 생산에 대한 질소원의 영향 질소원은 균체의 생육에 있어서 중요한 영향을 미치는 인

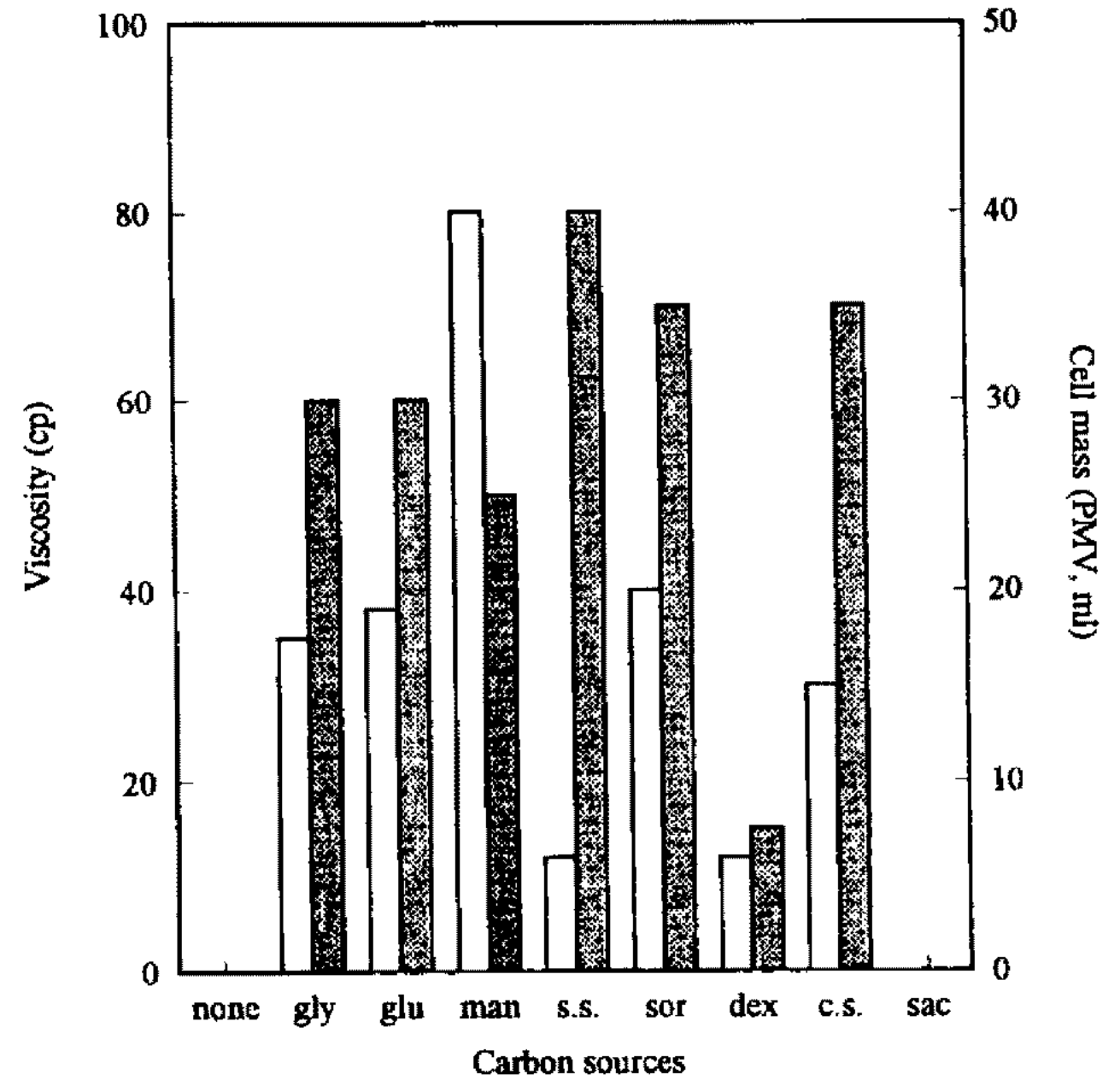


Fig. 3. Effect of carbon sources on the biopolymer production of *Metarrhizium anisopliae* (Metschn.) Sorok.
□; viscosity, ■; cell mass, gly; glycerol, glu; glucose, man; mannitol, s.s; soluble starch, sor; sorbose, dex; dextrin, c.s; corn starch, sac; sucrose

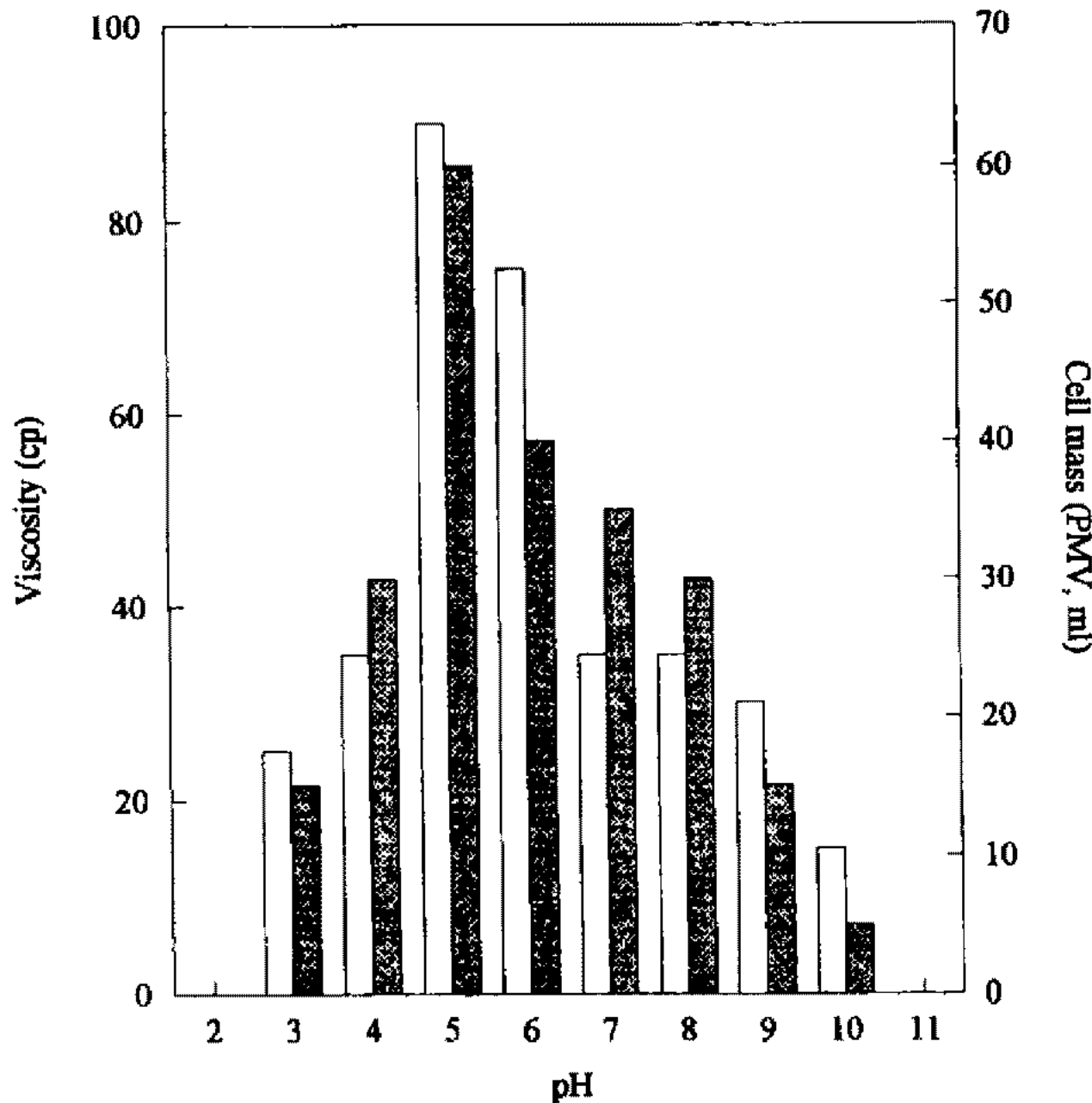


Fig. 2. Effect of initial pH on the biopolymer production of *Metarrhizium anisopliae* (Metschn.) Sorok.
□; viscosity, ■; cell mass

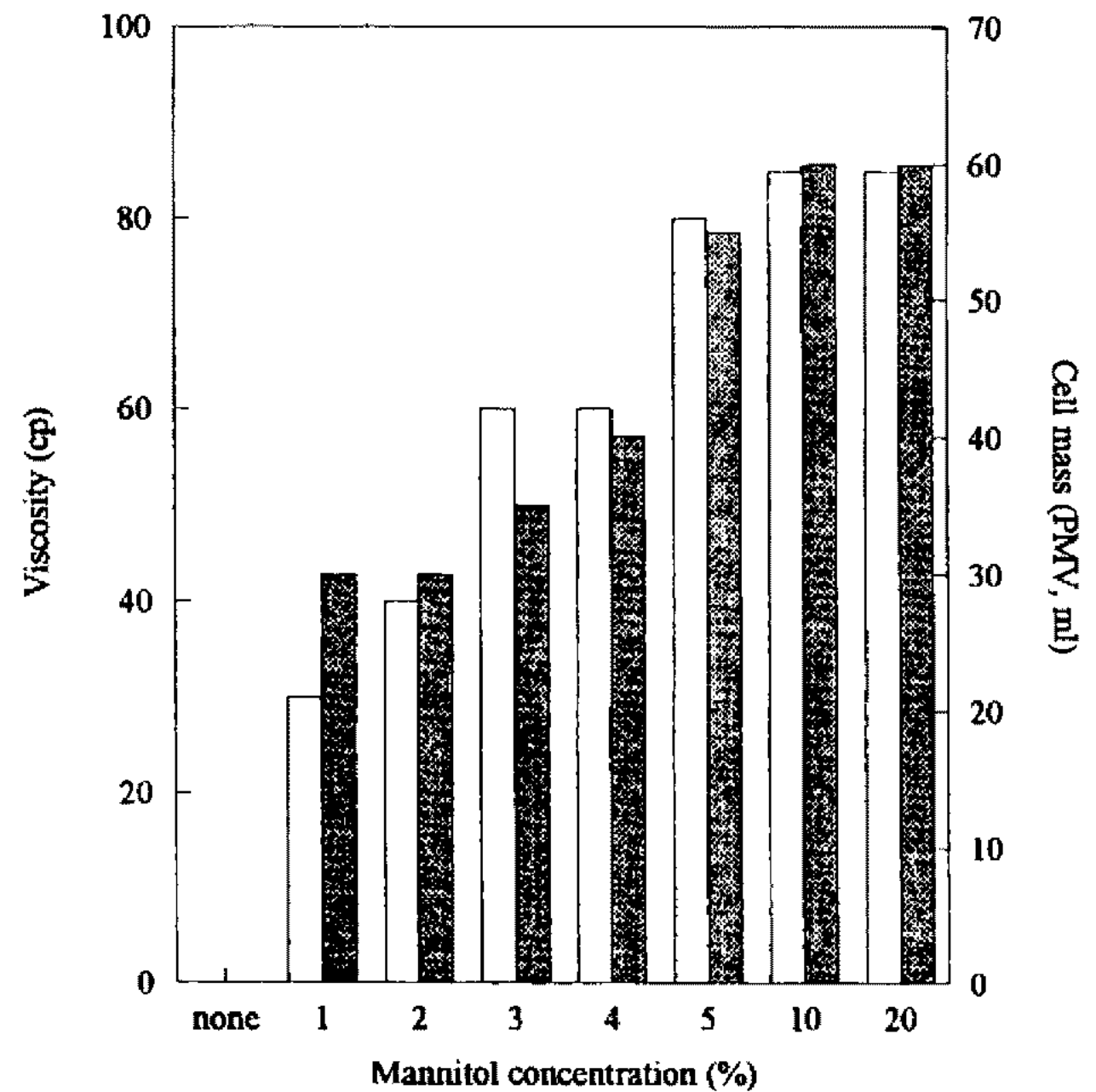


Fig. 4. Effect of mannitol concentration on the biopolymer production of *Metarrhizium anisopliae* (Metschn.) Sorok.
□; viscosity, ■; cell mass

자로 알려져 있다(19). *Metarrhizium anisopliae*(Metschn.) Sorok의 biopolymer 생산에 있어서 질소원의 영향을 알아보기 위하여 탄소원을 mannitol 5%로 고정하고, 유기질소원과 무기질소원을 각각 1%씩 첨가하여 그의 영향을 검토한 결과 Fig. 5에 나타난 바와 같이 polypepton이 첨가된 경우에서 beef extract, soytone을 사용한 경우보다 최대 10배의 점도를 나타내어 최적의 질소원인 것으로 나타났다.

Biopolymer YU-122 생산에 대한 배지의 C/N ratio의 영향 Brierley 등은(20) biopolymer 생산에 있어서 가장 중요한 인자는 탄소원과 질소원의 비인 C/N ratio인 것으로 보고한 바 있다. 이는 균의 생육이 어느 정도 형성된 다음 질소원이 계속 남아 있는 경우 biopolymer의 합성보다는 균주의 증식으로 계속되어 biopolymer의 생산이 이루어지지 않은 것으로 알려져 있어 biopolymer 생산에 있어서 가장 중요한 인자가 되는 것이다. 따라서 biopolymer를 생산함에 있어 최적의 C/N ratio를 검토하였다. 탄소원과 질소원의 합을 전체 배지의 2%로 하여 비율을 변화시켜 검토한 결과를 Fig. 6에 나타내었다. 최적의 C/N ratio는 3으로서 균체의 생육과 biopolymer 생산 모두 최대를 나타내었다.

Biopolymer YU-122 생산에 대한 무기염류의 영향 Biopolymer 생산에 있어서 이온의 중요성은 많은 연구자들로부터 알려져 있어(21), 여러 가지 무기염류의 biopolymer 생산에 미치는 영향을 조사하였다. 각각의 무기염류를 0.1%씩 첨가하여 biopolymer 생산에 미치는

영향을 조사하여 본 결과 K_2HPO_4 가 첨가된 경우에서 최대로서 KH_2PO_4 가 첨가된 경우 보다 3배의 점도를 나타내었으며 $CaCl_2$ 가 첨가된 경우에서도 49 cp의 점도를 나타내어 biopolymer의 생산에 좋은 효과를 나타내었다 (Fig. 7).

Biopolymer YU-122의 구성성분

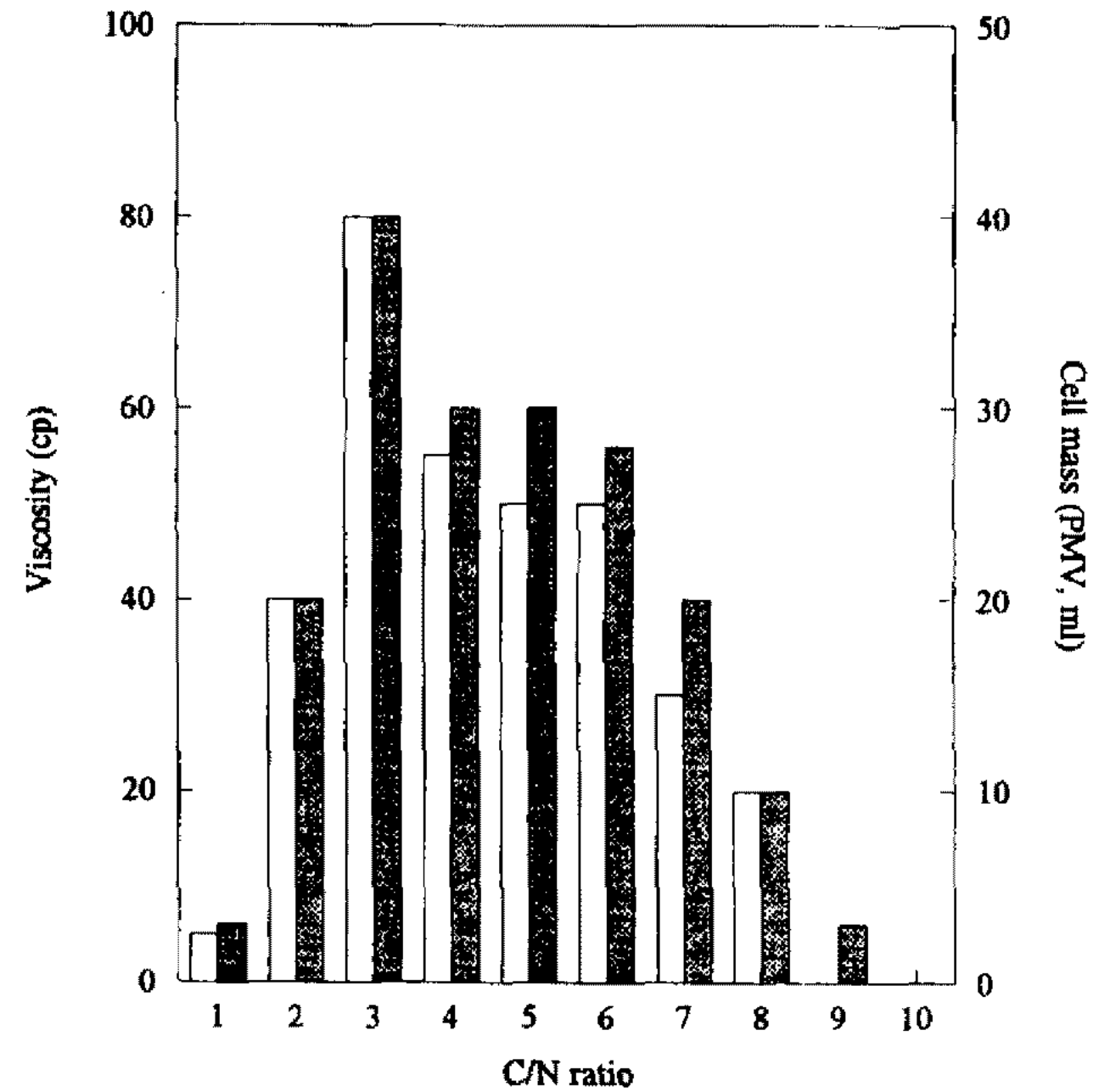


Fig. 6. Effect of C/N ratio on biopolymer production of *Metarrhizium anisopliae* (Metschn.) Sorok. □; viscosity, ■; cell mass

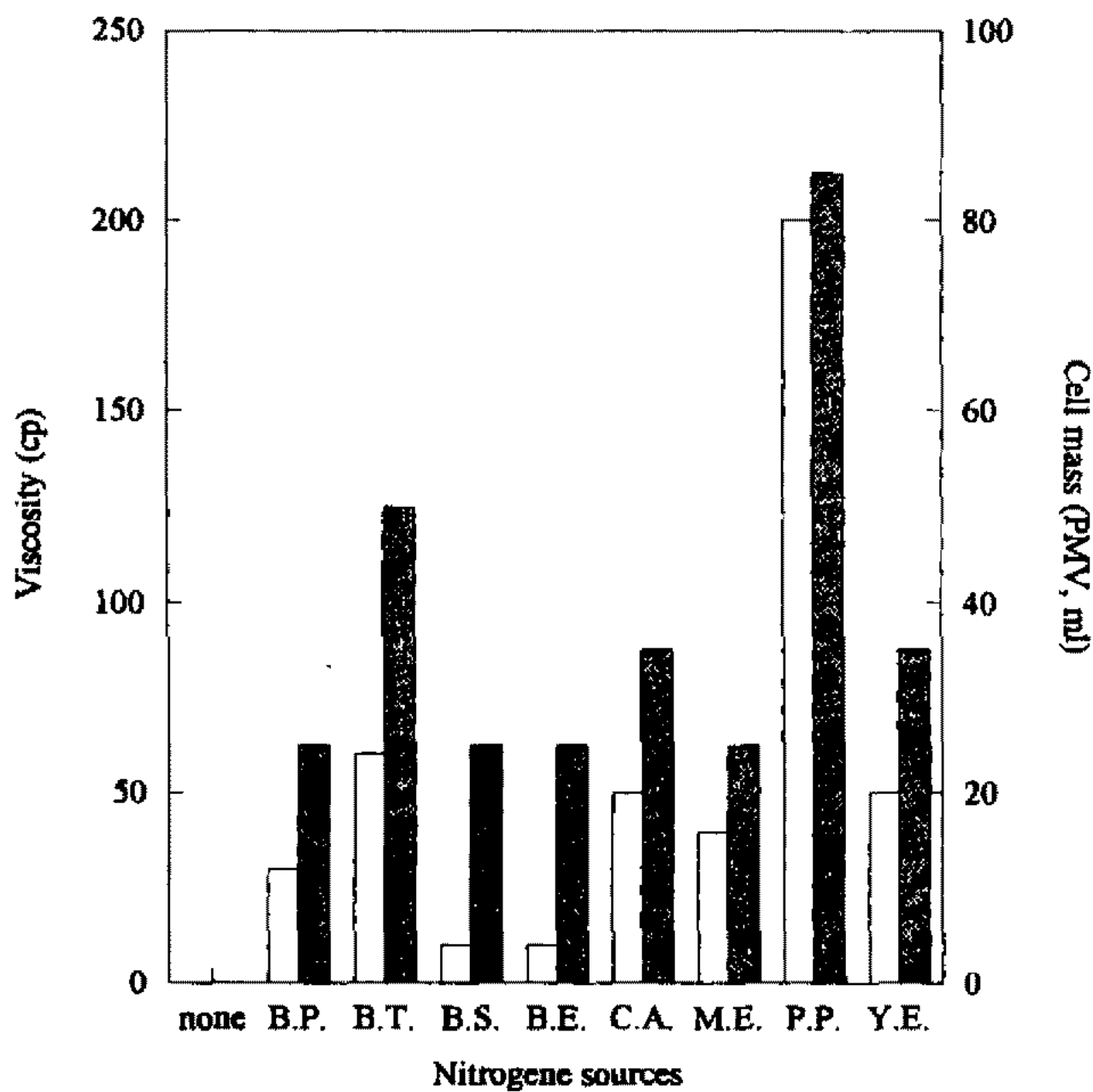


Fig. 5. Effect of nitrogen sources on the biopolymer production of *Metarrhizium anisopliae* (Metschn.) Sorok. □; viscosity, ■; cell mass, B.P; Bacto pepton, B.T; Bacto tryptone, B.S; Bacto oytone, B.E; beef extract, C.A; casamino acid,

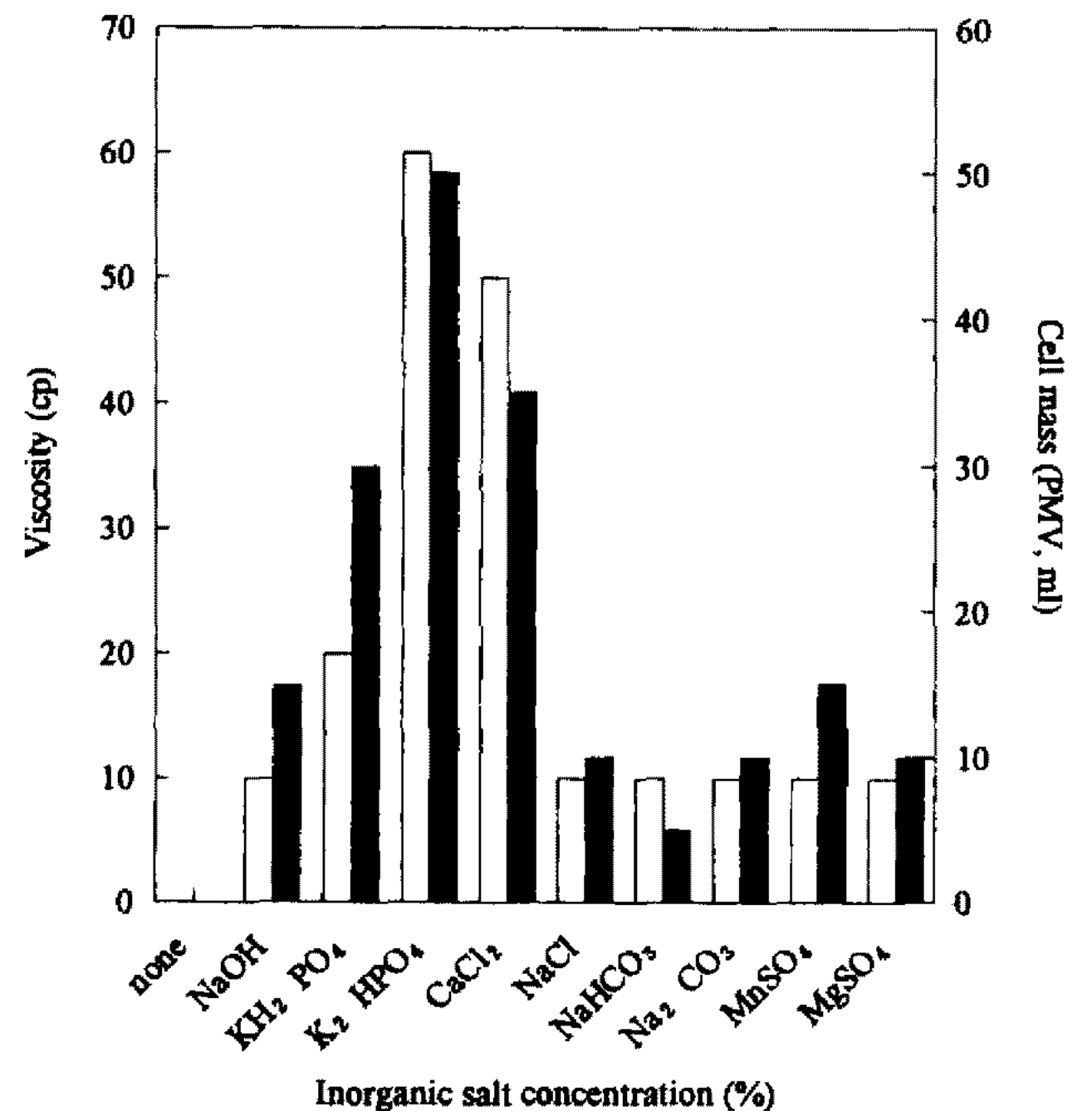


Fig. 7. Effect of inorganic salts on the biopolymer production of *Metarrhizium anisopliae* (Metschn.) Sorok. □; viscosity, ■; cell mass

분리된 biopolymer의 성분을 분석하기 위하여 phenol sulfuric acid법(13)으로 분석한 결과 당을 함유하고 있으며, Fehling법(13)으로 분석한 결과 6N HCl로 가수분해한 시료의 경우만 Cu₂O(적색침전물)가 생기므로 이 당은 환원당임을 관찰할 수 있었다(data not shown). C, H, N, 함량분석을 위해 CHN Analyzer로 분석한 결과 미량의 N이 검출되었으나, 대체로 C: H=1: 2의 비율로 존재함을 나타내었다(Table 1).

Biopolymer YU-122의 구성당의 분석 위하여 Biopolymer YU-122를 염산으로 가수분해한 다음 TLC를 실시한 결과를 Fig. 8에 나타내었다. 가수분해한 Biopolymer YU-122의 경우 Rf 0.6, 0.57의 두 위치에서 spot이 나타났으며 이는 glucose(0.6), galactose(0.57)와 일치하였다. 그 결과 Biopolymer YU-122를 구성하고 있는 구성당 성분으로는 glucose, galactose를 주 구성당으로 함유함을 알 수 있었다. 또한 이를 확인하기 위

Table 1. Relative content of C, H and N in Biopolymer YU-122

	Weight percent	Weight percent/M.W.
N	0.36	0.02
C	38.62	3.22
H	7.12	7.12

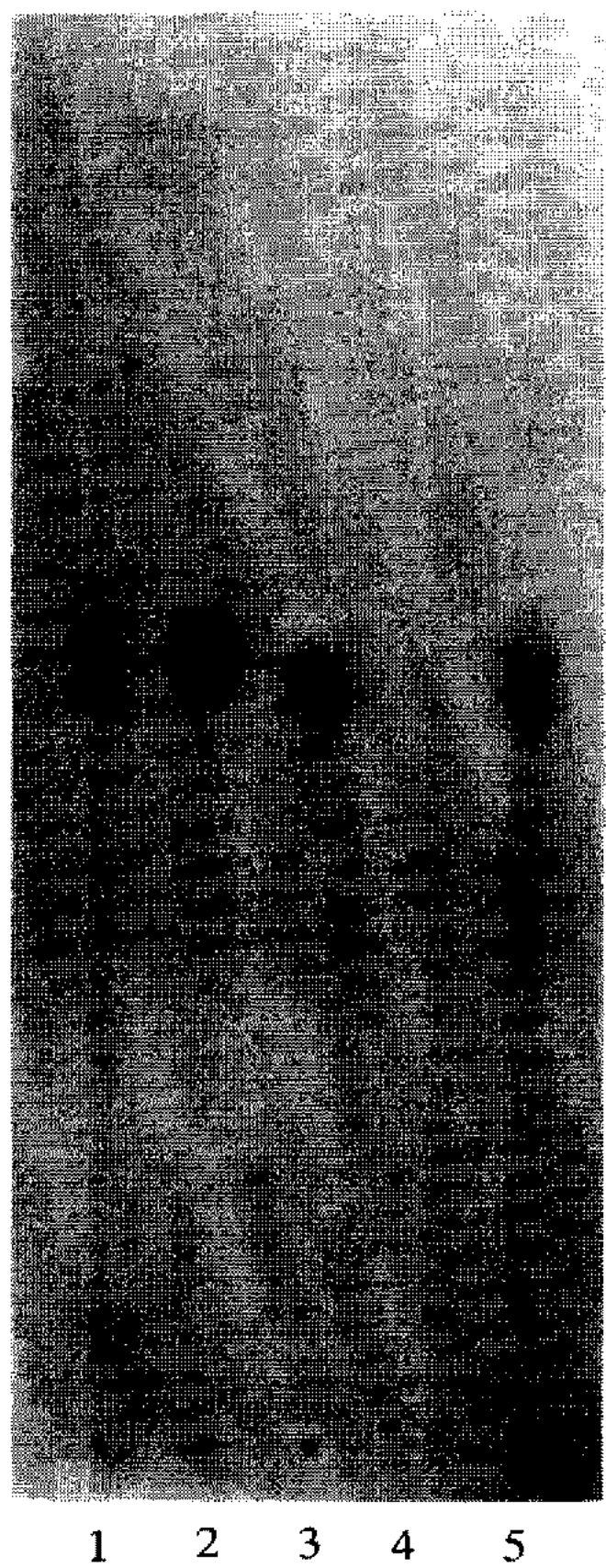


Fig. 8. Thin layer chromatography of Biopolymer YU-122. Lane 1,5; Acid hydrolyzate of the Biopolymer YU-122, lane 2; glucose, lane 3; galactose, lane 4; Biopolymer YU-122

하여 HPLC를 행하였으며, 표준당은 raffinose, glucose, galactose, fructose를 사용하였고 그 결과를 Fig. 9에 나

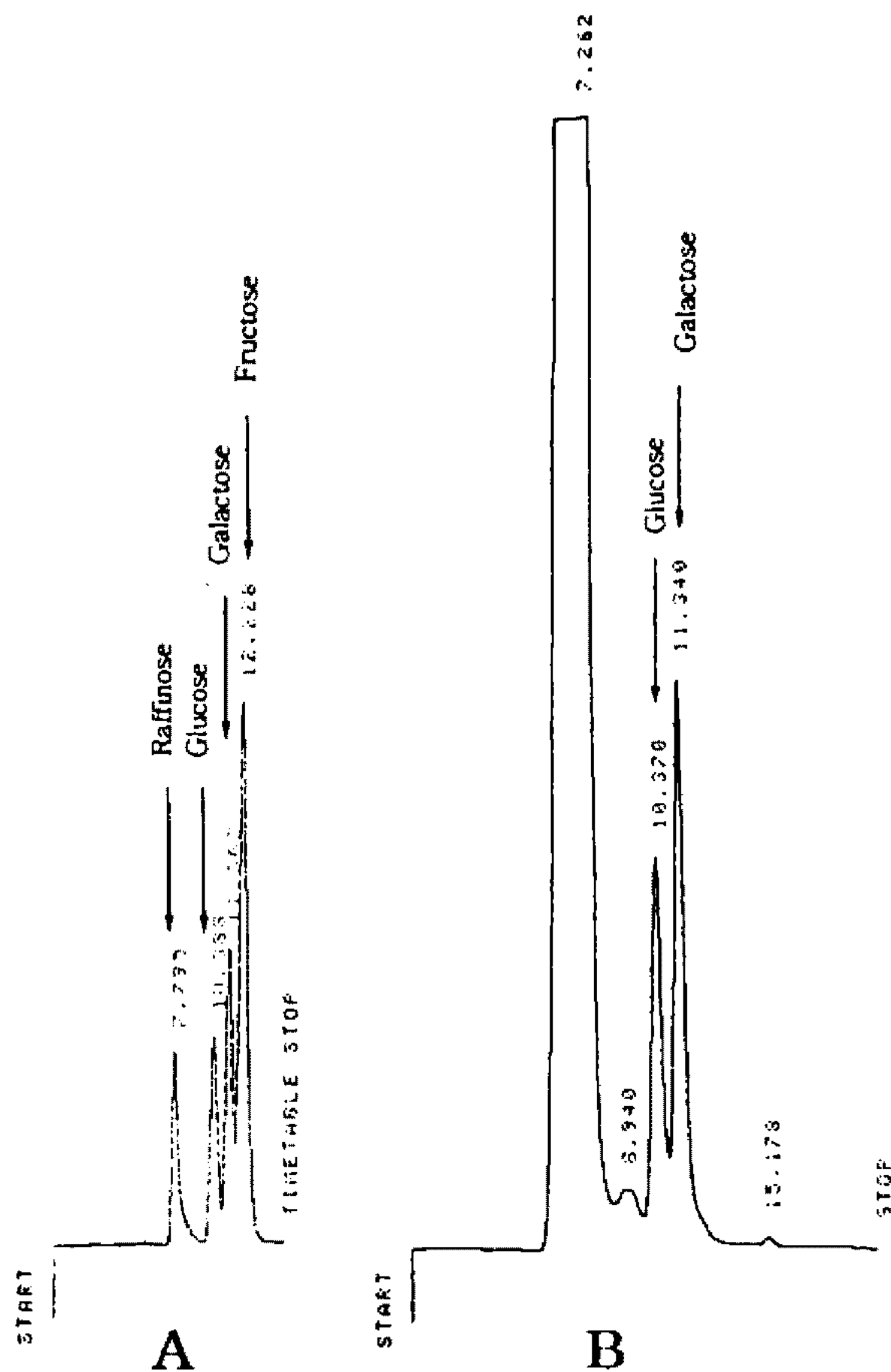


Fig. 9. HPLC of Biopolymer YU-122. A; standard, B; acid hydrolyzate of the Biopolymer YU-122

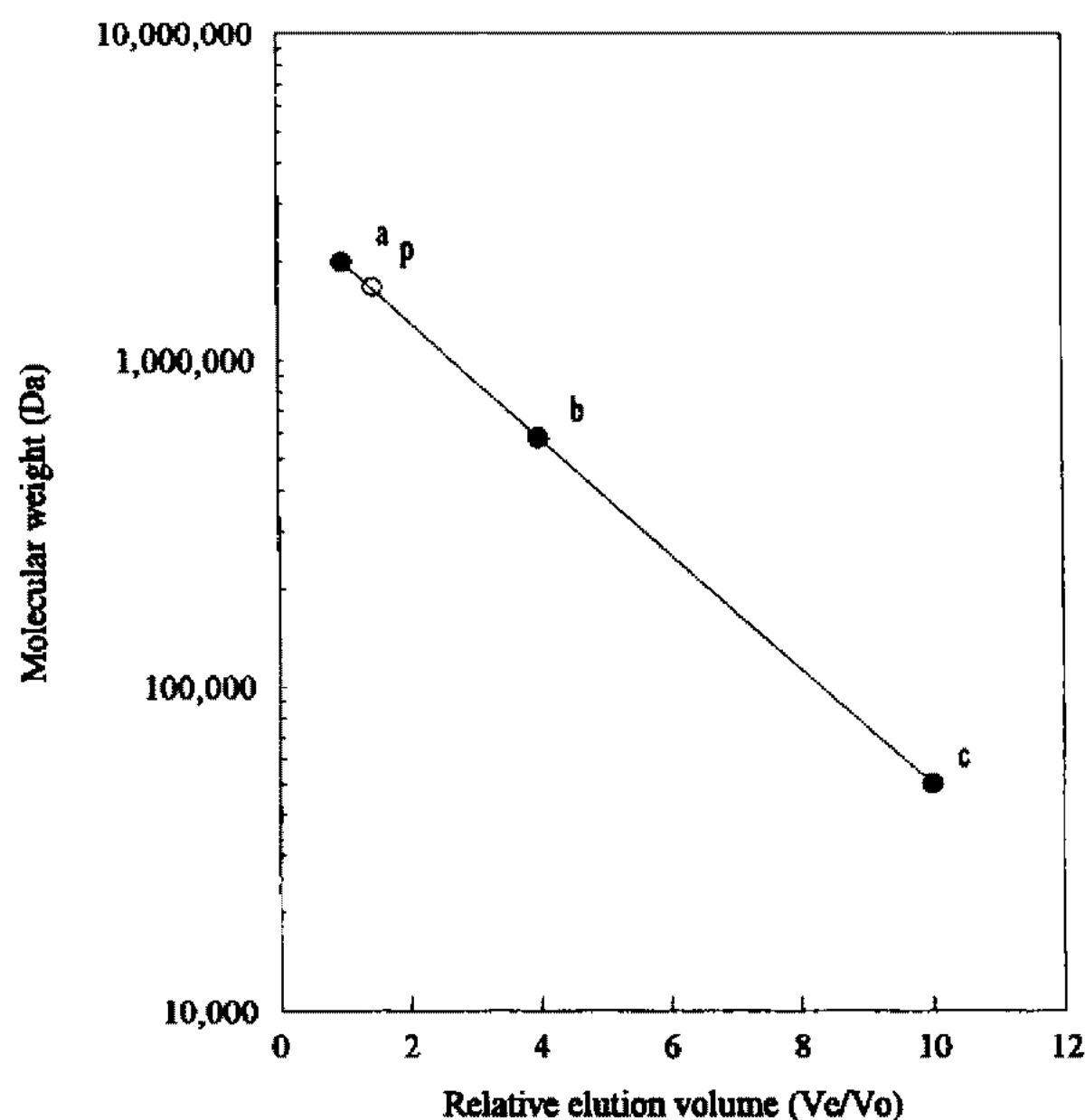


Fig. 10. Estimation of molecular weight of Biopolymer YU-122 using Sepharose 4B gel permeation chromatography. Standard molecular weight markers are dextrans(a; 2,000,000, b; 580,000, c; 50,000), p; Biopolymer YU-122

타내었다. Biopolymer YU-122의 경우 retention time 10.370, 11.340분에서 peak를 나타냈으며, 이는 glucose(10.388), galactose(11.362)와 일치하였다. 이 결과로부터 glucose, galactose 2가지 단당으로 존재함을 알 수 있었다.

또한, Biopolymer YU-122의 분자량을 측정하기 위하여 Sepharose 4B Gel permeation chromatography (column size: 1.0×70.0 cm)를 행하였다(Fig. 10). 각 표준분자량 물질 및 Biopolymer YU-122를 gel permeation chromatography한 후 이를 void volume(V_0)에 대한 표준물질의 elution volume(V_e)의 비율(V_e/V_0)과 log scale의 분자량과의 관계를 표준곡선으로 나타내어 분자량을 구하였다. 그 결과 Biopolymer YU-122의 분자량은 약 1.7×10^6 정도로 나타났다.

고 찰

토양으로부터 분리한 용균효소 생산 균주인 *Metarrhizium anisopliae*(Metschn.) Sorok이 biopolymer를 생산함을 관찰하고 이 biopolymer의 구성성분과 생산조건을 검토하였다. 탄소원으로는 mannitol을 사용한 경우 glucose와 sorbose를 사용한 경우보다 2배 이상의 생산을 나타내었으며, 경제적인 당 농도는 5%로 나타났다. 천연 질소원 중에서 polypepton을 사용한 경우, beef extract, soytone들의 경우보다 10배 이상의 biopolymer를 생산하였으며, 탄소원과 천연 질소원의 비는 3이었다. 특히 K_2HPO_4 및 $CaCl_2$ 를 배지에 첨가함으로써 biopolymer의 생산이 향상되었고, biopolymer 생산배지의 최적 pH는 pH 5.0, 최적 배양온도는 30°C이었다.

또한 *Metarrhizium anisopliae*(Metschn.) Sorok을 배양, 정제하여 얻은 biopolymer의 분자량과 C, H, N비를 분석한 결과 Biopolymer YU-122의 분자량은 1.7×10^6 이었으며, 미량의 N이 검출되었으나 C:H의 비는 약 3.21:7.12이었으며, 환원당의 형태로 존재하는 것으로 추정되었다. 따라서 그의 구성당을 분석한 결과 glucose와 galactose로 구성되어 있는 것으로 나타났다.

지금까지 보고된 미생물 유래의 biopolymer에는 *Leuconostoc mesentroides*가 생산하는 dextran(22), *Azotobacter vinelandii* 유래의 alginate(23), *Aureobaculum pullulans*로 부터 분리된 pullulan(24), *Bacillus subtilis* (25, 26), *Zymomonas mobilis*(9)가 생산하는 levan, *Acetobacter suboxydans*(27), *Rhizobium*(28), *Bacillus polymixa*(29), *Glomerella cingulata*(30), *Arthrobacter* sp. (31) 등이 생산하는 polysaccharides 등이 있다. 따라서 *Metarrhizium anisopliae*(Metschn.) Sorok이 생산하는 Biopolymer YU-122는 기존의 biopolymer와 전혀 다른 새로운 biopolymer임을 알 수 있었으며 이 새로운 bio-

polymer에 대한 보다 더 많은 물리, 화학적 연구를 수행하여 이 biopolymer의 응용성에 대한 연구가 필요할 것이다.

요 약

토양으로부터 분리한 *Metarrhizium anisopliae* (Metschn.) Sorok이 생산하는 biopolymer를 정제하여 분석하고, 그의 생산조건을 검토하였다. 탄소원으로 mannitol, 질소원으로는 polypepton을 사용했을 때 가장 많은 biopolymer를 생산하였고 K_2HPO_4 및 $CaCl_2$ 를 첨가함으로써 생산량이 더욱 증가하였다. 또한 이 biopolymer를 정제하여 그 분자량과 구성성분을 검토한 결과 *Metarrhizium anisopliae*(Metschn.) Sorok이 생산하는 Biopolymer YU-122는 분자량이 1.7×10^6 이고, C, H의 구성비가 1: 2이며 미량의 N이 검출되었으나, 주 구성성분은 glucose와 galactose의 환원당으로 이루어져있는 전혀 새로운 biopolymer인 것으로 나타났다.

감사의 글

이 연구는 연세대학교 생물산업소재연구센터의 연구비(과제번호 94-01-01-1)지원에 의해 수행된 결과입니다.

참고문헌

1. 양지영, 백운화, 유주현, 이계호. 1992. *Bacillus polymixa*가 생산하는 Levansucrase의 특성, 한국식품과학회 발표 논문초록집, 11: 6-9.
2. Berkeley, R. C. W., Gooday, G. W. and Ellwood, D. C. 1979. *Microbial Polysaccharides and Polysaccharase*, Academic Press, Pp 1-34.
3. Jung, K. H., Yun, J. W., Kang, K. R., Lim, L. Y. and Lee, J. H. 1989. Mathematical model for enzymatic production of fructooligosaccharides from sucrose, *Enzyme Microbiol. Technol.*, 11: 491-494.
4. Kang, Y. T., Kho, Y. H. and Chun, M. J. 1989. Production of high fructose syrup by flocculated *Actinoplanes missouriensis* NRRL B-3342, *J. Inst. Biotechnol.*, 1: 10-15.
5. Lee, C. H., Park, C. S., Han, B. J., Kim, B. C. and Jang, J. H. 1990. Studies on the rheological properties of sugar derivative sweeteners, *Korean J. Food Sci. Technol.*, 22(7): 852-857.
6. Morris, V. J. 1990. Biotechnically produced carbohydrates with functional properties for use in food systems, *Food Biotechnol.*, 4(1): 45-57
7. Munir, M. 1990. Continuous production of isomaltose by transglucosylation of sucrose with free and immobilized

- cells, *Food Biotechnol.*, **4**(1): 317.
8. Verrips, C. T. and Zaalberg, J. 1980. The intrinsic microbial stability of water-in-oil emulsions, *European J. Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **10**: 187-196.
 9. Viikari, L. 1984. Formation of levan and sorbitol from sucrose by *Zymomonas mobilis*, *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **19**: 252-255.
 10. Na, J. W., Cha, W. S. and Kim, S. I. 1990. Controlled drug release using biodegradable polymer, *Korean J. Biotechnol. Bioeng.*, **5**(4): 377-382.
 11. Ramsay, J. A., Cooper, D. G. and Neufeld, R. J. 1989. Effect of oil reservoir conditions on the production of water-insoluble levan by *Bacillus licheniformis*, *J. Gen. Microbiol.*, **7**: 155-165.
 12. Bradford, M. M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding., *Anal. Biochem.*, **72**: 248-254.
 13. Chaplin, M. F. and Kennedy, J. F. 1986. *Carbohydrate Analysis*, IRL press, Pp 1-8.
 14. Paul A. Sandford. 1979. *Advances in Carbohydrate Chemistry and Biochemistry*, **36**: 263-313.
 15. Sutherland, I. W. and Ellwood, D. C. 1979. In "Microbial Technology Current State, Future Prospects", ed by A. A. Bull et al, Cambridge Univ. Press, **107**.
 16. Anderson, N. and Doane, F. W. 1972. Agar diffusion method for negative staining of microbial suspensions in salts solutions., *Appl. Microbiol.*, **74**: 495-496.
 17. Moraine, R. A. and Rogovin, P. 1973. Kinetics of the xanthan fermentation, *Biotechnol. Bioeng.*, **15**: 225-237.
 18. Han, Y. W., and Claeke, M. A. 1990. Production and characterization of microbial levan, *J. Agri. Food Chem.*, **38**: 393-396.
 19. Kang, K. S. and Cottrell, I. W. 1979. *Microbial Technology* (Bull, A., Ellwood, D. C.), Academic Press, **1**: 417-481.
 20. Brierley, C. L., Kelly, D. P., Seal, K. J. and Best, D. J. 1985. In "Biotechnology: Principles and Applications", Blackwell Scientific Pub., Oxford.
 21. Dedonder, P. and Peaud-Lenoel, C. 1957. *Bull. Soc. Chim. Biol.*, **39**, 483-497.
 22. Aspinall, G. O. 1985. *The Polysaccharides*, **3**, Academic Press, New York, Pp 107-207.
 23. Jarman, T. R., Deavin, L., Slocombe, S. and Righelato, R. C. 1978. Investigation of the effect of environmental conditions on the rate of exopolysaccharide synthesis in *Azotobacter vinelandii*, *J. Gen. Microbiol.*, **107**: 59-64.
 24. Auer, D. P. F. and Seviour, R. J. 1990. Influence of varying nitrogen sources on polysaccharide production by *Aureobasidium pullulans* in batch culture, *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **32**: 637-644.
 25. Murao, S., Morita, M. and Takahara, Y. 1973. Sugar component of the polysaccharide produced by *Bacillus subtilis* FT-3, *J. Ferment. Technol.*, **51**(9): 653-660.
 26. Murphy, D. 1952. Structure of a levan produced by *Bacillus polymyxa*, *Can. J. Chem.*, **30**: 872-878.
 27. Currie, A. L., Ramanathan, N. and Colvin, J. R. 1962. Helical, noncellulosic microfibrils from *Acetobacter xylium* and *Acetobacter suboxydans*, *Biochim. Biophys. ACTA*, **60**: 163-170.
 28. Ghai, S. K., Hisamatus, M., Amemura, A. and Harada, T. 1981. Production and chemical composition of extracellular polysaccharides of *Rhizobium*, *J. Gen. Microbiol.*, **122**, 33-40,
 29. Mitsuda, S., Miyata, M., Hirota, T. and Kikuchi, T. 1981. High viscosity polysaccharide by *Bacillus polymyxa*, *Hakkogaku Kaishi*, **59**(4): 303-309.
 30. Sarkar, J. M., Hennebert, G. L. and Mayaudon, J. 1985. Optimization and characterization of an extracellular polysaccharide produced by *Glomerella cingulata*, *Biotechnol. Letters.*, **7**(9): 631-636.
 31. Bodie, E. A., Schwartz, R. D. and Catena, A. 1985. Production and characterization of a polymer from *Arthrobacter* sp., *Appl. Environ. Microbiol.*, **50**: 629-633.

(Received 20 August 1996)