

*Methylobacterium organophilum*에 의한 메탄올로부터 고점도 다당류, 메틸란, 생산을 위한 배양조건 최적화

최준호 · 이운택 · 김상용¹ · 오덕근² · 김정희*

한국과학기술원 생물과학과, ¹동양제과(주) 기술개발연구소,
²우석대학교 식품공학과

Optimization of Culture Conditions for Production of a High Viscosity Polysaccharide, Methylan, by *Methylobacterium organophilum* from Methanol. Choi, Joon-Ho, Sang-Yong Kim¹, Deok-Kun Oh², and Jung-Hoe Kim* Department of Biological Sciences, Korea Advanced Institute of Science and Technology, Taejeon 305-701, Korea, ¹Tong Yang Confectionary Co., R&D Center, Seoul 140-715, Korea, ²Department of Food Science and Technology, Woosuk University, Chonbuk 565-800, Korea - An extracellular polysaccharide, methylan, was produced under the specific conditions by *Methylobacterium organophilum* from methanol. The specific growth rate of cells was approximately constant regardless of C/N ratio and the specific product yield was maximum at a C/N ratio of 30. Methylan production was suppressed by the deficiency of mineral ions such as Mn⁺⁺ or Fe⁺⁺ ion. The optimal pH for cell growth and methylan production was 7. Whereas the optimal temperature for cell growth was found to be 37°C, that for methylan production was 30°C. The methanol concentration above 4% completely inhibited the cell growth. The initial methanol concentration for the maximal production of methylan was 0.5% (v/v) and above this concentration, methylan production was markedly inhibited. To overcome the substrate toxicity and inhibition for both cell growth and methylan production, a fed-batch culture of intermittent feeding within 5 g/l methanol was conducted under the optimal culture condition. Methylan production of was stimulated by nitrogen limitation and methylan was accumulated up to 8.7 g/l and cell mass also increased up to 12.4 g/l.

Key words: polysaccharide-methylan, methanol, optimization of culture condition, *Methylobacterium organophilum*

발효과정에 사용되는 탄소원은 탄수화물보다 메탄올이 더 경제적이다[6]. 또한, 메탄올은 99.8% 이상의 고순도이며 물과 잘 혼합되며 메탄올을 기질로 이용할 수 있는 미생물이 제한되어 있다. 이러한 장점으로 인하여 메탄올 자화 세균을 이용하여 유기산, 아미노산 및 단세포 단백질 등을 생산하는 것에 관한 많은 연구가 이루어져 왔다[10, 15, 16]. 그러나, 아직까지 미생물에 의한 메탄올로부터 다당류의 생산에 관한 연구는 적은 편이다[8, 9, 11].

미생물 유래 다당류는 그 구조와 특성에 있어서 매우 다양함을 지니고 있다. 이러한 다양함 때문에 다당류는 식품, 화장품, 화학, 제지, 섬유, 폐수처리 및 유지 등을 포함하는 광범위한 산업에 적용이 가능하고 안정제, 유화제, 흡수제, 흡습제, 부착제, 흡착제, 윤활제 및 점증제(thickening agent) 등으로 다양하게 사용할 수 있다. 또한, 각종 세균 질병의 진단, 예방 또는 치료 등과 관련되는 생리활성을 갖는 소재로서의 중요성도 더욱 높아지고 있다[2].

본 실험실에서는 특정 조건하에서 *Methylobacterium organophilum*이 메탄올로부터 새로운 고점도 다당류를 세포 밖으로 유리함을 발견하였다[12]. 발견된 다당류 메틸란은 gas chromatography와 화학분석을 한 결과, 탄수화물이 glucose, galactose, mannose로 약 2:3:2의 비율로 80.4% 존재하였고 12.4%의 uronic acid, 5.1%의 pyruvic acid 및 6.1%의 단백질 등으로 구성되어 있다. 메틸란은 gel permeation chromatography로 분석한 결과 약 2~4×10⁶ dalton의 분자량을 나타내고 1.0% 용액에서의 점도가 18,000 cp로 고점도 다당류이다[4].

세포의 다당류의 생산은 배지조성에 크게 영향을 받아 일반적으로 높은 비율의 탄소원/질소원에서 다당류의 생산이 촉진된다. 또한, 미생물 생산 다당류의 생산은 균체의 성장환경에 좌우되며 최적조건은 pH, 온도, 통기량, 교반속도, 점도 및 점증량에 큰 영향을 받는다. 생합성의 최적 pH는 세균의 경우 6.0~7.5, 곰팡이의 경우에 4.0~5.5로 주로 중성 또는 약산성이며 배지 조제시 초기 pH 보다는 배양 중의 pH가 더 큰 영향을 준다. 또한 거의 모든 다당류 생산균주는 호기성 또는 통성 혐기성 균이므

*Corresponding author
Tel. 82-42-869-2614, Fax. 82-42-869-5614
E-mail: kimjh@sorak.kaist.ac.kr

로 보통 산소가 제한되지 않았을 때 다당류의 생성이 가장 높다. 대부분의 다당류 생성균주는 중온균으로 20~40℃가 최적온도이며 고온균의 다당류 생산은 거의 알려져 있지 않다[13].

본 실험에서는 탄소원으로 메탄올을 사용하여 *Methylobacterium organophilum*을 배양한 후 균체 성장과 고점도 다당류, 메틸란의 생산 특성을 살펴보고 메틸란 생산을 위한 배양조건의 최적화를 수행하고자 하였다.

재료 및 방법

미생물 및 배지

본 연구에 사용한 균주는 메탄올 자화 세균인 *Methylobacterium organophilum* NCIB 11278 KC-1이었고, 사용배지는 메탄올 0.5%(v/v), $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 1.0 g/l, KH_2PO_4 1.305 g/l, Na_2HPO_4 2.13 g/l, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.45 g/l, $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 3.3 mg/l, $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 1.3 mg/l, $\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 130 $\mu\text{g/l}$, $\text{ZnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 130 $\mu\text{g/l}$, $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 40 $\mu\text{g/l}$, $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 40 $\mu\text{g/l}$, $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 40 $\mu\text{g/l}$, H_3BO_3 30 $\mu\text{g/l}$ 로 구성되었다.

배양조건

중배양은 agar 배지의 단일 colony를 배지 50 ml가 들어있는 250 ml 플라스크에 접종한 후 진탕 배양기에서 30℃, 200 rpm에서 24시간 동안 배양하였다. 본 배양은 중배양액을 배지 2 l가 들어있는 3 l 발효조에 접종하여 배양온도는 30℃, pH는 7.0으로 조절하였다. 배양 과정의 교반속도와 통기량은 용존산소 농도 20% 이상을 유지시키기 위하여 각각 400~1200 rpm 및 0.5~1.5 vvm의 범위에서 조절하였다.

배지 성분의 농도와 결핍영향

배지 성분의 농도와 결핍이 균체 성장과 메틸란 생산에 미치는 영향을 회분식 배양법으로 살펴보았다. 실험 목적에 따라 질소원과 금속이온의 농도를 변화시켰으며, 이때 메탄올의 농도는 0.5%(v/v)로 고정하였다.

DO-stat에 의한 유기식 배양방법

초기 메탄올 농도 0.5%로 배양을 시작하여 배양과정 동안 메탄올은 DO-stat 방법에 의하여 첨가하였다[20]. DO-stat은 배지 성분 중 기질(메탄올)이 완전히 고갈되면 용존 산소(dissolved oxygen, DO)가 급격히 증가하게 되고 용존 산소가 정한 값 이상으로 상승하게 된다. 이때, 발생하는 신호가 일정시간 동안에 펌프를 작동시켜 메탄올을 자동적으로 공급하는 방법이다.

분석방법

메탄올의 농도는 chromosorb 101(80/100 mesh) column이 장착된 GC(Shimadzu GC-6A, Japan)의 Flame ionization detector(Shimadzu RID-6A)를 이용하여 150℃에서 측정하였다. 다당류의 양은 균체를 제거한 후 Phenol-sulfuric acid 방법으로 측정하였다[13]. Ammonium sulfate의 농도는 Indo-phenol 방법으로 분석하였고[3] 유기 질소원의 질소 함량은 Micro-Kjeldahl 방법으로 측정하였다[14]. 균체 농도는 탁도계를 이용하여 파장 570 nm에서 현탁도를 측정하여 미리 측정된 표준 곡선을 이용하여 건조중량으로 환산하였다.

결과 및 고찰

C/N 비율과 질소원이 균체 성장과 메틸란 생산에 미치는 영향

일반적으로 많은 세균과 일부 곰팡이에서 C/N비율이 높아야 다당류의 생산이 향상되었고[18, 19], 다당류의 생산은 질소원 제한에 의하여 촉진된다고 보고되었다[1, 18]. 메틸란 생산의 최적 C/N 비율을 결정하기 위하여 0.5%(v/v)의 메탄올(C)과 0.1, 0.2, 0.3, 0.6 및 0.9 g/l의 ammonium sulfate(N)가 함유된 배지에서 *Methylobacterium organophilum*을 배양하였다. 이때, 각각의 C/N 비율은 68.4, 45.2, 27.1, 13.5 및 9.9에 해당된다. Fig. 1에 나타낸 것처럼 단위 균체당 메틸란 생산수율은 C/N 비율 약 30부근에서 최적이었다. 특히, 다당류를 생산하는 세포의 능력이 최적 C/N 비율 이하에서 급격하게 감소되었다. 균체의 비성장속도는 C/N 비율에 대하여 큰 차이가 없어 C/N 비율 9.9에서는 0.24 h⁻¹ 그리고 C/N 비율 68.4에서는 0.26 h⁻¹을 나타내었다. 균체 농도는

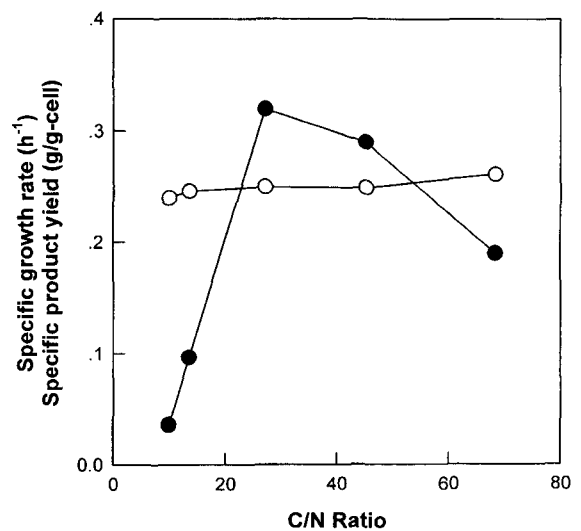


Fig. 1. Effect of C/N ratio on specific growth rate and specific product yield. Specific growth rate (○) and specific product yield (●).

Table 1. Effect of nitrogen sources on cell growth and methylan production

Nitrogen source (0.064 g-N/l)	Cell mass (g/l)	Methylan production (g/l)	Specific growth rate (h ⁻¹)	Specific product yield (g/g-cell)	Volumetric productivity (g/l·h)
(NH ₄) ₂ SO ₄	0.977	0.383	0.254	0.404	0.043
NaNO ₃	0.898	0.221	0.224	0.311	0.023
Urea	0.786	0.112	0.120	0.176	0.013
Casamino acid	0.707	0.280	0.076	0.467	0.003
Corn steep liquor	0.743	0.446	0.109	0.620	0.011
Yeast extract	0.721	0.788	0.072	1.186	0.017
Peptone	0.332	0.379	0.041	1.139	0.009

C/N 비율이 감소할수록(질소원의 농도가 증가할수록) 증가하였으나 메틸란 농도는 감소하였다[19].

메틸란 생산에 적당한 질소원을 찾기 위하여 여러 가지 질소원 중, 유기 질소원의 질소 농도를 Micro-Kjeldahl 방법으로 정량하여 총 질소의 농도를 0.064 N/l로 조절하여 사용하였고, 무기 질소원은 유기 질소원과 같은 질소 농도로 조절하여 사용하였다(Table 1). 질소원의 영향 실험에서는 메탄올의 농도를 0.5%(v/v)로 일정하게 하였다. Ammonium sulfate와 sodium nitrate 같은 무기 질소원은 미생물에 의하여 빠르게 이용되어 균체의 비성장속도가 0.22~0.25 h⁻¹로 높게 나타났고, 단위 균체당 산물수율도 0.3~0.4 g/g-cell로 비교적 높게 나타났다. Urea, casamino acid, corn steep liquor, yeast extract, peptone과 같은 유기 질소원의 비성장속도는 무기 질소원을 질소원으로 사용하여 배양한 경우보다 낮게 나타났다. Yeast extract와 peptone을 사용하여 배양하면 단위 균체당 산물수율이 다른 경우보다 1.1~1.2 g/g-cell로 비교적 높게 나타났으나 낮은 성장속도와 긴 배양 시간으로 메틸란의 생산속도가 낮게 나타났다. 그러므로 생산속도가 가장 높은 ammonium sulfate를 질소원으로 선정하여 다음 실험을 수행하였다.

금속 이온이 균체 성장과 메틸란 생산에 미치는 영향

*M. organophilum*을 사용하여 특정 금속 이온만 제거한 배지에서 특정 금속 이온의 결핍이 균체 성장과 메틸란 생산에 미치는 영향을 살펴보았다(Table 2). 여러 금속염 중에 Fe²⁺와 Mn²⁺ 이온을 결핍시켰을 경우에 다른 금속염을 결핍시켰을 경우와 달리 균체 성장과 메틸란 생산 모두 많이 감소하였다. 특히, Mn²⁺ 이온을 결핍시키면 메틸란이 전혀 생산되지 않았다. 이러한 결과로부터 Fe²⁺와 Mn²⁺ 이온이 균체 성장과 메틸란 생산에 중요한 인자임을 알았다.

균체 성장과 메틸란 생산에 중요한 인자인 Fe²⁺와 Mn²⁺ 이온의 역할을 살펴보면 Fe²⁺ 이온은 heme의 조효소로 사용되어 전자 전달계에 관여하고 Mn²⁺ 이온은 superoxide dismutase의 조효소로 사용된다고 보고되었다[7]. Fe²⁺와

Table 2. Effect of mineral on cell growth and methylan production

Deficient component	Cell mass (g/l)	Methylan (g/l)	Specific growth rate (h ⁻¹)	Specific product yield (g/g-cell)
Control	1.028	0.389	0.261	0.386
Ca ²⁺	1.101	0.425	0.228	0.386
Fe ²⁺	0.689	0.154	0.206	0.223
Mn ²⁺	0.431	0.000	0.205	0.000
Zn ²⁺	1.052	0.439	0.246	0.417
Co ²⁺	0.977	0.339	0.234	0.347
Mo ²⁺	1.025	0.368	0.267	0.359
Cu ²⁺	0.982	0.348	0.221	0.370
H ₃ BO ₃	0.997	0.369	0.242	0.370

Mn²⁺ 이온의 최적농도를 결정하기 위하여 각각의 이온의 농도를 FeSO₄ · 7H₂O와 MnSO₄ · 4H₂O의 형태로 하여 0에서 10 mg/l의 범위에서 실험을 수행하였다. Fe²⁺ 이온의 경우 균체 성장과 메틸란 생산에 대한 최적 농도가 1.3에

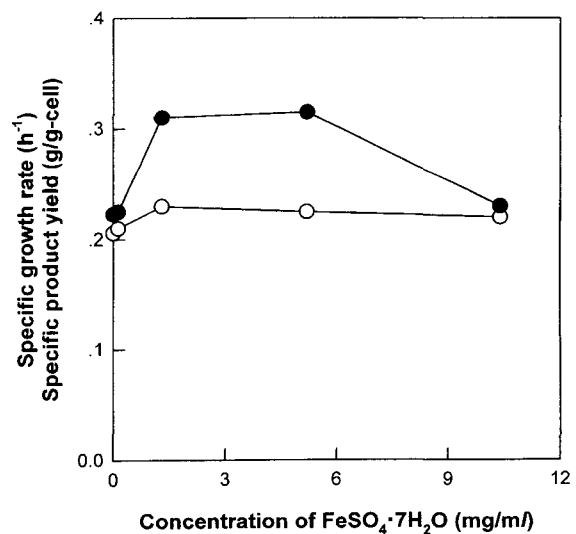


Fig. 2. Effect of FeSO₄ · 7H₂O on specific growth rate and specific product yield. Specific growth rate (○) and specific product yield (●)

서 5.2 mg/l 범위로 비교적 넓게 나타났다(Fig. 2). Mn^{++} 이온을 결핍시키면 전혀 메틸란이 생성되지 않았으며 0.1 mg/l 정도의 낮은 농도의 Mn^{++} 이온을 첨가하면 메틸란의 생성이 급격히 증가하였고, 그 이상의 농도에서는 급격한 변화가 없었다(Fig. 3). Mn^{++} 이온의 메틸란 생산의 최적 농도는 0.13에서 2.0 mg/l 범위로 나타났다. 균체의 비성장 속도는 Fe^{++} 와 Mn^{++} 이온 모두 실험 범위 내에서 농도에 관계없이 큰 차이없이 일정하였다.

온도와 pH가 균체 성장과 메틸란 생산에 미치는 영향
25°C에서 39°C까지 온도를 달리하여 배양 온도가 균체

성장과 메틸란 생산에 미치는 영향에 대하여 살펴보았다 (Fig. 4). 균체의 비성장속도는 37°C에서 최대이었으나 메틸란 생성은 30°C에서 최대이었다.

pH가 균체 성장과 메틸란 생산에 미치는 영향을 조사 하였다. Fig. 5에서 나타난 것처럼 pH 5 이하에서는 균체 성장과 메틸란 생산 모두 강하게 저해를 받았다. 균체 성장과 메틸란 생산은 중성 부근인 pH 7 근처에서 최적이었다. pH를 8로 일정하게 조절하여 배양하면 배양초기에는 균체 성장이 잘 일어나지 않은 시간(lag time)이 길게 존재하였고, 균체 성장과 메틸란 생산 모두 감소하였다.

메탄올이 균체 성장과 메틸란 생산에 미치는 영향

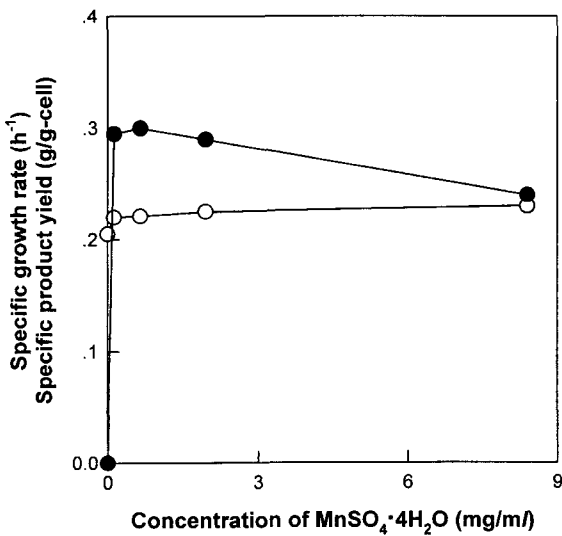


Fig. 3. Effect of $MnSO_4 \cdot 4H_2O$ on specific growth rate and specific product yield. Specific growth rate (○) and specific product yield (●).

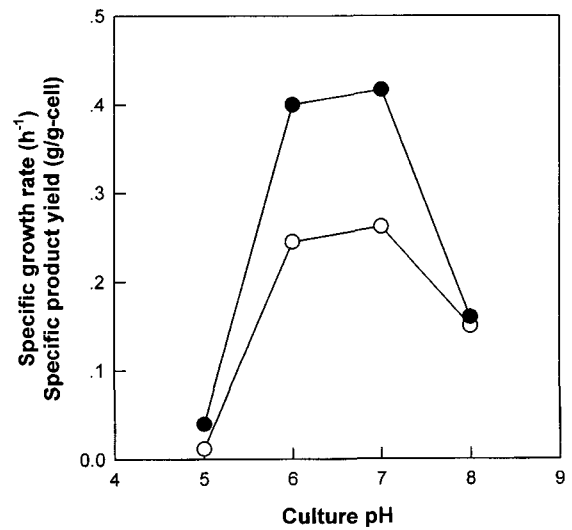


Fig. 5. Effect of pH on specific growth rate and specific product yield. Specific growth rate (○) and specific product yield (●).

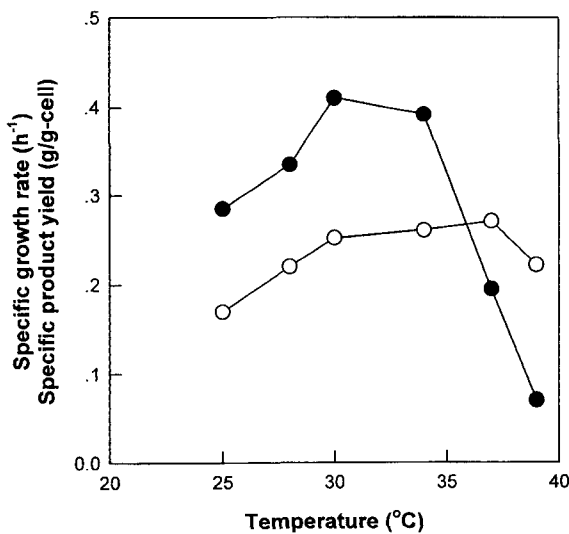


Fig. 4. Effect of temperature on specific growth rate and specific product yield. Specific growth rate (○) and specific product yield (●).

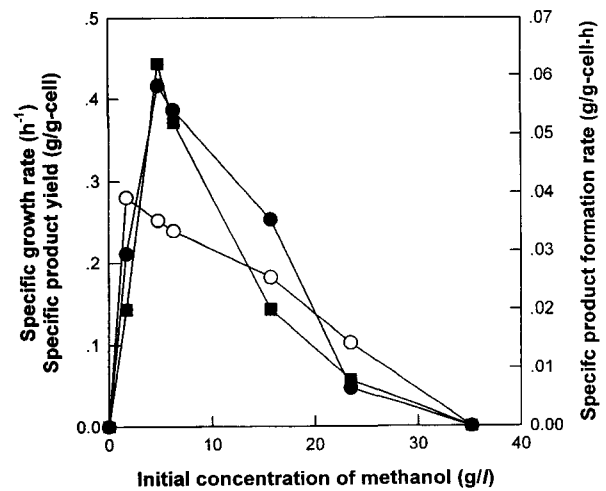


Fig. 6. Effect of initial methanol concentration on specific growth rate and specific product yield. Specific growth rate (○), specific product yield (●) and specific product formation rate (■).

메탄올은 세균뿐만 아니라 메탄올 자화 미생물에게도 독성을 지닌 물질이다[12]. Fig. 6은 배양 초기의 메탄올 농도를 변화시키면서 회분식 배양을 하여 메탄올의 농도가 균체 성장과 메틸란 생산에 미치는 영향에 대하여 나타낸 것이다. 메탄올 농도가 증가할수록 비성장속도가 감소하였고, 4% 이상의 농도에서는 균체 성장이 완전히 저해되었다. 균체의 비성장속도는 메탄올 농도 0.25% (v/v)에서 최대값 0.28 h⁻¹을 보여주었다. 단위 균체당 생산물 수율과 비생산물 생산속도는 메탄올 농도 0.5%일 때 최대이었고 그 이상의 농도에서는 메틸란의 생산이 급격히 감소하였다. 그러므로, 최대 메틸란 생산을 위한 배양조건은 메탄올 0.5%(v/v), FeSO₄ · 7H₂O 1.3 mg/l, MnSO₄ · 4H₂O 0.13 mg/l와 재료 및 방법에 묘사된 다른 조성으로 구성된 배지와 발효과정의 pH와 온도를 각각 7, 30℃로 조절하는 것이었다.

최적 배양조건에서 유기식 배양에 의한 메틸란 생산

메탄올의 독성과 저해를 극복하기 위하여 최적 배양조건에서 발효과정 동안에 질소원이 고갈되는 유기식 배양을 수행하였다. 메탄올은 DO-stat 방법에 의하여 자동적으로 공급하였다[20]. 이 방법에 의하여 메탄올 농도는 균체 성장과 메틸란 생산 모두가 저해되지 않는 5 g/l 이하로 유지하였다. 균체 성장, 메틸란 생산과 질소원 소비에 관한 발효 양상을 Fig. 7에 나타내었다. 회분식 배양

과 같이 메틸란은 질소원이 고갈된 후에 축적되기 시작하였다. 회분식 배양에서 최종 균체 농도와 최종 메틸란 농도가 각각 1.0 g/l와 0.4 g/l를 얻었음에 비하여 메탄올의 유기식 배양에서 최종 균체 농도와 최종 메틸란 농도는 각각 12.4 g/l 및 8.7 g/l이었다.

*Methylobacterium organophilum*을 사용하여 메탄올로부터 다당류, 메틸란의 생산을 위하여 C/N 비율, 초기 메탄올 농도 및 금속염 같은 배지 성분을 최적화하였고 온도와 pH 같은 환경 조건을 최적화하였다. 또한, 메탄올을 저해농도 이하로 공급하는 유기식 배양을 수행하여 회분식 배양보다 현저히 증가한 메틸란을 얻을 수 있었다.

요 약

*Methylobacterium organophilum*을 사용하여 메탄올로부터 세포외 고점도 다당류, 메틸란의 생산을 특정 배양조건에서 수행하였다. C/N 비율이 미치는 영향을 살펴본 결과 균체의 비성장속도는 C/N 비율에 대하여 큰 차이가 없었고, 단위 균체당 메틸란 생산수율은 C/N 비율 약 30부근에서 최적이었다. 여러 가지 금속염 중에서 Mn⁺⁺과 Fe⁺⁺이온이 결핍하면 메틸란의 생산이 현저히 저해됨을 보였다. 균체 농도와 메틸란 생산은 pH는 7 근처에서 최적을 나타내었다. 균체 성장의 최적온도는 37℃이었으나 메틸란 생산의 최적 온도는 30℃이었다. 메탄올 농도가 증가할수록 비성장속도가 감소하였고, 4% 이상의 농도에서는 균체 성장이 완전히 저해되었다. 메틸란 생산을 위한 최적 메탄올 농도는 초기농도로 0.5%(v/v)이었고 그 이상의 농도에서는 메틸란 생산이 급격히 감소하였다. 메탄올의 독성과 저해를 극복하기 위하여 최적 배양조건에서 메탄올의 유기식 배양을 수행하여 최종 균체 농도와 최종 메틸란 농도가 각각 12.4 g/l 및 8.7 g/l이었다.

참고문헌

1. Auer, D. P. F. and R. J. Seviour. 1990. Influence of varying nitrogen sources on polysaccharide production by *Aureobasidium pullulans* in batch culture. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **32**: 637-644.
2. Bikales, N. M. 1973. *Water Soluble Polymers*, pp. 227-242. Flenum Publishing Corp., New York.
3. Bolleter, W. T., C. J. Bushman, and P. W. Tidwell. 1961. Spectrometric determination of ammonia as indophenol. *Anal. Chem.* **33**: 592-594.
4. Choi, J. H., D. K. Oh, J. H. Kim, and J. M. Lebeault. 1991. Characteristics of a novel high viscosity polysaccharide, methylan, produced by *Methylobacterium organophilum*. *Biotechnol. Lett.* **13**: 417-420.
5. Dubois, M., K. A. Gilles, J. K. Hamilton, P. A. Rebers, and F. Smith. 1956. Colorimetric method for determina-

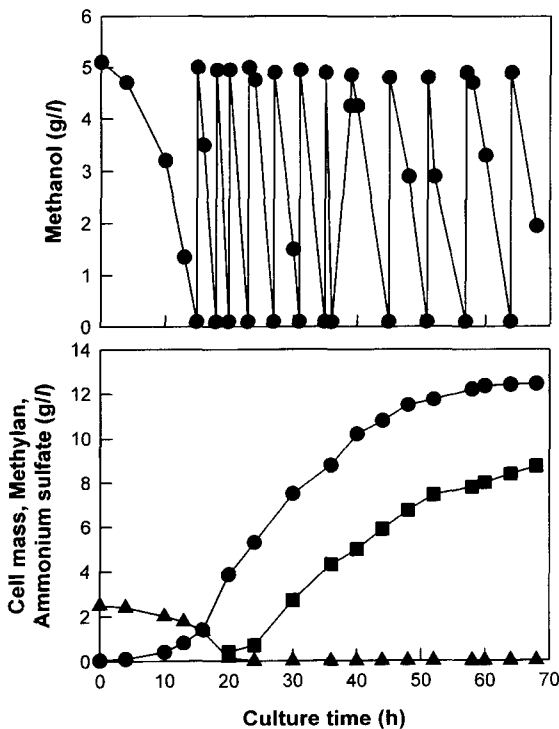


Fig. 7. Fermentation profile in intermittent feeding fed-batch culture.
Cell mass (●), methylan (■), ammonium sulfate (▲).

- tion of sugars and related substance. *Anal. Chem.* **28**: 350–356.
6. Faust, U. and P. Prave. 1983. Biomass from methane and methanol, pp. 83–103. In H. Dellweg(ed.), *Biotechnology*, Vol. 3, Verlag Chemie GmbH, New York.
 7. Gottschalk G. 1986. *Bacterial Metabolism*, pp. 1–36, Springer-Verlag, New York.
 8. Hou, C. T., A. I. Laskin, and R. N. Pantel. 1978. Growth and polysaccharide production by *Methylocystis parvus* OBBP on methanol. *Appl. Environ. Microbiol.* **37**: 800–804.
 9. Kanamaru, K. T. Hieda, Y. Iwamuro, Y. Obi, and T. Kisaki. 1982. Isolation and characterization of a *Hyphomicrobium* sp. and its polysaccharide formation from methanol. *Agri. Biol. Chem.* **46**: 2411–2418.
 10. Kato, N., Y. Tanni, and H. Yamada. 1983. Microbial utilization of methanol: Production of useful metabolites. *Adv. Biotechnol. Process.* **1**: 171–202.
 11. Misaki, A., Y. Tsumuraya, M. Kakuta, H. Takemoto, and T. Oigarashi 1979. D-Allose-containing polysaccharide synthesized from methanol by *Pseudomonas* sp. *Carbohydr. Res.* **75**: C8–C10.
 12. Lebeault, J. M., J. H. Kim, and J. H. Choi. 1991. Novel biological polymer. *U.S. Patent* 5,064,759.
 13. Magaritis, A. and G. W. Pace. 1985. Microbial Polysaccharides, pp. 1005–1043. In M. Moo-Yong(ed.), *Comprehensive Biotechnology* Vol. 3, Pergamon, Toronto.
 14. Morgan G. B., J. B. Lackey, and F. W. Gilcreas. 1957. Quantitative determination of organic nitrogen in water sewage and industrial wastes. *Anal. Chem.* **29**: 833–835.
 15. Morinaga, Y. and Y. Hirose. 1984. Production of metabolites by methylotrophy, pp. 106–118. In C. T. Hou (ed.), *Methylotrophs: Microbiology, Biochemistry and Genetics*, CRC press Inc., London.
 16. Smith S. R. L. 1981. Some aspects of ICI's single cell protein, pp. 342–348. In H. Dalton(ed.), *Microbial Growth on C₁-compounds*, Heyden, London.
 17. Souw, P. and A. L. Demain. 1979. Nutritional studies on xanthan production by *Xanthomonas campestris* NRRL B1459. *Appl. Environ. Microbiol.* **37**: 1186–1192.
 18. Sutherland I. W. 1979. Extracellular polysaccharides, pp. 1–49. In H. Dellweg(ed.). *Microbial Polysaccharide and Polysaccharides*, Academic, London.
 19. Sutherland I. W. 1982. Biosynthesis of microbial exopolysaccharides. *Adv. Microbial. Physiol.* **23**: 79–150.
 20. Yano, T., T. Kobayashi, and S. Shimizu. 1978. Fed-batch culture of methanol-utilizing bacterium with DO-stat. *J. Ferment. Technol.* **56**: 416–420.

(Received December 16, 1997)