

Bacillus sp. A56을 이용한 응집제 생산

서현호 · 이문호¹ · 김희식 · 박찬선 · 윤병대*
한국과학기술연구원 유전공학연구소, ¹화랑 환경

Biofloculant production from *Bacillus* sp. A56

Seo, Hyun-Hyo, Mun-Ho Lee¹, Hee-Sik Kim,
Chan-Sun Park and Byung-Dae Yoon*

Genetic Engineering Research Institute, KIST,
P.O. Box 17, Taedok Science Town, Taejeon 305-606, Korea
¹Hwa Rang Environment Co., LTD., Anyang 213-26, Korea

Abstract — A gram(+) bacteria that produced microbial flocculant was isolated from soil and classified as a *Bacillus* species and named as *Bacillus* sp. A56. The culture conditions of the strain for flocculant production were studied in a shake flask. Optimum temperature and initial pH for flocculant production were 30°C and 6.5, respectively. The optimized medium has following composition: glucose 20 g/l, NH₄NO₃ 0.5 g/l, K₂HPO₄ 1.0 g/l, KH₂PO₄ 0.8 g/l, MgSO₄·7H₂O 0.2 g/l, MnSO₄·4-6H₂O 0.3 g/l, CaCO₃ 0.5 g/l, yeast extract 0.3 g/l, tryptone 0.3 g/l in tap water. Under the optimum culture conditions, flocculant production was improved by ten times in comparison with in basal medium. In the jar fermentor, the highest flocculating activity was obtained at 30-hr cultivation time and the flocculant was increased with the increase of cells.

응집제는 활성오니법 등을 사용한 폐수처리분야, 토목건설공사에서의 청정처리제, 상·하수도의 조수분야, 발효공업에서의 균체분리, 식품공업 및 펄프·제지 공업에 이르기까지 광범위하게 사용되고 있으며(1-6), 산업의 발전에 따라 응집제의 사용은 계속 증가하는 추세에 있으나, 응집제 사용후 2차 처리가 환경측면에서 큰 문제가 되고 있다(7). 따라서, 이러한 환경문제를 해소하기 위한 새로운 응집제의 개발과 고효율의 응집제 개발을 목적으로 선진국에서는 미생물이 생산하는 응집성 고분자 물질에 관한 개발 연구를 진행하고 있다(7-10).

응집제에는 무기응집제와 유기응집제가 있으며, 유기응집제는 천연고분자 응집제와 합성고분자 응집제로 나눌 수 있다(8). 무기응집제(aluminium sulfate, polyaluminium chloride)는 상대적으로 가격이 저렴하여 널리 사용하고 있으나, 약품첨가율이 높고, 큰

부피의 flocc을 형성하는 단점이 있고, 유기응집제는 약품첨가율이 낮고 적은 부피의 flocc을 형성하고 단 시간내에 첨가가 가능하며 flocc 형성이 빠르고, 강도가 높으며 넓은 pH 범위에서 광범위하게 사용할 수 있는 장점이 있다(8, 11). 유기응집제중 천연고분자 응집제는 해초로부터 분리되는 sodium alginate와 chitin shell로부터 얻어지는 chitosan 등이 있으나, 현재로는 생산가격이 높은 단점이 있으며, polyacrylamide계의 합성고분자 응집제는 자연계에서 분해되기 어렵고, 단량체인 acylamide는 신경계에 독성이 있고, 암을 유발하는 물질로 알려져 있다(8, 9, 11, 12). 그러나, 미생물이 생산하는 응집성 고분자 물질은 인체에 무해하며, 생물계에서 쉽게 분해되므로 응집제 사용으로 인한 2차 환경오염을 방지할 수 있고, 가축의 사료 및 작물의 비료로 재활용하는 등의 부수적인 효과를 거둘 수 있다(12-15).

본 연구실에서는 상기 목적의 달성과 함께 새로운 응집제를 개발하기 위한 일환으로 토양으로부터 다양한 응집제 생산 미생물을 분리하여 관련 연구를

Key words: Biofloculant, *Bacillus* sp., identification, culture conditions

*Corresponding author

수행하고 있다. 본 보에서는 분리 미생물중 응집능이 우수한 고분자 물질을 생산하는 A56균주를 최종 선별하여 이 균주의 동정 및 응집제 생산을 위한 배양 조건의 검토 결과를 보고하는 바이다.

실험재료 및 방법

사용균주

토양으로부터 enrichment culture 방법으로 분리한 미생물중에서 active carbon에 대한 응집능이 우수한 A56균주를 사용하였다.

사용배지

미생물 분리 및 배양조건을 조사하기 위한 기초배지의 조성은 다음과 같다: glucose 2.0%, NH_4NO_3 0.2%, K_2HPO_4 0.1%, KH_2PO_4 0.1%, NaCl 0.05%, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.05%, yeast extract 0.01%, tap water를 사용하였으며, pH는 6.5~7.0이었다. 계대배양은 glucose 2.0%, beef extract 0.15%, peptone 0.2%의 조성을 갖는 배지에 한달마다 계대하며 실험하였다.

균체의 배양

액체배지 100 ml을 포함하는 500-ml의 Erlenmyer flask를 사용하였으며, 120 rpm의 reciprocal shaker로 30°C 에서 72시간 배양하였다. Fermentor 배양은 volume 2-l인 B. Braun fermentor(Model: Biostat M)를 사용하였으며, working volume은 1l로 하였다. 통기량은 1 vvm으로 고정하고, impeller speed는 200~1000 rpm으로 조정하여 산소분압이 20~40%가 되도록 하였다.

균체량은 660 nm에서 흡광도를 측정하여 나타내었다.

균주의 동정

본 균주의 형태학적, 배양적, 생화학적 성질은 Cowan(16)의 방법과 Macfaddin(17)의 방법에 준하여 검사한 것을 기초로하여 Bergey's manual of systematic bacteriology(18)에 따라 분류 및 동정하였다.

응집활성 측정

Active carbon(Junsei chemical Co.)을 표준 시료로 사용하였다. Test tube(18×180 mm)에 active carbon 현탁액(5000 ppm) 10 ml을 넣고 1.0% CaCl_2 용액 100 μl 를 첨가한 후 균체 배양액을 각 농도별로 희석하여

100 μl 를 첨가하였다. 이 용액을 약 10초간 혼합한 후 상온에서 3분간 정치한 다음 1 ml의 상등액을 취하여 550 nm에서 흡광도를 측정하였다. 대조구는 배양액 대신 증류수를 사용하였다. 응집활성은 각 농도별로 희석하여 응집활성을 측정한 시료중 550 nm에서 가장 낮은 흡광도를 나타낸 농도의 시료를 대상으로 흡광도값과 희석배수를 다음 식에 대입하여 계산하였다 (5).

$$\text{Activity(F.U.)} = (A - B) / A \times 100 \times F$$

F.U. : Flocculating Unit

A : Optical density of control

B : Optical density of sample

F : Dilution factor

Glucose 농도 측정

Glucose 농도는 PGO enzymes(glucose oxidase, peroxidase)와 o-dianisidine을 이용한 Sigma kit(catalogue No. 510-A)를 사용하여 측정하였다.

배양액의 점도 측정

배양액의 점도는 Brookfield(model DV-III) rheometer를 사용하여 상온에서 small size adaptor를 부착하고, 배양액 8 ml을 취하여 spindle No. 21으로 측정하였다.

결과 및 고찰

균주의 동정

본 균주의 전자 현미경 관찰은 Fig. 1과 같고, 균체 크기는 0.5~0.7 μm × 3.7~8.5 μm 이며, 분류학적 특성을 조사한 결과는 Table 1에 나타내었다. 본 균주는 Gram양성균이고, 운동성을 가진 간균으로 catalase를 가지며, gelatin과 urea 분해능이 없는 통성호기성 균주의 *Bacillus* sp.로 추정되었다. 탄소원 발효능의 실험결과 arabinose, lactose, maltose, sucrose, xylose, trehalose 등의 당류에서는 산을 생성하였고, glycerol과 inositol 등의 발효능은 없었다. 이상의 결과를 이용하여 Bergey's manual of systematic bacteriology를 검색한 결과 본 균주는 *Bacillus coagulans*와 유사한 것으로 동정되었으며, 최종적으로 *Bacillus* sp. A56으로 명명하였다.

응집제 생산을 위한 배양 및 배지조성의 최적화

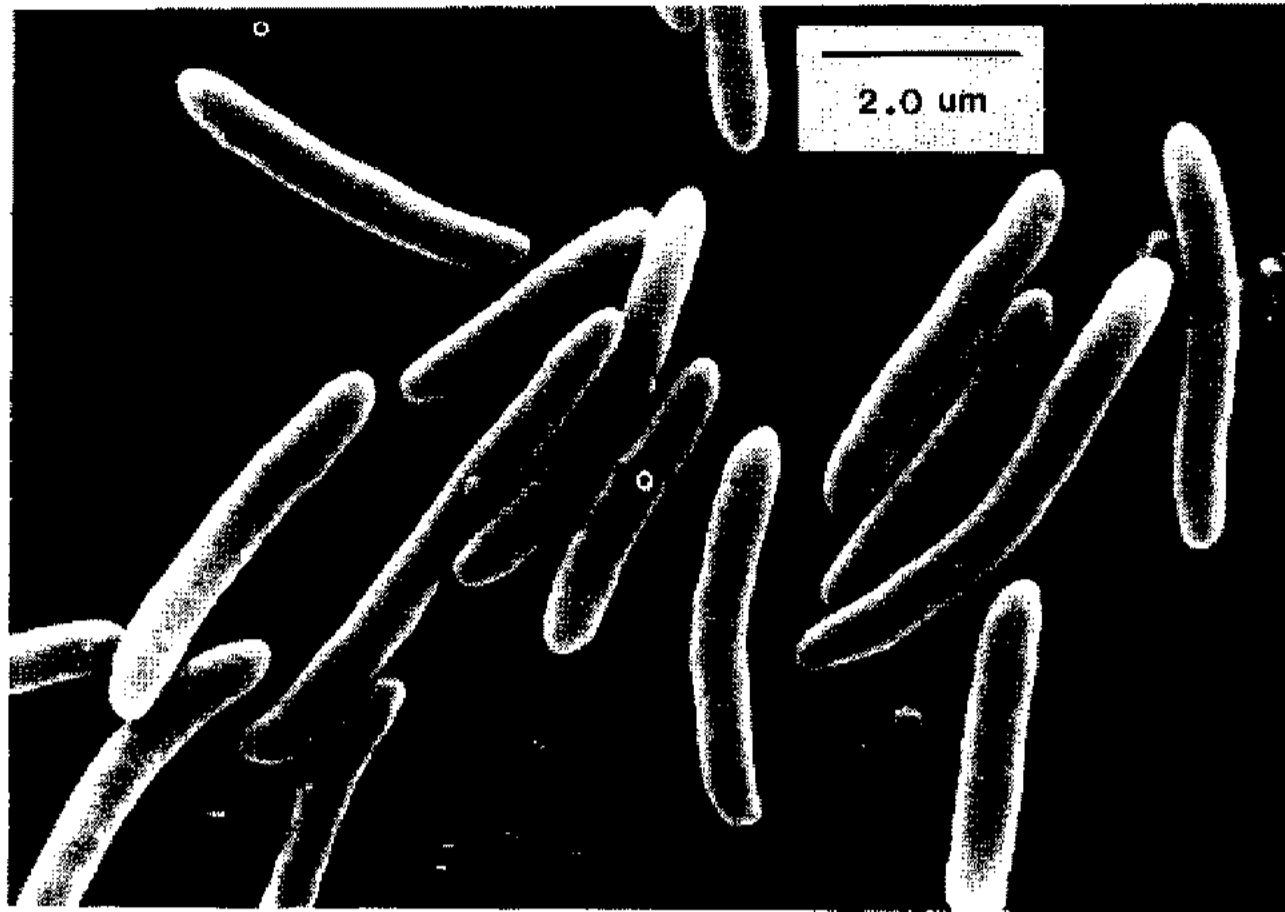


Fig. 1. Photograph of flocculant-producing isolate A56. Isolate A56 was incubated in the medium composed of 0.1% glucose, 0.3% peptone, 0.2% yeast ext. and 0.2% CaCl_2 at 30°C for 48 hrs.

배양온도와 초기 pH의 영향: 본 균주의 생육과 응집제 생산에 미치는 온도 및 초기 pH의 영향을 조사하기 위하여 기초배지에 균을 접종하여 각 온도별, pH별로 72시간 배양하여 균의 생육과 응집활성을 조사하였다(Fig. 2). 생육 최적온도는 28°C ~ 32°C 이었고, 응집활성은 30°C 에서 최고치를 보였으며, 25°C 와 35°C 에서는 75% 정도의 활성을 나타내었다. 생육 최적 초기 pH는 8 부근이었으며, 6.5 이하의 산성조건에서는 급격히 생육이 저하되었다. 그러나, 응집활성은 초기 pH 6.5에서 최고의 값을 보였고, pH 6~9 이외의 범위에서는 응집활성이 급격히 감소하였다. 초기 pH 6.5에서 균체량은 낮은 수준이지만 응집활성은 가장 높은 값을 나타내는 것으로 보아 균체생육과 응집활성 사이에는 직접적인 상관관계가 없었으며, 배양 초기 pH가 응집능에 중요한 요소로 작용하였다.

탄소원의 영향: 본 균주의 생육과 응집활성에 미치는 탄소원의 영향을 조사하기 위하여 기초배지에 각종 탄소원을 2.0% 되도록 첨가하여 pH 6.5, 배양 온도 30°C 에서 72시간 배양한 결과는 Fig. 3과 같다. 균의 생육은 dextrin 첨가시 가장 높았으나, 응집활성은 glucose, inositol, lactose 첨가시 우수한 결과를 보였고, 당당류 첨가가 starch나 dextrin과 같은 다당류 첨가보다 높은 응집활성을 유도하였다. 이하의 실험에서 탄소원으로는 glucose를 사용하였다.

무기질소원의 영향: Glucose를 탄소원으로 한 배지에 각각의 무기질소원을 0.2% 첨가하여 응집활성과 균체생육을 조사하였다(Fig. 4). 본 균주는 균체생육과 응집활성에 nitrate 이온보다는 ammonium 이온을 더

Table 1. Taxonomical properties of the strain A56

Morphological ¹	
Gram stain	positive
Shape	rod
Cell size	0.5~0.7 μm × 3.7~8.5 μm
Motility	motile
Flagella	found
Physiological	
Optimum temperature	30°C
Oxidase	-
Catalase	+
Urease	-
O/F ² test	F
Anaerobic growth	+
KCN medium tolerance	-
Methyl red test	+
Voges-Proskauer reaction	+
Indole test	-
Gelatin liquefaction	-
Arginine decarboxylation	-
Lysine decarboxylation	-
Ornithine decarboxylation	-
Aesculin hydrolysis	+
Acid production from ³	
Adonitol	-
Arabinose	+
Dulcitol	-
Glycerol	-
Inositol	-
Lactose	+
Maltose	+
Mannitol	+
Rhamnose	-
Salicin	+
Sucrose	+
Trehalose	+
Xylose	+

¹Morphological properties were examined after 24 hours cultivation

²Oxidation-Fermentation

³Basal medium(g/l): Proteose peptone 10, Bacto beef extract 1, NaCl 5, Bromocresol purple 0.02

잘 이용하는 것으로 나타났으며, ammonium nitrate 첨가시 가장 높은 응집활성을 보였다.

유기질소원의 영향: 무기질소원으로 NH_4NO_3 를 포함하는 배지에 각종 유기질소원을 0.01% 첨가하여 응집활성과 균체생육을 조사하였다(Fig. 5). 조사된

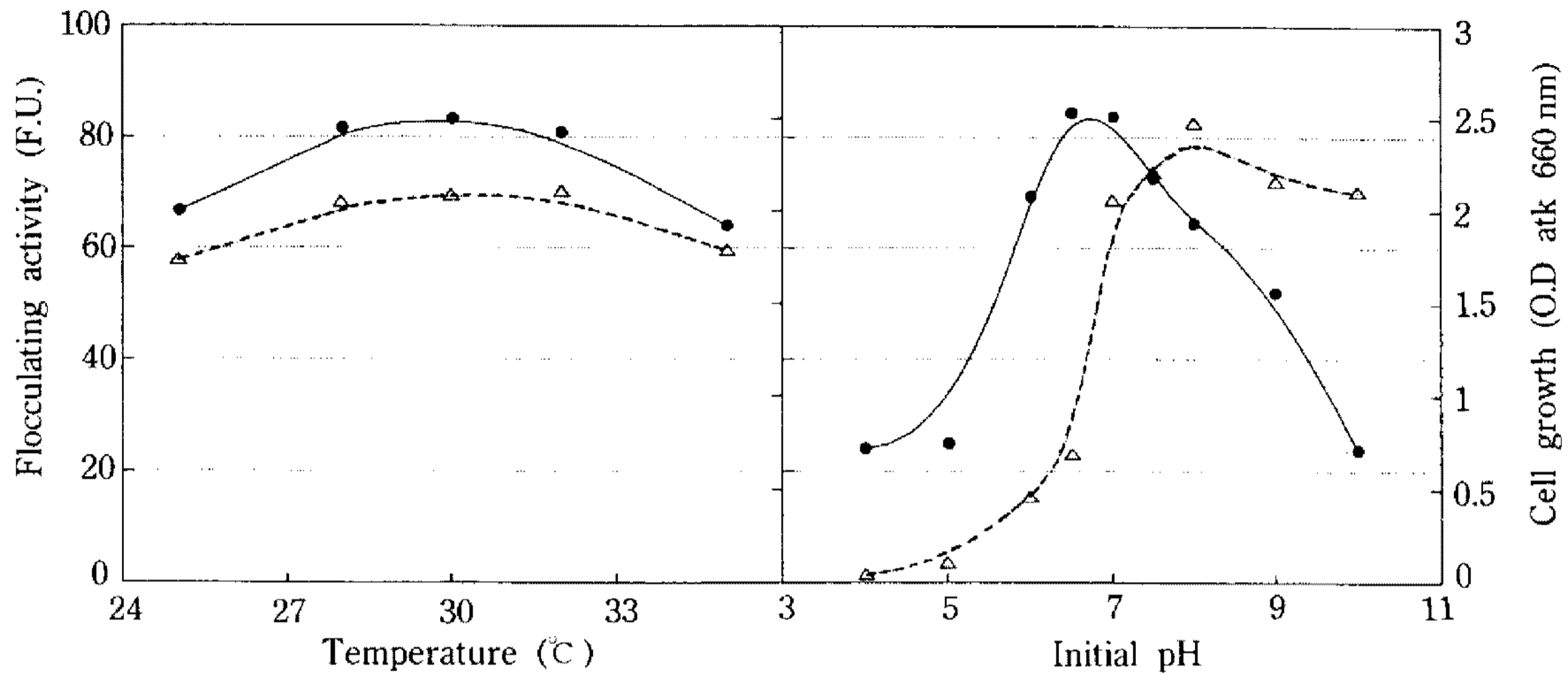


Fig. 2. Effect of temperature and initial pH on flocculant production and cell growth. Cultivation was performed with 500-ml erlenmeyer flask containing basal medium at 120 rpm for 72 hr. ●: Activity, △: Cell growth

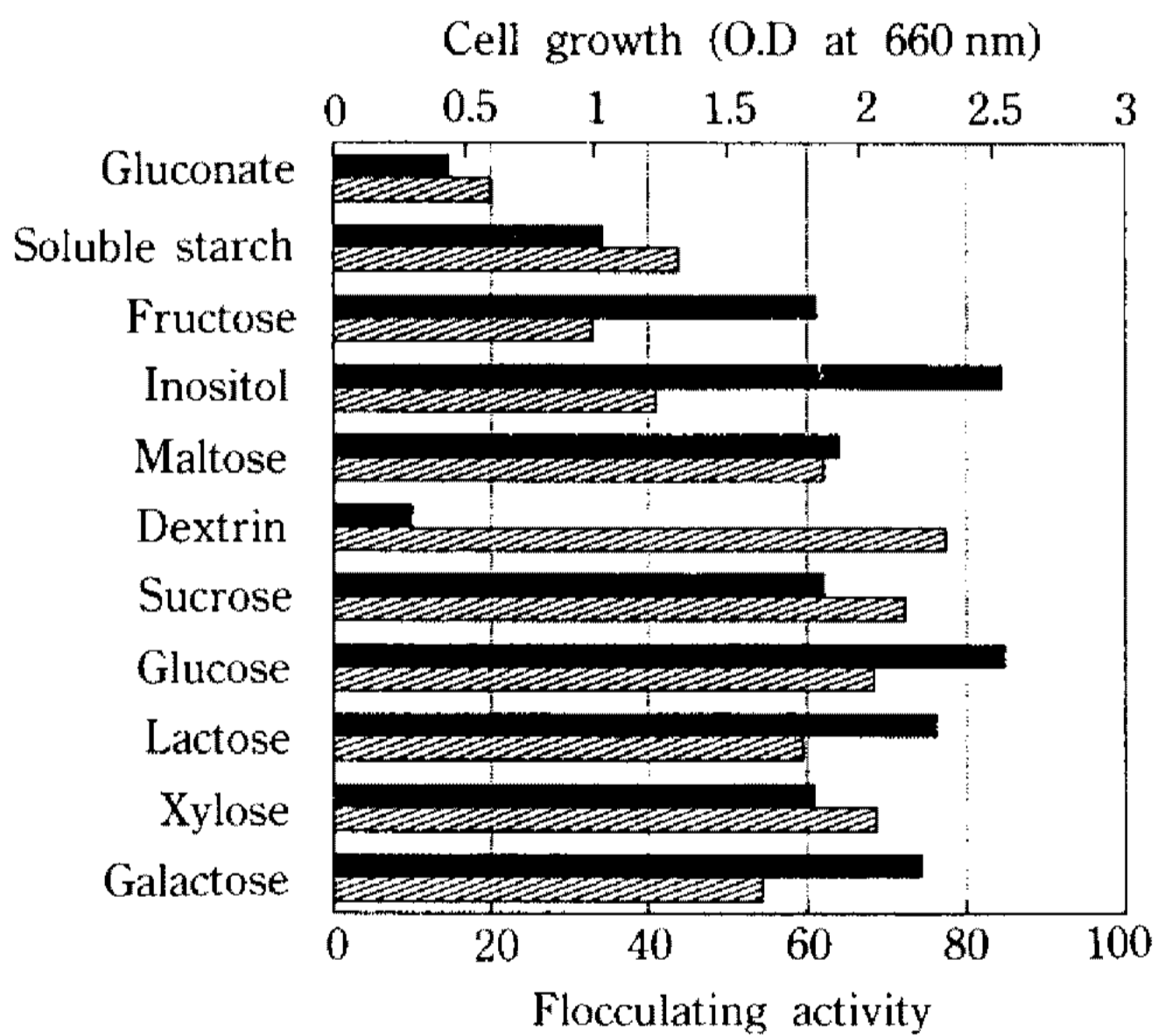


Fig. 3. Effect of carbon sources on flocculant production and cell growth. Cultured with basal medium containing 2.0% carbon sources at 30°C and pH 6.5. ■: Activity, ▨: Cell growth

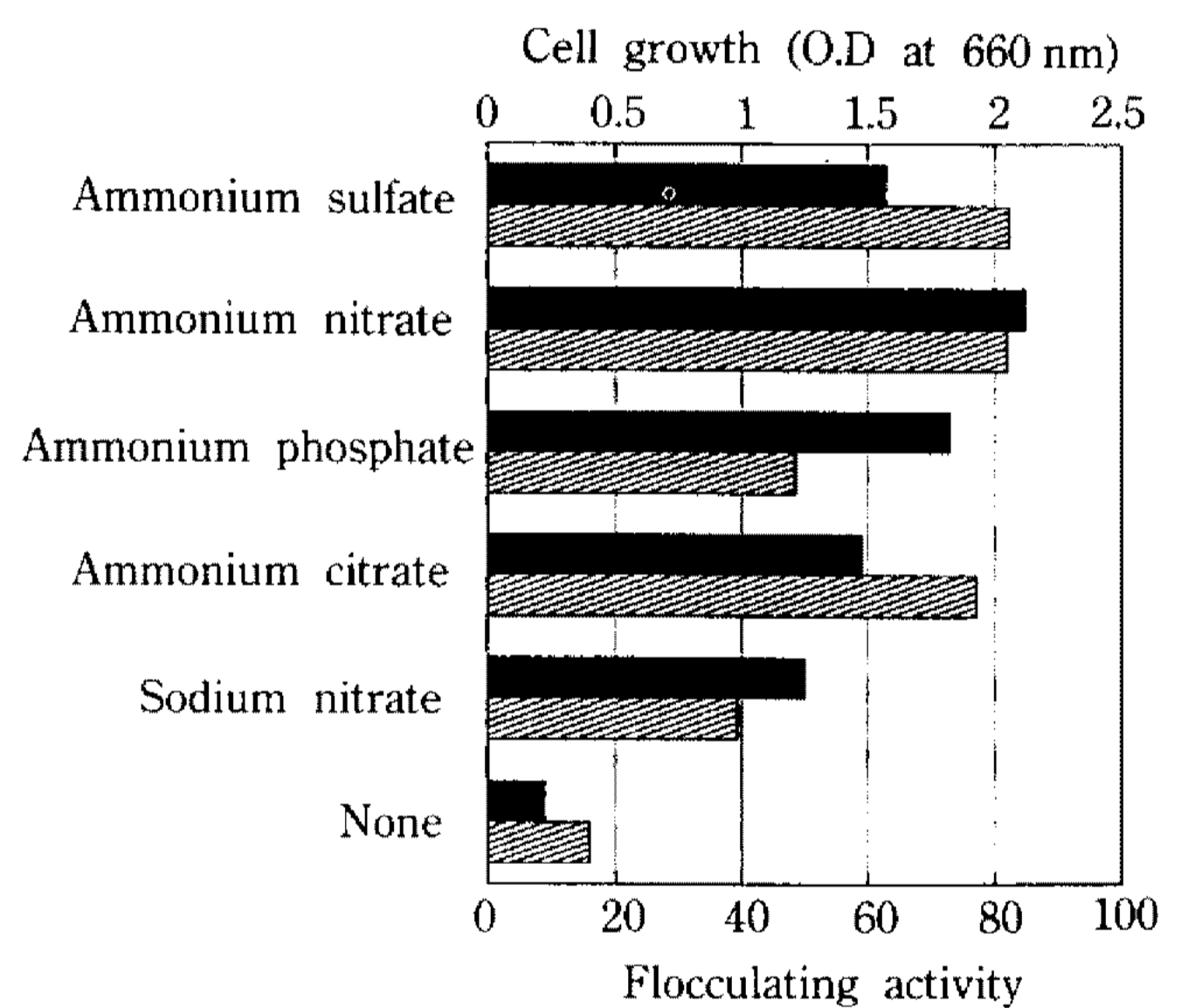


Fig. 4. Effect of inorganic nitrogen sources on flocculant production and cell growth. The medium contained 0.2% inorganic nitrogen sources. ■: Activity, ▨: Cell growth

유기질소원중 yeast extract와 tryptone을 1:1의 비율로 혼합첨가했을 때, 응집활성이 가장 우수하였으며, 유기질소원 무첨가보다 약 1.6배 향상된 응집활성을 보였다. 유기질소원(yeast ext.+tryptone)을 농도별로 첨가한 결과(Fig. 6) 균체량은 0.1% 첨가시까지 증가하였고, 응집활성은 0.06% 첨가시까지 비례적으로 증가하였다. 따라서 이하의 실험에서는 yeast extract와 tryptone을 1:1의 비율인 0.03%씩 첨가하였다.

무기염류의 영향: 본 균주의 응집활성과 생육에 미치는 무기염류의 영향을 조사하기 위하여 각 무기염류를 0.01% 첨가하였다(Fig. 7). Ca^{2+} 이온($CaCl_2$, $CaCO_3$)과 Mn^{2+} 이온($MnSO_4$) 첨가시 효과적인 응집활성을 보였으며, $CaCO_3$ 와 $MnSO_4$ 의 혼합첨가시 무첨가의 경우보다 1.5배 이상의 응집활성을 보여 최고의 활성을 나타내었다. Manganese 첨가가 다당류 생산을 촉진한다는 사실은 Appanna(19)의 *Rhizobium*속 균주에 의한 균체외 다당류 생산에서 보고된

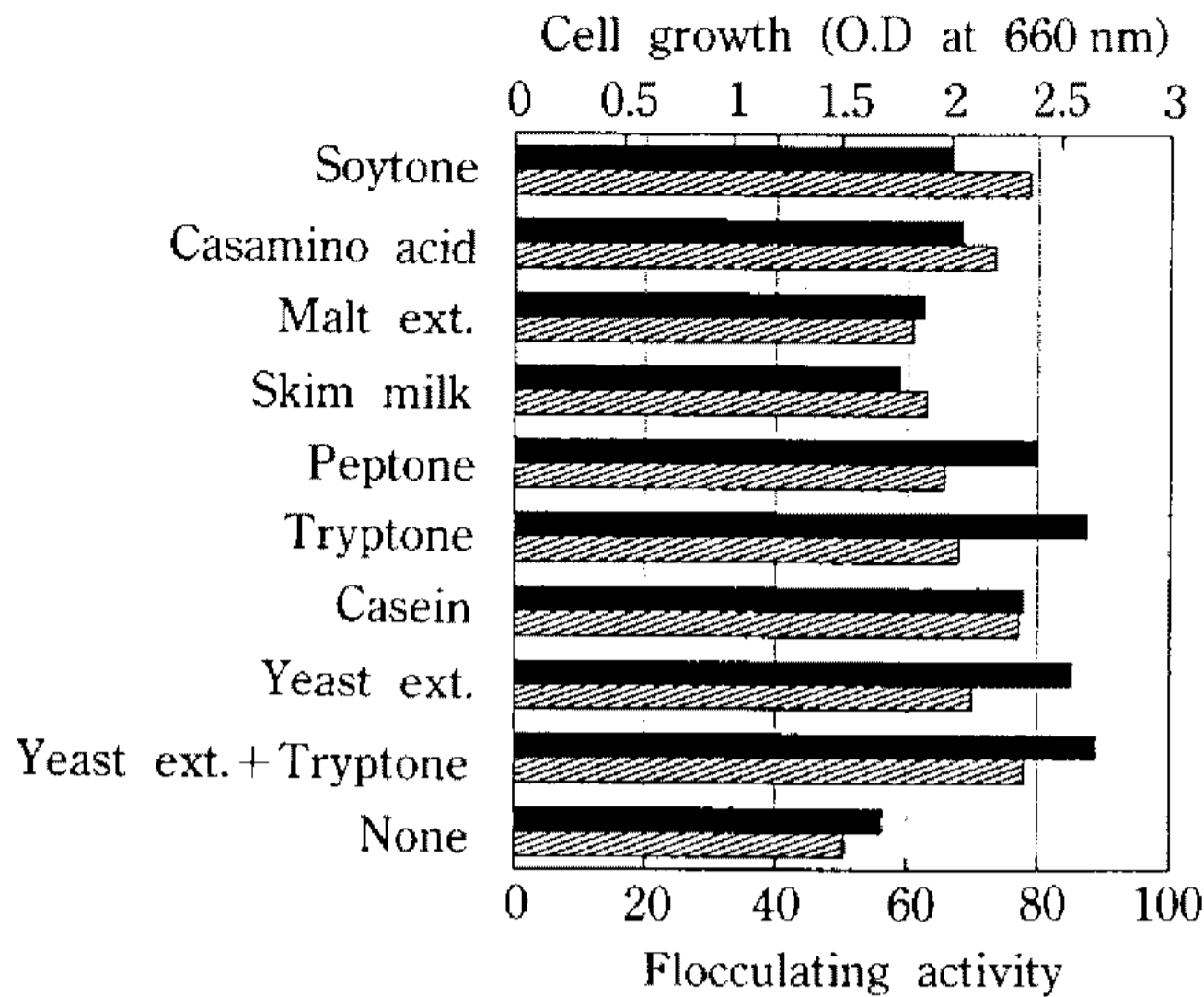


Fig. 5. Effect of organic nitrogen sources on flocculant production and cell growth.

Each organic nitrogen source was added at the concentration of 0.01%.

■: Activity, ▨: Cell growth

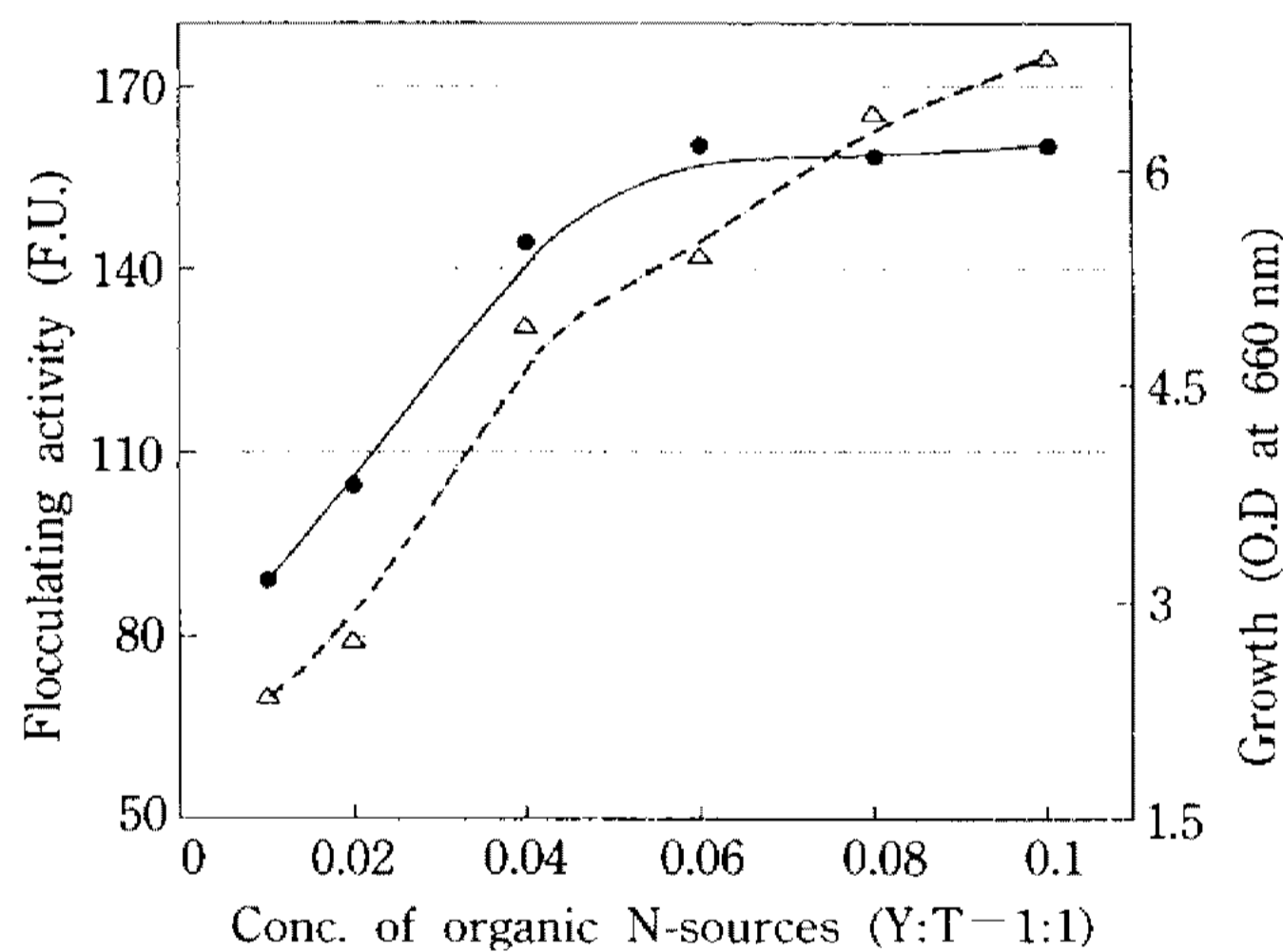


Fig. 6. Effect of organic nitrogen concentration on flocculant production and cell growth.

The media contained yeast extract and tryptone at the ratio of 1:1.

●: Activity, △: Cell growth

바 있으며, Kurane 등(14)이 산성 pH 범위에서는 응집제생산이 억제된다고 보고한 것으로 보아 calcium carbonate는 pH 저하를 막는 역할을 하여 다당류 생산을 높인 것으로 보인다. CaCO₃와 MnSO₄의 농도가 응집활성에 미치는 영향은 Fig. 8과 같다. CaCO₃는 0.05%에서 최고의 응집활성을 보였고, MnSO₄는 0.03% 첨가했을 때 가장 높은 응집활성을 보여 이하의 실험에서는 CaCO₃ 0.05%, MnSO₄ 0.03%를 첨가하였다.

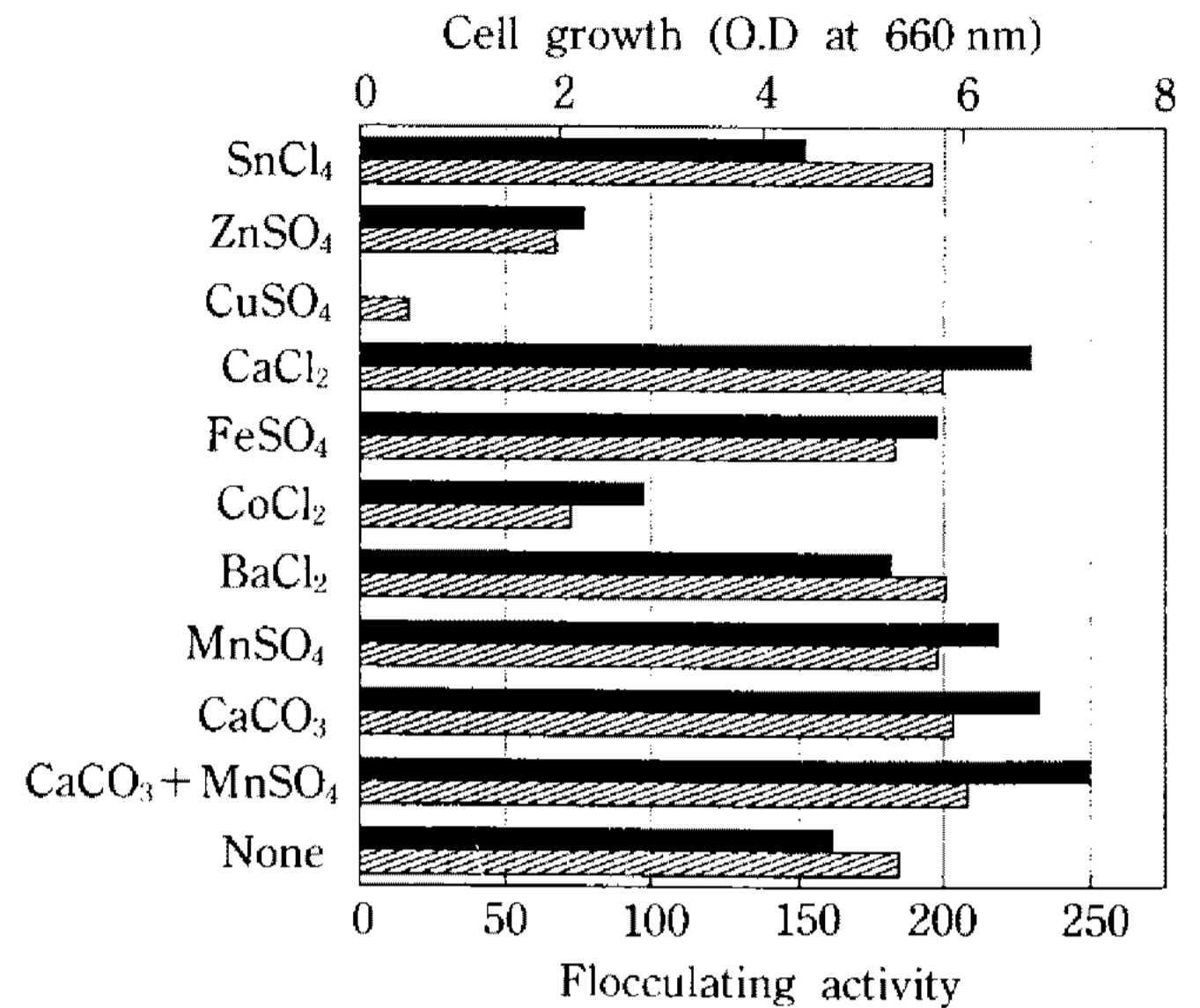


Fig. 7. Effect of inorganic salts on flocculant production and cell growth.

Each inorganic salt was added at the concentration of 0.01%.

■: Activity, ▨: Cell growth

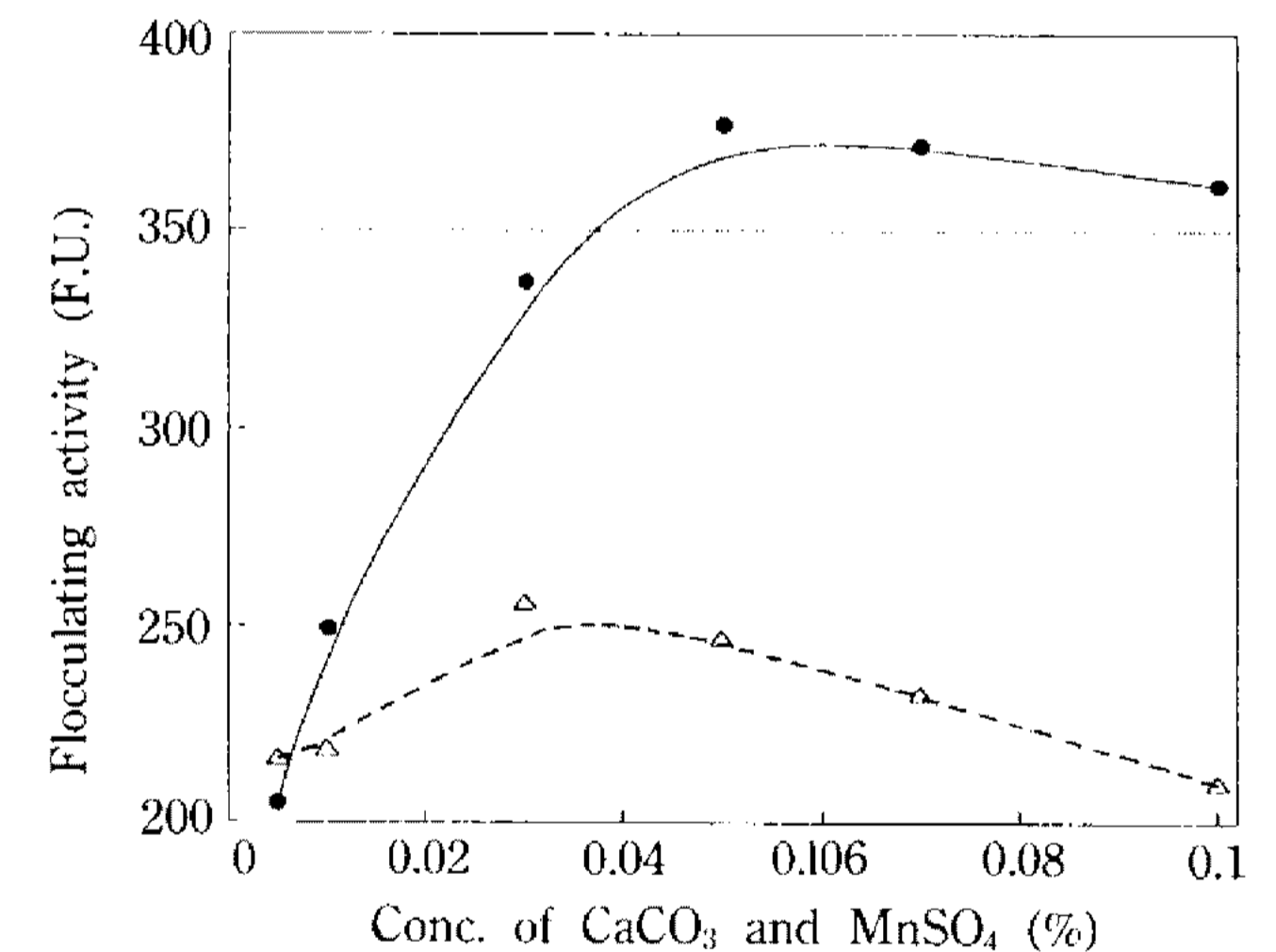


Fig. 8. Effect of CaCO₃ and MnSO₄ concentration on flocculant production and cell growth.

●: CaCO₃, △: MnSO₄

Potassium phosphate, magnesium sulfate, sodium chloride의 영향: 기초배지 성분인 K₂HPO₄/KH₂PO₄, MgSO₄, NaCl의 제한이 응집활성에 미치는 영향을 조사하기 위하여 각각의 성분을 기초배지 성분의 1/10 및 5배 되도록 하여 응집활성을 조사하였다 (Table 2). Potassium phosphate나 sodium chloride 성분을 제한한 경우 응집활성에 아무런 영향을 미치지 않았으나, magnesium sulfate 제한상태에서는 응집활성이 증가하는 것으로 나타났다. Magnesium sul-

Table 2. Effect of the limitation of some components on flocculant production

Components	Flocculating activity		
	Basal (×1)	Limitation (×10 ⁻¹)	Rich (×5)
Potassium phosphate	412.4	396.8	411.7
Magnesium sulfate	412.4	436.8	351.5
Sodium chloride	412.4	416.4	412.7

Cultivation was performed with 500-ml Erlenmeyer flask containing 2% glucose and 0.2% NH₄NO₃ for 72 hr.

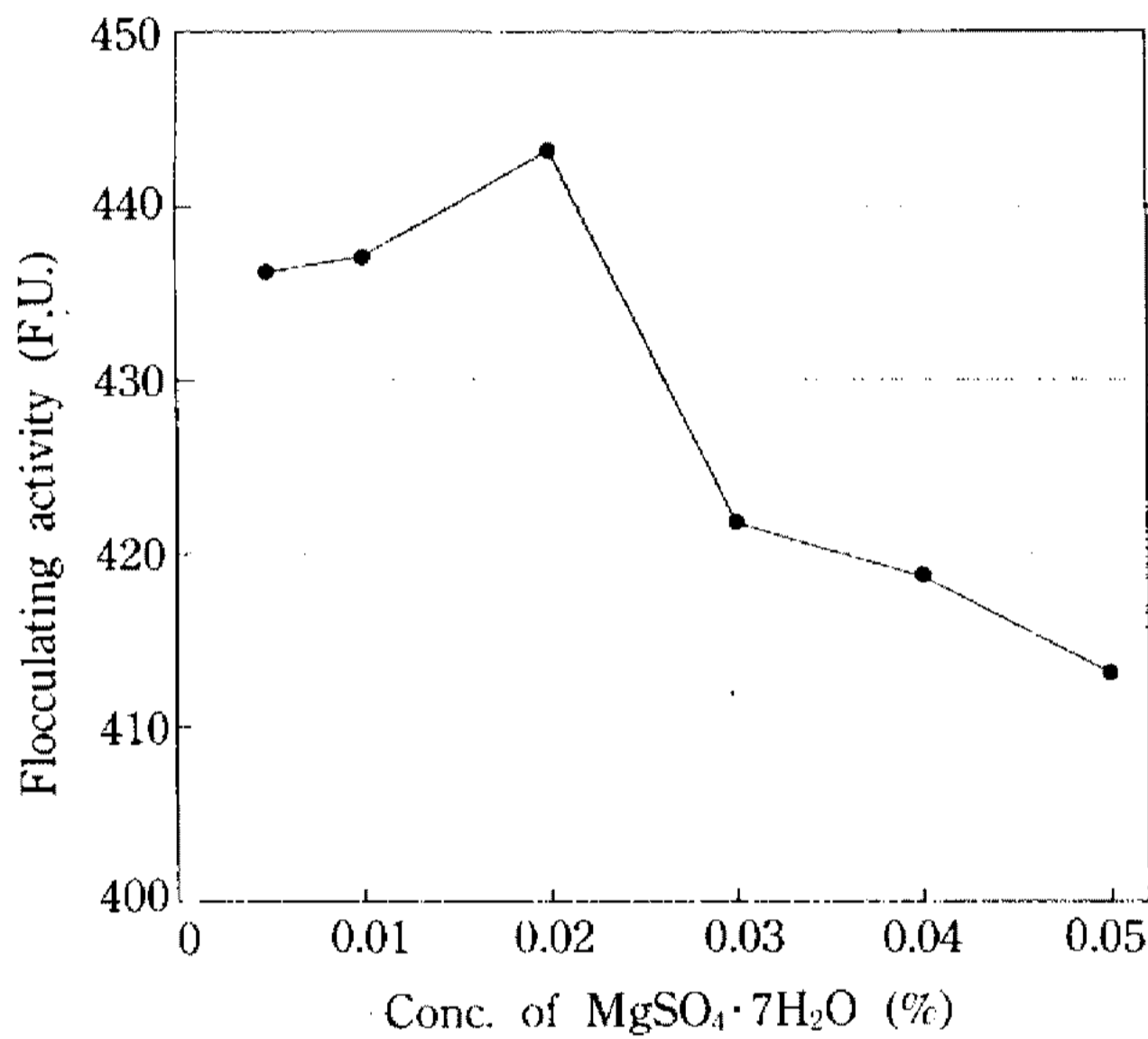


Fig. 9. Effect of MgSO₄·7H₂O concentration on flocculant production and cell growth.

fate를 농도별로 첨가하여 조사한 결과는 Fig. 9와 같다. 응집활성은 0.02%에서 가장 높았으며, 0.02% 이상의 농도에서는 응집활성이 감소하였다. 이하의 실험에서 MgSO₄의 경우 0.02% 첨가하였다.

C/N ratio의 영향: 이상의 실험에서 최적화된 배지성분에 탄소원(glucose)과 무기질소원(NH₄NO₃)의 비(C/N ratio)를 달리하여 응집활성과 균체생육을 조사하였다(Table 3). 균체생육은 glucose 농도 2.0%에서는 C/N ratio의 영향을 받지 않는 것으로 나타났으며, 3.0% 이상의 glucose 농도에서는 C/N ratio가 낮을수록 균체량이 증가하였다. Glucose 농도 2.0%일 때 C/N ratio 40에서 가장 높은 응집활성을 보였고, glucose 농도에 관계없이 C/N ratio가 높을수록 응집활성이 증가하였다. 이상과 같이 최적화된 배지에

Table 3. Effects of C/N ratio on flocculant production and cell growth

C/N ratio	2%		3%		4%	
	F	C	F	C	F	C
50			796.1	4.58	783.7	4.74
40	821.6	6.04				
30	692.5	5.62	781.1	5.62	680.2	4.88
20	732.9	4.95	775.6	6.89	578.2	7.64
10	587.5	5.43	591.5	8.51	442.8	7.95
5	326.1	5.63	483.8	8.85	442.6	9.62

F: Flocculating activity, C: Cell growth (O.D at 660 nm)

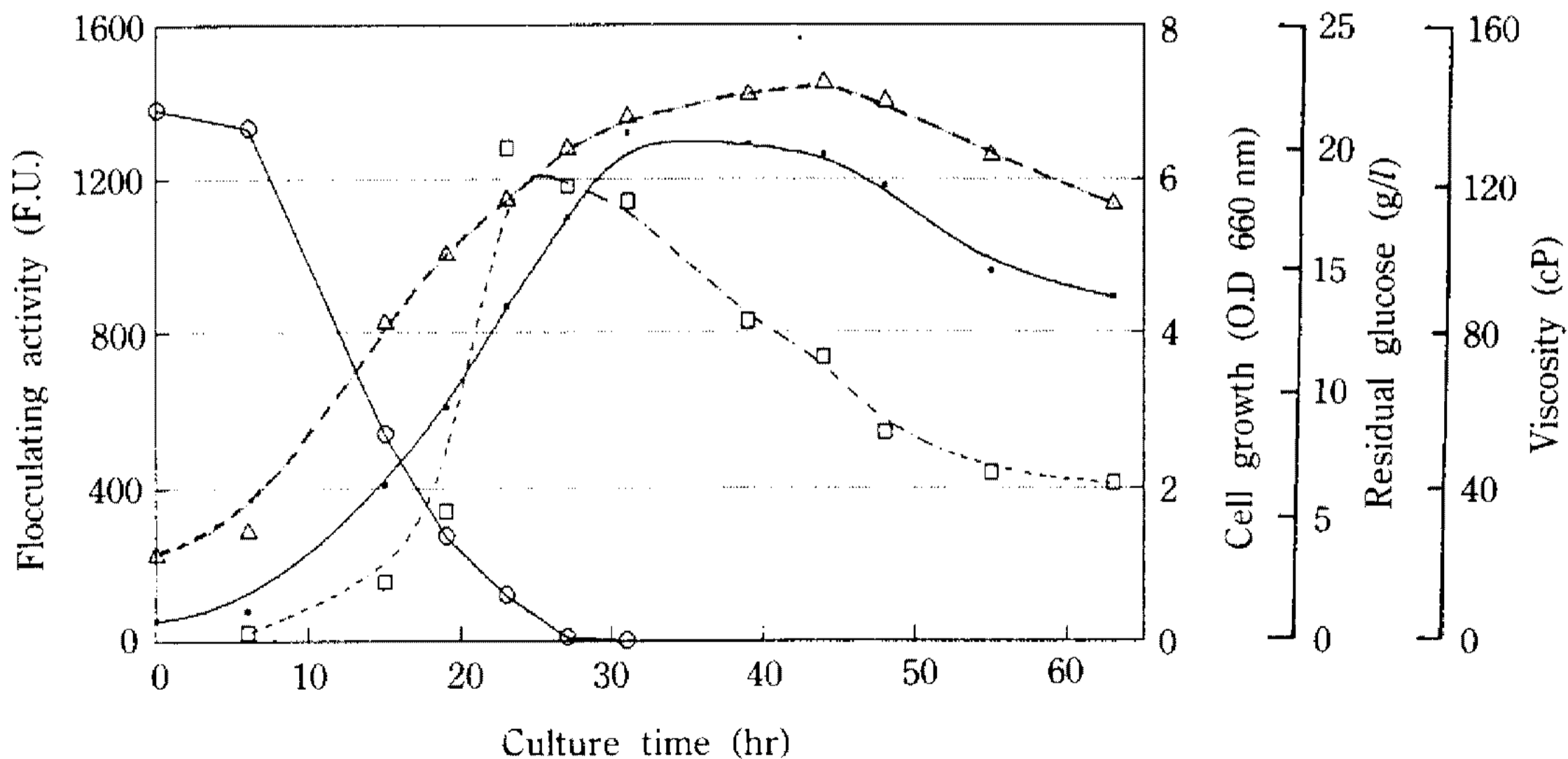


Fig. 10. Time course of flocculant production in jar fermentor.

Cultivation was carried out under the following conditions: working vol. 1l, aeration 1.0 vvm, impeller speed 200~1000 rpm, temperature 30°C and C/N ratio 40 in 2.0% glucose medium.

■: Activity, △: Cell growth, ○: Residual glucose, ▭: Viscosity

서의 응집 활성은 기초배지에서 보다 약 10배 정도 향상되었으며, 균체량은 약 3배 정도 증가하였다.

Jar fermentor에서의 응집제 생산

Flask level에서 최적화된 배지를 이용한 jar fermentor 배양에서는 배양 30시간에 최고의 응집활성을 보였다(Fig. 10). Shu 등(20)의 *Xanthomonas campestris*를 이용한 xanthan의 생산이 균체 대수증식기 초기부터 시작하여 정지기까지 계속된 것과 Kurane 등(14)의 *Rhodococcus erythropolis*를 이용한 응집제 생산이 균체증식곡선을 따라 증가한다는 보고와 비슷하게 응집활성이 균체량증가와 함께 증가하는 것을 보였다. 이 결과는 flask에서 배양하였을 경우(Fig. 3)와 상이한 결과를 나타내는데, flask level에서는 배양액의 pH 또는 용존산소 등이 율속인자가 되어 생육 및 응집활성에 영향을 미치는 것으로 생각된다. 배양 30시간 이후부터는 glucose가 모두 고갈되었으며, 이때 점도의 감소와 함께 응집활성도 저하되었다. Jar fermentor 배양에서의 응집활성은 flask 배양에서 보다 1.5배 정도 증가하였으며, 배양시간도 72시간에서 30시간으로 단축되었다.

요 약

토양에서 분리된 응집제 생산균주 A56은 gram 양성균이고, 운동성을 가진 간균으로 *Bacillus* sp.에 속하는 균주로 동정되어 최종적으로 *Bacillus* sp. A56으로 명명하였다. *Bacillus* sp. A56의 응집제 생산을 위한 최적 배양온도 및 초기 pH는 각각 30°C와 pH 6.5로 나타났으며, 탄소원과 질소원으로서는 glucose와 NH₄NO₃가 첨가된 배지에서 가장 높은 응집활성을 보였다. 유기질소원인 yeast extract와 tryptone의 경우 1:1의 비율인 0.03%씩을 각각 첨가했을 때 응집활성과 균체증식을 향상시키는 것으로 나타났다. 한편, CaCO₃와 MnSO₄도 응집활성을 높이는데 중요한 성분으로 작용하였으며, MgSO₄·7H₂O는 0.02% 농도 이상에서는 응집제 생산을 저해하는 것으로 나타났다. 응집제 생산을 위한 최적 C/N비(glucose/NH₄NO₃)는 2%(w/v) glucose 농도에서 40이었으며, 최적 배양 조건에서의 응집활성은 기초배지에서 보다 약 10배 정도 향상되었다. 또, jar fermentor 배양에서는 flask 배양시보다 배양시간이 단축되어 배양 30시간에 최고의 응집활성을 보였으며, 응집활성은 1.5배 증가하였다.

참고문헌

1. Gasner, L.L. and D.I.C. Wang. 1970. Microbial cell recovery enhancement through flocculation. *Biotech. Bioeng.* **12**: 873-887.
2. Tago, Y. and K. Aida. 1977. Exocellular mucopolysaccharide closely related to bacterial floc formation. *Appl. Environ. Microbiol.* **34**: 308-314.
3. Miki, B.L.A., N. Hung Poon, A.P. James and V.L. Seligy. 1982. Possible mechanism for flocculation interaction governed by gene FLO1 in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Bacteriol.* **150**: 878-889.
4. Miki, B.L.A., N. Hung Poon and V.L. Seligy. 1982. Repression and induction of flocculation interaction in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Bacteriol.* **150**: 890-899.
5. Nakamura, J., S. Miyashiro and Y. Hirose. 1976. Screening, isolation and some properties of microbial cell flocculants. *Agr. Biol. Chem.* **40**: 377-383.
6. Unz, R.F. and S.R. Farrah. 1976. Exopolymer production and flocculation by *Zoogloea* MP6. *Appl. Environ. Microbiol.* **31**: 623-626.
7. Gutcho, S. 1977. Waste Treatment with Polyelectrolytes and Other Flocculants. pp. 1-37, Noyes Data Corp., Park Ridge, New Jersey, U.S.A.
8. Toeda, K. and R. Kurane. 1991. Microbial flocculant from *Alcaligenes cupidus* KT201. *Agr. Biol. Chem.* **55**: 2793-2799.
9. Kurane, R. and Y. Nohata. 1991. Microbial flocculation of waste liquids and oil emulsion by a bioflocculant from *Alcaligenes latus*. *Agr. Biol. Chem.* **55**: 1127-1129.
10. Koizumi, J., M. Takeda, R. Kurane and I. Nakamura. 1991. Synergetic flocculation of the bioflocculant fix extracellularly produced by *Nocardia amarae*. *J. Gen. Appl. Microbiol.* **37**: 447-454.
11. Takagi, H. and K. Kadowaki. 1985. Flocculant production by *Paccilomyces* sp. Taxonomic studies and culture conditions for production. *Agr. Biol. Chem.* **49**: 3151-3157.
12. Kurane, R., K. Takeda and T. Suzuki. 1986. Screening for and characteristics of microbial flocculants. *Agr. Biol. Chem.* **50**: 2301-2307.
13. Zajic, J.E. and A. Leduy. 1973. Flocculant and chemical properties of a polysaccharide from *Pullularia pullulans*. *Appl. Microbiol.* **25**: 628-635.
14. Kurane, R., K. Toeda, K. Takeda and T. Suzuki. 1986. Cultural conditions for production of microbial flocculant by *Rhodococcus erythropolis*. *Agr. Biol. Chem.* **50**: 2309-2313.
15. Takagi, H. and K. Kadowaki. 1985. Purification

- and chemical properties of a flocculant produced by *Paecilomyces*. *Agr. Biol. Chem.* **49**: 3159-3164.
16. Cowan, S.T. 1974. *Manual for the Identification of Medical Bacteria* 2nd ed. Cambridge Univ. Press.
 17. Mac Faddin, J.F. 1984. *Biochemical Tests for Identification of Medical Bacteria*. 2nd ed. Williams & Wilkins Co.
 18. Krieg, N.R. and J.G. Holt. 1984. *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. 9th ed. Williams & Wilkins Co.
 19. Appanna, V.D. 1988. Stimulation of exopolysaccharide production in *Rhizobium meliloti* JJ-1 by manganese. *Biotechnol. Lett.* **10**: 205-206.
 20. Shu, C.H. and S.T. Yang. 1990. Effects of temperature on cell growth and xanthan production in batch cultures of *Xanthomonas campestris*. *Biotech. Bioeng.* **35**: 454-468.

(Received August 4, 1993)