

Enterobacter sp.의 다당 발효 중 배양액의 유변학 특성

이주하 · 이신영*

강원대학교 환경생물공학부, 바이오 셀 (주)

Rheological Properties of Culture Broth during Exo-Polysaccharide Fermentation of *Enterobacter* sp.

Ju-Ha Lee and Shin-Young Lee*

*Division of Environmental and Biological Engineering, Kangwon National University,
Chunchon 200-701, Korea
Biocell Co. Ltd., Kyunggi 445-920, Korea

Abstract

The rheology of fermentation broth during the production of exo-polysaccharide by an *Enterobacter* sp. isolated from the organic composter was investigated. The culture broth showed the non-Newtonian fluid behavior with higher degree of viscosity and pseudoplasticity as the cultivation proceeded. The rheological parameters such as flow index, consistency index, yield stress and apparent viscosity during the cultivation were not influenced by the cell density, but significantly related to the exo-polysaccharide production. Especially, the trend in changes of rheological parameters were well correlated with the state and progress of fermentation process. Therefore, it was suggested that the measurement in rheological parameters during cultivation of *Enterobacter* sp. could be used as an effective criteria for the detection of the fermentation process.

Key words: *Enterobacter* sp., rheology, culture broth, exo-polysaccharide production

서 론

탄수화물계 고분자(carbohydrate polymer)인 다당류는 생물계에서 가장 풍부하게 존재하며, 또 가장 오랫동안 사용되어온 대표적인 생물고분자이다(Yalpani, 1988). 이들 다당의 수용액은 점성을 갖거나 분산을 용이하게 하는 성질을 지니므로 조건에 따라 겔 형성능, 점착능, 윤활능 및 필름 형성능 등 광범위한 물성 기능성을 갖는다(Lee, 1992). 따라서 다당류는 그 동안 식품공업을 비롯한 농업, 제약, 제지, 직물 등 각종 산업분야에서 물성 소재로서 널리 이용되어 왔는데, 최근에는 생리기능 소재로서

도 크게 주목받아 바이오 의약품과 같은 부가가치 높은 제품의 개발 및 High-Tech에의 응용도 활발해지고 있다(Park, 1996).

특히, 미생물 다당류는 지금까지 상업적으로 이용되어 왔던 식물이나 해조류 유래의 다당과는 다른 독특한 물성 기능과 생리활성을 나타내며, 대량 생산도 가능하여 산업적 및 학문적인 관심이 더욱 고조되고 있다(Sutherland, 1996; Pintado *et al.*, 1999). 하지만 대부분의 미생물 다당 발효에서는 다당의 분자량이 수십만에서 수백만에 이르는 매우 큰 분자이므로 발효 중 배양액의 점도가 현저하게 증가하는 등 복잡한 유변학적 거동의 변화를 보여 산업적 응용을 어렵게 하고 있다(Charles, 1978; Landon *et al.*, 1993). 이는 이러한 유변학적 성질의 변화가 기체-액체간의 산소 전달 속도를 감소시키고 결과적으로 발효 수율을 현저히 저하시키며, 특히, 현저한 점도의 증가는 기질 및 생성물의 분석

Corresponding author : Division of Environmental and Biological Engineering, Kangwon National University, Chunchon 200-701, Korea
Tel: (033) 250-6273, Fax: (033) 243-6350
E-mail: sylee@kangwon.ac.kr

과 조절을 어렵게 하고, 다당의 대량 생산 및 회수에 있어서도 큰 장애가 되기 때문이다(Charles, 1978). 더구나 균일한 교반을 어렵게 함으로써 기계적인 교반식 발효조를 이용할 때는 교반 소비 에너지가 총 생산비의 20~30%나 되는 등, 다당 발효 시의 큰 문제점이 되고 있다(Taguchi, 1971).

그러므로 미생물 다당 배양액의 유변학적 성질을 파악하는 것은 효율적인 다당 발효공정의 설계, 발효 운전조작 조건의 최적화, 발효조의 설계 및 scale-up 등의 평가 측면에서 매우 중요하다(Taguchi, 1971).

지금까지 배양액의 유변학적 연구는 대규모 발효에서의 발효 배양액의 물질, 열 및 운동량의 전달 측면에서 보다 정량적인 정보를 얻기 위하여 수행되었다. 하지만 아직도 이들 연구는 비교적 미흡한 실정이어서 일부 배양 조건을 변화시켜 점도를 낮게 유지하거나(Kuratsu와 Innzuka, 1985), 점도의 측정에 의하여 발효의 진행 상태를 알리는 연구 등이 보고되고 있는 정도이다(Norberg와 Enfors, 1982; Fatile, 1985).

저자 등은 그 동안 유기성 폐기물의 composting에 사용하였던 토양 유래의 미생물 복합체(Hong과 Lee, 1999)로부터 분리한 *Enterobacter* sp.가 이당류인 유당을 자화하여 mannose, galactose 및 galacturonic acid를 구성당으로 하는 약 3.7×10^5 dalton의 hetro 다당을 생성함을 보고하였는데(Kim과 Lee, 2001), 배양시간의 경과에 따라 배양액의 점도가 현저히 높아져 물질전달을 저해하는 것으로 나타났다.

본 연구에서는 이 *Enterobacter* sp.가 생산하는 다당의 대량 생산을 위한 배양액의 특성 규명 및 반응기 설계, 조작의 향상 연구 일환으로, 다당 발효 중 배양액의 유변학 특성을 조사하였다. 아울러, 이들의 변화와 균체 증식, 기질 소비 및 다당 생성과의 상관관계를 검토하여 발효 진행 지표로서의 응용 가능성을 검토하였다.

재료 및 방법

균주 및 보존

본 연구에 사용한 균주는 유기성 폐기물의 composting에 사용하였던 토양 유래의 복합 발효 미생물체로부터 분리, 동정한 *Enterobacter* sp.이다(Kim과 Lee, 2001). YM agar plate에서 24시간 배양하고, 점질성을 나타내는 colony를 단리하여 보

존용 배지에서 30°C로 24시간 배양한 후, 4°C에서 보존하였고, 4주마다 계대배양하여 실험에 사용하였다.

배지 조성 및 조제

전배양 및 본배양의 배지는 lactose 10 g/L, Bacto-peptone 5 g/L, malt extract 3 g/L 및 yeast extract 3 g/L를 함유한 pH 7.0의 MYM(Modified Yeast Malt) broth 배지이었다. 탄소원과 질소원은 각각 분리하여 121°C에서 15분간 가압 멸균한 후 혼합하여 사용하였고, pH는 멸균 전에 1N HCl 또는 1N NaOH로 조절하였다.

배양

접종균의 전 배양은 보관 균주를 30°C에서 24시간 동안 배양하여 활성화시킨 후, MYM broth 20 mL를 함유한 100 mL 삼각 flask에 백금으로 1회 접종하여 30°C, 120 rpm에서 20시간 진탕배양하였으며, 이를 전 배양액으로 사용하였다. 본 배양은 전 배양액을 배지 50 mL을 함유한 250 mL 삼각 flask에 4%(v/v) 접종한 후, 30°C, 120 rpm에서 40시간 동안 진탕배양하였다.

균체량의 측정

20시간 진탕배양한 배양액을 45,000×g에서 40분간 원심분리하여 얻은 균체를 증류수로 2회 수세한 후, UV/Vis Spectrophotometer (Perkin-Elmer, 552S)를 이용하여 660 nm에서 OD(optical density)를 측정하였고, 균체량과 OD에 대한 표준곡선으로부터 건조 균체 중량으로 환산하였다.

다당 및 잔존당의 정량

다당의 생성량은 배양액을 원심분리하여 균체를 제거한 다음, 배양액에 2.5배의 acetone을 가하고 침전된 침전물의 양을 70°C에서 12시간 건조한 후, desiccator에서 항량이 되었을 때의 중량을 건조 중량으로 하였다. 한편, 잔존당은 균체 및 생성물을 제거한 배양액을 회전증발기에서 최종 부피가 3 mL가 되도록 조절한 후, Biochemistry Analyzer (YSI, Model 2700)로 lactose, glucose 및 galactose를 각각 측정하였다.

배양액의 유변학적 특성 측정 및 특성값의 산출

유변학 특성은 플라스크에서 40시간 배양하여 얻은 배양액을 45,000×g에서 40분간 원심분리하고,

상등액을 회전점도계(Brabender Viscotron, model No. 803401)로 저농도 경우는 D14 컵(안지름 50.5 mm, 바깥지름 52 mm, 높이 82 mm), 고농도의 경우는 E17 컵(안지름 20 mm, 바깥지름 21.7 mm, 높이 30 mm)을 각각 사용하여 측정하였다. 즉, 각 측정용 컵의 용량은 전자에서는 65 mL, 후자에서는 8 mL이었으며, 시료는 기포를 제거한 다음, 온도조절용 용기에 넣어 3분간 열평형시킨 후에 0-250 sec⁻¹의 전단속도 범위에서 전단속도에 따른 토오크의 변화를 X-Y-T 기록계로 자동기록하여 측정하였다.

한편, 유변학적 특성값은 경험적으로 널리 이용되는 다음의 Herschel-Bulkley 상태 방정식(Holdsworth, 1971)을 사용하여 산출하였다.

$$\tau = \tau_y + K\dot{\gamma}^n \quad (1)$$

여기서 τ 는 전단응력(Pa), τ_y 는 항복응력(Pa), $\dot{\gamma}$ 는 전단속도(sec⁻¹), n 은 유동거동지수, K 는 유체의 점도지수(Pa · secⁿ)이다.

τ 및 $\dot{\gamma}$ 값은 실험에서 구한 회전속도에 따른 토오크로부터 각각 다음 식으로 구하였다.

$$\dot{\gamma} = N \cdot X \quad (2)$$

$$\tau = B \cdot S \cdot Y \quad (3)$$

여기서 S 는 토오크 눈금값, N 은 회전속도(sec⁻¹)이며, B , X , Y 및 K 는 보정계수로 각각 토오크 측정용 스프링에 의존하는 scale factor, shear factor, stress factor 및 calibration constant이다.

K 및 n 값은 식 (1)을 변형하고 대수를 취하여 다음 식 (4)를 얻은 다음,

$$\log(\tau - \tau_y) = \log K + n \log \dot{\gamma} \quad (4)$$

$\log(\tau - \tau_y)$ vs. $\log \dot{\gamma}$ 를 도시하여 얻어진 직선의 기울기 및 $\log \dot{\gamma} = 0$ 일때의 절편 값으로부터 각각 구하였다.

이 때, 식 (4)에 포함된 τ_y 값은 다음의 Casson 식(Casson, 1959)에 의하여 구하였다.

$$\sqrt{\tau} = k_c \sqrt{\dot{\gamma}} + \sqrt{\tau} \quad (5)$$

여기서 k_c 는 Casson constant이다.

한편, 겔보기 점도 μ_a (Pa · s²ⁿ⁻¹)는 다음 식 (6)에 의하여 구하였다.

$$\mu_a = K \dot{\gamma}^{n-1} \quad (6)$$

결과 및 고찰

삼각 플라스크에서 회분 배양하면서 배양액의 균체 증식, 다당 생성 및 기질 소비의 경시변화를 조사한 결과는 Fig. 1과 같다. 접종 후 배양 초기부터 균체 및 다당량이 증가하여 배양 28시간 후 균체는 정지기로 이행되었으며, 다당량은 정지기 이후 40시간까지 계속 증가하여 약 4.8 g/L를 생산한 다음, 점차로 감소하였다. 또 배양액의 pH는 배양 초기(0-4시간) 균체의 증식과 더불어 감소하였는데, 이는 유기산의 축적이 일어난 것에 기인한다고 생각되었으며, 배양 4시간 이후부터 pH 상승 및 당의 소모가 많아지고 균체의 생육 및 다당의 생성도 급격히 이루어졌다. 배양 28~40시간 범위에서, 균체의 생육은 정지하였으나 잔존당의 농도는 계속 감소하였으며, 이는 당이 균체의 생육보다는 다당의 생성에 이용되기 때문이라 생각되었다. 또 배양 40시간 이후부터 다당의 양이 점차적으로 감소한 것은 이미 생성된 다당을 재이용하기 때문이라 생각되었다(Haggstro과 Forberg, 1986).

한편, 배양에 따른 균체의 생육 및 다당의 생성과 유변학적 특성값의 변화 관계를 알아보기 위해 whole broth와 cell-free broth의 2가지 경우로 나누어 이들의 전단속도와 전단응력과의 관계를 조사한 결과는 Fig. 2와 같다. 배양 초기 다당의 생성량이 극히 낮을 때는 전단응력과 전단속도의 관계가 직선을 나타내어 뉴턴 유체의 성질을 보였으나, 배양 시간의 증가에 따라 유동곡선은 비직선 관계를 나

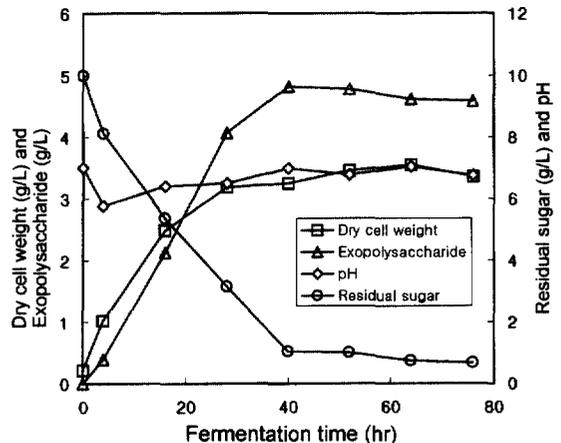


Fig. 1. Time course of batch cultivation of *Enterobacter* sp.

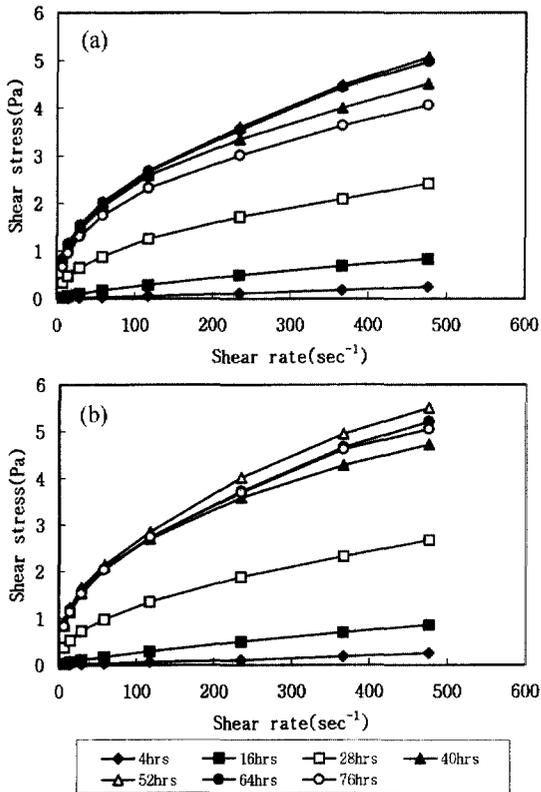


Fig. 2. Flow curves of whole and cell free broth during the exo-polysaccharide fermentation by *Enterobacter* sp. (a) Cell free broth (b) Whole broth

타내어 비뉴턴 유체의 성질을 가짐을 알 수 있었다. 통상 생물 반응기에서 나타나는 세포 농도 범위에서 세균, 효모와 같은 단세포 미생물이나 사상균의 pellet은 반응기내 배양액의 유동 특성에 거의 영향을 주지 않는다. 그러나 사상균의 균사체 생육에

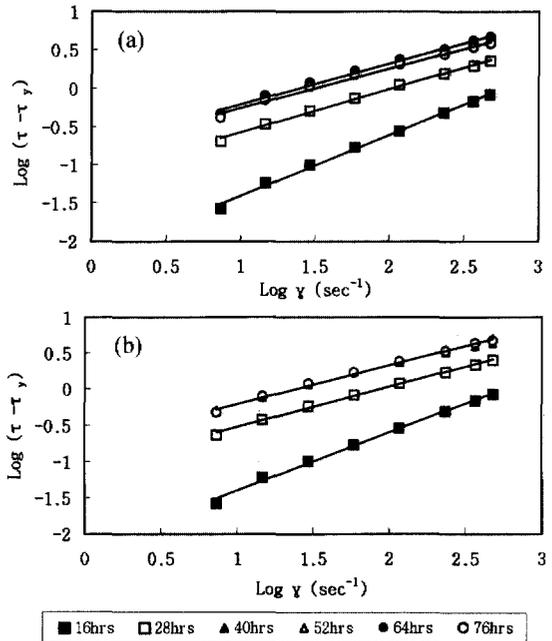


Fig. 3. Logarithmic plot of shear stress and shear rate for the cell free and whole broth by *Enterobacter* sp. (a) Cell free broth (b) Whole broth.

서는 비교적 낮은 균사체 농도에서도 높은 점성의 현탁액을 만들어 유변학적 성질에 크게 영향을 미친다(Pace, 1980; Kim, 1983; Oh *et al.*, 1993). 하지만 단세포 미생물의 경우도 다당류 발효의 배양액 경우에는 분비된 다당류 농도의 증가로 인하여 역시 심한 비뉴턴 유체의 성질을 나타낸다(Charles, 1978).

비뉴턴 유체의 거동을 보다 정량화하기 위하여 Fig. 2의 자료를 이용해서 Casson 식에 의해 항복

Table 1. Rheological parameters of whole broth and cell free broth at various fermentation times

Time (hr)	Whole broth			Cell free broth		
	τ_y^a	K^b	n^c	τ_y^a	K^b	n^c
4	-	-	-	-	-	-
16	0.0004	0.0062	0.8020	0.0030	0.0062	0.7986
28	0.1470	0.0829	0.5590	0.1320	0.0730	0.5634
40	0.3690	0.1884	0.5196	0.3250	0.1849	0.5138
52	0.4140	0.1851	0.5424	0.3810	0.1818	0.5302
64	0.3640	0.1837	0.5353	0.3490	0.1857	0.5260
76	0.3480	0.1783	0.5391	0.2540	0.1709	0.5120

^a: Yield stress (Pa)

^b: Consistency index (Pa · sⁿ)

^c: Flow index (-)

응력을 구하였으며, 이 값을 적용하여 서로 다른 배양시간에서 얻은 각 배양액 시료에 대한 전단응력과 전단속도의 관계를 양대수 좌표에 도시한 결과를 Fig. 3에 나타내었다. 그림에서 보는 바와 같이, $\text{Log}(\tau-\tau_y)$ 와 $\text{Log } \dot{\gamma}$ 는 직선관계를 나타내어 각 배양액의 유변학적 특성이 Herschel-Bulkley 식에 잘 적용됨을 알 수 있었다. Oh 등(1993)은 *Aspergillus niger* No. PFST-38을 액내배양하면서 유변학적 거동을 Power law와 Bingham plastic 및 Herschel-Bulkley 식을 적용하여 조사한 결과, 낮은 전단속도 하에서는 Power law와 Bingham plastic 식의 변화폭이 심한 반면, Herschel-Bulkley 식은 변화폭의 정도가 크지 않아 일반적인 의가소성 유체의 모델링 식으로 적용하는데 적합하다고 하였다. 따라서 본 연구에서도 Herschel-Bulkley 및 Casson 식에 의해 유변학적 특성값인 점조도 지수 K, 유동지수 n 및 항복응력 τ_y 값을 구하였다. 그 결과는 Table 1과 같으며, 또 이 Table 1의 유동지수, 점조도 지수 및 항복응력 값을 발효결과에 따라 도시한 결과는 Fig. 4와 같다. 배양시간의 경과에 따라 유동지수는 급격히 감소하다가 배양 40시간 이후 일정한 값을 유지하였으며, 점조도 지수는 배양시간이 경과함에 따라 급격히 증가하여 배양 40시간 이후 일정 값을 유지하였다. 반면, 항복응력은 배양 40시간까지 증가하며, 그 이후 점차 감소하는 경향을 나타내었다. 이는 다당 생성량이 증가함에 따라 K값이 증가하며, n값은 감소하는 경향과 일치하였는데, Landon

등(1993)도 *Leuconostoc mesenteroides* B512(F)에 의한 dextran의 발효 중 이와 유사한 결과를 보고한 바 있다. 일반적으로 배양시간이 경과함에 따라 K값이 증가한 후 다시 감소하고, n값은 계속적으로 증가하는 경향을 보이는데, 본 연구에서는 K값이 배양 40시간 이후에도 일정하게 유지되었다. 이는 다당 생성량이 감소되었음에도 불구하고 점도가 일정 값을 갖는다는 것을 의미하므로, 중합도의 감소 등, 다당의 구조적 변화가 없는 것을 의미한다. 또 Fig. 4에서 볼 때, culture broth와 cell free broth의 차이가 없었으므로, 균체의 농도는 유변학적 거동에 영향을 주지 않는 것으로 볼 수 있었다. Charles (1978)도 xanthan gum의 경우, 균체의 유·무가 유변학적 거동에 미치는 영향은 미약하였다고 보고하였으며, Landon 등(1993)도 dextran에서 미생물 배양액 내의 통기에 따른 기포의 유·무도 상대적으로 영향이 없다고 하여 본 실험의 결과와 잘 일치하였다.

한편, Fig. 5는 배양액의 전단속도의 증가(7.34~477.1 sec^{-1})에 따른 겔보기 점도의 변화를 나타낸 그림이다. 전단속도의 증가에 따라 겔보기 점도는 감소하였는데, 배양 40시간 이후에 급격히 감소하여 의가소성이 강해지는 경향을 나타내었다. 일반적으로 미생물이 생산하는 다당류에 전단력을 가했을 때, 전단영역 내의 분자 배열로 점도도 감소한다 (Linto *et al.*, 1991). 이 경우 전단속도를 낮추면, 점

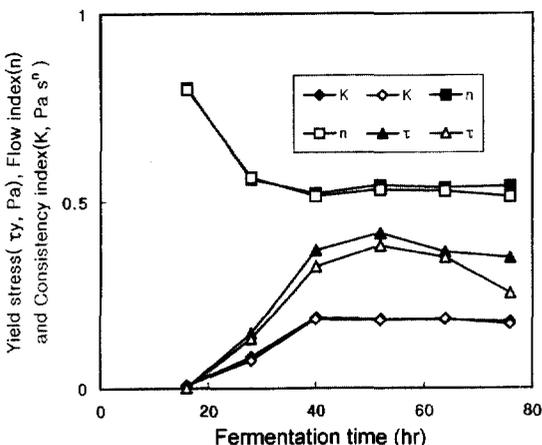


Fig. 4. Changes in rheological parameters of the whole and cell free broth of *Enterobacter* sp. fermentation. (Closed form; whole broth, Open form; cell free broth)

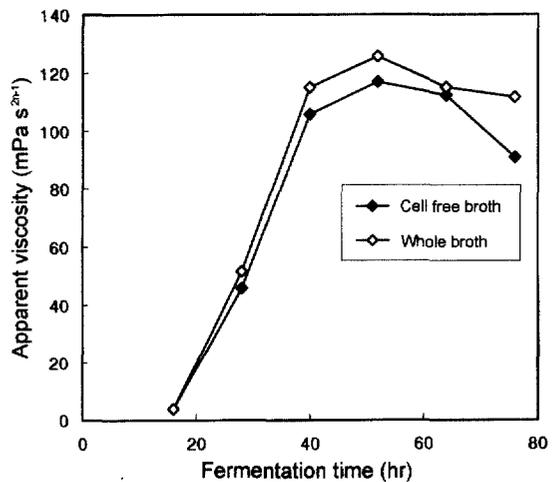


Fig. 5. Changes in apparent viscosities of the whole and cell broth during the fermentation of *Enterobacter* sp. (shear rate=7.34 sec^{-1}).

도는 곧 회복하게 되며, 이 때 점도의 감소는 분해의 의미가 아닌 분자의 재배열을 의미하므로, 본 실험에서도 겔보기 점도의 감소는 분자의 재배열에 기인하는 것으로 생각되었다.

또 Fig. 5의 배양 시간에 따른 일정 전단속도 7.34 sec^{-1} 에서 측정된 겔보기 점도를 보면, 균체를 포함하는 배양액과 균체를 배제한 배양액 모두 겔보기 점도는 큰 차이를 보이지 않아서 균체는 배양액의 겔보기 점도에 영향을 미치지 않음을 보였다. Fig. 5와 Table 1을 연관지어 살펴보면, 배양 40시간까지는 K값과 겔보기 점도가 잘 일치하여 배양 시간에 따른 다당 생산량과 밀접한 관련을 가짐을 알 수 있다. 일반적으로 발효 말기에는 다당의 구조적 변화 및 균체가 생산하는 효소로 인한 다당의 분해로 점도 및 다당의 양이 감소하는데, Leudy 등 (1974)은 *Pullularia pullulans*를 이용한 pullulan 발효에 있어서 pullulan을 포함하는 배양액의 점도 측정 시간의 경과로 도시한 경우, 약 5일 이후에는 대체로 점도가 감소하며, 이는 평균 분자량의 변화와 depolymerase에 의한 영향이라고 보고하였다. 본 실험에서는 점도와 다당 생산량이 배양 40시간 이후에도 거의 일정한 값을 보임으로써 다당의 구조적 변화나 depolymerase에 의한 분해 현상이 일어나지 않는 것으로 생각되었다.

결 론

유기성 폐기물의 composting에 사용된 토양유래의 복합 발효 미생물 제제로부터 분리, 동정된 다당 생성 균주인 *Enterobacter* sp.를 이용하여 회분배양에서의 배양액의 유변학적 특성을 조사한 결과, 다음과 같은 결론을 얻었다. 배양시간의 경과로 배양액은 점차 고 점성을 나타내고, 의가소성이 강한 비뉴턴 유체로서 거동하였다. 다당 발효 중 유동 지수, 점조도 지수, 항복 응력 및 겔보기 점도 등 유변학적 특성 값을 산출한 결과, 균체의 유·무에는 거의 영향을 받지 않았으나, 다당 생성과는 밀접한 관계를 보여 유변학적 특성값의 변화는 발효과정의 진행과 상태를 예측할 수 있는 효율적 수단임을 알 수 있었다.

문 헌

Casson, N. 1959. Rheology of disperse system. C.C. Mill

- (ed.). Pergamon Press, London, UK. pp84
- Charles, M. 1978. Technical aspects of the rheological properties of microbial cultures. *Adv. Biochem. Eng.* **8**: 1-62
- Fatife, I.A. 1985. Rheological characteristics of suspensions of *Aspergillus niger*: correlation of rheological parameters with microbial concentration and shape of the mycelial aggregate. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **21**: 60-64
- Haggstrom, L. and C. Forberg. 1986. Significance of an extracellular polymer for the energy metabolism in *Clostridium acetobutylicum*: A hypothesis. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **23**: 234-239
- Holdsworth, S.D. 1971. Applicability of rheological models to the interpretation of flow and processing behavior of fluid food products. *J. Textures Studies* **2**: 393-418
- Hong, O.P. and S.Y. Lee. 1999. Composting of organic wastes by solid fermentation reactor. *Kor. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.* **27**(4): 311-319
- Kim, D.J. and S.Y. Lee. 2001. Isolation of the exopolysaccharide producing *Enterobacter* sp. and some physicochemical properties of the polysaccharide produced by this strain. *Korean J. Biotechnol. Bioeng.* **16**(4): 370-375
- Kuratsu, Y. and K. Innzuka. 1985. Factors affecting broth viscosity and coenzyme Q10 production by *Agrobacterium* sp. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **21**: 55-59
- Norberg, A.B. and S.O. Enfors 1982. Production of Extracellular Polysaccharide by *Zoogloea ramigera*. *Appl. Environ. Microbiol.* **44**(5): 1231-1237
- Landon, R.S., R. C. S. Law, C. Webb. 1993. Fermentation broth rheology during dextran production by *Leuconostoc mesenteroides* B512(F) as a possible tool for control. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **40**: 251-257
- Ledy, B., A.A. Marsan, and B. Coupal. 1974. A study of the rheological properties of a non-Newtonian fermentation broth. *Biotechnol. Bioeng.* **16**: 61-76
- Lee, S.Y. 1992. Current research status of food-related polysaccharides. *The Microorganism and Industry* **18**(1): 33-40
- Linton, J.D., S.G. Ash, and L. Huybrechts. 1991. Microbial polysaccharides. In: *Biomaterials*. 5th ed., D. Byrom (ed.). M. Stockton Press, New York, USA. pp217-261
- Pace, G.W. 1980. Rheology of mycelial fermentation broths. In: *Fungal biotechnology*. J.E. Smith, D.R. Berry, and B. Kristiansen (ed.). Academic Press, New York, USA. pp95-110
- Oh S.H., P.S. O and C.H. Lee. 1993. Rheological properties of mycelial broth in submerged culture of *Aspergillus niger* No. PFST-38. *J. Microbiol. Biotechnol.* **3**(4): 292-297
- Park, J. W. 1994. Medical use and current status of carbohydrates/polysaccharides. *Biotechnology News* **1**(1): 31-37
- Pintado, M.E., A.I.E. Pintado, and F.X. Malcata. 1999.

- Production of polysaccharide by *Rahnella aquatilis* with whey feedstock. *J. Food Sci.* **64**(2): 348-352
- Sutherland, I.W. 1996, Extracellular polysaccharide. In: *Biotechnology* (vol. 6), 2nd ed.. H.J. Rehm and G. Reed (ed.). Verlag Chemie, Weinheim, Germany. pp613-657
- Taguchi, H. 1971. The nature of fermentation fluids. *Adv. Biochem. Eng.* **1**: 1-30
- Yalpani, M. 1988. Polysaccharides. Elsevier, New York, USA