

다당 생성 *Enterobacter sp.*의 분리 및 생성 다당의 특성

김 대 진 · †이 신 영
강원대학교 환경·생물공학부, 삼진순약공업(주)†
(접수 : 2001. 7. 16., 게재승인 : 2001. 8. 21.)

Isolation of the Exopolysaccharide Producing *Enterobacter sp.* and Physicochemical Properties of the Polysaccharide Produced by This Strain

Dae-Jin Kim and Shin-Young Lee†

†Division of Environmental and Biological Engineering, Kangwon National University, Chunchon 200-701, Korea
Samjunsunyak Co. Ltd., Kyunggi 421-160, Korea
(Received : 2001. 7. 16., Accepted : 2001. 8. 21.)

For the production of new exo-biopolymers from microorganisms, an exo-biopolymer producing bacterial strain was isolated from the composter used in composting of organic wastes. Bacteriological properties of this strain and physicochemical properties of producing exo-biopolymer were investigated. The isolated strain was identified as *Enterobacter sp.* through its morphological, cultural and physiological characteristics. The results of color reactions, CPC (cetyl pyridinium chloride) precipitation and infra red absorption spectral analysis indicated that this exo-biopolymer was presumed as an acidic polysaccharide with uronic acid. This polysaccharide was identified as hetero-polysaccharide consisting of galactose, mannose and galacturonic acid by gas chromatography, and the molecular weight of exopolysaccharide purified by gel chromatography were about 370,000 daltons. The polysaccharide solutions(0.50-2.0%, w/v) exhibited non-Newtonian flow behavior with pseudoplastic property and showed the ability of gel formation at above 1.5%(w/v) of polysaccharide concentration.

Key Words : *Enterobacter sp.*, screening, exopolysaccharide, physicochemical property

서 론

미생물 다당류는 상업적으로 이용되는 식물 다당류에 비해 물성이 다양하고 독특하며, 부가가치성이 매우 높아서 각종 산업의 기능성 신소재로서의 잠재력이 매우 크다(1,2). 특히, 미생물의 세포외 다당류(extracellular polysaccharide)는 세포벽의 일부로서 세포벽 주위에 캡슐(capsule)을 형성하거나 세포벽 외부에 점질물(slime)로서 발효 중에 축적되는 다당류로, 1차 또는 2차 대사산물이다(3,4). 이 세포외 다당류는 실제적 측면에서 미생물이 가장 다량으로 생성하는 다당류이며, 세포내 다당(intracellular polysaccharide)이나 세포벽 다당(structural polysaccharide)과는 달리, 배양액으로부터 회수가 쉽고, 정제 비용이 적게 들므로 상업적인 잠재력이 가장 높은 다당류이다(5). 특히 최근에 와서는 미생물 다당류가 과거의 단순 물

성기능 소재로서가 아니고 생체 중요 정보물질로서의 생리 기능소재로서도 주목받고 있어 미생물 다당에 대한 많은 연구가 이루어 졌으나 실제 산업적으로 이용되는 다당류는 매우 제한되어 있다(6). 따라서 세포외 미생물 다당류의 산업적 응용을 위해서는 새로운 다당류 생산 균주를 탐색하고, 이들의 신규 다당 취득을 위한 광범위한 연구가 이루어져야 한다. 하지만 국내의 경우, 신규 다당류의 취득이나 새로운 다당 생산 균주의 탐색 연구는 거의 이루어지지 않고 있어 다당에 대한 최근의 학문적 및 산업적 요구도에 부응하여 이들 연구의 활성화가 절실한 실정이다.

따라서 본 연구에서는 새로운 기능성을 갖는 생물 고분자의 취득을 위한 연구의 일환으로, 유기성 폐기물의 composting에 사용하였던 토양 유래 미생물 복합제제(7) 중의 한 미생물종이 점질물을 생성하는 것에 착안하여 이 균주를 분리, 동정하였다. 아울러 이 균주가 생성하는 생물고분자의 분리 정제 및 몇몇 이화학적 성상을 검토하였다.

†Corresponding Author : Corresponding author: Division of Environmental and Biological Engineering, Kangwon National University, Chunchon 200-701, Korea
Tel : +82-33-250-6273, Fax : +82-33-243-6350
E-mail : sylee@kangwon.ac.kr

재료 및 방법

균주 분리 및 보존

본 연구에 사용한 균주는 유기성 폐기물의 composting에 사용하였던 토양 유래 복합 발효 미생물 제제로부터 다음과 같이 분리하였다(7). 즉 발효 미생물 제제 200 g을 코호지 상자에 넣고, 여기에 300 g의 tap water를 가한 다음, 30°C에서 72시간 정치배양하였다. 10% 현탁액을 만들어 1시간 동안 진탕배양하였고, 이를 10배 비율로 희석하여 각 희석액을 YM agar 배지(Sigma, USA)에 분획 접종하였으며, 30°C에서 배양하면서 colony를 관찰하였다. Mucoid colony를 나타내는 점질균을 선정하고, 다시 YM broth 배지(Sigma, USA)에서 점성물질을 분비하는 것을 확인하여 생물고분자 생산 균주로 선정하였다. 분리 균은 yeast malt extract agar 배지[lactose 10 g/L(Junsei, Japan), peptone 5g/L, yeast extract 3 g/L, malt extract 3 g/L(Difco, USA), pH 6)에서 30°C로 12시간 배양한 후 4°C에서 보존하였으며, 4주마다 계대배양하면서 실험에 사용하였다.

배양 방법

점질균의 전 배양은 yeast malt extract agar 배지에서 보존하였던 균주를 30°C에서 2시간 incubation한 후, 이 균체를 위 배지 50 mL를 함유한 250 mL 삼각 플라스크에 백금으로 1회 접종하고, 30°C에서 12시간 진탕배양하여 종균 배양액으로 사용하였다. 또한, 본 배양은 상기 배지(pH 6.2) 50 mL를 함유한 250 mL 삼각플라스크에 종균 배양액을 4%(v/v) 접종한 후, 30°C에서 120 rpm으로 40시간 배양하면서 실험하였다.

분리 균주의 균학적 성질

분리균의 형태학적 특성, 배양 및 생리학적 특성을 각각 다음과 같이 조사하였다. 분리한 균주의 형태학적 성상은 Gram 염색, 항 산성균의 염색 및 운동성 여부 등을 상법(8,9)에 따라 조사하였다. 또 균주의 형태는 균체를 phosphotungstate (Fluka Chemie AG, Switzerland)로 negative staining한 다음, 투과전자현미경(Zeiss model EM 109)에서 12,000배로 사진 촬영하여 관찰하였다.

배양학적 특성은 살균한 각 배지에 전 배양한 생물고분자 생산균을 접종하고, colony 형태, 생육 정도 및 배면의 색 등, 배양상의 특성을 5일간 배양하면서 관찰하였다(9).

한편, 생리학적 특성은 분리 균주의 생육 온도, 생육 pH, 당 이용성, catalase 시험, 산소요구성 시험, V-P 반응, 탄수화물 발효성 시험, gelatin 액화시험, 전분 가수분해력 시험, citrate 이용시험, 질산염의 환원시험 등을 상법(8,10)에 따라 검토하였다.

생성 고분자의 분리

균체 배양액을 49,000xg에서 40분간 원심분리하고 균체를 제거한 다음 얻어진 배양액에 2배 량의 acetone(Yakuri Pure Chemicals, Japan)을 가하여 침전물을 얻었다. 이 침전물을 증류수에 용해하여 dialysis(MWCO 12000)하였으며 0.05 torr에서 24시간 동결건조하여 이를 조 생물고분자(crude biopolymer)로 하였다.

생성 고분자의 정제

Gel chromatography에 의한 분획: 증류수에 3~4일간 팽윤시킨 Sephadex G-200(Pharmacia, Sweden)을 column(2×60 cm)에 충전하고 0.4M NaCl 용액으로 평형화하였다. 생성 고분자 시료는 0.4M NaCl 용액에 충분히 녹인 후 원심분리하여 불순물을 제거하고 column에 충전하였다. 12 mL/hr의 유속으로 3 mL씩 분획하고, 각 fraction으로부터 당은 phenol-sulfuric acid 법(11)으로, 단백질은 Lowry 법(12)으로 측정하였다. 이때 void volume은 blue dextran (M.W. 2,000,000, Sigma, USA)으로 결정하였다.

CPC(cetyl pyridinium chloride) 침전에 의한 분리 및 정제: 조 생물고분자를 0.2%(w/v)가 되도록 증류수에 녹여 80°C에서 30분간 가열한 다음 9,000 xg에서 30분간 원심분리하고 불용성 물질을 제거하였다. 이 용액에 최종 농도가 0.4%(w/v)가 되도록 CPC (Fluka Chemie AG, Switzerland)를 첨가하고 충분히 complex가 일어날 수 있도록 30°C에서 30분간 방치한 다음, 원심분리하여 침전물과 상등액으로 분리하였다. 침전물은 증류수로 수세후 1 M NaCl에 용해시키고 acetone으로 재침전시켰다. 이를 다시 증류수에 녹여 dialysis를 행한 후, 0.05 torr에서 24시간 동결건조하여 시료로 하였다.

생성 고분자의 이화학적 분석

생성 고분자의 정색반응은 Anthrone, Fehling, Seliwanoff, Elson-Morgan, Carbazole-sulfate, Ninhydrin, Biuret 반응 등의 당, 아미노당, 산성당 및 단백질에 대한 각종 정색 반응을 상법(13,14)에 따라 조사하였다.

구성당의 확인은 가수분해물을 TLC 및 GC로 다음과 같이 분석하였다. TLC는 가수분해 시료를 전개용매로 n-butanol : ethanol : water(5 : 5 : 4, v/v)를 사용하여 전개시킨 다음, alkaline silver nitrate(Sigma, USA) 시약으로 발색시켜 관찰하였다(15). 이 때 가수분해는 1 N H₂SO₄로 100°C에서 8시간 동안 실시하였으며, Ba(OH)₂로 중화하고 여과한 후 농축하여 가수분해 시료로 사용하였다. GC는 Tayama 등(16)의 방법에 따라 완전히 methylation시킨 시료에 90% formic acid 1mL를 가해 100°C에서 16시간 반응시키고, 2 M trifluoroacetic acid (Sigma, USA) 1 mL로 100°C에서 5시간 동안 가수분해하였다. 이 가수분해 시료를 sodium borohydride(Sigma, USA)로 환원시키고 pyridine-acetic anhydride (1:1)를 가하여 100°C에서 2시간 동안 가열하여 acetylation시켰다. 구성당의 분석은 gas liquid chromatography (Varian Star 3400CX)를 이용하여 column; 3% OV-101, column temperature; 150-175°C gradient, detector; FID, carrier gas; He-30 mL/min, H₂-50 mL/min, flow rate; air-50mL/min, chart speed; 0.25 cm/min의 조건으로 실시하였다.

결과 및 고찰

생물고분자 생성 균주의 분리 및 균학적 성질

유기성 폐기물의 composting에 사용하였던 토양 유래의 복합 발효미생물 제제로부터 10종의 세균(구균 5종, 간균 5종)을 분리하였다. 이 중 mucoid colony를 나타내는 점질균은 4 균주이었는데(Figure 1), 이의 1 균주가 yeast malt extract

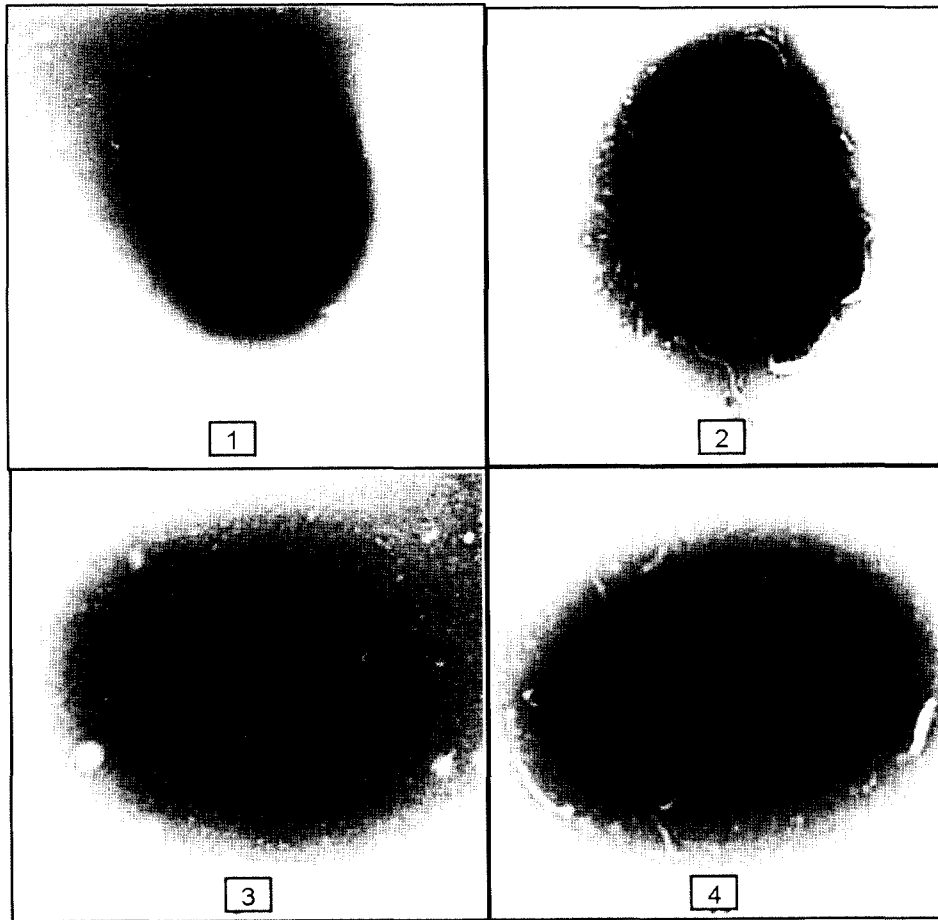


Figure 1. Transmission electron micrographs of bacterial strains isolated from composter using for composting of organic wastes. (x12,000, phosphotungstate negative staining)

Table 1. Morphological, cultural and physiological characteristics of isolated strain

Morphology	Culture	Physiology
Shape : Rod	Colony on nutrient agar (30°C, 24~48 hr)	Catalase : +
Motility : Non motile	Color : Yellow	Oxidase : -
Flagella : Not found	Form : Circular	Lipase* : -
Gram stain : Negative	Edge : Entire	Indole : -
Acid-fast : Negative	Elevation : Convex	MR test : -
	Opacity : Opaque	VP test : +
	Brillancy : No	Gelatin liquefaction : +
	NB** : Growth	Citrate utilization : +
	Turbid	Nitrate reduction : +
	Sediment	Polysaccharide from sucrose : +
		Hydrolysis of starch : +
		Hydrolysis of casein : +
		O-F test : Fermentative
		Oxygen requirement : Facultative anaerobic
		NaCl : <11%
		Growth Temperature : 15~45°C
		Growth pH : 4~10

* : Tween 80

** : Nutrient broth

broth에서 배양액 중에서도 점성을 나타내는 것을 확인하여 생물고분자 생성 균주로 선정하였다.

이 분리균의 형태, 배양 특성 및 생리적 성질을 조사하였

으며, 그 결과는 Table 1과 같다. Gram 음성균으로 비항산성이었으며, 포자는 존재하지 않았고, 운동성도 없었다. 또 Figure 1(1)의 전자현미경 사진에서 볼 수 있는 바와 같이,

Table 2. Fermentation and utilization of sugars by isolated strain

Sugar	Fermentation ^{a)}		Utilization ^{b)}
	Acid	Gas	
Amylopectin	-	-	-
Sucrose	+	+	-
Inulin	-	-	-
Sorbitol	-	-	++
Lactose	+	+	+
Dextrin	+	+	++
Fructose	+	+	+
Glucose	+	+	++
Galactose	+	+	+
Maltose	+	+	+
Mannitol	+	+	+
Soluble starch	-	+	+
Xylose	+	+	+
Mannose	+	+	+

a) + : Positive, - : Negative, b) + : Slightly utilized, ++ : Moderately utilized

단단균이었으며, 편모는 관찰되지 않았다. 배양학적 특성을 살펴보면, Nutrient 한천 평판배지에서의 colony 형태는 circular이었고, 색깔은 황색이었으며, 표면은 배양시간의 경과에 따라 점질물이 형성되어 매끄러운 상태였다. 또 Nutrient 액체 배지에서의 생육이 양호하였고, 균체의 침전현상이 관찰되었다. 생리학적 특성에서는 생육온도 범위가 15-45°C 이었고, 생육 pH 범위는 pH 4-10이었다. 또한 염농도 10%까지 생육이 가능하였으며, 질산염을 환원하고 catalase 반응에서 양성, oxidase 반응에서 음성을 나타내었고, starch와 gelatin의 분해능이 있었다.

한편, Table 2에서 보는 바와 같이, 당 발효에서는 대부분의 당에서 산과 가스를 생성하였으며, 당의 이용성에서는 amylopectin과 inulin을 제외한 나머지 당들을 모두 이용하였다. Fructose, galactose에서의 이용성이 높았고, 특히, 일반적으로 매우 드물게 나타내는 lactose에서의 강한 이용성을 보이는 흥미있는 특징을 보였다.

이러한 특성을 Cowan과 Steel(9)의 검색표에 의해 검색한 결과, *Enterobacter* 속의 한 균주인 것으로 동정하였으며, Bergey's manual(17)에 따라 검색한 결과에서는 V-P 반응에서 양성, methyl red 반응에서 음성, Tween 80에서의 분해력 결여, 매우 느린 gelatin liquefaction 등의 성질로부터 *Enterobacter cloacae*와 유사한 것으로 추정되었다.

생물고분자의 분획 및 정제

본 균주는 lactose를 기질로 하여 매우 높은 점성의 배양액을 형성하였다. 따라서 배양액을 원심분리(49000 xg, 40분)하여 균체를 제거한 다음, 배양 여액을 2배 량의 acetone을 가하여 침전물을 얻었으며, 이를 조 생물고분자(crude biopolymer)로 하였다. 이 조 생물 고분자는 담백색의 분말로 증류수에 잘 용해되었고 물에 용해된 생물고분자는 낮은 농도에서도 팽윤하여 고점성을 나타내었다. 또 분리된 생물 고분자를 CPC(cetyl pyridinium chloride)로 처리한 결과에서는 CPC의 착화합물이 얻어졌다. 일반적으로 다가 음이온적 성질을 갖

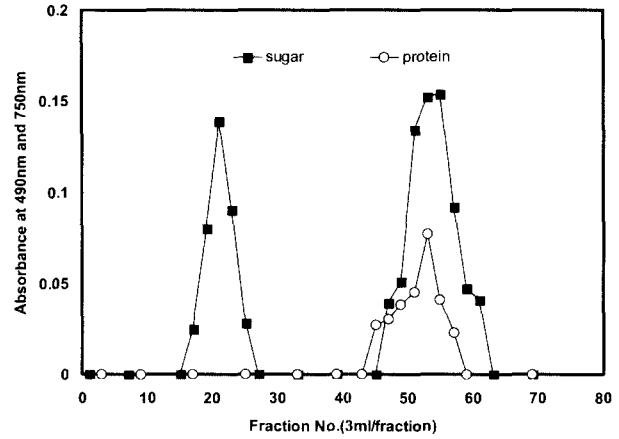


Figure 2. Gel chromatogram of the exo-biopolymer.

는 산성 고분자는 CPC나 4가 암모늄염, 특히 cetavlon(cetyl trimethyl ammonium) 등과 불용성의 착화합물을 형성한다(18). 따라서 이 고분자는 다가 음이온적 성질을 갖는 산성 고분자인 것으로 생각되었다. 또 CPC 처리로 부분 정제된 생물고분자 분획의 각종 정색반응을 조사한 결과에서는 당류의 일반반응인 Anthrone 및 Molish 반응에서 양성을 나타내었고, Elson-Morgan 반응, Oricnol-염화철 반응에서는 모두 음성을 나타내어 아미노당 및 pentose는 존재하지 않는 것으로 추정되었다. Anthrone-황산 반응 및 Carbazole-황산 반응은 모두 양성으로 나타나 uronic acid를 함유하는 것으로 추정되었으며, Selliwanoff 반응이 음성으로 나타나 ketose는 존재하지 않는 것으로 판단되었다. 그러나 Biuret 및 Nihydrin 반응에서 양성이었으므로 단백질도 존재하는 것으로 생각되었다. 따라서 당 및 단백질을 함유하는 산성의 고분자로 볼 수 있었으므로 Sephadex G-200으로 gel chromatography하였으며, 그 결과는 Figure 2와 같다. 용출부피 63 및 156 mL에서 각각 peak를 보이는 2개의 분획을 나타내었다. 첫 번째 분획은 blue dextran의 void 분획에 가까운 고분자 분획으로 당 반응을 보인 반면, 두 번째 분획은 비교적 분자량이 작은 분획으로 당 및 단백질 반응을 모두 나타내었다. 고분자 분획인 첫 번째 분획을 다시 gel chromatography한 결과, 자료로서 나타내지는 않았으나 균일한 분자량 분포의 단일 peak를 보여 젤 여과에 의한 균일성을 보였다.

생물고분자의 이화학적 성질

Gel chromatography하여 정제 생물고분자의 적외선 스펙트럼을 조사한 결과는 Figure 3과 같다. 3423 cm⁻¹에서 당류에 특이적으로 나타나는 강한 흡수가 관찰되었으며, 주로 uronic acid 흡수를 나타내는 carbon 이량체의 C=O stretching이 나타나는 1730 cm⁻¹ 부근의 흡수가 관찰되어 uronic acid의 양성 반응을 보인 것과 잘 일치하였다(19). 그리고 1624 cm⁻¹에서는 carboxyl 기 유래로 보이는 흡수가, 1408 cm⁻¹에서는 CH₂ bending으로 인한 흡수가 관찰되었으며, 비교적 보고된 다른 다당류의 적외선 흡수 스펙트럼과 유사한 양상을 보였다(19-21).

따라서 본 생물고분자는 다당류인 것으로 판단되었고, 산 가수분해하여 paper chromatography한 결과, R_f값이 서로 다른

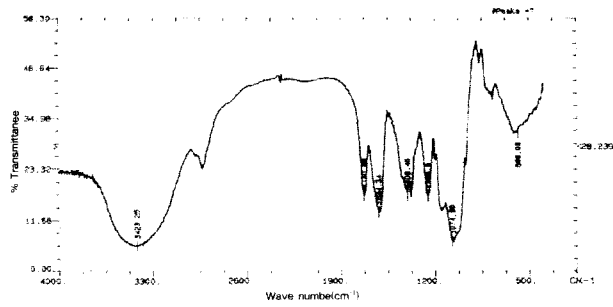


Figure 3. Infrared absorption spectra of the exo-biopolymer by CPC(cetyl pyridinium chloride) treatment.

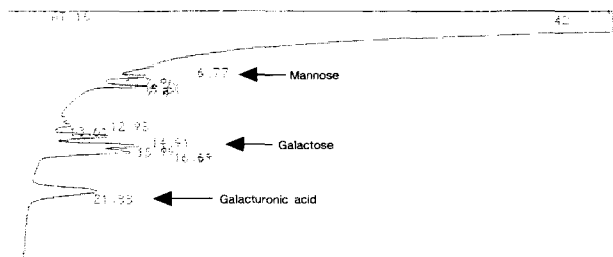


Figure 4. Gas chromatogram of the TMS derivatives of purified exopolysaccharide.

다수의 spot이 확인되었으며, 이로부터 mannose, galactose, glucose 및 galacturonic acid 등의 서로 다른 몇 개의 단당류로 구성되어 있음을 추정할 수 있었다. 보다 정확한 분석을 위해 산 가수분해한 후에 표준당과 함께 TMS 유도체를 조제하여 GC 분석하였으며, 그 결과는 Figure 4와 같다. 가수분해물은 표준당인 galactose, mannose 및 galacturonic acid와 같은 retention time을 보였다. 이때 galactose는 여러 개의 peak를 보였는데, 이는 trimethylsilylation될 때 furanoside 및 α 와 β -methylpyranoside에 의해서 서로 다른 3-4개의 peak를 나타내기 때문이다(11,22). 따라서 본 다당은 이들 세가지 monomer를 기본 단위로 중합체를 형성하는 heteropolysaccharide인 것으로 판단하였다. 이와 유사한 조성의 다당은 Flatt 등(23)에 의해 얻어진바 있는데, 이들에 의하면 *Rahnella aquatilis* 균주가 lactose-rich 반합성 배지에서 mannose: galactose: galacturonic acid=5:3:2의 lactan을 생성한다고 하였다.

본 다당의 분자량을 측정하기 위해 분자량이 서로 다른 3종 dextran을 표준시료로 gel chromatography하였으며, 용출 부피와 분자량의 대수값으로 도시한 결과를 Figure 5에 나타내었다. 세포의 생물고분자의 용출부피는 분자량 515,000과 162,000인 표준당의 사이 값 범위로 이로부터 구한 분자량은 약 370,000 dalton이었다.

한편, 본 다당의 점도 특성을 살펴보기 위해 0.5-2.0% 농도 범위의 여러 다당 수용액에 대해 전단 속도에 따른 전단응력의 변화를 측정하여 Herschel-Bulkley 식(24)으로 구한 유변학적 특성 값들은 Table 3과 같다. 0.5% 이상에서 모두 항복응력이 존재하였으며, 유동지수 값이 1보다 작아서 다른 다당류 용액과 마찬가지로 항복응력을 갖는 의가소성 유체로 거동하였다. 또 농도 증가로 점도지수 값이 증가하여 점증효과를 보였으며, 유동지수 값이 감소하여 의가소성이 강해짐

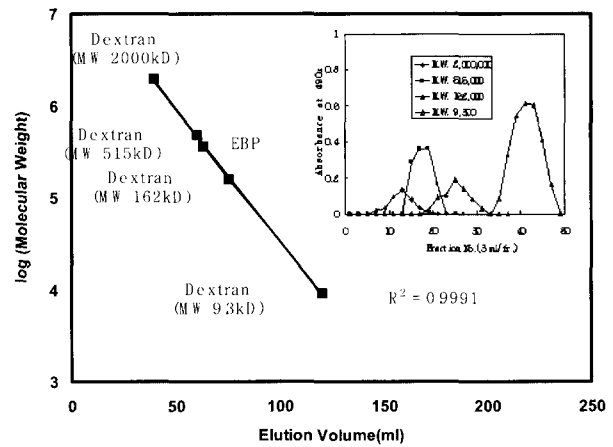


Figure 5. Molecular weight determination of the exopolysaccharide by gel chromatography using Sephadex G-200.

Table 3. Rheological parameters of exopolysaccharide solutions with different concentrations at 30°C

Concentration (%, w/v)	Rheological parameters		
	Consistency index (Pa · s ⁿ)	yield stress (Pa)	Flow index (-)
0.5	0.14	0.10	0.71
1.0	0.39	0.30	0.49
1.5	0.52	0.73	0.45
2.0	0.82	5.16	0.41

을 나타내었다. 특히, 항복응력은 1.5% 농도를 경계로 현저하게 높아졌는데, 이러한 변화는 이 농도에서 micelle의 형성 등 구조적 변화가 일어남을 의미한다(25). 실제로 여러 농도 범위에서 겔 형성능을 시험한 결과, 1.5%에서 겔이 형성되었으며, 이는 비교적 다른 다당에 비해 매우 낮은 값 범위로 겔화제로서의 잠재적 가능성을 보였다.

요 약

생물고분자 생산 균주를 분리하여 동정한 결과, 분리균주는 Gram 음성의 간균으로 내생포자를 형성하지 않았으며, nitrate 환원과 catalase 반응에서 양성이고, oxidase 반응에서 음성인 통성 혐기성의 한 균주로 분류학상의 위치를 검토한 결과, *Enterobacter* sp.로 판단하였다. 이 균주가 생성하는 생물고분자는 정색반응, CPC 침전, IR 분석 등에 의해 우론산을 함유한 산성의 다당인 것으로 추정되었다. TLC 및 GC에 의해 조사한 결과, mannose, galactose 및 galacturonic acid로 구성된 hetero 다당이었으며, 분자량은 약 3.7×10^5 이었다. 이 다당의 수용액(0.5-2.0%, w/v)은 비뉴턴 유체로 항복응력을 갖는 의가소성 유체로서 거동하였으며, 1.5% 농도 이상의 낮은 농도에서 겔 형성능을 나타내었다.

REFERENCES

1. Sutherland, I. W. (1996), Extracellular Polysaccharide, In *Biotechnology*, Vol. 6, 2nd ed., H.J. Rehm and G. Reed,

- Eds. p613-657, Verlag Chemie, Weinheim.
2. 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.
 3. Beveridge, T. J. and L. L. Graham (1991), Surface Layers of Bacteria. *Microbiol. Rev.*, **55**, 684-705.
 4. Wiseman, A. (1983), Principles of Biotechnology, p23, Blackie & Son Ltd., London.
 5. Margaritis, A. and G. W. Pace (1985), Microbial Polysaccharides. In *Comprehensive Biotechnology*, Vol. 3, M.Y. Murray, Ed. pp1005- 1044, Pergamon, Oxford.
 6. Lee, S. Y. (1992), Current Research Status of Food-related Microbial Polysaccharides. *The Microorganism and Industry*, **18**(1), 33-40.
 7. 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.
 8. Cappuccino, J. G. and N. Sherman (1992), Microbiology: A Laboratory Manual, 3rd ed., pp125-184, The Benjamin/Cummings Publishing Co., New York.
 9. Cowan, S. T. and K. J. Steel (1974), Manual for the Identification of Medical Bacteria, 2nd ed., Cambridge University Press, London
 10. Atlas, R. M. (1993), Handbook of Microbiological Media, p1007, CRC Press, New York.
 11. Chaplin, M. F. and J. F. Kennedy (1986), Carbohydrate Analysis, p2, pp23-33, IRL Press, Oxford.
 12. Bollag, D. M. and S. J. Edelstein (1991), Protein Methods, p56-59, Wiley-Liss Inc., New York.
 13. The Biochemical Society of the Republic of Korea (1985), Experimental Textbook of Biochemistry, pp18-32, p8, Dongmyoung Publishing Co., Ltd. Seoul.
 14. Stenesh, J. (1984), Experimental Biochemistry, pp237-245, Allyn and Bacon, Inc., Boston.
 15. Dawson, R. M. C., D. C. Ellioff, and K. M. Jones (1985), Data for Biochemical Research. 3rd ed., Clarendon Press. Oxford.
 16. Tayama, K., H. Minakami, E. Entani, S. Fujiyama, and H. Maski (1985), Structure of an Acidic Polysaccharide from *Acetobacter* sp. NBI1022, *Agric. Biol. Chem.*, **49**(4), 959-966.
 17. Buchanan, R. and N.E. Gibson (1989), Bergey's Manual of Determinative Bacteriology, 8th ed., Willams and Wilkins, Baltimore.
 18. Scott, J.E. and D. Glick (1960), Methods of Biochemical Analysis, Vol. 8, pp146-155, International Pub., New York.
 19. Neely, W.B. (1957), Infrared Spectra of Carbohydrates, In *Advances in Carbohydrate Chemistry and Biochemistry*, Vol. 12, pp13-33, W.L. Wolfrom and R.S. Tipson, Eds., Academic Press, New York.
 20. Kim, Y. H, S. K. Ahn, H. H. Suh, H. J. Kim, and B. D. Yoon (1993), The Production and Properties of exo-polysaccharides(POL-II) by *Bacillus* sp. LK-1, *Kor. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **21**(5), 478-485.
 21. Yoo, J. Y. and D. H. Chung(1989), Cultural Condition for Biopolymer Production by *Pseudomonas delafieldii*, *Kor. J. Appl. Microbiol. Bioeng.*, **17**(5), 468-474.
 22. Holme, D. J. and H. Peck (1983), Analytical Biochemistry, pp341-344, Longman, London.
 23. Flatt, J. H., R. S., Hardin, J. M., Gonzalez, D. E., Dogger, E.N., Lightfoot, and D.C., Cameron (1992), An Anionic Galactomann Polysaccharide Gum from a Newly-isolated Lactose-utilizing Bacterium. I. Strain Description and Gum Characterization. *Biotechnol. Prog.*, **8**, 327-334.
 24. 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.
 25. Krumal, K. L. and N. Sorkar (1975), Flow Properties of Gums Useful to the Food Industry. *Food Technology*, **29**, 36-40.