

생물고분자 생산 알칼리 내성 균주의 분리 및 특성

이신영 · 이범수 · 신원철 · 권익부* · 유주현**

강원대학교 발효공학과, *롯데그룹 중앙연구소, **연세대학교 식품공학과

Isolation and Characterization of Biopolymer Producing Alkali-Tolerant Bacterial Strain

Shin-Young Lee, Beom-Su Lee, Weon-Chul Shin, Ik-Boo Kwon* and Ju-Hyun Yu**

Department of Fermentation Technology and Engineering, Kangweon National University

*Lotte Group R & D Center

**Department of Food Engineering, Yonsei University

Abstract

For the production of useful products from microorganism, a bacterial strain producing the biopolymer was isolated from soil. The bacteriological characteristics of the strain were examined and some chemical properties of the biopolymer produced were investigated. The bacterial strain was identified as an alkali-tolerant *Bacillus* sp. The results of chemical composition, various color reactions and I.R. spectrum revealed that the biopolymer contained high protein content, low amino sugar and no uronic acid. However, the biopolymer was precipitated by treating with cetylpyridinium chloride and was found to be acidic.

Key words : alkali-tolerant *Bacillus* sp., biopolymer production, acidic biopolymer

서 론

최근 미생물을 이용한 유용물질의 생산에 많은 관심이 기울어지면서 미생물이 생산하는 다당류와 같은 생물고분자에 대한 학문적 또는 상업적 관심이 매우 높아졌다⁽¹⁻³⁾.

일반적으로 생물고분자는 젤 형성능, 유화안정력 및 표면장력의 조절능력 등을 가지며 수용액의 리올로지적 성질을 크게 변화시키므로 그 특성에 따라 각종 공업에서 광범위하게 사용되고 있다⁽³⁻⁶⁾. 특히, 미생물이 생산하는 다당류는 이미 알려진 식물성 다당류나 기타 합성고분자와는 달리 독특한 물성과 생리활성을 나타내고, 또 적당한 생산균주의 선택 및 배양방법으로 대량생산이 가능하므로 식물 및 해조류 유래의 각종 천연다당류와 결합하여 식품 및 각종 공업에서 중요 신소재로서 급격한 성장을 보이고 있다⁽³⁻⁹⁾. 항종양성이나 면역증강제로서의 약리효과도 인정되어 의약품으로서도 주목되고 있으며, 또 동물의 여러 장기나 식물의 조직 및 미생물의 세포막과 벽에 널리 분포하는 당의 유도체라 볼 수 있는 당단백질(glycoprotein)은 세포의 분화나 세포간 인식

등 생체내 분자 식별현상에 있어서도 중요한 역할을 하는 것이 밝혀져서 각종 생물기능을 갖는 중요 생체 구성 성분으로서도 큰 관심을 받고 있다^(10,11).

미생물 다당에 관한 연구는 1942년에 *Leuconostoc mesenteroides*의 배양에 의해 생산된 dextran의 의료면에서의 용도가 개발된 이래 많은 기초 및 응용연구가 수행되었으며^(4,12), 지금까지 알려진 중요 다당 생산균주로는 *Xanthomonas*, *Agrobacterium*, *Azotobacter*, *Bacillus*, *Pseudomonas*, *Arthrobacter*, *Methylomonas*, *Chromobacterium*, *Rhizobium*, *Alcaligenes*, *Erwinia* 등의 세균, *Hansenular*, *Tremella*, *Torulopsis* 등의 효모 및 *Aureobaculum*, *Sclerotium*, *Fusarium* 등 곰팡이의 많은 균종(species)이 있고, 각종 homo 또는 hetero 다당을 생성하는 것으로 보고되었다^(3,7,8,13,14).

*Bacillus*속 균주가 생산하는 생물고분자는 옛날부터 널리 연구되었으며 동일 균종에서도 구조 및 특성이 다른 다당이 생산되는 흥미있는 현상이 보고되었는데 지금까지 보고된 *Bacillus*속 다당 생산균주로는 *B. polymyxa* No.271, *B. polymyxa* C3, *B. strain* F-573, *B. polymyxa* var. *lactoviscosus*, *B. subtilis* FT-3, *B. subtilis* var. *polysaccharolyticum*, *B. circulans*, *B. polymyxa* No.458 등이 있다⁽¹⁵⁻²⁰⁾. 그러나 지금까지의 *Bacillus*속 균주의 다당 생산 최적 pH는 주로 6.0~7.0였으며 알칼리측에서의 다당류 발효생산은 보고된 바 없다.

따라서 본 연구에서는 새로운 생물고분자의 취득과

Corresponding author : Shin-Young Lee, Department of Fermentation Technology and Engineering, Kangweon National University, 192 Hyoja Dong, Chuncheon, Kangweon-do 200-701, Korea

이의 용도개발을 목표로 한 일련의 연구로서 알칼리내성 생물고분자 생산균주를 분리하여 동정하고 생물고분자에 관한 몇몇 이화학적 성상을 검토하였다.

재료 및 방법

균주의 분리 및 보존

춘천시 근교에서 채취한 토양으로부터 호알칼리성 미생물의 분리용 배지로 보고된 Akiba들⁽²¹⁾의 배지를 사용하여 알칼리내성 균주를 분리하였다. 이 중 고체배양에서 점조성의 점질물을 생성하는 균주를 1차 선별하였고, 다시 액체배양에서 배양액의 점성이 매우 높은 1균주를 선별하여 생물고분자 생산균주로 하였다. 분리균주는 Akiba들⁽²¹⁾의 한천 사면배지에서 30°C로 12시간 배양한 후 4°C에서 보존하였으며, 4주마다 계대 배양하면서 실험에 사용하였다.

배지조성 및 조제

본 실험에서 사용한 전배양 및 생산용배지는 glucose 10 g/l, polypeptone 5 g/l, yeast extract 5 g/l, K₂HPO₄ 1 g/l, MgSO₄·7H₂O 0.2 g/l 및 Na₂CO₃ 10 g/l의 조성을 갖는 배지(pH 10)이며, 121°C에서 15분간 가압 살균하여 사용하였다. 이 때 포도당과 Na₂CO₃는 각각 분리 살균하고 상온으로 냉각시킨 다음 첨가 혼합하였으며, 모든 배지의 pH는 살균 후 2 N Na₂CO₃ 또는 2 N HCl을 사용하여 조절하였다.

배양방법

접종균의 전배양은 균주를 전배양 배지 20 ml를 함유한 100 ml 삼각플라스크에 1백금이 접종하고, 30°C에서 12시간 진탕배양하였다. 본 배양은 생산용 배지 50 ml를 함유한 250 ml 삼각플라스크에 전배양액을 3%(v/v) 접종한 후, 30°C에서 120 rpm으로 2일간 진탕배양하면서 행하였다.

분리균주의 균학적 성질

형태적 성상은 Gram 염색, 포자염색 및 항산균의 염색(Acid-fast stain)을 각각 상법⁽²²⁾에 따라 행하고 광학현미경으로 검경하여 관찰하였다. 전자현미경 관찰은 균체 배양액을 3,000×g에서 10분간 원심분리하고 0.1 M potassium phosphate buffer(pH 7.0)에 현탁시킨 다음 phospho-tungstate 용액으로 negative staining하여 투과형 전자현미경(TEM Zeiss-model EM109)으로 12,000 배의 배율로 관찰하였다. 한편, 배양특성은 살균한 각 배지에 분리 균주의 전배양액을 접종하고 colony 형태, 성장도 및 배면의색 등 배양상의 특성을 5일간 배양하면서 관찰하였고, 생리적 특성은 상법에 따라 각종 생화학적 시험 및 생육 pH와 온도범위를 측정하여 실시하였다⁽²²⁾.

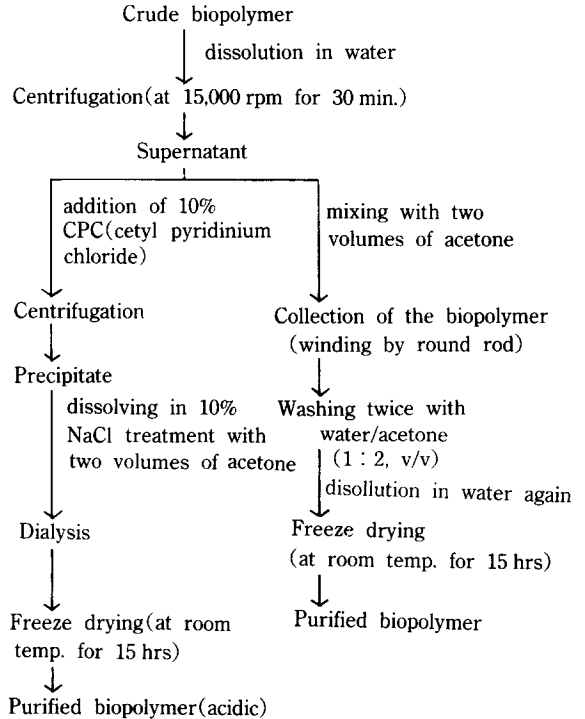


Fig. 1. A procedure of the purification of crude biopolymer

분석방법

균체량은 배양액을 적당히 희석하고 spectrophotometer(Spectronic 20, Milton Roy Co.)로 660 nm에서의 흡광도를 측정하여 구하였다. 배양액 중의 포도당의 양은 DNS(dinitrosalicylic acid)법⁽²³⁾ 및 glucose-oxidase법⁽²⁴⁾ 그리고 전당은 phenol-sulfuric acid법⁽²³⁾으로 각각 정량하였다. 한편, 생물고분자의 분리 및 정량은 다음과 같이 행하였다. 배양액을 1/2로 희석하고 15,000 rpm에서 60분간 원심분리하여 균체를 제거하였다. 상등액에 2배량의 acetone을 첨가하여 침전을 얻었으며, 이를 다시 증류수에 용해시켰다. 다시 acetone으로 침전하여 침전물을 dry oven에서 105°C로 항량이 될 때까지 건조시킨 후 조생물고분자(crude biopolymer)로 하였다. 생물고분자의 부분정제는 조생물고분자를 Fig. 1에서와 같이 CPC(cetylpyridinium chloride) 또는 acetone으로 처리하여 행하였고 동결건조하여 시료로 하였다. 한편, 생물고분자를 1 N H₂SO₄로 100°C에서 8시간 가수분해하고 BaCO₃로 중화하여 원심분리하였고, Amberlite IR-120(H⁺)로 탈염한 다음 진공 농축하여 가수분해 시료로 하였다.

생물고분자의 이화학적 분석

생물고분자의 정색반응은 Anthrone 반응, Fehling 반

Table 1. Morphological and cultural characteristics of the isolated strain

Test	Results	
Gram staining	Positive	
Spore staining	Positive	
Acid-fast staining	Negative	
Shape	Rod, not in chains	
Motility	Motile	
Nutrient agar(at 30°C for 24~48 hrs)		
Pigmentation	Brown color	
Form	Irregular	
Margin	Lobate	
Elevation	Umbonate	
Nutrient broth	Pellicle	
	pH 7	pH 10
Glucose-nutrient agar	++	+++
Glucose-nitrate agar	++	++
Glucose-asparagine agar	+	+

+++Good growth, ++Moderate growth, +Poor growth

Table 2. Utilization of carbohydrates

Carbohydrate	Utilization
Amylopectin	±
Dextrin	+
Fructose	++
Glycerine	+
Glucose	++
Galactose	+
Inulin	+
Maltose	++
Sucrose	++
Mannitol	++
Starch	++
Sorbitol	++
Xylose	±
Lactose	±
Mannose	++
Raffinose	±

±Slightly utilized, +Utilized, ++ Strongly utilized

응, Seliwanoff 반응, Elson-Morgan 반응, Carbazole-황산반응, 요오드-전분반응 및 Ninhydrin 반응을 상법^(23,24)에 따라 발색시켜 관찰하였다.

성분분석은 부분정제 시료의 단백질, glucosamine, acyl group, pyruvic acid 및 uronic acid를 각각 Kjeldahl법⁽²⁴⁾, Elson-Morgan법⁽²⁵⁾, Sloneker와 Jeanes들의 방법⁽²⁶⁾ 및 HCl에 의한 decarboxylase법⁽²⁷⁾으로 정량하였다.

적외선 흡수스펙트럼은 I.R. spectrometer(일본 분광공업계 JASCO A-3)를 사용하여 측정하였으며 시료는 KBr 정제법⁽²³⁾으로 조제하였다.

결과 및 고찰

생물고분자 생산균주의 분리 및 분리균의 균학적 성질 호알카리성 균주 배양 배지를 사용하여 균주를 분리하고, 이중 고체배양에서 점조성의 점질물을 생성하는 균주를 1차 선별하였다. 다시 액체배양에서 고점성의 물질을 분비하는 1 균주를 2차 선별하였으며, 이 분리균의 배양특성 및 형태적 성질은 Table 1과 같다. 중성(pH 7) 또는 알카리성(pH 10)의 각 배양기에서 모두 생육하였으나 pH 10의 Glucose-nutrient 한천배지에서의 생육이 가장 양호하였으며, 배양시간의 경과에 따라 점질물을 형성하였다.

또, Table 2에서 볼 수 있는 바와 같이 당당류, 이당류는 물론 당알코올과 전분 등을 잘 자화하여 광범위한 탄수화물의 이용특성을 나타내었다.

형태적 특성은 Fig. 2에서 보는 바와 같이 간균이었으나 편모는 관찰되지 않았다. 편성 호기성으로 운동성을 가지며, 중앙으로부터 말단부에 이르기까지 내생포자를 형성하였고, 비항산성으로 Gram 양성이었다. 한편, 생

리적 성질을 검토한 결과는 Table 3에서와 같이 온도 15~48°C 및 pH 4~11에서 생육이 가능하여 중온의 알카리내성 균주의 특성을 나타내었고, 12% NaCl의 육즙배지에서도 생육할 수 있었으며, 질산염을 환원하고 전분을 자화하였다. 또한, V-P 반응 및 catalase 반응에서 양성반응을 보였고, 당발효에서는 대부분의 당에서 산의 생성은 있었으나 gas 생성은 관찰되지 않았다. Cowan들⁽²⁸⁾의 검색표에 의하면 Gram 양성균의 간균으로 대생포자를 형성하는 세균으로는 *Bacillus*속과 *Clostridium*속의 균주가 있으며, *Bacillus*속 균주는 catalase 양성이고 대부분 호기적 특성을 나타낸다. 또, Smith들⁽²⁹⁾에 의하면 *Bacillus*속 균주의 일반적 특성으로 포자형성, 전분의 자화 및 V-P 반응의 양성반응 등이 포함된다.

따라서 본 균주를 *Bacillus*속의 균주로 동정하였으며, 또, 알카리 pH에서의 생육이 양호한 점으로부터 알카리내성균주인 것으로 판단하였다.

생성 생물고분자의 이화학적 성상

부분정제한 생물고분자는 담백색의 섬유상으로 무미, 무취였으며 냉수에 비교적 잘 용해되었고, 물에 분산된 생물고분자는 팽윤하여 점조성을 나타내었으며, 성분조성은 Table 4와 같다. 총 당함량은 52.78%로 다른 미생물 다당보다는 낮은 당함량을 나타내었다. 한편, acyl group과 pyruvic acid 함량은 극히 소량만이 존재하여 없는 것으로 간주되었고, CO₂는 검출되지 않아서 산성당(uronic acid)은 존재하지 않는 것으로 판단되었다. 또, 총 질소함량은 3.89%로 약 24.31%의 단백질을 함유하였으나 아미노당의 함량은 약 6.67%에 불과하여 본 생물고분자는 당단백질의 가능성을 보였다.

당단백질은 동물의 여러 장기나 식물의 조직 및 미생물의 세포막, 세포벽 등에 널리 분포되어 있는데, 최

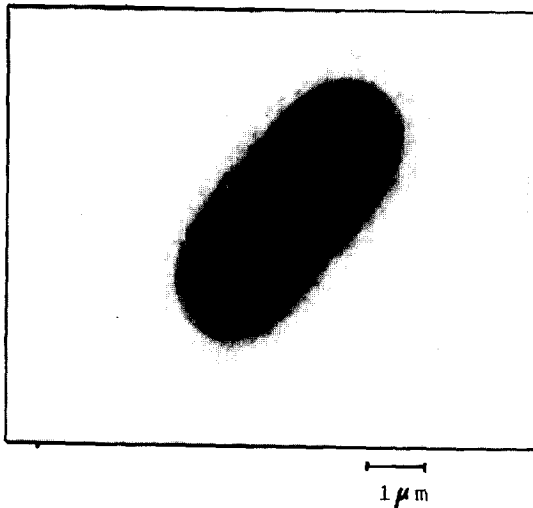


Fig. 2. Transmission electron micrograph of the isolated strain ($\times 12,000$)

Table 3. Physiological characteristics of the isolated strain

Test	Results
Catalase activity	Positive
Oxygen requirement	Positive
Voges-Proskauer test	Positive
Carbohydrate fermentation	
Acid but no gas : Amylopectin, dextrin, fructose, glycerine, glucose, galactose, inulin, maltose, sucrose, mannitol, starch, sorbitol, xylose	
No acid and no gas : Lactose, mannose, raffinose	
Casein hydrolysis	Positive
Gelatin liquifaction	Negative
Starch hydrolysis	Positive
Citrate utilization	Positive
Nitrate reduction	Positive
Indole production	Negative
H ₂ S production	Negative
Methyl red reaction	Negative
Polysaccharide production from sucrose	Positive
Tween 80 hydrolysis	Positive
Litmus milk reactions	
Gas formation	Negative
Litmus reduction	Positive
Curd formation	Positive
NaCl tolerance	<12%
Urease production	Negative
Oxidation-Fermentation test	Fermentative
Growth temperature(°C)	15~48
Growth pH	4~11

근에는 이들 당단백질이 세포의 분화나 세포간 인식 등 생체의 분자식별 현상에 중요한 역할을 하는 것으로 알려져서 이에 대한 관심이 높아지고 있다^(9,10). 지금까지 밝혀진 대부분 당단백질에서의 당성분은 일반적으로 단

Table 4. Chemical compositions of biopolymer

Components	Composition(%)
Total sugar	52.78
Acyl group	0.49
Pyruvate	0.04
CO ₂ (uronic acid)	-
Nitrogen(protein, N \times 6.25)	3.89(24.31)
Glucosamine	6.67
Crude ash	15.71

Table 5. Color reactions of the produced biopolymer

Test	Purified biopolymer	Hydrolysate
Anthrone reaction	Positive	Negative
Fehling reaction	Negative	Positive
Seliwanoff reaction	Negative	Negative
Elson-Morgan reaction	Positive	Positive
Carbazole-Sulfate reaction	Negative	Negative
Iodine reaction	Negative	Negative
Ninhydrin reaction	Negative	Positive

당류이나, N-acetyl 형태의 아미노당 또는 sialic acid 등으로 구성된 올리고당도 존재한다. 당함량도 매우 다양하여 몇몇 collagen의 0.5%에서부터 혈액형을 결정하는 glycoprotein의 8.5%까지 함유되어 있는 것으로 보고⁽³⁰⁾되고 있다.

한편, 부분정제 또는 가수분해한 생물고분자의 각종 정색반응은 Table 5와 같다.

부분정제 생물고분자 및 가수분해 시료는 모두 당의 일반반응인 Anthrone 반응 및 아미노당에 대한 Elson-Morgan 반응에서 양성이었으나 Carbazole-sulfate 반응에서는 모두 음성으로 uronic acid를 함유하지 않는 아미노당 또는 당단백질일 것으로 추정되었다. Uronic acid를 함유하지 않는 산성 다당류는 매우 드물어서 keratan sulfate I, II 등 일부 muco 다당에 국한되어 있다⁽⁵⁾. 또, I₂ 및 Seliwanoff 반응은 음성으로 전분 및 ketose는 존재하지 않음을 보였다. 아울러 부분정제 생물고분자의 Fehling 반응은 음성이었으나 가수분해로 환원성을 나타내었으며 Ninhydrin 반응은 부분정제 생물고분자에서는 음성, 가수분해 시료에서는 양성의 특징을 보였다. 그러나 생물고분자는 CPC(cetyl pridinium chloride)에 거의 대부분이 침전되어 산성 생물고분자인 것으로 판단되었다.

*Bacillus*속 다당 생산균주에는 *B. polymyxa* No.271, *B. polymyxa* C-3, *B. strain* F-573, *B. polymyxa* var. *lactoviscous*, *B. subtilis* FT-3, *B. subtilis* var., *B. circulans*, *B. polymyxa* No.458 등이 있으며 이들 다당은 일반적 구성당으로 glucose, galactose 등의 중성당 및 glucuronic acid 등을 함유하는 것으로 알려져 있다^(15, 20).

따라서 본 생물고분자는 이미 알려진 *Bacillus*속 균

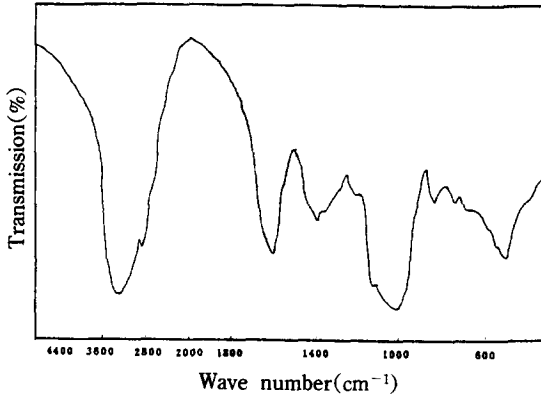


Fig. 3. Infra red absorption spectrum of the produced biopolymer

주의 다당과는 다른 특성을 나타낼 것으로 생각된다.

한편 당의 결합양식 또는 구성성분을 추정하기 위하여 정제 생물고분자의 적외선 흡수 spectra를 조사하였으며, 그 결과를 Fig. 3에 나타내었다. 당류 및 단백질에 특이적인 $3,400\text{ cm}^{-1}$ 에서의 강한 흡수⁽³¹⁾가 관찰되었다. 또, carboxyl기(이온성) 유래의 흡수가 $1,400$ 및 $1,600\text{ cm}^{-1}$ 부근에서 흡수가 관찰되었으나 주로 uronic acid의 흡수를 나타내는 carbon산 2량체의 $\text{C}=\text{O}$ 신축진동으로 고려되는 1725 cm^{-1} 부근의 흡수는 관찰되지 않았다. 기타 S-O 진동을 나타내는 $1,200\text{ cm}^{-1}$ 부근의 흡수 및 C-O-S 연결의 진동을 나타내는 $800\sim 900\text{ cm}^{-1}$ 의 흡수를 나타내어 유산 ester의 존재가 추측되었으며 보고된 유산화 다당의 적외선 흡수 spectrum과도 비교적 유사하였다^(31,32).

요 약

미생물을 이용한 유용물질 생산연구의 일환으로 토양으로부터 생물고분자 생산균주를 분리하고, 이 분리균에 대한 균학적 성질 및 생성 생물고분자의 이화학적 성상을 검토하였다. 분리균주는 *Bacillus*속의 한 균종으로 동정하였으며, 알칼리 내성균주의 특징을 나타내었다. 이 균주로부터 생성된 생물고분자는 성분분석, 정색반응 및 I.R. spectrum 분석결과 단백질 함량이 높고, 일부 amino sugar가 존재하나 uronic acid는 함유하지 않았다. 그러나 cetyl pyridinium chloride에는 침전되어 산성의 생물고분자인 것으로 추정되었다.

감사의 말

본 연구는 한국학술진흥재단의 1989년도 자유공모과제 연구비지원에 의해 이루어진 미생물에 의한 생물고분자의 생산과 이의 용도개발에 관한 연구의 일부인 바 깊은 사의를 표합니다.

문 헌

1. Yalpani, M. : Synthesis and characterization of polysaccharides. In *Polysaccharides : Syntheses, Modifications and Structure/Property Relations*, Elsevier, Oxford, p.1 (1988)
2. Yalpani, M. and Sanford, P.A. : Commercial polysaccharides : Recent trends and developments. In *Industrial Polysaccharides : Genetic Engineering, Structure/Property Relations and Applications*, Yalpani, M.(ed), Elsevier, New York, 311(1987)
3. Sinskey, A., Jamas, S., Easson, Jr. D. and Rha, C.K. : Biopolymers and modified polysaccharides. In *Biotechnology in Food Processing*, Harlendar, S.H. and Labuza, T.P.(ed), Noyes Pub., New Jersey, p.73(1986)
4. Glicksman, M. : Functional properties of hydrocolloids. In *Food Hydrocolloids*, Glicksman, M.(ed), CRC Press, Boca Raton, Vol.1, p.47(1982)
5. Sandford, P.A. and John. B. : Industrial utilization of polysaccharides. In *The Polysaccharides*, Aspinall, G.O. (ed), Academic Press, New York, Vol.2, p.411(1982)
6. Sanderson, G.R. : Polysaccharides in foods. *Food Technol.*, 35, 50(1981)
7. Sutherland, I.W. : Extracellular polysaccharides. In *Biotechnology*, Dellweg, H.(ed), Verlag Chemie, Weinheim, Vol.3, p.531(1983)
8. Slodki, M.E. and Cadmus, M.C. : Production of microbial polysaccharides. *Adv. Appl. Microbiol.*, 23, 19 (1978)
9. Kang, K.S. and Cottrell, I.W. : Polysaccharides. In *Microbial Technology*, Pepler, H.J. and Perlman, D.(ed), Academic Press, New York, Vol.1, p.417(1979)
10. 山本憲二, 竹川 薫, 門脇 節, 熊谷英彦, 折倉辰六郎 : *Flavobacterium*屬 細菌による糖タンパク分解酵素の生産と利用. *醸酵工業*, 45, 364(1987)
11. 宮崎利夫 : 多糖の構造と生理活性. 朝倉書店, 東京, p.1 (1990)
12. Alsop, R.M. : Industrial production of dextran. *Progr. Ind. Microbiol.*, 18, 1(1983)
13. Margaritis, A. and Pace, G.W. : Microbial polysaccharides. In *Comprehensive Biotechnology*, Murray Moo-Young, Pergamon Press, Oxford, Vol.3, p.1005(1985)
14. Ghai, S., Hisamatus, M., Amemura, A. and Harada, T. : Production and chemical composition of extracellular polysaccharides of *Rhizobium*. *J. Gen. Microbiol.*, 122, 33(1981)
15. Ninomiya, E. and Kizaki, T. : Highly viscous polysaccharide produced by *Bacillus polymyxa* No.271. *Nippon Nogeikagaku Kaishi*, 44, 270(1970)
16. Shioda, A., Yasuda, K., Kaneko, Y. and Doi, S. : Studies on the production of polysaccharides by microorganism(III). *J. Ferment. Technol.*, 49, 30(1971)
17. Murao, S., Morita, N. and Takahara, Y. : Sugar component of the polysaccharide produced by *Bacillus subtilis* FT-3. *J. Ferment. Technol.*, 51, 653(1973)
18. 村尾澤夫, 鹽澤朝夫, 高原義之, 橋本光木 : 日本特許公告, 52-12789(1977)
19. 石川秀雄, 木村良和, 鈴木茂生 : 日本特許公告, 52-4635 (1977)
20. Mitsuda, S., Miyata, N., Hirota, T. and Kikuchi, T.

- : High-viscosity polysaccharide produced by *Bacillus polymyxa*. *J. Ferment. Technol.*, **59**, 303(1981)
21. Horikoshi, K. and Akiba, T. : *Alkalophilic Microorganisms : A New Microbial World*. Japan Scientific Co. Press, Tokyo, p.1(1982)
 22. 長谷川武治 : 微生物の分類と同定. 學會出版, 東京, 上, p.203(1984)
 23. Chaplin, M.F. and Kennedy, J.F. : *Carbohydrate Analysis : A Practical Approach*. IRL Press, Oxford, p.3(1986)
 24. 中村道徳, 鈴木繁男 : 澱粉科學ハンドブック. 朝倉書店, 東京, p.190(1980)
 25. Morgan, W.T.J. and Elson, L.A. : A colorimetric estimation for the determination of N-acetyl glucosamine and N-acetyl chondrosamine. *Biochem. J.*, **28**, 988 (1933)
 26. Slonecker, J.H. and Jeanes, A. : Exocellular bacterial polysaccharide from *Xanthomonas campestris* NRRL B-1459. *Canadian J. Chem.*, **40**, 2066(1962)
 27. Browing, B.L. : *Method of Wood Chemistry*. Interscience Pub., New York, Vol.2, p.632(1967)
 28. Cowan, N.R. and Steel, K.J. : *Manual of the Identification of Medical Bacteria*. Cambridge Univ. Press, London, p.215(1965)
 29. Smith, N.R., Gordon, R.E. and Clark, F.E. : *Aerobic Spore-Forming Bacteria*. U.S.D.A., Agricultural Monograph No.16, p.3(1952)
 30. Spiro, R.G. : Study of carbohydrates of glycoproteins. In *Method in Enzymology*, Neufeld, E.F. and Ginsbury, V.(ed), Academic Press, p.3(1966)
 31. Neely, W.B. : Infrared spectra of carbohydrates. *Adv. Carbohydr. Chem. Biochem.*, **12**, 13(1957)
 32. Oda, M. : Saccharides and amino acids of the mucoid in an edible bird's nest. *Nippon Shokuhin Kogyo Gakkaishi*, **30**, 221(1983)
-
- (1990년 12월 24일 접수)