

다당류 메틸란의 산 성분 함량에 따른 점도의 변화

김상용 · 김정희* · 오덕근**

동양제과(주) 기술개발연구소, *한국과학기술원 생물과학과,

**우석대학교 식품공학과

Viscosity Change of Polysaccharide, Methylan by Acids Content

Sang-Yong Kim, Jung-Hoe Kim* and Deok-Kun Oh**

R&D Center, Tong Yang Confectionery Co.

*Department of Biological Sciences, Korea Advanced Institute of Science and Technology

**Department of Food Science and Technology, Woosuk University

Abstract

The chemical identities of purified polysaccharide, methylan, were analyzed by various chemical methods. The polysaccharide contained 79%(w/w) sugar, 6% protein, and 16% organic acids such as uronic acid, pyruvic acid, and acetic acid. With proceeding fermentation, the acids content in methylan increased from 10% at 34 hr to 17% at 72 hr, and the viscosity of methylan in the same concentration also increased. The correlation between viscosity and acid content in methylan was studied using chemically or biologically modified methylan. Methylan with a high content of pyruvic acid exhibited a high apparent and an intrinsic viscosity. When the pyruvic acid content of methylan with the same content of uronic acid was increased 1%, apparent viscosity and intrinsic viscosity increased 290 cp and 6 dL/g, respectively. Methylan with a high content of uronic acid exhibited a high apparent and an intrinsic viscosity. When the uronic acid content of methylan with the same content of pyruvic acid was increased 1%, apparent viscosity and intrinsic viscosity increased 85 cp and 1.5 dL/g, respectively. It was found that the increased viscosity of methylan resulted from the increased content of organic acids in methylan, and pyruvic acid was more an important factor contributed to the increase of methylan viscosity than uronic acid.

Key words: polysaccharide-methylan, pyruvic acid, uronic acid, viscosity

서 론

최근 생물공학기술의 발전과 더불어 고분자인 다당류, 특히 미생물에 의해 생성되는 다당류 및 이의 유도체에 대한 많은 연구와 관심이 집중되고 있다. 미생물 유래 다당류는 분자량, 구성당의 종류, 결합순서와 방법에 따른 구조의 다양성, 새로운 물리화학적 성질을 지닌 다당류를 개발할 수 있는 가능성 및 조건에 따라 겔 형성능력, 점도 증진능력, 유효능력, 표면장력의 조절 능력, 수분 흡수능력, 결착능력, 점착능력, 윤활능력 및 필름 형성능력 등의 광범위한 특성을 가지므로 페인트, 섬유공업, 제지, 화장품, 식품 등 각종 산업적 응용 면에서 많은 연구가 진행되어 왔다. 최근에

와서는 각종 세균 질병의 진단, 예방 또는 치료 등과 관련되는 생리활성을 갖는 소재로서의 중요성도 더욱 높아지고 있다^(1,2).

다당류 점도는 분자량, 당 성분의 비율, 구성성분의 함량의 변화에 뿐만 아니라 직선 구조 또는 분기 구조 같은 분자구조의 형태에도 영향을 받는다. 미생물 유래 다당류의 경우에는 배양조건에도 영향을 받아 배양온도, 배양 pH, 배지 성분, 배양 전단 속도 및 배양 시간에 따라 점도가 변화한다⁽³⁾. 다당류의 점도 조절인자로 배양조건은 여러 가지가 복합적으로 작용하기 때문에 적당하지 않지만 점도 조절인자로 구성성분의 함량을 사용한다면 점도를 원하는데로 조절하기가 용이하다. 점도 영향인자에서 구성성분의 함량에 따라 영향이 큰 것으로는 다당류 xanthan내의 pyruvic acid 가 점도에 영향을 준다는 보고는 있지만⁽⁴⁾ 아직까지 유기산이 점도에 미치는 영향을 정량적으로 살펴본

결과는 없다.

최근 본 실험실에서는 *Methylobacterium organophilum*이 특정조건에서 메탄올로부터 새로운 고점노 다당류 메틸란이 세포 외로 축적됨을 발견하였다^(5,7). 발견된 다당류 메틸란의 생산성을 증가시키기 위하여 배지최적화 및 환경조건 최적화를 수행하였으며^(8,9) 새로운 형태의 생물 반응기에 적용하였다⁽¹⁰⁾. 그리고, 메틸란의 산업적 적용을 위하여 메틸란에 의한 중금속 제거에 대하여서도 살펴보았다⁽¹¹⁾.

다당류의 점도를 조절할 수 있다면 산업적으로 유용 할 것임으로 본 연구에서는 다당류인 메틸란의 산성분 함량을 생물학적인 또는 화학적인 변형을 통하여 적당히 조절한 후, 다당류의 산 함량과 점도와의 관계에 대하여 살펴보고자 한다.

재료 및 방법

미생물 및 사용배지

이 연구에 사용한 균주는 메탄올 자화 세균인 *Methylobacterium organophilum* NCIB 11278 이였고, 사용 배지는 methanol 10 g/L, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 1.2 g/L, KH_2PO_4 2.52 g/L, Na_2HPO_4 4.24 g/L, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.9 g/L, $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 13.2 g/L, $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 5.2 g/L, $\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 0.52 g/L, $\text{ZnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 0.52 g/L, $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 0.16 g/L, $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 0.16 g/L, H_3BO_4 0.12 g/L로 구성된 화학합성 배지이다.

배양조건

250 mL 플라스크에서 배양액의 부피를 50 mL로 하여 배양시간에 대한 영향을 살펴본 실험은 72시간까지 배양하였고 그 외의 실험에서는 48시간까지 배양한 후 배양액을 시료로 사용하였다. 플라스크 배양조건으로는 교반속도 240 rpm, 초기 pH 7.0, 온도 30°C 이었다.

다당류의 분리 및 정제 방법

메틸란 정제를 위하여 배양액을 $10,000 \times g$ 조건으로 원심 분리하여 미생물 균체를 제거한 후, 상등액에 2배 부피의 에탄올을 첨가하여 메틸란을 침전시켰다. 침전된 메틸란을 진공 건조시키고 용해시킨 후 다시 2배 부피의 에탄올을 첨가하여 침전시켰다. 침전된 메틸란을 다시 진공 건조시킨 후 용해시켜 24시간 동안 투석시켰다. 투석된 메틸란을 동결 건조하였다. 본 실험에서는 정제된 다당류의 농도를 4 g/L로 만들어 사용하였다.

다당류 메틸란의 화학성분 분석

메틸란 중 총당 함량은 Phenol-sulfuric 법⁽¹²⁾으로 측정하였고, 단백질의 함량은 bovine serum albumin을 표준물질로 하여 Lowry 법⁽¹³⁾으로 측정하였다. 메틸란의 완전한 가수분해는 121°C에서 1시간동안 1.0 M TFA (trifluoro acetic acid)으로 수행하였다. TFA 가수분해 후, 환원당은 DNS 법⁽¹⁴⁾으로, uronic acid는 carbazol 법⁽¹⁵⁾으로 pyruvic acid는 Fridemann 법⁽¹⁶⁾으로 acetic acid는 hydroxamic acid 법⁽¹⁷⁾으로 각각 측정하였다.

다당류 내의 pyruvic acid의 함량 조절

메틸란 내의 pyruvic acid의 함량을 증가시키기 위하여 배지에 pyruvic acid를 첨가하여 배양하는 생물학적인 변형 방법을 사용하였다.

메틸란 내의 pyruvic acid의 함량을 감소시키기 위하여 메틸란 내의 pyruvic acid 제거시키는 다음의 화학적 변형 방법을 사용하였다. 메틸란 1 g/L를 2 N HCl로 pH를 2.0으로 조절하고 100°C에서 24시간 동안 반응시켰다. 반응 후 5 N NaOH로 중화시킨 후 투석하고 동결 건조하여 시료로 사용하였다⁽¹⁸⁾. 반응과정 동안에 시료를 채취하여 pyruvic acid의 함량이 감소된 메틸란을 얻을 수 있었다.

다당류 내의 uronic acid의 함량 조절

메틸란 내의 uronic acid의 함량을 증가시키기 위하여 배지에 glucuronic acid를 첨가하여 배양하는 생물학적인 변형 방법을 사용하였다.

메틸란 내의 uronic acid의 함량을 감소시키기 위하여 2 g/L의 메틸란 용액 100 mL에 NaBH_4 5 g을 첨가한 후 용해시켜 40°C에서 1시간 동안 반응시켜 환원시켰다. 환원 반응 후 18 N acetic acid 5 mL를 가하여 과량의 NaBH_4 를 분해시킨 후 투석하고 동결 건조하여 시료로 사용하였다⁽¹⁹⁾. 반응과정 동안에 시료를 채취하여 화학적으로 변형된 uronic acid가 감소된 메틸란을 얻을 수 있었다.

다당류 용액의 점도측정

다당류 용액의 점도는 Rotovisco RV20 (M5, Haake, Germany)을 이용하여 25°C에서 측정하였으며, 센서는 NV를 사용하였고 측정범위는 전단속도 10~2500 1/s 이었다. Pseudoplastic 물성을 지닌 메틸란 용액의 절보기 점도(K)는 아래의 Power law식을 사용하여 전단속도(γ)와 측정한 전단응력(τ)의 대수관계로부터 절편에서의 값으로부터 구하였다. 그러므로, 절보기 점도는 전단속도 1 1/s에서의 점도이다.

$$\tau = K\gamma^n$$

$$\log \tau = \log K + n \log \gamma$$

여기서, n 은 flow behavior index이다.

고유 점도는 Cannon Fenske capillary 점도계(Size 75, Cannon Instrument, State College, PA)를 사용하여 측정하였다. Capillary 점도계 안에 0.008~0.02 g/dL로 희석된 메틸란 용액을 넣고 25°C에서 20분 동안 방치하여 온도가 일정하게 하였다. 여러 농도의 메틸란 용액에서 메틸란 농도와 상태 점도와의 관계를 얻은 후 Huggins식을 이용하여 외삽하여 고유점도를 구하였다⁽²⁰⁾. 외삽은 직선 구간 내에서 선형 회기법(linear regression)에 의하여 구하였다.

결과 및 고찰

배양시간 증가에 따른 pyruvic acid, uronic acid 및 점도의 변화

*Methylobacterium organophilum*을 48시간 배양한 후 생산된 다당류 메틸란을 정제하였다. 정제된 다당류를 여러 가지 화학 방법에 의해서 분석한 결과 Table 1과 같았다. 79%의 당이 존재하였고 6%의 단백질과 16%의 유기산이 존재하였다. 존재하는 유기산 구성성분은 uronic acid, pyruvic acid, acetic acid이었고 각각의 함량은 약 12%, 약 4%, 1%미만 이었다. 다당류 xanthan에서는 구성성분에서 pyruvic acid 함량이 증가하면 점도가 크게 증가한다는 보고가 있으므로⁽⁴⁾ 메틸란내의 산의 함량이 메틸란 점도에 중요한 인자로 생각되어 주요 구성 유기산인 uronic acid와 pyruvic acid의 함량과 점도와의 관계를 살펴보았다.

메틸란의 발효 과정 중에 생성된 메틸란을 배양시간 별로 정제한 후 같은 4 g/L의 농도로 일정하게 용해하여 배양시간에 따른 점도 및 산의 함량 변화를 살펴보았다(Fig. 1). 배양시간이 경과할수록 같은 메틸란 농도에서 걸보기 점도는 점진적으로 증가하였다. 이러한 원인을 조사하기 위하여 분자량을 측정하였으나

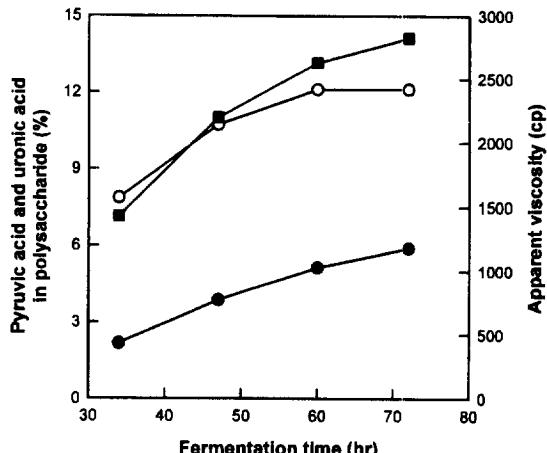


Fig. 1. Changes of uronic acid content, pyruvic acid content, and apparent viscosity of methylan during culture time. ●—●: uronic acid, ○—○: pyruvic acid, ■—■: apparent viscosity.

발효시간에 따라 큰 차이가 없었다. 그러므로, 배양시간에 따른 메틸란 내의 산 성분의 함량 변화를 살펴보았다. 발효가 진행됨에 따라 pyruvic acid와 uronic acid 같은 산의 함량은 메틸란 생성 초기(34시간) 10%에서 배양 말기(72시간)에서는 17%까지 증가하였고 산의 함량이 증가함에 따라 점도도 증가하였다. 특히 배양시간이 60시간에서 72시간으로 증가될 때 uronic acid의 함량이 일정하였지만 pyruvic acid의 함량이 증가하였고 점도도 증가하였다. 이것은 점도 증가에 pyruvic acid와 uronic acid 모두 관여한다는 것을 의미한다. 산 성분의 함량 증가는 메틸란 내에서 (-)전하의 증가를 의미하며, 그 결과 메틸란 분자내 고분자 사슬 간의 정전기적 반발력 증가하고 hydrodynamic domain이 증가하여 점도가 증가하는 것으로 추측된다. 그러므로, 메틸란의 산 성분이 증가하면 메틸란의 점도가 증가하였다.

다당류 내의 pyruvic acid의 함량 변화에 따른 점도의 영향

메틸란 내의 pyruvic acid의 함량 변화가 메틸란 용액의 점도에 미치는 영향을 살펴보기 위하여 다당류 메틸란의 생물학적 및 화학적 변형을 시도하였다. 생물학적 변형은 배지의 pyruvic acid의 농도를 여러 가지로 첨가시켜 배양하는 방법을 사용하였다(Fig. 2). 배지 중에 pyruvic acid 1 g/L 이내의 농도에서 배양하여 생성된 메틸란의 pyruvic acid의 함량은 배지의 pyruvic acid의 함량 증가함에 따라 급격히 증가하였다.

Table 1. Chemical components of polysaccharide, methylan

Chemical component	Content (w/w, %)
Total sugar	79.0
Reducing sugar	72.9
Protein	5.1
Uronic acid	12.1
Pyruvic acid	3.6
Acetic acid	0.2

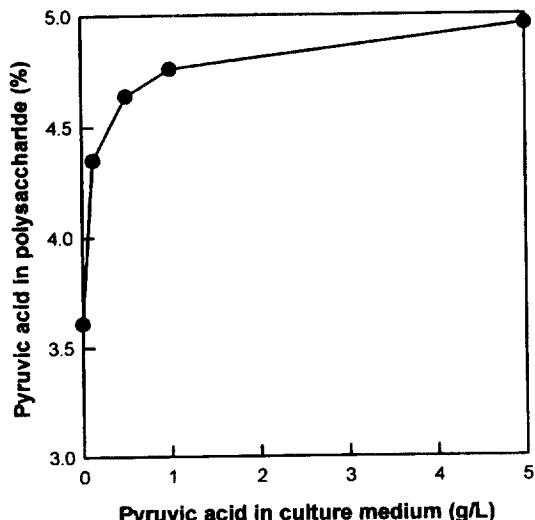


Fig. 2. Pyruvic acid contents in methylan produced on the media containing various concentrations of pyruvic acid.

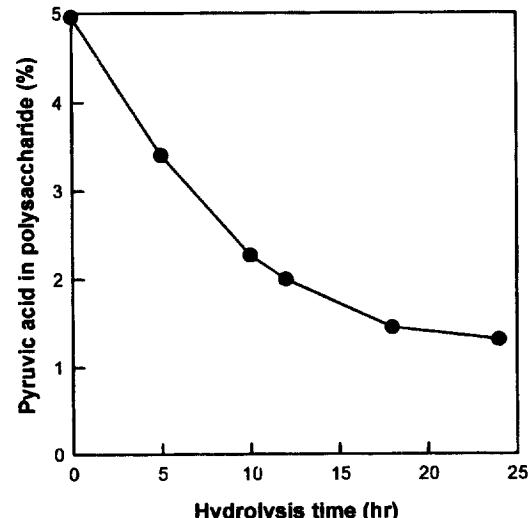


Fig. 3. Change of pyruvic acid content in methylan during acid hydrolysis.

그러나, 배지 중에 1 g/L 이상의 pyruvic acid를 첨가하여 배양하면 생성된 메틸란의 pyruvic acid의 함량은 배지의 pyruvic acid의 농도가 증가함에 따라 서서히 증가하였다. Pyruvic acid의 함량이 다르게 생성된 메틸란의 uronic acid의 함량은 비교적 일정하여 12.1~12.3%를 나타내었다. 이러한 결과는 다당류 내의 pyruvic acid의 함량 증가는 배지에 pyruvic acid의 양을 달리하여 첨가하면 어느 정도 조절할 수 있음을 의미한다.

산성에서 가열하여 반응시키면 다당류 내의 pyruvic acid가 어느 정도 제거된다. 반응시간에 따른 pyruvic acid의 변화를 Fig. 3에 나타내었다. 반응과정 동안에 uronic acid의 함량은 12.5%에서 24시간 후 11.8%로 비교적 적게 감소하였다. 이것은 uronic acid는 다당류의 주 사슬에 속하여 있어 산성에서 단단하게 결합이 유지되고 있고 이에 비하여 pyruvic acid는 다당류의 보조 사슬에 속하여 있어 산성에서 쉽게 결합이 분해되는 것으로 생각된다. 반응시간 10시간 이내에서는 다당류 내의 pyruvic acid의 함량이 급격히 감소하였으나, 그 이상의 시간에서는 pyruvic acid의 함량이 서서히 감소하였고 반응시간을 더 증가하여도 1.0%이하로는 감소하지 않았다.

생물학적 및 화학적 변형을 통하여 pyruvic acid의 함량이 다른 다당류를 얻었고 이 다당류를 이용하여 pyruvic acid의 함량과 겉보기 점도와 관계를 조사하였다(Fig. 4). 다당류 내의 pyruvic acid의 함량이 1.2%

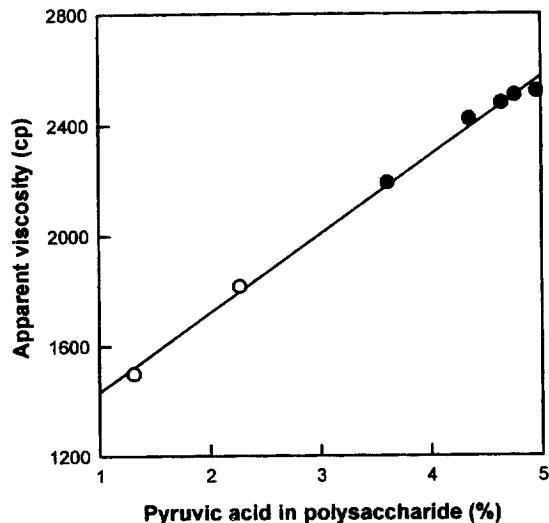


Fig. 4. Effect of pyruvic acid content in methylan on apparent viscosity of methylan solution. ●—●: biologically modified methylan, ○—○: chemically modified methylan.

일 때 점도는 약 1500 cp를 나타내었고 pyruvic acid 함량이 증가할수록 겉보기 점도가 증가하여 pyruvic acid의 함량이 5.0%일 때 점도는 약 2500 cp를 나타내었다. Pyruvic acid의 함량이 1% 증가할 경우 약 290 cp의 겉보기 점도가 증가하였다.

고유 점도 역시 pyruvic acid의 함량이 증가할수록 증가하여 pyruvic acid의 함량이 1.2%일 때 점도는 약 11 dL/g를 나타내었고 함량이 5.0%일 때 점도는 약 34

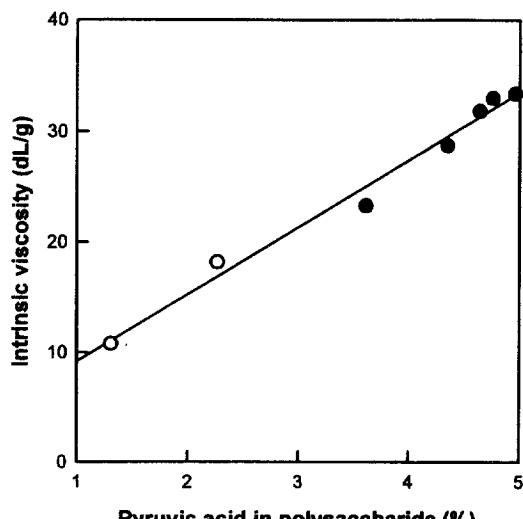


Fig. 5. Effect of pyruvic acid content in methylan on intrinsic viscosity of methylan solution. ●—●: biologically modified methylan, ○—○: chemically modified methylan.

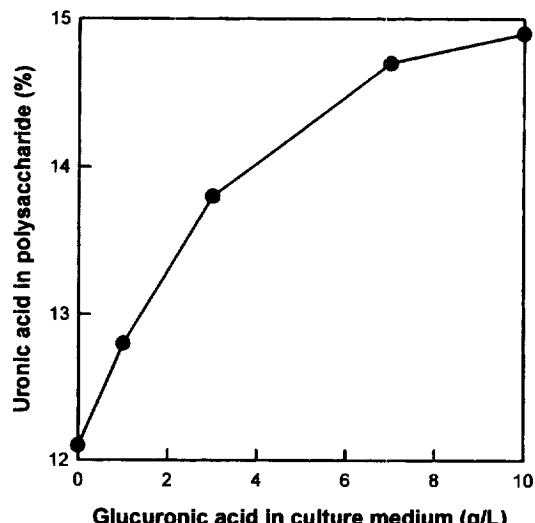


Fig. 6. Uronic acid contents in methylan produced on the media containing various concentrations of glucuronic acid.

dL/g를 나타내었다. Pyruvic acid의 함량이 1% 증가할 경우 약 6 dL/g의 고유 점도가 증가하였다.

다당류 내의 uronic acid의 함량 변화에 따른 점도의 영향

메틸란을 생물학적 및 화학적 변형을 통하여 uronic acid의 함량을 변화시켜 다당류 내의 uronic acid의 함량 변화가 메틸란 용액의 점도에 미치는 영향을 살펴보았다. 배지 중에 glucuronic acid의 함량을 여러 가지 농도로 변화시키며 첨가시켜 배양하여 생물학적 변형을 시도하였다(Fig. 6). 배지에 glucuronic acid의 함량을 0 g/L에서 10 g/L로 증가하였을 때 메틸란 내의 uronic acid의 함량은 약 12%에서 약 15%로 증가하였다. Uronic acid가 다르게 생성된 메틸란 내의 pyruvic acid의 함량은 비교적 일정하여 3.6~3.8%를 나타내었다. 이러한 결과는 배지에 uronic acid의 양을 달리 하여 첨가하면 배양 후 생성된 메틸란 내의 uronic acid의 함량이 다른 메틸란을 얻을 수 있음을 의미한다.

메틸란을 환원시키면 메틸란 내의 uronic acid의 함량이 감소되기 때문에 시간에 따른 환원과정을 Fig. 7에 나타내었다. 환원과정중 pyruvic acid의 함량은 3.6%로 변화가 없었다. 이것은 환원 반응의 경우 uronic acid만 특이적으로 환원을 시키므로 pyruvic acid의 경우에는 아무런 영향이 없는 것으로 생각된다. 메틸란 내의 uronic acid의 함량은 반응시간 1시간 이내에서

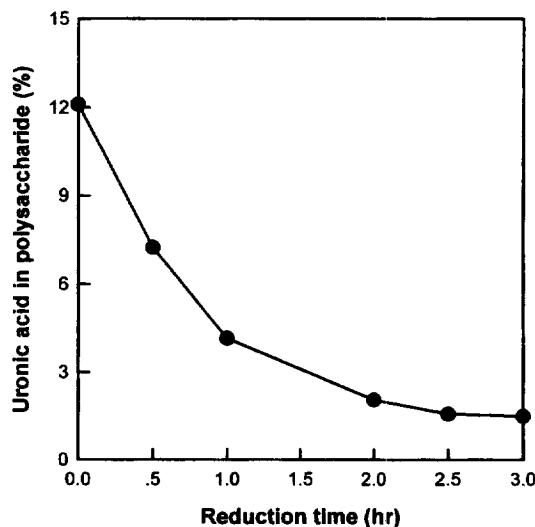


Fig. 7. Change of uronic acid content in methylan during reduction reaction.

급격히 감소하였으나 그 이상의 시간에서는 서서히 감소하였고 반응시간을 더 증가하여도 1.0% 이하로는 감소하지 않았다.

생물학적 및 화학적 변형을 통하여 uronic acid의 함량이 변화된 메틸란에서 uronic acid의 함량과 겉보기 점도와 관계를 조사하였다(Fig. 8). 겉보기 점도는 다당류 내의 uronic acid의 함량이 증가할수록 증가하여 uronic acid의 함량이 1.5%일 때 점도는 약 1200 cp를

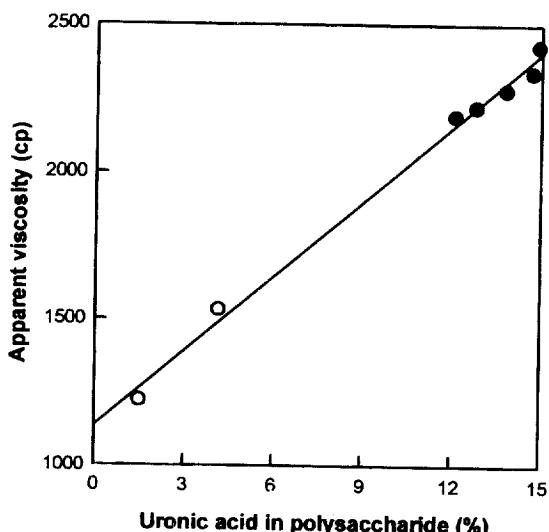


Fig. 8. Effect of uronic acid content in methylan on apparent viscosity of methylan solution. ●—●: biologically modified methylan, ○—○: chemically modified methylan.

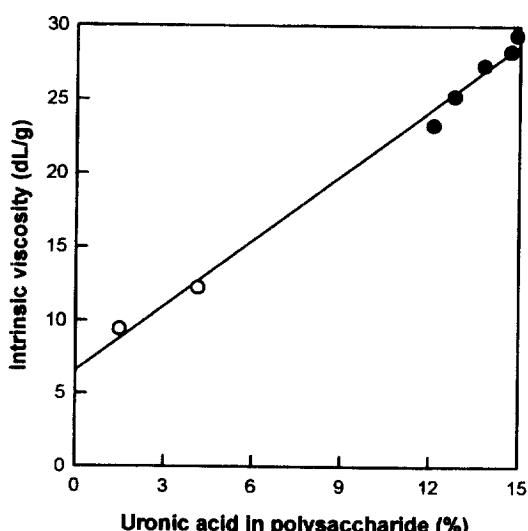


Fig. 9. Effect of uronic acid content in methylan on intrinsic viscosity of methylan solution. ●—●: biologically modified methylan, ○—○: chemically modified methylan.

나타내었고 15%일 때 점도는 약 2400 cp를 나타내었다. Uronic acid의 함량이 1% 증가할 경우 약 85 cp의 겉보기 점도가 증가하였다. 이러한 증가는 pyruvic acid의 약 290 cp의 겉보기 점도 증가의 약 30%수준에 불과하다. 메틸란의 점도 증가는 메틸란 내의 유기산의 함량이 증가할수록 증가되고 이때, 점도 증가에 더 기여하는 유기산은 uronic acid보다 pyruvic acid임

Table 2. Linear regression of pyruvic acid and uronic acid contents (X) and apparent and intrinsic viscosities of methylan (Y)

X	Y	a ¹⁾	b ²⁾	r ³⁾
Pyruvic acid (%)	Apparent viscosity (cp)	285.79	1149	0.998
Pyruvic acid (%)	Intrinsic viscosity (dL/g)	6.09	3.09	0.992
Uronic acid (%)	Apparent viscosity (cp)	84.66	1137	0.997
Uronic acid (%)	Intrinsic viscosity (dL/g)	1.47	6.62	0.996

¹⁾Slop.

²⁾Intercept.

³⁾Regression coefficient.

을 알 수 있었다.

고유 점도도 uronic acid 함량이 증가할수록 증가하여 uronic acid 함량이 1.5%일 때 고유 점도는 약 9 dL/g를 나타내었고 함량이 15%일 때 점도는 약 29 dL/g를 나타내었다. Uronic acid의 함량이 1% 증가할 경우 약 1.5 dL/g의 고유 점도가 증가하였다. 이러한 증가는 pyruvic acid의 6 dL/g의 고유 점도 증가의 약 25%수준에 불과하다. 메틸란의 고유 점도 역시 uronic acid보다 pyruvic acid의 함량에 더 민감하게 나타남을 알 수 있었다.

Pyruvic acid와 uronic acid의 함량을 X축으로 하고 겉보기 및 고유점도를 Y축으로 하여 선형 회기법으로 통계 처리하여 기울기, 절편 및 회기 계수를 Table 2에 정리하여 나타내었다. 회기 계수를 살펴보면 4가지 경우 모두 0.99 이상을 나타내어 다당류 메틸란의 산 성분의 함량과 그것의 점도는 직선관계임을 알 수 있었다.

본 실험에서는 메틸란의 점도 증가가 메틸란 내의 유기산의 함량이 증가할 수록 증가되었고 메틸란의 점도 증가에 대한 기여는 uronic acid보다 pyruvic acid가 더 크게 나타났다.

요약

정제된 다당류 메틸란을 여러 가지 화학 방법에 의해서 분석한 결과 79%의 당이 존재하였고 6%의 단백질과 16%의 유기산이 존재하였다. 배양시간이 증가함에 따라 pyruvic acid와 uronic acid 같은 산의 함량이 34시간의 10%에서 72시간에서는 17%까지 증가하였고 이에 따라 점도도 증가하였다. 메틸란 내의 산의 함량이 점도에 중요한 인자로 생각되어 주요 유기산인 uronic acid와 pyruvic acid의 함량과 점도와의 관계를 살펴보았다. 생물학적 및 화학적 변형을 통하여 pyruvic acid의 함량이 변화된 메틸란을 이용하여 pyruvic acid의 함량과 점도와 관계를 조사하였다. Py-

pyruvic acid 함량이 증가할수록 겉보기 점도와 고유 점도가 증가하였고 pyruvic acid의 함량이 1% 증가할 경우 약 290 cp의 겉보기 점도와 약 6 dL/g의 고유 점도가 증가하였다. 생물학적 및 화학적 변형을 통하여 uronic acid의 함량이 변화된 다당류에서 uronic acid 함량과 점도와 관계를 살펴보았다. 메틸란 내의 uronic acid의 함량이 증가할수록 점도가 증가하여 uronic acid의 함량이 1% 증가할 경우 약 85 cp의 겉보기 점도와 약 1.5 dL/g의 고유 점도가 증가하였다. 이러한 결과로부터 메틸란의 점도 증가는 다당류 내의 유기 산의 함량이 증가할수록 증가되고 메틸란의 점도 증가는 uronic acid보다 pyruvic acid에 더 기인함을 알 수 있었다.

문 헌

1. Bikales, N.M.: *Water Soluble Biopolymers*, Dalton, H. (Ed.), Flenum Publishing Corp., New York, p.227 (1973)
2. Sutherland, I.W.: *Comprehensive Biotechnology*, Dellweg, H. (Ed.), Verlag Chemie GmbH, Berlin, p.531 (1983)
3. Sutherland, I.W.: Polysaccharide modification: A physiological approach. In *Industrial Polysaccharide*, Yalpani, M. (Ed.), Elsevier Science Publishers, Amsterdam, p.71 (1987)
4. Smith, I.H., Symes, K.C., Lawson C.J. and Morris E.R.: Influence of the pyruvate content of xanthan on macromolecular association in solution. *Int. J. Biol. Macromol.*, **3**, 129 (1981)
5. Choi, J.H., Oh, D.K., Kim, J.H. and Lebeault J.M.: Characteristics of a novel high viscosity polysaccharide, methylan, produced by *Methylobacterium organophilum*. *Biotechnol. Lett.*, **13**, 417 (1991)
6. Lebeault, J.M., Kim, J.H. and Choi, J.H.: Novel biological polymer. U.S. Patent 5,064,759 (1991)
7. Kim, J.H., Choi, J.H., Oh, D.K. and Lebeault, J.M.: A novel high viscosity polysaccharide-biopolymer produced from methanol. *Proc. Asia-Pacific Biochemical Engineering Conference '90*, **1**, 229 (1990)
8. 오덕근, 임현수, 김정희: 고점도 다당류, 메틸란의 생산에 관한 교반속도의 영향. *한국농화학회지*, **38**, 190 (1995)
9. Oh, D.K., Kim, S.Y. and Kim, J.H.: Production of a high viscosity polysaccharide, methylan, by controlling ammonium ion", *Biotechnol. Lett.*, **18**, 1427 (1996)
10. Oh, D.K., Kim, J.H. and Yoshida T.: Production of a high viscosity polysaccharide, methylan, in a novel bioreactor", *Biotechnol. Bioeng.*, **54**, 115 (1997)
11. Kim, S.Y. Kim, J.H., Kim, C.J. and Oh, D.K.: Metal adsorption of the polysaccharide produced from *Methylobacterium organophilum*. *Biotechnol. Lett.*, **18**, 1161 (1996)
12. Dobios, M., Gilles, K.A., Hamilton, J.K., Rebers, P.A. and Smith F.: Colorimetric method for determination of sugars and related substance. *Anal. Chem.*, **28**, 350 (1959)
13. Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L. and Randall R.J.: *J. Biol. Chem.*, **193**, 265 (1951)
14. Miller, G.L.: Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. *Anal. Chem.*, **31**, 426 (1967)
15. Bitter, T. and Muir H.M.: A modified method for the determination of uronic acid by carbazol reaction. *Anal. Biochem.*, **4**, 330 (1962)
16. Friedemann, T.E. and Haugen G.E.: Determination of pyruvic acid in polysaccharide. *J. Biol. Chem.*, **147**, 415 (1943)
17. MaComb, E.A. and McCready R.M.: Determination of acetyl in pectin and acetylated carbohydrate polymer. *Anal. Chem.*, **29**, 819 (1957)
18. Painter, T.J.: Partial acidic and enzymic hydrolysis. In *Methods in Carbohydrate Chemistry*, Whistler, R.L. and Wolfrom, M.L. (Ed.), Academic press, New York, Vol. 5, p.280 (1965)
19. Wolfrom, M.L. and Thompson A.: Reduction with sodium borohydride. In *Methods in Carbohydrate Chemistry*, Whistler, R.L. and Wolfrom, M.L. (Ed.), Academic Press, New York, Vol. 2, p.65 (1963)
20. Barnes, H.A., Hutton, J.F. and Walters: In *An introduction to rheology*, Elsevier Science Publishers, Amsterdam, p.103 (1989)

(1997년 8월 8일 접수)