

## 효소분해에 의한 알긴산 올리고당류의 제조

주동식 · 이정석 · 박중제 · 조순영\* · 김희경 · 이응호  
부산수산대학교 식품공학과, \*강릉대학교 식품과학과

### Preparation of Oligosaccharides from Alginic Acid by Enzymic Hydrolysis

Dong-Sik Joo, Jung-Suck Lee, Jung-Je Park, Soon-Yeong Cho\*,  
Hee-Kyung Kim and Eung-Ho Lee

Department of Food Science and Technology, National Fisheries University of Pusan

\*Department of Food Science, Kangnung National University

#### Abstract

For the purpose of production of oligosaccharides from alginates, a bacterium was isolated from seaweed, and then an enzyme which degraded alginates was obtained from the bacterium. A specific activity of the enzyme was shown in G-rich block and Na-alginate (Wako Co.) as a result of reaction between the enzyme and six types of alginates (G-rich block, M-rich block and 4 commercial Na-alginate). Degradation products were prepared from the Na-alginate (Wako Co.) by the enzyme. The oligosaccharides were fractioned by Sephadex G-25 and Bio-gel P-2 and identified on a thin layer chromatography (TLC). Degree of polymerization (DP) of the oligosaccharides was shown from 2.6 to 7.5.

Key word: alginate, oligosaccharide, enzyme, degree of polymerization

#### 서 론

과거 다당류를 포함하여 당류에 대한 인식이 칼로리원이나 맛을 내는데 필요한 물질 정도로 인식되어 오던 것이 최근 당류에 대한 생체 내에서의 역할이 재조명되면서 당류에 대한 인식이 상당히 변화하고 있으며, 최근에는 당쇄공학이라는 영역으로 그 연구가 활발하게 이루어지고 있다<sup>(1,2)</sup>. 아울러 올리고당도 bifidobacteria의 활성 촉진 및 장내세균군의 개선 및 항콜레스테롤 효과<sup>(3,7)</sup>, 생체조절인자<sup>(8)</sup> 등의 역할이 알려지면서 많은 연구가 이루어지고 있다<sup>(9,11)</sup>. 이러한 다당류 또는 올리고당의 연구는 주로 육상 식물 다당류를 대상으로 널리 이루어지고 있으며, 해조 다당류나 올리고당의 기능성에 대한 연구는 근년들어 많이 행해지고 있으나<sup>(12,14)</sup>, 국내에서는 거의 초보적인 단계에 있는 실정이고, 최근 이에 대한 관심과 연구가 일부 분야에서 행해지고 있다<sup>(15)</sup>.

한편, 해조 다당류 중에서도 알긴산은 카르복실기

를 가지는 hetero형 산성 다당류로 D-mannuronic acid와 L-guluronic acid로 구성되어 있고<sup>(16,17)</sup>, 이 다당류들의 결합 방법에 따라 다양한 종류의 다당류가 만들어질 수 있는데, 이는 원료의 성장 즉, 해조의 부위별, 크기 및 생육 장소에 따라 알긴산의 구성 형태가 다른 원인이 된다<sup>(18,19)</sup>.

본 연구는 다양한 구조적 특성을 지니는 알긴산을 원료로 하여, 이를 특징적으로 분해하는 미생물 효소를 이용하여 다양한 기능 특성을 갖는 올리고당을 제조하는데 목표를 두고, 먼저 알긴산을 특징적으로 분해하는 균주를 분리하였고<sup>(20)</sup>, 그 균주가 생산하는 균체외 및 균체내 효소의 특성을 밝혔으며<sup>(21,23)</sup>, 이 효소들의 알긴산에의 작용 특성도 보고한 바 있다<sup>(24)</sup>. 본보에서는 몇 종류의 알긴산에 균체외 효소를 반응시켜 올리고당류를 생산하고, 이들을 분획하여 올리고당을 확인한 결과를 보고하고자 한다.

#### 재료 및 방법

##### 효소 및 알긴산

사용된 효소는 미역으로부터 분리된 *Vibrio* sp. AL-

Corresponding author: Eung-Ho Lee, Department of Food Science & Technology, National Fisheries University of Pusan, Pusan 608-767, Korea

145가 생산하는 균체의 효소<sup>(23)</sup>를 부분 정제하여 단백질 농도가 300-350 µg/ml 인 조효소를 사용하였다. 올리고당 제조에 사용된 알긴산은 시판 4 종류(Wako Co. 1종류, Sigma Co. 3종류)의 알긴산과 이들을 원료로 하여 제조한 polyguluronate와 polymannuronate 2종류였다.

Polyguluronate 및 polymannuronate는 Haug 등<sup>(25)</sup>의 방법에 따라 제조하였다. 즉, Na-alginate 1 g에 0.3 M HCl 100 ml를 가하여 100°C에서 2시간 동안 환류 가열을 행한 후 원심분리(3,000 rpm, 5 min)하여 침전물과 상징액(A)을 분리하였다. 침전물은 증류수에 용해시켜 0.1 M되게 NaCl을 첨가하고, pH를 2.8-3.0으로 조절하였다. 다시 원심분리하여 상징액(B)과 침전물(C)을 분리하고, 각각의 분획을 알코올 처리한 다음 수세한 후 건조하여 제조하였다. 여기서 B를 polymannuronate로, C를 polyguluronate로 이용하였다.

**알긴산과 효소의 반응**

알긴산으로부터 올리고당을 생산하기 위한 분해 반응은 각 알긴산을 1.5%(pH 8.0, 0.5 M NaCl) 되게 만들고, 이 알긴산 용액 1,000 ml에 부분 정제 효소를 20 ml씩 첨가하여 37±2°C에서 40시간까지 분해를 행하면서 2-5시간 간격으로 분해물을 취하여 끓는 수조에서 10분간 가열하여 효소를 불활성화시켜 TLC 용 시료로 하였다.

**환원당 및 전당 측정**

효소 반응에 따라 생성되는 환원당의 함량은 Somogyi-Nelson법<sup>(26)</sup>에 따라 시료 용액 1 ml와 동(銅)시약 1 ml를 test tube에 각각 취하고, water bath에서 20분간 가열하여 산화제 1동(Cu<sub>2</sub>O)을 생성시켰다. 여기에 몰리브덴 용액 1 ml를 가하여 발색시킨 다음, 520 nm에서 흡광도를 측정하여, mannuronic acid를 이용하여 얻어진 표준 검량선으로부터 환원당을 정량하였다.

전당은 phenol-sulfuric acid 법<sup>(27)</sup>에 따라 시료 용액 1 ml (10-100 µg/ml)를 test tube에 취하고, 5% phenol 용액 1 ml를 가한 후 혼합하고, 진한 황산 5 ml를 반응액에 직하하여 가능한한 발열시키면서 잘 혼합한다. 이 반응액을 실온에서 20-30분간 방치한 후 470 nm에서 흡광도를 측정하여 표준 검량선으로부터 구하였다.

**분해율 측정**

반응 시간에 따른 알긴산의 분해율은 아래에 나타낸 바와 같이 반응액의 전당에 대해 분해되어 생성된

환원당의 비로서 나타내었다.

$$\text{분해율 (\%)} = \frac{\text{환원당}}{\text{전당}} \times 100$$

**Thin layer chromatography (TLC)**

TLC aluminum plate (DC-Alufolien Kieselgel 60, Merk Art 5553, 20×20 cm)를 105°C에서 1시간 전처리하여, 데시케이터 중에서 방냉하였다. 이 plate에 시료액을 5-15 µl spotting한 후, 이 plate를 사용 1시간 전에 제조한 isopropyl alcohol, acetone, lactic acid 혼합액(1 : 3 : 3)에서 전개를 행하였다. 전개 후 60°C에서 건조하여 발색제(aniline, diphenylamine, acetone, phosphoric acid 혼합액)를 분무하여 105°C에서 1시간 동안 발색시켰다.

**겔크로마토그래피에 의한 분획**

Sephadex G-25 수지를 이용한 겔여과는 유리칼럼(φ1.5×100 cm)에 팽윤시킨 수지를 75 cm까지 충전시키고, 전용량에 대해 2-5%의 시료액을 용출, 분획하였다. 용출액은 0.05 M NaCl용액으로 하였고, 각 획분별 5 ml씩 분취하였다. 분취된 획분은 전당과 아울러 TLC로 분석하였다.

Bio-gel P-2 를 이용한 분획은 유리칼럼(φ2.0×100 cm)에 수지를 85 cm정도 충전시키고, 전용량에 대해 2-3%의 시료액을 loading한 후 micro pump를 이용하여 용출시켰다. 용출액은 물로 하였고, 각 획분별 5 ml씩 분취하고 전당 및 TLC 분석을 동시에 행하였다.

**중합도(DP) 측정**

올리고당(시료용액)의 중합도는 알긴산 분해물의 중합도를 측정하는 Timell's modification법<sup>(28)</sup>에 따라 측정하였다. 즉 시료 용액의 당농도를 136 µg/ml (3.4 mg/25 ml)로 조절하고, 이 시료 용액 1 ml에 1% sodium borohydride 1 ml 를 가하였다. 대조 실험으로는 1 N sulfuric acid로 만든 1% sodium borohydride (inactive borohydride)를 1 ml가하였다. 이것을 상온에서 1시간 방치한 후 4% phenol 용액 1 ml를 첨가한 다음, 진한 황산 5 ml를 가하고 다시 상온에서 30분간 방치한 후 490 nm에서 흡광도를 측정하였다. 이때 공시험은 시료 용액 대신에 증류수를 취하였다. 흡광도로부터 아래식에 의해 중합도를 계산하였다.

$$DP = \frac{Q}{Q-1} \quad (\text{여기서, } Q = \frac{\text{non-reduced oligosaccharide의 O.D.값}}{\text{reduced oligosaccharide의 O.D.값}})$$

**결과 및 고찰**

**올리고당 제조에 사용된 알긴산의 일반특성**

올리고당 생산을 위해 사용된 알긴산의 특징을 Table 1에 나타내었다. 시판의 Na-형 알긴산 4종류 (Sigma Co. 3 종류, Wako Co. 1종류)와 이들을 원료로 하여 제조한 guluronic acid (G-rich block) 및 manuronic acid (M-rich block) polymer를 2종류 사용하였다.

G-rich block과 M-rich block의 평균 중합도(DP)는 각각 13.5-14.0, 9.0-11.5로 G-rich block의 평균 중합도가 높음을 알 수 있었는데, 이 값은 제조과정의 처리 조건에 따라 다소 다를 수 있을 것으로 생각된다. M/G 비를 비교해 보면 G-rich block은 guluronic acid가 20일 때 manuronic acid가 1의 비율로, M-rich block의 경우는 manuronic acid가 12일 때 guluronic acid가 1의 비율로 혼재되어 있는 polymer임을 알 수 있었다. 다른 시판 알긴산은 점도와 M/G 비가 다소 차이가 있음을 알 수 있고 대체로 점도가 높을수록 M/G 비가 낮아 guluronic acid의 함량이 높음을 알 수 있는데, 이는 원조의 manuronic acid와 guluronic acid의 함량의 차이에서 기인하는 것으로 알려져 있다<sup>(29,30)</sup>. 이러한 알긴산의 성상 차이는 효소를 이용하여 올리고당을 생산할 때 올리고당의 형태에 절대적 영향을 미칠 수 있는 요소라고 판단된다.

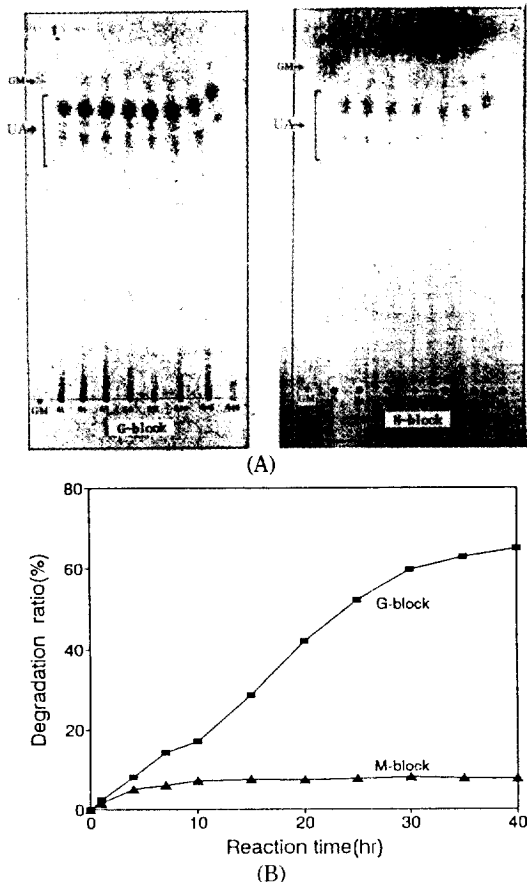
**Table 1. Properties of alginates used for production of oligosaccharides**

Substrate	Source	Viscosity <sup>1)</sup>	DP <sup>2)</sup>	M/G ratio <sup>3)</sup>
G-block	prepared with high viscosity Na-alginate	10.5	13.5-14.0	0.05
M-block	prepared with low viscosity Na-alginate	8.3	9.0-11.5	12.2
Na-alginate (Wako Co.)	-	3,600-3,700	-	1.31
High viscosity Na-alginate (Sigma Co.)	<i>Macrocystis pyrifera</i> (Kelp)	14,000	-	1.34
Medium viscosity Na-alginate (Sigma Co.)	<i>Macrocystis pyrifera</i> (Kelp)	3,500	-	1.58
Low viscosity Na-alginate (Sigma Co.)	<i>Macrocystis pyrifera</i> (Kelp)	250	-	2.05

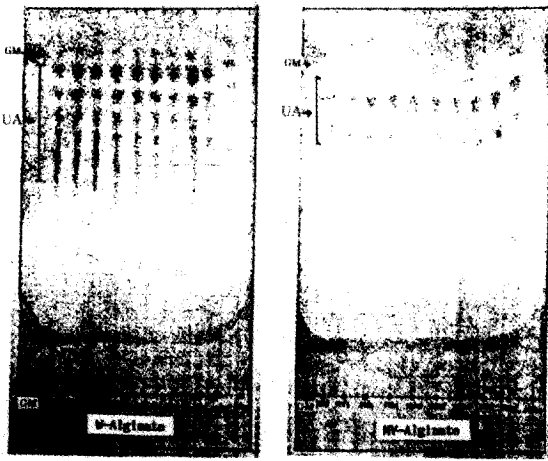
<sup>1)</sup>cps, viscosity of 2% solution at 25°C  
<sup>2)</sup>degree of polymerization  
<sup>3)</sup>M area/G area from GLC analysis

**반응시간에 따른 분해율 및 TLC**

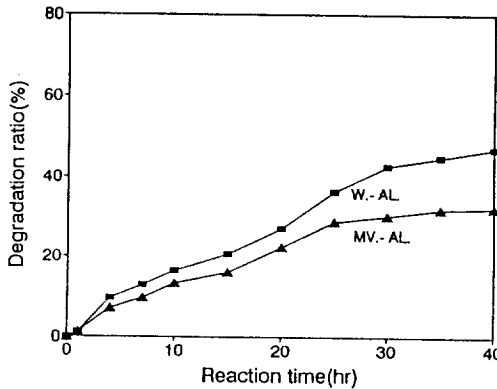
6종류의 알긴산과 효소를 반응시켜 분해산물을 획득하였고, 먼저 Fig. 1은 M-rich block과 G-rich block의 효소분해 산물의 TLC 및 분해율을 나타낸 것으로, G-rich block의 경우 반응 15시간 이후 높은 분해율을 보이고 있으며, 40시간 경과시 알긴산을 약 65% 정도 분해하였다. 반면 M-rich block은 40시간 분해를 행하여도 약 10% 정도의 분해율을 보여 큰 차이를 보여 주고 있는데, 이는 본 실험의 균체의 효소의 경우 G-block에만 특이적으로 작용하는 효소인 것으로 판단된다. 이는 TLC에 의해서도 확연히 구분되었는데, 즉 G-rich block의 경우는 4-5개의 spot가 확인되었으나, M-rich block의 경우는 1-2개의 spot가 나타날 뿐이고, 이것도 일부 공존했던 G-block의 분해물인 것으로 추



**Fig. 1. Thin layer chromatography (A) and degradation ratio (B) of degraded G- and M-block for each reaction time** GM: acid hydrolysates of sodium alginate, UA: fractions of unidentified alginate oligosaccharide, G-block, M-block: refer to the comment in Table 1



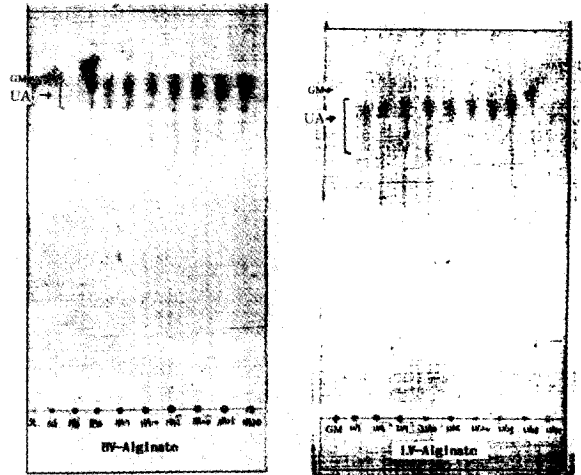
(A)



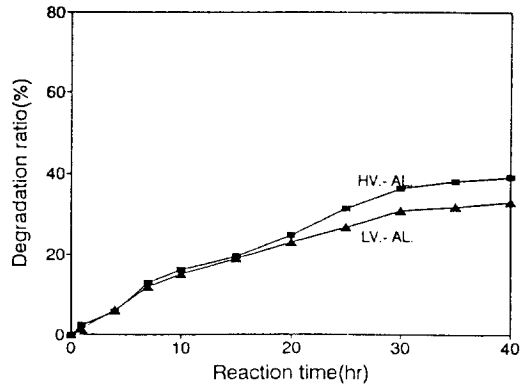
(B)

Fig. 2. Thin layer chromatography (A) and degradation ratio (B) of degraded W.- and MV.-alginate for each reaction time GM: acid hydrolysates of sodium alginate (mixture of guluronic acid and mannuronic acid), UA: fractions of unidentified alginate oligosaccharide, W.-alginate: Na-alginate (Wako Co.), MV.-alginate: medium viscosity Na-alginate (Sigma Co.)

정되었다. 한편, 분해시간의 경과에 따라 G-rich block의 분해율은 25시간까지는 증가하는 것으로 나타났고, 그 이후 계속 분해할 경우 TLC상의 spot가 2-3개로 감소하는 것으로 나타났는데, 이는 다소 중합도가 높았던 올리고당 형태의 물질이 지속적인 분해로 낮은 중합도 또는 단당류의 형태로 변화되는 것으로 판단되었다. 이상의 G-rich block과 M-rich block에 대한 분해율 및 TLC로 판단해 볼 때, 본 연구의 균체의 효소는 G-block에 특이적으로 작용하는 guluronate lyase 종류의 효소인 것으로 생각되었다<sup>(31,32)</sup>. 시판 알긴산들에 대한 본 효소의 분해 정도와 TLC상에서의 분해된 형태를 비교해 보면, 알긴산의 종류에 따라 뚜렷한 차이를 보여 주고 있는데, Na-alginate (Wako



(A)



(B)

Fig. 3. Thin layer chromatography (A) and degradation ratio (B) of degraded HV.- and LV.-alginate for each reaction time GM: acid hydrolysates of sodium alginate (mixture of guluronic acid and mannuronic acid), UA: fractions of unidentified alginate oligosaccharide, HV.-alginate: high viscosity Na-alginate (Sigma Co.), LV.-alginate: low viscosity Na-alginate (Sigma Co.)

Co.)의 경우 분해율이 50% 정도였고, TLC상에서의 spot는 6-7개인 것으로 확인되었다(Fig. 2). 반면, Sigma Co.의 고점도, 중점도 및 저점도 알긴산의 경우 2-5개의 spot만이 확인되고 있으며, 분해율도 30-40% 정도로 앞의 Na-alginate와는 상당한 차이를 보여 주고 있다(Fig. 2, 3). 이것은 원료에 대한 설명에서도 언급했지만 알긴산의 당조성에서 기인하는 것으로 확인되었고, 이는 임의의 알긴산 올리고당을 제조하고자 할 때, 기질로 이용되는 알긴산을 적절하게 선택해야 하고, 또 필요에 따라서는 특정의 형태로 알긴산을 만들어 사용해야 할 것으로 판단되었다.

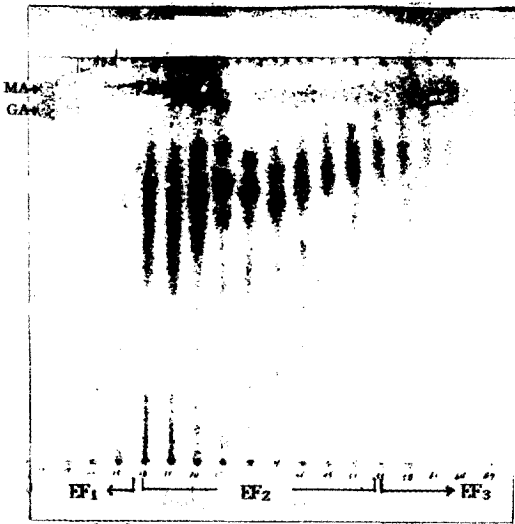


Fig. 4. Thin layer chromatography of each fraction separated by the Sephadex G-25 (MA: mannuronic acid, GA: guluronic acid)

칼럼크로마토그래피를 이용한 분해물의 분획 및 DP 측정

상기에서 확인된 것처럼 여러 알긴산 중에서도 TLC상에서 가장 확실한 spot를 형성하였던 Na-alginate (Wako Co.)를 올리고당 제조 기질로 하여 대량 분해한 후, 여러 중합도의 당류들이 혼합되어 있는 상태에서 필요로 하는 올리고당을 획득할 목적으로 알코올로 분별 침전을 행한 다음, Sephadex G-25로 크로마토그래피를 행하여 TLC상에서 spot를 확인한 후 (Fig. 4) 올리고당 분획으로 판단되는 분획들을 모아 농축한 다음, Bio-gel P-2 로 겔여과를 행하였고, 이를 확인하기 위해 분획별로 TLC를 행하였다(Fig. 5). 먼저 Sephadex G-25로는 단일 물질로 분리되지 않음을 알 수 있었으며, 알코올 분별 침전에 의해 분자량이 큰 당류는 어느 정도 제거된 올리고당이 혼합되어 있는 상태로 분획되었다. 이것을 그림에서 나타내었듯이 각각 F1, F2 및 F3의 분획으로 나누어 취하고, 농축한 후 어느 정도 크기의 올리고당인지를 예측해 보기 위해 평균 중합도를 측정된 결과(Table 2), F2 분획의 중합도는  $6.2 \pm 1.2$  정도를, F3 분획은  $2.8 \pm 0.5$  정도를 나타내었으며, F1 분획은 정확하게 측정된 것은 아니나 최소한 10 이상의 높은 중합도를 가지는 것으로 확인되었다. 한편, 중합도가  $6.2 \pm 1.2$  정도를 나타내었던 F2 분획을 모아 농축하여, 다시 Bio-gel P-2 겔여과를 행하여 각 분획별 TLC를 하여 4-5개의 중합도가 다른 올리고당이 혼합되어 있음을 확인하였다(Fig.

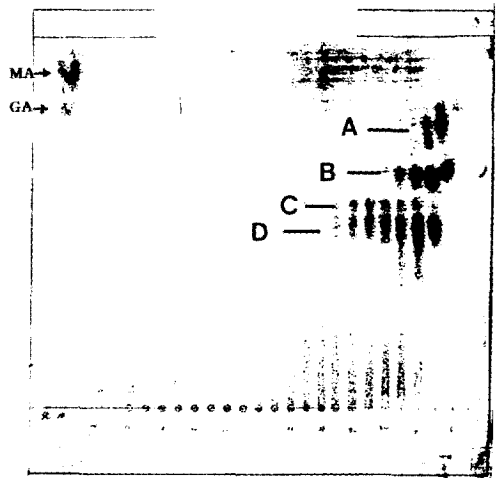


Fig. 5. Thin layer chromatography of each fraction separated by the Bio-gel P-2 (MA: mannuronic acid, GA: guluronic acid, A, B, C & D: unidentified oligosaccharide fractions)

Table 2. Degree of polymerization of oligosaccharide fractions separated by gel filtration with Sephadex G-25 and Bio-gel P-2 gel

Degree of Polymerization (DP)						
EF <sub>1</sub> <sup>1)</sup>	EF <sub>2</sub>	EF <sub>3</sub>	A <sup>2)</sup>	B	C	D
-	$6.2 \pm 1.2$	$2.8 \pm 0.5$	$2.5 \pm 0.5$	$4.0 \pm 0.5$	$5.0 \pm 1.0$	$6.5 \pm 1.0$

<sup>1)</sup>EF<sub>1</sub>, EF<sub>2</sub> & EF<sub>3</sub>: fractions of separated by the Sephadex G-25 as shown in Fig. 4

<sup>2)</sup>A, B, C & D: fractions obtained from TLC of Bio-gel P-2 chromatography (Fig. 5)

5). TLC상에서 나타난 spot들의 중합도를 알아보기 위해 동일한 조건에서 다른 TLC를 행한 후 A, B, C, D로 나누어 절취하여 물에 녹인 후, 상기의 방법으로 중합도를 측정된 결과(Table 2), A spot는  $2.5 \pm 0.5$ , B spot는  $4.0 \pm 0.5$ , C spot는  $5.0 \pm 1.0$ , D spot는  $6.5 \pm 1.0$  정도의 중합도를 가지는 올리고당임이 확인되었다.

### 요 약

6종류의 알긴산을 기질로하여 효소 반응을 시켜 알긴산 올리고당 제조를 시도한 결과, 실험에 사용한 효소의 경우 G-rich block에만 특이하게 작용하는 guluronate lyase 일종으로 G-block에 주로 작용하여 올리고당을 생성하는 것으로 확인되었다. 또한 4종류의 시판 알긴산중에서도 1종(Wako Co.)의 Na-alginate에 대해서 특이하게 6-7개의 올리고당 spot가 TLC에서 확인되었고, 그의 3종의 Na-alginate는 2-

4개 정도의 올리고당 spot가 TLC에 나타났다. 6-7개의 spot가 확인된 Na-alginate (Wako Co.)를 기질로 대량 분해시킨 후 Sephadex G-25 및 Bio-gel p-2로 분획, 정제를 행하고 중합도를 측정하여 올리고당을 확인한 결과, 중합도가 각각 다른 4개의 올리고당을 확인할 수 있었다.

## 감사의 말

본 연구는 1991년 한국과학재단 연구비 지원(과제 번호 91-07-00-14)으로 수행된 연구 결과의 일부이며, 이에 감사드립니다.

## 문헌

1. 佐佐木隆造: 糖鎖の生物機能. 日本農藝化學會誌, **67**, 1727 (1993)
2. 박준태: Carbohydrates/Polysaccharides의 의학적 이용 및 현재의 개발 현황. 생물공학 NEWS, **1**, 31 (1994)
3. Bullen, C.L., Teale, P.V. and Willis, A.T.: Bifidobacteria in the intestinal tract on infants. An *in vivo* study. *J. Med. Microbiol.*, **3**, 338 (1976)
4. Homma, N.: Bifidobacteria as a resistance factor in human beings. *Bifidobacteria Microflora*, **7**, 35 (1988)
5. Yoshika, H., Fujita, K., Sakata, H., Murono, K. and Iseki, K.: Development of the normal intestinal flora and its clinical significance in infants and children. *Bifidobacteria Microflora*, **10**, 11 (1991)
6. 齊藤忠夫, 中澤勇二: 含ピフィズ스活性オリゴ糖の研究成果とその利用性. *New Food Industry*, **30**, 73 (1988)
7. 日高秀昌, 榮田利章, 足立曉, 齊藤安弘: フラクトオリゴ糖の工業生産とその利用開發. 日本農藝學會誌, **61**, 915 (1987)
8. 菅野智榮: イソマルトオリゴ糖の生理機能とその應用. *New Food Industry*, **31**, 9 (1989)
9. 박관화: 탄수화물 신소재의 개발. 식품과학과 산업, **25**, 73 (1992)
10. 正井輝久: 大豆オリゴ糖の開發と今後の展望. *New Food Industry*, **32**, 5 (1990)
11. 岡田巖太郎, 海野剛裕, 中久喜輝夫: ゲンチオオリゴ糖の性状と食品への應用. *New Food Industry*, **32**, 28 (1990)
12. Guven, K.C., Ozsoy, Y. and Ulutin, O.N.: Anticoagulant, fibrinolytic and antiaggregant activity of carrageenans and alginic acid. *Botanica Marina*, **34**, 429 (1991)
13. Kindness, G., Williamson, F.B. and Long, W.F.: Inhibition by antithrombin III of carrageenan and xylan SP54-induced aggregation of human blood platelets. *Biochem. Soc. Trans.*, **8**, 84, (1980)
14. 北御門學, 西村光弘, 山口邦子, 曾照煌: アルギン酸から酵素分解によって調製したオリゴ糖の静菌作用. 日本水産學會誌, **59**, 315 (1993)
15. 구재근, 조길석, 도정룡, 우순자: 한국산 다시마 및 미역으로부터 Fucoidan의 추출 및 정제. 한국수산학회지, **28**, 227 (1995)
16. Fisher, F.G. and Dorfel, H.: The polyuronic acids of brown algae. *Z. Physiol. Chem.*, **302**, 186 (1955)
17. Hirst, E.L., Percival, E. and Wold, J.K.: The structure of alginic acid. Part IV. Partial hydrolysis of the reduced polysaccharide. *J. Chem. Soc.*, **8**, 1493 (1964)
18. Haug, A., Larson, B. and Smidsrod, O.: Uronic acid sequence in alginate from different sources. *Carbohydrate Research*, **32**, 217 (1974)
19. 金東洙, 朴榮浩: 알긴酸的 化學的 組成 및 그 物性에 대한 研究. (1)감태 알긴酸的 우론酸 組成. 韓國水産學會誌, **17**, 391 (1984)
20. 주동식, 조순영, 이응호: 알긴산 분해 세균의 분리 및 생육특성. 한국산업미생물학회지, **21**, 207 (1993)
21. 주동식, 이응호: *Vibrio* sp. AL-145가 생산하는 균체의 효소의 정제(I). 한국영양식량학회지, **22**, 234 (1993)
22. 주동식, 조순영, 이응호: *Vibrio* sp. AL-145가 생산하는 균체의 효소의 특성(II). 한국영양식량학회지, **22**, 240 (1993)
23. 주동식, 이정석, 박중제, 조순영, 안창범, 이응호: 알긴산 분해균 *Vibrio* sp. AL-145가 생산하는 균체내 효소의 정제 및 특성. 한국산업미생물학회지, **23**, 432 (1995)
24. 주동식, 이정석, 조순영, 신성재, 이응호: 알긴산의 부분적인 효소분해에 의한 특성 변화. 한국식품과학회지, **27**, 86 (1995)
25. Haug, A., Larsen, B. and Smidsrod, O.: A study of the constitution of alginic acid by partial acid hydrolysis. *Acta Chemica Scandinavica*, **20**, 183 (1966)
26. 日本食品工業學會: 食品分析法. 光琳, p.170 (1984)
27. 日本食品工業學會: 食品分析法. 光琳, p.189 (1984)
28. Hirst, E.L., Percival, E. and Wold, J.K.: The structure of alginic acid. Part IV. Partial hydrolysis of the reduced polysaccharide. *J. Chem. Soc.*, **8**, 1493 (1964)
29. Anzai, H., Uchida, N. and Nishide, E.: Determination of D-mannuronic acid to L-guluronic acid ratio in acid hydrolysis under improved conditions. *Nippon Suisan Gakkaishi*, **56**, 73 (1990)
30. Gacesa, P., Squire, A. and Winterburn, P.J.: The determination of the uronic acid composition of alginates by anion-exchange liquid chromatography. *Carbohydrate Research*, **118**, 1 (1983)
31. Doubet, R.S. and Quatrano, R.S.: Properties of alginate lyases from marine bacteria. *Appl. Envir. Micro.*, **47**, 699 (1984)
32. Tseng, C.H., Yamaguchi, K. and Kitamikado, M.: Isolation and some properties of alginate lyase from a marine bacterium *Vibrio* sp. AL-128. *Nippon Suisan Gakkaishi*, **58**, 533 (1992)

(1995년 9월 29일 접수)