

## *Streptococcus zooepidemicus*에 의한 히아루론산의 생산

유 대 식

계명대학교 자연과학대학 미생물학과

### Production of Hyaluronic Acid from *Streptococcus zooepidemicus*

Tae Shick Yu

Department of Microbiology, College of Natural Science,  
Keimyung University, 704-701 Taegu, Korea

#### ABSTRACT

An optimal composition of medium for hyaluronic acid production and some characteristics of its from *Streptococcus zooepidemicus* were investigated.

The hyaluronic acid from *S. zooepidemicus* was reached maximum level in the BY-medium containing 0.1% beef extract, 0.1% yeast extract, 3.0% glucose, 2.0% peptone, 0.1% NaCl and 0.5% CaCO<sub>3</sub> (pH 7.5) at 37°C for 36 hours with shaking. Addition of CaCO<sub>3</sub> to the medium was necessary to neutralize the lowered pH which was resulted from hyaluronic acid production.

Molecular weights of extracellular and cellular hyaluronic acid produced by the strain were 1-1.4 × 10<sup>6</sup> and 5 × 10<sup>6</sup>, respectively. The amount of extracellular hyaluronic acid was 91.9% of total hyaluronic acid produced and the rest was all intracellular.

#### 서 론

생체 고분자 물질로서 세포 간격에 수분을 함유시켜 세포 형태를 유지하고, 물리적 손상이나 세균 감염을 방지하는 것으로 밝혀진 hyaluronic acid(HA)는 N-acetyl-D-glucosamine과 D-glucuronic acid가 β-1.4로 결합된 분자량이 1,000,000 이상의 직쇄상의 고분자 다당류 물질이다. 특히 HA는 chondroitin sulfate와 함께 포유동물의 결합조직에 널리 존재하는 glycosaminoglycan의 일종이다.

1934년 Meyer와 Palmer(1)에 의하여 HA가 발견되었으며, 주로 태반, 분화세포, 관절액, 결합조직이나 닭벼슬에 많이 존재한다. *Streptococcus hemolyticus*의 A 및 C군의 세균 세포의 외층에서도 HA가 존재한다.(2)

HA는 결합 조직내에서 세포 간격에 물을 보유시키는 기능과 조직내에서 gelly상의 matrix를 형성하여 세포 형태를 유지시키기도 하며 피부의 윤활성과 유연성을 유지시켜 기계적 손상이나 세균 감염을 방

지하는 기능도 있다.

HA는 단백질과 결합하여 망상구조를 형성하므로 뛰어난 보습성을 나타내어 (3, 4) 화장품과 의약품으로 널리 이용된다.

HA는 많은 우수한 성질을 가지며 고가의 원료이므로 많은 연구가 이루어지리라 사료되나, 미생물에 의한 발효 생산에 관한 연구 결과가 거의 발표되지 않고 있다.

최근 장 등(5)에 의하여 *Streptococcus equi*(AT-CC 9527)를 이용하여 batch배양에 비해 chemostat 배양에서 117 mg/L/h의 HA를 생산 할수 있었다는 보고가 있을 뿐이다.

본 연구에서는 *Streptococcus zooepidemicus* (AT-CC 6621)에 의하여 HA를 발효 생산하기 위한 기초적인 연구를 수행했다. HA를 생합성 할 수 있는 세균을 선별했으며, HA의 생산성을 검토, HA의 생산을 위한 배양기의 개량, HA의 생성에 미치는 인자 등을 검토했다.

## 재료 및 방법

### 균주 및 배지

본 연구에 사용된 균주는 *Streptococcus equi* (ATCC 6580), *Streptococcus faecium* (KCTC 6621), *Streptococcus lactic* (KCTC 2013), *Streptococcus thermophilus* (KCTC 2128), *Streptococcus zooepidemicus* (ATCC 6621)이었다. Hyaluronic acid의 생산성이 높은 균주를 선별하기 위하여 공시균을 Brain-heart infusion broth(Difco)에 접종하여 37°C에서 36시간 회전식 진탕배양 (150 rpm)하여 배양액중의 HA를 정량하여 우량 균주를 선별했다. Brain-heart infusion broth는 고가의 배지이므로 염가의 배지를 얻기 위하여 선별된 균을 쇠고기추출물과 효모추출물을 함유한 배지를 기본배지 (0.1% 쇠고기 추출물, 0.1% 효모추출물, 2% peptone, 0.5% 식염, pH 7.0)로 하여 HA생산이 양호한 배지 조성을 검토했다.

### 생육도

공시균의 생육도는 spectrophotometer (Hitachi UV 100-400)를 사용하여 660 nm에서 배양액의 흡광도(OD)를 측정하여 표시했다.

### 당의 정량

배양액중의 잔존당은 Somogyi-Nelson method (6)에 따라 정량했다.

### 세포외층 HA의 분리

공시균의 배양액을 원심분리 (Kontron instruments, Centrifon T-124, A 12.24 rotor, 10,000 rpm)한 후, 상등액을 전처리하여 세포외 HA용액으로 사용했으며, 침전균체를 sodium dodecyl sulfate (SDS)로 처리하여 세포외층에 존재하는 HA를 분리시켜 세포외층 HA용액으로 사용했다.

즉, 200ml의 배양액으로부터 집균된 균체를 0.2% SDS가 함유된 1/15 M 인산완충액 (pH 7.0) 50ml에 현탁시켜 37°C에서 24시간 왕복식 진탕(110-120 strokes/min, amplitude 2.5cm)시켜 HA를 분리시켰다.

SDS로 처리한 균체 용액을 원심분리 (Kontron, A 12.24 rotor, 10,000 rpm)한 후 상등액을 에칠알코올로 전처리하여 세포외층 HA용액으로 사용했다.

### Hyaluronic acid의 정량

HA를 정량할시 간섭 인자 등을 최대한 제거하기

위하여 공시균의 배양액을 전처리하였다. 즉 배양액 1ml에 무수 에칠알코올 2ml를 혼합한 후, 4°C에서 약 10-12시간 방치하여 HA를 침전시켰다. 침전용액을 원심분리 (A 8.24 rotor, 10,000 rpm)하여 침전물은 1ml의 증류수에 녹여서 HA용액으로 사용했다. 침전물을 증류수에 용해시켰을 때 용해되지 않는 물질이 존재하면 상기조건에서 재원심분리하여 제거했다.

HA는 Carbazole method(7, 8)에 따라 정량했으며, 균의 선별 후는 변형된 Carbazole method(9)를 사용했다.

즉, 진한 황산에 0.025 M sodium tetraborate · 10H<sub>2</sub>O를 녹인 용액 5ml에 공시균 배양액의 전처리 용액 1ml를 넣어 잘 섞은 후 boiling water bath에서 10분간 가열했다. 이것을 실온에서 냉각한 후 알코올에 0.125% carbazole을 녹인 용액 0.2ml를 넣고 혼합하여 boiling water bath에서 15분간 가열하고 실온에서 냉각시켰다. 이것을 530 nm에서 흡광도를 측정하여 HA량은 *Streptococcus zooepidemicus*가 생성한 HA(Sigma H9390)를 표준물질로 사용한 표준 곡선으로부터 계산했다.

### 분자량 측정

HA는 일반적으로 분자량이 1,000,000 이상인 고분자 물질이므로 분자량 측정을 위한 표준 물질이 없으므로 gel여과에 의한 분자량의 측정은 매우 어렵다.

그러나 Rijn(10)에 의하여 HA의 분자량을 측정할 결과에 준하여 측정했다. 즉, 0.9% 식염이 함유된 0.01 M 인산 완충액(pH 7.4)에 HA용액을 혼합하여 RNase와 DNase로 37°C에서 2시간 반응시켜 고분자 핵산을 분해·제거 시켰다. Ultrogel A-2 (LKB, IBF Pharmindustrial 92390 Villeneuve-la-Garenne, France)는 분자량 25,000,000에서 120,000까지를 분리 할수 있는 gel이며, 용출조건은 시간당 5ml씩 용출시켰으며 3ml씩 분획하였다. 이 시료를 Ultrogel A-2 column (1.8 by 85 cm)에 용출시켜 void volumn (Vo)와 total volumn (Vt)사이에서 HA용출 pattern을 확인하여 plot하므로 분자량을 계산했다.

### 시 약

HA의 표준 곡선에 사용된 HA와 그 이외의 시약은 Sigma Chemical Co. (U.S.A.)의 특급 시약을 구입, 사용했다.

## 결과 및 고찰

### Hyaluronic acid 생성 세균의 선별

#### 〈HA 생성능〉

공시균인 *Streptococcus equi*, *Streptococcus faecium*, *Streptococcus lactis*, *Streptococcus thermophilus* 및 *Streptococcus zooepidemicus*를 Brain-heart infusion broth에 접종 후 37°C에서 36시간 회전식 진탕배양하여 HA의 생성량과 균의 생육도를 측정했다(Table 1).

Table 1. Production of hyaluronic acid

Strain	Final pH	Growth(OD 660nm)	HA(mg/ml)
<i>S. equi</i>	6.28	2.10	0.084
<i>S. faecium</i>	6.49	1.44	0.050
<i>S. lactis</i>	6.17	2.00	0.068
<i>S. thermophilus</i>	5.64	1.94	0.060
<i>S. zooepidemicus</i>	5.62	2.08	0.082

Table 1에서와 같이 HA의 생산성은 *S. equi*와 *S. zooepidemicus*에서 0.084 mg/ml의 HA를 생성하여 양호했다.

공시균의 생육 정도는 *S. equi*, *S. zooepidemicus*, *S. lactis* 및 *S. thermophilus*가 양호했으나 *S. faecium*은 상기 균들보다 생육 상태가 불량했다.

#### 〈공시균의 생육 곡선〉

포도당 3%를 함유시킨 Brain-heart infusion broth에서 *S. equi*와 *S. zooepidemicus*를 진탕배양 하면서 일정한 시간 간격으로 공시균의 생육도를 측정하여 생육곡선을 작성했다. Fig. 1에 나타난 바와 같이 *S. equi*는 18시간의 유도기를 거쳐 배양 30시간으로 정지기에 도달했다. 그러나 *S. zooepidemicus*는 30시간의 유도기를 거쳐 36시간 배양으로 정지기에 도달했다. 이상의 결과에서 보는 바와 같이 *S. zooepidemicus*의 최대 증식도에 도달하는 시간은 *S. equi*에 비하여 6시간이 길어서 36시간이 소요되었다.

HA는 생육곡선과 유사한 곡선으로 생성되었으며 두 균주간의 HA의 생산성은 Table 1에 나타난 바와 같이 약 0.080 mg/ml의 HA를 생성했다.

이상의 결과에 나타난 바와 같이 두 균주간에 HA 생산성은 비슷하나, *S. equi*보다 *S. zooepidemicus*가 유도기는 길지만 균 증식 상태나 균체를 제거하기 위하여 원심분리 할때 균의 침전성등이 양호하여 본 실험에서는 *S. zooepidemicus*를 사용했다.

#### 〈pH의 영향〉

Hyaluronic acid의 생산성에 미치는 진탕의 효과를 검토하기 위하여 진탕 배양을 36시간 시킨후 6시간을 정치하는 방법과 42시간을 계속적으로 진탕 배양한 후 HA의 생성량을 검토했다. Table 2에 나타난 바와 같이 균 증식에 있어서 진탕배양 후 정치 배양하는 실험군과 계속적인 진탕 배양하는 실험군에서는 별다른 차이점을 찾아볼 수 없었다. 두 실험군 모두 36시간을 진탕 배양시 균의 증식은 거의 완료되었기 때문에 진탕 효과는 나타나지 않는 것으로 사료된다. 공시균을 배양하므로 HA의 생성으로 배양액의 pH가 산성화하므로 pH를 0.1 N NaOH로 pH 7.0으로 수정·중화시키면서 배양하는 실험군(pH 7.0 fix)과 pH의 수정·중화시키지 않는 실험군(pH free)으로 나누어 실험했다. Table 2에 나타난 바와 같이 배양액의 pH를 pH 7.0으로 고정하지 않는 실험군에서는 미량의 HA가 생성되나, pH를 7.0으로 고정한 실험군에서는 HA가 다량 생성되었다. 더욱이 계속적으로 42시간 진탕 배양하면서 pH를 7.0으로 고정한 실험군보다 36시간 진탕 배양한 후 6시간의 정치 배양하면서 pH를 7.0으로 고정한 실험군은 HA의 생산성에서 약 40%의 증가 효과를 나타내었다.

Table 2. Effect of shaking culture on the hyaluronic acid production.

Culture condition	Growth(OD660nm)	Glucose	HA (mg/ml)	Relative HA (%)
Continuous shaking pH 7 fix	2.40	0.18	0.580	100
Continuous shaking pH free	0.06	2.29	0.040	6.9
After shaking, static pH 7 fix	2.14	1.02	0.860	148.3
After shaking, static pH free	0.04	2.43	0.040	6.9

#### 최적 배지 조성

*S. zooepidemicus*의 생육과 HA생성을 위한 Brain-heart infusion broth는 고가의 배지이므로 염가의 배지로 대체하고자 기본배지에 각종 탄소원 및 질소원을 첨가하여 균의 생육과 HA생산성을 측정했다.

#### 〈탄소원의 영향〉

공시균인 *S. zooepidemicus*에 의하여 HA생산에 미치는 탄소원의 영향을 검토하기 위하여 Table 3에 명기된 탄소원을 각 3%씩 첨가한 기본배지에 공시균을 접종·배양하여 균의 생육과 HA의 생성량을 측정했다.

**Table 3. Effect of carbon source on the hyaluronic acid production and cell growth.**

Carbon source(3%)	Final pH	Growth(OD 660nm)	HA (mg/ml)
None	7.95	0.20	0.040
Glucose	5.37	1.10	0.204
Sucrose	5.47	1.10	0.196
Dextrine	4.95	0.30	0.041
Soluble starch	4.87	0.25	0.038
Glycerol	8.32	0.28	0.060
Ethanol	8.30	0.26	0.062
Sodium acetate	8.43	0.28	0.028
Sodium citrate	8.45	0.24	0.022
Sodium fumarate	8.57	0.42	0.018

**Table 4. Effect of nitrogen source on the hyaluronic acid production.**

Nitrogen Source(0.2%)	Final pH	Growth(OD 660nm)	HA(mg/ml)
None	7.91	0.08	0.080
Ammonium citrate	7.80	0.12	0.010
Ammonium acetate	8.29	0.18	0.062
Ammonium sulfate	8.33	0.20	0.020
Peptone	8.28	0.84	0.100
Yeast extract	7.37	1.20	0.145
Beef extract	8.40	0.89	0.100

Table 3에 나타난 바와 같이 공시균의 생육과 HA 생성에 있어서 포도당과 서당이 양호했다.

그러나 유기산염은 균의 생육뿐만 아니라 HA 생산도 매우 불량하여 공시균은 유기산을 탄소원으로 이용 못하는 균이었다.

HA의 생성에 양호한 포도당의 농도에 의한 HA 생산성을 검토한 결과, 3% 포도당이 공시균의 생육과 HA 생성(0.105 mg/ml HA)도 가장 양호했다.

그러나 5% 포도당을 첨가한 배지에서는 균의 생육이 포도당 무첨가구 보다 약간 높은 0.23의 OD 660nm의 증식도를 나타내었으나 HA 생산성은 0.085 mg/ml로서 3% 포도당 첨가배지의 HA 생산성보다 약 20% 감소했다.

#### 〈질소원의 영향〉

공시균에 의한 HA 생성에 미치는 질소원의 영향을 검토하기 위하여 3% 포도당이 함유된 기본배지에 0.2%의 각종 질소원을 첨가하여 균의 증식도와 HA 생성을 검토한 결과는 Table 4와 같다.

실험에 사용된 암모늄 유기산염은 공시균의 생육과 HA 생산에 매우 불량했으며 유기질소원이 균의

생육과 HA 생성에 양호했다. 특히 효모 추출물은 균 생육도 양호 할 뿐 아니라 0.145 mg/ml의 HA를 생성하여 HA 생산면에서도 가장 양호한 질소원이었다.

HA 생성에 양호한 peptone과 효모 추출물 농도에 의한 HA 생산성을 검토한 결과 peptone의 농도는 2.0%였으며, 효모 추출물의 최적 농도는 0.1%였다.

#### 〈CaCO<sub>3</sub>농도의 영향〉

공시균이 생육하면서 HA의 생성에 따라 배양액의 pH가 산성화 되는 것을 방지하기 위하여 3.0% 포도당, 2.0% peptone 및 0.1% 효모 추출물이 함유된 기본배지에 중화제인 CaCO<sub>3</sub>를 첨가하여 배양액을 중화시키면서 공시균을 배양하고자 했다. CaCO<sub>3</sub> 농도가 HA의 생성에 미치는 영향을 검토한 결과를 Table 5에 나타냈다.

HA의 중화제로서 0.2-0.5%의 CaCO<sub>3</sub>를 첨가하므로 균 생육이 약 2.5배 증가하나, 고농도인 1.0% 이상의 CaCO<sub>3</sub> 첨가는 균 생육을 오히려 50% 저해시켰다. 이러한 결과는 CaCO<sub>3</sub>를 첨가하므로 배지의 산성화를 방지하여 균 생육을 촉진하나 과다한 CaCO<sub>3</sub> 첨가는 오히려 배지를 알칼리화하므로 공시균의 생육을 억제한다고 사료된다.

CaCO<sub>3</sub>에 의한 HA의 생산성은 0.2-0.5% CaCO<sub>3</sub> 첨가로 약 40%의 생산성이 증가되었다.

이와 같은 결과는 배지의 산성화를 방지시키므로 공시균의 생육을 촉진시켜 HA의 생산성을 촉진한 것으로 사료된다.

이상의 결과를 종합하면 HA의 생성을 위한 최적 배지 조성은 0.1% 쇠고기추출물, 0.1% 효모 추출

**Table 5. Effect of CaCO<sub>3</sub> concentration on the hyaluronic acid production.**

CaCO <sub>3</sub> conc.	Final pH	Growth (OD 660nm)	HA (mg/ml)	Relative production(%)
0	4.82	0.28	0.480	100
0.2	5.06	0.69	0.715	147.9
0.5	5.78	0.82	0.762	158.3
1.0	8.02	0.14	0.520	108.3
1.5	8.32	0.15	0.341	70.8

**Table 6. Effect of temperature on the hyaluronic acid production.**

Temperature(°C)	Final pH	Growth(OD 660nm)	HA(mg/ml)
30	5.65	0.71	0.692
37	5.92	1.05	0.894
40	5.72	1.04	0.730

물, 3.0% 포도당, 2.0% pepton 및 0.1% 식염, 배지 중화제로서 0.5% CaCO<sub>3</sub>가 함유된 배지(BY-broth)가 요구되었으며 초기 pH는 7.5가 양호했다.

#### <온도의 영향>

HA의 생성에 미치는 온도의 영향을 규명하기 위하여 HA의 생성 최적 배지조성의 BY-배지에 공시균을 접종하여 Table 6에 명기된 바와 같이 각각의 온도에서 진탕배양시켰다.

Table 6에 나타난 바와 같이 37°C에 공시균을 진탕배양하므로 공시균인 *S. zooepidemicus*의 생육도는 1.05로서 최고값을 나타낼 뿐 만 아니라 0.89 mg/ml의 HA를 생성시키므로 37°C의 배양 온도가 가장 양호한 온도였다.

HA생성의 최적 배지인 BY-배지에서 37°C, 36시간 진탕배양하므로 HA생성(0.89 mg/ml)은 Table 2에 나타난 바와 같이 Brain-heart infusion 배지에서 배지의 pH를 7.0으로 조정하면서 37°C, 36시간 진탕 배양한 후, 6시간 정지 배양한 결과(0.86 mg/ml)와 같은양의 HA가 생성되었다.

HA생산을 위한 배지로서 고가인 Brain-heart infusion배지의 사용 대신에 쇠고기 및 효모추출물과 배지 중화제인 CaCO<sub>3</sub>를 함유한 BY-배지의 사용이 권장될 수 있었다.

특히 Table 2의 결과보다 BY-배지를 사용하므로 배양시간을 약 6시간 정도 단축할 수도 있었다.

#### HA의 특성

0.5% CaCO<sub>3</sub>를 함유한 BY-배지에서 생성된 HA의 분자량, 세포외로 분비된 HA와 세포외층 HA의 양비 등을 검토했다.

세포외 HA와 세포외층 HA의 양비 : HA는 *Streptococcus hemolyticus*의 A 및 C군의 세균세포의 외층의 구성 성분이기도 하다(2).

공시균은 세포외로 HA를 분비하기도 하며, HA는 세포외층의 구성성분으로도 존재하므로 세포외 HA(extracellular HA)와 세포외층 HA(cellular HA)의 구성비를 검토했다.

Table 7에 나타난 바와 같이 BY-배지에서는 세포외층 HA양비는 전 HA량의 8.1%이며 세포외층 HA양비는 91.9%였다. 그러나 CaCO<sub>3</sub>를 첨가한 BY-배지에서는 세포외층 HA양비는 1.4%이며 세포외 HA양비는 98.6%였다.

이상의 결과로 BY-배지의 pH를 고정할수 있는 CaCO<sub>3</sub>의 첨가로 세포외의 HA생성은 증가되었으나,

Table 7. Distribution of cellular and extracellular hyaluronic acid.

Medium	Cellular HA (mg)	Extracellular HA (mg)
BY	40.97(8.1%)	467.14(91.9%)
BY+CaCO <sub>3</sub>	10.32(1.4%)	707.94(98.6%)

세포외층의 HA생성은 감소하였다. 이 결과는 intracellular matrix에서 형성된 HA는 CaCO<sub>3</sub>에 의하여 세포외로 분비를 촉진시키므로 세포외 HA의 생성이 증가되리라 사료된다.

HA의 분자량 : 세포외 HA와 세포외층 HA는 모두 고분자 물질로서 분자량 25,000,000까지 gel여과할 수 있는 Ultrogel A-2 column을 사용하는 gel여과법으로 측정했다.

Void volumn(Vo)과 total volumn(Vt)사이에서 용출되는 HA를 확인하고 분자량 25,000,000에서 120,000사이에서 plot하므로 분자량을 측정했다(10).

Ultrogel A-2 column에서 세포외 HA의 분자량은 약  $1-14 \times 10^6$ 이었으며, 세포외층 HA는  $5 \times 10^6$ 이었다. *Streptococcus*균주의 세포외 HA의 분자량과 세포외층 HA의 분자량은 각  $2 \times 10^6$ 과  $10 \times 10^6$ 이었다(10).

Rijn(10)의 *Streptococcus*의 세포외 HA의 분자량은  $2 \times 10^6$ 이었으나 본 공시균이 생성한 세포외 HA의 분자량은  $1-1.4 \times 10^6$ 으로서 약간 적었으며, 한편 세포외층 HA의 분자량은  $10 \times 10^6$ 이었으나 본 공시균의 세포외층 HA는  $5 \times 10^6$ 으로서 세포외 및 세포외층의 HA의 분자량 모두 Rijn(10)의 결과보다 약 반의 값을 나타냈다.

이러한 상이된 분자량은 공시균을 배양시 CaCO<sub>3</sub>의 첨가로 세포외로 HA분비시 HA의 분해가 이루어진 것으로 사료된다.

#### 요 약

*Streptococcus zooepidemicus*에 의한 hyaluronic acid 생성의 최적 배지 조성은 batch culture 조건에서 0.1% 쇠고기 추출물, 0.1% 효모 추출물, 3.0% 포도당, 2.0% peptone, 0.1% 식염 및 0.5% CaCO<sub>3</sub>이었으며, 배지의 초기 pH는 7.5로서 37°C에서 36시간 진탕배양하는 것이 양호했다.

특히 공시균의 생육에 수반되어 hyaluronic acid가 생성되므로 배지의 pH를 중화하기 위해 CaCO<sub>3</sub>의 첨가는 필수적이었다.

*S. zooepidemicus*가 생성한 세포외 HA의 분자량은  $1-1.4 \times 10^6$ 이였으며 세포외층 HA의 분자량은  $5 \times 10^6$ 이였다. 그리고 공시균이 생성한 전 HA양중 세포외 HA와 세포외층 HA의 양비는 91.9% 대 8.1% 였다.

### 감 사

본 연구는 한국과학재단 연구 지원(891-0407-0462-2)에 의하여 이루어졌으며, 이에 한국과학재단 당국에 깊은 감사를 드립니다.

### 참고문헌

1. K. Meyer and j. W. Palmer (1934), *J. Biol. Chem.*, 107, 629.
2. A. Markovitz, J. A. Cifonelli, and A. Dorfman (1959), *J. Biol. Chem.*, 234, 2343.
3. E. A. Balazs and D. A. Gibbs (1970), "Chemistry and Molecular Biology of the Intercellular Matrix", 3, 1241.
4. R. H. Pearce and B. J. Geimner (1970), "Advances in the Biology of Skin", 2, 89.
5. 장이섭, 정교민 (1987), *Korean J. Biotechnol. Bioeng.*, 1, 25.
6. M. Somogyi (1945), *J. biol. chem.*, 160, 69.
7. Z. Dische (1947), *Anal. Biochem.*, 167, 189.
8. M. F. Chaplin and J. F. Kennedy (1986), "Carbohydrate Analysis" IRL Press, 129.
9. T. Bitter and H. M. Muir (1962), *Anal. Biochem.*, 4, 330.
10. Van de Rijn (1983), *J. Bacteriol.*, 156, 1059.