

Polyglucuronic Acid C5-Epimerase에 의한 Algin 유사 다당류 생산 조건의 최적화

조계봉 · 장관식

서울산업대학교 식품공학과

Optimization of Conditions for the Production of Algin-like Polysaccharide by Polyglucuronic Acid C5-Epimerase

Gye Bong Cho and Pahn Shick Chang

Department of Food Science and Technology, Seoul National University of Technology

Abstract

We could produce algin-like biomaterial of polyiduronan using polyglucuronic acid C5-epimerase with polyglucuronic acid prepared by specific oxidation of primary alcohol groups of four kinds of polysaccharides (corn starch, rice starch, sweet potato starch, and cellulose). The enzyme activity was determined by the modified Dische carbazole methodology with the isolated crude enzyme from the supernatant centrifuged at 100,000×g for 1 hr after grinding fresh bovine liver. And then, the optimal substrate, pH, and temperature for the enzyme reaction of polyglucuronic acid C5-epimerase were determined as the oxidized sweet potato starch, 7.0, and 30°C, respectively. Conclusively, it could be possible to epimerize polyglucuronic acid in the oxidized sweet potato starch to polyiduronic acid. Therefore, we could obtain algin-like polysaccharide using the oxidized sweet potato starch and polyglucuronic acid C5-epimerase isolated from bovine liver.

Key words : oxidized sweet potato starch, polyglucuronic acid C5-epimerase, alginlike polysaccharide

서 론

Alginic acid는 1881년 Stanford에 의해서 갈조류에서 처음으로 발견된 물질로서, 감태, 모자반, 미역, 다시마 등의 갈조류(brown algae)의 세포막 구성성분으로 존재하는 다당류이다⁽¹⁾. Algin이란 이름은 alginic acid의 Na^+ , Ca^{2+} , Mg^{2+} 염의 혼합물인 alginates에 대한 일반적인 명칭이다.

영양학적 측면에서 볼 때, algin은 인체내에서 가수 분해되지 못하므로 소화흡수되지 않는 비칼로리식품의 원료로 사용할 수 있고⁽¹⁾, 식이섬유로서 중금속 체내 흡수 억제효과, 콜레스테롤 저해효과 및 정장작용을 갖고 있는 것으로 밝혀져 있다⁽²⁾. 또한 alginic acid의 점성을 이용하여 식품의 표면에 피막이나 필름을 만들어 수분 휘발, 전조, 산패 등을 방지할 수 있고, 외부로부터 오는 각종 반응을 차단할 수 있어 식품의 저장성을 향상시킬 수 있으며, 지방성분을 없애는 성

질인 소유성(lipophobicity)에 의하여 튀김의 점도와 경도를 조절할 수 있으며 튀긴 후의 전분노화를 방지할 수 있다⁽¹⁾. Algin의 교질용액은 의사가소성(pseudo-plasticity)을 나타내어 식품에 대한 입인의 감촉(mouth feeling)을 좋게 만들어 준다⁽³⁾. 이처럼 algin은 보건성, 피복성, 분리성, 소유성, 젤리화성 등의 기능을 갖고 있어 안정제, 농화제, 유화제로 사용된다.

그런데, alginic acid는 그 구조적인 특성상 찬물에는 녹지 않고 뜨거운 물에 미량 녹음으로써 식품첨가 시 가장 큰 단점으로 나타나고 있다. 이러한 문제점을 극복하기 위하여 alginic acid에 Na^+ , K^+ , Ca^{2+} , Mg^{2+} 등의 알칼리 금속염들을 결합시켜 수(水)가용성 alginic acid를 만들어 시판하고 있다. 그러나 수(水)가용성 algin은 상온에서 용해시키는데 많은 시간을 요구하며, alcohol류가 포함된 용매에는 잘 녹지 않으면서, 침전을 일으키는 특성이 있고 alginic acid의 농도가 증가함에 따라 필요 이상의 점성을 갖게 되고, 특히 액상식품에 0.5%이상 첨가되면 식품 고유의 특성을 잃게 되는 단점을 갖고 있다^(2,4).

또한 식품의 pH, 온도, 염농도 등을 고려해야 하는

데 60°C 이상에서는 점도가 떨어지고, pH 3~5에서는 gel를 형성하며, pH 3 이하에서는 침전을 일으키므로 산성식품에 적용 시 주의가 필요하며, 더욱이 소금이 8% 이상 함유된 식품에 첨가할 경우 염석현상이 일어나 점도가 저하되는 단점이 있다⁽¹⁾.

따라서 이러한 단점을 개선하기 위하여 70°C sodium acetate 존재 하에서 alginic acid와 propylene oxide를 4시간 동안 가열하여 ester화한 propylene glycol alginate(PGA)를 사용하게 된다⁽³⁾.

상법에 의하여 제조된 PGA는 내산성, 내염성을 갖고 있어 산성식품에 사용하기는 유리하다. 그러나, alginic acid가 생체 내에서 흡수되지 않고 모두 배출되는 것과는 달리 PGA는 위장에서 흡수되어 25~50%는 뇌로 배출되고 나머지는 장에서 분해되면서 장내 유산균의 생육을 저하시키는 특징을 갖고 있다^(1,5). 따라서, alginic acid의 특성을 유지하면서 점성이나 gel 형성능을 적절하게 조절할 수 있고 용해성을 향상시킬 수 있다면 식품 첨가 시 alginic acid의 이용범위를 크게 확대할 수 있을 것이다.

한편, algin 물질의 개선을 위하여 *Vibrio* sp. AL-128이나 *Vibrio* sp. AL-145가 생산하는 alginic lyase 효소를 이용하는 부분적인 효소분해에 의하여 특성을 변화시키거나^(2,6,8), *Azotobacter vinelandii*, *Pseudomonas aeruginosa* 등의 균이 생산하는 polyuronic acid C5-epimerase 효소를 이용함으로서 alginic acid 내의 D-mannuronic acid를 L-guluronic acid로 전환하여 algin의 특성을 개선시킬 수 있다⁽⁹⁻¹¹⁾.

그러나 이러한 균체 효소는 갈조류로부터 추출된 기존의 alginic acid를 가수분해하거나 epimerization 반응을 야기시키는 것으로 alginic acid의 추출 및 균체의 생산이 절대적으로 필요하다. 즉, 균체를 배양시킨 후 효소를 얻는 데 시간과 비용이 소모되고, 갈조류의 종류에 따른 alginic acid 함량 및 계절적인 변화와 추출조건에 따른 alginic acid 추출수율의 변화 및 추출잔사의 처리 (미역의 경우 alginic acid 함량 23~30%(건물기준))⁽¹²⁾ 등의 문제점이 있다.

본 연구에서는, 이러한 단점을 극복하고자 값싸고 흔하게 구할 수 있는 다당류 물질을 원료물질로 사용하고 효소공학적 기법을 이용한 생전환 공정에 의하여 algin 유사 신물질을 생산하고자 하였는 바, 1차 알코올기가 산화된 전분을 기질로 하고, 소의 간에 존재하는 polyglucuronic acid C5-epimerase 효소를 작용시켜 반응 특성을 고찰하고 새로운 algin 유사 물질의 생산을 위한 가능성성을 제시하고자 하였다.

재료 및 방법

실험재료

실험에 사용된 소의 간은 마장축산물시장(마장동, 서울)에서 도축 후 3~4시간 내의 간을 구입하여 사용하였으며, 효소 반응을 위한 기질은 Chang과 Cho의 방법에 의하여 1차 alcohol 기반의 특이적으로 산화된 전분⁽¹³⁾을 이용하였다. 또한 sodium alginate는 medium viscosity를 갖는 Sigma社(St. Louis, MO, U.S.A.) 제품을, 그 외의 시약은 EP 등급을 구입하여 사용하였다.

소의 간으로부터 polyglucuronic acid C5-epimerase의 추출

신선한 소간으로부터 C5-epimerase의 추출은 Campbell 등⁽¹⁴⁾의 방법을 변형하여 Fig. 1에 나타낸 방법에 따라 수행하였으며, 모든 공정은 4°C내에서 수행하였다.

여기서, buffer A는 0.1 M KCl과 0.025 M HEPES (N-[2-hydroxyethyl]piperazine-N'-[2-ethanesulfonic acid]), 0.015 M EDTA(ethylenediamine tetraacetic acid), 0.01% (w/v) triton X-100을 포함하는 완충용액이며, homogenization buffer는 0.1 M KCl과 0.025 M HEPES, 0.015 M EDTA, 0.1% (w/v) triton X-100을 포함하는

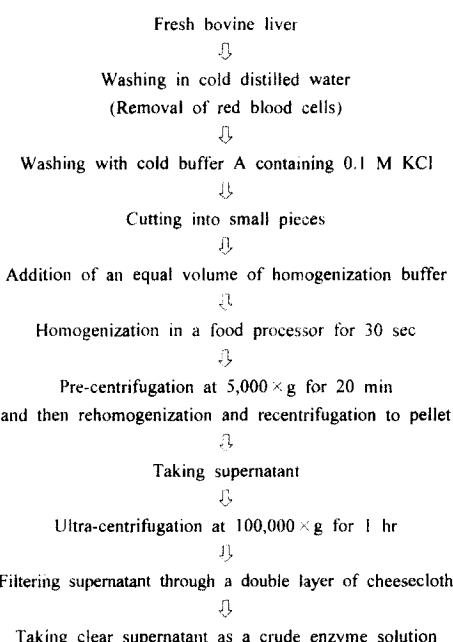


Fig. 1. Schematic diagram for the isolation of crude polyglucuronic acid C5-epimerase from bovine liver.

완충용액이다.

Polyglucuronic acid C5-epimerase 분리·정제를 위한 ammonium sulfate 분획의 최적화

초원심분리에 의하여 얻어진 상등액 중에는 효소단백질 외에 각종 수용성 물질이 혼재되어 있을 수 있으므로 다른 수용성 탄수화물 및 오염물질을 제거하기 위하여 ammonium sulfate를 80% 농도로 첨가하여 단백질을 침전시켰다. 4°C로 유지되는 cold chamber내에서 조효소 함유 용액에 ammonium sulfate를 서서히 첨가하여 효소함유 단백질을 침전시킨 후, 4°C에서 12시간 방치한 다음 900×g에서 10분간 원심분리하여 침전물을 얻었다.

초원심분리한 상등액 및 ammonium sulfate 침전물 내의 단백질 함량은 bicinchoninic acid(BCA) 방법⁽¹⁵⁾을 이용하여 정량하였다. BCA 방법은 Lowry 방법보다 간편하고 방해물질의 영향이 적으며 시약을 상업적으로 구입하여 사용할 수 있는 장점이 있다. 사용된 시약은 Sigma 社에서 kit를 구입하여 BCA 용액(reagent A)과

Preparation of assay solution (1.0 mL of 2.5 mg/mL sodium alginate, 4.3 mL of 50 mM collidine buffer (pH 7.0), 0.7 mL of 25 mM CaCl₂, 1.0 mL of the enzyme solution)

↓
Reaction at 25°C

↓

Sampling 1.0 mL every 2 hr and addition of 1.0 mL of ethanol, 1.0 mL of acetone, 160 μL of 1 M KCl

↓

Centrifugation at 6,000×g for 10 min

↓

Decanting supernatant and suspending precipitate in 1 mL of 0.2 M HCl

↓

Heating in a boiling water bath for 35 min and cooling at room temperature.

↓

Centrifugation at 9,000×g for 5 min

↓

Taking 50 μL of supernatant and addition of 50 μL of 5% (w/v) phenol and vortex mixing for 30 sec

↓

Placing on a bed of ice and addition of 250 μL of concentrated H₂SO₄ and then mixing for 30 sec

↓

Incubation in water bath at 80°C for 30 min

↓

Dilution with distilled water

and measurement of absorbance at 490 nm

Fig. 2. Procedure for the assay of polyglucuronic acid C5-epimerase using phenol sulfuric acid methodology.

4% CuSO₄ · 5H₂O 용액(reagent B)을 50 : 1 (v/v)로 혼합한 standard working reagent를 제조하여 시료액과 혼합한 후 흡광도를 측정하여 정량하였다.

Polyglucuronic acid C5-epimerase 활성 측정조건의 설정

효소반응의 최적화를 위하여 먼저 효소활성도 측정법이 확립되어야 하므로 Chang 등⁽²⁰⁾의 방법에 따라 반응액을 조제하여 25°C 반응기 내에서 효소반응을 일으킨 후, 반응액의 일정량을 채취하여 Chang 등⁽¹⁶⁾의 microphenol-sulfuric acid 방법과 Knutson과 Jeanes⁽¹⁷⁾의 개선된 Dische carbazole 방법을 각각 수행하여 효소활성도 측정 방법은 Fig. 2와 Fig. 3에 나타내었다.

효소반응을 위한 최적 기질의 선정

Chang과 Cho의 보고⁽¹³⁾에서 1차 alcohol 기만이 특이적 산화에 의해 생산된 전분인 산화된 고구마 전분, 산화된 옥수수 전분, 산화된 쌀 전분, 산화된 셀룰로오스 등을 기질로 하여 효소 반응을 일으킨 후 최종산물로 전환되는 속도를 비교함으로써 algin 유사 물질을 제조하기 위한 최적의 기질농도를 결정하였다.

Algin 유사물질의 효소적 생산을 위한 반응 pH 및 온도의 최적화

Algin 유사물질의 효소적 생산을 위한 최적 pH를 선정하기 위하여 반응액의 pH를 4.0~10.0 (pH 4.0~7.0은 citric acid-disodium phosphate buffer, pH 8.0~10.0은

Equilibration of H₂SO₄-borate (6 mL) in the ice bath

↓

Addition of the enzyme solution (0.7 mL) in the ice bath

↓

Vortex mixing for 4 sec

↓

Addition of carbazole reagent (0.2 mL) in the ice bath

↓

Vortex mixing for 4 sec

↓

Heating in a water bath for 30 min at 55°C

↓

Cooling in the ice bath for 5 min

↓

Standing at room temperature

↓

Measurement of absorbance at 530nm

Fig. 3. Procedure for the assay of polyglucuronic acid C5-epimerase using modified Dische carbazole methodology.

Clark and Lubs buffer를 사용하였음) 범위에서 변화시켰으며, 최적온도를 구하기 위하여 반응액의 온도를 최저 10°C에서 최고 40°C까지 상승·변화시켜 각각에 서의 효소활성도를 측정하여 극대의 생산율을 보이는 최적의 pH 및 온도를 결정하였다.

결과 및 고찰

Polyglucuronic acid C5-epimerase 활성 측정 조건의 확립

효소활성도 측정을 위하여 먼저, 기질내의 glucuronic acid와 반응산물내의 iduronic acid의 정량 조건을 설정하여야 하는 바, phenol-sulfuric acid 방법과 개선된 Dische carbazole 방법을 이용하여 uronic acid를 분석함으로써 polyglucuronic acid C5-epimerase 활성을 측정하였다.

Phenol-sulfuric acid 방법은 Fig. 2에서 보는 바와 같이 assay하는 공정이 까다롭고 많은 시간을 요구하며, 더욱이 효소 활성을 측정한 결과인 Fig. 4에서처럼 활성도 측정값의 재현성이 낮아 오차가 많이 발생하였다. 그 이유는 phenol-sulfuric acid 방법에 의하여 효소활성도를 측정하는 경우, i) 시료 전처리 과정 중에서 손실이 발생할 수 있으며, ii) 순수한 glucuronic acid와 iduronic acid를 비교할 때, 두 시료간의 absorbance 차이가 적은 데서 기인한 것으로 판단되었다.

따라서 새로운 assay 방법을 모색한 결과 개선된 Dische carbazole 방법을 선택하였는 바, Fig. 3에서 보는 바와 같이 assay 공정이 phenol-sulfuric acid 방법보다 단순하고 짧은 시간을 요구하며 시료 소비량이 0.7

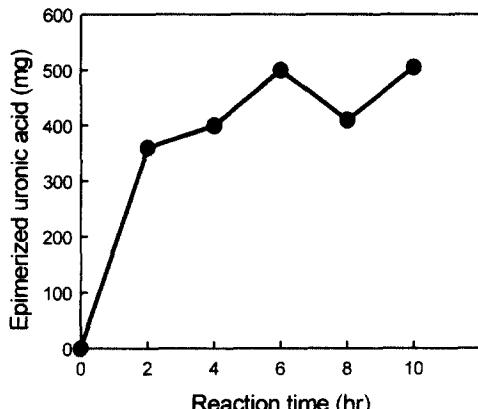


Fig. 4. Time course of polyglucuronic acid C5-epimerase reaction in sodium alginate as a substrate by phenol-sulfuric acid methodology.

mL로서 유리하며 Fig. 5에서처럼 활성도 측정값이 보다 예민하고 안정적이었다.

이상의 결과에 의하여 phenol-sulfuric acid 방법보다는 개선된 Dische carbazole 방법이 보다 정확하며 효율적인 것으로 판단되었다. 따라서 이 후의 실험은 Dische carbazole 방법에 의하여 효소활성도를 측정하였다.

효소 활성 측정을 위한 반응식의 확립

Borate가 첨가된 개선된 Dische carbazole 방법은 산화된 각종 다당류내의 glucuronic acid가 iduronic acid로 epimerization될 때 530 nm 파장의 흡광도가 비례

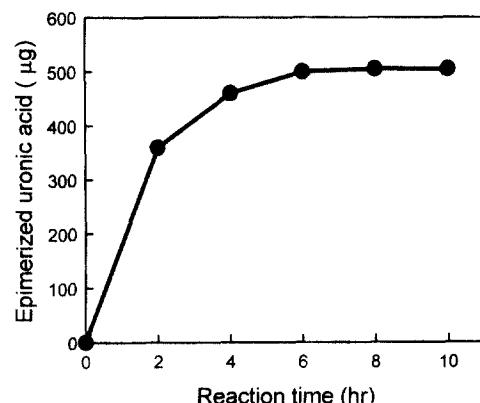


Fig. 5. Time course of polyglucuronic acid C5-epimerase reaction in sodium alginate as a substrate by Dische carbazole methodology.

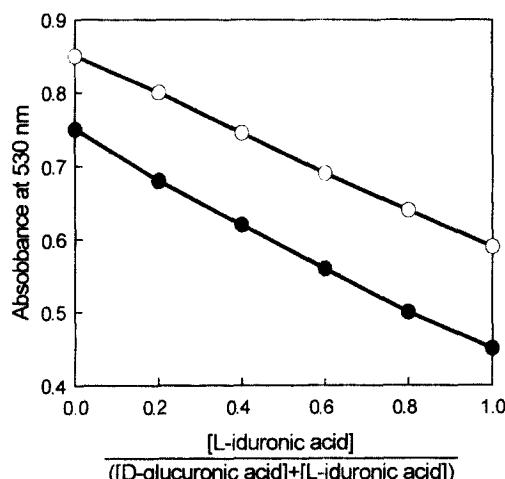


Fig. 6. Standard curve for the assay of polyglucuronic acid C5-epimerase using borate colorizing methodology. ● : 55°C, ○ : 100°C.

Table 1. Effect of ultracentrifugation and ammonium sulfate precipitation on the protein content and specific activity of polyglucuronic acid C5-epimerase

Treatment	Protein amount (mg/mL)	Enzyme activity (Unit/mL)	Specific activity (Unit/mg protein)
After ultracentrifugation (100,000×g)	0.575	0.928	1.614
After ultracentrifugation (100,000×g) and ammonium sulfate precipitation (80%)	0.561	0.894	1.593

적으로 낮아지는 원리를 이용한 것으로서 발색시의 온도, epimerized uronic acid (iduronic acid) 농도 및 흡광도와의 관계를 나타낸 표준곡선인 Fig. 6을 얻을 수 있었다.

이때의 표준곡선 방정식은

$$\text{Abs. at } 530 \text{ nm} = [4.44 \times 10^{-6} \times (\text{Temp.}) - 5.64 \times 10^{-3}]$$

(Concentration of epimerized product)

$$+ [0.98 - 3.11 \times 10^{-3}(\text{Temp.})] \text{ 으로 계산되었다.}$$

따라서, borate를 첨가한 Dische carbazole 발색반응 시의 온도 및 530 nm에서의 흡광도를 측정하면 epimerized uronic acid인 iduronic acid의 농도를 알 수 있게 되어 효소 활성도를 간편하게 계산할 수 있었다.

한편, 본 실험에서는 55°C에서 발색시켰으므로 아래의 계산식으로 단순화시켜 사용하였다.

$$\text{Abs. at } 530 \text{ nm} = -(5.3958 \times 10^{-3})(\text{Concentration of epimerized product}) + 0.8090$$

Polyglucuronic acid C5-epimerase 분리 및 부분 정제 조건의 결정

Polyglucuronic acid C5-epimerase의 분리 조건을 결정하기 위하여 초원심분리한 상동액과 이 상동액에 ammonium sulfate를 80% 농도로 첨가한 침전물에 대하여 단백질 함량과 specific activity를 측정하였다.

Table 1에 나타난 바와 같이, 단백질 함량 및 효소 활성도는 초원심분리만을 이행할 때가 오히려 높았으며, specific activity는 두 실험구 모두 유사함을 보였다.

이상의 결과로부터, 초원심분리 과정에만 의해서도 polyglucuronic acid C5-epimerase의 효소활성이 유효함을 확인할 수 있었는 바, 이후의 실험에서는 ammonium sulfate를 첨가하는 단계는 생략하고 초원심분리한 상동액을 직접 효소용액으로 사용하였다.

Polyglucuronic acid C5-epimerase 반응을 위한 최

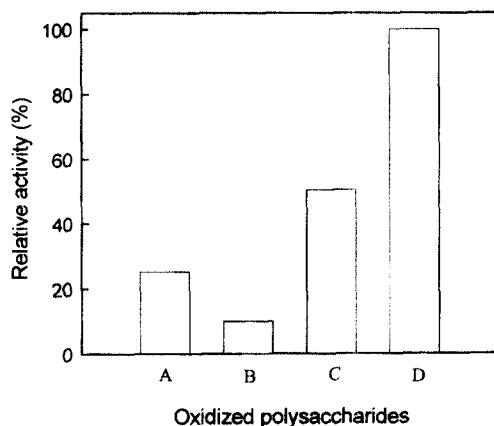


Fig. 7. Comparison of activities of polyglucuronic acid C5-epimerase acting on the various kinds of oxidized polysaccharides.

A: oxidized cellulose, B: oxidized corn starch, C: oxidized rice starch, D: oxidized sweet potato starch.

적 기질의 선정

Chang과 Cho의 보고⁽¹³⁾에서 얻어진 각종 산화전분들을 기질로 사용하여 최대의 활성을 보이는 기질을 선정한 결과는 Fig. 7과 같다. 산화된 고구마 전분을 사용하는 경우 최대의 효소 활성을 나타내어, 최적 기질로서 산화된 고구마 전분을 선정하였다. 산화된 각종 물질들 중에서 고구마전분에만 활성이 가장 높은 이유는 효소가 가장 접근하기 쉬운 분자 구조적인 구조에 기인하는 것으로 판단되었다.

Algin 유사 물질의 효소적 생산을 위한 반응온도 및 pH의 최적화

Polyglucuronic acid C5-epimerase 효소반응을 위한 최적 온도를 규명하기 위하여 반응액의 온도를 10°C에서 40°C까지 변화시키면서 효소반응을 수행하여 Fig. 8의 결과를 얻었다. Fig. 8에서 보는 바와 같이 효소 반응을 위한 최적 온도는 30°C인 것으로 판명되었다.

한편, 효소반응을 위한 최적 pH를 규명하기 위하여 최적화된 반응액의 온도 30°C하에서 반응액을 pH 4.0에서 10.0까지 변화시키며 효소 활성도를 측정한 결과 Fig. 9를 얻을 수 있었다. Fig. 9에서 보는 바와 같이 pH 7.0 이하의 산성 조건하에서와 pH 7.0 이상의 알칼리 조건하에서는 낮은 효소활성을 나타내었다. 따라서 효소반응을 위한 최적 pH를 7.0으로 결정하였는 바, Campbell 등⁽¹⁴⁾이 측정한 최적 pH 7.0~7.4의 범위에 포함됨을 확인하였다.

또한, pH 7.0의 반응액을 제조하기 위한 대표적인 buffer인 citric acid-disodium phosphate buffer와

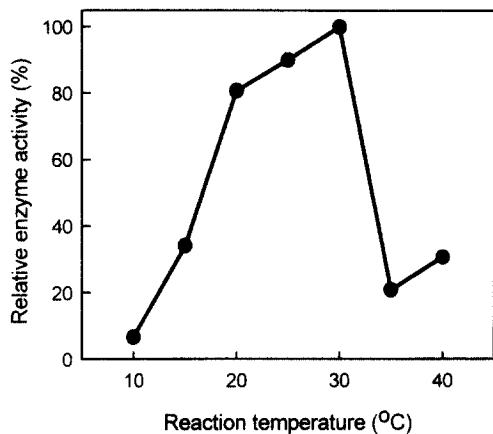


Fig. 8. Effect of temperature on polyglucuronic acid C5-epimerase activity.

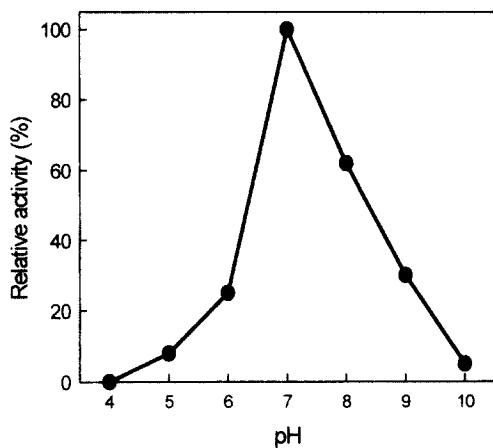


Fig. 9. Effect of pH on polyglucuronic acid C5-epimerase activity.

Table 2. Effect of different buffer on polyglucuronic acid C5-epimerase activity

Buffer (50 mM, pH 7.0)	Relative activity (%)
Collidine buffer	100
Citric acid-disodium phosphate buffer	62

epimerization 반응에서의 대표적인 buffer인 collidine buffer의 두 종류를 사용함으로써 buffer의 종류가 효소 반응에 미치는 영향을 살펴본 결과, Table 2에서 알 수 있듯이 반응액의 pH가 동일한 7.0일지라도 citric acid-disodium phosphate buffer를 사용하는 경우 collidine buffer의 경우에 비하여 38%가 감소된 효소활성을 나타내었는 바, 이는 citric acid-disodium phosphate buffer 내에 존재하는 염이 효소반응을 저해하는 것으로 예측되었다. 한편, 이러한 결과는 Larsen과 Haug^(9,10)

및 Skjæk-Bræk과 Larsen⁽¹⁸⁾의 보고와도 일치하는 것으로서 polyglucuronic acid C5-epimerase 효소의 경우에는 각종 염이 배제된 collidine buffer가 유용한 buffer인 것으로 판단되었다.

요약

구조와 용해도가 다른 4종류의 다당류(옥수수전분, 쌀전분, 고구마전분 및 셀룰로오스) 내의 1차 alcohol 기를 특이적으로 산화시켜 제조된 polyglucuronic acid 를 polyglucuronic acid C5-epimerase와 반응시켜 algin 유사 물질을 값싸게 대량으로 구득하고자 하였는 바, 신선한 소의 간을 마쇄한 후 100,000×g에서 1시간 원심분리한 상등액에서 조효소 용액을 구득하여 개선된 Dische carbazole 방법으로 효소활성을 측정하였다. 이때 효소 활성 측정을 위한 반응식을 다음과 같이 확립하여 활성도를 계산하였다; Abs. at 530 nm = -(5.3958 × 10⁻³) (Concentration of epimerized product) + 0.8090. 또한 polyglucuronic acid C5-epimerase 효소반응을 위한 최적 기질은 산화된 고구마전분이었으며, 최적 pH 및 온도는 각각 7.0과 30°C이었다. 따라서 특이적으로 산화된 고구마전분과 소의 간으로부터 추출된 polyglucuronic acid C5-epimerase를 이용하여 polyglucuronic acid가 polyiduronic acid로 전환된 algin 유사 물질의 효소적 생산이 가능한 것으로 판단되었다.

감사의 글

본 연구 내용은 1997년도 보건복지부 보건의료기술 연구개발사업(HMP-97-F-5-0026) 연구비 지원에 의하여 얻은 결과이므로 이에 감사드립니다.

문헌

1. Song, J.C. and Park, H.J. Food Additives, pp. 262-264. Ji-seong publishing Co., Seoul, Korea (1998)
2. Joo, D.S., Lee, J.S., Cho, S.Y., Shin, S.J. and Lee, E.H. Changes in functional properties of alginic acid by enzymatic degradation. Korean J. Food Sci. Technol. 27(1): 86-91 (1995)
3. Kim, D.H. Food Chemistry, pp. 390-392. Tamgudang, Seoul, Korea (1992)
4. Kaneko, Y., Yonemoto, Y., Okayama, K., Kimura, A. and Murata, K. Symbiotic formation of alginate lyase in mixed culture of bacteria isolated from soil. J. Ferment. Bioeng. 69: 192-198 (1990)
5. Yuk, S.H., Shin, B.C., Cho, S.H. and Lee, H.B. Biodegradable and pH-sensitive drug delivery system using

- sodium alginate and polyacrylic acid composite. Polymer. 14(6): 675-679 (1990)
6. Doubet, R.S. and Quatrano, R.S. Properties of alginate lyases from marine bacteria. Appl. Environ. Microbiol. 47: 699-675 (1984)
 7. Tseng, C. H., Yamaguchi, K. and Kitamikada, M. Isolation and some properties of alginate lyase from a marine bacterium *Vibrio* sp. AL-128. Nippon Susian Gakkaishi. 58: 533-540 (1992)
 8. Joo, D.S., Lee, J.S., Park, J.J., Cho, S.Y., Kim, H.K. and Lee, E.H. Preparation of oligosaccharides from alginic acid enzymatic hydrolysis. Korean J. Food Sci. Technol. 28(1): 146-151 (1996)
 9. Larsen, B. and Haug, A. Biosynthesis of alginate. Part I . Composition and structure of alginate produced by *Azotobacter vinelandii*(Lipman). Carbohydr. Res. 17: 287-296 (1971)
 10. Larsen, B. and Haug, A. Biosynthesis of alginate. Part II . Polymannuronic acid C5-epimerase from *Azotobacter vinelandii*(Lipman), Carbohydr. Res. 17: 297-308 (1971)
 11. Franklin, M.J., Chitins, C.E., Gacesa, P., Sonesson, A., White, D.C. and Ohman, D.E. *Pseudomonas aeruginosa* Alg G is a polymer level alginate C5-mannuronan epimerase. J. Bacteriol. 176(7): 1821-1830 (1994)
 12. Kim, K.H. and Cheong, J.J. Optimum conditions for extracting alginic acid from Undaria Pinnatifida and amino acid composition of its extraction residues. Korean J. Food Sci. Technol. 16(3): 336-340 (1984)
 13. Chang, P.S. and Cho, G.B. Oxidation of primary alcohol groups of polysaccharides with 2,2,6,6-tetramethyl-1-piperidine oxoammonium ion. Korean J. Food Sci. Technol. 29(3): 446-451 (1997)
 14. Campbell, P., Hannesson, H.H., Sandbeck, D., Rodn, L., Lindahl, U. and Li, J.P. Biosynthesis of heparin/heparan sulfate. Purification of the D-glucuronyl C-5 epimerase from bovine liver. J. Biol. Chem. 269(43): 26953-26958 (1994)
 15. Bollag, D.M., Rozyczyk, M.D. and Edelstein, S.J. Protein Method 2nd ed., pp. 72-79. Wiley-Liss Inc., New York, USA (1996)
 16. Chang, P.S., Mukerjea, R. and Robyt, J.F. Measurement of the activity of poly- uronic acid C-5 epimerases. Anal. Biochem. 258: 59-62 (1998)
 17. Knutson, C.A. and Jeanes, A. A new modification of the carbazole analysis. Application to heteropolysaccharides. Anal. Biochem. 24: 470-481 (1968)
 18. Skjæk-Bræk, G. and Larsen, B. A new assay for manuron C5-epimerase activity. Carbohydr. Res. 103: 133-136 (1982)

(1999년 11월 26일 접수)