碩士學位論文

DMSO 추출 및 EDTA 정제를 이용한 고순도 아가로스 제조

濟州大學校 大學院

食品工學科

姜 泰 煥

2009 年 2 月

DMSO 추출 및 EDTA 정제를 이용한 고순도 아가로스 제조

指導敎授 任 尙 彬

姜 泰 煥

이 論文을 工學 碩士學位 論文으로 提出함

2009 年 2 月

姜泰煥의 工學 碩士學位 論文을 認准함

審査委員長 姜 永 周 ㊞

委 員 河 璡 桓 ㊞

委 員 任 尙 彬 ㊞

濟州大學校 大學院

2009 年 2 月

Preparation of High Quality Agarose Using DMSO Extraction and EDTA Washing

Tae-Hwan Kang
(Supervised by professor Sang-Bin Lim)

A thesis submitted in partial fulfillment of the requirement for the degree of Master of engineering

2009. 2. .

This thesis has been examined and approved.

Thesis director, Yeung-Joo Kang, Prof. of Food Science and Engineering

Thesis director, Jin-Hwan Ha, Prof. of Food Science and Engineering

Thesis director, Sang-bin Lim, Prof. of Food Science and Engineering

Date

Department of Food Science and Engineering
GRADUATE SCHOOL
CHEJU NATIONAL UNIVERSITY

목 차

Summary ····· 1

Ⅰ. 서론 ····· 2

Ⅱ. 재료 및 방법 ····· 5
1. 재료 ····· 5
2. 실험방법 ····· 5
1) 한천 제조 ····· 5
2) 아가로스 제조 ····· 7
3) 일반성분 ····· 9
4) 황산기 함량 ····· 9
5) 응고 및 융해온도 ····· 9
6) 졸 및 겔 투명도 ····· 9
7) 겔강도 ····· 9
8) EEO($-m_r$) ····· 10
9) DNA 전기영동 ····· 10
10) FT-IR spectra ····· 10
11) ^{13}C NMR spectroscopy ····· 10
12) 입자표면분석 ····· 10

Ⅲ. 결과 및 고찰 ····· 11
1. 추출 한천의 이화학적 특성 ····· 11
2. 정제 아가로스의 이화학적 특성 ····· 14
3. 정제 아가로스의 EEO($-m_r$) ····· 19
4. 정제 아가로스의 DNA 전기영동 ····· 22

5. 정제 아가로스의 FT-IR spectra ····· 25
6. 정제 아가로스의 ^{13}C NMR spectroscopy ····· 29
7. 정제 아가로스의 입자표면분석 ····· 31

Ⅳ. 요약 ····· 35

참고문헌 ····· 36

JEJU NATIONAL UNIVERSITY 1952
JEJU 1952
제주대학교

Summary

Agar was prepared by acid hydrolysis using sulfuric acid from *Gelidium amansii* collected in Jeju, and their physicochemical properties were characterized. Agarose was also made from the agar through the consecutive refining processes of dimethyl sulfoxide(DMSO) extraction, distilled water- and ethylene diamine tetra acetic acid(EDTA)- washing, and their properties were compared with that of the standard agarose. The gel strength, the melting point and gelling point of the agar in this study were gradually decreased, but the content of sulfate ester wes hardly changed with the increase of the quantity of the added sulfuric acid. The agar made with 30 μL/L(pH 3.28) of the sulfuric acid was further processed by consecutive DMSO extraction and Na_2EDTA washing. For this agar, the content of sulfate ester was 0.06%, the gel strength was 2111 g/cm^2, and the electroendosmosis($-m_r$) was 0.08. Those properties were similar to that of the commercial agarose which was used for electrophoresis. The purified agarose in this study had lower absorbance in terms of gel transparency and had higher transparency than that of the standard agarose. Also, in DNA electrophoresis, the separation and movement speed of the purified agarose were similar to that of the agarose on the market. Under the FT-IR spectra, the purified agarose showed similar transmission values compared with the agarose on the market. In case of ^{13}C NMR, the purified agarose had the same carbon peak to the agarose on the market. When observed with scanning electron microscope, the agar had even and smooth surface without irregularity and pores, and the purified agarose had wide surface area with a large number of pores, while the agarose on the market had irregular surface to allow the solvent to easily permeate.

Ⅰ. 서론

우뭇가사리는 꼬시래기 등과 함께 한천의 주원료로 이용되는 바닷말 홍조식물로(1), 칠레, 남아프리카, 한국, 일본, 마다가스카르, 인도네시아 및 미국 켈리포니아 해역에 분포하고 있다(2). 해양수산부 어업생산통계자료에 의하면 국내 우뭇가사리의 생산량은 2006년 기준으로 약 3,000 M/T이며, 이 중 제주도의 생산량은 약 2,700 M/T으로 제주도의 생산 비중이 매우 높은 편이다(3).

현재 국내산 우뭇가사리의 약 60%는 일본에 건조품 또는 분말한천 형태로 단순 가공되어 수출되고 있으며, 나머지 40% 정도는 한천으로 제조되어 식품 첨가물 등에 소비되고 있다. 그러나 화장품, 의약품, 미생물 배지용 및 전기영동 등에 사용되는 고부가 한천 및 관련 응용제품은 대부분 수입에 의존하고 있는 실정이다(4).

최근에는 해외 저가 우뭇가사리의 대량 수입으로 제주산 우뭇가사리의 판매량이 급격히 감소되어 큰 어려움에 처해 있어 기존의 건조품 내지 한천 생산에 국한된 제주산 우뭇가사리를 활용하여 새로운 제품을 개발할 필요성이 대두되고 있다.

한천원료로부터 열수 추출하여 얻어지는 한천은 1,3-β-D-galactose와 1,4-L-3,6-anhydrogalactose가 직쇄상으로 결합되어 agarobiose를 이루고, agarobiose가 반복적으로 연결되어 분자량이 수만에서 수십만을 이루는 점질성 복합 다당류이며(5), 겔강도, 점도 및 융해 온도는 분자량에 의존성을 나타낸다(6). 또한, 한천은 이화학적 이성질체인 아가로스와 아가로펙틴으로 구성되어 있는데, 구성비는 계절, 지역 및 한천의 원료 등에 따라 다르나 약 7:3의 비율로 알려져 있다(7-9).

아가로스는 아가로펙틴 보다 큰 분자량을 가지며(10), 황산기 및 pyruvic acid 등과 같은 극성 잔기가 거의 존재하지 않는다(11). 따라서 아가로스와 아가로펙틴의 조성 비율에 따라 한천의 물성은 크게 달라진다고 보고되었다(7,12).

아가로펙틴에 존재하는 황산기 및 pyruvic acid 등은 음전하를 나타내므로 전기장 하에서 물질의 이동에 영향을 줄 수 있기 때문에, 시판 전기영동용 아가로스는 아가로펙틴을 제거하여 0.15% 이하의 황산기 함량을 나타내고 있다. 고순

도 아가로스는 생명공학과 분자생물공학 산업에 이용되는 필수 시약이며, 높은 부가가치로 인해 현재에도 효과적으로 아가로스를 생산하기 위한 연구는 꾸준히 진행되고 있다.

아가로스의 정제법은 아세칠화에 의한 아가로스 및 아가로팩틴의 분획 방법(13)과, 선택적인 용해도차를 이용한 방법(14), 4급 암모늄 침전법(15), 폴리에칠렌 글리콜 침전법(16), 디메칠 설퍼옥사이드(dimethyl sulfoxide, DMSO) 추출법(7), 이온 교환수지법(17), 암모늄 설페이트 침전법(18), 불용성 지지체를 이용한 흡착법(19), 아크리놀(acrinol) 침전법(20), 겔 크로마토그래피(21), 키틴·키토산 침전법(22) 및 아가로스 침전법(23) 등 약 40여 가지의 방법이 알려져 있으나 실제 대량생산공정에서의 세부적 정제방법은 각 기업에서 자체기술로 보유하고 있으므로 구체적인 정제 기술과 공정은 잘 알려져 있지 않다.

상기 정제방법 중 DMSO 추출법은 아가로스를 선택적으로 용해시키는 성질을 가진 DMSO의 고유성질을 이용한 것인데 추출 시간이 빠르며, 상온에서 겔화되지 않는다는 장점을 가지고 있다. 또한, DMSO 용매의 낮은 독성과 높은 한천 농도에서도 아가로팩틴을 분리시킬 수 있어 아가로스의 생산을 위한 용매로서 응용이 가능하다. 국내 연구에서도 아가로스 및 아가로팩틴의 조성비 연구에 DMSO 추출법이 사용되었고(8-9), 최근 전 등(24)에 의해서 DMSO 추출법을 이용한 전기영동용 아가로스의 생산을 위한 연구가 시도 되었으나, 황산기 함량이 0.29%로 시판 아가로스의 품질 수준에는 미치지 못하였다.

한편, Baterling이 시도한 불용성 지지체를 이용한 흡착법(19)은 한천을 ethylene diamine tetra acetic acid(EDTA)로 세척하여 황산기를 제거하고, 수산화알루미늄 겔이 아가로팩틴을 흡착하는 원리를 적용하여 고순도 아가로스를 제조하는 방법이다. 그러나 이 방법은 EDTA의 장시간 세척에 의한 한천의 가수분해로 고강도 아가로스 제조가 불가능하나(25), EDTA의 탁월한 황산기 제거 효과와 조작의 편의성 및 저비용 등의 장점을 가지고 있어 EDTA 처리시간의 조절에 따라 고순도 아가로스의 정제에 유용하게 응용할 수 있다.

따라서 본 연구는 제주산 우뭇가사리의 고부가 활용을 위한 일련의 연구로서 대량생산공정에 적합한 DMSO 추출법과 EDTA 정제법을 조합하여 고순도 아가로스를 제조하는데 그 목적이 있으며, 본 방법으로 제조된 아가로스를 시판되고 있는 표품 아가로스와 품질을 비교·검토하였다.

Ⅱ. 재료 및 방법

1. 재료

본 연구에 사용한 우뭇가사리(*Gelidium amansii*)는 2007년 8월경에 제주도 서귀포시 강정동 해역에서 채취하여, 실험실로 운반하고 이물질을 제거한 후 담수로 수세하고, 건조공정을 5회 반복하여 완전히 탈색한 다음 밀봉·보관하면서 사용하였다. 그리고 대조용 표품으로서 사용된 전기영동용 아가로스는 Seakem LE agarose(Lonza Co., U.S.A.)를 구입하여 비교·분석하였다.

2. 실험방법

1) 한천 제조

한천의 제조는 Fig. 1과 같이 하였다. 즉, 건조 보관된 30 g의 우뭇가사리를 Duran병에 취하고 1 L의 담수와 98%의 황산(Daejung chemicals Co., Korea)을 0-150 μL 첨가한 후 autoclave(HS-60, Hanshin medical Co., Korea)로 120℃에서 1 시간 동안 가압 추출하였다. 그런 다음 1 N NaOH를 사용하여 중화 시키고 나일론 천으로 여과·응고 시킨 후 2 cm 정육면체의 형태로 절단하였다. 이를 -20℃ 냉동고에 하루 동안 동결시킨 후 해동하여 담수로 2회 세척한 다음 탈수기(W-100T, Hanil, Korea)를 이용하여 수분을 제거하고, 35℃에서 건조 후 분쇄(1093 Cyclotec sample mill, Foss, Sweden)하였다.

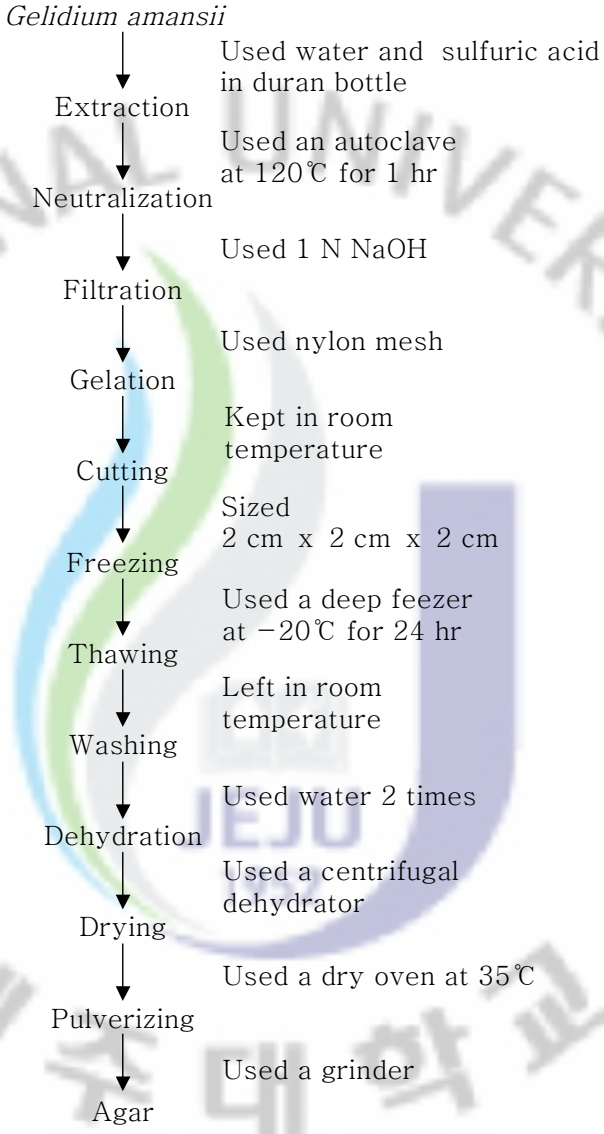


Fig. 1. Flow chart of agar manufacturing process.

2) 아가로스 제조

아가로스 제조는 Fig. 2에서 보는 바와 같이 3가지 방법으로 수행하였다. 즉, 한천 5 g을 100 mL DMSO (Daejung chemicals Co., Korea)와 함께 실온에서 2시간 교반시킨 다음 원심분리(10,000 × g, 30 min)하여 상층액을 4배 부피의 아세톤에 순차적으로 침전시키고, 침전된 아가로스를 아세톤으로 3회 세척하였다. 이를 회전 증발 농축기를 사용하여 40℃ 이하 온도에서 감압 건조하였다(Method A). 아세톤에 침전된 아가로스를 100 mL 증류수로 하룻밤 교반하고, 익일 2회에 걸쳐 증류수로 세척 후 이를 다시 아세톤 탈수하여 40 ℃ 이하에서 감압 건조시킨 방법(method B)과, 0.01 M의 Na_2EDTA (Daejung chemicals Co., Korea)용액 100 mL로 하룻밤 교반하고 증류수로 3회 세척 후 이를 다시 아세톤으로 탈수하여 40 ℃ 이하에서 감압 건조하는 방법(Method C)으로 정제과정을 세분화 하였다.

3) 일반성분

조단백질은 Kjeldahl법으로 총질소를 정량하여 그 값에 6.25의 질소계수를 곱하여 산출하였으며, 조회분은 건식회화법으로 측정하였다(26).

4) 황산기 함량

3 mg 시료를 1 N HCl로 105℃에서 5시간 동안 산 가수분해 시키고, 원심분리(10,000 × g, 5 min)하여 상층액 0.2 mL을 취하고 3.8 mL의 4% TCA 용액을 첨가한 후 미리 준비된 $BaCl_2$ - gelatin 시약 1 mL(증류수 400 mL에 gelatin 2 g을 넣고 65℃에서 용해 후 4℃에서 하룻밤 방치한 뒤 $BaCl_2$ 2 g을 녹인 후 2시간 방치하여 제조)를 첨가하여 20분간 방치한 다음 spectrophotometer(Libra S22, Biochrom Inc, England)를 이용하여 360 nm에서 흡광도를 측정하였다. 검량선은 K_2SO_4를 표준 황산염으로 하여 계산하였다(27).

5) 응고 및 융해온도

응고온도는 1.5% (w/v) 시료 용액을 외경 1.8 cm 시험관에 5 mL를 분주하고 20℃ 실내에서 방치하면서 시료용액의 유동성을 관찰하여 표면이 고정되어 움직

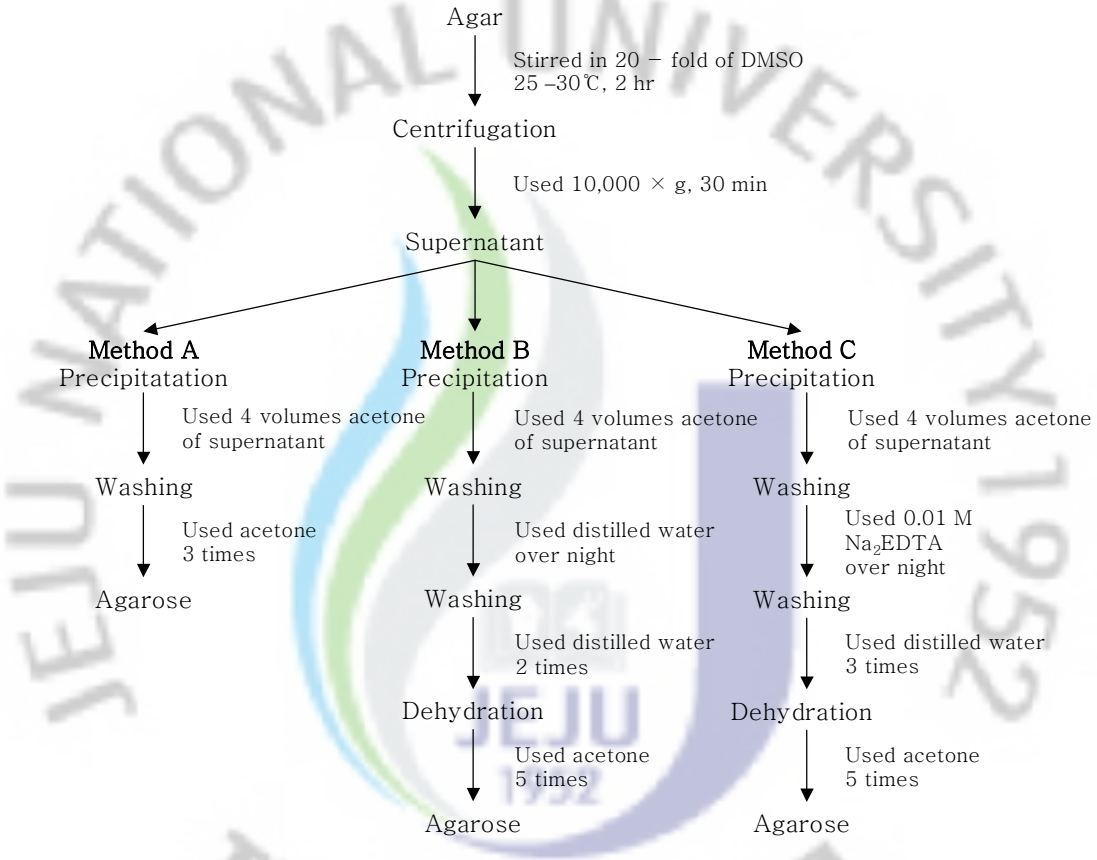


Fig. 2. Flow chart of agarose manufacturing process.

이지 않을 때의 온도를 3회 측정하여 평균값으로 나타내었다(28).

융해온도는 1.5% (w/v) 시료 용액을 외경 2 cm 스크류 시험관에 5 mL를 분주하여 20℃에 하룻밤 방치하고, 열풍건조기(OF-22GW, Jeio Tec, Korea)에 뒤집어서 고정 후 온도를 서서히 가열하여 시료 겔이 떨어지는 온도를 3회 측정하여 평균값으로 나타내었다(29).

6) 졸 및 겔의 투명도

1.0% (w/v) 시료 용액을 조제하여 1 cm 석영 셀에 분주하고 각각 65℃와 20℃로 온도를 고정한 후 spectrophotometer(Libra S22, Biochrom Inc, England)로 655 nm에서 흡광도를 측정하여 평균값으로 나타내었다(30).

7) 겔강도

겔강도는 1.5% (w/v) 시료 용액을 외경 5 cm 원통형 틀에 30 mL를 분주하고 20℃ 실내에서 하룻밤 방치하여 레오메타(TA-XT 2, Stable Micro Systems, England)로 파단강도를 측정하였다(31).

8) Electroendosmosis(EEO)

0.05 M의 barbital buffer(pH 8.6)를 사용하여 1% (v/w) 아가로스 겔을 제조하고, buffer에 용해시킨 10 mg/mL의 덱스트란(dextran, Sigma, U.S.A.)과 2 mg/mL의 알부민(human albumin, Sigma, U.S.A.)을 아가로스 홀(hole)에 각각 3 μL 씩 주입하여 50 V에서 1.5 시간 동안 전기영동을 하였다. 이동된 dextran은 에탄올에 변성시켜 확인하고 human albumin은 amido black(Sigma, U.S.A.)으로 염색 시킨 후 이동된 거리를 측정하여 EEO($-m_r$)를 구하였다(32).

9) DNA 전기영동

0.15 및 0.30 g의 시료를 15 mL TAE buffer에 용해시켜 겔을 성형한 후, 각각 1 kb(Biored, U.S.A.), 100 bp(Bioneer, Korea) DNA ladder를 3 μL 씩 주입하여 100 V의 전압 조건에서 전개 시킨 다음 ethidium bromide로 염색하여 확인하였다.

10) FT-IR spectra

FT-IR(IRPrestige-21, Shimadzu, Japan) 측정은 2.0 mg의 시료와 600 mg의 KBr를 혼합하여 pellet을 제작한 다음 측정하였다.

11) ^{13}C NMR spectroscopy

DMSO-d_6 700 mg에 30 mg의 시료를 용해시킨 후 실온조건하에서 핵자기공명분광기(JNM-LA400, Jeol Ltd., Japan)을 사용하여 측정하였다.

12) 입자표면분석

장방출주사전자현미경(Field Emission Scanning Electron Microscope; JSM-6700F, Jeol Ltd., Japan)를 이용하여 시료 입자 표면을 관찰하였다. 즉, 시료를 동결건조 하여 수분을 완전히 제거시키고 카본 테이프가 부착된 구리 시료대에 도포한 후 palladium mix로 코팅하여 ×100, ×500, ×5000, ×10000 배율로 표면구조를 관찰하였다(33).

JEJU NATIONAL UNIVERSITY 1952
JEJU 1952
제주대학교

Ⅲ. 결과 및 고찰

1. 추출 한천의 이화학적 특성

Table 1은 황산을 첨가하여 제조한 한천의 pH 조건에 따른 이화학적 특성을 나타내고 있다. 본 실험에서 제조한 한천의 황산기 함량은 0.75-0.89%로 pH 조건에 따른 황산기의 차이가 크지 않음을 알 수 있었다. Suzuki는 한천원료 7종을 대상으로 추출시 황산 첨가량에 따른 황산기 함량의 유의적 변화는 없었다고 보고하였는데(6), 본 실험 결과와 잘 일치 하였다. 변 등(30)의 연구와 도(25)의 연구에서는 국내산 우뭇가사리로부터 제조된 한천은 황산기 함량이 1% 이상이었지만, 본 연구에서 제조한 한천은 그 보다 낮은 함량을 나타내었는데, 이는 한천 제조 전 우뭇가사리의 탈색을 위한 세척과 한천 제조 과정 중 해동 후 담수 세척에 의하여 아가로팩틴과 함께 황산기가 상당량 제거 된 것으로 추정된다.

한천의 겔강도는 390-1017 g/cm^{2}의 범위를 나타내었으며, 황산의 첨가농도량에 따라 겔강도는 낮아지는 경향을 나타내었다. 겔강도의 주요 결정 인자는 한천에 존재하는 황산기의 함량, anhydrogalactose의 함량 및 한천 분자량으로 알려져 있다.

한천의 융해온도는 90.0-99.3℃의 범위였으며, 황산의 첨가량이 많을수록 융해온도는 감소하는 경향이었고, 응고온도는 30.6-35.3℃였다. Guiseley(28)는 시판 한천을 구입하여 응고온도를 측정한 결과, 본 실험으로 제조한 한천의 응고온도보다 높은 35-52℃로 보고한 바 있다.

본 연구에서 제조한 한천의 겔강도, 융해온도 및 응고온도가 황산의 첨가 농도가 높을수록 낮아지는 것은 한천 분자량의 감소에 기인한 것으로 판단된다.

한천의 수율은 추출액의 점도에 크게 좌우되는데, 본 연구에서도 황산의 첨가량이 증가함에 따라 추출액의 점도가 떨어져 한천의 수율은 대체적으로 증가하는 경향을 나타내었다.

이상의 결과로부터 한천 제조 과정에서 황산의 첨가는 한천 분자의 가수분해를 유도하여 겔강도, 융해온도, 응고온도 및 수율에 영향을 미치는 것으로 나타났으나, 황산기의 함량에는 큰 변화를 보이지 않았다.

JEJU NATIONAL UNIVERSITY 1952
JEJU 1952
제주대학교

Table 1. Properties of agar extracted from *Gelidium amansii* under different sulfuric acid conditions

H_2SO_4[a] (μL/L)	pH	Sulfate ester (%)	Gel strength[b] (g/cm^2)	Melting point[c] (℃)	Gelling point[d] (℃)	Yield (%)
0	7.29 ± 0.06	0.88 ± 0.08	1017 ± 0	99.3 ± 0.3	35.3 ± 0.6	41 ± 1.54
15	5.46 ± 0.04	0.84 ± 0.12	937 ± 7	95.2 ± 0.6	33.5 ± 0.0	44 ± 0.92
30	3.28 ± 0.04	0.89 ± 0.16	782 ± 4	94.5 ± 0.0	33.2 ± 0.3	45 ± 0.50
50	2.88 ± 0.03	0.75 ± 0.08	648 ± 112	93.3 ± 0.3	32.3 ± 0.3	47 ± 0.31
70	2.68 ± 0.02	0.75 ± 0.04	513 ± 28	92.0 ± 0.0	31.6 ± 0.3	47 ± 0.60
100	2.53 ± 0	0.83 ± 0.12	390 ± 10	90.0 ± 0.6	30.6 ± 0.6	46 ± 0.45
150	2.35 ± 0	-[e]	-	-	-	-

[a]98%.

[bcd]All samples were measured in 1.5% concentration.

[e]Not gelling.

2. 정제 아가로즈의 이화학적 특성

한천 제조시 황산을 첨가하는 목적은 여과를 용이하게 하여 한천 수율을 증대시킴과 동시에 아가로스 제조에 적당한 분자량의 한천을 얻기 위해서이다. 본 연구에서는 30 μL의 황산을 첨가하여 제조한 한천을 원료로 아가로스를 제조할 때, 시판되는 표품 아가로스의 일반적인 겔강도(1% 농도) 조건인 1,200 g/cm^2 이상이 가능한 것이 확인되었다. 황산 함량이 15 μL 이하로 첨가하여 제조한 한천을 이용하여 아가로스를 제조하면 융해온도가 높아 전기영동 겔로 사용이 어렵고, 50 μL 이상 첨가하여 제조한 한천으로부터 정제한 아가로스는 범용 전기영동용 아가로스로 사용하기에는 겔강도가 낮았다(data not shown). 따라서 본 연구에서는 아가로스 정제용 한천 제조시 첨가하는 황산 함량을 30 μL로 하였다.

제주산 우뭇가사리부터 제조한 한천을 원료로 하여 DMSO 추출과 증류수 및 Na_2EDTA 정제법으로 제조한 3가지 아가로스의 이화학적 특성을 Table 2에 나타내었다.

DMSO 추출법(Method A)으로 제조한 아가로스의 황산기 함량은 0.55%로 한천의 황산기 함량 0.89% 보다 낮은 값을 나타내었다. Tagawa(7)는 DMSO 추출법으로 황산기 함량이 1.1%인 아가로스를 제조한 바 있으나, 시판 전기영동급 아가로스의 황산기 함량 기준인 0.15% 이하의 순도에는 이르지 못하였다. DMSO 추출법으로만 황산기 함량이 낮은 고순도 아가로스를 제조하기 어려운 이유는 한천의 구조적 특징에 기인하는 것으로 추정된다. 즉, 아가로스와 아가로펙틴이 코일 형상으로 불규칙하게 뒤엉켜 존재(34-35)하는 한천을 DMSO로 용해하면, 아가로스와 결합된 일부 아가로펙틴도 같이 분리되어 DMSO 용매에 존재하기 때문에 황산기의 함량이 높은 것으로 보여 진다.

또한, DMSO로부터 추출된 아가로스를 아세톤에 침전하여 증류수로 세척하여 제조한 아가로스(Method B)의 황산기 함량은 0.13%로 DMSO 추출법으로만 제조한 아가로스 보다 낮은 값을 나타내었다. 이는 아가로펙틴은 아가로스와 비교하여 상대적으로 낮은 분자량을 갖기 때문에 증류수 세척에 의한 용해도차로 아가로펙틴이 일부 제거되기 때문인 것으로 판단된다. 즉, 아세톤에 침전된 아가로스의 입자는 표면적이 매우 넓은 망상 구조형태인 것을 Fig. 3에서 확인하였는데, 이와 같은 상태

에서 아가로스 입자에 소량 존재하는 아가로팩틴은 증류수 교반 등의 공정에 의하여 아가로스로부터 쉽게 이탈하여 물에 일부 용해되기 때문에 황산기 함량이 낮아진 것으로 사료된다.

한편, DMSO로부터 추출된 아가로스를 아세톤에 침전한 다음 Na_2EDTA로 세척하여 아가로스(Method C)를 제조하였다. 이 때, EDTA에 의한 아가로스의 가수분해를 최소화하기 위해 0.01 M Na_2EDTA 용액으로 12시간 동안 세척하여 아가로스를 제조하였는데, 이 방법으로 제조한 아가로스의 황산기 함량은 3가지 정제방법 중 가장 낮은 0.06%로 표품 아가로스(0.05%)와 거의 비슷한 결과로 나타내었다. Baterling(19)의 연구에서는 한천을 0.02 M EDTA 용액에서 2일간 교반하면, 황산기가 0.97%에서 0.15%로 감소한다고 보고하였으며, 도(25)는 EDTA의 가수분해 반응으로 인해 아가로스의 겔강도가 감소하였다고 발표한 바 있다. EDTA에 의한 황산기 제거효과는 기언급한 바와 같이 아가로스가 아세톤 침전으로 표면적이 넓은 망상구조가 되어 Na_2EDTA 교반 세척에 의하여 아가로스에 잔존하는 아가로팩틴이 쉽게 이탈하고, Na_2EDTA의 킬레이트 작용(19)과 병행하여 아가로펙틴에 존재하는 황산기를 효과적으로 제거한 것으로 사료된다.

3가지 방법으로 정제한 아가로스의 겔강도는 모두 2,000 g/cm^2 이상으로 한천의 겔강도(783 g/cm^2) 높은 값을 나타내었다. 정제방법에 따른 겔강도의 차이는 크지 않았으나 DMSO 추출과 증류수 세척(Method B)을 병행하여 제조한 아가로스가 가장 높은 겔강도를 나타내었다. 이는 증류수 세척에 의해 겔화능이 약한 아가로팩틴이 제거됨에 따라, 아가로스의 주 구성 성분인 anhydrogalactose 성분의 함량비가 높아진 것으로 해석되며, DMSO 추출과 Na_2EDTA 세척(Method C)으로 제조한 아가로스는 Na_2EDTA에 의해서 일부 가수분해 반응이 일어나 Method B로 제조한 아가로스 보다 겔강도가 약간 낮아진 것으로 생각된다. 본 시험결과가 유사한 연구보고가 기발표 된 바 있는데, 아가로스를 Na_2EDTA 용액으로 3회 세척한 경우 황산기 함량이 2.20%에서 1.11%로 크게 감소하였고, 겔강도는 618 g/cm^{2}에서 527 g/cm^{2}로 저하하였다는 결과가 있다(33). 따라서 EDTA를 아가로스 제조방법에 적용할 때에는 아가로스의 가수분해를 고려하여 적정시간으로 아가로스를 세척하는 것이 중요한 핵심이라 할 수 있다.

정제한 3가지 아가로스의 융해온도는 약 95-96℃의 비슷한 범위를 나타내어 아가로팩틴 및 황산기의 제거에 따른 융해온도의 변화는 미미하였다. Tagawa(36)의 연

구에서는 4종의 한천을 아가로스와 아가로팩틴을 분리 후 융해 온도를 측정하였는데 한천과 아가로스의 융해 온도는 큰 변화를 나타나지 않았다고 보고하여 본 연구와 잘 일치하였다. 따라서 융해온도는 겔화능에 관여하는 황산기 및 anhydrogalactose의 함량보다 한천 분자량에 가장 큰 영향을 받는 것으로 추정된다.

또한, 정제된 아가로스의 응고온도는 정제 후 약 2℃ 상승하여 35℃를 나타내었는데, 이는 아가로팩틴의 제거에 따른 겔화능의 상승으로 겔화온도가 높아진 것으로 해석된다.

아가로스의 졸 및 겔의 투명도는 아가로스 구성당 이외의 성분, 즉 우뭇가사리의 색소 성분, 아가로팩틴, 회분 및 불용성의 미세입자 등에 따라 좌우되며(30), 투명도는 아가로스의 간접적인 순도를 나타낸다고 볼 수 있다. 표품 아가로스 겔의 흡광도(O.D.)는 0.117을 나타내었으며, DMSO 추출과 Na_2EDTA 세척(Method C)에 따라 제조한 아가로스 겔의 흡광도(O.D.)는 0.104로 표품 아가로스 보다 더 낮은 값을 나타내어 투명도가 우수하다는 것을 확인하였다. 등전점 전기영동용 아가로스는 투명도가 아주 우수한 아가로스만 사용이 가능한데, Perlman은 아가로스에 galactomannan을 첨가하면 더욱 투명한 겔을 나타낸다고 보고하였으며(37), 고 등은 아가로스에 베타 글루칸을 첨가하였을 시 높은 해상도를 나타내는 겔 제작이 가능하다고 발표한 바 있다(38). 따라서 본 DMSO 추출과 Na_2EDTA 세척(Method C)에 의하여 제조한 아가로스는 자체 투명도가 높은 편으로 적정한 다당류의 첨가에 따라 등전점 전기영동용 아가로스로도 충분히 활용이 가능할 것으로 판단되었다.

3가지 방법으로 제조된 아가로스의 회분 함량은 정제에 의하여 한천의 회분 함량보다 감소하였으며, 이는 아가로팩틴의 극성 잔기에 주로 결합하여 존재하는 회분이 아가로스 정제방법에 의해 아가로팩틴이 제거됨으로서 감소한 것으로 생각된다. 본 연구에서 적용한 DMSO 추출과 Na_2EDTA 세척(Method C)을 병행한 방법은 한천에 주로 존재하는 나트륨 이온을 제거하기 어렵기 때문에(25) 결과적으로 DMSO 추출과 증류수 세척(Method B)으로 제조한 아가로스의 회분 함량 보다 높은 값을 나타낸 것으로 보여 진다.

조단백질은 3가지 정제방법에 의하여 황산기 함량과 유사하게 감소하는 경향을 나타내었다. 이는 아가로팩틴의 제거 원리와 마찬가지로 조단백질 성분이 DMSO에 용해되지 않는 성질과 증류수 및 Na_2EDTA의 세척으로 아가로스 성분에서 질소화합물이 제거되어서 감소한 것으로 추정된다.

이상의 결과에서 DMSO 추출과 Na_2EDTA 세척 과정을 병행 했을 때(Method C), 아가로스의 황산기 함량은 0.06%, 겔강도는 2111 g/cm^2, 융해온도 96℃ 및 응고온도 35℃로 표품 아가로스와 유사한 전기영동급 아가로스를 얻을 수 있었다.

JEJU NATIONAL UNIVERSITY 1952
JEJU 1952
제주대학교

Table 2. The physicochemical characteristics of crude agar, purified agarose and standard agarose

	Sulfate ester (%)	Gel strength[a] (g/cm^2)	Melting point[b] (℃)	Gelling point[c] (℃)	Absorption[d] (O.D. at 655 nm)		Crude Ash (%)	Crude protein (%)	Yield (%)
					Sol	Gel			
Agar[e]	0.89 ± 0.16	782 ± 4	94.5 ± 0.0	33.2 ± 0.3	0.048	0.185	2.52 ± 0.01	0.7 ± 0.03	-
DMSO	0.55 ± 0.00	2051 ± 41	95.0 ± 0.0	35.3 ± 0.3	0.004	0.129	0.58 ± 0.02	0.42 ± 0.03	56 ± 1.2
DMSO D.W. Washing	0.13 ± 0.04	2187 ± 103	95.8 ± 0.3	35.7 ± 0.6	0.002	0.114	0.42 ± 0.03	0.32 ± 0.02	53 ± 0.9
DMSO EDTA Washing	0.06 ± 0.03	2111 ± 4	95.2 ± 0.3	35.3 ± 0.6	0.002	0.104	0.61 ± 0.03	0.17 ± 0.02	53 ± 0.5
Standard agarose	0.05 ± 0.00	2168 ± 20	96.2 ± 0.3	35.7 ± 0.6	0.002	0.117	0.35 ± 0.01	0.18 ± 0.02	-

[abc]All samples were measured in 1.5% concentration.

[d]All samples were measured in 1.0% concentration.

[e]Agar produced by adding of 30 μL of sulfuric acid.

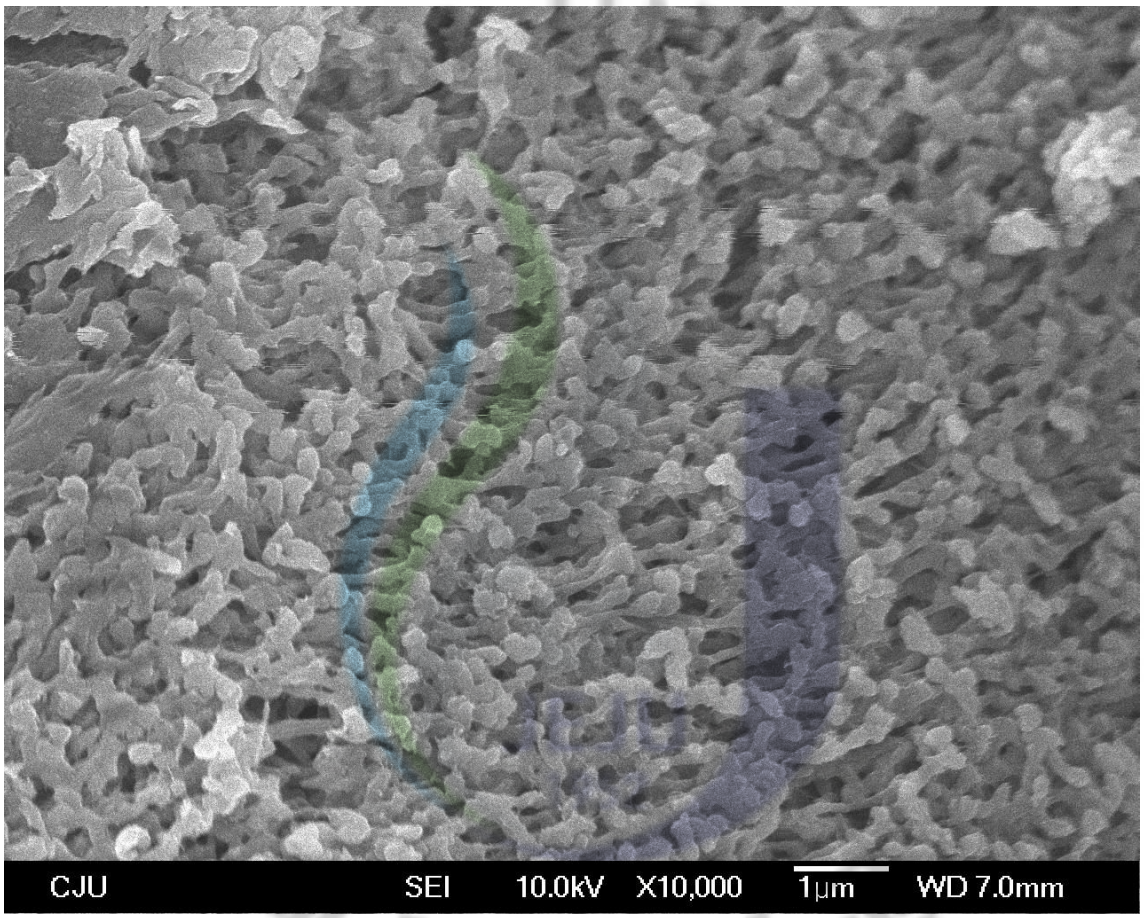


Fig. 3. Field emission scanning electron microscopic photographs of agarose powder obtained from method C (DMSO extraction and Na_2EDTA washing; 10000 ×).

3. 정제 아가로스의 EEO($-m_r$)

EEO는 전기영동에 있어서 중성 분자의 움직임 현상으로(Fig. 4), 아가로스 겔 내에 존재하는 황산기, pyruvic acid 및 회분 함량에 영향을 받으며, 측정은 0.5 M의 barbital buffer(pH 8.6) 상에 덱스트란과 알부민의 이동 거리를 계산하여 EEO를 나타낸다(39). 전기영동상에서 중성 덱스트란은 음극으로의 이동하며, 그 이동 속도는 황산기의 함량에 따라 차이가 있는 알려져 있다. 이와 반대로 알부민은 양극으로 이동하며, 덱스트란과 마찬가지로 아가로스의 황산기 함량에 비례적으로 이동 속도를 나타낸다. 즉, 아가로스의 황산기 함량이 많을수록 알부민과 덱스트란의 움직임은 비례적으로 빠른 이동 속도를 나타내며, 덱스트란의 이동 거리(X)와 텍스트란과 알부민의 거리(Y) 비율(X/Y)에서 EEO($-m_r$)는 황산기 함량에 비례한다.

3가지 방법으로 정제한 아가로스 및 표품 아가로스의 EEO($-m_r$)는 0.10, 0.10, 0.08 및 0.08로 나타났다(Fig. 5). 결과에서 보는 바와 같이 DMSO 추출법 및 Na_2EDTA(Method C)로 제조한 아가로스는 표품 아가로스와 거의 같은 EEO($-m_r$)를 나타내어 범용 전기영동급 아가로스로 활용이 기대된다.

Barteling(19)의 연구에서는 한천을 EDTA로 세척하였을시 황산기 함량이 0.97%에서 0.15%로 많이 낮아진 반면 EEO($-m_r$)는 0.78에서 0.52로 소폭 감소하였다고 보고하였다. 따라서 아가로스의 EEO($-m_r$)값은 황산기를 함유하는 아가로팩틴의 영향이 가장 큰 것으로 생각되며, EDTA 세척이 황산기 이외에 pyruvic acid 및 uronic acid 등과 같은 극성 잔기를 제거하는지에 대해서는 면밀한 연구가 앞으로 더 진행되어야 할 것이다.

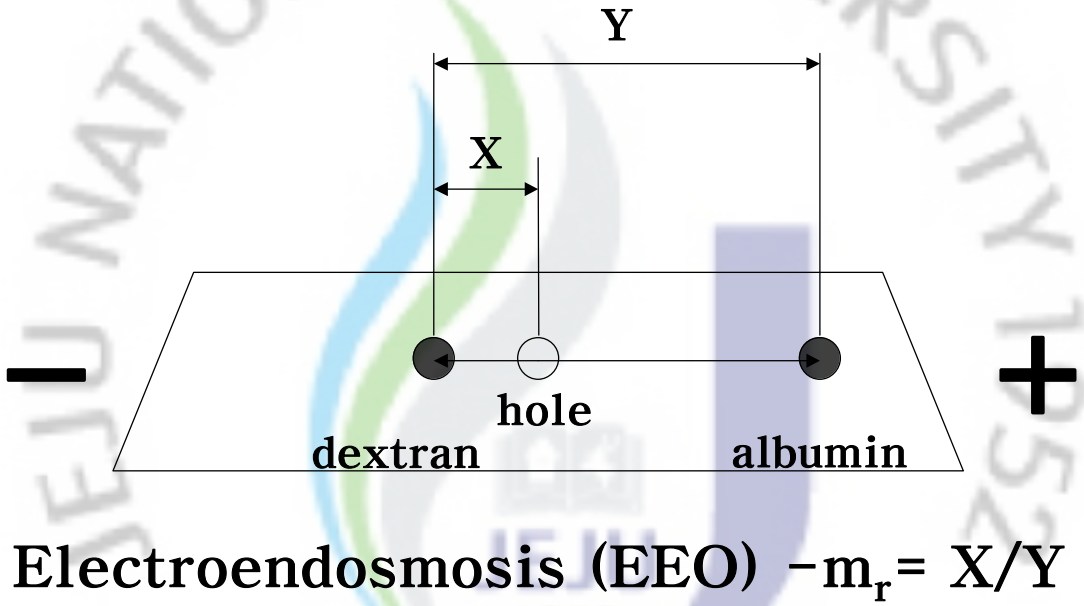
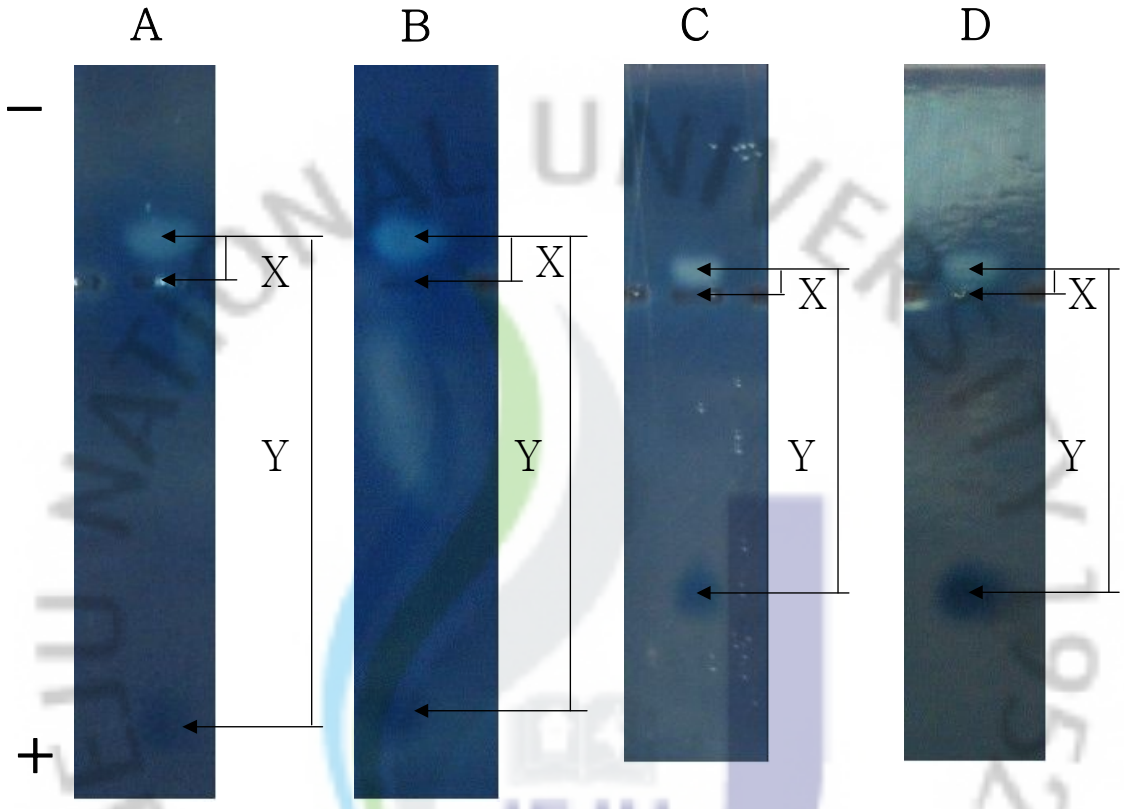


Fig. 4. Graphic representation of electroendosmosis.



ELECTROENDOSMOSIS (EEO) $-m_r$ = X/Y

Fig. 5. Gel electrophoresis for EEO(-mr) using dextran and human albumin in 1% agarose gel at 50v, barbital buffer condition. A, Method A (DMSO extraction, EEO = 0.10); B, Method B (DMSO extraction and D.W. washing, EEO = 0.10); C, Method C (DMSO extraction and Na_2EDTA washing, EEO = 0.08); D, standard agarose (EEO = 0.08).

4. 정제 아가로스의 DNA 전기영동

전기영동에 있어 핵산의 전개속도에 관여하는 인자는 전압크기, buffer의 종류, 핵산 분자량의 크기, 아가로스의 농도, 아가로스의 EEO($-m_r$) 등이 있다.

Fig. 6에 1 Kb DNA 편자를 분리하기 위하여 DMSO 추출(Method A; A), DMSO 추출 및 증류수 세척(Method B; B), DMSO 추출 및 Na_2EDTA 세척(Method C; C)으로 각각 제조한 아가로스와 표품 아가로스(D)로 1% 농도의 겔을 제작하여 전기영동한 결과를 나타내었다. DNA 편자의 이동은 아가로스의 황산기 함량 및 EEO($-m_r$)에 따라 느린 속도를 나타내었으며, DMSO 추출 및 Na_2EDTA 세척으로 제조된 아가로스(Method C)는 시판 아가로스와 유사한 분리능과 해상도를 나타내었다.

Fig. 7은 100 bp DNA 편자를 분리하기 위해서 1 Kb DNA 편자 분리능이 우수한 DMSO 추출 및 Na_2EDTA 세척 처리한 아가로스(Method C; A)와 표품 아가로스(B)를 2%의 농도로 겔 성형 후 전기영동을 시행한 결과인데, DNA 편자의 이동속도와 각 편자간의 분리능 그리고 해상도는 2개의 아가로스 모두 유사하여 DMSO 추출 및 Na_2EDTA 세척법을 병행하여 제조한 아가로스는 상용화가 가능한 품질임을 알 수 있었다.

이러한 결과로 미루어 볼 때, 아가로스는 전기영동을 시행할 때 황산기 함량이 EEO($-m_r$)에 비례적인 값을 나타내며, 높은 EEO($-m_r$)의 값은 DNA 편자의 분리 및 전개 속도에 영향을 미치는 것을 확인하였다. 또한 도(40)는 다량의 황산기가 존재하는 겔 상에 ethidium bromide로 염색한 후 탈색시에도 DNA 이외의 부분에서도 ethidium bromide가 제거되지 않아 겔 전체가 형광성을 띠는 효과로 DNA 편자의 확인이 어렵다고 보고하여, 고해상도를 요구하는 아가로스는 황산기, pyruvic acid 등과 같은 극성잔기의 함량에 따라 품질이 좌우된다고 볼 수 있다.

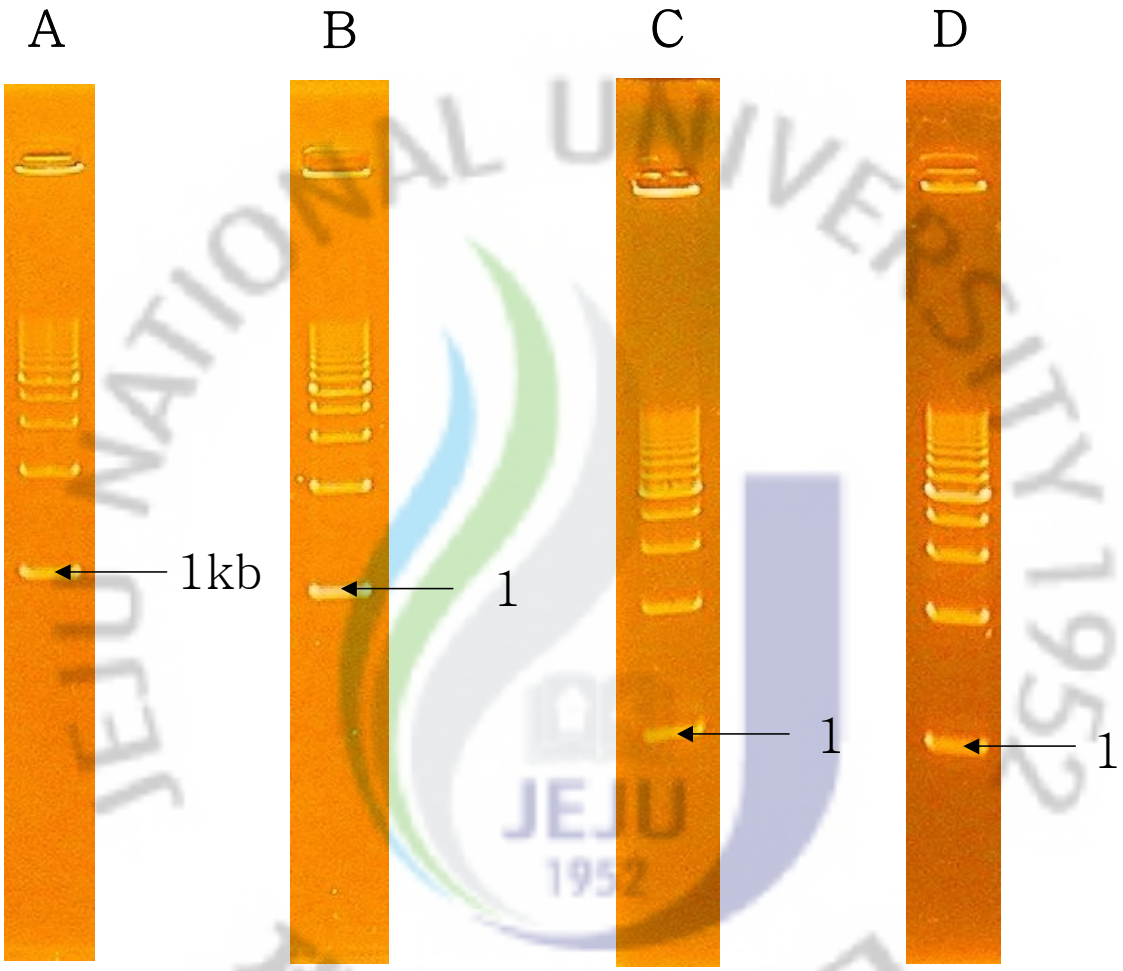


Fig. 6. Gel electrophoresis of 1 kb DNA ladder marker (from 250 bp to 10 kb) 1% agarose gel at 50v, TAE buffer condition. A, Method A (DMSO extraction); B, Method B (DMSO extraction and D.W. washing); C, Method C (DMSO extraction and Na_2EDTA washing); D, standard agarose.

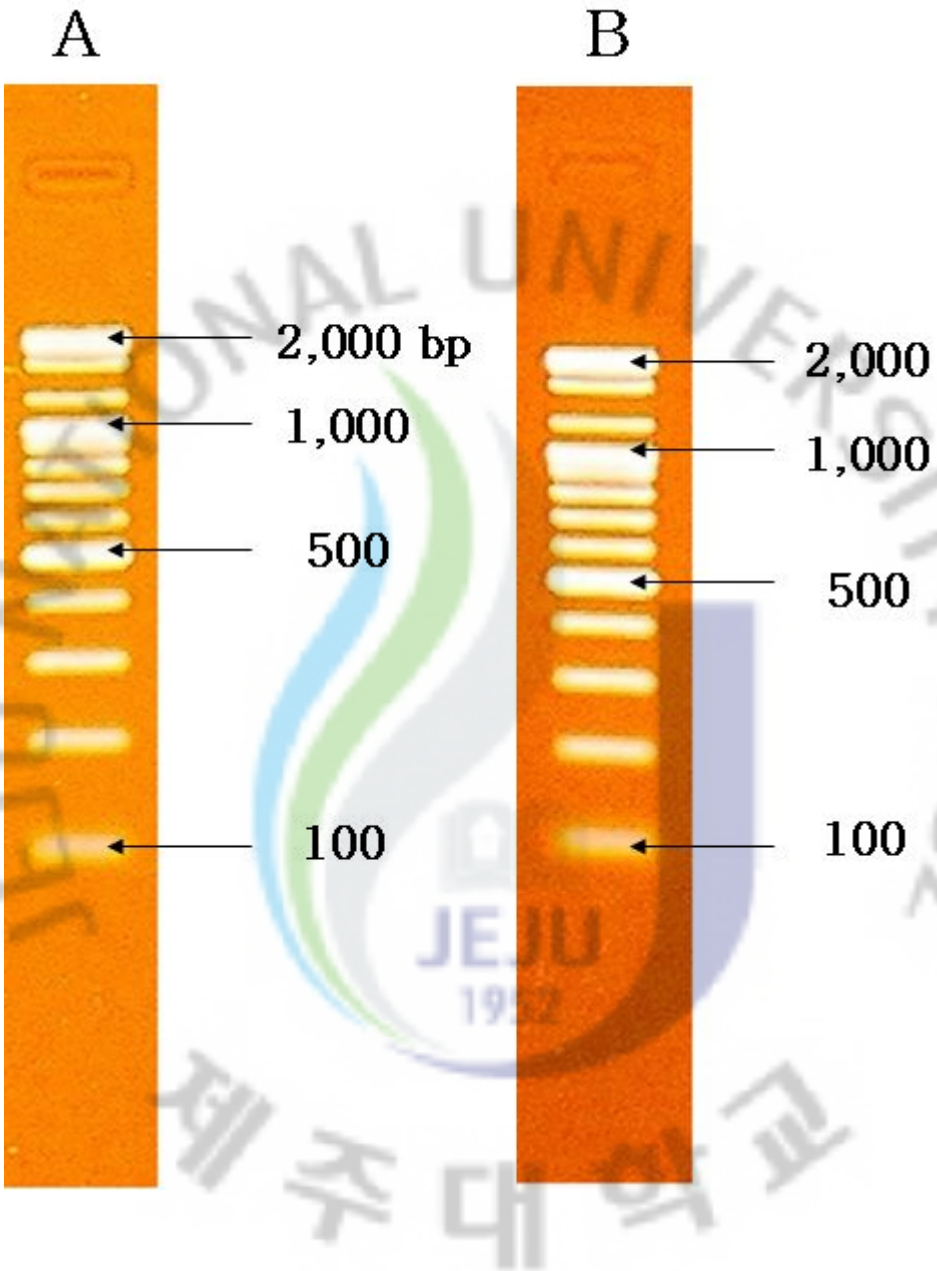


Fig. 7. Gel electrophoresis of 100 bp DNA ladder marker (from 2000 to 100 bp) 2% agarose gel at 100 V, TAE buffer condition. A, Method C (DMSO extraction and Na_2EDTA washing) agarose; B, standard agarose.

5. 정제 아가로스의 FT-IR spectra

한천(Fig. 8), DMSO 추출 및 Na_2EDTA 세척으로 제조한 아가로스(Method C; Fig. 9) 그리고 표품 아가로스(Fig. 10)의 FT-IR spectra 결과는 다음과 같다. 모든 시료에서 3450 cm^{-1}(-OH), 2920 cm^{-1}(-CH) 등의 구간에서 강한 피크를 형성하여 전형적인 한천 및 아가로스 피크의 형태를 보였다. 또한 L-galactose- 6-sulfate를 나타내는 868 cm^{-1}부근의 피크 또한 모든 시료에서 관찰되었다. 그러나 전체적인 황산기 함량을 나타내는 1250 cm^{-1} 부근의 피크는 황산기 함량이 높은 한천에서만 관찰되어 DMSO 추출 및 Na_2EDTA로 세척한 아가로스(Method C) 및 표품 아가로스와 뚜렷한 차이를 보였으나, 정제 아가로스와 표품 아가로스는 거의 유사한 패턴을 나타내었다.

JEJU NATIONAL UNIVERSITY 1952
JEJU 1952
제주대학교

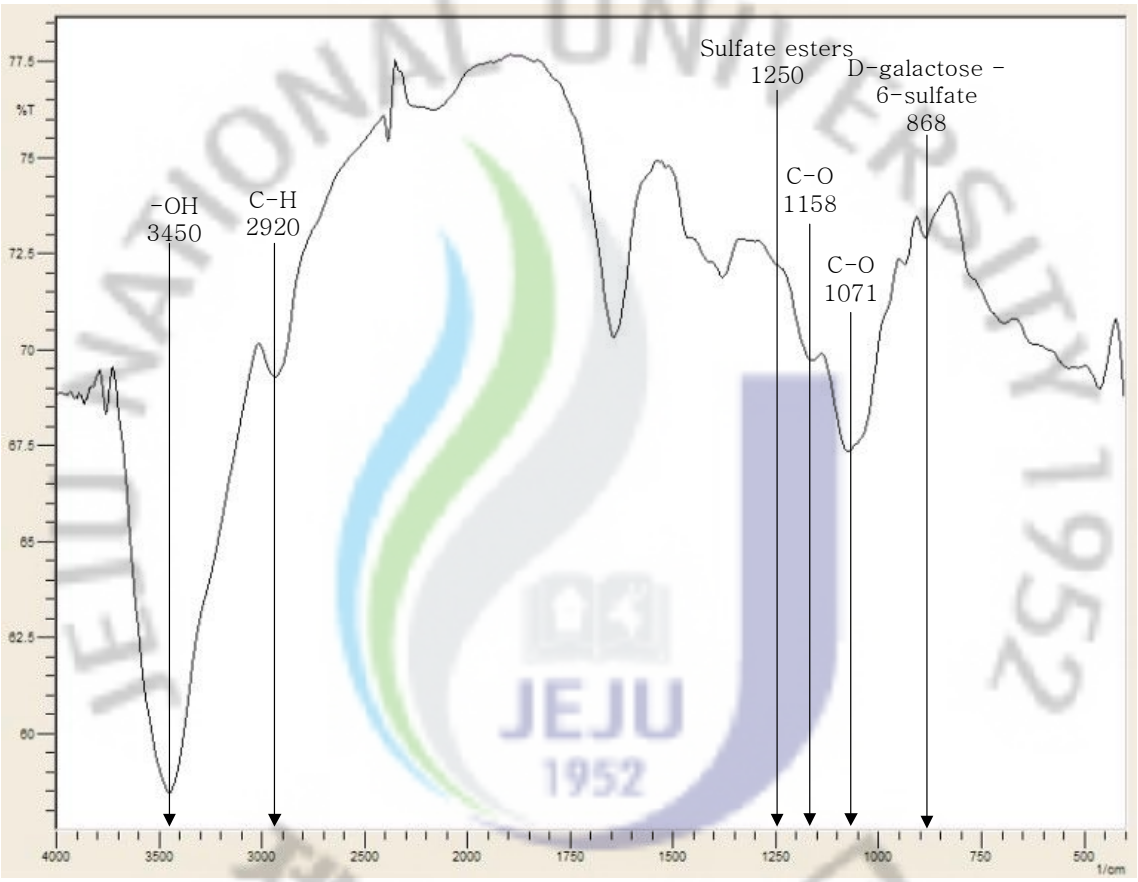


Fig. 8. FT-IR spectrum of agar prepared from *Gelidium amansii*.

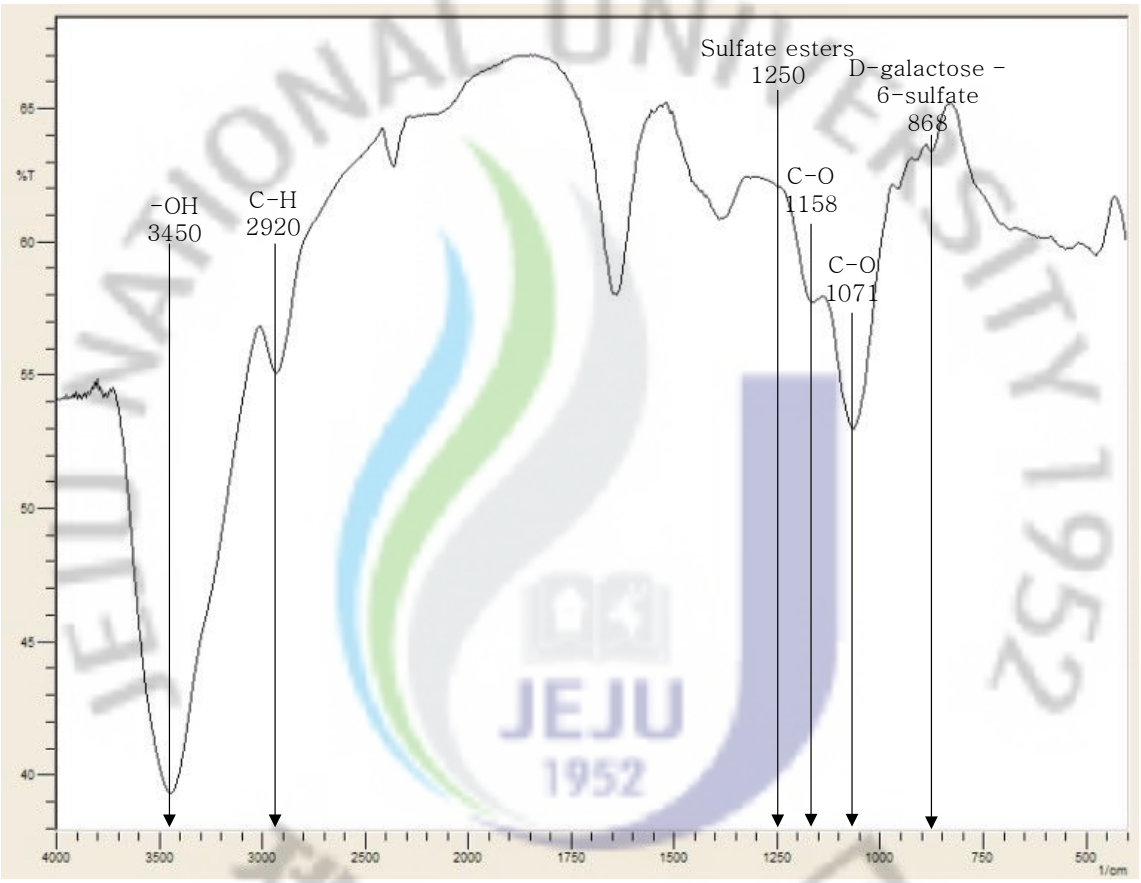


Fig. 9. FT-IR spectrum of agarose prepared from agar by Method C (DMSO extraction and Na_2EDTA washing).

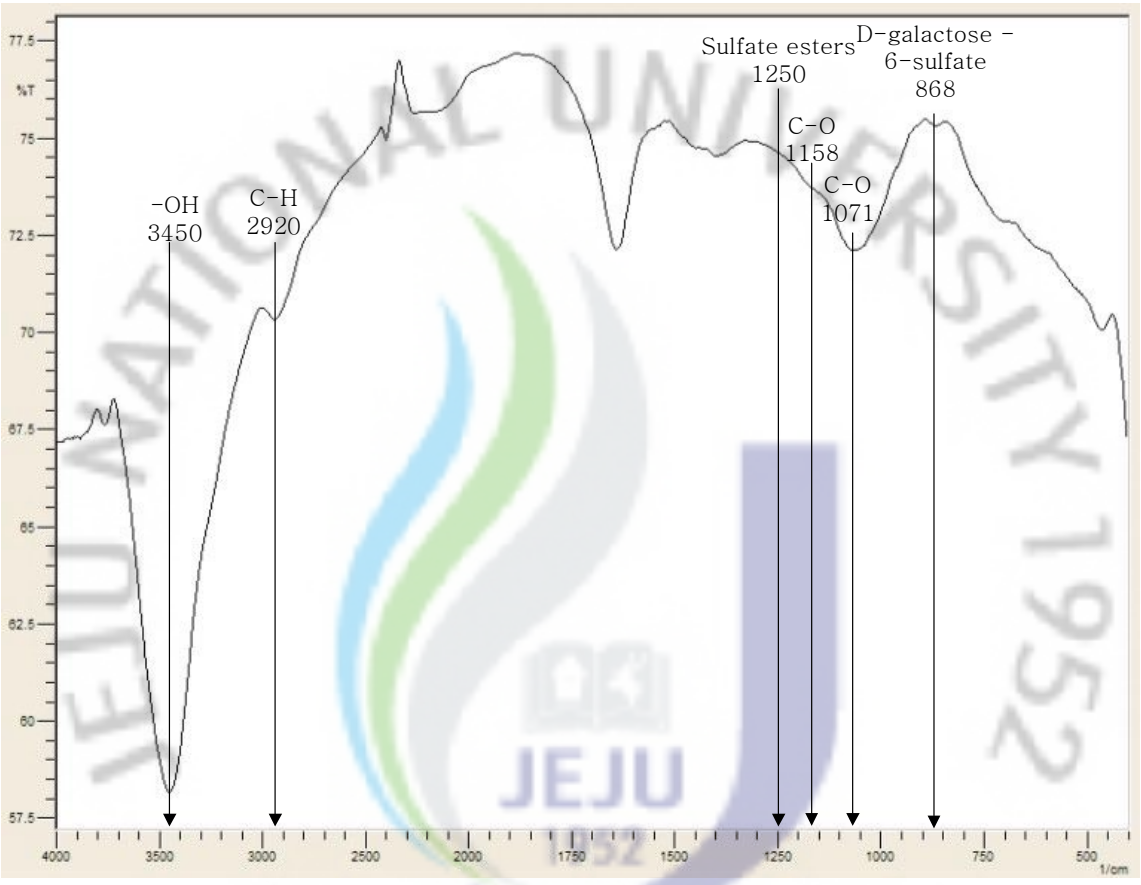


Fig. 10. FT-IR spectrum of standard agarose.

6. 정제 아가로스의 ^{13}C NMR spectroscopy

Nuclear magnetic resonace(NMR)는 홍조류 유래 다당류의 구조분석에 가장 효과적인 방법으로 알려져 있으나(41), 본 연구에서는 정제 아가로스의 정제도를 확인하는 차원에서 표품 아가로스와 함께 ^{13}C NMR spectroscopy를 수행하였다.

DMSO의 추출 및 Na_2EDTA 세척으로 제조한 아가로스(Method C; A)와 표품 아가로스(B)의 ^{13}C NMR의 결과는 Fig. 11과 같다. 두 시료간의 탄소 위치별(chemical shifts) ppm은 거의 일치하여, 두 시료물질은 동일한 아가로스 물질임을 알 수 있었다. 한편, 아가로스는 NMR상에서 12개의 agarobiose 탄소 시그널이 나타나야 되지만, 본 NMR에서는 11개 탄소 시그널이 나타났다. 이는 galactose의 6번 탄소 시그널이 타 탄소의 시그널 보다 강하게 나타나 겹쳐진 것으로 추측된다. Gamini는 아가로스의 ^{13}C NMR spectroscopy 분석한 결과, 80℃ 온도조건에서 D_2O와 DMSO-d_6의 용매에 따라 galactose 2번 탄소의 ppm shift를 보고(42)한 바 있는데, 본 연구에서 겹쳐진 시그널도 galactose 2번 탄소가 shift되어 galactose의 6번 탄소와 겹쳐 진 것으로 사료된다. 한편 분석한 2개의 아가로스 모두 agarobiose 탄소 12개 이외에 6-O-methyl-D-galactose, 2-O-methyl-L- 3,6-anhydrogalactose 등과 같은 메칠기의 탄소는 검출되지 않았다.

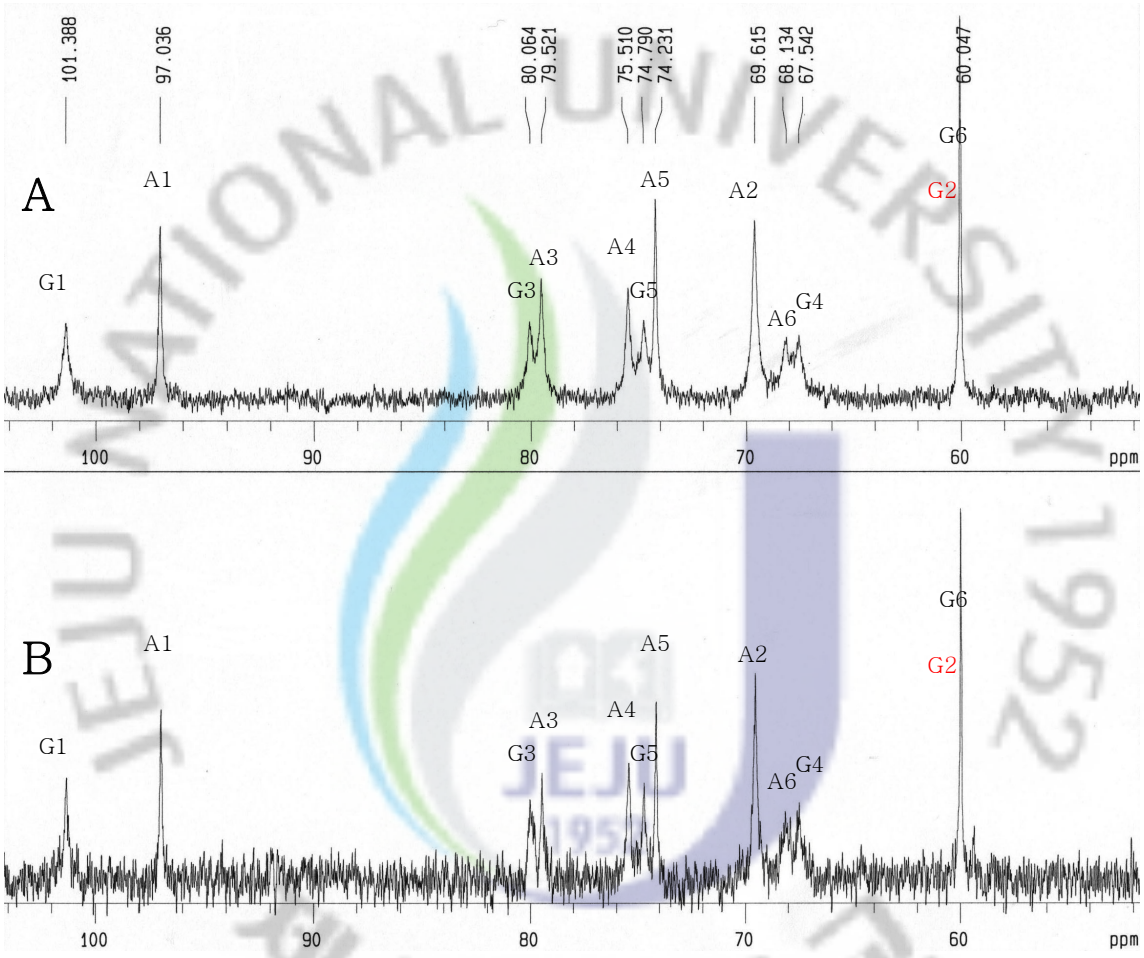


Fig. 11. ^{13}C NMR spectra of the method C (DMSO extraction and Na_2EDTA washing) agarose (A) and standard agarose (B).

7. 입자 표면 분석

김과 손(33)은 한천을 제조할 때 건조조건에 따라 입자 표면은 다른 구조를 나타낸다고 보고하였다.

본 연구에서 제조된 한천 입자의 형태 및 표면구조의 형상은 기공과 균열이 발견되지 않아 매우 견고하며, 표면적이 적고 입자간의 내부결합력이 강한 구조로 되어 있었다(Fig 12).

또한, DMSO에 용해된 아가로스를 아세톤 침전한 후 아세톤으로 탈수하여 제조한 아가로스 입자는 표면적이 넓고 입자 비중이 낮은 망상구조와 같은 형태로 존재하였다(Fig 13).

한편, 표품 아가로스는 많은 굴곡, 다량의 기공과 요철이 관찰되어 최종 건조 방법은 유기 용매 침전 과정을 통한 동결건조법 혹은 저비점 용매 휘발에 의한 건조라 추정된다(Fig 14).

이러한 입자구조는 전기영동 겔 성형 시 용해 속도에 영향을 미칠 수 있으며, 결과적으로 겔 제작 소요시간에 중요한 변수 요인으로 결정될 수 있다. 아가로스의 용해 시간이 길어짐에 따라 용매의 휘발이 많아져 사용자가 원하는 겔의 농도보다 높아질 수 있으므로 전기영동 조작시에 아가로스의 신속한 용해는 중요한 요소라 할 수 있다.

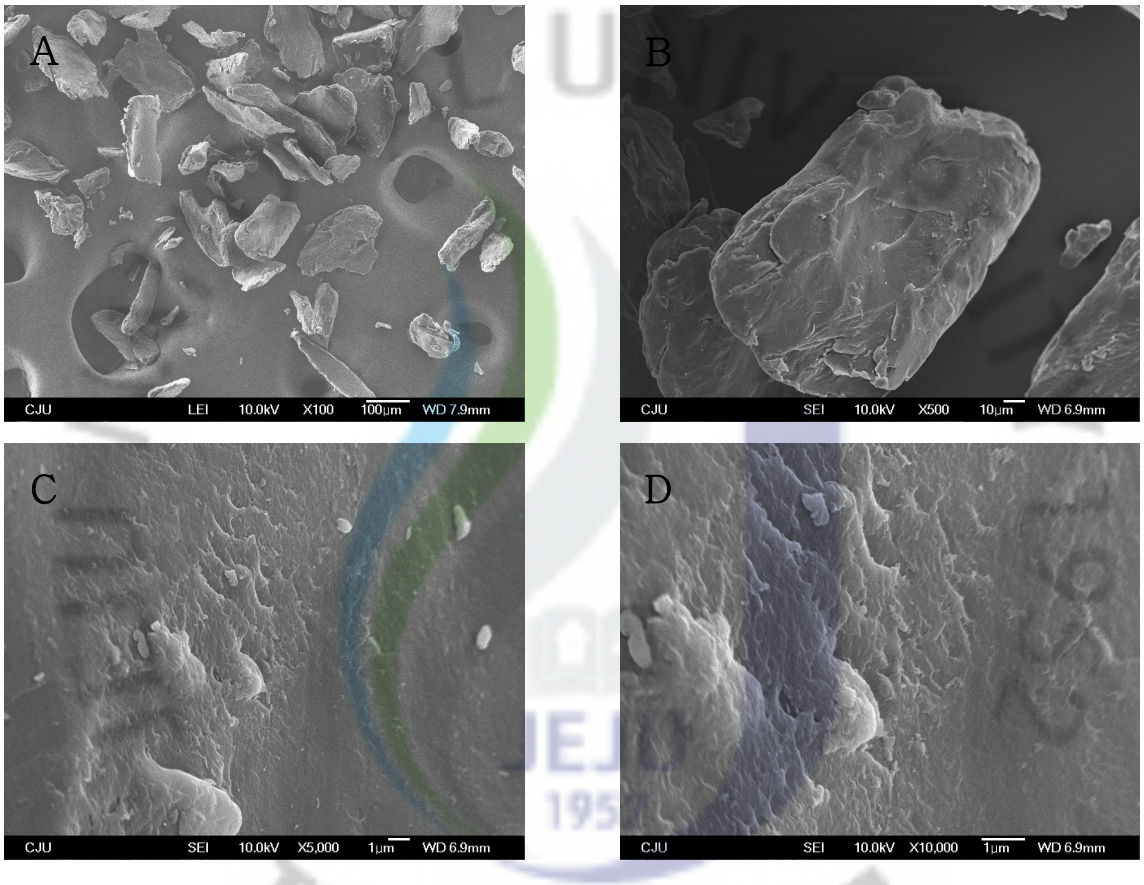


Fig 12. Field emission scanning electron microscopic photographs of agar powder.

A : 100 ×, B : 500 ×, C : 5000 ×, D : 10000 ×.

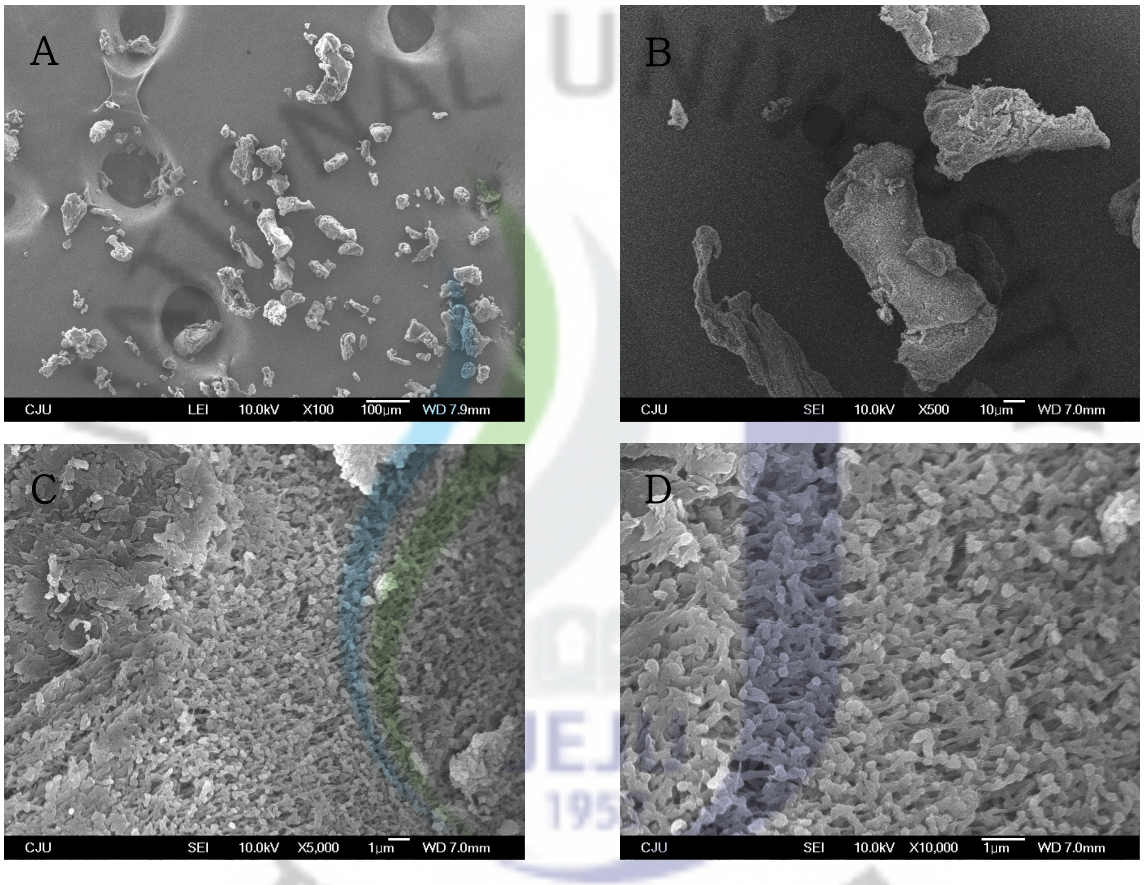


Fig. 13. Field emission scanning electron microscopic photographs of agarose powder obtained from method C (DMSO extraction and Na_2EDTA washing).
A : 100 ×, B : 500 ×, C : 5000 ×, D : 10000 ×.

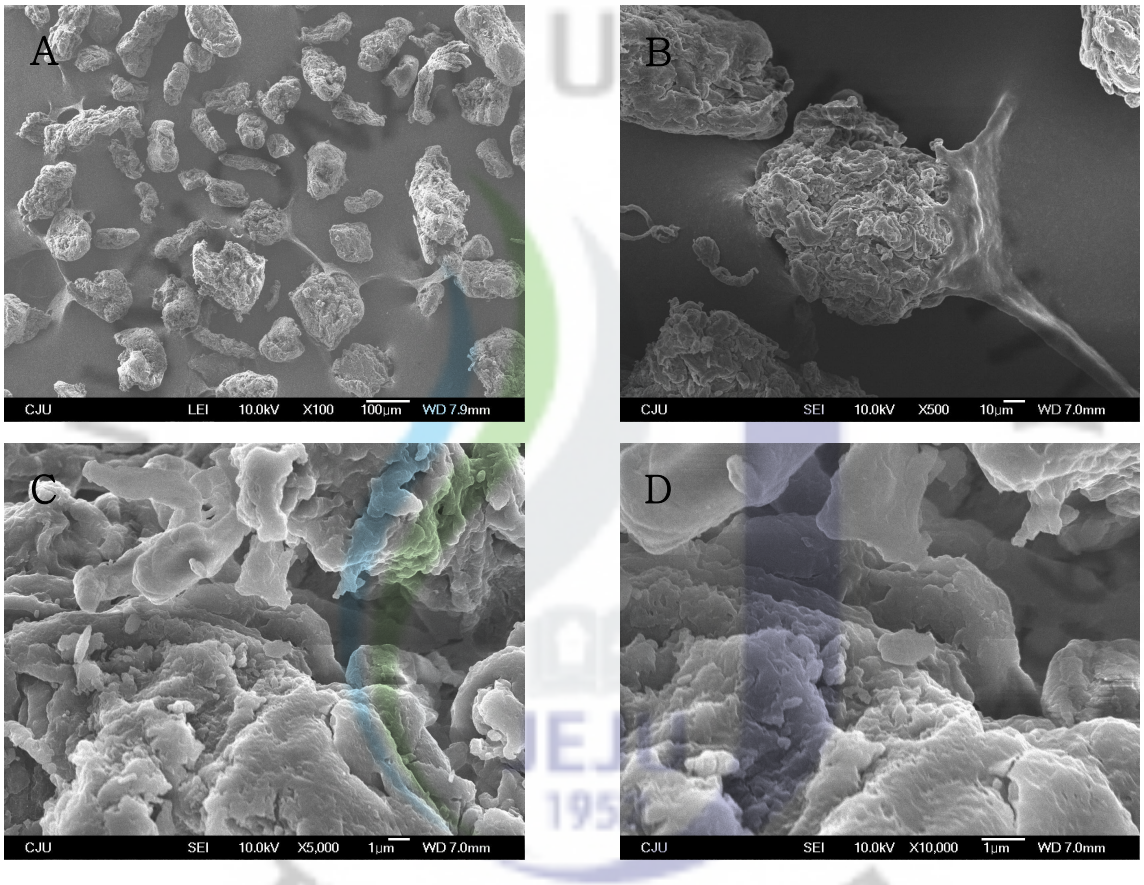


Fig. 14. Field emission scanning electron microscopic photographs of standard agarose powder.

A : 100 ×, B : 500 ×, C : 5000 ×, D : 10000 ×.

Ⅳ. 요약

제주산 우뭇가사리로부터 황산 첨가량에 따라 제조된 한천의 이화학적 특성을 분석하였으며, 이로부터 제조한 한천을 DMSO 추출, 증류수 및 EDTA 세척을 적용하여 제조한 아가로스를 표품 아가로스와 비교하였다.

한천 제조에서 자숙 과정에 황산 첨가량이 많을수록 겔강도, 융해온도 및 응고온도는 감소하였으나 황산기의 함량은 거의 변화가 없었다. 30 μL/L(pH 3.28)의 황산으로 추출·제조한 한천을 DMSO 추출과 Na_2EDTA 세척을 순차적으로 정제하였을 때 황산기 함량은 0.06%, 겔강도는 2111 g/cm^2, EEO(-m_r)는 0.08로 표품 아가로스와 비슷한 이화학적 특성을 나타내었다. 겔의 투명도는 정제한 아가로스가 표품 아가로스보다 우수하였으며, DNA 전기영동에서는 실험에 사용된 2개의 아가로스 모두 DNA 편자의 분리와 전개속도는 매우 유사하였다.

한천 및 정제 아가로스 그리고 표품 아가로스의 FT-IR spectra 측정 결과에서 정제 아가로스와 표품 아가로스는 거의 같은 흡수파장 범위를 나타내었으며, 한천은 아가로스와 달리 전체 황산기를 나타내는 1250 cm^{-1} 부근에서 피크를 나타내었다. 정제 아가로스 및 표품 아가로스는 ^{13}C NMR 측정에서 탄소 피크가 거의 일치하는 ppm을 나타내어 두 시료는 동일한 물질임을 알 수 있었다. 전자주사현미경의 입자 표면분석에서 한천은 굴곡과 기공이 존재하지 않는 견고한 형태를 나타내었고, 정제 아가로스는 기공이 다량 존재하여 표면적이 매우 넓은 형상이었으며, 표품 아가로스는 굴곡이 많이 형성되어 용매가 쉽게 침투할 수 있는 구조로 되어 있었다.

이상의 결과를 종합해 보면, DMSO 추출 및 EDTA 세척법으로 정제한 아가로스는 시판되고 있는 표품 아가로스와 이화학적 특성에서 큰 차이가 없었으며, ^{13}C NMR 등의 기기분석결과도 유사하게 나타나, 본 연구에 적용한 상기 방법은 향후 추가적인 Scale-up 실험 등이 보완된다면 고순도 아가로스의 산업적 대량생산을 위한 유용한 방법으로 활용이 가능하리라 판단되었다.

참고문헌

1. Armisen R. World-wide use and importance of *Gracilaria*. J. Appl. Phycol. 7: 231-243 (1995)

2. Armisen R, Galactas F. Production, properties and uses of agar. In: McHugh DJ (ed.). Production and Utilisation of Products from Commercial Seaweeds. FAO Fish. Tech. Paper 288: 1 - 57 (1987)

3. Ministry of Maritime Affairs and Fisheries. 2006 Fishery Production Survey. p. 80 (2007)

4. Korean Fisheries Society. Annual Statistics of Fisheries, Ministry of Maritime Affairs and Fisheries, Korea (in Korean). (1998)

5. Araki C, Hirase S. Studies on the chemical constitution of agar-agar. Bull. Chem. Soc. Jap. 33: 597-600 (1960)

6. Suzuki H, Sawai Y, Takada M. The Effect of Apparent Molecular Weigh and Components of Agar on Gel Formation. Food Sci. Technol. Res. 7: 280 - 284 (2001)

7. Tagawa S. Separation of agar-agar by dimethyl sulfoxide into agarose and agaropectin. J. Shiminoseki Fish. Univ. 14: 165-171 (1966)

8. Kang HI, Ko MS, Kim HJ, Kim WS, Bae TJ. Fluid properties and Quality of agar solution from cheju seaweed, *Gellidium amansii*. J. Kor. Fish. Soc. 29: 716-721 (1985)

9. Yoon HS, Park YH. Studies on the composition of agarose and agaropectin in agar-agar. (2) Seasonal Variation in the composition of agarose and agaropectin in agar prepared from *Gellidium amansii*. Bull. Kor. Fish. Soc. 18: 37-43 (1985)

10. Guiseley KB, Kirkpatrick FH, Provonchee RB, Dumais MM, Nochumson S. A further fractionation of agarose. Hydrobiologia 261: 505-511 (1993)

11. Duckworth M, Yaphe W. The structure of agar. Part I. Fractionation of a complex mixture of polysaccharides. Carbohyd. Res. 16: 189-197 (1971)

12. Fuse T, Katsuura K. The properties of agarose and agaropectin solution isolated by sodium iodide. Kogyo Kagaku Zasshi. 70: 724-728 (1967)

13. Araki C. Acetylation of agar like substance of *Gelidium amansii*. J. Chem. Soc. Jpn. 58: 1338-1350 (1937)

14. Glickman SA, Shubtosova IG. Physical chemistry of agar. Part Ⅱ. Theory and practice of agar fractionation. Koll. Zhur. 16: 281-286 (1957)

15. Hjerten S. A new method for preparation of agarose for gel electrophoresis. Biochim. Biophys. Acta. 62: 445-449 (1962)

16. Russell B, Mead TH, Polson A. A method of preparing agarose. Biochim. Biophys. Acta. 86: 169-174 (1964)

17. Zabin B. Agarose use of D.E.A.E. cellulose to remove the anionic polysaccharides from agar. U.S. patent 3.423.396 (1966)

18. Azhitskii GY, Kobozev GV. Use of ammonium sulfate to first eliminate agaropectin and then precipitate agarose. Lab. Delo 3: 143-145 (1967)

19. Baterling SJ. A simple method for the preparation of agarose. Clin. Chem. 15: 1002-1005 (1969)

20. Fuse T, Goto F. Some properties of agarose and agaropectin isolated from various mucilaginous substances of red seaweeds. Agr. Biol. Chem. 35: 799-804 (1971)

21. Izumi K. A new method for fractionation of agar. Agr. Biol. Chem. 34: 1739-1740 (1970)

22. Allan GC, Johnson PG. Marine polymers. Part I. A new procedure for the fractionation of agar. Carbohyd. Res. 17: 234-236 (1971)

23. Patil NB, Kale NR. A simple procedure for the preparation of agarose for gel electrophoresis. Ind. J. Biochem. Biophys. 10: 160-163 (1973)

24. Jeon YJ, Yasantha A, Lee JH. Characterization of agarose product from Agar using DMSO. Algae 20: 61-67 (2005)

25. Do JR. Extraction and purification of agar from *Gelidium amansii*. J. Kor. Fish. Soc. 30: 423-427 (1997)

26. AOAC. Official Method of Analysis of AOAC Intl. 16th ed. Method 991.43. Association of Official Analytical Communities, Arlington, VA, USA (1995)

27. Dodgson KS, Price RG. A note on the determination of the ester sulphate content of sulphated polysaccharides. Biochem. J. 84: 106-110 (1962)

28. Guiseley KB. The relationship between methoxyl content and gelling temperature of agarose. Carbohyd. Res. 13: 247-256 (1970)

29. Praiboon J, Chirapart A, Akakabe Y, Bhumibhamon O, Kajiwarac T. Physical and chemical characterization of agar polysaccharides extracted from the Thai and Japanese species of *Gracilaria*. scienceasia 32: 1513-1874 (2006)

30. Kim DS, Kim HR, Kim JH, Pyeun JH. Pilot-scale preparation and physicochemical characteristics of microbiological agar from *Gelidium amansii* in Korea. J. Kor. Fish. Soc. 33: 70-74 (2000)

31. Mollet JC, Rahaoui A, Lemoine Y. Yield, chemical composition and gel strength of agarocolloids of *Gracilaria gracilis*, *Gracilariopsis longissima* and the newly reported *Gracilaria* cf. *vermiculophylla* from Roscoff (Brittany, France) J. Appl. Phycol. 10: 59-66 (1998)

32. Kirkpatrick FH, Gulseley K, Provonchee R, Nochumson S. High gel strength low electroendosmosis agarose. U.S. patent 4,983,268 (1991)

33. Kim HG, Son HJ. Comparison of Thermal properties and surface structures of unmodified, spray-dried, and extrusion-dried agar. Kor. J. Food and Nutr. 10: 234-240 (1997)

34. Arnot S, Fulmer A, Scott WE, Deea ICM, Morehouse R, Rees DA. The agarose double helix and its function in agarose gel structure. J. Mol. Biol. 90: 269-284 (1974)

35. Corongiu G, Forlini SL, Clementi E. Hydration of agarose double helix: a Montecarlo simulation. Int. J. Quant. Chem.: Quant. Biol. Symp. 10: 227-291 (1983)

36. Tagawa S. Chemical studies on manufacture of agar-agar. Suisan Daigakko

Kenkyu Hoboku 17:83 - 86 (1968)

37. Perlman D. Galactomannan-agarose binary gel for uncleic acid electrophoresis. U.S. patent 5,230,832 (1993)

38. Go JH, Kim YH, Son HS, Hwang SY, Kim YS, Cho EW. Preparation of agarose gel including beta-1,3-glucan. Kor. patent 10-0,566,602 (2006)

39. Wieme RJ. Agar Gel Electrophoresis. Elsevier Publishing Company. New York pp. 110-113 (1965)

40. Do JR, Oh SW. Preparation of agarose from *Gelidium amansii* for gel electrophoresis using various purification methods and its resolution characteristics for DNA. Kor. J. Food Sci. Technol. 31: 110-114 (1999)

41. Murano E. Chemical structure and quality of agars from. *Gracilaria*. J. appl. Phycol. 7: 245 - 254 (1995)

42. Gamini A, Toffanin R, Murano E, Rizzo R. Hydrogen-bonding and conformation of agarose in methyl sulfoxide and aqueous solutions investigated by ^{1}H and ^{13}C NMR spectroscopy. Carbohyd. Res. 304: 293-302 (1997)

감사의 글

지금은 끝이 아닌 다시 새로운 도전이라 생각하며, 앞으로도 더욱 노력하는 사람으로 다시 다짐하여 봅니다.

먼저, 연구의 재미와 넓은 안목을 가르쳐 주신 임상빈 교수님께 깊이 감사드립니다.

건강 비법을 선물해 주신 송대진 교수님, 자신감과 용기를 심어 주신 김수현 교수님과 자상하게 격려해 주신 고영환 교수님께 감사를 전합니다.

저의 부족함을 채워 주신 강영주 교수님과 보다 높은 곳으로 이끌어 주신 하진환 교수님께 머리 숙여 감사드립니다.

작은 결실에도 큰 칭찬으로 힘을 넣어 주신 전유진 교수님, 연구에 매진할 수 있도록 배려해주신 강병식 사장님과 본 연구에 제 일처럼 상담과 고민해 주신 이정석 박사님께 진심으로 감사드립니다.

마음까지 따뜻하게 홍차를 대접해 주신 마흔다 선생님, 제 연구에 큰 도움을 주셨던 오철홍 선생님과 오태헌 선생님께 고마운 마음을 깊이 간직하고자 합니다.

친정 같은 분리공정방에 미보와 재성이, 한라바이오랩 동료들, 일상을 함께하는 조미란 연구원과 동규군, 경석이에게도 고마움을 전합니다.

사랑하는 부모님과 예쁜 나경이 그리고 나경이 엄마에게 이 결실을 바칩니다.