

제주산 우뚝가사리(*Gelidium amansii*)로부터 DMSO 추출과 EDTA 수세법에 의한 상용화 아가로스 제조

강태환¹ · 이승홍¹ · 백종석² · 강병식³ · 이정석⁴ · 이남호^{2*} · 전유진^{1,5*}

e-제주팜, ¹제주대학교 해양생명과학과, ²제주대학교 화학과, ³한라바이오템,
⁴제주관광어브랜드육성사업단, ⁵제주대학교 해양과학환경연구소

Preparation of Commercial Agarose from Jeju Seaweed, *Gelidium amansii* using DMSO Extraction and EDTA Washing

Tai-Hwan Kang, Seung-Hong Lee¹, Jong-Seok Baik², Byung-Sik Kang³,
Jung-Suck Lee⁴, Nam-Ho Lee^{2*} and You-Jin Jeon^{1,5*}

e-Jeju Farm Co., Jeju 690-071, Korea

¹Department of Marine life Science, Jeju National University, Jeju 690-756, Korea

²Department of Chemistry, Jeju National University, Jeju 690-756, Korea

³Halla Bio Lab Co. LTD., Jeju 690-150, Korea

⁴Jeju Olive Flounder Global Brand Promotion Agency, Jeju 695-814, Korea

⁵Marine and Environmental Research Institute, Jeju National University, Jeju 695-814, Korea

Agar was prepared from *Gelidium amansii* collected from Jeju Island, South Korea. This agar preparation has high gel strength and low sulfate content compared with *G. amansii* agar from Morocco. Accordingly, agarose was made from the Jeju agar through the consecutive refining processes of dimethyl sulfoxide (DMSO) extraction and ethylene diamine tetra acetic acid (EDTA) washing. The physicochemical properties of the resulting agarose were compared with those from agarose prepared using only DMSO extraction. Consecutive DMSO extraction and EDTA washing more strongly affected the physicochemical properties of the agarose (purified agarose) compared with the use of DMSO extraction alone. These properties were similar to those of commercial agarose used for electrophoresis. In DNA electrophoresis, the separation and movement speed of the purified agarose were similar to those of the commercial agarose. In a ¹³C NMR analysis, the purified agarose exhibited the same carbon peak as the commercial agarose. When observed under scanning electron microscopy, the agar had an even and smooth surface without irregularities or pores, and the purified agarose had a wide surface area with a large number of pores; the commercial agarose had an irregular surface that would allow the solvent to easily permeate. These results illustrate that the physicochemical properties of agarose prepared from DMSO extraction and EDTA washing were more effective than those observed after DMSO extraction alone; thus, these processes used in succession will be useful in agarose industries.

Key words: *Gelidium amansii*, Jeju Island, DMSO extraction and EDTA washing processing, Agarose, Physicochemical properties

서 론

우뚝가사리는 꼬시래기 등과 함께 한천의 주원료로 이용되는 홍조식물로(Armisen, 1995), 칠레, 남아프리카, 한국, 일본, 인도네시아 및 미국 캘리포니아 해역에 분포하고 있다(Armisen and Galactas, 1987). 해양수산부 어업생산통계자료에 의하면 국내 우뚝가사리의 생산량은 2006년 기준으로 약 3,000 M/T

이며, 이 중 제주도의 생산량은 약 2,700 M/T으로 제주도의 생산 비중이 매우 높은 편이다(Ministry of Maritime Affairs and Fisheries, 2006).

현재 국내산 우뚝가사리의 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(Korean Fisheries Society, 1998). 최근에는 해외 저가

*Corresponding author: youjinj@jejunu.ac.kr / namho@jejunu.ac.kr

우뭇가사리의 대량 수입으로 제주산 우뭇가사리의 판매량이 급격히 감소되어 지역 어민들의 경제적 손실이 발생하고 있다. 따라서 최근 기존의 건조품 내지 한천 생산에 국한된 제주산 우뭇가사리를 활용한 새로운 제품을 개발할 필요성이 대두되고 있다.

한천원료로부터 열수 추출하여 얻어지는 한천은 1,3-β-D-galactose와 1,4-L-3, 6-anhydrogalactose가 직쇄상으로 결합되어 agarbiose를 이루고, agarbiose가 반복적으로 연결되어 분자량이 수만에서 수십만을 이루는 점질성 복합 다당류이며(Araki and Hirase, 1960), 겔강도, 점도 및 용해 온도는 분자량에 의존성을 나타낸다(Suzuki et al., 2001). 또한, 한천은 아가로스와 아가로펙틴으로 구성되어 있는데, 구성비는 계절, 지역 및 한천의 원료 등에 따라 다르나 약 7:3의 비율로 알려져 있다(Tagawa, 1966; Kang et al., 1985; Yoon and Park, 1985). 아가로스는 아가로펙틴 보다 큰 분자량을 가지며(Guiseley et al., 1993), 황산기 및 pyruvic acid 등과 같은 극성 잔기가 거의 존재하지 않는다(Duckworth and Yaphe, 1971). 따라서 아가로스와 아가로펙틴의 조성 비율에 따라 한천의 물성은 크게 달라진다고 보고되었다(Tagawa, 1966; Fuse and Katsuura, 1967). 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. 고순도 아가로스는 생명공학과 분자생물공학 산업에 이용되는 필수 시약이며, 높은 부가가치로 인해 현재에도 효과적으로 아가로스를 생산하기 위한 연구는 꾸준히 진행되고 있다.

아가로스의 정제법은 아세틸화에 의한 아가로스 및 아가로펙틴의 분획 방법(Araki, 1937)과, 선택적인 용해도차를 이용한 방법(Glickman and Shubtosova, 1957), 4급 암모늄 침전법(Hjerten, 1962), 폴리에칠렌 글리콜 침전법(Russell et al., 1964), 디메틸 설퍼옥사이드(dimethyl sulfoxide, DMSO) 추출법(Tagawa, 1966), 이온 교환수지법(Zabin, 1966), 암모늄 설페이트 침전법(Azhitskii and Kobozev, 1967), 불용성 지지체를 이용한 흡착법(Baterling, 1969), 아크리놀(acrinol) 침전법(Fuse and Goto, 1971), 겔 크로마토그래피(Izumi, 1970), 키틴·키틴산 침전법(Allan and Johnson, 1971) 및 아가로스 침전법(Patil and Kale, 1973) 등 약 40여 가지의 방법이 알려져 있으나 실제 대량 생산공정에서의 세부적 정제방법은 각 기업에서 자체기술로 보유하고 있으므로 구체적인 정제 기술과 공정은 잘 알려져 있지 않다.

아가로스 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 아가로펙틴을 분리시킬 수 있어 아가로스의 생산을 위한 용매로서 응용이 가능하다. Kang et al. (1985)과 Yoon and Park (1985) 연구에서 아가로스 및 아가로펙틴의 조성비 연구에

DMSO 추출법이 사용되었고, 최근 Jeon et al. (2005)도 DMSO 추출법을 이용한 전기영동용 아가로스의 생산을 위한 연구가 시도 되었으나, 황산기 함량이 0.29%로 시판 아가로스의 품질 수준에는 미치지 못하였다.

한편, Baterling (1969)이 보고한 불용성 지지체를 이용한 흡착법은 한천을 ethylene diamine tetra acetic acid (EDTA)로 세척하여 황산기를 제거하고, 수산화알루미늄 겔이 아가로펙틴을 흡착하는 원리를 적용하여 고순도 아가로스를 제조하는 방법이다. 그러나 이 방법은 EDTA의 장시간 세척에 의한 한천의 가수분해로 고강도 아가로스 제조가 불가능하나(Do, 1997), 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 연구에서는 제주산 우뭇가사리로부터 한천을 추출한 후 대량생산공정에 적합한 DMSO 추출법과 EDTA 수세법을 병용하여 고순도 아가로스를 제조한 후 제주산 우뭇가사리의 고부가 활용을 위하여 그 품질을 비교·검토하였다.

재료 및 방법

재 료

제주산 우뭇가사리는 제주시 하도 어촌계에서 구입한 후 담수로 수세하고, 건조공정을 5회 반복하여 탈색한 다음 밀봉·보관하면서 사용하였으며, 모로코산 우뭇가사리는 경남 밀양에 소재하는 밀양한천에서 구입하여 실험에 사용하였다. 한편, 대조용 표품으로서 사용된 전기영동용 아가로스는 Seakem LE 아가로스(Lonza Co., USA)를 구입하여 비교·분석하였다.

한천제조

건조 보관된 30 g의 우뭇가사리를 1 L 담수가 들어간 Duran 병에 취하고 98%의 황산(Daejung chemicals Co., Korea)을 이용하여 pH 4로 조절한 후 autoclave (HS-60, Hanshin medical Co., Korea)에서 120℃에서 1시간 동안 가압 추출하였다. 그런 다음 1 N NaOH를 사용하여 중화시키고 나일론 천으로 여과·응고 시킨 후 2 cm 정육면체의 형태로 절단하였다. 이를 -20℃ 냉동고에 하루 동안 동결시킨 후 해동하여 담수로 3회 세척한 다음 탈수기(W-100T, Hanil, Korea)를 이용하여 수분을 제거하고, 80℃에서 건조 후 분쇄(1093 Cyclotec sample mill, Foss, Sweden)하였다.

제조된 한천으로부터 아가로스 제조

아가로스 제조는 2가지 방법으로 각각 제조하였다. 즉, DMSO 추출법은 한천 10 g을 200 mL DMSO (Daejung chemicals Co., Korea)와 함께 실온에서 2시간 교반시킨 다음 원심분리(10,000×g, 30 min)하여 상층액을 3배 부피의 아세톤에 순차적으로 침전시키고, 침전된 아가로스를 아세톤으로 5회 세척하였다. 이를 회전 증발 농축기를 사용하여 40℃ 이하 온도에서

감압·건조하여 제조하였다.

한편, DMSO 추출 및 EDTA 수세를 병용한 추출법은 DMSO 추출법과 동일한 방법으로 아가로스를 침전시킨 후 0.01 M의 Na₂EDTA 용액 200 mL로 하루밤 교반하였고, 증류수로 3회 세척한 다음 아세톤으로 탈수하여 40°C 이하에서 감압 건조하는 방법으로 아가로스를 제조하였다.

수분, 황산기 및 아가로스 함량 측정

수분 함량은 적외선 수분측정기(FD-600, KETT Co., Japan)을 사용하여 측정하였다. 황산기 함량 Dodgson and Price (1962)의 방법에 따라 측정하였다. 3 mg의 시료를 1 N HCl로 105°C에서 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 BaCl₂-gelatin 시약 1 mL (증류수 400 mL에 gelatin 2 g을 넣고 65°C에서 용해 후 4°C에서 하루밤 방치한 뒤 BaCl₂ 2 g을 녹인 후 2시간 방치하여 제조)를 첨가하여 20 분간 방치한 다음 spectrophotometer (Libra S22, Biochrom Inc, England)를 이용하여 360 nm에서 흡광도를 측정하였다. 검량선은 K₂SO₄를 표준 황산염으로 하여 계산하였다. 아가로스 함량은 다음과 같이 측정하였다. 한천 10 g을 30배의 DMSO와 함께 상온에서 2시간 용해시킨 다음 원심분리 하여 상층액을 취하였다. 상층액을 농축한 다음 3배의 아세톤을 서서히 가하여 아가로스를 침전시킨 후 여과하였다. 그런 다음 40°C 이하에서 감압건조하여 건물당 아가로스 함량을 계산하였다.

응고 및 용해온도 측정

응고온도는 Guiseley (1970)의 방법에 따라 1% (w/v) 시료 용액을 외경 1.8 cm 시험관에 5 mL를 분주하고 20°C 실내에서 방치하면서 시료용액의 유동성을 관찰하여 표면이 고정되어 움직이지 않을 때의 온도를 3회 측정하여 평균값으로 나타내었다. 용해온도는 Praiboon et al. (2006)의 방법에 따라 다음과 같이 측정하였다. 1% (w/v) 시료 용액을 외경 2 cm 스크류 시험관에 5 mL를 분주하여 20°C에 하루밤 방치하고, 열풍건조기(OF-22GW, Jeio Tec, Korea)에 뒤집어서 고정 후 온도를 서서히 가열하여 시료 겔이 떨어지는 온도를 3회 측정하여 평균값으로 나타내었다.

겔강도 측정

겔강도는 Mollet et al. (1998)의 방법으로 분석하였다. 1% (w/v) 시료 용액을 외경 5 cm 원통형 틀에 30 mL를 분주하고 20°C 실내에서 하루밤 방치하여 레오메타(TA-XT 2, Stable Micro Systems, England)로 파단강도를 측정하였다.

DNA 전기영동

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

Table 1. Properties of agar extracted from different *Gelidium amansii*

	Moisture content (%)	Yield (%) ¹	Agarose (%)	Gel strength (g/cm ²)	Sulfate content (%)
Jeju agar	6.5±0.9 ²	44.5±0.9	58.8±1.7	535±16.1	0.8±0.03
Morocco agar	6.4±0.9	44.1±2.2	65.3±2.3	258±18.1	1.2±0.09

¹ values in dry basis.

²The data are represented as mean ± SD. of triplicate data.

¹³C NMR spectroscopy

DMSO-d₆ 700 mg에 30 mg의 시료를 용해시킨 후 실온 조건하에서 핵자기공명분광기(JNM-LA400, Jeol Ltd., Japan)를 사용하여 측정하였다.

입자표면분석

입자표면분석 Kim and Son (1997)의 방법에 따라 장방출주사전자현미경(Field Emission Scanning Electron Microscope; JSM-6700F, Jeol Ltd., Japan)을 이용하여 시료 입자 표면을 관찰하였다. 즉, 시료를 동결건조하여 수분을 완전히 제거시키고 카본 테이프가 부착된 구리 시료대에 도포한 후 palladium mix 로 코팅하여 100 및 500 배율로 표면구조를 관찰하였다.

결과 및 고찰

제조한 한천의 수분함량, 수율 및 아가로스 함량

제주산 및 모로코산 우뭇가사리로부터 추출 정제한 한천의 수분함량, 수율 및 아가로스 함량은 Table 1에 나타내었다. 제주산 및 모로코산 우뭇가사리 유래 한천의 수분함량은 각각 6.5% 및 6.4%로 큰 차이가 없었으며, 수율도 건물당 각각 44.5% 및 44.1%로 수분 함량과 마찬가지로 큰 차이를 보이지 않았다. 한편, 모로코산 우뭇가사리 유래 한천의 아가로스 함량이 65.3%로 제주산 우뭇가사리 유래 한천의 아가로스 함량(58.8%) 보다 많이 나타났다.

제조한 한천의 겔 강도 및 황산기 함량

제주산 및 모로코산 우뭇가사리로부터 정제한 한천의 겔 강도는 Table 1에 나타내었다. 제주산 우뭇가사리 유래 한천의 겔 강도는 535 g/cm²으로 모로코산 우뭇가사리 유래 한천의 258 g/cm² 보다 2배 이상 높은 값을 나타내었다. 겔 강도의 주요 결정 인자는 한천에 존재하는 황산기의 함량과 anhydrogalactose의 함량 등으로 알려져 있다. 제주산 우뭇가사리 유래 한천의 황산기 함량은 0.8%로 모로코산 우뭇가사리의 황산기 함량(1.2%) 보다 낮은 값을 나타내었다(Table 1). Kim et al. (2000)과 Do (1997)의 연구에서는 국내산 우뭇가사리로부터 제조된 한천은 황산기 함량이 1% 이상이었지만, 본 연구에서 제조한 한천은 그

Table 2. The physicochemical characteristics of agarose prepared from Jeju agar by different extraction methods

	Moisture content (%)	Yield (%) ¹	Gel strength (g/cm ²)	Sulfate content (%)	Melting point (°C)	Gelling point (°C)
DMSO	6.0±0.6 ²	57.6±1.2	1386±18.7	0.45±0.04	95.3±1.6	34.0±0.4
DMSO EDTA Washing	6.6±0.8	57.1±0.2	1365±13.5	0.06±0.02	95.7±0.6	33.7±0.6
Standard agarose	-	-	2168±20.5	0.05±0.01	96.2±0.3	35.7±0.06

¹ values in dry basis.

²The data are represented as mean ± SD. of triplicate data.

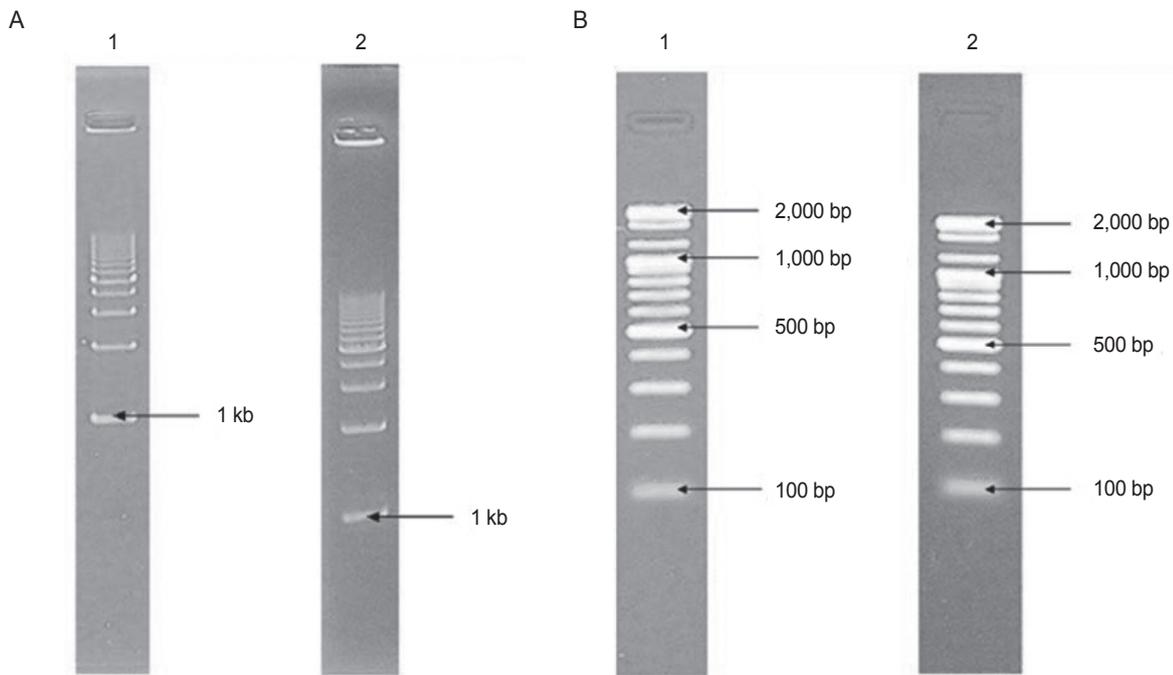


Fig. 1. Gel electrophoresis of 1 kb DNA ladder marker (from 205 bp to 10 kb) was fractionated in 1% agarose gels prepared from DMSO extraction agarose (lane A1) and DMSO extraction and EDTA washing agarose (lane A2). 100 bp DNA ladder marker (from 100 to 2,000 bp) was fractionated in 2% agarose gels made from DMSO extraction and EDTA washing agarose (lane B1) and commercial agarose (lane B2).

보다 낮은 함량을 나타내었는데, 이는 한천 제조 전 우뭇가사리의 탈색을 위한 세척과 한천 제조 과정 중 해동 후 담수 세척에 의하여 아가로펙틴과 함께 황산기가 상당량 제거 된 것으로 생각된다. 이상의 제조된 한천의 겔 강도 및 황산기 함량 등 이화학적 특성을 종합해 볼 때, 제주산 우뭇가사리가 모로코산 우뭇가사리 보다 아가로스 추출용 원료로서 적합하다는 결과를 얻을 수 있었다.

제주산 한천으로부터 DMSO 추출과 DMSO 추출 및 EDTA 수세를 병용한 추출법으로 제조한 아가로스의 이화학적 특성

DMSO 추출법은 아가르스를 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 아가로펙틴을 분리시킬 수 있어 아가로스의 생산을 위한 용매로서 응용이 가능하다. Kang et al. (1985)과 Yoon and Park (1985)의 연구에서 아가로스 및 아가로펙틴의 조성비 연구에 DMSO 추출법이 사용되었고, 최근 연구에 의하면 전기영동용 아가로스의 생산을 위하여 DMSO 추출법을 적용하였으나, 황산기 함량이 0.29%로 시판 아가로스의 품질 수준에는 미치지 못하였다고 보고하고 있다 (Jeon et al., 2005).

한편, 불용성 지지체를 이용한 아가로스 제조법은 한천을 EDTA로 세척하여 황산기를 제거하고, 수산화알루미늄 겔에 아가로펙틴을 흡착시키는 원리를 적용하여 고순도 아가르스를 제조하는 방법이다(Baterling, 1969). 그러나 이 방법은 EDTA의 장시간 세척시 한천의 가수분해로 고강도 아가로스 제조가 불가능하나(Do, 1997), EDTA의 탁월한 황산기 제거 효과와 조작의

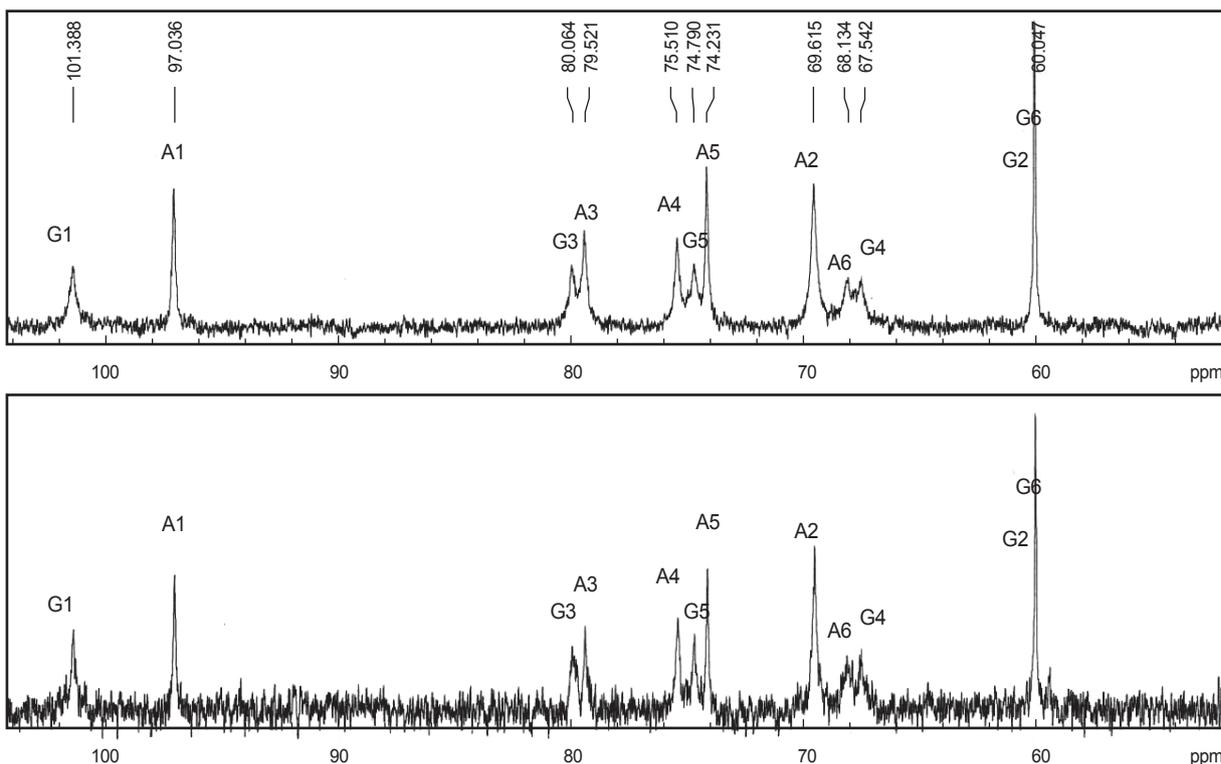


Fig. 2. ^{13}C NMR spectra of the DMSO extraction and EDTA washing agarose (A) and commercial agarose (B).

편의성 및 저비용 등의 장점을 가지고 있어 EDTA의 처리시간 조절에 따라 고순도 아가로스의 정제에 유용하게 응용할 수 있다.

따라서 본 연구에서는 한천으로부터 아가로스 제조시 응용할 수 있는 DMSO 추출법과 DMSO 추출법에 EDTA 수세공정 (DMSO 및 EDTA 병용 추출법)을 적용하여 고순도 병용 아가로스를 제조한 후 이화학적 특성을 비교·검토하였다.

수분함량 및 수율

제주산 우뭇가사리 유래 한천으로부터 DMSO 단독 추출법과 DMSO 추출 및 EDTA 수세를 병용한 방법을 이용하여 제조한 아가로스의 수분함량 및 수율은 Table 2에 나타내었다. Table 2에서 보는 바와 같이 DMSO 추출법 단독으로 아가로스를 제조한 경우 수분함량이 6.0%였으며, DMSO 추출 및 EDTA 수세법을 병용하여 추출한 아가로스의 수분함량은 6.6%로 약간 높았다. 수율은 2가지 방법으로 제조한 아가로스 모두 건물당 55% 이상이었는데, DMSO 추출법만으로 제조한 아가로스는 57.6%였으며, DMSO 추출 및 EDTA 수세법으로 제조한 아가로스의 경우 57.1%로 큰 차이는 보여지지 않았다.

황산기 함량

제주산 우뭇가사리 유래 한천으로부터 2가지 방법으로 제조한 아가로스의 황산기 함량을 Table 2에 나타내었다. DMSO 추

출법으로만 제조한 아가로스의 황산기 함량은 0.45%로 시판 병용 아가로스의 황산기 함량 기준인 0.12% 보다 매우 높은 값을 나타내었으나, DMSO 추출 및 EDTA 수세법을 적용하여 제조한 아가로스는 0.06%로 시판 아가로스과 비슷한 황산기 함량 결과를 나타내었다. DMSO 추출법으로만 황산기 함량이 낮은 고순도 아가로스를 제조하기 어려운 이유는 한천의 구조적 특징에 기인하는 것으로 추정된다. 즉, 아가로스과 아가로펙틴이 코일 형상으로 불규칙하게 뒤엉켜 존재하는(Arnot et al., 1974; Corongiu et al., 1983) 한천을 DMSO로 용해하면, 아가로스과 결합된 일부 아가로펙틴도 같이 분리되어 DMSO 용매에 존재하기 때문에 황산기의 함량이 높은 것으로 추측된다. 한편, Baterling (1969) 연구에서 한천을 0.02 M EDTA 용액에서 2일간 교반하면, 황산기가 0.97%에서 0.15%로 감소한다고 보고되었으며, Do (1997)도 EDTA의 가수분해 반응으로 인해 아가로스의 겔강도가 감소하였다고 보고한 바 있다. EDTA에 의한 황산기 제거효과는 아가로스과 아세톤 침전으로 표면적이 넓은 망상구조가 되어 EDTA 교반 세척에 의하여 아가로스과 잔존하는 아가로펙틴이 쉽게 이탈하고, 아울러 EDTA의 킬레이트 작용과 병행하여 아가로펙틴에 존재하는 황산기를 효과적으로 제거한 것으로 사료된다.

겔 강도

제주산 우뭇가사리 유래 한천으로부터 DMSO 추출법과

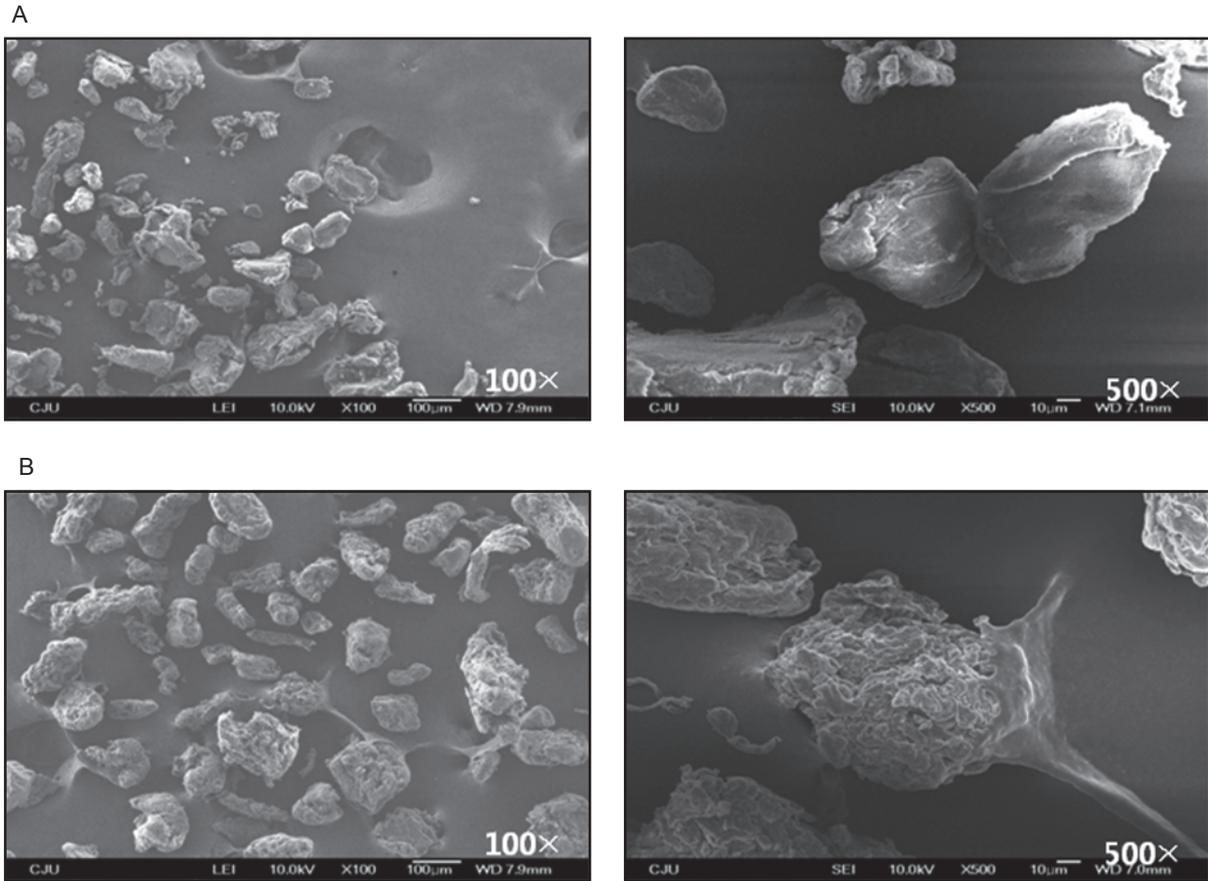


Fig. 3. Field emission scanning electron microscopic photographs of agarose powder obtained from DMSO extraction and EDTA washing method (A) and commercial agarose (B).

DMSO 추출 및 EDTA 수세법을 병용하여 제조한 아가로스 젤 강도는 Table 2에 나타내었다. DMSO 추출법으로만 제조한 아가로스의 젤 강도는 1,386 g/cm²로 DMSO 추출 및 EDTA 수세법으로 제조한 아가로스의 젤 강도(1,365 g/cm²) 보다 약간 높은 값을 나타내었는데, 이는 EDTA에 의해서 아가로스가 일부 가수분해 반응이 일어나 DMSO 단독 추출법으로 제조한 아가로스 보다 젤 강도가 낮아진 것으로 생각된다. 기 보고된 연구결과(Kim and Son, 1997)에서도 아가로스를 EDTA 용액으로 3회 세척한 경우 젤강도는는 618 g/cm²에서 527 g/cm²로 저하하였다는 결과가 있다. 따라서, EDTA를 아가로스 제조방법에 적용할 때에는 아가로스의 가수분해를 고려하여 적정시간으로 아가로를 세척하는 것이 중요하다고 할 수 있다. 한편, 2가지 방법으로 제조한 아가로스의 젤 강도 모두 일반적인 시판 범용 아가로스의 젤 강도 기준인 >1,200 g/cm² 보다 높은 값을 나타내어 적합하다고 사료된다.

용해온도 및 응고온도

제주산 우뭇가사리 유래 한천으로부터 DMSO 추출법과

DMSO 추출 및 EDTA 수세법을 이용하여 추출한 아가로스의 용해온도 및 응고온도는 Table 2에 나타내었다. 2가지 방법으로 제조한 아가로스의 용해온도는 약 95℃ 부근(DMSO 추출법: 95.3℃, DMSO 추출 및 EDTA 수세법: 95.7℃)으로 비슷한 범위를 나타내어 황산기의 제거에 따른 용해온도의 변화는 미미하다는 것을 알 수 있었다. Tagawa (1968)의 연구에서는 4종의 한천을 아가로스 및 아가로펙틴을 분리 후 용해 온도를 측정하였는데 한천과 아가로스의 용해 온도는 큰 변화를 나타내지 않았다고 보고하여 본 연구와 잘 일치하였다. 따라서 용해온도는 젤화능에 관여하는 황산기 및 anhydrogalactose의 함량보다 한천 분자량에 가장 큰 영향을 받는 것으로 추정된다. 한편, 2가지 방법으로 정제된 아가로스의 응고온도(DMSO 추출법: 34.0℃, DMSO 추출 및 EDTA 수세법: 33.7℃)도 용해온도와 마찬가지로 큰 차이가 없었다. 이상의 결과에서 DMSO 추출과 EDTA 수세 과정을 병행 했을 때, 아가로스의 황산기 함량은 0.06%, 용해온도 95.7℃ 및 응고온도 33.7℃로 시판되는 아가로스(황산기 함량은 0.05%, 용해온도 96.2℃ 및 응고온도 35.7℃)와 유사한 전기영동급 아가로스를 얻을 수 있었다. 하지만 젤 강도의 경우

1365 g/cm²로 시판되는 아가로스 겔 강도(2168 g/cm²)보다 낮은 값을 나타내었으나 일반적인 시판 범용 아가로스의 겔 강도 기준인 >1,200 g/cm² 보다 높은 값을 나타내어 적합하다고 사료된다.

아가로스의 DNA 전기영동

한천으로부터 아가로스를 제조한 후 겔 강도가 약하면, 장시간의 전기영동 중 buffer tank 내의 겔 온도가 올라갔을 때 망상구조의 변화를 가져와 밴드의 진행 속도가 구간별로 달라져 밴드의 일그러짐이나 smiling 현상이 일어난다. 또한, 겔 조작시 잘 찢어져 운반이나 slicing을 할 때 문제가 될 수도 있어 겔 강도가 높은 아가로스를 제조하는 것은 매우 중요하다. 제주산 우뭇가사리 유래 한천으로부터 DMSO 추출법과 DMSO 추출 및 EDTA 수세법으로 제조한 아가로스를 1% 농도의 겔로 제작하여 전기영동한 결과는 Fig. 1A와 같다. 전기영동에 있어 핵산의 전개속도에 관여하는 인자는 전압크기, buffer의 종류, 핵산 분자량의 크기, 아가로스의 농도, 아가로스의 EEO(-m) 등이 있는 것으로 알려져 있다. 아가로스를 겔화 시키면 전기적으로 중성 망상구조를 가진 형성하는데, 이 망상구조는 스핀지처럼 미세한 구멍들이 서로 통해 있어서 이 구멍의 크기보다 작은 물질은 어떤 힘을 걸어줄 때 일정 속도로 그 구멍을 통과하여 이동하게 된다. Fig. 1A에서 보는 바와 같이 1 Kb DNA 편자를 분리하기 위하여 아가로스를 매질로 전기영동한 결과, 해상도에서는 큰 차이가 없었으나 DMSO 단독 추출법으로 제조한 아가로스는 DMSO 추출 및 EDTA 수세법으로 제조한 아가로스 보다 느린 전개 속도를 나타내었고, 고분자 DNA의 분리가 용이하지 않음을 알 수 있었다. 한편, 2가지 방법으로 제조한 아가로스의 전기영동시 전개속도 차이는 황산기 함량의 차이에서 기인되는 것으로 추정된다. 이상의 전기영동 및 이화학적 분석 결과에서 보듯이 DMSO 추출과 EDTA 수세공정을 병행하여 아가로스를 제조하면 시판되고 있는 아가로스과 유사한 전기영동급 아가로스를 얻을 수 있음을 알 수 있다. 따라서 제주산 우뭇가사리로부터 DMSO 추출 및 EDTA 수세법으로 정제한 아가로스과 시판되고 있는 아가로스를 2%의 농도로 겔 성형 한 다음 전기영동한 결과(Fig. 1B) DNA 편자의 이동 속도와 각 편자간 분리능 그리고 해상도 모두 2개의 아가로스가 유사하여 DMSO 추출과 EDTA 수세 병행 추출법으로 제조한 아가로스는 상용화가 가능한 품질임을 알 수 있었다. Do and Oh (1999)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, 결과적으로 아가로스 겔 전기영동시 고해상도를 요구하는 경우 아가로스는 황산기, pyruvic acid 등과 같은 극성산기의 함량에 따라 품질이 좌우된다고 볼 수 있다.

¹³C NMR spectroscopy

Nuclear magnetic resonance (NMR)는 홍조류 유래 다당류

의 구조분석에 가장 효과적인 방법으로 알려져 있으나(Murano, 1995), 본 연구에서는 Fig. 2와 같이 제주산 우뭇가사리로부터 DMSO 추출과 EDTA 수세 병행 추출법으로 제조한 아가로스의 정제도를 확인하는 하나의 방법으로 시판되는 아가로스과 함께 ¹³C NMR spectroscopy를 수행하였다. 2가지 아가로스 간 탄소 위치별(chemical shifts) ppm은 거의 일치하여, 두 시료물질은 동일한 수준으로 정제된 아가로스임을 알 수 있었다. 한편, 아가로스는 NMR상에서 12개의 agarobiose 탄소 시그널이 나타나야 하지만, 본 NMR에서는 11개 탄소 시그널이 나타났다. 이는 galactose의 6번 탄소 시그널이 타 탄소의 시그널 보다 강하게 나타나 겹쳐진 것으로 추측된다. Gamini et al. (1997)는 아가로스의 ¹³C NMR spectroscopy 분석한 결과, 80℃ 온도 조건에서 D₂O와 DMSO-d₆의 용매에 따라 galactose 2번 탄소의 ppm shift를 보고한 바 있는데, 본 연구에서 겹쳐진 시그널도 galactose 2번 탄소가 shift되어 galactose의 6번 탄소와 겹쳐진 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 메틸기의 탄소는 검출되지 않았다.

입자표면 분석

우뭇가사리로부터 한천을 제조할 때 건조조건에 따라 입자 표면은 다른 구조를 나타낸다고 알려져 있다(Kim and Son, 1997). DMSO 추출 및 EDTA 수세법으로 제조한 아가로스 입자는 표면적이 넓고 입자 비중이 낮은 망상구조와 같은 형태로 존재하였으며(Fig. 3A), 시판되는 아가로스는 많은 굴곡, 다량의 기공과 요철이 관찰되었다(Fig. 3B). 2종의 아가로스 입자 표면이 조금 다른 것은 건조방법에 기인한 것으로 생각되며, 이러한 입자구조는 전기영동 겔 성형시 용해 속도에 영향을 미칠 수 있어 결과적으로 겔 제작 소요시간에 중요한 변수가 될 수 있다. 즉, 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.

이상의 결과를 종합해 보면, 제주산 우뭇가사리로부터 DMSO 추출 및 EDTA 수세법으로 정제한 아가로스는 시판되고 있는 아가로스과 이화학적 특성에서 큰 차이가 없는 것으로 나타났다. 따라서 본 연구에 적용한 상기 아가로스 제조 방법으로 향후 추가적인 Scale-up 실험 등이 보완된다면 제주산 우뭇가사리로부터 고순도 아가로스의 산업적 대량생산이 가능하리라 판단된다.

사 사

본 연구는 지식경제부와 한국산업기술진흥원에서 시행한 지역산업기술개발사업 연구비 지원에 의해 수행되었고, 이에 감사드립니다.

참고문헌

- Allan GC and Johnson PG. 1971. Marine polymers. Part I. A new procedure for the fractionation of agar. *Carbohydr Res* 17, 234-236.
- Araki C. 1937. Acetylation of agar like substance of *Gelidium amansii*. *J Chem Soc Jpn* 58, 1338-1350.
- Araki C and Hirase S. 1960. Studies on the chemical constitution of agar-agar. *Bull Chem Soc Jap* 33, 597-600.
- Armisen R. 1995. World-wide use and importance of *Gracilaria*. *J Appl Phycol* 7, 231-243.
- Armisen R and Galactas F. 1987. Production, properties and uses of agar. In: *Production and Utilisation of Products from Commercial Seaweeds*. McHugh DJ, ed. FAO Fish Tech Paper, 288, 1-57.
- Arnot S, Fulmer A, Scott WE, Deea ICM, Morehouse R and Rees DA. 1974. The agarose double helix and its function in agarose gel structure. *J Mol Biol* 90, 269-284.
- Azhitskii GY and Kobozev GV. 1967. Use of ammonium sulfate to first eliminate agaropectin and then precipitate agarose. *Lab Delo* 3, 143-145.
- Baterling SJ. 1969. A simple method for the preparation of agarose. *Clin Chem* 15, 1002-1005.
- Corongiu G, Forlini SL and Clementi E. 1983. Hydration of agarose double helix: a Montecarlo simulation. *Int J Quant Chem: Quant Biol Symp* 10, 227-291.
- Do JR. 1997. Extraction and purification of agar from *Gelidium amansii*. *J Kor Fish Soc* 30, 423-427.
- Do JR and Oh SW. 1999. 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.
- Dodgson KS and Price RG. 1962. A note on the determination of the ester sulphate content of sulphated polysaccharides. *Biochem J* 84, 106-110.
- Duckworth M and Yaphe W. 1971. The structure of agar. Part I. Fractionation of a complex mixture of polysaccharides. *Carbohydr Res* 16, 189-197.
- Fuse T and Goto F. 1971. Some properties of agarose and agaropectin isolated from various mucilaginous substances of red seaweeds. *Agr Biol Chem* 35, 799-804.
- Fuse T and Katsuura K. 1967. The properties of agarose and agaropectin solution isolated by sodium iodide. *Kogyo Kagaku Zasshi* 70, 724-728.
- Gamini A, Toffanin R, Murano E and Rizzo R. 1997. Hydrogen-bonding and conformation of agarose in methyl sulphoxide and aqueous solutions investigated by ^1H and ^{13}C NMR spectroscopy. *Carbohydr Res* 304, 293-302.
- Glickman SA and Shubtosova IG. 1957. Physical chemistry of agar. Part II. Theory and practice of agar fractionation. *Koll Zhur* 16, 281-286.
- Guiseley KB. 1970. The relationship between methoxyl content and gelling temperature of agarose. *Carbohydr Res* 13, 247-256.
- Guiseley KB, Kirkpatrick FH, Provonchee RB, Dumais MM, Nochumson S. 1993. A further fractionation of agarose. *Hydrobiologia* 261, 505-511.
- Hjerten S. 1962. A new method for preparation of agarose for gel electrophoresis. *Biochim Biophys Acta* 62, 445-449.
- Izumi K. 1970. A new method for fractionation of agar. *Agr Biol Chem* 34, 1739-1740.
- Jeon YJ, Yasantha A and Lee J. Characterization of agarose product from Agar using DMSO. *Algae* 20, 61-67.
- Kang HI, Ko MS, Kim HJ, Kim WS and Bae TJ. 1985. Fluid properties and Quality of agar solution from cheju seaweed, *Gelidium amansii*. *J Kor Fish Soc* 29, 716-721.
- Kim DS, Kim HR, Kim JH and Pyeon JH. 2000. Pilot-scale preparation and physicochemical characteristics of micro-biological agar from *Gelidium amansii* in Korea. *J Kor Fish Soc* 33, 70-74.
- Kim HG and Son HJ. 1997. Comparison of Thermal properties and surface structures of unmodified, spray-dried, and extrusion-dried agar. *Kor J Food and Nutr* 10, 234-240.
- Korean Fisheries Society. 1998. Annual Statistics of Fisheries. Ministry of Maritime Affairs and Fisheries, Korea
- Ministry of Maritime Affairs and Fisheries. 2006. Fishery Production Survey, 80.
- Mollet JC, Rahaoui A and Lemoine Y. 1998. 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.
- Murano E. 1995. Chemical structure and quality of agars from *Gracilaria*. *J appl Phycol* 7, 245-254.
- Patil NB and Kale NR. 1973. A simple procedure for the preparation of agarose for gel electrophoresis. *Ind J Biochem Biophys* 10, 160-163.
- Praibon J, Chirapart A, Akakabe Y, Bhumibhamon O and Kajiwarac T. 2006. Physical and chemical characterization of agar polysaccharides extracted from the Thai and Japanese species of *Gracilaria*. *Scienceasia* 32, 1513-1874.
- Russell B, Mead TH and Polson A. 1964. A method of preparing agarose. *Biochim Biophys Acta* 86, 169-174.
- Suzuki H, Sawai Y and Takada M. 2001. The Effect of Apparent Molecular Weight and Components of Agar on Gel Formation. *Food Sci Technol Res* 7, 280-284.
- Tagawa S. 1966. Separation of agar-agar by dimethyl sulfoxide into agarose and agaropectin. *J Shiminoseki Fish Univ* 14,

165-171.

Tagawa S. 1968. Chemical studies on manufacture of agar-agar. Suisan Daigakko Kenkyu Hoboku 17, 83-86.

Yoon HS and Park YH. 1985. 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.

Zabin B. 1966. Agarose use of DEAE cellulose to remove the anionic polysaccharides from agar. U.S Patent 3, 423, 396.

2011년 10월 20일 접수

2011년 11월 11일 수정

2011년 12월 7일 수리