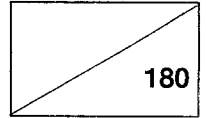


OOT. ~
L2937

GA0045-0988

최 종
연구보고서



19916632

국내산 홍조로부터 배지용 한천 및 아가로즈 제조에 관한 연구

Studies on preparation of Bacteriological agar and
agarose from red algae

연구기관

한국식품개발연구원

농림부

제 출 문

농림부 장관 귀하

본 보고서를 “국내산 홍조로부터 배지용 한천 및 아가로즈 제조에 관한 연구” 과제의 최종보고서로 제출합니다.

1998. 12. 20.

주관연구기관명 : 한국식품개발연구원
총괄연구책임자 : 도 정 룡
연구원 : 김 영 명
연구원 : 김 동 수
연구원 : 조 진 호
연구원 : 양 승 용
연구원 : 이 남 혁
연구원 : 홍 상 필
연구원 : 오 세 욱
연구원 : 김 은 미
연구원 : 박 동 준
연구원 : 이 주
협동연구기관명 : 부 경 대 학 교
협동연구책임자 : 김 선 봉

여 백

요 약 문

I. 제 목

국내산 홍조로부터 배지용 한천 및 아가로즈 제조에 관한 연구

II. 연구개발의 목적 및 중요성

1. 연구개발의 목적

국내 연안산 원조로 부터 추출한 한천의 이화학적 특성을 구명하고 이들 한천으로 부터 고품질의 한천 및 아가로즈를 제조코져 하였습.

2. 연구개발의 중요성

가. 기술적 측면

국내 양식기술의 발달로 해조의 생산량은 괄목할 만한 성장을 하였으나, 국내 소비의 정체 및 대일 수출악화로 채산성은 날로 악화되고 있다. 한천 정제 기술의 부족으로 국내에서 생산되는 한천은 대부분이 식품 첨가물로 이용되며, 고가의 의약품, 미생물 배지, 연구용 한천은 거의 모두 수입에 의존하고 있는 실정이다. 세계 시장에서 경쟁력을 갖추기 위해서는 고급 제품을 생산 할 수 있는 기술을 개발해야 한다.

나. 경제, 사회적 측면

국내의 한천 생산량은 전 세계 생산량의 12%인 700톤에 달한다. 그중 60~70%인 480여톤은 일본등지로 수출하고 있고, 나머지 200여톤은 식품 가공용으로 국내에서 소비되고 있다. 그러나 수출되는 한천의 대부분은 단순가공 처리한 제품들이고 고부가가치로 가공되는 의약품, 미생물 배지, 연구용 한천은 거의 모두 수입에 의존하고 있는 실정이며, 이로 인하여 어민 및 국내생산업계의 실질소득이 감소하는 요인으로 작용하고 있는 실정이다. 또한 중국에

서 생산되는 가격이 싼 한천으로 인하여 국제 경쟁력이 떨어지고 있다.

다. 사회적 측면

생활수준의 향상으로 비만, 고혈압, 대장암 등의 성인병이 증가하고 있으며 이의 예방효과 및 치료 효과가 있는 식이섬유에 대한 관심이 고조되고 있다. 한천은 좋은 식이섬유로서 앞으로 소비량이 늘어날 것으로 기대된다. 전 세계가 개방화 되는 추세를 미루어 보아 고급 한천을 생산 할 수 있는 기술 확보는 시급함.

III. 연구개발 내용 및 범위

1. 한천의 제조

가. 한천원조의 수집 및 수율조사

한천의 수율은 한천원조의 종류, 채취시기, 생육장소에 따라서 큰 차이가 있으므로 국내에서 생산되는 한천원조를 수집하여 수율을 조사함.

나. 한천의 추출 및 제조방법 확립

전 처리한 한천원조를 이용하여 산처리, 가압추출, 동결해동탈수, 등의 방법을 검토하여 최적의 한천제조 방법을 확립함.

2. 한천의 정제

한천중에 함유된 무기질, 단당류, 질소성분 등의 불순물을 저온에서 녹지 않는 한천의 특이한 물성을 이용하여 제거함.

3. 아가로즈의 분리 정제

한천의 주 구성성분인 아가로즈와 아가로펙틴의 용해도차, 흡착분리능의 차이 등의 방법을 이용하여 아가로즈를 분리함.

4. 정제한천의 활용

미생물 배지용 등의 활용도를 조사 함

5. 아가로즈의 활용

한천의 주성분인 아가로즈는 과학용으로 많이 이용되고 있으며, 특히 전기 영동용 기재로 이용되고 있다. 따라서, 한천으로부터 분리한 아가로즈를 이용하여 전기영동용 기재로의 활용성을 검토 함.

6. 한천 및 아가로즈의 이화학적 특성조사

정제 한천 및 한천으로부터 분리한 시료종의 황산기, 회분, 수분함량 측정 및 구성성분 분석을 통하여 순도를 조사하고, 한천의 중요한 물성인 겔 강도, 용해온도, 겔화온도, 수소이온농도 등을 조사함.

IV. 연구개발결과 및 활용에 대한 건의

1. 연구개발결과

가. 한천제조 및 정제

국내연안에서 자생하는 13종류의 홍조류를 남해안의 송도, 광안리 그리고 다대포에서 채취하여 일반성분을 조사한 결과, 회분함량은 다대포에서 채취한 꼬시래기의 경우 8.57%로 가장 낮았으며 송도에서 채취한 붉은잎은 30.23%로 회분함량이 가장 많았다. 한천원료로 주로 이용되고 있는 우뭇가사리의 경우 9.02~13.30%로 같은 종류의 해조류이지만 채취장소에 따라 함량차이가 있었다. 한천 원료인 꼬시래기의 경우도 8.57~14.07%로 우뭇가사리와 같이 채취장소에 따라 함량차이가 크다는 것을 알수 있었다. 단백질 함량은 광안리 풀가사리의 경우 18.11%로 가장 낮았고 송도 붉은까막살의 경우 33.90%로 가장 높았다. 지방은 0.11~0.90%로 모든 홍조류에

서 함량이 1%미만으로 낮게 나타났다.

꼬시래기를 한천의 원료로 사용할 때는 반드시 알카리 전처리를 해야함을 알 수 있었다. 따라서 수산화 나트륨을 0~8%의 농도로 전처리하여 한천을 추출한 결과, 6%처리시 겔강도가 좋은 한천을 제조할 수 있었다.

우뭇가사리를 원료로하여 한천을 추출할 때 pH는 6~7로 했을 때 추출수율이 가장 높았다. 회분함량은 3.7 - 4.4%로 나타났으며, 겔 강도가 630~640으로 상당히 높은 것으로 나타났다. 이 결과를 통해 추출용액은 약산성 또는 중성으로 하는 것이 효과적인 것으로 나타났다.

한천의 추출시간 및 추출온도를 조사한 결과 추출시간을 길게 할수록 추출온도가 높을수록 수율이 증가하는 것을 알 수 있었으며 100℃에서 추출하는 것 보다 120℃에서 추출하는 것이 수율면에서는 월등히 좋은 것으로 나타났다. 그리고 추출시간은 3시간이 적절한 것으로 판단되었다.

국내산 한천원료로서 현재 가장 많이 이용되고 있는 우뭇가사리의 채취장소 및 채취시기별 수율 및 추출물의 이화학적 특성을 조사한 결과, 3월에 채취한 원료에 비하여 6월에 채취한 원료의 수율이 높고 겔강도가 강한 것으로 나타났다.

한천원료의 산지에 따른 한천의 수율 및 품질을 살펴보기 위하여 남해안의 다대포, 송도, 광안리, 대변 그리고 일광에서 채취한 우뭇가사리와 제주도 및 울릉도산 우뭇가사리를 구입하여 한천질을 추출하고 이화학적 특성을 조사하였다. 그 결과 동일한 조건(120℃, 4시간)에서 추출한 한천의 수율은 31.6~46.8%로 산지에 따른 수율의 차이가 매우 컸고, 울릉도산 및 제주도산 우뭇가사리의 수율이 46.8% 및 43.6%로 매우 좋았다. 겔강도는 496~887 g/cm²로 산지에 따른 차가 매우 컸고, 동해안(대변, 일광)산 우뭇가사리에서 추출한 한천의 겔강도가 887 및 854 g/cm²로 매우 강하였다. 추출한 한천 중의 회분 함량은 2.63~2.92%로 산지에 따른 차이는 크지 않았고, 한천의 품질에 중요한 영향을 미치는 황산기의 함량은 1.38~

1.78%로 울릉도산 우뭇가사리에서 추출한 한천이 가장 낮았다.

우뭇가사리에서 추출한 한천을 사용하여 증류수 처리후 아세톤 탈수, EDTA염 처리, 에탄올 침전 처리, 아세톤 침전 처리 그리고 프로판올 침전 처리 등의 다양한 방법으로 한천을 정제한 결과, 모든 처리구에서 황산기 및 회분의 함량이 감소되어 정제효과가 있었다.

EDTA(ethylenediaminetetraacetate)처리시에는 황산기 및 회분함량이 상당히 감소되었으며, 수율은 71.9%였다. 증류수 처리 및 EDTA 처리 방법은 한천을 용해시키지 않고 간단하게 처리할수 있다는 것이 매우 큰 장점이다.

나. 아가로즈의 제조

1) 아가로즈 제조용 고강도 한천 제조

한천의 제조공정은 원조의 전처리, 추출, 여과, 탈수, 건조, 분쇄 그리고 포장의 과정을 거치게 된다. 위의 제조공정 가운데 전처리공정은 수용성 불순물을 포함한 이물질을 제거하는 과정일 뿐만 아니라 꼬시래기를 한천 원료로 사용할 경우에는 알칼리 처리에 의하여 겔화능을 부여하는 매우 중요한 과정이다(林과 岡崎, 1970). 그러나 우뭇가사리를 한천 원료로 사용할 경우에는 알칼리 처리를 하지 않고 한천을 제조하지만 겔강도가 높은 한천을 제조하기 위하여 수산화나트륨을 처리하여 한천을 제조하고 수율 및 이화학적 특성을 살펴보았다. 수산화나트륨을 0, 2, 4, 6 그리고 8%를 80℃에서 3시간 처리한 우뭇가사리로부터 추출한 한천의 수율을 조사한 결과, 일정처리 조건에서 수산화나트륨의 처리 농도가 증가 할수록 한천의 수율은 감소하였다. 즉 수산화나트륨을 처리하지 않은 경우 38.27%의 수율을 나타내었으나, 2, 4, 6, 8%의 수산화나트륨 처리시 한천의 수율은 24.20, 19.76, 18.63 그리고 15.76%였다.

수산화나트륨을 농도별로 처리한 우뭇가사리에서 추출한 한천의 이화학적 특성을 조사한 결과, 처리 농도가 증가할수록 추출한 한천의 겔강도는 비례하여 증가하였고, 회분과 황산기의 함량은 감소하였다. 즉, 수산화나트륨을 처리한 우뭇가사리로부터 추출한 한천 용액의 수소이온농도는 6.85~8.11범위로 나타났으며, 겔강도는 수산화나트륨을 처리하지 않은 경우 598 g/cm²였으며, 2, 4, 6, 8%의 수산화나트륨 처리시 한천의 겔강도는 989, 1467, 1565 그리고 1566 g/cm²으로 처리농도가 증가할수록 겔강도가 증가하였다. 회분 함량은 수산화나트륨의 처리농도가 증가할수록 감소하였으며 3.03~2.22범위로 나타났다. 황산기 함량은 수산화나트륨을 처리하지 않은 경우 1.41%였으며, 2, 4, 6, 8%의 수산화나트륨 처리시 황산기 함량은 0.93, 0.68, 0.50 그리고 0.37%로 처리농도가 증가할수록 대체로 감소하였다. 꼬시래기 원조로부터 추출한 한천의 구성성분과 겔강도에 관한 연구에서 꼬시래기 원조를 알칼리로 처리하면 L-galactose-6-sulfate에서 황산기가 떨어져 나가면서 한천중의 황산기 함량이 감소하고 겔강도가 증가한다는 Craigie and Wen(1984)의 보고와 일치하는 결과이다. 위에서 얻은 결과로부터 우뭇가사리 원조로부터 고강도 한천을 제조하기 위한 수산화나트륨의 처리농도는 6%로 결정하였다. 수산화나트륨의 최적 처리 온도를 결정하기 위하여, 수산화나트륨의 처리농도를 6%로 하고 40, 60, 70, 80 그리고 90℃에서 3시간처리한 우뭇가사리로부터 추출한 한천의 수율을 조사한 결과, 일정처리 조건에서 6% 수산화나트륨의 처리 온도가 증가할수록 한천의 수율은 감소하였다. 즉 6%의 수산화나트륨을 40, 60, 70, 80 그리고 90℃에서 3시간 처리한 우뭇가사리로부터 추출한 한천의 수율은 35.24, 29.24, 25.84, 19.63 그리고 15.42%였다. 온도별로 처리한 우뭇가사리에서 추출한 한천의 이화학적 특성을 조사한 결과, 처리 온도가 증가할수록 추출한 한천의 겔강도는 비례하여 증가하였고, 회분과 황산기의 함량은 감소하였다. 즉 수산화나트륨을 처리한 우뭇가사리로부터 추출한 한

천 용액의 수소이온농도는 6.85 - 8.18범위로 나타났으며, 겔강도는 40, 60, 70, 80 그리고 90℃에서 3시간처리한 우뭇가사리로부터 추출한 한천의 겔강도는 714, 808, 1224, 1565 그리고 1583g/cm²였고 황산기 함량은 1.18, 1.06, 0.83, 0.30 그리고 0.29%였다. 위에서 얻은 결과로부터 우뭇가사리 원조로부터 고강도 한천을 제조하기 위한 수산화나트륨의 처리온도는 80℃가 적절한 것으로 나타났다. 수산화나트륨의 최적 처리 시간을 결정하기 위하여, 수산화나트륨의 처리농도를 6%로 하고 80℃에서 2, 3 그리고 4시간 처리한 우뭇가사리로부터 추출한 한천의 수율을 조사한 결과, 수산화나트륨의 처리 시간을 길게 할수록 한천의 수율은 감소하였다. 즉 6%의 수산화나트륨을 80℃에서 2, 3 그리고 4시간 처리한 우뭇가사리로부터 추출한 한천의 수율은 21.95, 19.85, 그리고 14.75%였다. 시간별로 수산화나트륨을 처리한 우뭇가사리에서 추출한 한천의 이화학적 특성을 조사한 결과, 수산화나트륨을 처리한 우뭇가사리로부터 추출한 한천 용액의 수소이온농도는 7.57~8.46범위로 나타났으며, 겔강도는 80℃에서 2, 3, 4시간 처리한 우뭇가사리로부터 추출한 한천의 겔강도는 1596, 1579, 그리고 1569g/cm²였고 황산기 함량은 0.93, 0.84, 그리고 0.85%였다. 위에서 얻은 결과로부터 우뭇가사리 원조로부터 고강도 한천을 제조하기 위한 수산화나트륨의 처리시간은 2~3시간이 적절한 것으로 나타났다. 온도별로 처리한 우뭇가사리에서 추출한 한천의 구성당 조성을 분석한 결과, 우뭇가사리에서 추출한 한천의 구성당은 3,6-anhydrogalactose(An-Gal), galactose(Gal)가 주성분이었으며, 6-methyl-galactose(6-Me-Gal)와 xylose (Xyl)도 0.85~2.0% 함유되어 있었다. 수산화나트륨을 처리하지 않은 우뭇가사리로부터 추출한 한천의 Gal는 53.28%, An-Gal는 44.24%였으며, 수산화나트륨을 40, 60, 70, 80℃에서 처리한 우뭇가사리에서 추출한 한천의 경우, Gal는 51.69 - 52.96%, An-Gal는 44.05 - 46.10%로 수산화나트륨처리로 인한 구성당의 조성은 큰 차이가 없었다. 이러한 결과는 꼬시

래기 원조를 사용한 Craigie and Wen(1984)의 결과와 일치하지 않는 것으로 원조 자체의 구성당 조성 차이로 생각된다.

2) 아가로스 제조

키토산 처리시에 황산기 및 회분함량이 상당히 감소하였으며 수율은 60.8~70.7%로 나타났다. 한천에 대한 키토산의 농도를 10%로 하였을 때 황산기 및 회분함량이 0.3%로 떨어져 매우 좋은 결과를 나타내었다.

CPC를 이용하여 한천으로부터 아가로스를 분리할 때 적정 농도는 20%였고, 황산기 함량은 5%이상 처리시 급격히 떨어졌으며, 회분은 10%이상 처리에서 상당히 제거되었다. 수율은 64.1~73.5%범위로 나타났다.

PEG로 아가로스를 분리 한 결과, 황산기와 회분의 제거효과는 상당히 좋았으나 수율이 낮았다. 그리고 아가로펙틴을 침전시키기 위하여 많은 양의 PEG가 소요되었다. 수율을 높이고 PEG의 적정 사용량을 구하기 위하여 먼저 PEG를 한천용액에 대하여 농도별로 처리하여 수율과 겔강도를 조사한 결과, PEG의 농도가 증가함에 따라 수율이 비례하여 증가되었고 특히 한천용액에 대하여 20%의 PEG를 첨가했을 때 수율이 많이 증가 하였으나, 그 이상의 농도에서는 크게 증가하지 않았다. 분리한 아가로스중의 황산기 및 회분의 함량은 감소되었다. PEG처리에 의해 제조한 아가로스의 수율은 25~38%로 나타났다. 증제수로 수세하고 PEG로 분리한 아가로스의 겔강도는 1892g/cm², 용액의 투명도는 0.067, 겔의 투명도는 0.314이었고, 회분 함량은 0.83%, 황산기 함량은 0.177%로 나타나 수율이 낮지만, 이화학적 품질은 좋은 것으로 판단된다.

다. 정제한천 및 아가로스의 활용

1) 배지용 한천

순수배양된 균주(*Bacillus subtilis*, *Escherichia coli*, 김치 젖산

균)를 희석하여 colony number를 조사한 결과, 정제한천은 대조구로 사용된 Difco사의 agar와 비교하여 볼 때 거의 동일한 colony 수를 나타내어 배지용 한천으로 사용할 수 있는 것으로 나타났다. 특히, EDTA염으로 정제한 한천이 가장 적당한 것으로 판단되었다.

정제한천 3가지 모두 대조구로 사용된 Difco사의 한천과 colony수에서 유의한 차이를 나타내지 않았으며, 특이하게도 *Bacillus subtilis*가 성장하지 못한 정제한천 III에서 동일 수준의 colony 수를 나타내었지만 colony의 형상이 다른 agar와는 달리 작은 크기로 나타나 다른 배지와 약간의 차이가 있는 것으로 판단되었다.

2) 전기영동용 아가로즈

겔의 농도를 1%로 하여 DNA 전기영동한 결과, 국내산 한천은 DNA가 거의 분리되지 않았으며, acetone, n-propanol, iso-propanol로 정제한 한천은 국내산 한천보다는 개선되었으나(Fig. 19-21), DNA의 분리가 좋지 않은 것으로 나타났으며, EDTA염으로 정제한 한천을 사용한 결과, 대조구로 사용한 FMC 아가로즈와 유사한 분리정도를 나타내었다. 그리고, 키토산, PEG, CPC로 정제한 아가로즈는 FMC 아가로즈에 비해 DNA의 이동속도가 조금 늦지만 상당히 좋은 결과를 나타내었다. 아가로즈 제조시 수율이 높은 키토산의 경우, 중점성 키토산과 고점성 키토산을 각각 에탄올로 정제하여 처리해 본 결과, 중점성의 키토산을 에탄올로 정제하여 사용하였을 때 가장 좋은 결과를 나타내었다. 이러한 결과를 미루어 볼 때 키토산으로 정제한 아가로즈는 DNA 전기영동용 소재로 이용가능 할 것으로 판단된다.

겔의 농도를 1%로 하여 교차 면역 전기영동한 결과, 국내산 한천은 전개가 되지 않아 peak가 나타나지 않았고, EDTA염 정제한천, 키토산 정제한천, PEG 정제한천은 peak가 나타났으며, 키토산으로 정제한 아가로즈는 Sigma 아가로즈와 거의 유사한 peak를 나타내었다. 이러한 결과로 미루어

불 때 키토산으로 정제한 아가로즈는 교차면역 전기영동용 소재로 사용 가능 할 것으로 판단된다.

대조구로 Sigma agarose와 FMC agarose를 사용하여 단백질 전기영동한 결과, 겔강도, 탄력성 그리고 용해도는 PEG와 정제한 키토산으로 정제한 아가로즈는 양호하였으나, 겔투명도가 대조구에 비하여 부족한 것으로 나타났다지만, 단백질 전기영동용 기재로 이용 가능한 것으로 판단되었다.

2. 연구결과의 활용에 대한 건의

본 연구는 3년간에 걸쳐 한천 원료의 품질 특성, 한천의 제조법, 한천 정제방법, 아가로즈 제조법, 정제한천 및 아가로즈의 활용에 관하여 수행되었다. 본 연구는 실험실에서 수행되었으며, 이들 결과를 활용하여 국내에서 생산되는 한천의 품질을 개선 할 수 있을 것으로 사료된다. 본 연구 결과를 산업화 하기 위해서는 대량 생산시 수반될 수 있는 문제점을 보완 하기 위한 공장 규모의 시험 생산이 필요 할 것으로 사료된다.

SUMMARY

I. Title

Studies on preparation of Bacteriological agar and agarose from red algae

II. Objective and significance

Agar, the gelling ingredient found in *Gelidium* and *Gracilaria* species of seaweed, has an ancient history in the Orient, although its use in pure form only began in the seventeenth century. It was not until 1882 that the worldwide fame of agar was truly established when Robert Koch introduced the product to bacteriology as a superior culture medium. Today, agar is still the best culture medium available. Agar is composed of two major fractions—agarose, a neutral polymer and agaropectin, a charged, sulfated polymer. Agarose is essentially free of sulfate and consists of chains of alternate β -1,3-linked-D-galactose, α -1,4-linked 3,6-anhydro-L-galactose and agar has been used in many food products where its emulsifying, stabilizing and gelling properties and the heat-resistance of its gels are useful.

the present investigation was carried out for the purpose of preparation high quality agar and agarose and it was studied for utilities of high quality agar. domestic agar has been produced for food additive, high quality agar for bacteological agar has been incomed in the whole quantities in korean.

III. Contents and scope

1. Manufacture of agar

Investigation of agar yields, extraction time and temperature conditon of agar using various agaropytes for their optimum preparative condition.

2. Purification of agar

During the extraction process, undesired materials will obtained as well as the agar. such materials are soluble salts, seaweed pigments and cellulose etc. it was investigated to remove undesired materials using EDTA salts, organic solvents, distilled water.

3. Fractionation of agarose

Agar is composed of two major fractions-agarose, a neutral

polymer and agaropectin, a charged, sulfated polymer. it was investigated to obtain agarose using chitosan, polyethylen glycol, cetylpyridium chloride.

4. Application of purified agar

Agar is the best culture medium available. in korea, bacteriological agar is incomed in the whole quantities. it was investigated to use agar purified from domestic agar for culture medium.

5. Application of fractionated agarose

It was investigated to use agarose prepared from agar for gel electrophoresis.

6. Phycochemical properties of purified agar and agarose

Investigation of phycochemical properties-gel strength, transparancecy, mineal, ash, sulfate contents-purified agar and agarose.

IV. Results

Chemical components of red algae(*Gelidium amansii*, *Gracilaria verrucosa*, *Gigartina tenella*, *Carpopeltis cornea*, *Plocamium ovicornis*, *Callophyllis adnata*, *Lomentaria*

hakodatensis, *Gymnogongrus flabelliformis*, *Chondrus pinnulatus*, *Actinotrichia fragilis*, *Gloipeltis tenax* and *Campylaephora hypnaeoides*) were examined.

The contents of carbohydrate, ash, crude protein and fat in dried red algae are 40.38~69.88%, 8.57~30.23%, 18.11~33.90% and 0.11~0.90% on dry base, respectively. yields of water-soluble compound in dried red algae and contents of sulfate in water-soluble compound extracted red algae were 4.32~55.78% and 1.65~19.48%, respectively. The principal sugars of water-soluble compound extracted from red algae were galactose, 3,6-anhydrogalactose, glucose and xylose.

The effect of different treatments on the quality and yield of purified agar produced from *Gelidium amansii* has been studied and the extraction condition of agar produced from *G. amansii* has been examined, the contents of ash, sulfate in agar produced from *G. amansii* collected from different places were 2.63~2.92% and 1.38~1.78%, respectively. yields and gel strength of agar produced from *G. amansii* collected from different places were 31.6~46.8% and 496~887g/cm², respectively. It was effective to extract agar at 120°C for 2-3hrs.

Agar was purified by D.W. washing, EDTA washing, chitosan

treatment, CPC treatment, PEG treatment, ethanol precipitation, acetone precipitation and propanol precipitation. The mineral contents of agar produced from *Gelidium amansii* were Na(2934ppm), Ca(2472ppm), Mg(2259ppm), K(2527ppm), P(81.1ppm), Fe(66.4ppm), Al(71.7ppm), Zn(29.7ppm) and Pb(ND: not detected), respectively.

Preparative conditions of high-gel strength agar from *Gelidium amansii* have been studied. The effect of NaOH pretreatment on the quality and yields of agar extracted from *Gelidium amansii* was examined.

The gel strength of agar extracted from *G. amansii* pretreated with NaOH was higher than that of agar extracted from *G. amansii* non-pretreated with NaOH. The gel strength of agar extracted from *G. amansii* was influenced by concentration, temperature and time of pretreatment with NaOH. It was found that the proper concentration, temperature and time of NaOH pretreatment to produce high-gel strength agar was 6% NaOH, 80°C and 2-3hrs. The principal sugars of agar extracted from *G. amansii* were galactose, 3,6-anhydrogalactose.

It was conducted to investigate the preparative methods of agarose for gel electrophoresis from agar. Naturally occurring

agar consists of two main polysaccharides, the neutral polysaccharide agarose and the acid sulfated polysaccharide agaropectin. The sulphate and carboxyl functions of the agar are accumulated in the agaropectin. The hydrophilic, non-ionogenic, rigid and transparent gel matrix of the agarose is found to be suitable for gel electrophoresis, gel filtration and affinity chromatography. Agar was purified by chitosan treatment, CPC treatment, and PEG treatment. Yields of agarose purified from agar with chitosan, CPC and PEG were 56.7%, 55.6% and 62.3%. It was proper to treat with chitosan in preparative methods of agarose for gel electrophoresis from agar.

CONTENTS

I. Introduction	27
1. Objective and significance of development	27
1) Objective	27
2) Significance	27
2. Contents and scope	28
1) Manufacture of agar	28
2) Purification of agar	28
3) Fractionation of agarose	28
4) Application of purified agar	28
5) Application of fractionated agarose	29
6) Phycochemical properties of purified agar and agarose	29
3. State of art	29
II. Materials and Methods	34
1. Materials	34
2. Methods	35
III. Results and discussion	38

1. Preparation of agar and purification	38
1) Yields and components of agaropytes	38
2) Manufacture method of agar	43
(1) Method of pretreatment	43
(2) Extraction of agar	45
3) Purification of agar	52
4) Fractionation of agarose	60
2. Manufacture of agarose	61
1) Components of agar and agarose	61
2) Manufacture of agarose	62
(1) Pretreatment	62
(2) Fractionation of agarose	62
3) Purification of agarose	75
4) Physicochemical properties of purified agarose	75
(1) Mineral of agarose	75
(2) Sugar composition of agarose	76
(3) FT-IR	76
3. Application of purified agar and agarose	98
1) Manufacture of bacteriological agar	98
(1) Purification of agar by EDTA salts	98
(2) Purification of agar by organic solvent	100
(3) Practical use as culture medium of purified agar	101

2) Manufacture of agarose for gel electrophoresis	107
(1) Manufacture of high gel strength agar	108
(2) Manufacture of agarose by chitosan	115
(3) Manufacture of agarose PEG	117
3) Application of purified agarose	120
(1) DNA electrophoresis	120
(2) Cross immunoelectrophoresis	134
(3) Protein electrophoresis	136
IV. Conclusion and recommendation	139
References	143
Appendix	151

여 백

목 차

제 1 장 서 론	27
제1절 연구개발의 목적 및 중요성	27
1. 연구개발의 목적	27
2. 연구개발의 중요성	27
가. 기술적 측면	27
나. 경제, 사회적 측면	27
다. 사회적 측면	27
제2절 연구개발 내용 및 범위	28
1. 한천의 제조	28
2. 한천의 정제	28
3. 아가로스의 분리 정제	28
4. 정제한천의 활용	28
5. 아가로스의 활용	29
6. 한천 및 아가로스의 이화학적 특성조사	29
제3절 연구의 배경	29
1. 연구사례 조사	29
2. 한천 원료에 대한 검토 분석	33

제 2 장 실험재료 및 실험방법34

제1절 실험재료34

제2절 실험방법34

제 3 장 결과 및 고찰38

제1절 한천제조 및 정제38

1. 한천원조의 수율 및 성분조사38
2. 한천의 제조방법43
 - 가. 한천원료의 전처리 공정43
 - 나. 한천의 추출 공정45
 - 1) 한천의 추출에 미치는 수소이온농도(pH)의 영향47
 - 2) 추출시간 및 추출온도49
 - 3) 추출용액의 분리 공정50
 - 4) 탈수 및 건조 공정50
 - 5) 국내산 우뭇가사리의 산지별 생산 시기별 이화학적 특성51
3. 한천의 정제52
4. 아가로스 분리방법 검토60

제2절 <u>아가로즈의 제조</u>	61
1. 한천 및 아가로즈의 성분 조사	61
2. 아가로즈의 제조방법	62
가. 전처리 공정	62
나. 아가로즈의 분리	62
1) 키토산에 의한 아가로즈 분리	62
2) CPC(Cetylpyridium chloride)에 의한 아가로즈 분리	67
3) PEG(Poly ethylene glycol)에 의한 아가로즈 분리	71
3. 아가로즈의 정제	75
4. 정제 아가로즈의 이화학적 특성	75
가. 아가로즈의 무기질 분석	75
나. 구성당 분석	76
다. FT-IR(Fourier Transform Infrared Spectrophotometer)측정	76
제3절 정제한천 및 아가로즈의 활용	98
1. 배지용 한천의 제조	98
가. 배지용 한천 제조 방법	98
1) EDTA염에 의한 한천 정제	98
2) 유기 용매 처리에 의한 한천 정제	100
3) 배지용 한천의 실제실험 적용시험	101
2. 전기영동용 아가로즈의 제조	107
가. 고강도 한천의 제조	108
1) 알칼리 처리에 의한 고강도 한천 제조 방법	108
2) 알칼리 처리에 의한 고강도 한천	108
나. 키토산을 이용한 아가로즈 제조	115

다. PEG를 이용한 아가로즈 제조	117
3. 정제 아가로즈의 활용	120
가. DNA 전기영동	120
1) 실험방법	121
2) DNA 전기영동 실험결과	134
나. 교차 면역 전기 영동	134
1) 실험 방법	134
2) 교차 면역 전기영동 실험 결과	136
다. 단백질 전기영동	136
1) 실험 방법	136
2) 단백질 전기영동 실험 결과	137
제 4 장 결론 및 건의사항	139
참고문헌	143
부록	151

제 1 장 서 론

제1절 연구개발의 목적 및 중요성

1. 연구개발의 목적

국내 연안산 원조로 부터 추출한 한천의 이화학적 특성을 구명하고 이들 한천으로 부터 고품질의 한천 및 아가로즈를 제조코져 하였습.

2. 연구개발의 중요성

가. 기술적 측면

국내 양식기술의 발달로 해조의 생산량은 괄목할 만한 성장을 하였으나, 국내 소비의 정체 및 대일 수출악화로 채산성은 날로 악화되고 있다. 한천 정제 기술의 부족으로 국내에서 생산되는 한천은 대부분이 식품 첨가물로 이용되며, 고가의 의약품, 미생물 배지, 연구용 한천은 거의 모두 수입에 의존하고 있는 실정이다. 세계 시장에서 경쟁력을 갖추기 위해서는 고급 제품을 생산 할 수 있는 기술을 개발해야 한다.

나. 경제, 사회적 측면

국내의 한천 생산량은 전 세계 생산량의 12%인 700톤에 달한다. 그중 60-70%인 480여톤은 일본등지로 수출하고 있고, 나머지 200여톤은 식품 가공용으로 국내에서 소비되고 있다. 그러나 수출되는 한천의 대부분은 단순가공 처리한 제품 들이고 고부가가치로 가공되는 의약품, 미생물 배지, 연구용 한천은 거의 모두 수입에 의존하고 있는 실정이며, 이로 인하여 어민 및 국내생산업계의 실질소득이 감소하는 요인으로 작용하고 있는 실정이다. 또한 중국에서 생산되는 가격이 싼 한천으로 인하여 국제 경쟁력이 떨어지고 있다.

다. 사회적 측면

생활수준의 향상으로 비만, 고혈압, 대장암 등의 성인병이 증가하고 있으며, 이의 예방효과 및 치료 효과가 있는 식이섬유에 대한 관심이 고조되고 있다. 한천은 좋은 식이섬유로서 앞으로 소비량이 늘어날 것으로 기대된다. 전 세계가 개방화 되는 추세를 미루어 보아 고급 한천을 생산 할 수 있는 기술 확보는 시급하다.

제2절 연구개발 내용 및 범위

1. 한천의 제조

가. 한천원조의 수집 및 수율조사

한천의 수율은 한천원조의 종류, 채취시기, 생육장소에 따라서 큰 차이가 있으므로 국내에서 생산되는 한천원조를 수집하여 수율을 조사한다.

나. 한천의 추출 및 제조방법 확립

전 처리한 한천원조를 이용하여 산처리, 가압추출, 동결해동탈수, 등의 방법을 검토하여 최적의 한천제조 방법을 확립한다.

2. 한천의 정제

한천중에 함유된 무기질, 단당류, 질소성분 등의 불순물을 저온에서 녹지않는 한천의 특이한 물성을 이용하여 제거한다.

3. 아가로스의 분리 정제

한천의 주 구성성분인 아가로스와 아가로펙틴의 용해도차, 흡착분리능의 차이 등의 방법을 이용하여 아가로스를 분리한다.

4. 정제한천의 활용

미생물 배지용 등의 활용도를 조사 함

5. 아가로즈의 활용

한천의 주성분인 아가로즈는 과학용으로 많이 이용되고 있으며, 특히 전기영동용 기재로 이용되고 있다. 따라서, 한천으로부터 분리한 아가로즈를 이용하여 전기영동용 기재로의 활용성을 검토 함.

6. 한천 및 아가로즈의 이화학적 특성조사

정제 한천 및 한천으로부터 분리한 시료중의 황산기, 회분, 수분함량 측정 및 구성성분 분석을 통하여 순도를 조사하고, 한천의 중요한 물성인 겔 강도, 용해온도, 겔화온도, 수소이온농도 등을 조사한다.

제3절 연구의 배경

1. 연구사례 조사

가. 외국의 경우

일본에서는 오래 전부터 한천을 이용하여 만든 우무를 전통식품으로 먹어왔으며, 한천의 추출 및 이용에 관한 자료 뿐만 아니라 한천의 생산량이 가장 많다. 세계 2차 대전으로 인해 일본 한천이 미국 및 유럽으로 공급되지 못하자 유럽 및 미국을 중심으로 한천에 관한 연구가 활발하게 이루어 졌다. 한천에 관한 연구를 분야별로 살펴보면 한천의 추출, 정제, 물성, 구성성분으로 나눌 수 있으며, 한천의 주요 구성성분인 아가로즈에 관한 연구는 부가가치의 증대 차원에서 중요하며, 효율적인 아가로즈의 생산에 관련하여 특허가 있다.

배지로서의 한천에 관해 살펴보면 세균배양기로서 이용되는 것은 어느 정도 그 목적을 위하여 선택 또는 특별히 제조한 분말 또는 플레이크 상태의 것이 있다. 배지용 한천으로서 시판되고 있는 것의 원조는 꼬시래기이고, 우뭇

가사리 한천은 2차 대전 전에는 많이 이용되었지만 현재에는 이용되지 않거나 또는 소량 혼합하고 있다. 꼬시래기 한천은 용해시 투명도는 우뭇가사리 한천 보다 우수하지만 응고 시켰을 때 나오는 응결수가 많다는 결점이 있다. 응결수가 많은 배지를 평판에 응고 시켰을 때에는 표면이 응고되기 어렵고 또 경사면에 응고되면 물이 고이게 될 뿐만 아니라 한천과 시험관 벽사이에도 물이 생겨 배지가 유리벽에 고착되지 않는다. 한천은 경사면에 고착되어도 떨어지기 쉽고, 시험관을 회전시키면 배지가 벽면에서 이탈되는 점이 꼬시래기 한천의 결점이 되고 있다.

세균용 한천의 질로서는 투명도, 젤리강도, 점도, 순도 및 응결수 량이 문제가 되고 있다. 투명도 : 정제수에 가열용해하여 응고 시킨 것은 약간의 유백색을 띠면서 투명하지만, 이 유백색의 정도가 적은 것이 좋다. 꼬시래기 한천은 우뭇가사리 한천 보다 투명도가 우수하다. 젤리 강도 : 세균용 한천으로서 현재 이용되고 있는 것은 특수한 경우를 제외하고, 통상 300~400정도의 젤리 강도이다. 젤리 강도 300~400의 한천이 1.5%정도의 농도에서 가장 많이 사용된다. 그러나 외국제품의 젤리 강도는 한천의 종류에 따라서 차이가 있으므로 새로운 배지용 한천을 사용하고자 할 때에는 사용농도를 조절하여 이용하는 것이 좋다.

점도 : 젤리 강도가 강하여도 점도가 약하면 응고된 때에도 제대로 사용하기 어렵고 또 유리관에 밀착되지 않아 관벽에서 이탈되기 쉽다. 응결수량 : 원조가 우뭇가사리 또는 꼬시래기인지에 따라서 차이가 있지만 세균용 한천으로서의 응결수량이 적은 것이 사용상 양호하다. 순도 : 정제란 명칭이 붙은 한천일지라도 다소간 불순물을 함유하고 있다. 한천을 용해시켰을 때 대부분 용액이 투명하지 않은 것은 티끌 및 먼지를 비롯하여 많은 협잡물을 함유하고 있는 것으로 생각된다. 한천중의 불순물은 배지의 외관을 손상 시키고 균의 발육을 저지한다. 상법으로 가열멸균한 육수에 한천을 가하여 한천 배지로 만들 때 육수는 상당히 투명하고 한천 배지는 혼탁하여 방치하면 침전물이 생기

는 일이 있다. 이 침전물은 통상 인산칼슘 또는 인산마그네슘으로 한천중에 함유된 칼슘 또는 마그네슘 이온이 그 원인이다. 즉, 펩톤 및 엑기스중에 일부 혼입되어 있던지 또는 육수에 첨가한 가용성 인산염(인산나트륨, 인산칼륨 등)과 한천중의 칼슘 및 마그네슘이 작용하여 불용성의 인산칼슘 또는 인산마그네슘 등이 생성되는 것이다. 이와 같이 침전의 원인이 되는 칼슘 및 마그네슘이온은 또한 그양이 많으면 균의 발육에도 불리한 결과를 미친다.

한천중에 함유된 균의 발육 저지 물질로서 칼슘 및 마그네슘 이온 외에 불포화 지방산이 있다. 이들은 유해물질의 주체가 되고 있다. 특히 이 불포화 지방산의 작용에 민감한 균이 있는데 배양 때에 혈액을 이용하여 이 불포화 지방산을 혈구에 흡착시켜 무해하게 한다. 한천을 알콜에 침지시켜 탈지하던지 활성탄을 가하여 어느 정도 혈액과 동일한 효과를 기대하는 경우가 있다. 실한천 및 각한천은 잘게 썰어 하룻밤 물에 담가두었다가 다음날 배지에 가하는 것이 좋다. 수세에 의하여 한천질이 좋아지는 것은 경험적으로 알려져 있다. 한천의 품질이 검사성적에 영향을 미치는 일은 적지 않다. 예를들면 티부스균 및 포도상균의 파지형 구별 때 사용한천에 따라서 본래 용균되던 것이 용균되지 않는 다든지 또는 항생제에 대한 감수성 시험에 있어서 그 저지대의 폭이 한천에 따라 영향을 받는다.

외국산 배지용 한천을 살펴보면, Bacto-agar(Difco): 한천에서 침출성 물질, 색소, 염류를 최대한 제거한 정제품으로, 고형배지에는 1-2%로 이용하고, 또 운동성 검사, 혐기성세균배양의 반운동성 배지는 0.05-0.5%의 농도로 이용한다. Special agar, Noble(Difco) : Noble의 방법으로 정제한 한천이다. Agar purified(Difco) : 특수한 방법(아마 탈지와 수세)에 의하여 정제한 것으로 균의 영양 요구를 연구하는 배지로 이용되고, 또 조직배양액으로 추정된다.

New Zealand agar(Oxoid) : 일반 세균 배지용으로 이용되는 것으로 Bacto-agar에 상당한다. 소량의 침출성 물질을 함유하고, 고형 배지에는

1.2%, 반유동성 배지에는 0.05-0.5%로 이용한다. Oxoid agar No.3(Oxoid) : 젤리 강도를 강하게 하고 New Zealand agar보다 불순물을 제거한 것으로, 0.8-1.0%이용하면 고행 배지로 된다. 잘 정제되어 있으므로 투명도가 양호하며 특히 여과하지 않아도 깨끗한 배지가 된다. Ionagar No.2(Oxoid) : 이온교환 수지를 이용하여 불순물을 제거한 것으로 품질적으로 우수하고 Difco의 Agar purified에 필적한다. 고행배지에는 0.8-1.0%가한다. 겔내 침강반응용 배지 조직배양액 등으로 이용할 수 있다. 겔내 침강 반응용배지 등으로는 0.3-0.5%로 충분하다. K agar(BBL) : 이것은 진두발속에서 추출한 다당질이다. 다른 한천과 동일한 목적으로 이용되지만 K agar의 특징은 용해온도가 낮고, 적당량으로 사용하면 60℃내외의 온도에서 용해된다. 그 반면 젤리 강도는 약하고 용액으로한 상태가 다른 한천과 비교하면 깨끗하다. 보통 2%로 배지에 첨가하면, 평판(도포용)으로 이용하기에 충분하게 응고 되지만 다른 한천과 달리 배지에 염화 나트륨 대신 염화칼륨을 가하면, 1.5%에서도 사용할 수 있다. 또 K agar와 염류의 조합에 의하여 그 용해점 및 응고점이 달라진다. 도포용 한천 배지에는 염화칼륨 0.5%와 염화나트륨 0.5%가 적당하다(1).

나. 국내의 경우

국내에서의 한천에 관한 연구는 1926년 수산시험장에서 한천제조 시험에 성공한 것이 처음으로 그 이후 국내의 품질 좋은 한천원조를 이용한 제품생산이 꾸준히 계속되어 왔다. 한천에 관한 연구는 일부 원조종의 수율, 추출조건, 성분에 관한자료가 있다(50-58). 그러나, 고품질의 한천에 관한 연구 및 아가로즈에 관한 연구가 부족하여 배지용 한천, 연구용 아가로즈는 전량 외국에서 수입하고 있는 실정이다.

다. 조사연구개발사례에 대한 평가

미국 및 일본의 한천 및 아가로즈에 관한 연구는 각 제조회사의 특허 및 자체 보유 기술은 상당히 높은 수준인 것으로 생각되며 최근의 자료로 볼때 효율적인 정제 및 제조방법에 대하여 연구를 계속하고 있다. 그러나, 품

질이 좋은 한천원조가 생산되고 수출입의 개방화로 인하여 값싼 원조가 수입 가능한 국내의 사정을 감안 할때 고품질의 한천 및 고가의 아가로즈 생산을 위한 연구가 시급한 것으로 사료된다.

2. 한천 원료에 대한 검토 분석

한천의 원료는 우뭇가사리속, 개우무속, 새발속, 지누아리속, 꼬시래기속, 개꼬시래기속, 들가사리속, 싹새기속, 가시우무속, 비단풀속, 석목속이 있다. 이 가운데 우뭇가사리는 국내산 원조의 품질이 가장 좋은 것으로 알려져 있다. 한천원조의 채취방법은 일부의 해녀들에 의한 수작업과 태풍후 바닷가에서 수집하는 방법으로 하고 있다. 국내 연안에 한천원조가 많이 서식하고 있는 것으로 알려져 있으므로 배를 이용한 효율적인 방법으로 원조를 채취한다면 원조의 생산량을 늘일 수 있을 것이다. 꼬시래기는 칠레 등지에서 수입하여 사용하고 있다.

제 2 장 실험재료 및 실험방법

제1절 실험재료

한천의 제조 실험에 사용한 우뭇가사리는 가락동 농수산물 시장에서 탈색되지 않은 채로 구입하여 실험실에서 이물질을 제거하고 열풍건조기로 건조한 후 밀봉, 보관하면서 사용하였다.

한천원료의 산지에 따른 품질을 조사하기 위해서는 남해안의 다대포, 송도, 광안리, 대변 그리고 일광에서 채취한 우뭇가사리(*Gelidium amansii*)와 자갈치 시장에서 구입한 제주도 및 울릉도산 우뭇가사리를 연구실로 운반하여 이물질을 제거하고 열풍건조기로 건조한 후 밀봉하여 보관하면서 사용하였다.

국내산 홍조류의 구성성분에 사용한 해조류는 국내 연안(송도, 광안리, 다대포, 일광, 제주, 울릉도)에서 채취한 12종류의 홍조류 즉, 우뭇가사리(*Gelidium amansii*), 꼬시래기(*Gracilaria verrucosa*), 돌가사리(*Gigartina tenella*), 붉은까막살(*Carpopeltis cornea*), 애기곰솔이(*Plocamium ovicornis*), 붉은잎(*Callophyllis adnata*), 애기마디잘록이(*Lomentaria hakodatensis*), 부챗살(*Gymnogongrus flabelliformis*), 깃꼴진두발(*Chondrus pinnulatus*), 고리방사털(*Actinotrichia fragilis*), 풀가사리(*Gloipeltis tenax*) 그리고 석목(*Campylaephora hypnaeoides*)을 연구실로 운반하여 이물질을 제거하고 수돗물로 수세한 후 열풍건조기로 건조하고 밀봉하여 보관하면서 사용하였다. 해조류의 분류는 수산동식물명사전(1991), 標準原色圖鑑全集 海藻(1990) 그리고 學研生物圖鑑 海藻(1988)을 참고하였다.

제2절 실험방법

1. 일반성분

수분함량은 dry oven을 이용하여 105℃ 상압건조법으로 측정하였으며, 회분함량은 건식회화법, 단백질은 Kjeldahl 정량법 그리고 지방의 함량은 Soxhlet 추출법에 따라 측정하였다. 탄수화물 함량은 고형분의 총량에서 회분, 단백질 그리고 지방의 함량을 뺀 값으로 나타내었다(AOAC, 1990).

2. 수용성 성분

수용성 성분의 수율은 시료에 40배량의 증류수를 넣고 120℃에서 2시간 가압추출하고 감압여과 장치로 여과하여 얻은 여과액에 3배량의 알콜을 넣어 침전시키고 유리여과기로 여과하여 얻은 잔사를 감압 건조기로 건조하여 수율을 구하였다.

3. 구성당

국내산 홍조류에서 추출한 수용성 성분의 구성 당 분석은 Furneaux et. al.(1990)의 방법으로 gas chromatography로 분석 하였다.

4. 한천수율

한천의 수율은 시료에 40배량의 증류수를 넣고 120℃에서 3시간 가압추출하고 감압여과 장치로 여과하여 얻은 여과액을 겔화한 후 동결 해동하여 탈수하고 건조하여 수율을 구하였다.

5. 젤강도

한천의 겔강도는 한천 농도가 1.5%가 되도록 한천겔을 제조하여 Texture analyser(Stable Micro Systems)로 3회 측정하여 평균값을 구하였다.

6. 황산기 함량 및 Electroendoosmosis(EEO)의 측정

황산기 함량은 Dodgson and Price 방법에 따라 측정하였으며, electroendoosmosis는 Kirkpatrick 등의 방법에 따라 측정하였다.

7. DNA 전기영동

한천으로부터 분리, 정제한 아가로스를 사용하여 1% gel을 제조하여 전기영동에 공시하였다. DNA sample로는 1kb DNA ladder(Genosis, U.S.A) 1 μ g에 상당하는 양을 사용하였으며 대조구로는 SEAKEM LE agarose(FMC Bioproducts, U.S.A)를 사용하였는데 EEO(-mr)는 0.09~0.13, 황산기함량은 0.15% 미만의 제품이었다. Gel 1cm당 7V의 전압 조건에서 전개하였으며 ethidium bromide로 염색하여 검출하였다. 사용된 1kb DNA ladder는 14개의 fragments(10000, 8000, 6000, 5000, 4000, 3500, 3000, 2500, 2000, 1500, 1000, 750, 500, 250 base pairs)로 구성되어 있다.

8. 교차면역 전기영동

30ml Barbital buffer에 아가로스를 녹여 1% 용액으로 만든 후 5 cm×5cm 유리판에 5ml씩 취하여 아가로스 겔을 만들고 겔의 왼쪽 하단부분에 주입구를 만들어 NHS 7 μ l를 주입하였다. 전개판의 양쪽에 Barbital buffer를 채운후 Bridge를 연결하여 60mA에서 1차 전기영동 하였다. 2차

전기영동은 3.5ml의 아가로스 용액이 들어 있는 Test tube에 Anti-Human Complement를 35 μ l(1%)를 넣어 교반한 후 1차 전기영동에서 잘라낸 부분에 부어 아가로스 겔을 만든다. 2차 전기영동은 20mA 조건에서 시행하였다. 전개후 Comassie brilliant blue R-250으로 염색하여 검출하였다.

9. 단백질 전기영동

단백질 전기영동은 Laemmli(1970)의 방법을 변형하여 사용하였다.

Acrylamide Solution(22.2% acrylamide 3.6ml + 증류수 17.1ml

+1.5% Ammonium persulfate 2ml+ Glycine buffer 4ml)에 약 50 $^{\circ}$ C로 식힌 1.5% agarose용액 13.3ml, TEMED 20 μ l를 넣어 혼합하여 준비된 전기영동용 유리판에 부어 굳힌후 집게로 유리판을 고정하여 전기영동장치에 넣어 고정시켰다. Glycine buffer를 채워 size marker를 15 μ l씩 주입한후 10mA에서 20mA로 변압하여 전개시켰다. 전개후 Comassie brilliant R-250으로 염색하여, 약 20분간 탈색한후 9.2% Acetic acid로 고정시켰다

제 3 장 결과 및 고찰

제1절 한천제조 및 정제

1. 한천원조의 수율 및 성분조사

한천제조에 사용되는 원료는 홍조류에 속하는 우뭇가사리, 꼬시래기를 주로 이용하고 있으며, 국내산 원료로는 우뭇가사리만 이용이되고 있으며 꼬시래기는 동남아시아 등지에서 수입하여 사용하고 있다. 따라서 국내연안에서 자생하는 해조류 가운데 수집가능한 홍조류를 구입하여 수율 및 일반성분을 조사하여 한천원료로의 이용가능성을 검토하고자 하였다.

국내연안에서 자생하는 13종류의 홍조류를 남해안의 송도, 광안리 그리고 다대포에서 채취하여 일반성분을 조사하였다(Table 1). 그 결과, 회분함량은 다대포에서 채취한 꼬시래기의 경우 8.57%로 가장 낮았으며 송도에서 채취한 붉은잎은 30.23%로 회분함량이 가장 많았다. 한천원료로 주로 이용되고 있는 우뭇가사리의 경우 9.02~13.30%로 같은 종류의 해조류이지만 채취장소에 따라 함량차이가 있었다. 한천 원료인 꼬시래기의 경우도 8.57~14.07%로 우뭇가사리와 같이 채취장소에 따라 함량차이가 크다는 것을 알수 있었다. 단백질 함량은 광안리 풀가사리의 경우 18.11%로 가장 낮았고 송도 붉은까막살의 경우 33.90%로 가장 높았다. 지방은 0.11 ~ 0.90%로 모든 홍조류에서 함량이 1%미만으로 낮게 나타났다. 최근에 Cho et al. (1995)은 식용해조류중의 무기원소의 분포와 일반성분의 조성을 분석한 결과 채취 장소와 시기에 따른 변동이 컸다고 밝히고 있다.

Table 1. Proximate composition of red algae

Unit : %(dry base)

Species of algae	Collection place	Ash	Protein	Lipid	Carbohydrate
<i>Gelidium amansii</i>	Songdo	13.30	20.47	0.21	66.02
<i>Gigartina tenella</i>	Songdo	29.48	27.42	0.90	42.20
<i>Carpopeltis cornea</i>	Songdo	13.13	33.90	0.28	52.69
<i>Plocamium ovicornis</i>	Songdo	18.57	30.04	0.29	51.10
<i>Callophyllis adnata</i>	Songdo	30.23	26.03	0.29	43.45
<i>Gelidium amansii</i>	Ganganri	12.28	19.99	0.31	67.42
<i>Gracilaria verrucosa</i>	Ganganri	14.07	34.36	0.61	50.96
<i>Lomentaria hakodatensis</i>	Ganganri	29.94	29.00	0.68	40.38
<i>Gymnogongrus flabelliformis</i>	Ganganri	17.32	31.15	0.24	48.71
<i>Chondrus pinnulatus</i>	Ganganri	12.91	22.47	0.22	64.40
<i>Actinotrichia fragilis</i>	Ganganri	21.17	24.51	0.41	46.09
<i>Gloiopeltis tenax</i>	Ganganri	19.20	18.11	0.64	62.05
<i>Gelidium amansii</i>	Dadaepo	9.02	20.99	0.11	69.88
<i>Gracilaria verrucosa</i>	Dadaepo	8.57	26.90	0.26	64.27
<i>Campylaeophora hypnaeoides</i>	Dadaepo	11.41	31.69	0.53	56.37
<i>Carpopeltis cornea</i>	Dadaepo	15.56	23.37	0.36	60.71

수용성 성분의 수율은 남해안의 송도에서 채취한 붉은까막살의 경우 4.32%로 가장 적었고 광안리 깃꼴진두발은 55.78%로 수율이 가장 많았다. 한천원료로 주로 이용되는 우뭇가사리의 추출 수율은 30.58 ~ 38.64%로 채취장소별 함량차가 크게 나타났다(Table 2).

해조류 중에 존재하는 황산기는 해조다당류의 성질을 결정하는 중요한 요인이 될 뿐만 아니라 해조류에서 추출한 산성 다당류의 주요한 구성성분이 되므로 함량을 측정 한 결과, 황산기의 함량이 1.65 ~ 19.48%로 종류에 따른 황산기 함량의 차이가 매우 큰 것으로 나타났다. 황산기 함량이 많은 해조류는 산성다당류인 카라기난의 원조로 이용되고 있으며, 황산기의 함

량이 낮은 해조류는 한천원료가 되고 있다. 한천의 원료로 이용되고 있는 우뭇가사리와 꼬시래기는 10% 미만이었으나, 카라기난의 원료로 주로 이용되는 돌가사리에서는 19.48%, 갯꿀진두발은 17.96%, 풀가사리는 18.23%로 나타났다.

Table 2. Yields of water-soluble compound and contents of sulphate in red algae

Unit : %(dry base)

Species of algae	Collection place	Water-soluble compound	Sulphate
<i>Gelidium amansii</i>	Songdo	30.58	2.35
<i>Gigartina tenella</i>	Songdo	10.07	19.48
<i>Carpopeltis cornea</i>	Songdo	4.32	11.74
<i>Plocamium ovicornis</i>	Songdo	13.46	16.85
<i>Callophyllis adnata</i>	Songdo	25.49	11.15
<i>Gelidium amansii</i>	Ganganri	35.14	1.92
<i>Gracilaria verrucosa</i>	Ganganri	29.53	6.67
<i>Lomentaria hakodatensis</i>	Ganganri	33.54	2.98
<i>Gymnogongrus flabelliformis</i>	Ganganri	40.78	16.96
<i>Chondrus pinnulatus</i>	Ganganri	55.76	17.96
<i>Actinotrichia fragilis</i>	Ganganri	22.35	16.97
<i>Gloiopeltis tenax</i>	Ganganri	48.53	18.23
<i>Gelidium amansii</i>	Dadaepo	38.64	1.65
<i>Gracilaria verrucosa</i>	Dadaepo	41.81	9.03
<i>Campylaephora hypnaeoides</i>	Dadaepo	32.40	4.43
<i>Carpopeltis cornea</i>	Dadaepo	28.13	18.42

주로 한천 원료로 이용되고 있는 우뭇가사리는 1.65 ~ 2.35%였고, 꼬시래기는 6.67 ~ 9.03%로 꼬시래기 중의 황산기 함량이 우뭇가사리 중의 황산기 함량보다 월등히 많은 것으로 나타났다. 한천제조업에서 꼬시래기를 원료로 사용할 경우에는 알칼리 처리를 하여 황산기를 제거함으로써 우뭇가사리에서 추출한 한천과 같이 탄력있는 한천을 제조하고 있다.

본 실험에 사용한 13종류의 홍조류에서 추출한 수용성 성분의 구성당 조성을 gas chromatography로 분석한 결과(Table 3), 확인된 구성당은 3,6-anhydrogalactose(An-Gal), galactose(Gal), 6-methyl-galactose(6-Me-Gal), rhamnose(Rha), fucose, ribose(Rib), arabiose(Ara), xylose(Xyl), manose(Man) 그리고 glucose (Glu)였다.

Table 3. Sugar composition of red algae

Species of algae	place	Unit : %									
		An-Gal	Gal	6-Me-Gal	Rha	Fucose	Rib	Ara	Xyl	Man	Glu
<i>Gelidium amansii</i>	Songdo	42.89	52.11	-	0.59	1.94	-	-	0.98	0.66	0.83
<i>Gigartina tenella</i>	Songdo	8.85	73.04	-	0.74	3.74	0.48	-	6.52	0.59	6.04
<i>Carpopeltis cornea</i>	Songdo	10.21	65.83	9.05	0.87	1.57	0.83	-	5.66	1.49	4.50
<i>Plocamium ovicornis</i>	Songdo	1.42	57.21	-	1.10	5.53	1.10	-	6.60	0.95	26.09
<i>Callophyllis adnata</i>	Songdo	35.04	47.61	9.32	0.61	-	-	-	2.75	0.95	3.74
<i>Gelidium amansii</i>	Ganganri	37.01	58.61	0.79	1.44	-	-	-	0.81	0.59	0.75
<i>Gracilaria verrucosa</i>	Ganganri	27.87	54.18	-	0.64	-	-	-	0.63	0.47	16.21
<i>Lomentaria hakodatensis</i>	Ganganri	27.12	68.24	0.80	2.36	-	-	-	0.89	-	0.59
<i>Gymnogongrus flabelliformis</i>	Ganganri	36.02	56.90	-	0.67	-	-	-	2.56	0.67	3.17
<i>Chondrus pinnulatus</i>	Ganganri	19.26	74.38	-	1.01	-	-	0.53	2.72	0.62	1.47
<i>Actinotrichia fragilis</i>	Ganganri	2.93	80.74	-	1.09	-	-	-	9.12	-	6.12
<i>Gloiopeltis tenax</i>	Ganganri	20.56	75.89	-	0.78	-	-	-	1.61	0.38	0.78
<i>Gelidium amansii</i>	Dadaepo	45.61	51.25	-	1.82	-	-	-	0.51	0.45	0.35
<i>Gracilaria verrucosa</i>	Dadaepo	30.69	55.13	1.42	0.69	-	0.22	0.21	0.38	0.42	11.06
<i>Campylaeophora hypnaeoides</i>	Dadaepo	39.67	54.96	1.19	0.64	-	0.10	0.11	1.58	0.62	1.13
<i>Carpopeltis cornea</i>	Dadaepo	3.31	79.92	1.84	1.27	-	-	-	8.67	-	4.99

한천의 원료로 주로 이용되고 있는 우뭇가사리의 구성당은 An-Gal과 Gal가 95%이상 이었다. 꼬시래기의 구성당은 An-Gal과 Gal가 82.05 ~ 85.82%였으며 Glu가 11.06 ~ 16.21%로 나타났다. 부챗살의 구성당은 An-Gal과 Gal가 92.92%였으며 Glu와 Xyl가 각각 3.17, 2.56%였다. 석묵의 구성당은 An-Gal와 Gal가 94.65%였으며 Glu와 Xyl가 각각 1.13, 1.58%였다. 돌가사리의 주 구성 당은 Gal 가 73.04%, 붉은까막살은 Gal와 An-Gal 가 각각 65.83-79.92%, 3.31 ~ 10.21%, 애기곱슬이는 Gal가 57.21%였으며 Glu와 Xyl가 각각 26.09%, 6.60%였다. 붉은잎은 Gal가 47.61%였으며 An-Gal와 6-Me-Gal가 각각 35.04, 9.32%였고, 애기마디잘록이는 Gal가 68.24%였으며 An-Gal와 Rha가 각각 27.12, 2.36%이며, 깃꼴진두발은 Gal가 74.38%, An-Gal와 Xyl가 각각 19.26, 2.72%이고 고리방사털은 Gal가 80.74%, Xyl와 Glu가 각각 9.12, 6.12%, 풀가사리는 Gal와 An-Gal가 각각 75.89%, 20.56%로 주 구성 당 이었다. 구성 당의 조성비를 검토한 결과, 우뭇가사리와 꼬시래기 뿐만 아니라 석묵과 부챗살도 한천원료로서의 가능성이 있음을 알 수 있었으므로 석묵으로 한천을 제조한 결과 겔강도가 $1230\text{g}/\text{cm}^2$ (1.5%한천겔)인 한천(수율18%)을 만들 수 있었다.

2. 한천의 제조방법

한천원조로부터 한천을 제조하는 과정은 크게 원료의 전처리 공정, 추출 공정, 여과 공정, 탈수 및 건조 공정으로 나눌 수 있다. 따라서 이들 각 공정을 검토하여 최적의 한천제조 방법을 개선하고자 하였다.

가. 한천원료의 전처리 공정

한천원조에는 토사, 조개껍질등의 이물질이 부착하여 있기 때문에 10시간 이상 팽윤 시킨후 수세의 과정을 거쳐야한다. 우뭇가사리의 경우에는 수세후 바로 추출하지만 꼬시래기를 원조로 사용할 때에는 알칼리 처리

를 하여야 한다. 알칼리 처리를 하지않고 추출할 때에는 추출액의 겔화가 일어나지 않는다. 알칼리 처리는 보통 원조를 세척하기 전에 그대로 알칼리 용액에 담구어 가열처리를 하는데 처리조건은 꼬시래기의 종류와 산지에 따라서 다르다. 알칼리 처리시 수산화 나트륨의 농도는 3~20%, 처리온도는 60~90℃, 처리시간은 1~4시간으로 알려져 있다. 본 실험에서 사용한 꼬시래기의 경우 5%의 수산화 나트륨용액으로 2시간 또는 3시간 처리했을때 추출용액의 겔화가 일어나지 않았으며, 10%용액으로 3시간 처리시 겔강도가 강한 한천질을 추출할 수 있었다. 광안리 꼬시래기를 원료로 사용하였을 경우 수산화 나트륨의 농도를 0, 4, 8%로하여 85℃에서 3시간 처리하여 한천을 제조한 결과 0%처리구는 겔화가 일어나지 않았으며, 4%처리구와 8%처리구는 겔화가 일어났으나, 4%처리구는 8%처리구보다 겔강도가 낮았다.

Park et al. (1985)은 염산, 황산, 수산을 농도별로 처리하여 참우뭇가사리로 부터 한천을 추출하고(100℃, 1시간), 추출한 한천의 수율과 물성을 조사한 결과, 0.007N 염산추출시 수율이 38.7%로 가장 높았고, 0.005N 염산추출시 겔강도가 511g/cm²로 가장 높았고, 회분함량과 황산기 함량이 가장 낮았다고 보고하였다. Matsushashi(1977)는 0.1N 염산으로 전처리한 원조(우뭇가사리속)로 추출하면 수율이 높고, 겔강도도 좋은 한천을 제조할 수 있다고 하였다. 본 연구에서도 한천의 수율과 품질을 개선하고자 우뭇가사리를 0.1N 염산으로 10℃에서 30, 60, 90 그리고 120분간 전처리하여 한천을 제조하고 수율, 겔강도, 회분 그리고 황산기 함량을 측정하였다. 그 결과 염산으로 전처리하여 추출(120℃, 3시간)하는 경우에는 전처리하지 않은 시료에 비하여 오히려 수율이 감소되었고, 겔강도도 처리시간이 길어질수록 비례하여 감소하였다. 그 이유는 전처리 단계에서 한천질의 부분가수분해가 일어났기 때문으로 생각된다. 그러나 회분 및 황산기 함량은 감소하는 것으로 나타났다(Table 4).

Table 4. The physicochemical characteristics of agar extracted from *Gelidium amansii* pretreated 0.1N HCl

Pretreatment time(min.)	Yield(%)	Gelstrength(g/cm ²)	Ash(%)	Sulfate(%)
0	43.3	592	3.22	1.89
30	43.3	585	3.06	1.83
60	41.9	480	3.18	1.369
90	40.3	471	2.89	1.64
120	39.7	295	2.41	1.56

* Extraction condition : 120°C for 3hrs

Acid pretreatment : 10°C with 0.1N HCl

나. 한천의 추출 공정

한천은 한천원조(우뭇가사리, 꼬시래기)를 자숙, 한천질을 추출하여 여과 냉각시켜 만든 한천겔을 동결과 해동을 반복하면서 탈수하고 건조시켜 제조한다(Fig. 1). 한천의 제조공정 가운데 추출조건은 수율 및 한천의 물성에 큰 영향을 미친다. 박 등은 염산, 황산, 수산을 농도별로 처리하여 우뭇가사리로 부터 한천을 추출하고 수율과 물성을 조사하고, 0.007N 염산추출시 수율이 38.7%로 가장 높았고, 0.005N 염산추출시 겔강도가 511g/cm²로 가장 높았고, 회분함량과 황산기 함량이 가장 낮았다고 보고하였다.

꼬시래기로 부터 한천을 추출할 때에는 알카리 용액으로 전처리하여 추출함으로써 황산기의 함량을 떨어뜨리고, 한천의 주 구성성분인 3,6-anhydrogalactose의 비율을 증가시켜 한천의 겔화능을 증대시킨다. 그러나, 한천은 산이나 알카리 영역에서는 구성성분의 부분 가수분해로 인하여 물성의 변화를 받기 쉽다. 따라서 본 실험에서는 한천의 추출에 미치는 수소이온 농도의 영향, 추출시간 및 추출온도, 추출용액의 분리공정, 탈수

및 건조공정, 국내산 우뚝가사리의 산지별 생산 시기별 이화학적 특성을 조사하여 효율적인 한천 제조 조건을 설정하고자 하였다.

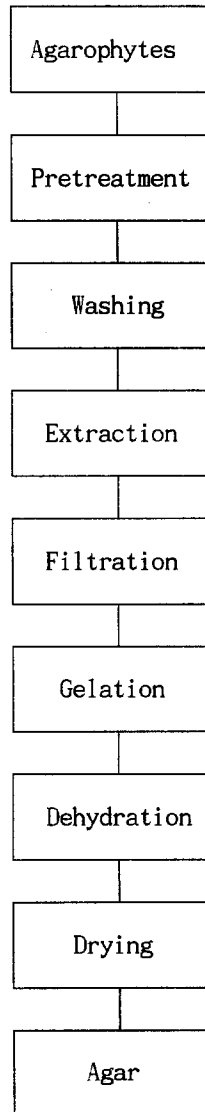


Fig. 1. Flow chart of agar manufacturing process

1) 한천의 추출에 미치는 수소이온농도(pH)의 영향

한천 원조로 부터 한천질을 추출할 때, 원조의 종류, 전처리 방법 그리고 추출조건에 따라서 한천의 성질 및 수율이 크게 달라진다. 일반적으로 한천의 추출시 산성용액으로 추출하는데 강산성 조건에서는 한천성분이 부분 가수분해를 받게 되며, pH 2이하와 pH 13이상에서는 전혀 겔화가 일어나지 않는다. 따라서 추출용액의 pH는 매우 중요한 요인이 된다. 본 실험에서는 pH에 의한 한천의 추출수율 및 겔화를 조사하였다(Table 5).

Table 5. The extraction of agar according to extraction solution(pH) from *Gelidium amansii*

pH	Yield(%)	Sulfate(%)	Ash(%)	Gel strength(g/cm ²)
3	17.3	2.10	4.0	570
5	17.2	1.91	3.7	630
7	18.7	1.97	4.1	630
9	13.8	2.17	4.4	640

* Extraction condition : extraction time 3hrs, temperature 100℃, Extraction solution 30 times.

우뭇가사리를 원료로하여 pH 3, 5, 7, 9에서 추출한 한천은 모두 겔화 하였으며 추출수율은 13.8~18.7%로 나타났다. 실험 결과 추출용액의 pH는 6~7로 했을 때 추출 수율이 가장 높았다. 회분함량은 3.7~4.4%로 나타났으며 겔 강도는 pH3에서 570으로 낮았으나 그 외에는 겔 강도가 630~640으로 상당히 높은 것으로 나타났다. 이 결과를 통해 추출용액은 약산성 또는 중성으로 하는 것이 효과적인 것으로 나타났다.

광안리에서 채취한 꼬시래기를 원료로하여 알카리 전처리를 하지않고 pH 3, 5, 7, 9에서 추출한 한천은 겔화가 되지 않거나 겔강도가 너무 약한 것

으로 나타났다(Table 6). 이 결과로 볼 때 꼬시래기를 한천의 원료로 사용할 때는 반드시 알칼리 전처리를 해야함을 알 수 있었다. 따라서 수산화나트륨을 0~8%의 농도로 전처리하여 한천을 추출한 결과, 6%처리시 겔강도가 좋은 한천을 제조할 수 있었다(Table 7).

Table 6. The extraction of agar according to pH of extraction solution from *Gracilaria verrucosa*

pH	pH extraction solution after extraction	
3	5.87	no gelling
5	5.98	no gelling
7	6.17	no gelling
9	6.29	no gelling
11	7.60	no gelling

* Extraction condition : extraction time 3hrs, temperature 100°C, extraction solution 20 times

Table 7. The extraction of agar according to NaOH solution pretreatment from *Gracilaria verrucosa*

NaOH Con. (%)	Yield(%)	Gelstrength(g/cm ²)	Ash(%)	Sulfate(%)
0	27.5	no gelling	13.2	6.30
2	6.5	1170	3.1	2.70
4	7.0	628	3.5	2.43
6	6.7	1208	3.9	2.37
8	6.8	1050	2.4	2.61

* NaOH pretreatment : 85°C, 3hrs

* extraction condition : extraction time 3hrs, temperature 100°C, extraction solution 30 times

다대포에서 채취한 석목을 원료로하여 한천을 제조할 때에도 꼬시래기의 경우와 같이 알칼리 전처리의 경우 겔강도가 좋은 한천을 제조할 수 있

었다(Table 8). 석묵한천의 겔강도는 1232-1241(g/cm²)로 나타났으며, NaOH 처리농도는 4%가 적절한 것으로 판단되었다.

Table 8. The extraction of agar according to NaOH solution pretreatment from *Campylocephora hypnaeoides*

NaOH Con. (%)	Yield(%)	Gelstrength(g/cm ²)	Ash(%)	Sulfate(%)
0	30.9	no gelling	6.43	4.23
2	17.4	1232	4.21	1.27
8	19.9	1241	2.94	0.98

* NaOH pretreatment : 85°C, 3hrs

* extraction condition : extraction time 3hrs, temperature 100°C, extraction solution 30 times

2) 추출시간 및 추출온도

한천제조 공장에서는 대형의 추출용기를 사용하며 자숙시간은 16시간 전후이다. 그러나 소량의 원료를 사용하는 경우에는 그렇게 많은 시간을 필요로하지 않는다. 100g의 전처리한 우뭇가사리를 사용하여 추출시간별로 수율을 살펴본 결과 100°C에서 1, 2, 3, 4 그리고 5시간 추출 하였을 때의 수율은 각각 16.9, 22.8, 31.1, 32.2 그리고 33.1%로 나타났다. Autoclave를 사용하여 120°C에서 1, 2, 3 그리고 4시간 추출 하였을 때의 수율은 각각 36.4, 42.1, 43.3 그리고 43.6%로 나타났다. 앞의 결과로 볼 때 추출시간을 길게 할수록 추출온도가 높을수록 수율이 증가하는 것을 알수 있었으며 100°C에서 추출하는 것 보다 120°C에서 추출하는 것이 수율면에서는 월등히 좋은 것으로 나타났다. 그리고 추출시간은 2-3시간으로 하는 것이 좋았다(Table 9).

Table 9. Yields of agar according to extraction time and temperature from *Gelidium amansii*

Extractiontime(hrs)	Extraction temperature	
	100℃	120℃
1	16.9	36.4
2	22.8	42.1
3	31.1	43.3
4	32.2	43.6
5	33.1	-

(%)

* extraction solution 30 times

3) 추출용액의 분리 공정

한천원료로부터 추출한 용액은 저온에서 겔을 형성할 뿐만 아니라 점성이 있기 때문에 추출용액을 분리하기가 매우 어렵다. 용액과 추출잔사를 분리하기 위해서는 여과 및 원심분리 방법이 가능하며 본 실험에서는 두가지 방법을 검토한 결과 소량의 시료를 사용할때는 두가지 방법이 가능하나 양이 많을 때에는 여과법이 효과적이었다.

4) 탈수 및 건조 공정

한천원료에서 추출한 추출용액을 여과한 후 상온에 방치하면 한천겔이 된다. 한천겔은 수분함량이 약 99%이므로 한천질을 얻기 위해서는 수분을 제거해야한다. 수분을 제거하기 위하여 동결과 해동을 반복하여 다량의 수분을 제거한 후 열풍건조기로 건조하는 방법과 유압식 압착탈수기로 대부분의 수분을 제거한 후 열풍건조기로 건조하는 방법을 사용하였다. 동결해동 방법은 모든 원료에 적용가능 하지만 압착탈수기를 사용하는

경우에는 겔의 강도가 약한 경우에는 손실되는 양이 많은 단점이 있었다. 그러나, 동결해동법에 비하여 압착탈수법을 사용하면 탈수에 소요되는 시간을 절약할 수 있었다.

5) 국내산 우뭇가사리의 산지별 생산 시기별 이화학적 특성

국내산 한천원료로서 현재 가장 많이 이용되고 있는 우뭇가사리의 채취장소 및 채취시기별 수율 및 추출물의 이화학적 특성을 조사한 결과(Table 10) 3월에 채취한 원료에 비하여 6월에 채취한 원료의 수율이 높고 겔강도가 강한 것으로 나타났다. 특히 6월에 송도에서 채취한 우뭇가사리의 한천 수율이 34.4%로 높게 나타났으며, 겔강도도 570 g/cm²으로 가장 좋았다.

Table 10. The physicochemical characteristics of agar extracted from *Gelidium amansii* collected various places and time

Sample Collection		Yield (%)	Ash (%)	Protein (%)	Lipid (%)	Gelstrength (g/cm ²)
Places	Month					
Dadaepo	March	16.2	5.0	3.7	0.3	480
Songdo	March	18.6	3.9	3.4	0.4	340
Songdo	June	34.4	4.0	3.1	0.3	570
Ganganri	March	17.4	4.2	4.0	0.4	320
Haeundae	June	32.5	4.1	6.4	0.3	440

* extraction condition : extraction time 3hrs, temperature 100°C, extraction solution 30 times

남해안(다대포, 송도, 광안리), 동해안(대변, 일광), 제주도 및 울릉도산 한천의 수율 및 이화학적 특성을 조사한 결과(Table 11), 한천 수율

은 31.6~46.8%범위로 제주도 및 울릉도산 우뭇가사리의 수율이 매우 높은 것으로 나타났고, 겔강도는 496~887 g/cm²로 동해안(대변, 일광)산 우뭇가사리에서 추출한 한천이 특히 강한 것으로 나타났다. 추출한 한천의 회분 함량은 2.4~2.8%범위로 우뭇가사리의 산지에 따른 차이는 크지 않았다. 황산기 함량은 1.25~1.67%로 나타났다. 이러한 결과는 지역별 우뭇가사리의 품질을 결정하는 중요한 기초자료가 될 수 있을 것으로 사료된다.

Table 11. The physicochemical characteristics of agar extracted from *Gelidium amansii* collected various places

Collection Places	Yields(%)	Gel strength(g/cm ²)	Ash(%)	Sulfate(%)
Dadaepo	38.4	565	2.5	1.38
Songdo	31.6	635	2.4	1.53
Ganganri	36.0	496	2.4	1.48
Daepyeun	34.3	854	2.5	1.67
Ilgwang	33.0	887	2.8	1.61
Chejudo	43.6	592	2.7	1.51
Ulreungdo	46.8	595	2.6	1.25

* extraction condition : extraction time 4hrs, temperature 120°C, extraction solution 30 times

3. 한천의 정제

한천정제의 의미는 한천구성성분 이외의 불순물을 제거하는 것으로 볼 수 있으며 넓은 의미로는 한천의 주 구성성분인 아가로스지의 분리정제도 포함되나 아가로스의 분리정제는 다음에 검토한다. 한천중에 함유된 무기질, 황산기 등의 불순물을 제거한 정제한천의 황산기, 회분 함량 및 한천의 주요한 특성인 겔강도를 측정하여 효과적인 한천정제 방법을 조사하였

다.

EDTA염(ethylenediaminetetraacetate) 및 증류수를 사용하여 한천을 정제한 결과(Table 12), 불순물로 함유된 황산기와 회분의 함량을 상당히 제거할 수 있었다. 증류수 처리는 한천분말에 40배량의 증류수를 넣고 하룻밤동안 교반후 탈수건조하였을 때 황산기 함량은 1.35%에서 1.32%로 감소하였고, 회분함량은 1.43에서 1.08%로 감소하였고 겔강도는 증가하였다. EDTA염을 2일 처리한 경우 황산기는 1.35%에서 0.37%로 회분함량은 1.43%에서 0.34%로 상당히 감소하였다. EDTA염 처리시에는 황산기 및 회분함량이 상당히 줄었으나 겔강도는 상당히 감소하였다. 따라서 회분과 황산기 함량이 낮고 겔강도도 높은 정제한천을 제조하기 위해서는 방법을 개선해야 할 필요성이 있음을 알수 있다.

Table 12. The physicochemical characteristics of purified agar extracted from *Gracilaria verrucosa*

Samples	Sulfate (%)	Ash (%)	Gel strength (g/cm ²)	Yields (%)
Agar from <i>G. verrucosa</i>	1.35	1.43	934	100.0
After D.W. washing	1.32	1.08	981	95.0
After 1 x day EDTA washing	0.66	0.53	384	83.5
After 2 x days EDTA washing	0.37	0.34	393	80.0

* Gel strength : 1.5% concentration

EDTA염을 처리한 정제한천의 겔강도를 개선하기 위하여 EDTA염을 처리하여 제조한 한천의 pH를 측정하니 산성 영역이었으며, 한천용액을 중화시켜 겔강도를 측정한 결과 겔강도가 개선되었다(Table 13). 그리고 겔강도가 높은 정제한천을 얻기 위하여 EDTA염 처리후, 0.2% NaBH₄를 첨가한

4%NaOH로 60℃에서 3시간 처리한 결과 937 g/cm²에서 1490g/cm²로 나타났으며 수율은 66.3%로 EDTA염 만으로 처리했을 때에 비하여 상당히 낮게 나타났다. 따라서 황산기 및 회분 함량이 낮고 겔강도가 높은 정제한천을 얻고자 할 때에는 EDTA염처리와 알칼리 처리법을 병행하는 것이 바람직할 것으로 사료된다.

Table 13. The physicochemical characteristics of purified agar extracted from *Gracilaria verrucosa*

Samples	pH	Sulfate (%)	Ash (%)	Gel strength (g/cm ²)
Agar from <i>G. verrucosa</i>	7.30	1.35	1.43	934
After 1 x day EDTA washing	5.20	0.26	0.68	134
After 1 x day EDTA washing	7.10	0.26	0.68	829
After 2 x days EDTA washing	5.10	0.26	0.50	60
After 2 x days EDTA washing	7.10	0.26	0.50	591

* Gel strength : 1.5% concentration

제주산 우뭇가사리에서 추출한 한천을 사용하여 증류수 처리후 아세톤 탈수, EDTA염 처리, 에탄올 침전 처리, 아세톤 침전 처리 그리고 프로판올 침전 처리 등의 다양한 방법으로 한천을 정제하였다(Table 14). 실험 결과에 의하면 모든 처리구에서 황산기 및 회분의 함량이 감소되어 정제효과가 있었다.

Table 14. The physicochemical characteristics of purified agar extracted from *Gelidium amansii*

Samples	Sulfate (%)	Ash (%)	Gel strength (g/cm ²)	Yield (%)
Agar from <i>G. verrucosa</i>	2.20	2.42	618	100.0
After D.W. washing	1.66	1.65	650	94.1
After D.W. washing, acetone dehydration	1.28	1.62	895	89.0
After 1 x repeated EDTA washing	1.26	1.93	530	77.1
After 2 x repeated EDTA washing	1.20	1.84	524	73.1
After 3 x repeated EDTA washing	1.11	1.82	527	71.9
After Ethanol precipitation	1.22	2.10	637	96.0
After Acetone precipitation	1.15	1.80	635	94.5
After n-Propanol precipitation	1.34	1.94	720	82.1

* Gel strength : 1.5% concentration

특히 증류수 및 EDTA염 처리과정은 한천을 용해하지 않고 처리하기 때문에 매우 편리한 장점이 있으므로 EDTA염의 농도별로 처리하여 이화학적 특성을 검토하였다(Table 15). 그결과, 황산기 및 회분 함량이 상당히 감소하였으며, 처리농도는 0.02M이 적당한 것으로 판단되었다.

Table 15. The physicochemical characteristics of purified agar extracted from *Gelidium amansii*

Samples	Sulfate (%)	Ash (%)	Gel strength (g/cm ²)	Yields (%)
Agar from <i>Gelidium amansii</i>	2.20	2.42	618	100.0
After 0.005M EDTA washing	0.51	1.41	665	80.6
After 0.01M EDTA washing	0.49	1.74	753	83.2
After 0.02M EDTA washing	0.48	1.94	758	82.7
After 0.04M EDTA washing	0.48	1.88	753	83.3
After 0.08M EDTA washing	0.48	1.86	857	83.2

* Gel strength : 1.5% concentration

한천에 함유되어있는 무기질은 여러 가지 방법으로 정제한 한천에서 그 함량이 감소되었다(Table 16). 우뭇가사리에서 추출한 한천에는 나트륨, 칼슘, 마그네슘 그리고 칼륨이 다량 함유되어 있었으며, 인, 철, 알루미늄, 아연 그리고 납은 100ppm이하로 미량이었다. 나트륨을 제거하는데는 CPC처리, 칼슘의 제거는 EDTA처리, 칼륨, 인, 철 그리고 아연의 제거는 키토산 처리시에 가장 효과가 좋았다.

Table 16. The content of mineral in agar purified with various methods

(Unit : ppm)

Samples	Na	Ca	Mg	K	P	Fe	Al	Zn	Pb
Agar from <i>Gelidium amansii</i>	2934	2472	2259	2527	81.1	66.4	71.7	29.7	ND
After D.W. washing	678	1778	1598	438	17.6	8.8	13.4	10.9	ND
After 1 x repeated EDTA washing	2291	93	31	341	6.5	44.4	109.6	11.0	ND
After 2 x repeated EDTA washing	2401	101	23	335	7.3	25.2	79.3	3.5	ND
After 3 x repeated EDTA washing	2691	83	23	607	7.4	29.7	86.6	2.4	ND
After Ethanol precipitation	1295	958	448	169	19.9	45.4	52.9	31.8	0.6
After Acetone precipitation	1101	1139	700	199	24.3	23.3	58.0	7.1	0.6
After n-Propanol precipitation	1444	1063	634	138	14.6	24.0	49.0	18.2	1.2

* ND : Not detected

Table 17. Sugar composition of agar and purified agar

Sample	An-Gal	Gal	6-Me-Gal	Rha	Fucose	Rib	Ara	Xyl	Man	Glu
Agar(S Co.)	42.19	50.76	1.47	2.01	-	-	-	0.97	1.38	1.24
Agar(A Co.)	43.31	51.19	0.80	1.01	-	-	-	1.56	1.35	0.80
Agar(F Co.)	45.72	35.87	14.79	1.36	-	-	-	-	1.40	0.85
Domestic agar	39.80	35.02	15.74	1.98	-	-	-	-	1.31	6.14
"(D.W. washing)	43.74	35.69	15.25	1.99	-	-	-	-	1.21	2.12
"(EDTA treatment)	43.97	34.18	16.14	1.74	-	-	-	-	1.40	1.94
Agar extracted from <i>Gracilaria verrucosa</i>										
2% NaOH pretreatment	41.20	49.98	1.56	-	-	-	-	0.74	1.28	5.24
4% NaOH pretreatment	39.71	44.16	1.27	-	-	-	-	-	1.38	13.48
6% NaOH pretreatment	40.44	50.00	1.39	-	-	-	-	-	1.11	7.06
8% NaOH pretreatment	44.57	44.30	1.65	-	-	-	-	-	1.48	8.01
Agar extracted from <i>Campylaeophora hypnaeoides</i>										
2% NaOH pretreatment	45.38	48.11	0.87	1.22	-	-	-	2.24	1.41	0.77
4% NaOH pretreatment	44.82	47.22	1.30	1.75	-	-	-	2.32	1.55	1.04

한천 및 정제한천의 구성당을 분석하였다(Table 7). 그 결과 한천의 주 구성당인 An-Gal, Gal 그리고 6-Me-Gal가 대부분의 시료에서 90%이상을 차지하였다. 그러나 M 사의 아가로스에는 mannose의 함량이 상당히 높았고, 국내에서 시판되는 한천에는 glucose의 함량이 타사 제품에 비하여 높았으나 증류수 처리 및 EDTA처리시 상당히 감소하였다.

Table 18. 3,6-Anhydro-Galactose contents of agar and agarose(%)

Sample	GC method	Resorcinol method
Agar(S Co.)	18.71	21.58
Agar(A Co.)	20.60	21.55
Agar(F Co.)	21.49	22.11
Agar(D Co.)	21.56	22.98
Domestic agar	20.73	22.93
"(D.W. washing)	16.69	22.28
"(EDTA 1day treatment)	23.59	23.96
"(EDTA 2days treatment)	32.62	23.59
Agar extracted from <i>Gracilaria verrucosa</i>		
2% NaOH pretreatment	11.63	15.25
4% NaOH pretreatment	14.35	17.18
6% NaOH pretreatment	11.34	15.67
8% NaOH pretreatment	18.09	15.76
Agar extracted from <i>Campylaeophora hypnaeoides</i>		
2% NaOH pretreatment	14.16	17.29
4% NaOH pretreatment	15.87	15.23

Table 18에서는 한천의 주 구성성분인 3,6-Anhydro-Galactose를 발색법(Resorcinol)과 GC법으로 정량한 결과이다. 외국산 한천 경우, 발색법에 의한 정량 결과는 21.55 - 22.98%, GC법으로 분석한 결과에서는 18.71 - 21.56%로 나타났다. 국내산 한천의 경우도 비슷한 결과로 나타났다. 국내산 한천 원조인 꼬시래기와 석묵을 여러농도의 수산화나트륨으로 전처리하여 제조한 한천도 함께 분석한 결과 3,6-Anhydro-Galactose의 함량이 비교적 낮게 나타났다.

4. 아가로스 분리방법 검토

한천의 주구성성분은 아가로스과 아가로펙틴이며 아가로스의 용도는 매우 다양하다. 따라서 아가로스를 효율적으로 분리정제하기 위한 연구가 계속 이루어져왔다. 본 연구에서는 주 연구내용인 아가로스의 효과적인 분리정제방법을 개발하기 위하여 여러 가지 방법을 사용하여 아가로스 분리방법을 검토하였다(Table 19). 결과를 살펴보면 키토산 처리에 의한 정제법은 황산기와 회분의 제거 효과가 가장 좋았다. PEG처리에 의한 한천 정제법은 황산기와 회분의 제거효과는 상당히 좋았으나, 수율이 55.6%로 매우 낮았다. CPC처리에 의한 정제 한천은 황산기와 회분의 함량이 감소하였고, 겔강도가 618에서 1180 g/cm²으로 가장 많이 증가하였다.

Table 19. The physicochemical characteristics of purified agar

Samples	Sulfate (%)	Ash (%)	Gel strength (g/cm ²)	Yield (%)
Agar from Gelidium amansii	2.20	2.42	618	100.0
After Chitosan treatment	0.87	1.22	755	62.3
After PEG treatment	0.94	1.34	645	55.6
tAfter CPC treatment	1.32	1.78	1180	56.7

* Gel strength : 1.5% concentration

제2절 아가로스의 제조

1. 한천 및 아가로스의 성분 조사

식품공업, 의약, 미생물 배지, 화장품 등의 다양한 용도를 가진 한천은 홍조류에 함유되어 있는 점질성 복합다당류로서 그 구성성분은 약 70%의 아가로스와 30%의 아가로펙틴의 혼합물로 알려져 있다. Agarose는 Agarobiose가 반복하여 직쇄상으로 결합되어 있으며, Agarobiose는 β -D-galactose + 3,6-anhydro-L-galactose의 구성성분으로 되어있는 것으로 알려져있다. 한천의 증성 다당인 아가로스는 면역확산, 전기영동, 바이러스와 세포입자의 겔여과를 위한 유용한 성분이라는 것이 밝혀짐에 따라 수율과 순도가 높은 아가로스를 분리하고자하는 연구가 많이 이루어지고 있다. Table 20에서는 아가로스를 구입하여 구성당 조성을 GC로 분석한 결과이다. 일반적으로 아가로스의 구성성분으로 알려진 D-galactose 와 3,6-anhydro-L-galactose가 주 구성성분으로 분석결과 나타났고 일부제품에서는 6-Me-Gal의 함량도 상당히 높게 나타났다. 그리고 Rha, Xyl, Man 그리고 Glu도 아가로스에서 확인되었다.

Table 20. Sugar composition of agarose

Samples	An-Gal	Gal	6-Me-Gl	Rha	Fucose	Rib	Ara	Xyl	Man	Glu
Agarose(A Co.)	36.84	48.27	11.25	1.45	-	-	-	-	1.25	0.95
Agarose(M CO.)	37.96	36.51	9.42	1.20	-	-	-	-	13.91	0.99
Agarose(F Co.)	45.24	49.39	1.26	2.20	-	-	-	-	1.49	0.42

Table 21에서는 아가로스의 주 구성성분인 3,6-Anhydro-Galactose를 발색법(Resorcinol)과 GC법으로 정량한 결과이다. 아가로스의 경우, 발색법에 의한 정량 결과는 22.15 ~ 24.69%, GC법으로 분석한 결과에서는 16.27

~ 20.40%로 나타났다.

Table 21. 3,6-Anhydro-Galactose contents of agar and agarose(%)

Sample	GC method	Resorcinol method
Agarose(A Co.)	16.27	22.15
Agarose(M Co.)	18.34	24.69
Agarose(F Co.)	20.40	23.37

2. 아가로스의 제조방법

가. 전처리 공정

아가로스의 원료로 사용하는 한천중에는 한천의 주성분 이외의 불순물이 함유되어 있으므로 먼저 증류수로 저온에서 수세하여 저온에서 가용성인 단당류등의 수용성 성분을 제거하고 아가로스를 분리하는 것이 좋다.

나. 아가로스의 분리

한천으로부터 아가로스를 분리하는 방법은 아세틸화에 의한 아가로스의 분리, 선택적 용해도차를 이용하는 방법, 4급 암모늄 침전법, 이온교환수지를 이용하는 방법, 불용성 지지체를 이용한 흡착법 및 전기영동법 등이 있다. 본 연구에서는 이들 방법 및 원리를 응용하여 효율적으로 아가로스를 분리하기 위한 방법을 검토하고, 나아가 더욱 개선된 방법을 찾고자하였다.

1) 키토산에 의한 아가로스 분리

키토산은 키틴의 탈아세틸화물로서 75%이상 탈아세틸화된 키토산은 양이온을 띠고 있으므로 식품공장에서 나오는 폐수중에 함유된 음이온을 띤 유기물의 응집제로 이용되고 있다. 이와같은 원리를 이용하여 한천의 구성성분인 아가로펙틴을 키토산으로 처리하여 침전시켜 제거함으로써

서 아가토즈를 분리하고자한다. 먼저 국내에서 시판되는 한천으로부터 키토산을 이용하여 아가토즈를 분리하고자 시도하였다. 키토산에 의한 아가토즈의 분리방법은 Fig. 2와 같다.

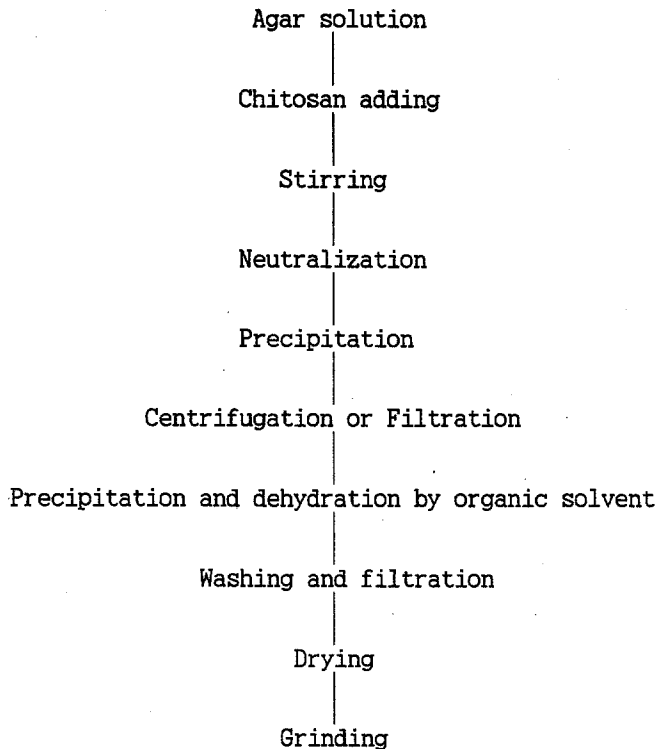


Fig. 2. Flow chart of agarose manufacturing process using chitosan

한천에 대하여 키토산의 농도별로 조절하여 아가토즈의 분리 효과를 검토한 결과(Table 22), 키토산 처리시에 황산기 및 회분함량이 상당히 감소하였으며 수율은 60.8 - 70.7%로 나타났다. 한천에 대한 키토산의 농도를 10% 하였을 때 황산기 및 회분함량이 0.3%로 떨어져 매우 좋은 결과를 나타내었다.

Table 22. The yield, sulfate, ash contents of agarose prepared by chitosan concentration

Samples	Sulfate (%)	Ash(%)	Yield(%)
Agar from <i>Gelidium amansii</i>	1.83	2.51	100.0
5 % chitosan treatment	0.72	0.76	70.7
10 % chitosan treatment	0.39	0.31	66.7
15 % chitosan treatment	0.90	0.52	60.8
20 % chitosan treatment	0.83	0.14	65.2

Table 23에서는 키토산을 농도별로 처리하여 분리한 아가로의 물성 즉 겔강도 및 투명도를 살펴 본 결과로서 반응용액의 pH가 4이하로 떨어지면 겔강도가 급격히 감소하였으며, 겔의 투명도도 좋지않았다. 따라서 겔강도 및 투명도를 개선할 방안을 고려해야 할 것으로 판단되었다.

Table 23. The physical properties of agarose prepared by chitosan concentration

Samples	pH	Gel strength (g/cm ²)	O.D. (agar solution)	O.D. (agar gel)
Agar from <i>Gelidium amansii</i>	7.20	334	0.243	0.534
5 % chitosan treatment	4.44	391	0.094	0.441
10 % chitosan treatment	3.78	140	0.304	2.221
15 % chitosan treatment	3.33	67	0.229	2.178
20 % chitosan treatment	3.11	94	0.393	1.620

* Gel strength : 1.5% concentration

pH : pH of reaction solution

앞의 결과에서 반응용액의 pH가 4이하에서는 겔강도 및 투명도가 좋지 않았으므로 이 점을 개선하기 위하여 한천용액의 pH를 조절하여 아가로를 분리하고 이화학적 특성을 조사하였다(Table 24). 결과에 나타나 있는 바와같이 황산기 및 회분 함량은 상당히 감소하였으나 겔강도는 원재료의 겔강도보다 떨어졌다. 그러나 pH를 조절하지 않았을 때보다는 개선되었다. 이러한 결과로부터 겔강도는 아가로스 분리과정중의 수소이온 농도에 큰 영향을 받는 것을 알 수 있었다.

Table 24. The physicochemical characteristics of agarose prepared by chitosan

Samples	pH	Sulfate (%)	Ash (%)	Gel strength (g/cm ²)	Yield (%)
Agar from <i>Gelidium amansii</i>	7.20	1.83	2.51	334	100.0
After 10% Chitosan treatment	6.60	0.71	0.23	218	55.9
After 10% Chitosan treatment	7.10	0.65	0.25	122	45.5
After 10% Chitosan treatment	8.00	0.61	0.24	159	54.8
After 10% Chitosan treatment	9.00	0.70	0.28	134	55.0

* Gel strength : 1.5% concentration

* pH was controled after reaction of agar solution and chitosan

pH : pH of reaction solution

Table 25에서는 한천용액의 pH를 7에서 10으로 조절하여 키토산 용액과 반응시키고 반응 침전물을 여과하여 제거한후 다시 상층액의 pH를 중성으로 조절하여 아가로스 분리 과정중 한천성분의 분해를 최소화하여 제조한 아가로스의 이화학적 특성을 조사한 결과이다. pH 9이상에서는 한천용액의 색이 갈색으로 변색 되었다. 겔강도는 원료와 거의 비슷하였으나 황산기 및 회분함량의 감소효과는 거의 나타나지 않았다. 그 이유는 중화와

정에서 첨가된 시약의 영향이 클 것으로 생각된다.

Table 25. The physicochemical characteristics of agarose prepared by chitosan

Samples	pH (agar solution)	Sulfate (%)	Ash (%)	Gel strength (g/cm ²)	Yield (%)
Agar from <i>Gelidium amansii</i>	7.2	1.83	2.51	334	100.0
After 10% Chitosan treatment	7.0	1.71	3.55	318	73.9
After 10% Chitosan treatment	8.0	1.65	3.92	345	71.4
After 10% Chitosan treatment	9.0	1.84	3.57	319	69.3
After 10% Chitosan treatment	10.0	1.82	5.26	320	68.8

* Gel strength : 1.5% concentration

* pH was controlled at 7.2 after reaction of agar solution and chitosan

Table 26에서는 아가로스 분리에 사용하는 키토산을 에탄올로 수세하고, 키토산용액을 여과하여 불용성 성분을 제거하여 사용하였다. 그리고, 한천용액의 pH를 6.61~9.00으로 조절하여 키토산 용액과 반응시키고 반응 침전물을 원심분리하여 제거한후 다시 상층액의 pH를 6, 7, 8 그리고 9로 조절하여 제조한 아가로스의 이화학적 특성을 조사한 결과이다. 겔강도는 상당히 증가되었으며 황산기 함량도 상당히 감소되었으나 회분함량의 감소효과를 거의 나타나지 않았다.

Table 26. The physicochemical characteristics of agarose prepared by chitosan

Samples	pH (agar solution)	Sulfate (%)	Ash (%)	Gel strength (g/cm ²)	Yield (%)
Agar from <i>Gelidium amansii</i>	7.2	1.83	2.51	334	100.0
After 10% Chitosan treatment	6.61	1.12	2.20	412	70.4
After 10% Chitosan treatment	7.16	1.15	2.64	475	72.2
After 10% Chitosan treatment	8.08	1.22	2.75	458	73.7
After 10% Chitosan treatment	9.00	1.27	2.63	441	73.4

* Gel strength : 1.5% concentration

* pH was controled after reaction of agar solution and chitosan

2) CPC(Cetylpyridium chloride)에 의한 아가로스 분리

CPC(cetylpyridinium chloride) 처리에 의한 한천 정제는 산성 다당류인 아가로펙틴과 반응하여 침전되고 중성인 아가로스와는 반응하지 않는 CPC의 성질을 이용하여 한천을 정제하는 방법으로(Hjerten, 1962), 황산기와 회분의 함량이 감소하고, 겔강도가 증가되므로 겔강도가 높은 아가로스를 제조하고자 할 때 매우 좋은 방법이다. CPC(Cetylpyridium chloride)에 의한 아가로스 분리과정은 Fig. 3과 같다.

CPC를 이용하여 한천으로부터 아가로스를 분리할 때 적정 농도를 찾기 위하여 한천에 대한 CPC의 비율을 5 - 40%범위에서 살펴보았다(Table 27 - 28). Table 27에서는 CPC를 농도별로 처리하여 황산기 함량, 회분 그리고 수율을 조사하였다. 그결과 황산기함량은 5%이상에서 급격히 떨어졌으며, 회분은 10%이상 처리에서 상당히 제거 되었다. 수율은 CPC처리시 64.1 - 73.5%범위로 나타났다.

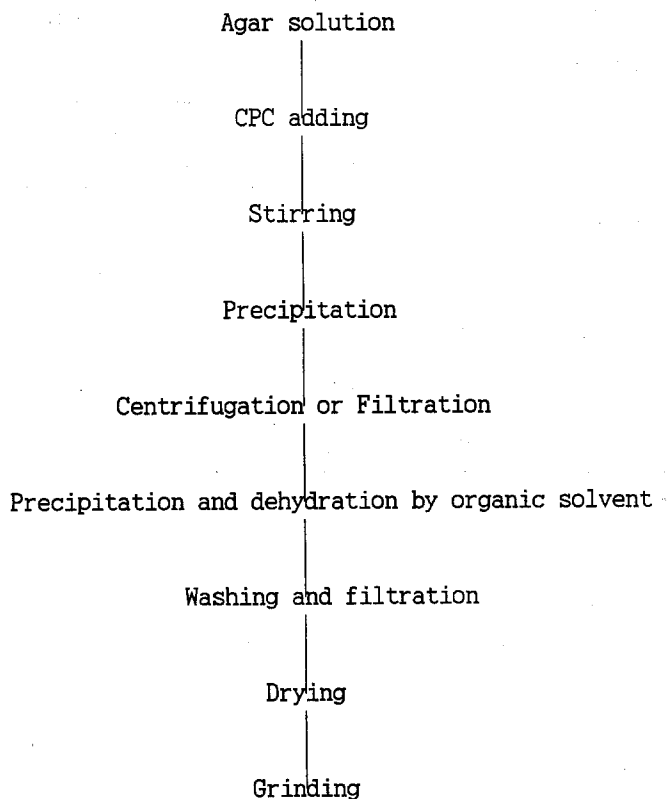


Fig. 3. Flow chart of agarose manufacturing process using CPC

Table 27. The yield, sulfate, ash contents of agarose prepared by CPC concentration

Samples	Sulfate (%)	Ash (%)	Yield (%)
Agar from <i>Gelidium amansii</i>	1.83	2.15	100.0
5% CPC treatment	0.55	2.12	65.9
10% CPC treatment	0.55	0.95	72.8
20% CPC treatment	0.53	0.83	73.5
30% CPC treatment	0.51	0.67	64.4
40% CPC treatment	1.52	0.79	64.1

Table 28. The physical properties of agarose prepared by CPC concentration

Samples	pH	Gel strengt (g/cm ²)	O.D (agar solution)	O.D (agar gel)
Agar from Gelidium amansii	7.20	334	0.243	0.534
5% CPC treatment	5.82	388	0.225	0.517
10% CPC treatment	5.73	416	0.377	0.579
20% CPC treatment	5.71	707	0.123	0.488
30% CPC treatment	5.63	725	0.007	0.344
40% CPC treatment	5.61	730	0.062	0.450

* Gel strength : 1.5% concentration

* pH : pH of reaction solution

Table 28에서는 CPC를 농도별로 처리하여 분리한 아가로스의 물성 즉 겔강도 및 투명도를 살펴 본 결과로서 반응용액의 pH는 5.61~5.82범위로 나타났으며 겔강도는 상당히 증가되었으나, 겔의 투명도도 대부분의 처리구에서 상당히 개선된 것으로 나타났다. 위의 결과로 볼 때, CPC 처리농도는 20~30%일때, 분리한 아가로스의 품질 특성이 가장 좋은 것으로 나타났다.

CPC에 의한 아가로스 분리시 아가로스가 주로 함유된 상층획분과 아가로펙틴이 주로 함유된 침전물을 효율적으로 분리하고 분리중에 겔화가 일어나는 것을 지연시키기 위하여 에탄올을 첨가하였다. 이때, 에탄올의 적정 농도를 찾기 위하여 반응용액에 대한 에탄올의 비율을 10 ~50%범위에서 살펴보았다(Table 29~30).

Table 29. The yield, sulfate, ash contents of agarose prepared by ethanol concentration

Samples	Sulfate (%)	Ash (%)	Yield (%)
Agar from <i>Gelidium amansii</i>	1.38	2.90	100.0
10% Ethanol treatment	0.14	0.20	51.1
20% Ethanol treatment	0.26	0.40	61.0
30% Ethanol treatment	0.24	1.10	67.6
40% Ethanol treatment	0.81	1.83	72.1
50% Ethanol treatment	0.66	1.81	79.6

Table 30. The physical properties of agarose prepared by ethanol concentration

Samples	Gel strengt (g/cm ²)	O.D (agar solution)	O.D (agar gel)
Agar from <i>Gelidium amansii</i>	329	0.245	0.523
10% Ethanol treatment	476	0.076	0.447
20% Ethanol treatment	362	0.088	0.407
30% Ethanol treatment	504	0.040	0.415
40% Ethanol treatment	419	0.028	0.388
50% Ethanol treatment	352	0.047	0.406

* Gel strength : 1.5% concentration

Table 30에서는 CPC의 첨가농도를 30%로 하고 에탄올 첨가농도를 다르게하여 분리한 아가로스지의 황산기, 회분 및 수율에 미치는 영향을 살펴

본 결과이다. 에탄올 농도를 40%이상 으로 처리했을 때 황산기 제거 효과가 매우 떨어졌고, 회분은 30%이상에서 효과가 매우 떨어졌다. 수율은 에탄올 농도를 높일수록 증가하였다. Table 30에서는 아가로의 겔강도 및 투명도에 미치는 영향을 살펴본 결과, 에탄올을 처리한 모든 처리구에서 겔강도 및 투명도는 개선되었다. 위의 결과로부터 CPC로 아가로를 분리하는 과정중 원심분리시에 반응용액이 균음으로 인하여 침전물과 상층액의 분리가 잘되지 않는 점을 개선하기 위하여 반응용액에 에탄올을 첨가하는 에탄올의 농도는 20~30%가 적정한 것으로 나타났다.

3) PEG(Polyethyleneglycol)에 의한 아가로스 분리

PEG(polyethyleneglycol)처리에 의한 한천 정제는 한천용액에 PEG를 첨가하여 한천용액중의 아가로펙틴을 용해도 차로 침전시켜 제거하는 방법으로 아가로스 분리에 사용되고 있다.

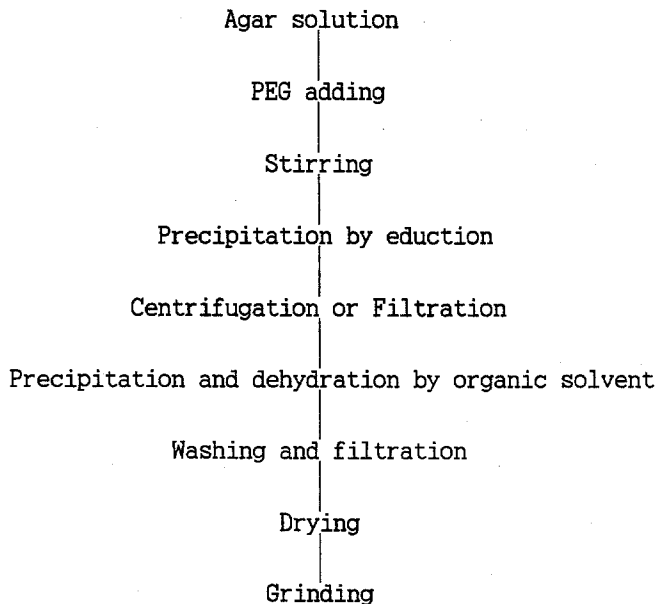


Fig. 4. Flow chart of agarose manufacturing process using PEG

PEG(Poly ethylene glycol)에 의한 아가로스 분리과정은 Fig.4와 같다. PEG로 아가르스를 분리 한 결과, 황산기와 회분의 제거효과는 상당히 좋았으나 수율이 낮았다. 그리고 아가로펙틴을 침전시키기 위하여 많은 양의 PEG가 소요되었다. 수율을 높이고 PEG의 적정 사용량을 구하기 위하여 먼저 PEG를 한천용액에 대하여 농도별로 처리하여 수율과 겔강도를 조사하였다(Table 31, 32). 결과를 살펴보면 PEG의 농도가 증가함에 따라 수율이 비례하여 증가되었고 특히 한천용액에 대하여 20%의 PEG를 첨가했을 때 수율이 많이 증가 하였으나, 그 이상의 농도에서는 크게 증가하지 않았다. 분리한 아가로스중의 황산기 및 회분의 함량은 감소되었다(Table 31).

Table 31. The yield, sulfate, ash contents of agarose prepared by PEG concentration

Samples	Sulfate(%)	Ash(%)	Yield(%)
Agar from <i>Gelidium amansii</i>	1.68	3.1	100.0
10% PEG treatment	0.86	0.9	52.9
20% PEG treatment	0.58	1.0	59.1
30% PEG treatment	0.61	1.2	67.5
40% PEG treatment	0.66	1.1	68.3
50% PEG treatment	0.87	1.4	70.4

PEG를 농도별로 처리하여 분리한 아가르스의 겔강도는 PEG를 처리한 모든 처리구에서 증가 효과가 있었으나, PEG의 농도를 증가시킴에 따라 겔강도 증가 효과가 감소되었다. 투명도는 원료한천보다 오히려 감소된 것으로 보아 투명도에 영향을 미치는 불순물이 아가로스 분리 과정중에 혼입되

는 것으로 생각되었다. 이들 결과로부터 한천으로부터 PEG를 이용하여 아가로즈를 분리할 때 PEG의 처리농도는 20%가 적절할 것으로 생각된다.

Table 32. The physical properties of agarose prepared by PEG concentration

Samples	Gel strengt (g/cm ³)	O. D (agar solution)	O. D (agar gel)
Agar from <i>Gelidium amansii</i>	465	0.188	0.514
10% PEG treatment	808	0.424	0.662
20% PEG treatment	669	0.310	0.563
30% PEG treatment	577	0.278	0.560
40% PEG treatment	560	0.274	0.540
50% PEG treatment	510	0.248	0.541

* Gel strength : 1.5% concentration

PEG에 의한 아가로즈 분리는 용해도차를 이용하기 때문에 기질이 되는 한천의 농도가 매우 중요하다. 그래서 한천용액의 농도를 3, 4, 5, 6 그리고 7%로 만든 후 한천용액에 대하여 20%의 PEG를 처리하여 분리한 아가로즈의 이화학적 특성을 조사하여(Table 33, 34), 한천용액의 적절한 농도를 결정하고자 하였다. 한천용액을 제조할 때 농도가 높아지면 용해가 잘되지 않기 때문에 7%이내에서 조사하였다. 한천으로부터 분리한 아가로즈의 수율은 5%이상에서는 큰 변화가 없었으며 회분과 황산기의 제거 효과도 5%이상에서는 오히려 감소되었다.

Table 33. The yield, sulfate, ash contents of agarose prepared by PEG(20%) with various agar concentration

Samples	Sulfate(%)	Ash(%)	Yield(%)
Agar from <i>Gelidium amansii</i>	1.68	3.1	100.1
3% agar solution	0.89	1.0	61.6
4% agar solution	0.89	1.2	63.4
5% agar solution	1.04	1.3	65.9
6% agar solution	1.05	1.5	65.8
7% agar solution	1.08	1.5	65.9

* PEG treatment concentration

Table 34. The physical properties of agarose prepared by PEG with various agar concentration

Samples	Gel strengt (g/cm ²)	O.D (agar solution)	O.D (agar gel)
Agar from <i>Gelidium amansii</i>	465	0.188	0.514
3% agar solution	530	0.165	0.423
4% agar solution	573	0.133	0.417
5% agar solution	463	0.235	0.520
6% agar solution	440	0.248	0.534
7% agar solution	313	0.278	0.560

* Gel strength : 1.5% concentration

PEG(20%)에 의한 아가로스 분리시 한천의 농도별로 분리한 아가로스의

겔강도 및 투명도를 조사한 결과에서는 3%와 4%에서는 겔강도가 증가하고 투명도도 개선되었으나 5%이상의 한천 농도에서는 겔강도가 떨어지고 투명도도 오히려 좋지 않게 나타났다(Table 34). 이들 결과로부터 PEG에 의한 아가로즈 분리시에는 한천의 농도를 4%로 하는 것이 적절한 것으로 나타났다.

3. 아가로즈의 정제

한천으로부터 아가로즈를 분리하는 과정에서 첨가된 시약 및 반응 중에 생성된 불순물을 효과적으로 제거하기 위하여 아가로즈 분리과정중 또는 분리후 증류수로 수세하거나 알콜수세 방법을 적용하여 분리한 아가로즈를 정제하였다. 키토산으로 아가로즈를 분리하였을 때 아가로즈의 투명도가 원료한천의 투명도보다 오히려 나쁘게 나타났으며 키토산을 알콜로 수세하여 사용한 결과 투명도가 개선되었다.

4. 정제 아가로즈의 이화학적 특성

가. 아가로즈의 무기질 분석

아가로즈중에는 무기질이 불순물로 함유되어 있다.

Table 35. The content of mineral in agarose prepared with various methods

Samples	(Unit : ppm)							
	Na	Ca	Mg	K	P	Fe	Al	Zn
Agarose(A Co.)	1165	63	10	119	14	15	245	1
Agar(F Co.)	2389	664	41	125	71	22	3	2
Agar from <i>Gelidium amansii</i>	2934	2472	2259	2527	81	66	72	30
After Chitosan treatment	250	84	24	2	2	ND	17	1
After PEG treatment	161	459	161	7	4	6	18	9
After CPC treatment	145	125	22	13	5	ND	9	7

* ND : Not detected

따라서, 국,내외산 아가로즈와 한천 그리고 본 연구에서 분리 정제한

아가로즈의 무기질 함량을 분석한 결과(Table 35), PEG, CPC 그리고 키토산으로 처리한 경우 전 항목의 무기질 함량이 매우 낮게 나타났으며, 특히 키토산을 처리하였을 때 가장 효과가 좋았다.

나. 구성당 분석

여러 가지 방법으로 분리 정제한 아가로즈의 구성당 조성을 분석한 결과(Table 36), 한천의 주 구성성분인 Galactose와 3,6-AN-Gal가 90%이상이었고 Rhamnose와 Mannose도 소량 함유되어 있었다. 그리고 6-Me-Gal도 5.12-6.77%가 함유되어 있었다.

Table 36. Sugar composition of agarose prepared by various method

Samples	Galactose	3,6-AN-Gal	6-Me-Gal	Rhamnose	Mannose
PEG treatment	46.92	47.39	5.12	0.57	-
CPC treatment	45.07	47.02	6.09	0.57	1.25
Chitosan treatment	48.56	42.54	6.77	0.15	1.97

다. FT-IR(Fourier Transform Infrared Spectrophotometer) 측정

한천중의 황산기 결합위치 및 주요 반응기의 특성을 조사하기 위하여 KBr pellet으로 시료를 조제하고, FT-IR(Jasco사, FT-IR-300)을 이용하여 측정하였다. 분석한 모든 시료의 FT-IR 스펙트럼에서 전형적인 한천의 peak로 나타났다. 즉, 930 cm^{-1} 부근의 peak는 3,6-galactose를 나타내고, 2929 cm^{-1} 부근의 peak는 C-H peak를 나타내는데 이들 peak는 전 시료 모두 뚜렷이 나타났다. 그러나, 전체 황산기를 나타내는 1250 cm^{-1} 부근의 peak는 약하고 또한 galactose-6-sulfate의 820 cm^{-1} 부근의 peak도 낮은 것으로 미루어 볼 때 황산기의 함량이 적음을 알 수 있다.

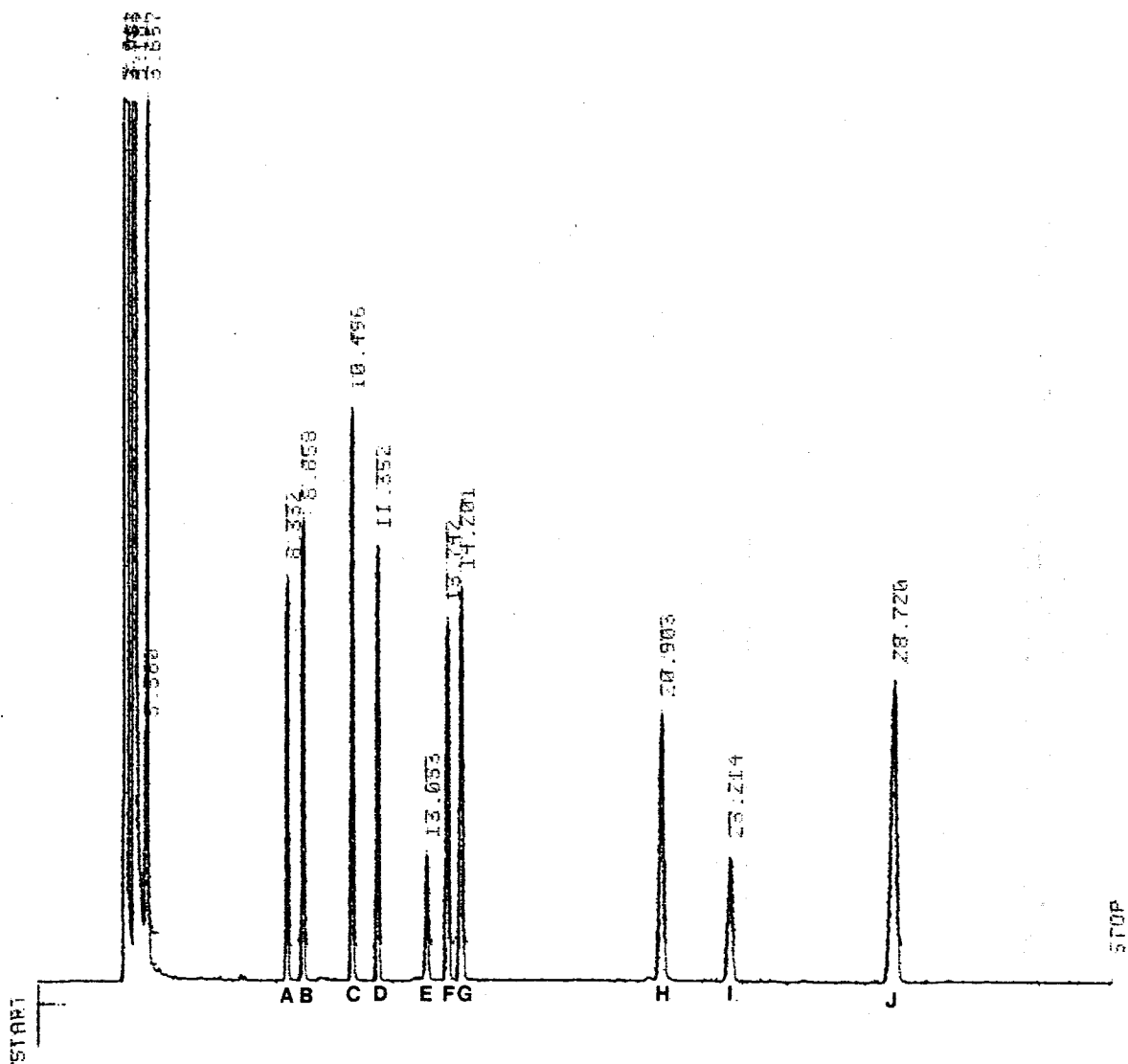


Fig. 5. GC chromatogram of alditol acetates

A:Rhamnitol, B:Fucitol, C:Ribitol, D:Arabinitol

E:3,6-anhydrogalactitol, F:6-methyl-galactitol

G:Xylitol, H:Mannitol, I:Galacitol, J:Myo-inocitol

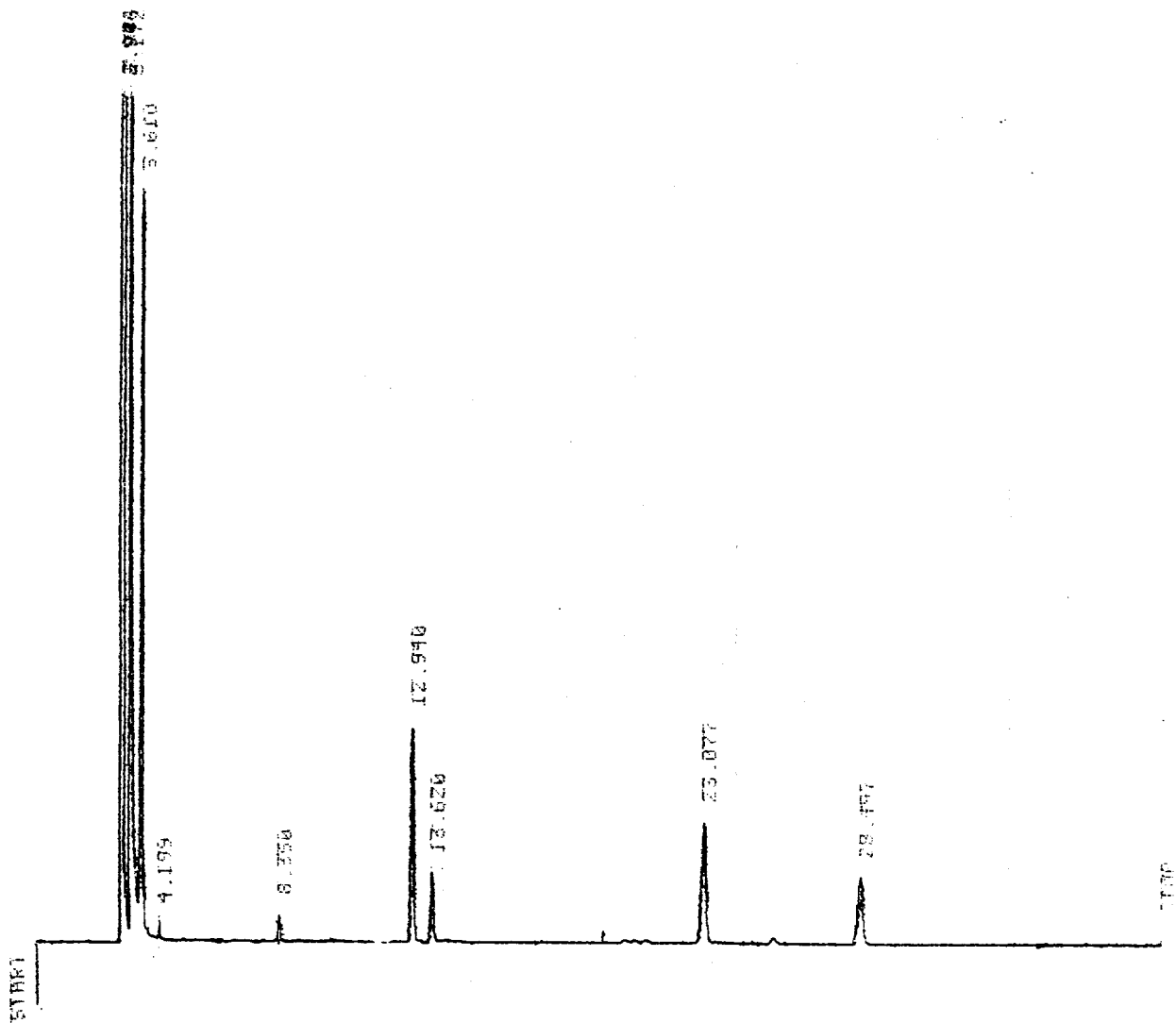


Fig. 7. GC chromatogram of commercial agar(B).

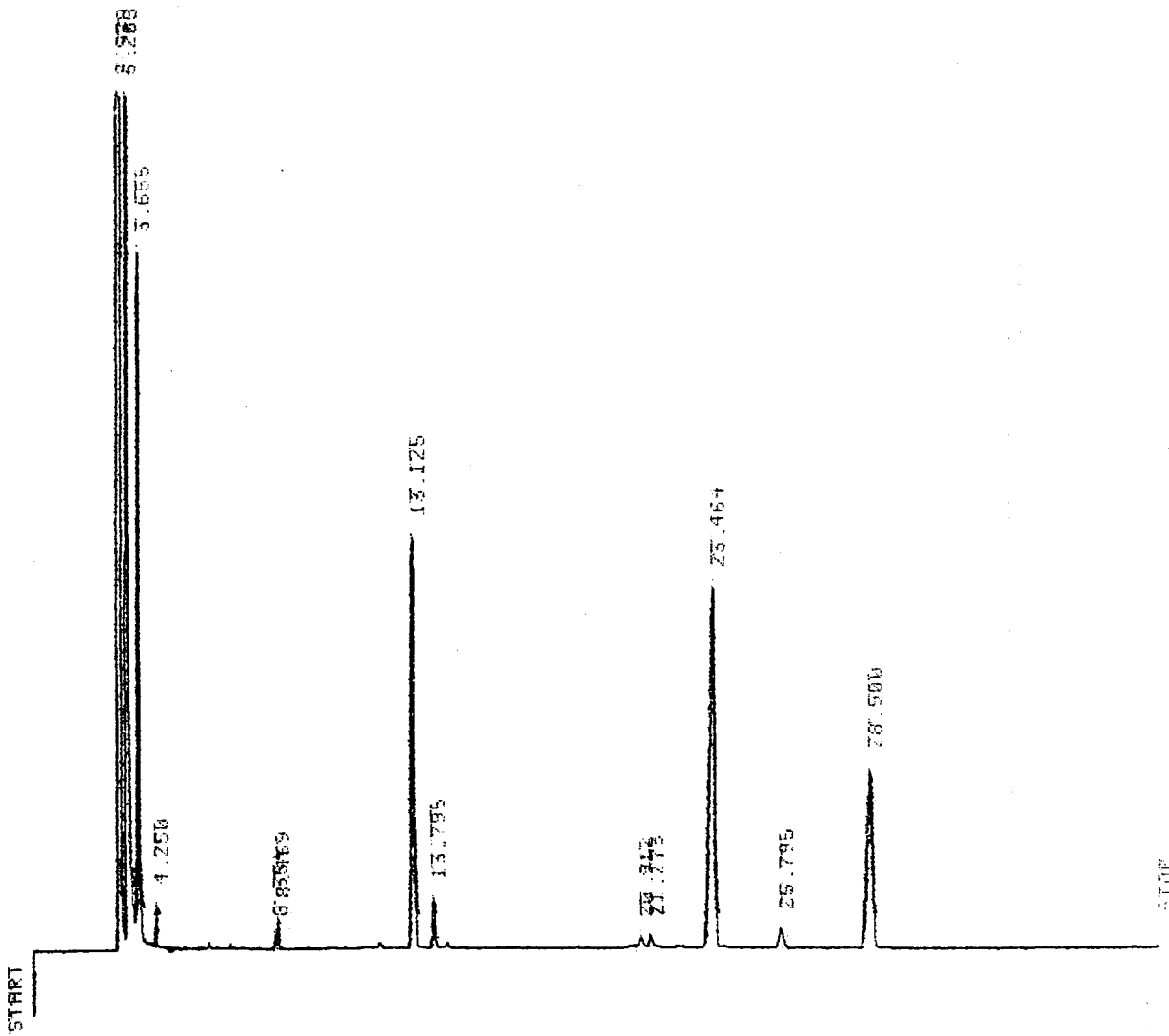


Fig. 8. GC chromatogram of commercial agar(C).

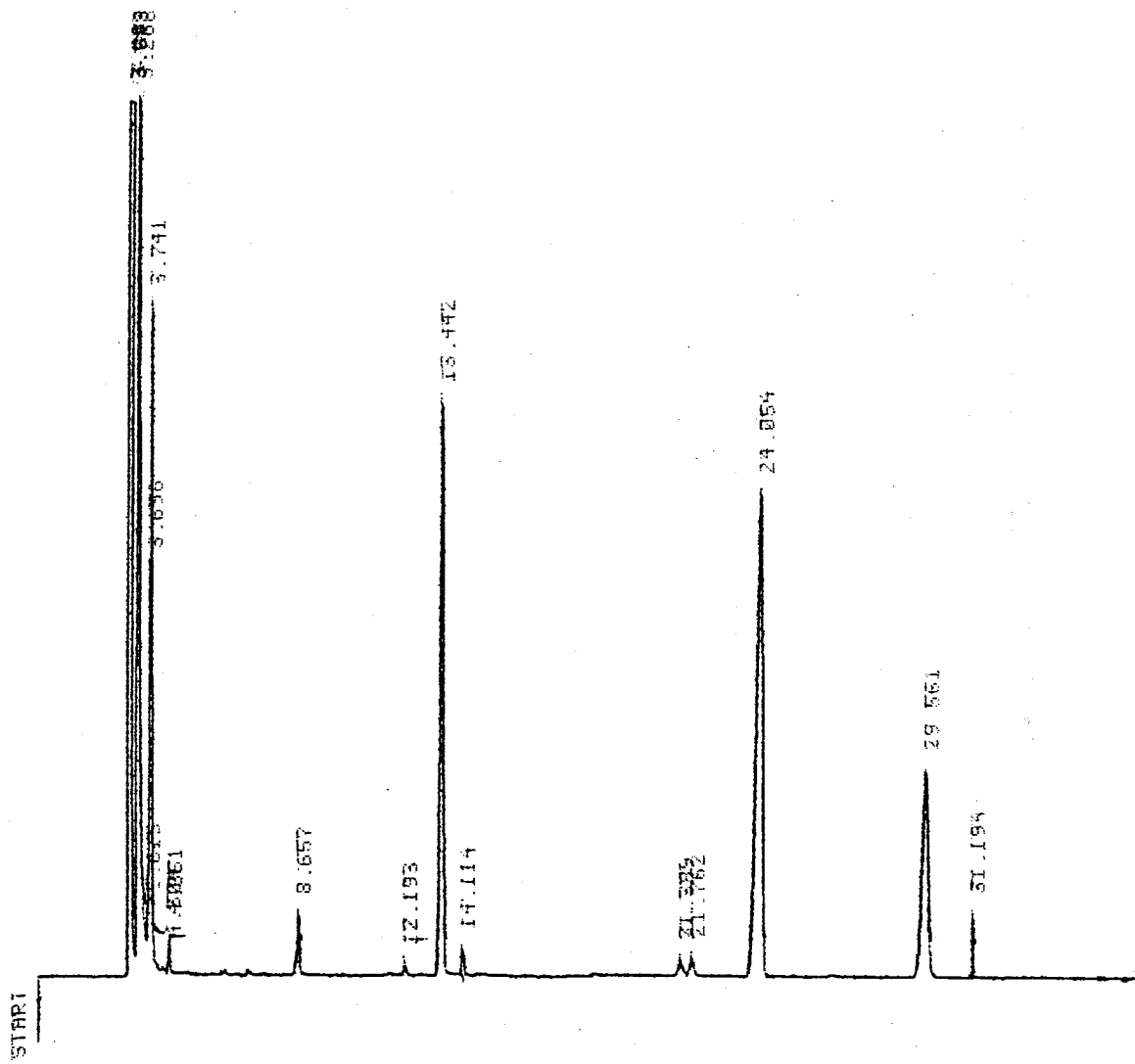


Fig. 9. GC chromatogram of commercial agar(F).

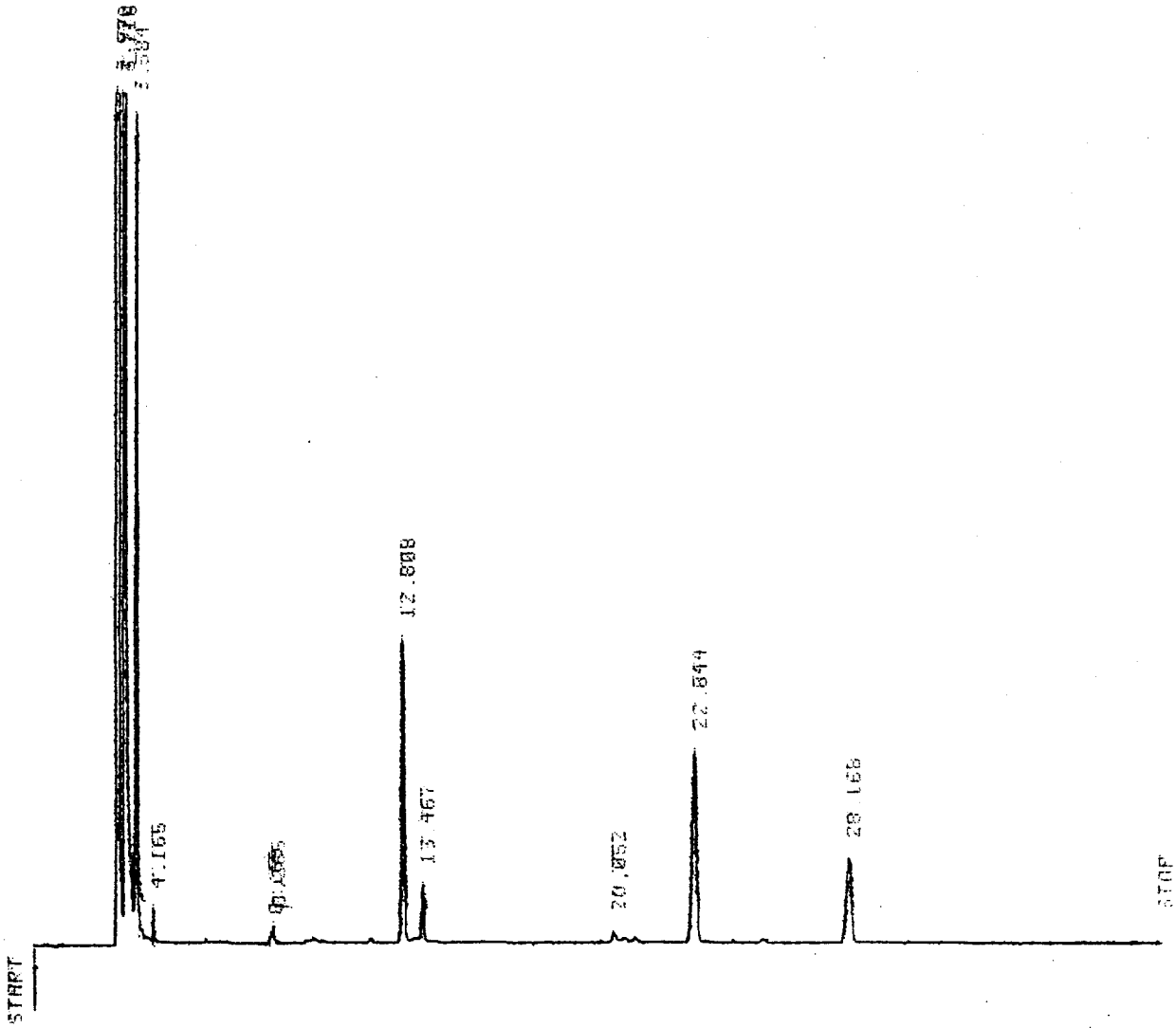


Fig. 10. GC chromatogram of agar purified with EDTA salt.

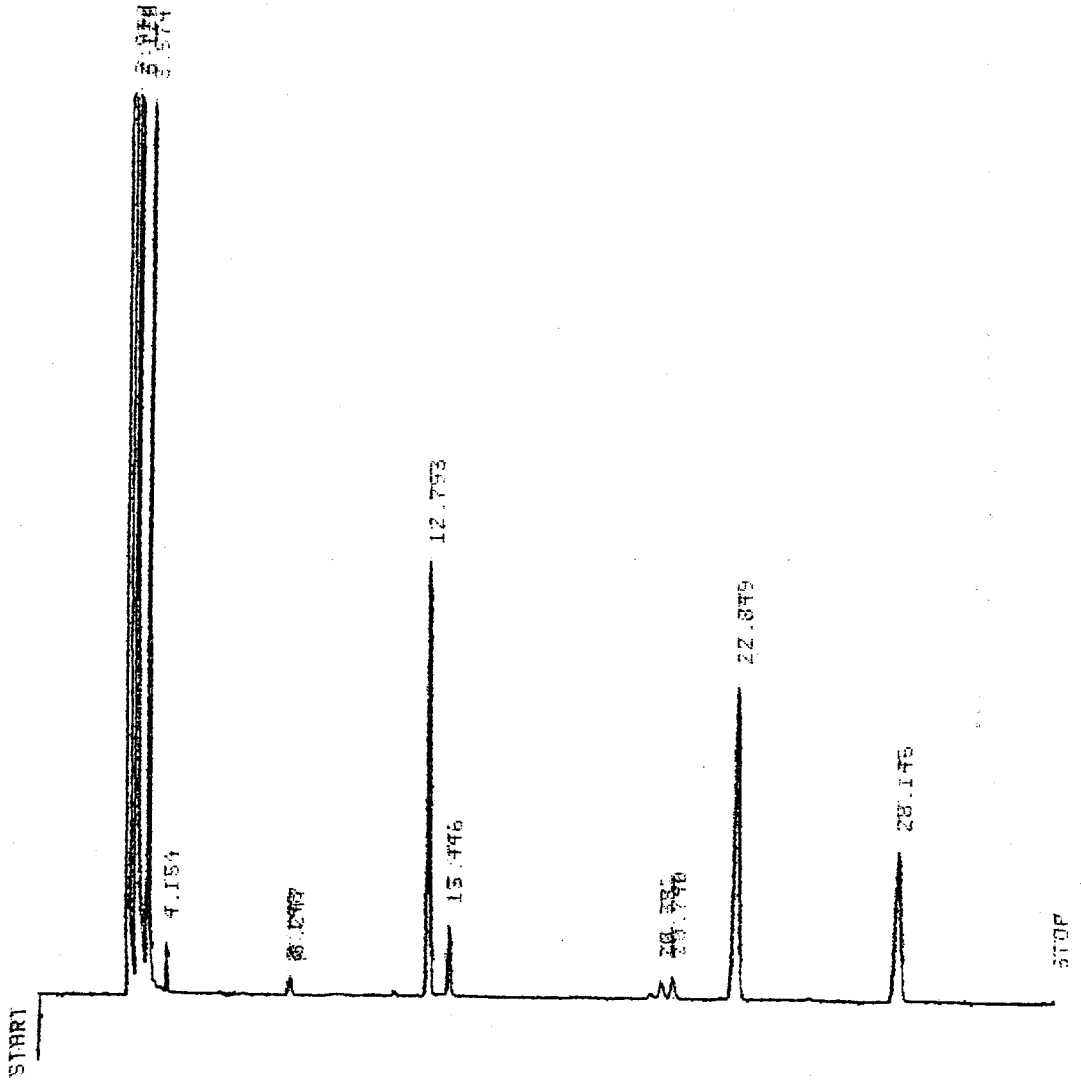


Fig. 11. GC chromatogram of agar purified with chitosan.

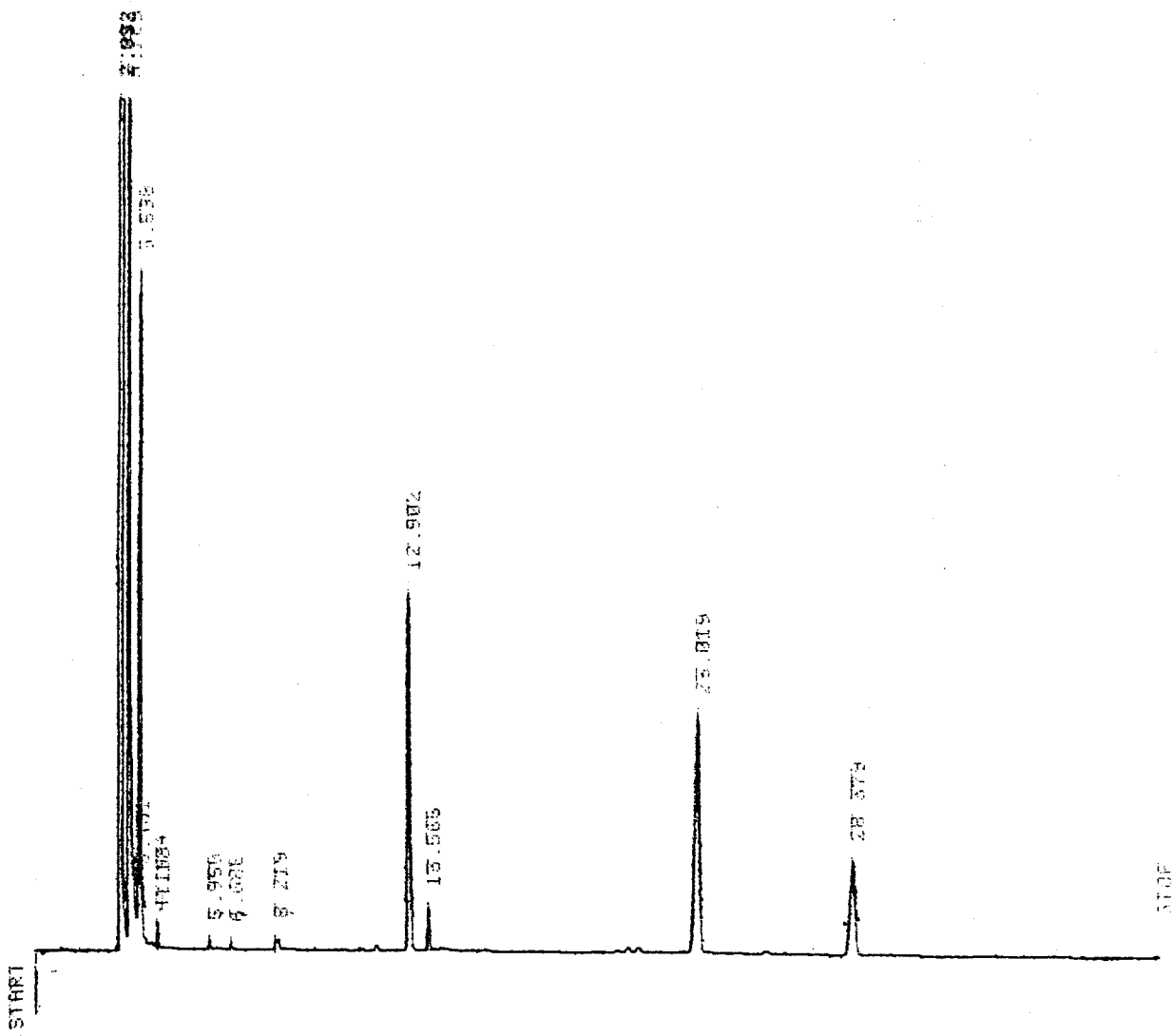


Fig. 12. GC chromatogram of agar purified with polyethylene glycol(PEG).

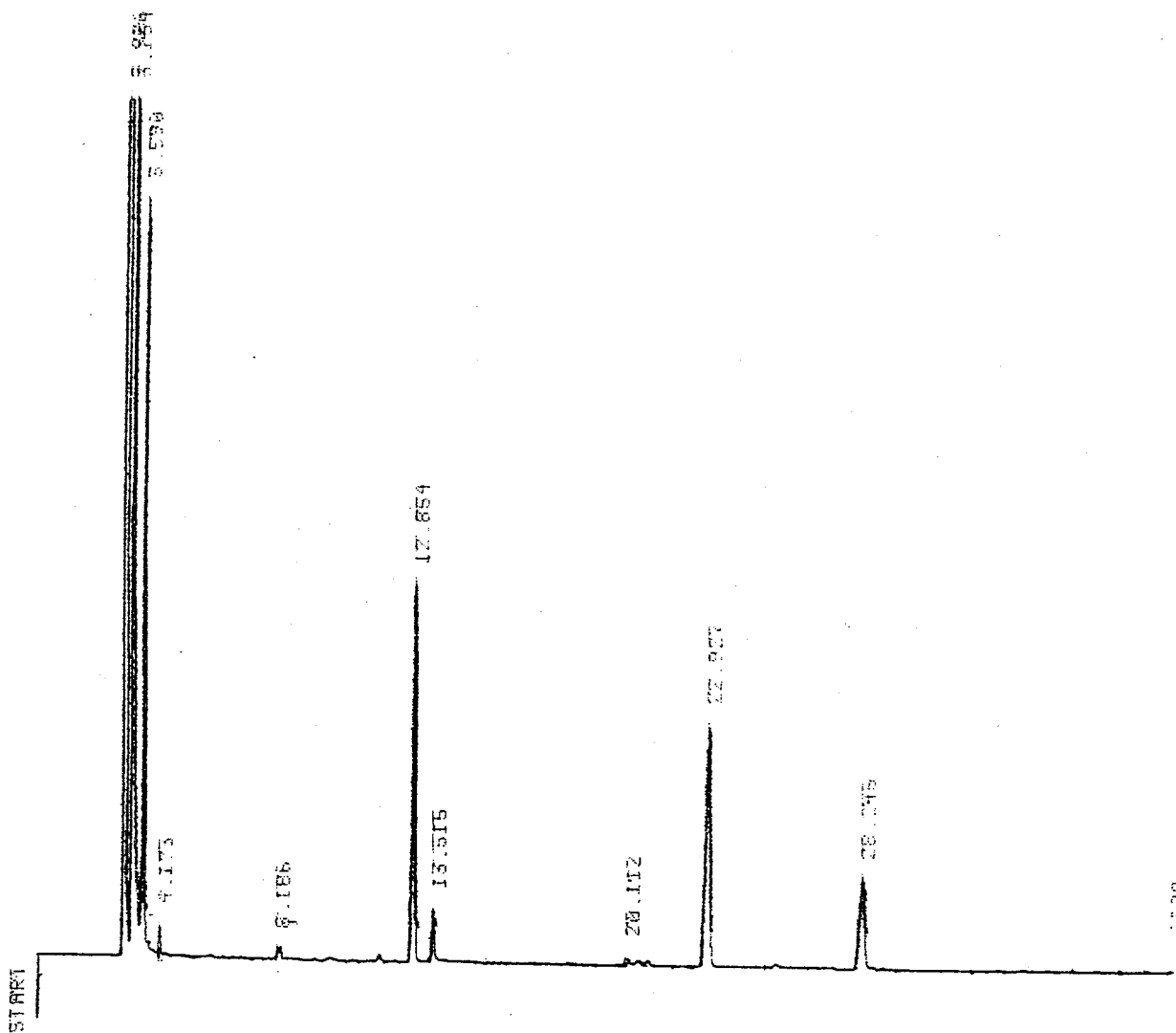


Fig. 13. GC chromatogram of agar purified with cetylpyridium chloride(CPC).

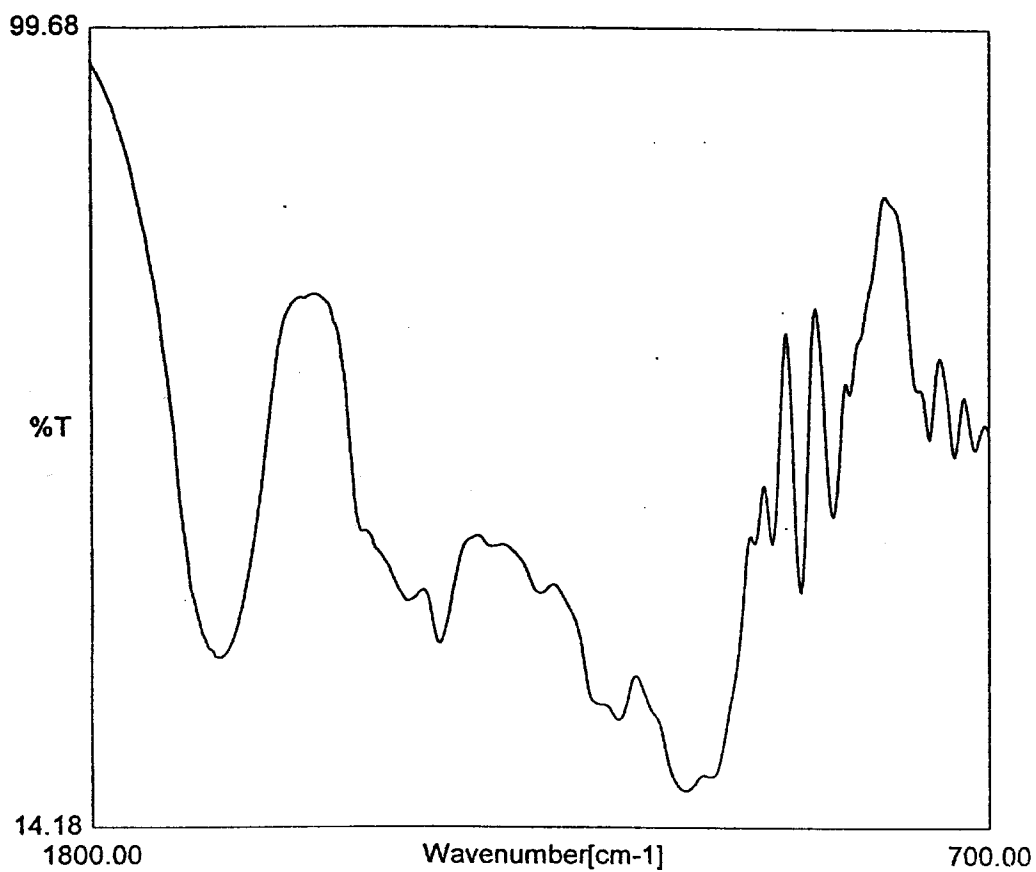


Fig. 14. FT-IR spectrum of agar prepared from *Gelidium amansii*.

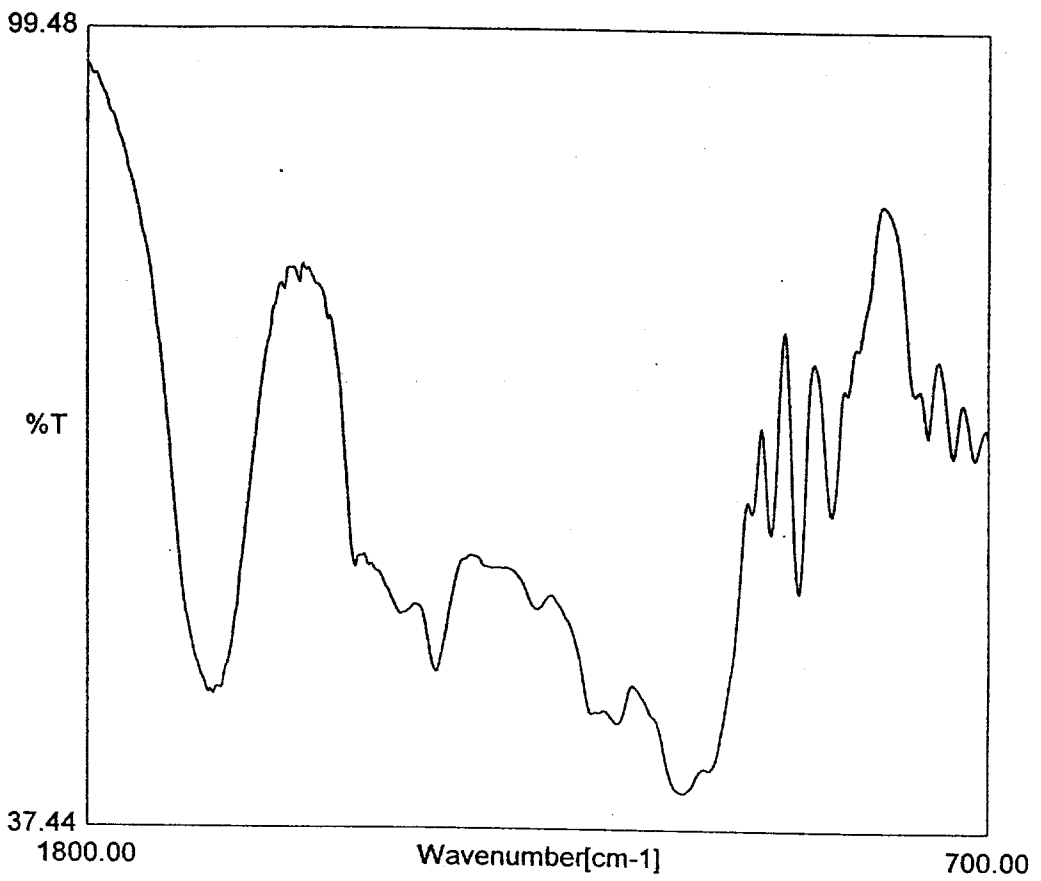


Fig. 15. FT-IR spectrum of agar prepared from *Gracila verrucosa*.

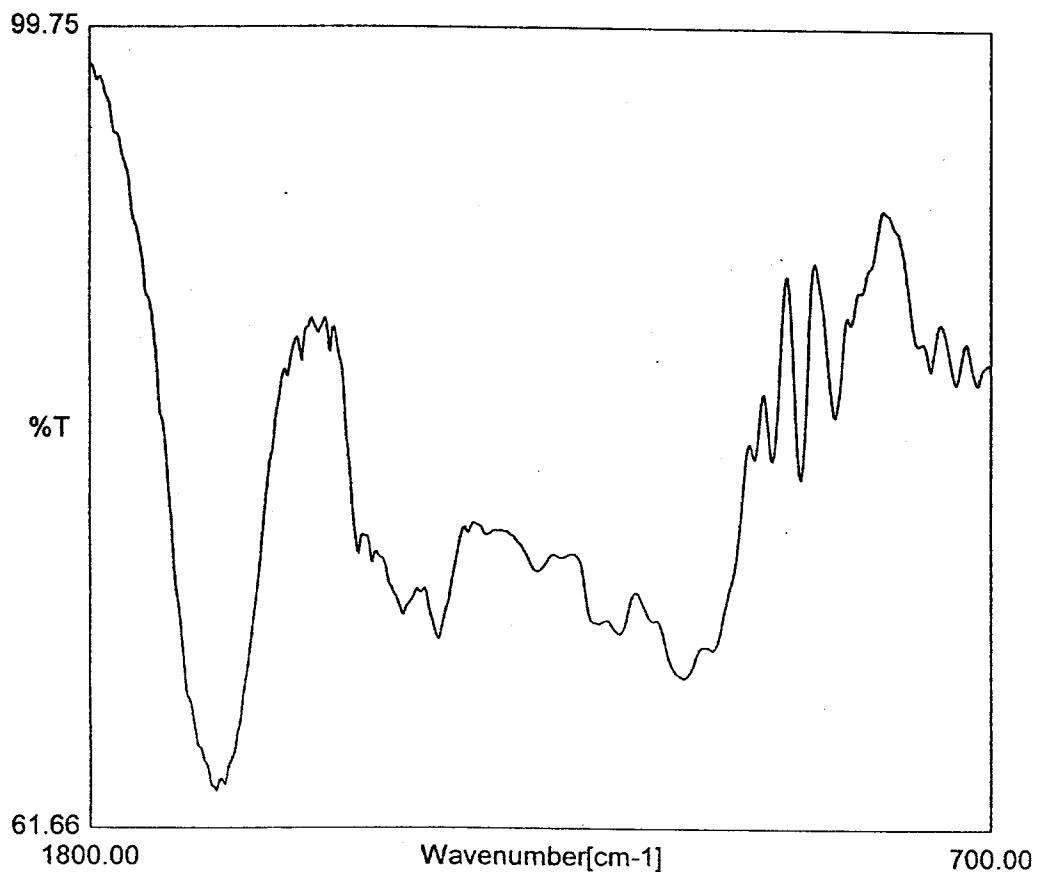


Fig. 16. FT-IR spectrum of bacto-agar.

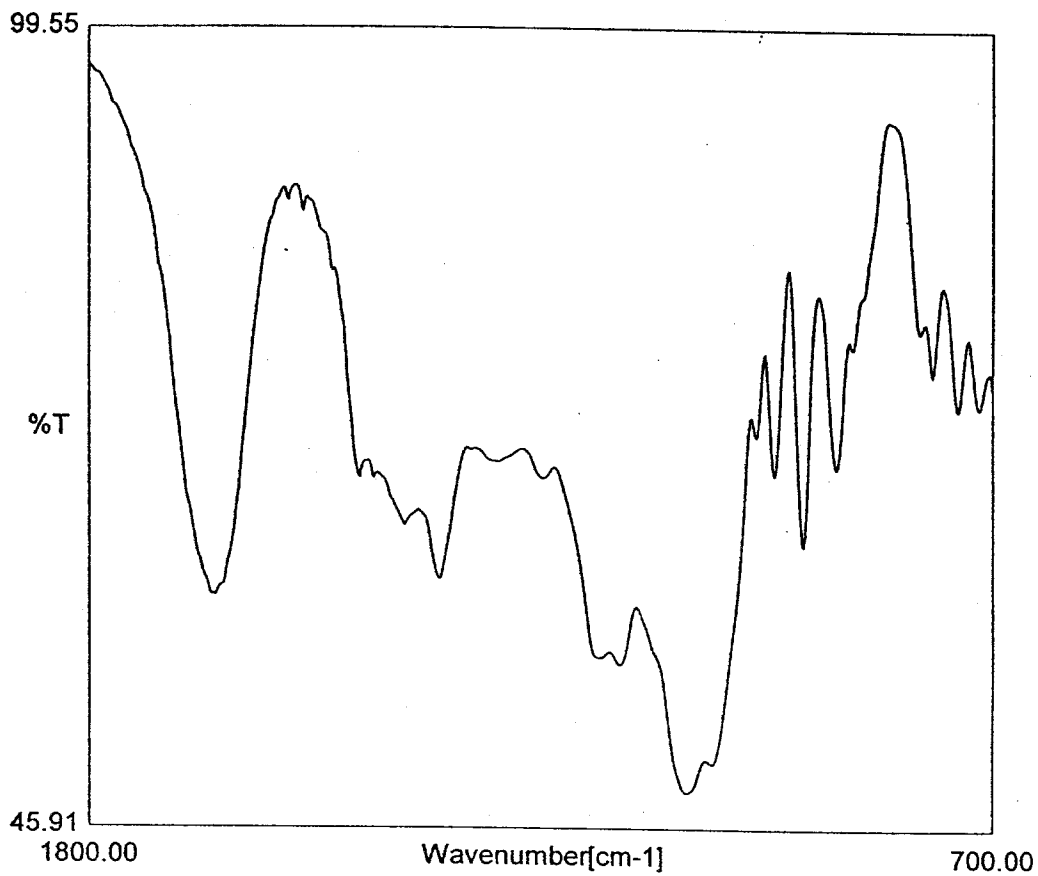


Fig. 18. FT-IR spectrum of commercial agarose.

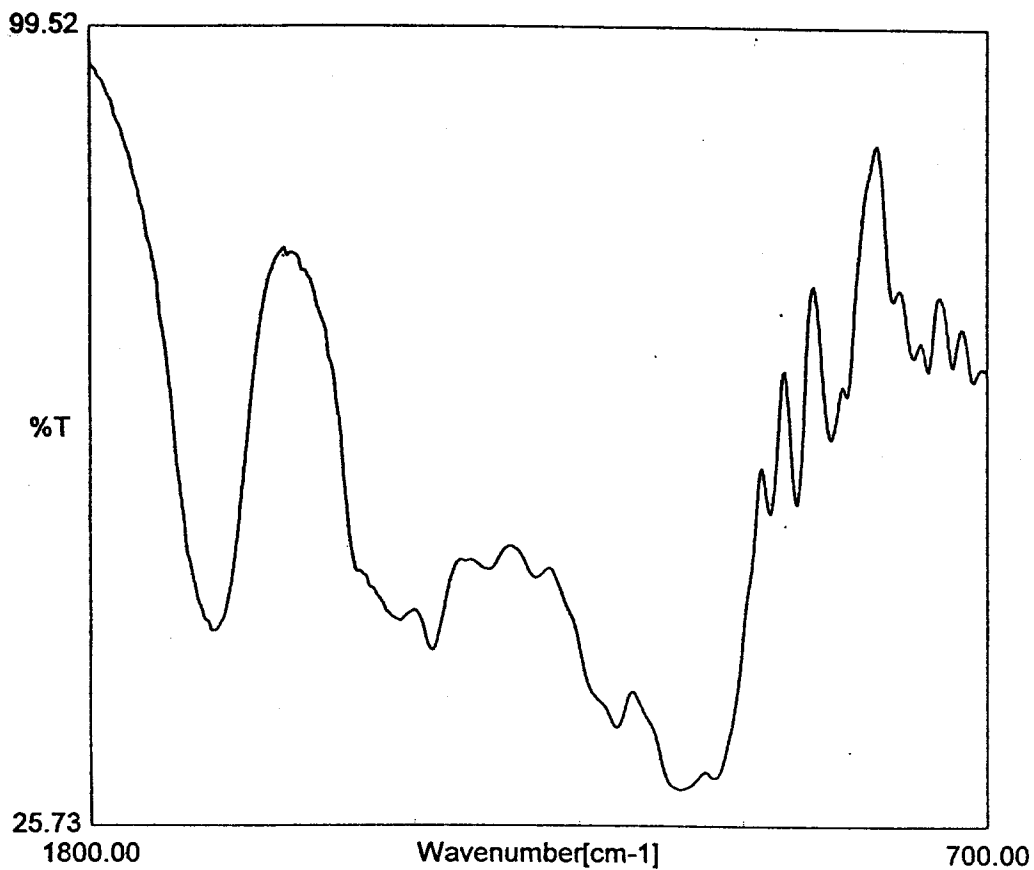


Fig. 17. FT-IR spectrum of commercial agarose.

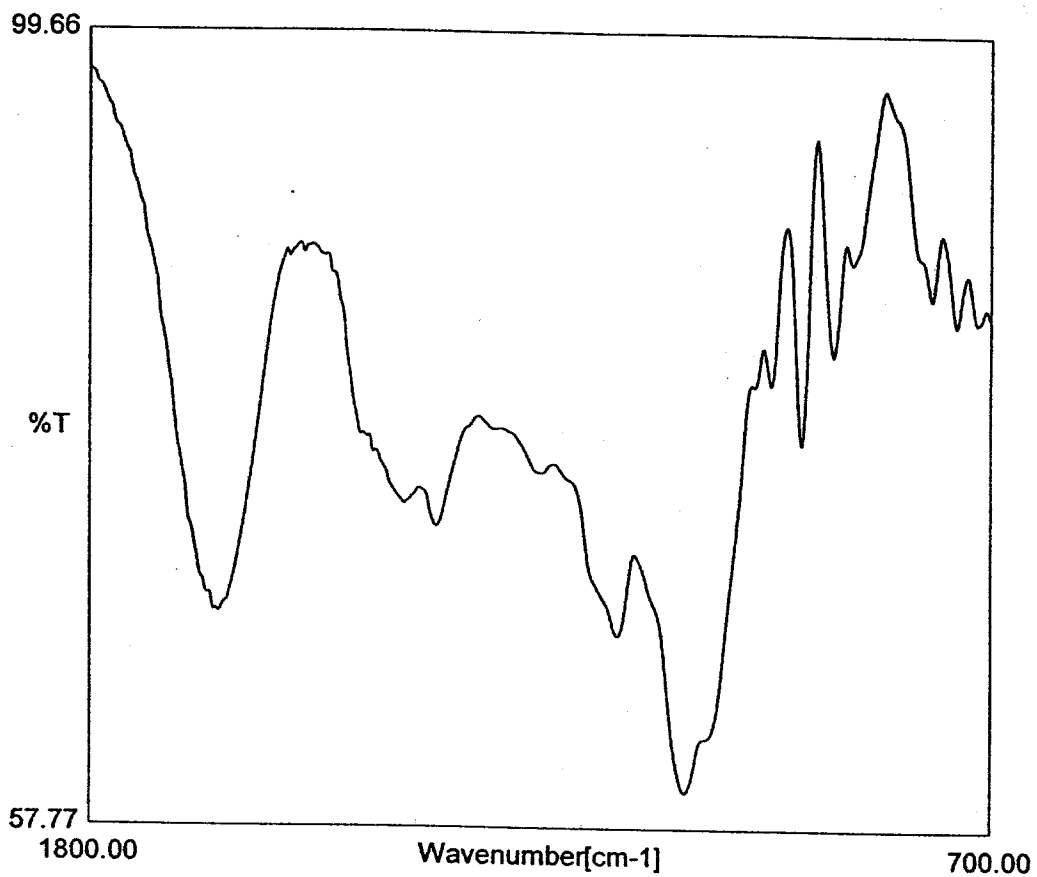


Fig. 20. FT-IR spectrum of agar purified with methanol.

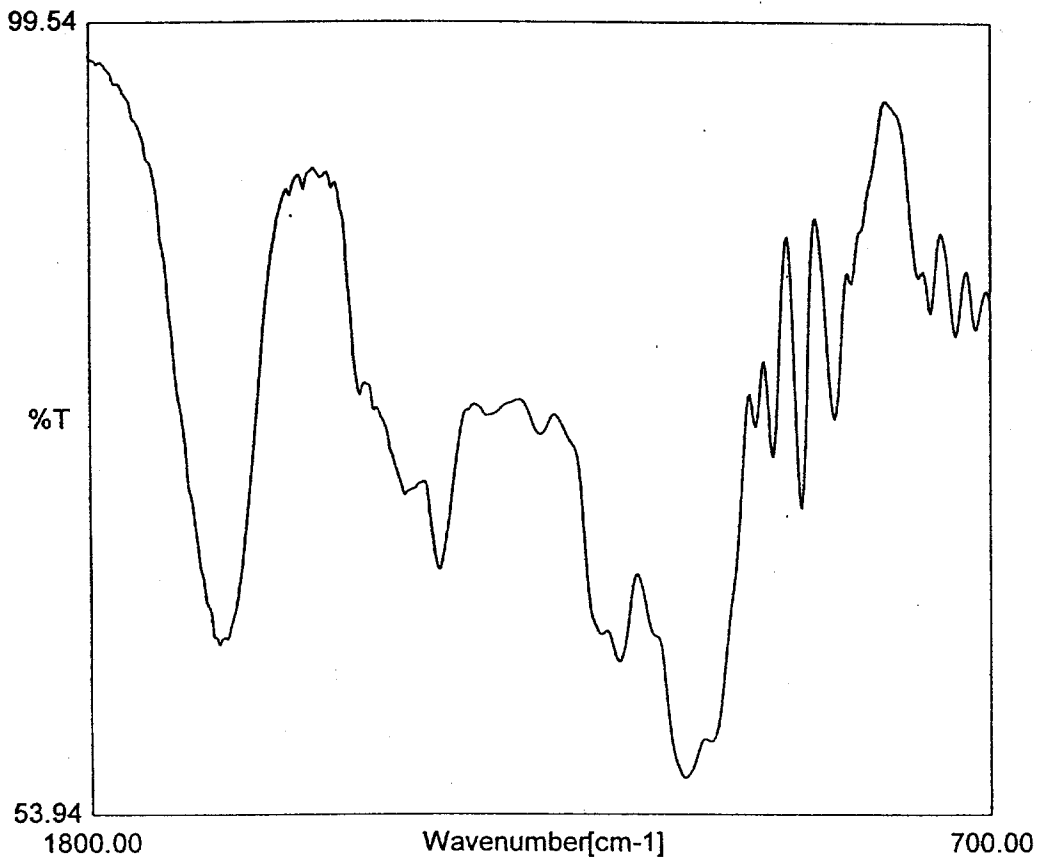


Fig. 19. FT-IR spectrum of agar purified with EDTA salt.

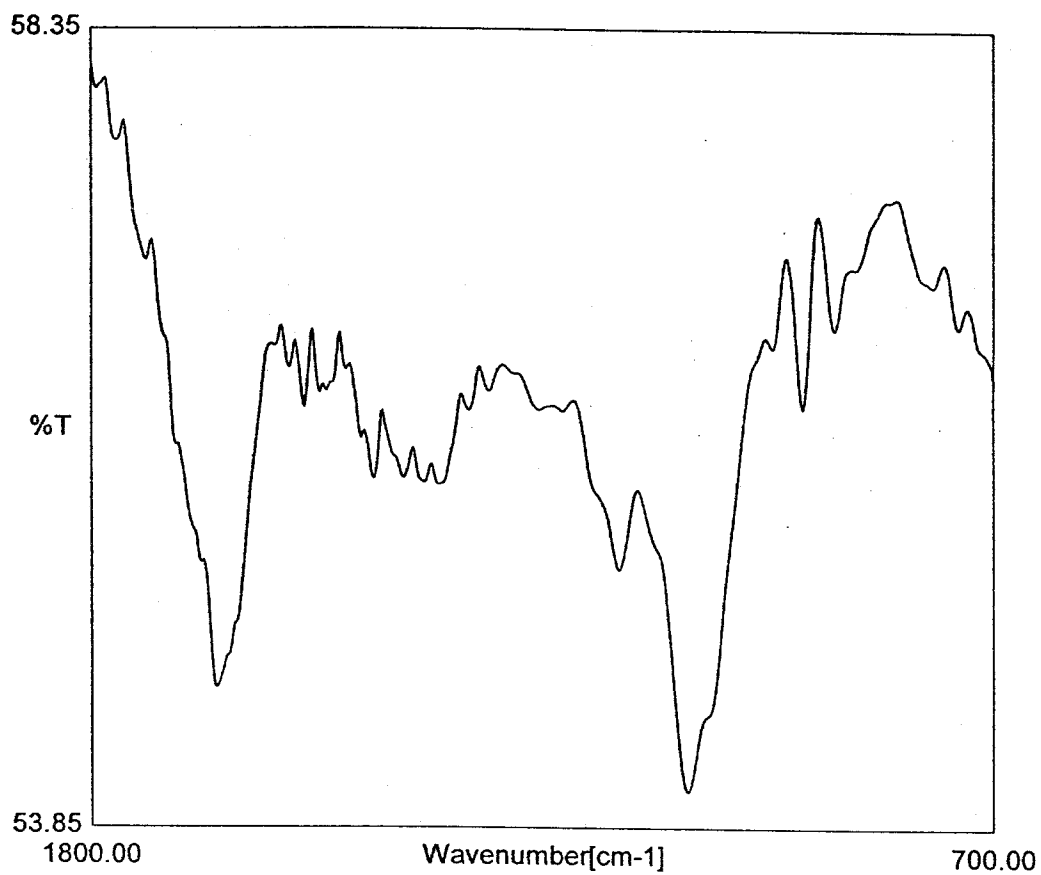


Fig. 21. FT-IR spectrum of agar purified with ethanol.



Fig. 22. FT-IR spectrum of agar purified with propanol.

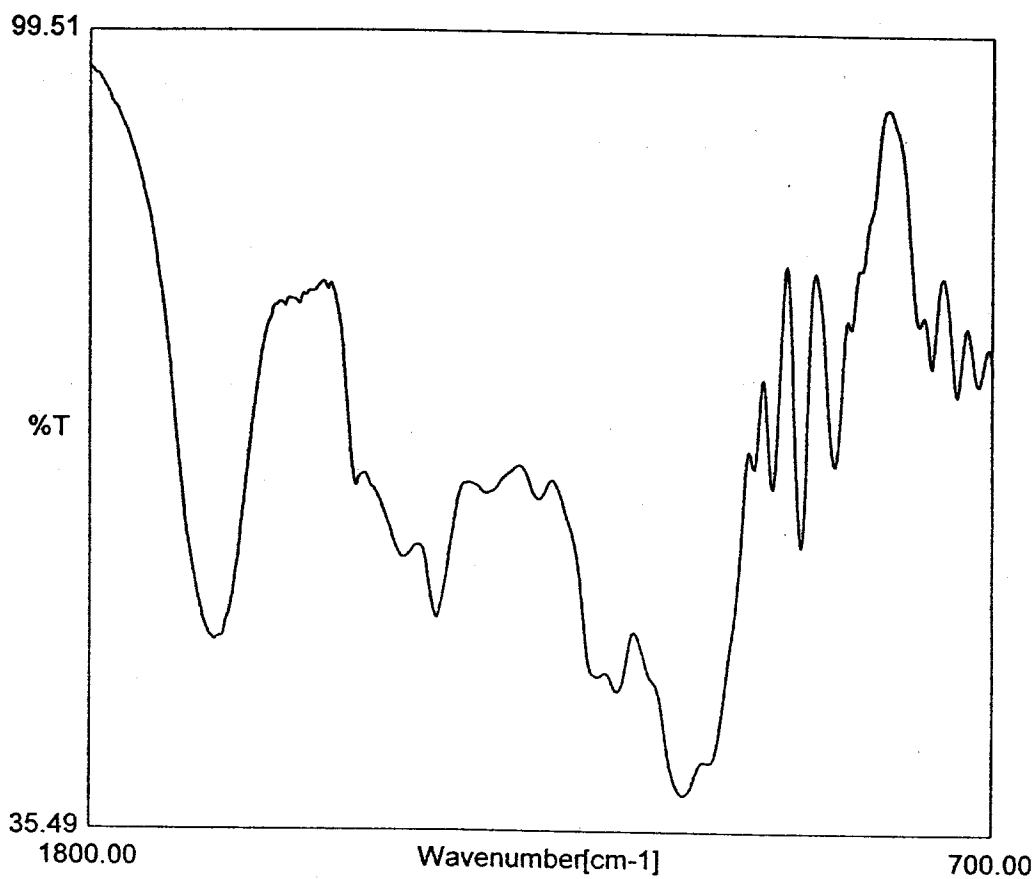


Fig. 23. FT-IR spectrum of agar purified with chitosan.

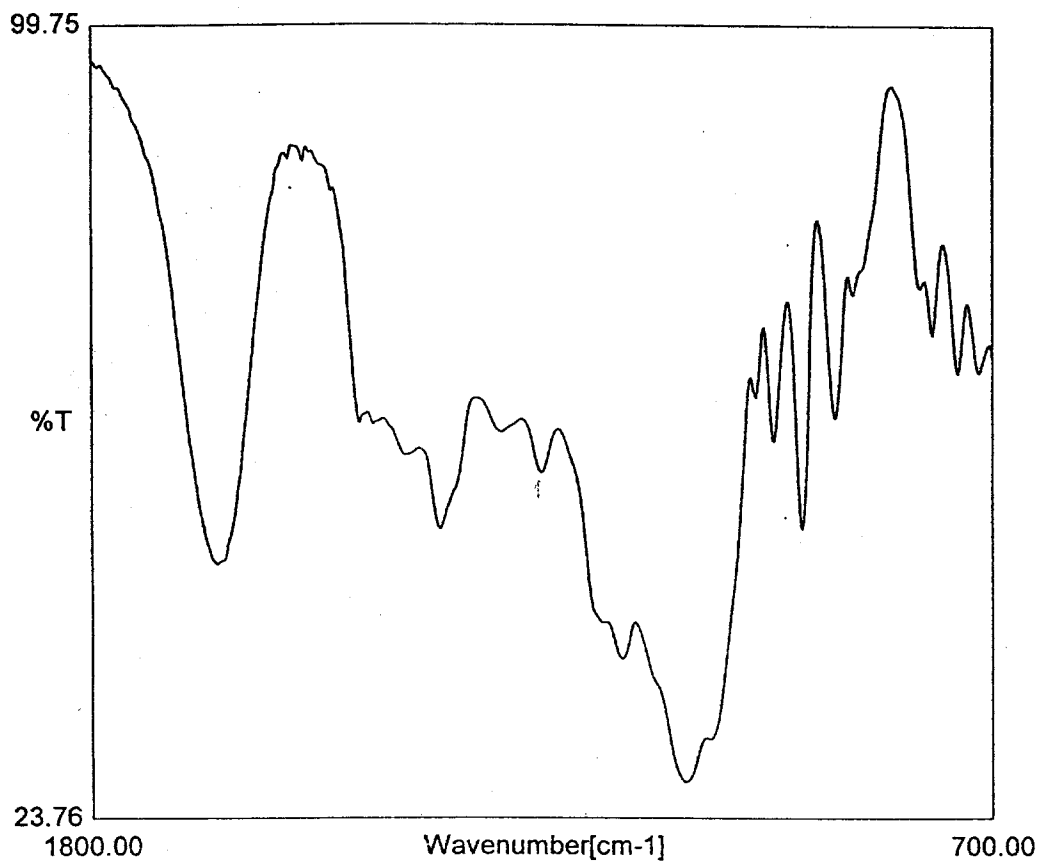


Fig. 24. FT-IR spectrum of agar purified with polyethylene glycol(PEG).

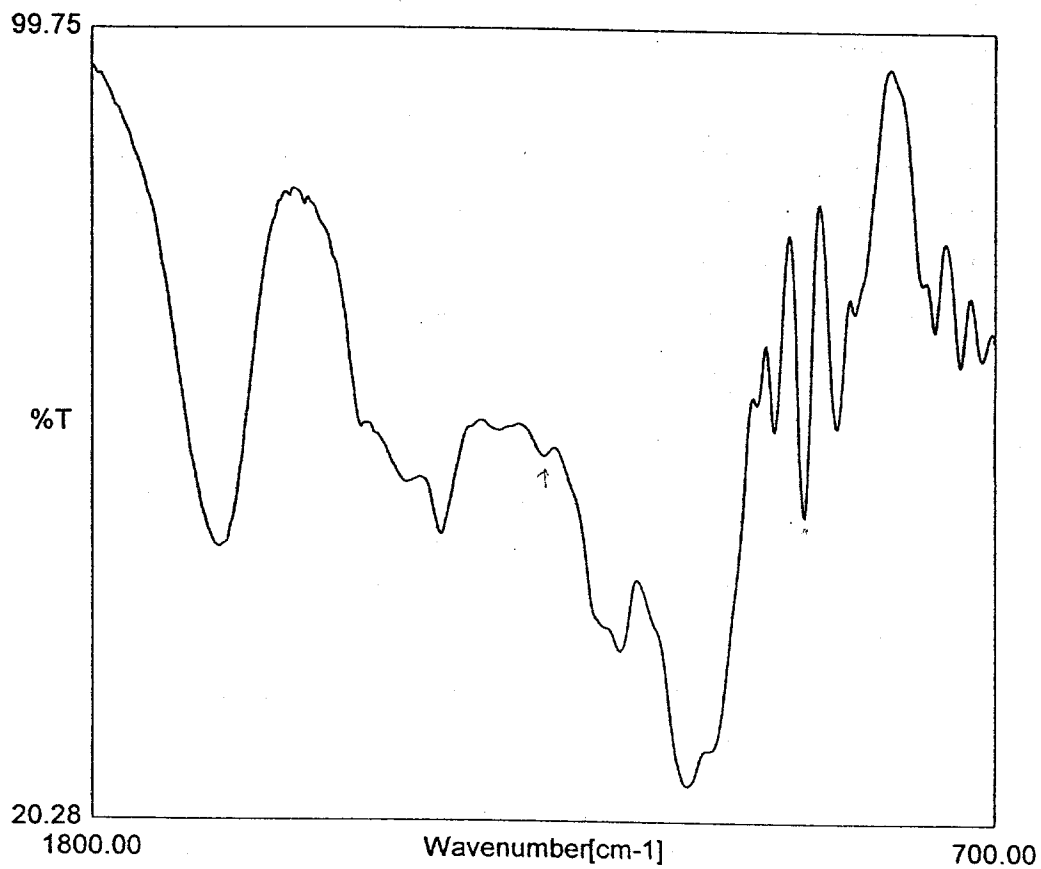


Fig. 25. FT-IR spectrum of agar purified with cetylpyridium chloride(CPC).

제3절 정제한천 및 아가로즈의 활용

1. 배지용 한천의 제조

한천을 정제하기 위하여 한천중에 함유되어 있는 무기질, 단당류, 질소성분 등의 불순물을 제거하기 위하여, 증류수 수세, EDTA염 처리법, 유기용매(메탄올, 아세톤, 프로판올) 처리법을 검토한 결과, 이들 한천 정제 방법으로 정제한 한천중에 함유된 황산기 및 회분함량이 감소하여 정제 효과가 있었다. 특히 EDTA염 처리시에는 한천을 용해시키지 않고, 팽윤상태에서 처리하기 때문에 처리과정이 간편할 뿐만아니라 EDTA염의 킬레이트 작용에 의하여 무기질 및 황산기를 효과적으로 제거 할 수 있었으며, 유기용매 처리시에는 지용성 성분을 비롯한 유기용매 가용성 물질이 제거되었으므로 그 결과를 기초로 하여 EDTA염처리에 의한 방법과 유기용매 처리법의 제조공정을 조사하고 이들 방법으로 제조한 정제한천을 이용하여 배지용 한천으로서의 이용가능성을 검토하였다.

가. 배지용 한천 제조 방법

1) EDTA염에 의한 한천 정제

EDTA염을 이용한 배지용 한천의 제조 공정은 Fig. 26과 같다. 즉 40mesh 이하의 한천 분말을 0.02M EDTA염 용액을 처리하여 회분을 제거하고 EDTA염에 의해 산성화된 용액을 중화시켰다. 중화과정에서 생성되는 염과 EDTA염을 수세처리하여 제거하고 여과하여 잔사(한천)를 취하였다. 여과과정을 통해 얻은 잔사(한천)에 아세톤으로 처리하여 색소등의 아세톤 가용성 성분을 제거하였다. EDTA염 처리에 의해 제조한 정제한천의 수율은 80-90%로 나타났다. EDTA염으로 정제한 한천의 회분함량은 2.47%에서 1.50%로 감소하였고, 황산기 함량은 1.48%에서 0.48%로 감소하여 정제효과가 있는 것으로 판단된다. 특히 겔강도가 높은 정제한천을 얻고자 할 때에는 EDTA염 처리후 알칼리 처리과정을 거치면 40-60%의 겔강도를 증강시킬

수 있다.

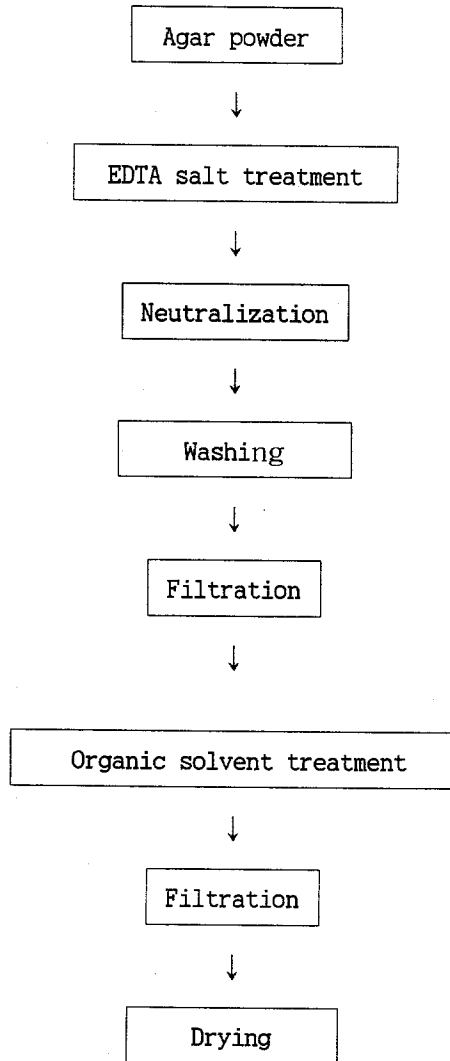


Fig.26. The Procedure for preparation of purified agar by EDTA treatment.

2) 유기 용매 처리에 의한 한천 정제

한천의 주성분은 고분자 다당류이므로 한천용액에 유기용매를 가하여 고분자의 한천성분은 침전시켜 한천을 정제하고자 하였다. 사용한 용매는 에탄올, 메탄올, 아세톤, 프로판올(Iso-propanol, n-propanol)이며 처리공정은 Fig. 27과 같다. 즉, 40mesh의 분말한천을 사용하여 121℃에서 30분간 처리하여 한천용액을 만든후 유리여과기로 여과하여 불용성 잔사를 제거하고 3배량의 용매를 교반하면서 첨가하여 고분자의 한천을 침전시켰다. 이때 포화식염수를 소량 첨가하면 침전물의 생성이 촉진된다. 침전물을(한천)을 감압여과하고 열풍건조하여 한천을 정제하였다. 유기용매 처리에 의해 제조한 정제한천의 수율은 75-85%로 나타났다.

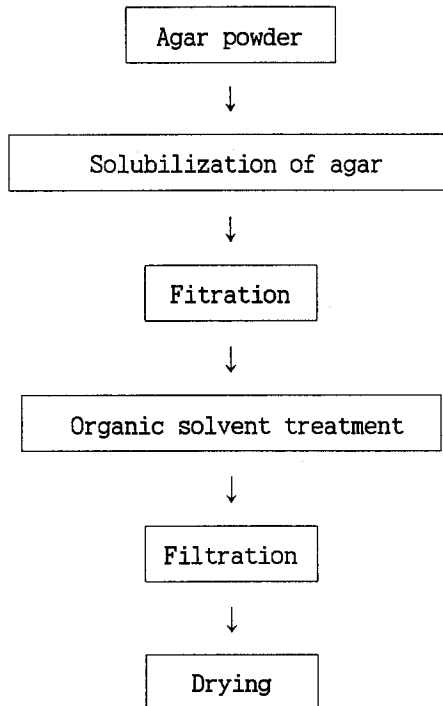


Fig. 27. The Procedure for preparation of purified agar by Organic solvent treatment.

3) 배지용 한천의 실제실험 적용시험

대상균주

독립균주로는 gram (+) 균주로 *Bacillus subtilis*를 사용하였으며 gram (-) 균주로는 *Escherichia coli*를 사용하였다. 두 균주 모두 한국미생물보존센터(KCCM)에서 분양 받았으며 액체 배양에 의해 균주를 activation 하여 사용하였으며 균주 성장기중 early log phase에 도달한 상태에서 실험에 공시하였다. 혼합균주로는 김치의 dominant microflora인 젖산균주를 대상으로하여 실증시험을 실시하였다.

사용배지

실험에 사용한 배지는 다음과 같다. 각각의 배지에 정제된 한천을 1.5% (w/w) 되게 정확히 첨가하여 멸균후 고체배지를 만들어 실험하였다.

Bacillus subtilis - nutrient broth

Bacto Beef Extract	3g
Bacto Peptone	5g/L

Escherichia coli-LB broth

Bacto Tryptone	10g
Bacto Yeast Extract	5g
Sodium Chloride	10g/L

김치 미생물-Lactobacilli MRS broth

Bacto Proteose Peptone No.3	10g
Bacto Beef Extract	10g
Bacto Yeast Extract	5g
Bacto Dextrose	20g
Tween 80	1g
Ammonium Citrate	2g
Sodium Acetate	5g
Magnesium Sulfate	0.1g
Manganese Sulfate	0.05g
Dipotassium Phosphate	2g

실험방법

각각의 방법에 의해 제조된 한천(한천 I 은 국내산 분말한천, 한천 II 는 국내산 실한천, 정제한천 I 은 EDTA염 정제한천, 정제한천 II 는 PEG정제한천, 정제한천 III 는 키토산 정제한천)을 위에 기술한 배지에 1.5%되게 정확히 첨가하여 고체배지를 만들었다. 대상균주는 early log phase에 도달한 균주를 이용하였다. 순수배양한 균주를 멸균된 1% peptone water를 이용하여 serial dilution 하여 희석액 1 mL을 고체배지위에 smearing한 후 30°C에서 24시간 배양한 후 성장한 colony를 계수하였다.

실험결과

*Bacillus subtilis*의 colony수

순수배양된 균주를 희석하여 다음과 같은 결과를 얻었다. 정제한천 I, II 모두 대조구로 사용된 Difco사의 agar와 비교하여 볼 때 거의 동일한 colony 수를 나타내어 배지용 한천으로 사용할 수 있는 가능성이 있음을 알 수 있었다. 정제한천 III의 경우 단 한 개의 colony도 성장하지 않았다.

Agar	Colony수
Control(Difco)	131
한천 I	129
한천 II	128
정제한천 I	132
정제한천 II	130
정제한천 III	0

*Escherichia coli*의 colony 수

대장균을 순수배양하여 적당히 희석하여 각각의 agar가 첨가된 LB 고체 배지에 도말하여 colony수를 측정하여 다음과 같은 결과를 얻었다.

Agar	Colony수
Control(Difco)	264
한천 I	257
한천 II	260
정제한천 I	262
정제한천 II	263
정제한천 III	261

정제한천 3가지 모두 대조구로 사용된 Difco사의 한천과 colony수에서 유의한 차이를 나타내지 않았으며 특이하게도 *Bacillus subtilis*가 성장하지 못한 정제한천 III에서 동일 수준의 colony 수를 나타내었지만 colony의 형상이 다른 agar와는 달리 작은 크기로 나타나 다른 배지와 약간의 차이가 있는 것으로 판단되었다.



A

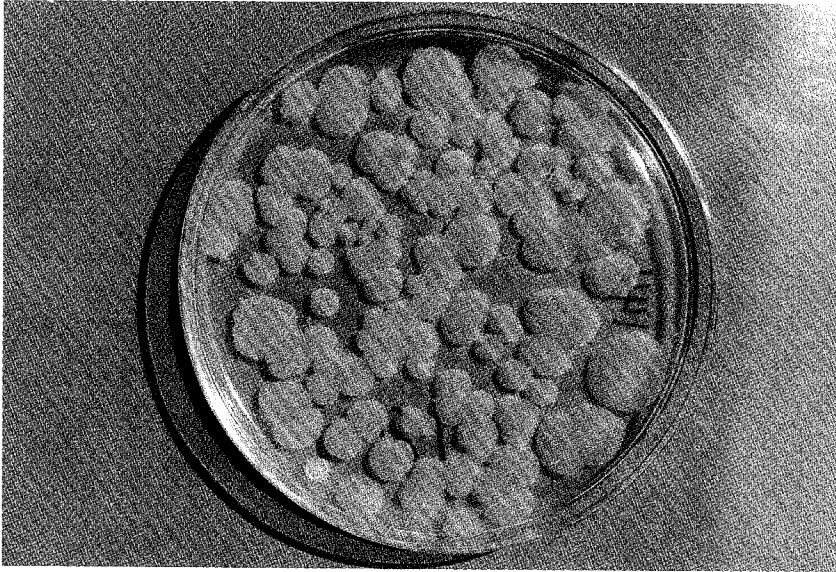


B

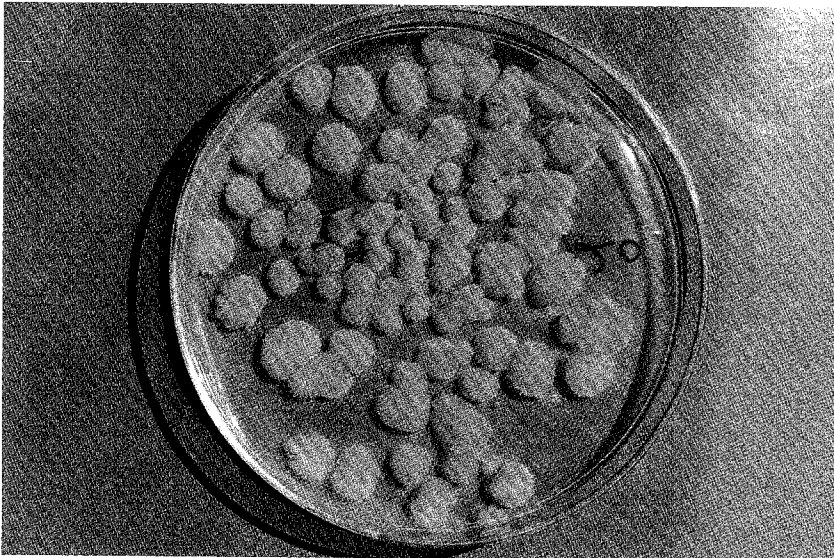
Fig. 29. Colony pattern of *Escherichia coli*

A : Difco bacto agar

B : Agar purified with EDTA salts



A



B

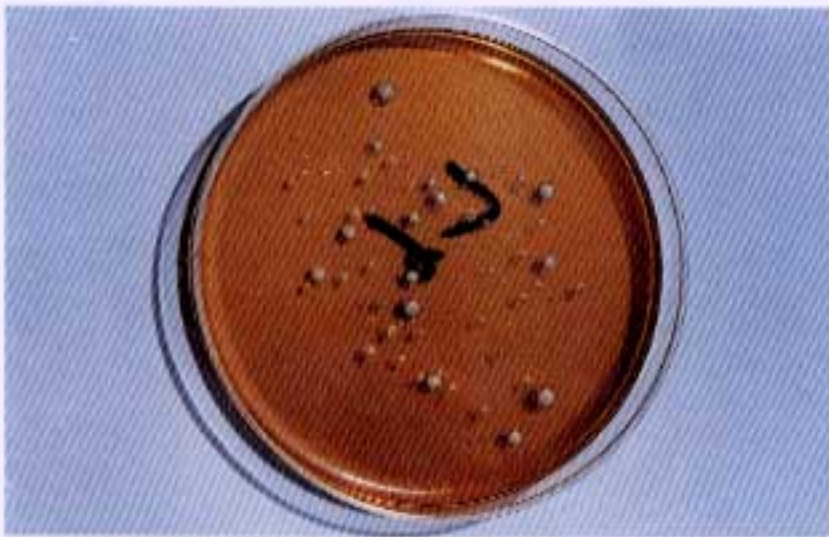
Fig.29. Colony pattern of *Bacillus subtilis*

A : Difco bacto agar

B : Agar purified with EDTA salts



A



B

Fig. 30. Colony pattern of total lactic acid bacteria in *kiachi*

A : Difco bacto agar

B : Agar purified with EDTA salts

김치 젖산균의 계수

속성적기에 도달한 김치를 마쇄하여 거어즈를 이용하여 여과하여 시험용 혼합균주로 하였다. 김치 여과액을 적당히 희석하여 MRS 고체 배지에 도말하여 anaerobic jar(Difco. co)에 넣어 혐기상태로 만들어 30℃에서 24시간 배양하여 colony를 계수하였다.

Agar	Colony수
Control(Difco)	242
한천 I	240
한천 II	239
정제한천 I	239
정제한천 II	242
정제한천 III	37

정제한천 I 및 II은 대조구에 비교하여 거의 동일한 수준의 colony 수를 나타내었으며 정제한천 III의 경우 대조구에 비하여 15% 정도의 colony를 나타내어 배지용 한천으로는 부적합한 것으로 판단되었다.

2. 전기영동용 아가로즈의 제조

한천을 정제하여 아가로즈를 제조하는 방법을 2차년도에서 검토한 결과, 연구용으로 많이 이용되고 있는 전기영동용 아가로즈를 제조하는 방법으로는 수율과 아가로즈의 품질면에서 키토산을 이용하는 방법이 가장 효과적이었으므로 전기영동용 아가로즈의 제조방법은 주로 이 방법을 개선하였다. 그리고, 현재 아가로즈 제조에 많이 이용되는 poly ethylene glycol(PEG)을 이용한 아가로즈 제조법도 함께 검토하였다.

가. 고강도 한천의 제조

전기영동용 아가로즈는 주로 고분자의 물질을 전기적으로 분리하기 위해 사용하므로 아가로즈중에 극성을 나타내는 성분이 없어야하며 겔화시켰을 때 겔강도가 매우 높아야 한다. 따라서 겔강도가 강한 아가로즈를 제조하기 위해서는 한천 자체의 겔강도가 일반 한천에 비해 높은 것을 사용하는 것이 필요하므로 먼저 고강도 한천제조법을 검토하였다.

1) 알칼리 처리에 의한 고강도 한천 제조 방법

우뭇가사리 원조로부터 겔강도가 강한 한천의 제조는 우뭇가사리를 수산화나트륨으로 전처리한 후 한천을 제조하였다. 고강도 한천제조 공정중 수산화나트륨 전처리 조건은 40, 60 70, 80 그리고 90℃의 온도 범위와, 0, 2, 4, 6 그리고 8%의 농도에서 처리하였다. 처리시간은 2, 3 그리고 4시간에서 검토하였다. 수산화나트륨을 처리한 우뭇가사리를 수세하고 증화한 후 한천을 제조하였다.

2) 알칼리 처리에 의한 고강도 한천

한천의 제조공정은 원조의 전처리, 추출, 여과, 탈수, 건조, 분쇄 그리고 포장의 과정을 거치게 된다. 위의 제조공정 가운데 전처리공정은 수용성 불순물을 포함한 이물질을 제거하는 과정일 뿐만 아니라 꼬시래기를 한천 원료로 사용할 경우에는 알칼리 처리에 의하여 겔화능을 부여하는 매우 중요한 과정이다(林과 岡崎, 1970). 그러나 우뭇가사리를 한천 원료로 사용할 경우에는 알칼리 처리를 하지 않고 한천을 제조하지만 겔강도가 높은 한천을 제조하기 위하여 수산화나트륨을 처리하여 한천을 제조하고 수율 및 이화학적 특성을 살펴보았다. Fig. 31에서는 수산화나트륨을 0, 2, 4, 6 그리고 8%를 80℃에서 3시간 처리한 우뭇가사리로부터 추출한 한천의 수율을 나타내었다.

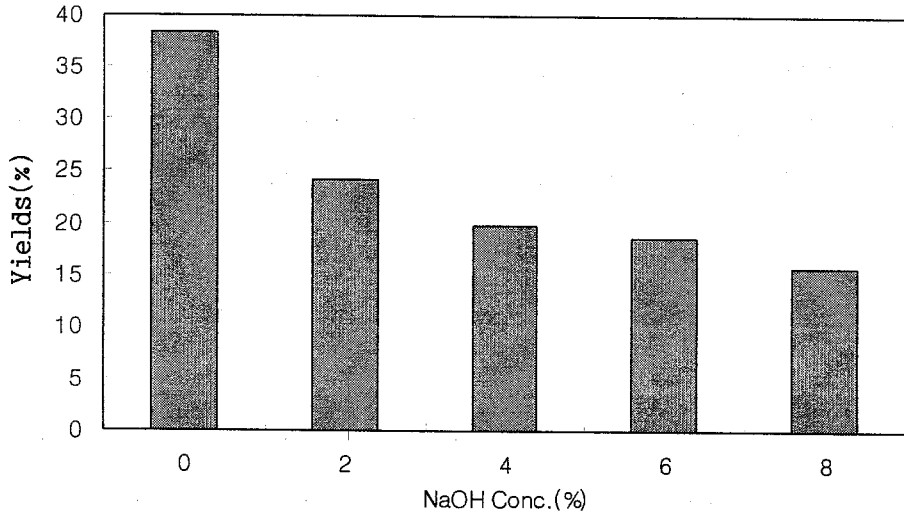


Fig. 31. Yields of agar extracted at 120°C, 3hrs from *Gelidium amansii* after alkali treatment of various concentrations at 80°C for 3hrs.

결과를 살펴보면 일정처리 조건에서 수산화나트륨의 처리 농도가 증가 할수록 한천의 수율은 감소하였다. 즉 수산화나트륨을 처리하지 않은 경우 38.27%의 수율을 나타내었으나, 2, 4, 6, 8%의 수산화나트륨 처리시 한천의 수율은 24.20, 19.76, 18.63 그리고 15.76%였다.

Table 37에서는 농도별로 처리한 우뚝가사리에서 추출한 한천의 이화학적 특성을 조사한 결과이며, 처리 농도가 증가할수록 추출한 한천의 겔 강도는 비례하여 증가하였고, 회분과 황산기의 함량은 감소하였다. 즉, 수산화나트륨을 처리한 우뚝가사리로부터 추출한 한천 용액의 수소이온농도는 6.85 - 8.11범위로 나타났으며, 겔강도는 수산화나트륨을 처리하지 않

은 경우 598 g/cm²였으며, 2, 4, 6, 8%의 수산화나트륨 처리시 한천의 겔 강도는 989, 1467, 1565 그리고 1566 g/cm²으로 처리농도가 증가할수록 겔 강도가 증가하였다. 회분 함량은 수산화나트륨의 처리농도가 증가할수록 감소하였으며 3.03 - 2.22범위로 나타났다. 황산기 함량은 수산화나트륨을 처리하지 않은 경우 1.41%였으며, 2, 4, 6, 8%의 수산화나트륨 처리시 황산기 함량은 0.93, 0.68, 0.50 그리고 0.37%로 처리농도가 증가할수록 대체로 감소하였다.

Table 37. The physicochemical characteristics of agar extracted from *Gelidium amansii* after NaOH treatment

Treatment Conc. (%)	Gel strength(g/cm ²)	Ash(%)	Sulfate(%)
0	598	3.03	1.41
2	989	2.85	0.93
4	1467	2.74	0.68
6	1565	2.29	0.50
8	1566	2.22	0.37

* Extraction condition : 120°C for 3hrs

* NaOH treatment condition : 80°C for 3hrs

이는 꼬시래기 원조로부터 추출한 한천의 구성성분과 겔강도에 관한 연구에서 꼬시래기 원조를 알칼리로 처리하면 L-galactose-6-sulfate에서 황산기가 떨어져 나가면서 한천중의 황산기 함량이 감소하고 겔강도가 증가한다는 Craigie and Wen(1984)의 보고와 일치하는 결과이다. 위에서 얻은 결과로부터 우뚝가사리 원조로부터 고강도 한천을 제조하기 위한 수산화나트륨의 처리농도는 6%로 결정하였다.

Fig. 32에서는 수산화나트륨의 최적 처리 온도를 결정하기 위하여, 수

산화나트륨의 처리농도를 6%로 하고 40, 60, 70, 80 그리고 90℃에서 3시간 처리한 우뭇가사리로부터 추출한 한천의 수율을 나타내었다. 결과를 살펴보면 일정처리 조건에서 6% 수산화나트륨의 처리 온도가 증가할수록 한천의 수율은 감소하였다. 즉 6%의 수산화나트륨을 40, 60, 70, 80 그리고 90℃에서 3시간 처리한 우뭇가사리로부터 추출한 한천의 수율은 35.24, 29.24, 25.84, 19.63 그리고 15.42%였다.

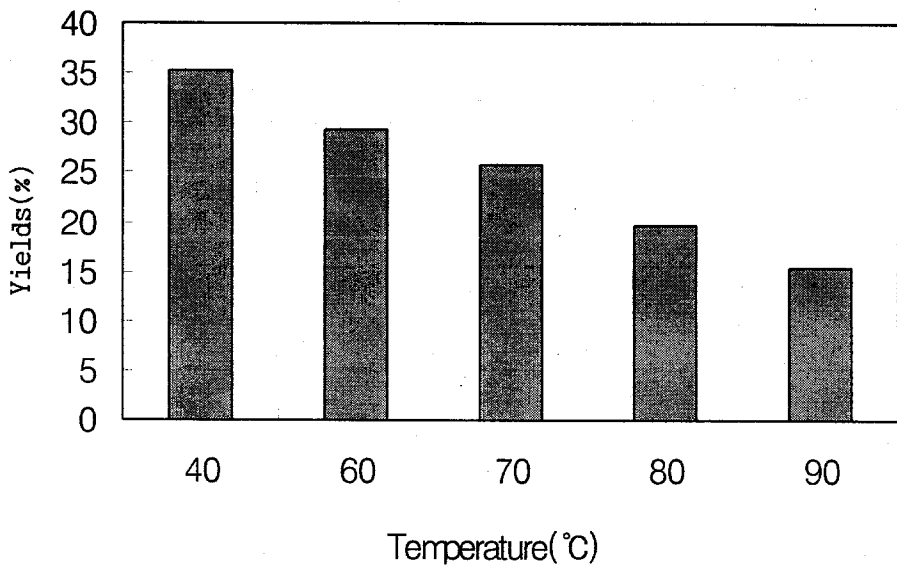


Fig.32. Yields of agar extracted at 120°C, 3hrs from *Gelidium amansii* after alkali treatment of various temperature at 6% concentration 3hrs.

Table 38에서는 온도별로 처리한 우뭇가사리에서 추출한 한천의 이화학적 특성을 조사한 결과이며, 처리 온도가 증가할수록 추출한 한천의 겔 강도는 비례하여 증가하였고, 회분과 황산기의 함량은 감소하였다. 즉 수산화나트륨을 처리한 우뭇가사리로부터 추출한 한천 용액의 수소이온농도

는 6.85 - 8.18범위로 나타났으며, 겔강도는 40, 60, 70, 80 그리고 90℃에서 3시간처리한 우뭇가사리로부터 추출한 한천의 겔강도는 714, 808, 1224, 1565 그리고 1583g/cm²였고 황산기 함량은 1.18, 1.06, 0.83, 0.30 그리고 0.29%였다.

Table 38. The physicochemical characteristics of agar extracted from *Gelidium amansii* after NaOH treatment

Treatment Conc. (%)	Gel strength(g/cm ²)	Ash(%)	Sulfate(%)
40	714	3.13	1.18
60	808	2.73	1.06
70	124	2.60	0.83
80	1565	2.29	0.30
90	1583	2.15	0.29

* Extraction condition : 120℃ for 3hrs

* NaOH treatment time and concentration : 6% for 3hrs

위에서 얻은 결과로부터 우뭇가사리 원조로부터 고강도 한천을 제조하기 위한 수산화나트륨의 처리온도는 80℃가 적절한 것으로 나타났다. Fig. 33에서는 수산화나트륨의 최적 처리 시간을 결정하기 위하여, 수산화나트륨의 처리농도를 6%로 하고 80℃에서 2, 3 그리고 4시간 처리한 우뭇가사리로부터 추출한 한천의 수율을 나타내었다.

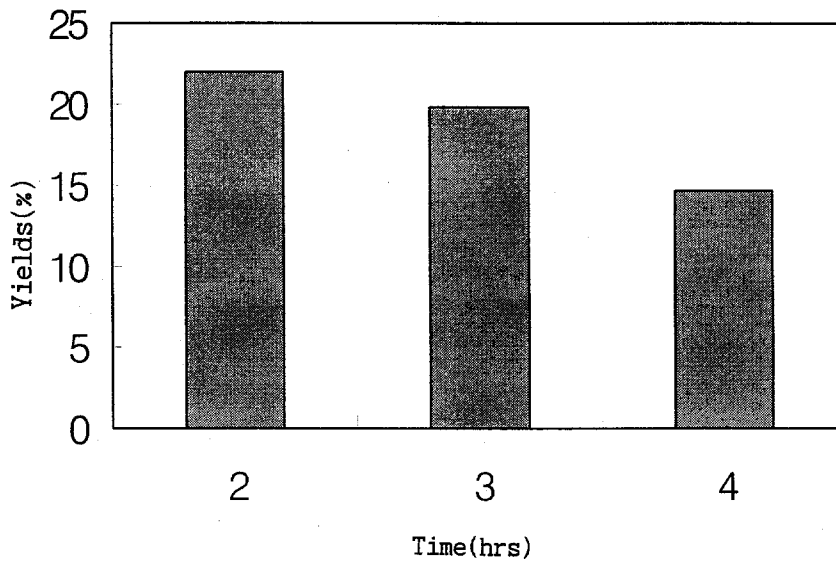


Fig.33. Yields of agar extracted at 120°C, 3hrs from *Gelidium amansii* after alkali treatment of various time at 80°C, 6% concentration.

결과를 살펴보면, 수산화나트륨의 처리 시간을 길게 할수록 한천의 수율은 감소하였다. 즉 6%의 수산화나트륨을 80°C에서 2, 3 그리고 4시간 처리한 우뚝가사리로부터 추출한 한천의 수율은 21.95, 19.85, 그리고 14.75%였다. Table 39에서는 시간별로 수산화나트륨을 처리한 우뚝가사리에서 추출한 한천의 이화학적 특성을 조사한 결과이다. 수산화나트륨을 처리한 우뚝가사리로부터 추출한 한천 용액의 수소이온농도는 7.57 - 8.46범위로 나타났으며, 겔강도는 80°C에서 2, 3, 4시간처리한 우뚝가사리로부터 추출한 한천의 겔강도는 1596, 1579, 그리고 1569g/cm²였고 황산기 함량은

0.93, 0.84, 그리고 0.85%였다. 위에서 얻은 결과로부터 우뭇가사리 원조로부터 고강도 한천을 제조하기 위한 수산화나트륨의 처리시간은 2 - 3시간이 적절한 것으로 나타났다.

Table 39. The physicochemical characteristics of agar extracted from *Gelidium amansii* after NaOH treatment

Treatment Conc. (%)	Gel strength(g/cm ²)	Ash(%)	Sulfate(%)
2	1596	2.55	0.93
3	1579	2.39	0.84
4	1569	2.36	0.85

* Extraction condition : 120°C for 3hrs

* NaOH treatment temperature and concentration : 6%, 80°C

Table 40에서는 온도별로 처리한 우뭇가사리에서 추출한 한천의 구성당 조성을 분석한 결과이다. 우뭇가사리에서 추출한 한천의 구성당은 3,6-anhydrogalactose(An-Gal), galactose(Gal)가 주성분이었으며, 6-methyl-galactose(6-Me-Gal)와 xylose (Xyl)도 0.85 - 2.0% 함유되어 있었다. 수산화나트륨을 처리하지 않은 우뭇가사리로부터 추출한 한천의 Gal는 53.28%, An-Gal는 44.24%였으며, 수산화나트륨을 40, 60, 70, 80°C에서 처리한 우뭇가사리에서 추출한 한천의 경우, Gal는 51.69 - 52.96%, An-Gal는 44.05 - 46.10%로 수산화나트륨처리로 인한 구성당의 조성은 큰 차이가 없었다. 이러한 결과는 꼬시래기 원조를 사용한 Craigie and Wen(1984)의 결과와 일치하지 않는 것으로 원조 자체의 구성당 조성 차이로 생각된다.

Table 40. Sugar compositions of agar extracted from *Gellidium amansii* after NaOH treatment

Unit : %

Treatment Temp. (°C)	Gal	An-Gal	6-Me-Gal	Xylose
non-treated	53.28	44.24	1.31	1.17
40	52.66	44.81	1.20	1.32
60	52.05	45.24	1.48	0.85
70	51.69	46.10	1.15	1.06
90	52.69	44.05	2.00	1.25

* Extraction condition : 120°C for 3hrs

* NaOH treatment time and concentration : 6% for 3hrs

나. 키토산을 이용한 아가로스 제조

키토산은 키틴의 탈아세틸화물로서 탈아세틸화된 키토산은 반응기를 가지고 있으므로 식품공장에서 나오는 폐수중에 함유된 반응기를 가진 유기물의 응집제로 이용되고 있다. 이와같은 원리를 이용하여 한천의 구성성분 가운데 반응기를 가진 아가로펙틴을 키토산으로 처리하여 침전시켜 제거함으로써 아가르스를 분리하고자 하였다. 키토산에 의한 전기영동용 아가로스 제조 공정은 Fig. 34과 같다. 즉, 고강도 한천 제조법으로 제조한 겔강도가 강한 한천을 0.02M의 EDTA염 용액으로 처리하여 한천중에 함유된 무기질을 제거하였다. 그리고, 한천을 용해시킬 때 일으킬 수 있는 한천성분의 가수분해를 최소화 하기 위하여 pH를 중성으로 한후 121°C에서 30분 가열하여 한천용액을 제조하였다. 70-80°C의 한천용액에 한천에 대한 키토산의 농도가 10%가 되게 교반하면서 첨가하여 아가로펙틴과 키토산을 반응침전시켰다.

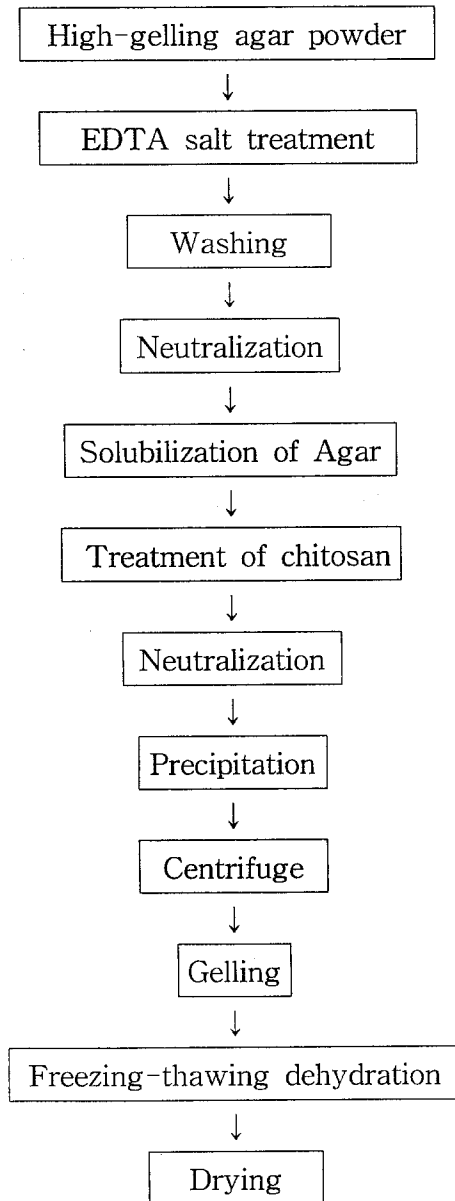


Fig. 34. The Procedure for preparation of agarose by chitosan treatment.

아가로즈 제조에 사용한 키토산은 불순물을 제거하기 위하여 알콜 및 증제수로 정제하여 사용하였다. 그리고, 잔존하는 키토산을 제거하고 반응 중에 일으킬 수 있는 한천의 가수분해를 최소화 하기 위하여 수산화나트륨 용액으로 중화시켰다. 이와 같이 처리한 반응용액을 70-80℃의 incubator 에 1시간 이상 두어 침전반응 시켰다. 원심분리(7000g, 20분, 30℃)에 의해 침전물을 제거하고 반응침전물이 혼입되지 않게 상층액을 취하여 겔화 하고 동결해동 탈수하였다. 동결해동탈수하고 증제수로 수세하여 중화반응 에서 생성되는 염을 제거하였다. 그리고 용해성을 좋게하기 위하여 진공동 결건조 하였다. 키토산 처리에 의해 제조한 아가로즈의 수율은 70-80%로 나타났다. 증제수로 수세하고 키토산으로 분리한 아가로즈의 겔강도는 1309 g/cm², 용액의 투명도는 0.022, 겔의 투명도는 0.280이었고, 회분 함량은 1.81%, 황산기 함량은 0.447%로 나타났다. 0.02M의 Na₂EDTA용액으로 수세하고 키토산으로 분리한 아가로즈의 겔강도는 1275 g/cm², 용액의 투명도는 0.027, 겔의 투명도는 0.310이었고, 회분 함량은 1.50%, 황산기 함량은 0.196%로 나타나 정제도가 좋은 것으로 판단되었다.

다. PEG를 이용한 아가로즈 제조

Poly Ethylene Glycol(PEG)를 이용한 아가로즈 분리는 한천용액 에 PEG를 첨가하여 아가로즈를 석출시키는 방법으로 제조공정을 검토하고 이 방법으로 제조한 아가로즈를 이용하여 전기영동용 소재로의 활용성을 검토하였다. PEG에 의한 전기영동용 아가로즈 제조 공정은 Fig. 35과 같다. 즉, 고강도 한천 제조법으로 제조한 겔강도가 강한 한천을 증제수로 처리하여 한천중에 함유된 수용성의 불순물을 제거하였다. 그리고, 한천을 용해시킬 때 일으킬 수 있는 한천성분의 가수분해를 최소화 하기 위하여 pH를 중성으로 한후 121℃에서 30분 가열하여 4%의 한천용액을 제조하였다. 한천용액의 농도는 수율과 매우 밀접한 관계가 있으며 가능하면 농도

를 높여야 하지만 농도가 높일 때 용해가 잘 되지 않으므로 주위해서 용해 시켜야 한다. 70-80℃의 한천용액에 PEG의 농도가 25%가 되게 교반하면서 첨가하였다. PEG가 한천용액에 용해되면서 아가로즈가 석출침전되며 침전이 잘 일으날 수 있도록하기 위하여 포화식염수를 소량 첨가하였으며, 침전반응은 70-80℃의 incubator에 3시간 이상 두어 침전반응 시켰다. 침전 과정에서 반응 온도가 낮으면 침전이 잘 일어나지 않게 되고 온도가 높으면 분리하고자 하는 아가로즈 즉 침전물의 색이 좋지 않으므로 주위해야한다. 침전반응 후 원심분리(7000g, 20분, 30℃)에 의해 침전물을 회수하고 침전물중에 함유된 PEG를 제거하기 위해 수세하였다. 여과하여 침전물인 아가로즈를 회수하고 다시 용해후 겔화하고 동결해동 탈수처리하고 용해성을 좋게하기 위하여 진공동결건조 하였다. PEG처리에 의해 제조한 아가로즈의 수율은 25-38%로 나타났다. 증제수로 수세하고 PEG로 분리한 아가로즈의 겔강도는 1892g/cm², 용액의 투명도는 0.067, 겔의 투명도는 0.314이었고, 회분 함량은 0.83%, 황산기 함량은 0.177%로 나타나 수율이 낮지만, 이화학적 품질은 좋은 것으로 판단된다.

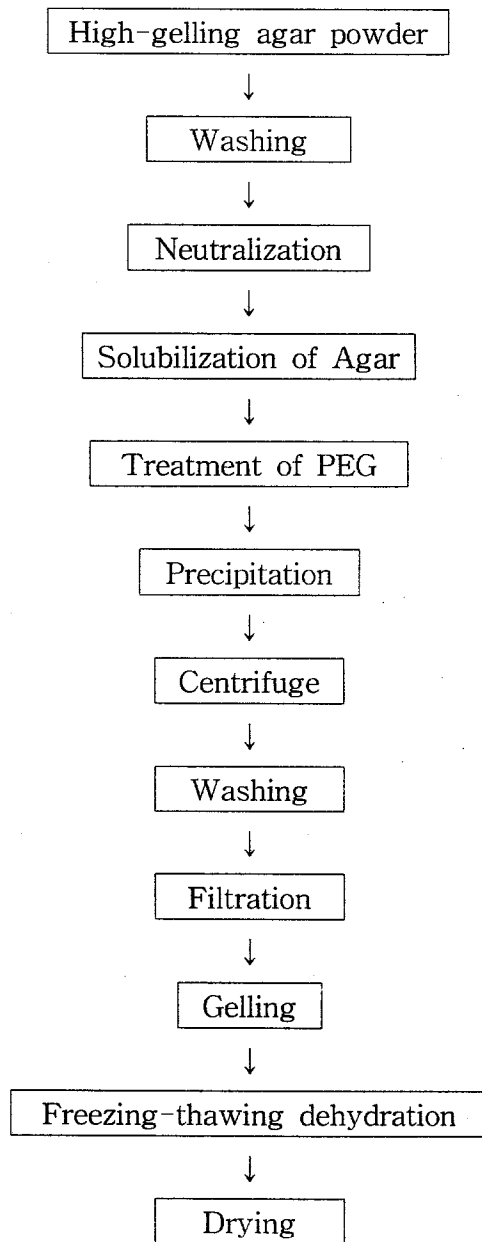


Fig. 35. The procedure for preparation of agarose by PEG treatment.

3. 정제 아가로즈의 활용

가. DNA 전기영동

DNA 전기영동시 migration에 미치는 주요한 factor는 다음과 같다.

① Agarose 농도

agarose 농도에 따라 전개되는 DNA의 크기가 결정되어야 한다. 즉, 전개되는 DNA의 electrophoretic mobility는 retardation coefficient와 agarose gel 농도에 영향을 받는다.

$$\log \mu = \log \mu_0 - k_r \tau$$

$\log \mu$ = electrophoretic mobility
 $\log \mu_0$ = free electrophoretic mobility
 k_r = retardation coefficient
 τ = gel concentration

따라서 전개하고자 하는 DNA의 분자량에 따라 agarose gel의 농도를 결정하여야 한다. 일반적으로 많이 사용되고 있는 DNA 분자량에 따른 agarose gel 농도는 다음과 같다.

Amount of agarose in gel(%)	Efficient range of separation of linear DNA Molecules(kb)
0.3	60-5
0.6	20-1
0.7	10-0.8
0.9	7-0.5
1.2	6-0.4
1.5	4-0.2
2.0	3-0.1

② 전압

전기영동시 migration 속도는 주어진 전압에 비례하게 되며 전압이 증가함에 따라 고분자의 DNA가 저분자의 DNA 보다 더욱 더 빠르게

migration 되기 때문에 정확한 결과를 얻기가 힘들다. 결론적으로 높은 전압은 고분자의 DNA 분리에 비효율적이다.

③ DNA 형태

Ethyidium bromide가 존재하지 않는 상황에서 nicked, relaxed DNA가 가장 느리게 이동하며 그 다음이 직선상태의 DNA이다. closed circular supercoiled DNA가 가장 빠르게 이동한다.

④ 전기영동 buffer

Buffer capacity가 큰 buffer를 사용할 때 더욱 더 빠르게 이동한다. 따라서 TAE buffer를 사용하였을 때가 TBE buffer를 사용하였을 때 보다 빠르다.

⑤ DNA의 분자량

전개 속도는 분자량의 \log_{10} 에 반비례한다.

⑥ DNA의 염기조성 및 전개 온도

크게 관련이 없는 것으로 보고되고 있다.

1) 실험방법

한천으로부터 분리 정제한 아가로스지의 실제 이용 가능성을 비교 검토하기 위하여 DNA의 이동속도 및 분리도가 가장 좋은 것으로 알려진 아가로스(FMC사 제품)와 함께 전기영동을 실시하였다. DNA 전기영동 실험 과정은 다음과 같다. 즉, 30ml TAE buffer에 아가로스를 녹여 1% 용액으로 만든후 comb(sample loading 자리)을 이용하여 well을 만들어 아가로스 겔판을 만든다. 전기영동 장치에 buffer를 채우고 아가로스 겔판을 넣고 겔판의 sample loading 자리에 loading 양은 DNA $1\mu\text{g}$ 에 상당하는 양 즉, DNA size marker $7\mu\text{l}$ (DNA $2\mu\text{l}$ + buffer $5\mu\text{l}$)을 loading 하였다. 그리고, 아가로스 겔 1cm당 7V의 전압 조건에서 약 4시간 전기영동에 공시하였다. 전개를 마친후 겔판을 ethyl bromide 용액(0.005%)으로 10초간 staining한 후

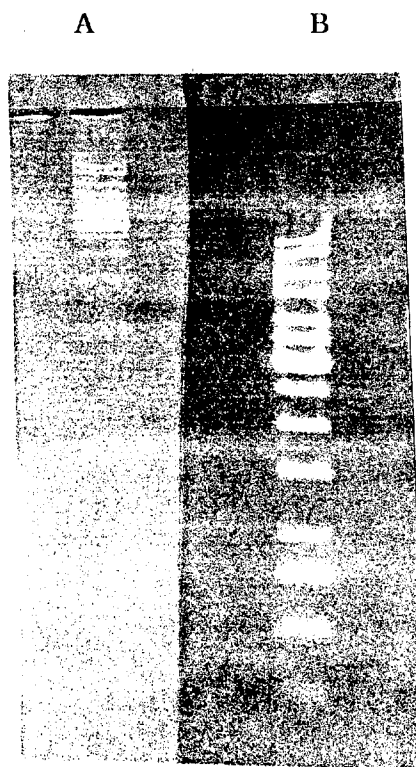


Fig. 36. Gel electrophoresis of 1kb DNA ladder using domestic agar gel(1.0%) at 7V/cm condition. The 1kb DNA ladder consisted with 14 fragment(10000, 8000, 6000, 5000, 4000, 3500, 3000, 2500, 2000, 1500, 1000, 750, 500, 250 base pairs). Control gel was made with SEAKEM LE agarose(B)

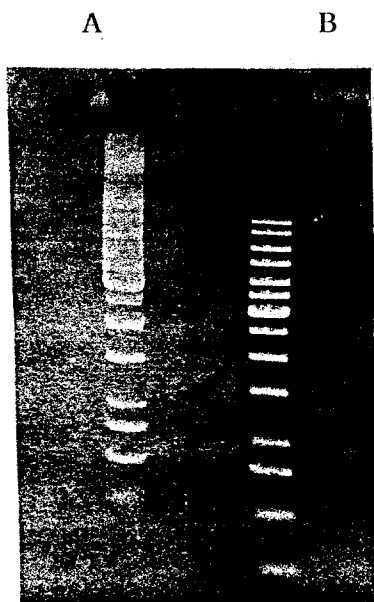


Fig. 37. Agarose gel electrophoresis of 1kb DNA ladder using agarose gel(1.0%) fractionated by CPC. Conditions are the same as in Fig. 1

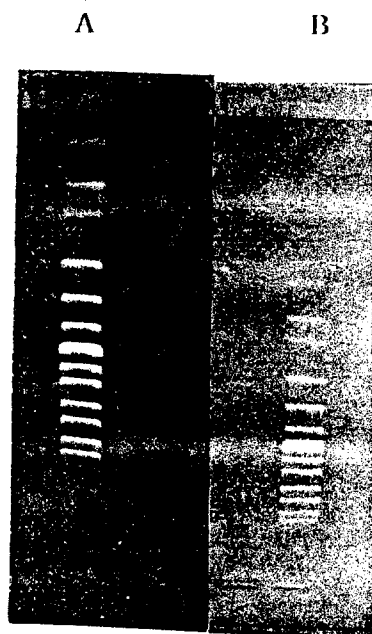


Fig. 38. Agarose gel electrophoresis of 1kb DNA ladder using agarose gel(1.0%) fractionated by PEG. Conditions are the same as in Fig. 1

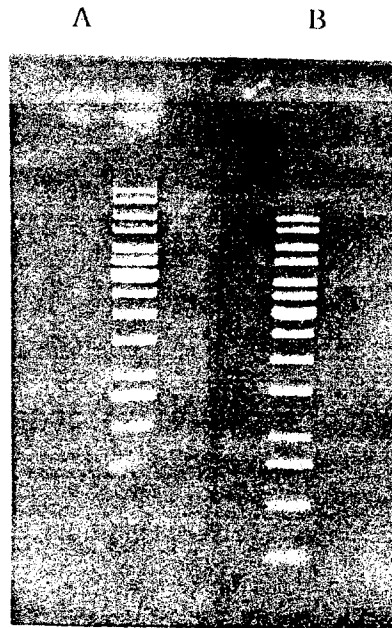
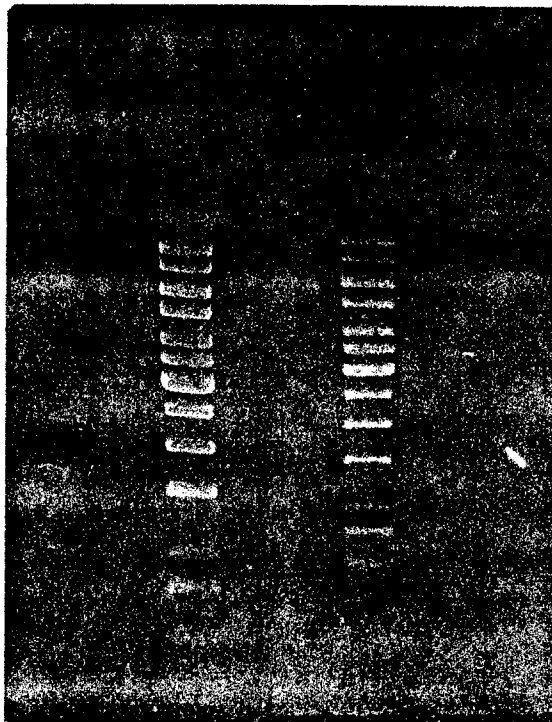


Fig. 39. Agarose gel electrophoresis of 1kb DNA ladder using agarose gel(1.0%) fractionated by chitosan. Conditions are the same as in Fig. 1



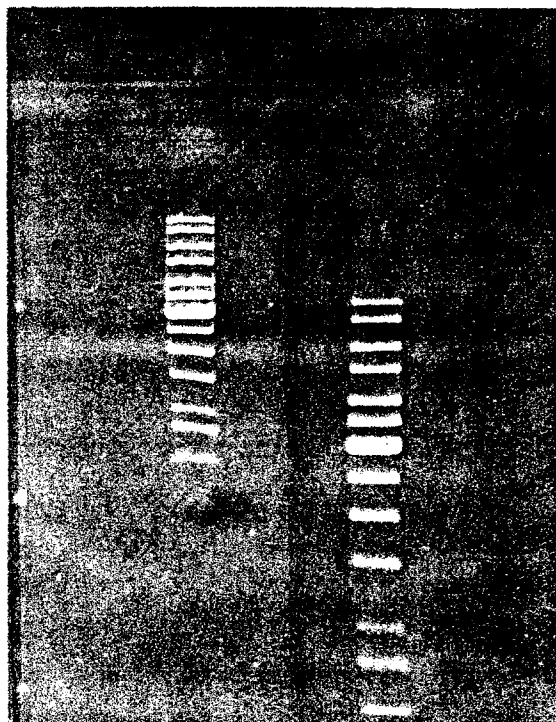
A

B

Fig. 40. Agarose gel electrophoretic pattern of DNA

A : FMC agarose

B : Domestic agar(drum dry)



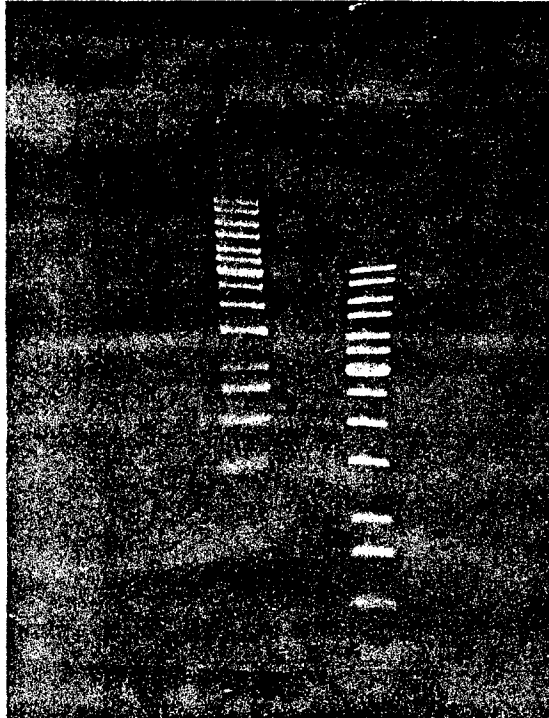
A

B

Fig. 41. Agarose gel electrophoretic pattern of DNA

A : Agarose fractionated using chitosan(high viscosity)
chitosan was purified with ethyl alcohol

B : FMC agarose



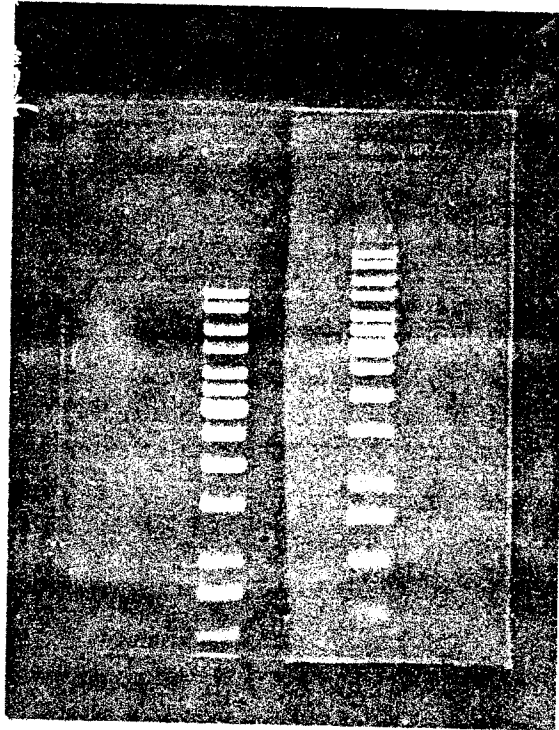
A

B

Fig. 42. Agarose gel electrophoretic pattern of DNA

A : Agarose fractionated using chitosan(high viscosity)

B : FMC agarose



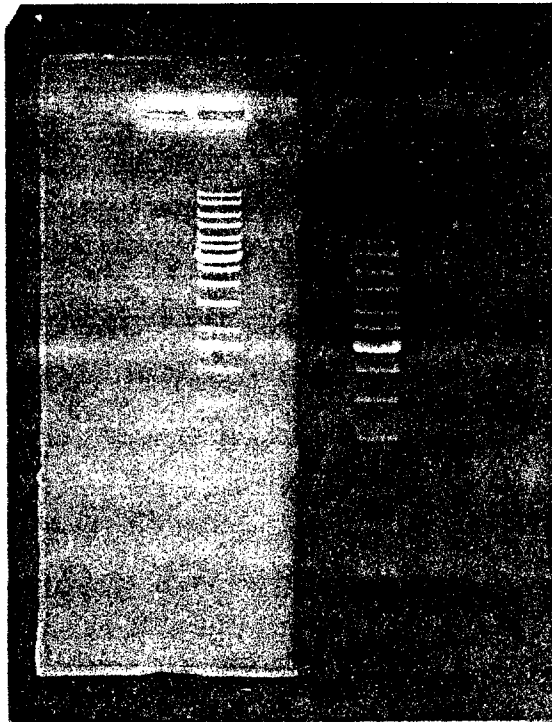
A

B

Fig. 43. Agarose gel electrophoretic pattern of DNA

A : FMC agarose

B : Agarose fractionated using chitosan (medium viscosity)
chitosan was purified with ethyl alcohol



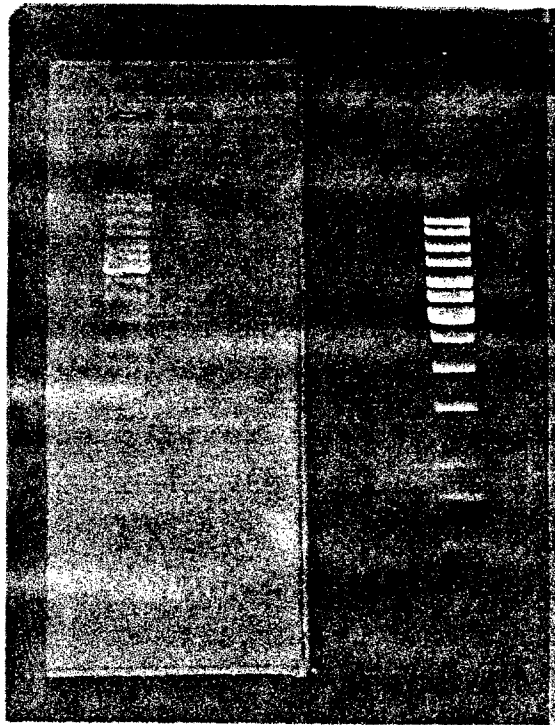
A

B

Fig. 44. Agarose gel electrophoretic pattern of DNA

A : Agar purified using iso-propanol

B : FMC agarose



A

B

Fig. 45. Agarose gel electrophoretic pattern of DNA

A : Agar purified using n-propanol

B : FMC agarose



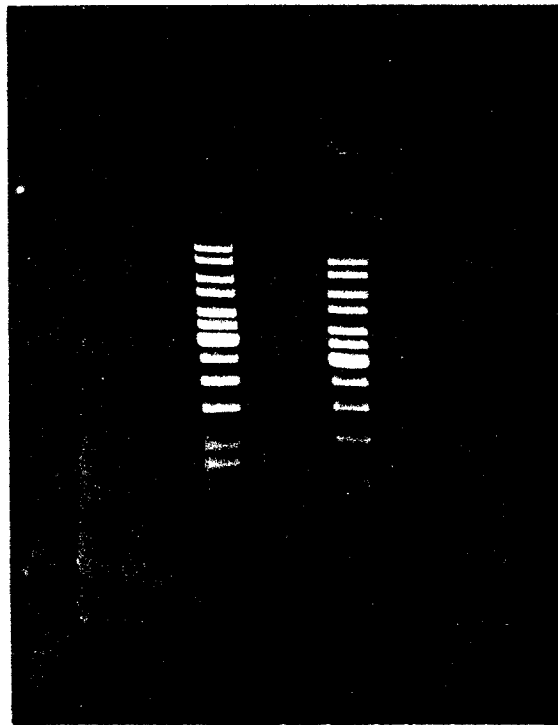
A

B

Fig. 46 Agarose gel electrophoretic pattern of DNA

A : Agar purified using acetone

B : FMC agarose



A

B

Fig. 47. Agarose gel electrophoretic pattern of DNA

A : Agar purified using EDTA

B : FMC agarose

증류수에서 약 30분간 destaining하여 아가로즈 겔 사이에 존재하는 EtBr 을 제거하였다. 겔판을 UV하에서 확인하고 사진을 찍어 실험 결과를 얻었다. 본 실험에 사용한 size maker는 14개의 fragments(10000, 8000, 6000, 5000, 4000, 3500, 3000, 2500, 2000, 1500, 1000, 750, 500, 250 base pair)로 된 표품을 사용하였다. TAE buffer는 242g의 Tris base, 57.1ml의 빙초산, 100ml의 0.5M Na₂EDTA를 1리터의 증류수 녹여 저장하여 두고 50배로 희석하여 사용하였다.

2) DNA 전기영동 실험결과

겔의 농도를 1%로 하여 DNA 전기영동한 결과, 국내산 한천은 DNA가 거의 분리되지 않았으며, acetone, n-propanol, iso-propanol 로 정제한 한천은 국내산 한천보다는 개선되었으나(Fig. 36-47), DNA의 분리가 좋지 않은 것으로 나타났으며, EDTA염으로 정제한 한천을 사용한 결과 (Fig. 47), 대조구로 사용한 FMC 아가로즈와 유사한 분리정도를 나타내었다. 그리고, 키토산, PEG, CPC로 정제한 아가로즈는 FMC 아가로즈에 비해 DNA의 이동속도가 조금 늦지만 상당히 좋은 결과를 나타내었다. 아가로즈 제조시 수율이 높은 키토산의 경우, 중점성 키토산과 고점성 키토산을 각각 에탄올로 정제하여 처리해 본 결과, 중점성의 키토산을 에탄올로 정제하여 사용하였을 때 가장 좋은 결과를 나타내었다. 이러한 결과를 미루어 볼 때 키토산으로 정제한 아가로즈는 DNA 전기영동용 소재로 이용가능 할 것으로 판단된다.

나. 교차 면역 전기 영동

1) 실험 방법

한천으로부터 분리 정제한 아가로즈의 실제 이용 가능성을 비교 검토하기 위하여 교차면역 전기영동용의 아가로즈(Sigma사 제품)와 함께 전기영동을 실시하였다. 교차 면역 전기영동 실험과정은 다음과 같다. 즉,

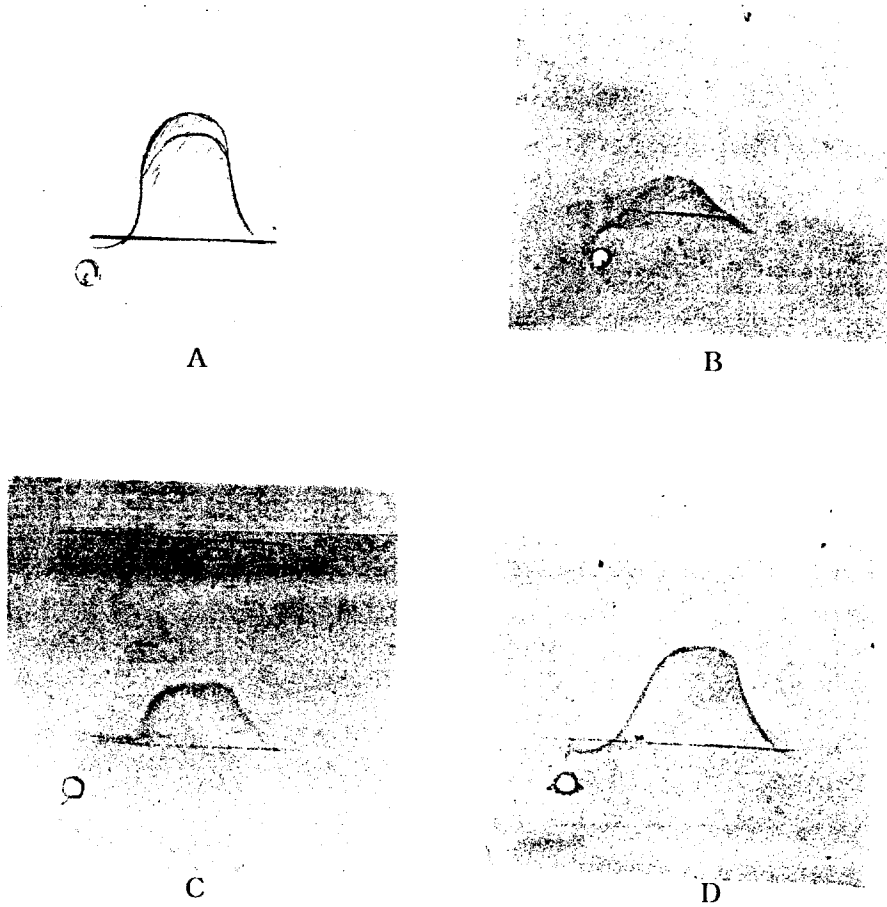


Fig. 48. Agarose gel closed-immuno-electrophoretic pattern of human serum. A: Sigma agarose, B: Agarose fractionated using EDTA, C: Agarose fractionated using chitosan, D: Agarose fractionated using purified chitosan

30ml Barbital buffer에 아가로즈를 녹여 1% 용액으로 만든 후 5cm×5cm 유리판에 5ml씩 취하여 아가로즈 겔을 만들고 겔의 왼쪽 하단부분에 주입구를 만들어 NHS 7 μ l를 주입한다. 전개판의 양쪽에 Barbital buffer를 채운후 겔을 놓고 Buffer와 닿는 끝부분에 Bridge(여과지)를 연결하고 V는 최대, 60mA로 setting한 뒤 1차 전기영동을 하였다. 겔의 끝부분까지 전개되는데 걸리는 시간은 약 50분 걸린다. 1차 전기영동이 끝나면 1차 전기영동된 겔의 부분만을 남기고 잘라낸 후 2차 전기영동에 사용한다. 2차 전기영동은 3.5ml의 아가로즈 용액이 들어 있는 Test tube에 Anti-Human Complement를 35 μ l(1%)를 넣어 교반한 후 1차 전기영동에서 잘라낸 부분에 부어 아가로즈 겔을 만든다. 2차 전기영동은 20mA에 setting한 후 약 5시간 음극에서 양극으로 전개한다. 전개가 완료된 겔은 여과지를 덮어 상온에 두어 약간 건조시키고, 0.005% Coomassie B. blue용액에 30초~1분정도 담가 염색(staining)한다. 염색한 겔을 destaining solution(D.W : Acetic acid : Ethanol = 87 : 8 : 5)담가 탈색하였다. 탈색한 겔은 사진을 찍어 실험 결과를 얻었다.

2) 교차 면역 전기영동 실험 결과

겔의 농도를 1%로 하여 교차 면역 전기영동한 결과(Fig. 48), 국내산 한천은 전개가 되지 않아 peak가 나타나지 않았고, Na₂EDTA 정제한 천, 키토산 정제한천, PEG 정제한천은 peak가 나타났으며, 키토산으로 정제한 아가로즈는 Sigma 아가로즈와 거의 유사한 peak를 나타내었다. 이러한 결과로 미루어 볼 때 키토산으로 정제한 아가로즈는 교차면역 전기영동 용 소재로 사용 가능 할 것으로 판단된다.

다. 단백질 전기영동

1) 실험 방법

Agarose를 포함한 SDS-PAGE는 Lammili의 방법에 따라 수행하였

다. 즉, agarose는 증류수를 첨가하여 100℃에서 용해시킨후 45℃까지 냉각하였다. 그런다음 별도로 준비된 Acrylamide용액에 첨가하여 최종 농도가 0.5% agarose-2.5% acrylamide가 되도록 조절하였으며 acrylamide용액의 buffer는 Tris-acetate(pH 7.4)를 사용하였다. SDS-PAGE에 공시한 단백질은 어류의 근원섬유 단백질을 화학적으로 가교시킨 고분자 단백질을 이용하였으며, 그 분자량 범위는 20만-160만 이었다.

2) 단백질 전기영동 실험 결과

대조구로 Sigma agarose와 FMC agarose를 대조구로 사용하여 단백질 전기영동한 결과(fig. 49), 겔강도, 탄력성 그리고 용해도는 PEG와 정제한 키토산으로 정제한 아가로즈는 양호하였으나, 겔투명도가 대조구에 비하여 부족한 것으로 나타났지만, 단백질 전기영동용 기재로 이용 가능한 것으로 판단되었다.

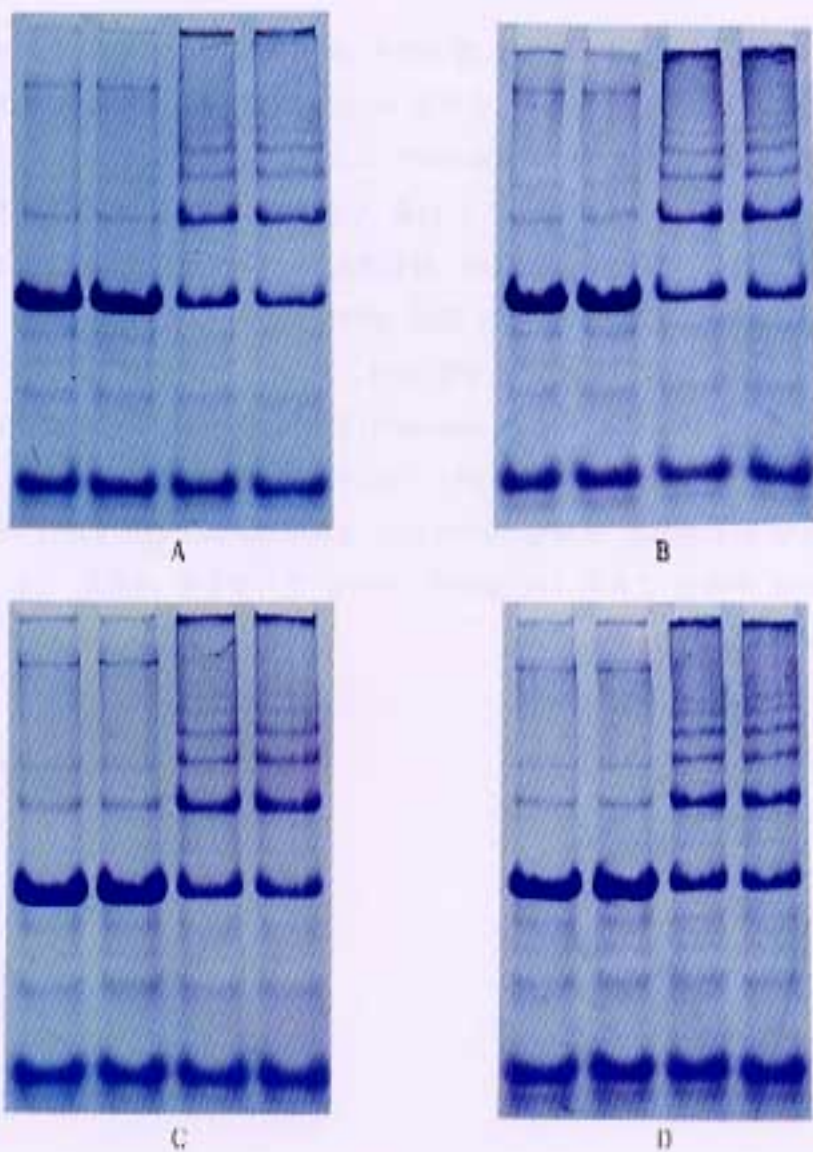


Fig.49. Gel electrophoretic pattern of protein

A : Sigma agarose

B : Agarose fractionated using chitosan

C : Agarose fractionated using purified chitosan

D : Agarose fractionated using PEG

제 4 장 결론 및 건의사항

국내연안에서 자생하는 13종류의 홍조류를 남해안의 송도, 광안리 그리고 다대포에서 채취하여 일반성분을 조사한 결과, 회분함량은 다대포에서 채취한 꼬시래기의 경우 8.57%로 가장 낮았으며 송도에서 채취한 붉은 잎은 30.23%로 회분함량이 가장 많았다. 한천원료로 주로 이용되고 있는 우뭇가사리의 경우 9.02~13.30%로 같은 종류의 해조류이지만 채취장소에 따라 함량차이가 있었다. 한천 원료인 꼬시래기의 경우도 8.57~14.07%로 우뭇가사리와 같이 채취장소에 따라 함량차이가 크다는 것을 알수 있었다. 단백질 함량은 광안리 풀가사리의 경우 18.11%로 가장 낮았고 송도 붉은까막살의 경우 33.90%로 가장 높았다. 지방은 0.11~0.90%로 모든 홍조류에서 함량이 1%미만으로 낮게 나타났다.

꼬시래기를 한천의 원료로 사용할 때 6%의 알카리 전처리시 겔강도가 좋은 한천을 제조할 수 있었다

우뭇가사리를 원료로하여 한천을 추출할 때 pH는 6~7로 했을 때 추출수율이 가장 높았다. 회분함량은 3.7 - 4.4%로 나타났으며, 겔 강도가 630~640으로 상당히 높은 것으로 나타났다. 이 결과를 통해 추출용액은 약산성 또는 중성으로 하는 것이 효과적인 것으로 나타났다.

한천의 추출시간 및 추출온도를 조사한 결과 추출시간을 길게 할수록 추출온도가 높을수록 수율이 증가하는 것을 알수 있었으며 100℃에서 추출하는 것 보다 120℃에서 추출하는 것이 수율면에서는 월등히 좋은 것으로 나타났다. 그리고 추출시간은 3시간이 적절한 것으로 판단되었다.

국내산 한천원료로서 현재 가장 많이 이용되고 있는 우뭇가사리의 채취장소 및 채취시기별 수율 및 추출물의 이화학적 특성을 조사한 결과, 3월에 채취한 원료에 비하여 6월에 채취한 원료의 수율이 높고 겔강도가 강한 것으로 나타났다.

한천원료의 산지에 따른 한천의 수율 및 품질을 살펴보기 위하여 남해

안의 다대포, 송도, 광안리, 대변 그리고 일광에서 채취한 우뭇가사리와 제주도 및 울릉도산 우뭇가사리를 구입하여 한천질을 추출하고 이화학적 특성을 조사하였다. 그 결과 동일한 조건(120℃, 4시간)에서 추출한 한천의 수율은 31.6~46.8%로 산지에 따른 수율의 차이가 매우 컸고, 울릉도산 및 제주도산 우뭇가사리의 수율이 46.8% 및 43.6%로 매우 좋았다. 겔강도는 496~887 g/cm²로 산지에 따른 차가 매우 컸고, 동해안(대변, 일광)산 우뭇가사리에서 추출한 한천의 겔강도가 887 및 854 g/cm²로 매우 강하였다. 추출한 한천 중의 회분 함량은 2.63~2.92%로 산지에 따른 차이는 크지 않았고, 한천의 품질에 중요한 영향을 미치는 황산기의 함량은 1.38~1.78%로 울릉도산 우뭇가사리에서 추출한 한천이 가장 낮았다.

우뭇가사리에서 추출한 한천을 사용하여 증류수 처리후 아세톤 탈수, EDTA염 처리, 에탄올 침전 처리, 아세톤 침전 처리 그리고 프로판올 침전 처리 등의 다양한 방법으로 한천을 정제한 결과, 모든 처리구에서 황산기 및 회분의 함량이 감소되어 정제효과가 있었다.

EDTA(ethylenediaminetetraacetate)처리시에는 황산기 및 회분함량이 상당히 감소되었으며, 수율은 71.9%였다. 증류수 처리 및 EDTA처리 방법은 한천을 용해시키지 않고 간단하게 처리할수 있다는 것이 매우 큰 장점이다.

우뭇가사리를 한천 원료로 사용할 경우에는 일반적으로 알칼리 처리를 하지 않고 한천을 제조하지만 겔강도가 높은 한천을 제조하기 위해서는 6%의 수산화나트륨을 80℃에서 2~3시간 처리하는 것이 적절한 것으로 나타났다

키토산 처리시에 황산기 및 회분함량이 상당히 감소하였으며 수율은 60.8~70.7%로 나타났다. 한천에 대한 키토산의 농도를 10% 하였을 때 황산기 및 회분함량이 0.3%로 떨어져 매우 좋은 결과를 나타내었다.

CPC를 이용하여 한천으로부터 아가로즈를 분리할 때 적정 농도는 20%였고, 황산기 함량은 5%이상 처리시 급격히 떨어졌으며, 회분은 10%이상

처리에서 상당히 제거 되었다. 수율은 64.1~73.5%범위로 나타났다.

PEG로 아가로즈를 분리할 때에는 한천용액에 대하여 20%의 PEG를 첨가하는 것이 가장 적절하였다. PEG처리에 의해 제조한 아가로즈의 수율은 25~38%로 나타났다. 증제수로 수세하고 PEG로 분리한 아가로즈의 겔강도는 1892g/cm², 용액의 투명도는 0.067, 겔의 투명도는 0.314이었고, 회분 함량은 0.83%, 황산기 함량은 0.177%로 나타나 수율이 낮지만, 이화학적 품질은 좋은 것으로 판단된다.

순수배양된 균주(*Bacillus subtilis*, *Escherichia coli*, 김치 젖산균)를 희석하여 colony number를 조사한 결과, 정제한천은 대조구로 사용된 Difco사의 agar와 비교하여 볼 때 거의 동일한 colony 수를 나타내어 배지용 한천으로 사용할 수 있는 것으로 나타났다. 특히, EDTA염으로 정제한 한천이 가장 적당한 것으로 판단되었다.

겔의 농도를 1%로 하여 DNA 전기영동한 결과, 국내산 한천은 DNA가 거의 분리되지 않았으며, acetone, n-propanol, iso-propanol로 정제한 한천은 국내산 한천보다는 개선되었으나, DNA의 분리가 좋지 않은 것으로 나타났다. EDTA염으로 정제한 한천을 사용한 결과, 대조구로 사용한 FMC 아가로즈와 유사한 분리정도를 나타내었다. 그리고, 키토산, PEG, CPC로 정제한 아가로즈는 FMC 아가로즈와 유사한 좋은 결과를 나타내었다. 이 가운데, 키토산으로 정제한 아가로즈는 DNA 전기영동용 소재로 이용가능 할 것으로 판단된다.

겔의 농도를 1%로 하여 교차 면역 전기영동한 결과, 국내산 한천은 전개가 되지 않아 peak가 나타나지 않았고, EDTA염 정제한천, 키토산 정제한천, PEG 정제한천은 peak가 나타났으며, 키토산으로 정제한 아가로즈는 Sigma 아가로즈와 거의 유사한 peak를 나타내었다. 이러한 결과로 미루어 볼 때 키토산으로 정제한 아가로즈는 교차면역 전기영동용 소재로 사용 가능 할 것으로 판단된다.

대조구로 Sigma agarose와 FMC agarose를 사용하여 단백질 전기영동한 결과, 겔강도, 탄력성 그리고 용해도는 PEG와 정제한 키토산으로 정제한 아가로즈는 양호하여, 단백질 전기영동용 소재로 이용 가능한 것으로 판단되었다.

본 연구는 3년간에 걸쳐 수행되었으며, 그 내용은 국내산 한천 원조로부터 한천의 제조 방법, 제조한 한천의 정제, 한천으로부터 아가로즈의 분리정제 그리고 정제한천 및 아가로즈의 활용도 검토로 이루어져 있다. 한천의 정제에 관한 연구 결과는 현재 특허 출원중이며, 연구 결과 가운데 학술적인 가치가 있는 결과는 3편이 학회에 투고되었다. 이러한 연구 결과는 실제 산업화에 적용하기 위해서는 대량생산시 파생될 수 있는 문제점을 보완하기 위한 공장 규모의 시험생산 검토가 필수적이다.

참고문헌

- Allan G.G., P.G. Johnson, Y-z. Lay and K.V. Sarkanen(1971) : Marine polymers ; Part 1. A new procedure for the fractionation of agar. Carbohyd. Res., 17, 234-236.
- Alfred polson(1965) : Fractionation of mixtures of agarose and agaropectin. British patent 1006259.
- A.O.A.C., 1990. Official Methods of Analysis of the Association of Official Analytical Chemists. 15th edition. K. Helrich, ed. Association of Official Analytical Chemists, Virginia, U.S.A..
- Araki C. and K. Aria. 1957. Studies on the chemical constitution of agar-agar. XX. Isolation of a tetrasaccharide by enzymatic hydrolysis of agar-agar. Bulletin of the chemical society of Japan, 30(3), 287-293.
- Araki C. and Arai K.(1962) : Methods in Carbohydrate Chemistry, α -L-Galactose. Academic Press, 122-126.
- Armisen R., Galatas(1987) : Production, properties and uses of agar. Food and Agriculture Organisation of the United Nations, 17-19.
- Barteling S.J.(1969) : A simple method for the preparation of agarose. Clinical Chemistry, 15(10), 1002-1005.
- Bemiller, J.N.(1965) : Methods in Carbohydrate Chemistry, Preparation of Agar and Agarose:Methanolysis:Mercaptolysis. Academic Press, 65-69.
- Bird K.T., J.H.Ryther(1990) : Cultivation of Gracilaria verrucosa (Gracilariales, Rhodophyta) Strain G-16 for agar. Hydrobiologia, 204(205), 347-351.

- Blethen J., Rockland, Maine(1966) : Method for the separation of agaropectin from agrose. United state patent no. 3281409.
- Braudo E.E., Muratalieva, I.G.Plashchina, V.B.Tolstoguzov(1991) : Correlation between the temperatures of formation/breakdown of the gel network and conformational transitions of Agarose macromolecules. Carbohydr.Polym. 15, 317-321.
- Cho D.M., D.S. Kim, D.S. Lee, H.R. Kim and J.H. Pyeun 1995. Trace components and functional saccharides in seaweed-1. Changes in proximate composition and trace elements according to the harvest season and places. Bull. Korean Fish. Soc. 28(1), 49~59(in Korean).
- Cho K.J., Y.S. Lee and B.H. Ryu 1990. Antitumor effect and immunology activity of seaweeds toward Sarcoma-180. Bull. Korean Fish. Soc. 23(5), 345~352(in Korean).
- Craigie, J.S., and Z.C. Wen. 1984. Effects of temperature and tissue age on gel strength and composition of agar from *Gracilaria tikvahiae* (Rhodophyceae). Can. J. Bot. 62, 1665-1670.
- Dodgson, K.S. and R.G. Price 1962. A note on the determination of the ester sulphate content of sulphated polysaccharides. Biochem.J., 84, 106~110.
- Dodgson, K.S.(1961) : determination of Inorganic sulphate in Studies on the Enzymic and Non-Enzymic Hydrolysis of Carbohydrate and Other Sulphate Esters. Biochem.J., 78, 312-319.
- Do, J. R. 1997. Extraction and purification of agar from *Gelidium amansii*. J.Korean Fish. Soc. 30(3), 423-427(in Korean).

- Do, J.R., Nam, Y.J., Park, J.H. and Jo, J.H.: Studies on chemical composition of red algae(in korean). *J. Korean Fish Soc.*, 30, 428-431 (1997)
- Duckworth M., Yaphe W.(1970) : Thin-layer chromatographic analysis of enzymic hydrolysates of agar. *J.Chromatog.*, 49, 482-487.
- Durairatnam M., T.M.B.Medeiros, A.M.Sena(1990) : Studies on the yield and gel strength of agar from *Gracilaria domingensis* Sonder ex Kuetzing(*Gracilariales*, *Rhodophyta*) following the addition of calcium. *Hydrobiologia*, 204(205), 551-553.
- Fernandez L., O.G.Valiente, V.Mainardi, J.L.Bello(1989) : Isolation and characterization of an antitumor active Agar-type polysaccharide of *Gracilaria dominguensis*. *Carbohydr.Res.*, 190, 77-83.
- Furneaux R.H., I.J.Miller, T.T.Stevenson(1990) : Agaroids from New Zealand members of the *Gracilariaceae*(*Gracilariales*, *Rhodophyta*) ; a novel dimethylated agar. *Hydrobiologia*, 204(205), 645-654.
- Gopal B.V.(1979) : Medicinal and pharmaceutical utilisation of purified agar-agar extracted from *gelidiella acerosa* of indian shores. *Marine algae in pharmaceutical science*, 675-680.
- Hegenauer J.C., Nace G.W.(1965) : An improved method for preparing agarose. *Biochimica et Biophysica Acta*, 111, 334-336.
- Hjerten S.(1962) : A new method for preparation of agarose for gel electrophoresis. *Biochimica et Biophysica Acta*, 62, 445-449.
- Hjerten S.(1961) : Agarose as an anticonvection agent in zone electrophoresis. *Biochimica et Biophysica Acta*, 53, 514-517.
- Hzima N., M.Fujihara, T.Nagumo(1980) : Application of a sintered silica gel plate to the thin-layer chromatography of carbohydrates.

- Journal of Chromatography, 193, 464-469.
- Izumi K. (1970) : A new method for fractionation of agar. *Agr. Biol. Chem.*, 34(11), 1739-1740.
- Kim, D.S., D.S. Lee, D.M. Cho, H.R. Kim and J.H. Pyeun 1995. Trace components and functional saccharides in marine algae 2. Dietary fiber content and distribution of the algal polysaccharides. *J. Korean Fish. Soc.* 28(3), 270~278(in Korean).
- Kim, S.H., H.Y. Park and W.K. Park 1988. Determination and physical properties of dietary fiber in seaweed products. *J. Korean Soc. Food Nutr.*, 17(4), 320~325(in Korean).
- Karamanos Y., M.Ondarza, F.Bellanger, D.Christiaen(1989) : The linkage of 4-o-methyl-L-galactopyranose in the Agar polymers from *Gracilaria verrucosa*. *Carbohydr.Res.*, 187, 93-101.
- Kirkpatrick, F.H., Kenneth, G., Richard, P. and Samuel, N. : High gel strength low electroendosmosis agarose. *U.S.Patent* 4,983,268 (1991)
- Laemmi, U.K.(1970) : Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4, *Nature*, 227, 680-685.
- Lahaye M., W.Yaphe(1989) : ^{13}C -N.M.R. Spectroscopic investigation of methylated and charged Agarose oligosaccharides and polysaccharides. *Carbohydr.Res.*, 190, 249-265.
- Lee, H.S., C. Rhee and H.C. Yang. 1985. A study on the purification by protein precipitants and washing of agar. *Korean J. Food Sci. Technol.* 17(5), 340-344(in Korean).
- Lee S.R., H.O. Cho and S.K. Park : Extraction yield and quality attributes of agar from domestic seaweeds according to various

- pretreatments(in korean). *Korean J. Food Sci. Technol.*, **7**,
109-344 (1975)
- Lee, Y.S., D.S. Kim, B.H. Ryu and S.H. Lee 1992. Antitumor and immunomodulating effects of seaweeds toward Sarcoma-180 cell. *J. Korean Soc. Food Nutr.* 21(5), 544~550(in Korean).
- Matsubashi, T. 1977. Acid pretreatment of agarophytes provides improvement in agar extraction. *J. Food Sci.*, 42(5), 1396-1400.
- Matsuhiro B., C.C.Urzu(1990) : Agar from *Gelidium rex*(Gelidiales, Rhodophyta). *Hydrobiologia*, 204(205), 545-549.
- Matsuhiro B., C.C.Urzu(1988) : Agaran from Tetrasporic and Cystocarpic *Gelidium Lingulatum*. *Bol. Soc. Chil. Quim.*, 33, 135-140.
- Matsuhiro B., Zanlungo A.B.(1983) : Colorimetric determination of 3,6-anhydrogalactose in polysaccharides from red seaweeds. *Carbohydr. Res.*, 118, 276-279.
- Mayer J.K., Wehrli H.(1937) : Comparaison chimique de la chitine et de la cellulose. *Helv. Chim. Acta.*, 20, 353-362.
- Mchugh D.J.(1987) : Production and utilization of products from commercial seaweeds : Bacteriological agar, Food and agriculture organisation of the united nations Rome, 17-21.
- Park Y.H.: Seasonal variation of total nitrogen content in the seaweed, *Gelidium amansii Lamouroux*(in korean). *Bull. Korean Fish. Soc.*, **2**, 83-86 (1969).
- Park, Y.Y., C. Rhee and H.C. Yang. 1985. Effect of acid treatment on extractability and properties of agar. *Korean J. Food Sci. Technol.* 17(5), 319-325(in Korean).
- Patil, N.B. and Kale, N.R.: A simple procedure for the preparation of

- agarose for gel electrophoresis. *Indian Journal of Biochemistry & Biophysics*. **10**, 160-163 (1973)
- Pickering T.D., M.E.Gordon, L.J.Tong(1990) : Seasonal growth, density, reproductive phenology and agar quality of *Gracilaria sordida* (Gracilariales, Rhodophyta) at Mokomoko Inlet, New Zealand. *Hydrobiologia*, 204(205), 253-262.
- Polson A. 1965. Fractionation of mixtures of agarose and agaropectin. British patent 1006259.
- Sachie I. 1993. Dietary fiber and function of digestion and absorption. *營養學雜誌*, 51(5), 251~258(in Japanese).
- Scott J.E.(1965) : Fractionation by Precipitation with Quaternary Ammonium Salts. *Methods Carbohydr. Chem.*, 5, 38-44.
- Talarico L., G.Guida, E.Murano, A.M.Piacquadio(1990) : Ultrastructure of the cell wall of *Gracilaria cf. verrucosa*(Gracilariales, Rhodophyta) : effects of steam explosion. *Hydrobiologia*, 204(205), 597-601.
48. Valiente O., L.E.Fernandez, R.M.Perez and G.Marquina(1993) : Partial methanolysis of the red seaweed *Laurencia gemmifera*. *Carbohydr.Res.*, 243, 191-197.
- Volpi N.(1993) : "Fast moving" and "slow moving" heparins, dermatan sulfate and chondroitin sulfate : qualitative and quantitative analysis by agarose-gel electrophoresis. *Carbohydr.Res.*, 247, 263-278.
- Whistler R.L.(1973) : Industrial gums. Academic press, inc., 29-48.
- Yoon, H.S. and Y.H. Park. 1984. Studies on the composition of agarose and agaropectin in agar-agar. *Bull. Korean Fish. Soc.* 24(2), 27-33(in Korean).

- 농림부. 1996. 농림수산통계연보, 대한민국 농림부.
- 林 金雄, 岡崎漳夫. 1970. 寒天ハンオドブック. 光琳書院, 248-249.
- 박건우(1987) : 배지용한천 제조방법. 대한민국 공개특허공보, 공개번호 87-7672.
- 박영호(1983) : 수산식품가공학. 형설출판사, 459-476.
- 本間三郎. 1988. 學研生物圖鑑 海藻. 柱式會社學習研究社. 日本(in Japanese).
- 水口純. 1970. 精製寒天の製造方法. 日本國特許廳, 昭45-5432.
- 이 철, 배승환(1984) : 寒天 抽出物の 乾燥方法에 따른 寒天의 品質. 한식지, 16(1), 78-82.
- 조한옥, 이서래(1974) : 海藻多糖類의 抽出에 미치는 방사선 照射의 효과. 한식지, 6(1), 36-41.
- 조한옥, 정만재, 이서래(1975) : 輸入原藻의 前處理과정에 따른 寒天의 收率 및 品質特性. 한식지, 7(3), 115-119.
- 天原光雄. 1990. 標準原色圖鑑全集 海藻. 保育社. 日本(in Japanese).
- 現代海洋出版局. 1991. 水産動植物名辭典. 現代海洋社. 서울(in Korean).
- 林 金雄, 平光 武, 中村武司(1969) : 輸入原藻オゴノリ(*Gracilaria* sp.)から 調製した寒天について. 日本農藝化學會誌, 43(10), 699-704.
- 小島 正明(1992) : 新しい 寒天の特性と その應用. *New Food Industry*, 34(11), 17-20.
- 松橋鐵治郎(1980) : 食料工業. 寒天. 886-890.
- 松島 雅美(1987) : 水産加工品と寒天. *New Food Industry*, 29(11), 46-48.
- 松島雅美(1982) : 粉末寒天の特質と利用. *New Food Industry*, 24(11), 21-23.
- 松島 正明(1992) : 新しい寒天の特質と その應用. *New Food Industry*, 34(11), 17-20.

- 理橋祐二(1986)：寒天の食品への利用. *New Food Industry*, 28(4), 20-23.
- 田畑 和廣(1993)：低凝固性寒天の特性と應用. *New Food Industry*, 35(7), 10-16.
- 荒木長次(1937)：寒天の化學的研究(第3報), 石花菜寒天質のアセチル化に就て. *日本化學會誌*, 58(12), 1338-1350.
- 布施恒明(1969)：寒天の利用に関する研究(第1報), 寒天のゲル化に及ぼす諸因子の影響. *日本農藝化學會誌*, 43(2), 110-114.
- 布施恒明(1969)：寒天の利用に関する研究(第2報), テングサ寒天の電離性. *日本農藝化學會誌*, 43(5), 292-295.
- 布施恒明(1969)：寒天の利用に関する研究(第3報), アガロース誘導體のゼリ-形成能. *日本農藝化學會誌*, 43(5), 296-299.
- 布施恒明(1969)：寒天の利用に関する研究(第8報), 寒天濃厚溶液の粘度挙動. *日本農藝化學會誌*, 43(10), 694-698.
- 布施恒明(1979)：寒天のゲル化性. *New Food Industry*, 21(1), 49-54.

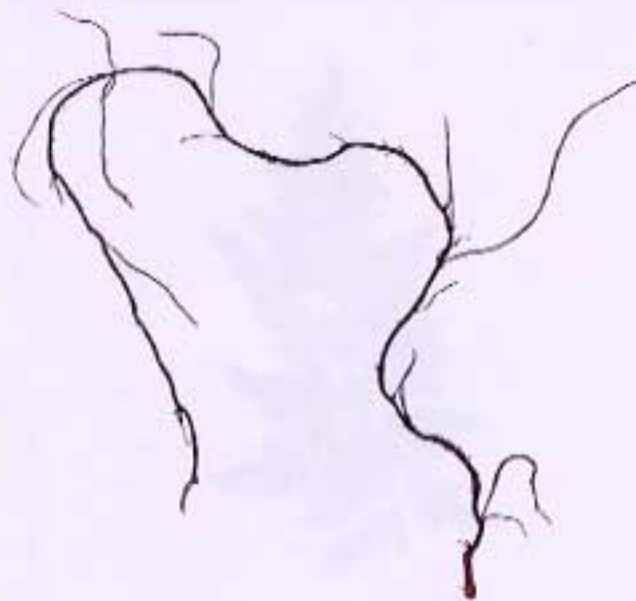
부 록

여 백

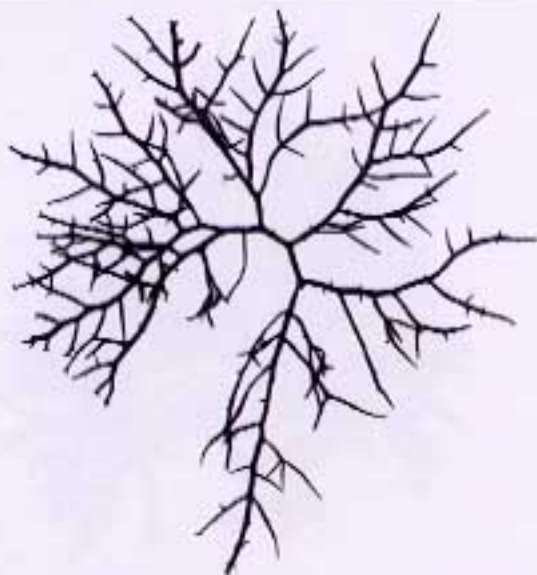
Gelidium amansii(Lamouroux) Lamouroux
홍조강 우뚝가사리목 우뚝가사리과 우뚝가사리



Gracilaria verrucosa(Hudson) Papenfuss
홍조강 돌가사리목 꼬시래기과 꼬시래기



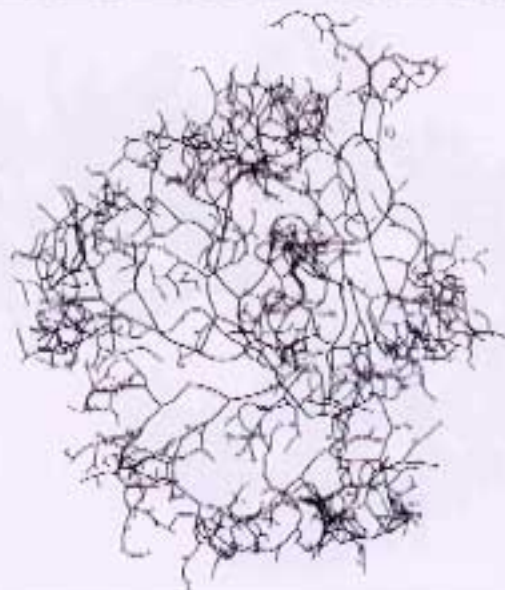
Gigartina tenella Harvey
홍조강 돌가사리목 돌가사리과 돌가사리



Laurencia nipponica Yamada
홍조강 분홍치목 빨간검둥이과 큰거실



Ceramium boydenii Gepp
홍조강 비단풀목 비단풀과 단박



Carpopeltis affinis(Harvey)Okamura
홍조강 지누아리목 지누아리과 참까막살



Carpopeltis crispata Okamura
홍조강 지누아리목 지누아리과 주름까막살



Callophyllis crispata Okamura
홍조강 지누아리목 붉은땀띠과 주름붉은잎



Carpopeltis cornea Okamura
홍조강 지누이리목 지누이리과 붉은까막살



Chondrus crispus Stackhouse
홍조강 돌가사리목 돌가사리과 주름진두발



Chondrus ocellatus Holmes
홍조강 돌가사리목 돌가사리과 진두발



Gloiopeltis tenax(Turner) J. Agardh
홍조강 지누아리목 풀가사리과 풀가사리



Plocamium ovicornis Okamura
홍조강 돌가사리목 곱슬이과 애기곱슬이



Plocamium telfair (Harvey) Harvey
홍조강 돌가사리목 곱슬이과 참곱슬이



Hypnea charoides Lamouroux
홍조강 돌가사리목 가시우무과 참가시우무



Gigartina intermedia Suringar
홍조강 돌가사리목 돌가사리과 애기돌가사리

