KOREAN J. FOOD SCI. TECHNOL.
Vol. 31, No. 1, pp. 110~114 (1999)

다양한 정제방법에 의한 전기영동용 한천유래 아가로즈의 제조 및 DNA 분리 특성

도정룡 · 오세욱
한국식품개발연구원

Preparation of Agarose from *Gelidium amansii* for Gel Electrophoresis using Various Purification Methods and Its Resolution Characteristics for DNA

Jeong-Ryong Do and Se-Wook Oh
Korea Food Research Institute

Abstract

The present study was conducted to investigate the preparative methods of agarose for gel electrophoresis from agar. Naturally occuring agar consists of two main polysaccharides, the neutral polysaccharide agarose and the acid sulphated 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 was found to be suitable for gel electrophoresis, gel filtration and affinity chromatography. Agar was purified by chitosan treatment, cetylpyridinium chloride (CPC) treatment, and polyethylene glycol (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.

Key words: agarose, purification, electrophoresis

서 론

식품공업, 의약품 및 전기영동 등에 사용되는 한천은 홍조류에 함유되어 있는 점질성 복합다당류이다. 국내에서 생산되는 한천원조는 수율과 품질에 있어서 매우 우수하며, 국내의 한천 생산량은 전 세계 생산량의 약 10%인 500톤에 달한다고 한다. 수출용 한천은 대부분이 단순 가공품이며 고가의 의약품, 미생물배지, 전기영동용급 한천은 거의 수입에 의존하고 있는 실정이다[1]. 국내의 한천에 관한 연구로는 주로 한천원조에 대한 성분분석[2-4], 전처리 조건 설정[5,6] 등이 대부분이며 한천 제품의 고급화를 통한 부가가치 창출에 대한 연구는 매우 부족한 상황이다.

Agar는 agarose와 agaropectin의 혼합물로서 agarose는 주로 3,6-anhydro-L-galactose와 D-galactose의 연속적인 linear polymer의 형태로 되어 있으며, 황산기와 carboxyl기는 주로 agaropectin에 위치하고 있다고 한다[7].

친수성이고, 이온 존재에 의한 전하를 띠지 않으며 투명하고 겔 형성능이 우수한 특성이 전기영동, gel filtraton, immunodiffusion 등의 실험에 요구되므로 agar에 존재하는 agropectin의 효율적인 제거가 고품질 agarose 생산에 가장 중요한 요건이라 할 수 있다[8].

따라서 본 연구에서는 국내 연안의 여러 지역에서 자생하는 우뭇가사리로부터 추출한 한천을 이용하여 chitosan, polyethylene glycol (PEG), cetylpyridium chloride (CPC) 등을 처리하여 agaropectin이 제거된 agarose를 조제하였으며 제조된 agarose의 전기영동적 특성을 파악하고자 하였다.

재료 및 방법

실험재료

실험에 사용한 한천원료는 1997년 4월에 자갈치 시장에서 구입한 제주산 우뭇가사리(*Gelidium amansii*)

Corresponding author: Do Jeong-Ryoung, Korea Food Research Institute, 46-1 Baekhyun-dong, Bundang-gu, Kyonggi-do 463-420, Korea

를 연구실로 운반하여 이물질을 제거하고 열풍건조기로 건조한 후 밀봉하여 보관하면서 사용하였다.

한천의 제조

한천의 제조는 Do[9]의 방법을 변형한 고강도 한천 제조법에 따라 조제하였다.

키토산을 이용한 아가로즈의 제조

상기한 방법에 따라 제조한 한천을 0.01 M의 Na_2 EDTA용액으로 처리하여 한천중에 함유된 무기질을 제거하였다. 그리고, 한천을 용해시킬 때 일어날 수 있는 한천성분의 가수분해를 최소화 하기 위하여 pH를 중성으로 한후 121℃에서 30분 가열하여 한천용액을 제조하였다. 70~80℃의 한천용액에 한천에 대한 키토산의 농도가 10%가 되게 교반하면서 첨가하여 아가로펙틴과 키토산을 반응침전시켰다. 아가로즈 제조에 사용한 키토산은 불순물을 제거하기 위하여 알콜 및 증제수로 정제하여 사용하였다. 그리고, 잔존하는 키토산을 제거하고 반응중에 일으날 수 있는 한천의 가수분해를 최소화 하기 위하여 수산화나트륨 용액으로 중화시켰다. 이와 같이 처리한 반응용액을 70~80℃의 incubator에 1시간 이상 침전반응 시켰다. 원심분리(7000 g, 20분, 30℃)에 의해 침전물을 제거하고 반응침전물이 혼입되지 않게 상층액을 취하여 겔화하고 동결해동 탈수하였다. 동결해동탈수하고 증류수로 수세하여 중화반응에서 생성되는 염을 제거하였다. 그리고 용해성을 좋게하기 위하여 진공동결건조 하였다.

Polyethylene glycol (PEG)를 이용한 아가로즈 제조

한천을 정제수로 처리하여 한천중에 함유된 수용성의 불순물을 제거하였다. 그리고, 한천을 용해시킬 때 일으날 수 있는 한천성분의 가수분해를 최소화 하기 위하여 pH를 중성으로 한후 121℃에서 30분 가열하여 4%의 한천용액을 제조하였다. 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. 원심분리(7000 g, 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.

Cetylpyridinium chloride (CPC)를 이용한 아가로즈 제조

CPC를 이용한 아가로즈 제조는 Do[9]의 방법에 따라 제조 하였으며 특히 용해성을 좋게하기 위하여 진공동결건조하였다.

황산기 함량 및 electroendoosmosis (EEO)의 측정

황산기 함량은 Dodgson and Price 방법[10]에 따라 측정하였으며, electroendoosmosis는 Kirkpatrik 등의 방법[11]에 따라 측정하였다.

DNA 전기영동

한천으로부터 분리. 정제한 아가로즈를 사용하여 1% gel을 제조하여 전기영동에 공시하였다. DNA sample로는 1 kb DNA ladder (Genosis, U.S.A) 1 μg에 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 1 cm당 7 V의 전압 조건에서 전개하였으며 ethidium bromide로 염색하여 검출하였다. 사용된 1 kb DNA ladder는 14개의 fragments (10000, 8000, 6000, 5000, 4000, 3500, 3000, 2500, 2000, 1500, 1000, 750, 500, 250 base pairs)로 구성되어 있다.

교차 면역 전기 영동

30 mL Barbital buffer에 아가로즈를 녹여 1% 용액으로 만든 후 5 cm×5 cm 유리판에 5 mL씩 취하여 아가로즈 겔을 만들고 겔의 왼쪽 하단부분에 주입구를 만들어 NHS 7 μL를 주입하였다. 전개판의 양쪽에 Barbital buffer를 채운후 bridge를 연결하여 60 mA에서 1차 전기영동 하였다. 2차 전기영동은 3.5 mL의 아가로즈 용액이 들어 있는 Test tube에 Anti-Human Complement를 35 μL (1%)를 넣어 교반한 후 1차 전기영동에서 잘라낸 부분에 부어 아가로즈 겔을 만든다. 2차 전기영동은 20 mA 조건에서 시행하였다. 전개후 Coomassie brillant blue R-250으로 염색하여 검출하였다.

결과 및 고찰

정제된 agarose의 화학적 특성

여러가지 방법으로 정제한 agarose의 화학적 특성을 조사하여 Table 1에 나타내었다. CPC 처리에 의한 한천 정제는 산성다당류인 agaropectin과 반응하여 침전되고 중성인 agarose와는 반응하지 않는 성질을 이용

Table 1. Physicochemical characteristics agarose prepared by various methods

Treatment	Sulfate (%)	Ash (%)	Gel strength[1)] (g/cm^2)	EEO ($-m_r$)	Yield (%)
Agar	1.79	2.12	1217	0.21	100.0
CPC	0.72	1.28	1880	0.11	55.3
PEG	0.38	0.83	1692	0.08	37.8
Chitosan	0.32	0.79	1387	0.07	58.1

[1)]Determined by 1.5% agarose gel

한 것으로서 황산기와 회분 함량이 감소하였으나 겔 강도는 현저히 증가하는 것으로 나타났다.

PEG를 이용하여 한천을 정제하였을 때 황산기 함량은 1.79%에서 0.38%로 감소하였으며 회분 함량도 0.83%로 현저히 감소하였다. 그러고 겔강도도 PEG 처리 이전보다 증가하는 것으로 나타났다. 전기영동용 agarose의 특성을 나타내는 elctroendosmosis는 0.21에서 0.08로 감소하였으며 이러한 수치는 일반시판되고 있는 분석용 등급의 agarose와 거의 동일한 수준이라고 판단되었다.

CPC를 이용하여 한천을 정제하였을 때 황산기 함량은 0.72%, 회분 함량은 1.28%로 나타났다. 그러고 겔강도도 PEG 처리 이전보다 현저히 증가하여 1880는 것으로 나타났다. 전기영동용 agarose의 특성을 나타내는 elctroendosmosis는 0.21에서 0.08로 감소하였으며 이러한 수치는 일반시판되고 있는 분석용 등급의 agarose와 거의 동일한 수준이라고 판단되었다.

Agaropectin을 제거하기 위하여 chitosan을 첨가하여 응집, 침전시켜 agarose를 제조하였다. 황산기 함량은 0.32%로, 회분은 0.79%로, electroendosmosis도 0.07을 나타내어 3가지 처리 방법중 가장 낮은 수치를 나타내었으므로 고품질의 전기영동용 agarose 제조 방법으로 가장 적합한 것으로 판단되었으며 수율도 62.3%로 3가지 방법중 가장 높게 나타나 고품질 agarose 제조 및 상업적 측면에서 가장 효율적인 방법으로 사료되었다.

정제된 agarose를 이용한 DNA 전기영동

우뭇가사리로부터 한천을 제조하여 전기영동에 공시하여 그 결과를 Fig. 1에 나타내었다. 대조구로 사용된 Seakem Le agarose (Fig. 1B)에 비하여 우뭇가사리 agar에서는(Fig. 1A) DNA의 migration이 거의 일어나지 않은 것으로 판단되었다. 제조된 gel의 투명도도 매우 낮게 관찰되었으며 전기영동후 ethidium bromide로 염색후 탈색시에도 DNA 이외의 부분에서도 ethidium bromide가 제거되지 않아 gel 전체가 형광성을 띠었다. 이는 agaropectin이 존재하여 황산기에 의해 DNA의 migration이 방해 받는 것으로 사료되었다.

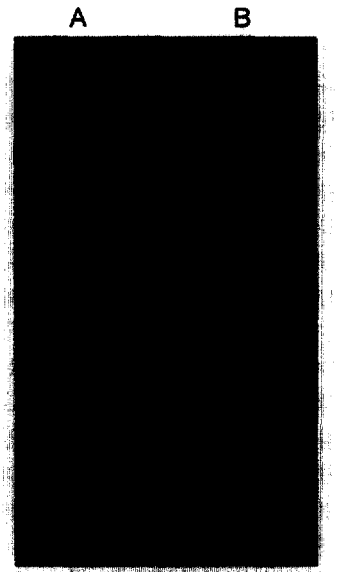

Fig. 1. Gel electrophoresis of 1 kb DNA ladder using domestic agar gel (1.0%) at 7 V/cm condition. The 1 kb DNA ladder consisted with 14 fragment (10000, 8000, 6000, 5000, 4000, 3500, 3000, 2500, 2000, 1500, 1000, 750, 500, 250 base pairs). Control gel was made with Seakem Le agarose (B).

CPC를 이용하여 agaropectin을 제거한 agarose를 이용하여 전기영동한 결과를 Fig. 2에 나타내었다. 전개는 대조구로 사용된 Seakem Le agarose (Fig. 2B)에 비하여 약 86.5%에 상당하는 속도로 이동되었으나 3.5 kb 이상 분자량의 DNA는 분리가 원활히 되지 않아 육안으로 해독이 난이한 것으로 나타나(Fig. 2A), 고분자 DNA resolution이 떨어짐을 알 수 있었다.

PEG를 이용하여 제조한 agarose를 이용하여 전기영동하였다(Fig. 3). 대조구로 사용된 SEAKEM LE agarose (Fig. 3B)에 비하여 68.3%의 전개속도를 나타내었으나 1~10 kb까지의 DNA가 원활히 분리됨을 관찰할 수 있어(Fig. 3A), CPC를 사용하여 정제한 agarose보다는 resolution이 우수함을 알 수 있었다.

키토산을 이용하여 agarose를 정제하여 그 결과를 Fig. 4에 나타내었다. 대조구(Fig. 4.B)에 비하여 82.5%

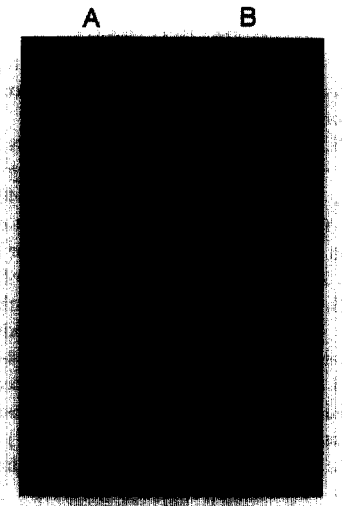

Fig. 2. Agarose gel electrophoresis of 1 kb DNA ladder using agarose gel (1.0%) fractionated by CPC. Conditions are the same as in Fig. 1.

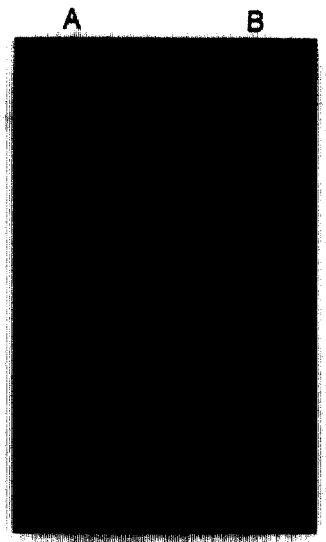

Fig. 3. Agarose gel electrophoresis of 1 kb DNA ladder using agarose gel (1.0%) fractionated by PEG. Conditions are the same as in Fig. 1.

의 전개속도를 나타내었으며 3가지 정제 방법중 가장 우수한 resolution을 나타내었다(Fig. 4A). 대조구에서 검출된 모든 band가 정제한 agarose에서도 검출되었으며 migration된 band의 형태도 우수한 것으로 판단되어 분석용 agarose 제조 방법으로 가장 우수한 것으로 생각되었다. 키토산으로 분리 정제한 아가로즈의 DNA resolution이 좋은 이유는 한천중의 산성기를 함유한 agaropectin이 키토산과 반응침전되어 제거되었기 때문으로 사료된다.

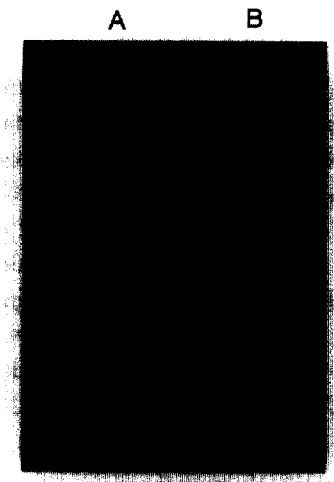

Fig. 4. Agarose gel electrophoresis of 1 kb DNA ladder using agarose gel (1.0%) fractionated by chitosan. Conditions are the same as in Fig. 1.

정제된 agarose를 이용한 교차 면역 전기영동

겔의 농도를 1%로 하여 교차 면역 전기영동한 결과 (Fig. 5), 국내산 한천은 전개가 되지 않아 peak가 나타나지 않았으나, EDTA로 정제한 agarose (Fig. 5B), 키토산으로 정제한 agarose (Fig. 5C)는 peak가 나타났다. 특히, 정제한 키토산으로 분리 정제한 agarose (Fig. 5D)는 Sigma agarose와 거의 유사한 peak를 나타내어 가장 효율적인 정제 방법으로 판단되었다.

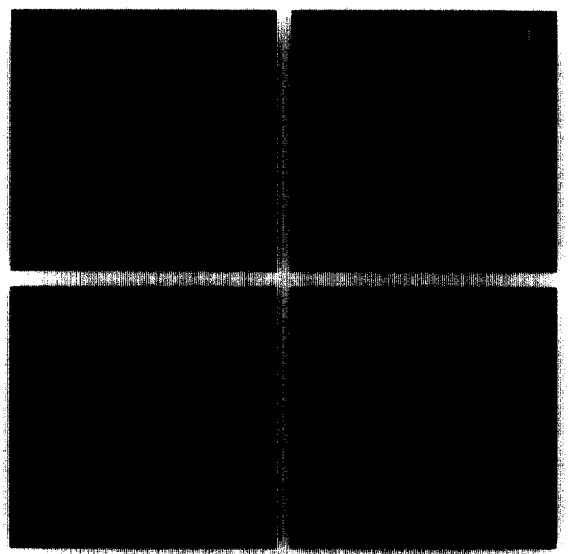

Fig. 5. Agarose gel crossed-immuno-electrophoretic pattern of human serum. A: Sigma agarose, B: Agarose fractionated using EDTA, C: Agarose fractionated using chitosan, D: Agarose fractionated using purified chitosan.

요 약

제주도산 우뭇가사리로부터 agar를 제조하여 분석용 등급의 agarose 제조를 위하여 cetylpyridium chloride (CPC), polyethylene glycol (PEG), chitosan을 처리하여 agaropectin을 제거하여 agarose를 분리, 정제하였다. 3가지 방법중 chitosan을 처리하여 정제한 agarose는 황산기 함량이 가장 낮았으며, electroendosomosis도 가장 낮은 수치를 나타내어 분석용 agarose 제조를 위한 가장 효율적인 방법으로 나타났으며 실제 DNA 전기영동 실험에서도 가장 우수한 resolution을 나타내었으며 교차면역 전기영동에서도 시판되고 있는 제품에 비하여 품질이 양호함을 알 수 있었다.

문 헌

1. Lee S.R., Cho, H.O. and Park, S.K.: 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)
2. 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)
3. Yoon H.S. and Park, Y.H.: Studies on the composition of agarose and agaropectin in agar-agar (in Korean). *Bull. Korean Fish. Soc.*, **24**, 27-33 (1984)
4. 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)
5. Lee H.S., Rhee, C. and Yang, H.C.: A study on the purification byprotein precipitants and washing of agar (in Korean). *Korean J. Food Sci. Technol.*, **17**, 340-344 (1985)
6. Park Y.Y., Rhee, C. and Yang, H.C.: Effect of acid treatment on extractability and properties of agar (in Korean). *Korean J. Food Sci. Technol.*, **17**, 319-325 (1985)
7. Allan G.G., Johnson, P.G., Lay, Y. and Sarkanen, K.V.: Marine polymers; Part 1. A new procedure for the fractionation of agar. *Carbohyd. Res.*, **17**, 234-236 (1971)
8. Patil, N.B. and Kale, N.R.: A simple procedure for the preparation of agarose for gel electrophoresis. *Indian J. Biochem. & Biophysics.* **10**, 160-163 (1973)
9. Do, J.R.: Extraction and purification of agar from *Gelidium amansii* (in Korean). *J. Korean Fish. Soc.*, **30**, 423-427 (1987)
10. Dodgson, K.S. and Price, R.G.: A note on the determination of the ester sulphate content of sulphated polusaccharides. *Biochem. J.*, **84**, 106-110 (1962)
11. Kirkpatrick, F.H., Kenneth, G., Richard, P. and Samuel, N.: High gel strength low electroendosmosis agarose. *U. S. Patent* 4,983,268 (1991)

(1998년 9월 3일 접수)