creative commons

COMMONS DEED

저작자표시-비영리-변경금지 2.0 대한민국

이용자는 아래의 조건을 따르는 경우에 한하여 자유롭게

- 이 저작물을 복제, 배포, 전송, 전시, 공연 및 방송할 수 있습니다.

다음과 같은 조건을 따라야 합니다:

저작자표시. 귀하는 원저작자를 표시하여야 합니다.

비영리. 귀하는 이 저작물을 영리 목적으로 이용할 수 없습니다.

변경금지. 귀하는 이 저작물을 개작, 변형 또는 가공할 수 없습니다.

- 귀하는, 이 저작물의 재이용이나 배포의 경우, 이 저작물에 적용된 이용허락조건을 명확하게 나타내어야 합니다.
- 저작권자로부터 별도의 허가를 받으면 이러한 조건들은 적용되지 않습니다.

저작권법에 따른 이용자의 권리는 위의 내용에 의하여 영향을 받지 않습니다.

이것은 이용허락규약(Legal Code)을 이해하기 쉽게 요약한 것입니다.

Disclaimer

dCollection

[UCI]I804:24011-200000240340

2010 8月

화학적 방법에 의한 저분자화 알지네이트의 생산기술 및 응용

朝鮮大學校 大學院

化學工學科

崔 維 成

화학적 방법에 의한 저분자화 알지네이트의 생산기술 및 응용

Preparation and applications of the alginates depolymerized by chemical treatment

2010 年 8 月 日

朝 鮮 大 學 校 大 學 院

化 學 工 學 科

崔 維 成

화학적 방법에 의한 저분자화 알지네이트의 생산기술 및 응용

指導敎授　曺　秉　旭

이 論文을 工學博士學位 申請論文으로 提出함.

2010 年　6 月

朝 鮮 大 學 校 大 學 院

化 學 工 學 科

崔　維　成

崔維成의 博士學位論文을 認准함

委員長 朝鮮大學校 敎 授 崔載坤 (인)

委 員 朝鮮大學校 敎 授 曺秉旭 (인)

委 員 朝鮮大學校 敎 授 李仁化 (인)

委 員 朝鮮大學校 敎 授 조 훈 (인)

委 員 朝鮮大學校 敎 授 김정규 (인)

2010 년 6 월

朝鮮大學校 大學院

목 차

LIST OF TABLES

LIST OF FIGURES

ABSTRACT

제 1 장 해조류 알지네이트의 저분자화

제 1 절 서 론 ····· 1
1. 해조류(Seaweed) ····· 1
2. 알지네이트(Sodium alginate) ····· 2
2. 1. 알지네이트의 구조 ····· 2
2. 2. 알지네이트의 특성 ····· 4
3. 기능성 다당류의 저분자화 ····· 6
3. 1. 물리적 방법 ····· 6
3. 2. 생물학적 방법 ····· 7
3. 3. 화학적 방법 ····· 7
3. 4. 광학적 방법 ····· 8
4. 본 연구의 배경 및 목적 ····· 8
4. 1. 과산화수소/초음파를 이용한 저분자화 ····· 8
4. 2. 과산화수소/전자빔을 이용한 저분자화 ····· 9

제 2 절 실 험 ····· 13
1. 시료 및 기기 ····· 13
1. 1. 시 료 ····· 13
1. 2. 기 기 ····· 13
2. 화학적 방법에 의한 저분자화 ····· 14
2. 1. 저분자 알지네이트 제조 ····· 14
2. 2. 저분자 알지네이트 처리 ····· 14
3. 화학적 방법에 의한 저분자화 ····· 14

3. 1. 저분자 알지네이트 제조 ·····14
3. 2. 저분자 알지네이트 처리 ·····15
제 3 절 결과 및 고찰 ·····17

제 4 절 결론 ·····58

제 2 장 저분자 알지네이트의 응용

제 1 절 서 론 ·····60
1. 항균제(Antibacterial materials) ·····60
2. 다당류 항균제 ·····61
3. 본 연구의 배경 및 목적 ·····62

제 2 절 실 험 ·····64
1. 시료 및 기기 ·····64
1. 1. 시 료 ·····64
1. 2. 기 기 ·····64
2. 실 험 ·····65
2. 1. 은-알지네이트 제조 ·····65
2. 2. 은-알지네이트 기본 특성 ·····65
2. 3 항균특성 ·····68
2. 3. 1. 사용 균주 및 배양 ·····68
2. 3. 2. 항균성 실험 방법 ·····69

제 3 절 결과 및 고찰 ·····70

제 4 절 결론 ·····94

LIST OF TABLES

Table. 1.1 Average chemical composition of seaweeds ····· 1
Table. 1.2 Electron beam irradiation in Domestic & International use. ····· 12
Table. 1.3 Molecular weight and viscosity of low molecular weight sodium alginate obtained using ultrasound wave in H_2O_2 ····· 28
Table. 1.4 Molecular weight and viscosity of low molecular weight sodium alginate obtained using H_2O_2 ····· 29
Table. 1.5 Degradation rate of LMWSAs by H_2O_2 with ultrasound or without ultrasound. ····· 36
Table. 1.6 Molecular weight and viscosity of low molecular weight sodium alginate obtained using e-beam irradiation in H_2O_2 (1 MeV) ····· 49
Table. 1.7 Continued ····· 50
Table. 1.8 Molecular weight and viscosity of low molecular weight sodium alginate obtained using e-beam irradiation in H_2O_2 (2.5 MeV) ····· 51
Table. 1.9 Continued ····· 52
Table 2.1 Reaction conditions for silver alginates preparation ····· 67
Table 2.2 Cultivation of the strains used ····· 68
Table 2.3 Silver contents and particle size of silver alginates(SiA) ····· 72
Table 2.4 Antibacterial properties of sodium alginate the depolymerized by E-beam. (1 MeV) ····· 78
Table 2.5 Antibacterial properties of sodium alginate the depolymerized by E-beam. (2.5 MeV) ····· 79
Table 2.6 Cell optical density of Low molecular weight sodium alginate for E. Coli. (λ=600 nm, 2,000 ppm) ····· 80
Table 2.7 Cell optical density of Low molecular weight sodium alginate for S. Aureus. (λ=600nm, 2,000ppm) ····· 80

Table 2.8 Cell optical density of Low molecular weight sodium alginate for P. acnes. (λ=600nm, 2,000ppm) ·····81
Table 2.9 Antibacterial properties of silver alginate.(MIC) ·····87
Table 2.10 Cell optical density of silver alginate. (λ=600nm) ·····87

LIST OF FIGURES

Fig. 1.1. Repeating units of the alginate monomers. (a) β-D-mannuronate [M] , (b) α -L-guluronate [G] ·····3

Fig. 1.2. Chemical structures of sodium alginates and different sequences of the segments of sodium alginate :(1) MM- block : comprised of M units only, (2) GG- block : comprised of G units only, (3) M and G blocks : comprised of M&G units. ·····3

Fig. 1.3 Egg-box structures of G-blocks in alginate. ·····5

Fig. 1.4. The antibacterial mechanism of alginate wound dressing. ·····5

Fig. 1.5 Schematic sketch of an apparatus for depolymerization of alginates·····16

Fig. 1.6 Scheme of Alginate depolymerization by Electron beam irradiation. ·····16

Fig. 1.7 FT-IR spectra of (a) pristine sodium alginate and LMWSAs treated in (b) 2 wt% H_2O_2, (c) 6 wt% H_2O_2, (d) 15 wt% H_2O_2.
[2 wt% in reaction concentration at 50 ℃ for 0.5 hr with ultrasonic wave] ·····19

Fig. 1.8 FT-IR spectra of (a) pristine sodium alginate and LMWSAs treated at (b) 30 ℃, (c) 40 ℃, (d) 50 ℃. [2 wt% in reaction concentration and 3 wt% H_2O_2 for 0.5 hr with ultrasonic wave] ·····20

Fig. 1.9 FT-IR spectra of (a) pristine sodium alginate and LMWSAs treated for (b) 0.5 hr, (c) 3.0 hr. [2 wt% in reaction concentration and 3 wt% H_2O_2 at 50 ℃ with ultrasonic wave] ·····21

Fig. 1.10 ^{1}H-NMR Spectra of (a) pristine sodium alginate and LMWSAs treated for (b) 0.5 hr, (c) 3.0 hr. [2 wt% in reaction concentration and 3 wt% H_2O_2 at 50 ℃ with ultrasonic wave] ·····23

Fig. 1.11 ^{13}C-NMR Spectra of (a) pristine sodium alginate and LMWSAs treated for (b) 0.5 hr, (c) 3.0 hr. [2 wt% in reaction concentration and 3 wt% H_2O_2 at 50 ℃ with ultrasonic wave] ·····24

Fig.1.12 Effect of H_2O_2 concentration on the molecular weight of LMWSAs.
[2 wt% in reaction concentration at 50 ℃ for 0.5 hr with ultrasonic wave] ·····30

Fig. 1.13 GPC profile of (a) pristine sodium alginate and LMWSAs treated in (b) 1 wt% H_2O_2, (c) 2 wt% H_2O_2, (d) 3 wt% H_2O_2, (e) 6 wt% H_2O_2, (f) 9 wt% H_2O_2, (g) 15 wt% H_2O_2
[2 wt% in reaction concentration at 50 ℃ for 0.5 hr with ultrasonic wave] ·····30
Fig.1.14 Effect of reaction temperature on the molecular weight of LMWSAs.[2 wt% in reaction concentration and 3 wt% H_2O_2 for 0.5 hr with ultrasonic wave]·····31
Fig. 1.15 GPC profile of (a) pristine sodium alginate and LMWSAs treated at (b) 30 ℃, (c) 40 ℃, (d) 50 ℃. [2 wt% in reaction concentration and 3 wt% H_2O_2 for 0.5 hr with ultrasonic wave] ·····31
Fig.1.16 Effect of reaction time on the molecular weight of LMWSAs. [2 wt% in reaction concentration and 3 wt% H_2O_2 at 50 ℃ with ultrasonic wave] ·····32
Fig.1.17 GPC profile of (a) pristine sodium alginate and LMWSAs treated for (b) 0.5 hr, (c) 3.0 hr. [2 wt% in reaction concentration and 3 wt% H_2O_2 at 50 ℃ with ultrasonic wave] ·····32
Fig. 1.18 GPC profile of (a) pristine sodium alginate and LMWSAs treated (b) without ultrasound wave, (c) with ultrasound wave.
[2 wt% in reaction concentration and 3 wt% H_2O_2 at 50 ℃ for 0.5 hr] ·····33
Fig.1.19 Effect of Ultrasound on polydispersity index of LMWSAs.
[2 wt% in reaction concentration at 50 ℃ for 0.5 hr] ·····33
Fig.1.20 Effect of Ultrasound on polydispersity index of LMWSAs.
[2 wt% in reaction concentration and 3 wt% H_2O_2 at 50 ℃] ·····34
Fig.1.21 Degradation rate of LMWSAs by H_2O_2 with ultrasound or without ultrasound.
[2 wt% in reaction concentration and 3 wt% H_2O_2 at 50 ℃] ·····36
Fig.1.22 Degradation rate constant of LMWSAs by H_2O_2 (a) with ultrasound wave or (b) without ultrasound wave.
[2 wt% in reaction concentration and 3 wt% H_2O_2 at 50 ℃] ·····37
Fig. 1.23 FT-IR Spectra of (a) pristine sodium alginate and LMWSAs (b) 0 wt% H_2O_2, (c) 1.5 wt% H_2O_2, (d) 3 wt% H_2O_2, (e) 4.5 wt% H_2O_2.

[2 wt% in reaction concentration, E-beam : 2.5 MeV, 20 kGy] ·····39
Fig. 1.24 FT-IR Spectra of (a) pristine sodium alginate and LMWSAs (b) 5 kGy, (c) 10 kGy, (d) 15 kGy, (e) 20 kGy.
[2 wt% in reaction concentration, E-beam : 2.5 MeV , H_2O_2=1.5 wt/v%] ·····40
Fig. 1.25 ^{1}H-NMR Spectra of (a) pristine sodium alginate and LMWSAs (b) 5 kGy, (c) 10 kGy, (d) 20 kGy.
[2 wt% in reaction concentration, E-beam : 1.0 MeV, H_2O_2=2.0 wt/v%] ·····42
Fig. 1.26 ^{1}H-NMR Spectra of (a) pristine sodium alginate and LMWSAs (b) 5 kGy, (c) 10 kGy, (d) 20 kGy.
[2 wt% in reaction concentration, E-beam : 2.5 MeV, H_2O_2=2.0 wt/v%] ·····43
Fig. 1.27 ^{1}H-NMR Spectra of (a) pristine sodium alginate and LMWSAs (b) 0 wt% H_2O_2, (c) 1.5 wt% H_2O_2, (d) 3 wt% H_2O_2, (e) 4.5 wt% H_2O_2.
[2 wt% in reaction concentration, E-beam : 1.0 MeV, 20 kGy] ·····44
Fig. 1.28 ^{1}H-NMR Spectra of (a) pristine sodium alginate and LMWSAs (b) 0 wt% H_2O_2, (c) 1.5 wt% H_2O_2, (d) 3 wt% H_2O_2, (e) 4.5 wt% H_2O_2.
[2 wt% in reaction concentration, E-beam : 2.5 MeV, 20 kGy] ·····44
Fig. 1.29 ^{13}C-NMR Spectra of (a) pristine sodium alginate and LMWSAs (b) 5 kGy (c) 20 kGy.
[2 wt% in reaction concentration, E-beam : 2.5 MeV, H_2O_2=2.0 wt/v%] ·····45
Fig. 1.30 Effect of hydrogen peroxide concentration on the molecular weight of LMWSAs.[2 wt% in reaction concentration, E-beam : 1.0 MeV] ·····53
Fig.1.31 Effect of Dose on the molecular weight of
LMWSAs.[2 wt% in reaction concentration, E-beam : 1.0 MeV] ·····53
Fig.1.32 Effect of Alginate concentration on the molecular weight of LMWSAs.[H_2O_2=2.0 wt/v%, E-beam : 1.0 MeV] ·····54
Fig.1.33 Effect of hydrogen peroxide concentration on the molecular weight of LMWSAs.[2 wt% in reaction concentration, E-beam : 2.5 MeV] ·····54
Fig.1.34 Effect of Dose on the molecular weight of

LMWSAs.[2 wt% in reaction concentration, E-beam : 2.5 MeV] ·····55
Fig.1.35 Effect of Alginate concentration on the molecular weight of LMWSAs.[H_2O_2=2.0 wt/v%, E-beam : 2.5 MeV] ·····55
Fig. 1.36 Effect of Dose on the degradation yield of LMWSAs.
[2 wt% in reaction concentration, E-beam : 1.0 MeV] ·····56
Fig. 1.37 Effect of Alginate concentration on the molecular weight of LMWSAs.[H_2O_2=2.0 wt/v%, E-beam : 1.0 MeV] ·····56
Fig. 1.38 Effect of Dose on the degradation yield of LMWSAs.
[2 wt% in reaction concentration, E-beam : 2.5 MeV] ·····57
Fig. 1.39 Effect of Alginate concentration on the molecular weight of LMWSAs.[H_2O_2= 2.0 wt/v%, E-beam : 2.5 MeV] ·····57
Fig. 2.1. Antibacterial mechanism of chitosan with microbial. ·····62
Fig. 2.2. Particle size distribution of silver alginates ; (a)Ag-A-3 (b)Ag-A-4. ·····73
Fig. 2.3 SEM micrographs of silver alginate particles(Ag-A-1), (a) x1,500, (b) x15,000, (c) x50,000 and (d) EDx. ·····74
Fig. 2.4 TEM micrographs of silver alginate particles(Ag-A-1), (a) x19,000, (b) x380,000 and (c) x470,000 ·····75
Fig. 2.5 Antibacterial effect of LMWSAs for *E.coli.* ·····82
Fig. 2.6 Antibacterial effect of LMWSAs for *S.aureus* ·····83
Fig. 2.7 Antibacterial effect of LMWSAs for *P.acnes* ·····84
Fig. 2.8 Antibacterial effect of alginates and Ag-alginate for *E.coli* ·····88
Fig. 2.9 Smear test for *E.coli.*: (a) B.K. (b) Pristine sodium alginate (c) LMWSA[1)] (d) silver alginate[2)] (at 35 ℃, for 24hr, 700 ppm) [1)] Mw : 16.5 kGy [2)] Ag-A-9 ·····89
Fig. 2.10 Antibacterial effect of alginates and Ag-alginate for *S.aureus* ·····90
Fig. 2.11 Smear test for *S.aureus.*: (a) B.K. (b) Pristine sodium alginate (c) LMWSA[1)] (d) silver alginate[2)] (at 35 ℃, for 24hr, 700 ppm) [1)] Mw : 16.5 kGy [2)] Ag-A-9 ·····91

Fig. 2.12 Antibacterial effect of alginates and Ag-alginate for *P.acnes.* ·····92
Fig. 2.13 Smear test for *P.acnes.* : (a) B.K. (b) Pristine sodium alginate (c) LMWSA[1)] (d) silver alginate[2)] (at 35 ℃, for 24 hr, 700 ppm) [1)] Mw : 16.5 kGy [2)] Ag-A-9 ·····93

Abstract

Preparation and applications of the alginates depolymerized by chemical treatment

Choi, Yoo-Sung
Advisor : Prof. Jo, Byung-Wook, Ph. D.
Department of Chemical Engineering,
Graduate school of Chosun University

Alginate, a linear polysaccharide derived from brown seaweed, is a collective term for a family of copolymers containing 1,4-linked β-mannuronic acid and α-gluuronic acid resides in varying properties and sequential arrangement.

Alginate has been used as food stabilizer, gelling agent, encapsulation material for drug, plant growth stimulator and wound dressing material. However, the nature of al -ginate's high molecular weight limits its application to some fields due to its high viscosi ty and poor solubility in water. Therefore, alginate with low viscosity and high solubility in water is desired for its broad application. Generally, polysaccharide can be degraded by chemical, enzymatic, and irradiation methods.

The chemical method and enzymatic treatment are typical conventional methods for manufacturing of alginates in low molecular weights. Enzymatic degradation could give chemical deformation minimized but require further purification process due to the formation of side products with the problems in environment and recovery factor.

The irradiation degradation process, however, give no serious side products and is considered simpler, faster and more environmentally friendly than aforementioned conventional one. Therefore, it can be used for mass production. but, the equipment

cost may be a weak point for mass production.

In this study, hydrogen peroxide(H_2O_2) was used for producing low molecular weight sodium alginates(LMWSAs) under e-beam irradiation or controlled sonication. Hydrogen peroxide, an excellent oxidizing agent can be easily decomposed to produce active radical and/or ions. It generates free hydroxyl radicals and/or hydroxyl anions which are active to depolymerize the alginate. The free radicals attacks the C-1 hydrogen atoms of mannuronate or guluronate to rearrange their structures followed by breaking glycosidic bonds. A ultrasonic wave is also useful to depolymerize the high molecular weight polysaccharides. The chain breaking reaction can be occured by the pulsation of bubbles by bubble collapse or cavitation effects. Polysaccharides such as cellulose are degraded by the scission of glycosidic bonds and the rate of hydroxyl radical generation can be accelerated by irradiation of e-beam or ultrasound.

The sodium alginates were characterized by using solution viscometry, GPC, FT-IR, ^{13}C-NMR and ^{1}H-NMR. Based on FT-IR, ^{13}C-NMR and ^{1}H-NMR taken before and after degradation it was revealed, that the depolymerization was initiated by the breakage of the glycosidic bonds of sodium alginate. Incorporation of hydrogen peroxide and e-beam irradiation are much more effective than any other methods in lowering the molecular weight of sodium alginate.

Another target of this work was to investigate the antibacterial properties of sodium alginate depolymerized. The alginate in wound dressings has been used as an important tool of modern wound management. By incorporating silver ions into alginate, antibacterial properties can be expressed. In order to incorporate silver ions onto the alginate, sodium alginate was reacted with aqueous solutions of silver nitrate. The silver ions of silver nitrate were exchanged with sodium ions in sodium alginate, resulting in the formation of alginate powder containing silver ions. Particle size and solubility of silver alginate can be controlled by adjusting the mole ratio of sodium and silver ions. SEM and TEM micrographs showed the silver alginate particles were sphere-shape and the particle was approximately 0.7 ㎛ average in size.

LMWSAs and silver alginate exhibit more strong antibacterial properties against the bacteria such as *Escherichia coli, Staphylococcus aureus,* and *Propionibacterium acnes.*, than pristine sodium alginate. MIC and cell optical density data showed that the

antibacterial properties were improved with decreasing the molecular weight of alginate. These results mean that silver ions in LMWSA could give dramatically improved functionality in bactericide.

Keywords : sodium alginate, polysaccharide, depolymerization, antibacterial property, silver alginate

제 1 장 해조류 알지네이트의 저분자화

제 1 절 서 론

1. 해조류(Seaweed)

삼면이 바다인 우리나라는 4계절 풍부한 해조류를 얻을 수 있는 장점이 있다. 해조류는 풍부한 미네랄과 많은 양의 섬유소를 가지고 있고, 최근 들어 해조류에서 추출되어지는 다양한 기능성 다당류(argar, alginate, carrageenan, fucoidan, 등)들이 독특한 생리 활성을 나타내고 기존의 생리활성 물질보다 더 우수한 효과를 나타냄으로써 해조류에서 얻어지는 다당류의 잠재성이 재인식되어지고 있다[1]. 해조류에서 추출되어지는 다당류는 육상의 식물에서 추출되어지는 다당류와는 다른 환경요인을 갖는다. 즉, 해수의 높은 염분 농도에 의해 이온 출입을 조절해야하는 이유로 인하여 세포벽 혹은 세포 간 다당류에 카르복실기나 에스테르결합의 황산기를 갖는 것이 많아서 육상의 식물과는 달리 독특한 특징을 갖는다[2]. 해조류는 통상 녹조류(green algae), 홍조류(red algae), 갈조류(brown algae)로 나뉘며 이들의 화학조성은 Table 1.1과 같다[3].

Table 1.1 Average chemical composition of seaweeds[3]

Component(%)	Brown	Red	Green
Water[1)]	79-90	70-80	70-85
Minerals[2)]	30-50	25-35	10-25
Carbohydrates	30-50[3)]	30-60[4)]	25-50[5)]
Protein	7 -15	7-15	10-15
Lipids	2-5	1-5	1-5
Cellulose	2-10	2-10	20-40

1) fresh weight base
2) dry weight base
3) mainly alginate and fucose-containing polysaccharides
4) mainly xylans and sulphated galactose-containing polysaccharides
5) mainly cellulose and starch

Table 1.1에서 보여주는 것처럼 녹조류, 홍조류 그리고 갈조류에서 추출되어지는 당(saccharide)은 그 성분과 함량에 차이를 보인다. 갈조류는 녹색식물과 공통점이 많은 조류로 엽록소와 카로노이드 이외에 피코크산틴이 있기 때문에 갈조류 특유의 색을 나타낸다. 약 250속, 1,500 여 종류가 있으며 냉수성 해역에 많으며 세포내에는 알지네이트, 후코이단 등 다른 해조류에서는 볼 수 없는 산성 다당류를 함유하고 있다[2]. 이러한 알지네이트와 후코이단과 같은 기능성 다당류들은 최근 10년동안 의·약학 분야에서 이를 이용한 연구와 치료제로서의 가능성에 대한 많은 보고가 있었다. 근래에는 수정과 발생, 면역계의 조절, 상처회복, 신경발생, 세포간의 신호전달, 항감염 반응, 세포 내 경로, 그리고 암세포로의 변환 등 매우 폭넓은 분야에서 연구가 활발하게 진행 중이다[4,5].

2. 알지네이트(alginate)

2.1 알지네이트(alginate)의 구조

알지네이트(Fig. 1.1)는 1883년 Edward Stanford그룹[6-7]에 의해서 처음 소개된 이래, 주로 갈조류에서 탄산수소나트륨 수용액을 사용하여 추출, 생산 되고 있는 기능성 다당류이다. 알지네이트를 포함하여 해조류에서 추출되어지는 기능성 다당류의 경우 해조류의 종류, 채취시기, 산지 및 부위에 따라 다당류를 구성하는 구성 성분과 함량 그리고 수득율에 차이가 발생한다[8-9]. 알지네이트는 Fig. 1.2에서 보는 것과 같이 β-D-mannuronate [M] 와 α-L-guluronate [G] 가 1-4 glycosidic 결합으로 이루어지는 hetero polysaccharide의 형태로 존재한다[10-13]. 알지네이트의 당 서열은 완전 무질서한 다당류의 형태가 아닌 Fig. 1.2에서 나타난 바와 같이 부분적으로 비슷한 블록들로 이뤄져있고 추출 조건에 따라 M/G ratio 및 분자량을 조절할 수 있는 것으로 알려져 있다[14].

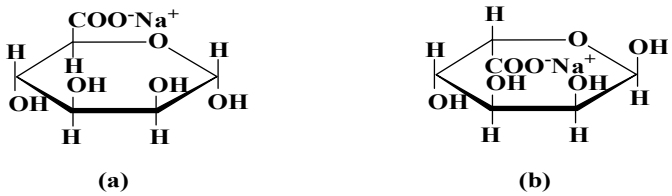
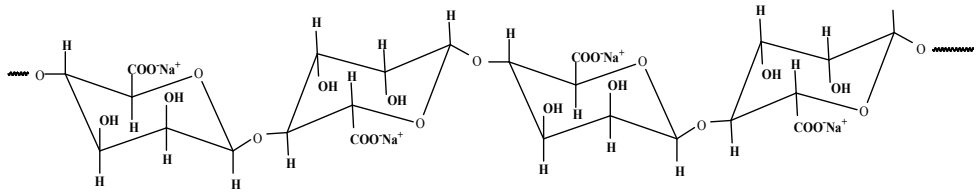
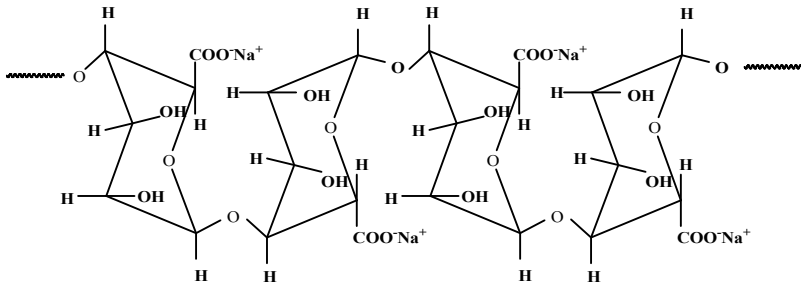


Fig. 1.1. Repeating units of alginate monomers.

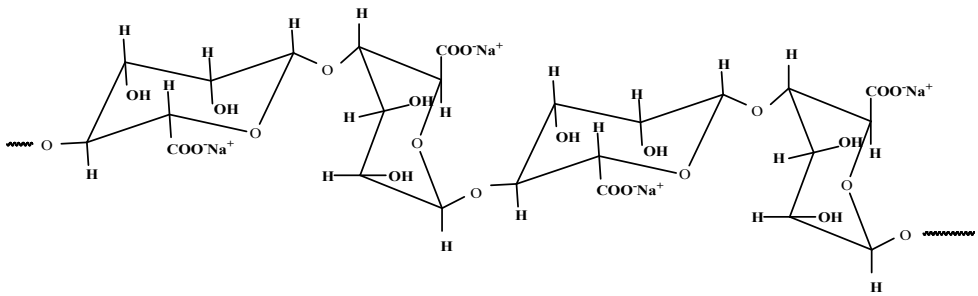
(a) β-D-mannuronate [M] , (b) α-L-guluronate [G]



(1)



(2)



(3)

Fig. 1.2. Different sequences of the segments of sodium alginate :(1) MM- block : comprised of M units only, (2) GG- block : comprised of G units only, (3) M and G blocks : comprised of M&G units.

2.2. 알지네이트 (alginate)의 특성

알지네이트는 M/G ratio, 분자량 그리고 Fig. 1.2.에서 보여준 것과 같이 세 종류의 polymer segment(MM-, GG-, MG-block)의 배열 상태에 따라 물리·화학적 성질 및 그 활용 범위가 결정된다. GG-block은 MM-block에 반해 약한 사슬(brittle chain)으로 형성되어있고 2가 양이온에 의해 겔 형성을 하면서 egg-box(Fig. 1.3.) 형태를 만든다[15,16]. 알지네이트의 M/G ratio는 그 활용 범위 및 방향에 영향을 준다. M-unit가 G-unit에 비해서 풍부한 경우 신체의 방어 체계를 제어하고 자극하는 신호물질로 사용되는 펩타이드 중 하나인 cytokin의 활성을 매우 활발하게 한다[17-19]. 따라서, 알지네이트를 창상치유제(wound dressing)혹은 약물전달(drug delivery)매체 로 응용하는 경우 M/G ratio가 큰 알지네이트가 사용되어지는 반면, 중금속 흡착제, 세포고정화 혹은 도료 부분 등으로 응용하는 경우 M/G ratio가 낮은 알지네이트가 사용되어지고 있다[20]. 특히 M/G ratio가 큰 칼슘 알지네이트의 경우에는 창상 치유제로 많이 사용되는데, 이는 섬유에 존재하는 칼슘 알지네이트(calcium alginate)가 상처 부위와 접촉하면 Ca^{2+}과 Na^{+}의 이온교환이 발생하게 되고, 불용성(insoluble)이던 칼슘 알지네이트가 용해(soluble)되고 팽윤에 유리한 소듐 알지네이트(sodium alginate)로 변하는 게 가능하기 때문이다. 상처 부위의 소듐 알지네이트는 많은 양의 물을 흡수하면서 부풀고 상처에 있는 박테리아들은 Fig. 1.4와 같은 형태로 창상 치유제에 trapping되어 박테리아의 확산을 막는 것이 가능해진다. 또한, 알지네이트가 가진 카르복실 그룹의 강한 음전하(negative charge)와 박테리아의 인지질층(lipid layer) 사이에 강한 상호 이온작용(lon -interaction)에 의해 박테리아가 죽게 된다[21, 22]. 극성을 띄는 유기 고분자 물질이 항균성을 갖는 비슷한 예로 미국 국립 과학 아카데미회보(Proc. Natl. Acad. Sci. USA 2006) 에 보고된 크리바노프 교수의 보고[21]에 의하면 폴리에틸렌이민으로 코팅된 유리 표면에 인플루엔자 바이러스를 올려놓으면 5분 이내에 활성을 잃어버린다고 제안하였다. 즉, 극성을 띄는 폴리 에티렌 이민이 마치 스파이크(spike)처럼 고분자 사슬들을 배열시켜 바이러스의 지질 이중층을 파고들어 병원성 박테리아를 죽게 만든다고 보고하였다. 천연 키토산이 항균성을 갖는 이유도 양이온화된 아미노기($-NH_3^+$)에 의해 발생되는 것으로 알려져 있다.

알지네이트의 카르복실그룹은 장내에서 식염과 결합하여 몸 밖으로 배출이 가능해 당뇨병 치료와 예방에 도움을 주고 중금속 체내 흡수억제, 항 돌연변이 효과,

글루코오스 내성의 향상, 그리고 혈청지질 감소에 직접적으로 영향을 주는 것으로 알려져 있다[22-25].

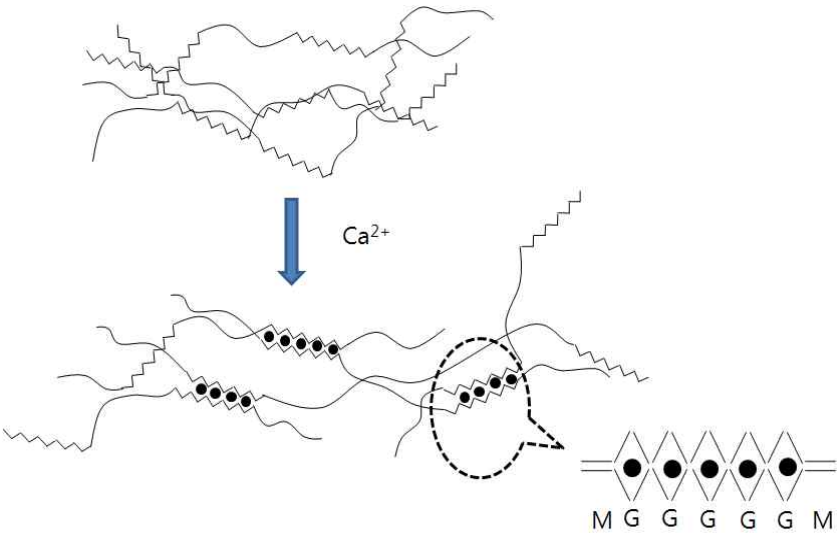


Fig. 1.3 Egg-box structures of G-blocks in alginate.

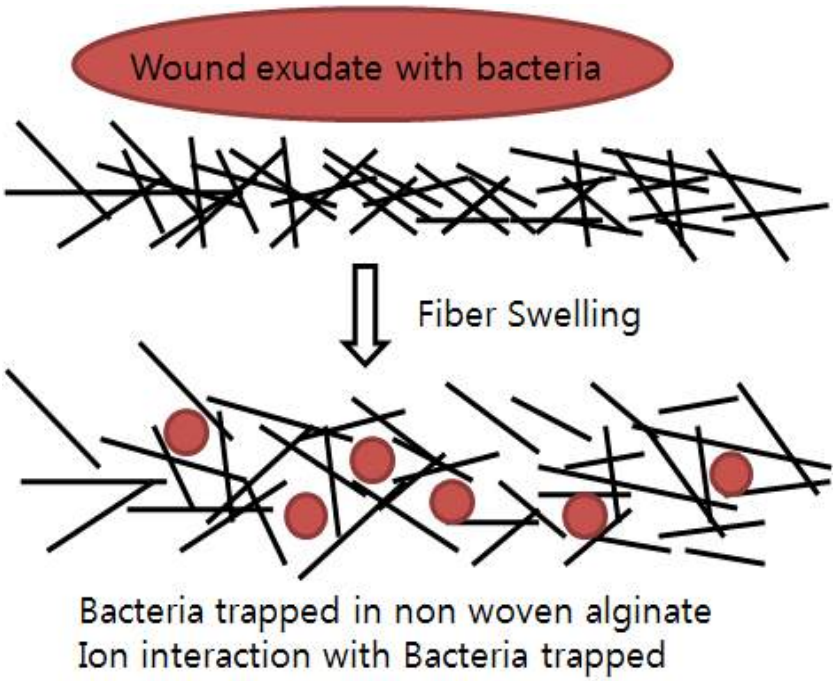


Fig. 1.4. The antibacterial mechanism of alginate wound dressing.

3. 기능성 다당류의 저분자화

다당류의 경우 분자량이 크게는 300 kDa 이상으로 유지되는 고분자량으로 고분자 상태가 그대로 사용되는 경우는 거의 없으며 대략적으로 100～10 kDa 적게는 5 kDa으로 조절하는 경우가 대부분이다. 다당류의 종류에 따라 차이가 발생하지만 200 kDa이상의 경우 용해시키기 어렵고 용해 시 용액점도가 높아 가공에 큰 어려움이 있다. 분자량이 낮은 다당류들을 결합시켜 분자량을 높이는 것은 불가능하기 때문에 분자량이 큰 다당류를 물리적, 화학적, 생물학적 그리고 광학적 방법 등을 사용하여 분자량을 조절하는 것을 다당류의 분자량 조절이라 정의한다.

해조류로부터 얻어지는 기능성 다당류인 알지네이트와 후코이단은 음식의 첨가물, 공업용 증점제, 그리고 바이오 분야까지 매우 폭 넓은 사용 범위를 가지고 있다. 하지만, 사용 분야에 따라 요구되는 특별한 물리적·화학적 성질이 있어서 실질적으로 사용되는 양은 매우 제한적이다. 또한, 기능성 다당류는 고분자량일때 보다 저분자화 될때 그들이 갖는 관능기의 노출이 증가되면서 기능성이 더욱 향상되는 것으로 알려져 있다[47-49]. 기능성 다당류 고유의 기능성이 발현되고 특정 분야에 사용을 위해서는 분자량이 적절하게 조절되어야만 한다. 분자량 조절을 위한 대표적인 방법들은 다음과 같다.

3.1 물리적 방법

다당류의 저분자화 방법 중 전단응력(shear stress)을 가하는 것이 물리적 방법의 기본이다. 대표적인 방법이 초음파(ultrasound)나 microwave를 이용한 방법인데, 초음파(ultrasound)는 용액 내에서 초당 수천수만 개의 작은 공기 방울을 형성하고 생성된 공기 방울의 내부와 외부 압력차 때문에 분자 사슬이 쉽게 절단 된다. 이때 발생되는 엄청난 와류 스트레스가 반응을 촉진시키거나 혹은 주위 분자의 결합을 파괴하는 현상을 가져오게 되는데 이런 현상을 동공효과(cavitation effect)라고 한다[50]. 또한 초음파나 microwave에 의한 진동(wave)은 고분자 사슬의 이동도(chain mobility)을 증진시켜 반응을 촉진시키는 효과가 있다. 초음파나 microwave를 사용하는 음향 화학(sonochemistry)분야는 1970년대부터 무기 화학 분야에서는 상당히 널리 사용되어진 방법이고 1980년대 중반부터 유기 화학 분야에서도 고분자 중합(polymerization) 및 고분자 분해(depolymerization)에 널리

사용되어지고 있다[96]. 근래에 들어 초음파를 이용한 다당류의 저분자화와 관련된 문헌이 많이 보고되어지는데 초음파를 이용하는 방법은 특별한 후처리(post-treatment)공정이 필요하지 않고 상온에서 공정이 가능하며 제조된 반응물의 분자량 분산도(PDI : polydispersity index)가 매우 좁은 값을 얻을 수 있다는 장점이 있다. 하지만 대량 반응이 어렵고 반응 효율이 낮아 대량 생산에는 적합하지 않는 단점을 갖는다[51].

3.2 생물학적 방법

생물학적인 방법은 최근에 많이 사용되는 방법으로 분해 효소(enzyme)를 이용하는 방법이다. 효소를 이용하여 저분자화 시키는 방법은 특정한 기술이 필요하지 않고 균일한 분해 반응을 유도 할 수 있지만, 균들로부터 얻어지는 효소들의 경우 대부분이 exo형태의 분해 효소들이어서 초 저분자량의 올리고당(oligosaccharide) 밖에 얻을 수 없다는 단점이 있다[52-54]. 또한 저분자화 반응이 완료된 후 효소의 제거가 어려우며, 효소 자체의 안정성도 문제 시 되고 있다. 즉, 저분자화 반응을 통해 얻어진 올리고당에 미량이나마 반응 효소들이 잔류 될 가능성이 있기 때문에 의·약학 분야에서의 사용이 제한되고 있다. 분자량의 조절이 어렵고 분해효소의 잔류 가능성 때문에 생물학적인 분자량 조절 방법은 응용 분야가 제한적이고 산업분야에서는 적합하지 못한 것으로 사료된다.

3.3 화학적 방법

강산이나 강염기를 이용한 화학적인 방법은 대량반응이 쉽고 분자량의 조절이 어느 정도 가능하다는 장점이 있지만 저분자화 반응이 매우 불규칙하게 진행되고 회수율(yield)이 낮으며 반응 종료 후 처리 공정에 많은 비용이 든다는 단점을 갖는다. 저분자화 반응이 불균일하게 진행되기 때문에 분자량 분포도(PDI : polydispersity index)가 다른 저분자화 반응에 비해 매우 넓다. 현재 산 가수 분해 방법에 의한 다당류의 저분자화는 환경적인 문제와 공정 효율상의 문제로 거의 사용하지 않고 있으며 앞서 언급한 것처럼 기능성 다당류의 경우 활용 분야에 따라 특정 분자량이 요구되기 때문에 현재 산가수분해법은 거의 사용되지 않는다[55,56].

3.4. 광학적인 방법

감마선이나 전자빔을 이용한 광학적인 방법은 근래 들어 많이 사용되는 다당류의 저분자화 방법이다. 광학적인 방법은 발생 전원의 세기조절이 가능하여 공정제어의 편리성, 정확성, 에너지 효율성, 그리고 제품의 균일성을 가지며 연속 공정이 가능해 대량 생산이 가능한 가장 이상적인 방법이라 사료된다. 광학적 방법은 빛의 조사(irradiation)에 의해 생성되는 자유라디칼 혹은 직접적인 에너지 전달에 의해 당(saccharide)의 1-4 glycosidic bonds를 끊어서 저분자화 되는 것으로 알려져 있으며[57-60] 전분(starch)이나 셀룰로오스(cellulose)와 같은 다당류들의 저분자화에는 매우 효과적인 것으로 보고되고 있다. 그러나 아직 식품이나 의·약품에 방사선의 이용이 상당히 제한적이고 장치 설비 비용이 매우 비싸다는 단점을 극복하지 못하고 있다.

4. 본 연구의 배경 및 목적

앞서 언급한 바와 같이 해조류에서 추출되어지는 기능성 다당류의 경우 매우 폭넓은 분야에 사용이 가능하지만 그 사용량은 매우 미약하다. 실질적으로 최근 10년 동안 의·약학 분야에서의 사용량이 다소 늘어났을 뿐 기존의 사용량을 크게 앞지르지는 못하고 있는 실정이다. 기능성 다당류들의 독특한 생리활성을 유지하면서 효과를 극대화시키기 위해서는 사용하고자하는 분야에 적합한 분자량을 갖는 것이 매우 중요하다. 그러나 기존의 저분자화 방법은 분자량 조절이 매우 어렵고, 설령 조절된다고 하더라도 대량 생산 측면에서 많은 제약이 따른다. 따라서 본 연구에서는 다음과 같은 방법으로 저분자화를 시도하여 분자량 조절을 용이하게 하고 생산 효율을 극대화하고자 한다.

4.1. 과산화수소/초음파를 이용한 저분자화

과산화수소/초음파를 이용한 다당류의 저분자화 방법은 기존의 산 가수 분해법을 이용한 처리 방법과는 달리 산화제를 이용한 처리 방법으로 저온에서 짧은 시간에 그리고 높은 효율을 얻을 수 있는 방법이다. 기존의 화학적인 방법은 HCl, H_2SO_4, H_3PO_4 그리고 CH_3COOH 등 다양한 산을 사용하여 고온에서 장시간 처리한 후

중화 침전 그리고 여러 차례 세척 공정을 거쳐 생성물을 얻어내는 방법이다[63]. 이러한 산 가수 분해 방법은 무엇 보다 후 처리 공정이 친환경적이지 못하고 회수율이 20 % 내외로 매우 낮아 경제적이지 못하다. 이런 단점을 보완하고자 근래에는 H_2O_2, $NaNO_2$ 그리고 O_3와 같은 산화제를 사용하여 다당류를 저분자화 시키는 일에 많은 연구 결과가 보고되고 있다[61,62,64,65]. 산화제를 사용한 저분자화 방법은 산화제가 열이나 개시제(initiator)와 같은 외부적인 요인에 의해 다량의 라디칼을 생성하고 생성된 라디칼이 당(saccharide)의 결합을 분해시켜 저분자화 시키는 방법이다. 앞서 언급한 산화제 중 과산화수소를 사용한 저분자화는 다른 방법에 비해 후처리가 매우 용이하다는 장점이 있다. 과산화수소의 경우 ΔG = -119.2 kJ/mol으로 자발적인 분해가 가능해 친환경적인 처리가 가능하다. 실제로 다당류를 산화시켜 저분자화한 사례를 보면 키틴(chitin)과 키토산(chitosan)의 경우, 기존의 화학적인 방법보다 매우 짧은 시간에 대량의 처리가 가능하였고 생성물의 회수율이 다른 방법에 비해서 월등하게 높았음을 보여주었다[65-68]. 과산화수소나 산(acid)를 이용한 다당류의 저분자화 방법은 용액 상태에서 저분자화 반응이 진행되어야 하는데 고분자 용액의 높은 점도와 당의 사슬에 존재하는 많은 하이드록실 그룹 때문에 사슬의 엉킴(entanglement)현상이 많이 발생해 효율적인 저분자화에 상당히 많은 제약이 따른다. 그러나 고분자 용액에 초음파를 조사시키면 고분자 사슬들의 운동성이 활발해져 사슬 사이 사이에 과산화수소로부터 생성된 하이드록시 라디칼이 쉽게 끼어 들어가 균일 반응에 큰 효과를 줄 수 있으리라 생각되며 또한 초음파 사용으로 반응 도중 발생하는 작은 공기 방울들이 깨지면서 사슬들의 저분자화를 촉진 시키는 동공 효과를 기대 할 수 있으리라 사료된다.
본 연구에서는 고분자량의 다당류를 과산화수소와 초음파를 사용하여 분해 반응의 효율을 높이고 처리 공정을 단순화시키며 분자량의 조절을 원활하게 할 수 있는 대량 생산하는 기술을 개발코자 한다.

4.2 과산화수소/전자빔을 이용한 저분자화.

과산화수소/전자빔을 이용한 다당류의 저분자화 방법은 열의 공급이나 개시제의 사용 없이 전자빔 조사(e-beam irradiation)만으로 과산화수소로부터 대량의 하이드록실 라디칼(HO·)이 생성 가능하다는 장점을 가지고 있다.
감마선 조사(gamma ray irradiation)를 사용하여 다당류를 저분자화 시키는 기술

역시 특별한 후처리가 필요하지 않고 재현성이 우수해 전자빔 조사 공정과 비슷한 장점을 갖지만, 기기 사용에 대한 비용이 상당히 고가이며 공정 특성상 전자빔과 같은 컨베이어 벨트를 이용한 scanning 유형으로 개발이 어려워 대량 생산에는 적합하지 못하다[69].

전자빔조사에 의한 과산화수소와 물로부터 하이드록실 라디칼(·OH)의 생성 및 다당류의 분해는 다음과 같다[70].

$$O \xrightarrow{v} H_2, H_2O, e_{aq}^-, H\cdot, \cdot OH, H_3O^+$$

$$H\cdot + H_2O_2 \rightarrow H_2O + \cdot OH$$

$$e_{aq}^- + H_2O_2 \rightarrow \cdot OH + OH^-$$

$$H_2O \xrightarrow{hv} 2\cdot OH$$

$$R + \cdot OH \rightarrow R\cdot + H_2O$$

$$R + \cdot H \rightarrow R\cdot + H_2$$

$$R\cdot \rightarrow \cdot R_1 + \cdot R_2$$

$$\cdot R_1 + \cdot R_2 \rightarrow R_1R_2$$

전자빔은 전자빔 가속기 특성상 공정 효율이 매우 높은 특징이 있는데, 전자빔이 직접 대상 물질에 조사됨으로 기존의 공정에 비해 매우 높은 효율을 나타내 생산성이 높다. 전자빔을 이용한 공정은 통상 다음과 같은 장점이 있다[71].

- 전자에너지의 고 효율성
- 높은 생산성
- 매우 짧고 간단한 반응공정
- 재현성이 매우 우수한 재현성
- 전기에너지를 이용한 청정공정

- 장치의 높은 내구성
- 공정의 자동화 및 연속공정

전자빔의 응용은 매우 넓은 분야에 응용이 가능하고 이들 중 관련된 기술의 실용화 단계를 Table 1.2 에 나타내었다[71]. 앞서 언급한 것처럼 전자빔 조사는 다른 공정기술에 비해 청정 기술이라 할 수 있지만 국내의 전자빔 실용화는 아직 초기 단계라 할 수 있다. 특히 국내·외를 막론하고 전자빔 조사에 의한 다당류의 저분자화 기술은 아직 특별하게 보고된바 없다.

따라서 본 연구에서는 과산화수소와 전자빔을 사용하여 하리드록실 라디칼의 생성률을 높히고 저분자화 효율을 극대화 시켜 대량생산이 가능하게 하고 분자량 조절을 용이하게 하여 효율적이고 친환경적인 방법으로 고분자 알지네이트를 저분자화 시키는 공정을 개발코자 한다.

Table 1.2 Electron beam irradiation in Domestic & International use [71]

Field	Application	Energy (MeV)	Domestic	Foreign
Polymer	Flame retardant tube	0.3~2	●	●
	Synthetic leather		○	●
	Tire, cured rubber		●	●
Environment	SOx, NOx, VOCs	1~10	■	○
	Waste water		■	○
	Waste sludge		▽	○
	Heavy metal		▽	○
Drug/Food	Pesticides	1~10	▽	●
	Sterilization		■	●
	Insecticide		▽	○
Semiconductor	Switching	2~10	■	●
	NTD wafer		▽	○
Atomic energy	Nuclear production	1~30	▽	●
	Irradiation damage		▽	●
	Nuclear sensor		▽	○
	Nuclear fuel		▽	○
	Electron beam		■	○
	Positron beam		▽	○
	X-ray & γ-ray		▽	○

● : Commercialization stage, ○: prehistory stage, ■ : Research stage, ▽ : no plan

제 2 절 실 험

1. 시료 및 기기

1.1 시료

본 연구에 사용한 고분자 알지네이트(pristine sodium alginate, Mw: 446,400)는 Junsei사의 제품을 사용하였으며 저분자화 시키는데 사용한 과산화수소(hydrogen peroxide, 30 wt%)는 삼척화학 제품을 특별한 처리 없이 사용하였고 ethanol은 (주) 동양 화학의 제품을 정제 없이 사용하였다. GPC-MALS(gel permeation chromatography multi-angle light scattering)의 이동상 용매는 Aldrich사의 $NaNO_3$, Na_2HPO_4 로 buffer solution(pH = 7)을 제조하여 감압여과장치(division of milipore, waters)와 필터(FH-0.45 ㎛, Waters)를 이용하여 여과 후 초음파 발생 장치로 2 시간 동안 탈기(degassing)하여 사용하였다. IR분석과 NMR분석은 Aldrich사의 potassium bromide (KBr pellet)와 deuterium oxide (D_2O, 용매)를 사용하였다.

1.2 기기

본 연구의 실험과 특성 조사를 위해 사용한 기기는 다음과 같다.

Ultra-sonicator : POWER SONIC 420 (Hwashin Technology)
Refrigerated Large Capacity Centrifugal separator : Combi-514R (Hanil)
Vacuum oven : Vaccum oven Model 285A (Fisher scientific)
FT-IR Spectrometer : NICOLET 6700 (Thermo scientific)
FT-NMR Spectrometer : JNM-LA300 (JEOL), INOVA 500 (Varian)
GPC-MALS sets ;
Pump : Waters 515 (Waters)
Detector : DAWN EOS (Light Scattering) + Optilab DSP (RI) (Wyatt)
Column : 2 X PL aquagel Mixed-OH (7.8 x 300 mm) (Agilent)
Software : ASTRA

Elemental Analyzer : Vario-EL III (CHOICE Analytical)
XRD : X' Pert PRO MPD diffractometer (PANalytical)
Capillary(Ubbelohde) viscometer : 525 01/0b (SCOTT)
E-beam irradiator : ELV-8 (eb-tech)

2. 화학적 방법에 의한 저분자화

저분자화 반응은 Fig. 1.5와 같이 기계적 교반 장치가 부착된 2 L용량의 반응기에 pristine sodium alginate와 증류수를 넣고 완전히 녹인 후 과산화수소를 넣어 실행한다. 고분자 알지네이트 용액의 최종 농도는 2 wt%, 반응 온도는 30 ~ 50 ℃, 과산화수소의 농도는 1~ 15 wt% 그리고 반응 시간은 0.5 ~3.0 시간으로 변화시키면서 저분자 알지네이트를 제조하였다. 초음파의 on-off time은 20초 간격을 두고 amplitude는 30 %로 고정시킨다. 초음파 사용에 의한 국부적인 가열을 막기 위해 기계적 교반장치의 교반 속도는 380~400 rpm을 항시 유지시킨다. 반응온도는 ± 2 ℃ 오차범위 안에서 circulator를 사용하여 조절하였다. 저분자화 반응이 완료된 저분자 알지네이트는 한 차례 여과 후 dropping funnel을 사용하여 에탄올에 침전시킨다. 원심분리기를 사용하여 회수된 알지네이트는 에탄올로 2회 세척 후 회수된 생성물에 잔류하는 과산화수소를 제거하기 위해 다시 증류수 300 mL에 녹인다. 완전히 녹은 용액은 회전 증발기를 이용하여 50 ℃이하에서 감압하여 용매를 제거하고 24시간동안 감압 건조하여 최종 생성물을 얻는다. 생성물의 회수율은 70 % 였으며 저분자 알지네이트는 시료병에 넣어 냉동실에서 보관하였다.

3. 전자빔 조사에 의한 저분자화

저분자화 반응은 pristine sodium alginate를 증류수에 완전히 녹인 후 과산화수소를 넣어 시료 용액을 준비하고, 전자빔 컨베이어 벨트에 준비된 시료 용액을 놓은 후 다양한 조사선량으로 전자빔을 조사시켜 저분자화 반응을 진행한다 (Fig. 1.6). 이때, 컨베이어 벨트의 이동 속도는 10 m/min 이었다. 고분자 알지네이트 용액의 최종 농도는 2 wt%, 전자빔의 에너지는 1.0 MeV와 2.5 MeV에서 조사선량을 2.5 kGy~20 kGy, 과산화수소의 농도는 0~4.5 wt%으로 상온에서 반응시키면서 각 조건의 영향을 확인하였다. 반응이 끝난 저분자 알지네이트 용액은 한 차례 여과

후, dropping funnel을 사용하여 에탄올에 침전시킨다. 침전물은 원심 분리기를 사용하여 회수하고 에탄올로 2회 세척 후, 회수된 생성물에 잔류하는 과산화수소를 제거하기 위해 다시 증류수 300 mL에 녹인다. 완전히 녹인 용액은 회전 증발기를 이용하여 50 ℃이하에서 감압하여 용매를 제거하고 24시간동안 감압 건조하여 최종 생성물을 얻는다. 생성물의 회수율은 65 %~45 %였으며 저분자 알지네이트는 시료병에 넣어 냉동실에서 보관하였다.

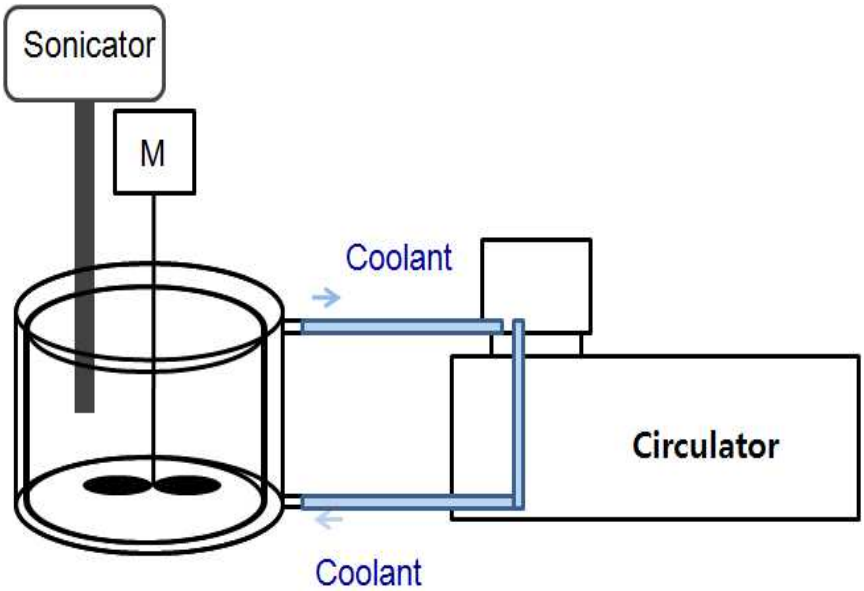


Fig. 1.5 Schematic sketch of an apparatus for the depolymerization.

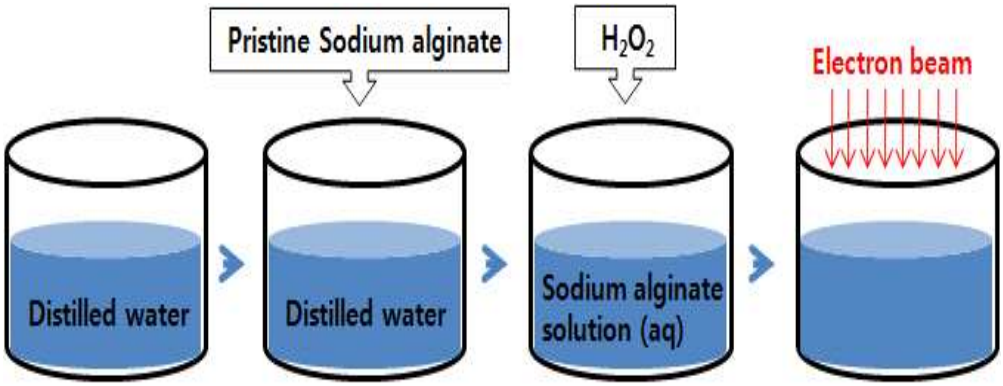


Fig.1.6 Scheme of Alginate depolymerization by Electron beam irradiation.

제 3 절 결과 및 고찰

1. 화학적 방법에 의한 저분자 알지네이트의 특성

1.1 저분자 알지네이트의 구조분석

제조된 저분자 알지네이트(low molecular weight sodium alginates : LMWSAs)의 분자 구조를 밝히는 것은 최종 생성물의 화학적 특성을 규명하고 최적화된 제조 공정을 결정하는 매우 중요한 인자이며 제조된 알지네이트의 응용분야를 결정하게 된다. 따라서 본 연구에서는 FT-IR과 FT-NMR을 이용하여 저분자 알지네이트의 구조를 분석하였다.

1.1.1 FT-IR

여러 가지 반응조건에서 제조된 저분자 알지네이트의 구조적 특성을 확인하기 위해 FT-IR spectrometer로 스펙트럼을 얻었으며 이를 다음과 같이 분석하였다.[80,81]

- 과산화수소의 농도에 따른 알지네이트의 구조분석

과산화수소의 농도를 달리하여 제조한 저분자 알지네이트(LMWSA)와 pristine sodium alginate의 FT-IR은 Fig. 1.7에 나타내었다. 카르복실산의 (OH^-) (3,444 cm^{-1}), CH 신축진동 (2,927 cm^{-1}), C=O 신축진동 (1,612 cm^{-1}), C-O 신축진동 (1,415 cm^{-1}) 피크들은 과산화수소의 농도가 증가함에 따라 큰 변화는 보이지 않았다. 특히, 1176 ~ 1088 cm^{-1}에서 보이는 1,4-glycosidic bond, C-O-C 피크들의 경향이 pristine sodium alginate와 일치하게 나타나는 것은 저분자화된 알지네이트의 구조에 변화가 생지지 않았음을 의미하며, 다만 1750 cm^{-1}(C=O)에서 관찰되는 새로운 피크는 알지네이트가 저분자화 반응 중 생성된 carboxylic acid group에 의한 것으로 사료된다. 이는 산·가수분해 방법으로 저분자 알지네이트를 제조한

Kim 그룹[80], Sakugawa 그룹[82]의 분석 결과와 일치하고 본 실험의 결과를 더욱 잘 뒷받침 하였다.

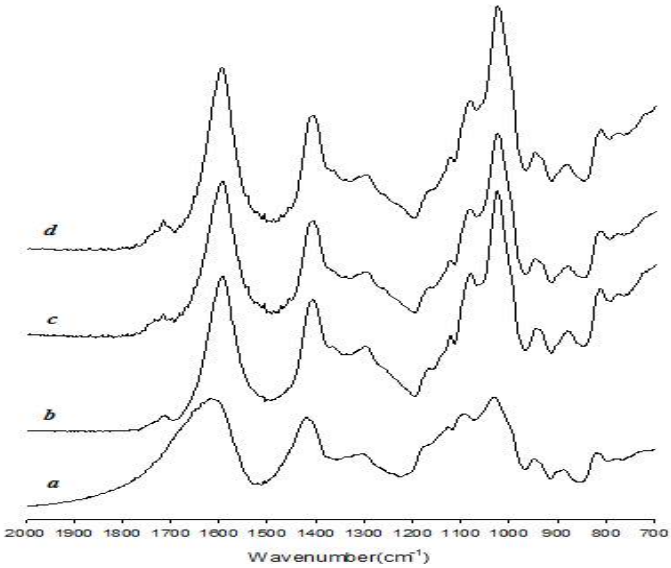
- 반응 온도에 따른 알지네이트의 구조분석

Fig. 1.8은 반응 온도를 달리하여 제조한 저분자 알지네이트(LMWSA)와 pristine sodium alginate의 경우이다. 온도에 따른 결과는 앞서 언급한 과산화수소의 농도에 따른 구조 변화 결과와 같은 경향을 보여줌으로써, 반응 온도 50 ℃까지는 온도의 변화에 따른 알지네이트의 구조에 변화가 생기지 않았음을 확인 할 수 있다.

- 반응 시간에 따른 알지네이트의 구조분석

저분자 알지네이트의 제조 시 반응시간이 미치는 영향을 조사하였다. 3 시간동안 반응 시킨 후 회수되어진 저분자 알지네이트의(LMWSA) 경우, 1,4-glycosidic bond(C-O-C)가 보여주는 1176 ~ 1088 cm^{-1}의 피크들의 intensity가 pristine sodium alginate와 0.5 시간동안 반응 시켜 얻은 저분자 알지네이트에 비해 상당히 많이 왜곡되어 보인다(Fig.1.9). 이는 저분자화 시 단당(monosaccharide)을 연결하는 1,4-glycosidic bond가 외부적인 요인으로 인하여 끊어짐을 확인 시켜주며 다른 여러 가지 방법으로 저분자화를 시도한 문헌들에서도 이와 유사한 저분자화 메카니즘으로 진행됨을 확인 할 수 있다[62-63, 69, 80-82].

과산화수소의 농도 증가에 따른 결과와 달리 1750 cm^{-1}에서 어떤 새로운 피크의 생성이나 intensity의 증가는 보이지 않았다.



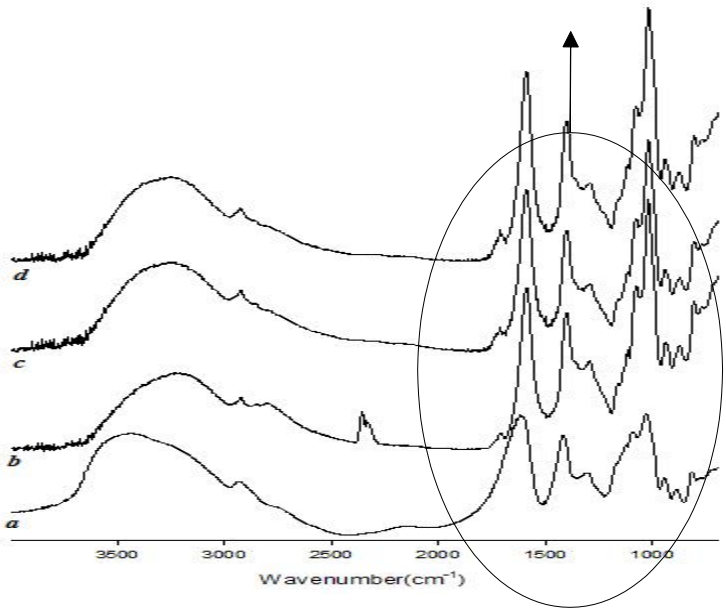


Fig. 1.7 FT-IR spectra of (a) pristine sodium alginate and LMWSAs treated in (b) 2 wt% H_2O_2, (c) 6 wt% H_2O_2, (d) 15 wt% H_2O_2.

[2 wt% in reaction concentration at 50 ℃ for 0.5 hr with ultrasonic wave]

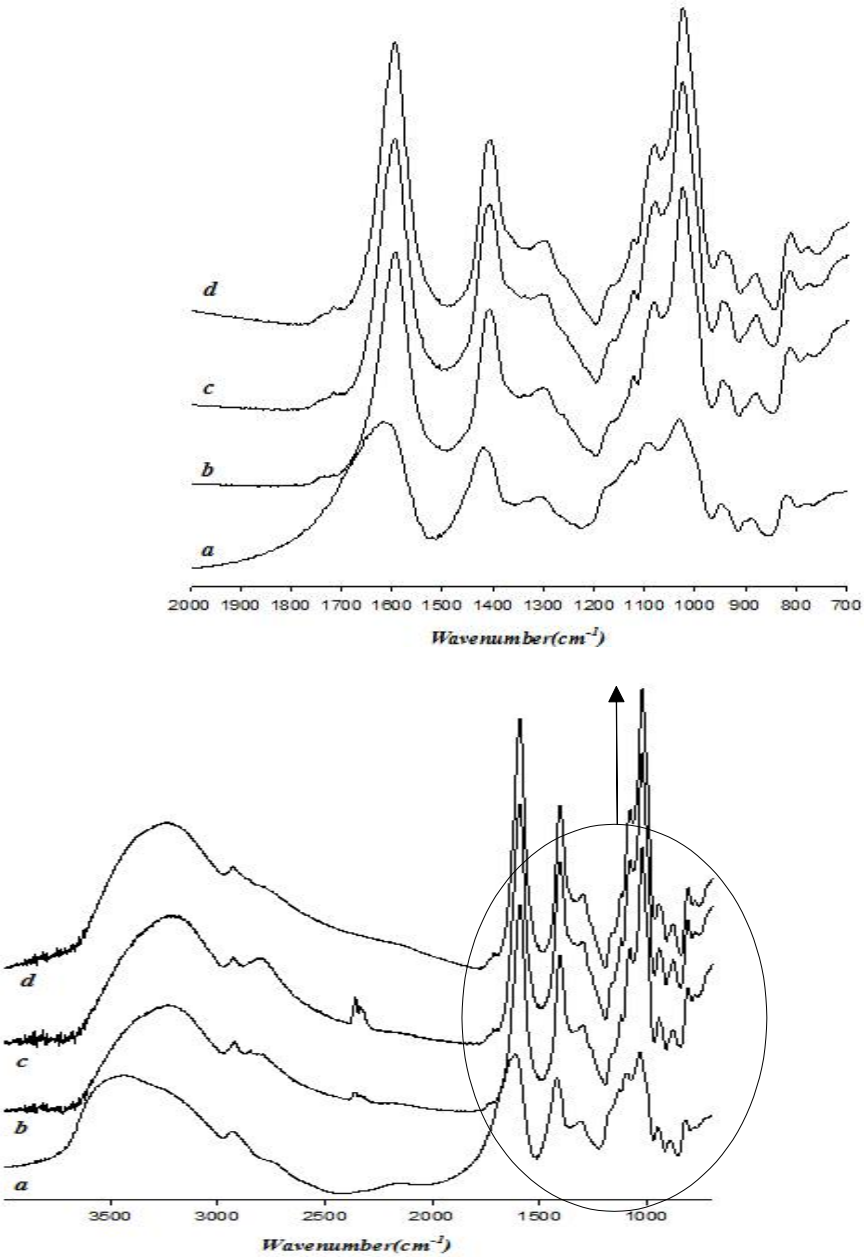


Fig. 1.8 FT-IR spectra of (a) pristine sodium alginate and LMWSAs treated at (b) 30 ℃, (c) 40 ℃, (d) 50 ℃.

[2 wt% in reaction concentration and 3 wt% H_2O_2 for 0.5 hr with ultrasonic wave]

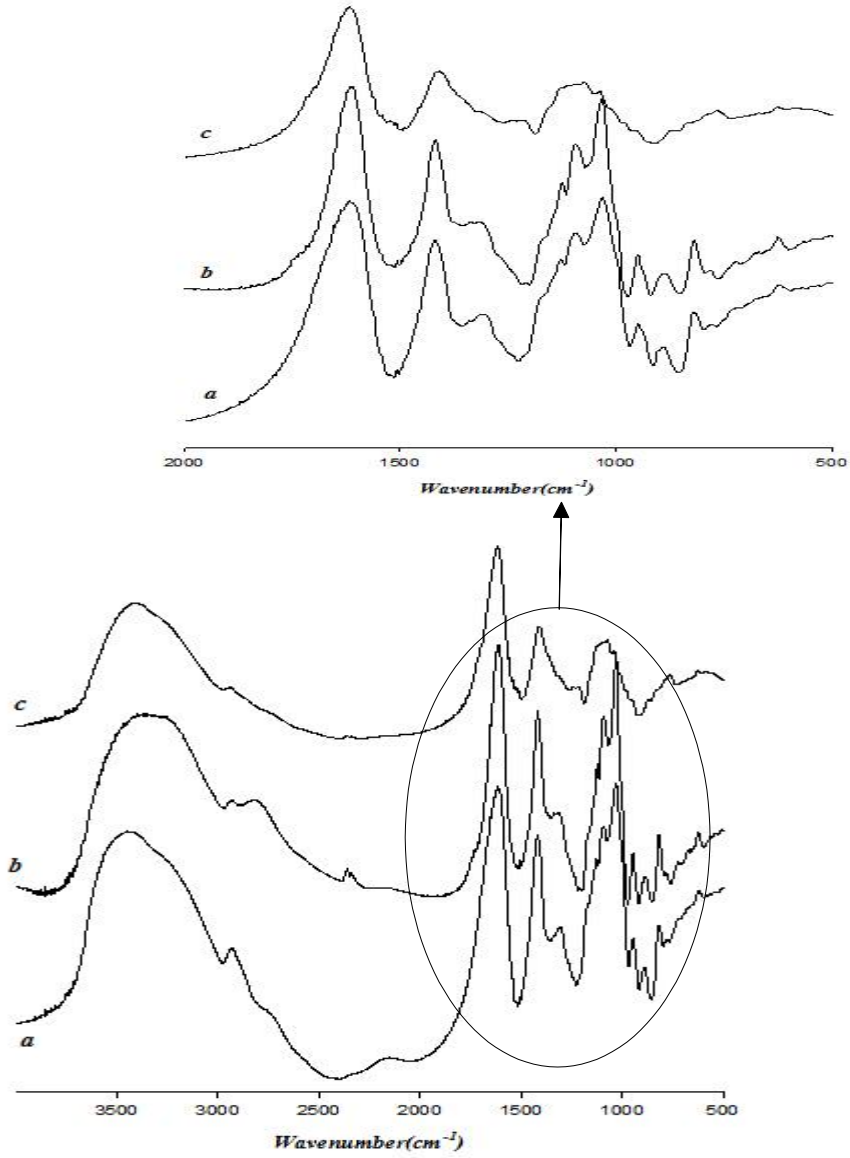


Fig. 1.9 FT-IR spectra of (a) pristine sodium alginate and LMWSAs treated for (b) 0.5 hr, (c) 3.0 hr.

[2 wt% in reaction concentration and 3 wt% H_2O_2 at 50 ℃ with ultrasonic wave]

1.1.2 FT-NMR

Fig. 1.10와 Fig. 1.11은 각각 ^{1}H-NMR과 ^{13}C-NMR 스펙트럼이다. FT-NMR spectrometer를 사용하여 과산화수소와 초음파를 이용한 저분자화가 알지네이트 분자구조에 미치는 영향을 확인하였다. ^{1}H-NMR을 통해 반응시간의 영향을 확인한 결과, Fig.1.12에서 보여준 바와 같이 반응 시간이 증가하면서 8.4 ~ 8.6 ppm사이에서 보이는 피크의 intensity가 증가함을 확인 할 수 있었다. 2.1 ppm 과 2.3 ppm에서 보여주는 피크들은 저분자화 반응도중 CH_3-, -CH_2-가 생성되고 이들이 알지네이트 주 사슬에 존재하는 것으로 보인다. 이는 Gomez 그룹[83]의 분석 결과와 상당 부분 일치한다. 또한, Fig. 1.12에서 보여주는 ^{13}C-NMR의 결과 160～180 ppm 부근에서 반응 시간이 증가함에 따라 새로운 많은 피크가 생성됨을 확인 할 수 있는데 이는 저분자화 시 1,4-glycosidic bond가 끊어지면서 말단 그룹에 형성되는 formate에 의한것으로 사료된다. 특히, 3시간 반응 시 130 ppm부근에서 보여주는 피크는 저분자화시 생성된 double bond에 의한 것으로 이는 Nagasawa 그룹[57]의 분석 보고와 유사한 결과이다. 이와 같은 다당류의 저분자화에 따른 말단 그룹의 화학구조 변화는 키토산의 저분자화에서도 보이는데 고분자 키토산의 저분자화가 진행됨에 따라 carboxyl group의 함량 증가와 formic acid의 생성에 대해서 보고되고 있다[84].

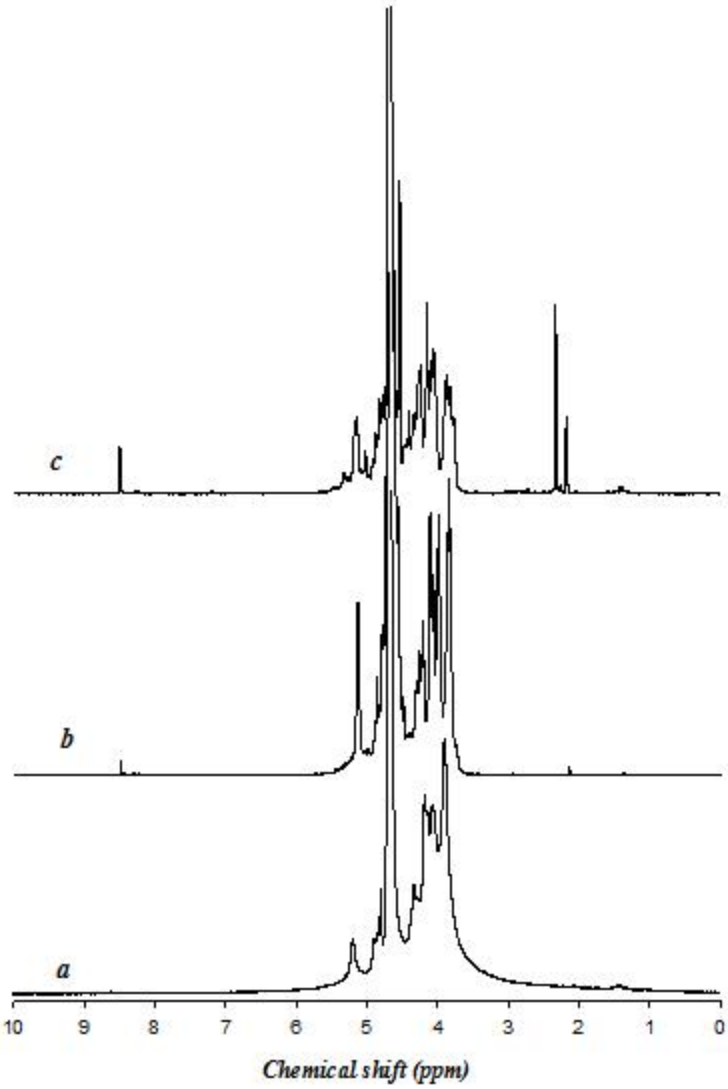


Fig. 1.10 ^{1}H-NMR Spectra of (a) pristine sodium alginate and LMWSAs treated for (b) 0.5 hr, (c) 3.0 hr.

[2 wt% in reaction concentration and 3 wt% H_2O_2 at 50 ℃ with ultrasonic wave]

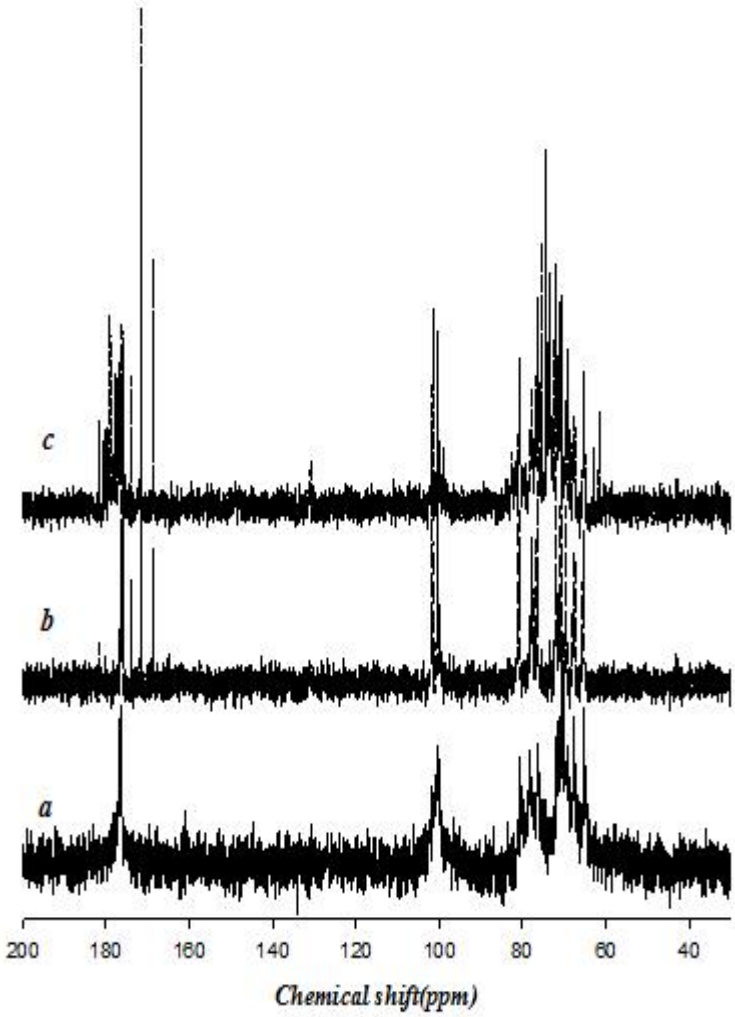


Fig. 1.11 ^{13}C-NMR Spectra of (a) pristine sodium alginate and LMWSAs treated for (b) 0.5 hr, (c) 3.0 hr.

[2 wt% in reaction concentration and 3 wt% H_2O_2 at 50 ℃ with ultrasonic wave]

1.2 저분자 알지네이트의 점도 및 분자량

초음파와 과산화수소를 이용하여 다당류를 저분자화시키는 방법이 분자량 저하에 많은 도움을 준다는 사실은 책자, 특허 그리고 논문을 통해 보고되었지만, 어느 정도 효과적이며 어떠한 조건에서 어떤 결과를 얻었는지 등의 정량적인 연구보고는 지금까지 전무하다. 다당류에 존재하는 많은 하이드록실 그룹은 molecular chain들 사이에 많은 Inter-, Intra- 수소결합(hydrogen bonding)을 유발시켜 수용액 상태에서 고분자의 형태를 가늠하기 어렵게 만들어 상대 분자량으로는 분자량을 결정하기 어려운 문제점이 있다.

따라서 본 실험에서는 multi angle light scattering(MALS)이 부착된 gel permeation chromatography (GPC)를 사용하여 절대분자량 값을 얻어내고, 동일한 조건에서 최소 3회 이상 용액 점도(solution viscosity)를 측정하여 분자량 측정과 용액점도 두 가지 방법으로 동시에 접근하여 특성 분석을 하였다.

제조된 저분자 알지네이트는 탈이온수(ionized water)를 사용하여 0.5 g/dL 농도로 용액을 만들고 0.45 ㎛ syringe filter를 사용하여 여과 후, Ubbelohde 점도계를 이용하여 35℃ 항온조에서 측정하였다.

저분자 알긴산의 분자량 및 다분산도(PDI : polydispersity index)는 겔투과크로마토그래피(GPC : gel permeation chromatography, Waters Co.)를 사용하여 측정하였다. GPC의 이동상 용매는 0.2 M $NaNO_3$, 0.1 M Na_2HPO_4의 buffer solution(pH 7)을, 고정상은 PLaquagel-OH 컬럼(7.8 mm × 30 cm) 두개를 연결하여 사용하였고 용출 속도는 용매펌프(M515, Waters Co.)를 이용하여 1.0 mL/min으로 하였다. 이때 이동상과 알지네이트 용액은 0.45 ㎛ 필터를 이용하여 여과한 후 사용하였다. 용출 피크들은 DAWN EOS (Light Scattering) 검출기와 동일한 파장을 사용한 Optilab DSP (RI) (Wyatt)로 측정하였고, ASTRA 소프트웨어를 이용하여 측정된 데이터를 처리하였다.

-과산화수소 농도의 영향

과산화수소의 농도가 저분자 알지네이트(LMWSA)의 분자량과 점도에 미치는 영향

을 알아보기 위해 다른 반응 조건은 동일하게 하고 과산화수소의 농도를 0 wt%~15 wt% 로 변화 시키면서 반응시킨 결과를 Table 1.3 Table 1.4 그리고 Fig. 1.12, Fig. 1.13에 나타내었다. 분자량은 초기 450 kDa에서 15.9 kDa까지 줄어들었고, 과산화수소의 농도가 3 wt%까지 급속도로 저하되던 분자량은 3 wt% 이상에서는 거의 일정함을 보인다. 이는 과산화수소로부터 생성되는 하이드록실 라디칼(·OH)의 수가 증가하다가 3 wt% 이상에서는 오히려 라디칼끼리의 커플링 결합이 발생하여 저분자화 반응이 효율적으로 진행되지 못한 것으로 사료된다. 또한 PDI값은 과산화수소의 농도와 상관없이 약 2 정도로 상당히 일정한 값을 보여주는데 이는 Nakagawa 등[85]의 연구 결과와 유사하며 사슬의 무작위 절단(random scission)을 의미한다. 이러한 결과는 다당류의 저분자화 방법 중 과산화수소를 이용한 저분자 공정에서 나타나는 특징인데 키토산의 저분자와 관련된 논문, 특허 등에서의 보고에 의하면 과산화수소 사용 시 PDI 값이 매우 적은 키토산을 얻을 수 있다[86].

- 반응 온도의 영향

반응 온도가 저분자 알지네이트(LMWSA)의 분자량과 점도에 미치는 영향을 알아보기 위해 다른 반응 조건은 동일하게 하고 반응온도를 30, 40, 50 ℃로 변화 시키면서 반응시킨 결과를 Table 1.3 Table 1.4 그리고 Fig. 1.14, Fig. 1.14에 나타내었다. 분자량은 30 ℃에서 96.4 kDa, 40 ℃에서 28.9 kDa 그리고 50 ℃에서 15.9 kDa을 보였다. 반응 온도 40 ℃이상에서부터 분자량이 크게 저하되는데 이는 40 ℃이상에서 과산화수소로부터 하이드록시 라디칼(·OH)이 충분히 생성되었기 때문으로 사료된다. 실제 과산화수소를 사용하여 다당류를 저분자화시킨 다른 문헌에서, 과산화수소가 분해되어 하이드록시 라디칼이 생성되는 만족할만한 조건은 50 ℃이상이라고 보고되어진 점도 이 결과를 뒷받침 하는 좋은 사례이다[57,67].

- 반응 시간의 영향

반응 시간이 저분자 알지네이트(LMWSA)의 분자량과 점도에 미치는 영향을 알아보

기 위해 다른 반응 조건은 동일하게 하고 반응 시간을 0.25, 0.5, 1.0, 1.5, 2.0, 2.5, 3.0 시간으로 변화 시키면서 반응시킨 결과를 Table 1.3 Table 1.4 그리고 Fig. 1.16, Fig. 1.17에 나타내었다. 반응 전 450 kDa의 고분자 알지네이트의 분자량이 반응 시작 0.5 시간 만에 15.9 kDa으로 급속도로 저분자화가 진행되었고, 3 시간 만에 2.4 kDa정도까지 완만하게 진행됨을 확인할 수 있었다. 하지만, 2 시간 만에 2.5 kDa까지 저하된 점을 미루어보아 2시간 이상의 반응은 공정 효율적인 측면에서는 무의미한 것으로 사료된다. 용액 점도 역시 분자량과 같은 경향을 보였다.

- 초음파 조사의 효과

과산화수소와 함께 사용된 초음파가 알지네이트의 저분자 반응에서 미치는 영향을 알아보기 위해, 다른 모든 반응 조건을 일정하게 하고 초음파 사용 유·무에 따른 분자량의 변화를 관찰하였다(Fig.1.18). 초음파를 사용한 경우 초음파를 사용하지 않은 경우 보다 분자량 및 점도의 저하속도가 확연하게 저하 속도가 빨라짐을 확인 할 수 있었다. 이는 앞서 설명한 초음파의 동공효과(cavitation effect)에 의해, 그리고 초음파가 사슬들의 운동성에 영향을 미쳐 사슬 사이사이에 과산화수소로부터 생성된 하이드록시 라디칼이 쉽게 들어가 분자량 저하에 상당한 영향을 미침으로 저분자화 반응속도가 빨라진 것이다. 일반적으로 초음파를 사용할 경우 그렇지 않은 경우에 비해 분자량 분포도(PDI)가 작아지는 결과를 보인다고 알려져[81]있지만, 본 실험에서는 이러한 결과를 확인할 수 없었다(Fig.1.19, 1.20). 이는 함께 사용되어진 과산화수소의 영향으로 사료되는데 Kim 등[73]은 과산화수소만 사용하여 키토산을 저분자화 시켰을 경우에도 상당히 좁은 분자량 분포(PDI=2~3)를 보임을 보고하기도 하였다. 즉, 과산화수소/초음파를 이용한 알지네이트의 저분자화에 미치는 초음파의 효과는 분자량 분포보다는 분자량 저하에 영향을 주며 또한, 분자량 저하 측면에서 보면, 과산화수소 베이스에서의 초음파 사용이 과산화수소만 사용하였을 때 보다 더욱 효과적이었다.

Table. 1.3 Molecular weight and viscosity of low molecular weight sodium alginate obtained using ultrasound wave in H_2O_2

Sample	No.	H_2O_2 (wt%)	Temp. (℃)	Time (hr)	Mw	Mn	P.D.I.	ηa	Yield(%)
HMWSA*					450,200	228,500	1.97	6.44	
A	1	1	50	0.5	100,600	45,500	2.20	2.68	52
	2	2	50	0.5	73,600	32,900	2.23	2.20	64
	3	3	50	0.5	15,900	9,300	1.70	0.75	71
	4	4	50	0.5	33,500	15,600	2.13	1.30	76
	5	9	50	0.5	38,000	17,500	2.17	1.42	68
	6	15	50	0.5	33,900	15,800	2.14	1.31	53
B	1	3	30	0.5	96,400	43,500	2.21	2.61	82
	2	3	40	0.5	28,900	13,900	2.08	1.17	77
C	1	3	50	0.25	101,300	45,800	2.20	2.69	83
	2	3	50	1.0	13,000	6.400	2.02	0.64	60
	3	3	50	1.5	6,000	6,600	2.28	0.33	52
	4	3	50	2	2,500	1,100	2.25	0.14	51
	5	3	50	2.5	2,800	1,500	1.86	0.10	44
	6	3	50	3	2,400	1,000	2.35	0.07	41

a : Inherent viscosity of the solution was measured at a concentration of 0.5 g/dL in distilled water at 35 ℃

Table. 1.4 Molecular weight and viscosity of low molecular weight sodium alginate obtained using H_2O_2

Sample	No.	H_2O_2 (wt%)	Temp. (℃)	Time (hr)	Mw	Mn	P.D.I.	ηa	Yield(%)
HMWSA*					450,200	228,500	1.97	6.44	
A	1	1	50	0.5	116,300	53,100	2.18	2.93	64
	2	2	50	0.5	113,700	51,900	2.19	2.89	78
	3	3	50	0.5	100,000	45,300	2.20	2.67	84
	4	4	50	0.5	109,300	49,700	2.19	2.82	86
	5	9	50	0.5	80,500	36,100	2.23	2.33	73
	6	15	50	0.5	106,800	48,500	2.20	2.78	68
B	1	3	30	0.5	137,300	63,400	2.16	3.24	85
	2	3	40	0.5	129,000	59,300	2.17	3.12	81
C	1	3	50	0.25	120,200	55,000	2.18	2.99	90
	2	3	50	1.0	88,900	40,000	2.22	2.48	82
	3	3	50	1.5	72,500	32,400	2.23	2.18	76
	4	3	50	2	48,300	21,700	2.22	1.67	71
	5	3	50	2.5	44,900	20,300	2.21	1.59	68
	6	3	50	3	32,100	15,100	2.12	1.26	58

a : Inherent viscosity of the solution was measured at a concentration of 0.5 g/dL in distilled water at 35 ℃

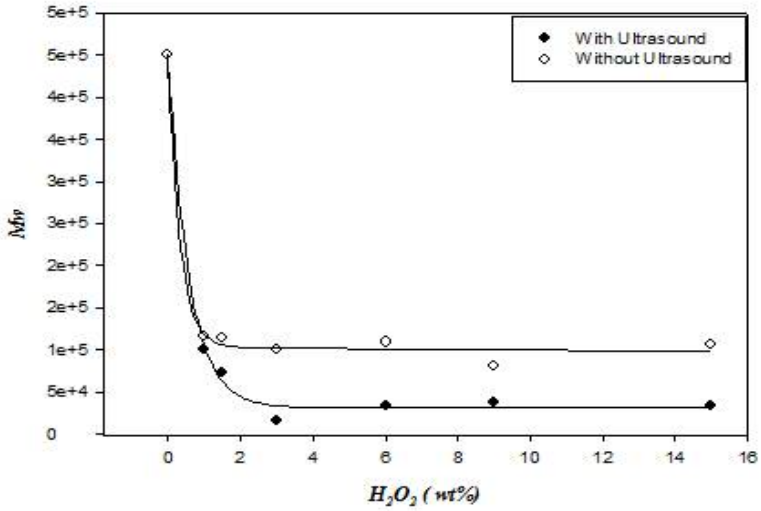


Fig.1.12 Effect of H_2O_2 concentration on the molecular weight of LMWSAs. [2 wt% in reaction concentration at 50 ℃ for 0.5 hr with ultrasonic wave]

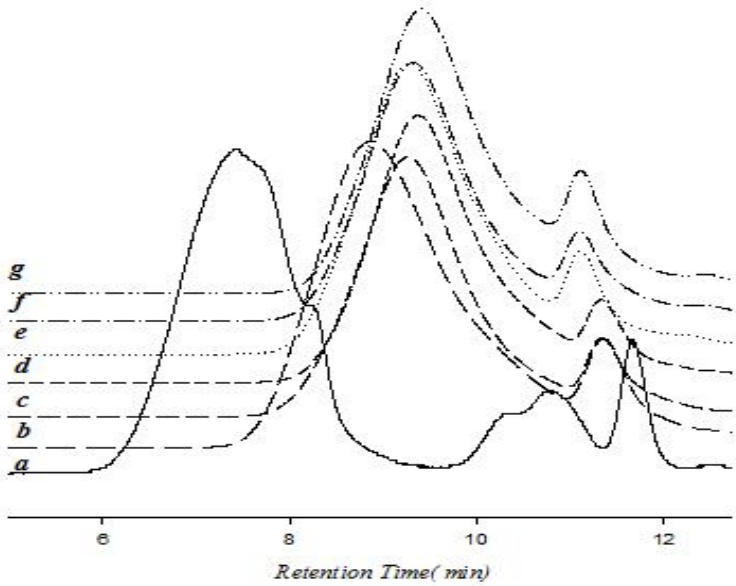


Fig. 1.13 GPC profile of (a) pristine sodium alginate and LMWSAs treated in (b) 1 wt% H_2O_2, (c) 2 wt% H_2O_2, (d) 3 wt% H_2O_2, (e) 6 wt% H_2O_2, (f) 9 wt% H_2O_2, (g) 15 wt% H_2O_2. [2 wt% in reaction concentration at 50 ℃ for 0.5 hr with ultrasonic wave]

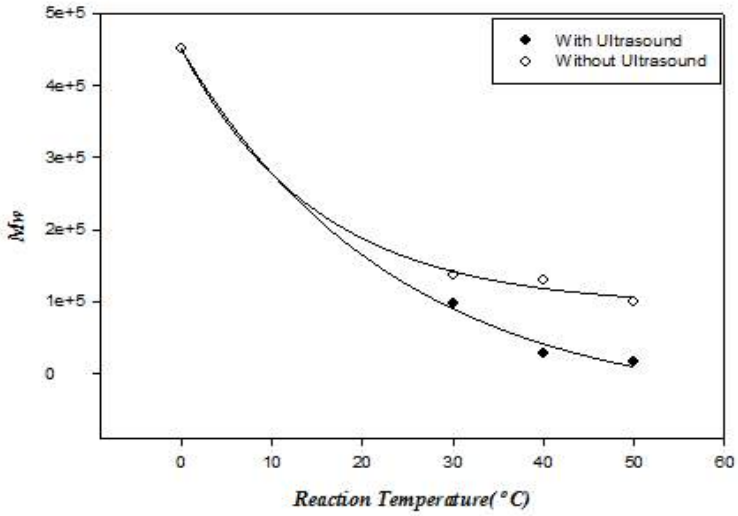


Fig.1.14 Effect of reaction temperature on the molecular weight of LMWSAs.

[2 wt% in reaction concentration and 3 wt% H_2O_2 for 0.5 hr with ultrasonic wave]

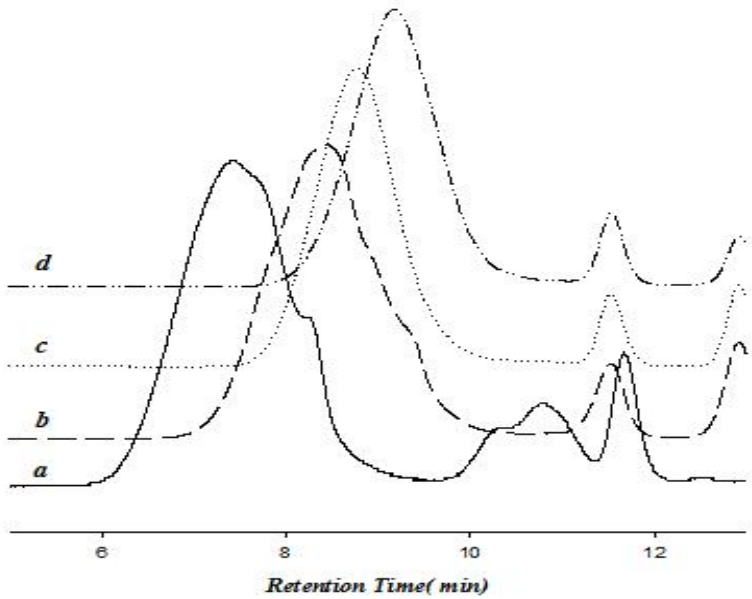


Fig. 1.15 GPC profile of (a) pristine sodium alginate and LMWSAs treated at (b) 30 ℃, (c) 40 ℃, (d) 50 ℃.

[2 wt% in reaction concentration and 3 wt% H_2O_2 for 0.5 hr with ultrasonic wave]

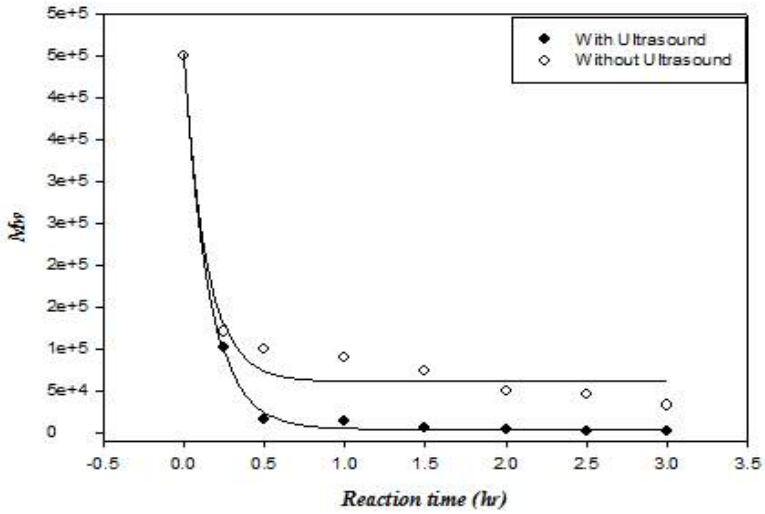


Fig.1.16 Effect of reaction time on the molecular weight of LMWSAs.

[2 wt% in reaction concentration and 3 wt% H_2O_2 at 50 ℃ with ultrasonic wave]

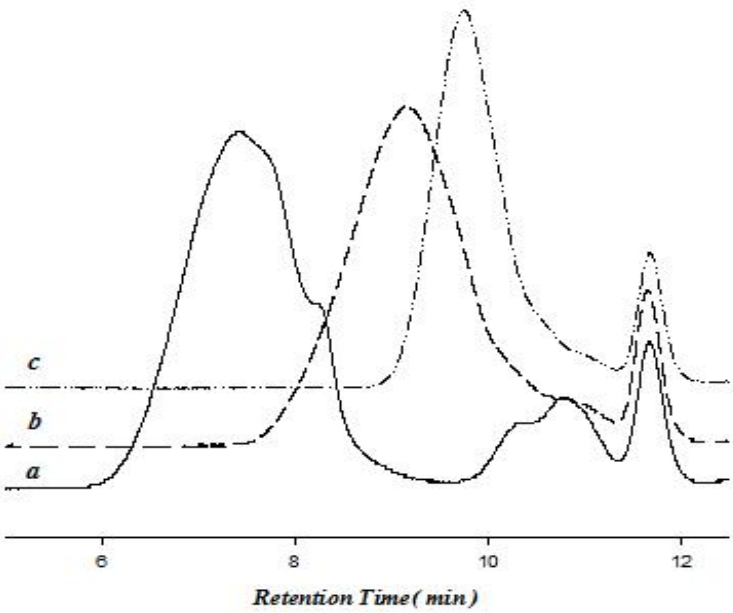


Fig.1.17 GPC profile of (a) pristine sodium alginate and LMWSAs treated for (b) 0.5 hr, (c) 3.0 hr.

[2 wt% in reaction concentration and 3 wt% H_2O_2 at 50 ℃ with ultrasonic wave]

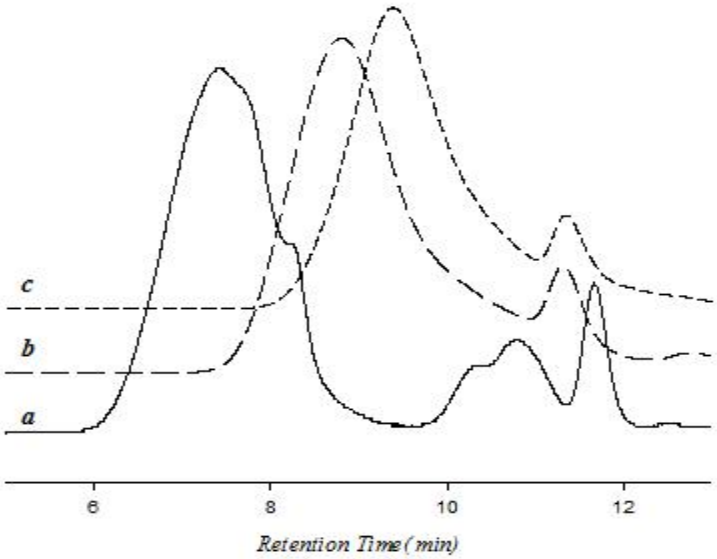


Fig. 1.18 GPC profile of (a) pristine sodium alginate and LMWSAs treated (b) without ultrasound wave, (c) with ultrasound wave.

[2 wt% in reaction concentration and 3 wt% H_2O_2 at 50 ℃ for 0.5 hr]

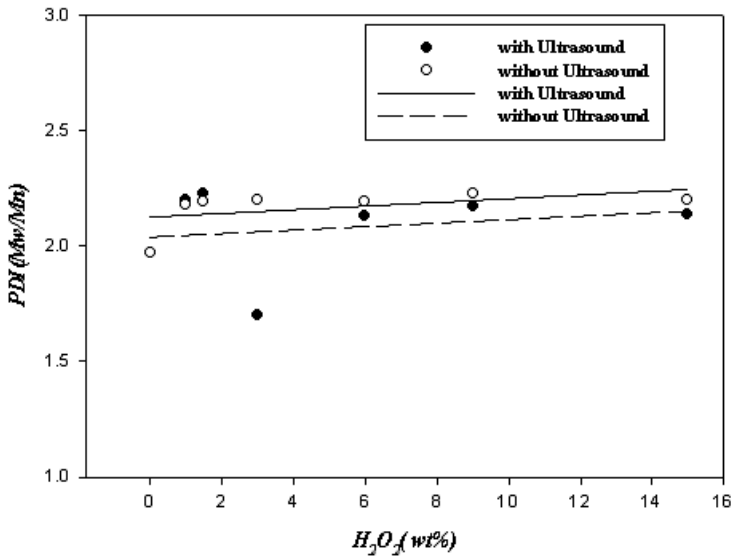


Fig.1.19 Effect of Ultrasound on polydispersity index of LMWSAs.

[2 wt% in reaction concentration at 50 ℃ for 0.5 hr].

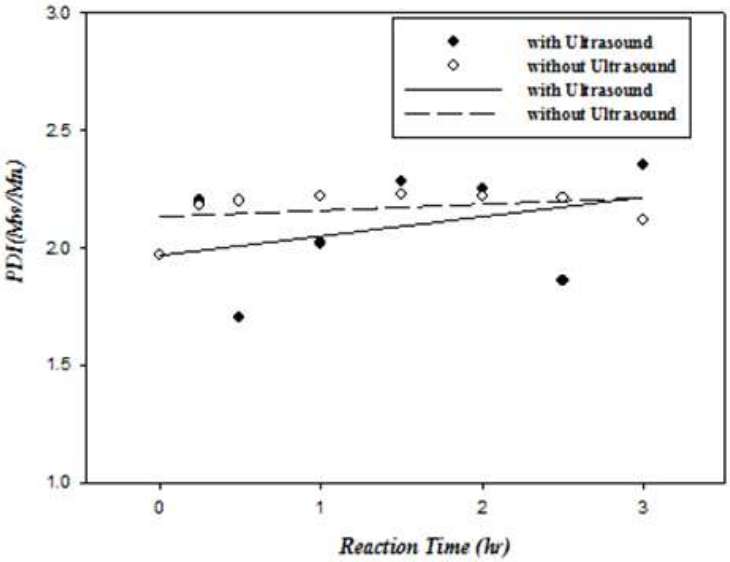


Fig.1.20 Effect of Ultra sound on polydispersity index of LMWSAs.
[2 wt% in reaction concentration and 3 wt% H_2O_2 at 50 ℃]

1.3 알지네이트의 분해 속도 상수와 분해율

과산화수소/초음파를 이용한 공정에서 초음파의 사용 여부가 반응 공정에 미치는 영향을 알아보기 위해 분해속도 상수를 계산하였다. 또한, 각각의 반응 조건에서 분해율(degradation rate)을 계산하여 최적의 반응 조건을 규명하였다.

먼저 분해속도 상수의 경우 다당류의 분해속도에 대해 제안된 여러 가지 속도 식 중 Chang의 식[88-90]을 사용하여 분해속도 상수를 구하였다.

$$= \frac{1}{M_0} + \frac{t}{m} \times k$$

여기서 M_0와 M_t는 각각 반응 전 pristine sodium alginate의 분자량과 t시간동안 반응 시킨 후 얻어진 저분자 알지네이트(LMWSA)의 분자량, m은 알지네이트 단량체의 분자량, 그리고 k는 분해 속도 상수(Degradation rate constant)이다. 분해 속

도 상수는 과산화수소/초음파를 사용한 반응의 경우 k = 0.5x10^{-3} min^{-1}이고, 초음파 사용 없이 과산화수소만 사용 시 k = 0.3x10^{-4} min^{-1}이다. 즉, 저분자화 반응에 초음파를 과산화수소와 함께 사용했을 시 과산화수소만 사용했을 경우에 비해 16배 정도 빠른 반응 속도를 보였다.

다음으로 각각의 반응 조건에서 반응 시간에 따른 분해율을 계산하였다. (Tsaih 그룹[88])

$$[1-(\frac{M_t}{M})]\times 100\ (\%)$$

여기서 R은 분해율(Degradation rate, %)이고 M_0와 M_t는 각각 반응 전 pristine sodium alginate 분자량과 t시간동안 반응 시킨 후 얻어진 저분자 알지네이트(LMWSA)의 분자량이다. 위 식으로부터 얻어진 결과 값은 Table 1.5와 Fig. 1.21에 각각 나타내었다. 분해율은 초음파를 사용 시 30분 만에 96.46 %에 이르렀고, 초음파 미사용 시 2시간 30분 이상 반응 시켰을 때 90.02 %를 보였다. 이는 초음파의 사용이 과산화수소를 이용한 알지네이트의 저분자화에 상당히 효과적임을 보여준다. 또한 과산화수소/초음파를 이용한 공정에서 30분 이상의 반응은 공정상 효과적이지 못함을 보여준다.

Table.1.5 Degradation rate of LMWSAs by H_2O_2 with ultrasound or without ultrasound.

	$R_{0,0.25}$*	$R_{0,0.5}$*	$R_{0,1.0}$*	$R_{0,1.5}$*	$R_{0,2.0}$*	$R_{0,2.5}$*	$R_{0,3.0}$*
With Ultrasound	77.49	96.46	97.11	98.66	99.44	99.60	99.68
Without Ultrasound	73.30	77.78	80.25	83.89	89.27	90.02	92.86

* : $R_{0,t}$: the degradation rate (R, %/h)between 0 and t in reaction time.

[2 wt% in alginate concentration at 50 ℃ H_2O_2=3 wt%]

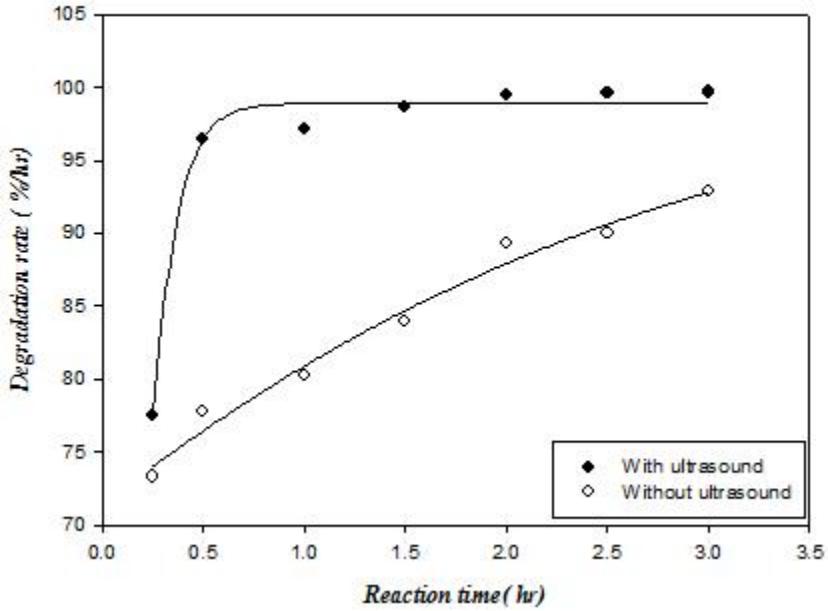
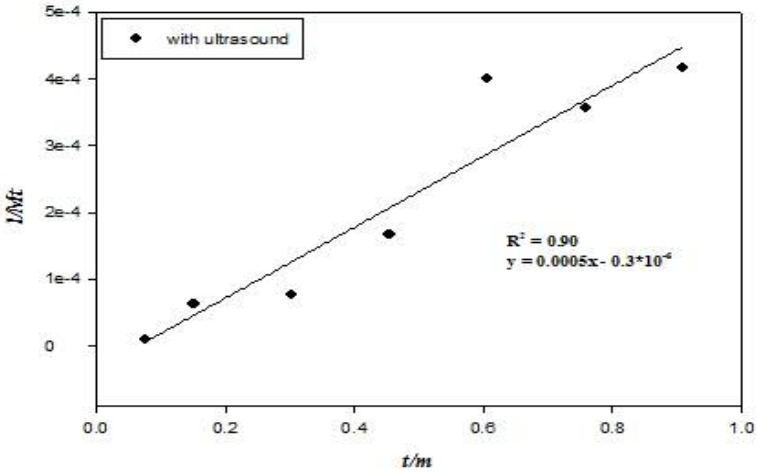
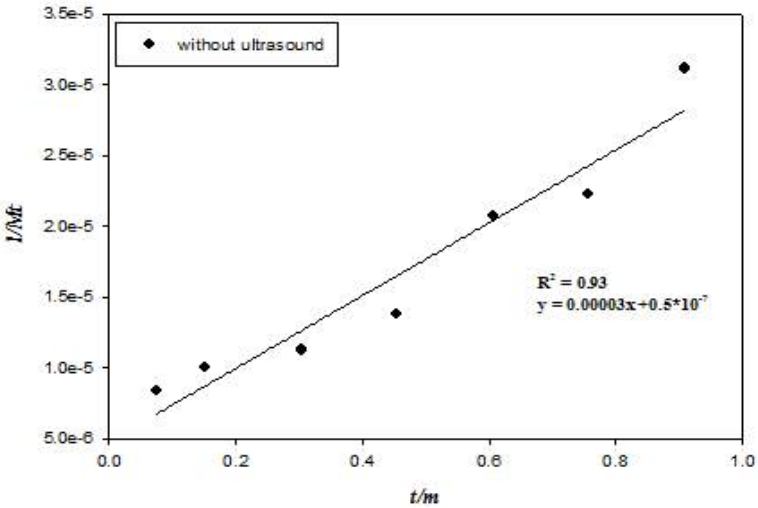


Fig.1.21 Degradation rate of LMWSAs by H_2O_2 with ultrasound or without ultrasound.

[2 wt% in reaction concentration and 3 wt% H_2O_2 at 50 ℃]



(a)



(b)

Fig.1.22 Degradation rate constant of LMWSAs by H_2O_2 (a) with ultrasound wave or (b) without ultrasound wave. [2 wt% in reaction concentration and 3 wt% H_2O_2 at 50 ℃]

2 전자빔 조사에 의한 저분자 알지네이트의 특성

2.1 저분자 알지네이트의 구조분석

전자빔 조사에 의해 제조된 저분자 알지네이트(LMWSA)의 화학적 구조를 확인하기 위해 FT-IR과 FT-NMR을 이용하여 그들의 구조를 분석하였다.

2.1.1 FT-IR

과산화수소 농도와 조사선량의 변화가 미치는 영향을 확인하기 위해 조사선량을 20 kGy로 일정하게 하고 과산화수소의 농도(0～4.5 wt%)를 달리하여, 그리고 과산화수소의 농도를 1.5 wt%로 일정하게 하고 전자빔 조사량(5～20 kGy)을 달리하여 제조한 저분자 알지네이트(LMWSA)에 대한 FT-IR spectra는 각각 Fig.1.23와 Fig.1.24 에 나타내었다. 카르복실산의 수산기(OH^-) (3,444 cm^{-1}), CH 신축진동 (2,927 cm^{-1}), C=O 신축진동 (1,612 cm^{-1}), C-O 신축진동 (1,415 cm^{-1}) 피크들은 화학적 방법에 의해 제조된 저분자 알지네이트와 거의 유사하거나 동일한 경향을 보여준다. 과산화수소의 농도가 증가하면서 1750 cm^{-1}(C=O)에서 새로운 피크가 관찰되는데, 이는 알지네이트가 저분자화 반응 중 생성된 carboxyl acid group에 의한 것으로 사료되고 앞서 언급한 과산화수소/초음파를 사용하여 저분자화 시킨 저분자 알지네이트에 대해서도 유사한 결과를 보여준다.

1,4-glycosidic bond(C-O-C)가 보여주는 1176～1088 cm^{-1}의 피크들의 intensity 역시 pristine sodium alginate에 비해 과산화수소의 농도 및 전자빔 조사선량의 증가에 따라 상당히 왜곡되어 보인다. 이는 과산화수소/초음파를 이용해 얻은 LMWSA와 비슷한 현상으로 과산화수소/전자빔을 이용해서 저분자화 시켰을 때도 같은 위치에서 단당의 결합이 분해되면서 저분자화가 진행됨을 설명하여준다.

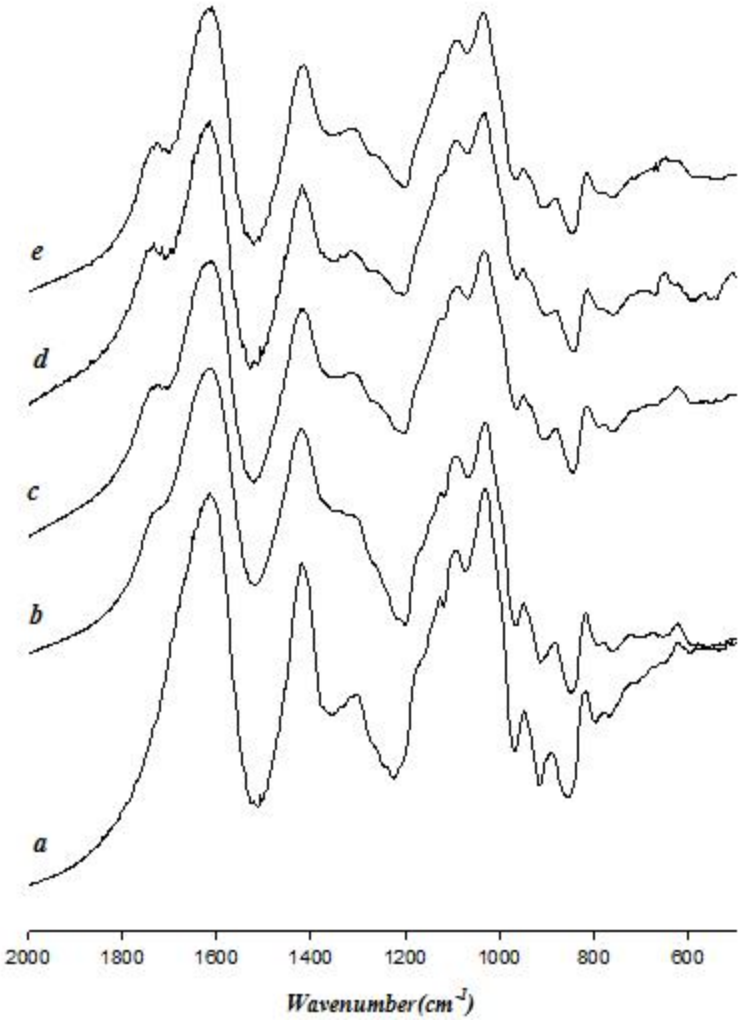


Fig. 1.23 FT-IR Spectra of (a) pristine sodium alginate and LMWSAs (b) 0 wt% H_2O_2, (c) 1.5 wt% H_2O_2, (d) 3 wt% H_2O_2, (e) 4.5 wt% H_2O_2. [2 wt% in reaction concentration, E-beam : 2.5 MeV, 20 kGy]

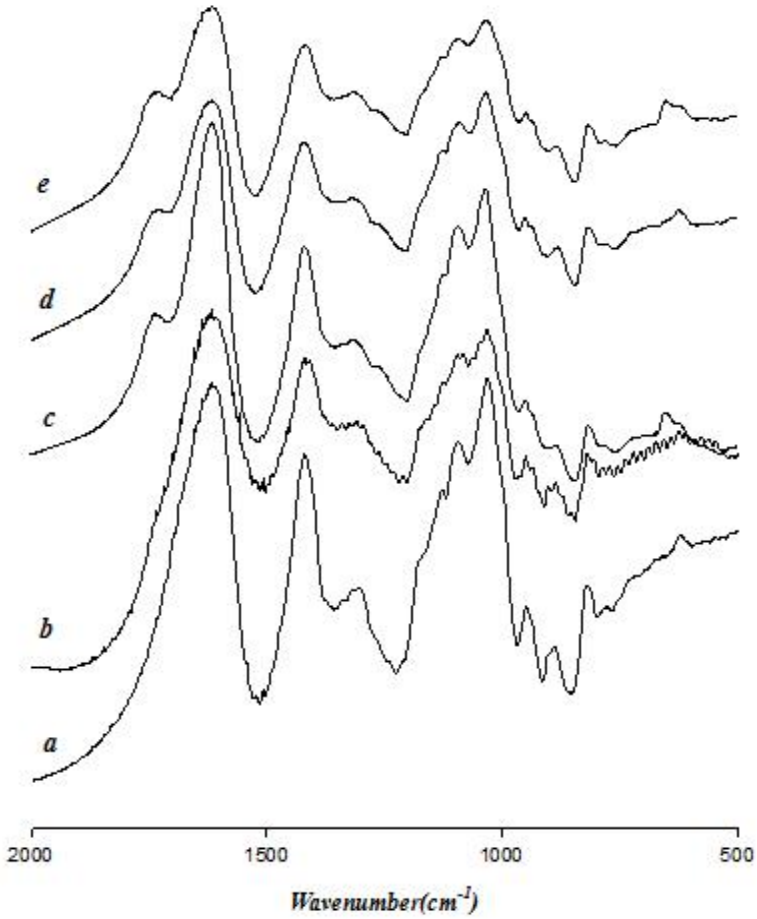


Fig. 1.24 FT-IR Spectra of (a) pristine sodium alginate and LMWSAs (b) 5 kGy, (c) 10 kGy, (d) 15 kGy, (e) 20 kGy.

[2 wt% in reaction concentration, E-beam : 2.5 MeV , H_2O_2=1.5 wt%]

2.1.2 FT-NMR

앞서 언급한 FT-IR 스펙트럼 분석 결과, 과산화수소/전자빔을 이용하여 제조한 저분자 알지네이트(LMWSA)의 경우 과산화수소/초음파를 사용하여 제조한 LMWSA와 상당히 유사한 메카니즘으로 저분자화가 진행된 것으로 보인다. 그러나 FT-NMR 스펙트럼에 대한 분석은 약간 다른 결과를 보여준다. 화학적 방법에 의해 얻어진 LMWSA의 경우 반응 시간이 증가하면서 말단 그룹의 변화에 의한 formate의 형성에 의한 피크(8.4~8.6 ppm)와 CH_3-, -CH_2- 그룹이 알지네이트의 주사슬에 존재하는 것으로 보여주는 피크(2.1 ppm, 2.3 ppm)가 보인(Fig.1.10) 반면에 전자빔 조사선량(5~20 kGy)를 달리하여 얻어진 LMWSA의 경우에는(Fig. 1.25, Fig. 1.26) 전자빔 에너지의 증가여부에 상관없이 8.4~8.6 ppm사이에서 보여지는 피크의 intensity가 아주 작고, 조사선량 증가에 따른 피크 intensity의 커지는 정도가 매우 작음을 확인 할 수 있었다. 이는 앞선 설명과 같이 말단그룹의 변화에 의해 생성된 formate로 사료된다. 하지만 CH_3-, -CH_2- 그룹에 의한 2.1 ppm 과 2.3 ppm 에서의 피크는 관찰되지 않았고, 3.5 ~5.5 ppm 범위의 다른 모든 피크들 역시 특별한 변화가 없음을 보인다. 또한, 과산화수소의 농도 증가(0~4.5 wt%)에 따른 ^{1}H-NMR 스펙트럼 (Fig. 1.27, Fig. 1.28)의 결과도 특별한 변화 없이 전자빔 조사선량의 증가에서 보여준 것과 동일한 결과만 관찰되었다. 이는 과산화수소/전자빔 방법이 과산화수소/초음파 방법보다 더욱 안전하게 즉, 화학적 구조가 거의 변화 없는 당의 형태를 그대로 유지한 저분자 알지네이트를 생산하는데 유리한 방법임을 보여준다.

^{13}C-NMR 스펙트럼(Fig. 1.29)은 176.97 ppm (G-6), 176.04 ppm(M-6), 102.25 ppm(M-1), 101.54 ppm(G-1), 80.81 ppm(G-4), 78.85 ppm(M-4), 76.69 ppm(M-5), 72.22 ppm(M-3), 70.78 ppm(M-2), 69.90 ppm(G-3), 68.18 ppm(G-5), 65.90 ppm(G-2)에서 피이크를 확인하였다. 조사선량의 증가에 따른 특별한 변화를 관찰할 수 없었고 각 피이크의 위치는 문헌의 값과 일치하였다. 감마선을 조사하여 저분자 알지네이트를 제조한 Lee 그룹[60]은 감마선의 조사선량을 증가시켰을 때 ^{13}C-NMR 스펙트럼에서 특별하게 생성되거나 혹은 없어진 피크가 발견되지 않음을 보고하였고 이는 본 연구 결과를 뒷받침하여 준다.

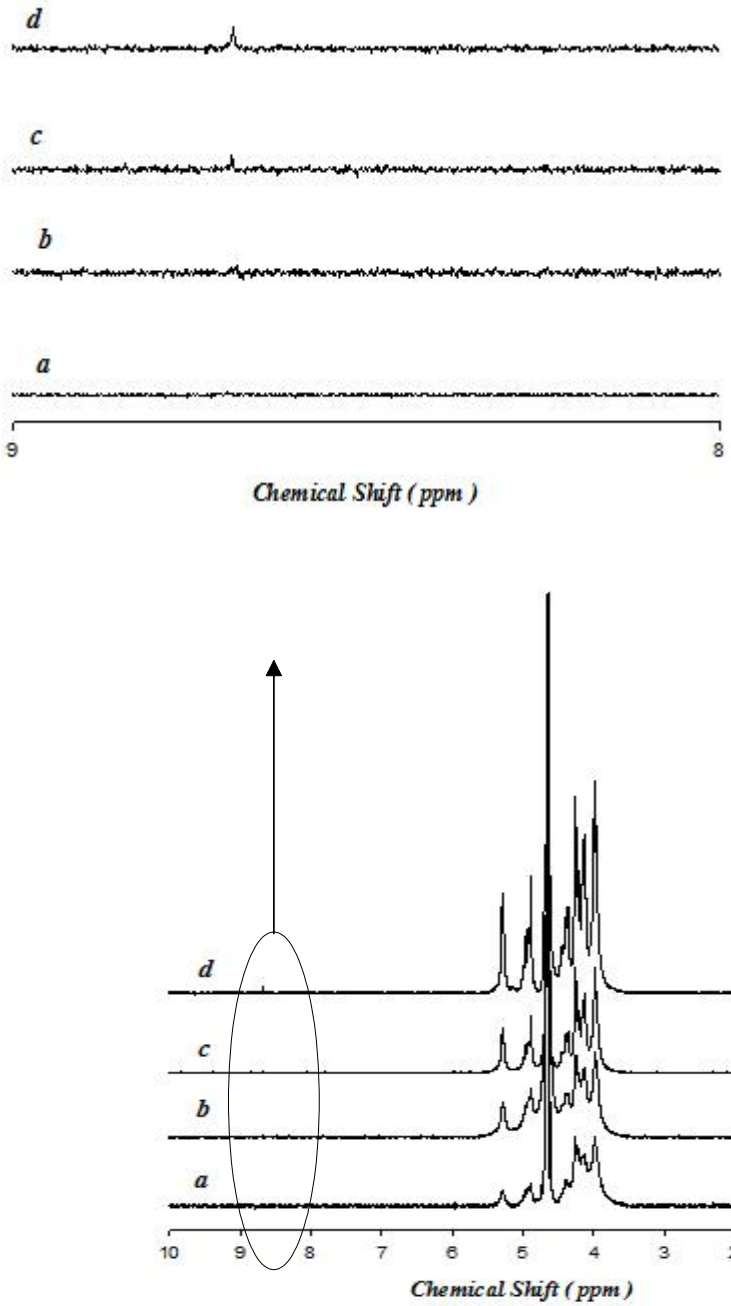
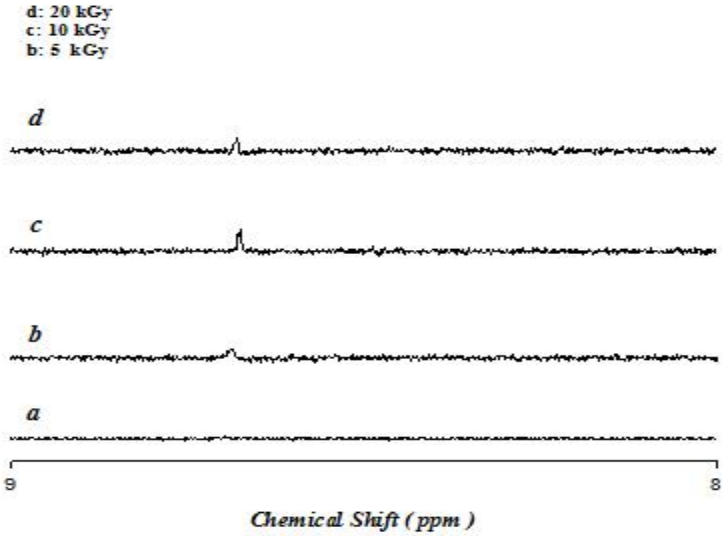


Fig. 1.25 ^{1}H-NMR Spectra of (a) pristine sodium alginate and LMWSAs (b) 5 kGy, (c) 10 kGy, (d) 20 kGy.

[2 wt% in reaction concentration, E-beam : 1.0 MeV, H_2O_2=2.0 wt%]



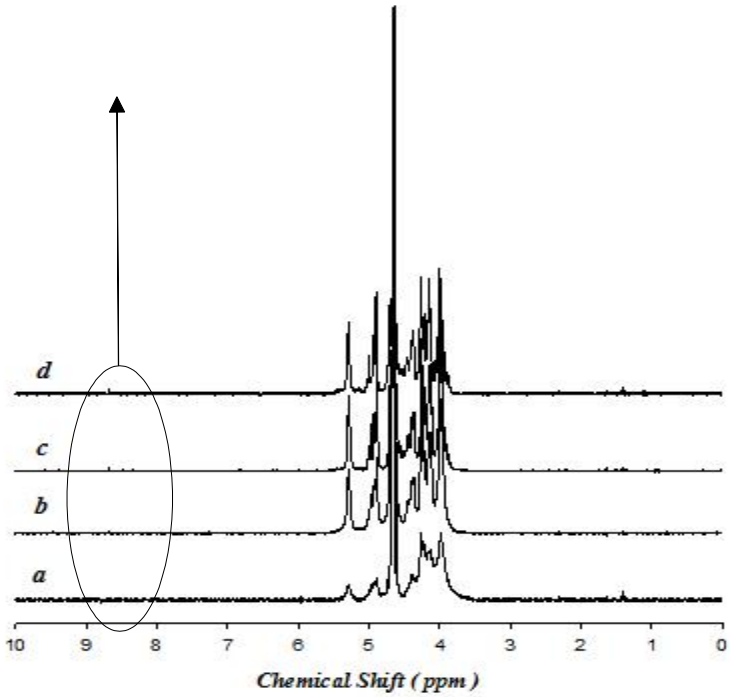


Fig. 1.26 ^{1}H-NMR Spectra of (a) pristine sodium alginate and LMWSAs (b) 5 kGy, (c) 10 kGy, (d) 20 kGy.

[2 wt% in reaction concentration, E-beam : 2.5 MeV, H_2O_2=2.0 wt%]

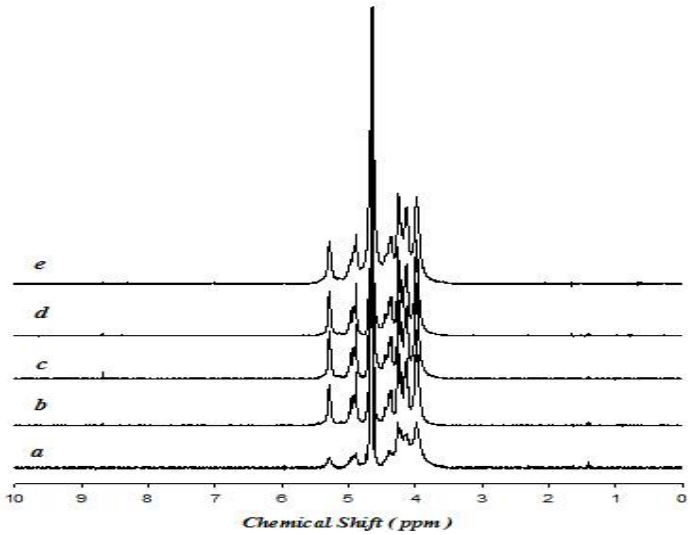


Fig. 1.27 ^{1}H-NMR Spectra of (a) pristine sodium alginate and LMWSAs (b) 0 wt% H_2O_2, (c) 1.5 wt% H_2O_2, (d) 3 wt% H_2O_2, (e) 4.5 wt% H_2O_2. [2 wt% in reaction concentration, E-beam : 1.0 MeV, 20 kGy]

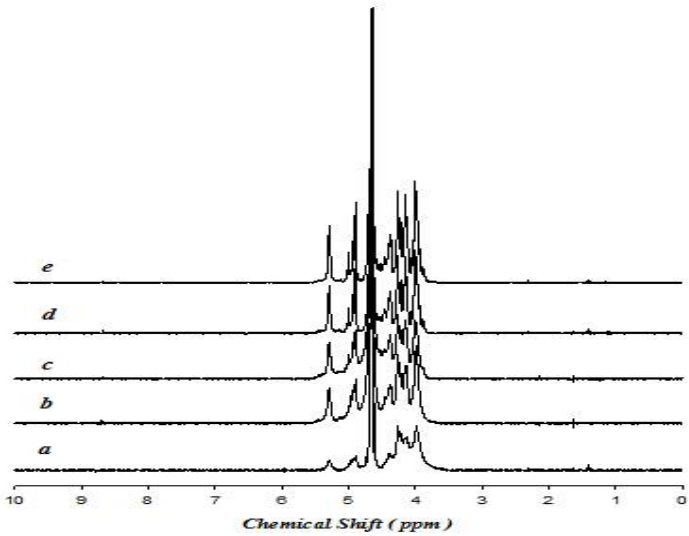


Fig. 1.28 ^{1}H-NMR Spectra of (a) pristine sodium alginate and LMWSAs (b) 0 wt% H_2O_2, (c) 1.5 wt% H_2O_2, (d) 3 wt% H_2O_2, (e) 4.5 wt% H_2O_2. [2 wt% in reaction concentration, E-beam : 2.5 MeV, 20 kGy]

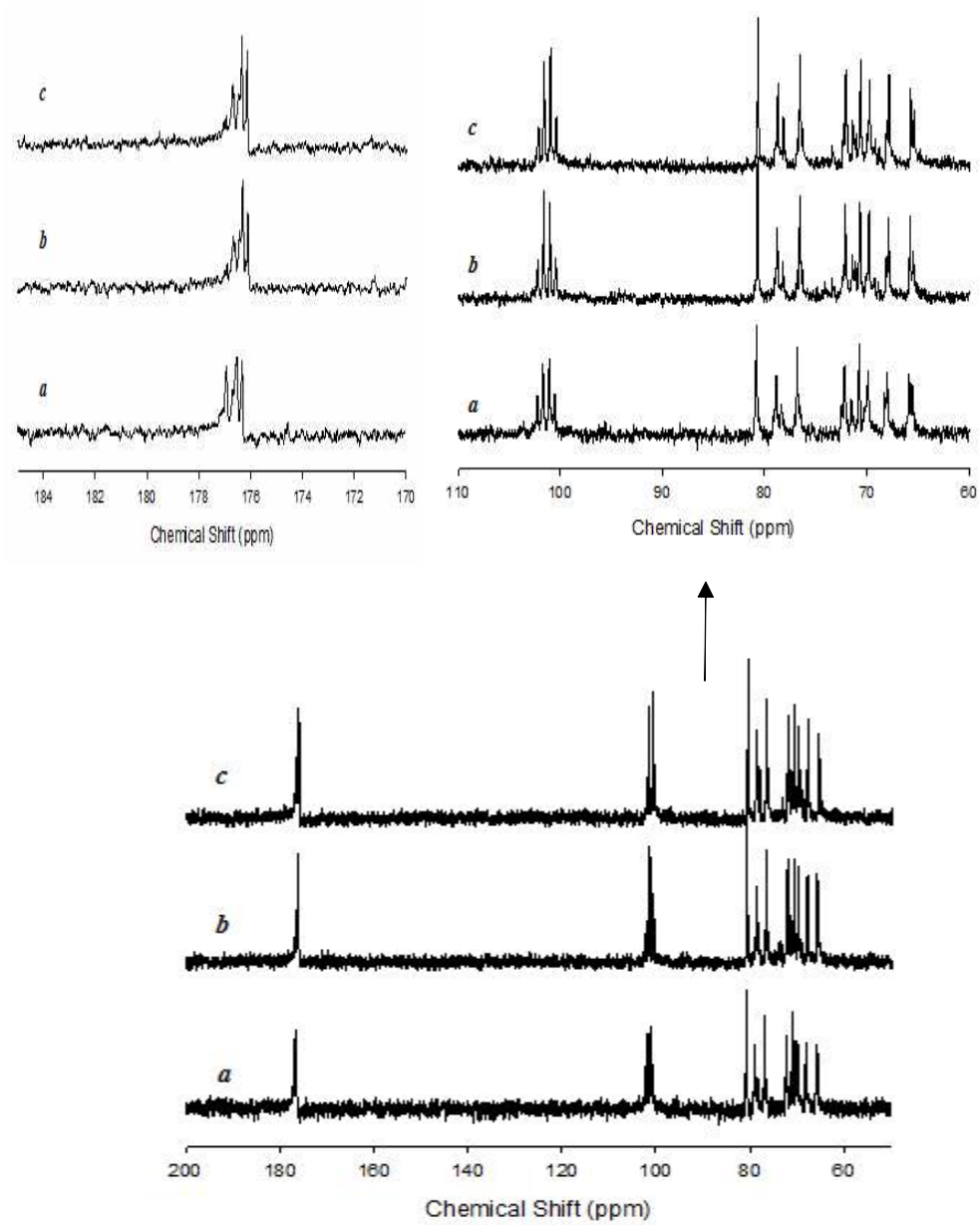


Fig. 1.29 ^{13}C-NMR Spectra of (a) pristine sodium alginate and LMWSAs (b)5 kGy (c) 20 kGy.

[2 wt% in reaction concentration, E-beam : 2.5 MeV, H_2O_2=2.0 wt%]

2.2 저분자 알지네이트의 점도 및 분자량

앞서 언급한 알지네이트의 점도 및 분자량 측정 방법과 동일한 방법으로 전자빔 조사에 의해 제조된 저분자 알지네이트의 분자량 및 점도를 측정하였다. 과산화수소 농도, 조사선량 그리고 pristine sodium alginate농도에 따른 분자량의 변화를 조사하였으며 분해수율 (Gs, degradation yield; mol/J)값을 계산[81]하여 분해 효율이 가장 좋은 분해 조건을 검토하였다.

-과산화수소 농도의 영향

과산화수소의 농도가 저분자 알지네이트(LMWSA)의 분자량과 점도에 미치는 영향을 알아보기 위해 다른 반응 조건은 동일하게 하고 과산화수소의 농도를 0~4.5 wt%로 변화 시키면서 과산화수소의 농도가 전자빔 조사에 의한 저분자화 시 미치는 영향을 확인하여 보았다. Fig. 1.30과 Fig. 1.33는 1 MeV에서 분자량이 450 kDa에서 28.2 kDa까지, 2.5 MeV에서는 17.6 kDa까지 줄어듬을 보여준다. 과산화수소가 전혀 함유하지 않는 실험 조건에서도 분자량이 상당히 저하되는 것을 확인 할 수 있다. 이는 전자빔의 영향으로 과산화수소가 전혀 없어도 물의 분해에 의해 생성된 하이드록실 라디칼(·OH)이 pristine sodium alginate를 저분자화 시켰기 때문이다. 즉 전자빔 이용과 함께 과산화수소가 함유된 실험 조건에서 분자량 감소율이 더 큼을 확인 할 수 있었다. 또한, 조사선량에 따라 조금의 차이는 있지만 과산화수소의 농도가 1.5 wt%를 넘어가면 오히려 분자량이 증가하는 경향을 보인다(Fig. 1.30, Fig. 1.33). 이는 과 생성된 하이드록실 라디칼이 coupling 반응을 발생시켜 효율이 저하되고, 주사슬의 말단에 생성된 라디칼이 다른 주 사슬에 존재하는 라디칼과 결합하여 오히려 분자량이 증가한 것으로 사료된다. PDI (polydispersity index)값은 과산화수소 농도에 따라 크게 변화를 보이지는 않았고 약 2의 값으로 상당히 균일하게 반응이 이뤄짐을 확인 할 수 있었다.

- 조사선량의 영향

전자빔 조사선량이 알지네이트의 저분자화에 미치는 영향을 확인하기 위해 다른 공정 조건은 동일하게 하고 조사선량만 2.5 kGy ~ 20 kGy로 증가시킨 결과를 Fig 1.31과 Fig 1.34에 나타내었다. 1.0 MeV 10 kGy에서 오히려 분자량이 약간 증가하는 결과를 보이나 에너지 조건(1.0 MeV, 2.5 MeV)에 관계없이 조사선량의 증가에 따라 분자량이 저하되는 경향을 확인 할 수 있었다. 조사선량의 증가는 같은 반응 조건에서 하이드록실 라디칼의 생성이 더 많아 짐을 의미하고 전체적으로 분자량은 조사선량의 증가와 비례하여 감소하였다.

- Pristine sodium alginate 농도의 영향

pristine sodium alginate의 농도가 분자량 저하에 미치는 영향을 확인하기 위해 알지네이트 용액의 최종 농도를 0.5 wt%부터 2.0 wt%까지 변화시키면서 저분자화를 진행하였다.(Fig. 1.32, Fig. 1.35) 1.0 MeV, 2.5 MeV 두 경우 모두 고농도일 때보다 저농도에서 분자량이 더 작아지는 것을 확인 할 수 있다. 이는 고분자 사슬의 운동성이 활발해져서 과산화수소 혹은 물에서 생성된 하이드록실 라디칼과 더 쉽게 반응이 일어나기 때문이라 사료된다. 이는 과산화수소/초음파를 사용한 저분자화 반응에서와 같이 초음파효과의 결과와 유사하다. 즉, 알지네이트 용액의 농도가 낮을 때 사슬의 운동성이 좋아져 저분자화 반응이 활발하게 일어나고 분자량이 저하되는 결과를 가져온다고 사료된다. 또한 고분자 용액의 농도가 낮아짐에 따라 PDI=2이하로 떨어짐을 확인할 수 있는데 이는 고농도에서 보다 저농도에서 반응이 균일하게 이뤄지기 때문이다.

2.3 알지네이트의 분해효율

과산화수소/전자빔을 이용한 공정에서 전자빔 조사선량에 따른 분해 효율을 확인하기 위해 Janik의 식[91]으로 분해효율을 계산하였다.

$$= \frac{2 \times c}{D \times d}\left(\frac{1}{M} - \frac{1}{M_{wo}}\right)$$

여기서, c는 각 실험 조건에서의 pristine sodium alginate의 농도(g/dm^3), d는 고분자 용액의 밀도(kg/dm^3), D는 조사선량(Gy) 그리고 M_w와 M_{wo}는 각각 전자빔 조사 전후의 분자량이다.

1.0 MeV에서 각각의 과산화수소 농도에 대하여 전자빔 조사량을 달리한 결과를 보면(Fig. 1.36) 과산화수소가 없는 조건에서의 분해효율은 과산화수소가 존재하는 조건에 비해서 낮음을 확인 할 수 있었다. 이는 전자빔과 함께 과산화수소를 사용할 경우 pristine sodium alginate의 저분자화가 더욱 효율적이라는 것을 의미한다. 과산화수소의 사용은 하이드록실 라디칼(·OH)의 발생량을 높이는 역할을 하고 전체적으로 과산화수소가 없는 경우보다 분해 효율이 높아지는 것으로 사료된다. 다만 과산화수소 양의 증가에 따라 분해 효율이 비례해서 증가하지는 않는데 이는 과 생성된 하이드록실 라디칼(·OH)의 영향으로 과산화수소/초음파에서 보여준 결과와 비슷한 경향을 보인다. 조사선량이 증가함에 따라 전체적으로 분해 효율이 감소하는 경향을 보이는데(Fig. 1.36, Fig. 1.37) 이는 조사선량의 증가는 알지네이트의 분자량 감소에 비효율적임을 의미한다. 따라서, 과산화수소/전자빔을 이용한 저분자화 공정 시 조사선량을 무작정 높이는 것은 효율성이 떨어진다고 결론지을 수 있다. Fig 1.37은 고분자 알지네이트의 농도에 따른 분해 효율을 보여주며 농도가 낮을수록 분해 효율이 낮아지는 결과를 얻었다.

2.5 MeV의 경우에도 위에서 언급한 1.0 MeV의 경우와 같이 유사한 경향의 분해 효율을 보인다. 단, 전자빔 에너지 2.5 MeV와 1.0 MeV를 비교하면 더 높은 에너지에서 분해 효율이 전체적으로 높게 나타났다.

Table. 1.6 Molecular weight and viscosity of low molecular weight sodium alginate using H_2O_2 with e-beam(1 MeV)

Sample	Mw	Mn	P.D.I.	ηa	Gs^b (mol/J) x 10^{-5}
HMWSA*	450,200	228,500	1.97	6.44	
A(2.0)-HP0.0-2.5 kGy	95,900	43,300	2.21	2.60	0.948
A(2.0)-HP0.0-5.0 kGy	58,700	26,200	2.23	1.90	0.855
A(2.0)-HP0.0-10 kGy	77,300	34,600	2.23	2.27	0.309
A(2.0)-HP0.0-15 kGy	55,900	25,000	2.23	1.84	0.302
A(2.0)-HP0.0-20 kGy	38,800	17,800	2.18	1.44	0.339
A(2.0)-HP1.5-2.5 kGy	51,300	23,000	2.22	1.74	1.991
A(2.0)-HP1.5-5.0 kGy	53,100	23,800	2.23	1.78	0.958
A(2.0)-HP1.5-10 kGy	46,200	20,800	2.21	1.62	1.561
A(2.0)-HP1.5-15 kGy	30,300	14,400	2.10	1.21	0.592
A(2.0)-HP1.5-20 kGy	30,600	14,500	2.10	1.22	0.439
A(2.0)-HP3.0-2.5 kGy	62,500	27,900	2.23	1.98	1.591
A(2.0)-HP3.0-5.0 kGy	36,100	16,700	2.16	1.37	1.468
A(2.0)-HP3.0-10 kGy	38,400	17,600	2.17	1.43	0.686
A(2.0)-HP3.0-15 kGy	42,800	19,400	2.20	1.54	0.406
A(2.0)-HP3.0-20 kGy	37,700	17,300	2.17	1.41	0.351
A(2.0)-HP4.5-2.5 kGy	92,300	41,600	2.21	2.54	0.994
A(2.0)-HP4.5-5.0 kGy	34,200	15,900	2.14	1.32	1.556
A(2.0)-HP4.5-10 kGy	44,100	19,900	2.20	1.57	0.591
A(2.0)-HP4.5-15 kGy	42,400	19,200	2.20	1.53	0.441
A(2.0)-HP4.5-20 kGy	28,200	13,600	2.06	1.15	0.479

Table. 1.7 Continued

Sample	Mw	Mn	P.D.I.	ηa	Gs^b (mol/J) x 10^{-5}
A(1.5)-HP3.0-2.5kGy	45,300	20,400	2.21	1.60	1.717
A(1.5)-HP3.0-5.0 kGy	42,800	19,400	2.20	1.54	0.914
A(1.5)-HP3.0-10 kGy	31,700	14,900	2.11	1.25	0.634
A(1.5)-HP3.0-15 kGy	21,700	11,200	1.92	0.95	0.632
A(1.5)-HP3.0-20 kGy	22,000	11,300	1.93	0.96	0.467
A(1.0)-HP3.0-2.5kGy	36,900	17,000	2.16	1.39	1.435
A(1.0)-HP3.0-5.0kGy	27,200	13,200	2.05	1.12	0.997
A(1.0)-HP3.0-10 kGy	20,200	10,700	1.88	0.90	0.681
A(1.0)-HP3.0-15 kGy	19,900	10,600	1.87	0.89	0.461
A(1.0)-HP3.0-20 kGy	17,900	9,900	1.79	0.82	0.387
A(0.5)-HP3.0-2.5kGy	30,300	14,400	2.10	1.21	0.888
A(0.5)-HP3.0-5 .0kGy	28,500	13,700	2.07	1.16	0.473
A(0.5)-HP3.0-10 kGy	23,900	12,000	1.98	1.02	0.285
A(0.5)-HP3.0-15 kGy	21,100	11,000	1.90	0.93	0.217
A(0.5)-HP3.0-20 kGy	18,100	10,000	1.80	0.83	0.190

a : Inherent viscosity of the solution was measured at a concentration of 0.5 g/dL in distilled water at 35 ℃

b: Degradation efficiency ; $= \frac{2 \times c}{D \times d}\left(\frac{1}{M} - \frac{1}{M_{wo}}\right)$

Table. 1.8 Molecular weight and viscosity of low molecular weight sodium alginate using H_2O_2 with e-beam(2.5 MeV)

Sample	Mw	Mn	P.D.I.	ηa	Gs^b (mol/J) x 10^{-5}
HMWSA*	450,200	228,500	1.97	6.44	
A(2.0)-HP0.0-2.5 kGy	57,700	25,800	2.23	1.88	1.743
A(2.0)-HP0.0-5.0 kGy	35,700	16,579	2.15	1.36	1.485
A(2.0)-HP0.0-10 kGy	26,200	12,897	2.03	1.09	1.037
A(2.0)-HP0.0-15 kGy	22,000	11,397	1.93	0.96	0.830
A(2.0)-HP0.0-20 kGy	19,300	10,400	1.85	0.87	0.714
A(2.0)-HP1.5-2.5 kGy	37,700	17,300	2.17	1.41	2.807
A(2.0)-HP1.5-5.0 kGy	23,300	11,800	1.96	1.00	2.349
A(2.0)-HP1.5-10 kGy	17,600	9,800	1.78	0.81	1.574
A(2.0)-HP1.5-15 kGy	16,500	9,500	1.73	0.77	1.124
A(2.0)-HP1.5-20 kGy	15,600	9,200	1.69	0.74	0.889
A(2.0)-HP3.0-2.5 kGy	44,100	19,900	2.20	1.57	2.362
A(2.0)-HP3.0-5.0 kGy	27,500	13,300	2.05	1.13	1.967
A(2.0)-HP3.0-10 kGy	17,900	9,900	1.79	0.82	1.549
A(2.0)-HP3.0-15 kGy	17,000	9,700	1.75	0.79	1.086
A(2.0)-HP3.0-20 kGy	15,900	9,300	1.70	0.75	0.873
A(2.0)-HP4.5-2.5 kGy	50,900	22,800	2.22	1.73	2.010
A(2.0)-HP4.5-5.0 kGy	32,400	15,200	2.12	1.27	1.651
A(2.0)-HP4.5-10 kGy	25,800	12,700	2.02	1.08	1.051
A(2.0)-HP4.5-15 kGy	17,300	9,700	1.77	0.80	1.067
A(2.0)-HP4.5-20 kGy	16,200	9,400	1.72	0.76	0.858

Table. 1.9 Continued

Sample	Mw	Mn	P.D.I.	ηa	Gs^b (mol/J) x 10^{-5}
A(1.5)-HP3.0-2.5kGy	450,200	228,500	1.97	6.44	
A(1.5)-HP3.0-5.0 kGy	57,700	25,800	2.23	1.88	1.743
A(1.5)-HP3.0-10 kGy	35,700	16,579	2.15	1.36	1.485
A(1.5)-HP3.0-15 kGy	26,200	12,897	2.03	1.09	1.037
A(1.5)-HP3.0-20 kGy	22,000	11,397	1.93	0.96	0.830
A(1.0)-HP3.0-2.5kGy	19,300	10,400	1.85	0.87	0.714
A(1.0)-HP3.0-5.0kGy	37,700	17,300	2.17	1.41	2.807
A(1.0)-HP3.0-10 kGy	23,300	11,800	1.96	1.00	2.349
A(1.0)-HP3.0-15 kGy	17,600	9,800	1.78	0.81	1.574
A(1.0)-HP3.0-20 kGy	16,500	9,500	1.73	0.77	1.124
A(0.5)-HP3.0-2.5kGy	15,600	9,200	1.69	0.74	0.889
A(0.5)-HP3.0-5 .0kGy	44,100	19,900	2.20	1.57	2.362
A(0.5)-HP3.0-10 kGy	27,500	13,300	2.05	1.13	1.967
A(0.5)-HP3.0-15 kGy	17,900	9,900	1.79	0.82	1.549
A(0.5)-HP3.0-20 kGy	17,000	9,700	1.75	0.79	1.086

a : Inherent viscosity of the solution was measured at a concentration of 0.5 g/dL in distilled water at 35 ℃

b: Degradation efficiency ; $= \frac{2 \times c}{D \times d}\left(\frac{1}{M} - \frac{1}{M_{wo}}\right)$

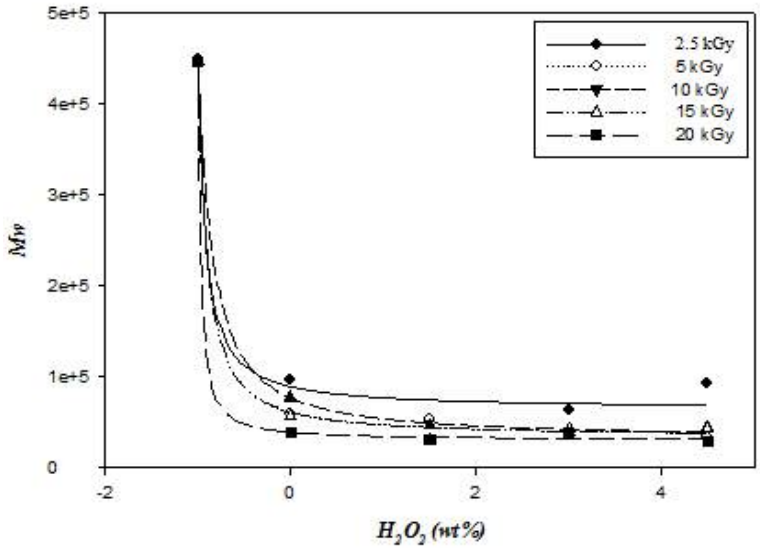


Fig. 1.30 Effect of hydrogen peroxide concentration on the molecular weight of LMWSAs. [2 wt% in reaction concentration, E-beam : 1.0 MeV]

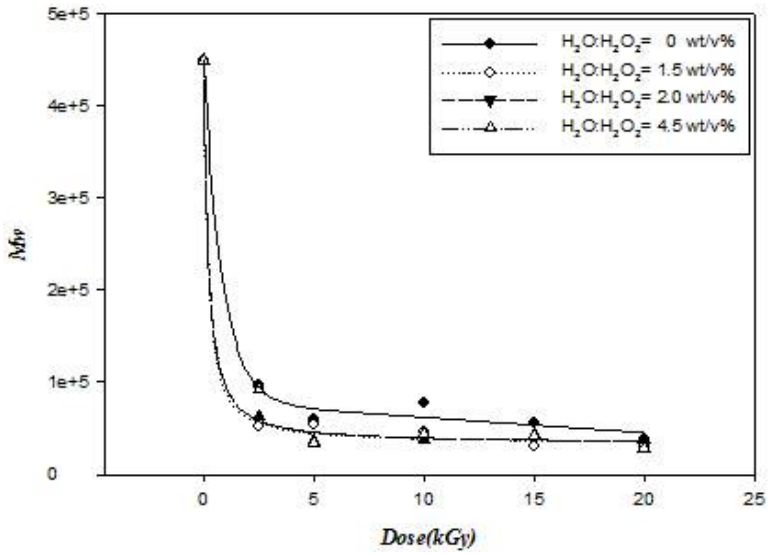


Fig.1.31 Effect of Dose on the molecular weight of LMWSAs. [2 wt% in reaction concentration, E-beam : 1.0 MeV]

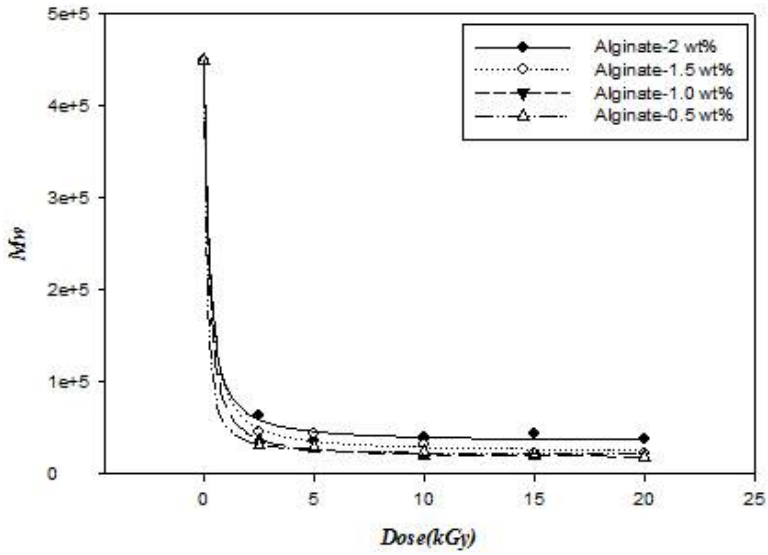


Fig.1.32 Effect of Alginate concentration on the molecular weight of LMWSAs.

[H_2O_2=2.0 wt%, E-beam : 1.0 MeV]

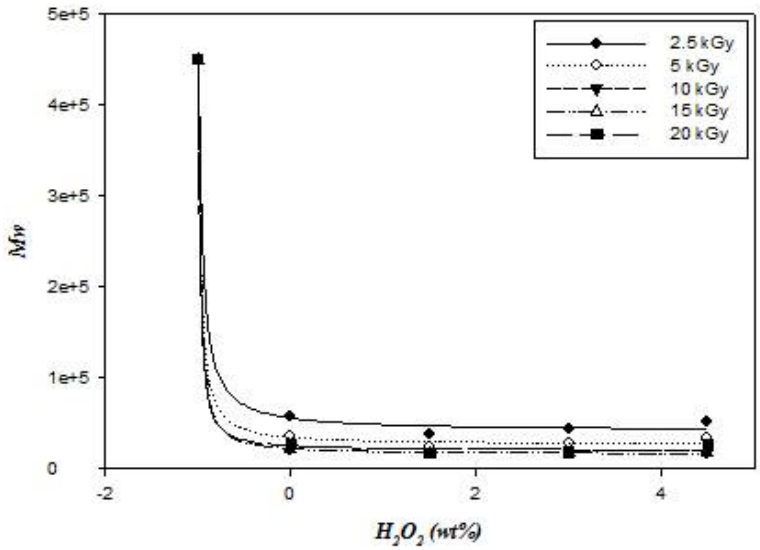


Fig.1.33 Effect of hydrogen peroxide concentration on the molecular weight of LMWSAs.

[2 wt% in reaction concentration, E-beam : 2.5 MeV]

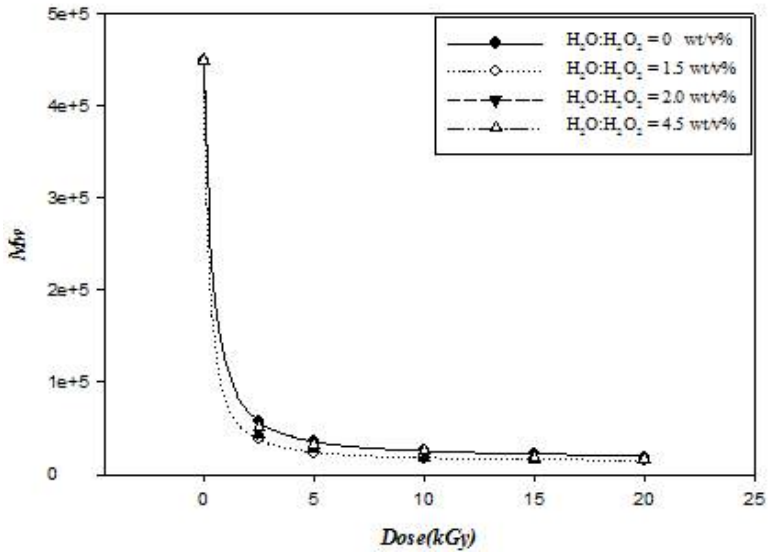


Fig.1.34 Effect of Dose on the molecular weight of LMWSAs.

[2 wt% in reaction concentration, E-beam : 2.5 MeV]

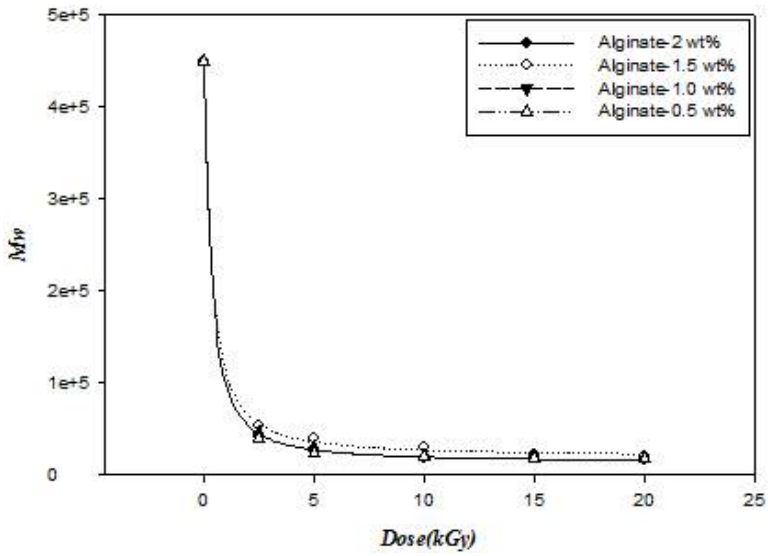


Fig.1.35 Effect of Alginate concentration on the molecular weight of LMWSAs.

[H_2O_2=2.0 wt%, E-beam : 2.5 MeV]

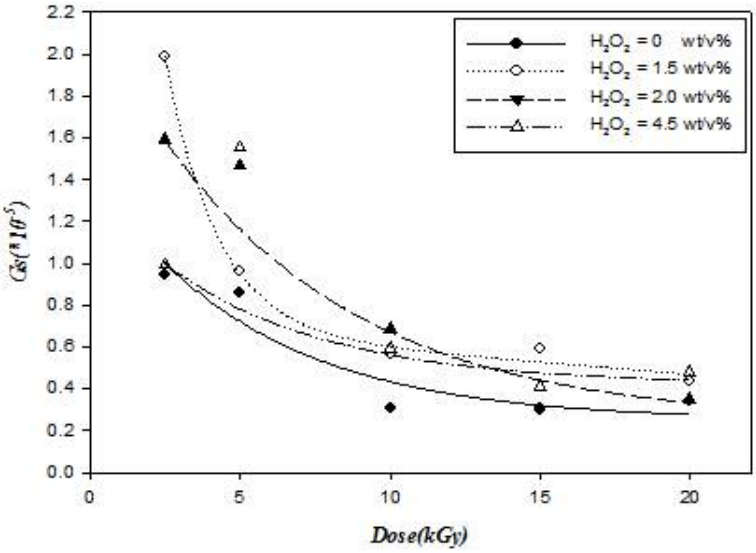


Fig. 1.36 Effect of Dose on the degradation yield of LMWSAs.

[2 wt% in reaction concentration, E-beam : 1.0 MeV]

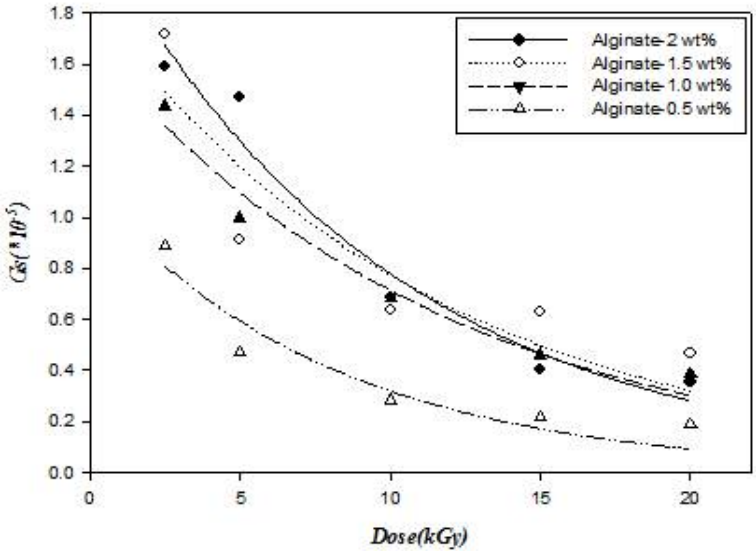


Fig. 1.37 Effect of Alginate concentration on the molecular weight of LMWSAs.

[H_2O_2=2.0 wt%, E-beam : 1.0 MeV]

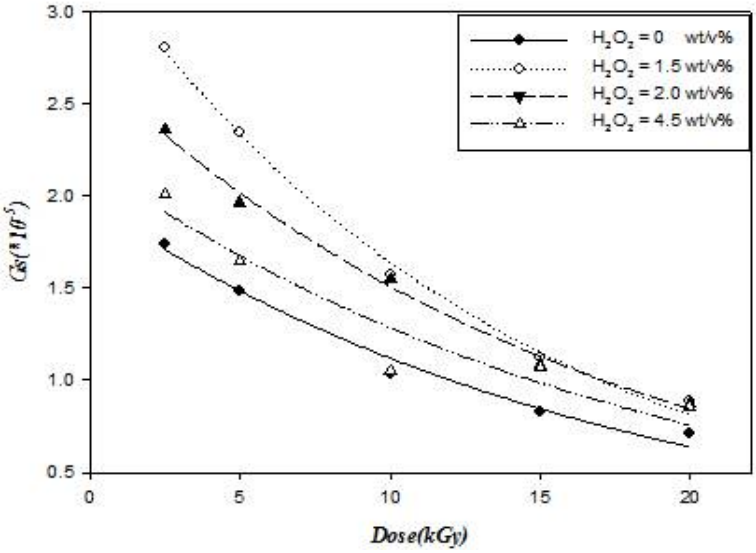


Fig. 1.38 Effect of Dose on the degradation yield of LMWSAs.

[2 wt% in reaction concentration, E-beam : 2.5 MeV]

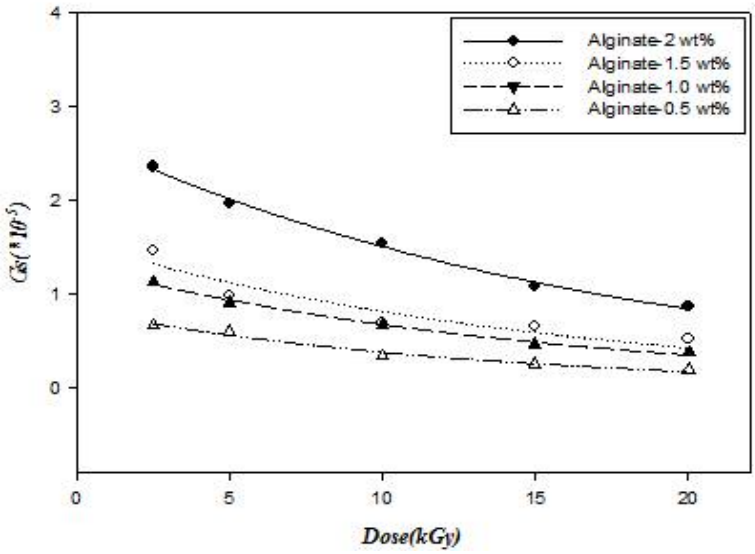


Fig. 1.39 Effect of Alginate concentration on the molecular weight of LMWSAs.

[H_2O_2= 2.0 wt%, E-beam : 2.5 MeV]

제 4 절 결 론

4.1 화학적 처리에 의해 제조된 저분자 알지네이트

미역에서 추출되어진 기능성 다당류인 고분자 알지네이트를 과산화수소와 초음파를 이용해 저분자화 시켜 얻은 저분자 알지네이트를 FT-IR과 FT-NMR을 통해 구조분석하고 Multi angle lighter scattering이 부착된 GPC를 통해 얻은 결론은 다음과 같다.

1. 과산화수소와 초음파만을 이용한 단순공정으로 손쉽게 저분자 알지네이트를 얻는 게 가능하였고 평균 62 %의 높은 회수율로 기존의 상용화된 공정에 비해 대량생산이 가능하였다.

2. 얻어진 저분자 알지네이트를 FT-NMR과 FT-IR을 통해 구조를 확인한 결과 저분자 알지네이트의 말단 그룹에 formate의 형성을 확인 할 수 있었다.

4. 분해율은 초음파를 사용 시 30분 만에 96 %에 이르렀고, 초음파 미사용 시에는 2시간 30분 이상 반응 시켰을 때 90 %를 보였다.

5. 과산화수소에 의한 저분자화 반응에서 초음파의 사용은 반응속도와 분해율에서 매우 효과적이었다.

6. 저분자화 반응의 최적조건은 과산화수소의 농도는 3.0 wt%, 반응온도는 50 ℃, 반응시간은 0.5 hr 이었다.

4.2 전자빔 조사에 의해 제조된 저분자 알지네이트

미역에서 추출되어진 기능성 다당류인 고분자 알지네이트를 과산화수소와 전자빔을 이용해 저분자화 시켜 얻은 저분자 알지네이트를 FT-IR과 FT-NMR을 통해 구조분석하고 Multi angle lighter scattering이 부착된 GPC를 통해 얻은 결론을 과산화수소/초음파에 의해 얻은 결론과 비교 분석한 결론은 다음과 같다.

1. Conveyer belt를 이용한 전자빔 조사(irradiation)방법은 짧은 조사 시간과 반자동화된 공정으로 인하여 기존의 다른 저분자화 공정보다 대량 생산 공정에 적합하였다.

2. 저분자화 반응에서 과산화수소는 3.0 wt%까지 농도 증가에 따라 분자량이 낮아지지만 그 이상에서는 변화가 없거나 더 높아지는 경향을 보였다.

3. 조사선량이 증가하면 분자량은 감소하였으며 사용한 전자빔 에너지가 높은 경우 에너지가 높을수록 저분자화 반응효율이 높다. 1.0 MeV와 2.5 MeV의 경우 분자량 값이 두배 이상 감소하였다.

5 알지네이트 용액의 농도가 낮을수록 저분자화 속도가 증가되고, 분해효율은 농도가 낮을수록 낮아지는 경향을 보였다.

6 분해 효율은 알지네이트의 농도가 2 wt%이고 과산화수소의 농도는 1.5 wt%, 전자빔 조건은 5 kGy, 2.5 MeV에서 가장 우수함을 확인 하였다.

제 2 장 저분자 알지네이트의 응용

제 1 절 서 론

1. 항균제 (Antibacterial materials)

항균 작용은 미생물 발육저해 작용인 정균작용 과 미생물 사멸 작용인 살균 작용으로 구분된다. 일반적으로 '항균'과 '살균'은 다른 개념인데 항균이란 미생물의 번식이 억제되거나 미생물이 생성 되는 것을 막는 것이고 살균은 근본적으로 균을 사멸시키는 것이다. 살균은 일시적인 효과를 나타내는 반면 항균은 살균에 비해 비교적 지속적인 효과를 나타낸다[72].

천연제품의 경우 항균 특성이 매우 짧고 수지의 성형가공 등의 온도에서 내열성이 없어서, 극히 제한된 공업용도로 밖에는 사용할 수 없는 것이 현실이고 주로 비누와 화장품과 같은 물질의 항균제로 사용된다. 천연 항균제의 경우 주로 서방성(徐放性) 고분자 물질과 결합시켜 사용하는데, 수분 등이 있을 경우 가수분해 등을 통해 항균제가 서서히 방출되거나 결합된 자체가 항균성을 갖는 형태로 주로 고분자 농약에 응용하려는 시도가 있다. 그러나 대부분의 항균약제의 경우 합성 항균제를 병용하고 있으며 항균제를 병용하지 않는 경우는 키토산을 제외하고는 거의 없는 실정이다. 최근들어 환경 및 인체의 유해성으로 우리나라뿐만 아니라 많은 나라에서 항균제의 사용에 대한 규제가 강화되고 있다. 특히, 유기계항균제는 무기계 항균제보다 비교적 가공이 쉽고 최종 제품의 기계적 물성, 투명도, 색상 등에 영향을 미치지 않아 현재까지 많이 사용되어왔지만 유기계 항균제에 대한 규제는 무기계 항균제 보다 엄격하게 실시되고 있다. 대표적인 몇 가지 이유는 다음과 같다.

- 일시적인 효능은 뛰어나지만 지속성의 결여
- 열적안정성 취약
- 피부자극성
- 장기적 사용 시 내성균 발생위험
- 폐기물에서 환경오염 물질 발생(다이옥신)

2. 다당류 항균제에 대한 개발 현황

항균제 비 함유 천연 고분자의 경우 현재까지 키토산이 거의 유일한 것으로 알려져 있다. 천연 항균 고분자인 키토산은 균의 세포벽과 갑각류의 외골격 안에 존재하며 천연적으로 풍부한 키틴을 탈아세틸화시켜 제조한다. 이러한 키토산은 우수한 생체 적합성과 생분해성으로 의료분야에 많이 사용되어지는 천연 고분자이다. 또한 최근에는 항균에 대한 관심이 높아지면서 키토산을 항균제로 사용하고자 하는 연구가 많이 진행 중이다. 앞서 언급한 바와 같이 항균제를 함유한 항균 물질의 경우 대부분 유기계 혹은 무기계 항균제를 함유하게 되는데 이러한 항균제가 여러 가지 엄격한 규정에 의해 사용상 많은 제약이 있다.

키토산의 항균기능은 양이온화된 아미노기(-NH3^{+})에 의해 발생되는 것으로 알려져 있다[73]. 양전하를 띄는 키토산의 아미노기와 미생물의 세포벽을 구성하는 인지질(Lipid layer)의 음전하 사이에 상호 이온작용(ion-interaction)으로 인하여 세포막 조직이 파괴되고 그로 인해 세포내의 원형질이 누출되어 미생물이 죽게 된다(Fig. 2.1).

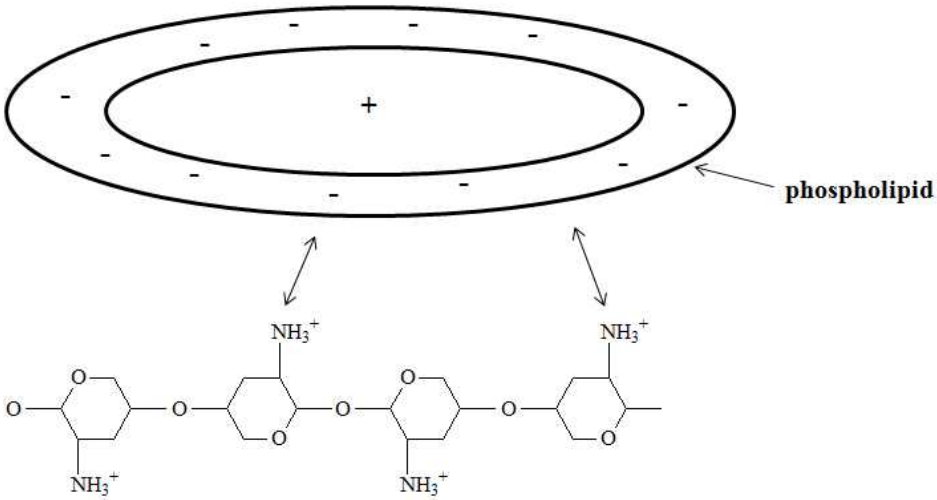


Fig. 2.1. Antibacterial mechanism of chitosan with microbial.

그러나 고분자 키토산이 갖는 항균성이 그리 크지 않기 때문에 항균성을 증진시키기 위한 많은 연구가 진행 중이다. 최근 보고된 키토산에 N-halamine을 도입하여 항균성을 증진시키는 연구의 경우 N-halamine은 다양한 미생물에 우수한 항균성, 비활성 그리고 재충전 할 수 있다는 장점이 있어 많은 연구자들이 관심을 가지고 있다[74-76]. N-halamine은 이미드, 아마이드, 아민그룹의 할로겐화에 의해 형성된 것으로 질소와 할로겐의 공유결합물을 말한다[77,78]. 또 다른 항균성 증진 방법인 키토산의 저분자화는 앞서 설명한 바와 같이 기능성 다당류를 저분자화시켜 다당류가 갖는 관능기의 노출을 극대화하여 그 기능성을 향상 시키는 방안이다.

3. 본 연구의 배경 및 목적

미역 다시마와 같은 천연 해조류에서 추출되어지는 알지네이트는 지금까지 상당히 많은 분야에 널리 이용되었지만 항균 고분자로의 사용에 대한 연구는 거의 보고 된바 없다. 알지네이트의 강력한 카르복실 그룹과 고입이 가능한 금속이온(Ag 등)은 균의 인지질 부분과 키토산 못지않은 강력한 상호이온작용(ion interaction)을 하리라 예상되어지고 알지네이트의 독특한 생리활성 때문에 봉합사에도 상당 부분 활용되어지는 점을 미루어 항균제로써 사용이 가능하리라 사료된다.

본 연구에서는 저분자 알지네이트의 항균특성을 조사하기 위해 분자량이 서로 다른 저분자 알지네이트를 제조하여 대장균(*Escherichia coli, E. coli*), 황색 포도상구균(*Staphylococcus aureus, S. aureus*) 그리고 여드름구균(*Propionibacterium acnes, P. acnes*)을 사용하여 최소 억제 농도(minimun inhibitory concentration, MIC) 및 광학세포농도(optical cell density)를 측정하였다. 또한, 유기물 항균제의 한계를 극복하기 위하여 은이온을 알지네이트와 반응시켜 저분자 은-알지네이트를 제조하였다. 은-알지네이트의 경우, 무기계 항균제인 은이온과 유기계 항균제인 알지네이트의 상호 단점을 보완하고 장점은 부각시키는 시너지 효과를 발휘하리라 사료된다.

제 2 절 실 험

1. 시료 및 기기

1.1 시료

은-알지네이트(silver alginate) 제조를 위해 본 연구에서 사용한 저분자 알지네이트는 앞서 제 1 장에서 언급한 과산화수소/전자빔 그리고 과산화수소/초음파방법으로 저분자화한 알지네이트를 사용하였다. Silver nitrate($AgNO_3$)은 Junsei사 제품을 사용하였고 IR분석을 위한 potassium bromide (KBr)은 Aldrich사 제품을 사용하였다. 액체배지를 제조하기 위해 사용한 yeast extract, tryptone, brain heat infusion, 그리고 tryptic soy medium은 DB Difco.사의 제품을 특별한 처리 없이 그대로 사용하였고 탈 이온수 제조 장치를 사용하여 얻은 탈 이온수를 모든 실험에 사용하였다. NaCl은 Sigma사의 제품을 Ethanol은 (주) 동양 화학 제품을 특별한 정제 없이 그대로 사용하였다

1.2 기기

본 연구의 실험과 특성 조사를 위해 사용한 기기는 다음과 같다.

Ultra-sonicator : POWER SONIC 420 (Hwashin Technology)
Refrigerated large capacity centrifugal separator : Combi-514R (Hanil)
Quantitative pump : 101V/R (WATSON/MARLOW)
Vacuum oven : Vaccum oven Model 285A (Fisher scientific)
Particle size analyser : ELS8000 (Photal)
UV-visible spectrometer : S3100 (Scinco)
SEM : S-4700 (Hitachi)
TEM : JEM-2000 FX II (Shimazu)
ICP-MS : OPTIMA 4300 DV (Perkin Elmer)

Autoclave : HB-506-10 (Hanback)
UV-visible spectrometer : S3100 (Bio-tek Instruents. Inc.)
Clean bench : DY-CB (Dong Yang)
Incubator : GHL-C4 (Han Baek)
Chamber : (Dong Yang)

2. 실험

2.1 은-알지네이트 제조

은-알지네이트 제조 반응은 저분자 알지네이트의 분자량, 질산은 농도, 그리고 질산은 용액의 적하 속도등을 변수로 하여 Table 2.1과 같은 반응조건에서 실험을 진행하였고 여러 변수들이 은-알지네이트 제조에 미치는 영향을 조사하였다. 저분자 알지네이트를 은-알지네이트로 변화(modification) 시키는 방법은 Scherr 그룹[92]의 방법을 변형시켜 제조하였다. 질산은(silver nitrate) 일정량을 80 mL에 녹인후 0.45 ㎛ syringe filter를 사용하여 여과시켜 질산은 용액을 준비한다. 저분자 알지네이트 2 g을 탈이온수 40 mL에 녹인 후 0.45 ㎛ syringe filter를 사용하여 여과 시켜 저분자 알지네이트 용액을 만든다. 여기에 준비된 질산은 용액을 정량 펌프를 이용하여 떨어뜨리면서 냉각반응기(ice bath)에서 반응시켰다. 반응 중 초음파를 사용하여 알지네이트 사슬끼리의 엉킴(entanglement)을 느슨하게 하고 생성된 은-알지네이트 입자들의 분산을 유도하였다. Ice bath에서 1시간동안 반응 시킨 후 원심분리기를 사용하여 생성물을 회수하고 에탄올로 3회 세척 후 진공 건조기를 사용하여 24시간동안 40 ℃에서 건조하였다. 건조된 은-알지네이트는 60 %의 회수율을 보였다.

2.2 은-알지네이트 기본특성

은-알지네이트의 입자크기(particle size)를 확인하기 위하여 건조된 은-알지네

이트 0.1 g을 3차증류수 10 mL에 녹인 후 알코올에 떨어뜨려 Photal사의 ELS8000를 사용하여 측정하였다. 총 3회에 걸쳐 측정하였으며 측정도중 입자들을 분산시키기 위해 초음파를 사용하였다.

은 알지네이트의 은 함량은 잘 건조된 은-알지네이트를 질산 용액에 녹여 Perkin Elmer사의 OPTIMA 4300 DV를 사용하여 확인하였다.그리고, 그들의 모폴로지는 잘 건조된 파우더상의 샘플을 gold sputtering 시킨 후 Hitachi사의 S-4700을 사용하여 SEM으로 확인하였다.

Table 2.1 Reaction conditions of silver alginates

Sample	Mw of Na-Alginate	Alginate (g)	Silver nitrate (g)	Dropping speed (ml/min)	Mole ratio (AgNO3/SA)
SiA-1	80,500	2	1.28	1	0.75
SiA-2	44,700	2	1.28	1	0.75
SiA-3	30,000	2	1.28	1	0.75
SiA-4	8,200	2	1.28	1	0.75
SiA-5	5,100	2	1.28	1	0.75
SiA-6	5,100	2	1.71	1	1.00
SiA-7	5,100	2	0.85	1	0.50
SiA-8	5,100	2	0.42	1	0.25
SiA-9	5,100	2	0.42	2	0.25

2.3 저분자 알지네이트와 은-알지네이트의 항균특성

2.3.1 사용 균주 및 배양

본 실험에 사용한 균주는 대장균 (*Escherichia coli*), 포도상 구균 (*Staphylococcus aureus*), 그리고 여드름 구균(*Propionibacterium acnes*) 을 확보하여 균 활성을 유지하면서 사용하였다.

대장균은 한국유전자은행 (KTCC)으로부터, 그리고 포도상 구균 및 여드름 구균은 미국 세포주균주은행 (ATCC)으로부터 분양받아 사용하였다. 각각의 균주의 배양 조건 (Conditions)은 다음과 같이 실시하였다.

대장균, 포도상 구균 그리고 여드름 구균의 배양 방법은 Table 2.2과 같이 실시하였으며, 배양된 균은 고체 배지에 4주마다 계대 배양하여 4 ℃에서 보관함으로써 균의 활성을 계속적으로 유지시켜 주었다.

대장균과 포도상 구균은 호기성 균으로 먼저 삼각 플라스크에 100 mL의 배지(medium)를 넣고 autoclave를 이용하여 121 ℃에서 15 min 동안 멸균 처리한 후, clean bench에서 상온 (20 ~ 25 ℃)까지 떨어뜨려 최적 배양된 균 (Cell Optical Density가 2.0 이상으로 2.0 ~ 2.6 × $10^{3\sim4}$ CFU/mL)을 50배 희석하고 24시간 배양하였다.

여드름 구균은 혐기성 배양으로 호기성 배양과 같은 방법으로 실시하며, 다만 혼합 가스 (80 % N_2, 10 % CO_2, 10 % H_2)를 공급할 수 있도록 자체 제작한 혐기성 chamber에 혼합 가스를 주입하여 균을 접종하였으며, gas pack anaerobic system (Difco 사)를 이용하여 배양하였다.

Table 2.2. Culture methods and conditions

	Culture method	Medium	Incubator
E. coli	37 ℃, Aerobic culture[1)]	LB medium[1)]	Aerobacter Chamber
S. aureus	37 ℃, Aerobic culture[1)]	BHI[2)]	Aerobacter Chamber
P. acnes	37 ℃, Anaerobic culture[2)]	TSB[3)]	Anaerobacter Chamber

[1)] LB medium : Yeast extract 5 g/L, Tryptone 10 g/L, NaCl 10 g/L

[2)] BHI : Brain Heart Infusion (BD 237500) 30 g/L

[3)] TSB : Tryptic Soy medium (BD 236950) 30 g/L

2.3.2 항균성 실험방법

제조한 저분자 알지네이트와 은-알지네이트의 항균성측정은 일반적으로 사용하는 방법인 KS K0693법을 응용하여 실시하였다. 항균성 확인은 24시간 배양 된 seed culture (종배양)를 고체 배지 (액체 배지에 agar 20 g/L를 첨가한 배지)에 20 ㎕씩 도말하여 24시간 배양 한 후 집락 (cloney) 유·무를 통해 확인하였다.

-항균제의 MIC (minimum inhibitory concentration) 측정

제조한 저분자 알지네이트와 은-알지네이트가 항균성을 나타내는 최소한의 농도를 측정하기 위해 각각의 균에 대한 최소저지농도(minimum inhibitory concentration,MIC)를 측정하였다.

저분자 알지네이트의 경우 항균측정을 위한 샘플의 최종 농도가 400 ~ 10,000 ppm으로 제조하였고, 은-알지네이트의 경우 700 ppm, 350 ppm 그리고 175 ppm으로 제조하여 24 시간동안 배양시킨다. 한천 배지 (agar medium) 희석 평판법 (plate method)으로 제조된 plate에 최적 배양된 균을 각각 20 ㎕씩 접종하여 유리 스프레더를 이용하여 streaking 한 후, 24시간 배양 한다. 배양 후 균의 생육이 나타나지 않는 최저 농도를 MIC로 결정하였다

-배양 시간에 따른 항균 물질의 세포 농도 (cell optical density)측정

제조한 항균 물질의 항균 지속성을 알아보기 위해 배양 시간에 따른 균들의 세포 농도를 측정하였다. 먼저, 멸균된 시험관에 4 mL의 배지를 넣는다. 적당하게 희석(원액을 10배, 20배, 100배 이상으로 단계적으로 희석)된 항균제를 1 mL 또는 0.001 ~ 0.200 g를 취하여 배지에 녹인 후 clean bench에서 1시간 동안 UV 처리하여 멸균 처리한다. 다음으로 최적 배양된 균을 각각 50 ㎕씩 접종하여 배양 시간에 따라 ELISA reader(Bio-tek Instruents. Inc.)방법으로 600 nm의 파장에서 세포의 농도 (cell optical density)를 측정하였다.

제 3 절. 결과 및 고찰

3.1 은-알지네이트 기본특성

기능성 다당류의 경우 분자량의 차이에 따라 그 기능성이 상당히 고무적으로 변하는 것으로 알려져 있고 대표적으로 키토산의 경우 분자량이 특정 범위로 조절되었을 때, 항균성이 우수한 것으로 많은 문헌에서 보고되어지고 있다[93,94]. 본 실험에서는 앞서 알지네이트를 이용하여 새로운 항균제로의 접근을 시도하기 위해 알지네이트의 분자량에 따른 은-알지네이트의 입자크기(particle size) 및 은 함유량을 측정하여 특성화 시켰다. Table 2.3 및 Fig.2.2~2.4은 분자량, 질산은농도, 그리고 적하속도에 따른 여러 가지 조건에서의 은-알지네이트의 은 함유량 및 입자크기 결과이다.

제조된 은-알지네이트의 은(silver) 함유량을 보면(Table 2.3) 여러 가지 실험조건에서 거의 이론값과 유사한 값을 보였고 오히려 약간 높은 값을 보이기도 하였다. 이는 반응에 참여한 은이온이 알지네이트의 카르복실 그룹에 이온결합의 형태로 치환된 것 외에도 물리적인 흡착의 형태로 존재하는 은 이온들 때문이다.

또한, 질산은과 알지네이트의 몰비(mole ratio)는 은-알지네이트의 용해도(solubility)에 영향을 미쳤고 몰비가 0.50 이상인 조건에서 제조된 은-알지네이트는 물에 불용성을 나타내었다. 은-알지네이트의 상태를 파우더(powder)상태부터 투명한 용액(transparency)상태까지 자유롭게 조절을 가능케하여 상당히 많은 분야에서 사용이 가능하리라 사료된다.

은-알지네이트의 입자크기(particle size)는 질산은의 농도가 일정하고 알지네이트의 분자량이 80.5 kDa에서0.754 ㎛를 보인것 외에는 평균 0.250 ㎛으로 비슷한 크기를 나타내었다. 이는 분자량이 큰 경우 상대적으로 사슬 안에 은 이온으로 치환되지 않는 카르복실 염 그룹의 비율이 높아져 사슬끼리 수소 결합이 많이 이뤄지고 이로써 사슬의 엉킴 (entanglement)이 발생했기 때문으로 사료된다. 분자량이 5.1 kDa으로 일정하고 질산은의 농도를 변화 시켰을 때의 결과는 몰비(mole ratio)가 0.75일 때 입자의 크기가 가장 커졌다가 작아짐을 확인할 수 있다. 몰비(mole ratio)가 0.50이하부터는 알지네이트 사슬 안에 나트륨이온(Na+)의 함량 증가에 따라 상당 부분 물에 용해되어서 상대적으로 작은 크기로 측정된 것으로 사

료된다.

3.2 은-알지네이트의 모폴로지

Fig.2.3 (a), (b) 그리고 (c) 는 silver alginate [SiA-1]의 SEM 사진들이다. (a)는 저배율로 전체적인 입자들의 모습을 관찰한 사진이다. (b)의 경우 입자들의 크기는 대략 0.6 ㎛ ~ 0.9 ㎛ 정도로 보이고 상당히 많은 부분들이 aggregation 되어있음을 확인 할 수 있다. 동그란 공 모양의 입자들도 보이는 반면 큰 입자들이 반으로 쪼개져 있는 모습도 보인다. 이는 반응 공정에서 입자들의 aggregation을 방지하기 위해 사용한 초음파에 의해 쪼개져 버린 입자들이라 사료된다. 또한, 초음파의 사용에도 불구하고 입자들이 많이 뭉쳐있는 모습을 보이는데 (c)를 보면 (a)그리고 (b)에서 보여준 입자들이 더 작은 입자들의 aggregation에 의해 생성된 큰 입자라는 것을 보여준다. 이는 실제 은-알지네이트의 크기는 분산만 잘 된다면 앞서 보여준 입자크기 측정 결과 보다 더욱 작은 크기로 제조가 가능하다는 것을 보여준다. (d)는 EDx 분석의 은(Ag) 피크로 은-알지네이트 입자의 제조를 확인 할 수 있었다.

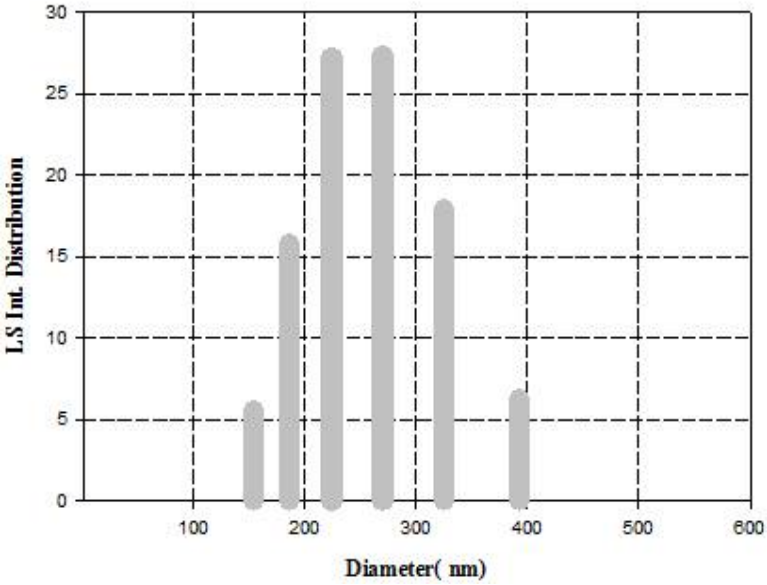
Fig. 2.4는 silver alginate [SiA-1]의 TEM 사진이다. (a)의 경우 SEM결과에서 보여주는 것과 일치하는 모습을 보여주는데 전체적으로 구형의 모습을 유지하고 있지만 작은 입자들이 aggregation된 것을 확인 할 수 있고 그 크기는 0.7 ㎛정도이다. (b)와 (c)는 (a)에서 보여준 입자를 고배율로 확대한 모습인데 SEM에서의 결과처럼 작은 입자들이 뭉쳐 있음을 확인 할 수 있었고 입자들의 크기는 5 nm이하부터 20 nm정도로 분포되어있음을 확인하였다.

Table 2.3 Silver ion contents and particle size of silver alginates(SiA)

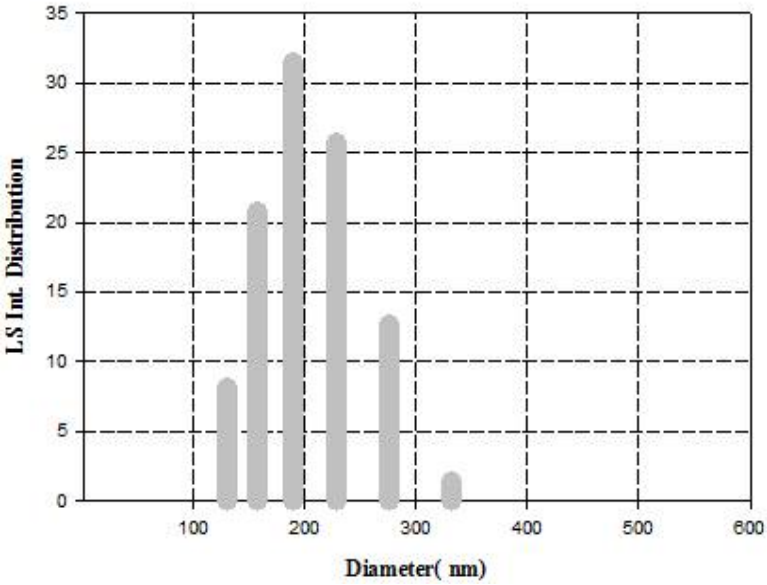
Samples	Molecular weight of alginate	mole ratio (AgNO3/SA)	Ag (%)	Ag[a] (%)	particle sizeb (㎛)
SiA-1	80,500	0.75	30.07	28.59	0.754
SiA-2	44,700	0.75	25.62	28.59	0.216
SiA-3	30,000	0.75	29.73	28.59	0.261
SiA-4	8,200	0.75	25.72	28.59	0.226
SiA-5	5,100	0.75	24.62	28.59	0.301
SiA-6	5,100	0.50	18.96	19.07	0.125
SiA-7	5,100	0.25	12.27	9.53	0.106
SiA-8	5,100	1.00	39.26	38.13	0.237
SiA-9	5,100	1.00	38.86	38.13	0.195

a ; Calculated values of silver content in silver alginate : On the assumption that all of sodium ion in sodium alginate changed to silver ion.

b ; The Particle size of silver alginates were measured by particle size analyser (ELS8000)

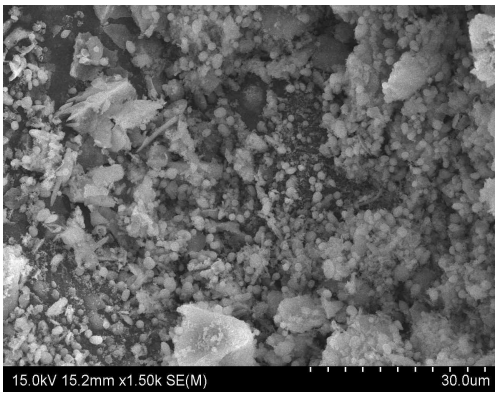


(a)

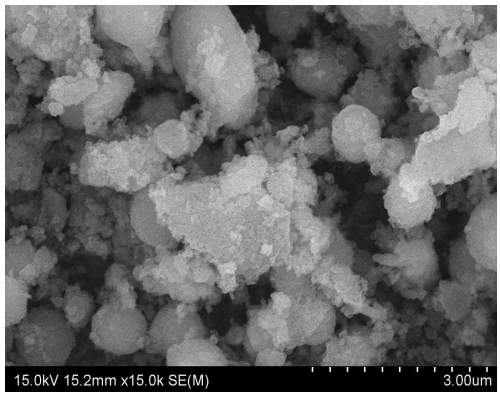


(b)

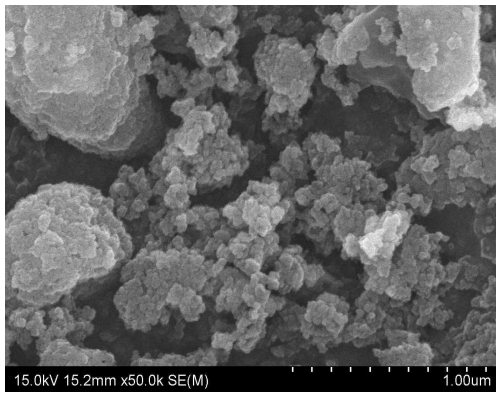
Fig.2.2. Particle size distribution of silver alginates ; (a)SiA-3 (b)SiA-4.



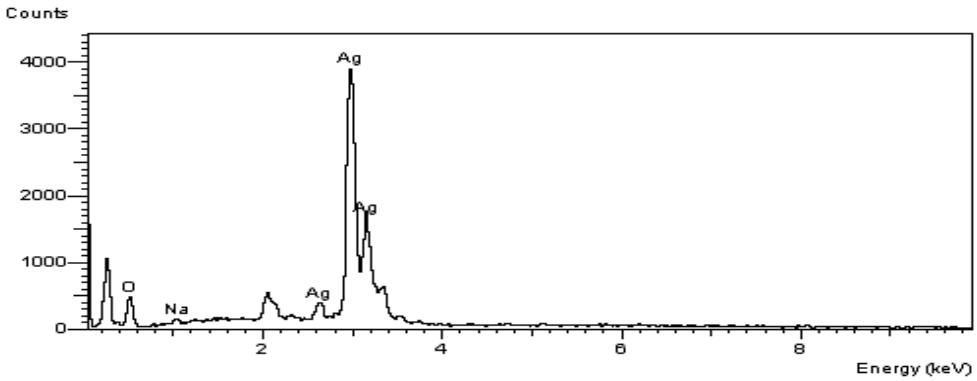
(a)



(b)

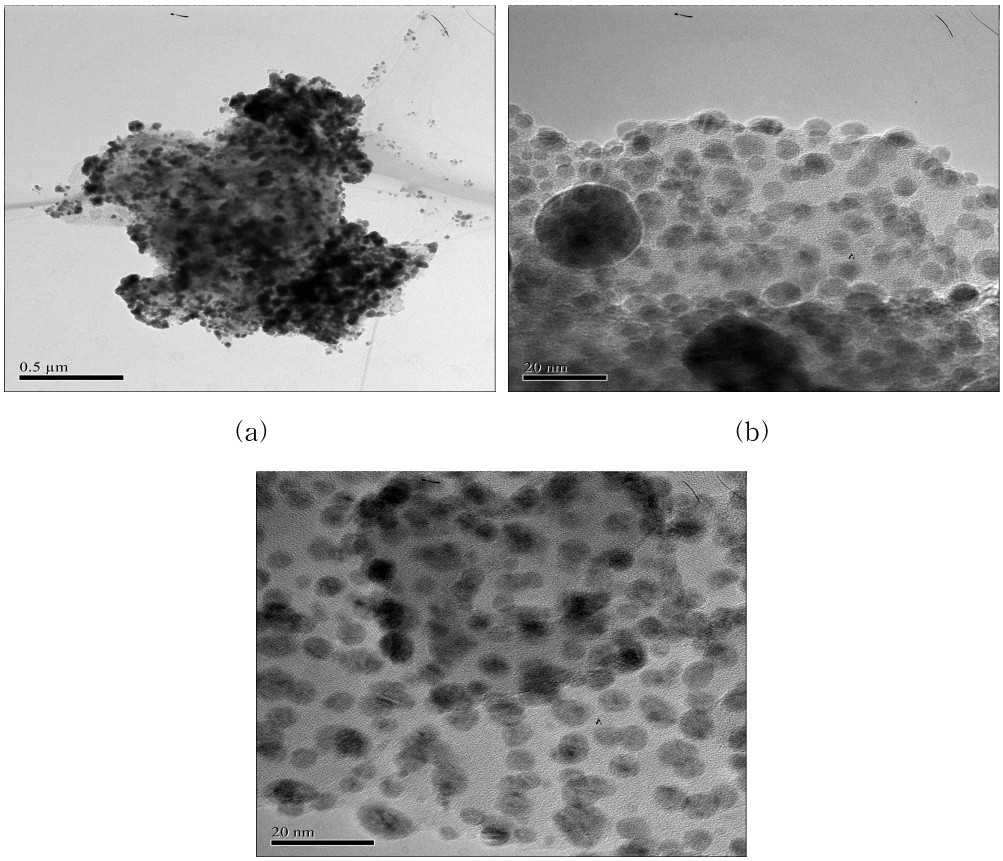


(c)



(d)

Fig. 2.3 SEM micrographs of silver alginate particles(SiA-1), (a) x1,500, (b) x15,000, (c) x50,000 and (d) EDx.



(a) (b)

(c)

Fig. 2.4 TEM micrographs of silver alginate particles(SiA-1), (a) x19,000, (b) x380,000 and (c) x470,000

3.2 저분자 알지네이트의 항균특성

저분자 알지네이트의 항균성을 규명하기 위한 대장균, 포도상구균 그리고 여드름 구균을 사용하여 측정한 MIC(minimum inhibitory concentration)값을 Table 2.4과 2.5에 나타내었다. 저분자화 반응전의 고분자 알지네이트는 측정 샘플의 최고 농도인 10,000 ppm에서도 모든 균에 대해서 항균성을 나타내지 않았고, 분자량이 낮아지면서 전체적으로 MIC가 낮아지는 것을 확인 할 수 있었다. 다만, 분자량이 92.3kDa보다 작은 38.8 kDa에서는 항균성을 보이지 않았는데 92.3 kDa에서는 항균성을 보인 경우와 같이 분자량이 높아도 항균성을 보이는 경우가 있었고 분자량이 상대적으로 더 낮아도 항균성을 보이지 않는 경우가 있었다. 기능성 다당류의 경우 분자 크기 및 분자량에 따라 그 기능성이 향상되기도 하고 오히려 저하되기도 한다. 즉, 다당류의 독특한 기능성을 결정하는 관능기(functional group)가 손실되지 않으면서 사용 목적에 적합한 분자량을 가질 때, 그리고 균의 세포벽에 수용될 수 있는 기하학적 구조를 가질 때 그 기능성이 증가되는 것이다. 따라서, 분자량이 상대적으로 작은 저분자 알지네이트가 본 실험 조건에서 항균성을 보이지 않는 것은 관능기의 손실과 분자의 크기 또는 얻어진 저분자 알지네이트의 형태가 항균성을 보이는데 적합한 크기가 아님을 미뤄 짐작할 수 있다. Choi[95] 등은 키토산을 저분자화 시켜 여러 가지 균으로 항균성을 측정하였고 그 결과 분자량이 더 높은 경우 항균성을 나타내는 경우도 있었고 분자량이 상대적으로 낮고 항균성을 보였던 샘플도 어떤 조건에서 항균성을 측정하는가에 따라 항균성을 보이지 않는 경우도 있다고 보고하였다. 분자량이 다른 경우 외에 키토산의 탈아세틸화를 측정하여 서로 다른 탈아세틸화를 갖는 샘플을 측정한 결과 분자량과는 상이한 결과가 나왔다. 분자량이 같다면 탈아세틸화 정도에 따라 항균성이 다르게 측정되었다. 즉 분자량 외에 키토산이 갖는 관능기의 영향에 따라 항균력에 큰 영향을 미친다고 보고되어지고 있다. 이와 같이 키토산의 항균성은 단순히 분자량 자체만으로 해석되기 어렵고 관능기(functional group), 순도 (purity) 그리고 항균 측정 방법 등이 서로 연관되어 상호 유기적으로 영향을 미치는 것을 알 수 있다. 결론적으로, 저분자 알지네이트에서는 반응조건과 분자량에 따라 항균성이 나타나고 그 정도에 차이가 생겼지만, 반듯이 분자량에 비례하여 항균력의 세기 및 활성이 결정되는 것은 아니다. 전체적으로 저분자화 반응을 시키지 않는 고분자 알지네이트에서는 어떠한 균에서도 항균성이 발견되지 않았다.

Table 2.6~2.8과 Fig. 2.5~2.7은 과산화수소/전자빔에 의해 제조된 저분자 알지네이트의 세포농도(cell optical density)측정 결과를 보여준다. 표에서 보여준 것과 같이 몇 가지 샘플의 경우 항균 지속성이 매우 우수함을 확인 할 수 있고, 균의 정체기인 48 시간 이후에도 균의 세포농도는 크게 증가하지 않았다(Table 2.6~2.8, Fig. 2.5~2.7). 또한, 분자량의 영향이 MIC 값에서는 큰 차이를 보이지 않았던 앞의 결과와 달리 배양시간에 따른 세포농도 결과에서는 분자량이 높은 경우보다 낮은 경우에 세포농도가 더 낮아졌고 분자량이 낮은 경우에 세포 증식을 거의 볼 수 없는 우수한 항균 지속성을 보여주었다. 이러한 우수한 항균 지속성은 다른 유기 항균제와는 달리 알지네이트의 경우, 뛰어난 흡착 능력과 용해 시 swelling되면서 균들의 활성을 저하시켰기 때문으로 사료된다. 이는 알지네이트가 항균제로써 활용이 가능하다는 처음의 가설을 훌륭하게 뒷받침 해주는 증거이다.

Table 2.4 Antibacterial properties of depolymerized sodium alginate by E-beam.(MIC)

Sample	Mw	Mn	MIC(Minimun Inhibition Concentration, ppm)		
			E. Coli	S. aureus	P. acnes
HMWSA*	450,200	228,500	X	X	X
A(2.0)-1-HP0-2.5	95,900	43,300	X	X	X
A(2.0)-1-HP0-5	58,700	26,200	X	X	X
A(2.0)-1-HP0-10	77,300	34,600	X	X	X
A(2.0)-1-HP0-15	55,900	25,000	X	X	X
A(2.0)-1-HP0-20	38,800	17,800	X	X	X
A(2.0)-1-HP1.5-2.5	51,300	23,000	X	X	X
A(2.0)-1-HP1.5-5	53,100	23,800	X	X	X
A(2.0)-1-HP1.5-10	46,200	20,800	X	X	X
A(2.0)-1-HP1.5-15	30,300	14,400	10,000	10,000	10,000
A(2.0)-1-HP1.5-20	30,600	14,500	10,000	10,000	10,000
A(2.0)-1-HP3.0-2.5	62,500	27,900	10,000	5,000	5,000
A(2.0)-1-HP3.0-5	36,100	16,700	2,000	2,000	2,000
A(2.0)-1-HP3.0-10	38,400	17,600	5,000	5,000	5,000
A(2.0)-1-HP3.0-15	42,800	19,400	5,000	5,000	5,000
A(2.0)-1-HP3.0-20	37,700	17,300	5,000	5,000	5,000
A(2.0)-1-HP4.5-2.5	92,300	41,600	5,000	5,000	5,000
A(2.0)-1-HP4.5-5	34,200	15,900	5,000	5,000	5,000
A(2.0)-1-HP4.5-10	44,100	19,900	5,000	5,000	5,000
A(2.0)-1-HP4.5-15	42,400	19,200	2,000	2,000	2,000
A(2.0)-1-HP4.5-20	28,200	13,600	5,000	5,000	5,000

* : HMWSA ; High molecular weight sodium alginate, pristine sodium alginate

Table 2.5 Antibacterial properties of depolymerized sodium alginate by E-beam.(MIC)

Sample	Mw	Mn	MIC(Minimun Inhibition Concentration, ppm)		
			E. Coli	S. aureus	P. acnes
HMWSA*	450,200	228,500	X	X	X
A(2.0)-2.5-HP0-2.5	57,700	25,800	X	X	X
A(2.0)-2.5-HP0-5	35,700	16,579	X	X	X
A(2.0)-2.5-HP0-10	26,200	12,897	X	X	X
A(2.0)-2.5-HP0-15	22,000	11,397	X	X	X
A(2.0)-2.5-HP0-20	19,300	10,400	X	X	X
A(2.0)-2.5-HP1.5-2.5	37,700	17,300	X	X	X
A(2.0)-2.5-HP1.5-5	23,300	11,800	X	X	X
A(2.0)-2.5-HP1.5-10	17,600	9,800	2,000	2,000	2,000
A(2.0)-2.5-HP1.5-15	16,500	9,500	2,000	2,000	2,000
A(2.0)-2.5-HP1.5-20	15,600	9,200	2,000	2,000	2,000
A(2.0)-2.5-HP3.0-2.5	44,100	19,900	5,000	10,000	5,000
A(2.0)-2.5-HP3.0-5	27,500	13,300	5,000	5,000	5,000
A(2.0)-2.5-HP3.0-10	17,900	9,900	2,000	2,000	2,000
A(2.0)-2.5-HP3.0-15	17,000	9,700	2,000	2,000	2,000
A(2.0)-2.5-HP3.0-20	15,900	9,300	2,000	2,000	2,000
A(2.0)-2.5-HP4.5-2.5	50,900	22,800	5,000	5,000	5,000
A(2.0)-2.5-HP4.5-5	32,400	15,200	2,000	2,000	2,000
A(2.0)-2.5-HP4.5-10	25,800	12,700	5,000	5,000	5,000
A(2.0)-2.5-HP4.5-15	17,300	9,700	2,000	2,000	2,000
A(2.0)-2.5-HP4.5-20	16,200	9,400	2,000	2,000	2,000

* : HMWSA ; High molecular weight sodium alginate, pristine sodium alginate

Table 2.6 Cell optical density of Low molecular weight sodium alginate for E. Coli. (λ = 600 nm, 2,000 ppm)

Sample / Time[hr]	A(2.0)-2.5-HP0-5	A(2.0)-2.5-HP1.5-5	A(2.0)-2.5-HP3.0-5	A(2.0)-2.5-HP4.5-5	A(2.0)-2.5-HP0-15	A(2.0)-2.5-HP1.5-15	A(2.0)-2.5-HP3.0-15	A(2.0)-2.5-HP4.5-15
0	0	0	0	0	0	0	0	0
12	1.245	1.312	0.124	0.098	0.098	0.121	0.045	0.078
24	1.878	1.789	0.408	0.289	1.012	0.149	0.123	0.134
36	2.645	2.435	0.577	0.319	2.112	0.432	0.213	0.204
48	2.876	2.765	0.832	0.397	2.478	0.645	0.312	0.289
60	2.967	2.845	1.478	0.509	2.735	0.897	0.402	0.315

Table 2.7 Cell optical density of Low molecular weight sodium alginate for S. Aureus. (λ = 600 nm, 2,000 ppm)

Sample / Time[hr]	A(2.0)-2.5-HP0-5	A(2.0)-2.5-HP1.5-5	A(2.0)-2.5-HP3.0-5	A(2.0)-2.5-HP4.5-5	A(2.0)-2.5-HP0-15	A(2.0)-2.5-HP1.5-15	A(2.0)-2.5-HP3.0-15	A(2.0)-2.5-HP4.5-15
0	0	0	0	0	0	0	0	0
12	1.323	1.423	0.224	0.125	0.145	0.215	0.095	0.068
24	1.745	1.896	0.452	0.345	1.2432	0.292	0.189	0.145
36	2.443	2.532	0.598	0.423	2.145	0.539	0.256	0.223
48	2.745	2.813	0.924	0.455	2.678	0.748	0.378	0.295
60	2.967	2.987	1.512	0.612	2.871	0.989	0.443	0.367

Table 2.8 Cell optical density of Low molecular weight sodium alginate for P. acnes. (λ = 600 nm, 2,000 qppm)

Sample / Time[hr]	A(2.0)-2.5-HP0-5.0	A(2.0)-2.5-HP1.5-5	A(2.0)-2.5-HP3.0-5	A(2.0)-2.5-HP4.5-5	A(2.0)-2.5-HP0-15	A(2.0)-2.5-HP1.5-15	A(2.0)-2.5-HP3.0-15	A(2.0)-2.5-HP4.5-15
0	0	0	0	0	0	0	0	0
12	0.745	0.345	0	0	0.645	0.624	0	0
24	1.145	0.761	0.125	0	1.080	1.064	0	0
36	2.565	1.251	0.287	0	2.345	1.345	0.112	0
48	2.745	1.675	0.425	0.085	2.765	1.745	0.213	0
60	3.002	1.864	1.669	0.120	2.954	2.045	0.304	0.089

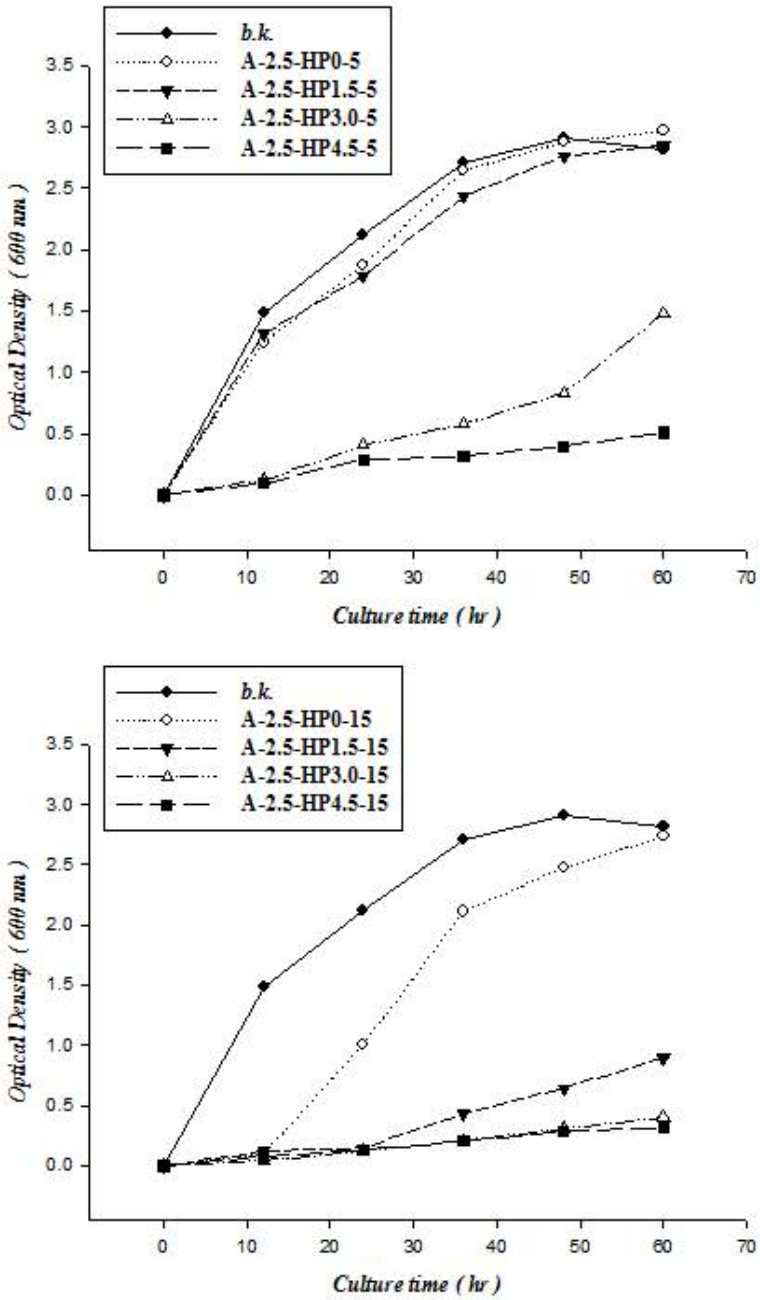


Fig. 2.5 Antibacterial effect of LMWSAs for *E.coli.*

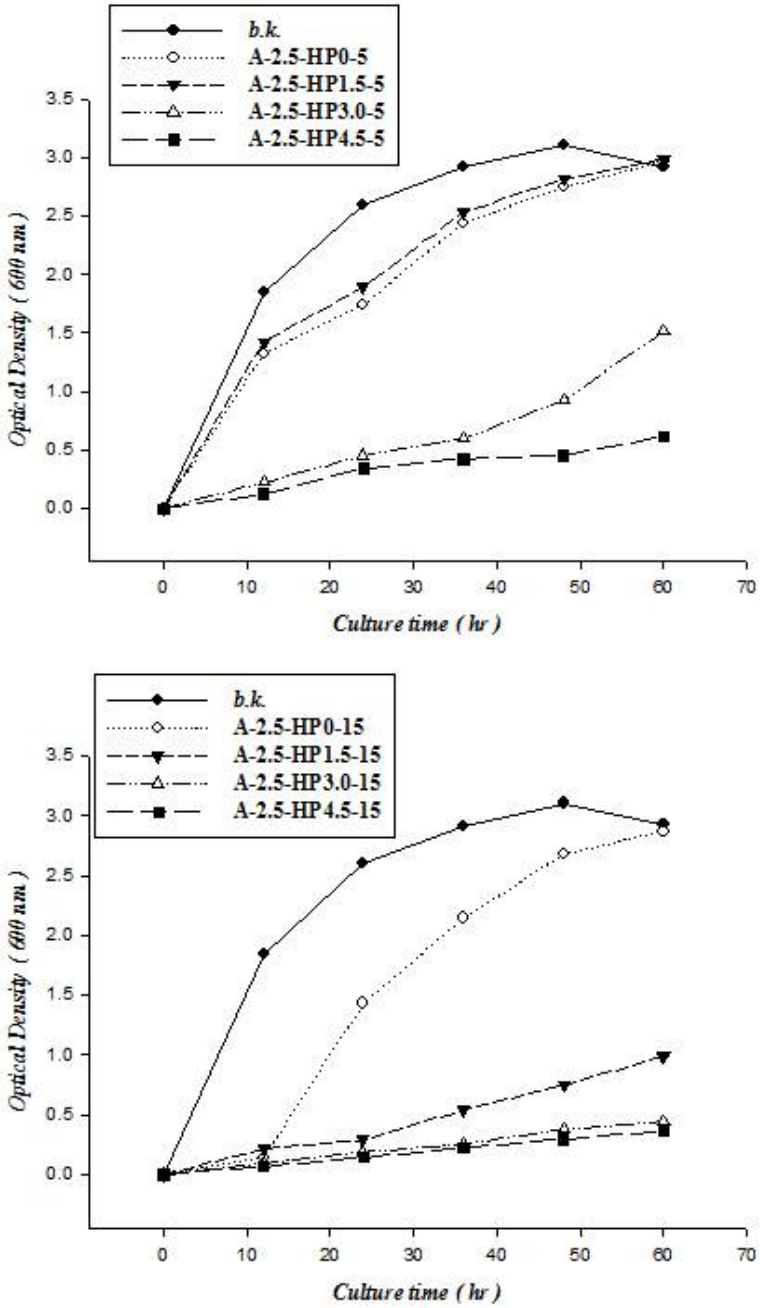
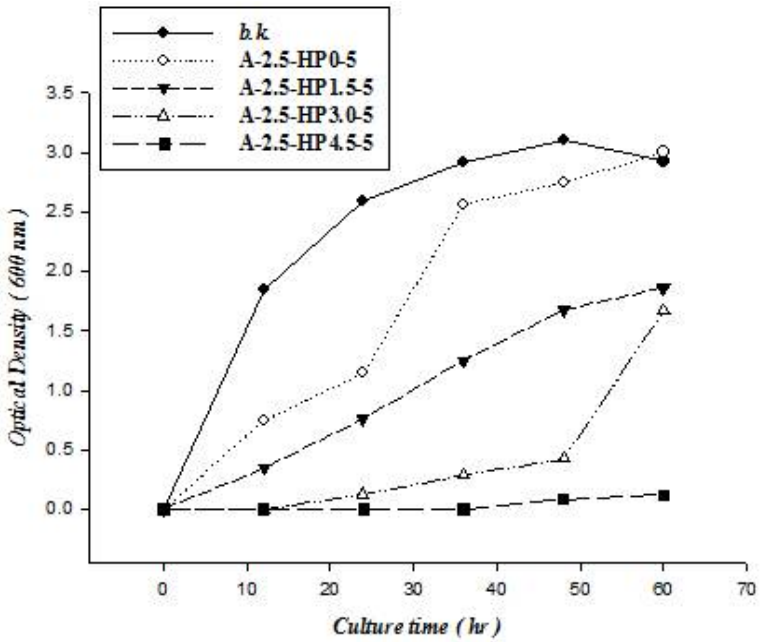


Fig. 2.6 Antibacterial effect of LMWSAs for *S.aureus*



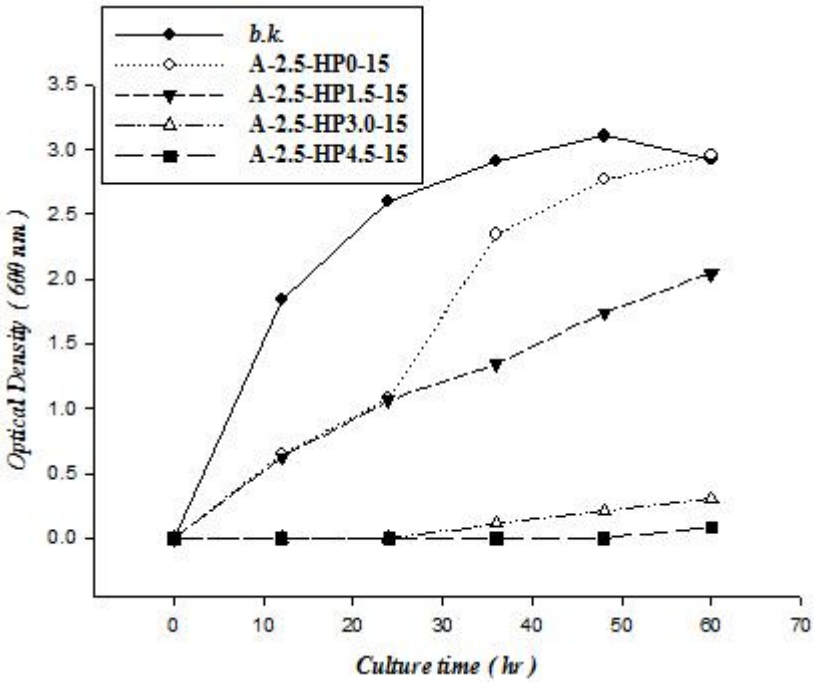


Fig. 2.7 Antibacterial effect of LMWSAs for *P.acnes*

3.3 은-알지네이트의 항균특성

저분자 알지네이트의 항균성을 측정한 방법과 동일하게 대장균, 포도상 구균 그리고 여드름 구균에 대한 MIC를 측정하여 Table 2.9에 나타내었다. 은-알지네이트의 항균 특성을 확인하기 위한 은-알지네이트는 SiA-9 (Molecular weight of LMWSA : 5,100 Dalton, mole ratio ($AgNO_3$/SA): 1.00, Ag (%) : 38.86 %, particle size : 0.195 ㎛)를 사용하였다. 은 알지네이트의 항균성 측정을 위한 샘플은 용액 상태로 만들었고 그 농도는 700 ppm, 350 ppm 그리고 175 ppm으로 하여 측정하였다.

MIC값을 보면 각각의 균들에 대해서 350 ppm으로 매우 우수한 특성을 보였다.
은-알지네이트가 아주 소량인 350 ppm에서 항균성을 나타낸다는 것은 중요한 의미를 갖는다. 일반적으로 지금까지 보고되어진 항균제의 항균성은 모두 우수하지만 항균제의 사용량에 대한 명확한 규제가 없다. 예를 들어 항균성이 전혀 없을 거라 사료되는 물질을 항균성에 대해 발표한 연구논문에서 사용한 항균제의 농도와 동일한 농도로 설정하여 실험했을 때 항균성을 나타낸다면 이는 그 연구 논문에서 사용한 항균제의 항균 활성은 항균제의 고유한 항균능력이라기 보다는 과다 사용에 의한 균 증식 저지라고 생각 할 수 있다. 그러나 이러한 항균제의 과다 사용은 인체에 이롭지 않고 오히려 부정적으로 작용할 가능성이 매우 높다. 세제는 소량만 사용하여도 항균력이 50 %가 넘고, 소금이나 심지어 사람의 소변까지도 내성을 보여주고 있다. 이는 현재까지 항균제로 인정되는 물질이라 하더라도 다량의 사용에 의해 항균성을 나타낸다면 항균제 고유의 작용으로 볼 수 없다는 것을 의미한다. 즉, 은-알지네이트의 경우 매우 소량으로도 충분한 항균성을 가짐을 확인할 수 있다.

은 이온계 항균제는 주로 비용출형으로 항균가공제로 많이 사용되어지고 있으며 이는 은 이온계 항균제의 경우 단기간에 보여주는 항균력보다 오랜 시간동안 항균력이 유지되는 것이 더 중요하다는 것을 의미한다. 따라서 제조된 은-알지네이트의 항균 지속능력을 알아보기 위해 항균제의 농도를 700 ppm, 350ppm, 그리고 175 ppm으로 달리해가며 세포농도를 측정하였고 그 결과를 Table 2.10과 Fig. 2.8~2.10에 나타내었다. 실험에 사용한 균에 따라 약간의 차이는 보이지만 전체적으로 350 ppm부터 매우 우수한 항균 지속능력을 보여 주었다.또한 700 ppm에서는 전혀 균의 성장을 확인 할 수 없았다. 이는 일반적인 천연 항균물질의 항균 지속 능력

이 2,000 ppm에서 나타내는 것에 비하면 5배 이상 뛰어난 항균 지속 능력을 가짐을 의미한다. 지금까지 보고되어진 은 이온계 항균제들의 항균 지속 능력을 보면, Ag+zeolite의 경우에는 항균제의 농도가 0.1 %일때 18시간 이후부터 균이 자라고 맥반석+Ag+zeolite의 경우에는 2 %일때 18시간 이후부터 균이 자라는 것으로 알려져 있다[95]. 위의 결과로 미루어볼때 은-알지네이트의 경우 현재까지 보고된 은-이온계 항균제와 비슷하거나 더 향상된 항균 지속능력을 가진다. 처음 기대한 바와 같이 저분자 알지네이트에 무기 항균제의 장점을 부여하기 위해 은-이온으로 변형(modification) 시킴으로써 유기항균제의 단점인 낮은 항균 지속성을 보완하면서 항균성은 더욱 증진되었기 때문으로 사료된다.

Table 2.9 Antibacterial properties of silver alginate.(MIC)

	E. coli			S. aureus			P. acnes		
SiA-9	700 ppm	350 ppm	175 ppm	700 ppm	350 ppm	175 ppm	700 ppm	350 ppm	175 ppm
MIC	X	X	O	X	X	O	X	X	O
	350 ppm			350ppm			350ppm		

X : no growth O : growth

Table 2.10 Cell optical density of silver alginate. (λ=600nm)

	E. coli			S. aureus			P. acnes		
	700 ppm	350 ppm	175 ppm	700 ppm	350 ppm	175 ppm	700 ppm	350 ppm	175 ppm
0	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
6	0.048	0.027	0.052	0.051	0.037	0.092	0.125	0.045	0.025
12	0.202	0.187	0.077	1.005	0.232	0.102	0.486	0.158	0.058
18	0.415	0.215	0.085	1.468	0.315	0.215	0.770	0.230	0.078
24	0.893	0.421	0.105	1.978	0.416	0.315	1.315	0.425	0.125
30	1.312	0.526	0.127	2.545	0.645	0.445	1.875	0.725	0.245

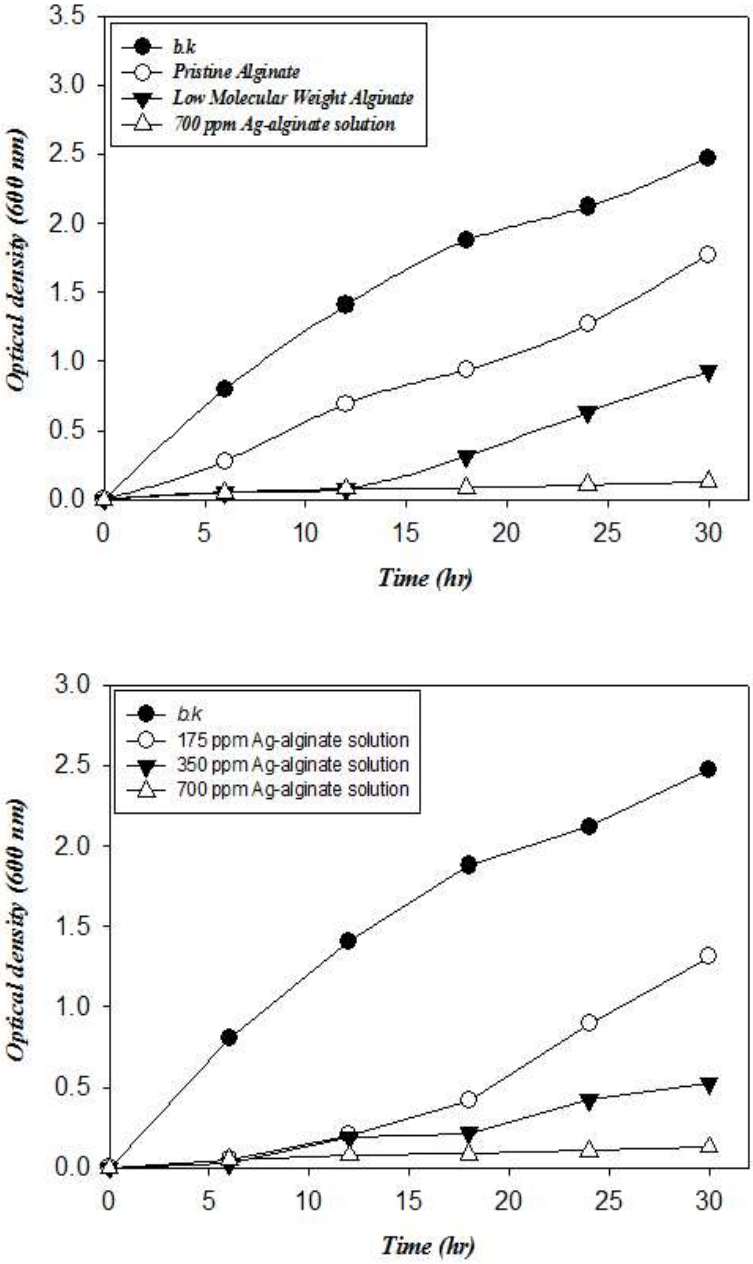


Fig. 2.8 Antibacterial effect of alginates and Ag-alginate for *E.coli*

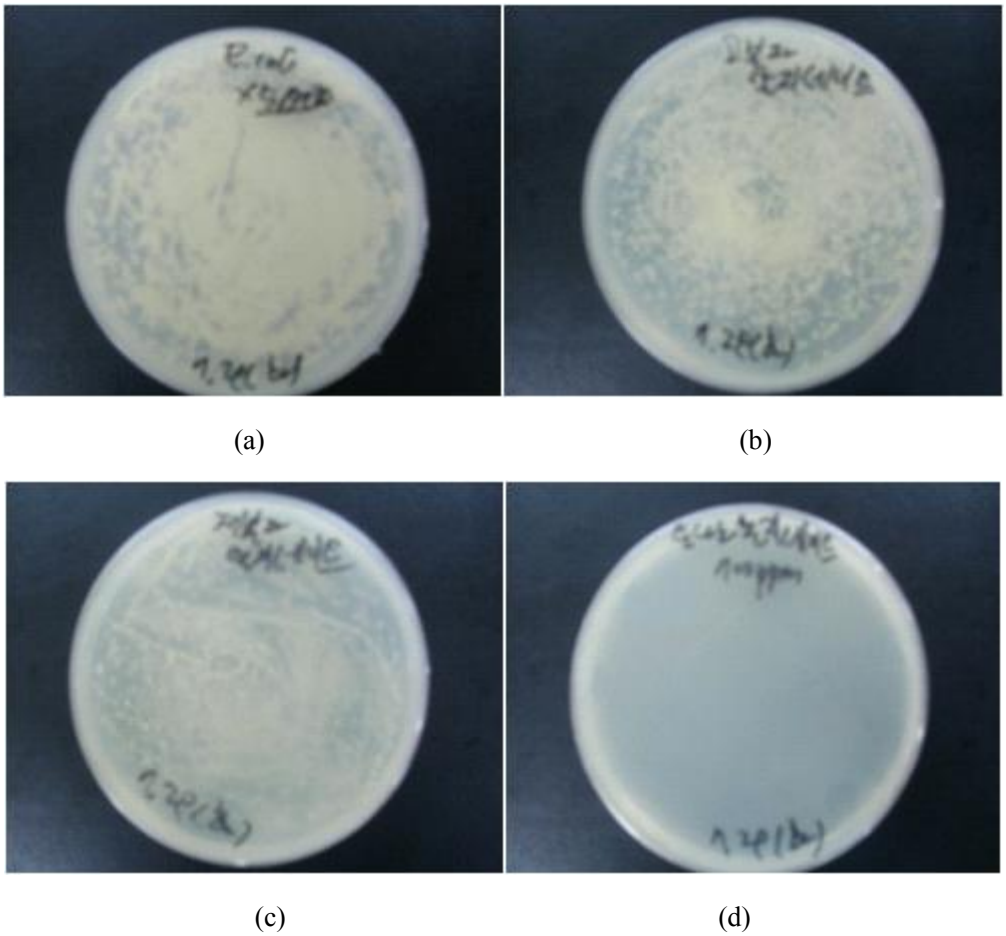
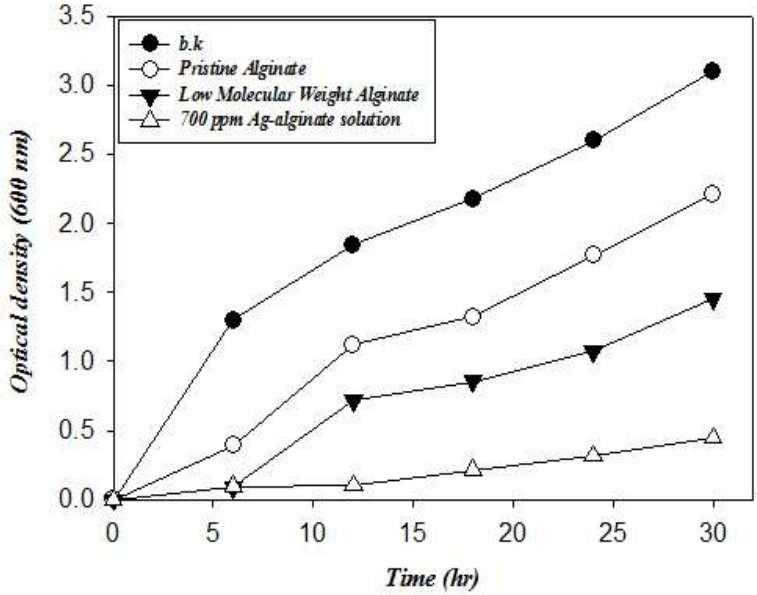


Fig. 2.9 Smear test for *E.coli.*: (a) B.K. (b) Pristine sodium alginate (c) LMWSA[1)] (d) silver alginate[2)] (at 35 ℃, for 24hr, 700 ppm) [1)] Mw : 16.5 kGy [2)] Ag-A-9



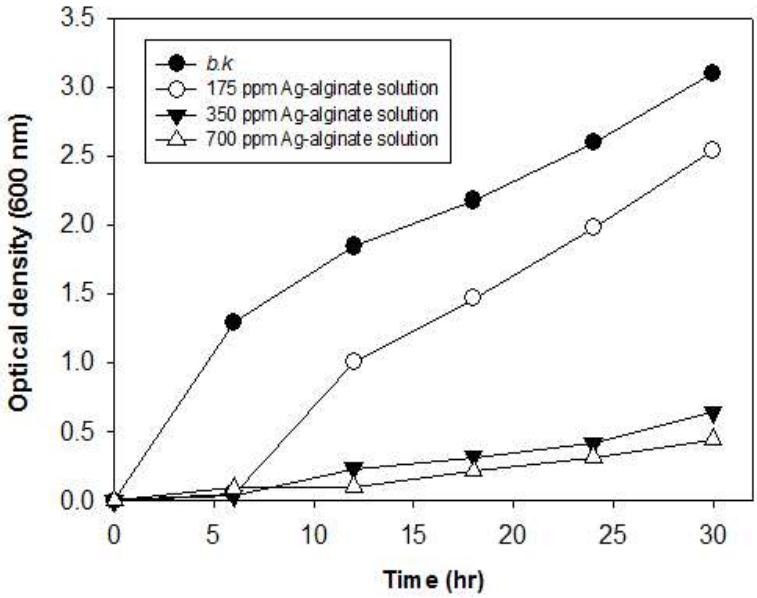
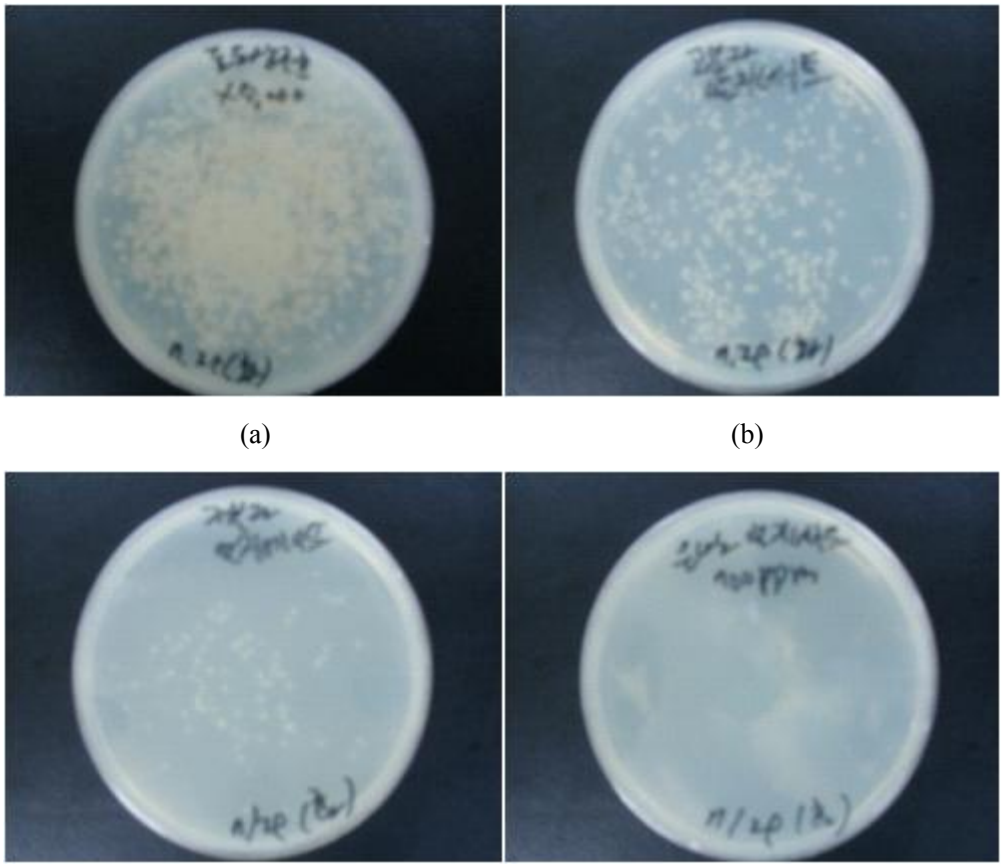


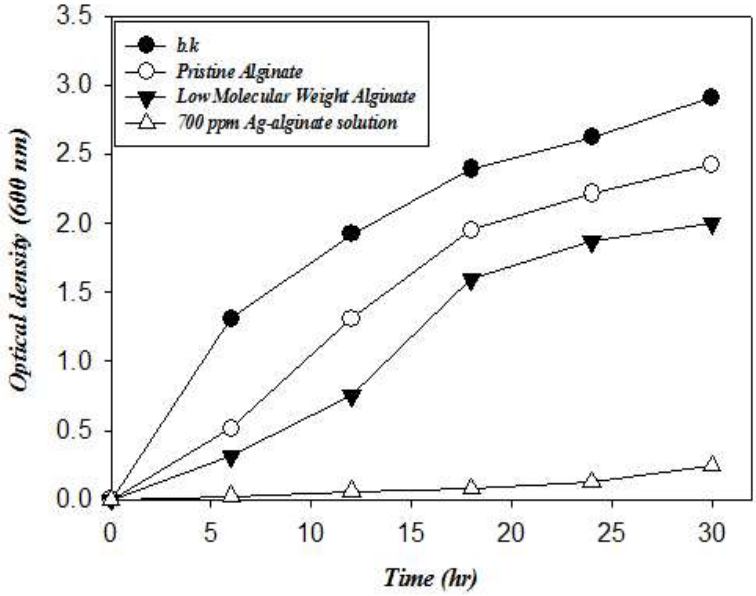
Fig. 2.10 Antibacterial effect of alginates and Ag-alginate for *S.aureus*



(a) (b)

(c) (d)

Fig. 2.11 Smear test for *S.aureus*.: (a) B.K. (b) Pristine sodium alginate (c) LMWSA[1)] (d) silver alginate[2)] (at 35 ℃, for 24hr, 700 ppm) [1)] Mw : 16.5 kGy [2)] Ag-A-9



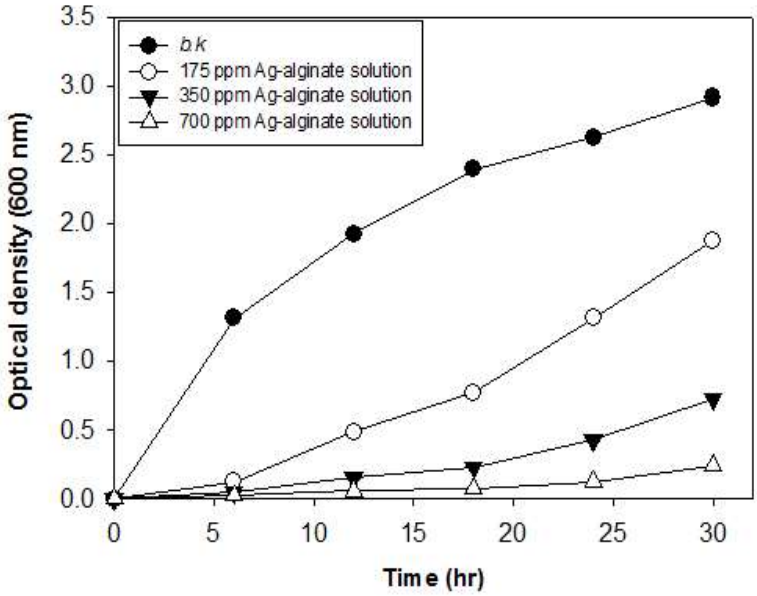
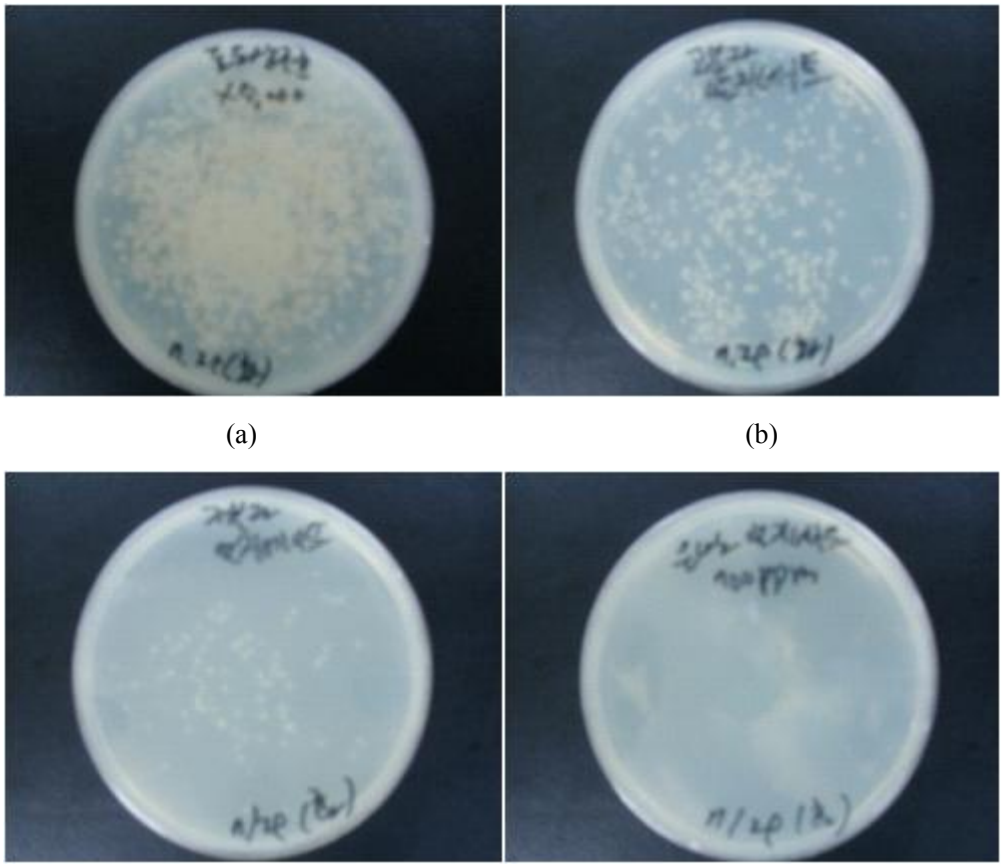


Fig. 2.12 Antibacterial effect of alginates and Ag-alginate for *P.acnes.*



(a) (b)

(c) (d)

Fig. 2.13 Smear test for *P.acnes.* : (a) B.K. (b) Pristine sodium alginate (c) LMWSA[1)] (d) silver alginate[2)] (at 35 ℃, for 24hr, 700 ppm) [1)] Mw : 16.5 kGy [2)] Ag-A-9

제 4 절. 결 론

4.1 은-알지네이트

과산화수소/초음파 그리고 과산화수소/전자빔으로 분자량을 조절하여 얻은 저분자 알지네이트를 사용하여 제조한 은-알지네이트(silver alginate)를 ICP-MS, SEM, TEM 그리고 particle size analyzer를 통해 얻은 결론은 다음과 같다.

1. 질산은 (silver nitrate)를 사용하여 손쉽게 은-알지네이트를 제조할 수 있었다.

2. 질산은과 저분자 알지네이트의 mole ratio를 조절하여 은의 함량을 조절할 수 있었고 용해도의 조절이 가능하였다.

3. 은-알지네이트의 은이온 함량은 이론적인 수치와 거의 비슷하거나 화학적 반응 외 물리적인 흡착으로 조금 더 높은 수치를 보였다.

4. 제조된 은-알지네이트의 경우 그 입자 크기는 일정한 분자량의 저분자 알지네이트를 사용 시 질산은의 농도가 증가함에 따라 증가하는 경향을 보였고 저분자 알지네이트의 분자량의 영향은 크게 받지 않았다. 다만 분자량이 80,500 da 인 경우에는 입자의 크기가 0.754 ㎛로 상당히 큰 것을 확인 할 수 있었다.

5. SEM과 TEM으로 확인한 은-알지네이트의 모폴로지는 전체적으로 구형을 유지하고 있었고 5~20 nm정도의 작은 입자들이 aggregation되어 0.7 ㎛정도의 큰 구형의 모습을 보였다.

4.2 은-알지네이트의 항균 특성

과산화수소/초음파 그리고 과산화수소/제조된 저분자 알지네이트와 은-알지네이트의 항균특성을 확인하기 위해 대장균, 포도상 구균 그리고 여드름 구균을 사용하여 MIC의 측정과 세포농도의 측정으로 그 항균성을 확인하고 얻은 결론은 다음과 같다.

1. 저분자화 시키지 않은 고분자 알지네이트의 경우 실험에 사용한 모든 균에 대해 항균성이 없음을 확인하였고, 저분자 알지네이트의 경우 MIC값이 2,000~10,000 ppm으로 항균성을 보였다.

2. 제조된 은-알지네이트의 경우 MIC 값은 350 ppm이었다.

3. 고분자 알지네이트, 저분자 알지네이트 그리고 은-알지네이트의 세포 농도를 확인한 결과 은-알지네이트가 가장 훌륭한 항균 지속성을 보였다.

4. 700, 350 그리고 175 ppm에서 세포 농도 측정 결과 은-알지네이트는 700 ppm에서 균이 전혀 성장하지 못함을 확인 하였다.

참고문헌

[1] Cannell, R.J.P. "Algae as a source of biologically active products." *Pest. Sci.,* 39,147-153 (2006)

[2] Jae-Il Park, Hee-Chul Woo, Jae-Hwa Lee "Production of Bio-energy from Marine Algae: Status and Perspectives." *Korean Chem. Eng. Res.,* 5,833-844 (2008)

[3] Arne Jensen "Present and Future Needs for Algae and Algal Products." *Hydrobiologia*, 1,15-23 (1993)

[4] Aris Persidis "The Carbohydrate-based Drug Industry." *Nature Biotechnol.,* 15,479-480 (1997)

[5] Mc Auliffe J.C. "Carbohydrates in Medicine" in Molecular and Cellular Glycobiology" (eds. M. Fukuda, O. Hindsgaul) *Oxford University Press*, pp. 249-275 (2000)

[6] Scott A Guelcher, Hollinger Jeffrey O "An introduction to biomaterials, Chapter 15" *CRC Press*, (2005)

[7]E. Nishide, H. Anzai, N. Uchida "Comparative investigation on the water-soluble and the alkali-soluble alginates from various Japanese brown algae." *A Nippon Suisan Gakkaishi*,, 53,1215-1219 (1987)

[8] A. Haug, B. Larsen, O. Smidsrod "Uronic acid sequence in alginate from different sources." *Carbohydr. Res.,* 32,217-225 (1974)

[9] Heyraud A. Colin-Morel, C. Gey, F. Chavagnat, M. Guinand, J. Wallach. "An enzymatic method for preparation of homopolymannuronate blocks and strictly alternating sequences of mannuronic and guluronic units." *Carbohydr. Res.,* 308, 417-422, (1998)

[10] E. Nishide, Y. Kinoshita, H. Anzai, N. Uchida, "Distribution of hot water extractable material, water soluble alginate and alkali soluble alginate in

different parts of Undaria pinnatifida." *Nippon Suisan Gakkaishi,* 54,1619-1622, (1988)

[11] E. Nishide, A. Hiroshi, U. Naoyuki, "A comparative investigation on the water soluble and the alkali soluble alginates from various Japanese brown algae." *Nippon Suisan Gakkaishi,* 53, 1215-1219 (1987)

[12] M. Fujihara, T. Nagumo, "Determination of the molecular weight of alginates by agarose gel filtration." *J. Chromatogr.,* 465,386-389 (1989)

[13] K. Noda, K. Takada "Mannuronic to guluronic aicd ratios of alginic acids prepared from various brown seaweeds." *Bull. Jpn. Soc. Sci. Fish,* 49,1591-1593 (1983)

[14] Johnna S. Temenoffa and Antonios G. Mikos "Review: tissue engineering for regeneration of articular cartilage." *Biomaterials,* 21,431-440. (2000)

[15] Yimin Qin "Gel swelling properties of alginate fibers." *J. Appl. Polym. Sci.,* 3,1641-1645. (2004)

[16] A. Haug, O. Smidsrod "The effect of divalent metals on the properties of alginate solutions." *Acta. Chem. Scand.,* 19,341-351. (1965)

[17] M. Otterlei, K. Ostgaard , G. Skjak-Braek, O. Smidsrød, P. Soon-Shiong , T. Espevik "Induction of cytokine production from human monocytes stimulated with alginate." *J. Immunotherapy,* 10,286-291. (1991)

[18] G. Skjak-Braek, T. Espevik "Application of alginate gels in biotechnology and biomedicine." *Carbohydr. Eur.*, 14,19-25. (1996)

[19] James W. Doyle, Timothy P. Roth, Robin M. Smith, Ya-Qi Li, Raymond M. Dunn "Effects of calcium alginate on cellular wound healing processes modeled in vitro." *J. Biomed. Mater. Res.,* 4,561-568. (1996)

[20] Yimin Qin "The gel swelling properties of alginate fibers and their applications in wound management." *Polym. Adv. Technol.,* 19,6-14 (2008)

[21] Jayanta Haldar, Deqiang An, Luis A´lvarez de Cienfuegos, Jianzhu Alexander M. Klibanov. "Polymeric coatings that inactivate both influenza virus and pathogenic bacteria." *PNAS,* 47,17667-17671 (2006)

[22] Stu Borman "Largest Synthetic Hetero-Oligosaccharide." *Chemical & Engineering News*, 47,17 (2006)

[23]Chiharu Nishiyama, Tadashi Nagai, Toshimasa Yano "Adsorption of Mutagens in Distilled Water by Dietary Fibers." *Agric. Biol. Chem.,* 3,797-802 (1991)

[24] M. Fujihara, T. Nagumo An influence of the structure of alginate on the chemotectic activity of marcrophages and the antitumor activity *Carbohyd. Res.,* 243,211-216 (1993)

[25] Y. Kimura, K. Watanabe, and H. Okuda, Effects of soluble sodium alginate on cholesterol excretion and glucose tolerance in rats *J. Ethnopharmacology*, 54,47-54, (1996).

[26] Schaeffer, D.J., V.S. Krylov. Anti-HIV activity of extracts and compounds from alga and Cyanobacteria. *Ecotoxicol. Envirom. Safety,* 45, 208-227 (2000)

[27] D.S. Kim, D.J. Lim, S.H. Moon, H.H. Shu, Y.I. Park, Purification of fucoidan from korean sea Tangle(Laminaria religosa) and Isolation of Fucoidan Degrading Microorganisms. *Kor. J. Micobiol. Biotechnol.,* 4, 362-365 (2004)

[28] L. Chevolot , A. Foucault, N. Kervarec, C. Sinquin, A.M. Fisher, C. Boisson-Vidal, Further data on the structure of brown seaweed fucans: relationships with anticoagulant activity. *Carbohyd. Res.,* 319,154-165. (1999)

[29] L. Chevolot, B. Mulloy, J. Ratiskol, A. Foucault, S. Colliec-Jouault, A disaccharide repeat unit is the major structure in fucoidans from two species of brown algae. *Carbohyd. Res.,* 330,529-535.(2001)

[30] A.O. Chizhov, A.Dell, H.R. Morris, S.M. Haslam, R.A. McDowell, A.S.

Shashkov, N.E. Nifant'ev, E.A. Khatuntseva, A.I. Usov A study of fucoidan from the brown seaweed Chorda filum. *Carbohyd. Res.*, 320,108-119.(1999)

[31] T. Nishino, T. Nagumo Structural characterization of a new anticoagulant fucan sulfate from the brown seaweed Ecklonia kurome. *Carbohyd. Res.,* 211,77-90. (1991)

[32] C. Boisson-Vidal, S. Colliec-Jouault, A.M. Fisher, J. Tapon Bretaudie`re, C. Sternberg, P. Durand, J. Jozefonvicz Biological activities of fucans extracted from brown seaweeds *Drugs Fut.*, 16, 539- 545.(1991)

[33] C. Boisson-Vidal, F. Haroun, M. Ellouali, C. Blondin, A.M. Fisher, A. de Agostini, J. Jozefonvicz Biological activities of polysaccharides from marine algae *Drugs Fut.*, 20,1237-1249.(1995)

[34] S. Hideyuki, K.T. Itsuko, N. Masato, H. Shusuke, S. Haruji, U. Sadao, Y. Teruto Inhibitory effect of Cladosiphon fucoidan on the adhension of Helicobacter pylori to human Gastric Cell. *J. Nutr. Sci., Vitaminol.*, 45, 325-336(1991)

[35] Kamaras J. Murrell W. G. Intestinal epitheloal damage in sides babies and its similarity to that caused by bacterial toxins in the rabbit. *Informa healthcare* 2,197-203 (2001)

[36] T. Nishino, Y. Aizu, T. Nagumo The Relationship Between the Molecular Weight and the Anticoagulant Activity of Two Types of Fucan Sulfates from the Brown Seaweed Ecklonia kurome. *Agric. Biol. Chem.*, 55,791-796(1991)

[37] Takashi Nishino, Terukazu Nagumo Anticoagulant and antithrombin activities of oversulfated fucans *Carbohydr. Res.*, 229,355-362 (1992)

[38] T. Nishino, H. Ura, T. Nagumo, *Bot. Mar.*, 38,187-193 (1995)

[39] T. Nishino, T. Nagumo Structural characterization of a new anticoagulant fucan sulfate from the brown seaweed Ecklonia kurome *Carbohydr. Res.*, 214,193-197 (1991)

[40] T. Bruhn, J. Du¨ ring, H-D Bruhn, L. Be´ress, Proceedings of 8th *International Symposium on Marine Natural Products*, Tenerife, Spain, 10-15 September, 1995, pp. 230-231.

[41] D. Eric, H. Dominique, L. Antoine Effect of Low Molecular Weight Fucoidan and Low Molecular Weight Heparin in a Rabbit Model of Arterial Thrombosis, *J. Vasc. Res.,* 45,529-537 (2008)

[42] Bachelet, Laure, Letourneur, Didier Affinity of low molecular weight fucoidan for P-selectin triggers its binding to activated human platelets *Biochimica et biophysica acta. General subjects.*, 2,141-146 (2009)

[43] Nardella A, Chaubet F, Boisson-Vidal C, Blondin C, Durand P, Josefonvicz J Anticoagulant low molecular weight fucans produced by radical process and ion exchange chromatography of high molecular weight fucans extracted from the brown seaweed Ascophyllum nodosum. *Carbohydr Res* 289, 201-208 (1996)

[44] Mauray S, Sternberg C, Theveniaux J, Millet J, Sinquin C, Tapon-Bretaudiere J, Fischer AM Venous antithrombotic and anticoagulant activities of a fucoidan fraction. *Thromb. Haemost.* 74,1280-1285 (1995)

[45] Bajaj MS, Kuppuswamy MN, Saito H, Spitzer SG, Bajaj SP Cultured normal hepatocytes do not synthesize lipoprotein-associated coagulation inhibitor-evidence that endothelium is the principle site of its synthesis. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 87,8869-8873 (1990)

[46] Lupu C, Poulsen E, Roquefeuil S, Westmuckett AD, Kakkar VV, Lupu F Cellular effects of heparin on the production and release of tissue factor pathway inhibitor in human endothelial cells in culture. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 19,2251-2262 (1999)

[47] S. Koyanagi, N. Tanigawa, H. Nakagawa, S. Soeda, H. Shimeno Over sulfation of fucoidan enhances its antiangiogenic and antitumor activities. *Biochem. Pharmacol.* 65,173-178 (2003)

[48] T. Nishino, H. Kiyohara, H. Yamada, H. Nagumo. An anticoagulant fucoidan from the brown seaweed Ecklonia kurome. *Phytochem.* 30, 535- 539 (1991)
[49] D.J. Schaeffer, V.S. Krylov, Anti-HIV activity of extracts and compounds from algae and Cyanobacteria. Ecotoxicol. *Environ. Safety* 45, 208-227(2000)

[50] Floros and Liang, J.D. Floros, H. Liang, Acoustically assisted diffusion through membranes and biomaterials. *Food Technology* 79,84 (1994)

[51] 안신영, 저분자 chitosan, chitosan oligo당, 수용성 chitin의 항균성에 관한 연구, *이화여자 대학교 대학원 박사학위 청구논문* (2002)

[52] D.B. Choi, B.Y. Ryu, Y.L. Piao, S.K. Choi, B.W. Jo, W.S. Shin, H. Cho, Studies on Saccharification from Alginate using Stenotrophomonas maltophilia *JIEC* 2,182-186 (2008)

[53] Aiba, S. Preparation of N-acetylchitooligosaccharides by hydrolysis of chitosan with chitinase followed by N-acetylation. *Carbohydr. Res.*, 265, 323-328(1994)

[54] W. S. Choi, K. J. Ahn, D. W. Lee, M. W. Byun, H. J. Park, Preparation of chitosan oligomers by irradiation. *Polym. Degrad. Stab.* 3, 533-538 (2002)

[55] Lingbin Lu, Ping Zhang, Yang Cao, Qiang Lin, Sujuan Pang, Huaming Wang, Study on Partially Oxidized Sodium Alginate with Potassium Permanganate as the Oxidant., *Journal of Applied Polymer Science*, 113, 3585-3589 (2009)

[56] Haug, A., Larsen, B., & Smidsrød, O. . Studies of the sequence of uronic acid residues in alginic acid. *Acta Chemica Scandinavica,* 21, 691-704.(1967)

[57] N. Nagasawa, H. Mitomo, F. Yoshii, T. Kume, Radiation induced degradation of sodium alginate. *Polym. Degrad. Stab.* 69, 279-285(2000)

[58] G. Pompe, U. Lappan, L. Ha¨ussler, Analysis of the influence of the

polymerisation degree on the thermal properties of irradiation modified poly(tetrafluoroethylene). *Thermochim. Acta.* 391,257-269(2002)

[59] D. M. Foley, E. Reher, F. Caporaso, S. Trimboli, Z. Musherraf, A. Prakash, Elimination of Listeria monocytogenes and changes in physical and sensory qualities of a prepared meal following gamma irradiation. *Food Microbiol.* 18, 193-204(2001)

[60] D.W. Lee, W.S. Choi, M.W. Byun, C.M. Lee, Effect of Irradiation on Degradation of Alginate., *J. Agric. Food Chem.,* 51, 4819-4823(2003)

[61] Nordtveit, R. J., Va°rum, K. M.,& Smidsrød, O. . Degradation of fully water-soluble, partially N-acetylated chitosans with lysozyme. *Carbohydrate Polymers,* 4, 253-260.(1994)

[62] Zhao Yang, Jin-Ping Li, Hua-shi Guan, Preparation and characterization of oligomannuronates from alginate degraded by hydrogen peroxide., *Carbohydrate Polymers* 58,115-121(2004)

[63] Allan, G. G., & Peyron, M. . Molecular weight manipulation of chitosan I : Kinetics of depolymerization by nitrious acid. *Carbohydr Res.,* 277, 257-272(1995)

[64] Chang, L. B., Tai, M. C., & Cheng, F. . Kinetics and products of the degradation of chitosan by hydrogen peroxide. *J. Agric. Food Chem.,* 49, 4845-4851(2001)

[65] Tanioka, S., Matsul, Y., Icie, I., Tanigawa, T., Tanaka, Y., Shibata, H., Sawa, Y., & Kono, Y. . Oxidative depolymerization of chitosan by hydroxyl radical. *Bioscience Biotechnology Biochemistry*, 60, 2001-2004(1996)

[66] Feng Tian*, Yu Liu, Keao Hu, Binyuan Zhao, Study of the depolymerization behavior of chitosan by hydrogen peroxide., *Carbohydrate Polymers* 57,31-37(2004)

[67] A. J. Aliste, F. F. Vieira, and N. L. Del-Masto, Radiation effects on agar,

alginates and carrageenan to be used as food additives *Radiation Physics and Chemistry*, 57, 305-308, (2000).

[68] Qun Zeng Huang, Shi Ming Wang, Jin Feng Huang, Li Hong Zhuo, Ying Chen Guo, Study on the heterogeneous degradation of chitosan with hydrogen peroxide under the catalysis of phosphotungstic acid., *Carbohydrate Polymers* 68,761-765 (2007)

[69] D-W Lee, W-S Choi, M-W Byun, H-J Park, Y-M Yu, and C-M Lee Effect of γ-Irradiation on Degradation of Alginate., *J. Agric. Food Chem.,* 16, 4819-4823 (2003)

[70] B. Kang, Y-D Dai, H-Q Zhang, D Chen, Synergetic degradation of chitosan with gamma radiation and hydrogen peroxide., *Polymer Degradation and Stability* 92, 359-362 (2007)

[71] D. H. Han, B. N. Kim, 전자빔 가속기의 산업적 응용., *News & Information for Chemical Engineers* 4,484-490 (2003)

[72] E. S. Sohn, S. W. Kim, 항균성 고분자 기술동향., KISTI 기술동향분석보고서 , (2002)

[73] 김희정, H_2O_2 분해 저분자화 chitosan의 제조 및 특성 연구, *이화여자 대학교 대학원 석사학위 청구논문* (2002)

[74]. K. F. Eltahlawy, M. A. Elbelndary, A. G. Elhendawy, and S. M. Hudson, “The Antimicrobial Acitivity of Cotton Fabrics Treated with Different Crosslinking Agents and Chitosan”, Carbohydrate Polymers, 2005, 60, 421-430.

[75]. M. Ma and G. Sun, “Antimicrobial Cationic Dyes. Part 3: Simultaneous Dyeing and Antimicrobial Finishing of Acrylic Fabrics” *Dyes Pigments,* 66, 33-41 (2005)

[76]. J. W. Lee, R. M. Broughton, A. Akdag, S. D. Worley, and T. S. Huang, “Preparation and Application of An-triazinebased Novel N-halamine Biocide for Antimicrobial Fibers”, *Fibers Polym.,* 8, 148-154 (2007)

[77]. S. D . Worley and D. E. W illiams “ Halamine Water Disinfectants” *Crit Rev Environ Control,* 18, 133-175 (1988)

[78]. C. H. Lin, J. C. Lin, C. Y. Chen, C. Y. Cheng, X. Z. Lin, and J. J. Wu, “Feasibility Evaluation of Chitosan Coatings on Polyethylene Tubing for Biliary Stent Applications”, *J. Appl. Polym. Sci,* , 97, 893-902 (2005)

[80] Y.Y. Kim and Y.J. Cho, " Studies on Physicochemical and Biological Properties of Depolymerized Alginate from Sea tangle, Laminaria japonicus by Thermal decomposition", *J. Korea Fish. Soc.* 4, 325-330(2010)

[81] Jaroslaw M. Wasikiewicz, Fumio Yoshii, Naotsugu Nagasawa, Radoslaw A. Wach, Hiroshi Mitom "Degradation of chitosan and sodium alginate by gamma radiation, sonochemical and ultraviolet methods." *Radiation Physics and Chemistry* 73,287-295 (2005)

[82] K. Sakugawa, A. Ikeda, A. Takemura, H. Ono. "Simplified Method for Estimation of Composition of Alginates by FTIR" *Journal of applied polymer Science*, 93,1372-1377 (2004)

[83] C.G. Gomez, M. Rinaudo, M.A. Villar "Oxidation of sodium alginate and characterization of the oxidized derivatives" *Carbohydrate Polymers* 67,296-304(2007)

[84] C.Q. Qin, Y.M. Du, L. Xiao "Effect of hydrogen peroxide treatment on the molecular weight and structure of chitosan" *Polymer Degradation and Stability* 76,211-218 (2002)

[85] S. Nakagawa and H. Okuda, *Nippon Shokuhin Kagaku Kogaku Kaishi*, 43(8), 917-922 (1996).

[86] 김민정, “갑각의 종류가 다른 chitin/chitosan의 제조에서 제조조건 변화에 따른 특성연구”, *이화여자대학교 대학원 박사학위 논문* (2001)

[87] S. L. Malhotra" Ultrasonic Solution Degradations of Poly(Alkyl Methacrylates)" *J. Macromol. Sci. Chem.*, 176, 745 (1975).

[88] M. L. Tsaih, R. H. Chen "The effect of reaction time and temperature during heterogenous alkali deacetylation on degree of deacetylation and molecular weight of resulting chitosan" *J. Appl. Polym. Sci.,* 88, 2917-2923 (2003)

[89] K. L. B. Chang, M.-C. Tai, F.-H. Cheng "Kinetics and products of the degradation of chitosan by hydrogen peroxide" *J Agric Food Chem* 49, 4845-4851 (2001)

[90] Żegota Henryk "The effect of gamma-irradiation on citrus pectin in N/sub 2/O and N/sub 2/O/O/sub 2/ saturated aqueous solutions" *Food Hydrocoll.,* 13, 477-481 (1999)

[91] I. Janik, E. Kasprzak, A. Al-Zier, J.M. Rosiak "Radiation crosslinking and scission parameters for poly(vinyl methyl ether) in aqueous solution." *Nucl. Instr. Meth. Phys. Res. B* 208, 374-379 (2003)

[92] George H. Scherr "Silver alginate foam compositions" *U.S. PAT. (6,696,077)* 2004

[93] Jae Won Lee, Chang Woo Nam, Sohk Won Ko "Antimicrobial finish of cotton fabric with acrylamidomethyl chito-oligosaccharide." *Journal of the korean fiber society*, 10,769-775 (1999)

[94] Jae Won Lee , Chang Woo Nam , Ha Soo Seong , Sohk Won Ko "Antibacterial finish of cotton fabric with chito-oligosaccharide(1)-treatment onto cotoon fabric DMDHEU" *Journal of the korean fiber society*, 10, 649-655(1998)

[95] 최정임, "Methicillin Resistant Staphylococcus aureus에 대한 chitosan의 항균성과 항균 시험방법에 관한 연구" *이화여자 대학교 대학원 박사학위 청구논문* (2001)

[96] Pelle Lidstrom, Jason Tierney, Bernard Wathey, Jacob Westman "Microwave assisted organic synthesis-a review." *Tetrahedron* 57,9225-9283 (2001)

감사의 글

요즘 들어 '유종의 미'라는 말이 자꾸 떠오릅니다. 3년 6개월이라는 결코 짧지 않은 시간동안 얻은 것과 잃어버린 것에 대한 많은 생각들이 스쳐지나갑니다. 학위과정은 저에게 부족함을 많이 느끼게 했던 소중한 시간이었습니다. 누구나 그렇듯 부족함을 느낄 때 가장 많이 성장하고 가장 많이 발전할 수 있으리라 생각합니다.

무엇보다도 학위과정 중 따끔한 질책으로 부족함을 가르쳐 주시고 따뜻한 격려로 이끌어 주시며 채워주신 조병욱 교수님의 큰 가르침에 머리 숙여 깊은 감사를 드립니다. 그리고 부족한 제 논문의 심사를 흔쾌히 허락해 주신 김정규 교수님, 최재곤 교수님, 조 훈 교수님 그리고 이인화 교수님께 감사드립니다. 또한 실험 과정 중 많은 조언과 격려를 주신 이재욱 교수님, 신현재 교수님, 이중헌 교수님께 깊은 감사를 드립니다. 그리고, 개인적인 업무와 실험으로 바쁜 와중에도 논문투고와 실험에 도움을 주신 많은 대학원 선후배님들과 특히 실험의 전반적인 부분과 제가 미쳐 신경 쓰지 못한 많은 부분을 함께한 (주)럭키공업의 민경두 선생과 김병옥 학생에게 감사드립니다. 아울러 김선일 교수님, 차월석 교수님, 한철 교수님, 권중근 교수님, 조정일 교수님, 윤두수 교수님, 이응재 교수님, 순천대학교의 최창용 박사님, 최수경 박사님, 손정선 박사님, 연세대학교 최향희 교수님, (주)한국스치로폴의 백 용 연구소장님께 감사드립니다.

끝으로 나약한 제가 여기까지 쓰러지지 않고 오도록 항상 노심초사하시며 지켜봐 주신 사랑하는 부모님, 장인 장모님, 형님, 누나 그리고 동생 내외에게 깊은 감사드립니다. 무엇보다도 끊임없이 제게 맑은 물을 부어준 사랑하는 아름다운 아내와 제 삶의 활력인 사랑하는 딸 민서에게 부족하지만 이 논문을 드립니다.

2010년 6월

최 유 성

저작물 이용 허락서

학 과	화학공학과	학 번	20077341	과 정	박사
성 명	한글 : 최 유 성 한문 : 崔 維 成 영문 : YOO-SUNG CHOI				
주 소	광주광역시 북구 오치동 1019-9번지				
연락처	e-mail : usung12@naver.com				
논문제목	한글:화학적 방법에 의한 저분자화 알지네이트의 생산기술 및 응용				
	영문:Preparation and applications of the alginates depolymerized by chemical treatment				

본인이 저작한 위의 저작물에 대하여 다음과 같은 조건 아래 조선대학교가 저작물을 이용할 수 있도록 허락하고 동의합니다.

- 다 음 -

1. 저작물의 DB구축 및 인터넷을 포함한 정보통신망에의 공개를 위한 저작물의 복제, 기억장치에의 저장, 전송 등을 허락함
2. 위의 목적을 위하여 필요한 범위 내에서의 편집과 형식상의 변경을 허락함(다만, 저작물의 내용변경은 금지함)
3. 배포・전송된 저작물의 영리적 목적을 위한 복제, 저장, 전송 등은 금지함
4. 저작물에 대한 이용기간은 5년으로 하고, 기간종료 3개월 이내에 별도의 의사 표시가 없을 경우에는 저작물의 이용기간을 계속 연장함
5. 해당 저작물의 저작권을 타인에게 양도하거나 출판을 허락을 하였을 경우에는 1개월 이내에 대학에 이를 통보함
6. 조선대학교는 저작물 이용의 허락 이후 해당 저작물로 인하여 발생하는 타인에 의한 권리 침해에 대하여 일체의 법적 책임을 지지 않음
7. 소속 대학의 협정기관에 저작물의 제공 및 인터넷 등 정보통신망을 이용한 저작물의 전송・출력을 허락함

: 동의( ) 반대(0)

2010년 6월

저작자 : 최유성 (인)

조선대학교 총장 귀하

“이 논문은 2007년도 정부재원(교육인적자원부 학술연구조성사업비)으로 (구) 한국학술진흥재단의 지원을 받아 연구되었음(KRF-2007-511-D00119).”