

非食用 海藻에서 蛋白質의 開發研究

1. 非食用海藻에서 蛋白質의 抽出條件 및 分離된 粗蛋白質의 아미노酸 組成

金 俊 平
中央大學校 食品加工學科
(1974년 1월 15일 수리)

Development of Protein Utilization from Inedible Algae

I. Separation of Crude Protein from Inedible Algae and its Amino Acids Pattern in Crude Protein

by

Jun Pyong Kim

Department of Food Processing, University of Chung Ang

(Received January 15, 1974)

Abstract

The development of protein utilization with inedible algae (*Ulva pertusa Kjellman*, *Sargassum amyendo Kjellman*) have been investigated. These include a) composition of algae, b) condition of extractability of crude protein with water and tris buffer, c) precipitation of crude protein with various precipitate agent, d) digestibility of algae diet which was mixed with wheat bran, e) pepsin digestibility of crude protein, and f) the amino acid composition of the algae protein. The results are obtained as follows;

(1) Two species of algae examined were good source of protein because they contained 17% to 19% of crude protein;

(2) *Ulva pertusa Kjellman* could be used for an animal diet, and its proper mixing ratio with wheat bran was 25% of algae to 75% of wheat bran, of which the condition reveals the best digestibility;

(3) Water was better extractant for protein of the algae than tris buffer, precipitation of protein in boiling water bath was the most economical method of preparation of the protein from algae unless the protein activity was required;

(4) For the precipitates from algae between pH 1~12, its yeield was increased in proportion to alkaline concentration;

(5) Extractability of protein from algae were not affected by either ascorbic acid or sucrose in tris buffer solution;

(6) Aspartic and glutamic acids were the amino acids most abundant in the algae proteins and essential amino acids, especially of leucine, isoleucine, valine, threonine, lysine, and tryptophan, were also relatively high in its contents.

結 言

인간에게 절대적으로 必要한 蛋白質의 攝取量과 그의 質의 攝取量은 先進國에 속한 사람에게도 問題가 될뿐 아니라 우리나라 사람에게는 절대량이 부족한 형편에 있으므로 蛋白質資源의 開發은 시급한 問題로 되고 있다. 특히 우리 나라는 三面이 바다로 둘러싸여 있어 海藻는 國民 食生活에 있어서 重要한 位置를 차지하고 있다. 우리나라 근해에서만도 400餘種의 海藻類가 알려져 있으며 그중 非食用海藻가 200餘種이나 된다. 海藻에 對한 研究는 주로 食用海藻의 몇 種類에 對한 一般成分⁽¹⁾⁽²⁾ 및 그의 아미노酸의 組成研究⁽³⁾⁻⁽¹⁰⁾은 相當히 研究되고 있으나 非食用海藻 特히 多量채취 가능한 海藻에 對한 研究는 거의 없는 實情에 있으므로 筆者는 현재 여러곳에서 손쉽게 또한 多量採取할 수 있는 海藻中 몇種類를 擇하여, 그의 利用을 目的으로 먼저 그의 간단한 動物實驗으로 蛋白質의 消化率을 살펴 보았으며 또한 蛋白質의 抽出條件 및 分離와 그의 組成을 檢討하고자 本實驗을 試圖한 것이다.

材料 및 實驗方法

ㄱ) 海藻試料: 구멍갈파래 (*Ulva pertusa Kjellman*) 및 개말 (*Sargassum anomyendo Kjellman*)이며 이는 전남 여수시 오동도 근해에서 수집하여 세척 탈염하고 풍건한 후 분쇄하여 시료로 사용하였다.

ㄴ) 藥 品

a) TCA(trichloro acetic acid): 一級試藥으로 蒸留水에 溶解시켜 使用하였다.

b) Ammonium sulfate: 一級試藥을 使用하였다.

c) Tris-buffer (pH 7.3)⁽¹¹⁾: N/10 HCl 42.5 ml, M/5 tris amino methane 25 ml 를 加하고 다시 증류수 32ml 를 加하여 pH 7.3의 buffer 용액으로 만들었다.

d) Viskings cellulose acetate tubing: 透析用으로 용액에 따라 적절히 절단하여 使用하였다.

e) Ascorbic acid: 特級 L-ascorbic acid 를 溶解시켜 使用하였다.

ㄷ) 海藻의 一般分析

海藻試料 건조품을 일반식품분석법을 적용하였으며 특히 총질소량은 Kjeldahl 分解法과 蒸溜法을 使用하여 測定하였다.

ㄹ) 구멍갈파래 蛋白質의 消化

구멍갈파래의 토끼에 對한 蛋白質의 消化를 살펴보기 위하여 (1) 밀기울에 채소를 배합하여 사육하는 것과 (2) 밀기울 75%와 파래 25%의 비율로 배합한 것과 (3) 밀기울 50%와 파래 50%의 비율로 배합한 것을 20여일간 사육실험하여 그의 급여 단백질의 총량과 배설

한 분의 단백질량으로 그의 소화율을 산출하였다. 사육 실험에 사용한 토끼는 흰토끼이며 단백질의 함량의 測定도 Kjeldahl 法으로 산출하였다.

ㄱ) 粗蛋白質의 分離

(a) 물로 抽出된 粗蛋白質의 分離⁽¹²⁾⁽¹³⁾

구멍갈파래개말의 세척 탈염후 풍건하고 분쇄하여 보관하였던 試料에서 蛋白質의 抽出條件 및 그의 가장 分離하기 쉬운 方法을 檢討하기 위하여 試料 50 g을 取하여 Fig. 1과 같은 方法으로 물을 400 ml 加한후 Waring blender에서 마쇄한후 二重의 cheese clothe(가제)로 잘 짜고 다시 그 殘渣에 물 400 ml 加한 후 다시 抽出壓搾한 것을 一回抽出液과 合하여 遠心分離機(3000 r.p.m.)로 遠心分離하여 上澄液을 合하였더니 약 600 ml가 되었다. 이 上澄液을 각각 50 ml를 取하여 다음과 같은 蛋白質의 沈澱實驗을 實施하였다.

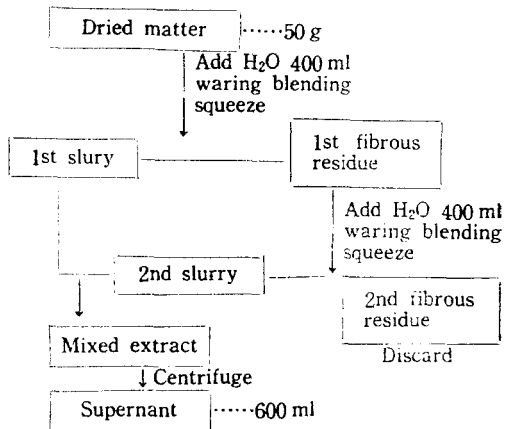


Fig. 1. Extract process of algae

(1) 試料 50 ml를 取해 100°C의 沸騰浴속에서 抽出液의 凝集된 것을 遠心分離하여 沈澱된 것과 分離하였다.

(2) 試料 50 ml를 取해 2N CH₃COOH 溶液속에 1%의 tannic acid가 들어 있는 溶液(pH 3.1)을 20 ml 加하여 생기는 沈澱物을 遠心分離하여 얻는다.

(3) 試料 50 ml에 trichloro acetic acid 50% 溶液 5 ml 加하여 생기는 沈澱物을 遠心分離하여 얻는다.

(4) 위의 同量의 試料에 20% TCA(pH 1.7)를 10 ml 加하여 얻어진 沈澱物을 分離하였다.

(5) 試料 50 ml를 取해 ammonium sulfate 20g를 加하여 沈澱시킨다. 沈澱物을 遠心分離하여 分離한후 2일간 투석하여 ammonium sulfate를 除去한후 그 沈澱物을 얻는다.

(6) 試料 50 ml를 取해 N HCl와 N NaOH로 pH 1에서 pH 12까지의 溶液을 위의 抽出液에 加하여 蛋白質의 沈澱된 것을 얻는다.

(b) Tris buffer 로 抽出된 粗蛋白質의 分離

前記 實驗은 물로 抽出된 蛋白質을 여러 條件에서 沈澱된 것을 檢討하였지만 本實驗에서는 tris Buffer (pH 7.3)에 ascorbic acid 및 sucrose 가 들어있는 溶液을 만들었다. 試料 50 g 를 取해 여기에 tris buffer 溶液 (pH 3.5) 400 ml 를 加하여 waring blender 로 마쇄한 후 二重의 cheese clothe 로 壓搾하여 그 殘渣에 다시 400 ml 의 tris buffer 를 加하여 抽出한 후 1回, 2回의 抽出液을 遠心分離하여 그 上澄液 50ml 씩 取해 前記 實驗과 같은 方法으로 (1) 100°C 까지의 加熱로 凝集되는 蛋白質 (2) 50% TCA 5ml 를 取하여 分離된 蛋白質 (3) ammonium sulfate 20 g 를 加하여 얻는 沈澱된 蛋白質을 투석하여 그 量을 算出하였다.

ㄷ) 粗蛋白質의 아미노酸 組成

抽出分離된 蛋白質의 大體의인 아미노酸 組成을 살피기 위하여 試料 一定量을 軟質試驗管에 取하여 여기에 6N HCl 를 넣고 減壓 眞空으로한 후 105°C oven 속에서 18時間 加水分解 시킨 후 鹽酸을 蒸發시키고 여기에 少量의 물을 加하여 그중에서 一定量씩 micropipette 로 Whatman No. 1 chromatography 用 paper 에 apply 한 후 二次元法으로 각 아미노酸을 分離하여 定量⁽¹⁴⁾하였다. 展開試藥으로는 一次元에 butanol : acetic acid : H₂O (4 : 1 : 2), 二次元에는 phenol : H₂O (50g : 125ml)를 使用하여 分離한 후 ninhydrin 으로 發色시켰다. 그 후 copper nitrate 溶液으로 固定시킨 후 波長 509 mμ 에서 測定하였으며 鹽酸 加水分解時 파괴된 tryptophan 의 測定은 Millon-Lugg 法⁽¹⁵⁾ (425mμ 波長)으로 檢出하였다.

ㄸ) 蛋白質의 pepsin 分解

TCA 로 沈澱되어 얻는 蛋白質의 pepsin 에 의한 分解程度를 살피기 위하여 試料 粗蛋白質을 少量의 5% formic acid (pH 2)에 溶解시키여 여기에 pepsin 을 蛋白質에 對해 1/50의 比로 添加하고 25°C 의 室內에서 magnetic stirrer 위에서 酵素分解를 시킨다. 이때 酵素

分解의 進行상태를 알기위하여 一定時間 간격으로 分解液의 一部를 取하여 paper chromatography 로 그 分解상태를 알아 보았다.

結果 및 考察

ㄱ) 海藻의 一般成分

試料의 一般成分의 分析値는 다음 Table 1와 같으며 試料구멍갈파래는 다른 海藻보다 特히 粗蛋白質의 含量이 많다.

ㄴ) 파래蛋白質의 消化率

구멍갈파래의 消化率의 實驗으로 힌토기를 實驗方法에서 言及한바와 같이 3區分하여 給與한 飼料과 糞中의 蛋白質의 消化率을 살펴 보았더니 Table 2와 같았으며 토끼의 生長率은 다음 Fig. 2와 같다. Tabl 2에서 보는바와 같이 蛋白質의 消化率에 있어서는 밀기울과 파래를 75% : 25%의 比로 給與한 것이 가장 消化率이 좋았으며 生長率도 가장 良好한 生長率을 보여 주었으며 그보다 많은 50% : 50%의 比로 給與한 3區의 것이 가장 體重이 떨어져 飼料의 價의 급어는 오히려 害롭다고 본다.

Table 2. Comparison of digestibility of feeding protein

	Diet	Feeding protein amount (2 days)	Protein in feces (2 days)	Digestibility
Group 1	Wheat bran vegetable	16.8(g)	5.5(g)	67(%)
Group 2	Wheat bran 75% alage 25%	18.5	4.7	75
Group 3	Wheat bran 50% alage 50%	5.85	2.1	64

Table 1. Composition of algae (%)

Kind of alages	Contents					
	Moisture	Crude protein	Crude fat	Crude fiber	Crude ash	Total sugar
<i>Ulva pertusa</i> Kjellman (구멍갈파래)	10.85	19.06	1.08	6.47	23.78	38.76
<i>Sargassum anumyendo</i> Kjellman (개 말)	14.85	17.37	0.92	36.49	21.64	8.74
<i>Ecklonia cava</i> Kjellman (감 태) ⁽¹⁶⁾	15.7	16.6	1.26	3.42	12.97	17.5
<i>Sargassum fulvellum</i> Agradh (모 자 만) ⁽¹⁶⁾	15.2	9.1	1.80	7.3	12.50	19.5

Table 3. Extracted protein, which was precipitated by various condition

Condition of precipitate agent	pH of precipitate agent	Weight of precipitate (I) (과 래)	Weight of precipitate (II) (개 말)
(1) Sup. solution (50ml) heated in boiling water	6.2	0.17(g)	0.056(g)
	6.2	1.23	0.8
		1.025	0.03
	Average	0.81	0.3
	Crude protein	0.4	0.1
(2) Tannic acid solution (1% tannic acid in 2N acetic acid) added 20ml into sup. sol. 50ml	3.1	0.3	0.1
	3.3	1.05	0.1
	Average	0.7	0.1
	Crude protein	0.25	0.025
(3) TCA (50%) 5ml added into sup. sol. 50ml	1.1	0.815	0.054
	1.1	0.2	0.1
	Average	0.5	0.1
	Crude protein	0.23	0.045
(4) TCA (20%) 10ml added into sup. sol. 50ml	1.7	0.176	0.08
	1.7	0.2	0.09
	Average	0.2	0.1
	Crude protein	0.1	0.045
(5) Ammonium sulfate 20g added into super. sol. 50ml	1.5	0.4	0.1
	1.5	0.22	0.094
	Average	0.3	0.1
	Crude protein	0.15	0.05

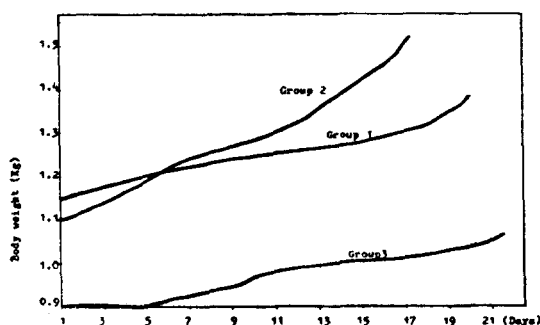


Fig. 2. Growing rate of feeding with algae and wheat bran

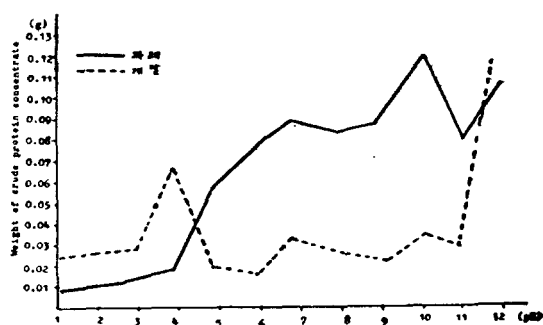


Fig. 3. Extractability of algae by pH control

ㄷ) 分離된 粗蛋白質

前記 6종류의 實驗方法 중 물로 抽出分離된 粗蛋白質을 건조하여 그 무게를 秤量하고 다시 粗蛋白質 含量을 Kjeldahl 法으로 測定하여 Table 3에 表示하였으며 pH 1에서 pH 12 範圍內에서 生成된 蛋白質 含有 沈澱物의 重量을 다음 Fig. 3에 表示하였다.

以上과 같은 結果로 海藻의 물에 依한 抽出物을 다시 여러 沈澱劑에 依해 粗蛋白質을 沈澱分離하여 보았더니 粗蛋白質을 가장 경제적으로 얻을수 있는 것은 100°C의 물속에서 凝集시켜 얻는것이 가장 좋은 方法으로 생각 된다.

그러나 蛋白質을 加熱한다는 것은 그의 變性을 촉진 시키므로 活性을 가진 蛋白質이나 얻어진 粗蛋白質을 精製하여 그 成分을 규명하는데는 좋은 方法이 못된다. 다른 沈澱劑中에서 比較的 순수하게 얻을 수 있는 方法은 硫安과 TCA 에 依해 沈澱시킨 方法이며 硫安 注加物을 visking tube 에서 透析하여 硫安을 除去하면 다시 얻어진 蛋白質을 精製하는데 使用할 수 있다.

Fig. 3에서 알 수 있는바와 같이 구멍갈파래나 개말에 있어서 좋은 沈澱條件은 alkali 性에 갈수록 粗蛋白質이 沈澱되기 쉽다는것을 알 수 있으며 구멍갈파래의 경우는 pH 4에서 比較的 많은량이 沈澱된 것을 알 수 있었다.

Tris Buffer 로 抽出 分離된 粗蛋白質 含有 沈澱物은 다음 Table 4와 같은 結果이다.

蛋白質의 抽出에 있어서 ascorbic acid와 sucrose 가 抽出時의 凝集을 억제하여 抽出에 영향을 준다는 Antoinette⁽¹⁷⁾ 및 다른 研究者⁽¹⁸⁾⁽¹⁹⁾의 植物葉 蛋白質의 研究와는 相關없이 本實驗에서는 ascorbic acid 와 sucrose 가 抽出에 도움을 주는것 같지 않다. 또한 tris buffer 의 경우 오히려 물로 抽出한것 보다 더 적은량의 蛋白質 含有物을 얻었으므로 海藻 蛋白質 抽出에는 물로 抽出 壓搾함이 좋은 方法이며 또한 變性에 相關이 없는 飼料用이나 食用으로 蛋白質 抽出에는 가장 손쉽게 할수 있는 熱處理에 依한 方法이 경제적임을 알수 있고 또한 收率도 良好한 편이다.

ㄹ) 粗蛋白質의 아미노酸의 組成

分離된 粗蛋白質을 鹽酸으로 酸分解시켜 얻는 粗蛋白質의 組成은 다음 Table 5와 같다.

以上の 아미노酸의 組成 分布로 알 수 있는 것과 같이 구멍갈파래나 개말에 있어서 中性아미노酸이 比較的 많이 들어 있으며 aspartic acid와 glutamic acid 같은 酸性아미노酸이 특히 많이 들어 있다.

그러므로 旨味를 나타내는 장류의 원료로서 使用할수가 있다고 본다.

Table 4. Extractability of algae protein by tris-buffer with ascorbic acid

Composition of extractant	Precipitate agent	pH	Weight of protein concentrate algae (I)*1	Weight of protein concentrate algae (II)*2
Extracted by tris-buffer (added 0.04M ascorbic acid) pH 7.3	(1) Heated in boiling water	7.3	0.234 (g)	0.034
	(2) TCA (50%) 5ml added	1.0	0.265	0.085
	(3) Amm. sulfate 20g added	6.5	0.926	0.031
Extracted by tris-buffer (added 0.1M ascorbic acid) pH 3.5	(1) Heated in boiling water	7.3	0.145	0.02
	(2) TCA (50%) 5ml added	1.0	0.206	0.088
	(3) Amm. sulfate 20g added	3.5	0.0625	0.011
Extracted by tris-buffer (added 0.1M ascorbic acid+0.5M surcose) pH 3.7	(1) Heated in boiling water	7.3	0.0304	0.012
	(2) TCA (50%) 5ml added	1.0	0.0135	0.012
	(3) Amm. sulfate 20g added	3.8	0.016	0.013

*1=파래

*2=개말.

Table 5. The amino acids pattern in crude protein of algae

(mg/100mg protein)

Kind of amino acid	Color intensity on paper		Concentration of amino acid		Kind of amino acid	Color intensity on paper		Concentration of amino acid	
	파 래	개 말	파 래	개 말		파 래	개 말	파 래	개 말
Asp.	+++++	+++	3.7	5.5	Leu, Ileu.	+++	+++	9.8	6.55
Glu.	+++++	++++	4.1	5.5	Thr.	++	++	0.3	0.5
Ser.	+++	++	1.06	1.0	Val.	+++	+++	8.2	4.4
Ala.	++++	+++	1.5	0.7	Trp.			0.014	
Cys.	+	+	2.52	2.0	Lys.	+	+	1.58	0.5
Tyr.	T	T	0.45	0.25	His.	T	+		0.9
Gly.	++	++	0.32	0.25	Arg.	++	T	2.26	0.55
Pro.	E	E			Phe.				
					Met.				

* E...Exist
* T...Trace

鹽基性아미노酸은 比較的 적게 들어 있다. 必須아미노酸중 methionine, phenylalanine 은 感知할수 없으나 其他 必須아미노酸인 leucine, isoleucine, valine, threonine, lysine, tryptophan 등이 들어 있어 營養的으로도 良好한 편에 속한 것이다.

口) Pepsin 에 依한 分解力

實驗方法에서 記述한바와 같이 分離한 粗蛋白質에 pepsin 酵素를 pH 2에서 分解시키면서 그 分解液에서 少量씩 取해 一次元 paper chromatography 로 分解生成된 遊離 아미노酸을 살펴 보았더니 粗蛋白質의 경우 一時間內에 蛋白質이 分解함을 알수 있었다.

要 約

非食用海藻中 구멍갈파래와 개말을 擇하여 그의 一般成分과 海藻중에 含有하고 있는 粗蛋白質의 抽出條件과 分離條件을 살펴 보았다. 또한 구멍갈파래의 動物飼料로서의 適否 實驗 및 海藻로 부터 分離한 粗蛋白質의 酵素에 依한 分解力과 그 아미노酸 組成 結果를 다음 과 같이 要約할 수 있다.

(1) 구멍갈파래에 19% 개말에 17%의 粗蛋白質이 含有되어 있으므로 蛋白質의 좋은 資源이 될수 있다.

(2) 구멍갈파래는 飼料로서 使用 可能하며 配合比는 밀기울에 對해 25%가 가장 體重의 增加가 좋을뿐 아니라 蛋白質의 消化率도 좋다.

(3) 粗蛋白質의 抽出條件은 Tris buffer 보다 물로 抽出한 것이 좋으며 蛋白質의 分離 回收에도 沸騰浴에서 하는 것이 가장 經濟적이며 收率도 좋다.

(4) 粗蛋白質의 分離에 있어서 pH가 alkali性에 갈수

록 收率이 좋다.

(5) Tris buffer 로 抽出시킨 粗蛋白質의 分離에 ascorbic acid 나 sucrose 가 影響을 주지 아니 하였다.

(6) 分離된 粗蛋白質의 아미노酸 組成中에 aspartic acid, glutamic acid 가 많이 들어 있으며 必須아미노酸인 leucine, isoleucine, valine, threonine, lysine, tryptophan 등이 比較的 많이 들어 있어 營養的으로 좋은 편이다.

本研究은 1973年度 文敎部의 研究助成費에 依해 이루어진 것이다.

試料 수집에 積極協助 하여 주신 장석진·송영석선생님과 實驗을 도와주신 중앙대학교 식품가공학과 여러분에게 深心한 謝意를 表하는 바입니다.

參考 文獻

- 1) 梁澄鎬: 中央大論文集, 9, 377 (1964).
- 2) 高橋武雄: 日本農藝化學會誌, 20, 522 (1943).
- 3) 李基寧, 李春寧, 李泰寧, 權泰完: 科연회보, 5 (2) 129 (1960).
- 4) 洪淳佑: 李敏載博士回甲記念論集, p. 185 (1964).
- 5) 李載容: 농화학회지, 6, 119 (1965).
- 6) 權泰完, 李泰寧: 한국농화학회지, 1, 55 (1960).
- 7) 洪淳佑: 서울大 論文集(D), 12, 56 (1962).
- 8) 李敏載, 洪淳佑, 李仁圭: 한국식물학회지, 5(3), 25 (1962).
- 9) 李敏載, 洪淳佑, 李仁圭: 서울大 論文集, 10, 1 (1961).
- 10) 李敏載, 洪淳佑: 서울大論文集, 11, 1 (1962).

- 11) 實驗化學講座：日本化學會編, 24, p. 224 (1958).
- 12) 崔相, 金健治, 金明姬, 金吉煥：한국식품학회지, 2, 8 (1970).
- 13) 崔相, 金健治, 金明姬, 金吉煥：한국식품과학회지, 2, 17 (1970).
- 14) 김준평：大田大學論文集, 3, p. 243 (1970).
- 15) 實驗農藝化學(東大農學部), 朝倉書店, 下卷, p. 441 (1960).
- 16) 조한옥, 이종욱, 최수규：한국식품과학회지, 5, 10 1 (1973).
- 17) Antoinette Betschart, J.E. Kinsella：J. Agr. Food Chem., 21, 60 (1973).
- 18) Heitefuss G.N：Arch. Biochem, Biophys., 85, 200 (1959).
- 19) Stahman M.A：Ann. Rev. plant physiol., 14, 137 (1963).