

## 韓國產 김중의 色素蛋白質의 分離 및 그 아미노酸 組成

金 俊 平 · 南 宮 錫\*

(中央大學校 食品加工學科 · 서울保健專門學校\*)

(1976년 6월 10일 수리)

## Isolation of Chromoprotein and Its Amino Acids Composition in Korean Laver.

by

Jun-Pyong Kim and Sok Nam-Kung\*

Department of Food Technology, Chung-Ang University

Seoul Health Junior College\* Seoul, Korea

(Received June 10, 1976)

### Abstract

In this research chromoproteins, namely phycoerythrin and phycocyanin in Korean laver are isolated and purified and their characteristics and the contents of amino acid are investigated. Three kinds of laver, Yonpyungdo product, Jindo product, and Kohung product are used in the experiments. The results are as following:

- 1) 0.68g of phycoerythrin and 0.72g of phycocyanin are isolated from 50g of laver.
- 2) when observed by microscope (1,000 times amplification), the crystals of phycoerythrin have the shape of small needles and phycocyanin that of platelets.
- 3) Absorption spectra of purified phycoerythrin shows strong absorption peaks at 546, 526, and 496m $\mu$ , and phycocyanin shows strong absorption peaks at 610 and 546m $\mu$ . After the phycoerythrin and phycocyanin were kept at 4°C for 24 and 48 hours. The peaks of phycoerythrin are slightly shifted and those of phycocyanin are decreased.
- 4) In amino acid analysis, sixteen kinds of amino acids are detected in phycoerythrin and phycocyanin. Amino acids found in the greatest amounts in phycoerythrin are glutamic acid, alanine, glycine and leucine. Essential amino acids are found to exist in phycocyanin in greater amounts than in phycoerythrin.

### 序 論

김은 국내에서年間 2천여만 속이 生産되며 水産物 총 수출 실적의 30%를 차지하는 중요한 海産物으로써 각종 영양소가 풍부한 珍味食品이다. 김<sup>(1)</sup>의 生産은 洛東江 沿岸으로부터 西南海 沿岸一帶와 忠淸道 沿岸에 이르는 廣範圍한 水域으로 分布되어 있으며 김의 생산시

기도 12월부터 翌年 4월까지 사이에 수집되고 있다. 김에는 色을 나타내는 水溶性 色素蛋白質이 存在하고 있으며 Kutzing<sup>(2)</sup>은 紅藻類에서는 赤色을 나타내는 것을 phycoerythrin(紅藻素), 靑藻類에서는 靑色을 나타내는 것을 phycocyanin(靑藻素)이라 하였고, Molish<sup>(3)</sup>는 이들 色素蛋白質을 밝혀내고 이것을 황산암모늄으로 結晶化시켰으며 Kitasato<sup>(4)</sup> 등은 色素蛋白質에 관한 연구를 더욱 발전시켰다.

이들 色素蛋白質은 構造나 物理的性質을 보면 hemoglobin과 유사하다. Tiselius<sup>(5)</sup>는 순수한 色素蛋白質을 얻기 위하여 황산암모늄용액으로 沈澱시킨 후 다시 電氣泳動法으로 精製할 수 있고 또 吸着크로마토그래피 방법을 利用할 수 있다고 報告하였으며 Fugiwara<sup>(6)</sup>는 일본산 김 중에서 色素蛋白質과 混存하는 粘性性物質인 phycocolloid를 제거하기 위하여 rivanol(2-ethoxy-6,9-diamino acridium lactate)를 加하여 分離를 시도한 바 있다. 한편 우리나라에서는 김에 관한 研究로는 海藻類의 成分에 관한 研究에서 一般成分<sup>(7)</sup>이 分析되었고 海藻의 化學的 特性과 系統學的 研究에서 해조류의 加水分解로 아미노酸組成에 관한 연구<sup>(8)</sup>가 있으며 이온크로마토그래피方法으로 김 중에서 아미노酸組成<sup>(9)</sup>을 定量한 바 있다. 또 한국산 김중에서 Flavin含量과 그 形態에 관한 연구와 放射線 照射가 김 중의 아미노酸에 미치는 영향에 관한 연구<sup>(10)</sup> 및 마른김의 有機酸과 糖類組成에 관한 연구<sup>(11)</sup> 등이 報告된 바 있다.

本 研究에서는 韓國産 김 중에 含有한 두 가지 色素蛋白質을 分離하여 그 分離法을 確立하고 그의 spectrophotometric pattern 및 아미노酸 組成을 研究하기 위하여 本 실험을 계획한 것이다.

## 實驗材料 및 方法

### 1. 試料

本 實驗에서 사용한 김은 1975年 2월에 연평도, 진도, 고흥에서 생산한 것을 시료로 하였다.

### 2. 一般成分 分析

김의 一般成分인 水分, 灰分, 粗蛋白質, 粗纖維, 粗脂肪 및 炭水化合物은 常法에 따라 定量하였다.

### 3. 色素蛋白質 分離

#### 1) phycoerythrin과 phycocyanin추출과 分離

건조된 김 50g에 증류수 1l를 가하여 실온에서 3일 방치 후 가재로 여과하여 갈색의 추출액에 1M 초산칼슘용액을 가하여 0.1M이 되도록 하고 30분후 Celite로 여과한다. 여액에 황산암모늄 400g/l를 가한 후 5°C에서 하루동안 방치하면 단백질이 沈澱된다. 沈澱物에 증류수 500ml를 가하여 2~3일간 셀로판주머니로 透析시킨 다음 1% rivanol 5ml를 가하여 沈澱物을 分離하여 濾液Ⅱ에 1% rivanol 15ml를 가하여 沈澱物과 濾液Ⅲ을 分離한다.

#### 2) phycoerythrin의 分離

上記 沈澱物에서 rivanol을 제거하기 위해  $\frac{M}{2}$  인산이

수소나트륨( $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ )과 증류수로 3~4회 洗滌하고 沈澱物에 10% 황산암모늄용액을 가하여 赤色の phycoerythrin용액을 얻는다. 그 용액을 30% 황산암모늄으로 포화시켜 遠心分離시킨 후 沈澱物을 증류수로 透析시킨 다음 上澄液에 포화 황산암모늄 농부피를 가하여 하루밤 동안 0°C에서 結晶化시킨다.

#### 3) phycocyanin의 分離

여액Ⅲ에 酸性白土를 가하여 rivanol을 제거하고 靑色の 여액Ⅳ에 황산암모늄 200g/l을 가한 후 하루밤 동안 5°C에서 방치한 후 沈澱物에 증류수를 가하여 透析시킨 후 遠心分離하여 上澄液에 포화 황산암모늄 농부피를 가하여 하루밤 동안 0°C에서 結晶化시킨다.

上記 김 중에서 두가지 色素蛋白質 分離過程의 요약을 Table 1에 실었다.

## 4. 色素蛋白質 確認實驗

#### 1) 色에 의한 區別

phycoerythrin과 phycocyanin결정을 소량 증류수에 용해시켜 肉眼으로 관찰한다.

#### 2) 結晶의 顯微鏡 確認

실험에서 얻은 결정을 1,000倍로 擴大하여 현미경으로 관찰한다.

3) Spectrophotometer, 吸光度에 의한 比較 phycoerythrin과 phycocyanin 결정을  $\frac{M}{30}$  phosphate buffer solution(pH 6.7)에 15 $\mu$ M 농도로 녹여서 Beckman DU Spectrophotometer를 사용하여 400~680m $\mu$ 파장에서 測定한다

※ phosphate buffer solution(pH6.7) 調製

$\frac{M}{30}$   $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ 용액과  $\frac{M}{30}$   $\text{KH}_2\text{PO}_4$  용액을 1:1(Vol/Vol)比로 混合한다.

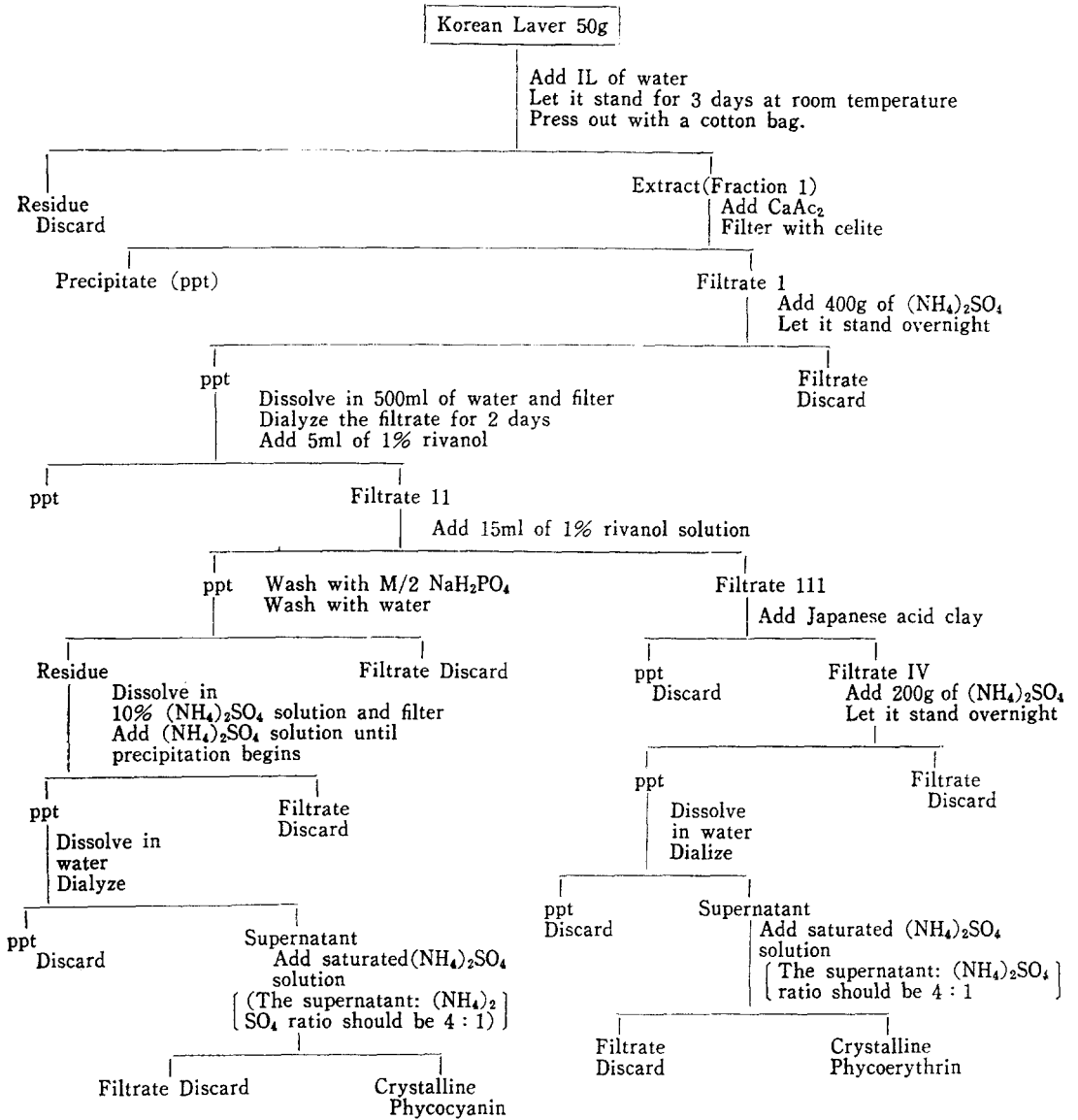
#### 4) phycoerythrin과 phycocyanin의 吸光度 變化

上記 色素蛋白質을 phosphate buffer solution (pH 6.7)에 녹여 時間에 따른 그 吸收曲線의 absorbance를 보기 위하여 4°C에서 24시간, 48시간 後의 變化를 관찰한다.

#### 5) 色素蛋白質의 아미노酸 組成

上記 3가지 試料 中 蛋白質 含量이 가장 많은 연평도産의 아미노酸 組成을 알기 위하여 phycoerythrin과 phycocyanin 一定量을 취하여 6N-HCl을 少量 넣고 減壓眞空으로 한 후 105°C Oven에서 24시간 가수분해시킨 후 그 加水分解液을 아미노酸 自動分析機(Hitachi model KLA-3B)에 의해 定量하였다.

Table 1. Procedure of isolation and purification of phycoerythrin and phycocyanin.



結果 및 考察

1. 김의 一般分析

김의 일반성분 分析値는 Table 2와 같으며 연평도

김은 그 중에서 粗蛋白質含量이 가장 많았다.

2. 色素蛋白質 分離

色素蛋白質 分離方法에 있어서 phycocolloid 存在가 순수한 色素蛋白質을 分離하는데 황산암모늄에 의한 결

Table 2. The Composition of Korean laver

Composition / Sample	Moisture (%)	Crude Protein (%)	Crude fat (%)	Total Sugar (%)	Crude fiber (%)	Crude ash (%)
Yonpyungdo	10.82	38.52	0.54	39.32	1.8	9.5
Jindo	11.86	35.45	0.56	40.23	1.7	10.4
Kohung	11.52	36.80	0.61	39.26	2.1	9.7

경화만으로는 곤란하다. Fugiwara<sup>(6)</sup>가 사용한 rivanol을 사용함으로써 이를 제거할 수 있었고 比較的 순수하게 分離할 수 있었다. 시료 50g에서 얻어진 phycoerythrin量은 0.68g, phycocyanin量은 0.72g이었다.

3. 色素蛋白質의 確認

1) 色에 의한 比較

실험에서 얻은 phycoerythrin과 phycocyanin結晶을 소량 증류수에 용해시켜 色을 肉眼으로 관찰하면 phycoerythrin은 赤色으로 phycocyanin은 靑色으로 보인

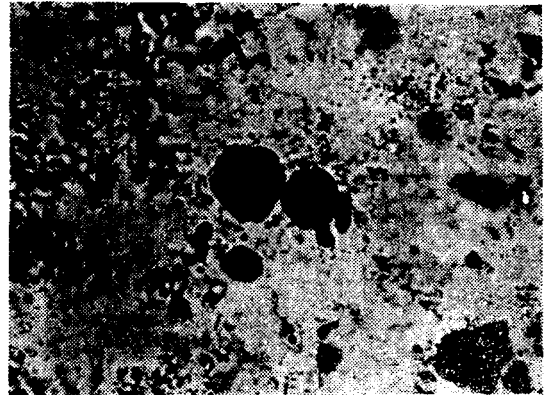
다.

2) 結晶의 顯微鏡 確認

실험에서 얻은 phycoerythrin 및 phycocyanin結晶을 顯微鏡으로 1,000倍 擴大하여 觀察하였다. Fugiwara<sup>(6)</sup>는 phycoerythrin은 바늘 모양과 프리즘으로 phycocyanin은 바늘과 원판모양으로 보인다고 報告한 바 있으나 본 실험 결과 Fig.1와 같이 phycoerythrin은 바늘모양으로 phycocyanin은 원판모양으로 이루어졌음을 알 수 있다.



phycoerythrin (×1,000)



phycocyanin (×1,000)

Fig.1 Photographs of crystalline phycoerythrin and phycocyanin

3) Spectrophotometer 吸光度에 의한 比較

phycoerythrin과 phycocyanin을 phosphate buffer solution(pH6.7)에 용해시켜 Beckman Du Spectrophotometer를 사용하여 400~680m $\mu$  파장에서 測定한 結果는 Fig.2, Fig.3와 같다.

Fig.2, Fig.3에서 보는 바와 같이 phycoerythrin은 496, 526, 546m $\mu$ 에서 peak를 이루고 phycocyanin은 546, 610m $\mu$ 에서 peak를 이루고 있다. 이 結果는 Table 3에서 보면 *Porphyra tenera*<sup>(4,5)</sup>는 가시부에서 일반적으로 phycoerythrin은 3개, phycocyanin은 2개의 peak가 나타나는 것으로 報告되었다. 본 실험 결과 phycoerythrin에 있어서는 다른 연구자의 peak와 약간 差異가 있음을 알 수 있고 phycocyanin은 Kitasato<sup>(4)</sup>의 peak와 一致하였다.

4. phycoerythrin과 phycocyanin의 spectrum變化

3)에서 測定한 phycoerythrin과 phycocyanin의 試料를 4°C에서 24시간, 48시간 방치 후 吸收帶의 變化와 그의 color intensity를 比較測定한 結果 Fig.4, Fig.5에서 보는 바와 같이 phycoerythrin은 약간 shift함을 나타냈고 phycocyanin의 경우는 color intensity가 24시

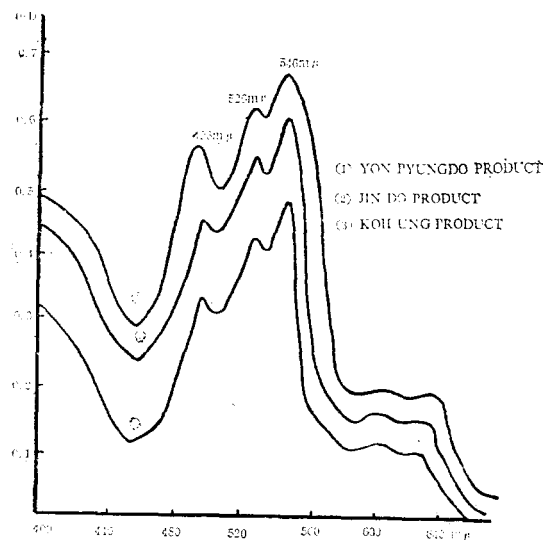


Fig. 2 Absorption spectra of phycoerythrin phosphate buffer at pH 6.7

Table 3. Absorption Maxima of Phycoerythrin and Phycocyanin

Phycoerythrin					
Alga	Authors	Absorption	maxima	(m $\mu$ )	PH
Korean Laver	Author	546	526	496	6.7
Porphyra tenera(R)*	Fujiwara(6)	560	546	496	6.8
	Tiselius(5)	560	546	496	6.8
	Kitasato(4)	560	526	495	—
	Svedberg(13)	555	534	495	6.8
Porphyra Pseudolinearis(R)	Takagi(14)	555	533	495	6.8
Porphyra Perforata(R)	Haxo et al. (12)	562	—	497	6.7
Ceramium rubrum(R)	Svedberg(13)	555	529	496	6.8
Rhodymenia pacifica(R)	Haxo et al. (12)	564	537	497	6-7
Phormidium ectocarpi(C)**	Haxo et al. (12)	565	542.5	—	6-7
Phormidium persicinum (C)	Haxo et al. (12)	560	—	—	6-7
Phycocyanin					
Korean Laver	Author	610	546		6.7
Porphyra tenera(R)**	Fujiwara(6)	615	—		6.8
	Tiselius(5)	610	552		6.8
	Kitasato(4)	610	546		—
	Svedberg(13)	610	552		6.8
Porphyra Pseudolinearis(R)	Takagi(14)	610	552		6.8
Porphyra perforata(R)	Haxo et al. (12)	617	555		6-7
Ceramium rubrum(R)	Svedberg(13)	621	546		6.8
Aphanizomenon flos aquae(C)**	Svedberg(13)	615			6.8
Lyngbya Lagerheimii(C)	Haxo et al. (12)	650			6-7

\* Rhodophyceae(R)

\*\*Cyanophyceae(C)

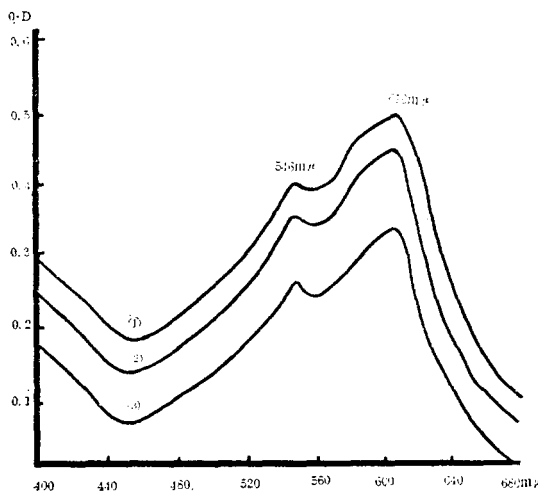


Fig.3 Absorption spectra of phycocyanin in phosphate buffer at pH6.7

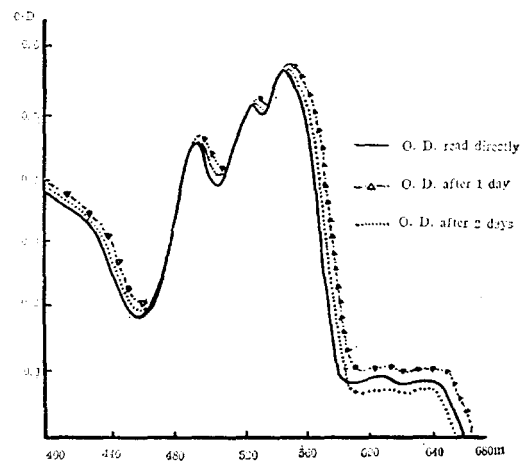


Fig.4 Variation of absorption spectra of phycoerythrin kept in 1-2 days at 4°C.

간후는 상당히 減少하고 48시간 후에는 약간 減少된 狀態로 나타났다. 이 實驗結果 phycocyanin의 變化는 光에 弱한 것으로 보이며 phycoerythrin이 phycocyanin보다 安定한것 같다.

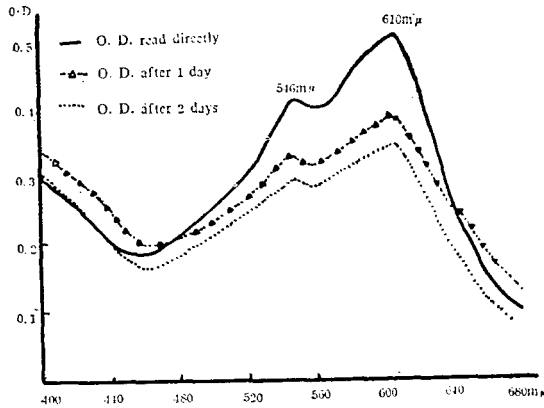


Fig.5 Variation of absorption spectra of phycocyanin kept in 1-2 days at 4°C

5. 色素蛋白質의 아미노酸 組成

표준아미노酸 중 中性 및 酸性아미노酸은 0.1μmole, 鹽基性 아미노酸은 각각 0.5μ mole를 표준 아미노산으로 하였으며 이에 前處理한 試料를 아미노酸 自動分析機에 넣고 표준 아미노산과 比較하여 定量한 結果는 Table 4와 같다. phycoerythrin과 phycocyanin에서는 cystine을 제외한 16종류의 아미노산이 검출 되었으며 그 中 必須아미노酸은 7종류를 含有하고 있으나 phy-

Table 4. Free amino acid contents of phycoerythrin and phycocyanin (mg/100mg)

amino acid	phycoerythrin	phycocyanin
Lysine	1.97	2.46
Histidine	1.76	2.02
Arginine	trace	1.95
Glycine	6.90	7.28
Alanine	6.47	9.41
Valine	4.14	3.37
Methionine	trace	1.01
Isoleucine	3.93	4.01
Leucine	5.5	6.90
Glutamic acid	15.40	16.63
Aspartic acid	6.41	4.01
Proline	2.83	5.24
Threonine	4.01	4.12
Serine	4.20	4.27
Tyrosine	1.80	2.24
Phenylalanine	trace	1.43

coerythrin에서는 arginine, methionine, phenylalanine을 미량 含有하고 있었다.

phycoerythrin에서는 glutamic acid, glycine, alanine 및 aspartic acid등이 현저히 많았으며 phycocyanin에서는 glutamic acid, alanine, leucine 및 glycine등을 多量 含有하고 있어 각종 아미노酸을 골고루 含有하고 있는 것으로 나타났다.

要 約

김 속에는 蛋白質이 約 38%정도 含有되어 있고 우리 日常生活에서 떨어질 수 없는 重要한 海産物의 한 종류이다. 특히 단백질이 色素蛋白質로 들어있으므로 한국산 김의 3종류 연평도, 진도, 고흥産에서 色素蛋白質인 phycoerythrin과 phycocyanin을 分離精製하고 그의 특성과 그중 含有된 아미노酸 含量 結果는 다음과 같다.

1) 한국산 김 중에서 色素蛋白質을 分離한 結果 phycoerythrin은 13.6%, phycocyanin은 14.4%의 量을 얻었다.

2) 分離한 結晶을 顯微鏡下에서 觀察하면 phycoerythrin은 赤色の 바늘모양으로 보이며 phycocyanin은 靑色の 원판모양으로 보인다.

3) phycoerythrin과 phycocyanin을 spectrophotometer로 그의 吸光度를 測定한 結果 phycoerythrin은 496mμ, 526mμ, 546mμ에서 peak를 이루고 phycocyanin은 546mμ, 610mμ에서 peak를 이루고 있다. 이들을 4°C에서 24시간, 48시간 방치한 후 phycoerythrin과 phycocyanin 變化를 比較한 結果 phycoerythrin은 그 吸光 peak의 波長이 약간 shift하고 phycocyanin은 absorbance가 약간 減少함을 나타냈다.

(4) 色素蛋白質에서 아미노酸 組成을 보면 16종류의 아미노酸이 검출 되었으며 그 中 phycocyanin에는 必需 아미노酸이 含有되었으나 phycoerythrin은 arginine, methionine phenylalanine을 미량 含有하고 있다.

參 考 文 獻

- 1) 崔春彦, 宋必淳: 科學叢刊, 1, 26(1959)
- 2) Kutzing, F.T.: *Phycologia Generalis Leipzig* (1843)
- 3) Molisch, H.: *Bot. Z.* 52, 177 (1894); 53, 131 (1895)
- 4) Kitasato, Z.: *Acta. phytochim.*, 2, 274 (1925)

- 5) Tiselius, A.: *Trans. Farad. Soc.*, **33**, 524 (1937)
- 6) Fugiwara, T.: *J. Biochem. (Japan)*, **42**, 411 (1955)
- 7) 梁滋鎔 : 中大論文集, **9**, 377 (1964)
- 8) 洪淳佑 : 서울大 論文集, **12**, 56(1962)
- 9) 李基寧, 李春寧의 2人 : 科연휘보, **5**(2), 129(1960)
- 10) 鄭炳璇 : 水大研報, **5**(1) 62(1963)
- 11) 朴榮浩 : 한국식품과학회지, **5**, 4 (1973)
- 12) Haxo, F., Oheocha, C. and Norris P.: *Arch. Biochem. Biophys.*, **54**, 162(1955)
- 13) Svedberg, T. and Katsurai, T.J.: *Am. Chem. Soc.*, **51**, 3573 (1929)
- 14) Takagi, M.: *Bull. Fac. Fisheries Hokkaido Univ.*, **3**, 253 (1953)
- 15) Fugiwara, T.: *J. Biochem. (Japan)*, **44**, 723 (1957).