

海藻蛋白質 抽出에 關한 研究

5. 赤利用 海藻의 水溶性 蛋白質 抽出條件

田 龍 姬 * · 李 康 鎬 * · 柳 洪 秀 **

* 釜山水產大學 食品工學科

** 群山水產專門大學

Studies on the Extraction of Seaweed Proteins Extraction of Water Soluble Proteins in Unexploited Seaweeds

Yong-Hee Jeon, Kang-Ho Lee and Hong-Soo Ryu

National Fisheries University of Busan, Gunsan Fisheries Junior College

Abstract

In this study, two species of algae, Ecklonia stolonifera, Sargassum thunbergii and one species of marine plant, Zostera marina(rhizoid and stem) were collected and examined to determine the extractability of water soluble protein and the influences of various factors including extraction time, temperature, ratio of sample vs solvent and pH upon the extractability were tested. The effects of precipitation treatments for isolation of algal protein from the extracts(TCA treatment, methanol treatment and pH control) were also tested.

Amino nitrogen and total nitrogen of purified samples made by obtained optimum conditions were estimated.

The effect of the ratio of sample vs solvent on extractability differed from species to species which was enhances at 1:100(w/v) in Sargassum thunbergii and Zostera marina while 1:150(w/v) for Ecklonia stolonifera.

The effect of extraction time and temperature was revealed differently in all species which might be considered to be caused by differences in the constitution of algal tissues. But in case of TCA insoluble nitrogen, it was showed the maximum extractability at 40-50°C for 1 hour extraction.

The optimum pH for the extraction of total nitrogen was 9-12 while the optimum pH was 6-7 for TCA insoluble nitrogen. And the pH control appeared to be most effective in the influence of precipitation treatment for isolation of algal protein.

諸 言

海藻蛋白質의 効率的인 利用을 爲한 基礎 資料를 얻기 爲하여 前報의 食用 海藻蛋白質 抽出條件 檢討에 이어 資源이 豊富하면서도 別로 利用되지 않는 2種의 海藻(곰피 *Ecklonia stolonifera*, 지층이 *Sargassum thunbergii*)와 1種의 海産植物(잘피 *Zostera marina*)을 選定하여 水溶性 蛋白質 抽出條件을 檢討하였다. 本 研究는 全窒素와 TCA 不溶性 窒素의 抽出에 影響을 미친다고 생각되는 添加水量(W/V), 抽出時間, 抽出溫度 및 抽出液의 pH 등에 따른 抽出效果를 檢討하고 여러가지 沈澱處理法에 따른 沈澱分離 蛋白質의 全窒素 및 아미노態 窒素를 測定하여 最適 沈澱分離 條件을 檢討하였다.

材料 및 方法

1. 試 料

곰피(*Ecklonia stolonifera*)와 지층이(*Sargassum thunbergii*)는 1979年 9月 9日 釜山市 龍塘洞과 慶南 梁山郡 日光面 七岩里에서 採取하여 물로 洗滌하고 種類에 따라 볼 수 있는 強韌한 葉脈部는 除去한 뒤 日乾(水分含量 20~25%)하여 polyethylene film 주머니에 密栓한 뒤 desiccator에 保管하면서 實驗하였고, 잘피(*Zostera marina*)는 1979年 8月 26日 慶南 梁山郡 機張面 三成里에서 採取하여 줄기(Stem)와 假根(rhizoid)을 分離하여 上記와 같이 保管하면서 實驗하였다.

2. 一般成分의 定量

1) 水分, 環元糖, 粗脂肪, 粗灰分, 粗纖維

前報(禹等 1979)와 同一하게 實驗하였다.

2) 全窒素 및 TCA 不溶性 窒素

全窒素는 抽出液의 一部를 取하여 Semi-micro

kjeldahl 法으로 定量하였고, TCA 不溶性 窒素는 抽出液 50ml에 50% TCA (trichloro acetic acid) 溶液 17ml를 加하여 얻은 沈澱을 全窒素와 같이 定量하였다.

3. 蛋白質의 抽出

柳 및 李(1977)의 方法과 같이 2g의 乾燥試料에 5ml의 증류수를 加하여 polyethylene 주머니(5cm × 10cm)에 密栓하고 dryice-methanol 寒劑中에서 急速凍結한 뒤 적당량의 海砂를 加하여 막사밭에서 마쇄하고 100ml의 증류수를 加한 뒤 恒溫水槽에서 50℃, 2時間 抽出한 것을 30分間 遠心分離(3000 rpm)시키고 그 上清液(I)을 取했고, 殘渣에 다시 100ml의 증류수를 加하여 上記와 같은 方法으로 抽出하여 上清液(II)를 얻어 I과 II를 合하여 抽出蛋白質 溶液으로 使用하였다.

4. 抽出蛋白質의 沈澱處理 및 精製蛋白質 粉末의 製造

上記 3의 方法으로 抽出한 蛋白質 溶液 50ml를 取하여 前報(禹等 1979)의 方法에 따라 TCA 法, methanol 處理法 및 pH 調節法으로 蛋白質을 沈澱 定量하였으며, 精製 蛋白質은 乾燥試料 50g을 凍結 破碎하여 5ℓ의 증류수를 加하여 抽出한 것을 前報(禹等 1979)와 同一하게 製造하였다.

5. 아미노態窒素의 定量

粉末原藻는 100mg, 精製蛋白質 粉末은 50mg을 取하여 駿加水分解시킨 뒤 Spies와 Chamber(1951)의 銅鹽法으로 定量하였다.

結果 및 考察

1. 生試料의 粗蛋白質 含量

實驗에 使用된 海藻試料의 一般成分은 table 1과 같다. 이 結果에 依하면 지층이와 곰피는 粗蛋白質

Table 1. Chemical composition of the sampled seaweeds

(% on dry basis)

Sample	Crude protein	Crude fat	Crude ash	Crude fiber	Glucoside
<u>Sargassum thunbergii</u>	17.7	3.4	24.8	5.7	47.2
<u>Ecklonia stolonifera</u>	17.2	4.6	225.6	5.3	45.6
<u>Rhizoid of Z. marina</u>	16.4	2.5	222.2	7.3	51.2
<u>Stem of Z. marina</u>	18.3	1.6	15.7	15.1	44.6

함량이 17% 정도이었으며 잘피의 경우는 假根과 줄기의 粗蛋白質 含量 差異가 있으나 平均值가 17.4%로써 지층이와 곰피와 비슷하였다. 이러한 결과는 Tsuruga (1962)가 報告한 지층이의 粗蛋白質 含量 12.1%, 李等 (1971)의 11.12% 및 朴等 (1976)의 10.8~21.2%의 結果보다 약간 높으나 이는 朴等 (1976)이 指摘한 바와 같이 採取時期와 場所 등의 差異 때문이라 생각되며, 곰피 역시 朴等 (1976)의 結果보다 높았다. 試料로 使用된 未食用 海藻의 粗蛋白質 含量이 比較的 높은 것으로 미루어, 蛋白質 給源으로서의 가치가 충분히 있다고 생각되며, 잘피도 역시 17% 以上の 粗蛋白質 含量을 나타내고 있고 還元糖 含量이 높고 實際로 甘味가 제법 있는 것을 보아, 이의 糖類 分析 定量의 必要性이 있다고 생각된다.

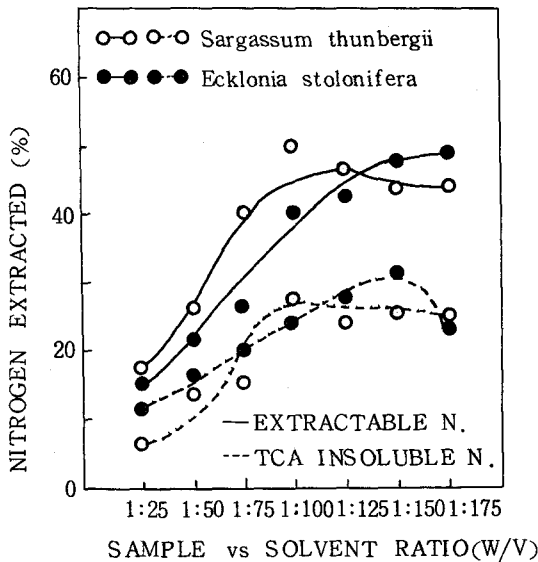


Fig. 1. Effect of the ratio of sample vs solvent ratio on protein extractability.

加했을 때 가장 抽出成績이 좋았다 (25%)는 結果와 상당한 差異가 있으나, 이는 原藻의 마쇄方法의 相異에서 온 結果라 생각된다. 또한 柳等 (1977)이 報告한 1:120~150(W/V)일 때 곰피와 비슷한 組織의 미역의 水溶性 蛋白質의 抽出率이 좋았다는 結果와 비슷하였으며, 奥村 (1961) 등의 다시마의 水溶性 蛋白質 抽出條件에서 乾燥試料 1g에 對하여 100 ml의 증류수를 加하여 抽出할 때 50% 程度의 抽

2. 全窒素 및 TCA 不溶性 窒素의 抽出에 미치는 諸要素의 影響

1) 試料-抽出溶媒比 (W/V)의 影響

水溶性 蛋白質 抽出에 미치는 抽出溶媒量의 影響을 檢討하기 爲하여 乾燥試料 2g에 對하여 증류수 50 ml에서 300 ml를 加하여 40°C에서 2時間 抽出한 窒素를 原藻의 總窒素量에 對한 百分率로 表示한 結果는 Fig. 1, 2와 같다. 이 結果에 依하면 곰피의 경우 添加水量이 300 ml일 때 最高의 抽出成績을 보였고 지층이는 200 ml (1:100 W/V), 잘피 假根은 全窒素 및 TCA 不溶性 窒素가 1:100에서 抽出成績이 좋았으며, 이의 줄기는 全窒素가 1:150에서 TCA 不溶性窒素는 1:100에서 最高의 抽出成績을 보였다. 이러한 結果는 金 (1974)이 곰피와 비슷한 乾燥갈래 50g에 對하여 400 ml의 증류수를

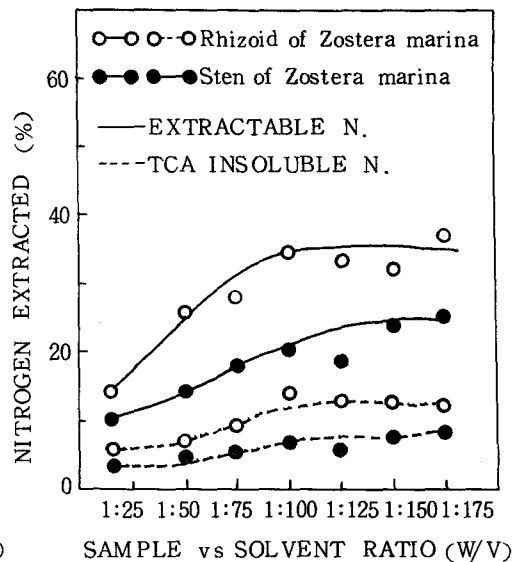


Fig. 2. Effect of the ratio of sample vs solvent ratio on protein extractability.

출成績을 얻었다는 報告와도 비슷하였다.

그러나 같은 褐藻類인 지층이의 경우는 1:100에서 最高의 抽出率을 보인 것은 이의 組織이 곰피보다 연하여 마쇄가 용이하게 되어 적은 添加水量으로도 抽出成績을 높일 수 있는 것이 아닌가 생각된다. 잘피의 경우는 假根은 1:100에서, 줄기는 1:150에서 相異한 最適 添加水量을 보이는 것은 添加水量이 海藻 組織의 強韌度와 密接한 關係를 가진다는 柳等

(1977)의 報告나 添加溶媒量은 葉體組織의 膨潤度에 影響을 미쳐 抽出成績에 큰 影響을 미친다는 李等(1978)의 報告를 감안한다면 같은 海藻類 경우일 지라도 試料 採取部位에 따라 強韌도가 다르기 때문에 最適 抽出溶媒量의 差異를 나타내는 것이라 생각된다.

2) 抽出時間의 影響

1)에서 採擇된 最適溶媒量의 증류수를 2g의 乾燥試料에 加하여 40℃에서 30分~5時間 窒素를 抽出한 結果를 Fig. 3.4에 表示하였다. 이 結果에 依

하면 지층이의 경우 全窒素는 2時間, TCA 不溶性 窒素는 1時間 程度의 抽出로도 最高의 抽出成績을 얻었고, 곰피는 全窒素가 3時間, TCA 不溶性 窒素가 2時間에서 抽出成績이 좋았다. 잘피도 全窒素가 2~3時間, TCA 不溶性 窒素는 1時間 抽出한 것이 좋았다. 이와 같이 종류에 따라 抽出時間이 다른 것은 組織의 強韌도에 依한 差에 依한 것이라 생각되며, 같은 試料라 할지라도 TCA 不溶性 窒素는 全窒素보다 짧은 時間內에 最高의 抽出成績을 보임은 비록 抽出時間이 徑過함에 따라 全窒素

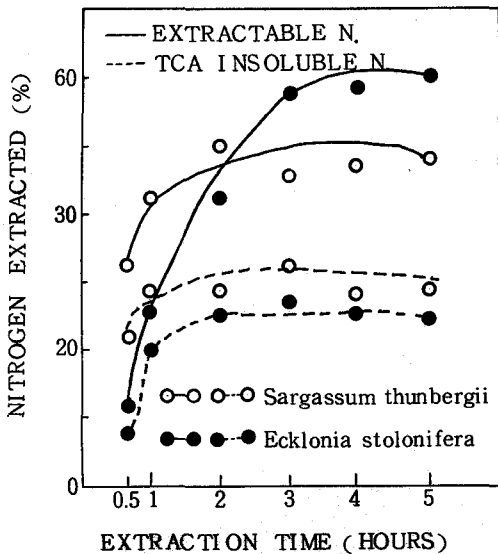


Fig. 3. Effect of extraction time on protein extractability.

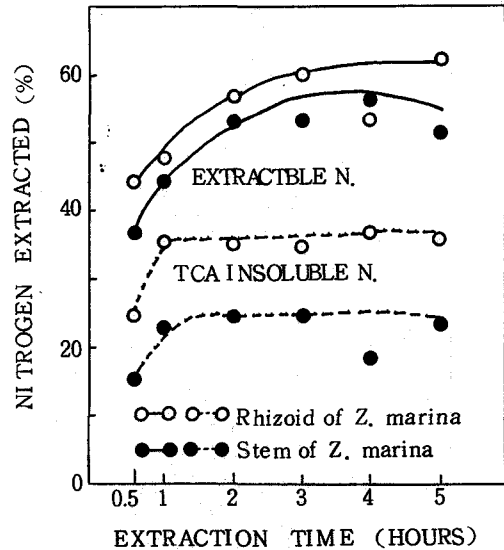


Fig. 4. Effect of extraction time on protein extractability.

의 量은 增加하나 이는 非蛋白態窒素가 抽出되기 때문이며 蛋白態窒素라 볼 수 있는 TCA 不溶性 窒素는 이보다 短時間에서 이미 抽出되어버린 結果라 생각된다. 이러한 結果는 奧村(1963) 및 Betschart(1975)의 報告에서도 純蛋白態窒素는 全窒素와는 달리 1時間 內에 抽出된다는 것과 잘 一致하였다.

3) 抽出溫度의 影響

窒素의 抽出에 미치는 抽出溫度의 影響을 檢討하기 爲하여 1), 2)에서 얻은 最適添加水量 및 抽出時間으로 溫度를 달리하며 窒素를 抽出한 結果를 Fig 5.6에 表示하였다. 이 結果에 依하면, 全試料에서 全窒素는 40℃에서, TCA 不溶性 窒素는 50℃에서 最高의 抽出成績을 보였고 60℃ 附近에서 抽出率

急激하게 떨어졌다. 이러한 結果는 奧村(1963) 및 金(1974)의 褐藻類는 100℃가 最適 抽出溫度가 될 수 있다는 報告와 相異하나 本實驗에서도 70℃ 以上에서는 약간 抽出成績이 좋아지는 傾向을 보였다. 이는 Gheyasuddin (1970)의 說明과 같이 高溫으로 因한 凝固蛋白質의 多量 流出로 抽出成績이 약간 좋아진 結果라 생각된다. 그러나 이들이 設定한 最適溫度에서의 抽出成績보다는 本實驗에서의 結果가 훨씬 좋은 것을 보아 蛋白質이 變性되는 60℃ 以上の溫度보다는 보다 低溫에서 抽出時間 및 添加水量 등의 多角的인 檢討를 통하여 效率的인 抽出을 期待하여야 할 것이라 생각된다.

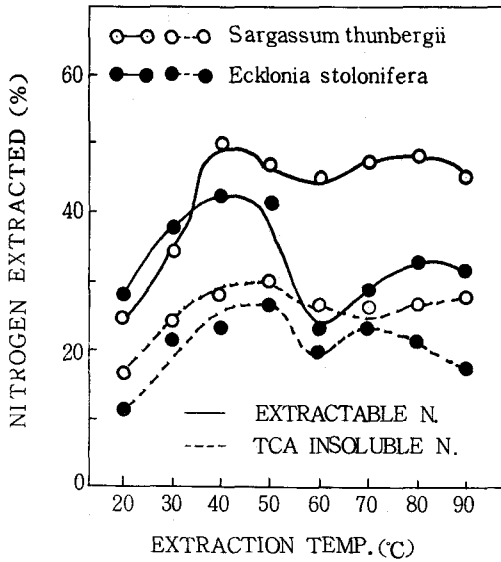


Fig. 5. Effect of extraction temperature on protein extractability.

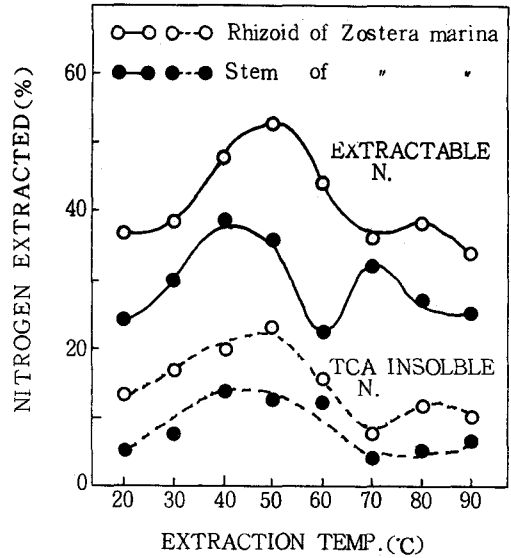


Fig. 6. Effect of extraction temperature on protein extractability.

4) pH의 影響

海藻의 水溶性 蛋白質 抽出에 미치는 添加水의 pH의 影響을 檢討하기 爲하여 乾燥試料 2g에 0.1 M tris-(hydroxy methyl)-amino methane 溶液을 前項에서 얻은 最適 添加水量을 加하고 0.1 N HCl 과 0.1 N NaOH로 pH를 2에서 13까지 調節한

後 最適 抽出時間 및 抽出溫度에서 窒素를 抽出한 Fig. 7.8과 같다. 이 結果에 依하면 一般의 草類 또는 海藻蛋白質 抽出에 미치는 pH의 影響을 檢討한 奧村 (1963), 保井 (1969), Samson (1971), Gheyasuddin (1970), Kilara (1962), Betschart (1973) 金 (1974), 朴 (1976) 및 柳 (1977) 등의 結果와 같

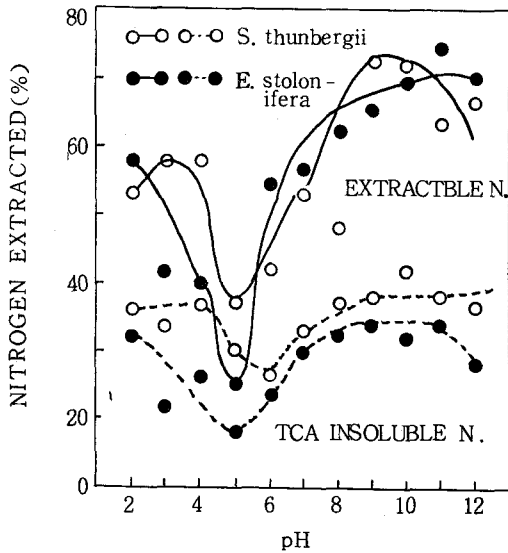


Fig. 7. Effect of pH on protein extractability.

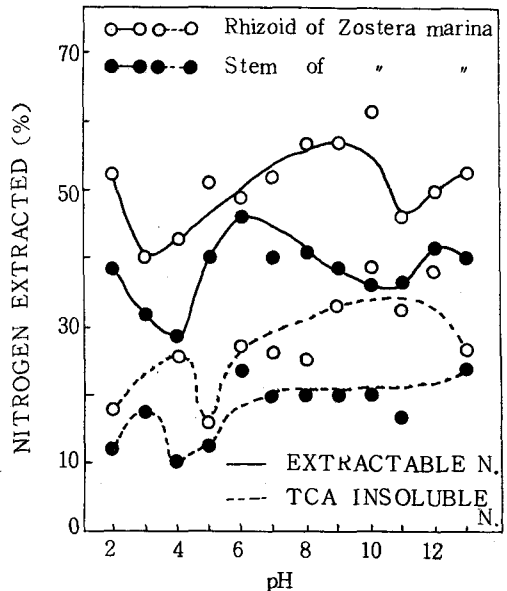


Fig. 8. Effect of pH on protein extractability.

이 pH 9 이상의 알칼리성일수록 全窒素의 抽出成績이 높았다. 그러나 TCA 不溶性 窒素은 pH 6~7 이상에서는 抽出成績이 좋아지고 있지 않는 결과를 보여 Betschart (1975)와 李 (1978)의 指摘과 같이 알칼리 條件에서는 葉體의 파괴가 쉽게 일어나서 多糖類와 非蛋白態窒素가 多量 抽出되기 때문이라 생각됨으로 海藻의 水溶性 蛋白質 抽出에는 TCA 不溶性 窒素가 가장 많이 抽出되는 pH 6~7 程度에서 抽出함이 有利하리라 생각된다. 그리고 蛋白質 沈澱操作에 利用되는 等電點은 Fig. 7.8에서 보듯이 蛋白質이 沈澱되어 抽出成績이 가장 떨어지는 點으로써, 곰피, 지층이 및 잘피假根은 pH 5.0 잘피 줄기는 pH 4.0으로 確認하였다.

3. 抽出蛋白質의 沈澱條件

抽出된 蛋白質의 最適 沈澱條件을 얻기 爲하여 TCA와 methanol로 處理하여 얻은 沈澱과 0.1N HCl을 使用한 等電點處理法으로 얻은 沈澱의 粗蛋

白質(窒素係數: 6.25)을 乾物重量으로 表示한 結果는 table 2와 같다. 이 結果에 依하면 지층이의 경우 TCA 處理와 pH 調節法이 25% 程度이고 methanol 處理는 15% 程度에 불과하였다. 朴等 (1976)은 지층이의 純蛋白質 分離條件 檢討에서 methanol 處理法에 依하면 抽出 粗蛋白質의 33% 沈澱되어 最適 沈澱條件이라 報告하고 있으나, 本實驗에서는 沈澱精製된 蛋白質의 品質을 粗蛋白質의 含量 및 아미노態窒素 含量을 測定하여 보다 窒素含量이 높고 效果인 方法을 모색함에 있음으로 그와 같은 表示 方法은 意義가 없을 것으로 判斷되어 表示 方法을 달리한 結果에서 은 差異가 생각되며, 또한 methanol 處理法은 大量의 methanol이 소비되는 短點(馬等, 1979)과 褐藻類에 많은 多糖類가 같이 沈澱되어 精製에 어려움이 隨伴되는 缺點이 있으므로 改良되어야 할 處 矣. 그러므로 보다 窒素含量이 많은 沈澱을 얻기 爲하여는 지층이의 경우 TCA

Table 2. Nitrogen contents of the purified protein by various treatments from the sampled seaweeds (% on dry basis, N. X 6.25)

Sample	TCA treatment	pH control	Methanol treatment
S. thunbergii	24.8	25.0	15.5
E. stolonifera	30.7	39.2	35.4
Rhizoid of Z. marina	37.0	50.6	42.0
Stem of Z. marina	30.8	67.7	26.4

또는 pH 調節에 依한 處理가 合理的 것 같으나, TCA 處理는 沈澱 中の 殘餘 TCA의 除去等이 問題가 되리라 생각되므로 pH 調節法이 좋을 것 같다. 곰피와 잘피의 경우도 마찬가지로 pH 調節法이 有利하다고 생각되며 특히 잘피줄기의 경우는 이의 效果가 상당히 좋아 沈澱의 粗蛋白 含量이 67.7%에 이르고 있었다.

4. 原藻 및 精製蛋白質의 아미노態 窒素含量

沈澱分離된 海藻蛋白質 및 磨碎原藻의 總窒素와 아미노態窒素 含量을 table 3에 表示하였다. 이 結果에 依하면 總窒素는 table 2와 3의 結果와 거의 一致하였고 아미노態窒素는 原藻의 경우, 種類에 따라 약간 달라 지층이와 곰피는 1800mg% 정도이

었고 잘피는 1500mg% 程度였다. 그러나 精製蛋白質은 그 精製效果의 差異로 인하여 지층이와 곰피는 各各 3200mg% 및 4600mg% 程度였으나 잘피의 경우는 效果가 좋아 6000mg% 이상의 含量을 나타내었다. 總窒素에 對한 아미노態窒素의 百分率은 지층이 原藻는 朴等 (1976)은 平均 83.2%라고 했으나 本實驗에서는 66.2%로 이보다 떨어지고 있으며 곰피는 67.8%로 朴等 (1976)의 結果와 비슷하였다.

그러나 抽出精製蛋白質의 경우는 總窒素에 對한 아미노態窒素 百分率이 平均 16% 이상 增加할 뿐 더러 아미노態窒素의 絕對量도 增加하였고 이의 效果는 特別히 잘피의 경우가 현저하였다.

Table 3. Contents of amino nitrogen and total nitrogen in seaweed samples.

Sample		Amino N.	Total N.	A. N./T. N. x 100
<u>S. thunbergii</u>	Raw	1876.4	2835.0	66.2
	P. P.	3219.0	4007.4	80.3
<u>E. stolonifera</u>	Raw	1862.8	2747.8	67.8
	P. P.	4617.7	6271.0	74.5
<u>Rhizoid of Z. marina</u>	Raw	1551.9	2625.7	59.1
	P. P.	6177.8	8090.8	76.4
<u>Stem of Z. marina</u>	Raw	1358.8	2931.0	46.4
	P. P.	6998.0	10837.4	64.6

*P. P. : purified protein

要 約

資源이 풍부한 赤利用海藻를 蛋白質 資源으로 利用하기 爲하여 지층이, 잘피 및 잘피 等 2種의 海藻와 1種의 海産植物을 選定하여 이의 水溶性 蛋白質 抽出條件을 檢討하였다.

1) 添加水量은 곰피는 1:150 (W/V)의 比로 加했을 때 抽出效果가 좋았고, 잘피와 지층이는 1:100 (W/V)일 때가 좋았다.

2) 抽出時間은 總窒素의 경우 2時間 以上에서, TCA 不溶性 蛋白質은 1時間 程度가 效果的이었다.

3) 抽出溫度는 40~50℃에서 抽出成績이 좋았으며 70℃ 이상에서 약간 높아지나 TCA 不溶性 窒素는 증가하지 않으므로 高溫抽出은 不利하였다.

4) pH의 影響은 全試料가 pH 9 以上에서 높은 抽出率을 보였으나 TCA 不溶性 窒素는 pH 7 以上에서는 增加하지 않는 관계로 pH 6~7에서 抽出함이 有利하였다.

5) 純蛋白質 沈澱 分離는 pH 調節法에 依한 處理가 窒素 含量이 가장 높았다.

6) 抽出蛋白質을 精製함으로써 아미노態窒素의 含量 및 總窒素에 對한 百分率도 높일 수 있는 效果를 얻을 수 있었다.

文 獻

Betschart, A. A. and J. E. Kinsella (1973): Extractability and solubility of leaf protein. J. Agr. Food Chem., 21(1), 60~65.

Betschart, A. A. (1975): Factors influencing the

extractability of safflower protein (Carthamus tinctorius L.). J. Food Sci., 40, 1010~1013.

Gheyasuddin, S., C. M. Cater and K. F. Mattil (1970): Effect of several variables on the extractability of sunflower seed proteins. J. Food Sci., 35, 453~456.

Kilara A and E. S. Humbert (1972): Nitrogen extractability and moisture adsorption characteristics of sunflower seed product. J. Food Sci., 37, 771~773.

金俊平 (1974): 非食用海藻에서 蛋白質의 改發研究, 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. 韓食科誌, 1(1), 17~23.

李仁圭 (1971): 韓國產 食用 海藻類의 成分에 關한 研究. 1. 數種 食用褐藻類의 構成 成分에 對하여, 韓農化誌, 14(3), 213~220.

李康鎬, 柳洪秀, 禹順姪 (1977): 海藻蛋白質 抽出에 關한 研究. 2. 食鹽可溶性 및 양콜可溶性 蛋白質의 抽出. 韓水誌, 10(4), 189~197

大石圭一, 田村祐子, 金井英治 (1961): 昂布의 品質~IV. エキス全窒素およびアミノ態窒素との關係. 日水誌, 27(6), 598~605.

奧村彩子, 大石圭一, 村田喜一 (1963): 昂布의 品質-VII. エキ스全 N およびアミノ-N の水抽出條件. 日水誌, 29(2), 1089~1091.

朴榮浩, 卞在亨, 吳厚圭, 姜泳周 (1976): 利用 海藻類의 利用化에 關한 研究. 1. 未利用 海藻類의 成分組成과 藻類蛋白質의 抽出. 韓水誌, 9(3), 155~162.

柳洪秀, 李康鎬 (1977): 海藻蛋白質 抽出에 關한

研究. 1. 水溶性蛋白質の抽出 韓水誌, 10(2), 115~125.

Samson, A.S., C.M. Cater, R.N. Khaund and K.F. Mattil (1971): Extractability of coconut proteins. J Food Sci., 36, 725~728.

Spies, J.R. and D.C. Chambers(1951): Spectrophotometric analysis of amino acid and peptides with their salts. J. Biol. Chem., 191, 1781~1797.

Tsuruga H. (1962): The uptake of radioruth-

enium by several kinds of littoral seaweed. Bull. Japan Soc. Sci. Fish., 28 (12), 1149~1154.

禹順姪・柳洪秀・李康鎬 (1979): 海藻蛋白質抽出에 關한 研究. 4. 抽出蛋白質의 沈澱條件 및 營養的 評價. 韓水誌, 12(4), 225~234.

保井忠彦, 神立誠 (1969): 純蛋白質 定量に用いる蛋白質沈澱劑について (第3報 0.3% NaOH 性 60% 熱アルコール溶性蛋白質のトリクロル酸による沈澱性. 日農化誌, 43(1), 71~75.