

추출 용매 및 효소 전처리 방법에 따른 포피란과 헤미셀룰로오스의 특성

안세라* · 구재근†

(*국립수산과학원 서해수산연구소 · †군산대학교)

Properties of Porphyran and Hemicellulose extracted with Different extract Solutions and Enzymatic Pretreatments from *Porphyra*

Se-Ra AN* · Jae-Geun KOO†

(*West Sea Fisheries Research Institute, National Institute of Fisheries Science · †Kunsan National University)

Abstract

Laver, *Porphyra*, is distinctive for its high content of proteins and polysaccharides such as porphyran and hemicellulose. The chemical properties of the polysaccharides extracted with different extraction methods such as hot water, dilute acid(pH 4.0) or alkali solution(2N NaOH) were examined to investigate the suitable extraction conditions for porphyran and hemicellulose from laver. For porphyran extraction, dilute acid solution was more preferable to hot water and alkali solution because of its higher 3,6-anhydrogalactose content and lower protein content. However, alkali solution was more suitable to extract the hemicellulose because of higher mannose content indicating the extraction of mannan. To decrease contamination of the polysaccharides with protein, the dried lavers were pretreated with enzymes (Protamex, Flavourzyme, Alcalase, Viscozyme) before hot water extraction. All enzyme pretreatments increased the yield of polysaccharides by compared with control (enzyme unpretreated) and Flavourzyme pretreatment was most effective to decrease protein contamination in the polysaccharide. All viscosities of porphyran solutions pretreated by enzymes were lower compared to the control porphyran solution and showed pseudoplastic behavior with yield stress. In case of alkali extraction of residues obtained after enzyme hydrolysis and hot water extraction, protease pretreatment increased the mannose contents in the polysaccharide while the xylose content was increased by Viscozyme pretreatment.

Key words : Laver, *Porphyra*, Extraction, Polysaccharide, Enzymatic pretreatment

I. 서론

김(*Porphyra*)은 국내 주요 해조 자원으로 2013년에 약 35만 톤, 2014년에 39만 톤이 생산되는 등 매년 꾸준히 생산량이 증가하는 추세이다

(Korea Statistical Information Service, 2016). 김에는 다량의 단백질과 탄수화물이 존재한다. 특히 탄수화물에는 isofloridoside와 floridoside 등의 유리당뿐 아니라 3,6-anhydro-L-galactose와 ester sulfate 등을 함유한 porphyran과 xylose, mannose

† Corresponding authors : 063-469-1828, kseaweed@kunsan.ac.kr

* 이 논문은 2015년도 군산대학교 교수장기국외연수경비의 지원에 의하여 연구되었음

로 이루어진 hemicellulose와 같은 김 고유의 다당이 함유되어있다(Anderson et al., 1967; Shin, 2012). 김에 함유된 다당에 관한 연구로는 porphyran 추출조건(Park et al, 1998), porphyran 저분자 및 체단백 연구(In and Koo, 2015), porphyran의 항산화 활성, macrophage 활성화, 혈중 콜레스테롤 저하작용, 항암효과, 혈청 및 조직의 칼슘, 마그네슘 및 칼륨 함량에 관한 연구(Zhang et al., 2004; Yoshizawa et al., 1995; Lee et al., 2010; Min et al., 2008; Jung et al., 2003)를 비롯하여 김 당단백질의 Sarcoma-180 cell에 대한 항암효과와 면역활성, 해조류의 다당과 hemicellulose의 항돌연변이 효과(Cho et al., 1990; Okai et al., 1993; Sung, 1997) 등이 있다. 그러나 김 다당에 관한 연구는 수용성 다당인 porphyran이 대부분을 차지하고 김에 함유된 hemicellulose에 대한 연구가 부족한 실정이다. 이는 hemicellulose가 porphyran에 비하여 상대적으로 함량이 적을뿐 아니라 추출, 분리하기 어렵기 때문으로 여겨진다. 본 연구에서는 김에 함유된 porphyran뿐 아니라 hemicellulose의 추출, 분리 조건을 검토하기 위해 열수, 묽은 산, 알칼리 추출에 따른 추출물의 특성을 조사하고 또한 효소 가수분해 전처리 후 추출한 분획물의 화학적 및 물성학적 특성을 조사하였다.

II. 재료 및 방법

1. 실험재료

김(*Porphyra yezoensis*)은 2013년 3월 충청남도 서천의 김 양식장에서 채취하고 수세 및 건조 후 분쇄하여 사용하였다. 효소는 Alcalase 2.4L FG(PLN05431, Novozymes, Denmark), Flavourzyme 500MG(HP202447, Novozymes, Denmark), Protamex(PW2A1096, Novozymes, Denmark) 그리고 Viscozyme L(KTN02118, Novozymes, Denmark)를 사용하였다.

2. 시료의 일반성분 분석

수분, 조회분, 조단백질, 조지방은 A.O.A.C법(1990)에 준하여 측정하였다. 수분은 105℃ 상압 건조법, 회분은 550℃ 직접회화법, 단백질은 Kjeldhal법, 지방은 Soxhlet 추출법으로 측정하였고 탄수화물은 100-(수분+회분+단백질+지방)으로 나타내었다.

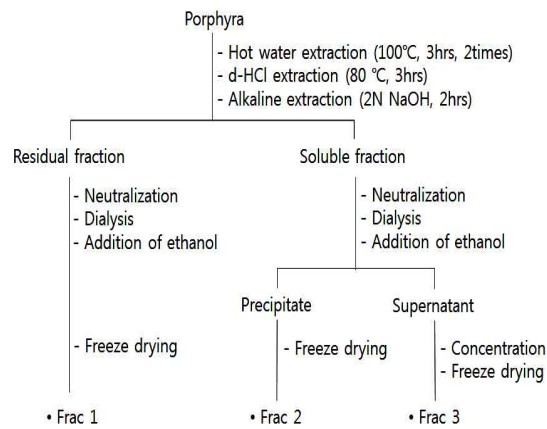
3. 다당의 화학적 조성 분석

총당의 함량은 phenol-sulphuric acid법(Dubois et al., 1956)에 따라 glucose를 표준물질로 사용하여 측정하였고, 단백질의 함량은 Lowry et al.(1951)의 방법에 따라 albumin bovine을 표준물질로 사용하여 측정하였다. 황산기 함량은 Dodgson et al.(1962)의 방법에 따라 K₂SO₄를 표준물질로 사용하여 측정하였다. 구성당 분석은 Furneaux et al.(1990)의 방법에 따라 측정하였다. 즉, 표준시약(rhamnose, fucose, arabinose, ribose, galactose, 6-O-methyl-D-galactose, D-xylose, 3,6-anhydrogalactose, D-mannose, D-glucose)과 시료에 내부표준물질(myo-inositol)을 넣어 각각 acetylation 유도체화 후 GC로 분석하였다. GC는 Hewlett Packard GC Model 6890, 검출기는 FID(flame ionization detector), 칼럼은 SP-2330(0.25mm I.D×30m, film thickness;0.2μm)을 사용하고 칼럼온도는 230℃, 주입구와 검출기 온도는 240℃, 이동상은 He을 1.1mL/min로 설정하여 분석하였다. 구성당 함량은 표준시약의 검량선을 이용하여 나타내었다.

4. 열수, 묽은 산, 알칼리 추출

열수와 묽은 산 추출은 Park et al.(1998)과 Koo et al.(2007)의 방법에 준하여 추출하였다([Fig. 1]). 열수 추출의 경우 김에 50배(v/w)의 증류수를 넣고 100℃에 3시간 추출한 뒤 원심분리(7,000×g, 10min)하고 잔사를 반복 추출하였다. 묽은 산 추출의 경우 김에 50배(v/w)의 증류수를 넣고 HCl

로 약산성(pH 4.0)으로 조절하여 80℃에서 3시간 추출한 뒤 원심분리(7,000×g, 15min)하였다. 열수 추출물과 묽은 산 추출물의 잔사는 동결 건조하여 잔사 분획물(Frac-1)을 얻었다. 상층액은 3배(v/v)량의 에탄올을 가하고 원심분리(7,000×g, 10min)하여 침전물로 분리한 후 침전물은 동결 건조하고 상층액은 에탄올을 제거한 뒤 동결 건조하여 각각 가용성 고분자 분획물(Frac-2)과 가용성 저분자 분획물(Frac-3)을 얻었다. 알칼리 추출은 Jung and Choi(2008)의 방법에 준하여 추출하였다. 즉, 김에 10배(v/w)의 2N NaOH를 넣고 40℃에 2시간 추출한 뒤 원심분리(10,000×g, 15min)하고 잔사와 상층액을 분리하여 각각 중화, 투석(MWCO:12-14,000)하였다. 투석액에 4배(v/v)량의 에탄올을 가하고 원심분리(9,000×g, 15min)하여 침전물과 상층액을 분리하여 침전물(Frac-1)은 동결 건조하고 상층액은 에탄올을 제거한 뒤 동결 건조하여 각각 알칼리 가용성 고분자 분획물(Frac-2)과 알칼리 가용성 저분자 분획물(Frac-3)을 얻었다.

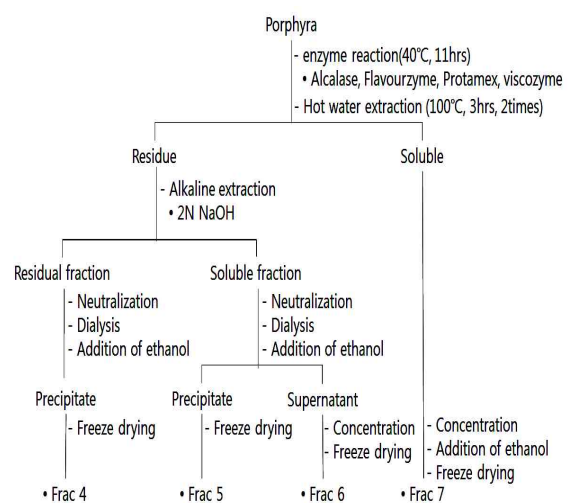


[Fig. 1] Flowchart for the fractions extracted with hot water, diluted HCl or 2N NaOH solutions

5. 효소 가수분해 후 열수 및 알칼리 추출

효소 가수분해가 알칼리 추출에 미치는 영향을

조사하기 위해 효소 가수분해 후 열수 및 알칼리 추출하였다([Fig. 2]). 즉, 마른 김 5g에 100ml의 증류수를 가하고 효소(Alcalase, Flavourzyme, Protamex, Viscozyme)를 5g씩 첨가한 뒤 water bath에서 40℃에 11시간 가수분해하였다. 가수분해물에 증류수 150ml를 가하고 100℃에서 3시간 추출한 뒤 원심분리(7,000×g, 10min)하여 얻은 상층액은 농축 후 4배(v/v)량의 에탄올을 가하여 침전물을 분리, 건조하여 효소 가수분해 열수 추출물(Frac-7)로 하였다. 또한 열수 추출하고 남은 잔사는 알칼리 추출을 하였다. 즉, 열수 추출하고 남은 잔사에 20배의 2N NaOH(v/w)를 가하고 40℃에 2시간 추출한 뒤 원심분리(10,000×g, 15min)하여 잔사와 상층액으로 나누었다. 잔사(Frac-4)와 상층액을 각각 중화한 후 투석(MWCO:12-14,000)하고 4배(v/v)량의 에탄올을 가한 다음 원심분리(9,000×g, 15min)하여 침전물과 상층액으로 분리하였다. 침전물은 동결 건조하여 고분자 분획물(Frac-5)과 가용성 저분자 분획물(Frac-6)을 얻었다.



[Fig. 2] Flowchart for the fractions extracted with 2N NaOH after enzyme hydrolysis from *Porphyra yezoensis*

Ⅲ. 결과 및 고찰

1. 김의 화학적 조성

김의 일반성분에 관한 결과는 <Table 1>에 나타내었다. 김의 주요 성분은 단백질 38.9%, 탄수화물 32.4%, 회분 18.3%로 단백질과 탄수화물이 71.3%를 차지하였다. 총당의 구성당 함량은 galactose 17.8%, 3,6-anhydrogalactose 2.4%, mannose 2.2%, glucose 1.5%, xylose 1.0% 순이었다. Kim et al.(2005)은 *Porphyra yezoensis*의 시판용 마른 김의 일반성분을 조사한 결과 단백질 32.1%, 탄수화물 35.7%, 회분 15.9%로 단백질과 탄수화물의 함량이 67.8%를 차지한다고 보고하였다. Koo and Park(1999)도 *Porphyra yezoensis*의 일반성분 분석을 통해 단백질 30-40%, 탄수화물

35-40%, 회분이 22-27% 함유되어 있다고 보고하였다. 본 연구와 유사하게 단백질과 탄수화물의 함량이 높은 경향을 나타내었다.

2. 열수, 묽은 산, 알칼리 용액을 이용한 추출

김을 [Fig. 1]에 따라 열수, 묽은 산, 알칼리 용액으로 추출하여 분리한 분획물의 수율 및 화학적 조성을 <Table 2>에 나타내었다. 가용성 고분자 분획물의 수율, 단백질, 총당 함량은 열수 가용성 고분자 분획물(HW Frac-2)이 각각 22.2%, 21.3%, 59.6%, 묽은 산 가용성 고분자 분획물(d-HCl Frac-2)이 17.3%, 15.8%, 63.6%, 2N NaOH 가용성 고분자 분획물(2N NaOH Frac-2)이 2.4%, 52.2%, 21.9%로 추출 조건에 따라 현저히 차이가 있었다.

<Table 1> Chemical compositions of the *Porphyra yezoensis*(%)

Moisture	Ash	Protein	lipid	Carbohydrate ^a	Monosaccharide contents								
					Rhm	Rib	An-Gal ^b	6-Me-Gal ^c	Xyl	Man	Gal	Glu	Total
8.4	18.3	38.9	2.0	32.4	0.3	0.3	2.4	0.6	1.0	2.2	17.8	1.5	26.1

^aCarbohydrate = 100-(moisture+ash+protein+lipid), ^b3,6-anhydrogalactose, ^c6-O-methyl-galactose

<Table 2> Yields and compositions of the fractions extracted with hot water, diluted HCl or 2N NaOH solutions from *Porphyra yezoensis*(%)

	Yield	Total sugar	Protein	SO ₄	Monosaccharide contents								
					Rhm	Rib	An-Gal ^a	6-Me-Gal ^b	Xyl	Man	Gal	Glu	Total
HW Frac-1	43.0	29.9	63.5	6.3	0.5	0.0	2.7	0.0	2.3	4.9	9.5	0.9	20.8
HW Frac-2	22.2	59.6	21.3	8.0	1.6	1.9	8.2	1.5	0.5	1.2	31.9	0.0	46.7
HW Frac-3	20.0	4.6	18.3	2.4	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	1.8	0.9	2.7
d-HCl Frac-1	54.0	39.6	67.7	4.0	0.4	1.6	1.7	0.0	1.7	3.8	8.1	1.7	18.9
d-HCl Frac-2	17.3	63.6	15.8	10.2	1.7	0.0	12.4	0.0	0.0	1.0	31.3	0.0	46.4
d-HCl Frac-3	18.4	5.0	14.2	1.5	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	1.8	0.0	1.8
2N NaOH Frac-1	29.2	52.5	26.9	9.1	0.6	0.0	7.8	0.7	2.2	5.4	24.8	1.6	43.2
2N NaOH Frac-2	2.4	21.9	52.2	4.7	0.0	0.0	4.0	0.0	0.0	2.1	15.2	0.0	21.4
2N NaOH Frac-3	13.7	4.7	53.4	4.1	0.0	0.4	0.0	0.0	0.0	0.0	1.6	0.0	2.0

^a3,6-anhydrogalactose, ^b6-O-methyl-galactose

즉, 수율은 열수 추출이 가장 높았고, 총당 함량은 묽은 산 추출이, 단백질 함량은 알칼리 추출이 가장 높아 추출 방법에 따라 가용성 고분자 분획물의 수율 및 조성이 달랐다. 특히 d-HCl Frac-2는 HW Frac-2에 비해 단백질 함량은 낮고 총당의 함량은 높았는데 이는 묽은 산에 의해 김 단백질 침전이 일어나 수용성 단백질 함량이 감소하고 상대적으로 고분자 분획물의 총당의 함량이 증가하기 때문으로 여겨진다. 반면에 2N NaOH Frac-2는 열수와 묽은 산 추출에 비하여 수율과 총당의 함량은 현저히 낮고 단백질 함량이 높은 특성을 나타내었다. 또한 알칼리 저분자 분획물(2N NaOH Frac-3)의 단백질 함량은 53.4%로 묽은 산 추출 저분자 분획물(d-HCl Frac-3) 14.2%에 비해 현저히 높았으나 알칼리 추출 잔사의 단백질 함량(2N NaOH Frac-1)은 26.9%로 묽은 산 추출 잔사(d-HCl Frac-1) 67.7%에 비해 오히려 감소하였다. 이는 김 단백질이 알칼리 용액에 의해 추출 및 분해되어 저분자 가용성 단백질 함량이 증가하고 그에 따라 잔사의 단백질이 감소하였기 때문으로 여겨진다. Park et al.(1998)도 pH 7.0, 100°C와 pH 4.0, 80°C에서 추출한 수용성 분획물의 단백질 함량을 측정한 결과 pH 7.0으로 추출한 고분자 분획물의 단백질 함량이 pH 4.0보다 높다고 보고하였다. 또한 Park and Koo(2008)는 100°C, 3시간 열수 추출하여 분리한 수용성 고분자 분획물의 수율과 총당의 함량을 각각 15.9%, 58.6%로 보고하였는데 본 연구의 22.0%, 59.6%보다 낮았다. 이는 계절 차이에 따른 김 시료의 단백질과 탄수화물의 함량 차이 때문으로 여겨진다.

각 분획물의 구성당 중 3,6-anhydrogalactose 함량은 d-HCl Frac-2이 12.4%, HW Frac-2이 8.2%, 2N NaOH Frac-2이 4.0% 순으로 함유되어 있다. 따라서 김 수용성 다당인 porphyran의 특징적인 구성 성분인 3,6-anhydrogalactose의 함량으로 미루어 볼 때 묽은 산 용액에 의해 porphyran이 효율적으로 추출됨을 알 수 있다. 반면에 알칼리 추

출은 2N NaOH Frac-2의 3,6-anhydrogalactose 함량이 2N NaOH Frac-1에 비하여 낮은 점으로 미루어 볼 때 열수 및 묽은 산 용액 추출에 비해 수용성 다당의 추출에 비효율적임을 알 수 있다. Park and Koo(2008)은 100°C, 3시간 열수 추출하여 분리한 수용성 고분자 분획물의 3,6-anhydrogalactose의 함량이 가장 높다는 보고하였다. 반면에 가용성 고분자 분획물의 mannose의 함량은 알칼리 추출 2.1%, 열수 추출 1.2%, 묽은 산 추출 1.0% 순으로 높았고 xylose의 함량은 열수 추출시 0.5%, 묽은 산과 알칼리 추출 고분자 분획물에는 검출되지 않았다. 따라서 2N NaOH 알칼리 추출을 하여도 mannose는 묽은 산 추출과 열수 추출에 비해 효율적으로 추출되나 xylose는 추출되지 않음을 알 수 있다. 김의 헤미셀룰로오즈는 껍질층을 구성하는 β -1,4 linked mannan과 세포벽을 구성하는 β -1,3 linked xylan으로 나누어져 존재한다(Frei and Preston, 1964). 따라서 2N NaOH 용액으로 추출하면 상피층을 이루는 mannan은 추출되나 세포벽 구성 성분인 xylan은 추출되지 않았음을 알 수 있다. 이상의 결과로 볼 때 묽은 산 용액에 의해 porphyran이 효율적으로 추출되고 알칼리 추출을 하면 김의 헤미셀룰로오즈 중 mannan이 열수나 묽은 산 추출에 비해 효율적으로 추출되나 다량의 단백질이 함께 추출되는 문제점이 있음을 알 수 있다.

3. 효소 전처리 후 알칼리 추출

김의 단백질을 효율적으로 제거하기 위해 [Fig. 2]에 따라 효소 가수분해한 후 알칼리 추출, 분리한 분획물의 수율 및 일반조성을 <Table 3>에 나타내었다. 가용성 고분자 분획물의 단백질 함량은 효소 종류에 따라 차이가 있어 Protamex 처리 시료 8.7%, Flavourzyme 처리 시료 11.0%, Alcalase 처리 시료 17.7%, Viscozyme 처리 시료 32.5% 순으로 함량이 낮았다. 특히 endo-type protease인 Protamex로 가수분해한 분획물이 endo

<Table 3> Yields and compositions of the fractions extracted with 2N NaOH after enzyme hydrolysis from *Porphyra yezoensis*(%)

	Yield	Protein	Monosaccharide contents							
			Rhm	Ara	An-Gal ^a	Xyl	Man	Gal	Glu	Total
Alc Frac-4	2.5	15.8	0.0	0.1	1.3	16.6	5.4	1.9	0.5	25.8
Alc Frac-5	2.7	17.7	0.0	0.0	4.2	0.5	14.5	8.9	0.7	28.7
Alc Frac-6	1.8	25.4	0.0	0.0	0.9	0.0	2.1	5.0	0.0	8.0
Fla Frac-4	3.8	22.8	0.1	0.1	1.7	17.7	6.5	2.4	0.5	29.0
Fla Frac-5	2.4	11.0	0.0	0.0	6.3	1.2	14.8	12.8	0.0	35.1
Fla Frac-6	2.2	18.6	0.0	0.0	5.8	0.0	5.0	12.1	0.0	22.9
Pro Frac-4	2.6	18.5	0.0	0.3	0.8	20.2	5.5	1.3	0.3	28.4
Pro Frac-5	3.5	8.7	0.0	0.0	4.4	0.8	15.6	9.3	0.0	30.2
Pro Frac-6	1.9	24.2	0.0	0.0	1.1	0.0	3.1	6.1	0.0	10.3
Vis Frac-4	6.9	50.9	0.0	0.0	0.4	14.5	1.1	0.3	0.3	16.7
Vis Frac-5	0.8	32.5	0.2	0.0	1.9	8.4	8.2	6.1	1.7	26.5
Vis Frac-6	14.1	85.6	0.0	0.0	0.0	0.0	1.9	0.6	0.0	2.5

^a3,6-anhydrogalactose

와 *exo* protease 혼합물인 Flavourzyme보다 낮아 단백질 제거율이 가장 높았고 또한 hemicellulase 활성이 있는 Viscozyme으로 가수분해 후 알칼리 추출한 분획물은 나머지 protease 가수분해 후의 분획물에 비하여 단백질 함량이 높아 단백질 제거율이 가장 낮았다. 고분자 분획물의 구성당 조성의 경우 포피란의 구성 성분인 3,6-anhydrogalactose의 함량은 protease 처리한 시료가 4.2-6.3%로 Viscozyme 처리한 시료 1.9%에 비하여 현저히 높았다. 또한 알칼리 가용성 헤미셀룰로오스의 구성 성분인 mannose의 함량은 Protamex 처리 시료 15.6%, Flavourzyme 처리 시료 14.8%, Alcalase 처리 시료 14.5%, Viscozyme 처리 시료 8.2% 순으로 protease 처리 시료가 Viscozyme 처리한 시료에 비하여 높았다. 반면에 xylose의 함량은 Viscozyme 8.4%, Flavourzyme 1.2%, Portamex 0.8%, Alcalase 0.5% 순으로 높아 알칼리 불용성 헤미셀룰로오스인 xylan이 Viscozyme에 가수분해되어 알칼리 용액에 추출됨을 알 수 있다.

[Fig. 2]에 따라 효소 가수분해 후 열수 추출한 수용성 고분자 분획물의 수율 및 조성을 효소 처리를 하지 않고 열수 추출한 분획물을 대조구 (control)로 함께 <Table 4>에 나타내었다. 수율의 경우 효소 가수분해 후 추출한 분획물의 수율은 34.3-39.1%로 대조구의 수율 22.2%에 비해 현저히 증가하였다. Protease뿐 아니라 carbohydrase인 Viscozyme으로 가수분해한 분획물의 수율도 증가하였는데 이는 단백질과 헤미셀룰로오스의 분해에 의해 수용성 고분자 물질의 용출이 용이해졌기 때문으로 여겨진다. 단백질 함량은 Protamex, Alcalase, Viscozyme 가수분해 분획물이 각각 23.3%, 22.7%, 21.2%로 대조구의 단백질 함량 21.3%와 차이가 거의 없었으나 Flavourzyme으로 가수분해한 분획물의 단백질 함량은 13.2%로 가장 낮아 *exo*-type의 protease가 *endo*-type의 protease에 비해 단백질 제거에 효과적임을 알 수 있다. 총당의 함량은 Viscozyme과 Flavourzyme 가수분해한 분획물이 각각 64.9%, 61.4%로 대조구보다 증가한 반면에 *endo*-type의 protease인

<Table 4> Yield, chemical compositions of polysaccharides extracted with hot water after enzyme hydrolysis(%)

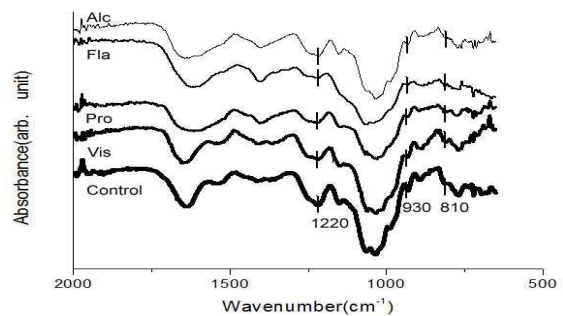
	Yield	Total sugar	Protein	SO ₄	Monosaccharide contents										
					Rhm	Fuc	Rib	Ara	An-Gal ^a	6-Me-Gal ^b	Xyl	Man	Gal	Glu	Total
Alc Frac-7	38.8	54.0	22.7	6.0	0.4	0.0	0.6	0.2	3.9	0.8	0.4	2.4	26.3	0.8	35.8
Fla Frac-7	34.3	61.4	13.2	7.2	0.5	0.2	0.2	0.0	4.1	0.8	0.5	1.9	28.3	0.0	36.5
Pro Frac-7	39.1	49.5	23.3	6.5	0.5	0.2	0.0	0.5	3.1	0.6	0.5	1.6	20.3	1.4	28.6
Vis Frac-7	34.4	64.9	21.2	6.7	0.7	0.0	0.0	0.0	7.3	1.0	0.2	3.6	33.5	3.0	49.2
Control ^c	22.2	59.6	21.3	8.0	1.6	0.0	1.9	0.0	8.2	1.5	0.5	1.2	31.9	0.0	46.7

^a3,6-anhydrogalactose, ^b6-O-methyl-galactose, ^crefer to HW Frac 2 in <Table 2>

Protamex와 Alcalase 처리한 분획물은 49.5%, 54.0%로 대조구보다 감소하였다. 황산기 함량은 효소 가수분해한 분획물 모두 대조구에 비하여 감소하는 경향을 나타내었으며 특히 Alcalase 가수분해한 분획물이 가장 낮았다. 구성당 중 3,6-anhydrogalactose 함량도 효소 가수분해 분획물이 대조구에 비하여 감소하였고, Protamex 가수분해 분획물이 3.1%로 가장 많이 감소한 반면에 Viscozyme 가수분해 분획물은 7.3%로 가장 적게 감소하였다. 따라서 endo-type의 protease인 Alcalase와 Protamex로 가수분해한 후 열수 추출한 경우 황산기와 3,6-anhydrogalactose 함량의 감소량이 다른 효소 처리에 비하여 높아 포피란 함량이 상대적으로 낮을 것으로 추정된다. Xylose의 경우는 효소 처리에 따른 함량 변화가 적은 반면에 mannose는 전 시료 모두 대조구보다 함량이 증가하였고 특히 Viscozyme 가수분해한 분획물은 대조구에 비해 3배 정도 증가하였다. 이상의 결과로 미루어 볼 때 효소 가수분해 후 열수 추출을 하면 수용성 고분자 분획물의 수율과 헤미셀룰로오스의 구성 성분인 mannose의 함량이 증가함을 알 수 있다. 또한 Flavourzyme 가수분해가 단백질 제거에 효과적임을 알 수 있다.

4. FT-IR 분석

효소 가수분해 후 열수 추출한 수용성 고분자 분획물의 FT-IR spectrum을 [Fig. 3]에 나타내었다. 수용성 고분자 분획물 모두 3,6-anhydro-L-galactose(930cm⁻¹)와 6-sulfate galactose(810cm⁻¹)의 peak가 관찰되었다. 또한 1,210-1,260cm⁻¹은 황산기의 O=S=O에 의한 진동 밴드로 전 시료 모두 1,220cm⁻¹ 부근에 peak가 검출되어 효소 처리 유무와 관계없이 황산기가 존재함을 확인하였다.



[Fig. 3] FT-IR spectra of polysaccharides extracted by hot water after enzyme hydrolysis

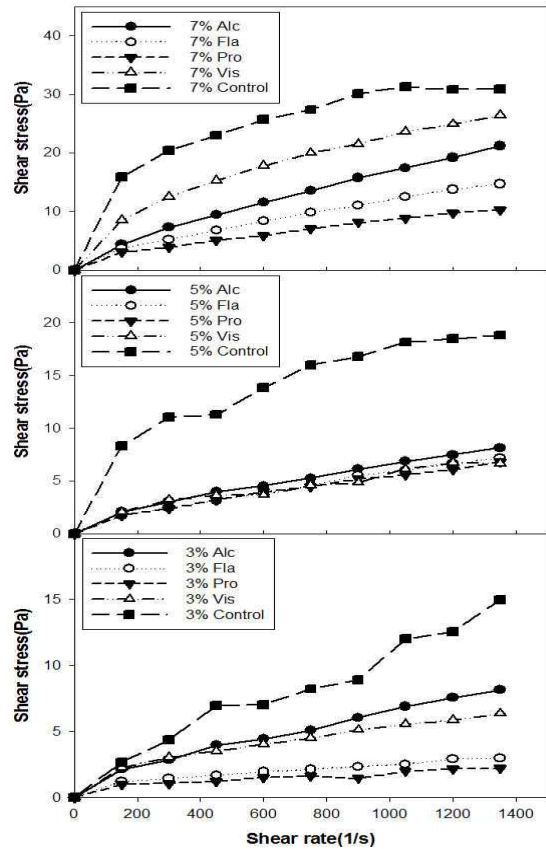
5. 효소 가수분해한 수용성 고분자 분획물의 점도 변화

효소 가수분해 후 열수 추출한 수용성 고분자

분획물 용액의 전단속도에 따른 전단응력 변화를 [Fig. 4]에 나타내었다. 전단속도 800 1/s에서 측정된 7% 용액의 전단응력은 효소 가수분해를 하지 않은 대조구 28.87 Pa, Viscozyme 20.62 Pa, Alcalase 14.56 Pa, Protamex 12.21 Pa, Flavourzyme 7.38 Pa 순으로 높았다. In and Koo(2015)는 포피란을 protease로 가수분해한 후 분자량별로 분획한 효소 가수분해물의 점도 측정을 통해 포피란의 점도는 분자량의 영향을 많이 받으며 분자량이 적을수록 점도가 저하한다고 보고하였다. 본 실험에서도 효소 가수분해한 분획물이 대조구보다 점도가 저하한 것은 분자량의 감소 때문으로 판단된다. 또한 수용성 고분자 분획물의 농도에 따른 유동 특성을 조사하기 위해 Casson식과 Herschel-Bulkley model식을 이용하여 구한 항복력, 유동 지수, 점조도 지수를 <Table 5>에 나타내었다. 결정계수값(r^2)은 0.901-0.997로 높은 상관성을 나타내었다. 항복력은 대조구의 경우 시료 농도 증가에 따라 값도 증가하는 경향을 나타낸 반면 효소 가수분해한 분획물은 3%와 5%간의 값 차이는 적었으나 고농도인 7%에서 급격히 증가하는 경향을 나타내었다. 또한 유동 지수 값은 전 시료 모두 1이하를 나타내어 항복력을 가진 의가소성 유체 특성을 나타내었다. 점조도 지수는 항복력과 동일하게 대조구의 경우 농도 증가에 따라 증가하는 경향을 나타내었으나 효소 가수분해 시료 모두는 3%와 5%간의 차이는 적고 고농도인 7% 농도에서 급격히 증가하는 특성을 나타내었다. 효소 종류에 따라서는 대조구, Viscozyme, Alcalase, Flavourzyme, Protamex의 순으로 높았다. 이상의 결과로 미루어 볼 때 효소 가수분해 전처리한 수용성 다당의 점조도 지수와 항복력 모두 농도가 높을수록 영향을 많이 받을 수 있었다.

6. 요약

김은 우리의 주요한 식품 자원으로 단백질 함



[Fig. 4] Shear stress vs shear rate plot of polysaccharides extracted by hot water after enzyme hydrolysis

량과 탄수화물의 함량이 매우 높다. 김에는 다량의 단백질과 탄수화물이 존재한다. 특히 탄수화물에는 isofloridoside과 floridoside 등의 유리당 뿐만 아니라 3,6-anhydro-L-galactose와 ester sulfate 등을 함유한 porphyran과 xylose, mannose로 이루어진 hemicellulose가 함유되어있다. 본 연구에서는 추출 방법에 따른 porphyran과 hemicellulose의 추출, 분리 조건을 검토하기 위해 열수, 묽은 산, 알칼리로 추출한 추출물의 특성을 조사하였다. 수율은 열수 추출이 가장 높았고, 총당 함량은 묽은 산 추출이, 단백질 함량은 알칼리 추출이 가장 높아 열수와 묽은 산 추출에 의해 수용성 다당인 포피란이 효율적으로 추출되었으며 묽은 산으로

<Table 5> Herschel-Bulkley Model of polysaccharides extracted with hot water after enzyme hydrolysis

	concentration(%)	C ^a	K ^b	n ^c	r ²
Alc	3	0.1086	0.0708	0.6512	0.9905
	5	0.1074	0.0675	0.6604	0.9983
	7	0.1689	0.1049	0.7341	0.9997
Fla	3	0.5339	0.0258	0.6298	0.9869
	5	0.3004	0.0285	0.7628	0.9956
	7	0.8439	0.0654	0.7441	0.9971
Pro	3	0.4761	0.0236	0.5854	0.9012
	5	0.4509	0.0306	0.7386	0.9975
	7	0.8986	0.0596	0.7020	0.9937
Vis	3	0.9699	0.0444	0.6659	0.9980
	5	0.8116	0.0393	0.6939	0.9681
	7	3.9832	0.1383	0.7116	0.9886
HW Frac-2	3	0.6156	0.0424	0.7861	0.9665
	5	5.2659	0.1234	0.6539	0.9666
	7	12.1430	0.1539	0.6796	0.9342

^aYield stress, ^bConsistency index, ^cFlow behavior index

추출시 단백질의 함량이 적었다. 알칼리 추출 조건에서는 포피란의 추출이 적었으나 단백질이 다량 동시에 추출되었고 mannan은 추출되나 xylan은 추출되지 않았다. 효소 가수분해(Protamex, Flavourzyme, Alcalase, Viscozyme) 후 열수 추출한 수용성 다당의 수율은 효소 처리 시료가 34.3-39.1%로 효소 처리하지 않은 대조구에 비해 증가하였고 Flavourzyme 가수분해가 단백질 제거에 가장 효과적이었다. 또한 효소 처리한 수용성 다당의 점도가 저하하였고 의가소성 유체 특성을 나타내었다. 효소 처리 후 열수 추출하고 남은 잔사를 알칼리 추출한 경우 mannan의 함량은 protease인 효소 처리 시료가 Viscozyme 처리한 시료에 비하여 높았다. 반면에 Viscozyme 처리 후 알칼리 추출한 경우는 xylose의 추출 함량이 증가하였다.

References

- Anderson, N. S. · Dolan, T. C. S. & Rees, D. A.(1965). Evidence for a Common Structural Pattern in the Polysaccharide Sulphates of the Rhodophyceae. Nature 205, 1060-1062.
- AOAC(1990). Official method of analysis of AOAC international. 16th. Ed.
- Cho, Kyung-Ja · Lee, Young-Suk & Ryu, Beung-Ho(1990). Antitumor effect and immunology activity of seaweeds toward Sarcoma-180. Korean Journal of Fisheries and Aquatic Sciences 23(5), 345-352.
- Dodgson, K. S. & Price, R. G.(1962). A note on the determination of the ester sulphate content of sulphated polysaccharides. Biochemical Journal 84(1), 106-110.
- Dubois, M. · Gills, K. A. · Hamilton, J. K. · Rebers, P. A. & Smith, F.(1956). Colorimetric method for the determination of sugars and related substances. Analytical chemistry 28(3), 350-356.
- Frei, E. & Preston, R. D.(1964). Non-cellulosic structural polysaccharides in algal cell walls. II. Association of xylan and mannan in *Porphyra umbilicalis*. Proceedings of the Royal Society of London B: Biological Sciences 160(980), 314-327.
- Furneaux, R. H. · Miller, I. J. & Stevenson, T. T.(1990). Agaroids from New Zealand members of the Gracilariaceae (*Gracilariales*, *Rhodophyta*) - a novel dimethylated agar. Thirteenth International Seaweed Symposium. Springer Netherlands. 645-654.
- In, Seo-Kyoung & Koo, Jae-Geun(2015). Chemical Composition and Rheological Properties of

- Enzymatic Hydrolysate of Porphyran Isolated from *Pyropia yezoensis*. Korean Journal of Fisheries and Aquatic Sciences 48(1), 58~63.
- Jung, Bok-Mi · Shin, Tai-Sun · Kim, Hyung-Rak · Jung, Kyoo-Jin & Kim, Seon-Bong(2003). Effect of porphyran isolated from laver, *Porphyra yezoensis* on Calcium, Magnesium and potassium contents in hyperlipidemic rats. Korean Journal of Fisheries and Aquatic Sciences 36(3), 220~224.
- Jung, Ji-Eun & Choi, Yong-Hee(2008). The optimization of extraction process on hemicellulose from rice bran. Korean Journal of Food Preservation 15(4), 532~541.
- Kim, Seon-Jae · Ma, Seung-Jin & Jang, Yoon-Sen (2005). Extraction and quality characteristics of porphyran from laver (*Porphyra yezoensis*) waste. Journal of the Korean Society of Food Culture 20(4), 446~450.
- Koo, Jae-Geun & Park, Jin-Hee(1999). Chemical and gelling properties of alkali-modified porphyran. Korean Journal of Fisheries and Aquatic Sciences 32(3), 271~275.
- Koo, Jae-Geun · Park, Byung-Chun · Kim, Byung-Gi · Kim, Hyun-Ae · Ryu, Chung-Hee & Kim, Sun-Young(2007). Chemical composition and rheological properties of deproteinated porphyran. Korean Journal of Fisheries and Aquatic Sciences 40(1), 1~7.
- Korea Statistical Information service(2016). Retrieved from <http://Kosis.kr>.
- Lee, Jung-Sun · Lee, Myung-Heon & Koo, Jae-Geun(2010). Effects of porphyran and insoluble dietary fiber isolated from laver, *Porphyra yezoensis*, on lipid metabolism in rats fed high fat diet. The Korean Journal of Food And Nutrition 23(4), 562~569.
- Lowry, O. H. · Rosebrough, N. J. · Farr, A. L. & Randall, R. L.(1951). Protein measurement with the folin phenol reagent. The Journal of Biological Chemistry 193(1), 265~275.
- Min, Hyun-Kyeng · Kim, Hyo-Ju & Chang, Hae-Chang (2008). Growth-inhibitory effect of the extract of porphyran-chungkookjang on cancer cell. Journal of the Korean Society of Food Science and Nutrition 37(7), 826~833.
- Okai, Yasuji · Higashi-Okai, Kiyoka & Nakamura, Sei-ichi(1993). Identification of heterogenous antimutagenic activities in the extract of edible brown seaweeds, *Laminaria japonica*(Makonbu) and *Undaria pinnatifida*(Wakame) by the umu gene expression system in *salmonella typhimurium* (TA1535/pSK1002). Mutation research letters 303(2), 63~70.
- Park, Jin-Hee & Koo, Jae-Geun(2008). A simple purification method and chemical properties of porphyran from *Porphyra yezoensis*. Korean Journal of Fisheries and Aquatic Sciences 41(6), 409~413.
- Park, Jin-Hee · Koo, Jae-Geun · Do, Jung-Ryong · Yang, Cha-Bum & Woo, Sang-Kyu(1998). Effect of extraction temperature and pH on the chemical properties of crude porphyran extracted from *Porphyra yezoensis*. Korean Journal of Fisheries and Aquatic Sciences 31(1), 127~131.
- Shin, Dong-Min(2012). Studies on the physicochemical properties of cell wall polysaccharides isolated from *Porphyra*. University of Kunsan.
- Sung, Mi-Kyung(1997). Effect of lignin and hemicellulose on the Mutagenicity of IQ. Journal Korean Society of Food and Nutrition 26(1), 67~71.
- Yoshizawa, Yasuko · Ametani, Akio · Tsunehiro, Jun · Nomura, Kazuyo · Itoh, Masao · Fukui, Fumio & Kaminogawa, Shuichi(1995). Macrophage stimulation activity of the polysaccharide fraction from a marine alga (*Porphyra yezoensis*) : Structure-function relationship and improved solubility. Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry 59(10), 1933~1937.
- Zhang, Quanbin · Li, Ning · Liu, Xiguang · Zhao, Zengqin · Li, Zhien & Xu, Zuhong(2004). The structure of a sulfated galactan from *Porphyra haitanensis* and its in vivo antioxidant activity. Carbohydrate Research 339(1), 105~111.

• Received : 08 November, 2016

• Revised : 18 November, 2016

• Accepted : 05 December, 2016