

# Porphyran의 신속한 정제 방법 및 화학적 특성

박진희<sup>1</sup>·구재근\*

<sup>1</sup>한양대학교 의생명연구원, 군산대학교 식품생명공학과

## A Simple Purification Method and Chemical Properties of Porphyran from *Porphyra yezoensis*

Jin-Hee PARK<sup>1</sup> and Jae-Geun KOO\*

<sup>1</sup>Institute of biomedical Science, Hanyang University, Seoul 133-791, Korea

Department of food science and biotechnology, Kunsan National University, Kunsan 573-440, Korea

A simple method for the purification of porphyran from laver *Porphyra yezoensis* was developed to obtain information for the development of food materials with biological functionality. Crude porphyran (CP) was extracted from dried laver in boiling water for 3 h, and then fractionated using cetylpyridinium chloride into an acidic fraction (CP-F1) and a neutral fraction (CP-F2). CP-F1 was fractionated further by fractional ethanol precipitation. Fraction CP-F1-70, precipitated at an ethanol concentration of 61-70% was the major fraction containing 68.1% of the yield from the initial fraction CP-F1. The CP-F1-70 fraction displayed a single band on Sepharose CL-4B with a molecular mass of 550 kDa, indicating a homogeneous polysaccharide. The molar ratio of galactose, 3,6-anhydro-L-galactose, 6-O-methyl-D-galactose and ester sulfate of CP-F1-70 was 1:0.32:0.07:0.53. This method is very useful for rapid and large-scale preparation of purified porphyran because it is compatible with mass production.

Key words: *Porphyra yezoensis*, Porphyran, Cetylpyridinium chloride, Fractional ethanol precipitation

### 서 론

Porphyran은 김 (*Porphyra* spp.), 김파래 (*Bangia fuscopurea*) 등의 세포벽 또는 세포간 충전 물질로 존재하는 수용성 산성 다당으로 주요 구성성분은 3,6-anhydro-L-galactose (3,6-An-Gal), 6-O-methyl-D-galactose (6-Me-Gal), D,L-galactose (Gal) 및 ester sulfate이다 (Peat et al., 1961; Gretz et al., 1983). Porphyran은 황산기와 methoxy 기가 다량 함유되어 있는 점을 제외하고는 agarose와 구조가 유사하여 L-galactose unit가 sulfate로, D-galactose unit가 methoxy기로 치환된 agarose라고 할 수 있다. 홍조류에서 추출한 한천과 카라기난도 기본 구성 성분이 3,6-An-Gal, 6-Me-Gal, Gal로 porphyran과 유사하나 galactose의 입체이성체인 D와 L form의 차이, 구성성분의 조성비 차이로 인해 각각 고유의 특성을 나타낸다 (Anderson et al., 1965; Morrice et al., 1983). Porphyran의 기능성으로는 항종양활성 (Noda et al., 1989a; 1989b; Kwon and Nam, 2007), 면역증강기능 (Yosizawa et al., 1995), 항고지혈증 작용 (Jung et al., 2001), 항산화작용 (Zhang et al., 2004) 등이 보고되어 있어 porphyran의 기능성 식이첨료로서의 이용 가능성이 매우 높다. 그러나 porphyran과 같이 황산기를 함유한 산성 다당인 fucoidan의 생리 기능성은 당의 구조 및 분자량에 따라 달라진다 (Teruya et al., 2007; Wang et al., 2008). 따라서 국내산 김에서 추출한 porphyran을 이용한 새로운 식품소재 개발을 위해서는 우선 porphyran을 정제한 후 정제 porphyran의 이화학적

특성의 조사가 필요하다. 본 실험에서는 국내 연안에서 다량 양식되고 있는 방사무늬김 (*Porphyra yezoensis*)로부터 추출한 조 porphyran을 cetylpyridinium chloride (CPC)와 에탄올 분별 침전법 (fractional ethanol precipitation)으로 연속 처리하여 정제하는 신속한 정제법을 개발하고 정제된 porphyran의 화학적 특성을 조사하였다.

### 재료 및 방법

#### Crude porphyran 추출

방사무늬김 (*Porphyra yezoensis*)을 담수로 가볍게 수세한 후 45°C에서 열풍 건조하였다. 분쇄 후 20 mesh 체로 걸러 통과한 분말을 시료로 사용하였다. 분말 시료에 50배 (V/W)의 증류수를 넣고 100°C에서 3시간씩 2회 반복 추출 후 여과하여 수용성의 열수추출액 (HWE)을 제조하였다. HWE를 부분 농축한 후 3배 용량 (V/V)의 에탄올을 가하여 침전 획분과 가용성 획분으로 분리한 후 각각을 농축 후 동결 건조하여 crude porphyran (CP)과 에탄올 가용성 성분 (HWE-ES)을 제조하였다 (Fig. 1).

#### Porphyran의 정제

Porphyran의 정제는 CP 용액에 cetylpyridinium chloride (CPC)를 첨가하여 산성 획분인 CPC 침전물과 중성 획분인 CPC 상등액으로 분리한 후 다시 산성 획분을 에탄올 분별 침전법 (fractional ethanol precipitation)으로 재분획하여 정제하였다. 즉 1% CP용액에 5% CPC용액을 침전이 생기지 않을

\*Corresponding author: kseaweed@kunsan.ac.kr

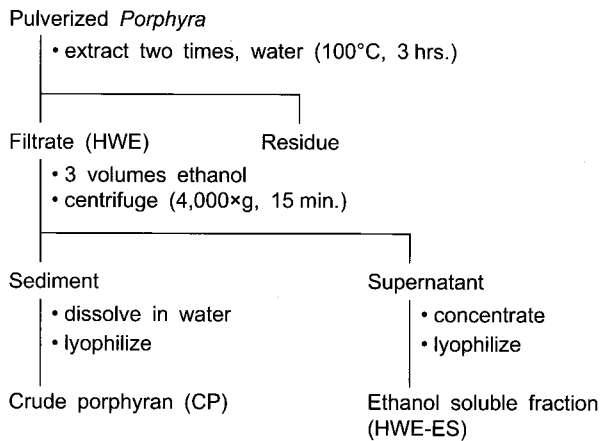


Fig. 1. Preparation scheme of crude porphyran (CP) and ethanol soluble fraction (HWE-ES) from hot water extract (HWE) of *Porphyra yezoensis*.

때까지 첨가하여 37°C에서 12시간 정착한 후 원심분리(4,000 g×15 min)하여 CPC-산성다당 복합체인 침전물과 CPC 상층액으로 분리하였다. 산성다당획분(CP-F1)은 CPC 침전물에 2M NaCl용액을 가하여 37°C에서 48시간 교반하여 CPC를 유리시킨 후 3배 용량의 에탄올을 가해 침전된 다당을 증류수에 다시 녹여 48시간 투석, 동결 건조하여 얻었다. 또한 중성다당 획분(CP-F2)은 CPC 상층액을 감압농축한 후 3배량의 에탄올을 가해 침전된 다당을 증류수에 녹여 48시간 투석한 후 동결 건조하여 제조하였다(Scott, 1965).

CPC 처리하여 얻은 산성 다당 획분은 에탄올 분별 침전법으로 재분획하였다. 즉, 1% CP-F1 용액에 에탄올 농도가 40%가 되도록 에탄올을 첨가한 후 원심분리(4,000 g×15 min)하여 에탄올 농도 40%에서 침전하는 획분(CP-F1-40)을 분리하였다. 남은 원심 분리 상층액에 에탄올 농도가 50%가 되도록 에탄올을 다시 추가한 후 원심 분리하여 에탄올 농도 41-50%에서 침전하는 획분(CP-F1-50)을 분리하였다. 동일한 방법으로 단계적으로 에탄올 농도 51-60%에서 침전하는 획분(CP-F1-60), 에탄올 농도 61-70%에서 침전하는 획분(CP-F1-70), 에탄올 농도 71-80%에서 침전하는 획분(CP-F1-80)을 분획한 후 각각 증류수에 24시간 투석한 후 동결 건조하였다(Whisler and Sannella, 1965).

#### Porphyran의 화학적 조성 분석

총당 함량은 페놀-황산법(Dubois et al., 1956), 단백질 함량은 Lowry et al. (1951), 황산기의 함량은 Dodgson et al. (1962)의 방법, 3,6-An-Gal의 함량은 Yaphe and Arsenault (1965)의 방법에 따라 분석하였다. 구성당 조성은 Furneaux et al. (1990)의 방법에 따라 acetylation 한 후 SP-2330 컬럼(0.25 mm I.D.×30 m)으로 230°C에서 gas chromatography (HP 6890)로 분석하였다. 구성당의 확인은 표준시약과 retention time을 비교하여 확인하였고 특히 3,6-An-Gal는 neoagarobiose (Sigma Co.)를 분해시킨 후 acetylation시켜 GC/MS (HP

5971A MSD)로 oven의 온도를 초기 30°C에서 분당 10°C씩 230°C까지 승온하면서 electronic impacted ionization (EI) mode에서 70 eV로 이온화하여 확인하였다. 구성당의 정량은 내부표준물질(myo-inositol)과 표준시약(6-methyl-galactose, neoagarobiose, D-xylose, D-mannose, D-galactose, D-glucose)을 시료와 동일하게 acetylation시켜 농도별 상대 면적비를 구하여 측정하였다.

#### 분자량 측정

분자량은 gel column chromatography를 이용하여 분자량을 확인하였다. Sepharose CL-4B 컬럼(2.0×88 cm)에 1% 시료 용액을 주입한 후 0.2 M NaCl로 용출시키면서 fraction collector로 7 mL씩 모은 후 페놀 황산법으로 490 mm에서 흡광도를 측정하였다. 분자량 표준시약은 Blue dextran (Type 2000), Dextran T-500 (5×10<sup>5</sup> m.w.), Dextran T-70 (7×10<sup>5</sup> m.w.), Dextran T-40 (4×10<sup>4</sup> m.w.)을 사용하였다.

## 결과 및 고찰

### Crude porphyran (CP)의 화학적 조성

Fig. 1의 방법에 따라 제조한 crude porphyran (CP), 열수추출물(HWE), 에탄올 가용성 성분(HWE-ES)의 화학조성은 Table 1과 같다. HWE의 조성은 당 31.8%, 단백질 14.2%, 황산기 3.6%로 단백질 함량이 비교적 높았다. HWE의 에탄올 침전 획분인 CP의 수율은 건조 김을 기준으로 15.9%이었으며, 화학 조성은 총당 58.6%, 단백질 9.8%, 황산기 10.5%, 3,6-An-Gal 13.2%로 HWE에 비하여 단백질의 함량은 감소하였고 당, 황산기 및 3,6-An-Gal의 함량은 증가하였다. Rees와 Conway (1962)는 *Porphyra*속 40종의 수용성 다당 조성을 분석한 결과 대부분의 경우 6-11%의 ester sulfate, 5-19%의 3,6-An-Gal, 3-28%의 6-methyl galactose (6-Me-Gal), 소량의 xylose로 구성되어 있었으며 품종 및 서식지역에 따라 조성과 함량이 차이가 많이 난다고 하였다. 본 실험에서 제조한 CP의 조성은 *P. umbilicalis*에서 추출한 다당과 비슷한 반면(Peat et al., 1961; Anderson and Rees, 1965) *P. columbina*에서 얻은 crude porphyran에 비해서는 황산기 함량이 낮았다(Brash et al., 1981).

Table 1. Yield and chemical compositions of HWE, HWE-ES and CP

Sample <sup>1</sup>	Yield <sup>2</sup>	Chemical composition (% , dry basis)			
		Total sugar	Sulfate	Protein	3,6-An-Gal <sup>3</sup>
HWE	35.7	31.8	3.6	14.2	6.6
HWE-ES	15.2	6.1	3.2	15.6	0.1
CP	15.9	58.6	10.5	9.8	13.2

<sup>1</sup>refer to Fig. 1, <sup>2</sup>% of dried laver, <sup>3</sup>3,6-anhydro-galactose.

#### CPC를 이용한 정제

CP에 CPC를 처리하여 분리한 CP-F1과 CP-F2의 수율 및 화학적 조성은 Table 2와 같다. 수율은 CP-F1이 69.2%, CP-F2

Table 2. Yield and chemical composition of acid (CP-F1) and neutral (CP-F2) fractions prepared by treatment with cetylpyridinium chloride (% , dry basis)

	Sample		
	CP	CP-F1	CP-F2
Yield <sup>1</sup>	100.0	69.2	6.7
Sulfate	10.5	12.7	2.7
Protein	9.8	3.2	25.8
Total sugar	58.6	69.5	34.5
3,6-An-Gal <sup>2</sup>	13.2	14.3	3.4
6-Me-Gal <sup>3</sup>	2.7	3.7	1.6
Gal	34.5	47.1	20.7
Xyl	tr <sup>4</sup>	-	tr
Man	tr	tr	tr
Glc	tr	tr	tr

<sup>1</sup>% of crude porphyran (CP), <sup>2</sup>3,6-anhydrogalactose, <sup>3</sup>6-O-methyl-D-galactose, <sup>4</sup>0<Trace<0.1%

가 6.7%로 CP-F1이 대부분을 차지하였다. CP-F1은 총당 69.5%, 황산기 12.7%, 단백질 3.2%로 CP에 비해 총당 및 황산기 함량은 증가하고 단백질 함량은 감소하여 보다 정제되었음을 알 수 있었다. 구성당의 조성은 galactose 47.1%, 3,6-An-Gal 14.3%, 6-Me-Gal 3.7%로 이들 3종의 당이 대부분을 차지하였다. 또한 CPC와 결합하지 않은 CP-F2 획분은 총당이 34.5%, 황산기 2.7%, 단백질 25.8%로 CP에 비해 총당 및 황산기 함량은 낮고 단백질 함량은 높아 상대적으로 극성이 낮은 당단백질 획분이었다. 이들 각 획분의 분자량은 Table 3과 같다. CP의 분자량 별 분포를 보면 720 kDa이 68%, 380 kDa이 22%, 50 kDa이 10%였으나 이를 CPC로 정제한 CP-F1의 경우는 720 kDa이 92%, 110 kDa이 8%로 CP에 비해 저분자 다당이 감소하였다. 따라서 화학조성과 분자량 분산성으로 볼 때 CPC처리를 통해 효과적으로 crude porphyran을 부분 정제할 수 있음을 알 수 있었다.

Table 3. Molecular weight of porphyran fractions prepared by treatment with cetylpyridinium chloride

Sample <sup>1</sup>	M.W. (10 KD)	% area of each peak
CP	72	68
	38	22
	5	10
CP-F1	72	92
	11	8
CP-F2	54	100

<sup>1</sup>refer to table 2.

Brash et al. (1981)은 *P. columbina*에서 추출한 crude porphyran이 cetyltrimethyl ammonium bromide (CTAB)와 DEAE-Sephadex A-25로는 분획되지 않는 단일한 물질이었다고 보고하였고, Villarroel and Zanjungo (1981)는 *P. columbina*에서 추출한 crude porphyran을 CTAB로 처리하여 2개의 획분으로 분획하였으나 두 획분의 화학조성의 차이가 거의 없었다고 보고하였다. 반면에 Peat et al. (1961)은 *P. umbilicalis*에서 얻은

다당을 CPC로 처리하여 정제된 분획을 얻을 수 있다고 보고하였는데 이는 본 실험 결과와 일치한다. 이 같이 연구자에 따라 다른 결과는 *P. umbilicalis*에서 추출한 다당과 본 실험에서 사용한 *P. yezoensis*에서 추출한 crude porphyran의 화학조성이 유사한 점으로 미루어 볼 때 품종에 따라 추출 다당의 화학조성이 차이므로 이로 인해 CPC 처리 효과가 달라지기 때문으로 여겨진다.

알코올 분별 침전법에 의한 분획

CPC로 부분 정제한 porphyran (CP-F1) 1% 용액에 알코올의 농도가 30-80%가 되도록 에탄올을 단계적으로 첨가하여 얻은 각 획분의 수율 및 화학적조성은 Table 4와 같다. 에탄올을 30%까지 첨가할 때 침전이 일어나지 않았으며 40% 이상부터 흰색의 침전이 소량씩 생기기 시작하여 70%의 농도에서 대부분의 다당이 침전되었다. 70% 이상에서는 극소량의 침전물 밖에 생성되지 않아 수율은 에탄올 61-70% 획분 (CP-F1-70)에서 68.1%로 가장 높았다. 총당, 3,6-An-Gal 및 황산기 함량도 CP-F1-70 획분에서 가장 높았고 CP-F1-80 획분에서는 오히려 감소하는 경향을 나타내었다. 그리고 단백질도 CP-F1-50과 CP-F1-60 획분에서 각각 16.6%와 17.5% 함유되어 있었으나 CP-F1-70 획분에서는 0.9%로 매우 낮았다.

Table 4. Yield, chemical composition and molecular weight of porphyran fractions obtained by fractional ethanol precipitation of P-F1 (% , dry basis)

Fraction	Yield <sup>6</sup>	Total sugar	Sulfate	Protein	3,6-An-Gal	M.W. (kD)
P-F1-40 <sup>1</sup>	3.5	64.8	8.6	8.1	10.2	820
P-F1-50 <sup>2</sup>	5.0	48.8	7.8	16.6	9.4	760
P-F1-60 <sup>3</sup>	5.4	50.2	6.6	17.5	12.1	750
P-F1-70 <sup>4</sup>	68.1	80.2	13.4	0.9	14.5	550
P-F1-80 <sup>5</sup>	0.8	29.2	6.5	4.0	5.8	-

Porphyran fractions precipitated in <sup>1</sup>0-40, <sup>2</sup>41-50, <sup>3</sup>51-60, <sup>4</sup>61-70 and <sup>5</sup>71-80% ethanol concentration, <sup>6</sup>% of P-F1.

CP-F1-70의 분자량은 550 kDa으로 CP-F1의 720 kDa에 비해 감소되었는데 이 같이 분자량이 차이가 나는 것은 앞의 40-60% 에탄올 농도에서 고분자 획분이 침전되어 제거되었기 때문으로 여겨진다. Fig. 2는 각 정제 단계별로 측정된 gel chromatogram으로 CP-F1-70에서는 단일한 peak가 얻어져 분자량이 대체로 균일함을 알 수 있었다.

알코올 분별 침전법으로 얻은 각 획분의 구성성분의 mole비는 Table 5와 같다. Galactose에 대한 3,6-An-Gal와 황산기의 mole 비는 알코올 농도 증가에 따라 감소하는 경향을 나타내었다. 주획분인 P-F1-70의 galactose, 3,6-anhydrogalactose, 6-methylgalactose와 sulfate의 mole비는 1.0:0.32:0.07:0.53으로 CP-F1과 매우 유사하여 CP-F1의 보다 정제된 형태임을 알 수 있고 galactose 2분자에 황산기 1분자가 결합되어 있을 것으로 여겨진다.

이상의 결과로부터 김 열수 추출물에 CPC 처리 후 알코올

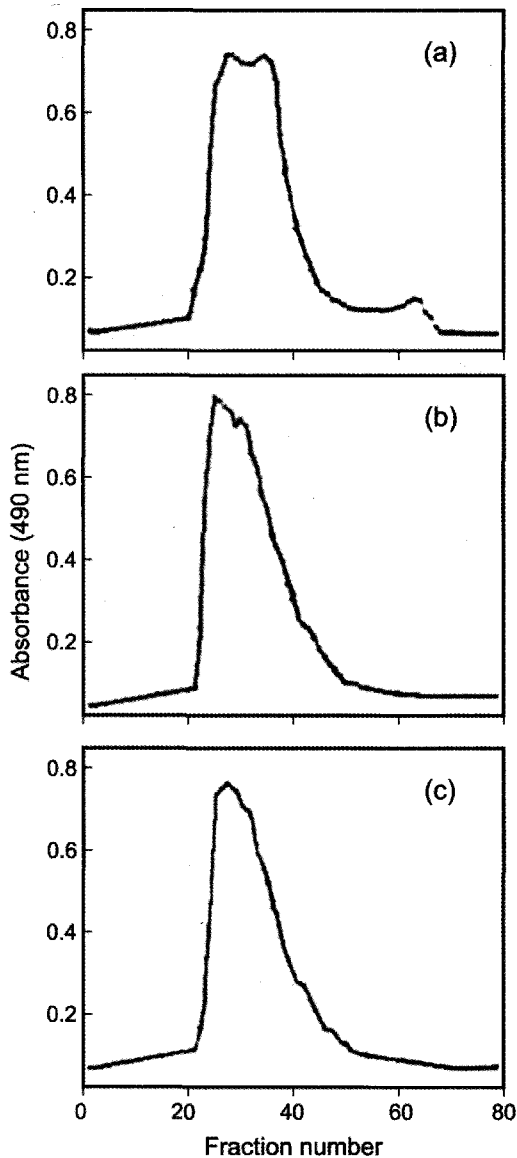


Fig. 2. Gel filtration chromatograms of CP (a), CP-F1 (b) and CP-F1-70 (c).

Table 5. Molar ratio of CP-F1 fractions prepared by using fractional ethanol precipitation

Fraction1	Molar ratio			
	Gal	3,6-An-Gal	6-Me-Gal	Sulfate
CP-F1	1	0.34	0.07	0.55
CP-F1-40	1	0.62	0.07	0.94
CP-F1-50	1	0.49	0.06	0.73
CP-F1-60	1	0.46	0.06	0.46
CP-F1-70	1	0.32	0.07	0.53

<sup>1</sup>refer to table 4.

분별 침전법으로 분획함으로써 분자량 및 화학 조성이 균일한 정제 porphyran을 비교적 간단하게 정제할 수 있음을 알 수 있었다.

## 사 사

이 논문은 2008년 군산대학교 수산과학연구소 학술연구비 지원에 의하여 연구되었음.

## 참 고 문 헌

- Anderson, N.S., T.C.S. Dolan and D.A. Rees. 1965. Evidence for a common structural pattern in the polysaccharide sulphates of the Rhodophyceae. *Nature*, 13, 1060-1062.
- Anderson, N.S. and D.A. Rees. 1965. Porphyran: A polysaccharide with a masked repeating structure. *J. Chem. Soc.*, 5880-5887.
- Brasch, D.J., H.M. Chang, C.T. Chuah and L.D. Melton. 1981. The galactan sulfate from the edible red alga *Porphyra columbina*. *Carbohydrate Res.*, 97, 113-125.
- Dodgson, K.S. and R.G. Price. 1962. A note on the determination of the ester sulfate from the sulphated polysaccharides. *Biochem. J.*, 84, 106-110.
- Dubois, M., K.A. Gills, J.K. Hamilton, P.A. Rebers and F. Smith. 1956. Colorimetric method for the determination of sugars and related substances. *Anal. Biochem.*, 28, 350-356.
- Furneux, R.H., I.J. Miller and T.T. Stevenson. 1990. Agaroids from New-zealand members of the Gracilariaceae (Gracilariales, Rhodophyta) a novel dimethylated agar. *Hydrobiologia*, 204/205, 645-654.
- Gretz, M.R., E.L. McCandless, J.M. Aronson and M.R. Sommerfeld. 1983. The galactan sulphates of the conchocelis phases of *Porphyra leucostricta* and *Bangia atropurpurea* (Rhodophyta). *J. Exp. Bot.*, 34, 705-711.
- Jung, K.J., B.M. Jung and S.B. Kim. 2001. Effect of porphyran isolated from laver, *Porphyra yezoensis*, lipid metabolism in hyperlipidemic and hypercholesterolemic rats. *J. Food Sci. Technol.*, 33, 633-640.
- Kwon, M.J. and T.J. Nam. 2006. Porphyran induces apoptosis related signal pathway in AGS gastric cancer cell lines. *Life Science*, 79, 1956-1962.
- Lowry, O.H., N.J. Rosebrough, L. Farr and R.J. Rindall. 1951. Protein measurement with the folin phenol reagent. *J. Bio. Chem.*, 193, 265-275.
- Morrice, L.M., M.W. McLean, W.F. Long and F.B. Williamson. 1983. Porphyran primary structure. *Eur. J. Biochem.*, 133, 673-684.
- Noda, H., H. Amano and K. Aeashima. 1989a. Studies on the anti-tumour activity of marine algae. *Nippon*

- Suisan Gakkaishi, 55, 1259-1264.
- Noda, H., H. Amano and K. Aeashima. 1989b. Antitumour activity of polysaccharides and lipids from algae. Nippon Suisan Gakkaishi, 55, 1265-1271.
- Park, J.H., J.G. Koo, J.R. Do, C.B. Yang and S.K. Woo. 1997. Effect of extraction temperature and pH on the chemical properties of crude porphyran extracted from *Porphyra yezoensis*. J. Korean Fish. Soc., 30, 127-131.
- Peat, S., J.R. Turvey and D.A. Rees. 1961. Carbohydrates of the red alga, *Porphyra umbilicalis*. J. Chem. Soc., 1590-1595.
- Rees, D.A. and E. Conway. 1962. The structure and biosynthesis of porphyran: A comparison of some samples. Biochem. J., 84, 411-416.
- Scott, J.E. 1965. Fractionation by precipitation with quaternary ammonium salts. In: Methods in carbohydrate chemistry, Vol. 5, R.L Whistler et al., ed. Academic Press, New York, 38-40.
- Teruya, T.T., T. Konish, S. Uechi, H. Tamaki and M. Tako. 2007. Anti-proliferative activity of oversulfated fucoidan from commercially cultured *Cladosiphon okamuranus* TOKIDA in U937 cells. Int. J. Biol. Macromol., 41, 221-226.
- Villarroel, L.H. and A.B. Zanlungo. 1981. Structural studies on the porphyran from *Porphyra columbina* (Montagne). Carbohydrate Res., 88, 139-145.
- Wang, J., Q. Zhang, Z. Zhang, and Z. Li. 2008. Antioxidant activity of sulfated polysaccharide fractions extracted from *Laminaria japonica*. Int. J. Biol. Macromol., 42, 127-132.
- Whistler, R.L. and J.L. Sannella. 1965. Fractional precipitation with ethanol purification of hemicelluloses. In: Methods in carbohydrate chemistry, Vol. 5, R.L. Whistler et al., ed. Academic Press, New York.
- Yaphe, W. and G.P. Arsenault. 1965. Improved resorcinol reagent for the determination of fructose, and of 3,6-anhydrogalactose in polysaccharides. Anal. Biochem., 13, 143-148.
- Yashizawa, Y., A. Ametani, J. Tsunehiro, K. Numura, M. Itoh, F. Fukui and S. Kaminogawa. 1995. Macrophage stimulation activity of the polysaccharide fraction from a marine algae (*Porphyra yezoensis*): structure-function relationships and improved solubility. Biosci. Biotechnol. Biochem., 59, 1933-1937.
- Zhang, Q., L. Ning, X. Liu, Zhao, Z.Z. Li and Z. Xu. 2004. The structure of a sulfated galactan from *Porphyra haitanensis* and its vivo antioxidant activity. Carbohyd. Res., 339, 105-111.

---

2008년 10월 6일 접수  
2008년 12월 16일 수리