

## 효소 가수분해 방법을 이용한 스피루리나 추출물의 제조

인만진\* · 권수연 · 채희정<sup>1</sup> · 김동청<sup>2</sup> · 김동호<sup>3</sup>

청운대학교 식품영양학과, <sup>1</sup>호서대학교 식품생물공학과, <sup>2</sup>성균관대학교 기초과학연구소, <sup>3</sup>에프엔바이오(주)

## Production of Spirulina Extract by Enzymatic Hydrolysis

Man-Jin In\*, Su Yeon Gwon, Hee Jeong Chae<sup>1</sup>, Dong Chung Kim<sup>2</sup> and Dong Ho Kim<sup>3</sup>

Department of Human Nutrition and Food Science, Chungwoon University, Hongseong 350-701, Korea

<sup>1</sup>Department of Food and Biotechnology, Hoseo University, Asan 336-795, Korea

<sup>2</sup>Institute of Basic Science, Sungkyunkwan University, Suwon 440-746, Korea

<sup>3</sup>FNBio Co., Ltd., Boryeong 355-811, Korea

Received October 2, 2007; Accepted November 22, 2007

An efficient production method of spirulina extract was developed by enzymatic treatment using cell lytic and proteolytic enzymes. The suitable dosage of Tunicase, a cell lytic enzyme, was found to be 2.0% (w/w). Proteolytic enzymes were screened to obtain high solid recovery and spirulina extraction (SE) index, which indicates nucleic acid-related substances content. Among the seven tested proteases, Esperase was selected and optimal dosage of this enzyme was 2.0% (w/w). The solid recovery and SE index of simultaneous treatment and co-treatment using optimal dosages of Tunicase and Esperase were greatly similar, respectively. However, co-treatment had the effect of shortening total hydrolysis time. The SE index and solid recovery of co-treatment were significantly enhanced by 75% (11.4 → 20.0) and 45% (45.2% → 65.3%), respectively, than those of the non-treated extracts.

**Key words:** enzymatic hydrolysis, solid recovery, spirulina extract

### 서 론

스피루리나(spirulina)는 나선형의 형태에 길이 300-500 μm, 직경 8 μm의 미세조류(microalgae)로 클로렐라와 함께 오랫동안 식량자원으로 이용되어 왔으며, 생물학적 활성을 갖는 성분을 함유하고 있어 건강기능식품으로 활용되고 있다.<sup>1)</sup> 스피루리나는 단백질 55-70%, 지방 6-9%, 탄수화물 15-20%, 다량의 무기질, 비타민 및 색소 성분을 함유하고 있다. 스피루리나는 단백질 함량이 높을 뿐만 아니라 8종의 필수 아미노산을 포함하고 있으며, 지방 성분 중에는 유리 지방산이 70-80%를 차지하며 linoleic acid와 linolenic acid와 같은 불포화 지방산이 주종을 이루고 있다. 탄수화물로는 포도당, rhamnose, mannose, xylose 등이, 색소 성분으로는 carotinoid, chlorophyll, phycocyanin 등이 함유되어 있다.<sup>2-4)</sup> 스피루리나의 생리적인 기능으로는 항산화, 염증방지, 중금속 독성 완화, 면역증진, 콜레스테롤 저하, 항알러지 등이 보고되어 있다.<sup>1,5-8)</sup> 우리나라의 건강기능식품법에서 스피루리나 제품은 필수 아미노산 공급, 단백질 공급, 영양

공급, 생리활성성분 함유, 건강증진 및 유지의 기능성을 갖는 것으로 규정되어 있으며, 2005년 4월 “개별인정형 원료성분인정”에서 콜레스테롤 수치를 낮추는 기능이 있음을 인정받았다. 또한 스피루리나 추출물은 항암 및 항산화 효과, 바이러스와 세균의 증식 억제, 면역 증강 등의 생리활성을 보이는 성분을 함유하고 있는 것으로 알려져 있다.<sup>9-12)</sup> 그러므로 클로렐라보다 클로렐라로부터 유효성분을 농축시킨 클로렐라 추출물이 다소 고가임에도 불구하고 식품 분야에서 다양하게 소재로 활용되는 것과 동일하게 스피루리나도 유사한 경향을 보일 것으로 판단된다.

지금까지 사용되고 있는 스피루리나 추출물은 열수 혹은 유기용매를 사용하는 단순한 추출법으로 제조되고 있다. 온수를 사용하는 추출법은 제조 방법이 간단하나 추출물의 수율이 20% 미만으로 낮으며<sup>13)</sup> 따라서 스피루리나에 함유되어 있는 성분의 손실이 큰 단점이 있다. 또한 유기용매를 사용하는 추출법도 수율이 15% 이하로 낮으며 추출물을 식품용으로 사용하는 경우 유기용매의 잔류도 문제가 될 수 있다.<sup>11)</sup> 따라서 본 연구에서는 스피루리나 추출의 효율을 향상시키기 위하여 효소 처리 후 열수로 추출하는 제조 방법을 검토하였다. 스피루리나 추출물 제조 과정에서 세포벽 분해 효소와 단백질 분해 효소의 사용이 고형분의 회수율과 유용 성분의 지표로 260 nm에서 흡광도를

\*Corresponding author

Phone: +82-41-630-3278; Fax: +82-41-632-3278

E-mail: manjin@chungwoon.ac.kr

보이는 핵산 관련 성분의 함량에 미치는 영향을 조사하고, 적절한 효소 처리 조건을 제시하였다.

## 재료 및 방법

**재료.** 실험에 사용된 스피루리나는 *Spirulina platensis*의 건조 분말로 Vedan Biotechnology Corp.(Taichung, Taiwan)의 제품이었다. 세포벽 분해 효소로는 Daiwa Kasei사(Osaka, Japan)의 Tunicase FN을 사용하였으며, 상업용 단백질 분해 효소로 Alcalase, Esperase, Flavourzyme, Kojizyme, Neutrase, Protamex는 Novozymes사(Bagsvaerd, Denmark), Collupulin는 DSM Corp.(Heerlen, Netherlands)의 제품을 사용하였다.

**스피루리나의 효소 처리.** 스피루리나 분말을 100 ml 증류수에 1%(w/w) 농도로 현탁하고 0.1 N HCl 혹은 NaOH를 사용하여 효소반응 pH로 조정하였다. 세포벽 분해 효소의 경우에는 pH 8.0으로, 단백질 분해 효소의 경우에는 각 효소의 반응 최적 pH로 조절하였다. 효소 분해는 스피루리나 현탁액에 먼저 Tunicase를 첨가하고 40°C에서 1시간 처리하여 세포벽을 분해시킨 후 단백질 분해 효소를 각 효소의 최적 반응 조건에서 반응시키는 2단계로 실시하였다. 모든 효소는 스피루리나 분말의 중량을 기준으로 0-4%(w/w) 범위에서 첨가하였다. 효소 처리가 끝난 반응액은 20 min간 끓여서 효소 반응을 정지시킨 다음 1,000 × g로 10분간 원심분리하여 상등액을 얻은 후 이를 분석에 사용하였다.

**분석 방법.** 추출 수율은 클로렐라 추출물의 제조에서와 동일하게 고형분 회수율(solid recovery)로 나타내었으며 원료로 사용한 스피루리나 분말과 동결 건조하여 얻은 추출물의 중량비로 계산하였다.<sup>14)</sup> 클로렐라 추출물에서 *Chlorella growth factor* (CGF)의 함량을 표시하는 것과 동일하게<sup>14)</sup> 스피루리나 추출물 중 260 nm에서 흡광도를 보이는 핵산 관련 성분의 함량을 나타내는 방법으로 spirulina extraction (SE) index를 다음 식으로 계산하여 사용하였다.

$$SE \text{ index} = A \times D \times W_1/W_2$$

여기서 A는 260 nm에서 상등액의 흡광도, D는 상등액의 희석배수,  $W_1$ 은 동결건조한 추출물의 중량,  $W_2$ 는 스피루리나 분말의 중량을 나타낸다.

## 결과 및 고찰

**세포벽 분해 효소의 영향.** 스피루리나 추출물을 제조하는 과정에서 세포벽 분해 효소의 사용이 고형분 회수율과 SE index에 미치는 영향을 조사하였다. 본 연구에 사용한 상업용 효소인 Tunicase는 *Arthrobacter* sp. ATCC 21712기원의  $\beta$ -1,3-glucanase로 pH 8.0에서 효모 세포를 lysis시키는 활성을 나타내는 효소이다. 세포벽 분해 효소의 최적 사용량을 조사하기 위하여 스피루리나 현탁액(1%)에 Tunicase를 스피루리나 중량 대비 0-4% 첨가하고 40°C에서 2시간 반응시킨 다음 20분간 열처리하였다. 고형분 회수율과 SE index는 Tunicase 사용량이 증가함에 따라 향상되었으며 2% 이상의 조건에서는 유사한 결과를 나타내었다.(데이터 제시는 생략함) Tunicase를 2% 처리한 경우 고형분 회수율은 49%(단순 열수 추출의 회수율)에서 56%로 다소 향상되었으며 SE index도 유사한 경향이었다. 그러므로 Tunicase의 사용량은 2%가 적당하였다. Tunicase를 2%로 첨가한 경우 고형분 회수율과 SE index는 반응 시간에 따라 증가하였으며, 반응 1시간 이상의 조건에서는 유사하였다. 본 연구의 결과가 클로렐라 추출물을 제조함에 있어 Tunicase를 1% 처리하면 고형분 회수율과 CGF index가 약 2배 증가하였다는 보고<sup>14)</sup>와는 큰 차이가 있으나 이는 클로렐라와 스피루리나의 세포벽의 차이에 기인하는 것으로 사료된다. 당과 단백질의 복합체로 이루어진 부드러운 스피루리나의 세포벽<sup>15)</sup>은 쉽게 파쇄되므로 스피루리나의 건조 과정에서 세포벽이 상당 부분 파쇄되어 세포벽 분해 효소의 효과가 유사한 연구 결과<sup>14,16)</sup>에 비하여 미미한 것으로 판단된다.

**단백질 분해 효소의 영향.** 스피루리나 추출물의 제조에 적합한 단백질 분해 효소를 선별하기 위하여 스피루리나 현탁액(1%)에 상업용 단백질 분해 효소를 처리하였다. 사용한 효소 중 가장 높은 고형분 회수율과 SE index를 보인 Esperase를 선별하였다(Table 1). 이때 효소를 사용하지 않은 대조구의 고형분 회수율은 50%, SE index는 12.0이었다. Esperase를 스피루리나 중량의 0-4%로 첨가한 후 2시간 반응시킨 결과, 고형분 회수율과 SE index는 Esperase 사용량에 비례하여 증가하였으며 2% 이상의 조건에서는 효소 사용량이 증가하여도 거의 일정한 결과를 나타내었다(Fig. 1). Esperase를 2%로 처리한 결과를 효소를 사용하지 않은 결과와 비교하면 고형분 회수율은

Table 1. Effect of proteolytic enzyme treatment on the production of spirulina extract

Commercial name	Optimal conditions		SE index <sup>1)</sup>	Solid recovery <sup>1)</sup> (%)
	pH	Temp. (°C)		
DSM Corp. (Netherlands)				
Collupulin	5.0~7.0	50~70	12.05	51.3
Novozymes (Denmark)				
Alcalase	6.5~8.5	60	13.30	65.1
Esperase	7.5~10.0	50~70	18.87	64.1
Flavourzyme	5.0~7.0	50	12.75	49.0
Kojizyme	5.5~6.5	50	12.36	48.0
Neutrase	5.5~7.5	45~55	11.96	54.0
Protamex	6.0	50	15.76	63.0

<sup>1)</sup>Calculation methods for the SE index and solid recovery were described in the Materials and Methods.

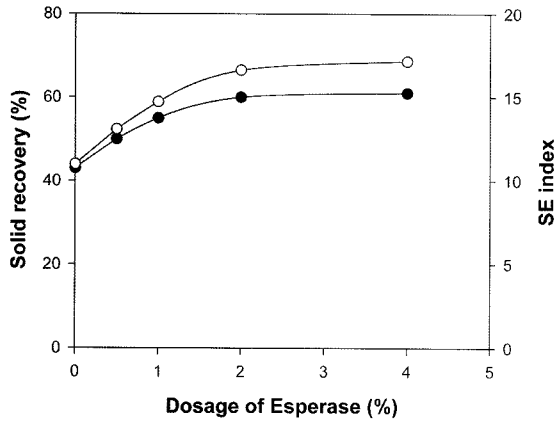


Fig. 1. Effect of dosage of Esperase on solid recovery (●) and spirulina extraction (SE) index (○). Reaction conditions: temperature; 50°C, pH 8.0, reaction time; 2 h.

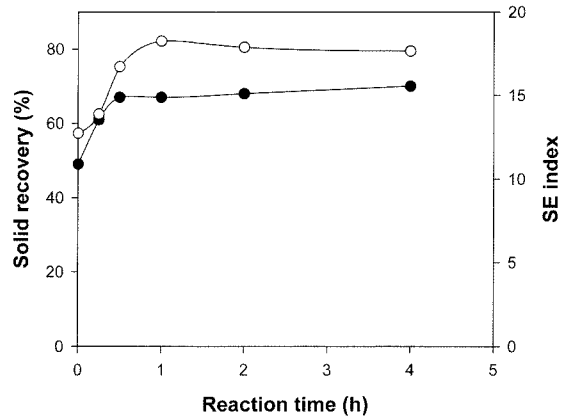


Fig. 2. Typical time course of solid recovery (●) and spirulina extraction (SE) index (○) during Tunicase and Esperase co-treatment. Reaction conditions: enzyme dosage; 2% Tunicase and 2% Esperase; temperature; 50°C, pH 8.0.

40%, SE index는 51% 향상되었다. 그러므로 Esperase의 사용량은 2%가 적당하였다. Esperase를 2%로 첨가한 경우 Tunicase의 경우와 유사하게 고형분 회수율과 SE index는 반응시간의 증가에 따라 향상되었으며, 반응 1시간 이상의 조건에서는 유사하였다. (데이터 제시는 생략함) 이상의 결과는 단백질 분해 효소에 의하여 스피루리나 단백질이 가수분해되어 용해도의 증가에 기인하는 것으로 단백질 분해 효소를 사용하여 효모나 헤모글로빈을 분해하였던 기존의 보고<sup>17,18)</sup>와 일치하는 결과이다. 본 연구와 유사하게 Esperase는 클로렐라 추출물의 연구에서도 효과적인 단백질 분해 효소로 보고<sup>14)</sup>되어 있으며, 1%를 사용하는 것이 클로렐라 단백질의 분해에 효과적인 것으로 보고되어 있다.

**효소 처리 순서의 영향.** 세포벽 분해 효소와 단백질 분해 효소의 처리 순서와 방법을 최적화하기 위하여 스피루리나 현탁액에 선별한 효소를 처리하였다. 효소 처리는 Tunicase와 Esperase의 2단 순차적 반응 혹은 1단 동시 반응으로 실시하였다. 순차적 반응은 Tunicase를 먼저 처리한 후 Esperase를 처리하였으며, 동시 반응에서는 두 효소를 동시에 스피루리나에 반응시켰다. 대조구로 효소를 사용하지 않은 조건과 Tunicase와 Esperase를 각각 사용한 조건을 포함하여 효소처리 조건에 따른 고형분 회수율과 SE index를 Table 2에 정리하였다. 효소를 사용하는 것이 단순 열수 추출보다는 효과적이었으며, Tunicase

와 Esperase를 단독으로 사용하는 것보다 두 종류의 효소를 모두 사용하는 것이 효과적이었다. 그러나 Tunicase와 Esperase를 2단으로 반응시킨 경우 고형분 회수율은 66.3%, SE index는 20.2이며, 동시에 반응시킨 경우엔 65.3%와 20.0으로 두 효소의 처리 방법에는 거의 차이가 없었다. 다만 Tunicase와 Esperase를 동시에 반응시키면 반응 시간을 절반으로 단축할 수 있는 장점이 있으므로 두 효소를 동시에 사용하는 것이 유리할 것으로 판단된다. Tunicase와 Esperase의 동시 처리에서 반응시간에 따른 고형분 회수율과 SE index의 변화의 전형적인 예를 Fig. 2에 나타내었다. 동시에 반응시키는 경우 단순 열수 추출보다 고형분 회수율은 약 45%(45.2% → 65.3%), SE index는 약 75%(11.4 → 20.0) 증가하였다. 이와 같은 결과는 단백질 분해 효소를 포함하여 작용 기작이 상이한 두 종류의 효소를 탈지 대두박<sup>19)</sup> 또는 클로렐라<sup>14)</sup>에 동시에 처리하여 분해 효율을 향상시킨 보고와 유사한 결과이다. 효소를 사용하는 스피루리나 추출물의 제조 방법을 경제적인 측면에서 검토하면 원료인 스피루리나가 고가이므로 효소 사용에 의한 원가의 상승 요인보다 제품 수율 향상에 의한 스피루리나 원단위의 감소로 원가의 하락 요인이 클 것으로 판단된다. 결론적으로 세포벽 분해 효소와 단백질 분해 효소를 사용하는 것은 스피루리나 추출물의 제조에 효과적이었다.

Table 2. Effect of enzyme treatment methods on production of spirulina extract

Enzyme treatments	Reaction conditions	SE index <sup>1)</sup>	Solid recovery <sup>1)</sup> (%)
No treatment	Extraction (boiling, 20 min)	11.43 ± 1.60	45.20 ± 4.95
Single-step hydrolysis (T <sup>2)</sup> 2%)	Hydrolysis (pH 8.0, 40°C, 1 h) → Extraction (boiling, 20 min)	17.52 ± 1.41	55.25 ± 2.12
Single-step hydrolysis (E <sup>3)</sup> 2%)	Hydrolysis (pH 8.0, 50°C, 1 h) → Extraction (boiling, 20 min)	18.66 ± 2.61	60.50 ± 0.71
Two-step hydrolysis (T 2% → E 2%)	Hydrolysis [pH 8.0, (40°C, 1 hr → 50°C, 1 h)] → Extraction (boiling, 20 min)	20.19 ± 0.99	66.33 ± 0
Single-step hydrolysis (T 2% + E 2%)	Hydrolysis [pH 8.0, 50°C, 1 h] → Extraction (boiling, 20 min)	19.99 ± 4.15	65.33 ± 4.95

<sup>1)</sup>Calculation methods for the SE index and solid recovery were described in the Materials and Methods. Data are shown as means ± standard deviation (n = 3).

<sup>2)</sup>T: Tunicase.

<sup>3)</sup>E: Esperase.

## 초 록

세포벽 분해 효소와 단백질 분해 효소를 이용하여 스피루리나 추출물을 효율적으로 생산할 수 있는 방법을 조사하였다. 세포벽 분해 효소인 Tunicase의 사용 농도는 2%가 적당하였다. 고형분 회수율과 핵산 관련 성분의 함량을 나타내는 spirulina extraction(SE) index를 기준으로 상업용 단백질 분해 효소를 선별하였다. 일곱 종류의 효소를 조사한 결과, Esperase가 가장 우수하였으며, 최적 사용량은 2%이었다. Tunicase와 Esperase를 순차적으로 반응시키거나 동시에 반응시켜도 고형분 회수율과 SE index는 매우 유사하였으며 동시에 사용하는 것이 반응 시간을 단축시킬 수 있었다. 두 효소를 동시에 반응시키면 단순 열수 추출보다 고형분 회수율은 약 45%(45.2% → 65.3%), SE index는 약 75%(11.4 → 20.0) 증가하였다.

**Key words:** 스피루리나 추출물, 효소분해, 회수율

## 감사의 글

본 연구는 중소기업청 산학협력실 사업의 지원에 의하여 수행되었습니다.

## 참고문헌

- Kay, R. A. (1991) Microalgae as food and supplement. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* **30**, 555-573.
- Ciferri, O. (1983) Spirulina, the edible microorganisms. *Microbiol. Rev.* **47**, 551-578.
- Annapurna, V. V., Deosthale, Y. G. and Bamji, M. S. (1991) Spirulina as a source of vitamin A. *Plant Foods Hum. Nutr.* **41**, 125-134.
- Tokusoglu, Ó. and Únal, M. K. (2003) Biomass nutrition profiles of three microalgae: *Spirulina platensis*, *Chlorella vulgaris*, and *Isochrysis galbana*. *J. Food Sci.* **68**, 1144-1148.
- Kim, W. Y. and Park J. Y. (2003) The effect of spirulina on lipid metabolism, antioxidant capacity and immune function in Korean elderly. *Korean J. Nutr.* **36**, 287-297.
- Nakaya, N., Homma, Y. and Goto, Y. (1988) Cholesterol lowering effect of spirulina. *Nutr. Rep. Int.* **37**, 1329-1337.
- Hayashi, O., Hirahashi, T., Katoh, T., Miyajima, H., Hirano, T. and Okuwaki, Y. (1998) Class specific influence of dietary *Spirulina platensis* on antibody production in mice. *J. Nutr. Sci.*

- Vitaminol.* **44**, 841-851.
- Sharma, M. K., Sharma, A., Kumar, A. and Kumar, M. (2007) Evaluation of protective efficacy of *Spirulina fusiformis* against mercury induced nephrotoxicity in Swiss albino mice. *Food Chem. Toxicol.* **45**, 879-887.
- Hernández-Corona, A., Nieves, I., Meckes, M., Chamorro, G. and Barron, B. L. (2002) Antiviral activity of *Spirulina maxima* against herpes simplex virus type 2. *Antiviral Res.* **56**, 279-285.
- Hirahashi, T., Matsumoto, M., Hazeki, K., Saeki, Y., Ui, M. and Seya, T. (2002) Activation of the human innate immune system by spirulina: augmentation of interferon production and NK cytotoxicity by oral administration of hot water extract of *Spirulina platensis*. *Int. Immunopharmacol.* **2**, 423-434.
- Ozdemir, G., Karabay, N. U., Dalay, M. C. and Pazarbasi, B. (2004) Antibacterial activity of volatile component and various extracts of *Spirulina platensis*. *Phytother. Res.* **18**, 754-757.
- Wu, L. -C., Annine Ho, J. -A., Shief, M. -C. and Lu, I. -W. (2005) Antioxidant and antiproliferative activities of spirulina and chlorella water extract. *J. Agric. Food Chem.* **53**, 4207-4212.
- Kim, H. -S., Kim, C. -H., Kim, J. -H., Kwom, M. -C., Cho, J. -H., Gwak, H. -G., Hwang, B. -Y., Kim, J. -C. and Lee, H. Y. (2006) Comparison of anticancer activities from the culture and extraction conditions of the *Spirulina platensis*. *Kor. J. Microbiol. Biotechnol.* **34**, 143-149.
- In, M. -J., Jang, J. E. and Kim, D. H. (2007) Enhancing extraction yield of chlorella extract by enzyme treatment. *J. Appl. Biol. Chem.* **50**, 132-135.
- Piñero Estrada, J. E., Bermejo Bescós, P. and Villar del Fresno, A. M. (2001) Antioxidant activity of different fractions of *Spirulina platensis* protean extract. *Farmaco* **56**, 497-500.
- Kim, D. C., Chae, H. J., Oh, N. -S. and In, M. -J. (2001) Effect of cell lytic enzyme on the production of yeast extract. *J. Korean Soc. Appl. Biol. Chem.* **44**, 273-275.
- Chae, H. J., Joo, H. and In, M. -J. (2001) Utilization of brewer's yeast cells for the production of food-grade yeast extract. Part 1: effects of different enzymatic treatments on solid and protein recovery and flavor characteristics. *Bioresource Technol.* **76**, 253-258.
- In, M. -J., Chae, H. J. and Oh, N. -S. (2002) Process development for heme-enriched peptide by enzymatic hydrolysis of hemoglobin. *Bioresource Technol.* **84**, 63-68.
- Chae, H. J., In, M. -J. and Kim, M. H. (1997) Optimization of enzymatic treatment for the production of hydrolyzed vegetable protein. *Korean J. Food Sci. Technol.* **29**, 1125-1130.