

스피루리나 효소가수분해물의 생리활성 탐색

손민희¹ · 박근형^{1,2} · 최아름¹ · 유귀재¹ · 인만진³ · 김동호⁴ · 채희정^{1,2*}

¹호서대학교 식품생물공학과, ²SGM바이오텍(주)

³청운대학교 식품영양학과, ⁴비타민하우스F&B(주)

Investigation of Biological Activities of Enzymatic Hydrolysate of Spirulina

Min Hee Son¹, Keun Hyoung Park^{1,2}, A Reum Choi¹, Guijae Yoo¹,
Man-Jin In³, Dong Ho Kim⁴, and Hee Jeong Chae^{1,2*}

¹Dept. of Food and Biotechnology, Hoseo University, Chungnam 336-795, Korea

²SGM Biotech Co., Ltd., Hoseo University, Chungnam 336-795, Korea

³Chungwoon University, Chungnam 350-701, Korea

⁴Vitamin Co., Ltd., Chungnam 355-811, Korea

Abstract

Biological activities of enzymatic hydrolysate of spirulina (EHS) were investigated. EHS showed no significant effects on the growth-stimulating activity for lactic-acid bacteria and antioxidant activity. EHS showed slight in vitro growth-inhibitory effects (15% at 1.42 mg/L) on a human cervical cancer cell line (HeLa). In addition, the anticoagulant activities of EHS were measured based on three different pathways: common, intrinsic and extrinsic pathways. As an indication of anticoagulant activity on common pathway, thrombin time (TT) of EHS (100 mg/L) was measured as 155.6 sec. Activated partial thromboplastin time (aPTT) for intrinsic pathway of EHS (1,000 mg/L) was measured as 95.8 sec. Prothrombin time (PT) based on extrinsic pathway of EHS (1,000 mg/L) was measured as 10.6 sec. These data showed that EHS have influences on anticoagulant factors of common pathway and intrinsic pathway. Consequently it was found that EHS could be used as a functional food for blood circulation.

Key words: spirulina hydrolsate, biological activity, anticoagulant activity

서 론

스피루리나는 지구상에서 가장 오래된 조류의 하나로서 약 30~40억 년 전 지구 표면에 처음 나타난 청록색의 남조류이며, 현미경으로 보면 나선형(spiral)으로 꼬여 있어 스피루리나로 명명되었다(1). 스피루리나는 멕시코, 아프리카 등 아열대지역의 높은 염분과 강알칼리성을 갖는 호수나 바다에서 자생한다. 스피루리나는 왕성한 광합성 능력으로 다량의 유기물과 산소를 공급하여 각종 호기성 동식물 및 미생물이 자랄 수 있는 환경을 조성하는 것으로 알려져 있다.

스피루리나는 영양소 조성이 우수한 자연식품으로 평가되어 인류의 건강식품 미래식량으로 주목받고 있으며 현재 전세계에 걸쳐 건강영양식품으로 널리 사용되고 있다(2). 스피루리나에는 단백질이 55~70%, 지방이 6~9%, 탄수화물이 15~20% 정도 함유되어 있고 다량의 무기질, 비타민, 섬유질 및 색소 성분을 함유하고 있다(3). 특히 스피루리나의 단백질은 18가지의 아미노산으로 구성되어 있으며 8가지 필

수아미노산을 포함하고 있다. 지질 성분 중에는 지방산이 70~80%에 달하고 linoleic acid, γ -linolenic acid 등의 불포화지방산이 큰 비중을 차지하고 있다(4,5). 탄수화물로는 포도당, 람노스, 만노스, 자일로스 등이 있고, 색소 성분으로는 등황색의 카로티노이드, 녹색의 클로로필, 청색의 피코시아닌 등을 가지고 있으며(6), 비타민 중에서는 B₁₂가 풍부하다(7).

최근에는 스피루리나의 기능성에 대한 많은 연구 결과가 보고되고 있다. Kim 등(8)은 스피루리나가 즉각형 알레르기 반응을 억제한다고 보고하였으며, Kim 등(9)과 Nakaya 등(10)은 각각 항암활성과 혈중 콜레스테롤 저하 효과가 있다고 보고하였다. Kuhad 등(11)은 항산화 활성의 증가와 신장 장애를 회복시키는 효과가 있다고 보고하고 있다. 그러나 클로렐라의 활성 성분인 클로렐라 성장촉진 인자(chlorella growth factor, CGF)(12)와 유사한 스피루리나의 활성 성분인 스피루리나 성장촉진 인자(spirulina growth factor, SGF)를 주성분으로 한 스피루리나 추출물에 대한 연구는 미비한 실정이다.

*Corresponding author. E-mail: hjchae@hoseo.edu
Phone: 82-41-540-5642, Fax: 82-41-532-5640

일반적으로 스피루리나 추출물은 열수 혹은 유기용매를 사용하는 단순한 추출방법에 의해 제조되고 있다. 온수를 사용하는 추출법은 제조방법이 간단하나 추출물의 수율이 20% 미만으로 낮아서(9) 스피루리나에 함유되어 있는 성분의 손실이 큰 단점이 있다. 또한 유기용매를 사용하는 추출법도 수율이 15% 이하로 낮다. 또한 추출물을 식품용으로 사용하는 경우 유기용매의 잔류도 문제가 될 수 있다(13). 반면 스피루리나 효소가수분해물(enzymatic hydrolysate of spirulina, EHS)은 기존의 열수 또는 유기용매를 이용한 추출방법과 다르게 세포벽분해효소와 단백질분해효소 등의 효소를 사용하여 추출하는 것이 특징이다. In 등(14)은 효소가수분해 방법을 이용한 스피루리나 추출물의 제조방법에 관하여 보고한 바 있다. 이러한 효소를 이용한 방법은 추출수율을 향상시킬 뿐만 아니라 낮은 온도에서 추출하기 때문에 유효 성분의 파괴가 적다는 장점이 있다(14). 또한 스피루리나의 기능성에 대한 대부분의 연구가 열수 또는 유기용매를 사용하여 제조한 스피루리나의 추출액을 대상으로 한 것인 반면 효소분해 추출물에 대한 보고는 전무한 실정이다.

따라서 본 연구에서는 스피루리나의 효소가수분해물 중의 새로운 생리활성물질의 존재 가능성을 알아보고자 항산화, 항혈전, 암세포 증식억제 활성 등의 생리활성을 탐색하였다.

재료 및 방법

재료 및 시약

원료로 사용한 스피루리나와 클로렐라는 비타민하우스 F&B(주)에서 공급받아 사용하였다. 클로렐라는 스피루리나와 유사한 미세조류 중 하나로 비교를 위하여 대조군으로 사용하였다. 가수분해를 위하여 세포벽 분해효소인 Tunicase FN(Daiwa Kasei Co., Japan)과 단백질 분해효소인 Alcalase(Novozyme Co., Denmark)를 사용하였다. 항혈전 시약인 activated partial thromboplastin time(aPTT) reagent, thrombin time(TT) reagent, prothrombin time(PT) reagent, 혈장(plasma), 염화칼슘(CaCl₂)은 모두 TECO사(Germany)의 제품을 사용하였다. 양성대조군으로는 헤파린과 아스피린(Sigma Chemical Co., USA)을 사용하였고, 항응고 활성 측정 장치로는 coagulometer(Coatron M1, TECO Co., Germany)를 사용하였다. 항산화 측정에 사용한 시약은 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl(DPPH), pyrogallol, Tris-HCl로 모두 Sigma사(USA)의 제품을 사용하였다. 흡광도 측정은 microplate reader(VERSAmax, Molecular Device, USA)를 사용하였다. 유산균 실험에 사용한 균은 김치발효균인 *L. mesenteroides*(KCCM 1132)와 유산균인 *L. bulgaricus*(KCTC 3635)이고, 배지는 MRS 배지(Difco Co., USA)를 사용하였다. 암세포 증식 억제 실험에 사용된 자궁경부암세포주(HeLa)는 한국세포주은행에서 분양받아 사용

하였으며, 암세포 증식 억제능은 cell counting kit(CCK, Dojindo Co., Japan)로 측정하였다. 양성 대조군인 5-fluorouracil (5-FU)은 Sigma사(USA)의 제품을 사용하였다.

스피루리나 효소가수분해물의 제조

본 실험에서는 In 등(14)의 방법을 사용하여 스피루리나 효소가수분해물(enzymatic hydrolysate of spirulina, EHS)과 클로렐라 효소가수분해물(enzymatic hydrolysate of chlorella, EHC)을 제조하여 실험에 사용하였다. 스피루리나와 클로렐라 분말을 각각 1%(w/w) 농도로 증류수에 현탁하고, 0.1 N HCl 또는 0.1 N NaOH를 사용하여 pH 8.0으로 조정된 후 세포벽분해효소인 Tunicase FN을 원료의 건물(dry matter) 중량 대비 2%의 농도로 첨가하였고, 40°C에서 1시간 동안 1차 가수분해하였다. 세포벽분해효소 처리 후 pH 8.0으로 제조정한 후 단백질분해효소인 Alcalase를 원료의 건물(dry matter) 중량 대비 2%의 농도로 첨가하여 50°C에서 1시간 동안 2차 효소분해 하였다. 효소 처리가 끝난 추출액은 95°C에서 20분간 끓여 효소반응을 정지시킨 다음 원심분리(2,390×g, 20 min)한 상등액을 동결건조 하여 분석에 사용하였다.

원소성분 분석

EHS와 EHC의 원소성분(C, N, H, S)을 원소분석기(ThermoFinnigan EA 1108, Fisons Instrument Co., Italy)를 사용하여 분석하였다.

유산균 증식활성 측정

미생물은 김치발효균인 *L. mesenteroides*와 유산균인 *L. bulgaricus*를 사용하였다. 유산균 증식 배지인 MRS 배지에서 균을 15시간 동안 전배양한 후 EHS와 EHC를 각각 0.5, 1%씩 첨가한 MRS 배지에 전배양한 균주를 접종하여 37°C에서 배양시켰다. 배양 중인 유산균을 시간별로 샘플링하여 흡광도를 600 nm에서 측정하였다.

DPPH에 의한 전자공여능 측정

전자공여능(electron donating ability, EDA)은 Heo 등(15)의 방법에 따라 다음과 같이 측정하였다. 메탄올에 0.4 mM의 농도로 용해한 DPPH 용액 160 μL와 시료 40 μL를 첨가하여 암소(dark site)에서 30분간 방치한 다음 515 nm에서 흡광도를 측정하였다. DPPH에 의한 전자공여능은 다음과 같이 시료용액의 첨가구와 무첨가구의 흡광도 감소율로 나타내었다.

$$EDA (\%) = \left(1 - \frac{\text{시료첨가구의 흡광도}}{\text{무첨가구의 흡광도}} \right) \times 100$$

암세포 증식 저해 활성 측정

자궁경부암세포인 HeLa cell을 이용하여 96-well plate에서 항암물질로 알려진 5-fluorouracil(5-FU)을 대조군으로 사용하여 암세포 증식 저해 활성을 측정하였다. 암세포의

생존율을 cell counting kit(CCK) assay를 이용하여 분석하였다. 공시험과의 흡광도 차이로 세포증식 저해능(inhibition rate, %)을 다음과 같이 산출하였다.

$$\text{Inhibition rate (\%)} = \frac{\text{Blank}_{\text{OD}} - \text{Sample}_{\text{OD}}}{\text{Blank}_{\text{OD}}} \times 100$$

항혈전 활성 측정

Thrombin time(TT) assay는 혈장과 시료를 9:1의 비율로 혼합한 용액 50 μL를 37°C에서 1분간 반응시킨 후, 37°C로 미리 예열된 5 unit TT reagent 50 μL를 첨가하여 혈장이 응고될 때까지의 시간을 반복 측정하여 평균값을 구하였다. 대조군으로는 3차 증류수를 사용하였고, 이 경우 15초의 응고시간을 나타내었다.

Activated partial thromboplastin time(aPTT) assay는 혈장과 시료를 9:1의 비율로 혼합한 용액 25 μL와 aPTT reagent 25 μL를 튜브에 첨가하여 37°C에서 5분간 가온한 후, 25 mM CaCl₂ 25 μL를 첨가하여 혈장이 응고될 때까지의 시간을 반복 측정하여 평균값을 구하였다. 대조군으로는 3차 증류수를 사용하였으며, 이 경우 33초의 응고시간을 나타내었다.

Prothrombin time(PT) assay는 혈장과 시료를 9:1의 비율로 혼합한 용액 25 μL를 37°C에서 2분간 반응시킨 후, PT reagent 50 μL를 첨가하여 혈장이 응고될 때까지의 시간을 반복 측정하여 평균값을 구하였다. 대조군으로는 3차 증류수를 사용하였으며, 이 경우 13초의 응고시간을 나타내었다. 양성대조군으로는 헤파린(heparin, Sigma)을 사용하였다.

결과 및 고찰

원소성분 분석

EHS와 EHC의 성분을 분석하였다(Table 1). 그 결과 EHS와 EHC는 탄소(C)를 각각 43.33%, 40.19%, 질소(N)를 각각 11.17%, 10.71%, 수소(H)를 각각 6.93%, 6.5%, 황(S)을 각각 0.56%, 0.41%씩 함유하여 탄소와 질소를 가장 많이 함유하는 것으로 나타났고, EHS와 EHC의 원소성분비가 거의 유사한 것을 알 수 있었다. EHS와 EHC의 단백질 함량을 비교하면 각각 69.8%, 66.9%로서 이 또한 유사한 함량비를 갖는 것으로 나타났다. 따라서 본 연구에서 스피루리나와 매우 유사한 성분을 지닌 클로렐라를 대조군으로 하여 생리

Table 1. Elemental composition of EHS and EHC (%)

Element	EHS	EHC
N	11.17	10.71
C	43.33	40.19
H	6.93	6.50
S	0.56	0.41
Others	38.01	42.19
Total	100	100

활성을 비교하였다.

유산균 증식활성 측정

클로렐라는 유산균 증식효과가 높은 것으로 보고되고 있으며(16), Cho 등(17)은 *S. thermophilus*, *L. casei* 및 *L. bulgaricus*에 클로렐라 추출물 분말을 0.5% 첨가 시 유산균 증식효과가 비첨가군에 비해 증가한다고 보고하였다. 따라서 본 연구에서는 스피루리나 효소가수분해물이 클로렐라 추출물과 유사한 유산균 증식 촉진 활성을 나타낼 지 여부를 확인하기 위하여 유산균 증식활성을 조사하였다.

EHS와 EHC 분말의 첨가 농도(0.5%, 1%)에 의한 *L. mesenteroides* 유산균 증식활성에 미치는 영향을 조사한 결과를 Fig. 1에 나타내었다. EHC(0.5, 1%) 첨가군이 다른 군들에 비해 *L. mesenteroides*에서 유산균 증식 촉진 활성이 높은 것에 반해 EHS는 그 활성이 높지 않은 것으로 나타났다.

요구르트 제조 시 starter로 쓰이는 유산균인 *L. bulgaricus*의 증식활성에 EHS와 EHC가 미치는 영향에 대해 알아본 결과, EHS와 EHC의 첨가가 무첨가군에 비해 큰 차이를 나타내지 않는 것으로 나타났다. 이는 Son 등(18)에서 스피

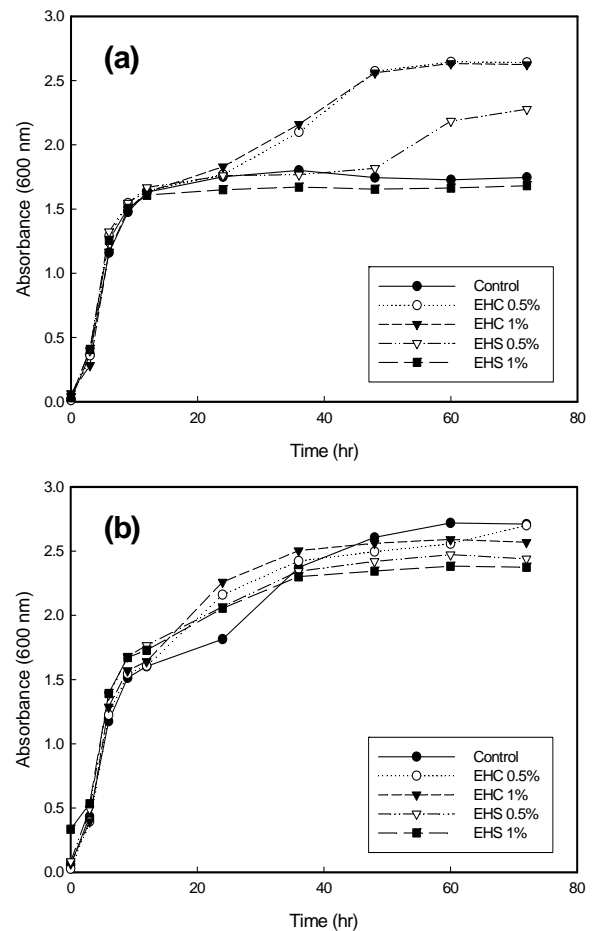


Fig. 1. Effect of EHS on the growth of lactic-acid bacteria. (a) *L. mesenteroides*, (b) *L. bulgaricus*.

루리나 1%를 *L. bulgaricus*에 첨가하였을 때 무첨가군에 비해 유산균수가 높게 나타났다는 보고와 일치하지 않는 결과로 스피루리나 분말을 첨가한 것에 비해 본 연구에서 사용한 EHS이 유산균 증식활성에 미치는 영향이 높지 않는 것으로 사료된다. 따라서 EHS와 EHC에 함유된 여러 가지 영양성분에 의해 유산균 증식활성에 큰 영향을 주리라 기대했던 것과는 다르게 일부 유산균에서만 그 활성이 나타남을 알 수 있었다.

DPPH에 의한 전자공여능 측정

전자공여능은 항산화작용의 대표적인 지표로서, 식이 중 항산화성 물질은 생체 내에서 과산화적 손상을 줄임으로써 동맥경화, 심근경색 등의 순환기질환의 예방에 효과적인 뿐만 아니라 활성산소에 의한 노화의 속도를 줄일 수 있는 것으로 알려져 있다.

EHS와 EHC의 DPPH에 의한 전자공여능을 조사한 결과 Fig. 2와 같이 나타났다. 50 mg/L의 동일한 농도에서 대조군인 ascorbic acid와 BHA는 각각 95%, 86%와 같이 높은 전자공여능을 나타낸 반면, EHS와 EHC는 모두 약 10% 미만의 낮은 전자공여능을 나타내었다. 이는 Kim 등(19)에서 미세조류인 *Nannochloris oculata*와 *Phaeodactylum tricornutum*를 지용성 용매와 수용성 용매로 추출하여 항산화 활성을 측정된 결과 지용성 용매로 추출한 추출물에서만 항산화 활성이 나타나 수용성 물질에서는 항산화 활성이 높지 않았다는 보고와 유사성을 갖는 결과로 판단된다. 또한 Brown 등(20)은 미세조류로부터 항산화 활성을 갖는 물질인 비타민을 분리 동정하여 간접적으로 미세조류의 항산화 활성을 보고하였는데, 본 연구에서 사용한 EHS는 반응매질을 물로 사용하였으므로 수용성 성분이 주로 용출되었을 것으로 판단되며, 또한 일부 수용성비타민 등의 성분이 용출되었다 할지라도 제조 시 boiling 과정을 거치면서 비타민 등의 성분이 파괴되어 항산화 활성이 나타나지 않은 것으로 추정된다.

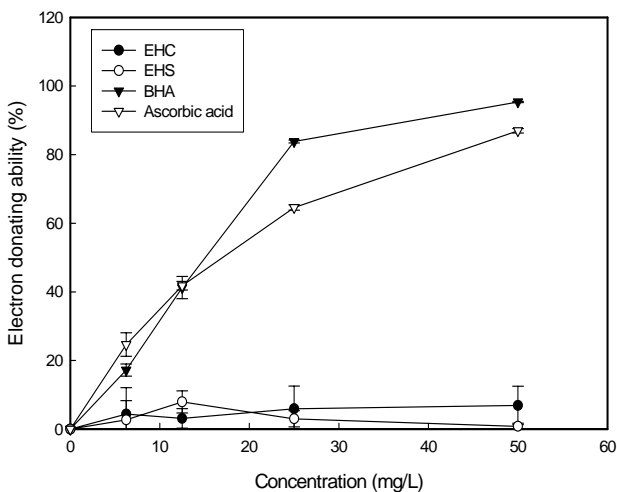


Fig. 2. Antioxidative activity of EHS determined based on electron donating ability.

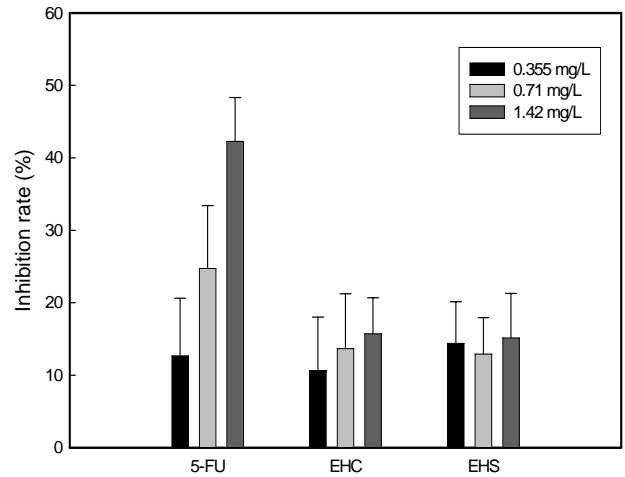


Fig. 3. Inhibition rate of HeLa cell by the treatment with EHS.

암세포 증식 저해 활성 측정

HeLa cell을 이용한 CCK assay법을 이용하여 EHS와 EHC에 대한 암세포 증식 저해 활성을 측정하였다(Fig. 3). 그 결과 1.42 mg/L의 동일한 농도에서 양성 대조군인 5-FU가 42%로 가장 높은 활성을 보였고, EHC 16%, EHS 15%로 각각 나타나 EHS와 EHC는 모두 암세포 증식 저해 활성이 낮게 나타났다. 이는 Lee(21)의 스피루리나를 물로 추출한 추출물이 HeLa cell의 증식을 억제한다는 보고와 일치하지 않는 결과로 본 연구에서 사용한 스피루리나 효소가수분해물은 기존에 스피루리나의 생리활성으로 알려졌던 암세포 증식 저해 활성은 높지 않은 것으로 사료된다.

항혈전 활성 측정

혈전은 과도한 출혈을 막기 위한 인체 내부 피드백 제어 활동 중 하나이다. 그러나 손상되지 않은 혈관에서의 혈전 생성은 고혈압, 심장병, 뇌졸중 등의 순환기계 질병들의 병인으로 작용하기도 하기 때문에 식품성분 중 혈전의 생성을 억제하는 물질에 대한 연구가 많이 이뤄지고 있다(22). 또한 항혈전 활성 측정 방법은 혈액 응고 기작에 따라 내인성 경로(intrinsic pathway), 외인성 경로(extrinsic pathway), 공통 경로(common pathway)로 나뉜다.

본 연구에서는 EHS의 항혈전 활성을 혈액응고 기작에 따라 3가지 방법으로 측정하였다.

첫째로 EHS가 공통경로에 미치는 영향을 알아보기 위해 TT assay법으로 항혈전 활성을 측정하였다. Fig. 4에서와 같이 양성대조군인 헤파린, 아스피린과 비교하였을 때 EHS의 혈액응고 저해 활성은 높게 나타났으며 반면, EHC의 혈액응고 저해 활성은 현저히 낮은 것으로 나타났다. 100 mg/L의 동일한 농도에서 혈액응고 저해 활성은 헤파린(56%) > EHS(55%) > 아스피린(45%) > EHC(19%)의 순으로 나타났다. 이는 Jang 등(23)에서 7.5% 농도의 전통된장이 730일 숙성시켰을 때 96%의 혈액응고 활성을 나타낸다는

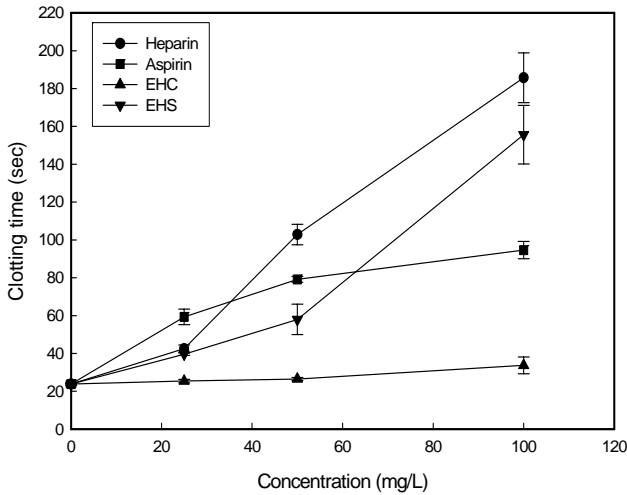


Fig. 4. Anticoagulant activity of EHS measured by TT assay.

보고에 비해 EHS는 낮은 활성을 보였지만, 본 연구에서 사용된 EHS와 된장시료의 농도를 비교해 보았을 때 EHS의 혈전용고 저해 활성이 된장보다 우수할 것으로 기대된다.

두 번째로 EHS의 내인성 경로에 대한 영향을 알아보기 위하여 aPTT assay법을 이용하여 항혈전 활성을 분석하였다(Fig. 5). 내인성 경로와 외인성 경로에 대한 활성 측정은 공통경로에서 높은 활성을 보인 대조군 헤파린과 EHS만을 가지고 분석하였다. 대조군인 헤파린과 비교하였을 때 EHS의 혈액응고 저해활성은 1,000 mg/L의 농도에서 95.8 sec로 대조군이 2.8 mg/L의 농도에서 71.1초인 것에 비해서는 낮은 수치였지만, Jang 등(24)에서 초피나무 추출물이 1,000 mg/L의 농도에서 96.5초로 보고한 것과 유사한 결과로 항혈전 활성을 가진 추출물의 활성분석 결과들과 유사하게 높은 값을 나타냄을 알 수 있었다.

마지막으로 외인성 경로에 대한 영향을 알아보기 위하여 PT assay법을 사용하여 분석한 결과는 Fig. 6과 같다. 양성

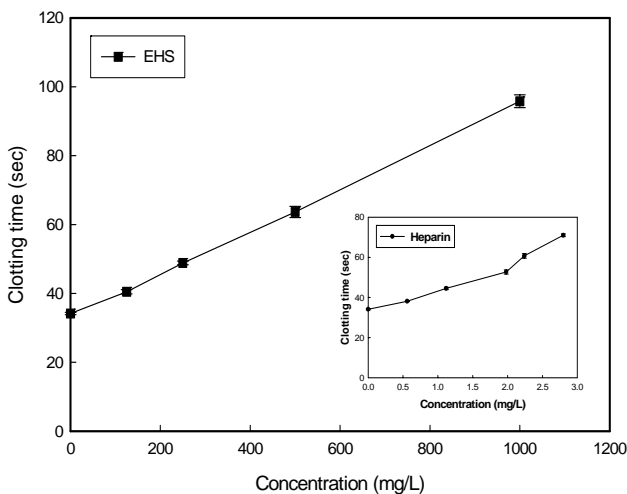


Fig. 5. Anticoagulant activity of EHS measured by aPTT assay.

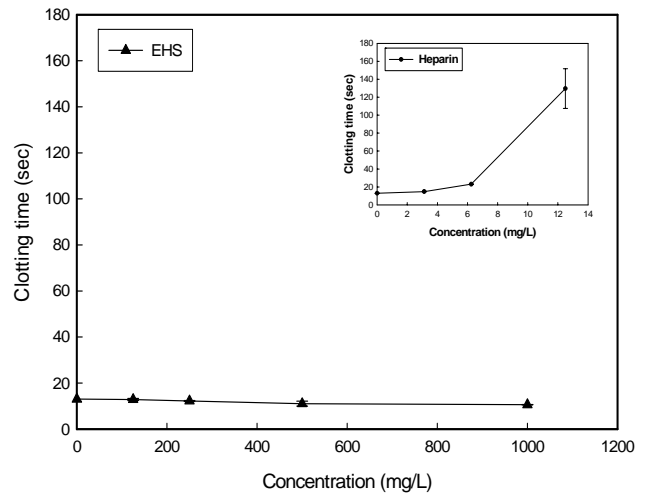


Fig. 6. Anticoagulant activity of EHS measured by PT assay.

대조군인 헤파린이 12.5 mg/L의 농도에서 129.5초인 것에 반해 EHS의 혈액응고 저해활성은 blank와 유사한 13초대인 것으로 외인성 경로에는 활성이 높지 않은 것으로 나타났다.

이러한 결과로 새로운 추출 방법에 따른 스피루리나 효소가수분해추출물의 기존의 연구에서는 알려지지 않은 새로운 생리활성인 항혈전 활성을 갖고 있음을 확인할 수 있었으며, 더 자세하게는 내인성 경로와 공통 경로에 활성이 있음을 알 수 있었다. 이상으로 기존에 스피루리나의 연구되지 않았던 새로운 기능성인 항혈전 활성을 이용하여 항혈전 건강기능식품으로 개발될 수 있을 것으로 사료된다.

요 약

스피루리나를 세포벽 가수분해효소와 단백질 가수분해효소로 처리하여 조제한 스피루리나 가수분해물(enzymatic hydrolysate of spirulina, EHS)의 생리활성을 조사하였다. 효소처리 가수분해물의 유산균 증식효과, 항산화능, 암세포 증식저해 활성, 항혈전 활성을 분석한 결과 EHS는 유산균 증식활성과 항산화능에 큰 영향을 미치지 않았으며, 자궁경부암세포(HeLa)에 대해 1.42 mg/L의 농도에서 15% 미만의 증식저해효과를 나타내었다. 반면 항혈전 활성을 공통 경로(common pathway), 내인성 경로(intrinsic pathway), 외인성 경로(extrinsic pathway)로 구분하여 측정된 결과, 공통 경로, 내인성 경로와 유사한 항혈전 활성이 있음을 확인하였다. 공통 경로를 thrombin time assay로 측정된 결과 EHS의 농도가 100 mg/L일 때 155.6초를 나타내었다. 내인성 경로는 activated partial thromboplastin time assay로 측정하였고, EHS의 농도가 1000 mg/L일 때 95.8초를 나타내었다. 외인성 경로를 prothrombin time assay로 측정된 결과 EHS의 농도가 1000 mg/L일 때 10.6초를 나타내었다. 결과적으로 스피루리나 효소가수분해물(EHS)이 항혈전경로 중 공통 경로와 내인성 경로에 활성이 있음을 알 수 있었으며, 이를

토대로 신규의 항혈전 기능성 원료로 개발될 수 있을 것으로 기대된다.

감사의 글

본 연구는 교육과학기술부와 한국산업기술재단의 지역혁신인력양성사업으로 수행된 연구 결과임.

문헌

1. Yang HN, Lee EH, Kim HM. 1997. *Spirulina platensis* inhibits anaphylactic reaction. *Lif Sci* 61: 1237-1244.
2. Kay RA. 1991. Microalgae as food and supplement. *Crit Rev Food Sci Nutr* 30: 555-573.
3. Romana I, Bellitti MR, Nicolaus B, Lama L, Mance C, Pagnotta E, Gambacorta A. 2000. Lipid profile: a useful chemotaxonomic marker for classification of new cyanobacterium in spirulina genus. *Phytochem* 54: 289-296.
4. Annapurna VV, Deosthale YG, Bamji MS. 1991. Spirulina as a source of vitamin A. *Plant Foods Hum Nutr* 41: 125-134.
5. Tokusoglu O, Unal MK. 2003. Biomass nutrition profiles of three microalgae: *Spirulina platensis*, *Chlorella vulgaris*, and *Isochrysis galbana*. *J Food Sci* 68: 1144-1148.
6. Miranda MS, Cintra RG, Barros SBM, Mancini-Filho J. 1998. Antioxidant activity of the microalga *Spirulina maxima*. *Braz J Med Biol Res* 31: 1075-1079.
7. Watanabe F, Takenaka S, Kittaka-Katsura H, Ebara S, Miyamoto E. 2002. Characterization and bioavailability of vitamin B12-compounds from edible algae. *J Nutr Sci Vitaminol* 48: 325-331.
8. Kim HM, Lee EH, Cho HH, Moon YH. 1998. Inhibitory effect of mast cell-mediated immediate-type allergic reactions in rats by spirulina. *Biochem Pharmacol* 55: 1071-1076.
9. Kim HS, Kim CH, Kim JH, Kwon MC, Cho JH, Gwak HG, Hwang BY, Kim JC, Lee HY. 2006. Comparison of anti-cancer activities from the culture and extraction condition of the *Spirulina platensis*. *Korean J Microbiol Biotechnol* 34: 143-149.
10. Ciferri O. 1983. Spirulina, the edible microorganism. *Microbiol Rev* 47: 551-578.
11. Kuhad A, Tirkey N, Palkhwal S, Chopra K. 2006. Effect of spirulina, a blue green algae, on gentamicin-induced oxidative stress and renal dysfunction in rat. *Fund Clin Pharmacol* 20: 121-128.
12. 이유경, 이홍금. 2002. 조류(Algae)의 산업적 이용. *생물산업* 15: 19-24.
13. Ozdemir G, Karabay NU, Dalay MC, Pazarbasi B. 2004. Antibacterial activity of volatile component and various extracts of *Spirulina platensis*. *Phytother Res* 18: 754-757.
14. In MJ, Gwon SY, Chae HJ, Kim DC, Kim DH. 2007. Production of spirulina extract by enzymatic hydrolysis. *J Korean Soc Appl Biol Chem* 50: 304-307.
15. Heo JC, Park JY, An SM, Lee JM, Yun CY, Shin HM, Kwon TK, Lee SH. 2006. Anti-oxidant and anti-tumor activities of crude extracts by *Gastrodia elata* Blume. *Korean J Food Preserv* 13: 83-87.
16. Yoon DH. 1980. Effect of chlorella powder on the growth of lactic acid bacteria. *MS Thesis*. Korea University, Seoul.
17. Cho EJ, Nam ES, Park SI. 2004. Effect of chlorella extract on acid production and growth of yoghurt starter. *Korean J Food Nutr* 17: 8-17.
18. Son CW, Shin YM, Sim HJ, Kim MY, Kim MR. 2007. Effect of spirulina on growth of lactic acid bacteria. *Korean J Food Cookery Sci* 23: 968-976.
19. Kim SK, Baek HC, Byun HG, Kang OJ, Kim JB. 2001. Biochemical composition and antioxidative activity of marine microalgae. *J Korean Fish Soc* 34: 260-267.
20. Brown MR, Mular M, Miller I, Farmer C, Trenerry C. 1999. The vitamin content of microalgae used in aquaculture. *J Appl Phycol* 11: 247-255.
21. Lee JN. 1999. Studies on screening of anticancer immuno-regulating functions from single cell protein, photosynthetic microalgae, *Spirulina platensis*. *MS Thesis*. Kangwon University, Kangwondo.
22. Yun YP, Kang WS, Lee MY. 1996. The antithrombotic effects of green tea catechins. *J Food Hyg Safety* 11: 77-82.
23. Jang IH, In MJ, Chae HJ. 2004. Manufacturing method for traditional doenjang and screening of high fibrin clotting inhibitory samples. *J Korean Soc Appl Biol Chem* 47: 149-153.
24. Jang MJ, Rhee SJ, Cho SH, Woo MH, Choi JH. 2006. A study on the antioxidative, anti-inflammatory and anti-thrombogenic effects of *Zanthoxylum piperitum* DC extract. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 35: 21-27.

(2009년 1월 9일 접수; 2009년 2월 3일 채택)