

*Chlorella vulgaris*의 지질 추출 후 부산물의 영양학적 및 관능적 평가

- 연구노트 -

오성호¹ · 최운용¹ · 서용창¹ · 김가빈² · 이신영² · 정경환³ · 강도형⁴ · 이현용^{1,5*}

¹강원대학교 바이오산업공학부, ²강원대학교 공과대학

³충주대학교 식품생명공학부, ⁴한국해양연구원, ⁵강원대학교 생명과학연구소

Nutritional and Organoleptic Evaluations of the By-products from *Chlorella vulgaris* after Lipid Extraction

Sung Ho Oh¹, Woon Yong Choi¹, Yong Chang Seo¹, Ga Bin Kim², Shin Young Lee²,
Kyung Hwan Jeong³, Do Hyung Kang⁴, and Hyeon Yong Lee^{1,5*}

¹Dept. of Biomaterials Engineering, School of Biotechnology and Bioengineering, and

²Dept. of Biological Engineering, College of Engineering, Kangwon National University, Gangwon 200-701, Korea

³Dept. of Food and Biotechnology, Chungju University, Chungbuk 380-702, Korea

⁴Korea Ocean Research & Development Institute, Gyeonggi 426-744, Korea

⁵Research Institute of Bioscience and Biotechnology, Kangwon National University, Gangwon 200-701

Abstract

Marine alga, *Chlorella vulgaris*, was extracted by chloroform-methanol (2:1, v/v) solvents for lipid extraction at 35°C for five hours (HCM-35) and its process was compared with conventional lipid extraction condition such as chloroform-methanol (2:1, v/v) at 65°C for one hour (CM-65). This low temperature extraction process showed that 80% of total lipid was extracted and its residues contained relatively unchanged amounts of intact proteins and other minerals as well as amino acid profiles. Interestingly enough, the weight fraction of carbohydrate in the residues slightly increased due to less denaturation at low process temperature. The biological activities of the residues such as cytotoxicity and immune cell growth activation were not much changed after being extracted. The sensory evaluation were found to be very favorable for being used as a food additive and/or food supplement. This result could also help to maintain the economic feasibility of utilizing marine resources in food and other relevant industries.

Key words: *Chlorella vulgaris*, low temperature extraction, lipid residual parts, food chemical analysis

서 론

광합성 미세조류는 식품 및 동물사료, 고도불포화지방산, 화학 및 제약 산업에 필요한 유용물질들을 생산할 수 있는 중요한 생물자원이다(1). 다양한 지질 조성을 갖고 있는 미세조류 중에서 *Chlorella*는 녹조류의 단세포 식물로 분류학상 Chlorolhycea강, Chlorococcm목, *Chlorella*속으로, 종(species)으로는 *vulgaris*, *pyrenoidosa*와 *ellipsoidea*가 널리 알려져 있으며, 이들은 2~10 μm의 구형 단세포 조류로 현미경으로만 볼 수 있을 정도이다(2). 이러한 *Chlorella*는 초기 일본 건강보조식품으로 널리 알려져 있었으며, 우리나라에서도 활발하게 연구되고 있는 건강관련 식품 중 하나로 단백질, 식이섬유, 비타민, 미네랄 등이 대량 함유된 영양 식품으로 인정받고 있으며, 다른 식품원료와는 달리 증식 속도가 매우 빠르므로 미래 식품으로 기대되어 많은 연구가 이루어

지고 있다(3). 특히 *Chlorella*에 포함된 CGF(*Chlorella* Growth Factor) 성분은 성장발육, 질병회복 등에 효과가 큰 것으로 보고되었으며(3), 그 외 성인병 및 항암관련 연구가 보고되고 있다(4,5). 또 다른 연구에서는 *Chlorella ellipsoidea*의 에탄올 추출물을 이용한 항산화, 미백 등의 실험을 통하여, 고부가가치 제품을 창출할 수 있는 결과를 보였다(6).

이와 같이 풍부한 mineral 조성을 가진 *Chlorella*는 환경 및 건강식품뿐만 아니라, 최근 많이 연구되어지는 바이오에너지 원료로 많이 활용되며 연구되어지고 있으나, *Chlorella*의 지질 추출 후 부산물의 활용 사례 및 가능성에 대한 연구 결과는 거의 전무한 실정이며, 기존 지질 추출 과정에 사용되는 Chloroform과 methanol과 같은 독성이 강한 각종 유기용매가 사용되어져 이의 처리 문제가 많은 것으로 생각된다.

따라서 본 연구에서는 바이오매스로서 경쟁력을 가지며, 균체의 생육이 빠른 것으로 알려진 *Chlorella*종을 이용하여

*Corresponding author. E-mail: hyeonl@kangwon.ac.kr
Phone: 82-33-250-6455, Fax: 82-33-253-6560

지질 추출 부산물의 식품 영양학적 연구를 진행하였다. 기존의 지질 추출 방법인 용매추출법은 클로로포름, 헥산, BF₃, 메탄올 등의 다양한 유기용매가 사용되어 지질 추출 부산물의 독성을 증가시키며, 고온 추출에 의한 식품영양학적 조성의 파괴를 가져와 부산물의 식품첨가물로서 활용 가치가 매우 낮으며, 두꺼운 세포벽을 이루고 있어 지질 추출 수율이 매우 낮았다(7). 이러한 단점을 개선하고자 본 연구에서는 기존의 용매추출법과는 달리 homogenization 전처리 과정과 최적화된 추출 용매로 얻어진 부산물의 식품영양학적 가치 평가를 통하여 앞으로 식품첨가물 및 기능성 소재로의 개발 등의 활용 가능성을 확인하고자 하였으며, 더 나아가 해양미세조류의 다양한 활용을 통한 환경 친화적 자원, 에너지 절약형 산업으로 환경오염문제 해결 및 산업구조 고도화에 기여할 수 있음을 보여주고자 한다.

재료 및 방법

재료 및 시약

Chlorella vulgaris(C-117)는 한국미세조류은행(Busan, Korea)로부터, 생리활성 측정에 사용된 인간 T 세포(Jurkat), 인간 B cell(Raji)은 ATCC(American Type Culture Collection, Manassas, VA, USA)로부터 분양 받았다. 세포 배양 배지인 HEPES buffer, Dulbeccos modified eagle medium (DMEM)과 RPMI1640, 혈청(FBS)은 GIBCO(invitrogen, Carlsbad, CA, USA)사로부터 구입하여 사용하였다. 또 gentamycin sulfate, sodium chloride, sodium bicarbonate, trypsin-EDTA와 그 외 시약들은 Sigma Adrich(St. Louis, MO, USA)사의 특급 시약을 사용하였다.

시료의 조제

*C. vulgaris*로부터 효율적인 지질 추출을 위해 동결 건조된 시료를 증류수에 12시간 동안 실온에서 교반한 후 고압 균질기(Micronox Inc., Seongnam, Korea)를 이용하여 1200 psi의 압력으로 1회 처리하여 균질화한 후 원심분리(5000×g, 30분)하고 동결 건조한 다음 80 mesh 크기로 분쇄하였다. 이 분말의 지질 추출을 위해 변형된 Folch 법(1957)을 이용(Fig. 1)하여 추출하였다(8-12). 즉, 1 g의 시료에(30:1) 부피비의 CHCl₃ : methanol(2:1, v/v) 용매에 넣고 35°C에서 5시간 동안 교반한 후 400 rpm에 원심 분리하였다. 분리된 여과물을 건조하여 추출 부산물로 실험에 사용되었으며(HCM-35), 분말의 활성 평가를 위해 100°C 물로 수직 환류 냉각기가 부착된 추출 flask에 시료 중량에 대해 각각 10배의 용매를 이용해 3시간 추출하고, 추출물은 감압여과 및 농축 후 동결건조를 통해 시료로 사용하였다. 이와 함께 대조군으로 고압 교반기를 사용하지 않고 65°C에서 한 시간 동안 추출하는 기존의 용매 추출 방법으로 추출했으며, 이같이 얻어진 추출물을 CM-65로 명명했다.

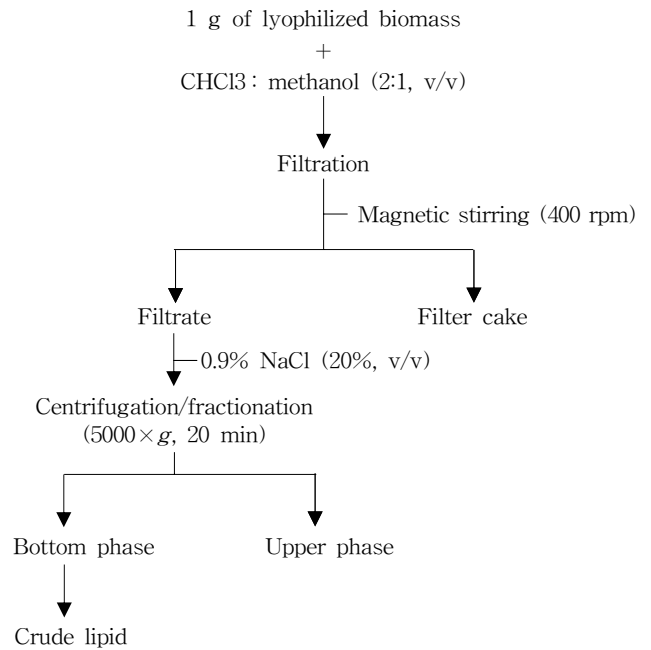


Fig. 1. Flow diagram of lipid extraction method for *Chlorella vulgaris*.

일반성분 분석

Association of Official Agricultural Chemists(AOAC)법에 따라 추출물의 식품 분석을 위해 수분 함량은 105°C 상압 건조법, 회분 함량은 550°C에서 직접 회화법을 이용하여 분석하였다(13). 조단백질 함량은 micro-Kjeldahl 법, 그리고 총 지질 함량은 Soxhlet 법을 이용하여 분석하였다. 소화성 당질 함량은 위의 측정치를 합한 값을 100에서 뺀 값으로 하였다.

아미노산 분석

추출물의 아미노산 함량은 일정량의 시료에 6 N HCl 용액을 가하고 질소가스를 충전한 후 110°C에서 24시간 가수분해하고 감압농축 시켰다. 이를 0.45 μm membrane filter로 여과하고 유도체 시약인 methanol : triethylamine : water : phenylisothio-cyanate(PITC) 혼합용액(7:1:1:1, v/v)을 첨가하여 감압 건조하였다. 이를 pico-tag 방법에 따라 HPLC (BIO-TEK Inc., Milan, Italy)로 분석하였다(14). 이때 분석 조건은 column: pico-tag, column temp.: 40°C, eluent: pico-tag eluent A & B, flow rate: 1.0 mL/min, chart speed: 1.0 cm/min, detector: UV 254 nm, injection volume: 10 μL이었다.

무기물 분석

무기질(Ca, P, Mg, K, Na, Fe, Zn, Cu, Mn) 함량 분석은 시료를 550°C 회화로에서 회화시킨 회분에 염산을 가하여 용해시키고 일정량으로 정용한 후 ICP-AES(inductively coupled plasma, JA38 PLUS, ISA Instrument S.A., Long-

jumeau, France)로 분석하였다(15). ICP-AES의 작동조건은 power: 1 kW for aqueous, nebulizer pressure: 3.5 bars for meinhasd type C, aerosol flow rate: 0.3 L/min이었으며, 각 무기질의 검출과장은 Ca 393.37, Mg 279.55, K 766.49, Na 588.99, P 213.62, Fe 238.20, Zn 213.86, Cu 224.80, Mn 766.49 nm이었다.

정상 세포(HEK293)에 대한 세포독성 측정

세포독성은 sulforhodamine B(SRB) assay 방법에 따라, 인간 정상 신장 세포(HEK293, ATTC)와 인간 정상 폐세포(HEL299, ATTC)를 96 well plate에 $4 \sim 5 \times 10^4$ cells/mL로 분주한 후 24시간 동안 배양 후 최종 농도 0.2, 0.4, 0.6, 0.8, 1.0 mg/mL로 제조한 각각의 시료를 100 μ L씩 첨가하여 48시간 동안 배양하였다. 배양 후에 상등 액을 제거하고 10% (w/v) trichloroacetic acid(TCA) 100 μ L를 가하여 4°C에서 1시간 동안 방치한 후 증류수로 4~5회 세척하여 TCA를 제거하고 각 well에 1%(v/v) 아세트산에 녹인 0.4% (w/v) SRB용액을 100 μ L씩 첨가하고 상온에서 30분 동안 염색시켰다. 결합되지 않은 SRB 염색액은 1% 아세트산 용액으로 4~5회 정도 세척, 건조시킨 후에 10 mM Tris buffer 100 μ L를 첨가하여 염색액을 녹여낸 후 540 nm에서 microplate reader(THERMO max, Molecular Devices, Sunnyvale, CA, USA)를 이용하여 흡광도를 측정하였다(16).

면역세포 생육 증진 효과 및 cytokine 분비량 측정

1.0×10^4 cells/mL의 농도의 인간 T 세포(Jurket)와 B 세포(Raji)를 10% FBS를 함유하는 RPMI 1640 배지에 24 well plate에 분주하여 6일 동안 배양하면서 매일 생 세포수를 hemacytometer로 측정하여 생육도를 측정했다. 이들 세포로부터 분비되는 cytokine인 IL-6와 TNF- α 의 정량을 IL-6와 TNF- α 정량 kit(Chemicon, Billerica, MA, USA)을 사용하여 450 nm에서 microplate reader(THERMO max, Molecular Devices) 흡광도를 측정하여 표준곡선과 비교해 cytokine의 양을 측정하였다(16-18).

지질 추출물의 관능평가

지질 추출 전후 *C. vulgaris* 분말의 관능검사 평가를 위해 두 조건의 *C. vulgaris*를 5°C에서 24시간 저장한 후, 검사시간 1시간 전에 상온에 보관 후 관능요원에게 제시하였다. 관능요원은 훈련된 대학원생 20명(24~29세의 남녀 각 10명씩)들로, 관능 검사원들 간의 영향을 배제하기 위해서 개별 칸막이 방(booth)을 갖추어 실시하였다. 또한, 검사실의 온도와 습도를 쾌적하게 조절하기 위해 냉, 온방 장치를 설치하여 실온을 20~25°C, 습도를 50~60%로 유지하였으며, 검사실 안의 광선량과 색깔 역시 검사원의 평가 결과에 영향을 미치므로 시료를 충분히 눈으로 감지할 수 있게 밝게 하였다. 이외에도 검사실내의 벽, 천장, 바닥 및 탁자 등은 적당히 밝고 안정된 색(흰색)으로 조성하였다. 본 관능 평가는 오점

검사법을 채택 후, 참고문헌 20의 방법을 변형하여 색깔(color), 매끈한 정도(smoothness), 향기(fragrance) 등 3가지 항목으로 구분하여 실시하였으며(19), 그 결과에 대한 유의성은 SPSS 프로그램을 이용하여 분산분석과 Duncan's multiple range test로 검정하였다.

통계처리

실험결과는 triplicate determinations에 의한 mean \pm SD로 표시했으며, 각 평균치 간의 차이는 Student t-test에 의해 $p < 0.01$, $p < 0.005$, $p < 0.001$ 수준에서 유의성을 검증하였다.

결과 및 고찰

일반성분 함량

본 연구에서 분석된 *C. vulgaris*의 CM-65와 HCM-35 추출 부산물의 일반성분 함량을 Table 1에 나타내었다. 시료 100 g 중 일반 조성을 살펴보면, 지질 추출 후 carbohydrate, water, ash의 함량이 증가한 것을 확인할 수 있으며, 특히 CM-65 부산물은 water와 ash가 각각 8.5%, 4.9%로 월등히 높았다. HCM-35 부산물의 crude protein 함량은 큰 변화가 없었으나, carbohydrate의 함량은 30.8%(w/w)로 크게 증가하였으며, total lipid 함량은 3.7%(w/w)로 크게 낮아진 것을 확인할 수 있다. 이는 고압균질기를 이용한 전처리 조건에 의해 추출 초반에 대부분의 지질 추출이 이루어졌음을 의미하며, 탄수화물, 단백질과 같은 거대 분자 물질의 형태적, 구조적 변화가 유발되어 단시간 내에 용출이 증가한 것으로 보인다. 또한, 추출 전 *C. vulgaris*의 calory는 453 kcal/100 g으로 매우 높으나, CM-65와 HCM-35 부산물은 각각 388.3 kcal/100 g, 383.7 kcal/100 g으로 낮았으며, 특히 최적화 지질 추출 처리에 의한 부산물의 calory가 상당히 낮아졌음을 확인할 수 있다. 이러한 결과는 전처리에 의한 지질 추출 과정으로 포화 및 불포화 지방산의 감소로 인하여 열량이 줄어든 것으로 사료된다. 따라서 다이어트용 식품첨가물로

Table 1. Comparison of chemical compositions and total calories of *Chlorella vulgaris* according to different lipid extraction conditions

Component	Chemical contents (% (w/w))		
	Before extraction	CM-65 ¹⁾	HCM-35 ²⁾
Carbohydrate	21.8	25.4	30.8
Crude protein	56.3	53.9	56.8
Total lipid	15.7	7.3	3.7
Water	3.0	8.5	5.3
Ash	3.2	4.9	3.4
Calory (kcal/100 g)	453.7	388.3	383.7

¹⁾CM-65: Conventional lipid extraction method at 65°C for one hour.

²⁾HCM-35: Low temperature lipid extraction at 35°C for 5 hr after homogenization at 1200 psi.

Table 2. Comparison of essential amino acids of *Chlorella vulgaris* at different extraction conditions

Composition	<i>Chlorella vulgaris</i> content (% (w/w))		
	Before extraction	CM-65 ¹⁾	HCM-35 ²⁾
Aspartic acid	9.4	9.6	9.3
Threonine	4.9	5.3	6.1
Serine	3.8	3.4	3.2
Glutamic acid	13.9	14.1	14.4
Proline	3.5	2.5	2.3
Glycine	4.1	3.6	2.2
Alanine	6.6	4.8	4.4
Cystine	0.6	0.5	0.4
Valine	5.8	6.3	7.7
Methionine	2.1	1.9	1.5
Isoleucine	5.8	7.3	8.5
Leucine	6.2	6.9	7.6
Tyrosine	7.3	5.8	4.5
Phenylalanine	5.8	5.9	6.4
Lysine	7.0	7.2	7.8
Ammonia	0.2	0.2	0.3
Histidine	2.5	4.8	5.2
Tryptophan	—	—	—
Arginine	10.5	9.9	8.2
	100.0	100.0	100.0

¹⁾CM-65: Conventional lipid extraction method at 65°C for one hour.

²⁾HCM-35: Low temperature lipid extraction at 35°C for 5 hr after homogenization at 1200 psi.

이용 가능하며, 특히 전처리 과정을 거친 지질 추출 방법은 높은 탄수화물, 조단백질 함량을 보임으로써 일반 식품첨가물로서 활용 가능성을 높인 것으로 사료된다.

아미노산 함량

Table 2와 같이 시료 100 g 중 56%(w/w) 이상의 높은 조성을 보인 단백질 구성 성분인 아미노산 조성을 살펴보면, 대부분의 조성 중 특히, 인간이 음식을 통하여 섭취해야 하는 threonine, valine, isoleucine, leucine, phenylalanine, lysine, histidine의 함량이 대부분 증가하였다. 특히 HCM-35는 glutamic acid의 함량이 14.4%(w/w)로 가장 높았으며, 대부분 높은 함량으로 고단백 사료로서의 이용 가능하다. 특히 leucine은 가금류의 가슴육 생산과 뼈, 피부, 근육조직의 성장과 재생, 헤모글로빈의 중요한 구성성분의 아미노산으로 많은 양이 필요한데, 이의 함량이 7.6%(w/w)로 높은 조성을 나타내었으며, methionine의 경우 성장은 향상되지만, 자체에 함황 아미노산이기 때문에 폐사 증가의 원인이 되는데, 이는 기존에 비해 1.5%(w/w)로 낮아졌다. 이 외에 일부 아미노산은 거의 비슷하거나 크게 증가하지 않았는데, 이는 작은 분자로 구성된 아미노산은 고압 균질기에 의한 고압의 영향을 적게 받았기 때문인 것으로 사료된다.

무기질 함량

Table 3의 시료 100 g 중 mineral 조성을 살펴보면, 지질 추출 후 mineral 함량이 크게 상승하였으며, 특히 homo-

Table 3. Comparison of several mineral compositions of *Chlorella vulgaris* at different extract process conditions

Composition	<i>Chlorella vulgaris</i> (mg/100 g)		
	Before extract	CM-65 ¹⁾	HCM-35 ²⁾
Ca	15.7	16.2	18.3
Fe	17.2	17.6	20.2
K	761.0	783.1	838.0
Mg	214.0	220.0	225.0
Mn	2.0	2.1	2.4
Na	115.1	120.9	136.8
Zn	2.2	2.7	2.9
P	647.0	690.3	731.3

¹⁾CM-65: Conventional lipid extraction method at 65°C for one hour.

²⁾HCM-35: Low temperature lipid extraction at 35°C for 5 hr after homogenization at 1200 psi.

genization 전처리 부산물은 월등히 높은 mineral 함량을 확인할 수 있다. 이의 부산물은 뼈와 치아 성분을 보충할 뿐만 아니라, 골다공증의 예방 및 신체 조직의 기능 유지에 필요한 칼슘(Ca)의 함량이 18.3 mg/100 g으로 상대적으로 높았으며, 그 외 인체 구성 성분으로서의 기능 수행을 위한 필수 mineral 성분인 칼륨(K), 마그네슘(Mg), 나트륨(Na), 인(P) 등은 각각 838.0 mg/100 g, 225.0 mg/100 g, 136.8 mg/100 g, 731.3 mg/100 g으로 일반 용매추출법에 의한 부산물보다 고르게 많이 함유하고 있어 변형된 지질 추출 방법에 의한 *C. vulgaris* 부산물의 건강식품 첨가물로서의 가능성이 매우 높다. 이는 다른 많은 연구 결과가 이를 뒷받침해 주며, 그중 녹조류는 바이오연료로서 뿐만 아니라 높은 식품영양학적 조성에 따른 동물 및 인간의 식품으로서 가능성을 언급하였으며(20), 또한 우유와 달걀에 비해 단백질, 비타민, 무기질의 함유량이 매우 높고(21), 쇠고기와 클로렐라의 아미노산 함량에서도 월등히 높음을 확인하여 동식물의 성장촉진, 뇌졸중 개선 및 예방, 면역 및 항균력 증강, 세포재생 등의 효과를 입증한(21,22) 많은 연구 결과가 이를 뒷받침한다.

정상 세포(HEK293, HEL299)에 대한 세포독성 측정

정상 세포에 대한 세포독성 실험은 두 가지 인간 정상 세포인 HEK293과 HEL299를 사용하였다(Fig. 2). 세포독성 실험 역시 CM-65와 HCM-35 추출 부산물을 이용하여 인간 정상 세포(HEK293, HEL299)에 대한 세포독성을 sulforhodamine B assay를 사용하여 측정하였다. 그 결과 두 추출물 모두 농도 의존적으로 증가하는 경향을 나타내었으며, CM-65와 HCM-35 부산물은 HEK293에 대해 각각 최고 투여 농도인 1.0 mg/mL에서 21.2%, 16.4%를 나타내어 고압균질기를 이용한 homogenization의 전처리에 의한 세포독성이 크게 낮아짐을 확인할 수 있다. 이러한 결과는 HEL299에서도 유사한 연구 결과를 보였다. 이는 homogenization 전처리에 의한 세포막이 비가역적으로 분해되어 막 투과성이 증가되어 독성 물질의 제거가 증가된 것으로 사료된다. 이러한 세포독성의 수치는 이미 연구된 *S. platensis*와 비교하여 최

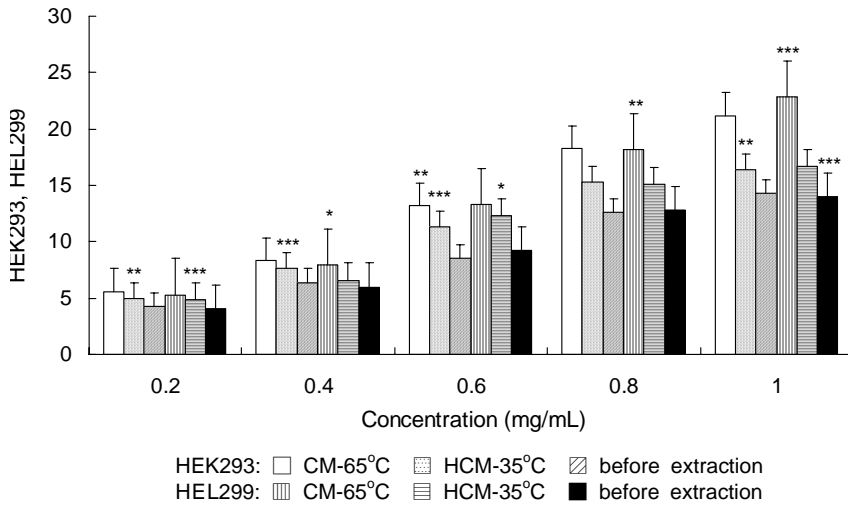


Fig. 2. Cytotoxicity of *Chlorella vulgaris* extracts on the growth of the human normal cells, HEK293 and HEL299. Mean \pm SD from triplicate separated experiments are shown. Each value were compared with control at *p<0.01, **p<0.005, ***p<0.001 by Student t-test. CM-65: Conventional lipid extraction method at 65°C for one hour. HCM-35: Low temperature lipid extraction at 35°C for 5 hr after homogenization at 1200 psi.

Table 4. The growth of human immune T, B cell by adding 0.5 mg/mL of the extracts of residual parts from different extraction processes

Extraction condition of sample		Cultivation time (day)						
		1	2	3	4	5	6	
T cell	Viable cell density ($\times 10^4$ cells/mL)	Before extraction	3.3 \pm 0.02	4.2 \pm 0.04	6.1 \pm 0.05	8.5 \pm 0.06	10.8 \pm 0.07	12.8 \pm 0.08
	Solvent extraction by pre-process		3.2 \pm 0.08	4.3 \pm 0.07***	6.0 \pm 0.11***	8.3 \pm 0.13***	10.4 \pm 0.16**	11.9 \pm 0.18*
B cell	Viable cell density ($\times 10^4$ cells/mL)	Before extraction	3.2 \pm 0.06	4.4 \pm 0.03	6.3 \pm 0.08	9.1 \pm 0.10	12.2 \pm 0.11	13.6 \pm 0.09
	Solvent extraction by pre-process		3.1 \pm 0.09	4.1 \pm 0.10*	5.9 \pm 0.11***	9.0 \pm 0.13***	11.9 \pm 0.10*	12.8 \pm 0.7*

Mean \pm SD from triplicate separated experiments are shown. Each value were compared with control at *p<0.01, **p<0.005, ***p<0.001 by Student t-test.

고 농도인 1.0 mg/mL에서 대부분 26% 이하의 세포독성을 나타내는 것으로 알려진 것과 비교하여(23) 크게 낮은 세포독성을 나타내어, 식품첨가물로 이용 가능하다.

면역세포 생육 증진 효과 및 cytokine 분비량 증진

Table 4에서는 면역 체계에 중요한 역할을 하는 면역 세포인 T세포, B세포의 면역 증진 효과를 확인하기 위하여 면역 B세포와 T세포의 생육 촉진 효과를 생육도와 생육도에 따른 cytokine의 분비량 측정을 통해 확인하였다. T 세포의 생육도의 경우 추출 전 후 모두 측정 1일부터 6일까지 계속적으로 증가하는 경향을 나타내며, 최대 생육도를 나타낸 6일째 추출 전후 각각 12.8 $\times 10^4$ cells/mL, 11.9 $\times 10^4$ cells/mL의 큰 차이를 나타내지 않았으며, 추출 후 부산물의 경우 T 세포의 생육을 유의적으로 증가시켰음을 확인할 수 있었다(Table 4). B 세포의 생육도의 경우도 T 세포의 생육도와 유사한 결과를 보여주었다. 최대 생육도를 나타낸 6일째 추출 전후 각각 13.6 $\times 10^4$ cells/mL, 12.8 $\times 10^4$ cells/mL로 추출 후 부산물의 생육도가 낮았지만, 이는 추출 전과 비교하여 큰 차이를 나타내지 않았다. 따라서 homogenization에 의한 전처리 과정은 유용 성분의 용출이 쉽고 에너지 수준이 제한적인 수소결합, 전기적 결합, 반데르발스 결합과 같은 약한 결합들에 의한 분리를 높임으로써 지질 추출 후, C.

vulgaris 부산물은 비교적 높은 B 세포와 T 세포의 생육을 확인할 수 있었다. 식물추출물의 효과에 관한 한 연구 결과 식육증진, 사료 섭취량 증가, 내인성 소화 효소 분비의 증가, 항균 및 항바이러스 활성의 부여, 면역 체계의 개선 등을 보고하고 있으며(24), 버섯 및 식물 추출물을 사료로 이용한 실험에서 항생제 대체로써 손색없음을 보고하고 있다(25). 이처럼 본 연구 결과 역시 높은 식품영양학적 가치뿐만 아니라, 건강 및 다이어트용 식품첨가물로 활용하기 위한 면역 활성도 또한 매우 높아 식품첨가물로 이용 가능하다. 또한 현재 가금 사료 내에 항생제 및 합성 성장 촉진 물질의 사용이 규제 또는 금지되었는데(26,27), 이를 가금류의 사료 첨가물로 활용 시 6일째 배양에서 생육 증진이 높아지는 결과를 볼 때, 가축의 사료 섭취로 가시적인 면역증강 효과를 나타낼 것으로 기대되며, 가축에게 사용되는 항생제를 줄일 수 있어 고부가가치 사료 첨가물로 이용이 기대된다.

관능검사에 의한 품질평가

지질 추출 부산물의 식품첨가물로서 이용가능성을 찾기 위한 품질평가를 색(color)과 매끈한 정도(smoothness), 향기(fragrance)에 관한 관능검사에 의하여 검토한 후 그 결과를 평균, 표준편차(95% 신뢰구간) 및 분산분석한 결과를 Table 5에 나타내었다. 그 결과 색에 대한 차이는 통계적으

Table 5. Results of sensory evaluation of the residues from different extraction processes

Extraction conditions	Total score	Color	Smoothness	Fragrance
Before extraction	9.88	3.95±0.83 ¹⁾	3.25±0.97	2.68±0.59
Solvent extraction by pre-process	11.72	4.00±0.77	4.02±0.70*	4.69±0.97*

¹⁾1: undesirable, 2: slightly undesirable, 3: slightly desirable, 4: desirable, 5: very desirable. *p<0.01.

로 유의차가 없었으나, 향기 및 매끈한 정도에 따른 유의적 차이를 나타내었으며(p<0.05). 이와 같은 결과를 Duncan's multiple range test를 이용하여 유의차 검정을 하였다. 외관은 매끈한 정도에서 유의적 차를 보였으며, 지질 추출 부산물이 4.02로 높은 점수를 얻었다. 이는 본 연구진에 의해 확립된 전처리를 통한 지질 추출의 최적화 공정을 통하여 11.72의 total score를 얻어 처리 전 9.88의 total score인 *C. vulgaris*보다 높은 관능평가를 보임으로써 높은 영양학적 가치와 함께 식감이 비교적 높아 다이어트 및 건강식품 첨가물로서 가치가 매우 높은 것으로 사료된다.

요 약

본 연구는 단단한 세포벽을 이루고 있어 지질 추출 및 유용 물질의 용출이 어려운 *C. vulgaris*를 이용하여, 1200 psi의 압력으로 1회 및 2회의 homogenization 전 처리가 이루어졌으며, chloroform-methanol 혼합 용액으로 기존 65°C 온도에서 짧은 시간(1 hr) 동안 비등이 이루어지던 것과는 달리, 35°C 온도조건에서 적정시간(5 hr) 동안 교반하는 최적 용매추출법으로 얻어진 지질 추출 부산물에 대한 식품영양학적 가치 평가와 세포독성, 면역 활성 탐색을 통하여 식품첨가물로 이용 가능성을 확인하였다. 일반성분 및 무기질, 아미노산 함량 분석결과 대부분의 유용 물질의 용출량이 증가하였으며, 특히 HCM-35는 총 열량의 감소와 함께 carbohydrate와 crude protein이 각각 30.8%, 56.8%로 높았으며, 그 외 필수 mineral 및 아미노산 함량의 증가를 통하여 다이어트 및 건강식품 첨가물로서 높은 가치를 확인했다. 또한, 정상세포(HEK293, HEL299)에 대한 세포독성은 16% 이하로 낮으며, 면역증진 효과를 분석한 결과 면역 B세포와 T세포에서 각각 12.8×10^4 cells/mL, 11.9×10^4 cells/mL로 6 일째 가장 높은 생육도를 보였으며, 추출 전 *C. vulgaris*와 비교하여 큰 차이가 없었다. *C. vulgaris*의 부산물은 높은 식품학적 및 생리활성 가치가 있다고 사료되며, 부산물의 소재화 가치가 높고, 특히 식품첨가물 이용 시, 다이어트 및 면역 기능을 통한 건강 향상이 기대된다. 또한 색깔, 매끈한 정도, 향기에 관한 관능 성 평가에서 높은 점수를 나타내어, 다이어트 및 건강보조식품 첨가물로 이용될 수 있을 것이다. 더 나아가 이와 같은 부산물 이용은 환경 친화적 자원 내 에너지 절약형 산업으로 환경오염문제 해결 및 산업구조 고도화에 기여할 것으로 기대된다.

감사의 글

본 관제(결과물)는 지식경제부의 지원으로 수행한 에너지자원인력양성사업의 연구결과입니다(2008-N-BL-HM-E-06).

문 헌

1. Chung WJ, Wang MS, Choi SI, Kim JK, Jeong BC. 1999. High cell density cultures of micro-algal *Dunaliella bardawil*. *Korean J Biotechnol Bioeng* 14: 160-166.
2. Lee MC. 2007. The effects of chlorella supplements for human. *International Journal of Coaching Science* 9: 31-40.
3. Kim JS. 2004. Preparation of chlorella drinks and its quality characteristics. *Korean J Food & Nutr* 17: 382-387.
4. Justo GZ, Silva MR, Queiroz ML. 2001. Effects of the green algae *Chlorella vulgaris* on the response of the host hemato-poietic system to intraperitoneal ehrlich ascites tumor transplantation in mice. *Immunopharmacol Immunotoxicol* 23: 119-132.
5. Hasegawa T, Okuda M, Nomoto K. 1994. Augmentation of the resistance against *Listeria monocytogenes* by oral administration of a hot water extract of *Chlorella vulgaris* in mice. *Immunopharmacol Immunotoxicol* 16: 191-202.
6. Kim HJ, Kim IH, Lee JH. 2008. Biological activities of ethanol extract from the seawater algae, *Chlorella ellipsoidea* C020. *Korean J Biotechnol Bioeng* 23: 125-130.
7. Sialve B, Bernet N, Bernard O. 2009. Anaerobic digestion of microalgae as a necessary step to make microalgal bio-diesel sustainable. *Biotechnol Adv* 27: 409-416.
8. Juan RR, Belarbi EH, Sanchez JLG, Alonso DL. 1998. Rapid simultaneous lipid extraction and transesterification for fatty acid analyses. *Biotechnol Tech* 12: 689-691.
9. Yi YJ, Yin H, Luo K. 2005. Culture conditions effect on the mycelium dry weight activating proteins produce. *Journal of Hunan Agricultural University* 31: 76-78.
10. Tan W, Hogan GD. 1998. Dry weight and N partitioning in relation to substrate N supply, internal N status and developmental stage in jack pine (*Pinus banksiana* Lamb.) seedlings: implications for modelling. *Ann Bot* 81: 195-201.
11. Iverson SJ, Lang SLC, Cooper MH. 2001. Comparison of the bligh and dyer and folch methods for total lipid determination in a broad range of marine tissue. *Lipids* 36: 1283-1287.
12. Cohen Z, Vonahak A, Richmond A. 1988. Effect of environmental conditions on fatty acid composition of the red alga *Porphyridium cruentum* correlation to growth rate. *J Phycol* 24: 328-332.
13. Thompson RH, Merola GV. 1993. A simplified alternative to the AOAC official method for cholesterol in multi-component foods. *AOAC Int* 76: 1057-1068.
14. Park SJ, Seong DH, Park DS, Kim SS, Gou J, Ahn JH, Yoon WB, Lee HY. 2009. Chemical composition of fermented *Codonopsis lanceolata*. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 38: 396-400.

15. Prosky L, Asp NG, Schweizer TF, DeVries JW, Furda I. 1998. Determination of insoluble, soluble, and total dietary fiber in foods and food products: interlaboratory study. *J Assoc Off Anal Chem* 71: 1017-1023.
16. Lee MK, Choi GP, Ryu LH, Lee GY, Yu CY, Lee HY. 2004. Enhanced immune activity and cytotoxicity of *Artemisia capillaris* Thunb. extracts against human cell lines. *Korean J Medicinal Crop Sci* 12: 36-42.
17. Han BH, Park MH, Cho JY, Park JS, Yoo ES, Baiik KU. 1988. Effect of ginsenosides from *Panax ginseng* on TNF- α production and T cell proliferation. *Yakhak Hoeji* 42: 296-301.
18. Kwon SY, Lee HS, Lee SH, Im GI, Kim SN, Kim HS, Hwang SW, Hwang SY. 2006. Analgesic effect and inhibition of prostaglandin E2 activity and pro-inflammatory cytokines production by ethyl alcohol extract from new herbal formula. *Kor J Pharmacogn* 37: 136-142.
19. Park SO, Kim KO. 1988. Effects of added corn starches on sensory characteristics of acorn mooks. *Korean J Food Sci Technol* 20: 613-617.
20. Lee JS, Kim DK, Lee JP, Park SC, Koh JH, Ohh SJ. 2001. CO₂ fixation by *Chlorella* KR-1 using flue gas and its utilization as a feedstuff for chicks. *J Microbiol Biotechnol* 11: 772-775.
21. Atsushi M. 1999. What is chlorella. *Food Ind* 9: 122-138.
22. Han JG, Kang GG, Kim JK, Kim SH. 2002. The present status and future of chlorella. *Food Sci Ind* 6: 64-69.
23. 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 conditions of the *Spirulina platensis*. *Kor J Microbiol Biotechnol* 34: 143-149.
24. Jamroz D, Wiliczekiewicz A, Wiertelcki T, Orda J, Skorupinska J. 2005. Use of active substance of plant origin in chicken diets based on maize and locally grown cereals. *Br Poult Sci* 46: 485-493.
25. Guo FC, Kwakkel RP, Williams BA, Li WK, Li HS, Luo JY, Li XP, Wei YX, Yan ZT, Verstegen MW. 2004. Effects of mushroom and herb polysaccharides, as alternatives for an antibiotic, on growth performance of broilers. *Br Poult Sci* 45: 684-694.
26. Rhodes MJC. 1996. Physiologically-active compounds in plant foods: an overview. *Proc Nutr Soc* 55: 371-384.
27. Best P. 2000. Health boosters from botany. *Feed Int* June: 15-16.

(2010년 2월 24일 접수; 2010년 5월 4일 채택)