

단백질 분해 효소를 이용한 스피루리나 추출물 제조 공정 최적화

인만진^{1*}

Optimization of Proteolytic Enzyme Treatment for the Production of Spirulina Extract

Man-Jin In^{1*}

요약 세포벽 분해 효소와 단백질 분해 효소를 이용하여 스피루리나 추출물을 효율적으로 생산할 수 있는 방법을 조사하였다. 특히 단백질 분해 효소의 처리 조건을 최적화하여 효율적인 스피루리나 추출물의 제조공정을 제시하였다. 세포벽 분해 효소인 Tunicase는 스피루리나의 중량 기준으로 2%를 사용하였고 2시간 동안 반응시켰다. 상업용 단백질 분해 효소로는 Alcalase를 사용하였다. 이때, Alcalase의 최적 사용량은 1%이었으며, 효소 반응 시간은 2시간이 적절하였다. Tunicase와 Alcalase의 처리 방법에서 Tunicase를 먼저 사용한 후 Alcalase를 사용하는 순차적으로 처리하는 것이 고형분 회수율과 spirulina extraction (SE) index를 최대로 증가시킬 수 있는 효과적인 방법이었다. 두 효소를 순차적으로 반응시키면 단순 열수 추출보다 고형분 회수율은 약 56%(45.2% → 70.7%), SE index는 약 100%(11.4 → 22.8) 증가하였다.

Abstract An efficient production method of spirulina extract was developed by enzymatic treatment using proteolytic enzymes. The suitable dosage of Tunicase, a cell lytic enzyme, was used to be 2.0% (w/w). To maximize solid recovery and spirulina extraction (SE) index, which indicates nucleic acid-related substances content, the dosage of Alcalase, commercially available protease, was found to be 1.0% (w/w). By simultaneous treatments using optimal dosages of Tunicase and Alcalase, the highest SE index and solid recovery were obtained. The SE index and solid recovery of simultaneous treatments were notably enhanced by 100% (11.4 → 22.8) and 56% (45.2% → 70.7%), respectively, than those of the non-treated extracts.

Key Words : Alcalase, enzymatic hydrolysis, solid recovery, spirulina extract

1. 서론

나선형의 형태에 길이 300-500 μm , 직경 8 μm 의 미세조류(microalgae)인 스피루리나(spirulina)는 클로렐라와 함께 오랫동안 식량 자원으로, 최근에는 건강기능식품으로 활용되고 있다[1, 2]. 스피루리나는 단백질 55-70%, 지방 6-9%, 탄수화물 15-20%, 다량의 무기질, 비타민 및 색소 성분을 함유하고 있다. 스피루리나는 단백질 함량이 높을 뿐만 아니라 필수 아미노산을 골고루 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[2-4]. 스피루리나의 생리적인 기능으로는 항산화, 중금속 독성 완화, 면역증진, 콜레스테롤 저하, 항알러지 등이 보고되어 있다[5-8]. 우리나라의 건강기능식품법에서 스피루리나 제품은 필수 아미노산 공급, 단백질 공급, 영양공급, 생리활성성분 함유, 건강증진 및 유지의 기능성을 갖는 것으로 규정되어 있으며, 2005년 4월 '개별인정형 원료성분인정'에서 콜레스테롤 수치를 낮추는 기능이 있음을 인정 받았다. 또한 스피루리나 추출물은 항암 및 항산화 효과, 바이러스와 세균의 증식 억제, 면역 증강 등의 생리활성을 보이는 성분을 함유하고 있는 것으로 알려져 있다 [9-12].

스피루리나 추출물의 제조방법은 열수 혹은 유기용매

¹청운대학교 식품영양학과

*교신저자: 인만진(manjin@chungwoon.ac.kr)

를 사용하는 단순한 추출법과 CO₂를 사용하는 초임계 추출법이 보고되어 있다[12-14]. 온수나 유기용매를 사용하는 추출법은 제조 방법은 간단하나 추출물의 수율이 20% 미만으로 낮으므로 스피루리나에 함유되어 있는 성분의 손실이 큰 단점이 있으며 특히 유기용매 추출물을 식품용으로 사용하는 경우 유기용매의 잔류도 문제가 될 수 있다. 또한 초임계 추출법은 고가의 추출 설비가 필요한 단점이 있다. 따라서 전보[15]에서는 스피루리나 추출의 효율을 향상시키기 위하여 효소 처리 후 열수로 추출하는 제조 방법으로, 세포벽 분해 효소와 단백질 분해 효소의 사용이 고형분의 회수율과 유용 성분의 지표로 260 nm에서 흡광도를 보이는 핵산 관련 성분의 함량에 미치는 영향을 보고하였다. 본 연구에서는 특히 스피루리나 추출물 제조 과정에서 추출물의 수율과 품질에 중요한 영향을 미치는 단백질 분해 효소의 처리 조건을 최적화하여 효율적인 스피루리나 추출물의 제조공정을 제시하였다.

2. 재료 및 방법

2.1 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, 단백질 분해 효소로 Novozymes사(Bagsvaerd, Denmark)의 Alcalase 2.4L을 사용하였다.

2.2 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 pH 7.5-8.0으로 조절하였다. 효소 분해는 스피루리나 현탁액에 먼저 Tunicase를 첨가하고 40℃에서 1시간 처리하여 세포벽을 분해시킨 후 Alcalase를 반응시키는 2단계로 실시하였다. 모든 효소는 스피루리나 분말의 중량을 기준으로 0-4%(w/w) 범위에서 첨가하였다. 효소 처리가 끝난 반응액은 20분간 끓여서 효소 반응을 정지시킨 다음 1,000 x g로 10분간 원심분리하여 상등액을 얻은 후 이를 분석에 사용하였다.

2.3 분석 방법

추출 수율은 기존의 방법과 동일하게 고형분 회수율 (solid recovery)로 나타내었으며 원료로 사용한 스피루리나 분말과 동결 건조하여 얻은 추출물의 중량비로 계산하였다. 클로렐라 추출물에서 *chlorella growth factor* (CGF)의 함량을 표시하는 것과 동일하게[16] 스피루리나 추출물 중 260 nm에서 흡광도를 보이는 핵산 관련 성분의 함량을 나타내는 방법으로 *spirulina extraction* (SE) index를 다음 식으로 계산하여 사용하였다[15].

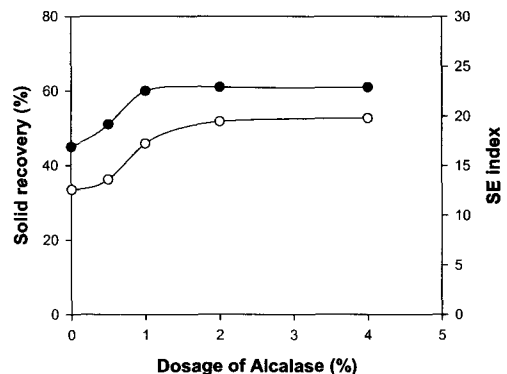
$$SE\ index = A \times D \times W_1 / W_2$$

여기서 A는 260 nm에서 상등액의 흡광도, D는 상등액의 희석배수, W₁은 동결건조한 추출물의 중량, W₂는 스피루리나 분말의 중량을 나타낸다.

3. 결과 및 고찰

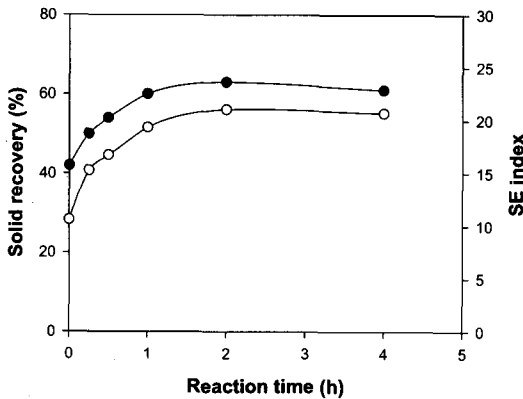
3.1 단백질 분해 효소의 최적화

상업용 산백질 분해 효소 중 스피루리나 추출물의 제조에서 고형분 회수율과 SE index를 향상시키기 위해 Esperase와 Alcalase가 적합하였다[15]. 두 효소 중 Alcalase는 매우 높은 고형분 회수율을 보였으며 식품용 효소이므로 Alcalase를 선택하여 연구를 진행하였다. Alcalase의 최적 사용량을 설정하기 위하여, Alcalase를 스피루리나 중량의 0-4%로 첨가한 후 2시간 반응시킨 결과, 고형분 회수율과 SE index는 Alcalase 사용량에 비례하여 증가하였으며 1% 이상의 조건에서는 효소 사용량이 증가하여도 거의 일정한 결과를 나타내었다 [그림 1].



[그림 1] Alcalase 사용량이 고형분 회수율(●)과 spirulina extraction index(○)에 미치는 영향

Alcalase를 1%로 처리한 결과를 효소를 사용하지 않은 결과와 비교하면 고형분 회수율은 30% 이상, SE index는 35% 이상 향상되었다. 그러므로 Alcalase의 사용량은 1%가 적당하였다. 효소 반응 시간을 결정하기 위하여 Alcalase를 1%로 첨가한 후 경시적으로 고형분 회수율과 SE index의 변화를 분석하였다. 그 결과 고형분 회수율과 SE index는 반응 시간의 경과에 따라 향상되었으며 2시간 반응 후 최대로 되었고 그 이상 반응시켜도 고형분 회수율과 SE index는 증가하지 않았다 [그림 2]. 따라서 Alcalase의 반응시간은 2시간으로 결정하였다. 이상의 결과는 스피루리나 단백질이 단백질 분해 효소에 의하여 가수분해되어 분자량이 작아짐으로써 용해도가 증가되었기 때문인 것으로 사료된다.



[그림 2] Alcalase 처리시 반응시간에 따른 고형분 회수율 (●)과 spirulina extraction index(○)의 변화

이와 같은 결과는 단백질 분해 효소를 사용하여 효모나 헤모글로빈을 분해하였던 기존의 보고[17, 18]와 일치하는 결과이다. 본 연구와 유사하게 Esperase는 클로렐라 추출물의 연구에서도 효과적인 단백질 분해 효소로 보고되어 있으며, 1%를 사용하는 것이 클로렐라 단백질의 분해에 효과적인 것으로 보고되어 있다[16]. 또한 Esperase로 스피루리나 단백질을 가수분해하는 경우에는 2%가 적합하였다[15].

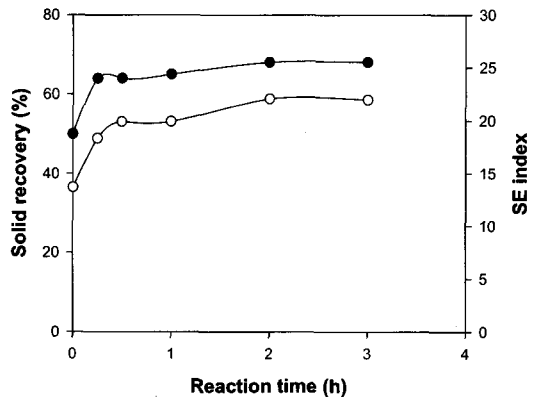
3.2 효소 처리 순서의 최적화

스피루리나 추출물을 제조를 위하여 1차로 세포벽을 파쇄하는 것이 필요하다. 간편하고 효율적인 방법으로 세포벽을 분해하는 효소를 사용하였다. 본 연구에서는 *Arthrobacter* sp. ATCC 21712기원의 것으로 pH 8.0에서

효모의 세포벽을 분해시켜 효모를 lysis시키는 활성을 나타내는 효소인 Tunicase를 사용하였다. Tunicase를 1%(w/w) 스피루리나 현탁액을 기준으로 스피루리나 증량의 2%(w/w)로 첨가하고 1시간 반응시키는 것이 추출물의 고형분 회수율과 SE index를 최대로 하는 조건이었다[15]. 따라서 효소 처리 순서의 최적화 연구에도 기존의 결과를 이용하였다. 세포벽 분해 효소와 단백질 분해 효소의 처리 순서와 방법을 최적화하기 위하여 스피루리나 현탁액에 선별한 효소를 2가지 방법으로 처리하였다.

3.2.1 세포벽 분해 효소와 단백질 분해 효소의 동시 처리

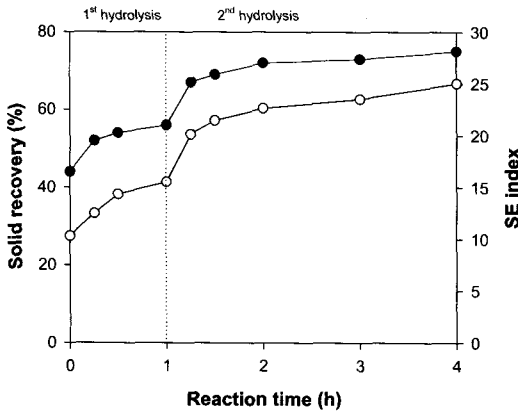
스피루리나 현탁액 (pH 8.0)에 Tunicase 2%와 Alcalase 1%를 동시에 처리하고 50℃에서 반응시켰다. 효소 반응 1시간 이내에 고형분 회수율과 SE index는 평형에 도달하였다. [그림 3]에 나타난 것처럼, 1시간 반응시킨 결과 단순 열수 추출(반응 0시간)보다 고형분 회수율은 약 30%(50.0% → 65.0%), SE index는 약 45%(13.7 → 19.9) 증가하였다. 두 종류의 효소를 동시에 처리하면 반응 시간이 단축되는 장점이 있으며 단백질 분해 효소를 포함하여 작용 기작이 상이한 두 종류의 효소를 효모 [17] 또는 클로렐라[16]에 동시에 처리하여 분해 효율을 향상되었다는 보고도 있다. 그러나 두 효소의 반응 온도와 pH가 상이한 경우에는 동시에 처리하기 곤란하다. 본 연구에서 두 효소 동시 처리 효과가 기존의 보고보다 미흡한 것은 Tunicase(최적온도 40℃)와 Alcalase(최적온도 50-60℃)의 반응 온도 차이에 기인하는 것으로 사료된다.



[그림 3] Tunicase와 Alcalase의 동시 처리시 반응시간에 따른 고형분 회수율(●)과 spirulina extraction index(○)의 변화

3.2.2 세포벽 분해 효소와 단백질 분해 효소의 순차적 처리

스피루리나 현탁액 (pH 8.0)에 먼저 Tunicase 2%를 가하고 40℃에서 1시간 반응시킨 후 50℃, pH 8.0에서 2차로 Alcalase 1%를 처리하여 반응시켰다. Tunicase를 이용한 1차 가수분해 반응은 전보[15]와 유사한 경향을 보였으며, 2차 가수분해로 단백질 분해 효소를 사용한 결과 고형분 회수율과 SE index는 다시 한번 증가하였다. 2차 가수분해의 반응 시간은 Alcalase만을 처리한 [그림 2]의 결과보다 단축되어 1시간이 적절하였다 [그림 4].



[그림 4] Tunicase와 Alcalase의 순차적 처리시 반응시간에 따른 고형분 회수율(●)과 spirulina extraction index(○)의 변화

순차적 처리로 Alcalase로 1시간 반응시킨 결과 단순 열수 추출(반응 0시간)보다 고형분 회수율은 약 60%(44.0% → 72.0%), SE index는 약 120%(10.3 → 22.6) 증가하였다. 작용 기작과 반응 조건이 상이한 두 종류의 효소는 처리함에 있어 각 효소의 최적 반응 조건에서 반응시킬 수 있는 순차적 처리법이 효과적임을 나타낸다. 탈지 대두박[19]이나 헤모글로빈[18]의 가수분해에서도 유사한 결과가 보고되어 있다.

이상의 결과를 대조구로 효소를 사용하지 않은 조건과 Tunicase와 Alcalase를 각각 사용한 조건을 포함하여 효소처리 조건에 따른 고형분 회수율과 SE index를 3회 반복하여 [표 1]에 정리하였다. 효소를 사용하는 것이 단순 열수 추출보다는 효과적이었으며, Tunicase와 Alcalase를 단독으로 사용하는 것보다 두 종류의 효소를 모두 사용하는 것이 효과적이었다. 그러나 Tunicase와 Alcalase를 동시에 반응시킨 경우 고형분 회수율은 66.5%, SE index는 21.1이며, 순차적으로 반응시킨 경우엔 70.7%와 22.8로 두 효소를 순차적으로 처리하는 것이 효과적이었다. Tunicase와 Alcalase를 순차적으로 반응시키는 경우 단순 열수 추출보다 고형분 회수율은 약 56%(45.2% → 70.7%), SE index는 약 100%(11.4 → 22.8) 증가하였다. 결론적으로 스피루리나 추출물을 제조하기 위한 기초적인 process diagram을 제안하면 [그림 5]와 같다.

[표 1] 스피루리나 추출물의 제조에서 효소 처리 방법의 영향

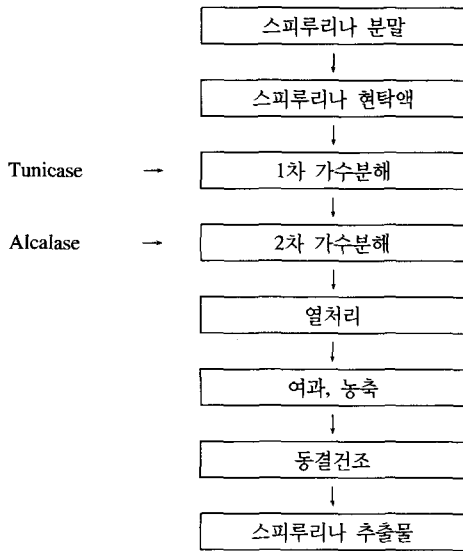
Enzyme treatments	Reaction conditions	SE index ¹⁾	Solid recovery ¹⁾ (%)
No treatment ²⁾	Extraction (boiling, 20 min)	11.43±1.60	45.20±4.95
Single-step hydrolysis ²⁾ (T ³⁾ 2%)	Hydrolysis (pH 8.0, 40℃, 1 h) → Extraction (boiling, 20 min)	17.52±1.41	55.25±2.12
Single-step hydrolysis (A ⁴⁾ 1%)	Hydrolysis (pH 7.5, 50℃, 2 h) → Extraction (boiling, 20 min)	19.35±1.58	60.20±1.41
Single-step hydrolysis (T 2% + A 1%)	Hydrolysis (pH 8.0, 50℃, 2 h) → Extraction (boiling, 20 min)	21.12±0.05	66.50±1.41
Two-step hydrolysis (T 2% → A 1%)	Hydrolysis [pH 8.0, (40℃, 1 hr → 50℃, 2 h)] → Extraction (boiling, 20 min)	22.84±0.80	70.67±4.24

¹⁾ 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).

²⁾ Taken from In *et al.* [15].

³⁾ T: Tunicase.

⁴⁾ A: Alcalase.



[그림 5] 스피루리나 추출물을 제조하기 위한 기초적인 process diagram

4. 결 론

다양한 생리적인 가능성이 알려져 있는 미세조류인 스피루리나로부터 세포벽 분해 효소와 단백질 분해 효소를 이용하여 스피루리나 추출물을 효율적으로 생산할 수 있는 방법을 조사하였다. 특히 추출물의 수율과 품질에 중요한 영향을 미치는 단백질 분해 효소의 처리 조건을 최적화하여 효율적인 스피루리나 추출물의 제조공정을 제시하였다. 세포벽 분해 효소인 Tunicase는 스피루리나의 중량 기준으로 2%를 사용하였고 2시간 반응시켰다. 상업용 단백질 분해 효소로는 Alcalase를 사용하였다. Alcalase의 최적 사용량은 1%이였으며, 효소 반응 시간은 2시간이 적절하였다. Tunicase와 Alcalase의 처리 방법에서 두 효소를 동시에 반응시키는 것보다 Tunicase를 먼저 사용한 후 Alcalase를 사용하는 순차적으로 처리하는 것이 고형분 회수율과 SE index를 최대로 증가시킬 수 있는 효과적인 방법이었다. 두 효소를 순차적으로 반응시키면 단순 열수 추출보다 고형분 회수율은 약 56%(45.2% → 70.7%), SE index는 약 100%(11.4 → 22.8) 증가하였다.

참고문헌

- [1] O. Ciferri, "Spirulina, the edible microorganisms," *Microbiol. Rev.*, Vol. 47, pp. 551-578, 1983.
- [2] R. A. Kay, "Microalgae as food and supplement," *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.*, Vol. 30, pp. 555-573, 1991.
- [3] V. V. Annapurna, Y. G. Deosthale, and M. S. Bamji, "Spirulina as a source of vitamin A," *Plant Foods Hum. Nutr.*, Vol. 41, pp. 125-134, 1991.
- [4] Ö. Tokuşoglu and M. K. Ünal, "Biomass nutrition profiles of three microalgae: *Spirulina platensis*, *Chlorella vulgaris*, and *Isochrysis galbana*," *J. Food Sci.*, Vol. 68, pp. 1144-1148, 2003.
- [5] W. Y. Kim and J. Y. Park, "The effect of spirulina on lipid metabolism, antioxidant capacity and immune function in Korean elderlies," *Korean J. Nutr.*, Vol. 36, pp. 287-297, 2003.
- [6] N. Nakaya, Y. Homma, and Y. Goto, "Cholesterol lowering effect of spirulina," *Nutr. Rep. Int.*, Vol. 37, pp. 1329-1337, 1988.
- [7] O. Hayashi, T. Hirahashi, T. Katoh, H. Miyajima, T. Hirano, and Y. Okuwaki, "Class specific influence of dietary *Spirulina platensis* on antibody production in mice," *J. Nutr. Sci. Vitaminol.*, Vol. 44, pp. 841-851, 1998.
- [8] M. K. Sharma, A. Sharma, A. Kumar, and M. Kumar, "Evaluation of protective efficacy of *Spirulina fusiformis* against mercury induced nephrotoxicity in Swiss albino mice," *Food Chem. Toxicol.*, Vol. 45, pp. 879-887, 2007.
- [9] A. Hernández-Corona, I. Nieves, M. Meckes, G. Chamorro, and B. L. Barron, "Antiviral activity of *Spirulina maxima* against herpes simplex virus type 2," *Antiviral Res.*, Vol. 56, pp. 279-285, 2002.
- [10] T. Hirahashi, M. Matsumoto, K. Hazeki, Y. Sacki, M. Ui, and T. Seya, "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.*, Vol. 2, pp. 423-434, 2002.
- [11] L. -C. Wu, J. -A. Annine Ho, M. -C. Shief, and I. -W. Lu, "Antioxidant and antiproliferative activities of spirulina and chlorella water extract," *J. Agric. Food Chem.*, Vol. 53, pp. 4207-4212, 2005.
- [12] G. Ozdemir, N. U. Karabay, M. C. Dalay, and B. Pazarbasi, "Antibacterial activity of volatile

component and various extracts of *Spirulina platensis*,” *Phytother. Res.*, Vol. 18, pp. 754-757, 2004.

- [13] H. -S. Kim, C. -H. Kim, J. -H. Kim, M. -C. Kwon, J. -H. Cho, H. -G. Gwak, B. -Y. Hwang, J. -C. Kim, and H. Y. Lee, “Comparison of anticancer activities from the culture and extraction conditions of the *Spirulina platensis*,” *Kor. J. Microbiol. Biotechnol.*, Vol. 34, pp. 143-149, 2006.
- [14] L. Wang, B. Pan, J. Sheng, J. Xu, and Q. Hu, “Antioxidant activity of *Spirulina platensis* extracts by supercritical carbon dioxide extraction,” *Food Chem.*, Vol. 105, pp. 36-41, 2007.
- [15] M. -J. In, S. Y. Gwon, H. J. Chae, D. C. Kim, and D. H. Kim, “Production of spirulina extract by enzymatic hydrolysis,” *J. Korean Soc. Appl. Biol. Chem.*, Vol. 50, pp. 304-307, 2007.
- [16] M. -J. In, J. E. Jang, and D. H. Kim, “Enhancing extraction yield of chlorella extract by enzyme treatment,” *J. Appl. Biol. Chem.*, Vol. 50, pp. 132-135, 2007.
- [17] H. J. Chae, H. Joo, and M. -J. In, “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.*, Vol. 76, pp. 253-258, 2001.
- [18] M. -J. In, H. J. Chae, and N. -S. Oh, “Process development for heme-enriched peptide by enzymatic hydrolysis of hemoglobin,” *Bioresource Technol.*, Vol. 84, pp. 63-68, 2002.
- [19] H. J. Chae, M. -J. In, and M. H. Kim, “Optimization of enzymatic treatment for the production of hydrolyzed vegetable protein,” *Korean J. Food Sci. Technol.*, Vol. 29, pp. 1125-1130, 1997.

인 만 진(Man-Jin In)

[정회원]



- 1985년 2월: 서울대학교 농화학
과 (농학사)
- 1987년 2월: 서울대학교 농화학
과 (농학석사)
- 1997년 2월: 서울대학교 농화학
과 (농학박사)
- 1999년 9월~현재: 청운대학교
식품영양학과 교수

<관심분야>

건강 기능성 식품 및 그 소재