

클로렐라(*Chlorella pyrenoidosa*) 단백질 추출을 위한 친환경 추출법 탐색

조경진¹ · 김민웅¹ · 김도균¹ · 한서진¹ · 강주홍¹ · 윤다현¹ · 최지선¹ · 김영목^{1,2*}

¹국립부경대학교 식품공학과, ²국립부경대학교 식품과학부

Exploring Eco-friendly Methods for Protein Extraction from *Chlorella pyrenoidosa*

Kyung-Jin Cho¹, Min-Ung Kim¹, Do-Kyun Kim¹, Seo-Jin Han¹, Ju-Hong Kang¹, Da-Hyeon Yoon¹, Ji-Sun Choi¹ and Young-Mog Kim^{1,2*}

¹Department of Food Science and Technology, Pukyong National University, Busan 48513, Republic of Korea

²Division of Food Science, Pukyong National University, Busan 48513, Republic of Korea

In this study, we investigated eco-friendly physical and enzymatic methods for extracting proteins from *Chlorella pyrenoidosa* via cell wall decomposition. The physical methods used were hot-water extraction (HW), sonication (S), and ultrasonication (US), whereas the enzymatic methods included two cell wall-decomposing enzymes (cellulase and viscozyme L) and three proteolytic enzymes (microbial protease, papain, and bromelain) at a 1% substrate concentration. The results showed that HW and S were unsuitable for extracting chlorella proteins because of their low protein extraction yields. Conversely, among the physical treatment methods, US showed the highest protein extraction yield of 16.78±0.47%. However, physical methods can cause protein denaturation due to temperature increases with extended treatment time. In enzymatic treatment, only microbial protease proved effective, achieving the highest protein extraction yield of 36.26±2.32% after 6 h of treatment. The use of mixed enzymes did not significantly improve the yield compared to treatment with microbial protease alone. This study suggests that microbial protease is an effective method for protein extraction from chlorella and highlights its potential for application in the food industry as foundational data.

Keywords: *Chlorella pyrenoidosa*, Protein extraction, Physical method, Enzymatic method

서론

기존 육상 양식 및 재배 등의 식량을 생산하는 방법은 환경 오염, 온실가스 배출, 생태계 파괴 및 자원 남용으로 토양 황폐화를 야기하여 식량의 대량생산을 위한 새로운 접근법이 필요하다(Sporchia et al., 2024). 특히, 단백질은 인체를 구성하는 주요 성분으로, 미래의 식량 자원에서 중요한 역할을 할 것으로 여겨지고 있다(Gasser, 2023). 이러한 이유로 새로운 단백질 공급원에 대한 연구가 필요하며, 높은 단백질 함량과 이산화탄소 배출이 적은 해양생물이 미래 식량 자원으로 대두되고 있다(Kumar et al., 2022). 미세조류는 담수 소비량이 낮고 생육에 필요한 육상의 면적이 적으며 비경작지와 해수에서 자랄 수 있어 지

속가능한 단백질 공급원으로 부상되고 있다(Mata et al., 2010, Raheem et al., 2018). 미세조류는 탄수화물, 단백질, 지방, 무기질, 비타민 등 영양성분이 풍부하며 특히, 클로렐라는 건물 기준 약 60%의 높은 단백질 함량과 필수 아미노산이 다량 함유되어 있다(Bito et al., 2020). 또한, 클로렐라는 피부건강, 항산화, 면역력 증진 및 혈중 콜레스테롤 개선의 기능성으로 식품의약품안전처에 기능성 식품원료로 등재되어 있으며(MFDS, 2024), 이러한 기능성을 활용한 식품 첨가물 및 식품 개발에 대한 연구가 진행되고 있다(Widyaningrum and Prianto, 2021; Mócsai et al., 2024). 클로렐라는 단단한 세포벽을 가지고 있어, 세포벽 내부에 분포되어 있는 단백질 및 기능성 생리활성 물질을 활용하는 데 어려움이 있다(Hildebrand et al., 2020). 이에

*Corresponding author: Tel: +82. 51. 629. 5832 Fax: +82. 51. 629. 5824

E-mail address: ymkim@pknu.ac.kr



This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial License (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/3.0/>) which permits unrestricted non-commercial use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

<https://doi.org/10.5657/KFAS.2024.0684>

Korean J Fish Aquat Sci 57(6), 684-690, December 2024

Received 13 November 2024; Revised 26 November 2024; Accepted 29 November 2024

저자 직위: 조경진(대학원생), 김민웅(대학원생), 김도균(대학원생), 한서진(대학원생), 강주홍(대학원생), 윤다현(대학원생), 최지선(대학원생), 김영목(교수)

NaOH, HCl, 황산 암모늄 등의 유기용매를 사용하여 클로렐라의 유용성분을 추출하고 있지만 안전성 문제가 있으며, 유용성분이 변성될 우려가 있다(Zwander et al., 2024). 또한, 지속가능한 단백질 공급원으로 사용하기 위해서는 친환경적인 방법이 필요하다. 클로렐라와 같은 미세조류 등의 세포벽 내부에 존재하는 유용 성분을 추출하기 위해 물리적 처리 및 효소 처리 등의 친환경적인 방법이 사용되고 있다(Weber et al., 2022). 물리적 처리는 bead milling (Postma et al., 2015), ultrasonication (Skorupskaite et al., 2019), microwave radiation (Huang et al., 2016) 및 homogenizer (Spínola et al., 2023)에 대한 연구가 진행되고 있다. 효소 가수분해는 미세조류의 세포벽과 같은 생체 구조를 분해하는 친환경적인 방법으로 효소의 높은 기질 선택성, 낮은 에너지 소비로 인해 다양한 산업 분야에서 연구가 활발히 이루어지고 있다(Da Silva et al., 2020; Patel et al., 2021; Guo et al., 2024). 따라서 본 연구에서는 초음파 처리, 열수 처리 및 효소 처리 등의 친환경적인 방법을 사용하여 식품에 사용할 수 있는 클로렐라 단백질을 효과적으로 추출하는 기술을 탐색하고자 하였다.

재료 및 방법

시료 및 시약

Chlorella pyrenoidosa 분말은 (주)정우당(Seoul, Korea)에서 구매하여 실험에 사용하였다. 실험에 사용한 효소 microbial protease (≥ 16 U/g; *Bacillus* sp.), papain (≥ 10 U/mg protein; *Carica papaya*), bromelain (≥ 3 U/mg protein; pineapple stem), cellulase (≥ 700 U/g; *Trichoderma reesei*) 및 viscozyme L (≥ 100 U/g; *Aspergillus* sp.)은 Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA)에서 구입하였으며, 0.1 N NaOH 및 0.1 N HCl은 덕산과학(Seoul, Korea)에서 구입하였다.

열수 처리

열수 추출(hot water, HW)은 In (2020)의 방법을 참고하여 수행하였다. 클로렐라 10 g과 증류수 200 mL를 혼합하여 5% (v/v) 농도의 클로렐라 현탁액을 제조하였다(Stack et al., 2018). 제조한 클로렐라 현탁액은 95°C 항온수조에 넣고 10, 20, 30 min 동안 추출하였다. 이후 원심분리기(Hanil Scientific, Inc., Gimpo, Korea)를 이용하여 10,000 g, 20 min 간 원심분리 후 상등액을 시료로 사용하였다.

초음파 처리

초음파 처리는 프로브 형태의 ultra sonicator (US; frequency 20 kHz; Sonics & Materials, Inc., Newtown, CT, USA)와 수조 형태의 sonicator (frequency 40 kHz; Hwashin Technology, Seoul, Korea)를 사용하여 클로렐라 단백질을 추출하였다(O'Connor et al., 2020). HW와 동일한 부피와 농도의 클로렐라 현

탁액을 제조한 뒤 초음파 처리를 하였다. US는 자사 매뉴얼에 따라 용량과 probe에 맞게 amplitude 60 (US60), 80 (US80), 100% (US100)의 강도로 10, 20, 30 min 간 처리하였으며, sonicator (S)는 기기에서 제공하는 파워 출력 단계인 1단계(100 W; S1), 2단계(250 W; S2) 및 3단계(400 W; S3)의 세기로 10, 20, 30 min 처리하였다. 이후 원심분리(10,000 g, 20 min)하여 상등액을 시료로 사용하였다.

효소 처리

클로렐라 단백질 추출을 위해 사용한 효소는 단백질 분해효소(microbial protease, papain 및 bromelain)와 세포벽 분해효소(cellulase 및 viscozyme L)를 사용하였다. 효소 처리는 Wang et al. (2024)의 방법을 참고하여 각 효소의 단일 처리 및 복합 처리로 나누어 두 가지 방법으로 진행하였다.

단일 효소 처리

물리적 처리와 동일한 방법으로 제조한 5% 클로렐라 현탁액에 기질 대비 각 효소를 1% (v/w) 첨가하였으며, 효소를 첨가하지 않은 현탁액은 대조군으로 사용하였다. 클로렐라 현탁액의 pH는 0.1 N의 HCl 또는 NaOH를 이용하여 효소 반응의 최적조건(microbial protease pH 10.0, papain pH 6.0, bromelain pH 6.0, cellulase pH 5.0, viscozyme L pH 5.0)으로 조정하였다. 이후 18 h 동안 50°C에서 150 rpm으로 진탕하였으며, 3 h 간격으로 시료를 채취하였다. 채취한 시료는 열처리(95°C, 10 min)로 효소 반응을 종료시킨 뒤 원심분리(10,000 g, 20 min)하여 상등액을 시료로 사용하였다.

복합 효소 처리

복합 효소 처리는 cellulase 처리 후 microbial protease를 사용하는 것(CP)과 반대로 microbial protease 처리 후 cellulase를 사용하는 조건(PC)으로 실험하였다. CP는 클로렐라 현탁액에 cellulase를 기질 대비 1%씩 첨가한 후 단독 cellulase 처리와 동일한 조건으로 3 h 처리 후, microbial protease를 기질 대비 1% 첨가하여 단독 microbial protease 처리와 동일한 조건으로 3 h 추가 반응시켰다. PC는 CP와 동일한 방법으로 microbial protease를 먼저 처리하였다. 이후 열처리(95°C, 10 min)로 효소 반응을 종료시켰으며, 원심분리(10,000 g, 20 min)하여 상등액을 시료로 사용하였다.

단백질 추출 수율

클로렐라 단백질 추출 수율은 Krieg et al. (2005)의 방법을 참고하여 bicinchoninic acid assay (BCA; Pierce™ BCA Protein Assay Kit, Thermo Fisher Scientific, Rockford, IL, USA)를 사용하였다. 96-well plate에 200 μ L의 염색 용액과 단계별로 희석한 샘플 25 μ L를 혼합한 뒤, 37°C에서 30분간 배양하였다. 이후 562 nm에서 흡광도를 측정하여 단백질 함량을 계산하였다. 단백질 정량을 위한 표준곡선은 bovine serum albumin을 표준

물질로 분석하였다. 단백질 추출 수율은 다음과 같은 방정식으로 계산하였다.

$$\text{Protein extraction yield (\%)} = P_1/P_0 \times 100$$

P_1 은 물리적 및 효소적 처리 후의 클로렐라 추출물의 단백질 함량(mg/mL)이고, P_0 는 처리하지 않은 클로렐라 현탁액의 단백질 함량(mg/mL)이다.

통계 처리

모든 실험은 3반복 수행하였으며, 실험 결과는 평균(mean) ± 표준편차(standard deviation)로 나타내었다. 통계처리는 SPSS 29 (IBM SPSS Advanced Statistics; Chicago, IL, USA)를 이용하여 분산분석(ANOVA)을 수행한 후 다중범위검정(Duncan's multiple range test)를 실시하여 유의성을 검증하였다($P < 0.05$).

결과 및 고찰

물리적 처리를 통한 클로렐라 단백질 추출 결과

물리적 처리에 따른 클로렐라 단백질 추출 수율은 Fig. 1

에 나타내었다. HW는 10 min ($5.42 \pm 0.78\%$)에서 30 min ($7.58 \pm 0.71\%$)으로 시간이 증가할수록 클로렐라 단백질 추출 수율이 증가하였다(Fig. 1A). 그러나, S 처리의 경우 S1, S2, S3 모두 시간이 증가할수록 클로렐라 단백질 추출 수율이 감소하였다(Fig. 1B). 또한, 초음파의 세기가 강해질수록 추출 수율이 감소하는 것으로 나타났다. S 및 HW는 단백질 추출 수율이 10% 아래로 나타나 클로렐라 단백질 추출에 큰 영향을 주지 않는 것으로 사료된다. US 처리의 경우, US60, US80 및 US100 모두 처리 시간이 증가함에 따라 수율도 증가하였으며, US80 30 min 처리 시 클로렐라 단백질 추출 수율이 $16.78 \pm 0.47\%$ 로 가장 높게 나타났다(Fig. 1C). 그러나 Fig. 1D에서 나타낸 바와 같이, US 처리 시간이 길어질수록 온도가 상승하는 것으로 확인되었으며, 이는 클로렐라 단백질 변성을 야기할 수 있다. US80에서 US100보다 높은 단백질 추출 수율이 나타났는데, 이는 파동이 강한 US100에서 클로렐라의 단백질이 변성되어 침전된 것으로 사료되며, 본 연구에서는 상등액을 시료로 하였기에 단백질 추출 수율이 감소한 것으로 사료된다(Zhou and Labuza, 2011). Wang and Jang (2012)은 초음파 처리 시 *C. pyrenoidosa*의 단백질 추출 수율이 약 17%로 보고하였으며, 본

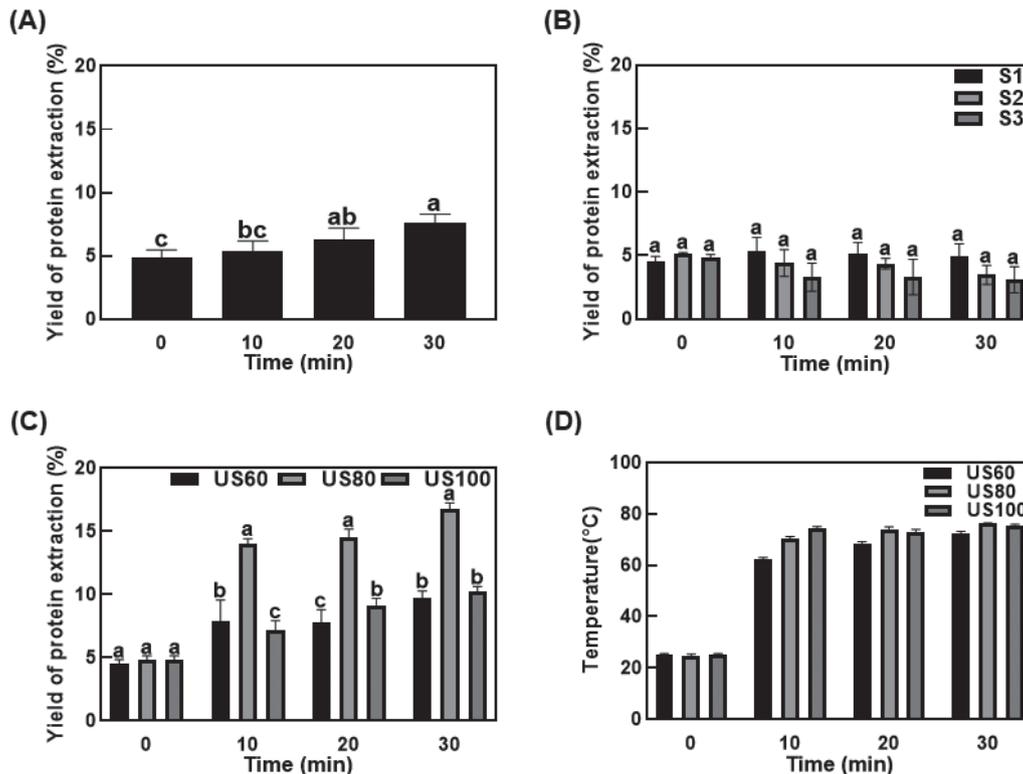


Fig. 1. Protein extraction yield from *Chlorella pyrenoidosa* by physical treatment. A, Hot water treatment; B, Sonication treatment; C, Ultrasonication treatment; D, Temperature of ultrasonication treatment; S1, Sonication power low; S2, Sonication medium; S3, Sonication power high; US60, Ultrasonication amplitude 60%; US80, Ultrasonication amplitude 80%; US100, Ultrasonication amplitude 100%. Values with different letters differ significantly ($P < 0.05$).

연구 결과와 유사하다. 또한, Schwenzfeier et al. (2011)의 연구에서 bead milling과 원심분리 처리 시 *Tetraselmis* sp.의 단백질 추출 수율이 7.56%로 보고하였다. 클로렐라의 세포벽은 cellulose, chitin과 같은 당류와 아미노당인 glucosamine으로 이루어져 있으며 세포벽 사이의 layer를 단백질이 지지하고 있는 구조로 외부의 스트레스에 대해 강한 저항성을 가지는 것으로 보고되어 있어(Weber et al., 2022), 물리적 처리는 클로렐라 단백질 추출에 적합하지 않은 것으로 사료된다.

세포벽 분해 효소를 이용한 클로렐라 단백질 추출 결과

효소를 통한 추출법은 친환경적이며 비교적 상온에서 처리할 수 있기 때문에 추출하고자 하는 성분의 변성이 적다는 장점이 있어 산업적으로 많이 활용되고 있다(Potkule et al., 2024). 따라서 본 연구에서는 세포벽 분해효소와 단백질 분해효소를 클로렐라의 단백질 추출을 위해 사용하였다. 세포벽 분해효소를 이용한 클로렐라 단백질 추출 수율은 Fig. 2에 나타내었다. 세포벽 분해효소인 cellulase는 6 h 처리 시 5.25 ± 0.69%로 클로

렐라 단백질 추출 수율이 가장 높았으며, 이후 감소하는 경향을 보였다. Viscozyme L은 3 h에서 7.08 ± 0.41%로 단백질 추출 수율이 가장 높았다. Cellulase 및 viscozyme L 모두 18 h까지 클로렐라 단백질 추출 수율이 10% 아래로 세포벽 분해 효과가 미비한 것으로 나타났다. 클로렐라 단백질은 세포벽의 층 사이에 존재하여 각 층을 연결하는 지지체의 역할을 하며(Ye et al., 2023), cellulase는 단백질 결합을 끊을 수 없기 때문에 클로렐라 내부 단백질이 용출되지 않은 것으로 사료된다.

단백질 분해효소를 이용한 클로렐라 단백질 추출 결과

단백질 분해효소를 이용한 클로렐라 단백질 추출 수율은 Fig. 3에 나타내었다. 모든 처리 시간에서 microbial protease, papain 및 bromelain 순으로 단백질 추출 수율이 높았다. Microbial protease는 6 h 처리 시 36.26 ± 2.32%로 클로렐라 단백질 추출 수율이 가장 높았으며, 이후 18 h까지 추출 수율이 감소하는 것으로 나타났다. Papain은 12 h 처리 시 단백질 추출 수율이 10.00 ± 0.63%로, bromelain은 9 h에 7.57 ± 0.89%로 단백

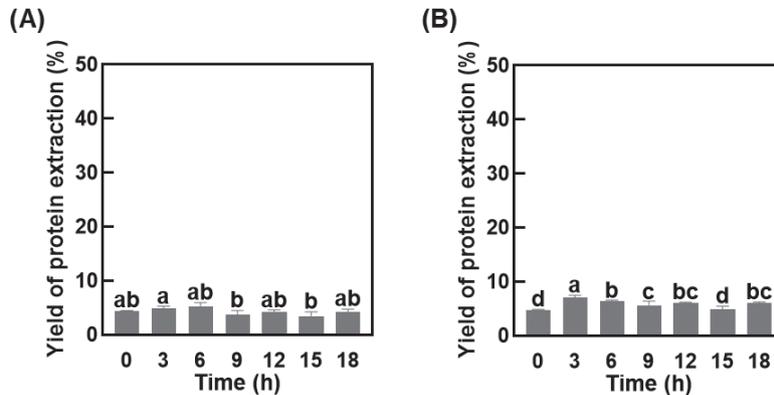


Fig. 2. Protein extraction yield from *Chlorella pyrenoidosa* by treatment with cell wall lysis enzymes. A, Cellulase; B, Viscozyme L. Values with different letters differ significantly ($P < 0.05$).

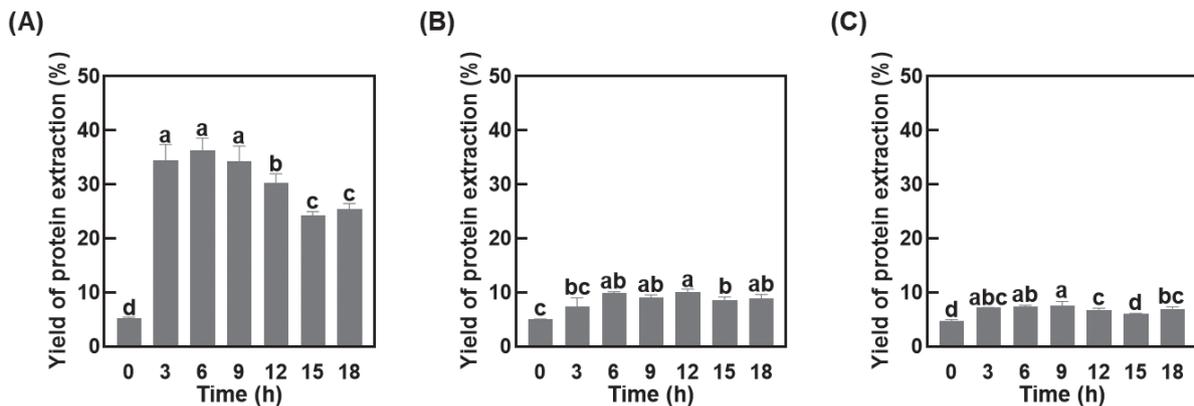


Fig. 3. Protein extraction yield from *Chlorella pyrenoidosa* by treatment with proteolytic enzymes. A, Microbial protease; B, Papain; C, Bromelain. Values with different letters differ significantly ($P < 0.05$).

질 추출 수율이 증가하였으며 이후 모두 감소하였다. 이는 효소 처리의 시간이 지나면서 단백질의 구조를 변화시키고 효소와의 상호작용을 방해할 수 있어, 단백질이 효소와 결합하지 못하거나, 다른 형태로 변형되어 추출 수율이 감소할 수 있다. 또한, Akharume (2021)는 효소 처리로 인한 단백질 변형은 단백질의 용해성에 영향을 미칠 수 있으며, 이는 최종 단백질 추출 수율 저하의 주요 원인이 될 수 있다고 보고하였다. Microbial protease, papain, bromelain은 식물성 소재의 세포벽을 분해하는데 효율적인 것으로 알려져 있지만(Xu et al., 2020), microbial protease만 추출 수율이 높은 것은 본 연구에서 사용한 효소 unit의 차이에 기인한 것으로 사료된다. 또한, papain 및 bromelain의 최적 pH가 중성인 반면, microbial protease의 최적 pH가 10으로 다른 효소에 비해 높아 세포벽이 약해진 것이 원인으로 사료된다(Weber et al., 2022). 또한, 앞서 언급한 것처럼 클로렐라 세포벽의 층 사이에 지지체의 역할을 하는 단백질이 존재하기 때문에 단백질 분해 효소에 의해 세포벽이 분해되는 것으로 사료된다. Safi et al. (2014)는 pH 12에서 2 h 동안 알칼리 처리를 하였을 때, *C. vulgaris*의 단백질 추출 수율이 33.20%로 보고하였다. 또한, Zhang et al. (2018)은 60% 알코올 처리 시 *C. pyrenoidosa*의 단백질 추출 수율이 27.79%로 보고하였다. Microbial protease 처리하였을 때와 상기 연구들과 유사한 결과가 나타났으며, 효과적으로 클로렐라 단백질을 추출할 수 있는 것을 확인하였다. 그러나, 클로렐라 단백질을 위한 효소 처리 시 클로렐라 세포벽 구조 변화와 효소 종류 및 처리 조건에 대한 정확한 작용 기작에 대해 보고된 연구는 아직 없어서 추가적인 연구가 필요할 것으로 사료된다.

복합 효소 처리를 이용한 클로렐라 단백질 추출 결과

클로렐라 세포벽 구조인 cellulose와 protein을 분해하여 내부 단백질을 추출하기 위해 효소를 복합적으로 처리하였다. 본 연구에서 클로렐라 단백질 추출에 있어 가장 효과가 좋았던 microbial protease와 세포벽의 주요 성분 중 하나인 cellulose 분해효소인 cellulase를 처리한 클로렐라 단백질 추출 수율은 Fig. 4에 나타내었다. CP는 $35.5 \pm 1.16\%$ 로 나타났으며, 단일로 microbial protease를 처리하였을 때 클로렐라 단백질 추출 수율($36.26 \pm 2.32\%$)과 유의적인 차이가 없었다($P > 0.05$). PC의 경우 클로렐라 단백질 추출 수율이 $29.5 \pm 0.3\%$ 로 나타났으며, microbial protease 단일 처리군보다 추출 수율이 낮았다. 이는 microbial protease가 클로렐라 단백질 추출에 있어 중요한 역할을 하는 것으로 사료된다. Cellulase를 추가 처리하였을 때, 단백질 추출 수율이 증가하지 않은 것은 cellulase가 세포벽을 약화시켜 구조가 변화하였더라도 단백질의 안정성에 부정적 영향을 미쳤을 수도 있다. PC가 단일 microbial protease 보다 단백질 추출 수율이 낮은 것은 효소 처리 과정에서 pH의 영향을 받아 단백질 구조가 변화되거나 변성이 일어나 단백질 추출에 방해요인으로 작용하였을 수 있다. 복합적인 효소의 처리는 산업

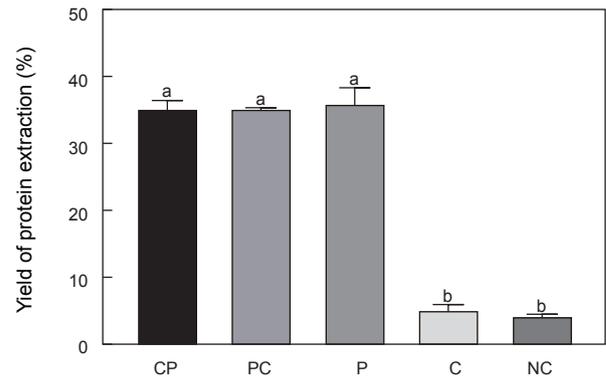


Fig. 4. Protein extraction yield from *Chlorella pyrenoidosa* by treatment with multiple enzymes (cellulase and microbial protease). CP, Microbial protease treatment after cellulase treatment; PC, Cellulase treatment after microbial protease treatment; P, Microbial protease treatment; C, Cellulase treatment; NC, Non-treatment. Values with different letters differ significantly ($P < 0.05$).

적용 시 추가적인 비용이 발생하기에 단일 효소 처리와의 단백질 추출 수율 차이가 미비한 본 연구에서는 microbial protease 단일처리가 복합처리보다 클로렐라 단백질 추출에 더 적합한 것으로 사료된다(Kumar and Verma, 2020).

본 연구는 클로렐라의 단단한 세포벽을 분해하고 세포벽 내부의 단백질을 추출하기 위한 추출 방법을 탐색하고자 하였다. 클로렐라의 세포벽을 분해하기 위해 친환경 추출법인 물리적 처리와 효소처리를 사용하였다. 물리적 방법은 클로렐라 단백질 추출 수율이 낮고, US의 경우 높은 온도로 인해 단백질이 변성될 우려가 있어 적합하지 않음을 확인하였다. 효소 처리의 경우 microbial protease를 기질 대비 1% 접종 후 3 h 처리하였을 때 클로렐라 단백질 추출 수율이 $36.26 \pm 2.32\%$ 으로 나타나 효과적으로 단백질을 추출할 수 있는 것으로 나타났다. 또한, 복합효소를 사용하였을 때와 유사하거나 높은 단백질 추출 수율을 나타냈다. 이러한 결과는 클로렐라의 단백질을 식품 산업에 적용하기 위한 기초 자료로 사용 가능할 것으로 사료되며, 추후 연구에서는 효소 처리 조건 최적화와 대량 생산에 적용하기 위한 연구가 진행되어야 할 것이다.

사 사

이 논문은 2024년도 정부(부산시)의 재원으로 부산테크노파크의 지원을 받아 수행된 연구임(2024년 수산 가공식품 혁신성장 현장밀착형 R&D 기술개발사업).

References

- Akharume FU, Aluko RE and Adedeji AA. 2021. Modification of plant proteins for improved functionality: A review. *Compr Rev Food Sci Food Saf* 20, 198-224. <https://doi.org/>

- org/10.1111/1541-4337.12688.
- Bito T, Okumura E, Fujishima M and Watanabe F. 2020. Potential of *Chlorella* as a dietary supplement to promote human health. *Nutrients* 12, 2524. <https://doi.org/10.3390/nu12092524>.
- daSilva AS, Espinheira RP, Teixeira RSS, de Souza MF, Ferreira-Leitão V and Bon EPS. 2020. Constraints and advances in high-solids enzymatic hydrolysis of lignocellulosic biomass: A critical review. *Biotechnol Biofuels* 13, 58. <https://doi.org/10.1186/s13068-020-01697-w>
- Gasser J. 2023. Role of proteins: Complex molecules present in the human body. *Enzym Eng* 12, 207. <https://doi.org/10.35248/2329-6674.23.12.207>.
- Guo X, Wu B, Jiang Y, Zhang Y, Jiao B and Wang Q. 2024. Improving enzyme accessibility in the aqueous enzymatic extraction process by microwave-induced porous cell walls to increase oil body and protein yields. *Food Hydrocoll* 147, 109407. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2023.109407>.
- Hildebrand G, Poojary MM, O'Donnell C, Lund MN, Garcia-Vaquero M and Tiwari BK. 2020. Ultrasound-assisted processing of *Chlorella vulgaris* for enhanced protein extraction. *J Appl Phycol* 32, 1709-1718. <https://doi.org/10.1007/s10811-020-02105-4>.
- Huang Y, Qin S, Zhang D, Li L and Mu Y. 2016. Evaluation of cell disruption of *Chlorella Vulgaris* by pressure-assisted ozonation and ultrasonication. *Energies* 9, 173. <https://doi.org/10.3390/en9030173>.
- In MJ. 2020. Improvement of protein extraction efficiency from defatted sesame meal with thermal and enzymatic treatments. *J Appl Biol Chem* 63, 291-295. <https://doi.org/10.3839/jabc.2020.039>.
- Krieg RC, Dong Y, Schwamborn K and Knuechel R. 2005. Protein quantification and its tolerance for different interfering reagents using the BCA-method with regard to 2D SDS PAGE. *J Biochem Biophys Methods* 65, 13-19. <https://doi.org/10.1016/j.jbbm.2005.08.005>.
- Kumar B and Verma P. 2020. Enzyme mediated multi-product process: A concept of bio-based refinery. *Ind Crops Prod* 154, 112607. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2020.112607>.
- Kumar R, Hegde AS, Sharma K, Parmar P and Srivatsan V. 2022. Microalgae as a sustainable source of edible proteins and bioactive peptides—Current trends and future prospects. *Food Res Int* 157, 111338. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2022.111338>.
- Mata TM, Martins AA and Caetano NS. 2010. Microalgae for biodiesel production and other applications: A review. *Renew Sustain Energy Rev* 14, 217-232. <https://doi.org/10.1016/j.rser.2009.07.020>.
- MFDS (Ministry of Food and Drug Safety). 2024. Current Status of Functional Ingredients Recognized in Health Functional Foods. Retrieved from https://www.foodsafetykorea.go.kr/portal/board/boardDetail.do?menu_no=3811&bbs_no=bbs464&ntctxt_no=1070220 on Nov 02, 2024.
- Mócsai R, Helm J, Polacsek K, Stadlmann J and Altmann F. 2019. The diversity of N-glycans of chlorella food supplements challenges current species classification. *Foods* 13, 3182. <https://doi.org/10.3390/foods13193182>.
- O' Connor J, Meaney S, Williams GA and Hayes M. 2020. Extraction of protein from four different seaweeds using three different physical pre-treatment strategies. *Molecules* 25, 2005. <https://doi.org/10.3390/molecules25082005>.
- Patel A, Patel H, Divecha J and Shah AR. 2021. Enhanced production of ethanol from enzymatic hydrolysate of microwave-treated wheat straw by statistical optimization and mass balance analysis of bioconversion process. *Biofuels* 10, 1251-1258. <https://doi.org/10.1080/17597269.2019.1608037>.
- Postma PR, Miron TL, Olivieri G, Barbosa MJ, Wijffels RH and Eppink MHM. 2015. Mild disintegration of the green microalgae *Chlorella vulgaris* using bead milling. *Bioresour Technol* 184, 297-304. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2014.09.033>.
- Potkule JB, Kahar SP, Kumar M and Annapure US. 2024. Impact of non-thermal techniques on enzyme modifications for their applications in food. *Int J Biol Macromol* 275, 133566. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2024.133566>.
- Raheem A, Prinsen P, Vuppaladiyam AK, Zhao M and Luque R. 2018. A review on sustainable microalgae based biofuel and bioenergy production: Recent developments. *J Clean Prod* 181, 42-59. <https://doi.org/10.1016/j.jclepro.2018.01.125>.
- Safi C, Ursu AV, Laroche C, Zebib B, Merah O, Pontalier PY and Vaca-Garcia C. 2014. Aqueous extraction of proteins from microalgae: Effect of different cell disruption methods. *Algal Res* 3, 61-65. <https://doi.org/10.1016/j.algal.2013.12.004>.
- Schwenzfeier A, Wierenga PA and Gruppen H. 2011. Isolation and characterization of soluble protein from the green microalgae *Tetraselmis* sp. *Bioresour Technol* 102, 9121-9127. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2011.07.046>.
- Skorupskaite V, Makareviciene V, Sendzikiene E and Gumbyte M. 2019. Microalgae *Chlorella* sp. cell disruption efficiency utilising ultrasonication and ultrahomogenisation methods. *J Appl Phycol* 31, 2349-2354. <https://doi.org/10.1007/s10811-019-01761-5>.
- Spinola MP, Costa MM and Prates JAM. 2023. Effect of selected mechanical/physical pre-treatments on *Chlorella vulgaris* protein solubility. *Agriculture* 13, 1309. <https://doi.org/10.3390/agriculture13071309>.
- Sporchia F, Antonelli M, Aguilar-Martínez A, Bach-Faig A, Caro D, Davis KF, Sonnino R and Galli A. 2024. Zero hunger: Future challenges and the way forward towards the achievement of sustainable development goal 2. *Sustainable Earth Reviews* 7, 10. <https://doi.org/10.1186/s42055-024->

00078-7.

- Stack J, Gouic AVL, Tobin PR, Guihéneuf F, Stengel DB and FitzGerald RJ. 2018. Protein extraction and bioactive hydrolysate generation from two microalgae, *Porphyridium purpureum* and *Phaeodactylum tricornutum*. *J Food Bioact* 1, 153-165. <https://doi.org/10.31665/JFB.2018.1134>.
- Wang W, Li J, Lu F and Liu F. 2024. Ultrasound-assisted multi-enzyme extraction for highly efficient extraction of polysaccharides from *Ulva lactuca*. *Foods* 13, 891. <http://doi.org/10.3390/foods13060891>.
- Wang X and Zhang X. 2012. Optimal extraction and hydrolysis of *Chlorella pyrenoidosa* proteins. *Bioresour Technol* 126, 307-313. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2012.09.059>.
- Weber S, Grande PM, Blank LM and Klose H. 2022. Insights into cell wall disintegration of *Chlorella vulgaris*. *PLoS One* 17, e0262500. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0262500>.
- Widyaningrum D and Prianto AD. 2021. *Chlorella* as a source of functional food ingredients: Short review. *IOP Conf Ser Earth Environ Sci* 794, 012148. <https://doi.org/10.1088/1755-1315/794/1/012148>.
- Xu Y, Galanopoulos M, Sismour E, Ren S, Mersha Z, Lynch P and Almutaimi A. 2020. Effect of enzymatic hydrolysis using endo-and exo-proteases on secondary structure, functional, and antioxidant properties of chickpea protein hydrolysates. *J Food Meas Charact* 14, 343-352. <https://doi.org/10.1007/s11694-019-00296-0>.
- Ye J, Yang C, Xia L, Zhu Y, Liu L, Cao H and Tao Y. 2023. Protoplast preparation for algal single-cell omics sequencing. *Microorganisms* 11, 538. <https://doi.org/10.3390/microorganisms11020538>.
- Zhou P and Labuza TP. 2011. Analytical methods: Differential scanning calorimetry. In: *Encyclopedia of Dairy Sciences (Second Edition)*. John WF, ed. Elsevier, Amsterdam, Netherlands, 256-263. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-374407-4.00026-1>.
- Zhang R, Chen J and Zhang X. 2018. Extraction of intracellular protein from *Chlorella pyrenoidosa* using a combination of ethanol soaking, enzyme digest, ultrasonication and homogenization techniques. *Bioresour Technol* 247, 267-272. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2017.09.087>.
- Zwander S, Chaturvedi P, Ghatak A, Weckwerth W, Marko D and Castejón N. 2024. Integrating eco-friendly approaches to produce protein extracts and hydrolysates with antioxidant properties from *Microchloropsis gaditana*. *Algal Res* 77, 103368. <https://doi.org/10.1016/j.algal.2023.103368>.