



저작자표시-비영리-변경금지 2.0 대한민국

이용자는 아래의 조건을 따르는 경우에 한하여 자유롭게

- 이 저작물을 복제, 배포, 전송, 전시, 공연 및 방송할 수 있습니다.

다음과 같은 조건을 따라야 합니다:



저작자표시. 귀하는 원저작자를 표시하여야 합니다.



비영리. 귀하는 이 저작물을 영리 목적으로 이용할 수 없습니다.



변경금지. 귀하는 이 저작물을 개작, 변형 또는 가공할 수 없습니다.

- 귀하는, 이 저작물의 재이용이나 배포의 경우, 이 저작물에 적용된 이용허락조건을 명확하게 나타내어야 합니다.
- 저작권자로부터 별도의 허가를 받으면 이러한 조건들은 적용되지 않습니다.

저작권법에 따른 이용자의 권리는 위의 내용에 의하여 영향을 받지 않습니다.

이것은 [이용허락규약\(Legal Code\)](#)을 이해하기 쉽게 요약한 것입니다.

[Disclaimer](#)

공학석사학위논문

반응 표면 분석법을 사용한 미생물 발효  
에 의한 스피루리나(*Arthrospira platensis*)  
단백질 추출 조건 최적화



2025년 2월

부경대학교대학원

식품공학과

최지선

공학석사학위논문

반응 표면 분석법을 사용한 미생물 발효  
에 의한 스피루리나(*Arthrospira platensis*)

단백질 추출 조건 최적화

지도교수 김 영 목

이 논문을 공학석사 학위논문으로 제출함

2025년 2월

부경대학교 대학원

식품공학과

최 지 선

최지선의 공학석사 학위논문을 인준함.

2025년 2월 21일



위 원 장 농학박사 양 지 영 (인)

위 원 농학박사 조 승 목 (인)

위 원 약학박사 김 영 목 (인)

## 목 차

|   |           |
|---|-----------|
| 목차 .....                                  | i         |
| 표 목차 .....                                | v         |
| 그림 목차.....                                | vii       |
| <b>Abstract .....</b>                     | <b>ix</b> |
| <b>I. 서론 .....</b>                        | <b>1</b>  |
| <b>II. 재료 및 방법.....</b>                   | <b>4</b>  |
| 1. 시료 준비 및 시약 .....                       | 4         |
| 2. 스피루리나 단백질 추출을 위한 처리 방법 .....           | 5         |
| 2.1. 물리적 처리 방법 .....                      | 5         |
| 2.2. 효소 처리 방법 .....                       | 6         |
| 2.3. 미생물 발효 방법 .....                      | 8         |
| 3. 스피루리나 단백질 추출법에 따른 수율 계산 및 아미노산 분석법.... | 10        |
| 3.1. 단백질 추출 수율 계산 .....                   | 10        |
| 3.2. 유리아미노산 분석 .....                      | 11        |
| 4. 스피루리나 발효법에 의한 단백질 추출 최적화 .....         | 13        |
| 4.1. 발효 배지 탐색.....                        | 13        |
| 4.2. Single-factor 분석 및 실험 디자인 .....      | 15        |
| 4.3. 최적 발효 조건의 검증 .....                   | 16        |
| 5. 최적 조건으로 발효한 스피루리나의 일반 성분 분석 .....      | 16        |

|   |    |
|---|----|
| 5.1. 수분.....  | 16 |
| 5.2. 회분.....  | 17 |
| 5.3. 조단백질.....                                      | 17 |
| 5.4. 조지방.....                                       | 18 |
| 5.5. 탄수화물.....                                      | 18 |
| 6. 최적 조건으로 발효한 스피루리나의 단백질 특성 분석.....                | 19 |
| 6.1. 유리 아미노산 분석.....                                | 19 |
| 6.2. SDS-PAGE.....                                  | 21 |
| 6.3. Native-PAGE.....                               | 21 |
| 7. 최적 조건으로 발효한 스피루리나에 대한 항산화 활성 측정.....             | 22 |
| 7.1. DPPH radical 소거 활성 측정.....                     | 22 |
| 7.2. ABTS radical 소거 활성 측정.....                     | 23 |
| 7.3. Ferric reducing antioxidant power (FRAP).....  | 23 |
| 7.4. Oxygen radical absorbance capacity (ORAC)..... | 24 |
| 7.5. 총 페놀 함량 측정.....                                | 25 |
| 7.6. 총 플라보노이드 함량 측정.....                            | 25 |
| 8. 통계 분석.....                                       | 26 |
| III. 결과 및 고찰.....                                   | 27 |
| 1. 스피루리나 단백질 추출 방법 탐색 결과 및 선정.....                  | 27 |
| 1.1. 물리적 처리를 이용한 스피루리나 단백질 추출.....                  | 27 |
| 1.2. 효소 처리를 사용한 스피루리나 단백질 추출.....                   | 29 |

|   |    |
|---|----|
| 1.3.미생물 발효를 통한 스피루리나 단백질 추출 .....                       | 31 |
| 1.4.유리아미노산 분석을 이용한 스피루리나 단백질 추출 방법 선정.....              | 33 |
| 2. 스피루리나 단백질 발효법을 위한 발효 배지 선정 .....                     | 36 |
| 3. 반응 표면 분석법을 이용한 스피루리나 단백질 추출을 위한 발효 최적<br>조건 확립 ..... | 38 |
| 3.1. Single-factor 분석.....                              | 38 |
| 3.2. Box-Behnken Design 을 통한 스피루리나 발효 최적화 모델 .....      | 41 |
| 3.3. 최적화된 모델의 검증 .....                                  | 55 |
| 4. 최적 조건으로 발효한 스피루리나 단백질 추출물의 특성 분석 결과 .                | 58 |
| 4.1. 일반 성분 분석 결과 .....                                  | 58 |
| 4.2. 아미노산 분석 결과 .....                                   | 60 |
| 4.3. SDS-PAGE 및 Native-PAGE 결과 .....                    | 63 |
| 4.4. 항산화 분석 결과 .....                                    | 65 |
| 4.5. 총 페놀 및 플라보노이드 함량 결과.....                           | 68 |
| IV. 요약 .....  | 71 |
| 참고문헌.....   | 74 |

## 표 목차

|  |    |
|--|----|
| Table 1. Enzymes for spirulina protein extraction .....  | 7  |
| Table 2. 11 <i>Bacillus</i> strains with high protease activity .....  | 9  |
| Table 3. HPLC condition for the free amino acids analysis of spirulina protein extraction .....  | 12 |
| Table 4. Selection of carbon and nitrogen sources for media exploration .....  | 14 |
| Table 5. Conditions for the free amino acids analysis of spirulina protein extraction .....  | 20 |
| Table 6. Composition of free amino acids of spirulina according to different extraction methods.....   | 35 |
| Table 7. Experimental range and level of independent variables designed to optimize the fermentation condition of protein extraction from spirulina..... | 42 |
| Table 8. Experimental design of independent variables for developing the optimized condition using Box-Behnken Design.....                               | 43 |
| Table 9. Box-Behnken Design of independent variables and response values (predicted and actual value).....   | 45 |
| Table 10. The polynomial equation derived from the Design-Expert program based on the various fermentation conditions for spirulina protein extraction   | 47 |
| Table 11. ANOVA for the analysis of variance and adequacy of their quadratic model .....   | 49 |

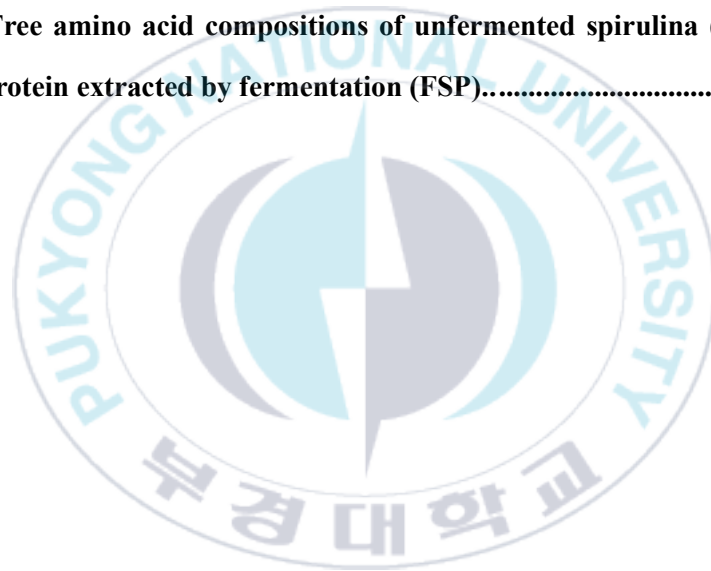
**Table 12. Regression analysis for the quadratic model..... 52**

**Table 13. Optimized model of fermentation condition to increase the yield of spirulina protein extraction..... 56**

**Table 14. Validation of the optimized model on the yield of spirulina protein extraction ..... 57**

**Table 15. Comparison of proximate compositions of spirulina..... 59**

**Table 16. Free amino acid compositions of unfermented spirulina (unFSP) and spirulina protein extracted by fermentation (FSP)..... 62**



## 그림 목차

|  |    |
|--|----|
| Fig. 1. Change of protein extraction yield from spirulina according to the treatment methods .....   | 28 |
| Fig. 2. Change of protein extraction yield from spirulina according to the treatment with different enzyme.....  | 30 |
| Fig. 3. Change of protein extraction yield from spirulina according to the various microbial fermentation.....   | 32 |
| Fig. 4. Change of protein extraction yield from spirulina according to the various media used in fermentation.....   | 37 |
| Fig. 5. The yield of protein extraction of spirulina fermented with <i>Bacillus amyloliquefaciens</i> MU2 according to various single factor .....           | 40 |
| Fig. 6. 3D response surface on the percentage of protein extraction yield according to dual factors.....   | 50 |
| Fig. 7. Comparison of predicted and actual value for yield of protein extraction. ....   | 54 |
| Fig. 8. (A) SDS-PAGE, (B) Native-PAGE analysis of protein fractions from unfermented spirulina (unFSP) and optimum condition fermented spirulina (FSP) ..... | 64 |
| Fig. 9. Comparison of antioxidant activities of between unfermented spirulina (unFSP) and optimum condition fermented spirulina (FSP). ....                  | 67 |

**Fig. 10. Comparison of phenolic content and flavonoid content of between unfermented spirulina (unFSP) and optimum condition fermented spirulina (FSP)..... 70**



Optimization of Protein Extraction Conditions from Spirulina (*Arthrospira platensis*) by  
Microbial Fermentation Using Response Surface Methodology

Ji-Sun Choi

Department of Food Science and Technology, Graduate School,  
Pukyong National University

**Abstract**

The global population continues to grow at an alarming rate, creating significant challenges in maintaining a sustainable and sufficient food supply to meet rising demand. Compounding this issue are factors such as increasing greenhouse gas emissions, environmental pollution, ecosystem degradation, and the overexploitation of land and natural resources, all of which necessitate innovative approaches to food production. Protein, a vital macronutrient, is projected to become increasingly scarce, underscoring the need for alternative protein sources and more efficient production technologies. Marine biomass has emerged as a promising resource for the future due to its low greenhouse gas emissions and high nutrient density. This resource category includes all marine organisms that can be harnessed for various applications, with microalgae such as spirulina (*Arthrospira platensis*) standing out due to their exceptional nutritional profile and versatility. Recent research has focused on optimizing the extraction of key components from marine biomass. Microbial fermentation has proven particularly suitable for large-scale and industrial applications. This study aimed to optimize the microbial fermentation process to extract protein from spirulina effectively and to evaluate its viability as an alternative protein source. Using response surface methodology, the fermentation conditions were optimized to enhance protein yield. The selection of strains and media that facilitated high protein extraction was followed by single-factor analysis and a Box-Behnken design to refine fermentation

parameters. The model demonstrated high reliability, with an  $R^2$  value of 0.9900. The optimal conditions identified were a fermentation temperature of 35.39°C, a fermentation time of 24 h 2 m 24 s, and a microbial inoculation rate of 4.275%. The composition and amino acid profile of the spirulina protein extract (FSP), produced via microbial fermentation, were compared with those of untreated spirulina (unFSP). Results revealed a higher concentration of essential amino acids (EAA) in FSP. Electrophoresis confirmed that FSP contained proteins with lower molecular weights. Additionally, FSP exhibited significant antioxidant activity and higher levels of phenols and flavonoids, demonstrating its strong potential as an alternative protein source.



## I. 서론

최근 기후 변화, 토지 황폐화, 물 부족, 인구 급증 등의 여러 요인으로 인해 식량 수요가 지속적으로 증가하면서, 현재의 식량 시스템에서 더 낮은 비용과 환경적 영향을 줄이는 방안을 모색하는 연구가 활발히 진행되고 있다(Bernaerts et al., 2020; Ladjal-Ettoumi et al., 2024). 지속 가능성, 미래 식량, 순환 경제 등은 이러한 연구의 핵심 주제이며, 급증하는 세계 인구의 영양 요구를 충족하는 동시에 환경 문제를 최소화하기 위해 혁신적인 농업 및 가공 기술을 활용하여 대체 공급원을 탐색하는 데 주목하고 있다(Fassio et al., 2023).

특히, 단백질은 인간 식단에서 필수적인 영양소로, 신체 조직의 형성과 유지, 면역 강화, 대사 조절, 에너지 공급, 근육 합성 등 생명 유지와 건강 관리를 위해 매우 중요하다(Salucci, 2023). 현재 대부분의 단백질은 육류에서 공급되지만, 전통적인 축산물 기반의 단백질 공급은 환경적 한계와 지속 가능성 문제를 야기하고 있다. 이에 따라 식물성 원료 추출, 세포 배양, 미생물 발효, 해조류 등을 활용한 대체 단백질이 주목받고 있다.

또한, 해조류는 환경적·영양학적으로 긍정적인 평가를 받고 있다. 해조류는 온실가스 배출량이 적고, 인체에 필요한 필수 영양소가 풍부한 해양 자원으로 보고되고 있다(Gao et al., 1994; Greetham et al., 2018). 이 중에서도 미세조류 단백질은 필수 아미노산을 포함하고 균형 잡힌 아미노산 구성을 갖추고 있어 높은 영양 가치를 지닌다. 미세조류의 아미노산 점수는 계란과 같은 전통적

단백질 공급원과 유사하다(Menegotto et al., 2019; Liu et al., 2023; Zhu et al., 2019; Cho & Park, 2024).

특히, 스피루리나(Spirulina)는 나선형 미세조류로, 단백질 함량(55-70%), 피코시아닌, 베타카로틴, 비타민 E 등 항산화 물질과 다양한 생리활성 화합물이 풍부하여 영양 보충제로 널리 활용되고 있다(Vieira et al., 2021; Zhou et al., 2023). 스피루리나와 같은 남세균은 식량 다양성을 확대하고 영양 품질을 향상시키는 데 기여할 수 있으며, 의약품, 식품첨가물, 건강기능식품, 화장품 등 다양한 분야에서 활용 가능성이 높다(White et al., 2024).

미세조류 단백질 추출에 있어 기술적·기능적 특성을 식품에 적용하려는 연구가 활발히 진행 중이다. 미세조류의 세포벽은 남세균보다 강하지만, 스피루리나는 펩티도글리칸으로 구성된 약한 세포벽을 가져 상대적으로 추출이 용이하다(Safi et al., 2013; Nunes et al., 2024). 세포벽 파괴는 전체 공정 비용에 큰 영향을 미치며, 세포 내 성분 방출과 최종 제품 품질에 중요한 역할을 한다(Delran et al., 2023). 일반적으로 열수 추출, 화학적 추출, 미생물 발효, 효소 추출, 초음파 등 다양한 방법이 사용된다(Günerken et al., 2016).

발효 식품은 미생물이나 효소를 이용해 생산되며, 생화학적 변화를 통해 항산화제, 펩타이드, 프로바이오틱스 등의 활성 물질을 포함한다(Mohamed et al., 2024). 발효는 화학적·물리적 방법보다 안전하며, 기능성 향상 및 생분해성을 증진하는 데 효과적이다(Du et al., 2024).

스피루리나 단백질 추출을 위해 다양한 추출 방법을 비교·분석하여 가장 효율적인 방법을 선정하고, 항산화 활성, 총 페놀 함량, 총 플라보노이드 함량을 측정하였다. Box-Behnken 설계(RSM)를 활용해 최적 추출 조건을 도출했으며,

이를 바탕으로 스피루리나 단백질 추출물의 성분 분석 및 항산화 활성을 평가하여 미생물 발효법을 이용한 스피루리나의 단백질 추출 수율에 대한 기술 적용과 대체 단백질 소재의 새로운 접근의 가능성을 확인하였다.



## II. 재료 및 방법

### 1. 시료 준비 및 시약

실험에 사용할 스피루리나는 (주)고미네 (Uijeongbu, Korea)에서 스피루리나 분말을 구매 후, 상온에 보관하여 사용하였다. 실험에 사용하기 전에 petri dish (SPL, Pocheon, Korea)에 10~11 g 씩 소분하여 6 h 동안 UVC 에 조사하였다.

실험에 사용된 효소 및 시약은 *Trichoderma reesei* 의 cellulase (EC 3.2.1.4), *Aspergillus sp.*의 viscozyme L (셀룰로오스 분해 효소 혼합물), alcalase, *Bacillus spp.*의 protease (EC 3.4.21.14), *Canca papaya* 의 papain (EC 3.4.22.2), 파인애플 줄기의 bromelain (EC 3.4.22.32), 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH), 2,2'-azino-bis (3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) diammonium salt (ABTS), Folin-Ciocalteu reagent, gallic acid, ( $\pm$ )-6-Hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchromane-2-carboxylic acid (trolox), Iron (III) chloride hexahydrate, quercetin, 2,4,6-Tris(2-pyridyl)-s-triazine (TPTZ), Coomassie brilliant blue, sodium dodecyl sulfate, acrylamide, 은 Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA)에서 구입하였다. Aluminium (III) chloride, potassium persulfate, sodium carbonate, sodium hydroxide, sodium nitrite 는 Junsei Chemical Co., LTD. (Tokyo, Japan)에서 구입하였다.

미생물 균주의 경우, all culture broth (ACB) 배지에 접종하여  $37 \pm 2^\circ\text{C}$ 에서  $24 \pm 2$  h 시간동안 배양하여 실험에 사용하였다.

## 2. 스피루리나 단백질 추출을 위한 처리 방법

### 2.1. 물리적 처리 방법

물리적 처리 방법으로는 초음파 처리, homogenizer, 열수 추출을 사용하였다. 건조된 스피루리나 분말 10 g 과 증류수 200 mL 를 혼합하여 5% (w/v%)의 스피루리나 수용액을 제조하였다. 초음파 처리는 수조 형태의 sonication (Powersonic 610, Hwashin, Seoul, Korea 400 W, 40 kHz)와 probe 형태의 ultrasonication (Sonics & materials, inc., Newtown, United States, 750 W, 20 kHz)를 사용하였다. Sonication 의 세기는 자사 매뉴얼대로 파워 3 으로 설정하여 10 min 동안 처리하였고, ultrasonication 은 amplitude 40%로 10 min 동안 처리하였다. Homogenizer (SHG-15A, SciLab<sup>®</sup>, Seoul, Korea)는 10,000 rpm 에서 10 min 간 처리하였다. 열수 추출은 50°C, 60°C 항온 수조 (SB-1000, EYELA, Tokyo, Japan) 에서 1, 2, 3 h 으로 처리한 후 원심분리 (10,000 ×g, 20 min, 4°C) 후 상등액을 분리하여 실험에 사용하였다.

## 2.2. 효소 처리 방법

스피루리나 단백질을 추출하기 위해 효소를 사용하여 스피루리나의 세포벽을 부수고자 하였다. 사용한 효소는 세포벽 분해효소 2종 (cellulase from *Trichoderma reesei*, viscozyme L), 단백질 분해효소 4종 (Alcalase, Protease from *Bacillus* spp., Papain from *Canca papaya*, Bromelain)으로 Sigma-Aldrich (St. Louis, MO)에서 구매하여 사용하였다(Table 1). 건조된 스피루리나 10 g 과 증류수 200 mL 를 혼합하여 5% (w/v%) 농도의 스피루리나 수용액을 제조하고, 3% (w/v%) 비율로 설정하여 각 효소를 첨가하였다. 제시된 Table 1.에 따른 최적 pH 를 맞추기 위해 1N NaOH, 1N HCl 을 사용하여 pH 를 조절하였고, 50°C에서 2 h 동안 200 rpm 으로 효소가수분해를 진행하였다. 그 이후에 효소 활성을 억제하기 위해 100°C에서 5 min 간 방치하였고, 10,000 ×g 에서 20 min 간 원심분리 후 상등액을 실험에 사용하였다.

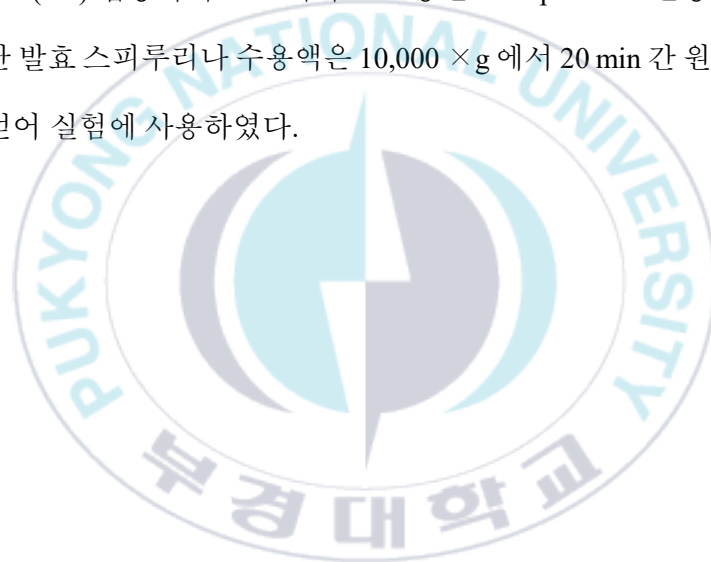
**Table 1. Enzymes for spirulina protein extraction**

| Enzyme                                   | Composition   | Optimal hydrolysis conditions |                  |
|--|---------------|-------------------------------|------------------|
|  |               | pH                            | Temperature (°C) |
| Alcalase                                 | Endopeptidase | 8.0                           | 50               |
| Protease from <i>Bacillus</i> spp.       | Endopeptidase | 10.0                          | 50               |
| Viscozyme L                              | Hemicellulase | 5.0                           | 50               |
| Cellulase from <i>Trichoderma reesei</i> | Cellulase     | 5.0                           | 50               |
| Papain from <i>Carica papaya</i>         | Endopeptidase | 5.0 ~ 7.0                     | 50               |
| Bromelain                                | Endopeptidase | 5.0 ~ 8.0                     | 50               |



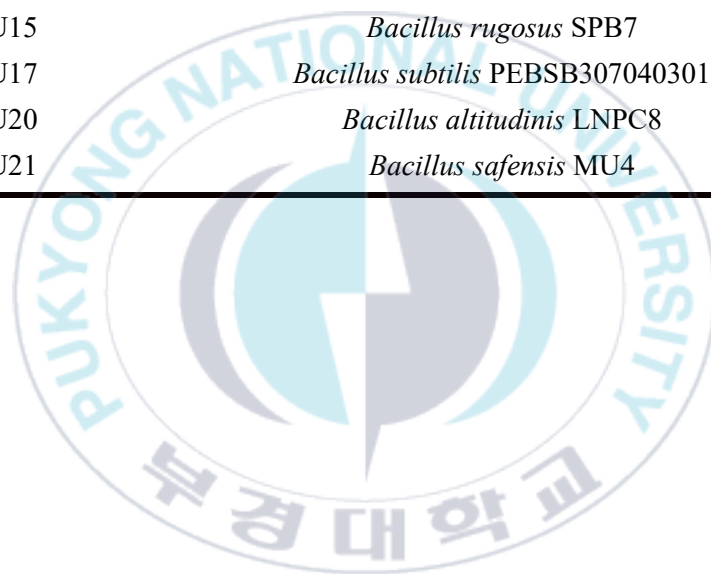
### 2.3. 미생물 발효 방법

*Bacillus* 속의 균주를 사용하여 발효하는 과정에서 스피루리나의 단백질을 추출하고자 하였다. 이전 연구에서 protease 활성이 높고, 용혈 활성, biogenic amine 등과 같은 안전성이 확인하여 선정된 *Bacillus* 속 균주 11 종을 실험에 사용하였다(Table 2). 11 종의 *Bacillus* spp.를 all culture broth (ACB) 배지에 접종하여 37°C에서 24 h 동안 배양하였다. 배양된 균액을 5% (w/v%) 스피루리나 수용액에 1% (v/v) 접종하여 37°C에서 24 h 동안 150 rpm 으로 진탕 배양하였다. 배양이 끝난 발효 스피루리나 수용액은 10,000 ×g 에서 20 min 간 원심분리한 후, 상등액을 얻어 실험에 사용하였다.



**Table 2. 11 *Bacillus* strains with high protease activity**

| No.  | Strains                                 |
|------|---|
| MU1  | <i>Bacillus altitudinis</i> AC11.2      |
| MU2  | <i>Bacillus amyloliquefaceins</i> MU2   |
| MU3  | <i>Bacillus vallismortis</i> SAB12      |
| MU7  | <i>Bacillus velezensis</i> ZY1          |
| MU12 | <i>Bacillus subtilis</i> MMS            |
| MU13 | <i>Bacillus subtilis</i> HY-88          |
| MU14 | <i>Bacillus subtilis</i> ZIM3           |
| MU15 | <i>Bacillus rugosus</i> SPB7            |
| MU17 | <i>Bacillus subtilis</i> PEBSB307040301 |
| MU20 | <i>Bacillus altitudinis</i> LNPC8       |
| MU21 | <i>Bacillus safensis</i> MU4            |



### 3. 스피루리나 단백질 추출법에 따른 수율 계산 및 아미노산 분석법

#### 3.1. 단백질 추출 수율 계산

단백질 농도는 bicinchoninic acid assay (BCA; Pierce™ BCA Protein Assay Kit, Thermo Fisher Scientific, Rockford, IL, USA)을 Cho et al. (2024)의 방법을 변형하여 분석하였다. 96 well plate 에 염색 용액 200  $\mu$ L 를 샘플 25  $\mu$ L 와 혼합한 후, 37°C에서 30 min 간 배양하였다. Synergy HTX microplate reader (BioTek instruments)를 사용하여 562 nm 에서 측정하였다. Bovine serum albumin 을 표준물질로 사용하여 단백질 정량을 위한 표준 곡선을 작성하였고, 만들어진 표준 곡선을 활용하여 스피루리나의 단백질 농도를 구한 후 아래의 식을 이용해 단백질 추출 수율을 계산하였다.

$$\text{Protein extraction yield (\%)} = \frac{P_{\text{TSP}}}{(R \times P_{\text{SP}} \times 10^6)} \times 100$$

$P_{\text{TSP}}$  = 추출 방법으로 처리한 스피루리나 단백질 농도 ( $\mu\text{g/mL}$ )

R = 스피루리나 수용액 비율

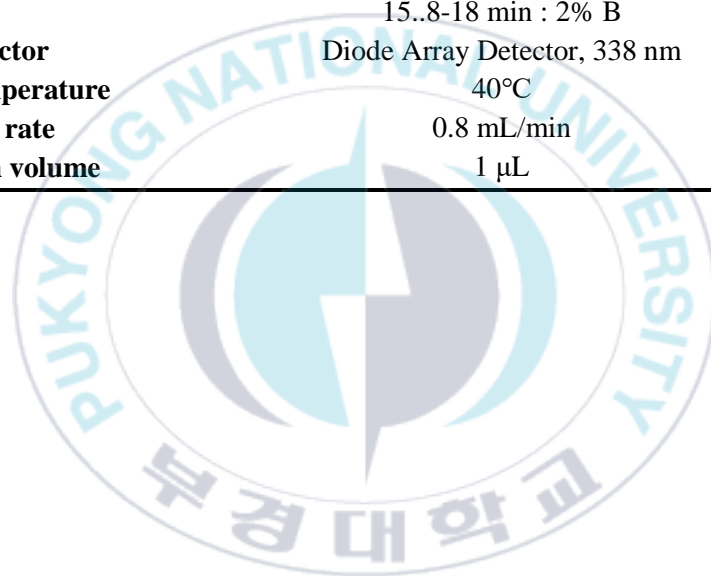
$P_{\text{SP}}$  = 스피루리나의 단백질 함량

### 3.2. 유리아미노산 분석

유리 아미노산 분석은 식품공전 (MFDS, 2024)의 식품 성분 시험법 중 아미노산의 방법을 일부 변형하여 진행하였다(Liu et al., 2017). 동결 건조된 스피루리나 발효물 0.5 g 을 정량하여 70% ethanol 용액 25 mL 를 가한 뒤 마그네틱 바를 이용하여 1 h 동안 교반 추출하였다. 이후 시료액을 4°C에서 13,000 rpm 로 10 min 간 원심분리 (Supra R22; Hanil Scientific Inc., Gimpo, Korea)하여 여과지 (No. 2; Advantec, Tokyo, Japan)로 여과하는 과정을 2 번 반복 후 flat bottom flask 에 옮겼다. 농축 플라스크에 모인 상등액은 진공감압농축기 (Hei-VAP Core; Heidolph, Schwabach, Germany)를 이용하여 35°C에서 감압농축하여 0.1 N Hydrochloric acid (Samchun, Seoul, Korea) 2 mL 에 녹인 후 0.20 µm membrane filter (Advantec)로 여과하였다. 여과된 시료액은 희석 후 high-performance liquid chromatography (HPLC; Agilent 1260 Infinity II LC, CA, USA)를 이용하여 분석하였다(Table 3). HPLC 를 이용한 유리아미노산 분석 시 *o*-phthaldialdehyde (OPA; Sigma-Aldrich, MO, USA)를 이용한 pre-column 유도체화를 진행한 후 분석하였으며, 표준 용액은 AAS18 (Sigma-Aldrich)을 사용하였다.

**Table 3. HPLC condition for the free amino acids analysis of spirulina protein extraction**

| <b>Analysis condition</b> |   |
|---------------------------|---|
| <b>Equipment</b>          | Agilent 1260 Infinity   |
| <b>Column</b>             | Agilent AdvanceBio AAA 4.6 x 100 mm, 2.7 $\mu$ m  |
| <b>Mobile Phase</b>       | A: 10 mM Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> , 10mM Na <sub>2</sub> B <sub>4</sub> O <sub>7</sub> , 5 mM NaN <sub>3</sub> , pH 8.2<br>B: Acetonitrile:Methanol:Water (45:45:10, v:v:v) |
| <b>Gradient</b>           | 0-0.35 min : 2% B<br>13.4 min : 57% B<br>13.5-15.7 min : 100% B<br>15..8-18 min : 2% B  |
| <b>Detector</b>           | Diode Array Detector, 338 nm  |
| <b>Oven temperature</b>   | 40°C  |
| <b>Flow rate</b>          | 0.8 mL/min  |
| <b>Injection volume</b>   | 1 $\mu$ L   |



## 4. 스피루리나 발효법에 의한 단백질 추출 최적화

### 4.1. 발효 배지 탐색

선정된 균주의 스피루리나 단백질 추출 수율을 향상시키기 위한 영양성분으로 3종의 탄소원과 3종의 질소원을 첨가하여 발효를 진행하였다. 탄소원은 dextrose, sucrose, fructose, 질소원으로는 protease peptone, beef extract, yeast extract 로 선정 후 발효하여 비교하였다(Table 4; Yoo et al., 2021). 각 탄소원, 질소원을 1% (w/v%) 농도로 만든 후에 스피루리나를 첨가하여 5% (w/v%) 스피루리나 수용액으로 제조하였다. *B. amyloliquefaciens* MU2 를 all culture broth (ACB) 배지에 접종하여 37°C에서 24 h 동안 배양하였다. 배양된 균액을 5% 스피루리나 수용액에 1% (v/v) 접종하여 37°C에서 24 h 동안 150 rpm 으로 진탕 배양하였다. 배양이 끝난 발효 스피루리나 수용액은 10,000 ×g 에서 20 min 간 원심분리한 후, 상등액을 얻어 단백질 추출 수율은 3.1 에서 설명한 방법으로 측정하였다.

**Table 4. Selection of carbon and nitrogen sources for media exploration**

| <b>Sources</b>   | <b>Media</b>     |
|------------------|------------------|
| Carbon sources   | Dextrose         |
|                  | Sucrose          |
|                  | Fructose         |
| Nitrogen sources | Protease peptone |
|                  | Beef extract     |
|                  | Yeast extract    |



## 4.2. Single-factor 분석 및 실험 디자인

본 연구에서는 스피루리나의 단백질 추출 수율에 영향을 줄 수 있는 발효 조건에 대한 종속변수의 유의미한 변화를 확인하기 위해 single-factor 를 수행하였다. 독립 변수는 발효 시간 (h), 발효 온도 (°C), 균 접종 비율 (%)로 설정하였으며, 종속변수로는 단백질 추출 수율 (%)로 설정하였다. 3 개의 독립변수 중 하나의 요인을 확인하기 위해 다른 두 요인은 center point 에 고정시킨 후 실험하였고, 실험은 3 회 반복하여 수행하였다..

Single-factor 실험 결과를 바탕으로 스피루리나의 단백질 추출 수율을 높이기 위한 *B. amyloliquefaceins* MU2 균주의 최적 발효 조건을 도출하기 위해 Box-Behnken Design (BBD) 및 Design-Expert 소프트웨어 (version 13.1.7)를 사용하였다. 프로그램을 통해 설계된 실험을 수행하여 최적 모델을 도출하였다. 모든 독립변수는 범위에 따라 세 가지 수준으로 설정하였으며, 최소값, 중앙값, 최대값에 대한 각각 -1, 0, 1 으로 부호화하였다. 종속 변수는 스피루리나의 단백질 추출 수율을 확인할 수 있는 BCA Protein Assay Kit (Thermo Fisher Scientific, Rockford, USA)로 설정하였다. 프로그램에서 제시된 17가지의 실험을 무작위 순서로 수행하였고, 재현성 확인을 위해 각 변수의 중심점을 5 회 이상 반복하였다. BBD 모델에서 설계된 조건들에 따른 각 종속변수 별 결과를 도출한 후, 아래의 식을 사용하여 2 차 회귀방정식을 도출하였다(Khuri & Mukhopadhyay, 2010).

$$Y = b_0 + \sum b_i X_i + \sum b_{ii} X_i^2 + \sum b_{ij} X_i X_j$$

Y = 예측응답(response)

X<sub>i</sub> = 독립변수

b<sub>0</sub> = 상수계수(constant coefficient)

b<sub>i</sub>, b<sub>ii</sub> 및 b<sub>ij</sub> = 교호작용 계수(interaction coefficient)

### 4.3. 최적 발효 조건의 검증

RSM-BBD 를 사용하여 도출된 최적화 모델의 재현성 및 유효성을 확인하기 위해 예측 값과 실측 값을 비교 및 검증하였다. 본 검증은 최적 조건으로 도출된 독립변수 조건으로 스피루리나를 *B. amyloliquefaciens* MU2 균주로 발효하였으며, 종속 변수의 예측 값 및 실측 값을 ANOVA 를 이용하여 통계적으로 비교 및 검증하였다.

## 5. 최적 조건으로 발효한 스피루리나의 일반 성분 분석

### 5.1. 수분

수분 분석은 식품공전의 식품 성분 시험법 중 상압가열건조법을 사용하여 진행하였다(MFDS, 2024). 수분 함량을 측정하기 위해 스피루리나 원물 및 최적 조건으로 발효한 스피루리나 분무건조물을 3 g 을 일정한 무게의 칭량 접시에 넣고 항량이 될 때까지 105°C에서 건조한 후, 아래의 식을 활용하여 계산하였다.

$$\text{moisture (\%)} = \frac{b - c}{b - a} \times 100$$

a = 칭량접시의 질량(g)

b = 칭량접시와 검체의 질량(g)

c = 건조 후 항량이 되었을 때의 질량(g)

## 5.2. 회분

회분 분석은 식품공전의 식품 성분 시험법 중 일반 성분 시험법 회분을 활용하여 진행하였다(MFDS, 2024). 회분 함량을 측정하기 위해 스피루리나 원물 및 최적 조건으로 발효한 스피루리나 분무건조물을 1 g 을 일정한 무게의 도가니에 넣고 600°C 용광로에 가열하여 흰색의 회분을 얻을 때까지 측정하였다. 가열하기 전과 후 무게를 측정하여 아래의 식을 활용하여 계산하였다.

$$\text{ash (\%)} = \frac{W_1 - W_0}{S} \times 100$$

W<sub>0</sub> = 항량이 된 도가니의 질량(g)

W<sub>1</sub> = 회화 후의 도가니와 회분의 질량(g)

S = 검체의 채취량(g)

## 5.3. 조단백질

조단백질 분석은 식품공전의 식품 성분 시험법 중 총 질소 및 조단백질을 일부 변형하여 진행하였다(MFDS, 2024). 자동 단백질 분석기 (Kjeltec TM 8400 analyzer unit Foss, Hilleried, Denmark)로 분석하여 조단백질의 함량을 산출하였다. 스피루리나 원물 및 분무건조물을 약 0.4 g 을 취하여 분해촉진제를 넣고, 황산 12

mL 첨가 후 420°C에서 60 min 간 분해시켜 상온으로 냉각시켰다. 이후 이를 시험용액으로 하여 증류, 적정 및 계산과정이 자동으로 수행되었다.

#### 5.4. 조지방

조지방 분석은 식품공전의 식품 성분 시험법 중 에테르추출법을 활용하여 진행하였다(MFDS, 2024). Soxhlet 추출기를 사용하여 수행되었으며, 스피루리나 원물 및 분무건조물을 5 g 을 원통형 여과지를 사용하여 면실로 덮었다. 50°C에서 16 h 동안 100 mL 의 에테르 (Samchun, Seoul, Korea)로 추출되었다. 추출한 후 회전농축기를 사용하여 45°C에서 에테르를 제거하여 건조 후 함량을 측정하고, 아래의 식을 사용하여 계산하였다.

$$\text{crude lipid (\%)} = \frac{W_1 - W_0}{S} \times 100$$

$W_0$  = 추출 플라스크의 무게(g)

$W_1$  = 조지방을 추출하여 건조시킨 추출 플라스크의 무게(g)

$S$  = 검체의 채취량(g)

#### 5.5. 탄수화물

탄수화물 함량은 총 함량 100%에서 나머지 성분(수분, 회분, 조단백질, 조지방)을 빼서 계산하였다.

## 6. 최적 조건으로 발효한 스피루리나의 단백질 특성 분석

### 6.1. 유리 아미노산 분석

최적 조건으로 발효한 스피루리나의 유리 아미노산에 대한 변화를 확인하기 위해서 분무건조를 한 시료 0.5 g 을 정량하여 70% ethanol 용액 25 mL 를 가한 뒤 마그네틱 바를 이용하여 1 h 동안 교반 추출하였다. 이후 시료액을 4°C에서 13,000 rpm 로 10 min 간 원심분리 (Supra R22; Hanil Scientific Inc., Gimpo, Korea)하여 여과지 (No. 2; Advantec, Tokyo, Japan)로 여과하는 과정을 2 번 반복 후 flat bottom flask 에 옮겼다. 농축 플라스크에 모인 상등액은 진공감압농축기 (Hei-VAP Core; Heidolph, Schwabach, Germany)를 이용하여 35°C에서 감압농축하여 0.1 N Hydrochloric acid (Samchun, Seoul, Korea) 2 mL 에 녹인 후 0.20 µm membrane filter (Advantec)로 여과하였다. 여과된 시료액은 희석 후 high-performance liquid chromatography (HPLC; Agilent 1260 Infinity II LC, CA, USA)를 이용하여 분석하였다(Table 5). HPLC 를 이용한 유리아미노산 분석 시 *o*-phthaldialdehyde (OPA; Sigma-Aldrich, MO, USA)를 이용한 pre-column 유도체화를 진행한 후 분석하였으며, 표준 용액은 AAS18 (Sigma-Aldrich)을 사용하였다.

**Table 5 . Conditions for the free amino acids analysis of spirulina protein extraction**

| <b>Analysis condition</b> |   |
|---------------------------|---|
| <b>Equipment</b>          | Agilent 1260 Infinity   |
| <b>Column</b>             | Agilent AdvanceBio AAA 4.6 x 100 mm, 2.7 $\mu$ m  |
| <b>Mobile Phase</b>       | A: 10 mM Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> , 10mM Na <sub>2</sub> B <sub>4</sub> O <sub>7</sub> , 5 mM NaN <sub>3</sub> , pH 8.2<br>B: Acetonitrile:Methanol:Water (45:45:10, v;v;v) |
| <b>Gradient</b>           | 0-0.35 min : 2% B<br>13.4 min : 57% B<br>13.5-15.7 min : 100% B<br>15..8-18 min : 2% B  |
| <b>Detector</b>           | Diode Array Detector, 338 nm  |
| <b>Oven temperature</b>   | 40°C  |
| <b>Flow rate</b>          | 0.8 mL/min  |
| <b>Injection volume</b>   | 1 $\mu$ L   |

## 6.2. SDS-PAGE

스피루리나 원물과 최적 조건으로 발효한 스피루리나의 단백질 분획은 Mini-Protein BioRad electrophoresis system (BioRad Laboratories Ltd., Watford, UK)을 사용하여 SDS-PAGE 로 측정하였다. 전기 영동은 12% separating gel 과 5% stacking gel 을 사용하여 실험 방법을 일부 변형하여 진행하였다(Cho et al., 2024). 샘플을 5X SDS-PAGE 샘플 완충액과 4:1(v/v)의 비율로 혼합하고 100°C에서 10 분동안 가열하였다. 20  $\mu$ L 의 샘플을 well 에 로딩한 후 110V 에서 2 h 동안 전기 영동 시스템을 실행하였다. 겔을 coomassie blue G-250 으로 염색하고 아세트산/메탄올/물(1:4:5, v/v/v) 용액을 사용하여 탈색하였다. HiQ BluePlus Protein Markers (A20028; BioD, Gwangmyeong, Republic of Korea)는 10~245 kDa 의 질량 범위에서 분획을 식별하는데 사용되었다.

## 6.3. Native-PAGE

스피루리나 원물과 최적 조건으로 발효한 스피루리나의 단백질 분획은 Mini-Protein BioRad electrophoresis system (BioRad Laboratories Ltd., Watford, UK)을 사용하여 Native-PAGE 로 측정하였다. 전기 영동은 12% separating gel 과 5% stacking gel 을 사용하여 실험 방법을 일부 변형하여 진행하였다(Cho et al., 2024). 샘플을 4X native-PAGE 샘플 완충액과 3:1(v/v)의 비율로 혼합하였다. 20  $\mu$ L 의 샘플을 well 에 로딩한 후 110V 에서 2 h 동안 전기 영동 시스템을 실행하였다. 겔을 coomassie blue G-250 으로 염색하고 아세트산/메탄올/물(1:4:5, v/v/v) 용액을 사용하여 탈색하였다. HiQ BluePlus Protein Markers (A20028; BioD,

Gwangmyeong, Republic of Korea)는 10 ~ 245 kDa 의 질량 범위에서 분획을 식별하는데 사용되었다.

## 7. 최적 조건으로 발효한 스피루리나에 대한 항산화 활성 측정

### 7.1. DPPH radical 소거 활성 측정

DPPH (2,2-diphenyl-2-picrylhydrazyl) radical 소거 활성은 Jo et al. (2023)의 방법을 변형하여 분석하였다. 스피루리나 단백질 발효물은 분무 건조하여 1 mg/mL로 녹여 실험에 사용하였다. 시료 500  $\mu$ L 에 0.15 mM DPPH (Sigma-Aldrich) 용액 1 mL 를 혼합하여 상온의 암실에서 30 min 간 반응시킨 후, 13,000 rpm 에서 10 min 간 원심 분리하였다. 원심분리한 상등액 200  $\mu$ L 를 96 well plate 에 분주하고 517 nm 에서 흡광도를 측정하였다. 음성대조군으로 시료와 동량의 DMSO 를 사용하였고, 양성대조군으로 1,000 ppm Trolox (Sigma-Aldrich)를 methanol (Honeywell Burdick and Jackson, Morristown, NJ, USA)에 녹여 사용하였다. DPPH radical 소거 활성은 아래의 계산식을 이용하여 계산하였다.

$$\begin{aligned} & \text{DPPH radical scavenging activity (\%)} \\ & = \frac{\text{Absorbance of control} - \text{absorbance of test}}{\text{Absorbance of control}} \times 100 \end{aligned}$$

## 7.2. ABTS radical 소거 활성 측정

ABTS (2,2'-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) radical 소거 활성은 Ryu et al. (2020)의 방법을 변형하여 분석하였다. 스피루리나 단백질 분무건조물은 DPPH radical 소거 활성 측정에서 사용된 것과 같은 방법으로 준비하였다. 2.4 mM potassium persulfate 를 포함하는 7 mM 의 ABTS (Sigma-Aldrich)를 제조한 후 암실에서 16 h 보관하여 ABTS 양이온 radical 을 형성시킨 후, microplate reader (Synergy HTX Multi-mode reader, BioTek, Winooski, VT, USA)로 734 nm 에서 흡광도를 측정하여 값이  $0.700 \pm 0.005$  가 되도록 증류수로 희석하여 사용하였다. 희석한 ABTS 용액 1 mL 와 시료 10  $\mu$ L 를 혼합하여 6 min 간 상온에서의 암실에서 반응 후 상등액 200  $\mu$ L 를 취해 96 well plate 에 분주하여 734 nm 에서 흡광도를 측정하였다. 음성대조군으로 시료와 동량의 증류수를 사용하였고, 양성대조군으로 1,000 ppm Trolox (Sigma-Aldrich)를 사용하였다. 아래 계산식을 이용하여 ABTS radical 소거 활성을 계산하였다.

$$\begin{aligned} & \text{ABTS radical scavenging activity (\%)} \\ & = \frac{\text{Absorbance of control} - \text{absorbance of test}}{\text{Absorbance of control}} \times 100 \end{aligned}$$

## 7.3. Ferric reducing antioxidant power (FRAP)

FRAP 은 Han et al. (2017)의 방법에 따라 분석하였다. 스피루리나 시료를 DMSO 에 1 mg/mL 로 녹이고 여과하여 실험에 사용하였다. FRAP 용액은 300 mM Acetate buffer (pH 3.6; Sigma-Aldrich)와 10 mM 2,4,6-tripyridyl-S-triazine (Sigma-

Aldrich) solution, 20 mM FeCl<sub>3</sub> · 6H<sub>2</sub>O (Sigma-Aldrich)를 10:1:1 (v/v/v)로 실험 직전에 혼합 및 37°C에서 보관하였다. 96 well plate 에 스피루리나 시료 10 µL 와 FRAP 용액 190 µL 를 분주하고 37°C에서 30 min 간 반응시킨 후 593 nm 에서 흡광도를 측정하였다. 음성대조군으로 시료와 동량의 DMSO 를 사용하였고, 결과값은 FeSO<sub>4</sub> · 7H<sub>2</sub>O (Sigma-Aldrich)를 표준물질로 하여 표준곡선을 작성하고 mM FeSO<sub>4</sub> · 7H<sub>2</sub>O equivalents/10µL 로 나타내었다.

#### **7.4. Oxygen radical absorbance capacity (ORAC)**

ORAC 은 Zulueta et al. (2009)의 방법을 변형하여 분석하였다. 스피루리나 시료를 DMSO 에 1 mg/mL 로 녹이고 여과하여 준비하였다. 78 mM fluorescein (TCI, Zwijndrecht, Belgium) 및 221 mM 2,2'-azobis (2-methylpropionamide) dihydrochloride (AAPH; Sigma-Aldrich)는 75 mM phosphate buffer (pH 7.0)에 녹여 사용하였다. 96 well plate 에 스피루리나 시료 10 µL 와 78nM fluorescein 50 µL 를 혼합하고 37°C에서 15 min 간 반응시킨 후, 25 µL 의 221 mM AAPH 와 반응시켰다. 반응용액에서 형광물질의 감소 정도를 482 nm 의 여기파장 및 535 nm 의 방출파장으로 5 min 에 한 번씩 120 min 동안 37°C에서 측정하였다. 음성대조군으로 시료와 동량의 DMSO 를 사용하였다. 결과값은 Trolox (Sigma-Aldrich)를 표준물질로 하여 표준곡선을 작성하고 µM trolox equivalents/10 µL 로 나타내었다.

### 7.5. 총 페놀 함량 측정

총 페놀 함량은 Tsai et. al. (2008)에서 제시된 방법을 변형하여 분석하였다. 스피루리나 단백질 추출물을 건조하여 증류수에 0.5 mg/mL 로 녹여 시료로 사용하였다. 시료 0.2 mL 에 1 N folin-ciocalteu reagent (Sigma-Aldrich) 1mL 를 혼합하여 상온에서 3 min 간 방치하였다. 그 후, 10% sodium carbonate (Sigma-Aldrich) 2 mL 를 혼합하고, 상온의 암실에서 30 min 간 방치한 후, 15,928 ×g 에서 5 min 간 원심 분리하여 상등액을 96 well plate 에 200 μL 분주하고, 760 nm 에서 흡광도를 측정하였다. Gallic acid (Sigma-Aldrich)를 표준물질로 표준곡선을 작성하였고, μM gallic acid equivalents (GAE)/mg 으로 나타내었다.

### 7.6. 총 플라보노이드 함량 측정

총 플라보노이드 함량은 Tsai et. al. (2008)의 방법을 참고하여 분석하였다. 스피루리나 단백질 추출물을 분무 건조하여 증류수에 0.5 mg/mL 로 녹여 시료로 사용하였다. 스피루리나 시료 0.25 mL 에 증류수 1 mL 5% NaNO<sub>2</sub> (Sigma-Aldrich) 0.75 mL 를 혼합하여 상온에서 5 min 간 방치하였다. 그 이후에 10% AlCl<sub>3</sub> (Sigma-Aldrich) 0.075 mL 를 혼합하고 상온에서 5 min 간 방치한 후, 혼합액에 1M NaOH (Daejung, Siheung, Korea) 0.5 mL 및 증류수 1.175 mL 를 가하고, 혼합액 96 well plate 에 200 μL 분주하였다. 510 nm 에서 흡광도 측정하였고, quercetin (Sigma-Aldrich)를 표준물질로 하여 표준곡선을 작성하고, μM quercetin equivalents (QE)/mg 로 나타내었다.

## 8. 통계 분석

본 연구의 실험은 3 회 반복하여 수행하였으며, 결과값은 평균  $\pm$  표준편차로 나타내었다. 결과값의 통계적 유의성을 나타내기 위해 SPSS (version 29.0.2.0, SPSS Inc., USA) 프로그램을 사용하여 ANOVA (analysis of variance) 분석을 수행한 후,  $p < 0.05$  수준에서 Duncan's multiple range test 를 사용하였다.

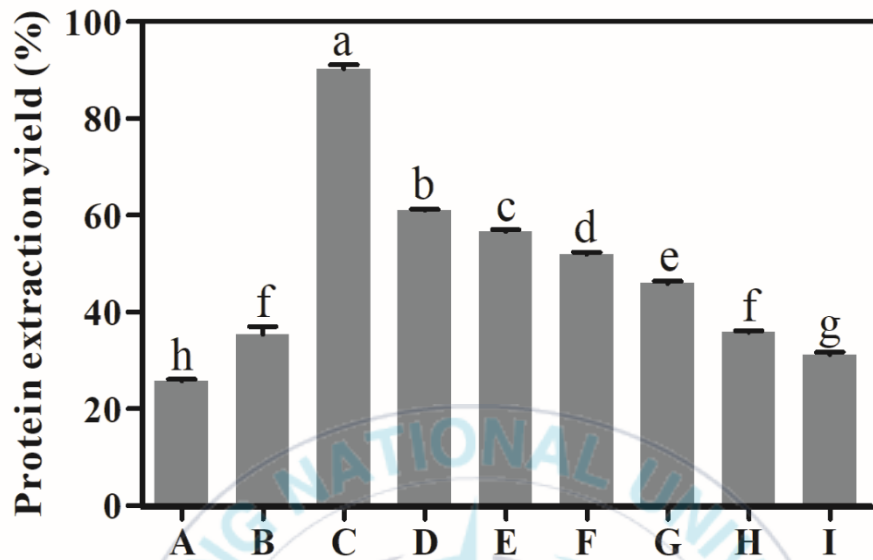


### Ⅲ. 결과 및 고찰

#### 1. 스피루리나 단백질 추출 방법 탐색 및 선정

##### 1.1. 물리적 처리를 이용한 스피루리나 단백질 추출

초음파 처리, homogenizer, 열수 추출을 이용하여 스피루리나의 단백질 추출을 하였다. 스피루리나 단백질을 위한 물리적 처리 결과한 후 단백질 추출 수율을 비교하였다(Fig. 1). 물리적인 충격을 사용하여 추출하는 방법에서 수조 형태의 sonication 은  $25.76 \pm 0.522\%$ , homogenizer 에서는  $35.46 \pm 2.234\%$ , probe 형태의 ultrasonication 은  $90.31 \pm 1.545\%$ 로 나타났다. 열수를 사용하여 추출하는 열수 추출은  $50^{\circ}\text{C}$ ,  $60^{\circ}\text{C}$ 에서 1, 3, 5 h 처리에 대한 단백질 추출 수율을 비교하였다.  $50^{\circ}\text{C}$ 에서 1 h 은  $61.06 \pm 0.493\%$ , 3 h 에서는  $56.70 \pm 0.859\%$ , 5 h 에서  $51.53 \pm 1.003\%$ 로 나타났고,  $60^{\circ}\text{C}$ 에서 1 h 에서는  $45.97 \pm 0.908\%$ , 3 h 에서는  $35.84 \pm 0.656\%$ , 5 h 에서는  $31.17 \pm 1.108\%$ 로 나타났다. 물리적 처리 방법 중 probe 형태의 ultrasonication 이 단백질 추출 수율이 가장 높은 것을 확인하였다. *Moringa oleifera* 씨앗에서 단백질 추출을 할 때 ultrasonication 이 기존의 알칼리 추출법 대비하여 단백질 추출 수율을 약 150% 증가시켰다는 결과와 유사한 것을 확인하였다(Fatima et al., 2023). Probe 형태의 ultrasonication 이 가장 높은 단백질 추출 수율이 나타난 것은 높은 밀도의 에너지를 시료에 직접 전달할 수 있기 때문으로 사료된다(Ashfaq & Younis, 2021). 반면에 수조형 sonication 의 경우, 에너지가 고르게 분포되지 않아 cavitation 이 불균일하게 발생되고, 열수 추출의 경우, 열로 세포벽을 파괴하는 것이 부족해 효율이 제한적인 것으로 판단된다(Zhou et al., 2021).

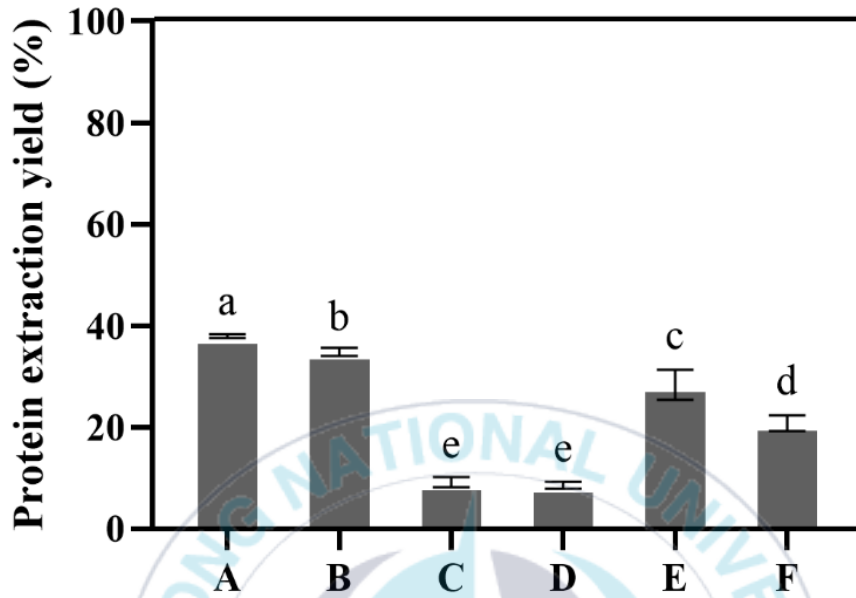


**Fig. 1. Change of protein extraction yield from spirulina according to the treatment methods**

A; sonication, B; homogenizer, C; ultrasonication, D; 50°C, 1 h, E; 50°C, 2 h, F; 50°C, 3 h, G; 60°C, 1 h, H; 60°C, 2 h, I; 60°C, 1 h. Values with different letters indicate significant differences at  $p < 0.05$  using one-way ANOVA.

## 1.2. 효소 처리를 사용한 스피루리나 단백질 추출

본 연구에서는 proteases (alcalase, microbial protease, papain and bromelain)와 cellulases (cellulase and viscozyme L)가 스피루리나의 단백질 추출 수율에 미치는 영향을 조사하였다. 스피루리나로부터 단백질 추출에 사용될 수 있는 효소를 선택하는데 각 효소의 최적 pH 와 온도에서 2h 동안 처리한 스피루리나의 단백질 추출 수율을 나타내었다(Fig. 2). 프로테아제인 alcalase, microbial protease, papain, bromelain 은  $37.96 \pm 0.385\%$ ,  $34.88 \pm 0.806\%$ ,  $28.38 \pm 2.964\%$  그리고  $20.79 \pm 1.569\%$  이고, 세포벽 분해 효소인 cellulase 와 viscozyme L 는 각각  $8.59 \pm 0.688\%$ ,  $9.19 \pm 1.024\%$ 로 나타났다. *Chlorella vulgaris* 에서 단백질 추출할 때 alcalase 와 같은 효소를 사용하여 높은 단백질 추출 수율을 확인한 결과는 본 연구에서도 유사한 경향이 관찰되었다(Cunha et al., 2022). Alcalase 와 같은 단백질 분해 효소는 단백질 가수분해를 통해 세포 내부 단백질을 효과적으로 분해하는 것처럼 세포벽 일부를 파괴하면서 단백질 분해하기 때문에 단백질 추출 수율이 높게 나타난 것으로 사료된다(Verdasco-Martin et al., 2019). 또한, Cellulase 와 같은 세포벽 분해 효소의 경우, 주로 다당류에 성분을 타겟하기 때문에 다당류, 단백질, 지질 복합체 등 복잡한 세포벽 구조로 인해 단독으로는 단백질 추출 효과가 제한적일 것으로 추정된다(Htoo et al., 2024).

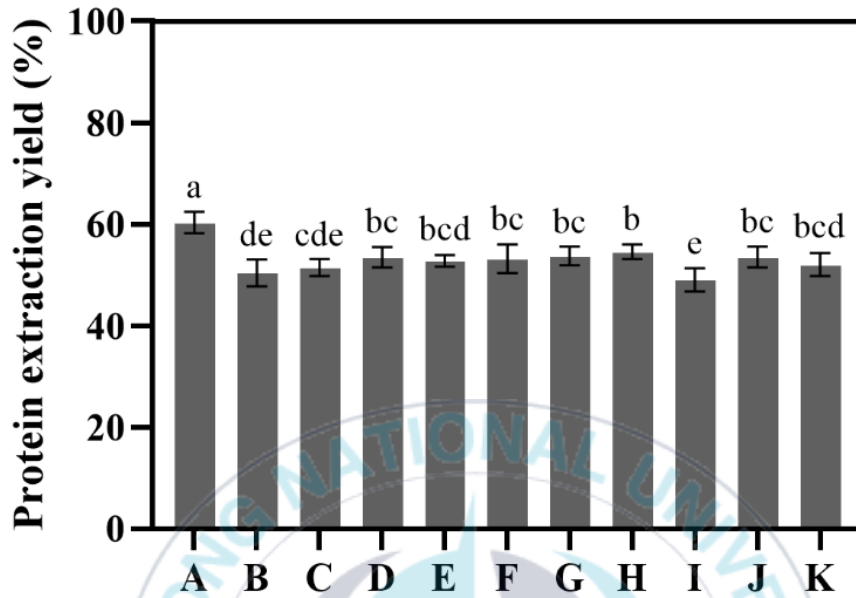


**Fig. 2. Change of protein extraction yield from spirulina according to the treatment with different enzyme**

A, Alcalase; B, Protease from *Bacillus* spp.; C, Viscozyme L; D, Cellulase from *Trichoderma reesei*; E, Papain from *Canca papaya*; F, Bromelain. Values with different letters indicate significant differences at  $p < 0.05$  using one-way ANOVA.

### 1.3. 미생물 발효를 통한 스피루리나 단백질 추출

선정된 *Bacillus* 속 균주들을 스피루리나의 발효 starter 로 적용하여 스피루리나 단백질 추출 수율을 나타내었다(Fig. 3). *B. amyloliquefaciens* MU2 균주가  $60.35 \pm 2.102\%$ 로 가장 높은 단백질 추출 수율을 나타냈으며,  $54.61 \pm 1.453\%$ 로 *Bacillus rugosus* SPB7 이 두번째로 높은 수율을 나타냈다. 가장 낮은 추출 수율인 균주는 *Bacillus subtilis* PEBSB307040301 인 것을 확인하였다. 또한, 같은 종의 균주일지라도 strain 에 따라 스피루리나 단백질의 추출 수율에 차이가 있는 것을 확인하였다. *B. subtilis* 의 경우 strain 에 따라 스피루리나 단백질 추출 수율의 변화가  $49.02 \pm 2.263 \sim 53.53 \pm 2.009$  로 가장 큰 변화를 나타냈다. 이러한 결과는 같은 종이더라도 strain 에 따라 생산하는 효소의 활성에 차이가 발생하기 때문인 것으로 사료된다. 본 연구와 유사하게 다른 환경에서 분리된 strain 이 다른 균주의 효소활성이 다른 것을 확인하였다(Mawadza et al., 2000). *B. amyloliquefaciens* 는 단백질 가수분해를 위한 neutral protease 를 대량으로 생산할 수 있는 미생물로 세포벽을 효과적으로 파괴하며, 세포 내부의 단백질을 펩타이드와 아미노산으로 분해해 단백질 추출 수율을 크게 증가시켰다(Zalila-Kolsi et al., 2023). 또한, *B. amyloliquefaciens* 가 생산하는 neutral protease 는 단백질 가수분해 뿐만 아니라 기능성 펩타이드 생성에도 기여하고 고부가가치 제품 생산이 가능한 것으로 알려져 있다(Wang et al., 2016; Zhang et al., 2022).



**Fig. 3. Change of protein extraction yield from spirulina according to the various microbial fermentation**

A; *Bacillus amyloliquefaciens* MU2, B; *Bacillus altitudinis* AC11.2, C; *Bacillus altitudinis* LNPC8, D; *Bacillus subtilis* MMS, E; *Bacillus subtilis* HY-88, F; *Bacillus subtilis* ZIM3 G; *Bacillus velezensis* ZY1, H; *Bacillus rugosus* SPB7, I; *Bacillus subtilis* PEBSB307040301, J; *Bacillus vallismortis* SAB12, K; *Bacillus safensis*. Values with different letters indicate significant differences at  $p < 0.05$  using one-way ANOVA.

#### 1.4. 유리아미노산 분석을 이용한 스피루리나 단백질 추출 방법 선정

단백질 추출 방법 중 단백질 추출 수율이 높은 3 가지 방법을 선별하여 유리아미노산 분석을 하였다(Table 6). 실험군 중 아미노산은 16 가지 종류의 아미노산에서 총 유리 아미노산의 함량은 기존 스피루리나는 281.51 mg/100 g, ultrasonication 을 사용하여 추출한 방법은 718.86 mg/100 g, 발효를 이용한 단백질 추출 방법은 10,884.19 mg/100 g, 50°C에서 1h 동안 열수 추출하여 단백질을 추출한 방법은 2,100.33 mg/100 g 으로 미생물 발효를 사용하여 단백질 추출한 방법이 가장 높게 나타났다. 발효, 열수 추출, ultrasonication 을 이용한 스피루리나 단백질 추출 방법과 기존의 스피루리나의 필수 아미노산의 함량은 각각 3,074.46 mg/100 g, 548.81 mg/100 g, 145.88 mg/100 g, 37.59 mg/100 g 으로 나타났는데 발효한 스피루리나가 원물에 비해 81.79 배, 가장 단백질 추출 수율이 높았던 ultrasonication 에 비해 25.39 배 높은 것을 확인하였다. 높은 수준의 필수 아미노산은 고품질 단백질에 중요한 요소로 보고되고 있다(Vieria et al., 2018). 특히, 근육 형성과 중추 신경계 조절에 관여하는 valine, isoleucine 및 leucine 을 포함하는 분지쇄아미노산(Branched-chain amino acids, BCAA)는 발효를 사용한 단백질 추출 방법에서 1,499.57 mg/100 g, 열수 추출을 사용한 방법에서는 144.87 mg/100 g, ultrasonication 을 사용한 방법과 기존의 스피루리나의 함량은 각각 31.61 mg/100 g, 12.80 mg/100 g 으로 발효한 스피루리나가 BCAA 또한 원물에 비해 117.15 배, 가장 단백질 추출 수율이 높았던 ultrasonication 에 비해 47.44 배 높은 것을 확인하였다. 발효하는 과정에서 미생물이 아미노산 합성 경로를 활성화하여 BCAA 와 필수아미노산이 증가한다고 알려져 있는데, 그 중에서

BCAA (leucine, isoleucine, valine)는 pyruvic acid 경로, 필수아미노산은 aspartate 경로를 활성화하여 효소 발현 및 대사 흐름의 조절로 아미노산 농도를 증가시킨다(Wang et al., 2022; Zalila-Kolsi et al., 2023; Wang et al., 2019). Ultrasonication 의 경우, 단백질 추출 수율은 높지만, 물리적으로 세포를 파괴할 뿐, 생물학적 합성 경로를 활성화하지 않기 때문에 BCAA 와 필수아미노산과 같은 아미노산의 함량이 증가하지 않을 것으로 사료된다(Parimi et al., 2015).



**Table 6. Composition of free amino acids of spirulina according to different extraction methods**

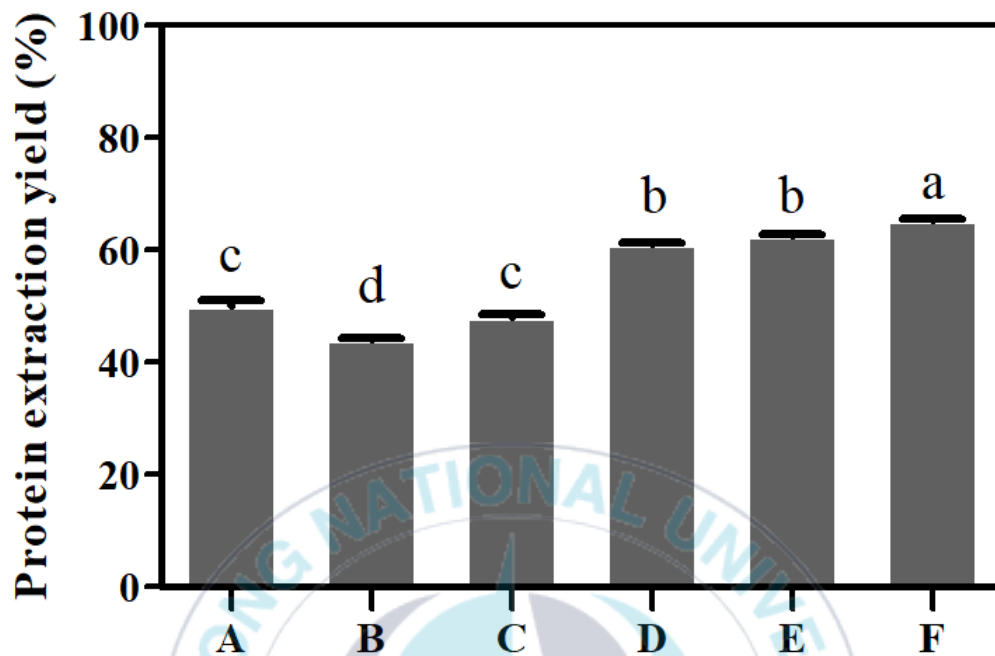
| <b>Free amino acid<br/>(mg/100g)</b> | <b>unSP*</b>           | <b>FSP</b>               | <b>WSP</b>              | <b>USP</b>            |
|--------------------------------------|------------------------|--------------------------|-------------------------|-----------------------|
| Aspartic acid                        | 74.4300 <sup>d1)</sup> | 1502.0093 <sup>a</sup>   | 356.7009 <sup>b</sup>   | 144.5561 <sup>c</sup> |
| Glutamic acid                        | 102.4745 <sup>d</sup>  | 2038.5518 <sup>a</sup>   | 424.1910 <sup>b</sup>   | 193.4398 <sup>c</sup> |
| Serine                               | 5.1953 <sup>d</sup>    | 47.0255 <sup>a</sup>     | 32.7705 <sup>b</sup>    | 11.8467 <sup>c</sup>  |
| Histidine                            | 3.8739 <sup>d</sup>    | 157.8527 <sup>a</sup>    | 33.0090 <sup>b</sup>    | 7.8306 <sup>c</sup>   |
| Arginine                             | 12.5824 <sup>d</sup>   | 1204.2726 <sup>a</sup>   | 69.5823 <sup>b</sup>    | 28.4026 <sup>c</sup>  |
| Glycine                              | 4.3289 <sup>d</sup>    | 51.0659 <sup>a</sup>     | 26.0762 <sup>b</sup>    | 9.0885 <sup>c</sup>   |
| Threonine                            | 6.0795 <sup>d</sup>    | 66.8989 <sup>a</sup>     | 32.6124 <sup>b</sup>    | 13.9429 <sup>c</sup>  |
| Alanine                              | 12.6143 <sup>d</sup>   | 656.7643 <sup>a</sup>    | 162.4055 <sup>b</sup>   | 50.0083 <sup>c</sup>  |
| Tyrosine                             | 6.3517 <sup>d</sup>    | 159.7420 <sup>a</sup>    | 72.4024 <sup>b</sup>    | 22.0795 <sup>c</sup>  |
| Cystine                              | 25.9483 <sup>d</sup>   | 2150.3005 <sup>a</sup>   | 407.3906 <sup>b</sup>   | 113.5570 <sup>c</sup> |
| Methionine                           | 5.2622 <sup>d</sup>    | 318.9238 <sup>a</sup>    | 86.3993 <sup>b</sup>    | 15.9087 <sup>c</sup>  |
| Valine                               | 2.7307 <sup>d</sup>    | 274.8505 <sup>a</sup>    | 47.6061 <sup>b</sup>    | 10.4011 <sup>c</sup>  |
| Phenylalanine                        | 5.8240 <sup>d</sup>    | 417.6294 <sup>a</sup>    | 82.2816 <sup>b</sup>    | 23.5348 <sup>c</sup>  |
| Isoleucine                           | 6.0671 <sup>d</sup>    | 469.3999 <sup>a</sup>    | 33.1628 <sup>b</sup>    | 11.8646 <sup>c</sup>  |
| Leucine                              | 3.9981 <sup>d</sup>    | 755.3185 <sup>a</sup>    | 64.1031 <sup>b</sup>    | 9.3424 <sup>c</sup>   |
| Lysine                               | 3.7534 <sup>d</sup>    | 613.5888 <sup>a</sup>    | 169.6338 <sup>b</sup>   | 53.0558 <sup>c</sup>  |
| Total                                | 276.3191 <sup>d</sup>  | 10,884.1944 <sup>a</sup> | 2,100.3275 <sup>b</sup> | 718.8594 <sup>c</sup> |

<sup>1)</sup> The different superscript lowercase letters in the same row indicate significant differences ( $p < 0.05$ ).

\* unSP, untreated spirulina; FSP, fermented spirulina; WSP, water extraction spirulina; USP, ultrasonication spirulina.

## 2. 스피루리나 단백질 발효법을 위한 스피루리나 단백질 추출 방법 선정

스피루리나 발효를 위한 최적 배지를 찾기 위해 탄소원과 질소원을 첨가하여 수행하였다. 각 탄소원, 질소원 모두 1% (w/v%)의 농도로 하여 37°C, 150 rpm 으로 24h 동안 진탕 배양하였다. 발효 후 상등액만 취하여 단백질 추출 수율을 확인한 결과가 Fig. 4 이다. 탄소원인 dextrose, sucrose, fructose 는 각각  $49.957 \pm 0.870\%$ ,  $44.058 \pm 0.529\%$ ,  $48.117 \pm 0.928\%$ 로 나타났고, 질소원인 protease peptone, beef extract, yeast extract 는 각각  $61.147 \pm 0.144\%$ ,  $62.587 \pm 0.461\%$ ,  $65.173 \pm 0.609\%$ 로 나타나 가장 추출 수율이 좋은 배지는 1% (w/v%)의 yeast extract 임을 확인하였다. 질소원은 아미노산, 펩타이드, 비타민 등을 다량 포함하는데, 이는 미생물의 성장과 단백질 합성에 즉각적으로 사용되고, 탄소원의 경우, 에너지 공급에 중요하지만, 발효물 내 질소 성분의 농도를 직접적으로 높이는 데는 한계가 있다(Spínola et al., 2024; Pérez-Alva et al., 2024).



**Fig. 4. Change of protein extraction yield from spirulina according to the various media used in fermentation**

A; Dextrose, B; Sucrose, C; Fructose, D; Protease peptone, E; Beef extract, F; Yeast extract. Values with different letters indicate significant differences at  $p < 0.05$  using one-way ANOVA.

### 3. 반응 표면 분석법을 이용한 스피루리나 단백질 추출을 위한 발효 최적 조건 확립

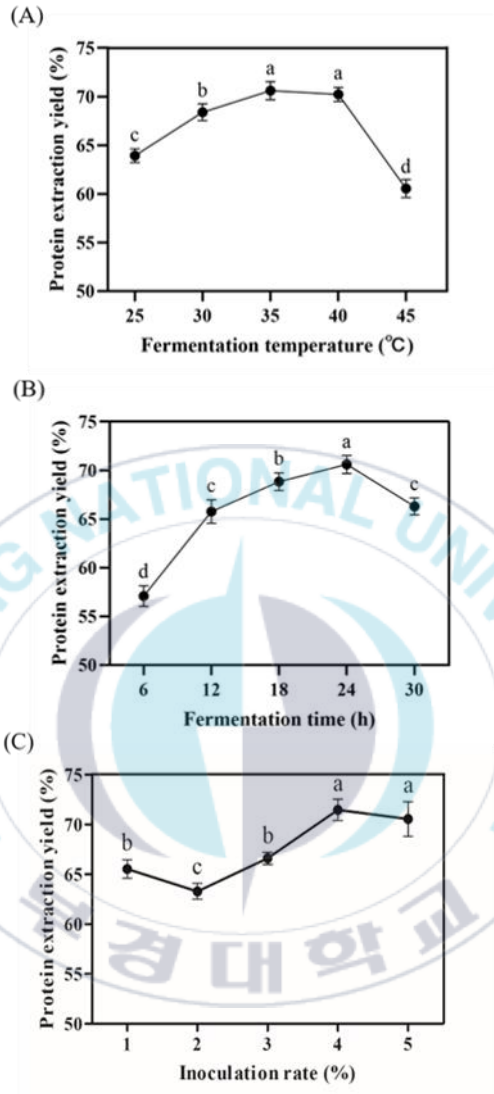
#### 3.1. Single-factor 분석

스피루리나에 *B. amyloliquefaciens* MU2 의 최적 발효 조건을 설정하기 위해 RSM 을 사용하였으며, 각 독립변수에 대한 범위를 설정하기 위해서 single-factor 분석을 수행하였다. 단백질 추출 수율 향상을 위해 RSM 을 사용하여 최적 조건을 도출한 선행연구들을 바탕으로 본 연구에서는 독립변수로서 발효 온도(°C), 발효 시간(h) 및 균 접종 비율(%)을 설정하였다(Li et al., 2024). 따라서 본 연구에서는 단백질 추출 수율을 종속변수로서 나타내었다.

발효 온도, 발효 시간 및 균 접종 비율의 single-factor 분석 결과는 Fig. 5.에 나타내었다. 발효 온도에 따른 단백질 추출 수율은 35°C가 70.611%로 나타나 유의적으로 높았으며, 25°C에서는 63.923%로 30, 35°C에 비해 유의적으로 낮은 것을 확인하였다(Fig. 5). 발효 시간은 24 h 에서 발효 시 스피루리나의 단백질 추출 수율이 70.611%로 6 h 및 12 h 에 비해 유의적으로 높았으며, 30 h 이상의 발효 시간에서는 단백질 추출 수율이 66.304%로 유의적으로 낮게 나타났다(Fig. 5.). 균 접종 비율에 따른 단백질 추출 수율은 4%에서 71.472%로 가장 높았으며 2% 및 3%에 비해 유의적으로 높게 나타났다. 따라서, *B. amyloliquefaciens* MU2 를 사용하여 발효한 스피루리나의 단백질 추출 수율에 대하여 발효 온도, 발효 시간 및 균 접종 비율은 유의미한 독립변수인 것을 확인하였다. 효모를 사용하여 고체 발효 조건을 최적화할 때, 무염 sauerkraut 를 유산균을 이용하여 발효 조건 최적화

하는 연구에서 발효 온도(°C), 발효 시간(h), 균 접종 비율(%)을 독립변수로 사용하는 것이 유사하다(Hu et al., 2016; Wang et al., 2024).





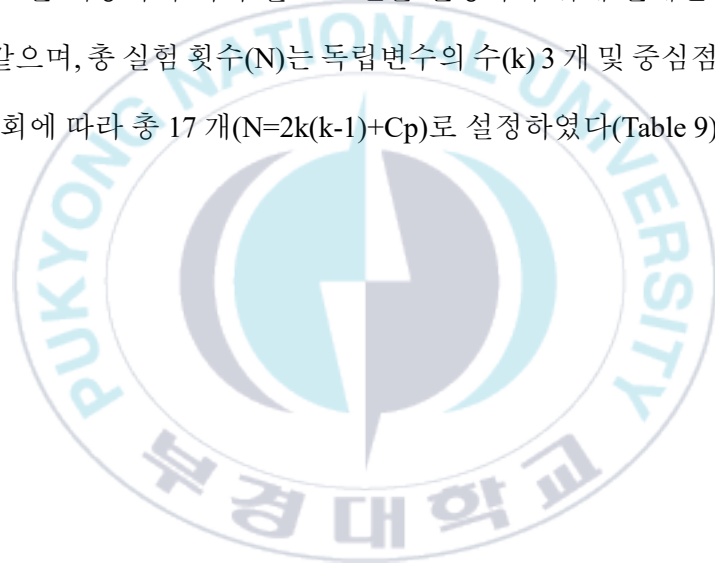
**Fig. 5. The yield of protein extraction of spirulina fermented with *Bacillus amyloliquefaciens* MU2 according to various single factor**

(A) fermentation temperature (°C), (B) fermentation time (h), (C) Bacterial inoculation rate (%). Values with different letters indicate significant differences at  $p < 0.05$  using one-way ANOVA.

### 3.2. Box-Behnken Design 을 통한 스피루리나의 발효 최적화 모델

스피루리나의 단백질 추출에 대한 *B. amyloliquefaciens* MU2 의 발효 조건을 최적화하기 위해 single-factor 실험을 기반으로 각 독립변수의 수준을 설정하였으며, 이를 각각 -1, 0 및 1 로 부호화하였다(Table 7). 발효 온도, 30°C, 35°C 및 40°C, 발효 시간 18 h, 24 h 및 36 h, 균 접종 비율 3%, 4% 및 5%를 각각 -1, 0, +1 로 설정하였다.

RSM-BBD 를 이용하여 최적 발효 조건을 설정하기 위해 설계된 실험 조건은 Table 8.와 같으며, 총 실험 횟수(N)는 독립변수의 수(k) 3 개 및 중심점에서의 반복 횟수(Cp) 5 회에 따라 총 17 개( $N=2k(k-1)+Cp$ )로 설정하였다(Table 9).



**Table 7. Experimental range and level of independent variables designed to optimize the fermentation condition of protein extraction from spirulina**

| <b>Single factor</b>  | <b>-1</b> | <b>0 (center point)</b> | <b>1</b> |
|-----------------------|-----------|-------------------------|----------|
| Temperature (°C)      | 30°C      | 35°C                    | 40°C     |
| Fermentation time (h) | 18 h      | 24 h                    | 30 h     |
| Inoculation rate (%)  | 3%        | 4%                      | 5%       |



**Table 8. Experimental design of independent variables for developing the optimized condition using Box-Behnken Design**

| No | Independent variables |                       |                      |
|----|-----------------------|-----------------------|----------------------|
|    | Temperature (°C)      | Fermentation time (h) | Inoculation rate (%) |
| 1  | 30                    | 24                    | 5                    |
| 2  | 35                    | 24                    | 4                    |
| 3  | 35                    | 24                    | 4                    |
| 4  | 35                    | 24                    | 4                    |
| 5  | 35                    | 18                    | 3                    |
| 6  | 40                    | 24                    | 5                    |
| 7  | 35                    | 24                    | 4                    |
| 8  | 40                    | 30                    | 4                    |
| 9  | 35                    | 18                    | 4                    |
| 10 | 35                    | 30                    | 4                    |
| 11 | 40                    | 18                    | 4                    |
| 12 | 40                    | 24                    | 3                    |
| 13 | 30                    | 24                    | 3                    |
| 14 | 35                    | 30                    | 3                    |
| 15 | 35                    | 18                    | 5                    |
| 16 | 35                    | 24                    | 4                    |
| 17 | 35                    | 30                    | 5                    |

RSM-BBD 에 따라 설계된 실험 조건 및 종속변수의 예측 값과 실측 값은 Table 9 에 나타내었다. 종속변수는 스피루리나의 단백질 추출에 영향을 미치는 단백질 추출 수율로 설정하였다. No. 7 ( $X_1$ , 35°C;  $X_2$ , 24 h;  $X_3$ , 4%)의 경우 단백질 추출 수율이 가장 높았다. No. 14 ( $X_1$ , 35°C;  $X_2$ , 30 h;  $X_3$ , 3%)의 경우 단백질 추출 수율이 가장 낮은 결과를 나타내었다. 종속변수와 독립변수 사이의 상관관계를 확인하기 위해 2 차 회귀방정식을 Table 10 에 나타내었으며, 도출된 2 차 방정식으로부터 예측 값을 계산하였다.



**Table 9. Box-Behnken Design of independent variables and response values (predicted and actual value)**

| No. | Independent variables        |                |                | Predicted value                 | Actual value |
|-----|------------------------------|----------------|----------------|---------------------------------|--------------|
|     | X <sub>1</sub> <sup>1)</sup> | X <sub>2</sub> | X <sub>3</sub> | Yield of protein extraction (%) |              |
| 1   | 30                           | 24             | 5              | 68.702                          | 68.427       |
| 2   | 35                           | 24             | 4              | 71.385                          | 71.371       |
| 3   | 35                           | 24             | 4              | 71.385                          | 71.408       |
| 4   | 35                           | 24             | 4              | 71.385                          | 71.234       |
| 5   | 35                           | 18             | 3              | 65.906                          | 65.534       |
| 6   | 40                           | 24             | 5              | 70.244                          | 70.281       |
| 7   | 35                           | 24             | 4              | 71.385                          | 71.659       |
| 8   | 40                           | 30             | 4              | 69.248                          | 68.813       |
| 9   | 30                           | 18             | 4              | 68.114                          | 68.496       |
| 10  | 30                           | 30             | 4              | 65.278                          | 65.155       |
| 11  | 40                           | 18             | 4              | 68.508                          | 68.578       |
| 12  | 40                           | 24             | 3              | 67.6                            | 67.822       |
| 13  | 30                           | 24             | 3              | 64.778                          | 64.688       |
| 14  | 35                           | 30             | 3              | 64.54                           | 64.672       |
| 15  | 35                           | 18             | 5              | 68.872                          | 68.687       |
| 16  | 35                           | 24             | 4              | 71.385                          | 71.118       |
| 17  | 35                           | 30             | 5              | 68.142                          | 68.460       |

1) X<sub>1</sub>, Fermentation temperature (°C); X<sub>2</sub>, Fermentation time (h); X<sub>3</sub>, Inoculation rate (%)

Table 9의 실험 결과를 토대로 2차 방정식을 도출하여 Table 10에 나타내었다. 2차 방정식은 분산분석을 기반으로 한 변수 요인을 활용하여 최적화 모델을 예측하는 데 사용되며, 각 계수의 비교를 통해 요인 간 상호작용을 분석할 수 있어 최적화 연구에 유익하다(Nguyen et al., 2020). 단백질 추출 수율이 높게 나오려면  $X_1$ 의 부호가 +,  $X_2$ 와  $X_3$ 의 부호가 -, +이므로 발효 온도와 균 접종 비율이 높을수록, 발효시간이 짧을수록 증가할 것으로 예상되었다.



**Table 10. The polynomial equation derived from the Design-Expert program based on the various fermentation conditions for spirulina protein extraction**

| Dependent variable           | Second-order Polynomial Equation  |
|------------------------------|---|
| Protein extraction yield (%) | $Y = 71.358 + 1.091X_1 - 0.524X_2 + 1.642X_3 + 0.894X_1X_2 - 0.32X_1X_3 + 0.159X_2X_3 - 1.316X_1^2 - 2.282X_2^2 - 2.238X_3^2$ |

1)  $X_1$ , Fermentation temperature (°C);  $X_2$ , Fermentation time (h);  $X_3$ , Inoculation rate (%)

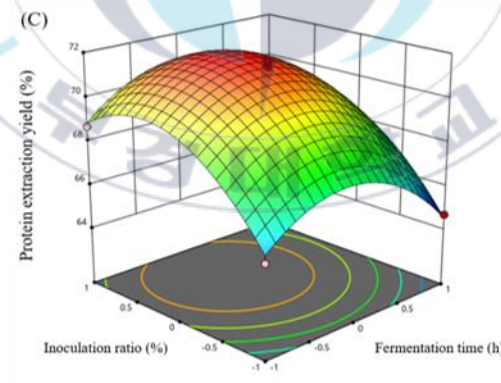
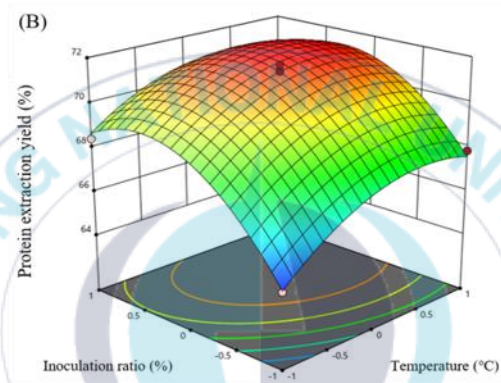
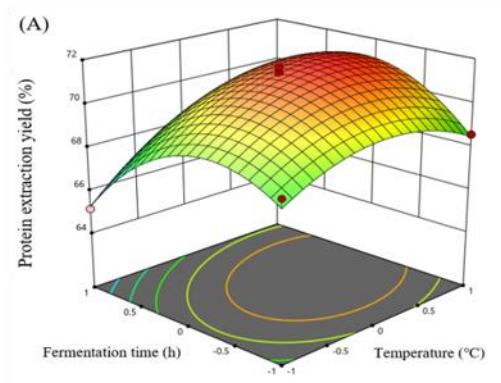


도출된 모델의 유의성을 검증하기 위해서 ANOVA 를 수행하였고, Table 11 에 나타내었다. 또한, 독립변수에 따른 종속 변수의 예측 값을 시각적으로 확인하기 위해 3D surface 에서 표면을 형성한 3D response surface 를 Fig. 6 에 나타내었다.

단백질 추출 수율 모델의 F-value 는 76.91 로 확인되었다. F-value 는 모형의 적합성을 판단하는 지표이며, 모델의 noise 가 생길 확률을 확인할 수 있으며 일반적으로 F-value 가 1 보다 크면 통계적으로 유의한 것으로 간주된다(Nguyen et al., 2020; Kim et al., 2014). 본 연구 결과 모든 종속변수의 모델의 F-value 가 1 보다 커 유의적인 모델임을 확인하였다. *p*-value 는 각 변수의 유의성 및 변수 간의 상호작용 강도를 나타내며 모든 모델에서 0.05 미만으로 나타나 통계적으로 유의한 것으로 확인되었다(Zhou et al., 2020). 또한 모델의 결함으로 인해 발생하는 오차를 확인해 모델의 적합성에 대한 평가에 사용되는 lack of fit (적합성 결여)는 본 연구의 *p*-value 가 모두 0.05 보다 크므로 종속변수에 대하여 유의하지 않은 모형임을 확인하였다(Said & Sarbon, 2020). 따라서 본 연구에서 개발된 모델은 통계적으로 적합함을 확인하였다.

**Table 11. ANOVA for the analysis of variance and adequacy of their quadratic model**

|                               | Protein extraction yield |             |         |                           |
|-------------------------------|--------------------------|-------------|---------|---------------------------|
|                               | Sum of Squares           | Mean Square | F-value | <i>p</i> -value           |
| Model                         | 92.8                     | 10.31       | 76.91   | <0.0001<br>significant    |
| X <sub>1</sub>                | 9.52                     | 9.52        | 71.03   | <0.0001                   |
| X <sub>2</sub>                | 2.2                      | 2.2         | 16.41   | 0.0049                    |
| X <sub>3</sub>                | 21.58                    | 21.58       | 160.96  | <0.0001                   |
| X <sub>1</sub> X <sub>2</sub> | 3.2                      | 3.2         | 23.85   | 0.0018                    |
| X <sub>1</sub> X <sub>3</sub> | 0.4096                   | 0.4096      | 3.06    | 0.124                     |
| X <sub>2</sub> X <sub>3</sub> | 0.1008                   | 0.1008      | 0.7519  | 0.4146                    |
| X <sub>1</sub> <sup>2</sup>   | 7.29                     | 7.29        | 54.36   | 0.0002                    |
| X <sub>2</sub> <sup>2</sup>   | 21.92                    | 21.92       | 163.53  | <0.0001                   |
| X <sub>3</sub> <sup>2</sup>   | 21.09                    | 21.09       | 157.28  | <0.0001                   |
| Residual                      | 0.9385                   | 0.1341      |         |                           |
| Lack of Fit                   | 0.7722                   | 0.2574      | 6.19    | 0.0552<br>Not significant |
| Pure error                    | 0.1662                   | 0.0416      |         |                           |
| Cor Total                     | 93.74                    |             |         |                           |



**Fig. 6. 3D response surface on the percentage of protein extraction yield according to dual factors**

(A), with temperature and inoculation rate (B), and with fermentation time and inoculation rate (C).

모델의 적합성을 확인하기 위한 회귀분석 결과는 Table 12 에 나타났다. 종속 변수에 대해 quadratic model 로 결정되었고 단백질 추출 수율의 모델의 R<sup>2</sup> 값은 0.9900 으로 나타났다. 모델의 R<sup>2</sup> 값이 1 에 가까울수록 실제 값과 예측 값 사이에서 높은 상관관계를 나타내는데 모델에서 스피루리나 단백질 추출 수율을 예측하는데 신뢰할 수 있는 것으로 나타났다. Adequacy precision 은 설계점에서 예측 값의 범위를 평균 예측 오차와 비교하여 계산한 적정 정밀도로 일반적으로 4 보다 큰 값일수록 적절한 모델임을 평가하는데 본 모델은 24.3754 로 스피루리나 단백질 추출 발효 조건을 탐색하는데 신뢰할 수 있다고 판단된다(Jeong et al., 2022). Coefficient of variation (변동계수)는 종속변수에서 10 미만인 것으로 나타나 신뢰할 수 있는 모델임을 확인하였다(Park et al., 2021). 이를 통해 개발된 모델의 정확성 및 신뢰도를 확인하였다.

**Table 12. Regression analysis for the quadratic model**

| <b>Sum of square</b>     | <b>Evaluation values</b> |
|--------------------------|--------------------------|
| Standard deviation       | 0.3622                   |
| Mean                     | 68.6120                  |
| Model degree             | Quadratic                |
| Coefficient of variation | 0.5337                   |
| PRESS                    | 12.6023                  |
| R-squared                | 0.9900                   |
| Adjusted R-squared       | 0.9771                   |
| Predicted R-squared      | 0.8656                   |
| Adequate precision       | 24.3849                  |



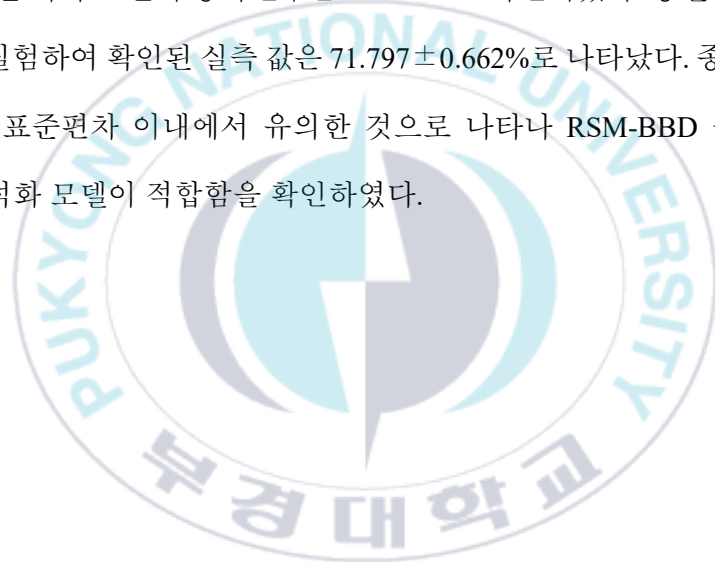
실제 값에 대한 예측 값을 표시한 Fig. 7 는 모든 반응 값이 45 도 대각선에 근접하게 나타나 적절한 상관관계를 나타내고 있음을 확인하였다. 분산된 포인트가 45 도 선에 근접하게 분포하는 경우에는 모델의 예측 정확도에 오류가 없음을 의미하고 반응 변수의 변경이 필요하지 않다는 것을 말한다. 따라서 본 모델은 스피루리나 단백질 추출의 발효 조건을 예측하는데 적합하다(Dao et al., 2019; Manmai et al., 2021).





### 3.3. 최적화된 모델의 검증

스피루리나 단백질 추출을 위한 발효 조건을 발효 온도, 발효 시간 및 균 접종 비율을 최적화하였다. RSM 을 이용하여 단백질 추출 수율을 최대화하려는 최적화 조건을 도출하였다(Table 13). 최적화 조건은 발효 온도 35.39℃, 발효 시간 24 h 2 m 24 s, 균 접종 비율 4.275%로 나타났다. 도출된 최적 조건으로 스피루리나를 발효하여 재현성을 검증하였으며, 예측 값 및 실측 값은 Table 14 과 같다. 예측된 최적 조건의 종속변수는 71.823%로 확인되었다. 동일한 최적 발효 조건으로 실험하여 확인된 실측 값은  $71.797 \pm 0.662\%$ 로 나타났다. 종속변수에서 실측 값은 표준편차 이내에서 유의한 것으로 나타나 RSM-BBD 를 이용하여 개발된 최적화 모델이 적합함을 확인하였다.



**Table 13. Optimized model of fermentation condition to increase the yield of spirulina protein extraction**

| <b>Independent variables</b>  | <b>Numerical optimization model</b> |
|-------------------------------|-------------------------------------|
| Fermentation temperature (°C) | 35.39                               |
| Fermentation time (h)         | 24.04                               |
| Inoculation rate (%)          | 4.275                               |



**Table 14. Validation of the optimized model on the yield of spirulina protein extraction**

| <b>Dependent variables</b> | <b>Predicted value</b> | <b>Actual value</b>          |
|----------------------------|------------------------|------------------------------|
| Protein extraction yield   | 71.823                 | 71.797 ± 0.662 <sup>1)</sup> |

<sup>1)</sup> Each value is mean ± S.D (N = 3).



## 4. 최적 조건으로 발효한 스피루리나 추출물의 특성 분석 결과

### 4.1. 일반 성분 분석

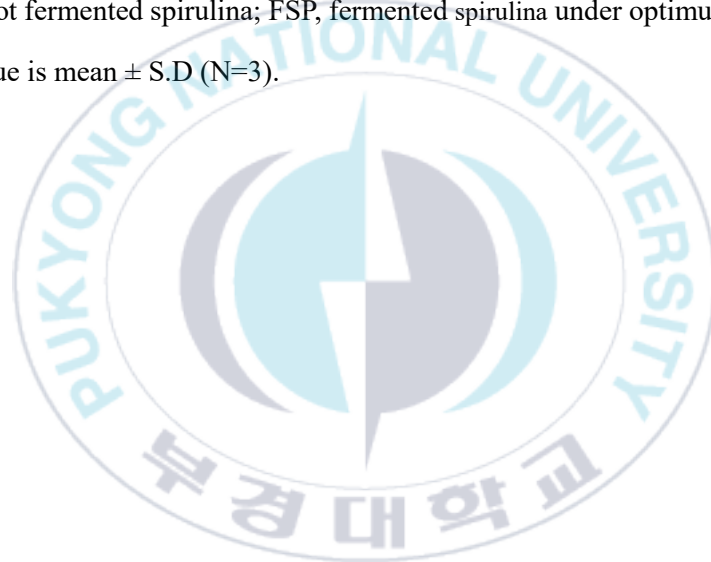
스피루리나 원물과 최적화된 발효 조건으로 발효한 스피루리나의 분무건조물의 일반 성분 분석에 대한 결과는 Table 15에 나타내었다. 대조군에 비해 최적화된 스피루리나의 수분, 회분, 조단백질 함량이 더 높게 나타났으며, 조지방과 탄수화물은 낮게 나타났다. 특히, 조단백질의 함량은 최적 조건으로 발효한 스피루리나( $74.286 \pm 0.513\%$ )이 원물( $70.059 \pm 0.295\%$ )에 비해 유의적으로 높게 나타났다. 하지만, 총 탄수화물의 함량은 원물이  $6.838 \pm 0.251\%$ , 발효한 스피루리나가  $3.417 \pm 0.711\%$ 로 줄어들었는데, 이는 *B. amyloliquefaciens*의 protease와 같은 효소 분비 및 대사활동으로 인해 스피루리나의 영양 성분이 변하며, 단백질 및 미네랄 함량이 증가하고, 탄수화물의 함량이 감소된 것으로 사료된다(Bai et al., 2022; Zalila-Kolsi et al., 2023; Zhang et al., 2022). *Bacillus* 균주를 사용하여 발효 후 조단백질 함량이 증가하고 탄수화물 함량이 감소한다는 다른 연구에서도 유사한 결과가 나타나는 것을 확인하였다(Chen et al., 2010; Teng et al., 2012; Gao et al., 2013).

**Table 15. Comparison of proximate compositions of spirulina**

| <b>%</b>      | <b>unFSP<sup>1)</sup></b> | <b>FSP</b>   | <b>t-test</b> | <b>p-value</b> |
|---------------|---------------------------|--------------|---------------|----------------|
| Moisture      | 4.153±0.445 <sup>2)</sup> | 5.988±0.364  | 5.525         | 0.780          |
| Ash           | 7.218±0.141               | 9.206±0.273  | -11.226       | 0.178          |
| Crude protein | 70.059±0.295              | 74.286±0.513 | -12.125       | 0.198          |
| Crude lipid   | 11.731±0.167              | 7.102±0.754  | 6.541         | 0.552          |
| Carbohydrate  | 6.838±0.251               | 3.417±0.711  | 6.455         | 0.111          |
| Total         | 100.000                   | 100.000      |               |                |

1) unFSP, not fermented spirulina; FSP, fermented spirulina under optimum conditions.

2) Each value is mean ± S.D (N=3).



## 4.2. 아미노산 분석 결과

처리하지 않은 원물 스피루리나와 최적 조건으로 발효한 스피루리나의 아미노산의 품질을 평가하기 위해서 유리 아미노산을 비교하였으며, 그에 대한 결과는 Table 16 에 나타내었다. 27 가지 종류의 유리아미노산이 검출되었고, 처리하지 않은 원물 스피루리나와 최적 조건으로 발효한 스피루리나의 유리 아미노산 함량은 각각 429.312 및 10,047.98 mg/100 g 였다. 필수 아미노산의 경우, 최적 조건으로 발효한 스피루리나의 필수 유리 아미노산의 함량은 5,585.715 mg/100 g 로 처리하지 않은 원물 스피루리나 (55.019 mg/100 g)보다 101.5 배 높았다. 그 중에서 alanine, glutamic acid, proline 과 같이 소수성 및 음전하를 띠는 아미노산은 항산화 활성과 같은 생리 활성 특성을 가지고 있다(Kurt et al., 2023; Moayedi et al., 2017). Alanine, glutamic acid, proline 의 함량 변화를 봤을 때 처리하지 않은 원물에서는 각각 31.381, 237.522 mg/100 g, proline 에서는 검출되지 않았지만, 최적 조건 발효한 스피루리나에서는 각각 620.459, 290.772, 449.789 mg/100 g 으로 증가하여 최적 조건으로 발효한 스피루리나에 항산화 활성과 같은 생리 활성 특성이 증가할 것으로 예상된다. 근육량 증가와 단백질 합성에 도움을 주는  $\beta$ -amino isobutyric acid (BAIBA)와 신경이완 및 기억력을 증진시키는  $\gamma$ -amino-n-butyric acid (GABA)는 처리하지 않은 원물에서 검출되지 않았지만, 최적 조건으로 발효한 스피루리나에서는 각각 309.697, 63.214 mg/100 g 으로 나타났다(Diez-Gutiérrez et al., 2020). 유리아미노산을 분석한 결과, 최적 조건으로 발효한 스피루리나가 처리하지 않은 원물에 비해 필수 아미노산 함량이 높은 것으로 나타났고, 기능성이 많이 함유되어 있어 식품의 대체 단백질

소재로 활용하기 유리하다. *B. subtilis* 균주를 사용하여 발효한 대두가 발효하지 않은 대두보다 유리아미노산 함량이 증가한다는 다른 연구에서도 유사한 결과가 나타나는 것을 확인하였다(Dajanta et al., 2011).



**Table 16. Free amino acid compositions of unfermented spirulina (unFSP) and spirulina protein extracted by fermentation (FSP)**

| <b>Amino acids<br/>(mg/100 g)</b> | <b>unFSP</b> | <b>FSP</b> |
|-----------------------------------|--------------|------------|
| P-Serine                          | 39.613       | 558.259    |
| Taurine                           | 10.756       | ND         |
| PEA                               | ND           | 224.064    |
| Aspartic acid                     | 10.918       | 76.754     |
| Threonine*                        | 6.525        | 92.654     |
| Serine                            | 7.951        | 11.725     |
| Glutamic acid                     | 237.522      | 290.772    |
| α-AAA                             | ND           | 96.015     |
| Glycine                           | 7.432        | 320.222    |
| Alanine                           | 31.381       | 620.459    |
| α-ABA                             | ND           | 224.892    |
| Valine*                           | 8.845        | 886.028    |
| Cysteine                          | ND           | ND         |
| Methionine*                       | ND           | 277.358    |
| Isoleucine*                       | 8.467        | 720.669    |
| Leucine*                          | 12.695       | 1,919.278  |
| Tyrosine                          | 6.825        | ND         |
| Phenylalanine*                    | 11.463       | 1,028.016  |
| β-Alanine                         | ND           | 228.268    |
| β-amino isobutyric acid           | ND           | 309.697    |
| γ-amino-n-butyric acid            | ND           | 63.214     |
| NH <sub>3</sub> -N                | 10.33        | 272.03     |
| Ornithine                         | ND           | 716.108    |
| Lysine*                           | 7.024        | 549.022    |
| Histidine*                        | ND           | 112.69     |
| Arginine                          | 11.565       | ND         |
| Proline                           | ND           | 449.789    |
| ΣEAA <sup>1)</sup>                | 55.019       | 5,585.715  |
| ΣNEAA                             | 374.293      | 4,462.265  |
| TAA                               | 429.312      | 10,047.98  |

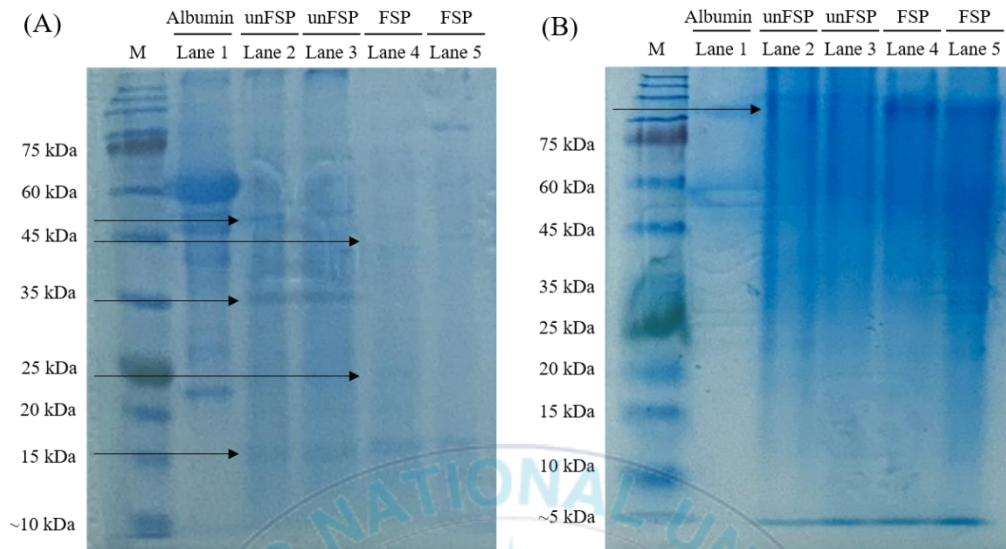
1) EAA, essential amino acid; ND, not detected; NEAA, non-essential amino acid; TAA, total amino acid.

\* Essential amino acid

### 4.3. SDS-PAGE 및 Native-PAGE 결과

전기 영동을 사용하여 기존의 스피루리나와 최적 조건으로 발효한 스피루리나의 단백질 프로필을 확인한 결과가 Fig. 8에 나타냈다. SDS-PAGE는 단백질의 크기를 기준으로 분리하여 샘플 내 단백질의 순도를 확인하는 데 주로 사용된다. 기존의 스피루리나의 SDS-PAGE band를 봤을 때, 약 50, 35, 15 kDa에서 확인되었고, 최적 조건으로 발효한 스피루리나에서는 15 kDa에서 band가 관찰되었다. 이는 미생물의 protease가 스피루리나의 단백질을 더 작은 분자로 전환시킨 것으로 사료된다. Fig. 8는 Native-PAGE에 대한 결과로, 단백질의 크기 이외에도 단백질의 상태 등을 파악할 수 있다. 기존의 스피루리나와 최적 조건으로 발효한 스피루리나의 밴드가 유사한 위치인 약 75 kDa에서 확인되었는데, 이는 단백질이 변성되지 않았음으로 사료된다. 이러한 결과는 클로렐라를 protease로 효소 처리하여 단백질을 분해한 뒤 전기 영동하였을 때 유사한 결과가 나타난 것으로 보아 유의미한 결과라고 할 수 있다(Cho et al., 2024). 또한, 유산균으로 발효한 스피루리나의 단백질 크기를 비교한 연구 또한 발효 전과 발효 후에 단백질의 크기가 작아지는 유사한 결과가 나타난 것을 확인하였다(de Castro et al., 2019).

따라서, 본 연구에서는 최적 조건으로 발효한 스피루리나는 소화 및 흡수가 간단한 저분자 단백질로 단백질이 풍부한 식품 생산에 단백질 재료의 대안으로 사용될 수 있을 것으로 기대한다.



**Fig. 8. (A) SDS-PAGE, (B) Native-PAGE analysis of protein fractions from unfermented spirulina (unFSP) and optimum condition fermented spirulina (FSP)**

M denotes the protein molecular marker (10~245 kDa).

#### 4.4. 항산화 분석 결과

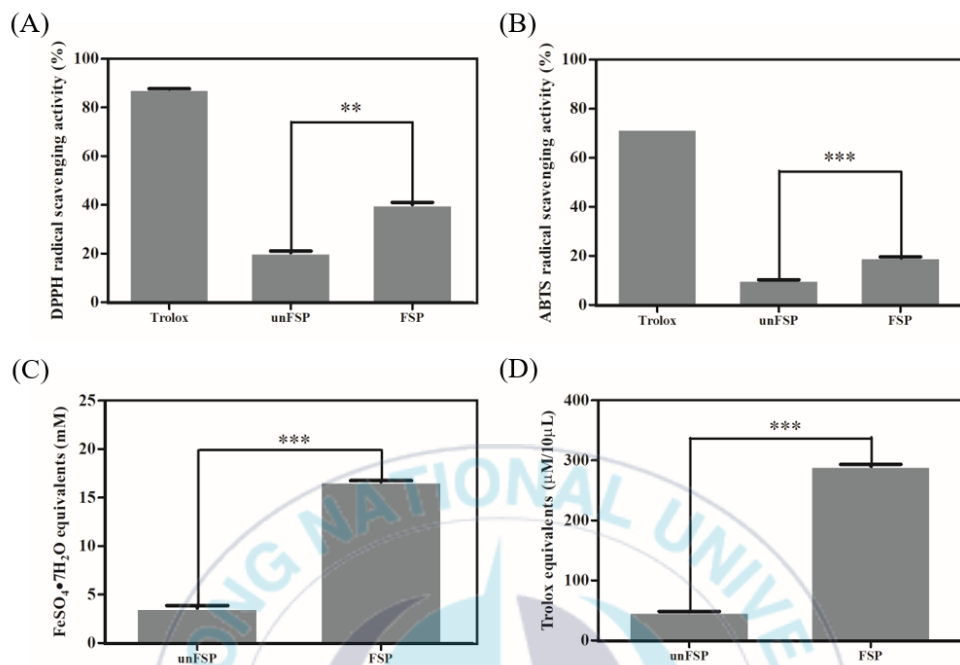
DPPH 라디칼 소거능은 구조 중간에 free radical 을 지닌 질소가 수산화기를 가진 복합물과 만나 수소결합을 이루면서 free radical 이 소거되는 원리를 이용한다(Jung & Jung, 2024). 최적 조건으로 발효한 스피루리나와 기존의 스피루리나의 DPPH 라디칼 소거능은 Fig. 9A 에 나타내었다. 최적 조건으로 발효한 스피루리나와 기존의 스피루리나는 각  $40.162 \pm 1.469\%$ ,  $20.412 \pm 1.116\%$ 으로 최적 조건으로 발효한 스피루리나가 유의적으로 더 높게 나타났다. 이러한 결과는 톳을 발효한 연구에서도 원물 대비 활성이 증가하는 결과와 유사한 것으로 나타났다(Song et al., 2011).

ABTS 라디칼 소거능은 ABTS 를 potassium persulfate 로 산화시켜 생성된 ABTS 양이온 라디칼이 시료 내의 항산화 물질에 의해 환원이 되는 원리를 이용한다(Re et al., 1999). 기존의 스피루리나와 최적 조건으로 발효한 스피루리나 분무건조물의 ABTS 라디칼 소거능은 Fig. 9B 에 나타내었다. 스피루리나와 최적 조건으로 발효한 스피루리나의 ABTS 소거능은 각각  $10.185 \pm 0.126\%$ ,  $19.350 \pm 0.487\%$ 로 최적 조건으로 발효한 스피루리나가 유의적으로 높게 나타났다. 이러한 결과는 대두를 발효한 연구에서도 원물 대비 활성이 증가하는 결과와 유사한 것으로 나타났다(Dai et al., 2017).

FRAP 환원능은 시료 내 항산화 물질에 의해  $Fe^{III}$ -TPTZ 가  $Fe^{II}$ -TPTZ 로 환원되는 원리를 이용한다(Griffin & Bhagooli, 2003). 최적화된 스피루리나와 기존의 스피루리나의 FRAP 환원능은 Fig. 9C 에 나타내었다. 최적 조건으로 발효한 스피루리나와 대조군이 각  $16.629 \pm 0.221$  mM  $FeSO_4 \cdot 7H_2O$

equivalents/10 $\mu$ L,  $3.588 \pm 0.464$  mM FeSO<sub>4</sub> · 7H<sub>2</sub>O equivalents/10 $\mu$ L 로 최적 조건으로 발효한 스피루리나가 유의적으로 높게 나타났다. 이러한 결과는 밀을 발효한 연구에서도 발효한 밀이 FRAP 환원능이 증가하는 결과와 유사하였다(Dey & Kuhad, 2014).

ORAC 분석법은 peroxy radical generator 에서 유도된 peroxy radical 에 대한 항산화 물질의 저해능을 측정하는 방법으로 peroxy radical 과 형광 probe 가 반응하여 형성되는 비형광 생성물의 양이 시간에 따라 얼마나 감소하는지를 평가하여 항산화 활성을 측정하는 원리이다(Kwon et al., 2019). 최적 조건으로 발효한 스피루리나와 기존의 스피루리나의 ORAC 활성 결과는 Fig. 9D 에 나타냈다. 기존의 스피루리나의 ORAC 활성 결과는  $47.952 \pm 0.690$   $\mu$ M trolox equivalents/10  $\mu$ L 이고, 최적 조건으로 발효한 스피루리나의 결과값은  $290.81 \pm 1.080$   $\mu$ M trolox equivalents/10  $\mu$ L 의 활성을 나타내었다.



**Fig. 9. Comparison of antioxidant activities of between unfermented spirulina (unFSP) and optimum condition fermented spirulina (FSP).**

DPPH (A), ABTS (B), FRAP (C) and ORAC (D). \*\*  $p < 0.005$ , \*\*\*  $p < 0.001$  ; an independent t-test comparison of different two samples (unFSP, FSP).

#### 4.5. 총 페놀 및 플라보노이드 함량 결과

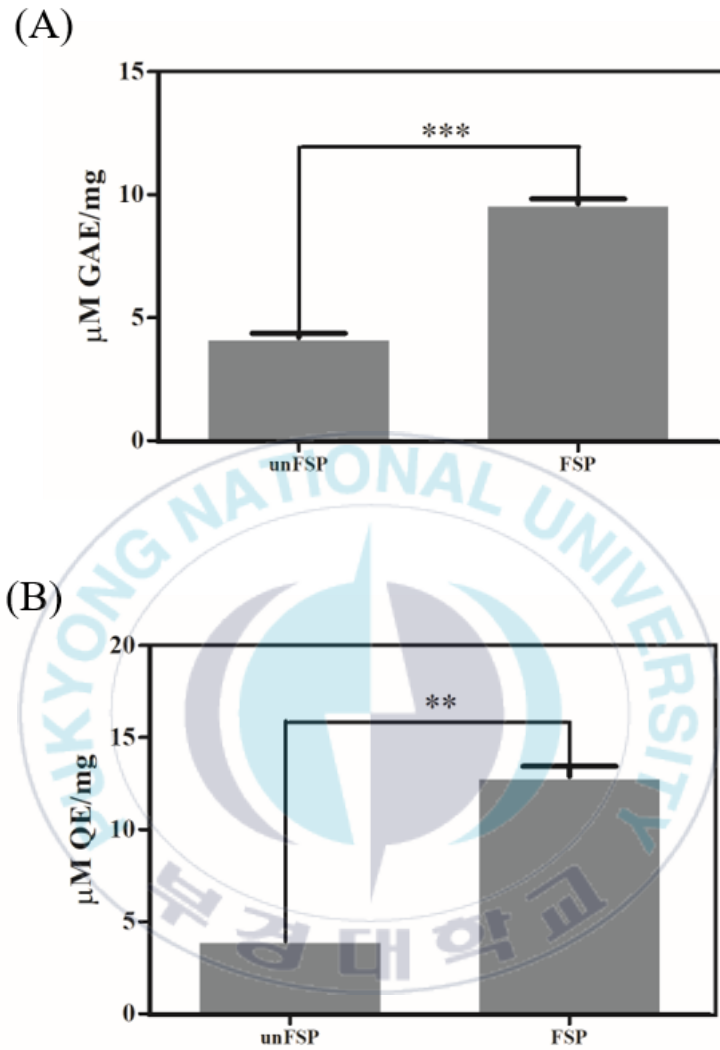
페놀류의 항산화 활성은 주로 환원제, 수소 공여체 및 금속 킬레이트제로 작용할 수 있는 특성으로 인해 항산화제 역할을 하고 있다(Kaur & Kapoor, 2002). 최적 조건으로 발효한 스피루리나와 기존의 스피루리나에 대한 결과는 Fig. 10A 에 나타내었다. 각 결과값은 기존의 스피루리나는  $4.20 \pm 0.286 \mu\text{g GAE/mg}$ , 최적 조건 발효한 스피루리나는  $9.53 \pm 0.343 \mu\text{g GAE/mg}$  로 최적 조건으로 발효한 스피루리나가 유의적으로 높게 나타났다. 이러한 결과는 발효한 kinema 가 비발효 대두보다 총 페놀 함량이 증가하였다고 보고한 바와 일치하였다(Moktan et al., 2008).

플라보노이드는 자연적으로 많이 발생하는 페놀계의 가장 큰 그룹으로 항균, 항암 등 많은 생물학적 활성을 가지고 있다(John et al., 2014). 최적 조건으로 발효한 스피루리나와 기존의 스피루리나의 총 플라보노이드 함량은 Fig. 10B 에 나타내었다. 스피루리나 최적 발효물과 대조군이 각각  $12.89 \pm 0.962 \mu\text{g QE/mg}$ ,  $4.00 \pm 0.000 \mu\text{g QE/mg}$  으로 최적 조건으로 발효한 스피루리나가 유의적으로 높게 나타났다. 이러한 결과는 *Citrus reticulata* 껍질 분말(CRPP)을 발효한 연구에서도 최적 조건으로 발효한 CRPP 이 발효하지 않은 CRPP 보다 총 플라보노이드 함량이 증가한다고 보고한 것과 유사한 것을 확인하였다(Mamy et al., 2024).

이상의 항산화 활성, 총 페놀 및 플라보노이드의 결과를 종합해보면, 스피루리나를 발효하는 과정에서 생리 활성 화합물의 방출이 증가하며, 단백질 가수분해로 생성된 펩타이드가 추가적인 항산화 활성을 발휘한다. 또한, 발효로 인한 유기산은 pH 를 낮추어 항산화 물질의 안정성을 높이고, 미생물

대사과정에서 생성된 생합성 화합물이 항산화 효과를 증진시키는데 기여하였고, 이러한 변화는 DPPH, ABTS, ORAC, FRAP 등 다양한 항산화 시험에서 활성을 강화시키는 것으로 확인되었다(Guilherme et al., 2020; Wolosiak et al., 2021; Xu et al., 2024) 이러한 결과는 *Lactobacillus plantarum* 으로 발효한 스피루리나가 TPC가 320%, 항산화 활성이 79% 증가한 결과와 본 연구의 결과와 유사한 것으로 나타났다(de Castro et al., 2019; Masten et al., 2021)





**Fig. 10. Comparison of phenolic content and flavonoid content of between unfermented spirulina (unFSP) and optimum condition fermented spirulina (FSP).**

TPC (A), TFC (B). \*\*  $p < 0.005$ , \*\*\*  $p < 0.001$  ; an independent t-test comparison of different two samples (unFSP, FSP).

## IV. 요약

최근 인구의 증가와 천연자원 고갈은 전 세계적으로 직면한 가장 심각한 문제 중 하나가 되었다. 현재 세계 인구는 75억 명으로 구성되어 있으며 2050년까지 90~100억으로 증가할 것으로 예상되는데, 이로 인해 결과적으로 지속 가능하고 건강하며 영양가 있는 식품에 대한 수요가 끊임없이 증가하고 있다. 오늘날 식품 시스템은 전 세계 온실 가스(GHG) 배출, 삼림 벌채, 물 소비와 같은 환경 문제에 가장 크게 기여하고 있다. 육류 생산은 GHG 배출과 물 소비에 극적인 영향을 미치는 것으로 나타났다. 따라서 단백질의 대체 공급원이 시급히 필요로 하고 있다.

미세조류는 단세포의 미세한 유기체로서, 실행 가능한 대체 단백질 공급원으로도 여겨진다. *Spirulina (Arthrospira platensis)*는 모든 전체 식품 중 가장 높은 단백질 함량을 기록한 필라멘트형 남조류로 비타민과 미네랄 함량이 높고, FDA 와 유럽 식품 안전 기관 (EFSA)에서 일반적으로 안전하다고 간주하기 때문에 기능성 식품으로 판매되고 있다. 미세조류는 가공되지 않은 상태에서는 단백질 소화율이 낮으며, 이러한 이유로 생물학적 이용가능성을 개선하기 위해 단백질 추출을 위한 기술을 개발하는데 많은 중점을 두고 있다. 기존에 사용한 단백질 추출 기술로는 외부적인 충격을 가해 용출시키는 물리적인 방법, 열수 추출, 효소를 사용하여 추출하는 방법, 산, 염기 등 용매를 사용하여 가수분해하였다. 하지만 이 기술들은 과도하게 에너지를 사용하고, 소비자들의 안전성의 문제로 새로운 추출 기술을 필요로 하고 있다. 이 중 미생물을 이용한 미생물 발효법은 다른 추출 방법들에 비해 산업적인 작용이

유리하다는 장점으로 식품 분야 뿐만 아니라 다양한 분야에서 활용되고 있다. 본 연구에서는 발효식품인 젓갈에서 분리한 *Bacillus* 균주 중 바이오제닉 아민 활성이나 용혈성과 같이 안전성이 확인되고, protease 활성이 뛰어난 균주를 스피루리나의 발효에 적용하여 단백질을 추출하고자 하였다.

Single-factor 분석 결과를 실시한 결과 발효 온도, 발효 시간 및 균 접종 비율이 스피루리나의 단백질 추출 수율에 대해 유의적으로 영향을 미치는 것을 확인하였다. 스피루리나 단백질 추출을 위한 최적 발효 조건을 도출하기 위해 Box-Behnken Design (BBD) 모델을 활용하였다. 발효 온도 30, 35 및 40°C, 발효 시간 18, 24 및 30 h, 균 접종 비율 3, 4 및 5%를 독립변수로써 각각 -1, 0 및 1로 부호화 한 후, 17가지 조건을 무작위로 실험하였다. 종속변수로는 단백질 추출 수율을 확인하였다. RSM 을 통해 종속변수에 대한 2 차 회귀방정식을 도출하였으며, ANOVA 분석을 통해 모델이 유의한 모델임을 확인하였다.

스피루리나의 단백질 추출 수율을 위한 최적 발효 조건으로 발효 온도 35.39°C, 발효 시간 24 h 2 m 24 s 및 균 접종 비율 4.275%을 도출하였다. 이후 도출된 최적 침지 조건을 재현하여 예측 값 및 실측 값을 비교 및 분석을 통해서 통계적으로 유의한 발효 조건임을 검증하였다.

스피루리나의 최적 발효 조건을 통해 제조된 스피루리나 발효물의 단백질 특성을 평가하기 위해 일반성분 분석, 아미노산의 함량, 전기 영동을 이용한 단백질 크기 확인, 항산화 능력 변화를 확인하였다. 실험 결과 스피루리나 발효물이 처리하지 않은 원물에 비해 조단백질, 근육 형성에 도움되는 BCAA 를 비롯한 필수아미노산의 함량 증가, 단백질 저분자화되는 것을 확인하였다.

항산화 실험 결과 스피루리나 발효물이 DPPH radical 소거 활성, ABTS radical 소거 활성, FRAP, ORAC, TPC 및 TFC의 활성이 처리하지 않은 원물에 비해 높은 것을 확인하였다.

미생물 발효법을 이용한 스피루리나의 단백질 추출 수율에 대한 기술 적용 가능성을 제시하며, 대체 단백질 소재의 새로운 접근법을 제안할 수 있을 것으로 사료된다.



## 참고문헌

- Ajomiwe, N., Boland, M., Phongthai, S., Bagiyal, M., Singh, J., & Kaur, L. (2024). Protein nutrition: Understanding structure, digestibility, and bioavailability for optimal health. *Foods*, 13(11), 1771.
- Alavijeh, R. S., Karimi, K., Wijffels, R. H., van Den Berg, C., & Eppink, M. (2020). Combined bead milling and enzymatic hydrolysis for efficient fractionation of lipids, proteins, and carbohydrates of *Chlorella vulgaris* microalgae. *Bioresource Technology*, 309, 123321.
- Asaduzzaman, A. K. M., Getachew, A. T., Cho, Y. J., Park, J. S., Haq, M., & Chun, B. S. (2020). Characterization of pepsin-solubilised collagen recovered from mackerel (*Scomber japonicus*) bone and skin using subcritical water hydrolysis. *International journal of biological macromolecules*, 148, 1290-1297.
- Ashfaq, A., & Younis, K. (2021). Ultrasound-assisted Extraction of Plant-Based Proteins: A Novel. *Indian Journal of Pure & Applied Biosciences*, 9(3), 145-150.
- Bai, J., Franco, M., Ding, Z., Hao, L., Ke, W., Wang, M., Xie, D., Li, Z., Zhang, Y., & Guo, X. (2022). Effect of *Bacillus amyloliquefaciens* and *Bacillus subtilis* on fermentation, dynamics of bacterial community and their functional shifts of whole-plant corn silage. *Journal of animal science and biotechnology*, 13, 1-14.
- Bernaerts, T. M., Verstreken, H., Dejonghe, C., Gheysen, L., Foubert, I., Grauwet, T., & Van Loey, A. M. (2020). Cell disruption of *Nannochloropsis* sp. improves *in vitro* bioaccessibility of carotenoids and  $\omega$ 3-LC-PUFA. *Journal of Functional Foods*, 65, 103770.
- Bleakley, S., & Hayes, M. (2017). Algal proteins: extraction, application, and challenges concerning production. *Foods*, 6(5), 33.

- Campbell-Platt, G. (1994). Fermented foods—a world perspective. *Food research international*, 27(3), 253-257.
- Chiavelli, L. U. R., Godoy, A. C., Silveira, R. D., Santos, P. D. S., Lopes, T. A., Santos, O. O., & Visentainer, J. V. (2020). Optimization of milk sample cleanup using response surface methodology. *Food Analytical Methods*, 13, 166-175.
- Cho, K. J., Kim, M. U., Jeong, G. J., Khan, F., Jo, D. M., & Kim, Y. M. (2024). Optimization of protease treatment conditions for *Chlorella pyrenoidosa* protein extraction and investigation of its potential as an alternative protein source. *Foods*, 13(3), 366.
- Cunha, S. A., Coscueta, E. R., Nova, P., Silva, J. L., & Pintado, M. M. (2022). Bioactive hydrolysates from *Chlorella vulgaris*: optimal process and bioactive properties. *Molecules*, 27(8), 2505.
- Dai, C., Ma, H., He, R., Huang, L., Zhu, S., Ding, Q., & Luo, L. (2017). Improvement of nutritional value and bioactivity of soybean meal by solid-state fermentation with *Bacillus subtilis*. *LWT*, 86, 1-7.
- Dajanta, K., Apichartsrangkoon, A., Chukeatirote, E., & Frazier, R. A. (2011). Free-amino acid profiles of thua nao, a Thai fermented soybean. *Food Chemistry*, 125(2), 342-347.
- de Marco Castro, E., Shannon, E., & Abu-Ghannam, N. (2019). Effect of fermentation on enhancing the nutraceutical properties of *Arthrospira platensis* (Spirulina). *Fermentation*, 5(1), 28.
- Delran, P., Frances, C., Peydecastaing, J., Pontalier, P. Y., Guihéneuf, F., & Barthe, L. (2023). Cell destruction level and metabolites green-extraction of *Tetraselmis*

- suecica* by low and intermediate frequency ultrasound. *Ultrasonics Sonochemistry*, 98, 106492.
- Dey, T. B., & Kuhad, R. C. (2014). Enhanced production and extraction of phenolic compounds from wheat by solid-state fermentation with *Rhizopus oryzae* RCK2012. *Biotechnology Reports*, 4, 120-127.
- Diez-Gutiérrez, L., San Vicente, L., Barrón, L. J. R., del Carmen Villarán, M., & Chávarri, M. (2020). Gamma-aminobutyric acid and probiotics: Multiple health benefits and their future in the global functional food and nutraceuticals market. *Journal of Functional Foods*, 64, 103669.
- Du, Q., Li, H., Tu, M., Wu, Z., Zhang, T., Liu, J., Ding, Y., Zeng, X., & Pan, D. (2024). Legume protein fermented by lactic acid bacteria: specific enzymatic hydrolysis, protein composition, structure, and functional properties. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 113929.
- Fassio, F., & Chirilli, C. (2023). The circular economy and the food system: a review of principal measuring tools. *Sustainability*, 15(13), 10179.
- Gao, K., & McKinley, K. R. (1994). Use of macroalgae for marine biomass production and CO<sub>2</sub> remediation: a review. *Journal of Applied Phycology*, 6, 45-60.
- Greetham, D., Zaky, A., Makanjuola, O., & Du, C. (2018). A brief review on bioethanol production using marine biomass, marine microorganism and seawater. *Current Opinion in Green and Sustainable Chemistry*, 14, 53-59.
- Griffin, S. P., & Bhagooli, R. (2004). Measuring antioxidant potential in corals using the FRAP assay. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 302(2), 201-211.

- Guilherme, R., Aires, A., Rodrigues, N., Peres, A. M., & Pereira, J. A. (2020). Phenolics and antioxidant activity of green and red sweet peppers from organic and conventional agriculture: A comparative study. *Agriculture*, 10(12), 652.
- Günerken, E., D'Hondt, E., Eppink, M., Elst, K., & Wijffels, R. (2016). Influence of nitrogen depletion in the growth of *N. oleoabundans* on the release of cellular components after beadmilling. *Bioresource Technology*, 214, 89-95.
- Htoo, N. Y. M., Krasesintra, O., Buncharoen, W., Kaewkod, T., Pekkoh, J., Tragoolpua, Y., Khoo, K. S., Chaipoot, S., Srinuanpan, S., & Pumas, C. (2024). *In vitro* immunomodulation activity of protein hydrolysate from spirulina (*Arthrospira platensis*): the ingredient of future foods. *Frontiers in Marine Science*, 11, 1303025.
- Hu, Y., Qin, H., Zhan, Z., Dun, Y., Zhou, Y., Peng, N., & Zhao, S. (2016). Optimization of *Saccharomyces boulardii* production in solid-state fermentation with response surface methodology. *Biotechnology & Biotechnological Equipment*, 30(1), 173-179.
- Jeong, G. J., Khan, F., Kang, M. G., Cho, K. J., Park, G. W., Jo, D. M., Park, S. K & Kim, Y. M. (2022). Preparation of rice paper enriched with laver (*Pyropia* sp.) and tapioca starch with process optimization using response surface methodology. *LWT*, 160, 113312.
- Jo, D. M., Song, M. R., Park, S. K., Choi, J. H., Kim, D. H., & Kim, Y. M. (2023). Potential application of lactic acid bacteria for controlling discoloration in tuna (*Thunnus orientalis*). *Food Bioscience*, 54, 102856.
- John, B. I. J. U., Sulaiman, C. T., George, S., & Reddy, V. R. K. (2014). Total phenolics and flavonoids in selected medicinal plants from Kerala. *International Journal Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*, 6(1), 406-408.

- Jung, J. E., & Jung, S. H. (2024). Identification of aromatic components and physiological activities of *Valeriana fauriei* essential oil. *Journal of the Korean Applied Science and Technology*, 41(3), 733-744.
- Kaur, C., & Kapoor, H. C. (2002). Anti-oxidant activity and total phenolic content of some Asian vegetables. *International Journal of Food Science & Technology*, 37(2), 153-161.
- Kim, H. D., Choi, J. I., & Han, S. J. (2014). Short article: Optimization of medium for carotenoid production by *Arthrobacter* sp. PAMC 25486 using response surface methodology. *Chemical Engineering*, 52 (6), 834-839.
- Kurt, H., Hosoglu, M. I., Guneser, O., & Karagul-Yuceer, Y. (2023). Influence of different bacteria species in chemical composition and sensory properties of fermented *Spirulina*. *Food Chemistry*, 400, 133994.
- Kwon, H. Y., Lee, S. M., Choi, S. I., Cho, B. Y., Choi, S. H., Sim, W. S., Xiongao, H., Jang, G. W., Lee, O. K., & Park, D. H. (2019). Antioxidant activities of *B. campestris* var. *chinensis* and *B. juncea* L. Czern var. *Laciniata* Makino baby leaf extracts. *Food Science and Preservation*, 26(3), 336-342.
- Ladjal-Ettoumi, Y., Hamadi, M., Douik, L. H., Cherifi, Z., & Nazir, A. (2024). Physicochemical, functional, and nutraceutical properties of *Spirulina* and *Chlorella* biomass: A comparative study. *Algal Research*, 81, 103561.
- Lafarga, T. (2019). Effect of microalgal biomass incorporation into foods: Nutritional and sensorial attributes of the end products. *Algal Research*, 41, 101566.
- Li, X., Feng, J., Lv, J., Liu, Q., Liu, X., Liu, Y., Xie, S., & Nan, F. (2024). Optimization of the preparation process of *Spirulina* blended liquor and *Spirulina* fermented wine,

- analysis of volatile components and in vitro antioxidant study. *Journal of Food Science*.
- Liu, C., Cheng, S., Wang, H., & Tan, M. (2023). Pickering emulsion stabilized by *Haematococcus pluvialis* protein particles and its application in dumpling stuffing. *Food Research International*, 170, 112957.
- Mamy, D., Boateng, I. D., & Chen, X. (2024). Two-pot optimization of nutrient sources to enhance antioxidants in *Citrus reticulata* peel powder through solid-state fermentation with *Aspergillus niger* CGMCC 3.6189. *Food Bioscience*, 59, 104145.
- Marco, M. L., Heeney, D., Binda, S., Cifelli, C. J., Cotter, P. D., Foligné, B., ... & Hutkins, R. (2017). Health benefits of fermented foods: microbiota and beyond. *Current opinion in biotechnology*, 44, 94-102.
- Marco, M. L., Sanders, M. E., Gänzle, M., Arrieta, M. C., Cotter, P. D., De Vuyst, L., ... & Hutkins, R. (2021). The International scientific association for probiotics and prebiotics (ISAPP) consensus statement on fermented foods. *Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology*, 18(3), 196-208.
- Masten Rutar, J., Cillero-Pastor, B., Mohren, R., Poklar Ulrih, N., Ogrinc, N., & Jamnik, P. (2021). Insight into the antioxidant effect of fermented and non-fermented *Spirulina* water and ethanol extracts at the proteome level using a yeast cell model. *Antioxidants*, 10(9), 1366.
- Mawadza, C., Hatti-Kaul, R., Zvauya, R., & Mattiasson, B. (2000). Purification and characterization of cellulases produced by two *Bacillus* strains. *Journal of biotechnology*, 83(3), 177-187.
- Menegotto, A. L. L., de Souza, L. E. S., Colla, L. M., Costa, J. A. V., Sehn, E., Bittencourt, P. R. S., de Moraes Flores, E. L., Canan, C., & Colla, E. (2019).

- Investigation of techno-functional and physicochemical properties of *Spirulina platensis* protein concentrate for food enrichment. *LWT*, 114, 108267.
- min Cho, K., & sook Park, H. (2024). Hydrogen yields and microbial community impacts of changes in carbohydrate concentration during hydrogen fermentation of food wastes. *New & Renewable Energy*, 20(1), 175-181.
- Moayedi, A., Mora, L., Aristoy, M. C., Hashemi, M., Safari, M., & Toldrá, F. (2017). ACE-inhibitory and antioxidant activities of peptide fragments obtained from tomato processing by-products fermented using *Bacillus subtilis*: Effect of amino acid composition and peptides molecular mass distribution. *Applied biochemistry and biotechnology*, 181, 48-64.
- Mohamed, V. B. H., Swedha, A., Sankaranarayanan, A., Pasumalaiarasu, S., & Parangusadoss, K. (2024). Significance of various aspects of food microbiology, fermentation, and latest technology and its impact on human health. In *Industrial Microbiology and Biotechnology: An Insight into Current Trends* (pp. 347-355). Singapore: Springer Nature Singapore
- Moktan, B., Saha, J., & Sarkar, P. K. (2008). Antioxidant activities of soybean as affected by *Bacillus*-fermentation to kinema. *Food Research International*, 41(6), 586-593.
- Nath, A., & Chattopadhyay, P. K. (2007). Optimization of oven toasting for improving crispness and other quality attributes of ready to eat potato-soy snack using response surface methodology. *Journal of Food Engineering*, 80(4), 1282-1292.
- Nguyen, T. V. T., Unpaprom, Y., Manmai, N., Whangchai, K., & Ramaraj, R. (2020). Impact and significance of pretreatment on the fermentable sugar production from

- low-grade longan fruit wastes for bioethanol production. *Biomass Conversion and Biorefinery*, 1-13.
- Nunes, E., Odenthal, K., Nunes, N., Fernandes, T., Fernandes, I. A., & de Carvalho, M. A. P. (2024). Protein extracts from microalgae and cyanobacteria biomass. Technofunctional properties and bioactivity: A review. *Algal Research*, 103638.
- Park, S. K., Jo, D. M., Kang, M. G., Khan, F., Hong, S. D., Kim, C. Y., Kim, Y. M., & Ryu, U. C. (2021). Bactericidal effect of ultraviolet C light-emitting diodes: Optimization of efficacy toward foodborne pathogens in water. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, 222, 112277.
- Pérez-Alva, A., Guadalupe-Daqui, M., Cárdenas-Pinto, S., Moreno, S. R., Thompson-Witrick, K. A., Ramírez-Rodrigues, M. A., Ramírez-Rodrigues, M. M., & MacIntosh, A. J. (2024). Brewing with Sea Vegetable: The effect of *Spirulina (Arthrospira platensis)* supplementation on brewing germination kinetics, yeast Behavior, and the physiochemical properties of the product. *Fermentation*, 10(8), 415.
- Re, R., Pellegrini, N., Proteggente, A., Pannala, A., Yang, M., & Rice-Evans, C. (1999). Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free radical biology and medicine*, 26(9-10), 1231-1237.
- Ryu, M. S., Yang, H. J., Jeong, S. J., Seo, J. W., Ha, G., Jeong, S. Y., & Jeong, D. Y. (2018). Characteristic study and optimization of culture conditions for *Bacillus amyloliquefaciens* SRCM 100731 as probiotic resource for companion animal. *Korean Journal of Microbiology*, 54(4), 384-397.
- Said, N. S., & Sarbon, N. M. (2020). Response surface methodology (RSM) of chicken skin gelatin based composite films with rice starch and curcumin incorporation. *Polymer Testing*, 81, 106161.

- Salucci, S. (2023). Nutrition and regulation of muscle protein synthesis. *Nutrients*, 15(18), 4017.
- Song, H. S., Kim, H. K., Min, H. O., Choi, J. D., & Kim, Y. M. (2011). Changes in physicochemical and sensory properties of *Hizikia fusiforme* water extract by fermentation of lactic acid bacteria. *Korean Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 44(2), 104-110.
- Spínola, M. P., Mendes, A. R., & Prates, J. A. (2024). Chemical composition, bioactivities, and applications of *Spirulina (Limnospira platensis)* in food, feed, and medicine. *Foods*, 13(22), 3656.
- Verdasco-Martín, C. M., Echevarrieta, L., & Otero, C. (2019). Advantageous preparation of digested proteic extracts from *Spirulina platensis* biomass. *Catalysts*, 9(2), 145.
- Vieira, M. V., Turkiewicz, I. P., Tkacz, K., Fuentes-Grünwald, C., Pastrana, L. M., Fuciños, P., Wojdylo, A., & Nowicka, P. (2021). Microalgae as a potential functional ingredient: evaluation of the phytochemical profile, antioxidant activity and *in-vitro* enzymatic inhibitory effect of different species. *Molecules*, 26(24), 7593.
- Wang, H., Yang, L., Ping, Y., Bai, Y., Luo, H., Huang, H., & Yao, B. (2016). Engineering of a *Bacillus amyloliquefaciens* strain with high neutral protease producing capacity and optimization of its fermentation conditions. *PLoS One*, 11(1), e0146373.
- Wang, H., Zhang, X., Qiu, J., Wang, K., Meng, K., Luo, H., Su, X., Ma, R., Huang, H., & Yao, B. (2019). Development of *Bacillus amyloliquefaciens* as a high-level recombinant protein expression system. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 46(1), 113-123.

- Wang, S., Wang, R., Zhao, X., Ma, G., Liu, N., Zheng, Y., Tan, J., & Qi, G. (2022). Systemically engineering *Bacillus amyloliquefaciens* for increasing its antifungal activity and green antifungal lipopeptides production. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, 10, 961535.
- Wang, W., Li, W., Huang, Y., Yang, Y., Liu, H., Yu, C., Yuan, Q., He, L., Hu, Q., Li, Y., Meng, T., Chen, H., Liao, J., Chen, O., Yu, S., & Zhang, F. (2024). Optimization of *Lactobacillus* fermentation conditions and its application in the fermentation of salt-free sauerkraut. *Frontiers in Microbiology*, 15, 1482163.
- White, H., & Gurney, T. (2024). Chlorella Supplementation Reduces blood lactate concentration and increases O<sub>2</sub> pulse during submaximal and maximal cycling in young healthy adults. *Nutrients*, 16(5), 697.
- Wołosiak, R., Drużyńska, B., Derewiaka, D., Piecyk, M., Majewska, E., Ciecierska, M., Worobiej, E., & Pakosz, P. (2021). Verification of the conditions for determination of antioxidant activity by ABTS and DPPH assays—A practical approach. *Molecules*, 27(1), 50.
- Xu, B., Dong, Q., Yu, C., Chen, H., Zhao, Y., Zhang, B., Yu, P., & Chen, M. (2024). Advances in research on the activity evaluation, mechanism and structure-activity relationships of natural antioxidant peptides. *Antioxidants*, 13(4), 479.
- Xu, Y., Galanopoulos, M., Sismour, E., Ren, S., Mersha, Z., Lynch, P., & Almutaimi, A. (2020). Effect of enzymatic hydrolysis using endo-and exo-proteases on secondary structure, functional, and antioxidant properties of chickpea protein hydrolysates. *Journal of Food Measurement and Characterization*, 14(1), 343-352.

- Yoo, H., Yoon, Y., & Oh, S. (2021). Growth media conditions for large-scale fermentation of *Bacillus subtilis* FWC1, *B. amyloliquefaciens* NAAS1, and *Pichia farinose* NAAS2. *Journal of Dairy Science and Biotechnology*, 39(3), 87-93.
- Yüce-tepe, A., Saroğlu, Ö., Daşkaya Dikmen, C., BilDik, F., & Özçelik, B. (2018). Optimisation of ultrasound-assisted extraction of protein from *Spirulina platensis* using RSM.
- Zalila-Kolsi, I., Ben-Mahmoud, A., & Al-Barazie, R. (2023). *Bacillus amyloliquefaciens*: harnessing its potential for industrial, medical, and agricultural applications—a comprehensive review. *Microorganisms*, 11(9), 2215.
- Zhang, J., Zhu, B., Li, X., Xu, X., Li, D., Zeng, F., Zhou, C., Liu, Y., Li, Y., & Lu, F. (2022). Multiple modular engineering of *Bacillus amyloliquefaciens* cell factories for enhanced production of alkaline proteases from *B. clausii*. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, 10, 866066.
- Zhou, J., Wang, M., Carrillo, C., Zhu, Z., Brncic, M., Berrada, H., & Barba, F. J. (2021). Impact of pressurized liquid extraction and pH on protein yield, changes in molecular size distribution and antioxidant compounds recovery from spirulina. *Foods*, 10(9), 2153.
- Zhou, L., Duan, X., Li, K., Hill, D. R., Martin, G. J., & Suleria, H. A. (2023). Extraction and characterization of bioactive compounds from diverse marine microalgae and their potential antioxidant activities. *Chemistry & Biodiversity*, 20(11), e202300602.
- Zhou, R., Zhang, M., Li, J., & Zhao, W. (2020). Optimization of preparation conditions for biochar derived from water hyacinth by using response surface methodology (RSM) and its application in Pb<sup>2+</sup> removal. *Journal of Environmental Chemical Engineering*, 8(5), 104198.

Zhu, Y., Zhao, X., Zhang, X., & Liu, H. (2019). Extraction, structural and functional properties of *Haematococcus pluvialis* protein after pigment removal. *International journal of biological macromolecules*, 140, 1073-1083.

