J. Korean Fish. Soc. 33(5), 482~488 한수지, 33(5), 482~488, 2000

*Spirulina platensis*가 생산하는 phycobilins의 spectral 특성 및 phycocyanin 색소의 안정성

주동식[1] · 조순영
강릉대학교 동해안해양생물자원연구센터

Stability of Phycocyanin and Spectral Characteristic of Phycobilins from *Spirulina platensis*

Dong Sik JOO and Soon Yeong CHO
East Coastal Marine Bioresources Research Center, Kangnung National University, Kangnung 210-702, Korea

The stability of c-phycocyanin and spectral property of phycobilins obtained from *Spirulina platensis* cultured by helical tubular photobioreactor were determined. The c-phycocyanin with maximal absorption of 622 nm and allophycocyanin with maximal absorption of 652 nm fractions were isolated from phycobilins by Sephadex G-100 gel chromatography. The yield of partially purified c-phycocyanin was about 1.5% to dried biomass. The stability of c-phycocyanin in the range of pH 4~9 was high, but c-phycocyanin was unstable over pH 10. The c-phycocyanin was stable at temperatures below 40℃, and at light intensity below 15000 lux. And metal ions were not affect the stability of c-phycocyanin.

Key words: *Spirulina platensis*, C-phycocyanin, Photobioreactor, Stability

서 론

미세 조류는 chlorophyll, carotenoid 또는 phycobilins와 같은 색소를 함유하며 주로 광합성을 통해 세포 성장과 번식을 행하는 식물군 또는 세균으로 분류되고 있으며, 그 종류나 수가 매우 다양하고 많다 (Becker, 1994). 이러한 미세 조류는 수권의 1차 생산 즉, 태양에너지 이용에 의한 무기물로부터 유기물의 생산을 주도하는 이용도가 낮은 생물군으로 여겨져왔다. 그러나 현재 인류가 이용하고 있는 자원의 한계를 예측하고 대체 자원 개발이 필요한 시점에서 미래 생물자원의 하나로 미세 조류가 주목을 끌고 있으며, 이에 대한 연구가 다양하게 진행되고 있다 (Aaronson et al., 1980; Aoyama et al., 1997; Barclay et al., 1988; Ciferri, 1983; Gudin et al., 1980). 일반적으로 미세 조류는 지상 식물보다 훨씬 빨리 성장하고 생균체 생산성이 높은 점, 담수나 해수는 물론이고 빛에너지를 확보할 수 있는 자연 환경에서는 쉽게 생육한다는 점, 다양한 조류종에서 단백질, 지질, 당질, 색소와 같은 산업적으로 흥미가 있는 생물 고분자 물질은 물론이고 특정의 생리 기능을 갖는 물질을 고농도로 생산할 수 있다는 점 등에서 중요한 생물산업 소재로서 그 가능성이 충분하다고 할 수 있다 (Benemann et al., 1987; Kishimoto et al., 1994; Piorreck et al., 1984; Benemann, 1989; Ciferri, 1983; Borowitzka, 1992; Ben-Amotz, 1980).

한편, *Spirulina platensis*는 남조류로 다세포이며 다른 녹조류나 홍조류 비해 크고 운동성이 있으며 알칼리성 염수 호수에 널리 생육한다 (Melack, 1979). *S. platensis*는 균체의 60% 이상이 단백질로 구성되어 주요한 단백질원으로 이용될 수 있고, 지질은 GLA (gamma linolenic acid, $C_{18:3}$) 함량이 높아 생리활성물질로도 이용 가능하다 (Piorreck et al., 1984). 아울러 *S. platensis*는 phycobilins라는 단백 색소를 다량 함유하고 있다는 측면에서도 다른 미세조류와 크게 구별되며 (Glazer, 1985), 이 중에서도 phycocyanin은 청색의 천연 색소로 다양한 생리 활성을 가지는 것으로 밝혀져 있어 식품 산업이나 생리 활성 물질 소재로서도 이용이 가능한 단백 색소이다 (Mizuno et al., 1982; Gantt et al., 1981; Ciferri et al., 1983). Phycocyanin 색소는 국내에서도 아이스크림, 사탕, 과자 등의 식품 산업과 화장품 등의 공업용으로 널리 이용되고 있는데, 대부분이 수입하여 사용하고 있다. 따라서 국내에서도 phycocyanin 색소의 생산 가능성을 확인하고 이 색소에 대한 다양한 기초적인 연구 수행이 필요한 실정이다.

본 연구에서는 식품 또는 생리 활성 물질 소재로 phycocyanin을 생산하기 위해 소규모의 tubular system에서 *S. platensis*를 배양하고 배양된 조류로부터 phycocyanin을 추출하였다. 아울러 *S. platensis*로부터 추출된 phycocyanin 색소를 부분 정제하여 스펙트럼 특성을 간단히 실험하였고, 부분 정제된 phycocyanin의 온도, pH, 빛 및 금속에 대한 안정성을 실험하였다.

재료 및 방법

사용 균주

본 연구에 사용된 균주 *Spirulina platensis* SAG 257.80은 독일 Albrecht-v.-Haller Institute의 Sammlung von Algenkulturen에서 분양받은 것이었다.

[1]Corresponding author; Kangnung city Jibyun dong 123, Kangnung National Univ. East Coastal Marine Bioresources Research Center

배양 배지

S. platensis 배양에 사용된 배지는 알칼리성 무기배지 (Schlosser, 1994)로 그 조성은 증류수 1000 mL에 $NaHCO_3$ 10.0 g, Na_2CO_3 3.0 g, K_2HPO_4 0.05 g, $NaNO_3$ 2.5 g, K_2SO_4 1.0 g, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.2 g, $CaCl_2 \cdot 2H_2O$ 0.04 g, EDTA 0.08 g, $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.01 g, Micro soln. [H_3BO_3 2.0 g, $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.01 g, $CuSO_4 \cdot 5H_2O$ 0.5 g, $Na_2MoO_4 \cdot 2H_2O$ 1.0 g, $MnSO_4 \cdot 4H_2O$ 2.0 g, Co $(NO_3) \cdot 6H_2O$ 1.0 g, EDTA 0.4 g, $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.7 g in 1000 mL D.W.] 5 mL을 가한 다음 멸균한 후 Vitamin B_{12} (10 mg/100 mL)를 1 mL 가한 것이었다.

배양 형태 및 조건

Phycocyanin 색소 추출을 위한 미세조류의 배양은 helical tubular photobioreactor로 용량은 18 L였고, 배양 온도와 빛 강도는 각각 35℃, 1450~1500 lux로 조절하였다. pH조절은 인위적으로 행하지 않았고, 별도의 CO_2 공급없이 공기만을 0.6 mL/min의 속도로 공급하면서 배양을 행하였다. Fig. 1에 배양기의 형태를 간단하게 모식하여 나타내었다 (Watanabe et al., 1995).

미세조류의 수확 및 처리

배양된 균체는 원심분리 (3000 rpm, 5 min)하여 분리하였고, 분리된 균체에 1.0% NaCl 용액으로 간단하게 수세한 다음 다시 원심분리하여 균체를 얻었고, 얻어진 균체는 동결 건조하여 phycocyanin 추출용 시료로 하였다.

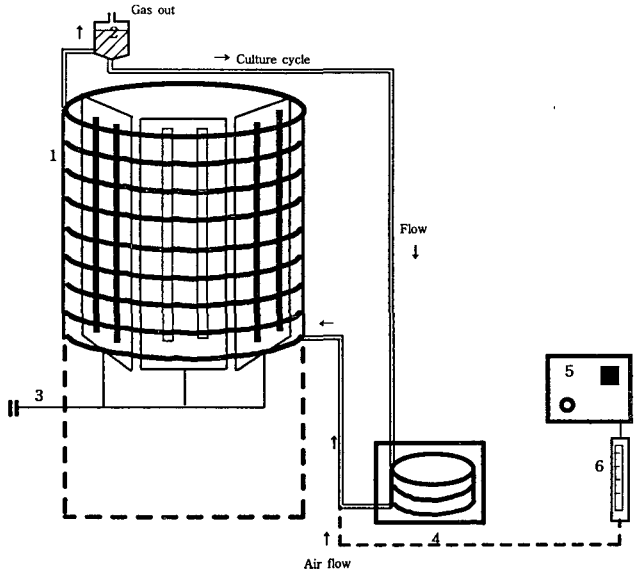

Fig. 1. A schematic diagram of the helical tubular photobioreactor system. The air-lift system in which the gas stream moves within the helical photostage and gas flow results in cycling of the culture medium.
1; helical photostage, 2; degasser, 3; fluorescent lamp, 4; heat exchanger, 5; air pump, 6; flow meter

일반 성분 및 phycocyanin 함량 측정

동결 건조된 *S. platensis*의 일반성분은 상법에 따라 수분은 상압가열 건조법, 회분은 회화법, 지방은 Soxhlet법, 단백질은 micro-kjeldahl법으로 행하였으며, 당질은 100에서 이들 성분을 제외한 나머지 값으로 나타내었다.

Phycocyanin 함량은 동결건조한 *S. platensis* 40 mg을 50 mL 원심관에 정평한 다음 10 mL 0.1 M phosphate buffer (pH 7.0)를 가한 다음 15분간 vortex하고 4℃ 냉장고에서 하룻밤 방치한후 원심분리 (3,500 rpm, 5 min, 5℃)한 다음 상층액을 취하여 620 nm에서 O.D.값을 측정하여 아래 식에 의해 phycocyanin 함량을 계산하였다 (Boussiba et al., 1979).

$$\text{C-phycocyanin (\%)} = \frac{A_{620} \times 10 \times 100}{3.39 \times \text{Sample (mg)} \times (\%\ \text{dry wt})}$$

A_{620}: 620 nm absorbance, 3.39: extinction of CPC at 620 nm, 10: total volume (mL)

단백색소 정제 및 스펙트럼 특성

동결 건조한 *S. platensis* 2.0 g을 250 mL 원심관에 정평한 다음 200 mL 0.1 M phosphate buffer (pH 7.0)를 가한 다음 30분간 vortex하고 4℃ 냉장고에서 하룻밤 방치한후 원심분리 (3,500 rpm, 5 min, 5℃)하여 crude phycobilins을 추출하였다. Crude phycobilins를 정제하기위해 100 mL 색소 추출물에 황산암모늄 16.5 g을 서서히 첨가하면서 교반하여 원심분리 (10,000 rpm, 10 min)하고 상층액을 취한 다음, 여기에 황산암모늄 20.0 g을 재첨가하여 교반한 다음, 원심분리하여 침전하는 색소 획분에 0.1 M phosphate buffer 30 mL를 첨가하여 원심분리한 후 상층액을 취하였다. 동일한 완충액으로 평형화시킨 Sephadex G-100 (Φ2.5 cm×100 cm)에 시료를 5 mL 흡착시킨 다음 동일한 완충액으로 용출 (40 mL/hr, 6 mL/fraction)시켰다. 분획된 각 획분 시료들의 스펙트럼 특성을 spectrophotometer (HP 8453)로 300~700 nm 범위에서 확인하였고, 아울러 c-phycocyanin, allophycocyanin 및 phycoerythrin으로 분획하였다.

Phycocyanin의 안정성

부분 정제하여 얻어진 phycocyanin의 온도 조건에 따른 안정성은 c-phycocyanin (phycocyanin 함량≒90 μg/mL)을 각 온도 조건에서 4시간 방치한 다음 c-phycocyanin의 흡광도 변화를 측정하였다. 빛에 대한 안정성은 각 빛 강도 조건 (25℃)으로 조절된 배양기에 시료를 2 mL씩 분주한 샤레를 4시간 방치한 다음 흡광도 값을 측정하여 비교하였다. 한편, pH 용액에 대한 안정성은 각 pH로 조절된 buffer (1.0 M) 2 mL에 시험 시료 0.5 mL을 가하여 상온 (25℃)에서 4시간 방치한 후 흡광도를 측정하였으며, 금속이온에 의한 안정성은 시험 시료에 1.0 M 농도로 Cl형 금속을 첨가한 다음 2시간 동안 약하게 교반하여 반응시킨 다음 흡광도를 측정하여 변화를 측정하였다. 반응시키지 않은 원시료를 대조구로하여 반응 전후의 흡광도를 측정하여 c-phycocyanin 함량을 계산하였으며, 반응 전후의 c-phycocyanin 잔존 함량으로 안정성을 비교하였다.

결과 및 고찰

*S. platensis*의 배양

실험실 단위로 *S. platensis*를 고농도로 배양하여 c-phycocyanin의 생산을 시도하였는데, helical tubular photobioreactor를 배양기 (Fig. 1)로 선택한 것은 self-shading 현상을 줄여 단위 부피당 빛의 흡수를 효율적으로 하기 위해서이고, batch culture로 오염을 줄일 수있고, 온도 조절이 용이하고, 공기 중의 CO_2 용해도를 높일 수 있는 장점이 있기 때문이다. 이 시스템을 이용할 경우 실린더 배양과는 차이를 보였는데 (Joo et al., 1998), 35℃ 온도 조건에서 1500 lux 정도의 빛 강도에서 최적의 성장 상태를 보였으며, 2500 lux 이상의 빛 강도 조건에서는 탈색과 함께 사멸하였다. 이러한 현상은 self-shading 현상을 줄여 빛 흡수 효율이 높았고 (Watanabe et al., 1995), 아울러 장시간 tube (9~10 min)를 따라 움직이면서 공기중의 CO_2 용해량이 증가하여 낮은 빛 강도 조건에서도 성장이 좋았던 것으로 판단되었다.

일반성분 및 phycocyanin 함량

Helical tubular photobioreactor로 배양하여 얻어진 *S. platensis* 동결 건조 시료의 일반성분을 분석한 결과, 단백질은 63.5±3.7%, 당질은 19.5±1.6%, 지질은 7.0±1.8이었고, 회분은 7.9±1.1 그리고 수분은 2.1±0.7이었다. 당질 함량이 다소 높고 회분 함량이 다소 낮은 것이 특징적이었으나, 통상의 *S. platensis*의 일반성분 함량과 일치하며, 회분 함량은 배양기내 배양으로 배양지 배양보다 외부 오염이 적었기 때문에 다소 낮게 나타난 것으로 판단되었다. 한편, 얻어진 균체의 c-phycocyanin 함량은 9.5% 정도로 실린더 배양으로부터 얻어진 균체의 11% 수준에는 미치지는 못했다.

색소 정제 및 스펙트럼 특성

*S. platensis*로부터 추출된 crude phycobilins는 단백 색소 이외에 세포로부터 추출된 다른 단백질과 혼합되어 있는 상태인데, 이러한 단백질을 제거하기위해 황산암모늄염을 첨가하여 1차적으로 거대 단백질 분자를 제거하였고, 2차로 황산암모늄염을 첨가하여 crude phycobilins를 침전시켜 분리하였다 (Fig. 2). 이 과정에서 c-phycocyanin을 포함한 대부분의 색소 단백질은 침전하여 쉽게 회수할 수 있었고, 얻어진 phycobilins를 gel chromatography하였다 (Fig. 3). 한편, gel chromatography에서 가장 먼저 용출된 획분은 옅은 황색으로 스펙트럼은 allophycocyanin과 c-phycocyanin의 최대 흡수 파장인 652 nm와 620 nm 부근에서 peak가 약하게 나타났으며, phycoerythrin 최대 흡수 파장에서는 확실한 peak가 나타나지 않아 옅은 황색 획분이 어떤 종류의 색소인지는 확인할 수 없었다 (Fig. 4). Fig. 5는 전형적인 allophycocyanin 최대 흡수 파장인 652 nm에서 주요 peak가 확인되어 일부 c-phycocyanin도 포함되어 있지만 allophycocyanin으로 판단할 수 있었고, allophycocyanin 획분 다음으로 용출된 색소는 allophycocyanin보다 훨씬 진한 청색으로 스펙트럼을 분석한 결과 (Fig. 6), 622 nm에서 최대 흡광 영역을 가지는 색소로 전형적인 c-phycocyanin 획분인 것을 확인할 수 있었다. 본 실험에서 목표로 하는 청색 색소가 이 획분으로 겔크로마토그래피후 얻어진 c-phycocyanin의 수율은 균체량에 대해 약 1.5% 정도로 완전 정제된 색소는 아니지만 수율이 매우 높았다.

Phycobilins from biomass
- fractionate with $(NH_4)_2SO_4$ in 30% saturation
- centrifuge (12,000×g, 10 min)

Supernatant
- fractionate with $(NH_4)_2SO_4$ in 60% saturation
- centrifuge (12,000×g, 10 min)

Supernatant
- resuspend in 10 ml 0.1 M phosphate buffer (pH 7.0)
- centrifuge (4,500×g, 10 min)

Supernatant
- apply to a Sephadex G-100 column (ϕ2.5 cm×100 cm) equilibrated with 10 mM phosphate buffer (pH 7.0)
- elute the column using 10 mM phosphate buffer (pH 7.0)
- pool the same color fraction

Scaning the O.D. in the range of 300~700 nm

Fig. 2. Procedure for purifying the phycobilins from *S. platensis*.

C-phycocyanin 색소의 안정성

부분 정제된 c-phycocyanin 색소의 안정성을 시험한 결과는 Fig. 7 및 8과 같다. 온도에 대한 안정성은 동결 저장에서는 물론이고 15℃까지 안정하였으며, 35℃ 이상의 온도에서는 변색이 진행되어 c-phycocyanin 함량이 낮아졌으며, 55℃에서는 17% 정도의 c-phycocyanin 함량이 감소하였다. 본 실험에서는 단백 색소라는 이유로 단백 변성이 쉽게 일어날 것으로 판단하여 고온의 조건에서는 안정성 실험을 행하지 않았지만, 산업적으로 이용성을 고려한다면 가열 살균 온도 범위까지 온도를 높혀서 경시적 변화를 관찰하여 시간에 따른 탈색 정도를 확인할 필요가 있을 것으로 판단되었다. 한편, 빛에 의한 탈색 정도를 시험한 결과 빛 강도 15000 lux까지도 전혀 변색이 일어나지 않았는데, 25000 lux에서는 최종 4시간 방치로 25% 정도의 변색이 일어나는 것으로 확인되었다. 이는 빛에 대해 어느 정도 민감한 것으로 판단되는데, 여름철 태양 빛 강도와 유사한 100000 lux 정도까지 빛 강도를 변화시키면서 안정성을 시험해볼 필요가 있을 것으로 판단되었다. 한편, pH에 대한 phycocyanin의 안정성을 시험한 결과에서 있듯이 중성부근이하 pH 4까지의 산성영역에서는 매우 안정한 것으로 나타났으며, pH 9 이상의 알칼리 영역에서는 다소 불안한 것으로 나타났는데, pH 11의 조건에서는 15% 정도의 변색이 일어난 것으로 확인되었다. 그리고 중금속에 의한 변색도 크게 관찰되지 않았다.

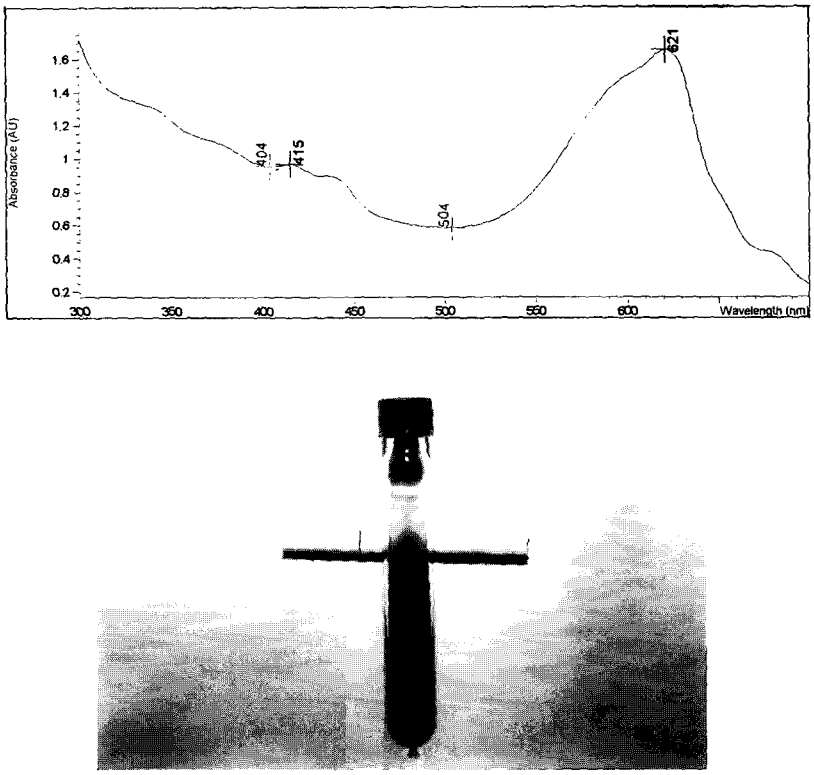

Fig. 3. Photograph and spectral property of crude phycobilin extracted from *Spirulina platensis*.

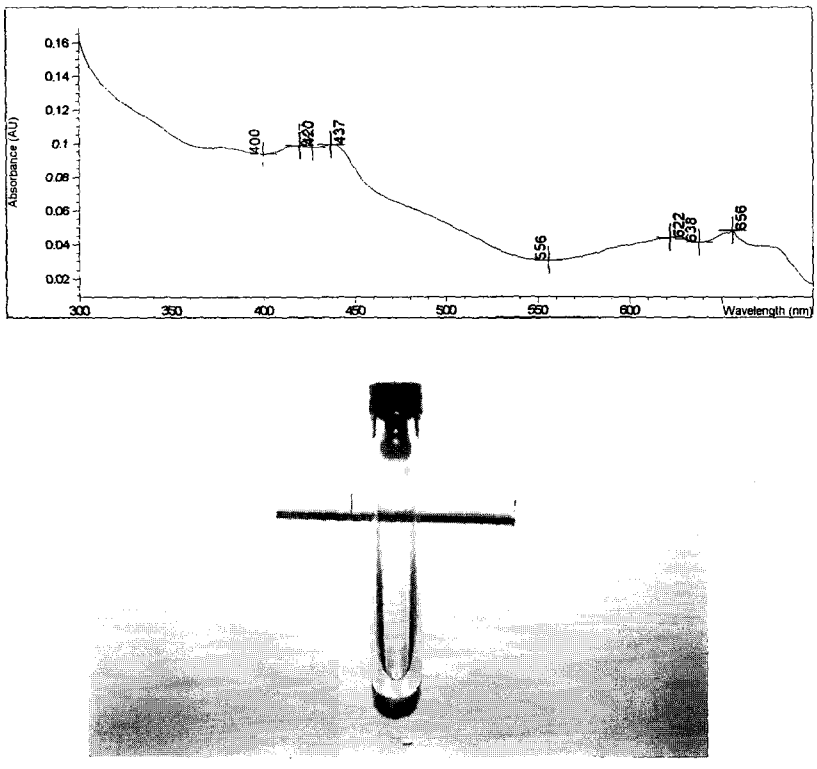

Fig. 4. Photograph and spectral property of unidentified pigment fractionated by Sephadex G-100 of crude phycobilin extracted from *Spirulina platensis*.

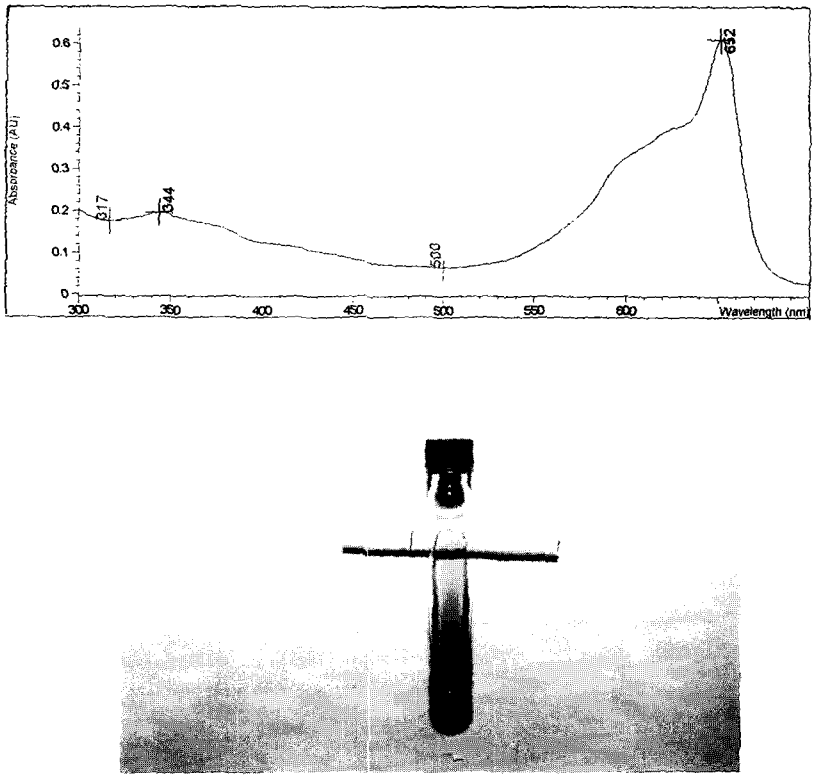

Fig. 5. *Photograph and spectral property of crude allophycocyanin fractionated by* Sephadex G-100 *of crude* phycobilin extracted from *Spirulina platensis.*

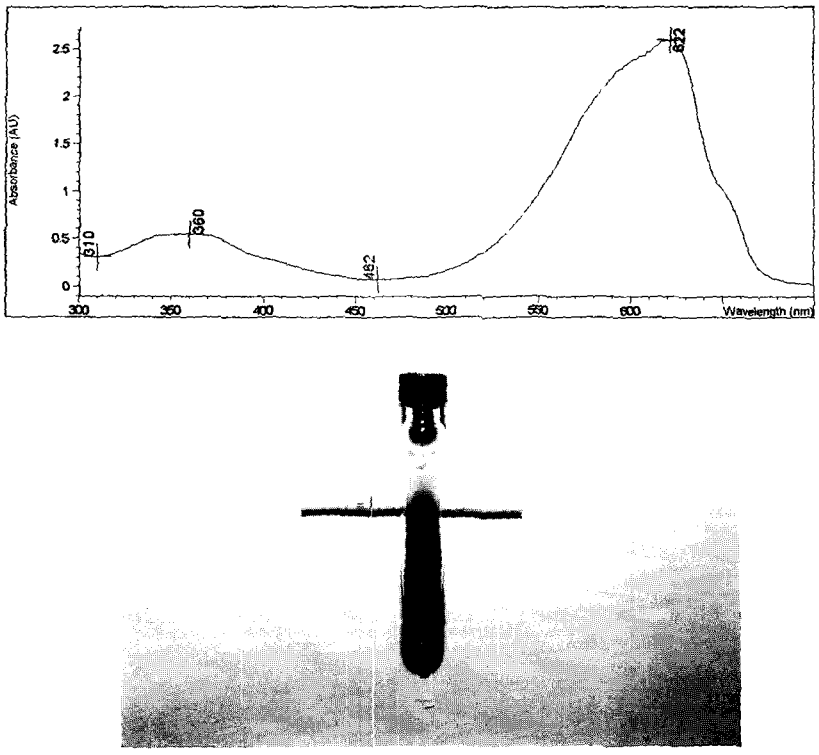

Fig. 6. Photograph and spectral property of c-phycocyanin fractionated by Sephadex G-100 of crude phycobilin extracted from *Spirulina platensis.*

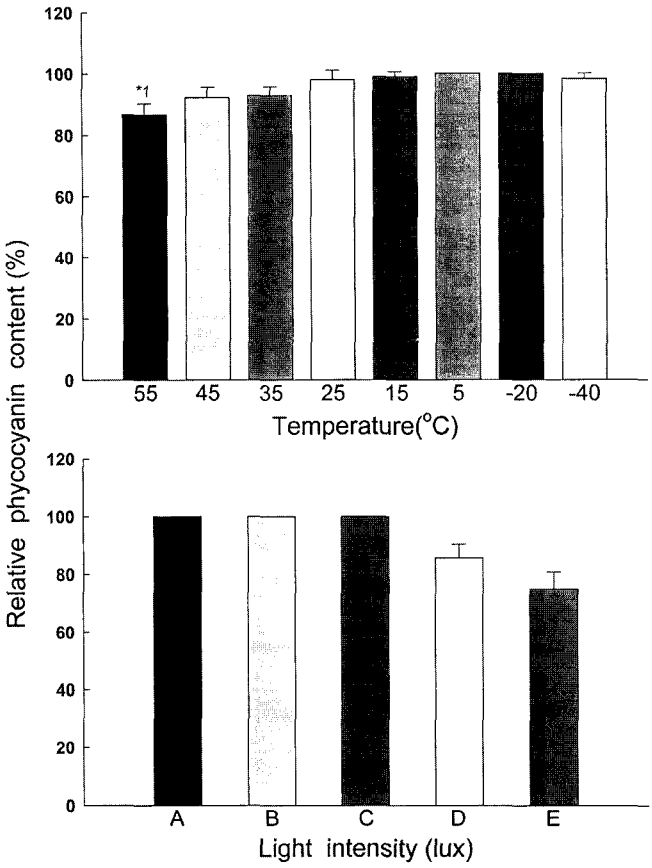

Fig. 7. Stability of c-phycocyanin in each temperature and light internsity conditions.
Light intensity; A: 50000, B: 10000, C: 15000, D: 20000, E: 25000
*1 Mean ± S.D.

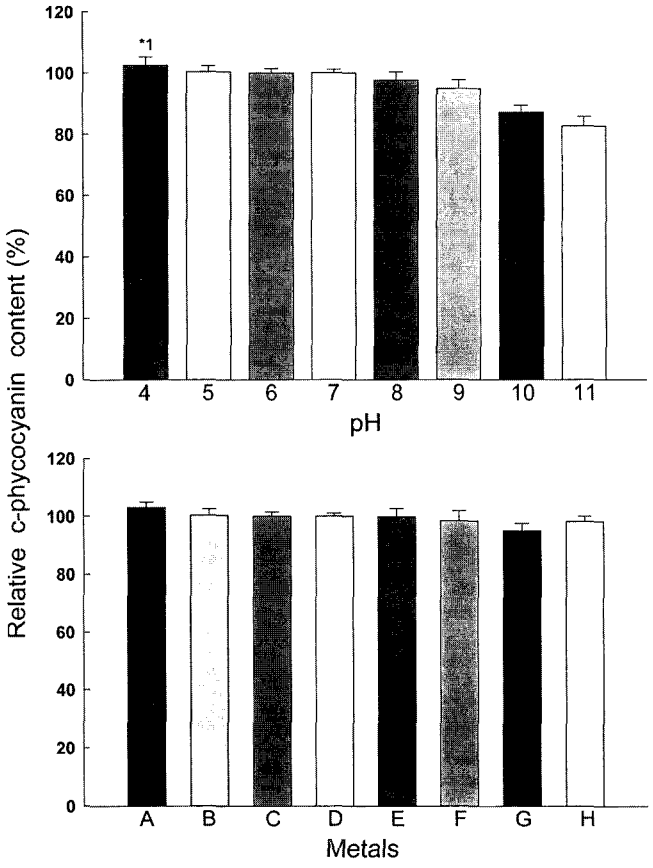

Fig. 8. Stability of c-phycocyanin in each pH and metal solution conditions.
Metals; A: $CaCl_2$, B: $MgCl_2$, C: NaCl, D: none, E: KCl, F: $MnCl_2$, G: $CuCl_2$, H: $ZnCl_2$
*1 Mean ± S.D.

요 약

실린더 배양기에서 구한 최적의 조건을 helical tubular photobioreactor (18 L)에 맞도록 조절하여 수확한 *S. platensis*의 일반성분을 분석한 결과, 단백질은 64.5±2.8, 당질은 20.8±1.9, 지방질은 7.2±1.2 및 회분 함량은 7.8±0.8이었다. 본 균체로부터 c-phycocyanin을 추출하여 염석과 Sephadex G-100으로 정제한 결과 크게 3개의 획분이 확인되었다. 이 획분들의 스펙트럼을 분석한 결과, 최대 흡광 영역 652 nm의 allophycocyanin과 최대 흡광 영역 622 nm의 c-phycocyanin이 확인되었고, 확실하지는 않지만 phycoerythrin으로 추측되는 한 획분을 얻을 수 있었다. 한편, c-phycocyanin 획분은 건조 균체량에 대해 1.5% 정도의 매우 높은 수율을 나타내었다. 부분 정제된 c-phycocyanin의 안정성을 실험한 결과, 저온에서는 매우 안정하였으며, 50℃ 이상의 온도에서는 약간 변색이 일어나는 것으로 확인되었다. 빛에 대한 반응은 15000 lux까지도 전혀 변색이 일어나지 않았으나, 25000 lux에서는 약 25%의 변색이 일어난 것으로 나타났다. pH에 대해서는 중성부근이하 pH 4까지의 산성영역에서는 매우 안정한 것으로 나타났으며, pH 9 이상의 알칼리 영역에서는 다소 불안한 것으로 나타났는데, pH 11의 조건에서는 15% 정도의 변색이 일어난 것으로 확인되었다. 한편, pH, 온도 및 빛 강도의 변화에 따른 금속의 영향을 확인하지는 않았으나 본 실험 조건에서는 종류에 관계없이 c-phycocyanin의 안정성에 영향을 미치지는 않는 것으로 나타났다.

참 고 문 헌

Aaronson, S., T. Berner and Z. Dubinsky. 1980. Microalgae as a source of chemicals and natural product. In Algae Biomass, ed. by Shelef, G and CJ. Soeder, Elservier/North Holland, Amsterdam.

Aoyama, K., I. Uemura, J. Miyake and Y. Asada. 1997. Fermentative metabolism to produce hydrogen gas and organic compounds in a Cyanobacterium, *Spirulina platensis*. J. Ferm. & Bioen., 83, 17~20.

Barclay, W., C. Wyman, R.A. Lewin and L. Cheng. 1988. Development of microalgal systems for the production of liquid fuels. pp. 55-64. *In* Stadler (eds.), Algal Biotechnology. Elsevier Applied Science, London.

Becker, E.W. 1994. Microalgae: Biotechnology and Microbiology.

Cambridge University Press, Cambridge.

Ben-Amotz, A. and M. Avron. 1980. Glycerol, β-carotene and dry algal meal production in commercial cultivation of *Dunaliella*. In Algae Biomass, ed., G. Shelef & C.J. Soeder, pp. 603~610, Elsevier/North Holland Biomedical Press.

Benemann, J.R., D.M. Tillet and J.C. Weissman. 1987. Microalgae biotechnology. TIBTECH, 5, 47~53.

Benemann, J.R. 1989. The future of microalgal biotechnology. In Cresswell (eds.), Algal and Cyanobacterial Biotechnology. Longman Scientific & Technical, Harlow.

Bogorad, L. 1975. Phycobiliproteins and complementary chromatic adaptation. Ann. Rev. Plant Physiol., 26, 369~401.

Borowitzka, M.A. 1992. Algal biotechnology products and process: Matching science and economics. J. Appl. Phycol., 4, 267~279.

Boussiba, S. and A.E. Richmond. 1979. Isolation and characterisation of phycocyanins from the blue-green algae *Spirulina platensis*. Arch. Microbiol., 120, 155~159.

Ciferri, O. 1983. Spirulina, the edible microorganism. Microbiol. Rew., 47, 551~578.

Ciferri, O. and O. Tiboni.1983. The biochemistry and industrial potential of *Spirulina*. Ann. Rew. Microbiol, 39, 503~526.

Gantt, E., C.A. Lipshultz, J. Grabowski and B.K. Zimmerman. 1979. Phycobilisome from blue green and red algae. Isolation criteria and dissociation characteristics. Plant Physiol., 63, 615~620.

Glazer, A.N. 1985. Light harvesting by phycobilisomes. Ann. Rev. Biophys. Chem., 14, 47~77.

Gudin, C. and D. Chaumont. 1980. A biotechnology of photosynthetic cells based on the use of solar energy. Biochem. Soc. Trans., 8, 481~482.

Joo, D.S., M.G. Cho, R. Buchholz and E.H. Lee. 1998. Growth and fatty acid composition with growth conditions for *Spirulina platensis*. J. Korean Fish. Soc., 31(3), 409~416 (in Korean).

Kishimoto, M., T. Okakura, H. Nagashima, T. Minowa, S.Y. Yokoyama and K. Yamaberi. 1994. CO_2 Fixation and oil production using Micro-Algae. J. Ferm. & Bioen., 78, 479~482.

Melack, J.M. 1979. Photosynthesis and growth of *Spirulina platensis* (Cyanophyta) in an equatorial lake (Lake Simbi, Kenya). Limnology and Oceanography, 24, 753~760.

Mizuno, H., N. Iso, T. Saito, F. Ohzeki and T. Hatano. 1982. Identification of phycocyanin isolated from *Porphyra tenera* and *Porphyra yezoensis*. Bul. Jap. Soc. Sci. Fish., 48, 971~974.

Piorreck, M., K.H. Baasch and P. Pohl. 1984. Biomass production, total protein, chlorophylls, lipids and fatty acids of freshwater green and blue-green algae under different nitrogen regimes. Phytochemistry, 23, 207~216.

Watanbe, Y., J. Noue and D.O. Hall. 1995. Photosynthetic performance of a helical tubular photobioreactor incorporating the Cyanobacterium *Spirulina platensis*. Biotech. & Bioen., 47, 261~269.

2000년 6월 17일 접수
2000년 9월 29일 수리