

|                                                                                                                                               |                                    |                                                                                                                                                                                                                                 |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
|                                                              | (19) 대한민국특허청(KR)<br>(12) 공개특허공보(A) | (11) 공개번호 10-2016-0045168<br>(43) 공개일자 2016년04월27일                                                                                                                                                                              |
| (51) 국제특허분류(Int. Cl.)<br>C12P 21/00 (2006.01) C12N 1/20 (2006.01)<br>(21) 출원번호 10-2014-0139665<br>(22) 출원일자 2014년10월16일<br>심사청구일자 2014년10월16일 |                                    | (71) 출원인<br>서강대학교산학협력단<br>서울특별시 마포구 백범로 35 (신수동, 서강대학교)<br>(72) 발명자<br>이승엽<br>서울특별시 서초구 방배중앙로7길 56 청구빌라 103호<br>이주은<br>서울특별시 성북구 돌곶이로14길 6-4(석관동)<br>이상호<br>경기 성남시 중원구 원터로18번길 19, 102동 809호 (하대원동, 성원초원아파트)<br>(74) 대리인<br>이원희 |

전체 청구항 수 : 총 11 항

(54) 발명의 명칭 고순도 피코시아닌 생산을 위한 2 단계 배양법 개발

(57) 요약

본 발명의 고순도 피코시아닌(phycoyanin) 생산을 위한 2 단계 배양법 개발은 세포 내 피코시아닌의 함량을 높일 수 있는 광합성 시아노박테리아 스피루리나(*cycanobacterium Spirulina platensis*)를 이용한 신규 배양법으로서 피코시아닌 순도 향상에 필요한 파장 및 세기를 조절할 수 있고 스피루리나 배양장치의 광원조건을 효과적으로 제시하여 고순도의 피코시아닌을 생산함으로써 항균, 항염증 및 항암 등에 유효한 광합성 색소 생산에 유용하게 사용될 수 있다.

대표도 - 도1

| 빛의 강도                                    | PC                           |     | APC 함량<br>Content<br>(mg·mL <sup>-1</sup> ) | PC/APC | PBP (mg·mL <sup>-1</sup> ) |
|------------------------------------------|------------------------------|-----|---------------------------------------------|--------|----------------------------|
|                                          | 함량<br>(mg·mL <sup>-1</sup> ) | 순도  |                                             |        |                            |
| 25μmol·m <sup>-2</sup> ·s <sup>-1</sup>  | 0.178                        | 1.6 | 0.058                                       | 3.1    | 0.236                      |
| 75μmol·m <sup>-2</sup> ·s <sup>-1</sup>  | 0.209                        | 1.5 | 0.072                                       | 2.9    | 0.281                      |
| 125μmol·m <sup>-2</sup> ·s <sup>-1</sup> | 0.140                        | 1.1 | 0.056                                       | 2.5    | 0.195                      |
| 200μmol·m <sup>-2</sup> ·s <sup>-1</sup> | 0.097                        | 0.6 | 0.035                                       | 2.8    | 0.132                      |

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 201333034

부처명 미래창조과학부

연구관리전문기관 (재)한국연구재단

연구사업명 원자력기술개발사업

연구과제명 대규모 방사성 오염의 생물학적 처리를 위한 친환경 융합 기술 개발

기 여 율 1/1

주관기관 서강대학교 산학협력단

연구기간 2013.12.01 ~ 2014.11.30

---

## 명세서

### 청구범위

#### 청구항 1

- 1) 스피루리나(*Spirulina*)를 배양하는 단계;
- 2) 적색 및 청색 혼합광을 조사하여 1차 배양하는 단계;
- 3) 상기 단계 2)의 1차 배양된 스피루리나에 청색광을 조사하여 2차 배양하는 단계; 및
- 4) 상기 단계 3)의 2차 배양된 스피루리나로부터 피코시아닌(phycoyanin)을 정제하는 단계를 포함하는 고순도 피코시아닌 생산 방법.

#### 청구항 2

제 1항에 있어서, 상기 단계 1)의 스피루리나는 스피루리나 플란텐시스(*Spirulina platensis*)인 것을 특징으로 하는 고순도 피코시아닌 생산 방법.

#### 청구항 3

제 1항에 있어서, 상기 단계 2)의 조사는  $20 - 150 \mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ 의 빛의 세기로 조사하는 것을 특징으로 하는 고순도 피코시아닌 생산 방법.

#### 청구항 4

제 1항에 있어서, 상기 단계 2) 및 단계 3)의 조사는 발광다이오드를 이용하여 조사하는 것을 특징으로 하는 고순도 피코시아닌 생산 방법.

#### 청구항 5

제 1항에 있어서, 상기 단계 2)의 배양은 3 -7일 배양하는 것을 특징으로 하는 고순도 피코시아닌 생산 방법.

#### 청구항 6

제 1항에 있어서, 상기 단계 3)의 조사는  $50 - 350 \mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ 의 빛의 세기로 조사하는 것을 특징으로 하는 고순도 피코시아닌 생산 방법.

#### 청구항 7

제 1항에 있어서, 상기 단계 3)의 배양은 12 내지 16일 동안 배양하는 것을 특징으로 하는 고순도 피코시아닌 생산 방법.

#### 청구항 8

제 1항에 있어서, 상기 단계 4)의 스피루리나로부터 정제된 피코시아닌은 식품등급(food grade) 순도를 갖는 것

을 특징으로 하는 고순도 피코시아닌 생산 방법.

#### 청구항 9

제 1항에 있어서, 친화성 침전(affinity precipitation) 및 암모늄 설페이트 침전(ammonium sulfate precipitation)을 이용하여 정제하는 단계를 추가적으로 포함하는 것을 특징으로 하는 고순도 피코시아닌 생산 방법.

#### 청구항 10

제 9항에 있어서, 상기 정제는 분석등급(analytical grade)의 피코시아닌을 분리하기 위한 것을 특징으로 하는 고순도 피코시아닌 생산 방법.

#### 청구항 11

- 1) 스피루리나를 배양하는 단계;
- 2) 적색 및 청색 혼합광을 조사하여 1차 배양하는 단계; 및
- 3) 상기 단계 2)의 1차 배양된 스피루리나에 청색광을 조사하여 2차 배양하는 단계를 포함하는 고순도 피코시아닌 생산용 스피루리나 배양 방법.

### 발명의 설명

#### 기술 분야

[0001] 본 발명은 미세조류를 이용한 고순도의 피코시아닌(phyocyanin)의 생산방법에 관한 것이다.

#### 배경 기술

[0002] 미세조류(microalgae)는 해양 생태계의 생산자로서 스스로 광합성을 하는 단세포 생물이다. 미세조류는 그 종류가 수십만에 이르고, 성장환경에 따라 다양한 생리활성 물질을 만들어 낸다. 특히 심해저나 용암지대 등 극한의 환경에서 자라는 미세조류에서는 육상에는 없는 새로운 기능성 물질이 발견되기도 한다.

[0003] 따라서 미세조류는 그야말로 다양한 생리활성 물질의 보고라 할 수 있다. 그리고 미세조류는 대량생산이 용이하다. 실제로 산업분야에서는 미세조류를 식품이나 수산양식용으로 대량 배양하여 왔다. 최근에는 바이오에너지 분야에서 미세조류를 바이오매스(biomass)로 활용하기 위하여 미세조류의 생산량을 증대하기 위한 연구가 활발하게 이루어지고 있어 앞으로 미세조류의 산업적 가치는 더욱 높아질 것이다.

[0004] 남조류(cyanobacteria)중의 하나인 스피루리나 플라텐시스(*Spirulina platensis*)는 다세포의 필라멘트 형태를 지닌 광합성 미생물이다. 단백질, 탄수화물, 비타민, 미네랄 같은 영양소가 풍부하여 식품으로 오랜시간 이용되어 왔고 높은 영양학적 가치로 인하여 유엔식량농업기구(UNFAO)가 미래식량으로 지정되어 왔다. 현재, 전 세계적으로 스피루리나 배양에 관한 연구가 많이 이뤄지고 있다.

[0005] 피코시아닌(Phycocyanin)은 남조류(cyanobacteria), 홍조류(rhodophytes), 땅속식물(cryptophytes)에서 발견되는 푸른색 색소이며, 특히 남조류가 고유의 푸른색을 가지는 것은 바로 피코시아닌을 다량 함유하고 있기 때문이다. 피코시아닌은 물에 녹으며 아주 강한 형광을 나타내고 항산화기능이 뛰어난 물질이다. 실제로 피코시아닌은 남조류가 식품, 화장품, 약품 등으로 활용되는데 필요한 핵심성분이다. 따라서 피코시아닌에 대한 연구 역시 매우 활발하게 진행되고 있으며 특히 최근에는 생명공학분야의 논문과 특허의 수 역시 증가하고 있다.

[0006] 피코시아닌은 스피루리나의 주요한 피코빌리 단백질로 건조중량의 29%를 차지하고 있다. 청색의 광합성 색소로서 광합성계에서 빛에너지를 흡수하여 엽록소 a에 전달하는 역할을 한다. 천연색소 및 형광마커로 사용되고

있고 향균, 항염증, 항산화, 항암 특성이 보고되고 있다. 이로 인해 피코시아닌을 균주로부터 효율적으로 생산하기 위한 다양한 방법들이 제시되고 있다. 피코시아닌은 흡광도 A680/A620 비율을 통해 순도를 결정하며 식품등급(food grade)( $> 0.7$ ), 분석등급(analytical grade) ( $\geq 4.0$ )으로 나눈다. 세포에서 1 차적으로 추출한 원액 상태는 0.7 이하의 낮은 순도를 보이므로, 사용목적에 따라 추가적인 복수의 정제과정이 필요하다. 피코시아닌은 그 순도에 따라 제품의 가격이 결정된다.

[0007] 순도 0.7 이상의 피코시아닌을 얻기 위해 암모늄 설페이트 침전법(ammonium sulfate precipitation), 한외여과법(ultrafiltration) 등의 방법을 사용하며 겔 여과 크로마토그래피(gel filtration chromatography) 및 이온-교환 크로마토그래피(ion-exchange chromatography)등을 통하여 순도 4.0 이상의 피코시아닌을 얻을 수 있다. 이러한 정제단계 증가는 생산비용과 직결되어 경제적, 시간적 손실이 발생한다.

[0008] 식품등급(Food grade) 수준의 정제는 최소한의 단계로 진행되어야 한다. 각 단계들은 산업 현장에서 매우 높은 비용을 요구한다. 세포 내에서 피코시아닌의 합성은 빛 세기와 파장, 염분, 온도, 질소원 농도 등의 배양조건에 영향을 받으며 이로 인해 추출시 순도 및 함량이 영향을 받는다.

[0009] 종래의 배양법은 태양광, 형광등, 단일파장의 발광다이오드 등을 광원으로 사용하였으며 이는 배양기간 중, 광원의 조사조건을 쉽게 조절하기 어려운 문제점이 있다. 광합성 미생물의 색소함량은 빛의 세기와 파장에 따라 수시로 변화한다. 세포에 도달하는 광합성 광량자속 밀도는 색소의 함량과 음의 상관관계를 가지며, 파장 범위에 따라 균체의 성장 및 합성되는 색소의 종류에 따라 상당한 영향을 미친다. 스피루리나 건조분말에서 유용물질 추출시 건조하지 않은 생균체에 비해 회수효율이 떨어진다. 이로 인해 스피루리나에서 추출한 피코시아닌의 순도에 상당한 영향을 줄 수 있다. 건조방법을 사용할 시에 피코시아닌은 약 50%, 단백질은 10-20%의 손실이 발생하는 문제점이 있다.

[0010] 이에, 본 발명자들은 색소 단백질 피코시아닌에 대한 효율적인 생산 방법을 개발하고자 노력한 결과, 세포 내 피코시아닌의 함량을 높일 수 있는 남조류인 광합성 시아노박테리아(cyanobacteria) 스피루리나 배양법을 새롭게 개발하여 피코시아닌 순도 향상에 필요한 파장 및 세기를 조절할 수 있고 스피루리나 배양장치의 광원조건을 효과적으로 제시하는 고순도의 피코시아닌 생산 방법을 제공함으로써 본 발명을 완성하였다.

## 발명의 내용

### 해결하려는 과제

- [0011] 본 발명의 목적은
- [0012] 1) 스피루리나(*Spirulina*)를 배양하는 단계;
- [0013] 2) 적색 및 청색 혼합광을 조사하여 1차 배양하는 단계;
- [0014] 3) 상기 단계 2)의 1차 배양된 스피루리나에 청색광을 조사하여 2차 배양하는 단계; 및
- [0015] 4) 상기 단계 3)의 2차 배양된 스피루리나로부터 피코시아닌(phycoyanin)을 정제하는 단계를 포함하는 고순도 피코시아닌 생산 방법을 제공하는 것이다.
- [0016] 또한, 본 발명의 목적은 친화성 침전(affinity precipitation) 및 암모늄 설페이트 침전(ammonium sulfate precipitation)을 이용하여 정제하는 단계를 추가적으로 포함하는 것을 특징으로 하는 고순도 피코시아닌 생산 방법으로서 제공되는 것이다.
- [0017] 나아가, 본 발명의 목적은
- [0018] 1) 스피루리나를 배양하는 단계;
- [0019] 2) 적색 및 청색 혼합광을 조사하여 1차 배양하는 단계; 및
- [0020] 3) 상기 단계 2)의 1차 배양된 스피루리나에 청색광을 조사하여 2차 배양하는 단계를 포함하는 고순도 피코시아닌 생산용 스피루리나 배양 방법을 제공하는 것이다.

## 과제의 해결 수단

- [0021] 상기 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은
- [0022] 1) 스피루리나(*Spirulina*)를 배양하는 단계;
- [0023] 2) 적색 및 청색 혼합광을 조사하여 1차 배양하는 단계;
- [0024] 3) 상기 단계 2)의 1차 배양된 스피루리나에 청색광을 조사하여 2차 배양하는 단계; 및
- [0025] 4) 상기 단계 3)의 2차 배양된 스피루리나로부터 피코시아닌(phycoyanin)을 정제하는 단계를 포함하는 고순도 피코시아닌 생산 방법을 제공한다.
- [0026] 또한, 본 발명은 친화성 침전(affinity precipitation) 및 암모늄 설페이트 침전(ammonium sulfate precipitation)을 이용하여 정제하는 단계를 추가적으로 포함하는 것을 특징으로 하는 고순도 피코시아닌 생산 방법을 제공한다.
- [0027] 나아가, 본 발명은
- [0028] 1) 스피루리나를 배양하는 단계;
- [0029] 2) 적색 및 청색 혼합광을 조사하여 1차 배양하는 단계; 및
- [0030] 3) 상기 단계 2)의 1차 배양된 스피루리나에 청색광을 조사하여 2차 배양하는 단계를 포함하는 고순도 피코시아닌 생산용 스피루리나 배양 방법을 제공한다.

## 발명의 효과

- [0031] 본 발명의 고순도 피코시아닌 생산을 위한 2 단계 배양법 개발은 광합성 시아노박테리아 스피루리나 플라텐시스(*cyanobacterium Spirulina platensis*)를 이용하여 피코시아닌의 함량을 높일 수 있는 신규 배양법으로서, 피코시아닌 순도 향상에 필요한 파장 및 세기를 조절할 수 있고 스피루리나 배양장치의 광원조건을 효과적으로 제시하여 고순도의 피코시아닌을 생산함으로써 항균, 항염증 및 항암 등에 유효한 광합성 색소 생산에 유용하게 사용될 수 있다.

## 도면의 간단한 설명

- [0032] 도 1은 각 시료는 흡광도 (680 nm)가 1.0에 도달할 때 채취하여 흰색 발광다이오드 빛의 세기에 따른 조추출물(crude extract) 상태의 피코시아닌의 함량, 순도, 알로피코시아닌의 함량, 비율, 전체 피코빌리 단백질의 함량을 나타낸 도이다.
- 도 2는 흡광도와 건조중량 간의 상관관계식을 이용하여 건조중량이  $1 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 에 해당하는 시점에서 각 시료를 채취한 후 광원의 파장에 따른 스피루리나에서 얻은 조추출물 상태의 피코시아닌의 함량, 순도, 알로피코시아닌의 함량, 비율, 전체 피코빌리단백질의 함량, 최대 바이오매스 생산 속도( $\mu_{\max}$ ), 바이오매스 및 최대 바이오매스 농도( $X_{\max}$ )를 나타낸 도이다.
- 도 3은 각 정제 단계에 따른 피코시아닌의 함량, 순도 및 회수율 변화를 나타낸 도이다.
- 도 4는 스피루리나 배양장치를 나타낸 도이다.
- 도 5는 광원의 파장에 따른 함량, 순도 변화를 나타낸 조추출물의 피코시아닌을 나타낸 도이다.
- 도 6은 빛의 파장과 세기를 배양단계에 따라 조절하는 2 단계 스피루리나 배양법을 사용하여 바이오매스, 조추출물의 피코시아닌 함량 및 순도 변화를 나타낸 도이다.

## 발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0033] 이하, 본 발명을 상세히 설명한다.
- [0034] 본 발명은
- [0035] 1) 스피루리나(*Spirulina*)를 배양하는 단계;
- [0036] 2) 적색 및 청색 혼합광을 조사하여 1차 배양하는 단계;
- [0037] 3) 상기 단계 2)의 1차 배양된 스피루리나에 청색광을 조사하여 2차 배양하는 단계; 및
- [0038] 4) 상기 단계 3)의 2차 배양된 스피루리나로부터 피코시아닌(phyco cyanin)을 정제하는 단계를 포함하는 고순도 피코시아닌 생산 방법을 제공한다.
- [0039] 상기 단계 1)의 스피루리나는 스피루리나 플란텐시스(*Spirulina platensis*)인 것을 특징으로 한다.
- [0040] 상기 단계 2)의 조사는  $20 - 150 \mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ 의 빛의 세기로 조사하는 것이 바람직하고, 배양은 3 -7일 배양하는 것이 바람직하나, 이에 한정하지 않는다.
- [0041] 상기 단계 3)의 조사는  $50 - 350 \mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ 의 빛의 세기로 조사하는 것이 바람직하고, 배양은 12 내지 16일 동안 배양하는 것이 바람직하나, 이에 한정하지 않는다.
- [0042] 상기 단계 2) 및 단계 3)의 조사는 발광다이오드를 이용하여 조사하는 것이 바람직하다.
- [0043] 또한, 상기 단계 4)의 스피루리나로부터 정제된 피코시아닌은 식품등급(food grade) 순도를 갖는 것을 특징으로 한다.
- [0044] 본 발명은 친화성 침전(affinity precipitation) 및 암모늄 설페이트 침전(ammonium sulfate precipitation)을 이용하여 정제하는 단계를 추가적으로 포함할 수 있다.
- [0045] 상기 정제는 분석등급(analytical grade)의 피코시아닌을 분리하기 위함이다.
- [0046] 본 발명은
- [0047] 1) 스피루리나를 배양하는 단계;
- [0048] 2) 적색 및 청색 혼합광을 조사하여 1차 배양하는 단계; 및
- [0049] 3) 상기 단계 2)의 1차 배양된 스피루리나에 청색광을 조사하여 2차 배양하는 단계를 포함하는 고순도 피코시아닌 생산용 스피루리나 배양 방법을 제공한다.
- [0050] 스피루리나는 백색·적색·청색의 발광다이오드를 사용하여  $20 - 200 \mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$  범위의 광도에서 배양이 잘 되나, 일정시간이 지나면 피코시아닌의 함량과 순도가 광원의 세기와 파장에 따라 크게 차이가 발생하였다. 이의 원인을 분석한 결과, 일정범위에서 광원의 세기 및 피코시아닌의 함량이 역의 상관관계를 가짐을 발견하였고 적색의 파장(660 nm)하에서는 바이오매스 생산 속도는 빠르지만 피코시아닌의 함량과 순도가 낮고 청색의 파장(450 nm)하에서는 바이오매스 생산 속도는 느리고 피코시아닌의 함량과 순도는 높은 결과가 발생하였다. 광원 조건에 따라 추출할 수 있는 색소 단백질의 양과 순도가 달라지기 때문에, 공동립영양 조건하에서 균주배양을 실시한 후, 추출한 조추출물(crude extract)의 피코시아닌 함량과 순도를 식품등급(food grade) 이상으로 최대한 높이하고자 하였다. 적색·청색·혼합광인 경우에 성장속도는 적색과 청색을 각각 사용한 실험군에서 성장속도가 중간 정도이고 배양기간 중의 피코시아닌 함량은 적색 단일광을 사용하였을 때와 유사하다. 이에 혼합광을 이용하여 대수기의 중간까지 배양하고 이를 피코시아닌 함량 확보에 유리한 청색 단일광으로 광원의 파장을 변경하여 배양을 진행하였다. 배양용기는 플라스크를 사용하거나 두께가 약 5 cm인 직사각형의 반응기를 사용할 수 있고, 빛의 균일한 조사를 위하여 광원의 조사방향으로 배양액의 높이는 5 cm를 넘지 않게 하고 진탕으로 교반하거나 통기배양법을 사용한다.
- [0051] 본 발명의 구체적인 실시예에서, 스피루리나 플란텐시스(*Spirulina platensis*)를 배양하여 빛의 세기에 따른 피코시아닌의 함량의 차이를 조사한 결과, 설정된 범위의 25 및  $75 \mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ 에서 피코시아닌의 함량 및 순도가 높음을 확인하였다(도 1 참조). 빛의 파장에 따른 피코시아닌 함량 측정된 결과, 청색광이 피코시아닌의

합성에 유리하였고 높은 순도인 2.78의 값을 나타냄을 확인하였다(도 2 참조). 피코시아닌 합성을 최대한 유도하여 순도가 최대로 높은 조추출물(ude extract)을 얻기 위하여 첫 번째 단계는 적청색 혼합광을 이용하고 두 번째 단계로 청색광만을 이용하여 배양한 결과, 순도 2.5 이상의 바이오매스가 증가함을 확인하였다(도 3, 5 및 6 참조).

[0052] 따라서, 본 발명의 고순도 피코시아닌 생산을 위한 2 단계 배양법 개발은 광합성 시아노박테리아 스피루리나(*cyanobacterium Spirulina platensis*)를 이용하고 피코시아닌 순도 향상에 필요한 파장 및 세기를 조절할 수 있고 스피루리나 배양장치의 광원조건을 효과적으로 제시하여 고순도의 피코시아닌을 생산함으로써 항균, 항염증 및 항암 등에 유효한 광합성 색소 생산에 유용하게 사용될 수 있다.

[0053] 이하, 본 발명을 실시예에 의하여 상세히 설명한다.

[0054] 단, 하기의 실시예는 본 발명을 예시하는 것일 뿐, 본 발명의 내용이 하기 실시예에 의해 한정되는 것은 아니다.

[0055] <실시예 1> 스피루리나 배양 조건 및 피코시아닌 함량 측정 방법

[0056] 한국 생명공학원으로부터 구입한 스피루리나 플라텐시스(*Spirulina platensis*) AP-20590 종을 SOT 배지 200 ml에 2 g/l로 접종하여 30°C ± 1, pH 9.0, 50 μmol · m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup> [660 nm, 450 nm], 24 시간 광조건에서 교반하여 배양하였다. 사용하는 광원 외의 불필요한 빛의 유입을 최소화하기 위하여 배양기 주변을 폐쇄하였다. 균주의 성장은 스펙트로미터를 사용하여 680 nm 파장의 흡광도를 통해 측정하였다. 기존에 측정된 흡광도와 건조균체량 사이의 상관관계식을 이용하여 표준곡선(standard curve)을 확립하였고 상관관계식을 하기의 [수학식 1]에 나타냈다.

수학식 1

[0057] 
$$\text{Dry weight(g/L)} = 1.074 \times A_{680} + 0.09855 \quad R^2 = 0.967$$

[0058] 피코시아닌의 함량은 스펙트로포토미터를 사용하여 620 nm와 652 nm에서 나타나는 최대 흡광도를 측정하여 결정하였다. 일반적으로 Bennett와 Bogorad가 제시한 방법에 의한 하기의 [수학식 2]를 이용하여 피코시아닌의 함량을 측정할 수 있다. 흡광도 620 nm는 피코시아닌의 최대 흡광도이고 280 nm는 추출물의 전체 단백질의 흡광도이다.

수학식 2

[0059] 
$$\text{C-phycocyanin (mg} \cdot \text{mL}^{-1}) = [A_{620} - 0.474(A_{652})]/5.34 \quad [\text{PC}]$$

[0059] 
$$\text{Allophycocyanin (mg} \cdot \text{mL}^{-1}) = [A_{652} - 0.208(A_{620})]/5.09 \quad [\text{APC}]$$

[0060] <실시예 2> 스피루리나 플라텐시스의 성장 및 피코시아닌(PC) 함량 평가

[0061] <2-1> 빛 조사량에 따른 피코시아닌 함량 측정

[0062] 빛의 세기에 따른 피코시아닌의 함량의 차이를 조사하기 위하여, 하기와 같은 실험을 수행하였다.

[0063] 구체적으로, 빛의 세기를 제외한 다른 조건을 동일하게 유지하고 회색 발광 다이오드를 사용하여 25, 75, 125, 200 μmol · m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup>이 네 가지 다른 빛 조사량 하에서 배양을 진행하였다. 이때 흡광도 680 nm에서 1.0으로 측정될 때 시료를 채취하여 피코시아닌 함량을 측정하였다.

[0064] 그 결과, 도 1에 나타난 바와 같이 광저해가 발생하지 않도록 설정한 빛의 세기 범위 내에서 세기가 가장 강할 때 성장속도가 높았지만, 피코시아닌의 최종 함량과 순도는 가장 낮았다. 설정된 범위의 25, 75  $\mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ 에서 피코시아닌의 함량 및 순도가 높은 값을 나타냈다(도 1).

[0065] <2-2> 빛의 파장(light Wavelength)에 따른 피코시아닌 함량 측정

[0066] 빛의 세기에 이어 빛의 파장에 따른 성장률과 피코시아닌 함량 차이를 조사하기 위하여 하기와 같은 실험을 수행하였다.

[0067] 구체적으로, 적색광(Red, 660 nm), 청색광(Blue, 450 nm), 적청색(적색과 청색을 반반 섞음, RB)의 발광다이오드를 광원으로 사용하였다. 이때 빛의 세기는 75  $\mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ 으로 고정하였으며 파장을 제외한 모든 조건을 상기 실시예 <2-1>의 방법과 동일하게 유지하였다.

[0068] 그 결과, 도 2에 나타난 바와 같이 파장에 따른 차이는 건조중량이 1.0 g/ℓ 일 때 시료를 추출하여 피코시아닌의 함량과 균체의 성장률 차이를 측정하였다. 적색광 하에서 성장속도가 가장 빠르고 피코시아닌의 함량과 순도가 가장 낮았고 청색광하에서 성장속도가 가장 느리고 피코시아닌의 함량과 순도가 가장 높았다. 알로피코시아닌과의 비율에서 청색광이 광합성 색소 중 피코시아닌의 합성에 더욱 유리하였다. 청색광의 경우에 상대적으로 높은 순도인 2.78의 값을 확인하였다(도 2). 따라서, 상기 실험결과를 통해서 피코시아닌의 함량 및 순도가 높은 조추출물(crude extract)을 얻기 위한 빛의 세기 및 파장을 선택할 수 있다.

[0069] <실시예 3> 2 단계 배양법을 이용한 피코시아닌 함량 및 순도 상승 평가

[0070] 상기 <실시예 2>로부터 얻은 빛의 세기 및 파장에 대한 성장률과 피코시아닌의 함량을 확인한 후에 피코시아닌 합성을 최대한 유도하여 순도가 최대로 높은 조추출물(ude extract)을 얻기 위하여 하기와 같은 실험을 수행하였다.

[0071] 구체적으로, 빠른 성장률을 나타내는 적색광은 피코시아닌의 함량과 순도가 다른 파장들에 비해 매우 낮고, 적색과 청색을 같이 사용할 시에는 청색으로만 배양하는 것에 비해 성장 속도는 빠르고 피코시아닌의 순도는 대기수까지는 비슷한 측정치를 나타내므로, 첫 번째 단계로 대수기까지는 중간지점( $\text{OD}_{680}=1.6$ )까지 적청색 혼합광을 이용하여 5일 동안 배양하고 바이오매스를 늘리고, 두 번째 단계로 청색광만을 이용하여 피코시아닌의 함량과 순도를 대폭 상승시켰다. 적청색 혼합광은 100  $\mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ 의 빛 세기를 사용하였다(도 4).

[0072] 그 결과, 도 3, 도 5 및 도 6에 나타난 바와 같이 첫 단계인 대수기 중간지점( $\text{OD}_{680}=1.6$ )까지 적청색 혼합광을 이용하였을 때 조추출물의 순도는 식품등급(food grade)인 2.0에 도달하였다. 청색광을 이용한 두 번째 단계에서는 배양 14일째에 최대 2.7 순도의 조추출물을 얻었다. 동일하게 2.7 순도를 기록한 청색광의 단일파장으로 배양한 실험보다 전체 배양기간을 약 7일 정도 감축한 효과가 있었다. 두 번째 배양단계에서 바이오매스의 증가는 청색광 75, 150, 300  $\mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ 의 순으로 빨랐으며 최대 바이오매스 양은 배양기관과 상관없이 비슷하였다. 150  $\mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$  경우에는 배양 10일 이후부터 순도 2.5 이상을 지속적으로 기록하였다(도 3, 5 및 6).

[0073] <실시예 4> 피코시아닌의 정제

[0074] 수용성 색소인 피코시아닌을 추출하기 위하여, 하기와 같은 실험을 수행하였다.

[0075] 구체적으로, 40 mM  $\text{CaCl}_2$  용매(pH4)를 이용하여 세포를 용해(lysis)시켰다. 먼저, 배양액 5 mL를 원심분리하여 펠렛(pellet)을 제외한 나머지 상층액을 제거하였다.  $\text{CaCl}_2$  용매로 2번 반복하여 세척한 뒤 40 mM  $\text{CaCl}_2$  용매 1.25 mL를 넣어 12 시간 동안 4 °C에서 보관한 뒤에 다시 원심분리하여 피코시아닌이 녹아 있는 진한 청색의 상층액만 분리하였다. 피코시아닌이 녹아있는 진한 청색의 상층액만 분리하였다. 피코시아닌의 함량을 정확하게 비교 가능하도록 바이오매스와 용매의 비율은 4:1로 유지하였다. 스피루리나 플라텐시스로부터 얻어낸 조추출물의 세포 잔해물을 유리섬유 여과지를 통해 제거하고 두 단계의 정제과정을 거쳤다. 먼저 잔해물을 제거한 조

추출물을 키토산과 혼합한 후 활성탄이 포함된 컬럼을 5 분간 통과시켰다. 이어서 황산암모늄의 포화농도를 각각 30%, 60%로 맞추어 황산암모늄 분획법을 실시하였다. 펠렛의 형태로 농축된 피코시아닌을 20 mM의 인산칼륨 버퍼(pH 6.9)에 녹인 후에 탈염을 위해서 투석을 실시하였다. 투석 후 5 mM 아자이드화 나트륨이 포함된 20 mM 인산칼륨 버퍼를 완충저장용액(storage buffer)로 사용하였다.

[0076] 그 결과, 도 3에 나타낸 바와 같이  $\text{CaCl}_2$  용매를 통해 생균체(fresh biomass)로부터 얻어낸 피코시아닌 순도 2.5에 달하는 조추출물 정제를 통해 분석농도(analytical grade)인 순도 4.0 이상으로 정제하였고, 컬럼 통과 후의 순도가 3.1로 상승함을 확인하였다. 황산암모늄 분획법 실시 이후에는 최종적으로 순도 4.2의 피코시아닌을 얻었으며 최종 회수율은 조추출물 대비 65%를 기록하였다(도 3).

## 도면

### 도면1

| 빛의 강도                                                       | PC                                         |     | APC 함량<br>Content<br>( $\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ ) | PC/APC | PBP ( $\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ ) |
|-------------------------------------------------------------|--------------------------------------------|-----|-----------------------------------------------------------|--------|------------------------------------------|
|                                                             | 함량<br>( $\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ ) | 순도  |                                                           |        |                                          |
| $25 \mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$  | 0.178                                      | 1.6 | 0.058                                                     | 3.1    | 0.236                                    |
| $75 \mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$  | 0.209                                      | 1.5 | 0.072                                                     | 2.9    | 0.281                                    |
| $125 \mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ | 0.140                                      | 1.1 | 0.056                                                     | 2.5    | 0.195                                    |
| $200 \mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ | 0.097                                      | 0.6 | 0.035                                                     | 2.8    | 0.132                                    |

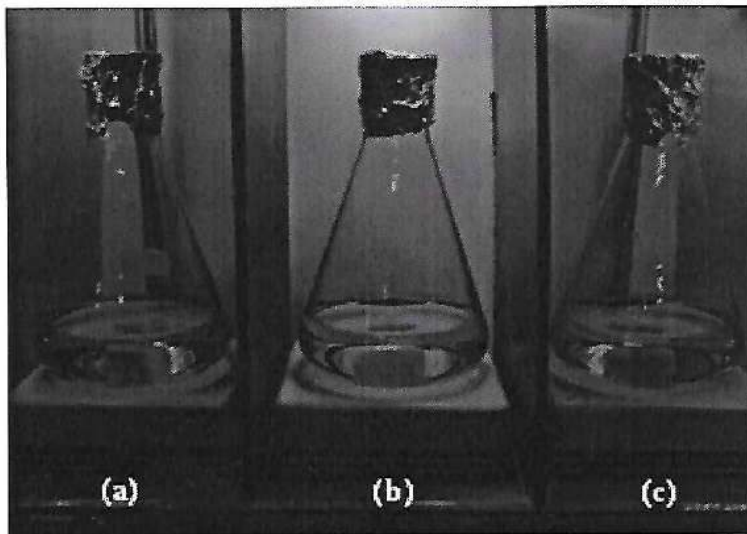
도면2

|                                                              |                                              | 빛의 파장      |          |             |
|--------------------------------------------------------------|----------------------------------------------|------------|----------|-------------|
|                                                              |                                              | 적색광 (Red ) | 혼합광 (RB) | 청색광 (Blue ) |
| PC                                                           | Content ( $\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ ) | 0.119      | 0.181    | 0.353       |
|                                                              | Purity                                       | 1.1        | 1.7      | 2.1         |
| APC                                                          | Content ( $\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ ) | 0.041      | 0.052    | 0.083       |
| PC/APC                                                       |                                              | 2.9        | 3.5      | 4.2         |
| PBP ( $\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ )                     |                                              | 0.160      | 0.233    | 0.437       |
| $\mu_{\max}$ ( $\text{d}^{-1}$ )                             |                                              | 0.542      | 0.337    | 0.192       |
| $P_x$ ( $\text{g} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ ) |                                              | 0.435      | 0.290    | 0.109       |
| $X_{\max}$ ( $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ )                |                                              | 3.0        | 3.2      | 2.5         |

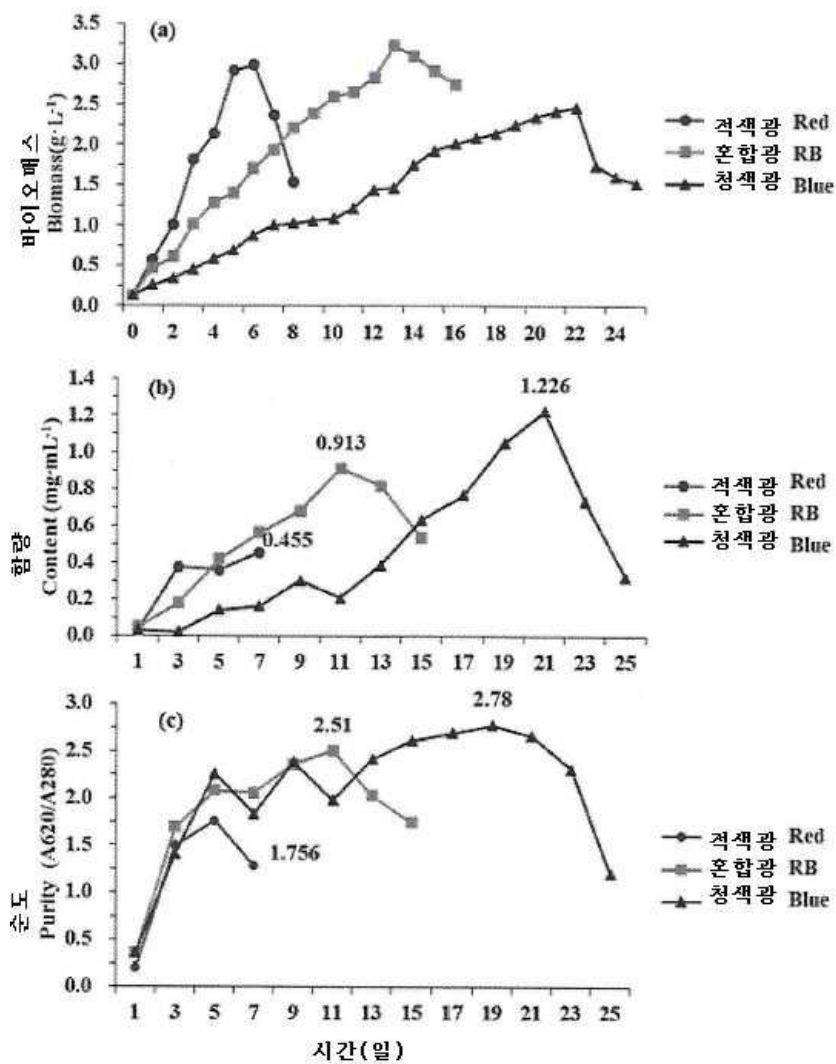
도면3

| 정제 단계                                                                                                                             | 스피루리나 플라텐시스 ( <i>Spirulina platensis</i> ) |     |            |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------------------------------------------|-----|------------|
|                                                                                                                                   | PC 함량 ( $\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ ) | 순도  | PC 회수율 (%) |
| 조추출물<br>( Crude extract )                                                                                                         | 0.946                                      | 2.5 | 100        |
| 키토산 및 활성탄<br>( Chitosan and Activated charcoal )                                                                                  | 0.903                                      | 3.1 | 95         |
| ( $\text{NH}_4$ ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> 로 30% 포화<br>( 30% saturation with ( $\text{NH}_4$ ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> ) | 0.785                                      | 3.0 | 83         |
| ( $\text{NH}_4$ ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> 로 60% 포화<br>( 60% saturation with ( $\text{NH}_4$ ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> ) | 0.618                                      | 4.2 | 65         |

도면4



도면5



도면6

