



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](#)

장 민 정 교수지도  
박사학위 청구논문

천연색소 단백질 피코에리트린에  
관한 연구

2020

성신여자대학교 대학원  
의류학과  
김 보 빈

# 천연색소 단백질 피코에리트린에 관한 연구

장 민 정 교수 지도

이 논문을 박사학위 논문으로 제출함.

2020년 4월

성신여자대학교 대학원  
의류학과  
김 보 빈

# 인 준 서

김보빈의 박사학위 논문으로 인준함

2020년 4월

심사위원장 \_\_\_\_\_ (인)

심 사 위 원 \_\_\_\_\_ (인)

심 사 위 원 \_\_\_\_\_ (인)

심 사 위 원 \_\_\_\_\_ (인)

심 사 위 원 \_\_\_\_\_ (인)

성신여자대학교 대학원

## 논문개요

최근 인공합성색소를 대체할 수 있는 천연색소의 관심이 증가하고 있다. 천연색소는 인공합성색소와 다르게 인체에 대한 독성이 낮거나 무해 하며 피부에 부작용이 적고 향균, 항암, 항산화 등의 기능성이 있으나 재현성, 표준화의 문제점, 원료공급의 불안정성, 고가의 원료비 등 한계점이 있다. 천연색소 중 피코에리트린은 대표적인 핑크색 색소로 자연계에 존재하는 형광물질 중 가장 밝은 핑크 색소 중 하나이다. 피코에리트린 색소를 추출하는 대표적인 방식은 홍조류인 김으로부터 에탄올 등의 유기 용매에서 추출하여야 한다. 그러나 김은 포자를 활용해 번식하는 해조류로서 다양한 포자들이 존재하고, 동일 집단 내 해조류에서만 추출하기가 어려워 핑크빛 색상을 일정하게 유지 시키기가 쉽지 않은 단점을 가지고 있다. 따라서 본 연구는 단백질 재조합 기술로 피코에리트린을 발현하고 안전성 및 기능성을 살펴본 후 인공합성색소와 표면 발색을 비교분석 하여 상업적 색소로서 대체 가능성을 살펴보는 데 그 목적이 있다.

본 연구의 실험 방법으로 피코에리트린 생합성을 담당하는 Hox1, pebS, HT-cpcA, cpcE, cpcF의 cDNA 유전자와 DNA 운반체인 플라스미드 (Plasmid) 벡터인 pACYCDuet1, pETDuet1, pCDFDuet1를 이용하여 대장균 (*E. coli*)을 형질전환(Transformation) 후 피코에리트린 발현이 잘 되었는지 확인하기 위하여 SDS-PAGE를 수행하였다. 피코에리트린 단백질 발현을 확인한 뒤, 대량 배양발효기를 활용하여 배양 후 그 속에 발현된 피코에리트린을 IMAC(Immobilized metal affinity chromatography)을 통해 정제하였다. 피코에리트린의 안전성 및 기능성을 실험하기 위하여 세포독성 시험 MTT Assay를 수행한 후, 항산화 효능시험 Anti-oxidant Assay 및 미백 효능시험 Melanin inhibitory assay를 실시하였고 피코에리트린 색소와 인공

합성색소를 넣은 립글로스를 제조한 뒤 분광측색계를 사용하여  $L^*$ ,  $a^*$ ,  $b^*$  값을 비교 분석하였다.

첫째, 피코에리트린 생합성 효소와 벡터를 이용하여 재조합 기술로 피코에리트린의 발현을 유도하였으며, 대량 배양기를 통해 합수 중량을 측정된 결과 약 8.31g/L의 대장균을 수확하였다. 대장균 속 피코에리트린을 정제한 결과 대장균 균체 g당 10.06mg의 정제 수율을 보였으며, 순도는 97.7%의 높은 순도를 나타내었다. 이렇게 추출한 피코에리트린은 자연에서 얻은 피코에리트린과 유사한 파장에서 최대 흡광을 나타내었다.

둘째, 정제된 피코에리트린에 대한 세포독성에 미치는 영향을 확인하기 위해 피부 세포주(HaCaT)를 이용한 MTT 검사를 한 결과, 세포독성은 없으며, 오히려 처리농도가 고농도일수록 세포 생존율이 높아짐을 확인하였다.

셋째, 정제된 피코에리트린에 대한 항산화 소재로서 가능성을 확인하기 위한 활성산소 제거능을 알아보기 위해 Anti-oxidant assay를 실험한 결과 고농도에서 과산화수소( $H_2O_2$ ) 농도가 제거되었다.

넷째, 피코에리트린의 미백 소재로서의 가능성을 확인하기 위하여 Melanin inhibitory assay를 수행한 결과, 피코에리트린이 멜라닌 합성을 농도 의존적으로 억제하여 미백 효능이 있음을 확인하였다.

다섯째, 피코에리트린의 색소로서의 제표화 가능성을 확인하기 위하여 립글로스를 제조하고, 인공합성색소를 함유한 립글로스와 표면 발색을 비교 분석한 결과 인공합성색소를 함유한 립글로스와 차이가 미비한 것으로 나타났다.

이 결과를 바탕으로 유전자재조합 기술을 응용한 피코에리트린 천연색소 단백질의 생산은 자연적으로 추출된 피코에리트린 단백질과 유사한 생산이 가능한 것을 보여주었다. 분리 정제된 피코에리트린 단백질은 피부세포 독성이 없으며, 항산화, 미백 효능을 나타내어서 단순한 천연색소를 뛰어넘어 고기능성 항산화 천연소재로서의 가능성을 시사하였다.

# 목 차

## 논문 개요

I. 서론 .....	1
1. 연구의 필요성 및 목적 .....	1
2. 연구의 내용 .....	4
II. 이론적 배경 .....	5
1. 천연색소 단백질 .....	5
2. 피코에리트린 .....	11
3. 단백질 재조합 .....	16
III. 실험 재료 및 방법 .....	21
1. 유전자 클로닝 실험 재료 .....	21
2. 안전성 및 기능성 실험 재료 .....	28
3. 립글로스 실험 재료 .....	19
4. 실험 방법 .....	31
IV. 결과 및 고찰 .....	44
1. <i>E.coli</i> 에서의 피코에리트린 유전자의 클로닝 및 발현 .....	44
2. <i>E.coli</i> 에서 발현된 재조합 피코에리트린 단백질의 발현 및 정제 .....	57
3. 정제된 피코에리트린의 동결건조 및 농도별 색도 비교 .....	64
4. 재조합 피코에리트린 단백질의 안전성 및 효능 평가 .....	65
5. 립글로스의 표면 발색 평가 .....	74
V. 결론 .....	76

## 참고 문헌

## ABSTRACT

## 표 목 차

<표 1> 천연색소 분류 .....	6
<표 2> 천연색소 단백질 분류 .....	8
<표 3> 균주와 플라스미드 .....	22
<표 4> 배지의 리터당 중량의 화학적 구성 .....	25
<표 5> SDS-Polyacrylamide gel 시약의 화학적 성분 .....	27
<표 6> SDS-page buffer의 화학적 조성 .....	27
<표 7> 립글로스 제조 처방 .....	29
<표 8> cDNA 시퀀스 .....	31
<표 9> PCR을 하기 위한 짧은 DNA 또는 RNA 분자 .....	33
<표 10> TAE(50X) Buffer의 화학조성 .....	34
<표 11> Ligation의 구성 .....	34
<표 12> 항생제 용액 농도 .....	35
<표 13> PCR 후 증폭된 DNA size .....	45
<표 14> HaCaT 세포에서의 피코에리트린의 농도별 독성평가 수치 도표 .....	66
<표 15> HaCaT 세포에서의 피코에리트린의 농도별 과산화물(H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> ) 제거 수치 도표 .....	68
<표 16> B16F1 세포에서의 피코에리트린의 농도별 독성평가 수치 도표 .....	71
<표 17> B16F1 세포에서의 피코에리트린의 농도별 멜라닌 생성 억제율 수치 도표 .....	72
<표 18> 립글로스의 표면 발색 비교 .....	75

## 그림 목 차

<그림 1> 연구 순서도 .....	4
<그림 2> 피코빌리솜의 빛 흡수 안테나 .....	12
<그림 3> 피코에리트린의 3D 모델링 구조와 리본모델 구조 .....	13
<그림 4> 피코에리트린의 생합성 과정 .....	14
<그림 5> 효소를 이용한 피코에리트린 합성과정 .....	16
<그림 6> 단백질 재조합 과정 .....	18
<그림 7> pACYCDuet-1 벡터 맵 .....	23
<그림 8> pETDuet-1 벡터 맵 .....	23
<그림 9> pCDFDuet-1 벡터 맵 .....	24
<그림 10> 재조합 피코에리트린의 정제과정 도식화 .....	39
<그림 11> 재조합 된 pCDF Duet-1-cpcE-F 벡터 구조 .....	46
<그림 12> 재조합 된 pACYCduet-1-pebS-Hox1 벡터 구조 .....	46
<그림 13> 재조합 된 pETduet-1-HT-cpcA 벡터 구조 .....	47
<그림 14> pETDuet1 벡터에서 HT-cpcA 유전자의 서열 검증 .....	49
<그림 15> pCDFDuet1 벡터에서 cpcE 유전자의 서열 검증 .....	50
<그림 16> pCDFDuet1 벡터에서 cpcF 유전자의 서열 검증 .....	51
<그림 17> pACYCDuet1 벡터에서 pebS 유전자의 서열 검증 .....	52
<그림 18> pACYCDuet1 벡터에서 Hox-1 유전자의 서열 검증 .....	53
<그림 19> HT-cpcA 단백질 서열 검증 .....	54
<그림 20> pebS 단백질 서열 검증 .....	54
<그림 21> Hox1 단백질 서열 검증 .....	55
<그림 22> cpcE 단백질 서열 검증 .....	55
<그림 23> cpcF 단백질 서열 검증 .....	56

<그림 24> $OD_{600}$ 흡광도측정 성장곡선 .....	58
<그림 25> SDS-PAGE 피코에리트린 발현 측정 .....	58
<그림 26> 대량 배양기를 사용한 3L 본 배양 및 <i>E. coli</i> 군체 .....	59
<그림 27> 피코에리트린의 정제 및 흡광 스펙트럼 .....	61
<그림 28> HPLC를 이용한 피코에리트린의 순도 확인 .....	62
<그림 29> 동결건조 된 재조합 단백질 피코에리트린 농도별 색도 비교 ...	64
<그림 30> HaCaT 세포에서의 피코에리트린의 농도별 독성평가 .....	66
<그림 31> 피코에리트린의 산화 손상 보호 분석 .....	69
<그림 32> B16F1 세포에서의 피코에리트린의 농도별 독성평가 수치도표 .....	71
<그림 33> B16F1 세포에서의 피코에리트린의 농도별 멜라닌 생성 억제율 .....	73
<그림 34> 색소에 따른 립글로스 .....	74

# I. 서론

## 1. 연구의 필요성 및 목적

21세기에 이르러 생활 수준과 친환경 의식이 높아지면서 식품, 의약, 화장품 산업에서 단순 케미컬의 조합이 아닌 내추럴리즘(naturalism) 선호에 따라 천연소재 사용이 증가하고 있으며,<sup>1)</sup> 소비자들의 건강하고 안전한 소비 수요가 늘어나면서 천연색소에 관한 관심이 급증하고 있다. Maria Isabel Landim Neves(2019)<sup>2)</sup>의 연구에서는 2015년부터 2019년까지 천연색소 성장률이 연간 6.5% 증가한 것으로 나타났으며 2020년까지 천연색소 시장은 1.7억 달러에 이를 것으로 전망하였다.

현재 색소시장은 착색률이 높고 안정하며 가격이 매우 저렴한 인공합성색소가 대부분 차지하고 있으나 피부를 자극하는 안전성 문제가 제기됨에 따라 사용을 엄격히 제한<sup>3)</sup>하고 있다. 천연색소는 인공합성색소와 다르게 피부에 무해 하며 항균, 항암, 항산화 등의 기능성<sup>4)</sup>이 있는 반면, 재현성, 표준화의 문제점, 원료공급의 불안정성, 고가의 원료비 등<sup>5)</sup> 한계점이 있다.

천연색소 중 피코에리트린(phycoerythrin)은 대표적인 핑크색 색소로 자연계에 존재하는 형광 물질 중 가장 밝은 핑크 색소 중 하나이다.<sup>6)</sup> 피코에리

- 
- 1) 문서윤, 김민희, 리순화 (2017). 천연 방향성 제품의 사용실태와 소비자의 만족도 및 선호도에 대한 연구. 한국디자인문화학회지, 23(2), pp. 193 - 206.
  - 2) Maria Isabel Landim Neves (2019). Trends and Challenges in the Industrialization of Natural Colorants. Food and Public Health, 9(2), pp. 33-44.
  - 3) 식품의약품안전. 제2015-74호, 2015.10. 07 시행 (검색: 2019.10.15)
  - 4) 김석진(2007). 천연색소분야 국내 기술동향. 식품기술, 20(3), p 38.
  - 5) 김효정(2004). 천연염료를 사용한 색조화장품 개발에 관한 연구. 계명대학교 대학원 박사학위논문.
  - 6) Lanton. F and J. Neveux (1997). Spatial and seasonal variations in abundance and spectral characteristics of phycoerythrins in the tropical northeastern Atlantic Ocean. Deep Sea Res, 44, pp. 223-246.

트린 색소를 추출하는 대표적인 방식은 홍조류인 김으로부터 에탄올 등의 유기 용매에서 추출하여야 한다.<sup>7)</sup> 그러나 김은 포자번식을 하는 해조류로서 다양한 포자들이 존재하고, 동일한 집단인 해조류에서만 추출하기가 어려워 핑크빛 색상을 일정하게 유지 시키기가 쉽지 않아 상업용 색소로서 품질관리(Quality Control; QC)의 어려움이 있고, 대량생산이 불가능하다는 결함이 있다. 따라서 공학적 세포에 의한 피코에리트린의 생산 수율 개선과 색상의 표준화를 통한 시장성, 원료가격의 효율성 등을 개선하여 천연색소를 상품화하는 필요성이 있다.

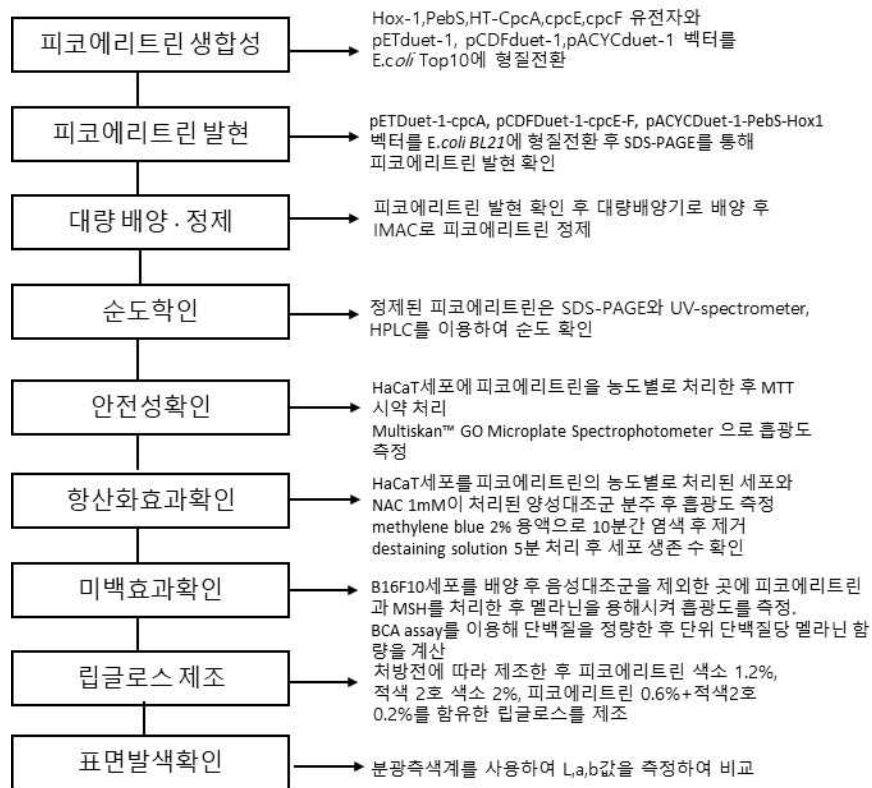
천연색소에 관한 선행연구로 이영희(2016)<sup>8)</sup>, 이승범(2018)<sup>9)</sup>은 추출 용매에 따른 최적화된 색소를 추출하는 방법을 연구하였다. 박재명(2019)<sup>10)</sup>, 박신호(2018)<sup>11)</sup>는 추출한 천연색소의 안전성과 기능성을 연구하였다. 정혁준(2007)<sup>12)</sup>, 김희구(1998)<sup>13)</sup>는 대량으로 천연색소를 추출하는 방법을 연구하였다. 이와같이 천연색소에 관한 연구는 천연색소의 색을 최적화하기 위한 추출 용매를 비교 분석하거나 색소의 기능성 및 안전성에 관한 연구가 대부분이며, 천연색소는 대량 생산하기 위해서는 색소의 원재료를 재배하는 비용이 많이 들거나 추출시간이 길게 소요되어 천연색소를 대량으로 생산하여 상업적으로 이용하는 것에는 미흡한 실정이다.

- 
- 7) 김중호 (1995). 홍조식물 *Ceramium kondoi*와 유사종의 피코에리트린에 의한 변역학적 연구. 충남대학교 대학원 석사학위논문.
  - 8) 이영희, 박영광, 백영미 (2016). 천연색소의 색 특성에 미치는 추출용매의 영향. 한국염색가공협회, 28(1), pp. 1-13.
  - 9) 이승범, 이원재, 홍일권 (2018). 천연색소 추출공정 최적화를 위한 반응표면분석법의 적용. 한국공업화학회, 29(3), pp. 283-288.
  - 10) 박재명, 박진숙 (2019). *Zooshikella* sp. 17TA 색소 추출물의 물리화학적 안정성과 항균활성. 한국해양바이오학회, 11(2), pp. 89-93.
  - 11) 박신호 (2018). 멧게 껍질(Ascidian shell)로부터 추출한 천연색소의 안정성에 대한 연구. 한국유화학회지, 35(1), pp. 292-298.
  - 12) 정혁준 (2007). *Monascus* 속 균주를 이용한 홍국의 제조 및 천연색소의 산업적 응용에 관한 연구. 계명대학교 대학원 박사학위논문.
  - 13) 김희구 (1998). *Monascus anka* 로부터 유기배양에 의한 적색소의 대량생산. 한국식품영양학회지, 11(6), pp. 617-621.

따라서 본 연구는 핑크색 천연색소 피코에리트린을 김에서 추출하는 기본적인 방법이 아니라 피코에리트린을 생합성 하는 유전자를 재편집하여 피코에리트린을 발현하고 대량 배양기를 통한 생산 효율성 증대에 초점을 두어 천연색소 단백질의 상업적 사용 가능성을 확인하고 발현된 피코에리트린의 안전성과 기능성 효능을 평가하여 천연색소로서의 가치를 확인하고자 한다. 그리고 얻어진 피코에리트린 색소를 립글로스에 적용하고 인공합성색소로 만들어진 립글로스와 표면 발색을 비교분석 하여 상업적 색소로서 대체 가능성을 살펴보는 데 그 목적이 있다. 이러한 연구는 의약품, 기능성 식품 및 화장품 등 여러 산업 분야에서 피코에리트린의 상업적 이용 가능성에 대한 기초자료를 제공하고자 한다.

## 2. 연구의 내용

피코에리트린 생합성을 위한 유전자와 벡터를 이용하여 피코에리트린 생합성을 준비하고 재조합된 벡터를 이용하여 피코에리트린을 발현한다. 발현된 피코에리트린을 확인한 후 대량배양을 한 뒤 Immobilized metal affinity chromatography(IMAC)를 통해 정제한다. 정제된 피코에리트린의 순도를 확인하여 안전성과 기능성을 측정하고 추출한 색소로 립글로스를 제조한 후, 표면 발색을 비교한다. 이상의 실험 순서는 <그림 1>과 같다.



<그림 1> 연구 순서도

## Ⅱ. 이론적 배경

### 1. 천연색소 단백질

#### 1) 천연색소의 정의 및 분류

색소의 사전적 정의를 살펴보면 가시광선을 선택적으로 흡수, 반사함으로써 물체의 색상이 나타나도록 해 주는 성분으로 생체의 색상을 나타내는 식물·동물·미생물 등의 천연색소가 있고, 화학적으로 물건에 색을 입히는 도료·안료 등의 공업용 인공합성색소가 있다.<sup>14)</sup>

천연색소는 식물·동물·미생물 색소로 나눌 수 있는데 식물성 천연색소는 과거부터 섬유나 공예품의 염료뿐만 아니라 의약품이나 식품 및 화장품의 착색제로 널리 쓰여 왔으며, 크게 조근 색소, 목피 색소, 화과 색소로 구분하고 식물의 꽃, 잎, 뿌리, 열매 등에서 추출한다. 식물성 천연색소 소재로는 홍화, 주근의 꽃, 포도의 껍질, 카카오, 치자, 자소의 잎, 울금, 당근의 뿌리 등이 있다.<sup>15)</sup> 식물체는 다양한 형태의 항산화 물질을 함유하고 있는데 식물 유래의 색소 성분으로 생체 내의 DNA 손상, 암 유발, 노화 등 다양한 질병의 원인이 되는 활성산소에 의한 손상을 방지함으로써 생체를 보호하는 중요한 유용성분으로 주목받고 있다.<sup>16)</sup>

동물성 천연색소는 동물계에서 얻을 수 있는 색소로 곤충, 어패류, 그 밖의 동물로 구분한다. 동물성 천연색소의 종류는 선인장과의 식물에 기생하는 연지벌레의 암컷을 건조 시켜 얻어지는 색소 코치닐<sup>17)</sup>과 락 연지벌레 유

14) 색소, <표준대국어사전> <https://stdict.korean.go.kr> (검색: 2019.10.01)

15) 지형준 (1997). 천연식물과 식용색소. 식품기술, 10(2), pp. 55-61.

16) 황초롱, 강민정, 심해진 (2015). 천연식물로부터 추출한 색소성분의 항산화 및 항비만 활성 한국식품영양과학회지, 44(2), pp. 165 - 172.

17) 김선영, 양진희 (2012). 코치닐 천연염료와 키토산을 이용한 색조화장품의 안정성에 관한

충이 분비하는 수지상 물질에서 분리되는 락 색소(Lac color) 등이 있다. 코치닐과 락 색소는 과거부터 화장품의 원료나 염색재료로 이용하였으며 내광성이 우수하고 안정성을 나타내 건조한 상태로 장기간 보관할 수 있는 장점이 있다.<sup>18)</sup>

미생물 색소는 홍국균에서 얻어지는 모나스커스, 해양 조류에서 얻어지는 피코빌린 단백질 등이 있다. 미생물에 의해 생산되는 천연색소의 장점은 배양시간이 짧고, 다른 천연색소보다 통일된 조건 설정이 가능하여 균질성 높은 생산물을 얻을 수 있으며 배지 조성이 간단하여 배양에 따른 비용도 절감할 수 있는 장점이 있다.<sup>19)</sup>

천연색소 분류를 정리한 내용은 <표 1>과 같다.

<표 1> 천연색소의 분류

분류	구분	종류	특징
식물성 색소	조근 모피 화과	홍화, 주근의 꽃, 포도의 껍질, 카카오, 치자, 자소의 잎, 울금, 당근의 뿌리 등	식물유래 성분으로 항산화 물질을 함유하고 있는 것이 많다.
동물성 색소	곤충 폐류 그밖의 동물	코지닐, 락 색소 등	내광성과 안정성이 좋아 장시간 보관 할 수 있다.
미생물 색소	미생물	모나스커스, 피코빌린 단백질	배양시간이 짧고 동·식물 유래 천연색소보다 통일된 조건 설정이 가능하다.

출처: Ahmet. G (2016)<sup>20)</sup>. Classification of Dye and Pigments

연구. 한국미용학회지, 18(6), pp. 1214-1222.

18) 김은하, 송연숙, 이근광 (2014). 락 색소를 이용한 모발의 염색성 연구. 한국미용학회지, 20(1), pp. 110-118.

19) 김주철, 김만철, 한주상 (2009). 적색색소를 생산하는 해양미생물 JE-34 균주의 분류학적 특성 및 항균 활성. 미생물학회지, 45(4), pp.368-376.

20) Ahmet G et al (2016). Classification of Dye and Pigments, Dyes and Pigments, pp. 31-45.

## 2) 천연색소 단백질의 종류

천연색소 단백질은 동·식물체의 조직이나 체액 등에 함유되는 복합단백질의 일종으로 특정한 색소와 결합하고 있는 단백질의 총칭이다.<sup>21)</sup> 천연색소 단백질은 단백질과 색소의 성질에 따라 헴 단백질, 금속 착화합물 단백질, 플라빈 단백질, 카로티노이드 단백질, 피코빌린 단백질 등으로 분류된다.<sup>22)</sup>

헴 단백질(heme protein)은 철-포르피린 착염과 단백질의 결합체이다. 단백질과 헴의 결합비는 1:1, 1:2, 1:4 등 여러 가지로 동·식물에 널리 존재한다. 헴 단백질은 척추동물 적혈구 속에 존재하는 적색의 헤모글로빈(hemoglobin), 진핵생물의 세포에 존재하는 적색 또는 적녹색의 시토크롬(cytochrome), 감자, 간, 적혈구, 신장에 존재하는 황색의 카탈라아제(catalase), 근육 조직에 존재하는 적색의 미오글로빈(myoglobin) 등이 있다.<sup>23)</sup>

금속 착화합물 단백질은 단백질과 금속 착 이온의 결합체를 말하며 구리 단백질과 철단백질이 있다. 구리 단백질의 예로는 헤모시아닌(hemocyanin)이 있고, 헤모시아닌은 갑각류나 연체동물의 혈액 속 구리와 결합하여 존재하는 단백질로 무색이지만 산소와 결합하면 청색을 띤다.<sup>24)</sup> 금속 착화합물 중 철 단백질은 철과 단백질이 결합된 황색의 페리틴(ferritin)으로 비장·소장·점막·간 등에 존재하며, 생체 내에서의 철의 저장이나 흡수에 관여한다.<sup>25)</sup>

---

21) Robert Huber (1987). Flexibility and rigidity, requirements for the function of proteins and protein pigment complexes. University of Leicester, 15. pp. 1009-1020.

22) Kenichi Honda (1999). 「Molecular Systems in Biological Photoreceptors」. Springer, Tokyo, p. 168.

23) J. Biol. Chem (1950). The distribution of the chromoproteins, hemoglobin, myoglobin, and cytochrome, in the tissue of different species, and the relationship of the total content of each chromoprotein to body mass. The Journal of Biological Chemistry, 182, pp. 317-334.

24) Jean Roche (1936). Animal Pigment. Ann. Rev. Biochem, 535, pp. 463-484.

25) Frank M. Torti and Suzy V. Torti (2002). Regulation of ferritin genes and protein. Blood, 99(10), pp. 3505 - 3516.

황색의 플라빈 단백질(flavoprotein)은 비타민 B<sub>2</sub>로 알려진 리보플라빈을 함유하는 단백질을 말한다. 플라빈모노뉴클레오티드(FMN) 또는 플라비나데닌디뉴클레오티드(FAD)를 조효소로 가지며 호흡에 관여하는 전자 운반체 역할을 한다. 아미노산산화효소(amino acid oxidase), 잔틴산화효소(xanthine oxidase) 등이 있으며 모두 산화환원효소로 작용하여 산화되어 황색 또는 황적색이 된다.<sup>26)</sup>

카로티노이드단백질(carotenoid)은 카로티노이드와 단백질의 결합체로 광화학적 반응 단백질인 로돕신이 비타민 A와 결합하여 붉은빛을 흡수한다.<sup>27)</sup>

피코빌린단백질(phycobiliproteins)은 피롤 유도체와 단백질의 결합체이다. 홍조류의 피코에리트린(phycoerythrin), 남조류의 피코시아닌(phycocyan) 등이 있다. 이들은 엽록체 속에 노란빛 또는 적색의 카로티노이드, 녹색의 클로로필과 함께 함유되어 있으며, 광합성의 보조색소로 알려져 있다.<sup>28)</sup>

이상의 내용을 정리하면 <표 2>와 같다.

<표 2> 천연색소 단백질 분류

단백질 색소	추출원	종류
헴 단백질	동물	헤모글로빈(적색), 시토크롬(적색 또는 적녹색) 미오글로빈(적색)
금속착화합물	동물	헤모시아닌(청색), 페리틴(황색)
카로티노이드	동물	로돕신(적색)
피코빌린단백질	식물	클로로필(녹색), 카로티노이드(노랑 또는 적색)
피코빌린단백질	미생물	피코에리트린(적색), 피코시아닌(청색)
헴 단백질	동·식물	카탈라아제(황색)
플라빈단백질		아미노산산화효소, 잔틴산화효소(황색 또는 황적색)

26) 김류련, 이정환, 남기석 (2011). 아미노-말단 리보플라빈 생성효소 단백질의 형광 특성. 한국미생물학회지, 47(1), pp. 14-21.

27) 정광환, 최아름 (2007). 고세균 타입 로돕신의 종류, 특징과 그 응용. 생화학분자생물학회, 27(2), pp. 15-20.

28) Lawrence Bogorad (1975). Phycobiliproteins and complementary chromatic adaptation. Ann. Rev. Plant Physiol, 26, pp. 369-401.

이러한 천연색소 단백질 중 피코에리트린은 해양환경에서 흔하고 풍부한 광합성 보조 단백질로 현존하는 형광 물질 중 가장 밝은 핑크색 색소 중 하나이다.<sup>29)</sup> 해양식물은 육상생물과 전혀 다른 환경에서 자라기 때문에 새로운 기능성을 갖는 색소를 생산할 수 있을 것으로 기대된다.<sup>30)</sup>

### 3) 천연색소의 추출방법

천연색소의 추출방법은 크게 분쇄법, 추출법, 효소법, 배양법으로 구분하며 분쇄법은 천연 동·식물을 건조하고 분쇄하여 단순 처리하는 방법이다. 추출법은 천연 동·식물로부터 색소 성분을 추출 또는 착즙하는 방법이다. 효소법은 천연 동·식물 및 생체 색소를 효소 처리하는 방법이다. 배양법은 미생물로부터 산출하는 색소로 원료의 종균을 배양하여 분류한 후 추출하는 제조방법이다.<sup>31)</sup>

천연색소 추출방법에 관한 선행연구로 이세희(2006)<sup>32)</sup>는 건조된 선인장 열매를 잘게 분쇄하여 색소로 사용하였으며 박미선(2002)<sup>33)</sup>은 홍국의 적색 색소를 추출하기 위하여 산성과 알칼리 용매를 이용하여 천연색소를 추출하였다. 이영희(2016)<sup>34)</sup>는 강황의 뿌리, 치자의 열매, 쑥의 잎, 녹차 잎의 색소를 추출 용매 증류수, 에탄올, 메탄올 및 아세톤을 사용하여 추출하였다. 황

29) Lanton, F. and Neveux, J (1997). Spatial and seasonal variations in abundance and spectral characteristics of phycoerythrins in the tropical northeastern Atlantic Ocean. Deep Sea Res, 44, pp. 223-246.

30) 정동우, 박진숙 (2008). 해양세균 *Pseudoa/teromonas psicida* TA20의 색소 추출물의 물리화학적 안정성과 생리활성. 생명과학회지, 19(8), pp. 1132 - 1138.

31) 최진현, 염정현, 배도규(2009). 특집 : 건강 & 웰빙 ; 천연색소 자원의 활용. 섬유기술과산업학회지, 13(2), pp 113-121.

32) 이세희, 조용석, 최순화 (2006). 선인장 열매의 색소 추출물에 의한 양모섬유의 염색. 한국염색가공학회지, 18(2), pp. 8-14.

33) 박미선, 홍인권 (2002). 천연색소 추출공정의 추출 용매 조성에 의한 색차 효과. 공업화학, 13(8), pp. 844-851.

34) 이영희, 박영광, 백영미 (2016). 천연색소의 색 특성에 미치는 추출 용매의 영향. 한국염색가공학회지, 28(1), pp. 1-13.

초롱(2015)<sup>35</sup>)은 포도 과피, 감, 아선약을 카탈라아제 효소를 이용하여 색소를 추출하였다. 김희선(2015)<sup>36</sup>)은 펙티나아제 효소를 이용하여 복분자의 색소를 추출하였다. 이에림(2017)<sup>37</sup>)은 향균 색소를 추출하기 위해 색소생성 세균을 시료 채취 후, 시료처리 및 배양을 한 뒤 색소가 생성된 세균을 분리하고 메탄올을 첨가하여 원심분리를 통해 색소를 추출하였다. 정동우(2006)<sup>38</sup>)는 해양 세균 속 천연색소를 추출하기 위하여 색소를 생성하는 균주를 선별하여 배양하고 생리 및 생화학적 특성을 조사한 뒤 염색체의 DNA를 분리하여 rDNA 염기서열을 PCR 후 물, 에탄올, 메탄올을 각각 첨가하여 추출하였다. 정영기(1999)<sup>39</sup>)는 해양미생물로부터 카로티노이드 색소를 추출하기 위하여 배양액을 원심분리한 후 침전물만을 회수하여 실온에서 증류수로 세포를 용해시킨 후 아세톤으로 2회 이상 색소를 추출하여 추출액을 에틸에테르로 전용시킨 후, 탈수시켜 감압 증류한 것으로 카로티노이드 색소를 추출하였다. 현재 상업적으로 이용되는 대부분 천연색소는 동·식물로부터 추출한 것으로 추출 용매를 사용하여 추출한다. 그러나 원료의 포자가 다양하고 추출 용매에 따라 색소의 염색성과 기능성이 달라<sup>40</sup>)지는 등 균일성에 한계가 있다. 그러나 미생물 색소는 최적 배양조건이 확립되면 통일된 균질성 높은 생산물로 대량생산이 가능한 장점이 있다.<sup>41)</sup>

35) 황초롱, 강재란, 심혜진 (2015). 마늘 효소 분해물과 천연색소 소재의 복합물이 고지방 식이성 흰쥐의 지질대사에 미치는 영향. 생명과학학회지, 25(6), pp. 663 - 672.

36) 김희선, 최우영, 김원석 (2015). 효소처리를 이용한 복분자 추출공정의 최적화 연구. 한국산업식품공학지, 19(1), pp. 62-69.

37) 이에림(2017). 향진균활성 violacein 색소를 생산하는 *Collimonas* sp. DEC-B5 균주의 분리 및 특성. 미생물학회지, 52(2), pp. 212-219.

38) 정동우, 박진숙 (2008). 해양세균 *Pseudoaeromonas piscida* TA20의 색소 추출물의 물리화학적 안정성과 생리활성. 생명과학학회지, 19(8), pp. 1132 - 1138.

39) 정영기 (1999). 해양미생물로부터 카로티노이드 색소의 생산을 위한 최적조건. 한국식품영양과학회지, 28(6), pp. 1239 - 1243.

40) 최형열, 이정순 (2015). 추출용매에 따른 애기뿔풀 색소의 특성 및 염색성. 한국생활과학회지, 24(6), pp. 859-870.

41) 김정보, 조경숙 (2006). 색소를 생산하는 탈질미생물의 동정 및 색소생산 환경조건 연구. 대한환경공학회, 12, pp. 1771-1776.

## 2. 피코에리트린

피코에리트린은 홍조류에 함유된 광합성 단백질 보조색소로, 전 세계에 분포하는 홍조류는 모두 4,000종이 있다. 우리나라에 분포하는 해조류 중 홍조류는 70%를 차지하며 355여 종이 있다.<sup>42)</sup> 대부분이 바다에 있고 해수가 고여 있는 조수 웅덩이, 조간대 하부, 약한 빛이 있는 곳이나 다른 해조류로 덮여 있는 그늘진 곳에서 서식한다.<sup>43)</sup> 홍조류의 색소체는 카로틴와 클로로필 a, d, 크산토펜류를 가지고 있으며 피코빌린계 색소로서 푸른색의 피코시아닌과 적색의 피코에리트린을 함유하고 있다. 따라서 홍조에서 물이 붉은 색으로 보이는 이유도 이 피코에리트린 때문이다.<sup>44)</sup>

### 1) 홍조류의 광합성 과정

홍조류의 광합성은 피코빌린(phycobilin)에서 시작되는데 각각의 피코빌린 단백질은 광 수확 안테나 복합체 피코빌리솜(phycobilisome)을 형성한다. 피코빌리솜은 빛 환경에 맞추어 빛의 흡수를 최대화하는 구조를 가진다.<sup>45)</sup> 피코빌리솜의 구성은 652nm 적색 빛을 흡수하는 알로 피코시아닌(allophycocyanin, APC)으로 구성된 중심부와 540nm의 녹색 빛을 흡수하는 피코에리트린(phycoerythrin: PE)과 620nm의 적색 빛을 흡수하는 피코시아닌(phytocyanin: PC) 원반이 모여서 마치 부채와 같은 모양을 하고 있다.<sup>46)</sup> 피코빌리솜의 빛

42) 홍채환, 김세원 (2004). 산업적 응용을 위한 홍조류 당화 기술, 한국생명공학회, 29(5), pp. 307-305.

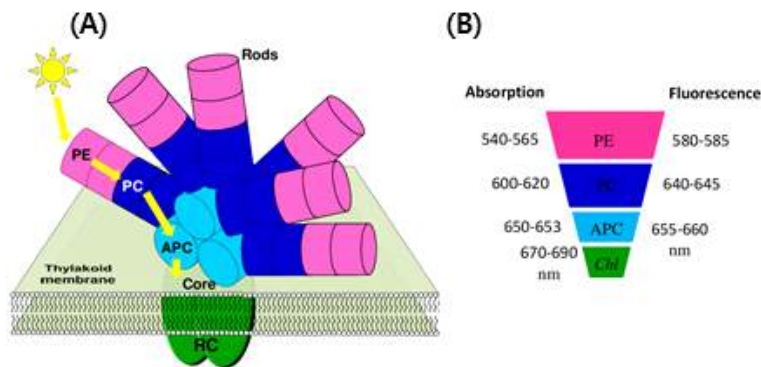
43) 이유경, 이홍금 (2002). 조류(Algae)의 산업적이용. 생물산업, 15(2), pp. 19-24.

44) 최 민 (2011). 해조류를 이용한 천연염료 개발. 전남대학교 대학원 석사학위논문.

45) Haijun Liu<sup>1</sup> et al (2013). Phycobilisomes Supply Excitations to Both Photosystems in a Megacomplex in Cyanobacteria. Science, 342(6162), pp. 1104-1107.

46) Henning Kirst et al (2014). Maximizing photosynthetic efficiency and culture productivity in cyanobacteria upon minimizing the phycobilisome light-harvesting antenna size. Biochimica et Biophysica Acta, 1837(10), pp. 1653-1664.

흡수 안테나 모양은 <그림 2-A>에서 보는 바와 같이 각 피코빌린 단백질은 펩타이드로 연결된 이음쇠를 통해 봉 말단부에서 중심부 전달되고 엽록소 a를 가진 광계 I 이나 광계 II의 반응중심으로 에너지를 전달한 뒤 가시광선 범위에서 빛을 흡수하고, 형광 방출 최대값 580nm로 방출한다. (그림2-B) 즉, 홍조류의 광합성 과정은 봉의 말단부인 피코에리트린에서 피코시아닌으로 전달하고 중심부인 알로 피코시아닌을 통해 엽록소a의 에너지 전달 경로로 전달한다.<sup>47)</sup>



<그림 2> 피코빌리솜의 빛 흡수 안테나

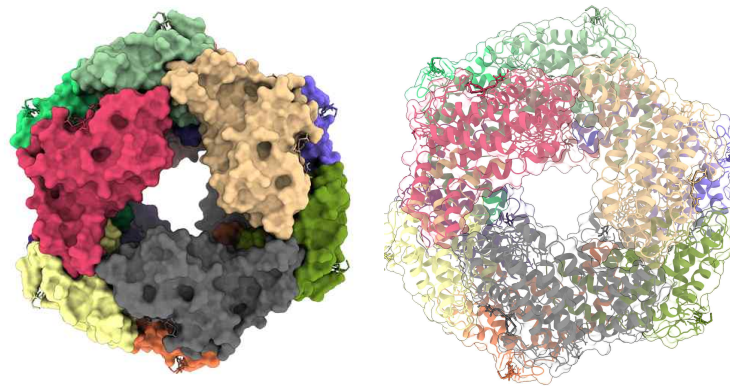
출처: <https://www.semanticscholar.org>

## 2) 피코에리트린의 구조 및 생합성 과정

피코빌린은 피코시아노빌린(phycocyanobilin, PCB), 피코에리트로빌린(phycocerythrobilin, PEB), 피코우로빌린(phycourobilin, PUB), 크립토비올린(cry

47) Percy M. Gault and Harris J. Marler (2009). 「Handbook on Cyanobacteria: Biochemistry, Biotechnology and Applications」. Nova Science Publishers, Inc. New York, pp. 124-125.

ptoviolin)을 포함하는 4개의 피를을 갖는 열린 고리의 구조를 보인다. 피코빌린단백질 피코에리트린은 알파( $\alpha$ )와 베타( $\beta$ ) 소단위체로 형성된 이형이량체(heterodimer,  $\alpha\beta$ )가 3개( $\alpha_3\beta_3$ ) 혹은 6개( $\alpha_6\beta_6$ )형태로 조립되어 있다. 형성된 삼합체나 육합체는 도넛 모양의 헥사머(hexamer) 구조 형태를 이루고 있으며 피코에리트린의 피코빌린 단백질 원반이라 한다.<sup>48)</sup> 엑스선 크리스탈로그래피 워크(X-ray crystallography work)을 통한 피코에리트린 3D구조 모델과 리본모델은 <그림 3>과 같다.



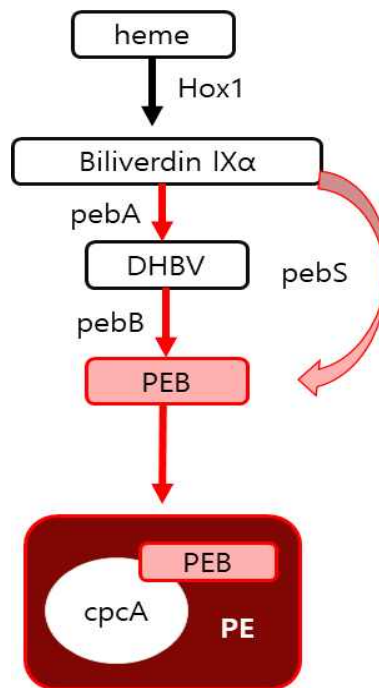
<그림 3> 피코에리트린의 3D 모델링 구조와 리본모델 구조

피코에리트린의 생합성 과정을 보면 헴이 닫힌 고리형에서 개방형 사슬 구조로 변화되는 단계가 첫 번째 생합성 단계이다. 헴 산화효소를 발현하는 Hox-1에 의해서 A와 D 고리가 끊어지면서 빌리버딘(biliverdin)이 생성된다.<sup>49)</sup> 그 후 피코에리트로빌린 생합성은 pebA와 pebB 두 효소가 관여하는 경로와 pebS에 의한 경로 2가지가 있다. 첫 번째 과정은 DHBV(dihydrobili

48) Shelly A Pizarro and Kenneth Sauer (2001). Spectroscopic study of the light-harvesting protein C-phycoyanin associated with colorless linker peptides. *Photochemistry and Photobiology*, 73(5), pp. 556-563.

49) Rhie, G. E and Beale, S. I (1995). Phycobilin Biosynthesis: Reductant Requirements and Product Identification for Heme Oxygenase from *Cyanidium caldarium*. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 320(1), pp. 184-194.

verdin)의 페레독신 산화환원효소 pebA가 D고리의 15번과 16 탄소에 의한 메틴(methine)을 환원시켜 중간산물인 DHBV가 생성된 후 연이어 피코에리트로빌린의 페레독신 산화효소 pebB에 의해 A고리가 환원됨으로써 피코에리트로빌린이 생성된다.<sup>50)</sup> 피코에리트로빌린을 합성하는 두 번째 과정은 피코에리트로빌린의 합성 효소를 발현하는 pebS를 통해 피코에리트로빌린을 생성한다. 이후 피코시아노 알과 서브유닛을 발현하는 cpcA, 피코시아닌 서브유닛과 피코시아노빌린을 결합시키는 cpcE 효소, cpcF 효소들의 부착반응을 통해 피코에리트린을 생합성 할 수 있다.<sup>51)</sup>



<그림 4> 피코에리트린의 생합성 과정

50) Sigurd M. Wilbank (1993). 268(2), Rod Structure of a Phycoerythrin 11-containing Phycobilisome, The Journal of biological chemistry, pp. 1236-1241.

51) T. Dammeyer and Frankenberg-Dinkel, N (2008). Function and distribution of bilin biosynthesis enzymes in photosynthetic organisms. Photochem Photobiol Sci, 7(10), pp. 1121-1130.

### 3) 피코에리트린의 선행연구 및 재조합 단백질의 생합성 과정

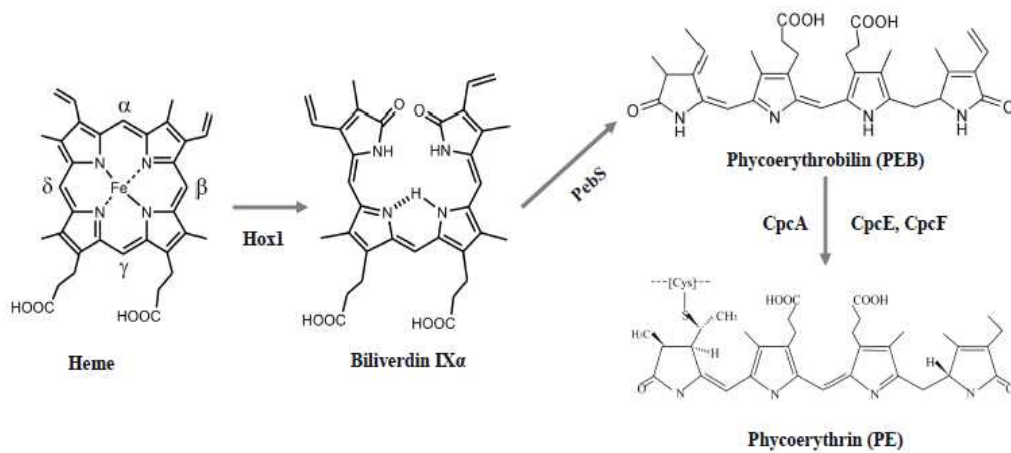
피코에리트린의 기능성에 관한 선행연구 김중호(1995)<sup>52)</sup>, Sonani, Ravi. R(2017)<sup>53)</sup>, Qunwen Pan(2013)<sup>54)</sup>, Jacobson(2016)<sup>55)</sup>을 살펴본 결과 피코에리트린은 항암, DNA 산화, 항산화 같은 다양한 생리적 효과와 약리학적 효과를 지닌 것으로 밝혀졌다.<sup>56)</sup>

피코에리트린의 정제 및 추출한 선행연구 남궁석(1976)<sup>57)</sup>, Lin, Yi-Hung (2014)<sup>58)</sup>, Munier, M(2015)<sup>59)</sup>를 살펴본 결과 다양한 홍조류로부터 추출 용매를 사용하여 피코에리트린을 정제 혹은 추출하였다. 그러나 이러한 과정은 해조류를 채취하고 건조해야 하는 복잡한 과정과 낮은 산출량을 달성한다.

이에 본 연구는 전통적인 방법인 해조류에서 추출하는 것이 아닌 <그림 5>와 같이 유전자 재조합 기술로 피코에리트린을 생합성하여 발현한다. Hox-1은 헴의 A와 D 고리가 끊어지면서 빌리버딘을 발현한다. 그 후 피코에리트로빌린(PEB)의 합성 효소를 발현하는 *pebS*를 통해 피코에리트로빌린(PEB)을 생성한다. 이후 피코시아노 알파 서브유닛을 발현하는 *cpcA*, 피코

- 
- 52) 김중호 (1995). 홍조식물 *Ceramium kondoi*와 유사종의 피코에리트린에 의한 면역학적 연구. 충남대학교 대학원 석사학위논문.
- 53) R. Sonani, Ravi, et al (2017). Phycoerythrin averts intracellular ROS generation and physiological functional decline in eukaryotes under oxidative stress *Datta. Protoplasma*, 254(2), pp. 849-862.
- 54) Pan Qunwen, Meizhen Chen (2013). Antitumor function and mechanism of phycoerythrin from *Porphyra haitanensis*. *Biol Res*, 46(1), pp. 87-95.
- 55) Peer B. Jacobson (2016). R-Phycoerythrin Induces SGC-7901 Apoptosis by Arresting Cell Cycle at S Phase. *Mar Drugs*, 14(9), p. 166.
- 56) 박준상 (2015). 해양 천연 유래 물질의 성장아교세포에 대한 항산화 효과 및 나노 DDS 개발. 인하대학교 대학원 석사학위논문.
- 57) 남궁석 (1976). 한국산 김중의 색소단백질의 분리 및 그 아미노산 조성, *한국식품과학회지*, 8(3), pp. 172-178.
- 58) Lin, Yi Hung, et al (2014). Fluorescent colored material made of clay mineral and phycoerythrin pigment derived from seaweed, *Dyes and Pigments*, 100, pp. 97-103.
- 59) Munier, M. et al (2015). One-step purification of R-phycoerythrin from the red edible seaweed *Grateloupia turuturu*. *Journal of Chromatography B*, 992, pp. 23-29.

시아닌 서브유닛과 피코시아노빌린(PEB)을 결합시키는 cpcE 효소, cpcF 효소들의 부착반응을 통해 피코에리트린을 발현하는 방법을 이용하여 색소의 표준화와 대량생산을 가능하게 하고자 한다.



<그림 5> 효소를 이용한 피코에리트린 합성과정

### 3. 단백질 재조합

오늘날 DNA는 생명체에 있어서 가장 중요한 유전물질이다. 영국의 의사 Hershey와 Chase가 1952년에 대장균에 기생하는 T<sub>2</sub> 파지가 대장균에 흡착하면, 파지의 DNA가 세포 속으로 들어가고 단백질은 세포 밖에 남는다는 실험을 통해서 DNA가 유전물질이라는 것을 최초로 밝혔다.<sup>60)</sup>

James D. Watson과 Francis Crick이 1953년에 DNA의 이중 나선 구조와 3차 구조에 대한 모델을 제시하면서 DNA에 관한 연구가 급격히 발전하였다.<sup>61)</sup> 이후로 1970~1980년대에는 DNA를 자르고 붙이는 다양한 효소들이

60) 존팔딘 (2013). 김해영, 「DNA 발견에서 유전자변형까지」. 다섯수레, 서울, pp. 25-26.

61) J. D. Watson and F. H. C. Crick (1953). The structure of DNA. Cold Spring Harb Symp Quant Biol, 18, pp. 123-131.

박테리아에 존재한다는 것이 밝혀졌으며, 이들 효소를 이용하여 인위적으로 시험관 내에서 DNA 조각을 자르고 붙여서 새로운 DNA를 만드는 유전자 재조합 기술이 확립되었다.<sup>62)</sup>

## 1) 단백질 재조합 과정

재조합 DNA를 인위적으로 *E. coli* 내에 발현시켰을 때 *E. coli*를 형질전환 시킬 수 있다. 살아있는 *E. coli* 내에서 재조합 DNA를 발현시켜 얻어진 단백질이 재조합 단백질이다.<sup>63)</sup> 단백질 재조합 과정은 DNA 절단, DNA 분리, DNA 접합, 숙주를 이용한 복제, 단백질 정제과정을 거치며 정리된 과정은 <그림 6>과 같다.<sup>64)</sup> 단백질을 재조합할 때, 전통적인 DNA를 절단하는 과정은 표적 유전자가 포함된 DNA와 *E. coli*의 플라스미드를 제한효소로 자르는 것이다. 제한효소는 다른 생물로부터 들어오는 DNA를 절단함으로써 자신을 보호하는 기능을 하므로 DNA의 특정 염기서열을 인식하여 제한효소 자리를 선택적으로 DNA를 두 가닥으로 자른다. 제한효소는 여러 종류가 있으며, 제한효소마다 인식하는 염기서열이 다르다.<sup>65)</sup> 김진관(2003)<sup>66)</sup>은 재조합 유전자를 이용하여 천연 인디고를 생산하는 연구를 진행하였는데 이때 DNA를 절단하는 과정에서 제한효소로 자른 일부분의 DNA 절단 조각에서 색이 나타나지 않았다. 이러한 전통적인 DNA 절단 과정의 비효율성을 보완한 김슨 어셈블리 (Gibson Assembly) 방법은 restriction enzyme digestion

62) Recombinant DNA technology history, <science history insitute> <https://www.sciencehistory.org> (검색: 2019.09.12.)

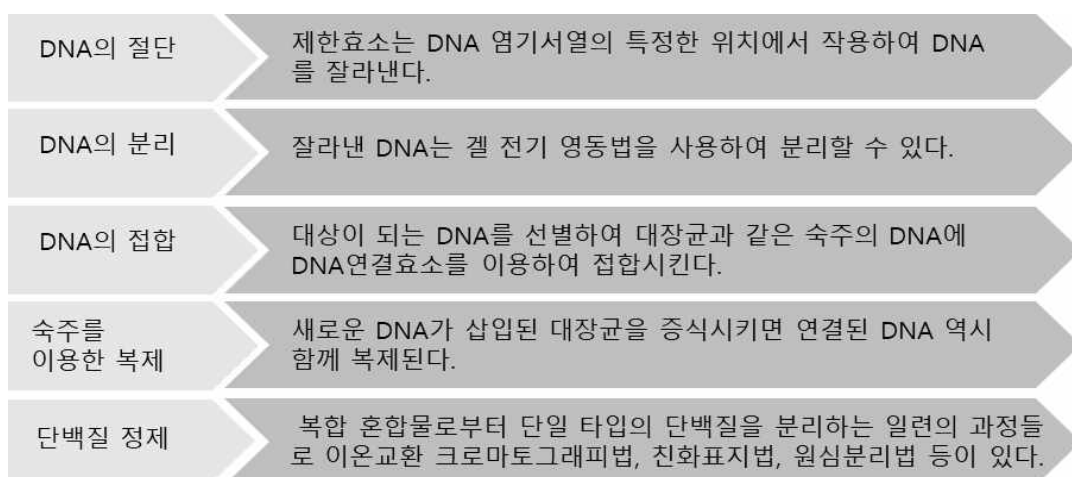
63) Jeremy M. Berg and John L et al (2007). 「Biochemistry」. Palgrave Macmillan, pp. 79-87.

64) Production of Recombinant Protein, <cusabio> <https://www.cusabio.com> (검색: 2019.11.13.)

65) Suliman Khan et al (2016). Role of Recombinant DNA Technology to Improve Life. International Journal of Genomics, pp. 1-4.

66) 김진권 (2003). 재조합 유전자를 이용한 천연 indigo 생산. 조선대학교 대학원 석사학위논문.

또는 호환 가능한 제한 부위가 필요 없이 2개 이상의 단편을 클로닝 할 수 있는 클로닝 절차이다<sup>67)</sup>. 클로닝 된 새로운 DNA를 대장균에 삽입하여 증식시키면 대장균 속의 새로운 DNA도 증식하여 함께 클로닝 된다. 그 후 대장균 속 발현된 단백질을 분리하기 위하여 이온교환 크로마토그래피, 친화 표지법, 원심분리법 등을 이용하여 대장균으로부터 단백질을 분리하고 정제한다.<sup>68)</sup>



<그림 6> 단백질 재조합 과정

출처: Production of Recombinant Protein, <cusabio> <https://www.cusabio.com>

이러한 과정을 통해 유전자재조합 단백질은 두 개 혹은 그 이상의 DNA를 유전자재조합 기술로 이어 붙여 만든 재조합 DNA에서 발현된다. 단백질 재조합 기술을 통해 아주 극소량으로밖에 얻을 수 없던 유용 단백질이나 상업용 효소가 현재는 미생물(박테리아, 곰팡이, yeast 등)과 곤충·식물세포 및 동물 세포 등을 이용해서 대량생산이 가능하게 되어 백신 개발이나, 병

67) Swara Kalva, Jef D. and Paolo Mita (2018). Gibson Deletion: a novel application of isothermal in vitro recombination. BioMed Central, 20(1), pp. 1-22.

68) Froger, A and Hall, J. E (2007). Transformation of Plasmid DNA into E. coli Using the Heat Shock Method. J. Vis, (6), p. 253,

충해에 강한 농작물을 만들고, 바이오 연료를 생산하는 미생물을 생성하는 데에도 이용하고 있다.<sup>69)</sup>

현재 대표적인 재조합 단백질 기술을 활용한 사례는 B형 간염 및 간암을 예방할 수 있는 B형 간염백신이다. B형 간염백신은 1965년 Baruch Samuel Blumberg와 1970년 David Dane에 의해 B형 간염바이러스를 제어할 수 있게 되었지만 혈액공급의 제한성, 높은 단가 등과 같은 내재적 단점으로 인하여 보편적 접종에 어려움이 있었다. 1984년 세계 최초로 재조합 단백질 기술을 활용한 백신인 출아형 효모를 이용한 재조합 백신이 개발되었고 수 년 후 저렴한 백신이 녹십자에 의해 개발되면서 B형 간염백신이 대중화 시대에 들어서게 되었다.<sup>70)</sup>

## 2) 단백질 재조합 선행연구

단백질 재조합 기술을 활용한 연구로 유미나(2011)는 Black Queen Cell Virus(BQCV)<sup>71)</sup>를 진단하기 위해 사용되는 방법이 현재 양봉현장에서 적용하기에 어려운 부분이 많아 일차적으로 병원체를 진단할 수 있는 BQCV의 항체 단백질을 대량으로 생산하여 BQCV 진단키트를 만들었다. 김성완(2014)<sup>72)</sup>은 누에의 실크를 대중화할 수 있는 소재로 개발하기 위해 실크 단백질 구성을 재조합하여 황색 형광 실크를 제작하였다.

김지윤(2014)<sup>73)</sup>은 Human chorionic somatomammotropin(HCS)라고도 불

---

69) 강정아인 (2001). 「단백질 실험 노트 (상)」, 월드사이언스, 서울, pp. 8-11.

70) 배경동, 장영석, 안상점 (2012). 백신의 역사, 현황 및 미래에 대한 고찰. 한국생물공학회, 19(1), pp. 8-5.

71) 유미선, 이보람, 노지나 (2011). Black Queen Cell Virus 재조합 단백질의 발현. 한국양복학회지, 26(4), pp. 275-282.

72) 김성완, 최광호, 김성렬 (2014). 피브로인 H-chain 재조합 단백질 발현시스템을 이용한 황색형광실크의 제작. 한국잠사학회, 52(2), pp. 102-109.

73) 김지윤, 임정희, 이원길(2014). 분비형 인간 유래 Placental Lactogen 재조합체 단백질 발현 및 정제. 한국동물번식학회, 38(2), P.27.

리우며 태반에서 분비되는 단백질성 호르몬인 placental lactogen(hPL)을 재조합 기술로 단백질을 발현하여 바이오의약품으로 사용하고자 하였다. 이성(2012)<sup>74)</sup>은 식중독은 물론, 아토피성 피부염의 원인 물질로 알려진 포도상구균 장내독소 B(Staphylococcal enterotoxin B; SEB)에 대한 치료제를 개발하고자 SEB를 재조합 단백질 기술로 발현한 뒤 난황항체를 투여하여 면역학적 특성을 연구하였다.

선행연구를 살펴보면 재조합 기술이 기존의 순수 정제 기술보다 주목을 받는 이유는 하나의 세포에서 하나의 단백질을 생산하던 공정으로부터 하나의 세포에서 수백 또는 수천 개의 단백질을 생산함으로써 원료 및 정제 단계에서 발생하는 비용의 절감과 생산되는 대량의 단백질들을 균일화하여 백신·의약품 및 산업용으로 다양하게 활용돼 부가가치가 매우 높은 기술로 평가받기 때문이다.<sup>75)</sup>

---

74) 이성, 이상래 (2012). 포도상구균에서 분비하는 장내독소 B(SEB)에 대한 재조합 단백질을 이용한 면역특이적 난황항체 생산. 한국가금학회지, 39(4), pp. 273-278.

75) 이재영, 한성구 (1995). 생명공정기술의 산업화 촉진방안에 관한 연구. 과학기술정책연구원, pp. 1-117.

### Ⅲ. 실험 재료 및 방법

#### 1. 유전자 클로닝 실험 재료

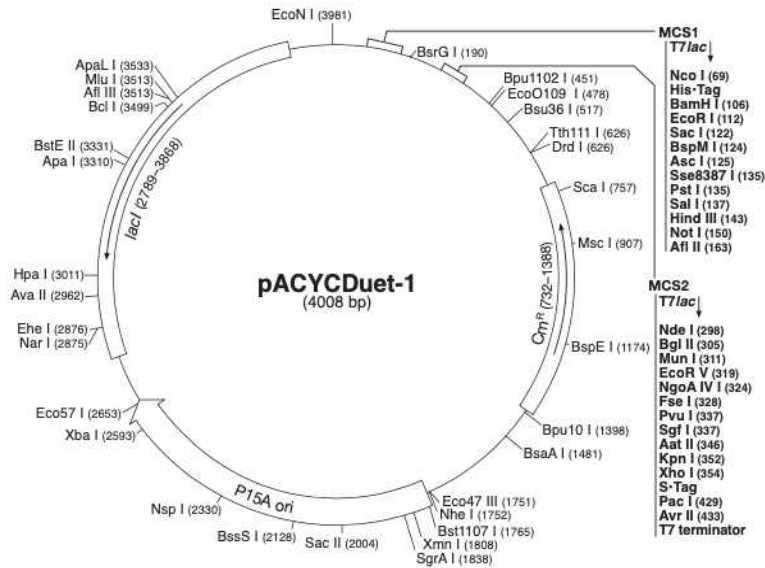
##### 1) 균주 및 플라스미드 Vector

본 연구에서 사용된 재조합 유전자 클로닝은 *E. coli* top 10 (invitrogen, USA)을 사용하여 진행하였고, 단백질 발현은 *E. coli* BL21(DE3) (Novagen, USA)을 사용하였다. *E. coli*에서 피코에리트린의 발현을 위한 유전자들의 염기서열은 NCBI (National Center for Biotechnology Information)로 부터 확보하였으며, 확보한 유전자들은 피코시아노알파유닛을 발현하는 *cpcA* (C-phycocyanin alpha chain, PCC 7002), 피코시아노빌린을 결합시키는 *cpcE* (phycocyanobilin lyase subunit alpha, PCC 7002)와 *cpcF* (phycocyanobilin lyase subunit beta, PCC 7002), 헴 산화효소인 Hox-1(heme oxygenase 1, PCC6803), 피코빌린을 합성하는 *pebS* (phycoerythrobilin synthase, myovirus) 이다.

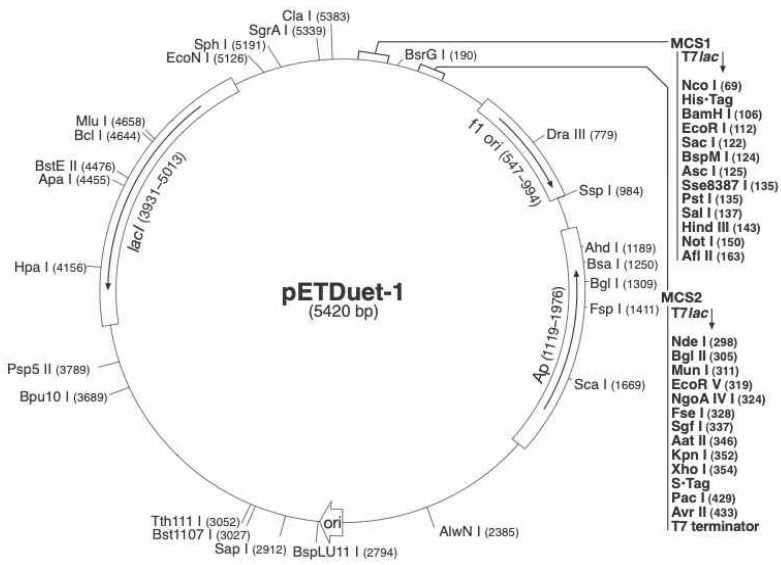
본 연구에서 5개의 단백질을 동시에 발현하기 위하여 각각 항생제의 저항과 복제원점 (Replication Origin)이 다른 벡터 세 가지를 이용하였다. 이용된 세 가지 벡터는 첫째, p15A Origin과 Chloramphenicol 저항성을 가지고 두 개의 Milti Cloning SITE(MCS)를 가지고 있는 pACYCDuet-1(Novagen, USA) <그림 7>, 둘째 pBR322 Origin과 Ampicilin 저항성을 가지고 두 개의 MCS를 가지고 있는 pETDUET-1(Novagen, USA) <그림 8>, 셋째 CDF Origin과 Spectinomycin 저항성을 가지고 두 개의 MCS를 가지는 pCDFDuet-1(Novagen, USA)<그림 9>를 사용하였다. 사용된 균주와 플라스미드의 유전자형 및 특성은 <표 3>에 나열하였다.

<표 3> 균주와 플라스미드

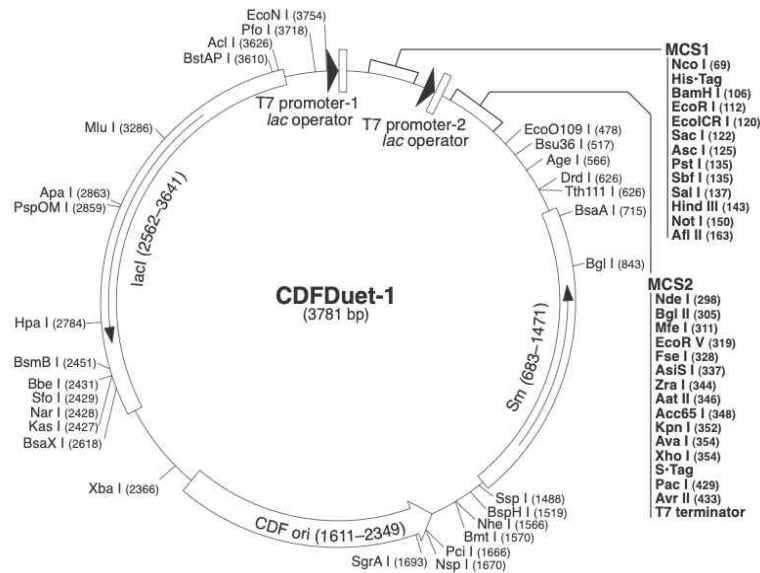
균주 또는 플라스미드	유전자형 출처
<i>E. coli</i> Top 10	$F^-$ , <i>mcrA</i> , $\Delta(mrr-hsdRMS-mcrBC)$ , $\phi 80lacZ\Delta M15$ , $\Delta lacX74$ , <i>nupG</i> , <i>recA1</i> <i>araD139</i> , $\Delta(ara-leu)7697$ , <i>galE15</i> , <i>galK16</i> , <i>rpsL(StrR)</i> , <i>endA1</i> $\lambda^-$
<i>E. coli</i> BL21(DE3)	$B, F^-$ , <i>ompT</i> , <i>gal</i> , <i>dcm</i> , <i>lon</i> , <i>hsdS<sub>B</sub></i> ( $r_B^- m_B^-$ ) (DE3 [ <i>lacI</i> <i>lacUV5-T7p07 ind1 sam7 nin5</i> ]), [ <i>malB</i> <sup>+</sup> ] <i>K-12</i> <sup>(<math>\lambda^S</math>)</sup>
pET Duet-1	<i>lacO</i> , T7 transl en RBS, T7 promoter, <i>Amp<sup>r</sup></i> , pBR322_Origin
pCDF Duet-1	<i>lacO</i> , T7 Promoter, CloDF13 (CDF) origin, <i>Spc<sup>r</sup></i>
pACYC Duet-1	<i>lacO</i> , T7 Promoter, p15A Origin <i>Cam<sup>r</sup></i>



<그림 7> pACYCDuet-1 벡터 맵(Novagen, USA)



<그림 8> pETDuet-1 벡터 맵(Novagen, USA)



<그림 9> pCDFDuet-1 벡터 맵(Novagen, USA)

## 2) *E.coli* 배양 배지 및 조성

*E. coli*를 배양하기 위하여 Luria-Bertani (LB) [(Tryptone 1%, Yeast Extract 0.5%, Sodium Chloride 1%(w/v)]는 121°C, 14 psi에서 20분 이상 습윤 고온 멸균(Autoclave)하여 액체 배양에 사용하였다. 플라스미드를 함유한 대장균만을 선별하기 위하여 항생제 Ampicillin (50ug/ml), Chloramphenicol (35ug/ml), Spectinomycin(25ug/ml)을 LB 용액에 첨가하여 사용하였다. 고체 평판 배지는 액체배지에 한천을 1.0%(w/v)로 고르게 섞어 멸균된 직경 10cm의 petri dish에 20ml를 부어 사용하였다. 완전히 굳은 배지는 포장 후 4°C에 냉장 보관하였다. 피코에리트린 발현을 위해서는 단백질 발현을 유도하기 위한 Lactose가 함유된 복합배지인 ZYM-5052 autoinduction을<sup>76)</sup> 사용하였다. *E. coli* 배양 배지의 종류 및 조성에 관한 내용은 <표 4>와 같다.

76) F.W. Studier (2005). Protein production by auto-induction in high-density shaking cultures. Protein Expression and Purification, 41(1), pp. 207-234.

<표 4> 배지의 리터당 중량의 화학적 구성

배지 종류	성분	양
LB(Luria-Bertani)	Tryptone	10g
	Yeast Extract	5g
	NaCl	10g
SOC Medium	Tryptone	20g
	Yeast Extract	5g
	NaCl	10g
	0.25M KCl	0.5g
	1M MgCl <sub>2</sub> ·6H <sub>2</sub> O(Fiter-sterilization)	10ml
	1M MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O(Fiter-sterilization)	10ml
	1M Glucose(Fiter-sterilization)	20ml
ZYM-5052 Rich Auto Induction Medium	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	6.5g
	K <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	7.1g
	(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	5g
	YeastExtract	24g
	NaCl	5g
	Tryptone	12g
	Glucose	0.5g
	Glycerol	20g
	Lactose	5g
	TraceMetals (100x)	1ml
	1M MgSO <sub>4</sub>	1ml

### 3) 재조합 DNA 관련 효소 및 시약

유전자 클로닝을 위하여 김슨 어셈블리 클로닝 키트(NEB, USA) 제품을 사용하였다. Polymerase chain reaction (PCR) 시약은 TaKaRa (Japan)의 Prime star Max를 사용하였으며, Oligonucleotide는 바이오니아(주)에서 주문 제작하여 사용하였다.

아가로즈 젤 전기영동에 사용된 50X TAE Buffer를 이용하였고, DNA 정제를 위한 PCR/gel purification kit 및 plasmid 분리를 위한 Nanoplus plasmid extraction kit는 바이오니아(주)에서 구매하여 사용하고, 1kb DNA Ladder와 6x agraose gel-loading buffer는 thermo fisher scientific(USA) 제품을 사용하였다. 기타 시약은 Sigma-aldrich Chemical Co.(USA)와 대정 화금(Korea) 제품에서 구매하였다.

### 4) SDS-PAGE 관련 시약 제조

SDS-polyacrylamide gel은 His-tagged 재조합 피코에리트로빌린이 접합된 cpcA(피코에리트린)의 발현확인 및 분석을 위해 사용되었다. 시약들은 Sigma-aldrich 사 제품과 Bio-rad(USA)를 사용하였으며 SDS-PAGE gel 제조 시약은 <표 5>, SDS-PAGE buffer 조성은 <표 6>과 같다.<sup>77)</sup>

---

77) SDS-PAGE Gel, <Cold Spring Harbor Protocols> <https://doi.org> (검색: 2019.09.21)

<표 5> SDS-Polyacrylamide gel 시약의 화학적 성분

용액	성분	양
30% Acrylamide	Bis-acrylamide acrylamide Deionized Water Filtration ,4℃ 보관	1g 29g adjust to 100ml
1.5M Tris/HCl (pH 6.8)	Tris base Deionized Water pH 6.8 보정 ,Auto-clave	36.3g adjust to 200ml 23.66ml HCl
1.5M Tris/HCl (pH 8.8)	Tris base Deionized Water pH 8.8 보정 ,Auto-clave	36.3g adjust to 200ml 4.28ml HCl
10% SDS	SDS (Sodium dedocyl sulfate)	10g adjust to 100ml
10% APS	ammonium persulfate	1g 10ml

<표 6> SDS-page buffer의 화학적 조성

용액	성분	양
10X Loading TGS buffer pH 8.3	Tris base(MW=121.1) Glycine 1% SDS	30.2g 144g 10.0g adjust to 1000ml
5X Sample buffer	1.5M Tris/HCl, pH 6.8 (250mM) 100% Glycerol (50%) SDS (10%) 1% Bromophenol blue(0.25%)	2.5ml 7.5ml 1.5g 3.7ml adjust to 10ml
Coomassie gel staining solution	Coomassie blue R-250 Methanol Glacial acetic acid Deionized Water	1g 450ml 100ml 450ml
Coomassie gel destaining solution	Isopropyl alcohol Glacial acetic acid Deionized Water	100ml 100ml 800ml

## 2. 안전성 및 기능성 실험 재료

인간 유래 피부각질 세포 HaCaT 세포는 ATCC(USA)에서 구매하였고, 세포배양에 사용되는 배지는 아미노산 및 비타민 농도를 갖는 배지(DMEM: Dullbecco's Modified eagle medium)와 아미노산, 비타민, 당 및 기본적인 염류를 포함하는 합성배지(FBS: Fetal Bovine Serum), 항생제로 이용하는 페니실린(penicillin), 스트렙토마이신(Streptomycin), 0.05% trypsin-0.02% 산화방지효과를 나타내는 에틸렌디아민테트라아세트산(EDTA: Ethylenedia minetetraacetic acid)는 모두 thermo fisher scientific(USA)에서 구매하였다.

테트라졸륨(tetrazolium)계열 발색시약인 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl-2H-tetrazolium bromide를 사용하여 세포독성과 세포 성장률을 측정하는 MTT, 과산화수소(Hydrogen peroxide :H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>), 항산화 효과를 가진 아세틸시스테인(N-Acetylcysteine: NAC), 청색의 염기성 색소(Methylene blue), 디메틸설포시드(Dimethyl sulfoxide : DMSO)는 Sigma(USA) 제품을 사용하였다. MTT 시약은 5mg/ml의 농도로 PBS에 녹여 0.22 $\mu$ m micro filter 로 여과하여 빛을 차단하여 보관하였다. 미백 실험에 사용한 kojic acid(Kojic acid)은 Aldrich(USA)에서 구매해서 사용하였다.

### 3. 립글로스 실험 재료

립글로스는 피코에리트린 색소 1.2%, 인공합성색소 적색 2호(Cal chemical, USA) 1.2%, 피코에리트린 색소 0.6%와 적색 2호 색소 0.6%를 넣은 후 <표 7>과 같은 처방으로 총 3가지를 제조하였다.

<표 7> 립글로스 제조 처방

ICID 명	원료명(제조사)	용도(배합목적)	배합비(%)
Microcrystalline Wax	Multi Wax(Sonneborn)	결합제, 벌킹제(증량제), 유화안정제, 점도증가제(비수성)	2.000
Ceresin	Ceresin Wax #810[Nikko Rical]	결합제, 점증제-비수용성	2.600
Methylparaben	Nipagin-M(M.P)[clariant]	착향제, 보존제	0.050
Propylparaben	Nipazol-M(P.P)[clariant]	착향제, 보존제	0.050
Diisostearyl Malate	Cosmol 222[Nisshin Ollio]	피부유연화제, 용제	21.780
Lanolin	Crodalan SWL[Croda]	유화안정제, 헤어컨디셔닝제, 피부보호제, 피부컨디셔닝제(유연제), 계면활성제(유화제)	20.000
Polyisobutene	Polyisobutene = PB 1004 F[clariant]	결합제, 피막형성제, 점도증가제(비수성)	34.000
Octyldodecanol	Eutanol G[basf]	향료, 피부유연화제, 용제	9.000
Polyglyceryl-2 Triisostearate	Cosmol 43[Nisshin Ollio]	피부컨디셔닝제(유연제), 계면활성제(유화제), 용제	4.000
VP/Hexadecene Copolymer	Antaron V-216[Ashland]	결합제, 피막형성제, 모발고정제, 현탁화제-비계면활성제, 점증제-비수용성	2.500
Tocopheryl Actate	Vit E.Acetate[Centerchem]	산화방지제, 피부컨디셔닝제	1.500
Glyceryl Linoleate/ Glyceryl Linolenate/Tocopherol	Vit.F Glycric ester [Cartactem]	피부유연화제, 계면활성제-유화제/피부컨디셔닝제(유연제), 계면활성제(유화제)/산화방지제, 착향제, 피부컨디셔닝제, 수분증발차단제	1.000
<b>Phycoerythrine</b>	<b>PE — 파우더 (0.1 % sol)</b>	<b>색소</b>	<b>1.200</b>
Water, Lavandula Angustifolia (Lavender) Flower Extract, Monarda	Greenol[bio-fd&c]	피부컨디셔닝제	0.100

Didyma Leaf Extract, Mentha Piperita (Peppermint) Leaf Extract, Freesia Refracta Extract, Chamomilla Recutita (Matricaria) Flower Extract, Rosmarinus Officinalis (Rosemary) Leaf Extract, Butylene Glycol, 1,2-Hexanediol			
Water, Thuja Orientalis Leaf Extract, Zanthoxylum Schinifolium Leaf Extract, Polygonum Cuspidatum Root Extract, Butylene Glycol, 1,2-Hexanediol	Resmelin HR[태뎀건강 생활]	피부컨디셔닝제	0.100
Fragrance	pf. 68064 (알리젠 프리 향)[조이라이프]	향료	0.120

#### 4. 실험 방법

##### 1) 유전자 클로닝(Gene cloning)

###### (1) 프라이머 제작 및 주형 DNA 준비

*E. coli*에서 깃손 어셈블리 ligation을 위한 벡터와의 homology 영역을 포함한 유전자들의 cDNA인 Hox-1, pebS, HT-cpcA, cpcE, cpcF 유전자들의 cDNA 서열을 최적화하여 바이오니아(주)(bioneer, korea)에 의뢰하여 합성한 것은 <표 8>과 같다. 재조합 벡터를 클로닝 하기 위해 깃손 어셈블리 기법을 활용하고, 플라스미드 벡터를 증폭하기 위하여 사용된 각 프라이머 서열은 <표 9>에 나열하였다.

<표 8> cDNA 시퀀스

cDNA	시퀀스
Hox-1 (5'→3')	<p>TAATACGACTCACTATAGGGGAATTGTGAGCGGATAACAATTCCCCTCTTAGTATATTAGTTAAGTATA            AGAAGGAGATATACATATGAGTGTCAACTTAGCTTCCCAGTTGCGGGAAGGGACGAAAAATCCCCTC            CATGGCGGAGAACGTCGGCTTTGTCAAATGCTTCTCAAGGGCGTTGTCGAGAAAAATTCCTACCGTAAG            CTGGTTGGCAATCTCTACTTTGTCTACAGTCCCATGGAAGAGGAAATGGCAAAATTTAAGGACCATCCCA            TCCTCAGCCACATTTACTTCCCCGAAGTCAACCGCAAACAAGCCTAGAGCAAGACCTGCAATTCTATT            ACGGCTCCAAGTGGCGCAAGAAGTGAATAATTTCTGCCGCTGGCCAAGCCTATGTGGACCGAGTCCGGCA            AGTGGCCGCTACGGCCCTGAATGTGGTGGCCATTCTACACCCGTTACCTGGGGGATCTTCCGGC            GGTCAAATTTCAAGAAAATGGCCAAAATGCCATGAATCTCCACGATGGTGGCACAGCTTCTATGAAT            TTGCCGACATTGATGACGAAAAGGCTTTTAAAAATACCTACCGTCAAGCTATGAATGATCTGCCATTGA            CCAAGCCACCGCCGAACGGATTGTGGATGAAGCCAATGACGCCTTTGCCATGAACATGAAAATGTTCAA            CGAACTTGAAGCAACCTGGTCAAGGCGATCGGCATTATGGTGTTC AACAGCCTCACCCGTCGCCGAGT            CAAGGCAGCACCGAAGTTGGCCTCGCCACCTCCGAAGGCTAGCTCGAGTCTGGTAAAGAAAC</p>
pebS (5'→3')	<p>CTTAAATAAGGAGATATACCATGACGAAAAACCCGCGTAACAACAAGCCGAAAGAAAATCCTGGACTCTA            GCTACAAAAGCAAACCATCTGGCAGAAGTACATTGATGCGCTGTTTGAACCTTCCCGCAACTGGAAA            TTAGCGAAGTTTGGGCCAAATGGGACGGTGGCAATGTCACCAAGGATGGTGGCGACGCGAAGCTGACCGC            AAACATCCGTACCGGCGAGCACTTCTTGAAGGCACGCGAGGCTCACATCGTTGACCCGAATTCGGACATT            TATAATACGATCCTGTATCCGAAAACGGGTGCGGATCTGCCGTTTTCGGTATGGATCTGATGAAATTCA            GCGACAAAAAAGTTATCATTGTGTTTGAATTTCAACATCCGCGGAGAAAATACCTGTTTAGCGTTGATGG            TCTGCCGGAAGATGACGCAAGTATCGTTTCTCGAGATGGGCAATCACTTTAGCAAGAATATCTTCGTG            CGTTACTGCAAGCCAGACGAAGTGGACCAAGTATCTGGATACTTTAAGCTGTATCTGACCAAGTACAAAG            AAATGATTGACAATAACAAACCGGTGGGTGAGGACACGACGGTCTACAGCGATTTGATACCTATATGA            CCGAGTTGGATCCTGTTCCGGCTACATGAAGAATAAGTTTGGTGAGGGTCGTTCCGAGGCCTTCGTCAA            TGATTTTCTGTTTCAGCTACAAATAAATGTCGACAAGCTTTCGGCCGCATAATGCTTAAAGTCGAACAGAAAGT            AATCGTATTGTACACGGCCGCATAATCGAAATTAATACGACTCACTATAGGG</p>

Ht-cpc A	<p><i>CTTTAAGAAGGAGATATAACCATGGGCAGCAGCCATCACCATCATCACCACAGCCAGGATCCGATGAAAA  CCCCCTTTACCGAAGCAGTAGCACTCGCTGATTCTCAAGGCCGTTTCCTCAGCAACACTGAGCTCCAGTA  CCTCTATGGTCGTCTTCGTCAAGGTGCTTTCGCCCTTGAAGCGGCTCAAACGTTGACTGCAAAAAGCTGAC  ACCCTCGTTAATGGTGTGCTCAAGCGGTTTACAGCAAGTCCCTTACACCACCAGCACTCTGGCAACA  ACTTTCGTGTGACCAGCGCGTAAAGACAAGTGTGCTCGTGACATCGTTACTACCTCCGCATGGTTAC  CTACTGCCTAGTTGCTGGTGGTACTGGCCCCATGGATGAGTACCTCATCGCTGGTGTGACGAAATCAAC  CGTACTTTCGATCTTCTCCAGCTGGTATGTTGAAGCTCTCAAGCACATCAAAGCAAACCATGGTTTGA  CTGGCGATGTGCTACTGAAACTAACAACACTACATCGACTACGCAATTAACGCCCTCAGCTAA <i>TTTGAATT  CGAGCTCGGCCG</i></i></p>
cpc-E	<p><i>CTTTAATAAGGAGATATAACCATGTCCGACTGGCAGATGGCTGAGGCCCTGACCCTAGAGGAGGCGATCGC  CAATATCCAACAAACGGAAGATACAGGTAACGCATTATGCGGCTTGGTGGTTTGGCAAAGTCCGGGTG  CAGGATGAGCGGGCCGTAATGCGTTGCTAGCAGCGTTAAAAGATGAGACGGATCGGTGCGCCGATGGA  GGTTATCCTCTACGTGAAACGCAGCAAAGCGTTGGGCAAGCTGGGCAATCTGGCAGCGGTGCAACCGT  TAATTGAGAGTTAGAAAAGTCTGATTATTATGTGCGGGAGTCGGCGGCCAATCGTTGGAGATGTTGGG  AGATCGGCAGGCAATTCCTGCGTTACAAGCGCTACTGCAGGAGGGGTTGCAGCGGCAGTCAAGGCTGAG  GGCAAACCCCATTTAGTGCAGCCCTATGAAGCGGTGATTGAGGCGTTAGGGACGATTGGTGCCACGGCGG  CGATCGCCGAGATTGAGCCATTTTAGATCATGAATTCGAAAAATTCGCTACGCAGCACTACGGGCCCTT  ATATCAACTGACCCAAGAAGCCATTACGCTGAACAGTTAATGGAAGCCTTGAATGGTAACCAGCTACA  GTTACGACGGTCTGCGCTGTTAGATTTGGGTGCTATCGGCTATGTTCCGGCGGGTCAGGCGATCGCCAAA  GCCTATGCCGAAAATAGCTTAAAGTTAATTTCCCTCAAGGGCATTCTCGAATCCCATTTACAACGGACCG  CCGAAACCCCTCGATGCGGACGGTTTACAATTGCTCGAATTAATGGATAGTCTGCTCTAG <i>GTGACAAGCT  TGC GGCCGCATAATGCTTAAGTCGAACAGAAAAGTAATCGTATTGTACACGGCCGCATAATCGAAAATTAA  TACGACTCACTATAGGG</i></i></p>
cpc-F	<p><i>TAATACGACTCACTATAGGGGAATTGTGAGCGGATAACAATCCCATCTTAGTATATTAGTTAAGTATA  AGAAGGAGATATACATATGCGATCGCTAATTTCTGAACCCATGACCGTCGACGTTTTAATTCGTGCCGTT  AACAAACCCACTTCAGCCCAAGACCTGGTCAAAAAATGTGGCCAACTCGCCGCAACAAAAGATGAACAA  GCCATTCCAACCTCTGGTAGAAGTGTGAAATTAATAATCCGGGGGCGCCGTCGCGGCGGTCAATGGTCT  TGATCAATATTGGCGAGGCCGTTGTGCCCTACCTCCTCGAAAATGTGATGGCTATAACTACGGAGCGCG  GGCATGGATGCTGCGGATCTTTGCCGGAATTGGTGATCCCAGAGCTTTAGACCTGCTAATTGAGGCGGGC  AATAAGGATTTTGCTTTAGTGTGCGGCGCTCTGCGGCCAAAGGGTTAGGGAATATTCATGGCATAAAG  TGCCAGATTCTGAGCGAGAAGTGCAGCAGCAAAAAGTCTGTGATTGTCTATTCTGGCCCTTGAAGATGG  AGAATGGGTGGTTCGCTATGGGGCGATCGCCGACTAGAGGGTTTGTGCAAGCCATTCCAGAAGCTAGA  AAAATCGTCATCAAAAACAACTACCGAATTTCTCACCACAGAACCAGAAGCCGCAATCCGTGCCCGA  ATCCAAAAAGCAATCCTGAGTCTTCCGTGACTCGAGTCTGGTAAAGAAAC</i></p>

<표 9> PCR을 하기 위한 짧은 DNA 또는 RNA 분자

프라이머	시퀀스 (5'→3')
pET-Duet-R	GGTATATCTCCTTCTTAA
pET-Duet-F	TTTGAATTTCGAGCTCGGC
pACYC,pCDF-Duet-R	GGTATATCTCCTTATTAA
pACYC,pCDF-Duet-F	CTCGAGTCTGGTAAAGAA
Duet-Down	GATTATGCGGCCGTGTAC
T7 terminator	GCTAGTTATTGCTCAGCGG
Duet-Up	TAGAAATAATTTTGTTTAA

### (2) PCR (Polymerase Chain Reaction)

PCR은 Prime star max (Takara) 제품을 사용해 실시하였으며, 프라이머는 forward, reverse 각각 15pmol, Prime star max 25μl, cDNA 150~200ng, 나머지는 멸균 증류수로 최종 부피 50μl에서 실시하였다. 95°C에서 3분 동안 변성을 하였고, 95°C에서 10초, 55°C 5초, 72°C 35초를 25회 수행하였으며 마지막으로 72°C 3분 동안 Final elongation을 주어 증폭시켰다. 모든 PCR 반응은 Gene Amp PCR System 2700(Applied bio system, USA)을 사용하여 수행하였다. 증폭된 PCR 생성물은 아가로즈 젤 전기영동을 통해 확인하였다.

### (3) 아가로즈 전기영동 및 DNA 정제

아가로즈 젤 전기영동은 50X TAE buffer(바이오니아, Korea)를 1x TAE Buffer로 희석하여 사용하였고, 준비된 PCR 생성물은 6x agraose gel-loading buffer를 5:1 비로 혼합한 후, 1.2%(w/v) 아가로즈 젤 상에서 DNA 1kb ladder와 함께 전압 100V로 전기영동 하였다. 아가로즈 젤 전기영동으로 증폭된 플라스미드 벡터 DNA를 확인한 후 PCR/Gel purification kit를 이용하여 제조사 메뉴얼에 따라 정제하였다. 50X TAE buffer의 조성은 <표 10>과 같다.

<표 10> TAE(50X) Buffer의 화학조성

TAE buffer	리터 당 표준 원액 (50X)	리터 당 작업 용액
Tris-acetate, EDTA PH 8.0	Trizma base 242g acetic acid 57.1ml 0.5M EDTA(pH 8.0) 100ml	40mM Tris-acetate 1mM EDTA

(4) 효소를 이용한 DNA Ligation과 형질전환

Gel purification kit를 이용하여 분리된 PCR 생성물은 김슨 어셈블리 클로닝 키트를 활용해 재조합하였다. Master mix(2x) buffer 10 $\mu$ l, PCR 생성물인 벡터와 합성한 cDNA를 농도가 1:3 비율이 되도록 넣고, 최종 부피를 20 $\mu$ l로 물로 채웠다. 50 $^{\circ}$ C에서 30분간 중탕하여 반응시킨 후, 형질전환 전 얼음에 보관하였다. Ligation의 구성은 <표 11>과 같다.

<표 11> Ligation의 구성

반응 혼합물	1~3 삽입 조각	Ligation을 위한 DNA set		
Linearized Vector	y $\mu$ l(25~50ng vector)	<b>pET-Duet HT-cpcA</b>	Vector	pETDuet-1
Purified PCR Fragment	x $\mu$ l(70~150ng insert)		Insert fragment	HT cpcA
Deionized Water	20-y-x $\mu$ l	<b>pCDFDuet cpcE, cpcF</b>	Vector	pCDFDuet-1
Master mix(2x)	10 $\mu$ l		Insert fragment	cpcE, cpcF
Total	20 $\mu$ l	<b>pACYDuet pebS, Hox1</b>	Vector	pACYCDuet-1
Reaction	50 $^{\circ}$ C, 30min		Insert fragment	pebS, Hox-1

수용성 세포(competent cell)는 *E. coli* TOP10을 3ml의 LB 액체배지에 37 $^{\circ}$ C에서 14시간 동안 1차 배양한 후, 50ml의 LB 액체배지에 1차 배양액 50ul를 넣고 OD<sub>600</sub>에서 흡광도가 0.4~0.6이 될 때까지 24시간 동안 20 $^{\circ}$ C에 2차 배양시켜, 4 $^{\circ}$ C에서 2500rpm으로 10분간 원심 분리하여 상층액을 모두 제거한 뒤 세포를 얼음에 보관하였다. Transformation Buffer(10mM PIPES,

15mM  $CaCl_2$ , 250mM KCl, 55mM  $MnCl_2$ , pH 6.7) 6ml를 넣고 세포를 풀어 준 뒤 동일한 조건으로 원심분리 후 Transformation Buffer 4ml에 세포를 풀어주었다. 10분간 얼음에 방치한 후 DMSO를 최종농도 5%가 되도록 넣어준 뒤 1.5ml 튜브에 100 $\mu$ l씩 분주 후 -80 $^{\circ}$ C에 보관하였다.

형질전환은 열 충격법<sup>78)</sup>을 사용하여 진행하였다. 수용성 세포 100 $\mu$ l에 ligation mixture 5 $\mu$ l를 첨가한 후 4 $^{\circ}$ C에서 20분 동안 방치한 후 42 $^{\circ}$ C에서 30초, 얼음에서 5분 동안 반응시키며, SOC 배지(2% tryptone, 0.5% yeast extract, 10 mM NaCl, 2.5 mM KCl, 10 mM  $MgCl_2$ , 10 mM  $MgSO_4$ , and 20 mM glucose)를 800 $\mu$ l를 첨가 후 37 $^{\circ}$ C에서 1시간 동안 180rpm으로 배양하였다. 이어서 2500 rpm에 2분 동안 원심 분리하여 100 $\mu$ l의 침전물에 각각의 저항성을 가진 항생제(Ampicillin, Chloramphenicol, Spectinomycin)가 포함된 LB 한천 평판 배지에 도말하여, 37 $^{\circ}$ C 배양기에서 18시간 동안 배양하였다. 항생제(Ampicillin, Chloramphenicol, Spectinomycin)의 저장온도 및 농도에 관한 내용은 <표 12>와 같다.

<표 12> 항생제 용액 농도

항생제	저장 용액		작업 농도	
	저장온도	농도	추천 농도	저항력 벡터
Ampicillin	-20 $^{\circ}$ C	50mg/ml	50 $\mu$ g/ml	pETduet-1
Chloramphenicol	-20 $^{\circ}$ C	34mg/ml	34 $\mu$ g/ml	pCDFduet-1
Spectinomycin	-20 $^{\circ}$ C	25mg/ml	25 $\mu$ g/ml	pACYCduet-1

78) Froger, A, Hall, J. E (2007). Transformation of Plasmid DNA into E. coli Using the Heat Shock Method. J. Vis. Exp. 1(6).

#### (5) 형질전환 균주 확인 및 균주 선별

형질전환 균주의 확인은 LB 한천 평판 배지에 생성된 균체들은 PCR을 통해 확인하였다. T7-terminator와 Duet-Up primer를 이용해 클로닝 PCR과 동일 조건으로 PCR을 수행하여 아가로즈 젤 1.5%(w/v) 전기영동으로 확인하였다. 각 벡터에 클로닝 된 재조합 유전자 염기서열 결정은 바이오니아에 의뢰하여 Duet-Down, T7terminator primer를 이용하여 염기서열을 확인하였다.

염기서열이 확인된 벡터가 들어간 균주들은 3ml LB에 각 벡터의 저항성을 가진 항생제를 넣고 4시간 동안 37°C에서 180rpm으로 배양하고, 그 후, 2500 RPM에 2분 동안 원심 분리하여 배양액을 제거하고, 바이오니아(Korea)의 Nanoplus- Plasmid mini Extraction kit를 활용해 plasmid DNA를 추출하였다. 최종 확인된 DNA를 pETDuet-1-HT-cpcA, pCDFDuet-1-cpcE-F, pACYCDuet-1-PebS-Hox1이라 하였다.

#### (6) 발현 균주 형질전환 및 단백질 발현

균주 선별을 통해 확인한 pETDuet-1-HT-cpcA, pCDFDuet-1-cpcE-F, pACYCDuet-1-PebS-Hox1 벡터를 모두 같이 *E. coli* BL21(DE3) 수용성 세포에 동일한 방법으로 형질 전환 시켰다. 그 후 항생제(Amp, Cm, Sp)가 첨가된 LB 한천 평판 배지에 100µl를 도말한 후, 37°C 배양기에서 15시간 동안 배양하였다. LB 한천 평판 배지에 형성된 균체를 LB배지 3ml(항생제)에서 15시간(37°C, 200rpm) 1차 배양 후, ZYM-5052 배지 30ml에 1차 배양 균 액 300µl을 넣고 4시간 배양(37°C, 200rpm) 후 온도를 30°C로 내려 15시간 추가 배양하였다. 단백질 발현을 확인하기 위해 시간별로 배양액 100µl를 취하여 2000rpm으로 1분간 원심분리 후, SDS Sample buffer 100µl에 녹여 100°C에 5분간 가열한 후, 15µl를 로딩하여 SDS-PAGE를 통해 시간별 피코에리트린 단백질의 발현을 확인하였다.

#### (7) 피코에리트린 단백질 대량배양 및 정제

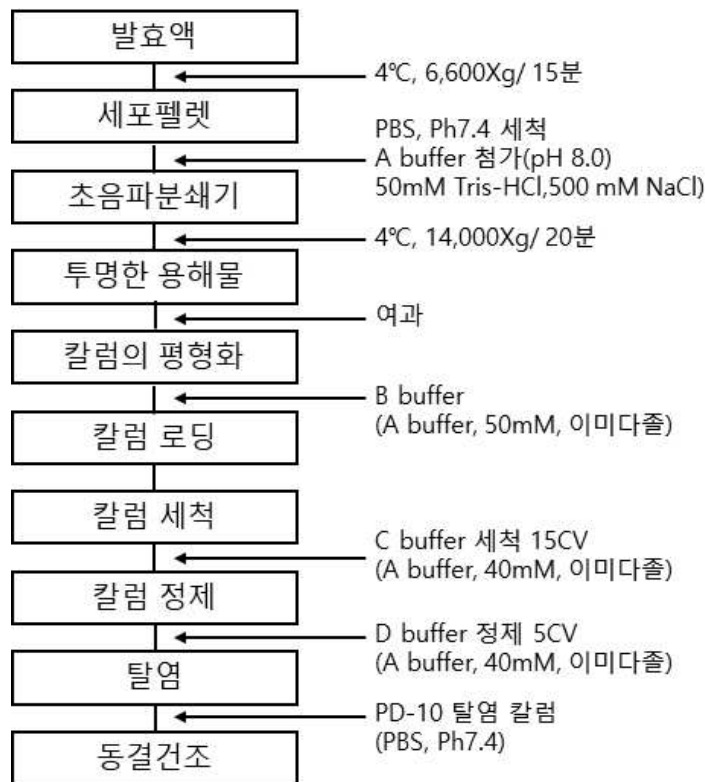
피코에리트린 단백질의 생산성과 경제성을 확인하기 위하여, 5L 대량 배양기(Cell Act, 두산에코비즈니스(주), 한국)를 활용하여 대량배양을 실시하였다. 항생제가 함유된 LB 배지 50ml에서 15시간 (37°C, 200rpm) 1차 배양하였다. 본 배양은 멸균된 5L 배양기에 3L 복합배지 ZYM-5052 Auto Induction 배지에 1차 배양액 50ml를 넣어주었다. 발효 조건은 350rpm, 통기 속도는 1v/v/m를 유지하며, pH 6.8을 유지하기 위하여 1M NaOH를 사용하였다. 온도는 37°C에서 6시간 배양 후, 30°C에서 24시간 동안 배양하였다. Auto induction 배지는 단백질 및 광범위한 단백질의 생산에 사용되었으며, IPTG를 사용하여 단백질의 발현을 유도하는 것보다 비용이 경제적이며, 특히 발현과 단백질 용해도가 훨씬 높다.<sup>79)</sup> *E. coli*의 세포 수가 유도기(지체기, Lag phase)를 지나 대수적으로 증가하는 대수 증식기(Log phase) 단계에 IPTG를 직접 접종하여 유도하는 방식이 아닌 배지 내 0.05%의 포도당(Glucose)을 전부 소모하고 난 후, 젖당(Lactose)을 소모하여 증식기에 맞춰 단백질 발현과 동시에 풍부한 탄소원료를 사용하여 대장균이 대량으로 생산할 수 있는 편리함이 있다. 피코에리트린을 발현하는 세포의 성장을 확인하기 위해 시간별로 OD<sub>600</sub>로 측정하여 성장곡선을 얻었다. 시간별로 채취한 *E. coli* 100μl를 300rpm으로 원심 분리하여 1ml PBS로 희석한 후 HP UV/Vis Spectrophotometer(Agilent, USA)를 활용하여 600nm에서의 흡광도를 측정하였다. 발효액으로부터 피코에리트린 단백질을 분리 정제하는 공정은 <그림 10>과 같다. 먼저 발효액 3L를 온도 4°C, 6,600xg에서 15분간 원심 분리하여 세포를 회수하고, 상등액을 제거한 후, PBS로 1회 세척하였다. 세포 수확량 대비 단백질 양을 측정하기 위해 함수 중량(wet weight)을 측정하고, 침전물을 A buffer(50mM Tris-HCl, pH 8.0, 500 mM NaCl) 300ml에 녹인 후 초

79) Studier, F. W. (2005). Protein production by auto-induction in high-density shaking cultures. *Protein Expression and Purification*, 41(1), pp. 207 - 234.

음과 분쇄기를 이용해 세포파쇄를 수행하였다(Amplitude 75%, 30초 파쇄/1분 냉각으로 15cycles). 세포파쇄액을 14,000xg에서 20분간 원심 분리하여 피코에리트린이 포함된 용해물을 취하여 0.45 um 여과하고 완료된 세포 용해물에 이미다졸 최종농도가 20mM이 되도록 첨가하였다. 크로마토그래피 칼럼에 30% 에탄올에 담긴 His60 Ni Superflow 수지(Takara, Japan) 40ml를 로딩한 후, 증류수와 B buffer(A buffer, 20mM 이미다졸)를 차례로 통과시켜 세척하여 에탄올을 제거하고, 평형화시켰다. 그 후 Ni-Superflow column에 피코에리트린이 포함된 투명한 용해물을 로딩하였다. 이때 T자형의 연결관(Three way stopcock)을 활용해 수지와 피코에리트린사이의 충분히 결합이 이루어질 수 있도록 유속을 조절하였다. C buffer(A buffer, 40mM 이미다졸)을 활용해 수지의 15 Column Volume(CV, 600ml) 세척한 후, D buffer(A buffer, 300mM 이미다졸)를 3 CV volume으로 정제하였다.

#### (8) 탈염 후 동결건조

정제한 피코에리트린 샘플은 니켈에 의한 침전을 방지하기 위해 PD-10 desalting column(GE healthcare, USA)으로 탈염하여 PBS Buffer로 정제하였다. 정제된 피코에리트린을 동결건조기 (FDCF-12012, (주) 오펜론, 한국) 선반에 넣은 후 온도 -40℃, 진공 5Torr 조건에서 동결을 하였고, -40℃ 진공 417Torr 조건에서 30시간, -35℃, 417Torr에서 20시간, 25℃까지 분당 0.5℃의 속도로 온도를 높여 동결건조를 완료하였다. 정제한 피코에리트린은 SDS-PAGE와 UV spectrometer(Agilent, USA), HPLC(Hawach, USA)를 이용하여 최종 순도를 확인하였다.



<그림 10> 재조합 피코에리트린의 정제과정

(9) SDS-폴리아크릴아미드겔전기영동

피코에리트린의 발현을 확인하기 위하여 Laemmli (1970)의 방법에 따라 0.1% SDS를 포함하는 4% Stacking gel과 12% dissolving gel을 사용하여 SDS-PAGE를 진행하였다.<sup>80)</sup> 시료를 5x sample buffer를 첨가하여 100°C에서 5분간 가열 후, 실온에서 5분간 13,000rpm으로 원심 분리하여 상층액을 로딩하였고, 전압 160V로 1시간 동안 전기영동을 진행하였다. 전기영동 후 Coomassie G-250 staining solution으로 염색하였으며, 증류수를 사용하여 탈색하였다.

80) 정기모 (2007). E. coli를 통한 재조합 hybrid 펩타이드 Hinnavin-MSH의 발현과 특성. 호서대학교 대학원 박사학위논문.

## (10) HPLC를 이용한 순도 확인

Waters 1525u Binary HPLC pump(Hawach, USA), Waters 996 Photodiode Array Detector(Gen tech, USA) 기기를 사용하여 최종 정제된 피코에리트린을 분석하였다. 피코에리트린 분석에는 Phenomenex Gemini (C18, 4.6\*250mm, 5um, 110Å) 컬럼을 사용하였고, 1ml/min의 유속으로 분석하였다. 분석에 사용된 용매는 용매 A(0.1% TFA in H<sub>2</sub>O), 용매 B (0.1% TFA in Acetonitrile)이고, 용매 기울기 조건은 2%/min으로 하여 280nm와 565nm에서 검출하였다.

## 2) 피코에리트린의 기능성 실험

재조합 피코에리트린 단백질의 세포독성을 확인하기 위한 세포 내 1차 Screening 시험 방법으로 살아있는 세포를 정확하게 측정하여 생존 세포 수를 확인하는 Tetrazolium-based colorimetric(MTT) assay를 이용하여 피코에리트린을 처리한 세포 주와 정상 세포주의 세포 증식 및 세포독성을 평가하였고 활성산소에 의한 세포의 산화 반응을 억제하는 항산화 효과를 확인하기 위하여 N-Acetylcysteine (NAC)<sup>81)</sup>을 양성 대조군으로 비교하여 확인하였다. 피코에리트린의 멜라닌 합성에 미치는 영향을 알아보기 위하여 멜라닌 합성을 억제하는 코직산(Aldrich, USA)을 양성대조군으로  $\alpha$ -MSH 처리하여 피코에리트린의 농도별 멜라닌 억제율을 알아보았다.

---

81) Aldini, G.et al (2018). N-Acetylcysteine as an antioxidant and disulphide breaking agent: the reasons why. Free Radical Research, 52(7), pp. 751 - 762.

(1) 세포독성 분석(MTT assay)

HaCaT세포(Sigma, USA)를  $1 \times 10^5$ /Well이 되도록 96-well plate에 평판하여 DMEM(Sigma, USA)에 배양하였다. 24시간 후 FBS(Sigma, USA)를 포함하지 않는 배지로 교체한 후 4시간 동안 starvation하였고 피코에리트린을 농도별로 처리하였다. 처리 24시간 후 5 mg/ml MTT (in PBS) 시약을 4  $\mu$  L/well 처리 후 알루미늄 foil로 96-well plate를 덮어 4시간 동안 배양하여 MTT가 환원되도록 하였다. 4시간 뒤 각 well에서 배양액을 제거하고, PBS로 3회 세척한 후, 150 $\mu$ l의 Dimethyl sulfoxide (DMSO) (Sigma-Aldrich, USA)를 넣어 Formazan이 골고루 녹을 수 있도록 5분간 Plate shaker에 방치하였다. 그 후, Multiskan™ GO Microplate Spectrophotometer(Thermo Scientific, USA)을 활용하여 540nm 파장에서 흡광도(Optical Density)를 측정하였다. 세포독성 정도는 아래식으로 산정하였다.

$$\text{세포안정성(\%)} = (\text{시험군의 흡광도} / \text{대조군의 흡광도}) \times 100$$

(2) 항산화 효과 분석(Anti-Oxidant assay)

정상 세포주인 HaCaT세포를 피코에리트린의 농도별로 처리된 세포와 NAC 1mM이 처리된 양성대조군을 각각  $1 \times 10^4$ /Well이 되도록 96-well plate에 분주하였고, Hydrogen peroxide가 최종농도 1mM이 되도록 처리하여 24시간 동안 배양 후, 상기 기재된 MTT Assay와 동일한 방법으로 흡광도를 측정하였고 동일한 조건으로 각각 배양된 세포에 배양액을 제거한 후 methylene blue 2% 용액을 150 $\mu$ l 분주하여 50℃에서 10분간 염색 후 제거, destaining solution(1% glacial acetic acid, 49% ethyl alcohol solution)으로 150 $\mu$ l를 분주하여 5분 동안 방치한 뒤 염색된 세포의 생존 수를 비교하였다.<sup>82)</sup>

### (3) 멜라닌 함량 측정(Melanin contents)

B16F10 세포(Sigma, USA)를 10% FBS, 1% 항생제가 함유된 DMEM 배지를 6well에 적정 세포 수( $1 \times 10^5$  cells/well)로 분주하였고, 37°C, 5% CO<sub>2</sub> 인큐베이터에서 24시간 배양한 다음 음성대조군을 제외한 모든 well에 1mM 멜라닌 형성을 유도하는 호르몬(melanocyte-stimulating hormone:  $\alpha$ -MSH)과 피코에리트린을 농도별로 함께 넣어주었다. 그 후 37°C, 5% CO<sub>2</sub> 인큐베이터에서 72시간 배양한 후 1 N NaOH 용액을 300 $\mu$ l씩 처리하여 세포를 용해하고 100°C에서 30분 동안 끓여 멜라닌을 용해시키고 400nm(405nm)에서 흡광도를 측정하였고 용해시킨 멜라닌을 취하여 단백질 농도 측정기 (Bicinchoninic acid assay: BCA assay)(Pierce, rockford, USA)를 이용해 단백질을 정량한 후 단위 단백질당 멜라닌 함량을 계산하였다.

---

82) 구은진 (2016). 조협 추출물이 HaCaT cells의 항염증과 SEB-1 cells의 피지분비 억제에 미치는 영향. 대한한방소아과학회지, 30(2), pp. 96-106.

### 3) 립글로스 제조 및 비교

#### (1) 립글로스 제조

피코에리트린 색소를 함유한 립글로스는 A, 적색 2호 인공합성색소(Cal chemical, USA)를 함유한 립글로스는 B, 피코에리트린+적색 2호 색소를 함유한 립글로스는 C 라 하였다. A 를 제조하기 위하여 처방전(표 7)에 제시한 원료를 배합 비율로 넣어 75℃까지 가온 용해 후, Disper 600 ~800rpm 으로 5분간 분산한 뒤 실온에서 50℃까지 냉각하였다. 피코에리트린 색소 1.2% 비율을 메인에 투입한 후 Disper 600 ~800rpm 으로 2분간 교반하였다. 향료(pf. 68064)를 메인에 투입한 후 Disper 600~800rpm 으로 3분간 교반하였다. 진공 탈포기를 이용해 탈기 후 25℃까지 냉각한 뒤 여과하였다. 적색 2호를 함유한 립글로스 B 를 제조하기 위하여 적색 2호 색소 1.2%를 넣어 A 공정과 같게 제조하였다. 적색 2호 색소와 피코에리트린 색소를 함유한 립글로스 C 를 제조하기 위하여 적색 2호 색소 0.6%와 피코에리트린 색소 0.6% 넣어 A 공정과 같게 제조하였다.

#### (2) 립글로스 표면 발색도 측정

피코에리트린 색소를 함유한 립글로스는 A, 적색 2호 색소를 함유한 립글로스는 B, 피코에리트린+적색 2호 색소를 함유한 립글로스는 C의 표면 발색도를 측정하였다. 측정기기는 분광측색계(CM-700d, Minolta, USA)를 사용하였고 측정된 값은 Hunter의 명도 (L\*)값, 적색도 (a\*)값 및 황색도 (b\*) 값을 3회 반복 측정하여 그 평균값으로 나타내었다.

## IV. 결과 및 고찰

### 1. *E.coli*에서의 피코에리트린 유전자의 클로닝 및 발현

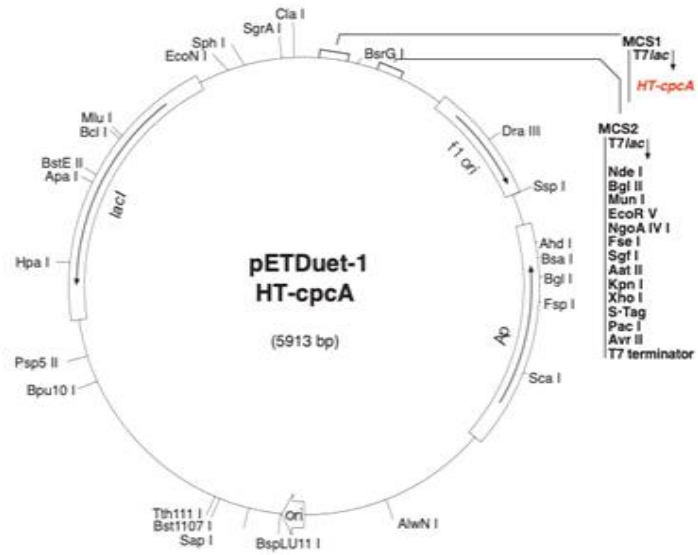
#### 1) PCR을 통한 피코에리트린 유전자 증폭 및 클로닝

피코에리트린을 생합성하기 위한 유전자(*cpcA*, *cpcE*, *cpcF*, *Hox-1*, *pebS*)와 재조합 단백질을 클로닝하기 위한 벡터 (*pET-Duet1*, *pCDF-Duet1*, *pACYC-Duet1*)를 바탕으로 Gibson 어셈블리를 위한 선형화된 벡터 DNA를 얻기 위해 PCR을 이용하여 유전자를 증폭하였다. PCR 후 증폭된 유전자들의 DNA size는 <표 13>과 같다. 예측 크기와 동일한 DNA들은 화염 멸균한 수술통을 이용하여 잘라낸 후 겔을 추출하는 키트를 사용하여 정확한 크기의 DNA만을 회수하였다. 회수한 DNA는 Gibson 어셈블리 키트를 사용해 Ligation 하였다. Gibson 어셈블리를 통하여 피코에리트린을 발현하기 위한 재조합된 벡터는 첫째, *pCDFduet-1-cpcE-F*<그림 11>으로 *pCDF Duet-1* 벡터 MCS1에 *cpcE*와 MCS2에 *cpcF*가 삽입되었다. 둘째, *pACYCduet-1-pebS-Hox1*<그림 12>으로 *pACYC Duet-1* 벡터 MCS1에 *pebS*와 MCS2에 *Hox-1*이 삽입되었다. 셋째, *pETduet-1-HT-cpcA*<그림 13>으로 *pET Duet-1* 벡터 MCS1에 *HT-cpcA*가 삽입되었다.

<표 13> PCR 후 증폭된 DNA size

PCR 생산	크기(bp)	벡터 / 삽입
Linearized pACYCDuet-1	3725	Vector
Linearized pCDFDuet-1	3498	Vector
Linearized pETDuet-1	5382	Vector
HT-cpcA	571	Insert
cpc-E	924	Insert
cpc-F	748	Insert
pebS	819	Insert
Hox-1	829	Insert





<그림 13> 재조합 된 pETduet-1-HT-cpcA 벡터 구조

## 2) 시퀀싱을 통한 염기서열 분석

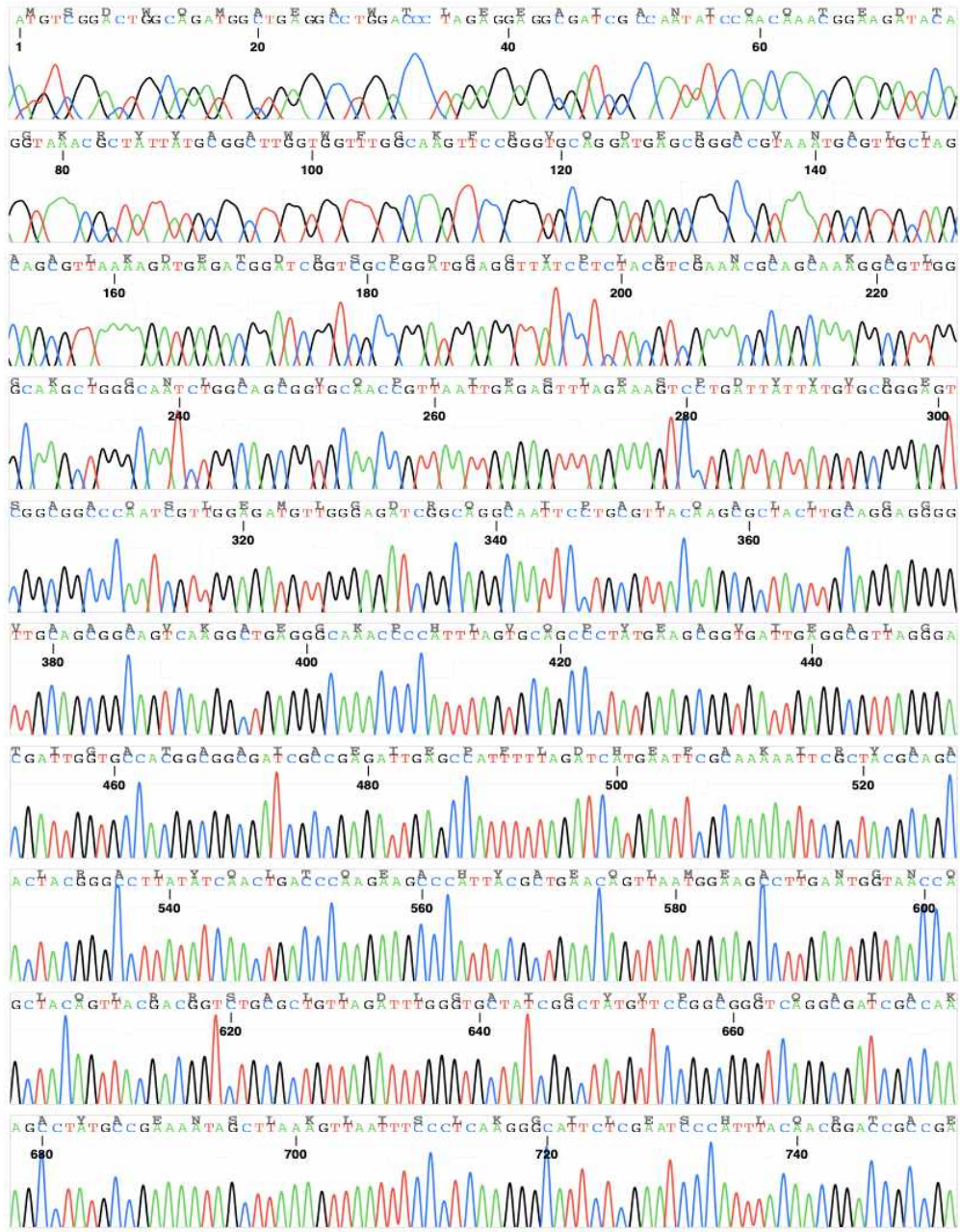
재조합 발현 벡터 pETDuet-1-HT-cpcA, pCDFDuet-1-cpcE-F, pACYC Duet-1-PebS-Hox1에 삽입된 유전자는 각 플라스미드의 T7 promoter로부터 발현 조절을 받으며, 두 개의 T7 promoter를 가지고 있는 특징(co-expression)이 있다.<sup>83)84)85)</sup> 형질전환 균주인 TOP10에서 선별하여 추출한 plasmid DNA를 T7 terminator primer와 Duet down reverse primer를 사용하여 바이오니아(주)에 자동 염기서열 분석을 의뢰하였다. 염기서열 분석 결과는 HT-cpcA <그림 14>, cpcE <그림 15>, cpcF <그림 16>, pebS <그림 17>, Hox1 <그림 18>에 나타내었다. DNA 염기서열은 아데닌(A: 초록색), 티민(T: 빨강색), 구아닌 (G: 검정색), 시토신 (C: 파랑색)으로 나타내었으며, 코돈 위에 단백질 서열을 나타내었다. 그 결과 유전자의 cDNA 서열이 바이오니아를 통하여 합성한 유전자의 cDNA 서열(표 9, 볼드체)과 정확히 일치하고, 유전자가 코딩하는 단백질의 서열이 NCBI에 등록된 단백질의 서열과 일치하는 것을 NCBI의 BLAST를 통하여 확인하였다. 재조합한 cpcA cDNA가 코딩하는 단백질의 서열이 NCBI에 등록되어 있는 C-phycoerythrin alpha subunit [Synechococcus sp. PCC 7002]의 단백질 서열과 100% 일치하였다. <그림 19> 재조합한 pebS cDNA가 Cyanobacterial Phycoerythrobilin [Prochlorococcus phage P-SSM2]의 단백질 서열과 100% 일치하였고 <그림 20> 재조합한 Hox-1 cDNA가 Heme Oxygenase 1 [Synechocystis sp. PCC 6803]의 단백질 서열과 99.58% 일치하였다. <그림 21> 재조합한 cpcE

83) Sheng Wu Gong, Cheng Xue Bao (2019). Co-expression of lignocellulase from termite and their endosymbionts. Chinese journal of biotechnology, 35(2), pp. 244-253.

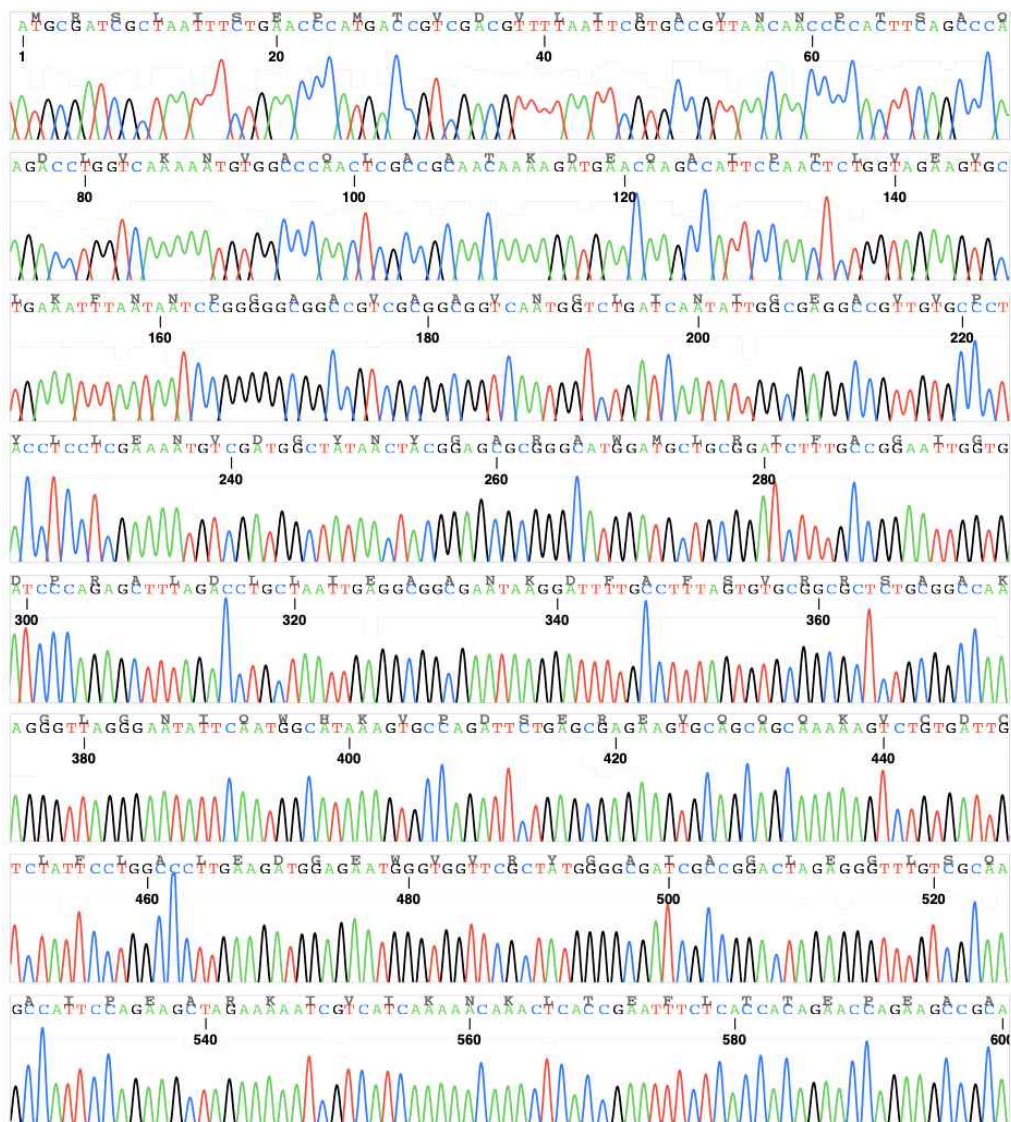
84) Deguang Sun, Xiaonan Zang (2019). Cloning of pcB and pcA Gene from Gracilariopsis lemaneiformis and Expression of a Fluorescent Phycocyanin in Heterologous Host. Genes (Basel), 10(322), pp. 1-14.

85) Wu H, et al (2020). Production of l-ribose from l-arabinose by co-expression of l-arabinose isomerase and d-lyxose isomerase in Escherichia coli. Enzyme Microb Technol, 132, pp. 1-8.

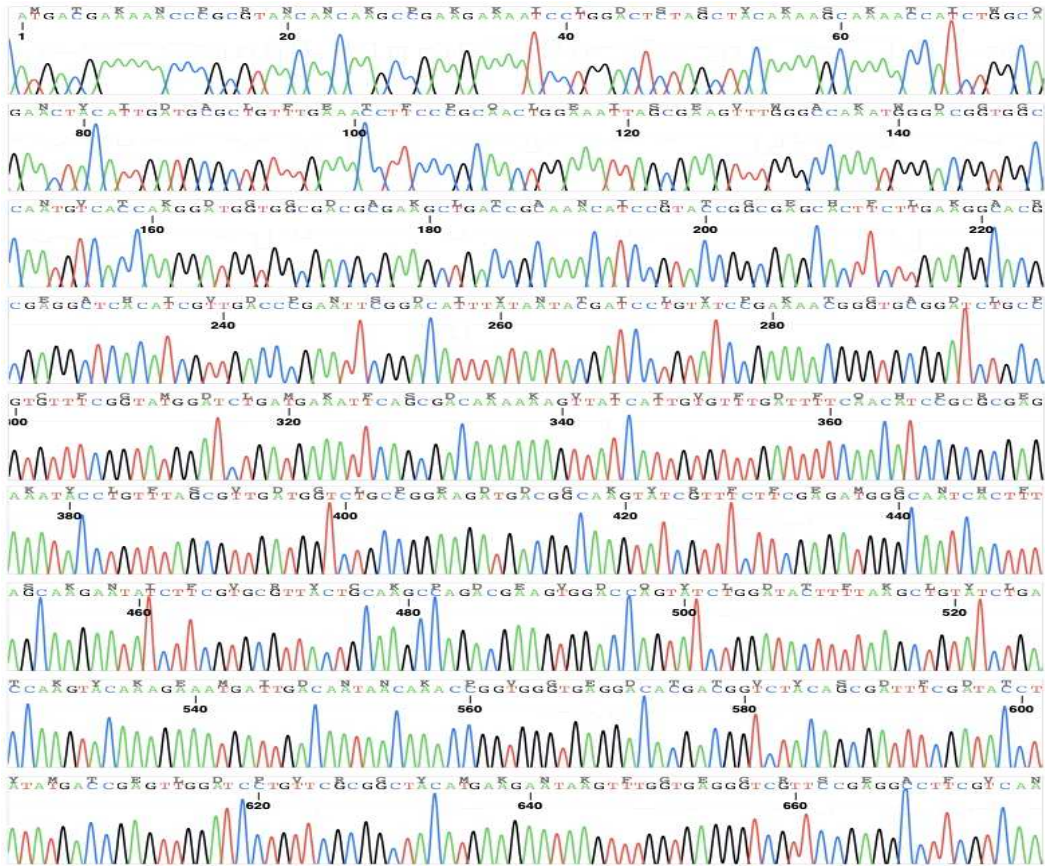




<그림 15> pCDFDuet1 벡터에서 cpcE 유전자의 서열 검증



<그림 16> pCDFDuet1 벡터에서 cpcF 유전자의 서열 검증



<그림 17> pACYCDuet1 벡터에서 pebS 유전자의 서열 검증



Score	Expect	Method	Identities	Positives	Gaps
336 bits(861)	2e-116	Compositional matrix adjust.	162/162(100%)	162/162(100%)	0/162(0%)
Query 15		MKTPLTEAVALADSQGRFLSNTELQYLYGRLRQGAFALAAQTLTAKADTLVNGAAQAVY			74
Sbjct 1		MKTPLTEAVALADSQGRFLSNTELQYLYGRLRQGAFALAAQTLTAKADTLVNGAAQAVY			60
Query 75		SKFPYTTSTPGNNFAADQRGKDKCARDIGYYLRMVTYCLVAGGTGPMDEYLIAGVDEINR			134
Sbjct 61		SKFPYTTSTPGNNFAADQRGKDKCARDIGYYLRMVTYCLVAGGTGPMDEYLIAGVDEINR			120
Query 135		TFDLSPSWYVEALKHIKANHGLTGDAATETNNYIDYAINALS		176	
Sbjct 121		TFDLSPSWYVEALKHIKANHGLTGDAATETNNYIDYAINALS		162	

<그림 19> HT-cpcA 단백질 서열 검증

Score	Expect	Method	Identities	Positives	Gaps
482 bits(1241)	3e-172	Compositional matrix adjust.	233/233(100%)	233/233(100%)	0/233(0%)
Query 1		MTKNPRNNKPKKILDSSYSKTIWQNYIDALFETFPQLEISEVWAKWDGGNVTKDGGDAK			60
Sbjct 1		MTKNPRNNKPKKILDSSYSKTIWQNYIDALFETFPQLEISEVWAKWDGGNVTKDGGDAK			60
Query 61		LTANIRTGEHFLKAREAHIVDPNSDIYNTILYPKTGADLPCFGMDLMKFSDKKVIIVDF			120
Sbjct 61		LTANIRTGEHFLKAREAHIVDPNSDIYNTILYPKTGADLPCFGMDLMKFSDKKVIIVDF			120
Query 121		QHPREKYLFSVDGLPEDDGKYRFFEMGNHFSKNIFVRYCKPDEVQYLDTFKLYLTKYKE			180
Sbjct 121		QHPREKYLFSVDGLPEDDGKYRFFEMGNHFSKNIFVRYCKPDEVQYLDTFKLYLTKYKE			180
Query 181		MIDNNKPVGEDTTVYSDFDYMTELDPVRYGMKNKFGGRSEAFVNDFLFSYK		233	
Sbjct 181		MIDNNKPVGEDTTVYSDFDYMTELDPVRYGMKNKFGGRSEAFVNDFLFSYK		233	

<그림 20> pebS 단백질 서열 검증

Score	Expect	Method	Identities	Positives	Gaps
500 bits(1287)	6e-179	Compositional matrix adjust.	239/240(99%)	240/240(100%)	0/240(0%)
Query 1		MSVNLASQLREGTKKSHSMAENVGFVKCFLKGVVEKNSYRKLVG NLYFVYSAMEEEMAKF			60
Sbjct 1		MSVNLASQLREGTKKSHSMAENVGFVKCFLKGVVEKNSYRKLVG NLYFVYSAMEEEMAKF			60
Query 61		KDHPILSHIYFPELNRKQSLEQDLQFYFGSNWRQEVKISAAGQAYVDRVRQVAATAPELL			120
Sbjct 61		KDHPILSHIYFPELNRKQSLEQDLQFYFGSNWRQEVKISAAGQAYVDRVRQVAATAPELL			120
Query 121		VAHSYTRYLGDLSGGQILKKIAQNAMNLHDGGTAFYEFADIDDEKAFKNTYRQAMNDLPI			180
Sbjct 121		VAHSYTRYLGDLSGGQILKKIAQNAMNLHDGGTAFYEFADIDDEKAFKNTYRQAMNDLPI			180
Query 181		DQATAERIVDEANDAFAMNMKMFNELEGNLKAIGIMVFNLSLRRRSQGSTVEGLATSEG			240
Sbjct 181		DQATAERIVDEANDAFAMNMKMFNELEGNLKAIGIMVFNLSLRRRSQGSTVEGLATSEG			240

<그림 21> Hox1 단백질 서열 검증

Score	Expect	Method	Identities	Positives	Gaps
532 bits(1371)	0.0	Compositional matrix adjust.	268/268(100%)	268/268(100%)	0/268(0%)
Query 1		MSDWQMAEAWTLEEAIANIQQTEDTGKRYAAWWFGKFRVQDERAVNALLAALKDETD RS			60
Sbjct 1		MSDWQMAEAWTLEEAIANIQQTEDTGKRYAAWWFGKFRVQDERAVNALLAALKDETD RS			60
Query 61		PDGGYPLRRNAAKALGKLG NLA AVQPLIESLESPDYVRESAAQSLEMLGDRQAIPALQA			120
Sbjct 61		PDGGYPLRRNAAKALGKLG NLA AVQPLIESLESPDYVRESAAQSLEMLGDRQAIPALQA			120
Query 121		LLAGGVAAAVKAEGKPHLVQPYEAVIEALGTIGATAAIAEIEPFLDHEFAKIRYAALRAL			180
Sbjct 121		LLAGGVAAAVKAEGKPHLVQPYEAVIEALGTIGATAAIAEIEPFLDHEFAKIRYAALRAL			180
Query 181		YQLTQEAHYAEQLMEALNGNQLQLRRSALLDLGAIGYVPAGQAIKAYAENSLKLISLKG			240
Sbjct 181		YQLTQEAHYAEQLMEALNGNQLQLRRSALLDLGAIGYVPAGQAIKAYAENSLKLISLKG			240
Query 241		ILESHLQRTAETLDADGLQ LLELMDSLL	268		
Sbjct 241		ILESHLQRTAETLDADGLQ LLELMDSLL	268		

<그림 22> cpcE 단백질 서열 검증

Score	Expect	Method	Identities	Positives	Gaps
431 bits(1107)	2e-152	Compositional matrix adjust.	213/213(100%)	213/213(100%)	0/213(0%)
Query 1		MRS LI SE PM TV DV L IR AV NN P T SA Q DL V KN VA Q LA AT K DE Q AI P T L VE V L K F NN P GA AV A			60
Sbjct 1		MRS LI SE PM TV DV L IR AV NN P T SA Q DL V KN VA Q LA AT K DE Q AI P T L VE V L K F NN P GA AV A			60
Query 61		AV NGL IN I GE AV VP Y L L EN V D G Y N Y GA RA W ML R I FA G I G D P RA L D L L I EA AN K D F A F S V R			120
Sbjct 61		AV NGL IN I GE AV VP Y L L EN V D G Y N Y GA RA W ML R I FA G I G D P RA L D L L I EA AN K D F A F S V R			120
Query 121		RS AA K GL GN I Q WH K VP D S E R E V Q Q K V C D C L F L A L E D G E W V V R Y G A I A G L E G L S Q A I P E A			180
Sbjct 121		RS AA K GL GN I Q WH K VP D S E R E V Q Q K V C D C L F L A L E D G E W V V R Y G A I A G L E G L S Q A I P E A			180
Query 181		RK I V I K N K L T E F L T T E P E A A I R A R I Q K A I L S L P	213		
Sbjct 181		RK I V I K N K L T E F L T T E P E A A I R A R I Q K A I L S L P	213		

<그림 23> cpcF 단백질 서열 검증

## 2. *E.coli*에서 발현된 재조합 피코에리트린 단백질의 발현 및 정제

### 1) *E.coli*의 단백질 발현확인

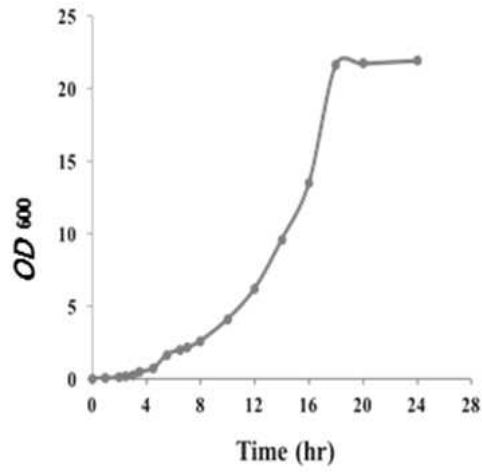
피코에리트린의 발현을 위하여 위에서 얻은 총 3개의 벡터를 BL21(DE3)에 동시에 형질전환 시켜 피코에리트린을 발현하는 *E. coli* (PE-BL21(DE3))을 확보하였으며 PE-BL21(DE3)을 3ml LB 액체배지에 피코에리트린 단백질의 발현을 유도하였다. 피코에리트린을 발현하는 세포의 성장을 확인하기 위해 시간별로  $OD_{600}$ 로 측정하고 성장곡선을 추정하여 HP UV/Vis Spectrophotometer (Agilent, USA)를 활용하여 흡광도측정을 나타낸 결과는 <그림 24>와 같다. 그 결과 M. A. Kacena(1999)<sup>86)</sup>연구와 같이 지체기, 성장기, 침체기, 사망기 전형적인 *E. coli*의 성장 패턴을 보이며, 성장 지연 단계를 거쳐 8시간 이후, 기하급수적으로 증가하는 단계를 거쳐, 18시간 이후 점차 정지 단계를 나타냈으며 최대  $OD_{600}$  값은 22로 나타났다.

피코에리트린의 시간별 발현량을 확인하기 위하여 시간별로 채취한 세포를 파쇄한 후, SDS-Page 확인 결과 19kDa의 재조합 단백질 피코에리트린의 발현을 <그림 25>로 확인하였다. 피코에리트린은 6.5시간부터 발현이 되기 시작하여 최대 발현시간은 23시간임을 확인할 수 있었다.

---

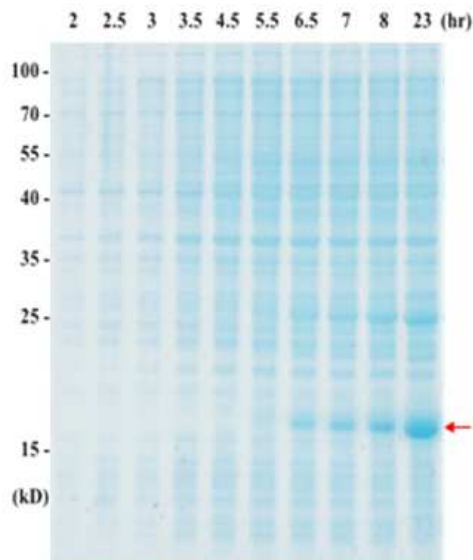
86) M. A. Kacena et al (1999). Bacterial growth in space flight: logistic growth curve parameters for *Escherichia coli* and *Bacillus subtilis*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 51, pp. 229 - 234.

### Growth Curve



<그림 24>  $OD_{600}$  흡광도 측정 성장곡선

### Expression



<그림 25> SDS-PAGE 피코에리트린 발현 측정

## 2) 피코에리트린 본 배양

피코에리트린의 발현을 확인한 후, 대량 배양 배지 ZYM-5052 Auto induction<sup>87)</sup>을 5L 대량 배양기를 사용해 *E. coli* 3L 본 배양을 실시하였다. 대량 배양하여 피코에리트린의 발현을 유도한 사진은 (그림 26) 좌측, 대용량 원심분리기를 이용해 *E. coli*를 배지와 분리한 사진은 (그림 26) 우측과 같다. 함수 중량(Wet weight)을 측정 결과 약 8.31g/L의 핑크색의 피코에리트린을 함유한 대장균을 수확하였다.



(그림 26) 대량 배양기를 사용한 3L 본 배양 및 *E. coli* 군체

87) Rich auto-induction medium, <Cold Spring Harbor Protocols>  
<http://cshprotocols.cshlp.org> (검색: 2019.09.23)

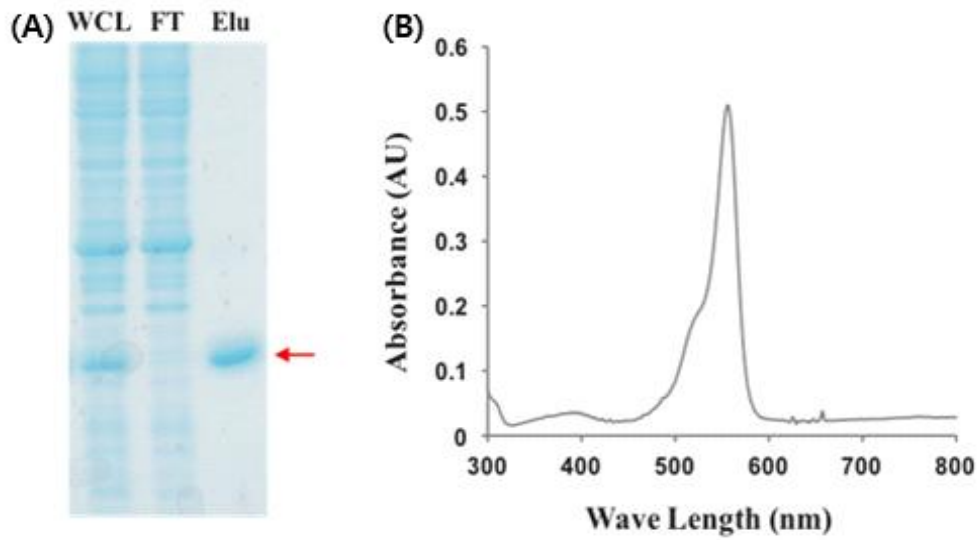
### 3) 피코에리트린의 정제 및 순도 확인

발현된 피코에리트린의 산물인 HT-CpcA는 N'-말단 부분에 있는 His·tag의 특성을 이용하여 IMAC으로 정제하였으며, 12% SDS-PAGE 확인 결과는 <그림 27-A>와 같다. 피코에리트린은 Ni-NTA 수지에 결합률이 높고 300mM 이미다졸로 용출한 결과 높은 순도로 정제가 되는 것을 확인하였다. 최종 정제 결과 피코에리트린은 *E.coli* 함수 중량(wet weight)대비 최종 동결건조 된 피코에리트린의 무게는 대장균 g당 10.06mg/g로 높은 생산율을 나타내었다.

정제한 피코에리트린의 흡광 영역을 확인하기 위하여 UV/Vis spectrophotometer를 이용하여 300nm에서 800nm까지 측정 한 결과 500nm에서 600nm 사이에서 흡광을 하고, 자연적으로 얻은 피코에리트린과 유사하게<sup>88)</sup> 556nm 파장에서 최대 흡광을 하였다. 그 결과는 <그림 27-B>과 같다. 피코에리트린의 순도를 확인하는 순도 지수는 10.58(A565/A280)의 높은 순도지수를 나타내었다.

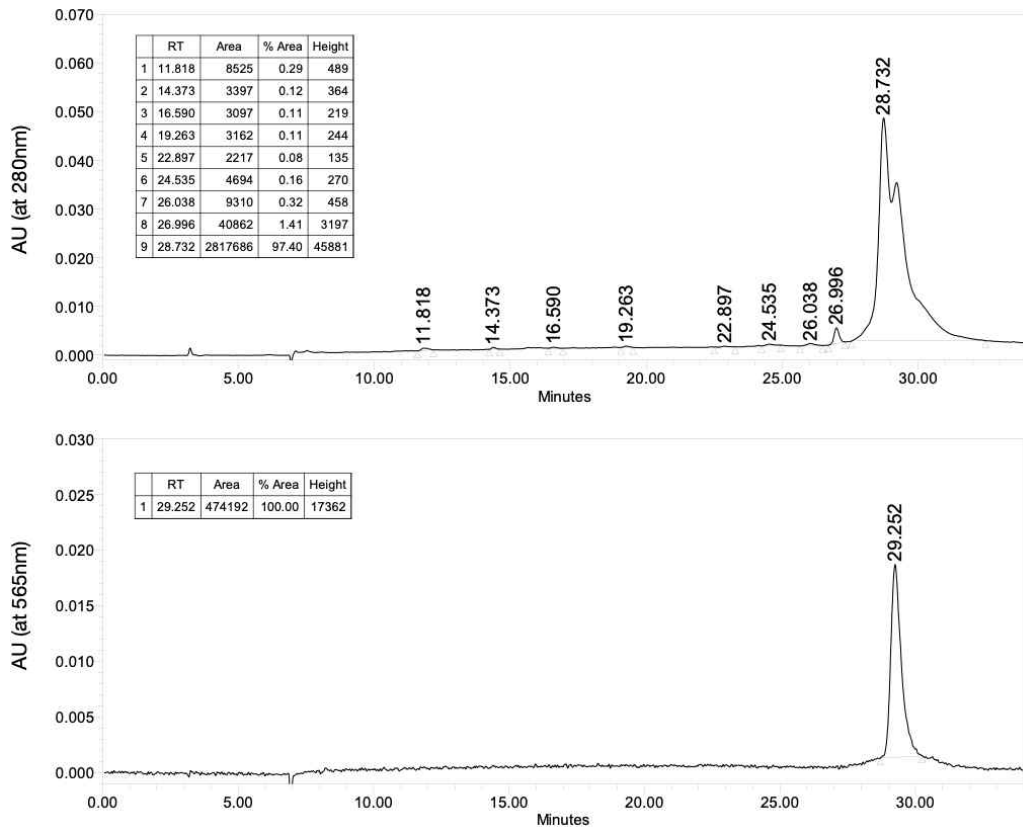
---

88) Dongyu Gu, a.b, et al (2018). Purification of R-phycoerythrin from *Gracilaria lemaneiformis* by centrifugal precipitation chromatography, *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci*, 1087(1088), pp. 138-141.



<그림 27> 피코에리트린 정제 및 흡광 스펙트럼

다음으로 정제된 피코에리트린의 순도를 결정하기 위하여 HPLC를 이용하여 C18 column을 통한 역상으로 분리하였다. 검출은 단백질의 최대 흡광 파장인 280nm와 피코에리트린의 최대 흡광 파장 영역인 565nm를 이용하여 피코에리트린을 검출하였다. 그 결과는 <그림 28>과 같다. 280nm와 565nm 모두 28~29분대에서 메인 피크가 나타나는 것을 확인하였고, 이 피크가 피코에리트린임을 시사한다. 280nm로 검출한 결과 메인 peak의 순도는 97.40%로 나타났다. 이는 SDS-PAGE를 통하여 확인한 높은 순도의 결과와 일치함을 보인다. 따라서 본 연구에서 개발한 방법으로 최대 97.40%의 높은 순도의 피코에리트린을 정제할 수 있음을 나타낸다.



<그림 28> HPLC를 이용한 피코에리트린의 순도 확인

R. Rossano는 25g의 조류로부터 15mg의 피코에리트린을 얻었다고 하였다.<sup>89)</sup> Munier(2015)<sup>90)</sup>는 홍조류 *Grateloupia turuturu* Yamada 종에서 전통적인 방법인 황산암모늄침전을 통한 피코에리트린을 추출한 결과 순도지수 2.89 (A565/A280) 및 건조 중량 1.41mg/g의 천연 피코에리트린을 얻었다. Dongyu Gu(2018)<sup>91)</sup>는 *Gracilaria lemaneiformis* 종에서 Centrifugal precipitation chr

89) R. Rossano a, N. et al (2003). Extracting and purifying R-phycoerythrin from Mediterranean red algae *Corallina elongata* Ellis & Solander. *Journal of Biotechnology*, 101, pp. 289-293.

90) Munier, M et al (2015). One-step purification of R-phycoerythrin from the red edible seaweed *Grateloupia turuturu*. *Journal of Chromatography B*, 992, pp. 23-29.

91) Dongyu Gu, a,b, et al (2018). Purification of R-phycoerythrin from *Gracilaria lemaneiformis* by centrifugal precipitation chromatography. *J Chromatogr B Analyt*

omatography 방법을 통하여 최종 0.5mg/g를 수확하였고, 순도지수는 3.0(A565/A280)으로 나타났다. Tooley(2011)<sup>92)</sup>는 대장균을 이용한 피코에리트린을 생산하여 최종 0.4mg/g(wet weight)을 얻었다고 보고 하였다.

본 연구에서 개발한 방법은 Tooley의 연구에서 얻은 수확량보다 25배 높은 10.06mg/g(wet weight)의 높은 생산성과 10.58(A565/A280)의 높은 순도지수, 97.4%의 높은 순도로 얻었다. 이는 전통적인 방법으로 피코에리트린을 추출하는 것보다 높은 수율과 순도를 가지는 것을 나타낸다. 현재 시장에서 주로 사용되는 천연색소는 적색의 코치닐, 황색의 치자황, 홍화황, 청색의 스피루리나 색소가 있다<sup>93)</sup>. 천연색소는 인체에 안전하지만 pH, 열, 빛에 약하다. Beata Mysliwa Kurdziel(2014)<sup>94)</sup>은 피코에리트린 색소 안정성을 연구한 결과, 피코에리트린은 건조하게 보관할 때 pH 5~6에서 매우 안정적으로 유지하고 긴 보관수명을 가진다고 하였다. 또한 60~65℃를 넘지 않을 때 피코에리트린 색소의 표백 현상이 나타나지 않는다는 결과가 나타났다. 피코에리트린은 안정성을 지니며 단백질 재조합 기술을 통해 높은 수율 생산이 가능하여 화장품 및 식품류의 천연색소로 사용할 수 있는 경제성이 확보되었다고 볼 수 있다.

---

Technol Biomed Life Sci, 1087(1088), pp. 138-141.

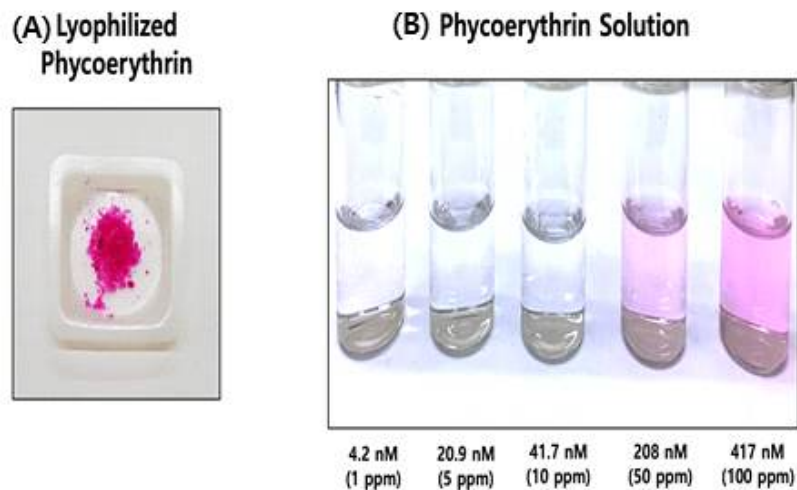
92) Aaron J. Tooley (2011). Biosynthesis of a fluorescent cyanobacterial C-phycoyanin holo- $\alpha$  subunit in a heterologous host. PNAS, 98(19), pp. 60-65.

93) 김석진 (2007). 천연색소분야 국내 기술 동향, 식품기술, 20(1), pp.39-68.

94) Beata Mysliwa-Kurdziel, Katalin Solymosi (2016). Phycobilins and Phycobiliproteins Used in Food. *Industry and Medicine sci*, 17(13), pp. 1173 - 1193.

### 3. 정제된 피코에리트린의 동결건조 및 농도별 색도 비교

동결건조로 얻어진 피코에리트린 파우더(그림 29-A)를 정제수에 1ppm, 5ppm, 10ppm, 50ppm, 100ppm으로 희석하여 농도별 색상을 비교한 것은 <그림 29-B>와 같다. 그 결과 50ppm의 농도부터 연한 핑크색을 나타내며 농도가 높아질수록 더 진한 핑크색을 나타내는 것을 확인할 수 있었다. 이 결과는 피코에리트린을 50ppm 이상의 농도로 화장품에 첨가하였을 경우 핑크색 색소로 사용할 수 있음을 보여준다. 이경은(2013)<sup>95)</sup>은 립제품으로 핑크색 색상을 가장 선호한다고 나타났다. 김희연(2008)<sup>96)</sup>은 식품에 사용하는 색소로 적색 색소가 높은 빈도를 차지하였다. 이는 피코에리트린이 화장품과 식품에서 핑크색 색소로서 활용도가 높을 것으로 사료된다.



<그림 29> 동결건조 된 재조합 단백질 피코에리트린의 농도별 색도 비교

95) 이경은 (2013). 여대생의 색조화장품 구매행동 및 사용실태. 한국니트디자인학회, 11(2), pp. 27-39.

96) 김희연, 남혜선 (2008). 경인지역 유통식품 중 타르색소 실태 조사 - 학교주변 어린이 기호 식품을 중심으로, 한국식품학회지, 40(3), pp. 243-250.

## 4. 재조합 피코에리트린 단백질의 안전성 및 효능 평가

### 1) 세포독성평가(MTT assay)

세포독성평가는 MTT 시약을 이용하는 노란색의 수용성 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2, 5 - diphenyl-2H-tetrazolium bromide(MTT)를 세포에 처리하면, 살아있는 세포의 미토콘드리아에 있는 탈수소 효소에 의해 Tetrazolium의 ring 구조가 끊어지면서 청자색을 띠는 비수용성의 MTT Formazan 결정으로 환원되는 원리를 이용하였다.<sup>97)</sup>

정제된 재조합 단백질 피코에리트린에 대한 세포독성에 미치는 영향을 결정하기 위해 MTT 검사를 통해 인간 유래 피부각질 세포 HaCaT 세포주에 처리하여 세포독성을 확인하였다. 측정된 수치는 <표 14>와 같으며 결과를 나타낸 그래프는 <그림 30>과 같다. 피코에리트린은 1, 5, 10, 50 및 100ppm에서 세포독성은 없음을 확인하였을 뿐만 아니라 50ppm, 100ppm 고농도에서 세포의 생존성이 각각 23%, 31% 향상되었음을 확인하였다. 이는 고농도의 피코에리트린을 식품 및 화장품에 사용하였을 때, 독성이 없음을 시사하고 천연색소로서 안전성이 있음을 확인하였다. 또한 고농도의 피코에리트린을 함유한 화장품을 개발할 경우 창상 치유에 효과가 있음을 나타내었다.

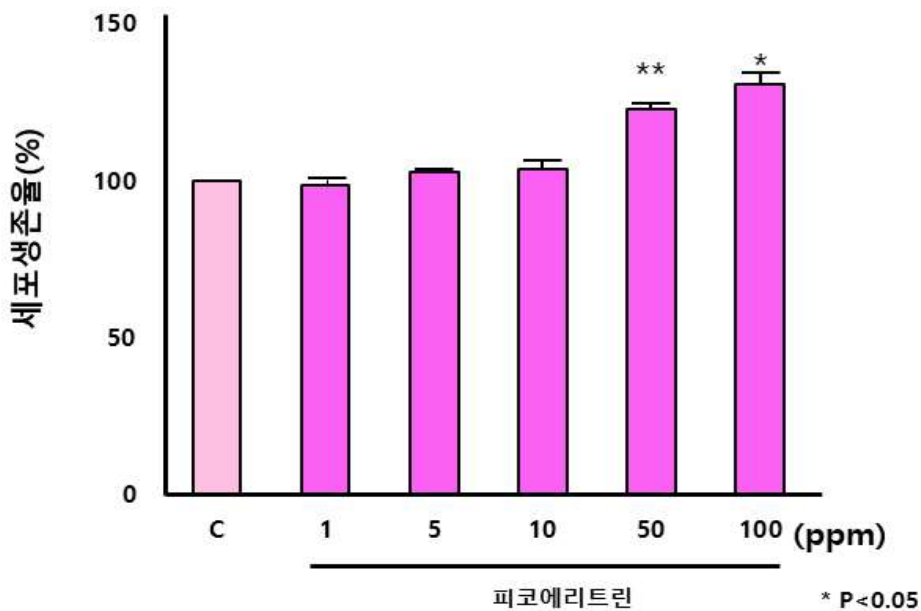
---

97) MTT Assay for Cell Viability and Proliferation, <MERCK>  
<https://www.sigmaaldrich.com> (검색: 2019.11.01)

<표 14> HaCaT 세포에서의 피코에리트린의 농도별 독성평가 수치 도표

표본	Abs. 540nm	Abs. 540nm		평균	세포 생존률 (%)			평균	편차	p-value
	n=1	n=2	n=3		n=1	n=2	n=3			
C	1.0889	1.0948	1.0583	1.081	100.000	100.000	100.000	100.000	0.000	-
PE 1	1.1609	1.0661	1.0022	1.076	106.612	97.379	94.699	99.563	6.250	0.915
PE 5	1.1708	1.0361	1.0789	1.115	107.521	100.119	101.947	103.196	3.856	0.288
PE 10	1.1329	1.1888	1.0821	1.135	104.041	108.586	102.249	104.959	3.267	0.119
PE 50	1.3949	1.2321	1.3649	1.331	128.102	112.541	128.971	123.205	9.245	0.049
PE 100	1.4090	1.4295	1.4233	1.421	129.397	130.572	134.489	131.486	2.667	0.002

$p < 0.05$



<그림 30> HaCaT 세포에서의 피코에리트린의 농도별 독성평가

## 2) 항산화 효과 분석(Anti-oxidant assay)

항산화 효과를 확인하기 위해 HaCaT 세포주에 산화 스트레스(oxidative stress)를 주고, 항산화 효과를 가진 N-Acetylcysteine(NAC)을 양성대조군으로 피코에리트린을 처리한 세포주를 비교하여 MTT Assay와 methylene blue staining을 실시해 세포에 대한 안전성 실험을 실시하였다. 측정된 수치는 <표 15>와 같으며 결과를 나타낸 그래프는 <그림 31>과 같다. HaCaT 세포를 과산화수소( $H_2O_2$ )로 처리하면 세포 사멸과 산화 손상을 일으킨다.<sup>98)</sup> 강력한 산화 방지제인 NAC를 이용한 전처리는 과산화수소의 산화 손상으로 부터 보호하는 항산화 효과가 있다. 과산화수소( $H_2O_2$ )에 의한 산화손상으로 인하여 대조군에서 세포의 생존율은 62.127%로 나타났다. 과산화수소와 양성대조군으로 사용한 산화 방지제인 NAC을 동시에 처리했을 때 세포생존율은 88.677%로 효과적으로 과산화수소에 의한 산화손상을 방지하였다. 정제된 재조합 단백질 피코에리트린은 저농도 1ppm, 5ppm 처리하였을 때 세포생존율은 각각 74.460%, 75.216%로 산화손상 방지에는 큰 효과가 없었다. 하지만 50ppm 처리하였을 때 세포생존율이 79.339%, 100ppm 처리 하였을 때는 80.484%로 나타났고, 이는 유의미하게 피코에리트린이 고농도에서 항산화 효과를 나타냄을 보여준다. 따라서 재조합 단백질 피코에리트린이 산화 손상을 방지하는 항산화 효과가 있음을 나타낸다.

Kumar Singh(2014)<sup>99)</sup>의 연구에서는 피코에리트린의 항산화 효과를 실험하기 위하여 *Caenorhabditis elegans*에 피코에리트린( $100 \mu\text{g ml}^{-1}$ )을 처리하여 *Caenorhabditis elegans*의 수명이 늘어나고 노화를 억제하는 결과를

---

98) 김수연 (2015). 과산화수소( $H_2O_2$ )에 의해 유도된 인간 각질형성세포주 손상에 대한 키네티(Kinetin)의 항산화 효과. 아시안뷰티화장품학회, 13(1), pp. 59-64.

99) Raghav Sonani, R and Niraj Kumar Singh and Jitendra Kumar (2014). Concurrent purification and antioxidant activity of phycobiliproteins from *Lyngbya* sp. A09DM: An antioxidant and anti-aging potential of phycoerythrin in *Caenorhabditis elegans*. Process Biochemistry, 49(10), pp. 1757-1766.

얻었다. Eun-Young Kim(2018)<sup>100)</sup>의 연구에서도 피코빌리단백질은 항산화 효과가 나타났다는 연구를 바탕으로 피코에리트린에서 PBP 1-2와 7-9 pep 펩타이드가 합성되어 HepG2세포를 PBP로 치료하면 과산화수소를 감소시키고 과산화분해효소의 발현을 회복시킴을 보여 피코에리트린의 항산화 활동을 증명하였다.

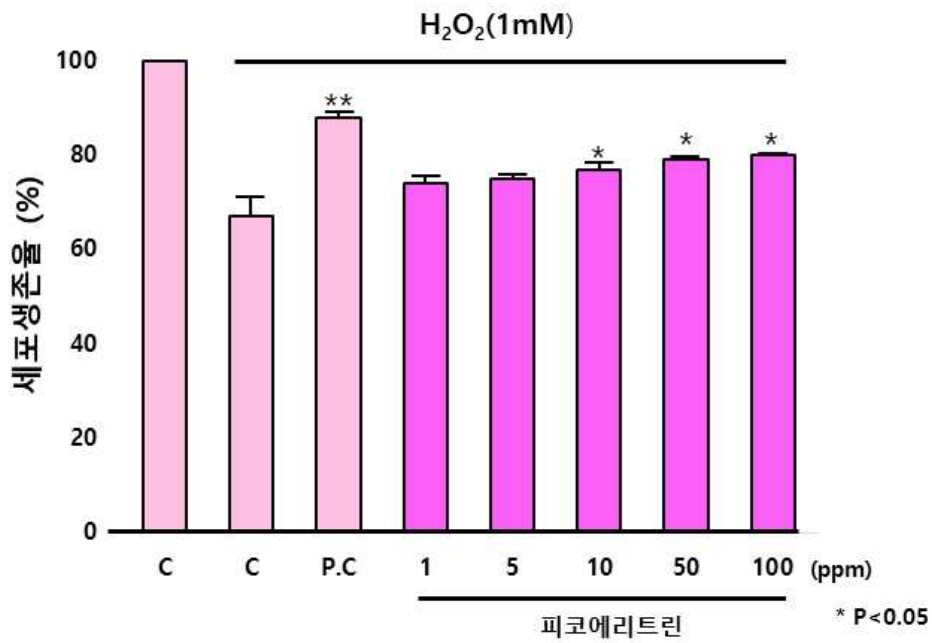
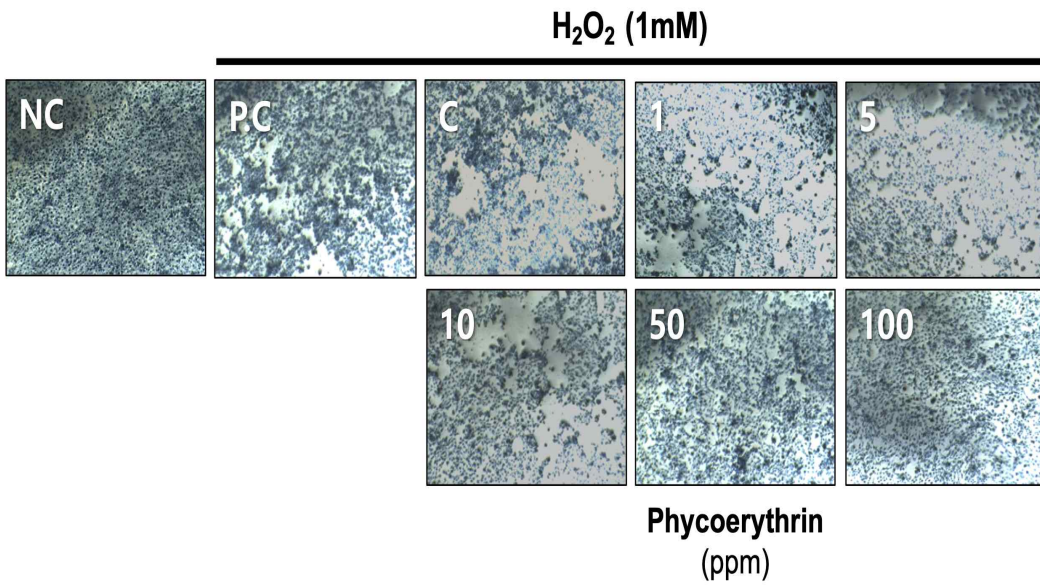
이러한 연구들을 종합하여 볼 때 피코에리트린은 기능성 식품, 제약 및 화장품 산업에서 산화 손상을 제거하는 항산화 기능의 가진 기능성 천연 산화 방지제의 역할이 가능하다고 사료된다.

<표 15> HaCaT 세포에서의 피코에리트린의 농도별 과산화물(H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) 제거 수치 도표

표본	Abs. 540nm			평균	세포 생존률 (%)			평균	편차	p-value
	n=1	n=2	n=3		n=1	n=2	n=3			
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> <sup>-</sup>	0.9418	0.9630	0.9545	0.953	100.00	100.00	100.00	100.00	0.000	-
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> <sup>+</sup>	0.6983	0.6047	0.6151	0.639	74.145	62.793	64.442	67.127	6.134	-
PC (NAC)	0.8478	0.8448	0.8427	0.845	90.019	87.726	88.287	88.677	1.195	0.004
PE 1	0.7177	0.7031	0.7079	0.710	76.305	73.011	74.164	74.460	1.617	0.116
PE 5	0.7194	0.7132	0.7178	0.717	76.386	74.060	75.202	75.216	1.163	0.088
PE 10	0.7278	0.7279	0.7467	0.734	77.278	75.587	78.229	77.031	1.338	0.052
PE 50	0.7448	0.7570	0.7667	0.756	79.083	78.609	80.325	79.339	0.886	0.027
PE 100	0.7576	0.7770	0.7667	0.767	80.442	80.685	80.325	80.484	0.184	0.020

*p*<0.05

100) Eun-Young Kim and Youn Hee Choi and Taek-Jeong Nam (2018). Identification and antioxidant activity of synthetic peptides from phycobiliproteins of *Pyropia yezoensis*. Int J Mol Med, 42(2), pp. 789-798.



<그림 31> 피코에리트린의 항산화 효과 분석

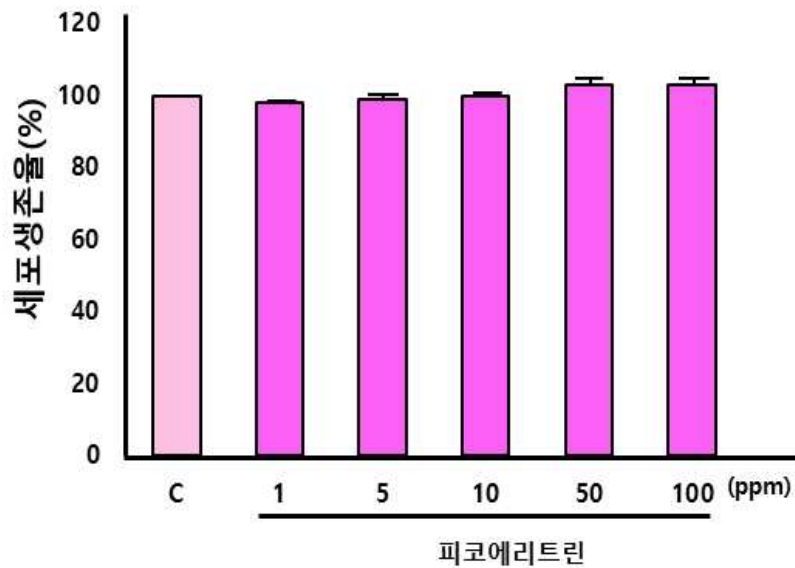
### 3) 멜라닌 억제 효능 분석(Melanin inhibitory assay)

정제한 피코에리트린이 멜라닌 합성에 미치는 영향을 보기 위해 mouse melanoma cell인 B16F10을 사용하여 실험을 진행하였다. 피코에리트린이 B16F10 세포의 생존율에 미치는 영향을 알아보기 위하여 MTT assay를 통한 세포독성을 측정하였다. 측정된 수치는 <표 16>과 같으며 결과를 나타낸 그래프는 <그림 32>와 같다. HaCaT세포의 세포독성 실험 결과와 동일하게 1, 5, 10ppm의 피코에리트린에서 세포안전성은 98%로 세포독성의 영향을 받지 않았다. 그 후, 멜라닌 생성 억제 효능을 확인하기 위하여 멜라닌 형성을 유도하는 것으로 알려진  $\alpha$ -MSH을 사용하여 1, 5, 10, 50, 100ppm 농도범위의 피코에리트린을 동시에 처리하여 멜라닌 생성 억제 효능을 평가하였다. 측정된 수치는 <표 17>과 같으며 결과를 나타낸 그래프는 <그림 33>과 같다. 멜라닌 생성 억제한다고 알려진 코직산은 양성대조군으로 사용하여 각 농도별로  $\alpha$ -MSH을 처리한 결과 양성대조군인 코직산(100ppm)의 경우 약 65% 멜라닌 생성을 억제하였다. 피코에리트린에 처리한 결과 1ppm의 저농도에서 멜라닌 생성을 20.04% 억제하였고, 100ppm의 고농도에서 37.96% 억제하였다. 이는 피코에리트린이 멜라닌 생성을 억제함을 시사하고 미백 효능이 있음을 나타낸다. 따라서 위의 결과는 본 연구에서 정제한 피코에리트린이 독성이 없고, 미백효과를 가진 천연 기능성 색소로서 가능성이 매우 높음을 시사한다.

<표 16> B16F1 세포에서의 피코에리트린의 농도별 독성평가 수치 도표

표본	Abs. 540nm	Abs. 540nm		평균	세포 생존률 (%)			평균	편차	p-value
	n=1	n=2	n=3		n=1	n=2	n=3			
C	0.7283	0.7485	0.7070	0.728	100.000	100.000	100.000	100.000	0.000	-
P.E 1	0.7274	0.7177	0.7006	0.715	99.876	95.885	99.095	98.285	2.115	0.295
P.E 5	0.7256	0.7218	0.7226	0.723	99.629	96.433	102.207	99.423	2.892	0.763
P.E 10	0.7216	0.7614	0.7221	0.735	99.080	101.722	102.136	100.980	1.658	0.414
P.E 50	0.7175	0.7920	0.7513	0.754	98.517	105.812	106.266	103.532	4.349	0.295
P.E 100	0.7387	0.7667	0.7609	0.755	101.723	102.432	107.724	103.828	3.326	0.184

$p < 0.05$

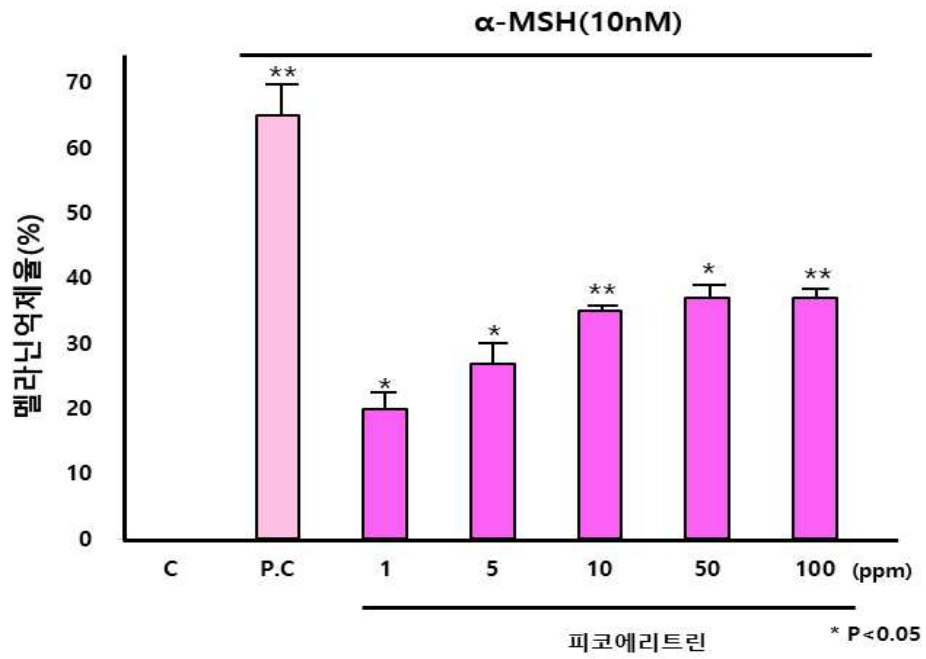


<그림 32> B16F1 세포에서의 피코에리트린의 농도별 독성평가 수치 도표

<표 17> B16F1 세포에서의 피코에리트린의 농도별 멜라닌 생성 억제율  
수치 도표

표본	멜라닌 (OD 450nm)			단백질 (OD 562nm)			멜라닌/단백질 (ug/ug)		
	α-MSH-	0.130	0.131	0.132	0.220	0.216	0.218	0.593	0.610
α-MSH+	0.263	0.266	0.269	0.180	0.186	0.183	1.466	1.430	1.470
K.A (100ppm)	0.176	0.175	0.180	0.195	0.198	0.196	0.903	0.888	0.917
P.E 1	0.242	0.242	0.257	0.194	0.196	0.195	1.252	1.241	1.322
P.E 5	0.247	0.241	0.224	0.193	0.191	0.192	1.277	1.261	1.169
P.E 10	0.228	0.221	0.225	0.194	0.195	0.194	1.176	1.139	1.162
P.E 50	0.222	0.211	0.212	0.192	0.189	0.191	1.160	1.159	1.114
P.E 100	0.229	0.228	0.224	0.204	0.200	0.202	1.124	1.146	1.114
표본	멜라닌 생성 억제율 (%)			평균	편차	p-value			
K.A (100ppm)	64.46 5	66.09 0	64.01 2	65.051	1.469	0.000			
P.E 1	24.50 7	23.02 8	17.05 8	20.0430	4.221	0.021			
P.E 5	21.63 6	20.59 5	34.80 0	27.6973	10.044	0.060			
P.E 10	33.24 2	35.45 8	35.65 8	35.5580	0.142	0.000			
P.E 50	35.07 0	33.02 6	41.25 5	37.1404	5.819	0.012			
P.E 100	39.22 4	34.67 8	41.24 6	37.9620	4.644	0.007			

$p < 0.05$

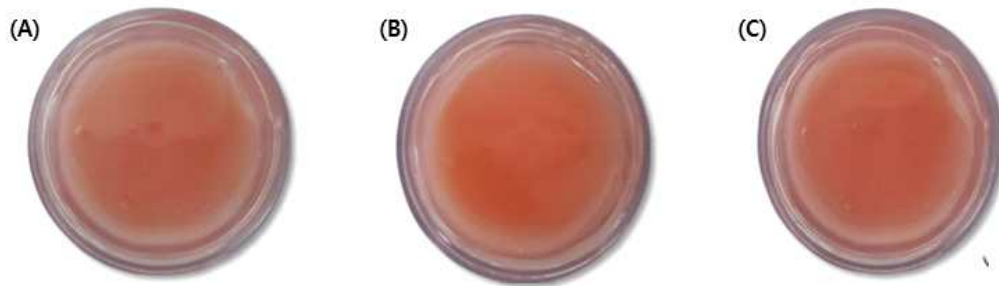


<그림 33> B16F1 세포에서의 피코에리트린의 농도별 멜라닌 생성 억제율

## 4. 립글로스의 표면발색 평가

### 1) 립글로스 제조

색조화장품에서 핑크색으로 사용되는 대표적인 제품은 립, 블러셔, 아이섀도 등이다. 그 중 립 제품은 사용 시 불가피하게 먹게 되는 제품이고, 입술의 점막에 사용되기 때문에 안전성에 유의하여야 한다. 또한 립 제품에 사용되는 색소는 인체에 무해하며 고순도의 성분이어야 한다.<sup>101)</sup> 따라서 발색의 효과를 잘 표현할 수 있는 립 제품을 선정하여 3가지 립글로스를 제조하고 기준단위에 제품을 정량을 두어 발색도를 평가하였다. 그 결과 색소함유율 1.2% 처방(표 7)에 따라 제조한 피코에리트린 색소 2.4g을 함유한 립글로스는 A, 적색 2호 색소 2.4g를 함유한 립글로스는 B, 피코에리트린 색소 1.2g과 적색 2호 색소 1.2g을 함유한 립글로스는 C는 <그림 34>와 같다.



<그림 34> 색소에 따른 립글로스

101) 김주덕, 신경은 (2018). 「최신 화장품학」. 광문각, 서울, p. 156.

## 2) 립글로스의 표면 발색도 결과

제조된 립글로스 A, B, C 표면 발색을 분광측색계(CM-700d, Minolta, USA)를 이용하여  $L^*$ ,  $a^*$ ,  $b^*$  값을 3회 반복 측정하여 그 평균을 나타낸 결과는 <표 18>과 같다.  $L^*$ 은 밝기를 나타내고  $L^*=0$ 이면 검은색이며,  $L^*=100$ 이면 흰색을 나타낸다.  $a^*$ 는 적색과 녹색 중 어느 쪽으로 치우쳤는지를 나타내며,  $a^*$ 값이 +이면 적색,  $a^*$ 값이 -이면 녹색에 치우친 색을 의미한다.  $b^*$ 는 황색과 청색을 나타내며,  $b^*$ 값이 +이면 황색으로,  $b^*$ 값이 -이면 청색을 의미한다.

<표 18> 표면 발색 비교

립글로스	색상	$L^* / a^* / b^*$
A		19.02/7.75/7.46
B		18.42/8.06/8.08
C		18.67/7.89/7.66

피코에리트린이 함유된 립글로스 A는  $L^*$ 값 19.02,  $a^*$ 값 7.75,  $b^*$ 값 7.46으로 나타났다. 인공합성색소 립글로스 B는  $L^*$ 값 18.42,  $a^*$ 값 8.06,  $b^*$ 값 8.08이었고 피코에리트린과 인공합성색소를 함유한 립글로스 C의  $L^*$ 값 18.67,  $a^*$ 값 7.89,  $b^*$ 값 7.66으로 측정되었다. 측정 결과 피코에리트린은 인공합성색소보다 명도는 조금 더 높고 적색 값이 조금 낮지만 유의미한 차이는 아니었다. 피코에리트린과 인공합성색소를 함께 함유한 립글로스 C는 인공합성색소를 함유한 B에 비교하여 명도는 높고 적색 값이 낮게 나타났지만 유의미한 차이는 아니었다. 따라서 피코에리트린 천연색소 단백질을 제품에 적용하였을 때 인공합성색소와 유사한 표면 발색을 보였으며 이는 피코에리트린이 인공합성색소와 색측면에서 경쟁 가능성이 있음을 시사한다.

## V. 결론

본 연구는 피코에리트린의 생합성을 담당하는 Hox1, pebS, cpcA, cpcE, cpcF의 cDNA 유전자를 확보하였고, DNA 운반체인 플라스미드(Plasmid) 벡터 pACYCDuet1, pETDuet1, pCDFDuet1을 유전자 증폭 기술인 PCR(Polymerase Chain Reaction)을 통하여 선형화된 벡터들의 DNA를 얻었다. 김슨어셈블리를 통하여 DNA 결찰을 진행 후 대장균(*E. coli*)에 형질전환(Transformation)하여 피코에리트린의 발현을 auto-induction 배지를 이용하여 유도한다. 이후, 단백질 발현이 잘 되었는지 확인하기 위하여 SDS-PAGE(Sodium Dodecyl Sulfate-PolyAcrylamide Gel Electrophoresis)를 수행하였다. 피코에리트린은 핑크빛 색상을 띄어 SDS-PAGE 상에서 띠(밴드)로 쉽게 관찰된다. 피코에리트린 단백질 발현을 확인한 뒤, 대량생산을 위해 5L 배양발효기를 활용하여 37°C 온도의 공기순환 조건에서 배양한 후, 대장균 균체들을 모아서 초음파처리를 통하여 대장균들의 세포벽을 깨고, 그 속에 발현된 피코에리트린을 IMAC(Immobilized metal affinity chromatography)을 통해 정제하였다. 피코에리트린의 천연색소 소재로서의 가치를 확인하기 위하여 세포독성 시험인 MTT Assay를 수행한 후, 항산화 효능시험 Anti-oxidant Assay 및 미백 효능시험 Melanin inhibitory assay를 실시하였고 피코에리트린을 함유한 립글로스과 인공합성색소를 함유한 립글로스와의 L\*, a\*, b\* 값을 분광측색계를 이용하여 비교하였다. 본 연구의 결과를 정리하면 다음과 같다.

첫째, 본 연구는 피코에리트린의 생합성 과정을 돕는 효소 Hox1, pebS, HT-cpcA, cpcE, cpcF의 유전자 정보와 단백질을 재조합을 위한 pACYCduet-1, pET Duet-1, pCDF Duet-1 벡터를 활용하여 피코에리트린 유전자

발현을 유도하였으며, 그 결과 피코에리트린 발현량은 균주 배양 6시간 이후 시간 의존성 함수로 발현량이 증가하는 추세를 보였다. 대량 배양기를 통해 함수 중량을 측정한 결과 약 8.31g/L의 대장균을 수확하였다. 발현된 피코에리트린을 500nm와 600nm 사이에서 흡광도를 측정한 결과, 자연적으로 생산된 피코에리트린과 유사하게 556nm 파장에서 최대 흡광을 나타내었다. 피코에리트린은 대장균 균체 g당 10.06mg의 정제 수율을 보였으며, 순도는 흡광 아미노산이 흡수하는 파장인 280nm에서 피코에리트린의 최대 흡수 파장인 556nm를 나눈 것으로,  $10.58(A_{556}/A_{280})$ 의 높은 순도 지수, 97.4%의 높은 순도를 나타내었다.

둘째, 정제된 피코에리트린에 대한 세포독성에 미치는 영향을 결정하기 위해 피부 세포주를 이용한 MTT 검사를 한 결과 1, 5, 10, 50 및 100ppm에서 세포독성은 없었으며, 오히려 50ppm, 100ppm에서 의존적으로 생존율 증가함수를 나타내었고, 이는 곧 피코에리트린이 피부세포의 이동촉진 혹은 세포분열을 증진 시키는 결과를 보여준 것이다.

셋째, 정제된 피코에리트린에 대한 항산화 소재로서의 가능성을 확인하기 위한 활성산소 제거 효능을 알아보기 위해 Anti-oxidant assay를 실험한 결과, 1, 5, 10, 50 및 100ppm에서 과산화수소( $H_2O_2$ ) 농도를 의존적으로 제거하여, 피코에리트린이 항산화 효능이 있음을 확인하였다.

넷째, 피코에리트린의 멜라닌 색소생성 억제능을 통한 미백 소재로서의 가능성을 확인하기 위하여 멜라닌세포를 이용하여 Melanin inhibitory assay를 수행한 결과, 1, 5, 10, 50 및 100ppm에서 멜라닌 합성을 농도 의존적으로 억제하여, 피코에리트린이 미백 효능이 있음을 확인하였다.

다섯째, 피코에리트린의 실질적인 제품에서 색소로서의 가능성을 확인하기 위하여 색조화장품 중 립글로스를 제조하여 인공합성색소와 비교실험 하였다. 피코에리트린 색소 1.2%, 인공합성색소 1.2%, 피코에리트린색소 0.6%와 인공합성색소 0.6% 비율로 섞은 립글로스 제품을 확인한 결과, 색상의 유의미한 차이가 나타나지 않았다. 따라서 현재 적색 인공합성색소를 사용하는 제품에 피코에리트린 색소를 대체할 수 있는 가능성이 있음을 시사한다.

이 결과를 종합적으로 고찰해보면 해양 유래 피코에리트린을 바이오 생합성하는 유전자들을 클로닝하고, 대장균 세포주 생산시스템에서 유전자재조합 기술을 응용한 피코에리트린 천연색소 단백질의 생산은 자연적으로 추출된 피코에리트린 단백질과 유사한 생산이 가능한 것을 보여주었다. 또한, 해조류에서 자연추출 시 핵산 같은 독성이 있는 용매 물질을 사용하여 피코에리트린 단백질을 얻는 것과 비교해 바이오 생합성에서 분리 정제하여 상대적으로 훨씬 안전하게 생산될 수 있음을 보여주었다. 분리 정제된 피코에리트린 단백질은 피부세포 독성이 없으며, 항산화, 미백 효능을 나타내어서 천연색소 단백질이 고기능성 향장 소재로서 산업적 활용가치가 높음을 의미할 뿐만 아니라, 천연단백질로서의 식품산업, 바이오 제품개발 등 다양한 산업 분야에서 적용될 수 있다는 것을 보여준다. 나아가 본 연구는 바이오기술을 통한 천연색소 단백질을 생산함으로써 다양한 천연색소 단백질이 바이오기술로 생산이 가능함을 시사하고 그 기술적 토대를 마련하는 데 의의가 있다.

## 참 고 문 헌

### <국내 문헌>

- 강정아인 (2001). 『단백질 실험 노트 (상)』, 월드사이언스, pp. 8-11.
- 구은진 (2016). 조협 추출물이 HaCaT cells의 항염증과 SEB-1 cells의 피지분비 억제에 미치는 영향. *대한한방소아과학회지*, 30(2), pp. 96-106.
- 김류련, 이정환, 남기석 (2011). 아미노-말단 리보플라빈 생성효소 단백질의 형광 특성. *한국미생물학회지*, 47(1), pp. 14-21.
- 김석진 (2007). 천연색소분야 국내기술동향. *식품기술학회지*, 20(3), pp. 38-68.
- 김선영, 양진희 (2012). 코치닐 천연염료와 키토산을 이용한 색조화장품의 안정성에 관한 연구. *한국미용학회지*, 18(6), pp. 1214-1222.
- 김성완, 최광호, 김성렬 (2014). 피브로인 H-chain 재조합 단백질 발현시스템을 이용한 황색형광실크의 제작. *한국잠사학회*, 52(2), pp. 102-109.
- 김수연 (2015). 과산화수소(H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>)에 의해 유도된 인간 각질형성세포주 손상에 대한 키네티(Kinetin)의 항산화 효과. *아시아뷰티화장품학회*, 13(1), pp. 59-64.
- 김은하, 송연숙, 이근광 (2014). Lac 색소를 이용한 모발의 염색성 연구. *한국미용학회지*, 20(1), pp. 110-118.
- 김정보, 조경숙 (2006). 색소를 생산하는 탈질미생물의 동정 및 색소생산 환경조건 연구. *대한환경공학회*, 12, pp.1771-1776.
- 김주덕, 신정은 (2018). 『최신 화장품학』. 광문각, 서울, p. 156.
- 김주철, 김만철, 한주상 (2009). 적색색소를 생산하는 해양미생물 JE-34 균주의 분류학적 특성 및 항균 활성. *미생물학회지*, 45(4), pp. 368-376.

- 김중호 (1995). 홍조식물 *Ceramium kondoi*와 유사종의 피코에리트린에 의한 면역학적 연구. 충남대학교 대학원 석사학위논문.
- 김지윤, 임정희, 이원길(2014). 분비형 인간 유래 Placental Lactogen 재조합체 단백질 발현 및 정제. *한국동물번식학회*, 38(2), p. 27.
- 김진권 (2003). 재조합 유전자를 이용한 천연 indigo 생산. 조선대학교 석사학위논문.
- 김효정 (2004). 천연염료를 사용한 색조화장품 개발에 관한 연구. 계명대학교 대학원 박사학위논문.
- 김희구(1998). *Monascus anka* 로부터 유기배양에 의한 적색소의 대량생산. *한국식품영양학회지*, 11(6), pp. 617-621.
- 김희선, 최우영, 김원석 (2015). 효소처리를 이용한 복분자 추출공정의 최적화 연구. *한국산업식품공학지*, 19(1), pp. 62-69.
- 김희연, 남혜선 (2008). 경인지역 유통식품 중 타르색소 실태 조사 - 학교 주변 어린이 기호 식품을 중심으로, *한국식품학회지*, 40(3), pp. 243-250.
- 남궁석 (1976). 한국산 김중의 색소단백질의 분리 및 그 아미노산 조성. *한국식품과학회지*, 8(3), pp. 172-178.
- 문서윤, 김민희, 리순화 (2017). 천연 방향성 제품의 사용실태와 소비자의 만족도 및 선호도에 대한 연구. *한국디자인문화학회지*, 23(2), pp. 193 - 206.
- 박미선, 홍인권 (2002). 천연색소 추출공정의 추출 용매 조성에 의한 색차 효과. *공업화학*, 13(8), pp. 844-851.
- 박신호 (2018). 멍게 껍질(Ascidian shell)로부터 추출한 천연색소의 안정성에 대한 연구. *한국유화학회지*, 35(1), pp. 292-298.
- 박재명, 박진숙 (2019). *Zooshikella* sp. 17TA 색소 추출물의 물리화학적 안정성과 항균활성. *한국해양바이오학회*, 11(2), pp. 89-93.

- 박준상 (2015). *해양 천연 유래 물질의 성장아교세포에 대한 항산화 효과 및 나노 DDS 개발*. 인하대학교 대학원 석사학위논문.
- 배경동, 장영석, 안상점 (2012). 백신의 역사, 현황 및 미래에 대한 고찰. *한국생물공학회*, 19(1), pp. 8-5.
- 신우람 (2018). *식용 천연색소의 결빙(냉각)에 따른 색채 변화와 설 색착도에 관한 연구*. 홍익대학교 대학원 석사학위논문.
- 유미선, 이보람, 노지나 (2011). Black Queen Cell Virus 재조합 단백질의 발현. *한국양복학회지*, 26(4), pp. 275-282.
- 이경은 (2013). 여대생의 색조화장품 구매행동 및 사용실태. *한국니트디자인학회*, 11(2), pp. 27-39.
- 이성, 이상래 (2012). 포도상구균에서 분비하는 장내독소 B(SEB)에 대한 재조합 단백질을 이용한 면역특이적 난황항체 생산. *한국가금학회지*, 39(4), pp. 273-278.
- 이세희, 조용석, 최순화 (2006). 선인장 열매의 색소 추출물에 의한 양모섬유의 염색. *한국염색가공학회지*, 18(2), pp. 8-14.
- 이승범, 이원재, 홍일권 (2018). 천연색소 추출공정 최적화를 위한 반응표면분석법의 적용. *한국공업화학회*, 29(3), pp. 283-288.
- 이영희, 박영광, 백영미 (2016). 천연색소의 색 특성에 미치는 추출용매의 영향. *한국염색가공협회*, 28(1), pp. 1-13.
- 이예림 (2017). 항진균활성 violacein 색소를 생산하는 *Collimonas* sp. DEC-B5 균주의 분리 및 특성. *미생물학회지*, 52(2), pp. 212-219.
- 이유경, 이홍금 (2002). 조류(Algae)의 산업적이용. *생물산업*, 15(2), pp. 19-24.
- 이재영, 한성구 (1995). 생명공정기술의 산업화 촉진방안에 관한 연구. *과학기술정책연구원*, pp. 1-117.

- 정광한, 최아름 (2007). 고세균 타입 로돕신의 종류, 특징과 그 응용. *생화학분자생물학회지*, 27(2), pp.15-20.
- 정기모 (2007). *E. coli*를 통한 재조합 hybrid 펩타이드 Hinnavin-MSH의 발현과 특성. 호서대학교 대학원 박사학위논문.
- 정동우, 박진숙 (2008). 해양세균 *Pseudoa/teromonas psicida* TA20의 색소 추출물의 물리화학적 안정성과 생리활성. *생명과학학회지*, 19(8), pp. 1132-1138.
- 정영기 (1999). 해양미생물로부터 카로테노이드 색소의 생산을 위한 최적조건. *한국식품영양과학회지*, 28(6), pp. 1239 - 1243.
- 정혁준 (2007). *Monascus* 속 균주를 이용한 홍국의 제조 및 천연색소의 산업적 응용에 관한 연구. 계명대학교 대학원 박사학위논문.
- 존판던 (2013). 김해영, 「DNA발견에서 유전자변형까지」. 다섯수레, 서울, pp. 25-26.
- 지형준 (1997), 천연식물과 식용색소. *식품기술*, 10(2), pp. 55-61.
- 최민 (2011). *해조류를 이용한 천연염료 개발*. 전남대학교 대학원 석사학위논문.
- 최진현, 염정현, 배도규(2009). 특집 : 건강 & 웰빙 ; 천연색소 자원의 활용. *섬유기술과산업학회지*, 13(2), pp 113-121.
- 최형열, 이정순 (2015). 추출용매에 따른 애기뿔풀 색소의 특성 및 염색성. *한국생활과학회지*, 24(6), pp. 859-870.
- 황초롱, 강민정, 심혜진 (2015). 천연식물로부터 추출한 색소성분의 항산화 및 항비만 활성. *한국식품영양과학회지*, 44(2), pp. 165 - 172.
- 홍채환, 김세원 (2004). 산업적 응용을 위한 홍조류 당화 기술, *한국생명공학회*, 29(5), pp. 307-305.

<국외 문헌>

- Ahmet G et al (2016). Classification of Dye and Pigments, *Dyes and Pigments*, 1, pp. 31-45.
- Aldini, G. et al (2018). N-Acetylcysteine as an antioxidant and disulphide breaking agent: the reasons why. *Free Radical Research*, 52(7), pp. 751 - 762.
- Amandine Bordat, Marie-Christine Houvenaghel, Sylvie German-Retana (2015). Gibson assembly: an easy way to clone potyviral full-length infectious cDNA clones expressing an ectopic VPg. *Virology Journal*, 12(1), pp. 1-89.
- Aaron J. Tooley (2011). Biosynthesis of a fluorescent cyanobacterial C-phycoyanin holo- $\alpha$  subunit in a heterologous host. *PNAS*, 98(19), pp. 60-65.
- Beata Mysliwa-Kurdziel, Katalin Solymosi (2016). Phycobilins and Phycobiliproteins Used in Food. *Industry and Medicine sci*, 17(13), pp. 1173 - 1193.
- Dammeyer T, Frankenberg-Dinkel N. (2008). Function and distribution of bilin biosynthesis enzymes in photosynthetic organisms. *Photochem Photobiol Sci*, 7(10), pp. 1121-1130.
- Deguang Sun, Xiaonan Zang (2019). Cloning of pcB and pcA Gene from *Gracilariopsis lemaneiformis* and Expression of a Fluorescent Phycocyanin in Heterologous Host. *Genes (Basel)*, 10(322), pp. 1-14.

- Dongyu Gu, a.b, et al (2018). Purification of R-phycoerythrin from *Gracilaria lemaneiformis* by centrifugal precipitation chromatography, *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci*, 1087(1088), pp. 138-141.
- Eun-Young Kim, Youn Hee Choi, Taek-Jeong Nam (2018). Identification and antioxidant activity of synthetic peptides from phycobiliproteins of *Pyropia yezoensis*. *Int J Mol Med*, 42(2), pp. 789-798.
- Frank M. Torti, Suzy V. Torti (2002). Regulation of ferritin genes and protein. *Blood*, 99(10), pp. 3505 - 3516.
- Froger, A, Hall, J. E (2007). Transformation of Plasmid DNA into *E. coli* Using the Heat Shock Method. *J. Vis. Exp*, 1(6), p. 253.
- F.W. Studier (2005). Protein production by auto-induction in high-density shaking cultures. *Protein Expression and Purification*, 41(1), pp. 207-234.
- Haijun Liu<sup>1</sup> et al (2013). Phycobilisomes Supply Excitations to Both Photosystems in a Megacomplex in Cyanobacteria. *Science*, 342(6162), pp. 1104-1107.
- Hanson, E. K (1999). Observations on Phycoerythrin, the Red Pigment of Deep-Water Algae. *The New Phytologist*, 8(10), pp. 337-344.
- Henning Kirst et. al (2014). Maximizing photosynthetic efficiency and culture productivity in cyanobacteria upon minimizing the phycobilisome light-harvesting antenna size. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1837(10), pp. 1653-1664.

- Hiroshi Shinozuka, et al (2018). Homology-based enzymatic DNA fragment assembly-based illumina sequencing library preparation. *Biol Methods Protoc*, 3(1), pp. 1-8.
- Kenichi Honda (1999). 「*Molecular Systems in Biological Photoreceptors*」. Springer, Tokyo, p. 168.
- J. Biol. Chem (1950). The distribution of the chromoproteins, hemoglobin, myoglobin, and cytochrome, in the tissue of different species, and the relationship of the total content of each chromoprotein to body mass. *The Journal of Biological Chemistry*, 182, pp. 317-334.
- J. D. Watson and F. H. C. Crick (1953). The structure of DNA. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol*, 18, pp. 123-131.
- Jean Roche (1936). Animal Pigment. *Ann. Rev. Biochem*, 535, pp. 463-484.
- Jeremy M. Berg, John L. Tymoczko, Lubert Stryer (2007). 「*Biochemistry*」. Palgrave Macmillan, pp. 79-87.
- Lanton, F. and Neveux, J (1997). Spatial and seasonal variations in abundance and spectral characteristics of phycoerythrins in the tropical northeastern Atlantic Ocean. *Deep Sea Res*, 44, pp. 223-246.
- Lawrence Bogorad (1975). Phycobiliproteins and complementary chromatic adaptation. *Ann. Rev. Plant Physiol*. 26, pp. 369-401.
- Lin, Yi-Hung, et al (2014). Fluorescent colored material made of clay mineral and phycoerythrin pigment derived from seaweed. *Dyes and Pigments*, 100, pp. 97-103.

- M. A. Kacena et al (1999). Bacterial growth in space flight: logistic growth curve parameters for *Escherichia coli* and *Bacillus subtilis*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, *51*, pp. 229 - 234.
- Maria Isabel Landim Neves (2019). Trends and Challenges in the Industrialization of Natural Colorants. *Food and Public Health*, *9(2)*, pp. 33-44.
- Munier, M et al (2015). One-step purification of R-phycoerythrin from the red edible seaweed *Grateloupia turuturu*. *Journal of Chromatography B*, *992*, pp. 23-29.
- Peer B. Jacobson (2016). R-Phycoerythrin Induces SGC-7901 Apoptosis by Arresting Cell Cycle at S Phase. *Mar Drugs*, *14(9)*, p. 166.
- Percy M. Gault and Harris J. Marler (2009). *Handbook on Cyanobacteria: Biochemistry*, Biotechnology and Applications. Nova Science Publishers, Inc. New York, pp. 124-125.
- Qunwen Pan, Meizhen Chen (2013). Antitumor function and mechanism of phycoerythrin from *Porphyra haitanensis*. *Biol Res*, *46(1)*, pp. 87-95.
- Raghav Sonani, R, Niraj Kumar Singh , Jitendra Kumar (2014). Concurrent purification and antioxidant activity of phycobiliproteins from *Lyngbya* sp. A09DM: An antioxidant and anti-aging potential of phycoerythrin in *Caenorhabditis elegans*. *Process Biochemistry*, *49(10)*, pp. 1757-1766.

- Rhie, G. E and Beale, S. I (1995). Phycobilin Biosynthesis: Reductant Requirements and Product Identification for Heme Oxygenase from *Cyanidium caldarium*. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, *320(1)*, pp. 184-194.
- Robert Huber (1987). Flexibility and rigidity, requirements for the function of proteins and protein pigment complexes. *University of L eicester*, 15. pp. 1009-1020.
- R. Rossano a, N. et al (2003). Extracting and purifying R-phycoerythrin from Mediterranean red algae *Corallina elongata* Ellis & Solander. *Journal of Biotechnology*, *101*, pp. 289-293.
- Shelly A Pizarro Kenneth Sauer (2001). Spectroscopic study of the light-harvesting protein C-phycoyanin associated with colorless linker peptides. *Photochemistry and Photobiology*, *73(5)*, pp. 556-563.
- Sheng Wu Gong, Cheng Xue Bao (2019). Co-expression of lignocellulase from termite and their endosymbionts. *Chinese journal of biotechnology*, *35(2)*, pp. 244-253.
- Sigurd M. Wilbank (1993). Rod Structure of a Phycoerythrin 11-containing Phycobilisome, *The Journal of biological chemistry*, *268(2)*, pp. 1236-1141.
- Studier, F. W. (2005). Protein production by auto-induction in high-density shaking cultures. *Protein Expression and Purification*, *41(1)*, pp. 207 - 234.
- Suliman Khan et al (2016). Role of Recombinant DNA Technology to Improve Life. *International Journal of Genomics*, pp. 1-4.

- Sonani, Ravi R, et al (2017). Phycoerythrin averts intracellular ROS generation and physiological functional decline in eukaryotes under oxidative stress Datta. *Protoplasma*, 254(2), pp. 849-862.
- Swara Kalva, Jef D. Boeke, Paolo Mita (2018). Gibson Deletion: a novel application of isothermal in vitro recombination. *BioMed Central*, 20(1). pp. 1-22.
- T. Dammeyer, Frankenberg Dinkel, N (2008). Function and distribution of bilin biosynthesis enzymes in photosynthetic organisms. *Photochem Photobiol Sci*, 7(10), pp. 1121-1130.
- Wu H, et al (2020). Production of l-ribose from l-arabinose by co-expression of l-arabinose isomerase and d-lyxose isomerase in Escherichia coli. *Enzyme Microb Technol*, 132, pp. 1-8.

#### <기타 자료>

식품의약품안전, 제2015-74호, 2015.10. 07 시행 (검색: 2019.09.10.)

색소, <표준대국어사전>

<https://stdict.korean.go.kr/search/searchView.do>

(검색: 2019.10.01)

천연색소편, <식품의약처안전처>

<https://www.slideshare.net/fatdogfish/ss-64717566>

2016. 8. 5 작성 (검색: 2019.09.25)

Anzalone, A. V. et al, <Nature>

<https://www.nature.com/articles/s41586-019-1711-4>

2019. 9. 21 작성 (검색: 2019.09.22)

Phycobilisome antenna, <semantic scholar>

<https://www.semanticscholar.org/paper/Plant-%28-Chlorophyll-%29-%28-Phycobiliproteins-and-%29/d176a52da53117f490a256ff3e9ffa40720fa6eb/figure/2> (검색:2019.10.22)

Production of Recombinant Protein, <cusabio>

<https://www.cusabio.com/c-20679.html>

(검색: 2019.11.13)

Recombinant DNA technology history, <science history insitute>

<http://www.sciencehistory.org> (검색: 2019.09.12)

Rich auto-induction medium, <Cold Spring Harbor Protocols>

[http://cshprotocols.cshlp.org/content/2010/8/pdb.rec12297.full?text\\_only=true](http://cshprotocols.cshlp.org/content/2010/8/pdb.rec12297.full?text_only=true)

(검색: 2019.09.23)

SDS-PAGE Gel, <Cold Spring Harbor Protocols>

<https://doi.org/10.1101/pdb.rec087908>

(검색: 2019.09.21)

MTT Assay for Cell Viability and Proliferation, <MERCK>

[https://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/roche/11465007001?lang=ko&region=KR&gclid=Cj0KCQjws\\_r0BRCwARIsAMxfDRhU2ARFjRa6n308IuhEzODZgizsl9sIYprOpM2r3ETQYehLwrZ2dVgaAlipEALw\\_wcB](https://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/roche/11465007001?lang=ko&region=KR&gclid=Cj0KCQjws_r0BRCwARIsAMxfDRhU2ARFjRa6n308IuhEzODZgizsl9sIYprOpM2r3ETQYehLwrZ2dVgaAlipEALw_wcB)

(검색: 2019.11.01)

# ABSTRACT

## A Study on the Natural pigment Protein Phycoerythrin

Bobin Kim

Depart of Clothing

Graduate School of

SungShin University

Recently, interest in natural pigments is increasing that can replace artificial synthetic pigments. Unlike artificial synthetic pigments, natural pigments have low toxicity to the human body and less side effects on the skin. They also have antibacterial, anticancer, and antioxidant functions. However, they have limitations such as reproducibility, problems of standardization, instability of raw material supply, and expensive raw material costs. Among natural pigments, phycoerythrin is a representative pink pigment. It is one of the brightest pink pigments in nature. A typical method for extracting phycoerythrin pigments is to extract from red seaweed with an organic solvent such as ethanol. However, because of the reproduction of spores, various spores exist in the seaweed and it is difficult to extract only from the same group of seaweed, which makes it difficult to maintain a uniform pink color. Therefore, the purpose of this study is to examine the safety and

functionality of expressing phycoerythrin by protein recombination technology, and then to figure out the replaceability of phycoerythrin as a commercial pigment by comparing the artificial synthetic pigments with the surface coloration

The experimental method of this study is after transforming *Escherichia coli* using cDNA genes of Hox1, pebS, HT-cpcA, cpcE, cpcF, which are responsible for phycoerythrin biosynthesis and pACYCDuet1, pETDuet1, pCDFDuet1, which are DNA transporter plasmid vectors, and to perform SDS-PAGE and to confirm whether the expression of phycoerythrin is well performed. After the expression of phycoerythrin protein was confirmed, the phycoerythrin expressed therein after culture was purified through IMAC using a mass culture fermenter. To test the safety and functionality of phycoerythrin, cytotoxicity test of MTT assay was performed, and antioxidant efficacy test of Anti-oxidant Assay and whitening efficacy test of Melanin inhibitory assay were performed. After lip gloss containing phycoerythrin and artificial synthetic pigments was made, L\*, a\*, and b\* values were compared and analyzed using a spectrophotometer.

First, as a result of the expression of phycoerythrin using phycoerythrin biosynthesis enzyme and vector by recombination technology, and measuring the weight of water through mass culture, approximately 8.31 g/L of *E. coli* was gathered. As a result of purification of phycoerythrin in *E. coli*, a purification yield was 10.06mg/g of *E. coli* and the purity was as high as 97.7%. The extracted phycoerythrin showed maximum absorption at a wavelength similar to that obtained in nature.

Second, MTT test using HaCaT was conducted to confirm the effect of purified phycoerythrin on cytotoxicity. As a result of the test, there was no cytotoxicity. Rather, the higher the process concentration, the higher the cell viability.

Third, as a result of performing an anti-oxidant assay to see if purified phycoerythrin is capable of removing active oxygen as an anti-aging material, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> concentration was removed at a high concentration.

Fourth, as a result of performing a melanin inhibitory assay to confirm whether phycoerythrin is possible as a whitening material, phycoerythrin inhibited melanin synthesis in a concentration-dependent manner and had a whitening effect.

Fifth, in order to confirm whether phycoerythrin has possibility on commercialization as a pigment, a lip gloss was made and was compared of surface coloration with that containing artificial synthetic pigments. As a result, there was little difference from the lip gloss containing artificial synthetic pigments.

To summarize, it was confirmed that the production of phycoerythrin natural pigments protein using genetic recombination technology is similar to that of naturally extracted phycoerythrin protein. The separated and purified phycoerythrin protein has no skin cell toxicity and has antioxidant and whitening effects, suggesting the possibility of being a high-performance anti-aging natural material that goes beyond simple natural pigments.