

## *S. platensis*로부터 phycobiliprotein의 분리에 관한 연구

김점지 · 김윤경 · 이미영

### Studies on the Isolation of Phycobiliprotein from *S. platensis*

Kim, Jum-Ji, Kim, Yoon-Kyoung and Lee, Mi-Young

**요 약** *S. platensis*로부터 phycobiliprotein을 30-60% 황산암모늄 분별침전법과 Sephadex G-100 gel filtration 및 DEAE-Sephacel anion exchange chromatography의 순서로 4.23의 정제도로 분리하였다. 분리된 phycobiliprotein은 최대흡수 파장이 620 nm인 c-phycoyanin이었다. 분리된 phycobiliprotein은 SDS-PAGE상에서  $\alpha$ 와  $\beta$ 의 두개의 소단위체로 구성되어 있으며,  $\alpha$ 와  $\beta$  소단위체의 분자량은 각각 14.5 kDa과 16 kDa 부근이었다. 또한 gel filtration을 사용한 변성 전 분자량은 약 100 kDa이었다. 이러한 결과는 본 연구에서 분리한 phycobiliprotein이  $(\alpha\beta)_3$ -trimer로 이루어졌음을 보여준다.

**Abstract** Isolation of phycobiliprotein from *S. platensis* was performed by using 30-60% ammonium sulfate fractionation, Sephadex G-100 gel filtration and DEAE-Sephacel anionic exchange chromatography. Isolated phycobiliprotein was determined to be a c-phycoyanin with a maximum absorption wavelength at 620 nm. This phycobiliprotein consisted of  $\alpha$  and  $\beta$  subunit when analyzed through SDS-PAGE. The molecular weights of  $\alpha$  and  $\beta$  subunit were 14.5 kDa and 16 kDa, respectively. The native molecular weight of phycobiliprotein through gel filtration was about 100 kDa. These results show that the structure of phycobiliprotein from *S. platensis* might be aggregated form of  $(\alpha\beta)_3$ -trimer.

**Key Words** : Isolation, *S. platensis*, Phycobiliprotein

### 1. 서 론

20세기 급속한 산업화과정에서 무분별한 에너지사용과 자원의 이용에 따라 토양, 하천, 해양 등의 자연환경이 극심하게 오염되는 결과를 초래하여 지구생태계를 크게 위협하게 되었다. 따라서 21세기에 들어서면서 자원 및 에너지 절약형, 친환경적 산업이 주목받기 시작하면서 생명공학이 새로운 시대의 패러다임에 적합한 첨단산업으로 부각되었고, 타 업에 비해 고부가가치 제품을 생산하는 특징이 있어 세계 각국이 치열한 기술개발경쟁에 돌입해 있는 상황이다.

생명공학 물질생산의 원료로서 해양미세조류는 지상 식물 보다 훨씬 빨리 성장하고 생균체 생산성이 높으며 담수나 해수는 물론이고 빛 에너지를 확보할 수 있는 자연 환경에서는 쉽게 생육할 수 있다[1]. 뿐만 아니라 다양한 조류 중에서 단백질, 지질, 당질, 색소와 같은 산업적으로 중요한 고분자 물질과 특정의 생리활성 물

질을 고농도로 생산할 수 있다는 점 등에서 중요한 생물산업 소재로 가능성이 충분하다고 할 수 있다[2]. 해양 미세조류를 사용한 생명공학적인 연구로는 크게 생물소재로서 biomass 자체를 이용하는 방법과 미세조류가 생산하는 기능성물질을 이용하는 방법이 있다. 국내의 경우 자연환경이 미세조류의 배양에 적합하지 않으므로 실내 배양장치의 개발을 중심으로 대량으로 biomass를 생산하거나 혹은 고부가 기능성물질을 생산하는 연구가 기초적인 수준에서 진행되고 있다[3, 4]. 미세조류의 대량 배양을 통해 얻어진 biomass는 가축이나 어류의 사료첨가제, 식품용 천연색소, 의약품 원료 및 건강식품등의 생물제품으로 개발될 수 있다. 현재 다양한 미세조류를 이용하여 기능성 물질을 생산하는 연구가 활발하게 진행되고 있는데 특히 *Chlorella*, *Spirulina*, *Porphyridium*, *Dunaliella*등이 단백질원 뿐만 아니라, 비타민, 고도불포화지방산, 당 및 색소의 생산 소재로서 유용하게 사용되고 있다[5, 6]. 미세조류가 생산하는 대표적인 색소는 carotenoid로서 carotenes와 xanthophylls로 대별된다. 그중 상업적인 가치를 널리 인정받고 있는 것은 *Dunaliella* 등이 생산하고 있는  $\beta$ -carotene으로서 항

\*순천향대학교 생명과학부  
E-mail : miyoung@sch.ac.kr

암, 항산화, 노화억제 등 다양한 활성을 가지고 있다. Xanthophylls과 lutein도 최근 새롭게 대두되고 있는 중요한 기능성 색소이다[7].

*S. platensis*는 남조류로 다세포이며 다른 녹조류나 홍조류에 비해 크고 운동성이 있으며 알칼리성 염수 호수에 널리 생육한다[8]. *S. platensis*는 균체의 60% 이상이 단백질로 구성되어 있어 주요한 단백질원으로 이용될 수 있고, 지질 중 GLA(gamma linolenic acid, C<sub>18:3</sub>) 함량이 높아 생리활성물질로도 이용 가능하다[3]. 또한 *S. platensis*는 phycobiliprotein이라는 형광성 단백질색소를 다량 함유하고 있다[9]. *S. platensis* 뿐만 아니라 cyanobacteria와 홍조류의 광수용체인 phycobilisome를 구성하는 phycobiliprotein은 형광성 단백질색소로서 식품이나 화장품의 첨가제와 의료용 진단시약으로 일부 국가에서는 이미 이용되고 있다. Rhodophyta나 Cryptophyta, 그리고 Cyanobacteria 등이 생산하는 phycobiliprotein에는 적색의 phycoerythrin과 청색의 phycocyanin 등이 있다. Phycobiliprotein은 단백질색소로서 항암, 항노화, 항HIV, 항염증 등의 다양한 생리활성을 가지고 있다고 보고되어 있다[10, 11]. 이 중에서도 c-phycoerythrin은 청색의 천연 색소로 다양한 생리활성을 가지는 것으로 밝혀져 있어 식품 산업이나 생리활성 물질 소재로 개발되어 있다[12, 13]. 그리고 immunomodulating activity, anticancer activity와 같은 질치료적인 가치뿐만 아니라 형광을 방출하는 특성을 지니고 있기 때문에 면역학적 진단을 위한 phycofluor probe로 개발될 수 있다[14, 15].

본 연구에서는 *S. platensis*로부터 phycobiliprotein을 분자체 크로마토그래피와 음이온 교환 크로마토그래피법을 사용하여 단일단백질피로 분리하였고 단백질 수준에서의 기초적인 특성을 조사하였다.

## 2. 실험재료 및 방법

### 2.1 단백질 색소의 추출

*S. platensis* 1.6 g을 막자사발에 넣고 액체질소로 파쇄한 후 0.1 M sodium phosphate buffer(pH 7.0) 5 ml을 가한 다음 파쇄하였다. 파쇄 후 최종 부피가 70 ml이 되도록 동일한 완충액을 가하여 30분간 교반한 후 4°C에서 하루 동안 방치한 다음 3,500 rpm에서 5분 동안 원심분리하였다. 100 ml 상등액에 황산암모늄 0~30%를 서서히 첨가하면서 교반한 후 10,000 rpm에서 10분 동안 원심분리하여 침전물을 제거하였다. 상등액에 다시 황산암모늄 30~60%를 첨가하여 교반한 후 원심분리(10,000 rpm, 10 min, 4°C)하여 색소단백질을 분획침전한 후 0.1 M sodium phosphate buffer(pH

7.0) 15 ml을 첨가하여 녹였다. 불용성 단백질을 제거하기 위해 다시 한 번 원심분리한 후 상층액을 취하여 투석막에 넣고 위와 동일한 완충액으로 4°C에서 8시간 투석한 후 크로마토그래피에 사용하였다.

### 2.2 Sephadex G-100 gel filtration

위에서 투석시킨 단백질을 0.1 M sodium phosphate buffer(pH 7.0)로 평형화시킨 Sephadex G-100 column (1.5 × 100 cm)에 주입하고 동일한 완충액으로 용출시켰다. 이때의 유속은 20 ml/hr이었으며 분획의 크기는 2 ml이었다.

### 2.3 DEAE-Sephacel ion exchange chromatography

위 과정에서 얻어진 분획된 시료들을 모아서 50 mM sodium phosphate buffer(pH 8.0)로 평형화 되어있는 DEAE-Sephacel ion exchange column (3 × 20.5 cm)에 주입하고 50 mM sodium phosphate buffer(pH 8.0)으로 column에 결합되지 않은 단백질을 씻어낸 후, 0~1 M NaCl이 포함된 50 mM sodium phosphate buffer (pH 8.0)의 농도구배로 용출시켰다. 이때의 유속은 20 ml/hr이었으며 분획의 크기는 2 ml이었다.

### 2.4 스펙트럼 특성과 단백질 정량

스펙트럼 특성을 UV-VIS spectrophotometer(Jasco V-550)로 300-700 nm 범위에서 확인하였고 c-phycoerythrin의 존재 확인을 위하여 620 nm에서의 흡광도를 측정하였다. 단백질농도는 Bradford법으로 측정하였다[16].

### 2.5 SDS polyacrylamide gel electrophoresis

정제과정을 통해 얻어진 분획된 각 시료들은 단백질 정량 후에 0.06 M Tris-HCl(pH 6.8), 2% SDS, 14.4 mM β-mercaptoethanol, 25% glycerol, 0.1% bromophenol blue가 들어있는 sample buffer와 잘 섞은 후 100°C 불에서 증탕하여 5분간 가열한 후 단백질을 완전히 변성시켰다. 시료와 표준 단백질 시료를 5% acrylamide로 된 stacking gel 그리고 15%의 separating gel을 포함하는 slab gel에 주입하여 전기이동을 수행하였으며 전압은 170 V로 유지해 주었다.

### 2.6 Glycoprotein 염색

전기이동이 끝난 후 SDS-polyacrylamide gel을 25%(v/v) isopropanol, 10% (v/v) acetic acid 용액에 넣고 하루 동안 세척하였다. 이때 용액은 1시간에 한 번씩 갈아주었다. 세척이 끝난 다음 0.2% periodic acid 용액에 넣고 4°C에서 45분간 방치한 후 증류수로 충분히

히 씻어주고 이 gel을 schiff's reagent에 넣고 4°C에서 45분간 방치한 뒤 10% acetic acid 용액에 gel을 넣어 탈색시켰다[17].

**2.7 SDS-polyacrylamide gel electrophoresis를 이용한 분자량 측정**

정제한 효소액의 순도와 분자량을 확인하기 위하여 SDS-PAGE 방법을 사용하였다[18]. 표준 단백질로는 myosin(205 kDa), β-galactosidase(116 kDa), phosphorylase b(97 kDa), fructose-6-phosphate kinase (84 kDa), bovine serum albumin(66 kDa), glutamic dehydrogenase(55 kDa), ovalbumin(45 kDa), glycerol dehyde-3-phosphate dehydrogenase(36 kDa), carbonic anhydrase(29 kDa), trypsinogen(24 kDa), trypsin inhibitor(20 kDa), α-lactalbumin(14.2 kDa), aprotinin(6.5 kDa) 등이 혼합되어 있는 제품을 사용하였다. 전개가 끝난 후 gel을 0.125%(w/v) coomassie brilliant blue R-250이 들어 있는 염색 용액에 약 3시간 동안 염색시킨 후 50% 메탄올과 10% 아세트산이 들어 있는 탈색 용액에서 3시간, 5% 메탄올과 7% 아세트산이 들어 있는 탈색 용액에서 하루 동안 충분히 탈색시켰다. Gel에 나타난 띠의 이동 거리를 측정하고 표준 단백질과 비교하여 분자 크기를 계산하였다.

**2.8 Gel filtration을 이용한 분자량 측정**

순수하게 정제된 c-phycoyanin의 native molecular weight를 결정하기 위해서 0.1 M sodium phosphate buffer(pH 7.0)로 평형화 되어있는 Sephadex G-100 gel filtration column에 β-amylase(200 kDa), albumin(66 kDa), cytochrome c(12.5 kDa)의 표준 단백질을 각각 5%의 glycerin을 함유하고 있는 0.1 M sodium phosphate buffer(pH 7.0)에 녹인 후 하나로 모아서 주입하고 동일한 완충액을 사용하여 20 ml/hr의 일정한 속도로 용출 시켰다. Spectrophotometer로 280 nm에서의 흡광도를 측정하여 각 단백질에 대한 용출 부피를 결정하였다. 그 결과로부터 계산한 partition coefficient (Kav)에 따라서 표준 직선을 그렸으며 순수하게 정제된 c-phycoyanin도 같은 방법으로 Sephadex G-100 gel filtration column에 주입하여 용출되는 부피와 속도를 일정하게 유지하여 280 nm에서의 흡광도 측정한 다음 표준 직선을 이용하여 분자량을 결정하였다.

**3. 결과 및 고찰**

*S. platensis*로부터 색소단백질인 phycobiliprotein을 정제하기 위하여 크로마토그래피에 의한 일반적인 단백

질 정제법을 사용하였다. *S. platensis*의 추출물은 단백질 뿐만 아니라 각종 생체물질의 혼합형태로 존재하므로 단백질 분획만을 분리하기 위하여 황산암모늄 분별 침전을 수행하였다. 0~30%의 황산암모늄을 먼저 처리하여 각종 단백질을 제거한 후 30~60%의 황산암모늄을 첨가하여 phycobiliprotein이 포함된 분획만을 침전시킬 수 있었다. 이 분획을 대상으로 전파장에 걸친 흡수스펙트럼을 측정한 결과 최대흡수파장이 620 nm이었다(Fig. 1). 황산암모늄 분별침전액을 Sephadex G-100 column에 주입하고 100 mM sodium phosphate buffer (pH 7.0)을 사용하여 단백질을 크기에 따라 용출시켰다. 단백질크기에 따라 용출분리된 분획중 푸른 색소단백질을 포함한 분획을 확인할 수 있었다. 크기에 따라 분리된 개별 단백질 분획의 280 nm에서의 흡광도 뿐만 아니라 최대흡수파장이 Fig. 2에 나타나 있다. Fig. 2에서 보여 주듯이 37번에서 53번 분획까지의 최대흡수파장이 620 nm이었으며, 620 nm에서 최대 흡광을 하는 이 지역 단백질 분획을 모두 회수할 수 있었다. 이 부분을 모아서 DEAE-Sephacel anionic exchange chromatography를 실시하였다. Fig. 3에서 보여주듯이 NaCl의 이온강도를 0~1 M의 농도구배 형태로 증가시켜서 phycobiliprotein과 다른 단백질들을 서로 분리할 수 있었다. 좌우대칭형으로 분리된 단백질 피크의 최대 흡수파장도 620 nm

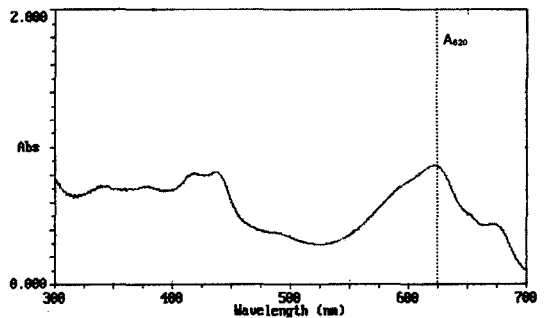


Fig. 1. Absorption spectrum of ammonium sulfate fractionated extract form *S. platensis*

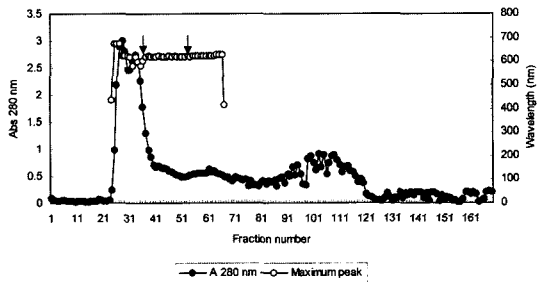


Fig. 2. Sephadex G-100 gel filtration chromatogram of phycobiliprotein from *S. platensis*

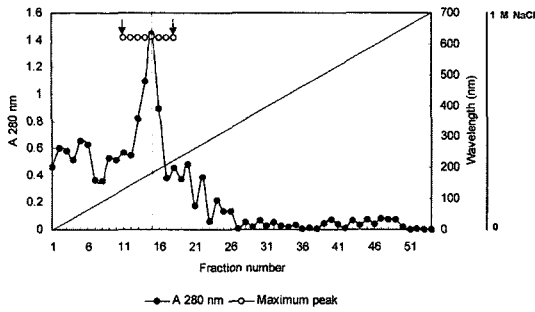


Fig. 3. DEAE-Sephacel ion exchange chromatogram of phycobiliprotein from *S. platensis*

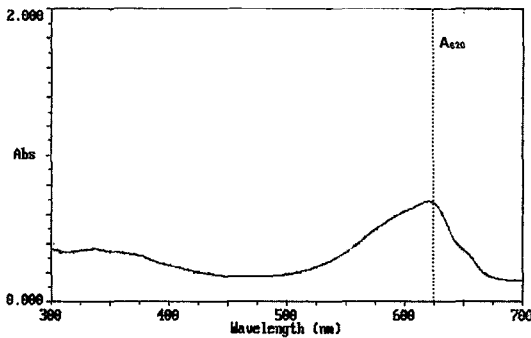


Fig. 4. Absorption spectrum of purified c-phycoerythrin from *S. platensis*

이였으므로 이 지역에서 정제된 청색 phycobiliprotein을 회수할 수 있었다. Fig. 4에는 정제된 phycobiliprotein의 전파장 흡수스펙트럼이 제시되어 있다. 이러한 결과는 본 실험에서 분리한 phycobiliprotein이 청색단백색소인 c-phycoeryth린임을 보여준다. Table 1에는 *S. platensis*로부터 분리한 phycobiliprotein의 정제단계별 정제도와 수득률이 계산되어 있다. 총 정제단계에서 620 nm/280 nm의 흡광도 비율을 기준으로 c-phycoeryth린의 정제도를 계산한 결과 최종 정제도는 4.23이었다. 또한 단백질 양을 기준으로 하여 약 0.96%의 수득률로 색소

단백질을 획득할 수 있었다. SDS-PAGE법을 사용하여 정제단계별로 단백질 분리 정도를 살펴본 결과 Fig. 5와 같이 크로마타그래피 단계를 거치면서 단백질 띠 중

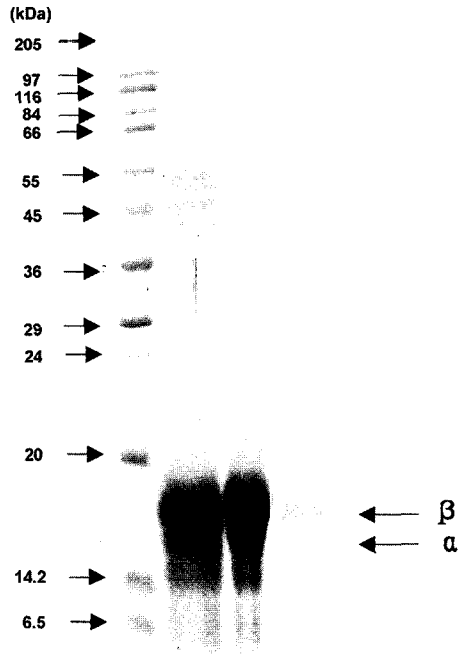


Fig. 5. SDS-polyacrylamide gel electrophoresis of phycobiliprotein from *Spirulina* sp. Lane 1: molecular weight markers [myosin(205 kDa),  $\beta$ -galactosidase(116 kDa), phosphorylase b(97 kDa), fructose-6-phosphate kinase(84 kDa), bovine serum albumin(66 kDa), glutamic dehydrogenase(55 kDa), ovalbumin(45 kDa), glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase(36 kDa), carbonic anhydrase(29 kDa), trypsinogen(24 kDa), trypsin inhibitor(20 kDa),  $\alpha$ -lactalbumin(14.2 kDa), aprotinin(6.5 kDa)], lane 2: crude proteins, lane 3: eluate from Sephadex G-100 column, lane 4: eluate from DEAE-Sephacel column.

Table 1. The Purification of c-Phycocyanin from *S. platensis*.

Purification step	Total protein (mg)	Yield (%)	Absorbance ratios (nm)	Purification fold
			620/280	
Crude extracts	248	100	0.509	1
30-60% Ammonium Sulfate	119.6	48.2	0.719	1.4
Gel Filtration	34.67	13.9	1.271	2.5
DEAE-Sephacel	2.4	0.96	2.157	4.23

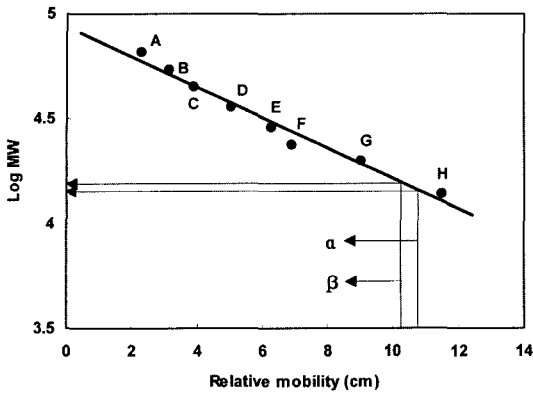


Fig. 6. Determination of the molecular weight of phycobiliprotein by SDS-PAGE. A : bovine serum albumin(66 kDa), B : glutamic dehydrogenase(55 kDa), C : ovalbumin(45 kDa), D : glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase(36 kDa), E : carbonic anhydrase(29 kDa), F : trypsinogen(24 kDa), G : trypsin inhibitor(20 kDa), H :  $\alpha$ -lactalbumin(14.2 kDa),  $\alpha$  : 14.5 kDa,  $\beta$  : 16 kDa.

류가 감소하였으며, DEAE-Sephacel에서 획득된 분획에서 최종적으로 두개의 단백질 띠가 나타났다. 따라서 본 실험에서 분리한 청색 phycobiliprotein은  $\alpha$ 와  $\beta$  소단위체의 두개의 소단위체로 구성되어 있음을 알 수 있다. 각 소단위체의 분자량을 측정된 결과 Fig. 6에서 보여주듯이  $\alpha$  소단위체와  $\beta$  소단위체의 분자량은 각각 약 14.5 kDa와 16 kDa으로 나타났다. 따라서 본 실험에서 분리한 phycobiliprotein의 최소 분자량은 약 30.6 kDa임을 알 수 있다. Blue green-alga인 *Anabaena sp.*[19]와 *Mastigocladus laminosus*[20]의 phycobiliprotein 분자량은 각각 36 kDa와 28 kDa로 보고되어 있다. 대다수 생물체의 phycobiliprotein은 두개의 소단위체로 이루어져 있으며 3차 구조가 중간에 서로 잘 보존되어 있다고 보고되어 있다[21].  $\alpha$ 와  $\beta$  두개의 소단위체는 높은 친화도를 가지고 서로 쉽게 결합할 수 있을 뿐만 아니라 ( $\alpha\beta$ )<sub>3</sub>-trimer와 ( $\alpha\beta$ )<sub>6</sub>-hexamer로도 쉽게 전환되어 광수용을 위한 복합체를 형성한다고 알려져 있다[22]. 또한 2개의 ( $\alpha\beta$ )<sub>6</sub>-hexamer가 비대칭적으로 위치하는 크리스탈 단위 구조가 결정되어있다[23]. Fig. 7에는 Sephadex G-100 gel filtration으로 phycobiliprotein의 변성전 분자량을 측정된 결과가 제시되어 있다. Fig. 7에서 알 수 있듯이 phycobiliprotein의 변성전 분자량은 약 100 kDa으로 측정되었다. SDS-PAGE로 측정된 변성후의 최소분자량과 Sephadex G-100 gel filtration을 통하여 측정된 변성전의 분자량을 서로 비교해 본 결과 본 실험에서 분리한 phycobiliprotein은 ( $\alpha\beta$ )<sub>3</sub>-trimer 구조로

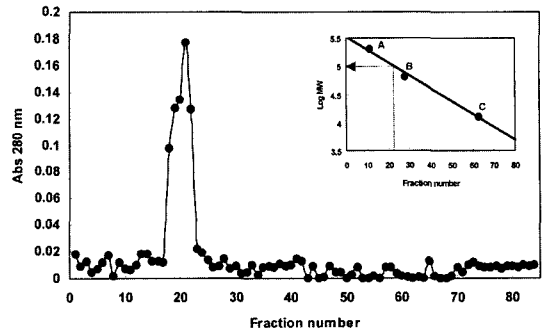


Fig. 7. Determination of the native molecular weight of phycobiliprotein by calibrated Sephadex G-100 gel filtration. A :  $\beta$ -amylase(200 kDa), B : albumin(66 kDa), C : cytochrome c(12.5 kDa).

이루어진 단백질임을 추측할 수 있다. 따라서 본 실험에서 *S. platensis*로부터 분리한 c-phycocyanin은 기존에 보고된 c-phycocyanin의 분자량과 서로 차이가 있음을 알 수 있다. Phycobiliprotein의 당단백질 여부를 알아보기 위해 당염색을 수행해본 결과 당부분이 염색되지 않았다. 이 결과를 통하여 c-phycocyanin은 당성분과 결합되어 있지 않음을 확인할 수 있었다(결과 미제시). c-Phycocyanin의 amino acid 구성은 주로 aliphatic 잔기로 구성되어 있다고 알려져 있으며[24] Glazer에 의하여 보고된 바로는[25] *Phormidium luridum*, *Spirulina maxima*와 *Oscillatoria aghardii*의 c-phycocyanin도 이와 비슷한 amino acid 구성을 나타내고 있었다[26].

본 실험에서는 *S. platensis*로부터 phycobiliprotein을 순수하게 분리하였으며 기초적인 수준에서의 특성을 통하여 이 단백질이 청색의 c-phycocyanin임을 확인할 수 있었다. 현재 단백질 수준에서의 구조와 특성을 규명하고 있으며 이를 통하여 산업적인 활용 및 응용가능성도 탐색하고자 한다.

#### 4. 결 론

본 연구에서는 *S. platensis*로부터 색소단백질인 phycobiliprotein을 황산암모늄 분별침전법과 gel filtration 및 DEAE-Sephacel chromatography의 순서대로 단계별 크로마토그래피를 실시하여 순수정제하였다. 정제된 단백질은 최대 흡수파장이 620 nm인 phycocyanin이었으며 소단위체 분자량을 측정된 결과( $\alpha\beta$ )<sub>3</sub>-trimer 형태로 구성되어 있었으며, 기존에 알려진 다른 phycobiliprotein과 소단위체 분자량이 상이하였다.

## 감사의 글

본 과제는 박슬기의 연구보조로 수행되었으므로 이에 감사합니다.

## 참고문헌

- [1] J. R. Benemann, et al., "Microalgae biotechnology", TIBTECH., 5, 47-53, 1987.
- [2] M. Kishimoto, et al., "CO<sub>2</sub> Fixation and oil production using Micro-Algae", J. Ferm. & Bioen., 78, 479-482, 1994.
- [3] M. Piorreck, et al., "Biomass production, total protein, chlorophylls, lipids and fatty acids of freshwater green and blue-green algae under different nitrogen regimes", Phytochemistry, 23, 207-216, 1984.
- [4] J. R., Benemann, "The future of microalgal biotechnology", In Cresswell (eds.), Algal and Cyanobacterial Biotechnology. Longman Scientific & Technical, Harlow, 1989.
- [5] O. Ciferri, "Spirulina, the edible microorganism", Microbiol. Rev., 47, 551-578, 1983.
- [6] M. A. Borowitzka, "Algal biotechnology products and process", Matching science and economics. J. Appl. Physicol., 4, 267-279, 1992.
- [7] A. Ben-Amotz and M. avron, "Glycerol,  $\beta$ -carotene and dry algal meal production in commercial cultivation of *Dunaliella*", In Algae Biomass, ed., G. Shelef & C. J. Soeder, pp. 603-610, Elsevier/North Holland Biomedical Press, 1980.
- [8] J. M. Melack, "Photosynthetic and growth of *Spirulina platensis* (Cyanophyta) in an equatorial lake (Lake Simbi, Kenya)", Limnology and Oceanography, 24, 753-760, 1979.
- [9] A. N. Glazer, "Light harvesting by phycobilisomes", Ann. Rev. Biophys. Chem., 14, 47-77, 1985.
- [10] H. Mizuno, et al., "Identification of phycocyanin isolated from *Porphyra tenera* and *Porphyra yezoensis*", Bul. Jap. Soc. Sic. Fish., 48, 917-974, 1982.
- [11] E. Gantt, et al., "Phycobilisome from blue green and red algae. Isolation criteria and dissociation characteristic", Plant Physiol., 63, 615-620, 1979.
- [12] O. Ciferri and O. Tiboni, "The biochemistry and industrial potential of *Spirulina*", Ann. Rew. Microbiol., 39, 503-526, 1983.
- [13] Dainippon Ink and Chemicals, "Lina blue A (Natural blue colorant of *Spirulina* origin), Technical information", Tokyo, Japan: Dainippon Ink and Chemicals, 1985.
- [14] N. Iijima and H. Shimamatsu, "Antitumor agent and method of treatment there-with, US patent pending", Ref 1150-726-A82679, Appl. 15, 1982.
- [15] M. N. Kronick and A. R. Grossman, "Immunoassay techniques with fluorescent phycobiliprotein conjugates", Clin. Chem., 29, 1582-1586, 1983.
- [16] M. M. Bradford, "A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dyebinding", Anal. Biochem., 72, 248-254, 1976.
- [17] J. F. A. McManus, "Histological and histochemical uses of periodic acid", Stain Technol., 23, 99-108, 1948.
- [18] U. K. Laemmli, "Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4", Nature, 227, 680, 1970.
- [19] A. N. Glazer and G. Cohen-Bazire, "Sub-unit structure of phycobiliproteins of blue-green algae", Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A., 248, 659-662, 1973.
- [20] A. Binder, et al., "C-phycocyanin from the thermophilic blue-green alga *Mastigocladus laminosus*", FEBS Lett., 20, 111-116, 1972.
- [21] A. N. Glazer, "Light guides. Directional energy transfer in al photosynthetic antenna", J. Biol. Chem., 264, 1-4, 1989.
- [22] D. A. Bryant, et al., "The structure of cyanobacterial phycobilisomes: a model", Arch. Microbiol., 123, 113-127, 1979.
- [23] A. K. Padyana, "Crystal structure of a light-harvesting protein c-phycocyanin from *spirulina platensis*", Biochem. Biophysic. Res. Communi., 282, 893-898, 2001.
- [24] S. Boussiba and A. E. Richmond, "Isolation and characterization of phycocyanins from the blue-green alga *spirulina platensis*", Arch. Microbiol., 120, 155-159, 1979.
- [25] A. N. Glazer, "Phycocyanins: structure and function", Photochem. Photobiol. Rev., 1, 71-115, 1976.
- [26] G. Cohen-Bazire, et al., "Physicochemical and immunological properties of allophycocyanins", Arch. Microbiol., 111, 225-238, 1977.