

돌연변이를 통한 미세조류 *Haematococcus pluvialis*의 Astaxanthin 생산성의 향상

박복준 · 김법민 · 심수현 · 김정동 · 이철균*
인하대학교 공과대학 생물공학과/생물산업기술연구소

Enhancement of Astaxanthin Production of *Haematococcus pluvialis* by Mutation. Park, Bok-Jun, Beob-Min Kim, Su-Hyun Shim, Jeong-Dong Kim, and Choul-Gyun Lee*. *Institute of Industrial Biotechnology, Department of Biological Engineering Inha University, Incheon 402-751, Korea* – *Haematococcus pluvialis* is a great producer of astaxanthin (3,3'-dihydroxy- β , β -carotene-4,4'-dione). The activities of astaxanthin include potential cancer prevention, immune response enhancement, antioxidant activity, and so on. Nevertheless, it tried to manipulate by mutation for overcoming low growth rate of wild type and limited production of astaxanthin. Mutated colony that is lager and more reddish one than wild type was selected by attempting to expose strains to UV irradiation and to treat chemical such as EMS and colchicines as mutagen. Selected mutants were further screened using inhibitors of the carotenoid biosynthetic pathway. Inhibitors used were nicotine and diphenylamine and both had decreased the survival rate by 40-50%. Among over 50,000 mutant colonies screened, two strains were selected. One selected mutant strain (U15-5) from UV treatment showed 1.68-fold higher total carotenoid contents per cell than that of the wild type strain. On the other hand, the other selected mutant strains (DS, M4-3) from colchicine treatment showed 20~30% faster cell growth than the wild type strain.

Key words: *Haematococcus pluvialis*, mutation, astaxanthin productivity

현재까지 약 400여 종이 밝혀져 있는 carotenoid는 노란 색 혹은 빨간색의 지질체통의 색소로 polyene과 말단의 ring 구조의 차이에 따라 구분된다[16]. 그 중 분자량 596.85, 융점 183°C로 polyisoprenoid, oxygen quenching 기능을 가진 benzenoid ring 결합체인 astaxanthin(3,3'-dihydroxy- β , β -carotene-4,4'-dione)은 양식산업에 있어 천연색소로 중요한 첨가제 역할을 하며 상업적으로 아주 유용한 물질로 주목 받고 있다[2-5, 18]. 특히 인체 내에서 vitamin A의 전구체 역할을 하며, 다른 carotenoid 보다 최소한 10배, vitamin E인 α -tocopherol 보다 500배 이상의 항산화 활성을 가지고 있는데 이것은 C-4와 C-4'에 위치한 oxo- 그룹 때문이라고 보고되어 있다[12, 14, 17]. 또한 cytokine 유도 활성으로 인한 면역기능 활성화, oxygen radical의 제거에 의한 cancer initiation과 propagation의 과정을 감소시켜 난소암, 간암 등의 예방 효과 등이 입증되어 의료 및 화장품 산업에도 상당한 가치가 인정되고 최근 많은 관심을 받고 있는 물질이다 [6-8, 18].

근래 미생물, 식물, 동물 등으로부터 유래한 유용 유전자가 유전자 조작에 의해 도입되어 유용물질을 대량 생산하게 되었고 미세조류의 경우도 광합성 기작 연구를 위한 여러 형

태의 유전자 조작기술이 개발되고 있다[9]. 돌연변이 유발원으로 α , β , γ , X선과 같은 이온화 방사선이나 자외선 등의 물리적 돌연변이 유도물[20, 21]과 알킬화 화합물, 과산화물, 퓨린유도체, 발암물질, 콜히친(colchicine) 등의 화학적 돌연변이 유도물이 있다[10, 18].

본 연구는 astaxanthin의 생산량 향상을 위하여 물리적 방법인 UV 조사와 화학적 방법인 ethyl methanesulfonate (EMS)와 colchicine을 이용하여 돌연변이를 유도하여 다양한 종류의 돌연변이를 확보하고, 그 중 균체성장이 빠르거나 astaxanthin 축적효율이 우수한 돌연변이주의 획득을 시도하였다.

재료 및 방법

사용균주 및 배양방법

본 연구에 사용된 미세조류는 *Haematococcus pluvialis* UTEX 16로 UTEX Culture Collection of Algae at the University of Texas(Austin, TX, USA)에서 분양 받았다. 접종균주의 배양은 Modified Bold's Basal Medium을 사용하였으며, 1 liter의 조성은 다음과 같다: NaNO₃ 0.2465 g, CaCl₂ 2H₂O 0.0249 g, MgSO₄ 7H₂O 0.07395 g, K₂HPO₄ 0.07490 g, KH₂PO₄ 0.175 g, NaCl 0.02513 g, C₁₀H₁₆N₂O₈ (EDTA) 0.04968 g, KOH 30.86 mg, FeSO₄ 7H₂O 4.98 mg, H₂SO₄ 0.98 mg, H₃BO₃ 11.13 mg, ZnSO₄ 7H₂O 8.83 mg,

*Corresponding author

Tel: 82-32-860-7518, Fax: 82-872-4046

E-mail: leecg@inha.ac.kr

MnCl₂ 4H₂O 1.44 mg, MoO₃ 6.06 mg, CuSO₄ 5H₂O 1.57 mg, Co(NO₃)₂ 6H₂O 0.49 mg, Na₂MoO₄ 2H₂O 1.19 mg. MBBM 배지를 250 mL Erlenmeyer flask에 110 mL의 부피로 넣고 광도 40 μE/m²/s, 교반속도 175 rpm, 온도 25°C를 유지하며 배양한 후 4일마다 계대배양하였다[9].

돌연변이주를 얻기 위한 실험에서는 야생종을 각각의 mutagen 처리 후 MBBM 1.5% agar plate에 200 μM nicotine과 15 μM diphenylamine을 넣어 carotenoid 저해물질로 selection pressure를 주었고, 자체 변형한 광 CO₂ 배양기 안에서 온도 25°C, 40 μE/m²/s의 광도로 2%의 이산화탄소를 공급하며 7~10일간 배양하여 여기서 colony를 얻었으며, 생성된 colony에 광도 200 μE/m²/s를 7일간 조사하여 mutagen 처리를 하지 않은 대조구보다 크기가 크고 더 많은 astaxanthin 형성이 되어 더욱 빨갛게 되는 colony를 찾았다.

선택된 colony들의 우수성을 실제 배양조건에서 확인하기 위해, 각 colony들을 96 well plate의 각각의 well(0.3 mL)에 백금이를 이용하여 옮겼고 기본배양조건에서 적정량의 생장이 이루어지면 점차 24 well plate, 100 mL flask, 250 mL flask까지 배양부피를 증가 시키면서 실험을 위한 돌연변이 seed를 확보하였고, 동시에 돌연변이주의 안정성을 검토하였다.

돌연변이 안정성을 위한 배양실험은 400 mL의 배양부피를 가진 bubble column photobioreactor(지름 40 mm, 높이 600 mm, Pyrex[®] 재질)으로 하였다. 공기에 이산화 탄소 5%를 혼합하여 0.2 vvm의 속도로 공급하였다. 그리고 온도는 25°C, 초기 pH는 7, 접종 농도는 1×10⁴ cells/mL로 배양하였다.

분석방법

세포 농도와 세포 크기는 Coulter Counter(Model Z2, Beckman Coulter, Inc., Fullerton, CA, U.S.A.)를 이용하여 측정하였다. 측정을 위한 샘플 세포는 50~80,000 fL의 범위에서 적당한 희석을 통해 20 mL의 Isoton[®]에 희석하여 3회 측정된 후 평균을 구하였다. 측정된 data는 AccuComp[®] software로 분석하여 세포의 크기 분포도와 입자수로 나타내어 세포 성장과 분화를 측정하였다[18]. Fresh cell weight는 여기서 얻어지는 자료로 바로 계산할 수 있었다. 건조 균체량(g/L)은 시료를 2,000 rpm에서 10분간 원심분리 후 상등액을 버리고 같은 방법으로 증류수로 2회 세척한 후 90°C에서 overnight하여 측정하였다.

Chlorophyll과 carotenoids 및 astaxanthin의 색소 측정은 준비된 시료 1 mL를 원심분리(3,000 rpm, 10 분)후 상등액을 버리고 고순도 acetone 1 mL을 넣고 자체적으로 제작한 homogenizer를 이용하여 2분간 12 strokes로 세포벽을 파쇄하고, 4°C에서 20분간 incubation하고, 원심분리(3,000 rpm, 10분)를 통해 상등액에서 추출된 색소를 측정하였다. Chlorophyll은 분광광도계(Model HP8453B, Hewlett Packard,

Waldbronn, Germany)를 이용하여 663 nm, 645 nm 파장에서 측정하였고 다음과 같은 식으로 계산하였다[18].

$$\text{Chlorophyll } a = (12.7 \times A_{663}) - (2.69 \times A_{645}),$$

$$\text{Chlorophyll } b = (22.9 \times A_{645}) - (4.64 \times A_{663})$$

Carotenoids와 astaxanthin은 최종 농도가 10 mg/L이하가 되도록 희석하여 측정하였고 이 범위에서 보정식은 다음과 같다[15].

$$\text{Astaxanthin concentration (mg/L)} = 0.0045 \times A_{475}$$

질소 농도 (mg-NO₃/L)의 측정은 spectrophotometer를 사용하여 분석하였고 광도의 측정은 Quantum sensor(Model LI-190SA, LI-COR, Inc., Lincoln, NE, U.S.A.)와 Datalogger (Model LI-1400, LI-COR, Inc., Lincoln, NE, U.S.A.)를 이용하여 표면광도를 측정하였다. pH는 pH meter(Model 720P, Istek, Inc., Seoul, Korea)를 이용하였으며 온도는 알코올 온도계를 사용하여 측정하였다.

돌연변이 방법

자외선 처리방법과 EMS 처리방법은 Usha Tripathi방법을 수정하여 사용하였다[19]. 자외선 처리시 clean bench안에서 자체 제작한 길이 450 mm, 높이 350 mm, 폭 310 mm의 검은 아크릴 재질 직육면체 내에 자외선 램프(UV-C 254 nm, 15 W, pilips)를 장착한 자외선 처리기를 사용하였고, 18 cm 거리에서 5~45분 조사하였다. EMS(Ethyl Methanesulphonate)는 sigma사 것을 사용하였으며 준비된 seed(2 × 10⁵ cells/mL) 50 mL를 원심분리 tube에 넣고 증류수로 2회 세척(1,000 rpm, 10 min, centrifugation and resuspension)한 후 세척된 세포에 증류수 40 mL로 채운 뒤 EMS 농도(0, 0.117, 0.468, 0.936% w/v)가 서로 다르게 준비된 30 mL flask에 10 mL씩 분주하였다. 30°C 광진탕배양기에서 1시간 처리한 후 각각 처리된 세포를 증류수로 2회 세척하여 EMS를 완전히 제거하였다. 4°C에서 overnight 후 적당한 희석을 통해 MBBM agar plate에 도말하여 CO₂ 배양기에서 2주 배양(25°C, 40 μE/m²/s)후 colony를 얻었다.

백합과 샤프론속(*Colchicum*)의 식물인 개샤프론(*Colchicum autumnale*)의 종자나 인경에 함유되어 있는 알칼로이드 물질인 colchicine 처리는 식물 육종에 사용한 방법을 변형하였다[1, 11, 13]. 계대배양 후 3일 경과된 vegetative 세포(2.3 × 10⁵ cell/mL)를 원심분리(1,000 rpm, 10 min)하여 pellet을 0.2 μm Minisart[®]를 이용한 filtration된 colchicine용액(0, 25, 50, 100 mg/mL)에 섞고 1일, 2일, 3일, 4일, 8일 동안 25 ± 1°C, dark condition에서 처리하였다. Colchicine 처리 후 각각 50 mL씩 buffer washing과 MBBM washing을 하고 50 mL 원심분리 tube에 넣고 20 mL의 MBBM으로 섞는다. 그 후 준비된 plate에 100 mL씩 분주하여 도말하고 CO₂ 배양기에서 2주 배양(25°C, 40 μE/m²/s)후 colony를 얻었다.

결과 및 고찰

돌연변이 실험

자외선 조사 정도를 결정하기 위하여 3일전 계대배양된 vegetative와 immature 세포를 자외선 램프(UV-C 254 nm, 15W)와 거리를 30 cm로 하여 생존율을 측정한다. 결과는 5분일 때 79.4%, 15분일 때 43.2%, 25분일 때 20.5%의 생존율을 나타내었고 거리가 18 cm일 때에는 5분에서 38.5%, 15분에서 7.5%, 25분에서 1.9%, 35분에서 0.7%의 생존율을 나타내었다(Fig. 1a, b). 생존율이 낮을수록 돌연변이체 발생

빈도를 높기 때문에 자외선과 세포 사이의 조사거리를 18 cm로 결정하였다. 현미경을 통해 UV 조사시간에 따른 세포의 상태는 조사 시간이 길어 질수록 세포의 내부에 검은 점이 생겼고 약간의 형태 일그러짐을 관찰할 수 있었다. 하지만 고체배지상의 colony 모양은 야생종과 비슷하였다.

일차적으로 자외선 처리된 세포들을 carotenoid 생합성 저해물질이 포함된 선별배지에 도달하여 2주간 CO₂ 배양기에서 배양하여 크고 붉은 색상을 띠는 colony들을 선별하였으며 선별한 변이균체 colony들을 3주간 진탕배양기에서 배양하고 1주간 고광도 induction 한 결과를 Table 1에 나타내었

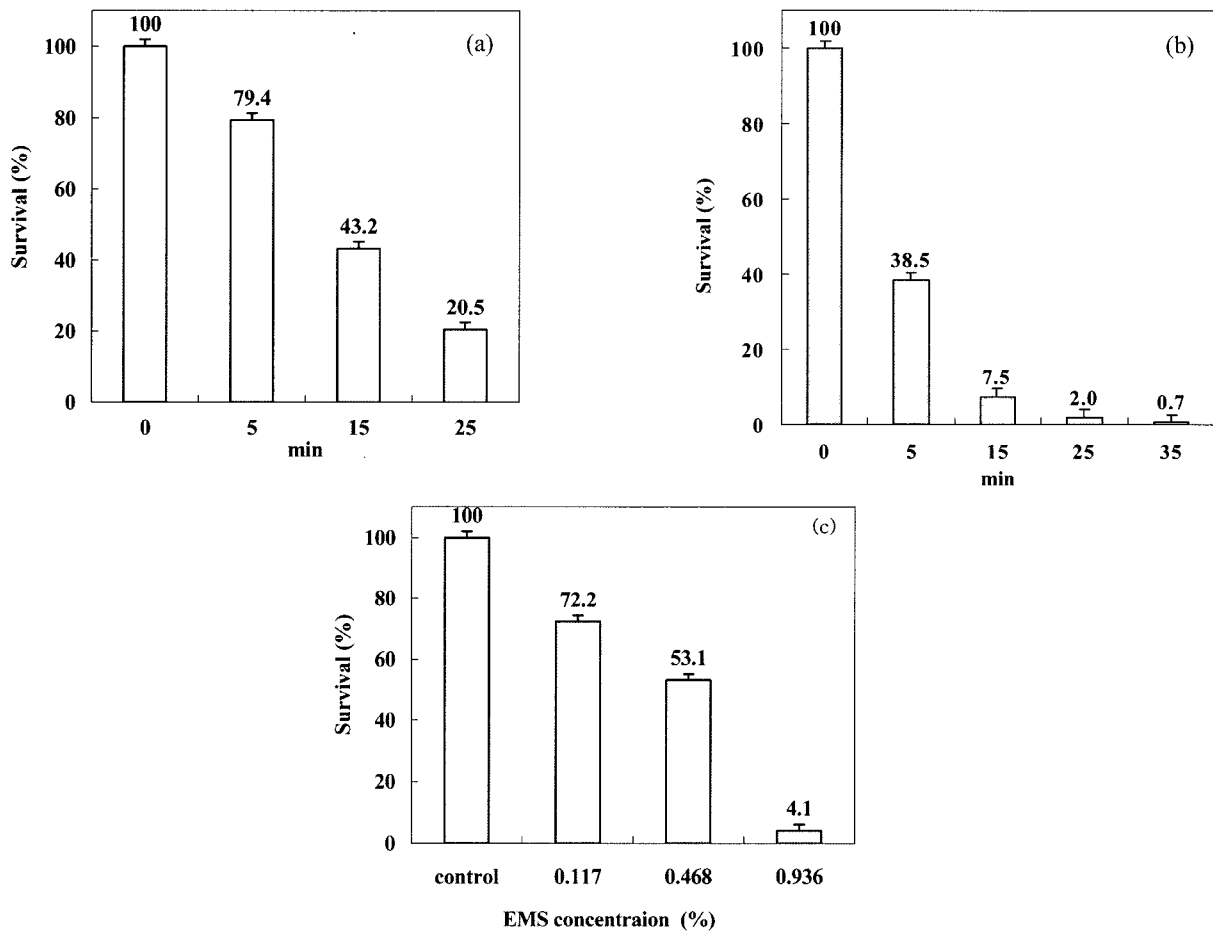


Fig. 1. Effect of UV irradiation and EMS on survival rates: (a) UV irradiation at 30 cm distance, (b) UV irradiation at 18 cm distance and (c) EMS concentration (w/v).

Table 1. Chlorophyll and astaxanthin concentration produced by wild type and UV mutants after 8 days cultivation in 250 mL-Erlenmeyer flasks.

Strain	Wild	U5-2	U5-4	U15-4	U15-5
Astaxanthin (mg/L)	24.37±1.22*	18.19±0.91	23.87±1.19	27.88±1.39	21.47±1.07
Chlorophyll a (mg/L)	2.85±0.14	1.70±0.09	1.34±0.07	2.60±0.13	4.12±0.21
Chlorophyll b (mg/L)	0.95±0.05	0.62±0.03	0.80±0.04	0.89±0.04	1.35±0.07
Cell FCW (g/L)	1.91±0.10	1.13±0.06	1.69±0.08	1.68±0.08	1.57±0.08
Astaxanthin per FCW (%)	1.27±0.06	1.61±0.08	1.41±0.07	1.66±0.08	1.37±0.07

*Data are the mean ± standard deviation from at least three independent assays.

다. 돌연변이균체 중 최대 세포 FCW는 1.6 g/L이었으며, carotenoid의 생성량은 27.88 mg/L이었고, 세포 FCW당 carotenoid 생성량은 1.66%이었다. 선별된 돌연변이체가 세포성장이나 야생종보다 조금 떨어지나 색소의 생성은 변이균체들이 FCW당 astaxanthin량이 야생종보다 1.1~1.3배 우수함을 보였다(Table 1).

Phenotype의 강한 변이체를 생성할 수 있는 mutagen인 EMS를 *H. pluvialis*의 야생종에 처리한 후 세포의 생존율을 알아보았다. Vegetative 상태의 세포를 가지고 EMS처리를 할 경우 완전히 치사하는 결과를 얻어 실험에 사용된 균체는 immature 상태의 *H. pluvialis*를 사용하였으며 EMS 농도는 각각 0, 0.117, 0.468, 0.936%(w/v)로 하였다. 증류수에 넣어 30°C의 온도에서 1시간 처리 하였을 때 각각의 생존율은 100%, 72.2%, 53.1%, 4.1%로 나타났다(Fig. 1c). 세포의 형태는 EMS 농도가 높을수록 심하게 일그러지고 세포가 붉게 변화하는 것을 관찰할 수 있었다. 처리된 세포들은 carotenoid 생합성 저해물질 diphenylamine이 포함된 선별배지에 도달하여 2주간 CO₂ 배양기에서 배양하였다. 그러나 야생종보다 colony 형성기간이 더 길었으며 야생종보다 더 크고 붉은 색상을 띄는 colony를 선별할 수 없었다.

현미경 관찰을 통하여 확인한 *H. pluvialis*의 life cycle은 vegetative, immature, mature 시기의 단계를 거쳐 성장하고 사멸하였다. Colchicine을 통한 돌연변이 유도시기를 결정하기 위하여 vegetative 세포와 immature cyst 세포를 가지고 처리하였다. Colchicine을 vegetative 시기에 처리하였을 때 농도 50 mg/L 이상에서 처리시간이 3일 이상 경과되면 세포치사가 현저해 짐을 알 수 있었고 immature cyst 시기일 때는 오히려 처리시간이 4일 이상이 경과해야 vegetative 시기에서 2~3일 처리할 때 세포가 약간 비대해지는 현상과 같은 변화를 관찰할 수 있었다.

증류수와 MBBM 안에 100 mg/L의 농도로 4일간 colchicine 처리한 세포에서 크고 붉은 colony들을 선별할 수 있었다(Fig. 2). 생성된 colony의 크기가 야생종에 비해 1.5~2배 정도의 큰 균체이었고 diphenylamine에서 선별한 colony의 형태는 야생종과 상이한 형태를 띄었다.

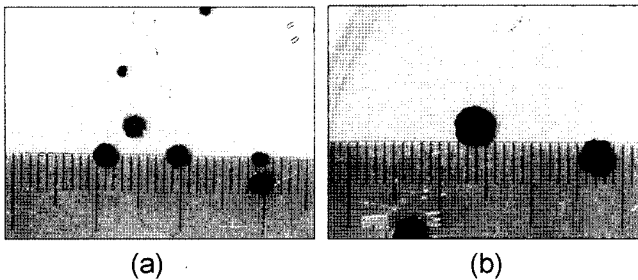


Fig. 2. Red colony size and morphology: (a) red colony of wild type after induction, (b) red colony of colchicine treated cell after induction 2 weeks.

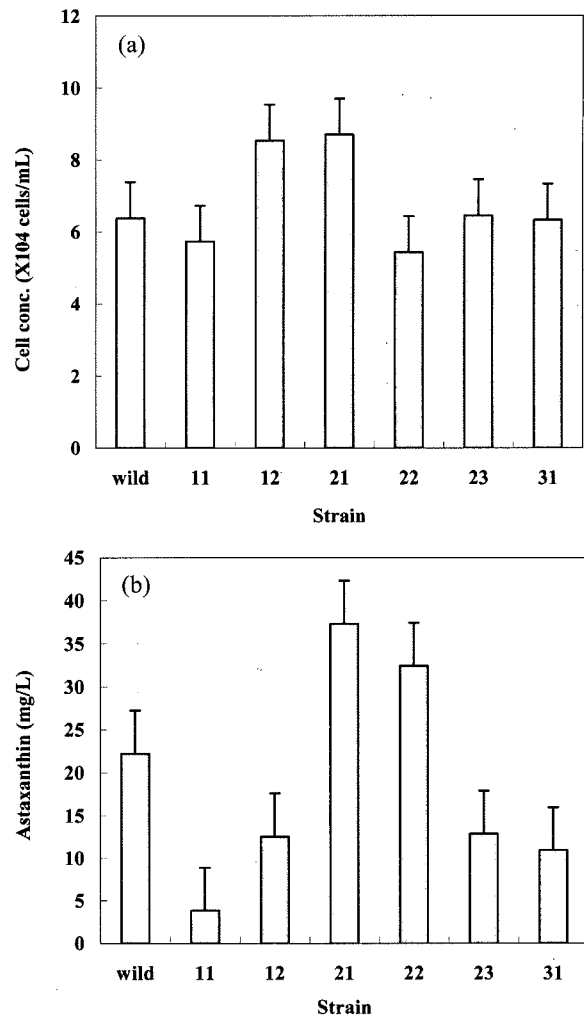


Fig. 3. Cell concentration (a) and total pigments concentration (b) at day 8 of cultivation. 11, 12: UV mutant, 21, 22, 23, 31: Colchicine treated strains after UV treatment.

UV 처리한 돌연변이체에 colchicine 처리

UV 처리한 돌연변이체를 가지고 두 번째 돌연변이를 시도하였다. Colchicine의 농도는 100 mg/L로 8일간 처리한 후 8일간 flask scale로 진탕 배양기에서 배양한 결과 야생종은 6.4×10^4 cells/mL의 농도였고 UV 처리에서 얻은 돌연변이체와 이중 돌연 변이시킨 돌연변이체가 각각 8.5×10^4 cells/mL, 8.7×10^4 cells/mL의 높은 농도를 나타내는 경향을 보였다. 총 색소량은 야생종이 22.2 mg/L를 나타내었으며 이중 돌연변이 처리하여 얻은 균체중 2종(21, 22)이 32.4 mg/L, 37.3 mg/L의 높은 색소농도를 나타내었다(Fig. 3). 색소량이 가장 큰 두 종을 각각 21균주는 UC100-1로 22균주는 UC100-3라고 명명하고 400 mL scale에서 실험을 하여 최종 성장속도와 carotenoid를 측정하기로 결정하였다.

다양한 우수종 배양실험

UV처리로 얻은 돌연변이에서 U15-5를 제외한 U15-4

(Table 1) 종과 같이 우수한 carotenoid 함량을 보인 변이주가 변이특이성이 퇴색하는 현상을 보여 안정성이 높은 1종(U15-5)과 colchicine 처리에서 얻은 돌연변이 2종(M3-4, DS)과 UV 조사 후 colchicine 처리한 돌연변이 2종(UC100-1, UC100-3)을 가지고 세포성장과 chlorophyll, carotenoid 양을 측정하였다. Colchicine 처리를 통해 얻은 돌연변이는 야생종 보다 세포성장이 약 20~30% 이상 높은 경향을 나타내었고 chlorophyll의 농도도 1.3~1.5배 이상 높은 경향을 보여주었다(Table 2). 16일간의 질소원인 nitrate를 공급하는 유기식 배양에서 질소원 공급을 중단하고 175 $\mu\text{E}/\text{m}^2/\text{s}$ 의 고광도 조사를 하는 induction 배양을 1주일 실시한 후의 결과에서 세포성장이 오히려 낮았던 UV 돌연변이가 total carotenoid 양이 221.2 mg/L로 야생종의 195.1 mg/L 보다 13% 증가한 결과를 보였고 건조중량당 astaxanthin 양은 48.8 mg/g DCW로 야생종보다 15% 증가한 경향을 보였다(Table 3).

선별된 우수균체의 배양 안정성 실험

다양한 우수종 배양실험의 결과를 바탕으로 UV 처리 후 colchicine 처리한 돌연변이 2종(UC100-1, UC100-3)을 제외한 나머지 4개의 종을 비교하였다. 세포성장을 관찰한 결과 colchicine 처리를 통해 얻은 돌연변이주 M3-4와 DS는 다양한 우수종 배양실험결과와 같이 야생종 보다 20~30%의 높은 성장속도를 관찰할 수 있었다. 그리고 1주간의 induction

Table 2. Cell concentration and total chlorophyll formation of variation mutant strains.

Strain	1 week culture		3 weeks culture	
	Cell Concentration (g/L)	Chlorophyll (mg/L)	Cell Concentration (g/L)	Chlorophyll (mg/L)
Wild	1.61±0.08	28.53±1.43	4.62±0.23	61.24±3.06
M3-4	2.28±0.11	41.71±2.09	8.75±0.44	77.75±3.89
DS	1.74±0.09	32.65±1.63	6.55±0.33	66.24±3.31
U15-5	1.87±0.09	41.04±2.05	7.00±0.35	85.74±4.29
UC100-1	2.45±0.12	53.31±2.67	6.88±0.34	79.31±3.97
UC100-3	1.48±0.07	33.34±1.67	8.06±0.40	79.91±4.00

Table 3. Total carotenoid and Astaxanthin per DWC production of variation mutant strains after 1 week induction.

Strains	After 1 week induction	
	Total carotenoid (mg/L)	Astaxanthin per DWC (mg/g)
Wild	195.11± 9.76	44.12±2.21
M3-4	215.58±10.78	35.11±1.76
DS	190.67± 9.53	42.70±2.14
U15-5	221.23±11.06	48.81±2.44
UC100-1	176.94± 8.85	36.91±1.85
UC100-3	154.04± 7.70	34.61±1.73

배양 결과는 야생종 232.4 mg/L, DS 212.9 mg/L, M3-4 214.8 mg/L, U15-5 242.2 mg/L의 total carotenoid 양을 보였으며 자외선 처리한 U15-5 돌연변이체는 생체중량당 astaxanthin 양이 47.1 mg/g FCW로 야생종의 27.9 mg/g 보다 1.68배 증가한 경향을 보였다(Fig. 4). 따라서, 최종 선별된 변이 3주에 대해서 배양 안정성이 있다고 사료되었다.

고찰

자외선 돌연변이 실험에서는 Tripathi[19]와 같이 생존율은 자외선 조사 시간이 길어질수록 짧아졌지만 자외선을 5분 조사하여 생존율이 38%일 때와 15분간 자외선을 조사하여 생존율이 7.5%일 때에 야생종보다 더 크고 붉은 colony가 보여 우선 선별하여 배양했을 때에는 Tripathi와는 다르게 7.5%에서 더 많은 astaxanthin을 생산하였다. 그리고 EMS 돌연변이에서는 Tripathi와 유사한 생존율을(Fig. 1c) 보였지만 야생종보다 크고 붉은 colony가 선별되지 못하였다. 그리고 새로운 돌연변이 방법을 모색하다가 식물육종에 쓰이는 colchicines을 선택하여 사용 하였다. *H. pluvialis*는 광합성 녹조류에 속하는 진핵생물로서 식물세포와 유사성이 많아 colchicine으로 돌연변이 실험에 사용한 것이다. Colchicine은 배수체를 만들어 주는 것으로 돌연변이 되었는데는 astaxanthin 생합성과정 억제제가 있는 배지(선택배지)에서도 생존하는 것으로 알 수 있었다. 그리고 colchicine 돌연변이는 야생종보다 성장속도가 빠르다는 것을 배양 실험을 통해 알 수 있었다. 이것들을 보아 자외선 조사는 astaxanthin 더 생산하는 돌연변이를 만들고 colchicine은 성장속도가 빠른 돌연변이를 만들었다. 그래서 이것을 합쳐서 자외선 처리 후 colchicine 처리한 것은 성장속도와 astaxanthin 생성량도 증가하는 돌연변이를 시도하였으나 결과는 만들어 지지 않았다. 그것은 자외선 조사로 손상 입은 유전자가 세포 성장에 관련된 것이거나 colchicine에도 저항성을 가지게 되었을 것으로 보인다.

상업적으로 돌연변이를 사용하게 된다면 자외선 조사한 돌연변이는 astaxanthin 생산에 그리고 세포 자체가 목적인 배양이라면 colchicine 처리하여 얻은 DS, M4-3이 좋을 것이다.

결론

본 연구는 물리적 화학적 돌연변이원인 자외선, EMS, colchicine을 사용하여 야생균주의 *H. pluvialis* 유래의 astaxanthin의 생산량을 높이기 위한 목적을 가지고 있었다. UV 기초실험을 통해 돌연변이원으로 자외선등 254 nm을 사용할 때 30 cm의 거리보다 18 cm의 거리에서 조사하는 것이 돌연변이율을 높일 수 있음을 확인하였으며 25분 이상 조사 때에 98% 이상의 치사율을 보임을 알 수 있었다. 또한 실험결과에서 세포성장이 야생종보다 조금 떨어지나 색소의

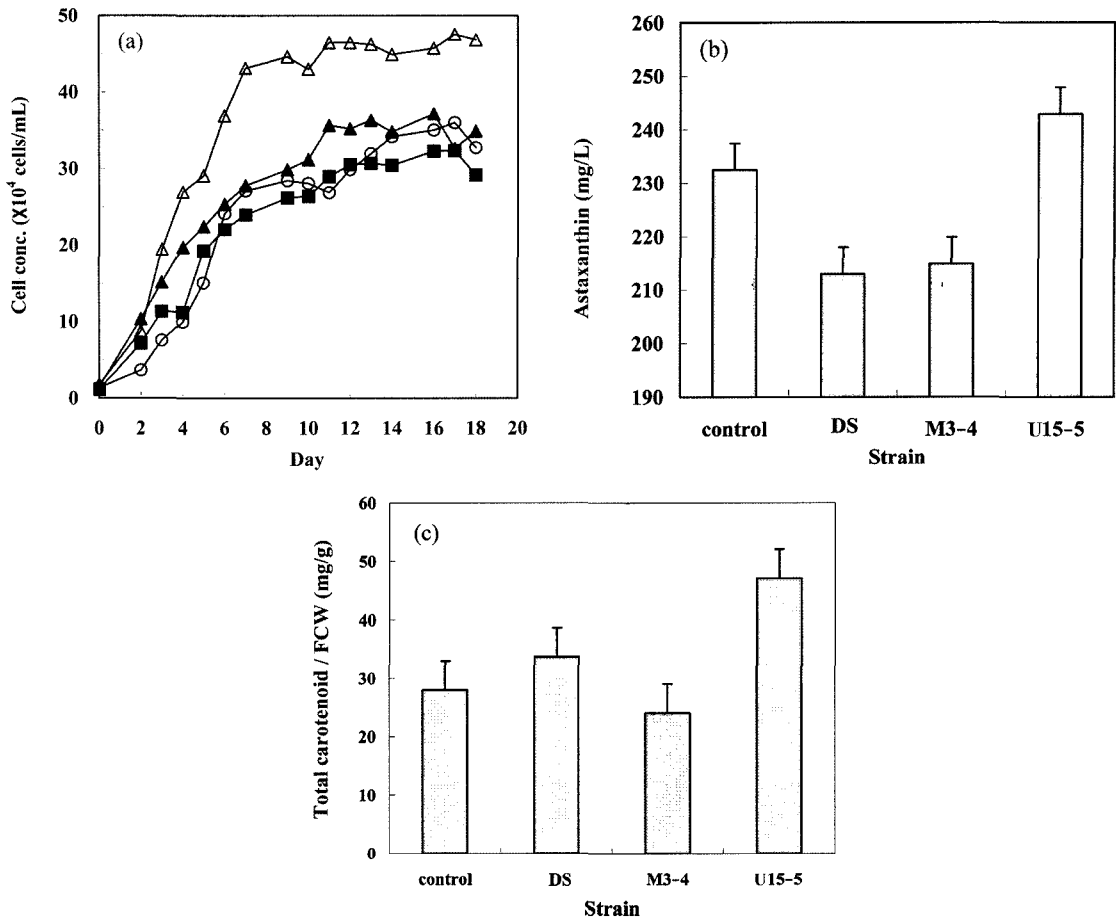


Fig. 4. Changes in cell number (a) and comparison of total carotenoid concentration (b) and astaxanthin per FWC (c) in each species. Symbols: wild (■), M3-4 (△), DS (▲), U15-5 (○).

생성은 변이균체들이 FCW당 astaxanthin량이 1.1~1.3배 높게 생산하는 좋은 결과를 얻었다.

EMS 기초실험을 통해 0.468%(w/v) 이상의 농도에서 46.9% 이상의 치사율을 보임을 알 수 있었으며 carotenoid 저해제에 대한 생존율은 43~82%를 보임을 알 수 있었으나 야생종보다 colony 형성기간이 2~3일 길었고 선별과정에서 더 크고 붉은 색상을 띠는 colonies를 선별하지 못한 결과를 얻었다.

Colchicine 기초실험을 통해 mutagen inducing solution으로 distilled water와 MBBM을 사용하는 것이 좋은 결과를 얻을 수 있음을 알 수 있었으며 100 mg/L의 농도에서 4일간 colchicine 처리한 돌연변이체를 selection pressure에 도달 하였을 때 크고 붉은 colonies을 선별할 수 있었고 생성된 colony의 크기가 대조군에 비해 1.5배 정도 크고 14.8%의 색소증가율을 보이는 좋은 결과를 얻었다.

세포의 성장과 astaxanthin의 양을 모두 높이기 위해 UV 처리한 돌연변이체에 colchicine 처리한 실험에서 얻은 균체 중 2종이 32.4 mg/L, 37.3 mg/L의 높은 색소농도를 나타내었으나 기대한 만큼의 결과를 얻지 못하였다.

다양한 우수종의 400 mL의 close culture와 안정성 실험을 통해 UV 처리로 얻은 돌연변이 U15-5는 야생종보다 균체당 1.68 배의 높은 astaxanthin 축척율을 보이는 것과 콜히친을 통해 얻은 M3-4, DS는 균체농도가 야생종보다 30% 이상 증가된 결과를 보이는 안정성을 보여주었다.

요 약

*Haematococcus pluvialis*는 astaxanthin을 많이 생산하는 미세조류로써 astaxanthin은 항산화제로 면역반응을 강화시켜주며 항암효과 등을 가지고 있다. 그런데 야생종의 낮은 성장속도와 astaxanthin의 생산에는 한계가 있기 때문에 이를 극복하기위해 돌연변이 방법을 사용하였다. 돌연변이 방법으로는 자외선 조사와 EMS와 colchicines 처리를 사용하여 야생종보다 colony가 크고 더 붉은 것은 선택하였다.

선별된 돌연변이들은 carotenoid 생합성과정을 억제하는 nicotine 과 diphenylamine을 이용하여 다시 선별하였다. 그때 생존율은 40-50%이었고 여기서 선별된 균주들을 다시 규모를 키워 배양한 결과 자외선 처리한 돌연변이인 U15-5가

야생종보다 세포당 total carotenoid 생산량이 1.68배 증가하였고, colchicine 처리한 DS와M4-3은 성장속도가 20~30% 증가하였다.

감사의 글

본 연구는 학술진흥재단 중점연구소 지원사업(KRF-2004-005-D00002)에 의해 지원되었으며, 이에 감사 드립니다.

REFERENCES

- Barnabas, B., B. Obert, and G. Kovacs. 1999. Colchicine, an efficient genome-doubling agent for maize (*Zea mays* L.) microspores cultured in anthero. *Plant Cell Rep.* **18**: 858-862.
- Becker, E. W. 1994. Biomechanical model of the P-type ion pumps of the cell. *Naturwissenschaften* **81**: 21-27.
- Borowitzka, M. A. 1997. Microalgae for aquaculture: Opportunities and constraints. *J. Appl. Phycol.* **9**:393-401.
- Borowitzka, M. A. 1999. Commercial production of microalgae: ponds, tanks, tubes and fermenters. *J. Biotechnol.* **70**: 313-321.
- Borowitzka, M. A. and L. J. Borowitzka. 1988. *Micro-algal biotechnology*. Cambridge, UK: Cambridge University Press.
- Chumpolkulwong, N., T. Kakizono, T. Handa, and N. Nishio. 1997. Isolation and characterization of compactin resistant mutants of an astaxanthin synthesizing green alga *Haematococcus pluvialis*. *Biotechnol. Lett.* **19**: 299-302.
- Chumpolkulwong, N., T. Kakizono, H. Ishii, and N. Nishio. 1997. Enzymatic conversion of beta-carotene to astaxanthin by cell-extracts of a green alga *Haematococcus pluvialis*. *Biotechnol. Lett.* **19**: 443-446.
- Chumpolkulwong, N., T. Kakizono, S. Nagai, and N. Nishio. 1997. Increased astaxanthin production by *Phaffia rhodozyma* mutants isolated as resistant to diphenylamine. *J. Ferment. Bioeng.* **83**: 429-434.
- Harker, M., A. J. Tsavalos, and A. J. Young. 1996. Factors responsible for astaxanthin formation in the chlorophyte *Haematococcus pluvialis*. *Bioresour. Technol.* **55**: 207-214.
- Hasegawa, H., S. Takashima, and A. Nakamura. 1995. Effect of gamma-ray irradiation on cultured anther of tobacco (*Nicotiana tabacum* L.). Radioactivity and morphological variants appearing in the haplod plants. *Plant Tiss. Cult. Lett.* **12**: 281-287.
- Herrera, J. C., L. G. Moreno, J. R. Acuna, M. De Pena, and D. Osorio. 2002. Colchicine-induced microspore embryogenesis in coffee. *Plant Cell Tiss. Org.* **71**: 89-92.
- Hong, S. P., M. H. Kim., and J. K. Hwang. 1998. Biological functions and production technology of carotenoids. *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.* **27**: 1297-1306.
- Ishikawa, T., T. Takayama, and H. Ishizaka. 1999. Amphidiploids between *Alstroemeria ligtu* L. hybrid and *A. pelegria* L, var. *rosea* induced through colchicine treatment and their reproductive characteristics. *Sci. Hortic.* **80**: 235-246.
- Kobayashi, M. 2003. Astaxanthin biosynthesis enhanced by reactive oxygen species in the green alga *Haematococcus pluvialis*. *Biotechnol. Bioprocess Eng.* **8**: 322-330.
- Lee, Y. K. 2001. Microalgal mass culture systems and methods: Their limitation and potential. *J. Appl. Phycol.* **13**: 307-315.
- Margalith, P. Z. 1999. Production of ketocarotenoids by microalgae. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **51**: 431-438.
- Palozza, P. and N. I. Krinsky. 1992. Antioxidant effects of carotenoids invivo and invitro - an overview. *Methods Enzymol.* **213**: 403-420.
- Park, E. K. and C. G. Lee. 2001. Astaxanthin production by *Haematococcus pluvialis* under various light intensities and wavelengths. *J. Microbiol. Biotech.* **11**: 1024-1030.
- Tripathi, U., G. Venkateshwaran, R. Sarada, and G. A. Ravishankar. 2001. Studies on *Haematococcus pluvialis* for improved production of astaxanthin by mutagenesis. *World J. Microb. Biotechnol.* **17**: 143-148.
- Wang, A. S., D. S. K. Chang., J. B. Milcic., and T. C. Yang. 1988. Effect of X-ray irradiation on maize inbred line B73 tissue cultures and regenerated plants. *Crop. Sci.* **28**: 358-362.
- Zhang, D. H. and Y. K. Lee. 1997. Enhanced accumulation of secondary carotenoids in a mutant of the green alga, *Chlorococcum* sp. *J. Appl. Phycol.* **9**: 459-463.

(Received Oct. 11, 2005/Accepted Mar. 30, 2006)