

## 자외선 조사에 의한 지질 고생산성 *Chlorella vulgaris* 변이주 분리

# Isolation of Lipid High-yielding *Chlorella vulgaris* Mutants by UV Irradiation

정행순<sup>1</sup>, 최민경<sup>2</sup>, 최태오<sup>1</sup>, 이재화<sup>2\*</sup>

Haeng Soon Jeong<sup>1</sup>, Min Kyung Choi<sup>2</sup>, Tae-O Choi<sup>1</sup>, Jae-Hwa Lee<sup>2\*</sup>

<sup>1</sup>(주)클로랜드, 거제시, 656-851, 대한민국

<sup>2</sup>신라대학교 바이오과학과, 부산광역시, 617-736, 대한민국

<sup>1</sup>Chloland Co. Ltd., Geoje 656-851, Korea

<sup>2</sup>Department of Bioscience, Silla University, Busan 617-736, Republic of Korea

(2014년 6월 11일 접수, 2014년 6월 17일 수정, 2014년 6월 17일 채택)

**Abstract** *Chlorella vulgaris*, a genus of single-cell green algae, is considered to be a very essential resource for the higher value-added business including functional food and biodiesel, due to its high contents of protein, carbohydrate and lipid. In this study, ultraviolet rays were irradiated in order to induce the mutation of *C. vulgaris*. After inducing the mutation, UV1-20 mutant, high in lipid was selected and its cell growth rate, dry weight, pigment content and lipid content were measured. The growth rate of the UV1-20 mutant was increased almost 1.5 times than the wild type, but pigment contents of chlorophyll and carotenoid were decreased. In addition, the lipid content of UV1-20 was increased 1.8 times than the wild type. Therefore, *C. vulgaris* mutant, isolated in this study, is considered to have sufficient potential to be used as a material for the higher value-added business.

**Keywords** : microalgae, *Chlorella vulgaris*, lipid, ultra violet, mutation

## 서 론

미세조류는 에너지 및 산업소재 생산, 온실가스 저감이 가능한 미래자원으로 최근 재조명 받고 있다. 미세조류는 잠재성이 매우 큰 만큼 CO<sub>2</sub> 고정화와 폐수처리 등의 환경 분야, 바이오디젤로 활용할 수 있는 에너지 분야, 그리고 식품과 화장품 및 플라스틱 등 화학 분야의 3대 분야를 중심으로 활용이 확대되고 있다 [5,8,18].

클로렐라는 1890년 네덜란드의 Beyerink에 의해 발견된 직경 2~10 μm의 구형 단세포식물로 광합성

에 의해 증식하는 미세 녹조류이다 [1]. 가장 널리 알려진 종 (species)으로는 *vulgaris*와 *pyrenoidosa* 및 *ellipsoidea*이며 고단백질 함량과 지질 축적량이 높아 식이 보조제 및 바이오매스로 이용되고 있다 [11]. 특히 미세조류의 지질은 바이오디젤로 이용 가능하여 이에 대한 연구 및 산업적 관심이 점차 증가하고 있는 추세이다. 또한 미세조류 내 높은 지질함 유율 및 유용 물질들의 축적량을 높이기 위한 방법들이 다양하게 시도되고 있으며, 최근에는 특정 유용물질이 증대된 균주를 개량하기 위한 다양한 방법들이 보고되고 있다. Kim et al. [13]의 연구에 의하면

\* Corresponding author  
Phone: +82-51-999-5748 Fax: +82-51-999-5831  
E-mail: jhalee@silla.ac.kr

This is an open-access journal distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial License (<http://creativecommons.org/licenses/bync/3.0>)

화학적 돌연변이원으로 ethyl methane sulphonate (EMS)를 처리하여 고농도 지질 축적 및 항산화물질로 알려져 있는 phycobiliproteins이 증대된 *Arthrospira platensis* 변이주를 분리하였으며 이러한 변이주는 산업적으로 유용한 소재로 이용될 수 있을 것으로 시사하고 있다. 화학적 돌연변이뿐만 아니라 물리적 돌연변이원을 이용한 균주개량도 시도된 바 있는데, Choi et al. [7]의 연구에서는 전자빔 조사에 의해 지질 함량이 증대된 *A. platensis* 변이주를 분리하였고 바이오 디젤의 품질을 결정하는 주요 지방산 성분 및 함량을 분석하였다. 그 결과 *A. platensis* 변이주는 야생균주에 비해 총 지방산 함량이 약 5배 증가하였고, 지질함량 또한 약 2배 증가한 결과를 보였다. Kim et al. [12]의 연구에서는 자외선 조사에 의해 균주개량을 시도하였으며 지질함량이 약 3배 증가된 *Nannochloropsis oculata* 변이주를 분리하였다. 특히 이들 변이주는 생장률이 야생균주보다 증가하면서 지질함량도 증가하여 경제적인 바이오 디젤 생산 균주로의 활용성이 높다고 평가하였다.

본 연구에서는 미세 녹조류의 일종인 *C. vulgaris*의 지질함량을 증대시키기 위하여 자외선을 조사하였고 돌연변이체를 유도하였다. 또한 변이주를 선별하고 분리 및 배양하는 기술을 개발하고, 확보된 변이주의 생장률과 지질함량 및 색소함량을 분석하였다.

## 재료 및 방법

### 사용균주 및 배양방법

본 연구에 사용된 미세조류는 *Chlorella vulgaris*로 한국미세조류은행(Korea Marine Microalgae Culture Center)으로부터 분양받아 사용하였다. f/2 배지를 균주 배양에 사용하였고, f/2 배지는 1 L의 인공해수에 NaNO<sub>3</sub> 150 mg, NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>·9H<sub>2</sub>O 8.69 mg, ferric EDTA 10 mg, MnCl<sub>2</sub> 0.22 mg, CoCl<sub>2</sub> 0.11mg, CuSO<sub>4</sub>·5H<sub>2</sub>O 0.0196 mg, ZnSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 0.044 mg, Na<sub>2</sub>SiO<sub>3</sub>·9H<sub>2</sub>O 50 mg, Na<sub>2</sub>MoO<sub>4</sub>·2H<sub>2</sub>O 0.012 mg, Vitamine B<sub>12</sub> 1 mg, Biotin 1 mg, Thiamine·HCl 0.2 mg을 첨가하여 제조하였다. 균주는 온도 25 °C, 교반 속도 120 rpm, 광도 3000 lux의 조건하에서 배양하였다 [6].

### 자외선 조사 및 돌연변이주 선별

*C. Vulgaris*의 돌연변이를 유도하기 위하여 일반

근자외선보다 더 강한 에너지 입사가 가능한 UV-B (254 nm) 과장을 UV 램프 스탠드(15 W, 76 μW/cm<sup>2</sup>, VILBER Luormat)를 이용하여 균체에 조사하였고, 광원과 균체사이의 조사거리는 약 15 cm를 유지하였다. 실험에 사용한 *C. Vulgaris* 균주는 PBS 용액으로 세척한 후, 60 mm dish에 5 mL씩 담아, 자외선에 1, 2, 3, 4, 5 분 간격으로 노출 시켰다. 자외선 조사 후 1%의 agar가 포함된 f/2 고체 배지에 도말하였다. 고체 f/2 배지에 형성된 콜로니는 액체 f/2 배지에 재배양하여 돌연변이주의 생물학적, 생화학적 특성을 조사하였다.

### 균체량 분석

균체량은 UV/Vis 분광기(Optizen 2120 UV, Mecacy Ltd, Korea)를 사용하여 흡광도 680 nm에서 측정하였다. 건조 균체량(Dry cell weight, DCW)은 항량된 여과종이를 이용하여 105 °C 건조기에서 3 시간 동안 균체를 건조시킨 후 얻어진 건조무게로부터 건조 균체량을 계산하여 O.D. 값과의 상관관계식을 산출하였다.

$$\text{Dry Cell weight (DCW, g/L)} = 0.4169 \times A_{680} + 0.1852$$

### 색소 함량 분석

*C. vulgaris*의 광합성 색소 함량을 분석하기 위하여 20일 동안 배양한 *C. vulgaris*의 chlorophyll과 carotenoid 함량을 측정하였다. 색소의 추출은 Cood et al. [9]의 방법의 변법에 따라, 시료 1 mL를 1,300 rpm에서 3분간 원심 분리하여 상등액은 제거하고 methanol 1 mL를 첨가하였다. 60 °C에서 30분간 용출한 후 0 °C에서 5분간 냉각시켰고 1,300 rpm에서 2분간 원심분리 하였다. Chlorophyll 함량을 분석하기 위해 분리된 상등액을 UV/Vis 분광기를 이용해 650 nm와 665 nm에서 흡광도를 측정하였으며 아래의 식을 이용하여 그 함량을 계산하였다.

$$\text{Chlorophyll (mg/L)} = (25.5 \times A_{650}) + (4 \times A_{665})$$

Carotenoid의 함량은 461 nm와 664 nm에서 흡광도를 측정하였고 아래의 식에 따라 그 함량을 계산하였다 [13].

$$\text{Carotenoid (mg/g)} = [A_{461} - (0.046 \times A_{664})] \times 4$$

**지질분석**

*C. Vulgaris*의 세포 내 지질함량은 Chen et al. [4]의 방법에 따라 측정하였고, 세포 내 축적된 지질의 함량을 측정하기 위하여 *C. Vulgaris*를 20일 동안 배양하였다. 680 nm에서의 흡광도를 0.4로 조정한 세포 10 µL와 증류수 138 µL, Nile red 2 µL, 그리고 DMSO 50 µL를 혼합한 후, 40 °C 배양기에서 10분간 반응시켰다. Nile red로 염색한 세포는 형광광도계(Infinite F200 pro, Tecan, Austria)를 이용하여 excitation 495 nm, emission 620 nm로 측정하였다. 형광값 (fluorescence intensity)은 미세조류 자체의 형광값 (autofluorescence)을 뺀 값으로 나타내었다.

**결과 및 고찰**

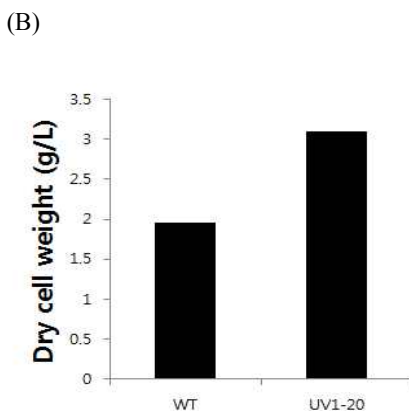
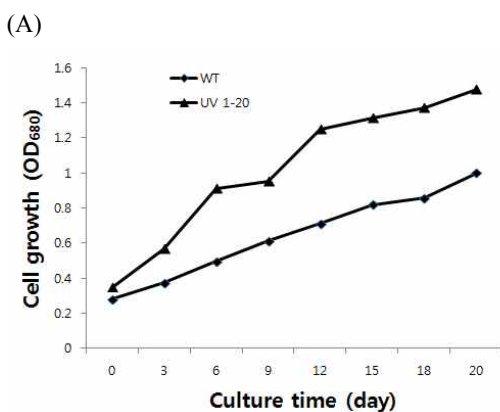
**자외선 유도 *C. vulgaris*의 세포 성장**

자외선 조사 후 형성된 콜로니 중 지질함량이 야생균주에 비하여 상대적으로 높은 결과를 보여준 변이주군을 자외선 조사 시간(1, 2, 3, 4, 5 분)에 따라

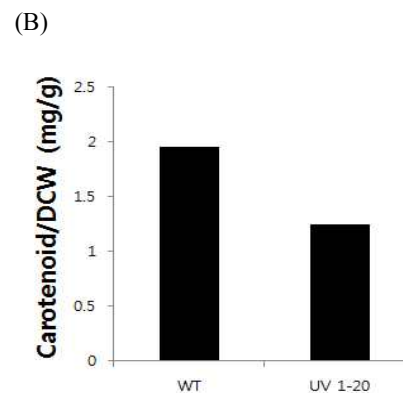
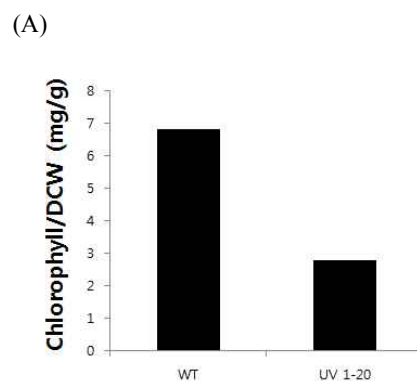
각각 UV1, UV2, UV3, UV4, UV5로 명명하였다. 특히 UV1 변이주군에서 지질함량이 높은 한 개의 변이주가 발견되었고, 이 변이주를 UV1-20라 명명하였다. UV1-20를 3일 간격으로 20일 동안 흡광도를 측정된 결과, 야생형 *C. vulgaris*에 비하여 UV1-20 변이주의 세포생장률이 약 1.5배 증가함을 보였다 (Figure 1(A)). 또한 세포조건함량도 세포 성장률의 증가로 인해 UV1-20 변이주가 야생균주보다 약 1.5배 증가한 결과를 보였다(Figure 1(B)). 이는 자외선 조사를 통하여 세포 성장률이 증가한 것임을 보여주며, Kim et al. [12]의 자외선 조사에 의한 *N. oculata*의 돌연변이 유도 실험에서 돌연변이주의 세포생장률이 야생균주에 비해 증가한 결과와 일치한다.

**자외선 유도 *C. vulgaris*의 색소 변화**

자외선 유도 돌연변이주 UV1-20의 세포 내 총 chlorophyll 함량을 측정된 결과, UV1-20은 야생균주에 비해 chlorophyll 함량이 감소하였다(Figure 2(A)). UV1-20 변이주의 carotenoid 함량 또한 야생균주에 비해 감소함을 확인할 수 있었다(Figure 2(B)). 자외



**Figure 1.** Effect of UV irradiation on the growth of *C. vulgaris*. (A) Cell growth, (B) Dry cell weight.

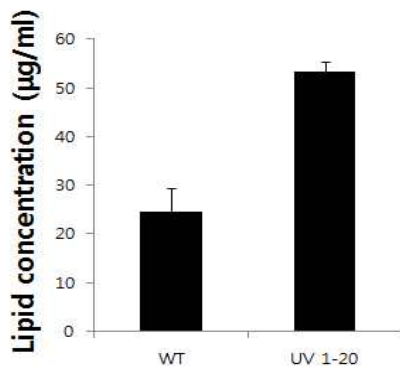


**Figure 2.** Comparisons of pigment contents in wild type and mutants of *C. vulgaris*. (A) Chlorophyll content. (B) Carotenoid content.

선 조사는 식물의 광합성, 성장 발달 및 형태 등에 영향을 주는 것으로 알려져 있으며 이로 인해 색소 감소 및 식물의 생산성을 감소시킨다고 보고된 바 있다 [16-17].

### 자외선 유도 *C. vulgaris*의 지질함량 변화

*C. vulgaris*의 야생균주와 돌연변이주의 지질함량 변화를 확인하기 위해 각 시료를 20일간 배양하였다. 각 시료는 Nile red로 염색한 후 형광값을 측정하여 지질함량을 분석하였다. 그 결과, 자외선 유도 돌연변이주 UV1-20의 지질 함량은 야생균주에 비해 약 1.8배 증가하였다(Figure 3).



**Figure 3.** Comparison of lipid content in wild type and mutants of *C. vulgaris*. Data are expressed as mean ± SD (n = 3).

일반적으로 미세조류는 환경적인 스트레스에 의해 지질함량의 영향을 받는다고 알려져 있으며, 질소원 농도, 광도의 조절 [14] 및 염분 농도의 조절 [10] 등으로 지질함량을 증가시킬 수 있다는 보고가 있다. 하지만 이와 같은 미세조류의 성장을 억제시키는 방법은 생산성이 낮아지게 되어 경제적인 활용성이 낮다고 볼 수 있다. 본 연구에서 분리된 *C. vulgaris* UV1-20 변이주는 야생균주에 비해 지질함량이 증가했음에도 불구하고 세포 성장 또한 증가하였다. 따라서 바이오 디젤의 품질을 결정하는 주요 지방산 성분 및 함량 분석 등의 추가적인 연구가 뒷받침 된다면 경제적인 바이오 디젤 생산 균주로 활용 가능성이 높은 것으로 사료된다.

### 결론

본 연구에서는 미세조류 *C. vulgaris*에 돌연변이원

으로 자외선을 조사하여 돌연변이를 유도하였고, 지질 함량이 높은 UV1-20 변이주를 분리하였다. 변이주 UV1-20는 야생균주와 비교하여 세포 성장률은 약 1.5 배 증가하였지만 chlorophyll과 carotenoid 함량은 야생균주에 비해 감소하였다. 또한 UV1-20의 지질함량은 야생균주에 비해 약 1.8배 증가하였다. 본 연구에서 분리된 세포 생장이 증가하면서 지질함량 또한 증대된 *C. vulgaris* 변이주는 바이오디젤을 비롯한 고부가가치 산업소재로 이용될 수 있을 것으로 기대된다.

### 감사의 글

본 논문은 정부(환경부)의 재원으로 국립생물자원관의 ‘나고야의정서 대응 창의연구개발을 위한 인력양성 사업’의 지원을 받아 수행하였습니다(NIBR No. 2013-02-071).

### References

1. Atsushi, M. 1999. What is *Chlorella*. *Food Ind.* **9**, 122-138.
2. Bilanovic, D., Andargatchew, A., Kroeger, T. and Shelef, G. 2009. Freshwater and marine microalgae sequestering of CO<sub>2</sub> at different C and N concentrations-response surface methodology analysis. *Energ. Convers. Manage.* **50**, 262-267.
3. Caldwell, C. R. 1993. Ultraviolet-induced photo degradation of cucumber (*Cucumis sativus* L.) microsomal and soluble protein tryptophanyl residues in vitro, *Plant Physiol.* **101**, 947-953.
4. Chen, W., Sommerfeld, M. and Hu, Q. 2011. Microwave-assisted Nile red method for *in vivo* quantification of neutral lipids in microalgae. *Biores. Technol.* **102**, 135-141.
5. Chiu, S. Y., Kao, C. Y., Tsai, M. T. Ong, S. C., Chen, C. H. and Lin, C. S. 2009. Lipid accumulation and CO<sub>2</sub> utilization of *Nannochloropsis oculata* in response to CO<sub>2</sub> aeration. *Bioresour. Technol.* **100**, 833-838.
6. Choi, H.-J. and Lee, S.-M. 2011. Effect of temperature, light intensity and pH on the growth rate of *Chlorella vulgaris*. *Journal of KSEE.* **33**, 511-515.
7. Choi, S.-J., Kim, Y.-H., Kim, A. and Lee, J.-H. 2013. *Arthrospira platensis* mutants containing high lipid content by electron beam irradiation and analysis of its fatty

- acid composition. *Appl. Chem. Eng.* **24**, 628-632.
8. Clark, J. H., Budarin, V., Deswarte, F. E. I., Hardy, J. J., Kerton, F. M., Junt, A. J., Luque, R., Macquarrie, D. J., Milkowski, K., Rodriguez, A. Samuel, O., Tavener, S. J. White, R. J. and Wilson A. J. 2006. Green chemistry and the biorefinery: A partnership for a sustainable future. *Green Chem.* **8**, 853-860.
  9. Cood, G. A., Okabe, K. and Stewart, W. P. 1980. Cellular compartmentation of photosynthetic and photo-respiratory enzymes in the heterocystous cyanobacterium *Anabaena cylindrica*. *Arch. Microbiol.* **124**, 149-154.
  10. Jeong, U-C., Han, J.-C., Choi, B.-D. and Kang, S.-J. 2013. Lipid and fatty acid composition in *Nannochloropsis oculata* cultured in varying salinities. *Kor. J. Fish. Aquat. Sci.* **46**, 252-258.
  11. Kang, M.-S., Sim, S.-J. and Chae, H. J. 2004. Chlorella as a functional biomaterial. *Korean J. Biotechnol. Bioeng.* **19**, 1-11.
  12. Kim, J.-H., Park, H.-J., Kim, Y.-H., Joo, H., Lee, S.-H. and Lee, J.-H. UV-induced mutagenesis of *Nannochloropsis oculata* for the increase of lipid accumulation and its characterization. *Appl. Chem. Eng.* **24**, 155-160.
  13. Kim, Y.-H. and Lee, J.-H. 2012. Isolation of *Arthrospira platensis* mutants producing high lipid and phycobiliproteins. *J. Korean Biotech. Bioen.* **27**, 172-176.
  14. Park, S.-J., Choi, Y.-E, Kim, C. W., Park, W.-K. and Yang, J.-W. 2010. Production of biomass and lipid using microalga *Nannochloris oculata* under different conditions of nitrogen and irradiance. *Journal of KSBB.* **25**, 553-558.
  15. Rodolfi, L., Zittelli, G. C. Bassi, N., Padovani, G. Biondi, N., Bonini, G. and Terdici M. R. 2009. Microalgae for oil : strain selection, induction of lipid synthesis and outdoor mass cultivation in a low-cost photobioreactor. *Biotechnol. Bioeng.* **102**, 100-112.
  16. Sisson, W. B. and Caldwell, M. M. 1976. Photosynthesis, dark respiration, and growth of *Rumex patientia* L. exposed to ultraviolet irradiance (288-15 nm) simulating a reduced ozone column. *Plant physiol.* **58**, 563-568.
  17. Teramura, A. H., Biggs, R. H. and Kossuth, S. 1980. Effect of ultraviolet-B irradiance on soybean II. Interaction between ultraviolet-B and photosynthetically active radiation on net photosynthesis, dark respiration, and transpiration, *Plant Physiol.* **65**, 483-488.
  18. Wang, B., Li, Y. Q., Wu, N. and Lan, C. Q. 2008. CO<sub>2</sub> biomitigation using microalgae. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **79**, 707-718.