

돌연변이 *Chlamydomonas reinhardtii*의 영양분 제한에 따른 지질 생산 및 지방산 조성 변화 연구

백재원, 최종일*

Effect of Nutrient Limitation on Lipid Content and Fatty Acid Composition of Mutant *Chlamydomonas reinhardtii*

Jaewon Baek and Jong-il Choi*

Received: 13 February 2015 / Revised: 23 March 2015 / Accepted: 31 March 2015

© 2015 The Korean Society for Biotechnology and Bioengineering

Abstract: Production of biodiesel from microalgae is dependent on the microalgal lipid content and free fatty acid composition. Both lipid and free fatty acid are regulated by nutrient sources. In this study, newly developed mutant *Chlamydomonas reinhardtii* with higher lipid content was investigated for the effect of nutrient limitation. Nitrogen NO_3^- and phosphate PO_4^{3-} were limited for nutrient starvation during the cultivation. Under nutrient starvation, total lipid content level was increased to 27~33% and C16:0 fatty acid content constituted over 31~43% of total fatty acid. Interestingly, we also found that the expression of fatty acid desaturase (FAD7) was decreased when nutrients were starved.

Keywords: *Chlamydomonas reinhardtii*, Fatty acid, Lipid

1. INTRODUCTION

전 세계에서 소비되는 에너지 중 화석연료가 차지하는 비중은 88%로 대다수를 차지하고 있다 [1]. 하지만 고유가와 부

산물로 인한 환경적 문제로 인해 소비가 제한적이다. 그러므로 화석연료를 대체할 수 있는 친환경 바이오 에너지 생산이 이를 극복할 수 있는 대안으로 떠오르고 있다. 태양열, 풍력, 지열 등 다양한 바이오 에너지원들이 있다. 그 중 미세조류 유래 바이오 에너지는 운송에너지로서 사용이 가능하고 생산 수율 또한 육상식물에 비해 20-25배 높은 것으로 알려져 있다 [2]. 특히 미세조류는 광합성을 통해 대기중의 탄소를 세포 내에 에너지 저장물질로 전환시킴으로써 에너지 소비 후 환경적인 측면에서 문제도 줄어들 것으로 기대되고 있다 [3-7].

미세조류는 일반적인 배양 조건에서 생장시 중성지질, 극성지질 및 인지질 등을 생합성을 한다 [8]. 하지만 영양원이 제한되는 조건에 노출이 되면 광합성에 의한 탄소원 고정 저해가 되면서 이로 인한 지질 생합성 형태가 변하고 중성지질의 합성이 증가하게 된다 [9]. 이때 합성되는 중성지질들은 세포 내 에너지 저장물질과 세포막 지질을 생성하는 전구체 역할을 한다 [10]. 이러한 현상은 세포내 총 지질 생산을 증가 시키고 이로 인한 바이오 에너지 생산 또한 증가할 것으로 기대되고 있다.

따라서 본 연구에서는 미세조류인 *Chlamydomonas reinhardtii*와 지질 생산량이 20% 증가된 돌연변이종 Cr-4013 [11]을 이용해 영양원이 제한 되었을 때 지질함량과 지방산 조성의 변화를 관찰하여 미세조류인 *C. reinhardtii*의 바이오 에너지원으로써의 가능성을 검증하고, 돌연변이종과 그 효율을 비교해 보고자 연구를 수행하였다.

전남대학교생물공학과
Department of Biotechnology and Bioengineering, Interdisciplinary Program of Bioenergy and Biomaterials, Chonnam National University, Gwangju 500-757, Korea
Tel: +82-62-530-1846, Fax: +82-62-530-1949
e-mail: choiji01@chonnam.ac.kr

2. MATERIALS AND METHOD

2.1. 균주 및 배지

본 연구에 사용된 미세조류 *Chlamydomonas reinhardtii* (UTEX #90)는 UTEX (University of Texas at Austin, Austin, TX)로 부터 분양 받아 사용하였다. UTEX #90을 이용해 지질 함량이 증가된 돌연변이 균주 Cr-4013 (기탁번호 KCTC 18236P) [11]은 한국생명공학연구원 미생물자원센터 (KCTC, yuseong-gu, Daejeon, South Korea)로 부터 분양 받아 사용하였다. 실험 균주는 Bold's Basal Medium (BBM) [12]을 이용하여 20°C에서 배양하였으며, 배지 성분 중 NaNO₃와 KH₂PO₄를 제거함으로써 배지 내 각각 nitrogen과 phosphate의 제한을 주었다.

2.2. 균주배양 및 성장률 측정

0.5 mg/mL의 농도로 전배양된 균주를 50 mL 배지에 1 mL씩 접종하여 20°C에서 12시간씩 광 (>30 μmol photons·m⁻²·s⁻¹) 암 주기를 주어 배양하였다. 4일간 배양 후 2,000 rpm에서 10분간 원심분리하여 각각 nitrogen과 phosphate가 제거된 배지로 2회 세척 후 다시 동일한 배지 50 mL에 접종하여 위와 같은 조건에서 3일간 배양하였다. 성장률은 50 mL 배양액을 미리 건조된 Whatman GF/C 여과지 (Whatman International Ltd., Maidstone, England)를 이용해 여과한 후 80°C에서 48시간 건조하여 건조 중량을 기반으로 측정하였다.

2.3. 지질 분석

배양 중 균주 100 μL 에 1 μL Nile-red 염색시약 (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) (1 mg/mL in acetone) 을 첨가한 뒤 30°C에서 30분간 반응하여 형광현미경을 이용해 증성지질의 생산 여부를 관찰하였다. 총 지질은 Bligh & Dyer 방법에 따라 chloroform과 methanol을 이용해 추출한 뒤 용매를 증발시켜 측정된 중량을 세포 건조중량당 백분위 함량으로 환산하였다. 지질 조성은 silica plate (Sigma-Aldrich)와 hexane/diethyl-ether/acetone (70:30:1 v/v/v)를 전개용매로 사용한 thin-layer chromatography (TLC)를 통해 분석을 하였다 [13]. Gas chromatography (GC) (6890 series GC System, Agilent, Santa Clara, CA, USA)를 이용한 fatty acid methyl ester (FAME) 분석을 통해 지방산 조성을 분석하였으며, Supelco-FAME Mix RM3 (Sigma-Aldrich)를 표준물질로 사용하여 지방산 조성을 분석하였다.

2.4. RNA 추출 및 유전자 발현을 확인: real-time PCR

총 RNA는 액체질소를 이용해 가루형태로 처리하여 Qiagen RNease plant mini kit (Qiagen Inc., Valencia, CA)를 이용해 추출하였다. 추출된 RNA 는 Transcriptor First Strand cDNA Synthesis Kit (Roche Applied Science, Mannheim, Germany)를 이용해 cDNA를 합성하여 유전자 발현을 확인하기 위한 real-time PCR용 template으로써 사용하였다.

유전자 발현 확인을 위한 유전자 chloroplast glycerolipid

Table 1. Primers used in qRT-PCR

Primers for qRT-PCR	Sequence (5'3')
FAD7-1-F	CACGACCAGAACGAGAAGATG
FAD7-1-R	TCTTGTTGAAGATGCCGTAGTC
FAD7-2-F	GCTGTGGTCTGTCCTTCAT
FAD7-2-R	AGTTCATTGCGTCACCACTAC
FAD7-3-F	CCTCGAAGGGTGCATCTTG
FAD7-3-R	TTCACCACTCAAACGCTATCA

ω-3-fatty acid desaturase (FAD7)는 NCBI GenBank를 통해 염기서열을 확보하여 primer를 제작하였으며 (Table 1), house-keeping gene으로는 actin을 사용하였다. Real-time PCR은 SYBR Premix Ex Taq (Takara Bio Inc., Otsu, Shiga, Japan)와 Illumina Eco Real-Time PCR system (Illumina, San Diego, CA)을 이용해 40 cycle (95°C for 15 s; 58°C for 15 s; 72°C for 20 s) 수행하였다.

3. RESULTS AND DISCUSSION

3.1. 성장률 및 지질함성

배지내의 영양원 존재 유무에 따른 야생형 *C. reinhardtii*와 돌연변이 균주의 성장률과 지질 함성량의 변화를 확인하기 위하여 배양시작 후 지질이 합성되기 시작하는 시점인 4일 차에 각각 nitrogen과 phosphate가 제거된 배지로 옮겨 변화를 관찰하였다. 기존에 연구에 의하면 nitrogen과 phosphate와 같은 영양원이 고갈 되었을 경우 미세조류는 성장이 저해가 되고, 바이오매스 생산량 또한 감소한다고 밝혀진 바가 있다 [14]. 본 연구에서도 배지가 옮겨진 후 3일간 세포성장을 관찰한 결과 영양원이 고갈되었을 경우 낮은 농도로 정체기에 머물러 있었고, 야생형의 경우 바이오매스 생산량은 일반 배지 상태에서 0.43 mgmL⁻¹d⁻¹이지만 영양원이 고갈된 배

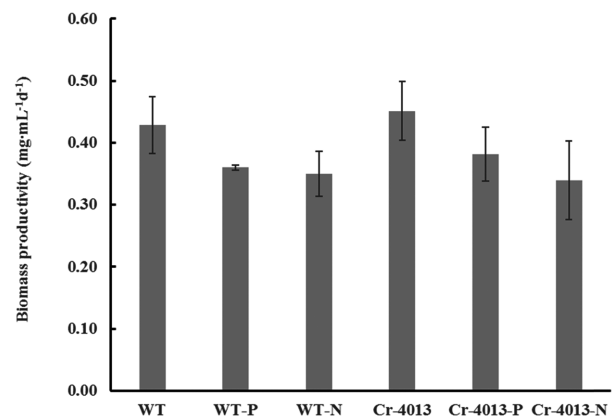


Fig. 1. Total biomass productivity of *Chlamydomonas reinhardtii* and its mutant strain Cr-4013. Data shown represent the mean values of biomass productivity based on total cell dry weight after 7 days cultivation. Symbols: (-N) medium lacking NaNO₃; (-P) medium lacking KH₂PO₄.

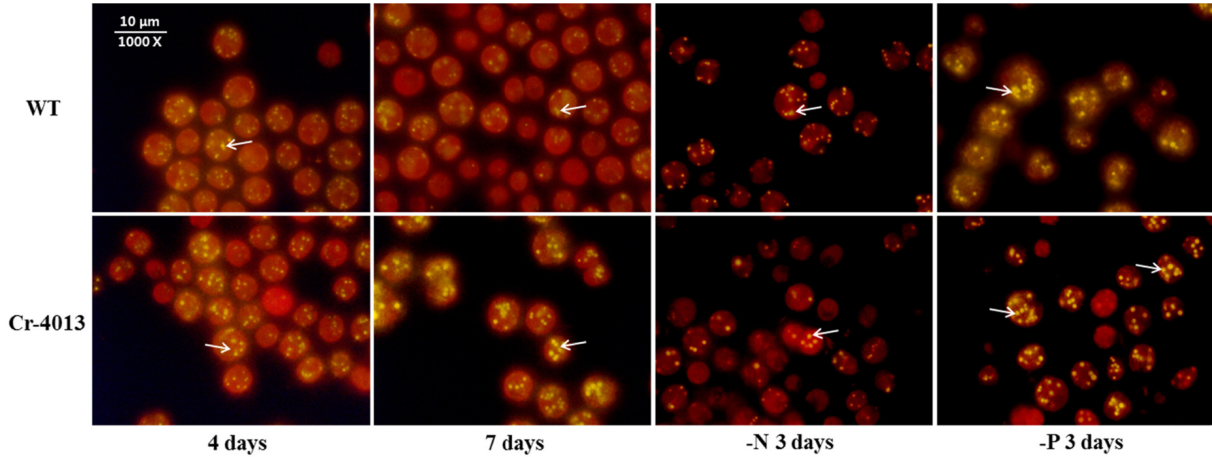


Fig. 2. Detection of neutral lipid accumulation using Nile red staining. The yellow fluorescence observed in the presence of Nile red indicates the presence of neutral lipids. Figures were taken that 4 days after cultivation in normal condition and added 3 days in nutrient limitation. Symbols: (-N) medium lacking NaNO₃; (-P) medium lacking KH₂PO₄.

지 상태에서는 0.36 (phosphate limitation), 0.34 (nitrogen limitation) mgmL⁻¹d⁻¹ 로 약 17% 감소하였다. 돌연변이 균주 Cr-4013의 경우에는 일반배지 상태에서 0.45 mgmL⁻¹d⁻¹ 바이오매스 생산량을 보였지만 영양원이 고갈되었을 때 0.38 (phosphate limitation), 0.34 (nitrogen limitation) mgmL⁻¹d⁻¹ 로 약 20% 감소한 것으로 확인되었다 (Fig. 1). 세포의 성장은 저해가 되었지만 Nile-red 염색을 통해 중성지질 합성여부를 관찰한 결과 영양원이 고갈되었을 경우 일반 배지에서 배양된 세포보다 중성지질 합성량이 증가한 것으로 확인되었다 (Fig. 2). 중성지질 및 극성지질 함량의 부분적인 증가는 곧 총 지질함량에 직접적으로 영향을 미치는데 [15], 본 실험에서 확인된 중성지질 함량의 증가를 바탕으로 총 지질 함량 또한 증가하였음을 예측할 수 있었다.

3.2. 총 지질 함량 및 지질 조성의 변화

총 지질 함량의 변화를 알아보기 위하여 모든 샘플들은 배양 7일차에 수확하여 지질을 추출하였고, 세포 무게당 함량으로 계산을 하였다. 그 결과 야생형에서 nitrogen이 고갈되었을 경우 약 25% 지질함량이 증가하였고, phosphate가 고갈되었을 경우엔 총 지질 함량에는 큰 변화가 없는 것으로 확인이 되었다. 하지만 지질 함량이 약 20% 증가된 돌연변이 Cr-4013의 경우 영양원이 고갈되었을 때 모두 약 33% 지질함량이 증가하는 것을 확인할 수 있었다 (Fig. 3). 이러한 결과는 다양한 미세조류 종들의 지질 함량에 영양원의 영향이 미친다는 기존 연구내용과 일치하고 있다 [16].

지질 조성의 변화를 확인하기 위하여 TLC를 통해 총 지질을 분리한 결과 야생형과 Cr-4013 모두 영양원이 고갈되면 주로 지방산이 증가하는 것으로 확인되었다 (Fig. 4). 특히 Cr-4013의 경우 영양원이 고갈되었을 때 총 지질 함량은 야생형에 비해 크게 증가하는 것으로 확인이 되었는데, 이는 지방산의 변화와 연관이 있을 것으로 예상된다. 그래서 본

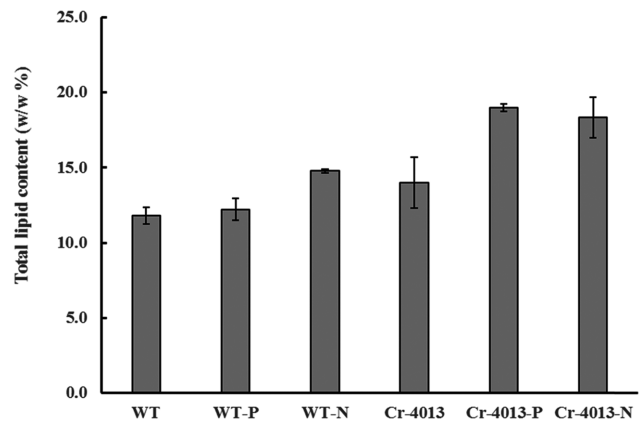


Fig. 3. Total lipid contents of *Chlamydomonas reinhardtii* and its mutant strain Cr-4013 cells harvested after grown under BBM and nutrient-starved BBM medium for 7 days. After 4 days culturing under normal BBM medium, starvation were carried out by replace nutrient depleted medium. Total lipid content level were represented based on dry cell weight. Symbols: (-N) medium lacking NaNO₃; (-P) medium lacking KH₂PO₄.

연구에서는 FAME 분석을 통해 지방산 조성의 변화를 확인해 보았다. 그 결과 영양원이 고갈되었을 때 야생형은 C18:1n9c와 C16:0 지방산은 증가하는 것을 확인할 수 있었고, 돌연변이 Cr-4013의 경우 C18:1n9t의 조성비가 감소하면서 C18:1n9c와 C16지방산이 증가한 것으로 확인되었다 (Fig. 5). 특히 C16:0 지방산의 경우 야생형과 돌연변이 균주 모두에서 영양원이 고갈되면 공통적으로 증가하는 경향을 보였고, 이 C16 지방산에는 중성 및 극성 지질이 모두 높은 비율로 함유되어있는 것으로 밝혀진 바가 있다 [17]. 또한 본 연구에서 수행한 지질 염색을 통해 극성 지질의 함량이 증가한 것으로 확인된 것으로 보아 영양원의 고갈은 C16 지방산의

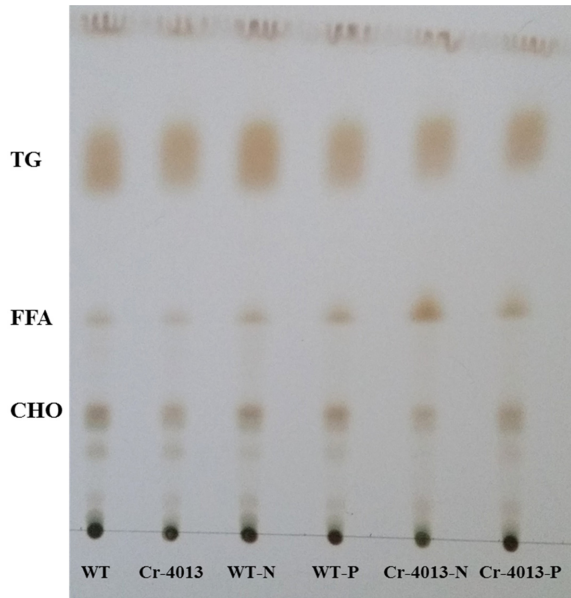


Fig. 4. Total lipid composition of *Chlamydomonas reinhardtii* and its mutant strain Cr-4013 was determined by thin-layer chromatography using hexane:diethyl-ether:acetic acid (70:30:1) and lipids detected via sulfuric acid. Standards used were triacylglycerol (TG), free fatty acid (FFA), cholesterol (CHO). Symbols: (-N) medium lacking NaNO₃; (-P) medium lacking KH₂PO₄.

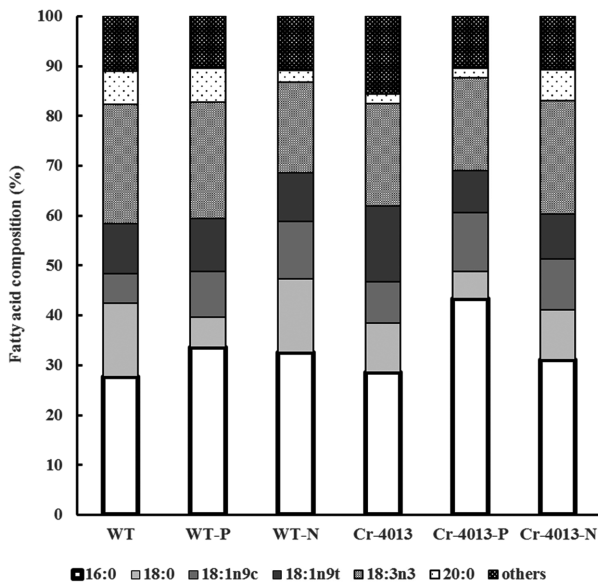


Fig. 5. Fatty acid composition (as percentage of FA with respect to total fatty acid fraction, % total FA) in *Chlamydomonas reinhardtii* and its mutant strain Cr-4013. Symbols: (-N) medium lacking NaNO₃; (-P) medium lacking KH₂PO₄.

극성 지질 함량을 높이고, 이로 인한 총 지질 또한 증가하였을 것이라고 예상이 된다.

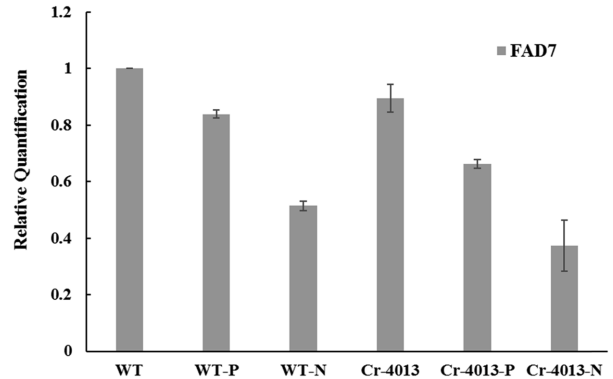


Fig. 6. Changes of FAD7 gene expression level. Gene expression detected by real time PCR in *Chlamydomonas reinhardtii* and its mutant strain Cr-4013 in response to nutrient starvation. Symbols: (-N) medium lacking NaNO₃; (-P) medium lacking KH₂PO₄.

3.3. 영양원 고갈로 인한 FAD7 유전자 발현의 변화

본 연구에서는 영양원이 고갈됨에 따라 야생형의 경우 P 제한 기질에서는 C18:0, N 제한 기질에서는 C20:0과 C18:3n3의 함량이 감소하였다. 돌연변이 Cr-4013의 경우 P 제한 기질에서는 C18:0과 C18:1n9t의 함량이 감소하였고, N 제한 기질에서는 C18:1n9t의 함량이 감소하였다. 이러한 지방산 조성의 변화에는 여러 유전자들의 발현이 관여하고 있다. 본 연구에서는 상대적으로 지방 함량의 변화가 큰 야생형의 경우 N 제한 기질, 그리고 돌연변이 Cr-4013의 경우 N 제한 기질과 P 제한 기질에서 공통적으로 감소한 지방산 조성을 확인한 결과 불포화지방산의 함량이 감소한 것을 확인하였다. 야생형의 N 기질 제한 조건에서는 C18:3n3, 돌연변이 균주에서는 C18:1n9t의 함량이 각각 감소하였다. 기존에 발표된 연구에 의하면 *Chlamydomonas* sp.에서 FAD 유전자의 발현이 증가하였을 경우 불포화지방산의 함량이 증가하는 것으로 밝혀진 바가 있다 [18]. 이에 따라 본 연구에서는 지방산 대사과정에서 불포화지방산 합성에 관련된 FAD 유전자의 발현이 감소하였을 것이라 예상할 수 있었고, *Chlamydomonas reinhardtii*에서 밝혀진 fatty acid desaturase인 FAD7 (chloroplast glycerolipid ω-3-fatty acid desaturase) 유전자 발현의 변화와 지방산 조성의 변화의 관계를 확인해 보고자 하였다. PCR 결과 영양원이 고갈되었을 때 FAD7 유전자의 발현이 감소하는 것으로 확인이 되었고, 이를 real-time PCR을 통해 분석한 결과 phosphate가 제거되었을 때 약 20% 발현이 감소하였고, nitrogen이 제거 되었을 때 약 50% 감소하는 것으로 확인되었다 (Fig. 6).

4. CONCLUSION

본 연구에서는 미세조류 배양시 영양원이 내부 저장물질인 지질 생합성에 미치는 영향을 연구하였다. 이를 위하여 미세조류인 *Chlamydomonas reinhardtii*와 기존 연구에 의해 확보

한 지질 합성량이 20% 증가된 돌연변이를 사용하여 각각 nitrogen과 phosphate가 제거되었을 때 지질 및 지방산의 변화를 연구하였다. 영양원이 제거되었을 때 세포의 성장률은 $0.43\sim 0.45 \text{ mgmL}^{-1}\text{d}^{-1}$ 에서 $0.34\sim 0.38 \text{ mgmL}^{-1}\text{d}^{-1}$ 로 약 20% 감소하였다. 하지만 총 지질 합성량은 영양원이 제거되었을 때 돌연변이 Cr-4013에서 최대 33% 증가를 하였고, 이는 *Chlamydomonas* 야생형에 비해 약 61% 증가한 수치이다. 또한 지방산 조성의 변화를 관찰한 결과 영양원이 고갈되었을 경우 C16 그룹의 지방산이 증가하였고, fatty acid pathway에서 불포화 지방산 합성과 관련된 FAD7 유전자의 발현이 감소하는 것으로 확인이 되었다. 이와 같은 실험 결과들은 돌연변이 Cr-4013이 바이오에너지 생산시 지질 생산에 높은 수율을 보일 것으로 기대되고, 또한 다른 미세조류를 이용한 고지질 생산 유도에 기초 자료로 사용될 수 있을 것으로 기대된다.

Acknowledgements

본 연구는 농림축산식품부·해양수산부·농촌진흥청·산림청 Golden Seed 프로젝트와 2013년도 전남대학교 학술연구비 지원에 의하여 연구되었습니다.

REFERENCES

- Brennan, L. and P. Owende (2010) Biofuels from microalgae-A review of technologies for production, processing, and extractions of biofuels and co-products. *Renewable and Sustainable Energy Reviews* 14.2: 557-577.
- Ahmad, A. L., N. H. Yasin, C. J. C. Derek, and J. K. Lim (2011) Microalgae as a sustainable energy source for biodiesel production. *Renewable and Sustainable Energy Reviews* 15: 584-593.
- Scurlock, J. M. O., D. O. Hall, J. I. House, and R. Howes (1993) Utilizing biomass crops as an energy source. A European perspective. *Springer Netherlands* 70: 499-518.
- Kosaric, N. and J. Velikonja (1995) Liquid and gaseous fuels from biotechnology: Challenge and opportunities. *FEMS Microbiology Reviews* 16: 111-142.
- Duffy, J. E., E. A. Canuel, W. Adey and J. P. Swaddle (2009) Biofuels: Algae. *Science* 326: 1345.
- Brune, D. E., T. J. Lundquist, and J. R. Benemann (2009) Microalgal biomass for greenhouse gas reductions: potential for replacement of fossil fuels and animal feeds. *Journal of Environmental Engineering* 135: 1136-1144.
- Demirbas, A. (2007) Importance of biodiesel as transportation fuel. *Energy Policy* 35: 4661-4670.
- Guckert, J. B. and K. E. Cooksey (1990) Triglyceride accumulation and fatty acid profile changes in *Chlorella* (*Chlorophyta*) during high pH-induced cell cycle inhibition. *Journal of Phycology* 26: 72-79.
- Wang, Z. T., N. Ullrich, S. Joo, S. Waffenschmidt, and U. Goode-nough (2009) Algal lipid bodies: stress induction, purification, and biochemical characterization in wild type and starchless *Chlamydomonas reinhardtii*. *Eukaryotic Cell* 8: 1856-1868.
- Grillitsh, K. and G. Daum (2011) Triacylglycerol lipases of the yeast. *Frontiers in Biology* 6: 219-230.
- Choi, J., M., Yoon, and D.H. Kim (2014) A mutant *Chlamydomonas reinhardtii* M4013 having higher lipid content and preparation method thereof, and the production of bio-diesel from the mutant *Chlamydomonas reinhardtii* M4013. *Korea Patent* 10-2013-0041784.
- Bischoff, H. W. and H. C. Bold (1963). *Some soil algae from Enchanted Rock and related algal species* (No. 4). University of Texas.
- Yao, S., A. Brandt, H. Egsgaard, and C. Gjermansen (2012) Neutral lipid accumulation at elevated temperature in conditional mutants of two microalgae species. *Plant Physiology and Biochemistry* 61: 71-79.
- Solovchenko, A. E., I. Khozin-Goldberg, S. Didi-Cohen, Z. Cohen, and M. N. Merzlyak (2008) Effects of light intensity and nitrogen starvation on growth, total fatty acids and arachidonic acid in the green microalga *Parietochloris incisa*. *Journal of Applied Phycology* 20: 245-251.
- Rodolfi, L., G. C. Zittelli, N. Bassi, G. Padovani, N. Biondi, G. Bonini, and M. R. Tredici (2009) Microalgae for Oil: Strain Selection, Induction of Lipid Synthesis and Outdoor Mass Cultivation in a Low-Cost Photobioreactor. *Biotechnology and Bioengineering* 102: 100-112.
- Bilanovic, D., A. Andargatchew, T. Kroeger, and G. Shelef (2009) Freshwater and marine microalgae sequestering of CO₂ at different C and N concentrations - Response surface methodology analysis. *Energy Conversion and Management* 50: 262-267.
- Hu, G, Y. Fan, L. Zhang, C. Yuan, J. Wang, W. Li, and F. Li (2013) Enhanced lipid productivity and photosynthesis efficiency in a *Desmodesmus* sp. mutant induced by heavy carbon ions. *PLoS one*. 8: e60700.
- An, M., S. Mou, X. Zhang, Z. Zheng, N. Ye, D. Wang, and J. Miao (2013) Expression of fatty acid desaturase genes and fatty acid accumulation in *Chlamydomonas* sp. ICE-L under salt stress. *Biore-source Technology* 149: 77-83.