

클로로필 고생산성 *Chlorella vulgaris* 변이주의 특성 분석

박현진¹, 김옥주², 하지민¹, 최태오², 이재화^{1*}

¹신라대학교 의생명과학대학 제약공학과

²(주)클로랜드

Received: July 29, 2015 / Revised: September 2, 2015 / Accepted: September 2, 2015

Characterization of *Chlorella vulgaris* Mutants Producing High Chlorophyll

Hyun-Jin Park¹, Ok Ju Kim², Ji Min Ha¹, Tae O Choi², and Jae-Hwa Lee^{1*}

¹Department of Pharmaceutical Engineering, College of Medical and Life Science, Silla University, Busan 617-736, Republic of Korea

²Chloland Co. Ltd., Geoje 656-851, Republic of Korea

Micro-algae are unicellular photosynthetic organisms and produce pigments such as chlorophyll and carotenoid. *Chlorella* contains a lot of protein and functional components like lipids, chlorophyll and carotenoids. In this study we induced mutants of *Chlorella vulgaris* (*C. vulgaris*) through ultraviolet radiation (UV-B) and selected two mutants by pigment (chlorophyll and carotenoids) content. We named the mutants 'UBM1-2', 'UBM2-57' and they were cultivated for 21-days. Cell growth, dry cell weight, protein content, lipid and pigments content were measured. The results indicated that the mutants displayed slower cell growth, lower dry cell weight and protein content than the wild type. However, for UBM1-2 the lipid content was 21% higher than the wild type. In addition, the mutants' chlorophyll content was 37% and 89% higher than the wild type and the carotenoids content was 27% and 70% higher than the wild type, respectively.

Keywords: Microalgae, *C. vulgaris*, chlorophyll, carotenoids, UV-B

서론

조류(algae)는 해수조류와 담수조류로 구별되며, 크기에 따라 미세조류(microalgae)와 거대조류(macroalgae)로 분류된다[23]. 미세조류는 이산화탄소, 물, 태양에너지를 이용하여 성장하는 광합성 단세포 생물로 탄수화물, 지질, 단백질, 색소 등 다양한 유용물질들을 함유하고 있어 이를 산업적으로 이용하기 위한 관심이 고조되고 있다[9].

미세조류 중 녹조류에 해당하는 클로렐라(*Chlorella*)는 직경 2–10 μm 의 구형 단세포로 20시간 마다 4배로 증식하여 육상 식물에 비해 증식속도가 빠르다고 알려져 있다[2, 11]. 클로렐라는 광합성을 통해 성장하며 세포 내 색소(엽록소 및 카로티노이드)와 지질과 같은 유용물질을 축적한다[12]. 또한, 다량의 단백질과 함께 약 14%의 지질을 함유하고 있다고 알려져 있다[6, 8].

자연에서 성장하는 미세조류(야생균주)의 경우 세포 내 유용물질 함유량이 적어 산업적 이용에 한계를 가진다[10]. 이를 극복하기 위해 유용물질 축적량이 증대된 미세조류 균주의 개량이 절실하다. 미세조류 개량을 위한 방법으로는 물리적, 화학적 돌연변이원 처리를 통한 무작위적 균주개량(random mutation)과 세포 내 유전정보 변화를 통한 균주개량 방법이 있다. 김 등[16]은 화학적 돌연변이원에 해당하는 EMS를 *Arthrospira platensis*에 처리하여 돌연변이를 유도하였으며, cerulenin 처리를 통해 선별한 돌연변이의 지질 함량은 야생균주에 비해 최대 4.8배 증가하였으며, phycoerythrins 함량 또한 약 6.9배 증대됨을 확인하였다. *Chlorella vulgaris* (*C. vulgaris*)에 EMS를 처리한 연구에서도 세포 생장은 야생균주와 비슷하나 지질 및 클로로필과 같은 유용성분의 함량이 증대된 변이주를 획득할 수 있었다[14]. 박 등[19]은 *Hamatococcus pluvialis*(*H. pluvialis*)에 자외선 조사와 colchicines를 처리하였으며, 자외선을 조사한 변이주에서 야생균주 보다 1.68배 높은 카로티노이드를 생산하였고, colchicines를 처리한 변이주는 성장속도가 야생균주 보다 20–30% 증가하였다. 이처럼 돌연변이원 처리를 통한 무작

*Corresponding author

Tel: +82-51-999-5748, Fax: +82-51-999-5636

E-mail: jhalee@silla.ac.kr

© 2015, The Korean Society for Microbiology and Biotechnology

위 돌연변이법은 미세조류 내 유용물질의 생산을 증대에 유용한 방법이다[4].

물리적 돌연변이원 가운데 자외선은 파장에 따라 UV-A (320–400 nm), UV-B (280–320 nm), UV-C (190–280 nm)로 나누어진다[7]. 해조류에 자외선을 조사하였을 경우 DNA, RNA, 단백질의 변형과, 세포분열, 세포의 크기, 생존율, 광합성 등의 감소를 초래한다[22]. 또한, 식물이 UV-B에 직접 노출되면 잎 구조와 생식생장기관의 변형을 초래하며, 세포 내 색소 합성 대사 감소를 초래한다[24]. 박 등[21]은 *A. platensis*에 자외선을 조사하여 돌연변이를 유도하였으며, 그 결과 지질 및 색소 함량이 야생균주에 비해 증대된 균주를 선별할 수 있었다. 또한 김 등[13]은 자외선을 *N. oculata*에 조사하여 선별한 돌연변이 균주에서 세포생장과 지질함량의 변화를 확인할 수 있었다. 이처럼 자외선 조사는 미세조류 내 유용물질 함량이 증대된 개량균주를 개발할 수 있는 방법으로 판단된다.

본 연구는 *C. vulgaris*에 자외선(UV-B)을 조사하여 기 확보한 변이주 중 색소함량이 증대된 변이주를 선별하고자 하였으며, 선별된 변이주의 특성을 분석하였다.

실 험

균주 및 배양조건

본 연구에 사용된 미세조류는 *Chlorella vulgaris* (KMMCC 191)로 한국미세조류은행으로부터 분양받아 사용하였다. f/2 배지를 이용하여 250 ml 삼각플라스크에서 working volume 100 ml 부피로 온도 25°C, 교반속도 120 rpm, 광도 3,000 lux의 조건하에 배양하였다[20]. 광주기는 12 h : 12 h(명 : 암)으로 명반응시 형광등을 이용하여 조사하였다. 상기 f/2 배지는 1 L의 인공해수[1]에 NaNO₃; 150 mg, NaH₂PO₄·9H₂O; 8.69 mg, ferric EDTA; 10 mg, MnCl₂; 0.22 mg, CoCl₂; 0.11 mg, CuSO₄·5H₂O; 0.0196 mg, ZnSO₄·7H₂O; 0.044 mg, Na₂SiO₃·9H₂O; 50 mg, Na₂MoO₄·2H₂O; 0.012 mg, Vitamine B₁₂; 1 mg, Biotin 1 mg, Thiamine·HCl; 0.2 mg을 첨가하여 제조하였다. 제조한 배지는 멸균 후 사용하였다.

자외선 조사 변이주 유도 및 선별

자외선 조사는 UV-B (254 nm)의 파장으로 자외선 램프 스탠드(15 W, 76 μM/cm², VILBER Lourmat, France)를 이용하여 균체에 직접 조사하였다. 조사거리는 약 15 cm였다. 대수 증식기의 *C. vulgaris* 균주를 인산완충액으로 세척한 후, 세포 흡광도(680 nm)를 0.5로 조정하여 5 ml씩 60 mm dish에 담아 자외선을 1, 2, 3, 4, 5분 조사하였다.

자외선 조사 후 세포를 적정량 희석하여 f/2 한천 고체평

판배지에 도말하여 콜로니가 생성될 때까지 약 3주간 배양하였다. 생성된 콜로니는 f/2 액체배지에 접종하여 세포가 일정 농도가 될 때까지 배양한 후 돌연변이주의 특성을 분석하였다[13].

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 3시간 동안 건조시킨 후 얻어진 건조무게로부터 좋은 직선성(R² = 0.992)으로 나와 아래의 상관관계식을 산출하였다[14].

단백질 분석은 bovine serum albumin (BSA)을 이용하여 다. 680 nm에서 흡광도 0.5로 세포를 조정하여 Bradford 법[17]에 따라 595 nm에서 흡광도를 측정하였다.

$$\text{Protein } (\mu\text{g/ml}) = (A_{595} + 0.0035) / 0.0349$$

지질함량 분석

미세조류의 총 지질 함량은 Chen 등[3]의 방법에 따라 측정하였다. 680 nm에서 흡광도를 0.5로 조정된 세포; 10 μl와 증류수; 138 μl, Nile red; 2 μl, DMSO; 50 μl를 혼합한 후, 40°C에서 10분간 반응시켰다. Nile red로 염색한 세포는 형광 광도계(Infinite F200 pro, Tecan, Austria)를 이용하여 excitation 495 nm, emission 620 nm로 측정하였다. 형광값(fluorescence intensity)은 미세조류 자체의 형광값을 뺀 값으로 나타내었으며, 지질 정량을 위해 triolein으로 표준 정량 곡선을 작성하였다. 그 결과 좋은 직선성(R² = 0.99935)으로 나와 야생균주 및 변이주의 지질 함량을 정량하였다.

색소 추출

미세조류의 광합성 색소를 측정하기 위해 21일 동안 배양한 세포(*C. vulgaris*) 1 ml을 13,000 rpm에서 2분간 원심분리 하여 상등액은 버리고 methanol 1 ml을 첨가하였다. 60°C에서 30분간 추출하고 0°C에서 5분간 냉각시킨 후, 상등액만 분리하여 UV/Vis 분광기로 650, 665, 461, 664 nm 파장에서 흡광도를 측정하였다. 클로로필과 카로티노이드의 양은 다음과 같은 식으로 계산하였다[5].

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

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

결과 및 고찰

자외선 유도 돌연변이주 선별 및 세포생장

미세조류 *C. vulgaris*의 돌연변이 유도를 위해 자외선을

1, 2, 3, 4, 5분 조사하였다. 자외선을 조사한 균주는 f/2 고체 배지에 접종하여 약 3주간 배양한 후, 생성된 콜로니 중 크기가 크고 진한 초록색을 띠는 단일 콜로니를 선별하였다. 자외선 조사시간 별로 얻어진 단일 콜로니를 8개씩 선별하여 f/2 액체 배지에 옮겨 배양하였다. 세포 성장에 큰 영향을 미치지 않으며, 색소함량이 가장 증대된 변이주 2종을 최종 선별하여 이를 UBM1-2, UBM2-57로 명명하였다.

UBM1-2, UBM2-57 변이주 2종을 21일 동안 3일 간격으로 세포생장을 측정하였다. UBM1-2, UBM2-57 균주는 야

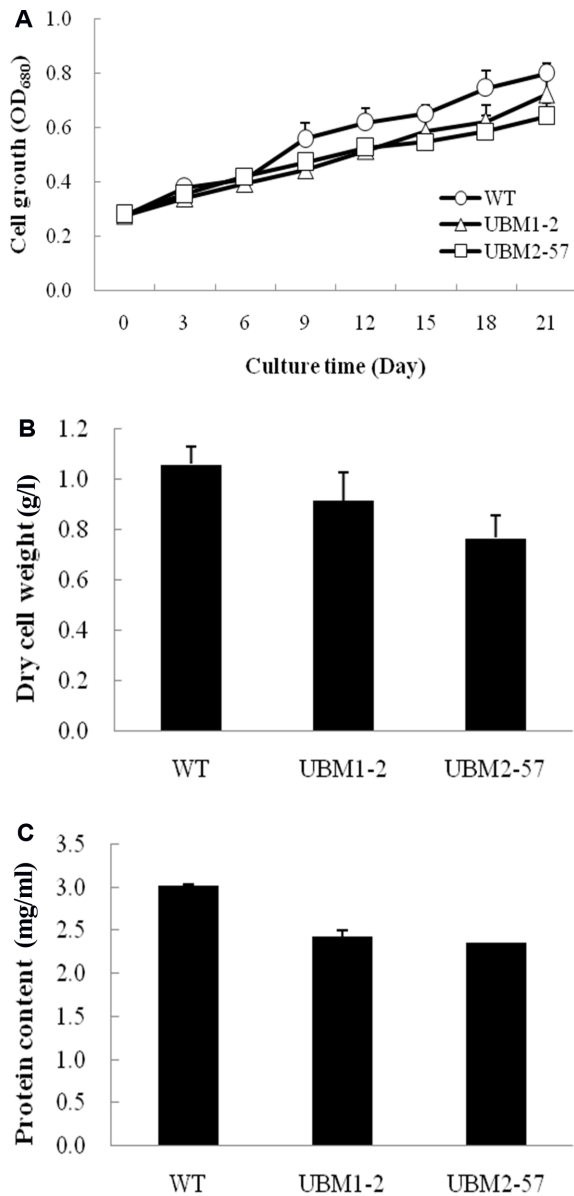


Fig. 1. Cell growth, dry cell weight and protein of wild type and mutants of *C. vulgaris*. (A) Cell growth, (B) Dry cell weight(DCW), (C) Protein content. Data are expressed as mean \pm SD (n = 3).

생균주(WT)에 비해 각각 10%, 20% 가량 더디게 성장함을 확인할 수 있었다(Fig. 1A). UBM1-2와 UBM2-57의 세포건조중량은 각각 0.92 g/l, 0.77 g/l로 WT (1.06 g/l)에 비해 약 14%, 28% 감소함을 확인하였다(Fig. 1B). 배양 21일 차에 세포 내 단백질 함량을 측정하였다. UBM1-2는 2.44 μ g/ml, UBM2-57은 2.36 μ g/ml로 WT (3.02 μ g/ml)에 비해 약 20%, 22% 감소하였다(Fig. 1C). 따라서 UBM1-2, UBM2-57 두 종 모두 WT에 비해 세포생장률, 세포 건조중량, 단백질 함량 모두 낮음을 확인하였다.

한 등[7]은 자외선이 식물의 광합성 색소를 파괴하며 세포 성장을 억제시킨다고 보고하였다. 본 실험결과로 얻어진 변이주도 세포 성장 및 단백질 발현이 WT보다 느리게 증식함을 확인하였다. 이처럼 강한 자외선(UV-B) 조사로 얻어진 변이주는 작물의 생체량과 수량감소를 수반한다.

자외선 유도 돌연변이주 2종의 지질 함량

클로렐라의 지방산 함량은 온도, 태양광선, 배지 내 영양원(질소원) 함량 등의 성장환경에 의해 변화된다[15]. 본 연구는 미세조류의 효과적인 염색을 위하여 흡광도 0.5로 세포를 조정하여 측정하였다. WT는 지질함량이 51.17 μ g/ml 이었고, UBM1-2와 UBM2-57 변이주의 지질함량은 각각 61.91 μ g/ml, 31.28 μ g/ml이었다(Fig. 2). UBM1-2는 WT에 비해 21% 증가하였으나, UBM2-57은 39% 감소하였다. UBM1-2 균주는 세포생장과 정반대의 결과로 세포생장은 감소하였지만, 지질 함량은 증가하는 경향을 보였다. 일반적으로 세포 생장이 낮을수록 지질 함량이 높다고 알려져 있다 [13]. 본 연구에서도 UBM1-2 균주는 WT에 비해 세포 생장이 9.6% 가량 더디게 성장하였지만, 지질 함량은 세포생장에 대비하여 지질을 약 11% 가량 더 많이 축적하고 있음을 확인하였다. 이는 외부로부터 스트레스에 대응하기 위해 미세조류 세포 내 지질 합성 대사가 활발히 일어남을 유추할 수 있다. *C. vulgaris*를 질소원이 제한된 배지에서 배양

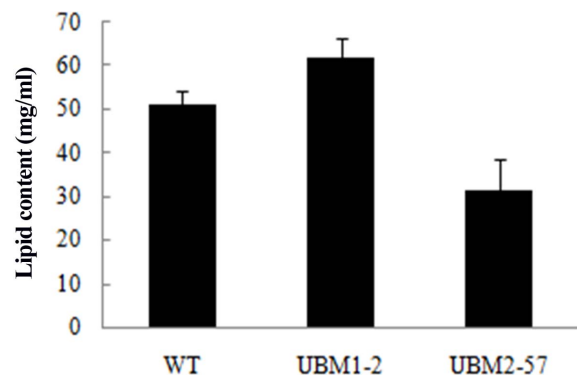


Fig. 2. Relative lipid content of wild type and two mutants of *C. vulgaris*. Data are expressed as mean \pm SD (n = 3).

하였을 경우 대조군에 비해 약 40%의 지질 함량이 증가된다고 보고되며[8], 미세조류가 스트레스에 노출되면 외부로부터 보호하기 위하여 지질 대사를 변경하거나 지질 축적량이 변화한다고 알려져 있다[4]. 스트레스 환경에서의 미세조류 생장은 지질 축적량을 증대시키는 요인이기도 하나 세포 내 생장을 더디게 만드는 작용을 하는 것으로 보고되고 있다.

자외선 유도 돌연변이주 2종의 색소 함량

21일간 배양한 미세조류 2종의 클로로필 및 카로티노이드 함량을 분석 하였으며, 클로로필과 카로티노이드 함량은 세포 건조 중량당 함량(DCW)으로 계산하였다. 클로로필(Fig. 3A) 함량은 UBM1-2, UBM2-57 균주가 각각 6.82 mg/g, 9.40 mg/g으로 WT (4.98 mg/g)에 비해 각각 37%, 89% 증가되었고, 카로티노이드(Fig. 3B) 함량은 UBM1-2, UBM2-57 균주가 각각 1.77 mg/g, 2.37 mg/g으로 WT (1.39 mg/g)에 비해 각각 27%, 70% 증가하였다. 식물에 자외선 조사는 광합성 저해를 초래하게 된다. 한 예로, 녹조 구멍갈파래 식물에 자외선을 2시간 가량 노출 시 광합성 색소가 50% 이상 감소하였으며[18], *N. oculata*에 자외선을 조사하여 분리한

변이주의 클로로필 함량은 야생균주 보다 낮았다[13].

하지만 본 연구에서는 자외선을 조사하여 분리한 변이주는 야생의 *C. vulgaris*보다 색소함량이 증가되었다. 박 등[19]은 *H. pluvialis*에 자외선을 조사하여 유도된 돌연변이주에서 총 카로티노이드 함량이 1.68배 증가하였다. 미세조류는 스트레스 환경에 노출되었을 경우 지질과 색소와 같은 유용 물질을 다량 축적하고 있다고 알려져 있다[5]. 이러한 보고들을 바탕으로 본 연구에서의 자외선 조사는 스트레스 요인으로 작용하여 *C. vulgaris*의 색소함량 변화에 영향을 주었을 것이라 사료된다.

요약

본 연구는 *Chlorella vulgaris*에 자외선을 조사하여 획득한 변이주 중 색소함량이 높은 변이주 2종(UBM1-2, UBM2-57)의 특성을 분석하였다. 2종의 변이주의 성장속도는 WT와 비교했을 때 20% 가량 더딘 성장율을 보였고, 세포건조 중량 및 단백질 함량 또한 세포생장과 비슷한 패턴을 보였다. 지질 함량은 UBM1-2 변이주에서 WT와 비교 시 21% 높은 지질 함량을 확인하였지만, UBM2-57 변이주는 WT보다 39% 낮은 지질함량을 축적하고 있음을 확인하였다. 하지만, 색소함량(클로로필, 카로티노이드)의 경우 WT와 비교 시 유의적으로 높은 함량을 축적하고 있음을 확인하였다. 클로로필 함량은 UBM1-2, UBM2-57 변이주가 WT보다 각각 37%, 89% 높았고, 카로티노이드 함량은 WT보다 각각 27%, 70% 높음을 확인하였다. 본 연구를 통해 선별한 미세조류 변이주는 야생균주와 비교 시 세포 생장에 큰 차이를 보이지 않으며, 유용성분을 다량 함유하고 있어 화장품 및 의약품, 건강 기능식품의 중요한 소재로써 이용이 가능할 것으로 판단된다.

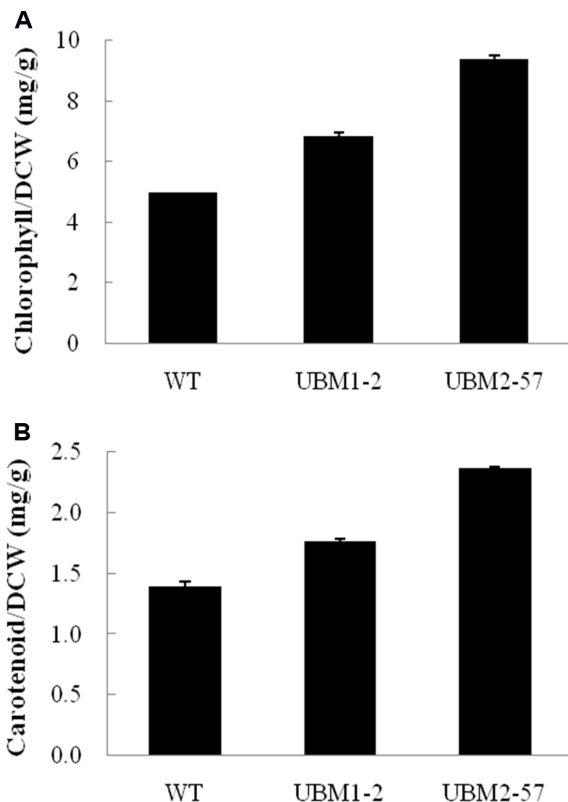


Fig. 3. Pigments content of wild type and two mutants of *C. vulgaris* (A) Chlorophyll content per dry cell weight, (B) Carotenoids content per dry cell weight. Data are expressed as mean \pm SD (n = 3).

References

1. Abo-Shady AM, Al-ghaffar BA, Rahhal MMH, Abd-El Monem A. 2007. Biological control of faba bean pathogenic fungi by three cyanobacterial filtrates. *Pakistan J. Biol. Sci.* **10**: 3029–3038.
2. Barclay WR, Meager KM, Abril JR. 1994. Heterotrophic production of long chain omega-3 fatty acids utilizing algae and algae-like microorganisms. *J. Appl. Phycol.* **6**: 123–129.
3. Chen W, Sommerfeld M, Hu Q. 2011. Microwave assisted nile red method for in vivo quantification of neutral lipids in microalgae. *Biores. Technol.* **102**: 135–141.
4. Choi S-J, Kim Y-H, Kim A, Lee J-H. 2013. *Arthrospira platen-sis* mutants containing high lipid content by electron beam irradiation and analysis of its fatty acid composition. *Appl. Chem. Eng.* **24**: 628–632.
5. Choi S-J, Lee J-H. 2015. Characteristic of *Arthrospira platen-sis* enhanced antioxidant activity. *Korean Soc. Biotechnol. Bio-*

- eng. J. **30**: 119–124.
6. Han JG, Kang GG, Kim JK, Kim SH. 2002. The present status and future of *Chlorella*. *Food Sci. Ind.*, **6**: 64–69.
 7. Han TJ. 1999. Overview of UV-B effects on marine algae. *Korean J. Environ. Biol.* **17**: 1–9.
 8. Illman AM, Scragg AH, Shales SW. 2000. Increase in *Chlorella* strains calorific values when grown in low nitrogen medium. *Enzyme and Microb. Technol.* **27**: 631–635.
 9. Jeong UC, Han JC, Choi BD, Kang SJ. 2013. Lipid and fatty acid composition in *Nannochloropsis oculata* cultured in varying salinities. *Korean J. Fish Aquat. Sci.* **46**: 252–258.
 10. Jo BH, Cha HJ. 2010. Biodiesel production using microalgal marine biomass. *Korean Soc. Biotechnol. Bioeng. J.* **25**: 109–115.
 11. Kang M-S, Sim S-J, Chae HJ. 2004. *Chlorella* as a functional biomaterial. *Korean Soc. Biotechnol. Bioeng. J.* **19**: 1–11.
 12. Kim DC, Won SI, In MJ. 2014. Preparation and quality characteristics of *Mul-kimchi* added with *Chlorella*. *J. Appl. Biol. Chem.* **57**: 23–28.
 13. Kim J-H, Park H-J, Kim Y-H, Joo H, Lee S-H, Lee J-H. 2013. UV-induced mutagenesis of *Nannochloropsis oculata* for the increase of lipid accumulation and its characterization. *Appl. Chem. Eng.* **24**: 155–160.
 14. Kim OJ, Lee J-H. 2015. Characterization of *Chlorella Vulgaris* mutants generated by EMS (Ethyl Methane Sulphonate). *Appl. Chem. Eng.* **26**: 265–269.
 15. Kim YH. 1999. The effect on bioactivities of *Chlorella*. *Food Ind.* **10**: 122–128.
 16. Kim Y-H, Lee J-H. 2012. Isolation of *Arthrospira platensis* mutants producing high lipid and phycobiliproteins. *Korean Soc. Biotechnol. Bioeng. J.* **27**: 172–176.
 17. Lee S-I, Park J-Y, Jung J-C, Lee D-C, Lee S-H, Ha I-M, et al. 2005. Effects of carbon source on production of leucocin A from transformed *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Life Sci.* **15**: 847–850.
 18. Marckerness SAH, Butt JP, Jordan BR, Thomas B. 1996. Ameriolation of ultraviolet-B-induced down-regulation of mRNA levels for chloroplast proteins, by high irradiance, is mediated by photosynthesis. *J. Plant Physiol.* **148**: 100–106.
 19. Park B-J, Kim B-M, Shim S-H, Kim J-D, Lee C-G. 2006. Enhancement of astaxanthin production of *Haematococcus pluvialis* by mutation. *Korean J. Microbiol. Biotechnol.* **34**: 136–142.
 20. Park H-J, Jin E-J, Jung T-M, Joo H, Lee J-H. 2010. Optimal culture conditions for photosynthetic microalgae *Nannochloropsis oculata*. *Appl. Chem. Eng.* **21**: 659–663.
 21. Park H-J, Kim Y-H, Lee J-H. 2012. Characterization of *Arthrospira platensis* mutants generated by UV-B irradiation. *Appl. Chem. Eng.* **23**: 496–500.
 22. Park J-H, Han TJ. 1999. Overview of UV-absorbing pigments in marine algae. *Algae* **14**: 201–212.
 23. Park JI, Woo H-C, Lee J-H. 2008. Production of bio-energy from marine algae: status and perspectives. *Korean Chem. Eng. Res.* **46**: 833–844.
 24. Yun HJ, Sung JK, Lee SY, Lee YJ, Ha SK, Sonn YK. 2014. Changes in photosynthesis and carbohydrate synthesis in response to elevated UV-B environment. *CNU J. Agricul. Sci.* **41**: 275–281.