

Enhanced Production of Astaxanthin in *Paracoccus haeundaensis* Strain by Physical and Chemical Mutagenesis

Yong Bae Seo^{1,2}, Tae Hyug Jeong³, Seong Seok Choi¹, Han Kyu Lim³ and Gun-Do Kim^{1*}

¹Department of Microbiology, College of Natural Sciences, Pukyong National University, Busan 48513, Korea

²Institute of Marine Biotechnology, Pukyong National University, Busan 48513, Korea

³Department of Marine and Fisheries Resources, College of Natural Sciences, Mokpo National University, Jeonnam 58554, Korea

Received January 31, 2017 / Revised March 6, 2017 / Accepted March 6, 2017

Carotenoids are natural lipid-soluble pigments, which are produced primarily by bacteria, algae, and plants. Many studies have focused on the identification, production, and utilization of natural sources of astaxanthin from algae, yeast, and crustacean byproducts as an alternative to the synthetic pigment, which is mostly used today. The aim of the present study was to identify a mutant of *Paracoccus haeundaensis* by exposure to UV and ethyl methanesulfonate (EMS). The mutant was then exposed to nutrient stress conditions to isolate an astaxanthin-hyperproducing strain, followed by characterization of the mutant. The survival rate decreased in accordance with an increase in the UV exposure time and an increase in the EMS concentration. A mutant of the original *P. haeundaensis* strain was identified that showed hyperproduction of astaxanthin following exposure to UV irradiation (20 min) and EMS treatment (0.4 M concentration). The optimal culture conditions for the PUE mutant were 25°C, pH 7-8, and 3% NaCl. The effects of various carbon and nitrogen sources on the growth and astaxanthin production of PUE were examined. The addition of 1% raffinose and 3% potassium nitrate influenced cell growth and astaxanthin production. The selected mutant exhibited an increase of 1.58 folds in astaxanthin content compared to initial wild type strain. A genetically stable mutant strain obtained using mutagen (UV irradiation and EMS treatment) may be a suitable candidate for further industrial scale production of astaxanthin.

Key words : Astaxanthin, carotenoid, mutagen, *Paracoccus haeundaensis*

서 론

카로티노이드(Carotenoid)는 자연계에 존재하는 지용성 색소로서 세균, 조류, 식물에서 합성된다. 카로티노이드는 일반적으로 C₃₀₋₅₀ 형태로 존재하며 탄소와 수소로만 이루어진 carotene 계열과 산소를 포함하는 xanthophyll 계열이 존재한다. Astaxanthin (3,3'-dihydroxy-β, β-carotene-4,4'-dione)은 xanthophyll계열의 색소이며, 8개의 isoprenoid units로 구성되어 있다[5]. 이러한 astaxanthin은 높은 항산화 활성을 가지는 물질로 알려져 있으며[1, 2, 10], 그 생물학적 기능으로는 광산화적 손상에 대한 방어[6], 집광성[10], 호르몬 전구물질[22] 등 다양한 역할을 수행한다. 이러한 astaxanthin의 다양한 기능성은 인간과 동물에 대한 잠재적인 이점에 관한 많은 연구들을 촉발시켰고 산업적으로는 식품 착색제, 사료 첨가물, 미용 소

제, 제약 소재로 이용되고 있다[7, 10, 17]. 또한, 항암 활성과 만성 질환의 예방에 중요한 역할을 수행한다고 보고되면서 그 산업적 이용 빈도는 더욱 더 증가하고 있다[1, 3, 20]. 따라서 astaxanthin은 화학 합성, 갑각류 등에서 추출, 미생물을 이용한 생합성 등으로 생산되어 그 수요량을 증대하고 있다. 화학 합성의 경우 Roche사에서 생산되는 astaxanthin이 있으며, 이들 대부분은 양어 사료(Calori-pink)로 사용되고 있다[9]. 그러나 최근 합성 astaxanthin의 생체 내 흡수 효율과 양어 사료 이력 추적제가 대두되면서 합성소재의 사용 빈도가 감소하는 추세이다. 세계 시장의 대부분을 차지하던 합성 astaxanthin의 대안으로 조류나 세균, 갑각류 등의 원료에서 astaxanthin를 생산, 정제하는 연구가 주목 받고 있다[8]. 하지만 갑각류 등에 의해서 추출하여 생산되는 astaxanthin의 경우 고비용의 추출 경비, 원료물질의 확보, 유기용매 또는 초임계 유체를 이용하여 추출하는 경우 추출 후 폐기물의 처리 등의 문제점으로 인하여 산업적 이용에 제한이 있다. 이러한 단점을 극복하기 위하여 astaxanthin을 생합성하는 미생물을 이용하여 생산하는 방법을 선호하고 있으며, 주로 이용되는 균주로는 *Hamatococcus pluvialis* [10], *Phaffia rhodozyma* [2], *Brevibacterium linens* [11], *Agrobacterium aurantiacum* [15] 등이 있다. 이와 더불어 astaxanthin 생합성 균주로부터 관련 유전자를 cloning하여 대

*Corresponding author

Tel : +82-51-629-5618, Fax : +82-51-629-5619

E-mail : gundokim@pknu.ac.kr

This is an Open-Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial License (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/3.0>) which permits unrestricted non-commercial use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

장균, 효모 등에서 생산하는 방법[13, 14, 21]과 돌연변이를 통한 astaxanthin 생산량 증대를 유도하는 연구들이 보고되고 있다[23-26].

양식 산업에 이용되는 astaxanthin은 양식 어류의 출하 전 사료와 함께 섭취 시켜 표피 또는 근육에 착색되는 효과로 자연산 어류 착색과 유사하게 만들어 소비자의 선호도를 증대시키는 역할을 한다. 이뿐만 아니라 astaxanthin은 β -carotene 이나 α -tocopherol 보다 뛰어난 항산화 능력을 가지고 있다 [16]. 그러나 어류 양식산업에서 사용되는 astaxanthin 제품의 경우, 정제된 astaxanthin을 어류 사료로 사용하기에는 경제성이 떨어지는 문제점이 있다. 따라서 합성 astaxanthin과 *H. pluvialis* 추출물의 혼합물을 주로 사용하게 되는 데, 이는 어류의 어피 착색률이 낮으며, *H. pluvialis*의 두꺼운 세포벽으로 인한 소화 흡수율이 어중에 따라 낮게 나타나는 단점을 가지고 있다[4, 27].

본 연구에서는 저비용 고효율의 astaxanthin을 생산하고, 이를 양식 어류 사료 첨가제로 개발하기 위한 기초 데이터를 제공하고자 한국 연근해에서 분리·동정된 C_{40} 계열 carotenoids 중 최종산물로 astaxanthin을 생합성하는 *Paracoccus haeundaensis*를 돌연변이 유도를 통해 astaxanthin 생합성 효율이 높은 변이주로 전환 시키고, 이들로부터 최적의 배양 조건과 astaxanthin 생합성 조건을 분석하고자 한다.

재료 및 방법

실험 재료 및 시약

본 연구에 사용된 Ethyl methanesulfonate (EMS), Ferric citrate 및 그 외의 일반 시약은 Sigma Chemical사의 특급 및 일반 시약을 사용하였고, Bacto-Tryptone, Bacto-Soytone, Bacto-Yeast extract, Poly peptone, NaCl은 Difco사에서 구입하였다. Astaxanthin 표준시약(Sigma, St. Louis, MO, USA)은 HPLC 정량분석을 위해 메탄올에 녹여 사용하였다.

균주 및 배양 조건

본 연구에 사용된 균주는 부산 해운대 연안에서 분리·동정된 밝은 오렌지색 색소를 띄는 *Paracoccus haeundaensis*이며, 이 균주는 PPES-II (0.2 g polypeptone, 1.0 g bacto soytone, 1.0 g proteose peptone, 1.0 g yeast extract, 3% NaCl, 0.1% ferric citrate) 배지를 이용하여 25°C, 48시간 진탕 배양하여 실험에 사용하였다.

돌연변이 균주 제조

돌연변이 유발을 위하여 UV 조사와 EMS를 이용하였다. UV 돌연변이는 PPES-II broth에서 25°C, 150 rpm 조건으로 24시간 동안 배양한 다음 OD₆₀₀ 값 0.1(약 10⁶ cells/ml)이 되도록 희석하여 멸균된 평판에 200 μ l을 분주 하였다. 이후 무균

평판에서부터 광원과의 거리를 20 cm로 고정된 후 조사 시간은 5-30 min 동안 UV (UV lamp: 254 nm, 30 W)를 조사하고 항온 배양기 25°C에서 18시간 동안 배양 후 PPES-II 평판 배지 (1.5% agar 함유)에 도말 하여 25°C에서 3일간 배양, 그 생존율 및 변이 균주를 분리하였다[22]. EMS 돌연변이는 PPES-II broth에서 상기 배양법과 동일하게 배양하여 균체를 원심분리하고 50 mM Phosphate buffered saline (PBS buffer) 완충액 (pH 5.0)으로 3회 세척한 후 50 mM PBS 완충액으로 OD₆₀₀ 값이 2가 되도록 현탁한 균체 용액 1 ml에 4 μ l의 EMS [0.01~0.4 M in 0.05 M PBS 완충액(pH 7.0)]을 가하여 25°C에서 45분간 배양하고 원심분리하여 50 mM PBS 완충액(pH 7.0)으로 3회 세척하여 EMS를 제거하였다. 그 후 50 mM PBS 완충액에 현탁하여 PPES-II 평판 배지에 도말하여 생존율 및 변이 주를 분리하였다[4]. 이와 같은 방법으로 각 돌연변이원에 대한 변이주를 선별하였으며, 우수 균주 선별을 위해서는 각각의 방법을 혼합하여 wild type 균주와 각각의 변이주의 astaxanthin 생산량을 HPLC로 비교 분석하였다.

배양 조건 및 색소 생산량 최적화 연구

최종 선별된 변이주의 배양조건 최적화를 위하여 탄소원, 질소원, 온도, pH, NaCl 농도 변화에 따른 변이주의 astaxanthin 생산량을 HPLC로 비교 분석하였으며, 균주 배양은 앞서 설명한 wild type 배양법과 동일하게 진행하였다.

Carotenoid 추출 및 Astaxanthin 분석

Carotenoid 추출은 Johnson 등[9] 발표한 논문을 참고하여 배양된 균주로 부터 carotenoid를 추출하였으며, 그 과정은 다음과 같다. 균주 배양액 1 ml를 13,000 rpm, 5분간 원심 분리하여 상층액을 제거하고, pellet에 90% acetone 1 ml을 첨가 후 3분간 homogenizer를 이용하여 세포를 파쇄한다. 파쇄액은 다시 13,000 rpm, 2분간 원심 분리하여, 상층의 acetone 층을 주사기 필터(0.22 μ m, nylon filter)를 이용해 여과하여 HPLC 분석 시료로 사용하였다. HPLC 분석은 Bio-rad (Hercules, CA, U.S.A.)사의 automated biologic HR system (#750-0047)을 이용하였다. Column은 Nova-Pak HR 6U C18 column (3.9×300 mm)이며, 40°C에서 분석하였다. 사용된 buffer의 조성은 다음과 같다: 14% 0.1 M Tris-HCl (pH 8.0), 84% acetonitrile, 2% methanol (0~15 min), 68% methanol과 32% ethyl acetate (15~20 min). Post-running은 10분간 이루어졌으며, Column 내 유속은 분당 1 ml이 되게 하였다. 분리된 astaxanthin은 photodiode array detector를 이용하여 absorption maxima인 470 nm에서 측정하여 표준물질과 비교 분석하였으며, astaxanthin standard는 Sigma-Aldrich에서 구입하였다.

통계 처리

모든 군의 실험 결과 수치는 평균±표준 오차(mean±SEM)로 나타내었다. 대조군과 실험 군간의 유의성 검정은 Student's t-test를 통해 이루어졌으며, $p < 0.05$ 일 때 유의적인 차이가 있는 것으로 판단하였다.

결과 및 고찰

UV 조사 및 EMS를 이용한 돌연변이주 선별

미생물의 carotenoid 함량은 활성 산소의 수준과 carotenoid 생합성에 관여하는 효소의 활성에 따라 각 개체의 carotenoid 생산량이 달라진다. 이에 본 연구에서는 UV 등을 이용하여 astaxanthin 생합성 균주인 *P. haeundaensis* (wild type strain)의 변이주를 제조하여 고함량의 astaxanthin 생산 변이주를 발굴하였다.

Wild type 균주의 돌연변이 유도를 위하여 돌연변이원으로 UV 및 EMS를 각기 다른 조사 시간과 농도로 처리하였다. 최초 wild type 균주를 1×10^6 cells/ml이 되도록 배양한 후 UV 조사의 경우 5, 10, 15, 20, 25, 30 min 단위로 조사하였으며, EMS의 경우 10, 50, 100, 200, 400 mM의 농도를 처리하여 돌연변이를 유도하였다.

그 결과 UV의 경우 조사 시간에 비례하여 colony 수가 감소하는 것을 알 수 있었으며, 세포 사멸율은 조사 시간 15 min 이상에서 50% 이하의 생존율을 보이는 것을 확인하였다(Fig. 1A). UV 조사에 의한 변이주 선별은 각 시간 대별 형성된 colony 중 가장 선명하게 밝은 오렌지색을 보이는 colony 6 개(각 시간 대별 1 개의 colony)를 선별하였으며, 이들로부터 biomass와 astaxanthin 생산량을 분석한 결과, UV 조사에 의해 선별된 6개의 colony는 wild type에 비해 PPES-II 배지에서의 성장 속도가 늦어지는 것을 확인 할 수 있었다. 이는 wild type 대비 선별된 변이주의 biomass 양이 감소하는 결과가 도출되었다. 그러나 astaxanthin 생산량의 경우 5, 10 min 구간에서 선별된 변이주의 경우 wild type과 비교적 동일한 생산량을 보였으나, 15 min 이후 구간에서 선별된 변이주는 생산량이 증가되었다. 최대 생산량을 보이는 변이주는 UV 조사 20 min 구간에서 선별된 변이주로 $64.2 \pm 1.3 \mu\text{g/ml}$ 으로 wild type 생산량 대비 약 1.45배($p < 0.05$)로 유의적으로 증가한 것으로 분석되었다 (Fig. 1B). 이 결과를 바탕으로 UV 조사 20 min에서 선별된 변이주를 P_{U20}으로 명명하였다.

EMS 처리에 따른 변이주 선별을 위하여 UV 조사 선별법과 동일하게 실험을 진행하였으며, 그 결과 EMS를 농도별 처리 시 세포 생존율이 UV 처리와 유사하게 감소되는 경향성을 보였다(Fig. 2A). EMS 처리 시 세균 세포 생존율은 10 mM에서 94.8%였으며, 300 mM 이상에서 생존율이 50% 이하로 감소하였다(Fig. 2A). 또한, EMS 처리 후 제조된 각 변이주(처리 농도 당 1개의 colony 선별)의 astaxanthin 생산량을 비교한

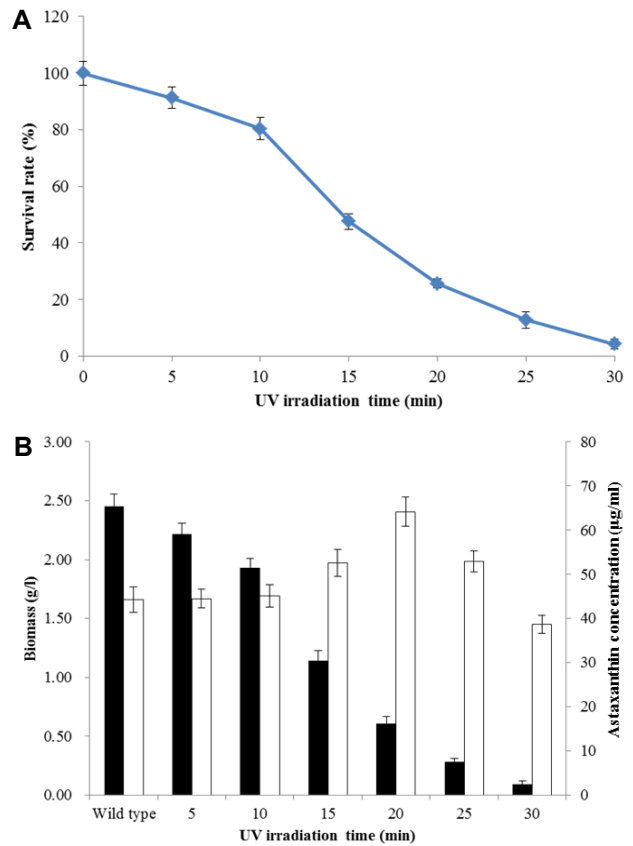


Fig. 1. Effect of UV irradiation on survival rate (A), biomass and astaxanthin production (B) in *Paracoccus haeundaensis*. Biomass (■), astaxanthin (□).

결과 EMS 400 mM 처리에 의해 제조된 변이주에서 가장 높은 astaxanthin을 생합성하는 것으로 밝혀졌으며, astaxanthin 생산량은 최대 $51.1 \pm 2.9 \mu\text{g/ml}$ 였다. 이는 기존 균주 생산량의 1.15배 증가하였지만, $p=0.114$ 로 나타나 유의적으로 증가하였다고 보기 어렵다(Fig. 2B). 이 결과를 바탕으로 EMS 400 mM로 처리한 변이주를 P_{E400}으로 지정하였다. 화학적 돌연변이 유도에 관한 선행 연구인 Kamath [19] 등이 발표한 논문과 비교 시 *H. pluvialis*의 경우 EMS 처리는 astaxanthin 생산량 증가 유도에 효율적이지 않은 방법으로 보고하고 있다. 본 연구에서도 EMS 처리에 의한 변이주 제조 방법이 UV 조사에 의한 제조 방법보다는 효율적이지 못한 것으로 사료된다.

Astaxanthin 생산량을 증대 시키는 조건(UV 20 min, EMS 400 mM)을 순차적으로 wild type에 처리하여 UV와 EMS를 동시에 처리한 돌연변이 균주를 확보하였으며, 이를 변이주를 PUE로 명명하였다. P_{U20}, P_{E400}, PUE 변이주의 astaxanthin 생산량을 비교한 결과 PUE 변이주에서 $70.7 \pm 1.3 \mu\text{g/g}$ 의 astaxanthin을 생합성하는 것으로 분석되어, wild type 균주를 포함하여 astaxanthin을 가장 많이 생산하는 것으로 확인되었으며(Table 1), wild type 균주와 비교하여 약 1.6배($p < 0.05$)로 유의적으로 증가한 것으로 분석되었다. 이러한 결과들을 종합

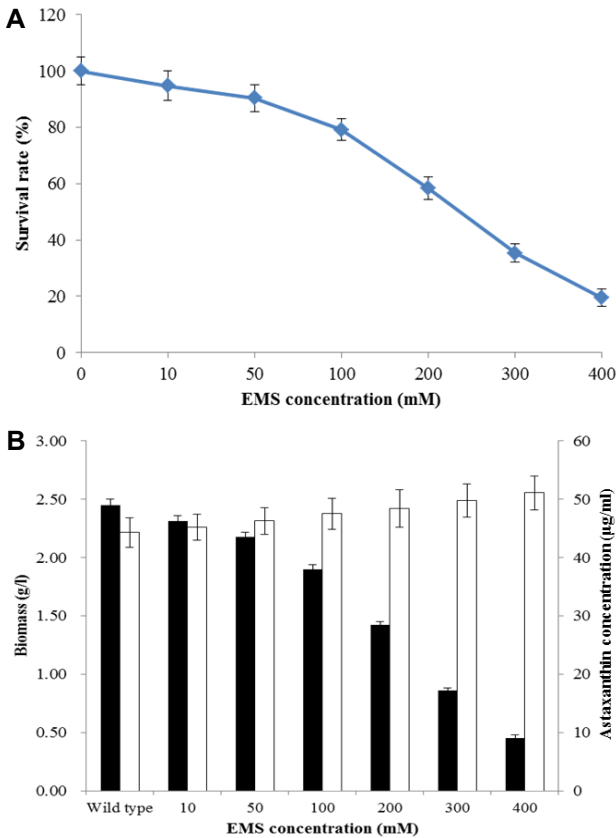


Fig. 2. Effect of EMS treatment on survival rate (A), biomass and astaxanthin production (B) in *Paracoccus haeuendaensis*. Biomass (■), astaxanthin (□).

Table 1. Astaxanthin content of wild type and mutants

	Biomass (g/l)	Astaxanthin production (µg/ml)
Wild type	2.45	44.3±2.5
P _u 20	2.16	64.2±1.3
P _E 400 ^f	2.30	51.1±2.9
PUE	2.07	70.7±1.3

*Bacteria were grown in PPES-II broth at 25°C for 48 hr. All the analyses were repeated in triplicates and their averages were employed.

하여 astaxanthin 생산 최적화된 균주로 PUE 균주를 지정하였다.

온도, pH, 염 농도 영향

선별된 PUE 변이주에 대하여 온도, pH, NaCl 농도에 따른 astaxanthin 생산량을 분석하기 위해서 재료 및 방법에 설명한 PPES-II 배지를 이용하여 각 조건에 대한 astaxanthin 생산량을 HPLC (재료 및 방법 참조)로 분석하였다. 변이주에 대한 온도, pH, NaCl의 최적 조건은 Lee 등[12]이 발표한 논문을 참조로 하였다.

PUE 변이주의 온도 변화 조건은 15~42°C이며, pH는 4~13,

NaCl 농도는 0~7%으로 설정하였다. 각 조건에서 가장 높은 astaxanthin 생산량을 조사한 결과 온도 변화의 경우 37~42°C 구간에서 10.2±0.5 µg/ml로 가장 낮은 생산량을 보였고, 25°C에서 70.9±1.6 µg/ml ($p<0.05$)로 유의적으로 가장 높은 생산량을 보였다(Fig. 3A). pH는 7~8 구간이었으며, 오차 범위 내에서 pH 8의 생산량이 75.5±1.3 µg/ml ($p<0.05$)로 유의적으로 가장 많은 astaxanthin을 생산 하였다(Fig. 3B). NaCl 농도는 해양성 세균인 *P. haeuendaensis*의 특성을 그대로 유지하는 것으로 분석되며 생산량은 3~4% NaCl 농도에서 70.2±1.2 µg/ml ($p<0.05$)로 astaxanthin 생산 효율이 가장 높은 것으로 분석되었다(Fig. 3C).

탄소원 및 질소원 영향

PUE 변이주의 탄소원과 질소원의 영향에 따른 astaxanthin 생산량 변화를 분석하기 위해서 1% 탄소원 8종류(Lactose, Mannitol, Fructose 등)와 3% 질소원 4종류(ammonium sulfate, ammonium chloride 등)를 첨가하여 사용하였다. PUE 균주의 배양에 사용된 배지 및 HPLC 분석법은 재료 및 방법에 설명하였다.

탄소원으로는 단당류인 glucose, lactose, mannitol, fruc-

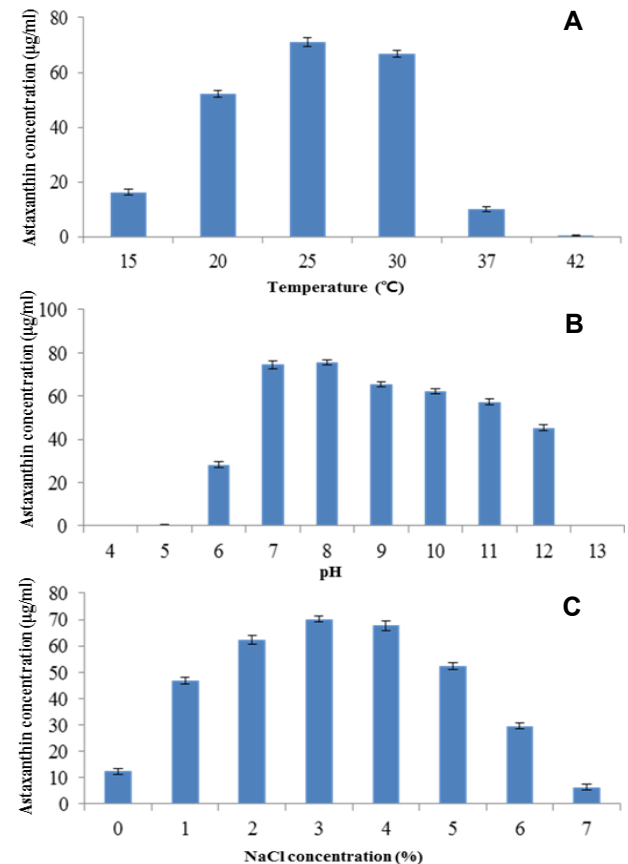


Fig. 3. Astaxanthin production of *P. haeuendaensis* mutants (PUE) obtained with (A) temperature, (B) pH and (C) NaCl concentration.

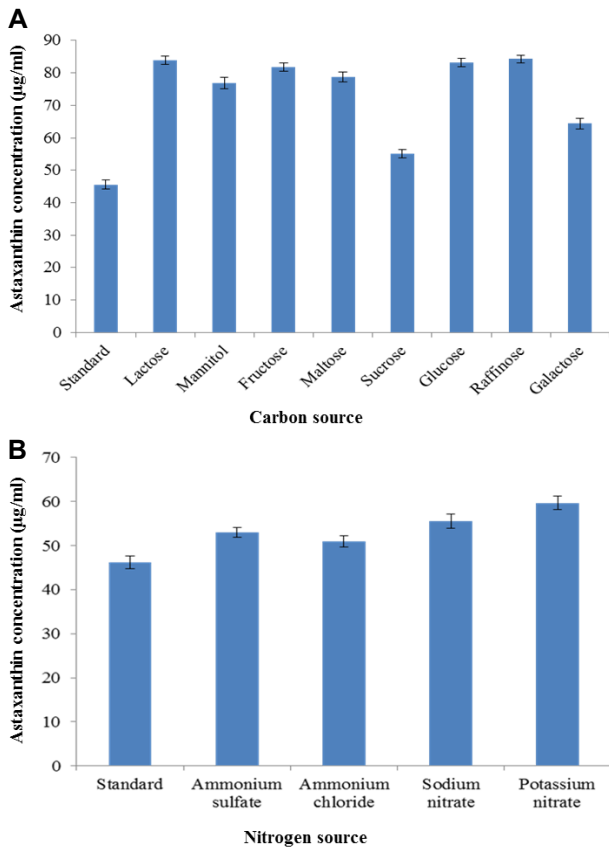


Fig. 4. Effects of carbon and nitrogen sources on the astaxanthin concentration of mutant PUE after 2 days. (A) Carbon sources, (B) Nitrogen sources.

tose, maltose, sucrose, raffinose, galactose를 사용하였다. Astaxanthin 함량을 가장 높이 증대시킨 탄소원은 glucose, lactose, fructose, raffinose이었으며, 1% 첨가 시 81.8~84.3 µg/

ml의 함량을 보여 PPES-II 배지에서 배양하여 생산된 astaxanthin 함량 보다 약 2배 정도의 함량이 증가하는 것으로 밝혀졌다(Fig. 4B). 또한, 효과적인 4종류의 당류 중 가장 효과적인 당은 1% raffinose로 함량은 84.3±1.2 µg/ml이었다($p<0.05$). 질소원은 ammonium sulfate, ammonium chloride, sodium nitrate, potassium nitrate를 사용하였으며, 가장 효과적인 질소원으로 potassium nitrate로 3% 첨가 시 약 59.7±1.5 µg/ml의 astaxanthin 함량을 보였다($p<0.05$). 그러나 standard 배지에서 생산된 astaxanthin 함량(45.6±1.4 µg/ml)과 비교 시 탄소원과 같은 정도의 생산량 증가 효과는 관찰되지 않았다(Fig. 4B). 이러한 결과를 분석하면 PUE 변이주의 astaxanthin 생산량 증대에 관여하는 조건은 탄소원의 경우 1% raffinose, 질소원은 3% potassium nitrate를 첨가 시 가장 효과적인 생산량 증대를 이끌 수 있다고 분석된다.

최적 배양 조건에서의 Astaxanthin 생산량 비교

Wild type와 PUE 변이주의 최적 배양 조건하에서의 astaxanthin 생산량을 비교하였다. 앞선 연구 결과에서 관찰된 astaxanthin 생산량 증대를 위한 최적 조건을 충족하기 위하여 1% raffinose와 3% potassium nitrate를 기본 배지인 PPES-II 배지에 첨가하여 200 ml의 배지를 제조 하였다. 그리고 제조된 배지에 wild type과 PUE 변이주를 1%씩 접종하여 25°C, 150 rpm에서 72시간 동안 배양하여 각 균주에서 생산된 astaxanthin 함량을 비교 하였다.

Fig. 5에서 보는 바와 같이, 초기 접종 후 18시간(대수증식기 초기 구간)까지는 wild type 균주의 생산량이 변이주 균주보다 더 높았다(wild type: 3.52±0.12 µg/ml, PUE: 1.3±0.02 µg/ml). 하지만 접종 후 21시간(대수증식기 중반부 구간) 이후부터 PUE 변이주의 생산량이 높아지기 시작하였다(wild type:

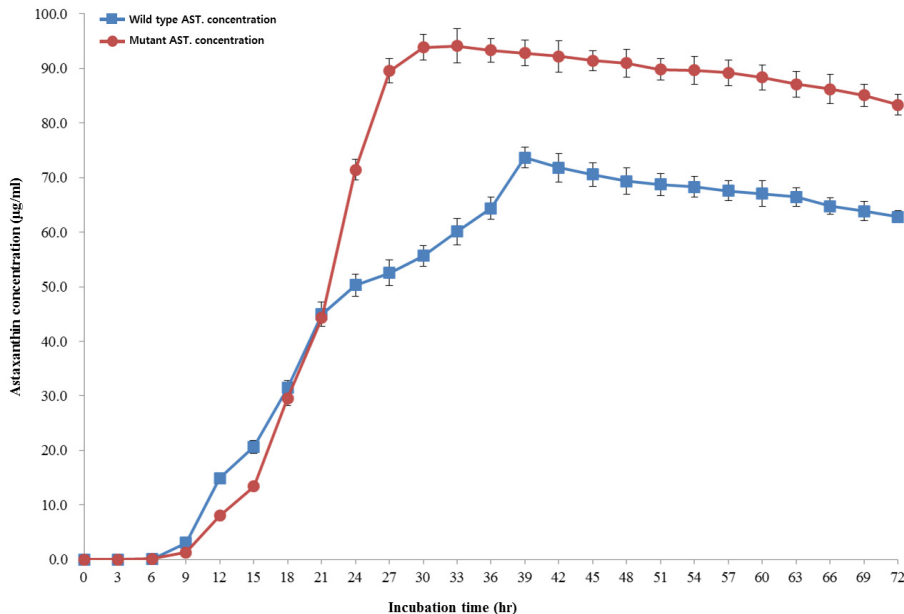


Fig. 5. Time profiles of astaxanthin production. Wild type (■) and PUE mutant (○).

44.9±2.24 µg/ml, PUE: 45.3±1.58 µg/ml). PUE 및 wild type 균주에 있어서 astaxanthin의 최대 생산량을 보이는 시간은 PUE 변이주의 경우 배양 후 33시간(94.2±3.11 µg/ml)이며, wild type은 배양 후 39시간(73.7±1.92 µg/ml)이었다. 이는 PUE 변이주에서의 astaxanthin의 생산량이 wild type과 비교하여 1.5배 정도 증가한 결과이며, 그 생산 시간은 3시간 단축 시킨 효과를 얻었다.

PUE는 wild type과 비교 시 높은 astaxanthin 생산량을 보이는 것을 확인하였다. 이러한 생산량 증대를 이룬 이유는 Pollmann [18] 등이 설명한 바와 같이 돌연변이원의 작용에 의한 carotenoid 생합성 경로에 작용하는 효소 활성 증가(혹은 관련 유전자의 변이)와 활성산소 증가에 따른 세균 세포의 방어 기작으로 카로티노이드 생산량 증대 등으로 알려져 있다. PUE 균주의 경우 astaxanthin 생산량과 시간을 단축하는 결과를 도출하였지만, 앞서 설명한 관련 유전자 또는 효소의 활성에 의한 생산량 증대를 이룬 결과는 분석하지 못하였다. 향후 계속되는 연구에서 카로티노이드 생합성 경로에 관여하는 유전자 및 효소의 작용에 대해 분석 할 것이다.

감사의 글

이 논문은 2016년 해양수산부 재원으로 한국해양과학기술진흥원의 지원을 받아 수행된 연구임(과제명: 한국 고유 색소 생산 해양 미생물을 이용한 양식 생물의 생리활성 및 체색 향상 제품 개발).

References

- An, G. H., Bielich J., Auerbach, R. and Johnson, E. A. 1991. Isolation and characterization of carotenoid hyperproducing mutants of yeast by flow cytometry and cell sorting. *Bio. Tech.* **9**, 70-73.
- Castelblanco-Matiz, L. M., Barbachano-Torres, A., Ponce-Noyola, T., Ramos-Valdivia, A. C., Cerda García-Rojas, C. M., Flores-Ortiz, C. M., Barahona-Crisóstomo, S. K., Baeza-Cancino, M. E., Alcaíno-Gorman, J. and Cifuentes-Guzmán, V. H. 2015. Carotenoid production and gene expression in an astaxanthin-overproducing *Xanthophyllomyces dendrorhous* mutant strain. *Arch. Microbiol.* **197**, 1129-39
- Cheng, J., Li, K., Yang, Z., Zhou, J. and Cen, K. 2016. Enhancing the growth rate and astaxanthin yield of *Haematococcus pluvialis* by nuclear irradiation and high concentration of carbon dioxide stress. *Bioresour. Technol.* **204**, 49-54
- Choi, E. S. and An, G. H. 2003. Preparation of the red yeast, *Xanthophyllomyces dendrorhous*, as feed additive with increased availability of astaxanthin. *Biotechnol. Lett.* **25**, 767-771.
- Emmerstorfer-Augustin, A., Moser, S. and Pichler, H. 2016. Screening for improved isoprenoid biosynthesis in microorganisms. *J. Biotechnol.* **235**, 112-120.
- Glaeser, J. and Klug, G. 2005. Photo-oxidative stress in *Rhodobacter sphaeroides*: protective role of carotenoids and expression of selected genes. *Microbiology* **151**, 1927-1938.
- Helmut, S. and Stahl, W. 2003. Antioxidant activity of carotenoids. *Mol. Aspects Med.* **24**, 345-351.
- Higuera-Ciapara, I., Felix-Valenzuela, L. and Goycoolea, F. M. 2006. Astaxanthin: A Review of its chemistry and applications. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* **46**, 185-196.
- Johnson, E. A. and Schroeder, W. A. 1996. Microbial carotenoids. *Adv. Biochem. Eng. Biotechnol.* **53**, 119-178.
- Kobayashi, M., Kakizono, T. and Nagai, S. 1993. Enhanced carotenoid biosynthesis by oxidative stress in acetate-induced cyst cells of a green unicellular alga, *Haematococcus pluvialis*. *Appl. Environ. Microbiol.* **59**, 867-873.
- Krubasik, P. and Sandmann, G. 2000. A carotenogenic gene cluster from *Brevibacterium linens* with novel lycopene cyclase genes involved in the synthesis of aromatic carotenoids. *Mol. Gen. Genet.* **263**, 423-432.
- Lee, J. H., Nam, S. W., Choi, T. J., Lee, W. J. and Kim, Y. T. 2004. *Paracoccus haeundaensis* sp. nov., a gram-negative, halophilic, astaxanthin-producing bacterium. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **54**, 1699-1702.
- Lee, J. H., Seo, Y. B., Jeong, S. Y., Nam, S. W. and Kim, Y. T. 2007. Functional analysis of combinations in astaxanthin biosynthesis genes from *Paracoccus haeundaensis*. *Biotechnol. Bioprocess Eng.* **54**, 1699-1702.
- Lee, P. C. and Schmidt-Dannert, C. 2002. Metabolic engineering towards biotechnological production of carotenoids in microorganisms. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **60**, 1-11.
- Misawa, N., Satomi, Y., Kondo, K., Yokoyama, A., Kajiwara, S., Saito, T., Ohtani, T. and Miki, W. 1995. Structure and functional analysis of marine bacterial carotenoid biosynthesis gene cluster and astaxanthin biosynthetic pathway proposed at the gene level. *J. Bacteriol.* **177**, 6575-6584.
- Nelis, H. J. and De Leenheer, A. P. 1991. Microbial sources of carotenoid pigments used in foods and feeds. *J. Appl. Bacteriol.* **70**, 181-191.
- Nishino, H., Murakoshi, M., Ii, T., Takemura, M., Kuchide, M., Kanazawa, M., Mou, X.Y., Wada, S., Masuda, M., Ohsaka, Y., Yogosawa, S., Satomi, Y. and Jinno, K. 2002. Carotenoids in cancer chemoprevention. *Cancer Metastasis Rev.* **21**, 257-264
- Pollmann, H., Breitenbach, J. and Sandmann, G. 2017. Engineering of the carotenoid pathway in *Xanthophyllomyces dendrorhous* leading to the synthesis of zeaxanthin. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **101**, 103-111.
- Sandesh Kamath, B., Vidhyavathi, R., Sarada, R. and Ravishankar, G. A. 2008. Enhancement of carotenoids by mutation and stress induced carotenogenic genes in *Haematococcus pluvialis* mutants. *Bioresour. Technol.* **99**, 8667-8673.
- Smith, T. A. D. 1998. Carotenoids and cancer: prevention and potential therapy. *Br. J. Biomed. Sci.* **55**, 268-275.
- Sun, N. K., Lee, S. H. and Song, K. B. 2004. Characterization of a carotenoid-hyperproducing yeast mutant isolated by low-dose gamma irradiation. *Int. J. Food Microbiol.* **94**, 263-267.

22. Vershinin, A. 1999. Biological functions of carotenoids-diversity and evolution. *Biofactors* **10**, 99-104.
23. Wachi, Y., Burgess, J. G., Iwamoto, K., Yamada, N., Nakamura, N. and Matsunga, T. 1995. Effect of Ultraviolet A (UV-A) light on growth, photosynthetic activity and production of biopterin glucoside by the marine UV-A resistant cyanobacterium *Oscillatoria* sp. *Biochemica. Biophysica. Acta.* **124**, 165-168.
24. Wang, C. C., Ding, S., Chiu, K. H., Liu, W. S., Lin, T. J. and Wen, Z. H. 2016. Extract from a mutant *Rhodobacter sphaeroides* as an enriched carotenoid source. *Food Nutr. Res.* **60**, 29580.
25. Wang, N., Guan, B., Kong, Q., Sun, H., Geng, Z. and Duan, L. 2016. Enhancement of astaxanthin production from *Haematococcus pluvialis* mutants by three-stage mutagenesis breeding. *J. Biotechnol.* **236**, 71-77.
26. Zhang, Y., He, M., Zou, S., Fei, C., Yan, Y., Zheng, H., Rajper, A. A. and Wang, C. 2016. Breeding of high biomass and lipid producing *Desmodesmus* sp. by Ethylmethane sulfonate-induced mutation. *Bio. Tech.* **207**, 268-275.
27. Zhao, Y., Shang, M., Xu, J. W., Zhao, P., Li, T. and Yu, X. 2015. Enhanced astaxanthin production from a novel strain of *Haematococcus pluvialis* using fulvic acid. *Process. Biochem.* **50**, 2072-2077.

초록 : 물리·화학적 돌연변이 유도를 통한 *Paracoccus haeundaensis*의 astaxanthin 생산량 증대

서용배^{1,2} · 정태혁³ · 최성석¹ · 임한규³ · 김군도^{1*}

(¹부경대학교 미생물학과, ²부경대학교 해양생명과학연구소, ³목포대학교 해양수산자원학과)

Carotenoid는 천연 지용성 색소이며, 세균, 조류, 식물 등이 생산한다. 세계 시장의 대부분을 차지하는 합성 염료의 대안으로서 현재는 조류나 세균, 갑각류 등의 원료로부터 아스타잔틴의 생산, 정제, 이용이 주목 받고 있다. 이 연구는 UV와 EMS를 이용하여 *P. haeundaensis*의 돌연변이를 유도하고, 결과적으로 astaxanthin을 과잉 생산하는 돌연변이주를 선별하고 특성을 확인하기 위해 다양한 배양 및 영양 조건을 이용하여 astaxanthin 생산량을 확인하였다. 실험 결과 UV 조사 시간이 증가하거나, EMS 농도가 증가할수록 균주의 생존율이 감소하였다. Astaxanthin 과잉 생산 돌연변이 균주의 경우 400 mM EMS와 UV 20분을 순차적으로 처리한 방법에서 선별된 변이주가 가장 높은 astaxanthin 생산량을 보이는 것을 확인하였으며, 이 균주의 이름을 PUE로 명명하였다. PUE의 최적 배양 조건은 25°C, pH 7-8, 3% NaCl이며, 1% raffinose, 3% potassium nitrate 첨가 시 astaxanthin 생산량이 증가하는 것으로 밝혀졌다. PUE에서는 wild type 균주에 비해 astaxanthin 생산량이 1.58배 증가함을 확인할 수 있었다. 본 연구의 실험 결과, 돌연변이 유도에 의해 선별된 변이주는 astaxanthin의 산업적 생산에 활용 가능한 후보가 될 수 있을 것으로 사료된다.