

전자빔 조사를 통해 유도된 *Arthrospira platensis* 변이주 분리 및 특성 분석

최수정 · 이재화[†]

신라대학교 의생명과학대학 제약공학과
(2015년 7월 7일 접수, 2015년 7월 23일 심사, 2015년 8월 20일 채택)

Isolation of an *Arthrospira platensis* Mutant Induced by Electron Beam Irradiation and its Characterization

Soo-Jeong Choi and Jae-Hwa Lee[†]

Department of Pharmaceutical Engineering, College of Medical and Life Science, Silla University, Busan 46958, Korea
(Received July 7, 2015; Revised July 23, 2015; Accepted August 20, 2015)

초 록

미세조류 *Arthrospira platensis* (*A. platensis*)는 색소(chlorophyll, carotenoids), 지질을 다량 함유하여 기능성 식품 생산에 중요한 자원으로 평가받고 있다. *A. platensis*에 조사선량 240 kGy의 전자빔을 조사하여 균주를 개량하고자 하였으며, 스크리닝을 통해 지질 함량이 높은 EM24를 선별하였다. EM24는 세포생장률 및 색소농도가 야생균주에 비해 약 1.2배 증가함을 확인하였다. 또한 형광강도법으로 측정 후 triolein을 이용해 세포 내 지질 농도를 정량하고자 하였다. EM24의 지질 농도는 62.9 mg/L로 야생균주(38.9 mg/L)에 비해 약 1.5배 증대되었다. 세포 내 지방산 또한 gamma-linoleic acid (GLA) 함량이 약 1.5배 증가하였다.

Abstract

Arthrospira platensis has high lipid and pigment (such as chlorophyll and carotenoid) contents and thus evaluated as an important resource in functional food production. The cell growth rate and pigment concentration of EM24 increased by approximately 1.2-fold than those of the wild-type strain (WT). Fluorescence intensity levels in EM24, which were quantified with a lipid triolein standard curve, also increased by approximately 1.5-fold than those in WT (62.9 mg/L vs. 38.9 mg/L). The analysis of fatty acid profiles indicated that the gamma-linoleic acid level in EM24 increased by 1.5-fold than that in WT.

Keywords: *Arthrospira platensis*, electron beam, random mutagenesis, lipid, fatty acids

1. 서 론

미세조류는 CO₂를 이용한 광합성을 통해 성장하며, 광합성 대사의 산물로 발생하는 탄수화물 및 중성 지질과 같은 유용 물질은 바이오 에너지, 식품, 사료 및 고부가가치 기능성 식품을 제조하는데 사용된다[1]. 현재 알려진 미세조류의 종류는 약 10만종에 달하며, 그중 *Arthrospira platensis* (*A. platensis*)는 아열대 알칼리성 환경에서 주로 서식하며 나선형의 남조류에 해당되는 미세조류로 알려져 있다[2]. *A. platensis*는 고부가가치의 건강기능식품, 사료, 제약 및 사료 제조와 같은 산업적으로 이용이 가능할 뿐만 아니라 바이오 에탄올, 수소, 바이오 디젤과 같은 재생 가능한 에너지 생산에도 사용이 가능하다[3]. *A. platensis*는 다량의 단백질과 클로로필, 카로티노이드, c-phycoyanin과 같은 색소 및 지방산을 함유한다. *A. platensis* 내 지방산 가운데

다가 불포화 지방산(PUFA)인 ω -3와 ω -6 계열의 지방산의 경우 식품 및 의약품으로 널리 이용되고 있다[4-7]. ω -6 계열의 지방산 가운데 γ -linolenic acid (GLA, C 18:3)는 *A. platensis*의 지방산 함량 가운데 20%에 해당하며 섭취 시 혈중 콜레스테롤을 낮추고 프로스타글란딘을 촉진하는 것으로 알려져 있다. 또한 *A. platensis* 내 당지질 및 지방산은 최근 향산화 및 항균활성이 보고되어진다[8].

미세조류 내 지방산은 바이오디젤로 활용하기 위한 연구가 진행 중에 있으며, 세포 내 지방산 함량 증대를 위한 연구 또한 함께 진행되고 있다. Palmitic acid (C 16:0), stearic acid (C 18:0), oleic acid (C 18:1), linoleic acid (C 18:2), linolenic acid (C 18:3)는 바이오디젤 생산에 적합한 지방산으로 생산되는 바이오디젤의 품질을 좌우한다[9]. *A. platensis*와 같은 나선형의 남조류는 세포 내에 약 20~60%의 지방산을 함유한다고 보고되어진다[10]. 남조류 내 불포화지방산은 건조중량당 약 1%의 GLA가 이용가능하며 이러한 불포화 지방산은 조류의 배양 조건 및 배지 내 영양성분에 따라 함량의 변화가 발생한다[11]. GLA와 같은 불포화 지방산 추출 생산성을 증대시키기 위해 지질 및 지방산이 고농도로 함유된 미세조류 균주개량은 필수적이라고 판단된다.

[†] Corresponding Author: Silla University,
Department of Pharmaceutical Engineering, College of Medical and Life
Science, Busan 46958, Korea
Tel: +82-51-999-5748 e-mail: jhalee@silla.ac.kr

미세조류의 지질 및 색소와 같은 유용물질의 함유량이 높은 균주를 개량하기 위해 물리적, 화학적 돌연변이원 처리를 통한 무작위적 돌연변이법(random mutagenesis)이 이용되고 있다. 무작위적 돌연변이법과 같은 인위적 돌연변이방법은 야생균주의 우량형질을 유지하며 원하는 방향으로의 유전형질 개량이 가능하다는 장점을 가진다. 물리적 돌연변이원에는 전자빔, 자외선, 감마선 등이 있으며, 화학적 돌연변이원에는 ethyl methane sulphonate (EMS), methyl methane sulphonate (MMS), N-methyl-N'-nitrosoguanidine (MNNG) 등이 있다. 미세조류 균주 개량을 위해 자외선 및 전자빔을 이용한 예가 보고되었다[12]. 자외선을 *A. platensis*에 조사하여 얻은 개량균주는 중성지질 및 항산화 효소(SOD, POD)의 함유량이 야생균주에 비해 증가함을 확인하였다[12]. *A. platensis* 균주에 전자빔을 조사하여 균주를 개량한 경우 또한 세포 내 항산화 물질인 플라보노이드 및 폴리페놀의 함량과 자유라디칼 소거능이 증가함을 확인하였다[13]. 화학적 돌연변이원의 경우 EMS 처리를 통한 미세조류 균주개량이 주를 이루고 있다. *Haematococcus pluvialis*에 EMS 처리를 통해 돌연변이 균주를 유도하였으며, 획득한 개량균주 내 astaxanthin의 생산성이 약 7.5% 증대됨을 확인하였다[14]. *A. platensis* 균주에 EMS 처리를 통해 획득한 돌연변이 균주 또한 지질과 항산화 효과를 나타내는 기능성 물질로 알려진 phycobiliprotein 같은 유용성분의 함량이 증대됨을 확인할 수 있었다. 이와 같이 돌연변이원 처리를 통한 돌연변이 균주 유도방법은 미세조류의 유용물질 함량을 증가시키는 방법으로 간주되지만, 많은 노동력과 비용의 소모로 인한 개발과정의 단축에 어려움을 가진다[15]. 따라서 돌연변이 균주 선별 효율이 높은 방법으로서의 균주개량이 필요하다고 판단되어지며, 본 연구는 물리적 돌연변이원인 전자빔 조사를 통한 균주개량을 진행하였다. 전자빔은 방사능 잔류에 대한 안전성이 검증된 돌연변이원에 해당되며 전자빔 조사를 통한 돌연변이유도는 적정 선량을 적용해 화학적 돌연변이원에 비해 시간적 소모가 적다는 장점을 지닌다[16]. 전자빔의 파장은 0.1~0.005 nm로 매우 짧으며 진공 상태이거나 전기장 및 자기장이 없을 때에는 직선으로 전달된다. 전자빔은 감마선이나 양성자 빔에 비해 파장이 짧아 투과 깊이가 얕으며 고에너지 조사가 가능하다. 전자빔을 생물체에 조사하면 전자가 DNA 구조를 이루는 특정 부위와 에너지 공명을 일으킨 후 흡수된 DNA를 들뜬 상태로 전환시켜 라디칼과 같은 파편으로 쪼개지거나 인산기로 흡수된 에너지의 전달을 통한 DNA 가닥의 절단이 발생된다[17,18]. 이렇듯 전자빔은 짧은 시간 내에 고밀도 라디칼 생성을 통해 인위적으로 돌연변이를 유발하며, 전자빔 조사를 통한 돌연변이 유도 방법은 조사 설비가 갖추어진 곳에서 표준화된 과정으로 적용방법이 비교적 단순하며 대량 시료 적용이 가능하다는 장점을 가지고 있다. 전자빔은 주로 미생물 멸균 및 오염물질 파괴 용도로 많이 이용되었으나[19], 미세조류 균주 개량 방법에 적용함으로써 전자빔 적용 범위가 확대될 수 있을 것이라고 판단된다. 본 연구에서는 전자빔 조사를 통해 *A. platensis* 개량 균주를 획득하였으며, 획득한 개량균주의 특성을 분석하고자 하였다.

2. 실험

2.1. 사용균주 및 배양방법

본 연구는 *Arthrospira platensis* NIES 39 (KCTC AG30033)를 한국 생명공학연구원 생물자원센터로부터 분양받아 사용하였다. 알칼리성 무기배지인 SOT 배지로 균주를 배양하였다. SOT 배지는 SOT-1과 -2를 각각 121 °C에서 15 min 간 멸균 및 냉각시켜 혼합 후 10 N NaOH

를 이용해 pH 9로 조절하였다[20]. 균주는 35 °C, 120 rpm, 광도 6,000 lux의 조건에서 배양하였다. 광주기는 12 h : 12 h (명 : 암)으로 명반응 시 형광등을 사용하였다[21].

2.2. 전자빔 조사 및 돌연변이 유도

증식기의 *A. platensis* 세포의 흡광도를 520 nm에서 1.0으로 조정하여 세포희석액을 전자빔 가속 장치의 전자빔 조사 챔버에 넣어 조사하였다(한국 원자력연구원, 대전). 조사선량이 240 kGy가 되도록 0.2 MeV, 1.2 mA, 5 min간 세포 희석액에 조사하였다. 전자빔 조사를 마친 세포 희석액을 SOT 고체 배지에 옮겨 35 °C에서 배양하였으며 생성된 콜로니를 분리하여 액체 SOT 배지에 옮겨 단일 배양하였다[22].

2.3. 균체량 분석

균체량은 520 nm에서 UV/Vis 분광기(Optizen 2120 UV, Mecasys Ltd, Korea)를 이용하여 흡광도를 측정하였다. 건조 균체량(Dry cell weight, DCW)은 항량된 종이필터(Whatman filter)를 이용하여 여과된 균체를 건조기에서 105 °C로 3 h 동안 건조시켜 무게를 측정하였다[23].

2.4. 색소 농도 분석

광합성을 통해 증가된 색소 농도 분석을 위해 12일 간 배양한 미세조류 균주의 클로로필, 카로티노이드 함량을 분석하였다. 클로로필과 카로티노이드 농도 측정은 세포 1 mL을 13,000 rpm에서 3 min간 원심분리한 뒤 상등액을 제거하고 methanol 1 mL을 첨가하였다. 60 °C에서 30 min간 반응하고 0 °C에서 2 min간 냉각시킨 후 13,000 rpm에서 2 min간 원심분리하여 상등액을 분리하였다. 분리한 상등액은 UV/Vis 분광기를 이용해 650, 653, 461, 664 nm 파장에서 흡광도를 측정하였다[24].

$$\text{Chlorophyll (mg/L)} = 25.5 \times A_{650} + 4 \times A_{653}$$

$$\text{Carotenoid (mg/L)} = (A_{461} + (0.046 \times A_{664})) \times 4$$

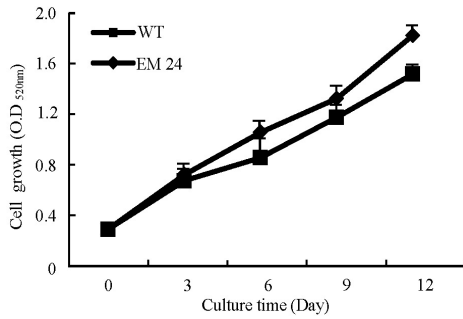
2.5. Nile red 염색을 이용한 고지질 함량 균주 선별 및 지질 정량

야생균주와 변이주의 중성지질 함량을 분석하기 위하여 Chen et al.[25]의 방법을 변형하여 측정하였다. 세포의 흡광도를 0.5로 조정 후 세포 10 µL와 증류수 138 µL, nile red 2 µL 그리고 DMSO 50 µL를 혼합하고 40 °C 배양기에서 10 min간 반응하였다. 형광광도계(Infinite F 200 pro, Tecan, Austria)를 이용하여 excitation 495 nm, emission 620 nm에서 형광값(fluorescence intensity)을 측정하였다. nile red로 염색된 세포의 형광값과 미세조류 자체의 형광값을 빼서 나타내었다[26].

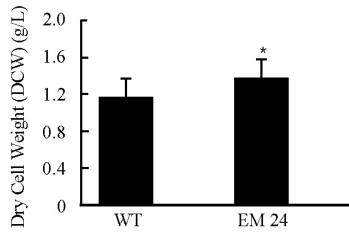
세포 내 중성지질 농도 측정을 위해 Bertozzini et al.[27]의 방법을 변형하여 측정하였다. 중성지질의 검량선으로는 triolein (Sigma)를 이용하였다. Triolein의 농도를 5, 15, 20, 25, 37.5, 50 µg/mL로 nile red로 염색하여 형광값을 측정하였다. 각 농도에 따른 형광 강도를 이용하여 표준 검량선을 작성한 후 세포 내 중성지질 농도를 결정하였다.

2.6. 지표성분 확인

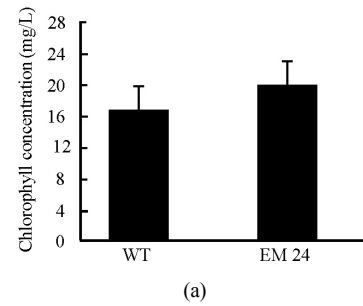
미세조류 내 지표성분 확인을 위해 Minkova et al.[28]의 방법을 이용하여 분석하였다. 야생균주와 선별한 변이주의 동결건조 시료를 20 mg/L의 농도로 희석 후 흡광도를 측정하여 chlorophyll-a, β-carotene, c-phycoyanin과의 유사성을 확인하였다. Chlorophyll-a와 β-carotene



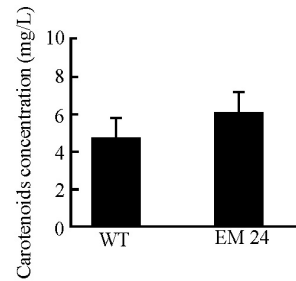
(a)



(b)



(a)



(b)

Figure 1. Cell growth, dry cell weight of electron - beam induced mutant (a) cell growth, (b) dry cell weight (DCW).

은 지용성 색소로 시료를 hexane에 용해시켜 측정하였으며, c-phyco-cyanin은 인산완충용액을 용해하였다.

2.7. 지방산 분석

지방산 분석을 위하여 이 등[29]의 방법을 이용하여 분석하였다. 야생균주와 변이주의 동결건조 시료 10 mg을 5 : 100의 비율로 혼합된 acetyl chloride와 methanol 용액 2 mL과 혼합하였다. 혼합물을 Teflon-capped pyrex tube에 넣고 차광 조건에서 100 °C에서 1 h 반응시켰다. 혼합물을 꺼내어 30~40 °C에서 냉각 후 hexane이나 iso-octane 같은 추출용매와 FAME solvent 용액을 첨가하고 5~30 s간 혼합하였다. 1 mL의 NaCl을 이용하여 세포 내 염을 제거하고 1 mL의 멸균수를 이용하여 세척하였다. 추출하여 얻은 상등액에 무수 황산 나트륨을 이용하여 건조시킨 후 gas chromatography (GC)를 이용하여 분석하였다. GC 조건으로는 이동상을 helium으로 이용하고 sample 주입온도는 250 °C, 초기온도는 110 °C로 1 min간 유지하였다. 온도 상승 속도는 1 min마다 5 °C씩 상승하며 주입온도까지 28 min이 소요되었다.

3. 결과 및 고찰

3.1. 돌연변이 유도 및 세포 성장

대수증식기의 *A. platensis* 세포에 전자빔 0.2 MeV 에너지, 1.2 mA로 약 5 min간 처리하여 240 kGy 세기로 조사하였으며, 전자빔 조사 후 얻은 변이주 가운데 지질 함량이 높았던 균주를 선별하여 EM24로 명명하였다. 변이주의 특성 분석을 위해 세포 성장 및 건조 중량을 측정, 분석하였다. 세포 성장 비교를 위해 야생균주와 EM24를 12일간 배양하였으며 3일 간격으로 측정하였다. 측정 결과, 변이주 EM24의 성장률은 야생균주에 약 1.2배 증가하였으며 EM24의 건조중량 또한 약 17% 증가함을 확인하였다(Figure 1(a), (b)). 다수의 논문들은 미세조류의 세포 성장률은 세포 내 색소 함량과 밀접한 관련이 있으며, 미

Figure 2. Pigment (chlorophyll and carotenoids) concentration of WT and EM24, (a) chlorophyll concentration, (b) carotenoids concentration.

세조류의 생장이 활발하여 광합성 빈도가 증가함에 따라 세포 내 색소 농도 또한 증가함을 보고하였다. 변이주 EM24 또한 색소의 농도 분석을 위해 배양 12일차에 클로로필 및 카로티노이드의 농도를 측정하였다(Figure 2(a), (b)). 전자빔 조사를 통해 유도된 변이주는 정상적인 배양 조건 하에서 야생균주와 큰 영향을 보이지 않음을 확인하였다. 이는 다른 물리적 돌연변이원인 자외선 조사로 유도된 변이주를 이용한 결과와 유사함을 확인하였다. *Nannochloropsis oculata*에 자외선 조사를 통해 균주를 개량하였으며, 획득한 균주가 야생균주에 비해 세포 성장률이 증대됨을 보고하였다[30]. 박 등[24]은 *A. platensis*에 자외선을 조사하였을 경우에도 야생균주에 비해 세포성장률이 증가된 변이주를 획득함을 보고하였다[24]. 이처럼 물리적 돌연변이원 처리는 야생균주에 비해 증대된 세포 성장률 및 색소 함량을 지닌 돌연변이주를 얻을 수 있을 것이라고 판단된다.

3.2. 전자빔 유도 돌연변이주의 중성지질 농도 분석

배양 12일차에 미세조류 내 지질 축적량을 측정하기 위해 형광 강도법을 이용하여 측정하였다. 형광 강도법의 경우 세포 내 지질 함량을 정확하게 알 수 없기 때문에 triolein을 이용해 정량 곡선 작성 후 형광 강도 수치를 적용하였다. 그 결과 EM24의 지질 농도는 약 62.9 mg/L로 야생균주의 지질 농도인 38.9 mg/L보다 약 1.6배 증가함을 확인하였다(Figure 3).

미세조류는 배지 내 영양분 고갈 환경과 같은 스트레스 요인이 발생할 경우 세포 내 중성 지질 및 색소와 같은 유용 물질 함유량이 증가하는 것으로 알려져 있다. 제한 배지를 이용한 *Haematococcus pluvialis* 성장 실험을 진행하였으며, 성장 영양소가 결핍된 배지에서 성장한 미세조류의 경우 세포 내 유용 물질인 astaxanthin의 함량이 증가함을 보고하였다[31]. *Chlorella vulgaris* 영양소 제한 성장 실험 결과 또한 *Haematococcus pluvialis* 실험과 유사한 경향을 보고하였다[32]. 지속적인 영양공급이 이루어지는 환경에서 미세조류의 균체 농도만 증가하였으나, 영양분이 결핍된 상황에서는 미세조류 내 지질 축적량

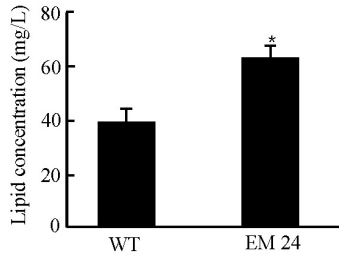


Figure 3. Neutral lipids concentration of WT and EM24.

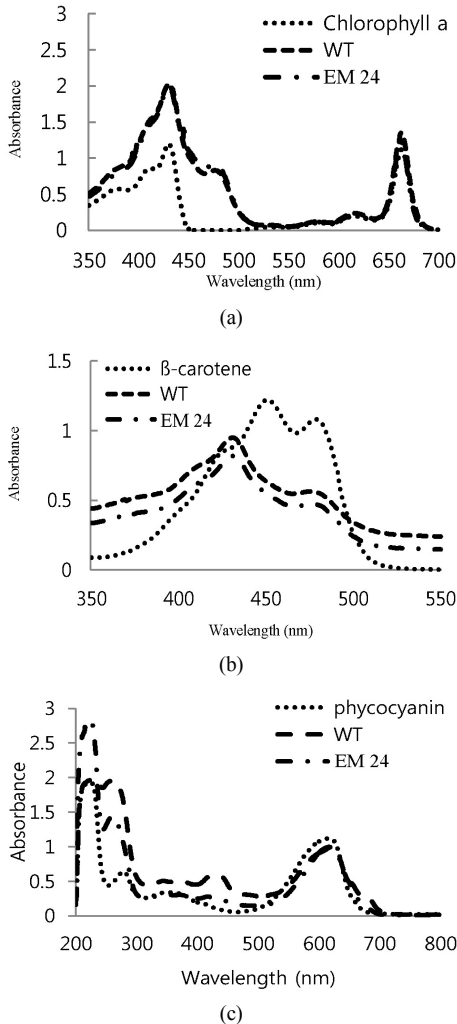


Figure 4. Absorption spectra of chlorophyll-a, β -carotene, phycocyanin, microalgae extract. (a) Absorption spectra of chlorophyll-a, WT and EM24. (b) Absorption spectra of β -carotene, WT and EM24. (c) Absorption spectra of phycocyanin, WT and EM24.

이 크게 증가함을 확인하였다. 이처럼, 스트레스에 노출된 미세조류는 스트레스에 대응하기 위해 지질과 같은 유용 물질의 합성 과정을 변환하게 된다. 미세조류의 유용 물질 합성 과정 변환은 세포 수확량 감소 초래한다. 하지만, EM24의 경우 야생 균주와 동일한 배양 조건에서 배양하였음에도 불구하고, 세포 내 지질 농도는 약 1.6배, 세포 생장률은 약 1.2배 증가함을 확인하였다. 하지만, 개량된 균주의 계대 배양이 이루어질 경우, 개량되기 전의 상태로 돌아가려는 성질로 인

Table 1. Fatty Acid Composition and Content of WT and EM24 (mg/g DCW).

| Fatty acid | Name | WT | EM 24 |
|------------|-----------------------|------|-------|
| C 14:0 | Myristic | 0.46 | 0.53 |
| C 16:0 | Palmitic | 8.38 | 13.26 |
| C 16:1 | Palmitoleic | 0.39 | 0.9 |
| C 18:0 | Stearic | 0.38 | - |
| C 18:1 | Oleic | 1.30 | 1.68 |
| C 18:2 | Linoleic | 3.60 | 5.97 |
| C 18:3 | Gamma linolenic (GLA) | 4.73 | 7.22 |

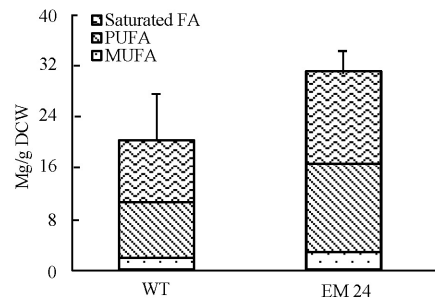


Figure 5. Fatty acid (saturated fatty acid, MUFA and PUFA) content of WT and EM24.

해 균주의 안정성은 떨어지게 된다. 본 연구를 통해 얻은 EM24는 실험실에서 약 2년간 계대 배양하였음에도 불구하고 세포 내 지질 농도는 야생균주에 비해 높음을 확인하였다. 전자빔 조사 후 스크리닝 단계에서는 EM24의 지질 농도가 45.2 mg/L로 야생균주(26.5 mg/L)에 비해 약 1.7배 증대됨을 확인하였으며, 2년이 지난 현재에는 약 1.6배가 증대됨을 확인하였다. 이는 계대 배양 횟수에 관계없이 세포 내 지질 농도의 안정성이 유지되는 것으로 판단된다.

3.3. 전자빔 조사 유도 돌연변이주의 성분 분석

전자빔 조사를 통해 획득한 돌연변이주 EM24와 야생균주 내 기능 성분 확인을 위해 분석하고자 하였다. Chlorophyll-a는 430 nm, 666 nm에서 높은 흡광도를 나타내었으며, 야생균주와 EM24 역시 동일한 경향을 확인할 수 있었다(Figure 4(a)). 미세조류 내 carotene 확인을 위해 β -carotene (Sigma, USA)를 이용하였다. 파장별 흡광도를 분석한 결과 β -carotene은 452 nm, 482 nm에서 높은 흡광도를 나타냈지만, 야생균주와 EM24는 439 nm와 490 nm에서 피크를 확인하였다(Figure 4(b)). C-phycocyanin 유무 분석을 위해 동일한 방법으로 실험을 진행하였으며, 200~800 nm까지 흡광도를 측정하여 분석하였다. C-phycocyanin의 경우 221 nm와 618 nm에서 높은 흡광도를 확인하였으며 야생균주와 EM24 또한 동일한 파장에서 높은 흡광도를 확인할 수 있었다. 본 연구는 야생균주와 EM24 추출물을 이용하여 세포 내 chlorophyll-a와 β -carotene, c-phycocyanin의 유무를 확인하고자 하였으며, 그 결과 chlorophyll-a와 c-phycocyanin은 표준물질과 유사한 파장에서 피크를 보임에 따라 동일한 세포 내 존재한다고 판단된다. 하지만 β -carotene의 경우 표준물질과 유사한 흡광도는 보였으나, 피크의 파장이 달라 정확한 분석을 위해서 HPLC, GC를 이용한 분석이 필요하다고 생각되어진다.

EM24 변이주의 지방산 함량을 GC를 이용하여 분석하였으며, 야생

균주와 변이주의 지방산을 분석, 비교하였다(Table 1, Figure 5). *A. platensis* 내 지방산은 8종 정도로, myristic acid (C 14:0), palmitic acid (C 16:0), palmitoleic acid (C 16:1), stearic acid (C 18:0), oleic acid (C 18:1), linolenic acid (C 18:2), linolenic acid (C 18:3)가 보고되었다. EM24의 지방산 총량은 약 29.56 mg/g으로 야생균주의 지방산 총량인 19.24 mg/g에 비해 약 1.5배 증가함을 확인하였다. EM24 내 지방산을 mono-unsaturated fatty acid (MUFA)와 poly-unsaturated fatty acid (PUFA)로 나누어 보았을 때에 각 1.5, 1.6배 증가하였다. PUFA 중 콜레스테롤 이동과 합성을 조절하여 혈중 HDL 콜레스테롤의 함량을 높이는 것으로 알려진 γ -linolenic acid(GLA)의 함량이 야생균주에서는 약 4.73 mg/g이었지만, EM24에서는 약 7.22 mg/g을 나타내어 약 1.5배 증가함을 확인하였다[33]. *A. platensis* 성장 조건 변화를 통해 GLA 함량을 증대시킨 연구가 보고되었다[11]. 하지만, GLA 정제를 위해 많은 비용이 소모됨을 볼 때에 균주 개량을 통한 GLA 함량 증대 균주 개량이 산업적으로 유용할 것이라고 판단된다.

바이오티셀 생산 시 미세조류 내 지방산 가운데 oleic acid (C 18:1)가 품질을 결정한다고 보고되어진다. EM24의 oleic acid 함량은 1.68 mg/g으로 야생균주(1.3 mg/g)에 비해 약 1.3배 증가하였다. *A. platensis* 균주는 다른 미세조류에 비해 지방산 함량이 낮아 바이오티셀 생산에 이용되지 않지만, 전자빔 조사를 통해 유도된 변이주에서 지방산 함량이 증대됨을 확인하였다. 최 등[22]은 240 kGy의 전자빔을 조사하여 *A. platensis* 균주를 개량하였으며 야생균주에 비해 GLA 함량이 6배 증대된 균주를 획득하였다. 또한 김 등[13]은 전자빔 조사를 통해 획득한 *A. platensis* 균주의 유용물질 함량을 분석한 결과, 야생균주에 비해 약 5배 증대된 지질을 함유함을 보고하였다. 두 문헌을 통해 전자빔 조사를 통한 미세조류 균주 개량은 지방산 및 지질 증대라는 장점을 가지는 것으로 판단된다.

4. 결 론

본 연구에서는 미세조류 *A. platensis*에 240 kGy의 전자빔을 조사하여 돌연변이주를 유도하고자 하였으며, 야생균주에 비해 지질 함유량이 높은 변이주 EM24를 선별하였다. EM24의 세포 생장률과 세포 건조중량 및 색소(클로로필 및 카로티노이드)농도는 야생균주에 비해 최소 1.2배 증가함을 확인하였다. 세포 내 증성지질 함량 정량을 위해 triolein을 이용한 검량선을 작성하였으며, 형광강도 수치를 적용하여 세포 내 지질축적 농도를 알아 본 결과 야생균주는 38.98 mg/L의 지질을 함유하고 있는데 반해 EM24는 62.9 mg/L의 지질을 함유하여 약 1.5배 증가하였다. 야생균주와 EM24 세포 내 기능성분 확인을 위해 chlorophyll-a, β -carotene, c-phycoyanin을 이용하여 파장별 흡광도를 측정하였다. 그 결과 표준물질로 이용한 chlorophyll-a와 c-phycoyanin 사이의 유사성은 확인하였으나 β -carotene과는 파장별 흡광도의 경향이 조금 달라 HPLC를 이용한 분석이 필요하다고 판단된다. 변이주의 지방산을 분석하였으며, EM24의 지방산 총량은 야생균주에 비해 약 1.6배 증가하였으며 PUFA 중 GLA의 함량이 약 1.5배 증가함을 확인하였다. 이처럼 전자빔 조사를 통한 돌연변이주 유도는 세포 생장률 및 색소, 지질, 지방산과 같은 유용물질의 축적량을 증가시켜 기능성 식품 뿐만 아니라 바이오 디젤 생산 산업에서도 적용될 수 있다고 생각된다.

References

1. K. Y. Lim, K. Sharma, S. Garg, and P. M. Schnk, The race for highly productive microalgae strains, *Biofuels*, **1**(6), 835-837 (2010).
2. S.-S. Hong and N.-H. Lee, Growth of *Spirulina platensis* in effluents from wastewater treatment plant of pig farm, *J. Microbiol. Biotechnol.*, **3**(1), 19-23 (1993).
3. A. Klanchui, T. Vorapreeda, W. Vongsangnak, C. Khannapho, S. Cheevadhanarak, and A. Meechai, System biology and metabolic engineering of *Arthrospira* cell factories, *Comput. Struct. Biotechnol. J.*, **4**(3), 1-8 (2012).
4. S. Otlés and R. Pire, Fatty Acid Composition of *Chlorella* and *Spiculina* Microalgae Species, *J. AOAC Int.*, **84**(6), 1708-17148 (2001).
5. S. cheevadhanarak, N. T. Marsac, J. C. Thomas, M. Tanticharoen, and P. Nomsawai, Light regulation of phycobilicome structure and gene expression in *Spirulina platensis* C1 (*Arthrospira* sp. PCC9483), *Plant Cell Physiol.*, **40**(12), 1194-1202 (1999).
6. P. B. Bescos, A. M. Fresno, and J. E. P. Estrada, Antioxidant activity of different fractions of *Spirulina platensis* protean extract, *Farmaco*, **56**, 497-500 (2001).
7. Y.-J. Lee, S.-C. Wok, H.-J. Kim, J.-H. Lee, and M.-R. Kim, Quality Characteristics and Antioxidant Activities of *Spirulina* Added Korean Rice Cake (Garaeduk) during Storage, *Korean J. Food Preserv.*, **16**(1), 8-16 (2009).
8. J. A. mendiola et al., Screening of functional compounds in supercritical fluid extracts from *Spirulina platensis*, *Food Chem.*, **102**(4), 1357-1367 (2007).
9. J.-Y. Kim, H. Joo, and J.-H. Lee, Carbon Dioxide Fixation and Light Source Effects of *Spirulina platensis* NIES 39 for LED Photobioreactor Design, *Appl. Chem. Eng.*, **22**(3), 301-307 (2011).
10. M. F. Ramadan, M. M. S. Asker, and Z. K. Ibrahim, Functional bioactive compounds and biological activities of *Spirulina platensis* lipids, *Czech J. Food Sci.*, **26**(3), 211-222 (2008).
11. S. R. Ronda and S. S. Lele, Culture conditions stimulating high gamma linolenic acid accumulation by *Spirulina platensis*, *Brazil. J. Microbiol.*, **39**(4), 693-697 (2008).
12. H.-J. Park, Y.-H. Kim, and J.-H. Lee, Characterization of *Arthrospira platensis* Mutants Generated by UV-B Irradiation, *Appl. Chem. Eng.*, **23**(5), 496-500 (2012).
13. Y.-H. Kim, S.-J. Choi, H.-J. Park, and J.-H. Lee, Electron beam-induced mutants of microalgae *Arthrospira platensis* increased antioxidant activity, *Ind. Eng. Chem.*, **20**(4), 1834-1840 (2014).
14. J.-K. Park and C.-G. Lee, Immobilization of Astaxanthin Extracted from Photosynthetic Micro Algae *Haematococcus lacustris*, *J. Chitin Chitosan.*, **13**(4), 210-214 (2008).
15. H. Y. Jeong and K.-R. Kim, Strain Improvement Based on Ion Beam-Induced Mutagenesis, *Kor. J. Microbiol. Biotechnol.*, **38**(3), 235-243 (2010).
16. Y. Hiroyasu, S. Akemi, H. Yoshihiro, D. Konosuke, T. Atsushi, and M. Toshikazu, Mutation induction with ion beam irradiation of lateral buds of chrysanthemum and analysis of chimeric structure of induced mutants. *Euphytica*, **165**(1), 97-103 (2009).
17. S. Y. Park, H. A. Noh, H. Cho, A. Dumont, S. Ptasinska, A. D. Bass, and L. Sanche, DNA damage by X-ray and low energy electron beam irradiation. *J. Kor. Radiat. Prot.*, **33**(2), 53-59 (2008).

18. S. Ptasinska and L. Sanche, On the mechanism of anion desorption from DNA induced by low energy electrons, *J. Chem. Phys.*, **125**(14), 144713-144722 (2006).
19. S. H. Yu, I. H. Cho, S. W. Chang, S. J. Lee, S. Y. Chun, and H. L. Kim, Decomposition Characteristics of Fungicides(Benomyl) using a Design of Experiment(DOE) in an E-beam Process and Acute Toxicity Assessment, *J. Kor. Soc. Environ. Eng.*, **30**(9), 955-960 (2008).
20. J. H. Ryu, H.-S. So, S.-H. Bae, H. S. Kang, B. C. Lee, S.-Y. Kang, H.-Y. Lee, and C.-H. Bae, Genetic Diversity of in vitro Cultured *Cymbidium spp.* Irradiated with Electron Beam, *Kor. J. Breed. Sci.*, **45**(1), 8-18 (2013).
21. Y. M. Kim, J.-Y. Kim, S.-M. Lee, J.-M. Ha, T. H. Kwon, and J.-H. Lee, Carbon Dioxide Fixation using *Spirulina platensis* NIES 39 in Polyethylene Bag, *Appl. Chem. Eng.*, **21**(3), 272-277 (2010).
22. S.-J. Choi, Y.-H. Kim, A. Kim, and J.-H. Lee, *Arthrospira platensis* mutants containing high lipid content by electron beam irradiation and analysis of its fatty acid composition, *Appl. Chem. Eng.*, **24**(6), 628-632 (2013).
23. S.-R. Moon, B.-K. Son, J.-O. Yang, J.-S. Woo, C. M. Yoom, and G.-H. Kim, Effect of Electron-beam Irradiation on Development and Reproduction of *Bemisia tabaci*, *Myzus persicae*, *Plutella xylostella* and *Tetranychus urticae*, *Kor. J. Appl. Entomol.*, **49**(2), 129-137 (2010).
24. H.-J. Park, Y.-H. Kim, and J.-H. Lee, Characterization of *Arthrospira platensis* Mutants Generated by UV-B Irradiation, *Appl. Chem. Eng.*, **23**(5), 496 (2012).
25. W. Chen, M. Sommerfeld, and Q. Hu, Microwave-assisted Nile red method for *in vivo* quantification of neutral lipids in microalgae, *Bioresour. Technol.*, **102**(1), 135-141 (2011).
26. Y.-H. Kim and J.-H. Lee, Isolation of *Arthrospira platensis* mutants Producing High Lipid and Phycobiliproteins, *Kor. Soc. Biotechnol. Bioeng. J.*, **27**, 172-176 (2012).
27. E. Bertozzini, L. Galluzzi, A. Penna, and M. magnani, Application of the standard addition method for the absolute quantification of neutral lipids in microalgae using Nile red, *J. Microbiol. Methods*, **87**(1), 17-23 (2011).
28. K. M. Minkova, A. A. Tchernov, M. I. Tchordadjieva, S. T. Fouradjieva, R. E. Antova, and M. C. H. Busheva, Purification of C-phycoeyanin from *Spirulina*(*Arthrospira*) *fusiformis*, *J. Biotechnol.*, **102**(1), 55-59 (2003).
29. H.-L. Tran, S.-J. Hong, and C.-G. Lee, Evaluation of extraction methods for recovery of fatty acids from *Botryococcus braunii* LB 572 and *Synechocystis* sp. PCC 6803, *Biotechnol. Bioprocess Eng.*, **14**(2), 187-192 (2009).
30. J.-H. Kim, H.-J. Park, Y.-H. Kim, H. Joo, S.-H. Lee, and J.-H. Lee, UV-induced mutagenesis of *Nannochloropsis oculata* for the increase of lipid accumulation and its characterization, *Appl. Chem. Eng.*, **24**(2), 155-160 (2013).
31. S. Boussiba, B. Wang, P. P. Yuan, A. Zarka, and F. Chen, Changes in pigments profile in the green alga *Haematococcus pluvialis* exposed to environmental stresses. *Biotechnol. Lett.* **21**, 601-604, (1999).
32. S. H. Oh, J. G. Han, N. Y. Kim, J. S. Cho, T. B. Yim, S. Y. Lee, and H. Y. Lee, Cell Growth and Lipid Production from Fed-batch Cultivation of *Chlorella minutissima* according to Culture Conditions, *Kor. Soc. Biotechnol. Bioeng. J.*, **24**(4), 377-382 (2009).
33. D.-K. Kim, J.-A. Shin, and K.-T. Lee, Monitoring of compositions of gamma-linoleic and omega-3 fatty acids in some functional foods consumed in market, *CNU J. Agric. Sci.*, **38**(2), 277-284 (2011).