



저작자표시-비영리-변경금지 2.0 대한민국

이용자는 아래의 조건을 따르는 경우에 한하여 자유롭게

- 이 저작물을 복제, 배포, 전송, 전시, 공연 및 방송할 수 있습니다.

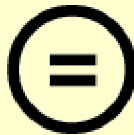
다음과 같은 조건을 따라야 합니다:



저작자표시. 귀하는 원저작자를 표시하여야 합니다.



비영리. 귀하는 이 저작물을 영리 목적으로 이용할 수 없습니다.



변경금지. 귀하는 이 저작물을 개작, 변형 또는 가공할 수 없습니다.

- 귀하는, 이 저작물의 재이용이나 배포의 경우, 이 저작물에 적용된 이용허락조건을 명확하게 나타내어야 합니다.
- 저작권자로부터 별도의 허가를 받으면 이러한 조건들은 적용되지 않습니다.

저작권법에 따른 이용자의 권리는 위의 내용에 의하여 영향을 받지 않습니다.

이것은 [이용허락규약\(Legal Code\)](#)을 이해하기 쉽게 요약한 것입니다.

[Disclaimer](#)

이 학 석 사 학 위 논 문

자외선 조사에 의해 유도된 *Chlorella*
vulgaris 변이주 특성 및 대량 배양

2017년 2월

부 경 대 학 교 산 업 대 학 원

미생물학과

최 태 오

이 학 석 사 학 위 논 문

자외선 조사에 의해 유도된
Chlorella vulgaris 변이주 특성 및
대량 배양

지도교수 전 용 재

이 論文을 理學碩士學位論文으로 提出함

2017년 2월

부 경 대 학 교 산 업 대 학 원

미생물학과

최 태 오

이 논문을 최태오의 이학석사
학위논문으로 인준함

2017년 2월

주 심 박사 김 군 도 (인)

위 원 박사 김 경 호 (인)

위 원 박사 전 용 재 (인)

목 차

표 (Table) 목록	3
그림 (Figure) 목록	4
초록 (Abstract)	6
I. 서 론	8
II. 재료 및 방법	17
1. 사용균주 및 배양조건	17
2. 균체량 분석	17
3. 색소 측정	18
4. 지질함량 분석	18
5. 돌연변이 유도	19
5.1. 자외선 조사 변이주 유도 및 선별	19
6. 대량 배양	21
6.1. 고밀도 광생물 반응기 장치구성 및 배치	21
6.2. 노지(Open pond) 대량 배양 장치 및 배치조성	23
7. 통계처리	24
III. 결과 및 고찰	28
1. 자외선 조사에 따른 <i>Chlorella vulgaris</i> 의 영향	28
1.1. 세포 생존율	28
1.2. 자외선 조사에 따른 <i>Chlorella vulgaris</i> 의 색소함량	30
1.3. 자외선 조사에 따른 <i>Chlorella vulgaris</i> 의 지질 함량	32
1.4. 콜로니 획득 (변이주 선별)	34
2. 자외선 조사로 유도된 변이주 특성	35
2.1 세포 성장 및 세포 건조 중량	35
2.2 자외선 조사로 유도된 변이주 세포의 색소 함량	39

2.3. 자외선 조사로 유도된 변이주 세포의 지질 함량	42
3. 대량배양을 위한 <i>Chlorella vulgaris</i> Mutant의 선정	44
3.1. 공기를 이용한 순환형 고밀도 광배양기를 이용한 <i>Chlorella vulgaris</i> 의 대량 배양	44
3.2. 노지 (Open pond) 대량 배양 비교	45
3.3. 야생균주와 돌연변이 균주 UBM1-10의 대량배양 성분분석 결과	48
IV. 요 약	50
V. 참 고 문 헌	52



List of Table

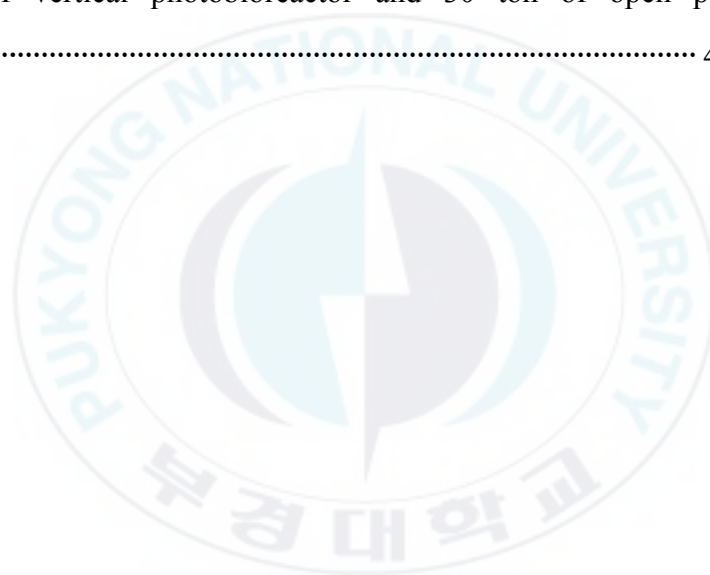
Table 1. The General classification of the algae	14
Table 2. The principle characteristics of the algae	15
Table 3. The taxonomic characteristics of the algae	16
Table 4. Components of F/2 Medium (g/L)	20
Table 5. Pigment contents and lipid production of UV-B induced mutants	43
Table 6. Comparative analysis of mass culture components of <i>Chlorella vulgaris</i> mutant (UBM1-10) and wild type	49



List of Figures

Figure 1. Ultraviolet lamp stand used in this study.	25
Figure 2. Photo images of the vertical photobioreactor system used in this study showing <i>Chlorella vulgaris</i> cultivation.	26
Figure 3. The outdoor microalgae cultivation system used in this study for mass cultivation.	27
Figure 4. Effect of UV-B exposure time on <i>Chlorella vulgaris</i> treated cell viability. Each value is expressed as a means $\pm$ SD of triplicate determinations. <i>p</i> -value: Students's <i>t</i> -test. $p < 0.05$ compared with control.	29
Figure 5. Effect of UV-B exposure time on <i>Chlorella vulagris</i> . (A) Chlorophyll contents, (B) Carotenoid contents. Each value is expressed as a means $\pm$ SD of triplicate determinations. <i>p</i> -value: Students's <i>t</i> -test. $p < 0.05$ compared with control.	31
Figure 6. Effect of UV-B exposure on <i>Chlorella vulagris</i> lipid contents. Each value is expressed as a means $\pm$ SD of triplicate determinations. <i>p</i> -value: Students's <i>t</i> -test. $p < 0.05$ compared with control.	33
Figure 7. Cell growth of UV-B induced mutants. Cell density (OD ₆₈₀ nm) was determined by spectrophotometer at 3 days intervals. Symbols: Wild Type (■), UBM1-2 (●), UBM1-3 (○), UBM1-10 (◆), UBM1-15 (▲), UBM1-18 (◇).	37

Figure 8. Dry cell weight of UV-B induced mutants. After 21 days of culture, the cell were harvested and measured DCW. Each value is expressed as a means $\pm$ SD of triplicate determinations. <i>p</i> -value: Students's <i>t</i> -test. <i>p</i> <0.05 compared with control.	38
Figure 9. Chlorophyll and carotenoid contents of UV-B induced mutants. (A) Chlorophyll, (B) Carotenoid contents. Each value is expressed as a means $\pm$ SD of triplicate determinations. <i>p</i> -value: Students's <i>t</i> -test. <i>p</i> <0.05 compared with control.	41
Figure 10. Growth of <i>Chlorella vulgaris</i> mutant (UBM1-10) & Wild type in 2 ton of vertical photobioreactor and 30 ton of open pond for 13 days.	47



Characterization of *Chlorella vulgaris* Mutants Induced by UV-B Irradiation and Mass Cultivation

Tae-O Choi

Department of Microbiology, Graduate School

Pukyong National University

Abstract

The thoughtlessness use and depletion of fossil fuels have generated major public concerns associated with the global environmental impact and the supply of alternative resources. The microalgae, *Chlorella vulgaris* can be considered as one of the important alternative resources for biodiesel production due to its relatively simple and fast growth characteristics, high lipid contents, the availability of mass culture technologies, and its non-competing culturable land use for food resources. In this study, we attempted to isolate economically potential high oleaginous strain of *C. vulgaris* for mass production via the random mutagenesis technique using UV-B irradiation.

For efficient UV-B mutagenesis for *C. vulgaris*, the cells were exposed for various time under UV-B. In general the cell viabilities were significantly decreased as the exposure time increased. We found that four minutes UV exposure was significant enough to achieve 50% lethal effect of UV-B for *C. vulgaris*. After the UV mutagenesis, the cell cultures were spreaded on F/2 agar plates and further cultured for 21 days under lab conditions. Colonies appeared as relatively bigger in size on the plates were isolated and

designated as UBM1-2, UBM1-3, UBM1-10, UBM1-15, and UBM1-18, respectively. After 21 day-cultivation, the resultant mutants were further determined for the cell growth, dry cell weight, pigments contents, and lipid contents based on the considering economically important parameters for biodiesel production under lab conditions. Among the mutants, in particular, UBM1-10 showed approximately 1.5-fold higher final cell Biomass and lipid content respectively than those from the wild type under lab conditions, although other strain such as UBM1-18 showed high potential for chlorophyll (13 mg/g) and carotenoid (3.18 mg/g) productions. Based on the results, UBM1-10 was selected for the mass scale cultivation in a tubular-type photobioreactor (TBPR) or open pond type reactor (OPR) under outdoor conditions. The mass cultivation results indicated that higher cell densities from both parental (1.7×10^9 cells/mL) and UBM1-10 (1.6×10^9 cells/mL) in the TBPR can be achieved rather as those cultured in the OPR type under the industrial conditions. However, UBM1-10 showed similar or a little less cell densities were produced as compared the parental strain cultured under same conditions using both type photoreactors. After the mass cultivation, the cells of UBM1-10 and the parental strain were further investigated for crude lipid contents and compositions. The results indicated that the crude lipid (0.3%) and eicosapentaenoic acid (0%) contents from UBM1-10 was higher than those (0.1%, 0.0261%, respectively) from the parent strain. Therefore, this study demonstrated that the economic potential of *C. vulgaris* as a biodiesel production resource can be increased with the consideration of photoreactor type as well as the strategic mutant isolation technique using UV-B.

I. 서 론

조류 (Algae)는 육상생물을 제외한 다양한 분류군을 포함하는 모든 광합성 미생물을 총칭하는 분류학적 용어이다 (Table 1). 조류를 구분하는 주된 기준은 광합성 색소, 편모의 구조, 색소체의 구조, 세포벽의 구성 성분, 광합성 저장물질 등의 다양한 화학적 형태학적 특성 등이 유용한 분류 기준이 된다 (Table 2, 3). 이러한 분류군 중 지구 위의 주요 서식처에 따라서는 해수조류와 담수조류로 분류되며, 또한 그 크기에 따라서 식물 플랑크톤이라 불리는 단세포성 미세조류 (Microalgae)와 다세포성 거대조류 (Macroalgae)로 분류된다. 미세조류들은 해양 및 담수 생태계의 주요 생산자로 활동하고, 다세포성 거대조류로는 녹조류, 홍조류, 그리고 황색조류의 일부인 갈조류가 이에 속하며, 이들은 바다를 주요 서식지로 하여 생지화학적 순환계 (Biogeochemical cycle)와 탄소 순환계 (Carbon cycle)에 주요한 역할을 담당하고 있다. 이러한 조류들은 연간 약 2,000억 ton에 달하는 지구 전체의 광합성성량 중 많은 부분을 담당하는 실질적인 지구의 일차 생산자이다(Park *et al.*, 2008).

미세조류는 CO₂, 물, 태양에너지를 이용하여 성장하는 광합성 단세포 생물로 탄수화물, 지질, 단백질, 색소 및 비타민 등 다양한 유용물질을 함유하고 있는 것으로 보고되어 이를 산업적으로 이용하기 위한 다양한 연구들이 진행되고 있다(Kay and Barton 1991, Varfolomeev and Wasseman 2011). 또한, 미세조류는 전 세계적으로 약 10만종 이상이 존재한다고 보고되어 있으며, 전체 종의 약 10% 정도만 알려져 있다(Joo *et al.*, 2000). 미세조류의 산업적 이용 장점은 태양의 빛에너지와 간단한 미네랄 성분 첨가만으로 광합성을 통해 무제한 증식이 가능하고, 다양한 환경에서 식

물보다 짧은 시간 동안 대량 생산이 가능한, 뛰어난 광합성효율과 바이오매스 생산량이 높은 장점 등을 보유하고 있다(Matta *et al.*, 2010, Grima *et al.*, 2003). 이러한 장점으로 인해, 다양한 건강기능식품 및 대체에너지 자원, 수산양식용 사료, 의약품의 원료물질 생산, 생화학 물질의 생산 원료 등으로 그 이용성이 확대되고 있다(Werman *et al.*, 2003). 또한 최근에는 화장품 소재로서의 새로운 자원으로도 각광을 받고 있는 실정이다(Choi *et al.*, 2014).

미세조류의 광합성 색소로는 주 색소인 클로로필 (Chlorophyll)과 보조 색소로 카로티노이드 (Carotenoides) 등을 가지고 있으며, 일반적으로 클로로필은 엽록체 속에 카로티노이드와 공존하는 색소이다(Park *et al.*, 2010). 클로로필 a와 b의 비율은 3 : 1로 알려져 있으며(Bhat *et al.*, 2000), 세포 내에서는 Protein, Lipoprotein과 결합한 상태로 존재하며, Vitamin C의 함량도 높다고 보고하고 있다(Kim and Lee, 2015). 미세조류가 생산하는 적 색소인 카로티노이드에는 인체 내에서 Vitamin A로 전환되는 β -carotene, Astaxanthin 및 Canthaxanthin등이 있고, 이들은 항산화, 항암, 심장병 예방, 노인성 황반 변성 등을 억제하는 효과를 지니고 있는 것으로 알려져 있다(Hong *et al.*, 1985).

미세조류는 육상생물보다 성장속도가 빠를 뿐만 아니라 빛이 있는 곳에서 쉽게 배양되는 장점과 더불어 광합성을 통하여 CO₂를 고정화하는 역할을 함으로써 지구온난화 문제가 대두되는 있는 오늘날 CO₂ 저감에 대한 연구의 중요성도 부각되고 있다(Borowitzka, 1992). 이러한 미세조류는 대기중에 있는 일정량의 CO₂에 의해 높은 세포성장률을 가져 다양한 산업에 적용가능하다(Oh *et al.*, 1988). 이러한 예로 최근 화력발전소와 제철소에서 발생하는 배기가스를 이용한 다양한 미세조류 연구들이 진행되

고 있으나, 이러한 산업폐기가스에는 CO₂ 및 독성가스 (SO_x, NO_x) 등을 함유하고 있어 광합성 효율 저해요인으로 작용하기 때문에, 효율적인 CO₂ 저감공정에 필요한 미세조류 선발 및 배양 최적화 등의 많은 연구가 진행되고 실정이다(Jimenez *et al.*, 2003).

세계 여러 나라에서는 현재 미세조류의 생산성을 높이기 위한 다양한 배양 반응기를 사용하고 있으며, 이러한 배양 반응기로는 판형, 관형, 수직형, 광생물 반응기 (Photobioreactor, PBR), 노지배양 (Open pond, Outdoor culture)방법 등이 있다(Richmond, 2004, Shin *et al.*, 2011). 노지 배양 방법은 설치비용이 저렴하다는 장점을 가지지만(Kim *et al.*, 2010), 일교차가 적고 넓은 부지를 필요로 하는 단점으로 인해 주로 하와이, 미얀마, 태국, 브라질, 중국 등에서 실용화되고 있다(Kim *et al.*, 2009). 우리나라의 경우 사계절이 뚜렷하고 기온차가 크며, 넓은 부지 확보의 어려움 때문에 실용화하기 위한 많은 난제를 가지고 있는 것으로 생각된다(Joo *et al.*, 1998). 이러한 노지배양법의 단점을 극복하기 위해, 최근 여러 가지 밀폐형 광생물 반응기가 보고되고 있지만 아직 범용화 되기는 이른 실정이다(Lee *et al.*, 2011). 미세조류는 빛 이외에도 다양한 성장인자인 물과 CO₂ 뿐만 아니라, 각종 미네랄 성분 및 유기 탄소성분들과 pH, 온도, 교반속도 등 여러 가지 요인들에 의해 조절 되어 진다(McHugh, 2003). 또한, 미세조류는 배양 조건에 따라 지질을 최대 70%까지 축적 할 수 있으며, 단위 면적당 지질 생산량이 식용작물보다 50~60배 이상 높은 지질함유량을 보유하여 대체 생물자원으로써의 가능성도 매우 커지고 있다(Spolaore *et al.*, 2006). 그러나 이러한 장점에도 불구하고 미세조류는 다른 미생물에 의한 오염에 크게 영향을 받고, 세포 밀도가 다른 미생물에 비해 상대적으로 낮아, 목적 물질의 경제적 생산에 어려움을 동반한다(Sung *et al.*, 1995).

이처럼 미세조류가 가진 대사산물의 생산효율을 증대시키기 위한 다양한 균주 개량 연구가 진행되고 있으며, 이러한 방법 중 하나로 무작위 돌연변이 (Random Mutagenesis)법을 이용하고 있다.

개량 균주 생산을 위해 이용되는 돌연변이원으로는 크게 화학적 돌연변이원과 물리적 돌연변이원으로 나뉜다. 화학적 돌연변이원으로는 Ethyl Methane Sulphonate (EMS), Methyl Methane Sulphonate (MMS), N-nitroso-methylurea (NMU) 등이 있고 물리적 돌연변이원으로는 UV, 전자빔, 감마선 등이 있다(Choi *et al.*, 2013). 예를 들어 *Arthrospira platensis*에 자외선을 조사하여 분리된 돌연변이주는 지질 함량과 카로티노이드 함량이 증가한 사례 등이 보고된 적이 있으며(Kim and Lee, 2012, Park *et al.*, 2012), *Haematococcus pluvialis*에 UV, Ethyl Methane Sulfonate (EMS), 1-methyl 3-nitro 1-nitrosoguanidine (NTG)등을 이용하여 총 카로티노이드와 Astaxanthin 함량이 증가한 돌연변이주를 분리할 수 있었다고 보고된 바 있다(Kanath *et al.*, 2008).

물리적 돌연변이원 가운데 자외선은 파장에 따라 UV-A (320-400 nm), UV-B (290-320 nm), UV-C (200-290 nm)로 나누어진다(Han *et al.*, 1999). 해조류에 자외선을 조사하였을 경우 DNA, RNA, 단백질의 변형과, 세포 분열, 세포의 크기, 생존율, 광합성 등의 감소를 초래한다고 알려져 있다(Park *et al.*, 1999). 또한, 식물이 UV-B에 직접 노출되면 잎 구조와 생식생장기관의 변형을 초래하며, 세포내 색소 합성 대사 감소를 유도한다(Yun *et al.*, 2014). 이처럼 자외선 조사는 미세조류 내 유용물질 함량이 증대된 개량균주를 개발할 방법으로 판단되고 있다. 또 다른 물리적 돌연변이원을 이용한 연구에서는 *Arthrospira platensis*에 전자빔을 조사하여 총 지질 함량이 약 2배 증가하고, 지방산 함량 또한 약 5배가 증가한 변이주를 얻

을 수 있었다고 보고된 바 있다(Park *et al.*, 2012). 또한, 전자빔은 식품의 살균, 살충과 일회용 의료기기의 멸균에 가장 보편적으로 이용되었으며, 공정 제어의 신속 정확성뿐만 아니라, 에너지 효율성이 뛰어나 현재 미세 조류 연구 선도 기술국에서도 이러한 방법을 이용한 다양한 연구가 활발히 진행 중에 있다(Hutchinson, 1985). 전자빔은 100 KeV~10 MeV의 에너지를 이용하여 의료기기 멸균 및 육종 분야 등에 다양하게 사용되고 있으며(Pourahrned and Pakravan, 1997), UV나 X-ray의 특성과는 달리 투과력이 크고 선량의 강도가 커서 조작의 시행 횟수를 최대한 줄일 수 있어, 시간과 경제적 효과적 효과가 뛰어난 것으로 알려져 있다(Chung *et al.*, 2002). 또한 조사 설비를 갖추고 있으면 표준화된 프로세스에 의해 대량시료 적용이 가능하다. 일부 식물학자들은 돌연변이 육종을 통한 유전적 조절 및 기능변화를 작물 개량에 적용하고 있다(Jeong and Kim, 2010). 하지만 생명공학 분야에서의 이용은 매우 낮으며, 미세조류를 이용한 돌연변이 연구는 미흡한 실정이다. 이와 같은 무작위적 돌연변이법을 이용한 균주 개량은 유전공학적 방법을 통한 균주 개량에 비해 단순한 방법으로 간주하지만, 개량된 균주 선별을 위한 시간과 노동력이 많이 소요되어, 효율성이 낮다는 단점을 지니지만 무작위 돌연변이를 통해 분리된 이러한 균주는 식품 및 사료 등의 다양한 제품에 적용가능하다는 장점이 있다(Jeong *et al.*, 2010). 자외선 조사를 통한 돌연변이 유발은 DNA 복제 과정과 밀접한 관련이 있다고 보고된 바 있으며(Friedberg, 2003), 세포에 자외선을 조사하였을 경우 세포 성장 억제, 콜로니 형성 능력 억제 및 DNA 손상을 들 수 있다. 대장균에 자외선을 조사하여 돌연변이를 유발하는 과정이 DNA 복제 과정에서 발생되며, 자외선 조사 시 발생한 DNA 손상 부위에 불특정 염기의 변화, 손실, 첨가 및 복제 과정이 반복되면 돌연변이가 유발된다고 알려져 있다(Friedberg, 2003).

미세조류 중 녹조류에 해당하는 클로렐라속 (*Chlorella* genus)은 지름 2~10 μm 의 구형 단세포로 20시간마다 4배로 증식하여 육상 식물에 비해 증식속도가 빠르다고 알려져 있다(Barclay *et al.*, 1999, Kang *et al.*, 2004). 클로렐라는 광합성을 통해 성장하여, 세포 내 색소 (엽록소 및 카로티노이드), 지질, 다당체와 같은 유용물질을 축적하는 것으로 알려져 있다(Kim *et al.*, 2014). 또한, 배양 방법으로 따라 다량의 단백질과 함께 약 14%의 지질을 함유하고 있다고 알려져 있다(Illman *et al.*, 2000; Han *et al.*, 2002).

따라서 본 연구에서는 향후 바이오연료 추출을 위한 Biomass 대량생산 및 어류 양식용 사료 등 산업적 활용 가능성을 목표로 하여 지질함량이 증대된 경제적인 미세조류 대량생산을 위한 균주 개량을 실시하였다. 이를 위해 *Chlorella vulgaris*에 자외선 (UV-B)을 조사하여 돌연변이를 유도하여 세포성장과 지질 함량 등이 증대된 다양한 변이주를 분리하였으며, 이러한 변이주의 특성을 분석하고 야생균주와 변이주의 배양 최적화를 통한 대량배양의 결과를 보고하고자 한다.

Table 1. The General classification of the algae

Common name	한글 일반명	Taxonomy
Blue green bacteria	남세균	Cyanobacteria
Blue green algae	남조류	Cyanophyta
Red algae	홍조류	Rhodophyta
Green algae	녹조류	Chlorophyta
Golden brown algae	황색조류	Chromophyta
Hapatophytes	착편모조류	Hapatophyta
Dinoflagellates	쌍편모조류	Dinophyta
Cryptomonads	은편모조류	Cryptophyta
Euglenoids	유글레나	Euglenophyta





II. 재료 및 방법

1. 사용 균주 및 배양 조건

본 연구에 사용된 미세조류는 녹조류인 *Chlorella vulgaris* (KMMCC 191)로 한국해양미세조류은행에서 분양받아 사용하였다. 배양법은 Watanabe(1960)가 보고한 방법인 F/2 배지를 이용하여 250 mL 삼각플라스크에서 working volume 100 mL 부피로 온도 25℃, 교반 속도 120 rpm, 광도 3,000 lux 조건하에 배양하였다. 광주기는 12시간 : 12시간 (명 : 암)으로 명반응 시 형광등을 사용하였다. F/2 배지의 조성은 다음과 같다 (Table 4).

2. 균체량 분석

*Chlorella vulgaris*의 균체량은 UV/visible Spectrophotometer (Optizen 2120UV, Mecacys Ltd, Korea)를 이용하여 680 nm에서 흡광도를 측정하였다. 건조 균체량 (Dry cell weight, DCW)은 종이필터 (Waterman No. 2)를 이용하여 세포 배양액 10 mL을 여과한 뒤, 여과된 균체를 Dry oven에서 105℃ 3시간 동안 건조하여 그 무게를 측정하였다(Kim and Lee, 2015).

세포생존율(Cell viability) 측정은 UV/visible Spectrophotometer (Optizen 2120UV, Mecacys Ltd, Korea)를 이용하여 680 nm에서 흡광도를 측정하였다.

3. 색소 측정

미세조류의 광합성 색소 함량을 분석하기 위하여 21 일 동안 배양한 *Chlorella vulgaris* 세포의 클로로필, 카로티노이드 함량을 분석하였다. 배양한 세포 1.0 mL을 원심분리 (3,000 rpm × 2 min) 한 후, 회수한 세포에 99% MeOH (메탄올) 1 mL를 첨가한 후, 60℃에서 30분간 추출한 다음 0℃에서 5분간 냉각 시킨 후, 분광 광도계 (Optizen 2120 UV/Visible Spectrophotometer, Mecacys, Korea)를 이용하여 650 nm, 665 nm에서 흡광도를 측정하여 클로로필 함량을 측정하였고, 카로티노이드 함량은 461 nm, 664 nm에서 흡광도를 측정하였다. 각 색소의 양은, Foyer 등(1994)에 의해 보고된 다음과 같은 식으로 계산하였다.

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

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

4. 지질함량 분석

*Chlorella vulgaris*를 21일간 배양하여 Chen 등(2011)에 의해 보고된 방법으로 세포 내 지질함량을 측정하였다. 미세조류의 효과적인 염색을 위해 분광광도계를 이용하여 측정대상 시료 전체를 각각 흡광도 (OD₆₈₀)를 0.5로 조정 후 96 well plate (costar 3790, Corning InCorp. NY, USA))를 이용하여 10 µL 세포배양액 , 138 µL 멸균증류수 , 2 µL Nile red , 50 µL DMSO 를 혼합한 후 40℃ 배양기에서 10분간 반응시키고 형광 광도계 (Fluorescence Spectrophotometer FS-2, SCINCO, USA)를 이용하여 excitation 490 nm, emission 620 nm로 측정하였다. 형광광도값 (fluorescence intensity value)은 미세조류 자체의 형광값 (auto-fluorescence)을 뺀 값으로 나타내었

다. 지질 정량을 위해 Triolein (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)으로 표준 검량선을 작성 한 후, *Chlorella vulgaris* (Wild type) 및 변이주(UBM)의 지질함량을 측정하였다.

5. 돌연변이 유도

5.1. 자외선 조사 변이주 유도 및 선별

자외선 조사는 UV-B (254 nm)의 파장으로 Clean Bench 안에서 자외선 램프 스탠드 (15 W, 76 $\mu\text{M}/\text{cm}^2$, VILBER Lourmat, France)를 이용하였고, 조사거리는 약 15 cm 이었다 (Figure 1). 대수 증식기의 *Chlorella vulgaris* 를 인산완충용액으로 세척한 후, 초기 흡광도 ($\text{OD}_{680} = 0.5$)로 조정 후, 조정된 세포 배양액 5 mL를 60 mm petridish에 담아 뚜껑을 열고 자외선을 조사하면서 1, 2, 3, 4, 5분 간격으로 1 mL 샘플링 하였다. 각 시간별로 자외선을 조사하여 얻은 샘플은 약 12일간 계속 배양하였다. 자외선 조사 후 세포를 흡광도 ($\text{OD}_{680} = 0.1$)로 희석하여, F/2 고체평판 배지에 도말하여 콜로니가 생성될 때까지 약 3주간 배양하였다. 생성된 콜로니는 F/2 액체배지에 접종하여 세포가 일정 농도가 될 때까지 배양한 후, 돌연변이 주의 특성을 분석하였다.

Table 4. Components of F/2 Medium (g/L)

	Components	Amounts
Salt Solution I	NaCl	20.758 g/L
	KCl	0.587 g/L
	NaHCO ₃	0.170 g/L
	NaBr	0.0746 g/L
	H ₃ BO ₃	0.0225 g/L
	NaF	0.0027 g/L
	Na ₂ SO ₄ · 10H ₂ O	5.5 g/L
Salt Solution II	MgCl ₂ · 6H ₂ O	9.393 g/L
	CaCl ₂ · 6H ₂ O	1.316 g/L
	SrCl ₂ · 10H ₂ O	0.0214 g/L

6. 대량 배양

6.1. 고밀도 광생물 반응기 장치구성 및 배치

본 연구를 통하여 분리된 돌연변이 균주를 외부의 오염원을 차단하여 순수 배양 및 고밀도 배양이 가능하도록 하기 위하여 고밀도 광생물 반응기를 구성하여 돌연변이 균주와 모 균주의 비교배양 실험을 진행하였다(Figure 2). PC 파이프 12개를 이용하여 수직형 관형 배양기 1조를 조립하고 동일한 광배양기를 1조 제작하여 병렬로 배치하되 공간섭을 피하기 위해 상호 겹치지 않게 배치하였다. 그 후 각 조의 상단의 12개의 PC 파이프 중 10개는 일반적인 광배양기 형태로 조립하고 1조와 2조의 나머지 끝부분에 하나씩 연결하여 2조 1세트가 전체적으로 연결되게 제작하였다. 총 12개의 PC 파이프에 공기를 공급하기 위한 공급 장치의 양쪽 한 부분은 공기가 공급되지 않게 반대방향으로 2조의 배양기를 제작하였다. 그 후, 10개의 배양기 내부에서 배출되는 공기배출구의 밸브를 조절하여 양 끝단의 PC 파이프에 압력이 증가하게 하여 공기가 올라오는 배양기 파이프의 배양액이 상승하여 반대편에 공기가 올라오지 않는 배양기로 넘어가게 하여 전체적으로 배양액이 순환하도록 제작하였다. 따라서 별도의 에너지를 사용하지 않고 공기를 이용해서 광배양기 내부의 배양액이 순환되게 함으로써 배양액 전체가 균일하게 혼합되어 연속배양을 위한 추가 배양액을 한곳에 공급하여 배양기 내부가 전체적으로 균일하게 혼합 되도록 구성하였다.

해수 약 2 ton에 해수소독제인 Calcium hypochlorite (NIPPON SODA, Japan) 5 g/ton을 투입하여 24시간 폭기하여 배양액을 소독한 후 중화제 Sodium thiosulfate (극동화학, CHINA)를 10 g/ton 투입하여 염소성분을 제거하여 중화시켰다. 중화된 해수에 *Chlorella vulgaris* 모 균주와 돌연변이 균주 배양액 (세포농도 약 3×10^7 cell/mL)의 약 700 L를 각각 약 1.6 ton의 해수에 혼합하여 초기 배양액 내의 미세조류 농도를 약 1×10^7 cell/mL이 되게 조정하

여 접종 배양액을 만든 후 각각 분리된 광배양기에 주입하여 접종하였다. 배지는 식물경작용으로 사용되는 비료를 사용하였으며, 고밀도 광배양기는 질소비료 ((주)풍농, 한국) 200 g/ton, 복합비료 (동부팜한농, 한국) 100 g/ton을 투입하였고, 복합비료의 용해도를 높이기 위해 사전 충분한 교반을 통해 녹인 후, 불용성 침전물 또는 잔사물은 제거하여 광배양기 내부의 오염을 방지하였다.

배양기간은 대기온도 등을 측정하였을 때, 낮의 최고 기온이 약 18℃~20℃ 내외인 4월 10일부터 22일까지 13일간 배양하였으며, 배양기간 중 낮의 대기온도가 약 18℃~20℃ 내외일 때 배양기 내부의 배양액 온도는 약 21℃~23℃로 유지되었으며, 새벽에는 17℃~18℃로 대기 온도와 비슷하게 유지되었다. 배양기간 중 별도의 인공광원을 사용하지 않은 자연광하에서만 실시하였으며, 배양 시 CO₂ 공급은 광배양기에 공기를 주입하기 위해 설치된 3마력 용량의 Air-blower (기전사, Korea)의 공기 흡입구에 연결하여 99%의 CO₂ (쌍용종합가스, Korea)를 0.2 L/min으로 공급하였다. CO₂의 공급은 pH의 변화에 의하여 투입되도록 pH 컨트롤러 (pH controller, 동일계기, Korea)를 이용하여 pH가 8.5 이상이 되면 CO₂를 투입하고, pH 8.0 이하로 떨어지게 되면 CO₂의 투입이 차단되도록 자동 설정하여, 배양 시 pH조절이 일정하도록 유지하였다. CO₂의 투입시간은 광합성이 활발하게 이루어지는 시간대인 10시부터 17시까지 공급되도록 Timer를 이용하여 조정하였으며, 그 이외의 시간에는 pH의 변화와 상관없이 CO₂의 주입을 차단하고 공기만을 투입하도록 설정하였다.

6.2. 노지(Open pond) 대량 배양 장치 및 배지조성

노지 대량배양 비교 실험 수행을 위해서 사용하는 배양탱크 중 자연광이 동일하게 공급되는 조건의 30 ton 규모의 배양탱크 ($6\text{ m} \times 6\text{ m} \times 0.8\text{ m}$) 4개를 선정하였으며 4개의 배양탱크를 1마력의 Air-blower (기전사, Korea) 1대를 이용하여 폭기시켜 배양액을 교반하도록 하였다 (Figure 3). 해수는 1차로 모래여과기를 거쳐 각 탱크에 동일하게 취수한 후 해수소독제인 Calcium hypochlorite (Nippon soda, Japan) 5 g/ton을 투여한 후 약 24시간 Air-blower를 이용하여 폭기시킨 후 중화제, Sodium thiosulfate (극동화학, China) 10 g/ton을 투입하여 염소성분을 제거하여 중화시켰다. 중화된 해수에 *Chlorella vulgaris* 모 균주와 돌연변이 균주 농축제품 (세포농도 약 100×10^8 cell/mL)을 각각 4개의 30 ton 배양탱크에 3 L씩 접종하여 모 균주 배양탱크 30 ton 2개, 돌연변이 균주 배양탱크 30 ton 2개를 설치하였으며 초기 배양액 내의 미세조류 농도를 약 1×10^7 cell/mL이 되게 조정하였다. 세포의 측정은 Hemocytometer (Thermo Fisher Scientific, USA)를 이용하여 현미경으로 측정하였으며, 이때 시료의 희석 비율을 100배하여 분석하였다.

배지는 고밀도 광배양기에서 사용된 것과 같은 제품으로 식물 경작용 비료로 사용되는 (주)풍농에서 제조한 요소비료와 (주)동부팜 한농에서 제조한 복합비료를 사용하였으며, 투입량은 요소비료 (질소성분 함량 46%)를 30 g/ton, 복합비료 (N-P-K-붕소의 함량 21-5-8-0.2)를 15 g/ton의 비율로 투입하였으며, 복합비료는 광배양기의 경우와 달리 배양탱크 내부를 오염시킬 염려가 없기 때문에 물에 녹여 사용하지 않고 입자 형태인 비료를 그대로 투입하였다

배양기간은 4월 21일부터 5월 3일까지 약 13일간 배양하였다. 배양기간 중 낮의 최고 대기온도는 약 $20^{\circ}\text{C} \sim 22^{\circ}\text{C}$ 내외로 광배양기와 달리 주야간 배

양탱크 수온 변화의 편차가 크지는 않았다. CO₂의 공급은 배양탱크에 공기를 주입하기 위해 설치한 1마력 Air-blower의 공기흡입구에 연결하여 99%의 CO₂ (쌍용종합가스, Korea)를 0.2 L/min으로 공급하였다. CO₂의 공급은 pH의 변화에 의하여 투입되도록 pH 컨트롤러 (pH controller, 동일계기, Korea)를 이용하여 pH가 8.5 이상이 되면 CO₂를 투입하고 pH 8.0 이하로 떨어지게 되면 CO₂의 투입을 차단하도록 자동 설정하여, 배양 시 pH 조절이 일정하도록 유지하였다. CO₂의 투입시간은 광합성이 활발하게 이루어지는 시간대인 10시부터 17시까지 공급되도록 Timer를 이용하여 조정하였으며, 그 이외의 시간에는 pH의 변화와 상관없이 CO₂의 주입을 차단하고 공기만을 투입하도록 설정하였다.

7. 통계처리

본 연구에 대한 실험결과는 3회 반복 실험에 의한 평균값으로 나타내었고, 대조군과 실험군의 통계학적 유의성 검정은 Student's *t*-test를 사용하였으며 표준편차 (p -value < 0.05) 수준에서 검정하였다.



Figure 1. Ultraviolet lamp stand used in this study.

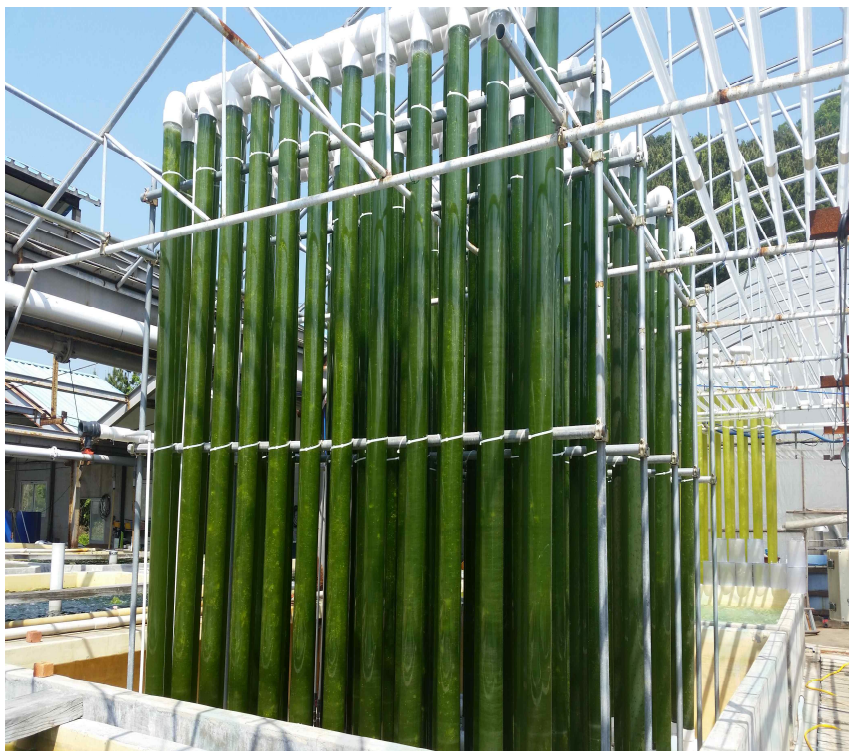


Figure 2. Photo images of the vertical photobioreactor system used in this study showing *Chlorella vulgaris* cultivation.

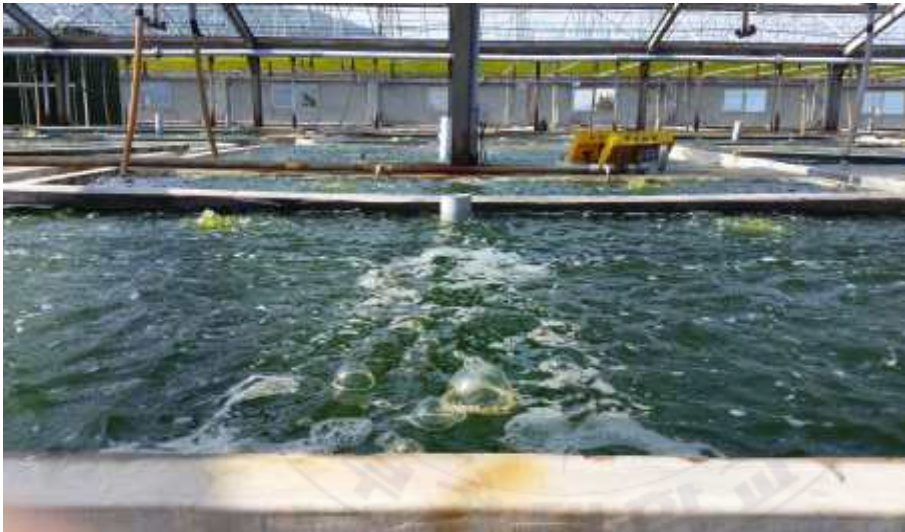


Figure 3. The outdoor microalgae cultivation system used in this study for mass cultivation.

III. 결 과 및 고 찰

1. 자외선 조사에 따른 *Chlorella vulgaris*의 영향

1.1. 세포 생존율

자외선 조사에 따른 *Chlorella. vulgaris*의 세포 생존율 및 변화 양상을 분석하였다. 실험에 적합한 자외선 조사선량을 확인하기 위해 UV-B (254 nm) 램프를 이용하여 1~5분간 조사하였고, 그 결과 자외선 조사시간이 길어질수록 세포 생존율이 감소함을 확인 하였다. 0분 조사한 세포의 생존율을 100%로 보았을 때, 5분 조사한 세포의 생존율은 약 30%임을 확인 하였으며, 이는 자외선 조사 시간 증가에 따라 조사선량이 증가하며 이에 따라 세포의 생존율 또한 감소함을 알 수 있었다 (Figure 4).



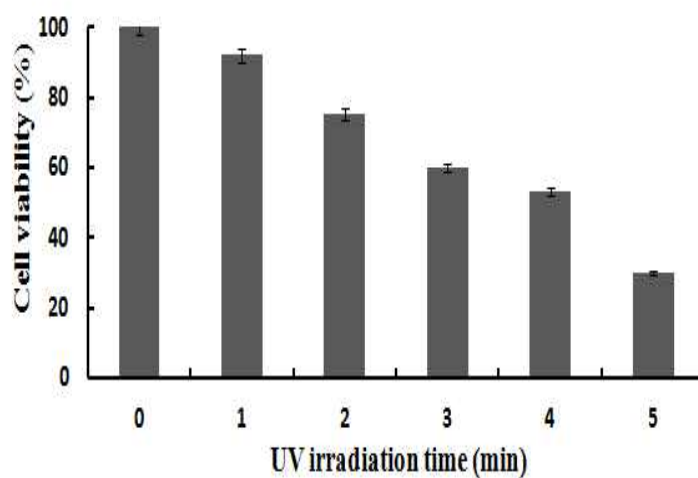
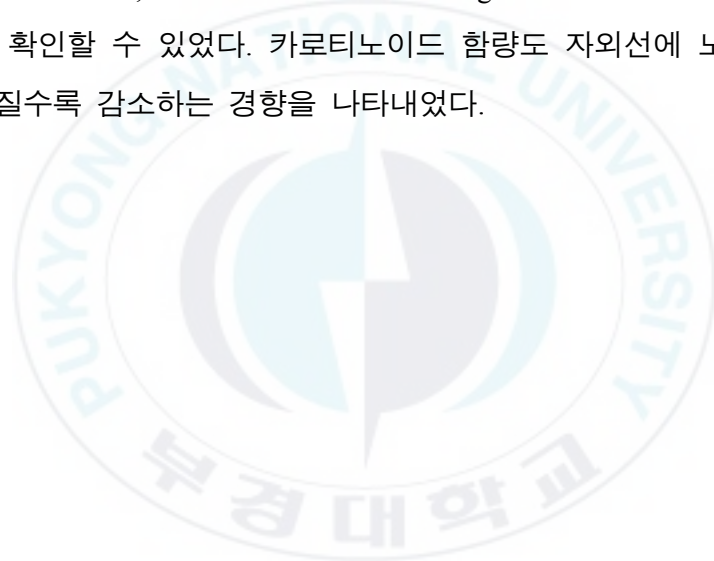


Figure 4. Effect of UV-B exposure time on *Chlorella vulgaris* treated cell viability. Each value is expressed as a means $\pm$ SD of triplicate determinations. p -value: Students's t -test. $p < 0.05$ compared with control.

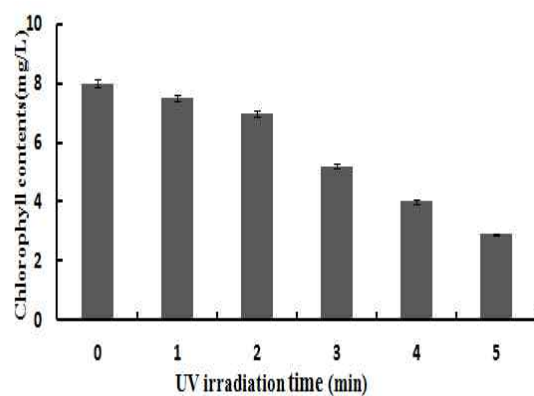
1.2. 자외선 조사에 따른 *Chlorella vulgaris*의 색소함량

자외선 조사 시간에 따른 세포 내 클로로필 함량은 Figure 5(A)에 나타내었으며 자외선을 1분 조사 시 7.5 mg/L, 2분 일 때 7 mg/L, 3분 조사하였을 때는 5.2 mg/L, 4분 조사하였을 때는 4 mg/L 그리고 5분간 조사하였을 때에 2.7 mg/L로써 자외선을 조사하지 않은 대조군에 비해 약 65% 감소함을 확인하였고, 조사 시간에 따라 색소의 함량이 감소함을 확인할 수 있었다.

자외선 조사 시간에 따른 카로티노이드 함량은 Figure 5(B)에 나타내었다. 자외선 조사 시간 1분 (1.7 mg/L), 2분 (1.46 mg/L), 3분 (1.3 mg/L), 4분 (0.8 mg/L)로 나타났으며, 5분 조사 시에는 0.7 mg/L로 대조군에 비해 약 65% 감소함을 확인할 수 있었다. 카로티노이드 함량도 자외선에 노출되는 시간이 길어질수록 감소하는 경향을 나타내었다.



(A)



(B)

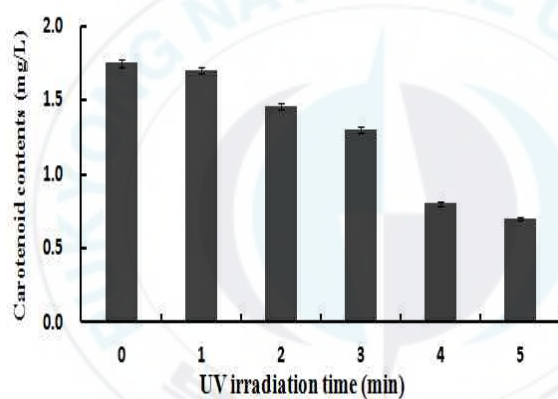


Figure 5. Effect of UV-B exposure time on *Chlorella vulgaris*. (A) Chlorophyll contents, (B) Carotenoid contents. Each value is expressed as a means $\pm$ SD of triplicate determinations. p -value: Students's t -test. $p < 0.05$ compared with control.

1.3. 자외선 조사에 따른 *Chlorella vulgaris*의 지질 함량

자외선 조사시간에 따른 지질 함량을 측정한 결과, 5분간 조사한 세포 내 지질 함량은 35 $\mu\text{g/mL}$ 로 자외선을 조사하지 않은 대조군이 43 $\mu\text{g/mL}$ 임을 감안할 때에 약 19% 감소함을 확인하였다. 이는 자외선 조사시간에 따른 세포 내 지질 함유량 변화는 크지 않음을 시사하였다 (Figure 6).



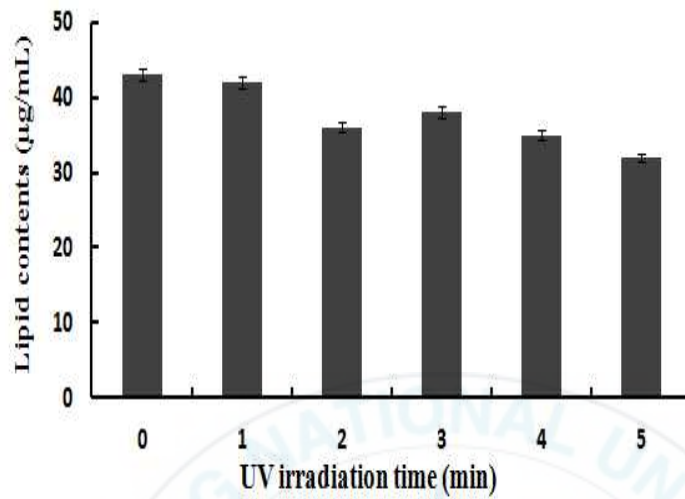


Figure 6. Effect of UV-B exposure on *Chlorella vulgaris* lipid contents. Each value is expressed as a means $\pm$ SD of triplicate determinations. p -value: Students's t -test. $p < 0.05$ compared with control.

1.4. 콜로니 획득 (변이주 선별)

C. vulgaris 세포에 자외선을 1, 2, 3, 4, 5분 간격으로 조사한 후, 자외선이 조사된 각 시료를 평판희석법을 이용하여 F/2 한천 고체 배지 (agar 0.5%)에 접종하였다. 실험실 배양조건은 25℃에서 광도 3,000 lux로, 광주기는 12시간 : 12시간 (명 : 암)으로 명반응 시 형광등을 사용하였다. 약 3주간 배양한 후 생성된 콜로니 중 크기가 크고 진한 초록색을 띄는 단일 콜로니 한 개를 선택하여 새 고체 배지에 도말한 후, 한 번 더 단일 콜로니를 유도하였다. 콜로니가 생성되면 F/2 액체 배지로 옮겨 배양하여 15일간 배양 후 돌연변이주의 특성을 분석하였다. 자외선 2, 3, 4, 5 분을 조사 후 분리된 변이주들은 세포생장률 (Figure 4)이 감소하고 세포내의 색소 (Figure 5)와 지질 (Figure 6) 함량도 감소하는 경향을 나타내었다. 실험에서 분리된 균주들 중 콜로니가 선명하지 않거나 액체배지에서 성장이 잘 안되는 균주들은 (Data not shown) 연구대상에서 제외하였다. 본 연구에서는 자외선을 1분 조사 후 분리된 콜로니 30개중 액체배지에서 세포성장이 양호한 5개의 돌연변이 균주를 Ultraviolet B Mutant (UBM)로 표현하여 각각 UBM1-2, UBM1-3, UBM1-10, UBM1-15, UBM1-18로 명명하고 각 균주의 특성을 분석하였다.

2. 자외선 조사로 유도된 변이주 특성

2.1 세포 성장 및 세포 건조 중량

UV-B 조사를 통해 얻은 *C. vulgaris* 세포에 변이주 5종에 대해 총 21 일 동안 3일 간격으로 세포 성장을 측정하였다. 변이주 UBM1-10, UBM1-15의 세포 생장은 야생 균주에 비해 각각 성장률이 높았으며, 이들의 최종 Biomass 생산량을 대조군과 비교하였을 때 각각 약 1.5배 높았다 (Figure 7). 또 다른 변이주인, UBM1-2, 야생균주 (WT), UBM5-4, UBM1-18의 세포 성장률은 야생 균주와 큰 차이를 보이지 않았지만 세포 건조중량 (최종 Biomass 생산량)을 측정한 결과 야생 균주는 1.8 g/L, UBM1-2는 1.075 g/L, UBM1-3는 0.93 g/L, UBM1-10은 2.8 g/L, UBM1-15는 2.8 g/L로 세포 성장률의 결과와 동일한 결과를 보였다 (Figure 8).

미세조류에 자외선을 조사하였을 경우 DNA, RNA 단백질의 변형과 세포분열, 세포의 크기, 세포 생존을 및 세포의 광합성이 감소한다고 보고되었다(Park *et al.*, 2015). 또한, 식물에 UV-B에 직접 노출되면 잎 구조와 생장기관의 변형을 초래하며, 세포 내 색소 합성 대사과정에 이상을 초래한다고 알려져 있다(Gleason and Wellington, 1993, Kim and Lee, 2015). 보고된 또 다른 예를 보면 *Arthrospira platensis* 세포에 자외선을 조사하여 얻은 돌연변이주의 경우, 돌연변이주의 세포 성장률은 야생 균주의 세포 성장률 비슷하거나 일부 증가함을 확인하였다(Park *et al.*, 2012). 또한, *Nannochloropsis oculata*에 자외선을 조사하여 얻은 돌연변이주의 경우에는 돌연변이균주가 야생 균주보다 세포 성장률이 증가함을 확인할 수 있었다(Kim and Lee, 2015). Gleason과 Wellington (1993)은 산호초에 자외선 조사에 따른 영향을 조사하였을 때, 자외선에 노출된 산호초의 경우, 노출되지 않은 산호초에 비해 세포 생장이 증가함을 보고하고 있다. 따라서 본

논문의 자외선 조사한 돌연변이주와 야생균주와 세포생장을 비교한 결과 또한 이전 보고된 연구 결과들과 유사한 형태를 나타내었다.



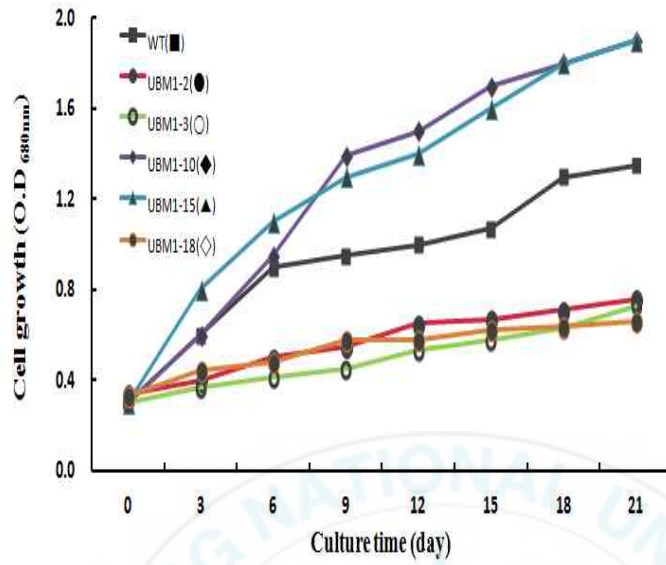


Figure 7. Cell growth of UV-B induced mutants. Cell density ($OD_{680\text{nm}}$) was determined by spectrophotometer at 3 days intervals. Symbols: Wild Type (■), UBM1-2 (●), UBM1-3 (○), UBM1-10 (◆), UBM1-15 (▲), UBM1-18 (◇).

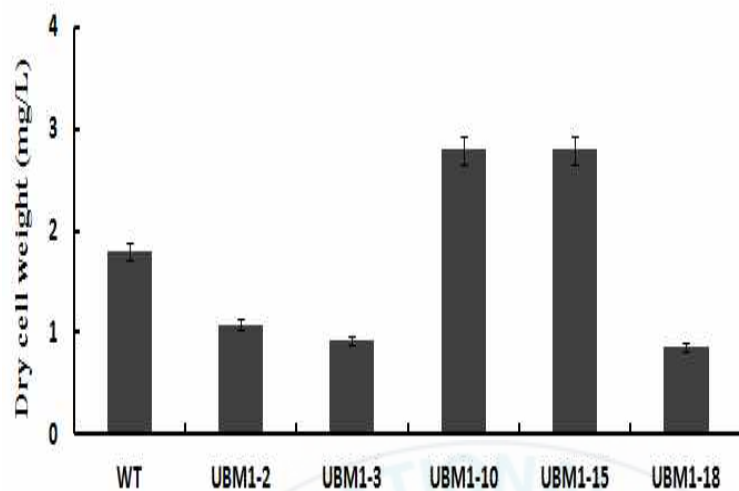


Figure 8. Dry cell weight of UV-B induced mutants. After 21 days of culture, the cell were harvested and measured DCW. Each value is expressed as a means $\pm$ SD of triplicate determinations. *p*-value: Students's *t*-test. $p < 0.05$ compared with control.

2.2 자외선 조사로 유도된 변이주 세포의 색소 함량

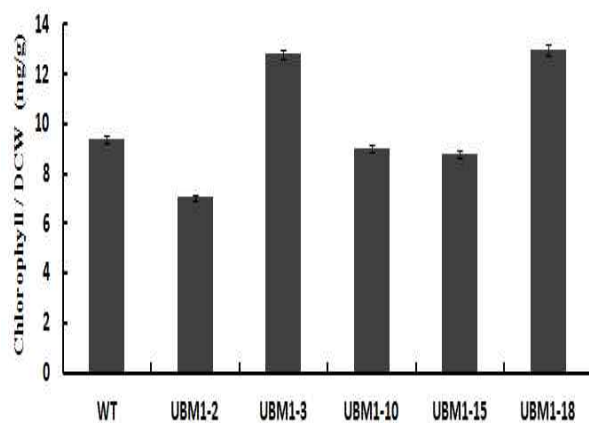
자외선 조사에 따른 *C. vulgaris* 변이주의 생장에 따른 색소함량 변화를 확인하기 위하여 배양 21일 차에 총 클로로필과 총 카로티노이드 함량을 측정하였다. 총 클로로필 함량 비교 결과 UBM1-3과 UBM1-18 균주 유래 클로로필 함량이 대조군 (9.38 mg/g)에 비해 각각 비교적 높은 12.8 mg/g과 12.99 mg/g를 함유하고 있음을 확인하였다. 하지만 나머지 변이주들은 야생 균주보다 상당히 낮은 함유율을 보유하고 있는 것을 확인하였다 (Figure 9A).

총 카로티노이드 함량 조사 결과 야생 균주가 2.28 mg/g인데 반해, UBM1-3 및 UBM1-18 변이주 유래 보조색소의 함량이 2.9 mg/g과 3.18 mg/g로 각각 나타났지만, 대부분의 변이주들이 비교적 낮은 총 카로티노이드 함량을 보유함을 확인할 수 있었다 (Figure 9B).

분리된 돌연변이 균주의 분석결과에서 대부분의 변이주들이 낮은 총 클로로필 및 카로티노이드 함량을 보유한 것을 확인하였듯이, 많은 문헌에서 식물에 자외선 조사는 광합성 저해를 초래하게 되는 유사한 결과를 보고하였다. 한 예로, 녹조 구멍갈파래에 자외선을 2시간 가량 노출시켰을 때 광합성 색소가 50% 이상 감소하였으며(Yun *et al.*, 2014), *N. oculata*에 자외선을 조사하여 분리한 변이주의 클로로필 함량은 야생 균주보다 낮았다(Kim *et al.*, 2013). 하지만 UBM1-3과 UBM1-18은 오히려 카로티노이드 함량이 증가하는 경향을 보여 주었으며, 이러한 유사결과는 Park과 Han (1999)에 의해 보고된, *H. pluvialis*에 자외선을 조사하여 유도된 돌연변이주에서 총 카로티노이드 함량이 1.68배 증가함을 확인한 결과와 유사함을 확인하였다. 이러한 결과는 미세조류가 스트레스 환경에 노출되었을 경우 보호기작으로 지질과 색소와 같은 유용물질을 다량 축적한다고 알려

저 있으며, 본 연구에 사용된 돌연변이원인 자외선 조사는 스트레스 요인으로 작용하여 *C. vulgaris*의 색소함량 변화에 영향을 준다고 밝힌 다양한 과거 연구들의 결과와 유사하였다(Vinebrooke and Leavitt; 1996; Estevez *et al.*, 2001; Kim and Lee, 2012). Kim과 Lee (2012)는 미세조류에 자외선을 조사하여 돌연변이주를 획득하였으며 이를 이용한 균주특성을 분석하였다. 자외선 조사를 통해 얻은 변이주의 생장은 야생 균주에 비해 높았으나, 색소 축적량은 감소함을 확인하였다. Vinebrooke과 Leavitt (1996)은 자외선을 조사한 실험군의 세포내 클로로필 색소함량이 대조군에 비해 약 50% 감소함을 발표하였다. Esteves 등(2001)은 자외선 조사를 통해 *Chlorella* sp.에 미치는 영향을 알아보려고 하였으며, 그 결과 대조군에서는 0.21 pmol의 β -카로틴이 함유되어 있었지만, 자외선을 조사한 실험군에서는 0.08 pmol의 β -카로틴이 함유되어 있어 약 62%가 감소함을 확인하였다. Sharma 등(2001)에 의하면 광합성을 통해 성장하는 식물세포에 자외선을 조사하면 식물 내 색소 함량이 감소함과 동시에 개체수의 감소도 함께 일어남이 보고되었다. 자외선 조사 시 식물세포 내 색소 함량의 감소는 Dube와 Vidaver(1992)의 결과를 통해 확인할 수 있었다. Dube와 Vidaver(1992)는 자외선은 식물의 생산성과 관련 있는 광합성을 저해하며, 자외선 조사를 통해 스트레스가 유도된 식물은 CO₂ 저감 효과 및 세포내 클로로필 함량의 감소를 불러움을 보고하였다. 이처럼 과거 많은 연구들에 의해 자외선 조사를 통해 분리된 대부분 변이주들의 클로로필 및 카로티노이드 함량의 감소는 당연한 결과일 것으로 예상되었다. 하지만 본 연구에서 분리된 변이주인 UBM1-3과 UBM1-18은 생장을 증가 및 생체량 증가에도 불구하고 높은 총 클로로필 함량과 카로티노이드 함량을 보유함을 확인함으로써 이 균주들이 잠재적으로 색소추출 소재 등 산업적인 적용이 가능한 균주임을 확인하였다.

(A)



(B)

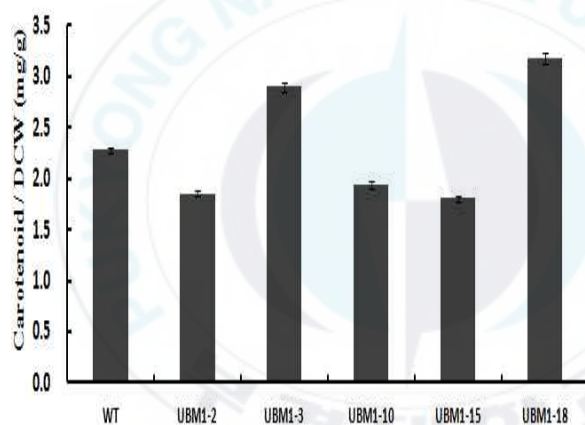


Figure 9. Chlorophyll and carotenoid contents of UV-B induced mutants. (A) Chlorophyll, (B) Carotenoid contents. Each value is expressed as a means $\pm$ SD of triplicate determinations. *p*-value: Students's *t*-test. *p* < 0.05 compared with control.

2.3. 자외선 조사로 유도된 변이주 세포의 지질 함량

변이주의 지질 함량을 측정한 결과 UBM1-2는 89.1 $\mu\text{g/mL}$ 로 지질 함량이 가장 높았으며, UBM1-3은 54.4 $\mu\text{g/mL}$, UBM1-10은 67.5 $\mu\text{g/mL}$, UBM1-15는 56.4 $\mu\text{g/mL}$, 그리고 UBM1-18은 60.35 $\mu\text{g/mL}$ 의 지질을 함유하여 야생 균주 보다 대부분 변이주에서 지질 함량이 각각 49%, 17%, 33%, 20%, 25% 증가함을 확인하였다 (Table 5).

미세조류는 질소와 같은 생장에 필요한 영양분의 고갈과 같은 스트레스가 발생 하였을 경우 세포 내 중성지질을 다량 축적하는 것으로 알려져 있다. Boussiba 등(1999)은 *Haematococcus pluvialis*를 이용하여 실험한 결과 질소 결핍 배지에서 배양 할 경우, 세포 내 Astaxanthin의 함량이 증가함을 보고 하였다. Oh 등(1998)은 *Chlorella vulgaris*를 이용한 Fed-batch실험을 진행하였다. 그 결과 지속적인 영양공급이 이루어지면 균체의 농도가 증가했으나, 영양분이 결핍되면 세포 내 지질 축적량이 증가를 확인하였다. 이처럼, 미세조류의 성장 시 스트레스에 노출되면 스트레스에 대응하여 유용물질의 합성 대사과정을 변환하게 되며 이는 성장 속도 감소를 통한 세포 수확량 감소를 초래한다. 하지만, 자외선 조사를 통해 얻은 변이주는 정상적 세포 성장 조건에서 야생 균주에 비해 생장률이 높으며 세포 내 지질을 다량 함유하는 것으로 미루어 볼 때, 경제적으로 유용하게 사용할 수 있을 것으로 생각 된다.

Table 5. Pigment contents and lipid production of UV-B induced mutants.

	DCW* (mg/L)	Lipid*** (μ g/mL)	Pigment contents/DCW (mg/g)	
			Chlorophyll	Carotenoid
WT**	1.8	45	9.38	2.28
UBM1-2	1.075	89.1	7.04	1.85
UBM1-3	0.93	54.4	12.8	2.9
UBM1-10	2.8	67.5	9.03	1.94
UBM1-15	2.8	56.4	8.8	1.81
UBM1-18	0.86	60.35	12.99	3.18

*: Dry Cell weight

** : Wild Type

***: mL($OD_{680}=0.5$)

3. 대량배양을 위한 *Chlorella vulgaris* mutant의 선정

자외선 조사를 통해 얻은 변이주의 건조 중량, 색소인 클로로필과 카로티노이드 및 지질 함량을 Table 5에 나타내었다. 총 5개의 변이주 중에서 UBM1-3과 UBM1-18은 야생균주에 비해 총 클로로필과 카로티노이드 함량이 높은 것으로 분석되어, 향후 천연색소 추출 등 산업적 소재로서의 잠재성을 확인할 수 있었다. 하지만 본 연구에서는 지질함량의 증가에 초점을 두고 있으므로, 대량배양을 위한 균주로 선택하지는 않았다. UBM1-10은 야생 균주보다 세포성장은 1.4배 증가하였고, 세포 건조중량은 1.5배 증가하였으며, 지질함량은 1.5배 증가하였으나 색소함량은 야생 균주 보다 감소하는 경향을 보였다. 이러한 결과로 인하여 우수 변이주로 UBM1-10을 대량배양 하는 균주로 선택하게 되었다 (Table 5).

3.1. 공기를 이용한 순환형 고밀도 광배양기를 이용한 *Chlorella vulgaris*의 대량 배양

실험실의 Lab. scale 상의 세포 성장 형태를 보면 3일 간격으로 측정한 wild type은 증식 속도가 완만하게 성장하고 선별된 변이주 UBM1-10은 9 일 부터 급격히 성장하는 양상을 나타내었다. 9일째의 세포 성장에서 모균주는 0.95 (OD₆₈₀)였고, UBM1-10은 1.39로 나타났다 (Figure 7). 하지만 광배양기를 이용한 대량 배양에서, 초기 약 3일간은 미세조류의 증식속도가 완만하게 성장하였으나, 5일 차부터 급격히 성장하기 시작하여 9일경의 야생 균주는 약 1.7×10^9 cells/mL의 세포 밀도를 보였으며, 돌연변이 균주에서는 약 1.6×10^9 cells/mL의 세포 밀도 (DCW 환산 시 약 2.5g/L)를 보였다. 배양 10일 이후에는 두 가지 균주 모두 세포의 수가 점차 감소하는 현상을 나타내었다. 따라서 경제적 최적 수확기는 광배양기의 경우 초기 접종일로부터 약 8일에서 10일 사이에 미세조류를 수확하고 다시 접종하여 배양하는 것이 효율적

인 것으로 판단되어 진다 (Figure 10). 실험실 배양에서는 UBM1-10이 야생균주에 비해 세포 성장이 약 1.4배 증가하는 경향을 보였으나, 광배양기를 이용한 대량배양에서는 야생균주와 비슷하게 또는 약간 낮게 나타났다. 이러한 결과를 초래한 이유로는 실험실 배양에서는 온도, 빛, 배지조성 등을 최적화한 조건으로 배양이 가능 하였다, 광배양기를 이용한 대량배양 시에는 온도, 빛 등을 인위적으로 조절하지 않고 자연적인 상태에서 배양을 하여 이러한 결과가 발생하였을 것으로 사료된다. 아울러 배지 또한 경제적인 측면을 고려하여 실험실 배양에서 사용된 F/2 배지를 사용하지 않고 식물 경작용 비료를 배지를 사용함으로써 F/2 배지에 포함되어 있는 미량요소들의 결핍 등에 의해 실험실 배양보다 저조한 성장을 보인 것으로 판단된다. 따라서 향후 산업적 대량 배양 시 세포 성장을 촉진 시킬 수 있는 또 다른 경제적인 배양 배지 탐색에 관한 실험이 필요할 것으로 판단된다.

3.2. 노지(Open pond) 대량 배양 비교

노지 대량배양에서는 야생 균주와 돌연변이 균주 모두 광배양기에서와 유사하게 배양초기 약 3일간은 미세조류의 증식속도가 미미하였으나 5일 이후부터는 완만하게 성장하였고, 배양 10일째에 야생 균주는 약 3×10^7 cells/mL의 세포 밀도를 보였으며 돌연변이 균주 (UBM1-10)는 약 3.2×10^7 cells/mL의 세포 밀도 (DCW 환산 시 약 0.5 g/L)를 보였다. 10일 이후에는 성장이 둔화하거나 감소하는 현상을 보였다. 야생 균주와 돌연변이 균주 모두 노지배양에서의 성장률에는 큰 차이를 보이지 않았으며 결과적으로 돌연변이 균주를 이용한 제품생산이 가능하며 경제적인 미세조류 생산을 위해서는 초기 접종 후 약 8일에서 10일 사이에 미세조류를 수확하는 것이 효율적일 것이라는 결론을 도출하였다 (Figure 10). 광배양기 및 노지 배양에 있어서도 야생 균주와 유사한 안정적인 생산이 가능한 것으로 볼 때 세포내 지질 함

량이 축적된 우수 변이주를 선별을 통해 바이오 연료 추출을 위한 Biomass 대량 생산 및 기능성 식의약품 산업에 적용이 가능 할 수 있을 것으로 생각되어 진다.

본 연구를 통해 고찰해 본 결과 배양대상 균주로 선정된 돌연변이 균주인 UBM1-10과 야생균주가 동일하게 광배양기를 이용한 대량배양이 노지 (Open pond) 대량배양에 비해 미세조류 생산량이 같은 양의 배양액 대비 약 5~6배 높게 나타났다. 단순한 단위 생산량 비교에서는 광배양기를 이용한 대량배양이 훨씬 높은 것으로 나타났지만 미세조류 Biomass 대량생산을 위한 산업적 적용을 위해서는 초기 시설 도입비, 운용비 등 단위 면적당 생산성 이외에도 다양한 경제성 분석을 통한 접근이 필요함으로 어떤 한 가지 배양 방법이 최선의 방법이라고 결론을 내리기는 어려운 측면이 있다고 판단된다. 다만 광배양기의 경우 노지배양에 비해 외부환경으로부터의 오염을 줄임으로써 단일 종의 순수배양이 가능하므로 고부가 물질 생산을 위한 미세조류 배양의 경우에는 광배양기를 이용한 배양방법이 적용돼야 할 것으로 판단되며 바이오 연료 생산을 위한 Biomass 대량생산, 어패류 양식용 사료를 위한 대량생산 등 일반적인 배양의 경우에는 노지 대량배양 방식을 적용하는 것이 경제적으로 유리할 것으로 판단된다.

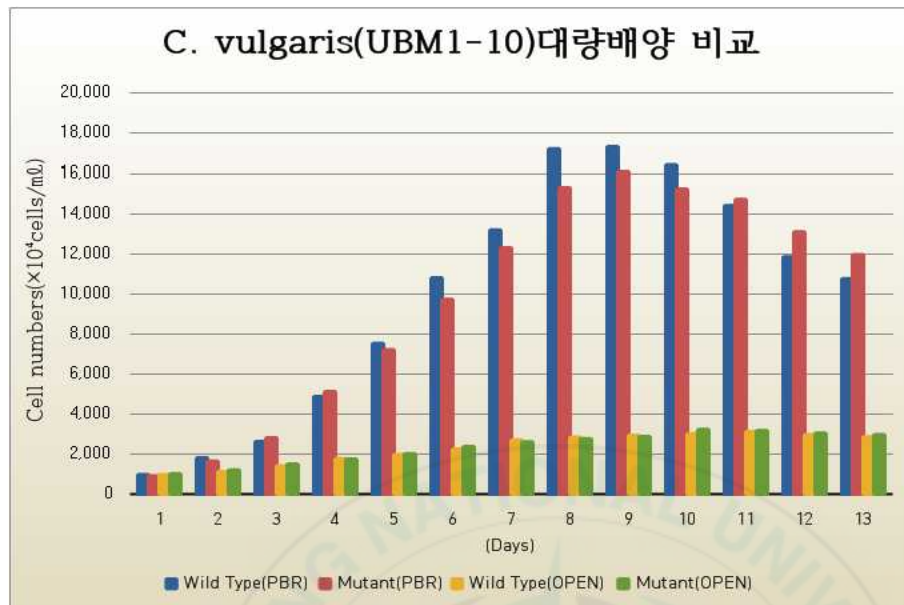


Figure 10. Growth of *Chlorella vulgaris* mutant (UBM1-10) & Wild type in 2 ton of vertical photobioreactor and 30 ton of Open pond for 13 days.

3.3. 야생균주와 돌연변이 균주 UBM1-10의 대량배양 성분분석 결과

본 연구를 통해 대량 배양대상 균주로 선정된 돌연변이 균주인 UBM1-10과 야생균주를 대량배양 후 중공사막을 이용하여 농축 (세포농도 약 100×10^8 cell/mL) 한 후 성분분석 ((주)한국분석기술연구원, Korea)을 의뢰한 결과, UBM1-10 균주가 야생균주에 비해 조지방 함량이 약 3배 증가하였음을 알 수 있었다 (Table 6). 실험실 배양에서는 UBM1-10 균주의 지질 함량이 야생 균주보다 1.5배 높게 (Table 5) 나타났으나 대량배양에서는 실험실배양보다 더 높은 약 3배의 증가를 보이는 것은 미세조류의 생장조건이 실험실보다 열악하므로 상대적으로 지질축적량이 증가된 것으로 판단된다. 일반적으로 돌연변이 균주를 대량배양 할 경우 원래의 야생 균주 상태로 복귀하는 경향 (Back mutation)이 있으나 본 연구를 통해 개량된 돌연변이 균주인 UBM1-10은 여러번의 계대배양 과정을 거치는 대량배양 이후에도 지질함량이 야생 균주에 비해 약 3배 증가한 것으로 볼 때 완전한 돌연변이를 일으켜 유전적 형질을 유지하고 있는 것으로 판단된다. 특히 지질성분 중에서 DHA 함량은 야생균주에 비해 약 2.9배 증가하였고 EPA 함량은 야생균주는 0.0261% 이었으나 돌연변이 균주인 UBM1-10에서는 EPA 성분이 없는 것으로 분석되었다. 이러한 결과에 대한 유전적인 특징에 대해서는 추가적인 연구가 필요할 것으로 판단된다.

Table 6. Comparative analysis of mass culture components of *Chlorella vulgaris* mutant (UBM1-10) and wild type

Components	Contents (%)	
	<i>Chlorella vulgaris</i> (UBM1-10)	<i>Chlorella vulgaris</i> (Wild Type)
Crude lipid	0.3%	0.1%
Crude protein	0.7%	0.1%
Crude ash	3.2%	2.1%
DHA	0.0518%	0.0176%
EPA	ND*	0.0261%

*: Not detected

IV. 요 약

미세조류는 배양이 용이하고 많은 유용물질을 함유하고 있어 산업적으로 이용이 가능하다. 본 연구에서는 *Chlorella vulgaris*에 자외선 조사를 통해 변이주를 유도하였다. 자외선 (15 Watt, 254 nm)은 1, 2, 3, 4, 5분간 조사하였으며, 그 결과 1분 조사 후 얻어진 5개의 변이주를 UBM1-2, UBM1-3, UBM1-10, UBM1-15, UBM1-18로 각각 명명하였다. 자외선 조사 시간에 비례 하여 세포 생존율 및 색소 함량이 감소함을 확인 할 수 있었다. 또한, 변이주의 특성 분석을 위해 21일간 배양 후 세포 성장률, 건조중량, 색소 함량 및 지질함량을 측정하였다. 세포건조중량은 WT 균주가 1.8 mg/L, UBM1-10과 UBM1-15는 2.8 mg/L로 가장 높게 나타났다. 세포 건조중량당 클로로필 함량은 UBM1-2, UBM1-10, UBM1-15는 감소, UBM1-3은 26% UBM1-18은 27% 각각 증가하였다. 세포 건조 중량당 카로티노이드 함량은 UBM1-2, UBM1-10, UBM1-15는 감소하였으나, UBM1-3과 UBM1-18은 증가하는 경향을 나타내었다. 지질 함량의 경우 WT 균주에 비해 모두 증가하는 경향을 나타내었고 UBM1-2의 경우 49%로 가장 높은 함량을 보였다. 특히 UBM1-10은 WT 보다 세포성장이 증가하며 세포 건조중량은 35% 증가, 지질함량도 34% 증가된 우수 변이주로 선택하였다. 본 연구에서는 자외선에 의해 유도된 *C. vulgaris* 변이주 UBM1-10을 우수 변이주로 선택하여 대량 배양시스템을 구축하였으며 고밀도 광배양기와 노지배양 비교 실험을 통하여 광배양기를 이용한 배양이 노지배양보다 같은 양의 배양액 대비 약 5~6배 이상 미세조류 생산량이 증가하였으며 WT 균주와 비슷한 성장 안정성을 나타냄으로써 산업적인 적용을 통한 대량생산이 가능한 것으로 판단하였다. 또한 대량배양 후 농축하여 성분을 분석한 결과 UBM1-10 균주가 WT균주에 비해 지질함량이 실험실 배양결과(1.5배)보다 높은 약 3배 이상 증가하였으며, 이는 돌연변이 균주 대량배양에서 흔히 발생하는 back mutation이 일어나

지 않고 완전한 돌연변이 균주로서의 유전적 형질을 가지고 있다는 결과로서 의미가 있다고 생각된다. 향후 본 연구에서 이용되어진 자외선 조사를 비롯한 다양한 물리적, 화학적 방법을 이용한 미세조류 돌연변이 균주 개발을 통하여 지질함량이 축적된 우수 변이주 개발을 통해 바이오 연료 생산을 위한 Biomass 대량 생산 및 야생 균주에 비해 고기능성 물질을 함유하는 돌연변이 균주를 개발함으로써 고부가 기능성 식의약품 산업 소재로서의 활용에 많은 기여를 할 수 있을 것이다.



V. 참 고 문 헌

- Abd, E. B., Farouk, H., K. and Gamal, S. (2007) Production of carotenoids from marine microalgae and its evaluation as safe food colorant and lowering cholesterol agent. *American-Eurasian J. of Agric. Environ. Sci.*, 2: 792-800.
- Barclay, W. R., Meager, K. M. and Abril, J. R. (1994) Heterotrophic production of long chain omega-3 fatty acids utilizing algae and algae-like microorganisms. *J. Appl. Phycol.*, 6: 123-129.
- Bhat, V. B. and Madyastha, K. M. (2000) C-Phycocyanin: a potent peroxy radical scavenger *in vivo* and *in vitro*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 275: 20-25.
- Borowitzka, M. A. (1992) Algal biotechnology products and processes—matching science and economics. *J. Appl. Phycol.*, 4: 267-279.
- Boussiba, S., Wang, B., Yuan, P., Zarka, A. and Chem, F. (1999) Change in pigments profile in the green alga, *Hematococcus pluvialis* expose to environmental stresses. *Biotechnol. Lett.*, 21: 601-604.
- Carlos, J., Belen, R. C., Diego, L. and Xavier, N. (2003) The Feasibility of industrial production of *Spirulina (Arthrospira)* in Southern Spain. *Aquaculture*, 217: 179-190.
- 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.
- Choi, S. J., Kim, Y. H., Jung, I. H. and Lee, J. H (2014) effect of nono

- bubble oxygen and hydrogen water on microalgae. *Appl. Chem. Eng.*, 25: 32-329.
- 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.
- Choi, S. J., Park, H. J. and Lee, J. H. (2015) Isolation of *Chlorella vulgaris* mutants producing high lipid contents and their characterization. *Appl. Chem. Eng.*, 26: 533-537.
- Chung, H. Y., Lee, Y. K., Kim, J. S., Cho, K. S. and Lee, Y. B. (2002) Mutant induction of several antifungal bacteria by gamma radiation (^{60}Co). *Korean J. Environ Agric.*, 21: 216-222.
- Dube, S. L. and Vidaver, W. (1992) Photosynthetic competence of plant let grown *in vitro*. An automated system for measurement of photosynthetic *in vitro*. *Physiol. Plant.*, 84: 409-416.
- Estevez, M. S., Malanga, G. and Puntaurlo, S. (2001) UV-B effects on antarctic *Chlorella* sp. cell. *J. Photochem. Photobiol. B*, 62: 19-25.
- Foyer, C. H., Descourvieres, P. and Kunert, K. J. (1994) Protection against oxygen radicals: an important defense mechanism study in transgenic plants. *Plant Cell & Environ.*, 17: 507-523.
- Friedberg, E. C. (2003) DNA damage and repair. *Nature*, 421: 436-440.
- Gerlier, D. and Thomasset, N. (1986) Use of MTT colorimeter assay to measure cell activation. *J. Immunol. Methods*, 94: 57-63.
- Gleason, D. F. and Wellington, G. M. (1993) Ultraviolet radiation and coral

- bleaching. *Nature*, 365: 836-838.
- Grima, E. M., Belarbi, E. H., Fernández, A., Medina, R. and Chisti, Y. (2003) Recovery of microalgal Biomass and metabolites: process options and economics. *Biotechnol. Advanc.*, 20: 491-515.
- Han, T. J. (1999) Overview of UV-B effects on marine algae. *Korean J. Environ. Biol.*, 17: 201-201.
- Han, J. G., Kang, G. G., Kim, J. K. and Kim, S. H. (2002) The present status and future of Chlorella. *Food Sci. Ind.*, 6: 64-69.
- Hong, S. C., Han, J. H., Lee, J., Ahn, Y. K., Yang, E. Y., Chae, S. Y., Kim, S. and Yoon, J. B. (2013) A simple and fast microplate method for analysis of carotenoid content in chili pepper (*Capsicum annuum* L). *Kor. J. Hort. Sci. Technol.*, 31: 807-812.
- Hutchinson, F. (1985) Chemical change induced in DNA by ionizing radiation. *Prog. Nucleic Acids Res. Mol. Biol.*, 32: 115-154.
- Illman, A. M., Scragg, A. H. and Shales, S. W. (2000) Increase in Chlorella strains calorific values when grown in low nitrogen medium. *Enzyme Microb. Tech.*, 27: 631-635.
- Jeong, H. Y. and Kim, K. R. (2010) Strain improvement based on ion beam induced mutagenesis. *Kor. J. Microbiol. Biotechnol.*, 38: 235-243.
- Joo, D. S., Cho, M. G., Buchholz, R. and Lee, E. H. (1998) Growth and fatty Acid Composition with Growth Conditions for *Spirulina platensis*. *J. Korean Fish. Soc.*, 31: 409-416.
- Joo, D. S., Jung, C. K., Lee, C. H. and Cho, S. Y. (2000) Content of

- phycocyanins and growth of *Spirulina platensis* with culture condition. **J. Korean fish Soc.**, 33: 475-481.
- Kanath, B. S., Vidhyavathi, R., Sarada, R. and Ravishankar, G. A. (2008) Enhancement of carotenoids by mutation and stress induced carotenogenic genes in *Hematococcus pluvialis*. **Bioresour. Technol.**, 99: 86678673.
- Kay, R. and Barton. L. (1991) Microalgae as food and supplement. **Crit. Rev. Food Sci. Nutr.**, 30: 553-573.
- Kang, M. S., Sim, S. J. and Chae, H. J. (2004.) Chlorella as a functional biomaterial. **Korean Soc. Biotechnol. Bioeng. J.**, 19: 1-6.
- Kim, D. C., Won, S. I. and In, M. J. (2014) Preparation and quality characteristics of Mul-kimchi added with chlorella. **J. Appl. Biol. Chem.**, 57: 23-28.
- Kim, J. H., Park, H. J., Kim, Y. H., Joo, H., Lee, S. H. and 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.
- Kim, Y. H. and Lee, J. H. (2012) Isolation of *Arthrospira platensis* mutants producing high lipid and phycobiliproteins. **J. Korean Biotechnol. Bioeng.**, 27: 172-176.
- Kim, Y. M., Kim, M. R., Kwon, T. H., Ha, J. M. and Lee, J. H. (2009) Optimum culture conditions for the growth of *Spirulina platensis* NIES 39. **J. Korean Ind. Eng. Chem.**, 20: 285-289.

- Kim, Y. M., Kim, J. Y., Lee, S. M., Ha, J. M., Kwon, T. H. and Lee, J. H. (2010) Carbon dioxide fixation using *Spirulina Platensis* NIES 39 in polyethylene Bag. *Appl. Chem. Eng.*, 21: 272-277.
- Kim, O. J. and Lee, J. H. (2015) Characterization of *Chlorella vulgaris* mutants generated by EMS (Ethyl Methane Sulphonate). *Appl. Chem. Eng.*, 26: 265-269.
- Lee, S. J., Go, S. G., Jeong, G. T. and Kim S. U. (2011) Oil production from five marine microalgae for the production of biodiesel. *Biotechnol. Biopro. Eng.*, 16: 561-566.
- Matta, T., Martins, A. and Caetano, N. (2010) Microalgae for biodiesel production and other applications: A review. *Renewable and Sustainable Energy Reviews* 14: 217-232.
- Mchugh, D. J. (2003) Guide to the seaweed industry. Rome: Food and Agriculture Organization of the United Nations.n. *FAO Fisheries Technical Paper*, 441.
- Oh, H. M., Kim, J. S. and Lee, S. J. (1998) Biological Fixation of Global Warming Gas (CO₂) by Microalgae. *Kor. J. Environ. Biol.*, 16: 291-297.
- Park, J. H. and Han, T. J. (1999) Overview of UV-absorbing pigments in marine algae. *Algae* 14: 201-212.
- Park, H. J., Jin, E. J., Jung, T. M., Joo, H. and Lee, J. H. (2010) Optical culture conditions for photosynthetic microalgae. *Nannochloropsis oculata*. *Appl. Chem. Eng.*, 21: 659-663.
- Park, J. I., Woo, H. and Lee J. H. (2008) Production of bio-energy from

- marine algae: Algae: status and perspectives. **Korean Chem. Eng. Res.**, 46: 833-844.
- Park, H. J., Kim, Y. H. and Lee, J. H. (2012) Characterization of *Arthrospira platensis* mutants generated by UV-B irradiation. **Appl. Chem. Eng.**, 23: 496-500.
- Pourahmad, D. and Parkravan. R. (1997) Radiosterization of disposable medical devices. **Radiat. Phys. Chem.**, 49: 285-286.
- Richmond, A. (2008) Handbook of Microalgae culture: **Biotechnol. Appl. Phycol.**, John Wiley & Sons. Blackwell, Science Ltd., 95.
- Sharma, R. (2001) Impact of solar UV-B on tropical ecosystems and agriculture. Case study: Effect of UV-B on rice. **Proc. SEAWPIT98 & SEAWPIT2000**, 1: 92-101.
- Shin, H. J., Park, J. H., Jung, W. K., Cho, H. and Kim S. W. (2011) Development of Biorefinary process using microalgae. **Kor. Precis. Eng.**, 28: 154-167.
- Spolaore, P., Cassan, C. J., Duran, E. and Lsambert, A. (2006) Commercial applications of microalgae. **J. Biosci. Bioeng.**, 101: 87-96.
- Sung, K. D., Ann, J. H., Lee, J. Y., Ohh, S. J. and Lee, H. Y. (1995) Kinetics of cultivating photosynthetic microalgae, *Spirulina platensis* in an outdoor photobioreactor. **Kor. Soc. biotechnol. bioeng. J.**, 10: 401-405.
- Varfolomeev, S. D. and Wasseman. L. A. (2011) Microalgae as source of biofuel, food, fodder, and medicines. **Appl. Biochem. Microbiol.**, 47: 790-807.
- Vinebrooke, R. D. and Leavitt, P. R. (1996) Effects of ultraviolet radiation

- on periphyton in an alpine lake. *Limnol. Oceanogr.*, 41: 1035-1040.
- Watanabe, A. (1960) List of algal strains in the collection at the Institute of applied microbiology, University of Tokyo. *J. Gen. Appl. Microbiol.*, 6: 283.
- Werman, M. J., Sukenik, A. and Mokady, S. (2003) Effect of the marine unicellular algae *Nanochloropsis* sp. to reduce the plasma and liver cholesterol. *Biosci. Biotechnical. Biochem.*, 67: 2266-2268.
- Yun, H. J., Sung, J. K., Lee, S. Y., Lee, Y. J., Ha, S. K. and Sohn, Y. K. (2014) Changes in photosynthesis and carbohydrate synthesis in response to elevated UV-B environment. *CNU J. Agricul. Sci.*, 41: 275-281.



Table 2. The principle characteristics of the algae

Division	Cell type	Principle pigments	Flagella
Cyanophyta	Prokaryotes	Chlorophyll a; Phycocyanin; phycoerythrin	Absent
Rhodophyta	Eukaryote	Chlorophyll a; phycoerythrin	Absent
Chlorophyta		Chlorophyll a, b	Smooth flagella
Chromophyta		Chlorophyll a, c ₁ , c ₂ ; fucoxanthin	One smooth flagellum and one flagellum with masticonemes
Haptophyta		Chlorophyll a, c ₁ , c ₂ ; fucoxanthin	Smooth flagella (and haptonema)
Dinophyta		Chlorophyll a, c ₂ ; fucoxanthin (partially chlorophyll a, c ₂ : phyconamin or phycoerythrin)	Smooth flagella
Cryptophyta		Chlorophyll a, c ₂ ; Phycocyanin; phycoerythrin	Flagella with masticonemes
Euglenophyta		Chlorophyll a, b	Flagella with hairs

Table 3. The taxonomic characteristics of the algae

Division	Chloroplast feature	Cell wall	Food reserve
Cyanophyta	No chloroplast; thylakoids free in cytoplasmic; unstaced phycobilisomes	4-layered peptideglycan	Starch
Rhodophyta	One layered thylakoids; Chloroplast ER absent	Cellulose	Starch
Chlorophyta	Thylakoids in stacks of 2-6 or more chloroplast ER absent; grana maybe absent	Cellulose, hydroxyproline, glycosides, xylans, mannans	Starch
Chromophyta	Thylakoids in stacks of 3 (2-6 brown algae); twp additional membrane of chloroplast ER	Cellulose, glucose, urouic acid	Chrysolaminarin or laminarin
Haptophyta	Thylakoids in stacks of 3; two additional membrane of chloroplast ER	oranic scale; one of several layers	Chrysolaminarin
Dinophyta	Thylakoids in stacks of 3; two additional membrane of chloroplast ER	Cellulose	Starch
Cryptophyta	Thylakoids in stacks of 2; two additional membrane of chloroplast ER	Periplast	Starch
Euglenophyta	Thylakoids in stacks of 3 or more; one additional membrane of chloroplast ER	Protinaceous pellicle	Paramylon