

# 지질 고 생산성 *Chlorella vulgaris* 변이주 분리 및 특성 분석

최수정 · 박현진 · 이재화<sup>†</sup>

신라대학교 의생명과학대학 제약공학과  
(2014년 12월 31일 접수, 2015년 2월 11일 심사, 2015년 7월 13일 채택)

## Isolation of *Chlorella vulgaris* Mutants Producing High Lipid and their Characterization

Soo-Jeong Choi, Hyun-Jin Park, and Jae-Hwa Lee<sup>†</sup>

Department of Pharmaceutical Engineering, College of Medical and Life Science, Silla University, Busan 46958, Korea  
(Received December 31, 2014; Revised February 11, 2015; Accepted July 13, 2015)

### 초 록

미세조류인 *Chlorella vulgaris* (*C. vulgaris*)는 다른 미세조류에 비해 다량의 지질을 함유한다. 본 연구는 자외선 조사를 통해 변이주를 유도하고자 하였다. *C. vulgaris*에 자외선을 1, 2, 3, 4, 5 min간 조사하였으며 자외선 조사 시간에 비례하여 세포 생존율 및 색소 함량이 감소함을 확인하였다. 자외선 조사를 통해 *C. vulgaris*의 변이주를 유도하였으며, 지질 축적량을 기준으로 두 개의 균주를 선별하였다. 선별한 변이주는 UM10, 15로 명명하였으며, 야생균주와 동일한 환경에서 배양하였다. 변이주의 특성 분석을 위해 21일간 배양 후 세포 성장률, 건조 중량, 색소 함량, 지질 함량을 측정하였다. 그 결과, 두 종의 변이주는 야생균주에 비해 약 1.4배 높은 세포 성장률을 보였으며, 건조 중량은 약 1.5배 증가하였다. 광합성을 통한 미세조류 내 색소 함량을 알아보기 위해 클로로필과 카로티노이드 함량을 측정하였다. 변이주의 클로로필 및 카로티노이드 함량 모두 야생균주에 비해 약 10% 감소함을 확인하였다. 변이주의 지질 함량은 야생균주에 비해 약 1.2, 1.5배 증가하였다.

### Abstract

Micro-algae *Chlorella vulgaris* (*C. vulgaris*) is an important source for bio-diesel because of the high content of neutral lipids. In this study, we intended to induce mutants of *C. vulgaris* by UV-B irradiation. *C. vulgaris* was first exposed to UV-B for 1, 2, 3, 4, 5 min. As the UV-B exposure time increased, the cell viability and pigment content were decreased. Mutants of *C. vulgaris* were also induced through ultraviolet irradiation and two strains were selected with respect to lipid contents, where were named as 'UM10', 'UM15'. They were then cultivated in the same way as to the wild type. After 21 days of cultivation, the cell growth, dry cell weight, pigment contents, and lipid contents were measured for investigating characteristics of mutants. As a result, the cell growth and dry cell weight of both mutants increased about 1.4 and 1.5 times, respectively compared with those of wild type. In addition, chlorophyll and carotenoid contents were measured in order to investigate pigment contents in micro-algae through photosynthesis. It was shown that chlorophyll and carotenoid contents of both mutants decreased about 10% compared to those of wild type. Lipid contents in UM10 and UM15 increased about 1.2 and 1.5 times, respectively compared to that of wild type.

**Keywords:** *Chlorella vulgaris*, ultra-violet, chlorophyll, carotenoid, lipid

## 1. 서 론

미세조류는 이산화탄소와 빛 에너지를 이용해 광합성을 통해 생산하기에 광합성 효율이 높으며 육상식물에 비해 단위면적당 생산율이 높다고 알려져 있다[1]. 미세조류 내 유용 성분들은 주로 의약품, 폐수 정화, 바이오매스 생산에 이용된다. 미세조류의 바이오매스 생산은 주로 지질 함유량이 높다고 알려진 종에 국한되어 있다[2]. *Chlorella vul-*

*garis* (*C. vulgaris*)는 해수에서 자생하는 미세조류로 세포 당 최대 30%의 지질 함유량을 자랑한다[3]. 또한  $\beta$ -carotene, canthaxanthin, astaxanthin과 같은 색소를 함유하며 이는 주로 암 치료를 위한 의약품 제조에 이용된다[4]. 하지만 *C. vulgaris*의 세포 크기가 2~10  $\mu$ m로 매우 작기 때문에 산업적 응용을 위해서는 균주 개량이 필요한 실정이다[5].

최근 미세조류는 바이오디젤 및 항공연료를 포함하는 진보된 바이오연료를 생산하는데 많은 주목을 받고 있으며 진보된 바이오연료를 위한 바이오매스에 대해 매우 많은 가능성이 잠재되어 있다. 현재 미세조류 바이오매스를 이용한 바이오디젤 생산은 배양, 수확, 오일 추출 및 조류 내 세포 추출 단계로 이루어져 있다. 바이오디젤 생산 비용 중 약 60%는 미세조류 배양에 사용되며, 20%는 세포 수확 시 이용된다. 미세조류 배양 및 수확에 전체 바이오디젤 생산비용의 80%가 사용됨을 볼 때에 균주 내 유용성분 증가를 위한 균주개량이 필수적

<sup>†</sup> 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

이다[6]. 미세조류 균주 개량 방법으로는 크게 미세조류 세포 내 유전자 정보를 변형하는 방법과 돌연변이원을 처리하여 균주를 개량하는 무작위적 돌연변이법(random mutagenesis)으로 나눌 수 있다[7]. 무작위적 돌연변이법은 미세조류와 같은 미생물의 균주 개량 방법의 일종으로 대사산물의 생산성 증대가 가능하다. 돌연변이 유발을 위해 물리적인 돌연변이원과 화학적인 돌연변이원을 균주에 처리하게 되는데, 물리적인 돌연변이원으로는 전자빔, 자외선, X-ray 조사 등이 있으며 화학적 돌연변이원으로는 ethyl methane sulphonate (EMS), N<sup>7</sup>-methyl-N<sup>7</sup>-nitrosoguanidine (MNNG), N<sup>7</sup>-methyl-N<sup>7</sup>-nitrosourea (MNU) 등이 있다[8].

이와 같은 무작위적 돌연변이법을 이용한 균주 개량은 유전적 정보 변화를 통한 균주 개량에 비해 단순한 방법으로 간주되지만, 개량된 균주를 선별하는데 시간과 노동력이 많이 소요되어 효율이 낮다는 단점을 가진다[9]. 자외선 조사를 통한 돌연변이 유발은 DNA 복제 과정과 밀접한 관련이 있다고 보고되어지며 세포에 자외선을 조사하였을 경우 세포 성장 억제 및 콜로니 형성 능력 억제, DNA 손상을 들 수 있다. 대장균에 자외선을 조사하여 돌연변이를 유발하는 과정이 DNA 복제 과정에서 발생되며, 자외선 조사 시 발생된 DNA 손상 부위에 불특정 염기를 주입 및 복제 과정이 반복되면 돌연변이가 유발된다고 발표하였다[10].

*A. platensis*에 자외선을 조사하여 돌연변이를 유도하였으며, 돌연변이의 항산화 효소(SOD, POD)와 중성지방 함량이 증가한 것을 확인하였다[11]. 또한 전자빔을 *A. platensis*에 조사하여 얻은 돌연변이 균주의 지방산 함량이 증가한 것을 확인하였다[7]. EMS 처리를 통해 *A. platensis* 균주를 개량하였으며 앞선 결과와 마찬가지로 중성지방 및 phycobiliprotein과 같은 유효성분의 증대를 보고하였다[12]. *Chlorococcum* sp. 균주에 자외선을 조사를 통해 항산화효소 및 단백질의 변화를 살펴 보았다[13]. 따라서 본 연구에서는 자외선을 조사하여 *C. vulgaris* 균주를 개량하였으며 선별된 균주의 특성을 파악하고자 하였다.

## 2. 실험

### 2.1. 사용균주 및 배양방법

본 연구에서는 한국해양미세조류은행에서 분양받은 *Chlorella vulgaris* (KMMCC 191)를 사용하였다. F/2 배지를 사용하여 250 mL 삼각플라스크에서 working volume 100 mL로 25 °C, 120 rpm, 광도 3000 lux의 조건에서 배양하였다. F/2 배지는 1 L의 인공해수(NaCl 20.758 g/L, KCl 0.587 g/L, NaHCO<sub>3</sub> 0.17 g/L, NaBr 0.0746 g/L, H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub> 0.0225 g/L, NaF 0.0027 g/L, Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> · 10H<sub>2</sub>O 5.5 g/L, MgCl<sub>2</sub> · 6H<sub>2</sub>O 9.395 g/L, CaCl<sub>2</sub> · 2H<sub>2</sub>O 1.316 g/L, SrCl<sub>2</sub> · 6H<sub>2</sub>O 0.0214 g/L)에 NaNO<sub>3</sub> 150 mg, NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> · 9H<sub>2</sub>O 8.69 mg, ferric EDTA 10 mg, MnCl<sub>2</sub> 0.22 mg, CoCl<sub>2</sub> 0.11 mg, CuSO<sub>4</sub> · 5H<sub>2</sub>O 0.0196 mg, ZnSO<sub>4</sub> · 7H<sub>2</sub>O 0.044 mg, Na<sub>2</sub>SiO<sub>3</sub> · 9H<sub>2</sub>O 50 mg, Na<sub>2</sub>MoO<sub>4</sub> · 2H<sub>2</sub>O 0.012 mg, Vitamine B<sub>12</sub> 1 mg, Biotin 1 mg, Thiamine · HCl 0.2 mg을 첨가하여 제조한 후 121 °C에서 15 min간 멸균, 냉각 후 사용하였다[13]. 광주기는 12 h : 12 h (명 : 암)으로 명반응 시 형광등을 사용하였다[8].

### 2.2. 자외선 조사 및 돌연변이 균주 선별

본 연구에서는 UV-B 파장(254 nm)으로 UV 램프 스텐드(15 W)를 이용하여 균체에 직접적으로 조사하였다. 대수 증식기의 *C. vulgaris* 균주를 인산완충용액으로 세척 후 6-well에 5 mL씩 담아 뚜껑을 열고 1, 2, 3, 4, 5 min 간격으로 자외선에 노출시킨 후 채취하였다. 획득한

샘플은 두 가지 방법으로 배양하였다. 첫 번째 방법으로는 균체 성장 확인을 위해 일부 샘플을 50 mL conical tube에 나눠 담고 10일간 액상배양하였다. 액상 배양은 12 h : 12 h (명 : 암)으로 형광등 조사하며 25 °C에서 배양하였다. 두 번째 방법으로는 콜로니 획득을 위해 자외선 조사 시간별로 획득한 샘플을 고체 f2 평판 배지에 도말하였다. 고체 배지에서 획득한 콜로니들을 액체 배지에 재 배양하여 세포 성장 및 유용성분 분석을 진행하였다[7].

### 2.3. 균체량 분석

세포 균체량 분석을 위해 680 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 이용해 여과된 균체를 105 °C로 조절된 건조기에서 3 h 동안 건조 후 무게를 측정하였다[15].

### 2.4. 색소 함량 분석

광합성을 통해 성장하는 미세조류 내 색소함량의 변화를 알아보기 위해 배양 21일 차에 세포 내 클로로필과 카로티노이드 함량을 분석하였다. 세포 내 색소함량 측정은 세포 1 mL를 13000 rpm에서 3 min간 원심분리한 뒤 상등액을 제거하고 methanol 1 mL를 첨가하여 60 °C에서 30 min간 반응하였다. 이후 0 °C에서 2 min간 냉각 후 13000 rpm에서 2 min간 원심분리 하여 상등액을 분리하였다. 분리한 상등액은 UV/Vis 분광기를 이용해 650, 653, 461, 664 nm 파장에서 흡광도를 측정하였으며 측정 후 아래 식에 대입하여 계산하였다[11].

$$\text{Chlorophyll (mg/L)} = (A_{650} \times 25.5) + (A_{655} \times 4)$$

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

### 2.5. 지질함량 분석

자외선 조사 후 얻은 변이주의 지질 함량을 분석하기 위해 Chen 등[16]의 방법을 이용하여 측정하였다. 측정하려는 세포의 흡광도를 0.5로 조정하고 세포 10 µL와 증류수 138 µL, 0.5 µg/mL 농도로 조절된 nile red 2 µL, DMSO 50 µL를 혼합하여 40 °C에서 10 min간 반응하였다. 반응 후 형광광도계(Infinite F 200 pro, Tecan, Austria)를 이용하여 excitation 495 nm, emission 620 nm에서 형광값(fluorescence intensity)을 측정 후 nile red로 염색된 세포의 형광값과 미세조류 자체 형광값을 빼서 세포가 가진 지질 함량을 분석하였다. 측정된 지질 함량의 정량을 위해 Bertozzini 등[17]의 방법을 변형하여 검량선을 작성하였으며 이를 바탕으로 세포 내 지질함량의 정량을 진행하였다.

## 3. 결과 및 고찰

### 3.1. 자외선 조사에 따른 *C. vulgaris* 영향

자외선 조사에 따른 *C. vulgaris*의 세포 생존율 및 변화 양상을 관찰하고자 하였다. 실험에 적합한 자외선 조사선량을 확인하기 위해 UV-B (254 nm)램프를 이용하여 1~5 min간 조사하였다. 그 결과 자외선 조사 시간이 길어질수록 세포 생존율이 감소함을 확인하였다(Figure 1). 0 min 조사한 세포의 생존율을 100%로 보았을 때, 5 min 조사한 세포의 생존율은 약 30%임을 확인하였다. 이는 자외선 조사 시간 증가에 따라 조사선량이 증가하며 이에 따라 세포의 생존율 또한 감소함을 알 수 있었다. 세포 내 색소함량 또한 자외선 조사 시간

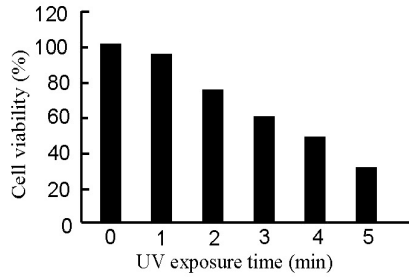


Figure 1. Effects of UV exposure time on the cell viability in *C. vulgairs* treated with UV-B irradiation.

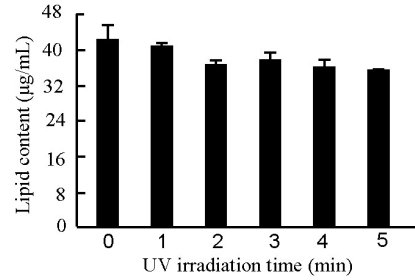
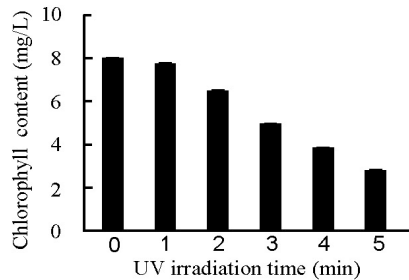
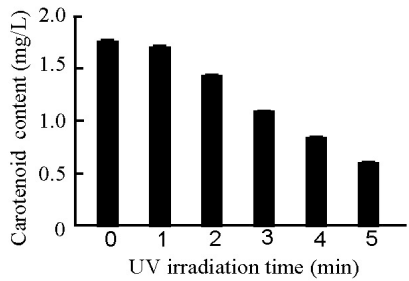


Figure 3. Effects of UV exposure time on the lipid content in *C. vulgairs* treated with UV-B irradiation.



(a)



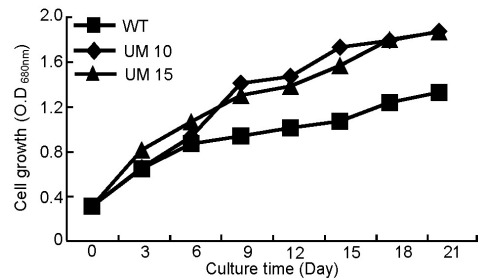
(b)

Figure 2. Effects of UV exposure time on the pigment (chlorophyll and carotenoid) content in *C. vulgairs* treated with UV-B irradiation. (a) Chlorophyll content, (b) Carotenoid content.

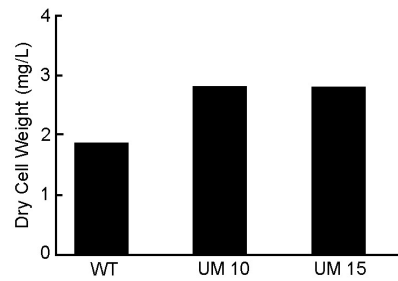
에 비례하여 감소함을 확인할 수 있었다. 클로로필 함량은 Figure 2(a)에 나타내었으며 자외선을 5 min간 조사하였을 때에 2.7 mg/L로써 자외선을 조사하지 않은 대조군에 비해 약 65% 감소함을 확인하였고, 5 min간 자외선을 조사한 세포의 카로티노이드 함량은 대조군에 비해 약 65% 감소함을 확인할 수 있었다(Figure 2(b)). 자외선 조사 시간에 따른 지질 함량 측정을 위해 3번 측정하였으며, 그 결과 5 min간 조사한 세포 내 지질 함량은 35 µg/mL로 자외선을 조사하지 않은 대조군이 41 µg/mL임을 감안할 때에 약 15% 감소함을 확인하여 자외선 조사 시간에 따른 세포 내 지질 함유량 변화는 크지 않음을 알 수 있었다(Figure 3). *Arthrospira platensis* (*A. platensis*) 균주에 자외선을 조사하였을 때에, 자외선 조사 시간이 증가할수록 나선형의 세포 형태가 변화하며 세포 내 색소함량이 감소함을 보고하였으며[11], *Nannochloropsis oculata* (*N. oculata*)의 경우에도 자외선 조사 시간에 비례하여 세포 생존율이 감소함을 확인하였다[8].

### 3.2. 자외선 조사에 따른 세포 성장 및 세포건조중량

*C. vulgaris* 세포에 UV-B (254 nm) 램프 스탠드를 이용하여 1 min간 조사하여 얻은 변이주 가운데 지질 함량이 야생균주에 비해 증대된



(a)



(b)

Figure 4. Cell growth and dry cell weight of WT, UM10 and UM15. (a) Cell growth, (b) Dry cell weight.

2종에 대해 UM10, 15로 명명하였다. UM10과 15를 3일 간격으로 세포 성장을 측정하였다(Figure 4(a)). UM10과 15의 세포 생장은 야생균주에 비해 약 1.4배 증가함을 보였다. 세포 건조 중량은 야생균주보다 증가함을 확인하였으며 UM15의 세포 건조 중량은 약 1.5배 증가하였다(Figure 4(b)). 박 등은 *A.platensis* 세포에 자외선을 조사하여 얻은 돌연변이주의 특성을 분석하였으며 돌연변이주의 세포 성장률은 야생균주와 비슷하거나 일부 증가함을 확인하였다[11]. 김 등 또한 미세조류인 *N. oculata*에 자외선을 조사하여 돌연변이주를 획득하였으며 야생균주보다 증가한 세포생장율을 확인하였다[8]. D. F. Glaeson은 카리브해에 자생하는 산호초에 자외선 조사에 따른 성장 확인실험을 진행하였다[18]. 그 결과 자외선에 노출된 실험군의 세포 농도와 생장률이 대조군에 비해 증가함을 확인하였다.

### 3.3. 자외선 조사에 따른 세포의 색소 함량

자외선 조사에 따른 *C. vulgaris* 변이주의 성장에 따른 색소함량 변화를 확인하기 위하여 배양 21일차에 클로로필과 카로티노이드 함량을 측정하였다(Figure 5). 두 변이주의 클로로필 함량은 UM10은 4.14 mg/L, UM15는 3.87 mg/L로 야생균주에 비해 각각 약 5, 11% 감소하였다. 카로티노이드 함량은 UM10이 1.54 mg/L, UM15가 1.41 mg/L

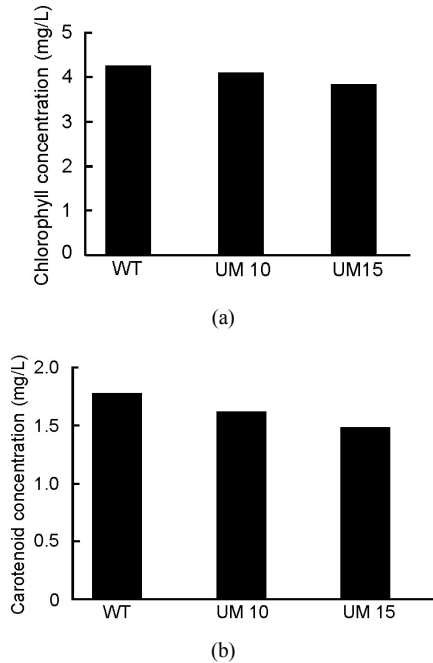


Figure 5. Chlorophyll and carotenoid content of WT, UM10 and UM15. (a) Chlorophyll content, (b) Carotenoid content.

로 약 10, 17% 감소함을 확인하였다.

위의 결과는 기 보고된 논문들과 유사한 결과를 나타냄을 확인할 수 있다. 미세조류에 자외선을 조사하여 돌연변이주를 획득하였으며 이를 이용한 균주특성을 분석하였으며, 자외선 조사를 통해 얻은 변이주는 생장은 야생균주에 비해 좋았으나, 색소 축적량은 감소함을 확인하였다[8]. Alpine 호수 내 부착생물에 자외선을 조사하였으며, 자외선을 조사한 실험군의 세포 내 클로로필 색소함량이 대조군에 비해 약 50% 감소함을 발표하였다[19]. 자외선 조사를 통해 *Chlorella* sp.에 미치는 영향을 알아보고자 하였으며, 그 결과 대조군에서는 0.21 pmol의  $\beta$ -카로틴이 함유되어 있었지만, 자외선을 조사한 실험군에서는 0.08 pmol의  $\beta$ -카로틴이 함유되어 있어 약 62%가 감소함을 확인하였다[20]. 식물 세포에 자외선 조사를 통해 색소가 감소함과 동시에 개체수의 감소도 함께 일어남을 보고한 논문을 통해 확인이 가능하다 [22]. S. L. Dube 등은 자외선은 식물의 생산성과 관련된 광합성을 저해하며, 자외선 조사를 통해 스트레스가 유도된 식물은 CO<sub>2</sub> 저감 효과 및 세포 내 클로로필 함량의 감소를 불러움을 보고하였다[22]. 이처럼 자외선 조사를 통해 스트레스가 유도된 변이주의 클로로필 및 카로티노이드 함량의 감소는 당연한 결과라고 판단된다.

### 3.4. 자외선 조사에 따른 세포의 지질 함량

세포 배양 21일째에 지질 함량을 측정하였으며, 동일한 과정을 3번 진행하여 평균값으로 그래프를 나타내었다. 변이주의 지질 함량을 측정한 결과 UM10은 36  $\mu\text{g/mL}$ , UM15는 30.1  $\mu\text{g/mL}$ 의 지질을 함유하여 야생균주에 비해 약 1.2, 1.5배 증가함을 확인하였다(Figure 6). 미세조류는 질소와 같은 생장에 필요한 영양분의 고갈과 같은 스트레스가 발생하였을 경우 세포 내 중성지질을 다량 축적하는 것으로 알려져 있다. *Haematococcus pluvialis*를 이용한 제한 배지 생장 실험에서 질소 결핍 배지에서 배양할 경우, 세포 내 astaxanthin의 함량이 증가함을 보고 하였다[23]. *Chlorella* 배양 과정에 fed-batch 실험을 진행하

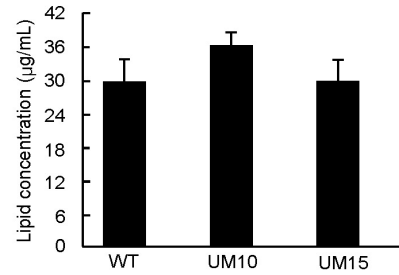


Figure 6. Lipid content of WT, UM10 and UM15.

였으며, 그 결과 지속적인 영양공급이 이루어지면 균체의 농도가 증가했으나, 영양분이 결핍되면 세포 내 지질 축적량이 증가를 확인하였다[24]. 이와 같이, 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 UM15 변이주는 정상적 세포 생장 조건에서 야생균주에 비해 생장률이 높으며 세포 내 지질을 다량 함유하는 것으로 이루어질 때, 경제적으로 유용하게 사용할 수 있을 것이다.

## 4. 결 론

본 연구는 미세조류 *C. vulgaris*에 자외선을 조사하여 지질이 다량 축적된 변이주를 얻고자 하였다. 자외선 조사선량에 따른 *C. vulgaris* 변화를 확인하기 위해 1, 2, 3, 4, 5 min 간 자외선을 조사하였다. 자외선 조사 시간에 비례하여 세포 생존율 및 색소함량, 지질 함량이 감소함을 확인하였다. *C. vulgaris*에 자외선을 1 min 간 조사하여 두 종의 변이주를 획득하였으며, 이를 UM10과 15로 명명하였다. 두 변이균주의 세포 생장은 야생균주에 비해 약 1.4배 증가하였으며 세포 건조 중량은 UM15가 약 1.5배 증가함을 확인하였다. UM10과 15의 클로로필 함량은 야생균주에 비해 최대 10% 감소하였으며 카로티노이드 함량은 최대 17% 감소하였다. 변이주의 지질 함유량은 세포를 Nile red로 염색하여 형광강도를 측정하였으며, triolein을 이용하여 정량하였다. 그 결과 자외선 조사를 통해 선별한 변이주 UM10과 15의 지질 축적량은 야생균주의 지질 축적량에 비해 약 1.2, 1.5배 증가함을 확인하였다. 자외선 조사를 통해 얻은 변이주는 야생균주에 비해 세포 생장률 및 건조중량, 세포 내 지질 축적량은 증가한 반면 세포 내 색소함량은 감소하였다. 자외선 조사라는 스트레스 요인이 세포 내 지질 축적량을 증가시키고, 광합성을 저해한 것이라고 판단된다. 미세조류 내 지질 축적량 증가는 바이오디젤과 같은 바이오매스 생산 및 기능성 식품 산업에 적용될 수 있을 것이다.

## References

1. A. Widjaja, C.-C. Chien, and Y.-H. Ju, Study of increasing lipid production from fresh water microalgae *Chlorella vulgaris*, *J. Taiwan Inst. Chem. Eng.*, **40**, 13-20 (2009).
2. E. Komor and W. Tanner, The determination of the membrane potential of *Chlorella vulgaris*, *Eur. J. Biochem.*, **70**, 197-204 (1976).
3. Z.-Y. Liu, G.-C. Wang, and B.-C. Zhou, Effect of iron on growth and lipid accumulation in *Chlorella vulgaris*, *Bioresour. Technol.*, **99**, 4717-4722 (2008).
4. R. L. Mendes, H. L. Fernandes, J. P. Coelho, E. C. Reis, J. M.

- S. Cabral, J. M. Novais, and A. F. Palavra, Supercritical CO<sub>2</sub> extraction of carotenoids and other lipids from *Chlorella vulgaris*, *Food Chem.*, **53**, 99-103 (1995).
5. L. E. de-Bashan, J.-P. Hernandez, T. Morey, and Y. Bashan, Microalgae growth-promoting bacteria as "helpers" for microalgae: a novel approach for removing ammonium and phosphorus for municipal wastewater, *Water Res.*, **38**, 466-474 (2004).
  6. J. Kim, G. Yoo, H. Lee, J. Lim, K. Kim, C. W. Kim, M. S. Park, and J.-W. Yong, Methods of downstream processing for the production of biodiesel from microalgae, *Biotechnol. Adv.*, **31**, 862-876 (2013).
  7. 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).
  8. 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).
  9. H.-Y. Jeong and K.-R. Kim, Strain improvement based on ion beam induced mutagenesis, *Kor. J. Microbiol. Biotechnol.*, **38**, 235-243 (2010).
  10. E. C. Friedberg, DNA damage and repair, *Nature*, **421**, 436-440 (2003).
  11. H.-J. Park, Y.-H. Kim, and J.-H. Lee, Characterization of *Arthrospira platensis* mutants generated by UV-B irradiation, *Appl. Chem. Eng.*, **23**, 496-500 (2012).
  12. 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).
  13. A. M. Abo-Shady, B. A. Al-ghaffar, M. M. H. Rahhal, and H. A. Abd-El Monem, Biological control of faba bean pathogenic fungi by three cyanobacterial filtrates, *Pakistan J. Biol. Sci.*, **10**, 3029-3038 (2007).
  14. S.-J. Choi, Y.-H. Kim, I.-H. Jung, and J.-H. Lee, Effect of nano bubble oxygen and hydrogen water on microalgae, *Appl. Chem. Eng.*, **25**(3), 324-329 (2014).
  15. 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).
  16. W. Chen, M. Sommerfeld, and Q. Hu, Microwave-assisted Nile red method for in vivo quantification of neutral lipids in microalgae, *Bioresour. Technol.*, **102**, 135-141 (2011).
  17. 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**, 17-23 (2011).
  18. D. F. Gleason, Differential effects of ultraviolet radiation on green and brown morphs of the Caribbean coral *Porites astreoides*, *Limnol. Oceanogr.*, **38**(7), 1452-1463 (1993).
  19. R. D. Vinebrooke and P. R. Leavitt, Effects of ultraviolet radiation on periphyton in an alpine lake, *Limnol. Oceanogr.*, **41**(5), 1035-1040 (1996).
  20. M. S. Estevez, G. Malanga, and S. Puntarulo, UV-B effects on antarctic *Chlorella* sp. cells, *J. Photochem. Photobiol. B.*, **62**, 19-25 (2001).
  21. R. Sharma, Impact of solar UV-B on tropical ecosystems and agriculture. Case study: Effect of UV-B on rice, *Proceedings of SEAWPIPT98 & SAEWPIT2000*, **1**, 92-101 (2001).
  22. S. L. Dube and W. Vidaver, Photosynthetic competence of plantlets grown in vitro. An automated system for measurement of photosynthesis in vitro, *Physiol. Plant.*, **84**(3), 409-416 (1992).
  23. 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).
  24. 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).