

## 염분과 온도의 동시 영향에 따른 해양 미세조류 *Nannochloropsis granulata*와 *Chlorella vulgaris*의 중성지질 및 녹말 축적에 관한 연구

고경준<sup>1,2</sup> · 이치현<sup>1,2</sup> · 문혜나<sup>1</sup> · 이연지<sup>1,2</sup> · 양진주<sup>3</sup> · 조기철<sup>2</sup> · 김대경<sup>2,†</sup> · 여인규<sup>1,†</sup>

<sup>1</sup>제주대학교 해양생명과학과

<sup>2</sup>한국기초과학지원연구원 제주센터

<sup>3</sup>대한피부과학연구소

## Simultaneous Effect of Salinity and Temperature on the Neutral Lipid and Starch Accumulation by Oceanic Microalgae *Nannochloropsis granulata* and *Chlorella vulgaris*

Kyungjun Ko<sup>1,2</sup>, Chi-Heon Lee<sup>1,2</sup>, Hye-Na Moon<sup>1</sup>, Yeon-Ji Lee<sup>1,2</sup>, Jinju Yang<sup>3</sup>, Kichul Cho<sup>2</sup>,  
Daekyung Kim<sup>2,†</sup> and In-Kyu Yeo<sup>1,†</sup>

<sup>1</sup>Department of Marine life Science, Jeju National University, Jeju 63243, Korea

<sup>2</sup>Jeju Center, Korea Basic Science Institute (KBSI), Jeju 63309, Korea

<sup>3</sup>Korea Dermatology Research Institute, Bidg. No. 10, 82<sup>nd</sup> St., Bundang-gu, Gyeonggi Province 13497, Korea

### 요 약

미세조류는 육상 식물과 비교하여 높은 성장률을 나타내며 다량의 지질과 탄수화물을 축적할 뿐 아니라 카로테노이드, 폴리페놀과 같은 생리활성 물질들을 체내에 축적하므로 바이오 에너지 및 기타 산업의 유망한 재료로 인식 되어왔다. 미세조류의 온도, 염분, 빛 등 비생물적 스트레스와 다양한 배양 조건에 따른 생화학 물질의 축적 변화 양상에 대한 연구는 많이 진행되어 왔지만 그러한 조건들의 동시적인 효과에 따른 성장과 생화학물질 조성 변화에 대한 연구는 거의 진행되지 않았다. 따라서 이번 연구에서는 산업적으로 많이 활용되고 있는 두 해양 미세조류인 *Chlorella vulgaris*와 *Nannochloropsis granulata*의 염분(10, 30, 50 psu) 및 온도(20, 25, 30 °C)의 동시 배양 조건에 따른 바이오 매스의 변화와 바이오 에너지에 사용되는 중성지질 및 녹말의 축적 변화를 회분배양의 실험적 조건에서 측정하였다. 그 결과 30 °C, 30 psu 조건에서 *C. vulgaris* 및 *N. granulata* 모두 가장 높은 성장을 나타냈고, 광합성 색소인 chlorophyll *a* 및 carotenoid의 축적 양상이 온도 의존적으로 증가하였으며 중성지질과 녹말의 축적은 염분과 온도의 조합에 따라 두 종의 양상이 서로 다르게 나타나는 사실을 확인할 수 있었다. 이를 통해 미세조류의 염분에 의한 성장과 중성지질 및 녹말의 축적 양상은 서로 다른 온도 조건에 따라 그 변화 정도가 다르게 나타날 수 있다는 사실을 확인할 수 있었다.

**Abstract** – Because microalgae represent high growth rate than terrestrial plants, and it can accumulate significant lipid and carbohydrate content, and other bioactive compounds such as carotenoid and polyphenol in their body, it has been considered as one of the promising resources in bio-energy, and other industries. Although many studies has been performed about the microalgae-derived biochemical accumulation under various abiotic conditions such as different temperatures, salinities and light intensities, the studies about simultaneous effect of those parameters has rarely been performed. Therefore, this study focused on evaluation of simultaneous effect of different salinity (10, 30, 50 psu) and temperatures (20, 25, 30 °C) on the changes of biomass, lipid, starch and photosynthetic pigment accumulation. As results, the highest growth rate was achieved at 30 °C and 30 psu in the both algal cultures, and the photosynthetic pigment, chlorophyll *a* and total carotenoid content, were increased in a temperature-dependent manner. The accumulation of lipid and starch contents exhibited different aspects under different combina-

<sup>†</sup>Corresponding author: dkim@kbsi.re.kr, ikyeo99@jejunu.ac.kr

tions of temperature and salinity. From the results, it is suggested that the changes of microalgal lipid and starch accumulation under different salinities may be affected by the different temperatures.

**Keywords:** Lipid(지질), Microalgae(미세조류), Salinity(염분), Starch(녹말), Temperature(온도)

## 1. 서 론

미세조류는 수서 환경에 서식하며 탄소 고정 과정인 광합성을 통해 대기 중 이산화탄소와 빛 에너지를 이용하여 탄소를 고정, 흡수하는 엽상체 식물이다. 미세조류는 수서 생태계 및 범지구적인 일차 생산자로서의 역할 뿐 아니라 바이오 연료, 양식 사료 및 각종 식·의약품 등으로 활용 할 수 있는 산업적인 가치를 지니고 있다(Priyadarshani and Rath[2012]). 최근 지구상의 석탄 연료 남용으로 인한 자원 고갈과 더불어 대기 중 이산화탄소의 증가량이 높아지고 있으며 그에 따른 지구온난화, 해양산성화 등 다양한 환경적인 문제가 야기되고 있다 (Chisti[2007]). 이에 따라 최근 재생 가능하며 지속 가능한 탄소중립 (carbon neutral) 개념의 에너지원에 대한 개발과 수요가 증가되고 있으며 그에 대한 방편 중 한가지로 미세조류 바이오 매스를 활용한 바이오 연료에 대한 연구가 매우 활발하게 진행되고 있다(Chisti[2007]; Fatih Demirbas[2009]). 기존에 사용되던 옥상 식물 또는 농작물을 활용한 바이오 연료의 생산은 처리과정 중 발생하는 nitrous oxide (N<sub>2</sub>O)와 같은 질소산화물을 많이 발생시키기 때문에 또 다른 형태의 온실가스를 생산할 수 있으며 탄소의 보상적인 순환의 측면에서 오히려 지구 온난화를 야기할 수 있다는 보고가 있다(Bridgwater *et al.*[2002]; Li *et al.*[2008]; Fatih Demirbas[2009]). 따라서 차세대 바이오 매스로 불리는 미세조류 바이오 매스를 바이오 연료로 활용하기 위한 연구가 최근 활발하게 진행되고 있으며 이를 통한 환경적인 해법을 찾기 위한 노력이 지속되고 있다(Schenk *et al.*[2008]). 미세조류는 옥상작물과 비교했을 때 다음과 같은 여러 장점들을 갖는다. 첫 번째로, 옥상식물과 비교하여 상대적으로 많은 양의 지질과 당을 내부에 축적 할 수 있으며, 추출된 지질은 디젤로 활용이 가능하고 당 성분은 가솔린의 대체 연료로 활용할 수가 있다(Chisti[2007]). 두 번째로, 미세조류는 옥상식물과 달리 작은 배양 시설에서도 많은 양의 바이오 매스를 수확할 수 있기 때문에 넓은 지역을 필요로 하지 않고 공간활용 측면에서 효율적이라 할 수 있다. 세 번째로 미세조류는 해양종을 활용할 경우 해수에 배양할 수 있으므로 식수 원인 담수를 사용하지 않으므로 물 부족 국가에서도 쉽게 활용할 수 있다. 네 번째로, 미세조류는 옥상의 농작물과 달리 인간의 식량 자원과 경쟁하지 않으므로 식량부족 문제를 일으키지 않는다. 다섯 번째로, 미세조류는 옥상 식물과 비교하여 광합성효율이 약 3 배 이상 높기 때문에 지구 온난화의 원인인 대기 중 이산화탄소를 더욱 효율적으로 제거할 수 있다. 여섯 번째로 미세조류는 환경에 대한 내성이 강하므로 다양한 배양 조건에서 생산 가능하며 특정 오·폐수를 영양분으로 성장할 수 있고 질소와 인, 중금속 등의 수계 오염 물질을 정화할 수 있는 능력을 지녔다(Moazami *et al.*[2011]; Miao and Wu[2006]; Widjaja *et al.*[2009]; Subhadra and Edwards[2010]).

미세조류가 축적하는 다양한 물질들은 환경적인 조건에 따라 그 양이 달라지기 때문에 염분, 온도, 질소 농도 및 광 조건 등의 비생물적인 환경조건을 활용한 배양법에 따라 생화학물질의 조성을 변화시켜 산업적으로 활용하려는 연구가 활발히 진행되어 왔다(Takagi and Yoshida[2006]; Zhu *et al.*[1997]; Ho *et al.*[2012]; Liang *et al.*[2009]). 특히, 이러한 비 생물적인 요인들 중 온도와 염분은 미세조류의 생리적 기능 조절과 성장에 매우 중요한 요인으로 인식되고 있다(Juneja *et al.*[2013]). 온도는 미세조류의 성장과 크기 및 생화학 물질의 축적뿐 아니라 영양염의 흡수, 대사작용 등에 상당한 영향을 미친다고 보고되어 왔으며 탄소 및 질소의 고정, 흡수와 광저해를 유발시키는 중요한 요소로도 인식되어 왔다(Juneja *et al.*[2013]; Vonshak and Torzillo[2004]). 염분에 의한 스트레스 또한 미세조류의 성장률과 물질 대사에 많은 영향을 준다고 보고되었으며 특정 종에서 높은 염분에 노출될 경우 높은 지질과 탄수화물이 축적된다는 보고가 있었다(Juneja *et al.*[2013]; Takagi and Yoshida[2006]). 이렇듯, 온도 및 염분의 작용에 의한 비생물적 스트레스는 조절이 간단하기 때문에 배양 조건의 변화에 의한 바이오 연료 생산성 증대에 이용할 수 있으며 최적화 된 배양기법을 찾기 위해 온도 및 염분의 동시적 효과에 따른 미세조류의 지질과 탄수화물 대사 및 그에 따른 바이오 매스의 생산성에 대한 연구들이 활발하게 진행되어 왔다. 특히 온도는 미세조류의 성장에 많은 영향을 미치며 온도가 증가 할수록 *Nannochloropsis oculata*, *Ochromonas danica* 및 *Spirulina sp.*와 같은 미세조류 종들에서 지질 및 탄수화물의 축적량이 증가 된다는 보고가 있었다(Aaronson[1973]; Converti *et al.*[2009]; Ogbonda *et al.*[2007]). 이러한 연구 결과들은 향후 미세조류의 바이오 연료를 생산할 수 있는 배양학적인 토대로서 매우 중요한 정보로 활용 될 수 있다. 따라서 이번 연구에서는 바이오 연료로 적합하다고 알려진 두 종의 해양 미세조류 *Nannochloropsis granulata*와 *Chlorella vulgaris*의 온도 및 염분에 의한 동시적 배양조건에 따른 성장과 생화학 물질의 축적 양상에 대하여 확인하고 이를 토대로 바이오 디젤로 활용할 수 있는 배양기법을 제시하고자 한다.

## 2. 재료 및 방법

### 2.1 미세조류 배양

*Nannochloropsis granulata* BDH02 (KC128500)와 *Chlorella vulgaris* (KMMCC-120)종은 영남대학교와 한국해양미세조류은행(Korea Marine Microalgae Culture Center, KMMCC)에서 각각 구입 하였다. 배양배지는 Erd-Schreiber's medium (ESM) 사용하였으며 배지의 조성은 다음과 같다; NaNO<sub>3</sub>, 12 mg, K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 0.5 mg, vitamin B<sub>12</sub> 0.1 µg, biotin 0.1 µg, thiamine HCl 10 µg, Fe-EDTA

25.9 µg, Mn-EDTA 33.2 µg, tris (hydroxymethyl)aminomethane 100 mg (Provasoli *et al.*[1957]). 배지의 pH는 8.0으로 조절하였으며 해수는 10, 30, 50 psu로 염분을 조절하기 위해 질소와 인 성분이 제거된 해염(Red Sea, Israel)를 사용 하였다. 염분은 SK-10S digital salt densimeter (SATO, JPN) 장비를 활용하여 정확하게 측정하여 실험을 진행하였다. 염분을 맞춘 각각의 배지는 15, 30, 45 °C로 조절된 multi-plant growth chamber (JEIO TECH, Korea)에서 배양하였으며 광주기는 12:12의 L/D cycle로, 광도는 150 µmol m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup>으로 유지하였고 2 L min<sup>-1</sup>의 flow rate로 aeration을 조절하여 배양기간 동안 유지시켜주었다. 초기 세포 농도는 5×10<sup>5</sup> cells mL<sup>-1</sup>였으며, 배양용기는 2 L의 Erlenmeyer flask (IWAZAKI, JPN)를 사용하였고 총 용량을 1 L로 맞추어 배양을 진행하였다.

## 2.2 미세조류의 일일 성장 및 바이오 매스 측정

성장은 흡광도 기법을 이용하여 측정하였으며 매 24시간 마다 synergy microplate reader (BioTek, USA)를 활용하여 96-well plate에서 600 nm 파장으로 optical density (OD)를 측정하였고 Axio Vert.A1 광학 현미경(ZEISS, GER) 및 혈구계수기를 사용하여 셀 농도를 측정, 검량선을 만들고 배양된 미세조류의 OD 값을 적용하여 세포수를 계산하였다(AI Ahmad *et al.*[2014]). Specific growth rate (SGR), divisions per day (DD), generation time (GT)은 다음의 계산식을 이용하여 구하였다(Fogg and Thake *et al.*[1987]; Levasseur *et al.*[1993]).

$$SGR = \ln(N_t / N_i) / (t_t - t_i) \quad (1)$$

$$DD = SGR / \ln 2 \quad (2)$$

$$GT = 1 / DP \quad (3)$$

$N_t, N_i$ : 대수성장기에서 초기와  $t$ 일 후의 세포농도 (Cells mL<sup>-1</sup>)

$t_t, t_i$ : 대수성장기에서 초기와  $t$ 일

미세조류의 바이오 매스는 Zhu and Lee (1997)의 방법을 이용하여 다음과 같이 측정하였다(Zhu and Lee [1997]). 먼저 10 mL 미세조류 배양액을 미리 건조하여 무게를 쟀 0.2 µm pore-size의 glass fiber filters (Whatman GF/F, 47 mm)로 여과한 이후, 증류수로 헹궈준 뒤 필터를 80 °C의 drying oven에 건조한 뒤, dessicator를 이용하여 방냉 하였다. 이후, 건조된 필터에 함유된 바이오 매스를 전자저울로 정확하게 무게를 측정하였다.

## 2.3 광합성 색소의 측정

광합성 색소인 chlorophyll *a* ( $C_a$ ), chlorophyll *b* ( $C_b$ ), total carotenoids 는 Wellburn (1994)이 제안한 메탄올 추출 방법을 이용하여 다음과 같이 측정하였다(Wellburn[1994]). 먼저, 미세조류 배양액 5 mL를 3분간 13,000 × g 에서 원심 분리하여 상등액을 제거한 후, 증류수를 이용하여 세포를 3회 씻어주었다. 그 후 다시 원심분리 후 상등액을 제거한 뒤 1 mL의 메탄올을 첨가하여 60 °C로 조절된 heating block에서 30분간 추출한 후 10,000×g에서 3분간 원심 분리한 후

상등액을 7315 spectrophotometer (Jenway, Staffordshire, UK)를 이용하여 470 nm, 653 nm, 666 nm에서 각각 측정한 후 다음의 계산식을 이용하여 구하였다(Wellburn[1994]).

$$\text{Chlorophyll } a = 15.65 \cdot A_{666} - 7.34 \cdot A_{653} \quad (4)$$

$$\text{Chlorophyll } b = 27.05 \cdot A_{653} - 11.21 \cdot A_{666} \quad (5)$$

$$\text{Total carotenoids} = (1000 \cdot A_{470} - 2.86 \cdot C_a - 129.2 \cdot C_b) / 221 \quad (6)$$

$A_{666}$ : 666 nm에서의 흡광도(Relative value)

$A_{653}$ : 653 nm에서의 흡광도(Relative value)

$A_{470}$ : 470 nm에서의 흡광도(Relative value)

$C_a$ : chlorophyll *a*의 양(ppm)

$C_b$ : chlorophyll *b*의 양(ppm)

## 2.4 미세조류의 중성지방 측정

중성지방의 함량은 Chen이 제안한 dimethyl sulfoxide (DMSO)와 microwave를 활용한 Nile red 분석법을 사용하여 다음과 같이 측정하였다(Chen *et al.*[2009]). 미세조류의 상등액 50 µL를 DMSO 100 µL와 혼합한 후 Nile red 용액(100 mg L<sup>-1</sup> in acetone; Sigma-Aldrich)을 10 µL 첨가하고 Q500 sonicator (QSONICA, UK)를 이용하여 1분간 sonication을 하였다. 그 후 Synergy microplate reader (BioTek, USA)를 이용하여 excitation 520 nm 그리고 emission 580 nm 파장으로 형광값을 측정하였다. 표준 검량선은 triolein (Sigma-Aldrich Co., USA)을 사용하였다.

## 2.5 미세조류의 녹말 측정

미세조류 녹말의 함량은 McCready *et al.*(1950)과 Brányiková *et al.*(2011)의 방법을 이용하여 다음과 같이 측정하였다(McCready *et al.*[1950]; Brányiková *et al.*[2011]). 미세조류를 동결 건조한 후 건조된 바이오 매스 10 mg을 3차 증류수 10 mL와 섞은 후 강하게 vortex하여 균질 하게 섞은 뒤 1 mL를 분취하여 3분 동안 10,000 ×g로 원심분리 하였다. 이후 상등액을 제거한 뒤 3차 증류수 0.25 mL를 첨가한 뒤 heating block에서 15분 동안 100 °C로 맞추고 hydrolysis 반응을 일으켰다. 그 후 상온에서 1시간 동안 식히고, 30% perchloric acid 0.25 mL를 첨가한 후 25 °C에서 15분간 shaking 해주었다. 그 후 증류수 0.6 mL와 혼합물을 섞고 3분간 10,000×g로 원심 분리한 뒤 8분간 100 °C에서 보관한 후, 혼합물 0.4 mL에 anthrone 용액(0.2 g anthrone reagent in 100 mL of 72% H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) 2 mL를 첨가하였다. 그 후 상온에서 식힌 뒤에 Synergy microplate reader (BioTek, USA)를 이용하여 625 nm에서 흡광도를 측정하였고 포도당(glucose)을 표준 물질로 검량하여 녹말의 농도를 구하였다.

## 2.6 통계학적 분석

실험은 3반복으로 진행하였고, two-way ANOVA와 one-way ANOVA 및 post-hoc *t*-test를 Microsoft Excel 2007 프로그램 (Microsoft, USA)을 활용하여 통계학적 분석을 하였으며,  $P < 0.05$ 이하의 값을 나타내는 통계치를 구하였다.

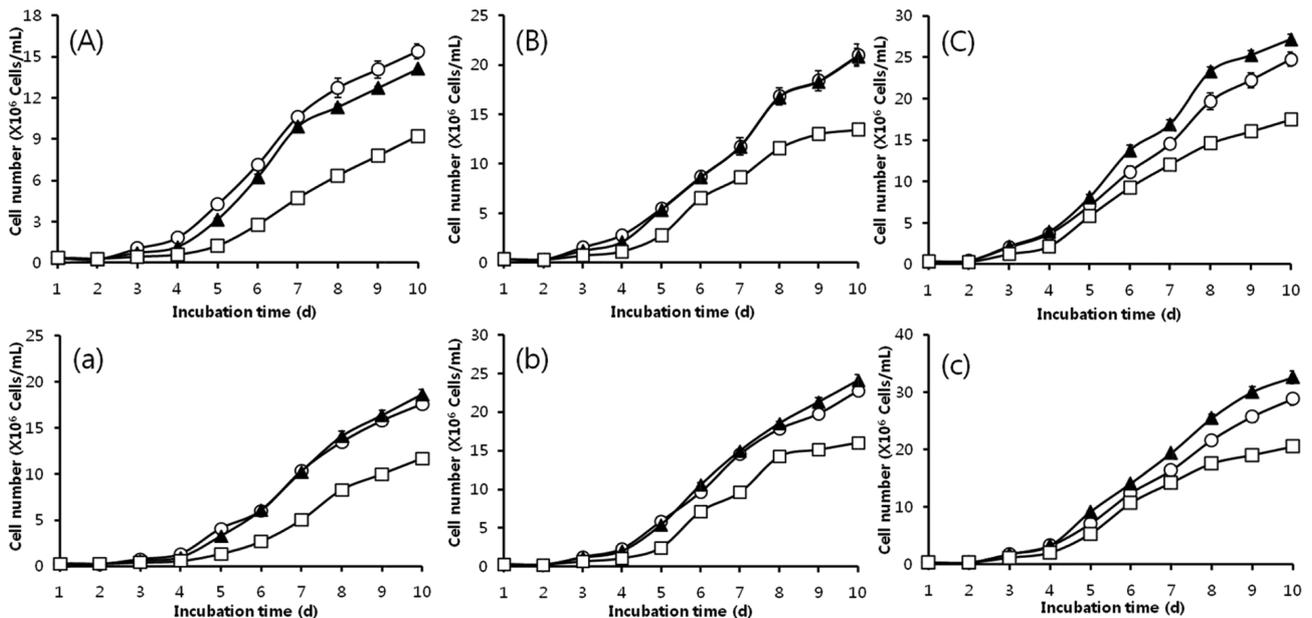
### 3. 결과 및 고찰

#### 3.1 미세조류의 온도 및 염분에 따른 성장변화

이번 연구는 *Chlorella vulgaris*와 *Nannochloropsis granulata*를 바이오 연료 사업에 적용할 시 염분이 약 30-35 psu인 자연 해수를 기준으로 10-50 psu의 염분 구간을 설정하여 실험을 진행하였고, 온도는 일반적인 미세조류의 배양 최적 조건인 25 °C를 기준으로 구간을 설정하였다.

Specific growth rate (SGR), division per day (DD), generation time (GT)의 값은 미세조류 회분배양 10일 후에 측정하였으며 *N. granulata*와 *C. vulgaris*는 서로 비슷한 성장률 수치를 보였지만, 서로 다른 염분과 온도 조건 하에서는 Table 1 및 Fig. 2에서 보는 바와 같이 두 종이 서로 다른 양상을 나타냈다. *C. vulgaris*와 *N. granulata*의 최대 SGR은 30 °C, 30 psu 배양에서 나타났고 최소값의 SGR를 보인 20 °C, 50 psu 배양 보다 *C. vulgaris*의 경우 1.29배, *N. granulata*의 경우 1.33배 정도의 높은 수치를 나타냈다(Table 1). 또한, Table 1에서 *C. vulgaris* 와 *N. granulata*의 성장은 증가된 DD 및 감소된 GT와 함께 온도 의존적으로 증가하는 것을 확인할 수 있었으며 측정된 바이오 매스의 값을 통해 같은 결과 값을 얻을 수 있었다. 기존 연구에 의하면 온도는 미세조류의 성장률, 세포의 크기에 영향을 줄 수 있으며 종에 따라 그 영향이 다르다고 보고되어 왔으며, 그 이유는 배양 온도가 미세조류의 탄소와 질소 흡수 및 활용에 큰 영향을 줄 수 있기 때문이라 알려져 있다(Juneja *et al.*[2013]; Raven and Geider[1988]). 또 다른 연구에 따르면 온도가 낮아질 경우 대사활성에 따른 광 저해가 발생하며 광합성에 연관된 PsbA의 합성이 저해되기 때문에 미세조류의 성장은 온도에 의해 큰 영향을 받을 수

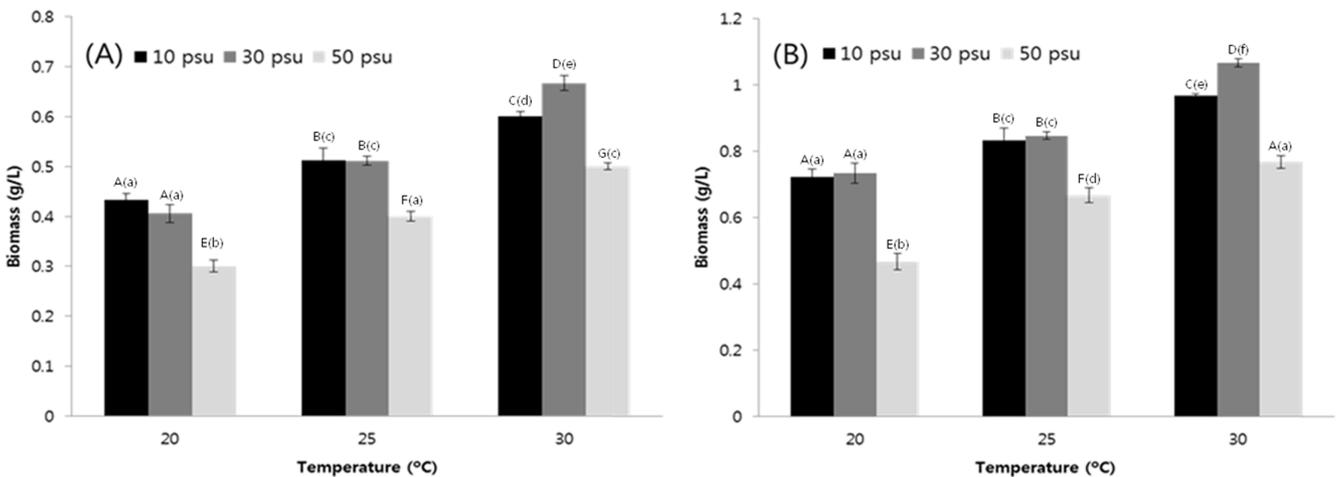
있다고 알려져 있다(Juneja *et al.*[2013]). 이번 연구에서 우리는 서로 다른 염분 조건에서 미세조류 성장이 온도에 의해 영향을 받을 수 있다는 사실을 확인 하였는데 *C. vulgaris*와 *N. granulata*의 배양 실험에서 세포 성장과 바이오 매스를 각각의 온도에서 비교했을 경우 10 psu보다 30 psu와 50 psu에서 증가하는 경향성을 나타낸다는 사실을 확인할 수 있었다. 또한 10 psu를 기준으로 비교하면 50 psu에서 *C. vulgaris*와 *N. granulata*의 하루당 세포 분열이 25 °C에서 10일 배양 동안 *C. vulgaris*에서는 1.08배, *N. granulata*에서는 1.12 배 더 증가했다는 사실을 확인할 수 있었다(Fig. 1, Table 1). 이전 연구에서 보고된 내용에 따르면, 세포의 내부와 외부 사이의 염분 농도를 조절하기 위한 삼투압 조절로 인해 낮거나 높은 염분에 노출된 조류는 성장률에 큰 영향을 받을 수 있다고 보고된 바 있다(Juneja *et al.*[2013]; Priya[2013]). 또한 삼투압에 의한 스트레스는 세포막 수분 이동에 영향을 미치며 그와 더불어 영양 염류 흡수에도 큰 영향을 준다는 보고가 있다(Ding *et al.*[2013]). 따라서 위와 같은 이유로 인해 미세조류 성장 역제는 낮은 염분(10 psu)과 비교할 때 높은 염분(50 psu)에서 삼투압에 의한 영양염 공급 시스템의 이상으로 인해 성장이 상대적으로 감소했다고 보여진다. 또 다른 연구 결과에 따르면, 높은 염분은 조류 세포에 활성산소종에 의한 산화 스트레스를 공급하는 원인이 되며 산화 스트레스에 따른 손상과 관련된 활성 산소종(ROS)으로 부터 세포막의 극 지질을 보호하기 위한 항산화 효소 발생에 따라 세포 신호 또한 영향을 받을 수 있다고 알려져 있다(Kumar *et al.*[2010]). 결론적으로 우리는 항산화 효소 분비의 최적화된 온도가 존재하기 때문에 미세조류 산화적 손상을 방지할 수 있으며 그러한 작용이 미세조류의 성장에 큰 영향을 주었을 것이라 추측한다.



**Fig. 1.** Effect of different salinities (10 psu: ○, 30 psu: ▲, 50 psu: □) and temperatures (A, a: 20 °C, B, b: 25 °C, C, c: 30 °C) on the growth of *Chlorella vulgaris* (capital letters) and *Nannochloropsis granulata* (lowercase letters) under 12:12 of L/D cycle and 150 μmol m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup> of light intensity.

**Table 1.** Simultaneous effects of temperature (°C) and salinity (psu) on the specific growth rate (SGR), divisions per day (DD), and generation time (GT) of oceanic microalgae *Chlorella vulgaris* (CV) and *Nannochloropsis granulata* (NG) for the 10 days of cultivation time under 150  $\mu\text{mole m}^{-2} \text{s}^{-1}$

Species	Temperature	Salinity	SGR	DD	GT
CV	20	10	0.4524 ± 0.012	0.6527 ± 0.012	1.5321 ± 0.012
		30	0.4393 ± 0.012	0.6338 ± 0.012	1.5778 ± 0.012
		50	0.4022 ± 0.012	0.5802 ± 0.012	1.7236 ± 0.012
	25	10	0.4809 ± 0.012	0.6938 ± 0.012	1.4414 ± 0.012
		30	0.4803 ± 0.012	0.6929 ± 0.012	1.4433 ± 0.012
		50	0.4511 ± 0.012	0.6508 ± 0.012	1.5367 ± 0.012
	30	10	0.5070 ± 0.012	0.7314 ± 0.012	1.3672 ± 0.012
		30	0.5207 ± 0.012	0.7512 ± 0.012	1.3312 ± 0.012
		50	0.4692 ± 0.012	0.6769 ± 0.012	1.4772 ± 0.012
NG	20	10	0.4205 ± 0.012	0.6066 ± 0.012	1.6485 ± 0.012
		30	0.4108 ± 0.012	0.5926 ± 0.012	1.6874 ± 0.012
		50	0.3634 ± 0.012	0.5243 ± 0.012	1.9074 ± 0.012
	25	10	0.4549 ± 0.012	0.6562 ± 0.012	1.5239 ± 0.012
		30	0.4541 ± 0.012	0.6552 ± 0.012	1.5263 ± 0.012
		50	0.4054 ± 0.012	0.5849 ± 0.012	1.7096 ± 0.012
	30	10	0.4732 ± 0.012	0.6827 ± 0.012	1.4649 ± 0.012
		30	0.4836 ± 0.012	0.6976 ± 0.012	1.4334 ± 0.012
		50	0.4346 ± 0.012	0.6270 ± 0.012	1.5948 ± 0.012



**Fig. 2.** Simultaneous effect of salinities (10, 30, and 50 psu) and temperatures (20, 25, and 30 °C) on the biomass ( $\text{g L}^{-1}$ ) production of *Chlorella vulgaris* (A) and *Nannochloropsis granulata* (B). Different letters exhibited significant differences ( $p < 0.05$ ). Both capital letters and lower case letter exhibited comparison of different temperatures and salinities respectively.

### 3.2 미세조류의 광합성색소 변화

미세조류의 광합성 색소는 용매의 종류와 사용되는 cuvet cell의 투과 길이(path length)에 따라 그 측정식이 다르게 나타나며 이미 여러 측정식들이 보고된 바 있다(Lorenzen[1967]; Wellburn[1994]; Tkachuk *et al.*[1988]). 이번 연구에서는 methanol 추출물을 활용하여 광합성 색소를 분석하였으며 기존에 methanol, acetone, ethanol, chloroform, dimethylformamide 및 dimethyl sulfoxide 등 다양한 유기 용매 분석 방법에 대한 측정식을 서술한 Wellburn (1994)의 방법을 사용하여 광합성 색소를 분석하였다.

우리는 다양한 염분 및 온도 조건에서 10일간 배양한 미세조류의

chlorophyll *a*와 total carotenoid 함량을 측정하였으며, Table 2에서 보는 바와 같이 *C. vulgaris*의 경우 광합성 색소인 chlorophyll *a* 양은 50 psu를 제외하고 온도 의존적으로 증가하였고 염분에 의해 의존적으로 감소하는 경향을 보였다. 그러나, *N. granulata*에서는 색소의 양이 온도 의존적으로 50 psu의 조건에서 증가한다는 사실을 확인할 수 있었으며, chlorophyll *a*는 염분에 의존적으로 감소하였음을 확인할 수 있었다. 또한 색소양은 20 °C, 25 °C 조건에서 염분 의존적으로 감소하였으며 30 °C에서는 또 다른 경향이 관찰되었다. Chlorophyll *a*는 미세조류의 광합성 주요 인자이기 때문에 chlorophyll 양의 높은 축적과 낮은 축적 정도의 차이는 조류의 성장과 본질적

**Table 2.** Simultaneous effects of temperature (°C) and salinity (psu) on the photosynthetic pigments accumulation of oceanic microalgae *Chlorella vulgaris* (CV) and *Nannochloropsis granulata* (NG) for the 10 days of cultivation time under 150 μmole m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup>

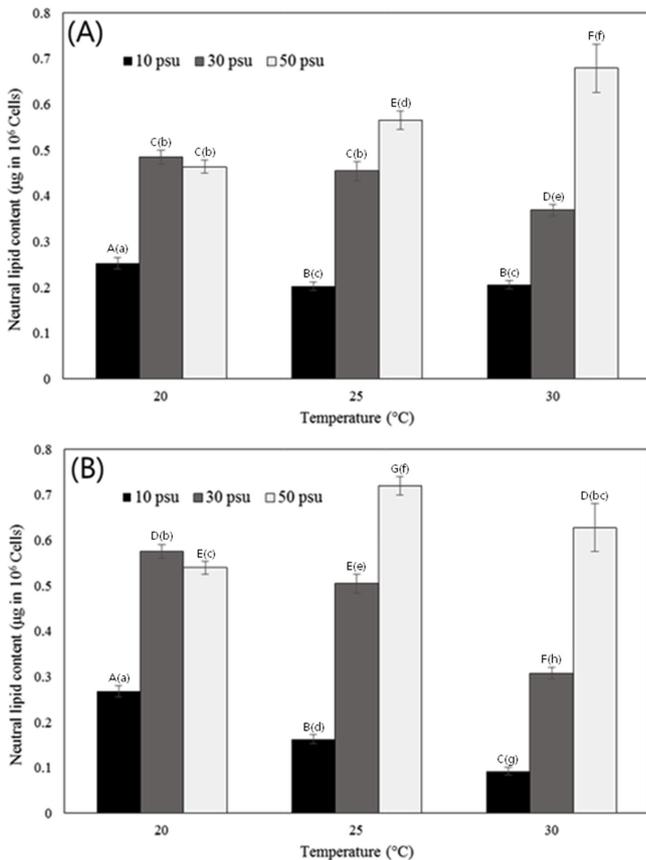
Species	Temperature	Salinity	Pigment (mg L <sup>-1</sup> )	
			Chlorophyll <i>a</i>	Total carotenoid
CV	20	10	3.1879 ± 0.005	0.6916 ± 0.032
		30	3.0838 ± 0.015	0.7447 ± 0.081
		50	2.1768 ± 0.021	0.8686 ± 0.093
	25	10	4.0563 ± 0.102	0.9664 ± 0.024
		30	3.8637 ± 0.016	1.0292 ± 0.009
		50	3.1650 ± 0.121	1.0439 ± 0.019
	30	10	4.1448 ± 0.087	1.1196 ± 0.095
		30	4.3873 ± 0.055	1.3852 ± 0.112
		50	3.0139 ± 0.045	1.5706 ± 0.019
NG	20	10	1.7122 ± 0.064	0.3839 ± 0.099
		30	2.2090 ± 0.045	0.5603 ± 0.020
		50	2.1841 ± 0.155	0.5532 ± 0.010
	25	10	3.5908 ± 0.007	0.9476 ± 0.065
		30	3.5659 ± 0.077	1.0435 ± 0.012
		50	2.7391 ± 0.048	0.9078 ± 0.077
	30	10	3.5356 ± 0.069	1.1414 ± 0.058
		30	3.5282 ± 0.053	1.2072 ± 0.090
		50	2.8765 ± 0.057	1.1571 ± 0.043

으로 관련이 있다. 이번 연구에서 우리는 낮은 온도(20 °C)에서는 염도가 높아짐에 따라 chlorophyll 양이 감소했다는 사실을 관찰하였으며 높은 온도에서는 서로 다른 경향성을 보인다는 사실을 확인하였다. 광합성과 연관된 낮은 온도와 높은 염분은 chlorophyll 양을 감소시키며 기존 연구에서는 온도와 염분은 광합성 활동에 영향을 미친다는 보고가 있었다(Ding *et al.*[2013]). 높은 염분은 광합성 저하의 원인이 될 수 있으며 낮은 온도 또한 전자 전달과 이산화탄소 고정 감소로 나타나는 광계 II 활동의 감소 원인 될 수 있다(Juneja *et al.*[2013]). 따라서 이번 실험의 결과로부터 조류 성장이 제한 받는 조건에서 chlorophyll *a*가 증가된 이유는 미세조류가 성장이 힘든 환경에서 광합성 효율을 극대화시켜 생존하기 위한 대사활동의 과정이라 생각된다. 또한, 우리는 30 °C에서 chlorophyll의 경향성이 다르게 보인 이유는 생화학 합성에 연관된 효소의 최적 온도에 따른 대사 경로 변화로 인한 것으로 판단하였다. 그리고 높은 염분에서는 ROS에 의해 기인한 산화스트레스에 의해 엽록체를 구성하는 막구조가 변형되어 광합성 색소 축적을 저해시킨 것으로 예측되며 그 결과 chlorophyll *a* 합성이 억제되고 바이오 매스 생산에 영향을 미친 것으로 판단된다. 높은 염분과 온도에서 성장과 광합성 색소 억제에 관련한 결과는 이미 다양한 종에서 보고된 바 있다(Vonshak *et al.*[1996]; Kirrolia *et al.*[2012]; Ding *et al.*[2013]). 다음으로 Table 2에서 보는 것과 같이 우리는 total carotenoid 축적 또한 온도와 염분에 의해 상당한 영향을 받았음을 확인할 수 있었으며 *C. vulgaris*와 *N. granulata* 두 종 모두에서 total carotenoid의 양은 온도 의존적으로 증가 하였고 *C. vulgaris*의 경우 모든 온도에서 염분 의존적으로 증가하였으며, *N. granulata*의 경우 모든 온도 조건의 30 psu에서 높은 carotenoid 수치가 관찰 되었다. Carotenoid는

강한 항산화 효과를 나타내며 외부 환경의 손상으로부터 엽록소 체계를 방어하는 중요한 역할을 하는 것으로 알려져 있다. 따라서 스트레스로부터 엽록체를 보호할 뿐만 아니라 에너지 전달 과정도 수행한다(Armstrong and Hearst[1996]; Juneja *et al.*[2013]). Total carotenoid는 광손상 발생시 높아지며 이를 유발하는 높은 온도에서 증가 된다는 사실이 이미 보고 되어있다(Juneja *et al.*[2013]; Liu and Lee[2000]). 기존 연구와 비슷하게, 이번 연구에서도 온도의존적으로 미세조류의 total carotenoid가 증가 되었다는 사실을 확인할 수 있었고 그 이유는 외부 스트레스에 대한 보호 기작 때문이라 생각된다. 또 다른 연구에 의하면 높은 염분은 *Dunaliella sp.*에서 carotenoid 축적을 높여주는 원인이 될 수 있다고 밝힌바 있다(Borowitzka *et al.*[1990]). 그러나 이번 연구에서 *N. granulata*의 경우 기존에 연구된 내용과 비슷한 경향을 나타내지 않았다(Table 2). 그러므로 carotenoid 축적은 종에 따라 그 축적 변화가 다르다고 판단된다.

### 3.3 중성지질 축적의 변화

중성지질의 분석은 10일간 배양 후에 Nile red를 활용한 형광법으로 측정 되었다. 이전 보고에 따르면, 단단한 엽록체 막과 함께 두껍고 단단한 세포벽을 갖고 있는 *Chlorella*와 같은 녹조류의 중성지질의 축적은 dimethyl sulfoxide (DMSO)와 microwave 또는 sonication을 사용한 방법이 효율적이라는 보고가 있다(Chen *et al.*[2009]; Ren *et al.*[2013]). Fig. 3에서 보는바와 같이 각 미세조류의 중성지질은 각각의 다른 염분과 온도로 이루어진 조건 하에 종마다 다른 경향을 보인다는 사실을 확인하였다. *C. vulgaris*의 경우 중성지질이 25 °C, 30 °C에서 염분 의존적으로 증가 하였고, 20 °C



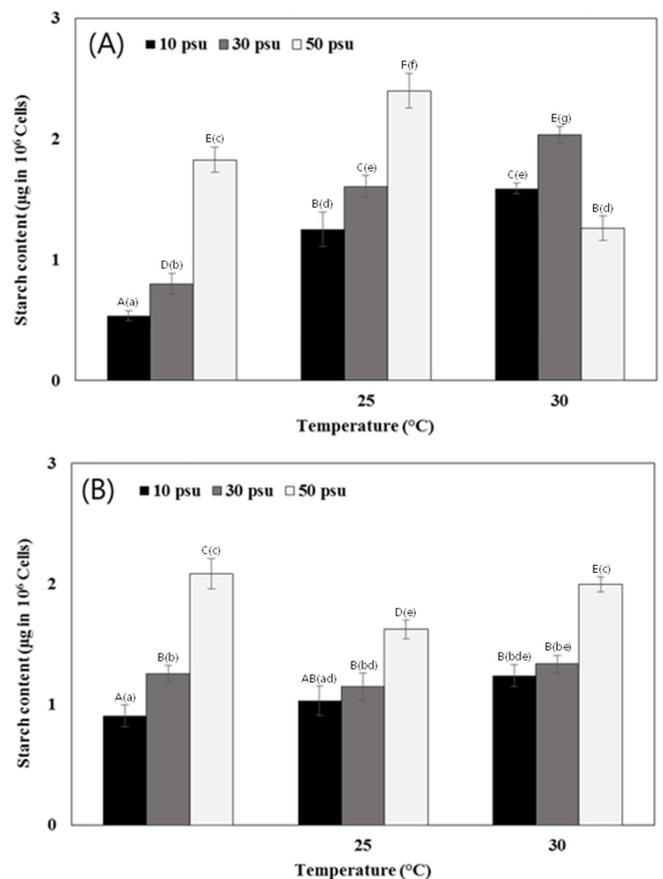
**Fig. 3.** Simultaneous effect of salinities (10, 30, and 50 psu) and temperatures (20, 25, and 30 °C) on the neutral lipid content (µg per 10<sup>6</sup> cells) of *Chlorella vulgaris* (A) and *Nannochloropsis granulata* (B). Different letters exhibited significant differences ( $p < 0.05$ ). Both capital letters and lower case letter exhibited comparison of different temperatures and salinities respectively.

에서는 50 psu일 때 감소 하였다. 이와 비슷하게, *N. granulata* 배양에서 중성지질의 양은 20 °C, 50 psu에서 감소되었고 25 °C와 30 °C에서 증가하였다. 기존의 여러 연구에서 이미 미세조류의 중성지질의 축적량은 염분에 의해 증가 될 수 있다는 보고가 있었다(Zhila *et al.*[2011]; Fabregas *et al.*[1984]). 또한 염분에 의한 스트레스는 미세조류의 중성지질 축적을 향상 시킬 수 있다는 보고도 있었다(Yilancioglu *et al.*[2014]; Kumar *et al.*[2010]). 하지만 이번 연구에서는 다른 온도 조건하에서 염분이 중성지질 축적에 서로 다른 영향을 준다는 사실을 확인할 수 있었다. 아직 더 많은 연구가 필요하지만, 낮은 온도에서의 당 대사를 일으키는 효소 불활성으로 인해 중성지질 축적량의 변화를 주었다고 생각된다. 또한 Fig. 3에서 보는 바와 같이 염분에 의한 중성지질 축적은 온도에 따라 전혀 다른 경향성을 나타내었으며 특히 10 psu, 30 psu에서 온도 의존적으로 중성지질이 감소 되었다는 사실을 확인할 수 있었고 50 psu에서는 오히려 높아지는 전혀 다른 경향을 보인다는 사실을 확인하였다. 그리고 중성지질은 *C. vulgaris*의 50 psu 배양에서 온도 의존적으로 증가하였으며 *N. granulata*에서는 30 °C에서 감소하는 경향을 보

였다. 이러한 두 종의 다른 경향성은 각 종마다 서로 다른 대사 경로로 인한 다양한 비생물적 스트레스에서 생화학적 축적 양상이 다르다는 사실을 보여준다.

### 3.4 녹말의 축적량 변화

미세조류에 축적된 녹말의 양은 기존에 연구된 바 있는 담수 미세조류인 *Chlorella sp.*의 perchloric acid를 활용한 hydrolysis 방법을 사용하였고, anthrone solution과 sulfuric acid의 반응에 따른 발색 변화에 따라 녹말을 분석하였다(Brányiková *et al.*[2011]). 녹말은 각각의 온도와 염분 조합에서 10일간 배양 후 측정 하였으며 Fig. 4A에서 보는 바와 같이 *C. vulgaris*에서는 50 psu를 제외한 10 psu, 30 psu에서 온도 의존적으로 증가하였고 30 °C 온도를 제외하고 또한 염분 의존적으로 증가하는 경향성을 나타냈다. *N. granulata*는 10 psu에서만 녹말의 양이 온도 의존적으로 약간 증가하였고 30 psu와 50 psu에서 특별한 경향이 관찰 되지는 않았지만 염분 의존적으로 모든 온도에서 증가된다는 사실을 확인할 수 있었다. 이전 연구에서 미세조류의 탄수화물 합성은 Calvin cycle로 알려진 대사 과정을



**Fig. 4.** Simultaneous effect of salinities (10, 30, and 50 psu) and temperatures (20, 25, and 30 °C) on the starch content (µg per 10<sup>6</sup> cells) of *Chlorella vulgaris* (A) and *Nannochloropsis granulata* (B). Different letters exhibited significant differences ( $p < 0.05$ ). Both capital letters and lower case letter exhibited comparison of different temperatures and salinities respectively.

통해 광 반응시 이미 형성된 adenosine triphosphate (ATP)와 같은 인 결합을 포함한 에너지를 사용함으로써 어두운 상태에서도 인산화 대사에 의해 합성 과정이 이루어 질 수 있다는 사실이 밝혀진 바 있다(Emerson *et al.*[1944]; Juneja *et al.*[2013]; A. Lehninger and Nelson[2005]). 미세조류의 녹말 축적에서 온도에 의한 영향은 종마다 다른 탄수화물 축적 양상을 보이기 때문에 여전히 정확한 경로가 밝혀지지는 않았다(De Oliveira *et al.*[1999]; Chen *et al.*[2013]). 이번 연구에서는 몇몇 미세조류의 녹말 양의 감소를 뚜렷하게 보였고 이러한 결과는  $\alpha$ -amylase와  $\alpha$ -glucan phosphorylase와 같은 효소들이 높은 온도(38 °C)에서 활성화 되었기 때문이라고 판단된다(Nakamura[1983]; Nakamura and Imamura[1983]; Juneja *et al.*[2013]). 그러므로, 두 종의 미세조류의 녹말 축적 패턴이 다른 이유는 종마다 다른 효소의 활성 정도의 차이에 의해 기인한 것이라 생각된다. 또한 이번 연구에서는 흥미롭게도 높은 온도(30 °C)에서 *C. vulgaris* 가 50 psu일 때 오히려 녹말이 감소되었다는 사실을 확인할 수 있었으며(Fig. 4A), 기존의 연구에서도 높은 염분은 미세조류 *Tetraselmis sp.* 종의 녹말 축적을 억제시킨다는 비슷한 보고가 있다(Yao *et al.*[2013]). 그러나 *N. granulata* 세포에서 녹말의 양은 염분 의존적으로 오히려 증가 하였다(Fig. 4B). 이러한 사실 또한 종의 대사활성 차이에서 기인한 것으로 판단된다.

#### 4. 결 론

이번 연구에서는 미세조류의 산업적 이용 가치를 평가하기 위해 두 가지 환경적 스트레스 인자인 염분과 온도 조건을 동시에 변화시켰을 때의 조류의 성장, 광합성 색소, 녹말 및 지질의 축적 양상 변화를 연구하였다. 미세조류는 30 °C, 30 psu에서 가장 높은 성장과 바이오 매스 생산량을 보였으며 녹말과 지질 축적은 종 의존적으로 변화된다는 사실을 확인할 수 있었고 서로 다른 온도에서 염분에 의해 중성지질 및 녹말과 같은 생화학 물질의 축적이 서로 다른 양상을 나타낸다는 사실 또한 확인할 수 있었다. 결론적으로 미세조류를 목적에 맞게 배양할 때 온도와 염분 및 그 밖의 요소를 동시에 고려할 필요성이 있으며 향후 pH, 광도, 광주기, 파장과 같은 다양한 요소들에 조합에 의한 미세조류 생화학물질 축적에 대한 더 많은 연구가 필요할 것으로 판단된다.

#### 후 기

이 연구는 기상청 “기후변화 감시예측 및 국가정책지원강화”(KMIPA2015-2050)의 지원으로 수행되었습니다.

#### References

[1] Aaronson, S., 1973, “Effect of incubation temperature on the macromolecular and lipid content of the phytoflagellate *Ochromonas danica*”, J Phycol, 9, 111-113.

[2] Al Ahmad, M., Al-Zuhair, S., Taher, H. and Hilal-Alnaqbi, A., 2014, “RF Microalgal lipid content characterization”, Sci Rep, 4.

[3] Armstrong, G.A. and Hearst, J.E., 1996, “Carotenoids 2: Genetics and molecular biology of carotenoid pigment biosynthesis”, FASEB J, 10, 228-237.

[4] A. Lehninger, D. and Nelson, M., 2005, “Cox, Lehninger Principles of Biochemistry”, 4th ed, W.H. Freeman, New York.

[5] Borowitzka, M.A., Borowitzka, L.J. and Kessly, D., 1990, “Effects of salinity increase on carotenoid accumulation in the green alga *Dunaliella salina*”, J Appl Phycol, 2, 111-119.

[6] Bridgwater, A.V., Toft, A.J. and Brammer, J.G., 2002, “A techno-economic comparison of power production by biomass fast pyrolysis with gasification and combustion”, Renew Sust Energ Rev, 6, 181-248.

[7] Brányiková, I., Maršálková, B., Doucha, J., Brányik, T., Bišová, K., Zachleder, V. and Vítová, M., 2011, “Microalgae—novel highly efficient starch producers”, Biotechnol Bioeng, 108, 766-776.

[8] Chen, W., Zhang, C., Song, L., Sommerfeld, M. and Hu, Q., 2009, “A high throughput Nile red method for quantitative measurement of neutral lipids in microalgae”, J Microbiol Meth, 77, 41-47.

[9] Chen, C.Y., Zhao, X.Q., Yen, H.W., Ho, S.H., Cheng, C.L., Lee, D.J. and Chang, J.S., 2013, “Microalgae-based carbohydrates for biofuel production”, Biochem Eng J, 78, 1-10.

[10] Chisti, Y., 2007, “Biodiesel from microalgae”, Biotechnol Adv, 25, 294-306.

[11] Converti, A., Casazza, A.A., Ortiz, E.Y., Perego, P. and Borghi, M.D., 2009, “Effect of temperature and nitrogen concentration on the growth and lipid content of *Nannochloropsis oculata* and *Chlorella vulgaris* for biodiesel production.”, Chem Eng Process, 48, 1146-1151.

[12] Ding, L., Ma, Y., Huang, B. and Chen, S., 2013, “Effects of seawater salinity and temperature on growth and pigment contents in *Hypnea cervicornis* J. Agardh (Gigartinales, Rhodophyta)”, Biomed Res Int, 2013.

[13] De Oliveira, M.A.C.L., Monteiro, M.P.C., Robbs, P.G. and Leite, S.G.F., 1999, “Growth and chemical composition of *Spirulina maxima* and *Spirulina platensis* biomass at different temperatures”, Aquacul Int, 7, 261-275.

[14] Emerson, R., Stauffer, J. and Umbreit, W., 1944, “Relationships between phosphorylation and photosynthesis in *Chlorella*”, Am J Bot, 31, 107-120.

[15] Fatih Demirbas, M., 2009, “Biorefineries for biofuel upgrading: a critical review”, Appl Energ, 86, S151-S161.

[16] Fogg, G.E. and Thake, B., 1987, “Algal Cultures and Phytoplankton Ecology”, 3rd ed. London, The University of Wisconsin Press, Ltd.

[17] Fabregas, J., Abalde, J., Herrero, C., Cabezas, B. and Veiga, M., 1984, “Growth of the marine microalga *Tetraselmis suecica* in batch cultures with different salinities and nutrient concentrations”,

- Aquaculture, 42, 207-215.
- [18] Ho, S.H., Chen, C.Y. and Chang, J.S., 2012, "Effect of light intensity and nitrogen starvation on CO<sub>2</sub> fixation and lipid/carbohydrate production of an indigenous microalga *Scenedesmus obliquus* CNW-N", Bioresource Technol, 113, 244-252.
- [19] Juneja, A., Ceballos, R.M. and Murthy, G.S., 2013, "Effects of environmental factors and nutrient availability on the biochemical composition of algae for biofuels production, A Review", Energies, 6, 4607-4638.
- [20] Kumar, M., Kumari, P., Gupta, V., Reddy, C.R.K. and Jha, B., 2010, "Biochemical responses of red alga *Gracilaria corticata* (Gracilariales, Rhodophyta) to salinity induced oxidative stress", J Exp Mar Biol Ecol, 391, 27-34.
- [21] Kirrolia, A., Bishnoi, N.R. and Singh, R., 2012, "Effect of shaking, incubation temperature, salinity and media composition on growth traits of green microalgae *Chlorococcum* sp.", J Algal Biom Utlzn, 3, 46-53.
- [22] Li, Y., Horsman, M., Wu, N., Lan, C.Q. and Dubois-Calero N., 2008, "Biofuels from microalgae", Biotechnol Progr, 24, 815-820.
- [23] Liang, Y., Sarkany, N. and Cui, Y., 2009, "Biomass and lipid productivities of *Chlorella vulgaris* under autotrophic, heterotrophic and mixotrophic growth conditions", Biotechnol Lett, 31, 1043-1049.
- [24] Levasseur, M., Thompson, P.A. and Harrison, P.J., 1993, "Physiological acclimation of marine phytoplankton to different nitrogen sources", J Phycol, 29, 587-595.
- [25] Liu, B.H. and Lee, Y.K., 2000, "Secondary carotenoids formation by the green alga *Chlorococcum* sp.", J Appl Phycol, 12, 301-307.
- [26] Lorenzen, C.J., 1967. "Determination of chlorophyll and pheopigments: spectrophotometric equations", Limnol Oceanogr, 12, 343-346.
- [27] McCready, R.M., Guggolz, J., Silviera, V. and Owens, H.S., 1950, "Determination of starch and amylose in vegetables", Anal Chem 22, 1156-1158.
- [28] Miao, X. and Wu, Q., 2006, "Biodiesel production from heterotrophic microalgal oil", Bioresour Technol, 97, 841-846.
- [29] Moazami, N., Ranjbar, R., Ashori, A., Tangestani, M. and Nejad, A.S., 2011, "Biomass and lipid productivities of marine microalgae isolated from the Persian Gulf and the Qeshm Island", Biomass Bioenergy, 35, 1935-1939.
- [30] Nakamura, Y., 1983, "Change in molecular weight distribution in starch when degraded at different temperatures in *Chlorella vulgaris*", Plant Sci Lett, 30, 259-265.
- [31] Nakamura, Y. and Imamura, M., 1983, "Change in properties of starch when photosynthesized at different temperatures in *Chlorella vulgaris*", Plant Sci Lett, 31, 123-131.
- [32] Ogbonda, K.H., Aminigo, R.E. and Abu, G.O., 2007, "Influence of temperature and pH on biomass production and protein biosynthesis in a putative *Spirulina* sp", Bioresour Technol, 98, 2207-2211.
- [33] Provasoli, L., McLaughlin, J.J.A. and Droop, M.R., 1957, "The development of artificial media for marine algae", Arch Mikrobiol, 25, 392-428.
- [34] Priyadarshani, I. and Rath, B., 2012, "Commercial and industrial applications of micro algae—A review", J algal biomass utln, 3, 89-100.
- [35] Priya, K., 2013, "Induction of bioactive compound composition from marine microalgae (*Lyngbya* sp.) by using different stress condition", J Coast Life Med, 1, 205-209.
- [36] Raven, J.A. and Geider, R.J., 1988, "Temperature and algal growth", New Phytol. 110, 441-461.
- [37] Ren, H.Y., Liu, B.F., Ma, C., Zhao, L. and Ren, N.Q., 2013, "A new lipid-rich microalga *Scenedesmus* sp. strain R-16 isolated using Nile red staining: effects of carbon and nitrogen sources and initial pH on the biomass and lipid production", Biotechnol Biofuels, 6, 1.
- [38] Siaut, M., Cuine, S., Cagnon, C., Fessler, B., Nguyen, M., Carrier, P., Beyly, A., Beisson, F., Triantaphylides, C., Li-Beisson, Y.H. and Peltier, G., 2011, "Oil accumulation in the model green alga *Chlamydomonas reinhardtii*, characterization, variability between common laboratory strains and relationship with starch reserves", BMC Biotechnol, 11.
- [39] Schenk, P.M., Thomas-Hall, S.R., Stephens, E., Marx, U.C., Mussgnug, J.H., Posten, C. and Hankamer, B., 2008, "Second generation biofuels, high-efficiency microalgae for biodiesel production", Bioenergy Res, 1, 20-43.
- [40] Subhadra, B. and Edwards, M., 2010, "An integrated renewable energy park approach for algal biofuel production in USA", Energy Policy, 38, 4897-4902.
- [41] Takagi, M. and Yoshida, T., 2006, "Effect of salt concentration on intracellular accumulation of lipids and triacylglyceride in marine microalgae *Dunaliella* cells", J Biosci Bioeng, 101, 223-226.
- [42] Tkachuk, R., Mellish, V.J., Daun, J.K. and Macri, L.J., 1988, "Determination of chlorophyll in ground rapeseed using a modified near infrared reflectance spectrophotometer", J Am Oil Chem Soc, 65, 381-385.
- [43] Vonshak, A., Kancharaksa, N., Bunnag, B. and Tanticharoen, M., 1996, "Role of light and photosynthesis on the acclimation process of the cyanobacterium *Spirulina platensis* to salinity stress", J Appl Phycol, 8, 119-124.
- [44] Vonshak, A. and Torzillo, G., 2004, "Environmental Stress Physiology", In Handbook of Microalgal Culture, Richmond, A, Ed, Blackwell, Oxford, UK, 2004, pp. 57-82.
- [45] Widjaja, A., Chien, C.C. and Ju, Y.H., 2009, "Study of increasing lipid production from fresh water microalgae *Chlorella vulgaris*", J Taiwan Inst Chem Eng. 40, 13-20.
- [46] Wellburn, A.R., 1994, "The spectral determination of chlorophylls *a* and *b*, as well as total carotenoids, using various solvents with spectrophotometers of different resolution", J Plant Physiol, 144, 307-313.

- [47] Yao, C.H., Ai, J.N., Cao, X.P. and Xue, S., 2013, "Salinity manipulation as an effective method for enhanced starch production in the marine microalga *Tetraselmis subcordiformis*", *Bioresource Technol*, 146, 663-671.
- [48] Yilancioglu, K., Cokol, M., Pastirmaci, I., Erman, B. and Cetiner, S., 2014, "Oxidative stress is a mediator for increased lipid accumulation in a newly isolated *Dunaliella salina* strain", *PLoS One*, 9, e91957.
- [49] Zhu, C.J., Lee, Y.K. and Chao, T.M., 1997, "Effects of temperature and growth phase on lipid and biochemical composition of *Isochrysis galbana* TK1", *J Appl Phycol*, 9, 451-457.
- [50] Zhu, C.J. and Lee, Y.K., 1997, "Determination of biomass dry weight of marine microalgae", *J Appl Phycol*, 9, 189-194.
- [51] Zhila, N.O., Kalacheva, G.S. and Volova, T.G., 2011, "Effect of salinity on the biochemical composition of the alga *Botryococcus braunii* Kütz IPPAS H-252", *J Appl Phycol*, 23, 47-52.

---

Received 29 June 2016

Revised 14 July 2016

Accepted 5 August 2016