

<https://doi.org/10.15433/ksmb.2019.11.2.081>

ISSN 2383-5400 (Online)

낙동강 수계에서 분리한 녹조류 2종의 질소와 인의 결핍에 따른 생장 및 지방산 변화 연구

Effects of Nitrogen and Phosphorus Starvation on Growth and Fatty Acid Production in Newly Isolated Two Freshwater Green Microalgae from Nakdonggang River

임경준^{1,†}, 박한울^{2,†}, 이창수³, 조복연⁴, 남승원¹, 이철균⁵, 김지훈^{3,*}

Kyung June Yim^{1,†}, Hanwool Park^{2,†}, Chang Soo Lee³, Bok Yeon Jo⁴, Seung Won Nam¹, Choul-Gyun Lee⁵, Z-Hun Kim^{3,*}

¹전임연구원, 국립낙동강생물자원관 미생물연구실, 상주시, 경상북도, 37242, 대한민국

²박사후연구원, 인하대학교 해양과학·생물공학과, 인천광역시, 22212, 대한민국

³선임연구원, 국립낙동강생물자원관 미생물연구실, 상주시, 경상북도, 37242, 대한민국

⁴전임연구원, 국립낙동강생물자원관 산업화지원실, 상주시, 경상북도, 37242, 대한민국

⁵교수, 인하대학교 해양과학·생물공학과, 인천광역시, 22212, 대한민국

^{1,3}Microbial Research Department, Nakdonggang National Institute of Biological Resources, Sangju-si, Gyeongsangbuk-do, 37242, Republic of Korea

^{2,5}Department of Marine Science & Biological Engineering, Inha University, Incheon-si 22212, Republic of Korea

⁴Bioresources Industrialization Support Department, Nakdonggang National Institute of Biological Resources, Sangju-si, 37242, Gyeongsangbuk-do, Republic of Korea

[†]Both authors contributed equally to this work

(Received 21 November 2019, Revised 8 December 2019, Accepted 12 December 2019)

Abstract In this study, effects of nitrogen (N) and phosphorus (P) starvation on the cell growth and fatty acid (FA) production of newly isolated freshwater microalgae were investigated. The microalgae were identified as *Chlorella* sp. and *Parachlorella* sp. through 18S rRNA sequencing. Optimal culture temperature and light intensity were investigated using a high-throughput photobioreactor, and the result was validated in 0.5 L bubble column photobioreactors using BG-11 without NaNO₃ and/or K₂HPO₄. Under nutrient starvation conditions, total FA contents of the microalgae were significantly changed rather than FA composition. Starvation of both N and P was most effective for increasing FA contents in *Parachlorella* sp (24.4±0.1%) whereas highest FA contents (42.6±1.8%) was achieved when only P was starved in *Chlorella* sp. among tested conditions. These results suggest an effective strategy for increasing FA production from microalgae using appropriate nutrient starvation.

Keywords : microalgae, nutrient stress, *Chlorella*, *Parachlorella*, fatty acid

서 론

미세조류는 수서환경에서 이산화탄소, 물, 무기

영양염 및 태양에너지를 이용하여 생장을 하며, 무기탄소를 흡수 및 고정할 수 있는 광합성 미생물이다. 지구 생태계의 1차 생산자이며, 전체 생산의 약

* Corresponding author
Phone: +82-54-530-0841 Fax: +82-54-530-0849
E-mail: kimzhun@nnibr.re.kr

This is an open-access journal distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial License (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/>)

절반을 담당하고 있다. 육상식물보다 빠른 광합성 작용을 통해 지구 탄소 순환에 중요한 역할을 하여 지구 대기환경에 큰 영향을 미친다고 알려져 있다 [1,2]. 산업적으로 불포화 지방산, 단백질, 색소 등과 같은 고부가가치 생리활성물질 생산과 대량배양이 용이하다는 장점을 통해 바이오에너지, 건강보조식품, 화장품, 식약품 등으로 활용 가치가 더욱 높아지고 집중적인 연구가 활발히 진행 중에 있다[3-5].

최근 들어 급격하게 상승한 대기 중 이산화탄소 농도는 인류와 생태계에 심각한 위협이 되고 있다. 이러한 이산화탄소 농도는 대부분이 화석연료의 과도한 사용에 기인한 것이다. 이와 동시에 현대 산업 사회를 떠받치는 화석연료의 감소로 인해 이를 대체할 미래의 에너지원에 대한 연구가 활발히 진행되고 있다. 대기 중의 이산화탄소를 감소시키는 동시에 지속 가능한 미래의 에너지원으로 미세조류가 큰 관심을 받고 있다[6,7]. 미세조류는 육상 식물에 비해 고효율의 광합성 기구(photosynthetic apparatus)를 이용하여 대기 중의 이산화탄소를 고정하여 에너지 밀도가 높은 유기물(e.g., 탄수화물, 지질)을 생산하여 두 문제를 동시에 해결할 수 있는 생물자원으로 집중적인 연구가 진행 중이다.

미세조류의 주요한 장점으로는 1)육상식물 성장에 부적합한 척박한 환경에서도 생장이 가능하며, 2)성장속도가 2~3배 높다. 또한 3)배양조건에 따라 미세조류의 체내에 바이오디젤 (biodiesel)로 전환이 가능한 지질의 함량을 70%까지 축적할 수 있다[8]. 따라서 미세조류의 세포 특성분석을 통해 성장 속도를 향상시키고 및 세포 내 지질의 함량과 생산성을 높이는 배양조건을 제공하는 것이 중요하다.

미세조류로부터 지질 생산을 증대시키기 위해 다양한 환경 인자가 영향을 미친다고 보고하고 있다. 미세조류의 성장과 지방산 생산은 환경조건(pH, 온도, 광도), 영양염의 농도(질소, 인), 염도 등에 영향을 받으며, 특히 배지 조성은 세포의 성장과 지질 합성에 큰 영향을 미친다[9-11].

예를 들어, *Chlorella vulgaris* 배양 시 질소와 인의 농도에 따라 지질생산성이 약 50% 차이를 보였으며, *Scenedesmus dimorphus*의 경우 배지 내 인성분의 결핍을 통해 지질의 함량과 생산성을 동시에 증가시킬 수 있다고 보고하고 있다[12]. 환경스트레스 인자 중 질소, 인 결핍, 광원 등에 따른 미세조류의 성장 및

지방산 생산에 미치는 영향에 관한 다양한 연구가 진행되었으나, 미세조류는 같은 종이라고 하더라도 서식환경에 따라 생리적 특성 다르며, 동일한 환경스트레스에 다른 반응을 보이기도 한다[13]. 따라서 가장 효과적인 환경스트레스를 탐색하고 적용하는 것이 지질 생산성 증대에 효과적일 것이다.

본 연구에서는 낙동강 수계에서 분리한 녹조류인 *Chlorella sp.*와 *Parachlorella sp.*를 이용하여 질소와 인의 결핍조건에서 성장, 지방산의 함량과 생산성에 미치는 연구를 진행하고자 하였다. 이를 통해 효과적인 스트레스 인자를 선별하여 고지질 미세조류 생산에 적용하고자 한다.

재료 및 방법

미세조류 분리 및 동정

본 연구에 사용된 미세조류를 분리하기 위해 경상북도 낙동강 상주보(36°26'02.6"N128°14'54.3"E)에서 담수 시료를 채집하였다. 채집한 담수 시료는 광학현미경 관찰을 통해 Pasteur pipette을 이용하여 단일종을 분리하였다. 배양배지는 미세조류 배양에 널리 사용되는 BG-11 배지를 사용하였다. 배지의 조성은 NaNO₃ 1.5 g/L, K₂HPO₄ 0.04 g/L, MgSO₄·7H₂O 0.075 g/L, CaCl₂·2H₂O 0.036 g/L, Citric acid 0.006 g/L, Ferric ammonium citrate 0.006 g/L, EDTA (disodium magnesium salt) 0.001 g/L, Na₂CO₃ 0.02 g/L, Trace-metal mix A5 (H₃BO₃ 2.86 g, MnCl₂·4H₂O 1.81 g, ZnSO₄·7H₂O 0.222 g, Na₂MoO₄·2H₂O 0.39 g, CuSO₄·5H₂O 0.079 g, Co(NO₃)₂·6H₂O 0.0494 g/L) 1 mL 121°C, 1.5기압에서 15분간 멸균한 뒤 사용하였다. 분리된 미세조류는 형태적 관찰을 위해 광학현미경 (Nikon Eclipse Ni-U, Nikon, Tokyo, Japan)을 이용하였다. 정확한 종 동정을 위하여 18S rRNA sequence 분석을 하였다. 18S rRNA 유전자 분석은 코스모진택(주)에 의뢰하여 수행하였다. 염기서열 분석은 미국 국립생물공학정보센터(NCBI)의 nucleotide BLAST search를 이용하였으며, MEGA6 소프트웨어를 사용하여 계통도를 작성하였다[14].

미세조류 최적 광도 및 온도 배양조건 탐색

신규로 분리·동정된 미세조류의 온도와 광도별 배

양조건 탐색을 위해 고처리 광생물반응기 (PhotoBiobox; Shinhwa Science, Daejeon, Korea)를 이용하였다[15]. 분리된 미세조류는 BG-11 배지에서 OD₆₈₀ 1.0까지 배양하였으며 배양된 미세조류는 BG11 배지로 희석하여 OD₆₈₀ 0.5로 조절한 후, 24-well culture plate (Eppendorf, Hamburg, Germany)에 접종하였다. 2종의 미세조류는 온도 10°C에서 35°C로 설정하였으며, 광도의 경우 75 ~ 750 μmol/m²/s로 각각 2일 동안 배양하였다. 배양 후 microplate absorbance reader (Multiskan GO Microplate Spectrophotometer, Thermo Scientific, Vantaa, Finland)를 이용하여 배양전과 후의 흡광도 값을 파장 680 nm에서 측정하여 성장성을 비교하였다.

질소와 인 결핍에 따른 성장 및 지질 변화

배지내의 질소와 인의 유무에 따른 미세조류 성장 및 지방산 생산 변화를 분석하기 위해 Table 1과 같이 배지를 준비하여 배양하였다. 질소 또는 인 결핍 조건은 NaNO₃와 K₂HPO₄를 제거된 BG-11 배지에서 NaNO₃ 1.5 g/L와 K₂HPO₄ 0.04 g/L를 각각 첨가하여 배양하였고, 질소와 인 결핍조건은 NaNO₃와 K₂HPO₄를 제거한 배지에서 배양하였다. 배양 조건은 고처리 광생물반응기를 통해 결정된 최적 배양조건인 *Chlorella* sp.의 경우 온도 25±1°C, 광도 300 μmol/m²/s의 조건에서 배양하였고, *Parachlorella* sp.는 온도 22±1°C, 광도 300 μmol/m²/s의 조건에서 0.5 L 원통형 광생물반응기를 이용하여 배양하였다. 5% 이산화탄소 가스를 반응기 하단부로부터 0.1 vvm속도로 공급하였다.

Table 1. Experimental condition of nitrogen and phosphorus starvation in BG-11 media for this study

Item	Control	N-/P+	N+/P-	N-/P-
N in BG-11 (247 mg/L)	+	-	+	-
P in BG-11 (7.1 mg/L)	+	+	-	-

두 미세조류의 질소와 인의 결핍조건에 따른 성장성과 지방산 생산에 대한 영향을 평가하기 위해 균체를 3,000 rpm, 15분간 원심 분리하여 균체만을 회수하였다. 균체에 남아 있는 질소와 인 성분을 제거

하기 위해 증류수를 이용하여 세척 후 다시 원심 분리하였다. 이 과정을 2회 반복한 뒤 질소와 인이 결핍된 BG-11배지에 접종하여 같은 배양조건으로 실험을 진행하였다. 샘플은 24시간 간격으로 O.D₆₈₀ 측정을 통해 성장을 분석하였다. 각 조건에서 추가적으로 4일 동안 배양한 뒤 배양액에서 세포만을 수집하여 지방산 분석을 수행하였다.

지질 추출 및 GC 분석

균체 내 지방산을 직접 전이에스테르화법으로 측정하였고, fatty acid methyl ester(FAME) 양으로 나타내었다. 녹조류 2종의 스트레스 처리된 각각의 배양액 400 mL를 채취하여 고속원심분리기를 이용하여 3,000 rpm에서 20분간 원심분리를 통해 바이오매스를 수확하였다. 수확된 바이오매스는 잔류 염분을 제거하기 위해 증류수로 2회 세척하고 원심분리를 2회 반복하였고, 동결건조기를 이용하여 2일 동안 건조시켰다. 동결 건조된 세포 20 mg과 내부표준물질인 C_{19:0} 지방산(Supelco, Bellefonte, PA, USA)을 2 mL의 5%(w/v) 아세틸클로라이드(acetyl chloride)/메탄올(methanol)과 혼합 후 오븐에 80°C에서 1시간 동안 반응시켰다. 반응이 끝난 후 2 mL의 n-hexane을 넣어 FAME을 추출하였다. FAME 함량과 지방산 조성은 기체 크로마토그래프(gas chromatograph; Acme 6000 GC, Younglin, Seoul, Korea)를 이용해 분석하였다. 지방산 분석을 위해 capillary column (HP-INNOWax, Agilent, CA, USA)을 이용하였고, 유량 3 mL/min의 헬륨가스를 이동상으로 이용하였다. 오븐의 분석조건은 초기 오븐 온도 140°C에서 1분간 정치하여 240°C까지 5 °C/min로 승온하여 최종온도에서 10분간 정치하였다. FAME의 정성분석을 위해 FAME standards mixture (F.A.M.E. MixC4-C24, SUPELCO, Bellefonte, PA, USA)와 미세조류 유래 FAME의 체류 시간을 비교하였다.

결과 및 고찰

미세조류 균주의 분리 및 동정

녹조류 2종은 낙동강 상주보 인근 담수 시료로부터 Pasteur pipette을 이용하여 단일 종을 분리한 다음 광학현미경을 통해 형태학적 분류를 수행하였다. 형

태를 관찰한 결과, *Chlorella* sp.는 직경 약 3.3±1.2 μm의 구형의 형태를 보였으며, *Parachlorella* sp.는 약 5.2±2.1 μm의 타원형의 형태로 관찰되었다(Figure 1a and 1b). 또한 진핵 미세조류 분류의 신뢰성을 높이기 위해 18S rRNA의 염기서열의 계통도 분석을 하였다. 결과는 Figure 1c와 같이 *Chlorella* sp.는

Chlorella sp. YACCYB105(MH619552)와 가장 높은 유사도를 보였으며, *Parachlorella* sp.는 *Parachlorella hussii* ACOI 473(HM126550)과 가장 높은 유사도를 타나냈다. 18S rRNA 염기서열 분석을 통해 녹조류 2종은 *Chlorella* sp.,와 *Parachlorella* sp.로 각각 명명하였다.

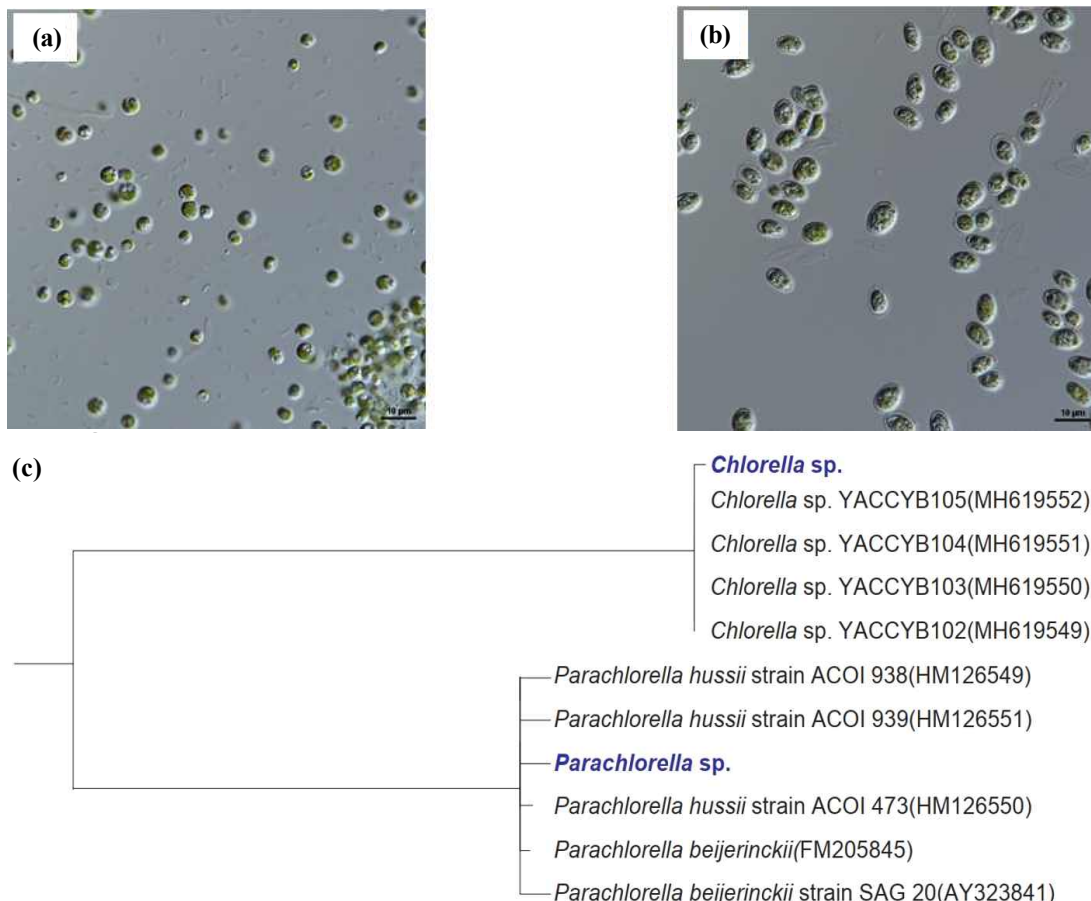


Figure 1. Microscope figures x1000 of *Chlorella* sp. (a) and *Parachlorella* sp. (b) isolated from Nakdonggang River. Phylogenetic Analysis of the 18S rDNA of *Chlorella* sp. and *Parachlorella* sp. isolated from Nakdonggang River (c).

최적 배양조건 탐색

녹조류 2종의 최적 온도 및 광을 탐색하기 위해 고처리 광생물반응기를 이용하여 온도 10 ~ 35°C, 광도 75 ~ 500 μmol/m²/s의 조건에서 각각 2일 동안 배양하였다. 온도별 탐색에서 *Chlorella* sp.와 *Parachlorella* sp.는 25±1°C, 300 μmol/m²/s, 22±1°C, 300 μmol/m²/s에서 각각 가장 높은 성장 속도를 보였다(Figure 2). 상기 실험에서 얻은 결과를 질소와 인의 결핍에 따른 성장성 및 지방산 생산실험에 적용하였다.

질소와 인의 결핍에 따른 미세조류 성장 및 지방산 분석

질소는 미세 조류의 필수 성분으로, 단백질과 같은 세포 구조에 필요한 단백질과 클로로필 등의 합성에 구성성분으로 이용된다. 인 성분은 질소와 마찬가지로 미세조류 대사에 중요한 세포분열, 생체에너지 생산 등 다양한 생합성과 반응에 참여하는 중요 요소이다. 따라서 두 인자의 결핍은 광합성 과정속에서 생산된 에너지를 질소나 인을 함유하고 있지 않는 화합물의 합성을 촉진시키게 된다(e.g., 지방,

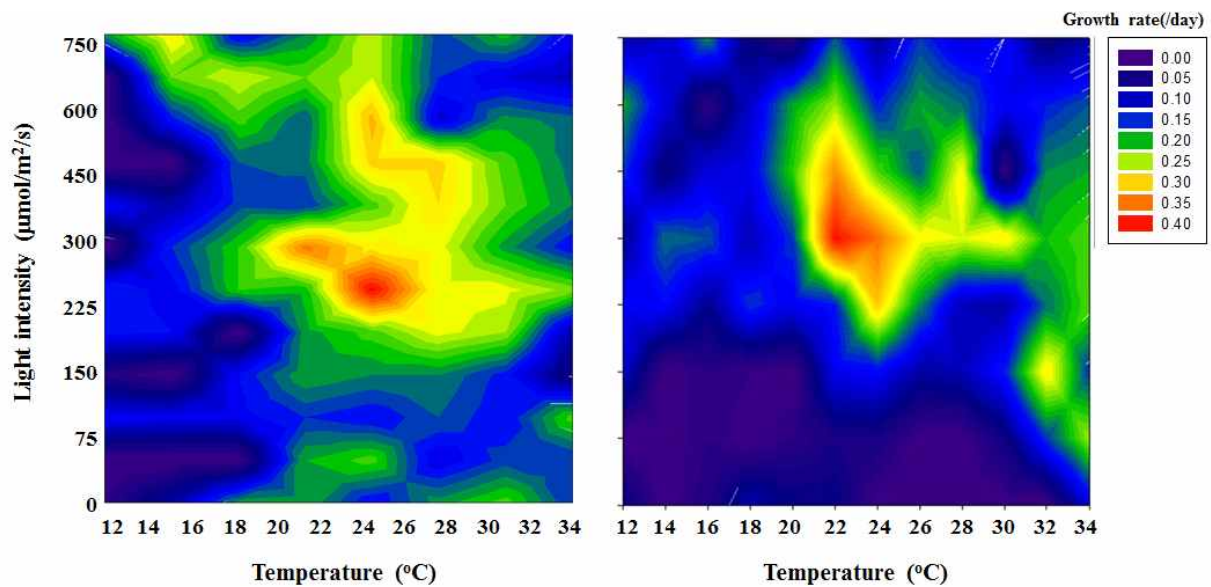


Figure 2. Growth profiles of *Chlorella* sp. (left) and *Parachlorella* sp. (right) under various light intensity and temperature.

탄수화물, 카로테노이드 등). 이는 지방산 생산측면에서 조성과 함량의 변화를 일으키는 중요한 역할을 한다고 보고되고 있다.

미세조류로부터 지방산 생산성을 극대화하기 위해 2단계 배양법이 널리 사용되고 있다. 첫 단계에서는 세포가 빠르게 성장할 수 있도록 스트레스 조건 없이 배양한 뒤 다음 단계로 세포가 정체기 (stationary stage)에 접어들었을 때, 세포를 다양한 스트레스 조건에 노출시켜 성장보다는 세포내 지방산 축적을 극대화하게 된다.

본 실험에서도 마찬가지로 낙동강에서 분리한 녹

조류 2종의 배지 내에 질소와 인의 유무에 따른 차이를 확인하기 위해서 질소와 인이 첨가된 BG-11 배지에서 7일간 배양한 뒤 균체만을 회수하여 NaNO_3 또는 K_2HPO_4 를 제거된 BG-11 배지에 재접종하여 4일간 추가적으로 배양하였다(Figure 3a and 3b의 화살표 참조). *Chlorella* sp.와 *Parachlorella* sp.의 7일간 배양으로부터 3.8 g/L와 4.1 g/L의 최대 바이오매스를 각각 얻었을 수 있었다. 이후 결핍배지에서는 예상한 것처럼 두 종 모두 뚜렷한 성장성을 보이지 않았다(Figure 3).

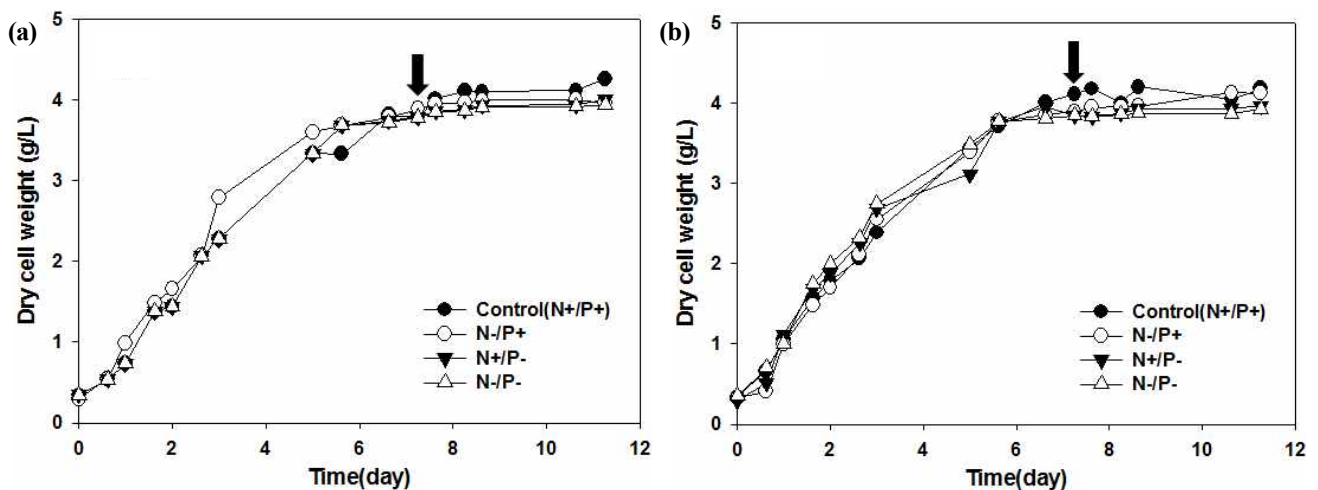


Figure 3. Time profiles of *Chlorella* sp.(a) and *Parachlorella* sp.(b) dry cell weight cultured under nitrogen and/or phosphorus starvation. Symbols: filled circle (●; control), open circle (○; N-/P+), filled inverted triangle (▼; N+/P-), open triangle (△; N-/P-). Arrows indicate point of medium replacement.

Chlorella sp.의 지방산 조성의 경우, 주요한 지방산의 조성은 linoleic acid(C_{18:2}), palmitic acid(C_{16:0}), oleic acid(C_{18:1}) 순으로 많은 것으로 분석되었으며, *Parachlorella* sp.의 주요한 지방산의 조성은 palmitic acid (C_{16:0}), linolenic acid (C_{18:3}), oleic acid (C_{18:1}) 순으로 많은 것으로 분석되었다(Figure 4a). 녹조류 2종 모두 질소와 인을 첨가한 배양 조건보다 질소 또는 인의 결핍 배양 조건에서 포화 지방산 비율이 감소하는 반면, 불포화 지방산 비율은 증가하였다. 질소 또는 인의 결핍조건에서 배양시 특징적인 것은 *Chlorella* sp.의 포화 지방산인 palmitic acid 비율 변화와 *Parachlorella* sp.의 불포화 지방산인 oleic acid 비율 변화이다(Figure 4a). *Chlorella* sp.는 질소 결핍 조건에서 24.9±0.3%의 높은 palmitic acid 비율을 가지며, *Parachlorella* sp.는 질소 결핍조건과 질소와 인의 결핍조건에서 oleic acid 비율이 각각 38.3±0.4%, 37.8±0.1%로 높은 것을 확인하였다. 질소 성분의 제한을 통해 *Botryococcus braunii* 균주를 배양 시 oleic acid의 함량이 증가되었다고 보고된 바 있으며[16], 이는 *Parachlorella* sp.의 질소 또는 인의 결핍 조건에서 oleic acid의 비율이 증가하는 것과 일치한다. 이 결과를 통해 미세조류의 특정 지방산을 생산 시 질소 또는 인의 결핍 조건에서 배양하여 생산하는 것이 효과적이라고 판단된다.

또한 질소와 인의 결핍에 따른 총지질의 지방산 조성은 Figure 4b에 나타낸 바와 같이 *Chlorella* sp.는 인 결핍조건에서 지방산 조성 비율이 42.7±1.8%로 가장 높았으며, *Parachlorella* sp.는 질소와 인의 결핍 조

건에서 지방산 조성 비율이 가장 높았다. 기존의 문헌에서 미세조류의 경우 질소 또는 인 결핍 조건에서 세포내의 탄수화물, 단백질, 지질 등이 증가한다고 알려져 있으며, 이는 본 연구의 결과와 일치한다. 이러한 결과는 미세조류의 지방산 생산 시 질소와 인 첨가한 배양 조건보다 질소 또는 인의 선택적 첨가를 통해 지방산을 생산하는 것이 효과적이라고 판단된다.

녹조류 2종의 질소와 인의 결핍에 따른 총 지방산 조성은 Figure 4b에 나타낸 바와 같이 *Chlorella* sp.는 인 결핍조건에서 지방산 함량이 42.7±1.8%로 가장 높았으며, *Parachlorella* sp.는 질소와 인의 결핍 조건에서 지방산 함량(24.4±0.1%)이 가장 높았다. 전술한 것처럼, 질소나 인의 결핍조건에 대한 미세조류의 지방산 함량의 변화가 모두 긍정적인 영향을 미치는 것은 아니다. *Chlamydomonas reinhardtii*를 이용한 연구결과에 따르면, 질소나 인의 단독결핍조건은 총지질 및 지방산 생산성을 높이는 것으로 나타났으나, 이와는 반대로 복합결핍조건은 지질생산성을 오히려 낮추는 것으로 나타났다[17]. 질소 성분 조절을 통해 *Neochloris oleabundans* 균주를 배양 시 질소원의 농도가 낮을수록 지질 함량이 증가되었다고 보고하였다[18]. 반면 *Chlorella* 종은 인 결핍이나 부족한 조건에서도 지방산 조성이나 바이오매스당 생산량에 크게 영향을 주지 않음이 보고된 바 있다[19]. 이러한 점은 같은 스트레스 조건이라고 하더라도 종마다 다른 결과를 보이기 때문에 효율적인 스트레스 조건을 실험적으로 규명하는 것이 중요하다는 것을 보여주고 있다.

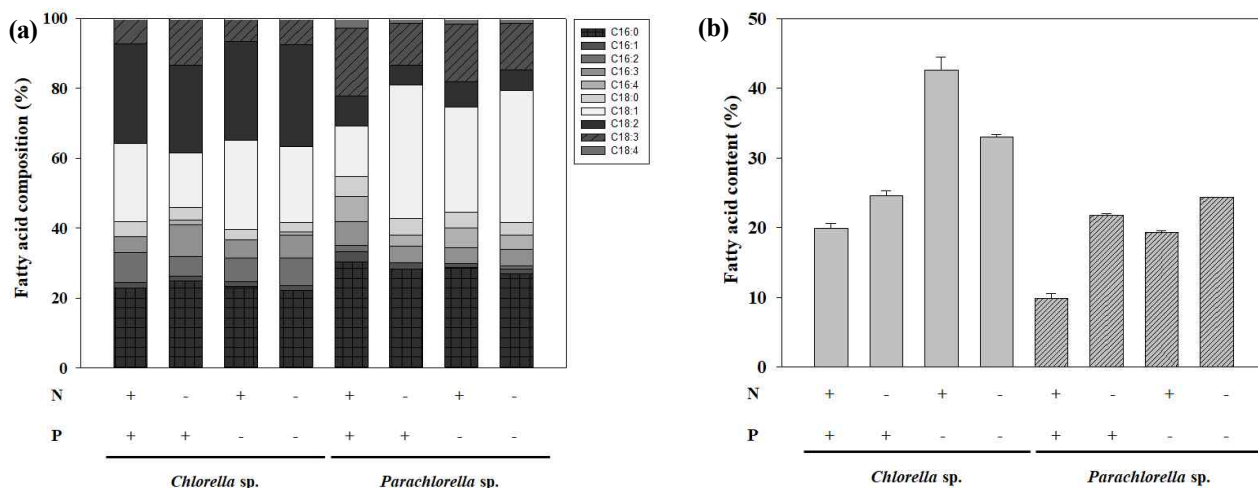


Figure 4. Fatty acid composition (a) and content (b) of *Chlorella* sp. and *Parachlorella* sp. cultured under nitrogen and/or phosphorus starvation.

결론

질소, 인, 광원 등 단일 스트레스 인자에 대한 미세조류의 성장과 지방산 생산 연구는 많이 진행되어 있는데 반해, 복합적인 스트레스를 통한 미세조류의 성장과 지방산의 변화 연구는 미비하다. 본 연구에서는 낙동강 상주보에서 녹조류 2종을 분리·동정하였으며, 분리한 2종의 배지 내 질소 또는 인의 단일과 복합결핍 조건에 따른 성장과 지방산의 변화에 대해 분석하고자 하였다. 연구 결과로부터 *Chlorella* sp.는 인 결핍 조건에서 그리고 *Parachlorella* sp.는 질소와 인의 복합결핍조건이 지방산 생산에 가장 효과적인 것으로 나타났다. 또한 질소 또는 인 결핍 조건에 따른 불포화 지방산의 조성변화는 미세조류 유래 지방산 생산 시 특정 지방산의 생산을 촉진시키거나 전체 지방산의 생산성을 향상시키는데 기여할 수 있을 것으로 판단된다.

감사의 글

이 연구는 환경부의 재원으로 국립낙동강생물자원관에서 지원을 받아 수행된 연구입니다 (NNIBR201902113).

References

1. Benemann, J. R. 1997. CO₂ mitigation with microalgae systems. *Energ. Convers. Manage.* **38**, S475-S479.
2. Wang, B., Y. Li, N. Wu, CQ, Lan. 2008. CO₂ bio-mitigation using microalgae. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **79**, 707-718.
3. Borowitzka, M. A. 2013. High-value products from microalgae—their development and commercialisation. *J. Appl. Phycol.* **25**, 743-756.
4. Joshi, S., R. Kumari and V. N. Upasani. 2018. Applications of algae in cosmetics: An overview. *Int. J. Innov. Res. Sci. Eng. Technol.* **7**, 1269-1278.
5. Kim, Z.-H., H. Park, Y.-J. Ryu, D.-W. Shin, S.-J. Hong, H.-L. Tran, S.-M. Lim, and C.-G. Lee. 2015 Algal biomass and biodiesel production by utilizing the nutrients dissolved in seawater using semi-permeable membrane photobioreactors. *J. Appl. Phycol.* **27**, 1763-1773.
6. Baicha, Z., M.J. Salar-García, V.M. Ortiz-Martínez, F.J. Hernández-Fernández, A.P. De los Ríos, N. Labjar, E. Lotfi and M. Elmahi. 2016. A critical review on microalgae as an alternative source for bioenergy production: A promising low cost substrate for microbial fuel cells. *Fuel Process. Technol.* **154**, 104-116.
7. Park, H., and C. -G. Lee. 2016. Theoretical calculations on the feasibility of microalgal biofuels: utilization of marine resources could help realizing the potential of microalgae. *Biotechnol. J.* **11**, 1461-1470.
8. Duong, V. T., F. Ahmed, S. R. Thomas-Hall, S. Quigley, E. Nowak, and P. M. Schenk, 2015. High protein-and high lipid-producing microalgae from northern Australia as potential feedstock for animal feed and biodiesel. *Front. Bioeng. Biotechnol.* **3**, 53.
9. Solovchenko, A., I. Khozin-Goldberg, S. Didi-Cohen, Z. Cohen, and M. Merzlyak. 2008. Effects of light intensity and nitrogen starvation on growth, total fatty acids and arachidonic acid in the green microalga *Parietochloris incisa*. *J. Appl. Phycol.* **20**, 245-251.
10. Kim, Z.-H, Lee, H.-S. and C.-G. Lee. 2009. Red and Blue Photons Can Enhance the Production of Astaxanthin from *Haematococcus pluvialis*. *Algae* **24**, 121-127.
11. Benvenuti, G., R. Bosma, M. Cuaresma, M. Janssen, M. J. Barbosa, and R.H. Wijffels. 2015. Selecting microalgae with high lipid productivity and photosynthetic activity under nitrogen starvation. *J. Appl. Phycol.* **27**, 1425-1431.
12. Takeshita, T., S. Ota, T. Yamazaki, A. Hirata, V. Zachleder, and S. Kawano. 2014. Starch and lipid accumulation in eight strains of six *Chlorella* species under comparatively high light intensity and aeration culture conditions. *Bioresour. Technol.* **158**, 127-134.
13. Ruangsomboon, S., M. Ganmanee, and S. Choochote. 2013. Effects of different nitrogen, phosphorus, and iron concentrations and salinity on lipid production in newly isolated strain of the tropical green microalga, *Scenedesmus dimorphus* KMITL. *J. Appl. Phycol.* **25**, 867-874.
14. Tamura, K., G. Stecher, D. Peterson, A. Filipski, and S. Kumar. 2013. MEGA6: molecular evolutionary genetics analysis version 6.0. *Mol. Biol. Evol.* **30**, 2725-2729.
15. Heo, J., Cho, D.-H., R. Ramanan, Oh, H.-M., and Kim, H.-S. 2015. PhotoBiobox: A tablet sized, low-cost, high throughput photobioreactor for microalgal screening and culture optimization for growth, lipid content and CO₂ sequestration. *Biochem. Eng. J.* **103**, 193-197.
16. Choi, G.-G., Kim, B.-H., Ahn, C.-Y., and Oh, H.-M. 2011. Effect of nitrogen limitation on oleic acid biosynthesis in *Botryococcus braunii*. *J. Appl. Phycol.* **6**, 1031-1037.
17. Kamalanathan, M., M. Pierangelini, L. A. Shearman, R. Gleadow, and J. Beardall. 2016. Impacts of nitrogen and phosphorus starvation on the physiology of *Chlamydomonas reinhardtii*. *J. Appl. Phycol.* **28**, 1509-1520.

18. Li, Y., M. Horsman, B. Wang, N. Wu, and C. Q. Lan. 2008. Effects of nitrogen sources on cell growth and lipid accumulation of green alga *Neochloris oleabundans*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **81**, 629-636
19. Woo, S.-G., and Park, J.-H. 2012. Effects of phosphorus starvation on fatty acid production by microalgae cultivated from wastewater environment. *KSCE. J. Civ. Eng.* **4**, 253-259.