발광다이오드 광량 및 파장에 따른 Chlorella vulgaris의 생장 및 생화학적 조성 변화 연구

한지승 · Peiiin Li · 최태진¹ · 오석진*

부경대학교 지구환경시스템과학부 해양학전공, 1부경대학교 미생물학과

Effects of the Spectral Quality and Intensity of Light-Emitting Diodes on Growth and Biochemical Composition of Chlorella vulgaris

Ji Seung Han, Peijin Li, Tae-Jin Choi¹ and Seok Jin Oh*

Division of Earth and Environmental System Science, Pukyong National University, Busan 48513, Republic of Korea ¹Department of Microbiology, Pukyong National University, Busan 48513, Republic of Korea

Growth responses of Chlorella vulgaris exposed to different light intensities and wavelengths of light-emitting diodes (LEDs) were investigated. C. vulgaris was cultured under red LED (650 nm), blue LED (450 nm), green LED (520 nm), and fluorescent lamps (three wavelengths, control). The maximum growth rates (μ_{max}) of C. vulgaris were highest under the blue LED, followed by the red LED, green LED, and fluorescent lamps. The low compensation photon flux density (I₀) and low half-saturation constants (K₂) were observed in C. vulgaris cultured under the red LED, indicating that high C. vulgaris growth is closely related to the low light intensity of the red LED suggesting that the red LED can be useful for the biomass production of C. vulgaris. Furthermore, it was observed that under the blue LED during the stationary phase, there was an increase in useful bioactive substances, such as proteins and lipids, which are beneficial for biomass production. In conclusion, the red LED is an economical light source that can enhance cell density, and the blue LED is effective in promoting valuable intracellular substances.

Keyword: Chlorella vulgaris, LED, Protein, Lipid, Growth

서 론

최근 바이오테크(biotechnology, BT) 분야를 색으로 구분하 고 있다. 바이오 에너지를 생산하는 화이트 바이오테크(white Biotechnology, WBT), 세포 내 영양물질을 추출하여 의약품 및 식품의 원료로 사용하는 레드 바이오테크(red biotechnology, RBT) 그리고 생활·산업 폐수 및 슬러지를 정화하고 식량 자원의 문제를 해결할 수 있는 그린 바이오테크(green biotechnology, GBT) 등으로 나뉘며, 미세조류는 빛, 물과 이산화탄소 와 같은 무기물을 유기물로 합성하기 때문에 생태계에서도 중 요하지만, BT 산업 전반에도 기여를 하고 있다(Bentahar et al., 2023). 미세조류의 상업적 이용을 위해서는 대량배양이 필수 적이며, 대량배양 방법에는 개방형과 밀폐형 배양장치로 나눌 수 있다(Chio et al., 2007). 개방형 배양장치는 유지비와 운전

*Corresponding author: Tel: +82. 51. 629. 6576 Fax: +82. 51. 629. 6568

E-mail address: sjoh1972@pknu.ac.kr

(cc)

This is an Open Access article distributed under the terms of $(\mathbf{\hat{s}})$ the Creative Commons Attribution Non-Commercial License BY NC (http://creativecommons.org/licenses/by-nc/3.0/) which permits unrestricted non-commercial use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

비가 저렴하고 단순하다는 장점이 있으나, 배양환경 조절이 어 렵고, 오염물질의 유입가능성이 크다는 단점을 가지고 있다(Javanmardian and Palsson, 1991; Chio et al., 2012). 밀폐형 배양 법 중 광생물반응기(photo-bioreactor, PB)는 계절적인 변화와 좁은 국토를 가지고 있는 우리나라에서 실효성이 높은 배양법 으로 고려되고 있으며(Gim et al., 2012), 고가의 생리활성물질 을 생산하는 미세조류 배양에 적극 사용되고 있다(Vasudevan and Briggs, 2008). 하지만 PB의 일반적인 광원으로 사용되는 형광램프는 발광체 특성상 부피가 크기 때문에 외부조사에 따 른 낮은 투과성과 운전비용 및 초기 투자 비용이 많이 든다는 단 점을 가지고 있다(Choi et al., 2012). 발광다이오드(light emitting diode, LED)는 최근 미세조류의 배양 효율을 극대화시키 기 위한 광원으로 주목받고 있다. LED는 비소화갈륨(GaAs) 또 는 인화갈륨(GaP)등의 화합물에 전류를 보내 빛을 발산하는 반

https://doi.org/10.5657/KFAS.2023.0878 Korean J Fish Aquat Sci 56(6), 878-888, December 2023

Received 28 August 2023; Revised 20 September 2023; Accepted 20 November 2023 저자 직위: 한지승(대학원생), Peijin Li(대학원생), 최태진(교수), 오석진(교수) 도체로, 소비전력의 5-10%만 빛으로 전환하는 형광램프와 달 리 90%를 빛으로 변환하기에 형광등의 2배, 백열등의 10배 정 도의 밝기를 내며 에너지 효율성에서 큰 장점을 가진다(Park et al., 2013b). 또한 LED는 기존의 발광체 보다 광원의 크기가 작 아 PB 안에 직접적인 배치가 가능해 광원의 전달 효율이 높고 (Carvalho et al., 2011), 광합성에 불필요한 파장까지 조사하 는 형광램프와 달리 광합성에 유리한 파장만을 조사하기 때문 에 미세조류의 영양 및 생장을 강화시켜 상업적으로 유리한 배 양이 가능하다(Lee and Plasson, 1994; Katsuda et al., 2004; Wang et al., 2007).

더욱이 LED는 특정 광도, 파장 및 펄스(pulse) 등을 배양 단계 에 맞게 조사하여, 미세조류 체내의 광합성 색소와 항산화물질, 지질과 같은 유용 생리활성물질의 합성이 촉진된다는 연구 결 과가 다수 보고 되어져 있다(Katsuda et al., 2004; Menon et al., 2013; Xu et al., 2014; Oh et al., 2015). Katsuda et al. (2004) 의 연구에 의하면 녹조류 Haematococcus plucialis는 청색파 장(파장 460 nm) 사용 시, 아스타잔틴(astaxanthin)의 생산효 율이 증가했다고 보고하였으며, Wang et al. (2007)은 남조류 Spirulina platensis가 적색파장(파장 660 nm)에서 배양 효율이 높아진다고 하였다(Wang et al., 2007). 또한 세포 내 지질 함 량이 높아 바이오디젤로 활용되는 녹조류 Botryococcus braunii의 경우 적색, 청색 그리고 녹색파장에 따라서 세포 내 탄수 화물 및 지질의 함량에 변화를 줄 수 있음이 확인되었다(Baba et al., 2012). Fu et al. (2013)는 청색파장과 적색파장를 혼합 한 혼합파장 수행 시 녹조류 Dunaliella salina의 베타-카로틴 (β-Carotene)과 루테인(lutein)의 함량이 높아진다고 하였으며, 저서성 규조류 Nitzschia sp.는 적색과 황색파장보다 청색파장 에서 chlorophyll a (chl-a) 함량이 높아진다고 하였다(Kwon et al., 2013). 또한 Abiusi et al. (2014)의 연구에서도 녹조류 Tetraselmis suecica가 적색파장에서 빠른 생장을 보였지만, 녹색 파장에서 높은 탄수화물 함량을 나타냈으며, Nannochloropsis sp.도 적색파장에서 빠른 생장을 보였지만, 지질 함량은 녹색파 장에서 증가하는 것으로 나타났다(Ra et al., 2016).

한편, 본 연구의 실험종인 *Chlorella vulgaris*는 RBT, GBT 그 리고 WBT의 중요한 재료로 활용되고 있다(Chisti, 2007; Harun et al., 2009; Kumar et al., 2010; Han and Oh, 2023). *C. vulgaris*는 세포 내 탄수화물, 단백질, 지질 및 색소와 같은 유 용물질을 축적하고(Kim et al., 2014a), 미네랄, 비타민, 무기질 및 아미노산 등 각종 영양소가 풍부하여(Safi et al., 2014), 미 래 식량자원의 유력한 후보로 평가되고 있다(Kang et al., 2004; Lee, 2007). 또한 *C. vulgaris* 내에 함유되어 있는 성장 촉진 인 자(chlorella growth factor, CGF)는 뇌졸중 개선 및 예방, 항암 효과(Noda et al., 1996; Justo et al., 2001), 동식물의 CGF, 성 인병 예방 등에 의학적인 효과가 있는 것으로 보고된 바 있다 (Hasegawa et al., 1995). 수산업분야에서도 *C. vulgaris*는 필 수 아미노산과 다중 불포화 지방산이 풍부하여 양식 사료의 사 료 첨가제로 활용되어지고 있으며(Enyidi, 2017), 양식 어류 및 갑각류의 색소침착 개선, 면역 및 항산화 활성에도 효과적이다 (Sergejevová and Masojídek, 2012; Xu et al., 2014).

따라서 본 연구는 *C. vulgaris*의 효과적인 BT 재료를 이해하 기 위해서, 먼저 생장에 미치는 LED 광량과 파장의 영향을 조 사하여, *C. vulgaris*의 생장에 대한 최적의 파장을 파악하였다. 또한 LED 광량 및 파장에 따라 달라지는 탄수화물, 단백질과 지질 함량을 측정하여 유용물질 증진에 효과적인 파장을 파악 하고 토의하였다. 이러한 결과들은 추후 고효율과 기능성을 고 려한 광배양시스템의 개발과 산업적 응용을 위한 기초자료로 활용될 것이라 기대된다.

재료 및 방법

Chlorella vulgaris 배양 조건

본실험에 사용된 조류는 *C. vulgaris* (PKVL7422)로, 배지는 초순수이온수를 바탕으로 한 BG11 (Stanier et al., 1971; Anderson, 2005)를 이용하였다. 유지배양은 수온과 염분이 각각 20°C, 0 psu였으며, 광량은 약 100 µmol/m²/s (12L:12D, coolwhite fluorescent lamp)에서 배양하였다. 모든 배양은 무균화 작업은 수행하지 않았지만, 2차적인 생물학적 오염을 막기 위 하여 실험기구는 고압(202 kPa, 30 min) 또는 건조멸균(185°C, 1 h)하여 사용하였으며, 모든 실험은 무균대(clean bench)에서 수행되었다.

파장에 따른 C. vulgaris의 생장 특이성 파악

파장별 광량에 따른 생장실험을 위한 광원은 복수파장인 형 광램프(삼파장등; Namyung Lighting Corp., Seoul, Korea) 를 이용하였으며, 단일 파장은 청색 파장(λmax=450 nm; LU-MILEDS, Mansfield, TX, USA), 녹색파장(λmax=520 nm; LUMILEDS) 및 적색파장(λmax=660 nm; LUMILEDS)을 이용하였다. 광원별 광량은 가시광선 차단필름을 이용하여 10, 50, 75, 100 그리고 200 µmol/m²/s (QSL-2100; Biospherical Instrument Inc., San Diego, CA, USA)의 5단계로 조절하였으 며 명암주기는 12L (light):12D (dark)가 되도록 하였다. 온도와 염분은 유지배양조건과 동일하였으며, C. vulgaris를 대수 생장 기까지 생장시킨 후 1 L 배양플라스크에 세포밀도는 1.2×105 cells/mL가 되도록 접종하였다. 세포밀도는 건중량(dry cell weight)을 측정하여 계산하였으며, 건중량측정은 세포 배양 액 10 mL을 여과(25 mm, GF/F)한 뒤, 여과지를 dry oven에서 75°C, 2시간 동안 건조하고 무게를 측정하였다. 이후 이틀 간격 으로 건중량을 측정하였다.

생장속도는 대수생장을 보였던 기간의 세포밀도를 이용하여 아래의 식에 대입하여 계산하였다. 각각의 실험은 triplicate 로 수행하였으며, 생장속도는 이의 평균값으로 나타내었다(단, triplication 중 명백히 오류로 판명된 값은 평균시 제외함).

µ, 생장속도(specific growth rate; /day) N₀, N_p, 대수생장기에서 초기와 t시간(day) 후의 건중량 △t, 대수생장기의 기간(day)

생장속도와 광량의 관계는 Lederman and Tett (1981)의 모델 을 개량한 다음 식을 이용하여 계산하였다.

μ, 생장속도(specific growth rate; /day)

μ_{max}, 최대생장속도(maximum specific growth rate; /day) I, 광량(irradiance; μmol/m²/s)

I., 보상광량(compensation photon flux density; μmol/m²/s)

K, 반포화광량(half-saturation light intensity; µmol/m²/s)

C. vulgaris의 생화학적 조성 측정

광량 및 파장 별 생화학적 조성을 측정하기 위해, 광량은 10과 100 μmol/m²/s (L:D=12L:12D)하에서 수행하였으며, 파장은 생장특이성 실험과 같이 청색파장, 녹색파장, 적색파장 그리고 형광등(복수파장)이었다. 온도와 염분은 유지배양 조건과 동일 하였으며, *C. vulgaris*를 대수 생장기까지 생장시킨 후 1 L 배양 플라스크에 세포밀도는 1.2×10⁵ cells/mL가 되도록 접종하였 다. 분석을 위한 시료는 대수생장기 중기와 정상기의 세포 배양 액을 여과(47 mm, GF/F)한 뒤, 여과지를 dry oven (75°C, 2시 간)에서 건조하여 분석시까지 냉암소(-70°C)에서 보관하였다.

탄수화물은 Dubois et al. (1956)에 의거한 phenol-sulfuric acid 방법, 단백질은 Lowry et al. (1951)의 방법 그리고 지질 은 Marsh and Weinstein (1966)의 방법에 따라 전처리 하였다. 또한 탄수화물은 glucose standard, 단백질은 protein standard 그리고 지질은 glycerintripalmitat (tripalmitin)을 표준용액으 로 사용하였으며, 모든 생화학적 조성물질은 전처리 후, 상등액 을 UV/Vis spectrophotometer (Xma-3000PC; Human Cop., Seoul, Korea)를 이용하여 탄수화물(490 nm), 단백질(750 nm) 그리고 지질(360 nm)에서 흡광도를 측정하였다.

결과 및 고찰

C. vulgaris의 파장 별 광량과 건중량의 관계를 보면, 광량과 시간이 증가할수록 건중량이 증가하였으며(Fig. 1), 이는 광량 및 시간의 증가에 따라 세포 밀도가 증가한 것을 의미한다. μ_{max} 는 청색 파장(1.03 /day)과 적색파장(0.95 /day)에서 높았으며, 그 다음으로 녹색파장(0.89 /day), 형광램프(0.83 /day) 순이었 다(Table. 1). 또한 세포가 생장이 가능한 최소 광량, 즉, 호흡 량과 광합성이 같은 광량을 의미하는 I₀는 청색(15.90 μmol/ m²/s)과 적색 파장(11.26 μmol/m²/s)에서 가장 낮게 나타났으 며, 그 다음으로 녹색 파장(21.23 μmol/m²/s)과 형광램프(21.92 μmol/m²/s) 순이었다. 하지만 빛에 대한 친화성(affinity)을 나 타내는 지표 Ks는 적색 파장(47.08 μmol/m²/s)이 청색파장 (137.6 μmol/m²/s)과 비교하여 약 3배 낮게 나타났다(Fig. 2; Table 1).

청색파장에서 높은 생장속도는 녹조류 Nannochloropsis sp. (Das et al., 2011)와 황색편모조류인 Isochrysis galbana (Yoshioka et al., 2012) 등이 보고되었으며, 적색파장에서 높은 생장 속도는 S. platensis (Wang et al., 2007)와 녹조류 C. pyrenoidosa (Chu et al., 2021) 등이 알려져 있다. 또한 Kim et al. (2014b) 는 적색파장에서 생장한 C. vulgaris의 세포밀도는 청색파장보 다 1.5배 더 높았다고 하였으며, Khalili et al. (2015), Lee and Plasson (1994)와 Yan et al. (2013)의 연구에서도 C. vulgaris가 적색파장에서 빠른 생장을 보였다고 하였다. 또한 Habibi and Sibi (2019)는 청색파장(420–450 nm)과 적색파장(660–700 nm)이 C. vulgaris의 생장에 효과적이라고 보고하였다.

청색파장은 광합성 및 에너지 활성화에 관여하고 유전자 전사 및 효소 활성화 조절을 도우며(Ruyters, 1984), 청색광수용체 인 phototropin (plot 1과 plot 2 유전자; Takemiya et al., 2005) 과 굴광성을 조절하는 phytochrome A (phy A유전자; Lariguet and Fankhauser, 2004)를 활성화시키기 때문에 높은 생장속도 를 보일 수 있다. 더욱이 청색파장은 미세조류의 광합성 색소 를 자극하는 촉매 역할을 하여(Atta et al., 2013), 청색광을 감 지하는 플라보단백질인 크립토크롬(cryptochrome)과 같은 색 소 축적을 강화시켜(Ma et al., 2012), 결국 *C. vulgaris*의 주요 색소인 chl-*a* 및 β-carotene을 증가시킨다(Baidya et al., 2021). 이처럼 청색 파장에서 높은 생장속도는 유전자 전사와 효소 활 동에 의한 복합적인 요인에 따른 세포분열의 가속에 의한 결과 로 판단된다.

적색파장의 높은 생장속도와 낮은 Ks는 Chl-a외에 녹조류가 함유하는 보조색소 chlorophyll b (chl-b)에 따른 것으로 보이 며, chl-b는 455 nm와 642 nm 범위의 청색파장과 적색파장을 흡수하여 chl-a로 광에너지를 전달하기 때문에 적색파장에서도 높은 생장속도를 보인 것으로 생각된다. 실제 Chlorella sp.는 주요 광합성 색소인 chl-a와 chl-b를 높은 함유하고 있는 것으

Table 1. Parameters of *Chlorella vulgaris* (PKVL7422) as a function of light intensity under red LED, green LED, blue LED and fluorescent lamp

Wavelength	Hyperbolic equation	μ_{max}	I ₀	Ks
Fluorescent lamp	µ=0.83(I-21.92)/(I+100.55)	0.83	21.92	144.39
Blue LED	µ=1.03(l-15.90)/(l+105.83)	1.03	15.90	137.63
Green LED	µ=0.89(I-21.23)/(I+113.23)	0.89	21.23	155.69
Red LED	µ=0.95(l-11.26)/(l+73.73)	0.95	11.26	47.08
LED Light-emitting diodes				



Fig. 1. Growth curves of *Chlorella vulgaris* (PKVL7422) cultured at various irradiance under red LED, green LED, blue LED and fluorescent lamp. LED, Light-emitting diodes.

로 보고되어 있다(Richmond, 2003; Nurachman et al., 2015). 또한 적색파장은 녹색파장과 비교하여 홍조류 *Porphyridium cruentum*의 광계 II 활성도를 3배 이상 향상시킨다는 보고가 있다(Cunningham et al., 1990). 이처럼 적색파장을 효율적으 로 흡수할 수 있는 Chl-b와 같은 보조색소의 보유에 따라 적색 파장을 생장에 효율적으로 이용할 수 있을 것으로 판단된다(Oh et al., 2015).

한편, *C. vulgaris*는 파장별로 탄수화물 함량의 차이가 뚜렷하 지 않았으나, 광량에 따라 큰 차이가 나타났다(Fig. 3). 낮은 생 장속도를 보였던 정상기 광량 10 μmol/m²/s의 녹색 파장(0.26 /day)에서 가장 높은 함량(320 μg/g)을 나타낸 반면, 높은 생장 속도를 보였던 정상기 광량 100 μmol/m²/s의 청색 파장(0.60 / day)에서 낮은 함량(133 μg/g)을 보였다. 또한 낮은 μ_{max}를 보 였던 녹색파장(0.89 /day)는 형광램프보다 약 1.29배, 청색파장 보다는 약 1.33배 높은 탄수화물 함량을 나타냈다. *C. vulgaris* 의 탄수화물 비율은 전체 생화학적 비율(탄수화물, 단백질, 지 질)로 보았을 때, 광량 10 μmol/m²/s에서 대수생장기 탄수화물 함량은 24-32%, 정상기 탄수화물 함량은 26-39%를 차지하 였으며 광량 100 μmol/m²/s에서 대수생장기 탄수화물 함량은 11-19%, 정상기 탄수화물 함량은 11-13%으로 낮은 광량에서 비교적 높은 비율을 나타났다.

Korozi et al. (2023)가 연구한 *C. vulgaris*는 청색 파장에서 가 장 높은 바이오매스 함량을 나타냈으나, 탄수화물 함량은 파장 별로 큰 차이가 없다고 보고했으며, He et al. (2023)이 연구한 *C. sorokiniana*도 백색 파장에서 가장 높은 건중량을 보였으나, 탄수화물 함량은 파장별로 큰 차이를 나타내지 않았다고 하여, 본 연구결과와 유사하였다. 또한 Suyono et al. (2016)의 연구 결과에 따르면, *C. zofingiensis*는 청색파장의 높은 광량(9,000 lux; 약 924 µmol/m²/s)에서 높은 건중량이 측정되었던 것과 달 리, 탄수화물 함량은 낮게 나타났으며, 낮은 광량(3,000 lux; 약



Fig. 2. Specific growth rates of *Chlorella vulgaris* (PKVL7422) cultured under red LED, green LED, blue LED and fluorescent lamp. LED, Light-emitting diodes.

346 µmol/m²/s)에서 높은 함량을 보였다. 높은 광량에서 생성 된 탄수화물은 세포 내 저장물질인 전분이 아닌 세포분열을 위 한 에너지원인 포도당으로 사용되어, 탄수화물 함량이 감소하 였다(Chen et al., 2013; Suyono et al., 2016). 반대로 낮은 광 량에서 탄수화물 함량 증가는 효소 활성도가 탄수화물 분해 속 도와 정비례하기 때문에 탄수화물 함량의 증가는 효소 활성의 감소를 의미한다고 하며(Loganathan et al., 2020), 세포 분열 속도의 감소가 세포의 효소 활동과 화학적 조성에 변화를 주 어 탄수화물 함량을 증가시킨다고 하였다(Markou, 2014). 따 라서 *C. vulgaris*는 생장에 낮은 광량은 생장에 스트레스를 주 는 환경요인으로 작용하여 탄수화물의 함량이 높게 나타난 것 으로 생각된다.

C. vulgaris의 단백질 함량은 정상기 광량 100 μmol/m²/s의 청색 파장(509 μg/g)에서 가장 높았고, 형광램프(461 μg/g), 녹 색 파장(453 μg/g), 적색 파장(355 μg/g) 순서로 나타나 났으 며, 광량 100 μmol/m²/s의 정상기 청색 파장은 형광램프 보다 1.1배 높은 단백질 함량을 보였다(Fig. 4). 광량에 따라서는 10 μmol/m²/s보다 100 μmol/m²/s에서 높은 함량을 보였으며, 정 상기 청색 파장 100 μmol/m²/s는 10 μmol/m²/s보다 1.53배 높 은 함량을 보였다. 또한 생장 단계에 따라서는 대수생장기보다 정상기에서 높은 함량이 나타났다. *C. vulgaris*의 단백질 비율 은 전체 생화학적 비율로 보았을 때, 광량 10 μmol/m²/s 대수생 장기 단백질 함량은 25-31%, 정상기 단백질 함량은 31-40%를 차지하였으며, 광량 100 μmol/m²/s 대수생장기 단백질 함량은 33-41%, 정상기 단백질 함량은 33-41%으로 나타났다.

Habibi and Sibi (2019)는 남조류 *S. platensis*, 녹조류 *Scenedesmus obliquus* 그리고 *C. vulgaris*가 적색과 청색 파 장에서 높은 생장률을 보였고, 단백질 함량은 청색과 녹색 파 장에서 최대 함량을 나타내어, 파장변화에 따라 달라진다고 보 고하였다. 또한 Asuthkar et al. (2016)는 *C. pyrenoidosa*가 가



Fig. 3. Carbohydrate contents in the exponential and stational phases of *Chlorella* vulgaris (PKVL7422) exposed to red LED, green LED, blue LED and fluorescent lamp (FL). LED, Light-emitting diodes.



Fig.4. Protein contents in the exponential and stational phases of *Chlorella* vulgaris (PKVL7422) exposed to red LED, green LED, blue LED and fluorescent lamp (FL). LED, Light-emitting diodes.

장 높은 생장속도를 보였던 청색 파장에서 가장 높은 단백질 함 량을 나타내었고, Baidya et al. (2021)가 연구한 *C. ellipsoidea* 에서도 청색파장에서 높은 건중량과 밀도를 보였고, 단백질 함 량도 청색 파장에서 가장 높게 나타났다고 하여, 본 연구결과 와 유사하였다. 청색 파장이 단백질을 구성하는 아미노산인 아 스파트산(aspartic acid)과 단백질 생합성에 사용되는 글루탐산 (glutarnic acids)를 증가시켜, 단백질 합성 속도를 증진시켰으 며(Payer et al., 1969), 광합성 유전자 전사를 촉진하고, 효소



Fig.5 Lipid contents in the exponential and stational phases of *Chlorella* vulgaris (PKVL7422) exposed to red LED, green LED, blue LED and fluorescent lamp (FL). LED, Light-emitting diodes.

활동을 활성화시키는데 기여하였기 때문으로 생각된다 (Teo et al., 2014). 또한 녹조류 Chlamydomonas reinhardtii의 경우, 705 nm에서는 광계 I만 활성을 보이는 반면에, 650 nm 이하에 서는 광계 I과 II가 모두 활성을 보이기 때문에 청색 계열의 파장 대(450-500 nm)에서 효율적인 광합성이 진행될 수 있다(Mulo et al., 2012). 하지만, Guo and Fang (2020)은 C. pyrenoidosa 가 청색 파장에서 높은 세포 밀도를 보였으나, 단백질 함량은 청색파장에서 가장 낮은 함량을 보였다고 하였다. 또한 Taufikurahman and Shafira (2019)는 C. vulgaris와 C. pyrenoidosa 의 단백질 함량이 파장별로 큰 차이가 없다고 하였으며, Kendirlioglu and Cetin (2017)이 연구한 C. vulgaris는 적색 파장에 서 높은 생장률과 단백질 함량을 보였다. 따라서 Chlorella는 종 에 따라서도 종주(strain)에 따라서도 파장에 대한 생화학적 조 성 변화가 서로 다른 결과를 나타낼 수 있는 것으로 보이지만, 기본적인 광합성색소 조성과 효성활성 등은 유사할 것으로 보 여, 이러한 특이성이 어떻게 발현이 되는지, 다양한 종주(strain) 에 대한 광에 대한 생리적인 현황을 살펴보는 것이 무엇보다 중 요할 것으로 생각된다.

C. vulgaris의 지질 함량은 정상기 광량 100 μmol/m²/s의 청색 파장에서 가장 높은 함량(713 μg/g)을 보였고, 적색 파장(577 μg/g), 녹색 파장(538 μg/g) 그리고 형광램프(526 μg/g) 순으로 나타났으며, 광량 100 μmol/m²/s의 정상기 청색 파장은 형광램 프 보다 1.4배 높은 함량을 보였다(Fig. 5). 광량에 따라서는 10 μmol/m²/s보다 100 μmol/m²/s에서 높은 함량을 보였으며 정상 기 청색 파장 100 μmol/m²/는 10 μmol/m²/s보다 1.6배 높은 함 량을 보였다. 생장단계별로 보았을 때, 광량 10 μmol/m²/s은 대 수생장기에 비해 정상기에서 지질의 함량이 1.1–1.7배 높게 나 타났고 광량 100 μmol/m²/s은 1.2–1.4배 높게 나타나, 모든 파 장에서 대수생장기보다 정상기에서 높은 함량을 나타냈다. 또 한 *C. vulgaris*의 지질 비율은 전체 생화학적 비율로 보았을 때, 광량 10 µmol/m²/s 대수생장기 지질 함량은 37-41%, 정상기 지질 함량은 37-40%를 차지하였으며 광량 100 µmol/m²/s 대 수생장기 지질 함량은 41-52%, 정상기 지질 함량은 47-54% 을 차지하여, 지질의 함량은 다른 생화학적 조성물질에 비하 여 상대적으로 높게 나타나, 미세조류가 체내 지질을 건중량 의 20-50% 이상 합성할 수 있다는 Chisti (2007)과 Hu et al. (2008)의 보고와 일치하였다.

Baidya et al. (2021)가 연구한 C. ellipsoidea는 높은 건중량 과 밀도를 보인 청색파장에서 가장 높은 지질 함량을 보였으 며, Habibi and Sibi (2019)가 연구한 C. vulgaris도 높은 건중 량을 나타냈던 청색 파장에서 가장 높은 지질 함량을 나타냈다. 또한 Nannochloropsis sp.와 Tetraselmis sp.가 높은 생장을 보 였던 청색 파장에서 최대 지질 함량을 보였다(Teo et al., 2014). 이는 단백질과 같이 청색 파장이 광합성 유전자 전사를 촉진 하고 효소 활동을 활성화시켜 함량이 증가된다고 보고하였다 (Ruyters et al., 1984). 하지만 Hultberg et al. (2014)가 연구한 C. vulgaris는 황색 파장에서 가장 높은 바이오매스를 나타냈으 나, 지질의 함량은 바이오매스 함량이 가장 낮았던 보라색 파 장에서 가장 높게 나타났다고 보고하였다. 또한 Severes et al. (2017)가 연구한 C. vulgaris는 적색과 청색을 혼합한 혼합파장 에서 바이오매스 생산량이 가장 높았다고 하였으며, 지질 함량 은 낮은 광량(220 lux; 4 µmol/m²/s)의 적색 파장에서 가장 높 은 함량이 나타났다고 하였다. Ra et al. (2016)는 N. salina, N. oceanica 및 N. oculata가 낮은 건중량을 나타냈던 녹색 파장에 서 높은 지질 함량을 보였다고 하였다. 따라서 파장에 따른 단백 질에서도 언급한 것과 같이, 녹조류에서 중에서도 종 또는 종주 에 따라서 특이성이 달라지는 것을 알 수 있다. 이러한 결과는 금후, 우리나라에서 분리한 녹조류에 대한 광특이성을 확인할 필요가 있을 것으로 생각된다.

생장을 촉진시키는 파장과 스트레스를 주는 조건으로 생화 학적 물질을 유도시키는 파장을 혼합한 혼합파장을 이용하였 을 때, 생리활성물질의 생산이 높아진다는 연구가 다수 보고 되어져 있다(Zhao et al., 2015; Ra et al., 2016; Sirisuk et al., 2018; Kim et al., 2019; Lee et al., 2023). Kim et al. (2019) 는 *C. vulgaris*가 대수생장기 후기까지 대량의 미세조류 생물량 집적을 위한 적색 파장을 주사하고, 정상기부터 유용물질 증진 을 위한 녹색 파장을 주사하였을 때, 지질 함량이 가장 높았다 고 하였으며 Ra et al. (2016)의 연구에서도 *N. salina, N. oceanica* 및 N. *occulata*가 대수생장기 후기까지 청색 파장을 주사 하고, 정상기부터 녹색파장을 주사한 다단계 배양에서 지질의 함량이 가장 높았다고 보고하였다. 또한 *C. vulgaris*, 녹조류 *S. obliquus* 및 *N. oleoabundans*가 단일 파장보다 적색과 청색의 혼합비가 5:5인 혼합파장에서 높은 생장률과 생산성을 보였으 며, 화학적산소요구량(chemical oxygen demand), 총질소(total nitrogen), 총인(total phosphorus) 제거율 효율이 높았다고 하 였으며(Zhao et al., 2015), Mao and Guo (2018)는 Arthrospira platensis가 적색과 청색의 혼합비가 8:2인 혼합파장에서 건중 량, 탄수화물 및 지질 함량이 가장 높았다고 하였다. 따라서 C. vulgaris의 광배양시스템 구축에 있어 청색파장과 적색파장을 일정비로 혼합한 혼합파장과 생장단계별로 파장을 달리하는 다 단배양 기법에 대해 검토가 필요할 것으로 보인다.

형광램프의 발광 효율은 20%로 가시광선대의 모든 파장을 구 현하지 못해 광합성 효율이 떨어진다는 단점을 가지고 있으나 (Park et al., 2012), LED는 식물의 광합성 및 생장에 필요한 파 장역을 선택적으로 공급하여 전체적인 빛의 이용효율을 높일 수 있다(Park et al., 2013a). 따라서 본 연구의 결과와 같이 미 세조류의 단백질과 지질의 합성은 형광등보다 특정 파장이 높 은 유용물질을 합성할 수 있어, 기존의 대량배양 광원인 형광램 프보다 LED의 단일파장이 세포의 생장과 유용물질 증진에 효 과적이었다고 판단된다. 또한 본 연구에서 사용된 C. vulgaris (PKVL7422) 종주는 LED 파장 중 적색파장과 청색파장에서 높은 생장속도를 보였지만, 적색파장에서 청색파장보다 낮은 Ks를 보였기 때문에 초기에 빠른 생장을 유도하기 위하여 적색 파장을 수행한다면 경제적인 효과에 기여할 수 있을 것으로 판 단된다. 또한 청색 파장은 단백질 및 지질과 같은 유용한 생화학 적 물질의 촉진에 유용한 파장영역임을 알 수 있었다. 금후 높은 세포밀도를 얻을 수 있는 경제적인 광원인 적색파장과 유용물 질 함량을 증진시키는 청색파장을 혼합한 혼합파장을 수행하여 경제적인 효과 및 생산성 증대에 기여할 수 있을 것으로 판단되 기 때문에 차후 생장단계별로 파장영역을 달리하는 다단배양과 서로 다른 파장을 동시에 조사하는 다중 파장 배양 등으로 바이 오매스 수확량 및 유용한 생화학적 물질의 거동을 살펴볼 필요 가 있을 것으로 생각된다.

References

- Abiusi F, Sampietro G, Marturano G, Biondi N, Rodolfi L, D'Ottavio M and Tredici MR. 2014. Growth, photosynthetic efficiency, and biochemical composition of *Tetraselmis suecica* F&M-M33 grown with LEDs of different colors. Biotechnol Bioeng 111, 956-964. https://doi.org/10.1002/ bit.25014.
- Andersen RA. 2005. Algal Culturing Techniques. Elsevier, Amsterdam, Netherlands.
- Asuthkar M, Gunti Y, S RR, Rao CS and Yadavalli R. 2016. Effect of different wavelengths of light on the growth of *Chlorella pyrenoidosa*. Int J Pharm Sci Res 7, 847-851. https://doi.org/10.13040/IJPSR.0975-8232.7(2).847-51
- Atta M, Idris A, Bukhari A and Wahidin S. 2013. Intensity of blue LED light: A potential stimulus for biomass and lipid content in fresh water microalgae *Chlorella vulgaris*. Bioresour Technol 148, 373-378. https://doi.org/10.1016/j. biortech.2013.08.162.

- Baba M, Kikuta F, Suzuki I, Watanabe MM and Shiraiwa Y. 2012. Wavelength specificity of growth, photosynthesis, and hydrocarbon production in the oil-producing green alga *Botryococcus braunii*. Bioresour Technol 109, 266-270. https:// doi.org/10.1016/j.biortech.2011.05.059.
- Baidya A, Akter T, Islam MR, Shah AKMA, Hossain A, Salam MA and Paul SI. 2021. Effect of different wavelengths of LED light on the growth, chlorophyll, β-carotene content and proximate composition of *Chlorella ellipsoidea*. Heliyon 7, e08525. https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2021. e08525.
- Bentahar S, Abada R and Nadia PY. 2023. Biotechnology: Definitions, types and main applications. YMER 22, 563-575. https://doi.org/10.37896/YMER22.04/49.
- Carvalho AP, Silva SO, Baptista JM and Malcata FX. 2011. Light requirements in microalgal photobioreactors: An overview of biophotonic aspects. Appl Microbiol Biotechnol 89, 1275-1288. https://doi.org/10.1007/s00253-010-3047-8.
- Chen CY, Zhao ZQ, Yen HW, Ho SH, Cheng CL, Lee DJ, Bai FW and Chang JS. 2013. Microalgae-based carbohydrates for biofuel production. Biochem Eng J 78, 1-10. https://doi. org/10.1016/j.bej.2013.03.006.
- Chio BR, Kim DS and Lee TY. 2012. Correlation conditions for marine microalgae *Isochrysis galbana* under illumination of light emitting diodes. J Korean Geo-Environm Soc 13, 63-68.
- Chio GG, Bae MS, Park JS, Park BJ, Ahn CY and Oh HM. 2007. Growth and r-Linolenic acid production of *Arthro-spira* (Spirulina) platensis in heterotrophic culture. Kor J Microbiol Biotechnol Lett 35, 45-51.
- Chisti Y. 2007. Biodiesel from microalgae. Biotechnol Adv 25, 294-306. https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2007.02.001.
- Chu B, Zhao J, Zheng H, Gong J, Chen K, Zhang S, Xiao G and He Y. 2021. Performance of LED with mixed wavelengths or two-phase culture on the growth and lipid accumulation of *Chlorella pyrenoidosa*. Int J Agric Biol Eng 14, 90-96.
- Cunningham FX, Dennenberg RJ, Jursinic PA and Gantt E. 1990. Growth under red light enhances photosystem II relative to photosystem I and phycobilisomes in the red alga *Porphyridium cruentum*. Plant Physiol 93, 888-895. https:// doi.org/10.1104/pp.93.3.888.
- Das P, Lei W, Aziz SS and Obbard JP. 2011. Enhanced algae growth in both phototrophic and mixotrophic culture under blue light. Bioresour Technol 102, 3883-3887. https://doi. org/10.1016/j.biortech.2010.11.102.
- DuBois M, Gilles KA, Hamilton JK, Rebers PA and Smith F. 1956. Colorimetric method for determination of sugars and related substances. Anal Chem 28, 350-356. https://doi. org/10.1021/ac60111a017.
- Enyidi U. 2017. Chlorella vulgaris as protein source in the diets of African catfish Clarias gariepinus. Fishes 2, 17. https:// doi.org/10.3390/fishes2040017.

- Fu W, Guðmundsso O, Paglia G, Herjólfsson G, Andrésson ÓS, Palsson BØ and Brynjólfsson S. 2013. Enhancement of carotenoid biosynthesis in the green microalga *Dunaliella salina* with light-emitting diodes and adaptive laboratory evolution. Appl Microbiol Biotechnol 97, 2395-2403. https:// doi.org/10.1007/s00253-012-4502-5.
- Gim GH, Lee YM, Kim DJ, Jeong SH and Kim SW. 2012. Comparison of biomass productivity of two green microalgae through continuous cultivation. KSBB J 27, 97-102. https://doi.org/10.7841/ksbbj.2012.27.2.097.
- Guo G and Fang Z. 2020. Effect of light quality on the cultivation of *chlorella pyrenoidosa*. E3S Web Conf 143, 02033. https://doi.org/10.1051/e3sconf/202014302033.
- Habibi R and Sibi G. 2019. Light emitting diode (LED) illumination for enhanced growth and cellular composition in three microalgae. Adv Microbiol Res 3, 1-6. https://doi. org/10.24966/amr-694x/100007.
- Han KH and Oh SJ. 2023. The effects of the light quality of a light emitting diode (LED) on the carbohydrate, protein and lipid contents of *Tetraselmis suecica* and *T. tetrathele*. J Korean Soc Mar Environ Saf 29, 36-43. https://doi. org/10.7837/kosomes.2023.29.1.036.
- Harun R, Danquah MK and Forde GM. 2009. Microalgal biomass as a fermentation feedstock for bioethanol production. J Chem Technol Biotechnol 85, 199-203. https://doi. org/10.1002/jctb.2287.
- Hasegawa T, Okuda M, Makino M, Hiromatsu K, Nomoto K and Yoshikai Y. 1995. Hot water extracts of *Chlorella vul*garis reduce opportunistic infection with *Listeria monocyto*genes in C57BL/6 mice infected with LP-BM5 murine leukemia viruses. Int J Immunopharmacol 17, 505-512. https:// doi.org/10.1016/0192-0561(95)00035-z.
- He Y, Lian J, Wang L, Tan L, Khan F, Li Y, Wang H, Rebours C, Han D and Hu Q. 2023. Recovery of nutrients from aquaculture wastewater: Effects of light quality on the growth, biochemical composition, and nutrient removal of *Chlorella sorokiniana*. Algal Res 69, 102965. https://doi.org/10.1016/j. algal.2022.102965.
- Hu Q, Sommerfeld M, Jarvis E, Ghirardi M, Posewitz M, Seibert M and Darzins A. 2008. Microalgal triacylglycerols as feedstocks for biofuel production: Perspectives and advances. Plant J 54, 621-639. https://doi.org/10.1111/j.1365-313x.2008.03492.x.
- Hultberg M, Jönsson HL, Bergstrand KJ and Carlsson AS. 2014. Impact of light quality on biomass production and fatty acid content in the microalga *Chlorella vulgaris*. Bioresour Technol 159, 465-467. https://doi.org/10.1016/j. biortech.2014.03.092.
- Javanmardian M and Palsson BO. 1991. High-density photoautotrophic algal cultures: Design, construction, and operation of a novel photobioreactor system. Biotechnol Bioeng 38, 1182-1189. https://doi.org/10.1002/bit.260381010.

- Justo GZ, Silva MR and Queiroz MLS. 2001. Effects of the green algae *Chlorella vulgaris* on the response of the host hematopoietic system to intraperitoneal ehrlich ascites tumor transplantation in mice. Immunopharmacol Immunotoxicol 23, 119-132. https://doi.org/10.1081/iph-100102573.
- Kang MS, Sim SJ and Chae HJ. 2004. *Chlorella* as a functional biomaterial. Korean J Biotechnol Bioeng 19,1-11.
- Katsuda T, Lababpour A, Shimahara K and Katoh S. 2004. Astaxanthin production by *Haematococcus pluvialis* under illumination with LEDs. Enzyme Microb Technol 35, 81-86. https://doi.org/10.1016/j.enzmictec.2004.03.016.
- Kendirlioglu G and Cetin AK. 2017. Effect of different wavelengths of light on growth, pigment content and protein amount of *Chlorella vulgaris*. Fresenius Environ Bull 26, 7974-7980.
- Khalili A, Najafpour GD, Amini G and Samkhaniyani F. 2015. Influence of nutrients and LED light intensities on biomass production of microalgae *Chlorella vulgaris*. Biotechnol Bioprocess Eng 20, 284-290. https://doi.org/10.1007/ s12257-013-0845-8.
- Kim DC, Won SI and In MJ. 2014a. Preparation and quality characteristics of *Mul-kimchi* added with Chlorella. J Appl Biol Chem 57, 23-28. https://doi.org/10.3839/jabc.2014.004.
- Kim DG, Lee CS, Park SM and Choi YE. 2014b. Manipulation of light wavelength at appropriate growth stage to enhance biomass productivity and fatty acid methyl ester yield using *Chlorella vulgaris*. Bioresour Technol 159, 240-248. https:// doi.org/10.1016/j.biortech.2014.02.078.
- Kim SH, Sunwoo IY, Hong HJ, Awah CC, Jeong GT and Kim SK. 2019. Lipid and unsaturated fatty acid productions from three microalgae using nitrate and light-emitting diodes with complementary LED wavelength in a two-phase culture system. Bioprocess Biosyst Eng 42, 1517-1526. https://doi. org/10.1007/s00449-019-02149-y.
- Korozi E, Kefalogianni I, Tsagou V, Chatzipavlidis I, Markou G and Karnaori A. 2023. Evaluation of growth and production of high-value-added metabolites in *Scenedesmus quadricauda* and *Chlorella vulgaris* grown on crude glycerol under heterotrophic and mixotrophic conditions using monochromatic light-emitting diodes (LEDs). Foods 12, 3068. https://doi.org/10.3390/foods12163068.
- Kumar MS, Miao ZH and Wyatt SK. 2010. Influence of nutrient loads, feeding frequency and inoculum source on growth of *Chlorella vulgaris* in digested piggery effluent culture medium. Bioresour Technol 101, 6012-6018. https://doi. org/10.1016/j.biortech.2010.02.080.
- Kwon HK, Oh SJ, Yang HS and Kim DM. 2013. Laboratory study for the phytoremediation of eutrophic coastal sediment using benthic microalgae and light emitting diode (LED). J Fac Agric 58, 417-425. https://doi.org/10.5109/27374.
- Lariguet P and Fankhauser C. 2004. Hypocotyl growth orientation in blue light is determined by phytochrome A inhibition

of gravitropism and phototropin promotion of phototropism. Plant J 40, 826-834. https://doi.org/10.1111/j.1365-313x.2004.02256.x.

- Lederman TC and Tett P. 1981. Problems in modelling the photosynthesis-light relationship for phytoplankton. Bot Mar 24, 125-134. https://doi.org/10.1515/botm.1981.24.3.125.
- Lee GC and Plasson BØ. 1994. High-density algal photobioreactors using light-emitting diodes. Biotechnol Bioeng 44, 1161-1167. https://doi.org/10.1002/bit.260441002.
- Lee MC. 2007. The effects of *Chlorella* supplements for human. J Coach Develop 9, 31-40.
- Lee UH, Kim SH, Lee SB, Kim SK and Jeong GT. 2023. Optimization of a two-phase culture system of *Chlamydomonas hedleyi* using light-emitting diodes and potential as a biodiesel feedstock. Process Biochem 127, 138-144. https://doi. org/10.1016/j.procbio.2023.02.012.
- Loganathan BG, Orsat V, Lefsrub and Wu BS. 2020. A comprehensive study on the effect of light quality imparted by light-emitting diodes (LEDs) on the physiological and biochemical properties of the microalgal consortia of *Chlorella variabilis* and *Scenedesmus obliquus* cultivated in dairy wastewater. Bioprocess Biosyst Eng 43, 1445-1455. https:// doi.org/10.1007/s00449-020-02338-0.
- Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL and Randall RJ. 1951. Protein measurement with the Folin phenol reagent. J Biol Chem 193, 265-275. https://doi.org/10.1016/s0021-9258(19)52451-6.
- Ma G, Zhang L, Kato M, Yamawaki K, Kiriiwa Y, Yahata M, Ikoma Y and Matsumoto H. 2012. Effect of blue and red LED light irradiation on β-cryptoxanthin accumulation in the flavedo of citrus fruits. J Agric Food Chem 60, 197-201. https://doi.org/10.1021/jf203364m.
- Mao R and Guo S. 2018. Performance of the mixed LED light quality on the growth and energy efficiency of *Arthrospira platensis*. Appl Microbiol Biotechnol 102, 5245-5254. https://doi.org/10.1007/s00253-018-8923-7.
- Markou G. 2014. Effect of various colors of light-emitting diodes (LEDs) on the biomass composition of *Arthrospira platensis* cultivated in semi-continuous mode. Appl Biochem Biotechnol 172, 2758-2768. https://doi.org/10.1007/ s12010-014-0727-3.
- Marsh JB and Weinstein DB. 1966. Simple charring method for determination of lipids. J Lipid Res 7, 574-576. https://doi. org/10.1016/s0022-2275(20)39274-9.
- Menon KR, Balan R and Suraishkumar GK. 2013. Stress induced lipid production in *Chlorella vulgaris*: Relationship with specific intracellular reactive species levels. Biotechnol Bioeng 110, 1627-1636. https://doi.org/10.1002/bit.24835.
- Mulo P, Sakurai L and Aro EM. 2012. Strategies for *psbA* gene expression in cyanobacteria, green algae and higher plants: From transcription to PSII repair. Biochim Biophys Acta Bioenerg 1817, 247-257. https://doi.org/10.1016/j.bba-

bio.2011.04.011.

- Noda K, Ohno N, Tanaka K, Kamiya N, Okuda M, Yadomae T, Nomoto K and Shoyama Y. 1996. A water-soluble antitumor glycoprotein from *Chlorella vulgaris*. Planta Med 62, 423-426. https://doi.org/10.1055/s-2006-957931.
- Nurachman Z, H H, Rahmaniyah RW, Kurnia D, Hidayat R, Prijamboedi B, Suendo V, Ratnaningsih E, Panggabean LMG and Nurbaiti S. 2015. Tropical marine *Chlorella* sp. PP1 as a source of photosynthetic pigments for dye-sensitized solar cells. Algal Res 10, 25-32. https://doi.org/10.1016/j. algal.2015.04.009.
- Oh SJ, Kwon HK, Jeon JY and Yang HS. 2015. Effect of monochromatic light emitting diode on the growth of four microalgae species (*Chlorella vulgaris*, *Nitzschia* sp., *Phaeodactylum tricornutum*, *Skeletonema* sp.). J Korean Soc Mar Environ Saf 21, 1-8. https://doi.org/10.7837/kosomes.2015.21.1.001.
- Park JC, Kwon ON, Hong SE, An HC, Bae JH, Park MS and Park HG. 2013a. Changes in the growth and biochemical composition of *Nannochloropsis* sp. cultures using lightemitting diodes. Korean J Fish Aquat Sci 46, 259-265. https://doi.org/10.5657/kfas.2013.0259.
- Park JE, Park YG, Jeong BR and Hwang SJ. 2012. Growth and anthocyanin content of lettuce as affected by artificial light source and photoperiod in a closed-type plant production system. Hortic Sci Technol 30, 673-679. https://doi. org/10.7235/hort.2012.12020.
- Park JY, Um YS, Jung IH, Jung YJ and Kim KH. 2013b. Development in auxiliary lighting for weather information. Korea Sci Art Forum 14, 193. https://doi.org/10.17548/ ksaf.2013.12.14.193.
- Payer HD, Sotriffer U and Mohr H. 1969. Effects of blue and red light on photosynthetic ¹⁴CO₂ uptake, and distribution of ¹⁴C in free and proteinbound amino acids in fern gametophytes [Dryopteris filix-mas (*L*) schott. Planta 85, 270-283. https:// doi.org/10.1007/bf00389403.
- Ra CH, Kang CH, Jung JH, Jeong GT and Kim SK. 2016. Effects of light-emitting diodes (LEDs) on the accumulation of lipid content using a two-phase culture process with three microalgae. Bioresour Technol 212, 254-261. https://doi. org/10.1016/j.biortech.2016.04.059.
- Richmond A. 2003. Handbook of microalgal culture: Biotechnology and applied phycology. In: Photosynthesis in Microalgae. Masojídek J and Koblízek M, eds. Blackwell Science, Oxford, U.K.
- Ruyters G. 1984. Effects of blue light on enzymes. In: Blue Light Effects in Biological Systems. Proceedings in Life Sciences. Senger H, ed. Springer, Berlin, Heidelberg.283-301. https:// doi.org/10.1007/978-3-642-69767-8 32.
- Safi C, Zebib B, Merah O, Pontalier PY and Garcia CV. 2014. Morphology, composition, production, processing and applications of *Chlorella vulgaris*: A review. Renew Sust Energ

Rev 35, 265-278. https://doi.org/10.1016/j.rser.2014.04.007.

- Sergejevová M and Masojídek J. 2012. Chlorella biomass as feed supplement for freshwater fish: sterlet, *Acipenser ruthenus*. Aquac Res 44, 157-159. https://doi.org/10.1111/j.1365-2109.2011.03011.x.
- Severes A, Hegde S, D'Souza L and Hegde S. 2017. Use of light emitting diodes (LEDs) for enhanced lipid production in micro-algae based biofuels. J Photochem Photobiol B Biol 170, 235-240. https://doi.org/10.1016/j.jphotobiol.2017.04.023.
- Sirisuk P, Ra CH, Jeong GT and Kim SK. 2018. Effects of wavelength mixing ratio and photoperiod on microalgal biomass and lipid production in a two-phase culture system using LED illumination. Bioresour Technol 253, 175-181. https://doi.org/10.1016/j.biortech.2018.01.020.
- Stanier RY, Kunisawa R, Mandel M CBG and Cohen-Bazire G. 1971. Purification and properties of unicellular blue-green algae (order Chroococcales). Bacteriol Rev 35, 171-205. https://doi.org/10.1128/br.35.2.171-205.1971.
- Suyono EA, Listyarini A and Hardiyati A. 2016. The effect of blue light in silinder photobioreactor on absorption of nitrogen and phosphate in liquid livestock waste and carbohydrate content of *Chlorella zofingiensis* Dönz. Appl Mech Mater 842, 103-110. https://doi.org/10.4028/www.scientific.net/amm.842.103.
- Takemiya A, Inoue SI, Doi M, Kinoshita T and Shimazaki KI. 2005. Phototropins promote plant growth in response to blue light in low light environments. Plant Cell 17, 1120-1127. https://doi.org/10.1105/tpc.104.030049.
- Taufikurahman T and Shafira H. 2019. Comparison Between Chlorella vulgaris and Chlorella pyrenoidosa in Biomass and Protein Content, Cultivated in Bioslurry and Grown Under Various LED Types. Joint Symposium on Plant Scienes and Products, Bandung, Indonesia.
- Teo CL, Atta M, Bukhari A, Taisir M, Yusuf AM and Idris A. 2014. Enhancing growth and lipid production of marine microalgae for biodiesel production via the use of different LED wavelengths. Bioresour Technol 162, 38-44. https:// doi.org/10.1016/j.biortech.2014.03.113.
- Vasudevan PT and Briggs M. 2008. Biodiesel production-current state of the art and challenges. J Ind Microbiol Biotechnol 35, 421-430. https://doi.org/10.1007/s10295-008-0312-2.
- Wang CY, Fu CC and Liu YC. 2007. Effects of using light-emitting diodes on the cultivation of *Spirulina platensis*. Biochem Eng J 37, 21-25. https://doi.org/10.1016/j.bej.2007.03.004.
- Xu W, Gao Z, Qi Z, Qiu M, Peng JQ and Shao R. 2014. Effect of dietary chlorella on the growth performance and physiological parameters of gibel carp, *Carassius auratus gibelio*. Turkish J Fish Aquat Sci 14, 53-57. https://doi. org/10.4194/1303-2712-v14_1_07.
- Yan C, Luo X and Zheng Z. 2013. Effects of various LED light qualities and light intensity supply strategies on purifica-

tion of slurry from anaerobic digestion process by *Chlorella vulgaris*. Int Biodeterior Biodegrad 79, 81-87. https://doi. org/10.1016/j.ibiod.2013.01.016.

- Yoshioka M, Yago T, Staka YY, Arakawa H and Morinaga T. 2012. Effect of high frequency of intermittent light on the growth and fatty acid profile of *Isochrysis galbana*. Aquaculture 338-341, 111-117. https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2012.01.005.
- Zhao Y, Sun S, Hu C, Zhang H, Xu J and Ping L. 2015. Performance of three microalgal strains in biogas slurry purification and biogas upgrade in response to various mixed lightemitting diode light wavelengths. Bioresour Technol 187, 338-345. https://doi.org/10.1016/j.biortech.2015.03.130.