

알칼리성 폐수처리를 위한 호염기성 남조류 *Arthrospira platensis*의 pH에 따른 지질생성 특성

이수현^a · 권수민^b · 황선진^{c,†}

경희대학교 일반대학원 환경응용과학과

Lipid Production Characteristics of the Basophilic Blue-Green Algae *Arthrospira platensis* Depending on pH for Alkaline Wastewater Treatment

Su-Hyeon Lee^a · Su-min Kwon^b · Sun-Jin Hwang^{c,†}

Department of Applied Environmental Science, Kyung Hee University

(Received 5 September 2023, Revised 13 October 2023, Accepted 25 October 2023)

Abstract

This study investigated the growth and metabolic characteristics of *Arthrospira platensis* (*A. platensis*) according to pH, which has an alkaline optimal pH. The intake of inorganic carbon was expected to be the highest at the optimum pH 9, but it was different from the expectation, so the cause of the excessive intake of inorganic carbon at pH 7 was investigated. We tried to verify the triacylglycerol (TAG) synthesis metabolic mechanism because it was assumed that the inorganic carbon intake of *A. platensis* according to pH is closely related to lipid production inside the cell. To verify this, the effects of pH on inorganic carbon intake were examined through lipid analysis in the cell of *A. platensis* according to pH. As a result, in the case of the effect of inorganic carbon intake of *A. platensis* according to pH on TAG content, pH 9 and pH 11 showed no significant difference in TAG content, but at pH 7, it was two times higher compared to pH 9 and pH 11. It was assumed that the reason why *A. platensis* excessively consumed inorganic carbon at pH 7 was because it increased the TAG content in proportion to the intake of inorganic carbon to protect cells from external pH stress. In addition, it is considered that the TAG content produced in proportion to the intake of inorganic carbon is because acetyl-CoA produced in the Calvin cycle is required for the synthesis of TAG.

Key words : *Arthrospira platensis*, Inorganic carbon uptake, Nile red, pH stress, TAG content

^a 연구원(Researcher), kg03075@khu.ac.kr, <https://orcid.org/0000-0001-7932-9666>

^b 연구원(Researcher), sumin6169@khu.ac.kr, <https://orcid.org/0000-0002-0880-4615>

^c Corresponding author, 교수(Professor), sjhwang@khu.ac.kr, <https://orcid.org/0000-0003-3865-4811>

This is an Open-Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial License (<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.

1. Introduction

심화되는 산업화와 도시 집중화 현상으로 인해, 산업폐수 배출량이 급증하게 되었다. 2019년 산업폐수 배출량은 약 480만톤/일이며, 그 중 알칼리성 폐수가 약 40%를 차지하고 있다(ME, 2021). 알칼리성 폐수는 중화조에서 중화과정을 거친 후, 활성슬러지법에 의해 처리된다. 활성슬러지법은 유기물 제거효율이 90%로 높지만, 질소와 인의 제거효율은 10~30%로 낮다. 따라서 질소와 인의 제거효율을 높이기 위한 대안으로 미세조류를 적용한 하폐수처리 연구가 활발하게 진행되고 있다(Amaro et al., 2023).

이에 알칼리성 미세조류를 알칼리폐수처리에 적용한다면, 추가적인 중화처리 과정 없이도 높은 수처리 효율을 보일 것으로 기대된다. *Chlorella vulgaris*는 환경적 적응성과 질소 및 인 제거능이 높기 때문에 하폐수고도처리 연구에 많이 사용된다. 그러나 *C. vulgaris*는 적정 pH 조건이 7~8이기 때문에 알칼리성 폐수를 처리하는 데에는 어려움이 있다.

반면, 적정 pH가 9인 *Arthrospira platensis*는 다른 미세조류 보다 세포 내부의 단백질 함량이 높기 때문에 폐수에서 많은 질소를 제거할 수 있으며(Yu et al., 2021), 남조류 중에서 상대적으로 성장률과 영양염류의 제거능이 높다는 장점이 있다(Zhai et al., 2017). 따라서 호염기성 미세조류인 *A. platensis*를 이용하여 알칼리성 폐수를 처리하는 것은 적합할 것으로 기대된다.

pH는 미세조류 성장에 미치는 주요 환경 요인으로서, 미세조류의 탄소농축메커니즘인 CO₂ Concentrating Mechanism (CCM)의 carbonic anhydrase (CA) 효소 활성에 영향을 미친다. CCM 이란 CA 효소에 의해 HCO₃⁻를 CO₂로 고정하여, CO₂ 농도를 증가시킴으로써, 광호흡 보다 광합성 기작을 우세하게 하는 메커니즘이다(Price et al., 2013). 적정 pH가 아닌 환경은 CA 효소의 활성을 낮추고 CCM 효율을 감소시켜 미세조류 대사에 저해를 준다고 알려져 있다(Muley et al., 2014). 또한, 미세조류가 성장하기에 적합한 pH가 아닌 환경에서는 미세조류의 엽록소 합성이 억제되고, 이는 광합성 활동에 영향을 미치기 때문에 궁극적으로 미세조류의 성장에 제한이 발생된다고 보고되었다(Del Campo et al., 2000). 이러한 내용을 보다 심도있게 조사하기 위하여, pH가 *A. platensis*의 성장 및 영양물질 대사에 미치는 영향을 파악하는 과정 중에, 적정 pH 보다 낮은 pH에서 무기탄소가 비정상적으로 과도하게 섭취되는 경향이 발견되었다. 이러한 경향이 나타난 원인에 대해, Ma (2020)의 연구에 따르면 미세조류는 스트레스 환경에서 세포를 보호하기 위해, 세포 내부의 에너지 대사를 전환하여 비극성 지질인 triacylglycerol (TAG)를 축적한다고 보고한 바 있다.

이에 pH 스트레스에 따른 무기탄소 섭취와 TAG의 합성간에 상관성이 있을 것으로 추측되어, 기존 연구동향을 조사한 결과, 미세조류의 pH 스트레스에 따른 TAG 축적에 관한 연구는 다수 존재하나, TAG 축적과 무기탄소 섭취간의 상관관계를 분석한 연구는 거의 전무하였다.

따라서 본 연구에서는 적정 pH 보다 낮은 pH에서 *A.*

*platensis*의 무기탄소 소비가 과도하게 많았던 원인을 파악하기 위해, pH에 따른 *A. platensis*의 무기탄소 섭취 및 acetyl-CoA의 전구물질 대사 특성이 세포내 TAG 함량변화에 미치는 영향을 파악하고자 하였다.

2. Materials and Methods

2.1 대상 미세조류 선정 및 배양

본 연구에 사용된 미세조류는 Korean Collection for Type Culture (KCTC)에서 분양받은 *Arthrospira platensis* 종을 사용하였고, 형태는 Fig. 1과 같다. *A. platensis*의 배양을 위해 사용한 배지는 SOT 배지이며, 구체적인 조성은 Table 1에 나타내었다. SOT 배지는 탄소, 질소, 인으로 구성된 SOT-1과 미량원소 및 마그네슘, 나트륨, 칼륨, 철 등으로 구성된

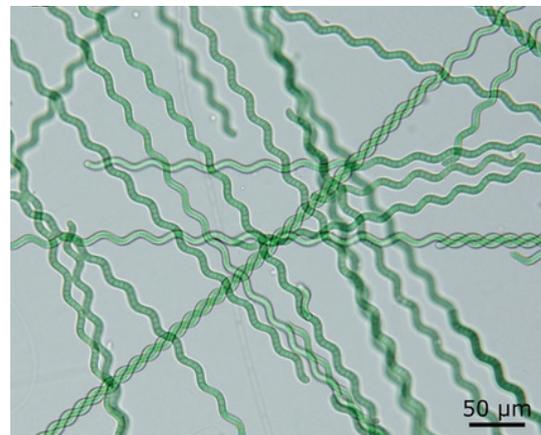


Fig. 1. Shape of *Arthrospira platensis*. (Nowicka-Krawczyk et al., 2019)

Table 1. Composition of SOT medium for *A. platensis* culture

	Components	Amount
SOT-1 (Distilled water 600 mL)	NaHCO ₃	16.8 g
	K ₂ HPO ₄	0.5 g
	NaNO ₃	2.5 g
SOT-2 (Distilled water 400 mL)	K ₂ SO ₄	1.0 g
	NaCl	1.0 g
	MgSO ₄ · 7H ₂ O	0.2 g
	CaCl ₂ · 2H ₂ O	0.04 g
	Na ₂ · EDTA	0.08 g
	FeSO ₄ · 7H ₂ O	0.01 g
	Trace-metals solution	1 mL
Trace-metals solution (Distilled water 1 L)	H ₃ BO ₃	2.86 g
	MnSO ₄ · 7H ₂ O	2.50 g
	ZnSO ₄ · 7H ₂ O	0.22 g
	Na ₂ MoO ₄ · 2H ₂ O	0.21 g
	CuSO ₄ · 5H ₂ O	0.08 g

SOT-2로 이루어져 있다. 실험에 이용할 *A. platensis*의 생물량 확보를 위해, *A. platensis*를 SOT 배지에 접종한 후, 온도 25°C, 광도 100 PPFd의 환경이 조성된 광배양기(HB-305M, Hanbeak CO, KOREA)에서 계대배양이 진행되었다. 계대배양 후 보존 중인 *A. platensis*를 항온챔버 및 pH controller를 이용하여, 30°C, pH 9±0.5 및 200 PPFd 광도 조건에서 전배양을 진행하였다.

2.2 실험 조건 및 방법

pH에 따른 *A. platensis*의 무기탄소 섭취 및 TAG 축적에 미치는 영향을 파악하기 위해, 적정 pH 보다 낮은 pH와 적정 pH를 비교하고자 하였으며, 추가적으로 적정 pH 보다 높은 pH도 설정하였다. 따라서 pH 7, 9, 11에 대해 pH controller를 이용하여 ±0.5 이내로 0.1N H₂SO₄와 0.1N NaOH를 주입하면서 유지하도록 하였다. 본 실험에서 운전 용량을 1.0 L로 하여, 9일간 실험을 진행하였으며, TAG 분석을 고려하여 초기 접종농도는 1.0 OD로 높게 설정하였다. 이때 사용된 배지는 SOT의 성장 중 탄소는 NaHCO₃ 200 mg-C/L, 질소는 NaNO₃ 32 mg-N/L, 인은 K₂HPO₄를 4 mg-P/L로 수정하여 주입해주었으며, 무기탄소, 질소 및 인은 fed batch type으로 고갈되지 않게 매일 추가 주입해주었다. 광도조건은 200 PPFd로 설정하였으며, 배양 온도는 30°C로 유지해주었다. 기타 세부사항 및 운전조건은 Table 2에 정리하여 나타내었다.

2.3 분석 방법

2.3.1 Optical Density (OD)

*A. platensis*의 성장량을 평가하기 위하여 OD 측정을 실시하였다. OD 측정 시, 미세조류 시료를 충분히 교반시킨 후 spectrophotometer (Optizen POP, Mecasys, KOREA)를 이용하여, 660 nm의 파장에서 측정하였다.

2.3.2 무기탄소

무기탄소 측정을 위해 TOC analyzer (TOC-V, SHIMADZU Co., Japan)를 이용하였다. 분석에 사용된 시료는 0.45 µm

Table 2. Experimental conditions for TAG accumulation in *A. platensis* according to pH

Reactor	2 L Erlenmeyer flask (Working volume 1.0 L)	Temp.	30°C
Algae species	<i>Arthrospira platensis</i> (Initial seeding conc. 1.0 OD)	Light intensity	200 PPFd
pH	7.0 ± 0.5, 9.0 ± 0.5, 11.0 ± 0.5 (by pH controller)	stirring speed	80 rpm
Medium	Modified SOT medium (NaHCO ₃ , NaNO ₃ , K ₂ HPO ₄ are modified NaHCO ₃ 200 mg-C/L as carbon source NaNO ₃ 32 mg-N/L as nitrogen source K ₂ HPO ₄ 4 mg-P/L as phosphate source)	C, N, P	fed batch

(Whatman, NO. 1822-047, UK) 여지로 여과한 여액을 정량범위에 맞게 희석하여 사용하였다.

2.3.3 질소 및 인

질소, 인의 분석은 Auto-sampler를 장착한 수질자동분석기 AA3(AutoAnalyzer 3, SEAL Analytical, Germany)를 이용하여 분석하였다. NO₃-N은 550 nm, PO₄-P는 800 nm 흡광과장에서 측정하였으며, 분석에 사용된 시료는 무기탄소와 동일하게 0.45 µm (Whatman, NO. 1822-047, UK) 여지로 여과한 여액을 적정 범위로 희석하여 수행하였다.

2.3.4 증성지질 TAG 측정

미세조류의 TAG 함량을 측정하는 방법으로 증량측정법과 nile red 염색법 등이 있는데, 본 연구에서는 단시간 내에 간편하고 신속하게 TAG 함량을 정량하는 방법인 nile red 염색방법을 사용하였다. TAG 함량은 Chen et al. (2009)의 nile red 분석 방법을 변형하여 다음과 같이 측정하였다. 먼저 초음파 발생기(F60, FISHER SCIENTIFIC, USA)를 이용하여 0.6 OD의 *A. platensis* 시료 5 mL를 3분간 전처리하였다. 전처리된 *A. platensis*에 100 µg/mL 농도의 nile red를 20 µl 주입하고 40°C에서 10분간 염색시킨 후, 형광광도계(F-7000, Hitachi Ltd., Japan)를 이용하여 excitation 470 nm, emission 560 nm에서 농도를 측정하고 TAG 함량을 분석하였다.

2.3.5 표준물질 및 검량선 작성

*A. platensis*의 TAG 함량을 측정하기 위해, 지질 표준물질인 triolein (Sigma-Aldrich Co., USA)을 스탠다드로 이용하였으며, 0.1, 0.5, 1, 2, 5, 10 µg/mL 농도의 triolein을 nile red로 염색하여 형광 강도를 측정하였다(Fig. 2). 이에 각 농도에 따른 형광 강도를 이용하여 검량선을 작성한 결과, 검량선의 상관계수(R²)는 0.9988로 높은 직선성을 보였으며, 이를 이용하여 *A. platensis*의 TAG 함량을 측정하였다.

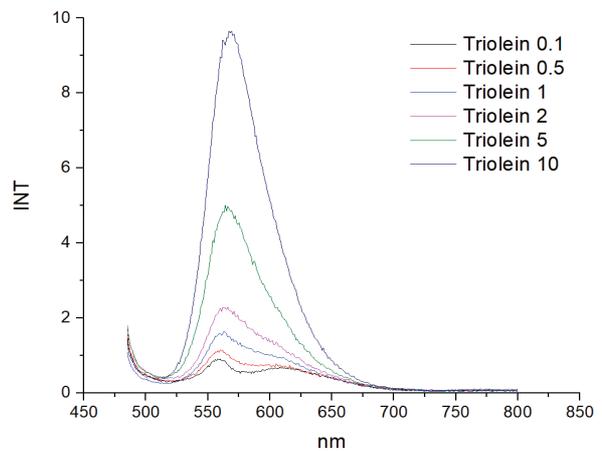


Fig. 2. Fluorescence value by triolein concentration at excitation 470 nm.

3. Results and Discussion

3.1 *A. platensis*의 성장량

pH 7~11에 대하여 *A. platensis*의 성장에 미치는 영향을 측정하여 아래 Fig. 3에 나타내었다. 비성장속도 관점에서 pH 7이 0.01/day로 가장 낮았으며, pH 9는 0.07/day, pH 11은 0.03/day의 비성장속도를 보였다.

비성장속도에서 관찰된 바와 같이, *A. platensis*가 성장하기에 적합한 pH 9 조건을 제외하고는, pH 7과 11에서 모두 pH 스트레스를 받은 것으로 보이나, pH 7에서 더 큰 스트레스를 받은 것으로 보인다.

이렇듯 적정 pH가 아닌 pH에서 성장이 저조한 이유로, 성장에 가용될 수 있는 에너지의 차이를 들 수 있다. Ihnken et al., (2014)에 따르면, 미세조류가 성장함에 있어 적합한 pH에서는 세포 내부 pH의 항상성을 유지하는데 소요되는 에너지는 거의 없다고 알려져 있다. 반면, 외부 pH가 적정 pH가 아닌 조건에서는 세포 내부의 pH를 적정한 pH로 유지하기 위하여 많은 양의 에너지를 소모하게 되고, 이로 인하여 실질적으로 세포합성에 사용되는 에너지가 낮기 때문에 미세조류의 성장과 대사과정에 피해를 줄 수 있다고 보고되고 있다(Sun et al., 2018).

적정 pH가 아닌 pH에서 성장이 저조한 또 하나의 이유로, 광계를 구성하는 성분과 물의 광분해가 발생하는 망간 클러스터의 보호성분을 들 수 있다. 광합성이 일어나는 막인 틸라코이드 막에는 광계가 존재하는데, 광계는 복잡한 막단백질로써 적어도 20여개의 단백질, 엽록소, 카로테노이드 등으로 구성되어 있다(Arntzen et al., 1978, as cited in Machold, 1981).

또한, 광합성 대사 중 명반응은 광계II에서 빛을 흡수하면 광계II의 망간 클러스터에서 물의 광분해가 발생하고, 이때 생성된 전자가 광계를 거치면서 명반응이 시작되는데, 광계II의 망간 클러스터는 많은 외인성 단백질에 의해 보호가 된다(Wollman et al., 1999).

이처럼 광계의 구성성분과 물의 광분해가 발생하는 망간 클러스터의 보호 성분이 모두 단백질로 구성되어 있고, 단백

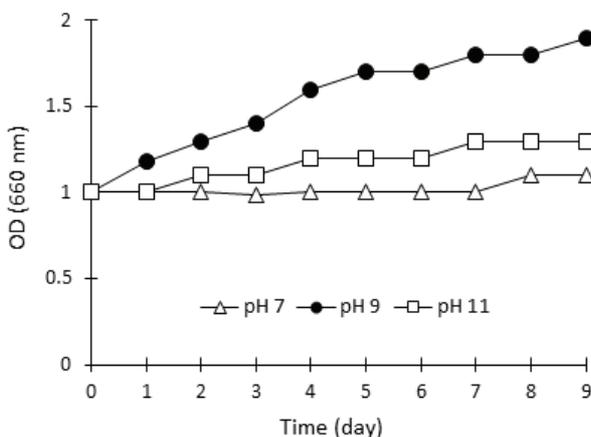


Fig. 3. Growth of *A. platensis* according to pH.

질은 pH에 의해 쉽게 변성이 되는 성질에 의해, Chorvatova (2020)에서 보고한 바와 같이 pH 스트레스 조건에서는 외부 pH에 의해 광계의 변성과 광합성 전자 수송에 문제가 발생되어 광합성이 제대로 이루어지지 못해 성장에 저해를 받은 것으로 추측되었다.

3.2 pH 조건에 따른 무기탄소 소비량

*A. platensis*의 무기탄소 소비에 미치는 pH의 영향을 Fig. 4에 나타내었다. 본 연구에서는 *A. platensis*의 적정 pH 9에서 무기탄소의 섭취가 가장 높을 것으로 예상되었으나, pH 7에서 무기탄소의 소비가 비정상적으로 과도하게 섭취됨을 확인하였다. pH 7에서 무기탄소 소비가 가장 높았으며, 적정 pH 9 보다 1.6배, pH 11 보다 4.5배 가량 높은 소비량을 보였다.

이렇듯 pH 7에서는 성장량에 비해 무기탄소 소비량이 높은데, 그 원인으로 *A. platensis*가 pH에 의해 스트레스를 받음에 따라, 세포 보호 메커니즘에 의해 TAG를 축적하는 특성을 지녔기 때문이라고 사료되었다(Lenka et al., 2016).

미세조류는 성장에 적합한 환경 조건에선 세포막의 인지질과 당지질과 같은 세포 구조적으로 중요한 역할을 하는 극성 지질을 축적하지만(Satpati and Pal, 2015), 외부 환경조건이 미세조류의 성장에 스트레스를 줄 때, 비극성 지질인 TAG를 축적한다고 알려져 있다(Illman et al., 2000). 이에 TAG가 생성되는 메커니즘을 검토해본 결과(Fig. 5), TAG는 광합성 과정 중 캘빈 회로(Calvin cycle)의 대사산물과 유기적인 관계를 지니고 있다고 판단되었다.

무기탄소가 유기화합물로 전환되는 과정인 캘빈 회로는 CO₂가 소비되면서 중간산물인 3-phosphoglycerate (3-PGA)가 형성되는데, Alishah Aratboni (2019)에 따르면 3-PGA는 지질 생합성 과정에서 acetyl-CoA로 파생되고, 파생된 acetyl-CoA가 ACCase에 의해 malonyl-CoA로 변환되며 지질 대사에 이용된다고 보고되었다.

즉, 광합성 과정에서 CO₂가 소비되고, 캘빈 회로에서 생성되는 3-PGA로 인해, acetyl-CoA가 파생되며, acetyl-CoA가 malonyl-CoA로 변환됨으로써 TAG의 합성이 이루어지므로,

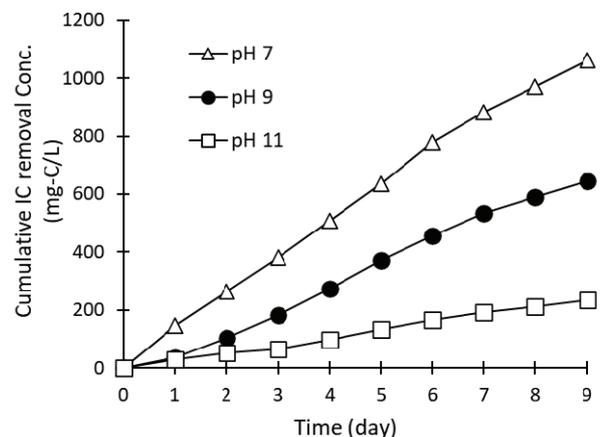


Fig. 4. Cumulative consumption of inorganic carbon by *A. platensis* as a function of pH.

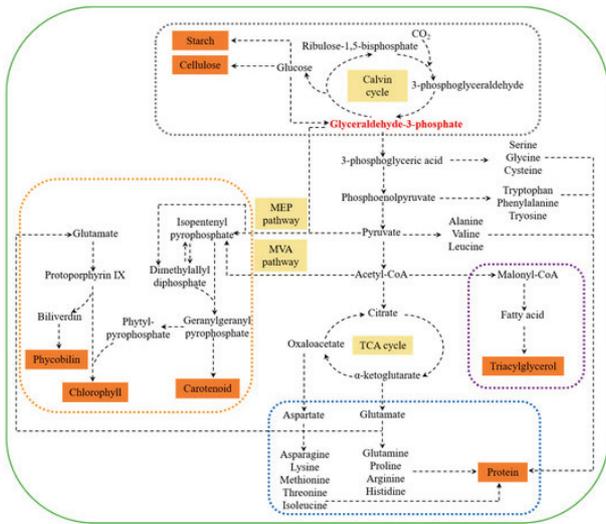


Fig. 5. Mechanism of carbohydrate, protein and lipid metabolism in microalgae. (Ma et al., 2020) (Gray: carbohydrate biosynthetic pathway, blue: protein biosynthetic pathway, Purple: lipid biosynthesis pathway, orange: pigment biosynthesis pathway)

pH 7에서의 높은 무기탄소 섭취는 TAG의 합성 및 축적과 관련이 있을 것이라 판단되었다. 이 부분을 규명하기 위해, 아래 3.3에서 pH에 따른 *A. platensis*의 TAG 함량변화를 분석 및 고찰하였다.

3.3 pH 조건에 따른 TAG 생성특성

9일에 걸친 pH 7~11에 대한 *A. platensis*의 TAG 함량분석 결과는 Fig. 6과 같다. TAG 분석을 통해 pH 조건 별 TAG 함량을 비교한 결과, pH 9와 pH 11은 TAG 함량에 유의한 차이를 보이지 않았으나, pH 7에서는 4일차 이후, pH 9와 pH 11에 비해 TAG 함량이 약 2배 높았다. 이는 앞서 언급한 바와 같이, *A. platensis*가 pH 스트레스에 의해 TAG를 축적하는 특성에 의한 결과라고 판단되었다.

성장량 및 기질 소비에서 검토된 바와 같이, *A. platensis*는 pH 11에서도 pH에 의한 스트레스를 받았으나, TAG 함량은 축적되지 않았다. 이는 TAG의 축적이 무기탄소 섭취와 관련성이 존재할 것으로 예상되어 Fig. 7에 *A. platensis*가 하루당 섭취한 무기탄소의 양을 제시하여 TAG의 축적과 미치는 영향을 파악하고자 하였다.

하루당 섭취한 무기탄소를 pH별로 비교하였을 때, pH 7은 120 mg-C/L/day, pH 9는 53 mg-C/L/day, pH 11은 23 mg-C/L/day씩 섭취함을 보였다. 무기탄소 섭취량과 TAG 함량을 비교해본 결과, TAG의 함량은 무기탄소 섭취와 비례하는 것을 볼 수 있었다. 따라서 무기탄소의 섭취량이 가장 많은 pH 7에서 TAG 함량 또한 높으며, 무기탄소 섭취량이 가장 적은 pH 11에서 TAG 함량이 가장 낮음을 보였다.

그러나 pH 9에서의 무기탄소 섭취량이 pH 11 보다 약 2배 높음에도 불구하고 TAG의 함량이 pH 11과 유의한 차이를 보이지 않은 이유로, *A. platensis*의 적정 pH에서 성장이 활

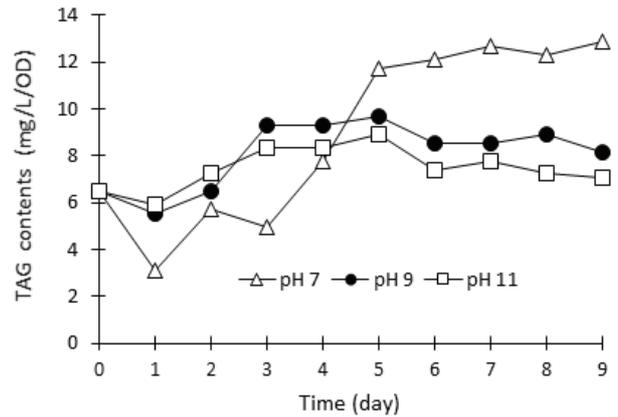


Fig. 6. TAG content of *A. platensis* according to pH.

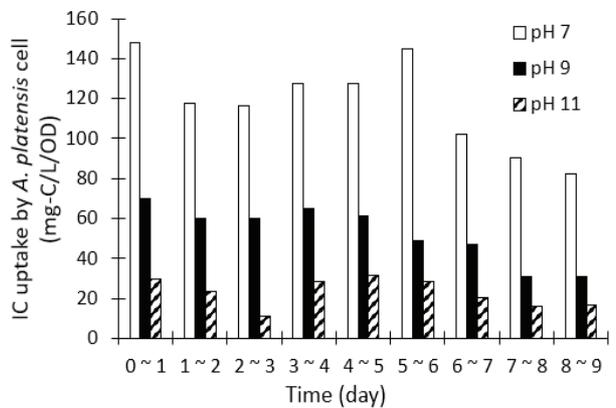


Fig. 7. Inorganic carbon consumption per day by *A. platensis* as a function of pH.

발함에 따라 발생하는 대사적 특성 때문이라고 추측하였다.

pH 9에서 *A. platensis*는 높은 비성장 속도를 보이므로, 섭취한 무기탄소는 지질의 생성뿐만 아니라, 성장에 필요한 물질인 단백질, 탄수화물 등의 합성에도 사용되기 때문에, pH 9에서 섭취한 무기탄소의 양만큼 TAG의 함량이 증가하지 않았다고 추측하였다.

본 실험을 통해 *A. platensis*의 적정 pH 보다 낮은 pH에서 무기탄소 섭취가 비정상적으로 높았던 것은 스트레스 조건에서 세포를 보호하고자, TAG의 함량을 높였기 때문이라고 판단되었다. 즉, TAG의 합성은 미세조류가 섭취한 무기탄소 대사과정에서 생성되는 acetyl-CoA를 이용하는 특성을 바탕으로, *A. platensis*가 외부 pH에 의해 스트레스를 받음에 따라 TAG의 함량은 무기탄소의 섭취량과 비례하여 생성되는 경향을 볼 수 있었다.

4. Conclusion

본 연구는 적정 pH가 알칼리성인 *A. platensis*를 이용하여 pH에 따른 *A. platensis*의 성장 및 대사특성을 파악하고자 하였다. *A. platensis*의 적정 pH 9에서 무기탄소의 섭취가 가장 높을 것으로 예상되었으나, 예상과 달리 pH 7에서 과도한

무기탄소를 섭취한 결과에 대한 원인을 규명하고자 하였다. 즉, pH에 따른 *A. platensis*의 무기탄소 섭취가 세포 내부의 지질 생성과 연관성이 깊다고 판단되어 TAG 합성 대사 메커니즘 관점에서 확인해 보고자 하였다. 이를 실험적으로 검증하기 위해, pH에 따른 *A. platensis*의 체내 지질분석을 통해 pH가 무기탄소 섭취량에 미치는 영향을 파악하였다. 그 결과, pH에 따른 *A. platensis*의 무기탄소 섭취가 TAG 함량에 미치는 영향의 경우, pH 9와 pH 11은 TAG 함량에 유의한 차이를 보이지 않았으나, pH 7에서는 pH 9와 pH 11에 비해 TAG 함량이 약 2배 높았다. *A. platensis*가 pH 7에서 과도한 무기탄소 소비경향을 보였던 원인은, 외부 pH 스트레스 조건에서 세포를 보호하고자, 무기탄소의 섭취량에 비례하여 TAG 함량을 높였기 때문이라고 판단되었다. 또한, 무기탄소의 섭취량과 비례하여 생성되는 TAG 함량은, 무기탄소가 유기화합물로 전환되는 캘빈회로에서 생성되는 acetyl-CoA가 TAG의 합성에서 요구되기 때문이라고 사료된다.

Acknowledgement

이 논문은 2018년도 정부(미래창조과학부)의 재원으로 한국연구재단의 지원을 받아 수행된 연구이며(No.NRF-2019R1A2C1084155) 이에 감사드립니다.

References

- Alishah Aratboni, H., Rafiei, N., Garcia-Granados, R., Alemzadeh, A., and Morones-Ramírez, J. R. (2019). Biomass and lipid induction strategies in microalgae for biofuel production and other applications, *Microbial Cell Factories*, 18, 1-17.
- Amaro, H. M., Salgado, E. M., Nunes, O. C., Pires, J. C., and Esteves, A. F. (2023). Microalgae systems-environmental agents for wastewater treatment and further potential biomass valorisation, *Journal of Environmental Management*, 337, 117678.
- 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, *Journal of Microbiological Methods*, 77(1), 41-47.
- Chorvatova, A. M., Uherek, M., Mateasik, A., and Chorvat, D. (2020). Time-resolved endogenous chlorophyll fluorescence sensitivity to pH: Study on *Chlorella* sp. algae, *Methods and Applications in Fluorescence*, 8(2), 024007.
- Del Campo, J. A., Moreno, J., Rodríguez, H., Vargas, M. A., Rivas, J., and Guerrero, M. G. (2000). Carotenoid content of chlorophycean microalgae: Factors determining lutein accumulation in *Muriellopsis* sp.(chlorophyta), *Journal of Biotechnology*, 76(1), 51-59.
- Ihnken, S., Beardall, J., Kromkamp, J. C., Serrano, C. G., Torres, M. A., Masojidek, J., Malpartida, I., Abdala, R., Jerez, C. G., and Malapascua, J. R. (2014). Light acclimation and pH perturbations affect photosynthetic performance in *Chlorella* mass culture, *Aquatic Biology*, 22, 95-110.
- Illman, A. M., Scragg, A. H., and Shales, S. W. (2000). Increase in *Chlorella* strains calorific values when grown in low nitrogen medium, *Enzyme and Microbial Technology*, 27(8), 631-635.
- Lenka, S. K., Carbonaro, N., Park, R., Miller, S. M., Thorpe, I., and Li, Y. (2016). Current advances in molecular, biochemical, and computational modeling analysis of microalgal triacylglycerol biosynthesis, *Biotechnology Advances*, 34(5), 1046-1063.
- Ma, R., Wang, B., Chua, E. T., Zhao, X., Lu, K., Ho, S., Shi, X., Liu, L., Xie, Y., and Lu, Y. (2020). Comprehensive utilization of marine microalgae for enhanced co-production of multiple compounds, *Marine Drugs*, 18(9), 467.
- Machold, O. (1981). Thylakoid membrane proteins of higher plant chloroplasts I. Methodical aspects, *Biochimie Und Physiologie Der Pflanzen*, 176(6), 535-548.
- Ministry of Environment (ME). (2021). *Current status of industrial wastewater generation and treatment*, 11-1480000-001452-10, Ministry of Environment. [Korean Literature].
- Muley, P., Dhupal, M., and Vora, D. (2014). Sequestration of atmospheric carbon dioxide by microbial carbonic anhydrase, *IOSR Journal of Environmental Science, Toxicology and Food Technology (IOSR-JESTFT)*, 8(11), 45-48.
- Nowicka-Krawczyk, P., Mühlsteinová, R., and Hauer, T. (2019). Detailed characterization of the *Arthrospira* type species separating commercially grown taxa into the new genus *Limnospira* (cyanobacteria), *Scientific Reports*, 9(1), 694.
- Price, G. D., Pengelly, J. J., Forster, B., Du, J., Whitney, S. M., von Caemmerer, S., Badger, M. R., Howitt, S. M., and Evans, J. R. (2013). The cyanobacterial CCM as a source of genes for improving photosynthetic CO₂ fixation in crop species, *Journal of Experimental Botany*, 64(3), 753-768.
- Satpati, G. G. and Pal, R. (2015). Rapid detection of neutral lipid in green microalgae by flow cytometry in combination with Nile red staining – an improved technique, *Annals of Microbiology*, 65, 937-949.
- Sun, X., Ren, L., Zhao, Q., Ji, X., and Huang, H. (2018). Microalgae for the production of lipid and carotenoids: A review with focus on stress regulation and adaptation, *Biotechnology for Biofuels*, 11, 1-16.
- Wollman, F., Minai, L., and Nechushtai, R. (1999). The biogenesis and assembly of photosynthetic proteins in thylakoid membranes, *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics*, 1411(1), 21-85.
- Yu, Y., Li, X., Wang, Z., Rong, J., Wang, K., Huo, Y., Geng, Y., Li, Y., and Wen, X. (2021). Effects of caprolactam wastewater on algal growth and nutrients removal by *Arthrospira platensis*, *Applied Sciences*, 12(1), 227.
- Zhai, J., Li, X., Li, W., Rahaman, M. H., Zhao, Y., Wei, B., and Wei, H. (2017). Optimization of biomass production and nutrients removal by *Spirulina platensis* from municipal wastewater, *Ecological Engineering*, 108, 83-92.