

NaNO₃, NaHCO₃ 농도가 *Arthrospira platensis* 성장에 미치는 영향

최수정, 하중명, 이재화*

Effect of NaNO₃ and NaHCO₃ Concentration on Microglae *Arthrospira platensis* Growth

Soo-Jeong Choi, Jong-Myung Ha, and Jae-Hwa Lee*

Received: 8 August 2015 / Revised: 11 December 2015 / Accepted: 15 December 2015

© 2015 The Korean Society for Biotechnology and Bioengineering

Abstract: *Arthrospira platensis* (*A. platensis*) is one of the most explored cyanobacteria and has been studied for proteins, vitamins, pigment (chlorophyll and carotenoids) and fatty acid. In this study, we tested the effect of NaHCO₃ and NaNO₃ on the microalgae growth under photoautotrophic culture in *A. platensis*. As a result, cell growth and dry cell weight were increased in proportion to the NaHCO₃ and NaNO₃ concentration. Pigment (chlorophyll and carotenoids) contents of *A. platensis* were increased with proportion to NaHCO₃ concentration. But, the content of pigment (chlorophyll and carotenoids) in 100% NaNO₃ medium of *A. platensis* was the highest, 40%, 140% and 200% NaNO₃ medium with pigment content of *A. platensis* was reduced. In conditions of NaHCO₃ (50%) or NaNO₃ (40%) limitation, *A. platensis* could accumulate lipids to high as 1.7-fold and 1.3-fold.

Keywords: *Arthrospira platensis*, NaHCO₃ and NaNO₃, Lipid, Pigment, Photosynthesis

1. INTRODUCTION

미세조류는 육상식물에 비해 높은 광합성 효율을 가지며, 타 작물에 비해 대량배양이 용이하다는 장점을 가진다 [1]. 미세조류는 이산화탄소 및 빛 에너지를 이용하여 광합성을 진행

하며 바이오매스 중량 당 50%의 탄소원을 함유하는 것으로 알려져 있다. 이는 약 100톤의 미세조류 생산을 위해 180톤이 넘는 이산화탄소가 소모됨을 말해주는 것으로 미세조류가 이산화탄소 고정화 산업에 이용되는 것을 말해준다 [2,3]. *Arthrospira platensis* (*A. platensis*)는 나선형의 남조류로 비타민, 지질 그리고 carotenoids, phycoeyanin, chlorophyll-α와 같은 색소를 함유한다 [4]. *A. platensis*는 비타민, 미네랄, 단백질 그리고 gamma-linoleic acid (GLA)와 같은 불포화 지방산을 포함하고 있어 영양학적으로 높은 가치를 가진다 [5]. *A. platensis*는 폐물 화합물과 같은 항산화물질이 함유되어 건강기능식품 및 의약품 제조 산업에 이용되고 있다 [6].

광합성으로 성장하는 미생물을 이용한 바이오연료 생산은 효과적인 재생연료로 각광받고 있으며, 미세조류는 세포 내 지질을 추출하여 바이오디젤을 생산할 수 있다 [7,8]. 미세조류는 육상 작물에 비해 약 50~100 배 이상 높은 지질 함유량을 가지지만, 세포의 밀도가 낮고 지질과 같은 유용물질의 추출 생산성이 낮아 경제적인 한계를 가진다 [9]. 이러한 단점을 극복하기 위해 미세조류 내 유용물질 함량 변화를 위한 연구들은 크게 균주 개량 방법과 배양환경 변화를 통한 방법으로 나눌 수 있다. 미세조류 균주 개량 방법은 유전적 조작 및 돌연변이원 처리를 통한 방법으로 세포 내 대사산물 함량 증대라는 장점을 가지지만, 시간 및 노동력이 많이 든다는 단점을 가진다 [10]. 배양 시 고려되어야 하는 조건으로는 이산화탄소 주입량, 온도, 배지 성분, 빛의 세기 (광도)가 있다. 미세조류 배양 시 이산화탄소를 주입할 경우 빛에 노출되는 면적이 넓어 생물량 증대라는 결과를 얻을 수 있으며, 주입되는 이산화탄소의 농도에 따라 미세조류의 성장속도가 결정된다고 알려져 있다 [11]. S. Chiu 등은 이산화탄소 농도를 조절하여 미세조류를 배양하였으며, 5% 이상의 이산화탄소를 주입

신라대학교 의생명과학대학 제약공학과
Department of Pharmaceutical Engineering, College of Medical and Life Science, Silla University, Busan 617-736, Korea
Tel: +82-51-999-5831, Fax: +82-51-999-5831
e-mail: jhalee@silla.ac.kr

할 경우 생장이 저해되며 2%의 이산화탄소를 주입할 경우 일반 공기 주입에 비해 약 4 배 이상의 증대된 생장률을 보고하였다 [12]. E. D. G. Danesi 등 [13]은 빛 세기를 달리하여 *A. platensis*를 배양 하였으며, 광도가 낮아질수록 세포 내 합성되는 chlorophyll- α 의 함량이 증가함을 확인하였다.

배지 내 영양소 결핍은 스트레스 요인으로 작용하게 되어 미세조류 생장에 영향을 미치는 것으로 보고된다 [14,15]. 미세조류의 성장에는 세포 내 지질 합성과 밀접한 관련이 있으며, 배지 내 영양분은 세포 바이오매스 함량 당 지질 함량 및 생산량을 결정하는 중요한 요인으로 작용한다. A. Converti 등 [16]은 질소원 농도 및 배양 온도를 조절하여 *Nannochloropsis oculata*와 *Chlorella vulgaris*를 배양하는 실험을 진행하였으며, 그 결과 배지 내 질소원 농도 및 배양 온도의 감소를 통해 세포 내 지질 함유량이 증대됨을 확인 하였다. 배지 내 질소원 농도 조절을 통해 *Chlorella protothecoides* 배양한 실험에서도 질소원이 증가함에 따라 세포 내 지질 축적량의 감소를 확인하였다 [17]. 배지 내 질소원 결핍은 세포 내 chlorophyll- α 감소 및 광합성으로 생성되지 않는 carotenoids의 함량이 증대됨을 확인하였다 [18]. 미세조류 생장 배지 내 무기탄소원 및 질소원의 결핍을 통해 세포 내 thylakoid membrane의 함량 감소, acyl hydrolase 활성 증대 및 phospholipid 자극과 같은 현상이 발생하는 것으로 알려져 있다 [19,20].

배지 성분의 결핍에 대한 연구는 많이 진행되어 있는데 반해, 성분의 증대에 대한 연구는 그렇지 않음을 판단할 때 본 연구는 상용화를 위해 중요하다고 판단된다. 본 연구는 *A. platensis* 배지 내 NaHCO_3 및 NaNO_3 의 함량을 조절하여 배지 성분에 따른 균주 내 유용물질 함량 변화를 분석하고자 하였다.

2. MATERIALS AND METHOD

2.1. 사용균주 및 배양방법

본 연구는 *Arthrospira platensis* NIES 39 (KCTC AG30033)를 한국생명공학연구원 생물자원센터로부터 분양받아 사용하였다. 알칼리성 무기배지인 SOT배지로 균주를 배양하였다. SOT 배지 (Table 1)는 SOT-1과 -2를 각각 121°C에서 15분 간 멸균 및 냉각시켜 혼합 후 10 N NaOH를 이용해 pH 9로 조절하였다. 균주는 35°C, 120 rpm, 광도 6,000 lux의 조건에서 배양하였다. 광주기는 12시간 : 12시간 (명 : 암)으로 명반응 시형광등을 사용하였다 [21].

2.2. 성분 제한 배지 제조 및 세포 배양

SOT 배지 내 질소원에 해당하는 NaNO_3 와 탄소원인 NaHCO_3 의 함량을 조절하여 배지를 제조, 멸균 및 냉각을 진행하였다. SOT 배지 1 L를 기준으로 NaNO_3 2.5 g을 100%로 보고 0 g에서부터 5 g까지 용량을 조절하였으며 NaHCO_3 의 함량은 16.8 g을 100%로 0 g부터 33.6 g까지 첨가하여 배지를 제조하였다. 각각의 영양분 제한에 따른 세포 생장을 확인하기 위한 실험

Table 1. Components of SOT medium

	Components	Amounts
SOT-1 (600 mL)	NaHCO_3	16.8 g
	K_2HPO_4	0.5 g
	NaNO_3	2.5 g
SOT-2 (400 mL)	K_2SO_4	1 g
	NaCl	1 g
	$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0.2 g
	$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0.04 g
	$\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0.01 g
	$\text{Na}_2\text{EDTA} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0.08 g
	A5 trace-metal sol.	1 mL
A5 trace-metal sol. (1 L)	H_3BO_3	2.86 g
	$\text{MnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	2.50 g
	$\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0.22 g
	$\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0.21 g
	$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	0.08 g

을 진행하는 것이므로 SOT 배지에 들어가는 타 성분의 함량은 1 L를 기준으로 동일하게 첨가하였다.

2.3. 균체량 분석

균체량은 520 nm에서 UV/Vis 분광기 (Optizen 2120 UV, Mecasys Ltd, Korea)를 이용하여 흡광도를 측정하였다. 건조 균체량 (Dry cell weight, DCW)은 항량된 종이필터 (Whatman filter)를 이용하여 여과된 균체를 건조기에서 105°C로 3시간 동안 건조시켜 무게를 측정하였다 [22].

2.4. 색소 함량 분석

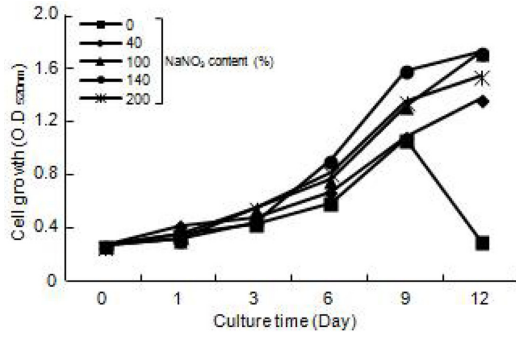
미세조류 내 색소 축적량 변화를 확인하기 위해 배양 12일차에 세포 내 클로로필 및 카로티노이드의 함량을 분석하였다. 세포 내 색소함량 측정을 위해 세포 배양액 1 mL을 13,000 rpm에서 3분간 원심분리 후 상등액을 제거하고 methanol 1 mL을 첨가하여 60°C에서 30분간 반응하였다. 반응 후 0°C에서 2분간 냉각하고 13,000 rpm, 2분간 원심분리하여 상등액을 UV/Vis 분광기로 흡광도를 측정하였다. Chlorophyll은 650 nm, 665 nm에서 흡광도를 측정하였으며 carotenoid는 461 nm, 664 nm에서 흡광도 측정 후 아래 식에 대입하여 계산하였다 [23].

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

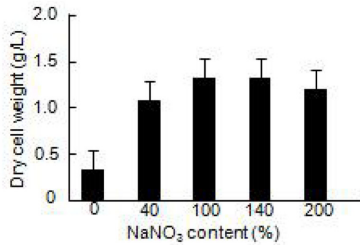
$$\text{Carotenoid (mg/L)} = (A_{461} + (0.046 \times A_{664})) \times 4$$

2.5. 지질함량 분석

배지 성분 변화에 따른 세포 내 지질 함량 변화를 알아보기 위해 Chen 등 [24] 및 Bertozzini 등 [25]의 방법을 준용하여 측정하였다. 측정하려는 세포의 흡광도를 520 nm에서 0.5로 조정 후 세포 10 μL , 증류수 138 μL , nile red (0.5 $\mu\text{g/mL}$) 2 μL , DMSO 50 μL 를 혼합하여 40°C에서 10분간 반응 후 형광



(a)



(b)

Fig. 1. Effect of NaNO₃ concentration on cell growth and dry cell weight of *A. platensis*, (a) Cell growth of *A. platensis*, (b) Dry cell weight of *A. platensis*.

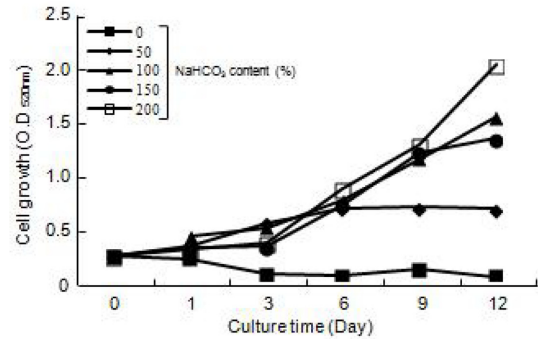
강도를 측정하여 지질 함량을 분석하였다. 지질 함량 정량을 위해 triolein (Sigma, USA)를 이용하여 검량선을 작성하였으며 좋은 직선성 (R²=0.999)를 나타내어 본 실험에 이용하였다.

3. RESULTS AND DISCUSSION

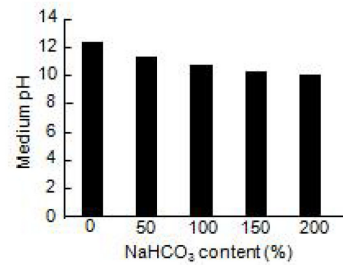
3.1. NaNO₃ 및 NaHCO₃ 농도 배지 성장 변화

대수증식기의 *A. platensis* 세포를 3,000 rpm에서 10분간 원심 분리하여 상등액 제거 후 세포를 수확하였다. 세포를 인산완충용액으로 2회 세척하였으며, 농도별로 제조한 SOT 배지를 첨가하여 배양하였다.

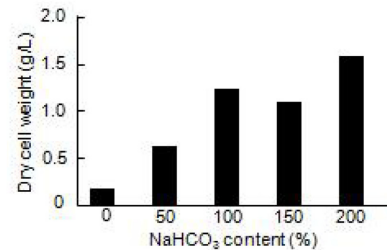
NaNO₃ 농도별 배지 성장을 확인해 본 결과 배지에 첨가한 양에 비례하여 성장함을 확인하였다 (Fig. 1(a)). NaNO₃ 0% 배지에서는 배양 9일차까지 세포가 성장하였으나 12일차에는 세포의 사멸을 확인하였다. 0% 배지의 세포 건조중량은 0.3 g/L로 100%는 1.3 g/L, 200%에서는 1.2 g/L로 SOT 배지 내 NaNO₃ 함량이 100% 이상에서는 세포 건조중량의 감소를 확인하였다 (Fig. 1(b)). 배양 12일 차에 NaHCO₃ 함량을 달리 하여 만든 배지의 세포 성장을 비교한 결과 NaHCO₃의 함량이 0%인 배지에서는 세포 대부분이 사멸하였으나, 다른 배지에서 성장한 세포의 경우 농도에 비례하여 세포 성장률이 나타남을 확인하였다 (Fig. 2(a)). 배지 내 NaHCO₃ 함량이 pH 변화에 관여함을 바탕으로 배양 12일차에 세포 배양액의 pH를 측정하였다. NaHCO₃가 들어가지 않은 0%의 배양액에서는



(a)



(b)



(c)

Fig. 2. Effect of NaHCO₃ concentration on cell growth, medium pH and dry cell weight of *A. platensis*, (a) Cell growth of *A. platensis*, (b) Medium pH of *A. platensis*, (c) Dry cell weight of *A. platensis*.

pH가 12.0이었으며, 100%에서는 10.4, 200%에서는 9.7로 NaHCO₃의 함량이 증가함에 따라 pH가 감소되는 양상을 확인하였다 (Fig. 2(b)). NaHCO₃가 0%인 배지에서 배양한 세포의 건조중량은 0.2 g/L인데 반해 200%가 첨가된 배지에서는 1.6 g/L로 pH가 2.3 낮아질 경우 세포 건조중량은 8배 가까이 증가됨을 알 수 있었다 (Fig. 2(c)). 배양액의 pH 변화는 세포의 성장률 및 건조중량에 영향을 미치는 것을 확인하였다.

M. Jitendra 등 [26]은 NaNO₃와 NaHCO₃ 함량을 조절하여 *A. platensis* 배양 실험을 진행하였다. 그 결과 NaNO₃ 함량이 0.15 g/L일 때에는 세포 건조중량이 3.0 g/L였으며 NaNO₃가 4.0 g/L에서는 3.56 g/L로 NaNO₃ 함량이 26배 증가했음에도 불구하고 세포 건조중량은 1.2배 증대됨을 확인하였다. 배지 내 NaHCO₃ 함량이 12 g/L일 경우 2.8 g/L의 세포 건조중량을 나타내었지만, 40 g/L에서 세포 건조중량이 4.4 g/L로 약 1.5

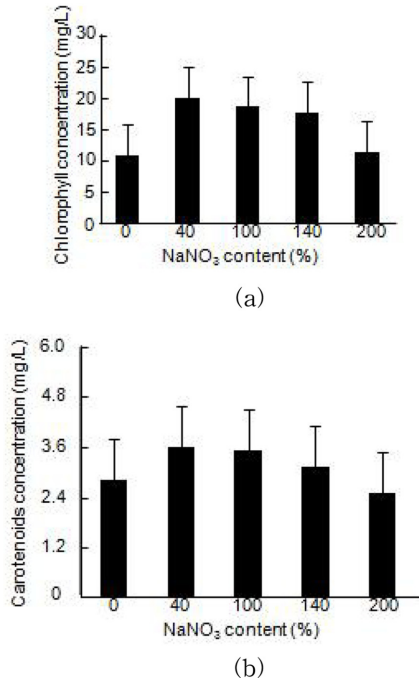


Fig. 3. Effect of NaNO₃ concentration on pigment (chlorophyll and carotenoids) concentration of *A. platensis*, (a) Chlorophyll concentration of *A. platensis*, (b) Carotenoid concentration of *A. platensis*.

배 증대됨을 확인하였다. X. Li 등 [27]은 배지 내 질소원과의 비율에 따른 미세조류 성장 실험을 진행하였으며, 질소원의 농도가 증가하였을 때 세포 생장의 증가를 확인하였다. L. E. Schmidt 등 [28]은 배지 내 pH 변화에 따른 세포 농도 변화를 확인하는 실험을 진행하였으며, pH가 알칼리성을 필수록 세포 농도가 높아짐을 보고하였다.

3.2. 색소 함량 변화

성분의 함량이 조정된 배지의 세포 내 색소함량 변화를 분석하기 위해 배양 12 일차에 *A. platensis* 내 클로로필과 카로티노이드 함량을 측정하였다. NaNO₃ 농도가 100%일 경우 클로로필 함량이 18.5 mg/L였으며, 0%일 때에는 10.6 mg/L에 비해 약 1.7배 증가하였으며 200% (11.3 mg/L)에 비해 약 1.6배 증가함을 확인하였다 (Fig. 3(a)). 카로티노이드 함량은 100%에서 3.5 mg/L로 0% (2.8 mg/L) 및 200% (2.5 mg/L)에 비해 약 1.4배 높은 함유량을 보였다 (Fig. 3(b)). 이는 SOT 배지 내 NaNO₃ 농도의 결핍 혹은 과잉이 세포 내 색소함량을 저해함을 유추할 수 있다. L. M. Colla 등 [29]도 NaNO₃ 농도를 조절하여 *A. platensis* 배양 실험을 진행하였으며, NaNO₃의 농도가 낮을 경우 (0.625~1.875 g/L)에는 농도에 비례하여 세포 성장 및 색소 함량이 증대되었지만, 농도가 높아질 경우 (2.5 g/L 초과) 감소함을 보고하였다. D.-L. Feng 등 [30]은 NO₂-N의 농도를 달리하여 *A. platensis* 배양 실험을 진행하였고, 배지 내 NaNO₃의 농도가 증가함에 따라 클로로필- α 의 농도가 증가함을 확인하였다.

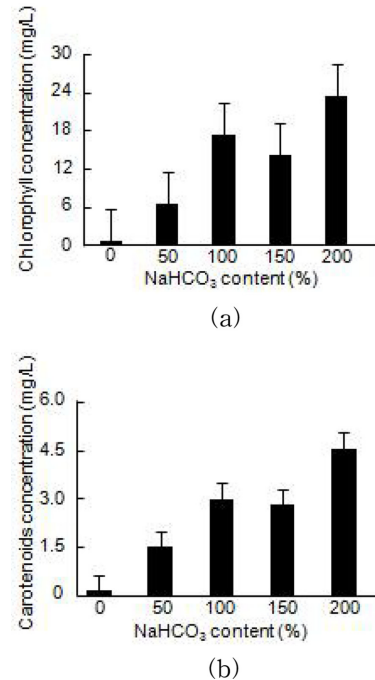


Fig. 4. Effect of NaHCO₃ concentration on pigment (chlorophyll and carotenoids) concentration of *A. platensis*, (a) Chlorophyll concentration of *A. platensis*, (b) Carotenoid concentration of *A. platensis*.

NaHCO₃ 농도는 NaNO₃ 농도와 다른 결과로 100%에서는 17.1 mg/L의 클로로필 함량을 나타내었지만, 200%에서는 23.1 mg/L로 1.4배 증대된 클로로필 생산량을 보였으며, 카로티노이드 함량 또한 100% (3.0 mg/L)보다 200% (4.6 mg/L)에서 약 1.5배 증대됨을 확인하였다 (Fig. 4). G. Sharma 등 [31]은 NaHCO₃의 농도를 25%, 50%, 100%로 나누어 배지를 제조한 뒤 *A. platensis* 배양 실험을 진행하였으며, 농도가 증가함에 따라 클로로필- α 의 함량이 증대됨을 확인하였으며 배지 내 HCO₃⁻의 농도 증가가 세포의 광합성 성장률을 증대한다고 보고 하였다. 또한 배지 내 무기 탄소원의 축적은 배지 내 해리된 탄산염으로 인해 발생하며, 발생된 탄산염은 배양액의 pH 조정 및 클로로필- α 합성 감소 및 CO₂ 고정화율과 연관이 있음을 보고하였다 [32,33].

3.3. 지질 함량 변화

배지 조성에 따른 세포의 지질 축적량 변화를 확인하기 위해 배양 12일 차에 Nile red를 이용한 염색 및 형광강도 측정을 통해 지질 함량을 측정, 분석하였다. NaNO₃ 농도에 따른 세포의 지질 함량 측정은 40%부터 200%까지의 세포만 측정하였다. 40%의 NaNO₃가 포함된 배지에서의 세포 지질 함량은 70.3 mg/L로 100% (53.7 mg/L)에 비해 약 1.3배 증대되었으며, 140%에서의 지질 함량은 75.2 mg/L로 100%에 비해 약 1.4배 증대됨을 확인하였다 (Fig. 5(a)). NaHCO₃ 농도에 따른 지질 함량은 50%부터 200%까지 측정하였으며, 50%에서는 90.9 mg/L로 대조군인 100% (51.3 mg/L)에 비해 1.8배 증대

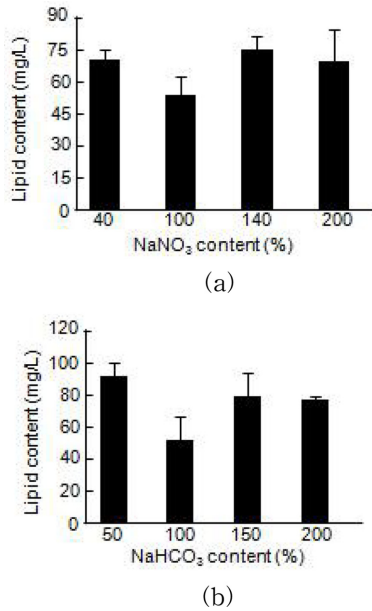


Fig. 5. Effect of NaNO₃ and NaHCO₃ concentration on lipid concentration of *A. platensis*, (a) Effect of NaNO₃ concentration on lipid concentration of *A. platensis*, (b) Effect of NaHCO₃ concentration on lipid concentration of *A. platensis*.

됨을 확인하였다 (Fig. 5(b)).

미세조류는 영양분 농도 변화 및 외부적 요인에 의한 스트레스 상황에서 성장할 경우 그에 대처하기 위해 세포 내 대사 과정을 변환하는 것으로 알려져 있다 [34]. V. Ordog 등 [35]은 질소원 조절을 통해 세포 내 지질 축적량의 변화를 관찰하고자 하였으며 질소원의 농도가 감소할수록 지질 축적량은 2.2배에서 1.6배까지 차이를 확인하였다. Y. Li 등 [36] 또한 질소원 농도를 조절하여 *Neochloris oleabundans* 균주를 배양하였으며, 질소원의 농도가 낮을수록 지질 함량이 증대됨을 보고하였다. Boussiba [37]는 질소 결핍 성장환경에서 *Haematococcus pluvialis*의 특성을 분석하였으며, 질소 결핍 환경에서 세포 내 astaxanthin의 함유량이 증가함을 보고하였다. F. Guiheneuf 등 [38]은 빛의 세기 및 탄소원의 농도에 따른 세포의 성장률 및 지질 함량의 차이를 분석하고자 하였으며, 동일한 빛을 조사한 환경에서 탄소원의 농도가 증가할수록 세포 농도 및 지질 함량이 증대됨을 확인하였다. L. Xia 등 [39]은 NaHCO₃ 농도에 따른 *Desmodesmus abundans* 세포 내 지질 축적량 변화를 확인하고자 하였다. 배지 내 NaHCO₃ 농도가 0 g/L에서는 23.7%의 지질을 함유하였으며, 25 g/L에서는 34.9%의 지질을 함유하여 약 1.5배 증가함을 보고하였다.

본 실험에서는 질소원과 탄소원이 증대되었을 경우 지질 함량이 증가함을 확인하였다. I. Gill 등 [40]은 미세조류 내에서 탄소원을 기질로 이용하여 지질을 생산하며, 이는 탄소원의 농도가 증가할 경우 세포 내 생체막 유동성의 향상성 유지를 위해 glycerol 및 지질 대사의 증가를 발표하였다. D. Feng 등 [41]과 Kim 등 [42]은 배지 내 질소원의 과다 주입은 질소

원 결핍과 같은 세포 내 스트레스를 유발하여 지질 함량이 증대됨을 보고하였다. 배지 내 질소원 과다는 세포의 TAG 생산을 증가시키는 것으로 알려져 있다. 이처럼 배지 내 질소원 및 탄소원의 증대가 미세조류 내 지질 함량을 증대시키는 본 실험 결과와 상응된다고 판단된다.

4. CONCLUSION

본 연구는 미세조류 *A. platensis*의 배지 성분 가운데 NaHCO₃와 NaNO₃의 함량 조절을 통한 균주의 성분 함량 변화를 알아보고자 하였다. NaHCO₃ 및 NaNO₃의 농도에 비례하여 *A. platensis*의 세포 성장 및 건조중량이 증가함을 확인하였다. 배양 12일 차에 NaHCO₃의 농도를 조절한 배양액의 pH를 측정할 결과 NaHCO₃를 넣지 않은 배양액의 pH가 12.0인데 반해 NaHCO₃의 농도가 200%인 배양액에서 약 9.7을 나타내어 NaHCO₃ 농도가 증가할수록 pH가 감소하며, 이에 따른 세포 성장률 및 건조중량이 증가함을 확인 할 수 있었다. 배양 12일 차에 배지 조성에 따른 색소 (클로로필 및 카로티노이드) 함량을 분석하였다. NaHCO₃농도에 따른 색소 함량의 변화는 세포 건조중량의 양상과 유사한 결과로, 배지 내 NaHCO₃의 농도가 증가함에 따라 클로로필 및 카로티노이드의 함유량이 증가함을 확인할 수 있었다. NaNO₃의 농도에 따른 세포의 색소함량은 0%에서부터 100%까지는 증가하였으나, 100% 이후부터는 색소함량이 감소하는 양상을 확인하였다. NaHCO₃ 및 NaNO₃ 함량 별 세포 내 지질 축적량을 측정하였으며, 그 결과 두 성분 모두 100%에서 가장 낮은 지질 함유량을 확인하였다. NaHCO₃의 함량이 50%일 경우에는 90.9 mg/L로 100% (51.3 mg/L)에 비해 약 1.8배 증가하였으며, NaNO₃의 함량이 50%일 때에는 70.2 mg/L로 100% (53.6 mg/L)에 비해 1.3배 증가함을 확인하였다. 배지 내 질소원과 탄소원 조절은 균주 성장에 스트레스 요인으로 작용하여 세포 성장률 및 유용물질 (색소 및 지질)함량을 증감시키는 요인으로 생각된다. 미세조류의 산업적 이용을 위해 성장률 및 유용물질의 생산성이 높아져야 하며, 이를 위한 방안으로 배지 내 성분 조절이 필요하며 비료와 같은 질소원 및 탄소원을 이용하기 위한 상용화 연구가 이루어져야 한다고 생각된다.

REFERENCES

- Pirt, S. J. (1986) The thermodynamic efficiency (quantum demand) and dynamics of photosynthetic growth. *New Phytol.* 102: 3-37.
- Benemann, J. R. (1997) CO₂ mitigation with microalgal systems. *Energy Convers Mgmt.* 22: 475-479.
- Micon, A. S., M. C. C. Garcia, A. C. Gomez, F. G. Camacho, E. M. Grima, and Y. Chisti (2003) Shear stress tolerance and biochemical characterization of *Peaenodactylum tricounutum* in quasi steady-state continuous culture in outdoor photobioreactors. *Biochem.*

- Eng. J.* 16: 287-297.
4. Henrikson, (1989) Earth food Spirulina. *California: Ronore Enterprises Inc.*, 180.
 5. Estrada, J. E., P. Bescos, and A. M. Villar Del Fresno (2001) Antioxidant activity of different fractions of *Spirulina platensis* protein extract. *IL Farmaco*, 56: 497-500.
 6. Miranda, M. S., R. G. Cintra, S. B. M. Barros, and J. M. Filho (1998) Antioxidant activity of the microalga *Spirulina maxima*. *Braz. J. Med. Biol. Res.* 31: 1075-1079.
 7. Wijffels, R. H. and M. J. Barbosa (2010) An outlook on microalgal biofuels. *Science* 329: 796-799.
 8. Vicente, G., M. Martinez, and J. Aracil (2004) Integrated biodiesel production: a comparison of different homogeneous catalysts systems. *Bioresour. Technol.* 92: 297-305.
 9. Karkos, P. D., S. C. Leong, C. D. Karkos, N. Siraji, and D. A. Assimkapoulos (2008) Review of *Spirulina* in clinical practice: Evidence-based human applications. *Evid. base Compl. Alternative Med.* 14: 1-4.
 10. Choi, S.-J., Y.-H. Kim, A. Kim, and J.-H. Lee (2013) *Arthrospira platensis* mutants containing high lipid content by electron beam irradiation and analysis of its fatty acid composition. *Appl. Chem. Eng.* 24: 628-632.
 11. Miron, A. S., F. G. Gamacho, Z. C. Gomez, E. M. Grima, and Y. Chisti (2000) Bubble column and airlift photobioreactors for algal culture. *AIChE J.* 46: 1872-1887.
 12. Chiu, S., C. Kao, M. Tsai, S. Ong, C. Chen, and C. Lin (2009) Lipid accumulation and CO₂ utilization of *Nannochloropsis oculata* in response to CO₂ aeration. *Bioresour. Technol.* 100: 833-839.
 13. Danesi, E. D. G., C. O. R. Yagui, J. C. M. Carvalho, and S. Sato (2004) Effect of reducing the light intensity on the growth and production of chlorophyll by *Spirulina platensis*. *Biomass Bioenergy* 102: 329-335.
 14. Cullen, J. J., X. Yang, and H. L. Macintyre (1992) Nutrient limitation and marine photosynthesis. In *Primary Productivity and Biochemical Cycles in the sea*, 69-88, Plenum Press.
 15. Brennan, L. and P. Owende (2010) Biofuels from microalgae—a review of technologies for production, processing, and extractions of biofuels and co-products. *Renew Sust. Energ. Rev.* 14: 557-577.
 16. Converti, A., A. A. Casazza, E. Y. Ortiz, P. Perego, and M. E. Borghi (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.
 17. Shen, Y., Z. Pei, W. Yuan, and E. Mao (2009) Effect of nitrogen and extraction method on algae lipid yield. *Int. J. Agric. Biol. Eng.* 2: 51-57.
 18. Geider, R. J., J. L. Roche, R. M. Greene, and M. Olaizola (1993) Response of the photosynthetic apparatus of *Phaeodactylum triocornutum* (Bacillario-phyceae) to nitrate, phosphate and iron starvation. *J. Phycol.* 29: 755-766.
 19. Joo, S.-J., S. Zhang, K. J. Choi, S. M. Lee, and S.-J. Hwang (2014) Effects of sodium bicarbonate as an inorganic carbon source on the growth of *Scenedesmus dimorphus*. *J. KSWW* 28: 555-560.
 20. Goldberg, I. K. and Z. Cohen (2006) The effect of phosphate starvation on the lipid and fatty acid composition of the fresh water eustigmatophyte *Monodus subterraneus*. *Phytochemistry* 67: 696-701.
 21. Choi, S.-J. and J.-H. Lee (2015) Characteristic of *Arthrospira platensis* enhanced antioxidant activity. *Kor. Soc. Biotechnol. Bioeng. J.* 30: 119-124.
 22. Moon, S.-R., B.-K. Son, J.-O. Yang, J.-S. Woo, C. M. Yoom, and G.-H. Kim (2010) Effect of electron-beam irradiation on development and reproduction of *Bemisia tabaci*, *Myzus persicae*, *Plutella xylostella* and *Tetranychus urticae*. *Kor. J. Appl. Entomol.* 49: 129.
 23. Chiu, S.-Y., C.-Y. Kao, M.-T. Tsai, S.-C. Ong, C.-H. Chen, and C.-S. Lin (2009) Lipid accumulation and CO₂ utilization of *Nannochloropsis oculata* in response to CO₂ aeration. *Bioresour. Technol.* 100: 833-838.
 24. Chen, W., M. Sommerfeld, and Q. Hu (2011) Microwave-assisted Nile red method for in vivo quantification of neutral lipids in microalgae. *Bioresour. Technol.* 102: 135.
 25. Bertozzini, E., L. Galluzzi, A. Penna, and M. Magnani (2011) Application of the standard addition method for the absolute quantification of neutral lipids in microalgae using Nile red. *J. Microbiol. Methods* 87: 17.
 26. Jitendra, M., S. Priyanka, J. Madhulika, S. Mohsina, M. Komal, and K. Neha (2012) Impact of different physical and chemical environment for mass production of *Spirulina platensis*—an immunity promoter. *I. Res. J. Biological Sci.* 1: 49-56.
 27. Li, X., H.-Y. Hu, K. Gan, and Y.-X. Sun (2010) Effects of different nitrogen and phosphorus concentrations on the growth, nutrient uptake, and lipid accumulation of a fresh water microalga *Scenedesmus* sp.. *Bioresour. Technol.* 101: 5494-5500.
 28. Schmidt, L. E. and P. J. Hansen (2001) Allelopathy in the prymnesiophyte *Chrysochromulina polyylepis*: Effect of cell concentration, growth phase and pH. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 216: 67-81.
 29. Colla, L. M., C. O. Reinehr, C. Reichert, and J. A. V. Costa (2007) Production of biomass and nutraceutical compounds by *Spirulina platensis* under different temperature and nitrogen regimes. *Bioresour. Technol.* 98: 1489-1493.
 30. Feng, D.-L., Z.-C. Wu, and D.-H. Wang (2007) Effects of N source and nitrification pretreatment on growth of *Arthrospira platensis* in human urine. *J. Zhejiang Univ. Sci. A* 8: 1846-1852.
 31. Sharma, G., M. Kumar, M. I. Ali, and N. D. Jasuja (2014) Effect of carbon content, salinity and pH on *Spirulina platensis* for phycocyanin, allophycocyanin and phycoerythrin accumulation. *J. Microb. Biochem. Technol.* 6: 202-206.
 32. Chauhan, S., V. Kaithwas, R. Kachouli, and S. Bhargava (2013) Productivity of the cyanobacterium *Spirulina platensis* in culture using high bicarbonate and different nitrogen sources. *American J. Plant. Physiol.* 8: 17-31.
 33. Vonshak, A., N. Kancharaksa, B. Bunnag, and M. Tahicharoen (1996) Role of light and photosynthesis on the acclimation process of the cyanobacteria *Spirulina platensis* to salinity stress. *J. Appl. Phycol.* 8: 119-124.
 34. Kim, Y.-H., S.-J. Choi, H.-J. Park, and J.-H. Lee (2014) Electron beam-induced mutants of microalgae *Arthrospira platensis* increa-

- sed antioxidant activity. *Ind. Eng. Chem.* 20: 1834-1840.
35. Ordog, V., W. A. Stirk, P. Balint, J. V. Staden, and C. Lovasz (2012) Change in lipid, protein and pigment concentrations in nitrogen-stressed *Chlorella minutissima* cultures. *J. Appl. Phycol.* 24: 907-914.
36. 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.
37. Boussiba, S., B. Wang, P. P. Yuan, A. Zarka, and F. Chen (1999) Changes in pigments profile in the green alga *Haematococcus pluvialis* exposed to environmental stresses. *Biotechnol. Lett.* 21: 601-604.
38. Guiheneuf, F., V. Mimouni, L. Ulmann, and G. Tremblin (2009) Combined effects of irradiance level and carbon source on fatty acid and lipid class composition in the microalga *Pavlova lutheri* commonly used in mariculture. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 369: 136-143.
39. Xia, L., J. Rong, H. Yang, Q. He, D. Zhang, and C. Hu (2014) NaCl as an effective inducer for lipid accumulation in fresh microalgae *Desmodesmus abundans*. *Bioresour. Technol.* 161: 402-409.
40. Gill, I. and R. Valiverty (1997) Polyunsaturated fatty acids: Occurrence, biological activities and application. *Trends Biotechnol.* 15: 401-409.
41. Feng, D., Z. Chen, S. Xue, and W. Zhang (2011) Increased lipid production of the marine oleaginous microalgae *Isochrysis zhangjiangensis* (Chrysophyta) by nitrogen supplement. *Bioresour. Technol.* 102: 6710-6716.
42. Kim, G R., G Mujtaba, M. Rizwan, and K. S. Lee (2014) Environmental stress strategies for stimulating lipid production from microalgae for biodisel. *Appl. Chem. Eng.* 25: 553-558.