

미세조류를 이용한 바이오디젤과 바이오디젤 유래 Neopentyl Polyol Ester 윤활유 베이스의 독성테스트

정해영 · ¹이중현 · ²유정우 · ³김의용 · †채희정
호서대학교 식품생물공학전공 및 벤처전문대학원,
¹조선대학교 화학공학과, ²(주) 신한에너지, ³서울시립대학교 화학공학과
(접수 : 2004. 12. 8., 게재승인 : 2005. 2. 14.)

Toxicity Test of Biodiesel and Biodiesel-derived Neopentyl Polyol Ester Lubricant Oil Base Using Microalgae

Haeyoung Jung, Jung-Heon Lee¹, Jeong Woo Yoo², Eui Yong Kim³, and Hee Jeong Chaet
Department of Food and Biotechnology and Department of Innovative Industrial Technology,
Hoseo University, Asan 336-795, Korea

¹Department of Chemical Engineering, Chosun University, Kwangju 501-759, Korea

²Neo Energy Co. Ltd., 633 Manho, Pyeongtack 451-764, Korea

³Department of Chemical Engineering, The University of Seoul, Seoul 130-743, Korea

(Received : 2004. 12. 8., Accepted : 2005. 2. 14.)

Toxicity test for biodiesel (BD), biodiesel-derived neopentyl polyol ester (NPE) lubricant oil base, lubricant oil for diesel engine (LODE) and petroleum diesel (PD) was carried out using microalgae, *Chlorella vulgaris*. According to the method of OECD 201, the EC₅₀ values of BD and NPE were estimated as 84 and 69 mg/L, respectively, which indicates that these compounds are classified as slightly toxic compounds. The EC₅₀ values of LODE and PD were measured as 42 and 24 mg/mL, respectively, showing that these compounds are considered as moderately toxic compounds.

Key Words : Biodiesel, neopentyl polyol ester (NPE) lubricant oil base, microalgae, *Chlorella vulgaris*, EC₅₀, toxicity test

서론

최근 환경오염이 증가함에 따라 생태계에 대한 위해성 평가의 중요성이 증대되고 있다. 과도한 에너지 소비, 화학물질의 생산과 소비 등으로 생물종의 다양성이 사라지고 생태계 본래의 기능이 상실되어 인간의 생존 자체도 위협받는 심각한 상황까지 이르렀기 때문이다(1, 2).

수중으로 배출된 화학적 오염 물질은 정적인 상태로 남아 있지 않고 일부 다른 화합물로 전환되며, 특히 중금속들은 분해되지 않아 지속적으로 독성을 나타내기도 한다(3). 수중에 유입된 오염물질은 희석되지만, 아주 낮은 농도에서도 생체 시스템에 흡수되어 생물학적 농축(biomagnification)의 과정을 거치므로 먹이사슬을 통하여 전체 생태계와 인간의 건강에 악

영향을 미친다. 독성 오염물질의 안전성을 결정하기 위해서는 오염물질의 이화학적 분석만으로는 부족하고, 생물학적 검정이 필요하다. 생물학적 검정은 어떤 물질이 시험 생물체의 신진대사, 번식의 감소, 생체기능의 상실이나 치사 등에 미치는 영향을 분석함으로써 오염물질의 유해성을 검사하는 방법으로서 물벼룩, 박테리아, 어류, 쥐 등 다양한 생물체들이 이용되고 있다(4-7).

수서 생물계의 독성을 평가하는 방법에는 화학물질에 대한 노출계가 매우 중요한 의미를 갖는다. 수서환경에서의 노출문제는 식품이나 주사와 같은 방법으로 화학물질을 강제로 투여하는 포유동물과는 달리 매우 복잡한 측면이 있다. 수서 독성 시험은 휘발성 물질, 분해성 물질 또는 용해도가 낮은 물질을 투여했을 때 투여량과 수중에 존재하는 양이 일치하지 않는 문제점이 있다. 수서식물에 대한 화학물질의 독성시험에는 주로 조류(algae)를 사용한다. 조류는 세대시간이 짧기 때문에 단시간 내에 여러 세대에 걸쳐 나타나는 독성을 평가할 수 있다는 장점이 있다(2). 미세조류를 이용한 독성분석의 예로 40종의 제초제의 독성을 *Chlorella vulgaris*를 이용하여 테스트한

† Corresponding Author : Department of Food and Biotechnology, Hoseo University, Asan 336-795, Korea
Tel : +82-41-540-5642, Fax : +82-2-6280-6346
E-mail : hjchae@office.hoseo.ac.kr

방법이 보고되어 있다(8). 이 방법에서는 시간 경과에 따라 조류의 성장을 관찰하여 성장저해에 대한 반수저해농도 (effective concentration which caused a 50% reduction in a measured parameter, EC₅₀)의 형태로 시험물질의 독성을 표시하고 있다.

조류를 이용하여 수중 생태계에서 독성테스트를 하는 규격으로는 OECD 201(9), ISO 8692(10), EU Guideline C3(11)과 ISO/DIS 10253(12) 등이 있다(13). ISO 규격에서는 *Selenastrum capricornutum*과 *Scenedesmus subspicatus* 등을 72시간 동안 배양하면서 독성분석하는 방법을 제시하고 있다. 반면에 OECD 규격에서는 *Selenastrum capricornutum*, *Chlorella vulgaris*와 *Scenedesmus subspicatus* 등을 이용하여 96시간 동안 시험하는 방법을 제시하고 있다.

바이오디젤 (biodiesel, BD)은 폐식용유, 대두유, 쌀겨 등 식물성 오일을 알코올에 반응시켜 만드는 분자 내 산소를 포함하고 있는 친환경 제품이다(14). 바이오디젤은 저장 중 미생물에 대한 안정성이 높지만(15) 토양이나 수중에 유출되었을 때 생분해성이 높은 것으로 보고되어 있다(16). 석유계 윤활유 등이 생태계에 유출되어 오염문제를 유발하므로 세계적으로 친환경성 생분해 윤활유의 개발에 많은 노력을 기울이고 있다(16).

윤활유나 바이오디젤 같은 화합물에 대한 독성시험 결과가 국내외적으로 보고된 바 없으며 국내에는 조류를 이용한 독성 시험 방법이 표준화되어 있지 않다.

본 연구에서는 생분해성 윤활유의 품질 평가에서 수중 생태계에 유출되었을 때 미치는 독성평가를 위한 국내외 규격 및 여러 문헌을 비교 검토하였다. 미세조류를 이용하여 바이오디젤과 바이오디젤 유래의 neopentyl polyol ester (NPE)계 윤활유 베이스, 디젤유 윤활유와 석유디젤의 독성을 함께 비교 평가하였다.

재료 및 방법

재료 및 장치

조류에 대한 급성독성시험시 사용한 NPE계 윤활유 베이스 [96% tetrapentaerythritol (C₇₇H₁₄₀O₈)과 4% methyl ester (C₁₉H₃₆O₂)의 혼합물]와 바이오디젤 (biodiesel, BD, C₁₉H₃₆O₂)은 (주)신한에너지로부터 제공받아 사용하였다. 비교 분석을 위해 석유디젤 (petroleum diesel, PD, C₂₀H₄₂O₅)과 디젤유 윤활유 (lubricant oil for diesel engine, LODE)는 각각 (주)LG, (주)S-oil의 제품을 사용하였다. *Chlorella vulgaris* AG 10006를 한국생명공학연구원 생물자원센터 (KCTC)에서 분양받아 독성 시험용 생물체로 사용하였다. 7,500~8,000 lux의 광도로 조광되는 진탕배양기 (Sejong, Korea)에서 명조건과 암조건을 각각 16시간과 8시간으로 조절하면서 미세조류를 96시간 동안 배양하였다. 조류의 성장은 혈구계 (haemocytometer) 상에서 역상현미경 (CK40-F200, Olympus, Japan)으로 관찰하였다.

조류 배양 조건

배양에 사용되는 배지는 Table 1과 같은 온도와 pH는 각각 21 ± 2°C와 8 ± 0.5로 맞추어 시험하였다. 균주는 19~21°C의 온도에서 빛에 노출시키면서 정치상태에서 배양용 배지를 담은

플라스크에서 보관하였다. 배양용 배지 200 mL를 500 mL 플라스크에 넣고 멸균한 다음 보관 중인 조류 배양액 1 mL를 넣고 1주일 동안 전배양하였다. 세포의 수를 혈구계로 관찰하여 초기의 세포농도가 10⁴ cell/mL가 되도록 100 mL의 배지에 희석하여 독성 시험용 배양 플라스크를 준비하였다.

Table 1. Composition of culture media for *Chlorella vulgaris*

| Reagent | Concentration (mg/L) |
|---|----------------------|
| NH ₄ Cl | 15 |
| MgCl ₂ ·6H ₂ O | 12 |
| CaCl ₂ ·2H ₂ O | 18 |
| MgSO ₄ ·7H ₂ O | 15 |
| KH ₂ PO ₄ | 1.6 |
| FeCl ₃ ·6H ₂ O | 0.08 |
| Na ₂ EDTA·2H ₂ O | 0.1 |
| H ₃ BO ₃ | 0.185 |
| MnCl ₂ ·4H ₂ O | 0.415 |
| ZnCl ₂ | 3×10 ⁻³ |
| CoCl ₂ ·6H ₂ O | 5×10 ⁻³ |
| CuCl ₂ ·2H ₂ O | 10 ⁻⁵ |
| Na ₂ MoO ₄ ·2H ₂ O | 7×10 ⁻³ |
| NaHCO ₃ | 50 |

급성독성시험

바이오디젤, NPE계 윤활유 베이스, 디젤유 윤활유와 석유디젤은 용해도가 낮기 때문에(16) 용매인 에탄올과 HCO40 (PEG-40 hydrogenated castor oil, CAS# 61788-85-0)의 혼합물 (EtOH : HCO40 = 1 : 1, w/w)을 용매로 사용하였다. 조류에 대한 화합물의 반수저해농도 (EC₅₀) 값을 결정하기 위한 시험에 앞서서 대략적인 각 화합물의 조류 성장저해농도를 구하기 위하여 0.01, 0.1, 1, 10, 100, 1,000 mg/L의 농도가 되도록 분석시료를 배지에 용해하여 예비시험을 하였다. 예비시험 결과에서 조류의 성장이 관찰된 최고 농도와 조류성장이 저해되는 최저 농도를 고려하여 최종시험의 농도를 설정하였다. 최종 시험은 3회 반복 시험하였다.

성장저해율 계산

조류 성장 곡선으로부터 미세조류의 성장저해율 (I_A)을 계산하기 위하여 다음과 같이 시간에 따른 성장곡선 면적 (A)을 구하였다(식(1)).

$$A = \frac{N_1 - N_0}{2} \times t_1 + \frac{N_1 + N_2 - 2N_0}{2} \times (t_2 - t_1) + \frac{N_{i-1} + N_n - 2N_0}{2} \times (t_n - t_{n1}) \quad (1)$$

여기서 A : 면적

t₁ : 시험개시 후 최초로 세포농도를 측정할 시간

t_n : 시험개시 후 n회 때 세포농도를 측정할 시간

N₀ : 시험개시시 (t₀)의 초기 세포농도 (cell/mL)

N₁ : t₁시간 후의 세포농도 (cell/mL)

N_n : t_n시간 후의 세포농도 (cell/mL)

시험물질농도에 대한 조류의 성장저해율 (I_A)은 식 (2)와 같다.

$$I_A = \frac{A_c - A_i}{A_c} \times 100 (\%) \quad (2)$$

여기서 A_c : 대조군의 성장곡선 아래 면적
 A_i : 각 시험물질의 성장곡선 아래 면적

이와 같이 각 시험 물질의 농도별로 96시간 후 성장저해율 (I_A)값을 구하였고 SPSS 10.0 프로그램 (SPSS Science, USA)을 이용한 probit 분석법에 의하여 반수저해농도 (EC_{50})를 산출하였다(9).

결과 및 고찰

국내외 규격 검토

바이오디젤과 바이오디젤 유래의 NPE계 윤활유 베이스를 독성 시험하기 위한 국내의 규격을 검토하였다. 윤활유와 같은 화합물에 대한 독성시험규격은 물론 조류를 이용한 독성 시험 규격으로서 국내에 표준화되어 있는 규격은 없으며, 국외에서는 OECD 201 규격이 제시되어 있다. 이 규격은 단세포 담수독조류의 성장에 미치는 화학물질의 영향을 측정하기 위한 것으로서 공장폐수, 유출수, 지하수 등의 영향을 측정하는 방법을 제시하고 있다. 조류를 이용한 수중 독성 분석을 보고한 예로서 제조제를 *Chlorella vulgaris*를 이용하여 EC_{50} 을 추정 한 보고(8), 광물을 채취하거나 제련할 때 나오는 폐수에 포함되어 있는 Zn, Cu, Cd, Pb와 같은 물질들의 독성을 분석한 보고(17) 등이 있다. 또한 *Selenastrum capricornutum*를 이용하여 연속식 배양기에서 실험한 보고도 있다(18).

물질안전보건자료 (material safety data sheets, MSDS)에서 제시한 독성 정보에 의하면 NPE계 윤활유 베이스와 석유디젤의 경우 동물실험 독성에 의한 판정 기준이 없으며, 바이오디젤과 디젤유 윤활유에 대한 항목 자체가 자료에 없었다(19). 바이오디젤의 독성 테스트 결과로서 보고된 바에 의하면 쥐에 대한 경구치사농도 (lethal dose concentration when 50% of the population were killed, LD_{50})는 5,000 mg/kg이고 무영향농도 (no observed effect concentration, NOEC)는 2,000 mg/kg으로 보고되어 있다(20). 그러나 바이오디젤, 석유디젤 및 윤활유에 대한 조류를 이용한 독성 시험 결과는 물론 수상에서의 독성시험 결과는 보고된 바 없다.

화합물질에 대한 각종 시험방법의 표준화를 위하여 국제적 노력이 지속적으로 수행되고 있으며 ISO, OECD와 EPA 등의 기구에 의해 표준화된 분석방법이 설정되어 있다. 국외 규격 중에서 OECD는 화학물질에 대한 국제적 상호 인증의 시발점이라 할 수 있다. 우리나라를 비롯하여 대부분의 경제선진국들이 OECD 시험지침을 공인하고 있어 본 실험에서는 OECD 201을 채택하여 실험하였다.

예비 독성시험측정

OECD 201에 의하면 독성시험용 조류로서 *Selenastrum capricornutum* (ATCC 22662), *Secnedesmus subspicatus* (86.81 SAG)와 *Chlorella vulgaris* (CCAP 211/11b)가 제시되어 있으며, 다른 조류 종을 사용할 때에는 명기하도록 되어 있다. OECD 201은 물에 잘 용해되는 화학물질을 기준으로 하여 제정되었고, 용해도가 낮은 물질의 경우 계면활성제와 유기용매를 사용할 수 있다. 바이오디젤, NPE계 윤활유 베이스, 디젤유 윤활

유와 석유디젤의 용해도는 각각 110, 130, 60과 20 mg/L로서 측정되었는데(16), 본 실험에서 용해도가 낮은 디젤유 윤활유와 석유디젤을 용해하기 위해 에탄올과 계면활성제인 HCO40, (PEG-40 hydrogenated castor oil)을 이용하였다. 따라서 이 물질을 대조군으로 선정하여 실험하였다. 대조물질은 독성이 적어야 하고 72시간 이내에 초기 세포농도보다 16배 이상을 증가시킬 수 있어야 한다. 대조군을 72시간 후 독성시험한 결과 Fig. 1에서 보는 바와 같이 에탄올 (500 mg/L)과 HCO-40 (500 mg/L)를 넣고 조류를 배양한 결과 초기 세포농도의 17배 이상 성장하였다. 따라서 이 두 물질을 분석시료의 용매와 대조군으로 사용하였다.

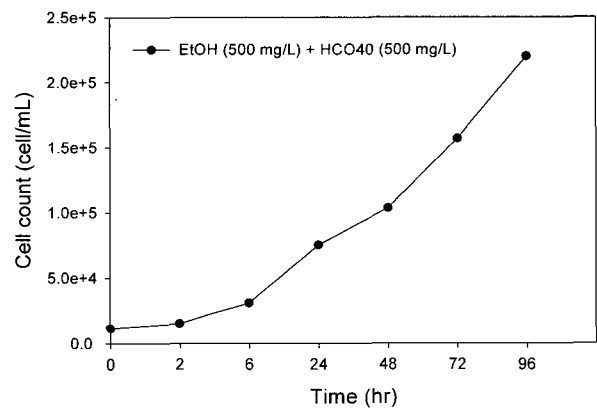


Figure 1. The growth of the microalgae in the presence of detergent HCO40 and solvent EtOH.

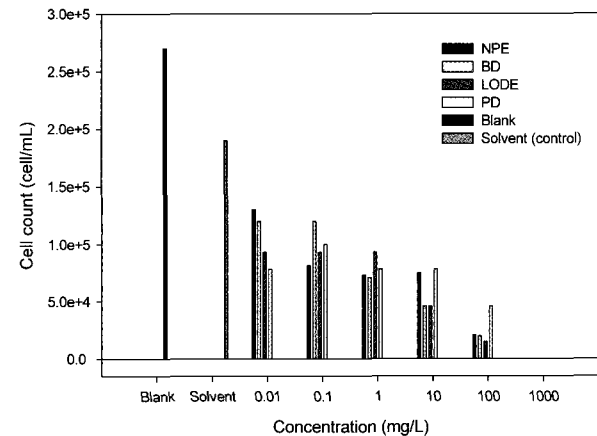


Figure 2. The preliminary toxicity test using microalgae after 96 hr incubation. Test compounds: (BD) biodiesel, (NPE) neopentyl polyol ester, (LODE) lubricant oil for diesel engine, (PD) petroleum diesel.

예비시험 농도는 0.01, 0.1, 1, 10 100, 1,000 mg/L로 설정하였으며 바이오디젤과 NPE계 윤활유 베이스, 디젤엔진 윤활유와 석유디젤의 예비시험의 결과는 Fig. 2와 같다. 바이오디젤, NPE계 윤활유 베이스, 디젤유 윤활유와 석유디젤은 모두 1,000 mg/L에서 성장을 하지 못하였으며 ($I_A=100\%$), 10~100 mg/L의 농도 범위에서 반수영향농도 (EC_{50})가 산출될 것으로 1차 추정되었다.

급성 독성 최종 시험

예비시험의 결과를 토대로 바이오디젤과 NPE계 윤활유 베이스의 최종 실험 농도로써 0, 50, 100, 200, 400, 600, 800, 1,000 mg/L를 설정하였고, 디젤유 윤활유와 석유디젤은 0, 50, 100, 200, 400, 600, 800 mg/L로 설정하였다. Fig. 3에서 보는 바와 같이 모든 분석대상 시료들은 농도가 높을수록 저해현상이 높아짐을 알 수 있었으며 시험 물질의 농도에 따른 성장곡선으로부터 성장저해율 (I_a)을 계산한 결과 Table 2와 같다. 또한 시험 물질별 반수저해농도 (EC₅₀)를 SPSS의 probit 분석법에 의하여 추정된 결과 바이오디젤, NPE계 윤활유베이스, 디젤유 윤활유와 석유디젤의 경우 각각 84, 69, 24와 42 mg/mL의 값이 산출되었다(Table 3). 일반적으로 반수저해농도 (EC₅₀)가 500 mg/L 이상인 물질을 상대적 무해 (relatively harmless)라고 하며 이외에도 실제적 무독성 (practically nontoxic, EC₅₀: 100~500 mg/L), 경독성 (slightly toxic, EC₅₀: 50~100 mg/L), 중등독성 (moderately toxic, EC₅₀: 10~50 mg/L)과 고독성 (highly toxic, EC₅₀: 5~10 mg/L)과 맹독성 (extremely toxic, EC₅₀: < 5 mg/L)으로 구분한다 (21). 바이오디젤과 NPE계 윤활유 베이스는 6단계로 분류되는

독성 등급 중 독성이 적은 경독성 (slightly toxic)으로 분류되었으며 디젤유 윤활유와 석유디젤의 경우 중등독성 (moderately toxic)으로 분류되었다(Table 3). 이상의 결과는 동일한 화합물을 지렁이를 이용한 토양 독성 분석결과(22)와 일치 하였다. 바이오디젤, NPE계 윤활유 베이스, 디젤유 윤활유와 석유 디젤의 조류에 대한 반수저해농도 (EC₅₀) 추정시의 유의확률 (p-value)은 각각 0.026, 0.016, 0.045와 0.029로서 유의수준 5%에서 유의함을 알 수 있었다.

테스트의 타당성 (test validation)

이상의 조류독성 시험결과를 실제적인 분석치로 활용하고자 할 때는 시험분석법이 적절한 타당성을 갖고 시험되었는지 확인하는 절차가 필요하다. 이러한 타당성 조사의 방법은 OECD 201에 의하면 다음과 같다. 첫째, 72시간 내에 대조물질의 경우 초기세포 농도보다 16배 이상 증가해야 한다. 본 실험에서 사용한 대조물질을 포함하는 배양 플라스크의 72시간에서의 세포 수는 초기세포 수의 16~17배 이상이었다. 즉, 조류 저해성장 실험에서 대조물질이 시험에 영향을 주지 않는 조건

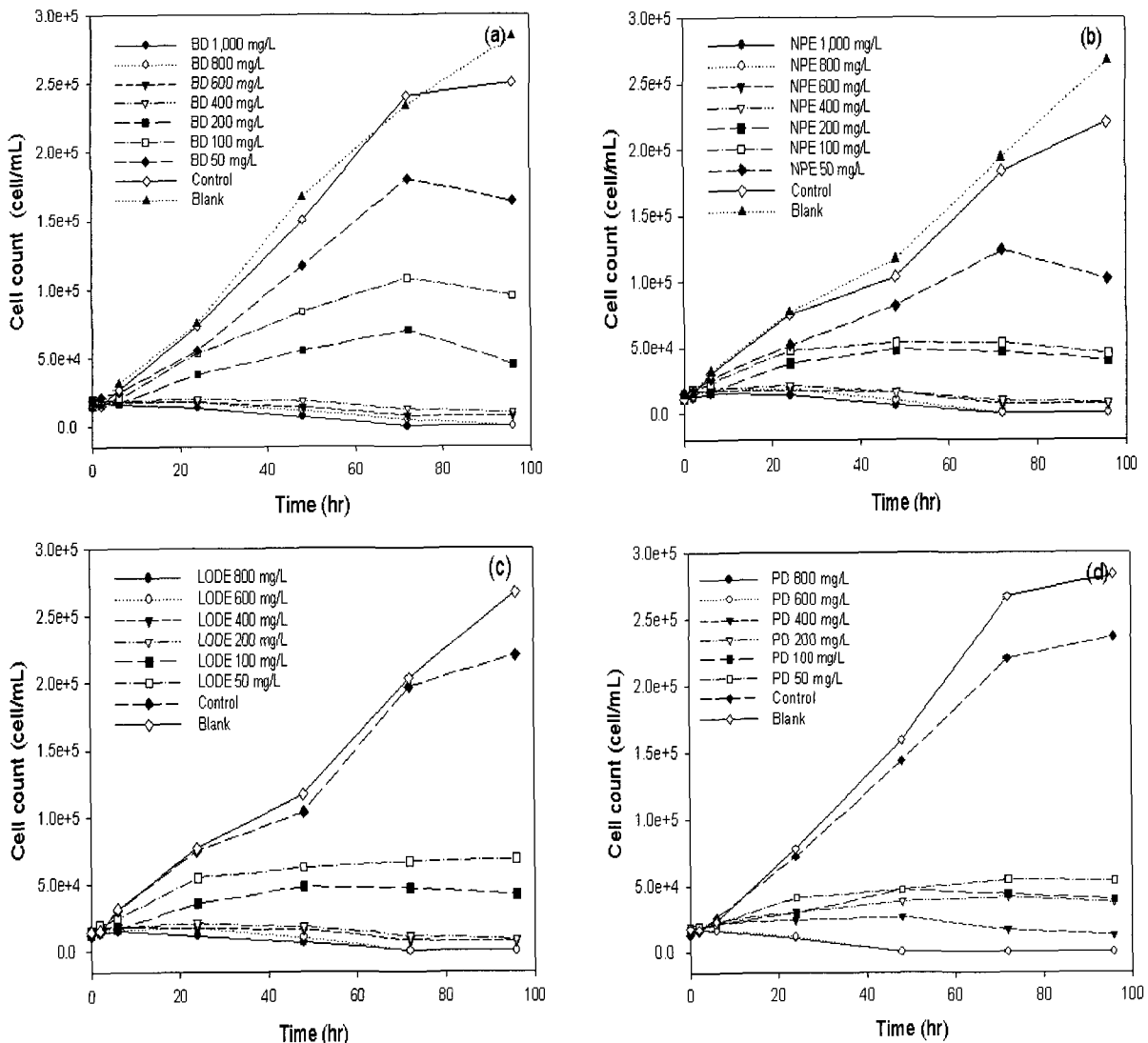


Figure 3. The final toxicity test using microalgae. Test compounds: (a) BD, (b) NPE, (c) LODE and (d) PD

에서 분석되었음을 의미한다. 둘째, 독성 시험 중 배양액의 pH가 1이상 증가하지 않아야 하는데 Table 2에서 보는 바와 같이 모든 실험구에서 시험 기간 중 pH 변화가 1 이상 차이가 나지 않아 분석절차상의 오류가 없음을 확인하였다.

Table 2. The result of the final toxicity test using the microalgae

| Test compounds | Concentration (mg/L) | Inhibition (%) | pH |
|---|----------------------|----------------|-----|
| Biodiesel (BD) | 1,000 | 100 | 8.2 |
| | 800 | 100 | 7.9 |
| | 600 | 100 | 8.2 |
| | 400 | 100 | 7.6 |
| | 200 | 76 | 7.7 |
| | 100 | 56 | 8 |
| Neopentyl polyol ester (NPE) lubricant oil base | 50 | 32 | 8 |
| | 1,000 | 100 | 7.9 |
| | 800 | 100 | 7.7 |
| | 600 | 98 | 7.9 |
| | 400 | 98 | 8.0 |
| | 200 | 73 | 7.8 |
| Lubricant oil for diesel engine (LODE) | 100 | 67 | 8.0 |
| | 50 | 41 | 7.7 |
| | 800 | 100 | 7.9 |
| | 600 | 100 | 8.0 |
| | 400 | 99 | 7.9 |
| | 200 | 100 | 7.9 |
| Petroleum diesel (PD) | 100 | 75 | 7.9 |
| | 50 | 62 | 7.8 |
| | 800 | 100 | 7.8 |
| | 600 | 100 | 8 |
| | 400 | 96 | 7.7 |
| | 200 | 85 | 7.9 |
| | 100 | 79 | 7.8 |
| | 50 | 73 | 8.2 |

Table 3. EC₅₀ values of the test compounds

| Test compounds | EC ₅₀ (mg/L) | Toxicity grade |
|---|-------------------------|------------------|
| Biodiesel (BD) | 84.1 (60-108)* | slightly toxic |
| Neopentyl polyol ester (NPE) lubricant oil base | 69 (40-96)* | slightly toxic |
| Lubricant oil for diesel engine (LODE) | 42.5 (14-62)* | moderately toxic |
| Petroleum diesel (PD) | 24.7 (2-51)* | moderately toxic |

* predicted by 95% confidence limits

요 약

바이오디젤과 바이오디젤을 기반으로 생산된 neopentyl polyol ester (NPE)계 윤활유 베이스, 디젤유 윤활유와 석유디젤을 분석 대상으로 하여 독성을 평가하였다. 조류를 이용하여 수용액 상에서 화학물질의 독성시험을 조사하는 OECD 201에 근거하여 *Chlorella vulgaris*를 96시간 동안 배양하면서 독성시험 분석한 결과, 바이오디젤과 NPE계 윤활유 베이스의 반수저해농도 (EC₅₀) 값은 각각 84와 69 mg/L로서 두 물질이 독성이 적은 경독성 (slightly toxic) 물질인 것으로 판명되었다. 디젤유 윤활유와 석유디젤의 경우 반수저해농도 (EC₅₀) 값이 각각 42와 24 mg/L로서 중등독성 (moderately toxic) 물질로 판정되었다.

감 사

본 연구는 산업자원부 청정생산기술사업의 연구지원 (과제번호: 10006873, 2003~2004년도)에 의하여 수행된 연구결과이며, 이에 감사드립니다.

REFERENCES

- Lee, S. (1998), New challenges in environmental toxicology, *Kor. J. Environ. Agric.* **7**, 65-73.
- Van Leeuwen, C. J. and J. L. M. Hermens (2001), Risk Assessment of Chemical: An Introduction, pp128-132, Kluwer Academic Publishers, Boston.
- Min, S. H., S. T. Kim, and G. H. Kim (2000), Evaluation of metal toxicity by alga, water fleas and luminescent bacteria, *Kor. Soc. Civil Eng.* **20**, 421-427.
- OECD (1984), OECD 202: *Daphnia sp.*, acute immobilisation test and reproduction test, Organization for Economic Cooperation and Development (OECD).
- ISO (1995), ISO 10712: Water quality-*Pseudomonas putida* growth inhibition test (*Pseudomonas* cell multiplication inhibition test), International Organization for Standardization (ISO).
- OECD (1984), OECD 203: Fish, acute toxicity test, Organization for Economic Cooperation and Development (OECD).
- OECD (1987), OECD 401: Acute oral toxicity, Organization for Economic Cooperation and Development (OECD).
- Ma, J., L. Xu, S. Wang, R. Zheng, S. Jin, S. Huang, and Y. Huang (2002), Toxicity of 40 herbicides to the green alga *Chlorella vulgaris*, *Ecotoxi. Environ. Safety* **51**, 128-132.
- OECD (1984), OECD 201: Alga, growth inhibition test, Organization for Economic Cooperation and Development (OECD).
- ISO (1989), ISO 9692: Water quality-Fresh water algal growth inhibition test with *Scenedesmus subspicatus* and *Selenastrum cupricornutum*, International Organization for Standardization (ISO).
- EU (1992), EU Guideline C3: Growth inhibition test with algae, *Off. J. Eur. Comm. L* **383A**, 179-186.
- ISO (1994), ISO/DIS 10253: Water quality-Marine algae growth inhibition test with *Skeletonema costatum* and *Phaeodactylum tricoratum*, International Organization for Standardization (ISO).
- Kooijman, S. A. L. M., O. A. Hanstveit, and N. Nyholm (1996), No effect concentration in algal growth inhibition tests, *Water Res.* **30**, 1625-1632.
- NREL (1998), Life cycle inventory of biodiesel and petroleum diesel for use in an urban bus, NREL/SR-580-24089, National Renewable Energy Laboratory.
- Park, H., H. Jung, and H. J. Chae (2003), Microbiological stability test of biodiesel, *Kor. Acad. Ind. Soc.* **4**, 387-390.
- Jung, H., E. Y. Kim, and H. J. Chae (2004), Biodegradability tests of biodiesel-derived pentaerythritol lubricant oil bases, *Kor. J. Biotechnol.* **19**, 132-137.
- Kaneko, H., S. Akiko, and H. Kuniaki (2004), Short-term toxicity test based on phosphate uptake, *Water Res.* **38**, 2173-2177.
- Grade, R., J. Gonzalez-Valero, P. Hcht, and V. Preifl (2000), A higher tier flow-through toxicity test with the green alga *Selenastrum capricornutum*, *Total Environ. Sci.* **247**, 355-361.
- http://www.kosha.or.kr/ (2001).
- House Bill No.1390 (2001), Biodiesel fuel and its integration into the agricultural economy of this state background memorandum, The North Dakota Legislative Council Staff for the Agriculture Committee.
- USEPA (1996), EPA 738-R-96-022: Reregistration eligibility decision (RED) mintin FF, United States Environmental Protection Agency (USEPA).
- Jung, H., W. Park, J. Lee, J. W. Yoo, E. Y. Kim, and H. J. Chae (2005), Toxicity test of biodiesel and biodiesel-derived neopentyl polyol ester lubricant oil base using earthworm, *Kor. J. Biotechnol.* (in press).