

미세조류 *Nannochloris oculata*의 성장과 지질 생산에 미치는 질소 농도와 광량의 영향

박상진 · 최윤이 · 김철웅 · 박원근 · 양지원*

한국과학기술원 생물화학공학과

Production of Biomass and Lipid Using Microalga *Nannochloris oculata* Under Different Conditions of Nitrogen and Irradiance

Sang-Jin Park, Yoon-E Choi, Chul Woong Kim, Won-Kun Park, and Ji-Won Yang*

Department of Chemical and Biomolecular Engineering, KAIST, 335 Gwahak-ro, Yuseong-gu, Daejeon 305-701, Korea

Abstract Increasing demands on fossil fuel have led to the unprecedented attraction to microalgal biofuel as an alternative energy. In this study, we investigated growth and lipid productions of microalga *Nannochloris oculata* under various carbon dioxide or nitrogen source concentrations and irradiance conditions. Biomass production of *N. oculata* was highest under 2% CO₂ with 0.3 flow rate (vvm). In addition, biomass productivities were proportional to the concentration of nitrogen source, whereas lipid biosynthesis was suppressed under higher nitrogen concentration (up to 50 mg/L). High irradiation (160~180 μmol/m²·s) enhanced growth rate and lipid production of *N. oculata*.

Keywords: *Nannochloris oculata*, lipid production, nitrogen concentration, and biomass productivities.

서 론

최근 100 여년 간의 인류 문명의 급격한 발전은 화석 연료 사용의 비정상적인 증가를 초래하여 왔다. 특히 우리나라를 포함한 BRICs 등 신흥 공업국의 비약적인 발전은 석유 등의 화석 연료 자원의 추가적인 수요를 증가시켰다. 전 지구상에 가용한 화석연료 자원은 한정되어 있는 점을 고려할 때, 이러한 화석연료에 대한 폭발적인 수요 증가는 궁극적으로 화석 연료의 고갈 시기를 크게 앞당기게 될 것이다. 더욱이, 화석 연료 자원의 기하급수적인 사용 증가는 온실가스의 배출과 지구 온난화와 같은 심각한 환경 파괴 문제를 필연적으로 수반하여 왔으며, 이에 대한 세계적인 경각심이 증대되고 있다. 이에 따라, 세계의 과학자들은 화석 연료를 대체할 수 있는 지속가능하고 환경 친화적인 청정 그린에너지를 발굴

하고 개발 상용화하는데 박차를 가하고 있다 [1].

바이오매스, 태양 발전, 풍력, 조력, 지열 등이 화석연료를 대체할 신재생에너지원으로써 제안되어 왔다. 이 중에서도, 바이오매스를 에너지로 활용하는 기술은 광합성을 통하여 이산화탄소를 흡수하면서도 대체 에너지원으로 가용한 바이오매스를 생성할 수 있다는 점에서 탄소 순환형 경제 체계를 확립할 수 있는 차세대 청정에너지 기술로 각광을 받고 있다. 더욱이, 최근의 고유가에 기인하는 에너지 위기는 바이오매스 기반 바이오 에너지 생산 및 개발에 대한 전 세계 학계와 산업계의 비상한 관심을 이끌어 내고 있으며, 이에 대한 연구의 필요성을 절실하게 만들고 있는 실정이다 [2,3].

미세조류를 활용한 바이오 에너지 개발 기술은 기존의 식량자원이나 산림자원을 활용한 바이오 에너지 개발이라는 개념을 초월하는 기술이다. 이는 기하급수적인 인구 증가에 기인하는 식량자원 부족에 따른 농작물의 바이오 에너지 활용에 대한 우려를 불식 시키면서도, 미세조류가 목재 등의 어느 생명체보다도 빠른 성장을 보인다는 측면에서 여타의 바이오 에너지 생명체들과 다른 뚜렷한 장점을 가지고 있

*Corresponding author

Tel: +82-42-350-3924, Fax: +82-42-350-3910

e-mail: jwyang@kaist.ac.kr

다 [4,5]. 무엇보다도 미세조류는 물과 기본적인 최소 영양 소만 갖추면 대부분의 생태계 환경 조건 하에서 생육이 가능하다는 점을 고려할 때, 미세조류 활용 바이오매스 생산은 삼면이 바다로 둘러싸인 우리나라의 실정에 가장 적합하고 실현가능성이 아주 높다고 하겠다 [6].

*Nannochloris oculata*는 *Nannochloropsis salina*라고도 알려져 있으며, 동물성 플랑크톤이나 산호초 등을 생산하는 수산업 분야에서 광범위하게 활용되어 지고 있는 우리 주변에서 흔히 볼 수 있는 황녹색의 해양 미세조류이다 [7]. 이러한 해양 미세조류로써의 범용성 뿐만 아니라, *N. oculata*는 바이오 에너지원으로 가용한 유력 성분인 지방의 함량이나 바이오 매스 생산 속도 등을 고려하였을 때, 여타의 미세조류와 비교하여 바이오 에너지원으로써 충분한 가능성을 보이고 있는 것으로 보고되고 있다 [8,9]. 이와 같은 *N. oculata*의 중요성과 잠재성에도 불구하고, 현재까지 이 미세조류를 바이오 에너지 자원으로 활용하려는 시도나 연구는 아쉽게도 크게 미흡한 현실이다.

따라서, 본 연구에서는 해양 미세조류인 *N. oculata*의 바이오 에너지원으로써의 가능성을 검증하여 보고자, 다양한 이산화탄소, 공기 주입 유량, 질소원 농도, 광도 등의 조건이 성장에 미치는 영향 등에 대한 연구를 수행하였다. 또한, 바이오 에너지원으로 가용한 가장 유력 성분인 지방질의 생산에 미치는 질소원 농도와 광도의 영향에 대한 실험을 수행하였다.

재료 및 방법

균주 및 배지

*Nannochloris oculata*는 한국 해양 미세 조류 은행 (C-031)에서 분양받았다. 실험 균주의 배양 배지는 f/2 배지를 사용하였으며, 성분 조성은 다음과 같다 [10].

- f/2 배지: 75 mg/L NaNO₃, 5 mg/L NaH₂PO₄ · H₂O, 1 mL trace metal solution, 0.5 mL vitamin solution
- Trace metal solution: 3.15 g/L FeCl₃ · 6H₂O, 4.36 g/L Na₂EDTA · 2H₂O, 9.8 mg/L CuSO₄ · 5H₂O, 6.3 g/L Na₂MoO₄ · 2H₂O, 22 mg/L ZnSO₄ · 7H₂O, 10 mg/L CoCl₂ · 6H₂O, 180 mg/L MnCl₂ · 4H₂O
- Vitamin solution: 1 mg/L vitamin B₁₂ (cyanocobalamin), 1 mg/L biotin, 200 mg/L thiamine · HCl

배양

모든 실험의 균주 접종은 초기 접종 biomass 양을 0.2 g/L로 균일하게 함으로써, 실험의 일관성을 유지하였다. 모든 배양 실험은 1.5 L의 배지가 담긴 2 L 반응기 (Schott Duran, Germany)에서 수행되었으며, 반응기내 균일한 환경을 유지하기 위하여 배양하는 동안 magnetic bar로 지속적으로 혼합시켰다. 배양 온도는 water jacket을 사용하여 25 ± 1°C로 일

정하게 유지시켰다. 광원은 FCL32SD/30 원형 형광등 (30 W, 1800 lm)을 외부 광원으로 사용하였으며 LI-250 조도계 (LI-COR biosciences, USA)를 이용하여 빛의 세기를 측정하였다. CO₂ 농도에 따른 *N. oculata*의 성장속도를 연구하기 위하여, 100% Air와 CO₂를 적절하게 혼합한 후 volume flow meter를 이용하여 CO₂와 공기 유량을 조절하여 *N. oculata* 배양액에 주입하였다. 이때에 기체의 오염을 방지하기 위하여 gas filter (Pore size 0.2 µm, Sartorius Stedim Biotech, Germany)를 거쳐 여과 후 주입하였다. 최종 CO₂ 농도를 2, 5, 10%로 다르게 주입하였으며 투입 기체의 유량은 0.3, 0.6, 0.9, 1.2 vvm (aeration volume/medium volume/minute)로 다르게 조절하였다. 또한 f/2배지 내의 질소 농도 (NO₃-N: 12.5 mg/L)를 2, 3, 4배 (NO₃-N: 25, 37.5, 50 mg/L)로 증가시키면서 질소 농도의 영향을 알아보았다. 광도에 따른 미세조류의 성장속도를 알기 위해 70~80 µmol/m²·s와 160~180 µmol/m²·s의 두 가지의 다른 광도 조사량 하에서 배양을 수행 하였다.

분석

*N. oculata*의 성장 속도는 흡광도를 측정하여 평가하였다. UV/Vis spectrophotometer (Optizen 3220 Mecasys, Korea)를 사용하여 660 nm의 파장에서 흡광도를 측정하였으며 측정된 흡광도 값은 기준에 확립된 standard curve에 적용하여 건조 중량으로 변환하였다. 미세조류의 성장 속도 (g/L · day)는 다음의 식을 사용하여 산출하였다.

$$\text{성장속도} = \frac{W_2 - W_1}{t_2 - t_1}$$

(W₁과 W₂은 각각 t₁, t₂ 시간에서의 건조 중량 (g/L))

배양된 미세조류는 원심분리기 (3439 g, 15 min)를 이용하여 수확하였고, 증류수로 두 번의 세척을 거친 후 액체질소로 급속 냉각시켜 동결 건조되었다. 건조된 미세조류의 탄소함량은 element analyzer (Thermo Finnigan, Italia)를 사용하여 분석하였으며, 탄소함량과 성장속도를 고려하여 CO₂ 고정화율 (g/L · day)를 계산하였다. 배지 내에 질소 농도는 AACS V Automatic water analyzer (DL Teh, Japan)를 사용하여 분석하였다. 미세조류의 총 지질 함량은 HP5890 Gas chromatography (Agilent, USA)를 사용하여 분석하였다 [11].

결과 및 고찰

이산화탄소 농도 영향

이산화탄소 농도에 따른 *N. oculata*의 성장률을 평가하기 위하여 다른 조건을 동일하게 유지하면서 (25°C; 가스 유속 0.6 vvm; f/2 배지) 이산화탄소 농도를 2, 5, 10%로 달리 하

여 *N. oculata*를 배양하였다. Fig. 1은 배양 실험 결과이다. 2%의 이산화탄소를 주입하였을 때 *N. oculata*의 성장률이 가장 높았으며, 5%의 이산화탄소의 농도까지는 성장률이 증가하였다. 최대 건조 중량으로 비교하였을 때 2% 농도의 이산화탄소를 사용하는 것은 100% 공기를 주입하는 것과 비교하여 대략 12% 정도의 성장이 증가하였다. 하지만, 이산화탄소의 농도를 10%로 증가시켰을 경우 오히려 성장 저해 효과를 보였다. 따라서 본 연구에서는 *N. oculata*의 성장을 위한 최적의 이산화탄소 농도는 2%라는 결론을 도출할 수 있었다. 최적의 농도인 2% 이산화탄소를 사용하였을 때, 최대 성장 속도와 이산화탄소 고정화 수율은 각각 0.139 g/L·day와 0.25g CO₂/L·day를 달성할 수 있었다.

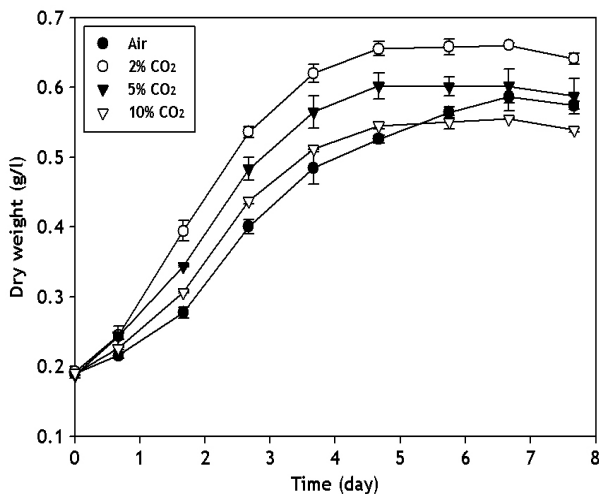


Fig. 1. Comparison of different concentrations of CO₂ for the growth of *N. oculata*. Initial inoculum size was adjusted with 0.2 g/L and subsequently incubated in the 1.5 L f/2 medium under the constant irradiance (70~80 μmol/m²·s). All experimental conditions were same except for the concentration of CO₂.

가스 유량 영향

*N. oculata*의 배양시 투입 기체 유량에 따른 성장률을 알아보기 위하여 0.3, 0.6, 0.9, 1.2 vvm의 투입 기체 유량에서의 *N. oculata*의 성장 속도를 비교하였다. 투입 기체 유량에 따른 성장 속도는 Fig. 2에서 보여지듯이, 투입 기체 유량이 증가함에 따라 조금씩 감소하였다. 투입 기체 유량이 0.3, 0.6, 0.9, 1.2 vvm으로 순차적으로 증가하면서, 성장 속도는 각각 0.156, 0.154, 0.154, 0.138 g/L·day로 점차적으로 감소하였다. 특히, 1.2 vvm의 기체 유량에서 최저의 성장률을 보이는 것은 기체 유량의 지나친 증가에 따른 shearing effect 때문인 것으로 보인다. 이러한 결과를 바탕으로, *N. oculata*의 배양의 최적의 기체 유량은 0.3 vvm으로 결정할 수 있었다. 따라서 앞의 Fig. 1에서 도출된 *N. oculata*의 배양의 최적 이산화탄소 농도인 2% 이산화탄소와 0.3 vvm의 투입 기체 유량 조건에서 이후의 실험을 수행하였다.

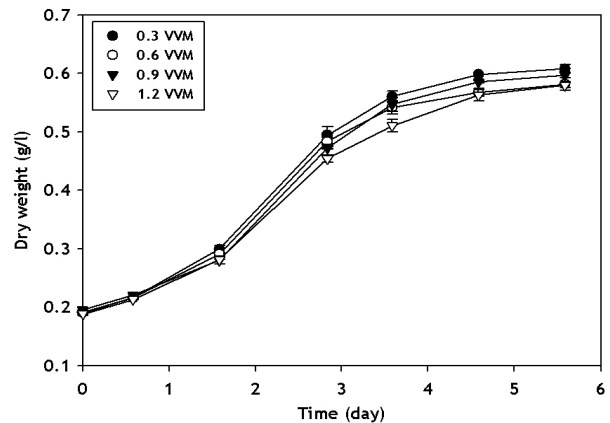


Fig. 2. Comparison of different gas flow rate for the growth of *N. oculata*. Initial inoculum size was adjusted with 0.2 g/L and subsequently incubated in the 1.5 L f/2 medium under the constant irradiance (70~80 μmol/m²·s). Previously optimized concentration of carbon dioxide (2% CO₂) was applied to the cultivation of *N. oculata*.

질소 농도 영향

질소 농도에 따른 *N. oculata*의 성장 및 지질 생산의 영향을 알아보기 위하여 이산화탄소 2%, 기체유량 0.3 vvm, 광도 70~80 μmol/m²·s 조건에서 질소 농도를 12.5, 25, 37.5, 50 mg/L (NO₃-N)으로 증가시키면서 *N. oculata*를 배양하였다 (Fig. 3). Fig. 3(a)는 시간에 따른 배양액 중 질소 농도의 변화를 보여주고 있다. 배양액 중 질소 농도는 배양 시간이 증가하면서 질소의 초기 농도와 상관없이 비슷한 속도로 감소하였다. 12.5 mg/L의 초기 질소 농도는 배양 2일 이내에 전부 소모되었으며, 최대 농도인 50 mg/L의 경우 6일 이내에 모두 소모되었다. 이는 *N. oculata*의 성장이 빠르게 증가하는 초기 배양 시기에 질소원이 대부분 사용되었음을 보여준다.

*N. oculata*의 바이오매스는 처음 2일 동안 모든 질소 농도에서 비슷한 성장률을 보였으나, 2일이 지난 후 질소 농도별 성장률의 차이를 보여주기 시작하였다. 12.5 mg/L 질소의 경우 질소가 전부 소모된 2일 이후부터 성장이 둔화되며 5일이 지난 후부터는 바이오매스량이 더 이상 증가하지 않았다. 마찬가지로 25 mg/L 질소의 경우 질소가 소모된 3일 이후부터 성장률이 감소하는 것을 관찰하였다. 따라서 배양액 중 질소 농도가 *N. oculata*의 바이오매스 성장에 큰 영향을 주는 것을 확인할 수 있었다. 배양 기간 중 질소 농도가 12.5, 25, 37.5 mg/L으로 증가함에 따라 *N. oculata*의 최대 건조 중량이 0.661, 1.031, 1.349 g/L로 점차적으로 증가하였다. 그러나 질소 농도를 50 mg/L으로 증가시켰을 경우에는 37.5 mg/L에서의 성장률과 비슷한 성장률을 보여주었다. 질소농도가 증가하면서 바이오매스 성장률이 증가하지만 50 mg/L 이상의 고농도 질소조건에서는 바이오매스 성장률 증가에 영향을 미치지 않는다는 것을 알 수 있었다. 따라서 본 실험에서 *N. oculata*의 성장을 위한 최적의 질소원 농도는 37.5-50 mg/L 사이라는 결론을 도출하였다.

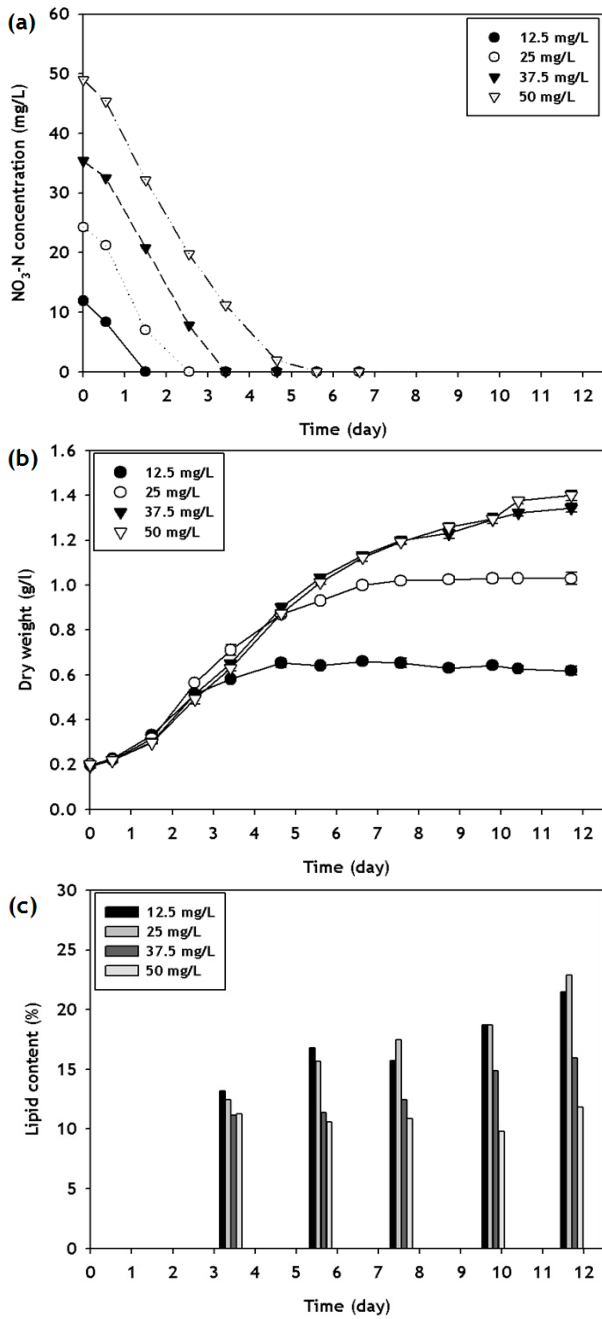


Fig. 3. Influence of nitrogen concentration on the growth and lipid production of *N. oculata* (a) nitrogen consumption curves (b) *N. oculata* biomass growth (c) lipid contents of *N. oculata*. Limited light intensity ($70\sim 80 \mu\text{mol}/\text{m}^2\cdot\text{s}$) was maintained throughout the cultivation.

지방함량의 경우, *N. oculata*의 바이오매스 성장과는 반대로 질소원 농도의 증가에 따라 오히려 감소하였다 (Fig. 3(a)). 질소 농도가 낮은 조건 (12.5, 25 mg/L ($\text{NO}_3\text{-N}$))에서 *N. oculata*의 지방 함량은 3일 이후로 점차적으로 증가하였으며, 20% 이상의 지방 함량을 보였다. 37 mg/L의 질소 농도 조건의 경우 질소가 모두 소모되고 바이오매스 성장이 둔화

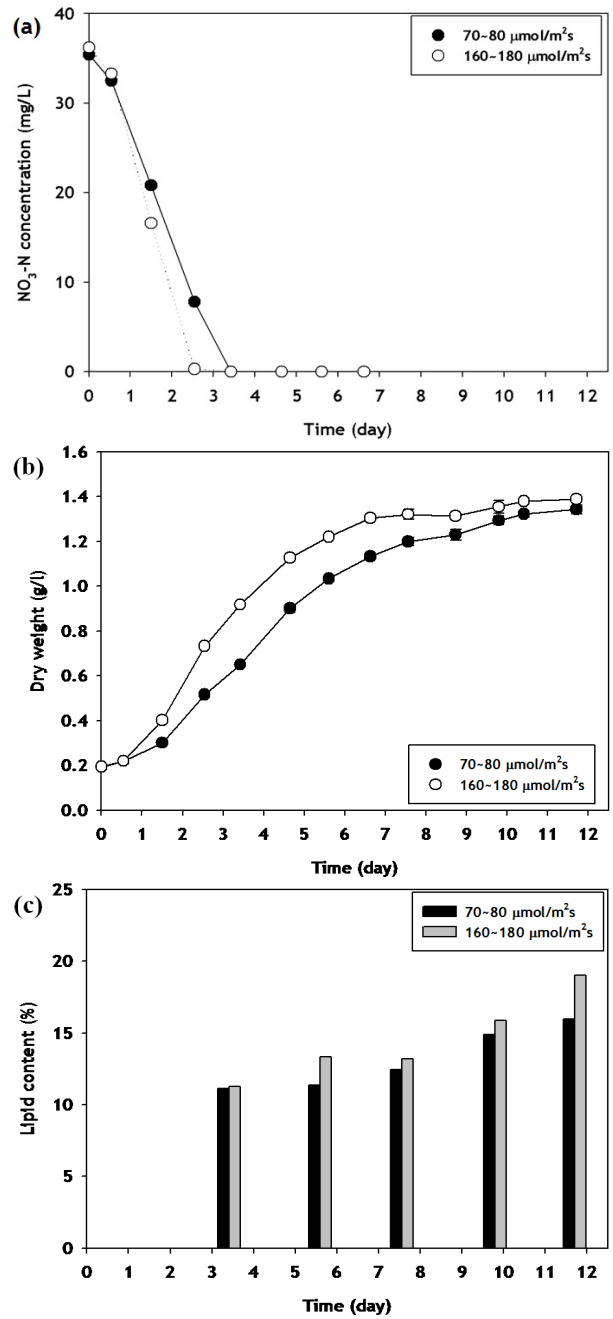


Fig. 4. Influence of light intensity on the growth and lipid production of *N. oculata* (a) nitrogen consumption curves (b) *N. oculata* biomass growth (c) lipid contents of *N. oculata*. The constant light intensity of $70\sim 80$ or $160\sim 180 \mu\text{mol}/\text{m}^2\cdot\text{s}$ was applied to the cultivation.

된 시점인 5일 이후부터 지방함량이 증가하기 시작하여, 15% 정도의 함량을 보여 주었다. 하지만 50 mg/L의 질소 농도 조건에서는 지방함량이 12% 정도로 상대적으로 낮았다. 이는 초기의 높은 질소 농도가 지방함량에 영향을 준 것으로 보인다. 본 연구 결과에서는 질소가 모두 소모되고 바이오매스 성장이 둔화된 시점에서부터 지방함량이 증가하기 시작하였

다. 이러한 결과는 질소원의 고갈이 많은 미세조류 종들의 지질 함량에 긍정적인 영향을 미친다는 기존의 보고와 일치하고 있다 [12,13]. 미세조류의 지질 함량 증가가 질소원 고갈을 인지하고 반응하는 진화학적으로 동일 또는 유사한 생물학적 기작을 통하여 이루어지고, 이는 미세조류 종간의 차이를 넘어선 수많은 미세조류 종들의 보편적인 기작인 것으로 보인다. 보다 심도 있는 분자 생물학적인 연구가 이러한 미세조류의 지질 생산의 보편적인 기작에 대한 이해를 높이기 위하여 필요하며, 이러한 기작에 대한 정확한 지식과 이해는 향후 미세조류 활용 바이오 에너지 생산의 상용화에 큰 보탬이 될 수 있을 것이다.

광도의 영향

광도의 영향을 비교하기 위하여 질소 농도 (37.5 mg/L)를 동일하게 하였고, 광도를 70~80 $\mu\text{mol}/\text{m}^2\cdot\text{s}$ 와 160~180 $\mu\text{mol}/\text{m}^2\cdot\text{s}$ 로 달리 하였다. 광도에 따른 바이오매스 성장과 지질함량을 비교하여 Fig. 4에 나타내었다. 배양액 중 질소 농도는 저광도와 비교하여 광도가 높은 조건에서 더 빠르게 감소하였으며, 이와 동시에 *N. oculata*의 바이오매스도 더 빠르게 성장하였다 (Fig. 4(a), (b)). 하지만 12일이 지난 후에는 두 광도에서 비슷한 성장량을 보여주었다. 광도의 증가가 바이오매스의 초기 성장 속도를 증가시키지만 충분한 시간을 주었을 경우에는 광도의 조사량과 무관한 질소 등 유효 영양분에 의해 총 바이오매스 생산량이 결정되는 것으로 보인다. 지방함량의 경우 처음 지방이 측정 된 3일 후에는 두 광도에서 차이를 보이지 않았으나, 시간이 지나면서 고광도 조건에서 더 높은 지질 함량을 나타내었다 (Fig. 4(c)). 이는 고광도 하에서의 빠른 성장에 따른 질소 고갈의 시점이 더 빠르다는 점을 고려할 때, 지방질 함량이 증가 될 수 있는 질소 고갈의 효과가 더 크게 영향을 미쳤을 것으로 생각된다. 따라서 본 연구에서 광도 조건이 *N. oculata*의 성장 속도와 지방 함량에 영향을 주는 것을 알 수 있었다.

결 론

본 연구에서는 해양 미세조류인 *Nannochloris oculata*를 사용한 바이오 에너지의 활용 가능성을 탐색 또는 연구하였다. 이를 위하여, 이산화탄소 농도, 기체 주입 유량, 질소 농도, 광도 조건을 변화하며 여러 환경조건에서 바이오매스 성장과 지질 생산량의 변화를 연구하였다. 이산화탄소 농도가 2%일 때, 바이오매스 성장 속도가 가장 빨랐다. 10% 이상의 이산화탄소 농도에서는 100% 공기를 불어 넣어 주는 것보다 큰 차이를 보이지 않거나 오히려 성장의 저해 효과가 나타났다. 공기 주입 유량의 변화는 바이오매스 성장 속도의 변화에 상대적으로 큰 영향을 미치지 못하는 못하였으나, 과도한 공기 주입 유량은 shearing effect에 의한 성장 저해를 초래하였다. 질소원 농도가 37.5 mg/L일 때 미세조류 *N. oculata*의 최대 성장률을 보여 주었고 바이오 에너지원인 지질의 함량은 위

부 질소원의 농도에 반비례하였다. 또한 고광도에서 바이오매스 성장률과 지질함량이 증가하였다. 이와 같은 실험 결과들은 향후 해양 미세조류인 *N. oculata*를 바이오에너지원으로 활용할 때, 성장과 지질 생산 유도에 관한 중요한 기초 자료로 사용될 수 있을 것으로 기대된다.

감 사

본 연구는 2010년도 지식경제부의 재원으로 한국에너지기술평가원 (KETEP)의 전력산업연구개발사업 (No. R-2007-3-112)으로 수행된 연구 성과입니다. 또한, 이 논문은 2010년도 정부 (교육과학기술부)의 재원으로 (재)차세대 바이오매스 연구단 (글로벌프론티어연구개발사업)의 지원을 받아 수행된 연구입니다 ((재)차세대바이오매스연구단-2010-0029728).

접수 : 2010년 11월 25일, 게재승인 : 2010년 12월 7일

REFERENCES

1. Wang, B., Y. Q. Li, N. Wu, and C. Q. Lan (2008) CO₂ biomitigation using microalgae. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 79: 707-718.
2. Clark, J. H., V. Budarin, F. E. I. Deswarte, J. J. E. Hardy, F. M. Kerton, A. J. Hunt, R. Luque, D. J. Macquarrie, K. Milkowski, A. Rodriguez, O. Samuel, S. J. Tavener, R. J. White, and A. J. Wilson (2006) Green chemistry and the biorefinery: A partnership for a sustainable future. *Green Chem.* 8: 853-860.
3. Kishimoto, M., T. Okakura, H. Nagashima, T. Minowa, S.-Y. Yokoyama, and K. Yamaberi (1994) CO₂ Fixation and Oil Production Using Micro-Algae. *J. Ferment. Bioeng.* 78: 479-482.
4. Chiu, S. Y., C. Y. Kao, C. H. Chen, T. C. Kuan, S. C. Ong, and C. S. Lin (2008) Reduction of CO₂ by a high-density culture of *Chlorella* sp in a semicontinuous photobioreactor. *Bioresour. Technol.* 99: 3389-3396.
5. 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.
6. Um, B. H. and Y. S. Kim (2009) Review: A chance for Korea to advance algal-biodiesel technology. *J. Ind. Eng. Chem.* 15: 1-7.
7. AlgaeForBiofuels: Algae Green-Chemicals and Biofuels Business Intelligent Information. <http://algaeorbiofuels.com>.(2010).
8. Chisti, Y. (2007) Biodiesel from microalgae. *Biotechnol.*

- Adv.* 25: 294-306.
9. Huntley, M. E. and D. G. Redalje (2007) CO₂ mitigation and renewable oil from photosynthetic microbes: A new appraisal. *Mitig. Adapt. Strateg. Glob. Change* 12: 573-608.
 10. Guillard, R. R. L. (1975) Culture of phytoplankton for feeding marine invertebrates. pp. 26-60. In: Smith, W.L. and M.H. Chanley (eds.) *Culture of Marine Invertebrate Animals*. Plenum Press, New York, USA.
 11. Park, J. Y., Z. M. Wang, D. K. Kim, and J. S. Lee (2010) Effects of water on the esterification of free fatty acids by acid catalysts. *Renew. Energ.* 35: 614-618.
 12. Rodolfi, L., G. C. Zittelli, N. Bassi, G. Padovani, N. Biondi, G. Bonini, and M. R. Tredici (2009) Microalgae for Oil: Strain Selection, Induction of Lipid Synthesis and Outdoor Mass Cultivation in a Low-Cost Photobioreactor. *Biotechnol. Bioeng.* 102: 100-112.
 13. Bilanovic, D., A. Andargatchew, T. Kroeger, and G. Shelef (2009) Freshwater and marine microalgae sequestering of CO₂ at different C and N concentrations - Response surface methodology analysis. *Energ. Convers. Manage.* 50: 262-267.
 14. Barsanti, L. and P. Gualtieri (2006) *Algae: Anatomy, Biochemistry, and Biotechnology*. pp. 213-214, CRC Press, Taylor & Francis.