

## *Dunaliella tertiolecta*를 이용한 미세조류 유래 바이오디젤의 FAME 성분 특성 연구

이돈민 · 민경일 · 임의순 · 하종한 · 이철균\* · 이봉희†

한국석유관리원 석유기술연구소

\*인하대학교 공과대학 생명화학공학과

†충북대학교 공과대학 화학공학과

(2014년 6월 12일 접수; 2014년 6월 26일 수정; 2014년 6월 27일 채택)

### Study of FAME components and total contents on Micro-algal Biodiesel derived from *Dunaliella tertiolecta*

Don-Min Lee · Kuyung-Il Min · Eui-Soon Yim · Jong-Han Ha  
Choul-Gyun Lee\* · Bong-Hee Lee†

Petroleum Technology R&D Center, Korea Petroleum Quality & Distribution Authority,  
Chungcheongbuk-do, 363-883, Korea

\*Dept. of Chemical and Biological Engineering, In-ha University, Incheon, 402-751, Korea

†Dept. of Chemical Engineering, Chungbuk National University, Chungcheongbuk-do,  
361-763, Korea

(Received June 12, 2014; Revised June 26, 2014; Accepted June 27, 2014)

**요약** : 국내 자동차용 경유에 혼합하여 유통 중인 바이오디젤은 물리적인 관점에서 기존 석유계 경유와 동점도, 밀도 등의 물성값이 유사하고 세탄가가 높은 장점이 있다. 또한 환경적인 측면에서는 기존의 석유유통 인프라 개조 및 변경없이 사용가능하다는 점과 합산소 연료로서 디젤기관에서의 연소성이 좋고 유해 배출가스 저감효과가 있으며 생분해성도 높아 환경오염이 적어 자동차용 경유 대체연료로 각광받고 있다. 그러나, 기존 식용계 작물을 원료로 하고 있다는 점에서 단점으로 지적되는 바이오디젤 대신 단위면적당 CO<sub>2</sub> 흡수율이 높고 빠른 성장 속도가 장점으로 거론되는 미세조류의 활용에 대한 연구가 대두되고 있다. 본 연구에서는 미세조류 중 *Dunaliella tertiolecta* 종을 이용하여 생산한 바이오디젤의 전환율을 연구하기 위해 기존에 사용되고 있는 GC-FID분석방법의 문제점에 대해 조사하고 TOF-MS 장비를 통한 개별 지방산 메틸에스테르의 성분을 검토하였다.

주제어 : 자동차용 경유, 바이오디젤, 미세조류, 지방산메틸에스테르(FAME), *Dunaliella tertiolecta*

**Abstract** : Biodiesel has very similar physical properties (density, kinematic viscosity) and has even higher cetane number compare with conventional diesel. There are no necessity to change or modify the infra-structure & engine system. It is known that fatty acid methyl ester (FAME) is

†Corresponding author (E-mail: bhlee@chungbuk.ac.kr)

oxygen-contained components increasing the combustibility, biodegradability and reduced the exhaust harmful gas. These things made the biodiesel more popular as an alternative diesel fuel.

But biodiesel's sources are controversial issues about CO<sub>2</sub> reduction effect at this time because those mainly come from edible plants such as soy, palm, rapeseed already spent lot of CO<sub>2</sub> to cultivate. Whereas micro-algae is focused because they are inedible and has rapid growth rates & high carbon-dioxide adsorption rate per area. In this study, we analyze the each FAME components using GC×GC-TOFMS in stead of GC-FID and verify the previous total FAME contents method's applicability through the micro algal biodiesel derived from *Dunaliella tertiolecta*.

*Keywords* : Automotive Diesel, Biodiesel, Micro-algae, Diesel, Fatty Acid Methyl Ester, *Dunaliella Tertiolecta*

## 1. 서론

바이오디젤은 석유계 경유에 비해 점도, 밀도 등의 물리적 특성이 유사하고 세탄가가 높아 자동차용 경유엔진 및 기존 석유유통 인프라 시설에 대한 변경 없이 사용 가능하며, 차량 연소과정에서 생성되는 이산화탄소(CO<sub>2</sub>)가 식물의 성장과정에서 흡수되므로 대기 중의 CO<sub>2</sub> 배출량을 줄일 수 있다는 점에서, 또한 산성비의 주범인 황성분이 거의 없고 연료 내에 포함되어있는 산소성분으로 인해 연소성이 높다는 점에서, 유해배출가스로 분류되는 다고리 방향족탄화수소와 질소계 화합물이 적다는 점에서 자동차용 경유의 청정 대체연료로 각광받고 있다.[1,2]

현재 바이오디젤의 원료 물질로는 오일을 함유한 곡류가 가장 많이 사용되고 있는데 미국의 경우 대두유, 유럽은 유채유 그리고 동남아시아는 팜오일을 사용하고 있다. 국내의 경우 원료 다변화 및 계절별 품질기준 조정을 위해 대두유와 팜유, 폐식용유를 사용하고 있다. 2012년 기준으로 전 세계 바이오디젤 생산량은 22.0백만kl/yr이며, 약 60%가 유럽에서 소비되는 것으로 알려져있다.[3]

그러나 대부분의 원료가 식용 작물에서 유래하는 것으로 알려져 있으며 바이오디젤 생산을 위한 동남아시아에 무분별한 산림 개발 및 훼손에 관한 문제점이 부각되면서 실질적인 환경 개선 효과를 가지는 원료물질에 조사 및 연구가 각국마다 활발하게 이루어지고 있다. 이러한 흐름으로 인해 최근에는 미세조류를 이용한 바이오디젤 생산 기술에 관심이 증가하고 있는데 아래 Table 1에서는 다양한 원료물질의 연간 생산량을 비교하

고 있는데 비록 이론적이긴 하지만 단위면적당 제일 높은 연간 생산량을 가지고 있는 것으로 나타났다. 이렇게 미세조류의 빠른 성장 속도와 높은 지질 함량은 바이오디젤로의 높은 생산성을 기대할 수 있으며, 성장에 필요한 영양염류로 폐수의 활용이 가능하다는 점에서 친 환경적인 원료로 검토되고 있다.[4,5]

바이오디젤 원료물질로서 미세조류에 대한 연구는 미국 NREL(National Renewable Energy Laboratory)에서 1978년부터 1996년까지 수행되었던 ASP(Aquatic Species Program)에서 많이 이루어졌다. 1998년 발간된 최종보고서에는 다양한 미세조류 관련 자료를 수록하고 있으며 최근에는 NREL과 DOE(Department of Energy)에서 연구를 재개 하여 미국내 본격적인 산업 구축을 위한 기술로드맵을 발표하였다.[6] 유럽의 경우 2009년부터 가속성산화안정도 시험(EN 15751) B7(바이오디젤 7%혼입 자동차용 경유)가 기준 20시간을 만족하는 조건 하에 보급하고 있으며, 일본은 5%이상 혼입 시 발생하는 산화안정성 및 저온성능 문제로 혼입 가능량을 낮게 예상하고 있다.[7,16]

국내의 경우 2002년부터 4년간의 시범보급을 바탕으로 상용화를 진행하였다. 2007년 9월 경제정책 조정회의에서 당시 기획재정부, 농림부산부, 지식경제부, 환경부, 국토해양부 합동으로 바이오디젤에 대한 면세를 조건으로 혼합비를 0.5% 상향시키는 중장기 보급계획을 수립하였으며 2010년에는 기존 계획을 재검토하여 2011년까지 한시적인 바이오디젤 2%에 대한 면제지원을 결정하고 2011년 말부터 2014년 현재까지 「석유 및 석유대체연료사업법」 품질기준 고시를 통해

2~5% 범위에서 의무 보급중이다.[8,15]

이처럼 국내외에서 바이오디젤 보급을 위해 많은 연구와 검토가 이루어지고 있으나 일부 국가를 제외하고는 미세조류유래 바이오디젤의 특성에 관한 보고서가 많이 부족한 실정이다. 동일한 종의 미세조류도 영양 수준, 온도, 일광 강도 등의 환경에 의해 서로 다른 성분과 물성을 나타낼 수 있다고 알려져 있어 다른 기존의 바이오디젤의 원료보다 어려운 점이 있다. 지금까지 약 40,000종 이상의 미세조류 혹은 해조류 종이 규명되었으나 아직 규명되지 않은 종도 많이 있으며, 일반적인 종은 선호하는 환경이나 색상에 의해 Cyanobacteria, Green algae, Golden algae, Brown algae으로 분류되는데 바이오디젤 원료로 가장 많이 검토되는 것은 녹조류(Green Algae, Chlorophyceae)으로 알려져 있다.[9,12]

S.Kent의 논문에 의하면 미세조류 종의 지질 함량은 건식 기준 무게%로 10~50%이상으로 매우 다양한데 그 이유는 동일종이더라도 성장조건 차이에 기인한 것이며[13,15], 이러한 이유로 지질함량으로 그 종에 대한 총 생산성을 정의할 수

없다. 일반적으로 성장조건에서의 낮은 에너지(낮은 온도와 빛) 조건에서는 불포화도가 증가하고 높은 에너지(높은 온도와 빛)에서는 포화도가 증가하는 것으로 알려져 있다.[16]

각 종에 대한 일반적인 평균 구성성분에서도 기존의 동·식물성 유지와 차이점을 발견할 수 있다. 예를 들어 기존 원료의 성분 분포가 C16에서 C18사이에 집중되어 있던 것과 달리 적게는 C12에서 C14의 영역에서 높게는 C20에서 C22의 고비점 영역까지 넓게 분포되어 있으며, 기존 1~2개의 이중결합 구조에서 많게는 6개의 이중결합을 포함 하는 것으로 알려져 있다.[17]

본 연구에서는 미세조류 유래 바이오디젤의 품질특성을 연구하기 위해 여러 종 가운데 *Dunaliella tertiolecta*에서 유래한 바이오디젤 시료를 확보하여 구성성분 특성을 분석하고 기존 지방산메틸에스터(FAME, Fatty Acid Methyl Ester)의 함량 분석 시험방법(EN 14103) 적용 여부를 검토하였다.[13]

Table 1. Biodiesel Productivity Dependent on Various Feedstocks [7]

Raw product	Oil Contents (A)	Harvest (B)	Cropland (C)	Productivity (D)
Corn ( <i>Zea mays</i> )	44	172	66	152
Cannabis sativa ( <i>Cannabis sativa</i> )	33	363	31	321
Soy bean ( <i>Glycine max</i> )	18	636	18	562
<i>Jatropha curcas</i>	28	741	15	653
<i>Camelina sativa</i>	42	915	12	809
Rapeseed ( <i>Brassica napus</i> )	41	974	12	862
Sunflower ( <i>Helianthus annuus</i> )	40	1,010	11	946
<i>Ricinus communis</i>	48	1,307	9	1,156
Palm ( <i>Elaeis guineensis</i> )	36	5,366	2	4,747
Microalgae(Low Oil Conc.)	30	58,700	0.2	51,927
Microalgae(Mid Oil Conc.)	50	97,800	0.1	86,515
Microalgae(High Oil Conc.)	70	136,900	0.1	121,104

※ unit: (A)=%, (B)=L oil/ha/year, (C)=m<sup>2</sup>/year/kg biodiesel, (D)=kg biodiesel/ha/year

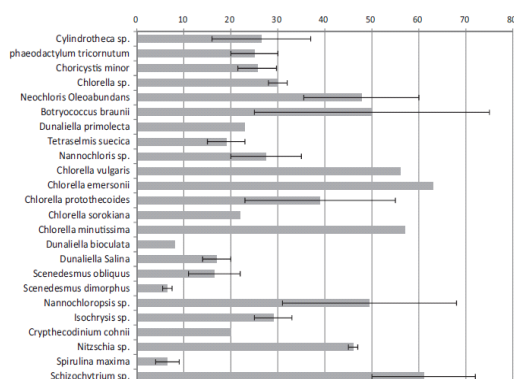


Fig. 1. Lipid contents reported for various algal species wt% [15]

※ Confidence intervals are min. and max. of reported values

## 2. 실험

### 2.1. 시약 및 재료

본 연구에 사용된 시료는 *Dunaliella tertiolecta* 종에서 추출된 지질에 메틸 에스터화 과정을 거친 바이오디젤과 바이오디젤 내 FAME 함량 분석에 사용되는 시험방법 중 가장 최근에 공인된 EN 14103에서 규정하고 있는 내부표준물질인 99.5% 이상의 순도를 가지는 Aldrich社의 Nonadecanoic acid methyl ester (FAME C19:0) 이 적용되었으며 바이오디젤과 내부표준물질의 희석을 위한 용매로 대정화금社의 HPLC급의 톨루엔을 사용하였다.

### 2.2. 실험 장치 및 시험 방법

미세조류 유래 바이오디젤 중의 FAME 성분 분포를 검토하기 위해 Agilent社 7890A 모델의 GC-FID와 미지피크에 대한 정밀분석과 성분 검토를 위해 Leco社의 GC×GC-TOFMS를 적용하였다. 먼저 FAME 성분 조사를 위한 GC-FID는 폴리에틸렌글리콜을 정지상으로 길이 30M, 내경 0.25mm 및 두께 0.25 $\mu$ m 조건의 DB-WAX 컬럼을 이용하였으며 이때의 주입부와 검출부 온도는 각각 250 $^{\circ}$ C로 설정하고 오븐의 온도는 60 $^{\circ}$ C에서 240 $^{\circ}$ C까지 승온 프로그램을 이용하여 분석을 통하여 얻어진 크로마토그램의 피크 면적과 내부표준물질(C19:0)과의 면적비를 이용하여 FAME 성분 및 함량을 추정할 수 있다.

$$C = \frac{(\Sigma A) - A_{EI}}{A_{EI}} \times \frac{C_{EI} \times V_{EI}}{W} \times 100 \quad (1)$$

여기서  $\Sigma A$ 는 C<sub>14</sub>~C<sub>24</sub> FAME 피크의 전체 면적을 의미하며 A<sub>EI</sub>는 내부표준물질 Nonadecanoic acid methyl ester 피크의 면적, C<sub>EI</sub>는 주입 내부표준물질의 농도(mg/ml)를, V<sub>EI</sub>는 주입 내부표준물질의 부피(ml), W는 시료의 무게(mg)를 나타낸다.[10]

정밀분석을 위한 장치로는 GC×GC-TOFMS를 사용하였는데 연료유 중 등유이상의 유분은 이성질체의 수가 급증하기 때문에 기존 가스크로마토그래피를 이용한 정성 분석에는 어려움이 있다. 즉 여러 성분이 컬럼에서 분리되지 않고 겹쳐 하나의 피크로 나타나는 현상이 발생하는데 이를 최대한 분리하기 위해 2개의 컬럼을 이용한 GC×GC가 필요하다. 일반적으로 2개의 컬럼 중

Table 2. GC-FID Conditions for FAME [10]

Component	Description
Column	DB-WAX(30m × 0.25mm × 0.25 $\mu$ m)
Inlet	
Temp	250 $^{\circ}$ C
Split Ratio	100:1
Pressure	11.72psi
Oven	
Program rate	60 $^{\circ}$ C(2min) → 10 $^{\circ}$ C/min → 200 $^{\circ}$ C → 10 $^{\circ}$ C/min → 240 $^{\circ}$ C(7min)
Run time	34min
Detector	
Temp	250 $^{\circ}$ C

1차는 비극성 컬럼을 사용하고 2차에는 극성을 사용함으로써 비점과 극성에 따라 성분 분리가 이루어지도록 구성되어 있다. 컬럼 중간에는 모듈레이터(modulator)가 설치되어 있어 온도변화에 따라 1차 컬럼의 용출 성분을 일정 시간 간격으로 2차 컬럼으로 이송시키는 역할을 수행하고 있다. 이후 검출기 부분에 TOFMS(time of flight mass spectrometry)를 설치하여 분리 피크에 대한 정성 분석이 가능하도록 하였다.

이밖에 유효 눈금 0.1mg이하의 최소 0.01 ~ 100mg의 측정범위를 가지는 저울과 효과적인 시료 전처리를 위한 초음파분쇄기(Sonicator)를 준비하였다.

미세조류 유래 바이오디젤 중의 FAME 피크 분석을 위해 내부표준물질 100mg과 해당 바이오디젤 시료 100mg을 소분하고 톨루엔 10ml에 희석한 후 Sonicator를 이용하여 1분간 분산작업을 실시한 후 분석하였다. 정밀분석을 위해 적용한 TOFMS의 경우 바이오디젤 10mg에 톨루엔 1ml 비율로 희석 후 개별 피크에 대한 성분 분석을 실시하였다.

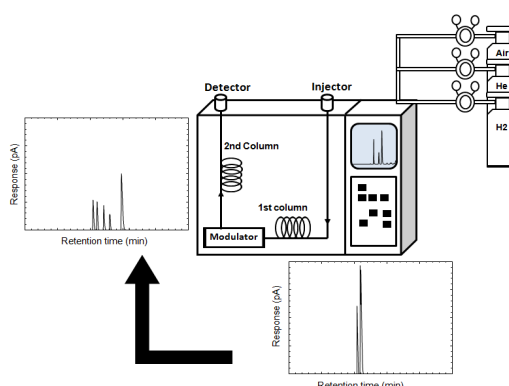


Fig. 2. Schematic diagram of GC×GC-TOFMS

### 3. 결과 및 고찰

#### 3.1. 시료 내 FAME 함량 및 조성 분석 결과

미세조류 *Dunaliella tertiolecta*를 이용하여 생산된 바이오디젤의 FAME함량을 분석한 결과 아래 Figure 3와 같이 16개 피크가 측정되었다. 이는 기존 동·식물계 유래 바이오디젤이 10개 내외

Table 3. GC×GC-TOFMS Condition

Component	Description
Column	
1st column	DB-WAX(30m × 0.25mm × 0.25 $\mu$ m)
2nd column	Rxi-17(0.89m × 100mm × 0.10 $\mu$ m)
Inlet	
Temp	240 $^{\circ}$ C
Split Ratio	100:1
Total Flow	101ml/min(Constant flow)
Oven	
1st Oven	
Program rate	60 $^{\circ}$ C(2min) → 10 $^{\circ}$ C/min → 200 $^{\circ}$ C → 5 $^{\circ}$ C/min → 240 $^{\circ}$ C(25min)
Run time	49min
2nd Oven	
Program rate	75 $^{\circ}$ C(2min) → 10 $^{\circ}$ C/min → 215 $^{\circ}$ C → 5 $^{\circ}$ C/min → 255 $^{\circ}$ C(25min)
Run time	49min
Modulator	
Temp offset	30 $^{\circ}$ C higher than 1st oven temperature
MS(TOF)	
Acquisition delay	410 Sec.
Mass range	35~600 $\mu$
Ion source temp	230 $^{\circ}$ C

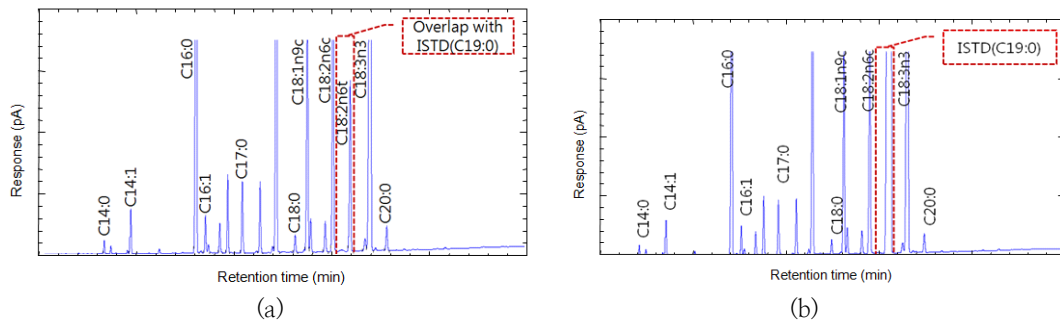


Fig. 3. Chromatogram of *Dunaliella tertiolecta* (a) w/o ISTD, (b) w/ISTD

Table 4. FAME Components of Biodiesel Depends on Sources

	Micro Algae	Animal			Plant				Remark
	<i>Dunaliella tertiolecta</i>	Lard	Tallow	Coconut	Palm kernel	Soy	Used cook Oil	Palm	
C8:0				6	3				
C10:0				5	4				
C12:0				44	52				
C14:0		2	3	17	16			1	
C14:1			1						
C15:0									
C16:0	19.6	23	25	9	7	10	16	48	
C16:1		3	4				1		
C17:0	1.8	0.5	0.5						
C17:1	1.8								
C18:0	0.5	11	11	3	1	5	4	5	
C18:1n9c	7.5	44	43	7	11	22	33	37	
C18:2n6c	9.7	11	8	2	2	51	37	9	
C18:2n6t	5.0								
C18:3n3	32.4	1	1	1	1	7	5	1	
C20:1n9c		1							
C20:4n6									
C20:5n3									
etc	<b>20.1</b>	2	2	3	1	3	3	0	
Total	98.4	98.5	98.0	96.7	97.6	97.5	98.5		

의 피크를 가지는 것과 비교했을 때 이번에 확보된 *Dunaliella tertiolecta* 유래 바이오디젤이 보다 다양한 성분으로 구성되어 있음을 알 수 있었으며, 각 피크에 대한 성분 규명을 위하여 확보 가능한 FAME 표준물질(약 33종의 개별성분 FAME 표준물질)과 미세조류유래 바이오디젤 분

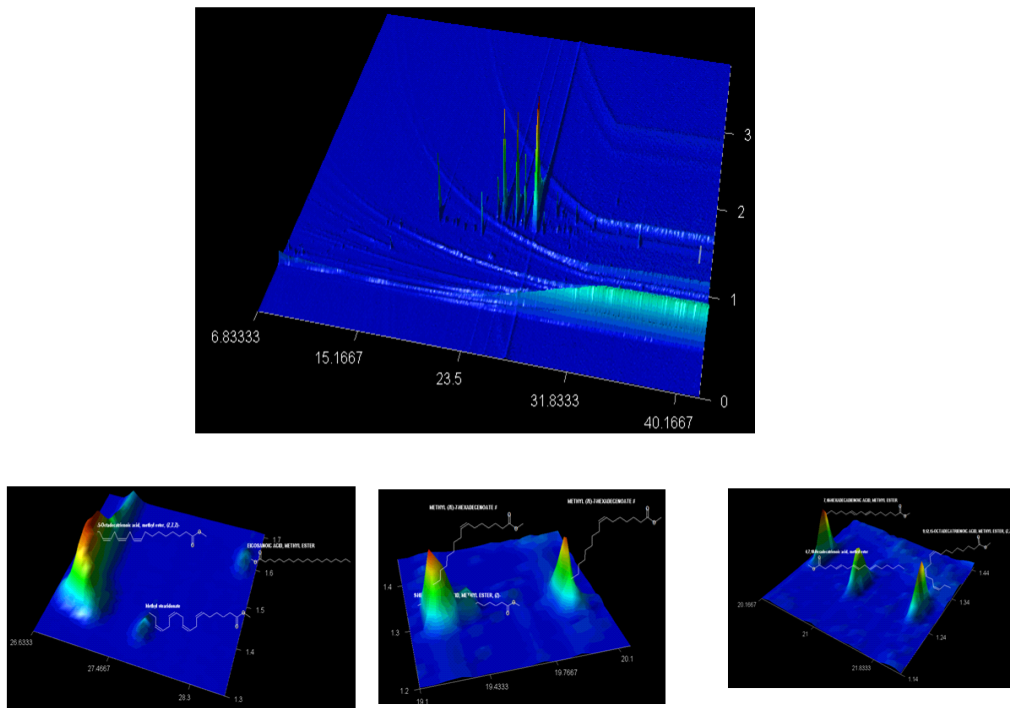
석결과로 얻어진 피크 머무름 시간 확인을 통한 비교를 실시하였다. Table 4와 같이 C<sub>16:0</sub>의 함량이 20%에 근접하고 있으며 이중결합이 3개인 C<sub>18:3n3</sub>이 32%를 차지하는 것으로 나타났다. 일반적으로 탄소 수가 적고 이중결합이 없는 파라핀계 분자 함량이 높은 경우 저온유동성이 취약하

Table 5. The Results of Unknown Components

	<i>Dunaliella tertiolecta</i>		Match (%)
	Retention Time	Components	
1	15.95	5,8-Octadecadienoic Acid ME	87.5
2	17.66	7-Hexadecenoic Acid ME	86.4
3	17.98	7,10-Hexadecanoic Acid ME	89.0
4	18.15	9,12,15-Octadecatrienoic Acid ME	86.1
5	19.24	4,7,10,13-Hexadecatetraenoate Acid ME	86.0
6	20.03	Cyclopropaneoctanoic Acid ME	75.3
7	20.36	6,9-Octadecadienoic Acid ME	87.7
8	21.75	Methyl Stearidonaic Acid ME	89.9
<b>Unknown Peak</b>	<b>8ea</b>		

고, 이중결합 수가 증가할 수 록 저온유동성을 개선되나 산화안정성이 취약해지는 것으로 알려져 있다. 더욱이 이번 연구에 사용하였던 *Dunaliella tertiolecta*는 8개의 피크가 미지 성분으로 분류되었으며 정밀분석을 통한 미지피크의

FAME 해당 여부 검토가 필요한 것으로 나타났다. 또한 FAME 함량 분석을 위한 표준시험방법 (EN14103)을 이용하는 경우 기존 바이오디젤 성분에는 나타나지 않았던 Trans-9,12-Octadecadienoic acid methyl ester( $C_{18:2n6}$ )가 검

Fig. 4. Spectrums of *Dunaliella tertiolecta* using GC×GC-TOFMS

출되었으며 이 피크가 표준시험방법의 내부표준 물질(C<sub>19:0</sub>)과 겹치는 현상이 확인됨에 따라 FAME를 정량할 수 있는 별도의 시험방법 검토가 필요한 것으로 나타났다.

### 3.2. 정밀분석 결과

*Dunaliella tertiolecta* 분석에서 규정되지 않은 미지피크와 관련하여 FAME 해당 여부를 확인하기 위해 GC×GC-TOFMS를 이용하였다. 결과 스펙트로미터를 바탕으로 기존 바이오디젤 분석용 가스크로마토그래피의 분석 결과를 머무름 시간 및 용출 성분을 기준으로 미지 피크의 위치를 추정하여 성분 분석을 실시하였다. 그 결과 Table 5와 같이 8개 피크 모두 바이오디젤의 원료인 FAME에 해당하는 것으로 나타났으며 그 중 일부 성분은 기존 동·식물계 원료유래 바이오디젤에서 볼 수 없었던 환형구조(Cyclopropaneoctanoic Acid, C<sub>17:0</sub>)와 이중결합이 4개 포함된(Methyl Stearidonate, C<sub>18:4</sub>) 메틸 에스터기가 포함된 것을 발견할 수 있었다.

## 4. 결론

온실가스 저감에 대한 효용성과 식용작물의 연료화로 인해 논란이 있는 기존 식용계 동·식물성 바이오디젤 대신 각광받고 있는 미세조류 중 *Dunaliella tertiolecta*종을 이용한 바이오디젤을 확보하여 기존 시험방법으로 FAME함량 분석 여부를 측정하였으며 그 과정에서 나타난 미지물질을 GC×GC TOF-MS를 이용하여 정밀분석하였다. 성분 분석 결과 기존 바이오디젤이 가지는 10개의 FAME보다 넓은 범위의 다양한 성분(16개 이상)의 메틸에스터기로 구성되어있음을 발견할 수 있었다. 이 때문에 기존 바이오디젤의 FAME함량을 분석하기 위해 사용되는 내부표준물질(C<sub>19:0</sub>)과 미세조류유래 바이오디젤의 일부 성분(C<sub>18:2n6t</sub>) 간의 겹침 현상이 나타남을 발견할 수 있었다.

또한 기존 바이오디젤에서는 검출되지 않았던 이중결합 4개 이상의 구성과 높은 이중결합 함량은 기존 바이오디젤의 단점으로 여겨지는 열악한 산화안정성을 더욱 악화 시킬 것으로 예상된다. 그러나 미세조류유래 바이오디젤의 경우 중에 따라, 혹은 동일종이라도 성장환경에 따라 구성성분이 달라질 수 있다는 점에서 좀 더 다양한 미세

조류 종에 대한 성분 분석 결과를 수집할 필요가 있을 것으로 추정된다.

## 감사의 글

본 연구는 2014년 해양수산부 해양미세조류이용 바이오디젤 생산기술개발연구의 재원으로 인하여 해양바이오에너지 생산기술연구센터의 지원을 받아 수행되었으며, 이에 감사드립니다.('바이오에너지 품질규격화 및 상용화 방안 개발', No. D10906213H320000111)

## References

1. A. Kirrolia, N. R. Bishnoi, and R. Singh, Microalgae as a boon for sustainable energy production and its future research & development aspects. *Renew. Sustain. Energy Rev.* **20**: 642-656(2013).
2. A. E. Atabani, A. S. Silitonga, I. A. Badruddin, T. M. I. Mahlia, H. H. Masjuki, and S. Mekhilefd, A comprehensive review on biodiesel as an alternative energy resource and its characteristics. *Renew. Sustain. Energy Rev.* **16**: 2070- 2093(2012).
3. Moon-Yong Lee, Jin-Hui Lee, Current Situation and overview of biodiesel over the global view. *J. of Korean Oil Chemists' Soc.* **30**: 528-539 (2013).
4. A. S. Silitonga, H. H. Masjuki, T. M. I. Mahlia, H. C. Ong, W. T. Chong, and M. H. Boosroh, Overview properties of biodiesel diesel blends from edible and non-edible feedstock. *Renew. Sustain. Energy Rev.* **22**: 346-360(2013).
5. J. Singh, and S. Gu, Commercialization potential of microalgae for biofuels production. *Renew. Sustain. Energy Rev.* **14**: 2596-2610(2010).
6. M. K. Lam, and K. T. Lee, Microalgae biofuels: A critical review of issues, problems and the way forward.



- Biotechnol. Adv.* **30**: 673-690(2012).
7. R. Halim, M. K. Danquah, and P. A. Webley, Extraction of oil from microalgae for biodiesel production: *A review*. *Biotechnol. Adv.* **30**: 709-732(2012).
  8. S. Amin, Review on biofuel oil and gas production processes from microalgae. *Energy Convers. Manage.* **50**: 1834-1840(2009).
  9. S. K. Hoekmana, A. Brocha, C. Robbinsa, E. Cenicerosa, and M. Natarajanb, Review of biodiesel composition, properties, and specifications. *Renew. Sustain. Energy Rev.* **16**: 143-169(2012).
  10. BRITISH STANDARD BS EN14103:2003 Fat and oil derivatives —Fatty Acid Methyl Esters (FAME)—Determination of ester and linolenic acid methyl ester contents.(2003)
  11. Jae-Kon Kim, Jo-Yong Park, Fuel properties of various biodiesel derived vegetable oil. *J. of Korean Oil Chemists' Soc.* **30**: 45-48 (2013).
  12. J. Pullen, and K. Saeed, An overview of biodiesel oxidation stability. *Renew. Sustain. Energy Rev.* **16**: 5924-5950(2012).
  13. R. O. Dunn, Effects of minor constituents on cold flow properties and performance of biodiesel. *Prog. Energ. Combust. Sci.* **35**: 481-489(2009).
  14. P. V. Bhale, N. V. Deshpande, and S. B. Thombre, Improving the low temperature properties of biodiesel fuel. *Renew. Energy* **34**: 794-800 (2009).
  15. S.Kent, Amber Broch, Review of biodiesel composition, properties, and specifications. *Renew. Sustain. Energy Rev.* **16**: 143-169 (2011).
  16. Jae-Kon Kim, Jo-Yong Park, Biodiesel Production Technology from Sewage Sludge. *J. of Korean Oil Chemists' Soc.* **30**: 688-700(2013).
  17. M. Oguma, N. Chollacoop, EAS-ERIA, Biodiesel fuel trade handbook 2010, 27-62(2010).
  18. J. -I. Park, H. -C. Woo, and J. -H. Lee, Production of bio-energy from marine algae: Status and perspectives. *Korean Chem. Eng. Res.* **46**: 833-844(2008).