

미세액적 광생물반응기를 활용한 광독립영양배양에서 *Chlamydomonas reinhardtii*의 성장성 분석

성영준* · 곽호석* · 최홍일* · 김영환* · 심상준***†

*고려대학교 화공생명공학과

02841 서울특별시 성북구 안암로 145

**고려대학교 그린스쿨

02841 서울특별시 성북구 안암로 145

(2016년 9월 2일 접수, 2016년 12월 2일 수정본 접수, 2016년 12월 5일 채택)

Growth Analysis of *Chlamydomonas reinhardtii* in Photoautotrophic Culture with Microdroplet Photobioreactor System

Young Joon Sung*, Ho Seok Kwak*, Hong Il Choi*, Jaon Young Hwan Kim*, and Sang Jun Sim***†

*Department of Chemical and Biological Engineering, Korea University, 145, Anam-ro, Seongbuk-gu, Seoul, 02841, Korea

**Green School, Korea University, 145, Anam-ro, Seongbuk-gu, Seoul, 02841, Korea

(Received 2 September 2016; Received in revised form 2 December 2016; accepted 5 December 2016)

요 약

최근 고부가가치 산물의 생산이 가능한 미세조류는 이산화탄소의 생물학적 전환 측면에서 많은 주목을 받고 있다. 그렇지만 미세조류 중 자체가 지닌 낮은 광합성 효율 및 생산성의 한계는 미세조류를 활용한 공정의 상업화를 막는 장애요인이다. 따라서 본 연구에서는 대표 미세조류 *Chlamydomonas reinhardtii*의 광독립영양 성장성 분석을 위한 미세액적 광생물반응기를 개발하였다. PDMS 기반의 미세유체 칩 내에 미세기둥을 배열하고 미세챔버의 높이를 조절하여 미세액적 내 이산화탄소의 전달속도를 증가시켰으며, 이는 세포 성장성과 형광 세기 변화를 통해 확인하였다. 마지막으로 미세액적 광생물반응기를 활용하여 다양한 이산화탄소 농도 및 광량 조건에서 *C. reinhardtii*의 광독립영양배양에서 성장성을 96 시간동안 관찰하고 분석하였다. 본 연구 결과를 통해 미세액적 광생물반응기는 성장성 및 유용물질 생산성이 우수한 미세조류 종을 빠르게 분석하고 쉽게 분리할 수 있는 효율적인 플랫폼임을 입증하였다.

Abstract – Recently, microalgae which can produce high-value products have attracted increasing attention for biological conversion of CO₂. However, low photosynthetic efficiency and productivity have limited the practical use of microalgae. Thus, we developed microdroplet photobioreactor for the analysis of photoautotrophic growth of model alga, *Chlamydomonas reinhardtii*. CO₂ transfer rate was increased by integrating micropillar arrays and adjusting height of microchamber. These results were identified by change of cell growth rate and fluorescence intensity. Lastly, the photoautotrophic growth kinetics of *C. reinhardtii* in microdroplet photobioreactor were investigated under different CO₂ concentrations and light intensities for 96 hours. As a result, microdroplet photobioreactor was efficient platform for isolation and rapid evaluation of microalgal strains which have enhanced productivity of high-value products and growth performance.

Key words: Microdroplet, Photobioreactor, *Chlamydomonas reinhardtii*, Photoautotrophic Culture, CO₂ Permeation

1. 서 론

전 세계 화석연료 소비의 증가는 대기 중 이산화탄소 농도를 증가시켜왔으며, 이로 인해 지구온난화현상, 기후변화, 생태계 붕괴 등

다양한 환경문제가 발생하고 있다. 이러한 문제들에 대한 우려는 대기 중 이산화탄소 감축을 위한 기술 개발에 대한 관심을 증대시켰다 [1,2]. 특히 미세조류와 같은 광합성 생물을 활용한 생물학적 전환기술은 빛 에너지만을 활용하여 친환경적으로 이산화탄소를 바이오디젤, 항산화물질, 바이오폴리머 등 다양한 고부가 유용물질로 전환할 수 있어 많은 주목을 받고 있다. 미세조류는 육상 식물에 비해 빠른 성장성, 해상 또는 황무지를 활용 가능하다는 점 등 많은 장점들을 갖고 있지만 [3-8], 종 자체가 지닌 낮은 광합성 효율과 생산성의 한계로 인해 대규모 미세조류 공정의 상용화를 위해서는 해결해야 할

†To whom correspondence should be addressed.

E-mail: simsj@korea.ac.kr

‡이 논문은 고려대학교 김성현 교수님의 정년을 기념하여 투고되었습니다.

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.

문제점들이 많이 남아있다[9].

현재까지 지구상에 50,000여종이 넘는 미세조류 종의 존재가 보고되었으나, 미세조류 연구는 일부 특정한 소수의 종에만 초점이 맞춰져 있다. 아직 연구에 활용되지 못한 미세조류 종들 중 광합성 효율 및 생산성이 우수한 미세조류 종을 분리하기 위해 플라스크 및 미량정량판(microtiter plate)을 이용한 보편적인 방법들이 활용되고 있다. 하지만 이는 노동집약적이고 시간 소모적인 방법이며 벌크 규모(bulk-scale)의 접근 방법은 통계적인 수치만을 제공해주기 때문에 단일 세포 성장성의 정확한 분석에는 한계가 있다[10].

기존의 접근법과 달리 미세액적 기반의 미세유체 시스템은 단일 세포 수준의 초고속 분석에 많은 이점들을 갖고 있다. 수용액상(aqueous phase)인 미세액적은 유상(oil phase)과 섞이지 않고 개별적인 광생물반응기 역할을 수행할 수 있으며 다양한 조건의 화학적, 생물학적 분석이 빠른 속도로 동시에 가능한 플랫폼이다[11,12]. 더욱이 미세액적 시스템은 일반적인 벌크에서보다 높은 부피당 표면적 비율을 바탕으로 향상된 열 및 물질 전달 속도를 가지며 이로 인해 내부 물질의 빠른 반응 및 분석이 가능하다[13]. 이러한 장점들을 기반으로 미세액적 시스템은 다양한 미세조류의 단일 세포 단위 분석에 폭넓게 활용되고 있다[14]. 미세액적을 활용한 현재까지의 연구들은 유기탄소를 에너지원으로 활용하는 종속영양배양에서 미세조류의 성장성 분석에 초점이 맞춰져 왔다. 하지만 종속영양배양은 추가적인 유기탄소 공급에 의한 에너지 및 비용 지출이 발생하는 문제점을 갖고 있다[15,16]. 미세조류는 광독립영양배양이 가능한 유기체로서 이산화탄소를 생장에 필요한 탄소원으로 전환해 바이오매스를 축적할 수 있다. 따라서 이산화탄소 저감 기술로 미세조류를 활용하기 위해서는 광독립영양배양에서 미세조류 성장성을 분석할 수 있는 플랫폼 개발이 필수적이다.

본 연구에서는 미세액적 기반 미세유체 시스템을 활용해 미세조류의 광독립영양배양에서 성장성을 빠르게 관찰 및 분석할 수 있는 시스템을 개발하였다. 특히 단일 세포 단위로 미세조류의 성장성을 고속 분석하기 위해 높은 광투과율, 기체 투과성 등의 장점을 지닌 poly(dimethyl-siloxane) (PDMS) 기반의 미세유체 시스템을 활용하였다[17-19]. 이를 통해 미세조류의 광독립영양배양에 필수적인 빛 에너지 및 이산화탄소를 효과적으로 공급할 수 있었다. 미세유체 칩 내 미세기둥 구조를 통해 미세액적을 일정하게 배열하고 동시에 안정적으로 고정하여 미세액적 내 미세조류의 성장성을 정확하게 분석하였다. 마지막으로 광독립영양배양에 필수 요소들인 이산화탄소 농도 및 광량을 조절하며 미세액적 내부에서 미세조류의 성장성을 개별 세포 단위로 빠르게 분석할 수 있는 시스템을 완성하였다.

2. 재료 및 방법

2-1. 미세유체 장치의 제작

미세액적 생성 및 보관을 위한 미세유체 장치의 구조는 AutoCAD (Autodesk, USA) 프로그램으로 디자인한 것을 포토마스크로 인쇄하였다(Han & All Technology, Korea). 두 개의 마스터몰드(master molds)는 실리콘 웨이퍼 및 네거티브 감광제(negative photoresist)인 SU-8 50 (Microchem, USA)를 사용하여 일반적인 포토리소그래피(photolithography) 기법[20]을 적용해 제작하였다. Sylgard 184와 경화제(Dow Corning, USA)를 10:1의 질량비로 혼합하여 SU-8 마스터몰드에 붓고 진공 펌프를 사용하여 혼합물에 포함된 공기를 빼내

었다. 80 °C 오븐에서 12 시간 이상 경화시킨 후, PDMS 판을 실리콘 웨이퍼에서 떼어내고 biopsy punch로 직경 1 mm의 입구(inlet)와 출구(outlet)를 만들었다. 다음으로 oxygen plasma 처리를 통해 슬라이드 글라스와 PDMS판을 화학적으로 결합시키고, 채널 표면의 소수성을 증대시키기 위해 완성된 미세유체 장치를 120 °C 오븐에서 하룻밤 이상 보관하였다.

2-2. 미세조류 균주 및 배양조건

실험에 사용된 균주는 *Chlamydomonas* Resource Center (University of Minnesota)에서 구매한 *Chlamydomonas reinhardtii*의 야생형 균주인 CC-125이다. 미세조류는 멸균된 100 mL 플라스크에서 Tris-phosphate 배지를 이용하여 광독립영양 조건에서 배양하였다. 미세조류의 생장기 동안 55 $\mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$ 의 광도 및 23 °C의 온도를 유지하며 5% CO₂ (v/v) 혼합공기를 주입하였다. 미세조류가 지수기(exponential phase)에 도달하였을 때 1 mL의 세포현탁액(cell suspension)을 3000 rpm 조건에서 10분 동안 원심분리하여 기존의 배지를 제거하고 신선한 Tris-phosphate 배지에 옮겨주었다. 미세액적의 생성을 위해 세포현탁액과 플루오로카본유(fluorocarbon oil)를 각각 분산상(dispersed phase) 및 연속상(continuous phase)으로 사용하였다.

2-3. 미세액적 생성 및 보관

미세액적 생성을 위해 플루오로카본유 계열의 FC-40 (Sigma-Aldrich)와 perfluorinated polyethers (PFPE)-polyethyleneglycol (PEG) block copolymer 계면활성제(Ran Biotechnologies, Beverly, MA)를 2%의 질량비로 혼합해서 사용하였다. 여기서 계면활성제는 에멀전(emulsion)의 안정성을 증가시킴으로서 미세액적의 융합을 막는 역할을 한다. 준비된 유상과 세포현탁액은 각각 1.5 mL의 저장소(reservoir)에 저장되고 연결된 pressure-driven pump (Fluigent, France)에 의해 flow-focusing 구조를 갖는 미세유체 장치 내부로 주입되어 미세액적을 생성한다(Fig. 1a, 1b). 미세액적은 약 90 μm 의 직경을 갖고

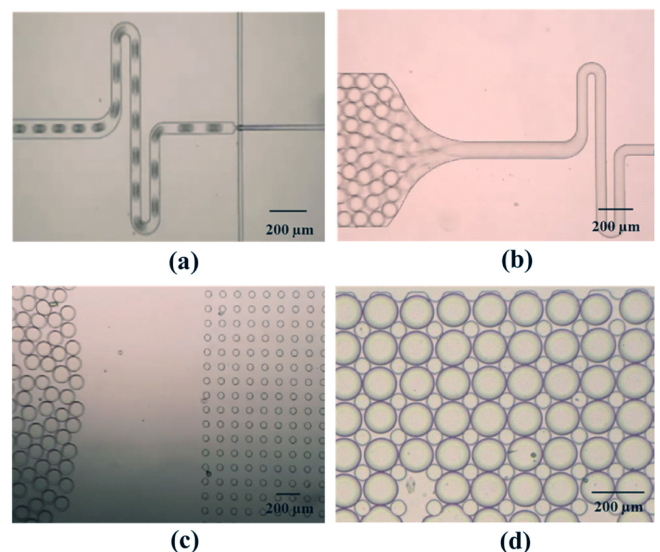


Fig. 1. Generation of microdroplets with (a), (b) flow-focusing structure of microchannel and (c) reinjection of microdroplets through polyethylene (PE) tubing. (d) Arrays of microdroplet photo-bioreactors captured by micropillar arrays.

40 Hz의 속도로 생성되며 이때 연속상과 분산상은 각각 190 mbar와 400 mbar의 압력으로 미세유체 채널 내부로 주입된다. 안정적으로 만들어진 미세액적은 polyethylene (PE) tubing을 통해 가로 5.0 mm, 세로 3.6 mm, 높이 30 μm , 50 μm , 80 μm 그리고 100 μm 인 직육면체 형태의 미세챔버(microchamber)에 채주입되며(Fig. 1c) 미세챔버 내에는 직경 60 μm 의 미세기둥이 채워져 있어 약 1,400개 이상의 미세액적을 포획할 수 있다(Fig. 1d).

2-4. 형광 분석법을 활용한 이산화탄소 전달 속도 분석

미세액적 내부로 확산되는 이산화탄소의 전달 속도 분석을 위해 pH 변화에 따라 형광의 세기가 달라지는 형광 염료인 pyranine (8-hydroxypyrene-1,3,6-trisulfonic acid trisodium salt, Sigma-Aldrich)을 1 mM의 농도로 탈염수에 녹여 형광 분석법에 사용하였다. 형광 이미지는 575 nm 파장 조건에서 형광 현미경과 ScopeLite 200 Microscope Illumination System (HORIBA Scientific Optical Building Blocks, NJ)을 사용하여 얻었다. 형광 이미지는 광퇴색(photobleaching)을 최소화하기 위해 짧은 순간에 DSLR 카메라(Canon EOS 700D)로 촬영하였다. 또한, 현미경 이미지의 형광 세기는 ImageJ 프로그램의 densitometry에 의해 정량화하였다.

3. 결과 및 고찰

3-1. 미세기둥 구조 및 미세챔버 높이가 미세조류의 성장에 미치는 영향

미세유체 내부에 구조물이 없는 경우 미세액적은 채널 내부에서 자유롭게 움직일 수 있어 다른 미세액적과 융합될 가능성이 높다. 그러므로 원하는 미세액적의 장시간 추적 및 정확한 분석에 한계가 있다(Fig. 2a). 이러한 한계를 극복하기 위해 미세기둥 구조를 도입하여 미세기둥 사이에 미세액적을 고정시켜 장시간 미세액적을 추적할 수 있었다(Fig. 2a). 그리고 기체 투과성이 우수한 PDMS 기반의 미세기둥 구조는 미세액적 내부에 포획된 미세조류의 성장에 필요한 이산화탄소를 효율적으로 공급할 수 있었다(Fig. 2b). PDMS 기반 미세기둥 구조의 이산화탄소 전달 효율을 조사하기 위해, (1) 미세기둥을 포함하는 장치, (2) 미세기둥을 포함하지 않는 장치, (3) 미세기둥을 포함하지만 PDMS의 기체 투과성을 차단한 장치를 각각 제작하였다. 각각의 장치에서 *Chlamydomonas reinhardtii*의 성장성 차이를 확인했다. 특히 미세기둥 구조를 포함하는 미세유체 장치에서 *C. reinhardtii*의 성장성이 가장 좋은 것을 확인할 수 있었다(Fig. 2c). 따라서 미세기둥 구조는 미세액적과 직접 접촉하여 이산화탄소 전달 속도를 증가시키고, 이로 인해 미세액적 내부에 포획된 *C. reinhardtii*의 성장성이 증가했다는 결론을 내릴 수 있었다.

미세액적의 직경은 약 90 μm 로 미세챔버 높이가 이보다 낮을 경우 미세액적이 눌리게 되어 미세챔버 표면과 미세액적의 접촉 면적이 넓어지는 효과를 유발할 수 있다. 이러한 효과를 확인하기 위해 30 μm , 50 μm , 80 μm 그리고 100 μm 의 높이를 갖는 미세챔버를 제작하여, 미세액적과 미세챔버 사이의 접촉 면적에 따른 *C. reinhardtii*의 성장성을 분석하였다(Fig. 2d). 다른 높이 조건에 비해 80 μm 높이의 미세챔버에서 *C. reinhardtii*의 성장성이 가장 우수한 것을 관찰하였다. 위의 결과를 통해 미세액적 눌림으로 인한 미세액적과 PDMS 표면 사이의 접촉 면적 증가가 미세액적 내부로의 이산화탄소 전달 속도를 증가시켰음을 알 수 있다. 하지만 높이가 30 μm 인 미세챔버

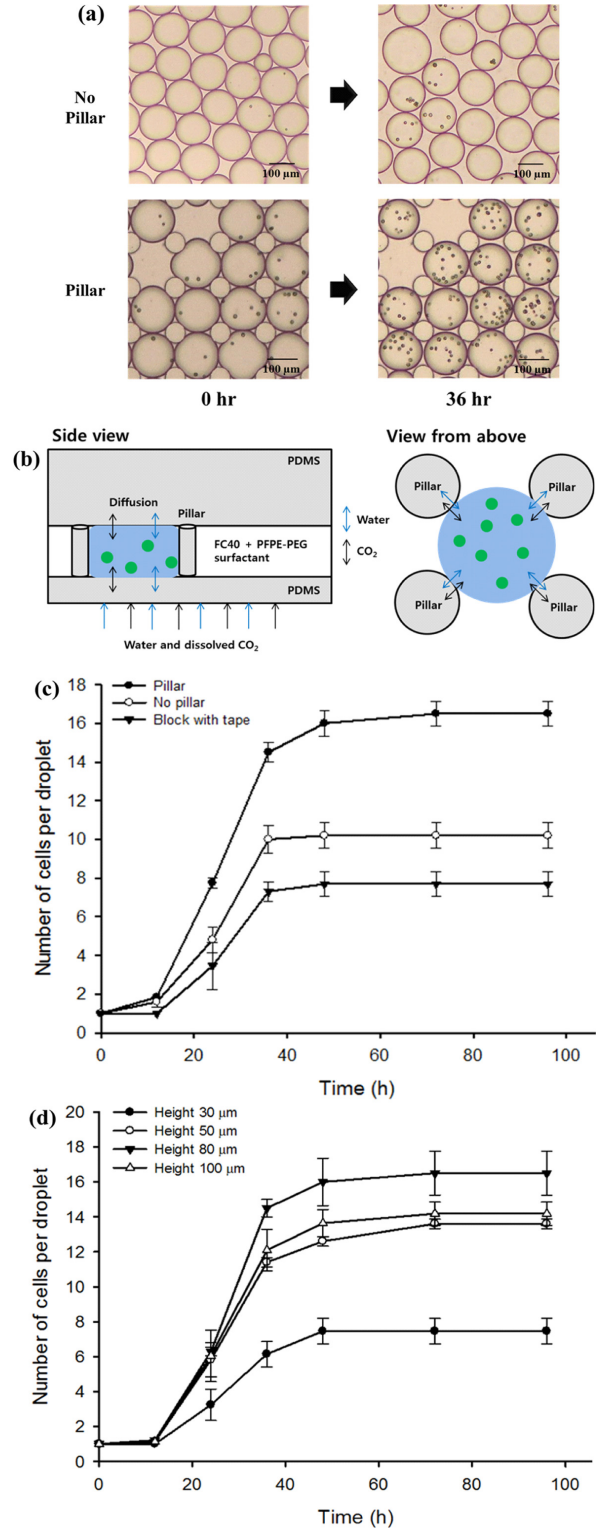


Fig. 2. Effect of micropillar arrays and height of microchambers on growth kinetics of *C. reinhardtii*. (a) Images of freely moved and captured microdroplets with non-pillar and pillar structure on microfluidics. (b) Increased contact area between microdroplet and PDMS-based micropillar structure can affect permeation of CO₂ and water. (c) Growth kinetics of *C. reinhardtii* with and without micropillar arrays. Microfluidics blocked with tape was negative control. (d) Growth kinetics of *C. reinhardtii* with different heights of microchambers. *C. reinhardtii* was grown under light intensity of 55 $\mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$ and ambient CO₂ concentration for 96 hours.

에서 *C. reinhardtii*의 성장성이 크게 저하되는 것을 관찰할 수 있었다. 이는 넓은 접촉 면적으로 인해 과량의 이산화탄소가 미세액적 내부로 전달되어 급격하게 낮아진 미세액적 내부 pH가 세포의 성장을 저해한 것으로 해석할 수 있다.

3-2. 형광 기반 분석법을 통한 이산화탄소 투과성 분석

미세유체 구조물을 통해 미세액적으로 전달되는 이산화탄소의 양을 정량화하기 위해 형광 분석법을 도입하였다. 높은 농도의 이산화탄소가 미세유체 구조물을 통해 미세액적에 전달되면 미세액적 내부의 pH가 낮아지고, 이러한 pH 변화를 분석하여 이산화탄소의 전달 정도를 정량적으로 확인할 수 있었다. pH 변화 분석을 위해 pH가 감소함에 따라 형광의 세기가 감소하는 pyranine [21]을 형광 분석법에 활용하였고, 대기 중 이산화탄소 농도(0.03%) 및 고농도 이산화탄소(5%) 조건에서 36 시간에 걸쳐 미세액적 내부의 형광 세기를 측정하였다(Fig. 3a). 36 시간이 지난 후 대기 조건 및 5% 이산화탄소 농도 조건에서 형광의 세기가 각각 초기 형광 세기의 97.8% 및 78.1%까지 감소했다(Fig. 3b). 위의 결과를 통해 이산화탄소의 농도가 높을 경우 미세액적 내부로 전달되는 이산화탄소의 양이 증가함을 확인할 수 있었다. 따라서 직경 90 μm 의 미세액적을 기준으로 미세기둥 구조 및 높이 80 μm 미세챔버를 포함하는 미세유체 장치가 *C. reinhardtii*의 광독립영양배양에서 성장성을 분석하기 위한 최적의 플랫폼이라는 결론을 내렸다.

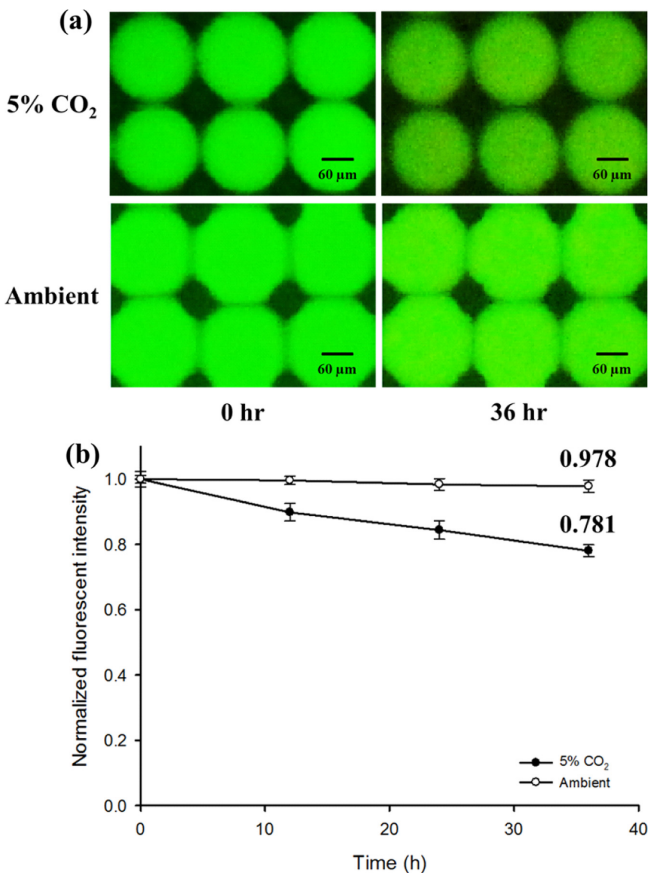


Fig. 3. CO₂ permeation assay based on fluorescence intensity. (a) Images of fluorescent microdroplets under different CO₂ concentrations (ambient and 5% CO₂). (b) Changes of fluorescence intensities under different levels of CO₂ (ambient and 5% CO₂) for 36 hours.

3-3. 미세액적 광반응기 내부에서 *C. reinhardtii*의 광독립영양 성장성 분석

앞선 실험에서 최적화된 미세유체 장치를 이용하여 광독립영양배양에 중요한 요소인 이산화탄소 농도와 광량이 *C. reinhardtii*의 생장에 미치는 영향을 조사하였다. 55 $\mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$ 의 광도 및 23 °C의 온도를 유지하며 다양한 이산화탄소 농도 조건하(0.03%, 1%, 2.5%, 5%)에서 세포 성장이 정체기(stationary phase)에 도달할

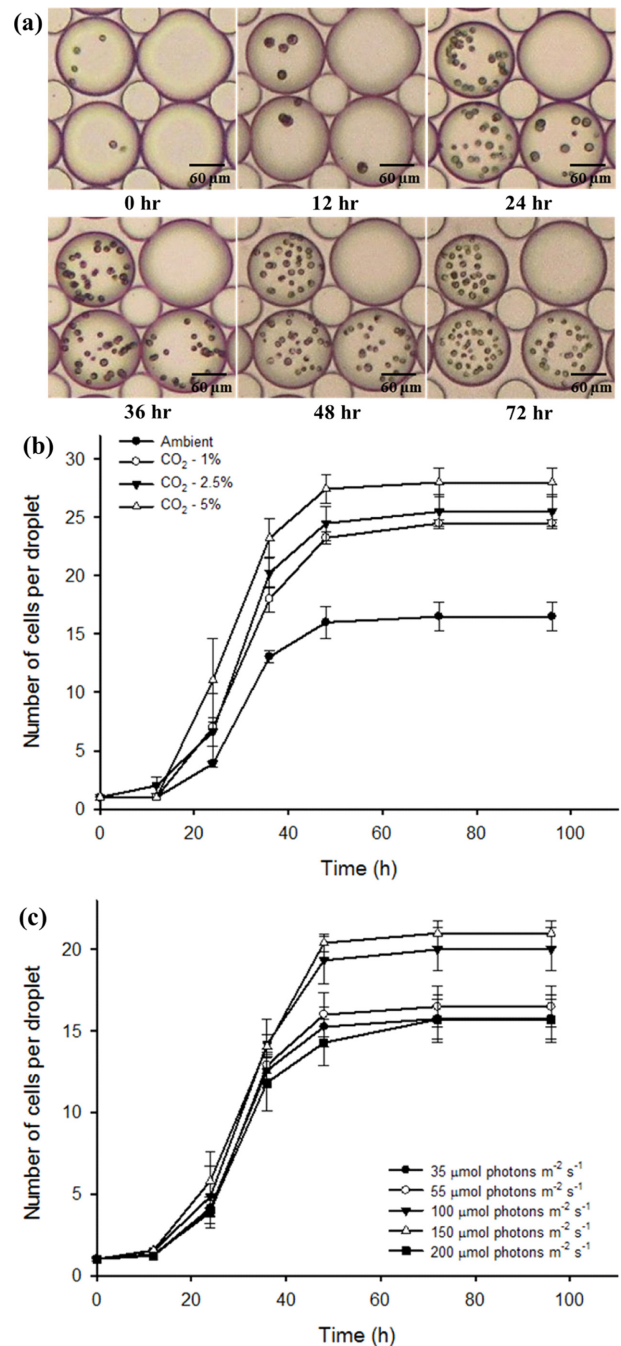


Fig. 4. Microdroplet-based photobioreactor for photoautotrophic growth of *C. reinhardtii* under different CO₂ concentrations and light intensities. (a) Photo images of cultivation of *C. reinhardtii* with microdroplet photobioreactor. Growth kinetics of *C. reinhardtii* under (b) different CO₂ concentrations (ambient, 1%, 2.5%, and 5%) and (c) light intensities (35, 55, 100, 150 and 200 $\mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$).

Table 1. Comparison of key growth parameters of *C. reinhardtii* (doubling time and maximum cell density) under different CO₂ concentrations and light intensities

	<i>C. reinhardtii</i> Doubling time (h)	Maximum cell density (cells mL ⁻¹)
CO ₂ concentration (55 μ mol photons m ⁻² s ⁻¹)		
5%	7.544±0.689	7.37±0.67×10 ⁷
2.5%	14.661±0.846	6.71±0.76×10 ⁷
1%	15.336±1.445	6.45±0.15×10 ⁷
Ambient	21.539±2.174	4.34±0.66×10 ⁷
Light intensity (Ambient)		
200 μ mol photons m ⁻² s ⁻¹	28.015±2.433	4.14±0.64×10 ⁷
150 μ mol photons m ⁻² s ⁻¹	16.904±1.162	5.53±0.42×10 ⁷
100 μ mol photons m ⁻² s ⁻¹	19.230±1.255	5.26±0.70×10 ⁷
55 μ mol photons m ⁻² s ⁻¹	21.539±2.174	4.34±0.66×10 ⁷
35 μ mol photons m ⁻² s ⁻¹	22.441±1.961	4.14±0.76×10 ⁷

때 까지 12 시간 단위로 미세액적 광반응기 내에서 *C. reinhardtii*의 광독립영양 성장을 관찰하였다(Fig. 4a). 대기 조건(0.03% CO₂)에서 가장 낮은 세포 성장성을 보였으며 이산화탄소 농도가 증가할수록 배가시간(doubling time)은 7.54 시간까지 감소하고 최대 세포 농도는 7.37×10⁷ cells mL⁻¹ 까지 증가하는 경향을 보였다(Fig. 4b, Table 1). 이러한 결과는 이산화탄소 농도가 증가함에 따라 미세액적 내부 *C. reinhardtii*의 광독립영양 성장성이 향상됨을 보여준다.

대기 중 이산화탄소 농도(0.03%) 조건에서 광량이 *C. reinhardtii*의 성장에 미치는 영향을 확인하였다(Fig. 4c). *C. reinhardtii*는 150 μ mol photons m⁻² s⁻¹의 광량 조건에서 최소의 배가시간(16.9 시간) 및 최대 세포 농도(5.53×10⁷ cells mL⁻¹)에 도달하였다(Fig. 4c, Table 1). 최소 광량 조건(35 μ mol photons m⁻² s⁻¹)에서 배양했을 때의 결과와 비교해 배가시간은 24.7% 감소하고 최대 세포 농도는 33.6% 증가했다. PDMS의 높은 투명도로 인해 광량이 증가함에 따라 미세액적 내부로 투과되는 빛 에너지가 증가하여 *C. reinhardtii*의 광독립영양 성장성이 향상되었다. 하지만 광량 200 μ mol photons m⁻² s⁻¹인 조건에서 배양했을 때 *C. reinhardtii*의 성장 저하가 있었으며, 이는 광저해(photoinhibition)에 의해 광합성 효율이 감소된 것으로 해석할 수 있다[22,23].

4. 결 론

본 연구에서는 미세액적 및 PDMS 기반의 미세유체 장치를 활용하여 광독립영양배양에서 모델 미세조류 균주 *C. reinhardtii*의 성장성을 빠르게 분석할 수 있는 플랫폼을 제안하였다. 미세액적 광생물 반응기를 고정시켜 *C. reinhardtii*의 성장성을 정확하게 분석하기 위해 미세기둥 구조를 도입했고, 그 높이를 조절하여 미세액적과 PDMS 표면이 넓은 접촉 면적을 갖게 함으로써 미세액적 내부로 전달되는 이산화탄소의 농도를 증가시킬 수 있었다. 향상된 이산화탄소 전달 속도는 pH 변화에 따라 형광 세기가 바뀌는 형광 염료를 이용하여 확인하였다.

현재까지 미세액적을 활용한 미세조류의 종속영양배양에서 성장성 분석은 활발하게 이루어져 왔지만, 광독립영양배양에서의 성장성 분석은 이루어지지 않았다. 광합성을 통해 이산화탄소를 바이오매스 및 유용한 물질로 전환할 수 있는 미세조류를 이산화탄소 전환 기술에 활용하기 위해 수많은 미세조류 중의 광독립영양배양에서의 빠른 성장성 분석 및 선별이 가능한 미세액적 광반응기 플랫폼의 개

발은 필수적이다. 이러한 시스템은 미세조류의 산업적인 활용을 가로막는 미세조류의 생산성 한계를 극복할 수 있는 우량 균주 확보에 유용한 선별 장치로서 활용될 수 있을 것이다.

감 사

본 연구는 Korea CCS R&D center의 학술연구비(2014M1A8A1049278), 한국에너지기술평가원(Korea Institute of Energy Technology Evaluation and Planning)의 학술연구비(20152010201900), 한국연구재단(NRF-2016R1A2A1A05005465/2010-0027955) 그리고 University-Institute Cooperation Program (2013)의 지원을 받아 수행되었으며 연구비 지원에 감사드립니다.

References

- Chisti, Y., "Biodiesel from Microalgae Beats Bioethanol," *Trends Biotechnol.*, **26**(3), 126-131(2008).
- Christenson, L. and Sims, R., "Production and Harvesting of Microalgae for Wastewater Treatment, Biofuels, and Bioproducts," *Biotechnol. Adv.*, **29**(6), 686-702(2011).
- Mata, T. M., Martins, A. A. and Caetano, N. S., "Microalgae for Biodiesel Production and Other Applications: A Review," *Renewable Sustainable Energy Rev.*, **14**(1), 217-232(2010).
- Pauly, M. and Keegstra, K., "Cell-wall Carbohydrates and Their Modification as a Resource for Biofuels," *Plant J.*, **54**(4), 559-568(2008).
- Pienkos, P. T. and Darzins, A., "The Promise and Challenges of Microalgal-Derived Biofuels," *Biofuels, Bioprod. Biorefin.*, **3**(4), 431-440(2009).
- Stephens, E., Ross, I. L., King, Z., Mussgnug, J. H., Kruse, O., Posten, C., Borowitzka, M. A. and Hankamer, B., "An Economic and Technical Evaluation of Microalgal Biofuels," *Nat. Biotechnol.*, **28**(2), 126-128(2010).
- Weyer, K. M., Bush, D. R., Darzins, A. and Willson, B. D., "Theoretical Maximum Algal Oil Production," *Bioenergy Res.*, **3**(2), 204-213(2010).
- Park, J. Y., Lee, G. A., Kim, K. Y., Kim, K. Y., Choi, S. A., Jeong, M. J. and Oh, Y. K., "Microalgal Oil Recovery by Solvent Extraction from *Nannochloropsis oceanica*," *Korean Chem. Eng. Res.*, **52**(1), 88-91(2014).

9. Lim, H. S., Kim, J. Y. H., Kwak, H. S. and Sim, S. J., "Integrated Microfluidic Platform for Multiple Processes from Microalgal Culture to Lipid Extraction," *Anal. Chem.*, **86**(17), 8585-8592(2014).
10. Dewan, A., Kim, J., McLean, R. H., Vanapalli, S. A. and Karim, M. N., "Growth Kinetics of Microalgae in Microfluidic Static Droplet Arrays," *Biotechnol. Bioeng.*, **109**(12), 2987-2996(2012).
11. Fair, R. B., "Digital Microfluidics: is a True Lab-on-a-chip Possible?," *Microfluid. Nanofluid.*, **3**(3), 245-281(2007).
12. Link, D. R., Grasland-Mongrain, E., Duri, A., Sarrazin, F., Cheng, Z., Cristobal, G., Marquez, M. and Weitz, D. A., "Electric Control of Droplets in Microfluidic Devices," *Angew. Chem., Int. Ed.*, **45**(16), 2556-2560(2006).
13. Schneider, T., Kreutz, J. and Chiu, D. T., "The Potential Impact of Droplet Microfluidics in Biology," *Anal. Chem.*, **85**(7), 3476-3482(2013).
14. Pan, J., Stephenson, A. L., Kazamia, E., Huck, W. T., Dennis, J. S., Smith, A. G. and Abell, C., "Quantitative Tracking of the Growth of Individual Algal Cells in Microdroplet Compartments," *Integr. Biol.*, **3**(10), 1043-1051(2011).
15. Chen, F., "High Cell Density Culture of Microalgae in Heterotrophic Growth," *Trends Biotechnol.*, **14**(11), 421-426(1996).
16. Morales-Sánchez, D., Tinoco-Valencia, R., Kyndt, J. and Martinez, A., "Heterotrophic Growth of *Neochloris oleoabundans* Using Glucose as a Carbon Source," *Biotechnol. Biofuels*, **6**(100), 1-12 (2013).
17. Mata, A., Fleischman, A. and Roy, S., "Characterization of Polydimethylsiloxane (PDMS) Properties for Biomedical Micro/Nanosystems," *Biomed. Microdevices*, **7**(4), 281-293(2005).
18. van Poll, M. L., Zhou, F., Ramstedt, M., Hu, L. and Huck, W. T. S., "A Self-Assembly Approach to Chemical Micropatterning of Poly(dimethylsiloxane)," *Angew. Chem., Int. Ed.*, **46**(35), 6634-6637(2007).
19. Zhou, J., Ellis, A. V. and Voelcker, N. H., "Recent Developments in PDMS Surface Modification for Microfluidic Devices," *Electrophoresis*, **31**(1), 2-16(2010).
20. Whitesides, G. M., Ostuni, E., Takayama, S., Jiang, X. and Ingber, D. E., "Soft Lithography in Biology and Biochemistry," *Annu. Rev. Biomed. Eng.*, **3**(1), 335-373(2001).
21. Chu, C.-S. and Lo, Y.-L., "Fiber-Optic Carbon Dioxide Sensor Based on Fluorinated Xerogels Doped with HPTS," *Sens. Actuators, B*, **129**(1), 120-125(2008).
22. Grima, E. M., Sevilla, J. F., Perez, J. S. and Camacho, F. G., "A Study on Simultaneous Photolimitation and Photoinhibition in Dense Microalgal Cultures Taking into Account Incident and Averaged Irradiances," *J. Biotechnol.*, **45**(1), 59-69(1996).
23. Vonshak, A., Torzillo, G. and Tomaseli, L., "Use of Chlorophyll Fluorescence to Estimate the Effect of Photoinhibition in Outdoor Cultures of *Spirulina platensis*," *J. Appl. Phycol.*, **6**(1), 31-34(1994).