

## 빛의 조사 기간에 따른 세 가지 미세조류의 지질 함량 변화와 균체의 당화 전환을 비교

임수빈 · 정지원 · 연재성 · 이나경 · 원종인<sup>†</sup>

홍익대학교 화학공학과  
121-791 서울시 마포구 와우산로 94  
(2014년 9월 22일 접수, 2014년 11월 25일 수정본 접수, 2014년 11월 27일 채택)

### An Analysis of Lipid Contents Produced from Three Different Microalgae Depending on the Lighting Period and Their Saccharification Conversion

Su-Bin Lim, Ji-Won Jeong, Jae-Sung Yeon, Na-Kyung Lee and Jong-In Won<sup>†</sup>

Department of Chemical Engineering, Hongik University, 94 Wausan-ro, Mapo-gu, Seoul 121-791, Korea  
(Received 22 September 2014; Received in revised form 25 November 2014; accepted 27 November 2014)

#### 요 약

본 연구에서는 빛의 조사기간을 변화시켜 세 종류의 미세조류(*Nanochloris*, *Dunaliella tertiolecta*, *Tetraselmis*)를 배양하고 이들의 성장속도 및 지질 함량을 분석하였다. 빛의 조사기간은 한국의 여름철과 겨울철의 일조시간을 반영해 각각 14.5시간과 7시간으로 설정하였다. 또한, 지질 추출 후 남은 미세조류를 당화시켜 포도당 전환율을 비교함으로써 미세조류의 바이오매스로써의 가능성을 가늠하고자 하였다. 실험 결과 *D. tertiolecta*가 다른 두 종의 미세조류보다 빛의 조사기간이 7시간일 때 최대 38% 높은 성장속도를 나타냈으며 지질함량은 최대 43.6% 정도 높은 결과를 보였다. 포도당으로의 당화 전환율도 *D. tertiolecta*가 최대 22% 높은 결과를 보였다.

**Abstract** – Microalgae have the advantages of being able to utilize the solar energy and culturing at a low cost. In particular, microalgae have a great potential in the production of biodiesel due to the high lipid content. Lipids produced from microalgae are converted to fatty acid methyl ester (FAME) by trans-esterification reaction and FAME is called a biodiesel in general. In addition, microalgae can also be utilized as a substrate for ethanol fermentation after saccharification reaction. In this study, three types of microalgae (*Nanochloris*, *Dunaliella tertiolecta*, *Tetraselmis*) were cultured and their lipid contents were compared. In addition, the effects of lighting period on the growth rate and lipid content were studied. Finally, the amounts of glucose produced from each saccharified microalgae were investigated. As a result, we demonstrated that *D. tertiolecta* has 43.6% higher lipid content and 22% higher glucose conversion than two others.

Key words: Microalgae, Biodiesel, Bioethanol, Lipid, Saccharification

#### 1. 서 론

현재 세계는 산업화의 진행이 가속화되면서 화석연료의 소비 또한 꾸준히 증가하고 있다. 이러한 화석연료 사용에 의한 여러 환경 문제 및 고갈 문제에 대응하기 위해 세계적으로 탄소 중립적이고 재생 가능한 대체 에너지에 대한 개발 연구가 대두되고 있으며[1], 그 중 각광받는 분야가 바이오매스를 이용한 바이오디젤이다. 19세기 후반 루돌프 디젤이 개발한 디젤엔진에 식물을 이용하여 디젤엔진의 연료로 사용하려는 시도는 있었지만, 그 후로 가용성 등이 문제가 되어 연구가 지속적으로 이루어지지 않았다. 그러나 최근 들어

에스테르 반응을 통한 바이오디젤 생산이 가능해짐에 따라 이에 대한 연구가 활발하게 이루어지고 있다[2].

바이오디젤은 동물성, 식물성유지의 주성분인 지질이 알코올과 에스테르 전이(transesterification)반응을 하여 생성되는 알킬에스테르(alkylester) 형태이다[3,4]. 가솔린이 5~8개, 디젤 연료가 15~19개의 탄소 결합을 가지고 있는 반면에 바이오디젤은 일반적으로 8개에서 22개의 탄소가 결합되어 있다. 또한 바이오디젤은 기존의 디젤과 달리, 산소원자를 포함하고 있기 때문에 환경에 미치는 영향이 상대적으로 적다. 현재 시판되고 있는 바이오디젤은 분자 내 11%의 산소를 포함하고 있으며 이러한 산소가 완전 연소를 도와주기 때문에 배기가스 절감 효과가 크다고 할 수 있다[5,6].

최근에는 미세조류에서 생산된 지질을 바이오디젤로 활용되는 연구가 활발하게 진행되고 있다[7,8]. 1세대인 곡물계와 2세대인 목질계와 달리 3세대 바이오매스인 미세조류의 특징은 곡물을 원료로 사용하지 않으므로 식량문제를 야기하지 않는다는 장점이 있을 뿐

<sup>†</sup>To whom correspondence should be addressed.

E-mail: jiwon@hongik.ac.kr

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.

만 아니라, lignin이 존재하지 않아 목질계 바이오매스에 비해 가공하는데 보다 효율적이라 할 수 있다[9]. 또한 지상 식물보다 훨씬 빨리 성장하여 균체 생산성이 높은 점, 담수나 해수는 물론이고 빛 에너지를 확보할 수 있는 자연 환경에서는 쉽게 생육한다는 점, 다양한 조류에서 단백질, 지질, 당질, 색소와 같은 산업적으로 관심이 있는 생체 고분자 물질은 물론이고 특수한 생리 기능을 갖는 물질을 고농도로 생산할 수 있다는 점 등에서 중요한 생물 산업 소재로서 그 가능성이 충분하다고 할 수 있다. 아울러 연중 내내 생산이 가능하여 지속적인 연료로 사용이 가능할 뿐만 아니라 지금까지 활용하지 못했던 폐수와 염의 사용이 가능하여 상수 처리 비용의 절감효과가 있고, 이산화탄소 흡수량이 목질계 바이오매스의 7배에 달하기 때문에 대기 중 이산화탄소 농도 저감 효과가 크다고 할 수 있다 [2,10,11].

특히 미세조류의 경우 당화(saccharification)반응 및 발효공정을 통해 바이오디젤 생산 후 남은 균체를 이용하여 바이오 에탄올로의 전환이 가능하다는 장점을 가지고 있다[12]. 일반적으로 녹조류는 cellulose를 주성분으로 이루어져 있으며, 갈조류는 galactan을 주성분으로 이루어져 있다. 이러한 다당류(cellulose, galactan)는 당화 반응을 통해 단당류(glucose, galactose)로의 전환이 가능하고, 다시 *Saccharomyces cerevisiae*와 같은 알코올 생산 균주를 활용한 발효를 통해 바이오 에탄올의 생산이 가능하다[12,13].

그러나 미세조류에서 생산한 바이오디젤 가격은 현재 석유디젤의 두 배 이상으로 경제성이 부족하다는 문제점도 존재한다[14]. 여러 나라에서 활발한 연구를 통해 이 문제를 해결하려고 노력하고 있지만 미세조류 바이오디젤이 본격적으로 상업화되는 시기는 2020년 이후로 예상된다[7,13]. 이러한 미세조류를 대체에너지, 바이오디젤로 상용화하기 위해서는 우수한 미세조류 종을 찾는 것과 동시에 미세조류의 효율적인 배양조건을 찾는 것이 필수 과제라 할 수 있다[15,16].

본 연구에서는 미세조류의 배양 시 우리나라에서 최적화된 미세조류 종을 선별하기 위해 여름(14.5시간)과 겨울(7시간)의 일조량 조건을 실험실에서 구현하고자 빛의 조사기간을 달리하여 미세조류를 배양하였다. *Nanochloris*, *Dunaliella tertiolecta*, *Tetraselmis*의 지질 함량은 건조세포를 기준으로 각각 30%, 23%, 20% 정도로 상당히 높다고 알려져 있으며 이 지질로부터 에스테르 전이반응을 통해 바이오디젤을 얻을 수 있다[17]. 이 세 종의 미세조류로부터 당화와 발효를 통해 바이오 에탄올을 생산하기 위해 당화 후 전환된 포도당 및 갈락토오스 농도를 측정하여 미세조류 3종의 바이오매스로서의 적합성 여부를 판단하고자 하였다.

## 2. 실험

### 2-1. 미세조류 배양

미세조류 *Nanochloris*, *D.tertiolecta*, *Tetraselmis*는 모두 한국 해양 미세조류 은행(KMMCC)에서 구입하였으며, 빛의 조사기간 및 조사량을 조절할 수 있는 배양기(JSPC-200C, JSR, 한국)를 이용해 배양하였다. 배양에 사용한 배지는 인공해수에 미량 금속 및 비타민을 첨가한 f2 배지를 사용하였으며(Table 1), 구입한 미세조류들은 100 mL 삼각플라스크 안에 멸균된 f2 배지 45 mL를 첨가한 후 미세조류를 5 mL를 접종하고 25 °C로 설정된 배양기 내에서 Orbital shaker(SH30, FINE PCR, 한국)를 이용하여 교반시켜줌으로써 종균 배양(seed culture)을 진행하였다. 7일간 배양 후 자체 제작한 500 mL의 원통형 배양기 안에 250 mL의 f2 배지를 첨가한 뒤 종균 배양을 진행한 미세조류 50 mL를 가함으로써 scale-up 실험을 진행하였다. 빛의 조사기간의 변화를 주기 위해 배양기 안의 명반응과 암반응을 변화시켜 낮과 밤의 환경을 조성하였다. 2주간 배양 뒤 200 mL의 배양액을 빼내고, 200 mL의 멸균된 f2 배지를 관형 배양기에 다시 가해 반복 유가식 배양(repeated fed-batch) 실험을 수행하였다. 한번 배양에 4일씩 총 16일 배양하였고 매일 UV-vis spectrophotometer (CARY 100, Agilent Technologies, 미국)를 통해 균체 성장 속도를 측정하였다.

배양기 안의 온도는 25 °C, 조도는 6000 lux, 관형배양기 내 공기의 체적유량(volumetric flow rate of air)을 25 cc/min으로 고정하였고, 빛의 조사기간은 한국의 여름철과 겨울철의 일조시간을 반영해 각각 14.5시간과 7시간으로 설정하였다.

### 2-2. GC를 이용한 지방산 분석

배양 과정을 마친 미세조류를 수확하여 함유하고 있는 지방산을 분석 하였다. 2주간 배양된 *Nanochloris*, *D. tertiolecta*, *Tetraselmis* 배양액을 수집하여 원심분리(Supra 22K, 한일, 한국) 후 증류수로 5회 세척하였다. 이 때 원심분리기는 12000 rpm, 10 min, 4 °C 조건으로 가동하였다. 세척 후 영하 80 °C에서 급속 냉각한 후 동결건조기(Bondiro, 일신, 한국)를 이용하여 동결 건조하였다. 이렇게 얻어진 건조세포 0.01 g 당 acetyl chloride와 methanol을 1:20(v/v)로 제조한 용액 20 mL를 가하고, 진탕배양기(Sseriker, 상우, 한국)에서 2시간, 65 °C, 120 rpm의 조건으로 반응시킨 다음 hexane과 증류수를 각각 1 mL씩 가하였다. vortex로 30초간 섞어준 후 5분간 원심분리(4 °C, 12000 rpm)하여 분리된 상등액 1 mL를 취하고 필터링 과정을

Table 1. Composition of f/2 medium

Artificial sea water		f/2 Trace metal solution		f/2 Vitamin solution	
	g/L		g/L solution		g/L solution
NaCl	23.926	FeCl <sub>3</sub> ·6H <sub>2</sub> O	3.15	Vitamin B <sub>12</sub>	0.001
Na <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	4.008	Na <sub>2</sub> EDTA·2H <sub>2</sub> O	4.36	Biotin/L	0.001
KCl	0.667	CuSO <sub>4</sub> ·5H <sub>2</sub> O	0.0098	Thiamine HCl	0.2
NaHCO <sub>3</sub>	0.196	Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> ·2H <sub>2</sub> O	0.0063		
KBr	0.098	ZnSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	0.022		
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	0.026	CoCl <sub>2</sub> ·6H <sub>2</sub> O	0.01		
NaF	0.003	MnCl <sub>2</sub> ·4H <sub>2</sub> O	0.18		
MgCl <sub>2</sub> ·6H <sub>2</sub> O	10.831				
CaCl <sub>2</sub> ·2H <sub>2</sub> O	1.519				
SrCl <sub>2</sub> ·6H <sub>2</sub> O	0.024				

거쳐 분석 시료를 준비하였다.

추출된 *Nanochloris*, *D. tertiolecta*, *Tetraselmis*의 지방산은 gas chromatography (7890A, Agilent Technologies, 미국)를 이용하여 정량/정성 분석하였다. Gas chromatography의 운반 가스는 질소로 하고, column은 capillary column, detector는 FID를 사용하였다. 오븐 온도는 120 °C에서 5분간 유지시킨 후, 분당 2 °C 씩 온도를 높이고 240 °C까지 도달 후 10분간 유지하여 총 225분간 운전하였다.

2-3. 당화반응과 HPLC를 이용한 분석

미세조류 건조세포 1 g에 0.1 M Sodium acetate buffer (pH 4.5) 1.8 mL와 Viscozyme (Novozymes) 0.2 mL을 첨가한 후 16시간, 46 °C, 250 rpm으로 당화반응을 시켰으며, 이후 4 °C, 12000 rpm에서 15 분간 원심 분리하여 상등액 만을 취하였다. 이를 0.005 N H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>를 용매로 하여, 35 °C, 유량 0.6 mL/min, Aminex HPX-87H column에서 HPLC(YL-9100, 영린, 한국)를 이용해 당 분석을 하였다.

3. 결과 및 고찰

3-1. 성장 속도 측정 결과

미세조류 배양액의 세포 농도는 UV-vis spectrophotometer를 이용하여 매일 측정하였다. 채취하는 배양액 sample의 양은 1 mL로 고정하였고, 500 nm 파장의 빛을 조사하였을 때 인공해수 1 mL와의 상대적 흡광도를 비교하여 농도를 계산하였다. 초기 15일까지는 미세조류를 일정농도까지 성장시키기 위해 조사시간의 변화를 주지 않았고, 15일부터 22일까지는 빛을 하루에 7시간 조사하였고, 그 후는 14.5시간 빛을 조사하여 빛의 조사시간에 따른 세포성장속도의 차이를 관찰하였다(Fig. 1). 세 가지 미세조류 중 모두 7시간 보다 빛의 조사 기간이 14.5시간일 때 성장이 더 잘 이루어지는 것을 확인할 수 있었다. 7시간 조사 조건에서는 *D. tertiolecta*와 *Nanochloris*가 거의 비슷한 성장 정도를 보인 반면, 14.5시간 조사 조건에서는 *D. tertiolecta*가 *Tetraselmis*에 비해 38%, *Nanochloris*에 비해 14% 높은 성장률이 나타남을 확인할 수 있었다. 따라서 *D. tertiolecta*가 다른 두 종에 비하여 빛의 조사 기간이 증가함에 따라 균체의 성장속도가 빨리 증가한다는 것을 알 수 있었고, 이는 균체 성장 속도 측면에서 보았을 때 일조량이 큰 기후에 적합한 종이라고 판단할 수 있었다.

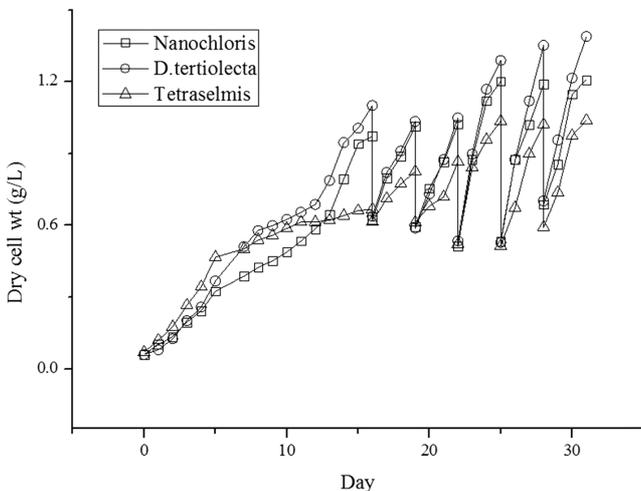


Fig. 1. The effects of lighting period on the cell growth rate.

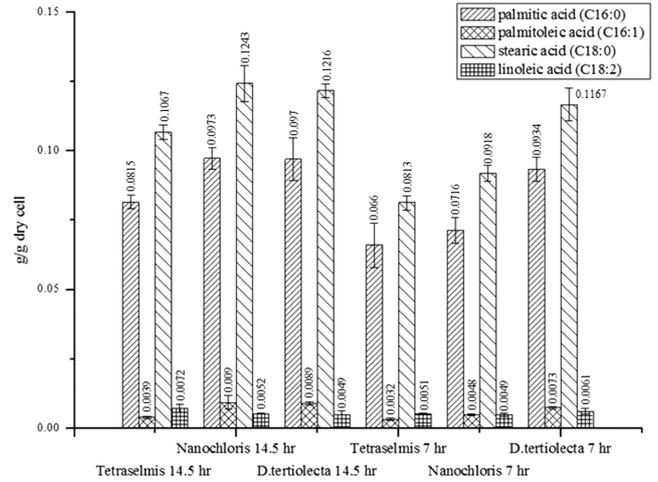


Fig. 2. The effects of lighting period on the lipid production.

3-2. 지방산 정량 분석 결과

미세조류 종에 따른 단위 세포 질량 당 생산하는 지방산의 총량 및 종류의 변화를 살펴보기 위하여 동일 질량의 건조질량으로부터 지방산을 추출한 뒤, GC를 이용해 지방산 함량을 분석하였다. 지방산 분석은 미세조류가 가장 많이 생산한다고 알려진 4종의 지방산 (palmitoleic acid, palmitic acid, stearic acid, linoleic acid)의 함량을 측정하였다(Fig. 2).

빛의 조사기간이 14.5시간 일 때는 *D. tertiolecta*, *Nanochloris*, *Tetraselmis*의 총 지질함량이 0.2324, 0.2358, 0.1993 (g/g dry cell)로 나타났으며, 이는 *D. tertiolecta*가 *Nanochloris*에 비해 2.6%, *Tetraselmis*에 비해 18.3% 정도 높은 지질함량을 보이는 것으로 확인되었다. 또한 7시간 조사 조건에서도 총 지질함량이 각각 0.2235, 0.1731, 0.1556 (g/g dry cell)로 빛의 조사 기간이 14.5시간 일때와 비교하여 전체적으로 지질함량이 비슷하거나 낮은 정도를 보였고, *D. tertiolecta*가 *Nanochloris*와 *Tetraselmis*에 비해 각각 29.1%, 43.6% 더 높은 지질함량을 보였다. 따라서 빛의 조사 기간에 관계없이 *D. tertiolecta*가 세포성장 속도도 빠르고 지질 함량도 높아 다른 두 종에 비하여 우수한 균주라는 것을 확인할 수 있었다. 또한, 모든 미세조류 중에서 stearic acid의 함량이 제일 높은 것을 알 수 있었고, 포화 지방산 (palmitic acid & stearic acid)의 생산량이 불포화 지방산(palmitoleic acid & linoleic acid)의 생산량보다 월등히 높음을 알 수 있었다.

3-3. 미세조류 당화 시 포도당 전환율 분석

HPLC를 통해 당화된 미세조류의 포도당 및 갈락토오스로의 전환율을 정량 분석하였으며, 미세조류 종류별 포도당 함량 분석 결과는 Table 2에 표시하였다. *D. tertiolecta*의 경우 포도당으로의 전환율이 0.2851(g glucose/g dry cell)로 가장 높았으며, 이는 *Nanochloris*, *Tetraselmis*에 비해 각각 1%, 22% 높은 포도당 전환율을 나타내었

Table 2. Glucose conversion yields of 3 different microalgae after saccharification

Microalgae	Glucose (g/g dry cell)
<i>Nanochloris</i>	0.2820
<i>Dunaliella tertiolecta</i>	0.2851
<i>Tetraselmis</i>	0.2338

다. 반면 당화 후 전환된 갈락토오스 양은 3종류 모두 거의 측정되지 않았으며, 이는 본 실험에 이용한 미세조류가 대부분 셀룰로오스로 구성되어 있음을 알 수 있었다.

#### 4. 결 론

배양실험 결과 미세조류 *D. tertiolecta*가 일조량이 7시간 조건에서 다른 두 개의 미세조류인 *Nanochloris*, *Tetraselmis* 보다 약간 높은 성장 속도를 보였으며, 14.5시간 조건에서는 최대 38% 높은 성장 속도를 나타냈다. 지방산 분석결과 또한 *D. tertiolecta*의 총 지질 함량이 14.5시간의 경우 *Nanochloris*의 지질함량과 비슷한 수준인 0.2324 (g/g dry cell)로 측정되었으며, 7시간의 경우에는 0.2235 (g/g dry cell)로 다른 두 종의 미세조류에 비해 최대 43.6% 정도 높은 지질함량을 보였다.

당화 실험결과 *D. tertiolecta*의 포도당 전환율이 가장 높았으며 *Nanochloris*, *Tetraselmis*에 비해 각각 1%, 22% 높은 포도당 전환율을 나타낸 반면 갈락토오스로는 거의 전환되지 못하였다. 전체적으로 종합해 보았을 때 *D. tertiolecta*가 다른 두 종에 비해 더 우수한 지질 생산 균주라는 것을 알 수 있었고, 바이오매스로 이용 가능성도 크다는 것을 확인할 수 있었다.

미세조류를 이용한 바이오에너지 생산 연구는 많은 장점에도 불구하고 낮은 생산성 때문에 상용화에 제동이 걸리고 있다. 발표된 자료에 따르면 바이오 디젤이 상용화 되려면 현재 효율의 약 100% 향상이 필요하다고 한다[2]. 뿐만 아니라 산화 안정성에 있어서도 특별한 고려가 필요한데, 이는 미세 조류 지질이 다중 불포화 지방 산을 많이 함유하고 있기 때문이다[18]. 미세조류 종에 대한 지속적인 탐색과 배양조건 최적화 연구 등이 이루어진다면 이러한 한계를 극복해 대체에너지로 사용이 가능할 것으로 기대된다.

#### 감 사

이 연구 논문은 2014학년도 홍익대학교 학술연구 진흥비에 의하여 지원되었음을 감사드립니다.

#### References

1. Minowa, T., Yokoyama, S., Kishimoto, M. and Okakura, T., "Oil Production from Algal Cells of *Dunaliella Tertiolecta* by Direct Thermochemical Liquefaction," *Fuel*, **74**(12), 1735-1738(1995).
2. Jo, B. H. and Cha, H. J., "Biodiesel Production using Microalgal Marine Biomass," *KSBB*, **25**, 109-115(2010).
3. Meher, L., Vidyasagar, D. and Naik, S., "Technical Aspects of Biodiesel Production by Transesterification-a Review," *Renew.*

- Sustain. Energy Rev.*, **10**(3), 248-268(2006).
4. Marchetti, J. M., Miguel, V. U. and Errazu, A. F., "Possible Methods for Biodiesel Production," *Renew. Sustain. Energy Rev.*, **11**(6), 1300-1311(2007).
5. Canakci, M., "The Potential of Restaurant Waste Lipids as Biodiesel Feedstocks," *Bioresour. Technol.*, **98**(1), 183-190(2007).
6. Fukuda, H., Kondo, A. and Noda, H., "Biodiesel Fuel Production by Transesterification of Oils," *J. Biosci. Bioeng.*, **92**(5), 405-416(2001).
7. Mata, T. M., Martins, A. A. and Caetano, N. S., "Microalgae for Biodiesel Production and Other Applications: A Review," *Renew. Sustain. Energy Rev.*, **14**(1), 217-232(2010).
8. Wahlen, B. D., Willis, R. M. and Seefeldt, L. C., "Biodiesel Production by Simultaneous Extraction and Conversion of Total Lipids from Microalgae, Cyanobacteria, and Wild Mixed-cultures," *Bioresour. Technol.*, **102**(3), 2724-2730(2011).
9. Nigam, P. S. and Singh, A., "Production of Liquid Biofuels from Renewable Resources," *Prog. Energy Combust. Sci.*, **37**(1), 52-68(2011).
10. Spolaore, P., Joannis-Cassan, C., Duran, E. and Isambert, A., "Commercial Applications of Microalgae," *J. Biosci. Bioeng.*, **101**(2), 87-96(2006).
11. Kim, D. G. and Choi, Y.-E., "Microalgae Cultivation Using LED Light," *Korean Chem. Eng. Res.*, **52**(1), 8-16(2014).
12. John, R. P., Anisha, G. S., Nampoothiri, K. M. and Pandey, A., "Micro and Macroalgal Biomass: a Renewable Source for Bioethanol," *Bioresour. Technol.*, **102**(1), 186-193(2011).
13. Xin, L., Hu, H., Ke, G. and Sun, Y., "Effects of Different Nitrogen and Phosphorus Concentrations on the Growth, Nutrient Uptake, and Lipid Accumulation of a Freshwater Microalga *Scenedesmus* sp.," *Bioresour. Technol.*, **101**(14), 5494-5500(2010).
14. Yoo, S. J., Oh, S.-K. and Lee, J. M., "Sensitivity Analysis with Optimal Input Design and Model Predictive Control for Microalgal Bioreactor Systems," *Korean Chem. Eng. Res.*, **51**(1), 87-92(2013).
15. Renaud, S. M., Tinh, L.-V., Lambrinidis, G. and Parry, D. L., "Effect of Temperature on Growth, Chemical Composition and Fatty Acid Composition of Tropical Australian Microalgae Grown in Batch Cultures," *Aquaculture*, **211**, 195-214(2002).
16. Sharma, Y. C., Singh, B. and Upadhyay, S. N., "Advancements in Development and Characterization of Biodiesel: A Review," *Fuel*, **87**(12), 2355-2373(2008).
17. Demirbas, A. and Demirbas, M. F., "Importance of Algae Oil as a Source of Biodiesel," *Energy Convers. Manage.*, **52**, 163-170(2011).
18. Hu, Q., Sommerfeld, M., Jarvis, E., Ghirardi, M., Posewitz, M., Selbert, M. and Darzins, A., "Microalgal Triacylglycerols as Feedstocks for Biofuel Production: Perspectives and Advances," *Plant J.*, **54**, 621-639(2008).