

# *Chlorella saccharophila* 배양을 위한 목질계 및 해조류 바이오매스 가수분해물의 이용

김아람, 김효선, 박미라, 김성구, 정귀택\*  
부경대학교 생물공학과

Received: August 17, 2016 / Revised: October 18, 2016 / Accepted: October 18, 2016

## Application of Lignocellulosic and Macro-algae Hydrolysates for Culture of *Chlorella saccharophila*

A-Ram Kim, Hyo Seon Kim, Mi-Ra Park, Sung-Koo Kim, and Gwi-Taek Jeong\*

Department of Biotechnology, Pukyong National University, Busan 48513, Republic of Korea

In this study, we investigated the possibility of using hydrolysates of lignocellulosics (rapeseed straw, barley straw, rice straw) and marine macro-algae (*Undaria pinnatifida*, *Laminaria japonica*, *Enteromorpha intestinalis*, and *Gracilaria verrucosa*) to cultivate *Chlorella saccharophila*. The growth of *C. saccharophila* was inhibited by 7 hydrolysates without active carbon treatment. In contrast, hydrolysates treated with active carbon increased the cell growth and product (oil and chlorophyll) formation by *C. saccharophila*. The oil contents of *C. saccharophila* treated with each hydrolysate were  $41.26 \pm 0.69\%$  (glucose),  $22.06 \pm 1.21\%$  (rapeseed straw),  $28.65 \pm 1.08\%$  (barley straw),  $31.15 \pm 0.76\%$  (rice straw),  $31.50 \pm 2.12\%$  (*U. pinnatifida*),  $31.49 \pm 4.53\%$  (*L. japonica*),  $29.63 \pm 3.93\%$  (*E. intestinalis*), and  $26.15 \pm 1.99\%$  (*G. verrucosa*), respectively. Lignocellulosics and marine macro-algae may be useful resources for improving the mass cultivation of *C. saccharophila*.

**Keywords:** Microalgae, lignocellulosics, macro-algae, *Chlorella saccharophila*, chlorophyll

## 서 론

최근 기후변화와 화석연료의 고갈로 신 재생에너지의 개발과 이용에 대한 관심이 높아지고 있으며, 이에 재생 자원으로 부터 열화학적 또는 생화학적 공정을 통해 다양한 바이오 연료와 화학제품을 생산하고자 하는 연구가 이루어지고 있다[1, 3, 16].

당과 전분계 자원은 식량자원으로 사용되고 있어 에너지 자원으로 이용에 한계가 있다. 식용작물의 부산물, 비식용작물, 나무 또는 삼림부산물 등과 같은 목질계 자원 (lignocellulosic biomass)은 탄수화물 중합체인 cellulose, hemicellulose 그리고 방향족 중합체인 lignin으로 구성되어 있다[1, 6, 10]. Cellulose와 hemicellulose는 물리, 화학, 생

물화적인 분해과정을 통해 탄수화물 중합체를 단당의 형태로 분해하여 미생물이 이용가능한 당으로 전환이 가능하다 [6, 9, 16].

최근 연구되고 있는 해양 바이오매스로 거대조류(macroalgae)가 있다. 이들은 광합성을 통해 햇빛에서 에너지를 얻으며 이산화탄소를 고정하며, 성장이 빠르고 육상 식물보다 단위 면적당 생산성이 우수한 자원으로 주목받고 있다[13]. 또한 종(species), 수확 장소 및 시기 등에 따라 구성성분(탄수화물 및 지질의 함량과 구성)이 다양하여 이용 가능성이 우수하다[10, 13–15, 17]. 현재 거대조류를 이용하여 물리적, 화학적 그리고 생물학적 공정을 통하여 바이오에탄올과 화학물질의 생산연구가 수행되고 있다[11, 14, 15, 17]. 또한, 조류로부터 지질을 추출해 바이오디젤 생산하거나 생리 활성을 조사하는 등 각종 분야에서 폭넓은 관련 연구가 진행되고 있다[4, 5, 8].

본 연구에서는 목질계 바이오매스인 보릿대, 벚짚 그리고 유채대와 해조류 바이오매스인 미역, 다시마, 파래 그리고 꼬

### \*Corresponding author

Tel: +82-51-629-5869, Fax: +82-51-629-5863

E-mail: gtjeong@pknu.ac.kr

© 2016, The Korean Society for Microbiology and Biotechnology

시래기를 탄소원으로 적용하기 위하여 전처리와 효소 가수분해를 통해 가수분해물을 얻고, 이를 미세조류 중 녹조류에 해당되는 *Chlorella saccharophila*의 배양에 탄소원으로의 이용 가능성을 조사하였다.

## 재료 및 방법

### 실험 재료

실험에 사용한 목질계 바이오매스인 보릿대(barley straw), 벃짚(rice straw) 그리고 유채대(rapeseed straw)는 2010-2011년에 광주광역시(대한민국) 일대에서 채취한 것을 건조하고 분쇄하여 실험에 사용하였다. 실험에 사용한 해조류 바이오매스 중 미역(*Undaria pinnatifida*)과 다시마(*Laminaria japonica*)는 부산 인근의 시장에서 구입하였으며, 파래(*Enteromorpha intestinalis*)와 꼬시래기(*Gracilaria verrucosa*)는 전남 완도(대한민국)에서 양식한 것을 2010년 10월에 수확하여 건조하여 보관하면서 실험에 사용하였다.

### 목질계 바이오매스의 전처리

목질계 바이오매스의 알칼리 전처리는 기존의 유채대를 대상으로 전처리한 논문[6]을 참고하여 7.9%의 NaOH를 사용하여 반응온도 68.4°C, 5.5시간의 조건에서 전처리 하였다. S/L ratio는 1:10으로 하였으며, shaking water bath (Scilab, Korea)에서 150 rpm으로 교반하면서 전처리를 수행하였다. 전처리 이후 망을 사용하여 전처리 된 바이오매스와 액을 분리하였으며, 고형물을 증류수를 이용하여 세척하여 사용하였다.

### 해조류 바이오매스의 전처리

다시마, 미역, 그리고 꼬시래기를 대상으로 효소 가수분해의 수율을 높이기 위해 해조류 바이오매스를 황산을 사용하여 전처리 하였다. 전처리에 사용한 황산의 농도는 100 mM로 설정하였고, 바이오매스를 total volume의 13% (w/v)를 첨가하였다. 이후 autoclave를 사용하여 130°C에서 90분 동안 반응하였다. 전처리가 끝난 해조류 바이오매스는 실온에서 충분히 냉각 후 효소 당화를 수행하기 위해 0.2 M citrate buffer (pH 4.8)와 증류수를 첨가하여 pH를 4.8로 조절하였다. 파래는 citric acid를 사용하여 전처리 하였으며, citric acid의 농도는 0.1 M이며, 바이오매스의 S/L ratio는 1:10으로 하였다. 이후 autoclave를 사용하여 130°C에서 90분 동안 반응하였다. 전처리가 끝난 해조류 바이오매스는 실온에서 충분히 냉각하여 NaOH를 사용하여 pH 4.8로 조절하였다.

### 효소당화

목질계 바이오매스의 효소 당화는 건조된 전처리물을 사

용하여 pH 4.8의 0.05 M citrate buffer와 S/L ratio는 1:10의 조건에서 수행하였다. 해조류 바이오매스는 전처리 후 중화한 가수분해물을 사용하였다. 효소 반응은 50°C의 shaking water bath (Scilab, Korea)에서 150 rpm으로 2일간 진행하였다. 효소 당화에 사용한 효소는 Cellic CTec2 (Novozymes, Denmark)와 Cellic HTec2 (Novozymes, Denmark)이며, CTec2와 HTec2의 첨가비율은 목질계 바이오매스 효소당화에 일반적으로 사용되는 비율인 1:0.1 비율로 혼합하여[5, 6] 건조중량을 기준으로 5% (v/w)를 사용하여 효소가수분해를 수행하였다. Cellic CTec2는 주로 cellulase,  $\beta$ -glucosidases, hemicellulose로 구성되어 있으며, Cellic HTec2는  $\beta$ -glucosidases와 endo-xylanase를 함유하고 있다[9].

### 미세조류 배지 및 배양 조건

바이오매스 가수분해물을 미세조류 배양에 사용하기 위해 바이오매스 가수분해물을 원심분리하여 상등액을 회수하여 활성탄을 사용하여 발효저해물질을 제거하였다. 정제된 바이오매스 가수분해물과 PG 배지 성분을 혼합하여 미세조류 배양 배지를 조제하였다. 바이오매스 가수분해물의 환원당의 농도는 증류수를 이용하여 희석하여 환원당의 농도가 10 g/l가 되도록 하였다. 121°C에서 15 min 멸균하여 미세조류 배양에 사용하였다. 미세조류 배양은 shaking incubator (Vision Scientific Co., Ltd., Korea)를 이용하며, 배양 온도는 25°C, 교반속도 120 rpm으로 배양하였다. 한국미세조류 은행에서 분양받은 *Chlorella saccharophila* (Kruger) Migula (KMMCC-195)를 본 실험에서 사용하였다. 미세조류 초기 접종량은 배지의 3%를 접종하였다. 모든 배양은 조건마다 2회 반복하였으며, 일정 시간마다 샘플을 취하여 분석에 사용하였다.

### 분석 방법

**미세조류 수확.** 미세조류의 지질함량 및 성분 분석을 위해 시료를 원심분리 하여 상등액은 당분석에 사용하였고, 남은 미세조류는 증류수를 사용하여 세척 과정을 2회 반복하여 배지 성분을 제거하였다. 세척을 마친 미세조류는 동결 건조하고 분쇄하여 보관하였다.

**Cell density 측정.** 미세조류의 성장을 측정하기 위해 분광광도계(SPEKOL 1300, Analytik Jena)를 이용해서 흡광도를 660 nm에서 측정하였으며, 표준곡선을 이용하여 건조 세포 농도로 환산하였다. 흡광도에 따른 cell 건조 중량의 표준곡선식은  $Y = 0.5351X - 0.016$  ( $R^2 = 0.995$ )이다. 이때, X는 측정된 흡광도 값이며, Y는 cell density (g/l)이다.

**오일 추출 및 함량 측정.** 오일 추출 방법은 Bligh and Dyer

method [2]를 이용하였다. 동결 건조된 미세조류 10 mg에 5 ml의 DW를 첨가한 후, homogenizer를 사용해 cell을 파쇄하였다. 파쇄된 cell에 chloroform과 methanol을 1:2 비율로 첨가한 다음 5분간 vortexing한 후 3,914 × g으로 10분간 원심분리하여 cell debris를 제거하였다. 이후 chloroform과 DW를 1:1 비율로 첨가하여 5분간 vortexing 후 다시 626 × g에서 10분간 원심분리 하여 층분리하였다. 아래의 chloroform 층을 회수하여 chloroform을 제거한 후 시료를 상온에서 건조하고 무게를 측정하였다. 측정된 chloroform 층의 무게(oil 량)는 추출에 사용한 바이오매스의 초기 무게와 비교하여 % of dwt (오일무게/건조중량 × 100)을 계산하였다.

**클로로필 추출 및 함량 측정.** 클로로필 함량을 측정하기 위해 methanol 10 ml에 동결 건조한 시료 10 mg을 첨가한 다음 균일하게 혼합하였다. 60℃에서 30 min 간 용출시킨 후 666 nm와 653 nm에서 흡광도를 측정하여 다음과 같은 식을 사용하여 색소의 양을 계산하였다[7].

$$\text{Chlorophyll (mg/l)} = 25.5 \times A_{653} + 4 \times A_{666}$$

이때, A는 absorbance로 흡광도이며, 653과 666은 각각의 파장을 의미한다.

**환원당 분석.** 환원당의 분석은 DNS method를 사용하였으며, glucose를 표준물질로 사용하였다[12].

**결과 및 고찰**

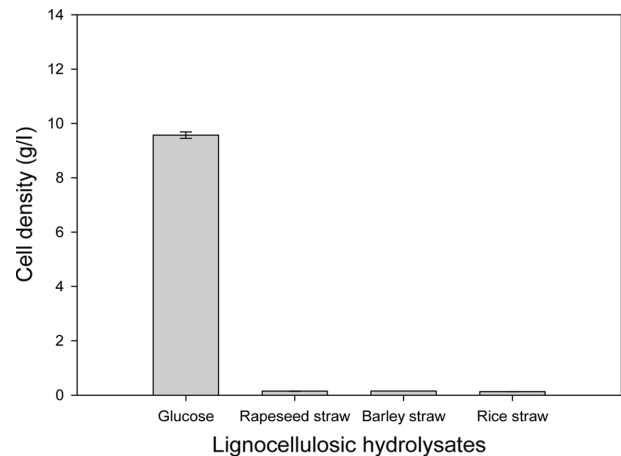
**바이오매스 가수분해물 제조**

전처리와 효소 가수분해가 끝난 7가지 바이오매스 가수분해물을 미세조류배지로 사용하기 위해 미세조류의 성장을 저해하는 물질을 제거하기 위하여 활성탄으로 처리 후 얻은 바이오매스 가수분해물의 환원당을 분석하여 그 결과를 Table 1에 나타내었다. 목질계 바이오매스에서는 볏짚에서 84.7 g/l, 그리고 꼬시래기에서 35.7 g/l의 환원당이 측정되었다. 목질계 바이오매스로부터는 종에 따라 49.3–84.6 g/l의 환원당을 얻을 수 있었으며, 해조류에서는 17.8–35.7 g/l의 환원당을 얻을 수 있었다. 특히 홍조류인 *G. verrucosa*에

서 상대적으로 높은 환원당을 얻을 수 있었다.

**바이오매스 가수분해물을 이용한 *C. saccharophila*의 성장 및 클로로필 생성**

**목질계 유래 당을 이용한 *C. saccharophila* 성장 및 클로로필 생성.** 유채대, 보릿대, 그리고 볏짚을 이용하여 가수분해물을 제작하여 미세조류를 12일간 배양한 결과를 glucose를 탄소원으로 첨가한 배지와 비교하였다. 동일 조건의 환원당 농도에서 실험을 실시하기 위하여 바이오매스 가수분해물과 glucose의 농도를 10 g/l가 되도록 희석하여 *C. saccharophila*를 배양하였다. Fig. 1은 glucose와 activated carbon으로 처리하지 않은 3종의 바이오매스 가수분해물을 대상으로 *C. saccharophila*를 배양한 결과를 나타낸 것이다. 주로 목질계 바이오매스의 산 가수분해 과정에서는 가수분해물에 5-HMF, levulinic acid, formic acid, acetic acid, furfural, 그리고 페놀성 성분들이 생성되고, 이러한 물질들은 미생물의 성장에 저해를 일으키는 것으로 알려져 있다[6, 9]. 또한 해조류는 다양한 색소성분과 페놀성 성분을 포함하고 있어 미세조류의 성장에 저해를 일으킬 것으로 판단된다[5, 8, 13, 14]. Activated carbon으로 처리하지 않은 바이오매스 가수분해물은 *C. saccharophila*의 성장에 저해를 나타내어 향후 실험에서는 바이오매스 가수분해물을 activated carbon 처리 후 시행하였다.

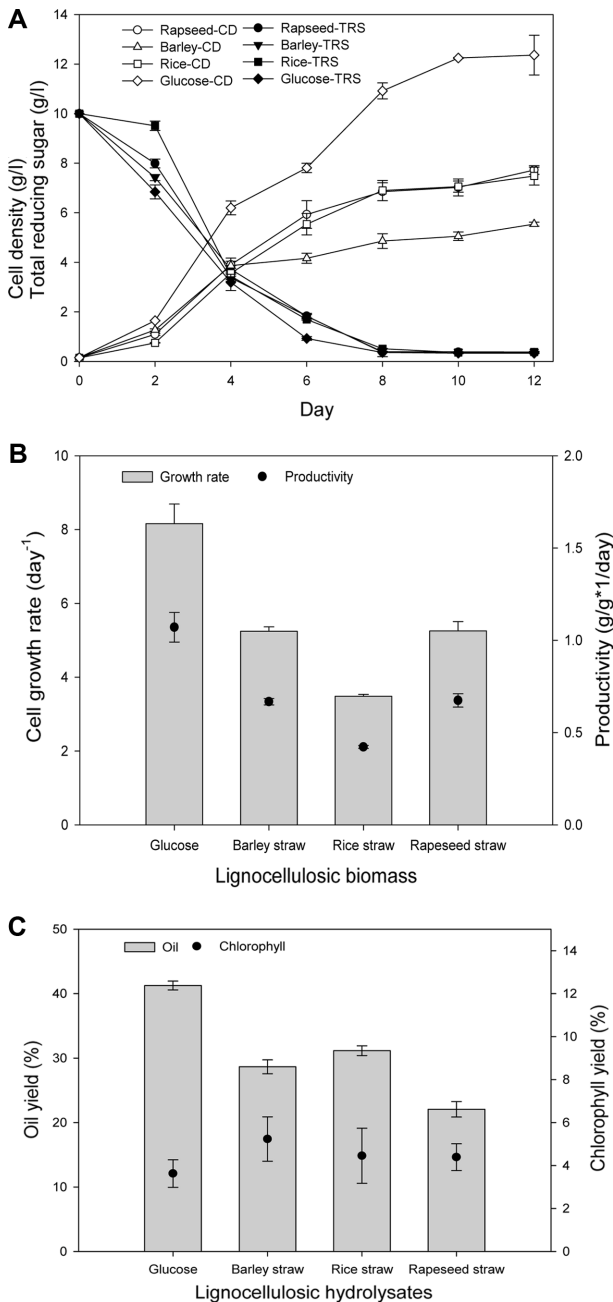


**Fig. 1. Effect of lignocellulosic hydrolysates on the growth of *C. saccharophila*.**

**Table 1. Reducing sugar concentration of lignocellulosics biomass and marine macro-algae hydrolysates.**

Reducing sugar (g/l)	Lignocellulosic biomass			Marine macro-algae			
	Rapeseed straw	Barley straw	Rice straw	<i>Undaria pinnatifida</i>	<i>Laminaria japonica</i>	<i>Gracilaria verrucosa</i>	<i>Enteromorpha intestinalis</i>
	49.28	67.71	84.64	18.69	17.75	35.70	21.40

The coefficient of determination (R<sup>2</sup>) of the standard curve was 0.996.



**Fig. 2.** Cell growth and production of oil and chlorophyll of *C. saccharophila* using lignocellulosic biomass hydrolysate treated with activated carbon. (A) Cell growth, (B) Cell growth rate and productivity, (C) Oil and chlorophyll.

Fig. 2는 목질계 바이오매스 가수분해물을 activated carbon으로 처리 후 얻은 가수분해물이 *C. saccharophila*의 성장 및 대사산물 생산에 미치는 영향을 나타내었다. Fig. 2A는 activated carbon으로 처리한 바이오매스 가수분해물을 이용하여 *C. saccharophila*를 12일 동안 배양하여 얻은 cell

growth를 나타내었다. Glucose만을 탄소원으로 사용한 경우에서 가장 높은 세포 성장을 보였다. 목질계 바이오매스 3종 중에서는 rapeseed straw와 rice straw에서 상대적으로 높은 성장을 보였다. 환원당은 배양 8일 정도에 대부분 소비되었으며, cell density 역시 8일 이후 성장이 더디게 이루어지는 것을 확인할 수 있었다.

Fig. 2B는 바이오매스 가수분해물을 이용한 *C. saccharophila*의 배양의 성장 속도와 productivity를 비교한 것이다. 목질계 바이오매스 가수분해물의 경우에는 Glucose를 탄소원으로 사용한 경우에 비하여 낮은 값을 나타내었다. 이는 바이오매스 가수분해물 중 환원당의 조성이 glucose 뿐만 아니라 xylose 등 다른 당이 혼합된 결과로 판단된다. 향후 이러한 혼합당이 *C. saccharophila*의 성장에 미치는 영향을 추가하여야 할 것으로 판단된다. 3종의 바이오매스 가수분해물을 비교한 결과, rapeseed straw (5.25 day<sup>-1</sup>)과 barley straw (5.24 day<sup>-1</sup>)가 비슷한 cell growth rate를 보였으며, rice straw는 3.48 day<sup>-1</sup>로 낮은 값을 나타내었다. Productivity 비교에서도 역시 cell growth rate와 같은 패턴을 보였으며, rapeseed straw와 barley straw가 각각 0.66 g/g/day와 0.67 g/g/day를 나타내었다. 초기 환원당의 농도가 같음에도 불구하고 이러한 성장의 차이는 각각의 바이오매스 가수분해물이 가지는 당의 조성 또는 제거되지 않은 저해물질의 영향이라고 판단된다.

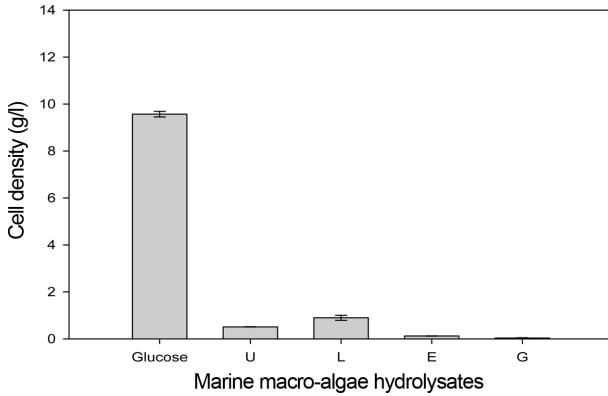
Fig. 2C는 목질계 바이오매스 가수분해물을 이용한 *C. saccharophila*의 배양 후 얻은 미세조류 바이오매스에 함유되어 있는 oil과 chlorophyll의 함량을 비교한 것이다. 대조구로 사용한 glucose의 경우에서 가장 높은 oil 함량을 나타내었다. Rice straw에서 목질계 바이오매스 중에서 가장 높은 oil 함량을 보였으나, cell growth rate는 가장 낮은 값을 나타내었다(Fig. 2B). 그리고 rapeseed straw가 가장 낮은 oil yield를 나타내었다. Chlorophyll 함량은 대조구로 사용한 glucose에서 목질계 바이오매스에 비하여 상대적으로 낮은 값을 나타내었고, 목질계 바이오매스들은 비슷한 결과를 보였다.

**해조류 가수분해물을 이용한 *C. saccharophila* 배양 및 대사산물 생성.** 해조류인 미역, 다시마, 파래 그리고 꼬시래기 가수분해물을 제작하여 *C. saccharophila*를 12일간 배양한 결과를 Fig. 3에 나타내었다. 4가지 해조류 가수분해물에 활성탄을 처리하지 않고, 12일간 배양한 결과, 거의 성장하지 않은 것으로 나타났다. 이는 해조류 가수분해물에는 해조류 유래의 다양한 polyphenol 등이 함유되어 있어 미세조류를 사멸시키거나 성장을 저해한 것으로 판단된다.

Fig. 4는 4종의 해조류 가수분해물을 활성탄을 사용하여 처리한 후 *C. saccharophila*를 배양한 결과를 나타낸 것이

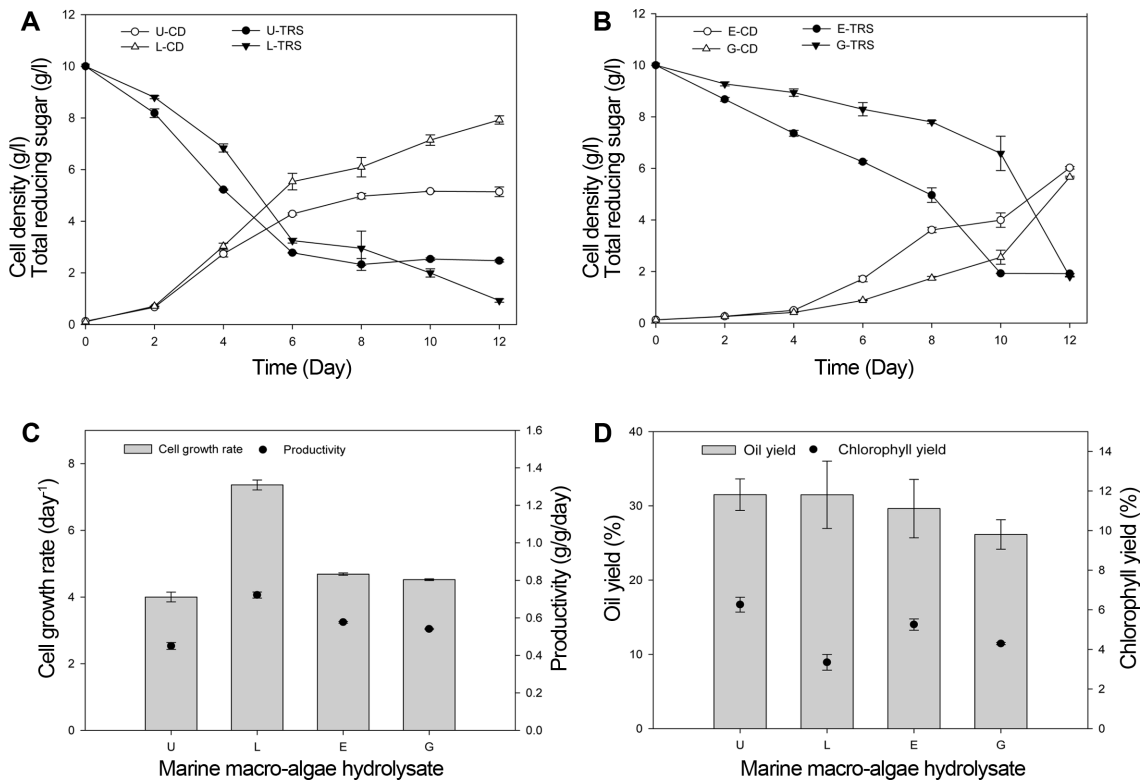


다. 활성탄을 처리한 해조류 가수분해물을 사용하여 *C. saccharophila*를 배양한 결과 활성탄 처리를 하지 않은 조건(Fig. 3)과 다르게 4가지 해조류 가수분해물에서 *C. saccharophila*가 성장하였다. Glucose를 첨가한 배지는 가



**Fig. 3. Effect of marine macro-algae hydrolysates on the growth of *C. saccharophila* before activated carbon treatment.** *U. pinnatifida* (U), *L. japonica* (L), *E. intestinalis* (E), and *G. verrucosa* (G).

수분해물의 성장을 비교하기 위한 것으로 앞의 목질계 유래 당 실험에서 사용된 Fig. 2A의 data를 비교한 결과 대조구로 사용한 glucose에서 가장 높은 성장을 보였다. 해조류 가수분해물 중 가장 성장이 우수한 것은 다시마로 확인되었으며, 10일 이후 성장이 거의 정지된 glucose ( $12.36 \pm 0.80$  g/l)와 미역( $5.14 \pm 0.19$  g/l)과는 대조적으로 12일까지 성장( $7.92 \pm 0.16$  g/l)을 나타내었다. 환원당이 모두 소비가 되지 않았으므로 긴 시간 배양할 경우 더 높은 성장을 기대할 수 있으리라 판단된다. 남아있는 환원당의 양과 성장 소요시간을 고려했을 때 12일까지의 배양이 적합하다고 판단하였다(Fig. 4A). 그리고 미역(*U. pinnatifida*)의 경우, 8일 이후 여분의 환원당이 잔존함에도 불구하고 거의 성장이 이루어지지 않은 것으로 보아 이는 *C. saccharophila*가 사용할 수 없는 형태의 당으로 판단된다(Fig. 4A). 또한 파래(*E. intestinalis*)의 경우에는 4일까지 거의 성장하지 않았으나, 이후 급격히 성장( $6.02 \pm 0.05$  g/l)하였다. 꼬시래기(*G. verrucosa*)의 경우에는 10일 이후 급격한 성장을 보였다( $5.66 \pm 0.03$  g/l). 이러한 경향은 파래와 꼬시래기의 가수분해물의 주성이 *C. saccharophila*가 섭취하는데 적응이 요구되는 당 구성인 것



**Fig. 4. Effect of marine hydrolysates on the growth and production of *C. saccharophila* after activated carbon treatment.** TRS is total reducing sugar and CD is cell density. *U. pinnatifida* (U), *L. japonica* (L), *E. intestinalis* (E), and *G. verrucosa* (G). (A) Cell growth and sugar consumption of *U. pinnatifida* and *L. japonica*, (B) Cell growth and sugar consumption of *E. intestinalis* and *G. verrucosa*, (C) Cell growth rate and productivity, (D) Oil and chlorophyll content.

으로 판단된다.

Fig. 4C에 해조류 가수분해물을 이용하여 *C. saccharophila*를 배양하여 얻은 cell growth rate와 productivity를 비교하였다. 다시마 가수분해물에서 가장 높은  $7.36 \text{ day}^{-1}$ 의 cell growth rate와  $0.72 \text{ g/g/day}$ 의 productivity를 나타내었으며, 이는 glucose의  $8.16 \text{ day}^{-1}$  cell growth rate와  $1.07 \text{ g/g/day}$ 의 productivity에 근접한 결과를 나타낸 것이다.

Fig. 4D는 해조류 가수분해물을 이용하여 *C. saccharophila*를 배양하여 얻은 oil과 chlorophyll 함량을 비교한 것이다. Oil 함량은 glucose에서 가장 높은 함량( $41.26 \pm 0.69\%$ ) (Fig. 2)을 나타내었으며, 해조류 가수분해물에서는 26–31%의 oil 함량을 나타내었다. Chlorophyll의 경우 미역에서 가장 높은 함량( $6.26 \pm 0.38\%$ )을 나타내었다. 또한 chlorophyll의 경우 다시마를 제외한 미역, 파래, 꼬시래기의 경우에 있어서 glucose를 첨가했을 때(Fig. 2)보다 높은 함량을 나타내었다. 이는 목질계 가수분해물의 결과와도 비슷한 양상을 나타내었다.

목질계 바이오매스인 유채대와 보리대 그리고 벧짚의 경우에는 그 주요 구성당이 glucose로 이루어진 cellulose와 주로 xylose로 이루어진 hemicellulose로 구성되어 있다. 이외에 소량의 galactose, arabinose와 같은 당으로 구성되어 주요 구성당이 미생물에 의해 이용가능한 당으로 알려져 있다 [3, 6, 9]. 그러나, 해조류 바이오매스인 미역, 다시마, 파래 그리고 꼬시래기의 경우에는 주요 탄수화물이 종에 따라 다양하게 alginate, laminaran, agar, sugar alcohol, cellulose 등으로 구성되어 있어 구성성분이 다양하다 [5, 9, 11, 13–15, 17]. 이러한 다양한 당의 구성은 가수분해물을 이용한 미세조류의 배양에 있어 육상의 목질계 바이오매스에 비하여 이용성이 낮아지는 결과를 나타내는 것으로 판단된다.

## 요 약

본 연구에서는 3종류의 목질계 바이오매스와 4종류의 해조류 바이오매스를 전처리와 효소가수분해 과정을 통하여 얻은 환원당을 이용하여 *C. saccharophila*를 배양하였다. 얻어진 가수분해물을 활성탄 처리 유무에 따라 배양한 결과, 목질계 바이오매스와 해조류 바이오매스 가수분해물을 활성탄 처리하지 않은 경우에는 *C. saccharophila*의 성장이 저해되었다. 목질계 바이오매스인 유채대와 보리대 그리고 벧짚과 해조류 바이오매스인 미역, 다시마, 파래 그리고 꼬시래기 가수분해물의 경우 활성탄 등으로 처리한 경우에서 목질계 바이오매스와 해조류 바이오매스 가수분해물에서 *C. saccharophila*의 성장이 관찰되었다. 미세조류의 생산성과 oil 함량, chlorophyll 등을 고려하였을 때 목질계 바이오매스와 해조류 바이오매스는 *C. saccharophila*의 product 생

산을 위한 배양에 이점을 가지며, 특히 chlorophyll 생산에 보다 유용하리라 판단된다.

## Acknowledgments

This work was supported by a Research Grant of Pukyong National University (2016 year).

## References

- Demibras A. 2007. Progress and recent trends in biofuels. *Prog. Energy Combust. Sci.* **33**: 1-18.
- Folch J, Lees M, Sloane-Stanley GH. 1957. A simple method for the isolation and purification of total lipid from animal tissues. *J. Biochem.* **226**: 497-502.
- Hayes DJ, Fitzpatrick S, Hayes MHB, Ross JRH. 2006. *The biofine process - Production of levulinic acid, furfural, and formic acid from lignocellulosic feedstocks*, pp. 139-164. In: B. Kamm, P. R. Gruber, M. Kamm (eds.). *Biorefineries - Industrial Processes and Products*, WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim.
- Jeong GT, Park DH. 2015. Optimization of lipid extraction from marine green macro-algae as biofuel resources. *Korean J. Chem. Eng.* **32**: 2463-2467.
- Jeong GT, Hong YK, Lee HH, Kong IS, Kim JK, Park NG, et al. 2014. Recovery of algal oil from marine green macro-algae *Enteromorpha intestinalis* by acidic-hydrothermal process. *Appl. Biochem. Biotechnol.* **174**: 221-230.
- Kang KE, Jeong GT, Park DH. 2012. Pretreatment of rapeseed straw by sodium hydroxide. *Bioprocess Biosyst. Eng.* **35**: 705-713.
- Kim JK, Park HJ, Kim YH, Joo H, Lee SH, Lee JH. 2013. UV-induced mutagenesis of *Nannochloropsis oculata* for the increase of lipid accumulation and its characterization. *J. Korean Ind. Eng. Chem.* **24**: 155-160.
- Kim DH, Jeong GT. 2014. Antimicrobial and antioxidant activities of extracts of marine green algae *Enteromorpha intestinalis*. *KSBB J.* **29**: 92-97.
- Kwon OM, Kim SK, Jeong GT. 2016. Potential of phosphoric acid-catalyzed pretreatment and subsequent enzymatic hydrolysis for biosugar production from *Gracilaria verrucosa*. *Bioprocess. Biosyst. Eng.* **39**: 1173-1180.
- Lynd LR. 1996. Overview and evaluation of fuel ethanol from cellulosic biomass: technology, economics, the environment, and policy. *Annu. Rev. Energy Environ.* **21**: 403-465.
- Lee SM, Kim JH, Cho HY, Joo H, Lee JH. 2009. Production of bio-ethanol from brown algae by physicochemical hydrolysis. *J. Korean Ind. Eng. Chem.* **20**: 517-521.
- Miller GL. 1959. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. *Anal. Chem.* **31**: 426-428.
- Park JI, Woo HC, Lee JH. 2008. Production of bio-energy from marine algae: Status and perspectives. *KICHE.* **6**: 833-844.
- Park EY, Jeong SM, Kim YJ, Lee DH. 2012. Review on hydrolysis

- methods of the macroalgae for production of bioethanol. *J. Korea Soc. Waste Manage.* **29**: 323-333.
15. Song BB, Kim SK, Jeong GT. 2011. Enzymatic hydrolysis of marine algae *Hizikia fusiforme*. *KSBB J.* **26**: 347-351.
16. The Pacific Northwest National Laboratory (PNNL) and the National Renewable Energy Laboratory (NREL). 2004. Top value added chemicals from biomass, volume I - Results of screening for potential candidates from sugars and synthesis gas. <http://www.osti.gov/bridge>.
17. Yeon JH, Seo HB, Oh SH, Choi WS, Kang DH, Lee HY, *et al.* 2010. Bioethanol production from hydrolysate of seaweed *Sargassum sagamianum*. *KSBB J.* **25**: 283-288.