

ORIGINAL ARTICLE

## 해양생물 *Botryococcus braunii*에서 유래한 바이오연료의 고급생산기술: 전처리 용매추출법

권성현 · 조대철<sup>1)\*</sup>

경상대학교 해양과학대학 해양환경공학과, <sup>1)</sup>순천향대학교 에너지환경공학과

## Higher Production of Biolipids from *Botryococcus braunii* using Pre-treated Solvent Extraction Methods

Sung-Hyun Kwon, Daechul Cho<sup>1)\*</sup>

Department of Marine Environmental Engineering, Gyeongsang National University, Tongyeong 53064, Korea

<sup>1)</sup>Department of Energy & Environmental Engineering, Soonchunhyang University, Asan 31538, Korea

### Abstract

A lipid-enriched strain of *Botryococcus braunii* (UTEX 572) was cultivated in a semi-batch aeration tank to enhance biomass as well as to develop intracellular lipids and fatty acids. A 30 day period of incubation produced 1.39 g/L of biomass and 0.31 g/L of total lipids in the biomass. The grown biomass was pre-treated using several methods to extract the total lipid content efficiently: ultrasonication was found to yield the highest percentage of lipids-namely 19.8% per biomass. Direct heating of biomass in an autoclave also showed better performance than when using only conventional solvent extraction. To enhance the biomass harvest and lipid extraction efficiency, coagulation and flocculation steps were added to the extraction process. It is noteworthy that not only the solvent type but also the solvent/biomass ratio greatly affected efficiency. In addition, the moisture content of the harvested(wet) biomass affected the efficiency significantly. This study elucidated the need for future research on optimizing this extraction process.

**Key words** : *Botryococcus braunii*, Biolipid production, Pre-treated solvent extraction, Semi-batch cultivation

### 1. 서론

지속가능한 에너지에 대한 세계적 관심은 증대일로에 있다. 화석에너지와 핵에너지에 기준한 현 에너지체계는 과도한 온실가스의 원천으로 파괴적이고 전지구적인 기후변화와 재앙을 초래하여 대체에너지에 대한 연구와 투자가 각 국에서 활발히 전개되고 있는 실정이다. 그 대안

의 하나가 바이오연료로서 가장 유망한 에너지로 간주되고 있다(Xiao et al., 2013; Cui et al., 2014). 미세조류 *Botryococcus*, *Chlamydomonas*, *Chlorella* 등은 전통적 곡물에서 생산되는 바이오오일보다 최대 300배나 많은 생산성을 자랑한다(Cooney et al., 2009). 더구나 곡물에 비해 이 생물의 수확 주기는 매우 빨라 1~10일 단위로 재생산이 가능하다.

Received 22 July, 2019; Revised 31 October, 2019;

Accepted 4 November, 2019

\*Corresponding author: Daechul Cho, Department of Energy & Environmental Engineering, Soonchunhyang University, Asan 31538, Korea  
Phone : +82-41-530-1341  
E-mail : daechul@sch.ac.kr

© The Korean Environmental Sciences Society. All rights reserved.

© 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.

**Table 1.** Oil content of some important microalgae which have been investigated

Microalga	Oil content (wt%,dry based)
<i>Botryococcus braunii</i>	25-75
<i>Chlorella sp.</i>	28-32
<i>Cryptocodinium cohnii</i>	20
<i>Cylindrotheca sp.</i>	16-37
<i>Dunaliella promolecta</i>	23
<i>Isochrysis sp.</i>	25-33
<i>Nonallanthus salina</i>	20 or more
<i>Nannochloris sp.</i>	20-35
<i>Nannochloropsis sp.</i>	31-68
<i>Neochloris oleoabundans</i>	35-54
<i>Nitzschia sp.</i>	45-47
<i>Phaeodactylum tricorutum</i>	20-30
<i>Schizochytrium sp.</i>	50-77
<i>Tetraselmis sueica</i>	15-23

특히 녹조류 *Botryococcus braunii*는 건조중량의 2-75%가 바이오디젤로 전환될 수 있는 탄화수소로 구성되어 있고(Kosaric and Velikonja, 1995; Lee et al., 1998) 다른 조류중에 비해 높은 지질함량, 탄화수소의 질과 같은 휘발유와 항공연료로의 제조 경쟁력이 우수하다(Metzger and Largeau, 2005). 한편 *B. braunii*에 의하여 생산된 바이오디젤의 연소 시 방출되는 배출 가스는 기존의 디젤유와 비교하여 CO는 20% 이하, NO<sub>x</sub>는 55%, 총 매연은 5% 수준이고 SO<sub>2</sub> 배출이 없다고 알려져 있으며, 생분해성과 무독성을 띤다(Wolf et al., 1985; Grima et al., 1994). Table 1은 미세조류 중에 따른 지질 함량을 표시한 것이다.

한편, 스케일업 및 대량생산은 2가지 공정으로 요약된다. 즉, 개방수로형과 튜브형 광반응기가 주로 연구되고 있다(Janssen et al., 2003). 생산성 면에서 보면 광반응기형태가 환경조절 인자를 최적화하여 높은 편이나 개방수로형이 배양조건을 조절하거나 최적화하기 어렵다는 단점에도 불구하고 투자와 운영비용 측면에서 훨씬 유리하다(Ugwu et al., 2008; Singh et al., 2010). 미세조류의 상용화 첫 단계인 수확과 추출에 대한 연구는 90년대 말 연구예산 감축으로 인한 여파로 진척되지 못하다가 2000년 중반 유전학적 성과로 인한 배양기술의 약진과 더불어 침전과 부상 등 집묵기술이 보고되었지만(Brennan

and Owende, 2010; Udman et al., 2010) 바이오연료 관련한 경제성 측면에서 파쇄와 원심분리의 기초에서 크게 개선되지 못하였다.

일반적 관점으로 볼 때 본 연구의 최종목표는 지질과 지방산 등 미세조류의 배양에서 획득하는 최대 산물에 있다. 일반적인 미세조류의 지질함량은 30-80% 정도이다. 지질은 본질상 유기용매에 용해성을 가진 소수성 탄화수소를 갖고 있다. 그런 까닭에 유기용매를 사용하면 이론상 추출이 용이하다. 크게 나누어 중성지질에 해당하는 triacylglycerol이 세포 원형질에서 미세 액적형태로 존재하며 반면 극성지질은 phospholipid나 glycolipid 형태로 세포막 등에 구조성분으로서 분포한다. 대부분의 미세조류는 낮은 정제기에 많은 중성지질을 축적한다고 알려져 있다. 따라서 log phase로 불리는 세포분열이 활발한 지수생장기를 피해 조류배양을 조절하는 것이 필요하다 보고되고 있다(Huerlimann et al., 2010; Griffiths et al., 2012). 이는 바이오연료의 최종 제품인 바이오디젤 등의 품질 결정에 부정적 요소가 되는 불포화지방산(monounsaturated or polyunsaturated fatty acids)의 비중을 줄이는 방법이기도 하다.

본 연구팀은 미세조류의 최적 성장조건과 최적 지방산 생산조건을 영양원의 제한, 질소/인 비의 변화, 질소원의 종류, 환경조건(pH, 온도, 빛의 세기), 성장 시기 등에

**Table 2.** BG11 (blue-green medium) stock

Component	weight in 1 L	Component	weight in 1 L
NaNO <sub>3</sub>	150 g	Trace metal solution:	
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	4.00 g	H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	2.86 g
MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	7.50 g	MnCl <sub>2</sub> ·4H <sub>2</sub> O	1.81 g
CaCl <sub>2</sub> ·2H <sub>2</sub> O	3.60 g	ZnSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	0.22 g
Citric acid	0.60 g	Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> ·2H <sub>2</sub> O	0.39 g
Ammonium ferric citrate green	0.60 g	CuSO <sub>4</sub> ·5H <sub>2</sub> O	0.08 g
EDTANa <sub>2</sub>	0.10 g	Co(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> ·6H <sub>2</sub> O	0.05 g
Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>	2.00 g	Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>	2.00 g

영향인자로 검토한 바 있다(Kwon et al., 2012). 특히 배지 조성은 세포의 성장 및 지질합성에 큰 영향을 미치는 주요 매개변수로서 고찰되었고 *B. braunii*의 고밀도 생산 및 생체내 지질함량을 제고하기 위한 기초 연구를 랩규모 유리 컬럼을 통해 수행한 바 있다(Endo et al., 1977; Bajpai and Bajpai, 1993; ; Lee et al., 1998; Xu et al., 2006). 이 연구는 그의 후속으로서 동일 균주를 사용한 대량 배양 설계와 고효율 지질생산을 위한 비회분식 반연속공정의 결과물을 제시한다.

**2. 재료 및 방법**

**2.1. 미세조류의 배양과 사용배지**

미세조류 *Botryococcus braunii* UTEX 572는 The University of Texas at Austin에서 분양받아 계대배양하여 유지하였다. 미세조류의 보존 및 배양은 BG 11 배지의 한천슬렌트를 사용하였고 25±2°C, 2000 lux 조도 및 16/8 광사이클을 적용하였다(Kwon et al., 2012).

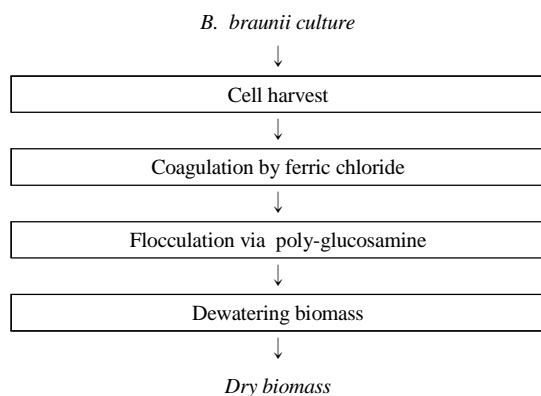
표준 BG(for Blue Green Algae) 11 배지 (Table 2)에서 성장 주요소인 질소(NaNO<sub>3</sub>):인(K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>)의 비율을 16:1로 조절하여 사용하였다(기초 실험에서 최적화함).

**2.2. 균체량 측정**

*B. braunii*의 균체량은 배양액 25 mL 을 4.7 Whatman GF/C 필터로 걸러 측정하였다. 필터와 함께 균체를 60°C에서 2-3 h 건조하여 데시케이터 방냉후 무게를 측정하였다. *B. braunii*의 배양에서 건조중량과 흡광도(y = 0.5511x + 0.0127, r<sup>2</sup> = 0.9986)는 매우 높은 상관성을 보였다. 따라서 *B. braunii*의 배양시 680 nm에서 흡광도 값을 측정하여 간편하게 건조중량을 계상할 수 있었다.

**2.3. 전처리, 추출 및 지질측정**

세포수확, 추출 및 지질측정은 다음 Fig. 1에 도시하였다. 미세조류세포는 유합(coagulation)와 응결(flocculation)과정을 거쳐 수확되었다. 염화제이철(ferric chloride)과 poly-glucosamine을 투입하여 세포를 수확한 바 300 rpm의 회전임펠러 조건에서 침강을 유도하였다. 세포슬러지는 탈수를 거쳐 분리되고 약 3시간 동안 자연건조 후 8시간 60°C 오븐에서 추가 건조하였다. 건조한 생체량 50 g을 4배의 물과 혼합한 후 초음파분쇄기(Sonics VCX 500)로 24 KHz 강도로 55°C에서 5분간 분쇄하였다. 진공여과 후 분액여두(soxhlet 장치)를 이용하여 chloroform : methanol(2 : 1, v/v) 혼합용매로 추출하였다. 조류 추출액에 증류수를 첨가하여 chloroform : methanol : water의 비율이 1 : 1 : 0.9가 되게 조절하여 분리된 chloroform층을 건조시켜 지질함량을 측정하였다.



**Fig. 1.** Flow scheme for harvesting algal biomass in this work.

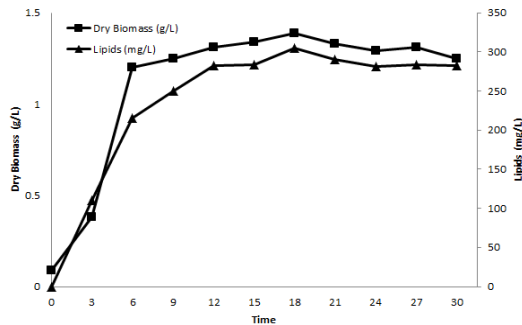


Fig. 2. *B. braunii* culture and its derived lipid production in a semi-batch system.

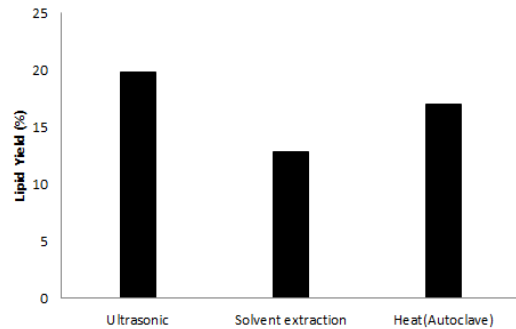


Fig. 3. Total lipid extracted from biomass by additional pre-treatments plus solvent extraction.

가압가열분쇄법 (autoclaving)은 탈수건조한 biomass 50 g을 2기압 (14.7 psig) 121 °C에서 20분간 열처리하여 수행하였다.

#### 2.4. 반회분식 배양(semi-batch cultivation)

아산지역 수재활용센터의 유허 유량조정조 (용량 : 2000 L)를 주 배양조로 사용하였다. 배양조의 수온은 15-18 °C를 유지하였고 일조시간은 일평균 6.6h이었다 (기상청 자료 참조). 산기 농도를 통하여 0.1%(v/v) 이산화탄소가 2.5 L/min 유량으로 공급되었다. 20 L 집중용 *Botryococcus* 배양액을 수조에 넣고 10-15 rpm의 속도로 패들 휠을 가동하였다. 배양액의 조성은 2.1에 기술한 바 있다. 처음 6일간 회분식으로 배양이 이루어졌으며 총 30일간 유가식 배양을 수행하였다. 매 3일마다 50 vol%의 혼합액이 제거되고 같은 부피의 순배양액이 공급되는 방식으로 진행되었다. pH는 초기 7.5로 시작하여 실험종료까지 7.5~8.5를 유지하였다.

### 3. 결과 및 고찰

본 연구는 개방 배양조에서 *Botryococcus*의 대량 배양과 지질 추출에 대한 다양한 측면을 고찰한 것이다. 해당 균주 *B. braunii* (UTEX 572)를 분양받아 실험실 조건에서 기초 배양 후 파이렛 규모인 개방 환경에서 지질 추출을 목표로 실험한 결과이다.

#### 3.1. *B. braunii*의 개방탱크 내 대량 배양

조류 *B. braunii* UTEX 572를 운전용량 2000 L (6 m × 6 m × 0.3 m)의 유량조정용 탱크에서 배양하였다. 씨

배양액은 약 2주간 실험실의 버블컬럼배양기에서 배양하여 탱크로 이전 집중하였다. 유량 탱크는 집중 전 0.09% NaOCl로 소독하고 희석한 배지액으로 충분히 세척하였다.

본 연구에서는 반회분식 배양법을 사용하였는데 초기에는 회분식 기법으로 성장을 유도하였다. 건조생체량이 약 1 g/L에 도달했을 때 조류 배양액의 40%를 제거·수확하고 같은 부피의 배지액으로 보충하였다. 이 과정은 매 3일마다 반복하여 총 30일간 배양이 이루어졌다. 배양액의 pH는 실험 내내 CO<sub>2</sub>가스를 주입하여 7.5~8.5로 유지되었다. 균체량은 Fig. 2에서 나타내었듯이 매 3일마다 측정되었고 건조 균체량은 최대 1.3 g/L로 실험기간 내내 유지되었고 최고 균체생산성은 0.5 g/L/d로 나타났다.

*N. salina* 및 *Scenedesmus* 종의 배양에서 배양기법을 회분식에서 연속식으로 전환했을 때 균체생산성이 비약적으로 향상되었음을 고려할 때(Balachandran and Nagamany, 2013; Ting et al., 2013), *B. braunii*의 반회분식 배양법도 부피 생산성을 크게 향상시켰다. 회분식 운전 시 최대 생산성은 0.2 g/L/d에서 반회분식으로 변경 후 0.5 g/L/d로 250% 향상이 이루어졌다.

한편 균체에서 최종 생산된 지질의 양은 최대 305 mg/L를 기록하였고 균체와 유사한 패턴으로 「증가-안정」 되는 양상을 보였다. 즉, 균체생장과 생성물의 변화가 1차적으로 비례하였다. 지질의 평균 생산성은 0.053 g/L/d였고 최대 0.07 g/L/d를 나타내었다.

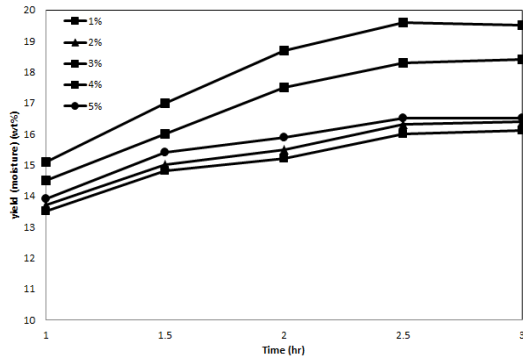


Fig. 4. Total lipid yields obtained from *B. braunii* biomass at different moisture contents with allowed time.

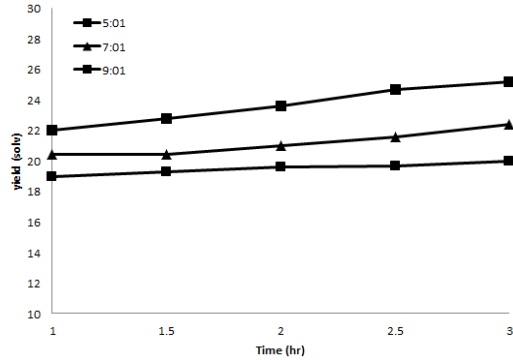


Fig. 5. Total lipid yields obtained from *B. braunii* biomass at different solvent biomass ratios (solvent:biomass) with allowed time.

### 3.2. 부가공정을 통한 조류균체의 수확

조류의 생장이 정체기에 도달할 때 균체가 수확되었다. 본 연구에서는 유합(coagulation)과 응결(flocculation)을 통한 방식을 적용하였다. 이때 염화제이철과 폴리글루코사민이 사용되었다. 또한 Jar test를 통하여 유량조정에 투입될 약품의 최적량이 결정되었다.

염화제이철 농도의 시험에서는 약 150 ppm 수준에서 세포의 융합이 가장 성공적으로 이루어졌고 이 농도에서 다음단계인 응결제 폴리글루코사민 투입량이 재 최적화되었다(20 ppm에서 최대 응결). Rashid et al.(2013)이 제안한 pH 5.5를 수확 전 과정에 적용하였다.

### 3.3 공정변수에 따른 지질 추출 최적화

조류 세포를 파괴하여 내생 산물인 지질을 추출하였다. 전통적인 화학용매추출에 더하여 2가지 전처리 방법을 추가 시험하였다. 초음파 처리한 경우 최대 지질 수율은 19.8%였고 전통적 용매 추출(chloroform-methanol)법은 12.8%에 머물렀다. 초음파 에너지로 세포를 파괴했을 때 약 2배정도 지질 추출이 용이해졌음을 알 수 있다. 가압가열법(autoclaving)을 적용했을 때는 최대 수율이 17.0%로 나타났다. 즉, 압력과 열에너지로 인해 조류 세포의 세포막이 효과적으로 파열되어 지질이 용이하게 수확되었음을 알 수 있었다.

#### 3.3.1. 수분함량에 따른 효과

전체적으로 지질의 추출은 공정매개변수의 특성에 크게 좌우된다: 용매, 수분함량, 추출온도 및 시간, 용매-균

체 비율 등(Chaiklahan et al., 2008; Siddigee and Rohan, 2011). 본 실험에서는 건조균체량 대비 수분함량과 용매-균체 비율을 변수로 하여 최대 지질 생산량을 구하였다.

수분함량의 최적화를 위한 전제 조건은 추출 온도 50-55°C, 교반속도 400 rpm과 용매-균체 비는 5:1로 고정하고 추출시간은 1-3 h을 기준으로 하였다. *Botryococcus* 건조균체 당 수분 비율을 1, 2, 3, 4, 5 wt%로 조정된 시료를 준비하였다. 함수율에 따라 지질 추출량은 증가하였고 추출시간을 연장함에 따라 지질함량도 증가하였다. (Fig. 4). 실험결과 수분함량 3 wt%에서 최대 지질 수율 19.8%가 도출되었고 수분함량을 더 늘렸을 때 1~2 wt% 보다는 높았지만 감소하였다. 즉, 수분의 존재가 더 이상 지질의 추출을 촉진하지 못했다는 것이며 용매와 수분이 적절할 때 추출용매의 세포내 침투가 최대로 이루어진다는 보고와 일치한다(Rao and Arnold, 1958). 다시 말해서 수분이 매우 적을 때 용매의 침투가 물리적 유동제한으로 저하되지만 과도한 수분이 존재할 때도 ‘유동성’은 증가하지만 용매의 침투력은 감소한다는 것을 보여준다(혼합유체에서의 물질전달 저항(barrier)의 증가).

#### 3.3.2. 용매-균체량 비율의 효과

추출의 물리작용 즉, 물과 기름의 비혼합성과 동류간의 가용성 때문에 상기의 비율은 추출에서 지대한 영향을 줄 것으로 기대된다. 이에 용매와 균체 무게 비를 각각 5:1, 7:1, 9:1로 조정된 시료를 준비하여 지질 추출량을 측정하였다(Fig. 5). 용매의 비중이 클수록 지질 추출량도

늘어나는 추세를 보였으며 추출시간 연장에 따른 효과는 상대적으로 크지 않았다. 즉, 충분한 양의 용매가 사용될 때 균체에 대한 침투는 약한 시간의 함수로서 초기에 침투가 완료되는 것으로 사료되며 지질의 가용화는 용매량에 상당히 좌우됨을 알 수 있었다.

현재의 실험조건에서 용매 : 균체 = 9 : 1일 때 최대 25.2%의 추출 수율을 보였다. 타 조류지질 추출연구 (Hossain and Salleh, 2008; Pokoo-Aikins et al., 2010)에서 최대 수율이 10% 내외인 것을 감안할 때 본 연구의 수율 25.2%는 매우 성공적으로 평가할 수 있으며 다소 높은 용매/균체 비에도 불구하고 고수율 추출법으로 권장할 수 있다.

#### 4. 결론

고지질 탄화수소의 함량이 높은 미세조류 *Botrococcus braunii* (UTEX 572)를 이용한 고밀도 배양과 이에 따른 지질생산을 파일럿 규모(2 m<sup>3</sup>) 비회분식 배양법으로 시도하였다. 이전 버블탑 반응기로 수행한 기초자료를 바탕으로 비회분식 배양의 지질 생산성과 함수량 및 용매비율과 같은 공정변수에 따른 지질 생산수율을 비교하였다. 연구결과로는 1) 비회분식 공정으로 30일 운전한 결과, 조류 균체량은 최대 1.39 g/L, 지질 농도는 0.31 g/L를 각각 얻었다. 또한 균체 생산성은 회분식 (0.2 g/L/d)에 비하여 월등히 높은 0.5 g/L/d를 나타내었고 지질 생산성도 최대 0.07, 평균 0.053 g/L/d를 보였다. 2) 수분의 함량에 따른 지질 추출성은 저함량과 고함량에서 낮았고 중간농도인 3 wt%에서 가장 높았는데 용매의 물리적 침투에 수분이 일종의 barrier로 작용함을 확인할 수 있었다. 또 용매의 균체대비 비율의 효과는 용매비중이 큰 9:1인 조건에서 추출량이 가장 높았다. 3) 추출을 용이하게 하기 위한 전처리 효과는 초음파+용매>가압가열+용매>순용매 순으로 나타났으며 균체의 유합 및 응결을 도입하여 균체 수확과 추출을 촉진할 수 있었다.

#### 감사의 글

이 저작은 2014 순천향대학교 연구년 프로그램 (조대철, 공대 에너지환경공학과)으로 지원되었기에 이에 감사드립니다.

#### REFERENCES

- Bajpai, P., Bajpai, P. K., 1993, Eicosapentaenoic acid (EPA) production from microorganisms: a review, *J. Biotechnol.*, 30(2), 161-183.
- Balachanolran, K., Nagamany, N., 2012, Feasibility of microalgal cultivation in a pilot-scale airlift-driven raceway reactor, *Bioresour. Technol.*, 108, 196-202.
- Brennan, L., Owende, P., 2010, Biofuels from microalgae-a review of technologies for production, processing, and extractions of biofuels and co-products, *Renew. Sust. Energ. Rev.*, 14, 557-577.
- Chaiklahan, R., Chirasawan, N., Loha, V., Bunnag, B., 2008, Lipid and fatty acids extraction from the *Cyanobacterium spirulina*, *Sci. Asia*, 34, 299-300.
- Cooney, M., Young, G., Nagle, N., 2009, Extraction of Bio-oils from microalgae. *Sep. Purif. Rev.*, 38, 291-325.
- Cui, Y., Rashida, N., Huc, N., Rehman, M. S. U., Han, J., 2014, Electricity generation and microalgae cultivation in microbial fuel cell using microalgae-enriched anode and bio-cathode, *Energy Convers Manage.*, 79, 674-680.
- Endo, H., Hosoya, H., Koibuchi, T., 1977, Growth yields of *Chlorella regularis* in dark-heterotrophic continuous cultures using acetate., *J. Ferment. Technol.*, 55, 369-370.
- Griffiths, M. J., Van Hille, R. P., Harrison, S. T. L., 2012, Lipid productivity, settling potential and fatty acid profile of 11 microalgal species grown under nitrogen deplete and limited conditions, *J. Appl. Phycol.*, 24, 989-1001.
- Grima, E. M., Camacho, F. G., Perez, J. A. S., 1994, Biochemical productivity and fatty acid profiles of *Isochrysis galbana* Parke and *Tetraselmis sp.* as a function of incident light intensity, *Process Biochemistry*, 29(2), 119-126.
- Hossain, A. B. M. S., Salleh, A., 2008, Biodiesel fuel production from algae as renewable energy, *Am. J. Biochem. Biotechnol.*, 4, 250-254.
- Huerlimann, R., Heimann, K., De Nys, R., 2010, Growth, lipid content, productivity, and fatty acid composition of tropical microalgae for scale-up production, *Biotechnol. Bioeng.*, 107, 245-257.
- Janssen, M., Tramper, J., Mur, L. R., Wijffels, R. H., 2003,

- Enclosed outdoor photobioreactors: light regime, photosynthetic efficiency, scale-up, and future prospects, *Biotechnol. Bioeng.*, 81, 193-210.
- Kosaric, N., Velikonja, J., 1995, Liquid and gaseous fuels from biotechnology: Challenge and opportunities, *FEMS Microbiol. Rev.*, 16, 111-142.
- Kwon, S. H., Lee, E., Cho, D., 2012, Optimal culturing and enhancement of lipid accumulation in a microalga *Botryococcus braunii*, *J. Environ. Sci. Int.*, 21(7), 779-785.
- Lee, S. J., Kim, S. B., Kim, J. E., Kwon, G. S., Yoon, B. D., Oh, H. M., 1998, Effects of harvesting time and growth stage on the flocculation of the green alga *Botryococcus braunii*, *Lett. Appl. Microbiol.*, 27, 14-18.
- Lee, S. J., Yoon, B. D., Oh, H. M., 1998, Rapid method for the determination of lipids from the green alga *Botryococcus braunii*, *Biotechnol. Tech.*, 12, 553-556.
- Metzger, P., Largeau, C., 2005, *Botryococcus braunii*: a rich source for hydrocarbons and related ether lipids, *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 66, 486-496.
- Pokoo-Aikins, G., Heath, A., Mentzer, R. A., Sam Mannan, M., Rogers, W. J., El-Halwagi, M. M., 2010, A Multi-criteria approach to screening alternatives for converting sewage sludge to biodiesel, *J. Loss Prev. Proc. Indus.*, 23, 412-420.
- Rao, R. K., Arnold, L. K., 1958, Alcoholic extraction of vegetable oils, pilot plant extraction of cotton seed by aqueous ethanol., *J. Am. Oil Chem. Soc.*, 35, 277-281.
- Rashid, N., Rehman, S. U., Han, J. I., 2013, Rapid harvesting of fresh water microalgae using poly-glucosamine, *Proc. Biochem.*, 48, 1107-1110.
- Siddigee, M. N., Rohan, S., 2011, Lipid extraction and biodiesel production from municipal sewage sludges: a review, *Renew. Sust. Energy Rev.*, 15, 1067-1072.
- Singh, J., Gu, S., 2010, Commercialization potential of microalgae for biofuel production, *Renew. Sust. Energy Rev.*, 14, 2596-2610.
- Ting, C., Stephen, Y. P., Ratanachat, R., Yebo, L., 2013, Cultivation of *Nannochloropsis salina* using aerobic digestion effluent as a nutrient source for biofuel production, *Appl. Energy*, 108, 486-492.
- Udman, N., Qi, Y., Danquah, M. K., Forde G. M., Hoadly A., 2010, Dewatering of microalgal cultures: A major bottleneck to algae-based fuels, *J. Renew. Sust. Energy.*, 2, 012701.
- Ugwu, C. U., Aoyagi, H., Uchiyama, H., 2008, Photobioreactors for mass cultivation of algae, *Bioresour. Technol.*, 99, 4021-4028.
- Wolf, F. R., Nonomura, A. M., Bassham, J. A., 1985, Growth and branched hydrocarbon production in a strain of *Botryococcus braunii*(Chlorophyta), *J. Phycol.*, 21, 388-396.
- Xiao, M., Shin, H. J., Dong, Q., 2013, Advances in cultivation and processing techniques for microalgal biodiesel: A review, *Korean J. Chem. Eng.*, 30, 2119-2126.
- Xu, H., Miao, X., Wu, Q., 2006, High quality biodiesel production from a microalga *Chlorella protothecoides* by heterotrophic growth in fermenters, *J. Biotechnol.*, 126(4), 449-507.

---

• 권성현, 경상대학교 해양과학대학 해양환경공학과 교수  
shkwon@gnu.ac.kr

• 조대철, 순천향대학교 에너지환경공학과 교수  
daechul@sch.ac.kr