



저작자표시-비영리-변경금지 2.0 대한민국

이용자는 아래의 조건을 따르는 경우에 한하여 자유롭게

- 이 저작물을 복제, 배포, 전송, 전시, 공연 및 방송할 수 있습니다.

다음과 같은 조건을 따라야 합니다:



저작자표시. 귀하는 원저작자를 표시하여야 합니다.



비영리. 귀하는 이 저작물을 영리 목적으로 이용할 수 없습니다.



변경금지. 귀하는 이 저작물을 개작, 변형 또는 가공할 수 없습니다.

- 귀하는, 이 저작물의 재이용이나 배포의 경우, 이 저작물에 적용된 이용허락조건을 명확하게 나타내어야 합니다.
- 저작권자로부터 별도의 허가를 받으면 이러한 조건들은 적용되지 않습니다.

저작권법에 따른 이용자의 권리는 위의 내용에 의하여 영향을 받지 않습니다.

이것은 [이용허락규약\(Legal Code\)](#)을 이해하기 쉽게 요약한 것입니다.

[Disclaimer](#)

공 학 석 사 학 위 논 문

해조류 및 목질계 바이오매스 가수분해물을
이용한 *Chlorella saccharophila*
배양 및 유용물질 생산



2016년 2월

부 경 대 학 교 대 학 원

생 물 공 학 과

김 아 람

공 학 석 사 학 위 논 문

해조류 및 목질계 바이오매스 가수분해물을
이용한 *Chlorella saccharophila* 배양
및 유용물질 생산

지도교수 정 귀 택

이 논문을 석사 학위논문으로 제출함.

2016년 2월

부 경 대 학 교 대 학 원

생 물 공 학 과

김 아 람

김아람의 공학석사 학위논문을 인준함

2016년 2월



위 원 장	공학박사	김 성 구	
위 원	공학박사	김 중 균	
위 원	공학박사	정 귀 태	

목차

List of Tables	iv
List of Figures	v
Abstract	vii

Chapter I

Chlorella saccharophila 배양 배지의 최적화

1. 서론	1
2. 재료 및 방법	3
2.1. 사용 균주	3
2.2. 배양 조건	3
2.3. 배양 배지 최적화	3
2.3.1. 배지 종류의 영향	3
2.3.2. 배양 방법의 영향	9
2.3.3. 접종량의 영향	9
2.3.4. 탄소원 종류의 영향	9
2.3.5. 탄소원 농도의 영향	9
2.3.6. 질소원 종류의 영향	10
2.3.7. 질소원 농도의 영향	10
2.4. 분석 방법	10
2.4.1. 클로렐라 수확	10
2.4.2. Cell density 측정	10
2.4.3. 오일 추출 및 함량 측정	11

2.4.4. 클로로필 추출 및 함량 측정	11
3. 결과 및 고찰	13
3.1. 배지 종류의 영향	13
3.2. 배양 방법의 영향	15
3.3. 접종량의 영향	17
3.4. 탄소원 종류의 영향	20
3.5. 탄소원 농도의 영향	22
3.6. 질소원 종류의 영향	24
3.7. 질소원 농도의 영향	26
3.8. 최적 조건에서 <i>C. saccharophila</i> 배양	28
4. 결론	30
참고문헌	31

Chapter II

목질계 및 해조류 바이오매스 가수분해물을 이용한 *C. saccharophila* 배양

1. 서론	35
2. 재료 및 방법	38
2.1. 목질계 바이오매스	38
2.2. 해조류 바이오매스	38
2.3. 바이오매스 전처리 및 효소당화	38
2.3.1. 목질계 바이오매스 전처리	38
2.3.2. 해조류 바이오매스 전처리	39
2.3.2.1. Sulfuric acid pretreatment	39

2.3.2.2. Citric acid pretreatment	39
2.3.3. 효소 당화	39
2.4. 바이오매스 배지 조성 및 배양 조건	40
2.5. 분석 방법	41
2.5.1. 클로렐라 수확	41
2.5.2. Cell density 측정	41
2.5.3. 오일 추출 및 함량 측정	41
2.5.4. 클로로필 추출 및 함량 측정	42
2.5.5. 환원당 분석	42
3. 결과 및 고찰	43
3.1. 바이오매스 전처리 및 효소당화 결과	43
3.2. 바이오매스 가수분해물을 이용한 <i>C. saccharophila</i> 성장	46
3.2.1. 목질계 바이오매스 유래 당을 이용한 <i>C. saccharophila</i> 성장	46
3.2.2. 해조류 유래 당을 이용한 <i>C. saccharophila</i> 성장	52
4. 결론	57
참고문헌	58
감사의 글	62

List of Tables

Chapter I

Table 1. PG medium composition	4
Table 2. JM medium composition	5
Table 3. JMS medium composition	6
Table 4. BG11 medium composition	7
Table 5. f/2 medium composition	8

Chapter II

Table 1. Chemical composition of seaweed in Korea	37
Table 2. Results of hydrolysis of lignocellulosic biomass	44
Table 3. Marine hydrolysates reducing sugar with pretreatment types and enzymatic hydrolysis	45

List of Figures

Chapter I

Fig. 1. Effect of medium kind of the growth of <i>C. saccharophila</i>	14
Fig. 2. Effect of light and dark condition on the growth of <i>C. saccharophila</i>	16
Fig. 3. Effect of inoculum size on the growth of <i>C. saccharophila</i> in mixotroph with light source.	18
Fig. 4. Effect of inoculum size on the growth of <i>C. saccharophila</i> in heterotroph without light source.	19
Fig. 5. Effect of sugar kind on the growth of <i>C. saccharophila</i> . (a) Cell growth curve, (b) Productivity.	21
Fig. 6. Effect of glucose concentration on the growth of <i>C. saccharophila</i> . (a) Cell growth curve, (b) Productivity.	23
Fig. 7. Effect of nitrogen source kind and concentration on the growth of <i>C. saccharophila</i>	25
Fig. 8. Effect of nitrogen source concentration on the growth of <i>C. saccharophila</i>	27
Fig. 9. Effect of optimization condition medium on the growth of <i>C. saccharophila</i> (a) Cell density, (b) Product.	29

Chapter II

Fig. 1. Effect of not dried lignocellulosic hydrolysates on the growth of <i>C. saccharophila</i> . (a) TRS is total reducing sugar, and CD is cell
--

density (b) Products. Barley straw (B), rice straw (Rice), rapeseed straw (R).	48
Fig. 2. Effect of not dried lignocellulosic hydrolysates on the growth of <i>C. saccharophila</i> on 12 day. (a) Cell growth rate and productivity, (b) Products.	49
Fig. 3. Effect of lignocellulosic hydrolysates on the growth of <i>C. saccharophila</i> on on 12 day. (a) Before activated carbon treatment, (b) After activated carbon treatment.	50
Fig. 4. Effect of after activated carbon treatmentlignocellulosic hydrolysates on the growth of <i>C. saccharophila</i> on 12 day. (a) Cell growth rate and productivity, (b) Products.	51
Fig. 5. Effect of before activated carbon treatment marine hydrolysates on the growth of <i>C. saccharophila</i> on 12 day. <i>Undaria pinnatifida</i> (U), and <i>Laminaria japonica</i> (L), <i>Enteromorpha intestinali</i> (E), and <i>Gracilaria verrucosa</i> (G).	54
Fig. 6. Effect of after activated carbon treatment marine hydrolysates on the growth of <i>C. saccharophila</i> . TRS is tatal reducing sugar, and CD is cell density. (a) <i>Undaria pinnatifida</i> (U), and <i>Laminaria japonica</i> (L), (b) <i>Enteromorpha intestinali</i> (E), and <i>Gracilaria verrucosa</i> (G).	55
Fig. 7. Cell growth rate and productivity of after activated carbon treatment marine hydrolysates on the growth of <i>C. saccharophila</i> on 12 day. (a) Cell growth rate and productivity, (b) Products. <i>Undaria</i> <i>pinnatifida</i> (U), and <i>Laminaria japonica</i> (L), <i>Enteromorpha intestinali</i> (E), and <i>Gracilaria verrucosa</i> (G).	56

Culture of *Chlorella saccharophila* and production of useful materials using
lignocellulosic and marine biomass hydrolysates

A-Ram Kim

Department of Biotechnology, The Graduate School,
Pukyong National University

Abstract

This study was culture of *Chlorella saccharophila* and production of useful materials using lignocellulosic and marine biomass hydrolysates. First studied optimization of *C. saccharophila* culture medium. This study factor was medium type, culture type, inoculum size, sugar kind and nitrogen source type. Culture was conducted in a shaking incubator and the reaction temperature is 25°C and agitated at 120 rpm. The used carbon sources tested in this study were fructose, mannose, lactose, sucrose, xylose, galactose, glycerol and some concentration glucose. Nitrogen sources were NH_4NO_3 , urea, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, casein, yeast extract, peptone, corn steep solid and some concentration KNO_3 and NaNO_3 . The 30 g/L glucose and 0.950 g/L NaNO_3 were found to be the best carbon and nitrogen source and concentration. Experiment result, oil content and chlorophyll content was 57.00% and 4.73% on 12 day. Used lignocellulosic hydrolysates, not dried rapeseed straw oil content and chlorophyll content was 31.75% and 5.56%, and after activated carbon treatment rapeseed straw oil content was 31.15% and barley straw chlorophyll content was 5.24% on 12 day. And used marine hydrolysates, after activated carbon treatment *U. pinnatifida* oil and chlorophyll content was 31.50% and 6.26% on 12 day.

Chapter I

Chlorella saccharophila

배양 배지의 최적화



1. 서론

현대 사회에서 재생에너지의 개발과 이용에 대한 관심이 증가하고 있다. 이로 인해 재생 가능한 자원으로부터 바이오 연료와 화학제품 등을 생산하고자 열화학적 또는 생물학적 공정 연구가 각광받고 있으며, 더 나아가 최근에는 기존에 이용해오던 육지의 바이오매스인 곡류와 목질계에서 벗어나 해양 자원인 해조류를 이용하고자 하는 연구가 활발하게 이루어지고 있다 [1-5].

해조류는 미세조류와 거대조류로 나뉜다. 이들은 광합성을 하는 엽록소를 가진 식물이며, 광합성을 통해 햇빛에서 에너지를 얻어 이산화탄소를 탄소원으로 사용하는 독립영양 미생물이다. 이들의 성장은 매우 빠르고 들판에서 자라는 육상 식물과는 달리 물속에서 자라기 때문에 3차원적으로 자란다. 따라서 육상 식물 보다 단위 면적당 생산성이 우수하며, 이러한 이유로 육상 식물보다 생산성이나 식량경쟁의 측면에서 우수한 자원이라고 평가받고 있다. 또한 다양한 종(species), 수확장소 및 시기에 따라 탄수화물 및 지질의 함량과 구성이 매우 다양하다. 이로 인해 해조류는 바이오매스로서 이용 가능성이 뛰어나다고 알려져 있다 [6-10].

해조류 중 거대 조류는 주로 바이오 에탄올 생산에 이용된다. 이들은 대부분 일차적으로 물리적, 화학적 그리고 생물학적인 방법을 사용하여 당 (sugar)을 얻은 후, 이차적으로 열화학적인 또는 생물학적 공정을 통하여 바이오 에탄올을 생산하는 연구가 수행된다. 이들 연구에서 대표적으로 사용되는 방법으로 고온고압의 열수를 이용하는 방법 [11], 산 또는 알칼리와 열수 처리를 병행하여 사용하는 방법 [12]이 있으며, 또 다른 방법으로는 효소나 이온성 액체를 이용하는 방법 [8, 12, 13], 마이크로웨이브나 초음파를 이용하는 방법 등이 존재 한다 [11-14].

미세조류는 바이오 에탄올을 생산하는 거대조류와는 다르게 유기물과 질소, 인 성분을 기질로써 사용하는 특성을 이용해 미세조류를 사용하여 영양염류 제거에 관한 연구 [15, 16], 지구 온난화 현상의 주원인인 이산화탄소를 제거하기 위해서 광합성 등의 생물학적 이산화탄소 고정화 공정에 관한 연구 [17], 또는 폐수 등에 포함된 중금속 흡착 등의 환경 문제를 해결하기 위한 연구가 진행되고 있다. 생산적인 측면으로는 미세조류로부터 지질을 추출해 바이오디젤을 생산하거나 생리활

성물질을 추출하여 항염증이나 생리활성기능을 가지는 물질을 밝혀내고 이들의 추출과 정제, 그리고 효능에 관한 연구 역시 진행되고 있다. 이를 위해 광도, CO₂, 염도, 온도, pH 등의 미세조류 배양의 여러 가지 조건에 대한 최적화 연구도 함께 진행되고 있다 [18].

클로렐라는 미세조류 녹조류의 한 종류이며 단세포로서 구형이며 녹색을 의미하는 그리스어 'chloros'와 작다는 뜻의 라틴어 'ella'의 합성어이다. 1890년 네덜란드의 Beterink에 의해 보고되었으며 공식적인 이름은 이때 명명 되었다. 클로렐라에는 엽록소가 포함되어 있어 광합성이 가능하며, 광합성을 통해 에너지 활동이 가능하다. 이를 이용하여 LED를 통해 파장을 달리하여 클로렐라의 배양이 활발히 이루어지고 있으며 이는 적색 파장에서 성장이 가장 우수한 것으로 알려져 있다 [19].

클로렐라의 또 다른 유용한 면은 바이오 디젤을 생산할 수 있다는 점이다. 일부 클로렐라의 경우 특수한 조건에서 lipid를 다량 축적하는데 이를 대량 배양하기 위해 여러 연구가 진행되고 있으며 [20, 21, 22], 또한 이로부터 lipid를 회수, 정제하는 연구 또한 진행되고 있다 [23, 24, 25].

본 연구에서는 유용물질을 생산하기 위해 녹조류 단세포의 일종인 *Chlorella saccharophila* (kruga) Migua를 대량으로 배양하고자 클로렐라 배양 배지 조건의 최적화에 관한 연구를 진행하였다. *C. saccharophila*는 해양에서 분리되었으며 glycerol을 섭취하는 능력이 있다고 알려져 있고, lipid를 축적하여 바이오 디젤 생산에 새로운 가능성을 제시하고 있다 [26]. 일부 논문에 의하면 *C. saccharophila*는 배양 방법에 따라 10~47%의 lipid 함량을 가지며, 저농도의 glucose와 non-aerated 일 때 lipid 함량이 증가한다고 알려져 있다 [27].

2. 재료 및 방법

2.1. 사용균주

본 연구에 사용한 클로렐라는 *Chlorella saccharophila* (Kruger) Migula 이며, 한국미세조류은행 (KMMCC-195)에서 분양받은 것을 사용하였다.

2.2. 배양 조건

본 실험은 모두 동일한 shaking incubator (Vision Scientific Co., Ltd, Korea)에서 진행하였으며 shaking incubator 내의 배양 온도는 25℃, 교반속도 120 rpm 으로 고정하였다. 사용한 배양 용기는 250 mL erlenmeyer flask (DURAN, Germany)를 사용하였으며 입구는 알루미늄 호일을 사용하여 막아주었다. 클로렐라의 preculture는 100 mL erlenmeyer flask에 PG medium을 사용하여 한국미세조류은행에서 분양받은 *C. saccharophila*를 배양하여 실험에 사용하였다. 모든 배양은 조건마다 2회 반복 배양하였고 일정 시간마다 샘플을 취하여 분석하였다.

2.3. 배양 배지 최적화

2.3.1. 배지 종류의 영향

클로렐라의 배지에 따른 성장 차이를 알아보기로 다양한 배양 배지를 사용하여 배양을 하였다. 사용 배지는 각각 PG, JM, JMS, BGII, f/2이며, 사용된 배지의 조성은 Table 1부터 Table 5에 나타내었다. 탄소원으로 glucose를 10 g/L 첨가하였으며 접종 후 10일간 배양하였다. PG는 식물 세포 배양에 쓰이는 배지이며 JM, JMS, BG11 그리고 f/2는 미세조류의 배양에 주로 쓰이는 배지이다.

Table 1. PG medium composition

(Unit : mg/L Distilled water)

Component	Contents
KNO ₃	1900
CaCl ₂ ·2H ₂ O	440
MgSO ₄ ·7H ₂ O	370
KH ₂ PO ₄	170
MnSO ₄ ·H ₂ O	16.9
ZnSO ₄ ·7H ₂ O	8.6
H ₃ BO ₃	6.2
KI	0.83
Na ₂ MoO ₄ ·2H ₂ O	0.25
CuSO ₄ ·5H ₂ O	0.25
CoCl ₂ ·6H ₂ O	0.25
FeSO ₄ ·7H ₂ O	37.3
EDTA-Na ₂	27.8
Myo-inositol	10
Glycine	0.2
Nicotinic acid	0.05
Pyridoxine HCl	0.05
Thiamine HCl	0.1
Glucose	10g

Table 2. JM medium composition

(Unit : mg/L Distilled water)

Component	Contents
$\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	20
KH_2PO_4	12.4
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	50
NaHCO_3	15.9
EDTA-FeNa	2.5
EDTA-Na ₂	2.5
H_3BO_3	2.48
$\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	1.39
$(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24} \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	1
Vitamin B12	0.04
Thiamine HCl	0.04
Biotin	0.04
NaNO_3	80
$\text{NaHPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$	36

Table 3. JMS medium composition

(Unit : mg/L Filtered natural seawater)

Component	Contents
$\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	20
KH_2PO_4	12.4
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	50
NaHCO_3	15.9
EDTA-FeNa	2.5
EDTA-NA ₂	2.5
H_3BO_3	2.48
$\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	1.39
$(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24} \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	1
Vitamin B12	0.04
Thiamine HCl	0.04
Biotin	0.04
NaNO_3	80
$\text{NaHPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$	36

Table 4. BG11 medium composition

(Unit : mg/L Distilled water)

Component	Contents
NaNO ₃	1500
K ₂ HPO ₄	40
MgSO ₄ ·7H ₂ O	75
Citric acid	36
Ammonium ferric citrate green	6
CaCl ₂ ·2H ₂ O	6
EDTA-Na ₂	1
Na ₂ CO ₃	20
H ₃ BO ₃	2.86
MnCl ₂ ·4H ₂ O	1.81
ZnSO ₄ ·7H ₂ O	0.22
Na ₂ MoO ₄ ·2H ₂ O	0.39
CuSO ₄ ·5H ₂ O	0.08
Co(NO ₃) ₂ ·6H ₂ O	0.05

Table 5. f/2 medium composition

(Unit : mg/L Filtered natural seawater)

Component	Contents
NaNO ₃	75
NaH ₂ PO ₄ ·9H ₂ O	50
Na ₂ SiO ₃ ·9H ₂ O	30
FeCl ₃ ·6H ₂ O	3.15
Na ₂ EDTA·2H ₂ O	4.36
CuSO ₄ ·5H ₂ O	9.8
Na ₂ MoO ₄ ·2H ₂ O	6.3
ZnSO ₄ ·7H ₂ O	22
CoCl ₂ ·6H ₂ O	10
MnCl ₂ ·4H ₂ O	180
Vitamine B ₁₂	0.0065
Biotin	0.0065
Thiamine HCl	0.1

2.3.2. 배양 방법의 영향

클로렐라의 배양 형태를 결정하기 위해 3가지 형태로 배양하였으며, 위 실험에서 선택된 PG배지에서 빛과 탄소원을 조건으로 하였다. 먼저 광합성에 따른 성장을 보기 위해 탄소원을 제공하지 않고 광원만 제공한 autotroph, 빛이 없는 환경에서 탄소원을 소비하는 호흡에 대한 성장을 알아보기 위한 heterotroph, 그리고 광원과 탄소원 모두 제공한 mixotroph, 3가지 형태로 배양하였다.

2.3.3. 접종량의 영향

클로렐라의 초기 접종량에 따른 성장을 알아보기 위해 위 실험에서 성장이 우수한 PG배지를 사용하였으며, 접종량은 배지의 1%, 2%, 3%, 4% 그리고 6% 로 설정하여 mixotroph으로 배양하였다. 배지별 초기 흡광도는 spectrophotometer를 사용하여 660 nm 파장에서 측정하였으며, 각각 1%에서 0.166, 2%에서 0.270, 3%에서 0.399, 4%에서 0.467 그리고 6%에서 0.676이었다.

2.3.4. 탄소원 종류의 영향

탄소원의 종류에 따른 클로렐라 배양 영향을 알아보기 위해 위 실험으로 선택된 PG배지에 8가지의 탄소원을 각기 다르게 첨가하여 배양하였으며, 각각 10 g/L 첨가 후 배양하였다. 사용한 탄소원은 각각 fructose, mannose, lactose, sucrose, xylose, galactose, glycerol 그리고 glucose이다. 그리고 접종량 실험을 고려해 접종량을 3% 내외로 하여 접종 후 12일간 배양하였다.

2.3.5. 탄소원 농도의 영향

Glucose의 농도에 따른 클로렐라 배양 영향을 알아보기 위해 glucose를 10 g/L, 20 g/L, 30 g/L, 40 g/L 포함하는 배지를 각각 제작하였으며, 접종량 실험을 고려

하여 접종량은 3% 내외로 하여 접종 후 8일간 배양하였다.

2.3.6. 질소원 종류의 영향

질소원의 종류에 따른 클로렐라의 배양 영향을 알아보기 위해 질소원의 농도를 1.9 g/L 포함하는 배지를 제작하였으며, 탄소원으로 30 g/L의 glucose를 첨가하였다. 사용한 질소원의 9가지로 NH_4NO_3 , urea, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, casein, yeast extract, peptone, corn steep solid, KNO_3 그리고 NaNO_3 이고 KNO_3 과 NaNO_3 는 0.95 g/L 농도 실험을 동시에 진행하였다. 접종량은 3% 내외로 하여 접종 후 8일간 배양하였다.

2.3.7. 질소원 농도의 영향

질소원의 농도에 따른 클로렐라 배양 영향을 알아보기 위해 위 실험 결과를 토대로 선택된 NaNO_3 을 0.475 g/L, 0.950 g/L, 1.425 g/L 포함하는 3가지 배지를 제작하였으며 glucose의 농도는 위 실험과 동일한 30 g/L로 설정하였다. 접종량 실험을 고려하여 접종량은 3% 내외로 하여 접종 후 10일간 배양하였다.

2.4. 분석 방법

2.4.1. 클로렐라 수확

클로렐라의 지질함량 및 성분 분석을 위해 클로렐라를 수확하였으며, 수확방법은 원심분리기를 사용해 배지와 클로렐라를 분리한 다음 증류수를 사용하여 수확한 클로렐라에 남아있는 배지를 제거하는 washing 과정을 2회 반복하였다. Washing을 마친 클로렐라는 동결 건조하고 분쇄하여 암실에서 냉장보관 하였다.

2.4.2. Cell density 측정

클로렐라의 성장을 측정하기 위해 흡광도를 spectrophotometer (SPEKOL 1300, Analytik Jena)를 사용해 660 nm 에서 측정하여 표준곡선을 이용하여 건조 세포 농도로 환산하여 나타내었다. 우선 12일간 배양한 클로렐라를 수확하여 원심분리기를 사용해 배지와 클로렐라를 분리하고 상등액을 제거하였다. 이후 증류수를 첨가하여 vortex를 사용해 균일하게 혼합하였다. 이후 수분측정기를 사용하여 일정량의 샘플에 포함된 클로렐라의 건조중량을 얻었으며, 이를 g/L로 환산하였다. 그리고 샘플을 일정 비율로 희석하여 흡광도를 측정하고 이를 통해 흡광도에 따른 cell 건조중량을 계산하고 이를 그래프로 나타내어 다음과 같이 표준곡선을 얻었다.

$$y = 0.5351x - 0.016 \quad (R^2 = 0.995)$$

이때 x는 측정된 흡광도 값이며, y는 cell density (g/L)이다.

2.4.3. 오일 추출 및 함량 측정

오일 추출 방법은 Bligh and Dyer method [28]를 이용하였다. 동결 건조된 클로렐라를 10 mg cell에 5 mL의 DW를 첨가하여 homogenizer를 사용해 클로렐라 cell을 파쇄 한다. 분쇄된 cell에 chloroform과 methanol을 1:2 비율 (3 mL:6 mL)로 첨가한 다음 5분간 vortexing하고 원심분리기를 사용해 5000 rpm으로 10분간 원심분리하여 cell debris를 제거한다. 이후 chloroform과 DW를 1:1비율 (6 mL:6 mL)로 첨가하여 5분간 vortexing 후 다시 2000 rpm에서 10분간 원심분리를 하여 층 분리를 한다. Lipid는 아래층의 chloroform을 회수하여 상온에서 건조하고 무게를 측정하여 처음 무게와 비교하여 % of dcw (오일무게/건조중량*100)을 계산하였다.

2.4.4. 클로로필 추출 및 함량 측정

색소 함량을 분석하기 위해 10 mL의 methanol에 10일 동안 배양하고 동결 건

조한 *C. saccharophila*을 10 mg을 첨가한 다음 균일하게 혼합하였다. 60℃에서 30 분간 용출시킨 후 666 nm와 653 nm에서 흡광도를 측정하여 다음과 같은 식을 사용하여 색소의 양을 계산하였다 [29].

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

이때 A는 absorbance로 흡광도이고 653과 666은 spectrophotometer가 내는 각각의 파장을 의미한다.



3. 결과 및 고찰

3.1. 배지 종류의 영향

배지 종류에 따른 클로렐라의 성장을 알아보기 위해 5가지 배지를 사용하여 배양하였다. 사용한 배지는 PG, JM, JMS, f/2 그리고 BG11 이며, Fig. 1은 10일간 5가지 배지에서 배양 후 측정한 클로렐라의 성장 그래프이다. 배양 결과 PG 배지에서 가장 높은 농도(1.99 ± 0.13 g/L)를 보였다. 이는 미세조류 배지인 f/2, JM 배지(1.68 ± 0.10 g/L)보다 높은 성장을 보이는 것이다. 그러나 cell growth rate를 고려하였을 때 PG배지에서 1.35 ± 0.09 g/L이고 f/2에서 1.16 ± 0.07 day⁻¹인데 반해, cell density가 낮은 JM배지에서 1.35 ± 0.06 day⁻¹의 높은 수치를 보였다. 그렇지만 추후 대량 배양 및 product의 생산을 고려할 때 이 실험에서 cell growth rate가 큰 영향을 주지 않을 것이라고 판단하였다. 따라서 본 실험 이후에서는 클로렐라의 대량 배양에 PG배지를 선택하였다.



Fig. 1. Effect of medium kind of the growth of *C. saccharophila*.

3.2. 배양 방법의 영향

배양 방법에 따른 *C. saccharophila*의 성장 정도를 알아보기 위해 3가지 형태로 배양 하였으며 10일 후 성장정도를 Fig. 2에 나타내었다. 먼저 광원과 알루미늄 캡을 사용한 autotroph에서 다른 두 배양 형태보다 현저히 낮지만 (0.22 ± 0.00 g/L), 초기 접종량과 비교했을 때 미량 성장한 것을 확인할 수 있었다. 이는 본 클로렐라가 자가 영양생물이며, 탄소원이 없는 환경에서 광합성만으로 성장은 가능함을 보여주는 것이다. 그러나 autotroph에서 원하는 농도까지 배양하는 시간과 광원에 대한 효율을 고려했을 때, 대량 생산을 하기 위한 배지 조성 연구에 적합한 배양 형태가 아니라고 판단되었다. 그리고 광원을 제공하지 않고 탄소원을 제공한 heterotroph에서는 어느 정도 높은 성장 (3.79 ± 1.19 g/L)을 확인할 수 있었다. 이는 앞의 autotroph (0.22 ± 0.00 g/L)과 비교했을 때 빛보다는 탄소원의 제공이 클로렐라 배양에 조금 더 중요한 것이라고 생각되는 부분이다. 그리고 이것은 2가지를 모두 제공한 mixotroph (5.83 ± 0.66 g/L)에서 확인할 수 있으며, 3가지 배양 결과와 비교했을 때 본 클로렐라 배양에는 광원이나 탄소원만을 제공하는 것 보다는 2가지 모두 제공할 때 가장 효율이 높은 것으로 판단된다. Cell growth rate 또한 ($4.53 \pm 0.72 \text{ day}^{-1}$) 향상되는 것을 확인하였다. 따라서 이후 실험은 mixotroph로 수행하였다.



Fig. 2. Effect of light and dark condition on the growth of *C. saccharophila*.

3.3. 접종량의 영향

접종량에 따른 *C. saccharophila*의 성장 정도를 알아보기 위해 PG 배지에서 접종량을 각각 배지의 1%, 2%, 3%, 4% 그리고 6%를 접종하였다. 각각의 초기 흡광도는 spectrophotometer를 사용하여 660 nm파장에서 측정하였을 때 1%에서 0.166, 2%에서 0.270, 3%에서 0.390, 4%에서 0.467, 그리고 6%에서 0.676 이었으며 mixotroph으로 접종 10일 후 성장 정도를 Fig. 3에 나타내었다. 그 결과 초기 접종량이 증가함에 따라 성장 역시 증가하는 것으로 나타났다. 그러나 1% (3.80 ± 0.62 g/L)를 접종한 배지와 2% (5.82 ± 0.66 g/L)를 접종한 배지를 비교했을 때 약 50%의 성장 차이를 보이나, 3% (6.46 ± 0.31 g/L)를 접종한 배지와 6% (7.35 ± 0.01 g/L)를 접종한 배지를 비교할 때 약 14%의 성장을 차이를 보여 6%의 성장률은 접종량에 비해 효율이 현저히 낮음을 보였다. 이는 클로렐라 배양에 초기 접종량이 성장에 영향을 미치며 일정 농도 이상의 초기 접종량은 그 효율이 떨어지는 것으로 생각된다. 특히 3% (6.46 ± 0.31 g/L)를 접종한 배지와 4% (6.50 ± 0.35 g/L)를 접종한 배지에서는 성장의 차이가 거의 나타나지 않는 것으로 나타났다. 마찬가지로 cell growth rate가 접종량이 증가함에 따라 오히려 감소하는 것을 확인할 수 있다.

그리고 heterotroph에서 마찬가지로 접종량을 2%, 3%, 4%로 하여 10일간 배양하였다. 각각의 초기 흡광도는 spectrophotometer를 사용하여 660 nm파장에서 측정하였을 때 2%에서 0.262, 3%에서 0.360, 4%에서 0.484이었다. 접종 10일 후 성장 정도를 Fig. 4에 나타내었으며, heterotroph에서는 mixotroph과는 반대로 접종량이 증가할수록 성장이 감소하는 것으로 나타났다. Productivity 또한 감소하는 것으로 나타났다. 이는 heterotroph에서 한정된 탄소원만 제공될 때 필요 이상의 초기 접종량은 오히려 비효율적이라는 것을 나타낸다. 따라서 본 실험에서 mixotroph이 이상적인 배양 형태임이 확인되었으며 이러한 점들을 기초로 하여 이후 실험의 초기 접종량 기준을 배지의 3% 내외로 결정하였다.



Fig. 3. Effect of inoculum size on the growth of *C. saccharophila* in mixotroph with light source.



Fig. 4. Effect of inoculum size on the growth of *C. saccharophila* in heterotroph without light source.

3.4. 탄소원 종류

탄소원의 종류에 따른 클로렐라 배양 영향을 알아보기 위해 PG 배지에 8가지의 탄소원을 각각 첨가하여 배지를 제작하였고, 접종량을 3%로 하였다. 첨가된 탄소원의 농도는 10g/L 이며, 12일간 배양하였다(Fig. 5(a)). 사용한 탄소원은 fructose, mannose, lactose, sucrose, xylose, galactose, glycerol 그리고 glucose이다. 배양 결과 fructose (6.35 ± 0.11 g/L)에서 가장 높은 성장을 보였으며, 그 다음으로 glucose (5.48 ± 0.00 g/L)가 높은 성장을 보였다. 이는 본 클로렐라가 알도헥소스인 glucose보다 케토헥소스인 fructose를 선호하는 것을 보여준다. 또한 대부분의 탄소원에서 12일 정도에 성장이 감소하였으나 galactose (4.40 ± 0.00 g/L)의 경우 오히려 성장이 급증하는 것을 보여주었다. 이는 클로렐라가 10일 이후 비 선호 탄소원인 galactose를 이용하기 위해 diauxic growth가 시작된 것으로 보여진다. Productivity (Fig. 5(b))에서도 비슷한 양상을 나타내었다. 그러나 본 실험에서는 경제적인 면과 클로렐라의 성장을 고려하여 fructose가 아닌 glucose를 탄소원으로 선택하였다.



Fig. 5. Effect of sugar kind on the growth of *C. saccharophila*. (a) Cell growth curve, (b) Productivity.

3.5. 탄소원 농도

탄소원의 농도에 따른 클로렐라 배양 영향을 알아보기 위해 PG 배지에 glucose를 각각 10 g/L, 20 g/L, 30 g/L, 40 g/L 첨가하여 배지를 제작하였으며, 접종량을 3%로 하여 클로렐라를 12일간 배양하였다. 배양 결과는 Fig. 6(a)에 나타내었으며 대체적으로 glucose의 농도가 증가할수록 성장률 역시 증가하는 추세를 보였다. 그러나 가장 높은 농도인 40 g/L (7.74 ± 0.74 g/L)에서는 오히려 30 g/L (8.89 ± 0.87 g/L)보다 성장이 낮은 것을 확인할 수 있었다. 이것은 cell growth rate (Fig. 6(b))에서도 확인이 가능하며, 이는 본 클로렐라 배양시 높은 농도의 glucose가 기질저해를 일으키는 것으로 생각된다. 따라서 본 실험에서는 가장 높은 성장을 보여준 30 g/L에서 배양하는 것으로 결정하였다.

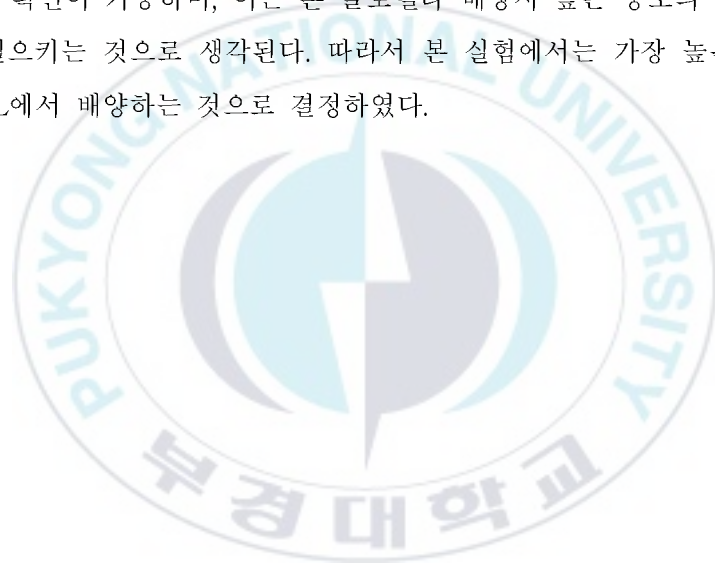




Fig. 6. Effect of glucose concentration on the growth of *C. saccharophila*.
(a) Cell growth curve, (b) Productivity.

3.6. 질소원 종류

질소원의 종류와 농도에 따른 클로렐라 배양 영향을 알아보기 위해 30g/L의 glucose를 포함하는 PG 배지에 9가지 질소원을 각각 첨가하여 배지를 제작하였고, 클로렐라를 3% 접종하여 8일간 배양하였다 (Fig. 7). 첨가한 질소원의 종류는 NH_4NO_3 , urea, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, casein, yeast extract, peptone, corn steep solid, KNO_3 그리고 NaNO_3 이며, KNO_3 과 NaNO_3 은 2가지 농도 (0.95 g/L, 1.90 g/L)로 실험하였다. 배양 결과 NaNO_3 를 0.95 g/L 첨가한 배지 (8.45 ± 0.00 g/L)에서 클로렐라의 성장이 가장 높은 것으로 나타났다. Productivity의 그래프인 Fig. 7(b) 역시 $7.30 \pm 0.00 \text{ day}^{-1}$ 으로 가장 높았다. KNO_3 와 NaNO_3 에서 높은 농도인 1.90 g/L (1.91 ± 0.24 g/L와 2.19 ± 0.01 g/L)에서 오히려 성장이 감소하는 것으로 보아 탄소원과 동일하게 기질저해 작용을 하는 것으로 보였다. 또한 1.90 g/L를 첨가한 다른 질소원 실험보다 NaNO_3 에서 수율이 좋으므로 질소원의 종류를 NaNO_3 로 결정하였다.



Fig. 7. Effect of nitrogen source kind and concentration on the growth of *C. saccharophila*.

3.7. 질소원 농도

NaNO_3 를 질소원으로 선정하고 질소원의 농도에 관한 추가적인 실험을 진행하였다. 실험은 0.475 g/L 0.950 g/L 그리고 1.475 g/L의 NaNO_3 로 배지를 제작하였으며, 그 외 조건은 선행 실험과 동일하였다. 접종 후 10일간 배양하였으며, 그 결과를 Fig. 8에 나타내었다. 배양 결과 0.950 g/L NaNO_3 (7.34 ± 0.06 g/L)에서 성장이 가장 높음을 알 수 있었고, cell growth rate 면에서도 우수한 것을 확인하였다. 따라서 본 실험의 결과를 바탕으로 클로렐라 배양시 질소원은 0.950 g/L의 NaNO_3 가 적절하다고 판단하였다.





Fig. 8. Effect of nitrogen source concentration on the growth of *C. saccharophila*.

3.8. 최적 조건에서 클로렐라 배양

모든 실험 결과를 종합하여 배지 조건의 최적화를 하였으며, 본 실험 조건으로 클로렐라를 12일간 배양하였고 그 결과는 Fig. 9에 나타냈다. 실험 결과 시간이 경과함에 따라 클로렐라의 cell density, 그리고 productivity는 증가하는 추세였으나, 10일 이후 감소하였다. 그러나 oil 함량의 경우에는 12일까지 증가하는 것을 확인할 수 있다. 이러한 사실은 10일 이후 배지의 영양성분이 대부분 고갈되면서 발생하는 환경적 스트레스에 기인해 oil의 함량이 오히려 증가한 것으로 보인다.





Fig. 9. Effect of optimization condition medium on the growth of *C. saccharophila*. (a) Cell density, (b) Products.

4. 결론

*C. saccharophila*의 대량 배양을 위한 배지 최적화 실험을 진행하였다. 실험 결과 사용 배지는 PG 배지가 적합하며, 배양 형태는 광원과 탄소원을 모두 공급하는 mixotroph이 적절하였다. 초기 접종량 역시 회수되는 클로렐라 양을 고려할 때 배지의 3% 내외로 접종하는 것이 효율적이다. 배지에 첨가되는 질소원과 탄소원의 경우 탄소원은 glucose를 30 g/L를 첨가하고 질소원은 NaNO_3 으로 0.95 g/L를 첨가하는 것이 적절하였으며, 이를 초과할 경우 영양원에 의한 기질저해가 발생하는 것으로 추측된다. 마지막으로 실험으로 알아낸 최적 배지 조건으로 배양한 결과 oil의 함량은 12일에서 가장 높았으나, 회수되는 클로렐라의 양과 chlorophyll의 양은 10일에서 가장 높았다. 따라서 보다 많은 lipid를 회수하기 위해서 *C. saccharophila*의 배양 일을 12일로 하되, chlorophyll의 회수를 위한다면 배양 일을 10일로 하는 것이 적절하다고 판단된다.

참고문헌

1. Demibras, A. (2007) Progress and recent trends in biofuels. *Prog. Energy Combust. Sci.* 33: 1-18.
2. Hayes, D. J., Fitzpatrick, S., Hayes, M. H. B. and Ross, J. (2006) The biofine process : Production of levulinic acid, furfural, and formic acid from lignocellulosic feedstocks, pp. 139-164.
3. Kamm, B., Gruber, P. R. and M. Kamm (2008) Biorefineries : Industrial Processes and Products, WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim.
4. Jeong, G. T. (2014) Production of total reducing sugar and levulinic acid from brown macro-algae *Sargassum fulvellum*. *Korean J. Microbiol. Biotechnol.* 42: 177-183.
5. Werpy, T. and Petersen, G. (2004) Top value added chemicals from biomass, volume I : Results of screening for potential candidates from sugars and synthesis gas. The Pacific Northwest National Laboratory (PNNL) and the National Renewable Energy Laboratory (NREL).
6. Bitton, G. (1996) John Wiley & Sons, Wastewater Microbiology. WILEY-BLACKWELL.
7. Hamasaki, A., Shioji, N., Ikuta, Y., Hukuda, Y., Makita, T., Hirayama, K., Matuzaki, H., Tukamoto, T., sasaki, S. (1994) Carbon Dioxide Fixation by Microalgae Photosynthesis Using Actual Flue Gas from a Power Plant. *Biochem. Biotechnol.* 45(1): 799-809.
8. Song, B. B., Kim, S. K., and Jeong, G. T. (2011) Enzymatic hydrolysis of marine algae *Hizikia fusiforme*. *KSBB J.* 26: 347-351.
9. Yeon, J. H., Seo, H. B., Oh, S. H., Choi, W. S., Kang, D. H., Lee, H. Y. and Jung, K. H. (2010) Bioethanol production from hydrolysate of seaweed *Sargassum sagamianum*. *KSBB J.* 25:283-288.

10. Park, J. I., Woo, H. C., and Lee, J. H. (2008) Production of Bio-energy from Marine Algae: Status and Perspectives. *KICChE*. 46: 833-844.
11. Lee, S. M., J. H. Kim, H. Y. Cho, H. Joo, and J. H. Lee (2009) Production of bio-ethanol from brown algae by physicochemical hydrolysis. *J. Korean Ind. Eng. Chem.* 20: 517-521.
12. Kim, C. (2010) Saccharification of Gelidium amansii by acid hydrolysis to generate mixed sugars. M.S. Thesis. Kyung Hee University, Seoul, Korea.
13. Choi, D., H. S. Sim, Y. L. Piao, W. Ying, and H. Cho (2009) Sugar production from raw seaweed using the enzyme method. *J. Ind. Eng. Chem.* 15: 12-15.
14. Kim, D. H. and Jeong, G. T. (2014) Antimicrobial and antioxidant activities of extracts of marine greenalgae Enteromorpha intestinalis. *KSBB J.* 29: 92-97.
15. Hashimoto, S and Furukawa, k., (1989) Nutrient Removal from Secondary Effluent by Filamentous Algae, *J. Fermt. Bioeng.* 67(1): 62-69.
16. Banat, J., Puskas, K., Esen, I. Al-Dahar, R. (1990). Wastewater Treatment and Algal Productivity in an Integrated Ponding System, *Biol. Wastes*, 32(4): 265-275.
17. Wilde, E. W., Benemann, J. R. (1993) Bioremoval of Heavy Metals by the Use of Microalgae, *Biotechnol. adv.*, 11(4): 781-812.
18. Kandah, M., Abu Al-Rub F.A., Al-Dabaydeh, N., (2003) The Aqueous Adsorption of Copper and Cadmium Ions on Sheep Manure, *Adsorption Science Technolo.* 21(6): 501-509.
19. Atsushi, M. 1999. What is Chlorella. *Food Ind.* 9, 122-138.
20. Lee, J. Y. (2010) Fatty acids production from Chlorella sp. KR-1 using bubble-column photobioreactors. *KSBB J.* 4: 183-183.
21. Oh, S. H., Han, J. G., Ha, J. H., Kim, S. S., Jeong, M. H., Jeong, H. S., Kwon, M. C., Kim, N. Y., Lee, S. Y., Cho, J. H. and Yoon, W. B. (2009)

- Cell Growth and Lipid Production of *Chlorella minutissima* upon Cultivation Conditions in Fed-batch Culture. *KSBB. J.* 1: 169-169.
22. Cho, S. J., Lee, D. H., Luong, T. T., Park, S. R., Oh, Y. K. and Lee, T. H. (2011) Effects of Carbon and Nitrogen Sources on Fatty Acid Contents and Composition in the Green Microalga, *Chlorella* sp. 227. *J. Microbiol. Biotechnol.* 21(10): 1073-1080.
 23. Park, J. Y., Choi, S. A., Jeong, M. J., Nam, B. R., Oh, Y. K. and Lee, J. S. (2014) Extraction of microalgal lipid by hypochlorous acid. *KSNRE. J.* 73-73.
 24. Lee, H. S., Jeon, S. G., Oh, Y. K., Kim, K. H., Chung, S. H., Na, J. G. and Yeo, S. D. (2012) Recovery of Lipid from *Chlorella* sp. KR-1 via Pyrolysis and Characteristics Pyrolysis Oil. *Korean Chem. Eng. Res.*, 50(4): 672-677.
 25. Hong, Y. K., Kim, J. B. and Ng, K. Y. S. (2011) Extraction of Lipids form Microalgae Using Polar and Nonpola Bi-solvent Systems. *J. Korean Solar Energy Society.* 31(6): 66-71.
 26. Singh, D., Puri, M., Wilkens, S., Mathur, S. A., Tuli, K. D. and Barrow, J. C. (2013) Characterization of a new zeaxanthin producing strain of *Chlorella saccharophila* isolated from New Zealand marine waters. *Bioresource Technology.* 143: 308-314.
 27. Tan, K. C. and Johns, R. M. (1991) Fatty acid production by heterotrophic *Chlorella saccharophila*. *Hydrobiologia* 215(1): 13-19.
 28. 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.
 29. Kim, J. K., Park, H.J., Kim, Y. H., Joo, H., Lee, S. H., Lee, J. H (2013) UV-induced Mutagenesis of *Nannochloropsis oculata* for the Increase of Lipid Accumulation and its Characterization. *J. Korean Ind. Eng. Chem.* 24: 155-160.

Chapter II

목질계 및 해조류 바이오매스
가수분해물을 이용한
Chlorella saccharophila 배양

1. 서론

최근 재생에너지의 개발과 이용에 대한 관심으로 인해 재생 가능한 자원으로부터 열화학적 또는 생물학적 공정을 통해 다양한 바이오연료와 화학제품을 생산하고자 하는 연구가 이루어지고 있다. 재생 가능한 자원으로는 크게 3가지로 나뉘며 이를 1세대, 2세대, 3세대 바이오매스라고도 부른다. 1세대 바이오매스인 식량자원은 주로 사탕수수나 옥수수, 콩 등의 잉여식량자원이나 식물유를 활용한 것이다. 식량을 재배하는 과정에서 이산화탄소가 광합성을 통해 이산화탄소 고정으로 지구온난화에 긍정적인 영향을 준다. 그러나 식량자원을 에너지로 이용하는 것은 기아 등의 도덕적 문제와 효율의 문제가 발생한다. 또 한정된 경작지로 인해 수확량을 늘리기 위해 경작지를 늘려야 하며, 이는 또 다른 환경문제를 야기한다 [1-5].

이를 보완하는 것으로 식량자원을 생산하고 남은 부산물인 목질계 바이오매스가 있다. 목질계 바이오매스로는 콩이나 옥수수, 카사바 등의 식량자원을 생산하면서 발생하는 지푸라기, 혹은 산림 부산물이나 가로수에서 떨어지는 낙엽 등 식량자원을 제외한 나머지 비식용작물들이며, 이들의 개발은 식량 자원 사용의 문제점을 해결해준다 [6-8]. 목질계 바이오매스는 lignocelluloseic biomass라고도 하며 탄수화물 중합체인 cellulose, hemicellulose 그리고 방향족 중합체인 lignin으로 구성되어 있다. Cellulose, hemicellulose가 ester 또는 ether 결합으로 lignin에 단단히 결합되어 있으며 [9], 이들 결합은 식물체 구조의 안정성과 구조적 견고성을 유지시켜주는 것으로 결합을 끊기가 어렵다. 특히 리그닌은 생물학적으로 분해하기 난해한 물질로 바이오매스 발효에 저해제 역할을 한다. 따라서 목질계 바이오매스를 효율적으로 이용하기 위해서 리그닌의 제거시도가 많이 이루어졌다. 이에선 물리 화학적 전처리 등이 있으며, 현재까지 개발된 방법으로는 산 또는 염기를 이용한 열수처리 오존 전처리 등이 있다 [10-15].

리그닌이 제거된 목질계 바이오매스는 cellulase와 hemicellulase를 사용한 효소가수분해를 통해 중합체를 단당의 형태로 쪼개어 바이오매스 발효에 이용이 가능하다. 그러나 효소가수분해시 발생하는 자일로스와 오탄당 등은 바이오매스 발효에 있어 저해작용을 야기하여 효율을 감소시키므로 이를 해결하고자 하는 것이 이슈가 되고 있다 [16].

또 다른 바이오매스로 해조류가 있으며 해조류는 미세조류와 거대조류로 나뉜다. 이들은 광합성을 통해 햇빛에서 에너지를 얻으며 이산화탄소를 탄소원으로 사용하는 독립영양 미생물이며, 성장이 빠르고 육상 식물보다 단위 면적당 생산성이 우수하다. 이 때문에 육상 식물에 비해 생산성이나 식량경쟁의 측면에서 우수한 자원으로 주목받고 있다. 또한 다양한 종(species), 수확장소 및 시기에 따라 탄수화물 및 지질의 함량과 구성이 36~75%, 0~3%으로 매우 다양하며 특히 cellulose를 다수 함유하고 있어 바이오매스로서 이용 가능성이 뛰어나다고 알려져 있다 [17-22].

해조류 중 거대 조류는 홍조류, 갈조류, 녹조류로 나뉘며 이는 광합성을 하는 엽록소에 의해 결정된다. 거대조류는 주로 바이오 에탄올 생산에 이용되며 물리적, 화학적 그리고 생물학적인 방법을 사용하여 당 (sugar)을 얻은 후 열화학적인 또는 생물학적 공정을 통하여 바이오에탄올을 생산하고자 하는 연구가 수행되고 있다. 대표적인 방법으로는 고온고압의 열수를 이용하는 방법 [23], 산 또는 알칼리와 열수 처리를 병행하는 방법 [24]이 대표적이며, 효소나 이온성 액체를 이용하는 방법 [19, 23, 23], 마이크로웨이브나 초음파를 이용하는 방법 등이 있다 [23-25].

미세조류는 유기물과 질소, 인 성분을 기질로써 사용하며, 미세조류를 이용해 영양염류 제거에 관한 연구 [26-27]와 지구 온난화 현상의 주원인인 이산화탄소를 제거하기 위한 생물학적 이산화탄소 고정화 공정에 관한 연구 [18]와 더불어 중금속 흡착 등의 환경 문제를 해결하기 위한 연구가 진행되고 있다. 또 미세조류로부터 지질을 추출해 바이오디젤 생산하거나 생리활성물질을 추출하여 항염증이나 생리활성기능을 조사하는 등 각종 분야에서 폭넓은 관련 연구가 진행되고 있다. 이를 위해 광도, CO₂, 염도, 온도, pH 등의 미세조류 배양조건의 최적화 연구도 함께 진행되고 있다 [28].

본 연구에서는 목질계 바이오매스인 보릿대, 벼짚 그리고 유채대와 해조류 바이오매스인 미역, 다시마, 파래 그리고 꼬시래기를 전처리와 효소 가수분해를 통해 가수분해물을 얻고, 이를 미세조류의 일종인 *Chlorella saccharophila*를 배양 하는데 탄소원으로 이용 가능성이 있는지 여부를 살펴보았다.

Table 1. Chemical composition of seaweed in Korea [20] (Unit : % dry weight)

Componet	Brown	Red	Green
Specific name	<i>Undaria pinnatifida</i> <i>Laminaria japonica</i> <i>Hizikia fusiforme</i>	<i>Porphyra tenera</i> <i>Gelidium amansii</i> <i>Gracilaria verrucosa</i>	<i>Enteromorpha compressa</i> <i>Ulva lactuca</i> <i>Monostroma nitidum</i> <i>Codium fragile</i> <i>Capsosiphon fulvescens</i>
Water (%)	86-91	70-91	88-92
Carbohydrates (%)	36-60	40-75	41-53
Protein (%)	6-20	2-39	17-23
Lipid (%)	1-3	0-2	0-1
Cellulose (%)	10-13	3-9	5-10
Main carbohydrate	Cellulose Alginate Fucoidan Laminarin Mannitol	Cellulose Xylan Mannan Agar Carrageenan	Cellulose Mannose Xylan Starch

2. 재료 및 방법

2.1. 목질계 바이오매스

실험에 사용한 목질계 바이오매스는 보릿대 (barley straw), 벃짚 (rice straw) 그리고 유채대 (rapeseed straw)로 수확 후 건조하고 분쇄하여 실험에 사용하였다.

2.2. 해조류 바이오매스

사용한 해조류 바이오매스로는 건조된 미역(*Undaria pinnatifida*), 다시마 (*Laminaria japonica*), 파래(*Enteromorpha intestinalis*) 그리고 꼬시래기(*Gracilaria verrucosa*)를 분쇄하여 실험에 사용하였다.

2.3. 바이오매스 전처리 및 효소당화

2.3.1. 목질계 바이오매스 전처리

목질계 바이오매스의 리그닌을 제거하기 위한 전처리는 알칼리 전처리로서 7.9% NaOH를 사용하였으며 1 L bottle (DURAN, Germany)에서 진행하였다. 알칼리 전처리는 기존의 유채대를 사용한 논문을 참고하여 7.9%의 NaOH를 사용하였고, 반응 조건은 68.4℃, 5.5 시간 반응하였다. S/L ratio는 1:10으로 하였으며, shaking water bath (SciLab, Korea)에서 150 rpm으로 교반하여 반응을 진행시켰다. 전처리 이후 망을 사용하여 리그닌이 제거된 바이오매스와 용매를 분리하였으며, 증류수를 이용해 남아있는 NaOH를 제거해주고 pH 7까지 증류수를 사용하여 중화하였다. 그 다음 85℃의 dry oven에서 2일간 건조하였다 [28].

2.3.2. 해조류 바이오매스 전처리

2.3.2.1. Sulfuric acid pretreatment

효소 가수분해의 수율을 높이기 위해 해조류 바이오매스를 황산을 사용하여 전처리하였다. 다시마, 미역, 그리고 꼬시래기를 사용하였으며, 전처리에 사용한 황산의 농도는 100 mM로 바이오매스를 total volume의 13% (w/v)를 첨가하였다. 이후 autoclave를 사용하여 90분 동안 130℃로 반응하였다. 전처리가 끝난 해조류 바이오매스는 실온에서 충분히 식혀 효소 당화에 사용하기 위해 pH 4.8의 0.2 M citrate buffer와 증류수를 적절히 첨가하였다.

2.3.2.2. Citric acid pretreatment

효소 가수분해의 수율을 높이기 위해 파래에 citric acid를 사용하여 전처리하였다. 사용한 citric acid의 농도는 0.1 M이며 바이오매스의 S/L ratio는 1:10으로 하였다. 이후 autoclave를 사용하여 130℃에서 90분 동안 반응하였다. 전처리가 끝난 해조류 바이오매스는 실온에서 충분히 식혀 pH 4.8로 NaOH를 사용하여 중화하였다.

2.3.3. 효소 당화

목질계 바이오매스는 건조된 전처리물을 사용하였으며, 효소 당화시 pH 4.8의 0.05 M citrate buffer (S/L ratio는 1:10)를 사용하였다. 해조류 바이오매스는 전처리 후 중화된 균일한 가수분해물을 사용하였다. 반응은 50℃의 shaking water bath (SciLab, Korea)에서 150 rpm으로 2일간 진행하였다. 사용 용기는 1 L bottle (DURAN, Germany)을 사용하였다. 효소당화에 사용한 효소는 C-Tec2와 H-Tec2이며, C-Tec2와 H-Tec2를 1:0.1 비율로 균일하게 혼합한 효소 혼합물을 사용하였다. 효소의 양은 건조중량을 기준으로 5% (v/w)를 사용하였으며, 위 조건

을 통해 해조류와 목질계 가수분해물을 얻었다.

2.4. 바이오매스 배지 조성 및 배양 조건

바이오매스 가수분해물을 클로렐라 배양 배지로 사용하기 위해 우선 가수분해물을 원심분리하여 상등액을 회수하였고, 이를 DNS 법으로 환원당을 측정하였다. 그리고 각각의 가수분해물을 autoclave에서 121℃에서 15 min 반응시켜 가수분해물에 남아있는 효소를 변성시키고 가수분해물을 첨가하기 전 클로렐라의 성장을 저해하는 물질을 제거하기 위해 활성탄으로 여과하였다. 가수분해물 대비 5%의 활성탄을 첨가하고 25℃의 shaking water bath에서 150rpm으로 2시간 반응하였다. 이를 원심분리하여 활성탄을 제거하여 각각의 환원당을 측정하였고 Table 2와 Table 3에 결과를 나타내었다. 그리고 Chapter I의 실험 결과를 바탕으로 PG배지 성분을 각각의 가수분해물에 첨가하고 가수분해물 배지를 제작하였다.

이때 가수분해물의 환원당의 농도가 모두 다르므로 비슷한 탄소원 조건을 형성하기 위해 증류수를 적절히 첨가하여 환원당의 농도가 10 g/L가 되도록 희석하였다. 기준이 되는 10 g/L의 환원당은 순수 glucose를 첨가한 배지의 농도 실험인 Chapter I의 glucose 농도별 실험을 참고하였다. 이후 autoclave에서 121℃ 15min 반응시켜 멸균하여 클로렐라 배양에 사용하였다.

본 실험은 모두 동일한 shaking incubator (Vision Scientific Co., Ltd, Korea)에서 진행하였으며, 배양 온도는 25℃, 교반속도 120 rpm으로 배양하였다. 사용한 배양 용기는 250 mL erlenmeyer flask (DURAN, Germany)를 사용하였으며, 입구는 알루미늄 호일을 사용하여 막아주었다.

클로렐라의 preculture는 100 mL erlenmeyer flask에 PG medium을 사용하였고, 한국미세조류은행에서 분양받은 *Chlorella saccharophila* (Kruger) Migula (Strain number KMMCC-195)를 본 실험에 사용하였으며, 초기 접종량은 배지의 3% 내외를 접종하였다. 모든 배양은 조건마다 2회 반복하였으며 일정 시간마다 샘플을 취하여 분석한 다음 그래프로 나타내었다.

2.5. 분석 방법

2.5.1. 클로렐라 수확

클로렐라의 지질함량 및 성분 분석을 위해 클로렐라를 수확하였으며, 수확방법은 원심분리기를 사용하여 배지와 클로렐라를 분리한 다음, 증류수를 사용하여 수확한 클로렐라에 남아있는 배지를 제거하는 washing 과정을 2회 반복하였다. Washing을 마친 클로렐라는 동결 건조하고 분쇄하여 암실에서 냉장보관 하였다.

2.5.2. Cell density 측정

클로렐라의 성장을 측정하기 위해 흡광도를 분광광도계 (SPEKOL 1300, Analytik Jena)를 이용해서 660 nm에서 측정하여 표준곡선을 이용하여 건조 세포 농도로 환산하였다. 우선 12일간 배양한 클로렐라를 수확하여 원심분리기를 사용해 배지와 클로렐라를 분리하고 상등액을 제거하였다. 이후 증류수를 첨가하여 vortex를 사용해 균일하게 혼합하였다. 이후 수분측정기를 사용하여 일정량의 샘플에 포함된 클로렐라의 건조중량을 얻었으며, 이를 g/L로 환산하였다. 그리고 샘플을 일정 비율로 희석하여 흡광도를 측정하고 이를 통해 흡광도에 따른 cell 건조중량을 계산하고 이로부터 다음과 같은 표준곡선을 얻었다.

$$y = 0.5351x - 0.016 \quad (R^2 = 0.995)$$

이때 x는 측정된 흡광도 값이며, y는 cell density (g/L)이다.

2.5.3. 오일 추출 및 함량 측정

오일 추출 방법은 Bligh and Dyer method [29]를 이용하였다. 동결 건조된 클로렐라를 10 mg cell에 5 mL의 DW를 첨가하여 homogenizer를 사용해 클로렐라 cell을 파쇄 한다. 분쇄된 cell에 chloroform과 methanol을 1:2 비율 (3 mL:6 mL)로 첨가한 다음 5분간 vortexing하고 원심분리기를 사용해 5000 rpm으로 10분간

원심분리하여 cell debris를 제거한다. 이후 chloroform과 DW를 1:1비율 (6 mL:6 mL)로 첨가하여 5분간 vortexing 후 다시 2000 rpm에서 10분간 원심분리를 하여 층분리를 한다. Lipid는 아래층의 chloroform을 회수하여 상온에서 건조하고 무게를 측정하여 처음 무게와 비교하여 % of dcw (오일무게/건조중량*100)을 계산하였다.

2.5.4. 클로로필 추출 및 함량 측정

색소 함량을 분석하기 위해 methanol 10 mL에 동결 건조한 *C. saccharophila* 시료 10 mg을 첨가한 다음 균일하게 혼합하였다. 60℃에서 30 min 간 용출시킨 후 666 nm와 653 nm에서 흡광도를 측정하여 식을 사용하여 색소의 양을 계산하였다 [30].

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

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

2.5.5. 환원당 분석

환원당의 분석은 DNS method를 사용하였으며, glucose를 표준물질로 사용하였다 [31].

2. 결과 및 고찰

2.1. 바이오매스 환원당 분석

전처리와 효소 가수분해가 끝난 7가지 바이오매스를 배지로 사용하기에 앞서 효소 가수분해로 생성된 환원당과 각각의 가수분해물에 활성탄을 사용하여 클로렐라의 성장을 저해하는 물질을 제거한 가수분해물의 환원당을 분석하였으며, 그 결과를 Table 2와 Table 3에 나타내었다.

목질계 바이오매스에서는 활성탄을 사용하기 전 벚짚 (90.4 g/L)이, 해조류 바이오매스에서는 꼬시래기 (43.3 g/L)가 가장 많은 양의 환원당이 검출되었으며, 활성탄 사용 후 벚짚에서 84.7 g/L, 그리고 꼬시래기에서 35.7 g/L의 환원당이 측정되었다. 활성탄 사용 후 가장 낮은 환원당이 측정된 것은 다시마로 17.8 g/L이었으나, 가수분해시 가장 낮은 환원당이 생성된 것은 건조되지 않은 유채대이며 10.4 g/L의 환원당이 측정되었다.

Table 2. Results of hydrolysis of lignocellulosic biomass

			Rapeseed straw	Barley straw	Rice straw
Pretreatment			7.9% sodium hydroxide (68.4°C, 5.5 hr, S/L ratio 1:10)		
Enzymatic hydrolysis			pH 4.8, 0.05M citrate buffer (50°C, 48 hr, S/L ratio 1:10)		
Reducing sugar (g/L)	Not dried		10.40	12.97	19.98
	Dried	Before activated carbon treatment	64.90	84.62	90.42
		After activated carbon treatment	49.28 (75.94%)	67.71 (80.01%)	84.64 (93.61%)

Table 3. Marine hydrolysates reducing sugar with pretreatment types and enzymatic hydrolysis

		<i>U. pinnatifida</i>	<i>L. japonica</i>	<i>G. verrucosa</i>	<i>E. intestinalis</i>
Pretreatment		100 mM sulfuric acid (130°C, 90 min, 13%(w/v))			0.1 M citric acid (130°C, 90 min, S/L ratio 1:10)
Enzymatic hydrolysis		0.2 M citrate buffer (pH 4.8) (50°C, 48 hr)			pH 4.8 (50°C, 48 hr)
Reducing sugar (g/L)	Before activated carbon treatment	19.97	20.84	43.31	31.67
	After activated carbon treatment	18.69 (93.60%)	17.75 (85.17%)	35.70 (82.42%)	21.40 (67.59%)

2.2. 바이오매스 가수분해물을 이용한 *C. saccharophila* 성장

2.2.1. 목질계 유래 당을 이용한 *C. saccharophila* 성장

목질계 바이오매스인 유채대, 보릿대 그리고 벚짳 가수분해물을 제작하여 클로렐라를 12일간 배양하여 Fig. 1과 Fig. 3에 나타내었다. 비교를 위해 순수 glucose를 첨가한 배지 또한 만들었으며, 이때 사용된 전처리물은 각각 건조되지 않은 바이오매스 전처리물 (Fig. 1, not dried), 건조된 바이오매스 가수분해물에 활성탄을 처리하지 않은 것과 (Fig. 3(a), before activated carbon treatment), 그리고 건조된 바이오매스 가수분해물에 활성탄을 처리한 것으로 (Fig. 3(b), after activated carbon treatment) 3가지 종류를 사용하였다. 건조된 바이오매스 가수분해물에 활성탄을 처리하지 않은 것에서는 *C. saccharophila*가 성장하지 않았으며 (Fig. 3(a)), Fig. 1과 Fig. 3(b)에서 10 g/L의 순수 glucose를 첨가한 배지에서 클로렐라의 성장 (5.25 ± 0.041 g/L와 14.39 ± 0.02 g/L)이 3가지 가수분해물보다 우수함을 알 수 있었다. 환원당은 8일을 기점으로 대부분 소비되었으며, cell density 역시 8일 이후 성장이 더디게 이루어지는 것을 확인할 수 있었다. 그러나 glucose를 첨가한 배지와는 다르게 10일 이후 계속적으로 더딘 성장이 이루어지는 Fig. 1과 성장이 급격히 증가하는 Fig. 3(b)를 보았을 때 이는 가수분해물에 혼재하는 혼합당에 의한 diauxic growth로 추측된다 (Fig. 1).

또한 Fig. 2의 productivity (0.43 ± 0.00 g/g/day와 1.07 ± 0.08 g/g/day)와 cell growth rate (3.31 ± 0.17 day⁻¹와 8.16 ± 0.53 day⁻¹) 역시 glucose가 우수함을 나타내었다. 이는 혼합당이 존재하는 가수분해물과는 다르게 순수한 glucose만을 사용하였기 때문에 클로렐라가 당을 소비하기 위해 준비하는 시간, 즉 lag phase가 짧고 단당의 소비가 보다 효율적이기 때문이라고 판단된다. 이는 배양 시간을 늘리게 되면 해결이 되나 시간 효율의 문제가 발생하게 되는 단점이 있다.

3가지 종류의 바이오매스를 비교하였을 때 건조되지 않은 바이오매스를 사용한 배양에서 *C. saccharophila*는 벚짳 (4.34 ± 0.61 g/L)이 성장이 우수하나, 활성탄 처

리볼의 배양은 보릿대 (7.72 ± 0.17 g/L)가 성장이 우세한 것을 알 수 있었다. 이는 최종적으로 같은 양의 환원당을 가지도록 만들어진 배지에서 성장의 차이를 보이는 것으로, 비록 동일한 알칼리 전처리와 효소 가수분해 과정을 거치지만 최종적으로 생산되었던 환원당의 종류와 농도가 다를 수 있음을 유추할 수 있다.

최종 생산물인 oil과 chlorophyll은 서로 다른 양상을 나타내었다. 건조되지 않은 바이오매스를 사용한 경우 유채대 ($31.75 \pm 3.15\%$)의 oil 함량이 가장 높았으며, chlorophyll의 함량 또한 유채대 ($5.56 \pm 0.25\%$)가 가장 높았다 (Fig. 2(b)). 그러나 활성탄을 처리했을 경우 oil 함량은 glucose에서 가장 높았고 ($41.26 \pm 0.69\%$), chlorophyll의 함량은 보릿대 ($5.24 \pm 1.03\%$)에서 가장 높음을 알 수 있다 (Fig. 4(b)). 이는 건조와 활성탄 처리에 따라 혼재된 환원당의 종류와 농도가 달라졌기 때문이라고 추측된다. 특히 활성탄을 처리한 가수분해물의 경우 glucose 보다 높은 chlorophyll 함량을 나타내었으며, 이는 chlorophyll의 생산시 가수분해물의 이용이 glucose 보다 유용함을 나타낸다.

그러나 Fig. 3(b)에서 glucose 그래프와 3가지 가수분해물의 그래프의 차이가 Fig. 1의 glucose 그래프와 3가지 가수분해물의 그래프 차이보다 크며, 특히 Fig. 1에서 가장 높은 성장을 보이는 벳짚이 Fig. 3(b)에서 가장 낮은 성장을 보이고 있다. 이것은 목질계 바이오매스 전처리에 있어 활성탄의 사용이 오히려 낮은 성장을 나타낼 수 있음을 의미하는 것이며, 앞에서 유추한바와 같이 건조와 활성탄 처리에 따라 혼재된 혼합당의 종류와 농도가 달라졌기 때문이라고 판단된다. 따라서 목질계 바이오매스 전처리물의 활성탄 사용은 비교적 비효율적이라고 생각된다.



Fig. 1. Effect of not dried lignocellulosic hydrolysates on the growth of *C. saccharophila*. (a) TRS is total reducing sugar, and CD is cell density
(b) Products. Barley straw (B), rice straw (Rice), rapeseed straw (R).



Fig. 2. Effect of not dried lignocellulosic hydrolysates on the growth of *C. saccharophila* on 12 day. (a) Cell growth rate and productivity, (b) Products.



Fig. 3. Effect of lignocellulosic hydrolysates on the growth of *C. saccharophila* on 12 day. (a) Before activated carbon treatment, (b) After activated carbon treatment.



Fig. 4. Effect of after activated carbon treatmentlignocellulosic hydrolysates on the growth of *C. saccharophila* on 12 day. (a) Cell growth rate and productivity, (b) Products.

2.2.2. 해조류 유래 당을 이용한 *C. saccharophila* 성장

해조류인 미역, 다시마, 파래 그리고 꼬시래기 가수분해물을 제작하여 *C. saccharophila*를 12일간 배양하고 이를 Fig. 5와 Fig. 6에 나타내었다. 4가지 해조류 가수분해물은 활성탄을 처리하지 않은 것 (Fig. 5)과 활성탄을 처리한 것 (Fig. 6) 두 종류를 사용하였으며, 12일간 배양한 결과 활성탄을 처리하지 않은 가수분해물에서는 *C. saccharophila*가 거의 성장하지 않은 것으로 나타났다.

활성탄을 처리한 해조류 가수분해물을 사용하여 *C. saccharophila*를 배양한 결과, 4가지 해조류 가수분해물에서 *C. saccharophila*가 성장하였으며, glucose에서 가장 높은 성장을 보였다. Glucose를 첨가한 배지는 가수분해물의 성장을 비교하기 위한 것으로 앞의 목질계 유래 당 실험에서 사용된 Fig. 3(b)와 동일한 것이다. 가수분해물 중 가장 성장이 우수한 것은 다시마로 확인되었으며 10일 이후 성장이 거의 정지된 glucose (12.36 ± 0.80 g/L)와 미역 (5.14 ± 0.19 g/L)과는 대조적으로 12일까지 높은 성장 (7.92 ± 0.16 g/L)을 보여주었다. 또한 가수분해물을 사용한 클로렐라 배양시 가장 높은 cell growth rate (7.36 ± 0.15 day⁻¹)와 productivity (0.72 ± 0.02 g/g/day)를 나타내었다 (Fig. 6(a)). 환원당이 모두 소비가 되지 않았으므로 긴 시간 배양할 경우 더 높은 성장을 기대할 수 있으리라 생각되어지나, 남아있는 환원당의 양과 성장 소요시간을 고려했을 때 12일까지의 배양이 적합하다고 판단하였다 (Fig. 6(a)). 그리고 미역의 경우, 8일 이후 여분의 환원당이 잔존함에도 불구하고 거의 성장이 이루어지지 않은 것으로 보아, 이는 본 클로렐라가 사용할 수 없는 형태의 환원당으로 판단된다 (Fig. 6(a)). 또한 4일까지 거의 성장하지 않았으나, 이후 급격히 성장하는 파래 (6.02 ± 0.05 g/L)와 10일 이후 급격한 성장을 보이는 꼬시래기 (5.66 ± 0.03 g/L)를 보았을 때, 파래와 꼬시래기를 가수분해할 때 생성된 환원당은 클로렐라가 소비하기에 적합하지 않거나 소비에 적합한 환원당의 양이 적었기 때문이라고 판단된다. 그리고 4일 후 급격한 성장을 보였으며 이는 혼합당을 소비하기 위한 lag phase로 보인다. 환원당이 소비되는 그래프로 확인이 가능하다 (Fig. 4(b)).

마지막으로 product 생산에서 oil과 chlorophyll은 서로 다른 양상을 나타내었다

(Fig. 5(b)). 먼저 oil의 경우 glucose에서 가장 높은 함량 ($41.26 \pm 0.69\%$)을 나타내었으며, chlorophyll의 경우 미역에서 가장 높은 함량 ($6.26 \pm 0.38\%$)을 나타내었다. 또한 chlorophyll의 경우 다시마를 제외한 미역, 파래, 꼬시래기에서 glucose를 첨가했을 때 보다 높은 함량을 나타내었다. 이는 목질계 가수분해물의 결과와도 비슷한 양상을 보이는 것을 알 수 있다.





Fig. 5. Effect of before activated carbon treatment marine hydrolysates on the growth of *C. saccharophila* on 12 day. *Undaria pinnatifida* (U), and *Laminaria japonica* (L), *Enteromorpha intestinali* (E), and *Gracilaria verrucosa* (G).



Fig. 6. Effect of after activated carbon treatment marine hydrolysates on the growth of *C. saccharophila*. TRS is total reducing sugar, and CD is cell density. (a) *Undaria pinnatifida* (U), and *Laminaria japonica* (L), (b) *Enteromorpha intestinalis* (E), and *Gracilaria verrucosa* (G).



Fig. 7. Cell growth rate and productivity of after activated carbon treatment marine hydrolysates on the growth of *C. saccharophila* on 12 day. (a) Cell growth rate and productivity, (b) Products. *Undaria pinnatifida* (U), and *Laminaria japonica* (L), *Enteromorpha intestinalis* (E), and *Gracilaria verrucosa* (G).

3. 결론

3종류의 목질계 바이오매스와 4종류의 해조류 바이오매스를 전처리와 효소가수 분해 과정을 통하여 환원당을 얻었으며 이를 이용하여 클로렐라를 배양하였다. 그리고 얻어진 가수분해물에 활성탄을 사용하여 배양한 결과, 목질계 바이오매스인 유채대와 보리대 그리고 벳짚에서는 활성탄 유무에 상관없이 모두 클로렐라가 충분히 성장하였으나 효율의 측면에서 활성탄을 사용하지 않는 편이 조금 더 유용하다고 판단된다. 또한 해조류 바이오매스인 미역, 다시마, 파래 그리고 꼬시래기 가수분해물의 경우 활성탄 등으로 저해물질을 제거해주었을 경우 충분히 성장함을 확인할 수 있었다.

따라서 본 실험 결과 목질계와 해조류 바이오매스를 이용한 *C. saccharophila*의 대량 배양은 이용 가치가 크다고 생각되어지며, 효율적인 배양을 위해 목질계 바이오매스 이용시 저해제 제거를 위한 활성탄을 사용하지 않는 것이 효율적이다. 이에 반해 해조류 바이오매스의 이용시 활성탄이 반드시 필요하다는 사실을 알아냈다. 또한 생산성과 oil 함량, chlorophyll 등을 고려하였을 때 목질계 바이오매스와 해조류 바이오매스는 클로렐라의 product 생산을 위한 배양에 이점을 가지며, 특히 chlorophyll 생산에 보다 유용하리라 판단된다.

참고문헌

1. Demibras, A. (2007) Progress and recent trends in biofuels. *Prog. Energy Combust. Sci.* 33: 1-18.
2. Hayes, D. J., Fitzpatrick, S., Hayes, M. H. B. and Ross, J. (2006) The biofine process : Production of levulinic acid, furfural, and formic acid from lignocellulosic feedstocks, pp. 139-164.
3. Kamm, B., Gruber, P. R. and M. Kamm (2008) Biorefineries : Industrial Processes and Products, WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim.
4. Jeong, G. T. (2014) Production of total reducing sugar and levulinic acid from brown macro-algae *Sargassum fulvellum*. *Korean J. Microbiol. Biotechnol.* 42: 177-183.
5. Werpy, T. and Petersen, G. (2004) Top value added chemicals from biomass, volume I : Results of screening for potential candidates from sugars and synthesis gas. The Pacific Northwest National Laboratory (PNNL) and the National Renewable Energy Laboratory (NREL).
6. National Non-Food Crops Centre (2011) Pathways to UK Biofuels: A Guide to Existing and Future Options for Transport, NNFCC 10-035.
7. Kosinkova, J., Doshi, A., Maire, J., Ristovski, Z., Brown, R., Rainey, T. (2015) Measuring the regional availability of biomass for biofuels and the potential for microalgae. *Renewable and Sustainable Energy Reviews* 49: 1271 - 1285.
8. National Non-Food Crops Centre (2011) Advanced Biofuels: The Potential for a UK Industry, NNFCC 11-011.
9. U.S. Department of Energy Office of Science (2006) Breaking the Biological Barriers to Cellulosic Ethanol: A Joint Research Agenda. Report from the December 2005 Workshop.

10. Peterson, A. A., Vogel, F., L, R. P., Fröling, M., Antal, M. J. Jr. and T, J. W. (2008) Thermochemical biofuel production in hydrothermal media: A review of sub- and supercritical water technologies. *Energy & Environmental Science* 1: 32 – 65.
11. National Non-Food Crops Centre.(2011) Advanced Biofuels, NNFCC Newsletter – Issue 19.
12. Zhu J. Y., Pan X. J., Wang G. S., Gleisner R (2009). Sulfite pretreatment (SPORL) for Robust enzymatic saccharification of spruce and red pine. *Bioresource Technology* 100(8): 2411 – 2418.
13. Iakovlev, M., van Heiningen, A. (2012) Efficient fractionation of spruce by SO₂-Ethanol-Water treatment: closed mass balances for carbohydrates and sulfur. *ChemSUSChem*. 5(8): 1625-1637.
14. Klinke H. B., Thomsen A. B., Ahring B. K. (2004) Inhibition of ethanol-producing yeast and bacteria by degradation products produced during pre-treatment of biomass. *Appl Microbiol Biotechnol* 66: 10 – 26.
15. Lynd, L. R., (1996) Overview and evaluation of fuel ethanol from cellulosic biomass: technology, economics, the environment, and policy. *Annual Review of Energy and the Environment*. 21: 403 – 465.
16. Bitton, G. (1996) John Wiley & Sons, Wastewater Microbiology. WILEY-BLACKWELL.
17. Hamasaki, A., Shioji, N., Ikuta, Y., Hukuda, Y., Makita, T., Hirayama, K., Matuzaki, H., Tukamoto, T., sasaki, S. (1994) Carbon Dioxide Fixation by Microalgae Photosynthesis Using Actual Flue Gas from a Power Plant. *Biochem. Biotechnol*. 45: 799-809.
18. Song, B. B., Kim, S. K., and Jeong, G. T. (2011) Enzymatic hydrolysis of marine algae *Hizikia fusiforme*. *KSBB J*. 26: 347-351.
19. Yeon, J. H., Seo, H. B., Oh, S. H., Choi, W. S., Kang, D. H., Lee, H. Y. and Jung, K. H. (2010) Bioethanol production from hydrolysate of seaweed

- Sargassum sagamianum. *KSBB J.* 25: 283-288.
20. Park, J. I., Woo, H. C., and Lee, J. H. (2008) Production of Bio-energy from Marine Algae: Status and Perspectives. *KICChE.* 6: 833-844.
 21. Park, E. Y., Jeong, S. M., Kim, Y. J., and Lee, D. H. (2012) Review on hydrolysis methods of the macroalgae for production of bioethanol. *J. Korea Soc. Waste Manage.* 29: 323-333.
 22. Lee, S. M., J. H. Kim, H. Y. Cho, H. Joo, and J. H. Lee (2009) Production of bio-ethanol from brown algae by physicochemical hydrolysis. *J. Korean Ind. Eng. Chem.* 20: 517-521.
 23. Kim, C. (2010) Saccharification of Gelidium amansii by acid hydrolysis to generate mixed sugars. M.S. Thesis. Kyung Hee University, Seoul, Korea.
 24. Choi, D., H. S. Sim, Y. L. Piao, W. Ying, and H. Cho (2009) Sugar production from raw seaweed using the enzyme method. *J. Ind. Eng. Chem.* 15: 12-15.
 25. Hashimoto, S and Furukawa, k., (1989) Nutrient Removal from Secondary Effluent by Filamentous Algae, *J. Fermt. Bioeng.*, 67(1): 62-69.
 26. Banat, J., Puskas, K., Esen, I. Al-Dahar, R. (1990). Wastewater Treatment and Algal Productivity in an Integrated Ponding System, *Biol. Wastes*, 32(4): 265-275.
 27. Wilde, E. W., Benemann, J. R. (1993) Bioremoval of Heavy Metals by the Use of Microalgae, *Biotechnol. adv.*, 11(4): 781-812.
 28. Kang K. E., Jeong, G. T., Park, D. H. (2012) Pretreatment of rapeseed straw by sodium hydroxide. *Bioprocess Biosyst Eng.* 35: 705-713.
 29. 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.
 30. Kim, J. K., Park, H.J., Kim, Y. H., Joo, H., Lee, S. H., Lee, J. H (2013) UV-induced Mutagenesis of *Nannochloropsis oculata* for the Increase of

Lipid Accumulation and its Characterization. *J. Korean Ind. Eng. Chem.* 24: 155-160.

31. Miller, G. L. (1959) Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. *Anal. Chem.* 31: 426-428.



감사의 글

학부 졸업이 었그제 같은데 벌써 대학원 졸업이 코에 닿을 듯 하네요. 그간 고맙고 감사한 일이 많았지만 가장 먼저 3년에 가까운 시간동안 모자란 저를 끝까지 지도하고 이끌어주신 정귀택 교수님께 감사드립니다. 바쁜 와중에도 저의 석사학위 논문을 봐주시고 심사해주신 김성구 교수님, 김중균 교수님에게도 감사드립니다. 그리고 많은 가르침으로 저의 좁은 학문의 눈과 생각을 넓혀주신 공인수 교수님, 박남규 교수님, 이형호 교수님, 홍용기 교수님 그리고 라채훈 박사님 감사합니다.

짧고도 긴 8개월 동안 실험을 도와준 바이오에너지공학 실험실 예비 석사 미라와 효선이, 같이 졸업하는 동섭이, 예진이, 창한오빠, wiset 진행하면서 큰 도움을 준 인영이, 하우, 장현이 오빠 감사합니다. 지금은 졸업한 하나뿐인 실험실 선배 동현이 오빠, 같이 고생했던 오민이, 석사과정이 끝나가는 지금까지 많고 많은 도움을 준 재형이 그리고 나만 바라보는 나의 고양이들 꾸꾸, 까미, 쭈니에게도 감사합니다.

끝으로 지금까지 제 삶에서 큰 힘과 격려, 그리고 아낌없는 지원을 해준 부모님과 동생에게 감사의 인사를 드립니다.