Review Paper

Bioethanol Production Using Microalgae

Jongkwan Park¹ · Hansol Mun² · Min-Ju Park³ · Heewon Jang² · Dae-Woon Jeong^{1,3,*}

¹School of Civil, Environmental and Chemical Engineering, Changwon National University

²Department of Environmental Engineering, Changwon National University

³Department of Environmental and Chemical Engineering, Eco-friendly Offshore Plant FEED Engineering Course, Changwon National University

(Received February 6, 2020; Revised February 24, 2020; Accepted February 27, 2020)

Objectives : Bioethanol is known as an important energy source that comes from plants, uses existing energy infrastructure without additional investment, and emits a low concentration of pollutants during combustion as eco-friendly renewable energy. Microalgae is reported as an effective material for producing bioethanol because of rapid biomass growth and relatively easy pretreatment steps. The objectives of this study are 1) to introduce general information of bioethanol production, 2) to show various processes for bioethanol production from microalgae, and 3) to provide an economic perspective of bioethanol.

Methods : Recent published peer-reviewed papers were collected and analyzed. The contents follow the order: 1) introduction, 2) general information about microalgae for bioethanol production, 3) bioethanol producing processes, 4) economic feasibility, and 5) conclusion.

Results and Discussion : The selection of the microalgae species and growing method are important to obtain high yield bioethanol. Physical, chemical, biological pretreatment was introduced. Also, comparison of the bioethanol producing processes was provided.

Conclusions : Bioethanol production from microalgae is a promising energy source because microalgae have lots of advantages as effective biomass such as rapid growth, high polysaccharide contents, and easy preparing step for bioethanol production. However, it has some limitations that need to overcome. Algae growing method, pretreatment technology, and fermentation steps still require advanced technology, which can improve economic feasibility.

Key Words : *Bioethanol, Microalgae, Biomass, Fermentation, Biofuel*

* Corresponding author E-mail: dwjeong@changwon.ac.kr Tel: 055-213-3743 Fax: 055-213-3749

총설

미세조류를 이용한 바이오 에탄올 생산 연구에 관한 고찰

박종관¹ · 문한솔² · 박민주³ · 장희원² · 정대운^{1,3,*}

¹창원대학교 토목환경화공융합공학부

²창원대학교 환경공학과

³창원대학교 친환경해양플랜트 FEED 공학과정 환경화공시스템공학

목적: 바이오 에탄올은 식물체로부터 유래하고, 추가적인 시설 투자없이 기존의 에너지 인프라를 이용할 수 있다는 점에서 중요한 에너지원으로 알려져 있다. 또한 연소시에도 저농도의 오염물질을 배출하는 친환경 에너지 자원이다. 특히, 미세조류는 빠르게 성장하고 바이오에너지로 변환할 때 상대적으로 쉬운 전처리를 할 수 있다는 점에서 효과적인 바이오 에탄올을 위한 생물자원으로 보고되었다. 본 총설에서는 미세조류를 이용한 바이오 에탄올 생산에 대한 일반적인 내용과 다양한 생산 방식, 그리고 바이오 에탄올에 대한 경제적 전망에 대한 정보를 제공하는 것을 목적으로 한다.

방법: 최근에 게재된 논문을 수집하고 분석하였으며, 연구 내용은 현재 바이오 에탄올과 미세조류 연구에 관한 소개, 바이오 에탄올 생산에 관한 일반적인 정보, 바이오 에탄올 생산 공정, 경제적 실효성, 마지막으로 한계점 및 앞으로의 전망의 순서로 구성되어 있다.

결과 및 토의: 높은 수율의 바이오 에탄올을 얻기 위해서 적절한 미세조류의 선택과 배양 방법이 중요하다. 그리고 바이오 에탄올 생산을 위한 미세조류의 물리적, 화학적, 생물학적 전처리 방법과 다양한 생산 공정에 대한 장단점을 소개하였다.

결론: 미세조류는 빠른 성장 주기, 높은 탄수화물 함량, 상대적으로 손쉬운 전처리 방법으로 인해 바이오 에탄올 생산을 위한 에너지원으로 기대가 된다. 그러나 경제성 향상을 위해 조류의 배양방법, 전처리 기술, 높은 수율의 바이오 에탄올을 생산하기 위한 적절한 발효 단계 등에 대한 추가적인 연구가 필요하다.

주제어: 바이오 에탄올, 미세조류, 바이오매스, 발효, 바이오에너지

1. 서론

세계는 화석연료의 과다한 사용으로 인한 고갈과 환경오염이라는 커다란 두 가지 문제에 직면하고 있다. 수차례 발생했던 석유 파동은 국가별 산업구조를 흔들어 위기를 발생시켰으며, 이산화탄소 배출에 대한 제제가 강화되는 파리협정의 시작일이 도래함에 따라 그 어느 때보다도 화석연료의 단점을 보완할 수 있는 대체 가능한 새로운 에너지의 개발에 관심이 모아지고 있다.¹⁾ 그 중 바이오에너지는 바이오매스의 열화학적 또는 생물학적 전환에 의해 생산되는 모든 에너지를 일컫는 말로 열이나 전기 등의 에너지를 생산하는 풍력, 태양광, 태양열 등 무형의 재생 에너지와는 다르게, 액체 또는 기체 상태의 연료로 생산되어 저장이 용이하고 기존의 화석연료를 기반으로 하는 에너지인프라의 변화 없이 사용할 수 있는 안정적인 에너지원으로 분류된다. 또한

전기의 생산 또는 수송용 연료 뿐만 아니라 천연 화학산업의 원료로서도 활용이 가능하다.

바이오에너지 생산을 위한 생물 자원 바이오매스는 원료에 따라서 1, 2, 3세대로 구분이 가능하다. 1세대 바이오매스는 주로 식용가능한 식물로부터 생산하는 것으로 옥수수나 감자에서 추출한 전분을 이용하는 방식과 사탕수수 또는 사탕무에서 추출한 설탕을 발효하여 만드는 방식으로 구분이 된다. 대규모 경작이 가능한 작물을 이용하는 점과 간단한 생산 방법을 장점으로 기술이 상용화되었고 현재에 여러 국가들이 사용하고 있지만, 식용가능한 자원을 사용한다는 윤리적인 문제와 곡물가격의 변동에 영향을 받는 경제적 관점에서의 단점을 가지고 있다. 2세대의 경우 목질계 바이오매스라고 하며 식용이 불가능한 원료인 밀짚과 같은 농업 부산물과 목재 등으로부터 발생하기 때문에 1세대의 윤리적 문제를 피하고, 경작지 확보 또는 산림훼손과 같은 환경

파괴없이 지속적으로 원료 공급이 이루어지는 장점을 가지고 있다.²⁾ 하지만 목질계 바이오매스의 세포 외벽 안에 포함되어 있는 셀룰로오스 또는 헤미셀룰로오스와 같은 당 성분을 추출하기가 쉽지 않아서 전처리 비용이 크다는 단점이 있다.³⁾ 3세대의 경우는 해수 또는 담수에 존재하는 조류를 이용하는 것으로 1세대가 가지고 있는 식량 윤리적인 문제와 2세대가 가지고 있는 전처리의 어려움을 해소할 수 있고, 뛰어난 이산화탄소 흡수 능력, 빠른 생산주기, 높은 생산성으로 새로운 바이오에너지 생산 원료로써 주목을 받고 있다.⁴⁾

바이오매스로부터 생산되는 에너지는 나무와 짚과 같은 고체 형태, 바이오 에탄올(bioethanol)과 바이오 디젤(biodiesel)을 포함하는 액체 형태, 가스 형태인 바이오 가스(biogas)가 있다. 이중에서 바이오 에탄올은 휘발유에 혼합하여 수송용 원료로 활용할 경우 옥탄가를 올려서 연소율을 높이고, 미세먼지 배출량을 줄여서 오염물질 발생량을 낮출 수 있으며, 수입 원유에 대한 의존도를 낮추어 자원 고갈을 방지할 수 있다는 큰 장점을 가지고 있지만, 앞에서 설명한 바와 같이 1세대와 2세대 바이오매스를 이용해서 에너지를 생산할 경우에 발생하는 문제점과 3세대 바이오매스를 사용하는 경우에도 상용화에 이르기까지는 시장 경쟁력을 높이기 위해 추가 기술 개발이 필요한 점이 단점으로 알려져 있다. 하지만 미국과 브라질의 경우 강력한 정부 주도의 바이오 에탄올 지원 정책과 대규모의 작물 경작지의 보유로 인해 세계 최대규모의 바이오 에탄올 생산 및 소비국으로 자리 잡고 있으며, 특히 브라질의 경우 바이오 에탄올 전용 차량이 매우 높은 비율을 차지할 정도로 상업화 및 산업화가 되어 있는 실정이다.⁵⁾

따라서 많은 양의 화석 연료를 에너지원으로 수입하고 있고, 대규모 경작이 어려운 우리나라의 상황에는 3세대 바이오매스를 이용한 바이오 에탄올 생산이 적합할 수 있다. 또한 최근 기후변화와 질소/인에 의해 매년 국내에 반복적으로 발생하는 부영양화 현상을 해결하기 위한 방안으로 미세조류를 이용할 수 있다. 질소/인을 제거하는 고도처리 공법을 개발하여 수질을 개선하고, 이때 발생한 미세조류를 회수하여 바이오매스로 사용하는 방법이다. 다양한 분야에서 미세조류를 배양하고 이를 이용해서 바이오에너지를 얻기 위한

연구들이 국내에서 시도되어 왔지만 최근 3년(2018-2020)을 기준으로 해서 학술연구정보서비스(RISS)를 이용해 확인해 볼 때 국문학술지에 발표된 관련 연구 결과는 19건으로 매우 부족한 상황이다.^{6,7)} 이에 반해서 국외에서 미세조류를 활용해서 바이오에너지를 생산하는 연구 결과들은 매년 증가하고 있으며 이는 관련분야에서의 국외 기술과의 격차가 나고 있고 국문으로 설명된 기술 자료가 부족한 것으로 해석할 수 있다.

이러한 이유로 본 논문은 새로운 에너지원으로서 3세대 바이오매스인 미세조류를 이용한 바이오 에탄올 생산에 관한 기술 현황과 향후 기술 발전 방향에 관한 내용을 논의하여 관련 분야 연구자 및 관심이 있는 일반인에게 최신 기술 자료를 제공하는 것을 목표로 하여 작성되었다.

2. 미세조류의 에너지 생산 잠재력

2.1. 3세대 바이오매스로서의 미세조류 특징

미세조류는 다른 바이오매스보다 높은 비율의 세포내 탄수화물 함량을 가지고 있고, 1세대 바이오매스와 같이 식용으로 사용되지 않으며, 2세대 바이오매스와 같이 복잡한 구조 및 리그닌을 함유하지 않아서 간단한 전처리과정을 가지기 때문에 바이오 에탄올 생산에 합리적인 바이오매스로 선택된다.⁸⁾ 또한 미세조류는 수로형 호수나 기술적으로 진보된 photobioreactor (PBR) system을 이용해 담수, 해수, 폐수 등 다양한 수원에 적응하여 배양할 수 있다.⁹⁻¹²⁾ 일정 시간 동안 배양되어 바이오매스가 커지게 된 미세조류는 여과, 침전, 부유, 응집 등의 방법을 통해 수확되고 이를 통해 얻어진 미세조류는 생산 공정을 통해 바이오에너지로 변환된다.

미세조류가 포함하고 있는 탄수화물은 주로 색소체에 축적되거나, 세포벽의 주성분을 이루고 있다. 색소체에는 저장물질로써 전분을 포함하고 있으며, 세포벽의 주성분은 셀룰로오스, 펙틴, 다당류 등을 포함한다.⁹⁾ Table 1에서는 1, 2, 3세대 바이오매스에 따른 생산성, 탄수화물 함량, 탄수화물 생산성을 비교했다. 일반적으로 목질계, 초본 또는 작물계 바이오매스와 미세조류에 의해 생산되는 바이오매스를 비교하였을 경우 최소 4배에서 크게는 30배 정도의 생산량

Table 1. Characteristics of bioethanol feedstock.¹¹⁾

Feedstock	Productivity (dry Mg/ha/year)	% Fermentable carbohydrate	Fermentable carbohydrate productivity (dry Mg/ha/year)
Woody Biomass	10-22	70-85	7-18.7
Switch grass	3.6-15	76.4	2.8-11.5
Corn	6-14	80-92	5.6
<i>Chlorella</i> sp.	127.8-262.8	33.4	42.7-87.8
<i>T. sueica</i>	38-139.4	11-47	4.2-65.5
<i>Arthrospira</i> sp.	27-70	15-50	4.1-35

Table 2. Percentage of carbohydrates in microalgae.

Algae strain	Culture condition	Biomass Productivity	Carbohydrate rate in cell	Reference
<i>Anistrodesmus gracilis</i> GY-09	PBR, Light intensity: 450 mol/m ² /s, 28±1°C, 150 rpm, 2.0% CO ₂	709 mg/L/d	39.0%	Chen et al. (2016) ¹⁴⁾
<i>Chlorella vulgaris</i> (CCAP 211/11B)	PBR, 25 mol/m ² /s, 25°C, 200 rpm, 5.0% CO ₂ , 14 days	37 mg/L/d	55.0%	Illman et al. (2000) ¹⁵⁾
<i>Chlorella vulgaris</i> P12	PBR, 70 mol/m ² /s, 30°C, 2.0% CO ₂	199 mg/L/d	41.0% (starch)	Dragone et al. (2011) ¹⁶⁾
<i>Chlorella vulgaris</i> FSP-E	PBR, Light intensity: 450 mol/m ² /s, 28±1°C, 150 rpm, 2.0% CO ₂	825 mg/L/d	54.84%	Chen et al. (2016) ¹⁴⁾
<i>Chlorococum humicola</i>	PBR	-	32.5%	Harun et al. (2011) ⁴³⁾
<i>Chlamydomonas reinhardtii</i> UTEX 90	PBR, 25-28°C, 2.0% CO ₂ , 3 days	48 mg/L/d	60.0%	Kim et al. (2006) ¹⁸⁾
<i>Pavlova pinguis</i>	PBR, 70-80 mol/m ² /s, 20±0.5°C, 0.5% CO ₂ 12:12 h light:dark	-	41%	Brown et al. (1998) ²⁰⁾
<i>Rhodomonas salina</i>	PBR, 70-80 mol/m ² /s, 20±0.5°C, 0.5% CO ₂ 12:12 h light:dark	-	22%	Brown et al. (1998) ²⁰⁾
<i>Tetraselmis</i> sp.	-	-	24.0%	Schwenzfeier et al. (2011) ¹⁹⁾
<i>Tetraselmis</i> sp. CS-362	PBR, 70-80 mol/m ² /s, 20±0.5°C, 0.5% CO ₂ 12:12 h light:dark	-	26.0%	Brown et al. (1998) ²⁰⁾
<i>Scenedesmus obliquus</i> UTEX 393	Autotrophically, Five medium, 100 mol/m ² /s, 100 rpm, pH 6.5	502.94 mg/L/d	32.5%	Singh et al. (2019) ²¹⁾
<i>Scenedesmus obliquus</i> CNW-N	PBR, 60-540 mol/m ² /s, 28°C, 300 rpm, 2.5% CO ₂ , pH 6.2 5 days	140 mg/L/d	51.8%	Ho et al. (2012) ²²⁾
<i>Scenedesmus subspicatus</i> GY-16	PBR, Light intensity: 450 mol/m ² /s, 28±1°C, 150 rpm, 2.0% CO ₂	760 mg/L/d	52.82%	Chen et al. (2016) ¹⁴⁾

의 차이가 나타났고, 이용가능한 탄수화물의 경우는 기존의 1, 2세대 바이오매스의 양이 큰 것으로 보이지만 생산성을 고려하였을 경우는 미세조류를 이용한 경우가 최대 30배 정도까지 차이가 나는 것으로 확인되었다. 하지만 미세조류 중에 따라 탄수화물의 구성과 함량은 달라질 수 있기 때문에 배양 조건에 따라 생산성이 높은 미세조류를 선택하는 것이 중요하다.

2.2. 기존 연구에서 사용된 미세조류의 탄수화물 함량

미세조류에 포함된 전분과 세포벽에 존재하는 다당류는 전처리 과정을 통해 바이오 에탄올 생산에 이용가능한 탄수화물로 변환될 수 있다.¹³⁾ Table 2에서는 자연계의 미세조류와 유전자 재조합으로 만들어진 미세조류들의 배양 방식과 세포 내 탄수화물 비율에 대해 나타났다. *Scenedesmus subspicatus* GY-16, *Chlorella vulgaris* FSP-E, *Anistrodesmus gracilis* GY-09는 PBR에서 배양되었을 경우, 이들의 탄수화물 비율은 각각 52.82%, 54.84%, 38.99%로 *Chlorella vulgaris* FSP-E이 가장 높았다.¹⁴⁾ *Chlorella vulgaris* (CCAP 211/11B)은 25 mol/m²/s의 광도의 PBR system에서 약 0.52 g/L의 바이오매스 농도와 약 55%의 탄수화물 함량을 달성할 수 있었다.¹⁵⁾ *Chlorella vulgaris* P12은 organic medium을 배양

에 사용하여 41%의 전분 함량을 달성하였다.¹⁶⁾ *Chlorococum humicola*은 32.52%의 탄수화물을 포함하고 있었으며 효소를 이용한 전처리를 한 결과 64.2%(w/w)의 glucose yield를 달성했다.¹⁷⁾ *Chlamydomonas reinhardtii* UTEX 90은 3일간 배양한 결과 53% starch를 포함한 1.45 g/L 바이오매스를 생산하였다.¹⁸⁾ *Tetraselmis* sp.은 대략 24-26%의 탄수화물 함량을 가지고 있었다.¹⁹⁾ *Pavlova pinguis*, *Rhodomonas salina*, *Tetraselmis* sp. CS-362은 PBR system에서 각각 41.0% 22.0%, 26.0%의 탄수화물 함량을 달성했다.²⁰⁾ *Scenedesmus obliquus* UTEX 393은 Bold 3N 배지에서 배양하였을 때 32.5%의 탄수화물 비율을 확인할 수 있었다.²¹⁾ *Scenedesmus obliquus* CNW-N은 medium를 이용해 PBR system에서 5일 배양 후 바이오매스 농도, 탄수화물함량이 각각 4.03 g/L, 51.8%이었다.²²⁾

3. 바이오 에탄올 생산 공정

바이오 에탄올은 미세조류에 포함된 다당류를 단당류로 전환 후 적절한 미생물을 이용한 발효 공정을 통해 생산이 가능하다. 사용되는 미세조류의 특성에 따라 다양한 형태의 처리과정이 존재하지만 일반적으로는 바이오매스의 전처리

Fig. 1. The basic processes of bioethanol production.

(pretreatment), 당화(saccharification), 발효(fermentation)의 순서로 생산이 된다. 전반적인 바이오 에탄올 생산 공정에 대한 개념도를 Fig. 1에 나타내었다.

3.1. 전처리(pretreatment) / 당화(saccharification)

전처리의 목표는 탄수화물, 단백질, 지질과 같은 세포 내 화합물을 이용할 수 있게 하는 것이며 세포벽을 파괴하고 세포 내의 탄수화물 구조를 변형시키는 역할을 한다.^{23,24)} 미세조류의 세포벽에 존재하는 셀룰로오스, 전분 형태의 다당류 탄수화물을 글루코스와 같은 발효 효율이 높은 단량체로 분해하기 위해서는 세포벽을 파괴한 후 당화 단계가 추가적으로 필요하다. 미세조류의 세포벽을 파괴하기 위한 전처리 방법에는 물리적, 화학적, 효소적 전처리 방법이 있으나, 화학적, 효소적 전처리 방법은 당화 과정을 포함하여 처리되는 방식들이 존재한다.

물리적 전처리는 세포 구조를 파괴하여 표면적을 증가시킴으로써 당화를 위한 효소가 접근할 수 있는 효율을 향상시킨다. 또한 세포의 입자 크기를 감소시키므로 효소 분해 속도를 증가시킬 수 있다.²⁵⁾ 그러나 높은 비용과 많은 에너지를 필요로 하는 단점이 있고,²⁶⁾ 물리적 전처리만으로는 세포 내 탄수화물의 구조에 직접 영향을 미치지 않기 때문에 탄수화물 구조를 변형시키기 위한 추가적으로 당화 단계를 필요로 한다. 물리적 전처리를 통한 세포벽의 파괴는 크게 bead beating, ultrasonication, high pressure homogenization (HPH)으로 나눌 수 있다.²⁷⁾

Bead beating은 바이오매스를 움직이는 bead와 접촉을 시킴으로써 단단한 세포벽을 분해시키는 기계적인 힘과 전단 응력을 이용하는데, 미세조류 바이오매스와 고속으로 회전하는 미세한 유리 또는 세라믹 bead의 충돌로 인해 세포가 파괴된다. Kim²⁸⁾ 등에 따르면 bead beating을 이용해서 전처리를 할 경우 그렇지 않은 경우에 비해 25% 높은 가수분해 효율을 보여주었다. Ultrasonication은 고주파 음파를 이용해서 캐비테이션을 발생시키고 전파 충격파가 주변 매체에서 제트 스트림을 형성하여 높은 전단력에 의해 세포가 파열되도록 하는 전처리 방식이다.²⁷⁾ 상대적으로 낮은 온도에서 세포를 파괴할 수 있다는 장점이 있고, bead 또는 화학물질을 첨가할 필요가 없으므로 처리 비용이 감소되는 장점을 가지고 있다. High pressure homogenization (HPH)는 세

포 현탁액을 고압으로 펌핑하여 밸브의 좁은 오리피스를 통해 가압되어 보다 낮은 압력의 챔버로 현탁액이 방출되면서 압력 강하 유도 전단 응력을 통해 세포 파괴가 이루어진다.²⁹⁾ *Chlorella* sp. 세포를 활용한 연구에서 전처리방법으로 HPH와 ultrasonication을 비교하였는데 HPH가 더욱 효과적으로 단단한 세포막을 파괴하였다는 결과를 발표하였다.³⁰⁾

다음으로 비물리적 전처리에는 화학적 전처리와 효소적 전처리가 있다. 화학적 전처리는 기계적 전처리에 비해 경제적이고, 효소에 비해 내구성이 좋고, 분해 속도가 빠르며 관리가 쉬운 장점이 있다.³¹⁾ 화학적 전처리로는 acid hydrolysis와 alkaline hydrolysis가 많이 사용되고 있다.

Acid hydrolysis는 산과 같은 화학물질을 사용함으로써 다당류에서 단당류로 가수분해하는 방법이며 일반적으로 사용하는 산은 황산과 염산이다. 특히 2세대 바이오매스와 달리 미세조류는 리그닌이 거의 없기 때문에 리그닌을 처리해야 하는 조건에 비해서 상대적으로 완화된 조건(낮은 산 농도, 낮은 온도)에서 화학적 전처리를 할 수 있는 점이 큰 관심을 끌고 있다. Wang³²⁾에 따르면 acid hydrolysis를 이용해서 미세조류의 전처리하였을 때 약 82%의 효율로 가수분해가 진행되었음을 보고하였다. 또 다른 연구에서도 3%의 황산을 이용해서 *Chlamydomonas reinhardtii* UTEX 90부터 60% 정도의 글루코스를 추출하기도 하였다. Ho³³⁾ 등의 연구에서도 *Chlorella vulagris*를 1% 황산을 이용해서 전처리하였을 경우 효소를 이용한 전처리 방법보다 더 높은 글루코스 수율(93.6%)을 얻었음을 보고하였다.

Alkaline hydrolysis는 수산화칼륨, 수산화칼슘, 암모니아, 수산화나트륨과 같은 알칼리 화합물을 사용하는 화학적 전처리방법이다. 알칼리 화합물을 통해 헤미셀룰로오스 및 셀룰로오스 사이의 에스테르 결합을 파괴하며, 가수분해 효소에 대한 접근성을 증가시킨다.³⁴⁾ Harun³⁵⁾ 등의 연구에 따르면, *Chlorococcum infusionum*을 0.75% (w/v)의 수산화나트륨을 이용해서 alkaline 전처리하였을 경우에 최대 조류당 1 g 당 350 mg의 글루코스 추출 효율과 0.26 g의 바이오 에탄올 생산 수율이 확인되었다. 또한 최근 *Chlorella* sp.와 *Tetraselmis suecica*를 alkaline 처리하였을 경우, 바이오매스의 구조 및 표면 변화로 인해서 당화 효율이 전처리하지 않은 경우보다 2-2.5배 높은 효율로 되었음을 보고한 연구도 있다.³⁶⁾

효소적 전처리는 기계적 방법보다 훨씬 작은 에너지를 필요로 하는 생화학적 처리이다. Cellulases, amylases, glucoamylases 등을 사용하여 미세조류를 가수 분해하는 전처리로서 화학적 전처리와 비교하였을 경우에 상대적으로 적은 에너지를 필요로 하고 높은 탄수화물의 수득율 및 장비 부식의 가능성이 적은 장점을 가지고 있다. 미세조류 셀룰로오스는 가수분해 효소인 cellulase 종류의 endo- β -1,4-D-glucanase, exo- β -1,4-D-glucanase, 그리고 β -glucosidase 등에 의해 glucose로 생성

Table 3. Recent applications of microalgae pretreatment for bioethanol production.

Pretreatment	Species	Conditions	Reference
physical_bead beating	<i>Chlorella</i> sp.	0.3-0.4 mm bead size 85% (v/v) beads filling 3000 rpm agitator speed	Doucha and Lívanský (2008) ⁽⁴⁰⁾
	<i>Chlorella vulgaris</i>	1 mm bead size 65% (v/v) beads filling 6, 9, 12 m/s agitator speed	Postma et al. (2016) ⁽⁴¹⁾
physical_HPH	<i>Scenedesmus obliquus</i>	biomass suspended in 5 mL water 24000 rpm, 2.5 min after 10 min in an ice bath	Miranda et al. (2012) ⁽⁴²⁾
	<i>Chlorella</i> sp.	68.94-275.78 MPa 30 min, orifice diameter 70 µm	Choi et al. (2016) ⁽³⁰⁾
physical_Ultrasonication	<i>Scenedesmus obliquus</i>	biomass suspended in 5 mL water 200 W 30 s 5 cycles with 10 min breaks	Miranda et al. (2012) ⁽⁴²⁾
chemical+saccharification _acid	<i>Scenedesmus obliquus</i>	1 M H ₂ SO ₄ 120°C, 30 min, 10% DCW	Miranda et al. (2012) ⁽⁴²⁾
	<i>Chlorococcum humicola</i>	0.56 M H ₂ SO ₄ 160°C, 15 min	Harun and Danquah (2011) ⁽⁴³⁾
	<i>Chlorococcum</i> sp.	1.51 M H ₂ SO ₄ 160°C, 45 min, 0.85% DCW	Halim et al. (2012) ⁽⁴⁴⁾
chemical+saccharification _alkaline	A (<i>Scenedesmus obliquus</i> , <i>Scenedesmus quadricauda</i> , <i>Nitzschia</i> sp.), B (<i>Aphanothece</i> sp.), C (<i>Desmodesmus spinosus</i> , <i>Nitzschia palea</i>)	A (1-7.5% H ₂ O ₂) B,C (1-2.5% H ₂ O ₂) 50°C, 60 min	Juárez et al. (2016) ⁽⁴⁵⁾
	<i>Chlorella</i> sp.	2.0% (w/v) NaOH, 120°C, 30 min	Kassim et al. (2016) ⁽³⁶⁾
	<i>Chlorococcum infusionum</i>	0.3 M NaOH 120°C, 60 min, 5% DCW	Harun et al. (2011) ⁽³⁵⁾
Enzymatic+saccharification	<i>Chlamydomonas reinhardtii</i> UTEX 90	thermostable α-amylase 0.005% 30 min, 90°C	Choi et al. (2010) ⁽³⁹⁾
	<i>Chlorella pyrenoidosa</i>	Cellulase, 24 h, pH 4.6, 50°C, 140 mg/m ² enzyme	Fu et al. (2010) ⁽⁴⁶⁾
	<i>Chlorerlla sorokiniana</i>	Cellulacast, 72 h, pH 4.5, 55°C	Hernández et al. (2015) ⁽⁴⁷⁾
	<i>Dunaliella tertiolecta</i>	Amyloglucosidase 0.4 mL enzyme/g biomass, 55°C, pH 5.5	Lee et al. (2013) ⁽⁴⁸⁾

된다.³⁷⁾ 전분 형태로 발견되는 탄수화물을 가수분해하기 위해서는, amylase 중 하나인 endo-amylase가 전분의 α-1,4-glycosidic bond을 공격하여 dextrin을 생성하고 그 후 생성된 dextrin에서 glucoamylase를 사용하여 glucose를 생성시킨다.³⁸⁾ Choi³⁹⁾ 등은 *C. reinhardtii* UTEX 90를 *B. licheniformis*의 α-amylase와 *Aspergillus niger*의 amyloglucosidase를 사용하여 효소적 전처리를 하였는데, 최적 조건에서 1 g의 미세조류로부터 235 mg의 바이오 에탄올 생산성을 발표하였다. 또 다른 연구에서는 *Trichoderma reesei* ATCC 26921의 cellulase를 사용하여 *Chlorococcum* sp.의 전처리를 하였는데, 72시간동안 40°C, pH 4.8의 조건에서 10 g/L의 미세조류 바이오매스로부터 64.2% (w/w)의 글루코스 수율을 확인하였다.¹⁷⁾ 그 이외의 물리적, 화학적, 효소적 전처리를 이용한 최신 연구 동향에 대해 Table 3에 정리하였다.

3.2. 발효(fermentation)

바이오 에탄올을 얻기 위해서는 미세조류의 탄수화물로부터 전처리해 얻은 발효성 당을 온도, pH 등의 조건을 설정하여 발효 미생물에 의하여 바이오 에탄올 및 기타 부산물로 전환시켜야 한다.⁴⁹⁾ Glucose, fructose, maltose, rhamnose 등과 같은 발효성 당은 발효 공정에서 미생물에 의해 기질로써 사용되며, 미생물은 이러한 당을 에탄올과 CO₂로 변환한다.⁵⁰⁾ 미세조류는 다양한 발효성 당을 함유하고 있으며, 이를 바이오 에탄올로 변환시킬 수 있는 적절한 미생물 종을 선택하거나 결합하여 사용한다면 수율을 더욱 증가시킬 수 있다.⁵¹⁾

3.2.1. 발효에 사용되는 미생물

바이오 에탄올은 혐기성 상태에서 미생물에 의해 단당류가 발효되는 과정에서 생성되며 이때 사용되는 미생물은 효

모와 박테리아이다. 효모 중에서는 주로 *Saccharomyces cerevisiae*, *Schizosaccharomyces pombe*, *Candida shehatae*, *Kluyveromyces marxianus*, *Kluyveromyces fragilis*, *Pichia stipitis*, *Pachysolen tannophilus*와 같은 균주가 주로 사용된다.⁵²⁻⁵⁵⁾ *Saccharomyces cerevisiae*는 포도당은 발효시킬 수 있고 5탄당은 발효시킬 수 없지만, 최근 DNA 재조합 기술을 통해 변형된 균주는 5탄당 분해 효소를 발생할 수 있는 것으로 알려져 있다.^{53,56)} *Pichia stipites*는 자일로스, 글루코스, 만노스, 갈락토스 등 다양한 당당류를 발효시킬 수 있다.⁵⁷⁾

한편, 박테리아는 주로 *Escherichia coli*, *Klebsiella oxytoca* 그리고 *Zymomonas mobilis*가 에탄올의 발효에 적합한 것으로 알려져 있다.⁵⁸⁾ 특히 *E. coli*는 혐기성 조건에서 높은 성장률, 저렴한 영양물질의 섭취, 다양한 탄소원을 분해할 수 있는 능력을 장점으로 바이오 에탄올 생산에 유리하다.^{59,60)} 한 연구에서 발효균주로 *E. coli* 계통의 박테리아를 사용하고 온도, 산의 농도, pH 그리고 반응시간의 조건을 조절하여 *Chlorella vulgaris*의 당화 효율을 연구 한 결과, 최대 0.4 g-ethanol/g의 수율을 보였다.⁶¹⁾ 최근에는 *E. coli* KO11과 *K. oxytoca*를 xylose와 glucose를 발효시킬 수 있도록 유전자를 변형하여 에탄올 수율을 올리는 연구가 이루어지고 있다.⁶²⁾ *Klebsiella oxytoca*는 그람음성 박테리아로 5 이하의 낮은 pH에서 생존할 수 있지만 바이오 에탄올 생성에 필요한 전 단계인 pyruvate 생성을 하지 못하는 단점이 있다.⁵⁸⁾ 이러한 이유로 *Z. mobilis*의 pdc (pyruvate decarboxylase) 및 adhB (alcohol dehydrogenase) 유전자를 포함하도록 유전자를 재조합한 *Klebsiella oxytoca* 균주를 이용한 바이오 에탄올 생산 연구가 진행되고 있다.⁶³⁾ *Zymomonas mobilis*는 포도당 기반 공급 원료에서 빠르게 바이오 에탄올을 생산하는 능력이 있으며, 효모 발효와 비교할 때 5% 더 높은 수율과 최대 5배 더 높은 용적 생산성을 보이는 것으로 알려져 있다.¹⁵⁾

3.2.2. 발효 공정 소개

3.2.2.1. Separate hydrolysis fermentation (SHF)

SHF 공정에서는 미세조류의 탄수화물인 다당류를 당당류로 가수분해 시키는 공정과 가수분해 생성물인 발효성 당을 미생물을 이용하여 발효시켜 에탄올로 전환하는 발효 공정이 따로 수행된다. 이 공정은 화학약품 사용량이 적어 비용이 적게 들며, 특히 발효공정에서 효모를 순환시켜 사용함으로써 연속 발효 시스템으로 운전할 수 있다.⁶⁴⁾ SHF 공정은 가수분해와 발효가 분리되어 다른 반응기에서 발생하기 때문에 두 가지 공정을 개별 운전으로 최적화 할 수 있지만, 가수 분해 중 glucose, cellobiose의 축적으로 인해 최종 생산물 형성이 억제될 수 있는 단점을 가지고 있기 때문에 불필요한 부산물이 형성되는 것을 막기 위하여 추가적인 중화과정 또는 정제 과정이 필요하다.⁶⁵⁾ 또 다른 단점으로는 높은 에탄올 수율을 얻기 위해서는 많은 양의 효모가 필요하

기 때문에 경제성이 떨어질 수 있으며, 가수분해를 위해 필요한 시간 동안 다른 미생물에 의한 오염이 발생할 가능성도 가지고 있다.⁶⁶⁾

3.2.2.2. Simultaneous saccharification and fermentation (SSF)

SSF 공정에서는 하나의 반응기에서 가수분해와 발효가 동시에 수행된다. Biomass와 효소, 효모를 함께 첨가하여 발효가능한 당으로 빠르게 변환하고 발효를 진행해서 에탄올로 변환시킬 수 있다.⁶⁷⁾ 하나의 반응기에서 가수분해와 발효가 동시에 이루어지기 때문에 글루코스가 생성되는 즉시 바이오 에탄올로 전환 될 수 있다. 이러한 점은 SHF에서 발생하였던 가수분해 물질 축적으로 인해 반응 억제 현상을 방지할 수 있으며, 발효가능 당이 생산되는 즉시 발효가 되기 때문에 공정 시간이 단축된다. 또한 하나의 반응기를 사용하기 때문에 경제적이다.⁶⁸⁾ 미세조류 중 *P. cruentum* (KMMCC-1061)을 이용해서 SHF와 SSF의 에탄올 수율을 비교한 연구가 있었는데, SSF 공정을 이용했을 때에는 10.5 g/L, SHF를 이용했을 때는 8.48 g/L의 에탄올 산출량이 계산되어서 SSF 공정을 이용했을 때 더 높은 에탄올 수율을 얻을 수 있다는 것을 확인할 수 있었다.⁶⁹⁾

3.2.2.3. Simultaneous saccharification and co-fermentation (SSCF)

SSF 공정에서 사용되는 미생물은 가수 분해를 통해 얻어진 옥탄당과 오탄당을 모두 처리할 수 없어서 오탄당을 따로 처리해야 할 필요가 있다. 이를 개선하기 위해서 SSCF 공정은 옥탄당과 오탄당을 동시에 처리하기 위한 유전적으로 변형시킨 미생물을 사용한다.⁷⁰⁾ 한 연구에서 유전적으로 변형시킨 *S. cerevisiae*와 *Z. mobilis*를 SSCF 공정에 이용해 glucose와 xylose를 동시에 발효시키기도 하였으며⁷¹⁾, SSCF 공정 또한 하나의 반응기에서 가수분해와 발효가 이루어지기 때문에 낮은 비용, 짧은 공정 시간, 미생물 오염 위험 감소 및 glucose, cellobiose의 축적으로 인해 발생하는 억제 효과를 감소할 수 있다는 특징을 가지고 있다.⁷⁰⁾

3.2.2.4. 암발효(Dark fermentation) / 광발효(Photofermentation)

Dark fermentation은 빛이 없는 환경에서 활동하는 미생물들을 이용하는 것으로 고분자 유기물을 미생물이 가수분해하고 이때 생성된 중간 생성물을 발효하여 바이오 에탄올을 생산하는 특성을 가진다. 셀 내부의 탄수화물을 해당과정을 통해 pyruvate로 분해하고 발효를 통해 에탄올을 배출한다. 또한 대사활동 중에서 수소를 생산하는 특징을 가지고 있어서 바이오 수소 생산을 위한 연구에서도 활용이 되고 있다. 알려진 미생물로는 *C. reinhardtii*, *Chlamydomonas moewusii*, *C. vulgaris*, *Oscillatoria limnetica*, *Oscillatoria limosa*, *Gleocapsa alpicola*, *Cyanotheca* sp., *Chlorococcum littorale*, and *Spirulina* sp., *Synechococcus* sp. 등이 있다.⁷²⁾ 하지만 Dark fermentation은 빛과 산소에 영향을 많이 받기 때문에

Table 4. Cases of bioethanol production from microalgae and microorganisms.

Microalgae	Fermentative microorganism	Pretreatment	Fermentation condition	Maximum ethanol production	Reference
<i>Scenedesmus</i> sp.	<i>Desmodesmus</i> sp.	2% sulfuric acid for 30 min at 120°C in an autoclave	30 h of incubation at 28°C with shaking at 120 rpm in an orbital shaker	24 g-ethanol/L	Sulfahri et al. (2012) ¹⁸⁾
<i>Microcystis</i> sp.	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> (ATCC 4126)	0.5 N sulfuric acid 120°C 4 h	SHF 60°C 20 min	18.57 g-ethanol/L	G'nerken et al. (2015) ²⁷⁾
<i>P. cruentum</i> (KMMCC-1061)	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> , KCTC 7906	enzymatic hydrolysis 37°C 7 h	SHF 30°C 7 h	8.48 g-ethanol/L	Choi et al. (2016) ³⁰⁾
<i>P. cruentum</i> (KMMCC-1061)	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> , KCTC 7906	enzymatic hydrolysis 37°C 7 h	SSF 37°C 12 h	10.5 g-ethanol/L	Choi et al. (2016) ³⁰⁾
<i>Chlamydomonas reinhardtii</i> CC-124	<i>Rhodobacter capsulatus</i>	-	photofermentation 12 h (12 h dark/12 h light)	19.94 g-ethanol/L	Kassim et al. (2016) ³⁶⁾

Table 5. Characteristics of different generation biomasses.⁷⁵⁾

Raw Material		Carbohydrate content (%)	Yield (L bioethanol /ton biomass)	Land use (m ² ·year/L bioethanol)	Productivity (L bioethanol /ha·year)
1 st	Corn	47.5 ⁷⁶⁾	460	2.5	3,450-4,600
	Beet	50 ⁷⁷⁾	100	1.3	5,000-10,000
	Sugarcane	40 ⁷⁸⁾	90	1.2	5,400-10,800
2 nd	Lignocellulosic Biomass	50-70	~240	1.0	~10,000
3 rd	Microalgae	20-50	129	1.40-0.47	7,093-53,199

공정을 최적화하기 어렵고, 낮은 에탄올 수율로 인해 아직까지 많은 연구가 이뤄지지 않는 상태이다.

Photofermentation은 빛에너지를 이용하여 탄수화물을 발효시켜 에탄올로 전환하는 방법으로, 광합성과 발효 두 단계를 포함하는 공정이다. 이 원리는 Calvin cycle에 의해서 무기탄소를 고정한 후에 중간체로써 인산염(phosphoglycerate)을 형성하여 pyruvate를 형성하고 두 가지 효소(pyruvate decarboxylase (PDC), alcohol dehydrogenase (ADH))에 의해 에탄올을 생성하게 된다. 광합성에 유리한 *Cyanobacteria* sp.을 이용한 연구들이 많은데 주로 *Synechocystis* sp. PCC 6803와 *Synechococcus elongatus* sp. PCC 7992의 2가지 종이 사용되고 있으며, 한 연구에서는 미세조류(*Chlamydomonas reinhardtii* CC-124)와 박테리아(*Rhodobacter capsulatus*)를 co-culture하는 photofermentation 공정을 이용하여 19.94±2.67 g/L 에탄올을 생산을 보고하기도 하였다.⁷³⁾ Table 4에 미세조류를 전처리하여 미생물 발효를 통해 바이오 에탄올을 생산한 최근 연구를 정리하였다.

4. 경제성

바이오 에탄올은 연소 과정에서 CO₂가 발생하지만 광합성 작용을 통해 CO₂를 흡수하는 과정에서 원료가 생산됨으로 기존 화석연료에 비해 대기중 CO₂ 농도 증가에 미치는 영향이 적은 탄소중립적인 연료로 알려져 있다. 이러한 이유로 바이오 연료의 사용으로 배출되는 CO₂는 국가의 배출량에서 제외하고 있다.⁷⁴⁾ 2017년 우리나라의 온실가스 배출량은 7억 9백만톤으로 CO₂가 전체의 약 92%를 차지하며, 최근 3년간 계속해서 증가하는 추세를 보이고 있는 상황에서 바이오 에탄올의 사용은 정치적, 경제적, 환경적 관점에서 고려해 볼 수 있는 에너지 대안 중에 하나이다.

Table 5에 세대별 다양한 바이오매스의 탄수화물 함량과 바이오 에탄올 수율, 토지 이용도 및 바이오 에탄올의 생산성을 나타내었다. 1세대의 생산성은 3,450~10,800 L-ethanol/ha·year, 2세대 생산성은 ~10,000 L-ethanol/ha·year이며, 3세대 생산성은 미세조류의 탄수화물 농도에 따라 7,093~53,199 L-ethanol/ha·year로 타 세대에 비해 최대 5배에 달하는 생산성을 나타내었다.⁷⁵⁾ 따라서 국내의 경우, 미국/브라질 같은 대

Table 6. Cost estimation of microalgae production in a raceway system.⁷⁶⁾

Parameter	Unit	Base case		Projected case	
		Operating days		Operating days	
		300	360	300	360
Depreciation	€/kg	0.3	0.24	0.16	0.128
Fertilizers		0.1	0.1	-	-
Carbon dioxide		0.92	0.92	-	-
Labor		0.18	0.16	0.1	0.1
Power		0.036	0.032	0.02	0.02
Purchase tax (VAT)		0.044	0.04	0.02	0.02
Other costs		0.16	0.12	0.06	0.06
Total cost		1.74	1.612	0.36	0.328

Table 7. Cost estimation of microalgae production in a photobioreactor system.⁷⁶⁾

Photobioreactor	Unit	Base case		Projected case	
		Operating days		Operating days	
		300	360	300	360
Depreciation	€/kg	6.1	5.1	3.1	2.5
Fertilizers		0.1	0.1	0	0
Carbon dioxide		0.2	0.2	0	0
Labor		0.1	0.1	0.05	0.02
Power		2.1	2.2	0.1	0.2
Purchase tax (VAT)		1	0.8	0.6	0.6
Other costs		0.4	0.4	0.2	0.2
Total cost		10	8.9	4.05	3.52

규모 경작을 통한 1세대 바이오 에탄올 생산이 불가능한 상황에서 소요 경지 면적이 비교적 적고 높은 생산성을 가진 미세조류를 활용한 바이오 에탄올 생산이 합리적이다.

Raphael Slade⁷⁹⁾ 연구팀은 배양방법에 따른 미세조류의 생산 비용을 분석하였다(Table 6, 7). 배양방법은 수로형 연못(raceway open pond)과 photobioreactor (PBR)로 구분하였다. 배양방법의 바이오매스 생산성과 에너지(W/m²) 및 면적(ha) 소요량, 증발량(L/m² day) 등을 각 배양방법의 특성을 고려하여 상대적인 수치로 설정하여 합리적인 비교가 가능하도록 하였으며 이 외의 수도세 및 전기세, CO₂ 및 영양물질 비용, 인건비 단가 등은 동일하게 설정하였다. 배양에 필요한 CO₂와 영양물질은 화력발전소와 폐수처리장에서 공급받는 경우를 projected case로 표기하고, 외부의 시설과 연계되지 않은 일반적인 경우는 base case로 구분하였다. 또한 미세조류 생산을 위한 연간 운전 일자를 고려하여 각 단계별 비용을 상세하게 고려하였는데, 그 결과 raceway 방식으로 미세조류를 생산하는 경우, base case는 1.6~1.7 €/kg-biomass (2,448원~2,600원)의 비용이 드는 반면 projected case는 CO₂와 영양물질의 공급에 드는 비용을 제외하면 0.3~0.4 €/kg-biomass (459원~612원)으로 감소했다. Photobioreactor (PBR) 방식의 경우 base case

는 9~10 €/kg-biomass (13,770원~15,300원)의 비용이 들었으며 projected case는 CO₂와 영양물질의 공급에 드는 비용을 제외한 경우에는 3.5~4.0 €/kg-biomass (5,300원~6,120원) 정도의 비용이 드는 것으로 분석하였다. 미세조류 생산 비용은 raceway 방식이 PBR보다 5~10배 정도 저렴한 것으로 파악이 되지만, raceway의 경우 소요되는 면적이 PBR보다 40배 정도가 크고 배양에 필요한 물의 양도 20배 정도 많기 때문에 현지 상황에 맞는 적절한 배양법을 선택하는 것이 중요하다.

5. 결론

탄소 중립적이며 연소시 오염물질 배출이 적은 바이오 에탄올은 기후 변화 및 화석 에너지 고갈 문제를 해결할 수 있는 대안적 에너지원으로 대두되고 있다. 우리나라와 같이 외부로부터 에너지를 공급받아야 하는 경우에 에너지 자립을 위한 기술로써 충분히 연구가 되어야 하는 분야이다. 하지만 1세대 기술은 경제성은 높지만, 대규모 경작이 어렵고 식량 자원에 대한 윤리적 문제가 존재하기 때문에 국내에 적용하기는 어려운 상황이고, 2세대 기술 역시 전처리 비용 문제와 낮은 생산 수율 문제로 실용화 가능성이 상대적으로

났다. 미세 조류를 이용한 3세대 기술의 경우는 기존 기술에 비해 높은 생산성, 상대적으로 낮은 전처리 및 배양 비용 등으로 인해 실용화 가능성이 가장 높은 분야라고 할 수 있다. 현재까지 개발된 연구 동향을 바탕으로 판단할 때, 기술의 경쟁력을 높이기 위해서는 1) 미세조류 수확 및 전처리 기술 개선, 2) 발효 공정에서의 생산 수율 증가에 대한 연구가 집중적으로 필요한 시점이다. 미세조류의 수확 공정은 전체 공정에서 20~30% 정도의 비용을 차지할 만큼 경제성에서 큰 부분을 차지하고 있다. 이를 줄이기 위해 선정된 미세조류에 맞는 배양 방식과 그에 맞는 수확 공정을 선택하는 것이 중요하다. 또한 발효 공정은 미생물에 의해 일어나는 생물학적 공정이므로, 유전자 재조합 기술을 통한 생산성 높은 균주의 개발이 일어날 경우 관련 연구에 큰 역할을 할 수 있을 것으로 생각된다. 또한 꾸준한 연구로 기술적인 발전을 거듭한다면 최근 문제가 되는 국내의 조류 발생 문제와 에너지 문제를 동시에 해결할 수 있는 기술로 사용될 수 있을 것이다.

Acknowledgement

본 연구는 환경부의 폐자원에너지화 재활용 전문인력 양성사업으로부터 지원을 받았습니다(YL-WE-19-001).

References

1. J. E. Kang, J. H. Ryu, J. G. Park, A study on the influencing factors on the economic performances of the waste-to-energy companies in Korea: focusing on the mediating effects of the government policies, *J. Korean Soc. Environ. Eng.*, 40(3), 111-122(2018).
2. S.-J. Park, M. Rana, D. Shin, J. H. Park, Lignin decomposition in hydrothermal liquefaction process using red-mud catalyst, *J. Korean Soc. Environ. Eng.*, 41(3), 132-139(2019).
3. J. H. Ko, Ligneous biomass energy, *News & Information for Chemical Engineers*, 29(3), 351-354(2011).
4. N. Dave, R. Selvaraj, T. Varadavenkatesan, R. Vinayagam, A critical review on production of bioethanol from macroalgal biomass, *Algal Res.*, 42, 101606(2019).
5. H. S. Kim, Bioethanol industry in the United States and Brazil, *World Agriculture*, 210(2), 45-70(2018).
6. D.-G. Lee, J.-J. Yoon, Biobutanol production from acid fermented solution of food waste using clostridium sp., *J. Korean Soc. Environ. Eng.*, 40(5), 211-216(2018).
7. T.-H. Kim, B.-S. Lim, H.-S. Park, Y.-M. Yum, Enhanced bio-hydrogen production from pretreated microalgal waste, *J. Korean Soc. Environ. Eng.*, 41(9), 494-500(2019).
8. J. Velazquez-Lucio, R. M. Rodríguez-Jasso, L. M. Colla, A. Sáenz-Galindo, D. E. Cervantes-Cisneros, C. N. Aguilar, B. D. Fernandes, H. A. Ruiz, Microalgal biomass pretreatment for bioethanol production: a review, *Biofuel Research Journal*, 5(1), 780-791(2018).
9. C.-Y. Chen, X.-Q. Zhao, H.-W. Yen, S.-H. Ho, C.-L. Cheng, D.-J. Lee, F.-W. Bai, J.-S. Chang, Microalgae-based carbohydrates for biofuel production, *Biochem. Eng. J.*, 78, 1-10(2013).
10. N. Hossain, J. Zaini, T. M. I. Mahlia, Life cycle assessment, energy balance and sensitivity analysis of bioethanol production from microalgae in a tropical country, *Renew. Sust. Energ. Rev.*, 115, 109371(2019).
11. N. K. Singh, D. W. Dhar, Microalgae as second generation biofuel. A review, *Agron. Sustain. Dev.*, 31(4), 605-629(2011).
12. K. K. Oh, Y. C. Park, K. H. Kim, Saccharification platform: bioethanol production using marine algae biomass, *News & Information for Chemical Engineers*, 32(3), 357-363(2014).
13. X. Wang, X. Liu, G. Wang, Two stage hydrolysis of invasive algal feedstock for ethanol fermentation, *J. Integr. Plant Biol.*, 53(3), 246-252(2011).
14. C.-Y. Chen, H.-Y. Chang, J.-S. Chang, Producing carbohydrate-rich microalgal biomass grown under mixotrophic conditions as feedstock for biohydrogen production, *Int. J. Hydrogen Energ.*, 41(7), 4413-4420(2016).
15. A. M. Illman, A. H. Scragg, S. W. Shales, Increase in chlorella strains calorific values when grown in low nitrogen medium, *Enzyme Microb. Technol.*, 27(8), 631-635(2000).
16. G. Dragone, B. D. Fernandes, A. P. Abreu, A. A. Vicente, J. A. Teixeira, Nutrient limitation as a strategy for increasing starch accumulation in microalgae, *Appl. Energy*, 88(10), 3331-3335(2011).
17. R. Harun, M. K. Danquah, Enzymatic hydrolysis of microalgal biomass for bioethanol production, *Chem. Eng. J.*, 168(3), 1079-1084(2011).
18. M.-S. Kim, J.-S. Baek, Y.-S. Yun, S. J. Sim, S. Park, S. Kim, Hydrogen production from *Chlamydomonas reinhardtii* biomass using a two-step conversion process: Anaerobic conversion and photosynthetic fermentation, *Int. J. Hydrogen Energ.*, 31(6), 812-816(2006).
19. A. Schwenzfeier, P. A. Wierenga, H. Gruppen, Isolation and characterization of soluble protein from the green microalgae *tetraselmis* sp., *Bioresour. Technol.*, 102(19), 9121-9127(2011).
20. M. R. Brown, M. A. McCausland, K. Kowalski, The nutritional value of four Australian microalgal strains fed to pacific oyster *crassostrea gigas* spat, *Aquaculture*, 165(3-4), 281-293(1998).
21. H. Singh, J. L. Varanasi, S. Banerjee, D. Das, Production of carbohydrate enriched microalgal biomass as a bioenergy feedstock, *Energy*, 188, 116039(2019).
22. S.-H. Ho, C.-Y. Chen, J.-S. Chang, Effect of light intensity and nitrogen starvation on CO₂ fixation and lipid/carbohydrate production of an indigenous microalga *scenedesmus obliquus* CNW-N, *Bioresour. Technol.*, 113, 244-252(2012).
23. Sulphari, Ni'matuzahroh, Y. S. W. Manuhara, Optimization of the bioconversion of *spirogyra hyalina* hydrolysates to become ethanol using *zymomonas mobilis*, *J. Appl. Environ. Biol. Sci.*,

- 2(8), 374-379(2012).
24. M. Demuez, A. Mahdy, E. Tomás Pejó, C. González Fernández, M. Ballesteros, Enzymatic cell disruption of microalgae biomass in biorefinery processes, *Biotechnol. Bioeng.*, 112(10), 1955-1966(2015).
 25. L. F. R. Montgomery, G. Bochmann, Pretreatment of Feedstock for Enhanced Biogas Production, 1st ed., IEA Bioenergy, Ireland(2014).
 26. C. Onumaegbu, J. Mooney, A. Alaswad, A. G. Olabi, Pre-treatment methods for production of biofuel from microalgae biomass, *Renew. Sust. Energ. Rev.*, 93, 16-26 (2018).
 27. E. Günerken, E. D'Hondt, M. H. M. Eppink, L. Garcia-Gonzalez, K. Elst, R. H. Wijffels, Cell disruption for microalgae biorefineries, *Biotechnol. Adv.*, 33(2), 243-260 (2015).
 28. K. H. Kim, I. S. Choi, H. M. Kim, S. G. Wi, H. Bae, Bioethanol production from the nutrient stress-induced microalga *Chlorella vulgaris* by enzymatic hydrolysis and immobilized yeast fermentation, *Bioresour. Technol.*, 153, 47-54(2014).
 29. Y. Chisti, M. Moo-Young, Disruption of microbial cells for intracellular products, *Enzyme Microb. Technol.*, 8(4), 194-204(1986).
 30. W. Y. Choi, H. Y. Lee, Effective production of bioenergy from marine *Chlorella* sp. by high-pressure homogenization, *Biotechnol. Biotechnol. Equip.*, 30(1), 81-89(2016).
 31. H. B. Aditiya, T. M. I. Mahlia, W. T. Chong, H. Nur, A. H. Sebayang, Second generation bioethanol production: A critical review, *Renew. Sust. Energ. Rev.*, 66, 631-653(2016).
 32. H. Wang, C. Ji, S. Bi, P. Zhou, L. Chen, T. Liu, Joint production of biodiesel and bioethanol from filamentous oleaginous microalgae *Tribonema* sp., *Bioresour. Technol.*, 172, 169-173(2014).
 33. S.-H. Ho, S.-W. Huang, C.-Y. Chen, T. Hasunuma, A. Kondo, J.-S. Chang, Bioethanol production using carbohydrate-rich microalgae biomass as feedstock, *Bioresour. Technol.*, 135, 191-198(2013).
 34. Y. Zheng, Z. Pan, R. Zhang, Overview of biomass pretreatment for cellulosic ethanol production, *Int. J. Agric. & Biol. Eng.*, 2(3), 51-68(2009).
 35. R. Harun, W. Jason, T. Cherrington, M. K. Danquah, Exploring alkaline pre-treatment of microalgal biomass for bioethanol production, *Appl. Energy*, 88(10), 3464-3467(2011).
 36. M. A. Kassim, S. Bhattacharya, Dilute alkaline pretreatment for reducing sugar production from *Tetraselmis suecica* and *Chlorella* sp. biomass, *Process Biochem.*, 51(11), 1757-1766 (2016).
 37. R. Soni, A. Nazir, B. S. Chadha, Optimization of cellulase production by a versatile *Aspergillus fumigatus* fresenius strain (AMA) capable of efficient deinking and enzymatic hydrolysis of solka floc and bagasse, *Ind. Crops Prod.*, 31(2), 277-283 (2010).
 38. M. J. E. C. van der Maarel, B. van der Veen, J. C. M. Uitendaal, H. Leemhuis, L. Dijkhuizen, Properties and applications of starch-converting enzymes of the α -amylase family, *J. Biotechnol.*, 94(2), 137-155(2002).
 39. S. P. Choi, M. T. Nguyen, S. J. Sim, Enzymatic pretreatment of *Chlamydomonas reinhardtii* biomass for ethanol production, *Bioresour. Technol.*, 101(14), 5330-5336(2010).
 40. J. Doucha, K. Lívanský, Influence of processing parameters on disintegration of *Chlorella* cells in various types of homogenizers, *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 81(3), 431-440 (2008).
 41. P. R. Postma, G. Pataro, M. Capitoli, M. Barbosa, R. H. Wijffels, M. Eppink, G. Olivieri, G. Ferrari, Selective extraction of intracellular components from the microalga *Chlorella vulgaris* by combined pulsed electric field - temperature treatment, *Bioresour. Technol.*, 203, 80-88(2016).
 42. J. R. Miranda, P. C. Passarinho, L. Gouveia, Pre-treatment optimization of *Scenedesmus obliquus* microalga for bioethanol production, *Bioresour. Technol.*, 104, 342-348 (2012).
 43. R. Harun, M. K. Danquah, Influence of acid pre-treatment on microalgal biomass for bioethanol production, *Process Biochem.*, 46(1), 304-309(2011).
 44. R. Halim, R. Harun, M. K. Danquah, P. A. Webley, Microalgal cell disruption for biofuel development, *Appl. Energy*, 91(1), 116-121(2012).
 45. J. M. Juárez, A. L. Hernando, R. M. Torre, S. B. Lanza, S. B. Rodríguez, Saccharification of microalgae biomass obtained from wastewater treatment by enzymatic hydrolysis. effect of alkaline-peroxide pretreatment, *Bioresour. Technol.*, 218, 265-271(2016).
 46. C.-C. Fu, T.-C. Hung, J.-Y. Chen, C.-H. Su, W.-T. Wu, Hydrolysis of microalgae cell walls for production of reducing sugar and lipid extraction, *Bioresour. Technol.*, 101(22), 8750-8754(2010).
 47. D. Hernández, B. Riaño, M. Coca, M. C. García-González, Saccharification of carbohydrates in microalgal biomass by physical, chemical and enzymatic pre-treatments as a previous step for bioethanol production, *Chem. Eng. J.*, 262, 939-945 (2015).
 48. O. K. Lee, A. L. Kim, D. H. Seong, C. G. Lee, Y. T. Jung, J. W. Lee, E. Y. Lee, Chemo-enzymatic saccharification and bioethanol fermentation of lipid-extracted residual biomass of the microalga, *Dunaliella tertiolecta*, *Bioresour. Technol.*, 132, 197-201(2013).
 49. M. M. El-Dalatony, M. B. Kurade, R. A. I. Abou-Shanab, H. Kim, E.-S. Salama, B.-H. Jeon, Long-term production of bioethanol in repeated-batch fermentation of microalgal biomass using immobilized *Saccharomyces cerevisiae*, *Bioresour. Technol.*, 219, 98-105(2016).
 50. O. Deesuth, P. Laopaiboon, P. Jaisil, L. Laopaiboon, Optimization of nitrogen and metal ions supplementation for very high gravity bioethanol fermentation from sweet sorghum juice using an orthogonal array design, *Energies*, 5(9), 3178-3197(2012).
 51. M. I. Khan, M. G. Lee, J. H. Shin, J. D. Kim, Pretreatment

- optimization of the biomass of microcystis aeruginosa for efficient bioethanol production, *Amb Express*, 7(1), 19(2017).
52. K. Dutta, A. Davey, J.-G. Lin, Evolution retrospective for alternative fuels: First to fourth generation, *Renew. Energy*, 69, 114-122(2014).
53. S. H. Mohd Azhar, R. Abdulla, S. A. Jambo, H. Marbawi, J. A. Gansau, A. A. Mohd Faik, K. F. Rodrigues, Yeasts in sustainable bioethanol production: A review, *Biochemistry and Biophysics Reports*, 10, 52-61(2017).
54. S. I. Mussatto, E. M. S. Machado, L. M. Carneiro, J. A. Teixeira, Sugars metabolism and ethanol production by different yeast strains from coffee industry wastes hydrolysates, *Applied Energy*, 92, 763-768(2012).
55. P. Saini, A. Beniwal, A. Kokkilgadda, S. Vij, Evolutionary adaptation of kluyveromyces marxianus strain for efficient conversion of whey lactose to bioethanol, *Process Biochem.*, 62, 69-79(2017).
56. K. A. Selim, D. E. El-Ghwas, S. M. Easa, I. Mohamed, A. Hassan, Bioethanol a microbial biofuel metabolite; new insights of yeasts metabolic engineering, *Fermentation*, 4(1), 16(2018).
57. A. Kumar, L. K. Singh, S. Ghosh, Bioconversion of lignocellulosic fraction of water-hyacinth (eichhornia crassipes) hemicellulose acid hydrolysate to ethanol by pichia stipitis, *Bioresour. Technol.*, 100(13), 3293-3297(2009).
58. M. Balat, H. Balat, C. Öz, Progress in bioethanol processing, *Prog. Energ. Combust.*, 34(5), 551-573(2008).
59. A. L. Gonçalves, M. Simões, Metabolic engineering of escherichia coli for higher alcohols production: An environmentally friendly alternative to fossil fuels, *Renew. Sust. Energ. Rev.*, 77, 580-589(2017).
60. C. Wang, B. F. Pfleger, S.-W. Kim, Reassessing escherichia coli as a cell factory for biofuel production, *Curr. Opin. Biotech.*, 45, 92-103(2017).
61. S. Lee, Y. Oh, D. Kim, D. Kwon, C. Lee, J. Lee, Converting carbohydrates extracted from marine algae into ethanol using various ethanolic escherichia coli strains, *Appl. Biochem. Biotechnol.*, 164(6), 878-888(2011).
62. T. Yuan, X. Li, S. Xiao, Y. Guo, W. Zhou, J. Xu, Z. Yuan, Microalgae pretreatment with liquid hot water to enhance enzymatic hydrolysis efficiency, *Bioresour. Technol.*, 220, 530-536(2016).
63. G. S. Jouzani, M. J. Taherzadeh, Advances in consolidated bioprocessing systems for bioethanol and butanol production from biomass: A comprehensive review, *Biofuel Res. J.*, 2(1), 152-195(2015).
64. K. Li, S. Liu, X. Liu, An overview of algae bioethanol production, *Int. J. Energy Res.*, 38(8), 965-977(2014).
65. C. K. Phwan, H. C. Ong, W.-H. Chen, T. C. Ling, E. P. Ng, P. L. Show, Overview: comparison of pretreatment technologies and fermentation processes of bioethanol from microalgae, *Energy Convers. Manag.*, 173, 81-94(2018).
66. A. R. Sirajunnisa, D. Surendhiran, Algae - A quintessential and positive resource of bioethanol production: A comprehensive review, *Renew. Sust. Energ. Rev.*, 66, 248-267(2016).
67. M. Cantarella, L. Cantarella, A. Gallifuoco, A. Spera, F. Alfani, Comparison of different detoxification methods for steam-exploded poplar wood as a substrate for the bioproduction of ethanol in SHF and SSF, *Process Biochem.*, 39(11), 1533-1542(2004).
68. M. Balat, Production of bioethanol from lignocellulosic materials via the biochemical pathway: a review, *Energy Convers. Manag.*, 52(2), 858-875(2011).
69. H. M. Kim, C. H. Oh, H.-J. Bae, Comparison of red microalgae (porphyridium cruentum) culture conditions for bioethanol production, *Bioresour. Technol.*, 233, 44-50(2017).
70. M. Danquah, B. Liu, R. Harun, Analysis of process configurations for bioethanol production from microalgal biomass, *Progress in Biomass and Bioenergy Production*, S. Shaukat (Ed.), In Tech, London, UK(2011).
71. M. Devarapalli, H. K. Atiyeh, A review of conversion processes for bioethanol production with a focus on syngas fermentation, *Biofuel Res. J.*, 2(3), 268-280(2015).
72. Y. Ueno, N. Kurano, S. Miyachi, Ethanol production by dark fermentation in the marine green alga, chlorococcum littorale, *J. Ferment. Bioeng.*, 86(1), 38-43(1998).
73. R. L. Costa, T. V. Oliveira, J. de Souza Ferreira, V. L. Cardoso, F. R. X. Batista, Prospective technology on bioethanol production from photofermentation, *Bioresour. Technol.*, 181, 330-337(2015).
74. E.-J. Min, S.-D. Kim, Introduction of bioethanol to domestic transportation market and implication for CDM project, in *Proceedings of the Fall Meeting of The Korean Society for New and Renewable Energy*, KSNRE, Busan, pp. 654-657(2007).
75. C. Silva, A. Bertucco, Bioethanol from microalgal biomass: A promising approach in biorefinery, *Braz. Arch. Boil. Technol.*, 62, e19160816(2019).
76. A. D. Putridinanti, C. T. Noviani, Gunawan, A. Agus, K. Harper, D. Poppi, A comparison of three highly fermentable carbohydrate sources (corn, cassava powder or cassava pulp) on in vitro digestion., *IOP Conf. Ser.: Earth Environ. Sci.*, 387, 012106(2019).
77. A. Procentese, F. Raganati, G. Olivieri, M. E. Russo, M. De La Feld, A. Marzocchella, Agro food wastes and innovative pretreatments to meet biofuel demand in Europe. *Chem. Eng. Technol.*, 42(5), 954-961(2019).
78. J. Howard, D. W. Rackemann, J. P. Bartley, C. Samori, W. O. S. Doherty, Conversion of sugar cane molasses to 5-hydroxymethylfurfural using molasses and bagasse-derived catalysts, *ACS Sustain. Chem. Eng.*, 6(4), 4531-4538(2018).
79. R. Slade, A. Bauen, Micro-algae cultivation for biofuels: cost, energy balance, environmental impacts and future prospects, *Biomass Bioenergy*, 53, 29-38(2013).

Authors

Jongkwan Park

School of Civil, Environmental and Chemical Engineering,
Changwon National University, Professor, ORCID[®] 0000-0002-
8308-7644

Hansol Mun

Department of Environmental Engineering, Changwon National
University, Master Course Student, ORCID[®] 0000-0003-1370-2442

Min-Ju Park

Department of Environmental and Chemical Engineering,
Eco-friendly Offshore Plant FEED Engineering Course, Changwon
National University, Ph.D. Candidate, ORCID[®] 0000-0003-0034-
7680

Heewon Jang

Department of Environmental Engineering, Changwon National
University, Master Course Student, ORCID[®] 0000-0002-6201-0728

Dae-Woon Jeong

School of Civil, Environmental and Chemical Engineering,
Changwon National University, Department of Environmental
and Chemical Engineering, Eco-friendly Offshore Plant FEED
Engineering Course, Changwon National University, Professor,
ORCID[®] 0000-0003-1842-3047