

*Nannochloropsis oceanica*로부터 용매추출법을 이용한 미세조류 오일 회수

박지연[†] · 이계안* · 김근용* · 김기용* · 최선아 · 정민지 · 오유관

한국에너지기술연구원 청정연료연구단
305-343 대전광역시 유성구 장동 71-2
*(주)엔엘피

619-912 부산광역시 기장군 일광면 화전리 403-5
(2013년 8월 30일 접수, 2013년 10월 17일 수정본 접수, 2013년 10월 22일 채택)

Microalgal Oil Recovery by Solvent Extraction from *Nannochloropsis oceanica*

Ji-Yeon Park[†], Gye-An Lee*, Keun-Yong Kim*, Ki-Yong Kim*, Sun-A Choi, Min-Ji Jeong and You-Kwan Oh

Clean Fuel Department, Korea Institute of Energy Research, 71-2 Jang-dong, Yuseong-gu, Daejeon 305-343, Korea
*NLP Corporation, 403-5 Hwajeon-ri, Ilgwang-myeon, Gijang-gun, Busan 619-912, Korea
(Received 30 August 2013; Received in revised form 17 October 2013; accepted 22 October 2013)

요 약

본 연구에서는 *Nannochloropsis oceanica*로부터 바이오디젤 원료유로 활용하기 위한 미세조류 오일을 추출하였다. 용매추출법을 이용하여 오일을 추출하였으며, 미세조류의 건조 및 습식 조건에서 오일 추출률(yield) 및 오일 추출 효율(efficiency)을 비교하였다. *N. oceanica*는 지방산 함량이 317.8 mg/g cell으로 건조중량 대비 30% 이상의 높은 오일 함량을 나타내었으며, 미세조류의 건조 조건에서 습식 조건보다 높은 오일 추출률을 나타내었다. 사용된 용매에 대해서 헥산 < 헥산-메탄올 < 클로로포름-메탄올 순으로 오일 추출률이 증가하였다. 그러나 추출된 오일의 지방산 함량을 분석한 결과, 오일 추출률이 증가할수록 지방산 함량은 감소하여 엽록소와 같은 불순물을 포함하고 있는 것으로 나타났다. 따라서 오일 추출률과 지방산 함량을 고려한 오일 추출 효율은 건조 조건에서 헥산-메탄올 이용 추출에서 82.6%의 가장 높은 효율을 나타내었고, 습식 조건에서는 클로로포름-메탄올 이용 추출에서 88.0%로 가장 높은 효율을 나타내었다. 따라서 경제적으로 미세조류의 건조가 가능한 경우에는 헥산-메탄올을 사용하고, 건조 비용이 높은 경우에는 습식 조건에서 클로로포름-메탄올을 사용한 용매추출법이 바람직하다.

Abstract – In this study, oil as a source of biodiesel from *Nannochloropsis oceanica* was extracted using organic solvent. The oil extraction yield and efficiency from dry and wet microalgae were investigated. The initial fatty acids content of the *N. oceanica* was 317.8 mg/g cell showing a high oil content over 30%. The yield from dry microalgae was higher than that from wet microalgae due to the inhibition of water. The yield by chloroform-methanol was the highest and the yield by hexane was the lowest. However, the total fatty acids contents with the chloroform-methanol were 678.7 and 778.2 mg/g oil under dry and wet conditions, respectively. The high oil extraction yield by chloroform-methanol reflected the fact that the extracted oil contained a high level of impurity. The hexane-methanol extraction from dry *N. oceanica* showed high oil extraction efficiency, 82.6%. The chloroform-methanol extraction under wet condition also showed high efficiency, 88.0%. While the hexane-methanol extraction from dry microalgae is desirable under low drying cost, the chloroform-methanol extraction from wet microalgae is desirable under high drying cost.

Key words: Microalgal Oil, Dry/wet Extraction, Solvent Extraction, *Nannochloropsis oceanica*, Biodiesel

1. 서 론

수송용 대체연료로 경유에 혼합되는 바이오디젤은 연소 시 발생하는 이산화탄소가 다시 식물의 광합성 기작에 의해 흡수되는 이산

화탄소 중립 연료로 관심을 받고 있다. 현재 국내 바이오디젤은 주로 대두유, 팜유 및 폐식용유로부터 생산되고 있으며, 원료의 대부분을 수입에 의존하고 있는 실정이다. 따라서 국내의 에너지 안보 측면에서 국내 자원을 이용할 수 있는 방안을 마련할 필요가 있으며, 지속적으로 증가하는 바이오디젤 목표량을 채우기 위해서는 더 많은 양의 원료유를 필요로 한다. 이러한 시점에서 육상 유지작물 대신 식량자원과 경쟁이 없고 오일 생산량이 10~100배 이상 높은 미세조류를 원료로 활용하는 기술이 국내뿐만 아니라 전 세계적으로 많은 관심을 받고 있다[1-5].

[†]To whom correspondence should be addressed.
E-mail: yeam@kier.re.kr

‡이 논문은 KAIST 양지원 교수님의 정년을 기념하여 투고되었습니다.
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.

미세조류로부터 바이오디젤을 생산하기 위해서는 미세조류 배양, 미세조류 수확, 오일 추출 및 바이오디젤 전환의 단계를 거치게 된다[3]. 배양된 미세조류는 수분이 99% 이상인 배양액 중에 존재하므로, 배양된 미세조류를 회수하기 위해서는 탈수 공정을 필요로 한다. 건조된 미세조류 시료를 이용한 오일 추출은 많은 연구가 이루어졌지만, 탈수 및 건조 공정에는 많은 에너지 비용이 소요되므로 습식 상태에서 오일을 추출하는 것이 바람직하다[6,7]. 미세조류로부터 오일을 추출하기 위하여 용매추출법, 효소처리법, 열수처리법, 마이크로파 이용법, aminoclay 이용법 등 다양한 오일 추출 공정이 연구되고 있다[8-11]. 오일 추출법의 대부분이 미세조류의 세포벽을 일부 붕괴시킴으로서 세포벽 내부에 있는 오일의 외부 노출이 용이해지는 기작을 포함하며, 붕괴된 세포벽의 내부나 외부에 존재하는 오일의 회수는 주로 유기용매를 이용한다[9,12,13].

다양한 오일 추출법 중에서 가장 일반적으로 이용되는 용매추출법은 비교적 운전이 간단하며 상온에서 적용가능하다는 장점이 있지만 건조된 시료에 대하여 주로 적용되어 왔으며, 수분 함량이 높아짐에 따라 오일 추출률이 저해를 받는다. 용매추출법에 다양한 유기용매가 적용될 수 있으며, 용매의 특성에 따라 오일 추출률이 달라질 것으로 기대된다.

본 연구에서는 *Nannochloropsis oceanica*로부터 건식 및 습식 조건에서 용매추출법을 이용하여 오일을 추출하고, 수분의 존재 여부에 따른 오일 추출률 및 추출 효율을 비교하고자 하였다. 또한 헥산, 메탄올, 클로로포름의 세 가지 용매를 검토하여 습식 조건에서 오일 추출 효율을 높일 수 있는 용매의 조건을 찾고자 하였다. 추출된 미세조류 오일로부터 황산 촉매를 이용한 에스테르화 반응을 통하여 *N. oceanica* 추출 오일의 바이오디젤 전환 가능성을 확인하였다.

2. 실험

2-1. 실험 재료

(주)엔엘피에서 배양하여 수확한 *Nannochloropsis oceanica*를 용매추출법을 위한 미세조류로 이용하였다. 원심분리를 통하여 수분을 일부 제거하고 수확된 *N. oceanica*의 농도는 300 g/L로 습식 오일 추출을 위하여 이용되었으며, 동결건조(일신 BioBase, FD5512)한 시료는 건식 오일 추출에 이용되었다. 용매추출법에 이용된 용매는 헥산(Junsei, 96%), 메탄올(Junsei, 99.6%), 클로로포름(Junsei, 99%)을 단독 또는 혼합하여 사용하였다.

2-2. 실험 방법

습식 오일 추출은 1 g의 미세조류를 포함한 3.3 mL 시료를 이용하였으며, 건식 오일 추출은 1 g의 동결건조된 시료를 이용하였다. 헥산, 헥산:메탄올=7:3(v/v), 클로로포름:메탄올=7:3(v/v)의 세 가지 용매를 사용하여 오일 추출률을 비교하였다. 미세조류 양은 용매 대비 5%(w/w)였으며, 1000 rpm에서 6시간 동안 충분히 교반한 뒤 오일을 포함하는 용매층을 회수하여 감압증발(Genevac, EZ2 PLUS)하여 용매를 휘발시키고 남아있는 오일을 회수하였다. 헥산 및 헥산:메탄올은 용매층이 상층이며, 클로로포름:메탄올은 용매층이 하층이었다.

오일 추출량 및 오일 추출률(yield)은 다음과 같이 계산되었다. 미세조류 지방산 분석법을 이용한 추출된 오일의 지방산 함량(mg/g oil) 분석 후, 오일 추출률과 지방산 함량의 곱으로 오일 추출 효율(efficiency)을 계산하였다.

$$\text{오일 추출량}(\%, w/w) = \frac{\text{회수된 오일량}(g)}{\text{미세조류 건량}(g)} \times 100 \quad (1)$$

$$\text{오일 추출률}(\%, w/w) = \frac{\text{회수된 오일량}(g)}{\text{미세조류 건량 내 총 지방산 함량}(g)} \times 100 \quad (2)$$

$$\text{오일 추출 효율}(\%, w/w) = \text{오일 추출률}(\%) \times \frac{\text{추출 오일 내 총 지방산 함량}(mg/g \text{ oil})}{1000} \quad (3)$$

추출된 미세조류 오일의 바이오디젤 전환 가능성을 확인하기 위하여 충분한 양의 메탄올과 황산 촉매를 이용하여 에스테르화 반응을 수행하였다. 미세조류 오일의 유리지방산 함량이 높아 산 촉매를 이용한 반응을 선택하였다. 오일:메탄올:황산=1:1:0.1(w/w)로 100 °C에서 1시간 반응시켰다. 증류수로 세정 후 전환된 바이오디젤의 지방산 메틸 에스테르(fatty acid methyl ester, FAME) 함량을 측정하였다.

2-3. 분석 방법

미세조류 및 추출된 미세조류 오일의 총 지방산 함량을 측정하기 위해 수정된 direct trans-esterification법을 사용하였다[14]. 건조 미세조류 및 추출 오일 각각 10 mg을 test tube에 넣고 클로로포름:메탄올(2:1, v/v) 2 mL을 넣은 뒤 vortex mixer로 10분간 섞어주고 내부 표준물질인 heptadecanoic acid-chloroform solution(Sigma-Aldrich, 500 µg/L) 1 mL을 넣고 메탄올 1 mL과 황산 0.3 mL을 넣어준다. Vortex mixer로 10분간 섞어준 뒤 100 °C 항온조에서 10분간 반응시킨 후 상온에서 충분히 식혀준다. 식힌 test tube에 증류수 1 mL을 첨가한 뒤 vortex mixer로 5분간 섞은 후 원심분리기(4,000RPM, 10분)에서 원심분리하고 층분리된 용액 중 아래층을 주사기로 뽑고 필터로 여과 후 vial에 1 mL을 넣고 가스 크로마토그래피(Agilent 7890)로 분석한다. 외부 표준물질로 Mix RM3, Mix RM5, GLC50, GLC70 (Supelco)을 사용하여 지방산의 정량 분석을 수행하였다.

추출된 미세조류 오일 중의 유리지방산 함량은 적정법에 의한 산가 분석을 통하여 측정하였다. 산가는 EN ISO 661(Animal and vegetable fats and oils - Preparation of test sample)의 방법으로 분석하였다. 산가 및 유리지방산 함량은 다음과 같이 계산되었다[15,16].

$$\text{Acid value} = \frac{56.11 \times V \times c}{m} \quad (4)$$

V = 사용한 KOH 용액의 부피(mL)

c = KOH 용액의 몰 농도(M)

m = 시료의 질량(g)

$$\text{Free fatty acid}(\%) \cong \frac{1}{2} \times \text{Acid value} \quad (5)$$

바이오디젤 전환 반응 후 지방산 메틸 에스테르(FAME)는 표준분석조건 EN 14103에 따라 분석하였다[17]. 250 mg 시료가 내부 표준물질인 methyl heptadecanoate-heptane solution(Fluka, 10 mg/g) 5 mL과 교반된 후 가스 크로마토그래피(Agilent 6890)로 분석하였다. FAME의 검출 및 분리를 위해 사용한 컬럼은 HP-INNOWAX capillary column(30 m×0.32 mm×0.5 µm)이다. Carrier gas로는 헬륨을 사용하였고, split mode의 split ratio는 45:1로 하였으며 헬륨가스 유속은 2.2 mL/min이었다. 오븐의 온도는 250 °C까지 증가하며, 인젝터의 온도는 250 °C, 검출기의 온도는 275 °C로 하였다.

3. 결과 및 고찰

3-1. *N. oceanica*의 지방산 함량 분포

*N. oceanica*의 지방산 함량 분포를 Table 1에 나타내었다. *N. oceanica*의 총 지방산 함량은 317.8 mg/g cell로서 건조 중량 대비 cell 당 약 31.8%의 지방산을 함유하고 있는 것으로 확인되었다. 이는 *N. oceanica*의 바이오디젤 전환 가능한 성분이 31.8% 포함되어 있다는 것을 의미한다. 지방산 중에서 주요 구성성분은 palmitic acid(32.3%)와 palmitoleic acid(28.3%)였다. Oleic acid 함량이 높을수록 바이오디젤의 산화안정성과 저온유동성이 향상되는데, *N. oceanica*의 경우는 oleic acid가 8.7%로 낮은 편이었다[18]. Others에는 홀수 개의 탄소 수 지방산이나 불포화 결합을 다량 포함한 지방산들이 포함된다.

3-2. 미세조류 오일 추출률

용매의 종류 및 수분 여부에 따른 미세조류 오일 추출률을 Table 2에 나타내었다. 동일 용매에 대하여 건식 및 습식 조건을 비교하면 건식 조건에서 높은 오일 추출률을 나타내었다. 따라서 용매추출법이 수분에 의해 저해를 받는다는 것을 확인할 수 있으며, 습식 상태에서 소수성의 오일과 용매의 접촉이 수분에 의해서 저해되었다. 용매별로 비극성의 헥산에서는 낮은 오일 추출률을 보이고 있다. 이는 비극성의 헥산은 주로 중성지방을 용해시키기 때문이다[19]. 헥산-메탄올 혼합 용매에서는 메탄올의 친수성 성질에 의해 중성지방 이외의 지질 성분도 같이 추출 가능하여 오일 추출률이 증가한 것으로 보이며, 저극성인 클로로포름과 극성인 메탄올에서는 더 많은 양의 다양한 지질이 용매층으로 추출되었다. 클로로포름-메탄올 사용시 오일 추출률이 100% 보다 높게 나온 것은 바이오디젤 전환 가능한 지방산 성분 외에 엽록소나 용매에 용해되는 다른 지질 성분들이 포함되어 있음을 의미하므로, 추출된 오일의 총 지방산 함량을 분석함으로써 오일의 순도를 점검해 보아야 한다. 헥산 용매에서는 습식과 건식에서 6.7배의 수율 차이가 나타나, 대두유와 같은 육상작물의 오일 추출에는 헥산이 사용 가능하지만, 다양한 지질 성분을 포함하고 있는 미세조류의 습식 상태에서의 오일 추출에는 비극성인 헥산만으로는 적합하지 않았다. 건조 시료에 대해서는 헥산에 극성인 메탄올을 혼합하여 추출률을 90.1%까지 증가시킬 수 있었다. 습식 조건에서는 헥산-메탄올도 수분의 저해작용으로 48.4%의 낮은 수율을 보

Table 1. Fatty acids contents and compositions of *N. oceanica*

Fatty acid		mg/g cell	Content (%)
Myristic acid	C14:0	1.0	0.3
Palmitic acid	C16:0	102.8	32.3
Palmitoleic acid	C16:1	89.9	28.3
Stearic acid	C18:0	2.2	0.7
Oleic acid	C18:1	27.6	8.7
Others		94.3	29.7
Total		317.8	100.0

Table 2. Oil extraction yields by room-temperature organic solvents from *N. oceanica*

Solvent	Extracted oil amount (%)		Oil extraction yield (%)	
	Dry	Wet	Dry	Wet
Hexane	18.8	2.8	59.2	8.7
Hexane-methanol	28.7	15.4	90.1	48.4
Chloroform-methanol	36.5	36.0	114.7	113.1

Table 3. Total fatty acids contents of extracted oil from *N. oceanica*

Solvent	Total fatty acid content (mg/g oil)	
	Dry	Wet
Hexane	953.2	998.5
Hexane-methanol	916.9	936.0
Chloroform-methanol	678.7	778.2

여 더 강한 용매인 클로로포름-메탄올을 사용해야 높은 수율을 얻을 수 있었다. 클로로포름-메탄올 조합에서는 두 용매가 친수성의 성질을 가지고 있어 수분에 의한 저해가 미미하여 건식 및 습식 조건에서 비슷한 추출률을 나타내었다.

3-3. 추출 오일의 총 지방산 함량 및 오일 추출 효율

추출된 미세조류 오일에 포함된 지방산 함량을 분석하여 Table 3과 같은 결과를 얻을 수 있었다. 헥산 및 헥산-메탄올 추출에서는 추출된 oil 당 900 mg 이상의 바이오디젤 전환 가능한 지방산 성분을 함유하고 있으며, 오일 추출률이 월등히 높았던 클로로포름-메탄올에서는 지방산 이외의 다른 지질 성분이 같이 포함되어 추출된 oil 당 지방산 함량은 건식 조건에서 678.7 mg, 습식 조건에서 778.2 mg으로 낮게 나타났다. 이는 추출된 오일에서 20~30% 성분이 바이오디젤 전환 가능하지 않다는 것을 의미하며, 바이오디젤 수율이 감소하게 된다.

오일 추출률과 추출된 오일의 바이오디젤 생산 가능한 지방산 함량을 고려한 오일 추출 효율을 Table 4에 나타내었다. 두 가지 값의 곱으로부터 계산된 효율을 보면 습식 조건에서 클로로포름-메탄올을 사용한 경우가 가장 높은 효율 88.0%를 나타내었으며, 건식 조건에서 헥산-메탄올을 사용하는 경우가 82.6%의 추출 효율을 나타내었다.

육상 유지작물과는 달리 물속에서 배양되는 미세조류로부터 오일을 추출하기 위해서 탈수 또는 건조의 수분을 제거하는 공정을 필요로 한다. 건조 공정은 높은 에너지 비용을 필요로 하기 때문에, 습식 조건에서 강한 용매를 사용함으로써 오일을 높은 효율로 회수하는 것이 가능하지만, 저렴한 건조 공정을 구상한다면 건식 조건에서 헥산-메탄올을 사용하여 오일을 추출할 경우 미세조류에 포함된 수분만큼의 반응기 크기를 줄일 수 있다.

3-4. 추출 오일의 바이오디젤 전환

추출된 미세조류 오일을 이용하여 바이오디젤 전환을 수행하였다. 건조시료로부터 헥산-메탄올 추출에 의해 회수된 오일과 습식시료로부터 클로로포름-메탄올 추출에 의해 회수된 오일의 황산 촉매에 의

Table 4. Oil extraction efficiencies of *N. oceanica* by solvent extraction

Solvent	Oil extraction efficiency (%)	
	Dry	Wet
Hexane	56.4	8.7
Hexane-methanol	82.6	45.3
Chloroform-methanol	77.8	88.0

Table 5. FAME contents of biodiesel after esterification of microalgal oil

Condition	Dry	Wet
Solvent	Hexane-methanol	Chloroform-methanol
Free fatty acid (%)	19.5	30.5
FAME (%)	95.4 (distillation)	93.3 (distillation)

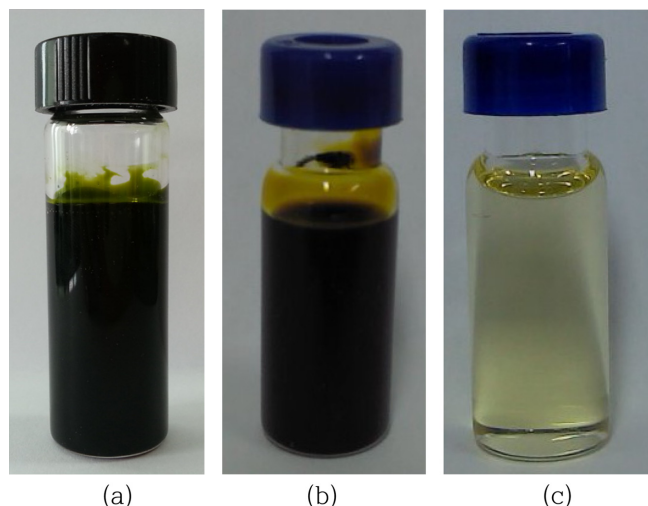


Fig. 1. Microalgal oil (a), biodiesel (b) and distilled biodiesel (c).

한 에스테르화 반응을 통하여 바이오디젤을 생산하였다(Table 5). 두 가지 미세조류 오일의 전환 반응 전 유리지방산 함량은 각각 19.5와 30.5%로 클로로포름이 용매로 사용되었을 경우 증가하는 경향을 나타냈으며, 유리지방산 함량이 높아 염기 촉매를 이용한 전이에스테르화 반응을 적용하면 비누화 현상이 발생하므로, 산 촉매를 이용한 전환이 바람직하다. 용매추출법으로 추출된 오일은 염색소를 포함하고 있어 진초록을 띠며, 바이오디젤 전환 후에도 진한 색깔을 띠고 있다(Fig. 1). 증류 공정을 거친 후 연한 노란색의 바이오디젤을 얻을 수 있었지만, FAME 함량이 96.5% 이상인 국내 바이오디젤 품질기준에는 미달하는 결과를 나타내어 물질 향상을 위하여 에스테르화 전환반응의 효율을 더욱 증가시키는 방안을 모색할 필요가 있다[11].

4. 결 론

*N. oceanica*는 지방산 함량이 317.8 mg/g cell으로 건조중량 대비 30% 이상의 높은 오일 함량을 나타내는 미세조류로 바이오디젤 생산을 위한 원료유로 적합하였다. 미세조류의 건조 조건에서 습식 조건보다 높은 오일 추출률을 나타내었으며, 사용된 용매에 대해서 헥산 < 헥산-메탄올 < 클로로포름-메탄올 순으로 오일 추출률이 증가하였다. 그러나 오일 추출률이 증가할수록 지방산 함량은 감소하여 염색소와 같은 불순물을 포함하고 있는 것으로 나타났다. 따라서 오일 추출률과 지방산 함량을 고려한 오일 추출 효율은 습식 조건에서 클로로포름-메탄올을 사용한 경우가 가장 높은 효율 88.0%를 나타내었으며, 건조 조건에서 헥산-메탄올을 사용하는 경우가 82.6%의 추출 효율을 나타내었다. 따라서 저렴하게 미세조류의 건조가 가능한 경우에는 헥산-메탄올을 사용하고, 건조 비용이 높은 경우에는 습식 조건에서 클로로포름-메탄올을 사용한 용매추출법이 바람직하다.

References

1. Chisti, Y., "Biodiesel from Microalgae," *Biotechnol. Adv.*, **25**, 294-306(2007).
2. Kim, J. K., Um, B. H. and Kim, T. H., "Bioethanol Production from Micro-algae, *Schizocytrium* sp., Using Hydrothermal Treatment and Biological Conversion," *Korean J. Chem. Eng.*, **29**, 209-

- 214(2012).
3. Li, Q., Du, W. and Liu, D., "Perspectives of Microbial Oils for Biodiesel Production," *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **80**, 749-756 (2008).
4. Yoo, S. J., Oh, S. K. and Lee, J. M., "Sensitivity Analysis with Optimal Input Design and Model Predictive Control for Microalgal Bioreactor Systems," *Korean Chem. Eng. Res.(HWAHAK KONG-HAK)*, **51**, 87-92(2013).
5. Schenk, P. M., Thomas-Hall, S. R., Stephens, E., Marx, U. C., Mussgnug, J. H., Posten, C., Kruse, O. and Kankamer, B., "Second Generation Biofuels: High Efficiency Microalgae for Biodiesel Production," *Bioenerg. Res.*, **1**, 20-43(2008).
6. Demirbas, A., "Production of Biodiesel from Algae Oils," *Energ. Source*, **A31**, 163-168(2009).
7. Xu, H., Miao, X. and Wu, Q., "High Quality Biodiesel Production from a Microalga *Chlorella Protothecoides* by Heterotrophic Growth in Fermenters," *J. Biotechnol.*, **126**, 499-507(2006).
8. Halim, R., Danquah, M. K. and Webley, P. A., "Extraction of Oil from Microalgae of Biodiesel Production: A Review," *Biotechnol. Adv.*, **30**, 709-732(2012).
9. Lee, Y. C., Huh, Y. S., Farooq, W., Chung, J., Han, J. I., Shin, H. J., Jeong, S. H., Lee, J. S., Oh, Y. K. and Park, J. Y., "Lipid Extractions from Docosahexaenoic Acid (DHA)-rich and Oleaginous *Chlorella* sp. Biomasses by Organic-nanoclays," *Bioresour. Technol.*, **137**, 74-81(2013).
10. Shin, H. J., Park, J. H., Jung, W. K., Cho, H. and Kim, S. W., "Development of Biorefinery Process Using Microalgae," *J. Korean Soc. Precis. Eng.*, **28**, 154-167(2011).
11. Lee, Y. C., Huh, Y. S., Farooq, W., Han, J. I., Oh, Y. K. and Park, J. Y., "Oil Extraction by Aminoparticle-based H₂O₂ Activation via Wet Microalgae Harvesting," *RSC Adv.*, **3**, 12802-12809(2013).
12. Biller, P., Friedman, C. and Ross, A. B., "Hydrothermal Microwave Processing of Microalgae as a Pre-treatment and Extraction Technique for Bio-fuels and Bio-products," *Bioresour. Technol.*, **136**, 188-195(2013).
13. Cho, H. S., Oh, Y. K., Park, S. C., Lee, J. W. and Park, J. Y., "Effects of Enzymatic Hydrolysis on Lipid Extraction from *Chlorella Vulgaris*," *Renew. Energ.*, **54**, 156-160(2013).
14. Lepage, G. and Roy, C. C., "Improved Recovery of Fatty Acid Through Direct Transesterification Without Prior Extraction or Purification," *J. Lipid Res.*, **25**, 1391-1396(1984).
15. AOCS Official Method cd 3d-63, "Acid Value," Official Method and Recommended practices of the AOCS, Fifth Edn. AOCS. Champaign, Illinois(2003).
16. Gustone, F. D., "Fatty Acid and Lipid Chemistry," Chapman & Hall, UK, 207(1996).
17. CEN, EN 14103, "Fat and oil derivatives - Fatty acid methyl esters (FAME) - Determination of ester and linoleic acid methyl ester contents," (2001).
18. Farooq, W., Lee, Y. C., Ryu, B. G., Kim, B. H., Kim, H. S., Choi, Y. E. and Yang, J. Y., "Two-stage Cultivation of two *Chlorella* sp. Strains by Simultaneous Treatment of Brewery Wastewater and Maximizing Lipid Productivity," *Bioresour. Technol.*, **132**, 230-238(2013).
19. Ferraz, T. P. L., Fiuza, M. C., Santos, M. L. A., Carvalho, L. P. and Soares, N. M., "Comparison of Six Methods for the Extraction of Lipids from Serum in Terms of Effectiveness and Protein Preservation," *J. Biochem. Biophys. Methods*, **58**, 187-193 (2004).