





2020 년 2 월

석사학위논문

Ultrasound sonication을 이용한 미세조류 세포막 파쇄에 관한 연구

조 선 대 학 교 대 학 원 기계공 학과 배명권



Ultrasound sonication을 이용한 미세조류 세포막 파쇄에 관한 연구 A Study on the Cell Disruption of Microalgae using Ultrasound sonication

2020년 02월 25일

조선대학교 대학원

기계공학과

배 명 권



Ultrasound sonication을 이용한 미세조류 세포막 파쇄에 관한 연구

지도교수 정 상 화

이 논문을 공학석사학위신청 논문으로 제출함

2019년 10월

조선대학교 대학원

기계공학과

배 명 권



배명권의 석사학위논문을 인준함



2019년 11월

조선대학교 대학원



목 차

LIST OF TABLES
LIST OF FIGURES IV
ABSTRACT ····································
제1장 서 론1
제1절 연구 배경1
제2절 연구 동향7
제3절 연구내용 및 방법9
제2장 초음파 개념 및 미세조류 배양11
제1절 초음파 개념11
1. 초음파
2. 초음파 공동 현상
제2절 미세조류 균주 및 배지14
제3절 미세조류 배양 및 성장 곡선 모델링15
1. 미세조류 배양
2. 성장곡선 모델링

제3장	초음파	처리	공정		22
-----	-----	----	----	--	----

- - 3. 초기 균체 용량에 따른 세포 파쇄 효율 30
- - 1. 초음파 장치의 조사 위치에 따른 파쇄 효율 38
 - 2. 초기 균체 농도에 따른 세포 파쇄 효율 …………… 40
 - 3. 파형 종류에 따른 세포 파쇄 효율 ……………………………………………42

제4장 연속 저주파 처리 공정48
제1절 연속 저주파 처리 장치 시스템의 구성 48
1. 연속 저주파 처리 장치 시스템48
2. 연속 저주파 파쇄 실험조건 51
제2절 연속 저주파 장치의 세포 파쇄
1. 초기 균체 농도에 따른 세포 파쇄 효율 51
2. 출력 파워에 따른 세포 파쇄 효율
3. 균체 순환 유량에 따른 세포 파쇄 효율 55
4. 초음파 작동주기에 따른 세포 파쇄 효율 58
5. 초기 pH에 따른 세포 파쇄 효율 62
제 5 장 결론
제 1절 연구 결론 65
제 2절 향후 연구 방향68

참 고 문 헌69



LIST OF TABLES

Table 1-1	Sigmodial regression model for biological growth curve2
Table 1-2	Biodiesel production yields using different biomass2
Table 1-3	Feature of microalgae harvesting method5
Table 2-1	Composition of TAP medium for Chlorella sp 14
Table 2-2	Sigmodial regression model for biological growth curve
Table 3-1	Output variable of batch low frequency device 23
Table 3-2	Level of parameters in LFNFU process
Table 3-3	Characteristic values of high frequency device probe
Table 3-4	Level of parameters in HFFU process
Table 3-5	Output power of ultrasound according to applied voltage
Table 4-1	Output variable of continuous low frequency sonication device 49
Table 4-2	Level of parameters in continuous low frequency sonication
process	
Table 4-3	Flow rate according to revolution per minute



LIST OF FIGURES

Fig. 1-1 Process flow showing the downstream steps needed to produce
biodiesel from biomass
Fig. 1-2 Classification of the cell disruption methods
Fig. 2-1 Classification of the sound waves according to the frequency 11
Fig. 2-2 Cavitation process
Fig. 2-3 Final cell concentration and the initial concentration of the medium
in batch culture process relationships15
Fig. 2-4 Schematic diagram of flat-panel photo-bioreactor
Fig. 2-5 Front panel of monitoring and control system
Fig. 2-6 Growth curve of Chlorella sp
Fig. 2-7 Growth curve of growth phase
Fig. 2-8 Growth curve of Chlorella sp. fitted with Logistic, Gompertz
models for OD Values
Fig. 3-1 Schematic diagram of batch low frequency non-focused ultrasound
23
Fig. 3-2 Experimental results of initial microalgae concentration
Fig. 3-3 Experimental results of output power
Fig. 3-4 Experimental results of initial capacity
Fig. 3-5 Experimental results of pH value
Fig. 3-6 Photomicrograph of cell variation during batch LFNFU processing 33



Fig. 3-7 Schematic diagram of batch high frequency focused ultrasound 36
Fig. 3-8 Experimental results of ultrasonic irradiation position
Fig. 3-9 Experimental results of initial microalgae concentration
Fig. 3-10 Difference between square and sine waves
Fig. 3-11 Experimental results of type of ultrasonic wave form
Fig. 3-12 Experimental results of applied voltage
Fig. 3-13 Photomicrograph of cell variation during batch HFFU processing 47
Fig. 4-1 Schematic diagram of continuous low frequency sonication system49
Fig. 4-2 Experimental results of initial microalgae concentration
Fig. 4-3 Experimental results of output power
Fig. 4-4 Experimental results of flow rate
Fig. 4-5 Experimental results of duty cycle
Fig. 4-6 Experimental results of flow rate and duty cycle
Fig. 4-7 Experimental results of pH value 64
Fig. 4-8 Photomicrograph of cell variation during continuous low frequency
sonication processing



ABSTRACT

A Study on the Cell disruption of Microalgae using Ultrasound sonication

Bae, Myeong Gwon Advisor : Prof. Jeong, Sang-Hwa, Ph.D. Department of Mechanical Engineering, Graduate School of Chosun University

Recently, because of industry development, the consumption of fossil energy such as petroleum, coal, and natural gas has increased exponentially. Therefore, there is an issue with environmental pollution caused by greenhouse gases due to energy shortages. The increase in carbon dioxide emissions is getting serious. In order to solve these serious problems, many studies are being conducted on renewable energy sources and alternative bioenergy. Among them, the third generation bioenergy, microalgae, has recently emerged as a resource with infinite potential. Microalgae are photosynthetic and independent nutrient microorganisms, a sustainable source of bio-energy without environmental pollution because they produce useful substances by synthesizing the necessary nutrients using inorganic light. In addition, one efficient approach is the production of biodiesel based on biomass extracted from the useful materials from microalgae; this approach also has a carbon dioxide reduction effect that might reduce global warming. To extract lipids from microalgae, the cell membrane disruption process is essential during the harvesting process, and research is being conducted into various ways for efficient lipid extraction. Harvesting methods are largely divided into mechanical and non-mechanical methods. In general, the mechanical methods has the advantage of maintaining



the protein structure of the microalgae well, but the processing is complicated, and the maintenance cost is high. Non-mechanical methods can harvest large quantities and are economical, but there are fatal disadvantages due to environmental pollution caused by chemical treatments. However, at present, the efficiency of extracting lipids from microalgae still requires research and development due to the lack of productivity and economy compared to existing bioenergy.

In this study, the efficiency of continuous and highly productive cell membrane crushing using an ultrasonic mechanical method, which causes not environmental pollution or has a not post-treatment cost due to the chemical process, was used for economic and efficient lipid extraction of microalgae. When microalgae are irradiated with ultrasonic waves according to type, the crushing efficiency of the microalgae varies greatly depending on the size and concentration of the cell and the thickness of the cell wall. This study was conducted to investigate the optimum crushing efficiency condition for the microalgae Chlorella sp. In addition, the necessary data was collected using various sensors to analyze the growth curves of cultured *Chlorella sp.* In order to measure the crystal coefficient of the growth curve, the growth curve was approximated using two types of mathematical equations: the Gompertz model and the Logistic model. In the low frequency experiment, four kinds of cell density, output power, initial capacity, and pH were designated as variables. Finally, in the continuous ultrasonic experiment, five kinds of optical density, output power, cell cycle flow rate, duty cycle, and pH were designated as variables, and the relationship between the variables was analyzed. Through the experiments, the effects of the interactions between the variables on the cell disruption efficiency and the optimum disruption conditions were studied. Experimental results showed that cell crushing efficiency was most affected by output power in all three types of ultrasonic devices. Moreover, the highest crushing efficiency result was obtained under all conditions when the pH was adjusted in parallel.



제1장서 론

제1절 연구 배경

산업혁명 이후 많은 발전을 이루면서 기존의 주 에너지원인 화석에너지 석유, 석탄, 천연가스 등의 사용량이 기하급수적으로 증가하였고, 이는 많은 문제점들을 야기했다. 기존 화석연료의 지나친 소모로 인해 이산화탄소가 다량 발생하여 이상 기후 현상들이 발생하고 있으며, 이러한 현상은 기온 상승의 원인이 되는 온실가 스에 의해 발생하고 있다¹¹. 최근 화석연료 기반의 산업을 위협할 수 있는 석유파 동의 위기, 전 지구적 대기 중 이산화탄소 증가에 의한 환경문제의 대두 등의 문 제점 대안으로 신재생 에너지 및 대체 바이오 에너지를 개발하려는 노력이 세계적 으로 일어나고 있다. 현재 다양한 종류의 신재생 에너지나 바이오 에너지에 대한 연구가 수행되고 있으며 그 중에서 제 3세대 바이오 에너지인 미세조류 (microalgae)가 청청 에너지 자원으로 각광을 받고 있다. 미세조류는 광·독립영양 미생물로 빛을 통하여 필요 양분을 무기질로 합성하여 유용물질을 생산하기 때문 에 환경오염이 없는 지속 가능한 에너지원이다^[2]. 또한, 미세조류는 이산화탄소를 고정하는 해양 생명체로서 고정된 이산화탄소로부터 다양한 유용물질을 생산할 수 있는 청정자원이라는 특징을 가지고 있다. 이러한 유용한 특징들을 많이 가지고 있지만 현재는 기존의 대체에너지원들 보다 경제성 및 생산성에서 단점을 갖고 있 기 때문에 연구개발이 필요한 시점이다. Table 1-1은 현재 사용되는 주요 에너지 자원 별로 특징을 비교한 것이다⁽³⁾. 현재 다양한 바이오매스(biomass)로부터 바이 오디젤을 생산하고 있고, 생산되는 바이오디젤 원료의 생산성을 비교하여 Table 1-2에 나타내었다⁴. Table 1-2에서 보는 바와 같이, 미세조류는 다른 식물성 작물 과 달리 부지의 사용량이 적고, 석유 및 디젤을 완전히 대체할 수 있는 가능성을 지니고 있는 연료로 무한한 잠재력이 있는 에너지원이다. 또한, 다른 작물과 달리 빠르게 성장하고 지질 함량이 뛰어난 특성을 지니고 있다. 현재 미세조류의 연구 는 유전자 조작을 통해 오일 생산능력이 높은 미세조류 확보 및 효율이 높고 비용 이 저렴한 조류 배양 시스템의 개발, 발전소나 공장에서 배출되는 산업가스 이용, 생활폐수 및 하수의 이용 기술 등 많은 분야에서 연구되고 있다^[5].



Division	Material industrial production	Greenhouse gas emissions	Reserve year	Economic time of guarantee
Microalgae	possible	low	unlimited	2020
Oil	possible	high	54	present
Coal	possible	high	112	present
Natural gas	possible	middle	64	present
New clear power	impossible	low	79	present
Light of the sun	impossible	low	unlimited	2020
Wind power	impossible	low	unlimited	present

Table 1-1 Comparison of major energy specific resource^[3]

Table 1-2 Biodiesel production yields using different biomass^[4]

Source	Biodiesel (L / ha / year)	
Corn	172	
Cotton	325	
Soybean	446 ~ 636	
Mustard seed	572	
Sunflower	952 ~ 1,070	
Rapeseed	1190	
Jatropha	741 ~ 1,892	
Coconut	2,689	
Oil palm	5,366 ~ 5,950	
Microalgae	\sim 136,900 (Oil content > 70%)	

미세조류의 대체 바이오 에너지 전환의 문제점인 경제성 및 생산성을 높이기 위해 미세조류 배양시스템 개발에 대한 연구가 활발히 진행 중이다. 초기에는 실 험실 수준 소규모 배양기술 중심의 연구가 주를 이루었으나, 현재 옥외배양, 연못 배양 등 미세조류의 생산성을 높이기 위해 다양한 대량 배양방법이 연구되고 있 다. 미세조류의 대량 배양방법은 크게 개방형 배양과 밀폐형 배양 두 가지로 분류 된다^[6]. 개방형 배양은 인공적 또는 자연적으로 영양원 공급이 풍부한 개방된 연못 이나 우물에서 배양하는 방법이다. 개방형 배양은 저렴한 초기 설비 투자와 운전 비용으로 배양이 가능하다는 장점이 있으나, 조류의 침전으로 인한 낮은 수율, 외 부적 오염을 통한 조류의 폐사 및 불안정성, 넓은 부지로 인한 영양원들의 불균등 분포 등 단점이 있다. 이러한 개방형 배양의 단점을 보완하기 위한 방법이 밀폐형 배양 방법이다. 밀폐형 배양 방법은 미세조류에 필수적인 빛, 기체 전달, 배지 등 을 효과적으로 제어 가능하고, 멸균 작업을 통하여 외부적인 오염을 방지 할 수 있다. 또한 장소에 제한적이지 않으며, 고농도 배양이 가능한 장점을 가지고 있다. 그러나 밀폐형 배양 방법은 장기간 조류 배양을 할 경우 미세조류의 파울링 (fouling) 현상으로 인해 점차 생산 효율이 낮아지며, 세척에 대한 어려움이 있다^[7].

다양한 배양 방법으로 배양된 미세조류로부터 유용물질을 얻기 위해 해결해야 할 과제 중 한 가지는 경제적인 미세조류 수확법의 개발이다. 대부분의 미세조류 는 크기가 30μm 이하로 매우 작으며, 종류마다 농도 및 밀도가 다르기 때문에 적 절한 수확 방법을 선택하여야 한다^[8]. 미세조류로부터 유용물질을 생산하기 위해서 는 Fig. 1-1과 같이 전처리(pre-treatment) 과정을 거쳐야 하며, 이 수확 과정에서 세포 파쇄 과정이 반드시 필요하다^[9].



Fig. 1-1 Process flow showing the downstream steps needed to produce biodiesel from biomass^[9]

일반적으로 미세조류의 수확방법은 크게 기계적 방법과 비기계적 방법으로 나 뉘어 사용되며, 각 방법의 종류를 Fig. 1-2에 도식화하여 나타내었다. 기계적 방법 으로는 비드 밀링 법(bead milling), 고압 균질화 법(high pressure homogenizing), 전 자기 펄스 법(pulsed electro magnetic), 및 초음파 처리법(sonication)등이 있으며, 비 기계적 방법 중에서는 효소가수 분해 법(enzyme hydrolysis)과 초임계 이산화탄소 추출 법(super critical CO₂ extraction)이 주로 사용된다¹¹⁰. Table 1-3에 미세조류 수확 방법의 특성을 비교하여 나타내었다¹¹¹. 비드 밀링이나 원심분리와 같은 기계적 방 법은 미세조류의 단백질 구조 상태를 잘 유지할 수 있으나 처리 과정이 복잡하고, 생산 비용 및 장비의 유지 보수비용이 많이 발생하며, 대량 수확을 하는데 취약한 문제점을 가지고 있다. 효소가수 분해법이나 초임계이산화탄소와 같은 비기계적 방법은 대량 수확이 가능하여 경제적인 수확 방법이지만, 미세조류의 단백질 구조 를 변화시키며 세포 파쇄 과정에서 화학적 처리 공정으로 인해 환경오염에 치명적 인 단점을 가지고 있다.



Fig. 1-2 Classification of the cell disruption methods^[10]



Method	Reliability	Energy requirement	Quality for conversion
Centrifugation	good	high	good
Chemoflocculation	good	high	poor
Sand filtration	fair	low	poor
Ultrafiltration	good	high	good
Microsieving	poor	low	poor
Bioflocculation	poor	low	good

Table 1-3	Feature of	microalgae	harvesting	method ^[11]	

그러나 다양한 기계적 방법 중 하나인 초음파 파쇄(ultrasound sonication) 방 법은 기존의 기계적 방법에 비해 처리 과정이 단순하고, 친환경적이며 미세조류 파쇄 과정이 연속 및 자동화 시스템이 가능한 장점이 있다^[12]. 초음파의 특징을 이 용하여 최근에는 미세조류 대량 수확의 효율을 높이기 위해 낮은 비용을 들여 연 속적으로 분리 수확이 가능한 초음파 파쇄 방법에 대한 연구가 활발히 진행되고 있다^[13].

본 연구에서는 미세조류의 대량 수확 과정에서 연속 및 자동화 시스템이 가능 하고, 경제성을 높일 수 있는 방법 중 하나인 초음파 방법을 이용하여 미세조류의 최적의 세포 파쇄 효율을 연구하기 위해 실험을 수행하였다. 다양한 미세조류 종 류 중 하나인 *Chlorella sp.*를 밀폐형 배양 방법인 평판형 광생물반응기에 회분 배 양하면서 배양기 내·외부로 센서를 부착해 얻은 데이터를 토대로 최적의 성장 조 건에 대하여 연구하였으며, 수학적 근사모델을 이용하여 미세조류 성장곡선을 근 사화하였다. 실험에 사용된 미세조류 *Chlorella sp.*의 최적의 세포 파쇄 효율의 조 건을 얻기 위해 각 주파수 대역에 따른 변수들의 상호작용을 통해 변수들 간의 최 적의 배합 조건을 찾는 실험을 수행 하였다. 초음파를 이용한 미세조류의 파쇄 효 율을 실험과 통계적 분석을 통하여 연구하였다.



제2절 연구 동향

현재 세계는 미래 에너지 산업으로 차량 전지, 우주 태양열 발전, 신재생 에 너지, 바이오 에너지 등 다양한 기술을 연구하고 있으며, 이 중에서 바이오 에너지 인 미세조류를 이용한 바이오연료 기술이 차세대 에너지로 각광받고 있다. 미세조 류를 이용한 바이오소재의 생산 연료인 바이오매스는 1, 2, 3세대로 진화하고 있으 며, 대표적인 광합성 미생물인 미세조류를 이용한 제3세대 바이오매스는 바이오연 료로 전환이 용이하며, 전처리 공정이 필요 없는 장점을 가지고 있어 다양한 연구 가 진행되고 있다. 또한 빠른 생장속도와 다량의 지질 성분을 함유하고 있고, 기존 의 식물보다 태양열에너지 효율이 약 25배, 이산화탄소 고정능력도 약 15배가량 높아 지구 온난화를 유발하는 주요 원인인 이산화탄소 문제를 효율적으로 억제할 수 있고, 1세대 바이오매스의 생산에 따른 식량 고갈 문제와 가격 인상에 대한 우 려를 해결할 수 있는 방법으로 각광받고 있다. 미국의 경우 1970년 세계 석유파동 을 겪으면서 DOE(Department of Energy)의 NREL(National Renewable Energy Laboratory)주관으로 1978~1996년에 걸쳐 약 0.25 억 불의 예산으로 'Aquatic Species Program(ASP)'을 통해 생물연료를 생산하기 한 미세 조류 탐색, 대량배 양 등의 연구를 수행하였다¹⁴. 최근 DOE(2012)는 2020년까지 미세조류 연료 1리터 당 가격을 1.5 달러 수준으로 낮추는 기술 개발을 제시하였고 조류 오일 10억 갤 런/넌 생산 시스템 정립 및 테스트 베드 구축을 추진하고 있다^[15]. 또한 미세조류 배양시설의 난방 목적으로 설치한 보일러에서 배출되는 연소가스를 미세조류인 Spirulina 배양 원료로 사용하여 증산의 효과를 보임으로써 생물학적 고정화에 의 해 이산화탄소 처리 비용을 저감하였다. 일본의 경우 지구환경산업 기술연구소 (Research Institute of Innovative Technology for the Earth, RITE)는 1990~1999 년까지 10년간에 걸쳐 약 1,000 억 원의 연구비를 이산화탄소 고정화 연구에 투자 하였다. RITE는 2004년부터 이산화탄소로부터 유용물질의 생산을 위한 기초 연구 로서 미생물을 이용한 이산화탄소 고정 시스템의 향상과 세포 내 에너지 전환 향 상에 관한 연구를 수행하고 있다. 국내 또한 이산화탄소의 고정화 연구를 1998년 부터 과학기술부의 환경 기반기술 개발 중점사업으로 수행하고 있다.

국내에서는 Spirulina, Chlorella 등을 이용한 폐수처리 및 생산된 조류의 바이 오매스 활용 등과 같은 산업적 적용을 위한 연구, 미세조류를 이용한 이산화탄소 고정화 연구, 미래부존 석유자원의 고갈에 대비하여 대체 에너지원인 미세조류 대 량배양에 의한 바이오 디젤 생산에 관한 연구 등이 대학, 연구소, 기업 등에서 소 규모로 수행 되고 있으며, 아직까지는 기반기술 개발 수준의 시작단계로 평가 되 고 있다. 최근 2009년 '저탄소 녹색성장'을 견인할 범부처 차원의 녹색기술 연구개 발 종합 대책이 확정 되어 지구온난화 및 에너지 위기에 적극적으로 대처하기 위 해 꾸준한 연구가 진행되고 있다^[16]. 국제에너지기구(IEA)에 의하면, 전 세계 바이 오 연료 수요는 2006년에서 2030년 사이 연평균 6.80 %의 성장세를 보일 것으로 예측하고 있다. 2030년에는 미세조류 바이오 연료 수요가 1억 톤을 돌파할 것으로 예측되고 있다^{117]}. 미세조류는 농업적 활용뿐 아니라 식품 및 의약품, 폐수처리 및 대체 에너지 등 다양한 산업 분야에서도 활용 가능하며 수요 및 잠재력이 매우 크 게 평가되는 청정에너지 자원이다. 또한 미세조류로부터 얻는 3세대 바이오매스는 항암 및 항생물질, 건강식품으로 고부가 물질로 전환되어 각광받고 있다. 이런 유 용 물질의 경제성을 위해 현재 우리나라도 미세조류의 고밀도 대량 배양, 수확기 술의 경제화, 물질 전환 기술 등 핵심 기술을 발전시켜 다음 세대를 위한 환경친 화적인 기술 개발에 힘을 쓰고 있다^[18].



제3절 연구내용 및 방법

바이오 에너지인 미세조류는 기존의 에너지원과 같이 수확 후 나오는 바이오 매스를 통하여 산업소재를 생산 가능하며, 이산화탄소 고정능력이 뛰어나 온실가 스로 인한 지구 온난화 문제의 대책으로 사용되고 있다. 그러나 현재 미세조류로 부터 생산되는 바이오연료 및 바이오매스는 기존의 1세대, 2세대 바이오매스에 비 해 얻을 수 있는 부가가치는 높으나, 생산성에서 경쟁이 되지 못하는 상황이다. 미 세조류가 3세대 바이오매스로 경제성을 갖추기 위해서는 대량배양 및 고효율 수확 이 필요하며, 생산 공정에서 소모되는 비용 중 가장 큰 비중을 차지하는 수확 방 법에서 경제적인 수확이 필요하다.

본 논문에서는 밀폐형 배양방법인 평판형 광생물반응기에서 미세조류를 회분 배양 하여 고농축 대량 배양된 미세조류를 경제적으로 수확하기 위해 처리 과정이 간단하고 친환경적인 초음파 방법을 이용한 세포 파쇄 기술을 연구하였다. 먼저 미세조류 Chlorella sp.를 고농도 및 최적의 성장 조건을 찾기 위해 15 L 평판형광 생물반응기에서 회분배양(batch culture)하였다. 미세조류의 성장 데이터를 얻기 위 해 평판형 광생물반응기에 광도 센서, 수소이온농도 센서, 탁도 센서, 산소 및 이 산화탄소 센서를 설치하여 데이터를 측정하였고, 측정된 데이터로 부터 성장곡선 을 나타내었다. 미세조류에 효율적으로 처리되는 초음파장은 미세조류의 종마다 작용하는 주파수대역과 입·출력 파워 값이 각각 다르기 때문에 실험에 사용된 Chlorella sp.종의 최적의 파쇄 효율 조건을 찾기 위해 회분 저주파, 회분 고주파 2가지 종류의 초음파 장치를 이용하여 실험을 진행하였다. 또한 생산성 및 경제성 을 높이기 위해 저주파를 이용한 연속적인 저주파처리를 위한 연동 시스템을 구성 하였다. 먼저 회분 저주파 장치는 미세조류의 초기 균체 농도, 출력 파워, 초기 용 량, 수소이온농도(pH)를 변수로 정하였고, 회분 고주파 장치는 초음파 조사 위치에 따른 효율. 초기 균체 농도, 함수발생기의 파형, 증폭기의 출력 파워 및 초기 인가 전압을 변수로 정하였다. 연속적인 저주파 장치에서는 미세조류의 초기 균체 농도, 출력 파워, 펌프의 유량 및 초음파 작동주기(duty cycle), 수소이온농도를 변수로 정하여 각 변수들 간의 상호작용을 통해 최적의 파쇄 효율 조건에 대한 연구를 실 험을 통해 진행하였다. 각 실험에서 실험계획법과 변수들 간의 레벨을 정해 순차 적으로 변화시키면서 최적의 배합조건을 실험을 통하여 연구하였다.



이와 같은 연구의 방법과 결과를 기술하기 위하여 다음과 같은 순서로 설명하 였다. 2장에서는 초음파 파쇄 공정과 실험에 사용된 미세조류 *Chlorella sp.*의 성 장 데이터로부터 성장곡선을 모델링한 결과를 기술하였다. 3장에서는 성장 데이터 로부터 얻은 최적의 성장 조건에서 회분 저주파 장치와 회분 고주파 장치의 세포 파쇄 효율 실험 결과를 기술하였다. 4장에서는 연속적인 저주파 장치 시스템구성 과 세포 파쇄 효율 실험 결과를 기술하였다.

제 2 장 초음파 개념 및 미세조류 배양

제1절 초음파 개념

1. 초음파

소리를 발생하는 진동체를 음원(acoustic source)라고 하며, 음원에서 발생하는 소리 에너지는 일정한 주파수(frequency)를 가지는 파동의 형태로 전달된다. 주파 수 크기에 따라 저음파(infrasound), 음파(acoustic), 초음파(ultrasound) 세 가지 종 류로 분류된다. Fig. 2-1에 주파수 구간에 따라 분류하여 나타내었다. 저음파는 지 진 등과 같이 진동수가 낮아 사람이 들을 수 없는 음파이고, 초음파는 사람이 들 을 수 있는 최고 주파수 보다 높은 음파를 말한다. 초음파는 여러 분야에서 연구 및 응용 되고 있으며, 생물학 및 미생물 분야에서 균질화 및 세포벽 파열 등 매우 폭넓게 활용되고 있다. 초음파는 빛과는 달리 전파되기 위해서는 매개체 즉 접촉 되는 매질이 필요하며, 그 매질의 특성에 따라 전달 속도가 차이가 발생한다^[19]. 일 반적으로 같은 매개체 또는 매질에서는 항상 같은 속도로 전달된다. 매질의 통과 과정에서 확산, 흡수, 산란(scatter) 등에 의해 감쇠되기 때문에 용도에 따라 적절 한 주파수 대역을 사용해야 한다. 일반적으로 접촉매질로 사용되는 매질은 물, 글 리세린, 오일, 풀 등이 있다.



Fig. 2-1 Classification of the sound waves according to the frequency



2. 초음파의 공동 현상

여러 가지 화학반응에 초음파를 이용할 때 그 반응도를 향상시키는 에너지원 은 공동현상(cavitation)이며, 공동화 현상은 크게 기포에서 핵의 생성, 기포의 성 장, 성정한 기포의 폭발적 파열 총 세 가지 단계로 진행된다. 먼저 초음파를 액체 매질에 조사를 하게 되면 핵이 진동을 하게 되며 분자 밀도가 크고 촘촘한 상태의 주기에서는 분자간의 평균거리가 짧아지고, 분자 밀도가 작은 희박한 상태의 주기 에서는 길어진다. 이때 충분한 부압의 초음파가 조사되면 희박한 상태의 주기에서 는 분자간의 거리가 액체상을 유지하는 매질 분자간의 경계거리 보다 길어져 액상 매질이 찢어지게 되고 그때 공동화 기포라고 불리는 공동이 생성되고, 이 단계가 핵의 생성단계이다. 이때 초음파 주기의 진동이 계속되면서 기포의 주위로부터 기 체나 증기를 받아들여 평균 직경을 증대 시킨다. 기포의 성장단계는 생성된 기포 들의 부압이 최대가 될 때까지 팽창하는 단계이며, 충분한 성장을 마친 기포가 순 간적으로 깨어지면서 압력이 수천 기압에 달하는 충격파를 생성시키는 단계가 폭 발적 파열단계이다. 공동화에 의해 형성된 기포가 다음 정의 반주기 동안 가해진 초음파 압력에 의하여 파열될 때 국부적으로 높은 온도와 고압의 파열압력이 발생 하며, 이때 발생하는 에너지에 의해 화학반응이 촉진된다. 초음파를 이용한 화학반 응의 경우 반응속도가 매우 빠르고, 반응 유도시간이 단축되며, 합성반응 시 촉매 가 불필요하다는 장점이 있다^[20]. 공동현상으로 인해 발생하는 매우 높은 에너지의 충격으로 인해 고압이 발생하게 되며, 발생된 높은 압력은 세포벽 및 세포 내부구 조를 쉽게 파열시킨다. 또한, 초음파의 기계적 효과로 인하여 용매가 세포로 침투 하게 되어 초음파 추출은 식물의 추출 효율을 증가 시킨다^[21,22]. 초음파에 의한 물 질의 분해는 공동의 파열에 의해 생성되는 순간적인 압력과 온도에 의한 열분해 반응과 이러한 열분해 반응에 의해 발생되는 라디칼에 의한 분해반응으로 나눌 수 있다. 열분해 반응으로 인해 자유라디칼을 형성하여 단시간에 세포 파쇄가 효과적 으로 이루어진다^[23].









제2절 미세조류의 균주 및 배지

본 연구에서 사용된 미세조류는 *Chlorella sp.*를 사용하였다. 배양에 사용된 배 양액은 TAP(Tris-Acetate-Phosphate)배양액를 사용하였으며, 배지 조성은 Table 2-1과 같다. 배지는 고압 멸균기(auto clave)를 이용하여 121 ℃에서 20 분 동안 멸 균하여 냉각 후 사용하였다.

Components	Amount(g/L)
50X FBS	
NH ₄ Cl	40
CaCl ₂ ·2H ₂ O	5
MgSO ₄ ·7H ₂ O	10
400X KPO4 mix	
1M K ₂ HPO ₄	43.2
1M KH ₂ PO ₄	22.32
200X tris mineral	
EDTA·2H ₂ O	10
FeSO ₄ ·7H ₂ O	1
ZnSO ₄ ·7H ₂ O	4.4
H ₃ BO ₃	2.28
MnCl ₂ ·4H ₂ O	1.02
CuCl ₂ ·2H ₂ O	0.22
Na ₂ MOO ₄ ·2H ₂ O	0.52
CoCl ₂ ·6H ₂ O	0.32
glacial accet(acid)	20ml
Tris	2.42

Table 2-1 Composition of TAP medium for Chlorella sp.



제3절 미세조류 배양 및 성장 곡선 모델링

1. 미세조류 배양

미세조류의 배양방법은 회분배양(batch culture), 연속배양(continuous culture), 유가식 배양(fed-batch culture) 등으로 나눌 수 있다. 이 중 회분배양방법은 배지 (media)에 균주를 접종한 후 수확 없이 어느 정도까지 배양을 한 후 통째로 수확 하는 방식이며, 실험 목적으로 많이 사용되는 배양 방법이다. 이러한 회분 배양방 법은 Fig. 2-3과 같이 일반적으로 균주가 약간의 준비단계를 지나 급격하게 성장 하고 어느 시점을 기준으로 더 이상 성장하지 않다가 급격하게 사멸하기 시작하기 때문에 균주의 성장곡선을 파악하기에 적절한 배양 방법으로 사용되고 있다.



Fig. 2–3 Final cell concentration and the initial concentration of the medium in batch culture process relationships



일반적으로. 미세조류 균주의 성장곡선은 크게 1) 지연기(lag phase), 2) 대수 또는 지수적 성장기(log or exponential growth phase), 3) 정체기(stationary phase), 4) 사멸기(death phase) 총 네 가지 단계로 구분된다.

첫 번째 단계인 지연기(lag phase)는 배지에 접종된 균주가 배지의 환경에 적 응하고 성장을 준비하는 단계이다. 지연기는 접종된 균주가 적응을 하는 단계이므 로 같은 성분의 다른 배지에서 이미 성장 중인 균주를 접종하게 되면 지연기는 발 생하지 않는 특징을 가지고 있다.

두 번째 단계인 대수 또는 지수적 성장기(log or exponential growth phase)는 접종된 균주가 급격하게 분열하여 성장하는 단계이며, 균주들이 가장 건강하고 활 발하게 활동하는 단계이다. 일반적으로 회분배양을 통해 배양을 하였을 경우 지수 적 장기에서 배양을 중단하는 경우가 많은데, 그 이유는 다음 단계인 정체기 구간 에서는 사멸하는 일부 균주들로 인하여 데이터의 오차가 발생하기 때문이다.

세 번째 단계인 정체기(stationary phase)는 균주들이 성장하는데 필요한 영양 분의 농도 즉, 배지의 영양분이 줄어들게 되면 발생하는 단계이다. 그래프 상으로 는 성장을 멈춘 것으로 보이나 성장을 계속하는 균주들이 비교적으로 일정하게 남 아 있으며, 일부 균주들은 성장을 멈추고, 또 다른 나머지 균주들은 사멸하는 단계 이다.

성장 곡선의 마지막 단계인 사멸기(death phase)는 일부 균주들이 성장을 계 속해서 하고 있으나 성장을 하는 개체보다 사멸하는 개체 수가 훨씬 많기 때문에 전체적인 균주의 개체 수가 줄어드는 단계이다. 보통 많은 경우 일부 균주들은 사 멸기에서도 생존하며, 균주들은 사멸한 균주들이 분비한 영양분을 통해 증식할 수 있다. 이러한 감소기 동안 성장 조건이 계속 나빠지게 되면 결국 생존해 있던 균 주들도 전부 사멸하게 된다.



2. 성장곡선 모델링

실험에 사용한 미세조류 *Chlorella sp.*의 최적의 성장 조건을 연구하기 위해 15 L 평판형 광생물반응기에서 성장에 가장 큰 영향을 미치는 조건 중 하나인 조 도의 변화를 주어 여러 가지 조건에서 회분배양 하여 데이터를 측정하였다. 미세 조류 *Chlorella sp.*의 성장곡선에 필요한 데이터는 15 L 평판형 광생물반응기에서 평균 19일 동안 배양하여 측정하였다. 미세조류 배양 과정 중 배양 환경을 일정하 게 제어하기 위해 평판형 광생물반응기 내·외부에 pH, 탁도, 조도, 산소 및 이산화 탄소 센서를 부착하여 데이터를 측정하였고, Labview 프로그램을 사용하여 실시 간 및 평균값으로 데이터를 수집하였다. 평판형 광생물반응기 외부의 광주기는 24:0으로 항상 일정한 조도 값을 유지시켜 배양하였다. 평판형 광생물반응기에서 네 가지 조도 조건으로 변화를 주어 배양한 *Chlorella sp.*의 성장곡선을 구하기 위 해 필요한 데이터인 균체량(cell concentrate)은 분광광도계를 이용하여 680 nm의 파장에서 광학밀도(optical density)를 측정하였고, 세포 개체 수를 측정 가능한 세 포계수기(cell counter)를 이용하여 균체수와 세포생존분석(live or dead)을 측정하 여 성장곡선에 반영하였다. 15 L 평판형 광생물반응기의 구성은 Fig. 2-4과 같이 나타내었고, Fig. 2-5은 Labview 프로그램의 프런트 패널을 나타내었다.



Fig. 2-4 Schematic diagram of flat-panel photo-bioreactor





Fig. 2-5 Front panel of monitoring and control system

네 가지 종류의 조도 조건에서 회분배양한 미세조류 *Chlorella sp.*의 광학밀도 를 분광광도계 및 세포 계수기로 데이터를 측정하였고, 얻은 성장곡선을 조도 조 건 별로 분류하여 Fig. 2-6에 나타내었다. 얻어진 성장곡선 중 가장 성장률이 높은 조도 조건을 기준으로 하여 성장 곡선을 세 가지 성장 단계로 분류하여 Fig. 2-7 에 나타내었다. 첫 번째 성장 단계인 지연기 단계는 배양에 사용한 미세조류 *Chlorella sp.*가 시드보관함(seed incubator)에서 먼저 배양한 미세조류를 사용하여 평판형 광생물반응기에 배양하였고, 시드보관함에서 이미 지연기 단계가 발생하여 회분 배양 시 지연기 단계가 생략 되었다. 조도 조건에 따른 성장 비교 결과 비성 장률을 나타내는 성장곡선의 기울기 값이 조도 8,000 Lux의 구간에서 가장 높고 긴 성장 기간을 나타냈으며, 같은 조건에서 최대 광학밀도 값 4.33을 나타내었다. 또한 지수적 성장기와 정체기의 구간이 다른 조건에 비해 가장 길게 유지되었으 며, 세포가 완전히 사멸하지 않고 성장 기간이 가장 긴 결과를 나타내었다.

가장 높은 광학밀도와 성장률을 나타낸 조도 8,000 Lux 구간에서의 성장공선 에서 수학적 근사 모델을 이용하여 비 성장 속도(specific growth rate)를 예측하 였다. 비 성장 속도를 예측하기 위해 Logistic 모델, Gompertz 모델을 사용하여 성 장 모델을 근사화하였고, 모델식은 Table 2-2에 두 가지 모델식을 사용하여 커브 피팅(curve fitting)한 성장곡선은 Fig. 2-8에 나타내었다. S자형(sigmoidal shape) 성장곡선은 일반적으로 수학적 파라미터(a, b, c)를 포함하고 있어 생물학적 의미 를 갖는 파라미터(A, μ_{max}, λ)로 수정하여 사용하였다^[24-25]. 여기서 A는 최대 개체, μ_{max}는 비 성장 속도 그리고 λ는 지체 시간을 나타낸 것이다. 사용된 두 가지 모 델식의 적합성을 나타내는 결정계수 즉, R^2 값을 정확하게 얻기 위해 순간적으로 증가한 광학밀도 4.33은 격리 자료로 판단되어 제외하여 모델링을 측정하였고, Logistic 모델은 0.8792 와 Gompertz 모델은 0.8897의 결과를 나타내었다. Gompertz 모델이 0.8897로 Logistic 모델보다 결정계수의 값이 크기 때문에 성장 을 예측하기에 적합한 모델로 선택하였다.





Fig. 2-6 Growth curve of chlorella sp.



Fig. 2-7 Growth curve of growth phase



Model	Equation (Mathematical parameter)	Modified equation (Biological parameter)		
Logistic	$y = \frac{a}{1 + \exp^{(b - cx)}}$	$y = \frac{A}{1 + \exp^{\left(\frac{4\mu_m}{A}(\lambda - t) + 2\right)}}$		
Gompertz	$y = a \exp^{\left[-\exp^{(b - cx)}\right]}$	$y = A \exp^{-\exp^{\left(\frac{\mu_m e}{A}(\lambda - t) + 1\right)}}$		
modified equation $e=exp(1)$				

Table 2-2 Sigmodial regression model for biological growth curve^[24-25]



Fig. 2-8 Growth curve of *Chlorella sp.* fitted by Logistic, Gompertz models for OD Values



제 3 장 초음파 처리 공정

제1절 회분 저주파 장치 시스템의 구성

1. 회분 저주파 장치 시스템

미세조류는 균주의 종류에 따라 세포막이 효율적으로 파쇄되는 주파수대역에 차이가 있으며, 초음파 처리 과정에서 알맞은 주파수대역으로 사용하는 것이 필요 하다. 이러한 특징 때문에 실험에 사용된 *Chlorella sp.*의 최적의 주파수대역을 연 구하기 위해서 주파수범위 20 kHz, 최대출력 500 watts의 회분(batch) 저주파 장 치(Low Frequency Non-Focused Ultrasound, LFNFU)를 구성하여 실험을 진행하 였다. 실험에 사용된 회분 저주파 장치의 출력 파워 및 진동에너지와 출력밀도를 Table 3-1에 나타내었고, 실험에 사용된 개략적인 회분 저주파 장치 시스템을 Fig. 3-1에 나타내었다.





Fig. 3-1 Schematic diagram of batch low frequency non-focused ultrasound

Table 3-1	Output	variable	of	batch	low	frequency	device
	-					1 0	

	Ampl	Prob	e output	power		Energy/ Power	Power density
		Air	Water	Chlorella	Vibration distance		
Unit	%		Watt		μm	watt	$watt/cm^2$
Level (1)	40	4	32	32	14.0	28	21.21
Level (2)	45	8	45	45	17.5	37	28.03
Level (3)	50	9	50	49	19.25	40	30.30
Level (4)	55	10	55	55	21.0	45	34.09
Level (5)	60	12	62	62	22.75	50	37.88


2. 회분 저주파 파쇄실험 조건

실험에 사용된 미세조류 *Chlorella sp.*의 최적의 세포 파쇄 효율 조건을 연구 하기 위해 초기 균체 농도(microalgae concentration), 초기 균체 용량(capacity), 장치의 출력 파워(output power), 균체의 초기 pH 네 가지 종류의 변수를 지정하 였고, 각 변수들을 변화시키면서 변수들 간의 상호작용이 미치는 영향에 대하여 실험을 통해 연구하였다. 원활한 실험을 위해 실험계획법을 통해 각 변수들의 단 계를 지정하여 순차적으로 실험을 진행하였고, Table 3-2에 나타내었다. 세포 파 쇄 효율은 식 (1)을 사용하여 파쇄 효율을 도출하였다^[26].

$$\eta = (1 - \frac{C_t}{C_0}) \times 100 \ (\%) \tag{1}$$

여기서, C_0 은 초기 세포농도이며, C_t 는 t분 동안 초음파 처리된 후의 세포농도이다. 초기 세포농도와 처리된 후의 세포농도 값은 분광 광도계 680 nm파장과 세포계수기를 사용하여 측정 및 계산하였다.

Table 3-2 Le	vel of param	eters in LFI	NFU process
--------------	--------------	--------------	-------------

Parameter	Microalgae concentration	Capacity	Power	рН
Unit	OD @680	ml	Watt (Ampl)	-logCH+
Factor	X_1	X_2	X_3	X_4
Level (1)	1.54	150	40	3.17
Level (2)	2.57	200	45	5.33
Level (3)	3.66	300	50	6.88
Level (4)	3.96	_	55	7.95
Level (5)	_	_	60	10.11



제2절 회분 저주파 장치의 세포 파쇄

1. 초기 균체농도에 따른 세포 파쇄 효율

미세조류 Chlorella sp.의 초기 균체 농도(microalgae concentration)에 따른 회 분 저주파 장치에서의 세포 파쇄 효율을 실험을 통해 연구하였다. 미세조류는 성 장을 거듭하면서 입자크기에 따라 다르게 응집되고 침전되기까지 시간이 농도에 따라 다르게 나타난다. 농도가 높아질수록 미세조류의 입자들 간의 발생하는 인력 때문에 파쇄 효율에 영향을 주기 때문에 총 네 가지 종류의 성장 구간을 순차적으 로 분류하여 미세조류를 수확하여 실험을 진행하였다. Fig. 3-2에 초기 균체 농도 에 따른 파쇄 효율 결과를 (a)에 나타내었고, 초음파 조사 시간에 따른 광학밀도 변화를 (b)에 나타내었다. 첫 번째 조건은 미세조류의 성장구간 중 지수적 성장기 의 초기 단계에 해당하는 광학밀도 1.54에서 초음파 파쇄 실험을 진행하였다. 그 결과 성장 초기 단계 미세조류의 세포막은 완전한 성장을 이루지 못하였으며, 세 포벽이 유연하기 때문에 초음파처리 과정 초기에 높은 파쇄 효율을 나타내었으나. 초음파 조사 시간이 지날수록 다른 조건들에 비해 세포 파쇄 효율이 낮아지는 결 과를 나타내었다. 두 번째 조건은 성장 구간 중 지수적 성장기 단계로 세포의 균 열과 성장이 폭발적으로 일어나는 단계이며, 광학밀도 2.57에서 실험을 진행하였 다. 그 결과 총 네 가지 종류의 조건에서 초음파처리 과정 중 가장 이른 시간 내 에 높은 파쇄 효율을 나타내었고, 초음파 조사 시간이 경과하여도 가장 높은 파쇄 효율을 유지하였다. 세 번째와 네 번째 조건은 성장구간 중 정체기 구간, 정체기 구간과 사멸기의 시작 지점에 해당되며. 높은 농도로 인해 입자 간의 인력이 강하 게 작용하는 단계이다. 이때 광학밀도 3.66과 3.96을 나타내었다.

초음파 장치의 영역에서 미세조류를 처리할 수 있는 양이 정해져 있기 때문 에 높은 농도를 나타낸 광학밀도 3.66과 3.96의 조건은 파쇄 효율이 다른 조건에 비하여 낮은 결과를 나타내었지만, 초음파 조사 시간이 경과할수록 초음파 처리로 세포가 꾸준히 파쇄되었고, 입자 간의 인력이 약해짐에 따라서 점차 파쇄 효율이 증가하는 결과를 나타내었다. 균체의 광학밀도 변화량은 초음파 조사 시간이 경과 함에 따라 광학밀도 3.96을 제외 한 모든 조건에서 20분 이내에 크게 감소하는 결 과를 나타내었다. 가장 높은 농도를 나타내는 3.96의 경우 입자 간의 인력으로 인 하여 초음파 처리 과정 중 세포 파쇄로 인해 인력이 약해졌음에도 불구하고 높은 농도로 인한 많은 입자 간의 인력 발생으로 광학밀도의 변화가 가장 미비한 결과 를 나타내었다. 광학밀도 값 3.66에서는 입자 간의 인력이 세포가 파쇄됨에 따라 점차 줄어들어 입자 간의 인력의 큰 변화로 인해 가장 큰 광학밀도 변화를 나타내 었다. 모든 조건들 중 가장 세포 파쇄 효율이 높은 지수적 성장기 구간인 2.57의 경우 광학밀도의 변화 또한 파쇄 효율에 비례하여 크게 변화하는 결과를 나타내었 다. 마지막으로, 지수적성장기의 초기 구간인 광학밀도 1.54에서는 세포의 성장이 완전하게 이루어지지 않았으며, 묽은 농도로 세포 간 인력이 낮기 때문에 초음파 처리 이후에도 광학밀도의 변화는 미비한 결과를 나타내었다.

초기 균체 농도에 대한 저주파 장치의 실험 결과 세포 파쇄 효율은 농도 단계 Level(2) > Level(3) > Level(4) > Level(1)의 순서로 나타났으며, 광학밀도의 변 화량은 Level(3) > Level(2) > Level(1) > Level(4)의 순서로 결과를 나타내었다. 세포의 성장과 파쇄 처리 결과를 쉽고 간편하게 예측할 수 있는 광학밀도 변화량 을 측정하는 방법은 실험에 사용된 *Chlorella sp.*의 경우 균체의 개체 수 보다 농 도에 따른 인력의 변화에 영향을 더 많이 받았으며, 세포계수기의 측정과 약간의 오차를 가지는 결과를 나타내었다.





(a) Cell reduction variation according to initial microalgae concentration



(b) Optical density variation according to initial microalgae concentration

Fig. 3-2 Experimental results of initial microalgae concentration



2. 출력 파워에 따른 세포 파쇄 효율

회분 저주파 장치의 출력 파워가 세포 파쇄 효율에 미치는 영향을 알아보기 위해 미세조류 Chlorella sp.를 이용하여 실험을 통해 연구하였다. 사용된 회분 저주파 장치의 출력 파워는 54 watt를 초과하였을 때 초음파 장치의 프로브 팁 (probe tip)의 온도가 급격히 상승하여 초음파 파쇄 시스템에 오버로드가 발생하여 최대 출력파워를 54 watt까지만 제한을 두고 실험을 수행하였다. 선행 실험으로 초기 균체 농도에 대한 실험 결과 중 가장 높은 파쇄 효율을 나타낸 광학밀도 2.57의 범위를 고정 하여 실험을 진행하였다. 출력 파워를 총 다섯 단계로 나눠 순 차적으로 분류하여 실험을 진행하였다. Fig. 3-3에 출력 파워에 대한 파쇄 효율은 (a)에 나타내었으며, 출력 파워에 대한 광학밀도 변화량은 (b)에 나타내었다. 실험 결과 출력 파워가 증가할수록 미세조류에 작용하는 진동 에너지가 증가하여 세포 파쇄 효율이 꾸준히 증가하는 결과를 나타내었다. 출력 파워가 비교적 낮은 33 watt~42 watt 구간의 경우 초기 초음파 조사 시간부터 최종 60분 조사 시간이 경과 할 때까지 낮은 세포 파쇄 효율을 나타내었다. 출력 파워를 점차 증가시켜가 며 실험을 진행하여 최대 54 watt까지 파쇄 효율은 출력 파워 값에 의해 크게 변 화 하였고, 가장 높은 출력 파워인 54 watt에서 초음파 조사 시간 5분 이후 파쇄 효율 85% 이상의 최대 세포 파쇄 효율을 나타내었다. 모든 조건에서 초음파 조사 시간 20분 이후부터 세포 파쇄 효율이 80 %로 양호한 결과를 나타내었다. 출력 파워의 값이 33 watt에서 42 watt까지 변화에 따른 파쇄 효율의 변화량보다 42 watt에서 54 watt까지 변화가 파쇄 효율의 급격한 변화를 나타내었고, 세포 파쇄 효율이 눈에 띄게 증가하는 결과를 나타내었다. 출력 파워에 대한 균체의 광학밀 도 변화량은 모든 조건에서 초음파 조사 시간이 경과함에 따라 점차 감소하는 결 과를 나타내었고, 가장 높은 파쇄 효율을 나타낸 출력파워 값 54 watt에서 균체의 광학밀도 변화량도 가장 큰 변화량 결과를 나타내었다.





(b) Optical density variation according to output power

Fig. 3-3 Experimental results of output power

3. 초기 균체 용량에 따른 세포 파쇄 효율

초음파 처리 방법은 초음파 영역에서 미세조류를 처리할 수 있는 양이 정해져 있으며, 이에 적절한 초기 용량을 지정하여 처리를 해야 효율적인 처리를 할 수 있다. 실험에 사용된 회분 저주파 장치의 초음파 처리 과정에서 초기 균체 용량 (initial capacity)이 세포 파쇄 효율에 미치는 영향을 연구하기 위해 미세조류 *Chlorella sp.*를 이용하여 실험을 통해 연구하였다. 선행 실험에서 가장 높은 파쇄 효율을 나타낸 초기 균체 농도 2.57과 출력 파워 54 watt를 고정하여 실험을 진행 하였다. 초기 용량은 각 150 ml, 200 ml, 300 ml로 세 가지 종류에서 실험을 수행 하였고, 150 ml 보다 낮은 초기 균체 용량은 실험에 사용된 초음파 장치에서 발생 하는 열에너지에 의해 오히려 파쇄 처리 과정에 부정적인 영향을 주어 최소 150 ml 값으로 고정하여 실험을 진행하였다. Fig. 3-4에 균체의 초기 용량에 대한 세 포 파쇄 효율 결과를 나타내었다. 실험 결과 실험에 사용된 저주파 장치에서 150 ml 이상의 초기 균체 용량으로 실험을 진행하였을 경우 초기 균체 용량이 증가함 에 따라 파쇄 효율은 점차 감소하는 결과를 나타내었고, 150 ml의 조건이 가장 높 은 파쇄 효율 결과를 나타내었다.



Fig. 3-4 Experimental results of initial capacity

4. 초기 균체pH에 따른 세포 파쇄 효율

일반적으로 균체는 염기 처리를 하였을 경우 세포막이 유연해지기 때문에 세 포 파쇄에 긍정적인 영향을 준다^[27]. 또한 균체의 산과 염기 처리(acid and alkali treatment)는 저온 보다 고온에서 효과적으로 작용한다. 이러한 특징들로 실험 중 발생하는 열에너지를 이용하여 균체에 pH의 변화에 따라 세포 파쇄 효율을 Chlorella sp.를 이용하여 실험을 통해 연구하였다. 선행 실험에서 가장 높은 파쇄 효율을 나타낸 초기 균체 농도 2.57과 출력 파워 54 watt, 초기 용량 150 ml를 고 정하여 실험을 진행하였다. 미세조류 배양 환경은 pH 7.2~7.5로 중성 구간의 배 양 환경에서 배양하였고, 산과 염기 처리를 위해 산성 처리의 경우 HCl을 사용하 여 pH를 낮추었으며, 염기 처리의 경우 NaOH를 사용하였다. pH는 각 5.33, 6.88, 7.95, 10.11으로 산성과 중성, 염기성의 범위에서 네 가지로 분류하여 실험을 진행 하였다. Fig. 3-5에 (a)는 pH값에 따른 세포 파쇄 효율을, (b)는 초음파 처리 과정 중 광학밀도의 변화량을, (c)는 초음파 처리 과정 중 pH의 변화량을 각각 나타내 었다. 실험 결과 균체가 산성을 띈 pH 5.33의 경우 세포막이 단단해지고 단백질 구조에 영향을 주어 세포 파쇄 효율이 가장 낮은 결과를 나타내었다. 염기성을 띈 pH 10.11의 경우 세포막이 유연해져 초음파 처리 초기에는 가장 빠르고 높은 세포 파쇄 효율을 나타내었다. 중성 구간인 pH 6.88 과 7.95의 구간은 초기 초음파 조사 시간에는 염기 처리를 한 조건보다 세포 파쇄 효율이 낮았지만, 조사 시간이 경과 할수록 꾸준한 파쇄 효율 증가를 나타내었고, pH 7.95에서 초음파 처리 40분 이후 최대 파쇄 효율인 95 % 이상인 양호한 결과를 나타내었다. 광학밀도 변화의 경우 산성을 띈 4.31의 경우 세포벽이 단단해져 초음파 처리 과정 중 광학밀도 변화량 이 미비였고, 염기성에서 가장 크게 변화하였다. 균체 pH변화량은 초음파 조사 시 간이 경과함에 따라 세포막이 꾸준히 파쇄되었고, 이에 내부적으로 단백질의 변화 가 발생하여 산성과 염기성 두 경우 모두 서서히 중성 구간으로 접근하는 양상을 나타내는 결과를 나타내었고, 중성의 경우 중성의 구간을 계속 유지하였다.

회분 저주파 장치의 실험 결과 총 네 가지 종류의 변수 중 가장 높은 세포 파 쇄 효율을 나타낸 배합 조건인 초기 균체 광학밀도 2.57, 출력 파워 54 watt, 균체 용량 150 ml, pH 7.95의 조건에서의 현미경 사진을 Fig. 3-6에 나타내었다.





(a) Cell reduction variation according to pH value



(b) Optical density variation according to pH value





(c) pH change according to sonication time

Fig. 3-5 Experimental results of pH value



Fig. 3-6 Photomicrograph of cell variation during LFNFU processing



제3절 회분 고주파 장치 시스템의 구성

1. 회분 고주파 장치 시스템

미세조류 *Chlorella sp.*의 최적의 주파수대역을 연구하기 위해서 회분(batch) 고주파 장치 시스템(High-Frequency Focused Ultrasound, HFFU)을 구성하여 실 험을 수행하였다. 실험에 사용된 회분 고주파 장치 시스템을 Fig. 3-7에 나타내었 고, 초음파 조사 위치에 따라 상단(top position) 초음파 프로브 조사 위치의 경우 개략도를 (a)에, 하단(under position) 초음파 프로브 조사 위치의 경우 개략도를 (b)에, 측면(side position) 초음파 프로브 조사 위치의 경우 개략도를 (b)에, 측면(side position) 초음파 프로브 조사 위치의 경우 개략도를 (c)에 나타내 었다. 장치는 신호를 발생시켜주는 함수 발생기(function generator)와 함수 발생기 에서 발생된 함수를 증폭시켜주는 전력 증폭기(high speed bipolar amplifier)를 사 용하였다. 초음파를 발생시켜주는 트랜스듀서(transducer)를 연결하여 초음파를 발 생하였고, 실험에 사용된 트랜스듀서의 주파수 대역, 에너지 밀도, 초점 넓이, 초점 거리 등 특성 값을 Table 3-3에 나타내었다. 함수 발생기에서 주파수는 1.1 MHz 에서 다양한 출력파워를 변화시켜가며 최적의 미세조류 파쇄 조건을 연구하였으 며, 발생된 파형(wave form)은 사각 파형(square wave), 사인 파형(sine wave)으 로 구동하여 실험을 수행하였다. 초점거리와 전압, 노출시간에 따라 미세조류의 세 포 파쇄 효율을 측정하여 최적의 조건을 찾기 위해 실험을 수행하였다.

	Frequency	Radius	Area	Power electric	Surface intensity	Focal intensity	Focal width	Focal Length
Unit	MHz	mm	cm^2	Watts	W/cm^2	W/cm^2	mm	mm
H-101	1.10	63.20	34.55	400	9.84	15815	1.37	10.21

Table 3-3 Characteristic values of high frequency device probe





(a) Schematic diagram of ultrasonic top-irradiation position



(b) Schematic diagram of ultrasonic under-irradiation position





(c) Schematic diagram of ultrasonic side-irradiation position



2. 회분 고주파 파쇄실험 조건

회분 고주파 장치에서 미세조류 *Chlorella sp.*의 최적의 세포막 파쇄 효율 조 건을 연구하기 위해 초음파 프로브 조사 위치, 초기 균체 농도, 함수발생기의 파 형, 증폭기의 출력 파워 및 인가전압 변수 총 네 가지 종류를 정하여 변화를 주어 가며 실험을 수행하였고, 각 변수들 간의 상호작용을 통해 최적의 세포 파쇄 효율 조건에 대하여 실험을 통해 연구하였다. 원활한 실험을 위해 각 변수들은 단계를 지정하여 순차적으로 실험을 진행하였고, Table 3-4에 나타내었다.

Parameter	Microalgae concentration	Power	Applied voltage	Wave form
Unit	OD @680	Watt	mvpp	
Factor	X_1	X_2	X_3	X_5
Level (1)	2.50	62	700	square
Level (2)	3.02	30	600	sine
Level (3)	3.74	41	500	_

Table 3-4 Level of parameters in HFFU process



제4절 회분 고주파 장치의 세포 파쇄

1. 초음파 장치의 조사 위치에 따른 파쇄 효율

회분 고주파 장치에서 미세조류 Chlorella sp.의 최적의 파쇄 효율 조건을 실 험을 통해 연구하였다. 먼저 실험에 사용된 초음파 장치의 프로브의 초점거리를 맞추기 위해 초음파 프로브 조사 위치에 따른 파쇄 효율을 실험을 통해 분석하였 다. 회분 고주파 장치의 고정 변수 조건은 1.1 MHz, 사각 파형, 700 mvpp, 초점거 리 11 cm를 고정하였으며, 균체에 대한 변수는 초기 광학밀도 3.0±0.1 범위에서 실험을 진행하였다. Fig. 3-8에 초음파 조사 위치에 따른 세포 파쇄 효율 결과를 (a)에, 초음파 조사 시간에 따른 광학밀도 변화량을 (b)에 나타내었다. 먼저 상·하 단 초음파 프로브 조사 위치의 경우 초기 초음파 용기에 따라 초기 용량이 2.2 L 의 상태에서 실험을 진행하였고, 측면 초음파 프로브 조사 위치의 경우 1.4 L의 용량으로 두 상태의 조건에 따라 초기 용량 0.8 L의 차이를 가진 상태에서 실험을 진행하였다. 실험 결과 하단 초음파 프로브 조사 위치의 경우 초음파 처리 초기 시간부터 가장 높은 파쇄 효율을 나타내었으나, 초음파 프로브의 위치가 바닥에 있어 초음파 처리 과정 중 자기교반기를 작동하지 못하여 균체의 교반이 원활하게 이루어지지 못하였고, 그 결과 초음파 조사 시간이 경과 할수록 다른 조건들에 비 해 세포 파쇄 효율이 점차 낮아지는 결과를 나타내었다. 상단 초음파 프로브 조사 위치의 경우 초음파 처리 초기부터 가장 낮은 파쇄 효율을 나타내었고, 미세조류 Chlorella sp.의 불투명한 시야 조건으로 인해 프로브의 알맞은 초점거리를 맞춰 실험을 진행하는데 에로사항이 발생하였다. 마지막으로 측면 초음파 조사 위치의 경우 다른 두 조건에 비해 초기 용량이 낮아 처리 가능한 용량이 적은 상태에서 실험을 진행하였고, 초음파 처리 초기에는 하단 조사 위치의 경우보다 낮은 세포 파쇄효율을 나타내었지만, 초음파 조사 시간 100분이 경과 한 이후 다른 두 가지 조건에 비해 더 높은 세포 파쇄 효율을 나타내었다. 실험을 통해 측면 초음파 조 사 위치는 다른 위치의 경우보다 프로브의 초점거리 및 교반의 문제 등 여러 가지 문제점을 보완하는 적절한 방법으로 판단된다.





(b) Optical density variation according to irradiation position

Fig. 3-8 Experimental results of ultrasonic irradiation position

2. 초기 균체농도에 따른 세포 파쇄 효율

미세조류 Chlorella sp.의 초기 균체 농도(microalgae concentration)에 따른 고 주파 장치에서의 세포 파쇄 효율을 실험을 통해 연구하였다. 선행 실험에서 가장 높은 파쇄 효율을 나타낸 측면 초음파 조사 위치, 1.1 MHz, 사각 파형, 700 mvpp, 초점거리 11 cm를 고정하여 실험을 진행하였다. 균체 농도 값을 2.50, 3.02, 3.74 총 세 가지로 분류하여 순차적으로 실험을 진행하였다. Fig. 3-9에 광학밀도에 따 른 세포 파쇄 효율 결과를 (a)에, 초음파 조사 시간에 따른 광학밀도 변화량을 (b) 에 나타내었다. 실험 결과 첫 번째 조건인 광학밀도 2.50은 성장곡선에서 지수적 성장기에 해당하며, 앞선 저주파 실험에서 가장 높은 세포 파쇄 효율을 나타내었 으나, 고주파 장치의 실험 에서는 초음파 초기 조사 시간에는 가장 높은 파쇄 효 율 결과를 나타내었지만, 초음파 조사 시간 90분 이후 더 이상 파쇄 효율이 증가 하지 않고 일정한 값으로 수렴하는 결과를 나타내었다. 세 번째 조건인 광학밀도 3.74는 성장곡선에서 정체기 구간에 해당하며, 초기 균체의 농도가 다른 조건들에 비해 가장 높은 값으로 입자들 간의 강한 인력으로 인해 초음파 처리 과정 중 가 장 낮은 세포 파쇄 효율 결과를 나타내었다. 마지막으로, 두 번째 조건인 광학밀도 3.02는 성장곡선의 지수적성장기 후기와 초기 정체기구간에 해당하며 초음파 조사 시간 초기에는 광학밀도 2.50의 조건보다 낮은 세포 파쇄 효율을 나타내었지만, 최 종 초음파 처리 120분 후에 어느 일정한 값에 수렴하지 않고 꾸준하게 증가하는 세포 파쇄 효율 결과를 나타내었다. 초음파 조사 시간에 따른 광학밀도의 변화량 은 먼저 가장 높은 광학밀도 3.74의 경우 입자간의 강한 인력으로 인해 광학밀도 변화량도 미비한 변화를 나타내었다. 균체의 성장이 낮아 광학밀도가 낮은 조건일 수록 초음파 조사시간에 따른 광학밀도의 변화량은 미비하지만 좀 더 큰 차이를 나타내었다.





(a) Cell reduction variation according to initial microalgae concentration



concentration

Fig. 3-9 Experimental results of initial microalgae concentration



3. 파형 종류 따른 세포 파쇄 효율

실험에 사용된 회분 고주파 장치의 함수발생기에서 발생하는 파형의 종류에 따라 미세조류 Chlorella sp.의 세포 파쇄 효율을 실험을 통해 연구하였다. 선행 실험에서 가장 높은 파쇄 효율을 나타낸 측면 초음파 조사 위치, 1.1 MHz, 700 mvpp, 초점거리 11 cm를 고정하여 실험을 진행하였다. 함수발생기에서 발생하는 파형은 사각 파형, 사인 파형 두 가지 종류의 파형으로 분류하여 실험을 진행하였 다. 사각 파형의 경우 출력파워 62 watt를 발생하였고, 사인 파형의 경우 출력파워 30 watt를 발생하였다. 같은 주파수 대역의 조건에서 파형의 종류에 따라 출력 파 워의 차이가 크게 발생하였다. 사각 파형과 사인 파형 두 종류 파형의 차이에 대 한 영역을 개략적으로 Fig. 3-10에 나타내었고, Fig. 3-11에 파형 종류에 따른 세 포 파쇄 효율 결과를 (a)에, 초음파 조사 시간에 따른 광학밀도 변화량을 (b)에 나 타내었다. 실험 결과 파형 종류의 변화에 따라 출력 파워의 변화의 차이가 크게 나타났고. 세포 파쇄 효율의 결과도 출력 파워에 따라 큰 차이를 나타는 결과를 나타내었다. 사인 파형의 경우 두 가지 종류의 주파수 대역에서 초기 초음파 조사 시간부터 최종 초음파 처리 120분이 경과할 때 까지 세포 파쇄 효율이 25 % 미만 으로 매우 낮은 파쇄 효율을 결과를 나타내었다. 같은 1.1 MHz의 주파수 대역에 서 사각 파형의 경우 최종 초음파 처리 120분 이후 50 % 이상의 파쇄 효율 결과 를 나타내었다. 초음파 조사 시간에 따른 광학밀도 변화량은 세포 파쇄 효율 결과 와 비례하게 가장 높은 파쇄 효율을 나타낸 사각 파형의 경우에서 가장 높은 변화 량을 나타내었다.





Fig. 3-10 Difference between square and sine waves



(a) Cell reduction variation according to wave form





(b) Optical density variation according to wave form

Fig. 3-11 Experimental results of type of ultrasonic wave form



4. 초기 인가전압에 따른 세포 파쇄 효율

선행 실험에서 회분 고주파 장치의 함수 발생기에서 발생한 파형의 변화를 통 해 미세조류 Chlorella sp.의 파쇄 효율을 실험을 통하여 알아보았고, 그 결과 초 음파 장치의 출력 파워의 변화에 따라 파쇄 효율이 크게 변화하는 결과를 나타내 었다. 함수 발생기에서 발생하는 초기 인가전압에 변화시켜 초음파 장치의 출력 파워에 더 변화를 주었을 경우 미세조류 *Chlorella sp*.에 초음파 장치의 출력 파워 가 미치는 영향을 실험을 통해 연구하였다. 선행 실험에서 가장 높은 파쇄 효율을 나타낸 측면 초음파 조사 위치, 1.1 MHz, 사각 파형, 초점거리 11 cm를 고정하여 실험을 진행하였다. 함수 발생기에서 발생한 초기 인가전압에 따른 초음파 장치의 출력 파워를 Table 3-5에 나타내었고, Fig. 3-12에 초기 인가전압에 따른 세포 파 쇄 효율 결과를 (a)에, 초음파 조사 시간에 따른 광학밀도 변화량을 (b)에 나타내 었다. 실험에 사용한 고주파 장치의 초기 인가전압의 최댓값은 700 mvpp를 초과 할 수 없어 700 mvpp를 최댓값으로 고정하여 점차 낮춰가며 실험을 진행하였다. 초기 인가전압은 초음파 장치의 출력 파워에 직접적인 영향을 주는 변수로 작용하 였고, 초기 인가전압이 감소함에 따라 초음파 장치의 출력 파워는 급격하게 감소 하였다. 실험 결과 저주파 장치 실험과 유사하게 출력 파워에 따라 파쇄 효율은 급격히 변화하는 결과를 나타내었다. 가장 높은 전압인 700 mvpp에서 출력 파워 60 watt를 발생하였고, 초기 인가전압 700 mvpp로 발생하였을 때 최종 초음파 처 리 후 가장 높은 세포 파쇄 효율의 결과를 나타내었다. 초음파 조사 시간에 따른 광학밀도의 변화량은 초기 인가전압이 증가함에 따라 세포 파쇄 효율도 증가하였 고, 마찬가지로 광학밀도 변화량 또한 증가하였다.

회분 고주파 장치의 실험 결과 총 네 가지 종류의 변수 중 가장 높은 세포 파 쇄 효율을 나타낸 배합 조건인 측면 초음파 조사 위치, 초기 균체 광학밀도 3.02, 사각 파형, 1.1 MHz, 초기 인가전압 700 mvpp 조건에서의 현미경 사진을 Fig. 3-13에 나타내었다.





(b) Optical density variation according to applied voltage

Fig. 3-12 Experimental results of applied voltage



Applied voltage (mvpp)	700	600	500
Output power (watt)	60	45	31

Table 3-5	Output	power	of	ultrasonic	device	according	to	applied	voltage
-----------	--------	-------	----	------------	--------	-----------	----	---------	---------



Fig. 3-13 Photomicrograph of cell variation during HFFU processing



제 4 장 연속 저주파 처리 공정

제1절 연속 저주파 처리 장치 시스템의 구성

1. 연속 저주파 처리 장치 시스템

미세조류가 차세대 바이오 에너지 전환을 위해 취약한 문제점인 낮은 경제성 과 효율적인 수확 방법 개발의 대안으로 기존의 방법 보다 경제적인 수확 방법인 연속적인 저주파 처리 장치 시스템을 구성하였다. 연속적인 저주파 처리 공정은 기존의 고정된 회분 저주파 방법보다 경제적이며, 추후 연속 및 자동 공정이 가능 한 이점을 가지고 있다. 연속적 저주파 처리 방법은 수확된 신선한 미세조류를 연 속해서 일정한 속도로 초음파 처리를 하여 처리하는 방법이며, 기존의 초음파 처 리 방법에 비해 대량 수확 및 대량 추출이 가능한 방법이다. 연속 저주파 처리 장 치의 구성은 연속적인 초음파 처리를 위해 장치 외부에 펌프와 유량계를 구성하여 균체의 일정한 유입·유출 속도를 유지하였고, 초음파 처리 과정 중 발생하는 열에 너지의 개입을 최소화하고자 얼음물을 일정한 속도로 초음파 처리 용기의 외부로 순환시켜 온도가 급격하게 상승하는 현상을 제어하였다. 또한 경제성 증가를 위해 처리 가능한 초기 처리 용량을 증가시켰으며, 사용한 초음파 장치에 증폭기를 더 하여 출력 파워를 증가 시켜 파쇄 효율에 도움을 주었다. Table 4-1에 사용된 연 속 저주파 장치의 출력 파워, 각 진동에너지와 출력밀도를 나타내었고, Fig. 4-1에 개략적인 연속 저주파 장치 시스템을 나타내었다.





Fig. 4-1 Schematic diagram of continuous low frequency sonication system

		Prob	Probe output power				_
	Ampl	Air	Water	Chlorella	Vibration distance	Energy/ Power	Power density
	%	watt			μm	watt	$watt/cm^2$
Level (1)	40	4	121	118	45.6	114	23.22
Level (2)	45	8	139	139	51.3	134	27.29
Level (3)	50	9	158	158	57.0	151	30.75
Level (4)	55	10	178	178	62.7	169	34.42
Level (5)	60	12	196	193	68.4	183	37.27

Table 4-1 Output variable of continuous low frequency sonication device

2. 연속 저주파 파쇄실험 조건

실험에 사용된 미세조류 *Chlorella sp.*의 초기 균체 농도, 초음파 장치의 출력 파워, 펌프 유량 속도, 작동주기, 초기 균체 pH 총 다섯 가지 종류의 변수를 정하 여 변화를 주었고, 각 변수들 간의 상호작용을 통해 연속 저주파 처리에서 최적의 파쇄 효율 조건을 실험을 통해 연구하였다. 연속 저주파 처리 장치의 처리 가능한 용기 내부의 최대 용량은 0.5 L이며, 원활한 순환을 위해 0.8 L로 초기 용량을 고 정하여 실험을 진행하였다. 실험은 실험계획법을 통해 각 변수들의 단계를 지정하 여 순차적으로 실험을 진행하였고, 각 실험의 프로세스를 Table 4-2에 나타내었 다.

Parameter	Microalgae concentration	Power	Flow rate	Duty cycle	рН
Unit	OD_{680}	W(Ampl)	rpm (ml/min)	sonication(min.) :flow rate(min.)	-logCH+
Factor	X_1	X_2	X_3	X_4	X_5
Level (1)	1.5	108 (40%)	rpm:150	5:1	5.26
Level (2)	2.8	185 (55%)	rpm:250	10 : 1	7.85
Level (3)	3.16	207 (60%)	rpm:350	20 : 1	10.12
Level (4)	4.13	225 (65%)	rpm:450	_	_

Table 4-2 Level of parameters in continuous low frequency sonication process



제2절 연속 저주파 장치의 세포 파쇄

1. 초기 균체 농도에 따른 세포 파쇄 효율

연속 저주파 처리 장치에서 미세조류 Chlorella sp.의 초기 균체 농도 (microalgae concentration)에 따른 세포 파쇄 효율을 실험을 통해 연구하였다. 실 험은 성장곡선에서 균체 농도 1.54, 2.80, 3.16, 4.13 총 네 가지 성장 구간으로 분 류하여 미세조류를 수확한 뒤 실험을 진행하였다. Fig. 4-2에 초기 균체 농도에 따 른 세포 파쇄 효율 결과를 (a)에, 초음파 조사 시간에 따른 광학밀도 변화량을 (b) 에 나타내었다. 실험 결과 성장곡선에서 지수적 성장기 초기에 해당되는 광학밀도 1.54의 경우 아직 균주들이 배지환경에 적응하는 단계이며, 세포벽의 성장이 완전 히 이루어지지 않았기 때문에 다른 조건에 비해 세포 파쇄 효율이 가장 낮은 결과 를 나타내었다. 성장곡선에서 사멸기 초기에 해당되는 광학밀도 4.13의 경우 균체 의 과다한 성장으로 인해 세포벽이 두꺼웠으며, 높은 농도로 입자 간의 인력이 강 해 세포 파쇄 효율이 점차 낮아지는 결과를 나타내었다. 성장곡선에서 세포가 폭 발적으로 성장하는 단계인 지수적 성장기의 단계에 해당되는 광학밀도 2.80 과 3.16의 경우 초기 초음파 조사 시간부터 높은 파쇄 효율을 나타냈으며, 최종 100분 초음파 조사 시간까지 꾸준한 세포 파쇄 효율 결과를 나타내었다. 지수적 성장기 에 해당되는 광학밀도 2.80의 경우에는 초음파 조사시간 20분 이후 파쇄 효율이 65 %이상의 효율을 나타내며 급격하게 상승하였고, 다른 조건들에 비해 최종 초 음파 처리 100분 이후 가장 높은 파쇄 효율을 결과를 나타내었다. 초음파 조사 시 간에 따른 광학밀도 변화량은 모든 조건에서 초음파 조사 시간이 경과할수록 점점 낮아지는 결과를 나타내었고, 세포 파쇄 효율이 가장 높게 나타난 광학밀도 2.80에 서 가장 크게 변화하는 결과를 나타내었다.









Fig. 4-2 Experimental results of initial microalgae concentration



2. 출력 파워에 따른 세포 파쇄 효율

연속 저주파 처리 장치의 출력 파워가 미세조류 Chlorella sp.의 세포 파쇄 효 율에 미치는 영향을 실험을 통해 연구하였다. 실험에 사용된 초음파 장치의 최대 출력 파워는 255 watt를 초과할 경우 장치 내의 급격한 온도 상승으로 인해 장치 에 오버로드가 발생하여 제한을 두어 실험을 진행하였다. 선행 실험에서 가장 높 은 파쇄 효율을 나타낸 초기 균체 농도 2.80을 고정하여 실험을 진행하였고, 출력 파워를 총 네 가지 종류로 분류하여 순차적으로 실험을 수행하였다. Fig. 4-3에 출 력 파워 변화에 대한 세포 파쇄 효율을 (a)에, 초음파 조사 시간에 따른 광학밀도 변화량을 (b)에 나타내었다. 실험 결과 출력 파워 변화에 따라 세포 파쇄 효율 변 화가 급격하게 나타났으며, 장치의 출력 파워가 증가 할수록 세포 파쇄 효율 또한 급격하게 증가하는 결과를 나타내었다. 출력 파워가 가장 낮은 108 watt의 경우 초기 초음파 조사 시간부터 최종 100분 조사 시간이 경과할 때까지 가장 낮은 파 쇄 효율을 나타내었고, 최종 세포 파쇄 효율이 50 % 미만인 효율을 나타내었다. 출력 파워가 185 watt의 경우 최종 100분 초음파 처리 이후에도 60% 미만의 세포 파쇄 효율 결과를 나타내었고, 출력 파워가 200 watt 이하의 출력을 나타낸 두 가지 조건의 경우 파쇄효율이 60 % 미만의 비교적 낮은 파쇄 효율 결과를 나타내 었다. 출력 파워가 가장 높은 255 watt의 경우 초음파 조사 시간 10분부터 최종 100분 초음파 조사 시간이 경과 할 때 까지 가장 높고 급격한 파쇄 효율을 나타내 었고, 모든 조건 중 가장 높은 세포 파쇄 효율을 나타내었다. 또한 초음파 조사 시 간 10분 후 급격하게 파쇄 효율이 증가하였으며, 최종 세포 파쇄 효율 90 %를 넘 는 양호한 결과를 나타내었다. 초음파 조사 시간에 따른 광학밀도 변화량은 출력 파워가 증가함에 따라 세포 파쇄 효율 급격하게 증가하였고, 광학밀도 변화 또한 가장 높은 출력 파워인 255 watt의 조건에서 크게 변화하는 결과를 나타내었다.







Fig. 4-3 Experimental results of output power

3. 균체 순환 유량에 따른 세포 파쇄 효율

균체의 순환 유량은 초음파 처리 과정에서 균체가 얼마나 초음파 처리에 접촉 되는지 결정하는 요인으로, 최적의 순환 조건을 실험을 통해 연구하였다. 기존의 고정적으로 초음파 처리하던 방식과 다르게 연속적으로 처리 가능하도록 초음파 처리 장치에 펌프를 연결해 사용하였고, 일정하게 유량을 제어하기 위해 유량계를 사용하였다. 선행 실험에서 가장 높은 파쇄 효율을 나타낸 초기 균체 농도 2.80과 출력 파워 255 watt를 고정하여 실험을 진행하였다. 순환 유량은 네 가지 로 구분 하여 펌프 rpm속도변화를 주어 실험을 진행하였다. 실험에 사용한 펌프는 최대 속 도가 600 rpm인 장치를 사용하였다. Table 4-3에 펌프의 순환 속도에 따른 Chlorella sp.의 순환 유량을 측정하여 나타내었고, Fig. 4-4에 균체의 순환 유량에 따른 세포 파쇄 효율 결과 (a)에, 초음파 조사 시간에 따른 광학밀도 변화량을 (b) 에 나타내었다. 실험 결과 균체 순환 유량의 모든 조건에서 초음파 조사 시간 60 분 이후 세포 파쇄 효율이 70%를 넘는 양호한 결과를 나타내었고, 순환 유량에 따라 유량이 가장 느린 150 > 250 > 350 > 450 rpm의 순서로 세포 파쇄 효율 결 과를 나타내었다. 가장 느린 150 rpm에서 초음파 조사 시간 20분 이후부터 최종 100분 초음파 처리까지 급격하고 가장 높은 파쇄 효율을 나타내었고, 초음파 조사 시간 20분 이후 60 % 이상의 양호한 세포 파쇄 효율을 나타내었다. 초음파 조사 시간에 따른 광학밀도의 변화량은 선행 실험과 같이 파쇄 효율에 따라 비례하게 나타났으며, 가장 높은 파쇄 효율을 나타낸 펌프 150 rpm에서 가장 크게 변화하였 다. 실험 결과에 따라 순환 유량이 느릴수록 세포 파쇄 효율이 증가하는 이유는 순환하는 균체의 초음파 처리 과정에서 순환 유량이 느릴수록 균체가 초음파 처리 에 단위 시간당 접촉되는 양이 증가하여 세포 파쇄 효율이 높은 결과가 나온 것으 로 판단된다.



Revolution per minute	Flow rate (ml/min)
150	415
250	700
350	1010
450	1290

Table 4-3 Flow rate according to revolution per minute









(b) Optical density variation according to flow rate

Fig. 4-4 Experimental results of flow rate

4. 초음파 작동주기에 따른 세포 파쇄 효율

선행 실험에서 연속 저주파 처리 장치의 균체 순환 유량이 느릴수록 단위 시 간당 처리되는 균체의 양이 증가하여 세포 파쇄 효율이 증가하는 결과를 나타내었 다. 이에 연속 저주파 장치의 순환 과정에서 초음파 작동 주기에 변화를 주어 균 체가 접촉하는 시간에 변화를 주었을 경우 세포 파쇄 효율에 미치는 영향을 연구 하기 위해 실험을 진행하였다. 선행 실험에서 가장 높은 파쇄 효율을 나타낸 초기 균체 농도 2.80과 출력 파워 255 watt, 순환유량 415 (ml/min)을 고정하여 실험을 진행하였다. 실험에서 작동주기는 5:1(5분 초음파 조사, 1분 순환), 10:1(10분 초음 파 조사, 1분 순환), 20:1(20분 초음파 조사, 1분 순환)로 세 가지 종류로 변화를 주어 실험을 진행하였다. Fig. 4-5에 초음파 작동주기의 변화에 따른 세포 파쇄 효 율 결과 (a)에, 초음파 조사 시간에 따른 광학밀도 변화량을 (b)에 나타내었다. 실 험 결과 작동주기가 20:1로 초음파 조사 시간이 가장 오랫동안 접촉된 20:1의 경우 보다 오히려 초음파 조사 시간이 10분인 10:1의 주기에서 가장 높은 세포 파쇄 효 율 결과를 나타내었다. 또한 같은 주기에서는 출력파워의 영향을 더 많이 받아 더 욱 더 급격한 파쇄 효율 결과를 나타내었다. 초음파 조사 시간이 가장 적은 5:1의 경우가 20:1의 경우 보다 초음파 조사 시간 초기에는 더 낮은 세포 파쇄 효율을 나타냈으나, 초음파 조사 시간이 경과할수록 점차 증가하여 초음파 조사 시간 60 분 이후에는 세포 파쇄 효율이 더 높은 결과를 나타내었다. 실험 결과 균체가 초 음파 처리 과정에서 작동주기를 주어 조사되는 시간에 따라 세포 파쇄 효율이 비 례하지 않은 결과를 나타내었다. 초음파 조사 시간에 따른 광학밀도 변화량은 세 포 파쇄 효율에 비례하여 가장 높은 파쇄 효율을 나타낸 작동주기 10:1의 225 watt의 출력 파워 에서 크게 변화하였고, 작동주기가 20:1로 초음파 조사 시간이 20분인 경우 세포 파쇄 효율은 다른 조건에 비하여 낮았지만, 광학밀도 변화량은 급격하게 변화하는 결과를 나타내었다.



2.0



Fig. 4-5 Experimental results of duty cycle

(b) Optical density variation according to duty cycle

Sonication time(min.)
또한 선행 실험의 결과로부터 장치의 순환 유량과 작동주기를 병행하여 초음 파 처리를 하였을 경우 균체의 세포 파쇄 효율에 미치는 영향에 대해 실험을 통해 연구하였다. 선행 실험에서 가장 높은 파쇄 효율을 나타낸 초기 균체 농도 2.80과 출력 파워 255 watt, 순환유량 415 (ml/min), 작동주기 10:1을 고정하여 실험을 진 행하였다. Fig. 4-6에 순환 유량과 작동주기를 병행하여 초음파 처리를 할 경우 세 포 파쇄 효율의 결과를 (a)에, 초음파 조사 시간에 따른 광학밀도 변화량을 (b)에 나타내었다. 실험 결과 균체의 순환 유량 415 (ml/min) 과 작동주기 10:1을 병행하 여 실험을 진행한 결과가 초기 초음파 조사 시간부터 최종 100분 조사 시간까지 가장 높은 세포 파쇄 효율을 나타내었고, 최종 초음파 처리 후 85 %이상의 양호 한 세포 파쇄 효율을 나타내었다. 초음파 조사 시간에 따른 광학밀도의 변화량은 선행 실험과 동일하게 파쇄 효율이 가장 높은 작동주기와 병행한 조건에서 가장 크게 변화하는 결과를 나타내었고, 순환유량 415 (ml/min)의 조건에서 크게 변화 하는 결과를 나타내었다. 작동주기와 병행하여 실험한 결과 단순하게 균체를 일정 하게 순환시켜 초음파 처리를 하여 얻는 파쇄 효율 결과보다 초음파 처리의 작동 주기를 설정하여 초음파 처리를 하였을 경우 좀 더 파쇄 효율의 결과가 더 높았으 며, 더 나아가 기존의 방법보다 미세조류의 효율적인 수확과 경제성을 갖는다고 판단된다.





(a) Cell reduction variation according to flow and duty cycle



(b) Optical density variation according to flow rate and duty cycle

Fig. 4-6 Experimental results of flow rate and duty cycle



5. 초기 pH에 따른 세포 파쇄 효율

균체에 산과 염기 처리를 하였을 경우 균체에 미치는 영향과 균체의 세포 파 쇄 효율을 실험을 통해 연구하였다. 선행 실험에서 가장 높은 파쇄 효율을 나타낸 초기 균체 농도 2.80과 출력 파워 255 watt, 순환유량 415 (ml/min), 작동주기 10:1 을 고정하여 실험을 진행하였다. 실험에 사용된 미세조류 Chlorella sp.의 배양 환 경은 pH 7.2~7.5로 중성 구간의 배양환경에서 수확하였다. Fig. 4-7에 (a)는 pH값 에 따른 세포 파쇄 효율을, (b)는 초음파 처리 과정 중 광학밀도의 변화량을, (c)는 초음파 처리 과정 중 pH의 변화량을 나타내었다. pH는 5.26, 7.85, 10.12 세 가지로 분류하여 실험을 진행하였다. 실험 결과 산성을 띈 pH 5.26의 경우 균체의 산성 처리로 인해 세포막이 단단해졌으며, 최종 초음파 처리 후 세포 파쇄 효율이 75 % 이하로 가장 낮은 결과를 나타내었다. 염기성인 pH 10.12의 경우 염기 처리로 인하여 세포막이 유연해졌으며, 그 결과 초기 초음파 조사 시간에는 가장 빠르고 급격한 세포 파쇄 효율 결과를 나타내었다. 중성인 pH 7.85의 경우 초기 초음파 조사 시간에는 염기의 경우 보다 낮은 세포 파쇄 효율을 나타냈지만, 초음파 조사 시간 60분 이후 가장 높은 파쇄 효율을 나타내었고 꾸준하게 증가하여 최종 90 % 이상의 효율로 가장 높은 파쇄 효율 결과를 나타내었다. 초음파 조사 시간에 따른 광학밀도 변화량은 중성 과 염기 처리의 경우 세포 파쇄 효율에 비례하여 크게 변 화하는 결과를 나타내었고, 산 처리의 경우 세포 파쇄 효율이 다른 조건에 비해 낮아짐에 따라 광학밀도 변화량도 적게 변화 하였다. 염기 처리를 한 균체가 세포 파쇄 효율이 점차 낮아지는 이유는 초음파 처리 과정 중 세포가 파쇄 됨에 따라 균체 내부의 단백질 변화가 생겼고, 그 결과 균체 내부의 pH 변화가 중성의 구간 으로 점차 접근하는 결과를 나타내었기 때문으로 판단된다. 염기 처리를 하였을 경우 중성의 경우 보다 최종 세포 파쇄 효율은 낮은 결과를 나타냈지만, 초음파 처리 과정 초기부터 빠르고 급격한 세포 파쇄 효율 결과를 나타내었다.

연속 저주파 장치의 실험 결과 총 다섯 가지 종류의 변수 중 가장 높은 세포 파쇄 효율을 나타낸 배합 조건인 초기 균체 광학밀도 2.80, 출력파워 225 watt, 순 환 유량 415 (ml/min), 작동주기 10:1, pH 7.85의 조건에서의 현미경 사진을 Fig. 4-8에 나타내었다.





(b) Optical density variation according to pH value





Fig. 4-7 Experimental results of initial pH value



Fig. 4-8 Photomicrograph of cell variation during continuous low frequency sonication processing



제 5 장 결 론

미세조류가 3세대 바이오 에너지로 발전하기 위해서는 효율적인 수확 방법의 개발과 경제성의 보완이 필요하다. 미세조류의 수확 과정 중 조류로부터 유용물질 을 얻기 위해서는 세포 파쇄 과정은 필수적이며, 효율적인 세포 파쇄 조건은 미세 조류의 종마다 최적의 주파수 대역과 출력 파워의 조건이 다르기 때문에 이에 맞 는 조건을 사용하여 파쇄를 하는 것이 중요하다. 본 연구는 친환경적이며, 연속 및 자동 공정이 가능한 초음파 처리 방법을 이용하여 미세조류 종류 중 하나인 Chlorella sp.의 최적의 파쇄 효율 조건을 연구하기 위해 (i) 회분 저주파, (ii) 회분 고주파, (iii) 연속 저주파 처리 세 가지 종류로 분류하여 각 방법을 이용하여 연구를 진행하였다. 먼저 실험에 사용한 *Chlorella sp*.는 15 L 평판형 광생물반응 기에서 평균 19일 동안 회분배양하여 얻은 데이터를 바탕으로 성장곡선을 모델링 하였고, 얻어진 성장곡선을 수학적 근사모델을 통하여 근사화하였다. 성장곡선을 통해 최적의 조건으로 배양된 미세조류를 세 가지 종류의 초음파 방법으로 최적의 세포 파쇄 효율에 대해 실험을 하였고, 각 주파수에 따른 최적의 파쇄 효율 배합 조건을 연구하였다. 또한 기존의 미세조류 고정적인 파쇄 방법의 경제성이 낮은 단점을 보완하기 위해 연속 저주파 시스템을 구성하여 생산성을 높였으며 연속 저 주파 시스템의 최적의 파쇄 효율 조건에 대하여 연구하였다.

제 1절 연구 결론

(1) 15 L 평판형 광생물배양기에서 미세조류의 성장에 큰 영향을 주는 조도 조건을 변화시키며 평균 19일 동안 회분 배양하였고, 얻어진 데이터로부터 미세조 류 Chlorella sp.성장곡선을 구하였다. 배양 결과 8,000 Lux 구간의 조도 조건에서 가장 높은 성장률을 나타내었다. 이때 성장곡선의 비 성장 속도를 예측하기 위해 수학적 근사모델인 Logistic 모델과 Gompertz 모델을 사용하여 성장곡선을 근사화 하였다. 성장 곡선에서 모델식의 적합성을 나타내는 결정계수는 Gompertz 모델에 서 0.8897, Logistic 모델은 0.8792결과를 나타내었고, Gompertz 모델이 Logistic 모 델 보다 높은 결과를 나타내어 Chlorella sp.의 성장을 예측하기에는 Gompertz 모 델이 적합한 모델이라고 선택하였다.



(2) 회분 저주파 장치를 이용하여 미세조류 Chlorella sp.의 최적의 세포 파쇄 효율 조건에 대하여 연구하였다. 실험 결과 초기 균체 광학밀도 2.57, 출력 파워 54 watt, 균체 용량 150 ml, pH 7.95의 조건에서 최종 초음파 처리 후 파쇄 효율 90 % 이상으로 가장 높은 세포 파쇄 효율 결과를 나타내었다. 같은 조건에서 산 과 염기 처리한 실험 결과 염기 처리의 경우 균체의 세포막이 유연해져 초기 세포 파쇄 효율이 급격하게 상승하는 결과를 나타내었다. 최종 초음파 조사 시간 경과 후에는 세포가 파쇄 됨에 따라 내부 pH의 변화로 인하여 중성 조건에서 파쇄 효 율 90 % 이상으로 가장 높은 세포 파쇄 효율을 나타내었다.

(3) 회분 고주파 장치를 이용하여 미세조류 Chlorella sp.의 최적의 세포 파쇄 효율 조건에 대하여 연구하였다. 실험 결과 초음파 프로브의 조사 위치는 측면 초 음파 조사 위치, 초기 균체 광학밀도 3.02, 사각 파형, 1.1 MHz, 700 mvpp의 조건 에서 최종 초음파 처리 120분 후 세포 파쇄 효율이 51 % 결과를 나타내었다. 회 분 고주파 장치의 실험 결과 많은 용량에 대하여 집속 처리하는 방식으로 초음파 처리가 되어 미세조류 Chlorella sp.의 최종 초음파 처리 후 세포 파쇄 효율은 회 분 저주파 장치보다 저조한 결과를 나타내었지만, 초기 용량의 차이가 10 배 이상 으로 매우 높은 처리 용량을 나타내었다.

(4) 회분 저주파 장치를 이용한 초음파 처리 후 파쇄 효율과 회분 고주파 장치를 이용한 초음파 처리 후 파쇄 효율의 차이가 큰 차이의 결과를 나타내는 이유는 회분 고주파 장치의 경우 초기 용적에서 회분 저주파 장치와 10 배 이상의 큰 용량 차이가 있으며, 실험에 사용된 미세조류 Chlorella sp.는 단단한 세포벽을 구성하는 셀룰로오스가 다량 함유되어있는 미세조류이고, 세포벽이 내·외층으로 구성되어있는 다층의 형태의 미세조류이기 때문에 고주파 처리 과정 같은 어느 부분의 초점 영역에 대해 집속되어 처리가 이루어지면 처리 가능한 영역이 매우 적은 영역으로 처리되기 때문에 집속 처리가 이루어지지 않는 저주파 장치에 비해 파쇄 효율이 낮아진다. 또한, 출력 파워의 기준이 일반 저주파 장치와 비교하여 현저히 낮게 발생하였기 때문에 파쇄 효율 결과의 차이가 큰 결과를 나타내었다.

(5) 미세조류의 3세대 바이오 에너지 전환의 문제점 중 하나인 수확 과정에서 생산성을 높이기 위해 보다 효율적인 생산이 가능한 연속 저주파 처리 장치 시스 템을 구성하였다. 연속 저주파 장치를 이용하여 미세조류 *Chlorella sp*.의 최적의 파쇄 효율 조건에 대하여 연구하였고, 실험 결과 초기 균체 광학밀도 2.80, 출력파 워 255 watt, 순환 유량 415 (ml/min), 작동주기 10:1, pH 7.85의 조건에서 최종 초 음파 처리 후 파쇄 효율 90 % 이상으로 가장 높은 세포 파쇄 효율 결과를 나타내 었다. 산 과 염기 처리를 병행하여 실험 하였을 경우 염기 처리를 한 경우 초기 초음파 처리 과정에서는 파쇄 효율이 급격하게 상승하는 결과를 나타내었다. 최종 초음파 조사 시간 경과 후에는 세포가 파쇄 됨에 따라 내부 pH의 변화로 인하여 중성 조건에서 파쇄 효율 90 % 이상으로 가장 높은 세포 파쇄 효율을 나타내었 다.

(5) 미세조류의 생산성 증대를 위해 연속 저주파 장치 시스템을 구성하여 실 험을 진행하였고, 기존의 초음파 장치와의 파쇄 효율 결과를 비교하였다. 회분 저 주파 장치의 경우 처리 가능한 초기 용량이 적지만 높은 파쇄 효율 결과를 나타내 었고, 회분 고주파 장치의 경우 처리 가능한 초기 용량이 많지만 비교적 낮은 파 쇄 효율 결과를 나타내었다. 그러나 연속 저주파 시스템의 경우 처리 가능한 용량 이 기존의 회분 저주파 장치보다 처리 가능한 용량이 5 배 증가하여 회분 저주파 장치의 단점을 보완하였고, 세포 파쇄 효율은 최대 90 %이상의 양호한 결과를 나 타내었다. 연속 저주파 장치 시스템은 기존의 초음파 처리 공정을 대체 가능하며, 미세조류 생산 공정에서 소모되는 노동력과 소모비용을 줄여 기존의 경제성이 부 족한 바이오 에너지의 단점을 보완하고 생산 효율을 더 높일 수 있을 것으로 판단 된다.

제 2절 향후 연구 방향

본 논문에서는 미세조류의 기계적 수확 방법 중 하나인 초음파 처리 방법을 이용하여 미세조류 Chlorella sp.의 최적의 세포 파쇄 효율에 대하여 연구하였고, 기존의 바이오 에너지와 비교하였을 때 문제점인 생산성 부족을 보완하기 위해 기 존 초음파 처리 방법을 보완한 연속 저주파 처리 시스템을 구성하여 최적의 파쇄 효율에 대하여 연구하였다. 연속 저주파 장치 시스템을 통해 기존의 회분 저주파 장치보다 생산성 문제를 좀 더 보완하며 생산 공정에서 소모되는 노동력과 소모비 용을 줄여 바이오 연료의 생산 효율을 더 높일 수 있을 것으로 판단된다. 하지만 아직까지도 배양 및 수확 이후 과정인 미세조류의 지질 추출 과정에서는 화학물질 을 이용한 추출방법이 쉽고 간편하게 뛰어난 효율을 내는 방법으로 가용되고 있 다.

향후 연구 방향으로는 연속 저주파 시스템과 자동화 시스템을 이용하여 화학 약품 처리로 인한 환경오염 없이 자연 친화적인 기술을 통해 지질을 추출하는 방 법에 대한 기술 개발이 필요하다. 또한, 미세조류의 배양 및 수확 그리고 지질 추 출의 시스템을 하나로 연동된 시스템으로 자동화하여 노동력과 생산 비용을 줄여 바이오 에너지의 생산 효율을 더 높일 수 있는 연구가 필요하다.



참 고 문 헌

- Ju Oh and Ju-Shin Oh, 2013, "Future resource of Microalgae", Korean Society of Civil Engineers, Vol. 61, No. 2, pp. 85–90.
- Hyun-Jin Park, Eun-Jung Jin, Tae-man Jung, Hyun Joo and Jae-Hwa Lee, 2010, "Optimal Culture Conditions for Photosynthetic Microalgae Nannochloropsis oculata", The Korean Society of Industrial and Engineering Chemistry, Vol. 21, No. 6, pp. 659–663.
- Chisti Yusuf, 2007, "Biodiesel from microalgae", Biotechnology advances, Vol. 25, No. 3, pp. 294–306.
- Hoon-Byung Jo and Joon-Hyung Cha, 2010, "Biodiesel production using microalgal marine biomass", The korean society for biotechnology and bioengineering, No. 25, pp. 109–115.
- Yu-Gwan Oh, 2012, "Biofuel production using microalgae: current status and perspective", The korean society of environmental agriculture, Vol. 12, No. 1, pp. 3–24.
- 6. Paul Chen, Min Min, Yifeng Chen, Liang Wang, Yecong Li, Qin Chen, Chenguang Wang, Yiqin Wan, Xiaoquan Wang, Yanling Cheng, Shaobo Deng, Kevin Hennessy, Xiangyang Lin, Yuhuan Liu, Yingkuan Wang, Blanca Martinez and Roger Ruan, 2009, "Review of the biological and engineering aspects of algae to fuels approach," International Journal of Agricultural and Biological Engineering, Vol. 2, No. 4, pp. 1–30.
- 7. Cheol-Gyun Lee, 1999, "Microalgae mass cultivation", Biotechnology Industry,



Vol. 12, No. 4, pp. 22-29.

- Hee-Mock Oh, 2011, "Current Status and Prospect of Fueling Microalgae Biomass," New & Information for chemical engineers, Vol. 29, No. 3, pp. 355–360.
- R. Halim, M. K. Danquah and P. A. Webley, 2012, "Extraction of oil from microalgae for biodiesel production: A review", Biotechnology Advances, Vol. 30, pp. 709–732.
- E. Gunerken, E. D'Hondt, M. H. M. Eppink, L. Garcia-Gonzlez, K. Elst and R. H. Wijffels, 2015, "Cell disruption for microalgae biorefineries", Biotechnology Advances, Vol. 33 pp. 243–260.
- Hee-Mock Oh and Chi-Young Ahn, 2009, "CO2 Fixation and Biodiesel Production using Microalgae", New & Information for chemical engineers, Vol. 12, No. 5, pp.12–20.
- J. F Spengler, W. T. Coakley and K. T. Christensen, 2004, "Microstreaming effects on particle concentration in an ultrasonic standing wave", The global home of chemical engineers journal, Vol. 49, No. 11, pp. 2773–2782.
- Hyun-Jae Shin, Won-Kyo Jung and Si-Wouk Kim, 2011, "Development of biorefinery process using microalgae", Journal of the Korean Society for Precision Engineering, Vol. 28, No. 2, pp. 154–167.
- 14. US Department of Energy(DOE), 2009, "Energy Efficiency & Renewable Energy, National Algal Biofuels Technology" Roadmap, p. 205.
- 15. You-Kwan Oh and Jeong-Geol Na, 2015, "Microalgal Biodiesel production Process", Journal of Industrial and Engineering Chemistry, Vol. 18, No. 3, pp.



1 - 14.

- 16. Hee–Mock Oh and Chi–Youn Ahn, 2009, "CO2 Fixation and Biodiesel Production using Microalgae", Chemical Engineering and Materials Research Information Center ,Vol. 12, No. 5, pp 12–20.
- Ki-Yeoul Bang, 2009, "World Energy Outlook 2009", Korea energy economics institute, pp. 1–141.
- Hawkes, J. Jeremy and W. Terence Coakley, 1996, "A continuous flow ultrasonic cell-filtering method", Enzyme and microbial technology, Vol. 19, No. 1, pp. 57–62.
- Sang-Jin Shin and Byoung-Jin Jeong, 2013, "Principle and comprehension of ultrasound imaging", Journal of the korean orthopaedic association, No. 48, pp. 325–333.
- 20. Seong-Key Lee, Young-Il Song and Hyun-Suk Song, 2002, "A Study on the Dye Wastewater Treatment Using in th Ultrasonic Process(1)," Journal of Korea Technological Society of Water and Waste Water Treatment, Vol. 10, No. 3, pp. 85-97.
- L. M. Paniwnyk, E. Beaufoy, J. P. Lormimer and T. J. Mason, 2001, "The extraction of rutin from flower buds of Sophoa japonica", Ultrasonic Sonochemistry, Vol. 8, pp. 299–301.
- 22. Jin-Hong Park, Hyun-Soo Lee, Hyoun-Chul Mun, Dae-Ho Kim, Nak-Sul Seong, Hae-Gon Jung, Jin-Ki Bang and Hyeon-Young Lee, 2004, " Improvement of Anticancer Activation of Ultrasounificated Extracts from Acanthopanax senticosus Harms, Ephedra sinica Stapf, Rubus coreanus Miq.



and Artemisia capillaris Thunb", Korean Journal of Medicinal Crop Science, Vol 12, No. 4, pp. 273–278.

- Nam-Kyu Lee, 2017, "Optimized Processing Condition of Production of Nannochloropsis oculata under Light-emitting Diode(LED) Condition", Journal of Life Science, Vol. 27, No. 7, pp. 754–759.
- 24. Mytilinaios and Ioannis, 2012, "Growth curve prediction from optical density data", International journal of food microbiology, Vol. 154, No. 3, pp 169–172.
- 25. M. H. Zwietering, 1990, "Modeling of the bacterial growth curve", Applied and environmental microbiology, Vol. 56, No. 6, pp. 1875–1881.
- 26. X. Tan, D. Zhang, K. Parajuli, S. Upadhyay, Y. Jiang and Z. Duan, 2018, "Comparison of Four Quantitative Techniques for Monitoring Microalgae Disruption by Low-Frequency Ultrasound and Acoustic Energy Efficiency," Environmental Science & Technology, Vol. 52, pp. 3295–3303.
- 27. Man-Jin Kim and Yong-Moon Kim, 2009, "Effect of cell lytic enzyme treatment on the extraction yield in production of microalgae extract", Foodservice management society of korea, Vol. 5, No. 1, pp. 83–93.