



저작자표시-비영리-변경금지 2.0 대한민국

이용자는 아래의 조건을 따르는 경우에 한하여 자유롭게

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

다음과 같은 조건을 따라야 합니다:



저작자표시. 귀하는 원저작자를 표시하여야 합니다.



비영리. 귀하는 이 저작물을 영리 목적으로 이용할 수 없습니다.



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

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

저작권법에 따른 이용자의 권리는 위의 내용에 의하여 영향을 받지 않습니다.

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

[Disclaimer](#)

2021년 2월
석사학위 논문

Ultrasound Sonication을 이용한
미세조류 *Dunaliella salina*의
세포막 파쇄에 관한 연구

조선대학교 대학원

기계공학과

최준혁

**Ultrasound Sonication을 이용한
미세조류 *Dunaliella salina*의
세포막 파쇄에 관한 연구**

**A Study on Cell Membrane Disruption of
Microalgae *Dunaliella salina* by Ultrasound
Sonication**

2021년 2월 25일

조선대학교 대학원

기계공학과

최준혁

Ultrasound Sonication을 이용한
미세조류 *Dunaliella salina*의
세포막 파쇄에 관한 연구

지도교수 정 상 화

이 논문을 공학석사학위 신청 논문으로 제출함

2020년 10월

조선대학교 대학원


기계공학과

최 준 혁

최준혁의 석사학위논문을 인준함

위원장 조선대학교 교수 장 완 식 

위 원 조선대학교 교수 박 종 락 

위 원 조선대학교 교수 정 상 화 

2020년 11월

조선대학교 대학원

목 차

LIST OF TABLES	V
LIST OF FIGURES	VII
ABSTRACT	X
제 1 장 서 론	1
제1절 연구 배경	1
제2절 연구 동향	7
제3절 연구내용 및 방법	9
제 2 장 미세조류 배양 및 초음파 개념	11
제1절 미세조류 <i>Dunaliella salina</i>	11
1. 미세조류 균주 및 배지	11
2. <i>Dunaliella salina</i> 종 특성	12
3. <i>Dunaliella salina</i> 배양	14
4. 성장 모델 근사화	15
제2절 초음파	18
1. 초음파 개념	18
2. 초음파 파쇄 이론	20

제 3 장 회분저주파 처리 시스템	22
제1절 회분저주파 처리 시스템 구성	22
1. 회분저주파 처리 장치 시스템	22
2. 회분저주파 실험조건	24
제2절 회분저주파 세포 파쇄	25
1. 초기 균체 광학밀도에 따른 세포 파쇄 효율	25
2. 출력파워 값에 따른 세포 파쇄 효율	28
3. 초기 균체 용량에 따른 세포 파쇄 효율	31
제 4 장 회분고주파 처리 시스템	33
제1절 회분고주파 처리 시스템 구성	33
1. 회분고주파 처리 장치 시스템	33
2. 회분고주파 실험조건	35
제2절 회분고주파 세포 파쇄	36
1. 파형에 따른 세포 파쇄 효율	36
2. 인가전압에 따른 세포 파쇄 효율	39
제 5 장 연속저주파 처리 시스템	42
제1절 연속저주파 처리 시스템 구성	42

1. 연속저주파 처리 장치 시스템	42
2. 연속저주파 실험조건	44
제2절 연속저주파 장치의 세포 파쇄	45
1. 초기 균체 광학밀도에 따른 세포 파쇄 효율	45
2. 출력파워 값에 따른 세포 파쇄 효율	48
3. 균체 순환 유량에 따른 세포 파쇄 효율	51
4. 초음파처리 장치 작동주기에 따른 세포 파쇄 효율	54
제 6 장 미세조류 <i>Chlorella sp.</i> 와의 파쇄 효율 비교	57
제1절 미세조류 <i>Chlorella sp.</i>	57
1. <i>Chlorella sp.</i> 종 특성과 <i>Dunaliella salina</i> 와의 차이	57
제2절 회분저주파 파쇄 실험 비교	58
1. 초기 균체 광학밀도	58
2. 출력파워	60
3. 초기 균체 용량	62
제3절 회분고주파 파쇄 실험 비교	66
1. 파형	66

2. 인가전압	68
제4절 연속저주파 파쇄 실험 비교	72
1. 초기 균체 광학밀도	72
2. 출력파워	74
3. 균체 순환 유량	76
4. 장치 작동 주기	78
제 7 장 결론	82
제1절 연구 결론	83
제2절 향후 연구 방향	85
참 고 문 헌	86

LIST OF TABLES

Table 1-1	Comparison of biodiesel from some sources	2
Table 1-2	Comparison of major energy specific resource	2
Table 1-3	Comparison of Microalgae production by capacity	4
Table 1-4	Comparison of oil content using various microalgae	4
Table 1-5	Various regulations on international internal combustion engines	8
Table 2-1	Composition of f/2 medium for <i>Dunaliella salina</i>	11
Table 2-2	Applications proposed for <i>Dunaliella salina</i> by different authors	13
Table 2-3	Biological growth curve of sigmoidal regression model	17
Table 2-4	Sound wave propagation speed depending on the medium ...	19
Table 3-1	Specification of batch LFNFU device	23
Table 3-2	Parametric orthogonal array table of the batch LFNFU process	24
Table 3-3	Output power according to input amplitude in batch LFNFU	30
Table 4-1	Characteristic values of high frequency device probe	33
Table 4-2	Parametric orthogonal array table of the batch HFFU process	35
Table 4-3	Output power according to applied voltage for batch HFFU ..	41

Table 5-1 Specification of continuous LFNFU device 43

**Table 5-2 Parametric orthogonal array table of the continuous LFNFU
process 44**

**Table 5-3 Output power according to input amplitude for continuous LFNFU
..... 49**

Table 5-4 Flow rate according to rev./min. 53

LIST OF FIGURES

Fig. 1-1 Process flow chart the phases required to produce biodiesel from microalgae	5
Fig. 2-1 Micrograph of <i>Dunaliella salina</i>	13
Fig. 2-2 Schematic diagram of flat-panel photobioreactor	14
Fig. 2-3 Graphic representation of the four phase of the growth curve	16
Fig. 2-4 Growth curve of <i>Dunaliella salina</i> fitted by Logistic, Gompertz, Baranyi models for Optical Density values	17
Fig. 2-5 Categorization of acoustic spectrum according to frequency	19
Fig. 2-6 Sound propagation in liquid	21
Fig. 2-7 The process from cavitation bubble formation to collapse	21
Fig. 3-1 Schematic diagram of batch LFNFU system	23
Fig. 3-2 Experimental results of initial optical density in batch LFNFU	27
Fig. 3-3 Experimental results of output power in batch LFNFU	29
Fig. 3-4 Experimental results of initial capacity in batch LFNFU	32
Fig. 4-1 Schematic diagram of batch HFFU system	34
Fig. 4-2 Experimental results of wave form for HFFU	37
Fig. 4-3 Difference between Square wave and Sine wave	38
Fig. 4-4 Experimental results of applied voltage for HFFU	40
Fig. 5-1 Schematic diagram of continuous LFNFU system	43

Fig. 5-2 Experimental results of initial optical density for continuous LFNFU 47
Fig. 5-3 Experimental results of output power for continuous LFNFU .. 50
Fig. 5-4 Experimental results of flow rate for continuous LFNFU 52
Fig. 5-5 Experimental results of duty cycle for continuous LFNFU 55
Fig. 6-1 Changes in *Chlorella sp.* cell reduction according to initial OD 59
Fig. 6-2 Changes in *Chlorella sp.* cell reduction according to output power 61
Fig. 6-3 Changes in *Chlorella sp.* cell reduction according to initial capacity 63
Fig. 6-4 Photomicrograph of cell variation during batch LFNFU processing 65
Fig. 6-5 Changes in *Chlorella sp.* cell reduction according to applied voltage 67
Fig. 6-6 Comparison of cell disruption efficiency according to applied voltage for batch HFFU 69
Fig. 6-7 Photomicrograph of cell variation during batch HFFU processing 71
Fig. 6-8 Changes in *Chlorella sp.* cell reduction according to initial OD 73

Fig. 6-9 Changes in *Chlorella sp.* cell reduction according to output power 75

Fig. 6-10 Changes in *Chlorella sp.* cell reduction according to flow rate 77

Fig. 6-11 Changes in *Chlorella sp.* cell reduction according to duty cycle 79

Fig. 6-12 Photomicrograph of cell variation during continuous LFNFU processing 81

ABSTRACT

A Study on Cell Membrane Disruption of Microalgae *Dunaliella salina* by Ultrasound Sonication

Choi, Jun Hyuk

Advisor: Prof. Jeong, Sang-Hwa, Ph.D.

Department of Mechanical Engineering,

Graduate School of Chosun University

Oil, coal, and natural gas, which are the main resources used in the existing industrial system, have significantly contributed to human development and improved the quality of life since the industrial revolution of the 18th century. Starting from industrial development, the use of fossil fuels has increased exponentially, and the extensive use of fossil fuel resources has caused numerous environmental problems. Additionally, fossil fuels are finite and prone to be depleted, and several studies on finding alternative resources have been conducted. Among related recent studies, biorefineries, which replace fossil fuels with biomass, have received significant attention worldwide.

Microalgae are third-generation biomasses, which grow through photosynthesis, and they use light, water, and minerals, which are necessary for photosynthesis, to create useful substances. Cells that consume as many nutrients as necessary for photosynthesis for growth store resources in the form of lipids, and the lipids can be used as fuel (biodiesel). Currently, natural materials produced in various fields are used, and extensive research on biodiesel as a sustainable, ecofriendly energy resource is being conducted. The cultivation of microalgae in the spotlight is generally divided into open-type and closed-type cultures, and research on a method of culturing them in large quantities is also in progress. It exists in numerous microalgae globally, and each microalga has a different size, shape, and growth environment. The cell membrane disruption process of microalgae is essential to extract natural substances produced by different microalgae species. Microalgal cell membrane disruption involves the use of various methods, generally divided into mechanical and nonmechanical methods.

In this study, cell membrane destruction was investigated through sonication for efficient microalgal cell membrane destruction, which compensated for the shortcomings of the conventional mechanical and nonmechanical methods. Generally, the mechanical method has a problem of high costs, and the nonmechanical method is problematic in terms of environmental pollution. Cavitation occurred when ultrasonic waves were irradiated to the solvent, and the study was conducted using the effect of cavitation on microalgal cells. The ultrasonic device consisted of batch low-frequency, batch high-frequency, and continuous low-frequency devices, and *Dunaliella salina* was used as the microalgae species for the experimental tests. First, the microalgae *Dunaliella salina* was cultured by using a flat-panel photobioreactor. The optimum cell disruption efficiency of the cultured *Dunaliella salina* was determined for the three experimental devices mentioned above. The batch low-frequency device utilized the initial optical density, output power, and initial cell capacity variables of the cells, and the batch high-frequency used the ultrasonic location, initial cell concentration, initial position, and waveform. Finally, in the continuous low frequency, the initial cell concentration, output power, cell flow rate, and duty cycle were used for the experiments. The optimal cell disruption conditions were investigated based on the influence of the variables on the disruption efficiency, and all values of the disruption efficiency were curve-fitted using a logistic model. The results of the study confirmed that the output power value of the sonication device had a significant effect on cell disruption efficiency in all experiments.

제 1 장 서 론

제1절 연구 배경

산업혁명 이후 진행된 공업화를 통한 발전은 인간 생활의 질 향상에 크게 기여하였다. 발전된 산업체계에서 주요 자원인 석유, 석탄 및 천연가스는 필수불가결한 자원으로 손꼽히고 있으며, 오늘날에도 화석연료들은 꾸준히 사용되고 있다. 18세기 산업혁명이 이뤄진 후 약 250년, 증가하는 화석연료 소비는 수많은 환경문제를 야기해 왔다. 이런 환경문제는 꾸준하고 급격한 화석연료의 소비로부터 기인하였으며, 화석연료의 사용이 가속화되면서 자원이 점차 고갈되어가는 상황이다. 또 최근 원유가격의 급격한 상승과 전 세계적인 이산화탄소 배출규제와 같은 다양한 문제에 대한 불안함 등으로 인해 차세대 신재생에너지에 대한 관심이 증가하고 있다^[1]. 최근 수많은 대체 에너지에 대한 연구가 활발히 진행 중이며, 그 중에서도 화석연료를 바이오매스로 대체하는 바이오 리파이너리가 국제적으로 큰 관심을 받고 있다^[2]. 바이오매스는 원료에 따라서, 곡물자원을 원료로 하는 1세대, 천연원료를 사용하는 2세대에 이어서 최근 3세대에는 조류를 원료로 하는 연구가 진행 중이다^[3]. 미세조류는 광합성을 통해 성장하는 미생물로서, 광합성에 필요한 빛과 물, 그리고 이산화탄소와 같은 무기물을 이용하여 유용물질을 생성한다. 성장을 위해 광합성으로 필요한 만큼의 양분을 소모한 균체는 세포 내에 지질형태의 자원을 저장하고, 이렇게 생성된 지질은 바이오디젤로 활용할 수 있으며, 미세조류가 생성한 다양한 유용물질은 다양한 분야에서 사용되고 있다. 또 미세조류가 광합성을 할 때 이산화탄소를 사용함으로써 탄소저감에 기여하는 방안도 상당히 유용하다. 이러한 장점들은 다방면으로 유용하지만 기존 대체자원들에 비해서 생산적, 경제적 측면에서 부족하기 때문에 지속적인 연구를 통해 발전시켜야 한다는 단점 또한 존재한다. Table 1-1은 바이오디젤 원료의 생산성을 비교하여 나타내고 있다^[4]. Table 1-1에서 보이는 것처럼 미세조류는 다른 곡물들과 다르게 적은 부지를 필요로 하고, Oil yield 값이 큰 것을 알 수 있다. 이러한 모습은 현재 사용하고 있는 화석연료를 대체 할 잠재력을 지니고 있음을 보여준다. Table 1-2는 현재 사용되는 주요 에너지자원과 미세조류의 특징을 비교하여 나타낸 것이다^[5].

Table 1-1 Comparison of biodiesel from some sources^[4]

Source	Land area needed (M·ha)	Oil yield (L/ha)
Canola	223	1190
Coconut	99	2,689
Corn	1540	172
Jatropha	140	1,892
Microalgae	2	136,900 (Oil content > 70%)
Microalgae	4.5	58,700 (Oil content < 70%)
Oil palm	45	5,950
Soybean	594	446

 Table 1-2 Comparison of major energy specific resource^[5]

Division	Greenhouse gas emissions	Material industrial production	Reserve year	Economic time of guarantee
Microalgae	Low	Possible	Unlimited	2020
Coal	High	Possible	112	Present
Light of the sun	Low	Impossible	Unlimited	2020
New clear power	Low	Impossible	79	Present
Nutral gas	Middle	Possible	64	Present
Oil	High	Possible	54	Present
Wind power	Low	Impossible	Unlimited	Present

미세조류의 뛰어난 잠재력을 극대화하기 위해서는 기존의 단점들을 해결해야 한다. 대체에너지로서 미세조류의 사용은 아직까지는 비경제적이고 비생산적인 현실에 직면해있다. 최근 미세조류의 생산성을 높이기 위해 대규모배양법에 대한 연구가 진행되고 있다. 초기 소규모 실험실 수준의 배양에서 여러 과정을 걸쳐서 대규모배양까지 연구가 진행되었으며, 개방형, 밀폐형 배양 두 가지로 분류가 된다^[6]. 개방형배양은 설치가 간단하고 시스템의 유지, 관리가 용이하며 운용비용이 낮다는 장점을 가지고 있어서 빠르게 상용화 되었다. 하지만 개방형이기 때문에 외부환경에 영향을 받기 쉬워서 오염으로 인해 극한 배양조건을 가진 민감한 조류에는 부적합하고, 조류침전으로 인한 낮은 수확량의 단점을 가지고 있다. 또 충분한 부지를 확보해야하기 때문에 국내에서 사용하기에는 효율이 떨어진다. 밀폐형 배양은 개방형의 단점을 보완하기 위해서 개발된 방법이다. 밀폐형 배양기는 광합성에 필요한 빛과 기체를 직접 제어할 수 있고, 조류 중에 따라서 배지를 선택적으로 사용할 수 있다. 또 앞서 언급한 외부 미생물로 인한 오염의 위험이 없기 때문에 극한 배양조건을 가진 조류의 고농도 배양에도 적합하며, 큰 부지를 필요로 하지 않는다. 하지만 아직까지 더 연구되어야 할 부분은 존재한다. 다양한 미세조류 중에 따라서 각각의 특징이 존재하기 때문에 장기적인 배양을 할 경우 미세조류에 의해서 빛이 차단되는 파울링(fouling) 현상이나, 성장한 조류가 침전되어 가라앉아 굳어버리는 현상 등이 발생한다^[7]. 이러한 현상은 미세조류 생산성을 감소시키고 폐사의 원인이 된다. Table 1-3은 개방형 배양과 밀폐형 배양의 용량 대비 생산성 비교하여 나타냈다^[6]. Table 1-3에 나타난 것처럼 개방형(Raceway pond)배양은 밀폐형에 비해서 현저히 낮은 생산성을 볼 수 있다.

미세조류는 전 세계적으로 다양한 종이 존재하며 현재 약 수많은 종이 알려졌다. 대다수의 국내의 미세조류는 담수 및 해양에 많이 존재한다^[8]. 미세조류는 1세대 곡물 자원들과는 다르게 빠르게 성장하고, 바이오매스로서 뛰어난 지질함량을 보이는 종들도 보고되고 있다. Table 1-4는 미세조류 중에 따라서 지질 함량을 비교하여 나타냈다^[9]. 수많은 미세조류로부터 생산되는 것은 지질뿐만 아니라 다양한 종류의 단백질, 탄수화물과 같은 천연 유용물질을 생산하므로, 지질 추출 이후에 유용물질을 더 수확할 수 있다. 바이오매스의 관점에서 미세조류는 식물자원보다 더 높은 광전환 효율까지 가지고 있고, 보다 더 다양한 천연 유용물질을 추출할 수 있는 장점과 연중 지속적으로 생산 할 수 있다는 이점을 가지고 있다.

Table 1-3 Comparison of Microalgae production by capacity^[6]

Culture system		Volume (L)	productivity (g/L)
Raceway pond		150,000	20
		360	20
Enclosed	Tube form	200	40
	Coil form	200	20
	Tube form	200	40
	Tube form	300	70

 Table 1-4 Comparison of oil content using various microalgae^[9]

Species	Oil content (% [dry weight])
<i>Cryptocodinium cohni</i>	20
<i>Cylindrotheca</i> sp.	16-37
<i>Chlorella emersoni</i>	63
<i>Chlorella minutissima</i>	57
<i>Chlorella protothecoides</i>	23 / 55
<i>Chlorella sorokiana</i>	22
<i>Chlorella vulgaris</i>	14-40 / 56
<i>Dunaliella bioculata</i>	8
<i>Dunaliella salina</i>	14-20
<i>Isochrysis</i> sp.	25-33
<i>Nannochloropsis</i> sp.	31-68
<i>Nannochloris</i> sp.	20-35
<i>Neochloris oleoabundans</i>	35-65
<i>Nitzschia</i> sp.	45-47
<i>Scenedesmus dimorphus</i>	6-7 / 16-40
<i>Scenedesmus obliquus</i>	11-22 / 35-55
<i>Schizochytrium</i> sp.	50-77
<i>Botryococcus braunii</i>	25-75

다양한 종의 미세조류를 배양하여 유용물질을 추출하는 방법은 각 종에 따라서 적절한 수확방법을 사용하는 것이다. 미세조류는 그 종에 따라서 크기, 모양, 그리고 성장환경에서 차이를 보인다. 대개 미세조류는 $30\mu\text{m}$ 이하의 크기를 가지며, 종에 따라서 원형, 일자형 등 다양한 세포 모양이 관찰된다. 이런 특징뿐만 아니라 조류로부터 얻어질 유용물질의 용도에 따라서도 수확방법은 달라질 수 있다. 미세조류 연료생산에서 수확에 사용되는 비용은 약 25%정도로서 경제적으로 최적화 된 수확기술이 적용되어야 한다. 미세조류로부터 생산된 유용물질의 추출은 Fig. 1-1에서 볼 수 있듯이 전처리(Pre-treatment)과정을 거치게 된다. 세포막을 파쇄 하는 Cell disruption은 세포 내 지질을 주변 배지로 강제 방출시키는 과정이며, 반드시 필요하다^[10].

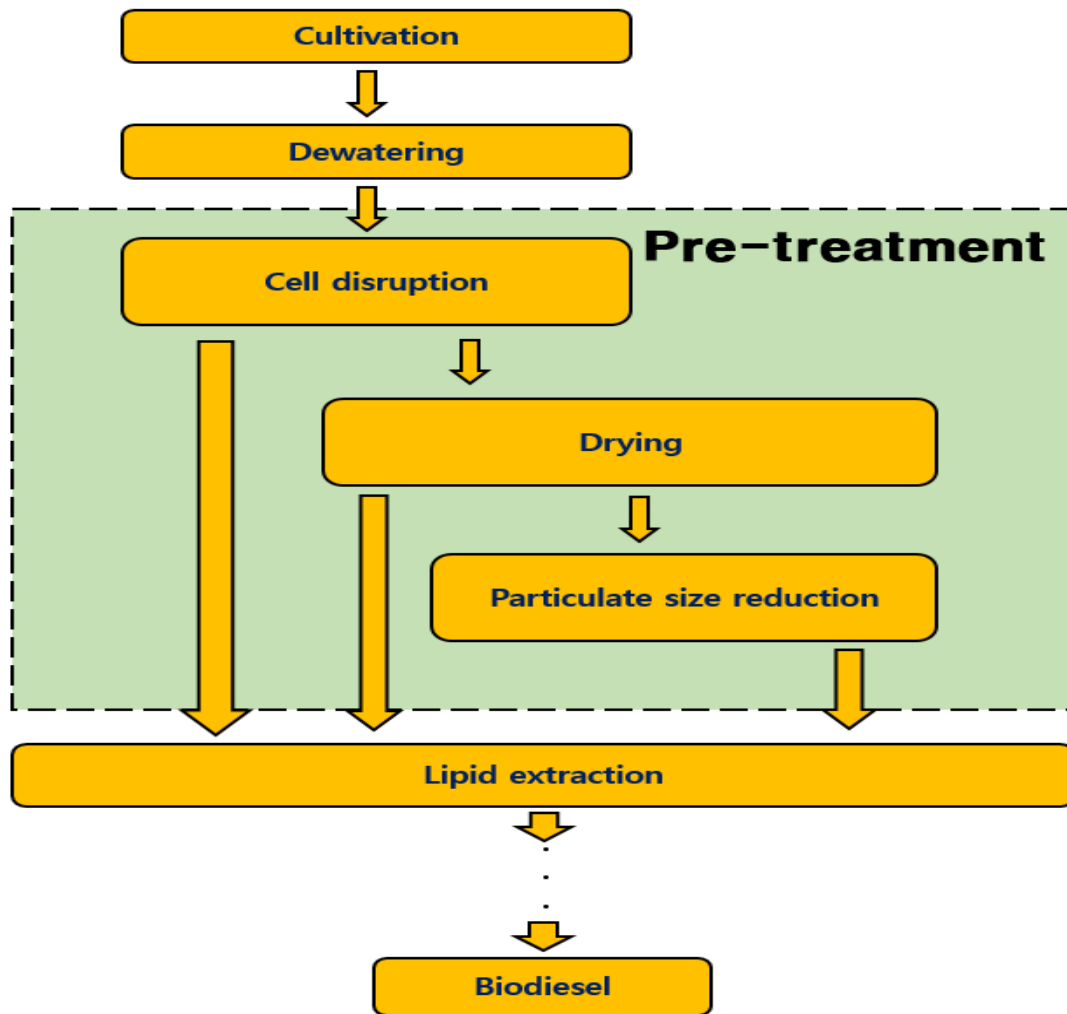


Fig. 1-1 Process flow chart the phases required to produce biodiesel from microalgae^[10]

미세조류의 세포막 파쇄방법은 보편적으로 비기계적 방법과 기계적 방법으로 구분되어 사용된다. 비기계적방법은 에너지 소모량이 적고 균일한 세포파쇄가 가능하지만, 화학적 처리로 인해 제품의 품질에 영향을 주고 환경오염에 영향을 미치며 처리시간이 길어진다. 기계적 방법은 세포 구조가 잘 보존된다는 장점이 있지만, 규모에 비해서 높은 에너지를 소비하며 복잡한 처리과정을 가지게 된다. 그리고 두 과정 모두 온도 상승으로 인한 파쇄효율 감소를 제어하기 위해서 냉각과정이 필수적으로 동반되어야 한다. 비기계적 방법의 대표적 처리법은 효소가수 분해(Enzyme hydrolysis), 초임계 이산화탄소 추출(Super critical CO₂ extraction) 등이 존재하며, 기계적 방법의 대표적인 처리법은 비드 밀링(Bead milling), 고압 균질화(High Speed Homogenization), 초음파처리(Sonication) 등이 존재한다^[11]. 다양한 기계적 방법 중 하나인 초음파(Sonication)처리법은 기존 기계적 방법과는 조금 다른 측면의 모습을 서술할 수 있다. 초음파처리법은 일반적인 기계적 방법들과 다르게 간단한 처리 공정을 가져 경제적이고, 친환경적인 미세조류 파쇄 방법으로 손꼽힌다^[12]. 초음파가 일으키는 공동현상을 이용한 초음파처리법은 저비용 고효율의 장점을 가지고 있으며, 연속적인 분리공정을 구성하는데 용이한 장점이 있다^[13]. 다양한 종의 미세조류의 적정 주파수의 초음파를 조사하면 미세조류의 세포 파쇄가 가능하며 더 긴 시간동안 조사할수록 많은 양이 파쇄된다^[14].

본 논문에서는 미세조류 세포막 파쇄 공정에서 경제적이고 친환경적인 초음파처리법을 활용하여 미세조류의 세포막 파쇄 최적 효율에 대하여 연구를 수행하였다. 연구를 진행하면서 사용한 미세조류 종은 *Dunaliella salina*를 사용하였으며, 평판형광생물반응기에서 회분배양을 진행하였다. *Dunaliella salina*를 배양하면서 각종 센서를 통해 수집한 데이터들을 바탕으로 미세조류의 성장곡선을 작성하였다. 작성한 성장곡선을 통해서 실험에 사용 할 미세조류의 적정 초기 광학밀도 단계를 설정하였고, 장비의 출력 파워, 초기 균체용량 등과 같은 실험에 영향을 미치는 조건들의 상호작용을 통해 최적 파쇄 효율에 대해서 실험을 통해 연구하였다.

제2절 연구 동향

환경오염에 관련된 문제가 세계적인 이슈로 떠오른 가운데, 여러 국가들의 대처 방안이 발표되고 있다. 대표적으로 세계 주요국가의 내연기관을 이용한 자동차에 대한 다양한 규제 법안이 발의되고 있으며, 2030년을 목표로 내연기관 판매금지 법안까지 발의 되었다^[15]. Table 1-5에서 국제적 내연기관 자동차에 대한 규제 유형을 알아 볼 수 있고, 내연기관으로부터 발생하는 다양한 환경문제를 알 수 있다. 국제적인 화석연료의 사용규제와 더불어 대체에너지, 신재생 에너지 등에 대한 다양한 기술연구가 수행되고 있으며, 친환경 에너지인 바이오매스 또한 다방면에서 연구가 진행되는 중이다.

현재 바이오매스는 곡물을 활용하는 1세대, 폐목재나 작물줄기를 사용하는 2세대, 그리고 3세대인 미세조류까지 발전해 왔다. 이러한 미세조류는 전 세계적으로도 다양하게 사용되고 있다. 전 세계적으로 대규모 미세조류 단지가 들어서고 있으며, 미국 에너지국의 조사에 따르면 1세대 바이오매스인 옥수수보다 3세대 미세조류를 사용할 때 80배 이상의 바이오연료를 생산 할 수 있는 것으로 보고하였다. 특히 미세조류는 식물과 비교하여 최대 10배정도 바이오매스 생산성이 높으며, CO₂ 고정능력도 월등히 좋아보다 더 친환경적인 효과도 기대 할 수 있다. 또 미세조류의 필요 면적이 적기 때문에 더 높은 지질 생산량을 기대 할 수 있다. 세계적인 정유회사 Exxon Mobil사는 미국의 SGI사와 6억 달러 규모의 미세조류를 통한 바이오연료 개발 연구를 체결했다. 미세조류가 생산하는 바이오연료는 석유 연료와 유사한 분자구조를 가지고 있다는 점을 이용해 바이오연료를 화석연료인 석유로의 전환이 가능하다는 분석이며, 이는 현재 시스템에서 소비자에게 판매가 가능하다는 것을 의미한다. 또한, 국제적으로 미세조류로부터 바이오연료를 생산하는 업체가 150개 이상으로 추정된다^[16].

국내에서는 1998년 과학기술부 주도 하의 이산화탄소 생물학적 처리 기술로부터 출발하여 ‘생물학적 전환에 의한 이산화탄소 고부가 생물제품 기술 개발’이 앞서 서술한 다양한 분야의 미세조류 활용을 목표로 진행되고 있으며, 지식경제부, 농림수산식품부 등과 같은 곳에서도 미세조류 관련 기초적 연구가 진행되고 있다. 최근 2009년 저탄소 녹색성장이라는 새로운 체계의 연구개발 종합대책이 수립되어 직면한 에너지 및 환경문제에 적극적으로 대처하기 위한 방안이 꾸준히 연구되고 있다. 이와 관련한 국내의 조류 생명공학은 아직 시작단계이며, 대학, 연구소 등에서 소규모로 진행되고 있는 것으로 판단된다.

3세대 바이오매스인 미세조류의 활용은 바이오매스뿐만 아니라 농업, 사료, 화장품, 폐수 처리, 의약품 등의 다양한 방향으로 범위가 증대되고 있다^[17]. 농업에서는 토양 개량제 및 생물비료, 의약품은 항산화제, 항생제, 항암제로서 두각을 나타내고 있으며, 폐수처리, 중금속 흡착과 같은 다양한 환경정화에 사용되고 있다. 그 외에 우주 개발, 방사능 완화 등 산업적으로 다방면에서 활용 가능한 자원으로도 각광받는 중이다.

Table 1-5 Various regulations on international internal combustion engines^[15]

Regulation form	Enforcement area		Obligor
	Overseas	Domestic	
Exhaust gas	Most countries	Enforcement	Producer
Fuel efficiency	USA, Japan, China	Enforcement	Producer
Green gas	USA, EU	Enforcement	Producer
ZEV mandatory sales system	USA(State of california)	Review	Producer
Bonus-malus system	France	Enforcement Expected	Consumer
Restriction on operation of high-emission vehicles	European major cities	Enforcement	User
Prohibition of sales of internal combustion engines	Germany, UK, Norway, etc.	Non-enforcement	Producer

제3절 연구내용 및 방법

차세대 신재생 에너지로 각광받는 3세대 바이오매스인 미세조류는 광합성을 이용해 성장한다. 광합성에 필요한 빛과 물 그리고 이산화탄소 같은 무기물을 이용해 천연 유용물질을 생산하며, 이런 유용물질 생성 과정에서 온실가스인 이산화탄소를 높은 수준으로 고정화 할 수 있다. 이러한 생물학적 특성과 생성된 유용물질을 활용하여 바이오디젤뿐만 아니라 농업, 사료, 화장품, 폐수 처리, 의약품 등의 다양한 방면으로 활용 할 수 있다는 장점들을 가지고 있다. 다양한 장점들 덕분에 미세조류는 이전 1, 2세대의 바이오매스 보다 더 광범위한 활용이 가능하다. 그러나 미세조류의 경쟁력은 아직 부족하기 때문에 경제적으로 부족한 모습이 나타날 수 있다. 미세조류의 경쟁력 향상을 위해서는 생산 공정에서 발생하는 비용을 감소하는 방법이 가장 핵심이며, 이를 위해서 대량배양과 효율적인 수확방법에 대한 연구가 진행되고 있다.

본 논문에서는 미세조류의 경제적 배양을 위해 평판형광생물반응기를 사용하여 밀폐형 배양을 진행하였고, 배양된 균체를 이용하여 경제적이고 친환경적인 초음파처리법을 이용하여 미세조류의 세포막 파쇄에 대한 연구를 실험을 통해서 진행하였다. 실험을 위해서 미세조류 *Dunaliella salina*를 15L 평판형광생물반응기를 통해 회분 배양하여 해당 균체의 성장 척도를 측정하였다. 미세조류의 성장량을 측정하기 위해서 균체의 광학밀도를 측정하였고, 일정한 조건의 배양을 위해 pH 센서, 조도 센서(illuminance sensor), 탁도 센서(turbidity sensor), gas meter와 같은 각종 센서들을 이용하여 배양조건을 제어 하였다. 측정된 데이터를 이용한 성장곡선을 통해 수학적 근사 모델을 활용하여 성장 모델을 근사화 하였고, 실험에 사용할 초기 균체 광학밀도 조건을 결정하였다. 다음 준비된 균체 *Dunaliella salina*를 이용하여 회분저주파, 회분고주파, 연속저주파처리장치를 이용하여 실험을 통해 연구하였다. 미세조류의 다양한 종 특성에 따라서 적정 파쇄 주파수대역, 출력과워 값이 다르기 때문에 저주파, 고주파의 2가지 회분초음파처리장치를 이용하였고, 연속적인 저주파 초음파처리장치를 이용하여 생산성 및 경제성 측면에서의 향상을 도모하였다. 각 실험에서 실험계획법과 처리장치의 스펙에 따라서 변수를 단계적으로 조정해가며 실험을 진행하였고, 최종적으로 변수들의 최적 값을 조합하여 연구를 진행하였다.

이와 같은 연구의 방법과 결과를 서술하기 위하여 다음과 같은 순서로 기술하였다. 2장에서는 실험에 사용된 미세조류 *Dunaliella salina*의 회분 배양을 통해 습득한 데

이더로부터 성장곡선 근사화 하였고, 초음파에 대한 기초적 설명을 기술하였다. 3장에서는 배양을 통해 결정한 초기 균체 광학밀도를 기점으로 회분저주파 세포막 파쇄 효율 실험결과를 기술하였다. 4장에서는 회분고주파처리장치의 세포막 파쇄 효율 실험결과를 기술하였다. 5장에서는 연속저주파처리장치 시스템과 세포막 파쇄 효율 실험결과를 기술하였다. 6장에서는 *Dunaliella salina*의 초음파 파쇄 결과와 *Chlorella sp.*의 초음파 파쇄 결과를 분석하여 기술하였다.

제 2 장 미세조류 배양 및 초음파 개념

제1절 미세조류 *Dunaliella salina*

1. 미세조류 균주 및 배지

본 연구에서 사용된 균주는 한국해양시료도서관으로부터 분양받은 *Dunaliella salina*를 사용하였다 배양에 사용된 배지는 f/2 media를 사용하였으며, 성분은 Table 2-1 과 같다^[18-19]. f/2 media는 해수를 base로 하여 제조되었으며, 20분 동안 121 °C에서 고압 멸균기를 통해 멸균하여 냉각 후 사용하였다.

Table 2-1 Composition of f/2 medium for *Dunaliella salina*^[18-19]

Components	Amount(g/L)
NaNO ₃	0.075
Na ₂ H ₂ PO ₄ H ₂ O	0.005
f/2 Trace metal solution	
FeCl ₃ 6H ₂ O	0.00315
Na ₂ EDTA2H ₂ O	0.00436
CuSO ₄ 5H ₂ O	0.0000098
Na ₂ MoO ₄ 2H ₂ O	0.0000063
ZnSO ₄ 7H ₂ O	0.000022
CoCl ₂ 6H ₂ O	0.00001
MnCl ₂ 4H ₂ O	0.00018
f/2 Vitamin solution	
thiaminHCl (vit.B ₁)	0.0001
biotin (vit.H)	0.0000005
cyanocobalamin (vit.B ₁₂)	0.0000005

2. *Dunaliella salina* 종 특성

본 연구에 사용된 *Dunaliella salina*는 호염성(염분의 농도가 높아야만 성장 가능한 미생물)녹색 미세조류의 일종이다. 미세조류 *Dunaliella salina*의 현미경 사진은 Fig. 2-1에 나타내었다. 세포 크기는 길이 5-25 μm , 폭 3-13 μm 의 다양한 크기의 타원형을 보이며, 편모를 가진 모습을 볼 수 있다^[20].

*Dunaliella*의 세포는 대부분 전분 과립으로 둘러싸여 있으며 중앙에 엽록체가 포함되어 있다. 엽록소 a와 b외에도 α , β -카로틴, 및 루테인 등과 같은 귀중한 카로티노이드 색소를 포함한다. 해당 균체는 항산화제이자 비타민 A의 전구체인 β -카로틴이 풍부하여 비타민A 다양한 식품보조제 및 화장품에 사용되고 있으며, 의약품 원료로서 글리세롤, 비타민C, 비타민E는 *Dunaliella salina*의 중요한 세포 내 구성요소로서 여러 유형의 암 및 퇴행성 질병 등의 발병률을 줄이는데 상당한 영향을 미친다^[21]. 또한 *Dunaliella salina*는 지질 축적이 높아 바이오디젤생산에 적합하다. 다른 조류들과 비교하여 상대적으로 높은 성장률과 다양한 환경에 대한 저항력이 높아 전 세계에서 서식하는 점 또한 장점이다^[22]. Table 2-2는 *Dunaliella salina*가 생산하는 유용물질들과 참고 문헌을 정리하여 나타냈다. 다양한 유용물질들이 농업, 공업, 식품업과 같은 여러 분야에서 활용되고 있으며, 최근에는 의약품 또한 조명을 받고 있는 점이 미래 자원으로써 큰 가치를 가진다고 볼 수 있다.

*Dunaliella salina*는 단단한 세포벽이 존재하지 않고 얇은 탄성 원형질막으로 둘러싸여있기 때문에 삼투압에 매우 민감하다^[23]. 세포의 구성 물질 중 글리세롤은 세포의 삼투압 균형과 효소 활성을 유지하는 수단으로 사용되기 때문에, 세포는 전분으로부터 다량의 글리세롤을 합성하여 고농도로 유지한다. 세포내의 다량의 글리세롤 합성은 고염도의 환경에서 더욱 활성화 되는 것으로 연구 되었으며, 염도가 감소하면 조금씩 움직임이 둔해지고 종국에는 세포의 많은 부분이 파열된다. 하지만 일부 세포는 감소한 농도에서도 생존하는 모습을 보인다. 이러한 특성을 볼 때 *Dunaliella salina*는 염분이 높은 환경에서 더 잘 성장한다는 것을 알 수 있으며, 염도가 낮은 환경에서도 어느 정도는 생존이 가능하다고 할 수 있다. 그러나 너무 높은 염도는 미생물이 생존 할 수 없는 환경이므로 사해(dead sea)에는 *Dunaliella salina*를 포함한 여타 미생물들이 존재하지 않는 것으로 알려졌다.

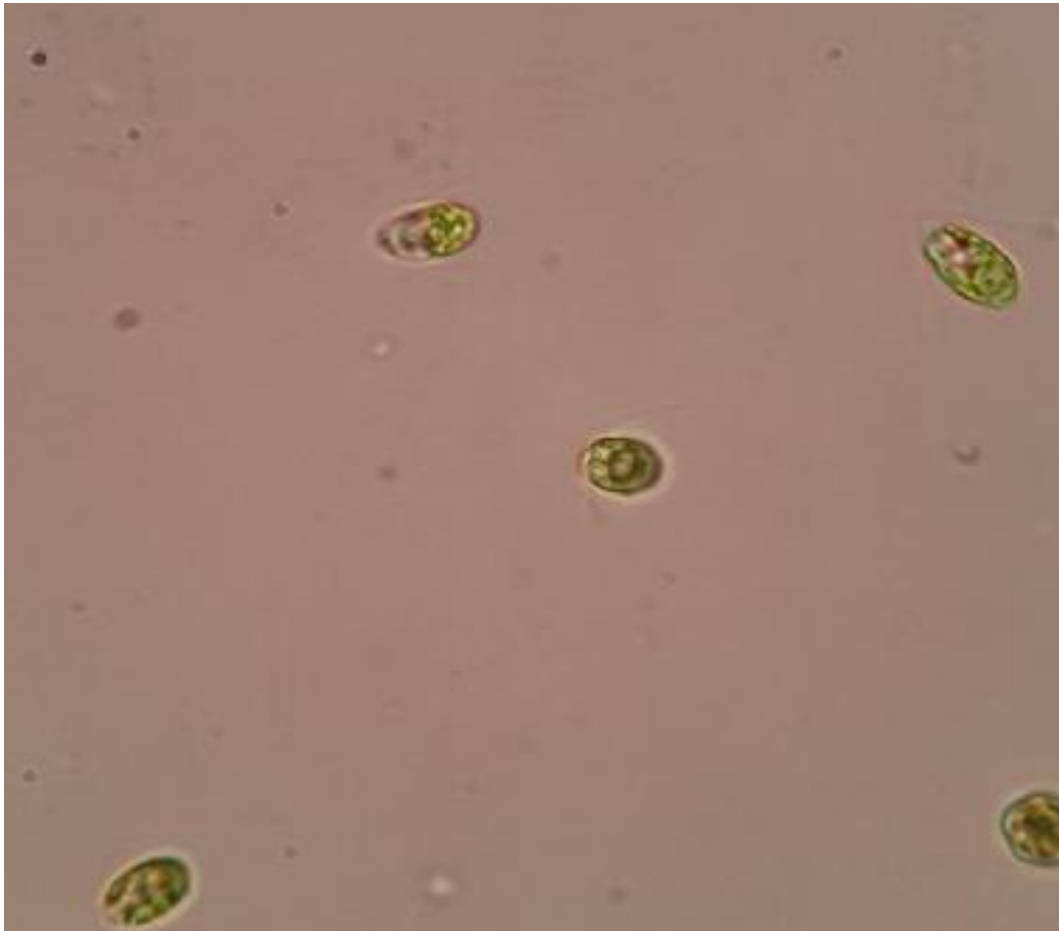


Fig. 2-1 Micrograph of *Dunaliella salina*

Table 2-2 Applications proposed for *Dunaliella salina* by different authors^[23]

Proposed application	References
Source of carotinoids, vitamins and antioxidants	Chidambara Murthy et al. (2005); Milko (1963)
Source of PUFA(ω 3 polyunsaturated fatty acids)	Abd El Baky et al. (2004)
Biological reactors	Geng et al. (2003)
Single cell protein (SCP), minerals	Supamattaya et al. (2005)
Enzymes	Ben Amotz and Avron (1990)

3. *Dunaliella salina* 배양

미세조류 *Dunaliella salina*의 회분배양(Batch culture)통해서 습득한 데이터를 토대로 성장곡선을 작성하였다. 회분배양은 여러 다양한 배양방법들 중 하나로서 목적물질의 성장에 필요한 성분이 포함된 배지 전체와 균주를 한 번에 접종한다. 한번 접종 한 후 새로운 배지와 균주의 첨가 없이 일정 기간 동안 배양하는 방식이다. 배지에는 성장에 필요한 성분이 제한적이기 때문에 시간이 지남에 따라 세포 량이 점차 증가하고, 영양분은 감소하여 일정 시간이 흐르면 성장이 멈추고 세포가 폐사하는 사멸기(death phase)에 들어서게 된다^[24].

*Dunaliella salina*의 회분배양은 15L 평판형광생물반응기에서 약 35일 동안 배양하였고, 일정한 배양 환경 유지를 위해 배양기 내·외부에 탁도센서, 광도센서, pH센서와 가스 조절장치를 구성하였다. 평판형광생물반응기의 구성은 Fig. 2-2에 나타내었다.

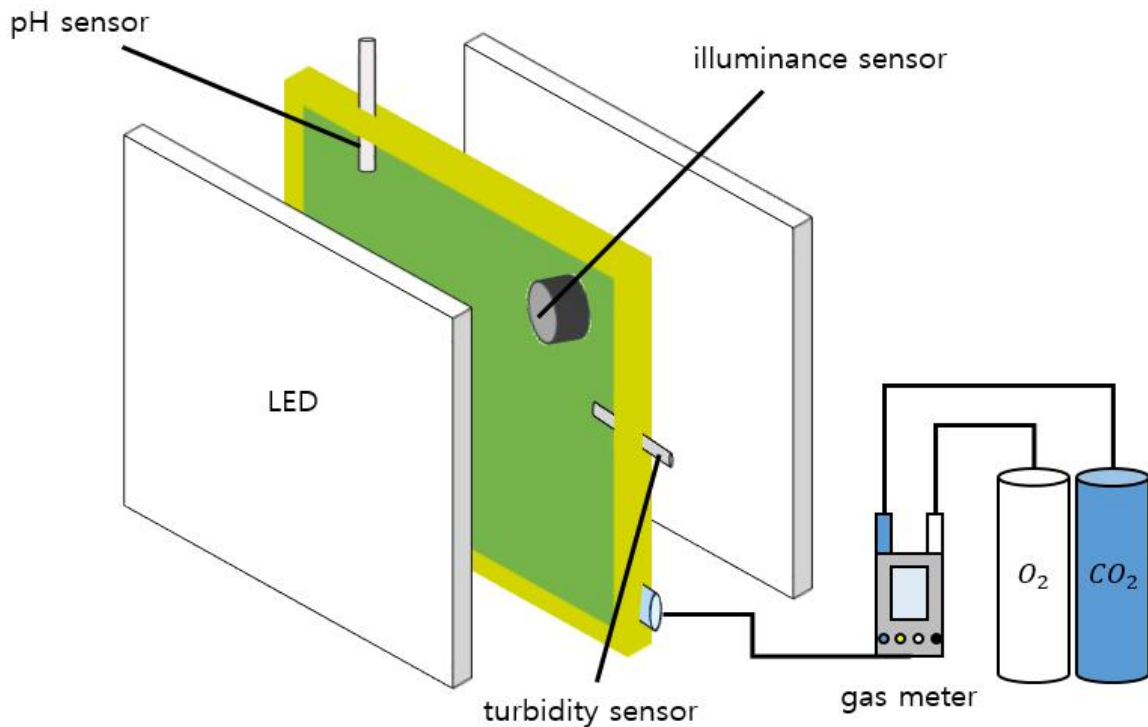


Fig. 2-2 Schematic diagram of flat-panel photobioreactor

4. 성장 모델 근사화

미세조류를 평판형광생물반응기에서 회분배양 하면서 각종 센서를 통해 pH 8, 조도 3,000 LUX으로 제어 하였으며, 일정한 조건으로 35일 동안 10ml의 샘플을 채취해 분광광도계(spectrophotometer)를 이용하여 광학밀도를 측정했다. 측정한 데이터들은 일자별로 정리하여 성장곡선을 작성하였다.

일반적인 성장 패턴은 S자형이며, 정체 단계에 이어 숫자가 더 빠르게 증가한 다음 속도가 느려지고 마침내 최대 수준에 도달하게 된다^[25]. S자형 성장곡선은 보편적으로 세 가지 수학적 매개 변수(a, b, c)를 사용하기 때문에 생물학적 의미가 없는 매개 변수로 시작 값을 추정하기 어렵다. 따라서 매개 변수를 생물학적 의미를 갖는 A(최대 개체 수), λ (성장 지연 시간), μ_{max} (비 성장 속도)로 대체하여 사용하였다^[26].

회분배양에서 성장곡선 단계에 대한 모습은 Fig. 2-3에 나타내었다^[27]. 성장곡선의 성장단계는 총 4가지 단계로 구분 할 수 있다. 첫 번째 단계는 lag phase로 균체가 성장하기 위해서 배지에 적응하고 필요한 효소를 만들며 준비하는 기간이다. 다음 두 번째 exponential phase는 배지에 적응한 균체가 영양소를 이용하여 최고 속도로 성장하는 시기이며 빠른 분열을 동반하는 시기이다. 이 때 세포의 활동이 가장 활발하며, 회분배양에서 지수기의 종료와 함께 배양을 멈추는 경우가 많다. 세 번째 stationary phase는 성장해오던 세포가 영양소, 성장요소의 결핍으로 더 이상의 세포 성장이 불가능한 상태이다. 이 때 세포는 분열하는 만큼 사멸하여 성장곡선이 정체되어 있는 것처럼 보이게 된다. 마지막 네 번째는 death phase로서 분열하는 세포보다 사멸하는 세포가 더 많아 전체적인 세포수가 감소하는 구간이다. 성장요소가 이미 결핍되어 있기 때문에 환경의 개선이 없으면 결국에는 모든 세포가 사멸한다^[28].

본 연구에서 작성된 성장곡선은 미세조류를 시드 보관함(seed incubator)에서 배양한 후 평판형광생물반응기에 배양하였기 때문에 성장곡선의 첫 번째 단계인 lag phase는 성장곡선에 나타나지 않았다. 수확한 자료를 바탕으로 작성한 성장곡선에서 특이점은 세 번째 단계인 stationary phase가 약 15일로 성장곡선 자료 수집의 절반을 차지한다는 점이다.

작성된 성장곡선에서 비성장 속도를 예측하기 위해 수학적 근사 모델을 사용하였다. Table 2-3에 수학적 근사모델에 대한 수식을 정리하여 나타냈고, Logistic, Gompertz, Baranyi 세 가지 수식을 바탕으로 성장곡선을 curve fitting 하여 Fig. 2-4에 나타내었다. 근사화한 모델식의 적합성을 나타내는 결정계수 R^2 값을 프로그램을 통해 측정하였고, 측정결과 세 가지 모델식의 결정계수 값은 모두 유사하게 나타났으며, Logistic 0.9198, Gompertz 0.9142, Baranyi 0.9191로 결정계수 값이 측정되었다. 세 가지 결정계수 중 가장 높은 Logistic이 성장을 예측하기에 가장 적합한 모델식으로 선택되었다.

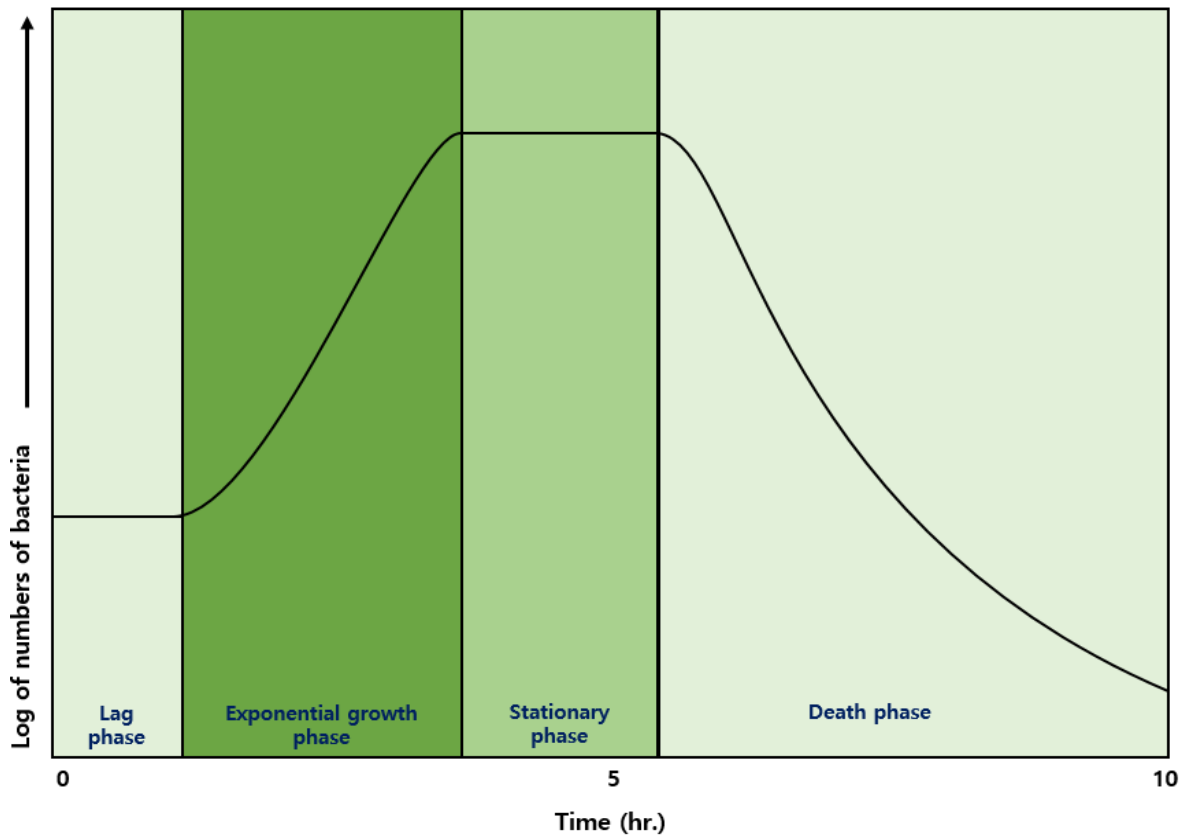


Fig. 2-3 Graphic representation of the four phase of the growth curve

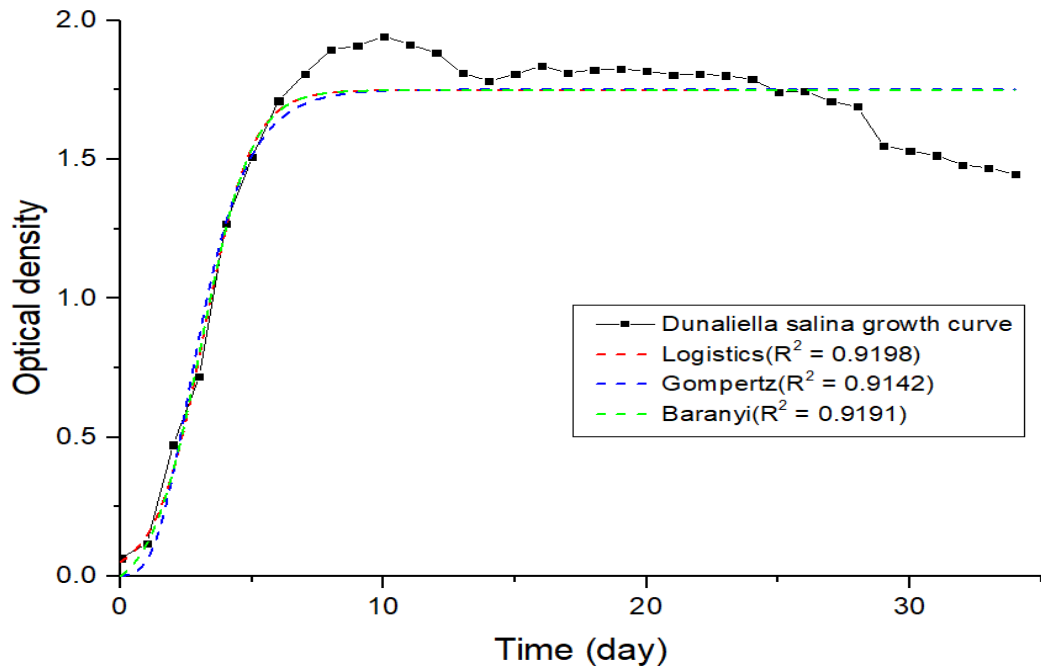


Fig. 2-4 Growth curve of *Dunaliella salina* fitted by Logistic, Gompertz, Baranyi models for Optical Density values

Table 2-3 Biological growth curve of sigmoidal regression model^[24-26]

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

modified equation $e=\exp(1)$

제2절 초음파

1. 초음파 개념

소리 또는 음파는 분자의 빠른 움직임으로 분자(매개체)의 진동은 소리를 발생시키는 진동체인 음원에서 귀와 같은 수신기로 에너지를 전달한다. 분자의 진동으로부터 발생한 음파 에너지는 일정 주파수를 가지고 한 위치에서 다른 위치로 에너지를 파동의 형태로 전달한다. 음파가 이동할 때 분자가 서로 가까워지면 이를 밀파, 멀어지면 소파라고 하며, 이런 기계적 움직임이 음파 파동이라고 부르는 기초가 된다^[29].

음파는 다양한 주파수를 가지게 되고 인간이 인식할 수 있는 주파수 스펙트럼은 대략 20Hz에서 20kHz사이의 범위를 가지고 이를 가청주파수라고 한다. 가청주파수를 중심으로 그 이하의 주파수를 가진 음파를 초저주파, 가청주파수 이상의 주파수를 가진 음파를 초음파라고 한다. Fig. 2-5에 주파수에 따라서 음향 스펙트럼을 분류하여 나타내었다.

음파의 전달은 매질을 통해서 전달되고 매질의 특성에 따라 전달속도의 차이가 난다. Table 2-3에 매질에 따른 음파의 속도를 나타내었다^[30]. 일반적으로 동일한 매질에서는 동일한 속도로 전달되며, 매질의 상태에 따라서 속도가 결정된다. 하지만 매질의 통과과정에서 투과, 흡수, 굴절, 산란등과 같은 요인 때문에 감소되므로 목적에 따라 적합한 주파수 대역을 사용해야 한다. 기체의 경우 온도에 영향을 받는 모습을 표를 통해 볼 수 있으며, 이는 기체의 온도가 높아질수록 압축률이 작아지기 때문에 음파의 전달속도가 증가하는 모습을 보인다^[31]. 이와 같은 관점으로 고체, 액체, 기체를 비교했을 때 압축률이 적을수록 더 빠른 전달 속도를 볼 수 있다.

앞서 언급한 것처럼 음파의 한 종류인 초음파는 약 20kHz이상의 높은 주파수를 가진 음파로서 가청주파수 이상의 음파이기 때문에 인간이 인식할 수는 없지만 정신적으로 영향을 미칠 수 있는 초고주파 효과가 연구를 통해 확인되었다^[32]. 그 외에 의학, 공학, 화학과 같은 다양한 분야에서 사용되고 있으며 미생물의 조직 파괴 같은 생물학적 분야에서도 활용되고 있다.

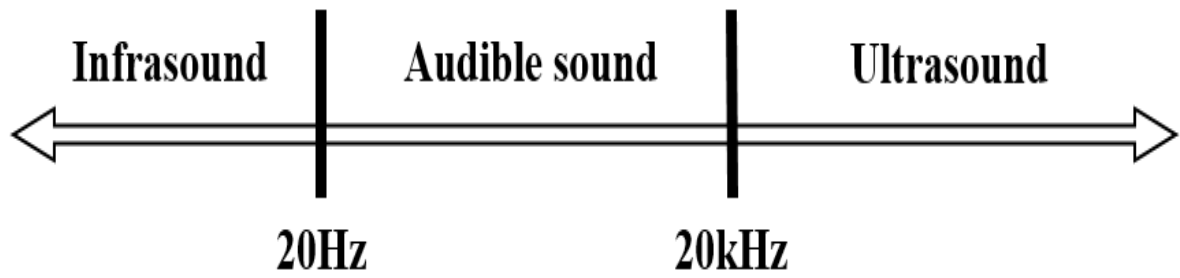


Fig. 2-5 Categorization of acoustic spectrum according to frequency

Table 2-4 Sound wave propagation speed depending on the medium

State	Material	Speed (m/s)
Gas (20°C)	Air (0°C)	331
	Air	344
	Helium	1005
	Carbon dioxide	266
Liquid	Fresh water	1440
	Sea water	1560
	Mercury	1460
	Aluminum	6400
Solid	Steel	6100
	Copper	3600
	Glass	4900-5800
	Wood	3500-5000

2. 초음파 파쇄 이론

초음파의 생물학적 활용에서 초음파를 이용한 미생물의 조직파괴는 초음파가 액체를 통과할 때 발생하는 공동현상(cavitation)과 관련이 있다. 액체 내의 소리 전파는 Fig. 2-6에 나타내었다.

음파는 소밀의 반복을 통해 전달되며 매질의 상태가 밀파의 경우 분자 간의 거리가 짧아지고, 소파의 경우 멀어지게 된다. 강력한 초음파는 소파 상태에서 액체분자 간의 거리를 더 멀어지게 압력을 가하고, 결국에는 액체분자의 인력을 초과하여 기포가 발생하게 된다. 이렇게 발생된 기포는 밀파 상태에서 소멸 되는데 이것이 가장 기본적인 공동현상의 설명이다. 음향장(acoustic field)에서 초음파에 의한 주기가 반복됨에 따라서 기포가 지속적으로 형성되고, 기포는 주위의 기체나 증기가 더해져 지속적으로 성장한다. 성장에 성장을 거듭한 기포는 불안정한 크기까지 팽창하여 결국에는 파괴된다^[33]. 공동현상의 기포 생성부터 파괴까지의 과정을 Fig. 2-7에 나타내었다.

용매 내에서 공동현상에 의해 발생하는 파괴는 엄청난 고온과 1000기압을 초과하는 압력을 생성한다. 이러한 폭발적인 파괴현상은 실제로 엄청난 충격파를 방출하며 방출된 충격파의 영향으로 기포 주변의 물질들이 손상된다. 이런 현상은 용매내의 세포에도 영향을 미친다. 기포의 파괴는 유체에 용해된 물질의 주변에 매우 큰 전단력을 생성하며, 이러한 전단력에 의해서 세포막과 세포 내부구조가 파열된다. 초음파를 이용한 다양한 물질의 분해는 공동현상으로 인한 충격파에 의해 생성되는 순간적인 고온, 고압의 충격으로 발생하는 열분해 반응으로 시작한다. 발생한 열분해 반응은 홀전자(unpaired electron)를 가진 원자 또는 분자인 자유 라디칼을 형성하며, 형성된 자유 라디칼은 불안정하기 때문에 주변 물질들을 반응하게 한다. 이러한 열분해 반응과 자유 라디칼에 의한 분해반응으로 목적물질의 빠른 파쇄가 가능하게 한다. 또 초음파의 기계적 효과에 의해서 생성된 강력한 난류로 세포내로 용매가 침투하여 파괴하는 모습을 보인다^[34]. 이러한 반응들을 통해서 효과적인 파쇄가 이루어지며, 초음파를 이용한 효과적인 세포 파쇄가 진행된다.

공동현상에 의해서 빠르고 효과적으로 이뤄지는 초음파를 이용한 세포 파쇄는 효율성을 높이기 위해서 다른 방법과 결합 할 가능성도 존재한다. 이러한 장점을 가진 초음파처리하는 바이오 리파이너리에서 더 각광받을 수 있는 강점으로 볼 수 있다.

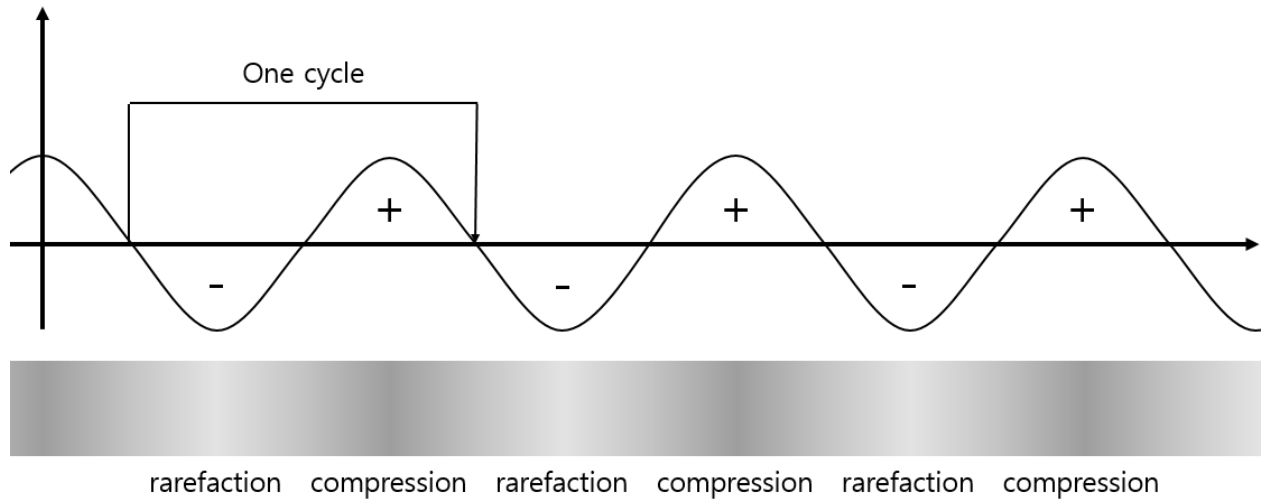


Fig. 2-6 Sound propagation in liquid

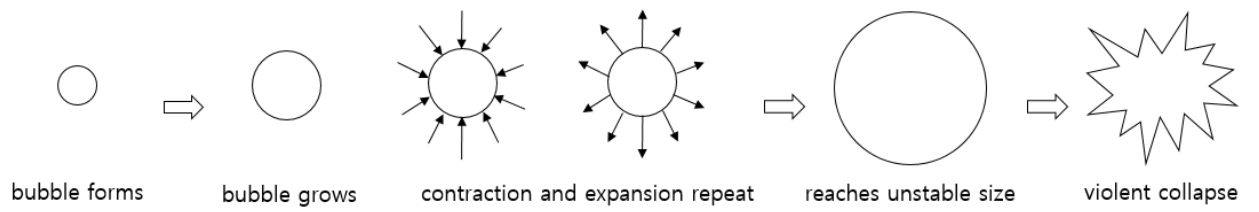


Fig. 2-7 Process from cavitation bubble formation to collapse

제 3 장 회분저주파 처리 시스템

제1절 회분저주파 처리 시스템 구성

1. 회분저주파 처리 장치 시스템

미세조류는 다양한 종과 특성을 가지고 있다. 이러한 다양성은 초음파처리에서 세포막이 효율적으로 파쇄 되는 주파수 대역에 차이를 보인다. 실험에 사용된 *Dunaliella salina*의 최적 주파수대역과 그 외 실험조건을 연구하기 위하여 초음파 장치를 구성하여 실험을 통해 연구를 진행하였다. 실험에 사용된 초음파 장치는 20kHz의 주파수 대역과 최대출력 500Watt의 스펙을 가진 Batch(회분) Low Frequency Non-Focused Ultrasound(저주파 비집속 초음파, LFNFU)시스템을 구성하였다. 회분저주파 처리 장치는 장치에서 실험시간, 진폭, 펄스간격과 같은 조건을 설정하여 실험을 진행할 수 있으나 일정 입력진폭을 사용하게 되면 장치의 발열로 인한 과부하가 발생하여 실험에 차질이 생기게 된다. 실험에 사용된 장치의 개략적인 시스템을 Fig. 3-1에 나타내었고, 세부 스펙을 Table 3-1에 나타내었다.

Table 3-1 Specification of batch LFNFU device

	Amplitude (%)	Probe output power (Watt)			Vibration distance (μm)	Power (Watt)	Power density (Watt/cm^2)
		Air	Water	Dunaliella			
Level (1)	40	4	32	30	45.6	28	21.21
Level (2)	45	8	45	43	51.3	37	28.03
Level (3)	50	9	50	50	57.0	40	30.30
Level (4)	55	10	55	57	62.7	45	34.09
Level (5)	60	12	62	61	68.4	55	37.88

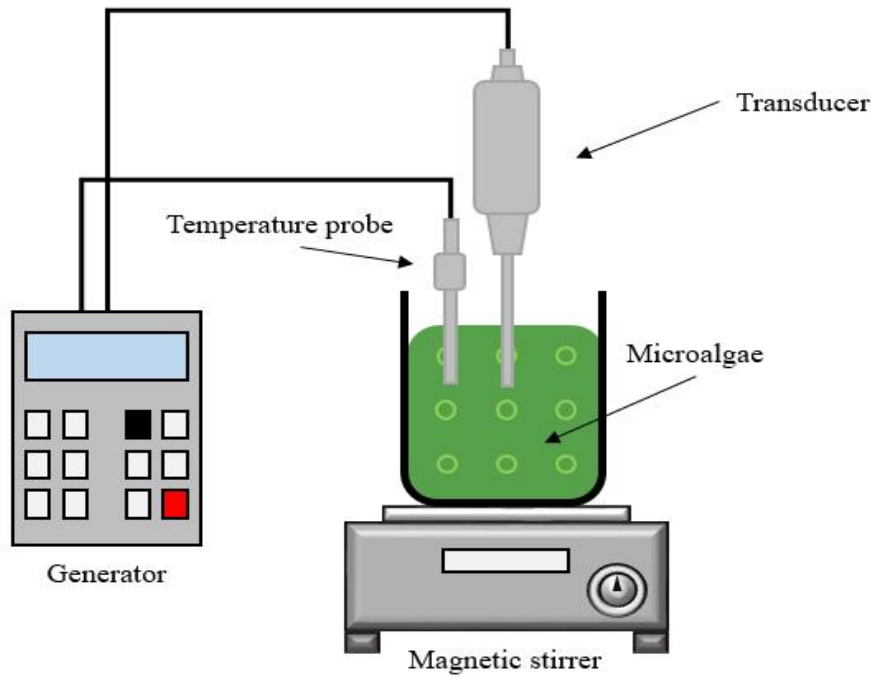


Fig. 3-1 Schematic diagram of batch LFNFU system

2. 회분저주파 실험 조건

초음파 처리를 이용한 미세조류 *Dunaliella salina*의 최적 세포막 파쇄 조건을 연구하기 위하여 성장곡선을 바탕으로 결정한 초기 균체 광학밀도(microalgae optical density)를 포함하여 초음파처리 장치 출력파워, 초기 균체 용량 세 가지 변수를 실험 조건으로 설정하여 실험을 진행하였다. 변수가 서로 미치는 영향에 대하여 실험을 진행하였고, 원만한 실험의 진행을 위해서 실험계획법을 바탕으로 변수들의 단계를 지정하여 차례대로 실험을 진행하였다. 단계를 지정한 변수들의 직교배열표를 Table 3-2에 나타내었으며, 식 (1)을 사용하여 세포 파쇄 효율을 계산하였다^[35].

$$C_{\eta} = \left(\frac{C_i - C_t}{C_i} \right) \times 100(\%) \quad (1)$$

여기서 C_i 는 초기 세포 농도, C_t 는 t분 동안 초음파 파쇄 후의 세포 농도이다. 초기 세포 농도와 초음파 파쇄 후 세포 농도 값은 세포계수기(Cell counter)를 사용하여 측정하여 계산하였다.

Table 3-2 Parametric orthogonal array table of the batch LFNFU process

Parameter	Microalgae optical density (OD @680)	Output power (Watt)	Capacity (ml)
Experiment number	Column number		
	1	2	3
1	1.2	54	200
2	1.4	54	200
3	1.6	54	200
4	1.8	54	200
5	2.0	54	200
6	1.4	33	200
7	1.4	38	200
8	1.4	42	200
9	1.4	48	200
10	1.4	54	300
11	1.4	54	500

제2절 회분저주파 세포 파쇄

1. 초기 균체 광학밀도에 따른 세포 파쇄 효율

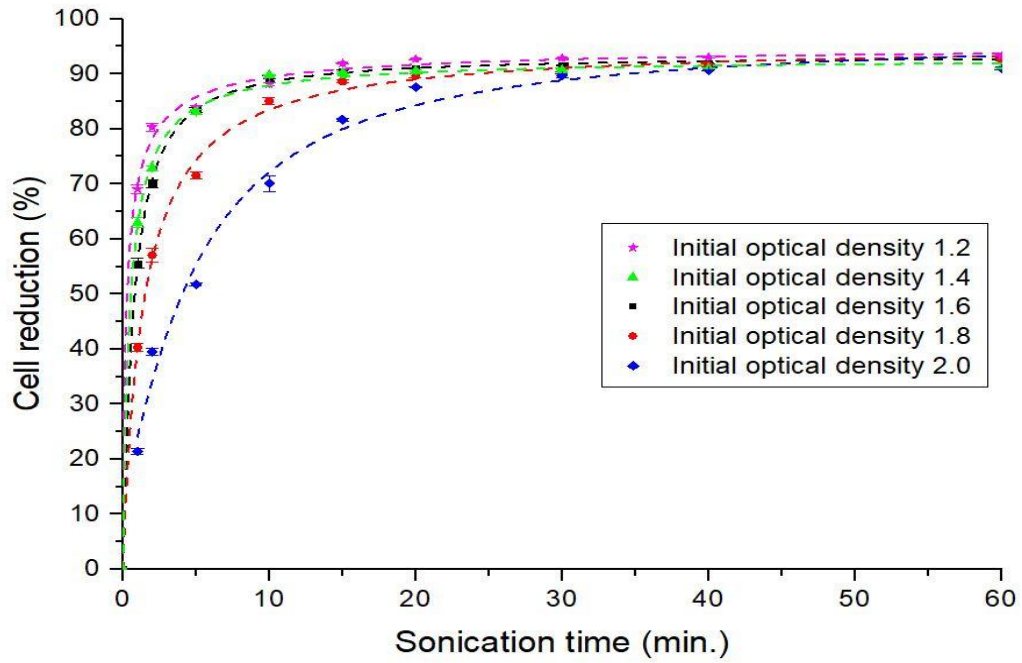
미세조류 *Dunaliella salina*의 초기 균체 광학밀도에 따른 회분 저주파 처리 장치에서의 세포 파쇄 효율을 실험을 통해 연구를 진행하였다. 미세조류의 성장이 진행 될수록 세포의 크기와 수가 증가하며, 농도가 시시각각 변화하게 된다. 배양기 내의 세포 농도가 높아질수록 상호간의 작용하는 인력이 증가하여 실험에 영향을 미치기 때문에 총 5단계의 광학밀도를 바탕으로 미세조류를 수확하여 실험을 진행하였다. Fig. 3-2에 초기 균체 광학밀도에 따른 파쇄 효율 결과를 (a)에 나타내었고, 초음파 처리 시간에 따른 광학밀도의 변화를 (b)에 나타냈다.

첫 번째 실험 조건은 exponential phase의 초반부에 해당하는 OD(optical density) 1.2에서 초음파 처리를 진행하였다. *Dunaliella salina*의 특성상 세포벽이 다른 미세조류에 비해서 얇고 exponential phase의 초반의 경우 세포의 성장은 빠르지만 세포막이 상대적으로 덜 형성되어있기 때문에 5가지 실험 조건 중 가장 빠른 시간에 90%이상의 효율을 달성하였다. 하지만 성장이 덜 되었기에 생성하는 유기물은 상대적으로 적을 것으로 예상된다. 두 번째 조건은 OD 1.4로 exponential phase의 중간정도의 단계에 해당된다. 이 단계는 세포의 분열과 성장이 본격적으로 증가하는 구간이다. 세포막은 첫 조건인 OD 1.2보다 더 두꺼운 세포막이 형성되었으며, 세포분열로 인한 초기 균체량도 더 증가하여 첫 번째 실험보다 상대적으로 느린 파쇄 효율을 보인다. 세 번째 조건은 OD 1.6으로 exponential phase의 후반부로 폭발적인 세포의 성장과 세포분열이 점차 감소하는 구간으로 세포간의 인력이 증가하는 구간이다. 세포막 파쇄 실험에서 초반에는 OD 1.4보다 낮은 효율을 보이지만 초음파처리 시간이 경과할수록 OD 1.4와 유사한 세포 파쇄 효율을 보인다. 네 번째는 OD 1.8로서 stationary phase에 해당하는 구간이다. 세포간 인력이 점차 강해지는 구간으로 해당 OD에서 실험한 결과를 보면 이전 실험들보다 확실히 낮은 세포 파쇄 효율을 나타낸다. 마지막 OD 2.0은 death phase에 해당하는 구간으로 다른 실험들과 비교해서 가장 낮은 효율의 실험 결과를 볼 수 있다. 초음파처리 장치에서 미세조류를 파쇄 할 수 있는 양이 한정되어 있기 때문에 고농도의 OD 1.8과 2.0은 다른 실험 조건과 비교하여 실험 초반부 상대적으로 매우 낮은 효율을 보

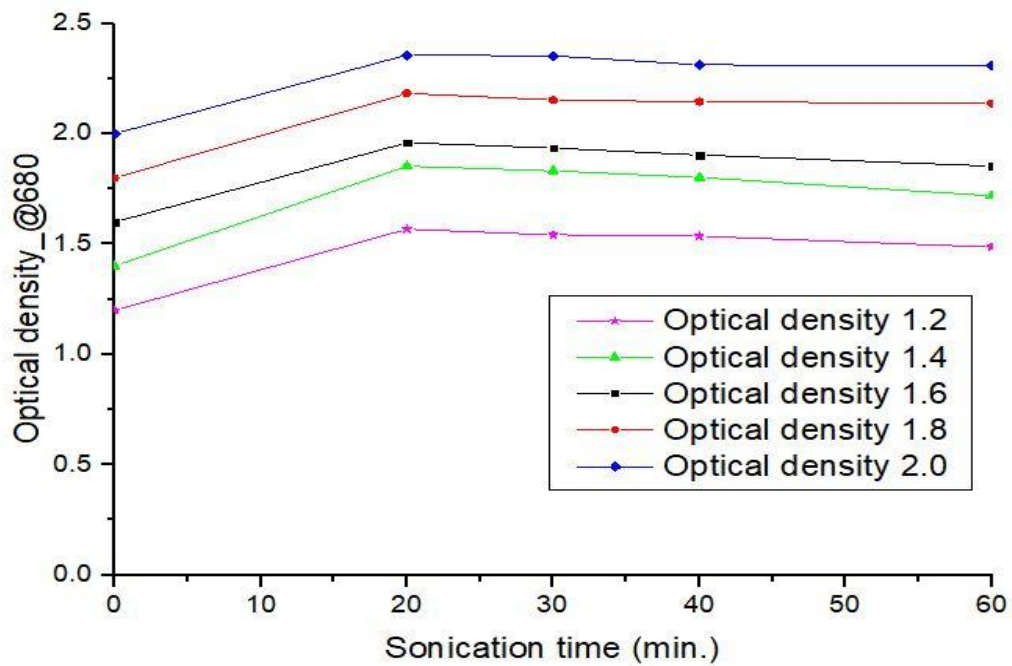
였다. 또 세포 농도가 높을수록 세포간의 인력이 증가하는 것 또한 실험에 영향을 미쳤을 것으로 예상된다. 그렇지만 초음파 처리 시간이 경과함에 따라서 세포간의 인력의 감소와 함께 점차적으로 증가하는 세포 파쇄 효율을 보였으며 총 60분의 실험에서 최종적으로 90%의 세포 파쇄 효율을 달성하는 모습을 볼 수 있다.

초음파 처리시간에 따른 균체 광학밀도 변화량은 모든 실험에서 증가하였다 감소하는 모습을 보인다. 이는 *Dunaliella salina*의 세포 파쇄 과정에서 실험 초반 세포 내부의 물질들이 방출되면서 세포계수기(cell counter)에서는 관찰되지 않았던 물질들이 분광광도계에 감지되어 나타난 것으로 보인다. 시간이 지날수록 광학밀도가 감소하는 것은 방출된 물질도 초음파의 영향을 받아서 분광광도계에 감지되는 물질들이 감소하여 나타난 것으로 보인다. 모든 실험에서 유사한 유형의 결과를 보이기 때문에 광학밀도의 변화는 세포 파쇄가 진행되고 있는 부분을 보여주는 척도로 생각할 수 있다.

초기 균체 광학밀도에 대한 회분 저주파 실험 결과 세포 파쇄 효율은 광학밀도 단계 OD 1.2 > OD 1.4 > OD 1.6 > OD 1.8 > OD 2.0의 순서대로 효율이 나타났으며, 광학밀도의 변화는 특이점을 찾아 볼 수 없었다. 초기 광학밀도에 따른 *Dunaliella salina*의 세포 파쇄 실험은 세포 계수기에 측정된 세포의 수와 농도에 따른 세포 간 인력에 의해 영향을 받았다. 해당 실험의 결과에서 초기 광학밀도 1.2의 경우 세포 파쇄 효율이 가장 좋게 나타났지만 부족한 성장에서의 세포 파쇄는 바이오 리파이너리의 의미가 크게 떨어지므로 다음으로 효율이 높게 측정된 초기 광학밀도 1.4를 채택하여 후속 실험을 진행하였다.



(a) Changes in cell reduction according to microalgae initial optical density



(b) Optical density change according to sonication time for initial OD

Fig. 3-2 Experimental results of initial optical density for batch LFNFU

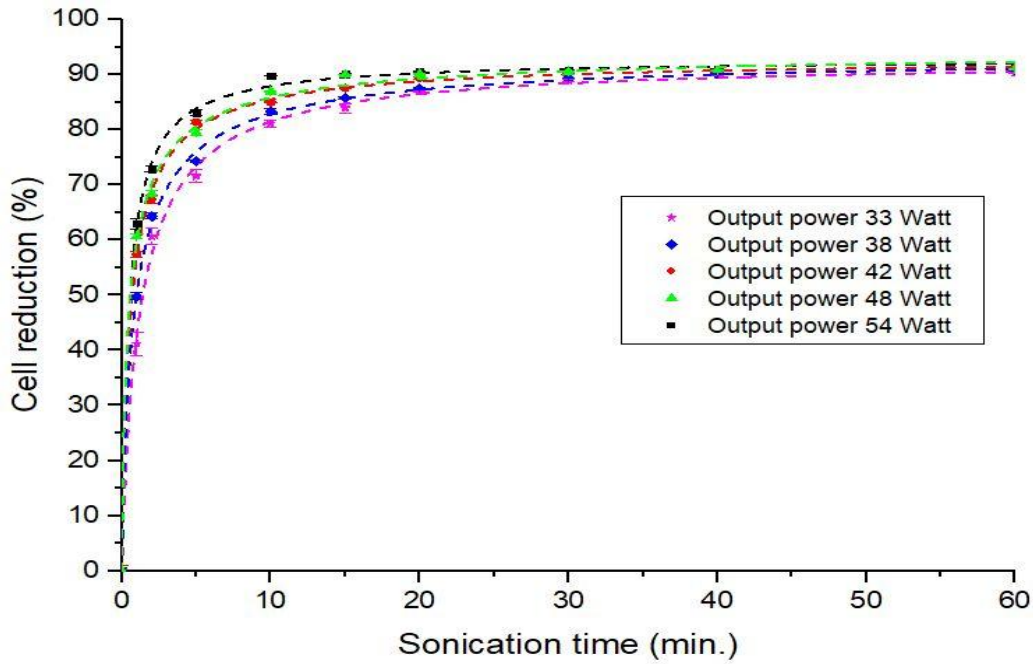
2. 출력파워 값에 따른 세포 파쇄 효율

저주파대역에서 초음파처리 장치의 출력파워가 세포 파쇄 효율에 어떤 영향을 미치는지 알아보기 위해서 실험을 진행하였다. 선행실험에서 채택한 *Dunaliella salina*의 초기 광학밀도 1.4를 고정변수로 지정하여 실험 초기조건으로 채택하였으며, 초음파 처리장치의 출력파워(output power)는 Table 3-2에 나타난 5단계로 실험을 진행하였다. 초음파 장치의 입력 진폭(input amplitude)에 따라서 출력파워 값이 결정되게 되는데 입력 진폭이 70%를 초과하게 되면 장치에 과부하가 발생하기 때문에 최대 입력 진폭을 60%까지만 제한하여 실험을 진행하였다. Table 3-3에 단계별로 입력 진폭에 대한 출력파워 값을 정리하여 나타내었고, Fig. 3-3의 (a)에 출력파워 값에 따른 세포 파쇄효율을, (b)에 초음파처리 시간에 따른 광학밀도 변화를 나타내었다.

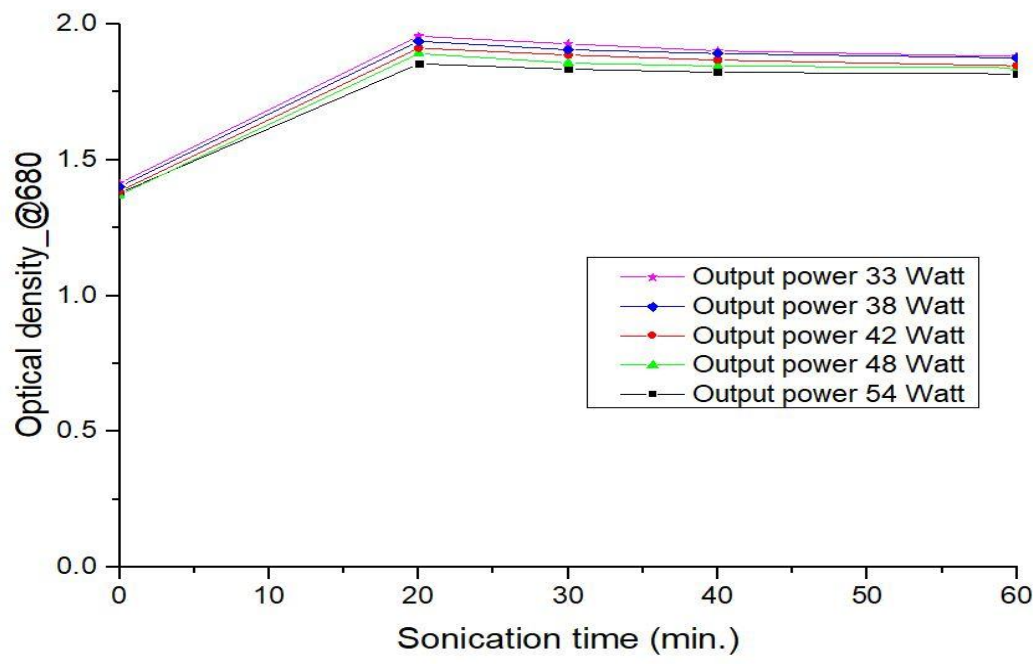
실험결과 출력파워 값에 따라서 실험결과가 유의미한 차이를 보이는 것으로 나타났다. 출력파워가 상대적으로 낮은 33, 38Watt는 실험 시작 후 약 15분 정도 후에 80%의 효율을 달성하였다. 하지만 최종 60분의 실험에서는 90%이상의 파쇄 효율을 나타내었다. 42, 48Watt는 실험 시작 후 약 15분이 경과했을 때 약 90%이상의 세포 파쇄 효율을 나타내었다. 마지막 54Watt에서는 실험시작 후 약 5분정도에 80%이상의 파쇄 효율이 나타났고 약 10분 정도에 90%의 효율을 달성하였다. 출력파워 값을 조정해가며 실험을 진행한 결과 60분 동안의 초음파처리에서 모든 실험의 결과가 90%이상의 효율을 달성하였으며, 출력파워가 높을수록 더 좋은 파쇄 효율을 볼 수 있었다. 총 5단계의 파쇄 효율을 비교하였을 때 33Watt와 38Watt가 유사한 효율을 보였고 42Watt와 48Watt가 유사한 효율을 보였다. 54Watt는 가장 높은 파쇄 효율이 나타났다.

균체 광학밀도의 변화는 모든 실험이 유사하게 나타났으며, 증가하였다가 감소하는 모습을 보인다. 출력파워가 높을수록 20분에서의 광학밀도가 낮았으며 이는 출력파워가 높을수록 과열 된 *Dunaliella salina*가 빠르게 파쇄 되어 내부의 물질들이 초음파의 영향을 더 빨리 받게 되는 것으로 보인다.

출력파워 값에 따른 세포 파쇄 효율 실험을 진행한 결과 54Watt > 48Watt > 42Watt > 38Watt > 33Watt 순으로 파쇄 효율이 좋은 것으로 나타났으므로 54Watt를 후속실험의 고정변수로 설정하여 실험을 진행하였다.



(a) Changes in cell reduction according to output power



(b) Optical density change according to sonication time for output power

Fig. 3-3 Experimental results of output power for batch LFNFU

Table 3-3 Output power according to input amplitude for batch LFNFU

Input amplitude (%)	Output power (Watt)
40	33
45	38
50	42
55	48
60	54

3. 초기 균체 용량에 따른 세포 파쇄 효율

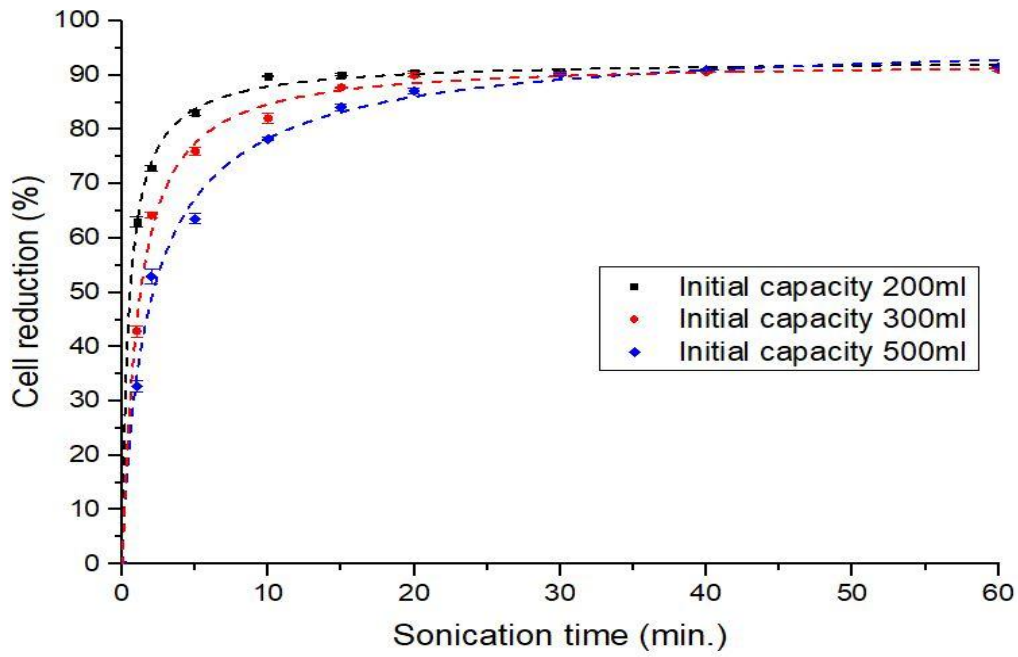
저주파 초음파 장치를 이용한 실험을 통해서 초기 균체 광학밀도와 장치의 출력과 위에 따른 세포 파쇄 효율을 측정하여 실험을 하였다. 후속 실험은 *Dunaliella salina*의 초기 균체 용량에 따른 실험을 진행하였다. 초음파 처리법에서 처리 할 수 있는 미세 조류의 양이 제한되어 있기 때문에 적당한 초기 균체 용량들을 설정하여 실험을 통해 연구하였다. 선행실험들로 채택한 초기 균체 광학밀도 1.4, 장치 출력과워 54Watt를 사용하였고 균체의 용량은 Table 3-3에 나타나있는 총 3단계의 변수로 실험을 진행하였다. Fig. 3-4의 (a)에 초기 균체 용량에 따른 세포 파쇄 효율 실험결과를 나타내었고, (b)에 초음파 처리 시간에 따른 광학밀도 변화를 나타내었다.

초기 균체 용량에 차이를 두어 실험한 결과 Fig. 3-4 (a)에 나타난 것처럼 균체용량이 적을수록 높은 세포 파쇄 효율을 나타내었다. 1단계 조건인 200ml에서는 실험 시작 약 5분정도에 80%이상의 효율을 보이며 10분 후에는 90%이상의 파쇄 효율이 나타난다. 200ml 조건에서 실험 시작 5분 정도에 높은 파쇄 효율을 보였기에 더 낮은 용량의 실험은 진행하지 않았다. 두 번째 조건인 300ml에서는 약 20분 정도의 초음파 처리 시간이 경과했을 때 세포 파쇄 효율 90%이상의 값이 나타난다. 용량이 가장 많은 500ml에서는 실험시작 약 30분이 경과하였을 때 90%이상의 효율이 나타났으며, 모든 실험들 중 가장 낮은 효율을 보이지만 총 60분의 실험에서 최종적으로 90%이상의 효율이 나타났다.

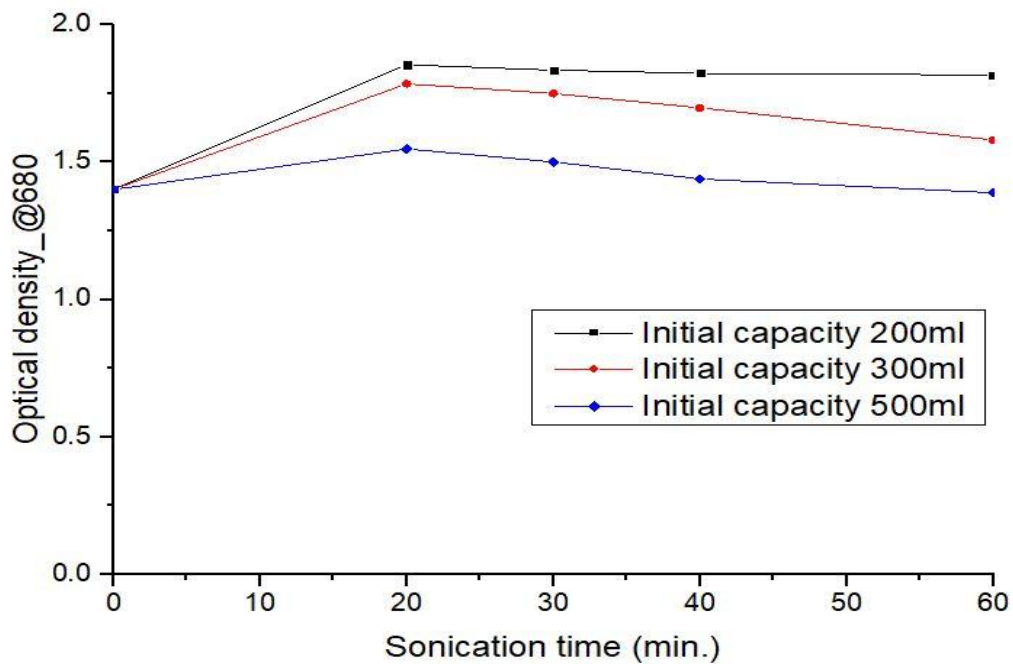
초음파 처리 시간에 따른 광학밀도의 변화량은 선행실험들에서 나타났던 것처럼 증가했다 감소하는 모습을 보이며, 200ml 용량에서 가장 높은 값으로 증가했다가 감소하는 모습을 관찰할 수 있으며, 용량이 적은 순서대로 광학밀도 값이 더 높게 증가하는 모습을 볼 수 있다.

균체 용량에 따른 세포 파쇄 실험결과 200ml > 300ml > 500ml의 순서대로 세포 파쇄 효율이 좋게 나타났으며 이는 균체 용량이 적을수록 더 좋은 파쇄 효율을 관찰할 수 있는 것을 알 수 있다.

회분 저주파 처리 장치를 이용한 초음파 파쇄 실험을 세 가지 종류의 변수를 단계에 따라서 진행한 결과 초기 균체 광학밀도 1.4, 출력과워 54Watt, 초기 균체 용량 200ml의 조건에서 가장 좋은 파쇄 효율을 볼 수 있었다.



(a) Changes in cell reduction according to initial capacity



(b) Optical density change according to sonication time for initial capacity

Fig. 3-4 Experimental results of initial capacity for batch LFNFU

제 4 장 회분고주파 처리 시스템

제1절 회분고주파 처리 시스템 구성

1. 회분고주파 처리 장치 시스템

초음파 처리를 통한 파쇄 실험을 진행함에 있어서 미세조류의 다양한 종과 특성으로 인해 초음파 주파수 대역에 따른 파쇄 효율의 차이가 나타난다. 미세조류 *Dunaliella salina*의 최적 주파수 대역에 관한 연구를 진행하기 위해서 Batch(회분) High Frequency Focused Ultrasound(고주파 집속 초음파, HFFU) 처리 시스템을 구성하였다. 시스템 구성은 신호를 발생시키는 함수 발생기(function generator)와 함수 발생기로부터 생성된 함수를 증폭시켜주는 전력 증폭기(high speed bipolar amplifier)를 사용하였다. 또한 초음파를 방출하는 트랜스듀서(transducer)를 연결하여 초음파를 발생시켰고, 트랜스듀서의 다양한 특성 값을 Table 4-1에 나타냈다. 회분고주파 함수파형, 인가전압과 같은 실험 변수들을 조작할 수 있으며, 주파수가 높기 때문에 소음의 발생이 없다. 그러나 프로브의 크기 때문에 실험에 사용할 적정크기의 실험용기가 필요하다. 실험에 사용된 회분고주파 처리 장치는 1.1MHz의 주파수를 바탕으로 인가전압, 파형(wave form)등을 조정하여 출력파워를 변화시켜가며 고주파 처리 장치에서 최적 세포 파쇄 효율에 대한 실험을 진행하였다. 회분 고주파 처리 시스템의 개략도는 Fig. 4-1에 나타냈다.

Table 4-1 Characteristic values of high frequency device probe

	Frequency (MHz)	Radius (mm)	Area (cm ²)	Power electric (Watts)	Surface intensity (Watt/cm ²)	Focal intensity (Watt/cm ²)	Focal width (mm)	Focal Length (mm)
H-101	1.1	63.20	34.55	400	9.84	15815	1.37	10.21

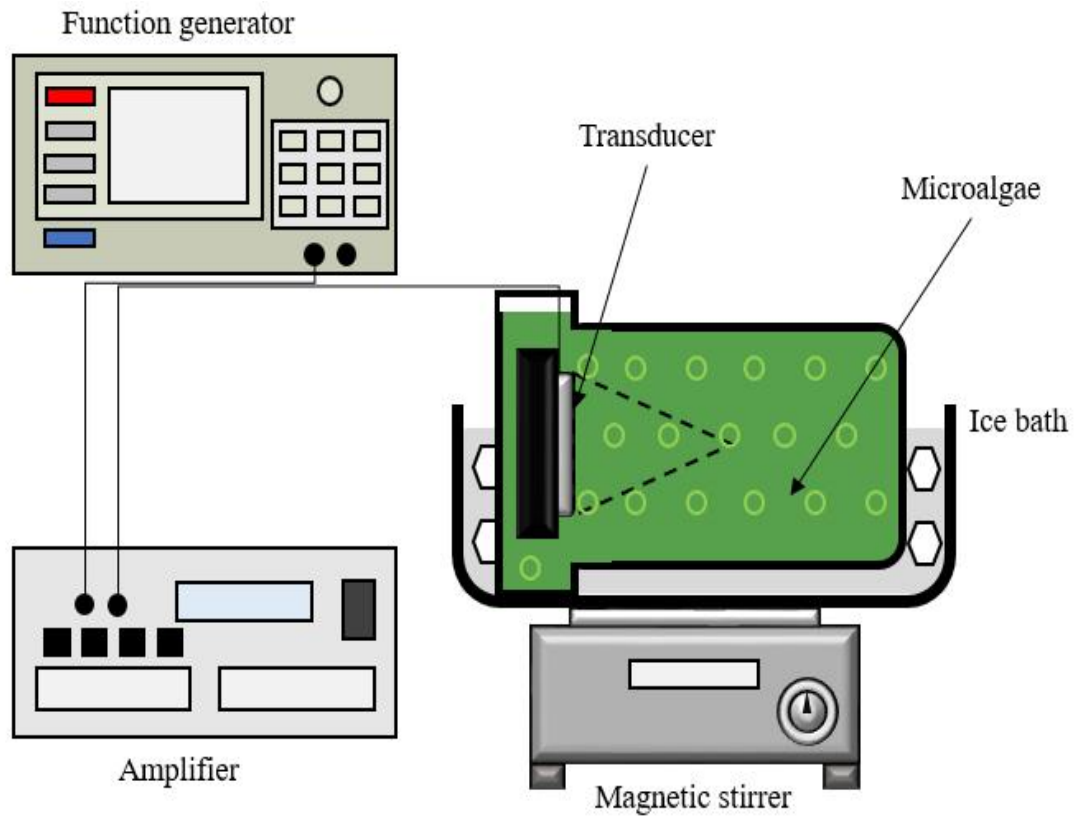


Fig. 4-1 Schematic diagram of batch HFFU system

2. 회분고주파 실험조건

미세조류 *Dunaliella salina*의 최적 세포 파쇄 효율 조건을 연구하기 위해서 회분고주파 처리장치를 사용하여 실험을 진행하였다. 실험 조건은 함수발생기의 파형과 인가전압 두 가지 종류를 정하여 단계를 나누어 순차적으로 실험을 통해 연구를 진행하였다. 초기 균체 용량은 1.4L로 결정하였으며, 각 변수들이 미치는 영향을 바탕으로 최적 세포 파쇄 효율에 대한 연구를 진행하였고, 각 실험 변수들의 단계에 따른 직교배열표를 Table 4-2에 나타내었다.

Table 4-2 Parametric orthogonal array table of the batch HFFU process

Parameter	Wave form	Applied voltage (mvpp)
Experiment number	Column number	
	1	2
1	Square	700
2	Sine	700
3	Square	500
4	Square	600

제2절 회분고주파 세포 파쇄

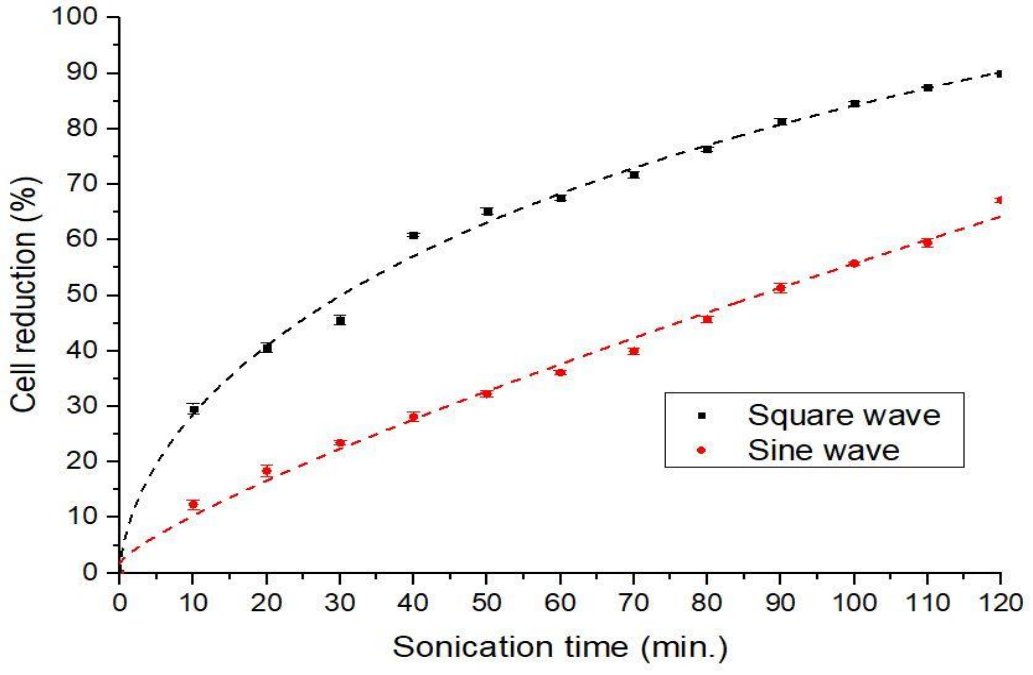
1. 파형에 따른 세포 파쇄 효율

회분고주파 처리 장치의 함수 발생기에서 발생하는 파형의 종류를 조정하여 미세 조류 *Dunaliella salina*의 세포 파쇄 실험을 수행하였다. 함수 발생기에서 설정 가능한 파형은 사각파(Square wave)와 사인파(Sine wave) 두 종류이며, 파형에 따라서 출력과워 값이 차이가 나타났다. 사각파의 경우 약 61Watt의 출력과워가 발생하였고, 사인파는 약 32Watt가 발생하였다. 동일한 주파수 대역에서 파형에 따라 출력과워의 차이가 발생하였고, 이런 차이가 미세조류 세포 파쇄 효율에 어떤 차이를 보이는지 실험을 진행하였다. Fig. 4-2의 (a)에 함수 발생기에서 발생하는 파형에 따른 세포 파쇄 효율을, (b)에 초음파 처리 시간에 따른 광학밀도 변화를 나타내었다.

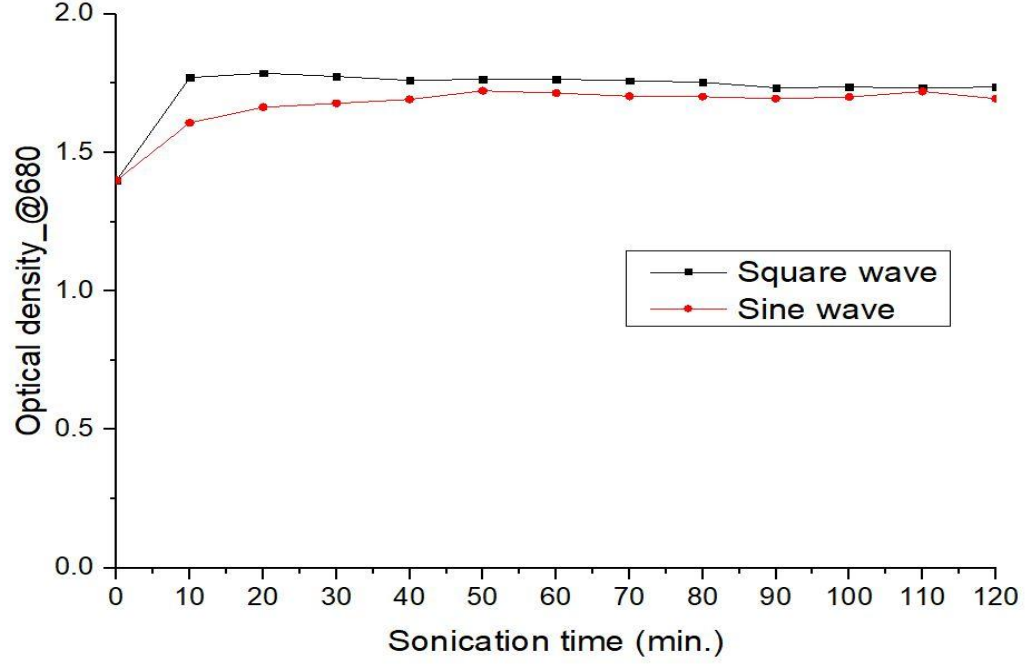
실험 결과 첫 번째 조건인 사각파에서는 총 120분의 실험에서 최종 파쇄 효율 90%를 달성하였다. 두 번째 조건인 사인파에서는 매우 저조한 파쇄 효율이 나타났으며 최종 파쇄 효율이 70%미만으로 나타났다. 사각파와 사인파를 비교 했을 때 두 조건의 출력과워 차이가 파쇄 효율에 영향을 미친 것으로 보인다.

광학밀도의 변화는 두 실험 조건 모두 초기 광학밀도에서 상승하여 실험이 종료 될 때까지 상승한 광학밀도를 유지하는 양상을 나타냈다.

회분고주파 처리 장치에서 함수 파형을 조정해가면서 실험을 진행한 결과 사각파 > 사인파인 것으로 나타났다. 사각파와 사인파의 영역차이를 Fig. 4-3에 개략적으로 나타내었다. 두 파형을 비교하였을 때 사각파와 사인파의 영역차이는 Fig. 4-3에 나타난 검정 음영만큼 차이가 났으며, 이에 따라서 출력과워 값의 차이가 나타났다. 파쇄 효율은 출력과워의 차이에 영향을 받은 것으로 보이며, 더 좋은 효율을 나타낸 사각파를 채택하여 후속 실험을 진행하였다.



(a) Changes in cell reduction according to wave form



(b) Optical density change according to sonication time for wave form

Fig. 4-2 Experimental results of wave form for HFFU

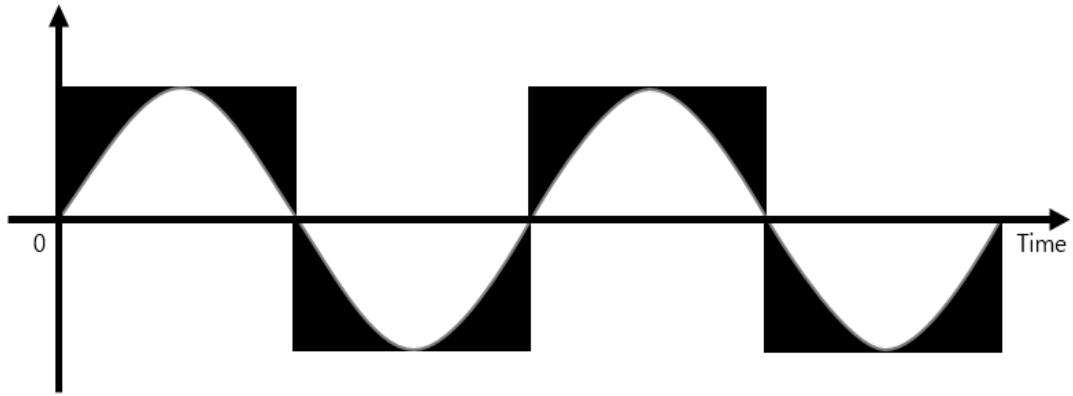


Fig. 4-3 Difference between Square wave and Sine wave

2. 인가전압에 따른 세포 파쇄 효율

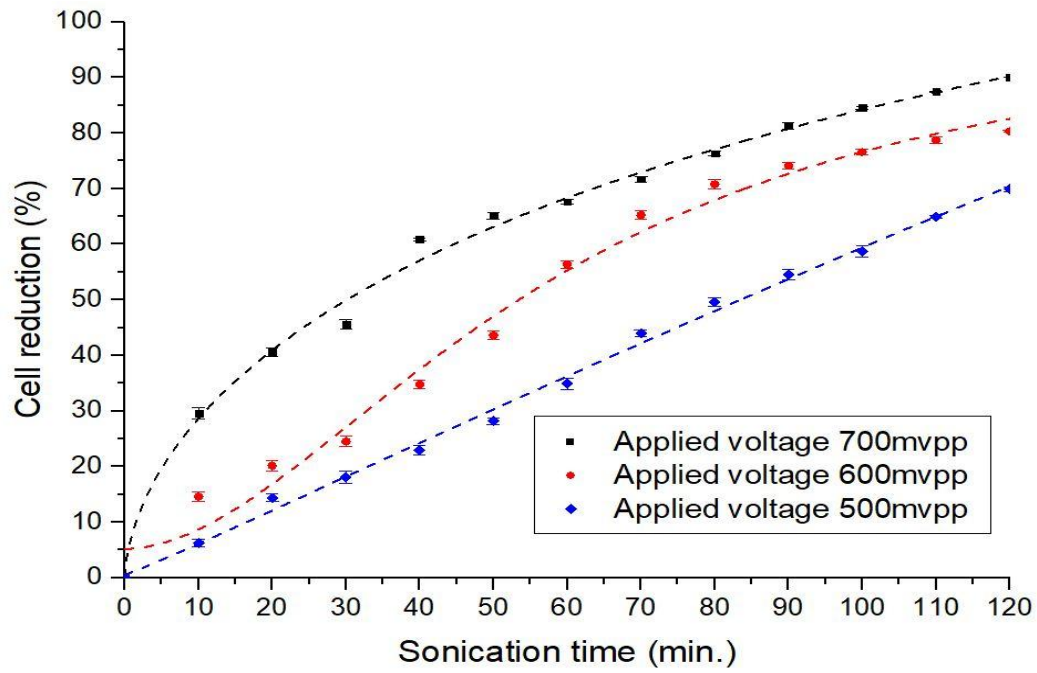
고주파 대역에서 회분고주파 처리 장치를 이용하여 합수 발생기의 인가전압에 변화를 주면 출력과워 값에 차이를 보인다. 이러한 영향이 미세조류 *Dunaliella salina*의 세포 파쇄 효율에 미치는 영향에 대하여 후속 실험을 진행하였다. 선행실험을 결과를 따라서 합수 발생기에서 사각파를 사용하였다. 합수 발생기에서 발생한 인가전압을 총 3단계로 나누어 실험을 진행하였으며, 700mvpp의 인가전압을 초과 할 수 없어 700mvpp를 최댓값으로 결정하였다. 장치의 인가전압에 따른 초음파 장치의 출력과워를 Table 4-3에 나타내었고, Fig. 4-4의 (a)에 인가전압에 따른 세포 파쇄 효율을, (b)에 초음파 처리 시간에 따른 광학밀도 변화를 나타내었다.

실험 결과 첫 번째 조건인 500mvpp에서는 매우 저조한 세포 파쇄 효율을 나타내었다. 총 120분의 세포 파쇄 실험에서 최종 70%미만의 파쇄 효율을 나타냈으며, 모든 조건을 통틀어서 가장 낮은 파쇄 효율을 보였다. 두 번째 조건인 600mvpp에서는 실험 초기에 저조한 파쇄 효율을 보이다가 처리 시간이 경과함에 따라 점차 증가하는 파쇄 효율을 나타내었다. 총 120분의 실험에서 최종적으로 80%의 효율을 달성하였다. 세 번째 조건인 700mvpp에서는 실험 초반부부터 양호한 파쇄 효율을 보였으며, 120분에서 90%의 파쇄 효율을 달성하였다.

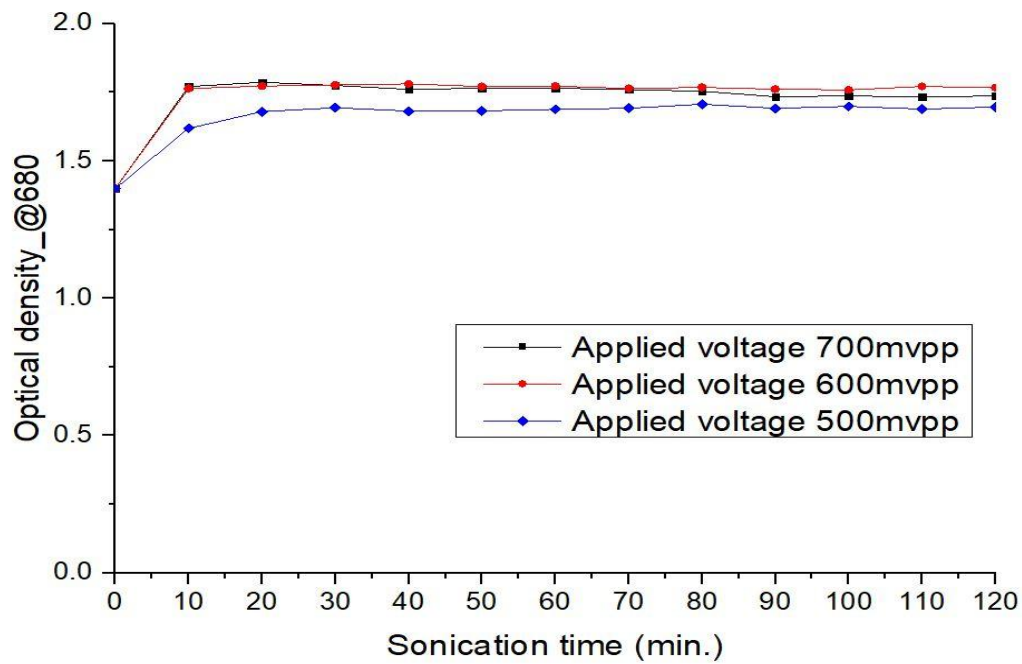
광학밀도 변화는 모든 실험이 초기에 증가하여 실험 종료까지 증가한 광학밀도 값이 유지하는 모습을 볼 수 있었다.

회분고주파 처리 장치에서 인가전압에 변화를 주어 실험을 진행한 결과 700mvpp > 600mvpp > 500mvpp인 것으로 나타났다. 인가전압에 변화를 주었을 때 초음파 장치의 출력과워 값에 직접적인 영향이 나타났다. 인가전압이 감소할수록 출력과워 값이 급격히 감소하였으며 감소한 출력과워 값에 따라서 파쇄 효율이 감소했다.

회분고주파 처리 장치를 이용한 초음파 파쇄 실험을 두 가지 종류의 변수를 단계에 따라서 진행한 결과 사각파, 인가전압 700mvpp의 조건에서 가장 좋은 파쇄 효율을 볼 수 있었다.



(a) Changes in cell reduction according to applied voltage



(b) Optical density change according to sonication time for applied voltage

Fig. 4-4 Experimental results of applied voltage for HFFU

Table 4-3 Output power according to applied voltage for batch HFFU

Applied voltage (mvpp)	Output power (Watt)
500	31
600	46
700	61

제 5 장 연속저주파 처리 시스템

제1절 연속저주파 처리 시스템 구성

1. 연속저주파 처리 장치 시스템

미세조류를 통해 생산된 유용물질을 활용하기 위한 바이오 리파이너리의 단점은 기존 자원대비 저조한 생산성으로 인한 경제적 취약점이다. 이와 같은 단점을 보완하기 위해서 보다 경제적인 연속적인 초음파 처리법에 대하여 연구를 진행하였다. 연속적인 초음파 처리 시스템의 장점은 회분 초음파 처리 시스템보다 많은 양을 처리할 수 있어서 더 경제적이다. 또 자동적인 공정 구성이 가능한 장점을 가지고 있다. 자동적인 시스템의 장점은 적당한 상태의 성장단계로 배양된 양질의 미세조류를 일정한 속도로 연속적인 초음파 처리를 통해 미세조류를 파쇄 하는 방법이다. 먼저 연속적인 초음파 처리를 위해서 연속저주파 처리 시스템을 구성하였고, 실험을 통해서 연구를 수행하였다. 시스템의 구성은 균체의 일정한 유동을 위해서 장치 외부에 펌프와 유량계를 구성하였고, 또 다른 펌프를 사용하여 얼음물을 처리 용기 외부로 순환시켜 공동현상으로 발생하는 열에너지가 실험에 미치는 영향을 최대한 감소시켰다. 또한 더 높은 파쇄 효율을 위해서 초음파 장치에 진동 증폭기를 사용하여 출력과위를 증폭시켰다. Fig.54-1에 연속저주파 처리 시스템의 구성을 개략적으로 나타내었고, Table 5-1에 연속저주파 처리 장치의 세부 스펙을 나타내었다.

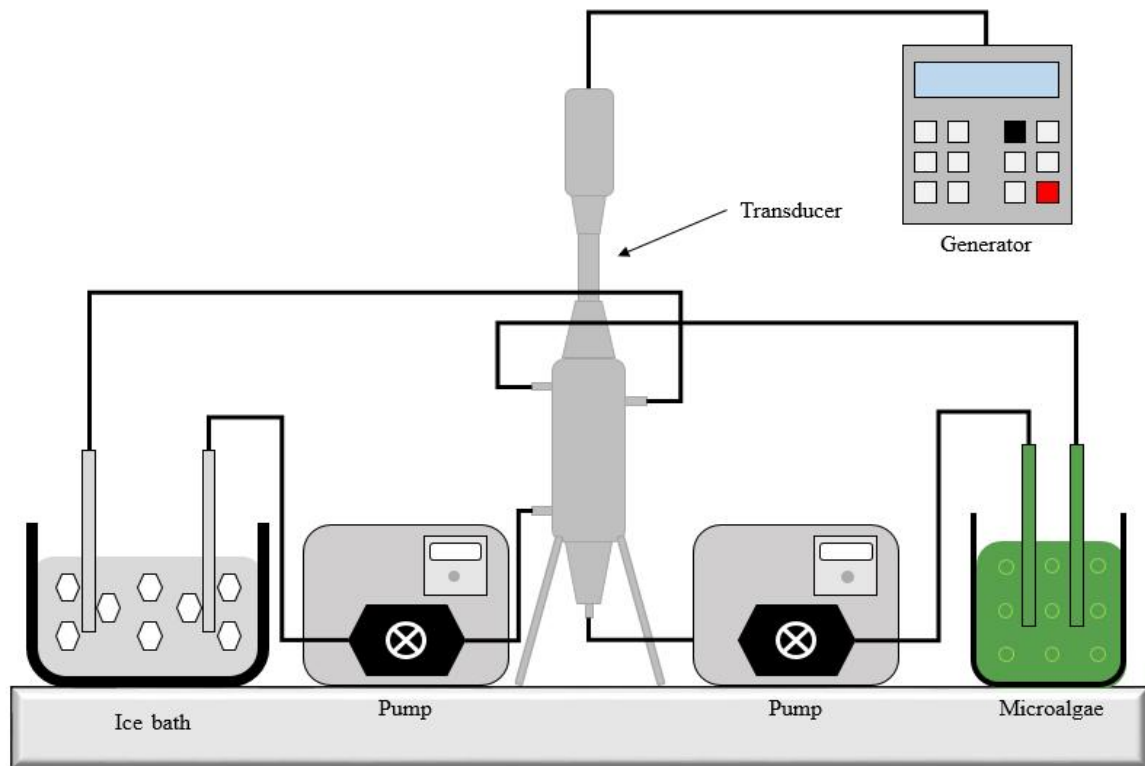


Fig. 5-1 Schematic diagram of continuous LFNFU system

Table 5-1 Specification of continuous LFNFU device

	Amplitude (%)	Probe output power (Watt)			Vibration distance (μm)	Power (Watt)	Power density (Watt/cm^2)
		Air	Water	Dunaliella			
Level (1)	20	2	63	63	45.6	65	13.23
Level (2)	30	2	85	86	68.4	88	17.92
Level (3)	40	4	121	120	91.2	114	23.22
Level (4)	50	7	158	160	114	151	30.75
Level (5)	60	10	196	199	136.8	183	37.27

2. 연속저주파 실험조건

연속저주파 처리 장치를 이용한 *Dunaliella salina*의 세포 파쇄 실험에서는 초기 균체 광학밀도, 장치의 출력과워, 균체의 순환유량, 초음파 장치의 작동주기 등 총 네 가지 종류의 변수를 설정하여 실험을 진행하였다. 실험에서 각 변수가 서로에게 미치는 영향을 통해서 최적의 파쇄 효율 조건을 실험을 통해 연구하였다. 실험에 사용된 초기 균체 용량은 장치의 최대 용량이 0.5L인 점을 고려하여 원활한 순환을 위해서 0.8L로 설정하였다. 원만한 실험을 위해서 실험계획법을 바탕으로 변수들의 단계를 지정하여 순차적으로 진행하였으며, 각 실험 변수들의 단계에 따른 직교배열표를 Table 5-2에 나타내었다.

Table 5-2 Parametric orthogonal array table of the continuous LFNFU process

Parameter	Microalgae optical density (OD @680)	Output power (Watt)	Flow rate	Duty cycle
Experiment number	Column number			
	1	2	3	4
1	1.2	207	150	-
2	1.4	207	150	-
3	1.6	207	150	-
4	1.8	207	150	-
5	2.0	207	150	-
6	1.4	62	150	-
7	1.4	85	150	-
8	1.4	115	150	-
9	1.4	160	150	-
10	1.4	207	250	-
11	1.4	207	350	-
12	1.4	207	450	-
13	1.4	207	150	5 : 1
14	1.4	207	150	10 : 1
15	1.4	207	150	20 : 1
16	1.4	207	150	30 : 1

제2절 연속저주파 장치의 세포 파쇄

1. 초기 균체 광학밀도에 따른 세포 파쇄 효율

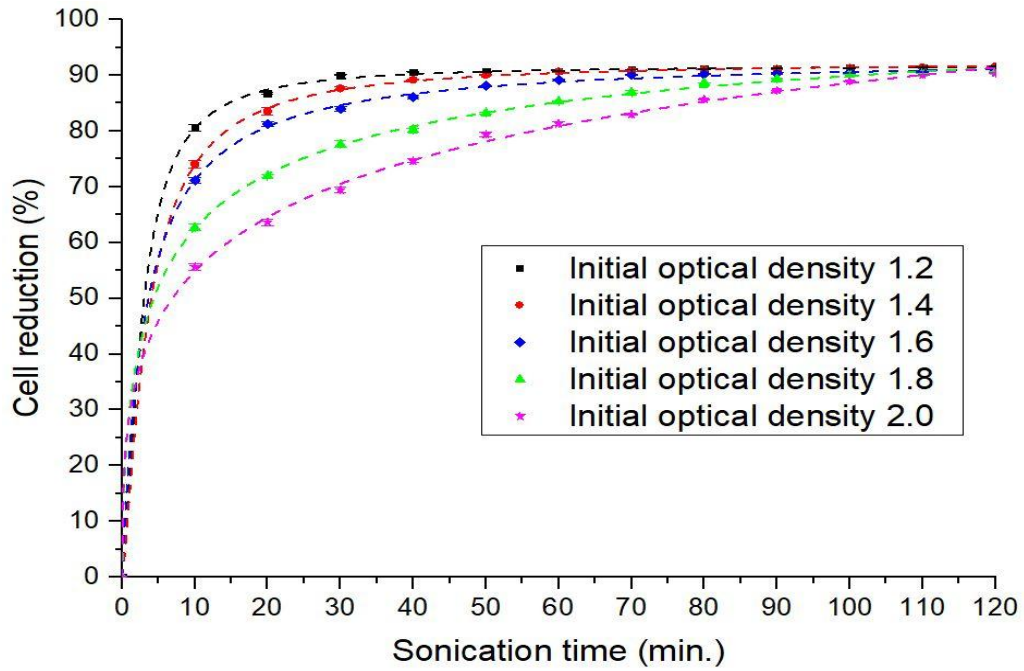
미세조류 *Dunaliella salina*의 초기 균체 광학밀도에 따른 세포 파쇄 효율을 연속저주파 처리 장치를 사용하여 실험을 통해 연구를 진행하였다. 실험은 총 5단계로 나뉘어 진행을 하였으며, 성장곡선을 통해서 측정된 광학밀도를 바탕으로 변수를 결정하였다. Fig. 5-2의 (a)에 초기 균체 광학밀도에 따른 세포 파쇄 효율을, (b)에 초음파처리 시간에 따른 균체 광학밀도 변화를 나타내었다.

총 다섯 단계의 실험을 통해서 연구를 한 결과 초기 광학밀도에 따른 세포 파쇄 효율변화는 회분저주파 처리 장치를 이용한 실험과 유사한 결과를 나타내었다. 먼저 첫 번째 조건인 OD 1.2에서 실험을 진행하였다. 광학밀도 1.2는 exponential phase의 초반부인 *Dunaliella salina*의 세포벽이 불완전한 성장 상태이기 때문에 해당 OD에서는 초음파 처리 10분에 80%의 파쇄 효율이 나타나며, 30분 이후로 90%이상의 빠른 파쇄 결과를 나타내었다. 두 번째 실험 조건 OD 1.4는 세포의 급격한 성장이 발생하는 exponential phase 중반부로서 더 발달된 세포벽으로 인해서 OD 1.2보다는 조금 느린 세포 파쇄 효율이 나타난다. 해당 구간에서의 초음파 처리는 실험 시작 후 약 50분 이후에 90%이상의 파쇄 효율이 나타난다. 세 번째 실험 조건인 OD 1.6은 exponential phase 후반부로 이전 실험 조건들 보다 더 두꺼운 세포벽과 세포 간 인력이 발생하여 세포 파쇄 효율이 더 낮게 나타났다. OD 1.6에서는 실험 시작 후 약 90분 이후에 90%이상의 효율이 나타났다. 네 번째 실험 조건인 OD 1.8은 stationary phase로서 이전 실험 조건들 보다 더 강력한 세포 간 인력이 작용해서 세포 파쇄 효율이 현저히 낮아짐을 볼 수 있다. 마지막 실험 조건인 OD 2.0은 death phase에 해당하며, 해당 실험 조건에서는 과도한 세포벽의 성장과 가장 강력한 세포 간 인력으로 가장 낮은 세포 파쇄 효율이 나타난다.

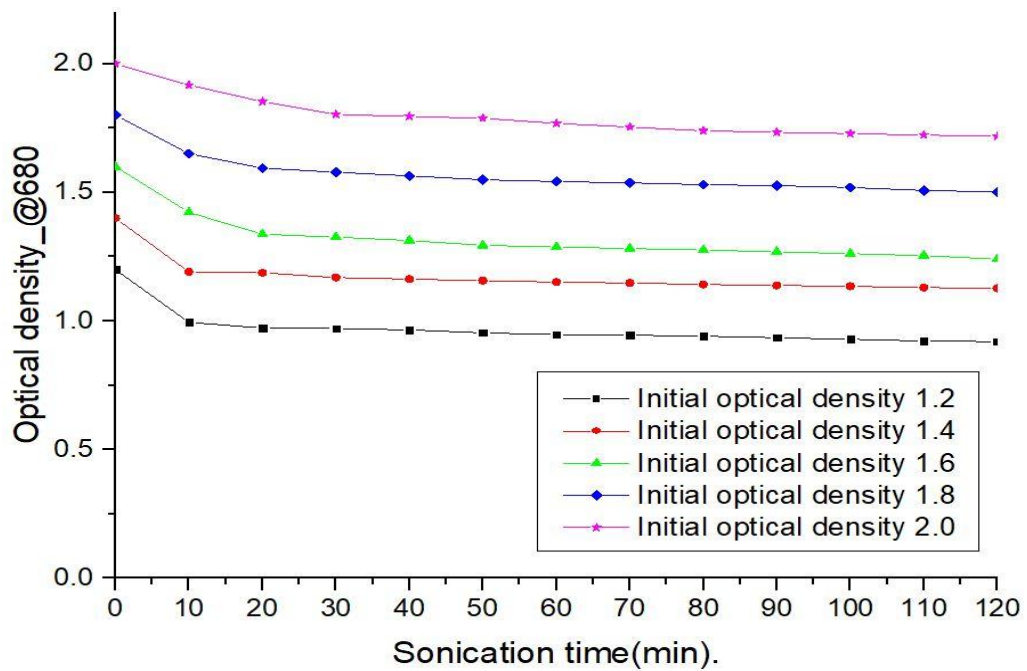
초음파 처리시간에 따른 광학밀도의 변화는 회분저주파 실험과 다르게 모든 실험 단계에서 점차 감소하는 모습을 모든 OD조건에서 볼 수 있다. 이는 증폭기를 사용하여 출력과위를 증폭시켜 나타난 결과로 보인다.

균체 초기 광학밀도를 실험 조건으로 5단계로 나누어 실험을 진행한 결과 OD 1.2

부터 OD 2.0까지 순서대로 높은 파쇄 효율이 나타났으며, OD 1.2에서 가장 좋은 효율이 나타났다. 그러나 회분저주파 처리 실험과 동일하게 OD 1.2는 바이오 리파이너리의 의미가 크게 떨어지므로 다음으로 효율이 높게 나타난 OD 1.4를 채택하여 후속 실험을 진행하였다.



(a) Changes in cell reduction according to microalgae initial optical density



(b) Optical density change according to sonication time for initial optical density

Fig. 5-2 Experimental results of initial optical density for continuous LFNFU

2. 출력파워 값에 따른 세포 파쇄 효율

연속저주파 처리 장치의 출력파워 값에 따른 미세조류 *Dunaliella salina*의 세포 파쇄 효율을 실험을 통해서 연구하였다. 연속저주파 처리 장치의 선행 실험 결과를 반영하여 균체 초기 광학밀도를 1.4로 고정하여 실험을 진행을 하였다. 실험에 사용된 처리 장치는 입력 진폭에 따라서 출력파워 값이 결정된다. 입력 진폭은 70%를 초과할 경우 장치의 급격한 발열로 인한 과부하가 발생하여 최대 60%의 입력 진폭을 제한하여 실험을 진행하였으며, 장치의 입력 진폭에 따른 출력파워 값을 Table 5-4에 정리하여 나타냈다. 연속저주파 처리 장치에는 증폭기를 추가하여 회분저주파 처리 장치보다 더 높은 출력파워 값이 나타난다. 출력파워 값은 총 5단계로 나누어 실험을 진행하였으며 Fig. 5-3의 (a)에 출력파워 값에 따른 세포 파쇄 효율을, (b)에 초음파처리 시간에 따른 균체 광학밀도 변화를 나타내었다.

실험 결과 출력파워 값에 따른 세포 파쇄 효율은 장치의 출력파워 값이 증가 할수록 좋은 효율을 나타내었다. 먼저 첫 번째 실험 조건인 62Watt에서는 가장 낮은 출력파워 값에 따라서 가장 낮은 파쇄 효율이 나타났다. 해당 조건에서는 총 120분의 실험이 종료될 즈음에 90%의 파쇄 효율을 달성하였다. 두 번째 실험 조건인 82Watt에서는 실험 시작 후 100분 정도에 90%의 효율을 달성하였으며, 세 번째 조건인 115Watt에서는 실험 시작 후 80분 정도에 90%의 효율을 달성하였다. 첫 번째부터 세 번째 실험 조건들은 상대적으로 저조한 파쇄 효율을 보였으나, 120분 동안 진행된 실험에서 90%의 효율을 달성하였다. 네 번째 160Watt에서는 실험 초반부부터 양호한 파쇄 효율이 나타나며 실험 시작 30분 이후에 80%효율이 나타나며, 60분 이후에는 90%의 파쇄 효율이 나타난다. 다섯 번째 출력파워 값이 가장 높은 207Watt에서는 가장 좋은 파쇄 효율이 나타난다. 해당 조건에서는 실험 시작 20분 이후 80%이상의 효율이 나타나며, 50분 이후에 90%의 파쇄 효율을 볼 수 있다.

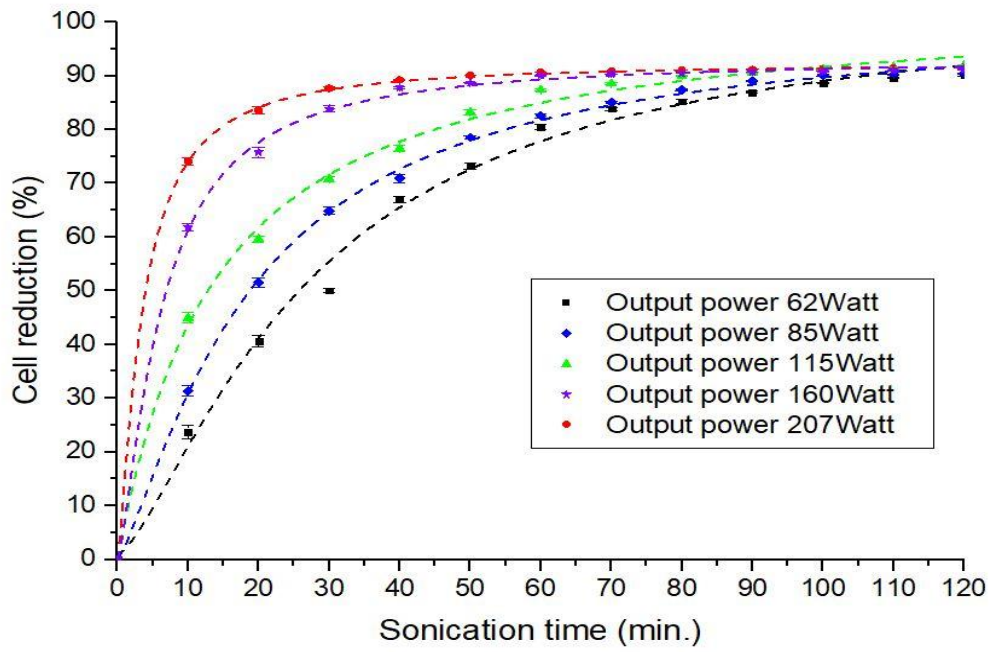
균체 광학밀도 변화는 출력파워 값이 낮은 62, 85Watt에서는 회분저주파 처리 실험과 동일하게 증가하였다 감소하는 광학밀도 값을 볼 수 있다. 다른 세 가지 조건에서는 강력한 출력파워의 영향으로 지속적으로 감소하는 양상을 볼 수 있다.

연속저주파 처리 장치의 출력파워 값에 따른 세포 파쇄 효율 실험을 진행한 결과 출력파워 값에 따라서 유의미한 파쇄 효율의 차이를 보였다. 출력파워 값이 높은

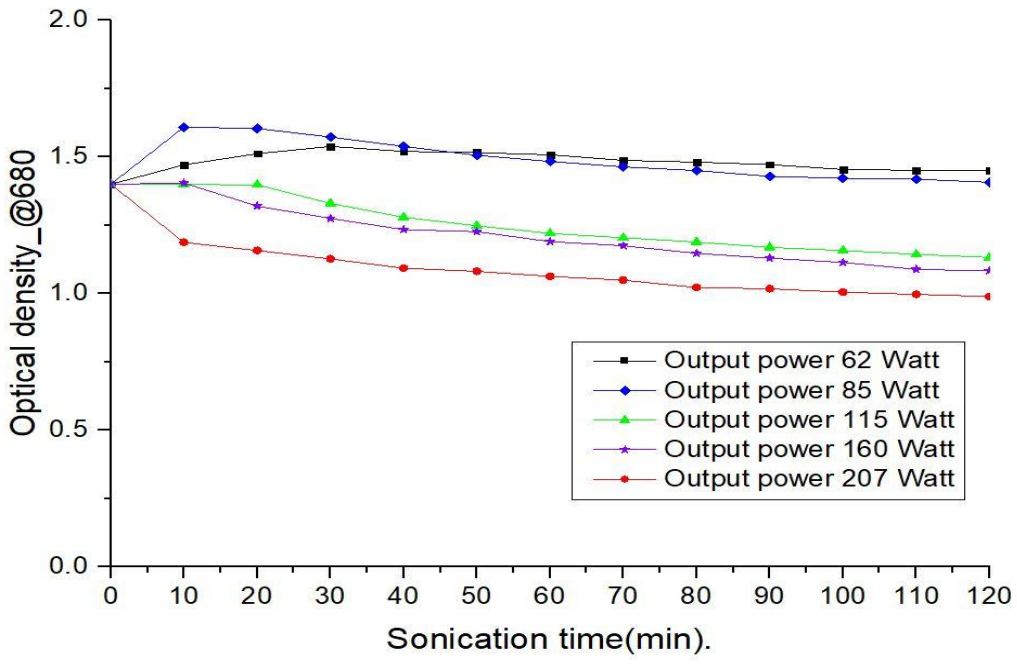
207Watt에서 출력과워 값이 낮은 62Watt 순으로 파쇄 효율이 좋은 것으로 나타났다. 따라서 207Watt를 채택하여 후속 실험을 진행하였다.

Table 5-3 Output power according to input amplitude for continuous LNFU

Input amplitude (%)	Output power (Watt)
20	62
30	85
40	115
50	160
60	207



(a) Changes in cell reduction according to output power



(b) Optical density change according to sonication time for output power

Fig. 5-3 Experimental results of output power for continuous LFNFU

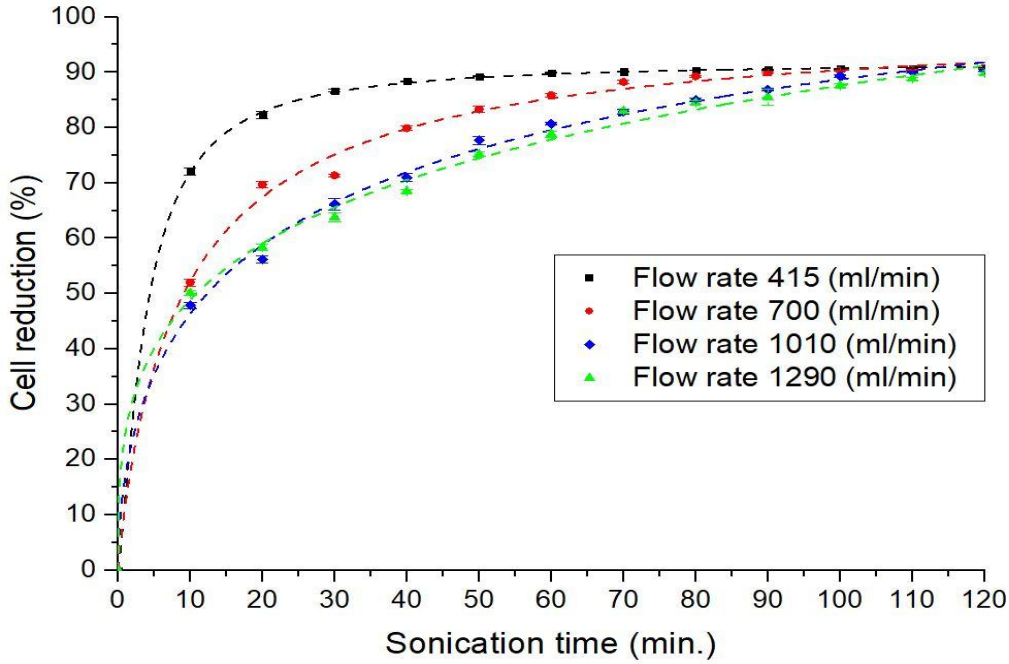
3. 균체 순환 유량에 따른 세포 파쇄 효율

기존의 고정적인 회분저주파 처리 장치와는 다르게 연속저주파 처리 장치의 외부에는 연속적인 초음파 처리를 위해 균체의 순환을 위한 펌프와 일정한 유량을 컨트롤하기 위한 유량계를 설치하였다. 후속 실험에서는 미세조류 *Dunaliella salina*의 순환 유량이 세포 파쇄 효율에 미치는 영향을 알아보기 위한 실험을 진행하였다. 선행실험에서 결과를 바탕으로 초기 균체 광학밀도 1.4, 장치 출력과워 207Watt를 실험의 고정변수로 사용하였고, 실험에 사용된 펌프는 최대 속도 600rpm 장치를 사용하였다. 유량은 펌프의 rpm속도에 따라서 4단계로 나누어 실험을 진행하였으며, 펌프의 rpm에 따른 유량을 유량계로 측정하여 Table 5-4에 나타냈다. Fig. 5-4의 (a)에 균체 순환 유량에 따른 세포 파쇄 효율을, (b)에 초음파처리 시간에 따른 균체 광학밀도 변화를 나타내었다.

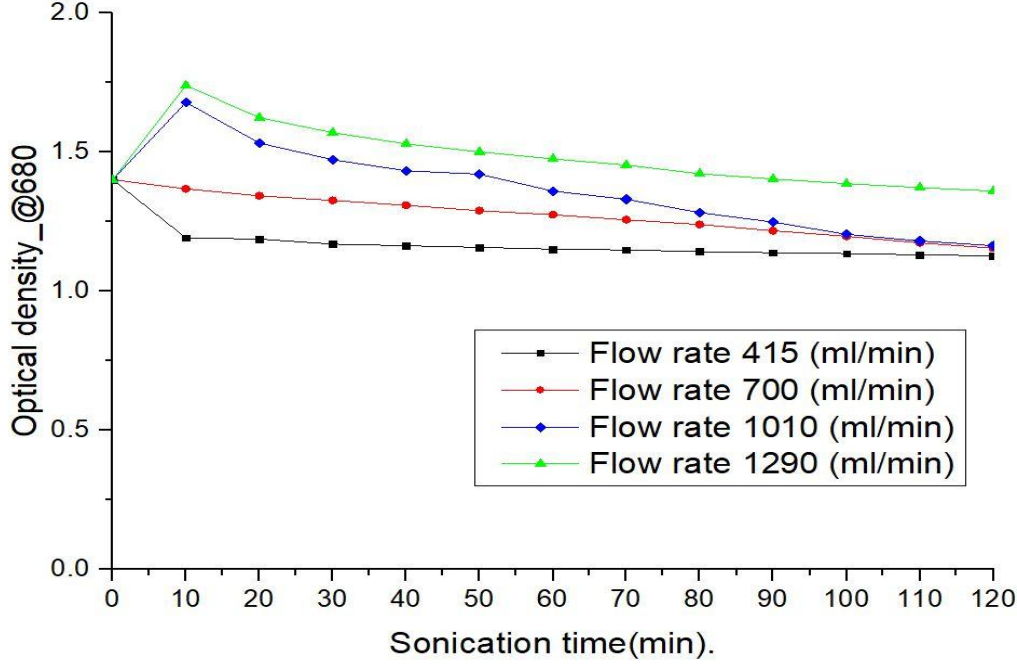
총 120분 동안의 실험 결과 모든 실험이 최종적으로 85%이상의 파쇄 효율을 달성하였다. 첫 번째 조건인 150rpm에서는 가장 좋은 파쇄 효율이 나타났다. 실험 시작 20분 이후에 80%이상의 효율을 살펴볼 수 있으며, 70분 이후에는 90%이상의 효율이 나타났다. 두 번째 250rpm에서는 실험 초반부에는 저조한 효율이 나타나지만 시간이 지남에 따라 점차 증가하는 파쇄 효율을 볼 수 있다. 해당 조건에서는 실험시작 90분 이후에 90%이상의 파쇄 효율이 나타났다. 세 번째, 네 번째 조건인 350rpm과 450rpm에서는 유사한 파쇄 효율을 볼 수 있다. 하지만 순환속도가 조금 더 느린 350rpm은 실험 시작 110분 이후에 90%효율을 달성하였으며, 순환속도가 가장 빠른 450rpm은 최종 120분에서 89%의 파쇄 효율을 달성하였다. 균체 순환 유량에 따른 실험은 순환 유량이 적을수록 좋은 파쇄 효율이 나타났다.

초음파 처리 시간에 따른 광학밀도의 변화는 순환속도가 상대적으로 느린 150, 250rpm의 두 조건에서는 실험 시작부터 감소하는 모습을 볼 수 있으며, 순환속도가 빠른 350, 450rpm에서는 광학밀도가 상승했다가 점차 감소하는 모습을 볼 수 있다.

연속초음파 처리 장치에서 균체 순환 유량에 따른 세포 파쇄 효율에 대한 실험을 진행한 결과 순환속도가 느린 150rpm에서 순환속도가 빠른 450rpm의 순서로 파쇄 효율이 나타났다. 이는 순환속도가 느릴수록 단위시간당 초음파의 영향을 받는 균체의 양이 상대적으로 많기 때문에 나타난 결과로 보인다.



(a) Changes in cell reduction according to flow rate



(b) Optical density change according to sonication time for flow rate

Fig. 5-4 Experimental results of flow rate for continuous LFNFU

Table 5-4 Flow rate according to rev./min.

rpm	Flow rate (ml/min.)
150	415
250	700
350	1010
450	1290

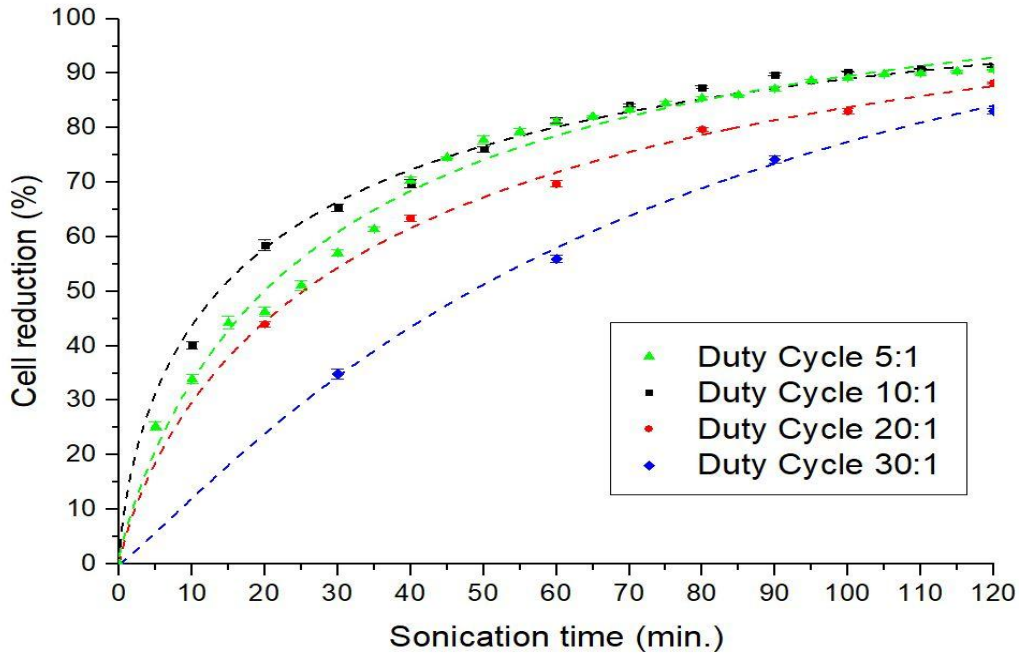
4. 초음파처리 장치 작동주기에 따른 세포 파쇄 효율

연속저주파 처리 장치를 통한 초음파 파쇄는 외부의 펌프를 사용하여 균체를 유동시켜 초음파 처리를 하는 방식으로 미세조류 세포막을 파쇄 한다. 이 때 균체의 유동속도가 느릴수록 더 높은 파쇄 효율을 선행실험을 통해서 알 수 있었다. 후속 실험에서는 연속초음파 처리 장치의 작동 주기를 조정하여 미세조류와 초음파의 접촉시간을 변화시켜 실험을 통해서 연구하였다. 선행실험에서 채택한 초기 균체 광학밀도 1.4, 출력과워 207Watt, 순환유량 415ml/min.을 초기 변수로 고정하여 실험을 진행하였다. 작동 주기는 5:1(5분 초음파 처리, 1분 순환), 10:1(10분 초음파 처리, 1분 순환), 20:1(20분 초음파 처리, 1분 순환), 30:1(30분 초음파 처리, 1분 순환)의 총 4단계로 나누어 실험하였다. Fig. 5-5의 (a)에 초음파 작동주기에 따른 세포 파쇄 효율 변화를 나타냈으며, (b)에 초음파 처리 시간에 따른 광학밀도 변화를 나타내었다.

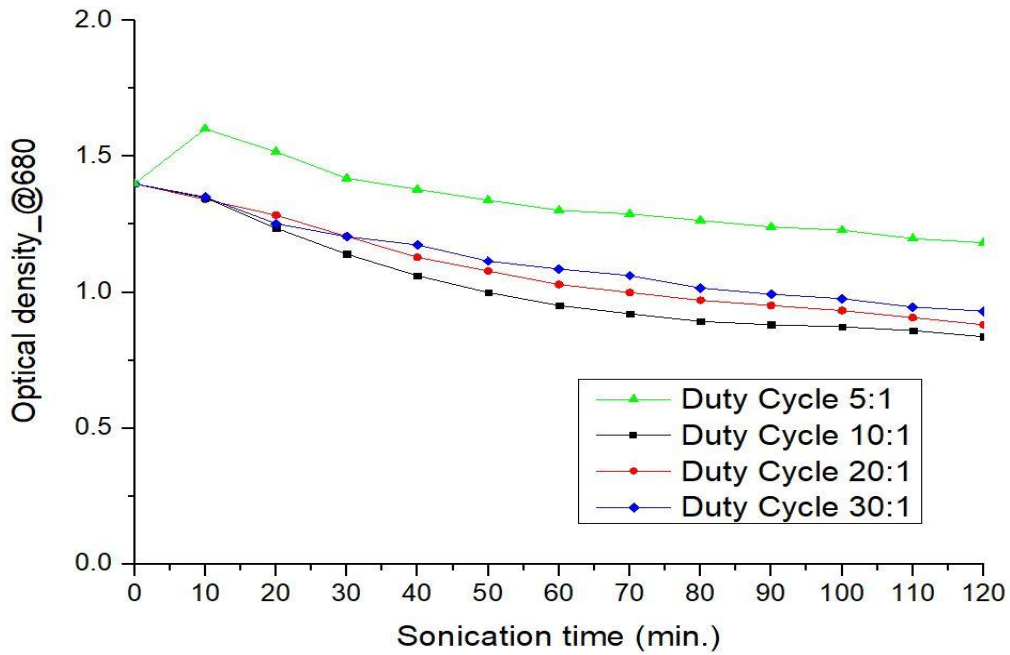
실험 결과 첫 번째 5:1 조건에서는 실험 초반 저조한 파쇄 효율이 나타난다. 그러나 40분 이후로 파쇄 효율이 급격히 증가하여 110분이 경과하였을 때 90%이상의 효율을 볼 수 있다. 두 번째 10:1 조건에서는 실험 초기부터 가장 좋은 파쇄 효율이 나타나며, 60분이 경과했을 때 80%의 효율을, 100분이 경과했을 때 90%이상의 효율을 달성하였다. 10:1 조건에서 가장 양호하고 좋은 파쇄 효율이 나타났다. 세 번째 조건인 20:1에서 진행한 실험 결과는 20분이 경과하였을 때 5:1과 비슷한 효율이 나타나지만 40분 이후로는 차이가 극명히 나타나며, 앞선 두 조건보다 낮은 파쇄 효율을 보인다. 총 120분 동안의 초음파 처리를 한 결과 최종 세포 파쇄 효율은 약88%가 나타났다. 네 번째 30:1 조건은 다른 실험들과 비교하여 가장 저조한 파쇄 효율이 나타났으며, 총 120분 동안의 초음파 처리 결과도 가장 낮은 파쇄 효율을 볼 수 있다.

초음파 처리 시간에 따른 광학밀도의 변화는 5:1 실험에서 증가하였다가 감소하는 모습을 보이나, 다른 시험들 보다 적게 감소했다. 다른 3종류의 실험은 모두 실험 시작부터 감소하는 모습을 볼 수 있으며, 작동 주기가 길어질수록 덜 감소한 것으로 나타났다.

연속저주파 처리 장치를 이용한 실험에서 장치의 작동주기를 조정하여 실험을 진 5:1 > 20:1 > 30:1순으로 파쇄 효율이 나타났다.



(a) Changes in cell reduction according to duty cycle



(b) Optical density change according to sonication time for duty cycle

Fig. 5-5 Experimental results of duty cycle for continuous LFNFU

연속저주파 처리 장치에서 초음파 파쇄 실험을 총 4종류의 변수를 단계별로 나눠 실험을 수행한 결과 초기 균체 광학밀도 1.4, 출력파워 207Watt, 순환유량 415(ml/min), 작동주기 10:1의 조건에서 가장 높은 세포 파쇄 효율 결과를 볼 수 있었다.

제 6 장 미세조류 *Chlorella sp.*와의 파쇄 효율 비교

제1절 미세조류 *Chlorella sp.*

1. *Chlorella sp.* 종 특성과 *Dunaliella salina*와의 차이

전 세계에 수많은 종의 미세조류가 서식하고 있다. 그 중에서도 *Chlorella sp.*는 녹조식물에 속하는 녹조류로서 단백질이 풍부하고 광합성 효율이 우수한 종으로 손꼽힌다. *Dunaliella salina*와 다르게 담수조류인 *Chlorella sp.*는 지름 10 μ m의 구형 세포 형태를 가진 플랑크톤성 단세포체로 편모가 없고, 이상적인 조건에서 *Chlorella sp.*는 이산화탄소, 물, 햇빛, 소량의 미네랄만을 필요로 하며, 빠르게 번식하는 특징을 가지고 있다^[36]. *Chlorella sp.* 세포는 엽록소를 다량으로 함유하고 있어 선명한 녹색을 띠는 특징을 가지고 있으며, 세포막은 셀룰로오스와 헤미셀룰로오스로 이루어져 있다. 클로렐라의 단백질 함량은 60%에 이르며 아미노산의 함량은 36%정도 함유하고 있으며, 지방산의 경우 약 67%정도를 함유하고 있다^[37]. 이러한 특징을 가진 *Chlorella sp.*는 주로 미국이나 캐나다에서 건강 보조 식품으로, 일본에서는 식품 보조제로 소비되고 있다.

*Chlorella sp.*는 구형의 세포 형태를 가지며, 타원형의 세포 형태를 가진 *Dunaliella salina*와 차이를 보인다. 또한 세포의 크기 차이를 보이며, 세포막의 구성에도 차이를 보인다. *Dunaliella salina*의 세포막은 얇은 탄성질의 글리세롤 막으로 구성되어 있으며, *Chlorella sp.*는 셀룰로오스와 헤미셀룰로오스로 구성된 막을 가지고 있다. 또 담수조류와 해수조류로서 성장 환경의 차이를 가지고 있으며, 성장 스펙트럼에도 차이를 보인다. *Chlorella sp.*는 약 광학밀도 4.3정도까지 성장하는 반면, *Dunaliella salina*는 광학밀도 2.0정도까지 성장한다.

이러한 차이점을 보이는 두 미세조류의 초음파 처리를 통한 파쇄 효율을 비교하였다. 본 논문에서 서술한 *Dunaliella salina*의 파쇄 효율과 *Chlorella sp.*의 파쇄 효율 실험 결과를 비교 하였다^[38].

제2절 회분저주파 파쇄 실험 비교

1. 초기 균체 광학밀도

회분저주파 파쇄 실험에서 초기 균체 광학밀도를 변수로 진행된 실험들을 비교 하였다. Fig. 6-1에 *Chlorella sp.*의 초기 균체 광학밀도에 따른 세포 파쇄 효율 실험 결과를 나타내었다.

초기 균체 광학밀도 실험을 비교한 결과 *Chlorella sp.*의 경우 exponential phase의 초반부에 해당하는 OD 1.54에서는 실험 초반부에 높은 파쇄 효율이 나타나지만, 시간이 경과할수록 저조한 파쇄 효율을 볼 수 있다. 또한 *Chlorella sp.*의 실험에서 exponential phase 중반부에 해당하는 OD 2.57에서 가장 높은 파쇄 효율이 나타났으며, stationary phase에 해당하는 OD 3.66과 death phase에 해당하는 OD 3.96에서는 높은 농도로 인한 입자 간 인력의 영향으로 실험 초반부에는 저조한 파쇄 효율이 나타나지만 시간이 경과할수록 파쇄 효율이 양호해짐을 볼 수 있으며, *Dunaliella salina*와 비교하여 stationary phase와 death phase의 파쇄 효율은 시간이 경과함에 따라 점차 양호해지는 모습을 두 실험 모두 관찰할 수 있다.

Fig. 6-1에 나타낸 *Chlorella sp.*와 Fig. 3-2의 (a)에 나타낸 *Dunaliella salina*의 회분저주파 처리 장치를 이용한 초기 균체 광학밀도를 조정된 세포막 파쇄 실험을 비교한 결과 *Chlorella sp.*는 exponential phase의 중반부에 해당하는 OD 2.57에서, *Dunaliella salina*는 exponential phase의 초반부에 해당하는 OD 1.2에서 가장 높은 파쇄 효율이 나타났다. 또한 전체적으로 *Dunaliella salina*의 파쇄 실험이 더 빠르게 90%의 효율을 달성하는 것을 볼 수 있다. 이는 *Dunaliella salina*의 세포막이 *Chlorella sp.*의 세포막에 비해서 더 얇기 때문에 실험 초기부터 잘 파쇄 되어 나타난 결과로 보인다.

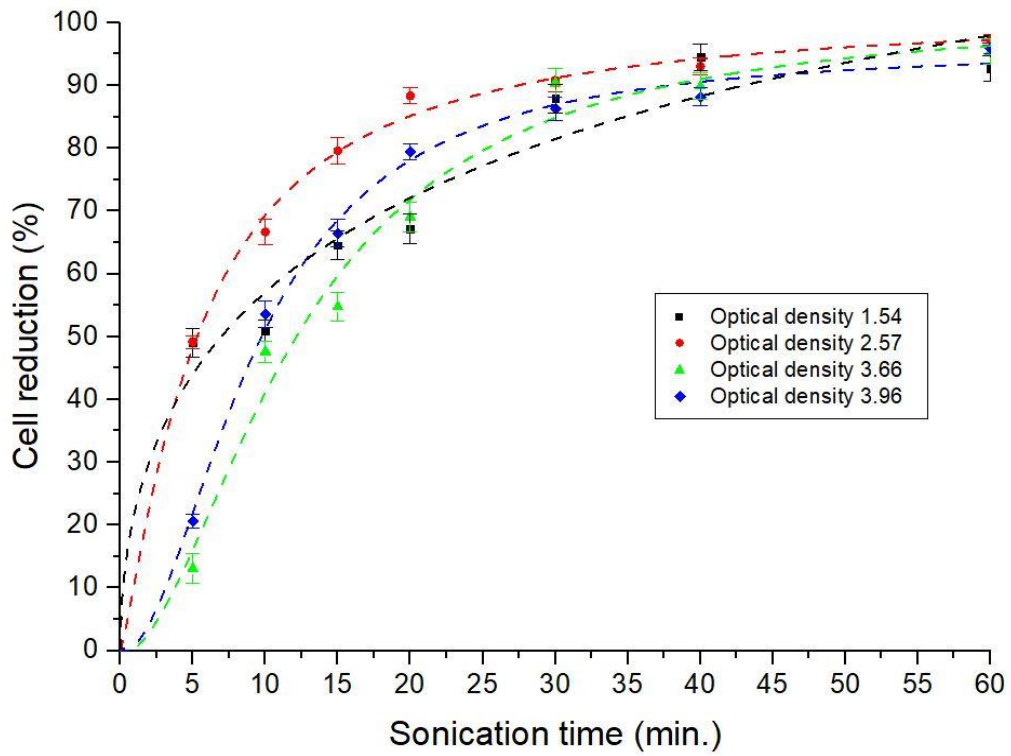


Fig. 6-1 Changes in *Chlorella sp.* cell reduction according to initial OD

2. 출력파워

회분저주파 처리 장치를 이용하여 장치 출력파워 값에 따른 세포 파쇄 효율 실험 결과를 비교하였다. 두 미세조류 모두 선행실험인 초기 균체 광학밀도 실험의 결과를 반영하여 초기 균체 광학밀도를 각각 2.57, 1.4에서 실험을 진행하였다. Fig. 6-2에 *Chlorella sp.*의 출력파워 값에 따른 세포 파쇄 효율 실험 결과를 나타내었다.

비교 결과 *Chlorella sp.*의 경우 출력파워가 비교적 낮은 33-42Watt에서는 저조한 파쇄 효율이 나타나며, 출력파워가 가장 높은 54Watt에서 실험 시작 후 5분이 경과했을 때 85%의 파쇄 효율을 볼 수 있다. 54Watt의 출력파워 값에서는 *Chlorella sp.*의 파쇄 효율이 초반부터 월등히 높게 나타나는 모습을 볼 수 있다. 이는 *Dunaliella salina*의 54Watt에서 진행한 실험 보다 더 높은 수치이다.

Fig. 6-2에 나타낸 *Chlorella sp.*와 Fig. 3-3의 (a)에 나타낸 *Dunaliella salina*의 회분저주파 처리 장치의 출력파워 값을 조정하여 세포막 파쇄 실험을 비교한 결과 *Dunaliella salina*의 경우 모든 출력파워 값에서 대체적으로 높은 파쇄 효율을 볼 수 있었다. 33Watt와 54Watt의 실험 초반 5분의 파쇄 효율을 비교하면 *Chlorella sp.*에서는 약 50% 정도의 차이가 나타나며 *Dunaliella salina*의 경우는 약 15%정도 차이가 나타난다. *Chlorella sp.*의 경우 출력파워 값에 따라서 파쇄 효율 차이가 극명한 모습을 볼 수 있었다.

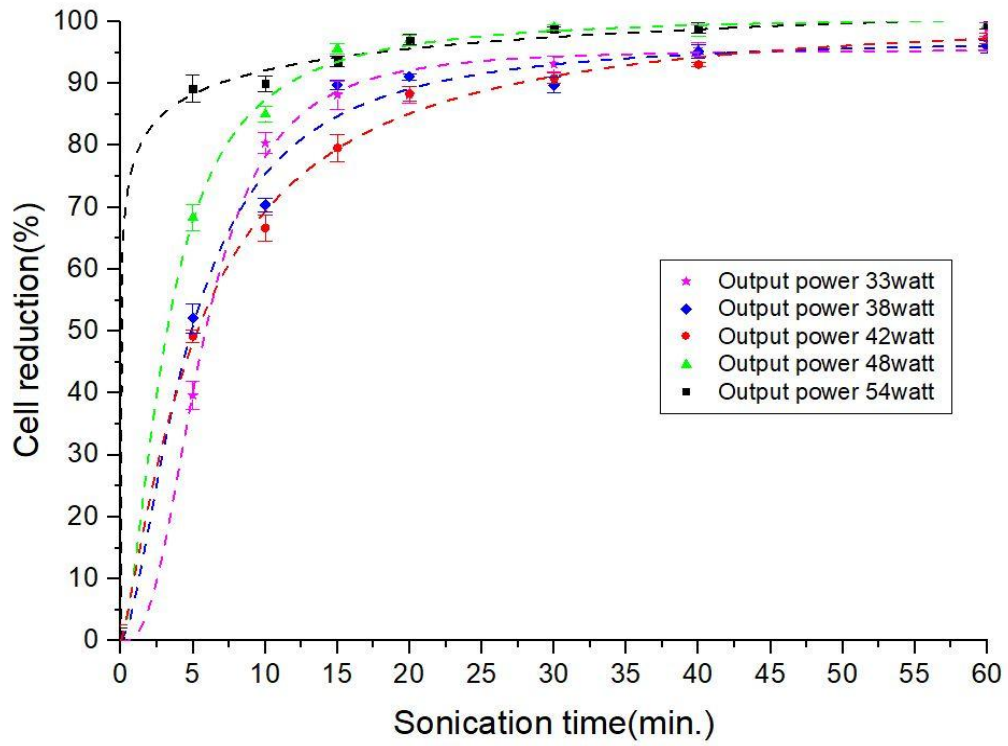


Fig. 6-2 Changes in *Chlorella sp.* cell reduction according to output power

3. 초기 균체 용량

회분저주파 처리 장치를 사용한 세포 파쇄 실험에서 초기 균체 용량을 조정해가면서 진행한 두 미세조류의 실험들을 비교 하였다. 실험 초기 조건으로 초기 균체 광학 밀도와 출력과워 값을 선행실험 결과들을 반영하여 실험을 진행 하였으며, 두 미세조류 모두 적절한 균체 용량을 결정하여 3단계에 나누어 실험을 진행하였다. Fig. 6-3에 *Chlorella sp.*의 초기 균체 용량에 따른 세포 파쇄 효율 실험 결과를 나타내었다.

*Chlorella sp.*의 경우 150, 200, 300ml의 용량을 가지고 실험을 진행하였다. 실험 결과 모든 실험이 용량이 적을수록 가장 높은 파쇄 효율을 나타내었다. *Chlorella sp.*의 경우 150ml에서 실험 초기부터 급격한 파쇄 효율이 나타났다. 그러나 용량을 증가시켜 실험한 200ml와 300ml에서는 실험 초반에 저조한 파쇄 효율 결과를 볼 수 있다.

Fig. 6-3에 나타낸 *Chlorella sp.*와 Fig. 3-4의 (a)에 나타낸 *Dunaliella salina*의 회분저주파 처리 장치의 초기 균체 용량을 조절한 세포막 파쇄 실험을 비교한 결과 *Dunaliella salina*의 경우 200ml에서 실험을 진행한 결과가 가장 높은 파쇄 효율을 나타냈다. 용량을 증가시킨 300ml, 500ml의 실험은 용량이 증가 하였음에도 불구하고 실험 초기부터 양호한 파쇄 효율이 나타났다. 두 미세조류의 같은 용량인 200ml와 300ml를 비교하였을 때, 두 조건 모두 *Dunaliella salina*에서 진행한 실험이 매우 월등한 파쇄 효율이 나타났으며, 가장 좋은 파쇄 효율을 나타낸 *Chlorella sp.*의 150ml와 *Dunaliella salina*의 200ml실험을 비교 한 결과, 두 실험의 결과가 유사하게 나타났다. 500ml의 *Dunaliella salina*의 실험과 *Chlorella sp.*의 200, 300ml을 비교하면 *Dunaliella salina*의 실험 파쇄 실험에서 더 좋은 파쇄 효율을 볼 수 있다.

회분저주파 처리 장치를 통한 두 미세조류 *Chlorella sp*와 *Dunaliella salina*를 비교 하였다. 각 실험에서 가장 좋은 효율을 나타낸 실험 조건들을 배합하여 진행한 실험에서 촬영한 현미경 사진을 Fig. 6-4 (a), (b)에 나타내었다. *Chlorella sp.*의 최적 효율 배합은 초기 균체 광학밀도 2.57, 출력과워 54Watt, 초기 균체 용량 150ml였으며, *Dunaliella salina*는 초기 균체 광학밀도 1.4, 출력과워 54Watt, 초기 균체 용량 200ml였다.

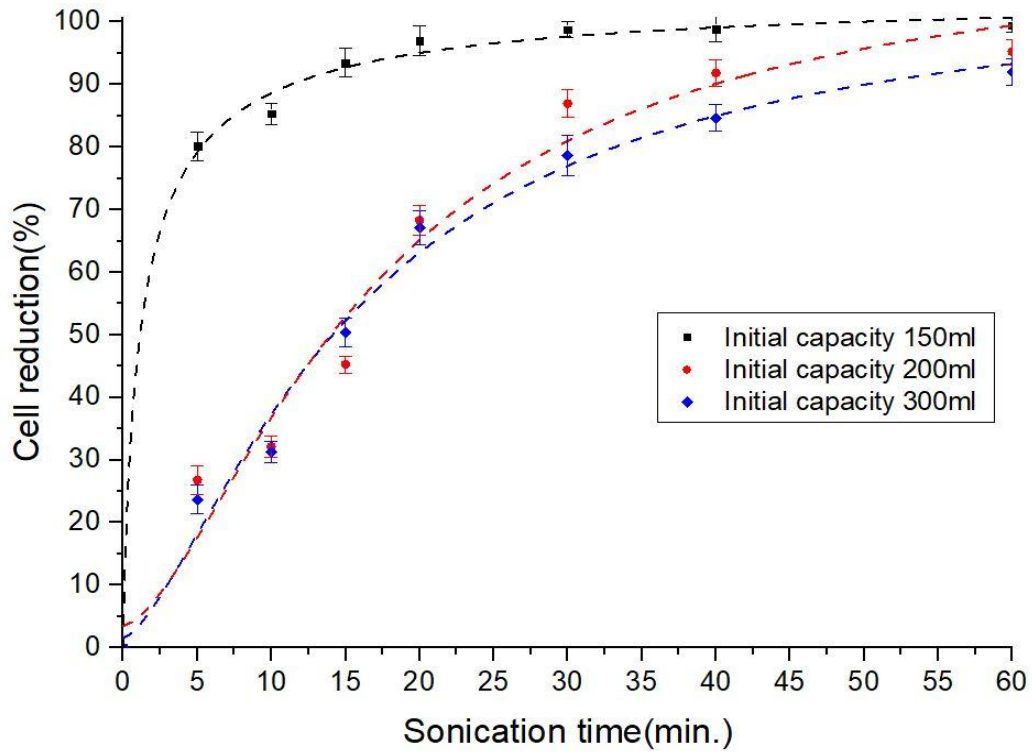
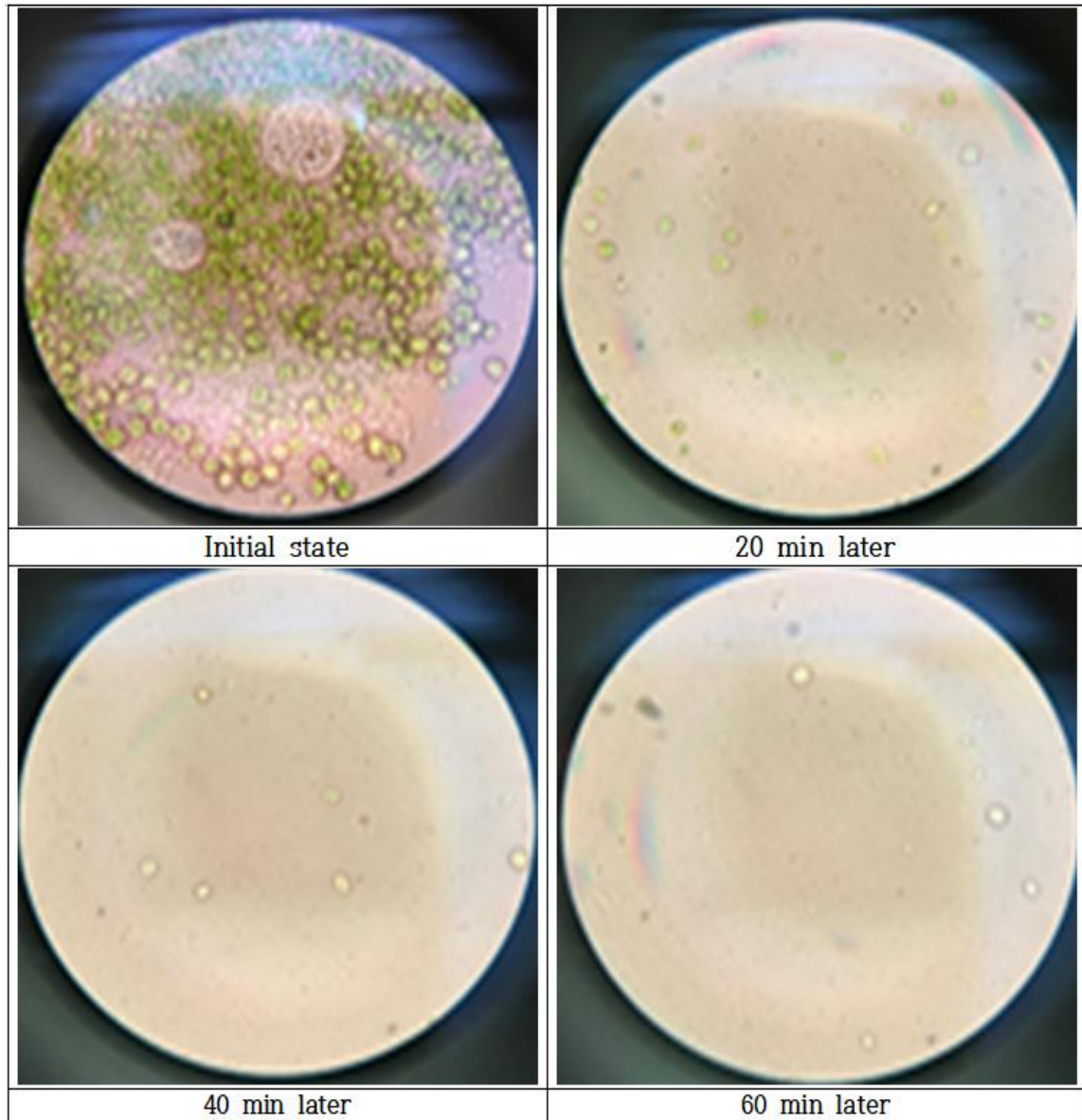
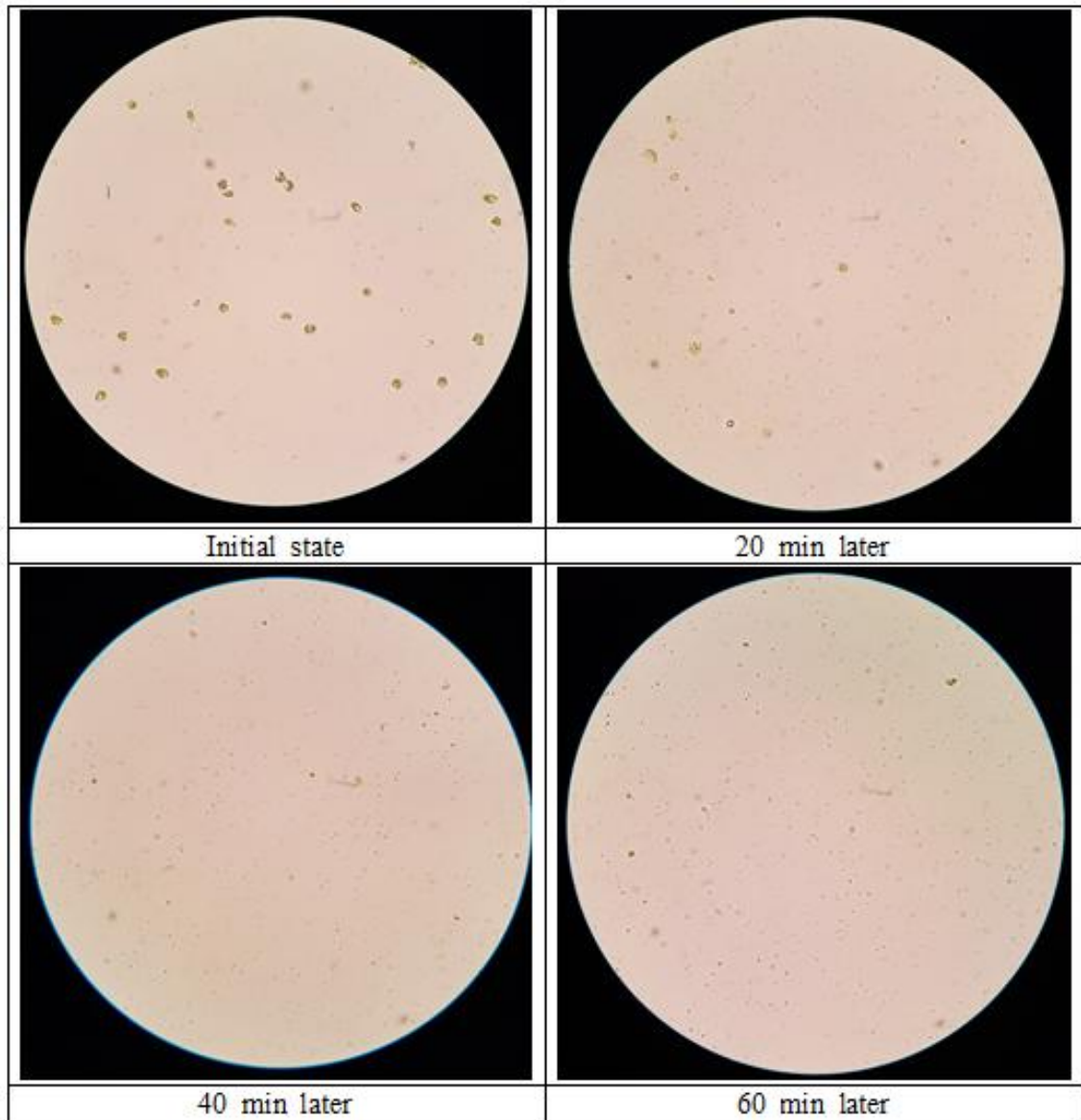


Fig. 6-3 Changes in *Chlorella sp.* cell reduction according to initial capacity



(a) Photomicrograph of *Chlorella sp.* cell variation during batch LFNFU processing



(b) Photomicrograph of *Dunaliella salina* cell variation during batch LFNFU processing

Fig. 6-4 Photomicrograph of cell variation during batch LFNFU processing

제3절 회분고주파 파쇄 실험 비교

1. 파형

회분고주파 처리 장치를 사용한 세포 파쇄 실험에서 함수 발생기의 함수 파형을 조정해가면서 진행한 두 미세조류의 실험들을 비교 하였다. 함수 발생기에서 조정할 수 있는 2가지 파형으로 단계를 나누어 실험을 진행하였고, Fig. 6-5에 *Chlorella sp.*의 함수 파형에 따른 세포 파쇄 효율을 나타냈다.

*Chlorella sp.*의 파형에 따른 세포 파쇄 효율은 먼저 사각파에서 120분의 실험에서 최종 파쇄 효율이 50% 미만의 저조한 파쇄 효율이 나타났다. 사인파에서는 최종 파쇄 효율이 20%미만으로 사각파보다 더 낮은 최종 파쇄 효율이 나타났다. 실험 초기 두 파형의 세포 파쇄 효율이 유사하게 나타났으나 사각파에서 진행한 실험이 시간이 경과할수록 더 높은 파쇄 효율이 나타났다.

Fig. 6-5에 나타낸 *Chlorella sp.*와 Fig. 4-2의 (a)에 나타낸 *Dunaliella salina*의 회분고주파 처리 장치의 함수 파형에 따른 세포 파쇄 효율을 비교하면, 두 미세조류 모두 사각파에서 더 높은 파쇄 효율을 볼 수 있었다. *Dunaliella salina*의 경우 사각파에서 최종 파쇄 효율이 90%이상으로 나타났으며, 사인파의 경우에는 최종 파쇄 효율이 60%이상으로 나타났다. 회분고주파 장치의 파형을 조정할 경우에 출력파워 값이 변화하여 세포 파쇄 효율에 영향을 미쳤다. 미세조류 중에 따라서 비교한 결과 두 파형 모두 *Dunaliella salina*에서 더 높은 파쇄 효율이 나타났고, 출력파워가 더 낮은 사인파에서 실험한 *Dunaliella salina*의 파쇄 효율이 사각파에서 실험한 *Chlorella sp.*의 파쇄 효율보다 실험결과가 더 좋게 나타난 것을 살펴볼 수 있었다.

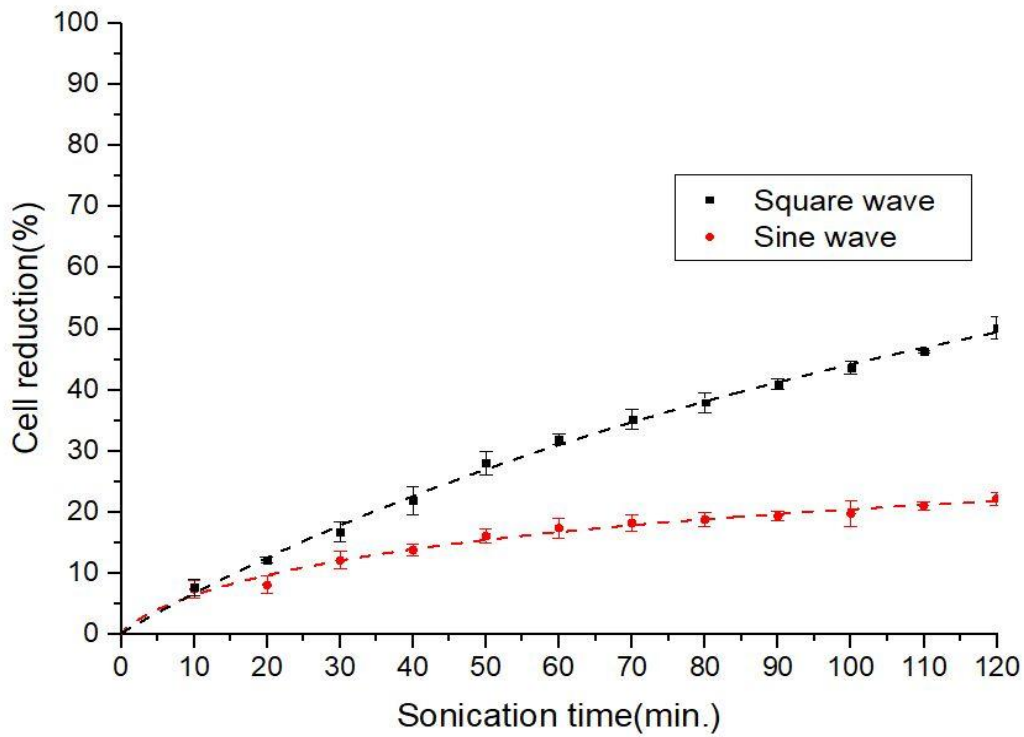


Fig. 6-5 Changes in *Chlorella sp.* cell reduction according to wave form

2. 인가전압

회분고주파 처리 장치를 사용한 세포 파쇄 실험에서 함수 발생기의 인가전압을 조정해가면서 실험을 진행한 결과들을 비교 하였다. 선행실험의 결과를 반영하여 함수의 파형은 사각파로 실험 초기 조건으로 결정하여 실험을 통해서 연구하였다. 함수 발생기의 인가전압은 700mvpp를 초과할 수 없어 최대 인가전압으로 700mvpp를 설정하였고 총 3단계로 나누어 실험을 진행하였다. Fig. 6-6에 *Chlorella sp.*의 인가전압에 따른 파쇄 효율 결과를 나타내었다.

먼저 *Chlorella sp.*의 실험 결과는 500mvpp에서 가장 낮은 세포 파쇄 효율이 나타났다. 총 120분 동안의 실험을 진행한 결과 25%미만의 세포 파쇄 효율이 나타났다. 600mvpp에서는 최종 파쇄 효율이 35%미만의 결과가 나타났으며, 가장 높은 파쇄 효율을 보인 700mvpp에서는 50%이상의 세포 파쇄 효율을 볼 수 있었다.

Fig. 6-6에 나타낸 *Chlorella sp.*와 Fig. 4-3의 (a)에 나타낸 *Dunaliella salina*의 회분고주파 처리 장치의 인가전압에 따른 세포 파쇄 효율을 비교하면, *Chlorella sp.*의 세포 파쇄 효율은 최대 50%의 파쇄 효율을 볼 수 있었다. 반면 *Dunaliella salina*의 경우에는 최소 65%이상의 세포 파쇄 효율이 나타난다. 인가전압을 조정할 경우 출력파워 값에 직접적으로 영향을 미치는 모습을 볼 수 있었으며, 가장 낮은 500mvpp의 인가전압으로 실험한 *Dunaliella salina*의 세포 파쇄 효율이 가장 높은 700mvpp의 인가전압으로 실험한 *Chlorella sp.*의 세포 파쇄 효율보다 높게 나타났다. 이러한 차이는 초음파 파쇄 실험에서 1.1MHz의 주파수 대역이 *Chlorella sp.*에는 적절하지 않은 것으로 판단된다. 반면 *Dunaliella salina*는 적절한 주파수 대역인 것으로 판단된다.

회분고주파 처리 장치를 통한 두 미세조류 *Chlorella sp.*와 *Dunaliella salina*의 파쇄 효율 실험 결과를 비교하였다. 각 실험에서 가장 좋은 효율을 나타낸 실험 조건들을 배합하여 진행한 실험에서 촬영한 현미경 사진을 Fig. 6-4 (a), (b)에 나타내었다. 두 미세조류 모두 최적 효율 배합은 사각파, 인가전압 700mvpp였다.

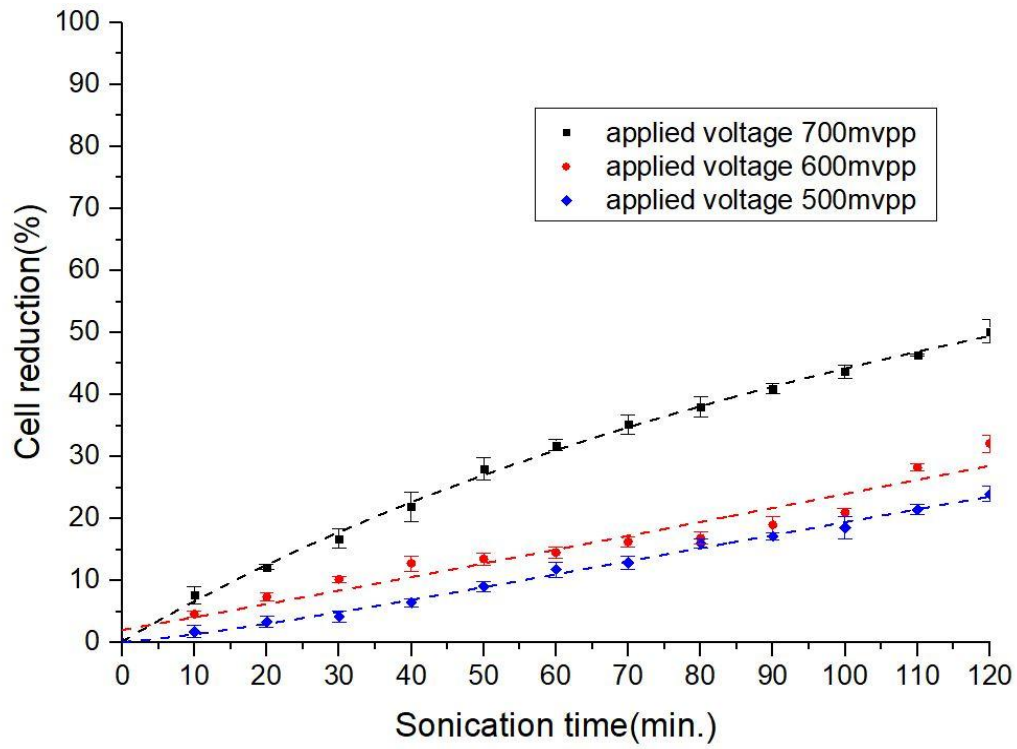
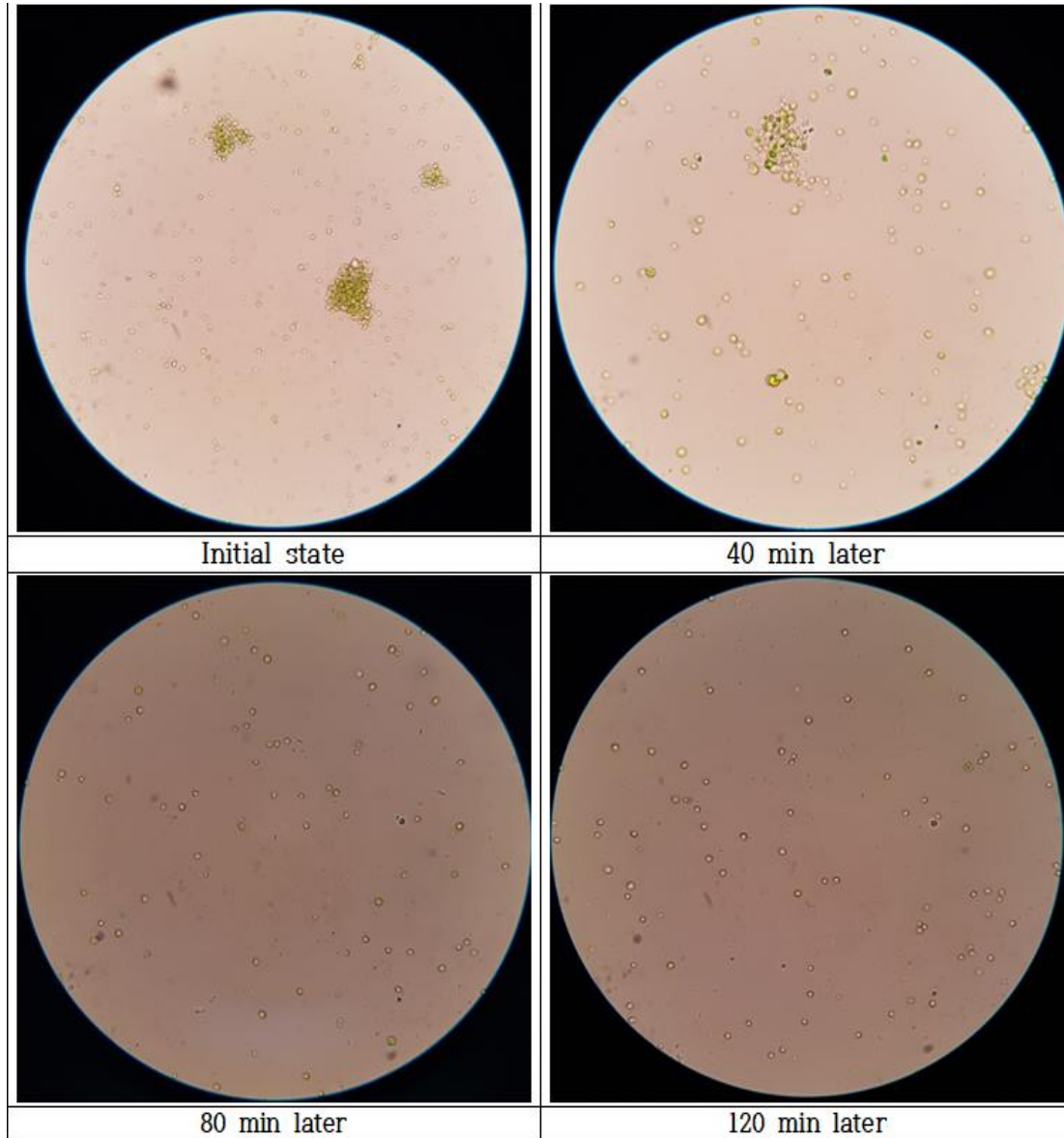
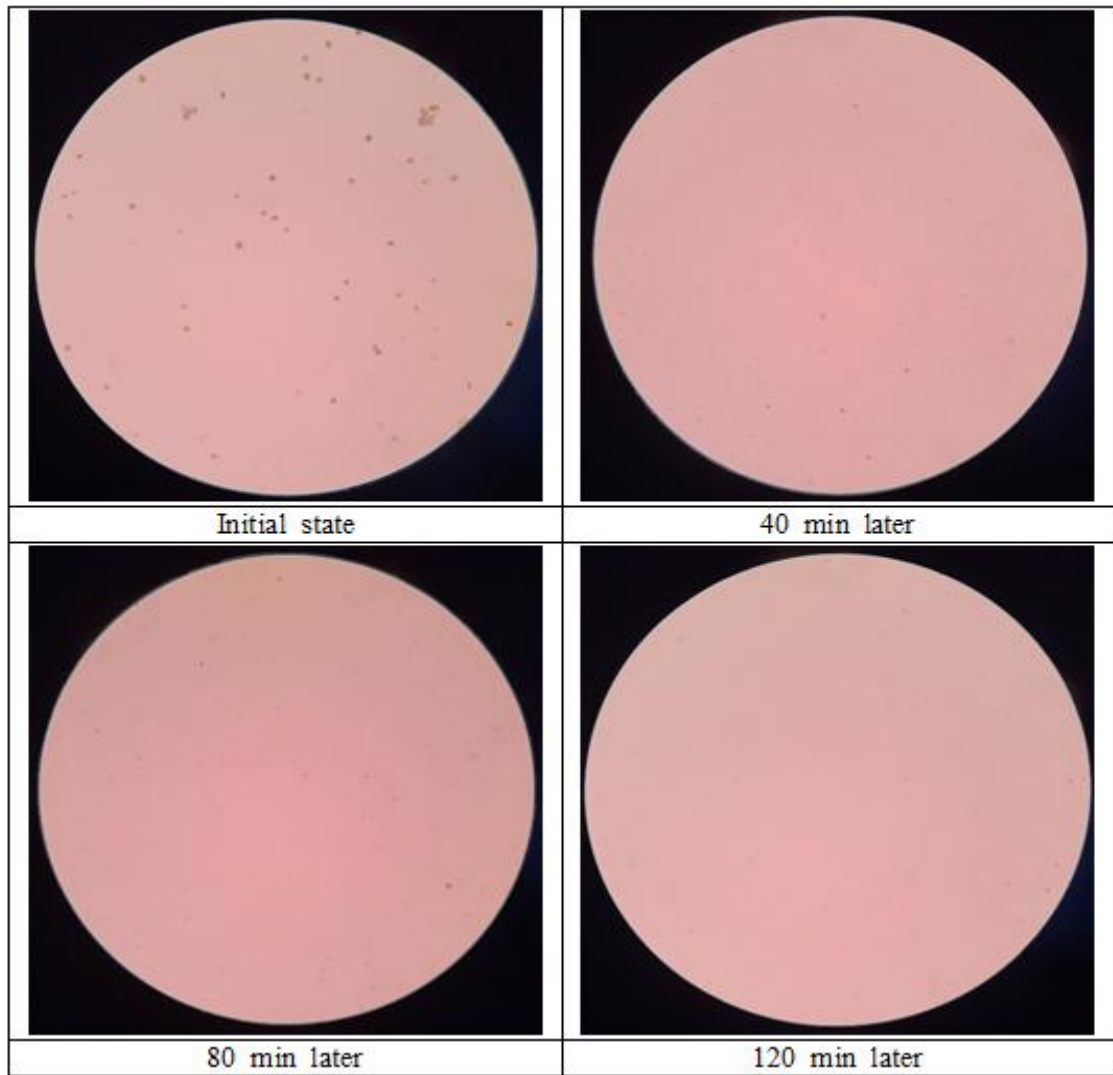


Fig. 6-6 Changes in *Chlorella sp.* cell reduction according to applied voltage



(a) Photomicrograph of *Chlorella sp.* cell variation during batch HFFU processing



(b) Photomicrograph of *Dunaliella salina* cell variation during batch HFFU processing

Fig. 6-7 Photomicrograph of cell variation during batch HFFU processing

제4절 회분저주과 파쇄 실험 비교

1. 초기 균체 광학밀도

연속저주과 파쇄 실험에서 초기 균체 광학밀도를 변수로 진행된 실험들을 비교 하였다. Fig. 6-8에 *Chlorella sp.*의 초기 균체 광학밀도에 따른 세포 파쇄 효율 실험 결과를 나타내었다.

초기 균체 광학밀도 실험을 비교한 결과 *Chlorella sp.*의 경우 exponential phase의 초반부에 해당하는 광학밀도 1.54에서는 실험 초반부에 높은 파쇄 효율이 나타나지만, 시간이 경과할수록 파쇄 효율이 감소한다. 또한 *Chlorella sp.*의 실험에서 exponential phase 중반부에 해당하는 광학밀도 2.80에서 가장 높은 파쇄 효율이 나타났다. 광학밀도 3.16은 2.80과 유사한 성장단계의 균주로서 마찬가지로 높은 파쇄 효율이 나타남을 볼 수 있다. 광학밀도 4.13은 death phase로 높은 농도로 인한 입자 간 인력의 영향으로 실험 초반부에는 저조한 파쇄 효율이 나타나지만 시간이 경과할수록 파쇄 효율이 양호해진다.

Fig. 6-8에 나타낸 *Chlorella sp.*와 Fig. 5-2의 (a)에 나타낸 *Dunaliella salina*의 연속저주과 처리 장치를 이용하여 초기 균체 광학밀도를 조정하여 세포막 파쇄 실험을 비교한 결과 *Chlorella sp.*는 exponential phase의 중반부에 해당하는 광학밀도 2.80에서, *Dunaliella salina*는 exponential phase의 초반부에 해당하는 광학밀도 1.2에서 가장 높은 파쇄 효율이 나타났다. *Dunaliella salina*의 경우 모든 구간에서 좋은 효율을 보인다. 특히 두 실험 모두 stationary phase와 death phase의 파쇄 효율은 시간이 경과함에 따라 점차 양호해지는 모습을 두 실험 모두 관찰할 수 있다. 또한 전체적으로 *Dunaliella salina*의 파쇄 실험이 더 빠르게 90%의 효율을 달성하는 것을 볼 수 있으며, 모든 실험이 90%의 효율에 달성하는 모습을 보인다.

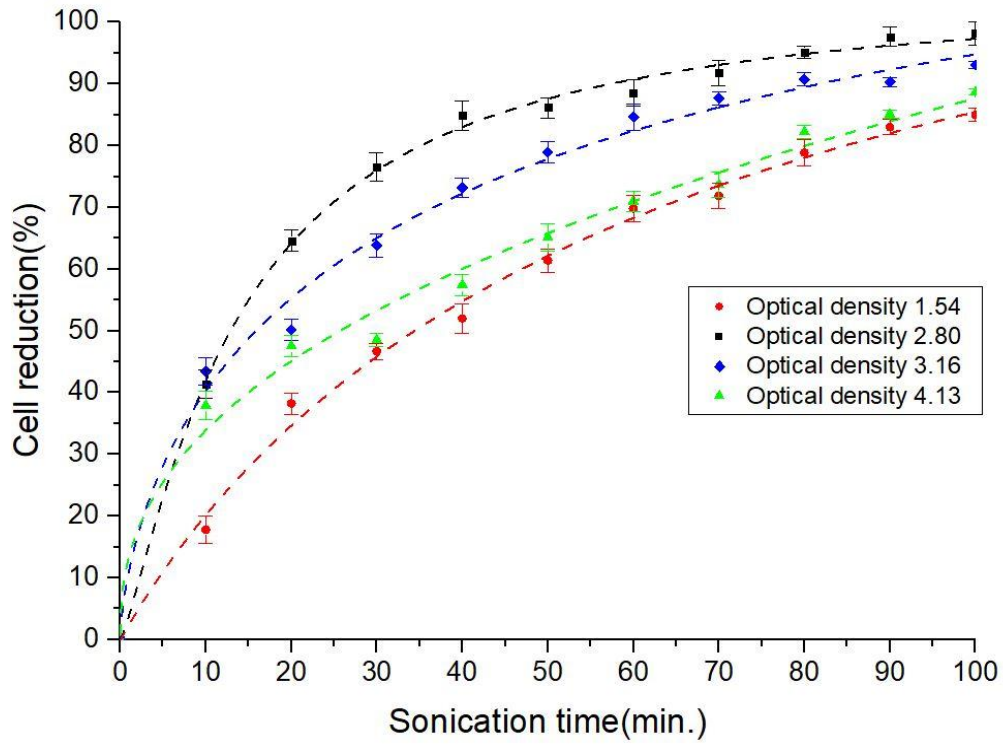


Fig. 6-8 Changes in *Chlorella sp.* cell reduction according to initial OD

2. 출력파워

연속저주파 처리 장치를 이용하여 장치 출력파워 값에 따른 세포 파쇄 효율 실험 결과를 비교하였다. 두 미세조류 모두 선행실험인 초기 균체 광학밀도 실험의 결과를 반영하여 초기 균체 광학밀도를 각각 2.80, 1.4에서 실험을 진행하였다. Fig. 6-9에 *Chlorella sp.*의 출력파워 값에 따른 세포 파쇄 효율 실험 결과를 나타내었다.

*Chlorella sa.*의 실험 결과를 살펴보면 출력파워 값이 가장 낮은 108Watt에서 가장 낮은 파쇄 효율이 나타난다. 108Watt의 파쇄 효율은 실험 초기부터 낮은 파쇄 효율을 볼 수 있으며, 최종 파쇄 효율은 50%미만이다. 185Watt의 경우 최종 파쇄 효율은 60% 미만의 파쇄 효율을 볼 수 있다. 출력파워가 200Watt 미만의 두 실험은 모두 저조한 세포 파쇄 효율이 나타났다. 205Watt의 경우 실험 초기에는 185Watt와 비슷한 효율을 보이지만 이후에도 지속적으로 파쇄 효율이 계속 증가하여 최종 파쇄 효율 80%이상의 양호한 파쇄 효율이 나타났다. 마지막 255Watt의 경우 초반부터 높은 파쇄 효율을 볼 수 있으며, 최종 파쇄 효율이 90%이상으로 나타났다.

Fig. 6-9에 나타낸 *Chlorella sp.*와 Fig. 5-3의 (a)에 나타낸 *Dunaliella salina*의 연속저주파 처리 장치를 이용하여 출력파워 값을 조정한 세포 파쇄 효율 실험을 비교한 결과 두 실험 모두 가장 높은 출력파워 값에서 가장 높은 세포 파쇄 효율을 볼 수 있다. 두 실험 모두 최종 세포 파쇄 효율 90%이상이 나타났으며, 출력파워 값에 따라서 순차적으로 세포 파쇄 효율이 나타남을 볼 수 있다. 한 가지 주목할 점은 *Chlorella sp.*의 실험에서 205Watt의 출력파워 값으로 실험한 최종 파쇄 효율보다 *Dunaliella salina*에서 진행한 160Watt의 실험이 더 높은 최종 파쇄 효율이 나타났다는 점이다.

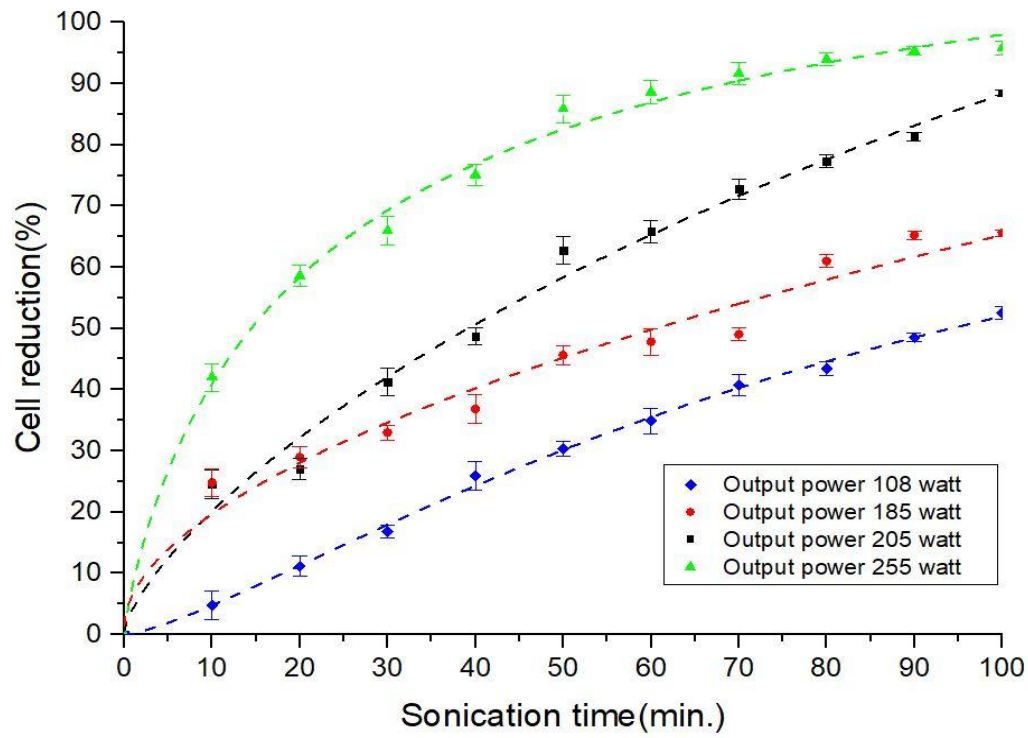


Fig. 6-9 Changes in *Chlorella sp.* cell reduction according to output power

3. 균체 순환 유량

연속저주파 처리 장치를 사용한 세포 파쇄 실험에서 초기 균체 용량을 조정해가면서 진행한 두 미세조류의 실험들을 비교 하였다. 실험 초기 조건으로 초기 균체 광학 밀도와 출력과워 값을 선행실험 결과들을 반영하여 실험을 진행 하였으며, 두 미세조류 모두 4 단계의 균체 순환 유량을 결정하여 실험을 진행하였다. Fig. 6-10에 *Chlorella sp.*의 균체 순환 유량에 따른 세포 파쇄 효율 실험 결과를 나타내었다.

*Chlorella sp.*의 균체 순환 유량 실험 결과를 보면 순환 속도가 느릴수록 높은 세포 파쇄 효율이 나타났다. 유량이 가장 적은 415ml/min에서 초음파 처리 시간 20분 이후부터 급격히 파쇄 효율이 증가하는 모습을 보이며, 최종적으로 90%이상의 세포 파쇄 효율이 나타난다. 또한 모든 실험이 70%이상의 파쇄 효율을 나타내는 양호한 결과를 볼 수 있다. 유속이 가장 빠른 1290ml/min과 1010ml/min의 세포 파쇄 효율은 모든 측정구간에서 비슷한 값이 측정되었으며, 415ml/min을 제외한 세 조건의 실험이 최종적으로 유사한 세포 파쇄 효율이 나타났다.

Fig. 6-10에 나타낸 *Chlorella sp.*와 Fig. 5-4의 (a)에 나타낸 *Dunaliella salina*의 연속저주파 처리 장치를 이용하여 균체 순환 유량을 조정하여 실험을 진행한 결과 두 실험 모두 가장 느린 415ml/min에서 가장 높은 파쇄 효율이 나타났으며, 유속이 느릴수록 세포 파쇄 효율이 높게 나온 모습을 관찰할 수 있다. 순환 유량이 느릴수록 파쇄 효율이 증가하는 이유는 유속이 느릴수록 균체가 단위 시간당 초음파 접촉하는 양이 증가하여 세포 파쇄 효율이 더 높게 나타난 것으로 설명할 수 있다.

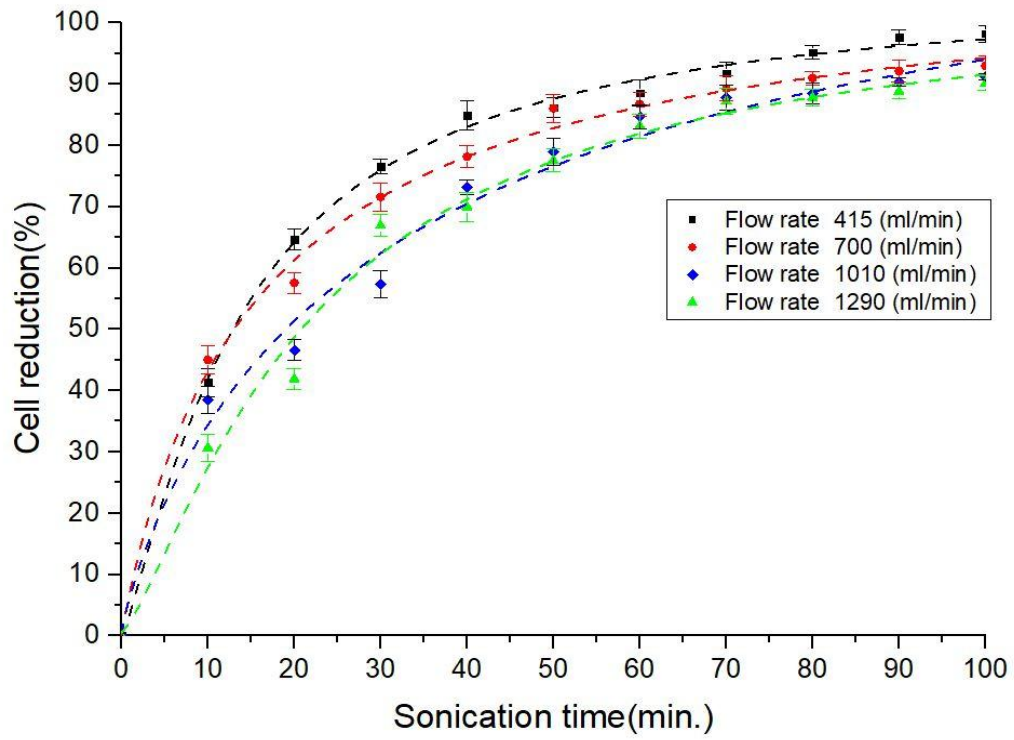


Fig. 6-10 Changes in *Chlorella sp.* cell reduction according to flow rate

4. 장치 작동 주기

연속저주파 처리 장치를 통한 초음파 파쇄는 외부의 펌프를 사용하여 균체를 유동시켜 초음파 처리를 하는 방식으로 미세조류 세포막을 파쇄 한다. 이 때 균체의 유동 속도가 느릴수록 더 높은 파쇄 효율을 선행실험을 통해서 알 수 있었다. 후속 실험에서는 연속초음파 처리 장치의 작동 주기를 조정하여 미세조류와 초음파의 접촉시간을 변화시켜 실험을 통해서 연구한 결과를 비교 하였다. 두 미세조류 모두 선행실험에서 채택한 실험 초기 조건으로 초기 균체 광학밀도, 균체 순환 유량, 출력과워 값을 선행 실험 결과들을 반영하여 실험을 진행하였다. Fig. 6-11에 *Chlorella sp.*의 초음파 처리 장치 작동주기에 따른 세포 파쇄 효율 실험 결과를 나타내었다.

*Chlorella sp.*의 장치 작동 주기 실험 결과를 보면 초음파와 가장 오래 접촉된 20:1에서 오히려 가장 낮은 세포 파쇄 효율이 나타났다. 가장 적게 접촉된 5:1 조건에서 오히려 20:1 조건의 실험보다 더 높은 파쇄 효율이 나타났다. 가장 좋은 파쇄 효율은 10:1 조건에서 나타났으며, 초음파 처리 장치 작동 주기를 조정한 실험에서 처리 시간과 파쇄 효율이 비례하는 결과가 나타나지는 않았다.

Fig. 6-10에 나타낸 *Chlorella sp.*와 Fig. 5-5의 (a)에 나타낸 *Dunaliella salina*의 연속저주파 처리 장치를 이용하여 장치 작동 주기에 따른 세포 파쇄 효율을 비교한 결과 두 실험 모두 10:1 조건에서 가장 높은 파쇄 효율이 나타났다. *Dunaliella salina* 또한 초음파 처리 시간과 파쇄 효율이 비례하는 결과는 나타나지 않았으며, 오히려 가장 긴 작동 주기를 가진 30:1 실험에서 가장 낮은 파쇄 효율이 나타났다.

연속저주파 처리 장치를 통한 두 미세조류 *Chlorella sp.*와 *Dunaliella salina*를 비교하였다. 각 실험에서 가장 좋은 효율을 나타낸 실험 조건들을 배합하여 진행한 실험에서 촬영한 현미경 사진을 Fig. 6-12 (a), (b)에 나타내었다. *Chlorella sp.*의 최적 효율 배합은 초기 균체 광학밀도 2.80, 출력과워 225Watt, 균체 순환 유량 415ml/min 작동주기 10:1이며, *Dunaliella salina*는 초기 균체 광학밀도 1.4, 출력과워 205Watt, 균체 순환 유량 415ml/min 작동주기 10:1으로 나타났다.

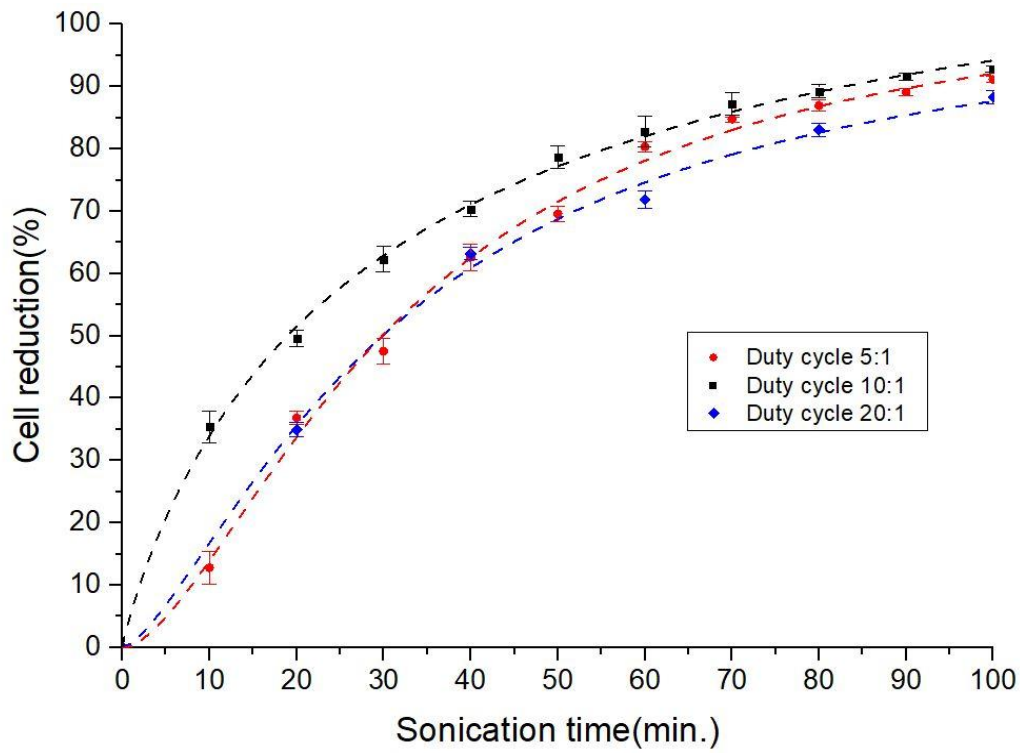
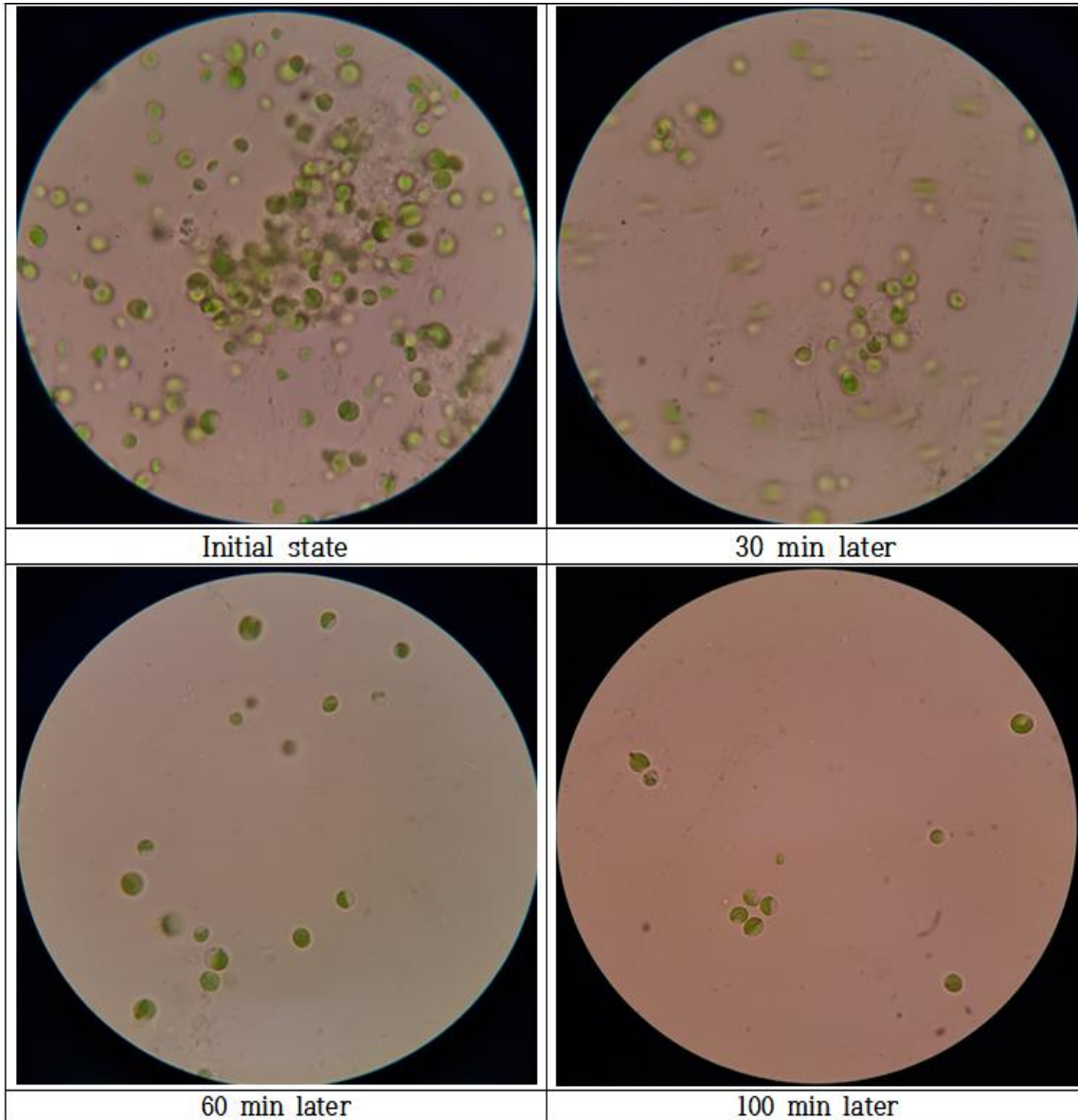
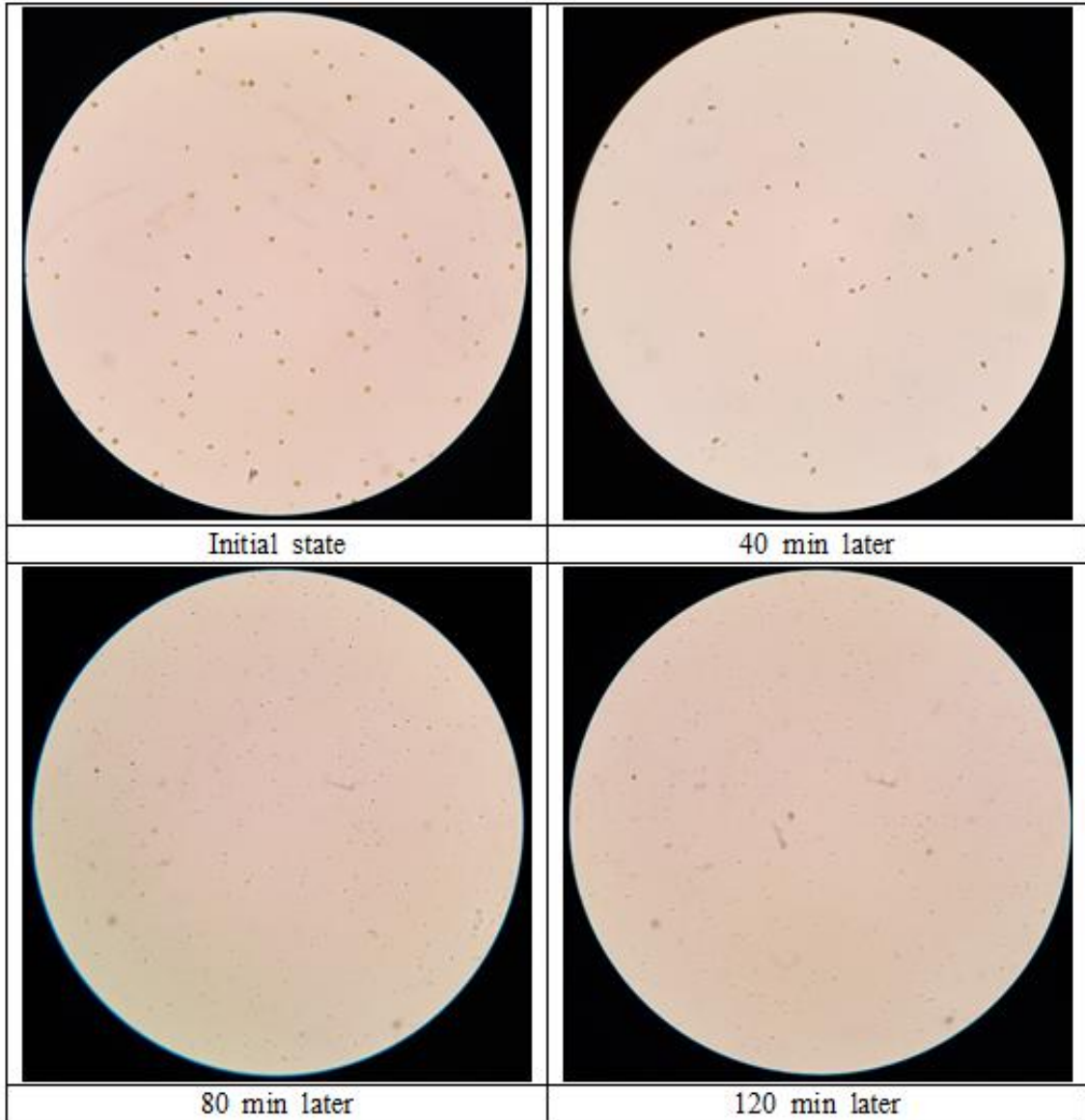


Fig. 6-11 Changes in *Chlorella sp.* cell reduction according to duty cycle



(a) Photomicrograph of *Chlorella sp.* cell variation during continuous LFNFU processing



(b) Photomicrograph of *Dunaliella salina* cell variation during continuous LFNFU processing

Fig. 6-12 Photomicrograph of cell variation during continuous LFNFU processing

제 7 장 결론

3세대 바이오매스인 미세조류는 차세대 에너지로 주목받는 자원으로 전 세계적인 관심을 받고 있다. 그러나 미세조류를 통한 바이오 에너지 활용은 현재 경제적인 취약점으로 인해서 지속적인 연구가 진행되고 있다. 미세조류 바이오 에너지의 상용화를 위해서는 미세조류가 생산하는 천연 유용물질을 얻기 위해서는 세포 파쇄 과정이 필수적이며, 다양한 방법들이 사용되고 있다. 경제성 향상을 위해서 미세조류가 생산하는 유용물질의 추출은 기존의 방법보다 더 효율적인 추출방법의 필요성이 대두되고 있다. 본 연구는 친환경적이고 보다 더 경제적인 초음파 처리를 통한 미세조류 파쇄 방법에 대해서 연구를 진행하였다. 전 세계에서 서식하는 미세조류는 다양한 종과, 종에 따른 특성 때문에 초음파 처리를 위해서는 주파수 대역과 출력파워 같은 여러 적절한 조건을 사용해야 한다. 먼저 미세조류 종중 하나인 *Dunaliella salina*를 연구에 사용할 미세조류로 선정하였고, 최적 파쇄 조건을 연구하기 위해서 (i)회분저주파, (ii)회분고주파, (iii)연속저주파 처리 장치를 활용하여 연구를 진행하였다. 먼저 미세조류 *Dunaliella salina*를 연구에 사용하기 위해서 15L 평판형광생물반응기에서 약 30일 동안 회분배양하여 측정된 데이터를 통해서 성장곡선을 모델링하였다. 모델링한 성장곡선을 세 가지 수학적 근사모델인 Logistic, Gompertz, Baranyi 모델 으로 근사화하였다. 성장곡선을 통해 미세조류 *Dunaliella salina*의 성장 단계에 따른 적정 광학밀도를 선정하여 초음파 처리 실험에 활용하였다. 실험은 앞서 언급한 총 3가지 처리 장치를 활용하여 진행하였고, 장치와 미세조류의 특성을 실험계획법을 통해서 단계별로 나누어 순차적으로 실험을 진행하였다. 또한 다른 미세조류와의 파쇄 효율을 비교하기 위해서 3가지 초음파 처리 장치에서 진행한 *Chlorella sp.*와 *Dunaliella salina*의 파쇄 효율 실험 결과를 비교하여 정리하였다.

제1절 연구 결론

(1) 15L 평판형광생물반응기에서 약 30일 동안 미세조류 *Dunaliella salina*의 회분배양을 통해서 측정된 데이터를 통해서 성장곡선을 모델링하였다. 모델링한 성장곡선을 바탕으로 비 성장 속도를 예측하기 위해서 수학적 근사모델인 Logistic, Gompertz, Baranyi 모델을 사용하여 성장곡선을 근사화하였다. 성장곡선에서 근사모델의 적합성을 나타내는 결정계수는 Logistic 0.9198, Gompertz 0.9142, Baranyi 0.9191로 결정계수 값이 측정되었으며, 결정계수가 가장 높은 Logistic 모델을 *Dunaliella salina*의 성장을 예측하기 가장 적합한 모델로 선정하였다.

(2) 회분저주파 처리 장치를 이용하여 미세조류 *Dunaliella salina*의 최적 세포 파쇄 조건에 대하여 실험을 통해서 연구하였다. 회분저주파 장치는 20kHz, 최대 500Watt의 스펙을 가진 처리 장치이다. 연구 결과 초기 균체 광학밀도 1.4, 출력파워 54Watt, 초기 균체 용량 200ml의 조건에서 초음파 처리 후 최종 90%이상의 세포 파쇄 효율 결과가 나타났다. 최적 초기 균체 광학밀도는 exponential phase의 도입부인 광학밀도 1.2에서 가장 높은 파쇄 효율을 볼 수 있었으나 바이오 리파이너리의 의미가 떨어지기 때문에 다음으로 높은 효율을 나타낸 광학밀도 1.4를 채택하였다. 회분저주파 처리 장치에서 파쇄 효율에 가장 큰 영향을 미친 변수는 출력파워 값으로 출력파워 값에 따라 미세조류 세포 파쇄 효율에 큰 차이가 나타났다.

(3) 회분고주파 처리 장치를 이용하여 미세조류 *Dunaliella salina*의 최적 세포 파쇄 조건에 대하여 실험을 통해서 연구하였다. 회분고주파 장치의 구성은 함수 발생기, 전력증폭기와 트랜스듀서로 구성되며, 장치의 주파수 대역은 1.1MHz로 고주파를 집속으로 방출한다. 연구 결과 사각파, 700mvpp의 인가전압 조건에서 최종 90%이상의 세포 파쇄 효율 결과가 나타났다. 회분고주파 처리장치에서 파쇄 효율에 가장 큰 영향을 미친 변수는 인가전압으로, 인가전압은 출력파워 값에 직접적인 영향을 미치는 변수로 나타났다.

(5) 미세조류의 차세대 에너지 자원으로서 활용하기 위해 해결해야 하는 경제성을 높이기 위해서 연속저주파 처리 장치를 구성하여 미세조류 *Dunaliella salina*의 최적 세포 파쇄 조건에 대하여 실험을 통해서 연구하였다. 연구 결과 초기 균체 광학밀도 1.4, 출력파워 205Watt, 균체 순환 유량 415ml/min, 작동주기 10:1의 조건에서 초음파 처리 후 최종 90%이상의 세포 파쇄 효율 결과가 나타났다. 연속초음파 처리 장치를 통한 실험에서는 외부에 균체의 순환을 위해 구성된 펌프의 rpm이 느릴수록 세포 파쇄 효율이 좋게 나타났다. 출력파워는 회분저주파 실험과 마찬가지로 높을수록 좋은 세포 파쇄 효율을 볼 수 있었다.

(6) 전 세계적으로 서식하는 미세조류는 다양한 종과, 종에 따른 특성 때문에 초음파 처리를 위해서는 주파수 대역과 출력파워 같은 여러 적절한 조건을 사용해야 한다. 해수에서 서식하는 미세조류 *Dunaliella salina*와 담수에서 서식하는 미세조류 *Chlorella sp.*의 초음파 파쇄 실험 결과를 비교하였다. 먼저 *Chlorella sp.*의 초음파 파쇄 처리 실험 결과이다. 회분저주파 처리 실험에서 *Chlorella sp.*는 exponential phase의 중반부인 광학밀도 2.57, 출력파워 54Watt, 초기 균체 용량 150ml에서 가장 높은 파쇄 효율이 나타났다. 회분고주파 처리 실험에서는 사각파, 700mvpp의 인가전압 조건에서 가장 높은 세포 파쇄 효율 결과가 나타났다. 연속저주파 처리 실험에서는 초기 균체 광학밀도 2.80, 출력파워 255Watt, 균체 순환 유량 415ml/min, 작동주기 10:1의 조건에서 초음파 처리 후 최종 90%이상의 세포 파쇄 효율 결과가 나타났다.

(7) 미세조류 *Dunaliella salina*와 *Chlorella sp.*의 실험 결과를 비교하였다. 회분초음파 처리 장치에서 저주파를 두 미세조류 모두 유사한 최적 파쇄 효율 조건이 나타났다. 그러나 균체 초기 용량에서 *Dunaliella salina*의 경우 용량이 더 많음에도 *Chlorella sp.*보다 더 높은 파쇄 효율이 나타났다. 이는 *Dunaliella salina*의 세포막이 글리세롤을 기반으로 한 얇은 막으로 구성되어있기 때문인 것으로 판단된다. *Chlorella sp.*의 단단한 세포막은 셀룰로오스를 기반으로 구성되어있다. 고주파를 이용한 실험은 *Dunaliella salina*가 더 높은 파쇄 효율을 나타냈다. 이는 *Dunaliella salina*의 적정 주파수 대역이 저주파에서부터 고주파임을 시사한다. 연속저주파 처리 실험은 회분저주파와 마찬가지로 유사한 실험결과가 나타났으며, 최적 파쇄 효율 조건도 동일하게 나타났다.

제2절 향후 연구 방향

본 논문에서는 기계적 미세조류 파쇄 방법의 하나인 초음파 처리 방법을 통해서 연구를 진행하였다. 미세조류의 차세대 에너지 자원으로서 발전과 유용물질의 사용을 위해서 세포 파쇄 실험을 진행하였다. 기존 회분초음파 처리 장치와 경제성 향상을 위한 연속저주파 처리 장치를 구성하였으며 미세조류 *Dunaliella salina* 선정하여 최적 세포 파쇄 효율에 대하여 실험을 통해서 연구하였다. 또한 미세조류 *Chlorella sp.*와 파쇄 효율을 비교하였다. 현재 미세조류의 초음파처리를 통한 추출은 초기 단계이다.

향후 연구 방향으로는 연속초음파 처리 장치의 자동화 시스템을 추가하여 더 경제적이고 효율적인 친환경 기술의 개발과 양질의 미세조류를 수확하여 고효율의 천연물질 추출방법에 대한 연구가 필요하다. 모든 시스템을 하나의 시스템으로 결합하여 배양, 수확, 추출의 과정을 자동화하여 일괄적으로 처리 할 수 있다면 기존의 화학약품을 사용하는 방법보다 더 간편하고 뛰어난 효율을 내는 방법으로 자리매김 할 수 있을 것으로 보인다. 또한 미세조류의 다양한 종 특성으로 인한 여러 조건에 대하여 지속적인 연구가 필요하다.

참고문헌

1. Hyeong-Won Kim, “Realization of microalgal growth by CO₂ and biofuel production plant construction by bioreactor”, Korea Institute of Plane Engineering and Construction, Vol. 13, No. 2, pp. 5-17, 2017.
2. Jong-Moon Park, “Biorefinery”, New & Information for chemical engineers, Vol. 29, NO. 3, pp. 361-365, 2011.
3. Hee-Mock Oh, “Current Status and prospect of Fueling Microalgae Biomass”, New & Information for chemical engineers, Vol. 29, NO. 3, pp. 355-360, 2011.
4. Yusuf Chisti, “Biodiesel from microalgae”, Biotechnology advance, Vol. 25, No. 3, pp. 294-306, 2007.
5. Ju Oh, Ju-Shin Oh, “Future Resource of Microalgae”, Korean Society of Civil Engineers, Vol. 61, No. 2, pp. 85-90
6. Jin-Suk Lee, “Research status of photobioreactor development with high solar power utilization”, The Korean Solar Energy Society, Vol. 1, No. 3, pp. 3-6, 2002.
7. Dae-Geun Kim, Yoon E Choi, “Microalgae Cultivation Using LED Light”, Korean Chemical Engineering Research, Vol. 52, No. 1, pp. 8-16, 2014.
8. Hyun-Jin Park, Eun-Jung Jin, Tae-man Jung, Hyun Joo, and Jae-Hwa Lee, “Optimal Culture Conditions for Photosynthetic Microalgae *Nannochloropsis oculata*”, The Korean Society of Industrial and Engineering Chemistry, Vol. 21, No. 6, pp. 2288-4505, 2010.
9. Byung-Hoon Jo, Hyung-Joon Cha, “Biodiesel Production Using Microalgal Marine Biomass”, The Korean Society for Biotechnology and Bioengineering, Vol. 25, No. 2,

- pp. 109-115, 2010.
10. Ronald Halim, Michael K. Danquah, Paul A. Webley, “Extraction of oil from microalgae for biodiesel production: A review”, *Biotechnology Advances*, Vol. 30, No. 3, pp. 709-732, 2012.
 11. E. Günerken, E. D'Hondt, M.H.M. Eppink, L. Garcia-Gonzalez, K. Elst, R.H. Wijffels, “Cell disruption for microalgae biorefineries”, *Biotechnology Advances*, Vol. 33, No. 2, pp. 243-260, 2015.
 12. Spengler, J. F., W. T. Coakley, and K. T. Christensen. “Microstreaming effects on particle concentration in an ultrasonic standing wave”, *American Chemical Society Journal*, Vol. 49, No. 11, pp. 2773-2782, 2003.
 13. Jae-Hyeok Kim, Sang-Hwa Jeong, “A study on the automatic harvest by on-off control for a combined system of continuous culture of microalgae and ultrasonic separation devices”, *Journal of Mechanical Science and Technology*, Vol. 31, No. 4, pp. 1581-1586, 2017.
 14. Joo-Hyun Sim, Hyung-Joon Seo, Byeong-Dae Kwon, “Study on the Efficiency of Algae Removal Using Ultrasonic Waves in Double Cisterns”, *Journal of Korean Society of Environmental Engineers*, Vol. 28, No. 12, pp. 1310-1315, 2006.
 15. Young-Wook Son, “The Status of Domestic and Overseas Eco-friendly Automotive Regulation and Supply Policy”, *The Korean Society Of Automotive Engineers*, Vol. 40, No. 12, pp. 53-58, 2018
 16. Hee-Mock Oh, Chi-Yong Ahn, “CO₂ Fixation and Biodiesel Production using Microalgae”, *Chemical Engineering and Materials Research Information Center*, Vol. 12,

- No. 5, pp. 12-20, 2009.
17. Kang-Kuk Choi, “Secure and utilize microalgae”, The Plant Resources Society of Korea, Academic symposium, pp. 138-148, 2017.
 18. R. R. L. Guillard, “Culture of phytoplankton for feeding marine invertebrate”, Culture of Marine Invertebrates Animals. Plenum, New York, USA, pp. 296-360, 1975.
 19. R.R.L. Guillard, and J.H, Ryther, “Studies of marine planktonic diatoms. I. *Cyclotella nana* Hustedt and *Detonula confervacea* (cleve)”, Canadian Journal of Microbiology, Apr 8, pp. 229-239, 1962.
 20. Aharon Oren, “A hundred years of *Dunaliella* research: 1905-2005”, Saline Systems, Vol. 1, No. 2, pp. 1-14, 2005.
 21. A. Kumudha, R. Sarada, “Characterization of vitamin B₁₂ in *Dunaliella salina*”, J Food Sci Technol., Vol. 1, pp. 888-894, 2016.
 22. Rajper Aftab Ahmed, Meilin He, Rajper Asma Aftab, Shiyan Zheng, Mostafa Nagi, Ramadan Bakri, Changhai Wang, “Bioenergy application of *Dunaliella salina* SA 134 grown at various salinity levels for lipid production”, Scientific Reports, Vol. 7, No. 8118, pp. 1-10, 2017.
 23. A. Hosseini Tafreshi, M. Shariati, “*Dunaliella* biotechnology: methods and applications”, Journal of Applied Microbiology, Vol. 107, No. 1, pp. 14-35, 2009.
 24. Jae-Hyeok Kim, Chung-Man Yoon, Sang-Hwa Jeong, “On-off Control for Continuous Culture of Microalgae in Flat Panel Photobioreactor”, Journal of the Korean Society of Manufacturing Technology Engineer, Vol. 25, No. 3, pp. 237-243, 2016.
 25. I. Mytilinaios, M. Salih, H. K. Schofield, R. J. W. Lambert, “Growth curve prediction

- from optical density data”, *International Journal of Food Microbiology*, Vol. 154, No. 3, pp. 169-176, 2012.
26. M. H. Zwietering, I. Jongenburger, F. M. Rombouts, K. VAN 'T RIET 1990, “Modeling of the bacterial growth curve”, *Applied and environmental microbiology*, Vol. 56, No. 6, pp. 1875-1881.
27. Miranda A. Raper, “Effect of Polyethylene Oxide (peo) Modification On the Structure and Antimicrobial Activity of the Antimicrobial Peptide Wlbu2” Oregon State University, 2016.
28. Michael T. Madigan, Thomas D. Brock, John M. Martinko, Jack. Parker, “*Brock biology of microorganisms*”, 8th ed., Prentice Hall, Upper Saddle River, NJ. 1997.
29. William D. O’Brien, “Ultrasound - biophysics mechanisms”, *Progress in Biophysics and Molecular Biology*, Vol. 93 No. 1-3, pp. 212-255, 2007.
30. Richard E. Berg, Dieter R. Brill, “Speed of Sound Using Lissajous Figures”, *The Physics Teacher*, Vol. 43, No. 1, pp. 36-39, 2005.
31. Jung-Bog Kim, Eun-Taek Kim, Ki-Hyun Nam, Soon-Sin Kwon, “Does Sound Wave Go Faster in More Dense Matter?”, *School Science Journal*, Vol. 1, No. 2, pp. 51-57, 2007.
32. Oohashi, Tsutomu, Emi Nishina, Manabu Honda, Yoshiharu Yonekura, Yoshitaka Fuwamoto, Norie Kawai, Tadao Maekawa, Satoshi Nakamura, Hidenao Fukuyama, Hiroshi Shibasaki, “Inaudible High-Frequency Sounds Affect Brain Activity: Hypersonic Effect”, *Journal of Neurophylogy*, Vol. 83, No. 6, pp. 3548-3558, 2000.
33. Timothy J. Mason, “Ultrasound in synthetic organic chemistry”, *Chemical Society*

- Reviews, Vol. 26, pp. 443-451, 1997.
34. So-Jung Kim, Donggiun-Kim, Jong-bum Park, Taek-Kyun Lee, “Phenolic Content, ”DPPH Radical Scavenging, and Tyrosinase Inhibitory Activities of Ecklonia cava Extracted with the Ultrasonic Wave Metho”, Journal of Life Science, Vol. 23, No. 7, pp. 913-918, 2013.
35. Xiao Tan, Danfeng Zhang, Keshab Parajuli, Sanjina Upadhyay, Yuji Jiang, Zhipeng Duan, “Comparison of Four Quantitative Techniques for Monitoring Microalgae Disruption by Low-Frequency Ultrasound and Acoustic Energy Efficiency”, Environ. Sci. Technol., Vol. 52, No. 5, pp. 3295-3303, 2018.
36. John Scheffler, "Underwater Habitats", Illumin., Vol. 9, No. 4, 2007.
37. Min-Sook Kang, Sang-Jun Sim, and Hee-Jeong Chae, “Chlorella as a Functional Biomaterial”, Korean J. Biotechnol., Vol. 19, No. 1, pp. 1-11, 2004.
38. Myeong-Gwon Bae. “A Study on the Cell Disruption of Microalgae using Ultrasound sonication”, Chosun university, Master’s thesis, 2020.