

저주파 초음파를 이용한 미세조류 파쇄

배명권*, 최준혁*, 박종락**, 정상화*,#

*조선대학교 기계공학과, **조선대학교 광기술공학과

Cell Disruption of Microalgae by Low-Frequency Non-Focused Ultrasound

Myeong-Gwon Bae*, Jun-Hyuk Choi*, Jong-Rak Park**, Sang-Hwa Jeong*#

*Department of Mechanical Engineering, Chosun Univ., **Department of Photonic Engineering, Chosun Univ.

(Received 11 October 2019; received in revised form 11 November 2019; accepted 18 December 2019)

ABSTRACT

Recently, bioenergy research using microalgae, one of the most promising biofuel sources, has attracted much attention. Cell disruption, which can be classified as physical or chemical, is essential to extract functional ingredients from microalgae. In this study, we investigated the cell disruption efficiency of *Chlorella sp.* using low-frequency non-focused ultrasound (LFNFU). This is a continuously physical method that is superior to chemical methods with respect to environmental friendliness and low processing cost. A flat panel photobioreactor was employed to cultivate *Chlorella sp.* and its growth curve was fitted both with Logistic and Gompertz models. The temporal change in cell reduction by cell disruption using LFNFU was fitted with a Logistic model. The experimental conditions that were investigated were the initial concentration of microalgal cells, relative amplitude of output ultrasound waves, processing volume of microalgal cells, and initial pH value. The optimal conditions for the most efficient cell disruption were determined through the various tests.

Key Words : Cell Disruption(세포파쇄), Microalgae(미세조류), Ultrasound(초음파), Cell Membrane(세포막), Logistic Model(로지스틱 모델)

1. 서 론

최근 세계적으로 크게 부각되고 있는 바이오 연료 중 지질 함량이 풍부한 미세조류(microalgae)를 이용한 제3세대 바이오 에너지에 대한 연구가 국내외적으로 활발히 진행되고 있다. 미세조류는 광·독립 영양 미생물

로 필요한 양분을 무기질로 합성하여 유용물질을 생산하는 에너지원이며, 또한 지구온난화의 원인인 이산화탄소 문제를 해결할 수 있는 에너지원으로 주목받고 있다. 미세조류로부터 유용물질을 얻기 위해서는 수확 과정이 필요하며, 그 과정에는 세포막 파쇄 공정이 필수적이다. 세포막 파쇄 공정에는 크게 기계적 방법과 비기계적 방법이 사용된다. 세포 파쇄 방법에 대한 분류는 Fig. 1에 도식화하여 나타내었다.

먼저 기계적 방법으로는 비드 밀링법(bead milling),

Corresponding Author : shjeong@chosun.ac.kr

Tel: +82-62-230-7178

고압 균질화법(high pressure homogenizing), 전자기 펄스법(pulsed electro magnetic), 및 초음파 처리법(sonication)등이 있으며, 비기계적 방법 중에서는 효소가수 분해법(enzyme hydrolysis)과 초임계 이산화탄소 추출법(super critical CO₂ extraction)이 주로 사용된다^[1].

일반적으로, 기계적인 방법은 미세조류의 단백질 구조 상태를 잘 유지할 수 있으나 처리 과정이 복잡하고, 장비 가격 또한 매우 고가이며 유지 보수 관리 비용이 많이 소요된다. 비기계적 방법은 대량 수확과 경제적으로 수확할 수 있는 이점이 있으나, 세포 파쇄 과정에서의 화학적 공정 처리로 인해 환경에 치명적인 오염을 유발할 수 있으며, 화학적 처리 과정 중에 단백질 구조에 영향을 미치며 처리 후에 정화 과정이 필요하다는 단점을 가지고 있다. 그러나 기계적인 방법 중 하나인 초음파 처리 방법은 기존의 다른 기계적 방법에 비교하여 과정이 단순하며, 경제적인 대량수확이 가능하고, 미세조류를 친환경적으로 파쇄 할 수 있다는 장점들을 가지고 있다. 또한, 초음파 처리 방법은 연속 및 자동화 시스템이 가능한 이점을 가지고 있다. 초음파 처리 방법에는 크게 저주파(~20 kHz)와 고주파(3~30 MHz)를 이용하는 방법이 있다.

본 연구에서는 후처리 비용이 많이 들고, 환경에 치명적인 영향을 주는 화학적 공정을 대신하고, 일반적인 기계적 방법과 다르게 처리 과정이 간단하고, 대량수확이 가능한 친환경적인 공정인 초음파를 이용하여 미세조류 세포막을 파쇄하는 연구를 수행하였다.

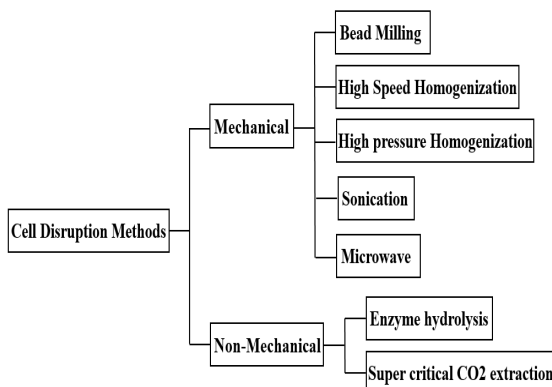


Fig. 1 Classification of the cell disruption methods

파쇄 공정에 사용된 미세조류는 평판형 광생물반응기에서 배양된 미세조류를 사용하였고, 미세조류의 성장 환경을 제어하기 위해 배양기 내에 센서를 배치하여 계측한 결과를 바탕으로 성장곡선을 모델링하였다.

최적의 성장 조건에서 배양된 *Chlorella sp.*를 저주파 초음파를 이용하여 세포막을 파쇄하는 실험을 수행하였다. 먼저, 최적의 성장을 위한 조도 조건을 실험적으로 구하였고, 초음파 장치의 최적의 파쇄 효율 조건을 구하기 위해 후속 실험을 수행하였다. 후속 실험의 변수 값으로는 초기 균체 농도, 초음파 출력 파워, 초기 균체 용량, 균체의 pH값 등 네 가지를 선택하였으며, 실험계획법을 이용하여 가장 좋은 파쇄 효율을 구하기 위한 연구를 수행하였다.

2. 미세조류 *Chlorella sp.* 배양 및 성장곡선 분석

2.1 균주 및 배지액

실험에 사용된 미세조류는 평판형광생물반응기에서 배양된 *Chlorella sp.*를 균주로 사용하였고, 배양에 사용된 배지는 고압 멸균기를 이용하여 121°C에서 20분 동안 멸균하여 냉각시킨 TAP(Tris-Acetate-Phosphate) media를 사용하였다.

2.2 성장 곡선

평판형광생물반응기에서 미세조류 성장에 영향을 주는 변수 중 하나인 조도 값에 따른 최적의 성장률을 구하기 위해 조도센서를 부착하여 계측하였고, 평균 17일 동안 네 가지의 조도 조건에서 *Chlorella sp.*를 배양하였다. 세포 내 산란도가 가장 높은 680 nm파장에서의 광학밀도(@OD680)를 측정하여 Fig. 2에 나타내었다. 실험 결과 네 가지 종류의 조도 변화 중 최대 광학밀도(@OD680)는 조도 값 8,000 lux 근방에서 4.33으로 측정되었고, 이때 성장률이 가장 좋은 것으로 측정되었다.

2.3 회귀 모델

평판형광생물반응기에서 조도 값의 변화에 따른 *Chlorella sp.* 성장 실험을 수행한 결과, 성장 속도가 가

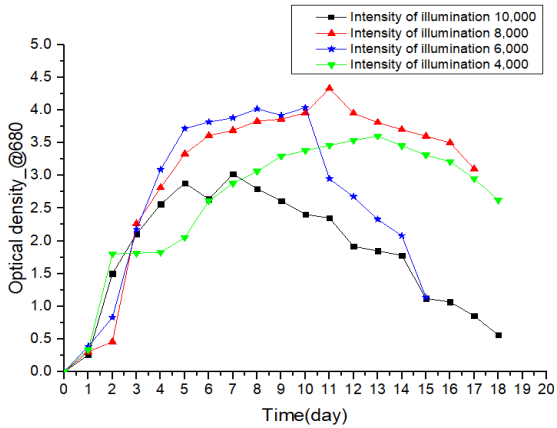


Fig. 2 Typical growth curve of *Chlorella sp.*

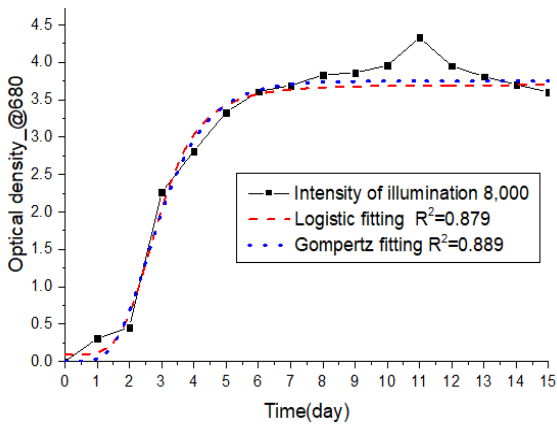


Fig. 3 Logistic and Gompertz models for optical density

장 빠르고, 성장 기간이 제일 긴 조도 값은 8,000 lux로 나타났으며, 이 조도 값에서 수학적 근사 모델을 이용하여 비성장 속도(specific growth rate)를 예측하였다^[2]. 균주에 대한 성장 모델은 Table 1에 나타낸 바와 같이 Logistic 모델과 Gompertz 모델을 사용하여 근사화하였다. 여기에서, a, b, c는 수학적 파라미터이고, A는 최대 개체 수, μ_m 는 비성장 속도, 그리고 λ 는 지체 시간이다. 광주기 값이 24:0인 상태에서 배양하여 측정된 광학 밀도(@OD680)값의 데이터를 기반으로 성장곡선을 근사화하였고, 근사화한 모델을 Fig. 3에 나타내었다.

Table 1 Sigmodal regression model for biological growth curve

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	$y = a \exp[-\exp(b-cx)]$	$y = A \exp^{-\exp\left(\frac{\mu_m c}{A}(\lambda-t)+1\right)}$

modified equation $e = \exp(1)$

3. Low Frequency Non-Focused Ultrasound System

3.1 저주파장치 구성

미세조류는 종류에 따라 세포막이 효율적으로 파쇄되는 초음파 주파수 영역이 서로 다르며 그에 맞는 주파수 영역의 선택은 매우 중요하다. 미세조류 *Chlorella sp.*의 최적의 파쇄 효율을 연구하기 위해 본 실험에 사용된 저주파 장치(Low Frequency Non-Focused Ultrasound, LFNFU)는 500 Watts, 20 kHz의 범위에서 사용되도록 제작되었다. Fig. 4에 개략적인 저주파 파쇄장치 시스템을 나타내었다.

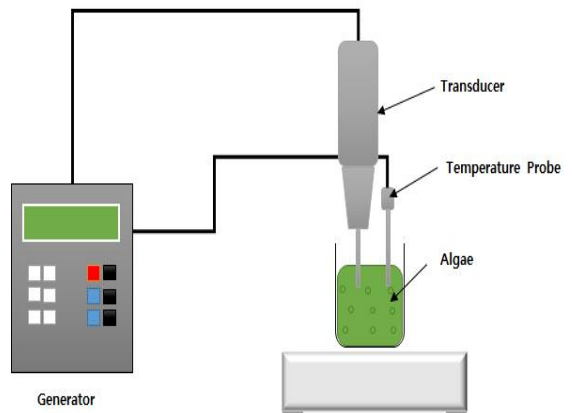


Fig. 4 Schematic diagram of low frequency non-focused ultrasound

3.2 초음파 파쇄 실험조건

저주파 장치를 이용하여 미세조류 파쇄 효율을 연구하기 위해 초기 균체 농도(microalgae concentration), 초기 균체 용량(capacity), 출력 파워, 균체 pH값 등 네 가지의 변수를 변화시키면서 각 변수가 파쇄 효율에 미치는 영향을 실험을 통하여 연구하였다. 변수들의 실험 범위는 Table 2에 나타내었다. 초기 균체 농도의 값 Level (5)와 초기 균체 용량 값의 Level (4)와 (5)는 파쇄 효율에 미치는 영향이 아주 작으므로 생략하였다.

Table 2 Level of parameters in sonication process

Parameter	Microalgae concentration	Capacity	Power	pH
Unit	OD680	ml	W(Ampl)	-logCH+
Factor	X_1	X_2	X_3	X_4
level (1)	1.546	150	40	3.17
level (2)	2.574	200	45	5.33
level (3)	3.663	300	50	6.88
level (4)	3.969	-	55	7.95
level (5)	-	-	60	10.11

Table 3 Experiment results using orthogonal array

No.	Concentration	Capacity	Power	pH	Efficiency (%)
1	1	1	3	3	92.64
2	2	1	3	3	97.29
3	3	1	3	3	95.36
4	4	1	3	3	95.87
5	2	1	1	3	95.89
6	2	1	2	3	97.29
7	2	1	3	3	98.70
8	2	1	4	3	99.52
9	2	1	5	3	99.46
10	2	2	5	3	98.21
11	2	3	5	3	92.01
12	4	1	5	1	45.70
13	4	1	5	2	99.21
14	3	1	5	3	98.46
15	4	1	5	4	99.21
16	3	1	5	5	96.74

초음파 파쇄 효율 결과에 대한 비선형 방정식은 식 (1)과 같이 나타낼 수 있다^[3].

$$Y = b_0 + \sum_{i=1}^4 b_i X_i + \sum_{i=1}^4 \sum_{j=1}^4 b_{ij} X_i X_j + \sum_{ii=1}^4 b_{ii} X_i^2 \quad (1)$$

여기서, Y 는 파쇄 효율, X_i 는 각각의 독립변수, b_0 는 초기항, b_i 는 독립변수의 계수, b_{ij} 는 변수의 상관 계수, b_{ii} 는 독립변수 제곱항의 계수를 나타낸다. 직교 배열을 적용하여 총 16가지의 배합 조건에서 실험을 수행하였다.

초음파 파쇄 실험 횟수 및 파쇄 효율 결과는 Table 3에 직교 배열표를 이용하여 나타내었다.

그리고 초음파처리에 대한 세포 파쇄 효율은 식 (2)와 같이 나타낼 수 있다^[4].

$$\eta = \left(1 - \frac{C_t}{C_0}\right) \times 100 (\%) \quad (2)$$

여기서, C_0 은 초기 세포 농도이며, C_t 는 t 분 동안 초음파 처리된 후의 세포 농도이다.

4. 실험 결과

4.1 초기 균체농도

평판형광생물반응기에서 배양한 *Chlorella sp.*의 초기 균체 농도에 따라 저주파를 이용하여 세포막 파쇄 실험을 수행하였다. 초기 균체 농도에 따른 파쇄 효율 변화를 Fig. 5에 나타내었다. 균체의 성장이 비교적 작은 초기 균체 농도가 1.54일 때, 초음파 처리 과정 중 다른 실험 조건보다 가장 짧은 시간에 높은 세포 파쇄 효율을 보였으나, 초음파 조사 시간이 경과됨에 따라 다른 조건들에 비해 낮은 파쇄 효율 결과를 나타내었다. 가장 높은 성장과 높은 광합성도 값을 나타낸 농도 3.66과 3.96의 경우에 두 변수가 비슷하게 초기 조사 시간에는 높은 농도로 입자의 인력이 강해 다른 조건에 비해 파쇄 효율이 떨어졌으나, 초음파 조사 시간이 경과 할수록 인력이 약해져 점차 파쇄 효율이 증가하는 결과를 나타내었다.

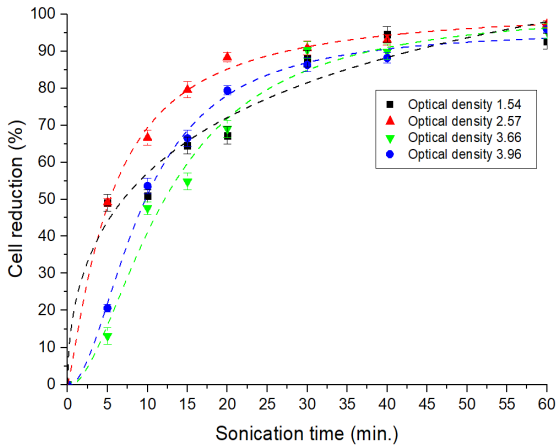


Fig. 5 Cell reduction variation according to initial OD value

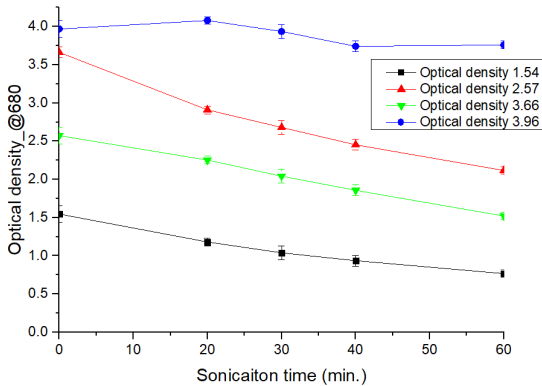


Fig. 6 Optical density variation during sonication for initial OD experiment

네 가지 실험 중에서 중간의 성장과 광학밀도를 가진 OD 2.57에서 가장 빠르고 높은 파쇄 효율을 나타내었으며, 초음파 조사 시간이 경과하여도 가장 높은 파쇄 효율을 나타내었다. 초음파를 조사하여 파쇄를 진행 중에 균체 광학밀도 변화 과정을 Fig. 6에 나타내었다. 초음파 조사 시간이 경과함에 따라 대부분 균체의 광학 밀도 값이 감소하는 결과를 나타내었다. 가장 높은 성장과 광학밀도를 나타낸 농도 3.96에서는 균체의 밀집도로 인하여 초음파 조사 후에도 균체 농도 변화가 다른 초기 균체 농도에 비해 미미하게 변화하였다.

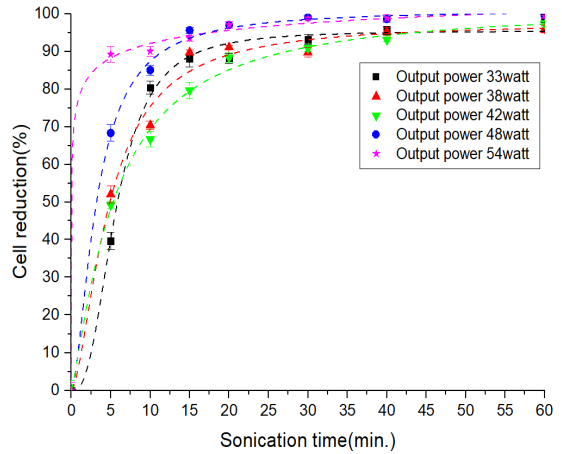


Fig. 7 Cell reduction according to output power

4.2 초음파장치의 출력파워

초기 균체 농도가 파쇄 효율에 미치는 영향에 대하여 실험한 결과 가장 높은 파쇄 효율과 균체 농도의 변화를 나타낸 광학 밀도(OD) 2.57값을 고정 변수로 하였으며, 초음파 장치의 출력 파워 변화에 따른 파쇄 효율을 분석하기 위해 다섯 가지 출력 파워 값에 따른 실험을 수행하였다. Fig. 7에 초음파 장치의 출력 파워에 따른 세포 파쇄 효율을 나타내었다.

실험 결과 모든 출력 파워 조건에서 초음파 조사 시간 10분 이내에 급격한 파쇄 효율의 증가가 나타났다. 출력 파워 값이 비교적 낮은 33 W(40%) ~ 42 W(50%)의 경우 초기 초음파 조사 시간부터 최종 60분의 조사 시간이 경과 할 때까지 낮은 파쇄 효율을 나타내었다. 그에 비해 가장 높은 54 W(60%)의 출력 파워의 경우 초기 조사 시간부터 최종 60분의 조사 시간까지 가장 높은 파쇄 효율을 나타내었다. 출력을 54 W(60%)이상 초과하여 주었을 경우에는 초음파장치 프루브 팁(probe tip)의 온도가 갑자기 상승하여 파쇄 시스템에 오버로드가 발생하였다. 총 다섯 가지의 실험 조건에서 초음파 조사 시간 20분이 경과 한 이후에는 모든 조건에서 세포 파쇄 효율이 80% 이상 나타나는 양호한 결과를 나타내었으며, 출력 파워 값이 54 W(60%)에서 초기 조사 시간부터 세포 파쇄 효율이 눈에 띄게 증가하는 결과를 나타내었다.

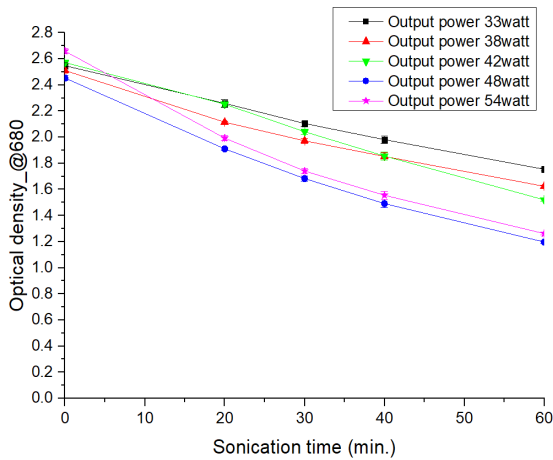


Fig. 8 Optical density variation during sonication for output power experiment

Fig. 8에 장치의 출력 파워 값에 따른 초음파 조사 중 광학밀도의 변화를 나타내었다. 출력 파워 값에 대한 균체의 광학 밀도의 변화량은 모든 조건에서 초음파 조사 시간이 경과함에 따라 점차 감소하였고, 가장 높은 파쇄 효율을 나타낸 54 W(60%)에서 균체의 광학 밀도 변화 값도 비례하여 가장 크게 변화하는 결과를 나타내었다. 파쇄 효율이 높은 48 W(55%) ~ 54 W(60%)의 구간에서는 균체의 광학 밀도 값도 크게 감소하여 파쇄가 비교적 잘 이루어졌음을 알 수 있다.

4.3 초기 균체용량

최적의 파쇄 효율 조건을 구하기 위해 초기 균체 농도에 대한 최적의 조건인 광학 밀도 2.57과 초음파 장치의 출력 파워에 대한 최적 조건인 54 W(60%)의 결과 값을 고정 하여 최적의 파쇄 효율을 나타내는 용기 내의 초기 균체 용량 조건을 구하기 위해 실험을 수행하였다.

Fig. 9는 초기 용량 변화에 따른 파쇄 효율을 나타내었다. 실험 결과 용기 내의 초기 균체 용량을 150 ml로 파쇄공정을 진행할 경우에 파쇄 초기부터 파쇄 효율이 급격히 증가하였고, 초기 용량이 200 ml와 300 ml로 증가 시켰을 경우 현저히 낮은 파쇄 효율 결과를 나타내었다.

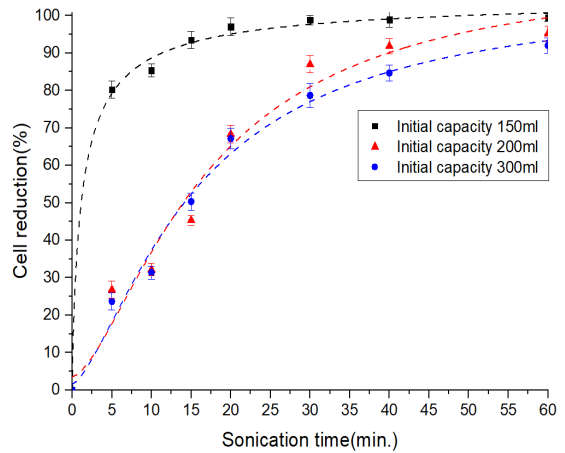


Fig. 9 Cell reduction according to initial sonication volume

4.4 균체의 pH 값

일반적으로 저온에서 보다 고온에서 산과 염기 처리(Acid & Alkali treatment)를 하였을 때 세포벽 구조가 유연해져 세포 파쇄에 영향을 미친다. 균체 내의 산과 염기 처리를 하였을 때 균체의 pH 값 변화에 따라 세포 파쇄 효율에 어떠한 영향을 미치는지에 대해 실험을 수행하였다. pH 5.33 ~ 10.11 범위에서 네 가지 종류의 조건에서 실험을 수행하였다.

Fig. 10에 파쇄 중 균체의 pH값의 변화에 따른 세포 파쇄 효율을 나타내었다.

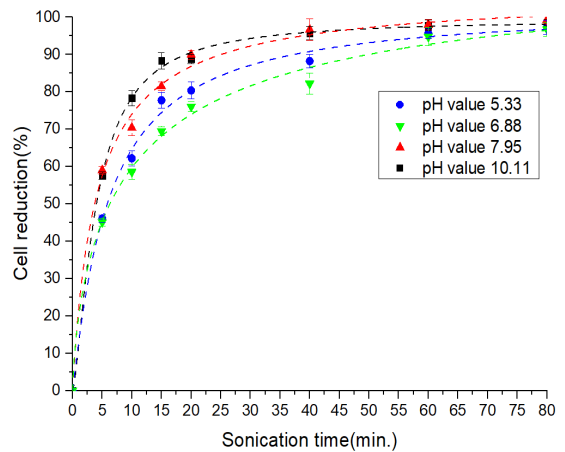


Fig. 10 Cell reduction according to pH value

균체의 pH값이 염기를 띄었을 경우에 세포막이 유연해져 세포 파쇄 효율이 증가하였고, 강염기인 pH 10.11의 경우 초음파 처리 초기에 가장 급격한 파쇄 효율을 나타내었지만, 초음파 처리시간이 경과함에 따라 파쇄 효율은 중성인 구간보다 낮은 파쇄 효율을 나타내었다. 산성의 경우에는 세포막이 단단해져 파쇄 효율이 낮아졌으며, 파쇄 효율에 따라 광학밀도 변화량도 현저히 낮아지는 결과를 나타내었다. 가장 높은 파쇄 효율은 중성 구간인 pH 7.95의 범위구간에서 가장 높은 결과를 나타내었다. Fig. 11에 균체의 각 초기 pH값에서 초음파 조사 중의 광학밀도 변화를 나타내었다. pH값에 따른 초음파 조사 과정에서 염기를 띄었을 경우 파쇄 효율이 증가하였는데, 이 경우 균체의 광학밀도 또한 크게 감소하였다. 강산성(pH 5.33) 경우에는 세포막 단백질의 구조변화로 인하여 광학밀도의 변화가 현저히 낮아지는 결과를 나타내었다.

초기 균체의 농도, 출력 파워, 초기 용량, pH의 네 가지의 변수에서 초음파 장치를 이용한 세포 파쇄 효율에 대해 최적의 조건을 찾는 실험을 수행하였고, 초기 pH에 대한 실험 결과를 제외한 나머지 3가지 조건에 대해 모든 결과 값이 초음파 조사 시간이 30분이 지난 후에는 파쇄 효율이 75%가 넘는 양호한 결과를 나타내었다. Fig. 12는 최대 효율을 나타낸 직교배열표 Table 3에서 No. 9의 조건에서 실험한 세포 파쇄 결과를 시간에 따라 촬영한 현미경 사진이다.

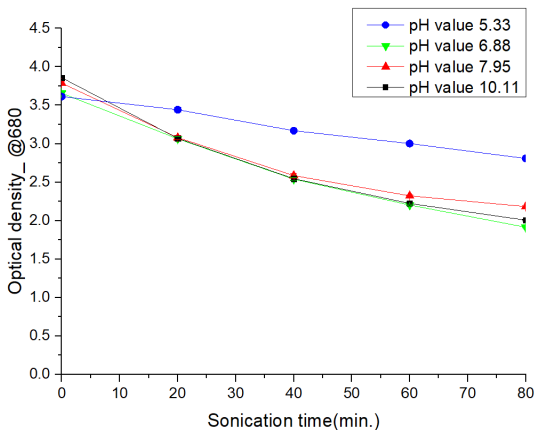


Fig. 11 Optical density variation during sonication for pH experiment

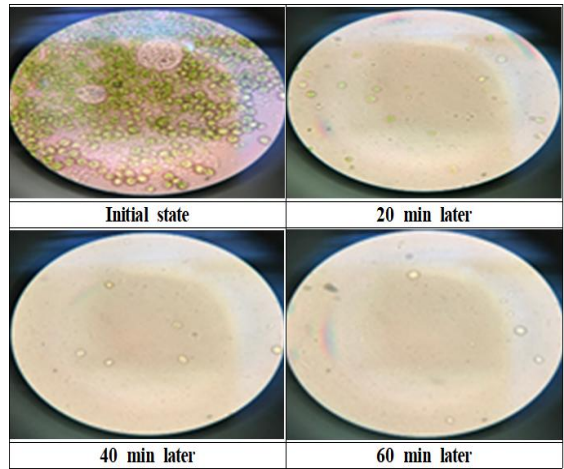


Fig. 12 Photomicrograph of cell variation during ultrasonic sonication processing

5. 결론

평판형광생물반응기에서 TAP media를 사용하여 배양된 미세조류 *Chlorella sp.*에 대해 최적의 성장 곡선을 측정하고, 회귀 모델을 통하여 미세조류의 성장률을 근사화하였다. 최적의 조도 조건을 먼저 결정하였고, 초기 균체 농도, 초음파 출력 파워, 초기 균체 용량, 균체의 pH값 등 네 가지 변수를 변화시키며 초음파 장치의 최적의 파쇄 효율 조건을 구하는 실험을 수행하였다. 본 논문의 결론을 정리하면 다음과 같다.

1. 총 17일 동안 평판형광생물반응기에서 배양한 *Chlorella sp.* 성장곡선을 모델링 하였다. 총 네 가지 조건의 조도 값에서 각각 세포 농도와 광학 밀도를 측정하여 비교하였고, 그 결과 조도 8,000 lux에서 가장 높은 성장률을 나타내었으며 균체의 최대 광학밀도 값은 4.33이 관찰되었다.
2. 가장 높은 성장률을 나타낸 조도 8,000 lux에서 배양된 *Chlorella sp.*의 비성장률(specific growth rate)을 예측하기 위해 Logistic 모델과 Gompertz 모델 2가지의 모델을 사용하여 성장 모델을 근사화하여 성장모델을 예측하였다.
3. 배양된 *Chlorella sp.*를 사용하여 초기 균체 농도에

대한 초음파 파쇄 실험을 수행하였고, 실험 결과 네 가지 조건 중에서 초기 광학밀도 2.57의 구간에서 가장 높은 파쇄 효율을 나타내었다.

4. 초음파 장치의 출력 파워에 따른 파쇄 효율 실험을 수행한 결과 모든 조건에 대해서 초음파 조사 30분 이후에는 파쇄 효율이 80% 이상으로 양호한 결과를 나타내었다. 높은 출력 값인 54 W(60%)에서는 급격하게 세포 파쇄 효율이 증가하였고, 세포 파쇄 효율에 가장 큰 영향을 주는 변수로 판단하였다.
5. 실험에 사용된 초음파 장치의 최적의 균체 용량에 대해 실험을 수행하였고, 초기 균체 용량이 150 ml일 때 가장 높은 파쇄 효율 결과를 나타내었다.
6. 초기 균체의 산과 염기 처리가 세포막 파쇄에 어떠한 영향을 미치는지 알아보기 위해 다섯 가지의 조건으로 실험을 수행한 결과, 균체의 pH의 값이 염기성을 띠었을 경우 산성의 경우 보다 세포막이 유연해져 파쇄 효율이 높아지는 결과를 나타내었고, 파쇄 효율에 따라 광학밀도 변화량도 비례하게 변화하는 결과를 나타내었다.

후 기

“이 논문은 2019년 한국연구재단의 이공학 개인 기초 연구지원사업의 지원을 받아 수행되었음. (Grant No. 2018R1D1A1B07047810).”

REFERENCES

1. Gunerken, E., D'Hondt, E., Eppink, M. H. M., Garcia-Gonzalez, L., Elst, K. and Wijffels, R. H. “Cell disruption for microalgae biorefineries”, *Biotechnology Advances*, Vol. 33, No. 2, pp. 243-260, 2015.
2. Kim, J. H., Yoon, C. M. and Jeong, S. H., “On-off Control for Continuous Culture of Microalgae in Flat Panel Photobioreactor”, *Journals of Korean Society of Manufacturing Technology Engineers*, Vol. 25, No. 3, pp. 237-243, 2016.
3. Kim, S. B. and Jeong, S. H., “Continuous Microalgae Separation Process Using Ultrasonic Waves”, *Journal of Korean Society of Manufacturing Technology Engineers*, Vol. 24, No. 4, pp. 407-413, 2015.
4. Tan, X., Zhang, D., Parajuli, K., Upadhyay, S., Jiang, Y. and Duan, Z., “Comparison of Four Quantitative Techniques for Monitoring Microalgae Disruption by Low-Frequency Ultrasound and Acoustic Energy Efficiency,” *Environmental Science & Technology*, Vol. 52, No. 5, pp. 3295-3303, 2018.
5. Kim, G. H., Ahn, D. G., Park, J. R., Choi, G. H., Kim, J. T., Kim K. W. and Jeong, S. H., “Bioprocess control for continuous culture of *Dunaliella salina* in flat panel photobioreactor”, *Journal of the Korean Society for Precision Engineering*, Vol. 30, No. 2, pp.137-142, 2013.
6. Kim, J. H. and Jeong, S. H., “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.