

Scenedesmus sp.로부터 Taguchi 법을 이용한 지방추출의 최적화

김나영 · 오성호¹ · 최운용¹ · 이현용¹ · 이신영*

강원대학교 생물공학과, ¹강원대학교 바이오산업공학부

Optimization of Lipid Extraction from *Scenedesmus* sp. Using Taguchi Approach

Na-Young Kim, Sung-Ho Oh¹, Woon Yong Choi¹, Hyeon-Yong Lee¹, and Shin-Young Lee*

Department of Bioengineering and Technology, Kangwon National University

¹School of Biotechnology and Bioengineering, Kangwon National University

Abstract For the biodiesel fuel production from microalgae, the lipid from wet and dry samples of green algae *Scenedesmus* sp. was extracted by using various solvents and pre-treatment methods. Extraction yield of the lyophilized sample was better than that of dry sample. Chloroform/methanol (2 : 1, v/v) and ultrasonication or homogenization method were also selected as the most effective solvent and pre-treatment methods for lipid extraction, respectively. Under these constraint conditions, optimization experiment of lipid extraction was investigated by Taguchi approach using orthogonal matrix L₉ (3⁴) method. The optimum extraction conditions of lipid extraction was obtained at pre-treatment of homogenization, extraction time of 5 hour, temperature of 35°C, and solvent ratio of 1 : 20 (w/v). Yield of extraction at optimized condition was 20.55% and it was 96% of total lipid content (21.38%) of *Scenedesmus* sp.

Keywords: *Scenedesmus* sp. lipid extraction, optimization, Taguchi method

서 론

최근 triglyceride oil과 monohydric alcohol의 전이에스테르반응에 의해 얻어지는 바이오디젤 (지방산의 monoalkyl esters)은 비독성 및 생분해성의 친환경적 대체연료로서 널리 인식되었으며, 이에 대한 학술적 및 산업적 관심이 매우 고조되고 있는 실정이다 [1-4].

따라서 각종 농작물, 동물성 유지 및 조류의 지질로부터 바이오디젤 생산에 관한 연구가 널리 수행되고 있는데, 이중 미세조류는 바이오디젤 생산을 위한 가장 유망한 자원의 하나로 부각되고 있다 [5-8].

미세조류로부터의 바이오디젤 생산을 위한 에너지 전환 공정은 크게 미세조류 biomass의 생산, biomass의 수확 및

오일 추출과정, 추출오일의 전이에스테르 반응에 의해 이루어진다 [9]. 이 중 미세조류로부터의 지질추출공정은 비용이 많이 들며, 논쟁이 되고 있는 공정의 하나로 높은 지방생산성과 함께 바이오디젤 생산의 bottleneck이라 할 수 있다 [10-12]. 그러므로 미세조류로부터의 바이오디젤화를 위해서는 먼저 간편하면서도 효율적인 추출방법 및 이에 의한 수율향상의 선행연구는 반드시 이루어져야 한다.

한편, *Chlorococcales*목의 *Scenedesmaceae*과에 속하는 *Scenedesmus* sp.는 담수 및 해양에 널리 분포하는 녹조류로서 지질함량이 높아 (16~40%)나 되어 바이오디젤의 대표적인 우수 공급원의 하나로 알려지고 있다 [13]. 하지만 *Scenedesmus* sp.에 대한 연구는 다른 미세조류에 비하여 매우 미흡하며, 특히, 높은 지방의 축적에도 불구하고 이들 지방의 추출관련 연구는 별로 보고된 바가 없다.

그동안 미세조류의 지질추출법으로는 Expeller/Press법, solvent oil 추출법, 초임계추출법 및 효소추출법, 삼투충격, ultrasonic assisted extraction 등의 기타 방법이 사용되

*Corresponding author

Tel: +82-33-250-6273, Fax: +82-33-243-6350

e-mail: sylee@kangwon.ac.kr

었다 [9,10-12,14].

Expeller/Press법은 추출수율이 70~75%에 불과하며, 용매추출과의 조합으로 실시된다. CO₂를 이용한 초임계유체 추출은 초임계 추출조건을 유지하기 위해 필요한 고압장치의 비용이 현저하게 높아서 그 응용이 제한되며, 주로 고부가가치 및 저용량 물질에 한정된다. 초음파의 사용은 몇몇 고액 추출공정에서 추출수율 및 물질전달속도를 증가시키거나 그 효과는 국부적이고 대량용량에의 적용은 에너지적으로 비효율적이다. 고압수증기처리와 같은 삼투충격 역시 느린 공정이고, 대량의 수증기를 필요로 하며, 효소추출법은 용매로서 작용하는 물과 함께 세포벽을 분해하는 효소를 사용하며, 오일의 분획은 쉬우나 용매추출공정보다 훨씬 더 비경제적이다 [10-12,15].

따라서 현실적으로 범용의 추출법은 안전성의 문제에도 불구하고 높은 추출수율 (95~99%)을 얻을 수 있는 고액 용매추출법이다 [11,16]. 주로 사용되는 용매추출법은 세포벽이 없는 animal tissue에서의 지질추출에 널리 유효하게 사용되어 왔다 [17,18]. 하지만 식물세포나 *Scenedesmus* sp.와 같은 microalgae는 세포벽이 존재하고 이들이 용매추출의 율속단계로 작용하므로 효율적 추출이 어려운 것으로 알려지고 있다 [19]. 따라서 간편하면서도 효율적인 추출 용매와 전처리 방법 및 이에 의한 수율향상을 위한 추출관련 연구의 필요성이 매우 높은 실정이다.

그동안 추출 최적화에 있어서는 하나의 변수를 고정시켜 놓고, 다른 여러 변수들을 차례로 변화시키는 방법인 one-factor-at-a-time method [20]가 널리 사용되었다. 하지만 이 방법은 변수들의 상호작용 및 중요변수에 대한 해석이 불가능하고 실험횟수가 매우 많아지는 단점이 있다. 따라서 최근에는 이러한 단점을 극복하기 위한 최적화 방법으로서 Taguchi법, 반응표면분석법 등의 통계적 실험법이 널리 이용되고 있다. 이중 직교배열법의 원리를 이용한 Taguchi법은 실험적 오차와 실험횟수를 줄일 수 있으며 추출요인의 기여도 및 상호관계를 쉽게 알 수 있고, 최적 추출조건을 확립할 수 있어, 지방의 추출 최적화에도 검토의 필요성이 높다 [21,22].

본 연구에서는 해양 녹조류의 일종인 *Scenedesmus* sp. 균주를 바이오디젤의 원료로 사용하기 위한 자료를 구축하기 위해 아직 표준방법이 확립되어 있지 않은 이 균주의 지질 추출에 미치는 효율적 추출용매와 전처리 방법을 탐색, 조사하였다. 아울러, 이에 근거하여 4요인 (온도, 시간, 용매비, ultrasonication or homogenization) 및 3수준 (level 1, 2, 3)의 Orthogonal matrix L₉(3⁴)법을 이용한 Taguchi법에 의해 최대의 지질수율을 얻을 수 있는 추출최적화를 실시하였다.

재료 및 방법

재료

본 실험의 균주는 *Scenedesmus* sp.이며, 조절된 조건하에

서 배양하여 원심분리 (3000 rpm, 10 min)로 균체를 수확한 후 동결건조 다음 분쇄 (100 mesh)한 것을 한국해양수산 연구원에서 제공받아 실험에 사용하였다. 동결건조시료는 밀봉하여 4°C의 냉장실에 보관하면서 실험에 사용하였다.

용매의 선정 및 추출횟수의 결정

추출용매를 선정하기 위해 용매추출법에서 널리 사용되는 5가지 용매 (acetone, chloroform/methanol (2 : 1, v/v), ethanol 및 hexane/ether (1 : 1, v/v), hexane)를 사용하여 각 용매별 추출수율을 측정하였다. 사용된 모든 시약은 특급시약 (Special grade, Carlo Erba Reagenti Co. Ltd.)이었다. 시료는 동결건조 후 분쇄된 건조시료와 동결건조 후의 분쇄시료를 용기에 넣고 증류수에 재현탁시킨 습시료의 두가지를 사용하였다. 재현탁은 증류수 (1 : 10, w/v)로 실온에서 자석교반기 (Digital hot plate/stirrer 046644-Series, Cole-Parmer, Vernon Hills Illinois, USA)에 의해 12시간 동안 교반 (400 rpm)하여 얻었으며, 재현탁 시료의 수분함량은 약 67.9%이었다. 추출은 동결건조시료 적당량 (1 g)을 회분식 추출용기에 넣고 용매 50 mL을 첨가하여 상온에서 24시간 동안 교반 (400 rpm)하여 추출한 후 추출 혼합액을 여지 (Advantec, No. 2)로 여과하고 건조중량을 측정하였다. 재현탁 시료의 경우는 수분함량을 고려하여 시료 건조중량과 용매의 비율이 1 : 50 (w/v)이 되도록 시료를 측정량한 다음, 용매를 첨가하고 상온에서 24시간 동안 교반하여 추출한 후 원심분리 (5000 × g, 20 min)하였고, 여지 (Advantec, No. 2)로 여과한 다음 건조중량을 측정하였다. 한편, 추출횟수는 우수 추출용매로 선정된 chloroform/methanol (2 : 1, v/v) 용매와 추출수율이 높았던 동결건조 시료를 사용하여 상기와 같은 방법으로 2회 및 3회 반복 추출하고 횟수별 수율을 측정하여 결정하였다.

전처리 방법의 선정

전처리는 시료를 microwave, ultrasonication 및 homogenization 방법을 이용하여 전처리한 후, 상기방법으로 1회 용매추출하고 수율을 조사하였다. Microwave 처리는 microwave oven (Mr-216mr, Gold Star, Korea)을 사용하여 동결건조 시료 및 이 시료에 증류수를 첨가 (수분함량 52.4%)한 시료를 넣고 5분 동안 처리 (2450 MHz)하였으며, ultrasonication 처리는 sonicator (Bransonic 5210, USA)를 이용하여 conical tube에 시료와 용매를 적정비로 넣은 후 10분간 (47 kHz) 처리하였다. 또한 homogenization 처리는 시료를 고압균질기 (high pressure homogenizer-mini 200, Micronox Inc. Korea)를 이용하여 1200 psi의 압력으로 처리하여 사용하였다.

추출시간 및 온도의 결정

추출시간의 영향을 조사하기 위해 상온에서 각 시간별

(5 min~24 h)로 추출 수율을 조사하였다. 이때 추출조건은 시료 1 g을 정확히 칭량한 후 상기 방법에서 최적용매로 선정된 chloroform/methanol (2 : 1, v/v) 용매 30 mL을 넣어 교반기 (400 rpm)로 교반하였으며 상기와 같은 방법으로 추출하였다.

Taguchi법에 의한 지방추출의 최적화실험 설계

지방추출의 최적화는 chloroform : methanol (2 : 1, v/v)를 사용하여 3수준 (low, medium and high level: 1, 2, 3), 4요인 (온도, 시간, 용매비, ultrasonication의 처리시간 혹은 homogenization의 횟수)의 Orthogonal matrix $L_9(3^4)$ 에 의한 Taguchi 법을 사용하여 실험계획하고 (Table 1), 지방을 Fig. 1과 같이 추출한 다음, 수율을 측정하여 실시하였다. 이 때, 직교배열, 자료분석 및 분산분석 (ANOVA)은 Taguchi법에 기초한 MINITAB® 15 software (Minitab Inc.)를 사용하였다.

Table 1. Experimental factors and their levels for orthogonal array design

Level	Temperature (°C)	Time (min)	Solvent ratio (v/v)	Ultrasonication (min)	Homogenization (Frequency)
	A	B	C	D	D
1	25	3	10 : 1	0	0
2	30	4	20 : 1	5	1
3	35	5	30 : 1	10	2

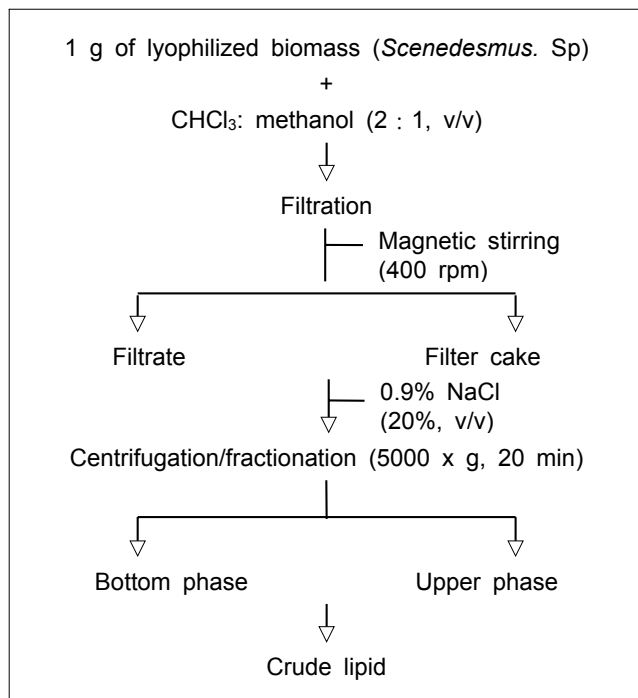


Fig. 1. Procedure for the extraction of lipids from the green microalgae *Scenedesmus. sp.*

결과 및 고찰

용매의 선정 및 반복추출의 영향

미세조류의 지방추출에 사용되는 용매로는 benzene, ether, cyclohexane, chloroform, acetone, methanol, ethanol 등이고, 주로 이들 용매의 한 가지 또는 두 가지 이상을 혼합하여 사용한다 [23]. 이 중 hexane은 극성용매이고 비교적 저렴하지만 고유의 강한 독성이 있다. 또, benzene은 발암물질로 규명된 물질이며, methanol은 독성이 피부를 통해 쉽게 흡수된다는 단점이 있다. 따라서 일반적으로는 Folch법 [17]의 chloroform : methanol (2 : 1, v/v) 용매가 널리 사용된다.

본 연구에서는 이 중에서 5가지 용매 즉, acetone, chloroform/methanol (2 : 1, v/v), ethanol, hexane/ether (1 : 1, v/v), hexane를 사용하여 동결건조된 시료 (수분함량 5%)와 이의 재현탁 습시료 (수분함량 67.9%)의 두 가지 시료에 대해 각 용매별 추출수율을 측정하였으며, 그 결과는 Fig. 2와 같다.

Table 2. Application of $L_9(3^4)$ orthogonal array design to the lipid yield from *Scenedesmus sp.*

Run	A	B	C	D	Lipid yield (%)	
					Ultrasonication	Homogenization
No.1	1	1	1	1	5.65 ± 0.92	4.19 ± 0.46
No.2	1	2	2	2	7.45 ± 1.77	20.04 ± 0.52
No.3	1	3	3	3	9.55 ± 1.77	22.16 ± 0.98
No.4	2	1	2	3	11.55 ± 0.07	19.69 ± 0.78
No.5	2	2	3	1	15.30 ± 1.56	11.17 ± 0.41
No.6	2	3	1	2	14.55 ± 0.49	17.49 ± 0.66
No.7	3	1	3	2	12.55 ± 0.49	20.41 ± 0.72
No.8	3	2	1	3	15.75 ± 0.78	17.41 ± 0.38
No.9	3	3	2	1	14.95 ± 0.49	13.92 ± 0.55

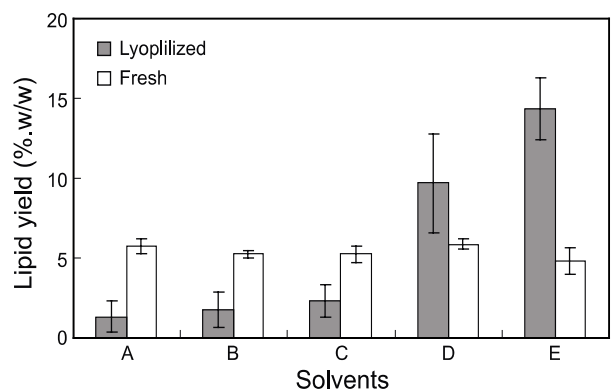


Fig. 2. Comparisons of lipid yield under the five different solvents from lyophilized and reconstituted fresh *Scenedesmus sp.* (A) Acetone, (B) Hexane, (C) Hexane/Ether, (D) Ethanol, (E) Chloroform/Methanol. (2 : 1, v/v).

재현탁 습시료의 추출수율은 4.8~5.8%로 용매에 따른 큰 차이를 보이지 않았다. 반면, 동결건조시료의 추출수율은 용매의 종류에 크게 의존하여 acetone 용매에서는 1.33%의

최저 수율을 나타내었고, chloroform/methanol (2 : 1, v/v) 용매에서는 14.36%로 최고수율을 나타내어 최저 및 최대 수율은 약 10배의 차이를 보였다. 대체로 동결건조시료는 각 용매에서 재현탁 습시료보다 높은 수율을 보였으며, 특히 가장 높은 추출수율을 보였던 chloroform/methanol (2 : 1, v/v)의 경우, 약 3배나 더 높은 추출수율을 보였다. 이와 같이 건조시료가 습시료보다 높은 용매 추출수율을 보이는 것은 다른 연구자들에 의해서도 보고되었으며, 이는 세포표면에 수분이 존재할 경우 수분이 지방과의 상호작용(반발)으로 지방의 용출을 방해하기 때문이라 볼 수 있다 [24].

한편, 최대의 추출수율을 보인 chloroform/methanol (2 : 1, v/v)용매를 사용하여 추출횟수의 증가에 따른 추출수율을 조사한 결과, 자료로 나타내지는 않았으나 추출수율은 1회 추출 시에 가장 높은 16.0%를 나타내었으나, 2회 추출 시에는 2.5%, 그리고 3회 추출 시에는 0.75%에 불과하여 추출횟수의 증가에 따른 수율의 증가효과는 무시될 수 있는 수준이었다. 따라서 추출횟수는 1회가 적합한 것으로 판단하였다.

따라서 이상의 결과에 따라 시료는 동결건조 시료, 그리고 추출용매는 chloroform/methanol (2 : 1, v/v) 용매를 사용하여 1회 추출하는 것이 가장 적합한 것으로 판단하였으며, 이하의 실험에 적용하였다.

전처리별 추출수율

전처리방법은 미세조류의 세포막을 손상시켜 세포내 지방의 추출수율을 높이기 위한 방법이며, 사용되는 전처리 방법에는 autoclaving, bead-beating, microwave, ultrasonication, 그리고 10% NaCl 용액을 이용한 삼투처리방법 등이 알려져 있다 [14,25].

일반적인 용매추출의 경우 열전달은 시료 밖에서부터 안쪽으로 일어나면서 추출물질이 세포내에서 밖으로 이동된다. 하지만 microwave 처리시는 열전달과 물질전달현상이 모두 세포내에서 밖으로 이루어지기 때문에 시료의 추출이 더욱 빠른 시간에 일어난다. 따라서 지방산 조성의 변화나 추출수율의 감소가 거의 없고, 추출시간을 7시간 이상이나 단축할 수 있는 것으로 보고되었다 [26]. 특히, Lee 등 [14]은 microalgae의 lipid 추출 시 여러 가지 전처리와 비교하여 microwave 방법이 비교적 높은 수율을 얻을 수 있다고 하였다. 또 가장 쉽고 간편한 추출전처리 방법이므로 쉽게 scale-up할 수 있어 대량공정으로의 변환이 가능한 방법이라고 보고하였다.

따라서 이 중에서 추출수율의 증가에 영향이 큰 것으로 보고된 microwave, ultrasonication 및 homogenization 방법을 이용하여 5분, 20분 및 5시간 동안 추출하면서 추출수율을 조사, 비교하였으며, 그 결과는 Fig. 3과 같다.

추출시간이 증가함에 따라 각 전처리로 추출수율이 대조구보다 전반적으로 증가하는 경향을 보였다. 하지만 ultrasonication 및 microwave 처리는 무처리구에 비해 매우 미미한 추출수율의 증가를 보였을 뿐이다. 반면,

homogenization의 처리는 짧은 시간인 5분의 추출에서 7%, 그리고 긴 시간인 5시간의 추출에서 11.4%의 추출수율을 보였으며, 이들 값은 no treatment, sonication 및 microwave 처리수율에 비해 5분 추출에서는 5배, 5시간의 추출에서는 약 2.4배 이상의 수율향상을 보이는 결과이었다.

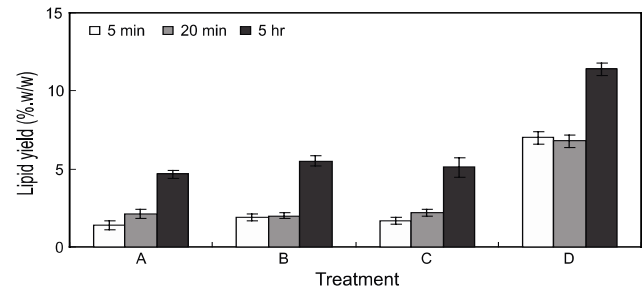


Fig. 3. Comparison of lipid yields under four different treatments from lyophilized *Scenedesmus* sp. (A) No treatment, (B) Ultrasonication, (C) Microwave, (D) Homogenization.

Taguchi법에 의한 지방추출의 최적화

용매추출의 최적화실험은 앞선 실험결과에 따라 동결건조 시료를 사용하고 최적 용매로 선정된 chloroform : methanol (2 : 1, v/v) 용매를 사용하여 다음과 같이 실험하였다. 즉, 지방추출의 최적화를 위해 추출온도, 추출시간, 용매비 및 ultrasonication 혹은 homogenization의 4인자에 대해 3 수준의 $L_9(3^4)$ orthogonal matrix 법을 사용하고 9개 처리조합에 따라 반응변수로서의 지방함량을 조사하였다. 그 결과는 Fig. 4에 나타내었다.

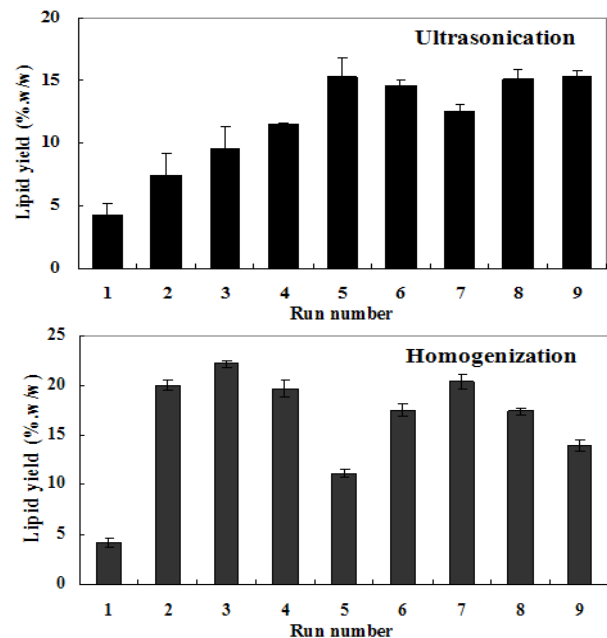


Fig. 4. Comparisons of lipid yields from *Scenedesmus* sp. by solvent extraction.

Ultrasonication 전처리를 하였을 때 추출물의 수율은 chloroform : methanol (2 : 1, v/v) 용매에서 각 인자의 수준에 따라 $5.65 \pm 0.92 \sim 15.75 \pm 0.78\%$ 로 각 조건에서의 수율 변화가 컸다. 처리조건에 따라 약 3배의 수율 차이를 보였으며 평균 수율은 $11.92 \pm 0.93\%$ 이었다. 하지만 homogenization 전처리를 했을 때의 추출물 수율은 이와는 다른 결과를 보였다. 전반적으로 ultrasonication 처리시보다 높은 수율을 보였으며 각 인자의 수준에 따라 $4.19 \pm 0.46 \sim 22.16 \pm 0.34\%$ 로 각 조건에서의 수율변화가 컸다. 처리조건에 따라 약 5배의 수율차이를 보였으며, 평균 수율은 $16.28 \pm 0.54\%$ 이었다.

Table 3. Analysis of extraction factors on lipid yield from *Scenedesmus* sp. with orthogonal array design

	Ultrasonication				Homogenization			
	A	B	C	D	A	B	C	D
K ₁	22.65	29.75	35.95	35.90	46.39	44.29	39.09	29.28
K ₂	41.40	38.50	33.95	34.55	48.35	48.62	53.65	57.94
K ₃	43.25	39.05	37.40	36.85	51.74	53.57	53.74	59.26
k ₁	7.55	9.92	11.98	11.97	15.46	14.76	13.03	9.76
k ₂	13.80	12.83	11.32	11.52	16.12	16.21	17.88	19.31
k ₃	14.42	13.02	12.47	12.28	17.25	17.86	17.91	19.75
R	6.87	3.10	1.15	0.77	1.78	3.09	4.85	9.99
Optimal level	1	2	3	4	4	3	2	1

$$K_i^A = \sum \text{lipid yield at } A_i, k_i^A = K_i^A/3, R_i^A = \max\{k_i^A\} - \min\{k_i^A\}$$

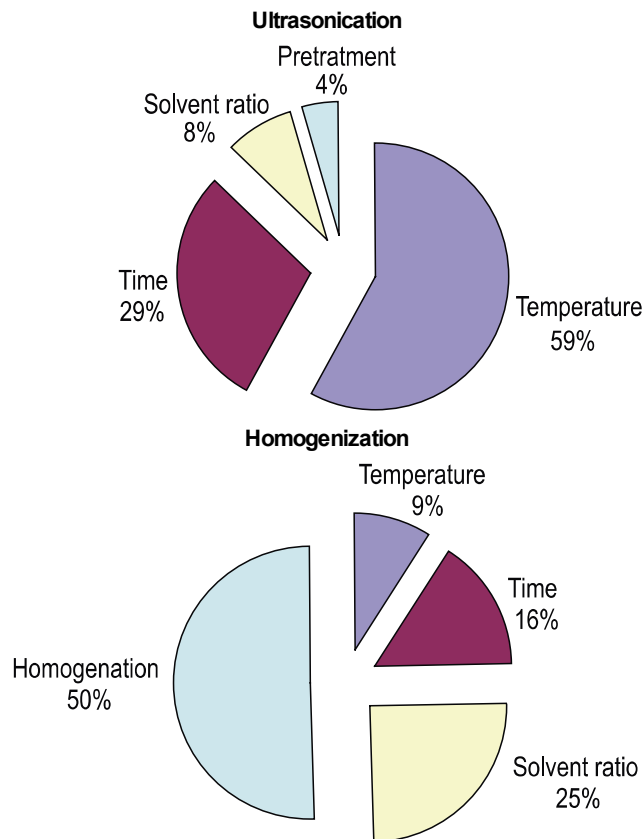


Fig. 5. Comparisons of order of effects of factors.

Orthogonal matrix법에 의해 각 인자들의 효과를 계산한 결과는 Table 3과 같다. 인자효과의 크기 순서를 최대의 차이값을 보이는 R값에 의해 살펴보면 ultrasonication 처리 시에는 extraction temperature > extraction time > solvent ratio > pre-treatment의 순서로 추출에 영향을 미쳤다. 반면, homogenization 처리시에는 pre-treatment > solvent ratio > extraction time > extraction temperature의 순서로 영향을 미치는 것을 알 수 있었다. Fig. 5는 이들 효과가 차지하는 비율을 나타낸 것으로 ultrasonication 처리시에는 추출온도 59%, 추출시간 29%, 용매비 8%이었고, 전처리 효과는 4%에 불과하였다. 하지만 homogenization 처리 시에는 전처리효과가 50%, 용매비 25%, 추출시간 16%, 추출 온도 9%로 전처리 효과가 매우 중요함을 보였다.

이러한 homogenization의 높은 전처리 효과는 세포벽의 구조파괴와 관련되는 것으로 생각되었고, 용매비의 영향은 시료의 응집현상과 관련되는 것으로 생각되었다. 즉, 추출 수율에 대한 용매비의 영향은 시료 1 g에 대한 용매비가 높아질수록 수율도 증가하는데, 자료화하지는 않았으나 용매비에 따른 입자형태를 살펴본 결과, 용매비가 낮은 10 : 1에서는 시료의 뭉침 (응집) 현상이 관찰되는 반면, 용매비가 높아질수록 시료의 응집이 적어져 시료의 응집물 형성이 표면적의 변화를 초래하여 추출수율을 감소시키는 것으로 생각되었다. 일반적으로 용매/고체비의 증가는 고체와 액체상 사이의 농도구배를 더 크게 하여 Fick 법칙에 따라 물질전달을 좋게 하므로 수율을 증가시킨다고 보고되었다 [27].

한편, Table 3의 자료에 근거하여 통계적 계산에 기초한 각 실험인자와 지방수율사이의 intuitive analysis 결과는 Fig. 6과 같다.

Homogenation한 경우 온도 및 시간수준의 증가로 지방 수율의 증가를 보였으나 용매비나 균질화의 처리횟수는 중간수준보다 더 높은 수준에서 수율의 증가를 보이지 않았다. 반면, ultrasonication의 경우는 처리시간이나 용매비의 증가수준에 따른 수율의 변화가 거의 없었고, 온도나 시간의 경우는 중간수준이상의 수준에서 수율증가를 보이지 않았다. 따라서 이들 자료 및 Table 3의 k_i^A 값으로부터 각 인자의 최적수준을 검정한 결과, optimal level은 두 가지 전처리에서 모두 추출온도 35°C, 추출시간 5시간, 용매비 30 : 1 (v/v)로, ultrasonication 처리를 하지 않은 1수준 및 2회의 homogenization 전처리구에서 확인되었다.

따라서 가장 높은 추출수율을 얻을 수 있는 최적조건은 homogenization 2회 처리시료를 용매비 1 : 30 (w/v)으로 35°C에서 5시간 동안 추출하는 것으로 생각되었다. 하지만 homogenization 처리시 optimal level은 2수준과 3수준에서 수율차이가 거의 없었고 용매비 역시 2수준과 3수준의 차이가 미미하여 공정비용을 생각했을 때 homogenization 1회 처리 및 용매비 20 : 1 (w/v)로 충분하다고 판단되었다.

이상의 추출수율에 대한 ANOVA 분석결과는 Table 4에서 보는 바와 같이, P < 0.05에서 유의성을 보여 통계적인 유의성이 있었다.

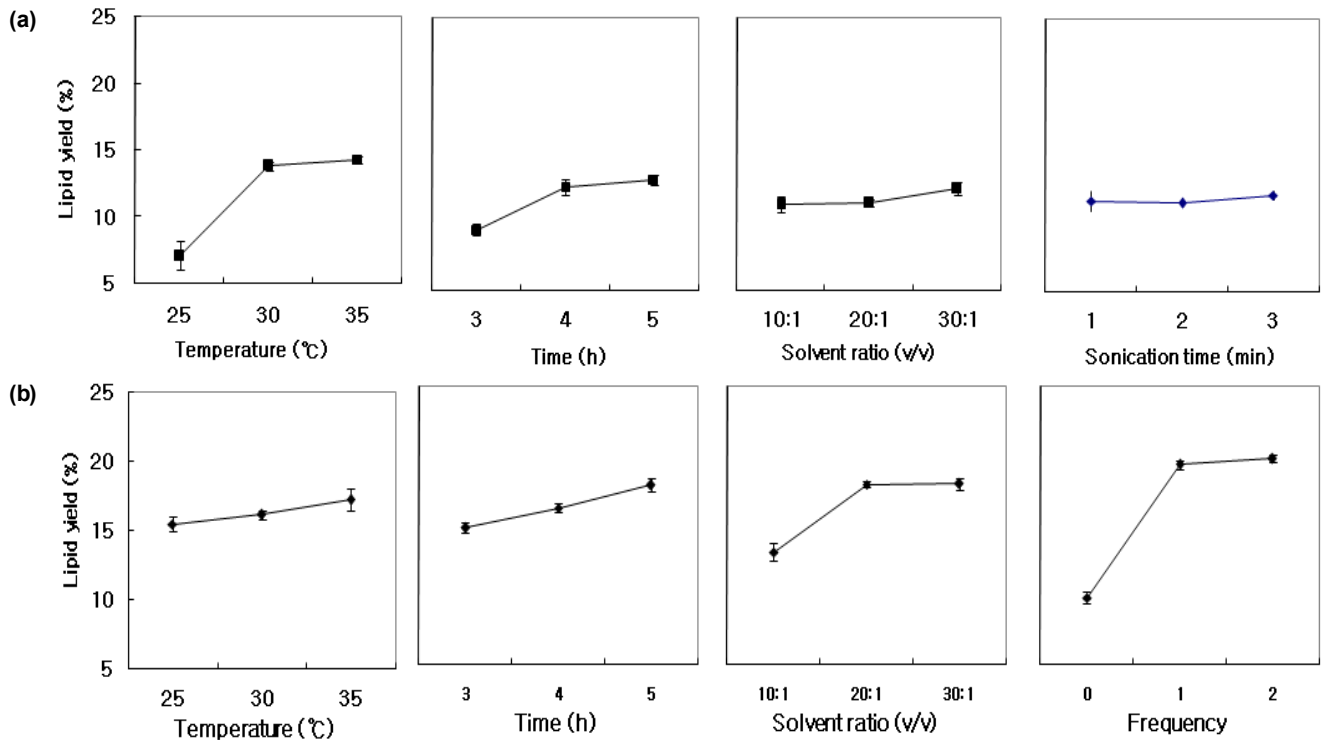


Fig. 6. Intuitive analysis of the relationships between experimental factors and lipid yield with pre-treatment of ultrasonication (a) and homogenization (b).

Table 4. Variance analysis for lipid yield and component contents

Ultrasonication					
Variance source	Sum of deviation square (SS)	Degree of freedom (V)	Mean square (MS)	F	P
Temperature	97.237	2	48.619	192.97	0.005
Time	23.634	2	11.817	46.90	0.021
Solvent ratio	2.404	2	1.202	4.77	0.173
Error	0.504	2	0.252		

S = 0.501941, $R^2 = 99.59\%$, $R^2(\text{adjustment}) = 98.37\%$

Homogenization					
Variance source	Sum of deviation square (SS)	Degree of freedom (V)	Mean square (MS)	F	P
Time	14.374	2	7.187	2.94	0.254
Solvent ratio	47.403	2	23.701	9.71	0.093
Pre-treatment	191.326	2	95.663	39.17	0.025
Error	4.884	2	2.442		

S = 1.56269, $R^2 = 98.11\%$, $R^2(\text{adjustment}) = 92.43\%$

실제로 chloroform : methanol (2 : 1, v/v)을 용매로 사용하여 이상에서 얻어진 최적 추출조건 즉, homogenization 처리 후 용매비 1 : 20 (w/v)으로 35°C에서 5시간 추출한 결과, 지방의 추출 수율값은 20.55%이었다. 이 값은 *Scenedesmus* sp.의 지방함량이 21.38%이므로 함유지방의 대부분 (96.1%)을 추출할 수 있음을 알 수 있었다.

결론

본 연구는 미세조류인 *Scenedesmus* sp.에 의한 바이오디젤의 생산연구 일환으로 이 균주로부터의 지방추출을 위한 효율적 용매의 선정과, 초음파, 고압균질화 및 마이크로웨이브 처리와 같은 전처리 효과를 조사하였다. 또한 Taguchi 법에 의한 지질추출의 최적화를 실시하였으며, 다음의 결과를 얻었다.

5가지 용매 (acetone, chloroform/methanol (2 : 1, v/v), ethanol, hexane/ether (1 : 1, v/v) 및 hexane)를 사용하여 습시료와 건조시료의 지방추출수율을 조사하고, 동결건조 시료 및 chloroform/methanol (2 : 1, v/v) 용매를 각각 추출 시료 및 용매로 선정하였다. 시료의 세포벽 손상에 의한 추출 수율의 향상목적으로 목적으로 3종 전처리방법 (microwave, ultrasonication 및 homogenization)을 사용하여 시간의 경과에 따른 추출수율을 전처리하지 않은 시료의 수율과 비교하여 전처리하지 않은 처리구, ultrasonication 및 microwave 처리구보다 약 2.4~5배 이상의 높은 추출수율증가를 보인 homogenization 방법을 전처리 방법으로 선정하였다. 이들 근거하에 추출온도, 추출시간, 용매비 및 ultrasonication 혹은 homogenization의 4인자에 대해 3수준의 $L_9(3^4)$ orthogonal matrix법 (Taguchi method)에 의해 지질추출의 최적화를 실시하였다. 그 결과, 최적 추출조건은 homogenization 1회 처리, 시료의 용매비 1 : 20 (w/v)으로 35°C에서 5시간 동안

추출하는 것이었다. 최적조건하의 추출수율은 20.55%로 *Scenedesmus* sp.의 총 지방함량 (21.38%)의 약 96%를 추출할 수 있었다.

감사의 글

본 연구논문은 지식경제부의 지원으로 수행한 에너지인력양성사업의 연구결과입니다 (2008-N-BL-HM-E-06).

접수 : 2010년 1월 26일, 게재승인 : 2010년 8월 25일

REFERENCES

- Antolin, G., F. V. Tinaut, Y. Briceno, V. Castano, C. Perez, and A. I. Ramirez (2002) Optimisation of biodiesel production by sunflower oil transesterification. *Bioresource Technol.* 83: 111-114.
- Demirbas, A. (2005) Biodiesel production from vegetable oils via catalytic and non-catalytic supercritical methanol transesterification methods, *Prog. Energy Combust. Sci.* 31: 466-487.
- Widjaja, A., C. C. Chien, and Y. H. Ju (2009) Study of increasing lipid production from fresh water microalgae *Chlorella vulgaris*. *J. Taiwan Inst. Chem. E.* 40: 13-20.
- Vicente, G., M. Martinez, and J. Aracil (2004) Integrated biodiesel production: a comparison of different homogeneous catalysts systems, *Bioresource Technol.* 92: 297-305.
- Sharif Hossain, A. B. M., S. Alishah, N. B. Amru, C. Partha, and N. Mohd (2008) Biodiesel fuel production from algae as renewable energy, *Am. J. Biochem. Biotechnol.* 4: 250-254.
- Shay, E. G. (1993) Diesel fuel from vegetable oils: Status and opportunities. *Biomass Bioenergy* 4: 227-242.
- Lee, O. M., J. H. Ahn, and B. R. Moon (2007) A study of ten taxa of newly reported green algae (division Chlorophyta) in Korea, *Korean J. Limnol.* 40: 50-60.
- Minowa, T., S. Y. Yokoyama, M. Kishimoto, and T. Okakurat (1995) Oil production from algal cells of *Dunaliella tertiolecta* by direct thermochemical liquefaction, *Fuel.* 74: 1735-1738.
- Amin, S. (2009) Review on biofuel oil and gas production processes from micro algae. *Energ. Convers Manage* 50: 1834-1840.
- Wikipedia, Algalculture. <http://en.wikipedia.org/wiki/Algalculture>.(2009).
- Oilgae, Algae oil extraction. <http://www.oilgae.com/algae/oil/extract/extract.html>.(2010).
- Biobubba, Oil extraction from algae. http://aeg-biofuels.com/MA_Extraction.htm.(2010).
- Mandal, S. and N. Mallick (2009) Microalga *Scenedesmus obliquus* as a potential source for biodiesel production. *Microbiol. Biotechnol.* 84: 281-291.
- Lee, J. Y., C. Yoo, S. Y. Jun, C. Y. Ahn, and H. M. Oh (2010) Comparison of several methods for effective lipid extraction from microalgae, *Bioresource Technol.* 101: 75-77.
- Raman, G. and V. G. Gaikar (2002) Extraction of piperine from *Piper nigrum* (black pepper) by hydrotropic solubilization, *Ind. Eng. Chem. Res.* 41: 2966-2976.
- Sayyar, S., Z. Z. Avidin, R. Yunus, and A. Muhammad (2009) Extraction of oil from *Jatropha* seeds-Optimization and kinetics, *Am. J. Applied Sci.* 6: 1390-1395.
- Folch, J., M. Lees, and S. G. H. Sloane (1956) A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissues, *J. Biol. Chem.* 226: 497-509.
- Bligh, E. G. and W. J. Dyer (1959) A rapid method of total lipid extraction and purification, *Can. J. Biochem. Phys.* 37: 911-917.
- Wiltshire, K. H., M. Boersma, A. Möller, and H. Buhtz (2000) Extraction of pigments and fatty acids from the green alga *Scenedesmus obliquus* (Chlorophyceae), *Aquat. Ecol.* 34: 119-126.
- Montgomery, D. C. and C. M. Borrer (2000) Mixed resolution designs as alternatives to Taguchi inner/outer array designs for robust design problems, *Qual. Reliab. Eng. Int.* 16: 117-127.
- Changa, M. Y., G. J. Tsaia, and J. Y. Houn (2006) Optimization of the medium composition for the submerged culture of *Ganoderma lucidum* by Taguchi array design and steepest ascent method, *Enzyme Microb. Tech.* 38: 407-414.
- Mohan, S. V., N. C. Rao, K. K. Prasad, Krishna, R. S. Rao, and P. N. Sarma (2005) Anaerobic treatment of complex chemical wastewater in a sequencing batch biofilm reactor: Process optimization and evaluation of factor interactions using the Taguchi dynamic DOE methodology, *Biotechnol. Bioeng.* 90: 732-745.
- Grima, E. M., A. R. Medina, A. G. Giménez, J. A. S. Pérez, F. G. Camacho, and J. L. García (1994) Comparison between extraction of lipids and fatty acids from microalgal biomass. *J. Am. Oil Chem. Soc.* 71: 955-959.
- Walker, T. H., H. D. Cochran, and G. J. Hulbert (1999) Supercritical carbon dioxide extraction of lipids from *Pythium irregulare*, *J. Am. Oil Chem. Soc.* 76: 595-602.
- Lee, S. J., B. D. Yoon, and H. M. Oh (1998) Rapid

- method for the determination of lipid from the green alga *Botryococcus braunii*, *Biotechnol. Tech.* 12: 553-556.
26. Virost, M., V. Tomao, C. Ginies, F. Visinoni, and F. Chemat (2008) Microwave-integrated extraction of total fats and oils, *J. Chromatogr. A* 196-197: 57-64.
27. Rakotondramasy-Rabesiaka, L., J. L. Havet, C. Porte, and H. Fauduet (2009) Solid-liquid extraction of protopine from *Fumaria officinalis* L. -Kinetic modelling of influential parameters, *Ind. Crop Prod.* 29: 516-523.