

# 이성분 용매 추출에 의한 미세조류로 부터의 바이오디젤용 지질 분리

홍연기\*, 김정배\*\*, 임 사이먼\*\*\*

\*충주대학교 화공생물공학과(hongyk@cjnu.ac.kr),

\*\*충주대학교 에너지시스템공학과(jeongbae\_kim@cjnu.ac.kr),

\*\*\* 웨인주립대학교 화학공학과 미국 국립 바이오 에너지 연구소(sng@wayne.edu)

## Extraction of Lipids from Microalgae Using Polar and Nonpolar Bi-solvent Systems

Hong, Yeon-Ki\* Kim, Jeong-bae\*\* Ng, K. Y. Simon\*\*\*

\*Dept. of Chemical and Biological Engineering, Chungju National University(hongyk@cjnu.ac.kr),

\*\*Dept. of Energy System Engineering, Chungju National University(jeongbae\_kim@cjnu.ac.kr),

\*\*\*National Biofuels Energy Laboratory, Dept. of Chemical Engineering and Material Science,  
Wayne State University(sng@waynes.edu)

### Abstract

Various single solvents were tested to find the effective solvent for the extraction of algae oil from wet-form *Chlorella minutissima*. In the case of single solvents, their extractabilities for algae oil were increased with their polarity because the water in wet algae cell is to form a solvent shell around the lipids. Based on these results, the wet-form algae samples were treated with a polar alcohol solvent and then a nonpolar solvent was added in algae residue. In the algae oil extraction by ethanol/n-hexane, total lipid contents were 40-50% and composition of triglyceride in extracted oil was 46.50%. Considering solvent toxicity of conventional solvent mixture such as chloroform and methanol for algae oil extraction, the ethanol/n-hexane system was identified as the effective one for the oil extraction from wet-form *Chlorella minutissima*

Keywords : 추출(Extraction), 클로렐라 미뉴티시마(*Chlorella minutissima*), 지질(Lipid), 트리글리세라이드(Triglyceride)

### 1. 서 론

바이오디젤은 연소기관으로의 적용을 목적

으로 식물성, 동물성 유지의 화학적 전환을  
통해 얻어지는 긴 사슬 지방산의 모노알킬에  
스터로서 기존의 디젤 연료를 대체하기 위한

투고일자 : 2011년 10월 4일, 심사일자 : 2011년 10월 9일, 게재확정일자 : 2011년 12월 6일  
교신저자 : 홍연기(hongyk@cjnu.ac.kr)

연료를 말한다.<sup>1)</sup>

기존 화석원료 유래 디젤 연료에 비해 바이오디젤은 미세먼지를 포함한 오염물질을 적게 배출함과 동시에 유지작물 재배에 의한 이산화탄소 배출을 감소시킬 수 있다.<sup>2)</sup>

바이오디젤 생산에 사용되는 원료는 동식물에서 추출되는 오일이지만 현재까지는 대두유와 팜유를 포함한 식물성 오일이 사용되고 있다. 그러나 식물유는 최근 애그플레이션에 따른 곡물가의 상승 등으로 인해 경제성이 악화되고 있는 실정이다.

최근 이에 대한 대안으로서 조류(algae)로 대표되는 제 3세대 바이오디젤 원료가 제시되고 있다. 조류는 기존의 에너지 작물에 비해 유지함량이 높고 빠른 성장속도를 가지며 극한환경에서도 성장이 가능할 뿐 아니라 식물자원의 10-100배에 이르는 오일생산성을 가진다. 아울러 재배에 필요한 면적 역시 기존 식물자원에 비해 훨씬 적게 요구되는 것으로 알려져 있다.<sup>3)</sup>

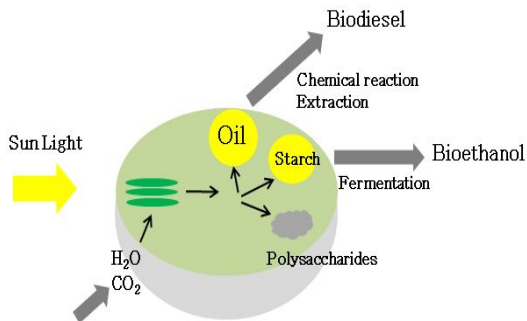


그림 1. 미세조류에서 바이오연료를 생산하는 경로<sup>4)</sup>

그림 1에서 보듯이 미세조류는 일반적인 육상식물과 마찬가지로 태양에너지 및 포집된 이산화탄소를 이용하여 오일과 전분을 포함한 대사산물을 생성한다. 태양에너지를 화학적인 에너지로 변환하기 위한 에너지 효율은 약 5%로서 타 식물에 비해 높은 것으로 알려져 있다.<sup>5)</sup> 생산공정은 크게 광생물반응기에서의 반응단계와 이후 바이오디젤 원료

용 오일을 얻기 위한 분리공정으로 나눌 수 있다.

광생물반응기에 사용되는 광원으로서 태양광을 사용할 경우 비용 절감면에서 유리하며 대표적인 반응기 형태로는 노지형(Raceway pond)을 들 수 있다. 태양광 수집을 용이하게 하기 위해서는 관형 형태의 광생물반응기를 사용할 수 있으며 반응기는 배지저장기와 광수집기(Solar collector)로 구성된다. 이 때 광수집기는 태양광을 잘 받도록 하기 위해 광투과율이 좋은 고분자 소재 또는 유리 소재를 사용한다. 충분한 태양광이 공급되기 어려운 환경에서는 LED나 광섬유와 같은 인공광원을 사용할 수 있다.<sup>6)</sup> 일반적으로 광생물반응기의 생산성은 하루에 60 g/m<sup>2</sup> (건조중량기준)정도이다. 배양된 미세조류로부터 수분을 제거하고 용매 추출 공정을 적용하면 바이오디젤의 원료가 되는 오일성분을 얻을 수 있다.

지금까지 미세조류로부터 오일의 추출은 건조형태의 조류로부터 Bligh와 Dyer에 의해 수립된 공정을 통해 이루어진다.<sup>7)</sup> 이 방법은 건조된 미세조류 조직에 포함된 지질을 메탄올과 클로로폼이 혼합된 공용매(cosolvent)와 접촉시켜 오일을 추출하는 것을 말한다. 같은 용매를 *Rhizoclonium hieroglyphicum*이나 *Scenedesmun obliquus* 등에도 적용한 사례가 있으며 지질 수율은 10-55%의 범위를 나타낸다.<sup>8) 9)</sup>

그러나 기존의 추출공정에서는 크게 두 가지의 문제점이 있다. 첫 번째는 용매로 사용되는 클로로폼과 메탄올의 독성문제이고 두 번째는 건조형태의 미세조류에 대한 추출공정을 실시함으로써 조류의 건조에 따른 많은 에너지가 요구된다는 것이다. 따라서 미세조류로부터 바이오디젤을 경제적으로 생산하기 위해서는 건조된 미세조류가 아닌 젖은 형태의 미세조류에 대한 추출공정 개발이 필요하며 동시에 사용되는 용매의 환경에 대한 영향이 적어야 한다.

본 연구에서는 젖은 형태의 조류로부터 조류 오일을 추출하기 위해 여러 용매에 대한 조류 오일 추출 특성을 알아보고 최종적으로는 극성과 비극성 용매를 적절히 조합하여 바이오디젤 생산에 적합한 오일을 추출할 수 있는 친환경 용매계를 개발하고자 한다.

## 2. 실험

### 2.1 미세조류 배양

*Chlorella minutissima* (UTEX 2219)는 미국의 텍사스대학에서 제공받았으며 세포의 크기는 2-5 $\mu$ m이다. 세포는 Modified Bold 3N medium에서 배양되었으며 배지의 산도는 6.2이다. 질소 결핍 배지의 경우 NaNO<sub>3</sub>와 soil-water를 제외하고는 Modified Bold 3N medium와 동일한 조성을 가진다.

조류 배양은 4L의 플라스크를 이용했으며 기체의 주입속도는 60 mL/min이며 4%의 농도로 공기/CO<sub>2</sub> 혼합기체를 주입하였다. 배양 플라스크는 외부광원에 연속적으로 노출시켰으며 광생물 반응기의 온도는 23°C로 유지하였다. 배양된 조류는 4일 후에 지수성장기에 도달하게 된다.

### 2.2 지질 추출

배양된 조류배양액을 원심분리기(Eppendorf centrifuge 5804R)을 이용하여 5000 rpm으로 10분간 원심분리한 후 상층의 배지를 제거하게 되면 농축된 조류를 얻을 수 있다. 이를 24시간 동안 -20°C에서 동결시킨다. 이 중 7 g의 샘플을 취하여 세포파쇄용 glass beads를 혼합한 후 교반을 10분간 실시하여 세포를 파쇄한다.

파쇄된 조류에 추출용 용매를 가하여 2시간 동안 접촉을 시킨다. 본 실험에서 사용된 용매는 메탄올 (Sigma), 이소프로판올(Mallinckrodt Baker), 톨루엔 (Sigma), 그리고 n-헥산 (Fisher Scientific)이다. 추출 후 얻어진 유기용매를 증발시키면 미세조류 오일을 얻게 된다.

극성/비극성 용매 조합에 의한 조류오일의

추출에는 4가지의 조합이 사용되었다. 극성 용매로서는 메탄올, 에탄올(Sigma), 부탄올 (Sigma)을 사용하였으며 비극성용매로서는 n-헥산을 사용하였다. 단일 용매에 의한 추출과 마찬가지로 7 g의 젖은 형태의 미세조류 샘플을 취하고 이를 8 mL의 극성용매와 혼합한다. 극성용매에 의한 추출을 2회 반복한 후 최종적으로 비극성용매인 n-헥산을 가하여 추출을 완료한다. 본 연구를 통해 수립한 추출과정은 그림 2에 제시되어 있다.

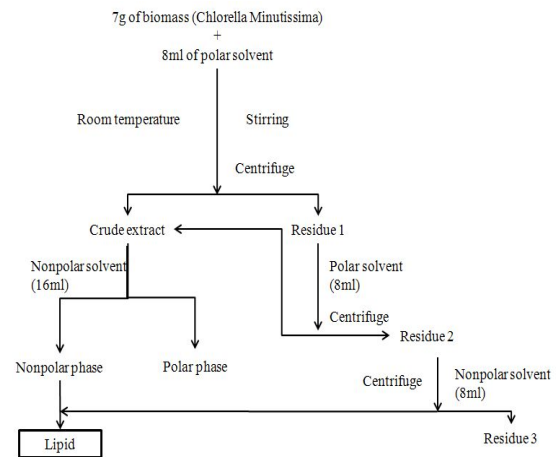


그림 2. 이성분 용매계에 의한 조류 오일 추출과정

### 2.3 지질 분석

추출된 미세조류 오일내의 자유지방산, 트리글리세라이드, 디글리세라이드, 그리고 모노글리세라이드의 함량을 결정하기 위해서 HPLC(High performance liquid chromatography, PerkinElmer Series 200)를 사용하였다.

지방산 조성 분석은 다음과 같다. 추출된 조류오일을 메탄올에 0.1M로 용해시킨 CH<sub>3</sub>ONa을 이용하여 메틸에스터로 전환시킨 다음 이를 n-헥산으로 추출한다. 실온에서 용매를 증발시키고 난 후 얻어진 메틸에스터를 GC-MS (PerkinElmer Clarus 500)를 이용하여 상세 조성을 분석하였다. 전체 메틸에스터 함량은 건조 미세조류 질량 대비 질량비로 계산하였다.

### 3. 결과 및 토의

#### 3.1 지질 추출량에 대한 용매 극성의 영향

그림 3에서는 용매 극성에 따른 지질 추출량의 변화를 나타내었다. 지질 추출량 만을 보면 극성 용매가 건조 조류 질량 대비 20-30%의 오일을 추출하는 것으로 나타나 효율적임을 알 수 있다. 또한 극성용매의 경우 단 한번의 추출만으로도 조류 오일의 상당부분을 추출하는 것으로 나타났다. 그러나 톨루엔이나 n-헥산과 같은 비극성 용매에 의한 추출에서는 추출능이 낮은 것으로 나타났다. 본 연구에서 사용된 조류는 젖은 형태의 조류이므로 조류내의 물이 지질 주위로 용매층(solvent shell)을 형성하게 된다. 이들은 극성이 낮은 용매가 지질과 접촉하여 지질을 용해 및 추출하는 과정을 어렵게 만든다. 세포막과 관련된 극성 지질은 극성 용매에 의해 지질과 단백질 간의 수소결합 및 정전기적 인력을 줄여야만 추출이 쉽게 된다. 따라서 상대적으로 극성이 낮은 용매들이 조류 내의 소수성 지질과는 친화력이 높음에도 불구하고 젖은 형태의 조류에서의 지질 추출능은 낮아질 수 밖에 없다.

표 1은 조류 오일 추출에 있어 불포화지방산과 포화지방산의 비율을 보여주고 있다. 불포화 지방산은 용매의 극성이 감소할수록 추출이 잘 되었다. 특히 톨루엔과 n-헥산의 경우에는 불포화 지방산만이 추출되었다.

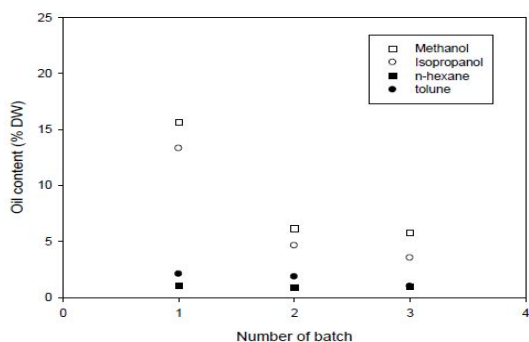


그림 3. 단일 용매의 극성에 따른 총 조류 오일의 추출량의 변화

표 1. 단일 용매추출로 얻어진 조류 오일 내 불포화 지방산과 포화지방산의 비율

Solvent	Ratio of unsaturated fatty acids to saturated fatty acids
Methanol	3.88
Isopropanol	8.27
Toluene	Only UFA
n-Hexane	Only UFA

#### 3.2 지질 함량에 대한 이성분 용매의 영향

일반적으로 극성 용매는 추출되는 지질의 범위를 증가시키지만 상대적으로 비극성 지질과는 낮은 혼화도를 가진다. 따라서 극성-비극성으로 이어지는 용매 추출 단계가 중요해진다. 본 연구에서는 용매가 조류 세포로의 침투를 용이하게 하기 위해 젖은 형태의 조류를 극성 용매로 우선 처리하게 된다. 이때 극성 지질이 추출이 되고 추출 후 남아 있는 잔류 조류에 대해서는 비극성 용매를 반복적으로 가하여 비극성 지질을 추출하게 된다.

표 2는 다양한 용매의 의해 추출된 조류 지질에 있어 자유지방산, 모노글리세라이드, 디글리세라이드, 트리글리세라이드의 조성을 보여주고 있다. 조류 오일의 주된 성분은 트리글리세라이드이다. 트리글리세라이드 이외 성분의 존재 유무는 조류의 배양 조건 뿐 아니라 조류오일 추출에 사용되는 용매의 특성에 따라 달라지게 된다. 전통적으로 사용되어온 클로로폼/메탄올 계의 경우 다른 용매계에 비해 추출능이 높음에도 불구하고 모노글리세라이드의 추출이 상대적으로 높은 것으로 나타났다. 1-부탄올/n-헥산계는 조류 지질 추출에 있어 낮은 효율을 보였다. 이는 1-부탄올이 메탄올이나 에탄올에 비해 소수성이 강하여 용매의 조류 세포내로의 침투가 어려워지기 때문으로 설명할 수 있다. 클로로폼/n-헥산 시스템에서는 대부분의 모노글리세라이드와 디글리세라이드가 에스테르화 및 전이 에스테르화 반응 중에 비극성 지방산메틸에스터로 전환될 수 있지만 미반응 모노 및 디

글리세라이드는 바이오디젤 생산성을 낮출 수 있다는 단점이 있다.

표 2. 극성/비극성 추출용매에 의해 추출된 조류 오일 내의 글리세라이드 조성

	Methanol /n-Hexane	Ethanol /n-Hexane	1-Butanol /n-Hexane	Chloroform /Methanol
Composition (mg/mL)				
Free fatty acids	12.00 (16.32%)	10.45 (16.64%)	6.90 (56.19%)	9.00 (10.59%)
Triglyceride	54.00 (73.42%)	46.50 (74.04%)	4.30 (35.02%)	39.50 (46.47%)
Diglyceride	6.00 (8.16%)	4.00 (6.37%)	0.64 (5.21%)	4.50 (5.29%)
Monoglyceride	1.55 (2.11%)	1.85 (2.95%)	0.44 (3.58%)	32.00 (37.65%)
Total	73.55 (100%)	62.80 (100%)	12.28 (100%)	85.00 (100%)
Total lipid contents(%)	39.63%	41.20%	2.70%	64.37%
Total lipid contents by HPLC(%)	15.64%	13.35%	2.59%	20.53%
Total triglyceride contents(%)	11.48%	9.96%	0.91%	9.46%

메탄올/n-헥산의 경우 트리글리세라이드의 추출능이 가장 높음에도 불구하고 메탄올이 가지는 독성으로 인해 실제 조류 오일 추출로의 응용은 어렵다. 에탄올/n-헥산의 추출 효율은 메탄올/n-헥산의 추출능과 거의 비슷할 뿐 아니라 에탄올이 메탄올에 비해 상대적으로 독성이 낮다는 장점을 가지고 있다. 따라서 에탄올/n-헥산 이성분 용매는 기존의 클로로폼/메탄올 이성분 용매를 대체할 수 있는 유력한 용매 시스템이 될 수 있다.

### 3.3 지방산 프로파일

표 3은 에탄올/n-헥산에 의한 조류 오일의 추출 과정에서의 지방산의 조성을 보여주고 있다. 추출 대상이 되는 조류는 조류내 오일 함량을 높이기 위해 흰색 및 적색 LED광원을 사용하였다. 광원에 따른 지방산메틸에스

터의 조성에는 큰 차이가 없었다.

표 3. 에탄올/n-헥산 용매에 의한 LED 광원으로 배양된 미세조류 오일의 지방산 조성

	White-LED	Red-LED
FAME(%)	0	69
C16:0	2.4	111
C16:1 to C16:3	3.9	82
C18:1	4.0	125
C18:2	4.1	61
C18:3	5.1	65
Reaction conversion(%)	60.79	55.81
Total lipid contents(%)	50.02	38.74
Biodiesel contents(%)	26.04	20.21

일반적으로 팔미틱(C16:0), 스테아릭(C18:0), 올레익(C18:1), 리놀레익(C18:2) 그리고 리놀레닉(C18:3)산이 바이오디젤을 구성하는 지방산이다. 산화안정성과 저온필터 막힘점과 같은 바이오디젤의 연료로서의 특성은 이들 지방산 조성에 따라 결정된다. 표 3에서 보듯이 팔미틱 산과 올레익 산이 조류 오일에서의 주된 성분인 것으로 분석되었다. 팔미틱산으로부터 유래된 바이오디젤은 저온필터 막힘점을 증가시키게 된다. 반면 C18:1과 C18:3의 높은 함량은 산화 안정성을 강화시켜 바이오디젤의 장기 보관을 가능하게 한다. 이는 본 연구에서 사용된 *Chlorella minutissima*로부터 유래된 바이오디젤이 상용 내연기관에도 적합함을 보여준다.

## 5. 결 론

미세조류 오일 추출을 위해 기존에 사용되어왔던 클로로폼/메탄올 용매를 대체할 수 있는 젖은 형태의 조류에 적합한 이성분 용매계를 개발함에 있어 다음과 같은 결론을 얻을 수 있었다.

- (1) 기존의 건조 미세조류와는 달리 젖은 형태의 미세조류는 조류 세포내에 다량의 물이 함유되어 있으므로 조류 오일 추출을 위해서는 용매의 극성이 높을수록 추출능이 높았다.
- (2) 젖은 형태의 미세조류에 대한 오일 추출 효율을 높이기 위해서 극성용매 추출 후 비극성용매 추출로 이어지는 추출단계를 수립하였으며 기존 클로로폼/메탄올계와 비교했을 때 에탄올/n-헥산은 이와 유사한 추출능을 보였다.
- (3) 에탄올/n-헥산은 바이오디젤 생산에 효과적인 트리글리세라이드에 대한 선택도가 높았으며 클로로폼/메탄올에 비해 용매 독성이 현저하게 낮으므로 이를 대체할 수 있는 용매계가 될 수 있다.

### 후 기

본 연구는 2010년도 충주대학교 해외파견 연구교수 사업의 지원을 받아 수행되었으며 이에 감사드립니다.

### 참 고 문 헌

1. 홍연기, 홍원희, “바이오디젤 공정기술과 연료특성”, 화학공학, Vol. 45, 2007, pp. 424-432.
2. Hoydoncx H.E, De Vos D.E, Chavan S.A., Jacobs P.A. Esterification and transesterification of renewable chemicals, Topics in Catalysis, Vol. 27, 2004, pp. 83-96.
3. Chisti Y, Biodiesel from microalgae, Biotechnol. Adv., Vol. 25, 2007, pp. 294-306.
4. Posten C, Schaub G, Microalgae and terrestrial biomass as source for fuels-A process view, J. Biotechnol., Vol. 142, 2009, pp. 64-69.

5. Schenk P.M, Thoams-hall S.R, Stephens E, Marx U.C, Mussgnug J.H, Posten C, Kruse O, Hankamer B, Second generation biofuels: high - efficiency microalgae for biodiesel production, Bioenergy Res., Vol. 1, 2008, pp. 20-43.
6. 이진석, 태양광 활용효율이 높은 광생물반응기 개발 연구 현황, 한국태양에너지학회지, Vol. 1, 2002, pp. 3-6.
7. Bligh E.G, Dyer W.J, A rapid method of total lipid extraction and purification, Can. J. Biochem. Physiol., Vol. 37, 1959, pp. 911-917.
8. Mulbry W, Kondrad S, Buyer J, Luthria D. L, Optimization of an oil extraction process for algae from the treatment of manure effluent, J. Am. Oil. Chem. Soc., Vol 86, 2009, pp. 909-915.
9. Silva T.L, Reis A, Medeiros R, Oliveira A. C, Gouveia L, Oil production towards biofuel from autotrophic microalgae semicontinuous ciltivations monitorized by flow cytometry, Appl. Biochem. Biotechnol., Vol. 159, 2009, pp. 568-578.