

응집제 혼합을 이용한 미세조류의 응집 특성

권도연¹, 정창규¹, 이철균², 이진원^{1*}

Flocculation Characteristics of Microalgae Through Combined Flocculants

Doyeon Kwon¹, Changkyou Jung¹, Choul-Gyun Lee², and Jinwon Lee^{1*}

접수: 2011년 8월 24일 / 게재승인: 2011년 10월 25일
© 2011 The Korean Society for Biotechnology and Bioengineering

Abstract: In this study, inorganic flocculant with biodegradable polymer flocculant was used for microalgae harvest. The aim of this study was to optimize the concentration of inorganic flocculant, the concentration of biodegradable polymer flocculant and reaction volume for decreasing the amounts of flocculant and obtaining the suitable pH range for seawater by response surface methodology. The flocculation of three marine microalgae, *Chlorella ellipsoidea*, *Dunaliella bardawil*, and *Dunaliella tertiolecta*, using inorganic flocculants and biodegradable polymer flocculants was investigated. The results indicated that the optimal flocculant quantity showed 0.1 g/L of ferric chloride, 7.5 g/L of chitosan on *Chlorella ellipsoidea*. In the case of *Dunaliella bardawil*, the optimal flocculant quantity showed amount of ferric sulfate more than 0.12 g/L and chitosan more than 0.75 g/L. In the case of *Dunaliella tertiolecta*, the optimal flocculant quantity showed 1.0 g/L of sodium aluminate, 0.75 g/L of chitosan.

Keywords: microalgae, harvest, *Chlorella*, *Dunaliella*, flocculation, response surface methodology (RSM)

1. 서론

현재 채취할 수 있는 원유가 한정적이며 원유 가격의 상승, 연료 연소 시 발생하는 이산화탄소로 인한 지구온난화 같은 기상이변을 일으키는 문제가 발생하고 있다. 따라서 세계 각국에서는 지구 온난화의 대표적인 주범인 이산화탄소의 배출량을 줄이기 위하여 재생 가능한 대체 에너지원 연구 개발을 진행하고 있다 [1-3].

대체 에너지원 중 하나인 바이오 에너지의 경우 바이오 디젤, 바이오 에탄올, 바이오 가스로 나눌 수 있다. 그리고 바이오 에탄올과 바이오 디젤을 수송 연료로 상용화한 나라도 있다 [4-6]. 바이오 디젤은 Corn, Canola, Oil palm 혹은 *Jatropha* 와 같은 육상 식물을 바이오 매스로 이용하여 생산할 수 있다.

또한, 미세조류인 *Botryococcus braunii*, *Chlorella sp.*, *Nannochloropsis sp.*, *Dunaliella sp.*의 경우 지질을 함유하고 있어서 바이오 디젤 생산을 위한 바이오 매스로 이용되어 질 수 있다 [7]. 이들은 육상 식물에 비하여 면적당 생산 수율이 높으며, 재배를 위해 필요한 경작지도 더 적다. 햇빛, CO₂와 미량의 무기영양소만 있어도 생장할 수 있다는 장점을 가지고 있다 [8-10].

미세조류로부터 바이오디젤을 얻기 위해서는 다음과 같은 단계를 거쳐야 한다. 미세조류를 대량으로 배양하고 배양액으로부터 미세조류를 수확한 뒤, 지질을 추출한다. 그리고 추출한 지질을 바이오 디젤로 전환한다.

미세조류로부터 수확 방법으로는 원심분리, 여과, 응집, 부유를 들 수 있다. 원심분리 방법은 가장 효율적이지만 아직까지 유지비에서 많은 비용이 들기 때문에 적합하지 못하다. 그리고 여과법의 경우 시간이 경과함에 따라 미세조류 덩어리에 의하여 막이 막히는 일이 발생한다. 따라서 주기적으로 막을 교체할 필요가 있다 [11].

¹서강대학교 화공생명공학과

¹Department of Chemical and Biomolecular Engineering, Sogang University, Seoul 121-742, Korea

²인하대학교 생명공학과

²Department of Biological Engineering, Inha University, Incheon 402-751, Korea

Tel: +82-2-705-8919, Fax: +82-2-702-7926

e-mail: jinwonlee1@sogang.ac.kr

부유법의 경우는 응집제 첨가 혹은 기포를 발생시켜 미세 조류 표면에 달라붙게 함으로써 밀도를 감소시켜 배양액 표면으로 떠오르게 하여 회수하는 방법이다. 하지만 상용화하기 위해서는 비용이 많이 들어간다.

반면에 응집제를 이용한 미세조류의 응집은 위 세가지 방법에 비하여 Species 특이성이 적으며 Scale-up 하기가 쉽다는 장점을 지닌다 [12]. 이전 연구결과에서 Aluminium 계열, Ferric 계열의 무기 응집제 사용 시 해양 미세조류 높은 응집 효율을 얻을 수 있었다 [13]. 하지만 Aluminium은 Alzheimer를 유발하는 것으로 알려져 있다 [14-16]. Ferric ion의 경우 용해 시 산도를 증가시키는 단점이 있다.

해수의 pH는 7.8-8.4 정도이다. 해수는 대기 중에 이산화탄소를 흡수하는 중요한 역할을 한다. 해수의 pH가 7 이하로 감소하면 해양 생태계에 악영향을 미칠 수 있다. 조개나 갑각류의 껍데기와 골격 형성을 방해하며, 플랑크톤 개체 수를 감소시킨다. 플랑크톤 감소는 먹이사슬을 통하여 어류의 개체 수를 감소시킨다.

무기 응집제가 해수에 용해되면 산도를 증가시킨다. 따라서 무기 응집제의 사용량을 줄이고 응집제 사용 시 발생하는 pH감소를 최소화할 필요가 있다.

생분해성 고분자 응집제의 경우 Chitosan을 예로 들자면, Chitinase와 같은 수중 생물이분비한 효소에 의하여 친환경적으로 분해가 된다. 하지만 이전 연구결과에서 높은 응집 효율은 무기 응집제에 비하여 응집제 양이 많을 때 얻을 수 있었다 [13]. 생분해성 고분자 응집제인 Chitosan은 무기응집제에 비하여 가격이 비싸다. 따라서 생분해성 고분자 응집제 사용 시 높은 비용을 부담해야 한다.

따라서 본 연구에서는 소량의 응집제로도 높은 응집 효율을 보이지만 환경에 독성을 갖는 무기 응집제와 친환경적이지만 가격이 비싼 생물학적 고분자응집제를 혼합하여 사용함으로써 각각의 단점을 보완하여 응집 효율을 높이고 각각의 응집제 양을 줄이며 친환경적인 응집 결과물을 얻기 위하여 연구개발을 수행하였다.

해양 미세조류인 *Chlorella ellipsoidea*, *Dunaliella bardawil* 그리고 *Dunaliella tertiolecta*를 대상으로 하였을 때 이전 연구에서 무기 응집제인 Ferric chloride와 Ferric sulfate, Sodium aluminate가 각각 가장 높은 응집 효율을 보였다 [13]. 따라서 본 연구를 수행하는데 선택하였다 [13]. 그리고 생분해성 고분자 응집제로서 Chitosan, Starch, Sodium alginate와 Alginic acid를 가지고서 연구개발을 수행하였다.

연구를 수행하는데 있어서 Response surface methodology (RSM)를 이용하였다. RSM은 인자가 둘 이상일 때 인자 간 상호영향을 확인할 수 있고 One factor at a time (OFAT)에 비해 실험 시행 횟수를 최소화하고 통계적으로 신뢰성 있는 결과를 얻을 수 있기 때문이다. 무기응집제의 양, 생분해성 고분자응집제의 양 그리고 반응부피가 응집 효율과 응집제 사용 시 미세조류 배양액 pH에 미치는 영향을 확인하였다. 이를 통하여 통계적으로 응집제를 이용한 미세조류 수확 시 응집 효율을 증가시키고 친환경성을 증진시키는 최적 혼합 조건을 찾았다.

2. 실험재료 및 방법

2.1. 미세조류 및 시약

실험에 사용한 미세조류는 *Chlorella ellipsoidea*, *Dunaliella bardawil* 그리고 *Dunaliella tertiolecta*를 사용하였다. *Chlorella ellipsoidea* 경우는 (주)클로렌드로부터 구입하였으며 *Dunaliella sp.*의 경우 서강대학교 생명과학과 정광환교수님 연구실로부터 분양 받았다. 그리고 배양액의 농도를 1 이하로 희석 시킨 상태에서 사용하였다.

무기 응집제로는 Ferric chloride, Ferric sulfate, Sodium aluminate를 사용하였고 생분해성 고분자 응집제로는 Chitosan, Starch, Sodium alginate, Alginic acid를 사용하였다. 이들을 Sigma-Aldrich Korea (St. Louis, MO, USA), Kanto Chemical (Tokyo, Japan)로부터 구입하였다.

2.2. 응집제 종류 선정 방법

*Chlorella ellipsoidea*의 경우 무기응집제로 이전 연구결과에서 응집제 1 g 당 응집 효율이 높았던 Ferric chloride 고정하고 여기에 생분해성 고분자 응집제로 Chitosan, Starch, Sodium alginate, Alginic acid를 혼합하여 응집 효율과 pH를 확인하였다. *Dunaliella bardawil*의 경우는 생분해성 고분자 응집제로 *Chlorella ellipsoidea* 실험에서 가장 높은 효율을 보였던 Chitosan으로 고정된 후 무기 응집제를 Ferric ion을 포함한 Ferric chloride, Ferric sulfate 그리고 Sodium aluminate를 혼합하여 응집 효율과 pH를 확인하였다. *Dunaliella tertiolecta*의 경우도 마찬가지로 생분해성 고분자 응집제로 Chitosan을 고정된 후 무기 응집제로 Ferric chloride, Ferric sulfate 그리고 Sodium aluminate를 혼합하여 응집 효율과 pH를 확인하였다.

이 때, 각각의 미세조류 배양액의 양을 200 mL로 하였으며 첨가한 무기응집제의 양은 0.01 g, 생분해성 고분자 응집제 양은 0.5 g을 사용하였다.

2.3. 실험 계획과 통계적 분석 방법

다른 인자들은 고정시킨 상태에서 하나의 인자의 수준만을 변화시켜 인자의 영향을 확인하는 One factor at a time (OFAT) 방법에서는 인자 간 상호작용을 확인하기 어렵다. 따라서 통계적으로 인자간 상호작용을 고려하면서 응집 효율과 pH에 미치는 영향을 확인하여 최적의 인자 조건을 결정하기 위해 Response surface methodology (RSM)을 실시하였다. 이를 위해 Minitab (Release 14)에서 Box-Behnken 법을 사용하여 실험을 계획하였다. 인자는 무기 응집제 양 (A), 생분해성 고분자 응집제 양 (B), 반응부피 (C)로 정하였고 인자의 수준은 Table 1-3과 같다. 반복 수를 2로 하였고 중심점은 6개로 하여 30회 실험조건을 얻을 수 있었다.

Analysis of variance (ANOVA) 분석 시 P 값이 0.05보다 작을 때 유의하다고 결론 내렸다. 또한, R² 값을 통하여 실제 실험결과 값이 예상한 모델에 잘 들어 맞는지를 확인하였다.

2.4. 응집 방법

각각의 미세조류는 모든 실험은 상온 (25°C)에서 실시하였

으며 반응부피 100 mL인 경우 미세조류 배양액 100 mL를 250 mL Flask에 넣어 반응시켰고 반응부피가 250 mL, 400 mL인 경우 미세조류 배양액 250 mL, 400 mL를 500 mL Flask에 넣어 반응시켰다.

각각의 미세조류에 대하여 무기 응집제와 생분해성 고분자 응집제를 Table 1-3과 같은 조건으로 주입하였다. 그리고 10 sec동안 180 rpm 으로 빠르게 교반하여 응집제가 배양액 각 부분에서 농도가 일정 하도록 분산 시켜 주었다. 그리고 10 min동안 80 rpm에서 천천히 교반을 시켜줌으로써 응집제와 미세조류간 반응이 일어나게 했다. 마지막으로 반응 후에 교반을 중지시키고 10 min 동안 상온에서 침전시킨 후 상등액의 OD를 측정하였다.

Table 1. Variables used Box-Behnken design with actual factor levels corresponding to coded factor levels

Variables	Symbol	Coded levels		
		-1	0	-1
Ferric chloride (g)	A	0.01	0.03	0.05
Chitosan (g)	B	0.1	2.3	4.5
Reaction volume (mL)	C	100	250	400

Table 2. Variables used Box-Behnken design with actual factor levels corresponding to coded factor levels

Variables	Symbol	Coded levels		
		-1	0	-1
Ferric sulfate	A	0.01	0.03	0.05
Chitosan	B	0.00	0.25	0.50
Reaction volume	C	100	250	400

Table 3. Variables used Box-Behnken design with actual factor levels corresponding to coded factor levels

Variables	Symbol	Coded levels		
		-1	0	-1
Sodium aluminate	A	0.1	0.3	0.5
Chitosan	B	0.1	0.3	0.5
Reaction volume	C	100	250	400

2.5. 응집 효율 측정 방법

미세조류의 농도를 UV/vis spectrophotometer (Shimadzu BioSpec-mini, Japan)를 이용해서 Beer-Lambert 법칙에 의하여 분광학적인 방법으로 측정하였다. 응집 전에 미세조류 배양액의 수면으로부터 1 cm아래에서 상등액을 채취하여 UV/vis spectrophotometer를 이용해서 흡광도 (OD)를 확인했다. 그 뒤 미세조류 배양액에 응집제를 첨가하여 반응시켜 침전시킨 후 응집제 첨가 전과 마찬가지로 수면으로부터 1 cm 아래 상등액을 채취한 후 UV/vis spectrophotometer를 이용해서 흡광도 (OD)를 확인했다. 응집 전, 후의 흡광도 (OD)로부터 미세조류 농도를 결정하였다. 이 때, 미세조류 종류별로 *Chlorella ellipsoidea*는 750 nm에서 *Dunaliella bardawil* 과 *Dunaliella tertiolecta*는 640 nm에서 흡광도 (OD)를 측정하였다. 그리고 흡광도 (OD)와 미세조류 농도간의 선형적인

관계식으로부터 미세조류의 농도로 환산한 후 응집 정도를 응집 효율 (Flocculation efficiency)로 정의 하여 다음과 같은 식으로부터 얻었다.

$$\text{Flocculation efficiency (\%)} = (1 - B / A) \times 100$$

여기서 A: 응집 전 수면으로부터 1 cm 아래에 있는 상등액의 미세조류 농도, B: 응집 후 수면으로부터 1 cm 아래에 있는 상등액의 미세조류 농도

2.6. pH 측정 방법

pH측정은 pH meter (Mettler-Toledo InPro 3030, Swiss)를 이용하여 측정하였다.

3. 결과 및 고찰

3.1. 미세조류 종별 무기 응집제와 생분해성 고분자 응집제 혼합에 따른 영향 확인

이전 연구에서 미세조류를 수확하는데 있어서 무기 응집제가 대체적으로 높았으나 미세조류 종별로 응집제 종류에 따른 응집효과가 차이가 있음을 확인할 수 있었다 [13]. 따라서 해양 미세조류인 *Chlorella ellipsoidea*, *Dunaliella bardawil*과 *Dunaliella tertiolecta*를 응집하기 위하여 미세조류 종별로 무기 응집제와 생분해성 고분자 응집제 조합을 선정하기 위하여 아래와 같은 실험을 실시하였다.

해양 미세조류인 *Chlorella ellipsoidea*의 경우 이전 연구에서 응집제 중에서 1 g 당 응집 효율이 가장 높았던 Ferric chloride를 선택하였다 [13]. 여기에 생분해성 고분자 응집제로서 Chitosan, Starch, Sodium alginate, Alginic acid를 혼합시켜 주었다. Fig. 1(a) 에서 볼 수 있듯이 Ferric chloride를 단일로 사용했을 때보다 Chitosan과 Starch를 혼합시켰을 때 응집 효율이 더 높았으며 특히, Chitosan을 혼합하였을 때 가장 높은 응집 효율을 보였다. 그리고 pH값은 Ferric chloride를 단일로 사용하였을 때는 4로서 응집 후 미세조류 배양액이 강한 산성을 나타냈지만 Chitosan을 혼합시켜 주었을 때는 pH 6으로 약한 산성을 나타냈다. 이것은 해양 미세조류 수확 시 해수의 pH (8.2)에 훨씬 근접하기 때문에 Ferric chloride만 사용하는 것보다 Ferric chloride와 Chitosan을 혼합하여 응집제로 사용하는 것이 응집 효율과 친환경성을 높일 수 있다는 결론을 내릴 수 있었다.

미세조류 *Dunaliella bardawil*의 경우 무기 응집제로 Ferric chloride, Ferric sulfate, Sodium aluminate를 생분해성 고분자 응집제 Chitosan과 혼합하여 응집 효율과 pH를 측정하는 실험을 실시하였다. Fig. 1 (b)에서 볼 수 있듯이, 무기 응집제 Ferric sulfate에 생분해성 고분자 응집제 Chitosan을 혼합하였을 때 가장 높은 응집 효율을 보였다. 이것은 이전 연구 결과에서는 *Dunaliella bardawil*을 수확하는데 있어서 0.5 g/L의 Ferric sulfate와 Chitosan을 단일로 사용했을 때 각각에 대하여 응집이 일어나지 않았다 [13]. 반면에 혼합하였을 때는 응집이 일어난 것을 통하여 *Dunaliella bardawil*도 응집

Table 4. P value of analysis of variance for response surface quadratic model

Source	DF	<i>Chlorella ellipsoidea</i>		<i>Dunaliella bardawil</i>		<i>Dunaliella tertiolecta</i>	
		Flocculation efficiency	pH	Flocculation efficiency	pH	Flocculation efficiency	pH
Blocks	1	0.647	0.826	0.264	0.440	0.377	0.542
Regression	9	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
Linear	3	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
Square	3	0.015	0.000	0.001	0.000	0.000	0.000
Interaction	3	0.018	0.000	0.903	0.079	0.015	0.000
Residual Error	19						
Lack-of-Fit	15	0.531	0.104	0.438	0.576	0.396	0.001
Pure Error	4						
Total	29						

제 혼합을 통하여 응집 효율을 증가시킬 수 있다는 결론을 내릴 수 있었다. pH의 경우 무기 응집제의 종류에 관계없이 8.6~8.8의 값으로 큰 차이를 보이지 않았다.

미세조류 *Dunaliella tertiolecta*의 경우 Ferric chloride, Ferric sulfate, Sodium aluminate에 생분해성 고분자 응집제인 Chitosan을 혼합하여 응집시켰을 때 응집 효율과 pH를 확인하였다. Fig. 1(c)에서 볼 수 있듯이 Ferric chloride와 Ferric sulfate에 Chitosan을 혼합한 경우 응집이 일어나지 않았다. Sodium aluminate에 Chitosan을 혼합한 경우에만 응집이 일어났고 응집 효율은 약 70% 였으며 pH는 8.8을 나타냈다. 이전 연구결과에서는 Sodium aluminate만 0.25 g/L 사용하였을 때 응집 효율이 50% 였고 Chitosan만을 2.5 g/L 첨가했을 때 응집 효율이 20% 미만이었다 [13]. 따라서 *Dunaliella tertiolecta*의 경우도 응집제 혼합을 통하여 응집 효율 증가를 확인할 수 있었다.

무기 응집제와 생분해성 고분자 응집제를 혼합한 경우 혼합에 사용한 응집제를 하나만 사용했을 때 보다 더 적은 응집제 양으로도 응집 효율이 상승하였다. 응집제를 사용한 배양액의 pH가 해수의 pH인 8.2에 근접해짐을 확인할 수 있었다. 따라서 무기 응집제와 생분해성 고분자 응집제의 혼합을 통하여 각각의 첨가량을 감소시키면서 효율을 높이고 친환경성을 증진시키는 결과를 얻었다.

이를 바탕으로 하여 Response surface methodology를 이용하여 선정한 응집제들로부터 최적의 응집 혼합 조건을 찾기 위한 연구를 추가적으로 수행하였다.

3.2. RSM을 이용한 *Chlorella ellipsoidea*의 응집제 혼합 조건 최적화

배양한 해양 미세조류인 *Chlorella ellipsoidea*를 응집할 때 Ferric chloride와 Chitosan의 혼합 최적조건을 찾고자 RSM을 이용하였다. 이 때, 독립 변수로서 Ferric chloride의 양, Chitosan의 양, 반응 부피로 정하였으며 종속 변수로서 응집 효율과 pH를 확인하였다.

30회 실험을 통하여 응집제 양 및 반응부피에 따른 *Chlorella ellipsoidea*의 응집 효율에 대해 다음과 같은 2차식 형태의 모델을 얻을 수 있었다.

$$F.E. = 24.8 + 1346.8 \times A - 27.7 \times B + 0.3 \times C - 20980.1 \times A^2 + 1.0 \times B^2 + 177.0 \times AB + 0.1 \times AC$$

Table 4에서 볼 수 있듯이 R² 값은 81.3%로서 이것은 실제

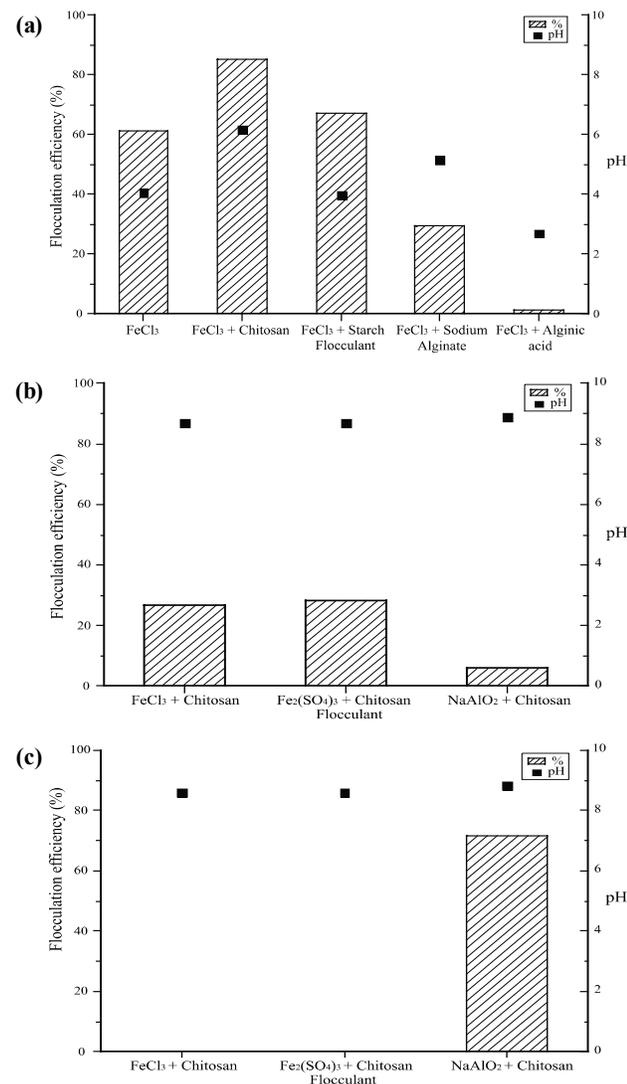


Fig. 1 Comparison of flocculation efficiency in various flocculants of *Chlorella ellipsoidea* (a), *Dunaliella bardawil* (b), and *Dunaliella tertiolecta* (c).

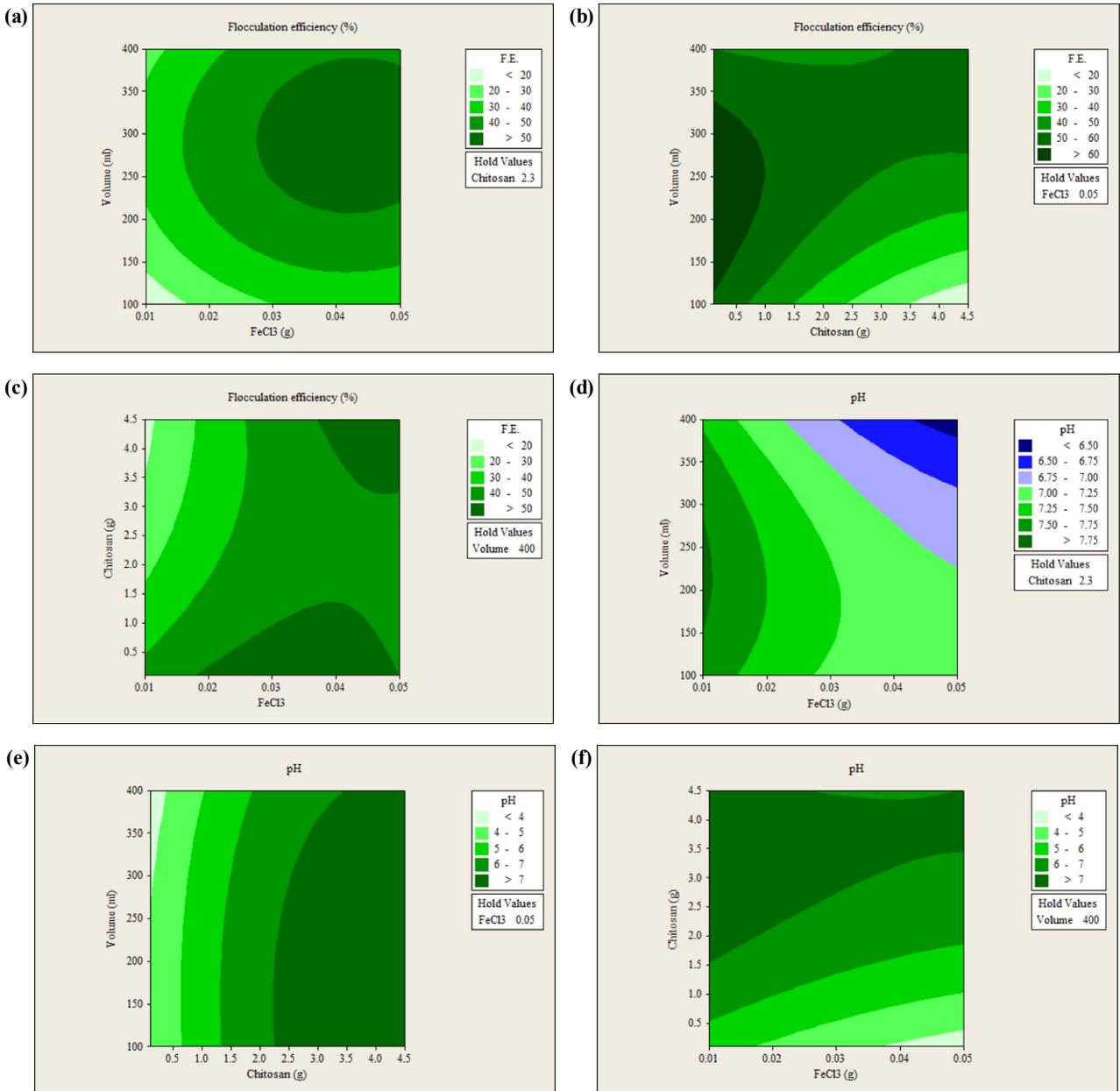


Fig. 2 Contour plot of flocculation efficiency by the combined effects between FeCl₃ and reaction volume (a), chitosan and reaction volume (b), and FeCl₃ and chitosan (c) Contour plot of pH by the combined effects between FeCl₃ and reaction volume (d), chitosan and reaction volume (e), and FeCl₃ and chitosan (f).

실험값이 위의 모델에 일치하는 정도를 나타내고 있다. 그리고 회귀분석에 대한 P값이 0.05보다 작기 때문에 유의 하다고 결론 내릴 수 있다. 또한, 잔차 오차의 적합성 결여 테스트의 P값이 0.531로 0.05보다 크다. 이것은 위의 2차식 형태의 모델이 반응표면을 적절하게 적합 시킨다고 볼 수 있다.

그리고 응집제 양 및 반응부피에 따른 *Chlorella ellipsoidea*의 pH에 대해 다음과 같은 2차식 형태의 모델을 얻을 수 있었다.

$$pH = 5.462 - 54.194 \times A + 1.455 \times B + 0.005 \times C + 338.542 \times A^2 - 0.235 \times B^2 + 9.858 \times AB - 0.038 \times AC$$

Table 4에서 볼 수 있듯이 R² 값은 98.3%로서 이것은 실제 실험값이 위의 모델에 잘 일치하고 있다는 것을 보여 준다. pH에 대한 회귀분석 결과에 대한 P값이 0.05보다 작으므로 유의 하다고 할 수 있다. 또한, 잔차 오차의 적합성 결여 테스트의 P값이 0.104로 0.05보다 크다. 이는 위의 2차식 형태의 모델이 반응표면을 적절하게 적합 시킨다고 볼 수 있다.

Fig. 2(a)는 Chitosan의 양이 2.3 g으로 일정할 때 Ferric chloride와 반응 부피의 변화에 따른 응집 효율 경향을 나타낸다. 반응 부피가 250 mL 이상의 반응 부피에서 Ferric chloride의 첨가량이 0.03 g 이상일 때 높은 응집 효율을 나타낸다.

Fig. 2(b)는 Ferric chloride의 양이 0.05 g으로 일정할 때

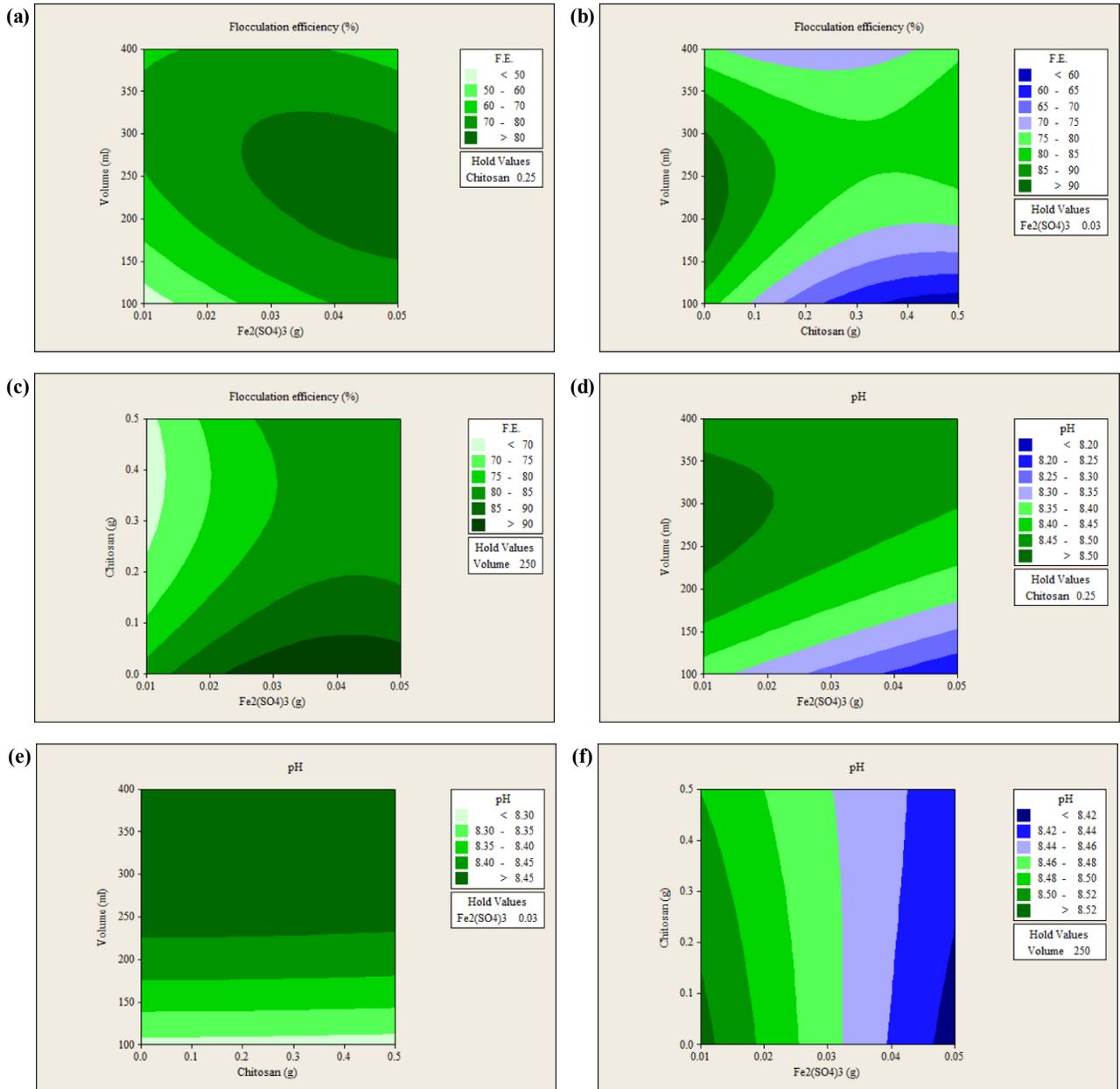


Fig. 3. Contour plot of flocculation efficiency by the combined effects between $Fe_2(SO_4)_3$ and reaction volume (a), chitosan and reaction volume (b), and $Fe_2(SO_4)_3$ and chitosan (c). Contour plot of pH by the combined effects between $Fe_2(SO_4)_3$ and reaction volume (a), chitosan and reaction volume (b), and $Fe_2(SO_4)_3$ and chitosan (c).

Chitosan과 반응 부피의 변화에 따른 응집 효율을 나타낸다. 반응 부피가 100 mL~350 mL 경우 Chitosan를 1.0 g 이하로 첨가할 때 60% 이상의 응집 효율 경향을 보인다.

Fig. 2(c)는 부피가 400 mL로 일정할 때 Ferric chloride와 Chitosan의 첨가량 변화에 따른 응집 효율을 나타낸다. Ferric chloride의 양이 0.05 g/L이상, Chitosan의 양이 3.75 g/L이하인 경우와 Ferric chloride의 양이 0.1 g/L이상, Chitosan의 양이 7.5 g/L 이상을 혼합한 경우가 가장 높은 응집 효율 경향을 보인다.

Fig. 2(d)는 Chitosan의 양이 2.3 g으로 일정할 때 Ferric chloride와 반응 부피의 변화에 따른 pH를 보여준다. Ferric

chloride의 양이 감소할수록 pH가 증가한다. Fig. 2(a)에서 응집 효율이 높았던 250 mL~400 mL, 0.03 g~0.05 g에서는 pH가 7.25보다 낮은 경향을 보인다.

Fig. 2(e)는 Ferric chloride의 양이 0.05 g으로 일정할 때 Chitosan과 반응 부피의 변화에 따른 pH경향을 나타낸다. Chitosan이 감소할수록 pH가 감소하는 경향을 보인다. Fig. 2(b)에서 응집 효율이 높았던 범위에서 pH의 값이 5 이하로 나타나는데 이것은 해수 조건에 적합하지 않은 pH이다. 따라서 해수 조건 (해수 pH = 8.2) 범위에 근접한 pH를 갖는 반응 부피 250 mL 이상, Chitosan 첨가량 2.0 g 이상일 때가 최적이라는 결론을 내렸다.

Fig. 2(f)는 부피가 400 mL로 일정할 때 Ferric chloride와 Chitosan의 첨가량 변화에 따른 pH를 나타낸다. Ferric chloride와 Chitosan의 농도가 최적의 pH를 가지면서 응집 효율이 높은 범위를 찾으면 Ferric chloride가 0.1 g/L이상, Chitosan이 7.5 g/L 이상 첨가했을 때가 최적이라는 결론을 내렸다.

3.3. RSM을 이용한 *Dunaliella bardawil*의 응집제 혼합 조건 최적화

배양한 해양 미세조류인 *Dunaliella bardawil*의 경우 무기 응집제로서 Ferric sulfate를 생분해성 고분자 응집제로서 Chitosan을 혼합하였을 때 높은 응집 효율을 보였으므로 이 응집제 들의 양과 반응 부피를 변화시키면서 RSM을 이용하여 응집 효율과 pH에 미치는 영향을 확인하는 실험을 수행하였다. *Chlorella ellipsoidea*와 마찬가지로 Box-Behnken 법으로 계획한 30회 실험을 통하여 다음과 같은 2차식 형태의 모델을 얻을 수 있었다.

$$F.E. = 20.8 + 1716.2 \times A - 124.1 \times B + 0.4 \times C - 12571.0 \times A^2 + 94.0 \times B^2 + 201.5 \times AB - 2.7 \times AC + 0.2 \times BC$$

Table 4에서 볼 수 있듯이 R² 값은 74.0%로서 이것은 실제 실험값이 위의 모델에 어느 정도 일치하는지를 나타낸다. 또한, 회귀분석에 대한 P값이 0.001로서 회귀분석 결과가 유의 하다고 볼 수 있다.

$$pH = 8.24413 - 6.40625 \times A - 0.07583 \times B + 0.00232 \times C + 6.25000 \times A^2 - 0.02000 \times B^2 + 2.25000 \times AB + 0.01250 \times AC + 0.00003 \times BC$$

pH에 대한 모델의 경우 Table 4에서 볼 수 있듯이 R² 값은 89.1% 로서 이것은 실제 실험값이 위의 모델에 일치하는 정도를 나타내고 있다. 회귀분석에 대한 ANOVA 분석 시 Interaction에 대한 P값이 0.079로 0.05 보다 크기 때문에 Ferric sulfate 양, Chitosan 양, 반응부피 상호작용에 대한 회귀분석 결과는 유의하지 않다고 볼 수 있지만 전체적인 회귀분석 결과에 대한 P값은 0.000이기 때문에 유의 하다고 볼 수 있다. 또한, 잔차 오차의 적합성 결여 테스트의 P값이 0.576로 0.05보다 크다. 이것은 위의 2차식 형태의 모델이 반응표면을 적절하게 적합 시킨다고 볼 수 있다.

Fig. 3(a)는 Chitosan이 0.25 g/L 일 때 반응 부피와 Ferric sulfate의 변화에 따른 응집 효율을 나타낸다. 반응 부피가 150 mL~300 mL이고 Ferric sulfate가 0.03 g~0.05 g 영역이 응집 효율 80% 이상의 높은 응집 효율을 보인다.

Fig. 3(b)는 Ferric sulfate를 0.03 g일 때 Chitosan과 반응 부피 변화에 따른 응집 효율을 나타낸다. 반응 부피가 150 mL~300 mL 구간에서 70% 이상의 응집 효율을 보이며 Chitosan 첨가량이 감소할수록 응집효율이 증가하는 경향을 보이며 보인다.

Fig. 3(c)는 반응 부피를 250 mL로 하였을 때 Ferric sulfate와 Chitosan의 첨가량을 변화에 따른 응집 효율을 나타낸다. 여기서는 Ferric sulfate 0.08 g/L이상, Chitosan 1.2 g/L

이하로 혼합 시에 80% 이상의 높은 응집 효율을 보인다.

Fig. 3(d)는 Chitosan이 0.25 g 일 때 Ferric sulfate와 반응 부피의 변화에 따른 pH를 나타낸다. Fig. 3(a)에서 높은 응집 효율을 보였던 반응 부피가 150 mL~300 mL이고 Ferric sulfate가 0.03 g~0.05 g 영역에서의 pH는 8.35~8.5의 값을 보인다.

Fig. 3(e)는 Ferric sulfate가 0.03 g일 때 Chitosan 첨가량과 반응 부피 변화에 따른 pH를 나타낸다. 여기에서 Chitosan 양에 상관없이 반응 부피가 커질수록 pH의 값이 높아지는 경향을 확인할 수 있었으며, pH 측정 결과 pH 8 이상의 값을 유지하였다. 이것은 추정된 회귀 계수에 대한 Chitosan의 P값이 0.669이고 반응 부피에 대한 P값이 0.000으로서 반응 부피가 pH에 대하여 중요한 인자라는 통계적 분석 결과를 만족한다. 따라서 응집 효율과 pH 둘 다 고려하였을 때 Chitosan 0.05 g 이하, 반응 부피 150 mL~300 mL으로 응집 시킬 때 최적 조건이라는 결론을 내릴 수 있다.

Fig. 3(f)는 반응 부피가 250 mL일 때 Chitosan과 Ferric sulfate의 첨가량 변화에 따른 pH를 나타낸다. 여기에서 Ferric sulfate 첨가량이 증가할수록 pH는 증가하는 경향을 보인다. 그리고 Chitosan보다는 Ferric sulfate 변화에 따른 pH 변화를 가지적으로 확인할 수 있다. 이것은 추정된 회귀계수에서 Ferric sulfate의 P값이 0.024로서 0.05보다 작을 경우 pH에 대하여 중요한 인자라는 통계적 분석결과를 만족한다.

3.4. RSM을 이용한 *Dunaliella tertiolecta*의 응집제 혼합 조건 최적화

미세조류 *Dunaliella tertiolecta*에 대하여 응집제를 혼합하는 앞선 실험에서 Fig. 1(c)에서 선정된 무기 응집제 Sodium aluminate와 생분해성 고분자 응집제 chitosan을 혼합하여 높은 응집 효율과 해수 (pH 8.2)에 적합한 pH를 갖는 응집제 양과 반응 부피 조건을 찾기 위한 실험을 진행하였다.

*Dunaliella tertiolecta*도 마찬가지로 Box-Behnken 법으로 계획한 30회 실험을 통하여 다음과 같은 2차식 형태의 모델을 얻을 수 있었다.

$$F.E. = 89.523 + 137.598 \times A - 67.274 \times B - 0.495 \times C - 23.646 \times A^2 + 132.323 \times B^2 + 0.001 \times C^2 - 25.281 \times AB - 0.312 \times AC - 0.049 \times BC$$

Table 4에서 볼 수 있듯이 R² 값은 90.7%로서 이것은 실제 실험값이 위의 모델에 거의 일치함을 나타낸다. 또한, 잔차 오차의 적합성 결여 테스트 P값이 0.396으로 0.05보다 크다. 이것은 위의 2차식 형태의 모델이 반응표면을 적절하게 적합 시킨다고 볼 수 있다.

$$pH = 9.05595 + 4.46458 \times A - 0.26250 \times B - 0.00575 \times C + 0.29167 \times A^2 + 0.54167 \times B^2 + 0.00001 \times C^2 - 0.01058 \times AC - 0.00050 \times BC$$

Table 4에서 볼 수 있듯이 R² 값은 98.6% 로서 이것은 실제 실험값이 위의 모델에 잘 일치함을 보인다. 또한, ANOVA

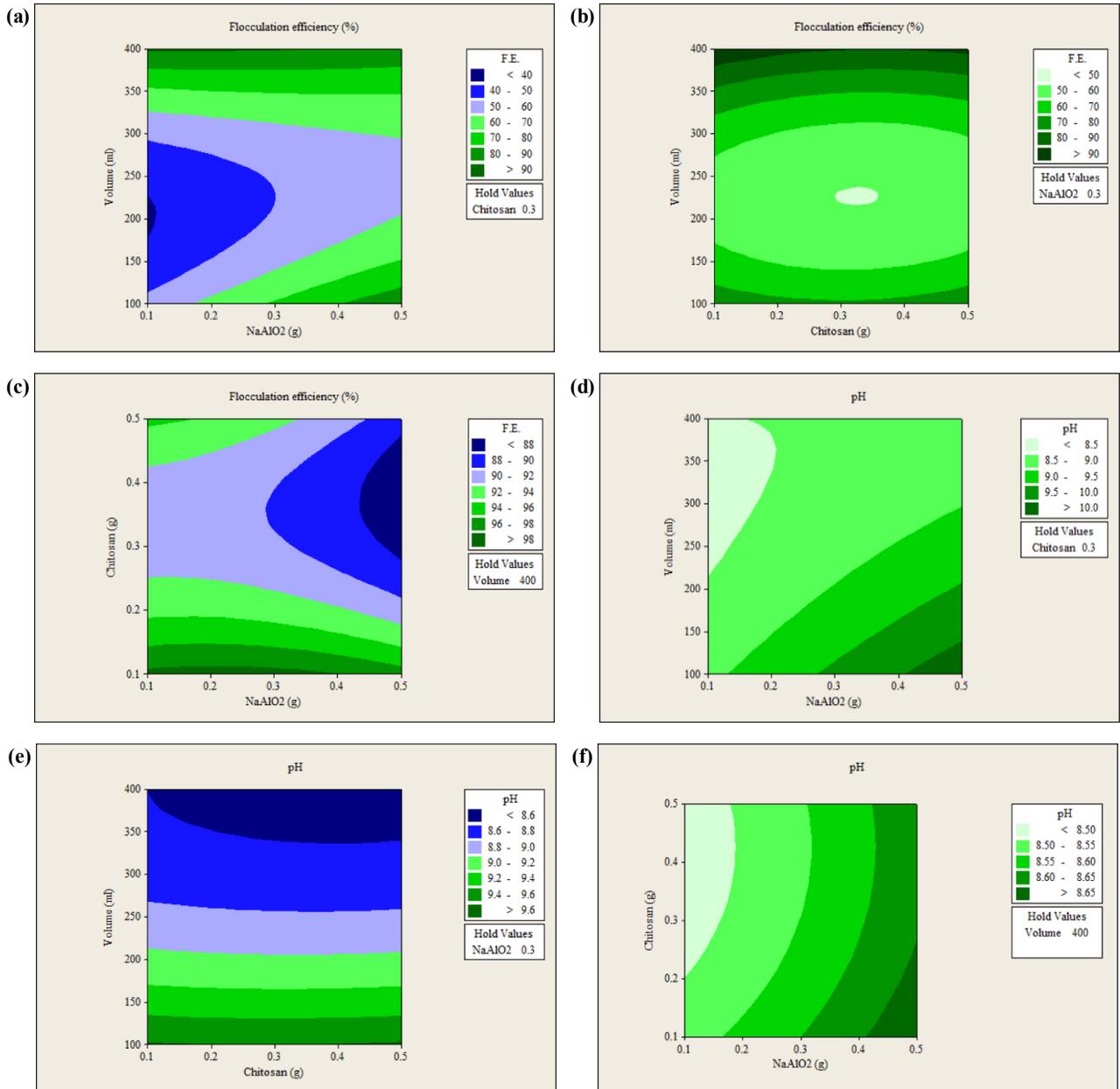


Fig. 4. Contour plot of flocculation efficiency by the combined effects between NaAlO₂ and reaction volume (a), chitosan and reaction volume (b), and NaAlO₂ and chitosan (c). Contour plot of pH by the combined effects between NaAlO₂ and reaction volume (d), chitosan and reaction volume (e), and NaAlO₂ and chitosan (f).

분석에서 회귀분석 결과에 대한 P값이 0.000으로서 유의하다고 볼 수 있다.

Fig. 4(a)는 Chitosan을 0.3 g으로 하였을 때 Sodium aluminate와 반응 부피 변화에 따른 응집 효율을 나타낸다. Sodium aluminate 양이 0.03 g 이상, 반응 부피 100 mL~150 mL 또는 325 mL~400 mL 이상 일 때 응집 효율이 60% 이상을 보였다.

Fig. 4(b)는 Sodium aluminate를 0.3 g 첨가하였을 때 Chitosan과 반응 부피의 변화에 따른 응집 효율을 나타낸다. 반응 부피가 350 mL 이상일 때 응집 효율이 70% 이상을 보인다.

Fig. 4(c)는 반응 부피가 400 mL일 때 Sodium aluminate와 Chitosan 첨가량에 따른 응집 효율을 나타낸다. 응집체의 양에 따라서 응집 효율 차이가 적고 86% 이상의 높은 응집 효율을 보인다.

Fig. 4(d)는 Chitosan을 0.3 g 첨가하였을 때 Chitosan과 반응 부피의 변화에 따른 pH를 나타낸다. 반응 부피가 감소할수록 Sodium aluminate가 증가할수록 pH가 증가하는 경향을 보인다. 반응 부피 200 mL 이상, sodium aluminate 0.2 g 영역에서 pH가 8.5 이하를 갖는다. 이것은 해수에 근접한 pH 범위이다.

따라서 Fig. 4(a)와 Fig. 4(d)를 비교해보면, 해수에 근접한

pH를 가지면서 높은 응집 효율을 갖는 반응 부피 200 mL 이상, sodium aluminate 0.2 g 이하가 최적 조건이라는 결론을 내릴 수 있다.

Fig. 4(e)는 Sodium aluminate를 0.3 g 첨가하였을 때 Chitosan과 반응 부피의 변화에 따른 pH를 나타낸다. Chitosan 첨가량에 상관없이 반응 부피가 증가할수록 pH가 낮아지는 경향을 보인다. 특히, 350 mL~400 mL 일 때 pH 8.6 이하로 해수에 가장 적합하였다. 이것은 Fig. 4(b)에서 반응 부피 350 mL이상 일 때 70% 이상의 응집 효율을 보이는 응집 조건과 상응하기 때문에 이 조건에서 응집을 실시하는게 적절하다.

Fig. 4(f)는 반응 부피가 400 mL 일 때 Chitosan과 Sodium aluminate 첨가량 변화에 따른 pH를 나타낸다. Sodium aluminate 첨가량이 증가할수록 pH가 증가하며 Chitosan이 증가할수록 pH가 감소하는 경향을 보인다.

Fig. 4(c)와 Fig. 4(f)를 비교하였을 때 해수 조건에 가장 근접한 pH 범위인 pH가 8.45~8.5인 Sodium aluminate 1.0 g/L이상, Chitosan 0.75 g/L 이하일 때가 90% 이상의 응집 효율을 만족시키면서 해수에 적합한 pH도 만족시키는 최적 조건으로 보인다.

4. 결론

해양 미세조류 중 (Species), 속 (Genus)에 따라 적합한 응집제가 있는데 *Chlorella ellipsoidea*의 경우 무기 응집제로 Ferric chloride와 생분해성 고분자 응집제 Chitosan을 사용하였으며, 응집이 일어나기 위해서 최적의 pH 조건을 가지는 Ferric chloride의 양이 0.1 g/L, Chitosan의 양이 7.5 g/L을 혼합하였을 때가 최적이라는 결론을 내릴 수 있었다.

*Dunaliella bardawil*의 경우는 무기 응집제로서 Ferric sulfate와 생분해성 고분자 응집제 Chitosan을 혼합하였을 경우 높은 응집 효율이 나타나는 것을 확인할 수 있었으며, 해수 pH에 적합한 8.5 부근의 범위를 보이면서 높은 응집 효율을 얻기 위해서는 Ferric sulfate의 첨가량을 0.12 g/L으로, Chitosan의 첨가량을 1.0 g/L으로 하는 것이 최적 조건이라는 결론을 내릴 수 있었다.

*Dunaliella tertiolecta*의 경우는 pH가 8.6부근 일 때의 응집 조건이 Sodium aluminate를 1.0 g/L, Chitosan을 0.75 g/L 혼합하여 첨가하는 것이 최적이라는 결론을 내릴 수 있었다.

본 연구를 통해서 독성이 있는 무기 응집제의 양을 줄이면서 동시에 친환경적인 생분해성 고분자 응집제를 같이 사용함으로써 응집 효율을 증가시키고 응집 후 해수에 적합한 pH를 갖는다는 사실과 함께 통계적인 방법을 이용하여 최적 조건을 제시할 수가 있었다. 이러한 최적화한 응집 방식은 미세조류 응집 시 응집제의 양을 줄이면서 응집 효율을 증가시키는 경제적인 장점을 지님과 동시에 응집 후 해수에 적합한 pH를 갖는 환경적인 장점을 지니고 있기 때문에 본 연구결과는 미세조류 기반 바이오 디젤 생산뿐만 아니라 다양한 산업분야에서 활용되어지는 응집 방식에 적용되어질 수 있으리라 기대한다.

감사

본 연구는 국토해양부 소관 해양생명공학기술개발사업의 연구비 지원에 의해 수행되었습니다.

References

- Brennan, L. and P. Owende (2010) Biofuels from microalgae-A review of technologies for production, processing, and extractions of biofuels and co-products. *Renew. Sustain. Energ. Rev.* 14: 557-577.
- Sharif Hossain, A. B. M. and A. Salleh (2008) Biodiesel Fuel Production from Algae as Renewable Energy. *Am. J. Biochem. Biotech.* 4: 250-254.
- Szkló, A. and R. Schaeffer (2006) Alternative energy sources or integrated alternative energy systems? Oil as a modern lance of Peleus for the energy transition. *Energ.* 31: 2513-2522.
- Junginger, M., T. Bolkesjø, D. Bradley, P. Dolzan, A. Faaij, J. Heinimö, B. Hektor, Ø. Leistad, E. Ling, M. Perry, E. Piacente, Frank, R. C., Y. Ryckmans, P. P. Schouwenberg, B. Solberg, E. Trømborg, A. da S. Walter, and M. de Wit (2008) Developments in international bioenergy trade. *Biomass Bioenerg.* 32: 717-729.
- Harun, R., M. Davidson, M. Doyle, R. Gopiraj, M. Danquah, and G. Forde (2011) Technoeconomic analysis of an integrated microalgae photobioreactor, biodiesel and biogas production facility. *Biomass Bioenerg.* 35: 741-747.
- Li, Y., M. Horsman, N. Wu, C. Q. Lan, and Nathalie D. C. (2008) Biofuels from Microalgae. *Biotechnol. Prog.* 24: 815-820.
- Chisti Y. (2007) Biodiesel from microalgae. *Biotechnol. Adv.* 25: 294-306.
- Raja, R., S. Hemaiswarya, N. A. Kumar, S. Sridhar, and R. Rengasamy (2008) A perspective on the biotechnological potential of microalgae. *Crit. Rev. Microbiol.* 34: 77-88.
- Lee, A. K., D. M. Lewis, and P. J. Ashman (2009) Microbial flocculation, a potentially low-cost harvesting technique for marine microalgae for the production of biodiesel. *J. Appl. Phycol.* 21: 559-567.
- Dismukes, C. G., D. Carrieri, N. Bennette, G. M. Ananyev, and M. C. Posewitz (2008) Aquatic phototrophs: efficient alternatives to land-based crops for biofuels. *Curr. Opin. Biotechnol.* 19: 235-240.
- Somasundaran, P. and T. Hubbard (2006) *Encyclopedia of surface and colloid science*. 2nd ed., pp. 2588-2591. CRC Press, Taylor & Francis Group, NY, USA.
- Uduman, N., Y. Qi, M. K. Danquah, G. M. Forde, and A. Hoadley (2010) Dewatering of microalgal cultures: A major bottleneck to algae-based fuels. *J. Renew. Sustain. Energ.* 2, 012701.
- Kwon, D. Y., C. K. Jung, K. B. Park, C. G. Lee, and J. W. Lee (2011) Flocculation characteristics of microalgae using chemical flocculants. *Korean J. Biotechnol. Bioeng.* 26: 143-150.
- Kurane, R. and H. Matsuyama (1994) Production of a bioflocculant by mixed culture. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 58: 1589-1594.
- Patil, S. V., C. D. Patil, B. K. Salunke, R. B. salunkhe, G. A. Bathe, and D. M. Patil (2011) Studies on characterization of bioflocculant exopolysaccharide of *Azotobacter indicus* and its potential for wastewater treatment. *Appl. Biochem. Biotechnol.* 163: 463-472.

16. Salehizadeh, H. and S. A. Shojaosadati (2002) Isolation and characterization of a bioflocculant produced by *Bacillus firmus*. *Biotechnol. Lett.* 24: 35-40.
17. Divakaran, R. and V. N. Sivasankara Pillai (2002) Flocculation of algae using chitosan. *J. Appl. Phycol.* 14: 479-422.
18. Vandamme, D., I. Foubert, B. Meesschaert, and K. Muylaert (2010) Flocculation of microalgae using cationic starch. *J. Appl. Phycol.* 22: 525-530.
19. Oh, H. M., S. J. Lee, M. H. Park, H. S. Kim, H. C. Kim, J. H. Yoon, G. S. Kwon, and B. D. Yoon (2001) Harvesting of *Chlorella vulgaris* using a bioflocculant from *Paenibacillus* sp. AM49. *Biotechnol. Lett.* 23: 1229-1234.
20. Golueke, C. G. and W. J. Oswald (1965) Harvesting and processing sewage-grown planktonic algae. *J. Water Pollut. Contr.* 37: 471-498.
21. Lubián L. M. (1989) Concentrating cultured marine microalgae with chitosan. *Aquacul. Engineer.* 8: 257-265.
22. Morales, J., J. de la Noüe, and G. Picard (1985) Harvesting marine microalgae species by chitosan flocculation. *Aquacul. Engineer.* 4: 257-270.
23. Gualtieri, P., L. Barsanti, and V. Passarelli (1988) Chitosan as flocculant for concentrating *Euglena gracilis* cultures. *Ann. Inst. Pasteur. Microbiol.* 139: 717-726.
24. Lertsutthiwong, P., S. Sutti, and S. Powtongsook (2009) Optimization of chitosan flocculation for phytoplankton removal in shrimp culture ponds. *Aquacul. Engineer.* 41: 188-193.
25. Grima, E. M., E. H. Belarbi, F. G. A. Fernandez, A. R. Medina, and Y. Chisti (2003) Recovery of microalgal biomass and metabolites: process options and economics. *Biotechnol. Adv.* 20: 491-515.