Korean Society for Biotechnology and Bioengineering Journal 29(2): 98-105 (2014)
http://dx.doi.org/10.7841/ksbbj.2014.29.2.98 ISSN 1225-7119 / eISSN 2288-8268

연구논문

초임계 이산화탄소와 유기용매를 이용한 *Chlorella vulgaris* 오일의 추출

유종훈*, 박미란, 임교빈

Extraction of Oil from *Chlorella vulgaris* Using Supercritical Carbon Dioxide and Organic Solvent

Jong-Hoon Ryu*, Mi-Ran Park, and Giobin Lim

접수: 2014년 1월 22일 / 게재승인: 2014년 3월 17일
© 2014 The Korean Society for Biotechnology and Bioengineering

Abstract: Three different types of extraction processes, which used supercritical carbon dioxide ($SCCO_2$) and organic solvent, were attempted to improve the extraction yield of oil from *Chlorella vulgaris*: cosolvent-modified $SCCO_2$ extraction, $SCCO_2$ extraction with ultrasonic sample treatment in organic solvent, and static extraction with organic solvent followed by dynamic $SCCO_2$ extraction. Among these, the last $SCCO_2$ extraction process was found to be most effective in the extraction of oil. Compared with pure $SCCO_2$ extraction, the extraction yield of oil was observed to increase about 7 times.

Keywords: *Chlorella vulgaris*, Supercritical carbon dioxide, Extraction, Oil, Organic solvent

1. INTRODUCTION

인류는 산업혁명 이후 다양한 형태로 요구되는 엄청난 양의 에너지를 얻기 위해 오랜 기간에 걸쳐 땅 속에서 형성된 석탄, 석유, 천연가스 등의 화석연료를 사용해 왔다. 하지만 과도한 화석연료의 사용으로 인해 지구의 온난화와 환경오염 문제가 점차로 심각해지고 있는 상황이다. 특히, 화석연료의 사용으로 배출되는 온실가스에 의해 발생된 지구 온난화와 이로 인한 기후변화는 현재 인류의 삶을 심각하게 위협하고 있으며, 더욱이 화석연료도 멀지 않은 시일 내에 고갈될 것으로 예측되고 있다 [1]. 이로 인해 전 세계적으로 고유가가 구조적으로 지속될 것이라는 전망과 OPEC의 감산, 개발도상국 중심의 급속한 수요 증가 등 어려운 에너지 수급 여건 속에서 에너지 자립을 위한 방안을 모색하려는 노력을 지속적으로 하고 있다 [2,3].

계속되는 고유가와 환경오염 및 지구 기후변화에 대한 사회적 인식의 증가로 새로운 대체에너지의 개발에 대한 관심이 증가하고 있으며, 태양열 · 태양광, 풍력, 조력, 수력 등의 자연 에너지와 바이오에탄올 (bio-ethanol)과 바이오디젤 (bio-diesel) 같은 바이오연료 (biofuel)의 개발에 많은 투자와 연구가 이루어지고 있다. 특히, 바이오연료는 재생 가능한 바이오매스 (biomass)를 통해 생산이 가능할 뿐만 아니라 전주기적 관점에서 고려할 때 이산화탄소의 발생이 거의 없다고 할 수 있기 때문에 환경 친화적이며 지속가능한 대체에너지로 주목받고 있다 [4,5].

바이오연료에 대한 사회적 요구가 커짐에 따라 바이오연료 생산을 위한 원료에 대한 수요와 관심도 지속적으로 증가하고 있는 상황이다. 바이오디젤 생산을 위한 1세대와 2세대 바이오매스로는 유채, 대두, 팜유 등과 같은 식용작물과 자트로파 (*Jatropha*)와 같은 비식용작물을 들 수 있다 [5,6]. 이러한 식용 또는 비식용 작물 바이오매스의 경우 식용작물을 재배할 수 있는 경작지를 바이오연료 생산을 위해 제공해야 하고, 이로 인해 곡물의 가격이 상승하는 사회적인 문제를 야

수원대학교 화학공학과
Department of Chemical Engineering, The University of Suwon, Hwaseong 445-743, Korea
Tel: +82-31-220-2599, Fax: +82-31-220-2528
e-mail: jhryu@suwon.ac.kr

기하고 있다 [5]. 따라서 최근에는 바이오연료 생산을 위한 3세대 바이오매스로 미세조류 (microalgae)를 이용하려는 연구가 활발히 진행되고 있으며, 이는 육상 식물에 비해 재배 가능 면적이 넓고 더 높은 생산 능력을 가지고 있기 때문이다 [5].

연못, 담수호, 바다와 같은 수상환경에서 서식하는 단세포성 조류 (algae)인 미세조류는 식물에 비해 증식속도가 빠르고, 기능 향상을 위한 유전자 조작이 용이하기 때문에 다양한 종류의 유용물질을 효율적으로 생산할 수 있다는 특징을 가지고 있다. 즉, 미세조류는 일반적인 토양 작물에 비해 성장속도가 매우 빠르고 단위 면적당 수십에서 수백 배 많은 오일을 생산할 수 있어 소규모의 경작지만으로도 배양이 가능하며, 염분이나 강한 알칼리성 환경에서도 성장할 수 있다는 장점을 가지고 있다 [5,7]. 해조류의 경우 탄수화물 함유량이 높아 바이오에탄올의 생산에 주로 이용되며, 미세조류는 지질 함유량이 높아 바이오디젤의 생산에 적합하다 [8]. 특히, 미세조류로부터 생산되는 오일은 바이오디젤로의 전환이 용이하기 때문에 미래의 에너지 자원으로 높은 관심을 받고 있다 [8,9].

미세조류의 오일 추출방법으로는 압착법, 유기용매 추출, 효소 추출, 삼투 추출 등을 사용할 수 있으며, 일반적으로 가장 널리 이용되는 추출법은 용매 추출법이나 이 방법의 경우 다량의 유기용매가 사용되어 추출 후 사용된 유기용매의 처리와 환경오염의 문제가 발생할 수 있다는 문제점을 갖고 있다. 기존의 오일 추출공정의 단점을 보완하고 개선하기 위한 환경 친화적인 대체기술로서 초임계 이산화탄소 (supercritical carbon dioxide, $SCCO_2$)를 이용한 초임계 유체 추출 (supercritical fluid extraction) 기술에 대한 연구가 활발히 진행되고 있다 [10-14].

초임계 유체 추출 기술은 높은 열 및 물질전달 속도, 매우 낮은 점도, 높은 확산계수로 인한 시료 내부로의 빠른 침투, 감압에 의한 추출물과의 자발적 분리 등과 같은 초임계 유체의 특성을 이용한 기술로서 추출이외에도 화학반응 및 분해, 증류, 결정화, 세정, 건조 등의 다양한 공정에서 저효율, 저품질, 환경오염 등과 같은 기술적인 어려움을 해결할 수 있는 기술이다 [13-15].

초임계 유체 기술에서 가장 널리 사용되고 있는 초임계 이산화탄소의 경우 임계온도와 압력이 각각 31°C와 7.3 MPa로 비교적 온화한 조건에서 작업할 수 있어 천연물 유효성분의 추출에 매우 적합하며, 무독성, 불연성, 저렴한 가격 등의 장점을 가지고 있으며, 온도와 압력 등의 공정조건의 변화와 보조용매 (cosolvent)의 사용을 통해 추출 대상물에 대한 다양한 용해력과 선택성을 부여할 수 있다는 장점을 가지고 있다 [14].

본 저자들에 의해 수행된 선행 연구 [15]의 실험결과에 의하면 초임계 이산화탄소만을 이용하여 미세조류로부터 오일을 추출하는 경우 유기용매 추출에 비해 매우 낮은 추출 효율이 나타났다. 이에 본 연구에서는 초임계 이산화탄소를 이용하여 녹색 미세조류인 *Chlorella vulgaris* (*C. vulgaris*)로부터 오일을 추출하는 공정에 세 가지 다른 방식으로 유기 용매를 첨가하여 추출 효율을 향상시키려는 시도를 하였다. 구체적으로 유기용매가 첨가된 초임계 이산화탄소 추출에서 유기용매의 첨가량, 유기용매를 이용한 초음파 전처리, 정적 추출 시간 (static extraction time) 등의 공정 변수가 미세조류 오일의 추출에 미치는 영향을 조사하였다.

2. MATERIALS AND METHOD

2.1. 실험재료

녹색 미세조류인 *C. vulgaris*는 (주)대상에서 분말 상태로 구입하였으며, 실온에서 보관한 뒤 실험직전에 건조하여 사용하였다. 초임계 유체로는 순도 99.5%의 이산화탄소 ((주)동민특수가스, 대한민국)를 사용하였으며, 분석 및 추출에 사용된 유기용매는 Fisher Scientific에서 분석등급으로 구입하여 더 이상 정제 없이 사용하였다. 추출물에 포함된 오일의 지방산 분석에는 지질 표준물질 (fatty acid methyl ester (FAME) mixtures; C4-C24, 99.9%, Supelco, USA)을 heptane에 용해시켜 사용하였다. 추출물 내 오일 함량 분석을 위해 potassium hydroxide (KOH, 85%, 덕산종합과학, 대한민국)와 methanol (Fisher Scientific, USA)을 구입하여 사용하였다.

2.2. 유기용매가 첨가된 초임계 이산화탄소 추출

본 연구에서 사용된 실험실 규모 초임계 유체 추출장치의 개략도를 Fig. 1에 나타내었으며, 이산화탄소의 흐름방향을 조절할 수 있도록 장치를 제작하였다. 초임계 유체 추출장치는 이산화탄소의 공급을 위한 고압 액체펌프 (EL-1, Lewa, Germany), 유기용매를 공급하기 위한 액체펌프 (Prep Pump, Chrom Tech. Inc., USA), 일정한 압력을 유지하기 위한 후방압력조절기 (back-pressure regulator, 26-1700, Tescom, USA), cartridge가 장착된 추출기 (extractor), 유량 조절기 (metering valve), 추출물 수집부 등으로 구성되었다. 일정량의 시료를 cartridge에 넣고 시료가 빠져나오는 것을 방지하기 위하여 유리솜 (glass wool)을 첨가하여 추출기 내에 장착하였다. 액체 상태의 이산화탄소를 고압 액체펌프로 가압한 후 예열기를 통과시켜 원하는 온도에 도달하게 한 후 추출 실험을 수행하였다.

본 연구에서는 세 가지 다른 방법으로 유기용매가 첨가된 초임계 이산화탄소 추출 실험을 수행하였다. 첫 번째 방법에서는 초임계 이산화탄소의 용해력에 변화를 주기 위해 초임계 상 (phase)을 유지할 수 있는 적당량의 유기용매를 보조용매로 초임계 이산화탄소에 혼입시켜 얻은 변형된 초임계 이산화탄소를 이용해 추출 실험을 수행하였다. 두 번째 방법에서는 약 8분간 보조용매로 변형된 초임계 이산화탄소를 추출기 내부에 공급하여 원하는 압력으로 가압한 뒤 초임계 이산화탄소의 공급 밸브를 닫고 보조용매로 사용된 유기용매를 1 mL/min의 유속으로 약 52분간 추출기 내부로 추가로 주입한 후 유기용매 공급밸브를 닫아 일정 시간 동안 정적 추

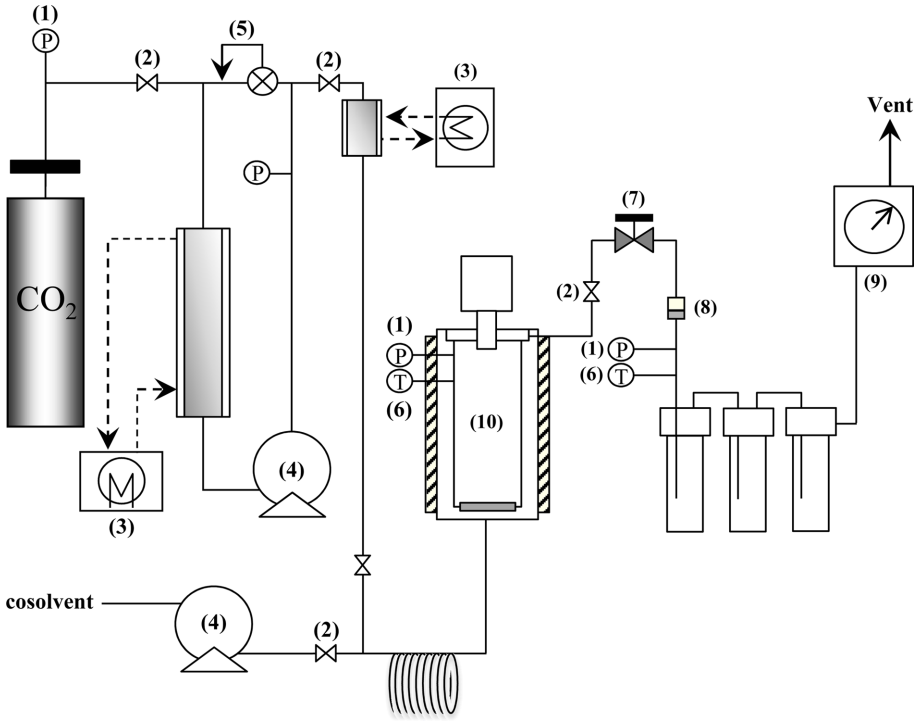

Fig. 1. Schematic diagram of the supercritical fluid extraction apparatus; (1) pressure gauge, (2) valve, (3) circulator, (4) high-pressure liquid pump, (5) back pressure regulator, (6) temperature indicator, (7) metering valve, (8) line filter, (9) gas meter, and (10) extractor.

출 (static extraction)이 이루어질 수 있도록 한 뒤 순수한 초임계 이산화탄소를 이용하여 동적 추출 실험을 수행하였다. 마지막 세 번째 방법에서는 미세조류 시료에 일정량의 유기용매를 혼합한 후 초음파 (VCX 130, Sonic & Materials Inc., USA)로 전처리한 다음 추출 cartridge에 넣어 순수한 초임계 이산화탄소를 이용해 추출 실험을 수행하였다. 이상의 세 가지 다른 방법으로 유기용매가 첨가된 초임계 이산화탄소 추출 실험을 3시간 동안 수행하였으며, 얻어진 추출물은 정확한 분석을 위해 헥산에 용해시켜 수집하였다.

2.3. 분석방법

2.3.1. 지질의 추출 수율

유기용매가 첨가된 모든 초임계 이산화탄소 추출 실험에서 미세조류로부터 추출된 총 지질의 양은 중량법을 이용하여 측정하였다. 본 연구에서 오일은 전이에스테르화 반응을 통해 FAME으로 전환할 수 있는 지질을 말하며, 총 지질은 미세조류로부터 추출된 전체 추출물을 지칭한다. 또한 추출 수율은 건조 상태의 미세조류 시료의 무게 대비 건조된 추출물의 중량비로 계산하였다. 추출물을 회전식 증발기로 농축한 후 60°C에서 감압 건조하여 추출된 총 지질의 양을 측정하였고, 이를 이용해 총 지질의 수율을 계산하였다.

2.3.2. 지방산 조성분석

미세조류 추출물 중의 지방산 조성과 함량을 조사하기 위해 내부 표준물질로 methyl nonadecanoate를 1 mg/mL의 농도로 heptane에 용해시켜 저장액 (stock solution)을 사용하였다. 추출물 50 mg에 저장액 5 mL를 넣어 용해시킨 다음 KOH-MeOH 2 N 용액 0.05 mL를 첨가하여 추출물 내 오일을 전이에스테르화 반응을 통해 FAME으로 전환한 후 GC/FID (Gas Chromatography/Flamed Ionized Detector, 5890 Series II, Hewlett Packard, USA)를 이용하여 지방산의 함량을 분석하였다. 분리된 성분의 확인을 위해 지질 표준물질 (FAME mixtures; C4:0-C24:1, 99.9%, Supelco, USA)을 이용하여 동정하였으며, 지방산의 조성은 크로마토그램 상에서 검출된 내부 표준물질 피크 면적에 대한 각 성분의 피크 면적을 비교한 면적분율 (area fraction)로 정량하였다. 분석 칼럼으로는 DB-1 (60 m × 0.25 mm × 0.25 μm, Agilent J&W Scientific, USA)를 사용하였으며, 오븐의 온도는 150°C에서 2분간 유지시킨 후 200°C까지 5°C/min의 속도로 승온시키고, 250°C까지는 2°C/min의 속도로 승온시킨 다음 20분간 온도를 유지하여 분석하였다. 이동상으로는 수소 기체를 사용하였고, 시료는 1 μL를 주입하였으며, split ratio는 50:1로 하였다. 또한 주입부와 검출부의 온도는 각각 250°C와 300°C로 유지하였다.

3. RESULTS AND DISCUSSION

본 연구에서는 미세조류로부터 오일을 추출할 때 초임계 이산화탄소 추출의 낮은 추출 수율을 개선하기 위해 유기용매를 앞에서 설명한 여러 방법으로 초임계 이산화탄소 추출에

첨가하여 그 효과를 평가하고자 하였다. 유기용매 첨가가 미세조류 오일의 초임계 이산화탄소 추출에 미치는 영향을 조사하기 위해 본 저자들에 의해 수행된 선행 연구 [16]의 결과를 고려하여, 압력과 온도를 각각 40 MPa과 80°C로 고정하여 추출 실험을 수행하였으며, 이산화탄소 유속은 9 L/min으로 일정하게 유지하였다.

3.1. 보조용매로 첨가된 유기용매의 영향

식물로부터 유효 성분을 추출하는데 있어 초임계 이산화탄소만을 사용해 얻은 추출 수율이 낮은 경우 이를 개선하기 위한 방법으로 일정량의 유기용매를 초임계 유체에 첨가하여 얻은 보조용매로 변형된 초임계 유체를 이용한 실험이 여러 연구자들에 의해 수행되었다 [16-18]. 본 연구에서는 적당량의 유기용매를 보조용매로 초임계 이산화탄소에 첨가할 경우 유기용매의 첨가가 미세조유에 함유된 총 지질과 오일의 추출에 미치는 영향을 조사하기 위한 실험을 수행하였다. 보조용매로는 선행 연구 [15] 결과 오일의 추출 수율이 가장 높았던 dichloromethane (DCM)/MeOH (1:2, v/v) 혼합 유기용매를 선정하여 1, 3, 5 mL/min의 유속으로 첨가되는 양을 변화시켜 3시간 동안 추출 실험을 수행하였다.

보조용매로 변형된 초임계 이산화탄소를 이용한 추출 실험을 수행한 결과 Fig. 2에 나타낸 바와 같이 첨가되는 유기용매의 공급 유속이 초임계 유체 단일 상을 형성할 수 있을 정도인 경우에는 순수한 초임계 이산화탄소 추출에 비해 총 지질과 오일의 추출 수율이 증가하는 것을 확인할 수 있었다. 반면 초임계 이산화탄소에 첨가되는 보조용매의 공급 유속이 높아 초임계 단일 상을 형성할 수 없는 경우에는 순수한 초임계 이산화탄소 추출에 비해 더 낮은 수율이 얻어졌다. 이는 초임계 이산화탄소에 첨가되는 보조용매의 공급 속도가 일정한 값을 초과하는 경우 초임계 이산화탄소와 보조용매가 충분히 혼합되어 단일 상을 형성할 시간적인 여유가 없으며, 이로 인해 미세조류 시료의 caking 현상이 나타나기 때문인 것으로 생각된다. 다시 말해 80°C의 비교적 높은 추출 온도에서 초임계 이산화탄소와 단일 상을 형성하지 못한 액체 상태의 유기용매가 추출기 하단의 시료와 섞여 있다가 추출이 진행되는 동안에 증발하면서 분말 상태의 시료들이 서로 조밀하게 응집되었기 때문이다 [18]. 실제로 시료의 caking 현상이 나타났는지를 알아보기 위해 추출 실험을 완료한 후 남아있는 시료를 관찰한 결과 시료가 치밀한 구조로 딱딱하게 굳어 있는 것을 확인할 수 있었다.

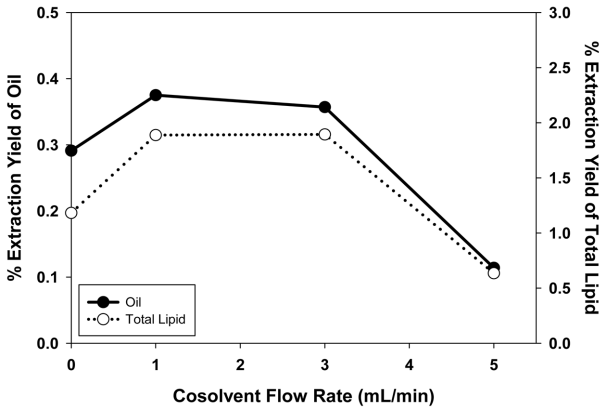

Fig. 2. Effect of cosolvent (DCM:MeOH, 1:2, v/v) flow rate on the extraction yields of total lipid and oil from *C. vulgaris*.

3.2. 정적 추출 시간의 영향

위의 실험 결과 적당량의 보조용매로 변형된 초임계 이산화탄소를 이용한 추출의 경우 순수한 초임계 이산화탄소 추출에 비해 *C. vulgaris*로부터 더 높은 수율의 오일을 추출할 수 있다는 것을 확인하였다. 이러한 보조용매 효과를 기반으로 오일의 추출 수율을 보다 더 향상시키기 위한 목적으로 시료가 채워진 추출기 내부로 초임계 이산화탄소를 주입해 가압함과 동시에 유기용매 (DCM/MeOH, 1:2)를 1 mL/min의 유속으로 8분간 주입하여 공정 압력에 도달하게 한 뒤 초임계 이산화탄소의 공급 밸브를 닫고 유기용매만을 1 mL/min의 동일한 유속으로 52분 동안 계속 주입한 다음 용매 공급 밸브를 잠그고 일정한 정적 추출 시간을 부여한 후 순수한 초임계 이산화탄소를 이용하여 3시간 동안 동적 추출 실험을 수행하였다.

정적 추출 시간에 따른 오일 추출 수율의 변화를 Fig. 3에 나타내었다. 정적 추출 시간이 증가함에 따라 추출 수율이 증가한 후 감소하는 것을 확인할 수 있었다. 이는 추출기에서의 유기용매와 초임계 이산화탄소에 의한 정적 추출 시간이 길어짐에 따라 용매와 시료와의 접촉 시간도 함께 증가하여 미세조류로부터 확산되어 나오는 오일의 추출량이 증가하기 때문이며, 80°C, 40 MPa에서 약 2.1 wt%의 오일 추출 수율을 얻을 수 있었다. 반면에 30분을 초과하는 정적 추출 시간에서는 앞의 보조용매로 변형된 초임계 이산화탄소 실험과 유사하게 추출 수율이 감소하였으며 추출 후 시료가 조밀한 구조로 딱딱하게 굳어 있는 것을 확인할 수 있었다. 이는 앞에

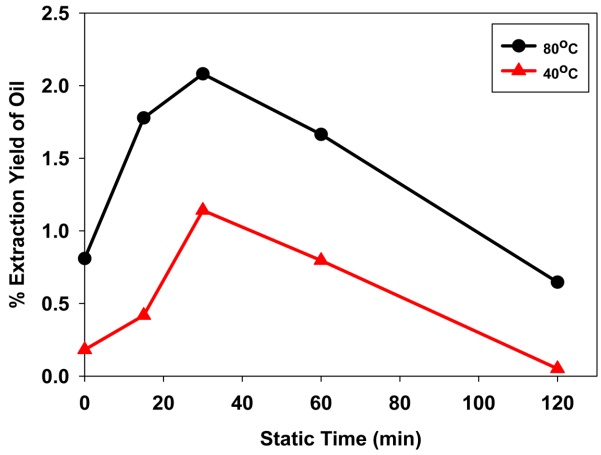

Fig. 3. Effect of static time on the extraction yield of oil from *C. vulgaris* after a mixed organic solvent (DCM/MeOH, 1:2, v/v) was injected into the extractor at a rate of 1 mL/min for 60 min.

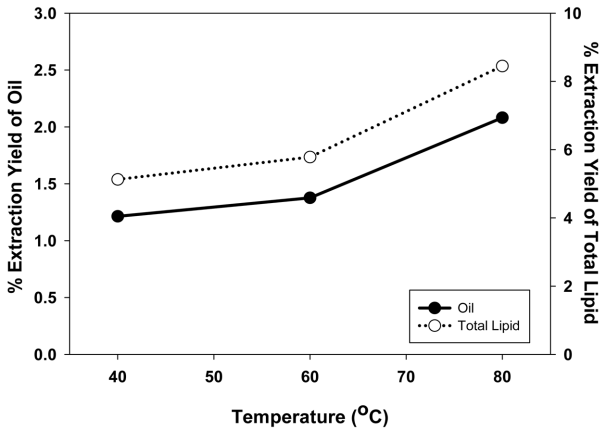

Fig. 4. Effect of temperature on the extraction yields of total lipid and oil from *C. vulgaris* when the static extraction time was fixed to be 30 min.

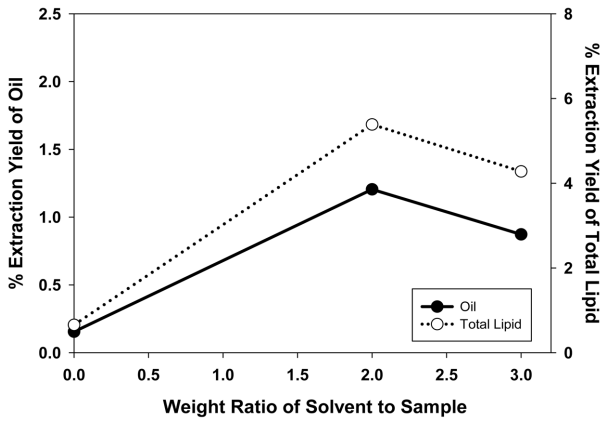

Fig. 5. Effect of the solvent/sample ratio on the extraction yields of total lipid and oil when *C. vulgaris* samples were pretreated with EtOH at an ultrasonic power of 15 W for 15 min.

서 설명한 바와 같이 caking 현상에 기인한 것으로 판단된다 [18]. 정적 추출 시간이 특정 값을 초과하여 미세조류에서 용매로 확산되어 나온 추출물의 양이 많은 경우 정적 추출 후 동적 추출이 진행되는 동안 초임계 이산화탄소에 의해 오일이 추출되어 나가는 속도보다 초임계 이산화탄소 상으로의 유기용매의 증발에 의해 오일 등의 추출물이 미세조류 시료와 함께 치밀한 구조로 응집되는 속도가 더 빠르기 때문에 추출 수율이 감소하는 것으로 생각된다.

정적 추출 시간을 30분으로 고정한 상태에서 추출 온도에 따른 오일 추출 수율의 변화를 Fig. 4에 나타내었다. 그림에 나타낸 것과 같이 추출 온도가 증가함에 따라 추출 수율이 향상되는 것을 확인할 수 있었다. 이는 온도가 높을수록 초임계 이산화탄소 내 용질의 확산속도가 더 높아 시료로부터 더 빠르게 오일이 추출되기 때문이다.

3.3. 초음파와 유기용매를 이용한 전처리의 영향

초임계 이산화탄소 추출에서 보조용매로 사용될 수 있는 유기용매를 이용하여 미세조류 시료를 전처리한 후 초임계 유체 추출 연구를 수행한 Tang 등 [19]의 연구 결과에 따르면 미세조류로부터 추출한 docosahexaenoic acid의 수율은 전처리 시 사용된 유기용매의 양이 증가함에 따라 증가하는 경향을 나타내었다. 이에 본 연구에서는 초임계 이산화탄소의 보조용매로 사용될 수 있는 있는 유기용매 (MeOH 또는 EtOH)를 일정 비율로 미세조류 시료와 혼합한 뒤 15분간 초음파로 전처리한 후 순수한 초임계 이산화탄소를 이용하여 3시간 동안 추출 실험을 수행하였다. Fig. 5와 6은 각각 EtOH과 MeOH을 시료와 혼합한 후 15 W의 초음파로 전처리된 시료의 초임계 이산화탄소 추출 실험 결과를 나타내고 있다. 시료와 혼합한 EtOH의 양이 일정량 이상 증가한 경우 총 지질과 오일의 추출 수율은 감소하였으나, EtOH보다 극성이 더 큰 MeOH을 사용한 경우에는 MeOH의 양이 증가할수록 총 지질의 추출 수율은 증가하는 경향을 보였다.

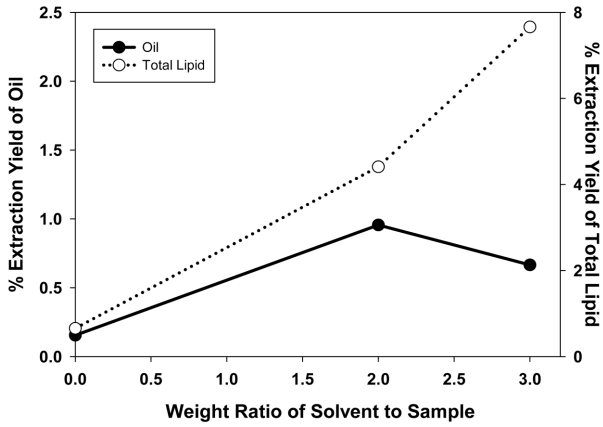

Fig. 6. Effect of the solvent/sample ratio on the extraction yields of total lipid and oil when *C. vulgaris* samples were pretreated with MeOH at an ultrasonic power of 15 W for 15 min.

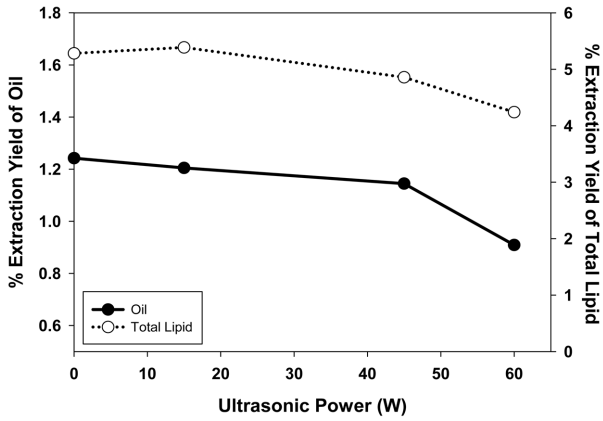

Fig. 7. Effect of ultrasonic power on the extraction yields of total lipid and oil when *C. vulgaris* samples were pretreated for 15 min with a sample/EtOH ratio of 1:2.

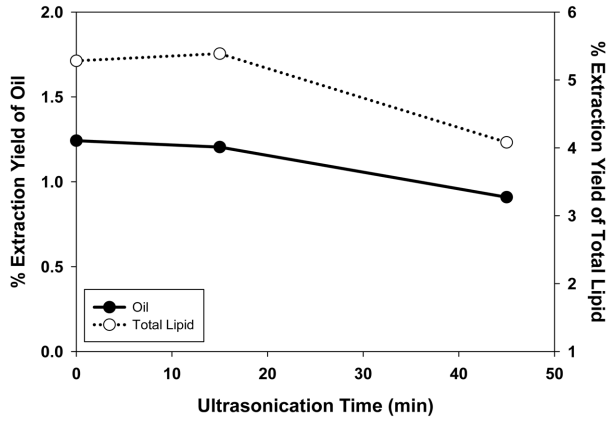

Fig. 8. Effect of ultrasonication time on the extraction yields of total lipid and oil when *C. vulgaris* samples were pretreated at an ultrasonic power of 15 W with a sample/EtOH ratio of 1:2.

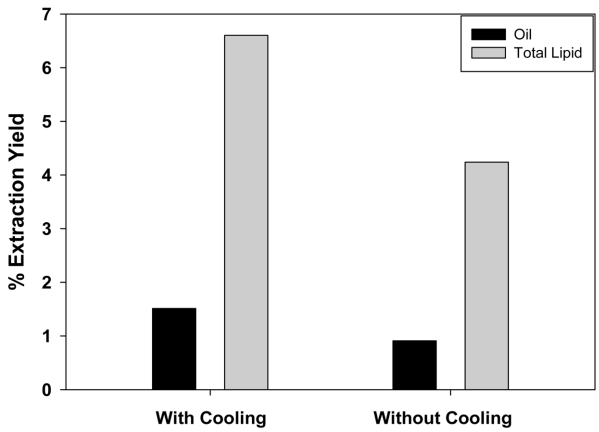

Fig. 9. Effect of cooling on the extraction yields of total lipid and oil when *C. vulgaris* samples were pretreated at an ultrasonic power of 60 W for 15 min with a sample/EtOH ratio of 1:2.

Fig. 7과 8은 시료와 EtOH를 1:2의 중량비로 혼합한 뒤 초음파로 전처리할 때 초음파의 출력량과 조사 시간에 따른 총 지질과 오일의 추출 수율의 변화를 보여주고 있다. 그림에 나타낸 것과 같이 시료 전처리 시 초음파의 출력량과 조사 시간이 증가함에 따라 추출 수율은 오히려 감소하는 경향을 보였다. 초음파 전처리에 따른 추출 수율의 감소 원인을 분석하기 위해 초임계 이산화탄소 추출 후 남아 있는 시료를 유기용매를 이용하여 다시 추출하여 미세조류에 포함된 총 오일 함량과 비교 분석하였다.

선행 연구 [15]에 의하면 유기용매 추출법 (DCM/MeOH (1:2, v/v))을 이용하여 *C. vulgaris*로부터 18시간 동안 추출한 결과 약 4.6 wt%의 오일이 *C. vulgaris*에 함유되어 있었다. 본 연구에서 시료와 EtOH를 1:2의 비로 혼합한 뒤 15 W의 초음파로 60분간 전처리한 후 초임계 이산화탄소를 이용하여 추출한 결과 0.96 wt%의 오일이 추출되었으며, 추출 후 남은 시료를 유기용매로 다시 추출한 결과 0.73 wt%의 오일이 추출된 것을 확인할 수 있었다. 이상의 실험 결과 유기용매와 초음파로 전처리된 시료의 경우 시료에 함유된 오일의 총량이 전처리되지 않은 시료에 포함된 총 오일 대비 약 36%로 상당히 낮은 것을 확인할 수 있었다. 이는 초음파 조사에 의해 오일이 다른 물질로 전환되거나 분해되어 FAME으로 전환될 수 있는 오일의 추출 수율이 낮아졌기 때문인 것으로 추정된다 [20,21]. 또한, 초음파 조사에 의해 국부적으로 매우 높은 온도가 발생하게 되어 caking 현상이 발생하게 되고 결과적으로 미세조류 시료의 뭉침 현상이 발생하게 되어 추출 수율이 감소한 것으로 생각된다 [18].

이러한 결과로 인해 Table 1에 정리한 것과 같이 불포화 지방산이 열에 의해 분해되기 때문에 낮은 오일 추출 수율이 얻어지는 것으로 판단되며, 이와 같은 현상을 억제하기 위해 초음파에 의한 시료 전처리 시 수반되는 온도의 상승을 최소화하기 위해 냉각기를 이용하여 10°C의 온도에서 60 W의 초음파로 15분간 시료를 전처리한 후 추출 실험을 수행하였다. 그 결과 Fig. 9에 나타낸 것과 같이 냉각해준 경우 추출 수율이

Table 1. Effect of ultrasonic sample treatment with EtOH on the fatty acid composition of oil extracted from *C. vulgaris*

Fatty Acid	Name	Composition (mg)			
		0 W	15 W	45 W	60 W
C14:1n5	Myristoleic acid	0.205	0.205	0.156	0.146
C16:1n7	Palmitoleic acid	0.193	0.214	0.186	0.176
C16:0	Palmitic acid	0.055	0.065	0.049	0.044
C18:3n6	-Linolenic acid	0.062	0.020	0.007	0.007
C18:3n3	a-Linolenic acid	104.174	101.705	96.445	77.132
C18:2n6t	Linolelaidic acid	11.425	11.135	10.519	8.440
C18:1n9c	Oleic acid	5.366	4.777	4.784	3.324
C18:1n9t	Elaidic acid	1.767	1.743	1.686	1.255
C18:0	Stearic acid	0.049	0.004	0.009	0.015
C20:3n6	cis-8,11,14-Eicosatrienoic acid	0.222	0.082	0.077	-
C20:2n6	cis-11,14-Eicosadienoic acid	0.284	0.231	0.248	0.158
C20:1n9	cis-11-Eicosenoic acid	0.222	0.214	0.243	0.165
C20:0	Arachidic acid	0.128	0.061	0.036	0.072
Total		124.152	120.455	114.445	90.932

Table 2. Comparison of fatty acid compositions of oils extracted from *C. vulgaris* by three different supercritical CO_2 extraction methods

Fatty Acid	Name	Composition (%)		
		Cosolvent-modified $SCCO_2$ extraction[a]	Modified $SCCO_2$ extraction with ultrasonic pretreatment[b]	Modified $SCCO_2$ extraction with static extraction time[c]
C10:0	Capric Acid	-	-	0.238
C14:1n5	Myristoleic acid	-	0.222	-
C16:1n7	Palmitoleic acid	0.196	0.124	0.125
C16:0	Palmitic acid	0.081	0.053	0.018
C18:3n6	-Linolenic acid	0.009	0.048	0.047
C18:2n6c	Linoleic acid	-	-	0.097
C18:3n3	a-Linolenic acid	85.499	79.280	82.628
C18:2n6t	Linolelaidic acid	9.881	13.322	8.309
C18:1n9c	Oleic acid	3.084	4.786	5.771
C18:1n9t	Elaidic acid	1.142	1.308	1.701
C18:0	Stearic acid	0.001	0.122	0.238
C20:2n6	cis-11,14-Eicosadienoic acid	0.084	0.283	0.304
C20:1n9	cis-11-Eicosenoic acid	0.021	0.383	0.330
C20:0	Arachidic acid	-	0.071	0.071
C22:0	Behenic acid	-	-	0.065
C24:0	Lignoceric acid	-	-	0.060
Total		100	100	100

[a]$SCCO_2$ extraction modified with 1 mL/min DCM/MeOH (1:2, v/v) at 80°C and 40 MPa for 3 h with a CO_2 flow rate of 9 L/min.
[b]$SCCO_2$ extraction at 80°C and 40 MPa for 3 h with a CO_2 flow rate of 9 L/min from a *C. vulgaris* sample pretreated with EtOH at an ultrasonic power of 60 W for 15 min.
[c]$SCCO_2$ extraction at 80°C and 40 MPa for 3 h with a CO_2 flow rate of 9 L/min after static extraction with DCM/MeOH (1:2, v/v) for 30 min.

증가하는 것을 확인할 수 있었으며, 초음파를 이용해 전처리를 할 경우 온도 상승을 억제하기 위해 냉각을 해줌으로써 불포화 지방산이 다른 물질로 전환되는 것을 방지할 수 있다는 것을 간접적으로 확인할 수 있었다.

3.4. 추출 효율 비교

보조용매로 변형된 초임계 이산화탄소 추출, 유기용매 첨가 후 정적 추출 시간을 이용한 초임계 이산화탄소 추출, 유기용매와 초음파를 이용한 전처리 후 초임계 이산화탄소 추출의 세 가지 다른 형태의 추출 방법을 통해 얻은 *C. vulgaris* 오일의 지방산 조성을 비교하여 Table 2에 나타내었다. 세 가지 추출법 모두 α-linolenic acid의 함량이 가장 높게 나타났으며, 추출 방법에 따라 지방산 조성에는 큰 차이가 없음을 확인할 수 있었다.

DCM/MeOH (1:2, v/v)이 보조용매로 첨가된 초임계 이산화탄소 추출에서는 약 0.37 wt%, 유기용매와 초음파 전처리를 이용한 추출에서는 약 1.5 wt%, 유기용매 첨가 후 정적 추출 시간을 이용한 추출에서는 약 2.1 wt%의 오일이 추출되어 약 4.6 wt%의 오일이 추출된 유기용매 추출에 비해 낮은 오일 추출 수율을 보이는 것을 확인할 수 있었다. 또한, 순수한 초임계 이산화탄소를 이용한 경우 약 0.3 wt%의 오일이 추출되어 [15] 유기용매 첨가 후 정적 추출 시간을 이용한 초임계 이산화탄소 추출 방법이 오일 추출 수율을 약 7배 향상시킬 수 있다는 것을 확인하였다.

4. CONCLUSION

본 연구에서는 미세조류로부터 오일을 추출할 때 초임계 이산화탄소 추출의 낮은 추출 효율을 개선하기 위해 유기용매를 세 가지 방법으로 초임계 이산화탄소 추출에 첨가하여 그 효과를 조사하였다. 첫 번째 방법에서는 유기용매를 보조용매로 첨가하여 초임계 이산화탄소의 용해력을 변화시켰으며, 약 0.3 wt.%의 낮은 오일 추출 수율을 보인 순수 초임계 이산화탄소 추출에 비해 추출 수율이 향상되는 것을 확인하였다. 이 방법에서는 유기용매의 공급 유속이 일정 값 이상인 경우, 순수한 초임계 이산화탄소 추출에 비해 더 낮은 수율이 얻어졌다. 두 번째 방법에서는 유기용매와 초음파를 이용하여 시료를 전처리한 후 초임계 이산화탄소를 이용해 추출을 하였으며, 초음파의 출력과 초음파 처리 시간이 증가할수록 추출 수율은 감소했으며, 전처리 시 시료를 냉각해줌으로써 추출 수율을 향상시킬 수 있었다. 마지막으로 유기용매 주입 후 정적 추출 시간을 이용한 초임계 이산화탄소 추출 방법의 경우 가장 높은 오일 추출 수율을 나타냈으며, 순수한 초임계 이산화탄소 추출에 비해 약 7배 높은 추출 수율을 얻을 수 있었다.

Acknowledgements

본 연구는 차세대 중소기업 산학연협력기술개발사업과 농촌진흥청 차세대바이오그린21사업 (과제번호: PJ009502)의 지

원에 의해 수행되었으며, 이에 감사드립니다.

REFERENCES

1. Nigam, P. S. and A. Singh (2011) Production of liquid biofuels from renewable resources. *Prog. Energy Comb. Sci.* 37: 52-68.
2. Singh, A., D. Pant, N. E. Korres, A. S. Nizami, S. Prasad, and J. D. Murphy (2010) Key issues in life cycle assessment of ethanol production from lignocellulosic biomass: challenges and perspectives. *Bioresour. Technol.* 101: 5003-5012.
3. Singh, A., B. M. Smyth, and J. D. Murphy (2010) A biofuel strategy for Ireland with an emphasis on production of biomethane and minimization of land-take. *Renew. Sustain. Energy Rev.* 14: 277-288.
4. Demirbas, A. (2009) Political, economic and environmental impacts of biofuels: A review. *Appl. Energy* 86: S108-S117.
5. Zhu, L. D., E. Hiltunen, E. Antila, J. J. Zhong, Z. H. Yuan, and Z. M. Wang (2014) Microalgal biofuels: Flexible bioenergies for sustainable development. *Renew. Sust. Energ. Rev.* 30: 1035-1046.
6. Findlater, K. M. and M. Kandlikar (2011) Land use and second-generation biofuel feedstocks: The unconsidered impacts of Jatropha biodiesel in Rajasthan, India. *Energ. Poli.* 39: 3404-3413.
7. Spolaore, P., C. Joannis-Cassan, E. Duran, and A. Isambert (2006) Commercial applications of microalgae. *J. Biosci. Bioeng.* 101: 87-96.
8. Patil, V., K. Q. Tran, and H. R. Giselrød (2008) Towards sustainable production of biofuels from microalgae. *Int. J. Mol. Sci.* 9: 1188-1195.
9. Sharif Hossain, A. B. M., A. Salleh, A. N. Boyce, P. Chowdhury, and M. Naqiuddin (2008) Biodiesel fuel production from algae as renewable energy. *Am. J. Biochem. Biotechnol.* 4: 250-254.
10. Bozan, B. and F. Temelli (2003) Extraction of poppy seed oil using supercritical CO_2. *J. Food Sci.* 68: 422-426.
11. Salgın, U., O. Döker, and A. Çalımlı (2006) Extraction of sunflower oil with supercritical CO_2: Experiments and modeling. *J. Supercrit. Fluids* 38: 326-331.
12. Mercer, P. and R. E. Armenta (2011) Developments in oil extraction from microalgae. *Eur. J. Lipid Sci. Technol.* 113: 539-547.
13. Han, X., L. Cheng, R. Zhang, and J. Bi (2009) Extraction of safflower seed oil by supercritical CO_2. *J. Food Eng.* 92: 370-376.
14. Macías-Sánchez, M. D., C. M. Serrano, M. R. Rodríguez, and E. M. de la Ossa (2009) Kinetics of the supercritical fluid extraction of carotenoids from microalgae with CO_2 and ethanol as cosolvent. *Chem. Eng. J.* 150: 104-113.
15. Ryu, J. H., M. R. Park, and G. Lim (2011) Supercritical carbon dioxide extraction of oil from *Chlorella vulgaris*. *KSBB J.* 26: 453-458.
16. Díaz-Reinoso, B., A. Moure, H. Domnguez, and J. C. Parajó (2006) Supercritical CO_2 extraction and purification of compounds with antioxidant activity. *J. Agric. Food Chem.* 54: 2441-2469.
17. Valderrama, J. O., M. Perrut, and W. Majewski (2003) Extraction of astaxantine and phycocyanine from microalgae with supercritical carbon dioxide. *J. Chem. Eng. Data* 48: 827-830.
18. Dunford, N. T. and F. Temelli (1995) Extraction of phospholipids from canola with supercritical carbon dioxide and ethanol. *JAOCS* 72: 1009-1015.
19. Tang, S., C. Qin, H. Wang, S. Li, and S. Tian (2011) Study on supercritical extraction of lipids and enrichment of DHA from oil-rich microalgae. *J. Supercrit. Fluids* 57: 44-49.
20. Imahara, H., E. Minami, S. Hari, and S. Saka (2008) Thermal stability of biodiesel in supercritical methanol. *Fuel* 87: 1-6.
21. Lee, S. B. and J. D. Lee (2009) The effect of ultrasonic energy on esterification of vegetable oil. *J. Korean Ind. Eng. Chem.* 20: 532-535.