

탈지미세조류로부터 초음파추출을 이용한 항산화 물질 생산 공정 최적화

조재민 · 신슬기 · 정현진 · 민보라 · 김승기 · 김진우[†]

신문대학교 식품과학과
31460 충청남도 아산시 탕정면 신문로 221번길 70
(2016년 12월 30일 접수, 2017년 3월 19일 수정본 접수, 2017년 3월 31일 채택)

Process Development for Production of Antioxidants from Lipid Extracted Microalgae Using Ultrasonic-assisted Extraction

Jaemin Jo, Suelgi Shin, Hyunjin Jung, Bora Min, Seungki Kim and Jinwoo Kim[†]

Department of Food Science, Sunmoon University, 70, Sunmoon-ro 221beon-gil, Tangjeong-myeon, Asan, Chungnam, 31460, Korea
(Received 30 December 2016; Received in revised form 19 March 2017; accepted 31 March 2017)

요 약

초음파 추출법(Ultrasonic-assisted extraction, UAE)은 기존의 추출법 대비 높은 추출 효율과 짧은 추출시간으로 식물 세포벽으로부터 생리활성물질 추출 또는 분리에 효과적인 방법으로 인식되어 관심이 증대되고 있다. 본 연구에서는 탈지미세조류(*Tetraselmis* KCTC 12236BP)에서 폴리페놀 추출을 위해 UAE를 적용하여 총 폴리페놀(TPC) 생산에 미치는 주요 추출변수의 영향을 평가하였다. 추출변수의 최적화를 위해 입자크기, 고액비(L/S ratio), 에탄올 농도, 추출 온도 및 추출 시간을 요인으로 하여 순차적인 최적화를 진행하였다. 실험에 적용 된 모든 변수는 TPC 추출에 유의한 효과를 보였으며 추출 온도가 TPC생산에 가장 큰 영향을 미침을 확인 할 수 있었다. 최적 추출조건은 혼합 입자 사용 시, 10% 고액비, 60% 에탄올, 추출온도 100 °C와 추출시간 30 분을 적용한 추출에서 8.7 mg GAE/g DW를 얻을 수 있었다. 동일한 추출조건에서 열수추출과 UAE를 비교하였을 때 UAE에서 TPC 추출이 1.8배 증가함을 확인하였다. 본 연구를 통해 저온 및 짧은 추출시간을 적용한UAE가 기존의 열수추출 공정에 비해 LEA를 이용한 생리활성물질 생산에 보다 효과적임을 확인하였다.

Abstract – Ultrasound-assisted extraction (UAE) has attracted growing interest, as it is an effective method for the rapid extraction of bioactive compounds from plants with a high extraction efficiency comparable to the conventional extraction. In this study, UAE was used for the extraction of polyphenols from lipid extracted microalgae (*Tetraselmis* KCTC 12236BP) and the effects of five extraction variables on the total phenolic compounds (TPC) were studied. For the optimization of extraction parameters, particle size, solid-to-liquid (L/S) ratio, ethanol concentration, extraction temperature and extraction time have been examined as independent variables. All variables exhibited the significant effects on the extraction of TPC and extraction temperature showed the most significant effect among five variables. The optimal extraction conditions were the extraction using mixed particle, S/L ratio of 10%, ethanol concentration of 60%, extraction temperature of 100 °C and extraction time of 30 min, which gave the 8.7 mg GAE/g DW for TPC. Compared with conventional hot-water extraction, TPC extraction under UAE was increased by up to 1.8 fold with same extraction condition. This study showed that UAE under low temperature and short extraction time was proven to be an effective extraction process for TPC production from LEA compared to conventional hot-water extraction process.

Key words: Lipid extracted microalgae, Byproduct, Polyphenol, Ultrasound assisted extraction

1. 서 론

화석연료의 고갈 및 공급 불안정, 중동 정세 불안정, 온실가스 증가에 따른 환경문제 발생으로 기존 화석연료를 기반으로 한 산업구

조가 크게 위협을 받고 있는 실정이며 이를 해결하기 위해 재생 가능한 자원을 이용한 탄소 중립적인 대체연료 개발이 전세계적으로 활발하게 시행되고 있다. 태양광, 풍력과 바이오연료 등이 화석연료 대체가 가능한 친환경에너지로 많은 각광을 받고 있으며 바이오 에탄올과 바이오디젤은 교통분야 중 대형 운송 수단의 대체가 가능한 유일한 대안으로 큰 주목을 받고 있다[1]. 하지만 목질계를 이용하는 2세대 바이오에탄올은 전처리와 효소당화의 기술적 한계로 인해 상업화가 지연되고 있는 상황으로 생산기술이 간단하고 상업

[†]To whom correspondence should be addressed.

E-mail: kimjw1028@sunmoon.ac.kr

This is an Open-Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial License (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/3.0>) which permits unrestricted non-commercial use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

화 진입 장벽이 낮은 바이오디젤에 대한 관심이 높아지고 있다. 최근 들어 이산화탄소 고정 능력이 뛰어나고 지질 생산효율이 우수하며 해양 배양이 가능한 해양 미세조류(microalgae)를 이용한 바이오디젤 생산에 많은 관심이 집중되고 있으나 육상 곡물을 이용한 바이오디젤 생산과 비교한 경쟁력 확보가 실용화를 위한 중요한 요소이다[2].

미세조류 유래 바이오디젤 생산가를 낮추기 위해서는 지질 추출 후 버려지는 부산물인 탈지미세조류 활용을 통한 부산물 credit을 확보하는 것이 하나의 방안으로 고려되고 있다. 탈지미세조류는 잔류 지질 외에 대부분 세포벽으로 이루어져 있으며 세포벽은 글루코오스의 다량체인 셀룰로오스와 헤미셀룰로오스를 구성하는 xyloglucan과 arabinoxylan에 의해 그물망을 형성하고 있으며, 다양한 폐쇄성 물질의 결합체인 리그닌이 외부를 감싸 보호하고 있는 형태를 지닌다[3]. 따라서, Phenolic compound는 식물의 세포벽을 형성하는 리그닌의 전구체로서 gallic acid, coumaric acid, caffeic acid, cinnamic acid, ferulic acid의 형태로 다가의 OH를 가진 폴리페놀로 존재하여 천연항산화제로 활용도가 높다고 하겠다. 리그닌에 포함 된 폴리페놀을 적절히 분리하였을 때 천연항산화제로 활용이 가능하여 고부가가치 식품, 화장품 및 의약품의 항산화 및 노화방지 기능성 소재로서 높은 가치가 있다고 하겠다[4]. 기존의 고온고압 처리에 의한 생리활성물질 추출은 높은 온도에서 산화가 촉진됨에 따라 생리활성 물질의 물리/화학적 성질을 빠르게 변형시켜 기능 저하의 원인이 되었다. 생리활성물질의 기능 저하를 방지하기 위한 기술들에 대한 연구가 끊임없이 시도되었으며, 여러 가지 추출 기술 중에 초음파 추출이 낮은 온도와 압력하에서 생리활성물질의 손실을 최소화할 수 있는 기술로 주목을 받고 있다[5,6].

본 연구에서는 친환경용매인 물을 이용한 탈지미세조류의 초음파추출을 통해 폴리페놀 생산 가능성을 확인하고 추출의 주요 영향인자인 파쇄 크기, 고액비, 에탄올 농도, 추출온도 및 추출시간의 최적화를 통해 추출시간이 감소되고 에너지 비용 절감이 가능한 상업화 적합형 폴리페놀 생산 공정을 제안하고자 한다.

2. 실험

2-1. 실험재료

본 연구에 사용 된 탈지미세조류는 인하대학교 해양바이오연구센터에서 실내배양기에서 배양 후 탈지가 완료 된 미세조류 *Tetraselmis* KCTC 12236BP를 제공받아 60 °C 오븐에서 12시간 건조하여 사용하였다. 건조 탈지미세조류를 0.11~1.00 mm (18~140 standard mesh size) 크기의 체로 5종류 크기로 분리하여 추출 실험에 사용하였다. 분리 된 시료는 실험에 사용할 때까지 -20 °C 냉동보관 하였다. 추출용매는 1차 증류수와 유기용매(Samchun, Korea, 98% 이상)를 사용하였으며 실험에 사용 된 기타 시약은 Sigma-Aldrich 사(St. Louis, MO, USA)의 순도 99% 이상을 사용하였다.

2-2. 고체분석

바이오매스의 성분 분석은 미국 신재생 에너지 연구소(NREL; National Renewable Energy Laboratory)의 표준분석 방법인 NREL LAP (Laboratory Analytical Procedure)에 따라 분석을 진행하였다[7]. 해당 바이오매스 고체 샘플 0.3 g을 3.0 ml 고농도 황산(72% w/w)에 넣고 30 °C에서 1시간 동안 가수분해를 진행한 후 84 ml의 증류수로

4.0% (w/w) 황산 액으로 희석한 후 고압멸균장치를 이용하여 121 °C에서 1시간 동안 2차 가수분해를 하였다. 그 이후에 용해되지 않은 잔여물을 Whatman #1 거름종이로 회수하여 건조 후 무게를 측정하여 리그닌 성분을 측정하였다. 본 실험에서 생성된 글루코오스, 자일로오스 등의 당과 에탄올은 HPLC (Waters Co., USA)를 사용하여 분석하였다. 가수 분해 된 상등액을 HPX-87P column (Bio-Rad, Aminex, CA, USA)와 Refractive index detector (Varian 356-LC, Varian, Inc., CA, USA)를 이용하여 각 성분에 대한 정량 분석을 수행하였다.

2-3. 초음파추출

냉장보관 된 탈지미세조류는 추출 실험에 앞서 60 °C 오븐에서 건조무게의 변화가 없을 때까지 건조하여 실험에 사용하였다. 폴리페놀의 용매추출을 위해 밀폐형 유리튜브에 건조 시료를 기본 추출 조건인 0.5 g 고체샘플과 용매 10 ml을 혼합 한 후, 60 °C에서 30분간 98% 에탄올을 이용하여 초음파추출을 진행하였다. 추출조건 최적화를 위해 5개 영향인자의 조건을 변경하면서 실험을 수행하였다. 초음파추출은 탈지미세조류에 증류수를 가한 후 초음파기(JAC Ultrasonic, Hwaseong, Korea)를 이용하여 실온에서 standing-bath 형태로 초음파(40 kHz, 200 W)를 이용하여 각각의 조건 별로 추출 하였다. 추출 시, 튜브의 바닥 면이 초음파 수조의 바닥에 닿지 않도록 stainless rack에 튜브를 위치시키고 용기 안의 추출물과 용매가 물에 완전히 잠기도록 위치시켰다. 추출 후, 1 ml의 추출액을 마이크로튜브에 옮겨 원심분리 후 상등액을 회수하여 필요에 따라 희석액을 만들어 총 폴리페놀(TPC) 측정에 사용하였다.

2-4. 총 폴리페놀(TPC) 분석

총 폴리페놀 함량은 Folin-Denis법을 사용하여 측정하였다. Folin-Ciocalteu's 페놀용액을 희석 추출물에 첨가하여 폴리페놀 화합물에 의해 청색으로 환원 발색하는 원리에 근거하여 흡광도 변화로 폴리페놀 농도를 측정하였다. 각 추출물을 1 mg/mL로 희석한 후, 희석한 각 추출물을 0.125 mL 취하고 여기에 0.5 mL 증류수를 넣은 후 0.125 mL의 Folin-Ciocalteu reagent를 가하여 5분간 반응시킨 후 1.25 mL의 7% sodium carbonate 용액을 첨가하여 실온에서 1시간 반응을 진행시킨 후 760 nm에서 흡광도를 측정하였다. 측정치는 농도별 gallic acid를 이용한 standard curve와 비교하여 mg gallic acid equivalent (GAE)/g dry weight (DW)으로 표시하였다[8]. 모든 시료는 3반복 실험을 통해 평균과 표준편차를 이용하여 표시하였다. 모든 실험은 3회 반복하여 실시하고 결과치를 평균과 표준편차로 표시하고(mean±SD), SAS software (Statistical Analysis System, SAS Institute Inc., Cary, NC, USA)를 이용하여 분산분석과 Duncan's multiple range test ($p < 0.05$)를 실시하였다.

3. 결과 및 고찰

3-1. 탈지미세조류 성분분석

탈지미세조류의 기본 성분은 목질계 바이오매스의 구성성분인 셀룰로오스와 헤미셀룰로오스 등의 탄수화물과 폴리페놀의 집합체인 리그닌으로 구성되어 있다. 식물세포벽의 주요성분으로 알려진 셀룰로오스는 다량체인 글루코오스의 glycosidic 결합에 의한 고분자물질로 화학 및 생물학적으로 강건한 구조를 지니고 있다. 아라

비노스, 만노스와 갈락토오스 등의 결합으로 이루어진 헤미셀룰로오스는 리그닌과 ester 결합을 통해 강하게 결합되어 있어 셀룰로오스를 외부로부터 감싸 결합의 강도를 높여주는 역할을 하여 외부의 물리/화학/생물학적 스트레스로부터 세포벽을 보호하는 역할을 한다[9]. 미국 NREL 연구소의 표준 목질계 성분분석법에 근거하여 탈지미세조류의 주요성분을 분석했을 때, 셀룰로오스와 헤미셀룰로오스 함량이 각각 13.6%와 5.6%로 기존 목질계 대비 1/2~1/3수준에 불과함을 확인 할 수 있었다. 특히 리그닌의 함량은 3.8%로 목질계 대비 1/4 수준으로 측정되었다. 이는 바이오디젤 추출 공정에서 사용 된 메탄올과 핵산과 같은 유기용매에 의해 소수성 리그닌이 분리되어 탈지미세조류에 잔류한 리그닌의 함량이 낮은 것이라 해석된다. 낮은 리그닌 함량으로 인해 리그닌으로부터 생산될 수 있는 폴리페놀의 양이 목질계 바이오매스 대비 낮은 것으로 예상되거나 리그닌과 결합하고 있는 헤미셀룰로오스의 함량이 상대적으로 낮아 리그닌 분해를 통한 폴리페놀 생산이 상대적으로 용이할 것이라 예상할 수 있다. 낮은 리그닌 함량과 추출의 높은 용이성이 폴리페놀 추출에 동시에 영향을 줄 것으로 판단되어 추출조건 최적화에 따라 폴리페놀 생산증대가 가능하리라 판단되어 추출조건 최적화의 수행이 필요하다고 판단되었다.

3-2. 초음파 추출 조건 최적화

약 20 kHz 이상인 음파를 초음파라고 하며 초음파추출법은 초음파 진동에 의한 초음파는 매질의 압축과 소원으로 파동을 전달하는 과정이다[10]. 이때 발생하는 공동현상(cavitation)에 의하여 짧은 시간에 큰 에너지의 전달이 가능하며, 파동 마찰에 의한 국부 온도 상승으로 인해 주위에 위치한 반응물의 운동에너지를 증가시킬 수 있고 초음파 에너지 충격 효과에 의하여 압력 상승을 유도하여 가열 및 혼합 효과 병행 증진시킬 수 있어, 짧은 반응시간 동안 높은 추출효율을 얻을 수 있는 장점이 있다. 초음파는 나노물질 합성, 추출, 혼합과 세척 등과 같은 산업분야에 넓게 활용되고 있는데 그 중, 추출을 통한 식품소재 생산에 활용도가 높다[11]. 초음파 추출법은 특히 식물 세포벽을 대상으로 초음파 추출을 적용할 때 공명 효과에 의해 세포벽을 효과적으로 파괴하여 유용물질의 용매로의 전달 효율이 향상되기 때문에 추출 효율이 증가된다고 알려져 있다[12]. 초음파추출이 낮은 온도에서 짧은 추출시간 적용을 통해 효과적인 물질 추출이 가능하여 탈지미세조류를 이용한 초음파 추출공정을 통한 폴리페놀 생산증대를 위해 미세조류의 입자크기, 고액비(S/L ratio), 에탄올농도, 추출온도와 추출시간에 따른 폴리페놀 생산 농도를 조사하였다.

탈지미세조류 입자크기가 폴리페놀 추출에 미치는 영향을 평가하기 위해 건조된 탈지미세조류를 입자를 sieve를 이용하여 각각 0.11, 0.21, 0.36, 0.60, 1.00 mm로 분리하여 폴리페놀 추출을 시도하였다. 각기 다른 입자를 동일한 추출조건인 고액비 5%, 95% 에탄올, 60 °C에서 30분간 추출을 진행하였다. 일반적으로 입자크기가 작을 경우 표면적 증가 효과에 따라 추출 효과가 증가하는 경향을 보이며 입자크기 증가에 따라 표면적 감소 효과에 의해 추출되는 산물의 농도가 낮아진다고 알려져 있다[13]. Fig. 1에 보는 바와 같이, 입자크기가 TPC 추출에 미치는 영향은 유의함을 알 수 있었다 ($p < 0.05$). 입자크기가 증가함에 따라 TPC 농도가 증가하여 0.36 mm에서 가장 높은 TPC농도를 보였으며 입자크기 증가에 따라 TPC 농도가 감소하는 경향을 보였다. 이는 입자크기가 작을 경우

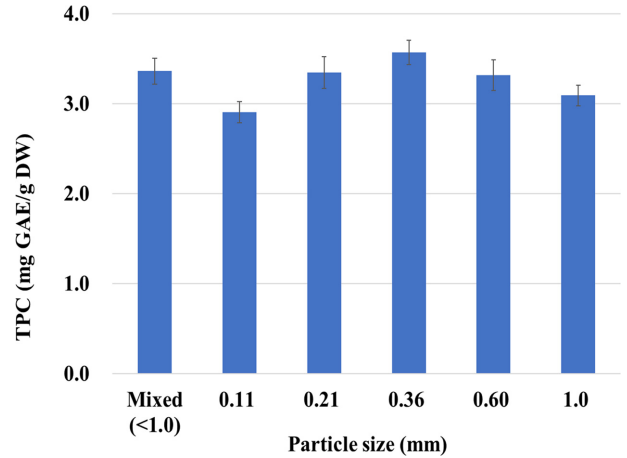


Fig. 1. Effect of particle size on extraction of the LEA polyphenolic compounds; TPC content expressed as a function of particle size of LEA (S/L ratio of 5%, ethanol concentration of 95%, extraction temperature of 60 °C, extraction time of 30 min), $p = 0.0022$ (particle size 0.11~1.0 mm), $p = 0.07$ (mixed vs. 0.36 mm)

몽칫 현상과 입자간 공극 감소로 입자와 용매의 접촉기회가 낮아져 세포벽에 대한 용매 침투가 어렵기 때문이라 판단된다. 반면, 입자크기 증가에 따라 입자 부피 대비 표면적의 상대적 감소로 인해 추출 효율이 감소함을 확인 할 수 있었다. 혼합 입자(1.0 mm 이하)를 사용하여 TPC를 추출하였을 경우 3.35 mg GAE/g DW의 TPC가 추출되었으며 이는 최대 TPC 생산을 보인 0.36 mm 입자크기와 비교하여 유의한 효과가 확인되지 않았다($p > 0.05$). 미세조류를 이용한 폴리페놀 추출에 있어 경제적인 공정 구성을 위해 별도의 입자크기 분별공정이 생략된 1.0 mm 이하의 혼합 미세조류를 사용하는 것이 보다 효율적이라 결론지을 수 있다.

Fig. 2은 초음파 추출공정에서 탈지미세조류 고체량과 용매량의 비율인 고액비(S/L ratio)가 폴리페놀 추출에 미치는 영향을 나타낸 것이다. 용매상에 추출된 폴리페놀의 총량을 기준으로 평가했을 때, 추출된 폴리페놀의 농도는 고액비 증가에 따라 유의하게 감소하는 경향을 보였다($p < 0.05$). 고액비 2.5~10% 구간에서 고액비 증

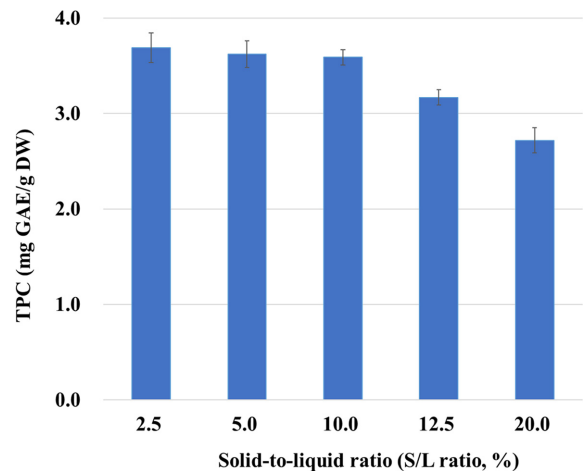


Fig. 2. Effect of liquid to solid ratio on the extraction of LEA polyphenolic compounds; TPC content expressed as a function of S/L ratio (mixed particle, ethanol concentration of 95%, extraction temperature of 60 °C, extraction time of 30 min), $p < 0.0001$ (S/L ratio 2.5~20.0%); $p = 0.370$ (S/L ratio 2.5~10.0%).

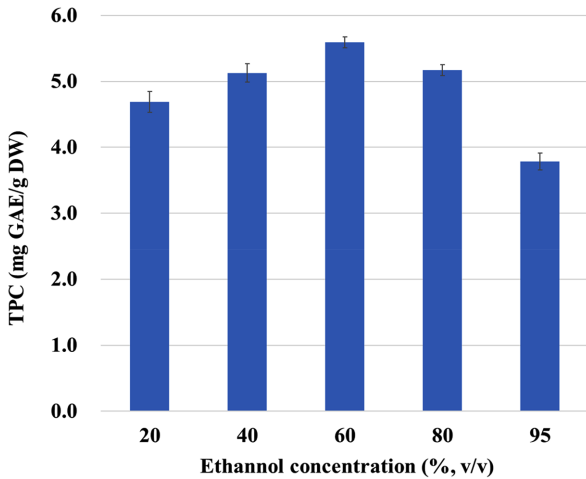


Fig. 3. Effect of ethanol concentration on the extraction of LEA polyphenolic compounds; TPC content expressed as a function of ethanol concentration (mixed particle, S/L ratio of 10%, extraction temperature of 60 °C, extraction time of 30 min), $p < 0.0001$ (Ethanol concentration 20~95%).

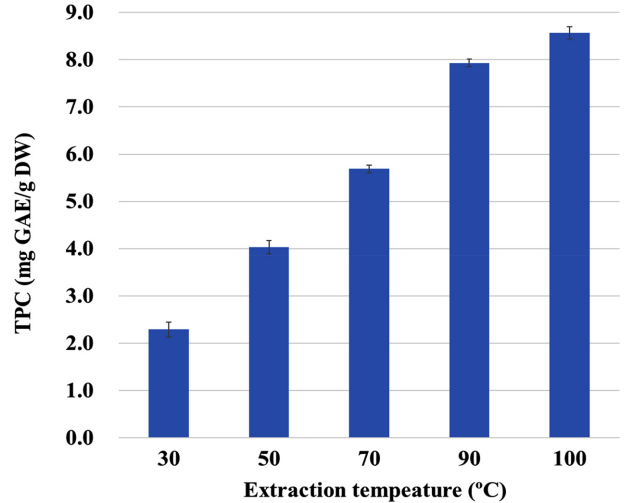


Fig. 4. Effect of extraction temperature on the extraction of LEA polyphenolic compounds; TPC content expressed as a function of extraction temperature (mixed particle, S/L ratio of 10%, ethanol concentration of 60%, extraction time of 30 min), $p < 0.0001$ (extraction temperature 30~100 °C); $p = 0.028$ (90 °C vs. 100 °C).

가에 따른 TPC의 변화는 유의하지 않은 것으로 평가되었다 ($P > 0.36$). 이는 고액비가 10% 보다 높은 조건에서 고체량 증가로 추출액의 폴리페놀 농도증가에 따른 농도구배 감소가 발생하여 추출 총량이 감소하는 것으로 보인다[14]. 경제적 측면에서 볼 때, 용매 투입 증가는 추출 장치 규모 또는 개수 증가로 이어져 설비비 증가를 가져오므로 최대 고액비 수준에서 높은 TPC 농도 확보가 가능한 고액비 10%를 최적 추출 조건으로 결정하였다.

목질계 바이오매스로부터 폴리페놀 추출에 있어 여러 가지 유기 용매가 사용되고 있으며 에탄올은 인체에 무해한 GRAS (generally recognized as safe)로 용매로 추출 효과가 우수하다 알려져 식품 또는 의약품 소재 생산을 위한 추출용매로 널리 사용되고 있다[15]. 폴리페놀 추출을 위해 사용되는 에탄올의 경우 물과의 혼합용매 사용 시 폴리페놀 추출능을 증가시킬 수 있다는 많은 연구결과가 보고되고 있다[16]. 물-에탄올 혼합용액 사용에 따른 TPC 생산농도의 변화를 Fig. 3에서 볼 수 있는데, 에탄올 농도 변화에 따라 TPC 생산은 유의한 영향을 받으며($p < 0.05$) 에탄올 농도가 60% 부근일 때 가장 높은 TPC생산농도를 확인할 수 있었다. 미세조류로부터 지질 추출 시 사용하는 용매는 소수성 용매인 헥산과 메탄올로 탈지공정 후 잔류하는 세포벽 성분에는 소수성 리그닌의 함량이 낮고 친수성 리그닌이 일부 함유되어 있을 것으로 보여 물과 에탄올 혼합 비율에 따른 친수도의 변화에 의해 세포벽에 존재하는 폴리페놀이 특정 에탄올 농도에서 높은 추출효율을 보인 것으로 판단된다[17].

추출온도가 폴리페놀 추출에 미치는 영향을 평가하기 위해 60% 에탄올을 이용하여 추출 온도를 30~100 °C로 변경하여 30분간 초음파 추출을 수행하였다(Fig. 4). 폴리페놀 농도는 추출온도에 영향을 유의하게 받음을 알 수 있으며($p < 0.05$) 온도 증가에 따른 폴리페놀 증가를 뚜렷하게 확인할 수 있었는데 실험온도 100 °C에서 8.56 mg GAE/mg DW의 TPC 추출이 되었다. 추출온도 90 °C와 비교할 때, 온도변화에 따라 유의한 효과가 있음을 알 수 있어 100 °C 조건에서 보다 높은 폴리페놀 생산이 가능한 최적조건임을 알 수 있었다($p = 0.028$). 추출온도 90 °C 이상에서 비교적 높은 폴리페놀 농도를 확인할 수 있었는데, 이러한 결과를 목질계 바이오매

스와 비교하였을 때, 탈지미세조류 세포벽 성분 중 낮은 헤미셀룰로오스 함량으로 인해 리그닌-헤미셀룰로오스의 결합이 적어 리그닌의 노출도가 높아져 비교적 낮은 온도에서 폴리페놀 추출이 가능함을 알 수 있었다. 특히 리그닌이 지질 추출 공정에서 소수성 용매에 의해 부분적으로 분리가 됐던 이유로 100 °C 부근의 낮은 온도의 초음파 추출조건에서도 효과적으로 폴리페놀 추출이 가능한 것으로 판단된다.

추출시간은 운전비용과 설비규모를 결정하여 생산가에 영향을 미치는 중요한 인자로 추출시간의 단축을 통한 생산성 향상과 함께 설비비용 감소가 필요하다[18]. Fig. 5에 보는 바와 같이, 추출시간 증가에 따른 폴리페놀 농도가 유의하게 증가하는 경향을 볼 수 있으며($p < 0.05$), 추출시간 60분에서 폴리페놀 농도가 8.8 mg GAE/g

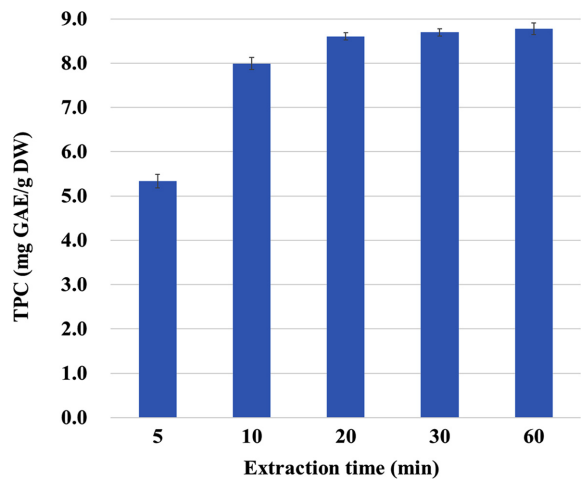


Fig. 5. Effect of extraction time on the extraction of LEA polyphenolic compounds; TPC content expressed as a function of extraction time (mixed particle, S/L ratio of 10%, ethanol concentration of 60%, extraction temperature of 100 °C), $p < 0.0001$ (extraction time 5~60 min); $p = 0.39$ (20 min vs. 30 min).

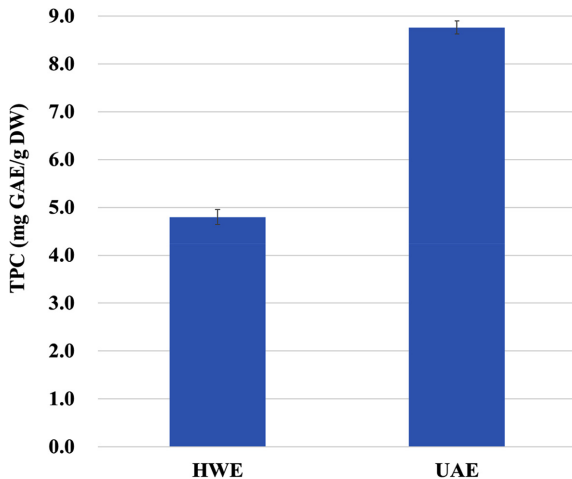


Fig. 6. Comparison of TPC extraction from hot-water extraction and UAE with water-ethanol binary solvent under the optimum extraction condition (mixed particle, S/L ratio of 10%, ethanol concentration of 60%, extraction temperature of 100 °C, extraction time of 20 min).

Table 1. Composition of lipid extracted microalgae (*Tetraselmis* KCTC 12236BP) and rice straw

| | Dry weight percent (%) | | |
|-------------|------------------------|---------------|--------|
| | Cellulose | Hemicellulose | Lignin |
| LEA | 13.6 | 5.6 | 3.8 |
| Rice straw | 34.4 | 17.9 | 12.4 |
| Corn stover | 38.4 | 24.4 | 17.0 |
| Switchgrass | 31.0 | 21.2 | 17.6 |

DW으로 가장 높음을 알 수 있었다. 추출시간 30분에 폴리페놀 생산량은 8.7 mg GAE/g DW으로 20분 추출에 비해 증가량이 유의하지 않은 것을 확인할 수 있었다($p=0.397$). 추출 초기에 폴리페놀 생산량이 매우 높은 것을 볼 수 있는데 물-에탄올 10분 추출을 적용했을 때 폴리페놀이 7.99 mg GAE/g DW 생산되었는데 이는 헤미셀룰로오스의 부재로 인해 리그닌으로부터 폴리페놀의 분리가 빠르게 발생함을 간접적으로 확인할 수 있었다. 초음파추출 20분 이후에 폴리페놀 농도가 8.6 mg GAE/g DW 후 유의한 증가가 없는 것으로 보아 추출시간 20분을 경제적인 관점에서 최적 추출시간으로 결정하였다.

초음파추출 최적화에서 도출된 조건을 이용하여 초음파추출과 열수추출(hot-water extraction, HWE)에서 폴리페놀 추출을 비교하였다. Fig. 6에서 보는 바와 같이 동일한 추출조건하에서 열수추출은 4.80 mg GAE/g DW인 반면 초음파추출은 8.76 mg GAE/g DW 추출하여 1.8배 높은 TPC를 추출이 가능하였다. 식물 세포벽으로부터 생리활성물질 추출을 위해서 열수추출법이 가장 널리 사용되고 있으나 열수추출법은 열에 의한 생리활성물질의 파괴, 단백질 변이, 높은 에너지 소비 및 낮은 추출효율 등의 단점이 있다. 본 실험에 사용된 초음파추출은 초음파에 의한 공동현상 발생으로 인해 내부압력 증가, 리그노셀룰로오스 구조의 파괴, 추출물의 확산 증대 및 낮은 온도와 짧은 추출시간으로 인해 열수추출 공정의 대비 에너지소모가 28.3%로 열수추출보다 경제적이고 효과적인 추출방법임을 확인할 수 있었다[19].

4. 결 론

바이오 디젤은 석유 기반의 액체 연료를 대체 할 수 있는 에너지로 특히 대형차량 중심의 수송연료를 대신할 수 있는 유일한 대안으로 인식되고 있어 그 수요가 지속적으로 증가할 것으로 판단된다. 미세 조류의 지질을 이용한 바이오디젤 생산은 기술적으로는 이미 실현 단계에 도달하였으나 가격 경쟁력의 확보가 상업화 성공에 마지막 해결과제로 남아있다. 기존의 생산과 추출공정을 최적화 시키고 biorefinery 개념을 도입하여 부산물로 생산되는 탈지미세조류로부터 폴리페놀과 같은 고부가가치 산물 생산을 통해 가격 경쟁력을 확보한다면 미세 조류를 이용한 바이오디젤 생산의 경제성 문제를 해결할 수 있을 것으로 판단된다.

본 연구에서는 미세조류를 이용한 바이오디젤 생산의 부산물인 탈지미세조류 세포벽 성분 중 리그닌으로부터 고부가가치 산물인 폴리페놀 추출에 있어 상업화에 적합한 공정개발을 위해 저온에서 보다 빠른 폴리페놀 추출이 가능한 초음파추출 공정을 도입하고 공정변수를 최적화하였다. 탈지미세조류에 초음파추출공정 최적조건을 적용하여 폴리페놀 추출 시 기존의 열수추출에 비해 1.8배 이상 높은 추출성능을 확인할 수 있었다. 이는 초음파의 공동현상으로 인해 생리활성물질의 분리와 전달 효율이 향상되었기 때문이며 초음파추출을 이용한 폴리페놀 추출은 짧은 공정시간과 낮은 에너지 소비로 기존의 환류냉각 또는 열수추출보다 보다 효율적으로 향산화 물질을 추출할 수 있으며 기존의 추출공정에 추가설치가 용이하고 설비가 간단하고 저렴한 매우 경제적인 추출 방법이라 판단된다.

감 사

이 논문은 해양수산부의 재원으로 해양생명공학기술개발사업(PJT200255, 해양미세조류 이용 바이오디젤 생산기술 개발) 연구개발비 지원에 의해 수행되었습니다.

References

- Park, J. Y., LEE, G. A., Kim, K. Y., Choi, S. A., Jung, M. J. and Oh, Y. K., "Microalgal Oil Recovery by Solvent Extraction from *Nannochloropsis oceanica*," *Korean Chem. Eng. Res.*, **52**(1), 88-91(2014).
- Jo, B. H. and Cha, H. J., "Biodiesel Production Using Microalgal Marine Biomass," *Korean Soc. Biotechnol, Bioeng. J.*, **25**, 109-115(2010).
- Kang, Y. H., "Phenolic Compounds and Antioxidant Activity in Cell Wall Materials from Deodeok (*Codonopsis lanceolata*)," *Korean J. Food Sci. Technol. Res.*, **41**, 345-349(2009).
- Kang, C. D., Park, T. H. and Sim, S. J., "Biological CO₂ Fixation to Antioxidant Carotenoids by Photosynthesis Using the Green Microalga *Haematococcus pluvialis*," *Korean Chem. Eng. Res.*, **44**(1), 46-51(2006).
- Shin, S. L. and Lee, C. H., "Antioxidant Activities of Ostrich Fern by Different Extraction Methods and Solvents," *J. Life Sci.*, **21**, 56-61(2011).
- Park, Y. C. and Kim, J. S., "Pretreatment of *Helianthus tuberosus* Residue by Two-Stage Flow Through Process," *Korean Chem. Eng. Res.*, **53**(4), 417-424(2015).

7. National Renewable Energy Laboratory, Standard Biomass Analytical Procedures, http://www.nrel.gov/biomass/analytical_procedures.html.
8. Jo, J. M., Choi, K. H., Shin, S. G., Lee, J. H. and Kim, J. W., "Optimization of Extraction Conditions of Polyphenolic Compounds from Amaranth Leaf using Statistically-based Optimization," *Korean Chem. Eng. Res.*, **54**(3), 315-319(2016).
9. Kim, T. H. and Lee, Y. Y., "Fractionation of Corn Stover by Hot Water and Aqueous Ammonia Treatment," *Bioresour. Technol.*, **97**, 224-232(2005).
10. Kim, Y. S. and Lee, K. J., "Extraction of Genistein and Formononetin from *Sophoraflavescens* Aiton using Ultrasonic wave," *Korean Chem. Eng. Res.*, **47**(2), 258-261(2009).
11. Park, Y. K. and Cho, C. H., "Effects of Additives on the Mechanical and Thermal Properties of Epoxy-based Nanocomposites Produced Using Sonication," *Korean J. Chem. Eng.*, **33**(6), 1938-1941(2016).
12. Chemat, F. and Khan, M. K., "Application of Ultrasound in Food Technology," *Ultrasonics Sonochem.*, **18**, 813-835(2011).
13. Jin, L., Ha, J. H., Choi, Y. Y., Seo, Y. C. and Lee, H. Y., "Enhancement of Cosmeceutical Activities of *Berberis koreana* Bark by High Pressure and Ultrasonification Extraction Processes," *Korean Soc. Med. Crop Sci.*, **19**, 54-65(2011).
14. Bilek, S. E., "The Effects of Time, Temperature, Solvent:solid Ratio and Solvent Composition on Extraction of Total Phenolic Compound from Dried Olive (*Olea europaea* L.) Leaves," *J. Food.*, **35**, 411-416(2010).
15. Stamatopoulos, K., Chatzilazarou, A. and Katsoyannos, E., "Optimization of Multistage Extraction of Olive Leaves for Recovery of Phenolic Compounds at Moderated Temperatures and Short Extraction Times," *Foods*, **3**, 66-81(2013).
16. Alonso, E., Bourzeix, M. and Revilla, E., "Suitability of Water-ethanol Mixtures for the Extraction of catechins and proanthocyanidins from *Vitis vinifera* seeds contained in a winery by-product," *Seed Sci. Technol.*, **19**, 545-552(1991).
17. Yilmaz, Y. and Toledo, R. T., "Oxygen Radical Absorbance Capacities of Grape/wine Industry Byproducts and Effect of Solvent Type on extraction of grape seed polyphenols," *J. Food Compos. Anal.*, **19**, 41-48(2006).
18. Vergara-Salinas, J. R., Pérez-Jiménez, J., Torres, J. L., Agosin, E. and Pérez-Correa, J. R., "Effects of Temperature and Time on Polyphenolic Content and Antioxidant Activity in the Pressurized Hot Water Extraction of Deodorized Thyme (*Thymus vulgaris*)," *J. Agric. Food Chem.*, **60**, 10920-10929(2012).
19. Choi, W. Y., Lee, H. Y., Lee, C. G., Song, C. H., Seo, Y. C., Kim, J. S., Kim, B. H. and Lim, H. W., "Comparison of Low Molecular Ginsenoside Contents and CO₂ Emission from Low Quality Fresh Ginseng by Low CO₂ Emission Processes," *Food Eng. Prog.*, **16**, 325-332(2012).