

321096-2

보안 과제( ), 일반 과제( O ) / 공개( O ), 비공개( )발간등록번호( O )  
유용농생명자원산업화기술개발사업 2023년도 최종보고서

발간등록번호

11-1543000-004386-01

곤충자원으로부터  
지방산 추출 개발 및  
고효율 지지와  
산업화

# 곤충자원으로부터 고효율 지지와 지방산 추출 개발 및 산업화

2023.06.01.

2023

주관연구기관 / 그린테코(주)  
공동연구기관 / 세종대학교  
한국석유관리원  
동국대학교

농림식품기술기획평가원  
농림축산식품부

농림축산식품부  
(전문기관)농림식품기술기획평가원

제출문

## 제 출 문

농림축산식품부 장관 귀하

본 보고서를 “곤충자원의 유용 지질을 이용한 고부가가치화 기술 개발”(개발기간 : 2021. 04. ~ 2022. 12.)과제의 최종보고서로 제출합니다.

2023. 06. 01.

주관연구기관명 : 그린테크(주)

(대표자) 이 상 훈 (인)

공동연구기관명 : 세종대학교 산학협력단

(대표자) 송 진 우 (인)

한국석유관리원

(대표자) 차 동 형 (인)

동국대학교 산학협력단

(대표자) 반 상 우 (인)

주관연구책임자 : 이 상 훈

협동연구책임자 : 윤 은 영

박 조 용

구 태 원

국가연구개발사업의 관리 등에 관한 규정 제18조에 따라 보고서 열람에 동의합니다.

## < 요약 문 >

※ 요약문은 5쪽 이내로 작성합니다.

사업명	유용농생명자원 산업화 기술개발 사업			총괄연구개발 식별번호 (해당 시 작성)			
내역사업명 (해당 시 작성)				연구개발과제번호		321096-2	
기술분류	국가과학기술 표준분류	LA0802	60%	LB0306	30%	LB0507	10%
	농림식품 과학기술분류	AB2099	60%	RA0306	30%	CA0202	10%
총괄연구개발명 (해당 시 작성)							
연구개발과제명	곤충자원의 유용 지질을 이용한 고부가가치화 기술 개발						
전체 연구개발기간	2021. 04. 01 - 2022. 12. 31( 1년 9개월)						
총 연구개발비	총 590,000 천원 (정부지원연구개발비: 525,000 천원, 기관부담연구개발비: 65,000 천원, 지방자치단체: 천원, 그 외 지원금: 천원)						
연구개발단계	기초[ ] 응용[ ] 개발[ ○ ]		기술성숙도 (해당 시 기재)		착수시점 기준( ) 종료시점 목표( )		
연구개발과제 유형 (해당 시 작성)							
연구개발과제 특성 (해당 시 작성)							
연구개발 목표 및 내용	최종 목표		곤충자원의 유용 지질을 이용한 고부가가치화 기술 개발				
	전체 내용		<ul style="list-style-type: none"> <li>○ 곤충자원에서부터 고효율 지질 개발 및 지방산 추출 개발 구축</li> <li>○ 곤충자원에서부터 고효율 지질 개발 및 지방산 추출 개발 확립</li> <li>○ 곤충 오일 및 지방산 추출 기술 개발 및 산업화: 2건</li> <li>○ 발효를 통한 바이오디젤 생산용 곤충의 지질 및 생산성 향상을 위한 사료 조성 개발: 2종</li> <li>○ 발효를 통한 곤충 지질 유래 기능성 화장품 소재 개발: 1종</li> <li>○ 기능성 지질 추출 부산물 이용 바이오디젤 합성 및 품질 향상 기술</li> <li>○ 부산물 지질을 활용한 바이오디젤 합성 및 연료 검증: 2건</li> <li>○ 곤충 유래 바이오디젤의 연료 안정성(저장 안정성, 금속 부식성) 검증</li> <li>○ 곤충자원을 활용한 바이오디젤 대량 생산 산업화 모델 제시</li> <li>○ 곤충 기능성 지방산의 항비만 효능 평가: 1건</li> </ul>				
	1단계 (해당 시 작성)	목표	<p>&lt;1년차&gt;</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>○ 곤충자원에서부터 고효율 지질 개발 및 지방산 추출 개발 구축</li> <li>○ 발효를 통한 바이오디젤 생산용 곤충의 지질 및 생산성 향상을 위한 사료개발</li> <li>○ 부산물 지질을 활용한 바이오디젤 합성 및 품질 향상 기술 개발</li> <li>○ 곤충 유래 기능성 지방산의 비만 및 식욕 억제 효능 분석</li> </ul> <p>&lt;2년차&gt;</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>○ 곤충자원에서부터 고효율 지질 개발 및 지방산 추출 개발 확립</li> </ul>				

		<ul style="list-style-type: none"> <li>○ 발효를 통한 곤충 유래 지질의 기능성 화장품 소재 개발</li> <li>○ 곤충 유래 바이오디젤 연료 안정성 검증 및 산업화 모델 제시</li> <li>○ 실험동물을 이용한 곤충 기능성 지방산의 항비만 효능 기전 구명</li> </ul>
	내용	<p><b>&lt;1년차&gt;</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>○ 곤충자원으로부터 고효율 지질 추출 개발 및 협동 기관 공급</li> <li>○ 고효율 지질로부터 고부가 지방산 소형 추출 개발: 카본 12개, 라우릭산 등</li> <li>○ 바이오디젤 생산용 곤충의 생산 효율 향상을 위한 인공사료 발효조건 확립 <ul style="list-style-type: none"> <li>- 인공사료의 사료 효율을 증대시키기 위한 발효 균주 선정</li> <li>- 인공사료의 사료 효율을 증대시키기 위한 발효 균주의 발효 능력 평가: 고분자물질 분해효소 활성 측정(amylase, protease, lipase 등)</li> </ul> </li> <li>○ 바이오디젤 생산용 곤충의 생산 효율 향상을 위한 발효 인공사료 개발 <ul style="list-style-type: none"> <li>- 인공사료의 사료 효율을 증대시키기 위한 발효 균주의 적정 혼합비율 및 발효 기간 확립: 고분자물질 분해 산물 측정 (아미노태질소, 단당류, 글리세롤 등) 및 생산 효율 향상 여부 확인(증체량, 생존율, 사육 기간 등)</li> <li>- 발효 인공사료의 방부제 첨가 조건 및 제형화 확립</li> </ul> </li> <li>○ 기능성 지질이 추출된 부산물 지질의 특성 분석을 통한 에스테르화 반응 최적화 기술</li> <li>○ 곤충 바이오디젤의 분리정제를 통한 고순도화 공정 기술 (FAME 함량 96.5% 이상)</li> <li>○ 부산물 지질을 활용한 바이오디젤의 국내 품질기준(KS M 2965) 적용 품질 특성 분석</li> <li>○ 곤충 유래 중쇄지방산의 농도별 세포독성 분석</li> <li>○ 곤충 중쇄지방산의 비만 관련 분자마커의 발현 억제 효능 분석</li> </ul> <p><b>&lt;2년차&gt;</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>○ 곤충자원으로부터 고효율 지질 대량 추출 개발 및 확립</li> <li>○ 고효율 지질로부터 고부가 지방산 대량 추출 개발(1차년 보완): 카본12개, 라우릭산 등</li> <li>○ 경제성 분석 및 산업화: 생산원가분석 및 경제성 분석, 현장 적용</li> <li>○ Lipase 활성이 우수한 균주를 활용한 곤충 지질의 발효조건 확립 <ul style="list-style-type: none"> <li>- 곤충 지질 발효능력이 우수한 균주 선정</li> <li>- 곤충 지질 발효능력이 우수한 균주의 발효능력 평가: 지질 분해효소 활성 측정</li> </ul> </li> </ul>

			<ul style="list-style-type: none"> <li>- 곤충 지질의 선발한 균주 활용 발효 후 발효 정도 평가: 유리지방산 및 글리세롤의 양 등</li> <li>○ 발효 지질 및 라우릭산을 활용한 미백 기능성 검정 <ul style="list-style-type: none"> <li>- 체외 tyrosinase 활성 저해 능력 검정: ELISA 등</li> <li>- 멜라노마 세포 내 tyrosinase 활성 저해 능력 검정: 세포 독성(MTT assay), ELISA 등</li> <li>- 세포 내 tyrosinase mRNA 발현 저해 활성 검정: qRT-PCR을 통한 HTYR1 등</li> <li>- 체외 DOPA 산화 반응에 대한 tyrosinase 활성 저해 검정: ELISA 등</li> <li>- 세포 내 멜라닌 생성 저해 능력 검정: ELISA 등</li> </ul> </li> <li>○ 발효 지질 및 라우릭산을 활용한 주름 개선 기능성 검정 <ul style="list-style-type: none"> <li>- 섬유아세포 내 collagen 생성 능력 검정: 세포 독성(MTT assay 등), ELISA, qRT-PCR 등</li> <li>- 섬유아세포 내 collagenase 활성 억제 능력 검정: 세포 독성(MTT assay 등), ELISA, qRT-PCR 등</li> <li>- 섬유아세포 내 elastase 활성 억제 능력 검정: ELISA 등</li> </ul> </li> <li>○ 발효 곤충 지질 및 라우릭산의 알러지 반응 검사: 인체 적용 시험(척포 시험 등)</li> <li>○ 생산된 곤충 유래 바이오디젤과 석유계 경유와 혼합한 연료의 혼합 영향성 평가</li> <li>○ 가속 노화 조건에서 바이오디젤의 품질 특성(수분, 요오드, 전산가 등) 변화 분석을 통한 장기 저장 안정성 평가</li> <li>○ 가속 노화 조건에서 금속 재질별 무게 변화 및 바이오디젤 내의 금속분 함량 변화 평가</li> <li>○ 곤충자원을 활용한 바이오디젤 대량 생산을 위한 산업화 모델 제시</li> <li>○ 비만 마우스의 시상하부 비만 표지 분자마커 유발 여부 확인</li> <li>○ 곤충 중쇄지방산의 비만 마우스의 항비만 효능 분석</li> </ul>
--	--	--	--

연구개발성과	
--------	--

연구개발성과 활용계획 및 기대 효과	<ul style="list-style-type: none"> <li>○ 곤충자원의 바이오디젤 소재산업화를 통한 신가치 창출 및 미래 블루오션 영역 확대</li> <li>○ 곤충 유래 바이오디젤 개발은 고유가에 따른 대응 외에 미세먼지 저감화에 따른 환경 개선, 에너지 안보강화, 곤충 농가소득 증대 등 효과 창출</li> <li>○ 곤충 유래 바이오디젤 생산 과정에서 발생하는 부산물의 가축 사료, 천연항생제, 바이오 화장품 등 고부가가치 소재 개발에 따른 동태등에 유래 바이오디젤의 가격 경쟁력 향상</li> <li>○ 곤충 이용에 의한 유기성 폐기물의 친환경적 처리 및 자원화를 통한 자연순환형 사회 구축</li> <li>○ 곤충 유래 기능성 지방산 이용에 의한 고부가가치 항비만 식품 및 항비만 기능성 사료 개발</li> <li>○ 곤충의 기능성 지방산의 항비만 소재 개발은 기존 식·의약 소재 이외에 새로운 분야로 기술범위 확대: 당뇨, 고혈압, 지방간 등</li> </ul>
---------------------	---

연구개발성과의 비공개여부 및 사유												
연구개발성과의 등록·기탁 건수	논문	특허	보고서 원문	연구 시설 ·장비	기술 요약 정보	소프트 웨어	표준	생명자원		화합물	신품종	
								생명 정보	생물 자원		정보	실 물
연구시설·장비 종합정보시스템 등록 현황	구입 기관	연구시설 ·장비명	규격 (모델명)	수량	구입 연월일	구입가격 (천원)	구입처 (전화)	비고 (설치장소)	ZEUS 등록번호			
국문핵심어 (5개 이내)	곤충		대량 생산		산업화		바이오에너지		라우릭산			
영문핵심어 (5개 이내)	Insect		Mass production		Industrialization		Bio energy		Lauric acid			

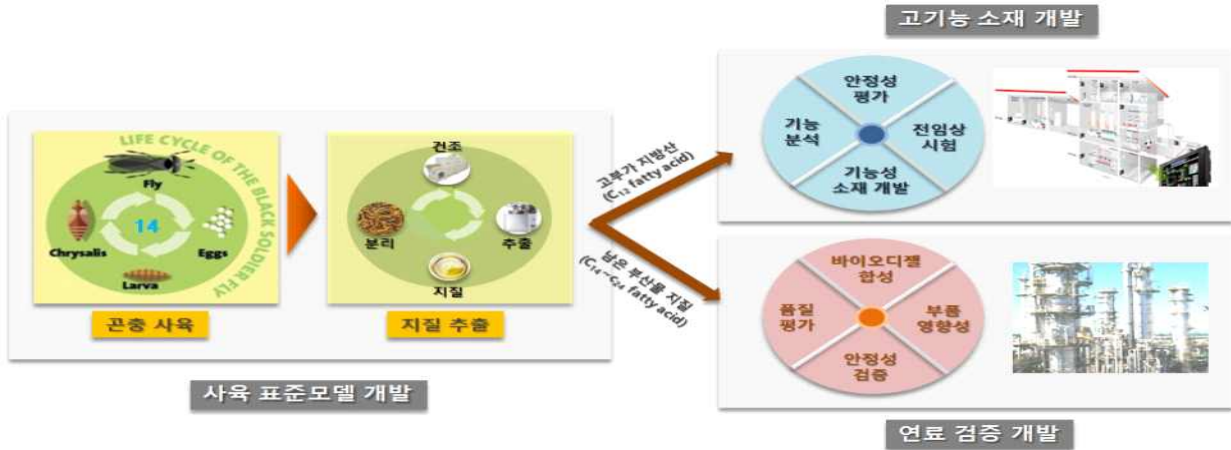
# 〈 목 차 〉

<b>1. 연구개발과제의 개요</b> .....	1
가. 연구개발의 개요 .....	1
나. 핵심기술 .....	1
<b>2. 연구개발과제의 수행 과정 및 수행 내용</b> .....	2
<b>&lt;주관기관(그린테코): 곤충자원으로부터 고효율 지질과 지방산 추출 개발 및 산업화&gt;</b>	2
가. 고효율 지질로부터 고부가 지방산 추출 .....	2
나. 고효율 지질로부터 추출된 고부가 지방산 협동 기관 공급 .....	17
다. 경제성 분석 및 산업화, 현장적용 .....	17
<b>&lt;제1협동(세종대): 발효를 통한 바이오디젤 생산용 곤충 사료 및 지질 활용 기능성 화장품 소재 개발&gt;</b>	24
가. 바이오디젤 생산용 곤충의 생산 효율 향상을 위한 사료 발효 조건 확립 .....	24
나. 바이오디젤 생산용 곤충의 생산 효율 향상을 위한 발효사료 개발: 2종 (갈색거저리, 동애등에) .....	25
다. Lipase 활성이 우수한 균주를 활용한 곤충 지질의 발효조건 확립 .....	30
라. 상기 발효 곤충 지질 및 다양한 지방산을 활용한 미백 및 주름개선 기능성 검정	32
마. 발효 곤충 지질의 알러지 반응 검사: 인체적용 첩포시험 .....	39
<b>&lt;제2협동(한국석유관리원): 부산물 지질을 활용한 바이오디젤 합성 및 연료 검증&gt;</b>	42
가. 기능성 지질이 추출된 부산물 지질의 특성 분석을 통한 에스테르화 반응 최적화 기술..	42
나. 곤충 바이오디젤의 분리정제를 통한 고순도화 공정 기술(FAME 함량 96.5% 이상) ..	49
다. 부산물 지질을 활용한 바이오디젤의 국내품질기준(KS M 2965) 적용 품질 특성 분석 .....	50
라. 시제품(스케일업) 곤충 유래 바이오디젤의 연료검증 .....	52
마. 생산된 곤충 유래 바이오디젤과 석유계 경유와 혼합한 연료의 혼합 영향성 평가..	55
바. 가속 노화 조건에서 바이오디젤의 품질 특성(요오드가, 전산가 등) 변화 분석을 통한 장기 저장안정성 평가 .....	65
사. 가속 노화 조건에서 금속 재질별 무게 변화 및 바이오디젤 내의 금속분 함량 변화 평가 .....	66
아. 곤충자원을 활용한 바이오디젤 대량 생산을 위한 산업화 모델 제시 .....	69
<b>&lt;제3협동(동국대): 곤충 기능성 지질을 이용한 고부가가치 기능성 소재 개발&gt;</b>	72
가. 연구개발과제의 수행 과정 .....	72
나. 연구개발과제의 수행 내용 .....	76
<b>3. 연구개발과제의 수행 결과 및 목표 달성 정도</b> .....	77
<b>4. 목표 미달 시 원인분석(해당 시 작성합니다)</b> .....	100
<b>5. 연구개발성과의 관련 분야에 대한 기여 정도</b> .....	100
<b>6. 연구개발성과의 관리 및 활용 계획</b> .....	100
<b>참고 문헌</b> .....	101

# 1. 연구개발과제의 개요

## 가. 연구개발의 개요

곤충자원의 대량 생산을 위한 **곤충 사육 표준모델**을 개발하고 생산된 곤충을 분리 → 건조 → 추출 공정을 통해 **고효율 지질 추출 기술**을 개발한 다음, 추출된 지질에서 **고부가 지방산인 C<sub>12</sub> fatty acid와 C<sub>13</sub> fatty acid** 이상의 지방산으로 분리하여 **고부가 지방산은 기능성 화장품 및 항비만 소재** 등의 고부가 소재로 개발하고 남은 부산물 지방산은 **바이오디젤로 전환하여 국내 품질기준을 만족하고 연료 안정성 검증**을 통해 곤충자원 활용을 극대화하는 산업화 모델을 제시하고자 함



< 제품 생산 개념도 >

## 나. 핵심기술

- 1) 곤충자원에서부터 **고효율 지질 추출** 개발 및 협동 기관 공급
- 2) 고효율 지질로부터 **고부가 지방산 소형 추출** 개발 및 산업화
- 3) **사료 조성 개발**: 지질 및 생산성 향상을 위한 곤충 사료의 발효 조건과 조성 개발
- 4) **화장품 소재 개발**: 곤충 지질의 기능성 향상과 미백 및 주름 개선에 기능성을 갖는 곤충 지질의 발효조건과 기능성 검정
- 5) **바이오디젤 합성 및 고품질화**: 기능성 지질을 추출하고 남은 부산물 지질의 물성 특성을 분석하여 적정 촉매, 반응 온도, 반응시간을 최적화하여 고수율의 바이오디젤을 합성하고 국내 품질기준을 만족하는 고품질화 기술 개발
- 6) **바이오디젤 연료 안정성 검증**: 새로운 원료를 이용하여 제조된 바이오디젤은 연료로서의 안정성이 검증되어야 시장에 유통될 수 있음 따라서, 연료 안정성 검증을 위해 가속 노화 조건에서의 저장 안정성 및 부품 부식성 평가를 시행
- 7) **산업화 모델 제시**: 바이오디젤 생산에서 차지하는 원료의 단가는 60% 정도로 가장 큰 비중을 차지하기 때문에 곤충자원의 대량 생산을 위한 표준모델을 제시하고 지자체, 농가 등과 연계된 사업화 모델을 제시
- 8) **곤충 지방산 이용 고부가가치 소재 개발**: 곤충 지질로부터 추출된 라우릭산 등 중쇄지방산을 이용하여 인간과 반려동물의 항비만 식품/사료를 개발함으로써 곤충 유래 지방산의 경제성을 극대화함

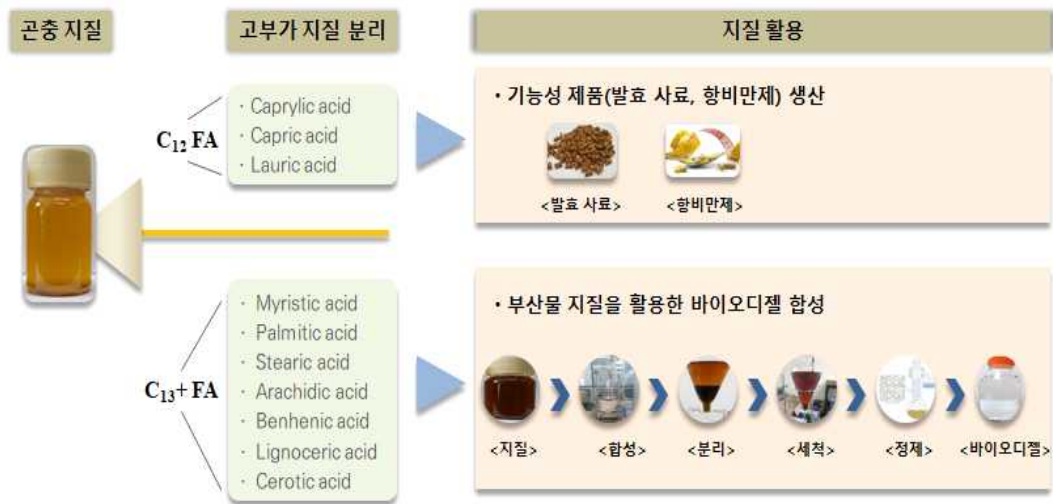


## 2. 연구개발과제의 수행 과정 및 수행 내용

<주관기관(그린테코): 곤충자원으로부터 고효율 지질과 지방산 추출 개발 및 산업화>

### 가. 고효율 지질로부터 고부가 지방산 추출

일반적인 지질은 트리글리세라이드와 지방산으로 구성되어 있으며 곤충(동애등에) 지질은 전산가가 2.7 mgKOH/g으로 낮아 대부분 트리글리세라이드로 이루어져 있었고 이를 수열 공정을 통해 지방산으로 전환한 다음에 감압 증류를 통해 고부가 지방산(C<sub>12</sub> 지방산)으로 분리하였다. 분리된 C<sub>12</sub> 지방산은 고부가 기능성 제품인 발효 사료 및 항비만제로 활용되고 부산물 지질인 C<sub>13</sub> 이상의 지방산은 바이오디젤로 전환하는 연구를 수행하였다.



< 곤충 지질의 고부가 지방산 분리 및 활용 >

곤충 지질에서 고부가 지방산(C<sub>12</sub> 지방산)인 라우릭산(lauric acid)을 추출하기 위해 트리글리세라이드를 지방산으로 분리하는 수열 공정과 고부가 지방산을 분리하는 감압 증류 공정을 수행하였다.

#### 1) 화학적 방법을 이용한 추출 개발

##### 가) 동애등에 지질 간이 수열 분해

첫 번째 진행했던 실험 결과 동애등에 지질에서 Lauric Acid가 분리되지 않았고 곤충 지질의 전산가를 측정한 결과 대부분이 트리글리세라이드로 이루어져 있다는 것을 알았고 트리글리세라이드를 지방산으로 전환하는 방법을 검토하였다.

곤충 지질에 함유되어있는 트리글리세라이드를 지방산으로 전환하기 위해 수열분해 반응을 1,2차 실험에 거쳐 진행하였다.

**1차 실험**에서 촉매는 황산을 사용하여서 물 5g, 지질 1g, 황산 0.05g 비율로 혼합하여 100rpm으로 교반하면서 100℃의 온도에서 진행하였고,

**2차 실험**에서 촉매는 황산을 사용하여서 물 10g, 지질 1g, 황산 0.05g 비율로 혼합하여 100rpm으로 교반하면서 110℃의 온도에서 진행하였다.

(1) 1차 실험

촉매는 황산을 사용하여서 물 5g, 지질 1g, 황산 0.05g 비율로 혼합하여 100rpm으로 교반하면서 100℃의 온도에 각각의 7시간, 24시간, 31시간 반응을 통해 Triglyceride가 Fatty acid로 전환 되었는지 확인하는 실험을 진행하였다. 100℃ 온도에서 가열할 때 수분이 증발되면 안 되기 때문에 증발한 수분을 다시 응집시켜서 일정량을 수집한 후 다시 혼합시켜 주는 방식으로 진행하였다.

(가) 실험 목적

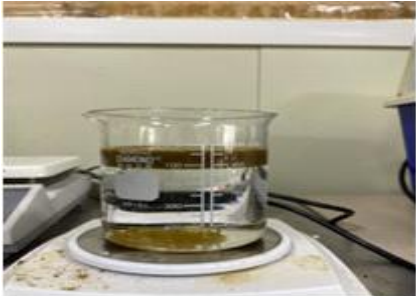
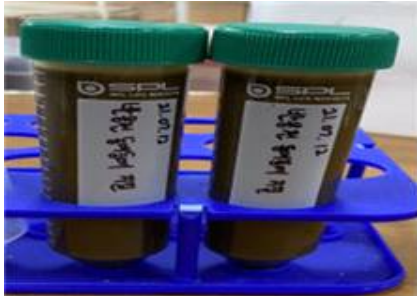
- 동애등에 지질에서 함유된 Triglyceride를 수열 분해하여 Fatty acid로 전환되는지 확인

(나) 실험 조건




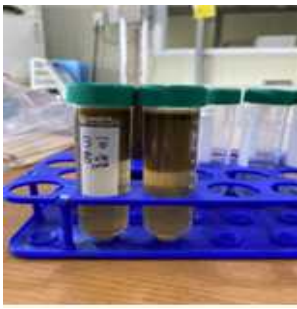


- 비율: 물 5g, 지질 1g, 황산 0.05g    - 반응 온도: 100℃
- 반응 시간: 7시간, 24시간, 31시간    - 회전 속도: 100rpm
- 증류된 수분은 다시 원물에 넣어 줌

(다) 실험 과정

- 준비 과정

 <p>3종류 물질을 혼합물 (물 400g, 지질 80g, 황산 4g을 준비)</p>	 <p>반응 전 동애등에 지질 사진</p>
<p>3종류 물질이 484g으로 100℃에서 7시간 후 100ml 채취, 24시간 후 100ml 채취, 31시간 후 100ml 채취하여 최종 남은 양은 184ml이다.</p>	

- 실험 과정

번호	내용	조건		
		100℃에서 7시간	100℃에서 24시간	100℃에서 31시간
1	반응시간 완료 후 1차 샘플 100ml 채취			
2	1차 sample 1일 정제 후 사진			

(라) 실험 결과

반응 전 지질과 반응된 3가지 샘플을 한국석유관리원에서 전산가를 확인하였고 확인 결과 전산가 측정값이 너무 낮아 전환되지 않음을 확인하였다. 그리고 실험 과정 중 증발한 수분은 바로바로 혼합물과 혼합되어야 하나 구조적으로 어려운 부분을 보완하여 다시 실험 준비를 하였다.

(2) 2차 실험

1차 실험 결과 전산가 측정값이 낮아서 다시 한번 수열분해를 진행하기로 하였다. 반응물인 수분이 증발하지 않도록 보완하였고 물의 비율을 더 늘려 물 5g, 지질 1g, 황산 0.05g에서 물 10g, 지질 1g, 황산 0.05g의 비율로 혼합하였다. 회전 속도는 그대로 100rpm에 반응 시간은 110℃에서 20시간만 가열하여 실험을 진행하였다.

(가) 실험 목적

- 첫 번째 진행했던 동태등에 지질 수열분해에서 전산가 측정값이 너무 낮게 나와서 한번 더 진행

(나) 실험 조건

- 혼합비율: 물 10g, 지질 1g, 황산 0.05g의 50배로 실험(물 500g, 지질 50g, 황산 2.5g)
- 반응 온도: 100℃      - 반응 시간: 20시간
- 회전 속도: 100rpm    - 증발한 수분은 다시 원물에 혼합

(다) 실험 과정

		
<p>1) 물 500g, 지질 50g, 황산 2.5g 3가지 물질을 혼합</p>	<p>2) 지질 수열분해에서 증발되는 수분이 순환되는 과정</p>	<p>3) 110°C, 100rpm으로 실험 시작</p>
		
<p>4) 수분이 증발하고 다시 응집되어 모인 후 원물로 들어가는지 확인</p>	<p>5) 20시간 가열 후 샘플 채취</p>	

(라) 실험 결과

채취한 샘플을 한국석유관리원에 보내 전산가를 확인하였고 전산가 측정값이 낮게 나와 다른 방법을 모색하였다. 수열 반응은 반응 온도, 반응 시간, 촉매량에 따라 전환 반응 수율이 크게 달라지므로 반응 인자를 변화시켜 실험하였다.

나) 동태등에 지질 수열분해 조건 잡기

앞선 실험을 거쳐 수열분해를 시도하였지만, 전산가 값이 낮게 나와 반응 온도를 450°C까지 높일 수 있게 반응기(DMSD-635, MISUNG S&I)를 설계 및 제작하였다.

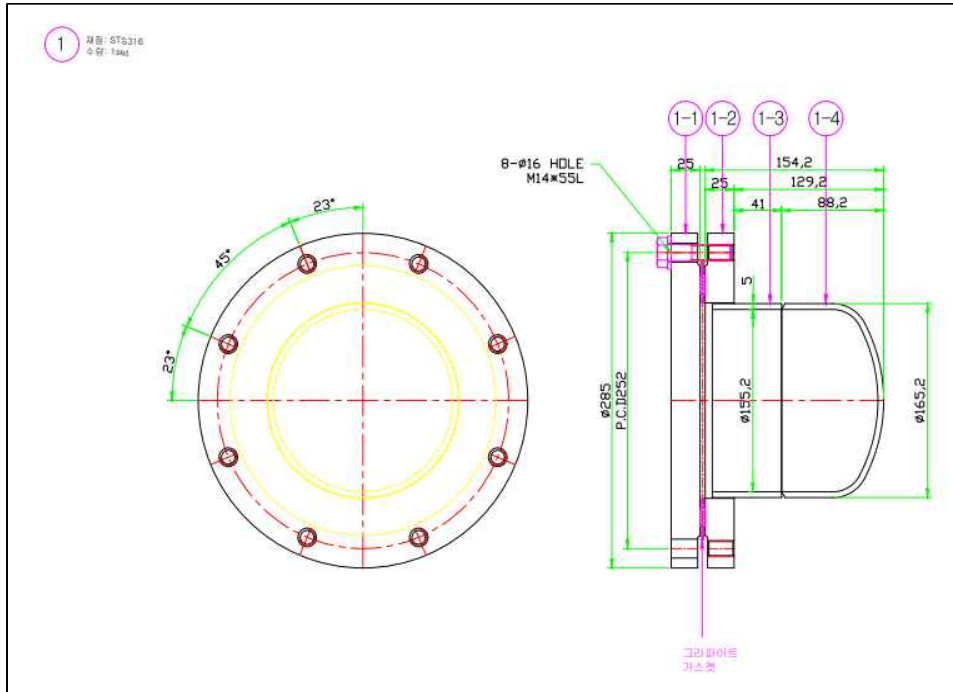
수열 반응기의 열 전달이 잘 될 수 있도록 고온과 고압에 사용 가능한 압력용기(2L)를 주문 제작 하였다.

- 디지털 히팅 교반 맨틀

- Heating Element Temperature: Up to 450°C Max.
- Stirring Speed: 150~1500rpm      • Capacity: 2000ml
- Watts: 500      • Dimensions: 248 \* 332 \* 214mm
- Power Supply: 220V or 110V 50/60Hz

- 압력용기: 재질(STS316)

- 도면



수열분해 조건 중 온도 조건을 잡기 위한 1차 실험 진행 후 결정된 온도 조건을 토대로 대량 생산을 위한 혼합 비율 조건을 잡는 2차 실험을 진행하였다.

**1차 실험**에서 혼합 비율 물 10g, 지질 1g, 황산 0.05g으로 150rpm으로 교반하면서 100℃, 130℃, 160℃에서 각각 20시간씩 반응을 하였다.

**2차 실험**에서 혼합 비율을 물 7g, 지질 1g, 황산 0.05g / 물 7g, 지질 1g, 황산 0.15g으로 200rpm으로 교반하면서 160℃에서 20시간 반응을 하였다.

(1) 1차 실험

(가) 실험 목적




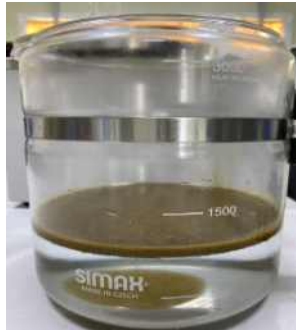
- 동해등에 지질 수열분해 온도 조건 파악하기 위함이다.

(나) 실험 조건

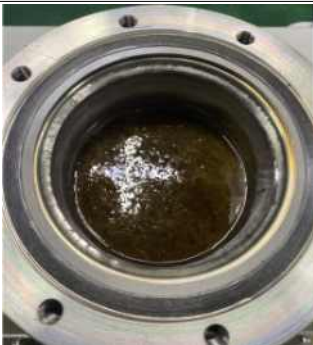








- 비율: 물 10g, 지질 1g, 황산 0.05g
- 반응 온도 및 시간: 100℃, 130℃, 160℃ 각각 20시간
- 회전 속도: 150rpm
- 수분이 증발하지 않도록 밀폐 압력 용기 사용


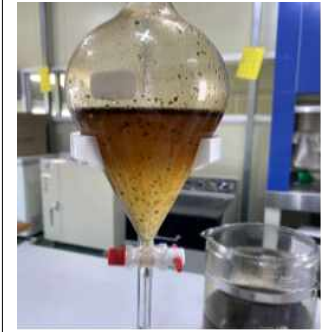


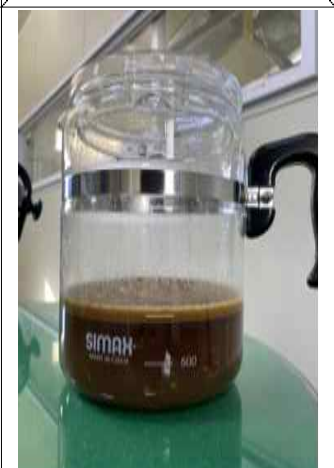
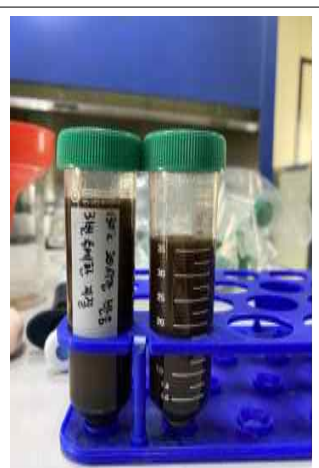
(다) 실험 과정

- 준비 과정

			
물 1000g 준비	지질 100g 준비	황산 5g 준비	3가지 물질을 혼합
3종류 물질을 혼합하여 100℃, 130℃, 160℃에서 각각 20시간 동안 가열 준비			

- 실험 진행

번호	내용	조건		
		100℃에서 20시간	130℃에서 20시간	160℃에서 20시간
1	혼합된 물질을 압력용기에 담음			
2	온도가 도달 후 20시간 가열			
3	투명한 병에 담아서 정제			

4	분별 깔대기를 이용해서 지방산 분리	X		
5	분리된 지방산을 분별깔대기를 통해 뜨거운 물로 3번 수세			
6	수세가 끝난 지방산을 전산가 측정을 위해 한국석유 관리원에 보냄			

(라) 실험 결과

100℃에서 20시간	130℃에서 20시간	160℃에서 20시간
지질층 분리 후 전산가 측정 결과 8 정도로 너무 낮아서 다른 조건으로 진행하기로 하였다.	전산가 측정 결과 53 정도로 100℃에 가열한 것보다는 높게 나왔으나 더 높게 나와야해서 온도를 더 높여서 진행하기로 하였다.	전산가 측정 결과 197 정도로 원래 Lauric Acid 전산가가 200정도 이므로 거의 근사치 값이 나와 수열 분해를 통해 Triglyceride가 Fatty acid로 전환된 것을 확인할 수 있었다.

(2) 2차 실험

(가) 실험 목적



- 1차 실험에서 정해진 온도 조건(160°C에서 20시간)을 토대로 대량 생산을 위한 혼합 비율 결정하기 위함이다.

(나) 실험 조건





- 비율: 물 7g, 지질 1g, 황산 0.05g / 물 7g, 지질 1g, 황산 0.15g
- 반응 온도 및 시간: 160°C 20시간
- 회전 속도: 200rpm
- 수분이 증발하지 않도록 밀폐 압력 용기 사용

(다) 실험 과정

- 준비 과정

1차 실험	2차실험
	
혼합량 1,610g(물 1,400g, 지질 200g, 황산 10g)	혼합량 1,610g(물 1,400g, 지질 200g, 황산 30g)

- 실험 진행

번호	내용	조건	
		첫 번째 조건 비율: 물 7g: 지질 1g: 황산 0.05g	두 번째 조건 비율: 물 7g: 지질 1g: 황산 0.15g
1	혼합된 물질을 압력용기에 담음		
2	온도가 도달 후 20시간 가열		



3	투명한 병에 담아서 정제		
4	분별 깔대기를 이용해서 지방산 분리		
5	분리된 지방산을 분별 깔대기를 통해 뜨거운 물로 3번 수세		
6	전산가 측정을 위해 한국석유관리원에 보냄		

(라) 실험 결과

- 첫 번째 조건: 한국석유관리원에서 전산가를 측정한 결과 전산가 값이 183 mgKOH/g으로 나왔다.
- 두 번째 조건: 한국석유관리원에서 전산가를 측정한 결과 전산가 값이 198 mgKOH/g으로 나왔다.
- 첫 번째, 두 번째 조건 결과 촉매(황산) 양 비율(0.05g, 0.15g)로 인한 전산값의 차이는 미비하다는 것을 알 수 있었다.  
따라서 혼합 비율 물 7g, 지질 1g, 황산 0.1g, 반응 온도 160℃, 반응 시간 20시간으로 결정되었다.

다) 동애등에 지질 수열분해

앞선 실험을 통해 얻어낸 혼합 비율(물 7g/지질 1g/황산 0.1g)에 따라 160°C의 온도에서 20시간 반응을 하였다. 그 후 정체를 시켜 분별 깔때기를 이용하여 지방산만 모았다. 모은 지방산은 뜨거운 물로 3번 수세 후 모아서 감압 증류 할 준비를 하였다.

(1) 실험 목적

- 동애등에 지질을 수열 분해하여 지방산으로 전환하기 위함

(2) 실험 조건

- 비율: 물 7g, 지질 1g, 황산 0.1g
- 반응 온도: 160°C
- 반응 시간: 20시간
- 회전 속도: 200rpm

(3) 실험 과정

- 실험 준비
- 혼합(물: 1400g, 지질: 200g, 황산: 20g)

- 실험 진행

번호	내용	사진
1	혼합된 물질을 압력용기에 담은 후 160°C에서 20시간 가열	
2	가열이 끝난 후 정체시킨 다음 분별 깔때기를 이용해서 지방산 분리	
3	분리된 지방산을 뜨거운 물로 3번 수세 후 모아서 보관	

(4) 실험 결과

- 여러번의 수열분해를 통하여 총 4,724ml의 지방산을 얻을 수 있었다.

### 3) 물리적 방법을 이용한 추출 개발

가) 동애등에 지질에서 Lauric Acid 분리

곤충 지질에 함유되어 있는 Lauric acid를 분리하기 위해 동애등에를 면역 유도하여 마이크로 웨이브로 건조 후 지질을 착유하였다. 착유된 동애등에 지질은 진공 농축기(Eva-05)를 이용해 감압 증류를 진행하여 카본 12개인 Lauric acid를 분리하는 실험을 하였다. 동애등에 지질 500g을 사용하였고 150rpm으로 교반을 계속하면서 반응 온도는 100℃에서부터 200℃까지 10℃ 간격으로 온도를 상승시키면서 분리 실험을 진행하였다.

#### (1) 실험 목적

동애등에 지질에 함유된 Lauric Acid 분리하기 위함

#### (2) 실험 조건 및 재료

- 동애등에 지질 500g
- 진공 회전 농축기(Eva-05)
  - 회전 속도: 150RPM
  - Ecaporatinf Flask: 1L
  - Cooling Surface: 1,600cm<sup>2</sup>
  - Heating Bathe Capacity & Temp: 2.5 lit Oil bath, Up to 200℃

#### (3) 실험 과정

동애등에를 건조후 착유하여 지질을 모음	온도를 상승시키면서 증류변화 과정을 실험
-----------------------	------------------------

- ① 동애등에를 면역 유도 후 건조 착유하여 지질을 모음
- ② 동애등에 지질 500g을 플라스크에 담고 100℃ 이르기까지 가열 후 30분 걸림
- ③ 온도 차이를 10℃ 간격으로 20분 동안 유지하며 11개 온도조건에서 증류 과정을 실험 (100℃, 110℃, 120℃, 130℃, 140℃, 150℃, 160℃, 170℃, 180℃, 190℃, 200℃)
- ④ 10℃ 상승하는데 걸리는 가열 시간은 20분이 소요됨

#### (4) 실험 결과

- 200℃까지 온도를 올려 반응을 보았지만 증류되는 것이 없어 실험 종료 하였고 Lauric Acid를 분리할 수 있는 다른 방법을 모색하였다.
- 시장에서 판매되는 진공 농축기(Eva-05) 상승온도 200℃까지로 한정되어 있었다.
- Heating Bath Capacity & Temp: 2.5 lit Oil bath, Up to 200℃

#### 나) 지방산 성분 모사 실험

지방산 성분 모사 실험을 통해 감압 증류로 분리가 가능한지 확인하기 위해 실험을 준비하였다. 곤충 지질에 들어있는 지방산 4종류에 대해 C<sub>12</sub> 지방산 160g, C<sub>14</sub> 지방산 40g, C<sub>16</sub> 지방산 160g, C<sub>18</sub> 지방산 160g을 혼합하였고 회전 속도는 150rpm으로 계속 교반 해주면서 100℃부터 200℃까지 15분 가열 후 5℃씩 상승하여 분리가 되는지 지켜보았다.

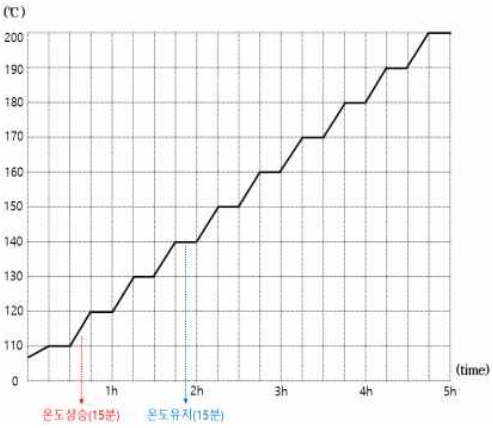


#### (1) 실험 목적

- 지방산 성분 모사 실험을 통해 증류로 분리가 가능한지 확인

#### (2) 실험 조건

- 비율: C<sub>12</sub> 지방산 20g, C<sub>14</sub> 지방산 5g, C<sub>16</sub> 지방산 20g, C<sub>18</sub> 지방산 20g
- 반응 온도: 100℃ ~ 200℃ (15분 간격으로 10℃ 상승)
- 반응 시간: 약 5시간(온도당 15분씩)
- 회전 속도: 150rpm

#### (3) 실험 과정

 <p>온도상승(15분)   온도유지(15분)</p>		
<p>C<sub>12</sub> 160g, C<sub>14</sub> 40g, C<sub>16</sub> 160g, C<sub>18</sub> 60g을 혼합 후 100℃에서 15분간 증류 시작</p>	<p>200℃에서도 증류되지 않아 실험 종료</p>	
<ol style="list-style-type: none"><li>① 동애등에 지질에 포함된 지방산 4종류(C<sub>12</sub>, C<sub>14</sub>, C<sub>16</sub>, C<sub>18</sub>) 구매 및 혼합</li><li>② 혼합된 4가지 지방산을 플라스크에 담고 100℃ 이르기까지 가열 후 30분 걸림</li><li>③ 온도 차이를 10℃ 간격으로 15분 동안 유지하며 11개 온도조건에서 분류과정을 실험 (100℃, 110℃, 120℃, 130℃, 140℃, 150℃, 160℃, 170℃, 180℃, 190℃, 200℃)</li><li>④ 15℃ 상승하는데 걸리는 가열 시간은 15분이 소요됨</li></ol>		

(4) 실험 결과

200℃까지 온도를 상승시키면서 실험을 했지만 증류가 되지 않아 실험을 종료하였다. 그 후 혼합된 지방산을 한국석유관리원에서 분석한 결과 255℃, 20mmHg에서 처음 증류가 시작되었던 것 알 수 있었다. 따라서 지방산은 증류로 분리가 가능하다는 것을 확인하였다.

다) 감압증류를 통한 Lauric Acid 분리 조건 잡기

수열분해를 통해 전환된 Fatty acid에서 C<sub>12</sub> 지방산인 Lauric acid를 증류를 통해 분리하기 위해서는 많은 양의 Fatty acid가 필요하기 때문에 수열분해로 1L 정도의 Fatty acid를 모은 뒤 500ml 씩 증류 분리를 진행하였다.

Fatty acid에는 Lauric acid가 약 20~25% 정도 포함되어 있어 가장 먼저 증발하기 때문에 500ml에서 25%만 증류를 시키기 위해 온도를 서서히 올려가면서 지켜 보았다. 수열 반응 후에 뜨거운 물로 수세하기 때문에 소량의 물이 남아 있을 수 있고 200rpm에 교반을 하면서 100℃에서 먼저 물을 증발시킨 뒤 150℃부터 5분 가열 후 5℃씩 온도를 올리면서 감압 증류를 진행하였다.

또한 히팅맨틀에서 발행하는 열전달이 잘 될 수 있도록 둥근 플라스크 주변에 Sea Sand (20~30mesh, 대정화금)를 넣어 줌으로써 열 손실을 막을 수 있었다.

온도를 상승하는 과정에 주위 낮은 온도로 인하여 증류가 되지 않고 증류된 지질이 굳는 문제가 발생하여 증류 부분 용기에 단열제를 적용하여 증류 시 지질이 굳는 문제를 해결할 수 있었다.

(1) 실험 목적


- Fatty acid를 감압 증류하여 Lauric Acid만 분리.

(2) 실험 조건

- 반응 온도: 150℃, 5분 가열 후 5℃ 상승
- 반응 시간: 지질에서 25%만 증류되어 분리될 때까지
- 회전 속도: 200rpm

(3) 실험 과정

번호	내용	조건(실험 진행 순서에 맞게 배치)		
1	Fatty acid에 함유된 수분을 100℃에서 먼저 날린 후 150℃부터 5분 온도 유지 및 5분 상승			

2	240~265℃ 5분 온도 유지 및 5분 상승			
3	플라스크 용 기를 단열재 로 감싸고 200℃부터 5 분 온도 유지 및 5분 상승	 <p data-bbox="485 801 1418 887">열이 식지 않게 단열재로 감싸서 온도를 조금씩 올리다가 237℃에서 증류되기 시작하여 249℃까지 125ml 증류량을 얻을 수 있었음</p>		
4	고부가 지방 산 추출			
감압 증류된 고부가 지방산 확보				

(4) 실험 결과

- 수열분해를 통해 얻은 지방산을 감압 증류를 통해 Fatty acid로 전환된 지질에서 25% 정도 분리하는데 성공하여 C<sub>12</sub> 지방산(Lauric Acid)와 C<sub>13</sub> 이상 지방산을 얻을 수 있게 되었다.
- 약 240℃ ~ 250℃에서 증류가 잘 된다는 점을 알 수 있었고, 증류 칼럼에 온도가 잘 떨어져서 증류가 원활하지 않아 단열재를 사용해 온도를 유지 시켜줘야 한다는 사실을 알게 되었다.

라) 감압증류를 통한 Lauric Acid 분리

수열분해를 통해 얻은 약 4,724ml의 지방산을 이용하여 감압증류를 진행하였다. 20L짜리 둥근 플라스크에 지방산을 담고 200RPM에 교반을 하면서 100℃에서 남은 수분을 제거 후 앞선 실험의 조건을 통해 200℃ 부터 천천히 온도를 올리면서 25% 정도 증류를 하였다.






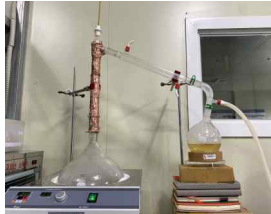

(1) 실험 목적

- 지방산을 감압 증류 하여 C<sub>12</sub> 지방산과 C<sub>13</sub> 이상의 지방산으로 분리하기 위함

(2) 실험 조건

- 반응 온도: 200°C ~ 245°C
- 반응 시간: C<sub>12</sub> 이하 지방산이 25% 증류되어 분리될 때까지
- 회전 속도: 200rpm

(3) 실험 과정

번호	내용	사진	
1	Fatty Acid 4,724ml를 대량 감압 증류를 위해 구매한 20L 둥근 플라스크(올포랩 구매)에 담음		
2	대량 감압 증류를 위해 구매한 20L 디지털 히팅교반맨틀(미성S&I 구매)에 감압 증류 준비 후 100°C에서 수분 제거		
3	200°C부터 천천히 온도를 올리면서 증발시키다가 245°C에서 25%가 증류되어 실험 종료		
4	C <sub>12</sub> 지방산 약 1,192.5ml C <sub>13</sub> 이상 지방산 약 3,420ml 얻음		

(4) 실험 결과



- 감압 증류를 통해서 C<sub>12</sub> 지방산 약 1,192.5ml, C<sub>13</sub> 이상 지방산 약 3,420ml를 얻을 수 있게 되었다.

## 나. 고효율 지질로부터 추출된 고부가 지방산 협동 기관 공급

협동 기관인 세종대에는 수열분해와 감압 증류를 통해 얻은 'C<sub>12</sub> 지방산'을 공급하여 미백 및 주름 개선 기능성 검정을 할 수 있도록 공급하였다.

또한 'C<sub>12</sub> 지방산'을 항비만제로 연구를 수행하기 위해 동국대학교로 각각 공급하였다.

'C<sub>13</sub> 이상 지방산'은 바이오디젤로 전환하는 연구를 수행하기 위해 '동애등에 곤충 지질'과 Fatty acid로 전환된 지질, 'C<sub>12</sub> 지방산(Lauric Acid)' 총 4가지를 한국석유관리원에 공급하였다.

	
<p>'Fatty acid로 전환된 지질 20ml', 'C<sub>12</sub> 지방산(Lauric Acid) 20ml', '동애등에 곤충 지질 원액 20ml'</p>	<p>'C<sub>13</sub> 이상 지방산 3,420ml'</p>
<p>한국석유관리원 공급</p>	

## 다. 경제성 분석 및 산업화, 현장적용


### 1) 경제성 분석

#### 가) 시장 현황

번호	상품	상호/상품명	가격	사이트 주소
1		힐리오 라우릭애씨드	1kg 8,500원	<a href="https://smartstore.naver.com/healio/products/6348157633">https://smartstore.naver.com/healio/products/6348157633</a>
2		코리아씨밀락 라우릴산	5kg 30,000원 1kg 6,500원 500g 4,000원 250g 2,500원 100g 2,000원	<a href="https://smartstore.naver.com/koreasimilac/search?q=%EB%9D%BC%EC%9A%B0%EB%A6%B4%EC%82%B0">https://smartstore.naver.com/koreasimilac/search?q=%EB%9D%BC%EC%9A%B0%EB%A6%B4%EC%82%B0</a>



3	 <p>KLK OLEO <b>LAURIC ACID</b> 라우릭산 25kg Bag</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>-Surfactant</li> <li>-Soap</li> <li>-Pesticide</li> <li>-Ester</li> <li>-Fatty alcohol</li> <li>-ETC</li> </ul> <p><b>PALMERA</b></p>	PMC KOREA 라우릭산	25kg 125,000원	<a href="https://smartstore.naver.com/pmckorea/products/5227817109">https://smartstore.naver.com/pmckorea/products/5227817109</a>
4	<p><b>라우린산</b> <b>(Lauric Acid)</b></p>	CURIOSO 라우린산	1kg 27,000원 500g 14,000원 100g 3,300원 50g 2,000원 10g 1,400원	<a href="https://smartstore.naver.com/curioso/products/5075585202">https://smartstore.naver.com/curioso/products/5075585202</a>
5		더위치 라우릭산	1kg 34,000원 500g 18,000원 50g 2,600원	<a href="https://smartstore.naver.com/thewitch/search?q=%EB%9D%BC%EC%9A%B0%EB%A6%AD%EC%82%B0">https://smartstore.naver.com/thewitch/search?q=%EB%9D%BC%EC%9A%B0%EB%A6%AD%EC%82%B0</a>
6		데이데이테라피 라우릭애씨드	1kg 9,800원 500g 5,800원	<a href="https://smartstore.naver.com/daydaytherapy/products/2900518825">https://smartstore.naver.com/daydaytherapy/products/2900518825</a>
7		월터엔터프라이즈 라우릴산	5kg 30,000원 1kg 6,500원 500g 4,000원 250g 2,500원 100g 2,000원	<a href="https://www.coupang.com/vp/products/204260809?itemId=600466108&amp;vendorItemId=4572670529&amp;src=1032001&amp;spec=10305201&amp;addtag=400&amp;ctag=204260809&amp;lp-tag=P204260809&amp;itime=20230222091227&amp;pageType=PRODUCT&amp;pageValue=204260809&amp;wPcid=16665771117412427894902&amp;wRef=cr.shopping.naver.com&amp;wTime=20230222091227&amp;redirect=landing&amp;isAddedCart=">https://www.coupang.com/vp/products/204260809?itemId=600466108&amp;vendorItemId=4572670529&amp;src=1032001&amp;spec=10305201&amp;addtag=400&amp;ctag=204260809&amp;lp-tag=P204260809&amp;itime=20230222091227&amp;pageType=PRODUCT&amp;pageValue=204260809&amp;wPcid=16665771117412427894902&amp;wRef=cr.shopping.naver.com&amp;wTime=20230222091227&amp;redirect=landing&amp;isAddedCart=</a>
8		코리아씨밀락 라우릴산	5kg 30,000원 1kg 6,500원 500g 4,000원 250g 2,500원 100g 2,000원	<a href="https://smartstore.naver.com/koreasimilac/search?q=%EB%9D%BC%EC%9A%B0%EB%A6%B4%EC%82%B0">https://smartstore.naver.com/koreasimilac/search?q=%EB%9D%BC%EC%9A%B0%EB%A6%B4%EC%82%B0</a>

9		<p>과학사랑 라우릴산</p>	<p>500g 16,500원</p>	<p><a href="http://www.sciencelove.co.kr/index.html?branduid=408838&amp;ref=naver_open&amp;NaPm=ct%3Dleexnfqo%7Cci%3D2cb963a0414731aa3522b6b60b96d5453ef14b7e%7Ctr%3Dslsl%7Csn%3D155665%7Chk%3Dda7952a619f91017e9d2a84328a3c68e44af9b61">http://www.sciencelove.co.kr/index.html?branduid=408838&amp;ref=naver_open&amp;NaPm=ct%3Dleexnfqo%7Cci%3D2cb963a0414731aa3522b6b60b96d5453ef14b7e%7Ctr%3Dslsl%7Csn%3D155665%7Chk%3Dda7952a619f91017e9d2a84328a3c68e44af9b61</a></p>
10		<p>퍼스트 과학 라우릴산</p>	<p>500g 20,000원</p>	<p><a href="https://firstsci.co.kr/product/detail.html?product_no=20881&amp;cate_no=48&amp;display_group=1&amp;cafe_mkt=naver_ks&amp;mkt_in=Y&amp;ghost_mall_id=naver&amp;ref=naver_open&amp;NaPm=ct%3Dleexp7s8%7Cci%3D4e6812592f475dd6af00b0c31da1c32ece027e5%7Ctr%3Dslsl%7Csn%3D476632%7Chk%3Da957c953b9b251d657c894a91bc8537eb53b6c47">https://firstsci.co.kr/product/detail.html?product_no=20881&amp;cate_no=48&amp;display_group=1&amp;cafe_mkt=naver_ks&amp;mkt_in=Y&amp;ghost_mall_id=naver&amp;ref=naver_open&amp;NaPm=ct%3Dleexp7s8%7Cci%3D4e6812592f475dd6af00b0c31da1c32ece027e5%7Ctr%3Dslsl%7Csn%3D476632%7Chk%3Da957c953b9b251d657c894a91bc8537eb53b6c47</a></p>
11		<p>한샘과학 라우릴산</p>	<p>500g 20,000원</p>	<p><a href="https://hssci.co.kr/product/detail.html?product_no=16002&amp;cate_no=48&amp;display_group=1&amp;cafe_mkt=naver_ks&amp;mkt_in=Y&amp;ghost_mall_id=naver&amp;ref=naver_open&amp;NaPm=ct%3Dleexqtnk%7Cci%3D6e8a7f54110bba9bdee50516a6da1ded3b04e874%7Ctr%3Dslsl%7Csn%3D408115%7Chk%3Da9c7fc16f9af5dcae0887b6ea9c92d358dfab67c">https://hssci.co.kr/product/detail.html?product_no=16002&amp;cate_no=48&amp;display_group=1&amp;cafe_mkt=naver_ks&amp;mkt_in=Y&amp;ghost_mall_id=naver&amp;ref=naver_open&amp;NaPm=ct%3Dleexqtnk%7Cci%3D6e8a7f54110bba9bdee50516a6da1ded3b04e874%7Ctr%3Dslsl%7Csn%3D408115%7Chk%3Da9c7fc16f9af5dcae0887b6ea9c92d358dfab67c</a></p>
12		<p>이안과학 라우릴산</p>	<p>500g 20,000원</p>	<p><a href="https://iaansci.co.kr/product/detail.html?product_no=8327&amp;cate_no=48&amp;display_group=1&amp;cafe_mkt=naver_ks&amp;mkt_in=Y&amp;ghost_mall_id=naver&amp;ref=naver_open&amp;NaPm=ct%3Dleexrkns%7Cci%3Da369255572aef4fc4a695cc6c283687142b40bf4%7Ctr%3Dslsl%7Csn%3D1209797%7Chk%3Dc5aab70f654da69d2e5da77d6a2608a5751559a1">https://iaansci.co.kr/product/detail.html?product_no=8327&amp;cate_no=48&amp;display_group=1&amp;cafe_mkt=naver_ks&amp;mkt_in=Y&amp;ghost_mall_id=naver&amp;ref=naver_open&amp;NaPm=ct%3Dleexrkns%7Cci%3Da369255572aef4fc4a695cc6c283687142b40bf4%7Ctr%3Dslsl%7Csn%3D1209797%7Chk%3Dc5aab70f654da69d2e5da77d6a2608a5751559a1</a></p>
13		<p>사이언스스타 라우릴산</p>	<p>500g 14,800원</p>	<p><a href="https://smartstore.naver.com/sciencestart/products/5018301937">https://smartstore.naver.com/sciencestart/products/5018301937</a></p>
14		<p>문성과학 라우릴산</p>	<p>500g 19,800원</p>	<p><a href="https://www.moonsung.kr/shop/goods/goods_view.php?goodsno=4635&amp;inflow=naver&amp;NaPm=ct%3Dleextpc%7Cci%3D930d7511e10e1e56704947e81ed578f6f6e23481%7Ctr%3Dslsl%7Csn%3D208185%7Chk%3D3389be5a7bcd2c2eff664e829fa834d7f9096b">https://www.moonsung.kr/shop/goods/goods_view.php?goodsno=4635&amp;inflow=naver&amp;NaPm=ct%3Dleextpc%7Cci%3D930d7511e10e1e56704947e81ed578f6f6e23481%7Ctr%3Dslsl%7Csn%3D208185%7Chk%3D3389be5a7bcd2c2eff664e829fa834d7f9096b</a></p>

15		21세기과학사 라우릴산	500g 17,600원	<a href="http://science21.kr/shop/goods/goods_view.php?goodsno=7848&amp;inflow=naver&amp;NaPm=ct%3Dleexvax4%7Cci%3Dc4a3aba6e4df08031be45e00da96a3da92ed445b%7Ctr%3Dslsl%7Csn%3D202482%7Chk%3Defa31651e42b52ecea5a893ead0780e072b8b519">http://science21.kr/shop/goods/goods_view.php?goodsno=7848&amp;inflow=naver&amp;NaPm=ct%3Dleexvax4%7Cci%3Dc4a3aba6e4df08031be45e00da96a3da92ed445b%7Ctr%3Dslsl%7Csn%3D202482%7Chk%3Defa31651e42b52ecea5a893ead0780e072b8b519</a>
16		오피스안 라우린산	500g 20,680원	<a href="http://www.officeahn.co.kr/shop/shopdetail.html?branduid=111326&amp;ref=naver_open&amp;NaPm=ct%3Dleexw5s8%7Cci%3D4d098c723aa30185045e2277619757641d9a8a4%7Ctr%3Dslsl%7Csn%3D72697%7Chk%3D26c24d5b9b361c29cbe1aea79cfde9463459a0b8">http://www.officeahn.co.kr/shop/shopdetail.html?branduid=111326&amp;ref=naver_open&amp;NaPm=ct%3Dleexw5s8%7Cci%3D4d098c723aa30185045e2277619757641d9a8a4%7Ctr%3Dslsl%7Csn%3D72697%7Chk%3D26c24d5b9b361c29cbe1aea79cfde9463459a0b8</a>
17		대영이화학 Lauric Acid	500g 14,000원	<a href="http://deayounglab.com/shop/item.php?it_id=1611794153&amp;NaPm=ct%3Dleexywj%7Cci%3Dc479f7b3fc0cc7d00ff9805da6b998c4584a46ae%7Ctr%3Dslsl%7Csn%3D1181669%7Chk%3Dcf031b1e13140fb1c3a9c44f8b7b195b69fee227">http://deayounglab.com/shop/item.php?it_id=1611794153&amp;NaPm=ct%3Dleexywj%7Cci%3Dc479f7b3fc0cc7d00ff9805da6b998c4584a46ae%7Ctr%3Dslsl%7Csn%3D1181669%7Chk%3Dcf031b1e13140fb1c3a9c44f8b7b195b69fee227</a>
18		마리노엘 라우르산	500g 4,300원	<a href="https://www.coupang.com/vp/products/6359844237?itemId=13421711177&amp;vendorItemId=80676345433&amp;src=1032001&amp;spec=10305201&amp;addtag=400&amp;ctag=6359844237&amp;lptag=P6359844237&amp;itime=20230222102548&amp;pageType=PRODUCT&amp;pageValue=6359844237&amp;wPcid=16665771117412427894902&amp;wRef=cr.shopping.naver.com&amp;wTime=20230222102548&amp;redirect=landing&amp;isAddedCart=">https://www.coupang.com/vp/products/6359844237?itemId=13421711177&amp;vendorItemId=80676345433&amp;src=1032001&amp;spec=10305201&amp;addtag=400&amp;ctag=6359844237&amp;lptag=P6359844237&amp;itime=20230222102548&amp;pageType=PRODUCT&amp;pageValue=6359844237&amp;wPcid=16665771117412427894902&amp;wRef=cr.shopping.naver.com&amp;wTime=20230222102548&amp;redirect=landing&amp;isAddedCart=</a>
19		버블뱅크 라우릭산	50g 3,000원	<a href="http://www.bubblebank.net/shop/shopdetail.html?branduid=447885&amp;search=%25B6%25F3%25BF%25EC%25B8%25AF%25BB%25EA&amp;sort=order&amp;xcode=012&amp;mcode=000&amp;scode=&amp;GfDT=aWt3UQ%3D%3D">http://www.bubblebank.net/shop/shopdetail.html?branduid=447885&amp;search=%25B6%25F3%25BF%25EC%25B8%25AF%25BB%25EA&amp;sort=order&amp;xcode=012&amp;mcode=000&amp;scode=&amp;GfDT=aWt3UQ%3D%3D</a>
20		GO5109 라우르산	5kg 33,400원 1kg 7,100원 500g 4,300원	<a href="http://go5109.com/shop/shopdetail.html?branduid=3501467">http://go5109.com/shop/shopdetail.html?branduid=3501467</a>
21		코스넷 Lauric Acid	25kg 90,750원	<a href="http://www.diyco.co.kr/goods_detail.php?goodsldx=360">http://www.diyco.co.kr/goods_detail.php?goodsldx=360</a>

22		JOONAE 라우릭산	1kg 9,000원	<a href="https://joonae.com/product/%EB%9D%BC%EC%9A%B0%EB%A6%AD%EC%82%B0-lauric-acid-98/5340/">https://joonae.com/product/%EB%9D%BC%EC%9A%B0%EB%A6%AD%EC%82%B0-lauric-acid-98/5340/</a>
23		덕산과학 Lauric Acid	500g 19,800원	<a href="http://www.duksan2.co.kr/shop/goods/goods_view.php?&amp;goodsno=7251">http://www.duksan2.co.kr/shop/goods/goods_view.php?&amp;goodsno=7251</a>
24		덕산종합과학 Lauric Acid	500g 11,660원	<a href="https://www.dslab.co.kr/?act=shop.goods_view&amp;GS=3011&amp;GC=GD0L010A">https://www.dslab.co.kr/?act=shop.goods_view&amp;GS=3011&amp;GC=GD0L010A</a>

## 2) 경제성분석 및 산업화

가) 지질 경제성: 건조된 유층 1kg, 1,000kg

번호	내용	유층 분말 생산량(kg) 조건		기 타
		1	1,000	
1	분말로부터 지질생산량 (liter)	0.3	300	
	라우릭산생산량(liter) (지질의 25%)	0.075	75	
2	국내 품질에 적용하여 바이오디젤로 전환량(%r)	78 (0.176)	176	- 국내 품질에 적용하여 바이오디젤로 전환 수율 78 (%)임 (2.25*0.78=1.76L)
3	L당 바이오 전환 비용	512원	115,200	- L당 바이오 전환 비용: 512 원 ·153,200=225*512
4	라우릭산 전환비용	210원	15,750	- 곤충지질에서 c12 분리함
<ul style="list-style-type: none"> <li>- 2019년 폐식용유를 원료로 한 전체 바이오디젤의 국내 공급 단가는 약 850원/L</li> <li>- 재고를 활용할 경우 Liter당 338원의 경제적 효과를 얻을 수 있음</li> <li>- 라울릭산 판매시 Liter당 10,000원의 경제적 효과를 얻을 수 있음</li> </ul>				

**바이오디젤 판매수의 분석을 위한 도출 항목**

항목	1리터/일	10리터/일
곤충 지질	2.1리터/일	21톤/일
지질 추출 수율	80%	80%
지질 추출량	1.7리터/일	17리터/일
고부가 지방산 비율	25%	25%
부산물 지방산 비율	75%	75%
부산물 지방산량	1.28리터/일	12.8리터/일
바이오디젤 전환 수율	78%	78%
바이오디젤 생산량	1리터/일	10리터/일

**곤충 지질 가격**

곤충 지질 가격 : 2,000원/L

**지질 추출 단가**

지질 추출 단가 : 210원/L

촉매: 141원/L  
전기요금: 69원/L

**바이오디젤 생산 단가**

바이오디젤 생산 단가 : 512원/L

메탄올: 200원/L  
촉매: 141원/L  
전기요금: 50원/L  
정제비용: 121원/L

**바이오디젤 판매 단가**

바이오디젤 판매 단가 : 1,800원/L

**고부가 지방산 판매 단가**

고부가 판매 단가 : 7,000원/L

곤충지질 2.1리터/일 규모 지출 비용: 2,000원/L\*2.1 + 210원/L\*1.7 + 512원/L\*1.28 = 5,212.36원

판매 수익: 1,800원/L\*1 + 10,000원/L\*0.42 = 6,000원

**787.64원**

나) 사료 첨가제 경제성 및 현장 적용 사료

- 건조된 유층 1kg, 1,000kg

번호	내 용		유층 분말 생산량(kg) 조건		기 타
			1	1,000	
1	사료 첨가제	지질 추출후 분리 된 곤충 박	0.55	550	- 건조 유층 분말 1kg시 55% 회수 됨 - 현재 사료용 곤충 분말 가격 1kg: 3,500원
		현재 시중 가격기 준으로 판매시 (원)	1,925	1,925,000	
2	천연 방부제	지질 추출후 분리 된 천연방부제	0.15	150	- 건조 유층 분말 1kg시 15% 회수 됨 - 현재 국내 천연방부제 가격은 1g 에 20,000-300,000원)g - 현재 수입 천연방부제 가격은 1g 에 30,000-100,000원)g
		현재 시중 가격 기준으로 판매 시 (원)	300,000 (1g에 2,000원 판매시)	300,000,000 (1g에 2,000원 판매시)	
- 지질 추출 후 분리된 곤충 박 가격이 현재 1kg에 3,500원 전·후에서 거래되고 있지만, 개발된 사료첨가제 및 천연방부제를 적용 시 1kg 건조 분말에서 300,000원의 매출을 올릴 수 있음					

다) 산업화

제품명	제품사진	제품용도	제품출시일	해당 기술의 제품출시 기여율(%)
사료용 그린오		○ 혼합, 단미, 또는 첨가 사료 등	23.4.1.	70

제품명	제품사진	제품용도	제품출시일	해당 기술의 제품출시 기여율(%)
추출물 그린오		○ 화장품 원료, 항비만 소재, 천연방부제	23.4.1.	70

## <제1협동(세종대): 발효를 통한 바이오디젤 생산용 곤충 사료 및 지질 활용 기능성 화장품 소재 개발>

### 가. 바이오디젤 생산용 곤충의 생산 효율 향상을 위한 사료 발효 조건 확립

#### 1) 인공사료의 사료 효율을 증대시키기 위한 발효 균주 선정 및 분양: 6종

선행연구에서 개발된 갈색거저리 유충의 바이오디젤 생산용 곤충 사료인 밀기울(wheat bran, WB)과 음식물쓰레기(food waste, FW)를 1:1로 혼합한 사료(WBFW)의 사료효율을 증대시키기 위해 발효하기 위한 균주를 선정하였다. 기존에 이유자돈의 성장과 체내 면역 강화에 긍정적인 영향을 미친 밀기울 발효<sup>1)</sup>, 한우용 반추위 내 지방산함량 개선을 위한 밤 사료 발효<sup>2)</sup>, 돈육의 도체 및 육질 향상을 위한 음식물쓰레기 사료 발효<sup>3)</sup>, 곤충 사료 발효<sup>4)</sup>에 이용되는 *Lactiplantibacillus plantarum*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Lactobacillus acidophilus*, *Bacillus subtilis*, *Pediococcus acidilactici*, *Limosilactobacillus fermentum*, EM(effective microorganisms, *Lacticaseibacillus casei*, 에버미라클)의 다양한 효소 활성을 비교분석을 하였다.

이때 선정된 균주 중 EM을 제외한 6종 균주(*Saccharomyces cerevisiae*, *Lactobacillus acidophilus*, *Lactiplantibacillus plantarum*, *Limosilactobacillus fermentum*, *Pediococcus acidilactici*, *Bacillus subtilis*)는 국립농업과학원 미생물은행(Korean Agricultural Culture Collection, KACC)에서 분양받아 실험을 진행하였다.

#### 2) 인공사료의 사료 효율을 증대시키기 위한 발효균주의 발효능력 평가

상기 6종 균주의 발효능력을 평가하기 위해 고분자물질 분해효소 활성을 측정하였다. 효소 활성은 다당류 분해효소인 amylase(Amylase activity assay kit, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA), maltase(Maltase assay kit, MyBioSource, San Diego, CA, USA), sucrase(Enzy Chrom™ invertase assay Kit, BioAssay Systems, Hayward, CA, USA), chitinase(Chitinase assay kit, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA), 단백질 분해 효소인 protease(Protease activity assay kit, abcam, Cambridge, UK), 지질의 분해 효소인 lipase(Lipase activity assay kit, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)를 측정하였다. 효소 활성 측정결과(표 2-1), *L. fermentum*의 배양액에서는 amylase, maltase, cellulase의 효소 활성이 높았으며, *L. acidophilus*의 배양액에서는 chitinase, sucrase, protease 효소 활성이 비교적 높은 것으로 나타났다. 또한 *P. acidilactici*의 배양액에서는 chitinase, maltase, sucrase, protease 효소 활성이 비교적 높아 *L. fermentum*, *L. acidophilus*, *P. acidilactici*의 3종 균주를 사료 발효를 위한 균주로 선정하였다.

균주명 \ 분해효소	Amylase (U/ml)	Chitinase (U/ml)	Maltase (U/ml)	Sucrase (U/ml)	Cellulase (U/ml)	Protease (%)	Lipase (U/ml)
<i>L. plantarum</i>	3.47±0.24	0.038±0.03	35.28±3.84	44.09±3.35	7.95±0.28	107.70±3.59	0.008±0.001
<i>L. fermentum</i>	4.01±0.50	0.001±0.00	851.31±6.89	24.94±1.45	9.16±0.18	112.35±3.75	0.009±0.000
<i>L. acidophilus</i>	3.56±0.12	0.049±0.02	15.58±3.56	73.96±0.12	8.48±0.34	116.87±3.90	0.009±0.001
<i>P. acidilactici</i>	2.77±0.29	0.053±0.01	289.85±7.34	43.24±3.52	5.66±0.74	112.59±3.75	0.009±0.001
<i>B. subtilis</i>	3.11±0.09	0.047±0.01	55.27±1.02	46.31±0.24	6.79±0.01	100±0.00	0.009±0.001
<i>S. cerevisiae</i>	3.34±0.12	0.051±0.02	426.83±2.64	42.70±0.80	6.05±0.21	106.85±3.57	0.009±0.000

<표 2-1. 6종 균주의 고분자물질 분해효소 효소활성>

나. 바이오디젤 생산용 곤충의 생산 효율 향상을 위한 발효사료 개발: 2종(갈색거저리, 동애등에)

<바이오디젤 생산용 갈색거저리 유충 사료 개발>

1) 사료효율을 증대시키기 위한 발효 균주의 적정 혼합 비율 확립 및 발효기간 확립

가) 사료효율 증대를 위한 발효 균주의 적정 혼합 비율 확립: 고분자 물질 분해 효소 측정 발효능력 평가를 통해 발효능력이 우수한 것으로 나타난 3종 균주(*L. fermentum*, *L. acidophilus*, *P. acidilactici*)의 적정 혼합 비율을 확립하기 위해 각 비율별로 균주를 혼합하여 밤새 배양한 후 탄수화물 분해 효소인 amylase, maltase, sucrase, 단백질 분해 효소인 protease, 지질 분해 효소인 lipase 활성을 측정하였다. 각 균주를 1:1:1, 2:1:1, 1:2:1, 1:1:2(*L. fermentum*: *L. acidophilus*: *P. acidilactici*)로 각각 혼합한 후 고분자 물질 분해 효소 활성을 측정하였다. 이 때 각 비율별 총 세균수는 동일하게 설정하여 실험의 오차 발생을 방지하였다. 탄수화물 분해 효소인 amylase의 활성은 2:1:1(3.95 U/mL), 1:1:1(3.90 U/mL), 1:2:1(3.77 U/mL), 1:1:2(3.55 U/mL)의 순으로 나타났으며, maltase의 활성은 1:2:1(92.26 U/ml), 1:1:(91.79 U/mgprot), 2:1:1(82.68 U/mgprot), 1:1:2(75.27 U/mgprot)순으로 나타났다.

Sucrase의 활성은 1:1:1(84.47 U/mL), 1:2:1(84.09 U/mL) 순으로 높았다. Protease 활성은 1:1:1(123.90%), 1:2:1(115.34%), 2:1:1(114.76%), 1:1:2(113.57%)의 순으로 나타났으며 지질분해효소 활성은 1:1:1비율이 0.0093 U/mL로 가장 높게 나타났다(표 2-2). 단백질과 지질분해효소 활성의 경우 균주의 비율이 1:1:1일 때 가장 높았으며, 탄수화물분해효소인 sucrase의 경우 2:1:1과 1:1:2비율에서 낮은 활성을 보였다. 따라서 탄수화물, 단백질, 지방 분해효소 활성이 골고루 높은 것으로 확인된 1:1:1 비율이 발효 균주의 적정 혼합 비율로 사료되었다.

균주비율 \ 분해효소	Amylase (U/ml)	Maltase (U/ml)	Sucrase (U/ml)	Protease (%)	Lipase (U/ml)
1 : 1 : 1	3.90 ± 0.24	91.79 ± 1.10	84.47 ± 3.35	123.90 ± 0.07	0.0093 ± 0.0003
2 : 1 : 1	3.95 ± 0.06	82.68 ± 0.26	56.44 ± 0.24	114.76 ± 0.47	0.0081 ± 0.0001
1 : 2 : 1	3.77 ± 0.12	92.26 ± 1.01	84.09 ± 0.12	115.34 ± 0.13	0.0080 ± 0.0001
1 : 1 : 2	3.55 ± 0.12	75.27 ± 3.84	53.08 ± 3.52	113.57 ± 0.21	0.0082 ± 0.0002

<표 2-2. 고분자물질 분해효소가 우수한 균주의 혼합비율별 분해효소 활성>

※균주비율(*L. fermentum*: *L. acidophilus*: *P. acidilactici*)



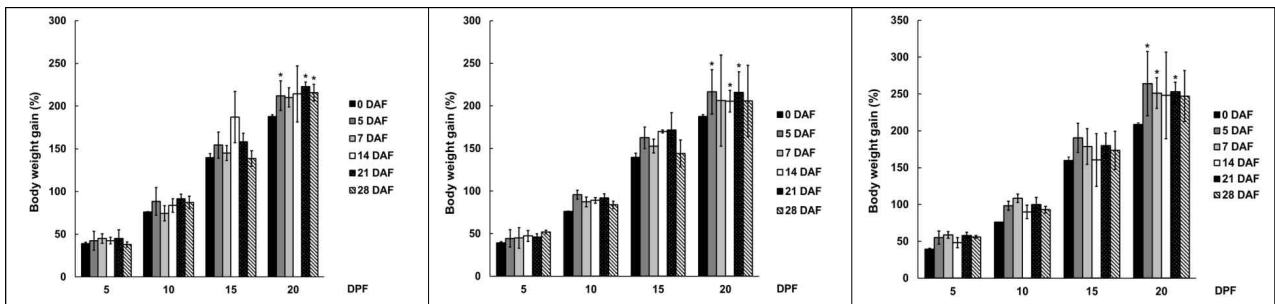
나) 사료효율 증대를 위한 발효 균주 활용 적정 발효기간 확립

선정된 적정 혼합 비율의 3종 발효균주(3M)와 기존 사료 발효에 사용되는 EM, 효모(yeast, Y)를 각각  $1 \times 10^6$  CFU/mL 농도로 밀기울/음식물쓰레기 혼합사료에 50 mL/kg 용량으로 첨가하여 5, 7, 14, 21, 28일간 발효한 후 갈색거저리 유충에 20일간 급여하면서 5일 간격으로 증체량을 확인하였다. 대조군으로는 발효하지 않은 WBFW 사료를 급여하였다. EM, 효모, 3M으로 발효한 WBFW로 사육된 갈색거저리 유충의 생존율은 모든 처리구에서 유의적인 차이를 보이지 않아 각각의 미생물로 발효된 사료가 갈색거저리 유충에 미치는 유해한 영향은 없는 것으로 추정된다(표 2-3). 급여 20일 후의 증체량을 비교한 결과 균주별로는 3M으로 발효한 사료를 급여한 갈색거저리 유충의 증체량이 가장 높았으며 5 DAF(264.06%), 21 DAF(253.01%), 7 DAF(251.21%), 14 DAF(248.14%), 28 DAF(247.22%), 0 DAF (208.69%)의 순서로 높은 증체량을 나타냈다. 5 DAF, 7 DAF, 21 DAF 처리구의 경우 0 DAF과 비교하여 유의적인 증체량의 증가를 보여 발효기간이 5일 정도만 되어도 증체량 증대 효과가 있는 것으로 나타났다(그림 2-1). 따라서 사료 발효기간이 짧을수록, 증체량 증대 효과는 클수록 경제적 가치가 높고 효율적이므로 3종 균주로 5일간 발효한 혼합사료(fermented WBFW, FWBFW)를 바이오에너지 생산용 갈색거저리의 사료로 최종 선정하였다.

발효기간(DAF) \ 발효균주	0	5	7	14	21	28
EM	100	100	99.3 ± 1.2	100	100	100
효모	100	100	99.3 ± 1.2	100	100	99.3 ± 1.2
3M	100	100	100	100	99.3 ± 1.2	100

<표 2-3. EM, 효모, 3M으로 발효한 WBFW로 사육된 갈색거저리 유충 생존율>

※DAF: days after fermentation



<그림 2-1. EM(좌), 효모(중), 3M(우)으로 발효한 WBFW로 사육된 갈색거저리 유충의 증체량>

※DAF: days after fermentation, DPF: days post feeding

2) 고효율 발효 인공사료의 방부제 첨가조건 및 제형화 조건 확립

가) 발효 사료의 방부제 첨가조건 확립

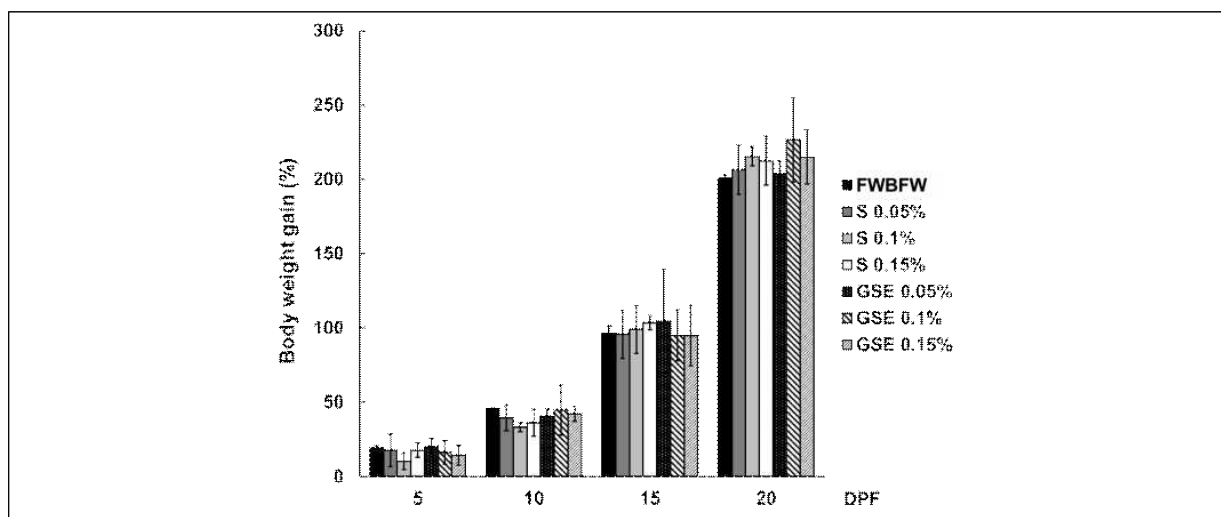
최근 항균력이 있다고 밝혀진 천연물인 자몽종자추출물(grapefruit seed extract, GSE)과<sup>5)</sup> 곤충사료에 보편적으로 사용되는 sorbic acid(S), propionic acid(P)를<sup>4,6)</sup> FWBFW 사료에 각각 0.05%, 0.10%, 0.15%의 비율로 혼합한 후 갈색거저리 유충에 20일 간 급여하였다. 그 결과 GSE와 S 처리구에서는 유의한 생존율의 감소가 나타나지 않았지만 P를 방부제로 사용한 처리구에서는 고농도

일수록 생존율이 급격히 감소하는 독성을 나타내어 방부제로서는 적합하지 않다고 판단하였다(표 2-5).

방부제 종류	-	GSE			S			P		
첨가(%)	-	0.05	0.1	0.15	0.05	0.1	0.15	0.05	0.10	0.15
생존율(%)	100	100	100	100	100	100	100	79.2 ± 1.3	59.4 ± 14.2	17.6 ± 8.1

<표 2-5. 방부제로써 GSE, S, P를 추가한 FWBFW로 사육된 갈색거저리 유충 생존율>

S와 GSE를 방부제로 사용한 사료를 급여한 갈색거저리 유충의 증체량을 비교 분석하였다. 그 결과, GSE 0.1%(226.58%), S 0.1%(215.55%), GSE 0.15%(215.11%), S 0.15%(212.44%), S 0.05%(206.42%), GSE 0.05%(203.87%) 순으로 높았으며, 모든 처리구에서 방부제를 첨가하지 않은 FWBFW보다 높은 증체량을 나타내었다(그림 2-2). 또한, GSE를 0.1% 첨가하였을 때의 증체량이 가장 높았지만 모든 처리구에서 유의미한 차이는 없었다. 따라서, sorbic acid와 자몽종자추출물의 가격은 1 kg 기준 각각 7,100원과 11,500원이기 때문에 sorbic acid가 더 경제성이 높으므로 저렴한 sorbic acid를 갈색거저리 사료 방부제로 선정하였고, 그 농도는 최소 첨가 농도인 0.05%로 결정하였다. 통계처리는 IBM SPSS ver.20을 활용하였으며 증체량의 경우 급여 20일 후 Duncan의 다중검정으로 수행하였다.



<그림 2-2. 방부제로써 S와 GSE를 첨가한 FWBFW 사료로 사육된 갈색거저리 유충 증체량>

※S: sorbic acid, GSE: grapefruit seed extract, DAF: days after fermentation

갈색거저리 유충에 독성을 우선 식중독균 중 그람음성균인 대장균(*Escherichia coli*)과 그람 양성균인 황색포도상구균(*Staphylococcus aureus*)에 대한 항균활성을 검정하였다. 이 때 사용 농도는 각각 0.05%, 0.10%, 0.15%로 동일하게 사용하였다. 그 결과, S와 GSE 모두 농도 의존적으로 항균활성을 가짐을 확인하여(표 2-5), 이들이 다양한 균에 대한 항균력이 있으므로 사료 방부제로 사용 가능한 것으로 판단하였다.

방부제(농도, %)	Size of inhibition zone	
	<i>E. coli</i>	<i>S. aureus</i>
S(0.05)	0	0
S(0.10)	0.1	0.2
S(0.15)	0.15	0.3
GSE(0.05)	0.07	0.1
GSE(0.10)	0.1	0.15
GSE(0.15)	0.2	0.25

<표 2-5. 대장균과 황색포도상구균에 대한 2종 방부제의 항균활성시험>

나) 갈색거저리 사료의 제형화 조건 확립

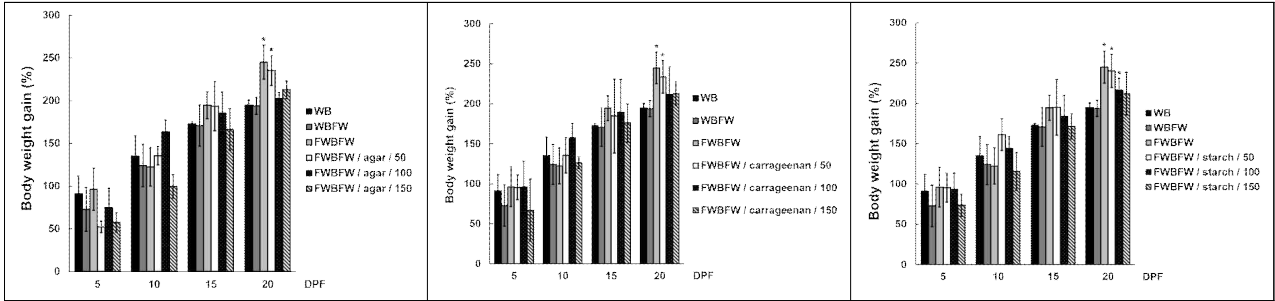
상기 갈색거저리의 발효 혼합사료(FWBFW)의 고형화 조건을 확립하기 위해 한천(agar, A), 카라기난(carrageenan, C), 감자전분(starch, S)을 사료량의 25%로 첨가하고 증류수를 사료량의 1:1(w/v)로 첨가하여 대용량 반죽기(Samwosa, Seoul, Korea)로 1시간 동안 반죽한 후 민서기(Hankook Fujee Industries, Hwaseong-si, Gyeonggi-do, Korea)를 활용하여 6 mm 지름의 크기로 성형하였다. 성형한 사료는 60°C에서 각각 50, 100, 150분간 건조한 후 작두로 1 cm 길이로 잘라 갈색거저리에 급여하였다. 3가지 고형화 재료를 첨가한 사료를 급여한 갈색거저리의 생존율은 모든 처리에서 유의한 차이가 없어 고형화 재료가 갈색거저리 유충에 미치는 유해한 영향은 없는 것으로 판단되었다(그림 2-3A). 증체량 또한 고형화 재료에 따른 유의미한 차이는 없었지만 건조시간이 짧을수록 증체량이 유의미하게 증가하는 것을 확인하였다. 이는 짧은 시간 건조하였을 때 사료의 함수량이 높기 때문인 것으로 추측되었다. 본 실험에 사용된 한천(6,380원/100 g), 카라기난(10,900원/100 g), 감자전분(7,900원/100 g)의 가격을 고려하였을 때 한천이 가장 경제적이었으며 고형화 재료에 따른 증체량 및 생존율의 차이가 없었으므로 고형화 재료는 한천으로 선정하였다. 통계처리는 IBM SPSS ver.20을 활용하였으며 증체량의 경우 급여 20일 후 0 DPF와 5, 7, 14, 21, 28 DPF간의 독립표본 T검정으로 수행하였다.

(A)

처리구	생존율(%)
WB	100
WBFW	100
FWBFW	100
FWBFW / agar / 50	100
FWBFW / agar / 100	99.3 ± 1.2
FWBFW / agar / 150	99.3 ± 1.2
FWBFW / carrageenan / 50	100
FWBFW / carrageenan / 100	100
FWBFW / carrageenan / 150	100
FWBFW / starch / 50	100
FWBFW / starch / 100	100
FWBFW / starch / 150	100

\*WB: wheat bran, WBFW: wheatbran/food waste, FWBFW: fermented WBFW

(B)



<그림 2-3. A(좌), C(중), S(우)로 발효한 WBFW로 사육된 갈색거저리 유충의 생존율(A) 및 증체량(B)>

※DAF: days after fermentation, DPF: days post feeding

다) 제형화된 사료로 사육된 갈색거저리의 조성분 분석

본 과제에서 개발한 방부제 첨가 및 제형화가 완료된 발효 밀기울/음식물쓰레기(FWBF WS 50) 사료를 급여한 갈색거저리 유충과 기존에 가장 널리 사용되는 밀기울 분말로 사육된 갈색거저리 유충의 지방함량을 비교한 결과, FWBFS50 사료를 급여한 갈색거저리의 지방함량이 유의하게 증가한 것을 확인하였다. 따라서 본 연구에서 제작한 사료를 갈색거저리에 급여하였을 때 증체량(그림 2-3) 및 지방함량 증대효과(표 2-6)가 있어 바이오에너지 생산용 갈색거저리 대량 사육에 사용하였을 때 경제성과 효율성을 높여주는 효과가 있을 것이라 기대된다. 통계처리는 IBM SPSS ver.20을 활용하였으며 지방함량의 경우 WB와 FWBFS50간의 독립표본 T검정으로 수행하였다.

(g/100 g)

	조단백질	조지방	탄수화물	조회분	칼로리(cal)
WB	54.47 ± 0.22	29.44 ± 0.73	12.04 ± .096	4.05 ± 0.00	527.67 ± 6.80
FWBFS50	52.70 ± 0.20	34.98 ± 0.7*	10.86 ± 0.95	3.99 ± 0.00	545.49 ± 6.96

<표 2-6. 제형화가 완료된 사료를 급여한 갈색거저리의 조성분 분석>

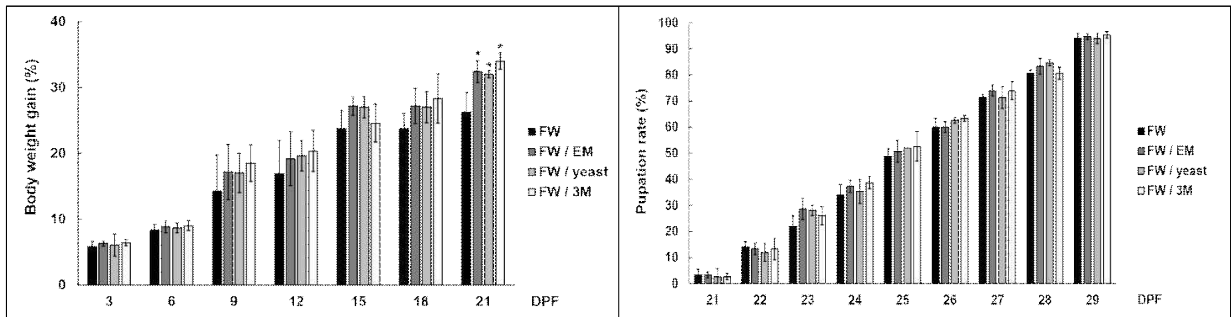
라) 갈색거저리의 지방함량 증대를 위한 최적 발효 사료 제조 공정 표준화

갈색거저리의 지방함량을 증대시키기 위한 표준화된 최적 발효 사료 제조 공정은 다음과 같다. ① 발효 사료 원료로 밀기울(WB)과 음식물쓰레기(FW)원료를 1:1로 혼합한다. ② 3종 균주(*L. fermentum*, *L. acidophilus*, *P. acidilactici*)를  $1 \times 10^6$  CFU/mL 농도로 WBFW에 50mL/kg 용량으로 처리하여 5일간 발효하여 발효사료(FWBFW)를 제조한다. ③ 발효가 끝난 FWBFW에 방부제로써 sorbic acid 0.05%를 첨가한 후(FWBFW-S), ④ 고형제로 agar 25%를 첨가한 후(FWBFW-SA), ⑤ 상기 혼합물과 증류수를 1:1(w/v)로 섞어 60분간 반죽기에서 반죽한다. ⑥ 반죽이 끝난 FWBFW-SA는 6 mm 지름으로 성형한 뒤 50분간 60°C에서 건조한 후(FWBFW-SA50) 1 cm 길이로 잘라 4°C에서 냉장보관하면서 사용한다.

## <바이오디젤 생산용 아메리카동애등에 유충 사료 개발>

### 1) 발효 사료를 급여한 아메리카동애등에의 증체량 및 용화율 분석

EM, 효모, 3종 혼합균주(3M)를 각각 아메리카동애등에의 사료로 일반적으로 사용되는 음식물쓰레기 건조 사료(foodwaste, FW)에 처리하여 5일간 발효한 사료를 제조하여 급여한 후 아메리카동애등에 유충의 증체량을 비교 분석하였다. 대조군으로는 발효하지 않은 FW를 사용하였다. EM, 효모, 3종 혼합균주를 처리하여 5일간 발효한 사료로 사육한 아메리카동애등에 유충의 증체량을 비교한 결과, 급여 21일 후에 FW/3M(34.02%), FW/EM(32.42%), FW/yeast(32.03%), FW(26.20%)의 순으로 높은 증체량을 보였으며 발효한 사료는 발효하지 않은 사료와 비교시 유의한 증체량 증가 효과를 나타내었다. 증체량 증가 효과는 FW/3M 사료 처리구에서 가장 높았지만 발효한 균주 종류별 유의미한 차이는 보이지 않았다(그림 2-4). 용화율의 비교에서는 첫 번째 용화된 개체는 사료급여 21일 후에 모든 처리구에서 나타났으며, 급여 30일 후에는 모든 개체가 용화하였다(그림 2-4). 모든 처리구에서 용화시기, 용화율의 유의한 차이는 없었다. 따라서 발효사료는 아메리카동애등에의 용화시기와 용화율에는 영향을 끼치지 않았으므로 발육 촉진 효과는 없었지만, 증체량을 증대시켜 경제성증대 효과가 있음을 알 수 있었다. 통계처리는 IBM SPSS ver.20을 활용하였으며 증체량과 용화율은 각각 21일 후와 29일 후의 FW와 FW/EM, FW/yeast, FW/3M간의 독립표본 T검정으로 수행하였다.



<그림 2-4. EM, 효모, 3M으로 발효한 FW로 사육된 아메리카동애등에 유충의 증체량(좌) 및 용화율(우)>

## 다. Lipase 활성이 우수한 균주를 활용한 곤충 지질의 발효조건 확립

### 1) 곤충 지질 발효 능력이 우수한 균주 선정 및 분양: 10종

갈색거저리와 동애등으로부터 유래한 지질의 기능성 화장품 소재로서의 효율을 증대시키기 위해 발효하기 위한 균주를 선정하였다. 문헌검색을 통해 기존 다양한 식물성과 동물성 지질에 접종하였을 때 높은 발효 효율을 가지는 것으로 보고된 *Lactobacillus gasseri*, *Lactiplantibacillus pentosus*, *Lactiplantibacillus plantarum*, *Lactobacillus curvatus*, *Bacillus subtilis*, *Pseudomonas pseudoalcaligenes*, *Pediococcus acidilactici*, *Staphylococcus warneri*, *Pediococcus pentosaceus*, *Saccharomyces cerevisiae*의 지질 분해효소와 분해산물 생성능을 비교하였다. 이 때 선정된 균주 10종은 모두 국립농업과학원 미생물은행(Korean Agricultural Culture Collection, KACC)에서 분양받아 실험을 진행하였다.

2) 곤충 지질 발효 능력이 우수한 균주의 발효능력 평가: 지질 분해효소 활성(lipase) 및 분해 산물(free fatty acid, free glycerol) 측정

상기 10종 균주의 지질 발효 능력을 평가하기 위해 지질 분해 효소인 lipase의 활성을 Lipase activity assay kit (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)로 측정하였다. 측정 결과 lipase의 활성은 *L. gasseri*, *L. pentosus*, *L. plantarum*, *L. curvatus*, *P. pentosaceus*, *S. warneri*, *P. pseudoalkaligenis*, *P. acidilactici*, *S. cerevisiae* 순으로 높은 것으로 나타났다(표 2-7). 통계 처리는 IBM SPSS ver.20을 활용하여 Duncan의 다중검정을 수행하였다.

균주명	효소	Lipase (mU/mL)	균주명	분해효소	Lipase (mU/mL)
<i>L. gasseri</i>		3.879 ± 0.397 <sup>a</sup>	<i>P. pseudoalkaligenes</i>		3.065 ± 0.310 <sup>cd</sup>
<i>L. pentosus</i>		3.557 ± 0.031 <sup>b</sup>	<i>P. acidilactici</i>		3.037 ± 0.062 <sup>cd</sup>
<i>L. plantarum</i>		3.240 ± 0.329 <sup>c</sup>	<i>S. warneri</i>		3.077 ± 0.021 <sup>d</sup>
<i>L. curvatus</i>		3.135 ± 0.003 <sup>c</sup>	<i>P. pentosaceus</i>		3.122 ± 0.061 <sup>c</sup>
<i>B. subtilis</i>		2.910 ± 0.048 <sup>e</sup>	<i>S. cerevisiae</i>		3.036 ± 0.046 <sup>d</sup>

<표 2-7. 10종 균주의 지질 분해 효소 활성>

분해 산물인 free glycerol은 Free glycerol assay kit(abcam, Cambridge, United Kingdom)으로 측정하였으며 측정 결과 *L. gasseri*, *L. plantarum*, *L. pentosus*, *L. curvatus*의 순으로 높은 값을 보였다. Free fatty acid는 Free fatty acid quantitation kit(Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)로 측정하였으며 측정 결과 *L. gasseri*, *P. pentosaceus*, *L. plantarum*, *S. warneri*에서 비교적 높은 것으로 나타나(표 2-8) 발효를 위한 균주는 lipase 활성과 free glycerol, free fatty acid 생성능이 모두 우수하였던 *L. gasseri*, *L. plantarum*의 2종을 선정하였다. 통계 처리는 IBM SPSS ver.20을 활용하여 Duncan의 다중검정을 수행하였다.

균주	산물	Free glycerol (μmol/mL)	Free fatty acid (μmol/mL)	균주	산물	Free glycerol (μmol/mL)	Free fatty acid (μmol/mL)
<i>L. gasseri</i>		1.330 ± 0.075 <sup>a</sup>	2.915 ± 0.175 <sup>a</sup>	<i>P. pseudoalkaligenes</i>		1.063 ± 0.022 <sup>b</sup>	2.297 ± 0.021 <sup>d</sup>
<i>L. pentosus</i>		1.094 ± 0.054 <sup>b</sup>	2.396 ± 0.136 <sup>cd</sup>	<i>P. acidilactici</i>		1.047 ± 0.010 <sup>c</sup>	2.377 ± 0.021 <sup>c</sup>
<i>L. plantarum</i>		1.297 ± 0.069 <sup>a</sup>	2.508 ± 0.145 <sup>b</sup>	<i>S. warneri</i>		1.077 ± 0.001 <sup>b</sup>	2.440 ± 0.001 <sup>b</sup>
<i>L. curvatus</i>		1.083 ± 0.062 <sup>b</sup>	2.378 ± 0.027 <sup>c</sup>	<i>P. pentosaceus</i>		1.019 ± 0.009 <sup>d</sup>	2.710 ± 0.013 <sup>a</sup>
<i>B. subtilis</i>		1.014 ± 0.009 <sup>c</sup>	2.403 ± 0.009 <sup>c</sup>	<i>S. cerevisiae</i>		0.951 ± 0.011 <sup>e</sup>	2.365 ± 0.053 <sup>c</sup>

<표 2-8. 10종 균주의 지질 분해 효소 활성>

3) 곤충 지질의 선발한 균주 활용 발효 후 발효정도 평가: 유리지방산 및 글리세롤의 양

효율적인 곤충 지질 발효 방법을 선정하기 위해 균주와 배양액을 함께 접종하는 형태와 균주를 배양한 후 배양액만을 접종하는 형태의 2가지 방법과 발효 기간을 선정하기 위해 곤충 지질을 각각 0, 0.5, 1, 2, 3, 4, 5, 7, 14, 21, 28, 35일간 발효한 후 지질의 분해 산물인 free glycerol과 free fatty acid의 함량을 비교하였다. 발효는 20 g의 동애등에 지질에 2g의 '균주 + 배양액' 또는 배양액만을 각각 혼합한 후 37°C에서 교반하면서 진행하였다. 2가지 방법 모두 발효일이 경과할수록 발효 산물의 양이 증가하는 경향을 보였으며 발효 28일 후 부터는 발효 산물의 양이 증가하지 않는 것으로 나타났다. 2가지 방법간의 비교에서는 배양액만을 사용하여 발효한 지질의 발효 산물이 '균주 + 배양액'을 사용하였을 때 보

다 항상 높은 것으로 나타났다(표 2-9). 따라서 지질을 발효하기 위한 방법으로는 배양액만을 지질에 접종하여 28일간 발효하는 것으로 결정하였다. 통계처리는 IBM SPSS ver.20을 활용하여 Duncan의 다중검정을 수행하였다.

발효 산물 발효 방법 발효일(day)	Free glycerol(μmol/mL)		Free fatty acid(μmol/mL)	
	균주 + 배양액	배양액	균주 + 배양액	배양액
0	2.678 ± 0.030 <sup>d</sup>	2.780 ± 0.032 <sup>d</sup>	3.138 ± 0.069 <sup>d</sup>	3.122 ± 0.071 <sup>d</sup>
0.5	2.705 ± 0.143 <sup>d</sup>	2.807 ± 0.040 <sup>cd</sup>	3.148 ± 0.287 <sup>d</sup>	3.133 ± 0.040 <sup>d</sup>
1	2.860 ± 0.023 <sup>d</sup>	2.864 ± 0.019 <sup>cd</sup>	3.170 ± 0.052 <sup>d</sup>	3.255 ± 0.019 <sup>cd</sup>
2	2.795 ± 0.051 <sup>cd</sup>	2.899 ± 0.041 <sup>cd</sup>	3.211 ± 0.048 <sup>d</sup>	3.295 ± 0.041 <sup>cd</sup>
3	2.863 ± 0.053 <sup>cd</sup>	2.967 ± 0.091 <sup>cd</sup>	3.307 ± 0.057 <sup>cd</sup>	3.292 ± 0.091 <sup>cd</sup>
4	3.041 ± 0.169 <sup>cd</sup>	3.145 ± 0.075 <sup>c</sup>	3.429 ± 0.039 <sup>c</sup>	3.314 ± 0.074 <sup>cd</sup>
5	3.387 ± 0.280 <sup>c</sup>	3.294 ± 0.159 <sup>c</sup>	3.441 ± 0.048 <sup>c</sup>	3.526 ± 0.159 <sup>c</sup>
7	3.685 ± 0.114 <sup>b</sup>	3.990 ± 0.124 <sup>b</sup>	3.632 ± 0.027 <sup>b</sup>	3.917 ± 0.124 <sup>b</sup>
14	3.668 ± 0.280 <sup>a</sup>	4.071 ± 0.480 <sup>ab</sup>	4.215 ± 0.065 <sup>a</sup>	4.799 ± 0.480 <sup>a</sup>
21	3.745 ± 0.114 <sup>a</sup>	4.091 ± 0.231 <sup>a</sup>	4.240 ± 0.048 <sup>a</sup>	4.824 ± 0.231 <sup>a</sup>
28	3.745 ± 0.114 <sup>a</sup>	4.048 ± 0.058 <sup>a</sup>	4.231 ± 0.027 <sup>a</sup>	4.815 ± 0.058 <sup>a</sup>
35	3.728 ± 0.120 <sup>a</sup>	4.031 ± 0.069 <sup>a</sup>	4.214 ± 0.065 <sup>a</sup>	4.798 ± 0.069 <sup>a</sup>

<표 2-9. 발효방법과 발효일에 따른 동애등에 지질 분해 산물 함량>

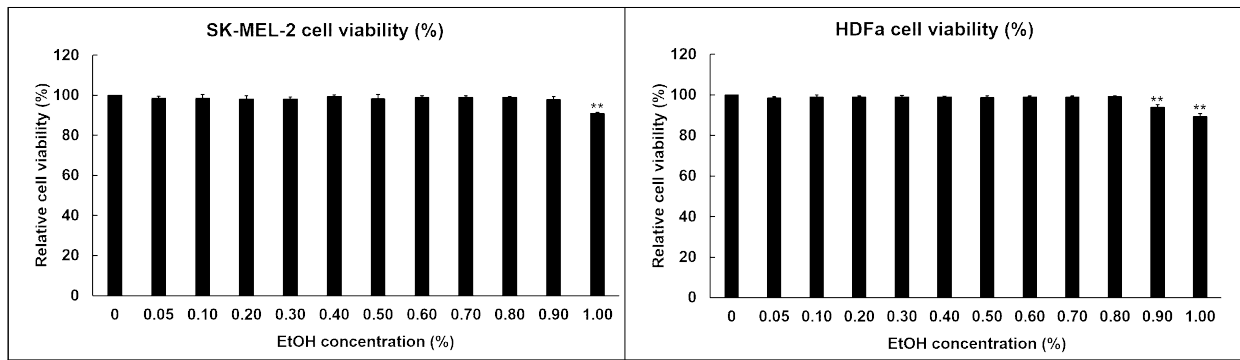
따라서 이후 수행될 미백 및 주름개선 기능성 검정을 위한 곤충 발효 지질은 발효하지 않은 갈색거저리 지질(*Tenebrio molitor* oil, TMO), 동애등에 지질(*Hermetia illucens* oil, HIO)과 상기 확립된 방법으로 발효된 갈색거저리 지질(fermented TMO, FTMO)과 발효된 동애등에 지질(fermented HIO, FHIO)을 준비하였다. 또한 다양한 지방산과의 미백, 주름개선 기능성을 비교하고자 갈색거저리 유충과 동애등에 유충의 가장 많이 포함된 포화지방산인 lauric acid, myristic acid, palmitic acid, oleic acid, linoleic acid, linolenic acid의 6종 지방산과 주관연구기관인 그린테코 주식회사에서 동애등에로부터 분리한 lauric acid(G), 대조군인 kojic acid의 총 8종을 활용하여 기능성을 검정 및 비교하였으며 lauric acid(G)를 제외한 지방산은 Sigma-Aldrich社(St. Louis, MO, USA)에서 구매하였다.

## 라. 상기 발효 곤충 지질 및 다양한 지방산을 활용한 미백 및 주름개선 기능성 검정

### 1) 지질과 지방산의 용매, 처리 농도 선정을 위한 세포독성 평가: MTS assay

#### 가) 지질과 지방산의 용매 선정을 위한 세포독성 평가

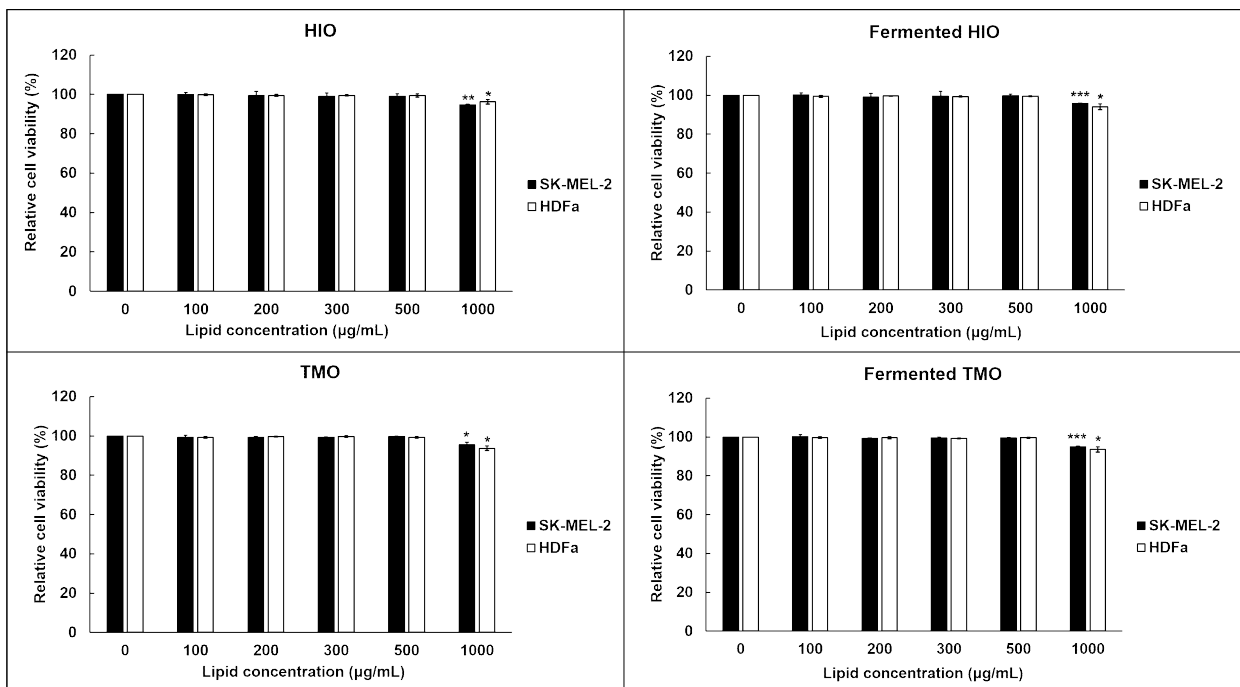
미백 기능성 검정을 위한 SK-MEL-2 세포주(사람의 멜라노마 세포)와 주름개선 기능성 검정을 위한 HDFa 세포주(사람의 섬유아세포)는 American Type Culture Collection(ATCC)에서 구매하였다. 지질과 지방산 처리를 위한 용매인 EtOH의 농도를 결정하기 위해 0~1%의 EtOH를 세포에 48시간 처리한 후 생존율을 확인하였다. 그 결과 SK-MEL-2 세포는 EtOH 농도가 1%일 때와, HDFa 세포는 0.09%일 때부터(그림 2-5) 유의한 생존율의 감소가 관찰되어 지질과 지방산의 용매는 0.08% EtOH로 결정하였다. 통계처리는 IBM SPSS ver.20을 활용하여 대조군과 각각 처리구의 T-test로 수행하였다.



<그림 2-5. 지질과 지방산의 용매에 대한 SK-MEL-2 세포와 HDFa 세포의 생존율>

나) 지질과 지방산의 처리 농도 선정을 위한 세포독성 평가

4종 곤충 지질의 각 세포에 독성 없는 최고 농도를 결정하기 위해 HIO, FHIO, TMO, FTMO를 SK-MEL-2 세포와 HDFa 세포에 0~150 µg/mL의 농도로 48시간 처리한 후 생존율을 확인하였다. 그 결과 4종의 지질 모두 110 µg/mL에서 유의한 생존율의 감소가 관찰되었다(그림 2-6). 통계처리는 IBM SPSS ver.20을 활용하여 대조군과 각각 처리군의 T-test로 수행하였다.

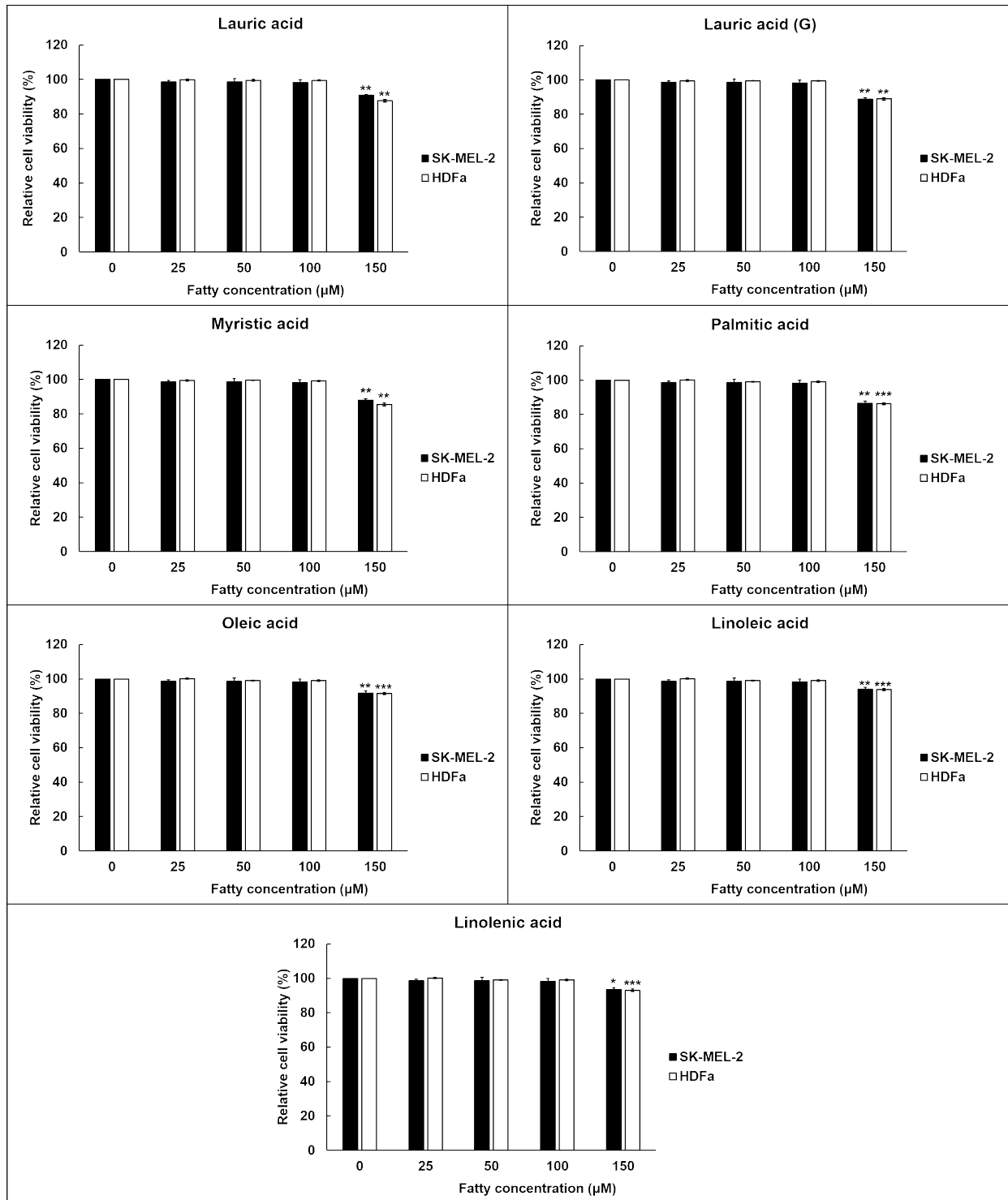


<그림 2-6. 4종 곤충 지질에 대한 SK-MEL-2 세포와 HDFa 세포의 생존율>

8종 지방산의 각 세포에 독성 없는 최고 농도를 결정하기 위해 각 지방산을 SK-MEL-2 세포와 HDFa 세포에 0~150 µg/mL의 농도로 48시간 처리한 후 생존율을 확인하였다. 그 결과 8종의 지방산 모두 150 µg/mL에서 유의한 생존율의 감소가 관찰되었다(그림 2-7). 4종 곤충 지질과 8종 지방산의 각 세포에 독성 없는 최고 농도는 각각 100µg/mL와 150µg/mL로 나타나 둘 중 더 농도가 낮은 100µg/mL를 세포 실험에 사용할 지질과 지방산의 최종 농도로 결정하였다.



통계처리는 IBM SPSS ver.20을 활용하여 대조군과 각각 처리구의 T-test로 수행하였다.



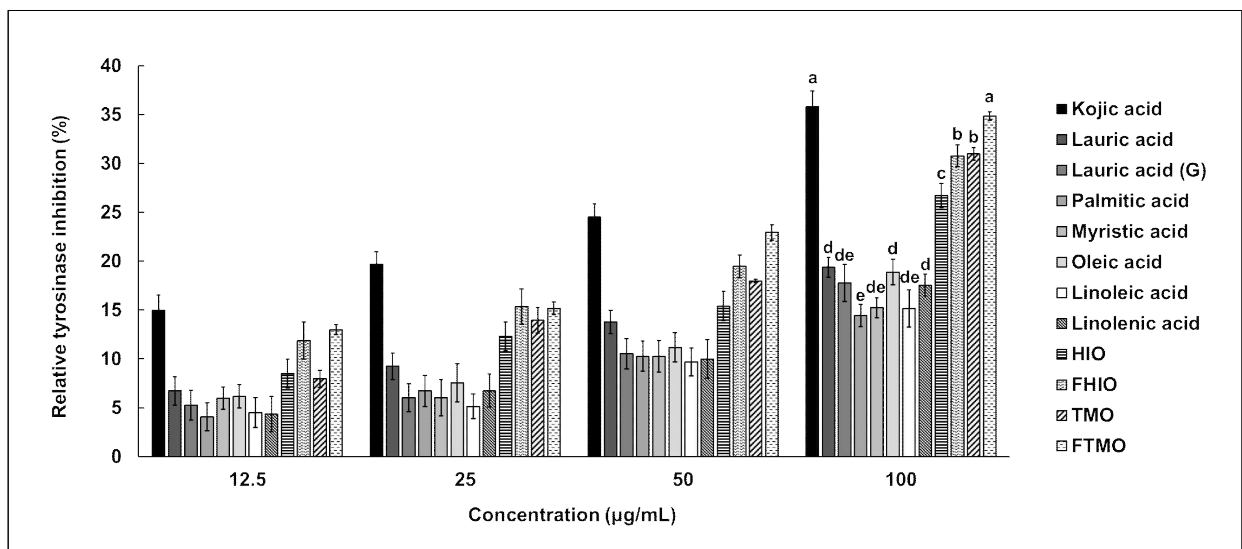
<그림 2-7. 8종 지방산에 대한 SK-MEL-2 세포와 HDFa 세포의 생존율>

## 2) 4종 곤충 지질과 8종 지방산의 미백 기능성 검정

가) 체외 DOPA 산화반응에 대한 tyrosinase 활성 저해 능력 검정: ELISA

Tyrosinase는 모노페놀의 수산화 과정과 o-디페놀을 o-퀴논으로 변환시켜 멜라닌의 합성을 조절하는 산화 효소로 피부의 멜라닌 생성에 관여하며 활성을 저해할 경우 멜라닌 생성을 억제시켜 미

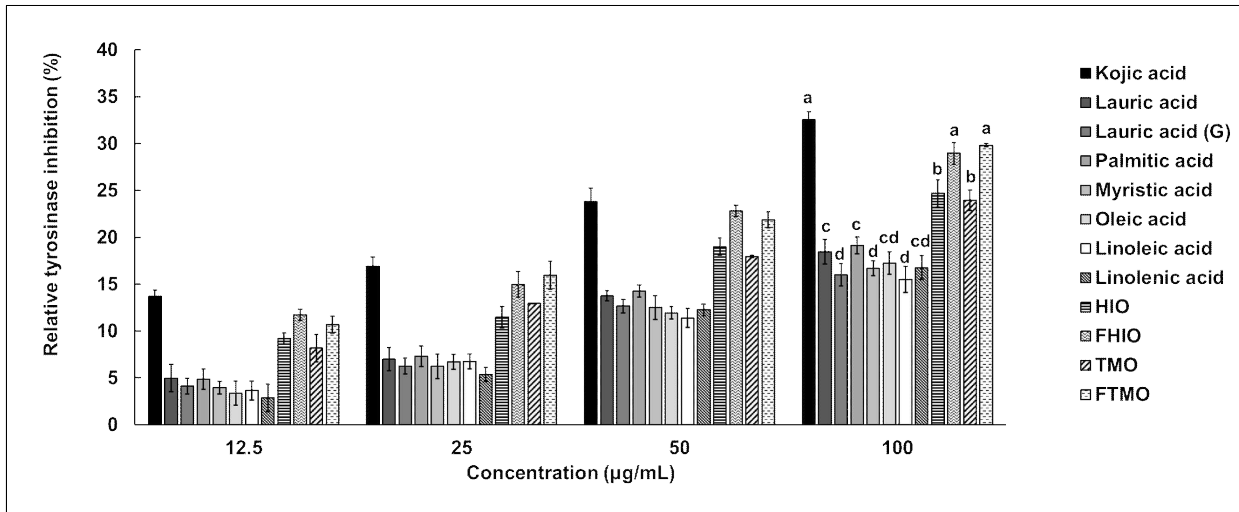
백 효과는 유도할 수 있다<sup>5)</sup>. 4종의 곤충 지질과 8종 지방산의 체외 tyrosinase 활성 저해 능력은 Tyrosinase inhibitor screening kit(Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)로 측정하였으며 대조군으로는 kojic acid를 사용하였다. 농도 구간은 12.5, 25, 50, 100µg/mL 범위에서 측정하였고 측정 결과 모든 처리구에서 농도의존적인 저해 활성을 보였으며 tyrosinase 저해 활성이 우수하다고 알려져 있는 kojic acid와 발효 곤충 지질인 FTMO가 Duncan의 다중 검정 결과 유의하게 비슷한 값을 보여 FTMO의 tyrosinase 저해 활성 또한 우수한 것으로 보인다. 또한 곤충 지질 4종 모두 kojic acid를 제외한 단일 지방산들 보다 높은 저해활성을 보였으며 비발효 곤충 지질과 발효 곤충 지질은 저해 활성이 유의한 차이를 보여 지질의 발효가 tyrosinase 저해 활성을 상승시키는 효과를 확인하였다(그림 2-8).



<그림 2-8. 4종 곤충 지질과 8종 지방산의 체외 tyrosinase 저해 활성 검정>

#### 나) SK-MEL-2 세포 내 tyrosinase 활성 저해 능력 검정: ELISA

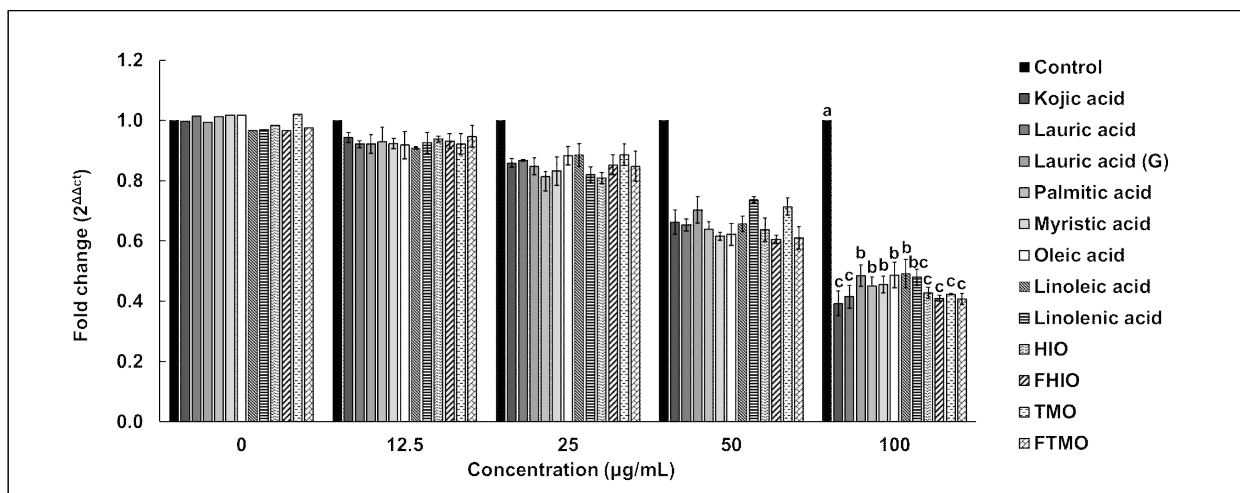
세포 내 tyrosinase 활성 저해 능력을 검정하기 위해 SK-MEL-2 세포를 EMEM 배지에 37°C, 5% CO<sub>2</sub> 농도에서 배양하였으며 4번의 passage를 거친 후 5번째 passage를 실험에 사용하였다. 6 well plate에 7 × 10<sup>4</sup> cell을 seeding한 후 각각 12.5, 25, 50, 100 µg/mL의 4종 지질과 8종 단일지방산을 세포에 처리하고 48시간이 경과한 뒤 tyrosinase 활성 저해 능력을 검정하였다. 그 결과 모든 처리구에서 농도의존적으로 tyrosinase 저해 활성이 증가하였으며 특히 100µg/mL에서 Duncan의 다중검정 결과 kojic acid와 FHIO, FTMO가 유의하게 비슷한 저해 활성을 보여 발효 지질의 세포 내 tyrosinase 저해 활성이 우수한 것으로 나타났다. 또한 비발효 지질과 발효 지질간의 저해 활성은 유의한 차이를 보여 발효가 지질의 미백 기능성에 긍정적인 영향을 미치는 것으로 나타났다(그림 2-9).



<그림 2-9. 4종 곤충 지질과 8종 지방산의 SK-MEL-2 cell 내 tyrosinase 저해 활성 검정>

다) SK-MEL-2 세포 내 tyrosinase mRNA 발현 저해 활성 검정: qRT-PCR

4종 곤충 지질과 8종 지방산이 tyrosinase mRNA의 발현을 효과적으로 저해하는지 확인하기 위해 6 well plate에  $7 \times 10^4$  cell을 seeding한 후 각각 12.5, 25, 50, 100 µg/mL의 4종 지질과 8종 단일지방산을 처리하고 48시간이 경과한 뒤 TRIzol reagent(Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)로 RNA를 추출한 후 tyrosinase 발현을 조절하는 전사체 분석을 위하여 primer를 제작한 후 발현량을 관찰하였으며 housekeeping gene으로 GAPDH를 사용하였다. 측정 결과 kojic acid, FTMO, lauric acid, FHIO, TMO, HIO의 순으로 낮은 mRNA 발현량을 보여 발효 곤충 지질이 tyrosinase 저해활성이 뛰어난 kojic acid만큼 tyrosinase mRNA 발현을 억제하는 것을 확인하였다(그림 2-10). 통계처리는 IBM SPSS ver.20을 활용하여 Duncan의 다중검정을 수행하였다.

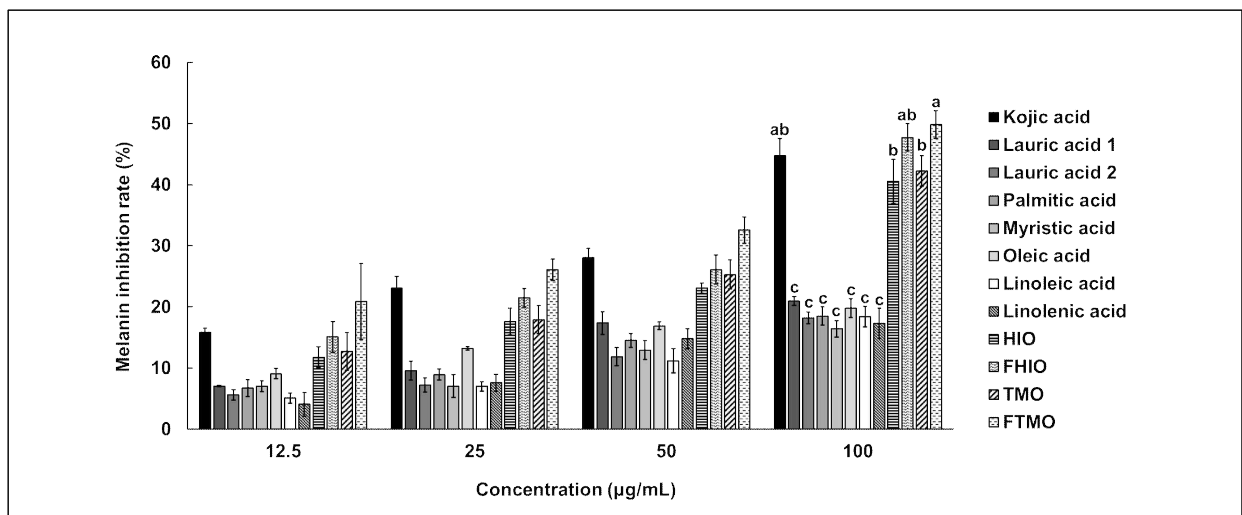


<그림 2-10. 4종 곤충 지질과 8종 지방산의 SK-MEL-2 cell 내 tyrosinase mRNA 저해 활성 검정>

라) SK-MEL-2 세포 내 멜라닌 생성 저해 능력 검정: ELISA

Tyrosinase에 의해 산화된 tyrosine은 melanin을 합성하게 되며 melanin은 조직에 존재하는 흑색 내지는 갈색 색소로 피부의 색을 결정하는 중요한 요소이므로 melanin 생성을 억제시킬 경우 미

백 효과를 유도할 수 있다<sup>7)</sup>. 4종 곤충 지질과 8종 지방산이 최종적인 melanin 생합성 과정을 효과적으로 억제하는지 확인하기 위해 6 well plate에  $7 \times 10^4$  cell을 seeding한 후 각각 12.5, 25, 50, 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 의 4종 지질과 8종 단일지방산을 처리하고 48시간이 경과한 뒤 Human melanin ELISA kit(Cusabio, Houston, TX, USA)를 활용하여 melanin의 생성 저해 능력을 검정하였다. 그 결과 모든 처리구에서 농도의존적인 melanin 생성 저해가 관찰되었다. 특히, FTMO에서 대조군인 kojic acid보다 유의하게 높은 저해 능력이 나타났으며 FHIO의 경우에도 kojic acid와 유의한 차이가 없었다(그림 2-11). 이는 상대적으로 FTMO에 많이 포함된 불포화지방산이 FHIO에 많이 포함된 포화지방산보다 나은 미백 기능성을 보이는 것으로 생각되며, 또한 비발효 지질보다 발효 지질에서 더 높은 melanin 저해 능력을 보인 것으로 보아 발효를 통해 흡수되기 쉬운 형태로 바뀌어 세포 내 흡수가 더 용이했던 것으로 사료된다. 통계처리는 IBM SPSS ver.20을 활용하여 Duncan의 다중검정을 수행하였다.

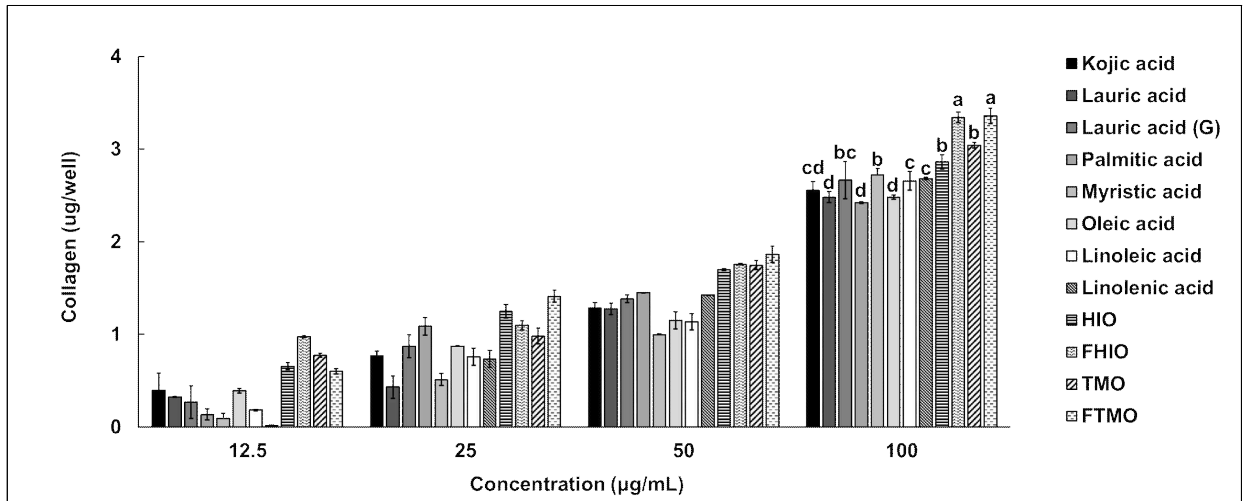


<그림 2-11. 4종 곤충 지질과 8종 지방산의 SK-MEL-2 cell 내 melanin 생성 저해 활성 검정>

### 3) 4종 곤충 지질과 8종 지방산의 주름개선 기능성 검정

#### 가) HDFa 세포 내 collagen 생성 능력 검정: ELISA

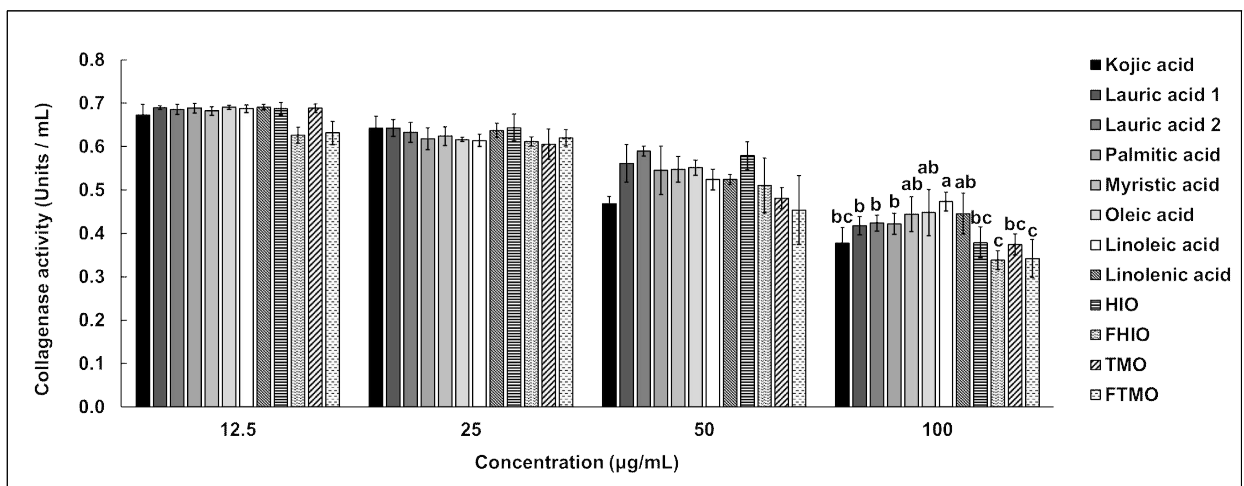
Collagen은 결합 조직의 주성분이며 피부 진피층의 약 90%를 차지하고 수분을 끌어당기는 히알루론산이 결합되어 있어 피부에 탄력을 주고 주름을 방지하는 효능이 있는 것으로 알려져 있다<sup>8)</sup>. 4종 곤충 지질과 8종 지방산의 세포 내 collagen 생성 능력을 검정하기 위해 HDFa 세포를 EMEM 배지에  $37^{\circ}\text{C}$ , 5%  $\text{CO}_2$  농도에서 배양하였으며 4번의 passage를 거친 후 5번째 passage를 실험에 사용하였다. 6 well plate에  $7 \times 10^4$  cell을 seeding한 후 각각 12.5, 25, 50, 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 의 4종 지질과 8종 단일지방산을 처리하고 48시간이 경과한 뒤 생성된 collagen의 양을 측정하였다. 그 결과 모든 처리구에서 농도의존적으로 collagen의 생성량이 증가하였으며 특히 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 의 농도에서는 발효 곤충 지질인 FHIO와 FTMO의 collagen 생성량이 유의적으로 가장 높은 것으로 나타났다(그림 2-12). 또한 비발효 지질과 발효 지질간의 생성량은 유의한 차이를 보여 발효가 지질의 주름개선 기능성에 긍정적인 영향을 미칠 것으로 추정되었다. 통계처리는 IBM SPSS ver.20을 활용하여 Duncan의 다중검정을 수행하였다.



<그림 2-12. 4종 곤충 지질과 8종 지방산의 HDFa 세포 내 collagen 생성 능력 검정>

나) HDFa 세포 내 collagenase 활성 억제 능력 검정: ELISA

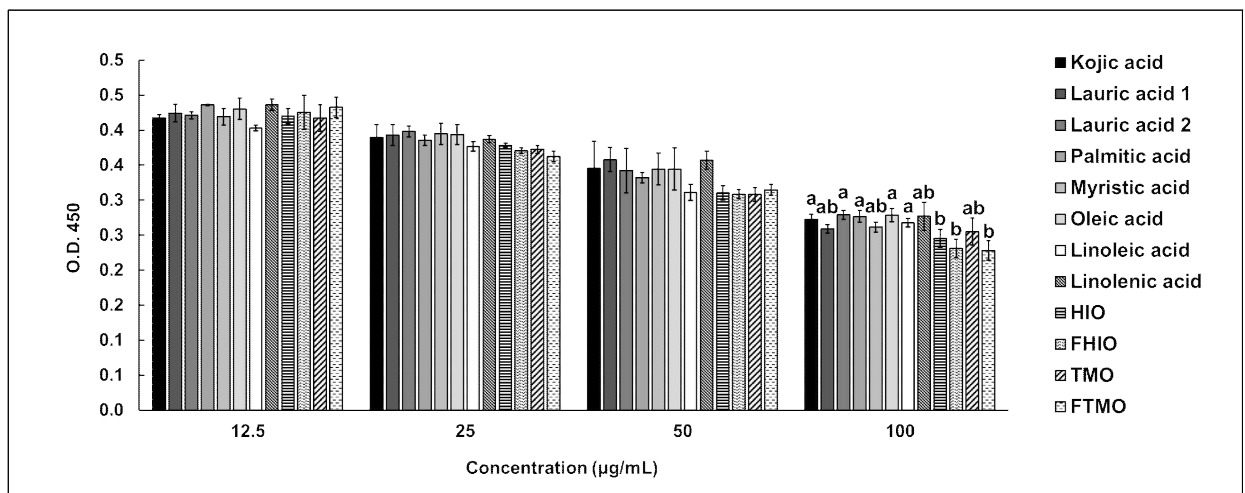
Collagen의 펩타이드결합의 가수분해를 촉매하는 효소인 collagenase의 활성을 4종 곤충 지질이 효과적으로 억제하는지 확인하기 위해 Collagenase activity assay kit(abcam, Cambridge, United Kingdom)를 활용하여 HDFa 세포 내 collagenase 활성 억제 능력을 측정하였다. 6 well plate에  $7 \times 10^4$  cell을 seeding한 후 각각 12.5, 25, 50, 100 µg/mL의 4종 지질과 8종 단일지방산을 세포에 처리하고 48시간이 경과한 뒤 생성된 collagenase의 활성 억제 능력을 검정하였다. 그 결과 모든 처리구에서 농도의존적으로 collagenase의 활성이 감소하는 경향이 나타났고 FHIO, FTMO, TMO, HIO, kojic acid의 순서로 collagenase의 활성이 낮아지는 것으로 나타났으며(그림 2-13) 이러한 경향은 4종 곤충의 지질이 다수의 단일지방산으로 이루어져 있어 각각의 단일지방산보다 collagenase 저해 활성이 더 높은 것으로 추정된다. 통계처리는 IBM SPSS ver.20을 활용하여 Duncan의 다중검정을 수행하였다.



<그림 2-13. 4종 곤충 지질과 8종 지방산의 HDFa 세포 내 collagen 생성 능력 검정>

다) HDFa 세포 내 elastase 생성 능력 검정: ELISA

Elastin은 collagen과 더불어 결합조직의 주요 성분이며 collagen 섬유를 지탱하는 역할을 수행하여 피부의 탄력을 유지시켜주는 단백질이며 이를 분해하는 elastase의 활성 억제 능력을 확인하여 주름개선 기능성을 검정하였다<sup>9)</sup>. HDFa 세포 내 elastase 활성은 Human elastase ELISA kit(Novus Biological, Centennial, CO, USA)으로 측정하였으며 6 well plate에  $7 \times 10^4$  cell을 seeding한 후 각각 12.5, 25, 50, 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 의 4종 지질과 8종 단일지방산을 처리하고 48시간이 경과한 뒤 생성된 elastase의 양을 O.D.값 측정을 통해 상대적으로 비교하였다. 그 결과 모든 처리구에서 농도의존적으로 elastase의 활성이 감소하는 경향을 보였으며 FHIO, FTMO, HIO, TMO 순서로 elastase의 활성이 감소하였다(그림 2-14). 이 또한 지질의 발효를 통해 분해된 유리지방산과 유리글리세롤의 영향인 것으로 추정된다. 통계처리는 IBM SPSS ver.20을 활용하여 Duncan의 다중검정을 수행하였다.



<그림 2-14. 4종 곤충 지질과 8종 지방산의 HDFa 세포 내 elastase 억제 능력 검정>

마. 발효 곤충 지질의 알러지 반응 검사: 인체적용 철폐시험

본 연구과제를 통해 개발된 FHIO와 FTMO의 기능성 화장품 등록을 위한 기초자료로 활용하기 위해 식품의약품안전처고시 “기능성화장품 심사에 관한 규정” 제 4조에 명시된 인체 철폐시험을 피엔케이피부임상연구센터(주)를 통해 수행하였다. 34명의 피험자(남성: 4명, 여성 30명, 평균나이 만 40.9세)를 대상으로 각 발효 지질을 24시간 철폐한 후, 철폐 제거 1시간, 24시간 후의 피부 반응에 대한 평가를 실시하였으며 철폐부위는 시험대상자의 척추를 제외한 등의 평평한 부위로 착색이나 피부손상이 없는 부위였다. 평가항목은 연구자의 육안 평가(Frosch & Kligman, CTFA guideline에 근거한 피부반응도 판독 및 Draize 방법을 응용한 피부자극 지수 범위를 확인하여 피부자극 정도를 구분)와 인구학적 조사(인체적용시험 시작 전 성별, 생년월일, 나이), 건강상태 조사(인체적용시험에 적합 여부 확인을 위한 육안 검사), 병력조사(인체적용시험 시작 전 주 증상, 발병일, 검사 및 치료 이력 조사)로 이루어졌다. 시험기간동안 34명의 피험자 모두 특별한 피부 이상반응에 대한 보고는 없었으므로 FHIO와 FTMO는 비자극성으로 판단되었다(그림 2-15, 2-16).

## 결과 보고서 요약문

시험제목	지질1 FHIO의 인체 피부 일차자극 시험		
시험기관	피엔케이피부임상연구센터㈜	연구관리번호	PNK-22N09-I41R
시험기간	2022년 11월 09일 ~ 2022년 11월 11일		
시험제품	지질1 FHIO		
시험목적	인체 피부에 대한 일차자극 유무를 확인하고자 시행하였다.		
시험대상자	시험대상자 선정 및 제외기준을 만족하는 만 20~55세의 성인 남녀		
시험대상자 수	최종유효평가 인원수: 34명		
시험방법	<p>1. 첩포부위: 시험대상자의 척추를 제외한 등의 평평한 부위로 착색이나 피부손상이 없는 부위</p> <p>2. 평가항목</p> <p>1) 연구자 육안 평가(피부자극 정도 평가)방법: Frosch &amp; Kligman, CTFA guideline에 근거하여 피부반응도를 판독하고 Draize 방법을 응용한 피부자극 지수 범위를 확인하여 피부자극 정도를 구분</p> <p>3. 기타 조사(관찰)항목</p> <p>1) 인구학적 조사: 인체적용시험 시작 전 성별, 생년월일, 나이 조사 2) 건강상태 조사: 인체적용시험에 적합 여부 확인을 위한 육안 검사 3) 병력조사: 인체적용시험 시작 전 주 증상, 발병일, 검사 및 치료 이력에 대하여 조사</p> <p>4. 방문일정: 3 회 방문으로 함</p> <p>1) 방문 1: 시험대상자 동의, 시험대상자 선정검사, 시험제품 첩포, 이상반응 확인 2) 방문 2: 첩포 제거, 첩포 제거 1시간 후 피부반응 육안평가, 이상반응 확인 3) 방문 3: 첩포 제거 24시간 후 피부반응 육안평가, 이상반응 확인</p>		
1차 유효성 평가 변수	첩포 제거 1시간 후, 24시간 후의 피부자극 지수		
안전성 평가	시험제품 사용 후 나타나는 이상증상에 대하여 평가한다.		
시험결과	<p>본 시험은 만 20~55세의 성인 남녀를 대상으로 "지질1 FHIO"의 인체 피부에 대한 일차자극 유무를 확인하였다.</p> <p>1) 본 시험을 종료한 시험대상자 34명은 남성 4명, 여성 30명으로 평균연령은 만 40.941세였다. 선정된 시험대상자들은 특별한 피부 증상은 없었으며 시험에 영향을 미칠 수 있는 질환 및 약물 복용력은 없었다.</p> <p>2) 시험제품인 "지질1 FHIO" 품목을 24시간 첩포하고, 첩포 제거 1시간, 24시간 후의 피부반응에 대한 연구자 육안평가를 종합한 결과, 시험제품은 비(무) 자극성으로 판단된다.</p> <p>3) 시험기간 동안 특별한 피부 이상반응에 대한 보고는 없었다.</p>		

<그림 2-15. FHIO의 인체적용 첩포시험 결과 보고서 요약문>

## 결과 보고서 요약문

시험제목	지질2 FTMO의 인체 피부 일차자극 시험		
시험기관	피엔케이피부임상연구센터㈜	연구관리번호	PNK-22N09-142R
시험기간	2022년 11월 09일 ~ 2022년 11월 11일		
시험제품	지질2 FTMO		
시험목적	인체 피부에 대한 일차자극 유무를 확인하고자 시행하였다.		
시험대상자	시험대상자 선정 및 제외기준을 만족하는 만 20~55세의 성인 남녀		
시험대상자 수	최종유효평가 인원수: 34명		
시험방법	<p>1. 첩포부위: 시험대상자의 척추를 제외한 등의 평평한 부위로 착색이나 피부손상이 없는 부위</p> <p>2. 평가항목</p> <p>1) 연구자 육안 평가(피부자극 정도 평가)방법: Frosch &amp; Kligman, CTFA guideline에 근거하여 피부반응도를 판독하고 Draize 방법을 응용한 피부자극 지수 범위를 확인하여 피부자극 정도를 구분</p> <p>3. 기타 조사(관찰)항목</p> <p>1) 인구학적 조사: 인체적용시험 시작 전 성별, 생년월일, 나이 조사 2) 건강상태 조사: 인체적용시험에 적합 여부 확인을 위한 육안 검사 3) 병력조사: 인체적용시험 시작 전 주 증상, 발병일, 검사 및 치료 이력에 대하여 조사</p> <p>4. 방문일정: 3 회 방문으로 함</p> <p>1) 방문 1: 시험대상자 동의, 시험대상자 선정검사, 시험제품 첩포, 이상반응 확인 2) 방문 2: 첩포 제거, 첩포 제거 1시간 후 피부반응 육안평가, 이상반응 확인 3) 방문 3: 첩포 제거 24시간 후 피부반응 육안평가, 이상반응 확인</p>		
1차 유효성 평가 변수	첩포 제거 1시간 후, 24시간 후의 피부자극 지수		
안전성 평가	시험제품 사용 후 나타나는 이상증상에 대하여 평가한다.		
시험결과	<p>본 시험은 만 20~55세의 성인 남녀를 대상으로 "지질2 FTMO"의 인체 피부에 대한 일차자극 유무를 확인하였다.</p> <p>1) 본 시험을 종료한 시험대상자 34명은 남성 4명, 여성 30명으로 평균연령은 만 40.941세였다. 선정된 시험대상자들은 특별한 피부 증상은 없었으며 시험에 영향을 미칠 수 있는 질환 및 약물 복용력은 없었다.</p> <p>2) 시험제품인 "지질2 FTMO" 품목을 24시간 첩포하고, 첩포 제거 1시간, 24시간 후의 피부반응에 대한 연구자 육안평가를 종합한 결과, 시험제품은 비(무) 자극성으로 판단된다.</p> <p>3) 시험기간 동안 특별한 피부 이상반응에 대한 보고는 없었다.</p>		

<그림 2-16. FTMO의 인체적용 첩포시험 결과 보고서 요약문>



<제2협동(한국석유관리원): 부산물 지질을 활용한 바이오디젤 합성 및 연료 검증>

가. 기능성 지질이 추출된 부산물 지질의 특성 분석을 통한 에스테르화 반응 최적화 기술

- 곤충 지질은 기능성 지질인 라우릭산(lauric acid)을 추출하기 위해 C<sub>12</sub> 이하 지방산과 C<sub>13</sub> 이상의 지방산으로 분리하였고 분리된 C<sub>12</sub> 지방산은 고부가 기능성 제품으로 활용되고 부산물 지질인 C<sub>13</sub> 이상의 지방산은 바이오디젤로 전환하는 연구를 수행하였고 지질의 특성(전산가)에 따라 반응인자인 촉매, 반응시간, 반응온도 등의 조건이 달라지므로 지질의 특성 분석이 매우 중요하다.



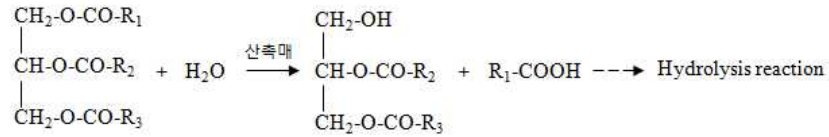
< 곤충에서 고부가 지질(C<sub>12</sub> 지방산)의 분리 및 활용 >

- 일반적으로 식물성 지질에는 탄소수가 짝수개인 지방산(lauric acid, palmitic acid, stearic acid 등)이 존재하나 동물성 지질에는 홀수개의 탄소수를 갖는 지방산(tridecanoic acid, pentadecanoic acid 등)이 존재할 수 있다.

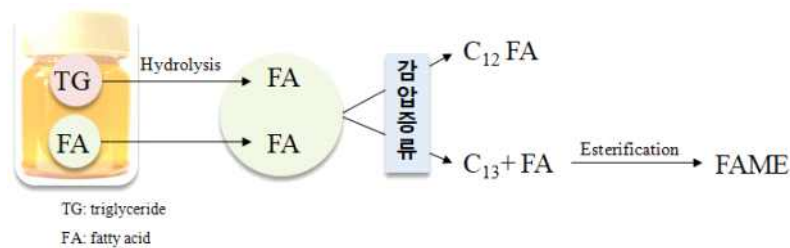
< 일반적인 지질의 지방산 조성 >

Fatty acid	Chemical structure	C:D
Caprylic acid	CH <sub>3</sub> (CH <sub>2</sub> ) <sub>6</sub> COOH	8:0
Capric acid	CH <sub>3</sub> (CH <sub>2</sub> ) <sub>8</sub> COOH	10:0
Lauric acid	CH <sub>3</sub> (CH <sub>2</sub> ) <sub>10</sub> COOH	12:0
Tridecanoic acid	CH <sub>3</sub> (CH <sub>2</sub> ) <sub>11</sub> COOH	13:0
Myristic acid	CH <sub>3</sub> (CH <sub>2</sub> ) <sub>12</sub> COOH	14:0
Pentadecanoic acid	CH <sub>3</sub> (CH <sub>2</sub> ) <sub>13</sub> COOH	15:0
Palmitic acid	CH <sub>3</sub> (CH <sub>2</sub> ) <sub>14</sub> COOH	16:0
Margaric acid	CH <sub>3</sub> (CH <sub>2</sub> ) <sub>15</sub> COOH	17:0
Stearic acid	CH <sub>3</sub> (CH <sub>2</sub> ) <sub>16</sub> COOH	18:0
Arachidic acid	CH <sub>3</sub> (CH <sub>2</sub> ) <sub>18</sub> COOH	20:0
Benhenic acid	CH <sub>3</sub> (CH <sub>2</sub> ) <sub>20</sub> COOH	22:0
Lignoceric acid	CH <sub>3</sub> (CH <sub>2</sub> ) <sub>22</sub> COOH	24:0
Cerotic acid	CH <sub>3</sub> (CH <sub>2</sub> ) <sub>24</sub> COOH	26:0

- 일반적인 지질은 트리글리세라이드(triglyceride)와 지방산(fatty acid)으로 구성되어 있으며 곤충(동애등에) 지질은 전산가가 2.7 mgKOH/g으로 낮아 대부분이 트리글리세라이드로 구성되어 있었고 곤충 지질의 트리글리세라이드는 수열 공정을 통해 지방산으로 전환한 다음에 감압증류를 통해 고부가 지방산(C<sub>12</sub> FA)을 분리하였다.

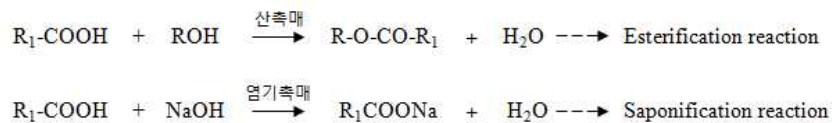


< 트리글리세라이드의 수열전환 반응 >



< 곤충 지질로부터 바이오디젤 합성 방법 >

- 고부가 지방산이 분리되고 남은 부산물 지질(C<sub>13</sub>+ 지방산)은 에스테르화 반응을 통해 FAME로 전환되고 고순도화 과정을 거쳐 96.5% 이상인 바이오디젤이 생산하였다.
- 트리글리세라이드로 이루어진 지질은 염기 촉매를 사용하고 지방산이 많이 포함된 지질은 산촉매를 사용하였다. 지방산은 산촉매를 사용하면 FAME로 전환되나 염기촉매를 사용하면 비누화 반응으로 soap을 형성한다. 수열반응으로 트리글리세라이드를 지방산으로 전환하였기 때문에 지방산으로 이루어진 부산물 지질도 산촉매인 황산을 이용하여 에스테르화 반응을 최적화하였다.



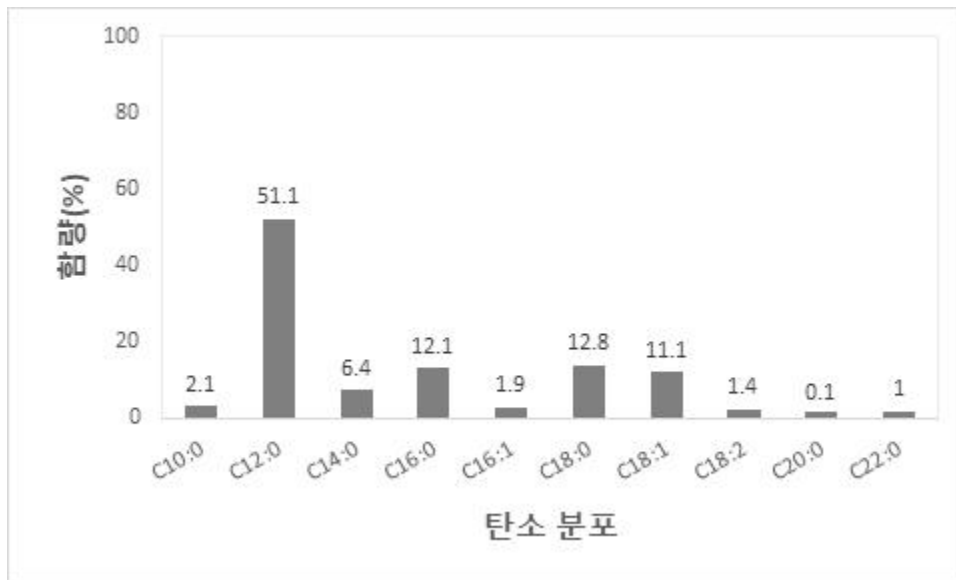
< 지방산의 촉매에 따른 전환반응 특성 >

- 동·식물성 지질은 C<sub>18:1</sub> > C<sub>16:0</sub> > C<sub>18:0</sub> 순으로 지방산 함량이 높고 식물성 유지의 코코넛, 팜핵유는 C<sub>12:0</sub> > C<sub>14:0</sub>, 팜유는 C<sub>16:0</sub>, 폐식용유는 C<sub>18:2</sub> > C<sub>18:1</sub> 순으로 지방산 함량이 높으나 곤충(동애등에) 지질은 C<sub>12:0</sub> > C<sub>16:0</sub> > C<sub>18:1</sub> 순으로 지방산 함량이 높다.

< 곤충 지질의 탄소수 분포 비교 >

Carbon distribution	대두유	폐식용유	팜유	코코넛유	팜핵유	곤충
8:0				6	3	
10:0				5	4	2.1
12:0				44	52	51.1
14:0			1	17	16	6.4
16:0	10	16	18	9	7	12.1
16:1		1				1.9
18:0	5	4	5	3	1	12.8
18:1	22	33	37	7	11	11.1
18:2	51	37	9	2	2	1.4
18:3	7	5	1	1	1	
20:0						0.1
22:0						1.0
Saturated	15	20	24	84	83	85.6
Unsaturated	80	76	47	10	14	14.4

- 곤충(동애등에) 지질에는 고부가 지방산인 라우릭산이 51.1% 함유되었으며 불포화지방산이 14.4%, 포화지방산이 85.6%를 나타내었다.



< Crude 곤충(동애등에) 지질의 탄소수 분포 >

- 곤충은 동애등에로 지질의 색은 황색을 나타냈으면 수열반응 후의 색은 갈색을 나타내었다. 감압증류를 통해 분리된 고부가 지방산은 옅은 노란색으로 투명하여 불순물이 없이 분리가 잘 되었음을 알 수 있었고 부산물 지질(C<sub>13</sub>+ 지방산)은 갈색을 나타내어 고형의 불순물이 포함되어 있음을 알 수 있었다.



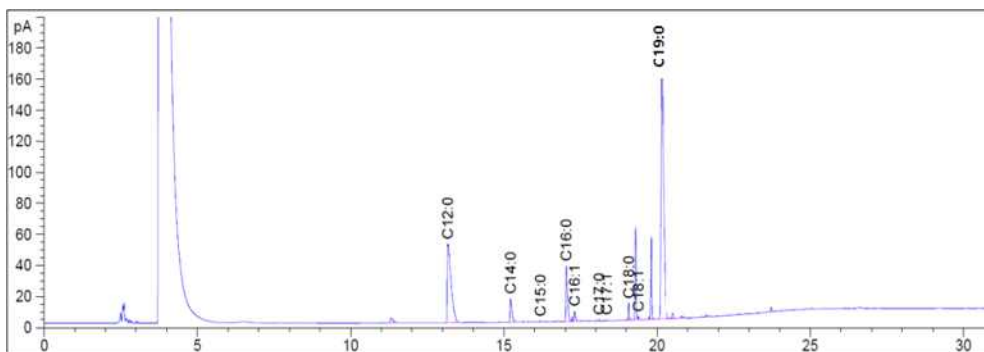
< 곤충지질의 고부가 지방산 분리 >

- 주관기관인 그린테코에서 제공한 곤충 지질, 전환 지질, C<sub>12</sub> 지방산, C<sub>13+</sub> 지방산의 전산가, 수분 함량 등을 분석하였다.  
Crude 곤충 지질의 전산가는 2.7 mgKOH/mg으로 트리글리세라이드가 대부분으로 바이오디젤로 전환하려면 염기촉매를 사용한다.

< 곤충 지질 특성 >

항목	곤충 지질	
	전환(TG→FA) 전	전환(TG→FA) 후
전산가(mg KOH/g)	2.7	223.9
유동점(°C)	17	20
회분(%)	0.17	0.13
수분(%)	0.08	0.12

- 하지만, 곤충 지질에서 C<sub>12</sub> 지방산을 분리하기 위해 수열반응을 수행하였고 수열반응 후의 전환 지질의 전산가는 223.9 mg KOH/g으로 대부분의 트리글리세라이드가 지방산으로 전환 되었음을 확인할 수 있었다.
- 회분 함량은 수열분해 반응 후의 수세 과정에서 금속분 및 불순물이 제거되어 감소하였고 수분은 과량의 반응물로 첨가된 후에 미량 남아 있어 증가하였다.



< 수열분해 전환 후 지질의 지방산 조성 >

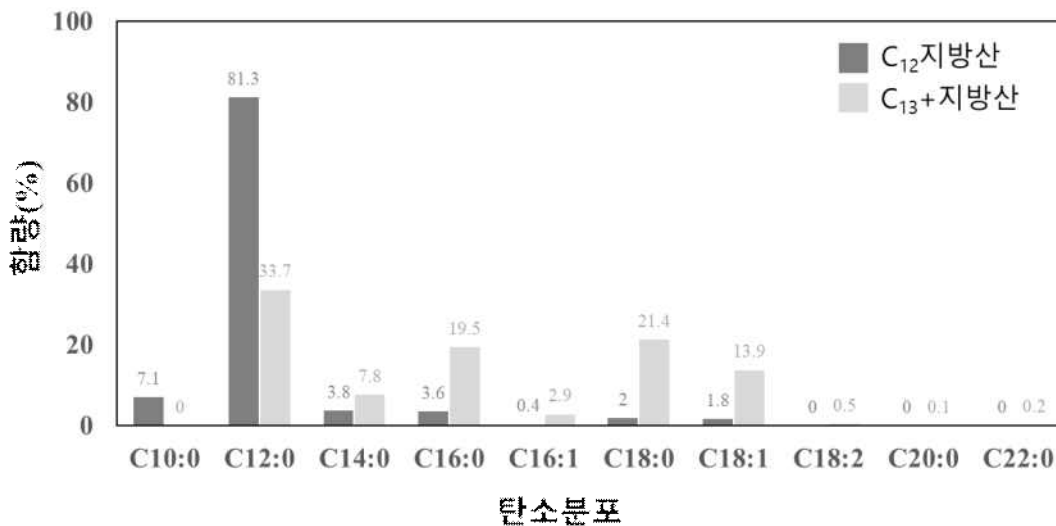
- 또한, 지방산으로 전환 후에 감압증류를 통해 C<sub>12</sub> 지방산(C<sub>12</sub> FA)과 C<sub>13</sub> 이상 지방산(C<sub>13+</sub> FA)을 분리하였고 이에 대한 특성을 분석하였다.

- C<sub>12</sub> 지방산은 전산가가 223.9에서 263.7 mgKOH/g으로 증가하였고 C<sub>13</sub> 이상 지방산은 192.9 mgKOH/g으로 감소하였다. 이는 C<sub>13</sub> 이상 지방산에는 전환되지 않은 트리글리세라이드와 고형 불순물 등이 포함되어 있어 상대적으로 전산가가 낮았음. 또한, 불순물에 의해 회분 함량이 증가하였다.

< 고부가 지방산 분리 지질 특성 >

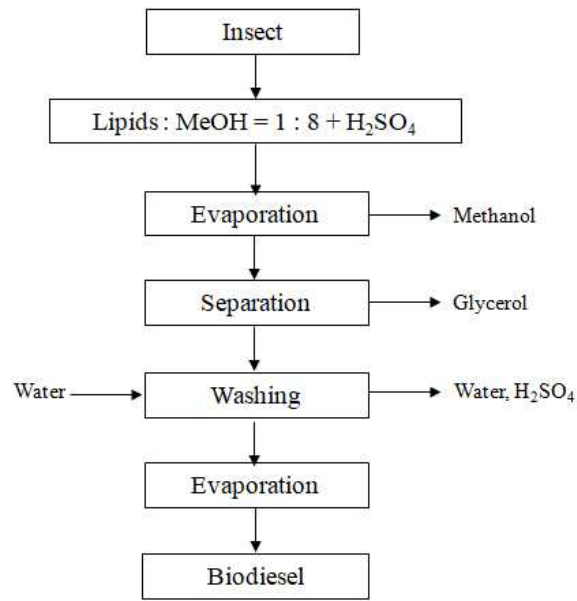
항목	곤충 지질	
	C <sub>12</sub> 지방산	C <sub>13+</sub> 지방산
전산가(mg KOH/g)	263.7	192.9
유동점(°C)	36	17
회분(%)	0.01미만	0.16
수분(%)	0.01미만	0.01미만

- 감압증류를 통해 분리된 C<sub>12</sub> 지방산(C<sub>12</sub> FA)과 C<sub>13</sub> 이상 지방산(C<sub>13+</sub> FA)의 가스크로마토그램을 분석하였다. 분리 전에는 C<sub>12</sub> 지방산 함량이 51.1%이었고 분리 후에는 33.7%를 나타내어 약 70%가 분리되었음을 확인하였다.
- C<sub>12</sub> 지방산의 가스크로마토그램 패턴에서도 C<sub>12</sub> 지방산이 다른 C<sub>14</sub>, C<sub>16</sub>, C<sub>18</sub> 지방산 피크보다 상대적으로 큰 것을 확인할 수 있었고 약 81.3%의 함량을 나타내었다. C<sub>13</sub> 이상 지방산에는 C<sub>12</sub> 지방산이 33.7%로 30%가 남아 있음을 확인하였다.



< 고부가 지방산 분리 후 지방산 조성 >

- 바이오디젤 전환 반응은 지질 원료의 산가에 의해 반응조건이 달라지고 일반적으로 고산가 원료는 산촉매(황산, 질산 등), 저산가 원료는 염기촉매(수산화나트륨, 수산화칼륨 등)를 사용함. 본 연구에 사용되는 곤충 부산물 지질은 지방산이 대부분으로 전산가가 192.9 mgKOH/g으로 산촉매인 황산을 이용하여 바이오디젤 합성반응을 수행하였다.



< 부산물 지질을 활용한 바이오디젤 합성 방법 >

- 부산물 지질은 황산 촉매를 사용하여 지질: 메탄올 비율을 1: 4, 6, 8, 10로 하고 촉매(0.03, 0.05, 0.07, 0.09), 반응온도(60, 65, 70, 75 °C), 반응시간(3, 6, 9, 12)에 따라 에스테르화 반응 최적화를 수행하였다.



< 바이오디젤 전환반응 장치 >

- 바이오디젤 합성반응에서 촉매량, 메탄올량, 반응시간, 반응온도가 증가할수록 수율은 증가하는 경향을 나타냈으며 반응조건 최적화를 위해 수율이 90% 이상인 조건을 찾았다.

< 바이오디젤 합성반응(촉매량) 최적화 >

지질(g)	메탄올(g)	촉매(g)	반응온도(°C)	반응시간(h)	수율(%)
5	40	0.15	60	6	61.3
5	40	0.25	60	6	87.7
5	40	0.35	60	6	93.8
5	40	0.45	60	6	94.2

< 바이오디젤 합성반응(메탄올) 최적화 >

지질(g)	메탄올(g)	촉매(g)	반응온도(°C)	반응시간(h)	수율(%)
5	20	0.25	65	6	59.8
5	30	0.25	65	6	78.2
5	40	0.25	65	6	91.7
5	50	0.25	65	6	91.9

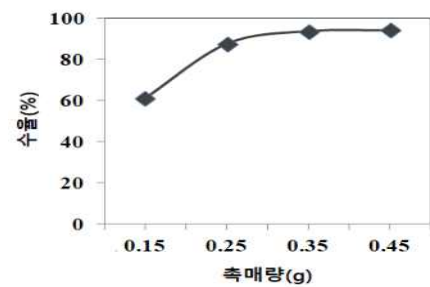
< 바이오디젤 합성반응(시간) 최적화 >

지질(g)	메탄올(g)	촉매(g)	반응온도(°C)	반응시간(h)	수율(%)
5	40	0.25	65	3	82.5
5	40	0.25	65	6	91.7
5	40	0.25	65	9	92.4
5	40	0.25	65	12	91.9

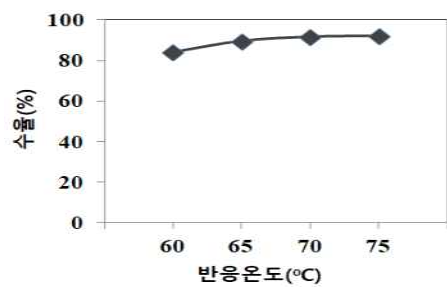
< 바이오디젤 합성반응(온도) 최적화 >

지질(g)	메탄올(g)	촉매(g)	반응온도(°C)	반응시간(h)	수율(%)
5	40	0.15	60	9	84.4
5	40	0.15	65	9	89.7
5	40	0.15	70	9	91.7
5	40	0.15	75	9	92.1

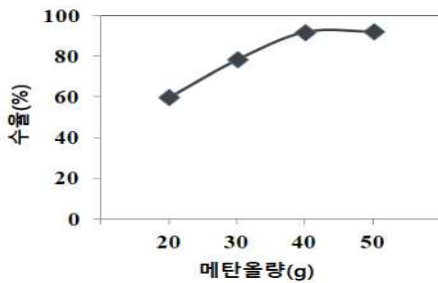
- 부산물 지질: 메탄올: 반응시간: 반응온도 = 5g: 40g: 6h: 60 °C인 경유에 황산촉매는 0.35 g에서 최적화되었으며 메탄올량, 반응온도, 반응시간에 대해 최적화를 실시하였다.



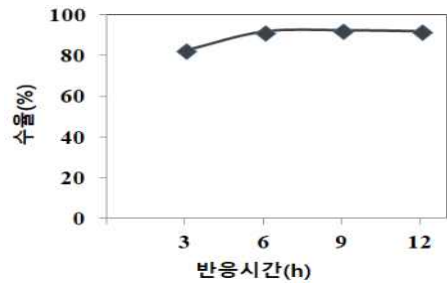
(a) 촉매량 변화



(b) 반응온도 변화



(c) 메탄올량 변화



(d) 반응시간 변화

< 바이오디젤 합성반응조건 최적화 >

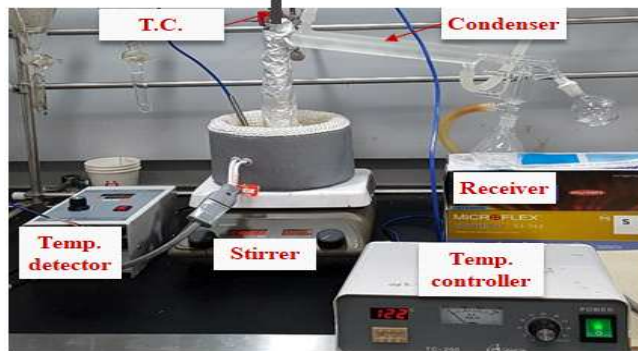
## 나. 곤충 바이오디젤의 분리정제를 통한 고순도화 공정 기술(FAME 함량 96.5% 이상)

- 부산물 지질을 통해 합성된 바이오디젤은 FAME 함량 96.5% 이상의 품질기준을 맞추기 위해 세척 및 정제 과정을 거쳐야 한다. 합성반응 후에 과량으로 첨가된 메탄올은 감압증류로 제거하였고 부산물인 글리세롤은 밀도차에 의해 정제하여 분리하였다.



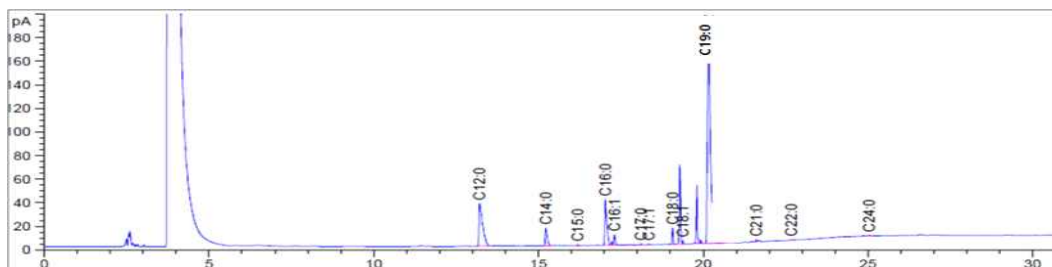
< 바이오디젤 고순도화 공정 >

- 촉매로 사용된 황산은 물로 세척 제거하고 마지막으로 미반응 지질 및 고형 불순물을 제거하기 위해 감압증류하여 최종의 바이오디젤(FAME 96.5% 이상)을 얻는 공정으로 최적화하였다.



< 바이오디젤 고순도화 장치 >

- 고순도화를 위한 감압증류는 교반을 하면서 250 °C까지 가열하였고 0.01 bar까지 감압하였음. 기화된 바이오디젤은 컨덴서를 거쳐 receiver에서 받아지고 약 90%의 바이오디젤을 얻을 수 있었다.



< 고순도화 공정 후의 FAME 분포 >

- 고순도화 공정을 거친 후의 가스크로마토그램의 패턴을 통해 C<sub>20</sub> FAME 이후의 피크가 감소되었음을 확인하였고 미반응 지질 및 불순물이 제거되어 FAME 함량이 97.2%까지 증가한 것을 확인하였다.



**다. 부산물 지질을 활용한 바이오디젤의 국내 품질기준(KS M 2965) 적용 품질 특성 분석**

- 국내 유통되고 있는 바이오디젤(100%)는 RFS 제도에 의해 자동차용 경유에 3.5% 의무혼합되어 사용되고 있으며 2030년까지 5.0%로 상향 예정이다.
- 바이오디젤은 석유 및 석유대체연료 사업법 시행령 제5조의 석유대체연료 종류로 명문화되어 있으며 동·식물성 유지를 메탄올과 반응하여 생성된 FAME가 96.5% 이상인 경우로 정의하고 있음. 또한, 동 법과 KS M 2965의 품질기준을 만족해야 한다.

< 국내 바이오디젤 품질기준(KS M 2965) >

항목	구분	품질기준	시험방법
지방산메틸 에스테르함량(무계%)		96.5 이상	KS M 2413, EN 14103
인화점(°C)		120 이상	KS M ISO 2719
동점도(40°C, mm <sup>2</sup> /s)		1.9 이상 ~ 5.0 이하	KS M ISO 3104
잔류탄소분(무계%)		0.1 이하	KS M ISO 10370
황분(mg/kg)		10 이하	KS M 2027
회분(무계%)		0.01 이하	KS M ISO 6245
동판부식(50°C, 3h)		1 이하	KS M ISO 20160
필터막힘점(°C)		0 이하	KS M 2411
밀도(15°C, kg/m <sup>3</sup> )		860 이상 ~ 900 이하	KS M 2002
수분(무계%)		0.05 이하	KS M ISO 12937
고형불순물(mg/kg)		24 이하	EN 12662
전산가(mg KOH/g)		0.50 이하	KS M ISO 6618
총 글리세롤(무계%)		0.24 이하	KS M 2412
모노글리세라이드(무계%)		0.80 이하	KS M 2412
디글리세라이드(무계%)		0.20 이하	KS M 2412
트리글리세라이드(무계%)		0.20 이하	KS M 2412
유리글리세롤(무계%)		0.02 이하	KS M 2412
산화안정도(110°C, h)		6 이상	EN 14112
메탄올(무계%)		0.2 이하	EN 14110
알칼리 금속 (mg/kg)	(Na + K)	5 이하	EN 14108, 14109
	(Ca + Mg)	5 이하	EN 14538
인(mg/kg)		10 이하	EN 14107

- 바이오디젤 내의 FAME 함량 측정은 EN 14103에 따라 C<sub>6</sub> ~ C<sub>24</sub> FAME의 합을 말하며 시료에 내부표준물질인 nonadecanoic acid methyl ester(FAME 19:0)를 넣어 캐필러리 컬럼 (Capillary column)으로 분석하였다.

< FAME 함량 분석 조건 >

항목	EN14103
적용범위	C <sub>6</sub> ~ C <sub>24</sub> 까지의 FAME (팜핵유, 코코넛유 BD 측정 가능)
내부표준물질	Nonadecanoic acid methyl ester(C <sub>19</sub> methyl ester)를 시료에 첨가하여 분석
시료 전처리	mg - Nonadecanoic acid methyl ester 100 - 시료 100 mg - Toluene 10 ml로 희석
컬럼	Polyethylene glycol 정지상으로 코팅된 것 (Carbowax 20M, DBwax, CPwax 등) - 길이: 30 m - 내부직경: 0.25 mm - 필름두께: 0.25 um
운반가스	- 수소 또는 헬륨 - 압력: 30 ~ 100 kPa - 유량: 1 ~ 2 ml/min
오븐 프로그램	60 °C(2min) → 10 °C/min → 200 °C → 5 °C/min → 240 °C(7min)

$$\text{FAME 함량} = \frac{\sum A - A_{EI}}{A_{EI}} \times \frac{W_{EI}}{W} \times 100$$

∑A: C<sub>600</sub> ~ C<sub>2411</sub> 까지의 FAME 면적의 합

A<sub>EI</sub>: Methyl nonadecanoate 피크의 면적

W<sub>EI</sub>: 시료에 첨가된 nonadecanoate 의 무게(mg)

W: 시료의 무게(mg)

< 바이오디젤 내의 FAME 함량 계산식 >

- 부산물 곤충 지질을 활용하여 합성한 바이오디젤은 국내 바이오디젤 품질기준(KS M 2965)의 주요항목에 대해 분석하였고 FAME 함량은 감압증류 공정을 추가하여 97.2%로 만족하였다. 바이오디젤의 불순물과 관련된 잔류탄소, 회분, 알카리 금속 등의 항목도 만족하였고 정제 공정과 관련한 전산가, 황분, 수분 등의 항목도 만족하여 주요항목을 만족하였다. 또한 기존의 식물성 유래 바이오디젤과 비교하였을 때, 동점도, 밀도, 수분 등 연료 품질은 거의 유사한 특성을 보인다. 그러나, 황분은 곤충 바이오디젤이 높은 경향을 나타내는데, 이는 촉매로 황산을 사용하고, 남아있는 황분에 의한 것으로 수세 및 증류를 통해 제거 가능하다. 기존 원료별 바이오디젤과 큰 품질 차이를 보이지 않아 바이오디젤 원료로 곤충 지질의 사용 가능성을 확인할 수 있다.

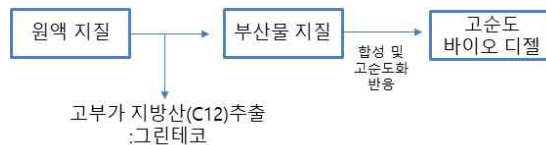
구분 항목	품질기준 (KS M 2965)	곤충 바이오티젤	대두유	폐식용유	유채유	자트로파유
지방산메틸 에스테르함량(무계%)	96.5 이상	97.2	98.2	97.6	97.4	98.2
동점도(40℃, mm <sup>2</sup> /s)	1.9 이상 ~ 5.0 이하	4.2	4.0	4.2	4.4	4.4
잔류탄소분(무계%)	0.1 이하	0.1 미만	0.1 미만	0.1 미만	0.1 미만	0.1 미만
황분(mg/kg)	10 이하	6.0	0.7	1.5	2.0	2.2
회분(무계%)	0.01 이하	0.01 미만	0.01 미만	0.01 미만	0.01 미만	0.01 미만
밀도(15℃, kg/m <sup>3</sup> )	860 이상 ~ 900 이하	875	886	884	885	881
수분(무계%)	0.05 이하	0.01 미만	0.01	0.01	0.02	0.04
전산가(mg KOH/g)	0.50 이하	0.16	0.24	0.32	0.36	0.45

< 곤충 유래 및 원료별 바이오티젤 품질 특성 >

## 라. 시제품(스케일업) 곤충 유래 바이오티젤의 연료검증

### 1) 부산물 지질(C<sub>13</sub> 이상 지방산(C<sub>13</sub>+ FA))의 특성 분석

- 그린테코로부터 곤충 원액 지질에서 고부가 지방산(C<sub>12</sub> 지방산)이 분리된 부산물 지질을 전달 받았다. 고부가 지방산은 발효사료, 향비만제 등 기능성 제품 생산에 이용하며, 고부가 지방산을 제외한 부산물 지질을 활용해 바이오티젤을 합성하여 연료 검증하고자 한다.



- 곤충 지질의 트리글리세라이드(triglyceride)에서 지방산(fatty acid)으로 전환 유무 확인 및 에스테르화 반응인자인 촉매, 반응시간, 반응온도 등의 조건들은 지질 특성(전산가, 수분 등)에 따라 달라지므로 지질 원료 분석이 필요하다.
- 부산물 지질은 갈색을 나타내며, 실온에서 약간 굳은 상태를 보인다.



<기능성 지질이 추출된 부산물 지질>

- 일반적인 지질은 트리글리세라이드(triglyceride)와 지방산(fatty acid)으로 구성되어 있으며 곤충(동애등에) 지질은 전산가가 2.7 mgKOH/g으로 낮아 대부분이 트리글리세라이드로 구성되어 있음. 부산물 지질의 전산가를 분석한 결과, 169.97mg KOH/g로 전산가가 크게 높아진 것으로 보아 곤충 지질의 트리글리세라이드는 수열 공정을 통해 지방산으로 전환됨을 확인하였다.
- 곤충 지질의 트리글리세라이드를 지방산으로 전환하는 수열공정에 황산이 사용됨에 따라 부산물 지질에 남아있는 황산에 의해 높은 황분값을 나타내었다.



<스케일업에 사용된 부산물 지질의 품질 특성>



항목	구분	분석 결과
전산가(mg KOH/g)		169.97
황분(mg/kg)		190
수분(무게 %)		0.02
회분(무게 %)		0.06

## 2) 바이오디젤 전환

- 바이오디젤 전환 반응은 지질 원료의 산가에 의해 반응조건이 달라지며 일반적으로 고산가 원료는 산 촉매(황산, 질산 등), 저산가 원료는 염기촉매(수산화나트륨, 수산화칼륨 등)를 사용함. 부산물 지질은 전산가가 169.97 mgKOH/g으로 지방산이 대부분을 차지하고 있어 산 촉매인 황산을 이용하여 바이오디젤 합성반응을 수행하였다.

### 가) Crude 바이오디젤 합성

과정	내용	사진
1. 합성 반응	지질:메탄올=1:8, 황산 7%, 반응시간: 10시간 반응온도: 110℃	
2. 감압증류	감압증류를 통한 메탄올 제거	

3. 수세	증류수를 첨가하여 수세 3회 이상 진행 (글리세롤, 황분 등 제거)	
4. 감압증류	수세 과정 중 남아있는 수분 제거	-
5. Crude 바이오디젤	감압증류 후 바이오디젤 - 미반응된 바이오디젤이 있어 FAME 함량 부족 (약 80 ~ 90% 정도의 FAME 함량)	

- 부산물 지질과 메탄올 1:8 비율, 촉매로 황산을 첨가하여 반응 시간, 반응 온도를 충분히 하여 반응시켰다. 합성 후 감압을 통하여 메탄올을 제거한 후, 증류수를 이용한 수세를 통해 합성으로 인해 생긴 글리세롤, 황분을 제거시켰다. 수세 과정 중 남아있을 수 있는 수분을 감압증류를 통해 최종적으로 제거함으로써 Crude 바이오디젤을 합성하였다.

#### 나) 정제를 통한 바이오디젤 고순도화

- Crude 바이오디젤 내의 불순물 제거를 위해 감압조건에서 온도를 증가시키면서 고순도화를 수행하였다.
  - ① 100℃에서 충분히 수분을 제거한 후, 30mmHg까지 천천히 압력을 낮춰 감압상태를 유지시킨다.
  - ② 압력의 유지가 안정되면 150℃까지 10℃ 단위로 온도 상승시킨다.
  - ③ 증류관의 이슬이 맺히는 것 / 증류관 표면 온도를 통해 증류 상태를 확인하여 증류되기 시작하면 5℃ 단위로 온도를 상승시킨다.(170℃: 증류되기 시작, 175℃: 증류관의 중간부분까지 증류, 180℃: 고순도화 바이오디젤이 받아지기 시작)
  - ④ 바이오디젤이 받아지기 시작하면 2~3℃단위로 온도를 상승시키면서 고순도화 바이오디젤을 얻는다.
  - ⑤ Crude 바이오디젤에서 불순물(피치) 10% 정도를 남기고 90%를 증류함으로써 고순도화 실시하여 FAME 함량 96.5% 이상 달성하였다.



(a) 고순도화 장치



(b) 정제 후 바이오디젤

마. 생산된 곤충 유래 바이오디젤과 석유계 경유와 혼합한 연료의 혼합 영향성 평가

1) 적정 시험방법 검토 및 바이오디젤(100%) 전항목 분석

가) 지방산메틸에스테르(FAME) 함량 시험방법 검토

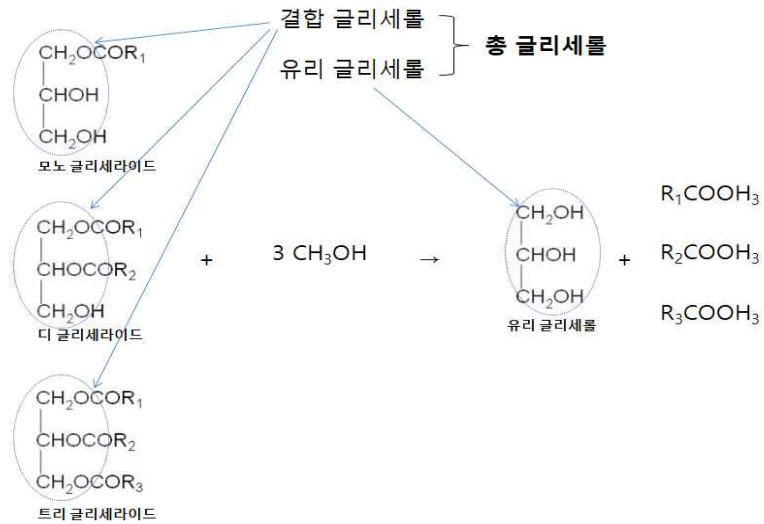
- 바이오디젤은 석유 및 석유대체연료 사업법에 따라 품질기준을 만족해야 한다. 지방산메틸에스테르 함량(무게%) 시험방법은 KS M 2413, EN 14103의 시험방법이 있다. 두 시험방법 모두 시험 목적은 동일하지만, EN 14103의 적용 범위가 더 넓고 표준물질로 사용되는 Nonadecanoic acid methyl ester(C19:0)의 순도를 보정하여 FAME 함량을 계산하는 점이 다르다.
- KS M 2413 시험방법은 식물성 원료로 제조된 바이오디젤에 적용해야 하므로 곤충 부산물 지질을 분석하기 위해 EN 14103의 방법으로 FAME를 분석하였다.

<지방산메틸에스테르 함량 시험방법 비교>

항목	KS M 2413	EN 14103
시험 목적	FAME의 에스테르 함량 90 무게 % 이상 및 리놀렌산 함량 1~15 무게 % 확인	
적용 범위	C <sub>14</sub> ~ C <sub>24</sub> 의 메틸에스테르를 함유하는 FAME에 적합	C <sub>6</sub> ~ C <sub>24</sub> 의 메틸에스테르를 함유하는 FAME에 적합
사용 시약	1. 헵탄 2. 메틸헵타데카노이트 3. 메틸헵타데카노이트: 10mg/ml 용액: 50mL 부피플라스크에 메틸헵타데카노이트 약 500mg을 넣고 헵탄으로 눈금까지 채움	1. 톨루엔 2. Nonadecanoic acid methyl ester(C <sub>19:0</sub> )
시료 처리 과정	시료 약 250mg을 무게를 단 후, 메틸헵타데카노이드 용액 5mL 주입	시료 약 250mg에 Nonadecanoic acid methyl ester를 약 100mg넣은 후, 톨루엔 10mL 주입
에스테르 함량 계산 방법	$C = \frac{(\sum A) - A_{EI}}{A_{EI}} \times \frac{C_{EI} \times V_{EI}}{m} \times 100\%$ <p> <math>\sum A</math>: C<sub>14</sub>의 메틸에스테르부터 C<sub>24:1</sub>까지의 메틸에스테르까지의 피크 전체 면적  <math>A_{EI}</math>: 메틸헵타데카노이드에 해당하는 피크 면적  <math>C_{EI}</math>: 사용한 메틸헵타데카노이드 용액의 농도(mg/mL)  <math>m</math>: 시료의 무게(mg)                 </p>	$C = \frac{\sum(A_x \times R_x) - A_{EI}}{A_{EI}} \times \frac{W_{EI}}{W} \times P \times 100$ <p> <math>\sum A_x</math>: C<sub>6:0</sub>부터 C<sub>24:1</sub>까지의 메틸에스테르까지의 피크 전체 면적  <math>R_x</math>: 내부표준물질(C<sub>19:0</sub>)에 상대적인 TCF의 보정계수  <math>A_{EI}</math>: Nonadecanoic acid methyl ester에 해당하는 피크 면적  <math>P</math>: Nonadecanoic acid methyl ester의 순도  <math>W_{EI}</math>: 내부표준물질로 사용된 Nonadecanoic acid methyl ester 무게  <math>W</math>: 시료의 무게                 </p>

나) 총 글리세롤 시험방법 검토

- 총 글리세롤이란 유리 및 결합된 글리세롤의 합으로 결합글리세롤은 모노, 디, 트리글리세라이드의 글리세롤 부분이다.



- 바이오디젤의 유리 및 총 글리세롤 정량을 위해 KS M 2421에 따라 분석하며, 시료에 2개의 내부표준물질 및 N-Methyl-N-trimethylsilyltrifluoroacetamide(MSTFA)를 첨가하는 전처리 과정을 통해 분석한다.

<글리세롤 분석 조건>

항목	KS M 2421
적용범위	<ul style="list-style-type: none"> <li>- BD100 바이오디젤 메틸 에스테르의 유리 및 총 글리세롤 정량</li> <li>- 검출한계: 유리글리세롤 0.005 ~ 0.05 무게%</li> <li>총 글리세롤 0.05 ~ 0.5 무게%</li> <li>- 코코넛 및 팜핵유와 같은 라우르 오일에서 얻어지는 식물성 메틸 에스테르 기름에는 적용하지 않음</li> </ul>
내부표준물질	<ul style="list-style-type: none"> <li>- 피리딘과 N-Methyl-N-trimethylsilyltrifluoroacetamide(MSTFA) 존재 하에 바이오디젤을 silyated유도체로 변환하여 분석</li> <li>- 2개의 내부표준물질(부탄트리올, 트리카프린), 4개의 표준물질(글리세롤, 모노올레인, 디올레인, 트리올레인)으로 검량선을 작성,</li> </ul>
시료 전처리	시료 100mg에 2개의 내부표준물질 및 MSTFA 100 $\mu$ l를 첨가하여 15~20분 동안 상온에서 정치 후 8mL의 헵탄 첨가
컬럼 온도 프로그램	50°C(1min) → 15°C/min → 180°C → 7°C/min → 230°C → 30°C/min → 280°C(10min)
검출기	불꽃이온화 검출기, 온도: 380°C
운반가스	수소 또는 헬륨, 유량 3mL/min

- 각각의 평균변환인자가 곱해진 결합글리세롤과 유리 글리세롤의 합을 총 글리세롤이라 한다.

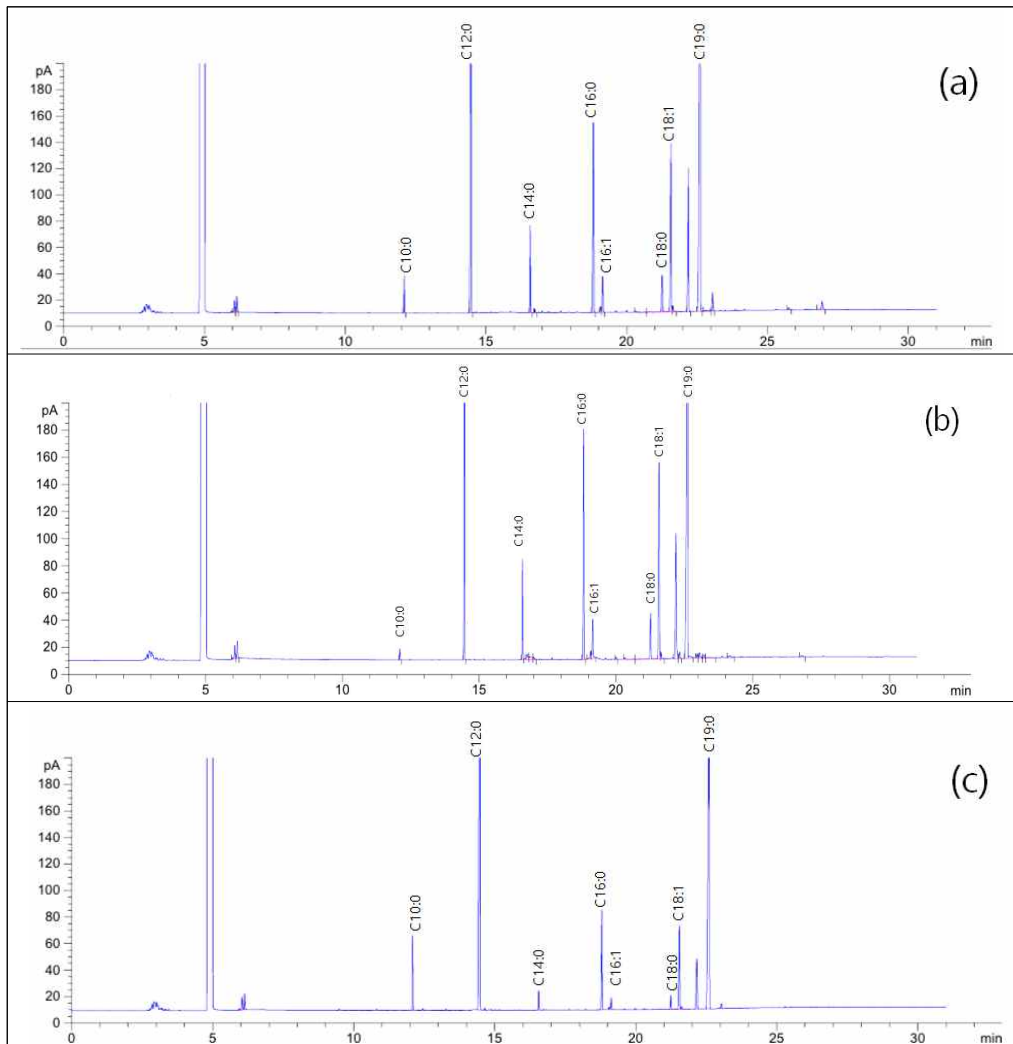
<시험 결과의 계산>

글리세롤	각각의 글리세라이드	총 글리세롤
$G = (a_g \times A_g / A_{is1} + b_g) \times W_{is1} / W$	$G_{li} = ( a_{oi} \times A_{gil} / A_{is2} + b_{oi} ) \times W_{is2} / W$	총 글리세롤 = 유리 글리세롤 + $\Sigma$ ( 각각의 글리세롤 함량 X 평균변환인자 )
G: 시료 중의 글리세롤 무게% A <sub>g</sub> : 글리세롤의 피크 면적 A <sub>is1</sub> : 내부 표준물질1(부탄트리올)의 피크 면적 W <sub>is1</sub> : 내부 표준물질1(부탄트리올)의 무게(mg) W: 시료의 무게(mg) a <sub>g</sub> : 검량 함수의 기울기 b <sub>g</sub> : 검량 함수의 절편	G <sub>li</sub> : 시료에 함유된 각각의 글리세라이드 무게 % A <sub>gil</sub> : 각각의 글리세라이드의 피크 면적 A <sub>is2</sub> : 내부표준물질 2(트리카프린)의 피크 면적 W <sub>is2</sub> : 내부표준물질 2(트리카프린)의 무게(mg) W: 시료의 무게(mg) a <sub>oi</sub> : 모노-, 디-, 트리올레인의 검량 함수 기울기 b <sub>oi</sub> : 모노-, 디-, 트리올레인의 검량 함수의 절편	평균변환인자 - 모노글리세라이드: 0.2591 - 디 글리세라이드: 0.1488 - 트리글리세라이드: 0.1044



다) 바이오디젤(100%) 전항목 분석

- 바이오디젤 합성에 사용된 부산물 지질은 고부가 지질(C<sub>12</sub> FAME)이 추출됨으로 인하여 C<sub>12</sub> 이상의 FAME 분포 비율이 증가함을 확인할 수 있다.

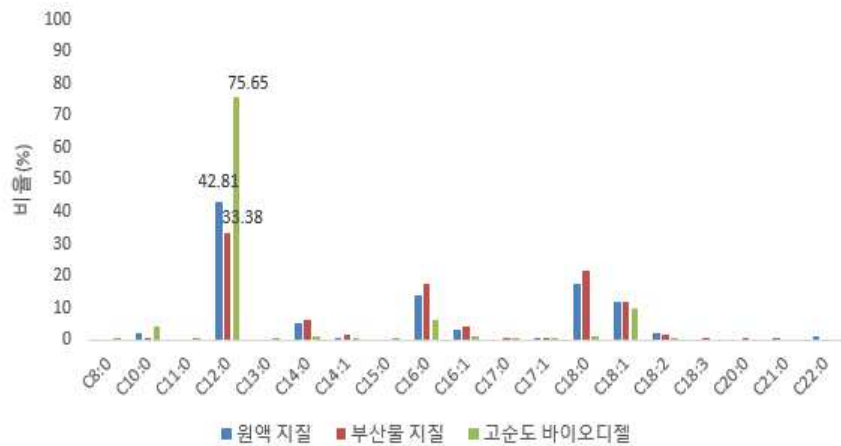


<FAME의 지방산 조성 비교: (a) 원액 지질, (b) 부산물 지질, (c) 고순도 바이오디젤 >

- 지방산메틸에스테르 함량은 원액 지질 90.51%, 부산물 지질 82.12%, 고순도 바이오디젤 97.7% 이다. Crude 바이오디젤을 정제 고순도화하여 FAME의 함량이 증가됨을 확인할 수 있었다. 또한, FAME 분포 비율 확인 시, 부산물 지질은 원액의 고부가 지방산이 제거되면서 원액 대비 C<sub>12</sub> 이상의 비율 증가를 확인하였다.

<FAME 분포 비율 비교>

분포	원액 지질	부산물 지질	고순도 바이오디젤(시제품)
C8:0	-	-	0.08
C10:0	2.29	0.72	4.35
C11:0	-	-	0.15
C12:0	42.81	33.38	75.65
C13:0	-	-	0.27
C14:0	5.29	6.22	1.02
C14:1	0.21	1.61	0.05
C15:0	-	-	0.04
C16:0	13.75	17.56	6.23
C16:1	2.95	4.32	1.00
C17:0	-	0.17	0.15
C17:1	0.18	0.17	0.08
C18:0	17.38	21.33	0.99
C18:1	12.00	11.90	9.58
C18:2	1.88	1.52	0.38
C18:3	-	0.39	-
C20:0	-	0.51	-
C21:0	0.23	-	-
C22:0	1.02	-	-
합계	100.00	100.00	100.00



- 국내 바이오디젤 품질기준에 따라 곤충 유래 바이오디젤을 분석하였다. 고순도 바이오디젤 FAME 함량 97.7%는 품질기준인 96.5% 이상을 만족하는 결과이며, 전산가 0.5mg KOH/g, 수분 0.019무게% 등 산화안정도를 제외한 모든 항목의 기준에 만족하였다. 산화안정성은 항산화제 등의 첨가제를 사용하여 해결할 수 있으며, 첨가제 TBHQ(tertiary-butyl hydroquinone) 260mg/kg을 첨가함으로써 산화안정도 1.9h에서 8.9h로 증가하여 모든 품질 기준을 만족하였다.

<고순도 바이오디젤의 품질 특성>

구 분	항 목	품질기준	시험방법	시험 결과	만족 여부
	지방산메틸 에스테르함량 (무계%)	96.5 이상	KS M 2413, EN 14103	97.7	만족
	인화점(℃)	120 이상	KS M ISO 2719	127.0	만족
	동점도(40℃, mm <sup>2</sup> /s)	1.9 이상 ~ 5.0 이하	KS M ISO 3104	2.644	만족
	산류탄소분(무계%)	0.1 이하	KS M ISO 10370	0.1 미만	만족
	황분(mg/kg)	10 이하	KS M 2027	1.6	만족
	회분(무계%)	0.01 이하	KS M ISO 2645	0.002	만족
	동판부식(50℃, 3h)	1 이하	KS M 2160	1	만족
	필터막힘점(℃)	0 이하	KS M 2411	-6	만족
	밀도(15℃, kg/m <sup>3</sup> )	860 이상 ~ 900 이하	KS M 2002	874.9	만족
	수분(무계%)	0.05 이하	KS M ISO 12937	0.019	만족
	고형불순물(mg/kg)	24 이하	EN 12662	9.5	만족
	전산가(mg KOH/g)	0.50 이하	KS M ISO 6618	0.5	만족
	총 글리세롤(무계%)	0.24 이하	KS M 2412	0.053	만족
	모노글리세라이드(무계%)	0.80 이하	KS M 2412	0.136	만족
	디글리세라이드(무계%)	0.20 이하	KS M 2412	0.001 미만	만족
	트리글리세라이드(무계%)	0.20 이하	KS M 2412	0.001 미만	만족
	유리글리세롤(무계%)	0.02 이하	KS M 2412	0.018	만족
	산화안정도(110℃, h)	6 이상	EN 14112	1.9 → 8.9	만족
	메탄올(무계%)	0.2 이하	EN 14110	0.01 미만	만족
알칼리 금속 (mg/kg)	(Na + K)	5 이하	EN 14108, 14109	0.1 미만	만족
	(Ca + Mg)	5 이하	EN 14538	0.1 미만	만족
	인(mg/kg)	10 이하	EN 14107	0.1 미만	만족

<시험 성적서>



[붙임]



한국석유관리원 비례기술연구소  
www.kpetrotest.or.kr

확인번호: Z25J-70K7-48GI-U1QP-49Z1

주 28115 충청남도 청주시 청원구 오창읍 양정3길 33

TEL: 043-217-0200

FAX: 043-240-7997

# 시험 성적서

성적서 번호 : TSC2023-0379B

시 료 명 : 바이오디젤

시험 항목	단 위	시험 결과	시험 방법	
황함량(자의선형광분광법)	mg/kg	1.6	ASTM D5453-19a	
잔류탄소분(마이크로법)	(m/m) %	0.01 <sup>*)</sup>	KS M ISO 10370:2014	
인화점(펜스키마텐스식 밀폐컵)	(C법) °C	127.0	KS M ISO 2719:2016	
외분	(m/m) %	0.002	KS M ISO 6245:2008	
금속분	P mg/L	0.1 미만	DIN EN 14107:2003	
수분(K-F전기광적법)	(m/m) %	0.019	KS M ISO 12937:2003	
밀도(15°C)	kg/m <sup>3</sup>	874.9	KS M ISO 3675:1998	
동점도(40°C)	mm <sup>2</sup> /s	2.644	KS M ISO 3104:2020	
고형불순물	mg/kg	9.5	DIN EN 12662:2014	
산화안정도(가속산화법)(110°C)	h	1.9	DIN EN 14112:2003	
지방산메틸에스테르함량(GC)	(m/m)%	97.7	EN 14103:2020	
جلي세롤	총جلي세린	(m/m) %	0.053	KS M 2412:2004
	모노جلي세라이드	(m/m) %	0.136	
	디جلي세라이드	(m/m) %	0.001 미만	
	트리جلي세라이드	(m/m) %	0.001 미만	

주1) 상기 시험결과는 시험방법 적용범위(0.10 m/m% ~ 30.0 m/m%)를 벗어난 결과임.

-다음페이지-



\* 홈페이지 접속 후 성적서 권위어부 메뉴에서 상단의 확인번호를 통해 위·변조여부를 확인할 수 있습니다.



[붙임]



한국석유관리원 미래기술연구소  
www.kpetrotest.or.kr

확인번호: Z25J-70K7-43GI-U1QP-49Z1

우 28115 충청북도 청주시 청원구 오창읍 양정3길 33

TEL: 043-217-0200

FAX: 043-240-7997

# 시험 성적서

성적서 번호 : TSC2023-0379B

시료명 : 바이오디젤

시험 항목		단위	시험 결과	시험 방법
글리세롤	유리글리세린	(m/m) %	0.018	KS M 2412:2004
동판부식(100℃ 3hr)		-	1	KS M ISO 2160:1998
메탄올함량(바이오디젤)		(m/m) %	0.01 미만	DIN EN 14110:2003
필터막힘점(CFPP)		℃	-6	KS M 2411:2011
전산가(색상저시약적정법)		mg KOH/g	0.5	KS M ISO 6618:1997
알칼리금속	Na+K	mg/kg	0.1 미만	DIN EN 14108:2015, DIN EN 14109:2003
알칼리금속	Ca+Mg	mg/kg	0.1 미만	DIN EN 14538:2006

문.



※ 홈페이지 접속 후 성적서 진위여부 메뉴에서 상단의 확인번호를 통해 위·변조여부를 확인할 수 있습니다.



[붙임]



한국석유관리원 미래기술연구소  
www.kpetrotest.or.kr

확인번호: 7L35-J70J-B356-H777-V6L6  
우 28115 충청북도 청주시 청원구 오창읍 양정3길 33  
TEL: 043-217-0200 FAX: 043-240-7997

# 시험 성적서

성적서 번호 : TSC2023-0374B

시료명 : 바이오디젤

시험항목	단위	시험결과	시험방법
산화안정도(가속산화법)(110℃)	h	8.9	DIN EN 14112:2003

끝.



※ 온라인지 검색 후 성적서 진위여부 메뉴에서 상단의 확인번호를 통해 위·변조여부를 확인할 수 있습니다.

page 2 of 2

## 2) 석유계 경유와 혼합한 연료의 혼합 영향성 평가

- 정부는 정유사가 국내 자동차용 경유에 바이오디젤을 의무적으로 혼합하여 사용하도록 하는 신·재생에너지연료 혼합 의무화제도(RFS, Renewable Fuel Standard)를 시행하고 있음. RFS 제도에 따라 자동차용 경유는 2023년까지 연간 바이오디젤 3.5%, 2026년까지 4.0%, 2029년까지 4.5%, 2030년 이후 5%로 의무혼합하여 사용한다.
- 바이오디젤이 혼합된 자동차용 경유는 석유제품의 품질기준과 검사방법 및 검사수수료에 관한 고시(산업통상자원부 고시 제2019-67호)의 품질기준을 만족해야 한다.

<자동차용 경유 품질기준>

항목	등급	자동차용 경유
유동점 (°C)		0 이하
인화점 (°C)		40 이상
동점도 (40°C, mm <sup>2</sup> /s)		1. 9이상~5.5 이하
증류성상 (90%유출온도, °C)		360이하
10% 잔유중 잔류탄소분 (무게%)		0.15 이하
물과 침전물 (부피%)		0.02이하
황분 (mg/kg)		10 이하
회분 (무게%)		0.02 이하
세탄값 (세탄지수)		52 이상
동판부식 (100°C, 3h)		1 이하
필터막힘점 (°C) <sup>1)</sup>		-18 이하
윤활성@60°C (HFRR 마모흔경, μm)		400 이하
밀도@15°C (kg/m <sup>3</sup> )		815 이상~835 이하
다고리방향족 함량 (무게%)		5 이하
방향족화합물 함량 (무게%)		30 이하
바이오디젤 함량 (부피%)		2 이상 5 이하

1). 필터막힘점은 11월 15일부터 다음해 2월 15일까지 생산수입단계검사에만 적용한다.

- 연료용 시제품 곤충 유래 바이오디젤(BD)을 자동차용 경유에 혼합하여 연료의 혼합 영향성 평가를 진행하였다. 시험에 사용된 경유는 4월부터 10월에 생산된 연료로 겨울용에 해당되지 않아 유동점, 필터막힘점 품질기준 적용을 받지 않는다. 곤충 유래 바이오디젤을 자동차용 경유에 5%, 7%를 혼합하였고 대부분 항목에서의 품질기준 만족하였다.

**<곤충 바이오디젤 혼합비율별 품질 특성>**

항목 \ 구분	품질 기준	바이오디젤 무첨가 경우	곤충 바이오디젤 5% 혼합 경우	곤충 바이오디젤 7% 혼합 경우	만족 여부
유동점(℃)	0 이하	-20	-18	-17	만족
인화점(℃)	40 이상	41.0	43.0	44.0	만족
동점도(40℃, mm <sup>2</sup> /s)	1.9이상~5.5이하	2.50	2.54	2.54	만족
중류성상 (90%유출온도, ℃)	360이하	332.3	333.7	333.4	만족
10% 잔유중 잔류탄소분 (무계%)	0.15 이하	0.01	0.01	0.01	만족
물과 침전물(부피%)	0.02이하	0.005미만	0.005미만	0.005미만	만족
황분 (mg/kg)	10 이하	5.4	5.2	5.4	만족
회분 (무계%)	0.02 이하	0.002	0.01 미만	0.01 미만	만족
세탄값(세탄지수)	52 이상	58.5	58.0	57.4	만족
동판부식(100℃, 3h)	1 이하	1 이하	1 이하	1 이하	만족
필터막힘점(℃)	-18 이하	-7	-5	-5	-
유회성@60℃ (HFRR 마모흔경, μm)	400 이하	402.0	397.5	378.5	만족
밀도@15℃(kg/m <sup>3</sup> )	815 이상~835 이하	818.6	820.0	820.8	만족
바이오디젤 함량(부피%)	2 이상 5이하	-	5	7	-

- 곤충 바이오디젤의 혼합비율이 증가할수록, 세탄값(세탄지수)·유회성 감소, 유동점·필터막힘 점·밀도 증가의 특징을 보인다.

**바. 가속 노화 조건에서 바이오디젤의 품질 특성(요오드가, 전산가 등) 변화 분석을 통한 장기 저장 안정성 평가**

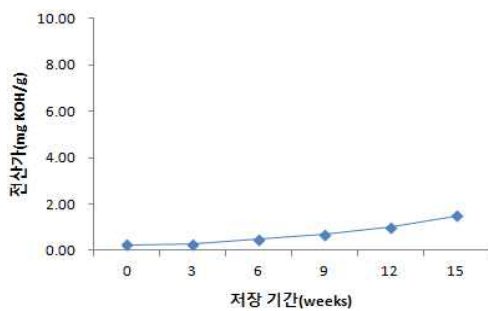
- 저장 안정성은 뜻 그대로 연료를 저장하는 과정 중 발생하는 현상을 평가하는 것으로 ASTM D4625 (Standard Test Method for Middle Distillate Fuel Storage Stability at 43℃)을 참고하여 43℃ 온도로 가속 노화 조건을 설정하여 수행하였다.
- ASTM D4625에 따르면 열화 속도는 연료마다 다르게 나타나지만 실온(21℃)보다 높은 온도에 저장하였을 때 가속화되고, 부가적인 화학반응을 최소화할 수 있는 43℃에서 연료의 열화가 약 4배 빠르게 진행된다. 이는 43℃에서 한 주 저장하는 것은 실온에서 한 달간 저장하는 것과 동등한 효과를 나타내는 것을 의미한다.
- 장기 저장 안정성 평가를 위해 합성한 곤충 부산물 지질 바이오디젤 품질 분석을 진행하였다.



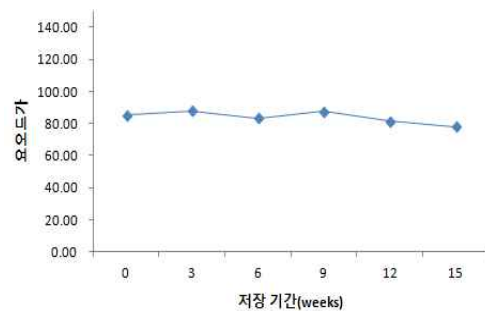
<곤충 부산물 지질 바이오디젤 품질 특성>

항목	구분	저장 주기(week) 시험 결과					
		0	3	6	9	12	15
전산가(mg KOH/g)		0.25	0.28	0.50	0.70	1.00	1.50
요오드가		85.56	88.00	83.50	87.71	81.57	78.18

- 곤충 부산물 지질 바이오디젤을 43 °C 오븐에 저장하고, 3주 간격으로 저장된 시료의 전산가, 요오드가 분석을 수행하였다. 전산가는 저장기간이 지남에 따라 증가하는 경향을 보이고, 요오드는 저장주기 전반적으로 감소하는 경향을 가지고 있다.



(a) 전산가 변화



(b) 요오드가 변화

<가속 노화 조건에서 저장 기간에 따른 바이오디젤의 전산가, 요오드가 변화>

- 장기 저장에 따른 산화반응으로 인하여 유기산 등이 생성되어 전산가가 증가된 것으로 판단되며, 바이오디젤 내에 존재하는 이중결합의 수를 나타내는 척도인 요오드는 감소하였다.

**사. 가속 노화 조건에서 금속 재질별 무게 변화 및 바이오디젤 내의 금속분 함량 변화 평가**










- 금속분 함량 변화 평가를 위해 구리, 스테인리스강, 알루미늄을 선택하였고, 시편을 2cm X 5cm로 제작하여 표면을 연마 처리하였다.
- 연마 작업에 사용된 금속 시편 표면에 묻어있는 연마제를 제거하였다.
- 바이오디젤에 대한 부식성평가 방법이 없어 ASTM D4054를 참고하여 가속노화조건을 온도를 설정하였다. 부품의 재질과 사용처에 따라 실험 온도를 93°C 또는 163°C로 설정하며, 93°C로 가속노화 시험온도를 설정하여 오븐에 넣어 3개월 이상 3주 주기로 확인하여 금속분 함량 변화를 평가하였다.



<금속분 함량 변화 평가를 위한 오븐 저장>

- 저장기간이 지난 후 금속 재질별 연료(바이오디젤) 및 금속 시편의 색 변화를 관찰하였다.. 구리의 경우 저장 기간이 지날수록 연료의 색이 점차 진해지는 것을 확인하였다. 스테인리스강과 알루미늄의 경우 큰 변화 없었다. 침지된 금속 시편을 꺼내서 육안으로 확인하였고 금속 시편의 색 변화는 없었다.

<금속 별 연료 및 시편 색 변화>

저장 기간(Weeks)	연료 색 변화 (Blank, 구리, SUS, Al 순서대로)	금속 색 변화 (구리, SUS, Al 순서대로)
0		
3		
6		
9		
12		



- 저장 기간이 지남에 따른 금속 시편의 무게 변화는 스테인리스강과 알루미늄에서 초기 시편과 비교하여 무게변화의 차이가 없음을 확인할 수 있으며, 구리 시편의 경우에는 미량 감소하는 경향을 보이고 있다.

<저장 주기별 금속시편의 무게 변화>

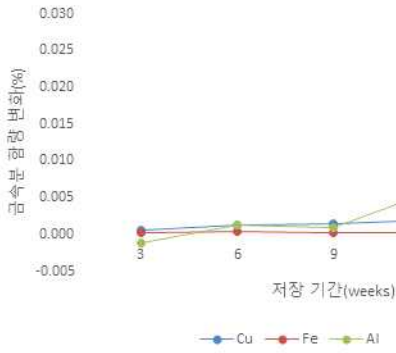
항목 \ 구분	저장 주기(week)별 무게변화(g)					
	0	3	6	9	12	15
구리	0.0000	0.0000	+0.0002	-0.0012	-0.0014	-0.0040
스테인리스강	0.0000	0.0000	+0.0005	-0.0005	-0.0004	-0.0022
알루미늄	0.0000	+0.0004	+0.0006	+0.0009	+0.0012	0.0000

- 연료 내의 금속분 함량 변화를 살펴보면 스테인리스강과 알루미늄은 미량 증가하지만 초기 연료와 비교하였을 때 큰 차이가 없음을 확인하였다. 구리의 경우, 연료 내 금속분 함량의 변화는 일정하게 증가하는 경향을 보인다.

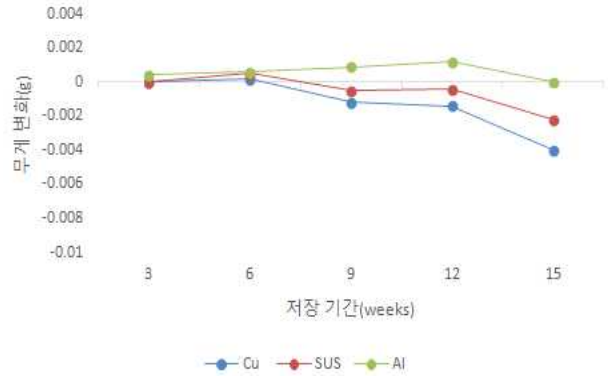
<저장 주기별 연료 내의 금속분 함량 변화>

항목 \ 구분	저장 주기(week)별 금속분 함량(%)					
	0	3	6	9	12	15
구리	0.0000	0.0005	0.0012	0.0015	0.0020	0.0027
스테인리스강	0.0003	0.0004	0.0007	0.0005	0.0005	0.0005
알루미늄	0.0220	0.0209	0.0234	0.0230	0.0279	0.0228

- 종합적으로 확인해보면, 스테인리스강과 알루미늄 시편에서는 미량의 변화는 있지만 초기와 비교하여 거의 차이가 없으며, 구리 시편은 침지 시 시편에서 시료로 구리가 석출되면서 연료 내의 금속분 함량 증가와 금속 시편의 무게 감소를 확인하였다.



(a) 연료 내의 금속분 함량 변화

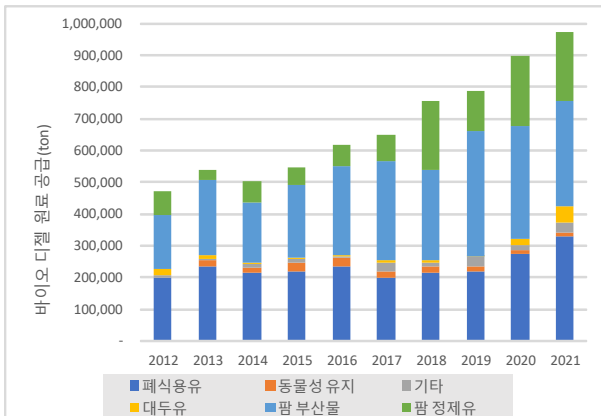


(b) 금속 시편 무게 변화

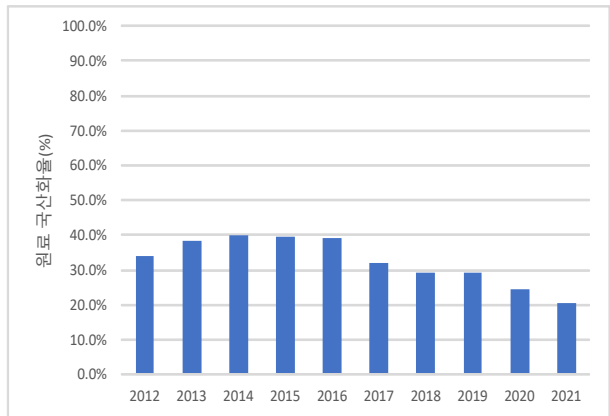
<금속분 함량 및 무게 변화>

아. 곤충자원을 활용한 바이오디젤 대량 생산을 위한 산업화 모델 제시

- 국내 바이오디젤 원료 중 국내산 원료는 폐식용유가 대부분이며, 수입산 원료는 팜 정제유와 팜 부산물이 대부분이다. '21년도 기준 수입 팜 정제유 및 팜부산물이 약 56.6%, 국내산 폐식용유가 약 20.3%이며 국내산 원료 비율은 약 20.7% 수준으로 '14년 이후 국내산 원료의 비율이 감소하는 추세이다.



(a) 바이오디젤 원료 공급 현황



(b) 바이오디젤 원료 국산화율

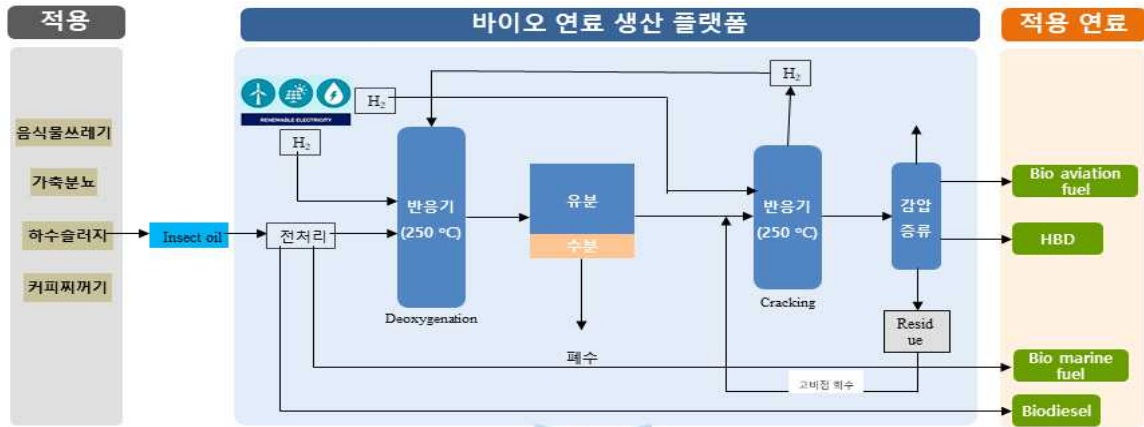
<바이오디젤 원료 공급 현황 및 국산화율>

- 신에너지 및 재생에너지 개발·이용·보급 촉진법에 따라 연도별 의무혼합비율은 2023년까지 자동차용 경유에 바이오디젤 3.5%이며 계속적으로 상향될 예정이다. 또한 산업통상자원부의 「친환경 바이오연료 확대방안」(2022.10.13.)에 따르면 바이오디젤 의무혼합비율은 '30년까지 당초목표 5.0%에서 8.0%까지 상향될 예정임. 따라서 신규 원료 개발을 통한 바이오디젤 보급 확대가 필요한 실정이다.



**<바이오디젤 의무혼합비율 현황>**

- 바이오연료의 원료로 사용되는 지질은 팜유, 폐식용유가 대부분을 차지하고 있으며 신규 원료로 미세조류가 지질 생산성이 높은 것으로 알려져 있다. 국내외 국제 및 정책에 의해 탄소중립 연료인 바이오연료를 확대하려 하고 있으며 국내 도입이 유력한 신규 바이오연료인 바이오항공유, 바이오선박유, 수첨바이오디젤은 원료가 동일하게 동·식물성 지질이 이용되고 있어 지질에 대한 수요가 앞으로 급격히 증가할 것으로 기대된다. 하지만 국내 동·식물성 지질은 생산환경, 수거 체계 등의 어려움으로 한계에 도달해 있어 새로운 원료 개발이 필요한 실정이기 때문에 곤충 지질이 대안이 될 수 있다.
- (생산) 바이오디젤은 원료인 지질이 생산단가의 60% 이상을 차지하고 있어 지질 생산단가를 낮출 수 있어야 함. 곤충은 음식물쓰레기, 가축분뇨 등의 처치 곤란한 폐기물을 먹이로 할 수 있는 장점이 있으므로 음식물쓰레기, 가축분뇨 처리함으로써 경제성을 확보할 수 있어 곤충 사육시설은 음식물쓰레기, 가축분뇨가 발생하는 지역 근처에 설치하는 것이 좋음. 또한 곤충은 제한된 공간에서 높게 쌓아 기를 수 있어 단위면적당 생산성이 우수하다. 하지만 곤충 사육에 있어 온도, 습도 등의 환경이 생장에 영향을 주기 때문에 이러한 조건을 표준화 및 자동화하여 폐기물 발생시설에 사육시설을 설치하여 지질까지 생산하도록 한다.
- (수거) 음식물쓰레기 처리장, 가축시설 등은 넓게 분포하고 있어 수거 체계가 필요하다. 이는 기존의 영농조합을 이용하여 판매하도록 하여, 각 지역에 분포되어 있는 영농조합에서 곤충 지질의 품질에 따라 가격을 매기고 수거하여 기존의 바이오디젤 생산사에 납품하도록 한다.
- (연료) 생산된 지질은 기존의 바이오디젤 생산사에 납품이 될 수 있으나 항공유, 선박유 등에 활용 및 연료 생산 플랫폼 시설을 구축할 수도 있다. 생산된 지질 중에 품질이 우수한 지질은 고품질 연료 생산공정의 원료로 사용하고 저급 지질은 바이오디젤 생산공정의 원료 사용하는 것이다. 고품질 연료 생산공정은 수요예측에 의해 수첨바이오디젤 또는 바이오항공유로 유연하게 생산이 가능하며, 바이오디젤 생산시 부산물로 발생하는 피치는 바이오선박유로 활용할 수 있음. 이러한 방식으로 연료 생산 플랫폼 시설을 구축하여 경제성을 확보할 수 있다.



정부의 이산화탄소 저감과 폐기물 처리를 동시에 달성할 수 있는  
**곤충 유래 바이오연료**(바이오디젤, 바이오항공유, 바이오선박유, 수첨바이오디젤)  
 생산 유연한 플랫폼 구축 가능

<산업화 모델(안) 제시>

- (시범단지조성) 위에서 언급한 생산 표준모델 개발, 수거체계 구축, 연료 생산 플랫폼 시설을 연계하여 시범단지를 조성하고 이를 보급하는 방안을 제안한다.
- (활성화) 정부는 처리하지 못하는 폐기물 에너지화, 국산 원료 개발 등의 연구개발 지원과 생산업체에 대한 투자 촉진을 위한 지원이 필요하다.



## <제3협동(동국대): 곤충 기능성 지질을 이용한 고부가가치 기능성 소재 개발>

### 가. 연구개발과제의 수행 과정

#### 1) 시험재료

본 연구에 사용된 동애등에 (*H. illucens*) 유충으로부터 추출한 중쇄지방산(Medium Chain Triglycerides, MCT)은 주관연구기관인 그린테코(주)로부터 분양을 받아 사용하였다.

#### 2) 세포주 및 세포배양

본 연구에 사용된 마우스 시상하부 세포주 GT1-7, 인간 소장상피 세포주 Caco-2 및 마우스 배양섬유 모세포주 L929는 모두 American Type Culture Collection(ATCC)에서 구입하였다. 이들 세포주는 이 세포주는 10% fetal bovine serum(FBS, GIBCO BRL, Eggenstein, Germany), 100units/ml penicillin, 100 g/ml streptomycin(GIBCO BRL, Eggenstein, Germany), 0.2% Fungizone(GIBCO BRL)이 포함된 RPMI 1640(BIOWhittaker, Walkersville, USA)를 사용하여 37°C와 5%의 CO<sub>2</sub>가 유지되는 배양기에서 배양하였다.

#### 3) MTT 분석

세포 생존율은 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) 분석으로 측정하였다. 시상하부 뉴런 GT1-7 세포, 인간 소장상피 Caco-2 세포 및 마우스 배양섬유 L929 세포를 각각 96-웰 플레이트에 웰당  $1 \times 10^4$ 개 세포의 밀도로 3반복으로 시딩하였다. 처리 후 배지를 제거하고 MTT(0.5 mg/ml)를 첨가한 후 CO<sub>2</sub> 인큐베이터에서 37°C, 2시간 동안 인큐베이션하였다. 형성된 불용성 결정을 DMSO에 녹인 후 마이크로플레이트 리더기(Anthos Labtec Instruments, Wals, Austria)를 이용하여 570 nm에서 흡광도를 측정하였다.

#### 4) 전사체 발현 분석

조직 또는 세포로부터 각각 total RNA를 분리한 후, high capacity cDNA reverse transcription kit (Applied Biosystems, IL, USA)를 이용하여 분리된 total RNA로부터 cDNA를 합성하였다. cDNA는 DNase I 처리(Invitrogen, Life Technologies) 후 M-MLV 역전사효소(Promega, Madison, WI) 및 oligo(dT) 프라이머로 합성되었다. Real-time PCR은 표 1의 특정 프라이머 세트를 사용하여 수행하였다. 전통적인 PCR 증폭은 표 1의 특정 프라이머 세트를 사용하여 60°C의 annealing 온도에서 27cycle을 수행하였다. PCR 산물의 분석을 위해 각 10µl PCR 산물은 1~2.5% 아가로스 겔에서 전기영동하고 UV 광 아래에서 검출하였다. 그리고 endogenous control은 Gapdh를 사용하여 상대정량 분석하였다.

**표 1.** 비만 관련 분자마커의 전사체 발현분석을 위한 primer 서열

Name	Sequences	GenBank Accession No.
Chop	Forward, 5'-CCACCACACCTGAAAGCAGAA-3' Reverse, 5'-AGGTGAAAGGCAGGGACTCA-3'	NM_007837
Grp78	Forward, 5'-GGCCTGCTCCGAGTCTGCTTC-3' Reverse, 5'-CCGTGCCACATCCTCCTTCT-3'	NM_022310
Erdj4	Forward, 5'-CCCCAGTGTCAAAGTACCAG-3' Reverse, 5'-AGCGTTTCCAATTTCCATAAATT-3'	NM_013760
Xbp-1	Forward, 5'-CAACCAGGAGTTAAGAACACG-3' Reverse, 5'-AGGCAACAGTGTGACAGTCC-3'	NM_013842
Atf4	Forward, 5'-GACCTGGAAACCATGCCAGA-3' Reverse, 5'-TGGCTGCTGTCTTGTGTTTGC-3'	NM_009716
Gapdh	Forward, 5'-CTTCAACAGCAACTCCCCTCTTCC-3' Reverse, 5'-TGGGTGGTCCAGGGTTTCTTACTCCTT-3'	NM_001289726

### 5) Western blot 분석

조직 또는 세포를 RIPA 용해 완충액(50mM Tris-HCl, pH 8.0, 150mM NaCl, 0.02% sodium azide, 0.1% SDS, 1% NP-40, 0.5% sodium deoxycholate 및 1mM phenylmethylsulfonyl fluoride)에서 용해시켰다. Bio-Rad 단백질 분석 키트(Bio-Rad, Hercules, CA)를 사용하여 세포 용해물의 단백질 농도를 측정했습니다. 동량의 단백질을 8% 또는 12% SDS-PAGE로 분리하고 이를 Semiphore transfer (Hoefer, TE-70)를 이용하여 PVDF membrane(Bio-rad)으로 transfer 하였다. 비특이적인 반응을 막기 위해 5% skim milk로 2시간 동안 blocking한 후, TBS-T 완충액 (10 mM Tris-HCL, 150 mM NaCl, 0.1% Tween 20)로 5분간 2회 세척 (washing)하였다. 세척 후 blocking 용액에 1차 항체 (primary antibody)를 적정량 희석해서 넣어주고 상온에서 5시간 동안 반응시켰다. 반응이 끝난 후 TBS-T 완충액으로 상온에서 10분간 5회 세척하고 HRP (horseradish peroxidase)로 표지된 2차 항체 (secondary antibody)를 희석해서 넣어 주고 상온에서 1시간 동안 반응시켰다. 반응 후 TBS-T로 상온에서 10분간 5회 세척한 후, 발색반응은 ECL(enhanced chemiluminescence) 검출 키트(Invitrogen, Waltham, MA)를 사용하여 검출하였다.

### 6) 동물실험 및 비만 유도

수컷 C57BL/6J 마우스(7주령)는 (주)Hana Biotech(Pyeongtaek, Korea)으로부터 구입하여 1주간 총 칼로리의 10%가 지방인 일반 식이로 적응시킨 후 실험에 사용하였다. 식이 유발 비만(DIO)을 생성하기 위해, 8주령 마우스에게 10주 동안 고지방 식이 [HFD, 60% 지방 (soybean oil 5.6% + lard 54.4%), D12492; Research Diets, New Brunswick, NJ] 를 공급하였다. 대조 정상 마우스는 동일한 기간 동안 저지방식이(LFD, 10% 지방, D12450B; Research Diets)를 공급하였다. 동태등에 유래 중쇄지방산의 항비만 효과를 확인하기 위하여 상기 60%가 지방(soybean oil 5.6% + lard 54.4%)인 고지방 식이의 54.4% lard 대신 동태등에 중쇄지방산 54.4%가 전량 대체된 사료는 (주)듀얼바이오텍(Seoul, Korea)에 의뢰하여 제조하였다 (그림 1). 실험군은 저지방 식이군(Normal diet, ND), 고지방 식이군((high



fat diet, HFD), 동애등에 중쇄지방산 첨가 식이(high fat diet containing 54.4% MCT, HFDMCT)으로 분류하였고 각 군마다 45마리씩 난괴법으로 나누었다. 사육 환경은 온도 22±1℃, 습도 50±5%로 유지하였고, 밤낮을 12시간으로 조절하였다. 또한 모든 실험 동물 사육관리는 식품의약품안전청에서 정한 “실험동물사용 및 사육관리 규정”에 따랐고, 실험의 전 과정은 동국대학교 동물실험윤리위원회로부터 승인(승인번호: IACUC-2022-09)을 받아 실험동물 사용관리 가이드라인에 따라 수행하였다.

**(DIO) Formulas 60 kcal% VHFD**

Product#	D12492	
	g%	kcal%
Protein	26	20
Carbohydrate	26	20
<b>Fat</b>	<b>35</b>	<b>60</b>
<b>Total</b>		100
<b>kcal/g</b>	5.24	
Ingredient	g	kcal
Casein, 30 Mesh	200	800
L-Cystine	3	12
Corn Starch	0	0
Maltodextrin 10	125	500
<b>Sucrose</b>	<b>68.8</b>	<b>275</b>
Cellulose, BW 200	50	0
Soybean Oil	25	225
Lard	245	2205
Mineral Mix S10026	10	0
DiCalcium Phosphate	13	0
Calcium Carbonate	5.5	0
Potassium Citrate, 1 H2O	16.5	0
Vitamin Mix V10001	10	40
Choline Bitartrate	2	0
FD&C Red Dye #40	0	0
FD&C Blue Dye #1	0.05	0
FD&C Yellow Dye #5	0	0
<b>Total</b>	<b>773.85</b>	<b>4057</b>

➡ Lard 대신 MCT oil 배합

그림 1. 60%가 지방인 고지방 식이(D12492; Research Diets, New Brunswick, NJ) 내 lard(54.4%) 대신 동애등에 중쇄지방산 오일(54.4%)로 전량 대체한 식이 조제

**7) 체중 및 사료 효율 측정**

실험기간 중 동물의 상태 관찰을 위하여 식이 후 3일 간격으로 80일 동안 체중을 측정하였다. 식이는 매일 동일한 시간에 공급하였고 전날 남은 사료의 양과 그날 공급한 사료의 양을 매일 측정하여 그 차이로 섭취한 식이량을 계산하였다.

사료 효율(FER: The feed efficiency ratio)은 실험 기간에 증가한 체중 증가량을 같은 기간 동안에 섭취한 식이량으로 나누어 산출하였다.

$$FER = [\text{body weight change (g)}/\text{food intake (g)}] \times 100$$

## 8) 실험 동물 처리

실험 동물은 식이 실험 종료 후 12시간 절식시킨 후 Zoletil50(VirbacKorea, Seoul, Korea) 0.2cc를 복강 주사하여 마취 후 개복하였다. 복부를 개복한 후 멸균 주사기를 사용하여 하 대정맥에서 혈액을 채취한 후 헤파린으로 처리한 멸균튜브에 모아 실험에 이용하였다. 채취된 혈액은 2,600rpm (4℃)에서 15분간 원심분리하여 상층액을 실험에 사용하였다. 채혈 후 PBS 용액을 조직으로 들어가는 혈관에 주입하여 혈액을 제거한 후 간과 신장을 적출하여 생리식염수로 헹구고 수분을 완전히 제거하여 무게를 측정하였다. 무게 측정 후 간은 실험에 사용하기 위해 homogenizer (Polyton PT-MR 3100, Kinematica AG, Luzern, Switzerland)로 균질화 하여 시료로 사용하였다. 부고환 지방조직은 적출하여 수분 제거 후 무게를 측정하였다. 모든 시료는 -80℃의 초저온냉동고에 보관하여 사용하였다.

## 9) 혈중 지질농도측정

혈중 중성지질 함량, 총 콜레스테롤 함량, HDL 콜레스테롤 함량, 혈중 LDL 콜레스테롤 농도, 동맥경화 지수(Atherogenic Index, AI), 심혈관위험지수(Cardiac Risk Factor, CRF)는 (주)한국비임상기술지원센터(Seongnam, Korea)에 의뢰하여 분석하였다.

## 10) 혈중 간기능 효소 측정

혈중 Aspartic acid transaminase (AST) 및 Alanine transaminase (ALT) 측정 또한 (주)한국비임상기술지원센터(Seongnam, Korea)에 의뢰하여 분석하였다.

## 11) 혈중 BUN 및 Creatinine 농도 측정

혈중 blood urea nitrogen (BUN) 및 혈장 creatinine 함량의 측정 또한 (주)한국비임상기술지원센터(Seongnam, Korea)에 의뢰하여 분석하였다.

## 12) 혈중 렙틴 농도

혈액 내의 렙틴 농도는 leptin mouse leptin ELISA kit (Invirogen, MA, USA)를 이용한 효소면역측정법으로 정량하였다.

## 13) 데이터 분석

모든 데이터는 평균  $\pm$  SD로 표시했다. 두 그룹 간의 비교는 Student 's t-test를 사용하여 수행하였고, 3개 이상의 그룹 간의 비교는 Dunnett 실험과 함께 일원 분산 분석을 사용하여 분석하였다. 분석은 SPSS 버전 18.0K(SPSS Inc., Chicago, IL)를 사용하였으며, p 값의 차이가 0.05 미만인 경우를 통계적으로 유의한 것으로 간주하였다.

## 나. 연구개발과제의 수행 내용

비만은 인간뿐만 아니라 반려동물에서 세계에서 가장 크고 빠르게 증가하는 공중 보건 문제로 널리 인식되고 있다. 비만은 에너지 섭취와 소비의 불균형으로 발생하며 대사증후군, 고혈압, 제2형 당뇨병, 뇌졸중, 암, 이상지질혈증 등 주요 동반질환을 유발한다. 반려견의 경우 비만과 관련된 10대 질환은 관절염, 방광/요로감염증, 갑상선호르몬 생산능력 저하, 간 질환, 무릎인대 손상, 당뇨, 척추 디스크, 지방종, 만성 신부전, 심장질환 순으로 높게 발병하며, 반려묘의 경우에는 방광/요로감염증, 만성 신부전, 당뇨, 간 질환, 천식, 관절염, 고혈압, 심장 질환, 담낭 질환, 척추 질환 순으로 높게 발병한다고 보고되어 있다.

반려동물의 비만 예방 및 사료는 거의 대부분이 ANF, Ruah, Holistics, Nutri, Purina 등 외국계 회사에서 양질의 가금류 고기나 양 고기 등을 이용한 주로 저지방 고단백질 저칼로리 용 사료 위주로 개발하여 산업화 되고 있으나, 항비만 효능에 대한 과학적 증거는 부족한 실정이다. 따라서 본 연구에서는 동애등에 및 장수풍뎅이 유충 추출물이 고지방식으로 유도된 생쥐의 음식 섭취량과 체중을 효과적으로 감소시킨다는 본 연구팀의 연구 결과와, 중쇄 지방산(카프릴산, 카프르산, 라우르산)이 케톤체를 생산하고, 케톤체의  $\beta$ -hydroxybutyric acid는 다양한 메커니즘으로 다이어트(체중감소) 효과를 발휘하며 장내미생물(microbiome)에도 작용하여 다이어트 효과를 발휘하는 메커니즘에 대한 다양한 연구 결과를 기반으로 동애등에 유래 중쇄 지방산을 이용하여 과학적으로 입증된 반려동물의 항비만 사료를 개발하고자 하였다. 이를 위한 당해 연도 연구수행 내용은 다음과 같다.

- 곤충 유래 중쇄지방산의 세포독성 분석
  - 소장 상피세포(Caco-2 cells), 신경세포 (hypothalamic neuronal GT1-7 cells) 및 섬유아세포(L929 cell) 등
- 곤충 중쇄지방산의 비만 관련 분자마커의 발현 억제 효능 분석
  - N-glycosylation 억제제인 tunicamycin에 의한 신경세포(GT1-7) 내 비만 표지 분자마커 유도
  - 곤충 중쇄지방산의 신경세포(GT1-7) 농도별 처리 농도별 비만 표지 분자마커의 발현 분석: Grp78, CHOP, eLF2 $\alpha$ , phospho-eIF2 $\alpha$
- 곤충 중쇄지방산의 leptin signaling을 통한 식욕 부진 효과 분석
  - Tunicamycin 및 중쇄지방산 농도별 처리 후 phospho-JAK2 및 phospho-STAT3 발현 비교 분석
- 비만에 의한 마우스의 시상하부 비만 표지 분자마커 유발 여부 확인
  - 수컷 마우스(C57BL/6J)에게 12 주간 HFD(지방 60%)와 LFD(지방 10%)를 각각 공급
  - 소포체 스트레스 반응 마커(Grp78, Chop, Atf4 등)의 발현 분석
- 곤충 중쇄지방산의 비만 마우스의 항비만 효능 분석
  - 중쇄지방산의 소포체 스트레스 반응 마커 발현 억제 효과 분석
  - 중쇄지방산의 비만 마우스의 섭취량 및 체중 변화에 미치는 효과 분석
  - leptin signaling을 통한 식욕 부진 효과 분석

### 3. 연구개발과제의 수행 결과 및 목표 달성 정도

#### 1) 연구수행 결과

##### (1) 정성적 연구개발성과

- 고효율 지질로부터 고부가 지방산 추출 개발
  - 곤충 지질은 전산가가 2.7mgKOH/g으로 낮아 트리글리세라이드를 수열분해를 통해 지방산으로 전환 후 감압증류를 통해 고부가 지방산을 분리함
  - 수열분해를 통해 지방산으로 전환하기 위한 최적의 조건으로 전산가 197 mgKOH/g을 확인함
    - 반응 온도(160℃), 반응 시간(20시간), 혼합 비율(물7g: 지질1g: 황산: 0.1g)
  - 전환된 지방산에서 감압증류를 통해 총지질 함량의 25%인 C<sub>12</sub> 지방산 분리함
- 고효율 지질로부터 추출된 고부가 지방산 협동 기관 공급
  - C<sub>12</sub> 지방산과 C<sub>13</sub> 이상 지방산으로 분리할 수 있음을 확인
  - C<sub>12</sub> 지방산은 세종대학교와 동국대학교에 공급
  - C<sub>13</sub> 이상 지방산과 샘플 '동애등에 곤충 지질 20ml', 'Fatty acid로 전환된 지질 20ml', 'C<sub>12</sub> 지방산 20ml'를 한국석유관리원에 공급
- 경제성 분석 및 산업화
  - 바이오디젤 및 라우릭산
    - 2019년 폐식용유를 원료로 한 전체 바이오디젤의 국내 공급 단가는 약 850원/L
    - 재고를 활용할 경우 Liter 당 338원의 경제적 효과를 얻을 수 있음
    - 라우릭산 판매 시 Liter 당 10,000원의 경제적 효과를 얻을 수 있음
  - 사료 첨가제 및 방부제
    - 지질 추출 후 분리된 곤충 박 가격이 현재 1kg에 3,500원 전·후에서 거래되고 있지만, 개발된 사료 첨가제 및 천연방부제를 적용 시 1kg 건조 분말에서 300,000원의 매출을 올릴 수 있음
  - 산업화: 사료용 제품 출시(사료용 그린오), 라우릭산 출시(추출물 그린오)
- 바이오디젤 생산용 곤충의 생산 효율 향상을 위한 사료 발효 조건 확립
  - 사료 효율 증대를 위한 발효 균주의 발효능력 선정: 3종
    - 문헌을 통해 선정한 6종 균주의 고분자물질(탄수화물 5종, 단백질 1종, 지방 1종) 분해 효소 활성 측정 후 3종 균주 최종 선정
- 바이오디젤 생산용 곤충의 생산 효율(증체량, 지방함량) 향상을 위한 고효율 발효 인공사료 개발: 2종(갈색거저리, 아메리카동애등에)
  - 사료 효율 증대를 위한 발효 균주의 적정 혼합 비율 및 발효 기간 확립: 2종 대상 사료 원료 조성: 갈색거저리(밀기울:음식물쓰레기 = 1:1), 아메리카동애등에(음식물쓰레기) 발효균주의 적정 혼합 비율 확립: 갈색거저리 및 아메리카동애등에(*L. fermentum*:*L. acidophilus*:*P.acidilactici* = 1:1:1) 발효 균주를 이용한 발효 기간 확립: 갈색거저리 및 아메리카동애등에(5일)
  - 고효율 발효 사료의 방부제 첨가 조건 및 제형화 확립
    - 고효율 발효 사료의 방부제 첨가 조건 확립: 2종(sorbic acid 0.05%, GSE 0.05%)
    - 고효율 발효 사료의 고형화 조건 확립: 3종(한천 25%, 카라기난 25%, 감자전분 25%)
    - 발효 사료의 증체량 증대 효과가 최대인 건조시간 확립
- 지방함량 증대를 위한 최적 발효 사료 제조 공정 표준화: 1종(갈색거저리)
- 발효를 통한 곤충 지질 유래 기능성 화장품 소재 개발: 1종

- 지질의 분해활성이 뛰어난 2종 발효 균주를 선정하고 발효방법, 발효기간 확립 후 비발효 곤충 지질보다 미백 및 주름개선 가능성이 향상된 발효지질 제조 기술
- 곤충 지질 특성 평가를 통한 고부가 지질 분리 공정 확립
  - 곤충 지질의 전산가는 2.7 mgKOH/g으로 대부분 트리글리세라이드로 구성되어 있음을 확인하여 고부가 지질(C<sub>12</sub> 지방산)을 분리하기 위해 수열분해 반응으로 트리글리세라이드를 지방산으로 전환하는 공정 도입
  - 수열분해 반응 후의 전산가 분석을 통해 지방산으로 전환됐음을 확인
- 부산물 지질을 활용한 바이오티젤 합성반응 최적화
  - 고부가 지질이 분리된 부산물 지질을 활용하여 반응조건에 따른 바이오티젤 전환 수율 확인을 통해 촉매, 메탄올, 반응온도, 반응시간 최적화 실시
  - 바이오티젤 전환 수율은 촉매량, 메탄올, 반응온도, 반응시간이 증가할수록 높아지나 일정 조건에 도달하면 일정한 수율을 나타냄
- 고순도 바이오티젤 합성 공정 최적화
  - 곤충 지질은 동물성으로 인, 황, 나트륨 등의 불순물 함량이 높아 이를 제거하고 FAME 함량이 96.5% 이상이어야 국내 품질기준을 만족할 수 있음
  - 바이오티젤 합성반응을 완료한 후에 메탄올 제거 → 글리세롤 제거 → 물로 세척 → 감압 증류 순으로 공정 최적화 실시
- 국내 바이오티젤 품질기준 적합성 검증
  - KS M 2965의 품질기준 항목을 기준으로 FAME 함량, 밀도, 수분 등 항목에 대한 적합성 평가를 통해 곤충 유래 바이오티젤의 국내 상용 가능성 검증
- 생산된 곤충 유래 바이오티젤과 석유계 경유와 혼합한 연료의 혼합 영향성 평가
  - Crude 바이오티젤 합성 및 정제를 통한 FAME함량 등 품질기준을 만족하는 곤충 유래 바이오티젤의 연료검증을 위한 스케일업 생산
  - 생산된 곤충 유래 바이오티젤의 적정 시험방법 검토 및 KS M 2965 품질기준에 따른 바이오티젤 주요 항목 분석 및 만족 확인
  - 자동차용 경유에 곤충 유래 바이오티젤을 5%, 7% 혼합하여 경유 품질 기준 만족함 확인
- 가속 노화 조건에서 바이오티젤의 품질 특성(요오드가, 전산가) 변화 분석을 통한 장기 저장안정성 평가
  - 43℃, 3개월 이상 가속노화 조건으로 설정하여 3주마다 요오드가, 전산가 분석을 통한 변화 확인
  - 전산가는 저장 주기가 지날수록 계속 증가하는 경향 및 요오드가는 저장주기에 따라 감소하는 경향을 보임
- 가속 노화 조건에서 금속 재질별 무게 변화 및 바이오티젤 내의 금속분 함량 변화 평가
  - 93℃, 3개월 이상 가속노화 조건으로 설정하여 생산된 곤충 유래 바이오티젤에 구리, 스테인리스강, 알루미늄을 침지시켜 금속 재질별 연료의 색, 금속분 함량, 시편의 무게 변화를 확인함
  - 금속분 함량의 경우, 구리에서 금속분이 증가하는 경향을 보이며, 스테인리스강, 알루미늄에서 함량 변화 없음을 확인
  - 또한 금속분 중 구리의 무게 감소변화가 가장 큼을 확인함

○ 곤충자원을 활용한 바이오디젤 대량 생산을 위한 산업화 모델 제시

- 국내 바이오디젤 원료 중 국내산 원료는 폐식용유가 대부분이며, 수입산 원료는 팜 정제유와 팜 부산물이 대부분임. '14년 이후 국내산 원료의 비율이 계속 감소하고 있으며, 국내외 국제 및 정책에 의해 탄소중립 연료인 바이오연료를 확대하려하고 있으며 신규 바이오연료인 바이오항공유, 바이오선박유, 수첨바이오디젤에도 원료로 동·식물성 지질이 이용되고 있어 지질에 대한 수요가 앞으로 급격히 증가할 것으로 기대됨. 그에 따라 곤충 지질은 새로운 원료의 대안이 될 수 있음
- (생산) 곤충 사육시설은 음식물쓰레기, 가축분뇨를 처리하도록 하여 경제성을 확보하고, 사육시설 표준화 및 자동화로 생산하도록 함.
- (수거) 기존의 영농조합을 이용하여 수거하도록 하며 바이오디젤 생산사에 납품하도록 함
- (연료) 생산된 지질 중에 품질이 우수한 지질은 수첨바이오디젤 또는 바이오항공유 등 고품질 연료 생산공정의 원료, 저급 지질은 바이오디젤 생산공정의 원료 사용하여 연료 생산 플랫폼 시설 구축함
- 생산, 수거 체계 구축, 연료 생산 플랫폼 시설을 연계하여 시범단지 조성하여 보급하는 방안 제안함

○ 곤충 유래 중쇄지방산의 세포독성 분석

- 곤충 유래 중쇄지방산(medium chain triglyceride, MCT)과 중쇄지방산 중 향균효과가 입증된 라우르산(lauric acid)의 농도별 세포독성을 분석하기 위하여 먼저 96-well plate에 인간 소장상피 세포 (Caco-2 cells), 마우스 시상하부 세포 (hypothalamic neuronal GT1-7 cells) 및 마우스 배양섬유 모세포 (L929 cell)를 triplicate well로  $1 \times 10^4$  의 세포를 배지에서 배양(5% CO<sub>2</sub>, 37°C, 24hr)했다. 세포독성 분석은 음성대조군(PBS), 양성대조군(1.0% DMSO), 처리군(중쇄지방산, 라우르산)을 각각 처리 후 배양(37°C, 24hr)하고 MTT(2,5-diphenyl-2H-tetrazolium bromide) assay를 이용하여 세포생존율을 측정하였다. 이때 처리군인 중쇄지방산 및 라우르산의 농도는 10, 20, 40, 60, 80, 100µg/ml 농도로 각각 달리하여 사용하였다. 대조군 및 처리군의 세포 처리 후 FBS 없는 배지 180ul 에 MTT용액(5mg/ml) 20µl 를 사용하여 배양(37°C, 4hr)하여 formazan을 생성하도록 했다. DMSO+EtoH(1:1) 150µl넣고 formazan이 용해되도록 교반기(RT, 20min)로 용해 후 ELISA Reader(Biotek Epoch2, USA Winooski)를 이용하여 530nm에서 흡광도를 측정하여 농도별 세포 생존율을 측정하였다. 흡광도는 MTT가 세포에 의해 formazan으로 분해된 양을 나타냈다. 이를 viable cell 수와 대조군과 비교하여 백분율(%)로 표시하였다.

$$\text{Cell viability(\%)} = (\text{treatment absorbance} / \text{control absorbance}) \times 100$$

- MTT assay 결과, 곤충 유래 중쇄지방산 및 라우르산은 본 실험에 사용한 Caco-2 세포, GT1-7 세포 및 L929 세포에 대해 독성을 나타내지 않는 것으로 나타났다. 즉, 세포생존율을 평가한 결과, 대체로 대조구와 비슷하였고 농도 의존적인 관계를 보이지 않아 높은 농도에서도 유의적인 차이는 관찰되지 않았다. 오히려 중쇄지방산은 GT1-7 세포에 대해 농도 의존적으로 세포 성장 효과를 나타내었다(그림 2)

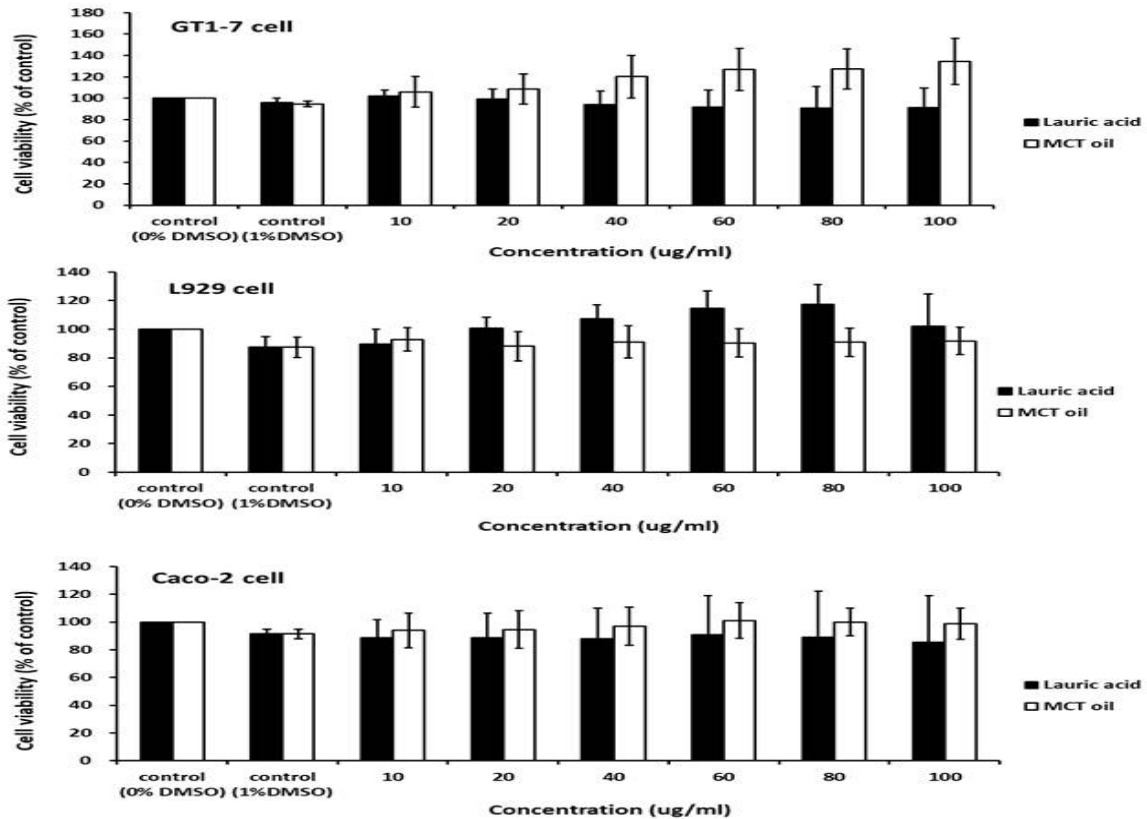


그림 1. 곤충 유래 중쇄지방산 및 라우르산의 농도별 처리에 의한 Caco-2 세포, GT1-7 세포 및 L929 세포의 독성 평가

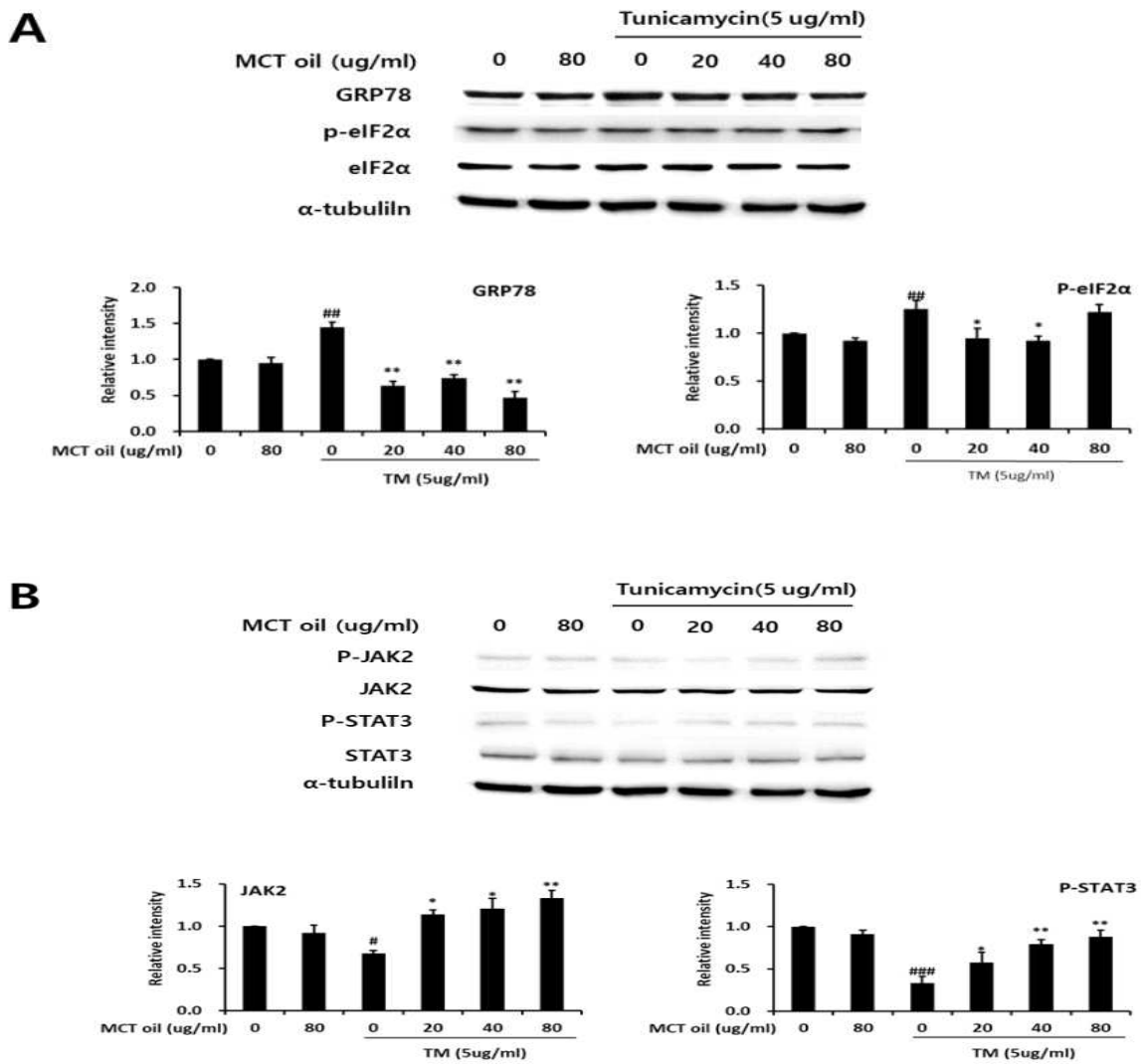
○ 곤충 유래 중쇄지방산의 비만 관련 분자마커의 발현 억제 효능 분석

- 시상하부 소포체(ER) 스트레스는 시상하부 기능 장애와 신경세포 사멸을 유발하여 비만 및 당뇨병과 관련된 섭식 행동 장애로 이어진다(D'Angelo et al. 1991, Milanski et al. 2009, Denis et al. 2010). 실제로, 시상하부 ER 스트레스와 렙틴 저항성은 증가된 에너지 섭취 및 체중과 관련이 있다(Ozcan et al. 2009, Won et al. 2009). 두 가지 요인은 밀접하게 연결되어 있으며, 시상하부 ER 스트레스는 렙틴 저항성과 비만 발달에 인과적 역할을 하는 것으로 나타났다(Ozcan et al. 2009, Hosoi et al. 2008). 또한, ER 스트레스 유도제를 사용한 시험관 내 및 생체 내 치료는 시상하부 ER 스트레스를 촉진하고 신호 변환기 및 STAT3(activator of transcription 3) 단백질의 렙틴 유도 인산화를 약화시키는 것으로 나타났다. 이는 에너지 균형에 대한 렙틴의 효과를 매개하는데 있어서 Try1138에서 STAT3의 인산화가 중요한 역할을 하는 것으로 규명되었다(Hosoi et al. 2008, Tsou and Bence 2012, Munzberg et al. 2004).
- 백색 지방 조직에서 주로 합성되고 분비되는 물질인 렙틴은 중추신경계(CNS)에서 음식 섭취와 에너지 소비를 조절하는 데 중요하다(Friedman and Halaas 1998, Gautron and Elmquist 2011, Tanida et al. 2015). 렙틴 수용체(LepRs)는 시상하부에 밀집되어 있는데, LepR에 대한 leptin의 결합은 Janus-활성화 키나아제 2(JAK2)의 인산화를 유도하며, 이는 차례로 LepR의 여러 티로신 잔기를 인산화하여 다른 신호 경로 및 생리학적 기능을 활성화한다(Banks et al. 2000, Klok et al. 2002, Ramirez 및 Claret 2015, Elmquist et al. 1998).

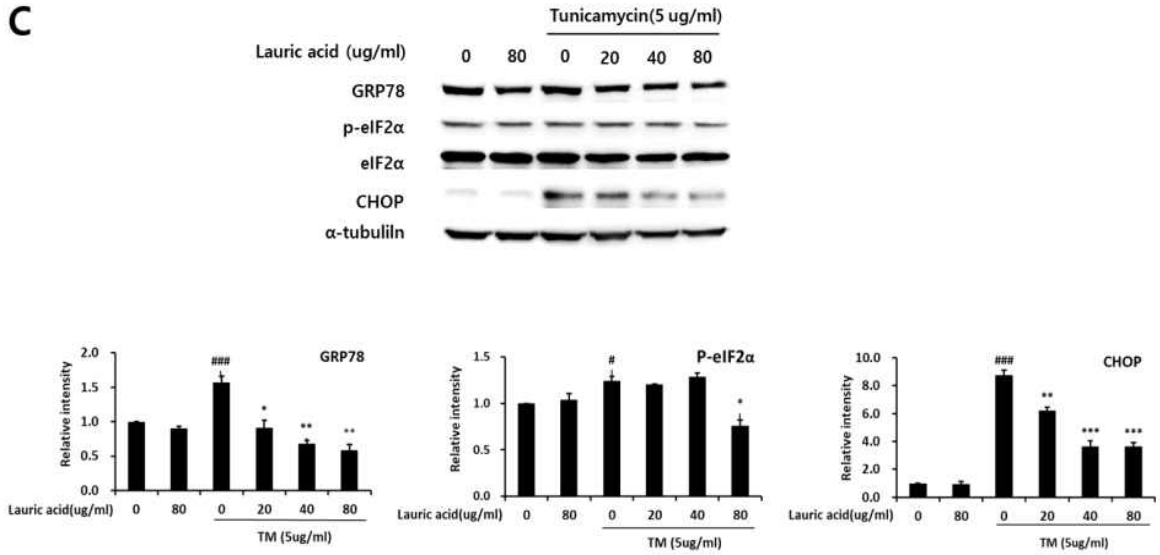
- CNS에서 시상하부의 아치형 핵(arcuate nucleus, ARC)은 섭식과 에너지 항상성을 조절하는 데 중요하다. ARC에는 식욕 조절을 위한 두 가지 주요 뉴런 하위 집단이 포함되어 있다. 신경펩티드 Y(NPY)와 agouti-related protein(AgRP)을 동시에 발현하는 식욕 유발 뉴런과 peptide pro-opiomelanocortin (POMC)을 발현하는 식욕부진 뉴런이다(Sobrino Crespo et al. 2014, Jovanovic 및 Yeo 2010). ARC 내에서 렙틴은 NPY/AgRP 뉴런을 억제하고 POMC 뉴런을 자극하여 에너지 섭취를 직접 조절한다(Jovanovic and Yeo 2010, Lewis et al. 1993, Stephens et al. 1995, Cowley et al. 2001). 또한, 시상하부 adenosine mono phosphate(AMP)- activated protein kinase(AMPK)는 세포 내 신호 전달을 통해 식욕과 영양소 대사를 조절하여 에너지 항상성을 유지한다(Schneeberger and Claret 2012). 이 키나아제는 또한 시상 하부에서 식욕 유발 신호(단식, 그렐린 등) 및 식욕 부진 신호(렙틴, 인슐린, 섭식 등)를 통해 에너지 항상성을 조절한다(Schneeberger and Claret 2012, Akieda-Asai et al. 2014, Munzberg and Morrison 2015, Minokoshi et al. 2004).
- 과거에도 다양한 항비만제가 개발되었으나 대부분 임상에서 다소 일관성 없는 효과와 부작용을 보였다. 따라서 비만에 대한 일관성과 부작용이 없는 새로운 치료법이 절실히 요구된다. 지난 수십 년 동안, 생물 활성 물질은 천연 생물 자원에서 분리 및 확인되었으며 식품 산업 및 전통 한의학에서 광범위하게 사용된다(Sagisaka et al. 2001, Miyano shita et al. 1996). 이러한 생물자원 중 곤충은 효과적인 생리 활성 물질의 공급원으로 상당한 주목을 받고 있다(Suh et al. 2010). 또한 유엔식량농업기구(FAO)는 곤충을 미래 인류의 대체 식량으로 보고했다. 곤충의 약리학적 효과와 안전성에 대한 과학적 증거는 부족하지만 아시아와 유럽에서는 다양한 곤충 종이 전통 의약품이나 식품으로 사용되어 왔다.
- 동애등에(*H. illucens*)는 최근 환경정화 곤충으로 산업계와 학계에서 두각을 나타내고 있다. *H. illucens*는 *Hermetia* 속에 속하는 파리의 유충으로 썩은 고기와 음식물 쓰레기에서 일반적으로 발견되며, 최근 여러 국가에서 가정 및 농업 폐기물의 음식물 쓰레기를 퇴비화와 동애등에 유충은 사료화하는 데 활용되고 있다. 또한, *H. illucens* 및 *Lucilia sericata*의 유충을 포함한 구더기 치료는 유럽과 미국을 비롯한 여러 국가에서 피부 궤양 및 감염 상처 치료를 위한 의료 자원/약용 유충으로 의료 분야에서 유용하게 활용되고 있다(Prete 1997, Armstrong et al. 2002, Chambers and Duffy 2003, Wang et al. 2006, Feng et al. 2010). 곤충 유래 생리활성 물질에 대한 관심이 높아지고 있음에도 불구하고 동애등에 유래 물질의 생물학적 활성에 대한 연구는 거의 이루어지지 않았다.
- 본 연구에서는 동애등에 유충에서 추출한 중쇄지방산을 고지방식이(HFD)를 먹인 비만 마우스의 시상하부의 ER 스트레스를 감소시키고 식이 유도를 악화시키는 식욕부진 효과로 이어지는지 여부를 조사하고자 했다.
- 이를 위해 먼저 본 실험에서는 곤충 유래 중쇄지방산(MCT) 및 중쇄지방산 중 항균효과가 입증된 라우르산(lauric acid)의 마우스 시상하부 세포 (hypothalamic neuronal GT1-7 cells)에 대한 항비만 및 소포체 스트레스(ER stress) 효과를 분석하였다. 곤충 유래 중쇄지방산 및 라우르산이 시상하부의 ER stress 및 leptin signaling pathway를 조절할 수 있는지 여부를 조사하기 위해 다양한 농도의 중쇄지방산 및 라우르산 (10~50



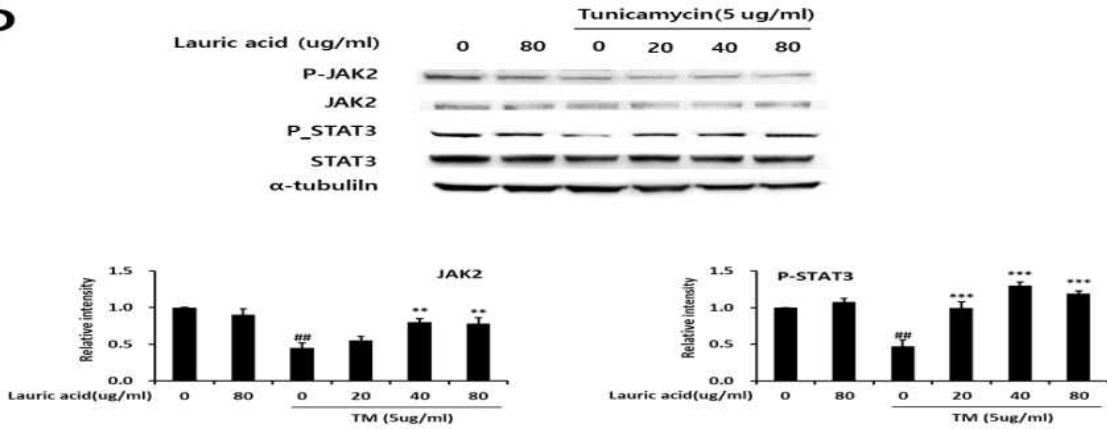
mg/mL) 및 N-glycosylation 억제제인 tunicamycin(TM) (5 $\mu$ g/mL)으로 처리 한 GT1-7 세포에 대한 real-time PCR 및 Western blot을 수행했다. 그 결과, 중쇄지방산 (그림 3A) 및 라우르산(그림 3C) 처리가 농도 의존적으로 ER stress 마커(Grp78, CHOP 및 phospho-eIF2)의 발현을 감소시켰다. 대조적으로, GT1-7 세포를 중쇄지방산(그림 3B) 및 라우르산(그림 3D)으로 처리하는 것은 TM 단독으로 처리하는 것과 비교하여 phospho-JAK2 및 phospho-STAT3와 같은 단백질에 의한 leptin signaling을 농도 의존적 증가를 유발하였다. 이러한 결과를 바탕으로, 중쇄지방산 및 라우르산이 ER stress를 줄임으로써 leptin signaling pathway의 발현을 유의하게 유도한다는 결론을 얻었다.



C



D



**그림 3.** 마우스 시상하부 신경세포 GT1-7에서의 ER stress 및 leptin signaling에 대한 곤충 유래 중쇄지방산 및 라우르산의 효과. GT1-7 세포를 tunicamycin(5µg/mL) 및 곤충 유래 중쇄 지방산(A) 및 라우르산(C) 0~80mg/mL를 6시간 동안 처리한 후 ER stress 반응 마커를 측정 하였음. GT1-7 세포를 TM (5µg/mL)과 중쇄지방산(B) 및 라우르산(D) 0~80mg/mL로 6시간 동안 처리한 후 렙틴 신호 마커를 측정하였음

○ 곤충 중쇄지방산 처리 마우스의 섭취량 및 체중변화에 미치는 효과 분석

- 실험동물의 비만을 유도하기 위하여 10주간 고지방식이 [HFD, 60% 지방(soybean oil 5.6% + lard 54.4%), D12492; Research Diets, New Brunswick, NJ] 를 공급하여 비만을 유도하였고, 동애등에 유래 중쇄지방산의 항비만 효과를 분석하기 위하여 고지방식이(HFD)의 54.4% lard 대신 동애등에 중쇄지방산 54.4%가 전량 대체된 고지방식이(HFD\_ MCT)을 10주간 공급하였다. 정상 식이군(ND), 고지방 식이군(HFD) 및 동애등에 중쇄지방산 첨가 고지방 식이군(HFD\_MCT)의 체중증가량, 식이섭취량 및 식이효율은 각각의 식이 후 3일 간격으로 80일 동안 측정하여 분석하였다(그림 4, 표 2). 그 결과, 비만유도기간 10주 동안의 체중증가는 실험군 간 유의한 차이를 나타내었으며, 고지방식이군(HFD)이 정상식이군(ND)에 비하여 체중이 유의하게 증가되어 고지방식이로 인하여 비

만이 유도되었음을 알 수 있었다. 식이섭취량 및 식이 효율 또한 HFD군과 ND군에서 통계적 유의성이 인정되어 고지방식이로 인하여 체중이 더 많이 증가함을 확인할 수 있었다(표 2).

- 10주 동안 동애등에 중쇄지방산 첨가 고지방 식이 사료를 섭취시켜 동애등에의 중쇄지방산이 마우스의 비만에 영향을 나타내는 지 분석한 결과, 체중 증가량에서 있어 HFD\_MCT군은 HFD군 및 ND군과의 통계적 유의성이 인정되었다(그림 4). 즉, 동애등에 중쇄지방산 첨가 고지방 식이군(HFD\_MCT)은  $3.07 \pm 0.61$  g의 체중이 증가해  $24.72 \pm 2.55$  g의 체중 증가를 보인 HFD군보다 유의하게 낮은 체중 증가를 나타내었다. 체중 증가에서 HFD\_MCT군은 HFD군 보다는 낮은 체중 증가를 나타내어 고지방식을 하더라도 동애등에 중쇄지방산을 병행 섭취하면 체중의 증가를 억제할 수 있을 것으로 판단되었다.
- 식이섭취량은 ND군>HFD\_MCT군>HFD군의 순서로 높게 나타났으나 통계적 유의성은 인정되지 않았다(표 2). 식이효율은 HFD군>ND군>HFD\_MCT군의 순서로 유의하게 높게 나타났는데, 이는 고지방식이가 칼로리 밀도가 높아 체중을 증가시켜 식이효율을 높이는 것으로 판단된다(표 2). HFD군 및 ND군에 비하여 HFD\_MCT군에서 식이효율이 감소되었는데 이것은 동애등에의 중쇄지방산에 의하여 일부 영양소의 소화흡수율과 이용률이 저하되었기 때문인 것으로 판단된다.

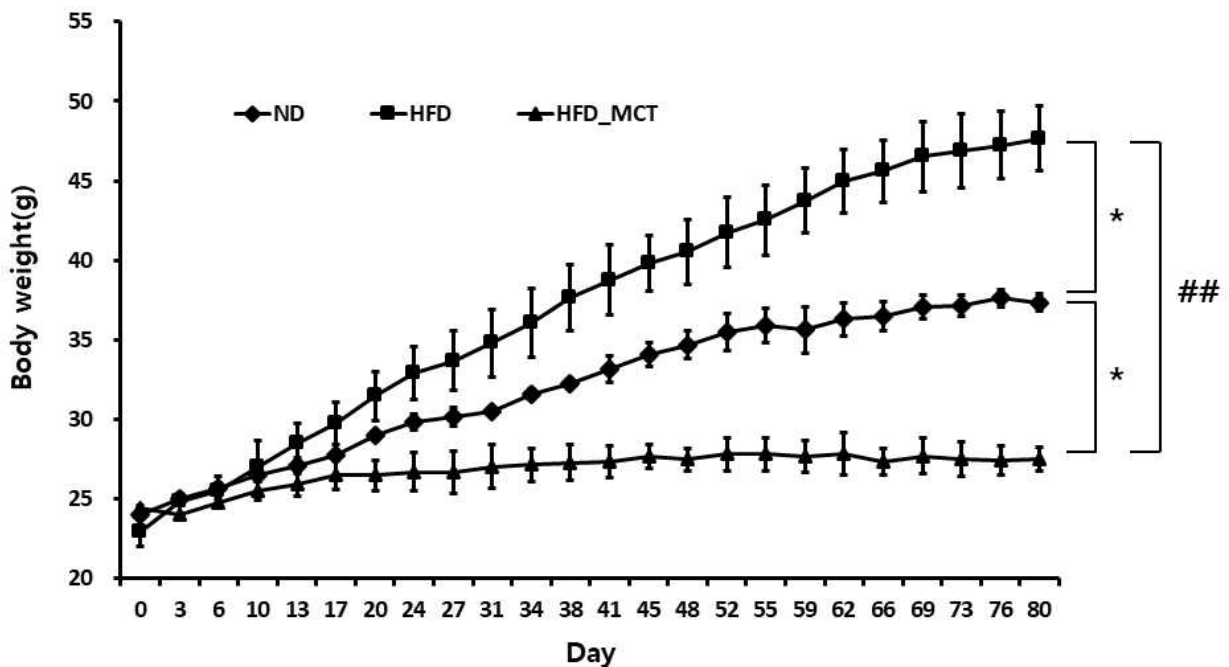


그림 4. 정상식이군(ND), 고지방식이군(HFD) 및 동애등에 중쇄지방산 첨가 고지방 식이군(HFD\_MCT)의 체중증가량

표 2. 동애등에 중쇄지방산 첨가 고지방식이를 10주 동안 공급한 마우스의 체중 증가 및 식이 섭취량의 변화

	Bodyweight (g)		Gained body weight(g)	food intake(g/day)	FER (%) <sup>4)</sup>
	Initial	final			
ND <sup>1)</sup>	24.00±0.35	37.33±0.64 <sup>b</sup>	13.33±0.61 <sup>b</sup>	3.39±0.20	4.92±0.09 <sup>b</sup>
HFD <sup>2)</sup>	22.93±0.92	46.65±2.05 <sup>a</sup>	24.72±2.55 <sup>a</sup>	2.66±0.27	11.73±2.13 <sup>a</sup>
HFD_MCT <sup>3)</sup>	24.40±0.20	27.47±0.76 <sup>c</sup>	3.07±0.61 <sup>c</sup>	2.85±0.32	1.34±0.13 <sup>c</sup>

<sup>1)</sup>ND: normal diet (10% fat)

<sup>2)</sup>HFD: high fat diet(60% fat = 5.6% soybean oil + 54.4% lard)

<sup>3)</sup>HFD\_MCT: high fat diet(60% fat = 5.6% soybean oil + 54.4% MCT)

<sup>4)</sup>FER: food efficiency ratio = [body weight change (g)/ food intake (g)] x 100

○ 곤충 중쇄지방산 처리 마우스의 혈중 지질 농도 분석

- 혈장 내 중성지방(triglyceride, TG)은 고지방식에 의해 가장 큰 영향을 받는다. ND군, HFD군 및 HFD\_MCT군에 대하여 혈액 내의 지질 농도 분석 결과, 고지방식이만을 섭취한 HFD군(105.00±62.00 mg/dL)에 비해 HFD\_MCT군(47.00±19.00 mg/dL)에서 혈장 중성지방 농도가 유의하게 낮게 나타났으며 ND군(54.00±21.00 mg/dL과 HFD\_MCT군의 중성지방 농도는 통계적 유의성이 인정되지 않았다(그림 5).

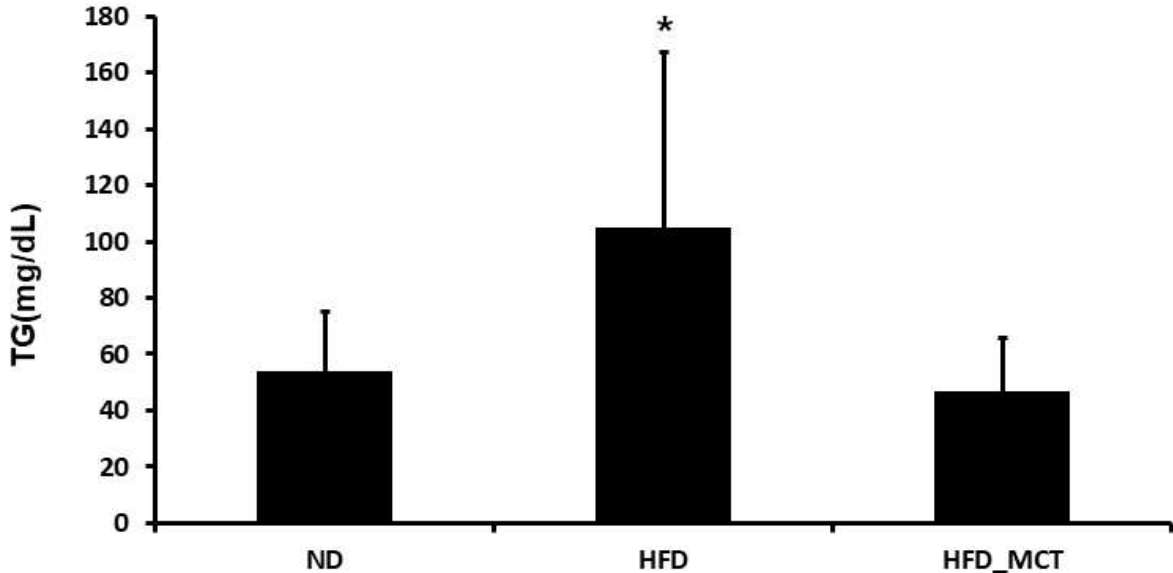


그림 5. ND군, HFD군 및 HFD\_MCT군의 혈장내 중성지방(triglyceride, TG) 농도

- 혈중 총 콜레스테롤의 함량은 그 값이 높아지면 관상 동맥질환이나 지방대사에 이상이 생겼다는 신호가 된다. HFD\_MCT군(141.00±11.00 mg/dL)의 혈장 총 콜레스테롤의 함량이 HFD군(220.00±36.00 mg/dL)에서의 총 콜레스테롤의 함량보다 유의하게 낮은 값을 나타내었으며, HFD\_MCT군과 ND군(115.00±35.00 mg/dL)에서는 통계적 유의성이 인정되지 않았다(그림 6).

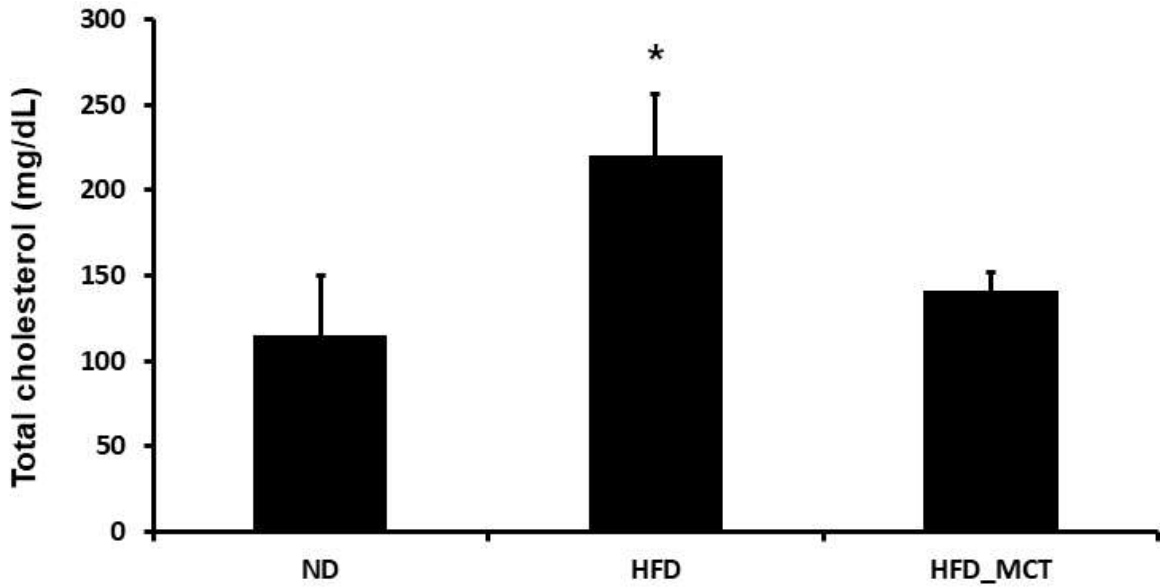


그림 6. ND군, HFD군 및 HFD\_MCT군의 혈중 총 콜레스테롤의 함량

- LDL 콜레스테롤은 주로 동맥 혈관 벽에 붙어 동맥경화를 일으키거나 심장질환의 원인이 되는 인자로 혈중 농도가 높아질수록 그 위험성이 커진다. 혈장 LDL 콜레스테롤의 농도는 HFD\_MCT군( $12.50 \pm 1.80$  mg/dL)이 HFD군( $18.10 \pm 5.80$  mg/dL)에 비하여 유의하게 낮았으며, ND군( $12.70 \pm 3.70$  mg/dL)과는 유의한 차이가 없었다(그림 7). 이상의 결과는 동애등에의 증쇄지방산이 혈중 콜레스테롤의 상승을 억제시킨 결과라고 추정할 수 있다.

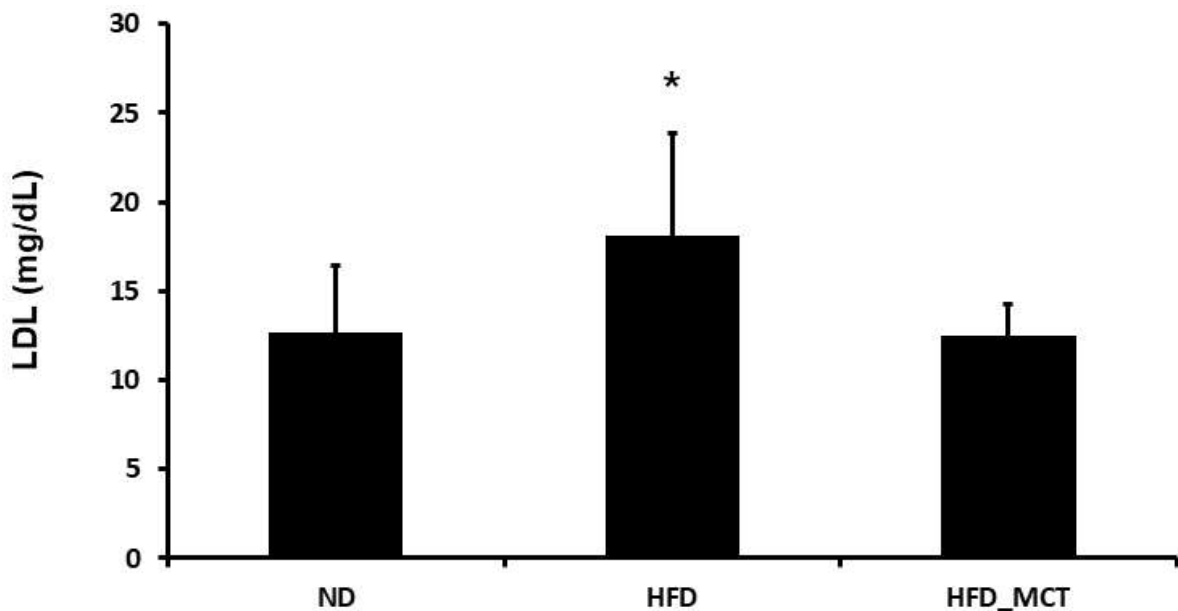


그림 7. ND군, HFD군 및 HFD\_MCT군의 혈중 LDL 콜레스테롤의 함량

- HDL 콜레스테롤의 경우 HFD\_MCT군( $96.10 \pm 8.20$  mg/dL)과 HFD군( $98.60 \pm 7.800$  mg/dL) 간에는 통계적 유의성이 인정되지 않는 반면에, ND군( $63.600 \pm 17.00$  mg/dL)의 HDL 콜레스테롤 양은 유의하게 낮았다(그림 8). HDL 콜레스테롤은 혈액 중의 동맥경화

를 일으키는 저분자 콜레스테롤을 제거하여 간으로 이동시키는 역할을 하는 좋은 콜레스테롤로 알려져 있어 동애등에의 중쇄지방산 섭취가 혈중 콜레스테롤 농도 개선에 도움을 줄 수 있을 것으로 판단된다.

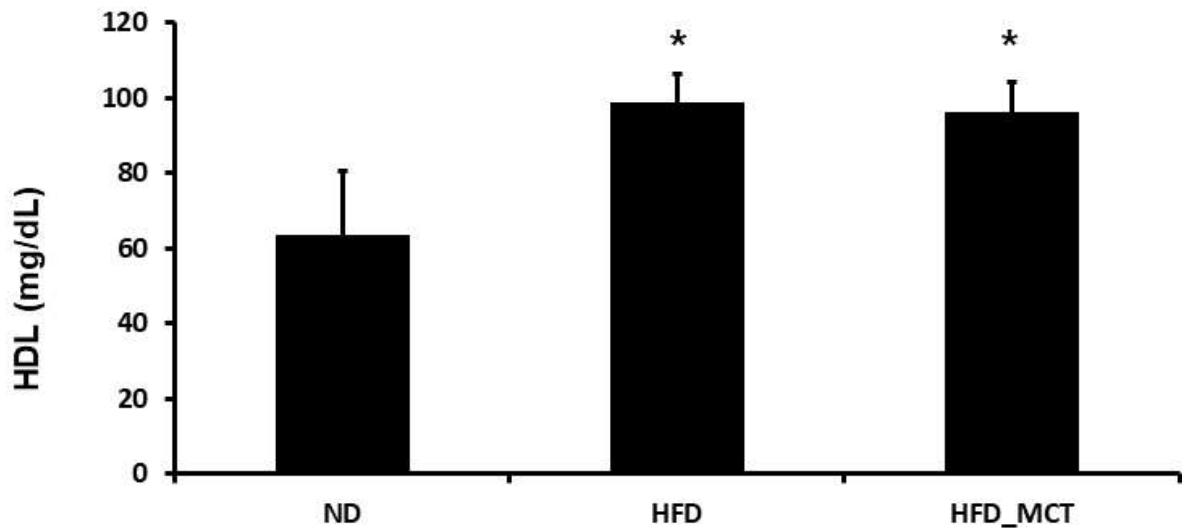


그림 8. ND군, HFD군 및 HFD\_MCT군의 혈중 HDL 콜레스테롤의 함량

- 비만이나 유전적 요인으로 체내 지질의 균형이 깨지면 혈장 내 lipoprotein인 LDL 콜레스테롤과 HDL 콜레스테롤의 비가 깨어지고, 그로 인한 동맥경화나 심혈관 질환 발생률이 높아진다고 보고되고 있다. 또한 혈중에 높은 농도의 콜레스테롤이 유지되면 동맥경화의 발생률이 증가하는데, 그 지표가 되는 것이 동맥경화지수(atherogenic index, AI)이다. 혈장 AI는 HFD군( $1.23 \pm 0.30$ ) > ND군( $0.81 \pm 0.30$ ) > HFD\_MCT군( $0.47 \pm 0.30$ ) 순으로 유의하게 높게 나타나 동애등에의 중쇄지방산 섭취가 동맥경화 지수를 유의하게 낮추어 줌을 확인할 수 있었다(그림 9).

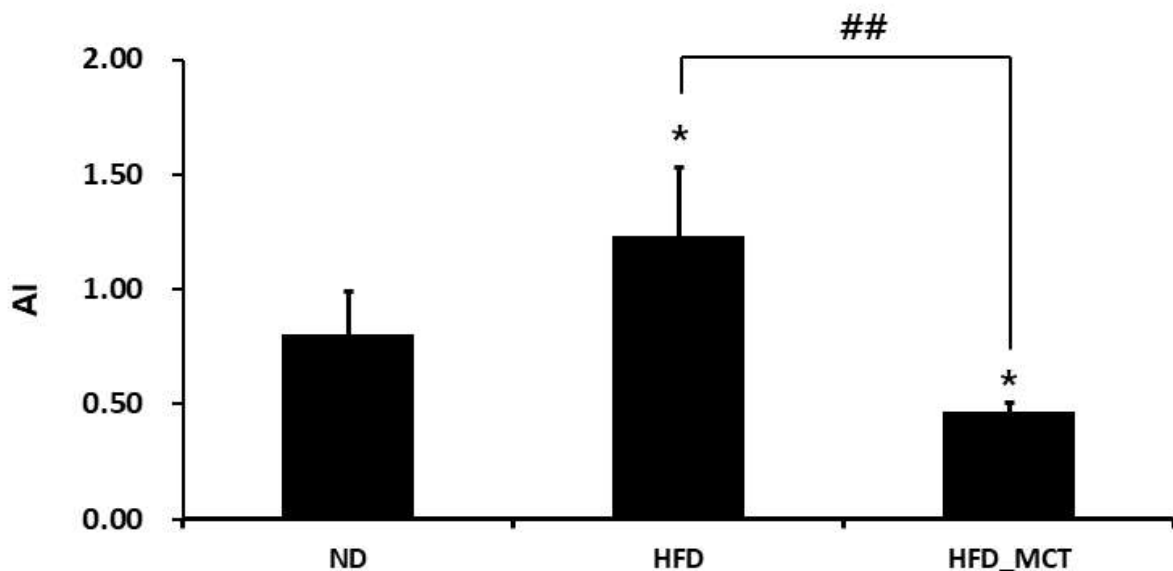


그림 9. ND군, HFD군 및 HFD\_MCT군의 혈장 동맥경화지수(atherogenic index, AI) 분석  
- 심혈관위험지수(cardiac risk factor, CRF) 또한 HFD군( $2.23 \pm 0.30$ ) > ND군( $1.81 \pm 0.19$ ) >

HFD\_MCT군( $1.47 \pm 0.04$ ) 순으로 높게 나타났으며, HFD\_MCT군은 HFD군과는 통계적 유의성이 인정되었으나, ND군과는 통계적 유의성이 인정되지 않았다(그림 10).

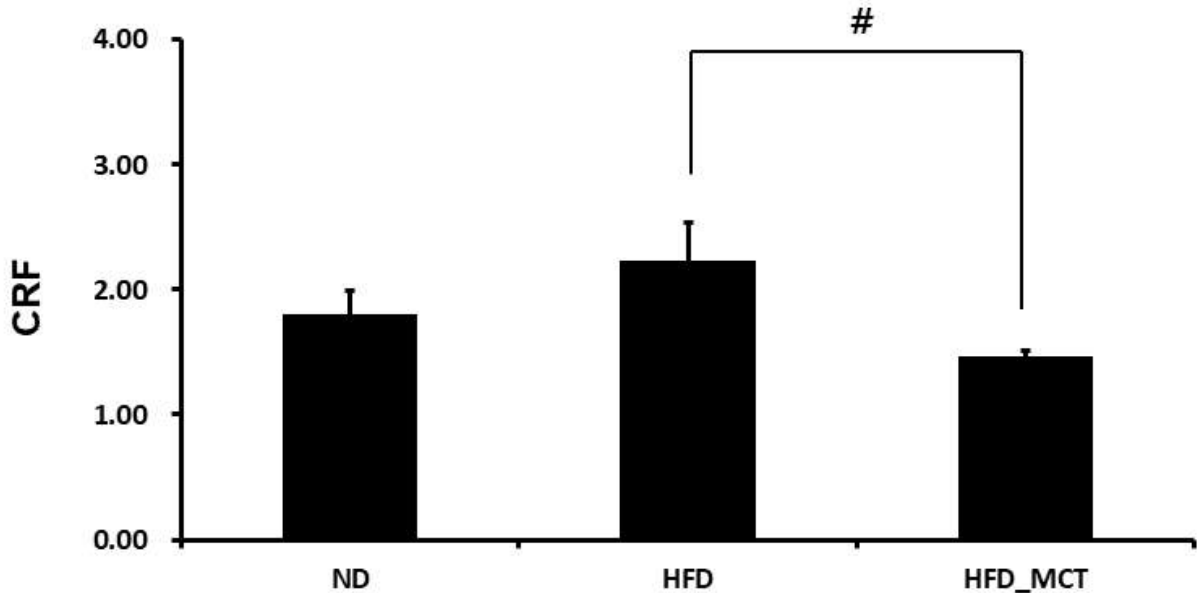


그림 10. ND군, HFD군 및 HFD\_MCT군의 혈장 심혈관위험지수(cardiac risk factor, CRF) 분석

○ 곤충 중쇄지방산 처리 마우스의 간 기능 효소 활성 분석

- 혈중 Aspartic acid transaminase (AST) 및 Alanine transaminase (ALT)를 이용하여 간 기능을 분석하였다. AST, ALT 효소는 간세포 내에 존재하는 효소로 세포가 파괴되거나 사멸하면 혈액 속으로 분비되어 혈액 내에서도 일정량이 검출 될 수 있다. 지방간이나 알코올의 섭취, 과체중 등의 이유로 간에 염증이나 세포의 파괴가 일어나면 정상적인 양보다 더 많은 AST, ALT가 혈액 속으로 분비된다. 혈액 내에 존재하는 AST의 양을 관찰한 결과, ND군은  $9.96 \pm 1.57$  U/L, HFD\_MCT군은  $7.65 \pm 5.45$  U/L, HFD군은  $10.30 \pm 2.41$  U/L으로 모두 정상 범위(0-20 IU/L)의 결과를 나타내었다. 그러나 HFD군의 AST 값이 ND군 및 HFDIO군의 값보다 유의하게 높게 나와 고지방 섭취로 인한 지방 대사 이상으로 간세포로부터 혈액 속으로 AST 효소가 많이 유출되고 있음을 확인할 수 있었다. 혈액 내에 존재하는 ALT의 양은 HFD\_MCT군은  $1.58 \pm 0.42$  U/L, ND군은  $2.66 \pm 0.47$  U/L, HFD군은  $3.10 \pm 1.03$  U/L으로 세 군 모두 정상범위(0-15 IU/L)의 결과를 나타내었으나, HFD군의 ALT 값이 HFD\_MCT군의 값보다 유의하게 높게 나와 고지방 섭취로 인한 지방 대사 이상으로 간세포의 파괴로 혈액 속으로 ALT 효소가 많이 유출되고 있는 것으로 판단되었다(그림 11).

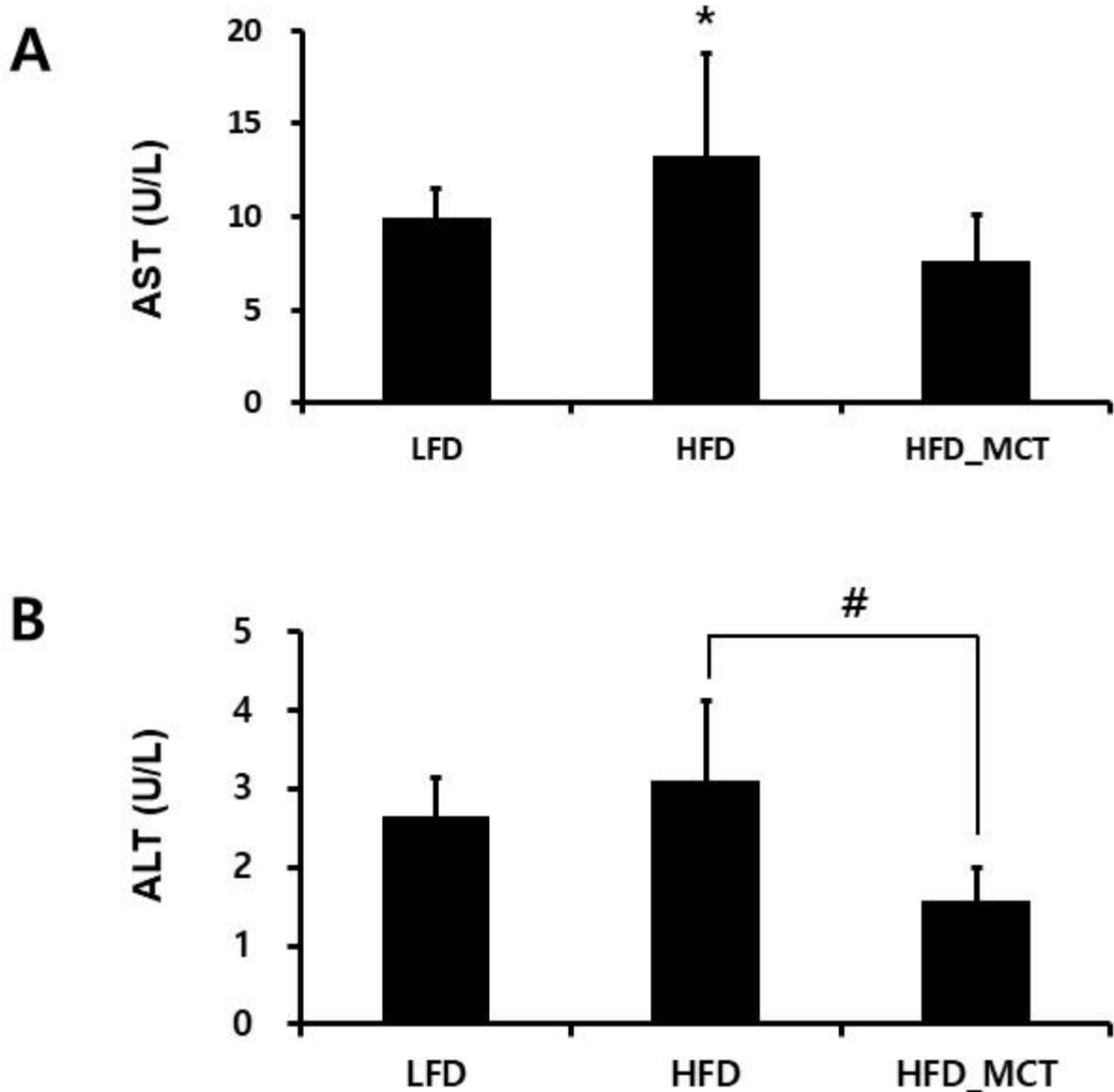


그림 11. ND군, HFD군 및 HFD\_MCT군의 혈중 AST(A) 및 ALT(B)를 이용한 간 기능 분석

○ 곤충 중쇄지방산 처리 마우스의 혈액요소질소 및 크레아틴 농도 분석

- 혈액요소질소(blood urea nitrogen, BUN)의 측정 결과는 HFD군( $17.50 \pm 1.65$  mg/dL), HFD\_MCT군( $13.80 \pm 1.45$  mg/dL), ND군( $15.01 \pm 3.20$  mg/dL)으로 HFD\_MCT군과 ND군의 값은 유의한 차이가 없었으나 HFD군과는 통계적 유의성이 인정되었다. 혈액요소질소(BUN)의 정상범위는 7.5-20.0 mg/dL의 범위로 세군 모두 정상 범위로 나타났다. 요소는 단백질 중의 질소 최종 대사산물로서 주로 간에서 합성되는 물질로 알려져 있다. 단백질의 대사과정 중에 발생하는 암모니아는 몸에 유독하지 않게 요소로 변경되어 혈액을 통하여 신장으로 이동한 후 뇨로 배설된다. 임상에서는 이렇게 생성된 요소를 일반적인 질소성분과 비교하기 위해 요소질소량(UN)으로 나타내는데 신장의 기능이 저하되면 뇨로 배설되는 요소질소량이 줄어들어 혈액 중의 요소질소량이 증가하게 된다. 또한 혈액은 요소질소에 대한 버퍼기능이 있어 버퍼의 기능이 50%이하로 떨어지기 전에는 요소질



소량이 정상치로 유지되는 것처럼 보이기 때문에 혈중 요소질소의 양이 정상치 이상으로 측정되면 이미 신장의 기능저하가 진행된 상황으로 판단할 수 있다. 혈액요소질소(BUN) 과 함께 신장 기능의 지표가 되는 크레아틴(creatinine)의 농도는 HFD군>ND군 >HFD-MCT군 순으로 높게 나타났으나 통계적 유의성은 인정되지 않았고, 세 군 모두 정상 (0.7-1.4mg/dL)으로 나타났다(그림 12).

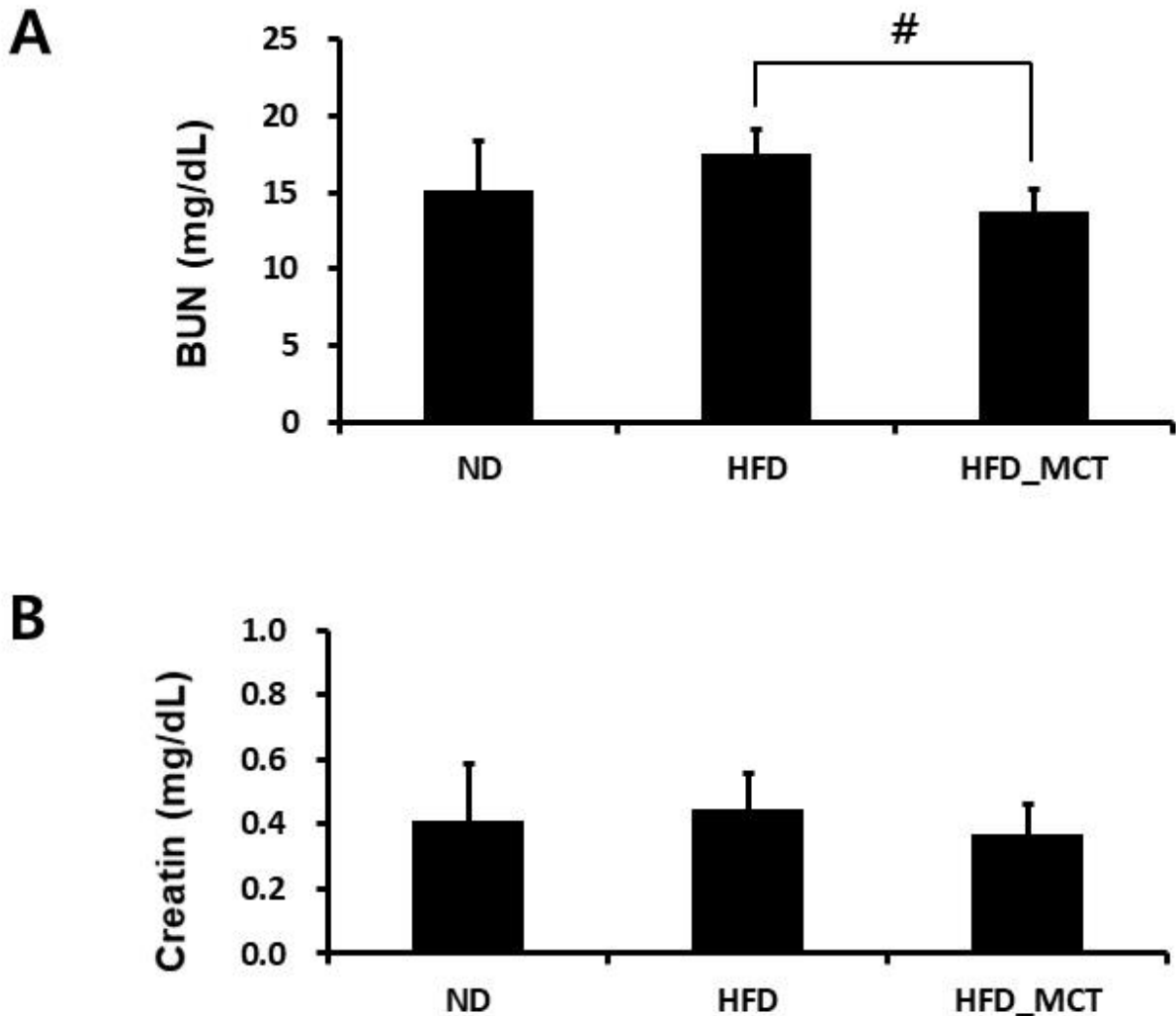


그림 12. ND군, HFD군 및 HFD\_MCT군의 혈중 혈액요소질소(blood urea nitrogen, BUN) 및 크레아틴(creatinine) 농도 분석

○ 곤충 중쇄지방산 처리 마우스의 렙틴 농도 분석

- 혈장 렙틴 농도를 측정한 결과, HFD군( $73.70 \pm 0.8$  ng/mL)>ND군( $13.03 \pm 3.8$  ng/mL)>HFD\_MCT군( $2.30 \pm 0.4$  ng/mL)>의 순으로 각 군 간에 고도의 유의한 차이를 보였다. 이는 정상식이 또는 고지방식이로 높아진 혈중 렙틴의 양이 동태등에의 중쇄지방산을 섭취하면서 유의하게 감소됨을 알 수 있었다. 혈중 렙틴의 양은 에너지를 과잉 섭취할 경우 식욕억제를 위해 생성이 증가하는 물질이므로 비만의 지표로 사용할 수 있다. 또한, 혈중 렙틴의 양은 체중 및 체지방과 상관관계가 높다고 보고되고 있다. 이러한 보

고들을 참고할 때 동태등에 중쇄지방산의 섭취는 체중 및 체지방을 감소시키고 혈중 렙틴의 농도도 감소시키는 것으로 생각할 수 있었다.

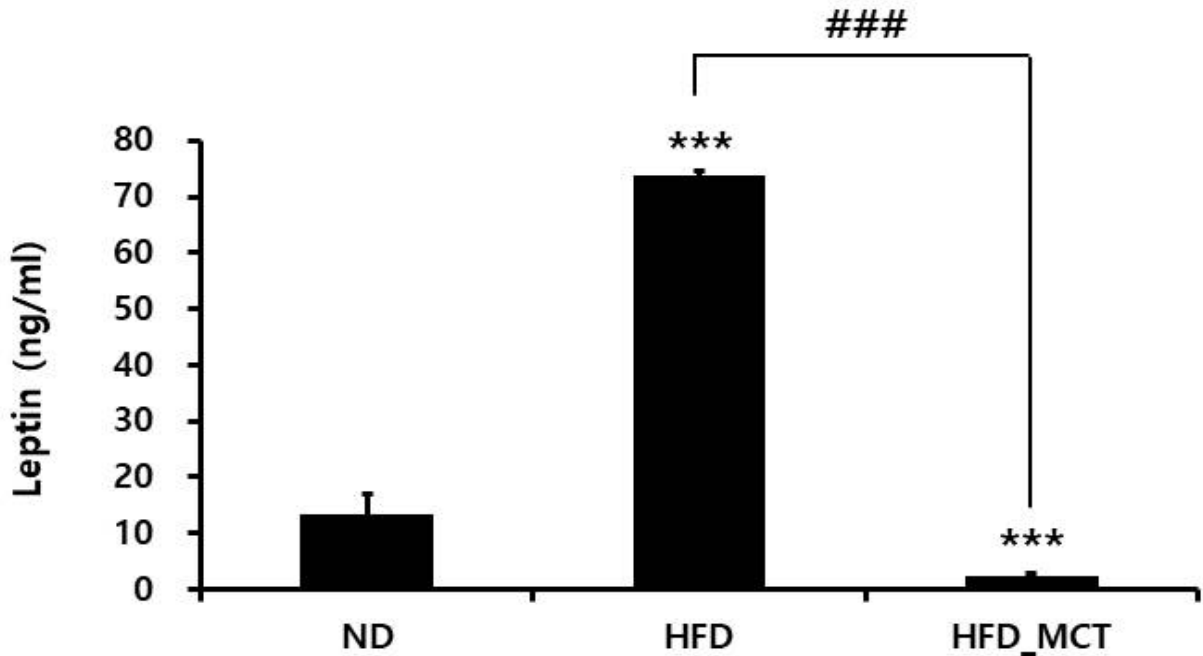


그림 12. ND군, HFD군 및 HFD\_MCT군의 혈중 렙틴(leptin) 농도 분석

○ 비만마우스의 시상하부 내 ER stress 발현 분석

- 비만이 마우스의 시상하부의 ER stress를 유발하는지 조사하기 위해 수컷 마우스(C57BL/6J)에게 10 주간 HFD(지방 60%)와 ND(지방 10%)를 공급했다. HFD를 먹인 마우스의 체중은 ND를 먹인 생쥐의 체중보다 유의하게 높았다. ND 및 HFD를 먹인 생쥐의 시상 하부에서 mRNA를 분리하고 ER stress 반응 마커(Grp78, Chop, splicing된 Xbp-1s, Atf4 및 ER DnaJ homolog 4E(Erd4))에 대한 각각 real-time PCR로 전사체 발현분석을 수행하였다. 그 결과, 실험에 사용한 모든 ER stress 반응 마커의 발현 수준은 HFD 유도 마우스에서 급격히 증가하여, HFD가 시상하부의 ER stress를 유도하고 시상하부 세포에서 UPR (unfolded protein response) 신호 전달 경로를 활성화시키는 것으로 판단하였다(그림 4).

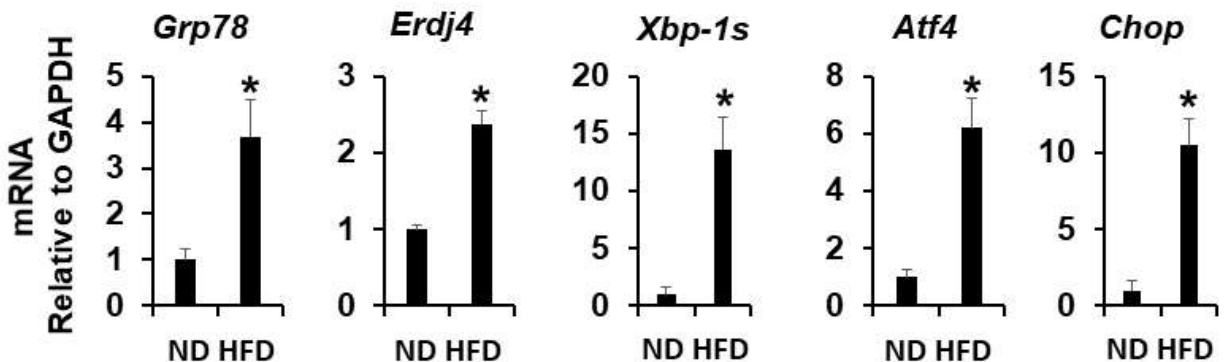


그림 12. 고지방식(HFD) 급이 마우스의 시상하부 ER stress 증가. HFD는 비만 마우스에서 ER stress 반응 마커의 mRNA 발현 수준을 극적으로 상향 조절했음

○ 곤충 중쇄지방산의 ER stress 반응 마커 발현 억제 효과 분석

- HFD 및 HFD\_MCT 급이 비만마우스의 시상하부의 ER stress 반응 마커(CHOP 및 Bip)의 발현 수준을 극적으로 감소시켰다. 또한, HFD\_MCT급이 비만 마우스에서 ER stress 반응 유전자 (Grp78, chop, Xbp-1s, Atf4 및 Erdj4)의 mRNA 발현 수준은 HFD 비만 마우스 보다 유의하게 낮았다.
- 이상의 결과는 동애등에의 중쇄지방산이 HFD 급이 비만 마우스 시상하부의 증가된 ER stress를 감소시킬 수 있음을 나타낸다(그림 13).

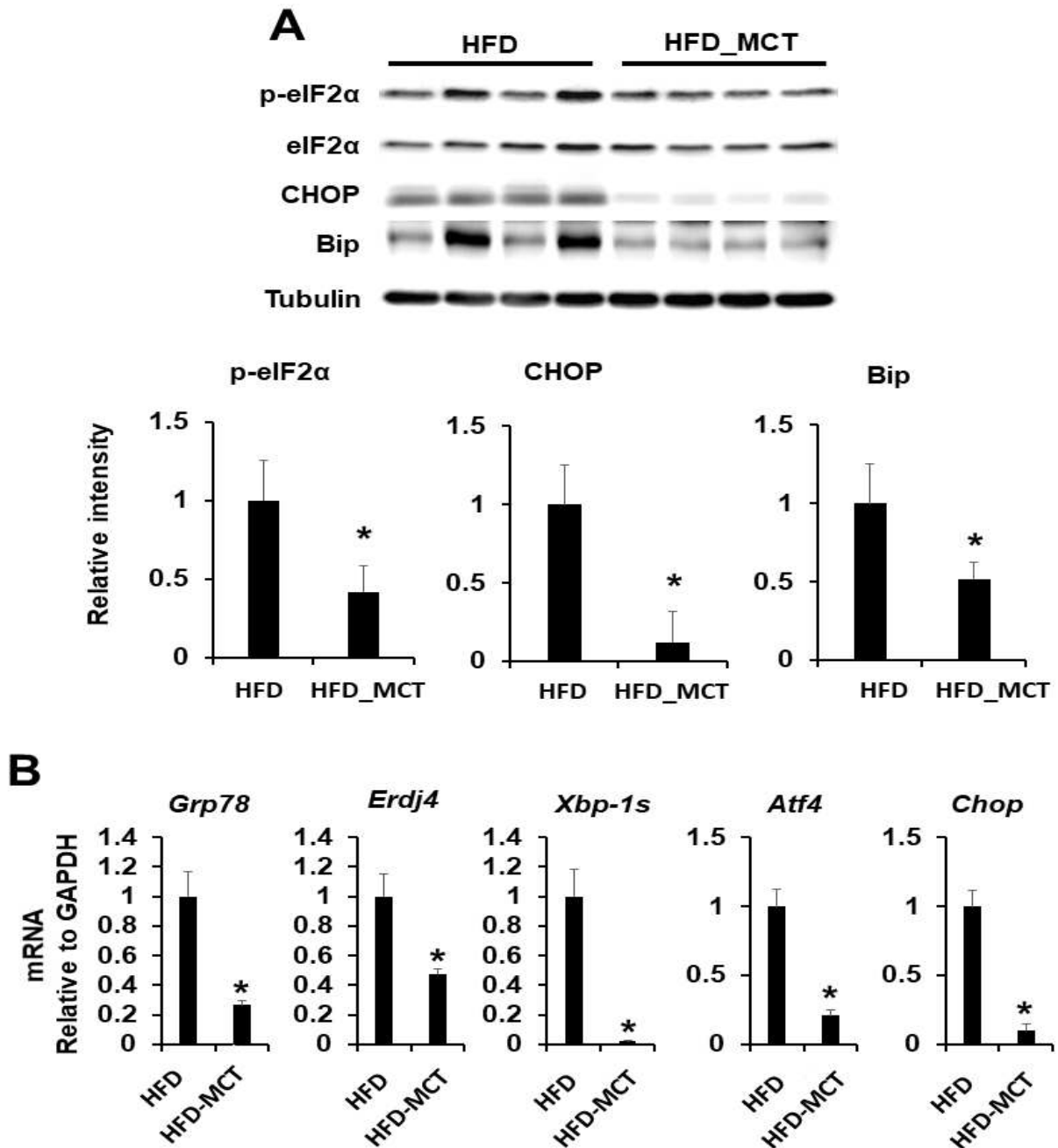


그림 13. HFD 및 HFD\_MCT 급이 마우스의 ER stress 반응 마커 발현 분석 (A) 동애등에 중쇄 지방산 급이에 의한 시상하부 ER stress 반응 마커의 발현 효과. (B) 시상하부 ER stress 반응 성 마커의 mRNA 발현에 대한 동애등에 중쇄지방산의 효과.

(2) 정량적 연구개발성과(해당 시 작성하며, 연구개발과제의 특성에 따라 수정이 가능합니다)

< 정량적 연구개발성과표(예시) >

(단위: 건, 천원)

성과지표명	연도	1단계 (YYYY~YYYY)	n단계 (YYYY~YYYY)	계	가중치 (%)
전담기관 등록·기탁 지표 <sup>1)</sup>	목표(단계별)				
		실적(누적)			
	실적(누적)				
연구개발과제 특성 반영 지표 <sup>2)</sup>	목표(단계별)				
		실적(누적)			
	실적(누적)				
계					

< 연구개발성과 성능지표(예시) >

평가 항목 (주요성능 <sup>1)</sup> )	단위	전체 항목에서 차지하는 비중 <sup>2)</sup> (%)	세계 최고		연구개발 전 국내 성능수준	연구개발 목표치		목표설정 근거
			보유국/보유기관	성능수준	성능수준	1단계 (YYYY~YYYY)	n단계 (YYYY~YYYY)	
1								
2								

(3) 세부 정량적 연구개발성과(해당되는 항목만 선택하여 작성하되, 증빙자료를 별도 첨부해야 합니다)

[과학적 성과]

성과목표	사업화지표										연구기반지								
	지식 재5권				기술 실시 (이전)		300사업화				기술 인증	학술성과			교육 지도	인력 양성	정책 활용· 홍보		기타 (타 연구 활용 등)
	특 허 출원	특 허 등록	품 종 등록	S M A R T	건 수	기 술 료	제 품 화	매 출 액	수 출 액	고 용 창 출		투 자 유 치	논 문 SC I	비 SC I			학 술 평 균 IF	정 책 활 용	
건	건	건	평 균 등 급	건	백 만 원	건	백 만 원	백 만 원	백 만 원	건	건	건	건	명	건	건			
가중치	15	20		15		25	10		5				10						
최종목표	3	3		1		2	9100		7		2		4						
2021년도	2												2						
2022년도	1	1		1		2	300		1		2		2						
소 계	3	1		1		2	300		1		2		4						
최 중 실 적	그린 테크	1			1		2		1										
	세종대	2	1								1		5				31		
	한석원												3						
	동국대										2		4						
합 계	3	1		1		2		1			3		12				31		

□ 논문(국내외 전문 학술지) 게재

번호	논문명	학술지명	주저자명	호	국명	발행기관	SCIE 여부 (SCIE/비SCIE)	게재일	등록번호 (ISSN)	기여율
1	Optimization of Feed Components to Improve <i>Hermetia illucens</i> Growth and Development of Oil Extractor to Produce Biodiesel	Animal s	이규식	11(9)	스위스	MDPI	SCI	2021.09.01	2076-2615	50%
2	Evaluation of Antimicrobial Activity in the Extract of Defatted <i>Hermetia illucens</i> Fed Organic Waste Feed Containing Fermented Effective Microorganisms	Animal s	이규식	12(6)	스위스	MDPI	SCI	2022.03.08	2076-2615	50%
3	Potential of antimicrobial peptide-overexpressed <i>Tenebrio molitor</i> larvae extract as a natural preservative for Korean traditional sauce	Insects	황두선, 이승훈, 구태원, 윤은영	13(4)	스위스	MDPI	SCIE	22.04.13	2075-4450	50%

□ 국내 및 국제 학술회의 발표

번호	회의 명칭	발표자	발표 일시	장소	국명
1	2021년도 한국생명과학회 30주년 기념 제 63회 정기총회 및 국제학술대회	이규식, 윤은영, 구태원	2021.08.12.	부산 롯데호텔 서면	대한민국
2	2021년도 한국생명과학회 30주년 기념, 제63회 정기총회 및 국제학술대회	이규식, 윤은영, 구태원	2021.08.12.	부산 롯데호텔 서면	대한민국
3	제65회 한국잡사학회 춘계학술대회	박관호, 윤은영, 구태원	2022.05.11.	대전 호텔인터시티	대한민국
4	제65회 한국잡사학회 추계학술대회	이규식, 윤은영, 구태원	2022.10.13.	제주 베스트웨스턴 호텔	대한민국
5	2021 추계 한국잡사학회	황두선, 윤은영	2021.11.04.	대전, 호텔 인터시티	대한민국
6	한국식품저장유통학회 추계심포지엄	윤은영	2021.11.05.	안동대학교 국제교류관	대한민국
7	2021 한국에너지학회 추계학술발표회	주다정, 박조용	2021.11.05.	제주 메종 글래드 제주 호텔	대한민국
8	한국신·재생에너지학회 2022년 춘계학술대회	주다정, 박조용, 이상훈	2022.04.15.	대구 EXCO	대한민국
9	AFORE 2022	주다정, 박조용, 김재곤, 황인하	2022.09.30.	제주 라마다 프라자 호텔	대한민국
10	제65회 한국잡사학회 춘계학술대회	황두선, 이승훈, 구태원, 윤은영	2022.05.11.	대전 호텔인터시티	대한민국
11	제65회 한국잡사학회 추계학술대회	황두선, 이승훈, 구태원, 윤은영	2022.10.13.	제주 베스트웨스턴 호텔	대한민국
12	제65회 한국잡사학회 추계학술대회	이승훈, 황두선, 구태원, 윤은영	2022.10.13.	제주 베스트웨스턴 호텔	대한민국

□ 기술 요약 정보

연도	기술명	요약 내용	기술 완성도	등록 번호	활용 여부	미활용사유	연구개발기관 외 활용여부	허용방식

□ 보고서 원문

연도	보고서 구분	발간일	등록 번호

생명자원(생물자원, 생명정보)/화합물

번호	생명자원(생물자원, 생명정보)/화합물 명	등록/기탁 번호	등록/기탁 기관	발생 연도

[기술적 성과]

지식재산권(특허, 실용신안, 의장, 디자인, 상표, 규격, 신제품, 프로그램)

번호	지식재산권 등 명칭 (건별 각각 기재)	국명	출원				등록			기여율	활용 여부
			출원인	출원일	출원 번호	등록 번호	등록인	등록일	등록 번호		
1	탈수슬러지를 이용한 곤충 사육 방법 및 곤충 유래 고효율 지질 추출 방법	대한민국	그린테코	2022.12.30.	10-2022-0191003					100%	
2	지방 함량 증대를 위한 갈색거저리용 사료 및 이의 제조방법	대한민국	세종대 산단, 그린테코	2022.06.13.	10-2022-0071811	10-2462551	세종대 산단, 그린테코	2022.10.28.	10-2462551	70%	
3	지방 함량 증대를 위한 아메리카왕거저리용 사료 및 이의 제조방법	대한민국	세종대 산단, 그린테코	2021.11.29.	10-2021-0166648					70%	

지식재산권 활용 유형

\* 활용의 경우 현재 활용 유형에 √ 표시, 미활용의 경우 향후 활용 예정 유형에 √ 표시합니다(최대 3개 중복선택 가능).

번호	제품화	방어	전용실시	통상실시	무상실시	매매/양도	상호실시	담보대출	투자	기타
1	√									

[경제적 성과]

시제품 제작

번호	시제품명	출시/제작일	제작 업체명	설치 장소	이용 분야	사업화 소요 기간	인증기관 (해당 시)	인증일 (해당 시)
1	사료용 그린오	2023.04.01.	그린테코(주)		혼합, 단미 사료 또는 첨가 사료 등 사용			
2	추출물 그린오	2023.04.01.	그린테코(주)		화장품 원료, 항비만 소재, 천연방부제			

기술 실시(이전)

번호	기술 이전 유형	기술 실시 계약명	기술 실시 대상 기관	기술 실시 발생일	기술료 (해당 연도 발생액)	누적 징수 현황
1	산업체이전	'곤충자원의 유용 지질을 이용한 고부가가치화 기술 개발' 노하우 기술의 통상 실시 계약	그린테코(주)	2023.01.30.		

사업화 투자실적

번호	추가 연구개발 투자	설비 투자	기타 투자	합계	투자 자금 성격*

□ 사업화 계획 및 무역 수치 개선 효과

성과				
사업화 계획	사업화 소요기간(년)	23년 4월 이후		
	소요예산(천원)			
	예상 매출규모(천원)	현재까지	3년 후	5년 후
		50,000	100,000	165,000
	시장 점유율	단위(%)	현재까지	3년 후
국내		0	0.01	0.05
국외				
향후 관련기술, 제품을 응용한 타 모델, 제품 개발계획		있음		
무역 수치 개선 효과(천원)	수입대체(내수)	현재	3년 후	5년 후
	수출			

□ 고용 창출

순번	사업화명	사업화 업체	고용창출 인원(1명)		합계
			2021년	yyyy년	
1	유용농생명자원 산업화 기술개발사업	그린테코	2021.07.19		
합계					

□ 홍보 실적

번호	홍보 유형	매체명	제목	홍보일
1	중앙일간지	베리타스알파	세종대 스마트생명산업학과 윤은영 교수 연구팀, 곤충 바이오디젤 생산기술 공동 개발	2020.07.22.
2	중앙일간지	연합뉴스	석유관리원 “곤충 활용한 바이오디젤 제조 기술 확보”	2021.06.25.
3	중앙일간지	뉴스핌권	‘이낌없이 주는 곤충’ 동애등에, 음식물쓰레기 먹고 기름 만든다	2021.06.25.
4	지방일간지	부산일보	석유관리원 “곤충 활용한 바이오디젤 제조 기술 확보”	2021.06.25.
5	중앙일간지	데일리안	한국석유관리원, 곤충 바이오디젤 제조 기술 확보	2021.06.25.
6	중앙일간지	가스신문	석유관리원, 곤충에서 바이오디젤 생산한다	2021.06.25.
7	중앙일간지	에너지플랫폼뉴스 지앤이타임즈	석유관리원, 곤충 유래 바이오디젤 생산 성공	2021.06.25.
8	중앙일간지	에너지경제신문	韓석유관리원이 확보한 바이오디젤 생산기술 곤충은?	2021.06.25.
9	중앙일간지	투데이에너지	석유관리원, 곤충 바이오디젤 제조기술 확보	2021.06.25.
10	중앙일간지	국토일보	‘곤충바이오디젤’로 CO2 잡는 석유관리원	2021.06.25.
11	중앙일간지	더나은미래	음식물쓰레기 처리하는 곤충, 바이오디젤 원료로	2021.06.25.
12	중앙일간지	전자신문	석유관리원, 곤충으로 바이오디젤 생산기술 확보	2021.06.25.
13	중앙일간지	한국경제TV	한국석유관리원, 곤충 바이오디젤 제조 기술 확보	2021.06.25.

14	중앙일간지	이투뉴스	석유관리원, 동해등에 활용 바이오디젤 생산기술 확보	2021.06.25.
15	지방일간지	광주매일신문	한국석유관리원 “곤충 바이오디젤 제조기술 확보”	2021.06.26.
16	중앙일간지	전기신문	“곤충으로 바이오디젤 만든다”	2021.06.27.
17	중앙일간지	컨슈머타임스	한국석유관리원, ‘곤충 바이오디젤 제조 기술’ 확보	2021.06.28.
18	중앙일간지	조선일보	세종대 스마트생명산업학과 윤은영 교수 연구팀, 곤충 바이오디젤 생산기술 공동 개발	2021.07.22.
19	중앙일간지	서울경제TV	윤은영 세종대 교수 연구팀, 곤충 바이오디젤 생산기술 공동 개발	2021.07.22.
20	중앙일간지	한국대학신문	윤은영 세종대 교수 연구팀, 곤충 바이오디젤 생산기술 공동 개발	2021.07.22.
21	중앙일간지	머니투데이	세종대 윤은영 교수 연구팀, 곤충 바이오디젤 생산기술 공동 개발	2021.07.22.
22	중앙일간지	핀포인트뉴스	세종대 윤은영 교수 연구팀, 곤충 바이오디젤 생산기술 공동 개발	2021.07.22.
23	중앙일간지	에너지경제신문	세종대 윤은영 교수 연구팀, 곤충 바이오디젤 생산기술 공동 개발	2021.07.22.
24	중앙일간지	여성소비자신문	세종대 스마트생명산업학과 윤은영 교수 연구팀, 곤충 바이오디젤 생산기술 공동 개발	2021.07.22.
25	중앙일간지	에듀동아	세종대 “윤은영 스마트생명산업융합학과 교수팀, 곤충 바이오디젤 생산기술 공동 개발”	2021.07.22.
26	중앙일간지	디지털타임스	세종대 윤은영 교수 연구팀, 곤충 바이오디젤 생산기술 공동 개발	2021.07.22.
27	중앙일간지	스마트경제	윤은영 세종대 스마트생명산업융합학과 교수 연구팀, 곤충 바이오디젤 생산기술 공동 개발	2021.07.22.
28	중앙일간지	교수신문	세종대 스마트생명산업융합학과 윤은영 교수 연구팀, 곤충 바이오디젤 생산기술 공동 개발	2021.07.22.
29	중앙일간지	더퍼블릭	세종대, 스마트생명산업융합학과 윤은영 교수팀 '바이오디젤 생산 기술' 연구	2021.07.22.
30	중앙일간지	한국강사신문	세종대학교 스마트생명산업융합학과 윤은영 교수팀, 곤충 바이오디젤 생산기술 공동 개발	2021.07.22.
31	중앙tv방송	KBS	[집중취재] "90%가 영세 농가" 판로 확보가 관건	2022.07.01.



□ 포상 및 수상 실적

번호	종류	포상명	포상 내용	포상 대상	포상일	포상 기관
1	수상	우수논문 발표상 (최우수상)	2022년 한국잠사학회 잠사·곤충 춘계학술대회에서 우수한 연구결과 구두 발표	황두선	2022-05-12	사단법인 한국잠사학회

[인프라 성과]

□ 연구시설·장비

구축기관	연구시설/ 연구장비명	규격 (모델명)	개발여부 (○/×)	연구시설·장비 종합정보시스템* 등록여부	연구시설·장비 종합정보시스템* 등록번호	구축일자 (YY.MM.DD)	구축비용 (천원)	비고 (설치 장소)

\* 「과학기술기본법 시행령」 제42조제4항제2호에 따른 연구시설·장비 종합정보시스템을 의미합니다.

[그 밖의 성과](해당 시 작성합니다)

(4) 계획하지 않은 성과 및 관련 분야 기여사항(해당 시 작성합니다)

2) 목표 달성 수준

추진 목표	달성 내용	달성도(%)
○ 곤충자원으로부터 고효율 지질 개발 및 지방산 추출 개발 구 축	○ 고효율 지질로부터 고부가 지방산 소형 추출 개발: 카본 12개, 라우릭산 등 - 협동기관 제공(라우릭산, C <sub>13</sub> 이상 지방산)	100
○ 곤충자원으로부터 고효율 지질 개발 및 지방산 추출 개발 확 립	○ 고효율 지질로부터 고부가 지방산 대량 추출 개발(1차년 보완): 카본 12개, 라우릭산 등 - 협동기관 제공(라우릭산, C <sub>13</sub> 이상 지방산)	100
○ 경제성 분석 및 산업화	○ 생산 원가 분석 및 경제성 분석, 시제품 2개 출시	100
○ 발효를 통한 바이오디젤 생산 용 곤충의 지질 및 생산성 향 상을 위한 사료 조성 개발: 2종	○ 발효를 통해 기존 갈색거저리와 아메리카동애 등에 사료인 밀기울과 음식물쓰레기보다 높은 증체량을 가지며 갈색거저리의 경우 지방함량 을 약 18% 증대시키는 사료 조성을 개발하여 바이오디젤 생산용 곤충으로써의 생산성과 경 제성을 향상시킴	100
○ 발효를 통한 곤충 지질 유래 기능성 화장품 소재 개발: 1종	○ 발효 조건과 방법을 확립하여 발효된 갈색거 저리와 아메리카동애 등에 유래 지질을 활용하 여 미백과 주름개선 기능을 검정한 결과 비	100

	발효 지질보다 높은 기능성을 확인하였고 기능성화장품 등록을 위한 기초자료로 활용하고자 인체접포시험을 수행한 결과 이상반응이 없어 비자극성인 것으로 확인되었음	
○ 부산물 지질을 활용한 바이오디젤 합성 및 품질 향상 기술 개발	○ 부산물 지질을 활용한 바이오디젤 합성 반응 최적화 및 국내 바이오디젤 품질 기준 적합성 검증	100
○ 곤충 유래 바이오디젤의 연료 안정성 검증 및 산업화 모델 제시	○ 석유계 경유와 혼합한 연료의 혼합 안정성 평가 진행 및 가속노화 조건에서의 바이오디젤의 품질 특성을 통한 저장안정성 평가 및 금속 재질별 무게변화 및 금속분 함량변화 평가	100
○ 곤충 유래 중쇄지방산의 세포 독성 분석	○ 소장 상피세포(Caco-2 cells), 신경세포 (hypothalamic neuronal GT1-7 cells) 및 섬유아세포(L929 cell) 독성 분석	100
○ 곤충 중쇄지방산의 비만 관련 분자마커의 발현 억제 효능 분석	○ N- glycosylation 억제제인 tunicamycin에 의한 신경세포GT1-7) 내 비만 표지 분자마커 유도	100
○ 곤충 중쇄지방산의 leptin signaling을 통한 식욕 부진 효과 분석	○ 곤충 중쇄지방산의 신경세포(GT1-7) 농도별 처리 농도별 비만 표지 분자마커의 발현 분석: Grp78, CHOP, eIF2 $\alpha$ , phospho-eIF2 $\alpha$	100
	○ Tunicamycin 및 중쇄지방산 농도별 처리 후 phospho-JAK2 및 phospo-STAT3 발현 비교 분석	100
○ 비만에 의한 마우스의 시상하부 비만 표지 분자마커 유발 여부 확인	○ 수컷 마우스(C57BL/6J)에게 12 주간 HFD(지방 60%)와 LFD(지방 10%)를 각각 공급	100
	○ 소포체 스트레스 반응 마커(p-eIF2 $\alpha$ , Bip, Chop, Grp78, Erdj4, Xbp-1s, Atf4) 분석	100
○ 곤충 중쇄지방산의 비만 마우스 항비만 효능 분석	○ 중쇄지방산의 소포체 스트레스 반응 마커 발현 억제 효과 분석	100
	○ 중쇄지방산이 비만마우스의 섭취량 및 체중 변화에 미치는 효과 분석	100
	○ leptin signaling을 통한 식욕 부진 효과 분석	100

4. 목표 미달 시 원인분석(해당 시 작성합니다)

1) 목표 미달 원인(사유) 자체분석 내용

관련사항 없음

2) 자체 보완활동

관련사항 없음

3) 연구개발 과정의 성실성

관련사항 없음

5. 연구개발성과의 관련 분야에 대한 기여 정도

6. 연구개발성과의 관리 및 활용 계획

연구개발성과 활용계획표 성과항목 중 사업화 계획(매출액, 기술료 등) 작성 필수

< 연구개발성과 활용계획표(예시) >

구분(정량 및 정성적 성과 항목)		연구개발 종료 후 5년 이내				
		2023	2024	2025	2026	2027
국외논문	SCIE					
	비SCIE					
국내논문	SCIE					
	비SCIE					
특허출원	국내					
	국외					
특허등록	국내	1	1			
	국외					
인력양성	학사	1	1			
	석사			2		
	박사				1	1
사업화	시제품개발		1			
	상품출시					
	기술이전					
	공정개발					
	매출액(단위: 천원)	400,000	800,000	1,600,000	2,500,000	3,500,000
	기술료(단위: 천원)					
비임상시험 실시						
임상시험 실시 (IND 승인)	의약품	1상				
		2상				
3상						
	의료기기					
진료지침개발						
신의료기술개발						
성과홍보						
포상 및 수상실적						
정성적 성과 주요 내용						

## <참고문헌>

1. Jeong, Y.D.; Lee, J.J.; Kim, J.E.; Kim, D.W.; Min, Y.J. Cho, E.S.; Yu, D.J.; Kim, Y.H. Effects of dietary supplementation of fermented wheat bran on performance and blood profiles in weaned pig. *Korean J. Agri. Sci.* **2017**. 44(3): 409–415.
2. Kim, D.H.; Joo, Y.H.; Lee, H.J.; Lee, S.S.; Paradhipta, D.H.V.; Choi, N.J.; Kim, S.C. Effect of inoculant application level on chemical compositions of fermented chestnut meal and its rumen fermentation indices. *J. Environ. Sci. Intn.* **2018**. 27(5): 333–340.
3. Park, K.K.; Park, H.Y.; Jung, Y.C.; Lee, E.S.; Yang, S.Y.; Im, B.S.; Kim, C.J. Effects of fermented food waste feeds on pork carcass and meat quality properties. *J. Food Sci. Technol.* **2005**. 37(1): 38–43.
4. 이희삼, 최지영, 박관호, 김원태, 김은성, 남성희, 박해철, 김성현, 김미애, 박인균, 황재삼, 안미영, 윤형주, 이경용, 신민지, 송명하, 이석현, 김선영, 박영규, 이상현, 이준석. 알기쉬운 산업곤충 사육기준 및 규격(개정). 국립농업과학원 농업생물부. **2017**.
5. Song YJ, Yu HH, Kim YJ, Lee NK, Paik HD. Anti-Biofilm Activity of Grapefruit Seed Extract against *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli*. *J Microbiol Biotechnol.* **2019**. 29(8):1177–1183.
6. Mendoza AC, da Rocha AC, Parra JR. Lyophilized artificial diet for rearing the Neotropical *Euschistus heros* (Hemiptera: Pentatomidae). *J Insect Sci.* **2016**.16(1):41.
7. Pillaiyar T, Manickam M, Namasivayam V. Skin whitening agents: medicinal chemistry perspective of tyrosinase inhibitors. *J Enzyme Inhib Med Chem.* **2017**. 32(1):403–425.
8. Gelse K, Pöschl E, Aigner T. Collagens—structure, function, and biosynthesis. *Adv Drug Deliv Rev.* **2003**. ;55(12):1531–1546.
9. Xu KH, Zhou M, Wu FL, et al. Identification and characterization of a novel elastase inhibitor from *Hirudinaria manillensis*. *Chin J Nat Med.* **2021**.19(7):540–544.
10. Kaplan, S.A. (2011) Re: National, regional, and global trends in body-mass index since 1980: systematic analysis of health examination surveys and epidemiological studies with 960 country-years and 9.1 million participants. *J Urol* 186(5), 1982–1983.
11. Kopelman, P. (2007) Health risks associated with overweight and obesity. *Obes Rev* 8 Suppl 1, 13–17.
12. Morton, G.J., Cummings, D.E., Baskin, D.G., Barsh, G.S. and Schwartz, M.W. (2006) Central nervous system control of food intake and body weight. *Nature* 443(7109), 289–295.
13. Elmquist, J.K., Coppari, R., Balthasar, N., Ichinose, M. and Lowell, B.B. (2005) Identifying hypothalamic pathways controlling food intake, body weight, and glucose homeostasis. *J Comp Neurol* 493(1), 63–71.
14. Grossman, S.P. (1975) Role of the hypothalamus in the regulation of food and water intake. *Psychol Rev* 82(3), 200–224.
15. 16. Gura, T. (1997) Obesity sheds its secrets. *Science* 275(5301), 751–753.
17. D'Angelo, E., Robatto, F.M., Calderini, E., Tavola, M., Bono, D., Torri, G. and Milic-Emili, J. (1991) Pulmonary and chest wall mechanics in anesthetized paralyzed humans. *J Appl Physiol* (1985) 70(6), 2602–2610.

18. Milanski, M., Degasperi, G., Coope, A., Morari, J., Denis, R., Cintra, D.E., Tsukumo, D.M., Anhe, G., Amaral, M.E., Takahashi, H.K., Curi, R., Oliveira, H.C., Carnevali, J.B., Bordin, S., Saad, M.J. and Velloso, L.A. (2009) Saturated fatty acids produce an inflammatory response predominantly through the activation of TLR4 signaling in hypothalamus: implications for the pathogenesis of obesity. *J Neurosci* 29(2), 359–370.
19. Denis, R.G., Arruda, A.P., Romanatto, T., Milanski, M., Coope, A., Solon, C., Razolli, D.S. and Velloso, L.A. (2010) TNF- $\alpha$  transiently induces endoplasmic reticulum stress and an incomplete unfolded protein response in the hypothalamus. *Neuroscience* 170(4), 1035–1044.
20. Ozcan, L., Ergin, A.S., Lu, A., Chung, J., Sarkar, S., Nie, D., Myers, M.G., Jr. and Ozcan, U. (2009) Endoplasmic reticulum stress plays a central role in development of leptin resistance. *Cell Metab* 9(1), 35–51.
21. Won, J.C., Jang, P.G., Namkoong, C., Koh, E.H., Kim, S.K., Park, J.Y., Lee, K.U. and Kim, M.S. (2009) Central administration of an endoplasmic reticulum stress inducer inhibits the anorexigenic effects of leptin and insulin. *Obesity (Silver Spring)* 17(10), 1861–1865.
22. Hosoi, T., Sasaki, M., Miyahara, T., Hashimoto, C., Matsuo, S., Yoshii, M. and Ozawa, K. (2008) Endoplasmic reticulum stress induces leptin resistance. *Mol Pharmacol* 74(6), 1610–1619.
23. Tsou, R.C. and Bence, K.K. (2012) Central regulation of metabolism by protein tyrosine phosphatases. *Front Neurosci* 6, 192.
24. Munzberg, H., Flier, J.S. and Bjorbaek, C. (2004) Region-specific leptin resistance within the hypothalamus of diet-induced obese mice. *Endocrinology* 145(11), 4880–4889.
25. Friedman, J.M. and Halaas, J.L. (1998) Leptin and the regulation of body weight in mammals. *Nature* 395(6704), 763–770.
26. Gautron, L. and Elmquist, J.K. (2011) Sixteen years and counting: an update on leptin in energy balance. *J Clin Invest* 121(6), 2087–2093.
27. Tanida, M., Yamamoto, N., Morgan, D.A., Kurata, Y., Shibamoto, T. and Rahmouni, K. (2015) Leptin receptor signaling in the hypothalamus regulates hepatic autonomic nerve activity via phosphatidylinositol 3-kinase and AMP-activated protein kinase. *J Neurosci* 35(2), 474–484.
28. Banks, A.S., Davis, S.M., Bates, S.H. and Myers, M.G., Jr. (2000) Activation of downstream signals by the long form of the leptin receptor. *J Biol Chem* 275(19), 14563–14572.
29. Kloek, C., Haq, A.K., Dunn, S.L., Lavery, H.J., Banks, A.S. and Myers, M.G., Jr. (2002) Regulation of Jak kinases by intracellular leptin receptor sequences. *J Biol Chem* 277(44), 41547–41555.
30. Ramirez, S. and Claret, M. (2015) Hypothalamic ER stress: A bridge between leptin resistance and obesity. *FEBS Lett* 589(14), 1678–1687.

31. Elmquist, J.K., Bjorbaek, C., Ahima, R.S., Flier, J.S. and Saper, C.B. (1998) Distributions of leptin receptor mRNA isoforms in the rat brain. *J Comp Neurol* 395(4), 535–547.
32. Sobrino Crespo, C., Perianes Cachero, A., Puebla Jimenez, L., Barrios, V. and Arilla Ferreira, E. (2014) Peptides and food intake. *Front Endocrinol (Lausanne)* 5, 58.
33. Jovanovic, Z. and Yeo, G.S. (2010) Central leptin signalling: beyond the arcuate nucleus. *Auton Neurosci* 156(1–2), 8–14.
34. Lewis, D.E., Shellard, L., Koeslag, D.G., Boer, D.E., McCarthy, H.D., McKibbin, P.E., Russell, J.C. and Williams, G. (1993) Intense exercise and food restriction cause similar hypothalamic neuropeptide Y increases in rats. *Am J Physiol* 264(2 Pt 1), E279–284.
35. Stephens, T.W., Basinski, M., Bristow, P.K., Bue-Valleskey, J.M., Burgett, S.G., Craft, L., Hale, J., Hoffmann, J., Hsiung, H.M., Kriauciunas, A. and et al. (1995) The role of neuropeptide Y in the antiobesity action of the obese gene product. *Nature* 377(6549), 530–532.
36. Cowley, M.A., Smart, J.L., Rubinstein, M., Cerdan, M.G., Diano, S., Horvath, T.L., Cone, R.D. and Low, M.J. (2001) Leptin activates anorexigenic POMC neurons through a neural network in the arcuate nucleus. *Nature* 411(6836), 480–484.
37. Schneeberger, M. and Claret, M. (2012) Recent Insights into the Role of Hypothalamic AMPK Signaling Cascade upon Metabolic Control. *Front Neurosci* 6, 185.
38. Akieda-Asai, S., Poleni, P.E. and Date, Y. (2014) Coinjection of CCK and leptin reduces food intake via increased CART/TRH and reduced AMPK phosphorylation in the hypothalamus. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 306(11), E1284–1291.
39. Munzberg, H. and Morrison, C.D. (2015) Structure, production and signaling of leptin. *Metabolism* 64(1), 13–23.
40. Minokoshi, Y., Alquier, T., Furukawa, N., Kim, Y.B., Lee, A., Xue, B., Mu, J., Fofelle, F., Ferre, P., Birnbaum, M.J., Stuck, B.J. and Kahn, B.B. (2004) AMP-kinase regulates food intake by responding to hormonal and nutrient signals in the hypothalamus. *Nature* 428(6982), 569–574.
41. Sagisaka, A., Miyanoshita, A., Ishibashi, J. and Yamakawa, M. (2001) Purification, characterization and gene expression of a glycine and proline-rich antibacterial protein family from larvae of a beetle, *Allomyrina dichotoma*. *Insect Mol Biol* 10(4), 293–302.
42. Miyanoshita, A., Hara, S., Sugiyama, M., Asaoka, A., Taniai, K., Yukuhiro, F. and Yamakawa, M. (1996) Isolation and characterization of a new member of the insect defensin family from a beetle, *Allomyrina dichotoma*. *Biochem Biophys Res Commun* 220(3), 526–531.
43. Suh, H.J., Kim, S.R., Lee, K.S., Park, S. and Kang, S.C. (2010) Antioxidant activity of various solvent extracts from *Allomyrina dichotoma* (Arthropoda: Insecta) larvae. *J Photochem Photobiol B* 99(2), 67–73.
44. Prete, P.E. (1997) Growth effects of *Phaenicia sericata* larval extracts on fibroblasts: mechanism for wound healing by maggot therapy. *Life Sci* 60(8), 505–510.

45. Armstrong, D.G., Mossel, J., Short, B., Nixon, B.P., Knowles, E.A. and Boulton, A.J. (2002) Maggot debridement therapy: a primer. *J Am Podiatr Med Assoc* 92(7), 398–401.
46. Chambers, L. and Duffy, M.L. (2003) Determination of total and speciated sulfur content in petrochemical samples using a pulsed flame photometric detector. *J Chromatogr Sci* 41(10), 528–534.
47. Wang, J., Wang, S., Zhao, G., Wang, Z., Lineaweaver, W.C. and Zhang, F. (2006) Treatment of infected wounds with maggot therapy after replantation. *J Reconstr Microsurg* 22(4), 277–280.
48. Feng, X., Cheng, G., Chen, S.Y., Yang, H. and Huang, W. (2010) Evaluation of the burn healing properties of oil extraction from housefly larva in mice. *J Ethnopharmacol* 130(3), 586–592.
49. Cai, D. and Liu, T. (2011) Hypothalamic inflammation: a double-edged sword to nutritional diseases. *Ann N Y Acad Sci* 1243, E1–39.
50. Purkayastha, S., Zhang, H., Zhang, G., Ahmed, Z., Wang, Y. and Cai, D. (2011) Neural dysregulation of peripheral insulin action and blood pressure by brain endoplasmic reticulum stress. *Proc Natl Acad Sci U S A* 108(7), 2939–2944.
51. Zhang, X., Zhang, G., Zhang, H., Karin, M., Bai, H. and Cai, D. (2008) Hypothalamic IKKbeta/NF-kappaB and ER stress link overnutrition to energy imbalance and obesity. *Cell* 135(1), 61–73.
52. Cakir, I., Cyr, N.E., Perello, M., Litvinov, B.P., Romero, A., Stuart, R.C. and Nillni, E.A. (2013) Obesity induces hypothalamic endoplasmic reticulum stress and impairs proopiomelanocortin (POMC) post-translational processing. *J Biol Chem* 288(24), 17675–17688.
53. Schneeberger, M., Dietrich, M.O., Sebastian, D., Imbernon, M., Castano, C., Garcia, A., Esteban, Y., Gonzalez-Franquesa, A., Rodriguez, I.C., Bortolozzi, A., Garcia-Roves, P.M., Gomis, R., Nogueiras, R., Horvath, T.L., Zorzano, A. and Claret, M. (2013) Mitofusin 2 in POMC neurons connects ER stress with leptin resistance and energy imbalance. *Cell* 155(1), 172–187.
54. Minokoshi, Y., Shiuchi, T., Lee, S., Suzuki, A. and Okamoto, S. (2008) Role of hypothalamic AMP-kinase in food intake regulation. *Nutrition* 24(9), 786–790.
55. Blanco Martinez de Morentin, P., Gonzalez, C.R., Saha, A.K., Martins, L., Dieguez, C., Vidal-Puig, A., Tena-Sempere, M. and Lopez, M. (2011) Hypothalamic AMP-activated protein kinase as a mediator of whole body energy balance. *Rev Endocr Metab Disord* 12(3), 127–140.
56. Gao, S., Kinzig, K.P., Aja, S., Scott, K.A., Keung, W., Kelly, S., Strynadka, K., Chohnan, S., Smith, W.W., Tamashiro, K.L., Ladenheim, E.E., Ronnett, G.V., Tu, Y., Birnbaum, M.J., Lopaschuk, G.D. and Moran, T.H. (2007) Leptin activates hypothalamic acetyl-CoA carboxylase to inhibit food intake. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104(44), 17358–17363.

### 주 의

1. 이 보고서는 농림축산식품부에서 시행한 유용농생명자원산업화기술개발사업의 연구보고서입니다.
2. 이 보고서 내용을 발표하는 때에는 반드시 농림축산식품부에서 시행한 유용농생명자원산업화 기술개발사업 사업의 연구결과임을 밝혀야 합니다.
3. 국가과학기술 기밀 유지에 필요한 내용은 대외적으로 발표 또는 공개하여서는 안 됩니다.