

GOVP1200711575

해조류의 포자 포자착생촉진제 개발

**Screening and Development of Fouling Agents
from Seaweeds and Plants**

2006. 11.

순천향대학교

해양수산부

[별지 제8호서식]

최 종 보 고 서

2004 년도 수산특정연구개발사업에 의하여 완료한 해조류의 포자착생촉진제 개발에 관한 연구의 최종보고를 붙임과 같이 제출합니다.

- 첨부 : 1. 최종보고서 8부
2. 최종보고서 디스켓 1매
* 최종보고서 파일은 인터넷(<http://rptf.kmi.re.kr>)으로 제출

2006 년 9 월 일

총괄연구책임자 신 현 응 (인)

주관연구기관장 김 창 교 (직인)

해 양 수 산 부 장 관 귀 하

제 출 문

해양수산부 장관 귀하

본 보고서를 “해조류의 포자착생촉진제 개발에 관한 연구” 과제의 최종보고서로 제출합니다.

2006 년 9 월 일

주관연구기관명 : 순천향대학교

총괄연구책임자 : 신 현 응

연 구 원 : 김 광 훈

연 구 원 : 박 남 식

연 구 원 :

협동연구기관명 :

협동연구책임자 :

협동연구기관명 :

협동연구책임자 :

요 약 문

I. 제 목

해조류의 포자 착생 촉진제 개발

II. 연구개발의 목적 및 중요성

해양 오염원의 유입으로 해양 생태계 및 환경 파괴가 가속화 되고 있으며, 주변국의 200해리 배타적 경제수역 선포로 인해 우리나라 근해 어장의 축소로 해양생물자원의 감소 및 연안 어장 생산성 저하를 부추기고 있다. 배타적 경제수역 선포로 인한 근해 어장 축소에 대응하고, 연안 생태계의 황폐화를 막아 해양생태계 보존 및 복원을 위한 바다 녹화 사업의 요구로 현재 인공 해중립 조성에 인공어초를 투입하고 있으나, 어초를 구성하는 콘크리트 및 강재에서 분비되는 독성물질로 인해 포자 등의 초기 착생 기간이 증가하며, 부착의 저감을 초래하고 있다. 또한 해중립 조성을 위한 인공어초시설 사업에 많은 예산이 투입되었음에도 지금까지 인공어초시설사업에 대한 투자효과가 제대로 평가 되지 않았다.

본 연구의 목적은 첫째, 경제 및 지역성 해조류의 포자 부착을 촉진하는 착생촉진제의 개발이며 둘째, 인공어초의 주 재료인 콘크리트나 강재에 착생촉진제를 도장하여 포자의 착생 효율을 높이고 해중립 형성을 가속화하여 해양환경 복원, 부영양화의 방지 및 해양오염원 감소를 유도할 수 있도록 하는 것이며 셋째, 해중립 형성을 통한 해양 생물자원 증대 효과와 해양 레크레이션과 같은 여가선용 자원으로 이용될 수 있도록 하는 것이다.

III. 연구개발 내용 및 범위

본 연구내용은 일차 년도에 생물 유래의 포자 착생촉진 물질의 추출, 분리 및 이들 후보 착생 촉진 물질의 착생 효과를 파악하기 위하여 Agar Diffusion Method (ADM)와 생물검증으로 1차 착생기능도를 검증하고, 쿠폰 PVC 패널 및 인공 콘크리트 구조물 등을 이용한 2차 착생기능도를 검증하였다.

이들 후보 착생촉진 물질을 인공 구조물에 도장하기 위한 기본 도료의 물성을 평가하였으며, 기본 도료에 후보 착생촉진 물질을 혼합한 혼합 도료를 콘크리트 블록 및 PVC 패널에 도장하여 착생기능도를 검증하였고, 사각 인공어초 표면에 혼합 도료를 도장한 후에 남해에 투여하여 그 효과를 측정하였다.

IV. 연구개발결과

1. 생물 유래의 착생제 효과검증 결과

- 육상 및 해양의 생물 유래의 천연물을 이용한 쿠폰 실험 결과 바이오 필름 형성되는 천연물을 선별함.
- 후보 착생 물질을 추출하기 위해 박층크로마토그래피, 실리카 겔 크로마토그래피, HPLC, prep-HPLC, GC, NMR과 같은 분석기들이 이용되었음.
- 생물 유래의 benzyl acetate의 특성. (Mw=150.07) ^1H NMR (500 MHz, CDCl_3) : δ 7.19 (aromatic proton), δ 5.34 (methylene proton), δ 2.01 ppm (methyl proton) ^{13}C NMR (125 MHz, CDCl_3): δ 170.3 (ketone carbon), δ 20.7 (methyl), δ 68.2 (oxygenated methylene carbon), δ 127.2- 129.0 (aromatic carbon), δ 141.2 ppm (aromatic quaternary carbon).

2. 착생촉진제에 대한 일차 착생기능도 검증

- Agar diffusion method (ADM) 실험 결과 benzyl acetate (203 %), cis-3-hexen-1-ol (197 %), decanal (174 %), isoeugenol (168 %), p-anisaldehyde (147 %)에서 모두 대조군보다 높은 부착율이 확인되었음.

3. 연안의 착생기능효과도 검증결과

- 후보 착생 촉진 물질의 아야진 내항에서의 쿠폰 실험결과 benzyl acetate (95 %), cis-3-hexen-1-ol (65 %), decanal (100 %), ethyl 2-methylbutyrate (92 %), p-anisaldehyde (98 %), trans-2-hexen-1-ol (90 %)에서 면적대비 65 ~ 100 %의 부착률이 확인되었음.

4. 패널 검증 및 착생기작 규명

- PE 실험결과 30 % benzyl acetate에서 전체 면적의 75 %에서 해조류 부착이 관찰되었음

5. 착생제를 이용한 도장

- 내마모성 (abrasion resistance) 및 내염수성 (saline resistance) 검증을 통한 최적화된 도료 조성비 확립
- 내마모성시험 결과는 바인더 함량에 따라 (5 % > 15 % < 25 % < 35 % < 45 %) 확인되었음
- 내염수성 시험 결과 benzyl acetate, cis-3-hexen-1-ol, decanal, isoeugenol, p-anisaldehyde와 조합된 도료가 대조군 (98 %)과 비교하여 별 차이를 보이지 않았으나 (92 ~ 95 %), trans-2-hexen-1-ol와 조합된 도료에서 85%로 내염수성이 관찰되었음.

6. 착생 효과 검증

- 후보 착생 촉진제를 도장한 PVC 및 콘크리트 블록이 동해 아야진 내항에 설치되었으며, 콘크리트 블록의 90일 경과 후 실험 결과 면적 대비 benzyl acetate, decanal에서 100 %의, cis-3-hexen-1-ol, isoeugenol, p-anisaldehyde, trans-2-hexen-1-ol, alunite에서는 95 %의 연성

착생생물의 부착이 관찰되었고, PVC 패널의 경우 90일 경과 후 hexyl acetate에서 100 %, p-anisaldehyde, ethyl myristate, trans-2-hexen-1-ol에서 95%, benzyl acetate (85 %), decanal, alunite에서는 80 %의 연성착생생물의 부착이 관찰되었음.

7. 국내 주요 연안에 대한 착생 효과 검증

- 후보 착생 촉진제를 도장한 PVC 및 콘크리트 블록이 부산 조도 선착장에 설치되었으며, 콘크리트 블록의 90일 경과 후 실험 결과 면적 대비 alunite (60 %), hexyl acetate (55 %), benzyl acetate, decanal, ethyl 2-methylbutyrate (50 %), ethyl myristate (45 %), p-anisaldehyde (40 %)의 연성착생생물 부착이 관찰되었으며, cis-hexen-1-ol에서는 60 %의 경성착생생물의 부착이 관찰되었음.
- 부산 조도 선착장 외곽에 후보 착생 촉진 도료가 도장된 사각 인공어초를 투입하여 검증되고 있음.

8. 대량생산 방법 연구

- 착생 효과 검증 결과 4개의 착생 효과 물질을 선정
- 도료 생산공정을 단순화 하여 착생 도료 제조
- 제조된 착생 도료의 분산 정도 평가 방법
- 재질에 따른 도장(spray / brush)의 표준화

V. 연구개발결과의 활용계획

포자나 유생의 부착을 돕는 착생촉진제 개발은 어초의 재질이 강재인 경우 부식 속도를 낮추며, 콘크리트 재질의 경우 자체 독성 방출을 억제시킨다. 또한 어초 표면의 촉진제 도포로 부착생물의 초기 착생을 증가시킴으로 인해 해양환경 및 녹화사업에 기여하며, 어획고 증가 및 해양환경 복원이 가속화할 것으로 예상된다.

1. 착생촉진물질 개발 기술

- 착생촉진제의 검증지역을 확대 및 계절별 자료를 확보하여 해중림 조성의 기반 자료로 사용하고 해중림을 통해 해양생태계복원과 수산자원 조성에 필요

2. 착생 물질 검증 기술

- 부착성 미세조류의 착생을 통해 균집을 분석할 수 있고 바이오 모니터링 방법으로 활용 가능

3. 연안 생태계 보존 및 복원 방안 수립을 위한 정보제공

- 본 연구 결과를 이용해 해중림 조성을 위한 기초 자료를 제공 함
 - (1) 해중림 조성을 위한 실험실 내의 효능 검증 방법 제시
 - (2) 현장 실험을 위한 합리적 실험방법 제시
 - (3) 착생도료 개발을 위한 도료 제작방법 제시

4. 어장환경 조성

- 본 연구 결과를 이용해 착생 효율을 높여 경제적 손실을 감소시킴
 - (1) 수산자원 고갈문제를 해결하기 위한 하나의 방법으로 인공어초에 포자 착생을 위한

착생 촉진물질을 제공

- (2) 인공어초에 해조류 포자 부착 유도 기법 개발을 통한 초기 포자 착생 기간 감소
- (3) 조성된 해중림을 통한 어족보호와 어민 소득 증대
- (4) 인류의 식량자원인 수산물의 지속적 공급

S U M M A R Y

I . Subject

Screening and Development of Fouling Agents from Seaweeds and Plants

II . Objectives

In recent years marine ecosystem and surroundings are being increasingly affected by marine pollution. The decrease in marine productivity in offshore and coastal areas around Korean sea is mainly due to the reduction of offshore grounds since the declaration of EEZ effective from UNCLOS, 1944. Artificial reef is an alternative to reconstruct the marine environmental resources. However, this artificial reef has a few toxic substances in their concrete mixtures. This prevents spore settlement of seaweeds which eventually reduce the seaweed population. Although artificial reef for submarine forest is well investigated, it is not properly planned to employ artificial reefs and evaluate their performance.

In this study, firstly, fouling agents were screened from seaweed and plant extracts which could attract seaweed spores. Secondly, those fouling agents were incorporated in paint formulation and applied to artificial reefs to increase the productivity of the submarine forest. These natural nontoxic fouling agents preserve the marine environment and increase the productivity. Finally, the submarine forest can be used to increase the productivity of offshore and marine ranching grounds which can also be enjoyable for people for their recreation.

III . Materials and methods

At first step, a study was conducted to extract and isolate fouling agents from seaweeds and plants. To know the effects of fouling agents extracted from algae, their fouling efficiencies were screened by spore attachment bioassay using agar diffusion method (ADM). Later PVC panel and artificial reef immersion tests were conducted.

The proven fouling agents were incorporated into the formulated paints. The formulated paints were tested for their physical properties by ASTM (American Society for Testing

Materials) before coating onto test panel and artificial reefs. Initially, the fouling paints were coated on small concrete bricks and PVC panels. Later coated on artificial reefs and were immersed into south coastal waters to examine their effects.

IV. Results

1. Laboratory tests

In order to know the efficiency of fouling agents, seaweed and plant powders were screened against algal spores.

Selected seaweeds and plants were extracted and subjected to chemical characterization (TLC, Silica gel, HPLC, prep-HPLC, GC, NMR).

The chemical characterization of a fouling agent, benzyl acetate was as follows, (Mw, 150.07) $^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, CDCl_3) : δ 7.19 (aromatic proton), δ 5.34 (methylene), δ 2.01 ppm (methyl) $^{13}\text{C-NMR}$ (125 MHz, CDCl_3): δ 170.3 (ketone), δ 20.7 (methyl), δ 68.2 (oxygenated methylene), δ 127.2– 129.0 (aromatic carbon), δ 141.2 ppm (aromatic quaternary carbon).

2. Bioassay

Spore attachment assay was carried out by agar diffusion method (ADM). When compared to control (100%), two fold increases in spore attachment were observed on benzyl acetate coatings with 203%. More or less similar effect was observed for cis-3-hexen-1-ol (197%). Spore attachment on decanal, isoeugenol and p-anisaldehyde coatings were 174%, 168% and 147%, respectively.

3. Field test 1.

To evaluate the efficiency of fouling agents, PVC test coupons were immersed at east coast. On PVC coupons fouling coverage was observed in the following order: benzyl acetate (95 %) > cis-3- hexen-1-ol (65 %) > decanal (100 %) > ethyl 2-methylbutyrate (92 %) > p- anisaldehyde (98 %) > trans-2-hexen-1-ol (90 %).

4. Field test 2.

Similar to PVC coupon tests, Polyethylene (PE) rafts also immersed in coastal waters. In which coating made with benzyl acetate (30%) algal attachment was found to be 75%.

5. Coatings made with fouling agents.

Formulation for optimum paint stability was tested by abrasion resistance and saline resistance. According to the binder proportions the order of abrasion resistance was: 5 % > 15 % < 25 % < 35 % < 45 %. The saline resistance of control paint was 98% but it reduced in trans-2-hexen-1-ol with 85%.

6. Attachment test with PVC panel and concrete bricks in east coast.

- Immersed for 90 days (attachments) :concrete bricks - benzyl acetate, decanal (100 %), cis-3-hexen -1-ol, isoeugenol, p-anisaldehyde, trans-2-hexen-1-ol, alunite (95 %), PVC panel - hexyl acetate (100 %), p-anisaldehyde, ethyl myristate, trans-2-hexen-1-ol (95%), benzyl acetate (85 %), decanal, alunite (80 %).

7. Attachment test with PVC panel and concrete bricks in east coast.

- Immersed for 90 days (attachments) : concrete bricks - alunite (60 %), hexyl acetate (55 %), benzyl acetate, decanal, ethyl 2-methylbutyrate (50 %), ethyl myristate (45 %), p-anisaldehyde (40 %), cis-hexen-1-ol (60 % : hard fouler).
- Fouling agent-coated artificial reefs were immersed into south coast and tested for fouling attachments.

8. Study for large scale production

- Determination of fouling attraction properties of four fouling agents.
- Standardizing paint formulation with better dispersion of fouling agents.
- Evaluation fouling paint by ASTM.
- Standardization of spray and brush coatings.

V. Development program for fouling agents

Fouling agent can enhance the settlement of spores and larvae of algae and animals respectively, which will initiate the colonization of soft and hard foulers. Ultimately, marine environment around artificial reef will be developed with algae and animal communities which also help the preservation of marine ecosystem.

1. Development for fouling agents.

- Expansion area for testing formulated paint.
- Need of preservation of marine surroundings as well as the construction of Submarine forest

2. Checking methods of fouling agents.

- Bio monitoring, their community.

3. Preservation of coastal and Information of marine ecosystem.

- The results offer effective fouling-enhancing coatings for the construction of submarine forest.
 - (1) Bioassay for construction of Submarine forest
 - (2) Field test (PVC coupon test, concrete brick..etc.).
 - (3) Formulation of fouling agents.

4. The construction of submarine forest

- The results are promising to enhance the colonization of algae and animals, and the developed coatings are economical.
 - (1) Development of fouling agent for the submarine forest.
 - (2) Decrease for spore settlement time.
 - (3) Preservation of marine ecosystem and increase marine productivities of fisherman.
 - (4) Supplying continuously a marine food to people.

CONTENTS

Chapter 1. Research Background	1
1. Objectives	1
2. Background	1
3. Scope	2
Chapter 2. The present status of development of fouling agent	4
1. National status	4
2. International status	4
3. Prospect	5
Chapter 3. Methods and Results	6
1. Methods	6
I. Sampling	6
II. Spore motility test	10
III. Agar Diffusion Method (ADM)	11
IV. PVC panel, polyethylene(PE) and Artificial reef	12
V. Paint formulation and spray coating	15
VI. Physical properties of paint	16
VII. Deployment of artificial structures	17
2 Results	19
I. Sampling	19
II. Spore motility test	29

III. Agar Diffusion Method (ADM)	31
IV. PVC panel	34
V. Polyethylene(PE)	36
VI. Physical properties of paint	37
VII. Spore attachment test	38
VIII. Production of fouling agent paints: large scale	46
IX. Results and Discussion	48
Chapter 4. Contribution and attainment	50
1. Development	50
2. Background	50
3. Attainment	50
Chapter 5. Application plan	53
1. Development	53
2. Application plan	53
Chapter 6. References	54

List of Table

Table 1	Eluting solvent gradient system of silica gel column chromatography	7
Table 2	Condition of gas chromatography mass spectrometry (GC-MS) used for the determination of isolated compound	9
Table 3	Composition of fouling agent coatings (FA formula)	16
Table 4	Composition of fouling agent coatings (FA formula)	16
Table 5	Biological and chemical properties of benzyl acetate	24
Table 6	Effect of FA candidates on motility of spores of <i>Ulva pertusa</i> .	30
Table 7	Agar Diffusion Method: <i>Ulva</i> spore attachment on agar (2 %) coated slides impregnated with different fouling agents (FAs)	32
Table 8	Agar Diffusion Method: <i>Ecklonia cava</i> spore attachment on agar (2%) coated slides impregnated with different fouling agents (FAs)	33
Table 9	Fouling coverage (%) estimated on perforated PVC plate etched with test circles. Test circles coated with 1 or 2 ml of fouling agents with rosin matrix (DX200, DX650 and DX700)	35
Table 10	Abrasion resistance (AR) against sea waters	38
Table 11	Immersion test with PVC panels at Ayajin harbor, east coast of Korea	40
Table 12	Immersion test with PVC panels at Cho Do, south coast of Korea	42
Table 13	Immersion test with concrete bricks at Ayajin harbor, east coast of Korea	44
Table 14	Immersion test with concrete bricks at Cho Do, south coast of Korea	45

List of Figure

Fig. 1	Agar diffusion method (ADM): experimental glass slides were coated by agar (2%) impaegrated with fouling agent (FAs), kept inside motile spore suspension and incubated in darkness (18h) ..	11
Fig. 2	Scheme of perforated PVC plate (150 cm × 60 cm) etched with test circles	12
Fig. 3	Structure of a polyethylene (PE) artificial reef plates	12
Fig. 4	Concrete artificial reef blocks coated with fouling agents, before (A) and after (B) immersion [structure of a concrete artificial reef (a). Plan of fouling agent (FA) coating on the artificial reef (b)]..	13
Fig. 5	Immersion test using PVC panels and concrete bricks coated with FA coatings.....	14
Fig. 6	Square artificial reef blocks coated with FAs (fouling agents) ..	15
Fig. 7	Process of immersion of concrete bricks (A) and artificial reef blocks (B) coated with FAs.....	18
Fig. 8	Prep-HPLC profile for the <i>Jasminum</i> sp.. The fraction was subjected to HPLC C ₁₈ reversed phase column (Microsorb, 21.4 mm × 250 mm). It was eluted with a isocratic of 80% methanol for 60min at a flow rate 2 ml min ⁻¹ of 20 ml volume fractions. The absorbance was monitored at 254 nm	19
Fig. 9	HPLC profile for the fraction <i>Jasminum</i> sp. The fraction collected from prep-HPLC was subjected to HPLC C ₁₈ reversed phase column (microsorb, 4.6 mm × 250 mm, Cosmosil). It was eluted with a isocratic of 50 % methanol for 20 min at a flow rate 1 ml min ⁻¹ . The absorbance was monitored at 220 nm	20

Fig. 10	GC-MS analysis of benzyl acetate. Analysis was on a HP-5 column (30 cm × 0.25 mm × 0.25 μm ID) maintained at 100 °C and programmed to 150 °C at 4 °C min ⁻¹ , 200 °C at 3 °C min ⁻¹ , 200 °C at 7 °C min ⁻¹ and held at 200 °C for 6 min. Carrier gas was controlled at 0.6 ml min ⁻¹ with a split ratio of 1 : 50	21
Fig. 11	IR spectra of benzyl acetate	22
Fig. 12	¹ H-NMR spectra for benzyl acetate in CDCl ₃	23
Fig. 13	Structure of cis-3-hexen-1-ol	25
Fig. 14	Structure of decanal	25
Fig. 15	Structure of ethyl myristate	25
Fig. 16	Structure of ethyl 2-methylbutyrate	26
Fig. 17	Structure of furfuryl alcohol	26
Fig. 18	Structure of hexyl acetate	26
Fig. 19	Structure of hexyl alcohol	27
Fig. 20	Structure of isoeugenol	27
Fig. 21	Structure of methyl salicylate	28
Fig. 22	Structure of p-anisaldehyde	28
Fig. 23	Structure of trans-2-hexen-1-ol	28
Fig. 24	Fouling assemblage on perforated PVC test panels after 30 days exposure to Ayajin harbor waters	35
Fig. 25	Fouling assemblage on polyethylene (PE) test plate after 30 days exposure to Ayajin harbor waters	36
Fig. 26	Immersion test with PVC panels at Ayajin harbor, east coast of Korea	41
Fig. 27	Immersion test with PVC panels at Cho Do, south coast of Korea	43
Fig. 28	Immersion test with concrete bricks at Ayajin harbor, east coast of Korea	44
Fig. 29	Immersion test with concrete bricks at Cho Do, south coast of Korea	45

목 차

제 1장 연구개발과제의 개요	1
1. 연구개발 과제의 목표	1
2. 필요성	1
3. 범위	2
제 2장 국내외 기술개발 현황	4
1. 국내	4
2. 국외	4
3. 앞으로 전망	5
제 3장 연구개발 수행 및 내용 및 결과	6
1. 수행내용	6
I. 착생 물질 시료 채취	6
II. 포자 운동 효과 검증	10
III. Agar Diffusion Method (ADM)을 이용한 착생기능 검증	11
IV. 쿠폰패널, PE(polyethylene) 및 인공어초 제작	12
V. 도료 제작 및 도장	15
VI. 도료의 물성 실험	16
VII. 설치	17
2 연구 결과	19
I. 착생 물질 시료 채취	19
II. 포자 운동 효과 검증	29
III. Agar Diffusion Method (ADM)을 이용한 착생기능 검증	31
IV. 쿠폰패널 실험	34
V. PE(polyethylene)	36
VI. 도료 물성 검증	37

VII. 착생율 효과 검증	38
VIII. 착생 촉진 물질의 대량 생산 방법 제시	46
IX. 종합결론	48
제 4장. 목표달성 및 관련 분야의 기여도	50
1. 연구개발	50
2. 연구내용	50
3. 연구개발 목표의 달성도	50
제 5장. 연구개발 결과의 활용계획	53
1. 연구개발	53
2. 연구 결과의 활용계획	53
제 6장. 참고문헌	54

제 1장 연구개발과제의 개요

1. 연구개발 과제의 목표

해조류 포자의 착생을 촉진하는 생물 유래의 촉진제 분리 및 구조 규명과 분리한 착생 촉진제의 패널 검증은 통한 착생 촉진제의 효과를 검증한다.

2. 필요성

가. 기술적 측면

다양한 해조류의 대사물질은 생태계에서 군집구조를 유지하고 생활사 중에서 단세포성 포자의 착생과 유, 무성생식에도 관여한다. 특히 포자의 부착 또는 유성생식을 하기 위하여 갈조류는 페로몬을 분비하여 유성생식의 확률을 높이는 것으로 보고된 바 있으며, 경계층 안에서 포자는 운동하면서 기질을 선택하는 것으로 알려져 있다. 이러한 해양생물이 선박이나 인공물 표면에 부착하여 발달 및 성장하는 것을 착생 (fouling)이라한다 (Shin, 1995). 해양착생생물은 크게 두 가지 형태로(Gaines and Roughgarden, 1985; Granovskaya et al., 1992) 수생식물이 주류를 이루고 있는 연성착생생물 (soft fouler, 軟性)과 패류가 주류를 이루고 있는 경성착생생물 (hard fouler, 硬性)로 나뉜다. 플랑크톤 단계에 있는 해양착생생물 (benthic marine organisms)의 포자나 유생은 물리적, 화학적, 생물학적인 미세 환경과 거대 환경에 영향을 받는다 (Walters and Wethy, 1991; Walters, 1992; Shin and Smith, 2001). 미세 환경은 바닥으로부터 1000 μm 까지 이루는 경계층 (boundary layer)으로 포자나 유생이 갖고 있는 운동성 (motility), 광주기성 (phototaxis), 화학주기성 (chemotaxis), 착생자극 (settlement stimulation), 표층의 선택성 (active selection) 등에 의하여 착생장소를 선택한다 (Buttaman, 1987; Amsler et al., 1992; Doherty and Fowler, 1994). 해양 박테리아, 곰팡이, 미세조류 등으로 형성되는 초기 생체막 (biofilm)은 바닷물과 기질 표면에 화학반응이 일어나 저서성 미세생물들이 일시 또는 영구 착생하여 생체막을 형성하게 된다. 생체막의 구성은 착생생물의 군집을 형성하게 하는 요인으로, 첫째 초기 착생 (early attachment) 둘째, 경쟁과 포식 (competition and predation) 셋째, 방해요인 (disturbance) 넷째, 물리적인 환경요인 (environmental gradients in physical factors) 등에 영향을 받게 된다 (Kirchman et al., 1982). 또한 화학적인 기질의 특성에 따라 포자 착생의 선택이 이루어지는데 해조류 포자에서 분비되는 착생 물질과 기질의 화학적인 구성에 따라 착생율에 영향을 미친다.

오염원의 유입으로 해양 생태계 및 환경 파괴가 가속화 되고 있으며, 이로 인해 해양생물자원의 감소를 부추기고 있다. 이러한 해양생태계 복원을 위한 바다 녹화 사업의 요구로 현재 인공 해중림 조성에 콘크리트 또는 강재를 주원료로 하는 인공어초를 투입하고 있으나, 어초를 구성하는 콘크리트 및 강재에서 분비되는 독성물질로 인해 포자 등의 초기 착생 기간이 증가하며 부착의 저감을 초래한다. 이러한 어초의 단점으로 시설 및 효과에 대한 문제점이 발생되고 있다. 따라서 영양염류 또는 중금속을 흡수하여 축적할 수 있는 능력을 가진 해조류의 포자착생을 촉진하는 물질을 이용하여 단기간에 인공어초 표면에 착생을 통해 해중림의 번무를 유도하고, 대상 연안

지역 오염원을 감소시키는 생물을 이용한 저감방안 기술이 필요하다 (한국해양수산개발원, 2002).

나. 경제·산업적 측면

해중림 조성을 위하여 인공어초시설 사업에 많은 예산이 투입되었음에도 지금까지 인공어초 시설사업에 대한 투자효과가 제대로 평가 되지 않았다. 종전의 인공어초 시설사업은 주로 기술적 분야에 한정되어 있으나, 그 효과는 불특정 다수에게 나타나고 장기간에 걸쳐 발생하므로, 경제적 및 산업적 측면에서의 연구가 필요하다. 특히 한·일 및 한·중 어업협정의 체결에 따라 우리나라의 어장이 대폭 축소되면서, 연안어장의 이용에 대한 수요는 날로 증가하고 있으나, 어장 생산성은 날로 떨어지고 있어 수산업의 산업적 기반이 흔들리고 있다는 것이다 (한국해양수산개발원, 2002.). 해조류의 포자나 무척추동물의 유생이 초기 착생하기에는 콘크리트 어초에서 분비되는 독성물질로 인하여 포자나 유생의 착생 기간이 증가하여 환경회복에 대한 경제적 손실이 크게 나타나고 있다. 해조류의 번무는 어류의 서식지와 산란 장소를 제공하여 어민의 소득증가와 중금속의 흡착으로 연안 환경오염을 저감 시키는 경제적 효과를 볼 수 있다.

다. 사회·문화적 측면

해중림 형성은 단순히 어족 자원의 증가를 위한 것이 아닌 연안 오염원의 유입을 방지하고, 이로 인하여 연안 환경 개선 효과를 기대할 수 있으며, 해중림이 형성된 연안 해역은 어족 자원의 보호와 형성으로 어업인의 소득 증대와 일반인들의 해양 레크레이션 장소로서의 여가선용 자원으로 그 기능이 증대될 것 수 있다. 또한 해양생태계 및 수산자원에 미치는 영향을 제고시키기 위해 교육 자료의 제작과 환경 보호의 중요성 인식이 필요하다.

3. 범위

가. 연구개발 내용

본 연구내용은 일차 년도에 천연물 유래의 해조류 포자 착생촉진제 물질의 추출 및 분리하며, 이들 후보 착생 촉진 물질의 착생 효과를 파악하기 위하여 Agar Diffusion Method (ADM) 및 생물검증으로 1차 착생가능성을 검증하고, 쿠폰 PVC 패널 및 인공 콘크리트 구조물 등으로 2차 착생가능성을 검증하였다.

이들 후보 착생촉진 물질을 인공 구조물에 도장하기 위해 기본 도료의 물성을 평가하였으며, 기본 도료에 후보 착생촉진 물질을 혼합한 혼합 도료를 콘크리트 블록 및 PVC 패널에 도장하여 착생가능성을 검증하였고, 사각 인공어초 표면에 혼합 도료를 도장한 후에 남해에 투여하여 그 효과를 검증하였다.

나 .연차별 연구 개발 내용 및 범위

(1) 1차년도 연구개발 세부 내용

(가) 착생제 탐색 및 분리 정제

- 생물유래의 착생제 탐색
- 후보 착생제 분리
- 후보 착생제 구조 규명

(나) 착생기능성 검증

- 주요연안의 착생촉진제에 대한 일차 착생기능성 검증
- 2차 착생기능효과 검증

(다) 패널 검증 및 생물유래 착생촉진제 효과 검증

- 패널 검증 및 착생기작 규명
- 생물 유래의 착생제 효과검증

(2) 2차년도 연구개발 세부 내용

(가) 착생 촉진제 도장 효과 검증

- 도료의 조성 비율 측정
- 착생제를 이용하여 도장

(나) 착생율 효과 검증

- 착생효과 검증
- 국내 주요 연안에 대한 착생율 효과 검증

(다) 대량생산방법 제시

- 도료 공정의 단순화
- 대량 생산 방법 제시

제 2장 국내외 기술개발 현황

1. 국내

연근해어업의 연간 생산량이 '80년대의 1,532천톤에서 1990년대 들어 1,433천톤으로 감소하는 추세이며, 날로 감소하는 어업자원을 보전하는 방안으로 어업자원의 서식환경을 개선하기 위한 방안으로 1971년부터 인공어초 시설사업을 실시하였으며, 1999년까지 약 4,253억원을 투자하여 약 142천ha의 면적에 740여 개소의 인공어초 어장을 조성하였다. 또한 1970년대는 미미한 투자였으나, 1980년대는 1970년대에 비하여 10배가 증가하였고, 1990년대부터는 연평균 사업비가 36,463백만원에 이르렀다. 최근 10여 년 전까지는 연안 20 m이내에 바가지 모양의 반구형어초를, 연안 30 m이상 되는 곳에는 크기 2 m의 사각어초를 설치하였으나, 현재는 육교형 어초, 지반 어초 등 다양한 형태로서 설치되고 있다. 설치 형태에서도 초창기에는 대상 지역에 투척(자유투하)하는 방식을 취하였지만 이런 경우 어초의 손실이 심해 그 역할을 하지 못하므로 블록을 쌓듯이 더미를 만들어 놓고 있다 (국립수산과학원, 2004). 전국 연안에 총 19종의 어초 모델이 시설되었으나 사각형 어초가 약 80 %를 차지하고 있고, 대상생물의 기능 및 해역 여건에 적합한 어초 모델이 선정되지 않아 어초의 효과를 극대화할 수 없다 (한국해양수산개발원, 2002). 콘크리트 어초의 경우 인공어초 분야에서 가장 많이 사용하고 있는 재료이나 침투성으로 인해 해수나 공기가 콘크리트내의 철근이 묻혀있는 곳까지 쉽게 침투할 수 있어 철근 부식이 일어나고, 해조류 포자나 무척추동물의 유생이 콘크리트 자체에서 분비되는 독성물질로 초기 착생 기간이 증가하여 경제적인 손실 발생하며, 강제 어초는 부식방지를 위한 도료 도장으로 인하여 착생 효과가 저감 된다 (국립수산과학원, 2004). 따라서 이러한 문제해결을 위한 방안으로 인공어초에 착생촉진제를 도포하여 단기간 내에 착생효율을 증진시킴으로써, 인공어초의 착생 효과를 극대화 하고자 한다.

2. 국외

산업의 발전으로 해양환경의 파괴로 인하여 바다가 황폐해져 감에 따라 바다 녹화사업의 필요성 대두되고 있으며, 미국, 일본, 중국, EU, 한국의 해양영역문제로 자국의 해양환경 보존 및 복원이 전 세계적인 관심으로 부각되어, UN 해양법협약 발효에 따른 세계 각국의 배타적 경제수역 (EEZ)의 선포와 공해조업 규제 등으로 해외어장이 축소되고 있다. 일본의 경우 1930년에 콘크리트 어초가 야마구치현에서 시험채용 되었던 것이 본격적 인공어초의 기원으로 1954년부터는 국가시책으로 사용자재를 콘크리트로 한정하여 인공어초 사업이 실시되었다. 본격적으로 사업이 실시된 1974년 이후의 실적을 보면, 제 1차 연안 어장 정비개발계획 기간 중인 1976 ~ 1981년간에는 750억엔이 투자되었으며, 제 2차 연정개발사업기간인 1982 ~ 1987년까지는 1400억엔, 그리고 제 3차 사업기간인 1988 ~ 1993년간에는 1440억엔이 투자되었으며, 제 4차 사업기간인 1994 ~ 2001년까지는 인공어초를 비롯한 증양식장의 조성 등의 사업비로 6000억엔이 계획되어 있다. 이처럼 1974년부터 1990년까지 일본에서는 약 7000억엔이 인공어초

시설사업비로 투자되었다. 미국의 인공어초 사업은 1916년 담수에서 처음 시작하였으나, 거의 실시하지 않다가 1984년 어업진흥법이 제정된 이후 권장하여 상당히 추진되고 있다. 다른 국가와 다른 점은 내수면에서도 대량 투하하여 관리 하고 있다. 캐나다에서는 비영리 단체인 인공어초 협회 (The Artificial Reefs Society)에서 레크리에이션을 목적으로 인공어초 사업을 진행하고 있다. 또한 WTO에 의한 수산물의 수출입자유화에 따른 값싼 수산물의 유입은 우리 수산업에 경제 부담을 초래하고 있다. 따라서 이러한 문제해결 방안 중 하나로 포자나 유생의 부착을 돕는 착생촉진제의 개발하여 해양 환경복원 및 해중림을 조성하는 것이다.

3. 앞으로 전망

포자나 유생의 부착을 돕는 착생촉진제 개발은 어초의 재질이 강재인 경우 부식 속도를 낮추며, 콘크리트 재질의 경우 자체 독성 방출을 억제시키며, 어초 표면의 촉진제 도포로 부착 생물의 조기 착생을 증가시킴으로써 해양환경 및 녹화사업에 기여하며, 어획고 증가 및 해양환경 복원이 가속화할 것으로 예상된다.

가. 기술적 측면

해양오염으로 인한 해양생태계의 환경복원기술의 기초자료 제공에 사용될 것이며, 연안생태계 및 어장환경 회복기술의 기초자료 제공될 것이다. 또한 연안 자원 생물의 효율적 관리를 위한 자료 제공 및 인공 어초의 착생 촉진제 개발에 따른 해중림 조성이 가속화될 것이며, 해조류의 어초 형성에 의한 연안 유입 중금속 제거에 기여할 것으로 예상된다.

나. 경제 · 산업적 측면

해중림 형성으로 연안으로부터 유입되는 영양염류 또는 중금속의 흡착을 통해 해양생태계의 오염 저감 및 부영양화 방지로 적조 발생률이 감소 될 것이며, 해양생태계 보존에 따른 해양생물의 서식지 다양화와 이로 인한 연안에 분포하는 어족 자원의 증가 및 해중림 형성을 통한 해양 생태계의 복원이 예상된다.

제 3장 연구개발 수행 내용 및 결과

1. 수행 내용

I. 착생 물질 시료 채취

착생물질 시료 선정

순천향대학교 해조 양식학 실험실에 설치되어 있는 천연 시료은행에서 1차 착생효능을 가진 물질들을 검증한 결과를 토대로 후보 착생물질들은 다음과 같이 선정되었다.

1. 시약 및 기기

일차 시료 검증에서 포자의 부착 기능을 활성화 하는 시료를 분리하기 위하여 박층 크로마토그래피 실리카겔 (입자크기 70 ~ 230 μm)은 시그마 제품을 고성능 액체 크로마토그래피 (HPLC) 분석용 용매는 TEDIA사, NMR 분석용 CDCl_3 -d3 (0.03 % TMS)는 Aldrich 제품을 구입하여 사용하였다. 그 외에 사용된 시약과 추출 용매는 특급 또는 1급 시약을 사용하였다. 본 연구에서 착생촉진제 성분의 분리는 감압농축기 (N-N series, EYELA, Co. Japan), 동결건조기 (Bondiro, IL SIN Eng., Co. Korea), 초저온 냉동고 (Sun Elelectronic, Co. Korea), 배양기 (VS-1203P3, Vision Scientific, Co. Korea), 분광광도계 (V-550, UV-1601- Spectrophotometer, Shimadzu, Co. Japan)를, 분획 채취용 고속 액체 크로마토그래피 (prep-HPLC) (LC-908, Jai, Co. Japan) 그리고 고성능 액체 크로마토그래피 (HPLC) (LC-10AT system, Shimadzu, Co. Japan)를, 물질분석에는 가스크로마토그래피 / 가스질량분광기 (GC / MS), 적외선 분광 분석기 (FT-IR), 핵자기 공명 스펙트럼 (NMR)를 사용하였다.

2. 시료 채취 및 추출

본 실험에 사용한 시료는 경상남북도, 충청남북도, 강원도 등지에서 채취하여 이물질 제거하고 세척한 후 음건 하였다. 추출 수율을 높이기 위해 분쇄기를 이용하여 분쇄하여 분말로 만들어 시료로 사용하였다. 메탄올 1 ℓ 에 분말 시료 100 g을 넣고 24 h동안 보관 한 후 추출 하여 상등액만 모아, 이를 3회 반복하여 모두 합친 후에 37 $^{\circ}\text{C}$ 에서 감압농축기를 이용해 메탄올을 1 / 10로 증발시켜 제거한 뒤 0.22 μm 필터로 여과하였으며, -20 $^{\circ}\text{C}$ 에서 보관하여 실험에 사용하였다.

3. 박층 크로마토그래피 (Thin Layer Chromatography)

메탄올 추출물의 유기용매에 따른 용해도를 알아보기 위하여 박층 크로마토그래피 (TLC) (SIL G/UV254, 0.25 mm layer with fluorescent indicator, machereynagel Co. Germany)를 이용하여 헥산, 클로로포름, 메틸렌 크로라이드, 에틸 아세테이트, 에탄올, 메탄올을 전개 용매로 사용하였고, UV lamp (UVGL-58, UV-254/366 nm, UVP Inc. U.S.A)로 Rf값을 확인하였다.

4. 실리카 겔 크로마토그래피

실리카 겔 (70 ~ 230 μm)을 헥산으로 충전 하였고, 유리관 칼럼 (10 cm \times 90 cm, PTEE와 plate 부착)은 시료의 양에 따라 선택하여 사용하였으며, 실리카 겔과 시료의 비는 50 : 1의 비율로 하였다. 주 전개용매로는 [헥산, 헥산 : 에틸 아세테이트 = 95 : 5, 헥산 : 에틸 아세테이트 = 90 : 10, 헥산 : 에틸 아세테이트 = 80 : 20, 헥산 : 에틸 아세테이트 = 70 : 30, 헥산 : 에틸 아세테이트 = 60 : 40, 헥산 : 에틸 아세테이트 = 50 : 50, 에틸 아세테이트, 에틸 아세테이트 : 메탄올 = 95 : 5, 에틸 아세테이트 : 메탄올 = 90 : 10, 메탄올] 하여, 순차적으로 10 ml min⁻¹의 유속으로 분취하였다 (Table 1).

Table 1. Eluting solvent gradient system of silica gel column chromatography.

Eluting solvent (ratio)	Volume(ml)
Hexane	2000
Hexane : Ethyl acetate (95 : 5)	2000
Hexane : Ethyl acetate (90 : 10)	2000
Hexane : Ethyl acetate (70:30)	2000
Hexane : Ethyl acetate (60:40)	2000
Hexane : Ethyl acetate (50:50)	2000
Ethyl acetate	2000
Ethyl acetate : Methyl alcohol (95:5)	2000
Ethyl acetate : Methyl alcohol (90:10)	2000
Methyl alcohol	2000

5. 분획 채취용 고속 액체 크로마토그래피 (prep-High Performance Liquid Chromatography)
- [HPLC 1차분리]

물질의 분리를 위하여 고속 액체 크로마토그래피 (prep-HPLC) C18 reversed phase column (Microsorb, 21.4 mm × 250 mm)에 적용하였으며, 안정된 조건하에서 80 % 메탄올과 20 % 물 혼합 용매를 사용하여 60분 동안 유속 5 ml min⁻¹로 용출시켰고, 254 nm에서 흡광도를 측정하면서 각 분획구들의 분취를 수행하였다. 분획구들의 생리활성 검증을 통해 우수한 포자 운동성 활성을 나타낸 분획구를 가스크로마토그래피 / 가스질량분광기 (GC / MS), 적외선 분광 분석기 (FT-IR), 핵자기 공명 스펙트럼 (NMR)을 사용하여 물질 구조 분석의 시료로 사용하였다.

6. 고성능 액체 크로마토그래피 (High Performance Liquid Chromatography; HPLC)
- [HPLC 2차분리]

분획 채취용 고속 액체 크로마토그래피에 의해 얻어진 물질 중 우수한 포자 운동성 활성을 나타낸 분획구를 고성능 액체 크로마토그래피 C18 reversed phase column (Microsorb, 4.6 mm × 250 mm, Cosmosil)에 적용하였고, 안정된 조건으로 50% 메탄올과 50 % 물의 혼합 용매를 사용하여 60분 동안 유속 1 ml min⁻¹로 용출시켰고, 220 nm에서 흡광도를 측정하면서 물질을 정제하였다.

7. 기체 크로마토그래피 질량측정 스펙트럼 (Gas Chromatography Mass Spectrum; GC MS)

고성능 액체 크로마토그래피에서 활성부분만을 회수하여 건조시킨 후 메탄올에 녹인 다음 1 mg을 기체 크로마토그래피 분석에 사용하였다. 기체 크로마토그래피에는 모세관 칼럼인 HP-5 (Hewlett-Packard, 30 m × 0.25 mm × 0.25 μm)를 사용하였으며 이동상 기체는 헬륨을 사용하였고 주입 비율은 0.6 ml min⁻¹으로 분할주입법 (1 : 50)을 사용하였다. 주입구의 온도는 230 °C이고 칼럼의 초기 온도는 100 °C였으며, 동일 온도에서 2분간 유지한 후 4 °C min⁻¹의 속도로 150 °C까지 높이고 3 °C min⁻¹의 속도로 200 °C까지 높인 후에 다시 7 °C min⁻¹의 속도로 250 °C까지 높여서 6분간 유지시켰다. Ion source는 electron ionization mode로써 280 °C에서 70 eV를 사용하였다 (Table 2).

Table 2. Condition of gas chromatography mass spectrometry (GC-MS) used for the determination of isolated compound.

Parameter	Condition
Column	HP-5 column (30cm×0.25mm×0.25μm)
Injector temperature	230°C
Detector temperature	230°C
Initial temperature	100°C
Programing rate	4°C/min to 150°C 3°C/min to 200°C 7°C/min to 250°C
Final temperature	250°C for 6 min
Carrier gas flow-rate	Helium at 0.6 ml/min
Split ratio	1:50

8. FT-IR

작용기 유무 결정을 위한 IR은 Perloin-Elner GX spectrophotometer를 사용하여 분석하였다.

9. 핵자기 공명 스펙트럼 (Nuclear Magnetic Resonance)

정제한 물질의 구조분석을 위하여 $^1\text{H-NMR}$ $^{13}\text{C-NMR}$ 을 분석하였다. 수소-핵자기 공명 ($^1\text{H-NMR}$) 스펙트럼은 Jeol JNH-ECP NMR (600 MHz)으로부터 얻었고 탄소-핵자기 공명 ($^{13}\text{C-NMR}$) 스펙트럼은 Jeol JNH-ECP NMR (150 MHz)로부터 얻었다.

상기 과정을 동일한 방법으로 *Sargassum* sp., *Ecklonia cava*, *Arachis hypogaea*, *Vaccinium* spp., *Citrus limon*, *Malus pumila* var. *dulcissima*, *Thea sinensis*, *Cinnamomum loureirii* 등에서 물질을 추출 및 분리 정제하여 그 구조를 분석하였다.

II. 포자 운동 효과 검증

후보 착생물질의 포자 운동 효과 검증은 대표적인 부착성 해조류인 구멍갈파래 (*Ulva pertusa*)의 포자를 이용하였다. 실험에 사용한 파래는 강릉 근교의 경포대, 남애리, 아야진항, 한진, 태안일대, 제주도 연안에서 채집하여 실험실로 운반하였으며, 목적 해조체만 분류하였다. 분류 후, 엽체 표면의 부착생물들을 제거하기 위하여 1분씩 3회 반복 초음파 처리 후에 고압멸균기 (autoclave, 121 °C 45 min)로 살균한 해수로 세척하였다. 그리고 1 % 베타딘 및 2 % 트리톤 용액에 1분간 침전시켜 간단한 멸균처리를 한 후에 반 건조 시켰다. 반 건조된 파래를 멸균해수에 담아 $80 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$, 20 °C 배양기에 넣고 포자방출을 유도하였다 (Fletcher, 1989). 후보 착생물질 1 mg 당 $10 \mu\text{l}$ 의 dimethyl sulfoxide (DMSO)를 첨가하여 용해 ($100,000 \text{ mg} \cdot \ell^{-1}$)시킨 후, 포자가 방출된 해수에 용해시킨 후보 착생물질을 $4,000 \text{ mg} \cdot \ell^{-1}$, $2,000 \text{ mg} \cdot \ell^{-1}$, $1,000 \text{ mg} \cdot \ell^{-1}$, $500 \text{ mg} \cdot \ell^{-1}$, $250 \text{ mg} \cdot \ell^{-1}$, $125 \text{ mg} \cdot \ell^{-1}$ 이 되도록 첨가한 후에 포자 운동 유무를 광학현미경 (Olympus CK2)을 이용하여 $\times 100$ 배율로 검정하였다. 100 %, 즉 운동성이 전혀 관찰되지 않는 경우는 ++++로, 포자의 운동성이 95 % ~ 75 %인 경우는 +++, 75 % ~ 50 %인 경우는 ++로, 50 % ~ 20 %인 경우는 +로 나타내었으며, 포자의 운동성이 활발한 경우는 -로 나타내었다. 각 희석농도별 접종 전에 해수 내 포자의 운동 상태를 확인하여 대조군과 비교 사용하였다 (Sidharthan et al., 2006).

III. Agar Diffusion Method (ADM)을 이용한 착생기능 검증

후보 착생촉진 물질의 포자 착생율을 검증하기 위한 일차 실험중 하나로 Agar Diffusion Method (ADM)을 이용하여 포자의 착색율을 검증하였다. 실험에 사용한 슬라이드는 10 % HCl에 24 h동안 담군 후에 다시 증류수에 24 h동안 담아 세척하여 사용하였다. 증류수 100 ml에 2 g의 한천을 넣고 가열하여 액체 형태의 한천배지 (2 %)를 만들고, 제작된 한천배지는 항온 수조 (52 °C)에 넣어 배지의 액상 상태를 유지시켰다. 2 % 한천배지 5 ml에 후보 착생 물질 5 μ l를 넣어 1000 $\text{mg} \cdot \ell^{-1}$ 의 시료 제작하였으며, 동일한 방법으로 10 $\text{mg} \cdot \ell^{-1}$ 의 시료를 제작하여 실험에 사용하였다. 제작한 시료를 1 ml씩 슬라이드 글라스에 도말하여 30분간 상온에서 건조시켰으며, 대조군으로는 2 % 한천배지를 도말하여 사용하였다 (Shin and Smith, 2001). 구멍갈과래의 포자 또는 감태의 포자가 방출되어있는 바닷물에 준비한 슬라이드를 넣고 18h 동안 암실에 보관하였다. 18 h 후에 흐르는 물에 슬라이드를 표면을 세척한 뒤 광학 현미경 (Olympus CK2)을 이용하여 $\times 400$ 배율로 포자의 부착 유무를 관찰하였다 (Fig. 1).

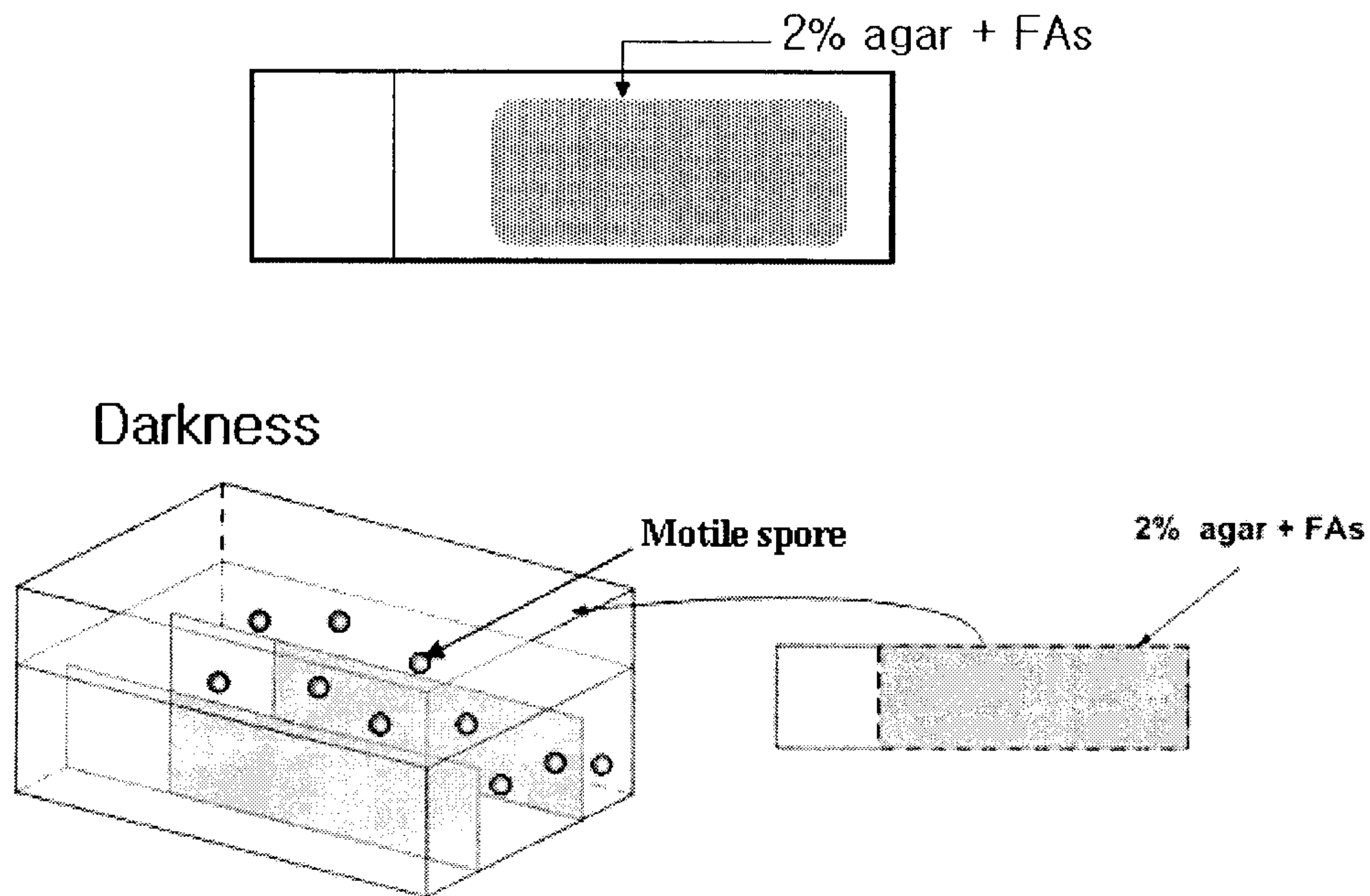


Fig. 1. Agar diffusion method (ADM): experimental glass slides were coated by agar (2%) impregnated with fouling agents (FAs), kept inside motile spore suspension and incubated in darkness (18 h).

IV. 쿠폰 패널 , Polyethylene (PE) 및 인공어초 제작

1. 쿠폰, PE 패널

쿠폰 패널은 PVC 소재를 이용 150 cm × 60 cm (L × W) 크기로 제작한 다음, 5 cm 간격으로 직경 3 cm, 깊이 0.3 cm의 실험구를 뚫어 제작하였으며, 연안 설치 후 PVC 판의 뒤틀림을 방지하기 위해 4개의 실험구 사이에 한 개의 구멍을 뚫어 물의 흐름을 원활하도록 하였다 (Fig. 2). 실험에 사용한 인공어초는 시판중인 콘크리트 구조물을 이용하였으며, 구조물의 규격은 200 cm × 30 cm × 30 cm (L × W × H)로 구성하였다. 또한 200 cm × 15 cm × 1 cm (L × W × T) 규격의 polyethylene (PE) 판을 제작하여 실험에 사용하였다 (Fig. 3 ~ 4).

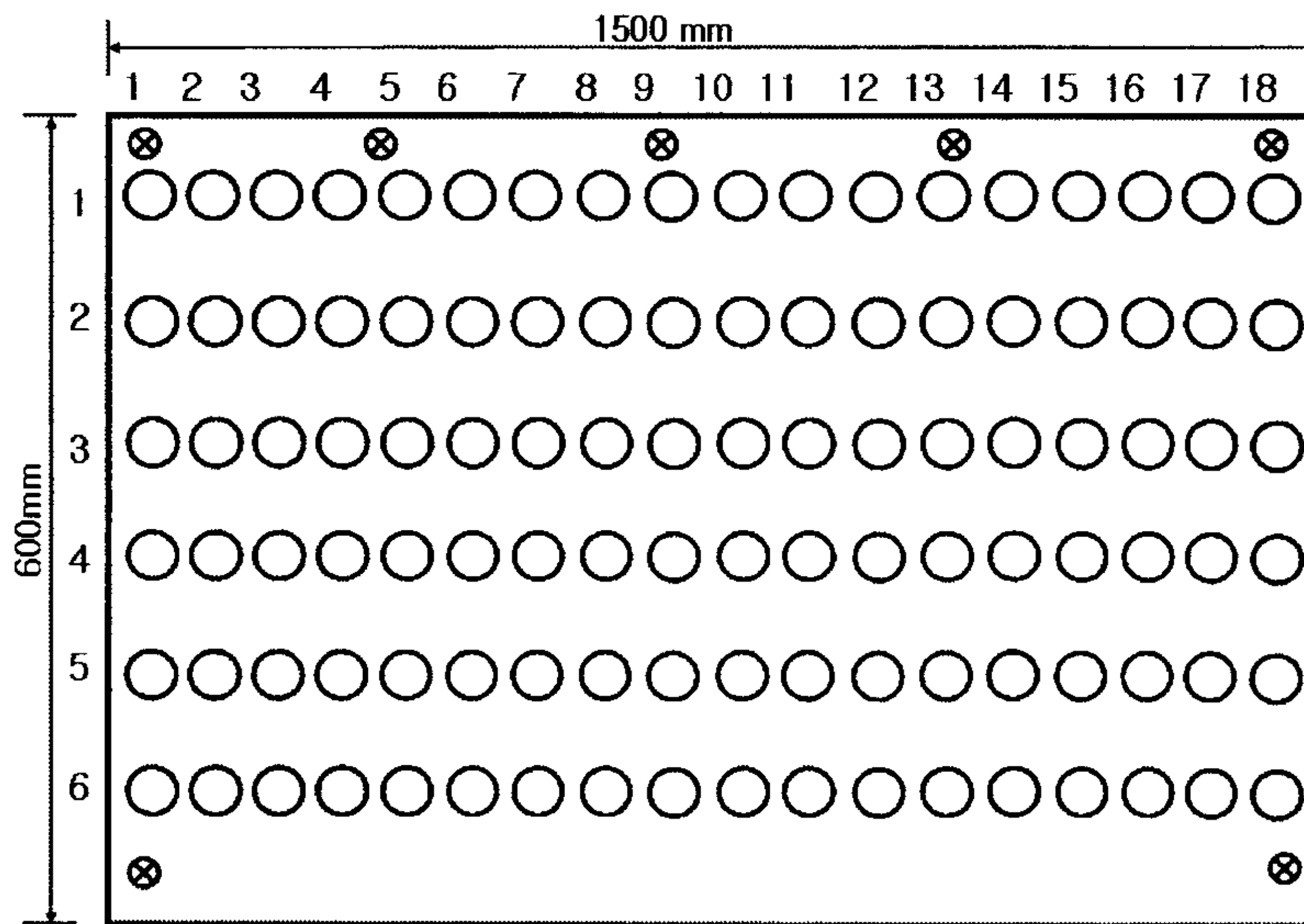


Fig. 2. Scheme of perforated PVC plate (150 cm × 60 cm) etched with test circles.

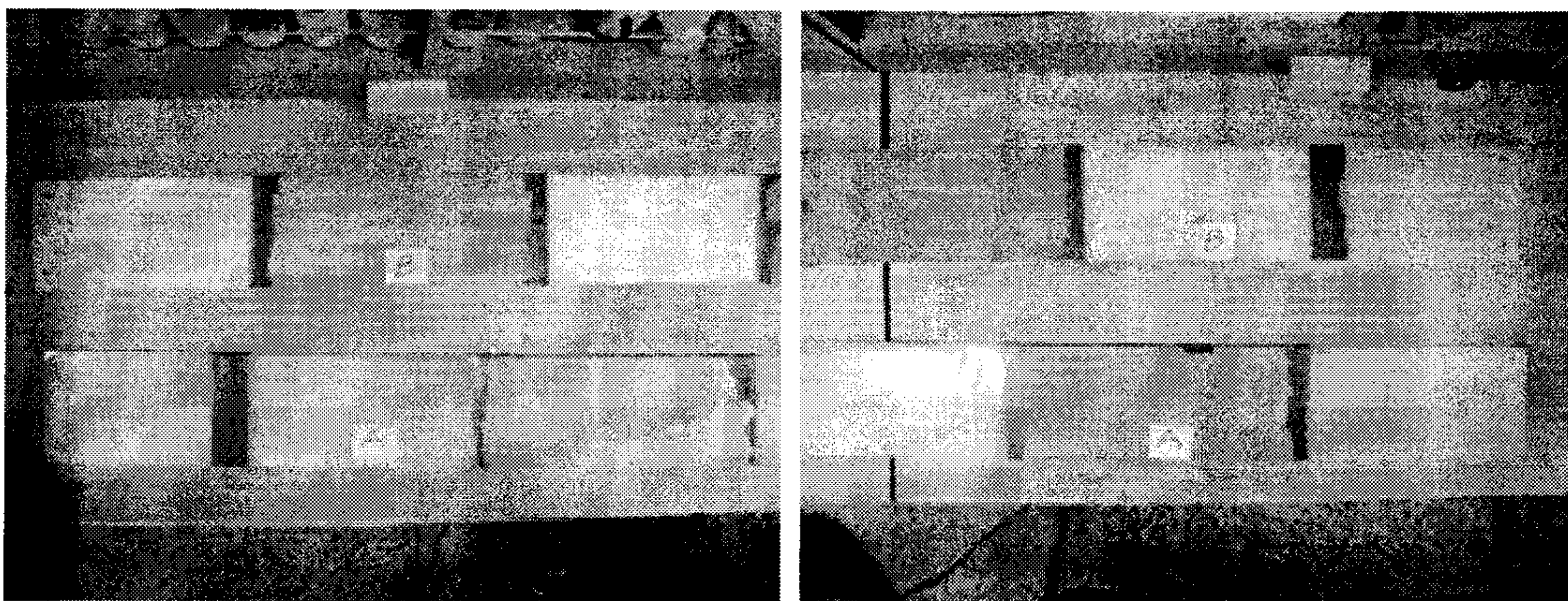


Fig. 3. Structure of a polyethylene (PE) artificial reef plates.

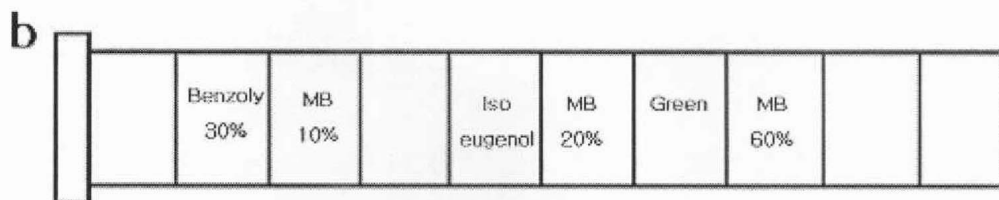
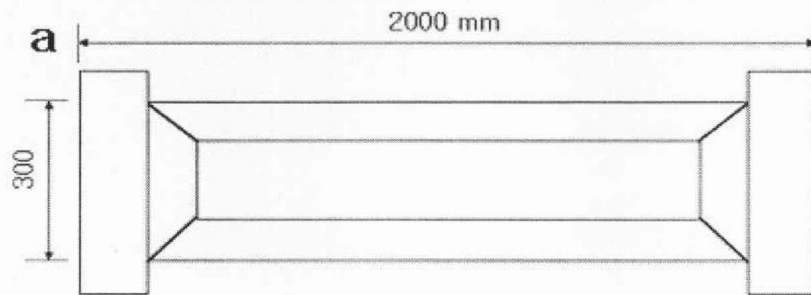
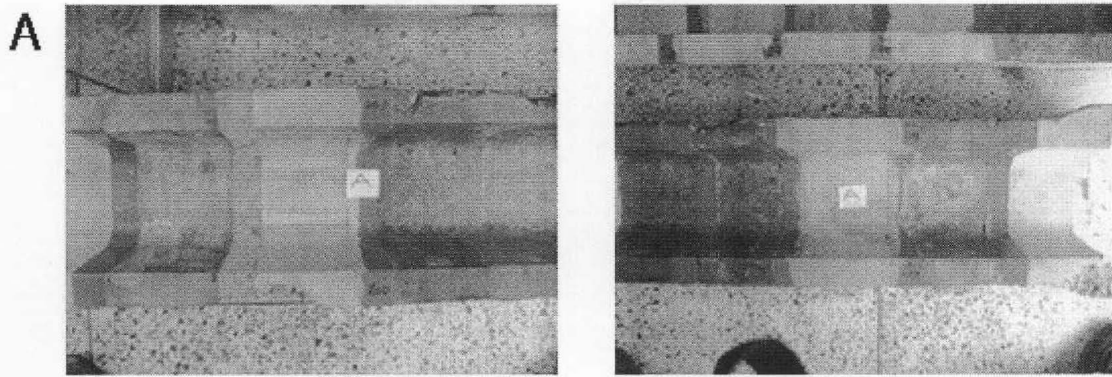


Fig. 4. Concrete artificial reef blocks coated with fouling agents, before (A) and after (B) immersion [structure of a concrete artificial reef (a). Plan of fouling agent (FA) coating on the artificial reef (b)].

2. PVC 패널, 콘크리트 블록 및 사각 콘크리트 어초

PVC 소재의 패널을 10 cm × 10 cm (L × W) 크기로 제작한 다음 #1000 사포로 연마하여 도장 전 4개의 패널을 한조로 하여 수평하게 A4용지에 고정하여 정열 하였다. PVC 패널과 더불어 시판되고 있는 콘크리트 블록을 실험에 사용하였으며, 사각 인공어초는 기존 콘크리트 어초를 사용하였다 (Fig. 5 ~ 6).

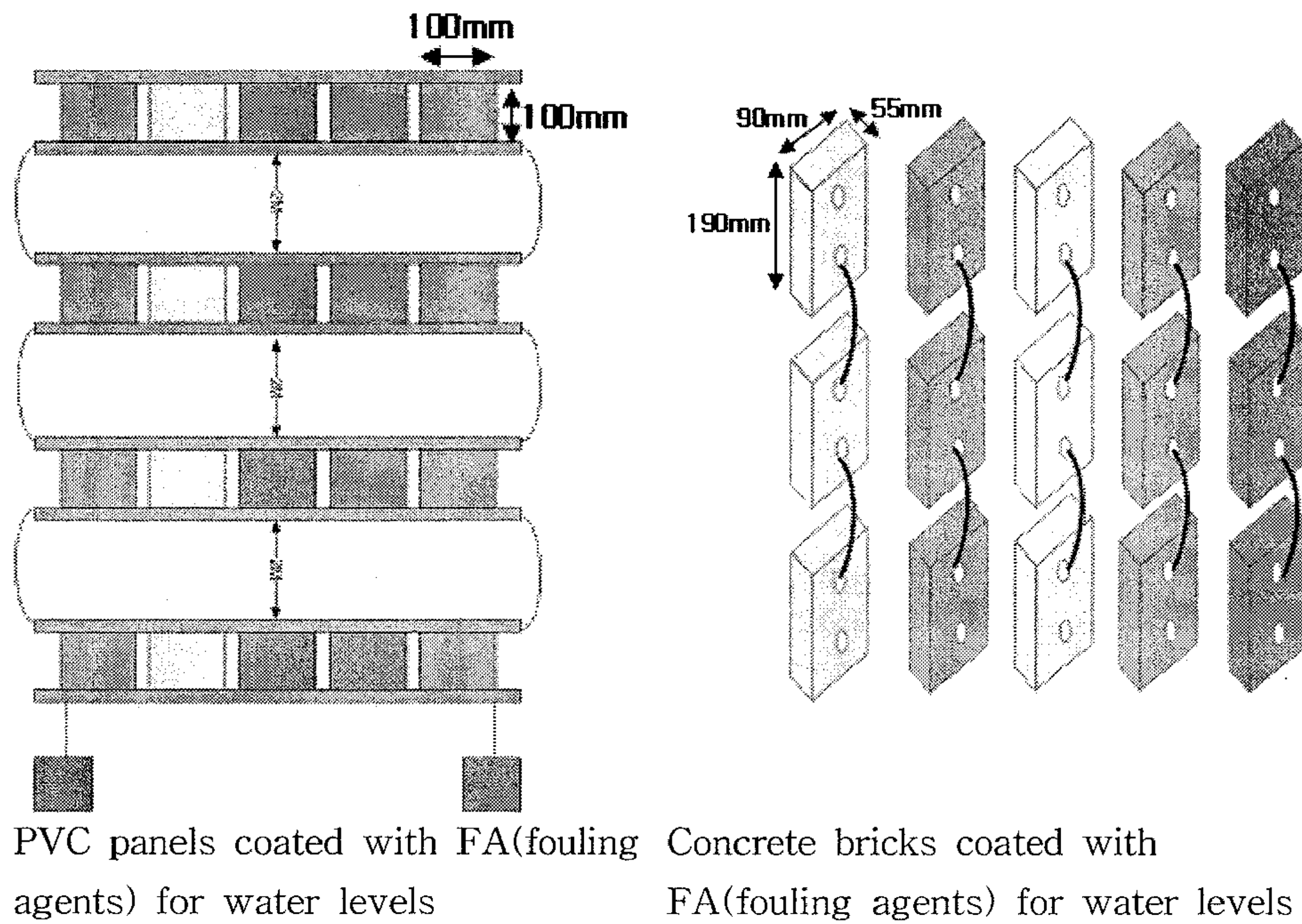


Fig. 5. Immersion test using PVC panels and concrete bricks coated with FA coatings.

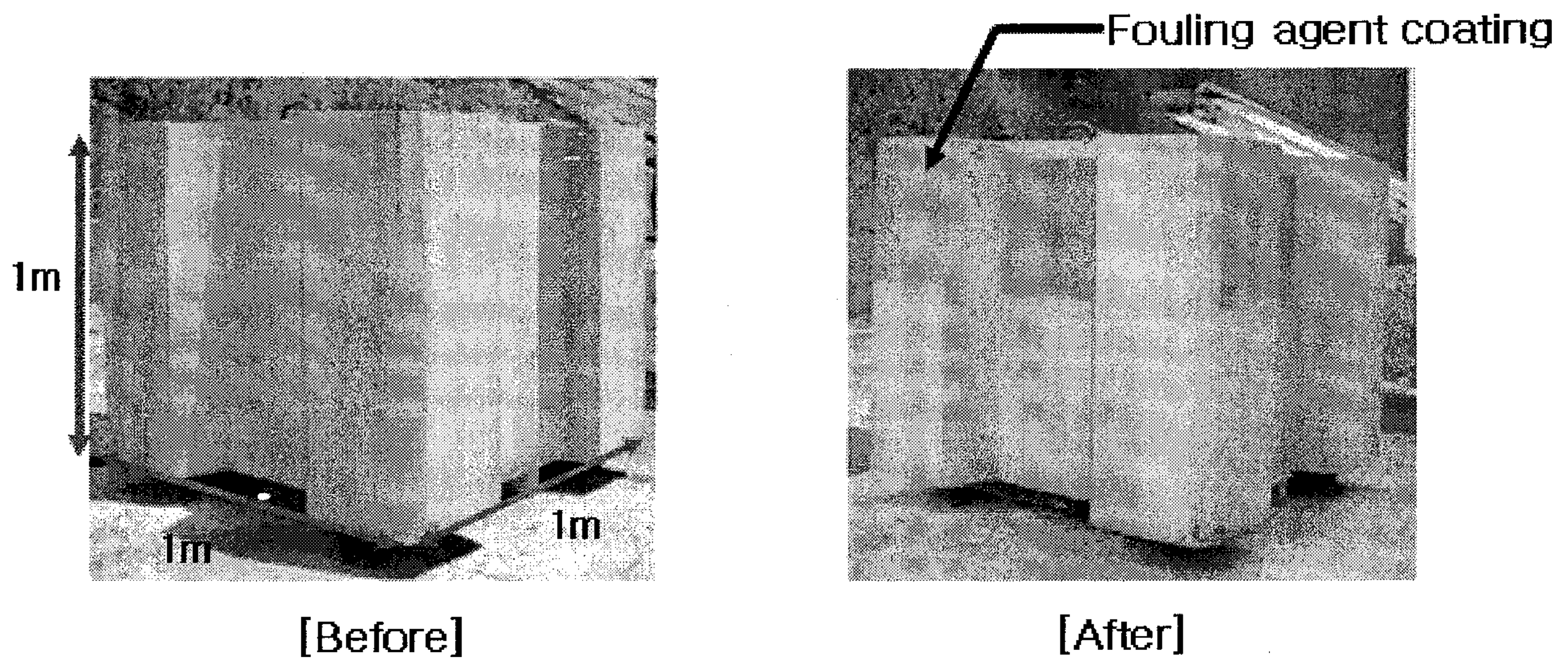


Fig. 6. Square artificial reef blocks coated with FAs (fouling agents).

V. 도료 제작 및 도장

쿠폰 패널에 도장한 도료 (로진; DX200, DX650, DX700)는 후보착생물질들 (fouling agents; FAs)과 교반하여 제작하였다. 쿠폰 PVC에 물질과 혼합한 도료를 각각 1 ml, 2 ml씩 피펫을 이용하여 실험구에 주입하였으며, 도료 주입 후 2 ~ 3일간 음건하여 연안에 설치하였다. 인공어초와 PP에 도장할 도료는 접착을 위한 수지 14 ~ 40 %, 용제 25 ~ 54 %, 각종 첨가제 1 %를 교반한 기본 도료에 후보착생물질 10 ~ 60 %를 넣고 교반하여 실험용 도료를 제작하였다. 제작한 도료는 PE와 인공어초 표면에 페인트 붓을 이용하여 도장한 후에 2 ~ 3일간 상온에서 음건하였으며, 도막 두께는 약 150 μm 로 도장하였다 (Table 3).

후보 착생촉진 물질 혼합 도료는 접착용 수지 24 % 및 용제 54 %를 교반한 기본 도료에 후보착생물질 2 %를 넣고 교반하여 실험용 도료를 제작하였다 (Table 4). 제작한 혼합 도료는 사각 인공어초 표면에 도료용 붓을 이용하여 3 ~ 5회 도장한 후에 상온에서 음건하였으며, 도장 두께는 약 150 μm 로 맞추었다. 콘크리트 블록의 표면 도장도 도료용 붓을 이용하여 3 ~ 5회 도장하였으며, PVC 패널 도장은 에어 콤푸레샤 (Sung won, KA-902SN)와 스프레이건 (Hyup sung, W-2000; 노즐직경 1 mm)을 사용하여 2 ~ 3회 반복 도장하였고, 콘크리트 블록과 패널은 도장 후에 2 ~ 3일 음건하여 사용하였다.

Table 3. Composition of fouling agent coatings (FA formulations).

Ingredients	Alunite(I) (%)	Alunite(II) (%)	Alunite(III) (%)	Proportion (%)
Fouling agents	60	20	10	15
Resin	14	30	30	40
Additives	1	1	1	1
Solvent	25	49	59	54

Table 4. Composition of fouling agent coatings (FA formulations).

Ingredients	Proportion (%)
Fouling agents	2
Resin	24
Solvent	74

VI. 도료의 물성 실험

1. 내마모성 (abrasion resistance)

내마모성 측정은 ASTM D968, KS3321 등에 따른 낙사 마모 시험 방법을 사용하였으며, 바인더 (B)와 수지 (S)의 비율 (B/S; A- 95/5, B- 85/15, C- 75/25, D- 65/35, E- 55/45)을 달리하여 시험 도료를 제작하였으며, 실험용 철판에 도장한 후에 음건하였다. 완전 건조된 실험용 철판을 ASTM D968, KS3321 등에 따른 낙사 마모 시험 방법을 통해 검증하였다. 시험 조건은 SIC #24를 90 cm 위에서 45 ° 기울기로 설치하여 직경 5 mm의 도막 파괴부가 생길 때까지 소요된 모래의 양과 도막의 기계적 충격에 의한 파괴 정도를 측정하였다. 낙사 마모 시험 외에 수치적으로 표시가 가능한 ASTM D4060-8 Tabor 마모 시험 방법을 따랐다. Tabor 마모시험을 마모윤으로 CS-17을 이용하여 마모 시 도막 무게 감소로 표시하였다.

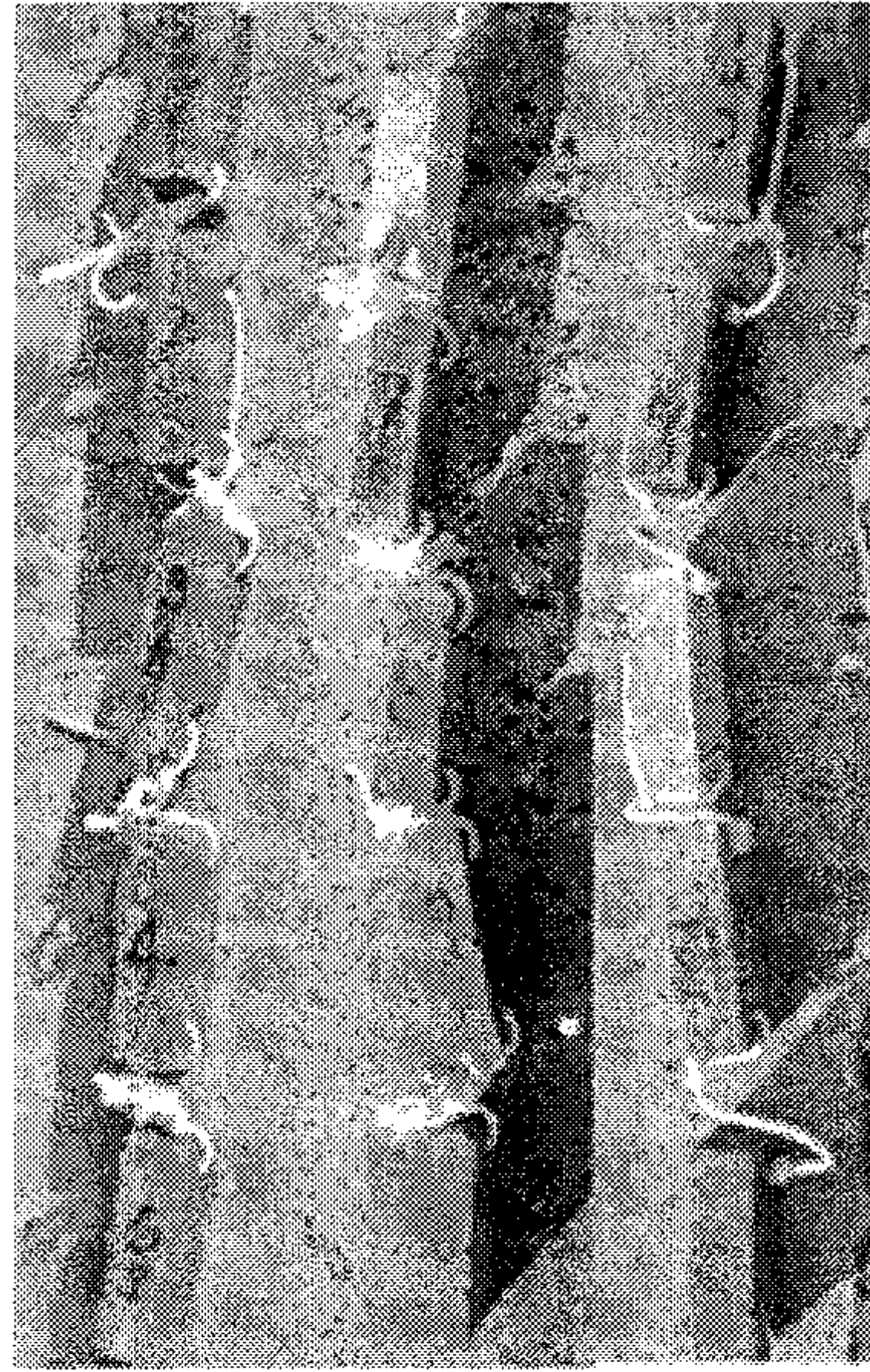
2. 내염수성 (Saline Resistance)

콘크리트 또 강재 재질의 인공어초는 해수와 화학적 반응하여 어초로서의 기능을 오랜 시간 동안 유지시켜 줄 수 없기 때문에 적절한 도료 포물러를 찾기 위한 실험으로 내염수성 시험을 실시하였다. 내염수성이 좋다할 지라고 착생촉진 능력을 발휘하기 위해서는 일정한 친수성이 필요하기 때문에 적절한 염수성 및 친수성이 필요하였다. 침지 30일 경과 후 도장된 패널 또는 인공 구조물의 내염수성을 측정하였으며, 소실된 도료의 도장 부분을 실을 이용하여 도장의 면적을 측정하였고, 측정한 실의 길이를 환산하여 내염수성 여부를 규명하였다.

Ⅶ. 설치

도장한 도료가 건조 된 후에 동해 속초 근교 아야진 내항에 설치하였다. 인공어초는 지반을 확인 한 후에 수심 5 M 지점에 가라 앉혀 설치하였으며, PE와 쿠폰 패널은 고정된 부표를 이용 수심 0.5 ~ 2 M 이내가 되도록 설치하였으며, PVC 패널 세트 및 콘크리트 블록은 건조 한 뒤에 동해 속초 근교 아야진 내항과 부산 조도 내 선착장 (N: 35°4'38", E: 129°5'16")에 수직으로 설치하였고, 사각 인공어초는 부산 조도 선착장 앞 수심 5 M 지점에 투하하였다 (Fig. 7).

A



B

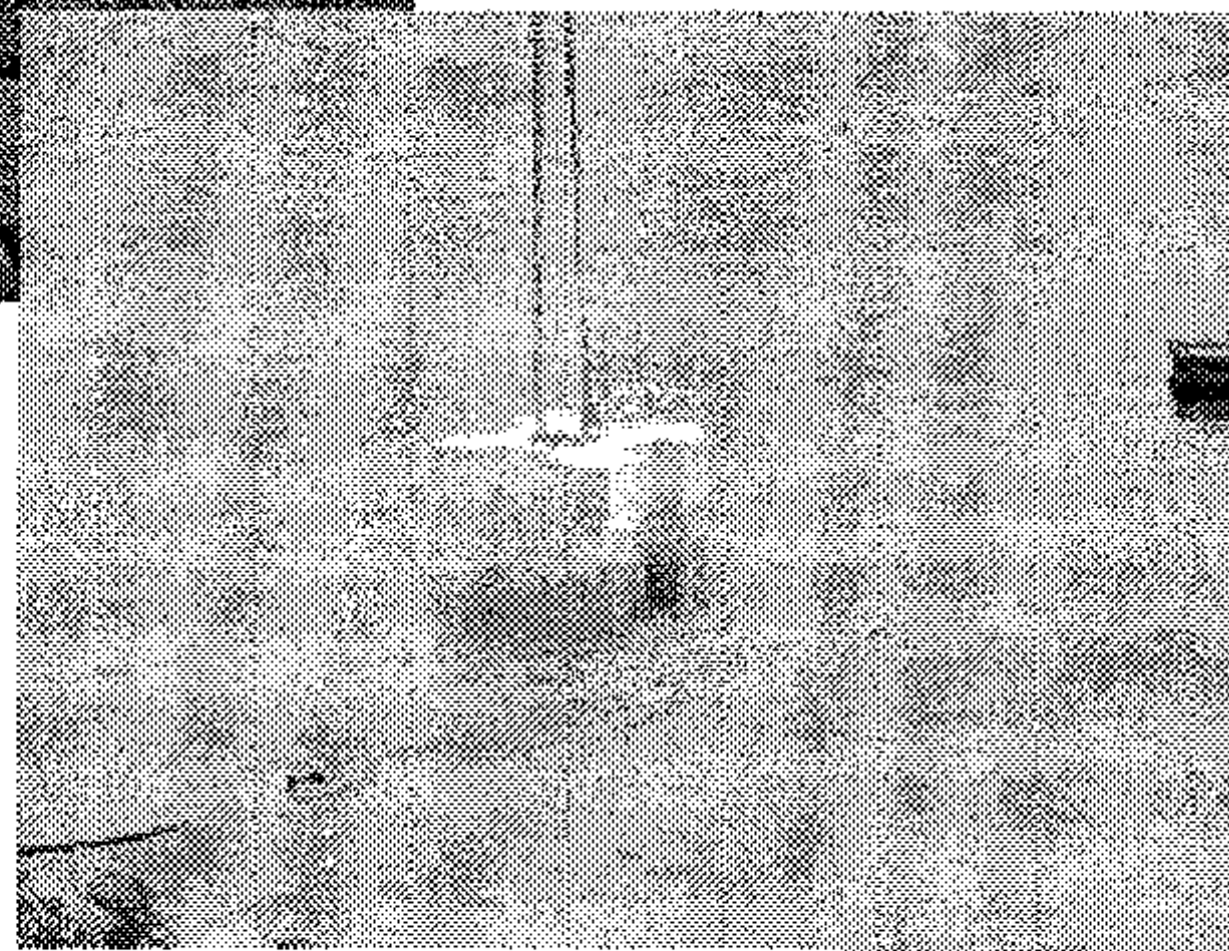
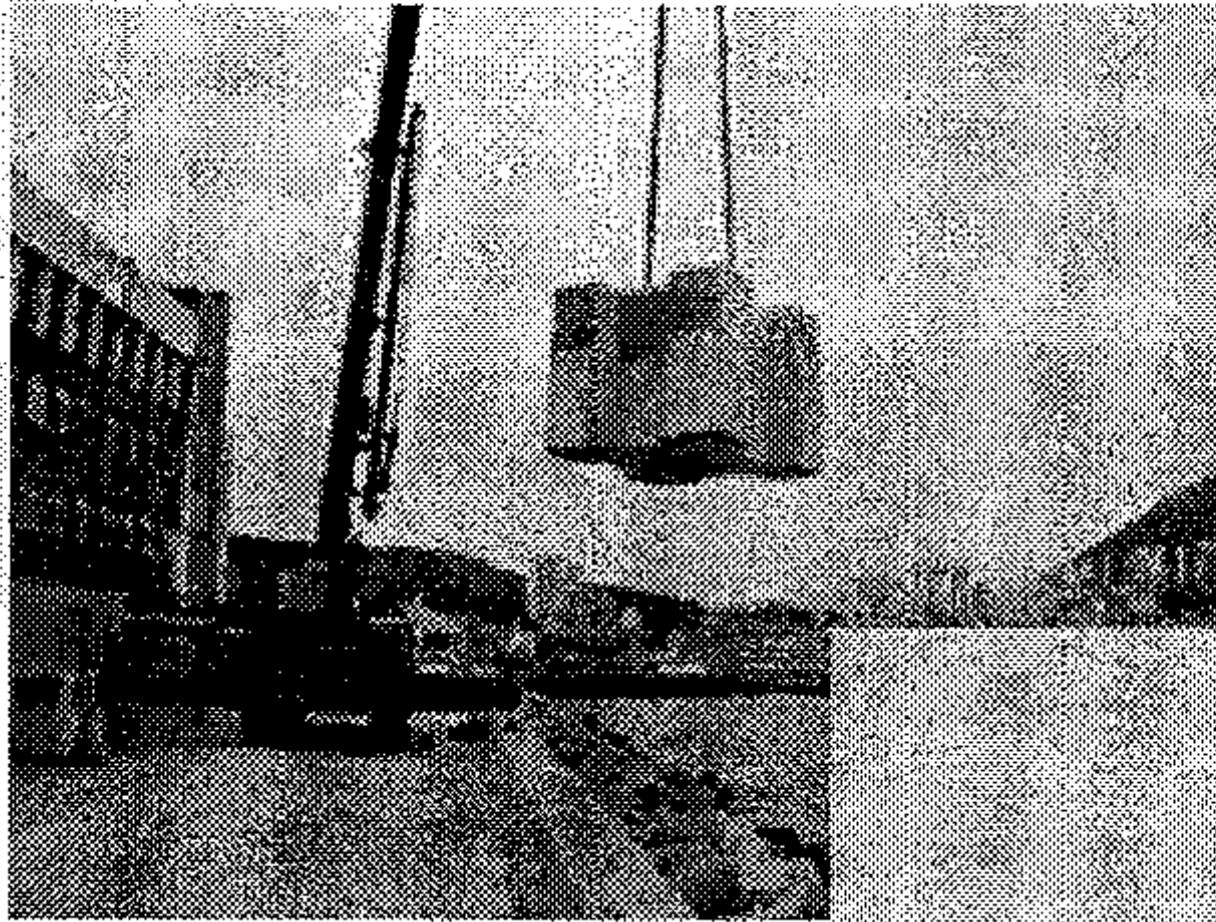


Fig. 7. Process of immersion of concrete bricks (A) and artificial reef blocks (B) coated with FAs.

2. 연구 결과

1. 착생 물질 시료 채취

1. 실리카 겔 크로마토그래피 분획의 활성화도

메탄올 추출물을 실리카 겔 컬럼 크로마토그래피를 통해 유기용매에 의해 분취된 분획들을 박층 크로마토그래피를 통해 시료의 전개를 확인하여 hexane, EtOAc, MeOH 의 농도를 조절하여 분획하였으며, 분획 된 분획구를 대상으로 motility 포자 운동성 및 ADM test를 실시한 결과 EtOAc : MeOH = 1 : 1 fraction에서 가장 높은 착생 촉진 효과를 나타냈다.

2. 고속 액체 크로마토그래피 (prep-High Performance Liquid Chromatography)를 통한 물질의 분리 - 1차 HPLC

메탄올 추출물을 분획 채취용 고속 액체 크로마토그래피 C18 reversed phase column (Microsorb, 21.4 mm × 250 mm)에 적용하여, 안정된 조건으로 메탄올과 물을 각각 80 %와 20 % 혼합한 용매를 섞어 사용하여 60분 동안 유속 5 ml min⁻¹로 용출시켰으며 254 nm에서 그 흡광도를 측정하면서 각 분획구들을 분취하여 각각 분획하였다 (Fig. 8).

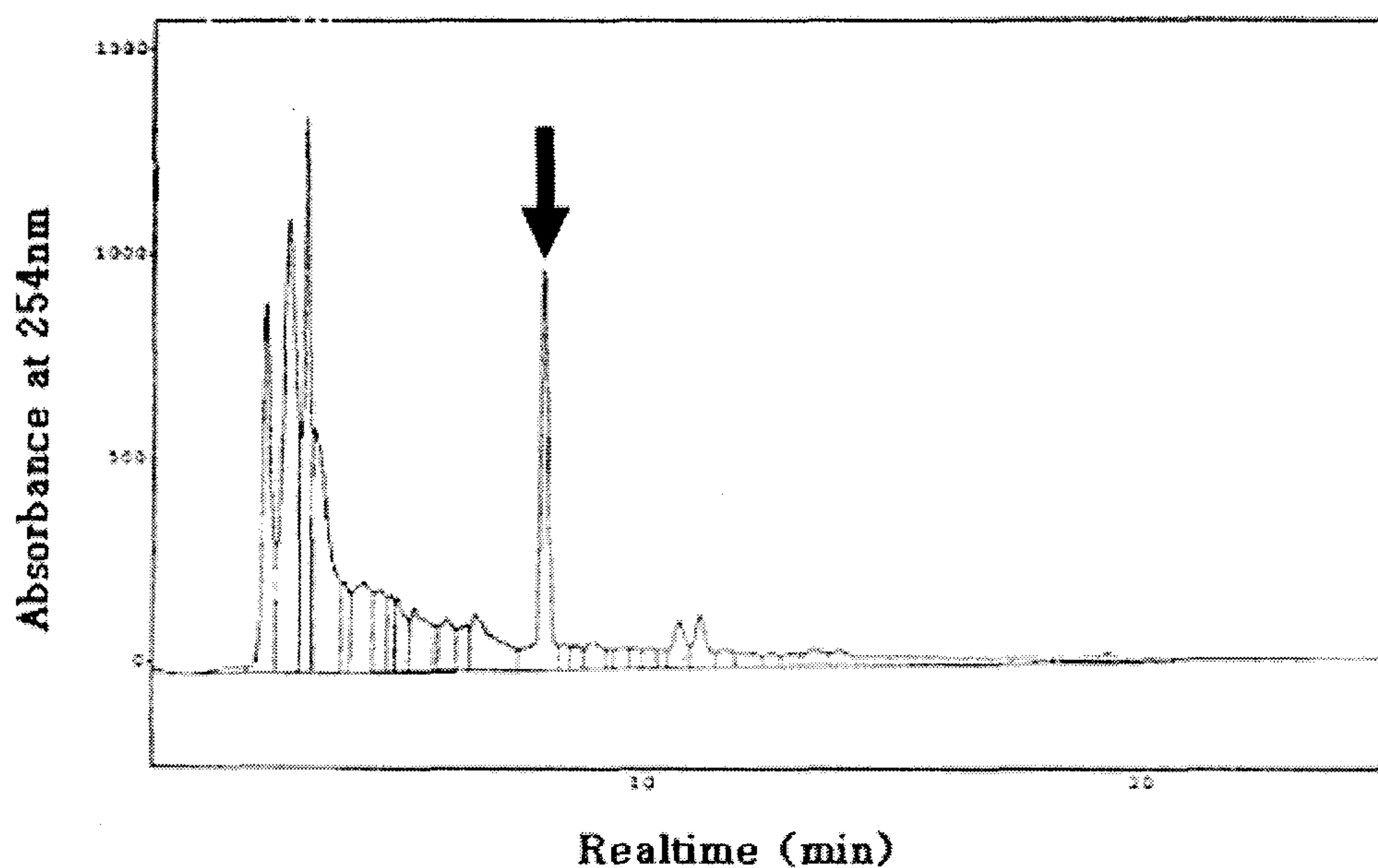


Fig. 8. Prep-HPLC profile for the *Jasminum* sp. The fraction was subjected to HPLC C18 reversed phase column (Microsorb, 21.4 mm × 250 mm). It was eluted with a isocratic of 80% methanol for 60min at a flow rate 2 ml min⁻¹ of 20 ml volume fractions. The absorbance was monitored at 254 nm.

3. 고속 액체 크로마토그래피를 통한 물질의 정제 (HPLC) - 2차 HPLC

분획 채취용 고속 액체 크로마토그래피를 사용하여 분취한 각 분획구들을 고성능 액체 크로마토그래피 C18 reversed phase column (Microsorb, 4.6 mm × 250 mm, Cosmosil)에 적용하여, 안정된 조건으로 메탄올과 물을 각각 50 % 씩 혼합한 용매를 사용하여 60분 동안 유속 1.0 ml min⁻¹로 용출시켰으며, 220 nm에서 흡광도를 측정하면서 물질을 정제하였다 (Fig. 9).

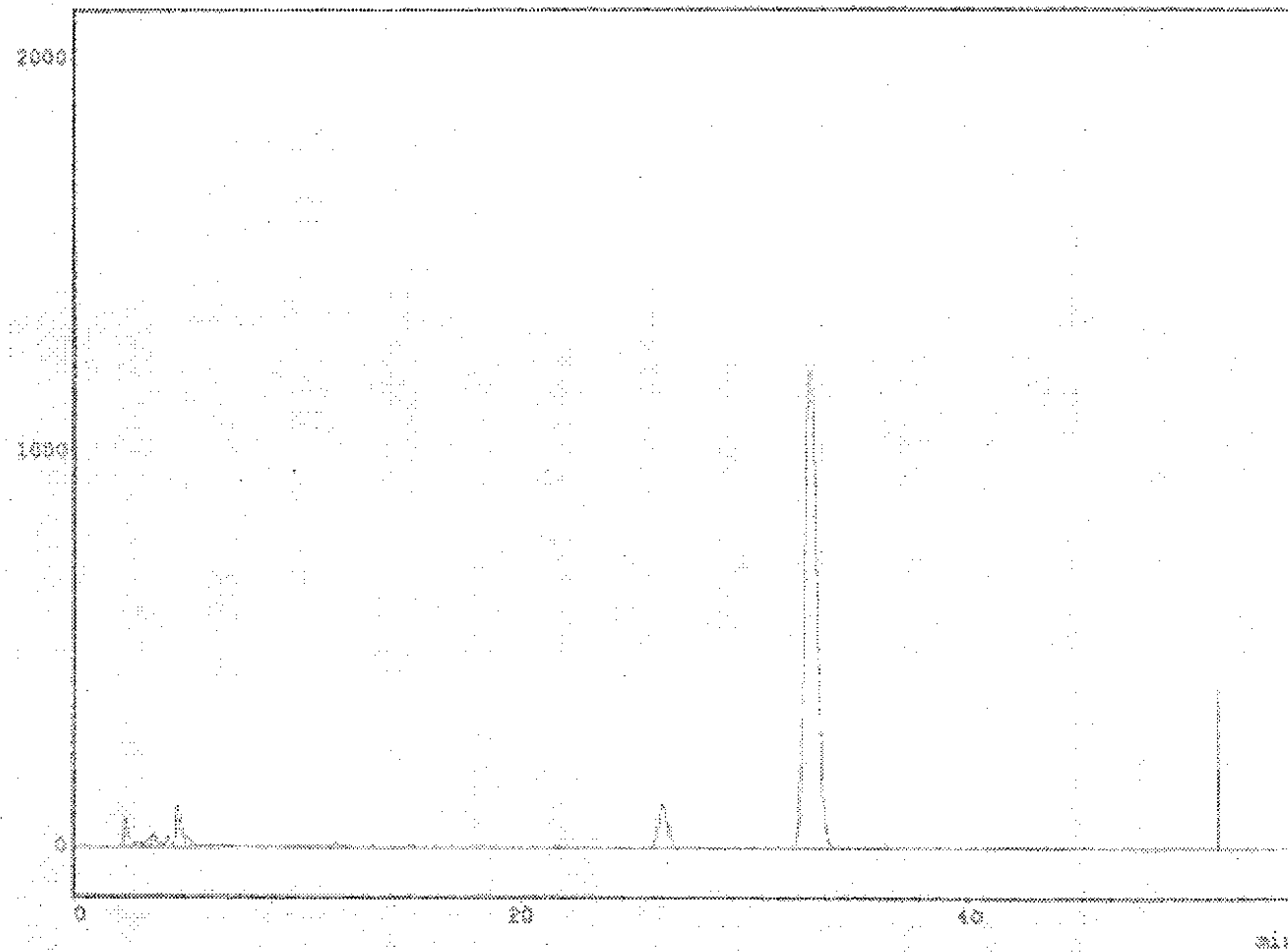


Fig. 9. HPLC profile for the fraction *Jasminum* sp. The fraction collected from prep-HPLC was subjected to HPLC C₁₈ reversed phase column (microsorb, 4.6 mm × 250 mm, Cosmosil). It was eluted with a isocratic of 50 % methanol for 20 min at a flow rate 1 ml min⁻¹. The absorbance was monitored at 220 nm.

4. 기체 크로마토 그래피 질량 분석 스펙트럼 (GC-Mass Spectrum)

고성능 액체 크로마토그래피 (HPLC)에서 활성부분 (메탄올 농도 80%) 만을 회수하여 건조시킨 후 메탄올에 녹인 다음 1 mg을 기체 크로마토그래피 질량 분석 스펙트럼 (Hewlett-Packard, 30 m × 0.25mm × 0.25μm)에 적용하여 이동상인 기체는 헬륨을 사용하였고, 주입비율은 0.6 ml min⁻¹으로 분할 주입법 (1 : 50)을 사용하여 분석하였다. *Jasminum* sp.에 대한 기체 크로마토그래피 질량 분석 스펙트럼 (GC-MS)을 사용하여 분자량을 구하였다 (Fig. 10). 데이터베이스 검색 결과 benzyl acetate (Mw; 150.07)로 확인되었다.

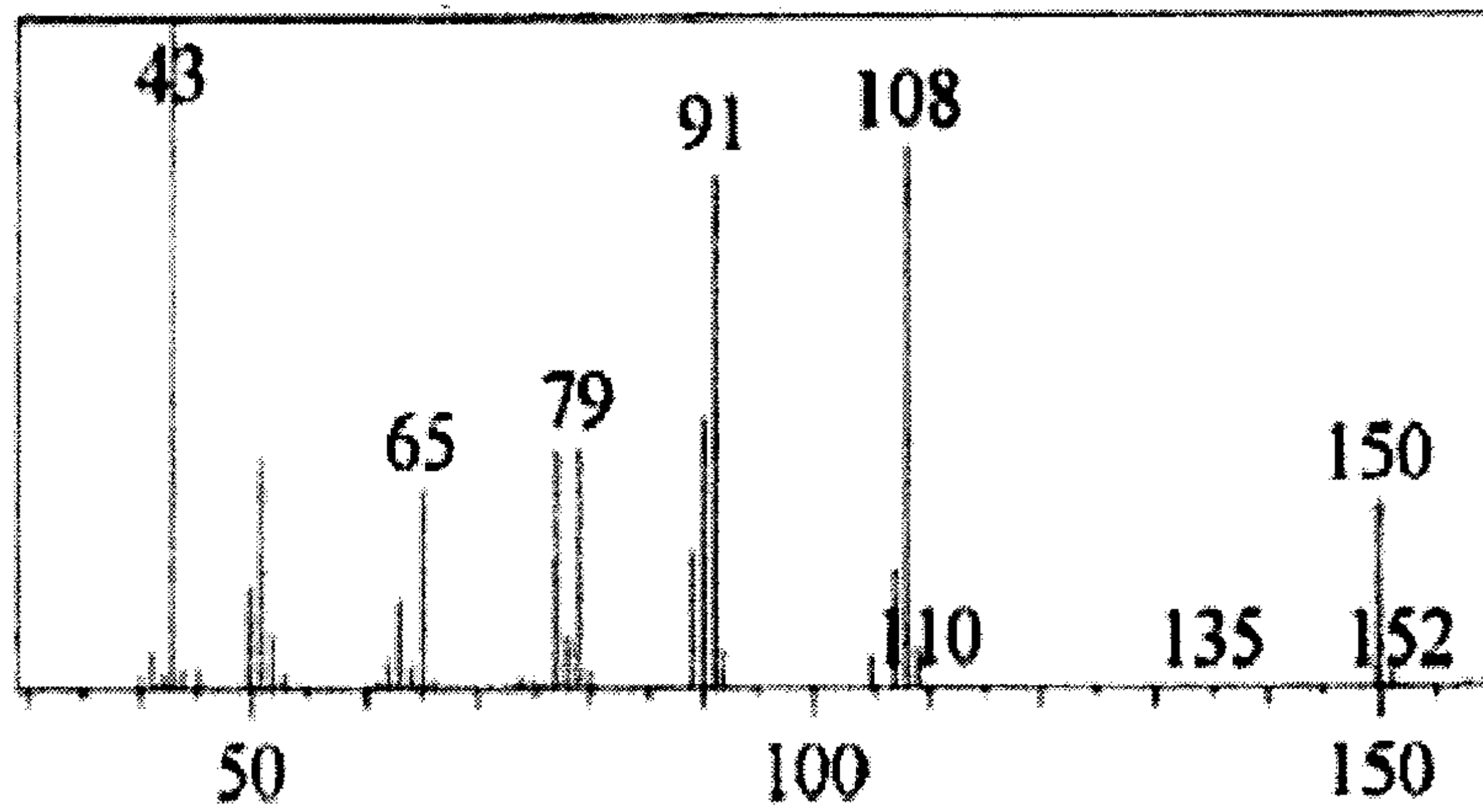
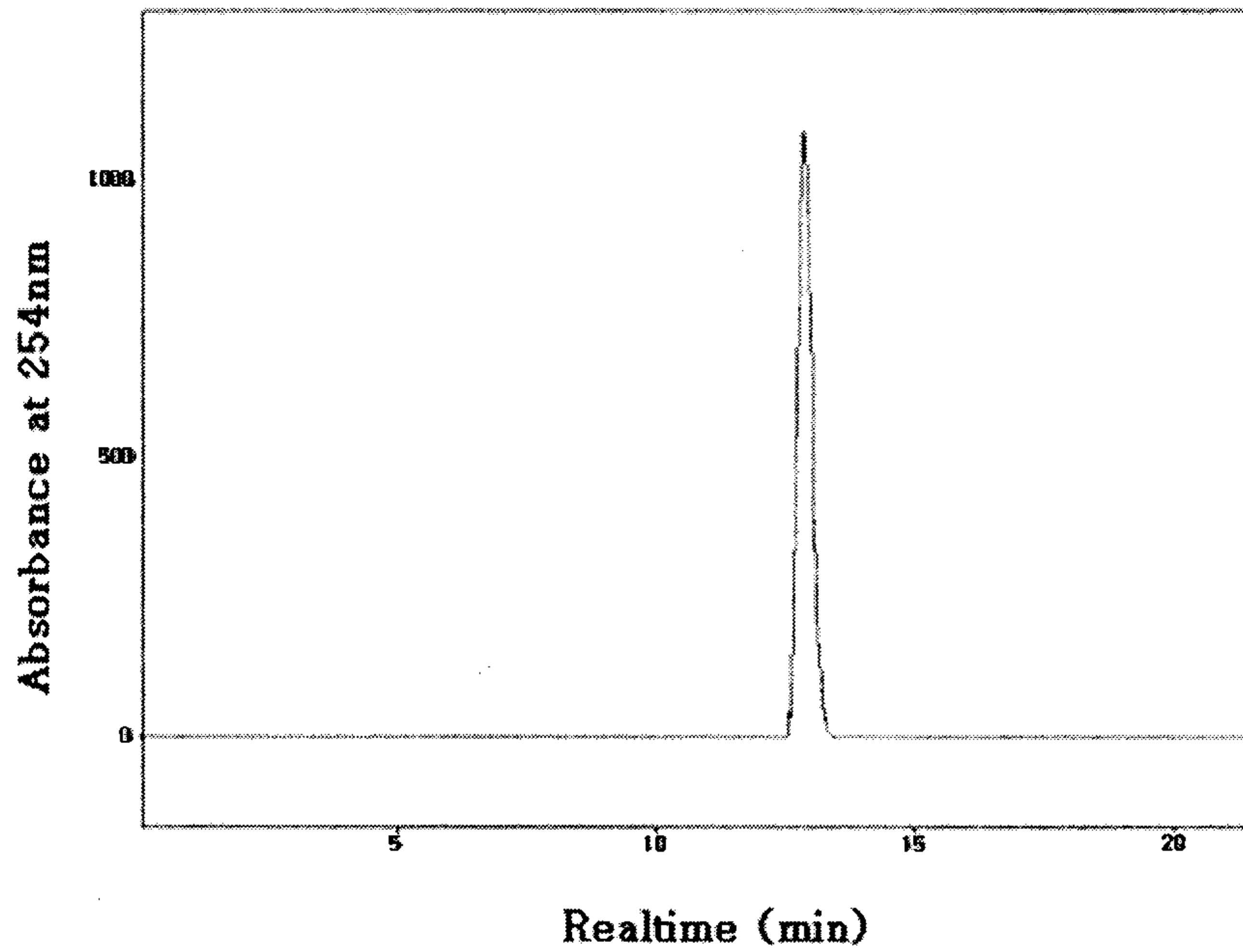


Fig. 10. GC-MS analysis of benzyl acetate. Analysis was on a HP-5 column (30 cm × 0.25 mm × 0.25 μm ID) maintained at 100 °C and programmed to 150 °C at 4 °C min⁻¹, 200 °C at 3 °C min⁻¹, 200 °C at 7 °C min⁻¹ and held at 200 °C for 6 min. Carrier gas was controlled at 0.6 ml min⁻¹ with a split ratio of 1 : 50.

5. FT-IR spectrum 분석을 통한 작용기 확인

Perloin-Elnor GX spectrophotometer를 사용하여 IR spectrum을 확인한 결과 max값은 1718.6 cm⁻¹, 1485.6 cm⁻¹, 1443.3 cm⁻¹, 1371.7 cm⁻¹, 1247.8 cm⁻¹, 1021.4 cm⁻¹, 745.5 cm⁻¹로 나타났다 (Fig. 11).

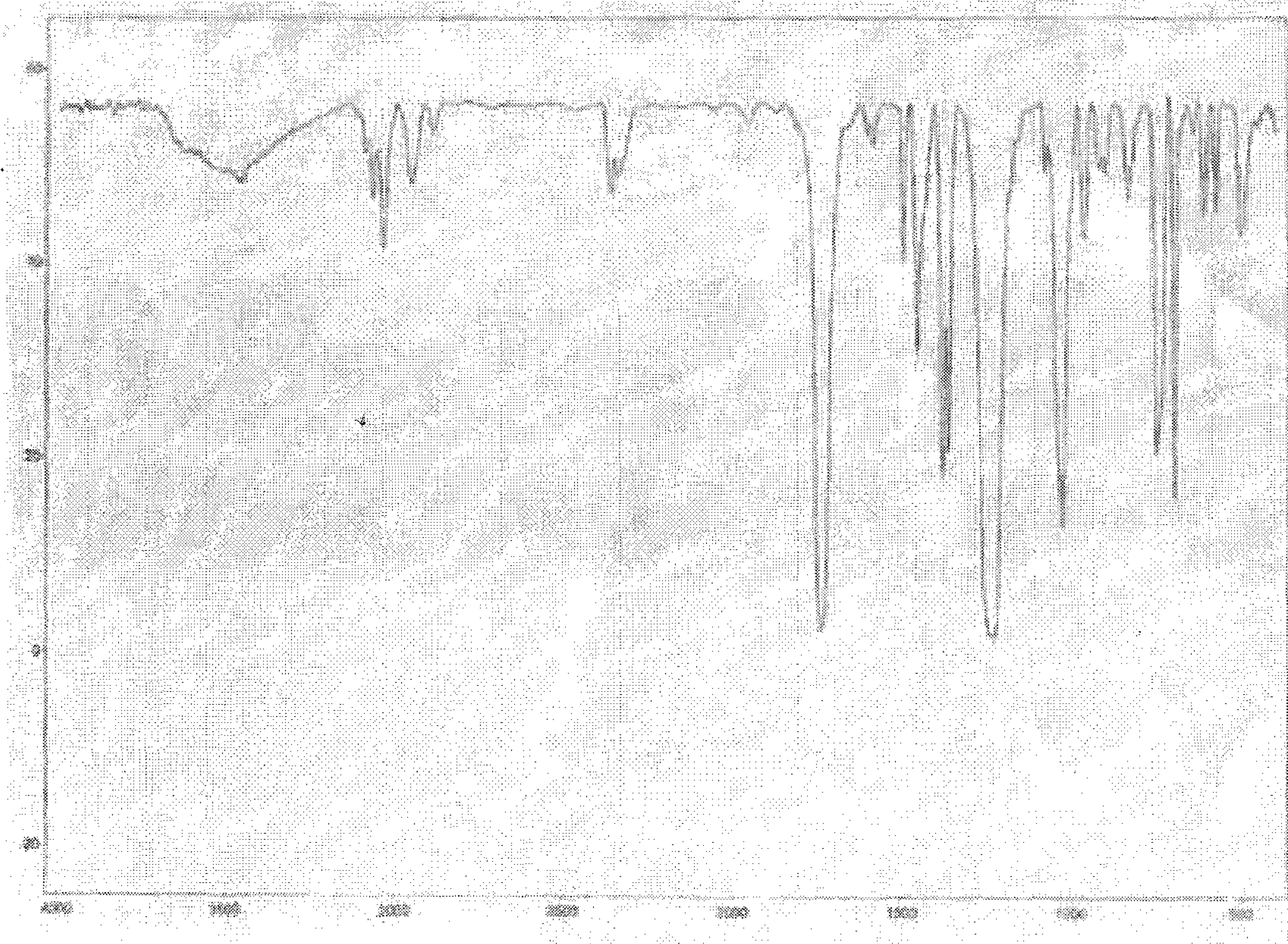


Fig. 11. IR spectra of benzyl acetate.

6. 핵자기 공명 스펙트럼 (Nuclear Magnetic Resonance; NMR)

고성능 액체 크로마토그래피를 사용하여 분취한 분획구에 대한 수소-핵자기 공명 및 탄소-핵자기 공명에 의한 분석 결과 ^1H NMR (500 MHz, CDCl_3) : δ 7.19 (aromatic proton), δ 5.34 (methylene), δ 2.01 (methyl) ^{13}C NMR (125 MHz, CDCl_3): δ 170.3 (ketone), δ 20.7 (methyl), δ 68.2 (oxygenated methylene), δ 127.2-129.0 (aromatic carbon), δ 141.2 (aromatic quaternary carbon)로 분석 되었고, 구조는 benzyl acetate로 판명되었다 (Table 5; Fig. 12).

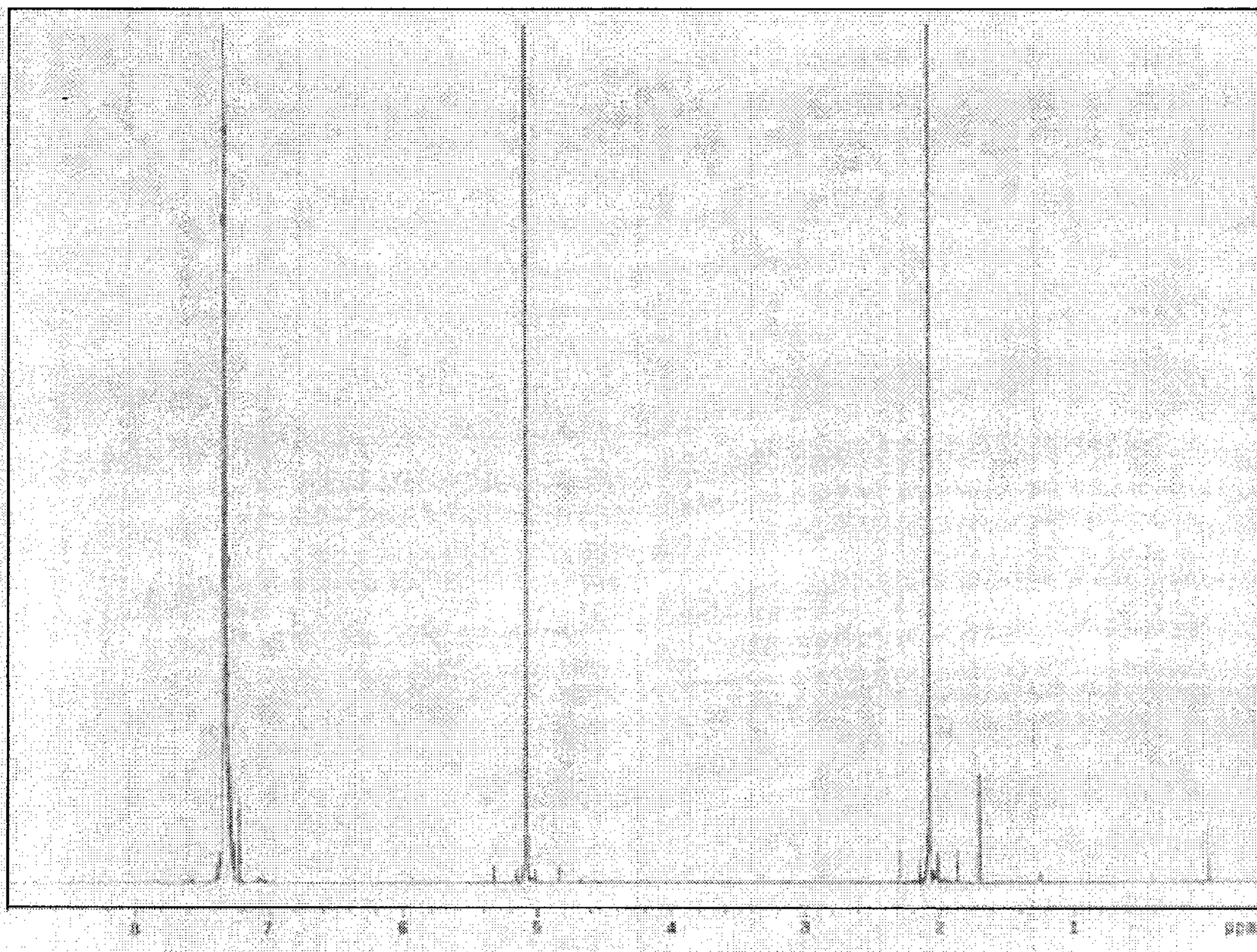
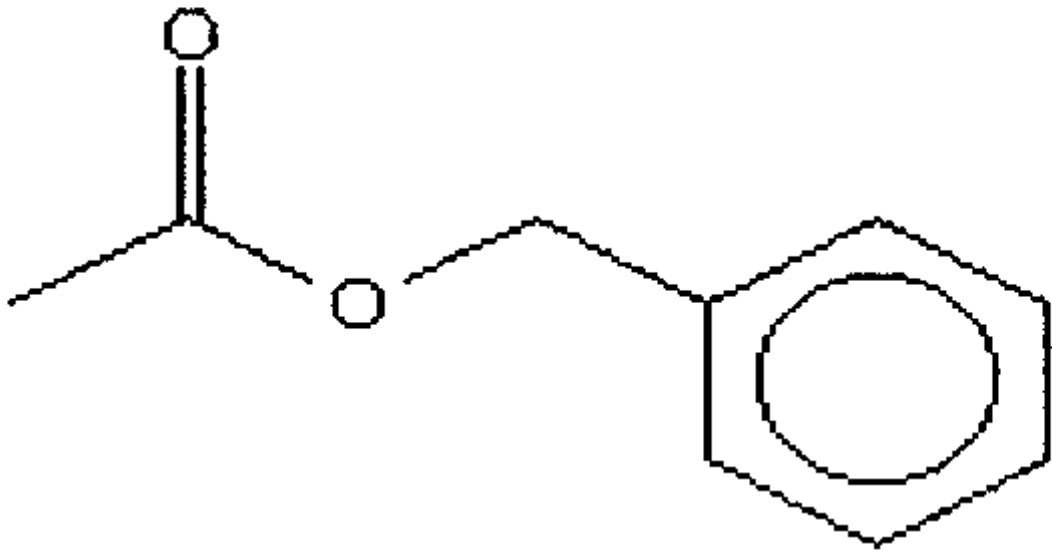


Fig. 12. ^1H -NMR spectra for benzyl acetate in CDCl_3

Table 5. Biological and chemical of benzyl acetate.

Benzyl acetate	
GENERAL CHARACTERISTICS	⇒ Molecular Formula : C ₉ H ₁₀ O ₂ ⇒ Molecular Weight : 150.17 ⇒ CAS Number : 140-11-4
PHYSICAL CHARACTERISTICS	⇒ Physical state : liquid. ⇒ Boiling Point : 210 °C (410 °F) ⇒ Melting Point: -51°C (-59.8°F) ⇒ Odor : Fruity. Flora.
CHEMICAL CHARACTERISTICS AND USES	⇒ Synonym: acetic acid, phenylmethyl ester; benzyl ethanoate; alpha-Acetoxy ⇒ Color: Colorless. Clear ⇒ Solubility: Soluble in diethyl ether, acetone. Very slightly soluble in cold water. ⇒ Stability: The product is stable.
Structure	
ECONOMICAL CHARACTERISTICS	⇒ Aldrich: ₩ 36,000 / 100 g ⇒ Aldrich: ₩ 71,000 / 1 kg

상기 과정을 동일하게 하여 *Sargassum* sp., *Ecklonia cava*, *Arachis hypogaea*, *Vaccinium* spp., *Citrus limon*, *Malus pumila* var. *dulcissima*, *Thea sinensis*, *Cinnamomum loureirii* 등을 추출 및 분리 정제 하여 그 구조를 분석하였으며, 각각의 추출물을 분석 규명하였으며, 추출물로 판명 된 물질들 (benzyl acetate, cis-3-hexen-1-ol, decanal, ethyl myristate, ethyl 2-methylbutyrate, furfuryl alcohol, hexyl acetate, methyl salicylate, p-anisaldehyde, hexyl alcohol, isoeugenol, trans-2-hexen-1-ol)이었다.

cis-3-hexen-1-ol 는 탄소 6개로 이루어진 $C_6H_{12}O$ 이며 분자량은 100.16와 CAS No. 928-96-1이고 (Fig. 13), 주로 블루베리에 많이 함유 되어있으며, 또 다른 이름으로는 cis-3-hexenol; cis-hex-3-en-1ol; Hex-3(Z)-enol 이다.

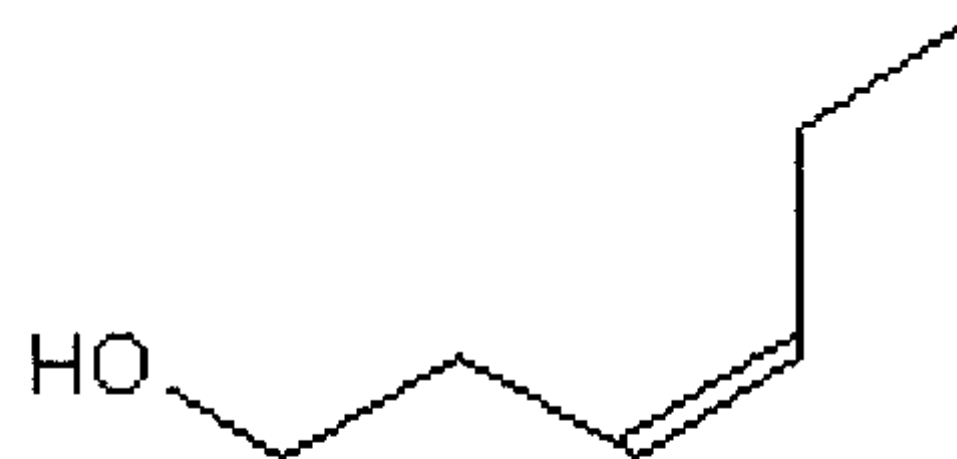


Fig. 13. Structure of cis-3-hexen-1-ol.

Decnal는 탄소 10개로 이루어진 $C_{10}H_{20}O$ 이며, 분자량은 156.27와 CAS No. 112-31-2이고 (Fig. 14), 주로 계피나무에 많이 함유 되어있으며, 또 다른 이름으로는 n-Decaldehyde; Decyl aldehyde; C-10 Aldehyde; 1-Decyl aldehyde 이다.



Fig. 14. Structure of decnal.

Ethyl myristate는 탄소 16개로 이루어진 $C_{16}H_{32}O_2$ 이며, 분자량은 256.42와 CAS No. 112-31-2이고 (Fig. 15), 주로 땅콩 및 야채류에 많이 함유 되어있으며, 또 다른 이름으로는 Myristic acid, Ethyl ester of tetradecanoic acid; Ethyl N-tetradecanoate이다.

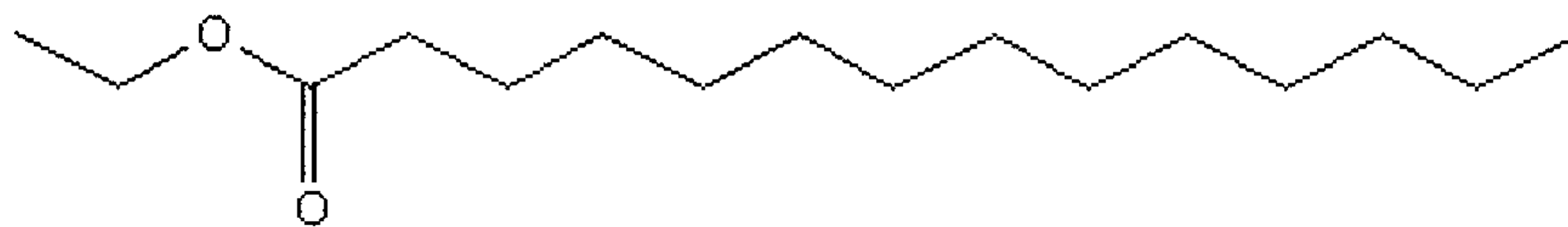


Fig. 15. Structure of ethyl myristate.

Ethyl 2-methylbutyrate는 탄소 7개로 이루어진 $C_7H_{14}O_2$ 이며, 분자량은 130.18와 CAS No. 7452-79-1이고 (Fig. 16), 주로 모자반류에 많이 함유 되어있으며, 또 다른 이름으로는 Butyric acid, 2-methyl-, ethyl ester; Ethyl 2-methylbutyrate; 2-methylbutanoic acid ethyl ester이다.

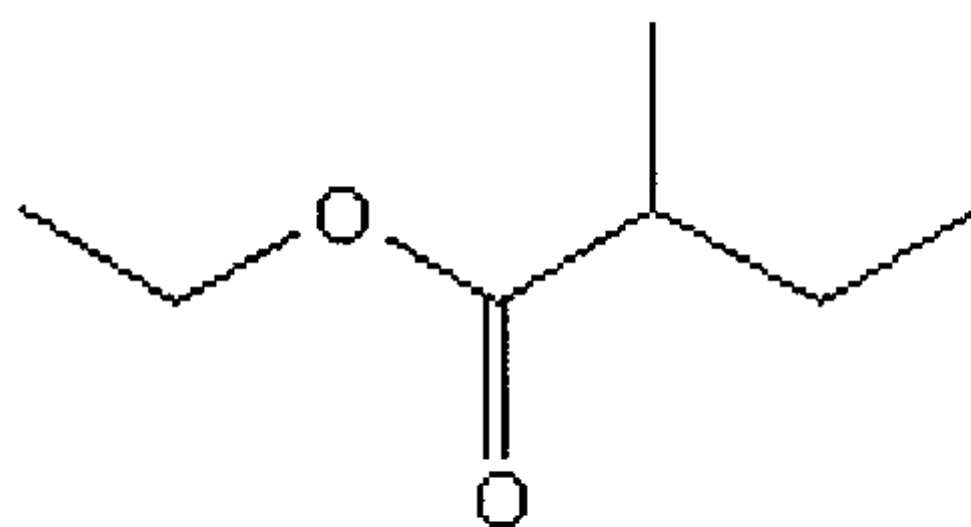


Fig. 16. Structure of ethyl 2-methylbutyrate.

Furfuryl alcohol는 탄소 5개로 이루어진 $C_5H_8O_2$ 이며, 분자량은 98.10와 CAS No. 98-00-0 이고 (Fig. 17), 주로 모자반류에 많이 함유 되어있으며, 또 다른 이름으로는 furfuryl alcohol; α -Furylcarbinol; methanol, (2-furyl)-; NCI-C56224; 2-furfurylalkohol 이다.

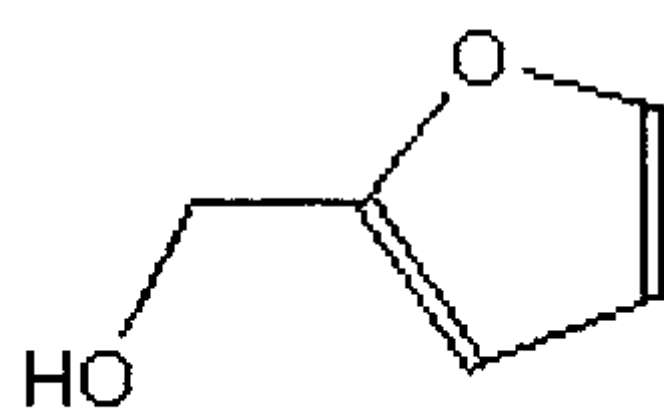


Fig. 17. Structure of furfuryl alcohol.

Hexyl acetate는 탄소 8개로 이루어진 $C_8H_{16}O_2$ 이며, 분자량은 144.21와 CAS No. 142-92-7 이고 (Fig. 18), 주로 모자반류에 많이 함유 되어있으며, 또 다른 이름으로는 acetic acid, hexyl ester; n-Hexyl acetate; hexyl ester of acetic acid이다.

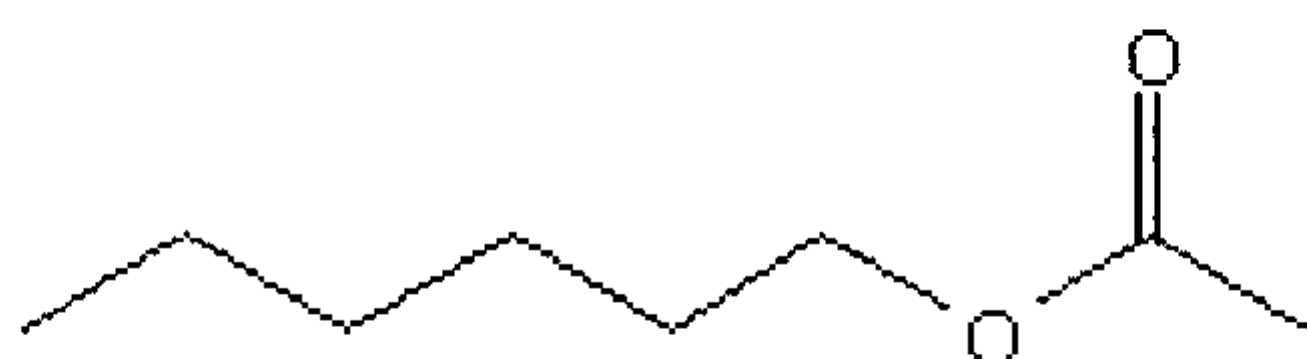


Fig. 18. Structure of hexyl acetate.

Hexyl alcohol는 탄소 6개로 이루어진 $C_6H_{14}O$ 이며, 분자량은 102.17와 CAS No. 111-27-3이고 (Fig. 19), 주로 사과에 많이 함유 되어있으며, 또 다른 이름으로는 hexyl alcohol; n-Hexan-1-ol; n-Hexanol UN 2282; exxal 6; n-Hexenol 이다.



Fig. 19. Structure of hexyl alcohol.

Isoeugenol는 탄소 10개로 이루어진 $C_{10}H_{12}O_2$ 이며, 분자량은 164.20와 CAS No. 97-54-1이고 (Fig. 20), 주로 레몬에 많이 함유 되어있으며, 또 다른 이름으로는 phenol, 2-methoxy-4-(1-propenyl)-; Phenol, 4-Propenylguaiacol; 2-Methoxy-4-[(1E)-1-propenyl] phenol 이다.

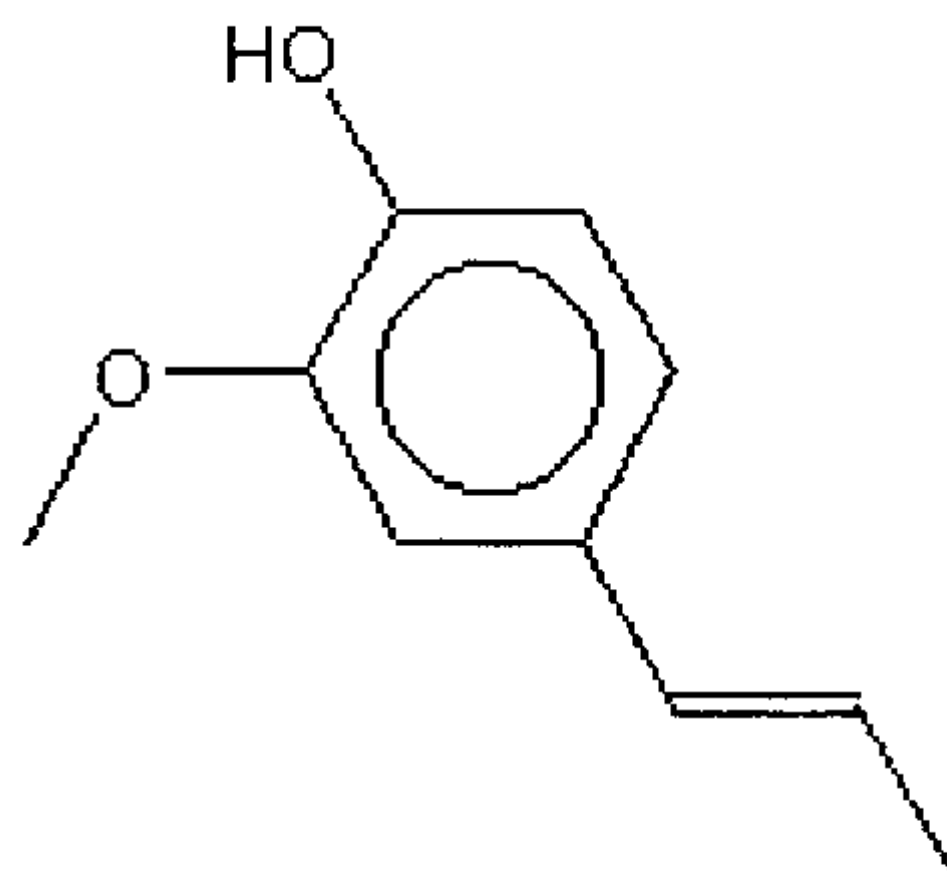


Fig. 20. Structure of isoeugenol.

Methyl salicylate는 탄소 8개로 이루어진 $C_8H_8O_2$ 이며, 분자량은 152.15와 CAS No. 119-36-8이고 (Fig. 21), 주로 모자반에 많이 함유 되어있으며, 또 다른 이름으로는 methyl salicylate; benzoic acid, 2-hydroxy-, methyl ester; synthetic; gaultheric acid이다.

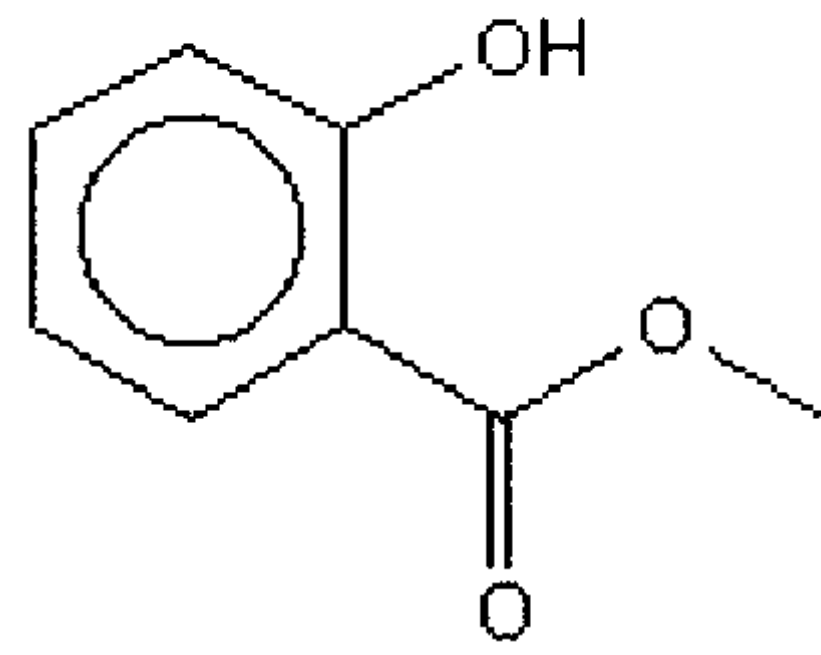


Fig. 21. Structure of methyl salicylate.

p-anisaldehyde는 탄소 8개로 이루어진 $C_8H_8O_2$ 이며, 분자량은 136.15와 CAS No. 123-11-5이고 (Fig. 22), 주로 모자반에 많이 함유 되어있으며, 또 다른 이름으로는 p-anisaldehyde; p-anisic aldehyde; anisal; methoxybenzaldehyde이다.

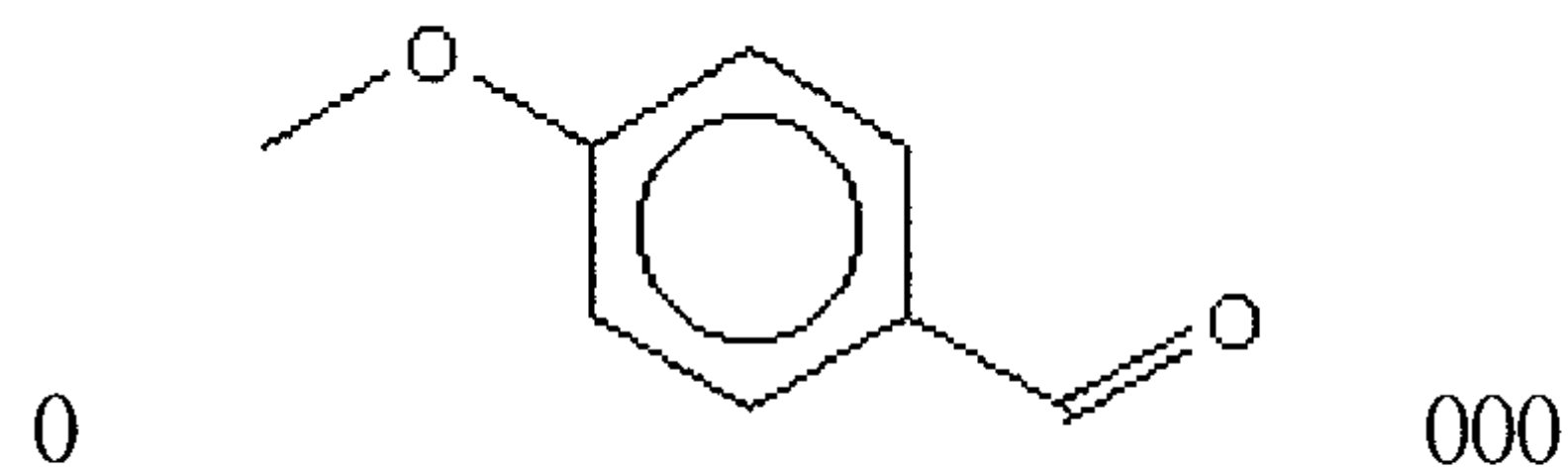


Fig. 22. Structure of p-anisaldehyde.

trans-2-hexen-1-ol는 탄소 6개로 이루어진 $C_6H_{12}O$ 이며, 분자량은 100.16와 CAS No. 928-95-0이고 (Fig. 23), 주로 홍차에 많이 함유 되어있으며, 또 다른 이름으로는 (E)-2-Hexen-1-ol; trans-2-Hexen-1-ol; (E)-hex-2-enol; Hex-2(E)-enol이다.



Fig. 23. Structure of trans-2-hexen-1-ol.

II. 포자 운동 효과 검증

13개의 후보 착생물질을 이용하여 포자 운동효과를 검증하였다. 실험 결과 benzyl acetate, decanal에서 포자 운동성이 $1000 \text{ mg} \cdot \ell^{-1}$ 까지 발견되지 않았으며, $250 \text{ mg} \cdot \ell^{-1}$ 부터 포자의 운동성을 보이기 시작했다. cis-3-hexen-1-ol은 $4000 \text{ mg} \cdot \ell^{-1}$, $2000 \text{ mg} \cdot \ell^{-1}$ 까지 포자의 움직임이 없었으나, $500 \text{ mg} \cdot \ell^{-1}$ 부터 포자의 유형이 관찰되었다. Ethyl myristate, ethyl 2-methylbutyrate, furfuryl alcohol에서는 $1000 \text{ mg} \cdot \ell^{-1}$ 까지 소수의 포자 유형이 관찰되었으며, $500 \text{ mg} \cdot \ell^{-1}$ 이후부터는 대조군보다 활발한 포자의 운동이 관찰되었다. Hexyl acetate에서는 $125 \text{ mg} \cdot \ell^{-1}$ 까지 포자의 활발한 운동을 관찰할 수 있었으며, hexyl alcohol, isoeugenol, methyl salicylate에서는 $4000 \text{ mg} \cdot \ell^{-1}$, $2000 \text{ mg} \cdot \ell^{-1}$, $1000 \text{ mg} \cdot \ell^{-1}$, $500 \text{ mg} \cdot \ell^{-1}$ 에서 25 % 이상의 포자 운동 저해가 발견 되었으나, $250 \text{ mg} \cdot \ell^{-1}$ 부터 대조군과 비슷한 운동을 확인 할 수 있었다. p-anisaldehyde, trans-2-hexen-1-ol에서는 $4000 \text{ mg} \cdot \ell^{-1}$ 에서 운동성이 거의 보이지 않았으나, $500 \text{ mg} \cdot \ell^{-1}$ 이하부터 포자의 활발한 유형이 관찰되었다 (Table 6). 검증 결과 실험에 사용된 후보 착생 촉진 물질의 포자 운동에 대한 작용은 두 가지 상반된 모습을 보였다. Benzyl acetate, cis-3-hexen-1-ol, decanal와 같이 물질과 반응하여 포자의 움직임이 관찰되지 않는 경우와 hexyl acetate, hexyl alcohol, isoeugenol, methyl salicylate와 같이 반응 후에 더욱 활발한 포자의 움직임이 발견되는 모습을 보였다. 실험 결과를 통해 후보 착생물질이 포자의 운동에 영향을 주고 있음을 검증할 수 있었다.

Table 6. Effect of FA candidates on motility of spores of *Ulva pertusa*.

Fouling agents	Concentration (mg · ℓ ⁻¹)					
	4000	2000	1000	500	250	125
Benzyl acetate	++++ ¹⁾	++++	++++	+++	++	-
cis-3-hexen-1-ol	++++	++++	+++	+	+	-
decanal	++++	++++	++++	+++	++	-
Ethyl myristate	+++	+++	+++	+	+	+
Ethyl 2-methylbutyrate	+++	+++	+++	+	+	-
Furfuryl alcohol	+++	+++	+++	+	+	-
Hexyl acetate	-	-	-	-	-	-
Hexyl alcohol	+	+	++	-	-	-
Isoeugenol	+	+	++	+	-	-
Methyl salicylate	+	+	+	+	-	-
p- anisaldehyde	+++	+	++	+	+	-
trans-2-hexen-1-ol	+++	++	++	+	+	-
Pentadecanoic acid	+++	+++	++	++	+	-

¹⁾ The motility responses were classified as follows: Very strong response +++++, 100 %; Strong +++, 95 - 75 %; Moderate ++, 75 - 50 %; Weak +, 50 - 25 %; No response -, and 25 - 0 %

III. Agar Diffusion Method (ADM)을 이용한 착생기능 검증

한천배지 (2 %)에 후보 착생물질을 교반하여 파래 포자가 방출되어 있는 해수에 담가 18 h 동안 암실에 보관한 후에 고, 저농도 별 ($1000 \text{ mg} \cdot \ell^{-1}$, $10 \text{ mg} \cdot \ell^{-1}$) 부착율을 측정하였다. 실험 결과 대조군으로 사용된 한천배지 (2 %)의 부착율을 100 %로 나타냈다. $10 \text{ mg} \cdot \ell^{-1}$ 하에서 cis-3-hexen-1-ol은 대조군 대비 153 %, benzyl acetate는 148 %로 대조군보다 높은 부착율을 보였으며, 모든 후보 착생 물질이 도말된 슬라이드에서 대조군보다 높은 포자의 부착을 확인할 수 있었다. $1000 \text{ mg} \cdot \ell^{-1}$ 하에서는 benzyl acetate가 203 %로 가장 높은 부착율을 보였으며, cis-3-hexen-1-ol은 197 %, decanal은 174 %, p-anisaldehyde에서는 130 %로 대조군 보다 높은 부착율을 보였다. 대부분의 후보 착생 물질이 도말된 슬라이드에서 대조군으로 사용된 한천배지만을 넣은 슬라이드보다 높은 부착율을 보였으며, $1000 \text{ mg} \cdot \ell^{-1}$ 에서 $10 \text{ mg} \cdot \ell^{-1}$ 보다 높은 부착율이 나타났다. 한천배지 실험결과 benzyl acetate, cis-3-hexen-1-ol에서 농도별 ($1000 \text{ mg} \cdot \ell^{-1}$, $10 \text{ mg} \cdot \ell^{-1}$) 결과가 대조군과 143% 이상의 부착율을 보였다 (Table 7).

한천 배지 (2 %)에 후보 착생물질을 교반하여 갈조류인 감태의 포자가 방출되어 있는 해수에 담가 18 h 동안 암실에 보관한 후에 고, 저 농도 별 ($1000 \text{ mg} \cdot \ell^{-1}$, $10 \text{ mg} \cdot \ell^{-1}$) 부착율을 측정 하였으며, 대조군으로 사용된 한천배지 (2 %)의 부착율을 100 %로 나타냈다. $10 \text{ mg} \cdot \ell^{-1}$ 하에서 decanal에서 대조군 대비 224 %로 가장 높은 부착율을 보였으며, cis-3-hexen-1-ol (190 %), ethyl myristate (186 %), p-anisaldehyde (177 %), hexyl acetate (167 %), benzyl acetate (154 %) 순으로 부착을 보였다. 감태 포자 실험에서도 파래 포자의 실험과 비슷하게 대부분의 후보 착생 물질이 도말된 슬라이드에서 대조군으로 사용된 한천 배지 만을 넣은 슬라이드보다 높은 부착율을 보였다. $1000 \text{ mg} \cdot \ell^{-1}$ 에서는 benzyl acetate (323 %), p-anisaldehyde (236 %), ethyl 2-methylbutyrate (235 %), trans-2-hexen-1-ol (212 %), cis-3-hexen-1-ol (197 %), decanal (193 %)의 부착율이 관찰되었다. 실험 결과 $1000 \text{ mg} \cdot \ell^{-1}$ 에서 $10 \text{ mg} \cdot \ell^{-1}$ 보다 높은 부착율이 나타났다 (Table 8).

Table 7. Agar Diffusion Method: *Ulva* spore attachment on agar (2 %) coated slides impregnated with different fouling agents (FAs). Mean \pm SD (%)

Fouling agents	Concentration ($\text{mg} \cdot \ell^{-1}$)	
	10	1000
Benzyl acetate	594 \pm 66.79 (148 ¹⁾)	816 \pm 82.32 (203)
cis-3-hexen-1-ol	617 \pm 75.44 (153)	792 \pm 100.84 (197)
Decanal	539 \pm 42.08 (134)	701 \pm 75.28 (174)
Ethyl myristate	501 \pm 36.38 (125)	613 \pm 42.18 (152)
Ethyl 2-methylbutyrate	432 \pm 65.91 (107)	519 \pm 80.72 (129)
Furfuryl alcohol	618 \pm 34.78 (154)	764 \pm 60.03 (190)
Hexyl acetate	506 \pm 19.72 (126)	590 \pm 43.96 (147)
Hexyl alcohol	525 \pm 47.43 (131)	651 \pm 44.17 (162)
Isoeugenol	530 \pm 18.24 (132)	677 \pm 32.79 (168)
Methyl salicylate	464 \pm 35.55 (115)	609 \pm 46.77 (151)
p- anisaldehyde	589 \pm 23.15 (147)	522 \pm 38.84 (130)
trans-2-hexen-1-ol	415 \pm 21.05 (103)	492 \pm 45.87 (122)
Pentadecanoic acid	511 \pm 33.65 (127)	635 \pm 41.36 (158)

¹⁾Spore attachment (%) compared to control (agar coating) (%)

Table 8. Agar Diffusion Method: *Ecklonia cava* spore attachment on agar (2%) coated slides impregnated with different fouling agents (FAs). Mean \pm SD (%)

Fouling agents	Concentration ($\text{mg} \cdot \ell^{-1}$)	
	10	1000
Benzyl acetate	212 \pm 65.54(154 ¹⁾)	446 \pm 75.40(323)
cis-3-hexen-1-ol	262 \pm 22.38(190)	271 \pm 45.55(197)
Decanal	310 \pm 24.43(224)	266 \pm 51.51(193)
Ethyl myristate	256 \pm 15.23(186)	166 \pm 34.25(121)
Ethyl 2-methylbutyrate	182 \pm 23.60(132)	352 \pm 47.70(235)
Hexyl acetate	230 \pm 47.04(167)	252 \pm 50.68(183)
Isoeugenol	185 \pm 33.63(134)	276 \pm 28.98(200)
p- anisaldehyde	245 \pm 33.63(177)	326 \pm 28.51(236)
trans-2-hexen-1-ol	197 \pm 26.44(143)	292 \pm 52.69(212)

¹⁾Spore attachment (%) compared to control (agar coating) (%)

IV. 쿠폰 패널 실험

(가) 쿠폰 패널을 통한 착생 효능 검증

쿠폰 패널을 속초 아야진 내항에 설치 30일 경과 후 부착 유무를 관찰하였으며, 바인더로는 로진 DX250, DX600, DX700을 사용하였다. 쿠폰 패널의 결과는 면적 대비 부착율을 상, 중, 하 [High, H (100 ~ 85 %); Medium, M (84 ~ 45 %); Low, L (44 ~ 5 %)]로 표기하였으며, 각 바인더 별, 물질별 차이를 나타내었다. 본 실험에서는 녹조류인 파래 (*Enteromorpha* sp.)가 우점하게 부착하였다, DX200을 바인더로 사용한 결과 대조군은 1 ml, 2 ml 모두 면적 대비 45 % 정도의 파래 (*E. sp.*)가 부착되었음이 관찰되었다. 후보 착생 물질 중 ethyl 2-methylbutyrate는 1 ml에서 면적 대비 70 %, 2 ml에서 100 %의 부착을 확인 할 수 있었으며, benzyl acetate에서는 1 ml에서 40 %의 부착율을 보였으나, 2 ml에서는 100 % 부착을 보였다. 바인더 DX650에서 대조군은 1 ml에서 20 %, 2 ml에서는 85 %의 부착율이 나타났다. Ethyl 2-methylbutyrate은 면적 대비 100 %의 부착을 확인 할 수 있었으며, decanal과 p-anisaldehyde에서는 1 ml에서 65 ~ 85 %의 부착율을 2 ml에선 모두 100 %의 부착이 나타났다. 바인더 DX700에서의 대조군은 1 ml에서 50 %, 2 ml 단계에서 25 %의 부착율을 보였다. p-anisaldehyde에서 1 ml, 2 ml 모두 100 % 부착을 보였다. 쿠폰 패널을 이용한 부착 유무의 관찰 결과 ethyl 2-methylbutyrate, p-anisaldehyde에서 바인더나 도료의 양에 상관없이 조류의 부착을 확인할 수 있었다 (Table 9; Fig. 24).

Table 9. Fouling coverage (%) estimated on perforated PVC plate etched with test circles
 Test circles coated with 1 or 2 ml of fouling agents with rosin matrix (DX200
 DX650 and DX700).

Fouling agents	DX200		DX650		DX700	
	1ml	2ml	1ml	2ml	1ml	2ml
Benzyl acetate	L ¹⁾	H	-	M	H	-
cis-3-hexen-1-ol	M	L	-	M	L	-
Decanal	L	L	M	H	H	-
Ethyl myristate	L	M	H	-	-	-
Ethyl 2-methylbutyrate	M	H	H	H	L	H
Hexyl acetate	M	M	M	L	-	M
Isoeugenol	L	L	H	M	H	-
p-anisaldehyde	-	M	M	H	H	H
trans-2-hexen-1-ol	H	L	L	H	M	M
Alunite	M	-	L	M	H	L
Control	M	M	L	H	M	L

¹⁾ High, H (100 % ~ 85 %); Medium, M (84 % ~ 45 %); Low, L (44 % ~ 5 %); Control (45 %)

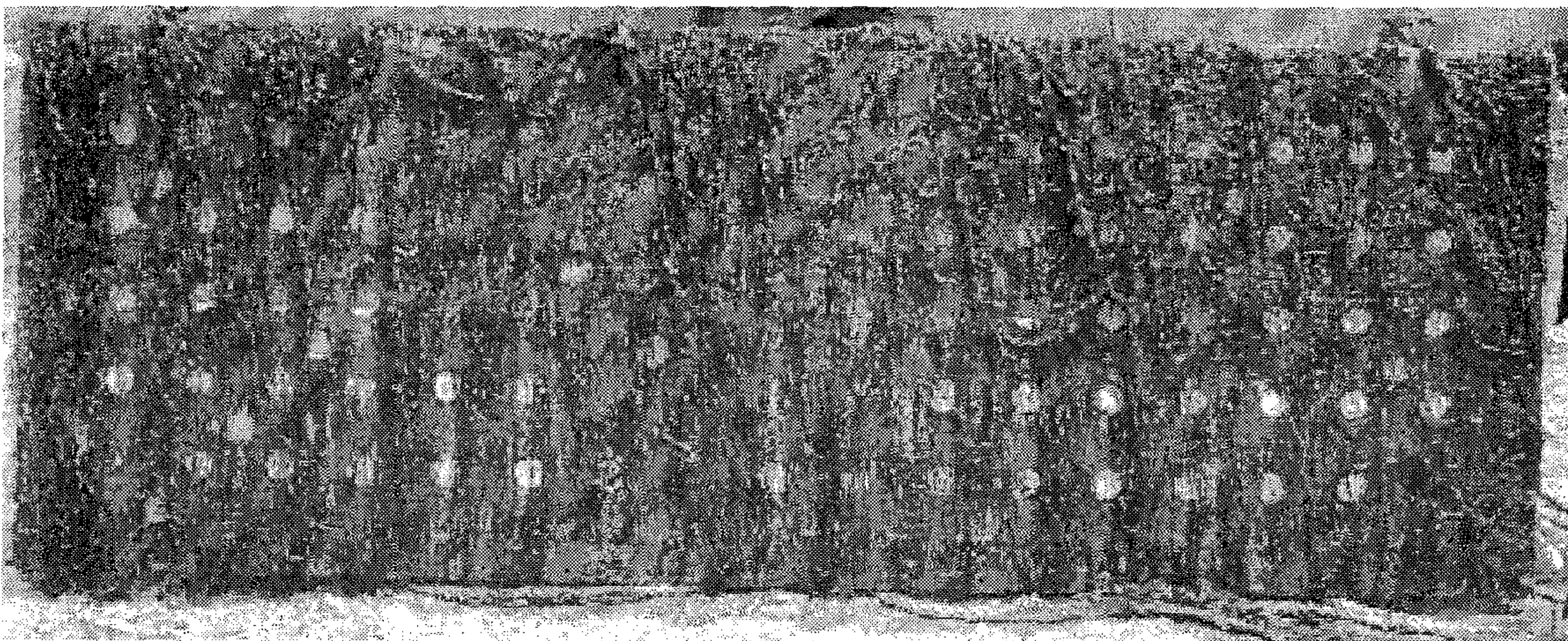


Fig. 24. Fouling assemblage on perforated PVC test panels after 30 days exposure to
 Ayajin harbor waters.

V. Polyethylene (PE)

(가) Polyethylene (PE) 패널을 통한 착생 효능 검증

후보 착생 물질 중 착생 촉진 유무를 관찰하기 위하여 후보 착생 물질의 첨가 비율 (%)를 다르게 하여 시험 도료를 제작하였으며, 제작한 시험 도료를 도료용 붓을 이용하여 PE 표면에 도장 한 후에 음건하여 사용하였다. 30일 경과 후 관찰한 결과 맥반석의 첨가율이 20 %인 도료 도장 부분은 면적의 90 % 이상이 파래 (*Enteromorpha* sp.)에 부착됨이 관찰되었으며, 60 % 첨가 도료가 도장된 부분에서는 더욱 밀집된 부착 (100 %)을 보였다. 또한 30 % benzyl acetate에서도 도장 면적의 75 % 이상이 파래에 부착된 것이 관찰되었다 (Fig. 25).

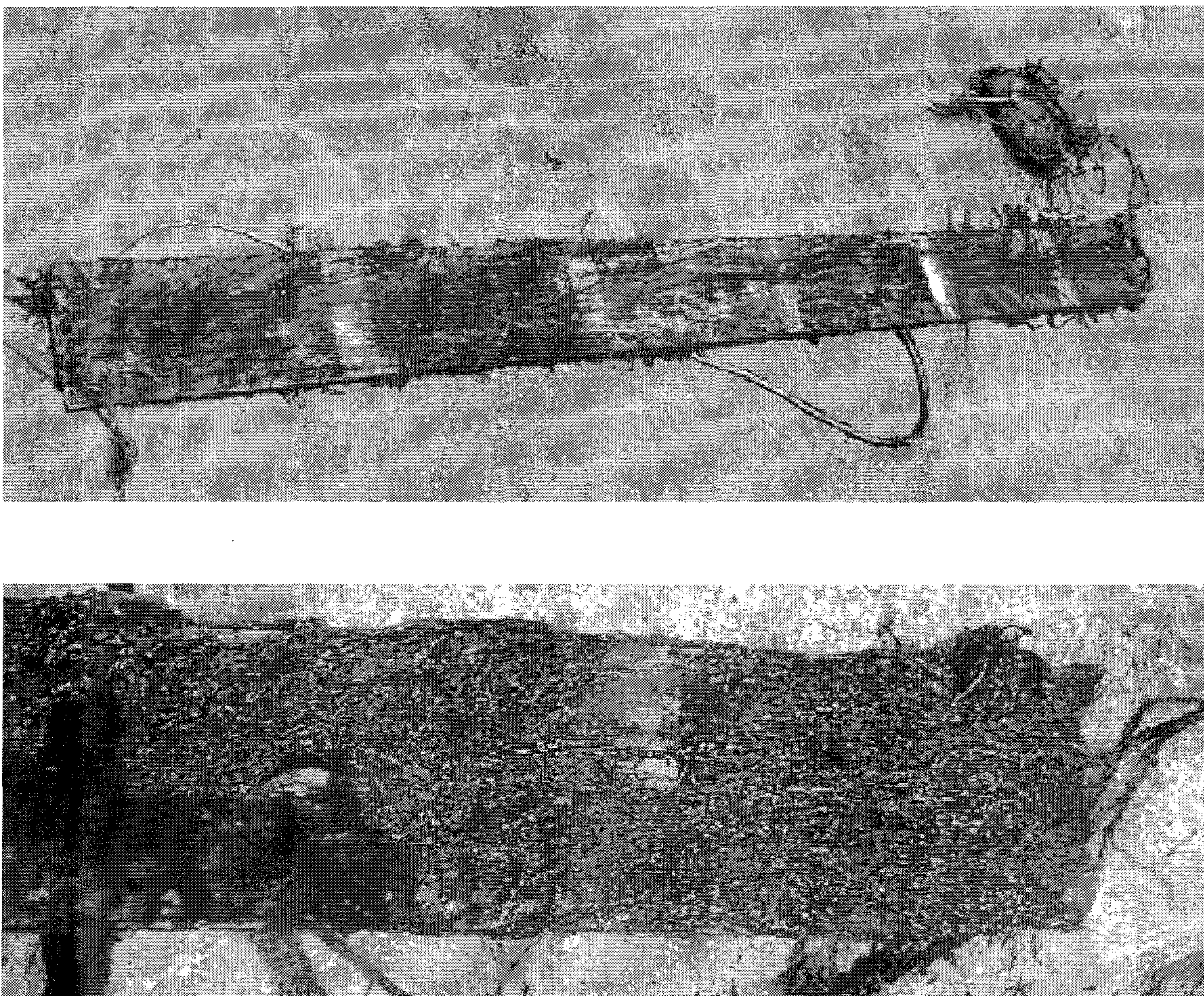


Fig. 25. Fouling assemblage on test polyethylene (PE) plate after 30 days exposure to Ayajin harbor waters.

VI. 도료 물성 검증

(가) 내마모성 (Abrasion resistance) 검증

최적 도료 비율을 찾기 위해 내마모성 실험을 실시하였으며, 시험 도료가 도장된 실험용 철판을 ASTM D968, KS3321등에 따른 낙사 마모 시험 방법을 통해 검증하였다. 검증 결과 무게 감소량 (mg)은 A: 197 mg, B: 147 mg, C: 225 mg, D: 333 mg, E: 523 mg으로 A, B, C에 비해 D, E의 마모량이 높게 나타났다. 실험결과 A와 B 도료는 마모율은 적게 나타났으나, 도막의 두께가 얇아 착생 촉진 물질의 접착능이 떨어질 우려가 있으며, D, E 도료는 접착능은 높으나 마모율 또한 높아 착생 물질의 빠른 소실이 우려된다. 이 결과를 통해 최적화된 도료의 기본 구성 비율을 조성하였다.

(나) 내염수성

후보 착생 촉진 도료를 도장한 패널 세트를 동해 아야진 내항에 설치하였으며, 30일 경과 후에 도장된 패널 표면의 해수에 의한 마모율을 알아보았다. 그 결과 benzyl acetate (94 %), cis-3-hexen-1-ol (95 %), decanal (92 %), p-anisaldehyde (94 %)에서 대조군과 유사한 마모 정도를 나타냈으며, trans-2-hexen-1-ol (85 %), isoeugenol (86 %)에서 가장 많은 마모율을 보였다. 염수 또는 기타 해양 물리작용에 의하여 도장 표면의 닳거나 벗겨지는 문제를 알아보기 위한 실험으로써 대부분의 물질은 염수 및 해양환경에 뛰어난 견고도를 보였으며, trans-2-hexen-1-ol (85 %)과 isoeugenol은 대조군과 비교 시 염수 및 해양환경에 많은 영향을 받은 것이 관찰되었다 (Table 10).

Table 10. Abrasion resistance (AR) against seawaters.

Fouling agents	%
Control	98
Benzyl acetate	94
cis-3-hexen-1-ol	95
Decanal	92
Ethyl myristate	88
Ethyl 2-methylbutyrate	90
Hexyl acetate	88
Isoeugenol	86
p-anisaldehyde	94
trans-2-hexen-1-ol	85

VII. 착생율 효과 검증

(가) 콘크리트 블록 및 PVC를 이용한 착생 효능 검증

최적화된 도료 포뮬러 (Table 3)에 후보 착생 촉진 물질을 넣어 도료로 사용하였다. PVC 패널 표면에 에어 콤푸레샤의 압력을 7 ~ 10 kgf·cm²으로 조절하여 스프레이건을 연결한 후에 2 ~ 3회 반복 도장 하였으며, 2 ~ 3일간 음건하여 완전 건조 후에 패널 세트를 제작하여 사용하였고, PVC 패널에 도장된 도료의 무게는 평균 2.73 ± 0.49 g이었다. 동해 아야진에 설치한 PVC 패널은 30일 경과 후 대조군으로 사용한 기본 도료에서 면적 대비 연성착생생물 (soft fouler; SF) 10 %와 소수의 경성착생생물 (hard fouler; HF), 30 %의 바이오 필름 (biofilm; BF)이 형성 되었으며, PVC 대조군 또한 바이오 필름 형성 (30 %)이 주를 이루었다. cis-3-hexen-1-ol, ethyl myristate, ethyl 2-methylbutyrate에서 면적 대비 60 %의, decanal, hexyl acetate는 50 %, p-anisaldehyde, alunite에서는 40 %의 바이오 필름이 형성된 것이 관찰되었다. 90일 경과 후 기본 도료 대조군에서는 75 %의 연성착생생물의 부착이 확인되었으며, PVC 대조군은 95 % 연성착생생물 부착이 관찰되었다. Hexyl acetate에서 100 %의 부착이, p-anisaldehyde, ethyl myristate, trans-2-hexen-1-ol에서 95 %, benzyl acetate에서는 85 %, decanal, alunite에서는 80 %의

연성착생생물 부착이 관찰되었다 (Table 11; Fig. 26).

부산 조도 선착장에 설치한 PVC패널 결과 30일 경과 후 대조군으로 사용한 기본 도료에서는 부착생물을 발견 할 수 없었으며, PVC 대조군에서는 연성과 경성부착생물이 면적 대비 각각 15 %가 부착한 것을 관찰되었다. 관찰 패널 모두에서 낮은 부착율이 나타났으며 연성, 경성착생생물이 확인되었다. 90일 경과 후 기본 도료 패널과 PVC 패널 모두 바이오 필름이 형성 (85 %)된 것을 관찰 할 수 있었다. Decanal, alunite (85 %), p-anisaldehyde (80 %)에서 바이오 필름이 형성되었으며, isoeugenol (25 %), benzyl acetate, ethyl 2-methylbutyrate, hexyl acetate (20 %)에서 연성착생생물의 부착이 관찰되었다 (Table 12; Fig. 27).

콘크리트 블록의 도장은 도료용 붓을 이용하여 2 ~ 3회 반복 도색하였으며, 2 ~ 3일간 음건하여 완전 건조 후에 사용하였으며, 콘크리트 블록에 도장된 도료의 평균 무게는 20.14 ± 6.73 g이었다. 동해 아야진에 설치한 콘크리트 블록의 30일 경과 후 관찰 결과 대조군으로 사용한 기본 도료 도장 블록과 일반 블록에서는 각각 12 %와 25 %의 연성착생생물이 부착되었으며, isoeugenol은 면적 대비 70 %의 연성착생생물의 부착이 확인되었으며, ethyl myristate는 45 %의 연성착생생물 부착과 10 %의 바이오 필름 형성이, decanal에서는 30 %의 연성착생생물과 15 %의 바이오 필름이, benzyl acetate는 20 %의 연성착생생물 부착과 바이오 필름형성이 관찰되었다. 90일 경과 후 대조군으로 사용한 기본 도료 도장 블록과 일반 블록에서 연성착생생물이(각각 90 %, 50 %) 우점하였으며, benzyl acetate, decanal에서는 100 %의 연성착생생물의 부착을 확인하였으며, cis-3-hexen-1-ol, isoeugenol, p-anisaldehyde, trans-2-hexen-1-ol, alunite에서 95 %의 연성착생생물 부착이 관찰되었다. Ethyl myristate에서는 65 %의 연성착생생물 부착이 관찰되었다 (Table 13; Fig. 28).

부산 조도 선착장에 설치한 콘크리트 블록의 30일 경과 후 관찰 결과 대조군으로 사용한 기본 도료 도장 블록에서는 면적 대비 25 %의 연성착생생물 부착이 관찰되었으며, 일반 블록에서는 부착생물이 관찰되지 않았다. Hexyl acetate에서 25 %의 연성착생생물과 10 %의 바이오 필름형성이 나타났으며, benzyl acetate에서는 20 %의 바이오 필름형성이 관찰되었다. cis-3-hexen-1-ol, decanal, ethyl 2-methylbutyrate, isoeugenol, p-anisaldehyde에서 10 %의 바이오 필름이 형성되었다. 90일 경과 후 대조군으로 사용한 기본 도료 도장 블록은 30일 경과 시와 동일한 결과를 얻었으며, 연성착생생물의 부착이 높은 물질로는 alunite (60 %)와 hexyl acetate (55 %), benzyl acetate, decanal, ethyl 2-methylbutyrate (50 %)에서 관찰되었으며, 경성착생생물로는 cis-3hexen-1-ol (60 %), ethyl myristate (45 %)로 나타났다 (Table 14; Fig. 29).

PVC 패널과 콘크리트 블록을 이용한 검증 결과 benzyl acetate, cis-3-hexen-1-ol, decanal, p-anisaldehyde에서 고른 부착반응이 확인되었으며, 동해와 남해에 부착 생물의 특이점이 발견되었다. 동해 아야진 내항의 경우 연성착생생물의 부착이 높게 나타나는 반면, 부산 조도 선착장에서는 경성착생생물과 연성착생생물이 관찰되었다. 또한 콘크리트 블록에 비하여 PVC 패널에서 바이오 필름 형성이 높게 관찰되었다.

Table 11. Immersion test with PVC panels at Ayajin harbor, east coast of Korea.

Fouling agents	30 day (%)			90 day (%)		
	S-F*	H-F	B-F	S-F	H-F	B-F
Benzyl acetate	10	3	25	85	5	
cis-3-hexen-1-ol	5	10	60	50	5	5
Decanal	-	10	50	80	-	10
Ethyl myristate	-	3	60	95	-	-
Ethyl 2-methylbutyrate	3	5	60	75	5	5
Hexyl acetate		3	50	100	-	-
isoeugenol	5	3	25	75	5	-
p- anisaldehyde	5	10	40	95	-	-
trans-2-hexen-1-ol	3	5	20	95	-	-
Alunite	3	10	40	80	-	10
Control paint	10	5	30	75	5	5
Control(PVC)	3	10	30	95	-	-

*Soft fouler, S-F; Hard fouler, H-F, Bio film, B-F

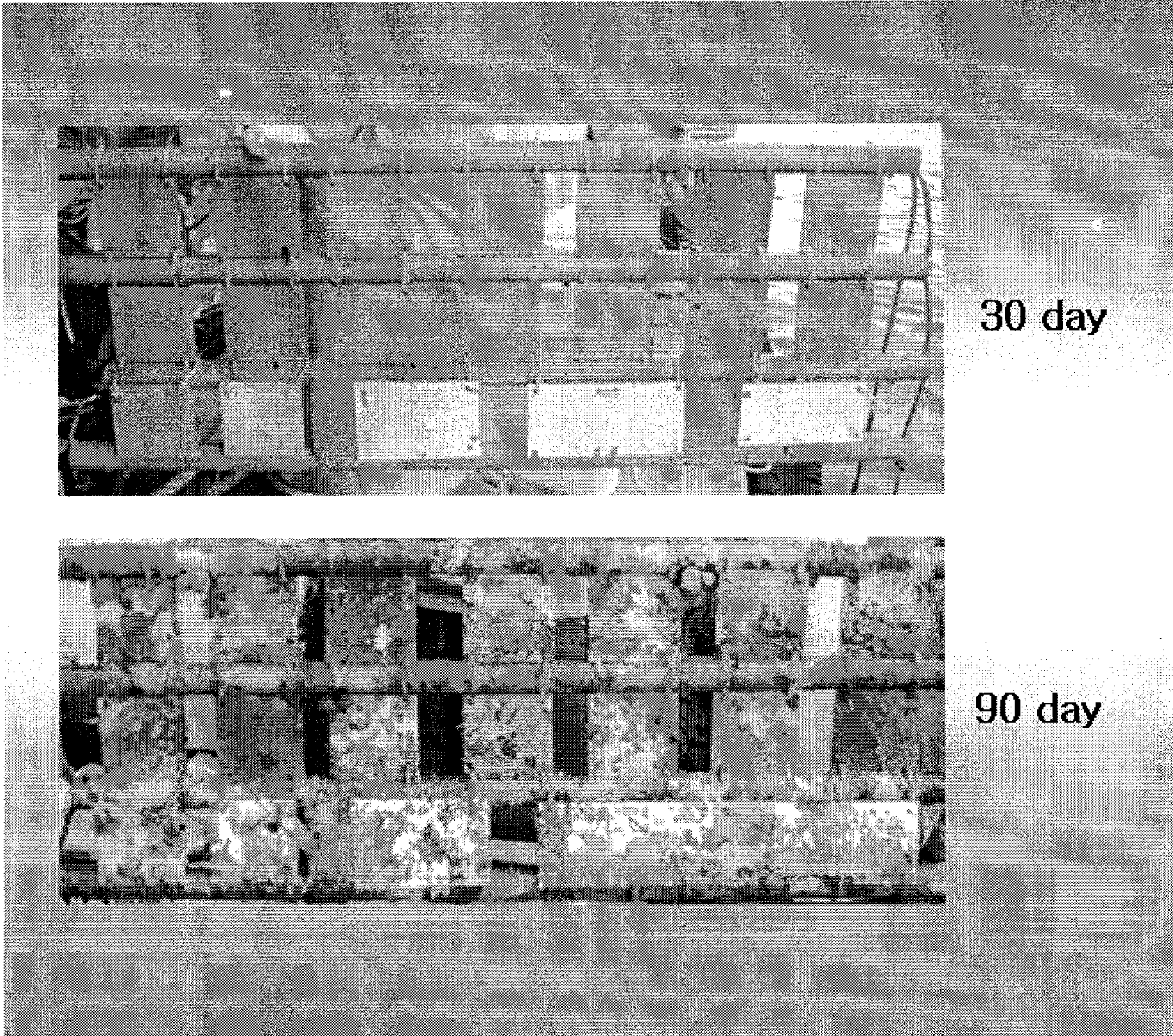


Fig. 26. Immersion test with PVC panels at Ayajin harbor, east coast of Korea

Table 12. Immersion test with PVC panels at Cho Do, south coast of Korea.

Fouling agents	30 day (%)			90 day (%)		
	S-F*	H-F	B-F	S-F	H-F	B-F
Benzyl acetate	8	3	5	20	10	50
cis-3-hexen-1-ol	-	3	-	5	25	40
Decanal	3	3		5	5	85
Ethyl myristate	-	-	5	-	8	80
Ethyl 2-methylbutyrate	-	3	-	20	5	30
Hexyl acetate	-	3	-	20	5	40
isoeugenol	5	3	-	25	5	65
p- anisaldehyde	3	1	3	5	5	80
trans-2-hexen-1-ol	-	2	-	5	10	75
Alunite	3	3	-	10	5	85
Control paint	3	-	-	5	5	85
Control(PVC)	15	2	15	5	5	80

*Soft fouler, S-F; Hard fouler, H-F, Bio film, B-F

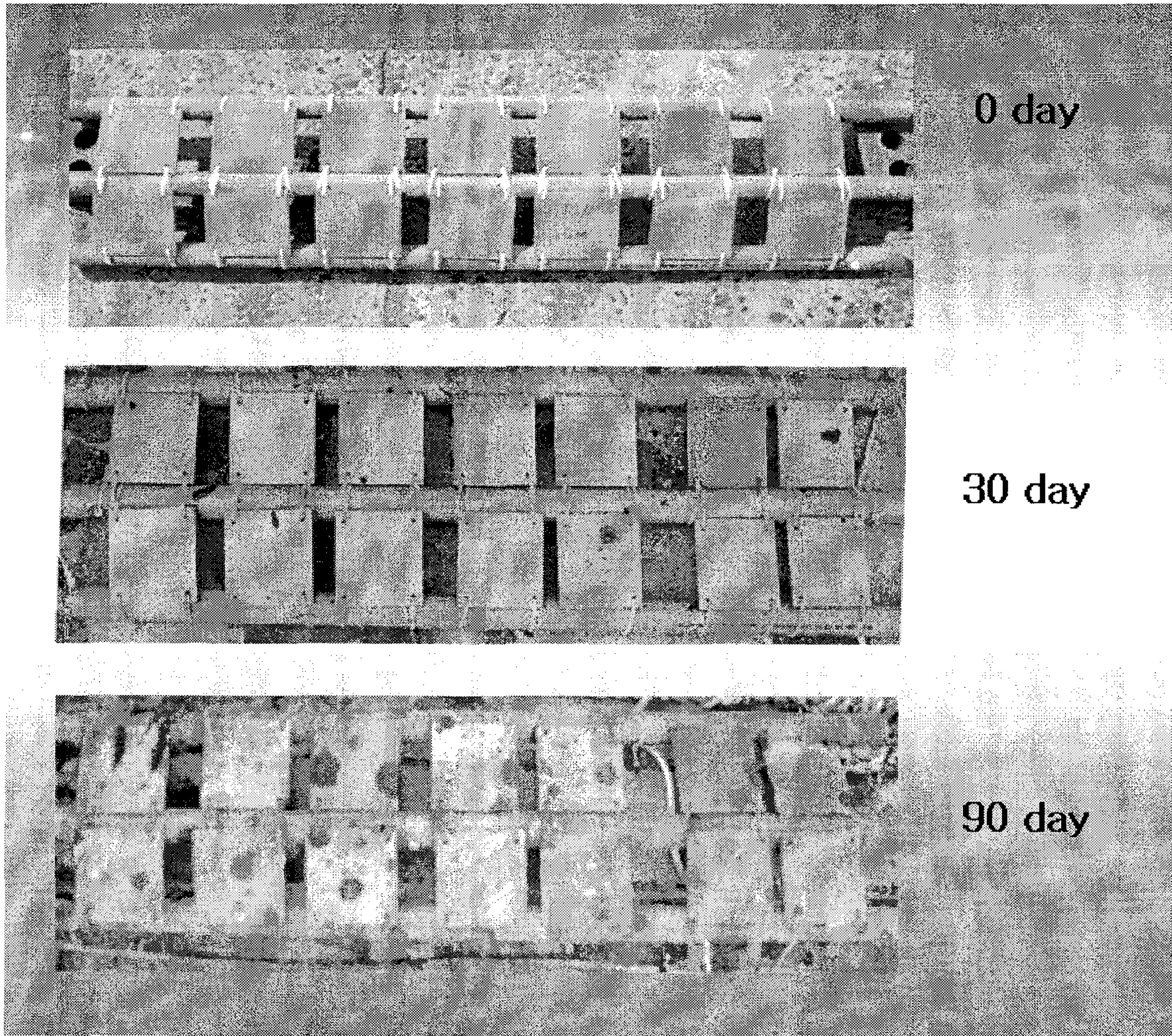


Fig. 27. Immersion test with PVC panels at Cho Do, south coast of Korea.

Table 13. Immersion test with concrete bricks at Ayajin harbor, east coast of Korea.

Fouling agents	30 day (%)			90 day (%)		
	S-F*	H-F	B-F	S-F	H-F	B-F
Benzyl acetate	20	-	20	100	-	-
cis-3-hexen-1-ol	6	-	20	95	5	-
Decanal	30	-	15	100	-	-
Ethyl myristate	45	-	10	65	-	10
Ethyl 2-methylbutyrate	-	-	5	3	5	5
Hexyl acetate	15	-	15	85	-	-
isoeugenol	70	-	10	95	5	-
p- anisaldehyde	3	-	5	95	-	-
trans-2-hexen-1-ol	5	-	5	95	-	-
Alunite	5	-	5	95	5	-
Control paint	12	-	5	90	-	-
Control	25	-	-	50	10	-

*Soft fouler, S-F; Hard fouler, H-F, Bio film, B-F

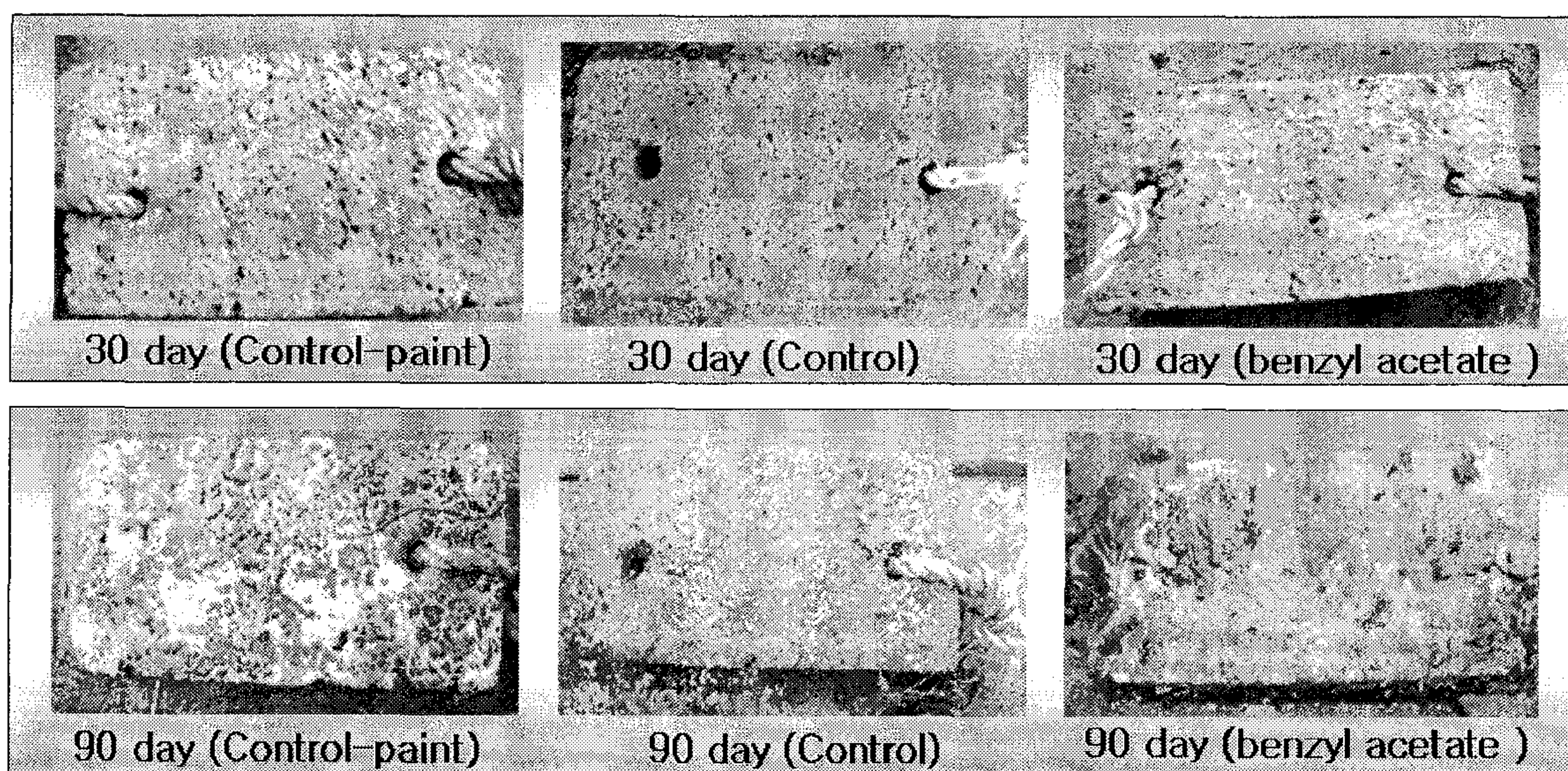


Fig. 28. Immersion test with concrete bricks at Ayajin harbor, east coast of Korea.

Table 14. Immersion test with concrete bricks at Cho Do, south coast of Korea.

Fouling agents	30 day (%)			90 day (%)		
	S-F*	H-F	B-F	S-F	H-F	B-F
Benzyl acetate	-	-	20	50	30	5
cis-3-hexen-1-ol	-	-	10	30	60	-
Decanal	5	-	10	50	35	5
Ethyl myristate	-	-	5	45	45	5
Ethyl 2-methylbutyrate	5	-	10	50	10	-
Hexyl acetate	25	-	10	55	40	-
isoeugenol	10	-	10	20	35	20
p- anisaldehyde	10	-	10	40	20	5
trans-2-hexen-1-ol	-	-	5	30	30	10
Alunite	5	-	5	60	10	10
Control paint	25	-	-	25	-	20
Control	-	-	5	25	40	15

*Soft fouler, S-F; Hard fouler, H-F, Bio film, B-F

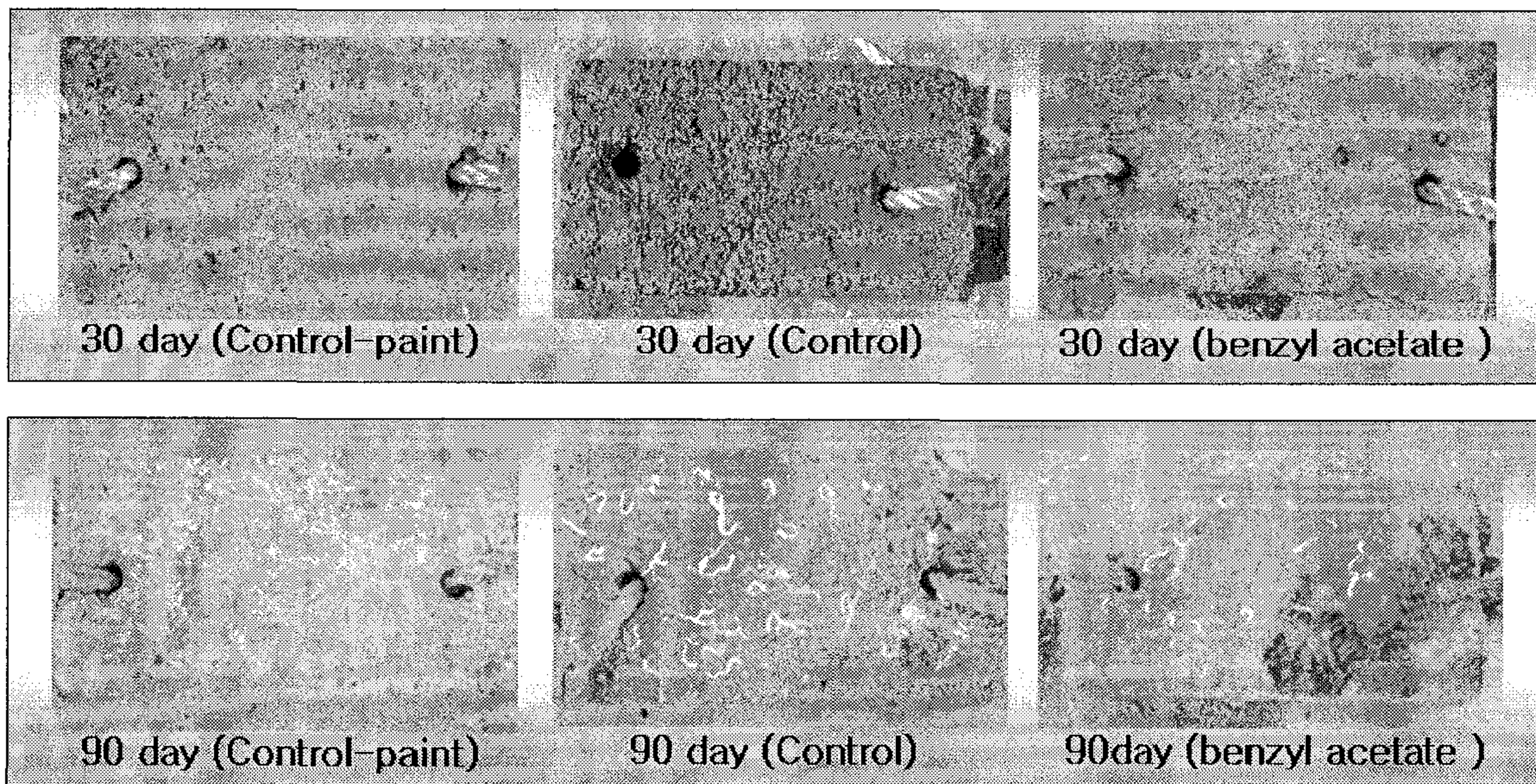


Fig. 29. Immersion test with concrete bricks at Cho Do, south coast of Korea.

Ⅶ. 착생 촉진 물질의 대량 생산 방법 제시

○ 도료조합

도료 제조 시 작업실 내·외부의 환경요소 (온도, 습도, 바람) 등을 고려하였으며, 도료 제조에 쓰이는 물질들은 환경요소들에 의해 변질 될 수 있고, 도료 제조에 필요한 레진 (resin), 용제 (solvent), 로진 (rosin)의 역할을 극대화하기 위하여 작업실 내부의 이물질 등을 제거해야 한다. 도료용 용기 (500ml)에 용제 (methyl isobutyl ketone) 27 %와 송진 (wood rosin) 12 %를 교반기를 이용하여 1,000 rpm에서 10분간 교반한 후에 용해 여부를 확인하였으며, 완전한 용액 상태가 될 때까지 교반하였다. 완전한 용액 상태로 교반한 후에 비닐레진(vinyl resin; VAGH)을 27 % 첨가하였으며, 2,400 rpm에 20분간 고속 분산하였다. 분산한 혼합물에 후보 착생 촉진 물질 (Fouling agents; FAs) 2 %를 첨가하여 2,400 rpm에 10분간 고속 분산하였다. 도료 조합은 도료 최적화 실험을 통하여 증명된 조합비를 이용하였으며, Hegman-type gauge (0 ~ 100 μm)로 연육정도가 50 μm 이하이면 분무기 (spray gun) 또는 붓을 이용하여 도장하였다.

- 입자

도료 내 입자 크기의 변화에 따라 그 도장 방법이나 특성이 달라지므로, 규격화된 도료를 제작하기 위하여 입자크기를 측정할 수 있는 Hegman-type gauge (0 ~ 100 μm)를 사용하였으며, 규격화된 도료의 적정한 입자 크기는 약 50 μm (일반적인 도료: 30 μm 이하)로 선정하였다. 이는 착생촉진 도료로서 생물학적, 물리적, 경제적면을 고려하여 착생 효율을 높게 발휘 할 수 있는 입자 크기를 고려하여 선정하였다.

- Spray coating

제작된 도료는 분무기 (spray gun) 또는 도장용 붓 / 롤러를 이용하여 도장하였으며, 분무 도장은 에어 콤푸레샤를 사용하였다. 도장 시에는 에어 콤푸레샤 (Sung won, KA-902SN)와 spray gun (Hyup sung, W-2000; 노즐직경 1.3 mm)을 연결한 후에 에어 콤푸레샤의 압력을 7 ~ 10 $\text{kgf} \cdot \text{cm}^2$ 으로 맞추어 분사시험을 통해 정상적인 출력여부를 확인 한 후에 분사하였다. 도료 분사 전 착생촉진 도료를 Ford cup (No. 4)를 이용하여 약 30초의 점도로 사용하기 위해서 용제를 이용하여 조정하였으며, 1 ~ 2 회의 시험 분사 후에 패널 또는 인공 어초에 약 3회 도장을 규칙으로 하나, 착생촉진물질에 따라 2회 반복 도장도 시행하였다. 1회 도장 후 60 μm 의 도막 형성하였다.

- Brush coating

붓 또는 롤러 도장은 분무 도장에 비해 도료 점도 상태를 맞추는 번거로움이 적은 편이며, 1회 도장으로 도막의 두께는 80 μm 가 형성 되므로 평균적으로 2번 도장하였다. 그러나 규모가 큰 인공어초에 칠하는 데는 시간이 많이 걸리며, 도료 도막이 두껍게 형성 되므로 상대적으로 건조 시간이 증가됨을 알 수 있었다.

○ 어초 재질별 도장 방법 및 건조 조건은 다음과 같다.

- 콘크리트

콘크리트 재질의 어초는 약 2번 정도 도장 또는 붓 칠을 통해 도장 할 수 있으며, 도막 두께를 늘리기 위하여 3번까지 도장하였다. 첫 번째 도장에서는 콘크리트 재질의 미세한 구멍 특성상 빠르게 흡수 되었으며, 약 2분 후에 2번째 도장을 시행하는데 두 번째 도장부터는 콘크리트의 미세한 구멍이 보이지 않았다. 약 5분 후에 마지막 3번째 도장을 하였으며, 30분간 상온에서 자연 건조 후 건조 여부를 확인하여 투하하였다. 3회 이상으로 도장을 하면 착생촉진 능력을 오래 지속 시킬 수 있지만, 5번 이상의 도장은 도막의 견고성을 감소시켜 도장의 형태가 오래 지속되지 않는다.

- 철골

철골의 특성상 착생촉진도료 도장 전 접착력을 높이기 위한 철골용 프라이머를 미리 도장한 후에 그 위에 착생촉진도료를 도장하였으며, 프라이머가 도장된 철골 구조도 분무기 (spray gun) 또는 붓 도장으로 하는데 약 3회 정도 도장 하였다, 붓 도장은 점도가 고려되지 않기 때문에 2회 도장도 가능하였지만 도장 간격 사이에 분무 도장 보다 도료 건조 시간이 증가되었다.

IX. 종합결론

1. 착생촉진제 분리 및 구조 규명

생물 유래 추출물을 분리 및 정제하였고, 각각의 추출물을 분석 규명하였으며, 추출물로 판명된 물질들은 benzyl acetate, cis-3-hexen-1-ol, decanal, ethyl myristate, ethyl 2-methylbutyrate, furfuryl alcohol, hexyl acetate, methyl salicylate, p-anisaldehyde, hexyl alcohol, isoeugenol, trans-2-hexen-1-ol이다.

2. 착생 효과

가. 포자 운동효과 검증

생물 유래 추출물을 이용한 포자 운동 효과 검증 실험결과 benzyl acetate, cis-3-hexen-1-ol, decanal에서는 $1000 \text{ mg} \cdot \ell^{-1}$ 까지 포자의 움직임이 관찰되지 않았으며, 이를 통해 대상 포자의 빠른 부착을 예상하였고, hexyl acetate, methyl salicylate, hexyl alcohol, isoeugenol에서는 고농도에서도 포자 운동이 관찰되었다. 두 가지 상반되는 결과는 해조류 포자의 초기 부착 또는 운동에 영향을 미치는 것으로 사료 된다.

나. ADM

한천배지 (2%)를 이용한 후보 착생촉진물질의 초기 착생 정도를 관찰한 결과, 파래 포자를 이용한 실험의 경우 고농도 ($1000 \text{ mg} \cdot \ell^{-1}$)는 저농도 ($10 \text{ mg} \cdot \ell^{-1}$) 보다 높은 부착율을 보였으며, 고, 저농도에서 모두 높은 부착을 보인 것은 benzyl ethanoate (고; 203 %, 저; 148 %), cis-3-hexen-1-ol (고; 197 %, 저; 153 %)로 관찰되었다. 감태 포자를 이용한 실험에서도 파래 포자와 같이 고농도가 저농도 보다 평균적으로 높은 부착율을 보였으며, 저농도에서는 decanal은 대조군 대비 224%의 부착을 보였으며, cis-3-hexen-1-ol (190 %), ethyl myristate (186 %) 순으로 관찰되었다. 고농도에서는 benzyl acetate (323 %), p-anisaldehyde (236 %), ethyl 2-methylbutyrate (235 %)순으로 높게 관찰되었다. 녹조류와 갈조류 대표종을 이용한 ADM 결과 benzyl acetate와 cis-3-hexen-1-ol에서 평균 이상의 부착을 확인 할 수 있었다.

다. PVC 패널

후보 착생물질이 혼합된 도료를 PVC 패널에 분무기를 이용하여 도장 한 후 동해 아야진 내항 및 남해 부산 조도 선착장에 설치하여 결과를 확인하였다. 아야진 내항에 설치한 패널의 경우 30일 경과 후 연성착생생물 또는 경성착생생물은 소수 나타났으며, cis-3-hexen-1-ol (60 %), decanal (50 %), ethyl myristate (60 %), ethyl 2-methylbutyrate (60 %), hexyl acetate (50 %), 대조군 (30 %)에서 바이오필름 형성이 관찰되었다. 90일 경과 후에는 연성착생생물의 부착이 주류를 이루었으며, benzyl acetate (85 %), decanal (80 %), ethyl myristate (95 %), hexyl acetate (100 %), p-anisaldehyde (95 %), trans-2-hexen-1-ol (95 %)로 관찰되었다. 남해 부산 조도 선착장에 설치한 패널의 경우 연성착생생물과 바이오필름 형성이 나타났으며, 90일 경과

후 benzyl acetate (20 %), ethyl 2-methylbutyrate (20 %), hexyl acetate (20 %), isoeugenol (25 %)에서 연성착생생물의 부착이 관찰되었고, 바이오필름은 decanal (80 %), ethyl myristate (80 %), p-anisaldehyde (80 %)으로 나타났다. PVC 패널 실험결과 아야진 내항의 경우 초기 (30일 경과) PVC 표면의 착생 주류는 바이오필름 형성이 두드러 졌으며, 90일 경과 후 초기 바이오필름이 형성된 패널에서 일반적으로 연성착생생물의 부착이 높게 관찰된 반면, 남해 부산 조도 선착장에 설치한 패널의 경우 동해에 비하여 연성착생생물과 바이오 필름형성이 낮게 관찰되었다.

라. 콘크리트 블록

후보 착생물질이 혼합된 도료를 콘크리트 블록에 도료용 붓이나 롤러를 이용하여 도장 한 후 동해 아야진 내항 및 남해 부산 조도 선착장에 설치하여 결과를 관찰하였다. 아야진 내항에 설치한 콘크리트 블록의 경우 90일 경과 후 연성착생생물의 우점하게 나타났으며, benzyl ethanoate (100 %), cis-3-hexen-1-ol (95 %), decanal (100 %), p-anisaldehyde (95 %), isoeugenol (95 %), trans-2-hexen-1-ol (95 %)로 관찰되었다. 남해 부산 조도 선착장에 설치한 콘크리트 블록의 경우 90일 경과 후 연성착생생물과 경성착생생물의 부착이 함께 관찰되었다. 연성착생생물의 경우 benzyl acetate (50 %), decanal (50 %), ethyl 2-methylbutyrate (50 %), hexyl acetate (55 %)에서 부착이 관찰되었으며, 경성착생생물의 경우 cis-3-hexen -1-ol (60 %), ethyl myristate (45 %), hexyl acetate (40 %)에서 부착이 관찰되었다. 콘크리트 블록의 실험결과 PVC 패널과는 달리 초기 (30일 경과) 부착은 거의 발견되지 않았으나, 90일 경과 후 부터 동해 및 남해에 설치한 콘크리트 블록에서 연성 및 경성 착생 생물의 부착을 관찰할 수 있었다. 대조군으로 사용된 도료를 도장하지 않은 콘크리트 블록의 경우 동해 및 남해 모두 도료가 도장된 블록보다 낮은 부착이 관찰되었다. 이는 도료가 콘크리트 블록 자체의 독성 방출을 감소시켜 포자 또는 유생의 초기 착생율을 증가시킨 것으로 판단된다.

해조류는 주변 해수로부터 무기염 또는 중금속을 흡수하여 축적할 수 있는 능력을 가지고 있어 그 연안지역의 저서성 해조류에 대한 군집과 우점종을 규명하여 우점종에 대한 포자 착생을 촉진 시킴으로서 보다 많은 오염원을 감소시키는 역할을 수행한다 (Merrill, 1994; Merrill & Fletcher, 1991; Shin & Han, 2001). 해조류 포자의 착생을 촉진하는 생물 유래의 촉진제 개발과 그 효능 검증을 위해서 구멍갈파래 (*Ulva pertusa*)와 감태 (*Ecklonia cava*)를 대상으로 실험이 수행되었으며 (순천향대학교, 2002; Sidharthan et al., 2007), 생물 유래 추출물의 착생 기능 검증 결과 밝혀진 후보 착생 물질을 도료로 제작하여 PVC, 콘크리트 블록 및 사각 인공어초에 도장하여 그 결과를 확인하였다. 검증 결과 benzyl acetate, cis-3-hexen-1-ol, decanal, p-anisaldehyde에서 고른 착생 촉진이 관찰되었고, 콘크리트 블록 도장 유무에 따라 초기 부착이 높아짐을 알 수 있었으며, 콘크리트 어초의 침투성 저감 및 부착 증가를 예측할 수 있다.

제 4장 목표달성도 및 관련 분야의 기여도

1. 연구 목표

본 연구는 해조류 포자의 착생을 촉진하는 생물 유래의 촉진제 분리 및 구조 규명과 분리한 착생 촉진제의 패널 검증을 통한 착생 촉진제의 효과를 검증한다.

2. 연구 내용

해조류와 생물 유래의 착생 촉진 후보 종을 선별하였으며, 생물 유래의 착생 촉진 물질을 탐색하였다. 실험실 내에서의 포자 착생 검증을 위하여 착생생물포자 부착억제(ADM) 방법을 확립하였으며, 연안에서의 검증을 위해 쿠폰 패널 실험법, PE 패널 실험법, PVC 패널, 콘크리트 블록 실험법을 확립하였다. 상기 검증 방법으로 인해 천연물 유래의 착생 촉진 물질의 효능을 검증하였으며, 가장 효과 있는 착생 촉진제 조성물 도료의 대량 생산 방법을 제시 하고자 한다.

3. 연구개발 목표의 달성도

목 표	달 성 내 용	달성도(%)
생물 유래의 착생제 효과 검증 결과	<ul style="list-style-type: none"> - 육상 및 해양의 생물 유래의 천연물을 이용한 쿠폰 실험 결과 바이오 필름 형성되는 천연물이 선별되었음. - 후보 착생 물질을 추출하기 위해 박층크로마토그래피, 실리카 겔 크로마토그래피, HPLC, prep-HPLC, GC, NMR이 이용되었음. - 생물 유래의 benzyl acetate의 특성. (Mw, 150.07) ¹H-NMR (500 MHz, CDCl₃) : δ 7.19 (aromatic proton), δ 5.34 (methylene), δ 2.01 ppm (methyl) ¹³C-NMR (125 MHz, CDCl₃): δ 170.3 (ketone), δ 20.7 (methyl), 68.2 (oxygenated methylene), δ 127.2-129.0 (aromatic carbon), δ 141.2 ppm (aromatic quaternary carbon). 	100
착생촉진제에 대한 일차 착생 기능성 검증	<ul style="list-style-type: none"> - Agar diffusion method (ADM) 실험 결과 benzyl acetate (203%), cis-3-hexen-1-ol (197%), decanal (174%), isoeugenol (168%), p-anisaldehyde (147%)에서 모두 대조군보다 높은 부착율이 확인되었음. 	100

목 표	달 성 내 용	달 성 도 (%)
연안의 착생 기능 효과 검증 결과	- 후보 착생 촉진 물질의 아야진 내향에서의 쿠폰 실험결과 면적 대비 benzyl acetate (95%), cis-3-hexen-1-ol (65%), decanal (100%), ethyl 2-methylbutyrate (92%), p- anisaldehyde (98%), trans-2-hexen-1-ol (90%)에서 65~100%의 부착율이 확인되었음.	100
패널 검증 및 착생 기작 규명	- PE 실험결과 면적 대비 30% benzyl acetate에서 75%의 해조류 부착이 관찰되었음	100
착생제를 이용한 도장	- 내마모성(abrasion resistance) 및 내염수성(saline resistance) 검증을 통한 최적화된 도료 조성비 확립 - 내마모성시험 결과는 바인더 함량에 따라 (5% > 15 % < 25% < 35% < 45%) 확인되었음 - 내염수성 시험 결과 benzyl acetate, cis-3-hexen-1-ol, decanal, isoeugenol, p-anisaldehyde와 조합된 도료가 대조군(98 %)과 비교하여 별 차이를 보이지 않았으나 (92 ~ 95 %), trans-2-hexen-1-ol와 조합된 도료에서 85 %로 내염수성이 관찰되었음.	100
착생 효과 검증	- 후보 착생 촉진제를 도장한 PVC 및 시멘트 블록이 동해 아야진 내향에 설치되었으며, 시멘트 블록의 90일 경과 후 실험 결과 benzyl acetate, decanal에서 면적 대비 100 %의, cis-3-hexen-1-ol, isoeugenol, p-anisaldehyde, trans-2-hexen-1-ol, alunite에서는 95 %의 착생생물 부착이 관찰되었고, PVC 패널의 경우 90일 경과 후 hexyl acetate에서 100 %, p-anisaldehyde, ethyl myristate, trans-2-hexen-1-ol에서 95 %, benzyl acetate (85 %), decanal, alunite에서는 80 %의 연성착생생물의 부착이 관찰되었음.	100

목 표	달 성 내 용	달 성 도 (%)
국내 주요 연안에 대한 착생물 효과 검증	<ul style="list-style-type: none"> - 후보 착생 촉진제를 도장한 PVC 및 시멘트 블록을 부산 조도 선착장에 설치하였으며, 시멘트 블록의 90일 경과 후 실험 결과 전체 면적의 alunite (60 %), hexyl acetate (55%), benzyl acetate, decanal, ethyl 2-methylbutyrate (50 %), ethyl myristate (45 %), p-anisaldehyde (40 %)의 연성착생생물 부착이 관찰되었으며, cis-hexen-1-ol에서는 60 %의 경성착생생물의 부착이 관찰되었음. - 부산 조도 선착장 외곽에 후보 착생 촉진 도료가 도장된 사각 인공어초를 투입하여 관찰하였음. 	100
대량생산 방법 연구	<ul style="list-style-type: none"> - 착생 효과 검증 결과 4개의 착생 효과 물질을 선정 - 도료분산공정을 간결화 된 순서를 통한 착생 도료 제조 - 제조된 착생 도료의 분산 정도 평가 방법 - 재질에 따른 도장 (spray, brush)의 메뉴얼화 	100

제 5장 연구 개발 결과의 활용계획

1. 연구결과

- 가. 실험실 내의 포자 착생 실험을 위한 실험 방법 확립 (ADM)
- 나. 연안에서의 포자 착생 효능 검증을 위한 실험 방법 확립
 - 쿠폰 패널 실험법
 - PE 패널 실험법
 - PVC 패널, 콘크리트 블록 실험법
- 다. 착생 도료 제작법
- 라. 대량 생산 방법 제시

2. 연구결과의 활용계획

- 가. 착생촉진물질 개발 기술
 - 착생촉진제의 검증지역 확대 및 계절별 자료를 확보하여 해중림 조성의 기반 자료로 사용하고, 해중림을 통해 해양생태계복원과 수산자원 조성에 필요
- 나. 착생 물질 검증 기술
 - 부착성 미세조류의 착생을 통해 군집을 분석할 수 있고, 바이오 모니터링 방법으로 활용 가능
- 다. 연안 생태계 보존 및 복원 방안 수립을 위한 정보제공
 - 본 연구 결과를 이용해 해중림 조성을 위한 기초 자료를 제공 함
 - (1) 해중림 조성을 위한 실험실 내의 효능 검증 방법 제시
 - (2) 현장 실험을 위한 합리적 실험법 제시
 - (3) 착생도료 개발을 위한 도료 제작법 제시
- 라. 어장환경 조성
 - 본 연구 결과를 이용해 착생 효율을 높여 경제적 손실을 감소시킴
 - (1) 수산자원 고갈문제를 해결하기 위한 하나의 방법으로 인공어초에 포자 착생을 위한 착생 촉진물질을 제공
 - (2) 인공어초에 해조류 포자 부착 유도 기법 개발을 통한 초기 포자 착생 기간 감소
 - (3) 조성된 해중림을 통한 어족보호와 어민 소득 증대
 - (4) 인류의 식량자원인 수산물의 지속적 공급

제 6장 참고문헌

- Amsler, C.D., D.C. Reed and Neushul, M. 1992. The microclimate inhabited by marcoalgae propagules. *Br. Phycol. J.* 27: 253-270.
- Buttaman, C.A. 1987. Larval settlement of soft sediment invertebrates; the spatial scales of patten explained by active habitat selection and the emerging role of hydrodynamical processes. *Oceanogr. Mar. Biol. Ann. Rev.* 25: 113-165.
- Doherty, P. and Fowler, T. 1994. An empirical test of recruitment limitation in coral reef fish. *Science.* 263: 935-938.
- Fletcher, R.L. 1980. Studies of the recently introduced brown alga *Sargassum muticum* (Yendo) Fensholt. III. Periodicity in gamete release and "incubation" of early germiling stage. *Bot Mar.* 231: 425-432.
- Gaines, S. and Roughgarden, J. 1985. Larval settlement rate: a leading determinant of structure in an ecological community of the marine intertidal zone. *Proc Nat. Acad. Sci.* 82: 3707-3711.
- Granovskaya, L.A., L.A. Telitchenko, E.L. Shirokova and Sveltlova, E.N. 1992. Significance of phytoplankton in the formation of biological full value of water under conditions of intensive UV-irradiation. *Gidrobiologicheskul Zhurnal.* 28: 42-46.
- Kirchman, D., S. Graham, D. Resih and Mithchell, R. 1982. Bacteria induce settlement and metamorphosis of *Janua brasiliensis* Grube (Polychaeta: spirobidae). *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 56: 153-163.
- Merrill, J.W. 1994. Mariculture techniques for use *in reducing the effects of utrophication. In: Delepine, R., Morand, P.(eds.) Production and explitation of entire seaweeds, *Proc Water Technol.* 13: 287-294.

Merrill, J. and Fletcher, R. 1991. Green tides cause major economic burden in Venice Lagoon, Italy. *Appl. Phycol. Forum.* 8: 1-3.

Shin, H.W. 1995. Biofouling by marine weedy algae. *Kor. J. Phycol.* 10: 97-108.

Shin, H.W and Han, T.J. 2001. Development of marine algae anti-spore fouling agent and physiological responses of *Ulva pertusa* to inorganic pollutants. 산불예측 및 생태계 보전 심포지엄. pp. 63-78.

Shin, H.W. and Smith, C.M. 2001. Antifouling activity of six nontoxic chemicals on spore attachment of *Ulva fasciata*. *J. Environ. Biol.* 22(3): 145-151.

Sidharthan, M., S.M. Jung, B.R. Haridatta, J.H. Lee, C.Y. Lim, Y.K. Kang, N.S. Park and Shin H.W. 2006. A new antifouling hybrid CDP formulation with ethyl heptanoate: Evaluation of AF performance at Ayajin harbor, east coast of Korea. Proceedings of the 3rd WSEAS/IASME int. Conf. on Electrosience & Technology For Naval Engineering, Greece. pp 36-44.

Sidharthan, M., G.S. Viswanadh, Kyoung Ho Kim, Hyuk Jun Kim and H.W. Shin. 2007. Biofouling attractants from a brown marine alga *Ecklonia cava*. *J. Environ. Biol.* 28(2). (in press)

Walters, L.J. 1992. Field settlement locations on subtidal marine hard substrata: is active larval exploration involved? *Limnol. Oceanogr.* 37: 1101-1107.

Walters, L.J. and Wethey, D.S. 1991. Settlement, refuges, and adult body form in colonial marine invertebrates: A field experiment. *Biol. Bull.* 180: 112-118.

Wethey, D.S. 1991. Spatial patten in barnacle settlement: day to day changes during the settlement season. *J. Mar. Biol.* 64: 687-698.

국립수산과학원. 2004. 경상남도 인공어초 사후관리 조사용역 보고서.

순천향대학교. 2002. Recovery and protection of marine ecosystem from forest fire. 과학기술부. 최종보고서.

한국해양수산개발원. 2002. A study on the development alternatives for fishery resources enhancement. 해양수산부. 최종연구보고서.