

발간등록번호

11-1541000-000439-01

해조류 바이오매스의 그린에너지화 및 통합적 활용을 위한 기반구축 연구

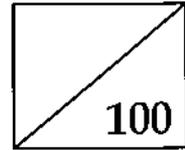
Establishment of the Basis for Green Bioenergy Production and
Integrated Utilization of Marine Macroalgae

2010. 4



농림수산식품부

Ministry for Food, Agriculture, Forestry and Fisheries



해조류 바이오매스의 그린에너지화 및 통합적 활용을 위한 기반구축 연구

Establishment of the Basis for Green Bioenergy Production and
Integrated Utilization of Marine Macroalgae

2010. 4

제 출 문

농림수산식품부 장관 귀하

본 보고서를 『해조류 바이오매스의 그린에너지화 및 통합적 활용을 위한 기반구축 연구(연구기간 : 2009. 06. 19~2010. 4. 18)』 용역사업의 결과보고서로 제출합니다.

2010. 4

총괄연구책임자 : 우희철(부경대학교)
연 구 원 : 김경현(고려대학교)
 : 김군도(부경대학교)
 : 김영숙(국립수산과학원)
 : 김형락(부경대학교)
 : 서동진(한국과학기술연구원)
 : 상병인(한국과학기술연구원)
 : 서영웅(한국과학기술연구원)
 : 신태선(전남대학교)
 : 오경근(단국대학교)
 : 이지은(성균관대학교)
 : 전영중(경원대학교)
 : 최재수(부경대학교)

연구보조원 : 남우중(경원대학교)
: 윤은주(고려대학교)
: 김희택(고려대학교)
: 백경숙(단국대학교)
: 원경연(단국대학교)
: 최원일(단국대학교)
: 최재형(부경대학교)
: 이민섭(부경대학교)
: 이지영(부경대학교)
: 손유경(부경대학교)
: 정철우(부경대학교)
: 강성오(부경대학교)
: Khoa, P. T(부경대학교)
: Li, Pan(성균관대학교)
: 송민우(성균관대학교)
: 정석채(성균관대학교)
: 박상아(전남대학교)
: 안소라(전남대학교)
: 오현주(한국과학기술연구원)
: 조민옥(한국과학기술연구원)
: 양기석(한국과학기술연구원)
: 윤영현(한국과학기술연구원)
: 최재욱(한국과학기술연구원)
: 주인범(한국과학기술연구원)
: 전진우(한국과학기술연구원)
: 원종성(한국과학기술연구원)
: 최종호(한국과학기술연구원)

요 약 문

I. 제 목

해조류 바이오매스의 그린에너지화 및 통합적 활용을 위한 기반구축 연구

II. 연구개발의 목적 및 필요성

기존 화석연료 사용 시 발생하는 문제점인 공해 및 온실가스 발생의 획기적 감축과 자원고갈이라는 에너지 위기를 극복하기 위한 대안으로 친환경적인 대체에너지의 개발이 매우 시급한 상황이다. 특히 석유 고갈로 인한 원유 수급의 불안정성과 개발도상국의 급격한 경제성장으로 인한 세계 에너지 소비량 증가로 석유자원을 무기화하려는 움직임이 활발하여 국가에너지 안보가 위기에 직면하고 있는 상태이다. 이에 국내 실정에 맞는 지속가능한 바이오매스를 활용한 대체에너지 개발을 통해 국내 에너지 자립과 저탄소 녹색성장 구현이 절실하나, 국내 고유의 다량 바이오매스 자원이 없는 실정이다. 국내에 이용 가능한 바이오매스 자원 중 해조류는 비식량계 바이오매스로써 경작지 잠식으로 인한 식량생산 감소 및 식량 수급 불균형 문제를 야기하지 않으며, 육상바이오매스 자원에 비해 단위면적 당 생산 수율이 높아 국내 실정에 매우 적합한 바이오매스 자원으로 생각된다. 하지만 아직까지 국내에서는 해조다당류를 대상으로 한 기능성 식품 개발 및 알코올 발효를 통한 액체연료 생산 등 일부 분야에만 연구가 국한되어 있으며, 해조류를 통합적으로 활용하여 바이오에너지 및 고부가 물질을 생산하기 위한 요소기술에 대한 기초자료 및 연구가 전무한 실정이다. 따라서 본 용역사업에서는 국내에서 이용가능한 해조류 조체에 대한 정확한 정보의 확보 및 데이터베이스 구축에 대한 연구, 해조류 바이오매스로부터 다양한 기능성 유용성분 및 유가금속 회수 그리고 부산물을 활용하기 위한 연구, 다양한 해조당으로 구성된 해양 바이오매스의 효과적인 분별 및 회수를 위한 화학적 및 생물학적 전처리/당화 기술에 관한 연구 및 알코올 발효 이외에 혐기성 소화, 열화학적 전환 등을 이용한 연료 생산 기술에 대한 연구를 수행하여 경쟁력 있는 요소기술들의 통합과 연계를 도모하고, 최종적으로 해조류의 대량 생산을 통한 그린에너지화 및 부산물의 통합활용을 위한 실증 및 상용화를 위한 기반을 구축하고자 한다.

III. 연구개발의 내용 및 범위

1. 해조류 통합활용화

- DB 구축 및 표준화
 - 해조류 구성 당류의 확보 및 분석조건 확립
 - 해조류/전처리물의 당 분석 및 발효당/비발효당의 분석
- 부산물 활용 통합공정
 - 해조류 저분자 생리활성물질의 기능성 분석
 - 해조류 처리물의 저분자 생리활성물질 함량 및 분획물의 생리활성 분석
- 화학적 전처리 및 당화
 - 대상 해조류에 대한 전처리 공정별 적용 시험 및 평가
 - 대상 바이오매스 1차 전처리 공정 최적화 및 효소 가수분해도 평가
- 생물학적 당화
 - 생물정보학 및 미생물 스크리닝을 이용한 해조류 분해 미생물 선정
 - 선정 미생물의 갈조류 분해 산물의 대사체 및 해조류 분해효소 프로파일링

2. 해조류 그린에너지화

- 알코올 발효
 - 해조류 유래 당류 별 알코올 발효 특성 평가
 - 당화액 내 당과 저해물질의 프로파일링
 - 당화액 내 복합당 동시 이용을 위한 유전자 탐색 및 발현기구 도출
 - 재조합균주 개발 target 유전자 및 기술 선정
- 혐기성 소화
 - 해조류 분해균주의 스크리닝
 - 혐기성 유기산 발효 최적화
 - 혼합 알코올 제조 기본 공정 구축
- 열화학적 전환
 - 해조류 바이오매스의 물리화학적 특성 및 열적 동특성 데이터 확보
 - 공정 조건에 따른 바이오오일 생산 최적화
 - 바이오오일의 물리화학적 및 연료 특성 분석

IV. 연구개발결과

1. 해조류 통합활용화

■ DB 구축 및 표준화

- 해조류를 ion exchange Shim-pack ISA-07(4.0 × 250 mm) 분석 column과 Shim-pack ISA guard column(4.0 × 50.0 mm)을 사용하며 이동상으로 potassium borate(pH 8)과 B용액으로 potassium borate(pH 9)를 사용하는 post-column 유도체화 방법을 이용하여 해조류의 단당류 및 이당류를 분석하였다. 해조류를 0.2 M HCl로 가수분해하여 분석한 총환원당의 순서는 다음과 같다. 우뚝가사리(7348 ppm) > 진두발(5355) > 도박(4587) > 파래(2872) > 우뚝가사리(수과원-1996) > 서실(1594) > 대왕물(1216) > 감태(1160) > 다시마(548) > 미역(466). 같은 종일지라도 생산지에 따라 총 환원당 함량뿐만 아니라 조성도 많이 차이가 남을 보여주었다.
- 감태를 100% ethanol로 추출하고 hexane, chloroform, ethyl acetate, butanol, water 용매로 추출물을 용매분획하고 항산화성이 높은 ethyl acetate 층을 GS-310 GPC column을 사용하여 다시 항산화 활성이 높은 분획을 검색한 후 역상 Phenomenex C18(2), JAI C18, Shimadzu C18 column을 활용하여 methanol, acetonitrile, 0.1% formic acid in water 이동상으로 활성이 높은 물질의 분획 방법을 확립하였다.
- 다시마도 감태와 같은 방법으로 용매를 사용하여 분획하고 이 분획에 대한 활성을 검색한 결과 hexane 층이 높게 나타났다. 따라서 hexane 층을 역상 JAI column에 의하여 분획을 한 다음 Phenomenex C18(2)을 사용하여 활성물질에 대한 분획 조건을 확립하였다.

■ 부산물 활용 통합공정

- 다시마의 알코올 획분을 유기용매로 분획하여 다양한 생리활성을 분석한 결과 항염증, 항비만, 항치매, 항당뇨합병증에 효과가 있는 것으로 나타났으며, 추가적인 연구로 이들을 이용한 건강기능성 식품 개발이 가능한 것으로 기대된다.
- 모자반의 항염증 활성은 다시마와 마찬가지로 *n*-hexane과 dichloromethane 획분에서 나타났으나, 다시마의 *n*-hexane 획분에 비해 모자반의 *n*-hexane 획분은 8배, 모자반의 dichloromethane 획분은 6배가

량 낮은 것으로 나타났다. 그러나 다시마에 비해 세포독성은 4배가량 낮은 것으로 나타나 건강기능성 식품의 소재로서의 안정성은 높은 것으로 평가되었다. 특히 모자반의 항암활성은 다시마에 비해 훨씬 높은 것으로 나타나 항암활성 물질의 분리와 이들에 대한 추가적인 기능연구가 필요한 것으로 판단된다.

- 곰피에는 다양한 생리활성 물질들이 존재하는 것으로 보고되고 있으며, 본 연구개발을 통하여 4종의 화합물을 분리하여 이들의 항산화, 항염증, 항암 기전을 규명하였다.

■ 화학적 전처리 및 당화

- 열수처리 다시마를 H_2SO_4 등의 산축매와 NaOH 등의 알칼리축매 총 5종을 이용하여 축매의 종류 및 농도에 따른 전처리시험을 진행한 결과, NaOH 등의 알칼리 축매를 사용하였을 때 전처리효과가 높은 것으로 나타났다. 상기 전처리 시험군 중 전처리 축매별로 1~2군을 선별하여 효소가수분해도를 평가한 결과, 1.0% NaOH 축매를 이용한 전처리 시료에서 가장 높은 효소가수분해도(99.1%)를 나타내었다.
- 탈염처리 다시마를 H_2SO_4 축매와 ammonia 축매를 이용하여 전처리 후 효소당화한 결과, H_2SO_4 를 사용하였을 경우보다 ammonia를 사용하였을 때 전처리 효과가 높은 것으로 나타났다(H_2SO_4 축매 전처리 시료의 효소당화율: 34.4%, ammonia 축매 전처리 시료의 효소당화율: 85.8%).

■ 생물학적 당화

- 해양 salt marsh grass에서 분리한 그람 음성균인 *Saccharophagus degradans*는 해조류와 식물들의 구성 성분인 agar, alginate, chitin, cellulose, fucoidan, laminarin, pectin, pullulan, starch, xylan 등을 분해가능한 효소를 가지고 있다. 이에 생물정보학 및 미생물 스크리닝을 이용한 해조류 분해 미생물로 *S. degradans*를 선정하였다.
- *S. degradans*를 다양한 탄소원으로부터 배양하여 *S. degradans*의 polysaccharide의 분해 메커니즘을 성장 속도 및 효소 생산 속도 관점에서 비교하였으며, 그 분해 산물들을 GC-TOF-MS를 이용하여 분석한 결과 아미노산, 아민류, 유기산, 인, 당류, 지질 등 총 98개의 대사체를 동정하였다. 통계학적 분석을 기반으로 한 대사체 프로파일링을 통해 *S. degradans*의 fatty acids, amino sugars, uronic acids, nucleotides 등의 대사 경로의 차

이를 확인할 수 있었으며, 다양한 탄소원에서 metabolic signature를 규명하였다.

2. 해조류 그린에너지화

■ 알코올 발효

- 에탄올 발효 균주인 *S. cerevisiae* KTCT 7296을 이용한 당화 해조류 발효 조건을 확보하였다. 산처리 당화 도박액의 경우 포도당과 비슷한 정도로 발효가 진행되나 산처리 당화 다시마액의 경우, 발효되지 않았다. 따라서 갯벌에서 혼합 알코올을 생산하는 새로운 균주 BS-5를 분리하였고 다양한 당류를 이용할 수 있는 것을 확인하였다. 알코올 발효에서는 BS-5의 포도당 사용시 알코올 생산성은 50%로서 *S. cerevisiae* KTCT 7296에 60%에 근접했다.
- 다시마, 도박, 진두발, 파래 등을 산과 효소를 사용하여 처리한 당화액 중에서 다시마 당화액으로부터 가장 높은 부탄올 생산성과 미생물 성장을 관찰할 수 있었다. 또한 전처리와 당화공정에 따른 당화액의 성분과 조성의 변화가 미생물 성장과 부탄올 생산성에 영향을 미치는 중요한 인자라는 것을 확인하였다. 해조류로부터 고수율의 부탄올을 생산하는 재조합 균주의 개발을 위하여 필요한 다양한 분자유전학적 도구와 재료들을 확보하였으며 고수율 부탄올 균주, 다당체 직접 분해 부탄올 생산 균주 및 혼합당 이용 가능 균주를 우선적으로 개발하기 위한 유전자 targeting 및 cloning을 수행하였다.

■ 혐기성 소화

- 해조류에 대한 혐기성 소화에서 seed, 온도, pH, 체류시간과 같은 parameter의 최적화 연구를 수행하여 최적조건을 도출하였으며, 이를 토대로 장기간의 배양실험을 수행하였다. 그 결과 VFA 농도는 시간이 갈수록 증가하여 최종적으로 4.65 g/L 이었으며, 이를 기준으로 수소첨가 반응수율이 80%라는 가정하에서 계산하면 혐기성 소화를 통해 얻을 수 있는 혼합알코올 수율은 292 L 혼합알코올/유기물 톤 이다.
- 유기산으로부터 알코올을 제조하기 위한 기술 2가지에 대한 가능성을 조사하였다. 2단계 반응인 에스테르화 반응 및 수소화 반응은 전체 공정 효율이 거의 90%에 도달하였다. 1단계 반응인 유기산의 직접 수소화 반응은

반응조건에서 수소화 반응 이외에도 에스테르화 반응이 진행되어 알코올 선택도가 낮게 관찰되었다.

■ 열화학적 전환

- 총 8종의 해조류 바이오매스를 대상으로 하여 물리·화학적 특성 및 열적 동특성 데이터를 확보하였으며, 이를 기초로 열분해 공정에 가장 적합한 해조류 바이오매스는 다시마로 판단된다.
- 다시마를 원료로 하여 급속 열분해 공정을 이용하여 바이오오일을 생산하는 실험을 수행하였으며, 공정 조건인 열분해 온도, 최소 유동화속도 비, feeding rate이 열분해 생성물의 수율에 미치는 영향을 파악하였다. 실험 결과, 최적 조건은 열분해 온도 425 °C, 최소 유동화속도 비 5, feeding rate 600 g/hr 이며 바이오오일 최대 수율은 35.4 wt% 이었다.
- 생성된 바이오오일의 물리·화학적 특성 및 조성을 분석하였으며 그 결과 바이오오일의 발열량은 dry basis에서 6258.29 kcal/kg으로 기존 화석연료 발열량의 2/3 수준이었으며, 또한 정성 분석을 통해 aliphatics 계열의 화합물의 가장 많이 생성된 것을 확인하였다.

V. 연구개발결과의 활용계획

본 용역사업을 통하여 국내에서 이용가능한 해조류에 대한 기초 정보 및 데이터베이스를 구축하고 통합적 활용 및 그린에너지화를 위한 기초 데이터를 확보하였다. 이와 같은 연구수행 결과로부터 도출된 해조류 바이오매스의 통합적 활용방안을 성공적으로 수행하기 위해서 해조류 대량양식, 건강신소재 개발, 생물학적 전환공정 개발, 그린에너지 융합공정 개발, 그리고 통합공정 및 제품 개발에 대한 연구를 본격적으로 추진할 계획이다. 특히, 해조류 바이오매스 기반 통합공정의 경제성을 확보하기 위하여 경쟁력 있는 요소기술들의 유기적인 연계를 도모하여 최종적으로 해조류의 대량 생산을 통한 그린에너지화 및 부산물의 통합활용을 위한 실증 연구에 박차를 가하고자 한다.

목 차

제 1 장 연구개발과제의 개요	11
제 1 절 연구의 필요성 및 목적	11
제 2 절 기술의 종류 및 범위	16
제 2 장 국내외 기술개발 현황	63
제 1 절 해조류 통합활용화에 대한 기술개발 동향	63
제 2 절 해조류 그린에너지화에 대한 기술개발 동향	67
제 3 장 해조류 통합활용화 연구개발 내용 및 결과	69
제 1 절 해조류 데이터베이스 구축 및 표준화	69
제 2 절 해조류 생리활성 물질 검색 및 성분 규명	91
제 3 절 해조류 화학적 전처리 및 당화	150
제 4 절 해조류 생물학적 당화	166
제 4 장 해조류 그린에너지화 연구개발 내용 및 결과	179
제 1 절 해조류 에탄올 발효	179
제 2 절 해조류 부탄올 발효	187
제 3 절 해조류 혐기성 소화	198
제 4 절 해조류 열분해	220
제 5 장 결과 및 향후 계획	239
제 1 절 연구 결과 요약	239
제 2 절 기술 구성 및 연계도	243
제 3 절 향후 계획	248
제 6 장 참고문헌	249
부록	255
A. 추진경과 일정표	255
B. 심포지엄 개최 결과 요약	256
C. 연구성과물	258
D. 언론 보도자료	270

제 1 장 연구개발과제의 개요

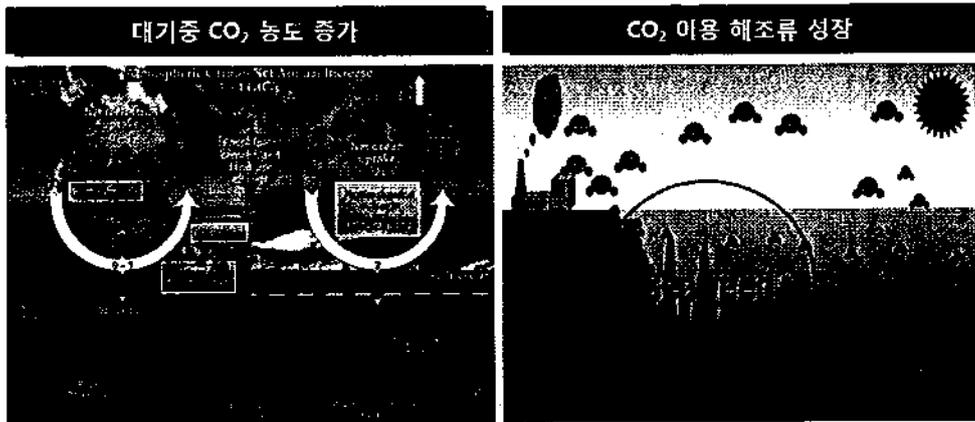
제 1 절 연구의 필요성 및 목적

1. 경제산업적 측면

- 비식용 바이오매스 에너지자원으로서의 해조류 활용 가능성 조사
- 해조류의 통합적 활용을 통한 경제적 그린에너지 생산기반 구축
- 해조류의 통합적 활용을 위한 구성성분 및 적용기술 특성 조사
- 기후변화협약 대응 및 수산분야 녹색산업화에 의한 신성장동력 창출

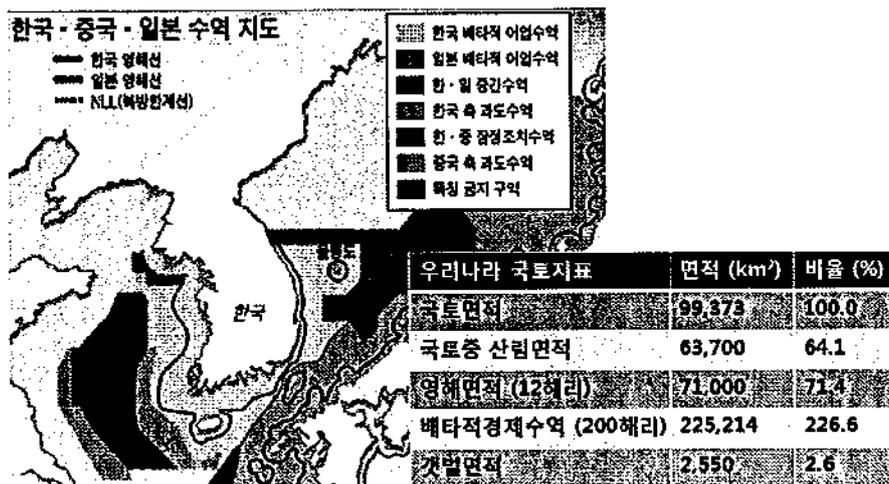
최근 석유자원 고갈로 인한 원유 수급의 불안정성과 개발도상국의 급격한 경제성장으로 인하여 세계 에너지 소비량이 지속적으로 증가하고 있으며, 이에 석유자원을 무기화하려는 움직임이 활발해지면서 국가에너지 안보가 위기에 직면하고 있다. 또한 기존 화석연료 사용 시 발생하는 문제점인 공해 및 온실가스 발생의 획기적 감축이 가능한 그린에너지의 개발이 요구되고 있으며 이들을 통하여 기후변화협약 대응 및 에너지 자립을 달성하고 장차 그린에너지 산업을 국가발전의 한 축으로 성장시키고자 하고 있다. 따라서 국내 실정에 맞는 지속가능형 바이오매스를 활용한 수송용 바이오연료 개발을 통해 국가 에너지 자립과 저탄소 녹색 성장의 국가 기본계획에 부합하여 신성장동력을 창출하고자 하고 있다.

하지만 최근 바이오연료 생산에 대한 폭발적인 관심에 의하여 옥수수, 콩, 유채, 사탕수수 등의 육상 바이오매스에 대한 가격이 급격히 상승하는 효과를 보였다. 나아가 이들 곡물들은 지속적인 인구 증가를 감안할 때 앞으로 식량부족 상황을 초래할 수 있으며, 에너지 생산을 위한 원료로 사용할 경우 대량 재배 시 비료 및 살충제 사용으로 인한 제2의 환경문제를 유발시킬 수도 있다는 우려를 낳고 있다. 이에 해조류 바이오매스에 대한 관심이 최근 높아지고 있다. 해조류는 해수 중의 부영양 물질, 수중 및 대기 중 이산화탄소의 흡수 등 환경회복 기능을 보유한 환경친화적 생물로서, 해조류를 이용한 지구 온실가스 저감 및 바이오 에너지 생산 가능성에 대한 세계적인 관심이 집중되고 있다. 또한 해조류는 비식량계 바이오매스로서 경작지 잠식으로 인한 식량생산 감소 및 식량 수급 불균형 문제를 야기하지 않으며, 육상바이오매스 자원에 비해 단일면적 대비 생산 수율이 높아 해조류를 원료로 하는 바이오에너지 생산 및 고부가 물질 생산기술은 국내 실정에 매우 적합하며 경쟁력 있는 기술로 평가되고 있다.



[그림 1-1-1] 해조류의 이산화탄소 포집 및 저장 효과

특히 우리나라는 해조류 양식기술 및 생산량 측면에서 세계 4위 수준의 인 프라 및 기술력을 보유하고 있어 해조류 바이오매스를 기반으로 하는 연구개발에 정부 주도의 집중 투자가 이루어질 경우 성공 가능성이 매우 높다고 할 수 있다. 경제성 측면에서 바이오에탄올 추출용 바이오매스의 생산단가는 0.49달러/리터 이하가 되어야 하나, 1년에 1~2회 밖에 수확하지 못하는 육상작물의 경우, 경제성 확보에 어려움이 있다. 그러나 연간 채취 횟수가 10회 이상인 해조류는 국내 양식장 이용 시 에탄올 생산량은 19억리터로 휘발유의 20%를 대체(양식장 7만ha의 절반인 3.5만ha재배, 에너지 수율 20% 적용)할 수 있으며, 동남아 근해까지 확대 시 86억리터로 90%를 대체(양식장 16만ha 기준)할 수 있을 것으로 분석되어 경제성이 매우 뛰어나다고 알려져 있다.



[그림 1-1-2] 우리나라 국토지표

하지만 해조류 바이오에너지 연구개발이 세계적으로 활발하게 추진되고 있으나 아직 실용화에는 이르지 못한 상태이다. 구미국가에서는 1970년대부터 해조류를 이용한 바이오에너지 연구를 지속적으로 추진 중하였다(미국: 대형 갈조류(Macrocystis)로부터 바이오에탄올 생산 연구; 영국: 다시마로부터 바이오에탄올 생산 연구; 노르웨이: 갈조류로부터 바이오에너지 연구). 일본은 『아플로 & 포세이돈 2025 계획』을 수립하여 해조류 바이오에너지 개발을 추진 중이다. 현재 발표된 계획을 보면 일본의 배타적 경제수역에 6,500만톤의 해조류를 양식하여 바이오연료 2,000만kl를 생산하고 동시에 우라늄 등의 희귀금속을 1,950톤가량 생산하고자 기반 기술을 연구개발하고 있다.

국내의 경우 대량 양식에 비하여 바이오에너지 및 고부가 물질 생산에 적합한 해조류 종류, 전처리 및 당화 공정, 생산공정에 대한 기초자료 및 연구결과물이 거의 전무한 실정이다. 따라서 본 사업팀은 『바이오매스용 해조류의 대량양식 및 바이오에너지 생산기술 개발 로드맵(타당성 조사) 연구』 기획사업에 이어 바이오 에너지 생산용 해조류 성분의 DB구축 및 기술표준화와 더불어 그린에너지화 및 부산물의 통합적 활용을 위한 기반구축연구를 수행하고자 하며, 차세대 그린에너지 생산 원천기술을 확보함으로써 21세기 에너지 선진국 대열 합류에 기여하고자 한다.

2. 기술적 측면

- 해조류 조체에 대한 정확한 정보의 확보 및 데이터베이스 구축이 필요함
- 해조류 바이오매스로부터 바이오연료를 생산하는 공정의 경제성을 제고하기 위해서는 기능성 유용성분 및 유가금속 회수 그리고 부산물 활용 등의 통합적 노력이 필요함
- 다양한 해조당으로 구성된 해양 바이오매스의 효과적인 분별 및 회수를 위해서는 화학적 및 생물학적 전처리/당화 기술의 개발이 필요함
- 해조류의 그린에너지화를 위하여 발효 공정 이외에도 혐기성 소화, 열화학적 전환 등의 다양한 접근이 필요하며 이를 통한 경제성 있는 상호 연계공정의 개발이 타당하다고 판단됨

가. 해조류 통합활용화

해조류는 탄소화합물로 이루어진 에너지 저장물질이라고 할 수 있으며, 재생자원 중 유일하게 화석연료를 대신할 수 있는 대체 에너지원과 더불어 석유화학 공업의 대체 원료물질 공급원(chemical feedstock)이 될 수 있는 자원이다. 바이오에

너지 및 고부가가치 제품을 생산하기 위해서는 해조류 조체에 함유되어 있는 구성 당 성분 및 저분자 화합물에 대한 정확한 정보의 확보 및 데이터베이스 구축이 필요하다. 특히, 국내연안에서 대량 양식되고 있거나, 바이오에너지 대상 해조류로 가능성이 높은 다시마, 미역, 김, 툯 및 모자반의 전체 단당류 조성을 분석하여 향후 바이오에너지 생산에 요구되는 발효성 당류의 함량 분석이 완료되어야 바이오에너지 생산수율을 정확하게 계산할 수 있고, 차후 경제성 평가의 지표로 활용할 수 있다.

해조류의 기능성 연구는 주로 해조다당류를 대상으로 기능성 식품의 개발에 국한되어 있는 실정이며, 최근 갈조류에 함유된 다량의 polyphenol 화합물에 대한 생리활성 연구가 활발하게 진행되고 있다. 해조류는 다양한 형태의 유용성분들을 포함하고 있으며 이들 성분들은 서로 복합적으로 견고하게 결합되어 있기 때문에 해조류의 유용성분들을 자원화하기 위해서는 당화과정 이전에 다양한 방법의 전처리기술들이 요구된다. 해조류의 물리적 및 화학적 전처리과정에서 생성되는 polyphenol류와 이들의 유도체, 여러 종류의 단당류 및 그들 유도체들의 생리활성을 규명함으로써 전처리 과정에서 파생되는 부산물들을 활용하여 기능성 소재로의 개발이 가능하다. 생물학적 전처리 시에는 polyphenol류가 부산물로서 대량으로 파생되기 때문에 이들의 효과적인 활용을 위한 대량분리 공정기술의 확립이 절실히 필요하며, 바이오에너지 생산 과정 중 해조류의 물리적 및 화학적인 전처리 방법에 따른 당조성과 저분자 화합물들의 조성변화를 분석함으로써 알코올 발효를 위한 전처리 공정의 최적화가 필요하다. 또한 전처리 공정 과정에서 생성될 수 있는 발효 저해물질의 함량을 분석, 저해물질의 생성을 억제하는 방법을 도입하여 발효수율을 향상시킬 방안이 모색되어야 한다.

다양한 종의 해조류들은 각각 서로 다른 성분비, 결합구조, 반응성 등으로 인하여 전처리 조건 또한 다양해야 하며, 전처리 조건이 최적화 되어있지 못하면, 미반응 유용성분의 잔류물 또는 과잉반응에 의해 부생된 불순물들을 포함하게 되기 때문에 효율적인 당화 또는 발효를 수행할 수 없게 되므로 전처리 공정의 선별도 중요한 변수가 될 수 있다. 해조류로부터 발효성 당을 얻기 위한 당화공정에는 화학적 방법과 생물학적 방법이 있으며, 화학적 방법을 이용하면 비교적 쉽게 당화를 할 수 있다는 장점을 갖고 있으나 당화과정 중 대규모의 오염물질이 발생하며 이로 인해 당화율 및 발효수율의 저해가 초래된다. 따라서 당화 및 발효수율의 제고를 위하여 새로운 효소개발을 통한 당화공정의 개발이 필요하다.

나. 해조류 그린에너지화

화석연료의 고갈로 인한 원유 수급의 불안정성과 개발도상국의 급격한 경제 성장으로 인해 세계 에너지 소비량 증가로 국가에너지 안보가 위기에 직면하고 있다. 이에 국내 실정에 맞는 지속가능형 바이오매스를 활용한 수송용 바이오연료 개발을 통해 국내 에너지 자립과 저탄소 녹색성장세계현이 절실하고 있으나 국내 고유의 다량 바이오매스 자원이 없는 것이 현실이다. 이에 대한 대안으로 해조류는 비식량계 바이오매스로써 경작지 잠식으로 인한 식량생산 감소 및 식량 수급 불균형 문제를 야기하지 않으며, 육상바이오매스 자원에 비해 단위면적 인생산 수율가능형인 해조류를 원료로 하는 바이오에너지 생산 및 고부가 물질 생산기술은 국내 실정에 매우 적합하며 경쟁력 있는 기술로 판단된다.

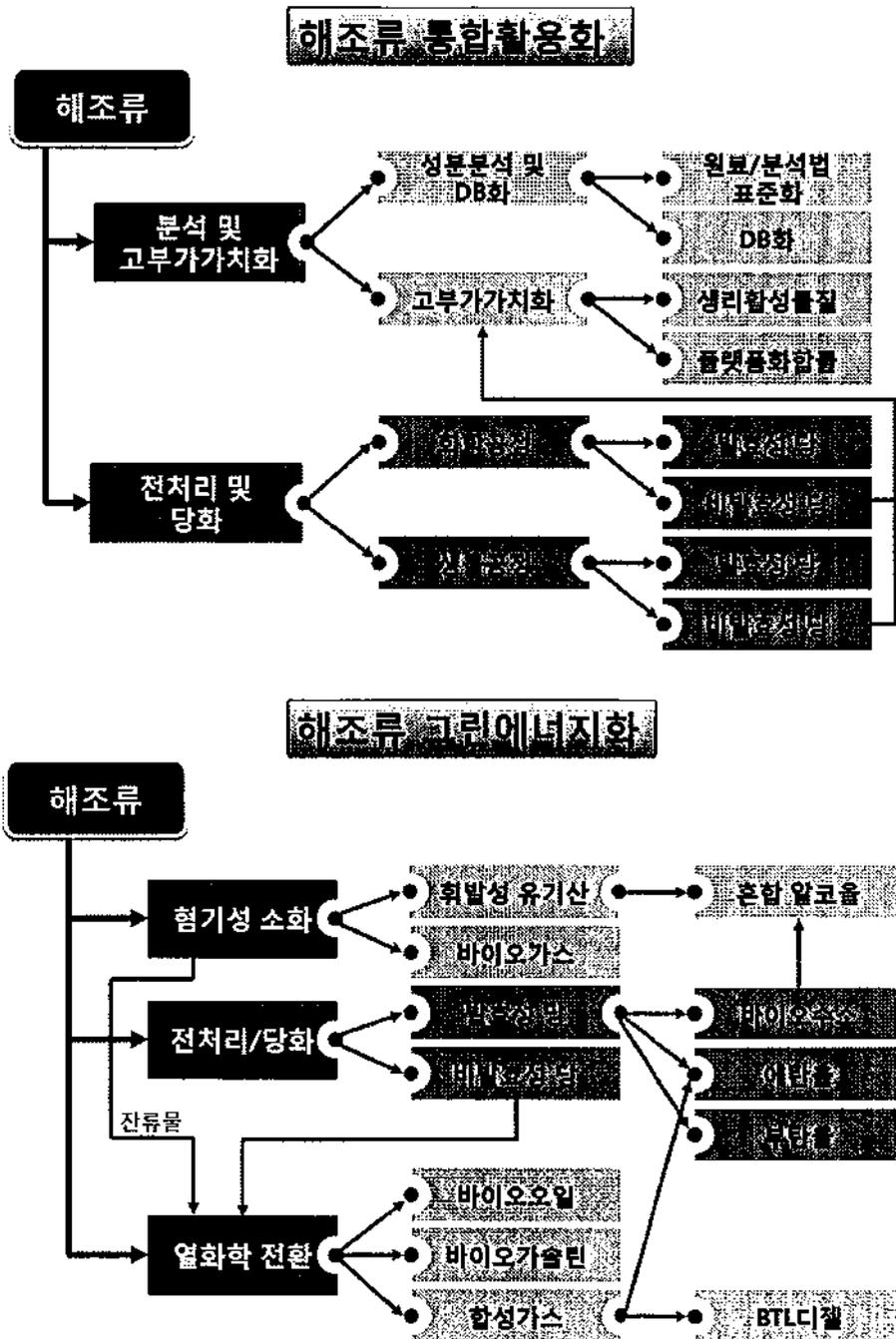
현재 국내에서 해조류 대량 양식기술이 세계 4위 수준의 인프라와 기술을 보유하고 있지만, 바이오에너지 및 고부가 물질 생산에 적합한 해조류 종류와 전처리 및 당화 공정, 생산공정에 대한 기초자료 및 연구결과가 전무한 실정이다. 그리고 섬유소계 에탄올 생산이 지금까지 산업화되지 못하는 이유는 전체 에탄올 생산 공정에 있어서 섬유소의 당화가 차지하는 공정비용이 너무 높고, 당화수율이 낮아 바이오매스자원으로서 효과적으로 이용되지 못하고 있으며, 부생되는 분해물들이 에탄올 발효시 발효저해물질로 작용하여 아직까지 비경제적 요소로 남아있기 때문이다. 해조류 역시 이러한 문제점들이 극복되어야만 해조류로부터 생산된 연료용 에탄올이 기존의 화석연료와 경쟁하여 대체 에너지로서의 역할을 할 수 있을 것이다. 이를 위해서 해조류의 효율적 전처리 및 당화는 물론 유용성분들의 효과적 분별 및 회수가 선행되어야 한다.

또한 현재까지 국내에서는 알코올 발효에 통한 액체연료 생산 연구에만 집중하고 있으나 이 외에 대안으로서 열화학적 처리방법이나 혐기성 소화를 통한 연료생산 기술의 해조류 바이오매스에 대한 적용 타당성 검토가 필요하다.

결국, 기반구축연구를 통해 경쟁력 있는 요소기술들의 통합을 도모하고, 최종적으로 해조류의 대량생산을 통한 그린에너지화 및 부산물의 통합활용을 위한 실증 및 상용화 연구들이 체계적 프로그램에 의해 본격적으로 수행되어야 할 필요가 있다.

제 2 절 기술의 종류 및 범위

본 기반구축연구에서는 해조류 바이오매스의 그린에너지화 및 통합적 활용을 위해 DB 구축 및 표준화, 부산물 활용 통합공정, 화학적/생물학적 전처리 및 당화, 당화 플랫폼, 혐기성소화 플랫폼, 열화학 플랫폼 등의 7가지 기술로 중분류하고, 경쟁력 있는 요소기술들을 통합하여 최종적으로 경제성 있는 공정을 도출하고자 한다.



[그림 1-2-1] 해조류 바이오매스 통합적 활용 기술 상호연계도

1. 해조류 정의 및 종류

해조류는 일차생산자로서 바다에서 서식하는 해산식물의 한 부류이며, 조류(藻類)중 육안적인 크기로 대형조류 또는 바닥의 기질에 붙어서 사는 저서성 조류라고도 부른다. 최근 바이오매스로서 해조류에 대한 관심이 높아지고 있다. 해조류는 육상식물의 경우처럼 식량문제를 촉발시키거나 산림자원의 경우처럼 자원을 고갈시키는 문제점을 극복할 수 있는 유망한 바이오매스로서 기대되고 있는 자원이다.

전 세계에 분포하는 조류의 종수는 약 4만여 종으로 알려져 있으나 이보다 4~8배 정도 많은 기록되지 않은 종들이 존재할 것으로 보고되어 있다. 우리나라에 분포하는 해조류 자원은 녹조류 98종, 갈조류 166종 및 홍조류 489종 등 총 753종이 분포하고 있다. 현재 인간이 이용하고 있는 해조류의 종수는 약 500여종에 이르며, 이중 양식이 이루어지고 있는 종은 약 20여종에 불과하다. 세계에서 가장 중점적으로 양식이 이루어지고 있는 분류군은 5개 속(Genus)에 국한되고 있으며 이는 홍조류에 속하는 김속(*Porphyra*), 유큐우마속(*Eucheuma*) 및 꼬시래기속(*Gracilaria*)과 갈조류에 속하는 다시마속(*Laminaria*) 및 미역속(*Undaria*)이다.

2. 해조류 전처리 및 당화

가. 정의 및 기술 개요

전처리(pretreatment)의 기본 개념은 이미 20세기 초에 목질계 섬유소 물질을 소나 말과 같은 반추 동물의 사료로 이용하기 위해서 알칼리 처리하여 소화도(digestibility)를 증진시키고자 시도한데서 비롯된다. 소화도는 산이나 효소에 의한 섬유소의 당화, 주로 포도당으로 전환되는 정도를 의미하며, 오늘날 바이오매스의 효소적 가수분해에 대한 결정적 인자로 인정되고 있다.

해조류에 대한 전처리 공정의 시도는 아직까지 보고된 바가 없지만, 해조류를 이용하여 에탄올을 생산하고자 할 경우, 목질계에서와 마찬가지로 전처리, 당화 그리고 발효 등 일련의 공정을 필요로 하게 된다. 이 때 에탄올을 생산하는 공정의 속도 결정 단계는 에탄올 발효 이전의 탄수화물 또는 섬유소의 당화 공정인데, 대부분 목질계 바이오매스의 소화도는 별도의 전처리 공정 없이는 불과 20%를 넘지 못하는 것을 예로 알 수 있듯이, 해조류 바이오매스가 경제적으로 에탄올 전환공정에 이용되기 위해서는 효과적인 전처리 공정을 필요로 한다.

해조류 바이오매스의 소화도 및 반응성(reactivity)에 영향을 미치는 주요 요소로 섬유소 자체의 결정도(crystallinity)나 물질의 다공성(porosity)외에 비발효성 당 구성성분의 함량도 주요한 변수가 된다. 해조류 바이오매스의 효소적 가수분해

반응속도는 효소의 흡착이 가능한 발효성 당 고분자의 표면적에 대한 함수이다. 따라서 반응속도는 유효효소의 흡착량에 따라 증가하며, 흡착된 효소의 가수분해 속도는 해조류 바이오매스 구성 당 고분자의 결정도에 의해 결정된다. 즉, 비교적 가수분해가 용이한 무정형 당 고분자와 결정형 당 고분자의 비율이 효소의 가수분해 속도를 결정한다고 볼 수 있다. 또한 해조류 바이오매스의 비발효성 당 고분자는 효소가 흡착될 수 있는 유용성분의 표면을 둘러싸고 있어 효소의 접근을 어렵게 할 뿐만 아니라 효소가 비발효성 당 고분자에 직접 흡착하기도 하여 비발효성 당 고분자의 존재는 물리적으로 효소의 접근을 제한할 뿐 아니라 유효효소도 감소시켜 결과적으로 가수분해 속도를 낮추게 되는 결과를 초래하게 된다.

해조류 바이오매스는 그 종류가 다양하여 녹조류(Green Algae), 홍조류(Red Algae), 갈조류(Brown Algae) 등으로 크게 나눌 수 있으며, 다양한 종류의 미세조류(Micro Algae)도 포함할 수 있다. 오늘날 해조류의 유용성분인 씨놀과 같은 폴리페놀 등의 부산물도 그 기원에 근거하여 해조류 바이오매스의 한 부분으로 생각할 수 있다. 일반적으로 파래나 청각 등을 포함하는 녹조류는 종류에 따라 약 25~50%의 탄수화물 또는 섬유소의 에너지 유용성분들을 포함하고 있고, 미역, 다시마, 모자반 등의 갈조류는 약 30~50% 정도 알긴산 등의 탄수화물 및 섬유소를 포함하고 있다. 또한 우뭇가사리나 김, 풀가사리 등의 홍조류는 30~60% 정도 우무나 카라기난 등의 탄수화물 및 섬유소를 포함하고 있다. 해조류 바이오매스의 구성성분들은 위에 열거한대로 그 종류에 따라 종류 및 구성비의 차이는 다양하지만, 주요성분은 크게 발효성당 및 비발효성 당 그리고 단백질 및 일부 리그닌 등으로 크게 나눌 수 있다.

해조류 바이오매스의 전처리 공정은 아직까지 보고된 바가 없지만, 그 종류나 형태가 매우 다양하기 때문에 다양한 바이오매스의 종류에 따라 전처리 기술도 다양하게 적용되어야 한다고 판단할 수 있다. 주요 전처리 방법으로는 기계적 분쇄, 알칼리 팽윤, 약산 가수분해, 증기폭쇄 전처리 등이 적용되고 있으며 이러한 방법들의 조합에 의해 수행될 수도 있다.

지금까지 개발된 전처리 공정 기술은 주로 목질계 바이오매스의 전처리를 목적으로 하고 있으며, 해조류 바이오매스에 대해서는 새로운 전처리 공정이 개발되기 전까지는 우선은 목질계 바이오매스 전처리 공정의 응용에 기초를 두어야 할 것으로 사료된다. 효과적인 전처리 공정에서는 리그닌계 바이오매스의 섬유소 분율을 증가시키고, 미세섬유의 결정성을 감소시켜, 단위 바이오매스 당 효소의 흡착율이 높고, 섬유소의 이 높이가 증가되어 흡착된 효소의 가수분해 능력이 증가되어야 한다. 또한 전처리의 궁극적인 목적이 바이오매스로부터 당의 생성을 최대화하거나 효소에 의한 당의 생성 능력을 극대화하는 것이므로 고수율의 당 생성 생성도 생성

당의 분해를 최소화하는 것도 중생성 능력을 극대화하측, 당화 반응 속도상수(k_s)와 생성당의 분해 속도상수(k_d)의 비율(k_s/k_d)이 최대가 되는 높은 선택성이 요구된다. 따라서 대부분의 전처리 공정은 촉매의 이용, 높은 온도 그리고 짧은 체류시간을 갖는 공정들이 취해지고 있다.

다음은 현재 적용되고 있는 몇 가지 전처리 공정들에 대하여 조사한 것이다. 생물학적, 화학적 그리고 물리적인 전처리 기술들이 개발되었다. 광에너지의 조사(irradiation) 또는 기계적 분쇄 등의 물리적인 방법들은 비교적 공정이 느리고, 에너지가 많이 요구되므로 경제적 소모가 높은 편이다. 생물학적 방법은 주로 리그닌을 분해하는 미생물들의 처리에 근거하여 장치의 단순성이나 에너지소모가 적은 장점이 있지만, 처리 속도가 매우 느리고 리그닌 외에 섬유소나 헤미셀룰로오스가 소비되는 단점이 있다.

다양한 종류의 화학약품들이 효소적 가수분해를 증진시키고자 전처리 공정에 이용되고 있는데, 에탄올이나 메탄올과 같은 용매, NaOH와 같은 염기들이 리그닌을 용해시키지만 가격이 너무 비싸기 때문에 전처리와 같은 대용량의 공정에는 부적합한 것으로 판단된다. 암모니아는 회수가 쉽고, 공정투입 중 발효억제물질의 생산이 거의 없으며 에너지나 투자비용도 비교적 합리적인 것으로 인식되고 있지만, 가장 널리 퍼져있는 목질계 바이오매스나 폐지 등에서도 전처리 효과를 나타낼 수 있을지는 의심스럽다. 약산 전처리는 가장 광범위하게 연구 개발된 공정이지만, 그럼에도 불과하고 부식성으로 인해 투자비용이 많이 들고, 생산물의 중화를 위한 다른 화학약품들과 부생되는 석고(gypsum)의 처리비용이 추가된다는 단점이 있다.

나. 물리적 방법

(1) 기계적 분쇄(Mechanical Comminution)

일반적으로 전처리 공정은 단독의 기술을 적용하기보다는 몇 가지 기술의 조합에 의하여 수행된다. 그 중 가장 대표적이고 초기에 요구되는 전처리 공정이 바로 기계적 분쇄 과정인데, 여기에는 바이오매스의 크기가 1-3 cm정도가 되는 분쇄(commminution) 외에도 마쇄(grinding) 또는 세분(milling) 과정이 포함된다.

증기폭쇄 전처리공정(chopped size; 1-3cm 정도)을 제외하고는 거의 모든 공정들이 마쇄 또는 세분(0.2-2.0mm) 공정을 필요로 하는데, 기계적 세분공정들을 통해 바이오매스의 표면적은 증가되게 되고, 따라서 발효성계 고분자의 가수분해율도 증가하게 될 것이다. 그러나 이러한 공정들은 시간이 많이 소요되고, 에너지 소모가 매우 큰 공정들이다. 바이오매스의 크기가 0.15 mm 이하일 때에 소요되는

에너지는 그 바이오매스가 가지고 있는 총 에너지 25% 이상을 차지하고, 크기가 0.07-0.08 mm 이하일 경우에는 오히려 바이오매스 총 에너지의 100%가 넘는 에너지가 요구된다고 하였다. 바이오매스의 종류나 구성에 따라 다소 차이는 있겠지만 지금까지 발표된 전처리 공정에 관한 연구결과들이 주로 0.25 mm 이상 크기의 바이오매스를 다룬 것도 바로 이와 같은 이유에서 비롯된다.

(2) 알칼리 팽윤(Alkali Swelling)

NaOH, 아민, 그리고 암모니아 등은 팽윤제(swelling agent)로 작용하여 수분이 포함되어 있는 바이오매스의 팽윤을 촉진시킨다. 천연 바이오매스의 내부기공이 30,000 Dalton일 때 NaOH 팽윤 처리 후, 기공의 크기가 40,000-50,000 Dalton까지 증가된다. 기공 또는 모세관의 확장은 효소나 산 등의 침투를 용이하게 하여 가수분해율을 증가시킬 수 있다. 또한 팽윤제는 결정형 구조를 개조시키거나 심지어는 결정성 구조를 파괴시키기도 한다.

알칼리 팽윤 후 바이오매스의 소화도는 리그닌 함량과 상관관계가 있다고 하였다. 비교적 리그닌 함량이 적은 초본식물이나 벚짚 등의 농경잔여물에서는 약 알칼리 팽윤 처리가 높은 효과를 보였지만, 리그닌 함량이 높은 소프트우드에서는 거의 효과를 보지 못하였다고 하였다. 알칼리 처리의 기본 원리는 비발효성 당 고분자, 리그닌 그리고 섬유소 간의 에스터결합(ester bond)의 비누화 반응(saponification)이다. 특히 헤미셀룰로오스의 자일란과 리그닌 성분들의 uronic ester 결합의 비누화 반응으로 바이오매스 팽윤도는 물에서보다의 높은 팽윤 특성을 갖게 된다. 유사한 기작으로 암모니아 또한 팽윤제로 작용한다. 알칼리 처리에서 에스터 결합의 비누화 반응에 의해 카르복실기가 이온화되지만, 암모니아 처리에서는 에스터 결합의 ammonolysis에 의해 아미드가 생성된다. NaOH 처리에 비해 암모니아 처리에서 팽윤도는 다소 떨어지지만 암모니아는 NaOH에 비해 가격이 1/3 정도에 미치고, 휘발성을 가지고 있기 때문에 회수가 용이하다는 장점이 있어 다른 전처리 기술에서도 암모니아의 사용량은 점점 늘어나고 있다.

다. 화학적 방법

(1) 약산 가수분해(Dilute Acid Pretreatment)

산, 특히 염산이나 황산과 같이 무기산(mineral acid)의 가수분해 촉매기능은 약산처리가 많은 바이오매스 전처리 공정의 근간이 되는 기능이다. 2차 세계대전 당시에는 강산을 이용해 바이오매스를 가수분해하였지만, 일정 온도 이상에서는

생성당의 분해로 인하여 낮은 당수율을 나타내었다. 현재에는 약산을 이용하여 비교적 온화한 조건으로 헤미셀룰로오스의 자일란을 자일로스로 가수분해하는데 이용하고 있으며, 자일란의 자일로스로의 고전환율은 바이오매스 전처리의 총괄 경제성을 증가시키는데 기여할 수 있다. 또한 리그닌과 섬유소로부터의 헤미셀룰로오스의 이탈은 섬유소의 반응성을 한층 증가시키는 결과를 갖는다. 헤미셀룰로오스의 가수분해 속도는 산의 농도, 반응온도, 그리고 고/액 비율에 의존하며, 보통 헤미셀룰로오스가 완전하게 가수분해되기 위해서는 160 °C에서 5~10분, 140 °C에서 30~60분의 반응시간이 소요된다. 옥수수 속대(corn cobs)에 대해 황산 0.45-0.5%로 140-160 °C의 반응온도로 전처리할 때 섬유소의 당 수율이 90% 이상이라고 보고되었다.

약산 전처리 공정은 미국 국립 신재생에너지연구소(NREL)의 바이오매스-에탄올 프로그램에서 전처리공정으로 채택되어 있으며, 최근에는 두 단계 온도변환, 환류 흐름방식 등의 약산 전처리 공정의 효율을 증대시키기 위한 연구가 진행되고 있다. 그러나 약산 전처리 공정은 생성당의 분해를 최소화하여야 하고, 공정완료 후 다른 화학물질들을 이용하여 생성물을 증화시켜야 한다는 근본적인 문제점을 가지고 있어 이에 관한 연구가 선행되어야만 효과적인 전처리 공정이 될 수 있다.

(2) 증기 폭쇄 전처리(Steam Explosion)

증기 폭쇄 전처리 공정은 오늘날 가장 상업화하기 쉬운 공정으로 여겨지고 있다. 다른 전처리 공정에 비해 비교적 크기가 큰 바이오매스를 가압 반응기에 충전시키고 160~260 °C의 포화증기를 불어넣어 수초에서 수분동안 가압반응(100~700 psig)을 시킨 다음, 갑작스럽게 압력을 방출시키면 파열된 바이오매스를 얻을 수 있다. 이 과정에서 헤미셀룰로오스의 가수분해, 리그닌의 구조가 파괴되고 한다. 그러나 과도한 반응조건은 생성당의 분해를 야기시키는데, 250 °C에서 1분간 가압 반응을 진행했을 때 자일란이 완전 용해되고 2분간 처리했을 때에는 60% 이상의 자일로스가 파괴되었다고 한다. 증기 폭쇄 전처리의 장점은 우선 급속한 헤미셀룰로오스의 용해로 인한 바이오매스의 구조변화를 들 수 있고, 두 번째로 압력강화에 의한 기계적 마찰이 바이오매스에 부과되어, 섬유질의 파쇄로 인한 바이오매스의 표면적 증가를 들 수 있다.

약산 처리공정에서와 마찬가지로 발생하는 생성당의 분해물은 에탄올 발효에 있어 미생물에 대한 독성 영향을 미치게 되므로 별도의 세척공정을 필요로 하며, 이 과정에서 용해된 당의 손실이 야기되므로, 총괄 당 수율이 떨어지는 문제점이 남아있다.

(3) 암모니아 폭쇄(AFEX; Ammonia Fiber Explosion)

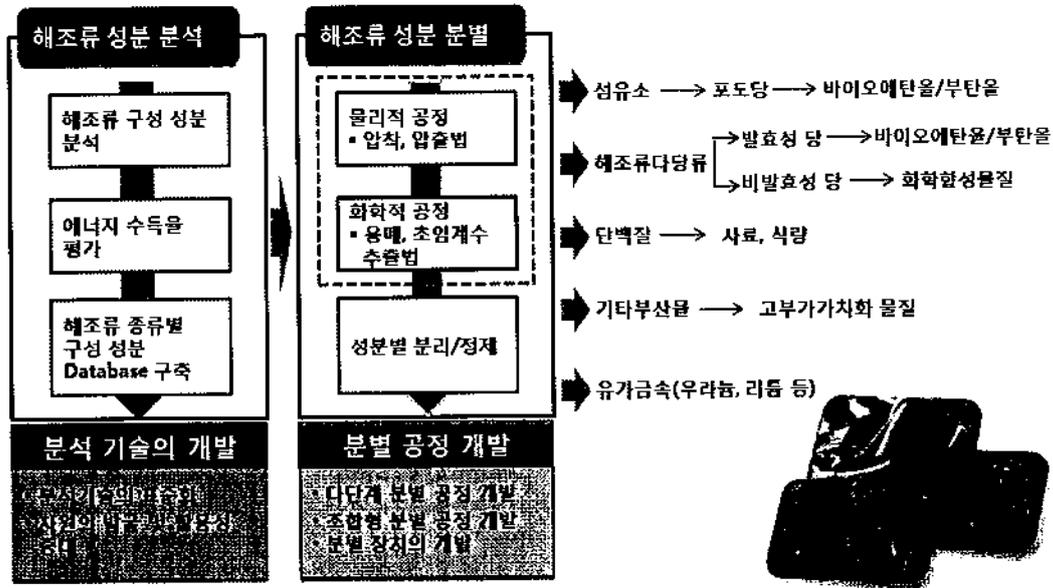
바이오매스를 암모니아수로 가압 반응시킨다. 증기폭쇄 전처리와 비교하여 비교적 온화한 반응조건(상온~90 °C, 150-180 psig)에서 암모니아의 고휘발성에 의해 바이오매스의 폭쇄 현상이 일어난다. 암모니아와 바이오매스를 약 1:1(w/w)의 비율로 반응기에 넣고 수십분에서 수시간동안 반응시키면 암모니아는 바이오매스 구조로 쉽게 침투해 들어가는데, 반응 후에는 잔여 암모니아를 증발시키도록 방치시켜 놓는다. AFEX 전처리를 초본식물이나 농경 잔여물 등에 적용했을 때, 약 80-경 잔초본식수율을 나타내었지만, 하드우드나 소프트우드에서는 불과 50% 이하초본식수율을 나타내어 리그닌 함량이 높은 바이오매스에 반서는 효과적인 결과를 얻지 못하였다. 폐신문지에 AFEX를 적용하였을 때, 역시 하드우드에서와 마찬가지로 40% 이하초본식수율을 나타냈다고 하여, AFEX는 적용 가능한 바이오매스가 한정되어 있음을 알 수 있다. AFEX 전처리는 알칼리 처리에서초본기작과 마찬가지로 암모니아에 의해 리를 초본반응성이 증가하였을 뿐만 아니라, 섬유소 결정성에도 영향을 준다고 용했을 때, 또한 암모니아의 급속한 증발속다. 인해 증기 폭쇄 처리에서와 같이 바이오매스의 표면적을 효과적으로 증가시켜준다. AFEX 전처리에서는 약산 전처리에서처럼 반응 후 중화 공정이 요구되지 않으며, 상대적으로 낮은 온도 조건으로 생성당의 분해를 줄일 수 있어 별도의 세척공정이 따르지 않는다는 장점이 있다.

또한 전처리된 바이오매스에는 약 0.5-1.5% 정도의 암모니아가 잔존하는데 이것은 발효공정에서 미생물의 질소원으로 이용될 수 있으며, 농경잔여물 등의 사료화에 특히 효과적이라고 볼 수 있다.

(4) 바이오매스 분별 (Biomass Fractionation)

바이오매스의 알칼리 추출물이나 리그닌 분해물들은 발효억제물로서 작용하고, 헤미셀룰로오스 및 자일로스는 섬유소와 비교해 전처리 공정에 대해(특히 산 처리) 더 민감하다. 또한 섬유소로부터 생성된 당(포도당)은 헤미셀룰로오스로부터 생성된 당(주로 자일로스) 보다는 발효 효율이 높은 편이다. 이러한 바이오매스 구성 물질들의 차이점은 이들을 한 반응기 또는 일괄 공정으로 처리하기에는 효율의 저하라든지, 경비 및 에너지의 낭비를 초래하는 원인이기도 하다. 바이오매스 분별의 주 목적은 이들 구성 성분들을 일련의 전처리 기술 조합에 의해 분리해 내어, 각각의 용도에 맞게 다른 공정을 유도하여, 바이오매스 이용률을 극대화하는 것이다. 바이오매스를 분별하는 방법으로는 알칼리 추출 방법과 약산 처리 기술을 이용하여 방법과 약산 침출 공정과 암모니아 침출 공정을 조합한 방법이 있다. 약산을 이용

하여 완전하게 헤미셀룰로오스를 분리해 내었을 때, 잔류 바이오매스의 성분은 70%의 섬유소와 30%의 리그닌 조성을 보였으며, 이어지는 암모니아 침출공정에 의해 10%의 리그닌만이 함유되어 있는 우수한 섬유소 잔류물을 얻을 수 있다.

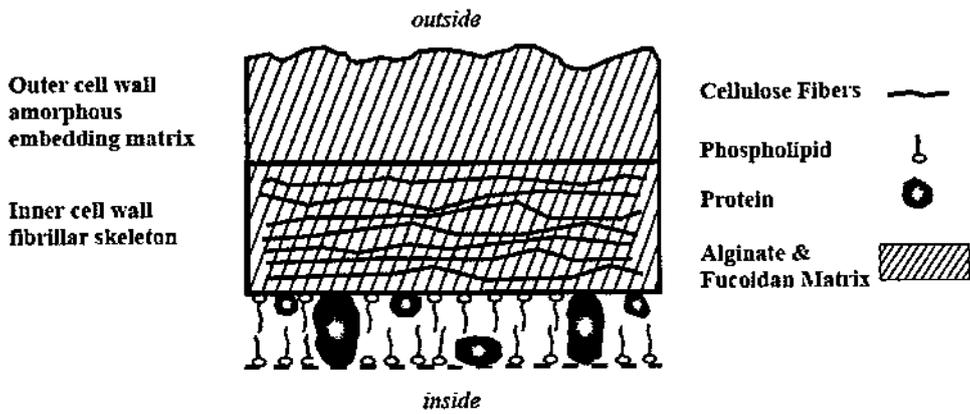


[그림 1-2-2] 화학적 해조류 전처리 기술

라. 생물학적 방법

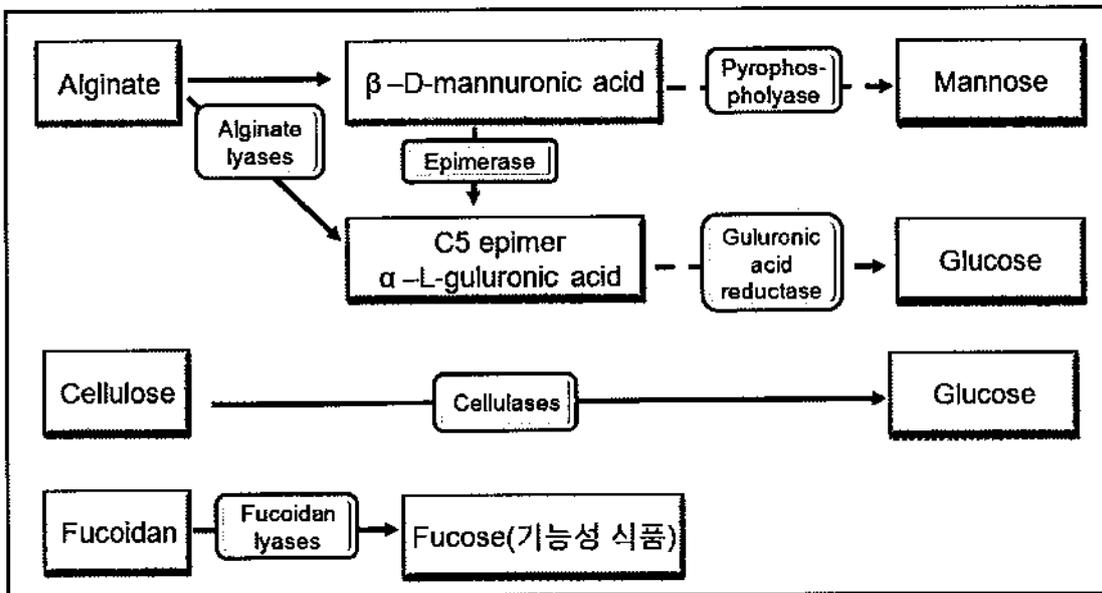
(1) 갈조류 분해효소 개요

갈조류의 생물학적 분해에 이용되는 효소는 효소로서의 기질 특이성을 갖기 때문에 구성성분에 맞는 효소의 개발이 필요하므로 구성성분에 대한 이해가 필요하다. 갈조류의 탄수화물은 세포벽의 주 구성성분으로 존재하거나 저장 탄수화물 형태로 존재한다. 갈조류의 세포벽에 존재하는 탄수화물은 alginate와 fucoidan으로 주로 구성되어 있으며 cellulose fiber 등이 소량 존재한다. Alginate는 갈조류 건중량의 12-34%에 해당되며 fucoidan의 녹조류나 홍조류에는 거의 존재하지 않으며 갈조류에 다량 존재한다. 종마다 함유량은 차이가 있으며 세포벽의 건중량의 약 8-15%까지 존재한다고 알려져 있다.



[그림 1-2-3] Cell wall structure in the brown algae

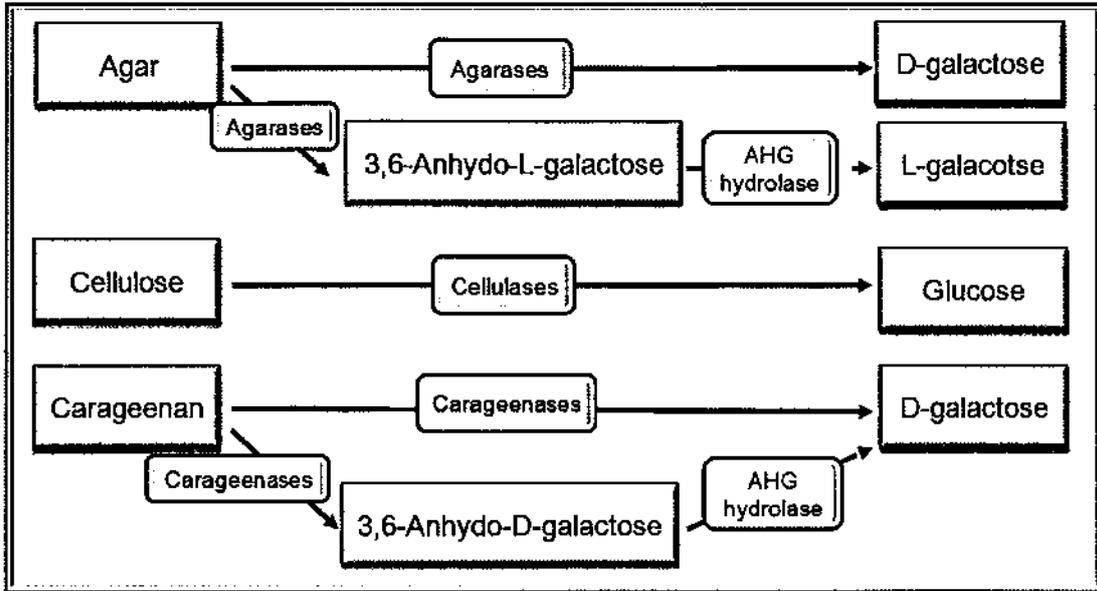
갈조류의 저장 탄수화물은 크게 두 종류로 구성되어 있는데 mannitol과 laminaran으로 구성되어 있다. Mannitol의 경우 수확시기에 따라 차이가 있지만 건 중량의 최대 6.8-15%까지 존재하며 laminaran은 glucose로 이루어져 있으며 0.5-3.7% 이상 존재한다고 알려져 있다.



[그림 1-2-4] 갈조류 구성성분별 생물학적 전환 과정 모식도

(2) 홍조류 분해효소의 개요

홍조류의 주요 구성산물은 agar와 carrageenan으로 구성된 갈락탄이다. 이것은 홍조류 탄수화물의 60%에 해당되며 20% 가량의 cellulose를 포함하고 있다.



[그림 1-2-5] 홍조류 구성성분별 생물학적 전환 과정 모식도

(3) 생물학적 전환 효소 개발 현황

신규 효소 ¹⁾	개발 효소 ²⁾	개량 효소 ³⁾
Glucuronic acid reductase (녹조류) AHG hydrolase (홍조류) Guluronic acid reductase (갈조류)	C-5 epimerase (갈조류) Pyrophosphorylase (갈조류)	Cellulase (공통) Glucuronase (녹조류) Xyloglucanase (녹조류) Alginate lyase (갈조류) Agarase (홍조류) Carageenase (홍조류)

- 1) 신규효소: 전 세계적으로 찾지 못한 효소로서 존재한다고 예측하고는 있으나 단백질 정제를 못하였거나 유전자를 찾지 못한 효소
- 2) 개발효소: 단백질에 대한 유전자 정보가 알려져 있지만 정확하게 활성을 규명하지 못하였거나 활성이 미약한 효소
- 3) 개량효소: 단백질에 대한 연구가 많이 이루어진 효소로 다른 자원으로부터 새로이 얻어야 하거나 개발된 것의 활성을 증진 시켜 사용하여야 하는 효소

(4) 신규 효소개발 방법

(가) 탄수화물 분해물 미생물의 스크리닝

해조류를 이용하여 성장하는 미생물들을 스크리닝하여 분해능을 갖는 미생물군들을 선별한다. 이를 토대로 해당 미생물을 순수 분리 및 배양 후 분해능이 갖는 미생물 군들을 재선별한다. 선별된 균주를 형태적, 배양적 특성과 16S rRNA gene sequence analysis와 API test(당대사)를 이용하여 동정한다. 활성을 증진시키기 위해 자외선이나 변이유발물질을 이용하여 돌연변이를 일으킨 후 adaptation을 시킨 후 분해능이 탁월한 균주를 최종 선별한다.

(나) 분해 효소의 분리 및 동정

선별한 미생물 균주를 이용하여 해조류를 분해하는 효소를 chromatography를 이용하여 분리·정제하여 서열 분석을 통해 효소를 동정하고 유전자 데이터베이스를 이용하여 알려진 효소와의 상동성을 확인한다. 또한 대량생산과 분리를 용이하기 위해 his-tag 단백질을 적절한 host를 이용하여 클로닝을 하여 발현여부를 확인한다.

(다) 효소 개량

효소의 활성을 증진시키기 위해 해당 단백질 구조를 규명하여 단백질의 특성을 파악하고 또한 유전자 reshuffling등의 방법을 통해 단백질의 특이성 및 활성을 개선시킨다.

(라) 효소 생산 및 공정

단백질의 생산을 극대화하기 위해 온도, pH, 배양시간을 최적화하여 단백질의 생산을 증진 시키고 pH, 온도, 반응시간을 조절하여 단백질의 최적 반응 조건을 결정한다. 또한 CBM(CBP) 및 익스팬신과 같은 보조단백질과 metal ion등의 보조인자들을 이용하여 반응성 증진을 시키고 RSM을 이용하여 효소들의 최적 농도를 결정하여 반응을 극대화시켜 탄수화물로부터 one-step 당화기술을 확보한다.

(5) 탄수화물 구성비 및 이론적 당화율

구분	탄수화물	위치	함유량 (DW기준)	주성분	발효성 전환효소	당화율
갈조류	alginate	세포벽	12-34%	mannuronate guluronate	guluronic acid reductase (glucose)	0% (12-34%)
	fucoidan	세포벽	8-15%	fucose	X	8-15%
	laminaran	저장 탄수화물	0.5-3.7% (max 11.6%)	glucose	X	0.5-3.7%
	mannitol	저장 탄수화물	6.8-15%	mannitol	X	6.8-15%
	cellulose	세포벽	trace	glucose	X	-
홍조류	carrageenan	세포벽	약 60%	galactose	AHG hydrolase	30% (60%)
	agaran			L-galactose		
	cellulosic fibril	세포벽	약 20%	glucose xylose mannose	X	20%

3. 부산물 활용 통합공정 기술

가. 정의 및 기술 개요

우리나라 연안에서 자생하는 곰피, 툯, 보라우무, 미역, 다시마, 매생이, 감태, 뜸부기, 파래 등 수십 종의 해조류로부터 항산화활성, 아질산염 억제활성, 염색제이상 억제효과, 항돌연변이 효과 등이 알려져 있다. 그러나 바이오에너지 개발을 위해 요구되는 발효성 당의 함량을 분석한 자료는 없으며, 산/알칼리 처리 공정 후 각 단계에서의 유용물질의 회수에 관한 자료 또한 전무한 상태이다. 따라서, 해조류의 구성성분 및 발효성 당 함량분석을 통하여 해양 바이오에너지 생산에 최적합한 해조류를 선정하고 공정과정의 개발과 더불어 각 단계에서 회수될 수 있는 유용물질의 분석 및 활용을 통한 통합기술을 말한다.

최근 의학의 발달과 생활환경의 개선에 의해 인간의 수명이 크게 연장됨에 따라 노화관련 질환의 예방과 치료를 위하여 천연식품에서 그 해법을 찾으려는 노력이 well-being 선풍과 맞물려 고조되고 있으며, 이러한 시대적 조류와 함께 식물체에 함유된 성분은 다양한 생리활성을 지닌다는 사실에 관심이 고조되면서 여러 분야에서 이들 순수 생리활성 성분을 이용하기도 하고 생리활성 성분이 포함된 식품과 약초 및 자생식물 등의 식물소재를 이용한 연구활동이 국내외적으로 활발히 진행되고 있다.

특히 육상식물에서 분리된 polyphenol 화합물들은 대사성질환들과 퇴행성

질환에 대한 예방효과가 있는 것으로 알려져 이들을 대상으로 한 건강기능성 식품과 의약품의 개발에 많은 연구가 진행되고 있으며, 포도주, 차, 커피 등의 음료와 여러 가지 과일과 야채는 polyphenol의 주요한 공급원이다. 그러나 현재 진행되고 있는 대부분의 연구는 육상식물의 polyphenol 화합물들이며, 막대한 자원의 보고인 해양으로부터 유래되는 polyphenol 화합물들의 생리활성에 관한 연구는 지극히 제한적이다. 식물체에 다량 함유되어 있는 다양한 형태의 polyphenol 화합물들은 항산화제로 작용함으로써 항염증성, 항암성, 항동맥성 등의 생리활성이 높은 것으로 알려져 이들의 소재개발이 국내외적으로 활발히 진행되고 있다.

2007년 현재 전세계적인 기능성식품 시장규모는 2000억 달러로써 이중 국내의 기능성식품시장은 3조 5천억 원대로 매년 5% 가량 증가하고 있는 추세이다. 특히 상위 5 항목 내에 식이섬유제품을 포함하고 있어 국내 해조류 유래 식이섬유 제품의 개발전망이 높다.

미국 DRI보고서는 1997년 16억 달러이던 해양 및 생물농업 시장규모를 2013년에는 126억 달러로 성장할 것으로 전망하고 있다. 그러나 현재 미국에서 연구 중인 항암제의 절반이상이 해양신물질이란 점을 고려하면 해양 자원을 이용한 기능성식품의 개발에 대한 전망은 높게 평가된다.

곰피와 감태는 갈조식물 다시마목 미역과의 다년생 해조류로써 우리나라의 동해와 남해의 특산물로 무기질을 풍부히 함유하고 있으며 약간 뚱은 맛이 인기가 좋아 예로부터 식용으로 이용되어 왔다. 곰피는 부영양화가 지속되는 지역에서의 해중립 조성을 통한 오염원 제거 등으로 활용 가능하므로 농림수산식품부에서는 해중립사업의 주요한 해조류로 곰피를 평가하고 있다. 다년생의 동해·남부해안 특산으로서 영남지방 근해에 분포하였으나 서식지가 점점 북상하여 현재는 남해안, 포항 근처까지 분포하며, 1년생 해조류와 달리 연중 광합성을 하며 바다의 숲 역할을 하는 연안 생태계의 중요한 일차 생산자이다. 최근 곰피와 감태 중에는 phlorotannin 계 화합물이 풍부하게 함유되어 있으며, 이들에 관한 기능성 연구가 활발히 진행되고 있다.

나. 갈조류에 함유되어 있는 플로로탄닌류의 생리 기능성에 대한 연구

(1) 항산화 효과

곰피 또는 감태 추출물에서 phloroglucinol, eckstolonol, dieckol, eckol, phlorofucofuroeckol 및 triphloroethol-A의 5종의 phlorotannins가 분리되어 이에 대한 항산화 효과가 알려졌으며, 감태에서 분리된 triphloroethol-A가 γ -선에 의한

세포보호효과는 ROS 감소에 의한 미토콘드리아의 산화적 손상을 감소시킴으로서 나타난다.

감태로부터 분리된 eckol과 phloroglucinol을 산화제를 처리한 폐 상피세포에 처리한 결과 catalase 활성증가와 더불어 ERK와 NF- κ B의 활성을 변화시킴으로써 세포보호 효과를 나타내는 것으로 보고되고 있다.

곰피, 감태 등의 갈조류의 주요 화합물인 eckol과 dieckol, eckstolonol과 phlorofucofuroeckol A는 L-ascorbic acid보다 훨씬 높은 항산화성을 나타내었으며, 이러한 화합물들은 항노화 기능성 식품개발을 위한 소재로 활용가능하다.

(2) 항암효과

플로로탄닌류를 다량 함유하고 있는 감태(*Ecklonia cava*)에 관한 연구로는, 감태추출물이 상피세포에 있어 암전이 관련 효소인 metalloproteinase (MMP)-2와 -9의 발현을 억제하는 것으로 알려졌으며, 효소분획물 또한 항산화 및 암세포 사멸 효과가 있음이 보고되고 있지만, 구체적인 세포내 분자 기전에 대한 연구는 아직 이루어 지지 않고 있는 실정이다.

감태로부터 분리된 eckol과 dieckol을 폐 상피세포에 처리한 결과 NF- κ B와 AP-1 전사활성을 변화시켰으며, MMP-1의 활성저해효과가 뛰어난 것으로 판명됨으로써 산화적 스트레스에 의해 손상된 피부세포 보호효과가 우수한 것으로 평가되었다.

감태로부터 분리된 phlorotannin의 일종인 triphloroethol-A는 γ -선에 의해 손상된 피부세포에 처리한 결과 ROS 감소에 의한 mitochondria의 산화적 손상을 감소시킴으로써 피부보호효과는 나타난다.

(3) 기타 효과

해조류를 대상으로 한 생리활성연구는 대부분이 동물실험을 통한 혈청지질 및 cholesterol 개선효과, 비만방지효과, 항산화효과 등이 있으며, 해조올리고당의 항산화와 항염증효과, 황산다당류의 암세포사멸효과 등이 세포 및 동물실험을 통하여 연구되어 있다.

다. 해조다당류의 기능성 연구현황

최근 해조류의 약리효과가 규명됨으로써 해조 다당류의 기능성에 대한 연구가 활발히 진행 중이며 일본 동경대학, 미국 오레곤주립대, 대만대학 등에서 갈조류의 약리효과를 규명하기 위하여 알긴산과 포르피란을 분리하여 항암, 항콜레스테롤, 항당뇨 및 면역조절기능에 관한 연구를, 이태리의 POLYtech 연구소에서 히알론산의 항암, 항콜레스테롤 효과, 약물전달매체로서의 역할에 대한 연구를 수행하고 있다. 그리고 일본 전매청, 히로시마대학, 프랑스의 Bioquimica 연구소 등에서는 한천을 분해시키는 agarase 생산 미생물에 관한 연구를, 일본의 미에대학과 큐슈대학, 캐나다의 퀘벡대학에서는 알긴산 분해효소 생산 미생물에 관한 연구를 수행하고 있으며 주로 효소의 특성연구에만 국한된 상태이다. 그리고 전 세계적으로 보았을 때, 해당기술 분야에서 해조류 분해효소를 생산하는 미생물분리법과 분해효소의 발효조건은 개발되어 있으나, 효소에 의한 올리고당의 대량 생산은 문제가 있어 이를 해결하기 위해 고효율성의 효소를 대량 생산하기 위한 해양미생물 분리연구가 진행 중이다.

해양 다당류는 동물사료, 생화학적 전환과정의 기질 또는 생산공정의 원료로써 사용되는 양이 점차 늘고 있어 중요한 재생자원으로 부각되고 있다. 해조다당류는 food thicker로서 식품산업에 중요한 역할을 하고 있다. 이 외에 마요네즈 안정제, 초콜렛 밀크 등의 부유제, 가공육의 swe안정ing agent로 사용되고 있다. 해조 다당류는 의약산업에도 다양하게 응용되고 있는데 chitosan은 투석시 blood plasma expanders로, alg 밀크te는 위벽보호제로, agar는 하제로 사용되고 그 외에도 유화제 또는 연고에도 이용되고 있다. 이러한 용도는 고분자의 해조다당류가 지니고 있는 물성을 이용한 것이다.

해양으로부터 얻는 다양한 산업용 소재의 부가가치는 많은 차이가 있다. 예로서 식품용 agar는 kg당 15달러 수준이나 미생물배양용 agar는 100-200 달러, agar로부터 추출한 전기영동용 고품질 agarose는 kg당 400달러가 넘는다. 면역반응 등에 사용되는 색소인 phycobiliprotein은 1 kg당 7,500만불이라는 초고가로 Cyanotech사에서 판매되고 있기도 하다. 따라서 고부가가치의 상품을 개발하기 위하여 해양생물공학 기술개발이 필요하다.

해조다당류에 관한 국내의 연구는 주로 대학 및 산업계에서 식품첨가물 또는 건강식품용으로 해양 바이오 폴리머가 연구되었다. 또한, 생명공학연구소를 중심으로 국가 연구기관에서도 생분해성 바이오폴리머에 대한 연구를 지속적으로 수행하였으며, 최근에는 일부 벤처 업체에서 바이오 폴리머를 고부가가치성 식품 및 의약품 소재로 연구개발하고 있다.

최근에 해양 유래 바이오폴리머와 관련된 연구가 학계 및 업계를 중심으로 활발히 진행되고 있으며, 이의 결과로 생리기능성 식품소재 저분자 폴리만유로네이트의 제조방법과 이를 이용한 건강보조식품, 건강식품음료, 라면 및 식빵, 다이어트 식품의 제조방법 등이 다각적으로 보고되고 있다.

이와 같이 해양 유래 바이오폴리머는 산업 전반에서 기능성 소재로 이용되고 있는 천연 고분자물질이다. 그러나 해조다당류를 바이오에너지 자원으로 활용하는 단계에서 파생되는 비발효성 당류의 활용을 위한 대체기술이 필요하다. 즉, 비발효성 당류의 중합기술을 개발함으로써 중합체의 생리활성을 규명함으로써 산업적 용도를 넓힐 수 있다.

라. 해조류의 구성성분과 고부가가치화를 위한 기능성 분석

해조류는 바닷물 속에서 생육하는 은화식물의 총칭으로 녹조류, 갈조류 및 홍조류로 대별된다. 현재 우리나라에 서식하고 있는 해조류의 종류는 약 700여종이며 그 중에 홍조류(489종류)가 가장 많고 다음이 갈조류(166종류), 녹조류(98종류) 순이다. 우리나라뿐만 아니라 전 세계적으로 널리 분포하고 있으며 많은 종류가 식용되고 있으나 거의 대부분이 비소화성 복합다당류로 이루어져 산이나 알칼리에도 비교적 안정하고 특수한 소화효소에 의하지 않고는 분해되기 어렵다.

유럽에서는 해양생물학 전반에 걸친 기초가 튼튼하며 해양생명공학 발전 및 공동연구 증진을 위해 1995년에 European Society for Marine Biotechnology를 설립하였고, 해조류 다당류 분해효소는 프랑스, 해조다당류의 개량을 위한 수식기술@r 태리가 기술적인 우위에 있으며, 미국에서Euro 다당류 이용에 관한 연구는 낮@r수준이증진을 는 미국인의 식생활이 해조류를 섭취하지 않은 식습관 때문인 것으로 판단된다.

해조류를 이용한 기능성 식품의 개발은 단연 일본이 선점하고 있다. 일본에서의 해조류 유래 식·의약 제품으로, 다양한 종류의 해조류를 원료로 암 예방효과가 있는 드링크류, 다이어트용 드링크와 스넥류, 면역증강용 스넥류, 비만방지에 효과가 있는 마요네즈 등 많은 기능성 제품들이 시판되고 있는 실정이다.

비타민, 무기질 및 미량원소의 공급원으로서 식용가치가 높으며 사료, 비료, 의약품, 식품첨가물 등의 제조 원료에 이르기까지 해조류의 이용률이 확산되고 있다. 특히 다른 해양생물에 비해 무한한 생산 잠재력을 지니고 있어 그 이용가치는 더 높아지고 있다고 볼 수 있다. 미역, 다시마, 감태 등의 해조류는 식용으로 이용이 가능하며, 이들로부터 유래된 polyphenol, 다당류, vitamin E, 불포화지방산 등의 이용은 이미 활성화 되고 있다.

따라서 해조류에 의한 기능성 식품 개발 및 신약, 식품의약의 개발의 가능성은 충분한 잠재력을 가지며 해조류의 다양성, 생리활성 검색의 다양화, 산업화의 다양화가 함께 어우러진다면 해조류 유래 기능성 물질의 개발은 충분한 잠재력과 세계적인 경쟁력을 갖춘 연구가 될 수 있다.

우리나라 연안에서 자생하는 곰피, 툫, 보라우무, 미역, 다시마, 매생이, 감태, 뜰부기, 파래 등 수십 종의 해조류로부터 항산화활성, 아질산염 억제활성, 염색체이상 억제효과, 항돌연변이 효과 등이 알려져 있다. 그러나 바이오에너지 개발을 위해 요구되는 발효성 당의 함량을 분석한 자료는 없으며, 산/알칼리 처리 공정 후 각 단계에서의 유용물질의 회수에 관한 자료 또한 전무한 상태이다.

따라서, 해조류의 구성성분 및 발효성 당 함량분석을 통하여 해양바이오 에너지 생산에 최적합한 해조류를 선정하고 공정과정의 개발과 더불어 각 단계에서 회수될 수 있는 유용물질의 분석 및 활용 방안 모색이 병행되어야 한다.

마. 해조류 유래의 기능성 물질

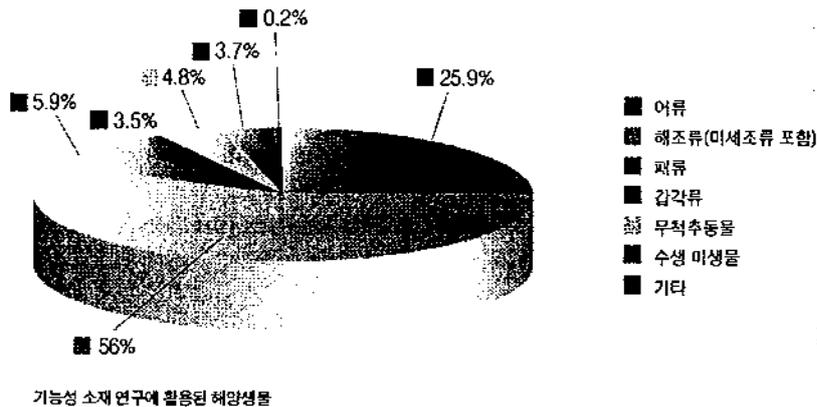
해양생물로부터 기능성 물질을 탐색하고 활용하고자 하는 연구는 1970년대 후반부터 시작되었으며, 지금까지의 연구결과 육상생물에서는 알려지지 않았던 새로운 화합물들이 다수 존재한다는 것이 밝혀짐에 따라 해양이 생물신소재의 보고로 집중 부각되고 있다.

해양생물은 육상생물과는 서식환경이 매우 상이하기 때문에 유전적으로 특이성을 갖도록 진화되었고, 이로 인해 육상생물에 비해 매우 다른 환경 적응과 이에 따른 세포내 대사과정의 차이로 인하여 대사산물의 차이가 매우 클포내 대사기대 되어 왔다. 뿐만 아니라, 지구서식 생물 중 80%를 차지하는 해양생물 종과 막대한 자원량이 파악되고 있어, 향후 육상 생물자원을 대체할 중요한 기능성 소재자원으로 주목받고 있다.

(1) 기능성 소재 탐색을 위한 해양 조류들

해조류(거대조류)는 함유하고 있는 색소에 따라 녹조류, 갈조류, 홍조류로 나뉘는데, 해양에 대량으로 존재하고 있으며 주변의 생물들에게 양분 공급, 파도로부터 보호, 은신처, 부착기질로서 영향을 준다. 또한 얕은 바다에 많고 채집이 쉬워 예전부터 많은 연구가 이루어져 왔다.

녹조류의 종류로는 가시파래, 홑파래, 모란갈파래, 설파래, 참홀파래, 청각, 청태 등이 있으며, 갈조류는 미역, 다시마, 모자반, 툫, 대황 등이 있고, 홍조류는 김, 우뚝가사리, 불등가사리, 풋가사리, 카라니긴 등이 있다.



[그림 1-2-6] 기능성 소재 연구에 활용된 해양생물

해양미세조류는 크기가 작지만 해양의 1차 생산자로서 하부영양단계에서 매우 중요한 역할을 담당하고 있다. 전 세계적으로 10,000여 종 이상의 식물플랑크톤이 알려져 있으며, 기능성 소재연구는 주로 녹조류, 남세균과 쌍편모조류에서 집중적으로 수행되었고, 요즘 들어서는 식물성 플랑크톤 자체를 기능성 식품화 및 소재로 활용하고 있다.

(2) 해조류 유래의 대표적 기능성 소재

현재까지 연구되어진 해양생물 유래 기능성 소재는 펩티드류가 전체의 50%로 가장 많이 차지하고 있으며, 다당류(뮤코 다당류), 올리고당, 식이섬유, 지질소재, 비타민류, 폴리페놀 및 클로렐라, 스피롤리나 등의 소재가 최근 기능성 소재로 주목받고 있다.

해조류 유래 산성다당류인 푸코이단을 비롯하여 식이섬유들은 일본, 미국, 유럽 등 선진국의 경우 많은 연구가 수행되어 이미 시판 중에 있다. 특히, 다시마 또는 미역으로부터 제조한 푸코이단은 항종양, 면역부활 및 항혈액응고 활성 등 다양한 기능성이 소개되었다. 감태로부터의 polyphenol 성분은 미백효과를 나타내며 화장품 소재로서 활용되고 있다.

그러나 이들 소재의 고순도 분리 정제 및 대량 생산기술이 아직 초보적 수준에 있어 보다 고부가가치 소재화로의 연구개발이 시급한 실정이다.

해조로부터 추출된 다당류에는 갈조류의 fucoidan과 홍조류의 carrageenan 같은 면역체계에 영향을 미치는 것이 많으며, 김으로부터 열수 또는 묽은 염산에서 추출되어지는 porphyran을 많이 함유한 획분에서도 쥐의 macrophage를 활성화하

는 작용이 알려져 있다. 김에 함유되어 있는 porphyran은 산성다당으로 1,4 위치에 결합하는 α-L-galactose-황산잔기가 면역부활 물질로서의 생물학적 활성 기능을 갖는다고 보고되고 있다.

갈조류인 다시마, 모자반, 팽생이모자반, 짝잎모자반의 황산다당이나 녹조류인 청각의 glucuronic sulfate도 항암효과가 있다. 다시마 *Laminaria japonica*와 그 근연종인 *L. chotensis*, *L. angustata*, 대황 *Eisenia bicylis*, 감태 *Ecklonia cava*에서 추출한 조(粗)fucoidan도 백혈병 암세포를 집중시킨 마우스의 생명을 25% 이상이나 연장시켰다.

바. 보고된 해조류의 구성성분 분석기능성 유효 물질 분석

(1) 거대 해조류의 구성성분

(단위 : mg/100g)

구분	수분	단백질	지질	당질	섬유	회분
김	11.1	38.8	1.9	39.5	1.8	6.9
미역	13.0	15.0	3.2	35.3	2.7	30.8
다시마	9.5	8.2	1.2	58.2	3.3	19.6
툇	13.6	13.6	1.3	47.0	9.2	18.3

(2) 단백질과 아미노산

(단위 : mg/100g)

구분	김	미역	다시마	툇	구분	김	미역	다시마	툇
Ile	1500	200	280	480	Val	2400	260	390	580
Leu	2700	350	520	800	His	540	80	140	160
Lys	1900	240	360	360	Arg	2100	210	270	430
Met	840	95	140	260	Ala	4200	280	580	630
Cys	640	48	180	180	Asp	3400	390	1000	1000
Phe	1400	210	320	480	Glu	4200	440	1700	1200
Tye	1200	99	160	240	Gly	2200	240	400	530
Thr	1800	180	350	470	Pro	1500	170	420	430
Trp	480	59	94	120	Ser	1500	160	310	420

(3) 지질과 지방산

해조류에는 EPA(eicosapentaenoic acid)와 DHA(docosahexaenoic acid)가 다량 함유되어 있어 섭취하면 혈관 확장, 혈소판 응집 저하, 혈관의 투과성 항진 작용을 갖는 홀수 계열의 prostaglandin을 증가시켜 반대 작용을 하는 thromboxane를 감소시키는 효과를 나타낸다.

(4) 탄수화물과 다당류

- 단당(기본구성): 과당, 포도당.
- 이당(2분자): 맥아당, 설탕, 유당.
- 다당: 2~10개의 당 결합체인 소당 이상의 결합체.
- 다당류(단당류+단당류): 알긴산, 카라기난, 한천, 후코이단, 라미나란 등.
- 탄수화물: 생체기능의 3대 영양소, 당질(에너지원으로 이용 가능), 식이섬유(비 영양소이면서 생리 효과), 다당류(가장 유용).

해조류	미역	다시마	북
알긴산 함유량(%)	27.1~28.8	17.1~22.6	20.2~20.5

(5) 식이 섬유

- 불용성 식이섬유(IDF): cellulose, mannam, Xylan 등 세포막 구조물질.
- 수용성 식이섬유(SDF): 수용성 pectin질, 해조 다당류 등 세포간질.

(6) 무기 성분

구분	생리작용	결핍증	구분	생리작용	결핍증
Na	세포 외 액의 삼투압 조절, 신경 흥분 전달	식욕 감퇴, 피곤	P	뼈, 치아성분핵산, 인지질 구성 성분	뼈, 치아 약화
K	세포 외 액의 삼투압 조절, 신경 흥분 전달	근 무력증, 신경 장애.	Fe	산소운반 빈혈방지 전자전달	빈혈, 무력감
Ca	뼈, 치아 성분, 혈액 응고, 근육 수축	성장 저해. 뼈,치아의 약화. 신경 과민	Zn	몸의 PH 균형 유지	
Mg	뼈, 치아성분 energy 생산	근육 마비. 신경 착란	I	갑상성 호르몬 생성체 증가	체중 증가 체중 감소

(7) 비타민

구분	A(IU)	B1(mg)	B2(mg)	나이아신(mg)	C(mg)
김	16,000	1.29	3.83	11.0	112.5
미역	2,100	0.34	1.32	9.2	17.2
다시마	940	0.45	0.68	2.8	11.3
툰	360	0.01	0.16	2.1	-

사. 보고된 해조류의 기능성 유효 물질 분석

(1) 김

생리활성	기능성 성분		
노화 방지 개선	β-카로틴, 요소, 망간, 비타민-E, 비타민-C, 식이 섬유, n-3계 및 n-6계 다가 불포화 지방산.		
피부장애 방지개선	탄닌계, 자외선 흡수 물질, 아연, β-카로틴		
콜레스테롤 저하	식이섬유(알긴산, 유산다당), 푸코스테롤 요소		
고혈압 저하	식이섬유 라미닌 (아미노산의 일종), EPA 외 n-3계의 다가불포화지방산		
동맥경화 예방개선	푸코스테롤, 인, 푸코이단, EPA외 n-3계의 다가 불포화 지방산		
항 암	β-카로틴, 인지질, 당지질, EPA외 n-3계의 다가 불포화 지방산		
골다공증 예방개선	칼슘	정장 작용	식이섬유, 해조다당류
당뇨병 예방개선	식이 섬유 단백질	시력 장애 예방	β-카로틴, 타우린
항 지방 간	콜린	빈혈 예방 개선	철, B12
성 기능 장애 예방	세렌, 아연, 비타민-E	담석증 예방개선	식이섬유(푸노단), 타우린
위장염 예방개선	식이섬유(알긴산, 카라기닌)		
심근경색 뇌근경색 예방개선	타우린, 푸코스테롤 인, EPA외 n-3계의 다가 불포화 지방산		
※ 김은 아미노산과 단백질의 함량이 가장 높은 식품이다. 타우린 함량 : 시판 드링크 - 1,000 mg/ 100g 김 - 1,279 mg/ 100g			

(2) 미역

생리활성	기능성 성분
발암의 억제	미역, 다시마 100g 중에는 포코스테롤이 21g 함유 (푸코스테롤은 지금까지 알려진 발암 억제 물질 중 가장 높은 부류에 속함)
고혈압, 동맥 경화 예방 치유	칼슘(나트륨을 배설시키는 역할로 혈압을 강하시킴)
산후 조리	칼슘, 요오드, 철, 망간, 인 등 미량 원소(피를 맑게 하고 수유를 많이 함), 만니톨(자궁 수축 작용)
어린이 성장 발육 촉진	칼슘(우유의 3배)
변비, 정장 효과	섬유질
IQ 및 미용 효과 갑상선 장애 방지 산후 자궁 수축과 지혈	요오드(갑상선 호르몬에 작용하여 신진대사를 촉진시키는 역할로 지능발달을 돕고, 머리카락 및 피부를 활성화시킴)
비만 억제	각종 미량 원소(Na, K, Ca, Mg, P, Fe, Zn, I), 물을 많이 흡수하고 있다.
체내 오염물질(중금속) 배출, 식이섬유에 의한 LDL-콜레스테롤 억제	알긴산(점질성 다당류)
염분을 소변으로 배출	칼륨
발암의 방어인자 포함	셀레늄(se)

(3) 다시마

기능성 성분	생리활성
요오드	체내의 대사를 활발하게 하고 심신을 건강하게 한다
라미닌	혈압저하
알긴산(식이섬유)	콜레스테롤 저하, 정자활동 증가, 배설활동 촉진, 혈압조절
식이섬유(Dietary Fiber)	장의 연동운동, 배설작용 촉진, 당, 지방의 흡수를 지연시킴 담즙산과 콜레스테롤을 흡착, 배출하여 혈중 콜레스테롤 저하
칼슘(Ca)	뼈 강화
섬유질	소화기관 및 장내 영양분의 흡수를 조절 장내 지방, 콜레스테롤, 과다한 염분, 중금속, 발암물질, 숙변 등의 노폐물을 신속히 몸 밖으로 배설하는 작용
라미닌(아미노산)	혈압 저하
칼륨	나트륨 배설을 촉진, 혈압을 낮춤, 숙취 예방 효과
아연	신진대사 촉진

(4) 톳

기능성 성분	생리활성
비타민 A, β-카로틴, 비타민 B1-2, 비타민C, 니아신. β-카로틴 (100g 중 0.2mg)	노화 방지
미네랄	신진 대사 활성화, 모발의 영양 공급 및 미용 효과
칼슘(철분, 인, 회분, 단백질)	성장기 아동 및 임산부의 뼈 성장과 골다공증 예방

(5) 스피루리나 (미세조류)

(가) 구성성분

18종의 단백질, 13종의 비타민, 14종의 미네랄 염류소, 감마리놀레익산 GLA, 항산화제 SOD, 다당류, 섬유질 등의 영양원소가 균형 있게 함유되어 있다.

(나) 기능성 성분

- 철분과 철분 흡수를 도와주는 활성 물질: 빈혈 예방
- 비타민B12: 악성 빈혈 예방
- 감마리놀렌산: 아토피성 체질 개선
- 칼슘과 칼슘 흡수에 도움을 주는 비타민 K: 골다공증 예방과 개선
- 아미노산 조성이 균형 잡힌 양질의 단백질과 항산화 활성 물질: 간 기능 보호
- 비타민과 각종 미네랄 및 항산화 물질: 간세포 재생에 효과
- 베타카로틴, 제이크산틴 등 각종 항산화 활성 카로티노이드: 암 발생 예방
- 카로틴과 핵산: 활성산소를 무해화, 노화를 지연
- 비타민12와 철분은 혈액속의 적혈구를 증가
- 염류소: 강력한 살균작용, 심장기능 강화, 변비 해소작용, 빈혈의 예방 및 치료

아. 해조류의 생리 활성과 주요 기능성 성분 - 종합

효 용	성 분	주된 해조류
콜레스테롤 저하	식이섬유(알긴산, 유산다당) 푸코스테롤요소	다시마, 미역, 김, 우뭇가사리, 모자반, 팽생이모자반, 참풀가사리
고혈압 저하	식이섬유(알긴산, 유산다당) 라미닌(아미노산일종) EPA와 n-3계 다가불포화지방산	
동맥경화 예방개선	푸코스테롤인 푸코이단 EPA와 n-3계 다가불포화지방산	
갑상선종 예방개선	요소	다시마, 미역
항 압	식이섬유(알긴산, 유산다당), β -카로틴, 인지질, 당지질 EPA와 n-3계 다가불포화지방산	다시마, 미역, 김, 모자반, 팽생이모자반, 팔손이풀
골다공증 예방개선	칼슘	툃, 미역, 다시마, 김
당뇨병 예방개선	식이섬유(알긴산, 유산다당), 단백질	다시마, 미역, 김, 개우무
심근및뇌 경색 예방개선	EPA와 n-3계 다가불포화지방산, 타우린, 푸코스테로인.	미역, 김, 다시마
빈혈 예방개선	철, B12	다시마, 미역, 툃, 김
노화 방지개선	β -카로틴, n-3계 및 n-6 다가불포화지방산, 요소, 망간, 비타민E, 비타민C, 식이섬유	미역, 다시마, 툃, 팔손이풀, 김외 식용해조
피부장해 방지개선	탄닌계, 자외선흡수물질 β -카로틴, 아연	툃, 김, 모자반, 팽생이모자반
정장작용	식이섬유(해조다당)	미역, 다시마, 김외의 식용해조
시력장해 예방개선	β -카로틴, 타우린	김, 파래
성기능장해 예방개선	세렌, 아연, 비타민E	김, 팔손이풀
위장염 예방개선	식이섬유(알긴산, 카라기난)	미역, 다시마, 우뭇가사리, 김
담석증 예방개선	식이섬유(푸노란), 타우린	참풀가사리, 김
항지방간	콜린	김

4. 당화 플랫폼

가. 정의 및 기술 개요

약 40,000종의 많은 종류가 알려져 있는 해양조류는 매우 다양한 특성을 지닌 생물군으로 구성되어 있고, 해양조류 유래의 유용물질은 가장 잘 알려진 건강보조식품 외에도 천연색소, 의약품 물질, 생화학물질, 사료 등으로 다양하며 최근 바이오에너지 생산을 위한 자원으로 검토되고 있다. 해양 바이오매스를 미생물이 발효하기에 적합한 당으로 전환하는 전처리/당화공정을 통해 확보된 당류를 미생물 발효를 통하여 바이오에탄올, 바이오부탄올과 같은 바이오알코올 연료를 생산하고 이를 수송연료 품질기준에 적합하게 분리/정제하는 공정을 당화 플랫폼 기반 바이오연료 생산기술이라 한다.

- 바이오에탄올 생산기술: 해양 바이오매스의 당화산물을 에탄올 생산 미생물의 발효 탄소원으로 활용하여 에탄올을 생산하고 연료유 수준의 물성을 지니도록 정제하는 기술.
- 바이오부탄올 생산기술: 바이오에탄올 발효와 동일한 해양 바이오매스 당화산물을 탄소원으로 사용하지만 발효과정에 부탄올을 생산하는 미생물을 활용함으로써 부탄올을 생산하고 연료유 수준의 물성이 되도록 정제하는 기술.

나. 바이오에탄올 생산기술

2000년 초반 고유가가 시작된 이후로 전 세계적으로 수송용 바이오연료 생산이 폭발적으로 급증하고 있다. 수송용 바이오연료 중에서도 상업적 발효 공정이 개발된 바이오에탄올 생산이 급증하였는데, 국제적으로 미국, 브라질, 캐나다, 스웨덴 등에서 바이오에탄올을 자동차 연료로서 사용되고 있으며, 중국, 호주, 일본 등에서도 적극적으로 에탄올 사용을 도입하고 확대하는 움직임을 보이고 있다. 2005년 에탄올의 총생산량은 460억 리터이며 각국 생산현황은 미국과 브라질이 167억과 166억 리터로 전체의 약 72%를 점하고 있으며 다음으로 중국이 38억 리터, 인도가 17억 리터, 러시아가 7.5 억 리터, EU 각국의 합계는 30억 리터, 일본은 1.1억 리터이다. 2012년에는 바이오에탄올 생산량이 650 억 리터로 현재의 1.7배로 증가될 것으로 예상된다.

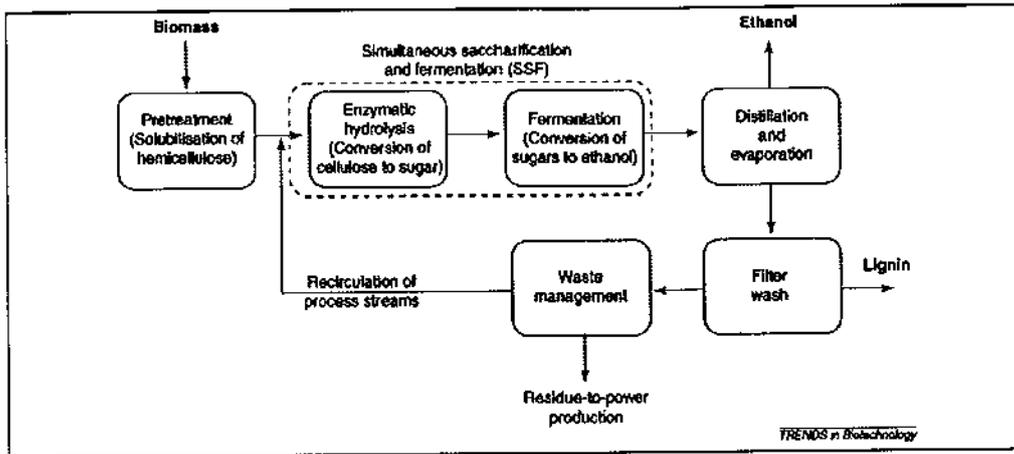
바이오에탄올 생산은 사탕수수, 옥수수, 사탕무와 밀 등 당질계 및 전분질계 식용 작물로부터 생산될 수 있으며, 현재 가동 중인 모든 상용화된 공정은 이들 원

료를 사용하고 있다. 미국의 경우 옥수수 전분을 원료로 하여 바이오에탄올을 생산하고 있으며 브라질의 경우 사탕수수를 이용하여 바이오에탄올을 생산하고 있다. 하지만, 상당수의 인류가 식량난에 허덕이고 있고 특히 경작면적이 적은 우리나라에서 식량자원을 에너지원으로 이용하는 것은 적절하지 못하며, 앞으로 급속하게 증가하게 될 수송용 에탄올의 수요량을 충족시키기 위해서는 안정적인 바이오에너지 원료원이 될 수 있는 비식용 바이오매스를 활용한 에탄올을 생성하는 것이 필요하다.

바이오에탄올 생산은 생물공정을 이용한 연료 및 화학물질의 연구에 관련되어 미국 및 브라질을 중심으로 많은 연구되고 있으며, 미국, 브라질, 프랑스에서는 저분해질 에탄올연료와 목질계 에탄올 연료에 관한 연구가 각각 상용화단계, 개발연구단계에 있다. DOE Biofuels program은 국립 신재생 에너지 연구소(NREL; National Renewable Energy Laboratory)를 중심으로 섬유소계 바이오매스로부터 에탄올을 비롯한 대체 에너지원의 생산을 위한 기초연구와 pilot plant를 통한 상용화 기술을 개발 중이다.

일본의 경우, 당을 알코올로 변환할 때 효율성을 대폭 향상시킨 미생물을 개발하고 셀룰로오스와 헤미셀룰로오스를 당으로 변환시키는 과정에서 생성되는 발효 저해 물질을 현저히 감소시키는 RITE-HONDA 프로세스를 개발하는데 성공했다고 보고되고 있다.

미국의 경우, 생산되는 모든 옥수수 전량을 바이오에탄올 생산 원료로 사용하더라도 미국 휘발유 수요의 20%만 대체 가능하다. 즉, 늘어나는 수송용 바이오연료 수요를 충당하기 위해서는 목질계 바이오매스 및 유기성 폐기물을 이용한 바이오연료 생산이 필수적이다. 하지만, 섬유소계 또는 목질계 바이오매스를 원료로 사용하기 위해서는 전처리와 당화 과정이 선행되어야 하는데, 여기에서 효과적인 전처리 기술 개발과 전처리시 생성되는 미생물 성장 저해 물질 제거 기술 등이 요구되어진다. 또한, 유기성 폐기물을 이용한 에탄올 생산은 식용 작물로부터의 에탄올 생산보다 기술 개발이 어렵고, 생산 수율도 떨어지는 등 여러 공정 인자들이 개선되어야 경제적 바이오연료 생산이 가능하다.



[그림 1-2-7] 바이오매스로부터 에탄올 생산 공정 개요

에탄올 발효공정은 일반적인 자당(sucrose)나 전분(starch)를 기본으로 하는 공정과 비교하여 해양 바이오매스나 유기성폐기물을 이용하는 공정은 여러 가지 당분의 혼합물이 전처리 및 분해과정에서 나온 발효저해물질(저분자 유기산, 푸란 유도체, 페놀 및 무기물)등과 공존하고 있어서 에탄올 생산 공정에서 주의를 요한다.

일반적으로 에탄올 발효는 분리당화발효공정(separate hydrolysis and fermentation, SHF)과 동시당화발효공정(simultaneous saccharification and fermentation, SSF)로 나누어지게 된다. 분리당화발효공정은 당화공정(saccharification)과 에탄올발효(ethanol fermentation)공정을 각각 다른 반응기에서 수행하는 것으로 당화과정과 발효과정 각각에 반응하는 효소와 에탄올발효미생물에 최적의 조건에서 반응시킬 수 있다는 장점이 있다. 하지만 분리당화발효공정은 당화공정과 발효공정을 따로 하여 당화공정에서의 셀룰라아제의 중간생성물과 최종생성물인 셀로바이오스와 포도당의 반응기내에 축적됨에 따라 효소의 활성도에 inhibition에 따른 문제로 인해 반응이 종결된다는 단점이 있다. 이를 위해서는 셀로바이오스를 분해하는 β -glucosidase를 추가적으로 주입하는 방법과 효소의 농도를 높게 하는 방법, 그리고 반응기에 분리막을 설치하여 glucose를 제거하는 방법들을 사용하였으나, 이는 공정의 비용이 비싸기 때문에 경제적이지 않다.

하지만 동시당화공정은 당화공정과 발효공정을 동시에 함으로써 효소가 바이오매스를 당화시켜 단당류가 생성되면, 에탄올 발효미생물이 생성된 당을 사용하여 에탄올을 생산하게 되어 반응기에 글루코오스의 축적을 최소화 할 수 있다. 동시당화발효공정과 이상발효공정을 비교하였을 때 이점들은 ① 셀룰라아제의 활성도가 저해되지 않으므로 효율이 증가하며, ② 효소사용량이 낮고, ③ 최종산물로의 전환 효율이 높으며, ④ 생산된 글루코오스를 바로 에탄올로 전환되기 때문에 이에

따른 멸균의 필요도가 적고, ⑤ 반응시간이 짧으며 그리고 ⑥개의 반응기를 사용하기 때문에 반응기의 사이즈가 작아진다는 것들이 있다.

그러나 동시당화발효공정의 경우 몇 가지 문제점들을 수반하게 된다. 첫 번째로는 온도에 따른 문제점으로써, 당화효소와 에탄올생산 미생물의 최적온도가 다르다는 점이다. 당화효소의 경우 45-50 °C의 온도에서 최적의 활성도를 나타내며, 에탄올생산 미생물의 경우 30 °C에서 최적의 활성도를 나타내므로, 온도제어에 따른 공정의 문제점을 수반하게 된다. 이러한 문제점을 해결하기 위해 동시당화발효공정의 온도를 약 38°C로 하여 당화와 발효의 반응에 관여하는 효소 및 미생물에 저해가 없도록 하여 *T. reesei*와 *S. cerevisiae*를 이용하여 연구가 진행되었으며, *Kluyveromyces marxianus*와 *K. fragilis*를 이용하여 약 42 °C에서 실험하여 0.5 g ethanol/g cellulose를 생산한 결과도 보고되고 있다. 이러한 온도에 대한 문제점의 해결책 중 하나로써 에탄올생산 미생물의 형질을 개량하여 고온내성 에탄올생산 미생물을 만드는 연구가 시도되었다.

두 번째 문제점으로는 생산되는 에탄올로 인해 에탄올생산 미생물과 당화효소의 활성도에 저해를 준다는 점이다. 이러한 문제는 생산되는 반응기에서 바로 분리(separation)하는 방법으로 처리 가능하며, 이러한 방법은 에탄올 추출과도 연계된다. 몇 가지 방법들이 공정에서 사용되고 있으며, 그 중의 하나의 방법으로 gas stripping 방법이 있다. 이는 공정에 지속적으로 가스를 주입하여, 휘발성이 높은 에탄올을 반응기 밖으로 추출 후 콘덴서를 연결하여 이를 포집하는 방법으로 이를 이용하여 에탄올을 반응기에서 분리하여, 미생물 및 효소의 활성도에 저해를 없애도록 한다. 또한 효소 및 에탄올생산 미생물에 에탄올 내성 형질을 개량시키는 연구와 고가의 효소 사용량 절감과 고농도의 에탄올 생산을 위해 당화 및 발효를 동시에 수행할 수 있는 재조합 미생물 등을 획득하기 위해 선진국에서는 지속적인 연구가 수행되어 지고 있다.

리그노셀룰로오스 물질들, 특히 단단한 나무나 곡물류의 미가공 물질들의 경우는 약 5-20%의 오탄당 자일로스(xylose) 및 아라비노스(arabinose)를 함유하고 있는데 이들은 대부분의 발효 공장에서 사용 중인 일반 균주인 *Saccharomyces cerevisiae*에 의해 발효로 에탄올로 변하지 않는다. 지금까지 자일로스는 가장 풍부한 오탄당이기에 때문에 이 자일로스를 발효시킬 수 있는 균주의 개량도 중요한 연구주제이다.

또한 해양 바이오매스의 경우, 고 염분을 함유하고 있는데 일반적으로 염분은 *S. cerevisiae*의 성장 저해, 기질 소모 및 에탄올 생산을 저하 등을 야기시키는 에탄올 발효의 저해 인자로 잘 알려져 있다. 일부 연구자들의 보고에 의하면 포도당

및 맥아당(maltose) 배지에서 염분 농도의 증가는 *S. cerevisiae* 의 성장을 급격히 저하시켰고 맥아당의 경우 0.7 M NaCl 농도에서 에탄올 생산율이 현저히 낮았다고 보고하고 있다. 또한 이러한 염분의 영향을 극복하기 위해 에탄올 생산 균주에 대한 유전자 조작 기법 등이 사용되고 있다.

에탄올 발효에 이용되기 위한 균주의 특성으로는 ① 바이오매스당 에탄올의 전환율이 높고, ② 효소 가수분해의 고온에 따라서, 높은 온도의 저항성을 가지고 있어야 하며, ③ 에탄올에 대한 내성이 강하고, ④ 낮은 pH에 대한 내성도 있어야 한다.

현재 에탄올 생산에 쓰이고 있는 미생물은 효모 뿐이며, 효모는 선택적으로 에탄올을 생산하므로, 부산물이 적어 발효 후의 에탄올 회수가 편리하고, 세포의 사이즈가 박테리아보다 커서 취급이 용이하다. *Clostridium thermosaccharolyticum*, *Thermoanaerobacter ethanolicus*, *Pachysolen tannophilus* 효모들의 경우에는 일반적인 효모가 발효를 하지 못하는 5탄당(pentose)의 이용이 가능하여 많은 연구가 진행되고 있다. 이들의 박테리아는 6탄당(hexose)도 이용하고, 발효온도가 높아 생산된 에탄올이 계속 증발되므로, 최종산물인 에탄올에 의해 발효가 억제되는 것을 막을 수 있어, 앞으로의 에탄올 발효에서 효모를 대체할 가능성이 크다. 그러나 현재까지 연구된 미생물들은 불필요한 부산물의 생산이 너무 많고, 생산되는 에탄올의 농도 또한 낮다.

또 박테리아인 *Zymomonas mobilis*가 에탄올발효 균주로서 연구되고 있다. Gram-음성균인 *Zymomonas*는 열대지방에서는 술의 제조에 사용된 적도 있으며, 특수한 대사경로를 통해 글루코오스 1분자로부터 2분자의 에탄올을 생산하여, 같은 양의 포도당에서 에탄올을 효모보다 약 5-10% 더 높은 수율로 생산한다. 차후 바이오에탄올의 대량생산에 있어서 생산속도가 빠른 미생물의 형질개량에 있어서도 효모보다 유전적으로 변화시키기가 수월하여, *Zymomonas*의 에탄올 내성을 증가시키는 연구가 진행 중에 있다.

효모들 중에서는 *Saccharomyces cerevisiae*, *S. ellypsoides*, *S. uvarum*, *S. fragilis*, *Schizosaccharomyces pombe* 등이 에탄올 생산에 선택되어지고 있다. 또한 리그노셀룰로오스의 중요 성분 중 하나인 자일로스(xylose)를 분해하는 효모인 *Pachysolen tannophilus*, *P. stipitis* 와 *Candida shehatae* 등이 활발히 연구되어졌다.

나. 바이오부탄올 생산기술

에탄올 생성과 더불어 부탄올의 생성에 대한 연구가 최근 들어 다시 주목받고 있다. 연료로서 부탄올은 에탄올에 비해 높은 에너지를 가지고, 낮은 함수율을

가지며, 기존의 자동차의 엔진의 수정 없이 바로 상용할 수 있는 등의 장점이 있어서, 디젤과 등유의 대체물로 부탄올의 필요성이 제기되고 있고, 부탄올의 휘발유 대체제로서의 우수성에 관한 사실이 보고되고 있다.

최근 들어 바이오매스로부터 알코올 연료를 발효공정을 통하여 생산하여 수송용 연료를 대체하려는 연구가 활발히 진행되고 있다. 이미 에탄올의 경우 미국 및 브라질에서는 대량의 에탄올이 발효공정을 통하여 생산되어 가솔린과의 혼합물 형태로 차량용 연료로 대량 소비되고 있다. 특히 브라질의 경우에는 모든 주유소에서 공급되고 있는 가솔린에는 에탄올이 혼합되어 있는 상태료로 대미국의 경우에는 2020년까지 차량용 연료의 20%를 화석연료가 아닌 에탄올과 같이 재생가능한 에너지로 대체하는 계획을 가지고 연방정부차원에서 강력히 추진하고 있다.

바이오부탄올은 바이오에탄올과 같이 가솔린을 대체할 수 있는 연료물질로서 그 성상이 표 1-2-1와 같이 기존 가솔린과 매우 유사하여 최근 많은 각광을 받고 있다. 특히 에탄올연료에 비하여 탄소수가 2개 더 많기 때문에 더 높은 에너지밀도를 가지고 있으며, 특히 물과 상호 용해되지 않아 에탄올에 비해 송유관과 같은 여러 가지 석유화학 인프라에 대한 부식을 야기하지 않고 그대로 이용할 수 있다는 장점이 최근 크게 부각되고 있다. 또한 부탄올의 낮은 증기압으로 인해 연료의 RVP(Reid Vapor Pressure)를 높이지 않아 옥탄가 향상제로서 정유공장의 높은 증기압을 가지는 값싼 부산물(예, butane)을 기온이 높은 여름철에도 사용이 가능하게 하여 연료의 경제성을 높여준다. 이러한 이유로 미국 듀폰과 영국 BP에서 공동연구를 통하여 조만간 상용화를 계획하고 있으며 Gevo, Metabolic Explorer, Green Biologies, Advanced Biofuels, Cobalt 등의 벤처회사들에 의해 고농도 부탄올 생산 미생물 개발 연구가 이루어지고 있다.

[표 1-2-1] 바이오에탄올 및 바이오부탄올 성상 비교

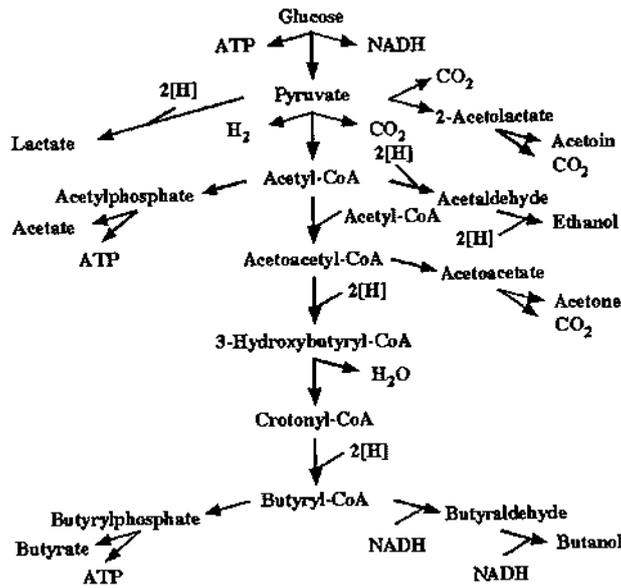
	n-Butanol	Ethanol	Gasoline
Specific Gravity @ 15°C	0.814	0.794	0.720~0.775
Heating Value, MJ/L	26.9~27.0	21.1~21.7	32.2~32.9
Research Octane Number (RON)	94	106~130	95
Motor Octane Number (MON)	80~81	89~103	85
RVP of 5% and 10% Alcohol/Gasoline Blends, psi	6.4/6.4	31/20	-
Oxygen, wt%	21.6	34.7	<2.7
Water Solubility @ 25°C, %	9.1	100.0	<0.01

이렇게 바이오부탄올이 최근 급격하게 바이오연료로서 관심을 끌고 있으나, 사실 바이오부탄올 생산의 역사는 상당히 오래되어 이미 1차, 2차 세계대전 중에 아세톤 및 부탄올을 군사적 목적으로 생산/공급하였다. 특히 바이오부탄올을 생산하는 미생물을 발견한 와이즈만 박사는 이 공로로 후에 초대 이스라엘 대통령이 되었다. 이미 이 당시 바이오부탄올 생산량은 에탄올 다음으로 발효공정을 통하여 가장 생산을 많이 하는 제품이었다.

그러나 1960년대 급속한 석유화학의 발전 및 저유가의 영향으로 부탄올이 석유화학공정에 의하여 생산됨에 따라서 바이오부탄올의 생물공정을 통한 생산은 거의 중단되었다(구소련연방과 남아프리카공화국은 1980년대까지 생물공정 생산을 유지하였고 중국은 현재까지 생물공정 생산을 유지하고 있음). 최근 원유가격의 급등 및 이산화탄소 중립적 연료(Carbon neutral)의 필요가 크게 증가됨에 따라 바이오부탄올의 발효공정에 의한 생산 및 발효공정에 대한 관심이 증가하게 되었다.

미생물에 의한 부탄올 발효는 2007년 미국의 DuPont사와 영국의 BP사에서 연료 생산을 위한 부탄올의 발효의 시작을 공고하면서 더 많은 관심을 받고 있다. 바이오부탄올은 주로 *Clostridium* 속 균주의 혐기성 발효의 최종 산물로 생산되며 특히 용매 생성 단계를 가지는 *Clostrida*인 *Clostridium acetobutylicum*, *Clostridium beijerinckii*, *Clostridium saccharoperbutylacetonicum*, 그리고 *Clostridium saccharobutylicum*에 의한 부탄올 생산연구가 진행되고 있다.

부탄올의 생성은 유기산 생성 단계와 용매 생성 단계로 나누어지는 대사경로에 의해 이루어진다. 가장 잘 알려진 부탄올 생성균인 *C. acetobutylicum*의 발효 대사경로는 그림 1-2-8에서 보는 바와 같다. 균의 생육단계에 따라서 유기산 생성 단계에서는 butyrate, acetate, CO₂, H₂ 등이 주로 생성되고 ethanol, acetone, lactate가 배양조건에 따라 소량 생성된다. 이러한 대사산물의 구성은 대수증식기를 지나면서 용매 생성 단계로 변화하여 분비된 유기산들이 흡수되어 부탄올과 아세톤으로 전환된다.



[그림 1-2-8] *Clostridium acetobutylicum*에 의한 부탄올 대사과정

발효에 의한 부탄올 생산은 화석원료로부터 부탄올이 값싸게 만들어지기 전에는 많은 나라에서 시도되었다. 옥수수 유청과 당밀을 이용한 부탄올 생성에서의 경제성에 관한 연구에서, 바이오 부탄올의 종류에 의한 회수는 석유화학 경로에 비해 경제성이 없으므로 나타났지만, 균주 개량으로 부탄올 생산성이 향상된 *C. beijerinckii* BA101 이나 *C. acetobutylicum* P260을 사용하여 가수분해된 농업부산물의 발효 연구에서 농업 부산물이나 폐기물로부터 부탄올의 상업적 생성가능성이 조금씩 개선되었다. 바이오부탄올 가격은 발효에 사용되는 기질 가격에 직접적인 영향을 받음으로 인해, 유기성 폐기물을 이용한 부탄올 생성 연구가 꾸준히 진행되고 있다.

그러나 섬유소가 많은 농업부산물은 용매 생성 단계를 가지는 *Clostrida*에 의해 잘 분해되지 않는다. 농업부산물을 이용한 부탄올 생성을 위해서는 전처리와 가수분해로 유기물의 분해가 선행되어야 하는데 이러한 전처리 과정에서 미생물 생육저해 물질이 생성되게 된다. Ferulic acid와 p-coumaric acid 같은 *Clostridia* 생육저해 물질이 부탄올 생성에 미치는 영향과 제거에 관한 연구도 진행 중이다.

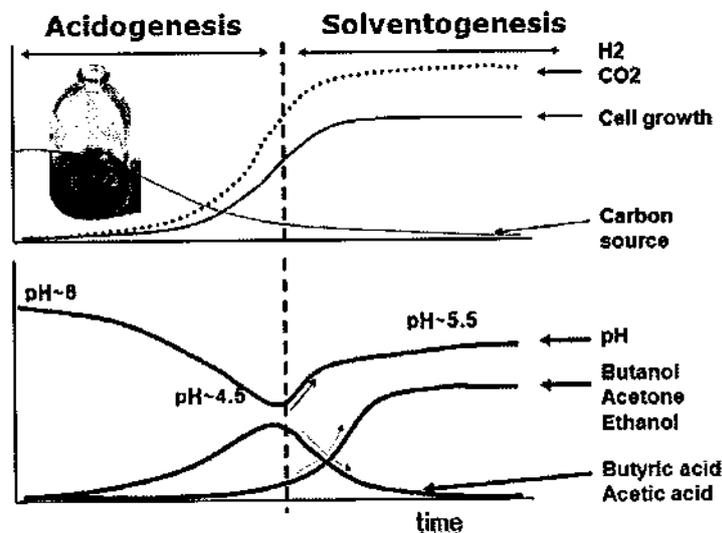
KIST 연구팀에서는 *C. acetobutylicum* 824을 이용한 부탄올 생성 및 추출연구에서 연속추출에 의해 부탄올의 생성이 증가됨을 증명하였다. 또한 *C. saccharoperbutylacetonicum* N1-4을 이용하여 음식물류 폐기물로부터 부탄올 생성연구를 진행하고 있다. 효소로 전 처리한 음식물류 폐기물의 경우 발효에 의해 28.5 g butanol/100 g hexose 부탄올 생성을 확인할 수 있었다.

DuPont와 BP와 같은 세계 주요 기업이 바이오 부탄올에 투자하는 현시점

에서, 당이나 전분 등을 이용한 부탄올 생산이 상업 발효로 시작되었지만, 궁극적으로는 경제성 측면에서 농업폐기물이나 음식물폐기물 같은 유기성 폐기물이나 해양 바이오매스 등이 부탄올 발효의 기질로 이용될 것으로 기대된다.

그러나 현재까지 부탄올 발효에 사용되는 탄수화물은 초기 사탕수수유래 당 및 감자 유래 전분 등이었으며 최종 부탄올 농도 10 g/l, 생산성 0.5 g/l/hr 수준이었다. 이러한 부탄올 농도 10 g/l는 효모 미생물에 의하여 생산되는 바이오에탄올에 비하여 현저히 낮은 수준이다(에탄올 최종농도 100 g/l, 생산성 2 g/l/hr). 따라서 바이오에탄올과 같은 수준으로 최종 농도 및 생산성이 증가되어야만 가솔린을 대체할 수 있는 연료가 될 수 있을 것이다. 그러나 이러한 부탄올 생산성 및 농도의 증가를 막는 요인이 여러 개 있을 수 있으나 그 중 가장 큰 것이 부탄올 자체의 독성에 의한 미생물 저해 현상이다.

대부분의 *Clostridium* 속 미생물의 경우 부탄올을 포함하여 유기용매 화합물의 농도가 20 g/l를 상회하면 주요한 세포 대사활동이 정지된다고 알려져 있다. 따라서 20 g/l 이상이 생산되지 않도록 탄소원을 주입해야 하는데 결과적으로 이러한 저농도 탄소원의 주입이 부탄올의 낮은 생산성의 원인이 된다.



[그림 1-2-9] 산발효와 용매발효로 구성된 부탄올 생산과정

현재 까지 알려진 주요한 부탄올 발효 저해 기작은 세포막의 유동성 증가 및 이로 인한 주요 세포에너지 효소의 저해(ATPase)로 보고되고 있다. 부탄올 외에 아세톤 및 에탄올도 역시 저해 현상을 일으킬 수 있으나, 일반적인 발효에서는 아세톤의 농도가 40 g/l 정도로 증가되지 않기 때문에 부탄올이 주요한 발효 저해 산물로 추정되고 있다. 따라서 이러한 발효 저해 현상을 저감시키기 위한 여러 가

지 생물공학적 연구가 진행되고 있다.

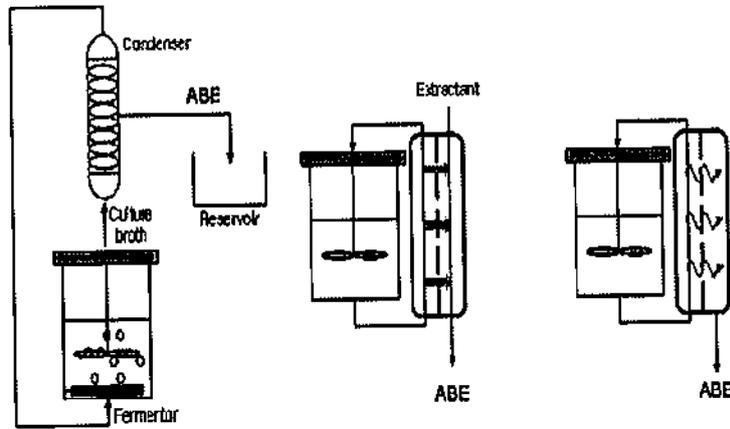
전통적으로는 발효균주의 돌연변이나 특정 유전자를 조작하여 부탄을 내성 균주를 개발하고 있다. 특히 잘 알려진 부탄을 내성 균주는 *Clostridium beijerinckii* NCIMB 8052가 있으며 이 균주의 경우 화학적 돌연변이 약품에 의하여 선발된 것으로 알려져 있다. 부탄을 내성 균주 개발 외에 발효공정을 통하여 이를 해결하려는 시도도 꾸준히 진행되고 있다. 일반적으로 회분식 반응기를 이용한 공정은 오염 현상을 막을 수 있으며, 그 운전 조작이 용이하여 주로 이용되고 있다.

회분식으로 바이오부탄올을 생산할 경우 미생물 농도는 4 g/l 이하이며, 생산성은 0.5 g/l/hr 정도로 상당히 낮은 수준이다. 반면 연속식 발효 공정은 미생물을 배양하는데 있어서 초기 지연기, 멸균, 생물반응기의 청소 등에 소요되는 시간을 절감할 수 있어서 결과적으로 생산성을 증가시킬 수 있는 장점이 있다. 또한 생산물인 부탄올에 의한 생산물 저해 현상은 반응기에서의 연속적인 부탄올 제거 (*in-situ* 생산물 제거)를 통하여 억제할 수 있다.

협기조건 하에서 반응기내의 미생물 농도를 높이는 데는 두 가지 방법이 흔히 이용된다(세포고정화, 세포재순환). 미생물의 농도를 높이면서 동시에 연속적으로 생산되는 부탄올을 제거하기 위해서는 부탄올을 생산할 수 있는 미생물을 효과적으로 고정화할 필요가 있다. 부탄올 생산 미생물을 고정화하기 위해서는 다양한 담체가 사용되는데 점토벽돌에 미생물을 고정화하여 생산성을 15.8 g/l/hr 수준으로 증가시킬 수 있었다는 보고가 있다. *Clostridium acetobutylicum*을 섬유상 고정화담체에 고정화하여 4.6 g/l/hr의 생산성을 얻었다는 발표도 있다. 현탁 상태의 세포를 필터나 막을 이용하여 세포를 분리하고 이를 다시 반응기로 순환시켜 세포의 농도를 높이는 세포 재순환을 통하여 생산성을 향상시키려는 시도가 있었으며, 이러한 경우 생산성이 6.5 g/l/hr로 증가한다는 보고가 있었다.

협기성 미생물은 호기성 미생물과 달리 세포 외부로 세포의 고분자물질 (extracellular polysaccharide)를 잘 형성하지 않기 때문에 세포 고정화가 용이하게 되지 않는다. 따라서 이러한 부탄올 생산 미생물을 효율적으로 고정화하기 위해서는 미생물과의 친화성이 높으면서도 표면적이 넓은 담체를 이용할 필요가 있다. *Clostridium*계 미생물을 이용하여 수소를 생산하는 실험에서 PVA(Polyvinyl alcohol)계 스폰지나 표면에 활성탄이 코팅된 PU(Polyurethane)계 스폰지를 이용하는 것이 보고된 바 있다. 또한 부족한 세포외고분자를 보충하여 미생물을 고정화하기 위하여 다양한 수용성 고분자를 이용하여 세포를 자체 고정화하여 응집상 형태로 만든 사례도 보고된 바 있다. 따라서 이러한 방법을 이용할 경우 기존 부탄올 생산성보다 더 높은 생산성을 기대할 수 있을 것이다.

부탄올의 심각한 생산물 저해 현상으로 인하여 부탄올을 생성되는 즉시 생물반응기에서 제거해 줄 필요가 있다. 그림 1-2-10은 부탄올의 연속 제거를 위하여 사용된 여러 가지 공정을 보여주고 있다. 이에 혐기 발효공정 중에서 생성되는 가스를 이용하여 상대적으로 소수성인 바이오부탄올을 탈기하는 gas stripping 공정, 부탄올을 선택적으로 추출하는 유기용매를 이용하는 액-액 추출 공정, 막을 이용하여 추출하는 perstraction 공정, 부탄올을 선택적으로 통과시키는 막을 이용하여 부탄올을 제거 농축하는 투과증발(pervaporation) 공정 등이 있다.



[그림 1-2-10] 발효액중 부탄올의 연속적인 제거 공정

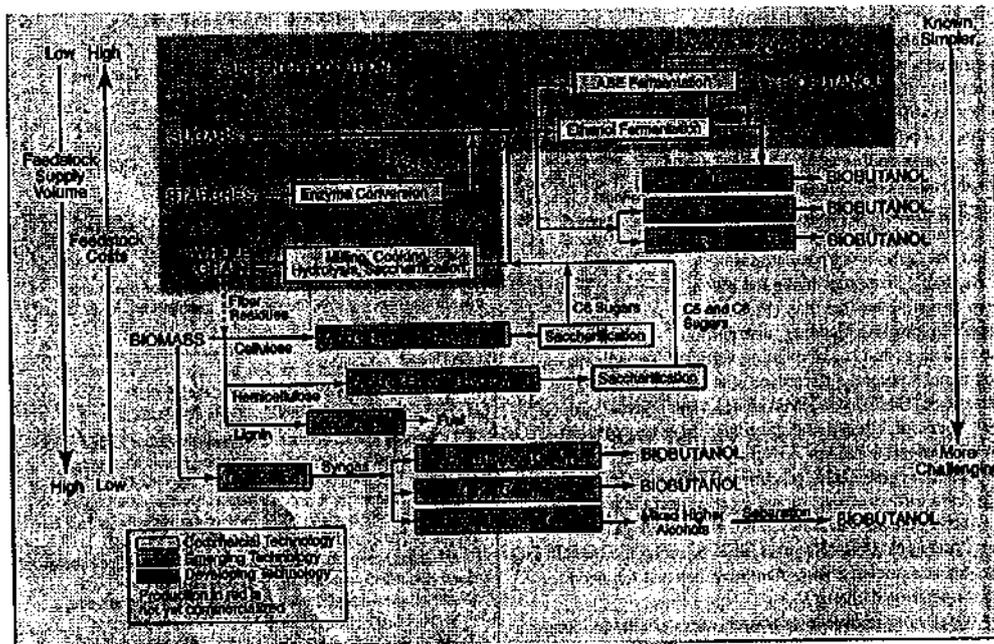
이러한 여러 가지 공정들을 조합하여 실제 부탄올 생산 결과를 정리한 결과는 표 1-2-2과 같다. 표 1-2-2에서는 여러 가지 공정들을 이용하여 부탄올을 생산하였을 때 부탄올 생산농도, 생산성, 수율을 비교하고 있다. 아직 직접적인 에너지 소모량에 대해서는 자료가 없어서 비교할 수 없기 때문에 실제 공정의 선택에 있어서는 에너지 소모량도 고려할 필요가 있다고 판단된다.

[표 1-2-2] 발효액 중 연속적인 부탄올 제거 공정의 적용 시 바이오부탄올 생산 성능 비교표

Process	Yield (g/g)	ABE solvent concentration (g/L)	ABE solvent productivity (g/L/hr)
Batch	0.42	24.2	0.34
Batch with gas stripping	0.47	75.9	0.61
Batch with pervaporation	0.42	32.8	0.50
Continuous immobilized reactor	0.38	7.9	15.8
Continuous with gas stripping	0.40	460	0.91
Continuous with liquid extraction	0.30	14.5	3.08

바이오부탄올의 생산에 있어서 기질인 당의 가격이 미치는 영향은 절대적으로 크기 때문에 조금 더 저렴한 당을 기질로서 이용하려는 연구가 많이 진행되어 왔으며, 포도당, 전분, 옥수수, 사탕수수 등으로부터 부탄올을 성공적으로 생산할 수 있다. 그러나 이러한 기질 외에 농업 및 임산부산물을 이용하여 부탄올을 생산하려는 시도가 상당히 이루어지고 있으며, 미국의 경우 풍부한 농업 부산물인 옥수수 부산물을 기질로 이용하여 부탄올을 생산하는 연구가 상당히 진척되고 있다.

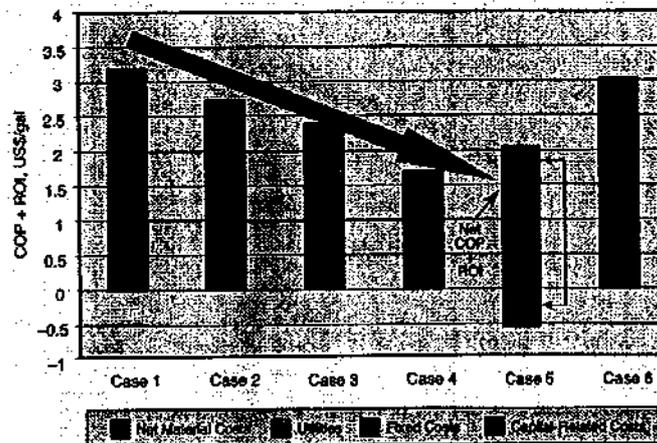
그림 1-2-11에서 알 수 있듯이 부탄올은 바이오매스로부터 다양한 반응경로를 통해 생산될 수 있다. 에탄올을 탈수반응인 Guerbet Catalysis를 통해 부탄올을 생산하는 기술은 이미 기술적인 기반연구가 많이 이루어져 있으며 유사한 반응인 에탄올로부터 에틸렌을 생산하는 공정이 이미 브라질에서 상업운전을 시작하였다. 발효공정에 의한 부탄올의 생산 경제성은 열화학적 공정과의 지속적인 비교 경쟁을 통해 확보되어야 할 것이다.



[그림 1-2-11] 발효와 열화학적 공정을 통한 부탄올 생산경로

바이오 부탄올의 경제성은 현재 전 세계적으로 연간 약 10억갤론의 부탄올을 용제로써 생산/소비하는 기존 화학시장에서의 가격구조에 의해 좌우될 가능성이 높다. 그림 1-2-12는 바이오부탄올의 생산 비용을 현재 개발되었거나 향후 생산기술로 기대가 되는 대표적인 공정별로 COP(Cost of Production)과 ROI(Return on Investment)을 비교한 것이다.

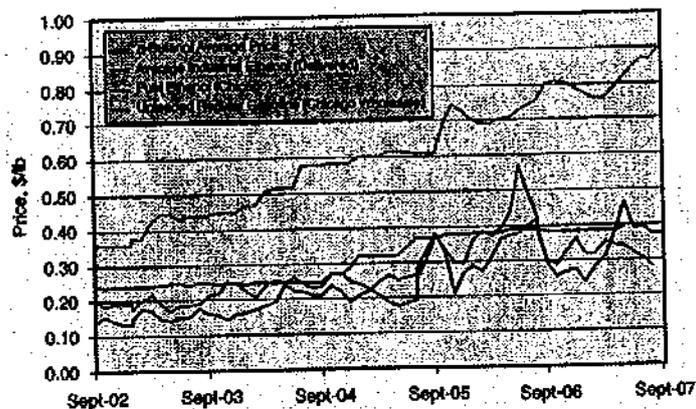
- Case 1: 목재칩을 탄소원으로 하는 *Clostridium acetobutyricum*에 의한 ABE 발효공정
- Case 2: Illinois 대학의 Blascheck 교수에 의해 개발된 돌연변이 균주인 *Clostridium beijerinckii* BA101이 옥수수 전분을 탄소원으로 하여 발효액에서의 부탄올 연속 추출공정없이 부탄올을 생산하는 공정 (기존 옥수수 전분을 이용하는 에탄올 공장을 용이하게 부탄올 생산공정으로 전환할 수 있는 유망한 공정임)
- Case 3: 옥수수전분을 탄소원으로 하여 Environmental Energy, Inc.에서 개발한 2단 부탄올 고정화 반응공정 (Case 2에서 주장하는 것보다 생산성이 높다고 주장하나 구체적인 시험자료를 제시하지는 못하고 있음)
- Case 4: 바이오에탄올을 화학촉매 반응인 Guertbet Catalysis를 통해 바이오부탄올로 생산하는 공정 (반응기술은 이미 알려져 있으나 상용화공정은 없음)
- Case 5: 바이오매스의 가스화를 통한 합성가스 제조 후, 화학촉매반응을 통한 부탄올 생산공정
- Case 6: 현재 석유화학공정에서 oxo synthesis 반응을 통한 부탄올 생산공정



[그림 1-2-12] 바이오부탄올 생산 비용 비교

그림 1-2-13은 과거 5년간의 부탄올, 수소용 연료용 에탄올, 무연 휘발유의 가격변동을 보여주고 있다. 이를 통해 부탄올이 수송용 연료시장에서 경쟁력을 가지기 위해서는 현재 무연 휘발유 가격보다 약간 싸거나 유사한 수준의 시장가격을 제시할 수 있는 생산공정의 개발이 필요함을 알 수 있다. 바이오연료 생산 기술은 급등하는 원유가격 및 지구온난화 문제를 해결할 수 있기 때문에 시급히 개발하고 보급해야 할 기술이다. 바이오부탄올의 경우 에탄올에 비하여 수송용 연료로서 여러 가지 장점을 가지고 있는 것은 사실이나, 생산성, 생산물 농도에 있어서 에탄올에 비견되지 못하고 있는 현실이다.

그러나 부탄올의 독성 문제를 고효율 발효기술 개발을 통하여 해결하고, 원료 문제를 리그노셀룰로오스를 이용하는 기술 개발을 통하여 해결한다면 에탄올과 비슷한 가격에 부탄올을 생물학적 발효공정을 통하여 생산할 수 있으리라 전망한다. 세계적으로 아직 바이오부탄올이 상업화되지 못하였기 때문에 기술 개발에 있어서 우리나라가 아주 늦지는 않은 것으로 판단된다. 따라서 관련 분야의 연구자들이 합심하여 이 분야의 기술 개발에 경주한다면 우리나라의 석유 의존도를 낮추고 지속가능한 발전에 기여할 수 있을 것이다.



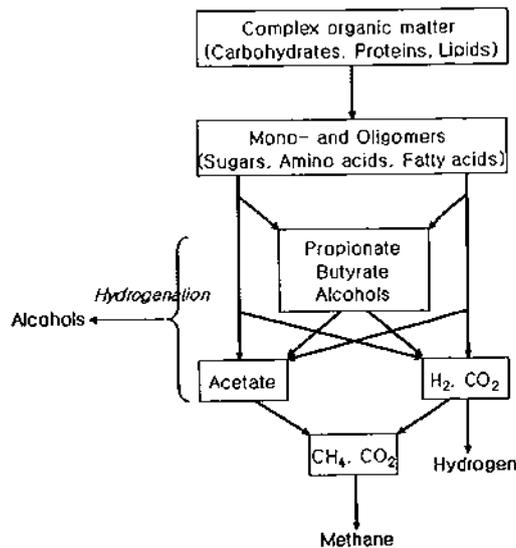
[그림 1-2-13] 부탄올, 무연휘발유, 에탄올 시장 가격 비교

5. 혐기성소화 플랫폼

가. 정의 및 기술 개요

혐기성 소화(혹은 VFA; volatile fatty acid) 플랫폼은 혐기성 혼합배양에 의하여 바이오매스를 일단 유기산 혼합물로 분해한 후 이것을 필요에 따라 메탄, 수소 등 가스 상태의 연료로 전환시켜 회수하거나 수소첨가반응을 통하여 알코올혼합물 형태의 액체연료로 전환하는 방법이다.

이 때 생산되는 유기산은 초산(C2), 프로피온산(C3), 부티르산(C4) 등으로 구성되며 이들은 수소첨가반응을 통하여 각각 에탄올, 프로판올, 부탄올로 변환된다. 액체연료를 목표로 할 경우에는 혐기성 혼합 배양시 메탄발효 저해성분을 추가하거나 반응조건을 조정함으로써 메탄가스로의 전환을 억제할 수 있다.



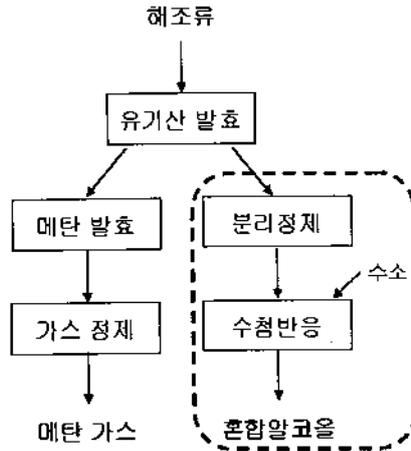
[그림 1-2-14] 혐기성 소화 플랫폼의 개념도

혐기성 소화 플랫폼의 가장 큰 장점은 특정미생물을 이용하는 것이 아니라 자연계에 존재하는 분해미생물을 그대로 활용하는 혼합배양이므로 별도의 살균공정이 필요 없고, 이에 따라 살균에 필요한 막대한 에너지가 절약될 수 있으며 바이오매스의 종류에 관계없이 적용이 가능하다는 점이다. 또한 바이오매스 분해를 위하여 고가의 효소를 별도로 투입할 필요가 없다.

메탄이나 수소가 최종목표산물일 경우에는 배양액으로부터 자동적으로 분리되므로 회수비용이 적게 든다. 반면에 액체연료가 목표산물일 경우에는 일단 저농도로 존재하는 유기산을 어떻게 경제적으로 농축하는가 하는 문제와 유기산을 알코올로 변환시키는데 필요한 수소를 어떻게 확보하느냐 하는 문제가 해결되어야 한다. 또한 최종적으로 생산되는 산물이 알코올의 혼합물이므로 순수한 바이오연료를 원할 경우에는 추가적인 정제공정을 필요로 하는 단점이 있다. 이러한 이유로 인하여 현재까지는 메탄가스를 만드는 공정만이 실용화에 접근하여 있다.

나. 해조류로부터 혐기성 소화를 통한 액체연료 생산기술 적용

해조류를 원료로 이용하여 혐기성 소화를 통하여 메탄가스를 생산하는 기술과 목질계 바이오매스를 건식 소화를 통하여 VFA를 생산한 후 이를 혼합알코올로 전환하는 기술은 개별적으로 개발되어 각각 실용화 가능단계에까지 접근해있다. 이 두 가지 기술을 융합한 기술, 즉 해조류로부터 혐기성 소화 중 산 발효까지만 수행하고 여기서 생성된 VFA들을 회수한 후 수소첨가 반응을 통하여 혼합알코올을 생산하는 기술은 아무도 시도해본 적이 없다(그림 1-2-15).



[그림 1-2-15] VFA 플랫폼을 이용한 해조류로부터의 혼합알코올 생산 개념도

VFA 플랫폼은 해조류에 특히 적합할 것으로 예측된다. 목질계 바이오매스를 이용한 VFA 공정은 목질계에 포함된 리그닌의 분해가 느리게 진행되기 때문에 50~80일 간의 오랜 반응시간이 필요하나, 해조류의 경우에는 리그닌이 포함되어 있지 않기 때문에 산 생성 반응(acidogenesis)은 3일 정도의 짧은 기간에 끝나는 것으로 알려져 있다. 또한 해조류의 경우에는 생산성이 높기 때문에 목질계와 같은 야적형 건식 소화 설비가 아니라 밀폐형 반응기의 사용도 가능하기 때문에 산 발효 시에 생성되는 수소를 회수하여 추후 수소 첨가반응에 활용하기가 용이하고, VFA 플랫폼의 문제점으로 예상되는 악취문제도 관리하기가 용이하다.

해조류의 VFA 플랫폼에 의한 처리는 다음과 같은 많은 장점을 가지고 있다.
당화플랫폼에 비하여,

- 원료(해조류의 종류)에 대한 제한이 없거나 낮다.
- 따라서 여러 가지 해조류를 섞어서 사용할 수도 있다.
- 특정 효소를 개발할 필요가 없다.
- 단백질, 지방 등 탄수화물 이외의 유기성분들도 VFA로의 전환에 이용되므로 수율이 높다.(당화플랫폼의 1.5배 이상)
- 혼합배양이기 때문에 멸균을 할 필요가 없으며 따라서 이 때 필요한 에너지를 절감할 수 있다.
- 혼합알코올은 순수 에탄올보다 연료 특성이 우수하다.
- 유기산 생성까지는 이미 일본에서의 실증연구와 폐수처리에서의 오랜 경험을 통하여 상대적으로 기술축적이 많이 되어 있으므로 빠른 시간 내에 실용화까지 이를 수 있다.

메탄가스 생성에 비하여,

- 산발효(체류시간 2~3일)는 메탄발효(체류시간 15~25일)보다 반응속도가 5~6배 빠르므로 생산성이 높다.
- 메탄발효 단계에서 CO₂로 손실되는 carbon을 회수함으로써 높은 수율이 기대된다. (일본에서의 실증시험 결과로는 100 kg의 유기산으로부터 22 Nm³의 메탄을 회수하여 Carbon 회수율은 50%에 불과하다. 즉 유기산 중의 carbon의 50%가 미전환 혹은 CO₂로 loss)
- 유기산으로부터 알코올을 얻는 수율을 80%로 가정할 경우 해조류 1톤(수분 90%)으로부터 기대되는 혼합알코올의 양은 61 kg이다(에탄올 기준 77 ℓ). 이를 에너지로 환산할 경우 메탄 대비 2.1 배, 가격으로 비교할 경우 메탄 대비 3.5배의 높은 부가가치를 가진다(표 1-2-3).

[표 1-2-3] VFA 플랫폼에 의하여 생성되는 혼합알코올(에탄올을 대표로 가정함)과 메탄의 에너지 수율 및 부가가치 비교

	메탄	에탄올
생산량(톤당)	22Nm ³	77 ℓ
연소열	50MJ/Kg	26.8MJ/Kg
에너지 수율(MJ/톤)	786	1628
비율	1	2.1
단가	700 원/Nm ³	700 원/ℓ
부가가치(원/톤)	15,400	53,900
부가가치 비율	1	3.5

이에 반하여 VFA 플랫폼은 다음과 같은 다음과 같은 문제점이 예상된다.

당화플랫폼에 비하여,

- 유기산 분리 정제의 문제: 산발효에 의하여 생성된 유기산을 경제적으로 농축 회수하기 위한 별도의 정제공정의 개발이 필요하다. 에탄올의 경우에는 물보다 비등점이 낮기 때문에 distillation에 의한 분리방법이 적용이 되고 있으나 VFA의 경우 대부분 물보다 비등점이 높기 때문에 다른 정제 방법의 도입이 필요하다.
- Hydrogenation 단계에서 필요한 수소의 확보 및 경제성 문제: VFA 플랫폼의 경제성 분석 결과를 보면 바이오매스 가격 다음으로 높은 항목이 수소 가격이다. 따라서 수소를 저렴하게 확보하는 것은 본 VFA 플랫폼의 경

제성을 좌우하는 매우 중요한 요소이다. 전술한 바와 같이 산 발효시 생성되는 바이오가스 중에는 상당량의 수소가 포함되어 있으므로 이를 일부 활용하고 나머지는 외부로부터 공급하는 방안을 찾아야 한다. 혹은 해조류를 이용하는 생물학적 수소생산 공정과 결합하는 방법도 가능하다.

메탄가스 생성에 비하여,

- 유기산 분리 정제의 문제: 바이오가스는 기체이기 때문에 저질로 배양액으로부터 분리가 된다. 그러나 VFA는 배양액에 낮은 농도로 용해된 상태로 존재하기 때문에 에스테르화 반응과 수소화 반응을 하기 전에 먼저 배양액으로부터 분리시키고 농축시키는 단계가 필요하다. 따라서 이 공정에 들어가는 에너지와 비용을 최소화시키는 기술의 개발이 필요하다.
- 수소의 확보 및 경제성 문제: 바이오가스 생산 시에는 불필요한 문제이다. 따라서 바이오가스 생산보다 높은 경제적 타당성을 가지기 위해서는 이 공정에 들어가는 모든 비용들을 최소화하여야 한다.

6. 열화학 플랫폼

가. 정의 및 기술개요

열화학플랫폼이란 열화학적인 방법으로 원료인 바이오매스를 전환하여 바이오연료를 생산하는 기술을 의미한다. 본 플랫폼기술에는 가스화, 열분해 등의 열적 전환기술을 이용하여 합성가스, 바이오오일 등을 생산하고 이들 물질들을 화학축매로 전환하는 기술이 있으며, 또한 당물질 및 유지를 함유한 작물로부터 추출되는 물질을 금속담지 축매, 고체산 축매, 이원금속 축매 등 다양한 불균질계 축매를 이용하여 수소, 가솔린, 디젤 등의 연료 제품을 제조하는 기술로 구성되어 있다.

- 합성가스 제조 및 전환기술: 탄화수소를 포함하는 고체 또는 액체의 바이오매스를 공기, 산소 또는 물과 반응시켜 CO, H₂, CO₂, N₂ 등을 포함하는 합성가스(syngas)를 생산하는 기술 및 합성가스를 이용하여 수소, 메탄올 및 FT 합성유를 생산하는 기술.
- 바이오오일 제조 및 전환기술: 고체 또는 액체의 바이오매스를 산소 또는 증기와 접촉하지 않고 순수하게 열분해시켜 생산되는 바이오오일을 이용하여 방향족 화합물, 경질 및 중질 탄화수소를 생산하는 기술.
- 바이오매스 활용 수소 및 유분 제조기술: 바이오매스의 전처리 및 당화를

통하여 얻어지는 5탄당, 6탄당 및 혼합당 등을 출발물질로 하고 다양한 금속촉매를 이용한 수상 개질반응을 통하여 수소 및 C₁~C₁₅ 등의 다양한 유분을 생산하는 기술.

- 바이오디젤 원료 활용기술: 유지작물, 미세조류, 해조류 등의 바이오매스에서 추출가능한 식물성 오일 및 동물성 지방을 이용하여 알킬 에스테르, C₁-C₁₈ 파라핀/올레핀 등의 최종제품을 화학촉매로 생산하는 기술 및 알킬 에스테르의 부생성물인 글리세롤을 이용하여 고부가가치 화학제품을 생산하는 기술.

나. 바이오오일 생산 급속열분해공정

열분해는 무산소 조건에서 유기성물질이 외부에서 공급되는 에너지에 의해 열적으로 분해되어 탄소성 취(Char), 오일, 연료 가스로 환원 전환되는 공정으로 정의한다. 열분해는 산화 반응이 아니므로 NO_x, SO_x 등의 대기오염물질이 생성되지 않으며, 미량의 불활성기체를 운반기체로 공급하기 때문에 소각과 달리 분진 등의 발생이 최소화된다.

열분해는 여러 가지 공정 변수 중에서도 온도와 승온속도가 가장 큰 영향을 미치는 것으로 알려지고 있다. 낮은 열분해 온도와 느린 승온속도가 특징인 slow pyrolysis를 적용하는 경우 취 수율이 높아지는 반면에 오일, 가스 부산물의 수율이 떨어진다. 이에 반하여 fast pyrolysis는 승온속도 100-1000 °C/s의 매우 빠른 속도로 450-550 °C까지 승온시키며, 열분해 가스의 반응기내의 체류시간을 1-2초 이내로 극히 짧게 하여 생성물간의 2차 반응을 최대로 억제하고, 반응기를 빠져나온 열분해 가스를 급속히 냉각시켜 생성물을 고정시키는 방법으로 오일 생산을 높이고, 취 생산을 감소시킬 수 있으므로 폐목재를 포함한 바이오매스 열분해에 가장 많이 적용되고 있다.

바이오매스 열분해에 의해 생성되는 바이오 오일은 시료에 따라 정도의 차이는 있지만 보통 50-75 wt% 정도의 액상 연료 수율을 가지는 것으로 보고되고 있으며, 개질을 위한 특별한 공정을 거치지 않은 1차 생성 오일이라도 상용화 연료유의 절반정도에 해당하는 약 16-19 MJ/kg의 발열량을 가지고 있어서 화력발전소의 보일러나 가스터빈과 같은 장치에서 직접 연료로서 이용될 수 있는 것으로 유럽의 여러 나라에서 보고되고 있다.

또한 바이오오일 내 약 50%에 달하는 산소함량은 화학적인 불안정성, 비휘발성, 부식성, 화석연료와 비혼화성, 저장 및 수송하는 동안 중합반응 등을 유발하는 핵심 요소이다. 이러한 바이오오일은 촉매 개질 반응 등을 통하여 적은 산소 함

유량, 높은 발열량과 안정성을 가진 연료유 수준으로 개선할 수 있다.

식물의 원소 구성상 황과 질소의 함량이 거의 없으므로 fast pyrolysis 공정과 촉매 개질로 얻어진 바이오 연료는 황산화물과 질소산화물의 배출로 인한 대기 환경오염문제를 크게 저감시킬 수 있다. 더구나 식물 자체의 산소 성분을 적정 농도까지 잔류시킨다면, 최근 크게 문제가 되고 있는 MTBE 등의 옥탄가 향상제를 첨가하지 않고도 높은 옥탄가의 연료를 얻을 수 있다. 또한 폐기물 바이오매스의 fast pyrolysis는 에너지 생산에 대한 잠재성이 높기 때문에 최종 수요 창출에도 문제가 없을 것으로 여겨진다.

바이오매스를 효과적으로 열분해하기 위해서 다양한 형태의 반응기 개발이 이루어지고 있다. Fluidized bed(유동층) 형태가 가장 보편적이며, 이외에도 여러 형태의 반응기가 개발 완료되었거나 현재 진행 중으로 대표적인 반응기 형태는 아래에서 보는 것과 같다.

- Bubbling fluidized bed : 스페인에 소재하고 있는 Union Fenosa Co.를 포함한 여러 회사에서 개발하고 있는 반응기로 Union Fenosa는 200 kg/h의 Pilot 설비를 현재 운전 중에 있다. 캐나다에서는 RTI 설계에 기초한 50 kg/h의 Pilot 설비가 운전 중이고, 영국에서는 Wellman이 개발한 설비가 Pilot test(200 kg/h) 중에 있다.
- Circulating fluid bed와 Transported bed : 본 반응기는 Pilot test 단계를 거쳐 상업화 수준까지 개발되어 있는 상태이다. 미국에서는 본 반응기를 적용하여 폐목재를 열분해하여 생성된 바이오오일로부터 식품 향료제를 생산하는 설비를 갖추고 상업 운전 중이다(시간 당 2톤 식품 향료제 생산).
- Ablative pyrolysis : Vortex 반응기를 근간하여 개발되고 있으며, 미국의 국립연구소 NREL에서 진행 중이고, CNRS에서도 활발히 연구개발 중이다. 본 장치는 다른 설비와 달리 입자 크기가 상대적으로 큰 바이오매스도 열분해할 수 있으며, 공정의 율속은 바이오매스의 열 흡수 속도가 아닌 반응기의 열전달에 달려 있다. 그러므로 핵심기술은 반응기에 열전달을 어떻게 효과적으로 할 수 있는지로 이에 대한 연구개발이 현재 진행 중에 있다.
- Entrained flow fast pyrolysis : 본 공정 및 장치는 Georgia Tech Research Institute에 의해 개발되었고, Egemin Co.에 의해 Pilot test를 거치고 있다. 그러나 고온의 열전달 매체인 가스로부터 바이오매스로의

열전달이 효과적으로 이루어지지 않아 기대했던 것 보다 성과를 거두지 못하고 있는 실정이다. 따라서 Pilot 설비 이상으로 발전되지 못했고 현재는 개발이 중지된 상태이다.

- Rotating cone reactor : 최근에 개발되고 있는 흥미로운 반응기로 University of Twente에서 발명한 장치이고, BTG Co.에 의해 개발 중에 있으며 현재 200 kg/h의 Pilot test가 진행되고 있다.
- Vacuum Pyrolysis : 캐나다의 Professor R. Christian에 의해 개발된 공정으로 말 그대로 반응기 내부를 진공 상태로 유지하는 것으로 다른 공정과 달리 slow pyrolysis를 적용하고 있다. 비록 승온 속도가 떨어지더라도 진공 반응을 통해 Fast Pyrolysis의 효과를 거둘 수 있는 것으로 알려지고 있다.

위에서 언급한 여러 공정 이외에도 현재 개발 중에 있는 것들이 상당 수 있으며, 대부분이 유럽연합과 북미를 중심으로 이루어지고 있다. 현재 세계적으로 바이오오일을 상업적으로 개발한 회사 중에서 fast pyrolysis 기술을 활용하여 수익을 올리는 대표적인 회사로서는 캐나다 밴쿠버에 소재한 DynaMotive Technologies Corporation, 네덜란드 Enschede에 본사를 둔 BTG(Biomass Technology Group), 미국 보스톤의 Ensyn Group Inc. 등을 꼽을 수 있다. 표 1-2-4에서 2002년 현재 가동 중인 바이오오일 회수 급속열분해 관련 회사들을 요약하였다.

[표 1-2-4] 상업용 fast pyrolysis 공정

반응기 형태	규 모	개발 기관 및 기업
Fluid bed	250 kg/h 400 kg/h(2000 kg/h 설계) 20 kg/h	Wellman Dynamotive RTI
Transported bed	약 2×1500kg/h 650 kg/h 20 kg/h	Red Arrow (Ensyn) ENEL (Ensyn) VTT (Ensyn)
CFB(Circulated Fluid bed)	10 kg/h	CRES
Rotating cone	150 kg/h	BTG
Ablative	20 kg/h 20 kg/h	NREL Aston
Vacuum	3500 kg/h	Provac
Unspecified	350 kg/h	Fortum

촉매 개질반응은 크게 제올라이트 촉매를 이용하여 탈산소화시키는 크래킹 공정과 NiMo/alumina와 CoMo/alumina 같은 전이금속 담지 촉매를 사용하여 70-200 bar 범위의 고압 조건에서 수소/CO/수증기를 함께 주입함으로써 탈산소와 수첨분해 반응을 유도하는 수소화 공정으로 나누어진다.

- ZSM-5와 Y 같은 제올라이트 촉매는 Å 단위의 기공 크기로 인해 바이오매스 열분해를 통해 생성된 거대 분자들을 반응시키는데 어려움이 있다. 또한 다량의 강산점의 존재는 과도한 크래킹을 야기시키는 반면에 MCM-41, MCM-48, SBA-15 등과 같은 메조포러스 촉매는 기공의 크기가 나노미터 수준에서 매우 균일하며, 그 기공의 배열이 일정한 특징을 가진다. 또한 기공의 크기를 합성 조건에 따라 1 nm에서 30 nm까지 정밀하게 조절할 수 있다는 장점을 갖고 있으며 기공의 연결 구조도 조절이 가능하다. 메조포러스 촉매들은 산도가 제올라이트에 비하여 낮은 편으로 바이오매스 열분해에서 재료의 과도한 분해반응을 방지할 수 있으며 기공 크기가 ZSM-5, Y 등과 같은 제올라이트에 비해 큰 범위이므로, 바이오오일 개질에 아주 적합하여 기술 개발이 진행되고 있다. 그러나 MCM-41 같은 메조포러스 물질은 수열안정성이 현저히 낮기 때문에 바이오오일 내 30% 정도의 수분 함량과 500℃ 정도의 고온에서 크래킹 반응이 수행된다는 것을 감안하면 안정성 면에서 문제가 있을 것으로 추측된다.
- 현재 바이오오일 생산을 위한 촉매 개발에 있어서 상기의 문제점을 해결할 수 있는 제올라이트의 산 특성을 가지면서 MCM-41과 같은 메조기공을 갖는 메조/마이크로 촉매를 적용하는 연구가 이루어지고 있다.

제 2 장 국내외 기술개발 현황

- 최근 국내에서 뿐만 아니라 해외에서도 곡류 등의 농산물 대신에 해조류를 이용하여 바이오연료를 생산하는 연구에 많은 관심을 보이고 있으나 해조류 대량양식 면에서 경험이 일천하여 기술의 상용화에 어려움을 겪고 있다.
- 해외 여러 나라 중에서도 일본은 양식업에 관하여 가장 많은 경험을 축적하고 있어 해양 바이오매스를 이용한 바이오연료 생산 가능성에 가장 큰 관심을 보였다. 이에 “아폴로 & 포세이돈 구상 2025”을 발표하고 일본의 배타적 경제수역 내의 외양에 실효평면적 5,000 km²의 인공조장을 구성하여 해양생물자원을 이용해 바이오연료를 2025년경 연간 2000만 kL를 생산하는 계획을 제시하였다.
- 일본과 마찬가지로 해양 바이오매스의 양식업에 강점을 가지고 있는 우리나라의 경우, 최근 한국생산기술연구원, 한국해양연구원, 국립수산물과학원 등의 연구기관에서 홍조류, 녹조류 등을 이용한 바이오에탄올 생산 관련 특허를 출원하여 해양 바이오매스 이용 바이오연료 생산에 심혈을 기울이고 있다. 하지만 아직까지 해양 바이오매스의 구성성분에 대한 데이터베이스 및 당화/발효 관련 기술들이 성숙되지 않아 연구투자가 필요한 실정이다.

제 1 절 해조류 통합활용화에 대한 기술개발 동향

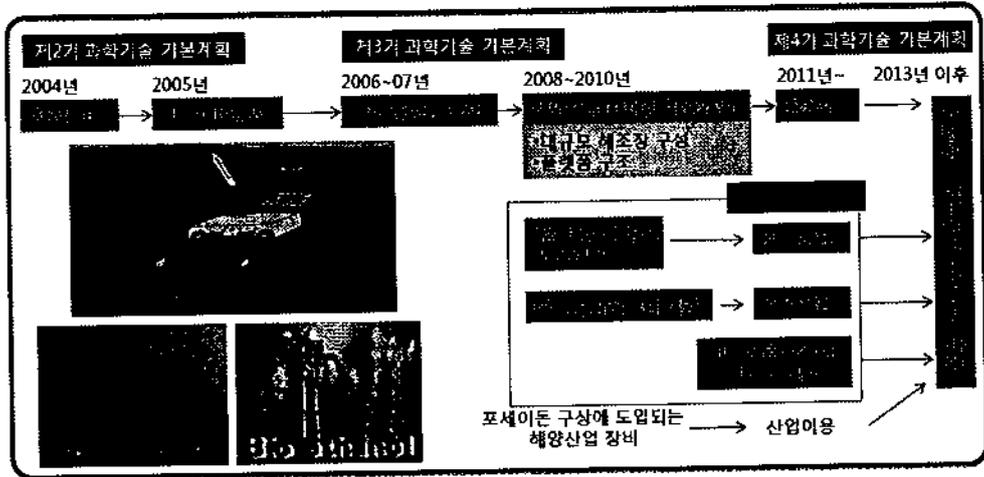
1. 일본

가. “아폴로 & 포세이돈 구상 2025” 프로젝트

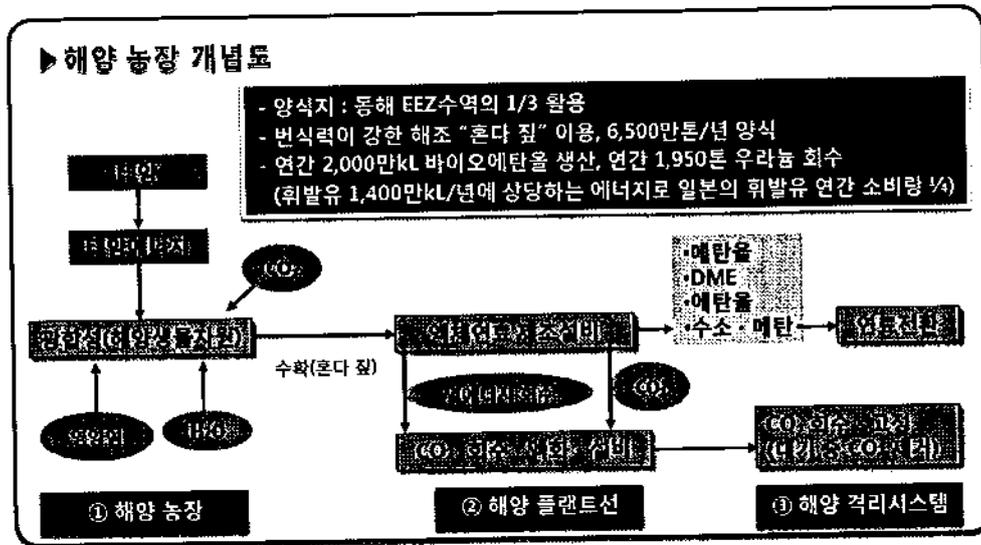
‘아폴로 & 포세이돈 구상 2025(Apollo & Poseidon Initiative 2025)’은 일본의 배타적 경제수역(EEZ) 3분의 1에 해당하는 해역에 6,500만톤의 해양생물자원 ‘모자반’을 양식해 바이오에탄올 등 바이오연료를 연간 2,000만 kL 생산(이는 휘발유 1,400만 kL에 상당하는 에너지로, 일본의 휘발유 연간 소비량의 약 4분의 1에 해당)하고 이와 함께 해수에 용해돼 있는 우라늄 등 희소금속 등을 해조에 농축시키도록 개량해 해조에서 1950톤의 우라늄(이는 일본 원자력발전에서 사용하는 우라늄의 40%)과 메탄, 디메틸에테르(DME) 등 생산하여 자원대국으로 만들겠다는 구상이다.

일본은 국토면적이 38만 km²로 협소하며, 에너지 자원이 부족하다. 그러나 배타적 경제수역의 면적(405만 km²)을 비교하면 세계 6위의 광대한 영해를 가지고 있으며, 거기에는 무궁무진한 량의 태양에너지가 입사되어 있다. 그래서 일본에서는 배타적 경제수역 내의 외양에 실효평면적 5,000 km²의 대규모의 인공조장을 조성하

여, 해면 아래의 10m 정도까지 유광층 내에 모자반 등의 대형 해조류를 육성하여, 이것을 수확 후, 30만톤급의 대형양식 플랜트선상에 해양바이오매스 원료에서 메탄올이나 DME, 에탄올 등의 액체연료를 대규모로 공업 생산하는 Total system을 구상하였다.



[그림 2-1-1] 아폴로 & 포세이돈 구상 2025' 로드맵



[그림 2-1-2] 아폴로 & 포세이돈 구상: 해조로부터 바이오에탄올 및 희귀금속 회수

미쓰비시종합연구소를 중심으로 '산·학·관' 연합체가 발안한 이 구상은 현재 경제적 효율성 검증 단계에 있다. 이미 도쿄부립해양센터, 산업기술종합연구소, 물질재료연구기구 등 정부계 연구기관과 미쓰비시전기, 스미토모전기공업, 시미즈건설 등 기계, 자동차, 건설회사 등이 대형 컨소시엄에 참가하고 있는 데다, 이

구상이 실현되면 영국의 북해 유전개발에 상당하는 효과를 얻을 수 있다는 시선이 나오면서 시선이 더욱 뜨거워지고 있다.

본 구상의 실현에는 1990년의 기준 연 CO₂ 총배출량 12억3300만톤의 약 2%(교토의정서 삭감목표량의 3분의 1)를 삭감할 수 있고, 생산한 BTL(Biomass to liquid)을 수증기 개질하여 연료전지의 연료로 사용하면 275만 kW(발전효율 50%의 경우)의 전력을 발전하는 가능하다.

또 하나 주목할 것은 바다 위에 떠다니는 거대한 풍력발전소 구상이다. 일본 국립환경연구소 (National Institute for Environmental Studies) 개발팀이 구상한 바다 위에서 바람을 찾아 떠다니는 길이 2 km, 폭 70 m의 거대한 선박형 해상 풍력발전소는 이미 기술적인 검증이 끝난 상태다. 10년 후 실용화를 준비 중인 이 해상 발전소에는 직경 120 m의 풍차 11대를 설치할 계획이다. 육지에서는 2 km 내에 11대의 풍차를 세우는 것은 불가능하다. 육지의 경우 풍차 간에 바람의 영향으로 발전량이 감소하기 때문에 풍차 직경의 8배에서 10배가 떨어지게 설치한다. 사용하는 풍차 직경이 120 m라면 풍차의 간격만 약 1 km 정도 간격을 뒤야 한다는 계산이다. 하지만 풍차의 방향을 고정하고 선박 자체가 이동한다면, 언제나 바람을 옆에서 받기 때문에 뒷바람에 다른 풍차가 영향을 받지 않게 된다. 시뮬레이션 결과에 따르면, 육지에서의 가동률은 30%인데 해상에서는 60%나 돼 2배의 발전력을 얻을 수 있어서 기대가 더욱 고조되고 있다.

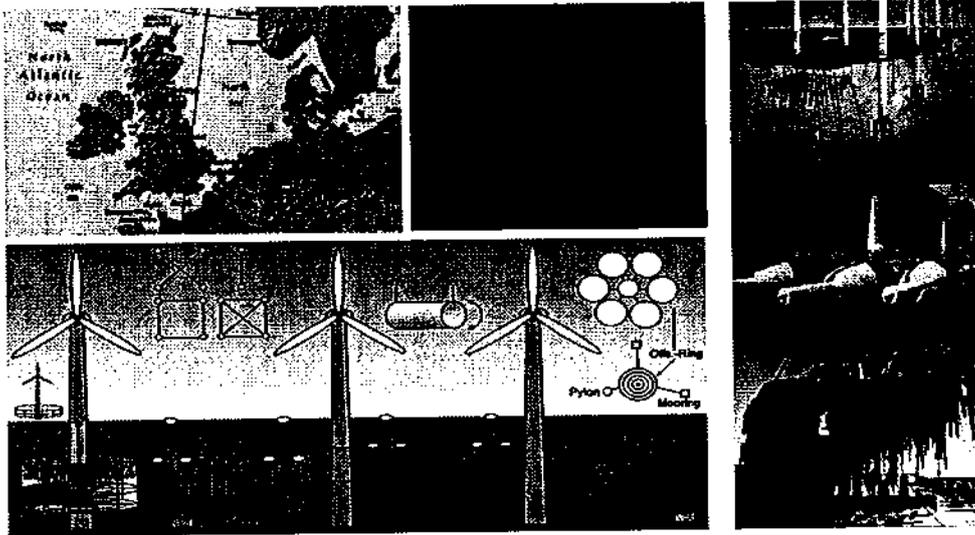
나. 해조류 분해효소 연구

효소를 이용한 해조류 분해에 관한 연구는 주로 일본을 중심으로 이루어져 왔다. 한천, 알긴산, 카라기난 분해효소의 유전자 cloning과 재조합효소의 생산에 관한 많은 연구와 기술들이 개발되어왔다. 그러나 해조류로부터 알코올을 생산하기 위한 발효성 당류의 생산과 관련된 연구는 극히 제한적이다. 또한 효소로써 해조다당류를 분해하기 위하여 해조다당류가 젤화되지 않는 온도인 45 °C 이상에서 활성을 나타내는 내열성 해조다당류 분해효소의 개발이 관심을 끌고 있다. 내열성 한천 분해효소의 경우 일본 해양연구소의 Horikoshi 박사팀에 의해 β-agarase 생산균주가 분리되어 효소가 개발되었다.

2. 미국과 유럽

미국 해양대기국에서는 National Marine Fisheries Service(NMFS)와 National Sea Grant College Program(NSGCP)를 통하여 수산, 양식과 경영과 연안 관리에 적절한 방법을 선정하고 바다의 생물자원을 인간이 이용하는 방안에 대한

비전을 제시하고 있다. 유럽의 덴마크에서는 해양에 설치된 풍차의 구조물을 이용하여 해조류 외해양식기술을 개발 중에 있다.



[그림 2-1-3] Sea Wind Farms (Alfred Wegener Institute, Denmark)

3. 국내 해조류 통합활용화 기술개발 동향

1999년에 제주대학교에서 “Environmentally Friendly Marine Seaweed Aquaculture(친환경적인 해조양식)” 제목으로 미국, 일본, 러시아의 학자들과 우리나라의 조류생태 및 양식학자들이 모여 친환경적인 바다의 해조양식에 대해 토론하였으며 이는 바다를 관리하는 기초개념으로 활용되고 있다. 그리고 2000년에는 영남대학교에서 21세기, 해양환경과 해양생물자원의 전망이라는 주제로 바다의 자원으로로서의 조류의 이용성을 극대화하기 위한 방안에 대해 다루었다. 2002년에는 한국해양대학교에서 해양생물자원의 개발과 전망(Development and prospect of marine bioresources)에 대해 국제 연구자들간 교류와 토론이 지속적으로 이루어지고 있다.

국립수산과학원이 거대조류의 양식기술개발 및 연구에 중점을 두고 있으며, 동해 특산 다년생해조류 대량생산기술개발, 배우체 분리 및 보존기술 개발, 바다숲 조성기술 및 양식장설계 기술보유, 다시마 선발육종, 해조류 원형질체 분리 및 융합 기술 개발, 홍조류인 김의 선발육종 및 종 보존기술 개발이 진행 중이다.

본 연구팀에 의해 바이오매스 확보를 위한 해조류자원 스크리닝 및 양식기술개발과 해조류로부터 바이오에너지 및 통합활용 연구를 수행 중에 있다. 또한 해조다당류를 분해시키기 위하여 알긴산, 한천 및 카라기난 분해 미생물 균주 확보 및 알긴산과 카라기난 분해효소 유전자 확보하고 있으며, 이들의 조합에 의한 해조류의 분해조건에 관한 추가적인 연구가 필요하다.

제 2 절 해조류 그린에너지화에 대한 기술개발 동향

1. 일본

일본 도쿄가스에서는 해안에 쌓이는 파래(*Ulva* sp.)를 수거하여 소각하는 대신 이를 원료로 하여 혐기성 소화를 통하여 메탄가스를 생산한 후 이를 이용하여 전기를 발전하는 기술이 현장시험단계까지 와있다. 이들의 보고에 의하면 5개월간의 시험운전 결과 1톤(습중량)의 원료(파래 또는 다시마(수분 90%))로부터 평균 22 Nm³의 메탄가스를 획득하였다.



[그림 2-2-1] 일본 Tokyo Gas의 해조류를 원료로 한 메탄가스 생성공정

또 다른 연구그룹인 Tokyo 대학의 연구 결과에 의하면 다시마로부터 혐기성 소화에 의하여 0.25-0.28 Nm³/kg-vs 의 메탄 수율을 얻었다. 이는 다시마 중의 vs(volatile solid) content(0.112 Kg/Kg wet-weight)를 감안할 때 상기 Tokyo Gas의 연구 결과와 유사한 수준이다(22-25 Nm³/톤).

2. 미국과 유럽

미국의 Dupont사와 BAL 연구소는 해조류로부터 바이오부탄을 연구를 위해 DOE로부터 9백만달러 펀드를 조성 받았으며, 미국 연안의 2.5%를 이용하여 연간 68억리터의 바이오연료를 생산할 계획에 있다.

영국 스코틀랜드의 에너지부는 해조류를 이용한 "6백만유로 BioMara research project"를 착수하였으며, 2020년까지 운송연료의 10%를 대체하는 것을 목표로 하고 있다. BioMara사는 European Union's INTERREG IVA Programme 등으로부터 약 4.9백만유로를 지원받아 기후변화대응 및 CO₂ 감축을 위해 해조류 대량 양식 및 바이오연료 개발 연구를 수행 중에 있다.

노르웨이의 Seaweed Energy Solutions as(SES)사는 트론헤임 앞 연안에서

파일럿 규모로 해조류 배양 시험연구를 수행 중이며, 50,000 ha 클러스터에서 15,000천톤의 해조류를 생산하여 바이오에탄올 32억리터(혹은 바이오메탄 20 TWh)를 생산할 계획에 있다.

3. 국내 해조류 그린에너지화 기술개발 동향

최근 농산물 대신 해조류(홍조류)인 우뚝가사리 등으로 바이오에탄올을 만들 수 있는 기술이 국내 기술진에 의해 개발되었는데 한국생산기술연구원 김경수 박사팀은 우뚝가사리 등 홍조류로 바이오에탄올을 제조하는 데 성공했다. 우뚝가사리는 발효 가능한 탄수화물의 함량이 목질계 원료에 비해 1.5-2배 정도 높은데다, 목질계 원료에서 반드시 제거해야 하는 리그닌 성분이 없어 제조공정이 간편하다는 장점을 지닌다. 홍조류로부터 직접당화법과 다단계당화법 등의 당화법을 통해 수율을 높이는 방법으로 총 전환 수율이 20~32%인 바이오 에탄올을 제조하는 데 성공했는데 현재 목질계의 에탄올 전환 수율은 20~25%인 것과 비교하면 충분한 경제성이 있다고 생각된다. 또한 질소(N)를 영양분으로 삼는 홍조류의 특성상 연안해역의 해수정화 효과가 탁월하고, 이산화탄소 배출감축 제도가 본격 시행되는 2013년부터는 환경과 에너지 문제를 동시에 해결할 수 있는 가용자원으로 급부상할 전망이다.

또한 국내에서는 한천 생산 해조류인 꼬시래기, 녹조류인 구멍갈파래 등을 대상으로 한 알코올 생산 연구가 알려져 있으며, 한천을 황산으로 분해시킨 후 효모를 이용하여 알코올 생산을 위한 기술을 개발 중에 있으나, 원료 해조류로부터 알코올 생산수율이 낮아 추가적인 연구가 수행 중에 있다.

제 3 장 해조류 통합활용화 연구개발 내용 및 결과

제 1 절 해조류 데이터베이스 구축 및 표준화

1. 연구 목적 및 내용

가. 연구 목적

해조류를 구성하고 있는 단당류 및 이당류의 조성에 대한 database를 확립하고 검색된 생리활성 물질에 대한 분리 및 분석 방법을 확립하고자 한다.

나. 연구 내용

해조류 주성분은 단수화물로 이들은 구성하는 당은 해조류에 따라 다양한 단당류로 구성되어 있는데 해조류에 따른 단당류 및 이당류의 조성을 분석하기 위하여 HPLC에 의한 단당류 및 이당류의 분석 방법을 확립하고 거대 해조류에 대한 구성당 조성을 분석한다. 또한 해조류에 기능성 물질 검색을 위해 다시마 및 감태에 대한 용매 추출물에 따른 분획물 분리방법을 확립하고 검색된 생리활성물질에 대한 순수 물질 분리 방법을 확립한다.

2. 연구 방법

가. 실험장치 및 재료

(1) 시료

해조류의 구성당 database 확립을 위한 해조류 시료는 다시마, 파래, 미역, 도박, 감태, 곰피, 대왕물, 우뚝가사리, 서실, 진두발 등을 사용하였다. 생리활성물질 검색 및 분리를 위한 시료로 다시마, 모자반 및 감태를 사용하였다.

(2) 실험장치

(가) 구성당 분석방법 확립을 위한 Post-column reaction 방법

Shimadzu LC-20AD pump, Shimadzu CTO-20AC oven, Shimadzu Sil-20AC auto-sampler, Shimadzu RF-10AxI fluorescence detector, Shimadzu

CRB-6A reaction box, Shimadzu CBM-20A system controller, LC Workstation software, ion exchange Shim-pack ISA-07 (4.0× 250 mm) 분석 column, Shim-pack ISA guard column (4.0× 50.0mm).

(나) 구성당 분석방법 확립을 위한 RI detector 또는 ELSD detector

Jasco PU-980 pump, Jasco AS-950 autosampler, Jasco UV-975 UV/vis detector, Jasco LG-2080-54 degasser, Jasco LG-2080-04 gradient unit, LC-Net II/ADC controller, Jasco Chrompass integrator, Shimadzu ELSD-LT, Shimadzu RI detector, Luna 3 μ NH₂ 100Å (4.6 mm × 150 mm), Asahipack NH₂P-50 (4,6 mm × 250 mm)

(다) Uronic acid 분리 조건

Shimadzu LC-20AD pump, Shimadzu CTO-20AC oven, Shimadzu Sil-20AC auto-sampler, Shimadzu SPD-20A UV detector, Shimadzu CBM-20A system controller, LC Workstation software, ion exchange Shim-pack ISA-07 (4.0 × 250 mm) 분석 column, Shim-pack ISA guard column (4.0 × 50.0 mm).

(라) 생리활성 물질 검색을 위한 분획 HPLC

Shimadzu LC-6AD pump 3대, Shimadzu CTO-20A oven, Shimadzu Sil-20A auto-sampler, Shimadzu SPD-M20A Diode array detector, Shimadzu FRC-10A fraction collector, Shimadzu RI-10A reflective index detector, Shimadzu CBM-20A system controller, LC Workstation software, Gel permeation Shodex GS-310 (500 mm × 21.2 mm) Prep column.

(마) 생리활성 물질 순수 분리 HPLC

Shimadzu LC-6AD pump 3대, Shimadzu CTO-20A oven, Shimadzu Sil-20A auto-sampler, Shimadzu SPD-M20A Diode array detector, Shimadzu FRC-10A fraction collector, Shimadzu RI-10A reflective index detector, Shimadzu CBM-20A system controller, LC Workstation software, Phenomenex C18(2) (300 mm × 21.2 mm) Prep column, C18 security Guard Prep Cartridge column(15× 21.2 mm)

(바) 생리활성물질의 구조분석

JNM ECP-400 (JEOL, Japna) NMR로, 분자량은 GC/MS (Shimatzu, GCMS QP-5050A)로 분석하였다.

나. 실험 절차

(1) Post-column에 의한 구성당 분리 절차

해조류는 2%(g/g)의 농도로 0.2 M HCl, H₂SO₄, HNO₃의 산과 NaOH 염기를 사용하여 30분 동안 가수분해하거나 이 시료용액에 plasma를 처리하여 가수분해를 촉진한다. 이렇게 분해된 해조류의 단당류는 이온 column에 의하여 분리한 다음 boric acid와 1% arginine 혼합용액과 150 °C 반응조에서 유도체화 한 다음 형광검출기(Ex=320, Em=430)를 사용하여 분석한다.



(2) RI detector 및 ELSD detector에 의한 분리 절차

Post-column방법과 같은 방법으로 전처리된 다당류는 NH₂ column과 RI 검출기 또는 ELSD-LT 검출기를 사용하여 단당류를 분리하여 이들에 대한 최적 분석 조건을 확립한다.



(3) 다시마로부터 uronic acid 표준 물질분리

Ice bath에서 sodium alginate 50 mg을 0.5 mL 80% H₂SO₄와 혼합한 후 진한 황산과 혼합액을 20°C 18시간 방치한다. 진한 황산이 2 N 용액이 되도록 6.5 mL 증류수를 가하고 마개를 닫고 끓는 물에서 5시간 가열한다. CaCO₃를 첨가하여 중화한 후 침전물을 여과기로 여과한다. filter에 남은 침전물을 초기용액의 두 배

정도로 씻는다. 여과액은 약 10 mL 정도로 농축한다. 이 시료를 Dowex resin으로 분리하고 다시 Prep. HPLC로 표준물질을 얻는다.



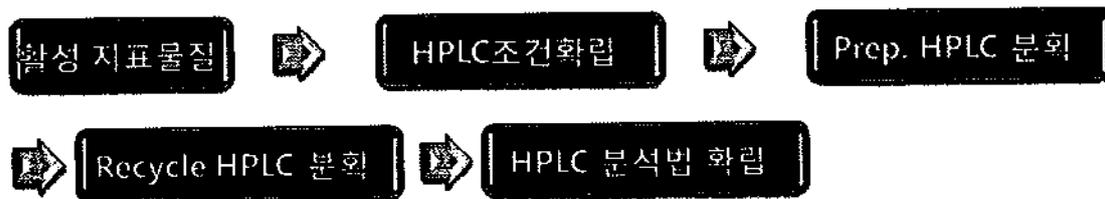
(4) 다시마 및 감태로부터 생리활성 검색

다시마 및 감태의 ethanol 추출물을 건조한 다음 hexane, chloroform, ethyl acetate, butanol 등의 용매로 분획하여 이를 GPC로 분획을 나누고 생리활성물질을 검색한다.



(5) 다시마 및 감태로부터 생리활성 분리

검색된 생리활성 분획은 Prep. column에 의하여 여러 분획으로 나눈 다음 다시 각 분획에 대하여 활성을 검색하고 검색된 분획은 다양한 HPLC 방법으로 순수 분리하고 NMR로 물질을 확인한다.



(6) 생리활성물질의 분석방법 확립

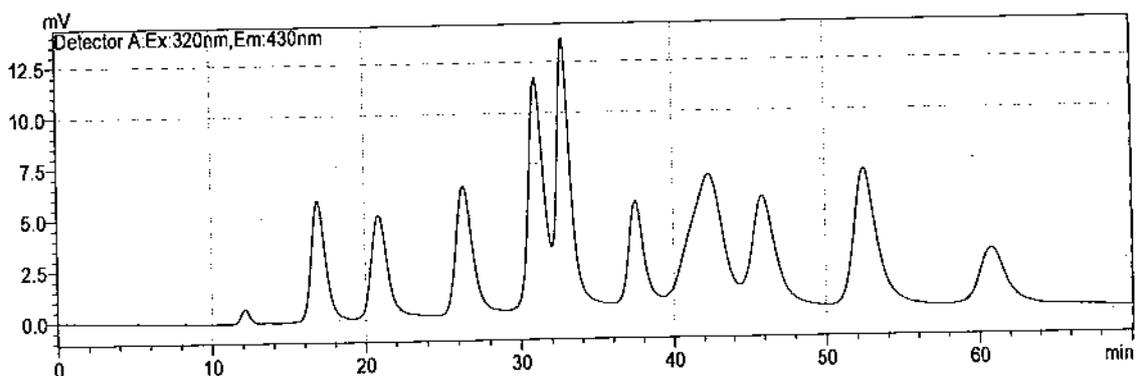
생리활성물질의 분석방법은 통합활용팀과 공동으로 수행하였다. 분석항목으로는 항산화, 항염증, 항치매, 항비만, 항암 및 항당뇨합병증 등으로 항산화, 항염증, 항치매, 항비만, 항암은 세포수준에서의 활성법을 확립하였으며, 항산화와 항당뇨합병증 효과는 효소활성 측정법으로 확립하였다.

3. 연구수행 결과

가. 해조류의 구성당 분석 방법 확립

(1) Shim-pack ISA Post-column에 의한 방법

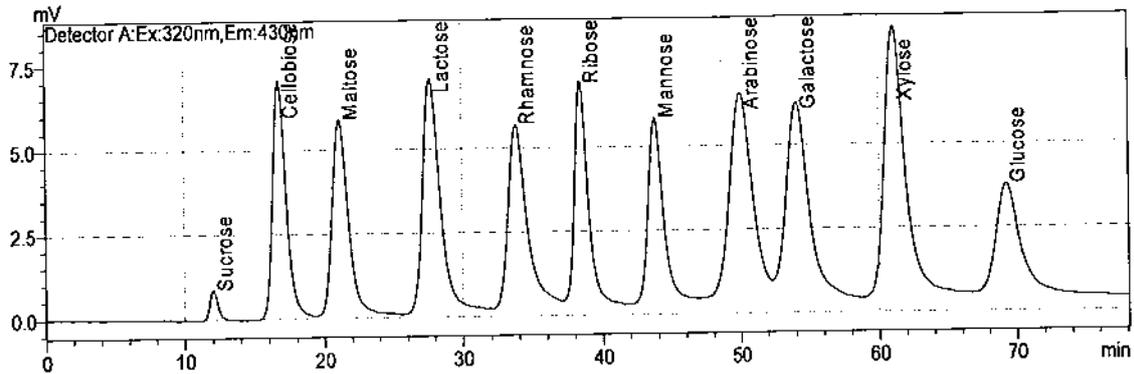
해조류 구성 당류의 분석을 위하여 ion exchange Shim-pack ISA-07 (4.0 × 250 mm) 분석 column과 Shim-pack ISA guard column (4.0 × 50.0 mm)을 사용하였다. 이동상은 A용액으로 potassium borate (pH 8)과 B용액으로 potassium borate (pH 9)를 사용하였는데 B용매를 0분에서 0%로 시작하여 30분에 50%로 증가시키고 50분에 100%로 증가하여 15분간 100%로 유지하다가 65분 이후에 0%로 감소하여 총 90분의 분석 시간으로 하였다. Injection volume으로 10 μL 주입하였으며 post-column 방법을 이용하여 환원당을 유도체화 한 후 형광 검출기(Ex=320, Em=430)를 사용하여 분석하였다. 본 방법에서 사용한 표준물질은 다음과 같은 단당류 및 이당류를 사용하였다. 표준물질로 cellobiose, maltose, rhamnose, ribose, mannose, arabinose, galactose, xylose, glucose, fructose를 사용하여 조건을 구하였다. 이 표준물질은 자연계에 함유되어 있는 단당류와 이당류는 모두 포함하고 있는 표준물질로 이들이 분리 된다면 거의 대부분의 당성분이 분석된다고 예상할 수 있다. 이 분석 조건에서는 arabinose와 fructose가 그림 3-1-1과 같이 분리되지 않아 45분에 용출되는 peak에 같이 두성분이 용출되었다. 그러나 해조류는 arabinose를 포함하고 일반 식물성 식품이나 동물성 식품에는 arabinose대신 fructose를 함유하고 있어 해조류의 단당류 및 이당류를 분석하는데 어려움이 없었다.



[그림 3-1-1] 이당류 및 단당류 표준물질(arabinose와 fructose 함유)의 크로마토그램

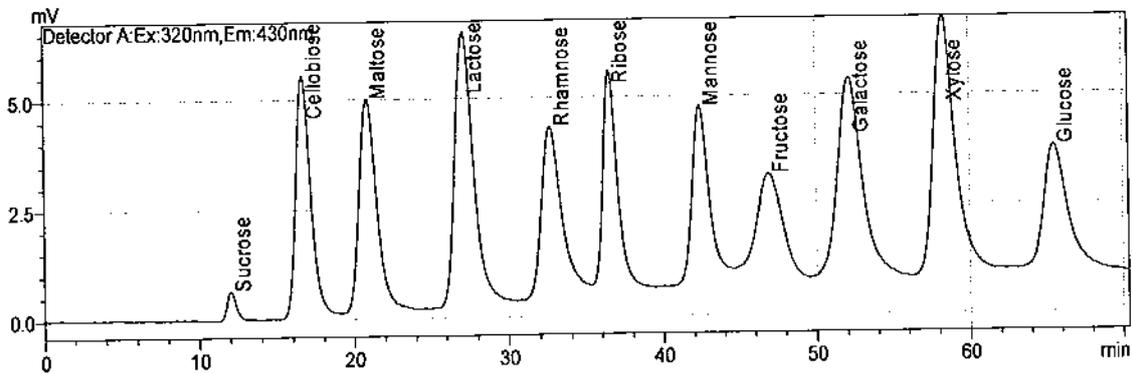
Fructose를 함유하지 않은 해조류의 구성당 분석시 적용될 표준물질들을 앞에서 확립된 조건에 따라 분리할 경우 그림 3-1-2에서와 같이 표준물질에 arabinose가 포

함되어 있고 fructose가 함유되지 않은 표준물질로 arabinose가 잘 분리됨을 보여준다.



[그림 3-1-2] 이당류 및 단당류 표준물질(arabinose 함유)의 크로마토그램

그림 3-1-3은 fructose를 함유하고 arabinose를 함유하고 있는지 않은 표준물질로 이동상의 조성을 높여 그림 3-1-2보다 fructose가 arabinose보다 일찍 용출됨을 알 수 있었다.

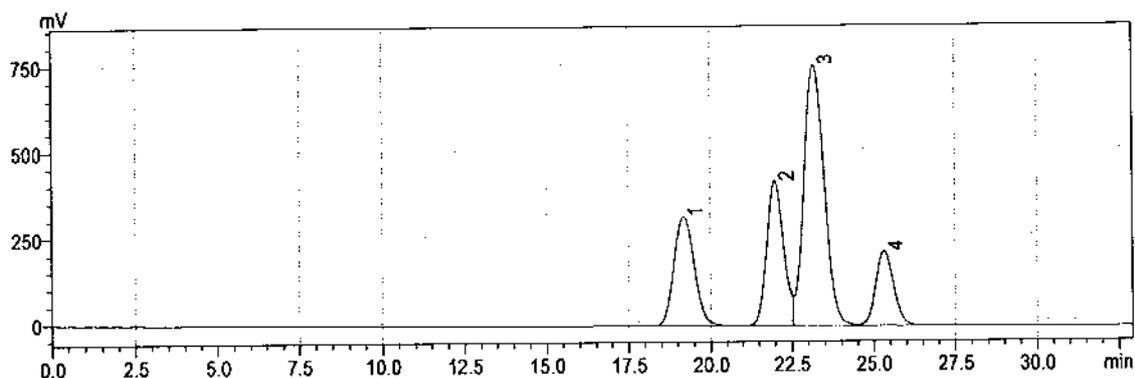


[그림 3-1-3] 이당류 및 단당류 표준물질 (fructose 함유)

(2) NH₂ column에 의한 방법

Asahipack NH₂P-50와 Luna 3 μ NH₂ 100Å (4.6 mm × 150 mm)의 column을 이용하여 단당류의 분리 조건에 대하여 연구하였다. 또한 Aminex HPX-87H, Sulpcos 610H, Shodex Ca column을 사용하여 단당류의 분리 조건을 검토하였다. NH₂ column에 대한 이동상은 acetonitrile : water(80:20)의 혼합 이동상을 이용하여 fructose, xylose, fucose, glucose를 표준물질로 하여 분리하였다(그림 3-1-4). 대부분의 column에서는 Shimadzu ISA-07과 같이 분리될 수 있는 column은 없었다. 또한

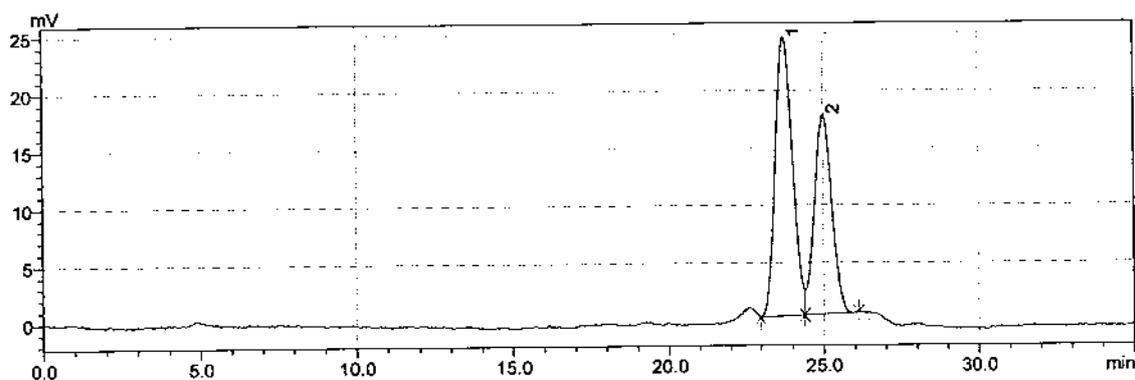
RI 검출기를 사용함으로써 이동상을 gradient를 할 수 없기 때문에 분리 조건을 구하기가 용이하지 않았다.



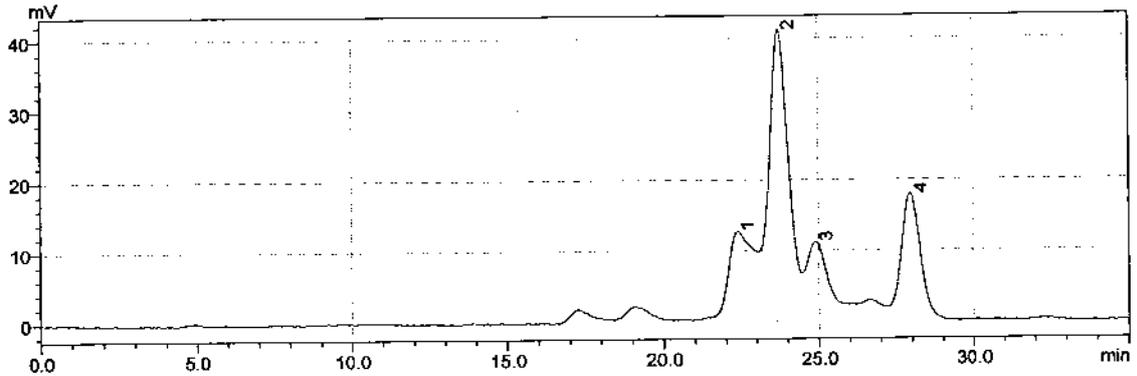
[그림 3-1-4] NH₂ column에 의한 단당류 표준물질
(1.fructose, 2.xylose, 3.fucose, 4.glucose)

(3) Uronic acid 분리 조건

Sodium alginate를 80% H₂SO₄와 혼합한 후 진한 황산용액으로 가수분해된 alginate의 구성당류는 uronic acid들이다. 이러한 uronic acid를 분리하기 위하여 20mM sodium phosphate buffer(pH 2.5)을 이동상으로 하여 Shim-pack SCR-101N(300 mm × 7.8 mm)와 SCR guard column (50 mm × 4.0 mm)를 이용하여 분석 조건을 구하였다. 이동상의 흐름은 1.0 mL/min, column 온도는 50 °C로 하여 RI detector를 사용하였다.



[그림 3-1-5] Alginate 가수분해물의 크로마토그램
(1. guluronic acid, 2. manuronic acid)



[그림 3-1-6] 다시마 가수분해물의 크로마토그램

(4) 해조류의 단당류 및 이당류 조성

해조류의 주요 구성성분인 단당류와 이당류의 조성을 분석하기 위해서 먼저 가수분해 촉매인 산과 염기를 비교하였다. 산 촉매로 0.2 M HCl, 0.2 M H₂SO₄, 0.2 M HNO₃의 산과 염기 촉매로 0.2 M NaOH를 사용하여 홍조류인 도박 가수분해물인 단당류와 이당류를 분석 비교하였다. NaOH의 경우 산과 동일한 조건을 사용하였을 경우 분해 분해되는 단당류와 이당류가 검출되지 않아 NaOH는 분해 촉매로서 부적합한 것으로 나타났다. 산으로 도박을 가수분해 할 경우 황산이 가장 많은 환원당을 생성하였고 질산, 염산의 순이었다. 그러나 당의 함량이 약간씩 다르게 나타났다. 비환원당인 sucrose의 경우 질산이 황산보다 높게 나타났다. cellobiose의 경우 염산은 전혀 검출되지 않았다. 황산은 arabinose, galactose, glucose의 단당류를 많이 생성하였고 염산은 xylose를 많이 분해하였다. 따라서 황산이 가장 적합한 도박 가수분해 촉매로 판단되었다.

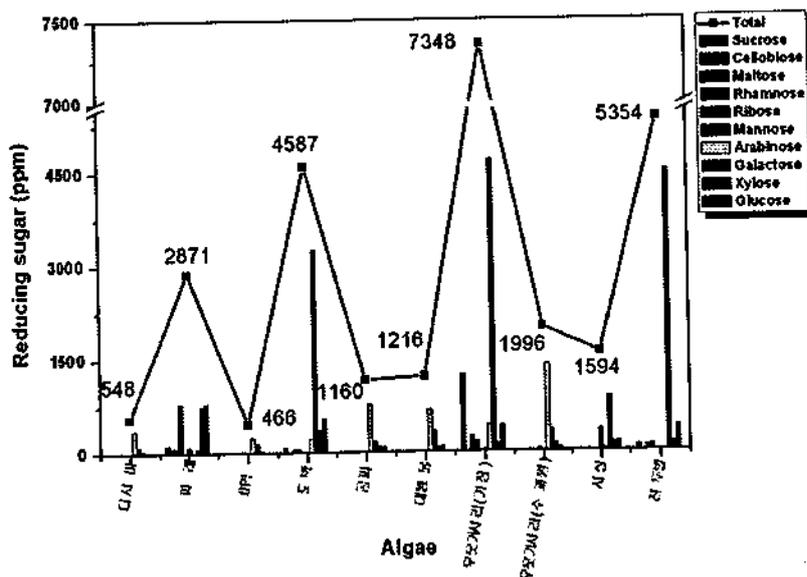
[표 3-1-1] 산과 염기에 의해 홍조류인 도박 가수분해 생성물인 환원당 비교

	(단위) ppm			
	NaOH	HCl	H ₂ SO ₄	HNO ₃
Sucrose	0	83	115	135
Cellobiose	0	-	33	44
Maltose	0	50	36	103
Rhamnose	0	51	31	143
Ribose	0	21	21	23
Mannose	0	10	18	12
Arabinose	0	223	265	232
Galactose	0	3246	4312	3951
Xylose	0	361	309	316
Glucose	0	540	761	658
Total	0	4587	5901	5617

다시마, 파래, 미역, 도박, 감태, 곰피, 대왕물, 우뭇가사리, 서실, 진두발 등 해조류에 대한 환원당의 함량을 검사하기 위하여 염산으로 처리하여 post-column 방법으로 분석하였다(표 3-1-2). 기장산 우뭇가사리가 총 환원당 함량으로 가장 많이 함유하고 있었으나 수과원의 우뭇가사리는 기장산에 비하여 아주 낮은 총환원당 함량을 보여 대조적이었다. 우뭇가사리에 가장 많이 함유한 당은 galactose였으며, 다음으로 비환원당인 sucrose가 많이 함유되어 있었고 arabinose, glucose, maltose 순이었다. 총 환원당이 그 다음으로 많은 해조류는 진두발이었는데 우뭇가사리와 같이 galactose가 가장 많이 함유되었으며 다음으로 glucose였다. 해조류마다 조성성분에 많은 차이를 나타냈다.

[표 3-1-2] HCl로 가수분해한 해조류의 환원당 비교 (단위: ppm)

	다시마	파래	미역	도박	곰피	모자반	우뭇가사리 (기장)	우뭇가사리 (수과원)	서실	진두발
Sucrose	-	127	-	83	-	-	1239	-	21	90
Cellobiose	2	88	2	-	2	2	-	7	-	-
Maltose	1	87	-	50	-	1	240	1	18	83
Rhamnose	10	795	5	51	20	22	163	8	15	101
Ribose	6	13	23	21	11	12	11	43	11	278
Mannose	7	100	9	10	19	23	34	15	351	12
Arabinose	363	58	238	223	768	672	427	1390	35	24
Galactose	104	72	155	3246	169	338	4690	348	876	4510
Xylose	32	745	31	361	89	66	126	123	130	128
Glucose	24	786	3	540	82	79	418	62	138	388
Total	548	2871	466	4587	1160	1216	7348	1996	1594	5354



[그림 3-1-7] 해조류 가수분해물의 환원당 비교

같은 조건에서 분석한 총환원당 생성량의 순서는 다음과 같다. 우뭇가사리(7348 ppm) > 진두발(5355) > 도박(4587) > 파래(2872) > 우뭇가사리(수과원-1996) > 서실(1594) > 모자반(1216) > 감태(1160) > 다시마(548) > 미역(466) 같은 종일지라도 생산지에 따라 총 환원당 함량뿐만 아니라 조성도 많이 차이가 남을 보여주었다.

산축매 하에서 plasma 처리가 해조류의 가수분해와 환원당 생산량에 미치는 영향을 보기 위하여 홍조류인 도박에 0.2 M HCl을 처리하고 30 mA plasma를 5분, 10분, 30분 처리하여 환원당을 분석하였다.

[표 3-1-3] 0.2M HCl과 30 mA plasma를 처리한 도박의 환원당 (단위: ppm)

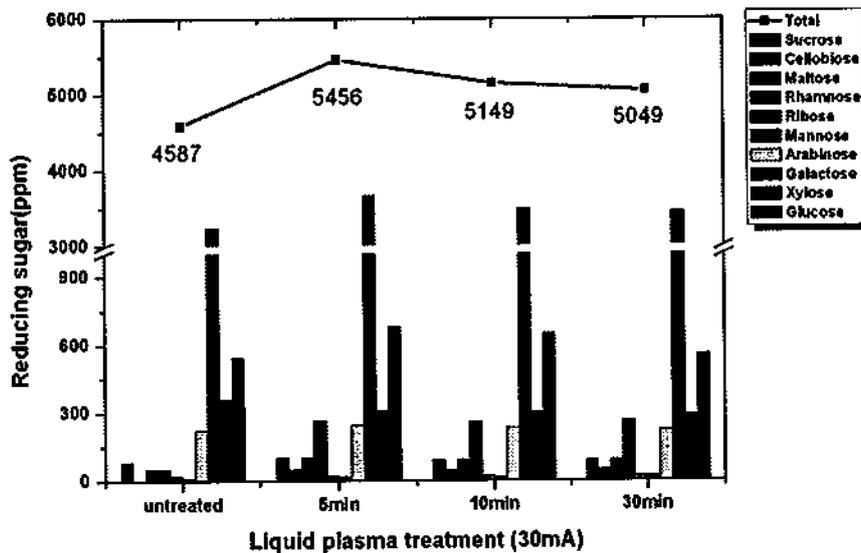
	Non-Plasma	30 mA		
		5 min	10 min	30 min
Sucrose	83	104	91	90
Cellobiose	-	49	45	49
Maltose	50	102	93	91
Rhamnose	51	265	258	245
Ribose	21	23	22	23
Mannose	10	18	17	18
Arabinose	223	246	231	223
Galactose	3246	3665	3490	3446
Xylose	361	310	299	288
Glucose	540	676	648	556
Total	4587	5456	5149	5049

Plasma를 처리하지 않은 도박과 5, 10, 30분간 처리한 도박의 환원당 함량을 비교할 때 처리하지 않은 것보다는 5분간 처리한 도박의 환원당 함량이 높았으나 처리 시간이 길어질수록 당의 함량이 감소하는 경향을 나타내어 plasma 처리가 길어지면 환원당이 열에 의한 파괴가 증가되는 것으로 예상된다. 가장 파괴가 많이 되는 당은 cellobiose와 maltose가 10분으로 증가함에 따라 약 8% 감소하였으며 rhamnose는 가장 적은 함량이 감소하였다. 10분에서 30분으로 증가할 때 glucose가 14% 감소하여 가장 많은 변화를 보여 주었다.

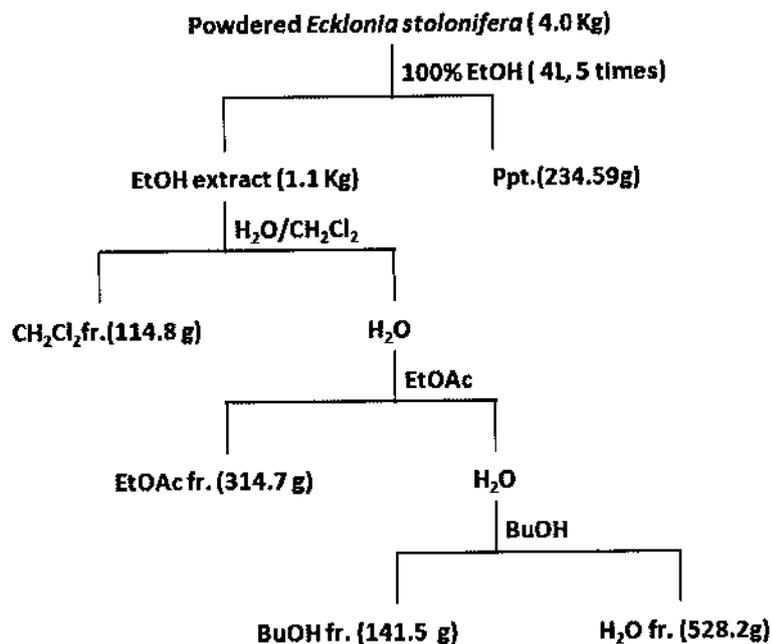
(5) 감태로부터 생리활성 검색 및 분리

감태의 생리활성물질을 검색하기 위하여 4.0 kg 감태를 ethanol로 추출하여 1.1 kg의 건조된 ethanol 추출물을 얻었고 hexane, dichloromethane, ethyl acetate,

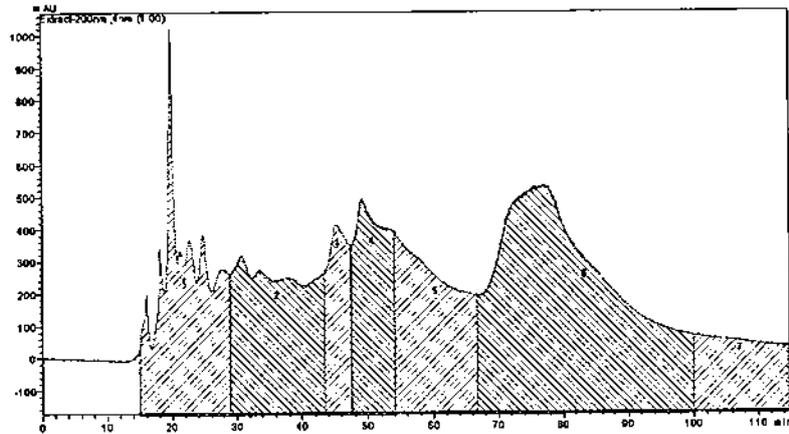
butanol, water등으로 용매 분획을 하여 각각 114.8 g, 314.7 g, 141.5 g, 528.2 g을 얻었다(그림 3-1-9). 각 용매 분획에 대하여 항산화 활성을 측정된 결과 Ethyl acetate층이 가장 높았고 다음으로 butanol층이 높았다. 따라서 ethyl acetate 층을 methanol에 200 mg/mL의 농도로 용해하고 Shodex GS-310 column (500 mm × 21.2 mm)을 이용하여 다음의 그림과 같이 분획하였다.



[그림 3-1-8] Plasma 처리한 해조류 도박의 환원당 변화



[그림 3-1-9] 감태 ethanol 추출물의 용매 분획

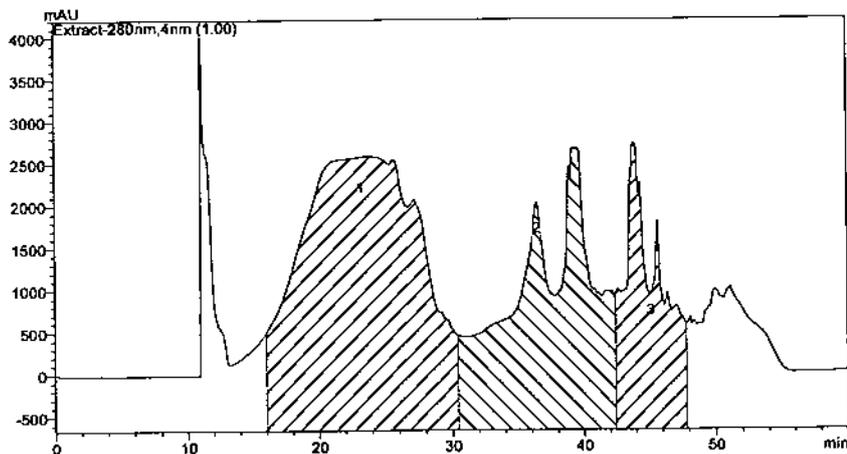


[그림 3-1-10] 감태 ethyl acetate 용매분획 층의 GS 분획 크로마토그램

[표 3-1-4] Ethyl acetate 층을 GS-310 column으로 7개 분획물의 무게 (단위: g)

Fr. 1	Fr. 2	Fr. 3	Fr. 4	Fr. 5	Fr. 6	Fr. 7
2.32	2.04	1.43	4.12	3.88	3.00	0.85

이동상을 methanol로 하여 5 mL/min의 유속으로 흘러 120분간 분획시간 동안 UV 270 nm에서의 흡광도를 기준으로 하여 분획물을 나누었다. 총 18.0 g의 ethyl acetate 층을 분획하여 분획물 Fr. 4가 가장 많이 얻어졌으며 분획물 Fr. 7이 가장 적었다. 항산화 활성이 높은 Fr. 3-6번을 먼저 Prep. HPLC 이용하여 순수분리를 시도하였다. 분획물 Fr. 4의 4.12g을 methanol에 용해하고 이동상 methanol과 0.1% formic acid를 이용하여 Phenomenex C18(2) (300 mm × 21.2 mm) Prep column, C18 security Guard Prep Cartridge column(15 × 21.2 mm) 사용하여 1차 분리한 결과를 그림 3-1-11에 나타내었다.

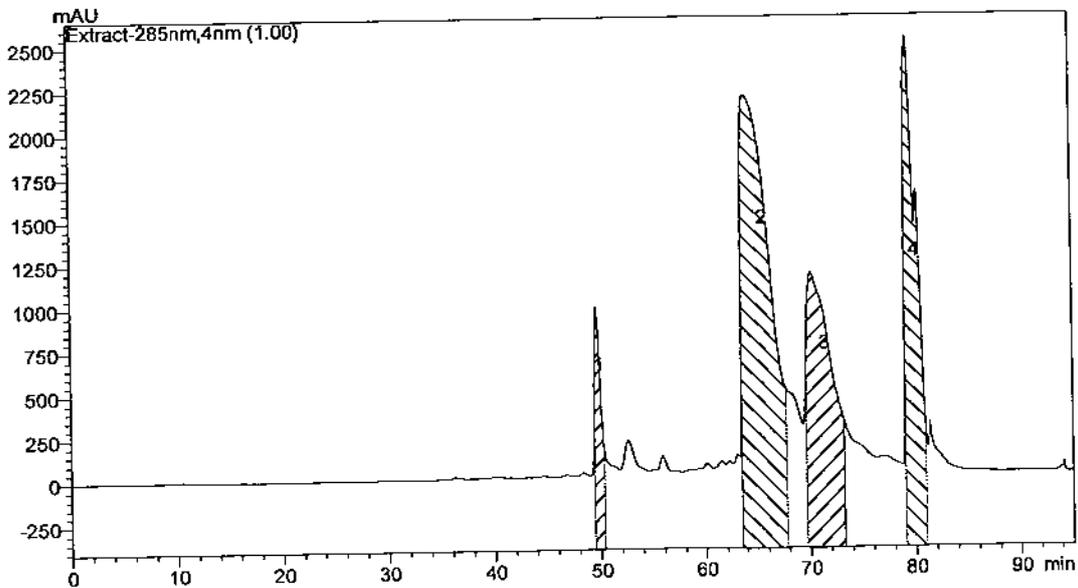


[그림 3-1-11] 감태 ethyl acetate 용매분획 층의 GS Fr. 4 분획의 C18 prep column 크로마토그램

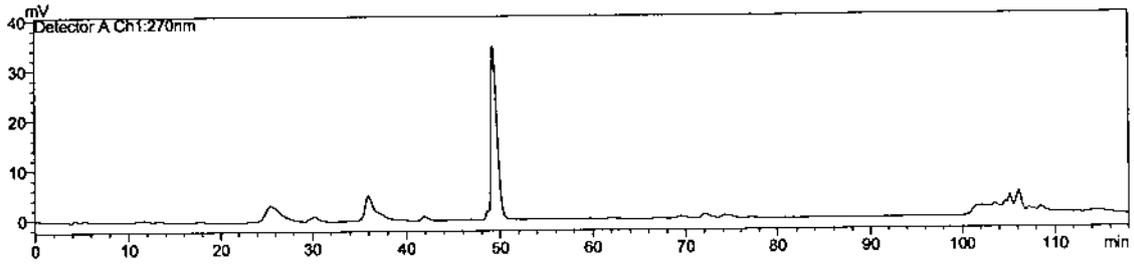
이 분획은 다시 JAI C18 (500 mm × 21.2 mm) Prep column을 사용하여 그림 3-1-12와 같이 3개의 분획을 얻었다. 그림에서 4번째 분획은 column washing 과정 중에 용출되는 peak로 이 분획 또한 활성 시험을 하였다. 이렇게 얻어진 분획의 항산화 활성을 측정하여 생리활성 물질임을 확인하였다(표 3-1-4). 각각의 분획물들의 항산화 활성은 표품인 Vit. C에 비해 훨씬 높은 항산화 활성을 나타내었으며, ROS 소거능은 분획물의 종류에 따라 다소 차이가 있었다. 이들의 분획물을 분석용 Phenomenex C18(2) (150 mm × 4.6 mm) column으로 분리하여 순도를 확인하여 현재 구조를 분석하기 위한 실험 중에 있다(그림 3-1-13 ~ 3-1-15).

[표 3-1-4] 곱피 ethylacetate 획분에서 분리된 화합물의 항산화 활성

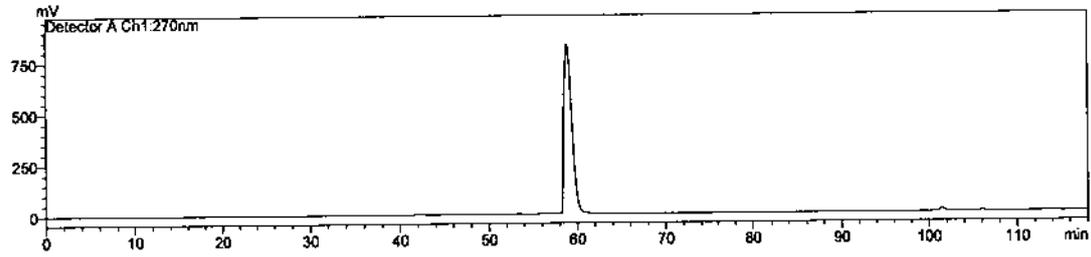
	DPPH radical 소거능	ROS 소거능 (EC ₅₀)
Fr. 3	0.58	4.5
Fr. 4	0.45	2.4
Fr. 5	0.67	5.1
Fr. 6	0.55	3.8
L-ascorbic acid	1.8 µg/ml	-



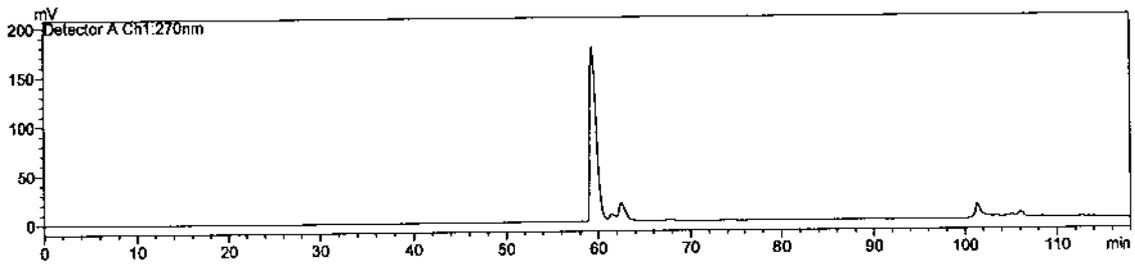
[그림 3-1-12] 감태 ethyl acetate 용매분획 층의 GS4-RP2 분획을 JAI C18 Prep. column에 의한 크로마토그램



[그림 3-1-13] GS4-RP2-RP1에서 얻어진 분획의 분석 HPLC에 분리

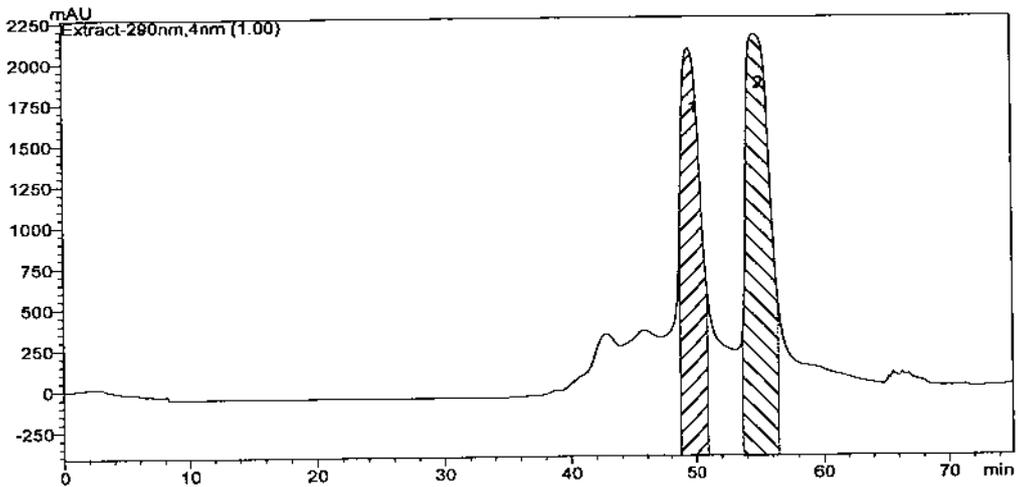


[그림 3-1-14] GS4-RP2-RP2에서 얻어진 분획의 분석 HPLC에 분리

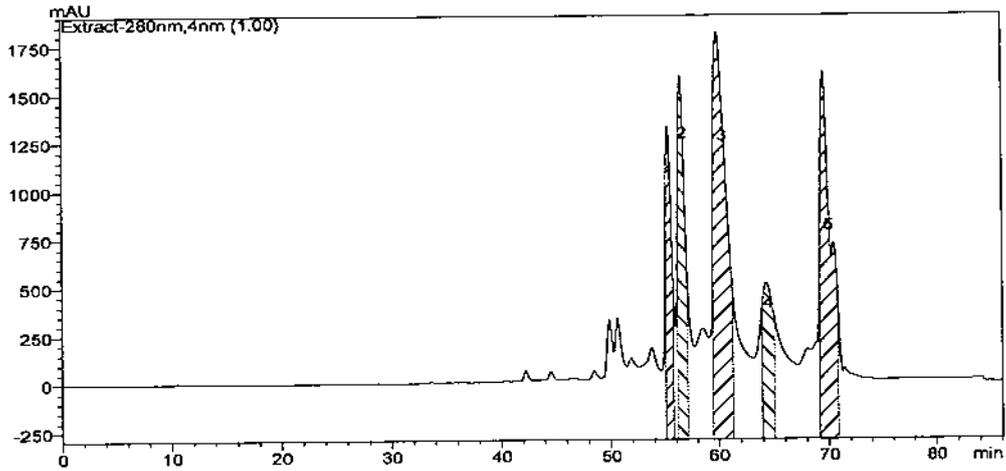


[그림 3-1-15] GS4-RP2-RP3에서 얻어진 분획의 분석 HPLC에 분리

GS분획 Fr. 5번은 Fr. 4번과 비슷한 조건을 이용하여 다음 그림 3-1-16과 같이 분획하였다.



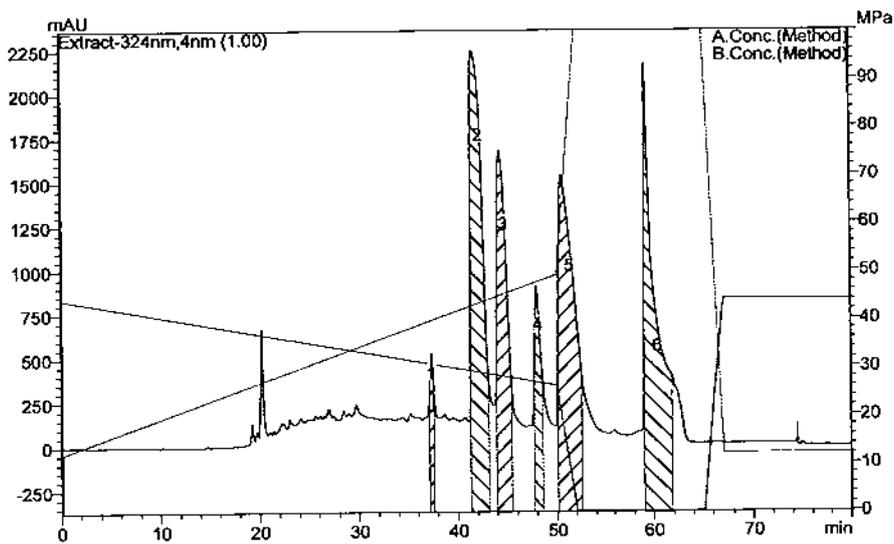
[그림 3-1-16] 감태 ethayl acetate 용매분획 층의
GS Fr. 5분획의 C18 prep column 분획



[그림 3-1-17] 감태 ethyl acetate 용매분획 층의
GS5-RP2 분획을 JAI C18 prep column에 의한 분획

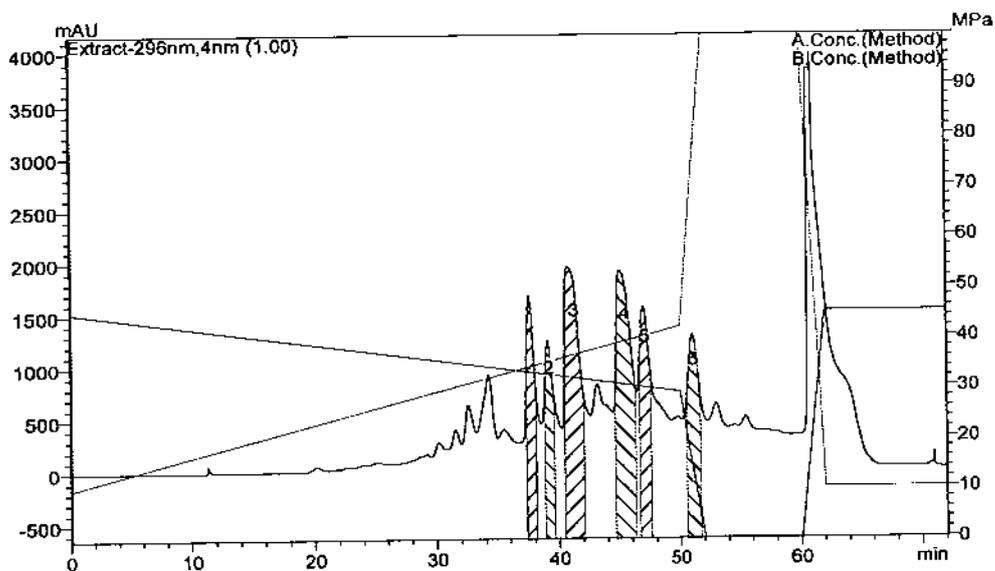
Ethyl acetate 분획 4번과 같이 GS Fr. 5번도 2개의 Peak로 분리되었고(그림 3-1-16), 이를 다시 JAI C18 prep. column을 이용하여 그림 3-1-17과 같이 분리하였다. 상기 그림과 같이 4개의 활성성분이 분획되었으나 1번과 2번은 분획량이 적어서 활성 실험을 하지 못하고 3번과 4번의 항산화 활성을 측정하였다.

GS6번 분획은 GS4번과 같은 방법으로 분리하여 그림 3-1-18과 같이 분획물을 얻었다. GS6번은 한번에 5개의 분획으로 분리되었는데 이는 chromatogram의 사선과 같이 용매조성의 변화로 분리하였다.



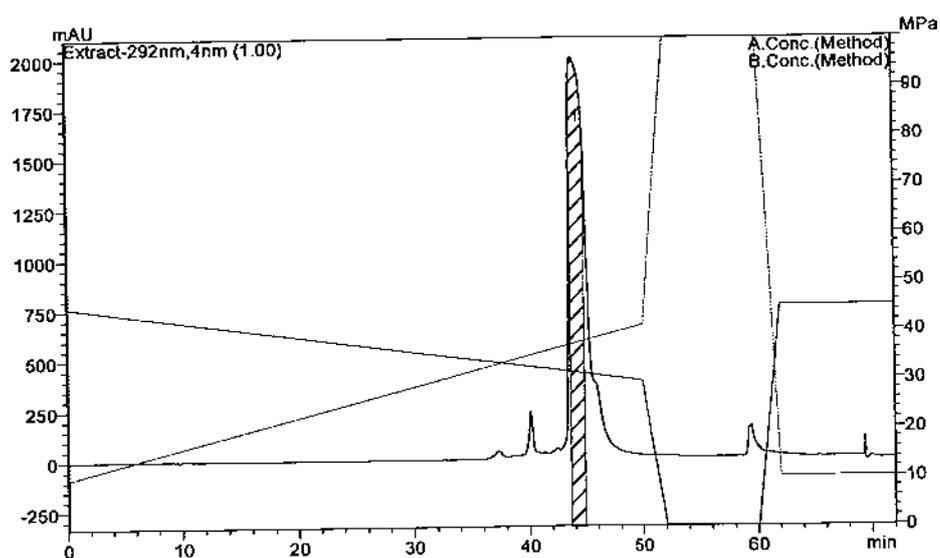
[그림 3-1-18] 감태 ethyl acetate 용매분획 층의
GS Fr. 6분획의 C18 prep column 분획

GS2번 분획은 GS6와 같은 방법으로 분리하여 그림 3-1-19와 같이 분획을 얻었다. GS6번은 한번에 5개의 분획으로 분리하였는데 이는 chromatogram의 사진과 같이 용매조성의 변화로 분리하였다.



[그림 3-1-19] 감태 ethyl acetate 용매분획 층의 GS Fr. 2분획의 C18 prep column분획

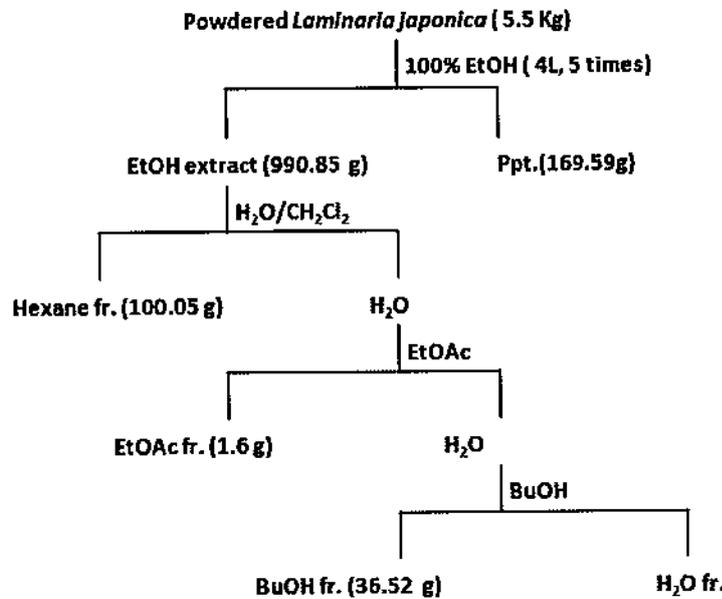
위에서 얻어진 GS2-RP4는 다시 정제과정을 통하여 순도를 높이고 NMR을 사용하여 구조분석을 한 결과 phlorofucofuroeckol B로 확인되었다.



[그림 3-1-20] 감태 ethyl acetate 용매분획 층의 GS Fr. 2-RP4 분획의 분석 column에 의한 재정제

(6) 다시마로부터 생리활성 검색 및 분리

다시마의 생리활성물질을 검색하기 위하여 4.5 kg 감태를 ethanol로 추출하여 990.85g의 건조된 에탄올 추출분말을 얻었고 hexane, dichloromethane, ethyl acetate, butanol등으로 용매 분획을 하여 각각 100.05 g, 1.6 g, 36.52 g 을 얻었다 (그림 3-1-21).



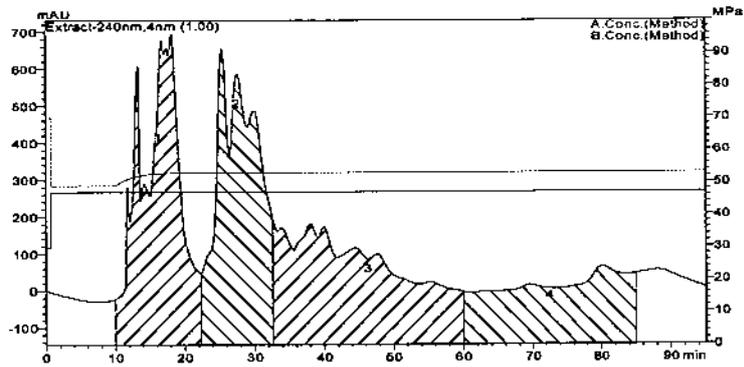
[그림 3-1-21] 다시마 ethanol 추출물의 용매 분획과정

각 용매 분획에 대하여 항염증 활성을 측정을 한 결과 hexane층이 가장 높아 이 분획층을 다시 methanol 가용층과 불용층으로 나누어 methanol 가용층을 200 mg/mL의 농도로 용해하고 JAI C18 column (500 mm × 21.2 mm)을 이용하여 다음의 그림 3-1-22와 같이 분획하였다.

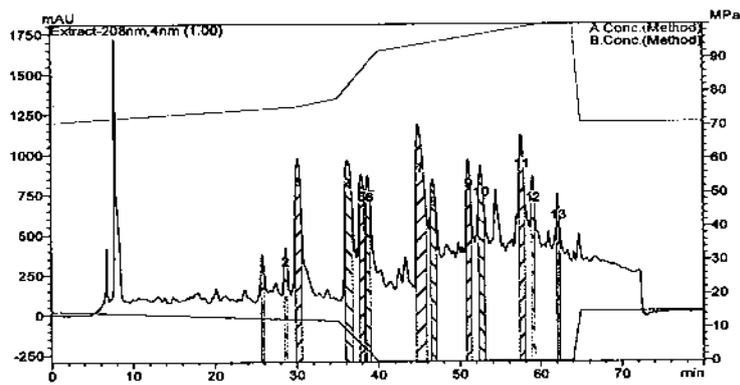
Hexane 용매 분획이지만 분획물의 많은 양이 hexane보다는 methanol에 잘 용해되어 이 층을 methanol에 녹여 역상 C18 column을 이용하여 그림 3-1-22 같이 4개의 분획으로 Hexane 이중 분획 Fr. 2번을 다시 Phenomenex C18(2) column으로 13개의 분획으로 H₂hexane 8번 분획까지는 어느 정도 순수하게 He되었으나 그 이후의 분획물은 baseline과 겹쳐지는 것으로 예상된다.

JAI fraction의 3번을 Phenomenex C18(2) column을 사용 15개의 분획으로 분취하였다. 초기에는 수용성 물질로 독성이 강하고 항염증 기능이 약한 반면(그림 3-1-24) 5번이후의 분취물은 독성이 약하면서 항염증 기능이 증가되는 것으로 나타났다(그림 3-1-25). 6번과 7번 획분을 NMR과 GC/MS로 분석한 결과 6번은

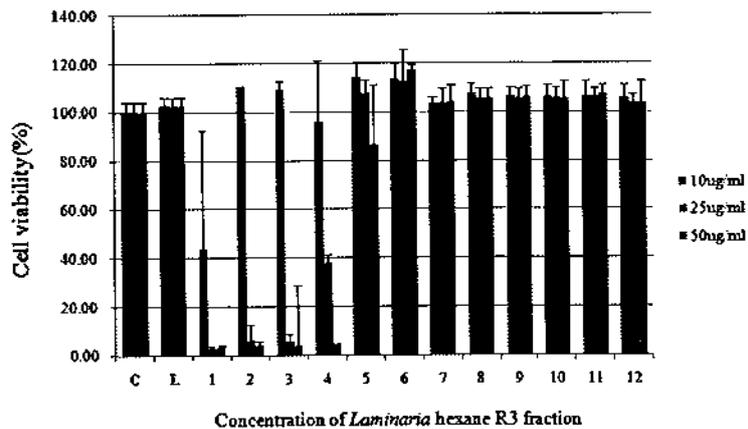
hexadecanoic acid methyl ester로, 7번 획분은 9-octadecenoic acid methyl ester로 동정 되었다.



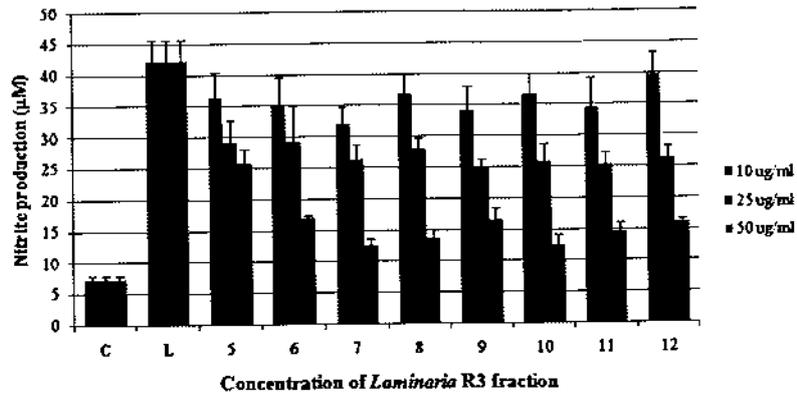
[그림 3-1-22] 다시마 Hexane 용매분획 층의 JAI column 분획



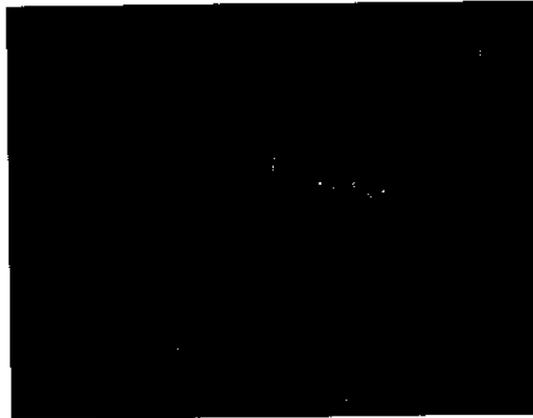
[그림 3-1-23] 다시마 JAI column Fr. 2번 분획을 Phenomenex C18(2)로 분획한 chromatogram



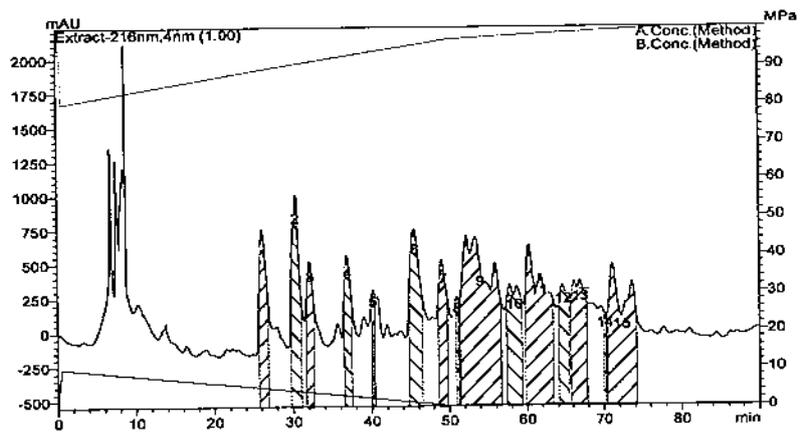
[그림 3-1-24] 다시마 JAI column Fr. 3번 분획을 Phenomenex C18(2)로 분획한 획분들의 세포독성



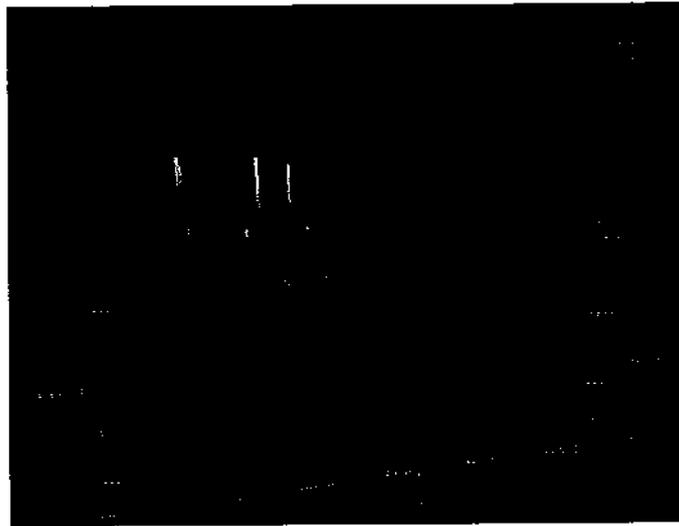
[그림 3-1-25] 다시마 JAI column Fr. 3번 분획을 Phenomenex C18(2)로 분획한 획분들의 항염증 활성



[그림 3-1-26] 다시마 JAI column Fr. 2번 분획을 Phenomenex C18(2)로 분획한 chromatogram



[그림 3-1-27] 다시마 JAI column Fr. 3번 분획을 Phenomenex C18(2)로 분획한 chromatogram



[그림 3-1-28] 다시마 JAI column Fr. 3번 분획을 Phenomenex C18(2)로 분획한 chromatogram

(7) 생리활성물질의 분석방법 확립

생리활성물질의 분석방법은 통합활용팀과 공동으로 확립하였으며, 저분자 화합물의 분리중의 활성 분석은 항산화와 항염증 활성을 측정하여 활성획분들을 분리하였다.

(가) 항산화 활성

① DPPH 래디칼 소거능

분리된 분획물과 분리된 화합물의 항산화활성은 Nanjo 등의 방법에 따라 radical 소거능으로 측정하였다. 즉, 20 μ l의 시료와 40 μ l의 DPPH 용액 (100 μ M) 을 96 well에 취한 후 실온에서 30분간 반응시킨 후 ELISA reader로 520 nm에서 흡광도를 측정하여 계산하였다.

② 세포내 ROS 측정

세포내 ROS 측정은 형광 probe인 DCFH-DA를 사용하여 측정하였다. 분리된 phlorotannin을 각각 다른 농도로 RAW 264.7 세포에 1-6시간 처리한 후 1 μ g/ml의 농도로 LPS를 처리한 후 2 시간 후에 세포를 수거하여 세포중의 ROS를 DCFH-DA와 반응시켜 생성된 형광의 강도를 형광광도계로 측정하였다. 측정시 여기파장은 485 nm이며, 방출파장은 528 nm이다.

(나) 항염증 활성

① 세포배양 및 세포독성 시험

Macrophage RAW 264.7 (ATCC, Rockville, MD) 세포를 10% FBS가 함유된 DMEM 배지로 배양하였다. 분리물의 세포독성은 MTS kit (CellTiter96 Aqueous One Solution Cell Proliferation Assay Kit)를 사용하였다. 즉, well 당 10^5 cells 농도로 세포를 분주한 후 24 시간 배양한 후 분리된 시료를 (0-50 μ M) 가하여 24시간 배양한 후 95 μ l의 배지와 5 μ l의 MTS 용액을 가한 후 3시간 후 490 nm에서 흡광도를 측정하였다.

② 염증 매개인자 (NO) 분석

RAW 264.7 cells를 5×10^5 농도로 12-well plate에서 24시간 배양하였다. 배양된 세포에 0-20 μ M의 분리된 시료와 1 μ g/mL의 LPS를 가한 후 24 시간 배양하였다. 배양된 배지성분을 회수하여 배지중의 NO와 PGE₂의 농도를 분석하였다. NO는 Griess 반응에 따라 분석하였다. 즉, 100 μ l의 세포배양액에 동일량의 Griess 시약 (0.1% naphthylethylenediamine dihydrochloride and 1% sulfanilamide in 5% H₃PO₄)을 가한 후 1 시간 후에 540 nm에서 흡광도를 ELISA reader로 측정하였다.

4. 요약 및 제언

해조류를 ion exchange Shim-pack ISA-07 (4.0 × 250 mm) 분석 column과 Shim-pack ISA guard column (4.0 × 50.0 mm)을 사용하며 이동상으로 potassium borate (pH 8)과 B용액으로 potassium borate (pH 9)를 사용하는 post-column 유도체화 방법이 해조류의 Cellobiose, maltose, rhamnose, ribose, mannose, arabinose, galactose, xylose, glucose와 같은 단당류 및 이당류를 분석하는 최적의 방법으로 예상된다. 다만 이 분석방법으로는 arabinose와 fructose를 동시에 분석할 수 없는 것이 단점이다. 그러나 이 방법은 환원당을 유도체화 한 후 형광 검출기 (Ex=320, Em=430)를 사용하기 때문에 저 농도의 환원당을 분석하여 해조류의 당 database를 확립하는 최적으로 방법으로 선택하여 해조류의 당을 분석하였다. 해조류를 0.2 M HCl로 가수분해하여 분석한 총환원당의 순서는 다음과 같다. 우뭇가사리(7348 ppm) > 진두발(5355) > 도박(4587) > 파래(2872) > 우뭇가사리(수과원-1996) > 서실(1594) > 대왕물(1216) > 곰피(1160) > 다시마(548) > 미역(466) 같은 종일지라도 생산지에 따라 총 환원당 함량 뿐만 아니라 조성도 많이 차이가 남을 보여주었다. 더불어 질산, 황산, 수산화나트륨 등의 촉매로 가수분해하여 환원당을

측정한 결과 수산화나트륨은 전혀 해조류의 당을 가수분해하지 못했으며 황산이 가장 높은 총 환원당을 가수분해하였다. 또한 산처리 후 5분 이내의 plasma 처리는 환원당 가수분해율을 높이는 결과를 보여주었다.

감태를 100% ethanol로 추출하고 hexane, chloroform, ethyl acetate, butanol, water 용매로 추출물을 용매분획하고 항산화성이 높은 ethyl acetate층을 GS-310 GPC column을 사용하여 다시 항산화 활성이 높은 분획을 검색한 후 역상 Phenomenex C18(2), JAI C18, Shimadzu C18 column을 활용하여 methanol, acetonitrile, 0.1% formic acid in water 이동상으로 활성이 높은 물질의 분획 방법을 확립하였다.

다시마도 감태와 같은 방법으로 용매를 사용하여 분획하고 이 분획에 대한 활성을 검색한 결과 hexane 층이 높게 나타났다. 따라서 hexane 층을 역상 JAI column에 의하여 분획을 한 다음 Phenomenex C18(2)을 사용하여 활성물질에 대한 분획 조건을 확립하였다. 연구기간이 짧은 관계로 분리된 화합물의 구조분석이 진행 중에 있으며, 조만간 수종의 화합물들의 구조가 규명되면 보다 많은 과학적이 자료를 축적할 것으로 예상된다.

제 2 절 해조류 생리활성 물질 검색 및 성분 규명

1. 연구 목적 및 내용

가. 연구 목적

해조류를 이용한 바이오에너지 생산 시 해조류 중에 함유되어 있는 저분자 화합물들을 분리하여 이들의 생리활성을 다양한 각도에서 검색하여 식의약품 소재로 활용함으로써 바이오에너지 생산 시 경비 절감에 기여하고자 한다.

나. 연구 내용

우리나라의 대표적인 갈조류인 다시마, 모자반 및 곰피의 저분자 생리활성 물질을 ethanol (EtOH)로 추출한 후 *n*-hexane, dichloromethane, ethylacetate (EtOAc), *n*-butnaol (*n*-BuOH) 및 물 획분으로 분리한 후 각각의 획분 함량을 분석하였으며, 각각의 획분에 대하여 항산화, 항염증, 항치매, 항비만, 항암 및 당뇨합병증 저해효과를 규명함으로써 이들 생리활성물질들을 식의약 소재로 활용하기 위한 기초자료를 확보하였다.

2. 연구 방법

가. 실험장치 및 재료

(1) 실험장치

농축기 (rotary vacuum evaporator), 추출기, 대형 silica 칼럼, HPLC, CO₂ 배양기, 전기영동장치, 클린벤치, 액체질소탱크, 항온조, 전기영동장치, 실시간 PCR 장치, 이미지 분석기, 형광현미경, ELISA leader (Molecular Devices, USA), Fluorescent microscopy ECLIPSE 50i (Nikon, Japan)

(2) 실험 재료

건조 다시마 50 kg, 건조 모자반 10 kg, 건조 곰피 50 kg, MDA-MB-231 breast cancer cells (ATCC), RAW 264.6 cells (ATCC), HepG2 cells (ATCC), JB6 cells (ATCC), B16 cells (ATCC), PCR용 primer (Bioneer), 2',7'-Dichlorofluorescein diacetate (Sigma-Aldrich), LPS (Sigma-Aldrich), Luciferase assay kit (Promega), pRL-TK DNA (Promega), reverse transcriptase (Promega), penicillin (GIBCO-BRL),

streptomycin (GIBCO-BRL), Dulbecco's Modified Eagle's 배지 (GIBCO-BRL), Minimum essential 배지 (GIBCO-BRL), trypsin-EDTA (GIBCO-BRL), fetal bovine serum (GIBCO-BRL), sodium pyruvate (GIBCO-BRL), non-essential amino acid (GIBCO-BRL), CellTiter 96[®]AQ_{ueous} One Solution Cell Proliferation Assay kit (Promega), Tacrine (Sigma-Aldrich), dimethylsulfoxide (Sigma), PGE₂ ELISA kits (R&D Systems), IL-1b (R&D Systems), IL-6 (R&D Systems), TNF-a (R&D Systems), PARP (Santa Cruz), caspase-8 (R&D Systems), Bid (R&D Systems), Fas (R&D Systems), FasL (Santa Cruz), cytochrome c (Santa Cruz), Cleaved caspase-3 (Cell Signaling Tech Siogy), SP600125 (A.G. Scientific), COX-2 (Santa Cruz), iNOS (Santa Cruz), NF-kB p65 (Santa Cruz), Ikb-a (Santa Cruz), phospho-Akt (p-Akt) (Santa Cruz), Akt (Santa Cruz), phospho-ERK (p-ERK) (Santa Cruz), phospho-JNK (p-JNK) (Santa Cruz), phospho-p38 MAPK (p-p38 MAPK) (Santa Cruz), anti-rabbit 2 차 항체 (R&D Systems), anti-mouse 2 차 항체 (R&D Systems), ECL detection kit (GE healthcare). EZ-Cytox Cell Viability Assay Solution WST-1[®] (Daeil Lab Service), proteinase inhibitors (Intron biotechnology), Protein Quantification Kit (Dojindo Molecular Technologies), nitrocellulose membrane (PALL Life Sciences), 1차 항체(anti-cytochrome c, anti-Ras, anti-HSP27, anti-Bcl-xL, anti-caspase8, anti-a-actinin, anti-WAVE-2, anti-Rac1/2/3, anti-p-MEK1/2, anti-p-Erk1/2, anti-CDK6, anti-p-cdc2, anti-p21^{Waf1/cip1}; Cell Signaling Technology 사), 2차 항체(horseradish peroxidase-coupled anti-rabbit IgG, anti-mouse IgG; Cell Signaling Technology사)

나. 실험 절차

(1) 해조류 저분자 생리활성물질 함량 분석조건 확립

(가) 해조류 저분자 생리활성물질 추출조건 확립

건조 다시마 일정량에 50배량의 EtOH 또는 acetone의 농도를 달리하여 상온에서 5시간 동안 3회 추출한 후 추출용매를 증발시켜 동결건조 후 DMSO에 녹여 추출물 중의 phlorotannin 농도를 Folin-Ciocalteus 법으로 분석하였다.

(나) 다시마의 저분자 생리활성물질의 유기용매 획분 분리

분쇄된 건조다시마 분말로 만든 시료 3.5 kg을 환류 냉각기를 부착한 집기

병에 담은 후 10 L의 EtOH을 넣은 후, 수욕상에서 3시간 동안 추출하였다. 추출액을 여과하여 rotary vacuum evaporator를 사용하여 40 °C에서 농축하였다. 위와 같은 방법으로 다시 2회 더 반복하여 EtOH 추출물을 얻었다. 추출물을 H₂O:EtOH (9:1, v/v)의 혼합용매로 녹인 후, 분액 깔대기에 부어, 동량의 *n*-hexane를 넣어 분액 깔대기를 흔들어 용해시켜 평형화시킨 후 위층의 *n*-hexane 가용부를 모아 무수 황산 나트륨 (sodium sulfate, anhydrous)으로 처리한 다음 여과하여 농축하여 *n*-hexane 불휘발을 분리하였다. 동일한 방법으로 dichloromethane을 H₂O층에 가하여 하층의 dichloromethane 가용부를 모아 dichloromethane 휘분을 분리하였다. H₂O층에 동량의 EtOAc를 가하여 상층의 EtOAc 가용부를 모아 EtOAc 불휘발을 분리하였다. 또한 *n*-BuOH에 대해서도 동일한 방법으로 시행하여 상층의 *n*-BuOH 휘분과 하층의 H₂O 휘분을 분리하여 회수하였다. 각 휘분의 수율은 상압건조법에 의하여 측정하였으며, polyphenol 화합물의 함량은 Folin-Ciocalteus 법으로 분석하였다. 모자반과 곰피의 유기용매 불휘도 다시마와 동일한 방법으로 행하였다.

(다) 저분자 생리활성 화합물의 분리

다시마로부터 얻은 hexan 휘분을 recycling HPLC system에 장착된 Asahipak GS-310 칼럼 (500 × 20 mm, Showa Denko, Japan)으로 겔여과하여 분자량에 따라 3개의 휘분으로 분리하였다. 각각의 휘분들에 대한 생리활성 (항산화, 항염증, 항암 활성)을 측정하여, Shim-pack PREP-ODS (5 μm, 100 Å, 250 mm × 20 mm, Shimadzu Co., Tokyo, Japan) 칼럼으로 순수하게 분리하였다.

곰피의 경우 항산화활성이 높은 EtOAc 휘분 5 g을 methanol에 녹여 대형 silica column (100×10 cm)에 loading하여 dichloromethane과 methanol (MeOH) 혼합용액으로 (6:1, 5:2, 4:3, 3:4, 2:5, 1:6, v/v, 1.2 L)-용출시킨 후 분리된 휘분의 항산화 또는 항염증 활성을 측정하여 활성이 높은 휘분을 분리하였다. 활성이 높은 휘분을 recycling HPLC system에 장착된 Asahipak GS-310 칼럼 (500 × 20 mm, Showa Denko, Japan)으로 겔여과하여 유사한 분자량의 물질들을 회수하였다. 각각의 휘분들에 대한 생리활성 (항산화, 항염증, 항암효과)을 측정하여, Shim-pack PREP-ODS (5 μm, 100 Å, 250 mm × 20 mm, Shimadzu Co., Tokyo, Japan) 칼럼으로 순수하게 분리하였다.

(라) 활성 화합물의 구조/기능분석

분리된 화합물의 동정은 본 연구진이 확보하고 있는 표품과 1차적으로 C₁₈과 silica TLC plate에 전개시켜 확인하였다. 확증이 안될 경우 ¹H-과 ¹³C-NMR

spectrum을 비교분석하였다. 신규 화합물의 경우 부경대 공동실험실습관에 의뢰하여 분리물을 동정하였다. 분리된 화합물은 화학적 방법에 의한 유도체의 제조 및 분해산물을 얻었다. 2D-NMR spectroscopy로서 ^1H - ^1H , ^1H - ^{13}C COSY, DEPT, HMBC, NOESY spectrum을 얻어서 해석을 통하여 구조를 결정하였다. 이렇게 분리하여 얻은 화합물을 분석을 위한 지표물질과 생리활성을 위한 시료로 사용하였다.

(2) 해조류 저분자 생리활성물질의 기능성 분석

(가) 항염증 활성

① 세포배양 및 세포독성 시험

Macrophage RAW 264.7 (ATCC, Rockville, MD) 세포를 10% FBS가 함유된 DMEM 배지로 배양하였다. 분리물의 세포독성은 MTS kit (Cell Titer⁹⁶ AQueous One Solution Cell Proliferation Assay Kit)를 사용하였다. 즉, well 당 10^5 cells 농도로 세포를 분주하여 24시간 배양한 후 분리된 시료를 가하여 24시간 배양한 후 95 μl 의 배지와 5 μl 의 MTS 용액을 가하여 1시간 후 490 nm에서 흡광도를 측정하였다.

② 염증 매개인자 (NO, PGE₂) 분석

RAW 264.7 cells를 5×10^5 농도로 12-well plate에서 24시간 배양하였다. 배양된 세포에 각기 다른 농도의 분리된 시료와 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 의 LPS를 가한 후 24시간 배양하였다. 배양된 배지성분을 회수하여 배지중의 NO와 PGE₂의 농도를 분석하였다. NO는 Griess 반응에 따라 분석하였다. 즉, 100 ml의 세포배양액에 동일량의 Griess 시약 (0.1% naphthylethylenediamine dihydrochloride and 1% sulfanilamide in 5% H₃PO₄)을 가한 후 1시간 후에 540 nm에서 흡광도를 ELISA reader로 측정하였다. PGE₂ 농도는 PGE₂ enzyme-linked immunosorbant assay kit(Amersham Biosciences)를 사용하여 측정하였다.

③ 염증관련 cytokine의 분석

염증관련 cytokine (TNF- α , IL-1 β , IL-6)의 분석은 ELISA kit를 사용하여 제조사의 manual에 따라서 측정하였다. 즉, 분리된 시료와 LPS로 처리된 RAW 264.7 세포를 6-24시간 배양한 후에 배지 중에 파비된 cytokine을 ELISA 법으로 분석하였다.

④ Western Immunoblot

분리된 시료로 처리된 RAW 264.7 세포를 PBS로 2회 씻은 후 cell lysis buffer (50 mM Tris-HCl, pH 7.5, 150 mM NaCl, 1% Nonidet-40, 1% Tween-20, 0.1% SDS, 10 µg/mL leupeptin, 50 mM NaF, 1 mM PMSF)를 가하여 4°C에서 1시간 방치하여 18,000 g에서 10분간 원심분리하여 상등액을 얻었다. 일정량의 단백질 (20-40 mg)을 SDS-PAGE로 분리하여 nitrocellulose에 옮긴 후 1차 항체, 2차 항체로 순차적으로 반응시킨 후 ECL 화학발광 kit를 이용하여 특정 단백질의 발현을 확인하였다. 분석대상 단백질은 iNOS, COX-2, ERK, pERK, p38, pp38, JNK, pJNK, pAkt, Akt, PI3K, NF-κB, IκBα 등이다.

⑤ RNA분리 및 RT-PCR

세포내 total RNA는 RNeasy mini kit (Qiagen, USA)로 분리하였다. 분리된 total RNA 1 mg을 이용하여 ImProm Reverse Transcription System (Promega, USA)으로 cDNA를 합성하였다. 합성된 cDNA를 이용하여 real-time PCR로써 상대적인 mRNA 발현량을 측정, 분석하였다. House keeping 유전자는 GAPDH를 사용하였다. Real-time RT-PCR 대상 유전자는 COX-2와 iNOS이다. 전사수준에서 이들 유전자의 전사량을 측정함으로써 분리된 화합물에 의한 염증 유발 단백질의 억제 정도가 전사 수준 또는 번역수준에서 억제됨을 알 수 있다. PCR에 사용된 Primer의 서열은 다음과 같다.

COX-2 sense, 5' -CCTAGGCTTCAG CCTCACAC-3' ;
COX-2 antisense, 5' -CAGCCTAATGTTTCAGCGACA-3' ;
iNOS sense, 5' -CACCTTGGAGTTCACCCAGT-3' ;
iNOS antisense, 5' -ACCACTCGTACTTGGGATGC-3' ;
GAPDH sense, 5' -TGGCACAGTCAAGGCTGAGA-3' ;
GAPDH antisense, 5' -CTTCTGA GTGGCAGTGATGG-3' .

⑥ 염증관련 전사인자 활성분석

염증에 관여하는 주요 전사인자인 NF-κB의 전사활성은 NF-κB 결합부위를 함유하는 plasmid를 이용하여 분석하였다. NF-κB promoter를 함유한 pGL-2 vector를 세포에 lipofectamine을 이용하여 transfection 한 후 24시간 동안 분리된 시료를 처리하여 8시간 더 배양한 후 세포를 용해하여 20 mg 단백질과 substrate를 첨가하여 luminometer로써 luciferase 활성을 측정하였다.

(나) 항산화 활성

① DPPH 래디칼 소거능

분리된 분획물과 분리된 화합물의 항산화활성은 Nanjo 등의 방법에 따라 radical 소거능으로 측정하였다. 즉, 20 ml의 시료와 40 ml의 DPPH 용액 (100 mM) 을 96 well에 취한 후 실온에서 30 분간 반응시킨 후 ELISA reader로 520 nm에서 흡광도를 측정하여 계산하였다.

② 세포내 ROS 측정

세포내 ROS 측정은 형광 probe인 DCFH-DA를 사용하여 측정하였다. 분리된 시료를 각각 다른 농도로 RAW 264.7 세포에 1-6시간 처리한 후 1 mg/ml의 농도로 LPS를 처리한 후 2시간 후에 세포를 수거하여 세포중의 ROS를 DCFH-DA와 반응시켜 생성된 형광의 강도를 형광광도계로 측정하였다. 측정시 여기파장은 485 nm이며, 방출파장은 528 nm이다.

③ 항산화 관련 단백질의 분석

분리된 시료로 처리된 HepG2 세포를 PBS로 2회 씻은 후 cell lysis buffer (50 mM Tris-HCl, pH 7.5, 150 mM NaCl, 1% Nonidet-40, 1% Tween-20, 0.1% SDS, 10 µg/mL leupeptin, 50 mM NaF, 1 mM PMSF)를 가하여 4 °C에서 1시간 방치하여 18,000 g에서 10분간 원심분리하여 상등액을 얻었다. 일정량의 단백질 (20-40 mg)을 SDS-PAGE로 분리하여 nitrocellulose에 옮긴 후 1차 항체, 2차 항체로 순차적으로 반응시킨 후 ECL 화학발광 kit를 이용하여 특정 단백질의 발현을 확인하였다. 분석대상 단백질은 Nrf-2, HO-1, NQO-1, ERK, pERK, p38, pp38, JNK, pJNK, pAkt, Akt, PI3K 등이다.

④ 항산화 단백질의 전사 변화

세포내 항산화에 관여하는 주요 전사인자인 Nrf-2의 전사활성은 Nrf-2 결합 부위를 함유하는 plasmid를 이용하여 분석하였다. Nrf-2 promoter를 함유한 PCBG를 세포에 lipofectamine을 이용하여 transfection 한 후 24시간 후 분리된 phlorotannin을 처리한 후 8시간 더 배양한 후 세포를 용해하여 20 mg 단백질과 substrate를 첨가하여 luminometer로써 luciferase 활성을 측정하였다.

(다) 항치매 활성

① 세포배양 및 세포독성 시험

뇌세포인 BV2 세포를 10% FBS가 함유된 DMEM 배지로 배양하였다. 분리물의 세포독성은 MTS kit (CellTiter⁹⁶ AQueous One Solution Cell Proliferation Assay Kit)를 사용하였다. 즉, well 당 10^5 cells 농도로 세포를 분주한 후 24시간 배양한 후 분리된 시료를 (0-50 mM) 가하여 24시간 배양한 후 95 ml의 배지와 5 ml의 MTS 용액을 가한 후 1시간 후 490 nm에서 흡광도를 측정하였다.

② 염증 매개인자 (NO, PGE₂) 분석

BV2 세포를 5×10^5 cell/well의 농도로 12-well plate에서 24시간 배양하였다. 배양된 세포에 0-20 μ M의 분리된 시료와 1 μ g/mL의 LPS를 가한 후 24시간 배양하였다. 배양된 배지성분을 회수하여 배지 중의 NO와 PGE₂를 분석하였다. NO는 Griess 반응에 따라 분석하였다. 즉, 100 ml의 세포배양액에 동일량의 Griess 시약 (0.1% naphthylethylenediamine dihydrochloride and 1% sulfanilamide in 5% H₃PO₄)을 가한 후 1시간 후에 540 nm에서 흡광도를 ELISA reader로 측정하였다. PGE₂ 농도는 PGE₂ enzyme-linked immunosorbant assay kit(Amersham Biosciences)를 사용하여 측정하였다.

③ 염증관련 cytokine의 분석

염증관련 cytokine의 분석으로 TNF- α , IL-1b, IL-6를 ELISA kit(Amersham Biosciences)를 사용하여 제조사의 manual에 따라서 측정하였다. 즉, 분리된 시료와 LPS로 처리된 BV2 세포를 6-24시간 배양한 후에 배지 중에 분비된 cytokin을 ELISA 법으로 분석하였다.

④ Western Immunoblot

분리된 시료로 처리된 BV2 세포를 PBS로 2회 씻은 후 cell lysis buffer (50 mM Tris-HCl, pH 7.5, 150 mM NaCl, 1% Nonidet-40, 1% Tween-20, 0.1% SDS, 10 mg/mL leupeptin, 50 mM NaF, 1 mM PMSF)를 가하여 4 °C에서 1시간 방치하여 18,000 g에서 10분간 원심분리하여 상등액을 얻었다. 일정량의 단백질 (20-40 mg)을 SDS-PAGE로 분리하여 nitrocellulose에 옮긴 후 1차 항체, 2차 항체로 순차적으로 반응시킨 후 ECL 화학발광 kit를 이용하여 특정 단백질의 발현을 확인하였다. 분석대상 단백질은 iNOS, COX-2, ERK, pERK, p38, pp38, JNK, pJNK, pAkt, Akt, PI3K, NF- κ B, I κ Ba 등이다.

⑤ RNA분리 및 RT-PCR

세포내 total RNA는 RNeasy mini kit (Qiagen, USA)로 분리하였다. 분리된 total RNA 1 mg을 이용하여 ImProm Reverse Transcription System (Promega, USA)으로 cDNA를 합성하였다. 합성된 cDNA를 이용하여 real-time PCR로써 상대적인 mRNA 발현량을 측정 분석하였다. House keeping 유전자는 GAPDH를 사용하였다. Real-time RT-PCR 대상 유전자는 COX-2와 iNOS이다. 전사수준에서 이들 유전자의 전사량을 측정함으로써 분리된 화합물에 의한 염증 유발 단백질의 역제거 전사 수준 또는 번역수준에서 억제됨을 알 수 있다. PCR에 사용된 Primer의 서열은 다음과 같다.

COX-2 sense, 5' -CCTAGGCTTCAG CCTCACAC-3' ;

COX-2 antisense, 5' -CAGCCTAATGTTTCAGCGACA-3' ;

iNOS sense, 5' - CACCTTGGAGTTCACCCAGT-3' ;

iNOS antisense, 5' -ACCACTCGTACTTGGGATGC-3' ;

GAPDH sense, 5' -TGGCACAGTCAAGGCTGAGA-3' ;

GAPDH antisense, 5' -CTTCTGA GTGGCAGTGATGG -3' .

(라) 항비만 효과

① 세포배양 및 지방분석

섬유아세포인 3T3-L1 세포를 high glucose DMEM에 배양하여 세포가 100% confluent될 때까지 배양하고, 2일 후에 MDI를 처리하여 지방세포로 분화를 유도하였다. 분화 유도시 일정량의 시료를 처리하여 7-9일 배양한 후에 지방세포로의 분화 억제효과를 Oil-Red O로 염색한 후 현미경 관찰과 염색된 지방을 추출하여 500 nm에서의 흡광도로 분석하였다.

② 비만 관련 단백질 및 유전자 분석

3T3-L1 섬유아세포가 MDI 처리에 의하여 지방세포로 분화시에 관여하는 전사인자인 PPAR γ 와 SREBP-1c와 같은 전사인자의 발현량을 시료처리 후 7일째에 Western blot으로 분석하였다. Western blot 조건은 항염증효과시의 분석조건과 동일하며, 1차 항체처리시의 조건은 항체에 따라 약간의 변화가 있다.

세포내 total RNA는 RNeasy mini kit (Qiagen, USA)로 분리하였다. 분리된 total RNA 1 mg을 이용하여 ImProm Reverse Transcription System (Promega, USA)으로 cDNA를 합성하였다. 합성된 cDNA를 이용하여 real-time PCR로써 상대

뒤, 그 1차 항체를 인지할 수 있는 발광형의 2차 항체를 처리하여 항원-항체 반응을 시키고 x-ray 필름에 노출하여 단백질 발현량의 변화를 분석하였다.

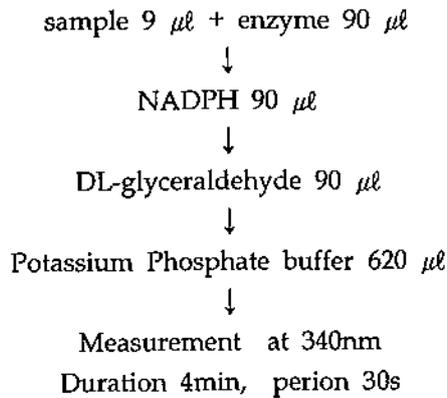
(바) 당뇨병병증 치료 및 예방효과

① 활성물질의 분리

건조분말상태의 다시마 5.5 kg을 환류 냉각기를 부착한 집기병에 담은 후 10 L의 MeOH을 넣은 후, 수욕상에서 3시간 동안 5회 추출하였다. 추출물을 H₂O:EtOH (9:1, v/v)의 혼합용매로 녹인 후, 분액 깔대기에 부어, 동량의 *n*-hexane를 넣어 분액 깔대기를 흔든 다음 평형화시킨 후 위층의 *n*-hexane 가용부를 모아 무수 황산 나트륨 (sodium sulfate, anhydrous)으로 처리한 다음 여과하여 농축하여 *n*-hexane 불용물을 분리하였다. 동일한 방법으로 dichloromethane을 H₂O층에 가하여 하층의 dichloromethane 가용부를 모아 dichloromethane 회분을 분리하였다. H₂O층에 EtOAc를 가하여 상층의 EtOAc 가용부를 모아 EtOAc 불용물을 분리하였다. 또한 *n*-BuOH에 대해서도 동일한 방법으로 시행하여 상층의 *n*-BuOH 회분과 하층의 H₂O 회분을 분리하여 회수하였다.

② 쥐 안구 aldose reductase (RLAR) 저해 활성 측정

RLAR 저해 활성을 측정하기 위한 효소원의 조제는 Hayman과 Kinoshita의 방법을 수정하여 실시하였다. 흰쥐의 수정체를 적출하고 수정체 1개당 0.5 mL의 phosphate buffer를 가하여 homogenization하였다. 이를 4 °C, 10,000 rpm으로 20분간 원심분리한 후 그 상등액을 취하여 사용하였다. 반응 buffer인 potassium phosphate buffer(pH 7.0) 620 mL, 효소원 90 mL, NADPH(1.6 mM) 90 mL, DMSO에 녹인 MeOH extract와 각각의 회분 9 mL, 기질로는 90 mL의 DL-glyceraldehyde를 큐벳에 넣어 UV spectrophotometer(Ultrospec 2100pro, Amersham Biosciences, Sweden)을 이용하여 340 nm에서 NADPH 흡광도의 감소율을 측정하였다. 대조군은 시료대신 DMSO를 첨가하여 측정하였으며, 저해율은 다음의 식으로 구한 후 선회귀 방정식을 사용하여 통계처리하였다(그림 3-2-1).

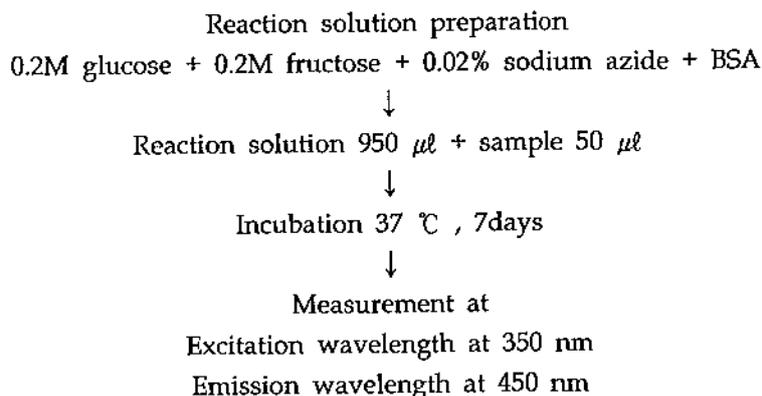


$$\text{저해율 (\%)} = 1 - (\text{시료의 흡광도} - \text{대조군의 흡광도}) / \text{표준흡광도} \times 100$$

[그림 3-2-1] 쥐 안구 aldose reductase 저해 활성 분석법

③ Advanced glycation End (AGE) formation inhibition assay (AGE 형성저해능 분석)

AGE 형성억제활성은 Vinson과 Howard의 방법을 변형하여 실험하였다. 먼저, AGE 반응용액을 준비하였다. 0.2 M glucose, 0.2 M fructose 와 bacteria의 성장을 막기 위한 0.02% sodium azide를 50 mM sodium phosphate buffer에 녹인 후, 10 mg/mL bovine serum albumin을 첨가하였다. AGE 반응용액 950 μL 과 10% DMSO에 녹인 여러 농도의 sample (f.c. 50-1600 $\mu\text{g/mL}$ for MeOH extract and fractions) 50 μL 를 섞은 후, 37 $^{\circ}\text{C}$ 에서 7일간 배양하였다. 이후 spectrofluorometric detector (FLx800 microplate fluorescence reader, Bio-Tek Instrument, Inc., Winooski, USA)를 이용하여 350 nm(excitation wavelengths)와 450 nm(emission wavelengths)에서 반응생성물의 형광 강도를 측정하였다(그림 3-2-2). AGE 형성 억제율은 graphical plot로부터 구하였으며, 양성대조군으로는 aminoguanidine hydrochloride가 사용되어졌다.



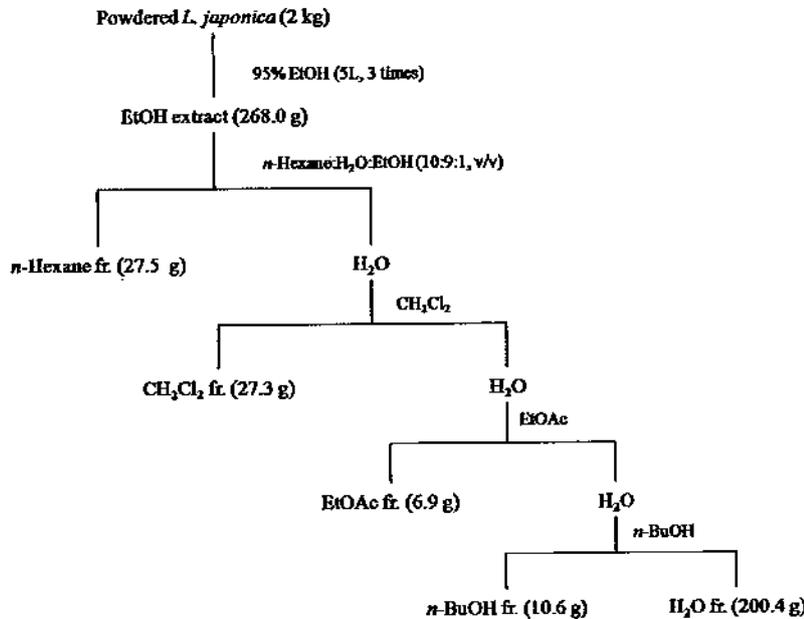
[그림 3-2-2] AGE 형성 저해 활성 분석법

3. 연구수행 결과

가 해조류 저분자 물질의 분리

(1) 다시마 저분자 활성물질의 분획

다시마(*Laminaria japonica*)의 에탄올 추출 및 각 용매별 분획과정은 그림 3-2-3에 나타내었다.

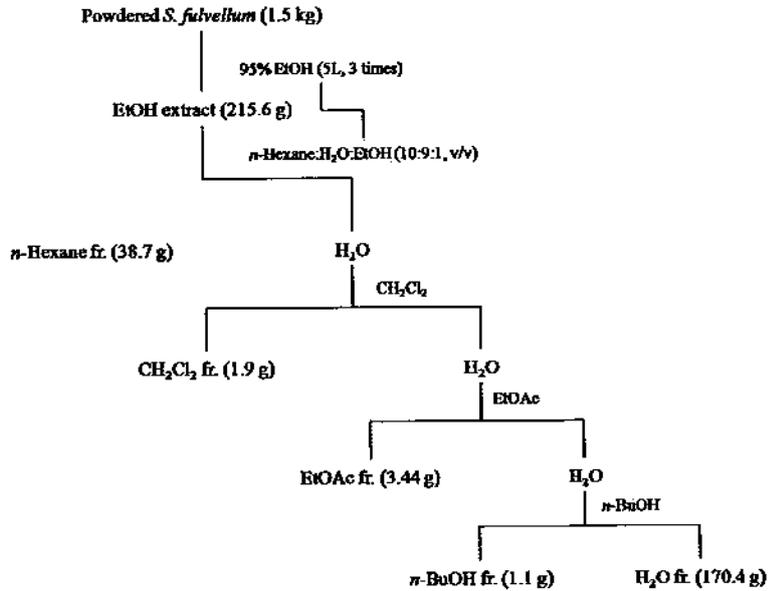


[그림 3-2-3] 다시마 추출 및 유기 용매 분획 과정

다시마를 건조 후 분말로 만든 시료 2 kg을 환류 냉각기를 부착한 집기병에 담은 후 5 L의 EtOH을 넣은 후, 수욕상에서 3시간 추출하였다. 그리고 추출액은 여과하여 rotary vacuum evaporator를 사용하여 40 °C에서 농축하였다. 위와 같은 방법으로 다시 2회 더 반복하여 총 268 g의 EtOH 추출물을 얻었다. 추출물을 H₂O:EtOH (9:1, v/v)의 혼합용매로 녹인 후, 분액 깔대기에 부어, 동량의 n-hexane를 넣어 분액 깔대기를 흔든 다음 평형화시켰다. 이후 위층의 n-hexane 가용부를 모아 무수 황산 나트륨(sodium sulfate, anhydrous)으로 처리한 다음 여과하여 농축하였다. 이와 같은 방법으로 4회 더 반복하여 n-hexane 분획물 27.5 g을 얻었다. 동일한 방법으로 dichloromethane을 H₂O층에 가하여 하층의 dichloromethane 가용부를 모아 dichloromethane 회분 2.73 g을 얻었다. H₂O층에 EtOAc를 가하여 상층의 EtOAc 가용부를 모아 EtOAc 분획물 6.94 g을 얻었다. 또한 n-BuOH에 대해서도 동일한 방법으로 행하여 상층의 n-BuOH 회분 10.65 g과 하층의 H₂O 회분 200.4 g을 얻었다. 이상과 같은 방법으로 3회 추출하여 평균값을 얻었다.

(2) 모자반 저분자 활성물질의 분획

모자반(*Sargassum fulvellum*)의 에탄올 추출 및 각 용매별 분획과정은 그림 3-2-4에 나타내었다.

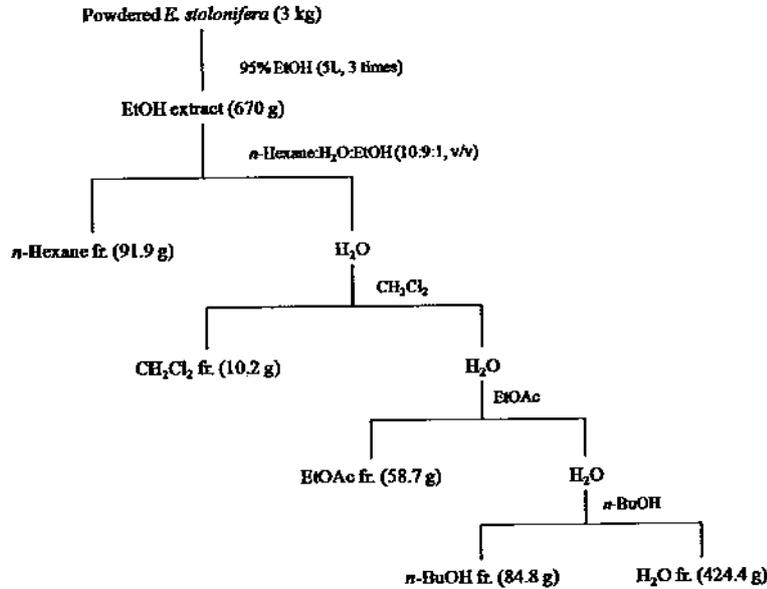


[그림 3-2-4] 모자반 추출 및 유기용매 분획 과정

다시마를 건조 후 분말로 만든 시료 1.5 kg을 환류 냉각기를 부착한 집기병에 담은 후 5 L의 EtOH을 넣은 후, 수욕상에서 1시간 추출하였다. 그리고 추출액은 여과하여 rotary vacuum evaporator를 사용하여 40℃에서 농축하였다. 위와 같은 방법으로 다시 2회 더 반복하여 총 215.6 g의 EtOH 추출물을 얻었다. 추출물을 H₂O:EtOH (9:1, v/v)의 혼합용매로 녹인 후, 분액 깔대기에 부어, 동량의 n-hexane를 넣어 분액 깔대기를 흔든 다음 평형화시켰다. 이후 위층의 n-hexane 가용부를 모아 무수 황산 나트륨 (sodium sulfate, anhydrous)으로 처리한 다음 여과하여 농축하였다. 이와 같은 방법으로 4회 더 반복하여 n-hexane 분획물 38.7 g을 얻었다. 동일한 방법으로 dichloromethane을 H₂O층에 가하여 하층의 dichloromethane 가용부를 모아 dichloromethane 획분 1.9 g을 얻었다. H₂O 층에 EtOAc를 가하여 상층의 EtOAc 가용부를 모아 EtOAc 분획물 3.44 g을 얻었다. 또한 n-BuOH에 대해서도 동일한 방법으로 행하여 상층의 n-BuOH 획분 1.1 g과 하층의 H₂O 획분 170.4 g을 얻었다. 이상과 같은 방법으로 3회 추출하여 평균값을 얻었다.

(3) 곰피 저분자 활성물질의 분획

다시마와 동일한 방법으로 곰피(*Ecklonia stolonifera*)의 알코올 추출 및 각 용매별 분획과정은 그림 3-2-5에 나타내었다.



[그림 3-2-5] 곰피 추출 및 유기용매 분획 과정

곰피를 건조 후 분말로 만든 시료 3 kg을 환류 냉각기를 부착한 집기병에 담은 후 5 L의 EtOH을 넣은 후, 수욕상에서 3시간 추출하였다. 그리고 추출액은 여과하여 rotary vacuum evaporator를 사용하여 40 °C에서 농축하였다. 위와 같은 방법으로 다시 2회 더 반복하여 총 670.0 g의 EtOH 추출물을 얻었다. 추출물을 H₂O:EtOH (9:1, v/v)의 혼합용매로 녹인 후, 분액 깔대기에 부어, 동량의 n-hexane를 넣어 분액 깔대기를 흔든 다음 평형화시켰다. 이후 위층의 n-hexane 가용부를 모아 무수 황산 나트륨(sodium sulfate, anhydrous)으로 처리한 다음 여과하여 농축하였다. 이와 같은 방법으로 4회 더 반복하여 n-hexane 분획물 91.9 g을 얻었다. 동일한 방법으로 dichloromethane을 H₂O층에 가하여 하층의 dichloromethane 가용부를 모아 dichloromethane 획분 10.2 g을 얻었다. H₂O층에 EtOAc를 가하여 상층의 EtOAc 가용부를 모아 EtOAc 분획물 58.7 g을 얻었다. 또한 n-BuOH에 대해서도 동일한 방법으로 행하여 상층의 n-BuOH 획분 84.8 g과 하층의 H₂O획분 424.4 g을 얻었다. 이상과 같은 방법으로 3회 추출하여 평균값을 얻었다.

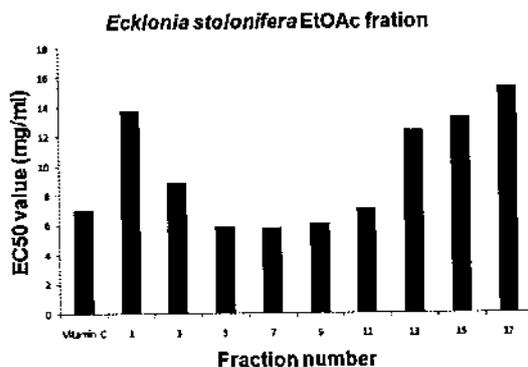
(4) 활성물질의 분리

(가) 다시마 *n*-hexane 획분으로부터 항염증물질 분리

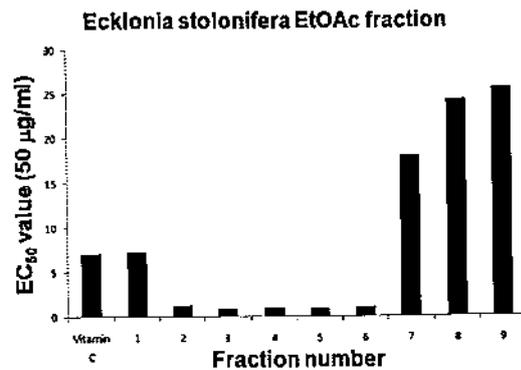
다시마로부터 얻은 *n*-hexane 획분을 recycling HPLC system에 장착된 Asahipak GS-310 칼럼 (500 × 20 mm, Showa Denko, Japan)으로 겔여과하여 분자량에 따라 3 개의 획분으로 분리하였다. 각각의 획분들에 대한 항염증 활성을 측정하여, 활성이 높은 GS3 획분을 Shim-pack PREP-ODS (5 μm, 100 Å, 250 mm × 20 mm, Shimadzu Co., Tokyo, Japan) 칼럼으로 순수하게 분리하였다. 분리된 2 종의 물질을 ¹³C-과 ³H-NMR로 구조분석과 GC-MS로 분자량을 측정한 결과 hexadecanoic acid methyl ester와 9-octadecenoic acid methyl ester로 판명되어 이들의 항염증기전에 대하여 연구 중이다.

(나) 곰피 EtOAc 획분으로부터 항산화/항염증물질 분리

곰피 EtOAc 획분에서 ROS 소거능과 NO 생성억제능이 가장 높게 나타났으므로, EtOAc 획분을 대상으로 항염증 활성이 우수한 화합물 분리를 시도하였다. 먼저 EtOAc 획분중의 항산화 활성을 보다 향상시키기 위하여 silica로 충전된 column(10 × 100 cm)에 5 g의 EtOAc 획분을 loading하여 MeOH과 EtOAc 혼합용액 (EtOAc:MeOH = 50:1 - 5:1)으로 17 개의 획분을 분리하였다. 각각의 획분들의 항산화 활성을 측정한 결과 fraction 5-11 번 획분들의 항산화 활성이 높게 나타났다(그림 3-2-6).



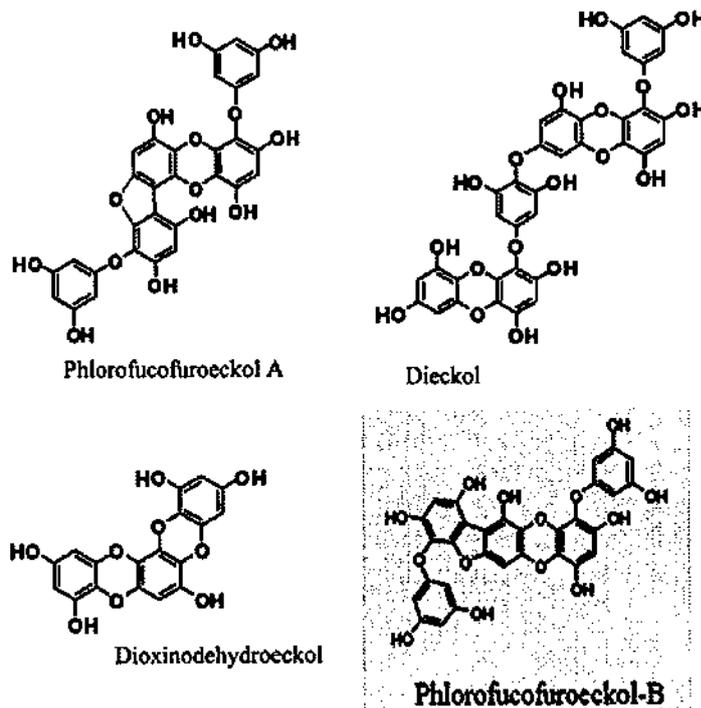
[그림 3-2-6] 곰피 EtOAc 획분의 1차 silica 칼럼 크로마토그래피



[그림 3-2-7] 곰피 EtOAc 획분의 2차 silica 칼럼 크로마토그래피

따라서 5-11획분들을 모아서 2차 silica column chromatography를 실시하였다. 그 결과 fraction 2-6번까지의 분획물의 항산화 활성은 Vit.C에 비하여 5배가량 높게 나타났다(그림 3-2-7).

2차 칼럼크로마토그래피에서 활성이 높게 나타난 2-6번 획분들을 모아서 Asahipak GS-310(500 × 20 mm, Showa Denko, Tokyo, Japan) 칼럼을 부착한 HPLC 시스템(pump, Shimadzu LC-6AD; photodiode array detector, Shimadzu SPD-M20A; degasser, Shimadzu DUG-20A₃; anauto-sampler, SIL-20A; fraction collector, ShimadzuFRC-10A; systemcontroller, CBM-20A; Shimadzu LC solution, ver.1.22sp)으로 분리하였다. Asahipak GS-310 column으로 분자량별로 분리한 결과 5개의 분획(GS1-GS5)을 얻었다. 활성이 높은 GS3 획분(1.110 g)을 Shim-pack PREP-ODS(5 mm, 100 Å, 250 mm × 20 mm, Shimadzu Co., Tokyo, Japan)으로 역상크로마토그래피한 결과 8종의 획분(GS3-ODS1toGS3-ODS8)을 얻었다. 그중 순도가 높은 GS3-ODS1(67 mg), ODS-3(150 mg), ODS-5(45 mg) 및 ODS7(144 mg) 획분을 ¹³C-과 ³H-NMR로 구조를 분석한 결과 GS3-ODS1은 phlorofucofuroeckol A로, ODS-3은 dieckol로, ODS-5는 phlorofucofuroeckol B로, ODS7은 dioxinodehydroeckol로 밝혀졌다. 분리된 화합물들의 구조는 다음과 같다(그림 3-2-8).



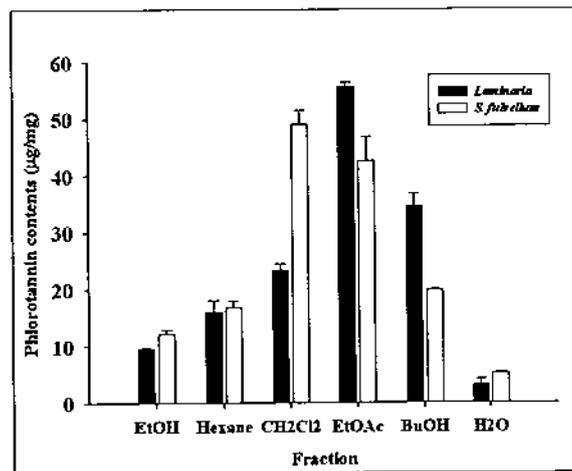
[그림 3-2-8] 곰피 EtOAc 획분으로부터 분리된 phlorotannin 화합물

나. 분리 획분의 생리활성

(1) 분리 획분의 항산화 활성

(가) 다시마와 모자반 획분의 phlorotannin 함량

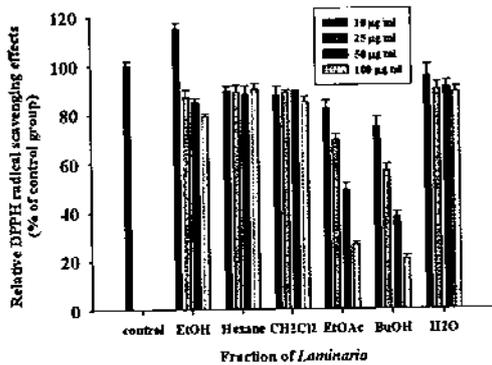
다시마와 모자반의 각 획분으로부터 phlorotannin의 함량을 측정하여 비교하였다. 각 획분의 phlorotannin 함량은 phloroglucinol을 표준품으로 하여 mg/mg으로 나타내었다(그림 3-2-9). 다시마의 획분 중 EtOAc 획분에서 가장 많은 양의 phlorotannin이 있는 것으로 나타났으며 모자반의 경우 dichloromethane 획분과 EtOAc 획분에서 가장 많은 양의 phlorotannin이 있는 것으로 확인되었다. 그리고 다시마와 모자반의 *n*-hexane 획분에는 phlorotannin의 함량이 낮은 것으로 나타났다.



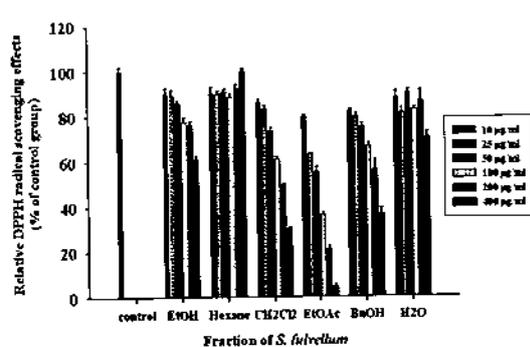
[그림 3-2-9] 다시마와 모자반 획분의 phlorotannin 함량

(나) 다시마와 모자반 획분의 항산화 활성

다시마와 모자반 획분의 항산화 활성을 알아보기 위하여 DPPH와 반응시켜 radical의 소거능을 분석하였다(그림 3-2-10). 그 결과 다시마의 EtOAc 획분과 *n*-BuOH 획분에서 높은 DPPH radical 소거능이 나타났으며, 다른 획분에서는 DPPH radical 소거능이 확인되지 않았다. 모자반은 dichloromethane과 EtOAc, 그리고 *n*-BuOH 획분에서 DPPH radical 소거능이 확인되었으며, EtOAc 획분의 항산화 활성이 가장 높게 나타났다. 이러한 결과는 각 획분내 phlorotannin의 함량과 유의하게 나타났다. 각 획분의 EC₅₀ 수치를 표 3-2-1에 나타내었다.



다시마



모자반

[그림 3-2-10] 다시마와 모자반 획분의 DPPH radical 소거능

[표 3-2-1] 다시마와 모자반 획분의 DPPH radical 소거능. (a) 다시마; (b) 모자반

(a)		(b)	
<i>L. japonica</i>	EC ₅₀ (µg/ml)	<i>S. fulvellum</i>	EC ₅₀ (µg/ml)
EtOH	100<	EtOH	400<
Hexane	100<	Hexane	400<
Dichloromethane	100<	Dichloromethane	199.3 ± 1.3
Ethyl acetate	49.0 ± 2.6	Ethyl acetate	55.5 ± 2.0
Butanol	28.4 ± 1.4	Butanol	224.7 ± 17.6
Water	100<	Water	400<

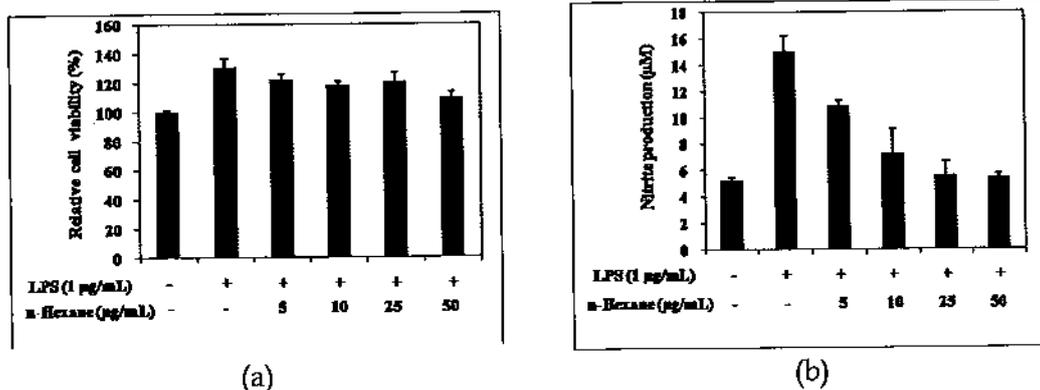
(2) 분리 획분의 항염증활성

주요 염증 병인 인자로 잘 알려진 COX-2와 iNOS 발현을 선택적으로 저해시킬 수 있는 천연물 유래 생리활성 물질 개발 연구 및 향후 이들을 이용한 항염증 치료제 개발 연구는 기능성식품 개발 측면에서 중요성이 매우 크다. EGCG 및 curcumin, resveratrol, isoflavone 등에 의한 항염증 효과는 IκB-a 단백질 분해 억제를 통한 NF-κB 전사인자 활성화 억제, PKC 및 JNK 활성화 감소를 통한 염증 병인 인자인 iNOS, COX-2와 염증성 cytokine인 TNF-α와 IL-1β의 유전자 발현 억제와 깊은 관련이 있음이 밝혀졌다. 또한 AP-1 전사인자 활성화 억제 및 세포 내 유해 활성 산소 생성 감소 등도 여러 생리활성 물질에 의한 염증 억제 효과와 관련이 있음이 알려졌다.

해조류에서 분리되는 polyphenol 중 갈조류로부터만 존재하는 phlorotannin에 대하여 antioxidation, antidiabetic complication, anti-amnesia 등의 여러 가지 생리활성이 보고된 바 있다. 최근 phlorotannin의 LPA2, lipoxygenase 등 anti-inflammatory activity에 대한 연구도 보고된 바 있지만 inducible nitric oxide synthase (iNOS), cyclooxygenase 2(COX-2)와 같이 염증 관련 효소 단백질의 발현 기전에 대한 자세한 연구 결과는 보고되지 않고 있다. 본 연구개발에서에서는 다시마 추출물로부터 항염증 소재를 개발하기 위하여 LPS (lipopolysaccharide)로 유발되는 RAW 264.7 대식세포에서의 염증 반응에 대하여 다시마와 참모자반 추출물의 항염증 효과를 확인하고 그 기전을 밝히고자 하였다.

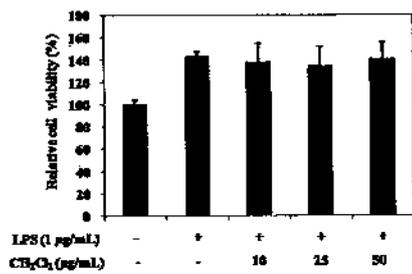
(가) 다시마 분획물의 항염증 활성

다시마 추출물의 항염증 효과를 분석하기 위하여 LPS와 함께 RAW 264.7 세포에 처리하여 실험하였다. Macrophage에서 LPS에 의해 염증 반응이 일어나면 iNOS 효소에 의하여 nitric oxide (NO)가 생성되어 분비되며 이는 염증 반응을 나타내는 지표로 활용된다. 실험 결과 다시마 중 n-hexane과 dichloromethane 획분이 세포의 생존률에 영향을 미치지 않으면서 LPS에 의한 nitrite의 생성을 농도 의존적으로 억제시키는 것으로 나타났다(그림 3-2-11, 3-2-12). 이러한 결과는 다시마의 n-hexane과 dichloromethane 획분이 LPS에 의한 염증 반응을 저해시킨다는 것을 나타낸다. 따라서 이후 실험에서는 다시마의 n-hexane과 dichloromethane 획분으로 실험을 진행하였다.

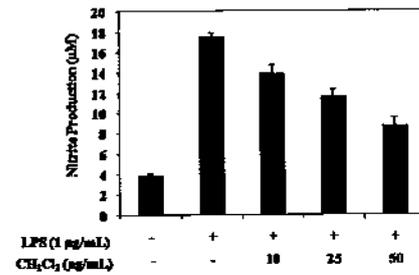


[그림 3-2-11] 다시마 n-hexane 획분의 항염증 활성

(a) 세포 생존률 분석; (b) NO 생성률 분석



(a)

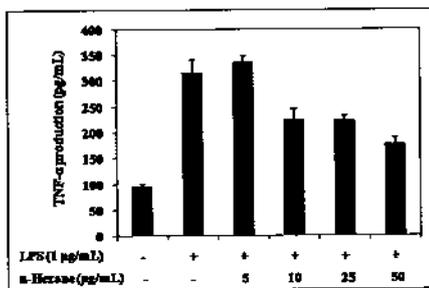


(b)

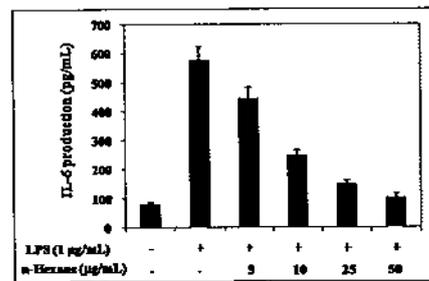
[그림 3-2-12] 다시마 dichloromethane 획분의 항염증 활성

(a) 세포 생존률 분석; (b) NO 생성률 분석

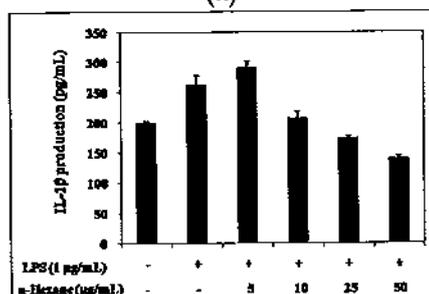
Macrophage에서 LPS에 의해 염증 반응이 일어나면 여러 기전을 통하여 TNF- α , IL 등 염증 관련 cytokine이 발현되며 이는 염증 반응에 대한 민감 지표가 된다. 다시마의 *n*-hexane 획분을 LPS와 처리하여 24시간 배양 후 상층액을 TNF- α 와 IL-6, IL-1 β 를 ELISA assay를 통해 분석한 결과 LPS에 의해 다량 발생하는 TNF- α 와 IL-6, IL-1 β 가 *n*-Hexane 획분에 의하여 농도 의존적으로 억제되는 것을 확인하였다(그림 3-2-13). 이러한 결과는 다시마의 *n*-hexane 획분이 LPS에 의해 발생하는 염증 반응을 억제하여 염증성 cytokine의 발생을 효과적으로 억제시킨다는 것을 의미하고 있다.



(a)



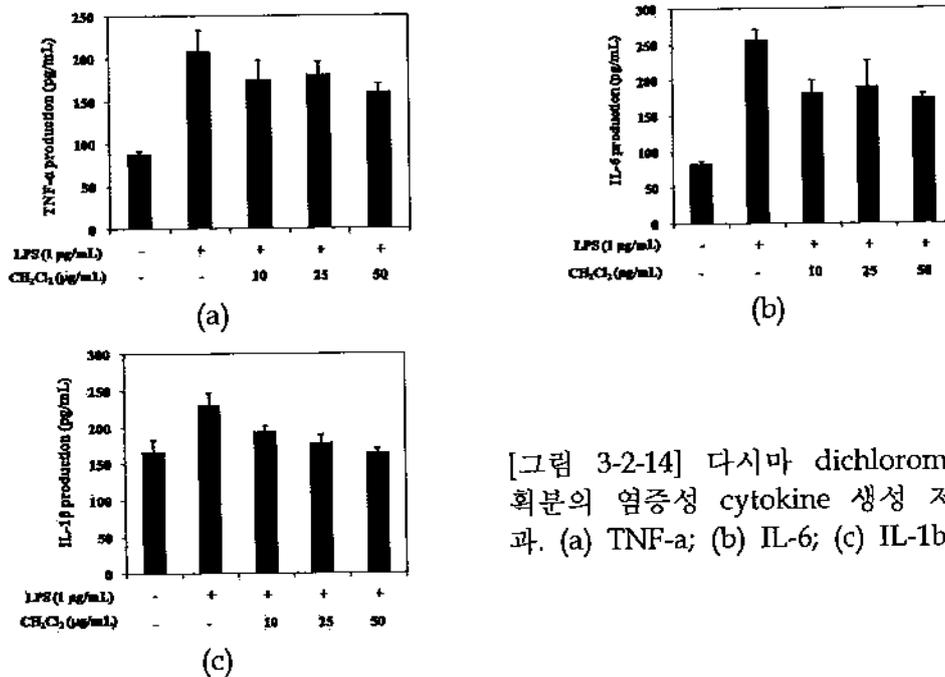
(b)



(c)

[그림 3-2-13] 다시마 *n*-hexane 획분의 염증성 cytokine 생성 저해 효과.(a) TNF- α ; (b) IL-6; (c) IL-1 β .

다시마의 dichloromethane 획분을 LPS와 처리하여 24시간 배양 후 상층액을 TNF-a와 IL-6, IL-1b를 ELISA assay를 통해 분석한 결과 LPS에 의해 다량 발생하는 TNF-a와 IL-6, IL-1b가 *n*-Hexane 획분에 의하여 감소함을 확인하였다(그림 3-2-14). 이러한 결과는 다시마의 dichloromethane 획분 역시 LPS에 의해 발생하는 염증 반응을 억제하여 염증성 cytokine의 발생을 효과적으로 억제시킨다는 것을 의미하고 있다.

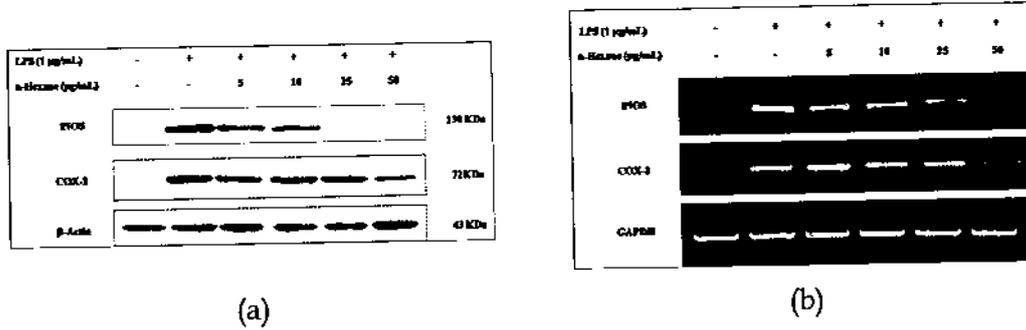


[그림 3-2-14] 다시마 dichloromethane 획분의 염증성 cytokine 생성 저해 효과. (a) TNF-a; (b) IL-6; (c) IL-1b.

다시마의 *n*-hexane 획분의 항염증 기전을 확인하기 위하여 RAW 264.7 세포에 추출물을 처리하고 1시간 후 LPS를 처리하여 16시간 배양한 다음 단백질을 추출하여 Western blot으로 NO를 발생시키는 iNOS와 PGE₂를 생산하는 COX-2 단백질의 변화를 분석하였다. 그 결과 다시마의 *n*-hexane 획분은 LPS에 의하여 유발되는 iNOS와 COX-2 단백질의 과발현을 농도 의존적으로 억제시키는 것으로 나타났다(그림 3-2-15(a)). 이 결과는 다시마의 *n*-hexane 획분이 iNOS와 COX-2의 발현을 번역 또는 번역 후 단계에서 억제시키며 다시마의 *n*-hexane 획분은 LPS에 의해 유발되는 NO와 cytokine의 생성 반응을 염증 관련 효소의 발현 단계에서 조절하고 있다는 것을 나타낸다.

다시마의 *n*-hexane 획분에 의한 iNOS와 COX-2 단백질 발현 조절이 전사단계에서 일어나는지를 확인하기 위하여 iNOS와 COX-2 특이적인 primer를 사용하여

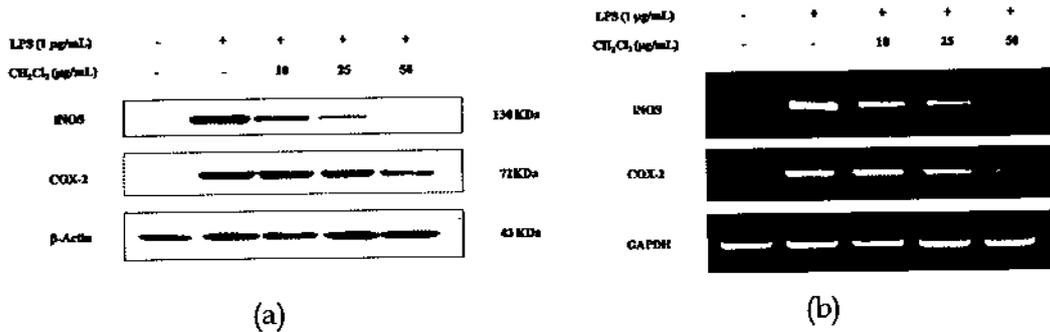
RT-PCR를 행하였다. 그림 3-2-15(b)에 나타난 바와 같이 iNOS mRNA는 다시마의 *n*-hexane 획분에 의해 농도 의존적으로 저해되는 것으로 나타났다. 따라서 다시마의 *n*-hexane 획분은 염증 반응에 의한 iNOS와 COX-2의 효소 발현을 전사 단계에서 억제시키는 것으로 확인되었다.



[그림 3-2-15] 다시마 *n*-hexane 획분의 iNOS, COX-2 효소 단백질 발현 저해 효과
(a) iNOS, COX-2 단백질 발현; (b) iNOS와 COX-2 mRNA 발현

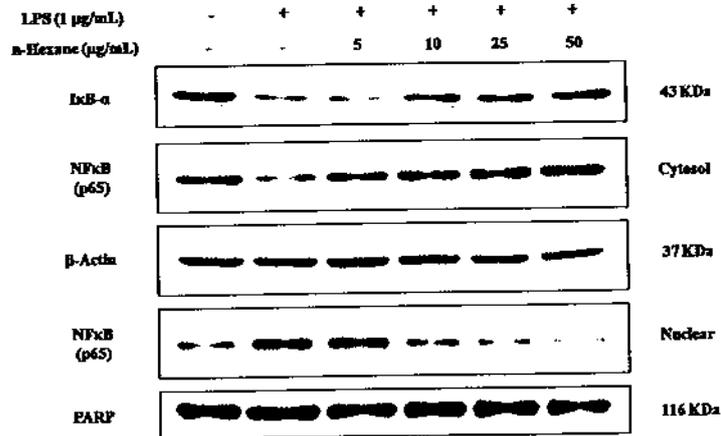
다시마의 dichloromethane 획분의 항염증 기전을 확인하기 위하여 RAW 264.7 세포에 추출물을 처리하고 1시간 후 LPS를 처리하여 16시간 배양한 다음 단백질을 추출하여 Western blot으로 NO를 발생시키는 iNOS와 PGE₂를 발생시키는 COX-2 단백질의 변화를 분석하였다. 그 결과 다시마의 dichloromethane 획분은 LPS에 의하여 유발되는 iNOS와 COX-2 단백질의 과발현을 농도 의존적으로 억제시키는 것으로 나타났다(그림 3-2-16(a)). 이 결과는 다시마의 dichloromethane 획분이 iNOS와 COX-2의 발현을 번역 또는 번역 후 단계에서 억제시키며 다시마의 dichloromethane 획분은 LPS에 의해 유발되는 NO와 cytokine의 생성 반응을 관련 효소의 전사 단계에서 조절하고 있다는 것을 나타낸다.

iNOS와 COX-2 단백질 발현이 전사단계에서 일어나는지를 확인하기 위하여 iNOS와 COX-2 특이적인 primer를 사용하여 RT-PCR를 행하였다. 그림 3-2-16(b)에 나타난 바와 같이 iNOS mRNA는 다시마의 dichloromethane 획분에 의해 농도 의존적으로 현저히 저해되고 있는 것으로 나타났다. 따라서 다시마의 dichloromethane 획분은 염증 반응에 의한 iNOS와 COX-2의 효소 발현을 전사 단계에서 억제시키는 것으로 확인되었다.



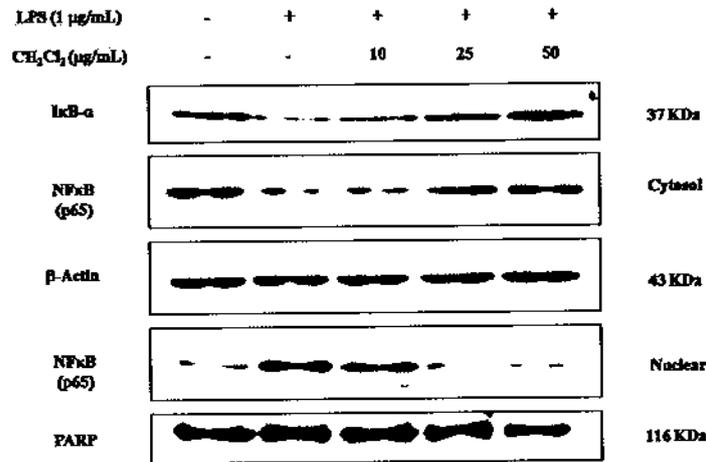
[그림 3-2-16] 다시마 dichloromethane 획분의 iNOS, COX-2 효소 단백질 발현 저해 효과. (a) iNOS, COX-2 단백질 발현; (b) iNOS와 COX-2 mRNA 발현

iNOS와 COX-2의 전사는 NF-κB를 포함한 다양한 전사 인자들에 의해 조절되는 것으로 알려져 있다. 특히 NF-κB는 세포내 IκB-a와 heterodimer를 이루고 있으며 염증 반응이 일어나면 여러 기전을 통하여 IκB-a가 인산화되어 분해됨으로써 NF-κB와 분리된다. 인산화된 IκB-a는 ubiquitin에 의하여 분해되고 유리된 NF-κB는 핵으로 이동하여 다양한 유전자의 전사를 활성화 하는 것으로 알려져 있다. 다시마의 *n*-hexane 획분에 의한 전사 인자 활성화 조절을 확인하기 위하여 시료를 처리한 후 핵 단백질과 세포질 단백질을 분리하여 추출하였다. 각각의 단백질은 Western blot으로 분석하여 IκB-a와 NF-κB의 발현 정도를 확인하였다. 그 결과 다시마의 *n*-hexane 획분은 IκB-a의 활성화를 농도 의존적으로 억제하고 NF-κB의 이동을 억제하며 NF-κB의 promoter 활성화를 억제시키는 것으로 나타났다(그림 3-2-17). 이러한 결과는 다시마의 *n*-hexane 획분이 LPS에 의한 IκB-a의 활성화를 억제하여 NF-κB의 이동을 억제함으로써 염증 반응에서 발현되는 여러 가지 유전자의 발현을 전사단계에서 조절하였다는 것을 의미하였다.



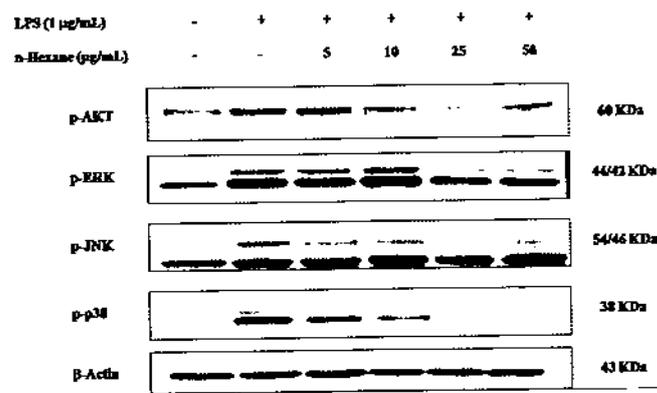
[그림 3-2-17] 다시마 *n*-hexane 획분의 NF-κB 활성화 저해 효과

다시마의 dichloromethane 획분에 의한 전사 인자 활성화 조절을 확인하기 위하여 시료를 처리한 후 핵 단백질과 세포질 단백질을 분리하여 추출하였다. 각각의 단백질은 Western blot으로 분석하여 IκB-a와 NF-κB의 발현 정도를 확인하였다. 그 결과 다시마의 dichloromethane 획분은 IκB-a의 활성화를 농도 의존적으로 억제하고 NF-κB의 이동을 억제하며 NF-κB의 promoter 활성화를 억제시키는 것으로 나타났다. 이러한 결과는 다시마의 dichloromethane 획분이 LPS에 의한 IκB-a의 활성화를 억제하여 NF-κB의 이동을 억제함으로써 염증 반응에서 발현되는 여러 가지 유전자의 발현을 전사단계에서 조절하였다는 것을 의미하였다(그림 3-2-18).



[그림 3-2-18] 다시마 dichloromethane 획분의 NF-κB 활성화 저해 효과.

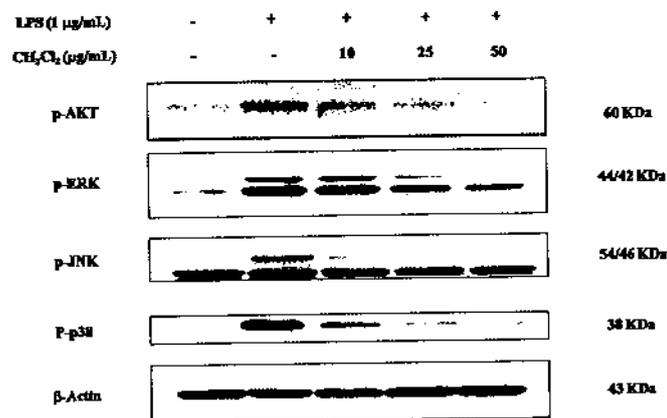
LPS에 의한 IκB-a의 감소와 그에 따른 NF-κB의 활성화 및 핵 이동은 MAPKs와 PI3K/Akt pathway의 활성화에 의한 것으로 알려져 있다. RAW 264.7 세포에서 LPS에 의한 MAPKs와 Akt 활성화에 대하여 다시마의 *n*-hexane 획분이 어떠한 영향을 미치는지 알아보기 위하여 RAW 264.7 세포에 다시마의 *n*-hexane 획분을 1시간 처리한 후 LPS를 처리하여 각각 1시간 후 단백질을 추출하여 Western blot으로 단백질의 발현을 확인하였다. 그 결과 다시마의 *n*-hexane 획분은 LPS에 의한 Akt, ERK, JNK, p38의 인산화를 농도 의존적으로 억제시키는 것으로 나타났다(그림 3-2-19). 따라서 다시마의 *n*-hexane 획분은 ERK, JNK, p38의 인산화를 억제하고 PI3K/Akt pathway를 억제하여 NF-κB의 활성화 및 핵 이동을 억제하고 여러 가지 염증성 cytokine과 iNOS, COX-2 효소의 발현을 조절하는 것이라 생각된다.



[그림 3-2-19] 다시마 *n*-hexane 획분의 MAPKs와 PI3K/Akt pathway 저해 효과

RAW 264.7 세포에서 LPS에 의한 MAPKs와 Akt 활성화에 대하여 다시마의 dichloromethane 획분이 어떠한 영향을 미치는지 알아보기 위하여 RAW 264.7 세포에 다시마의 dichloromethane 획분을 1시간 처리한 후 LPS를 처리하여 각각 1시간 후 단백질을 추출하여 Western blot으로 단백질의 발현을 확인하였다. 그 결과 다시마의 dichloromethane 획분은 LPS에 의한 Akt, ERK, JNK, p38의 인산화를 농도 의존적으로 억제시키는 것으로 나타났다(그림 3-2-20). 따라서 다시마의 dichloromethane 획분은 ERK, JNK, p38의 인산화를 억제하고 PI3K/Akt pathway를 억제하여 NF-κB의 활성화 및 핵 이동을 억제하고 여러 가지 염증성 cytokine과 iNOS, COX-2 효소의 발현을 조절하는 것이라 생각된다.

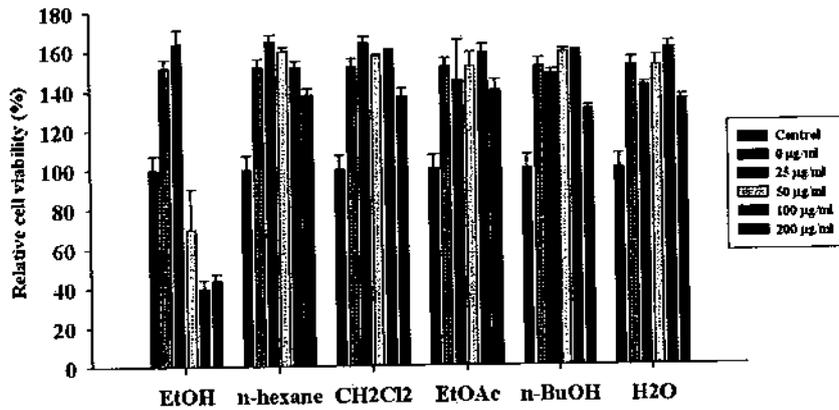
따라서 다시마의 *n*-hexane 획분과 dichloromethane 획분은 염증관련 질환의 예방과 치료를 위한 건강기능성 식품의 소재로 활용될 가치가 높은 것으로 평가되며, 다시마를 원료로 한 바이오에너지 생산시 다시마를 먼저 알코올로 처리하여 항염증성 물질을 추출한 후 그 잔사를 이용하여 에너지를 생산함으로써 에너지 생산비용을 절감할 수 있을 것으로 판단된다.



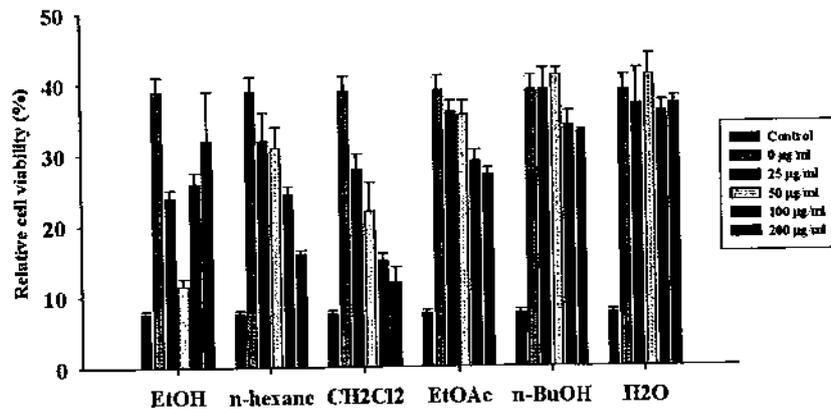
[그림 3-2-20] 다시마 dichloromethane 획분의 MAPKs와 PI3K/Akt pathway 저해 효과

(나) 모자반 분획물의 항염증 활성

모자반 추출물의 항염증 효과를 분석하기 위하여 LPS와 함께 RAW 264.7 세포에 처리하여 실험하였다. Macrophage에서 LPS에 의해 염증 반응이 일어나면 iNOS 효소에 의하여 nitric oxide (NO)가 생성되어 분비되며 이는 염증 반응을 나타내는 지표로 활용된다. 실험 결과 모자반 추출물 중 EtOH, dichloromethane, EtOAc, n-BuOH 화분이 세포의 생존률에 영향을 미치지 않는 것으로 나타났다(그림 3-2-21). 또한 LPS에 의한 nitrite의 생성 분석 결과 다시마와 같이 모자반의 n-hexane, dichloromethane과 EtOAc 화분에서 농도 의존적으로 nitrite의 생성이 억제되는 것으로 나타났다(그림 3-2-22). 따라서 이후 실험에서는 세 화분을 대상으로 실험하였다.

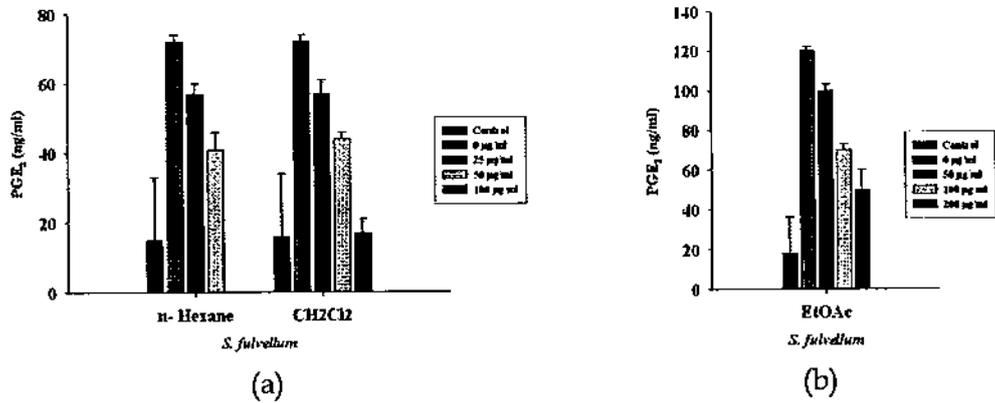


[그림 3-2-21] 모자반 추출물에 의한 RAW 264.7 세포의 독성



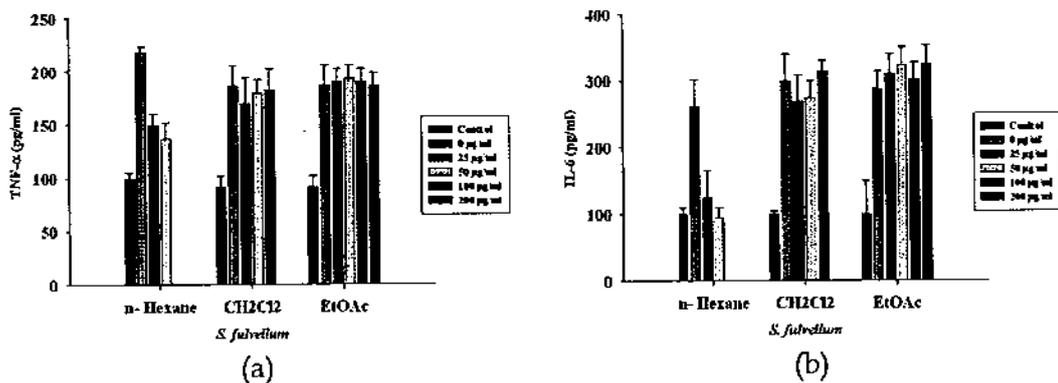
[그림 3-2-22] 모자반 추출물의 NO 생성 저해 효과

Macrophage에서 LPS에 의해 염증 반응이 일어나면 COX-2 효소가 과발현되며 이 효소에 의하여 PGE₂가 생성되어 분비되며 이는 염증 반응을 나타내는 지표로 활용된다. LPS에 의한 PGE₂의 생성 분석 결과 모자반의 *n*-hexane, dichloromethane과 EtOAc 획분에서 농도 의존적으로 PGE₂의 생성이 억제되는 것으로 나타났다 (그림 3-2-23).



[그림 3-2-23] 모자반 추출물의 PGE₂ 생성 저해 효과
(a) n-Hexane, dichloromethane 획분; (b) EtOAc 획분

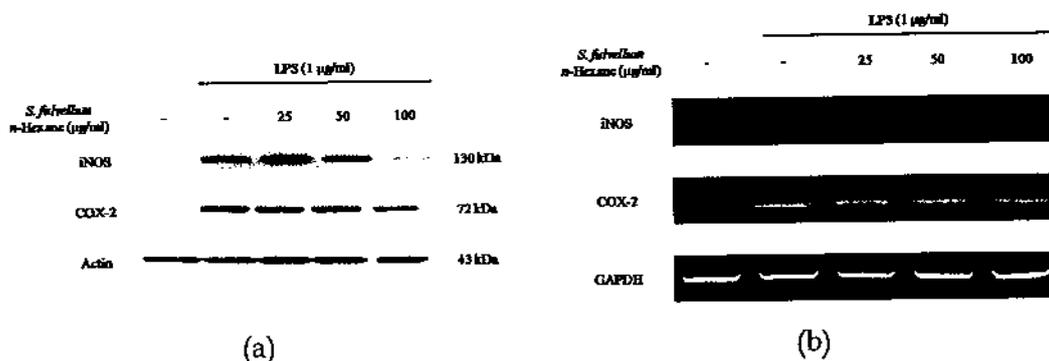
모자반 추출물이 LPS에 의한 염증성 cytokine의 생성에 미치는 영향을 확인하기 위하여 모자반의 *n*-hexane, dichloromethane과 EtOAc 획분을 처리한 후 1시간 동안 배양하여 다시 LPS를 처리하였다. 세포를 24시간 배양 후 상층액을 TNF- α 와 IL-6를 ELISA assay를 통해 분석한 결과 LPS에 의해 다량 발생하는 TNF- α 와 IL-6가 모자반의 *n*-hexane 획분에 의하여 농도 의존적으로 억제되는 것을 확인하였다(그림 3-2-24). 이러한 결과는 모자반의 *n*-hexane 획분이 LPS에 의해 발생하는 염증 반응을 억제하여 염증성 cytokine의 발생을 효과적으로 억제시킨다는 것을 의미하고 있다.



[그림 3-2-24] 모자반 추출물의 염증성 cytokine 생성 저해 효과. (a) TNF- α ; (b) IL-6

모자반의 *n*-hexane 획분의 항염증 기전을 확인하기 위하여 RAW 264.7 세포에 추출물을 처리하고 1시간 후 LPS를 처리하여 16시간 배양한 다음 단백질을 추출하여 Western blot으로 NO를 발생시키는 iNOS와 PGE₂를 발생시키는 COX-2 단백질의 변화를 분석하였다. 그 결과 모자반의 *n*-hexane 획분 획분은 LPS에 의하여 유발되는 iNOS 단백질의 과발현을 농도 의존적으로 억제시키는 것으로 나타났다. 하지만 COX-2 단백질의 과발현은 100 mg/ml의 농도에서 억제 활성이 나타났다(그림 3-2-25(a)).

iNOS와 COX-2 단백질 발현이 전사단계에서 일어나는지를 확인하기 위하여 iNOS와 COX-2 특이적인 primer를 사용하여 RT-PCR를 행하였다. 그림 3-2-25(b)에 나타난 바와 같이 iNOS mRNA는 모자반의 *n*-hexane 획분에 의해 농도 의존적으로 현저히 저해되고 있는 것으로 나타났다. 그러나 COX-2의 mRNA에는 유의적인 차이가 나타나지 않았다. 따라서 모자반의 *n*-hexane 획분은 염증 반응에 의한 iNOS 효소 발현을 전사 단계에서 조절하여 NO의 생성을 억제시키며 COX-2의 효소 발현에도 어느 정도 관여하여 관련 cytokine의 생성을 조절하는 것으로 생각된다.

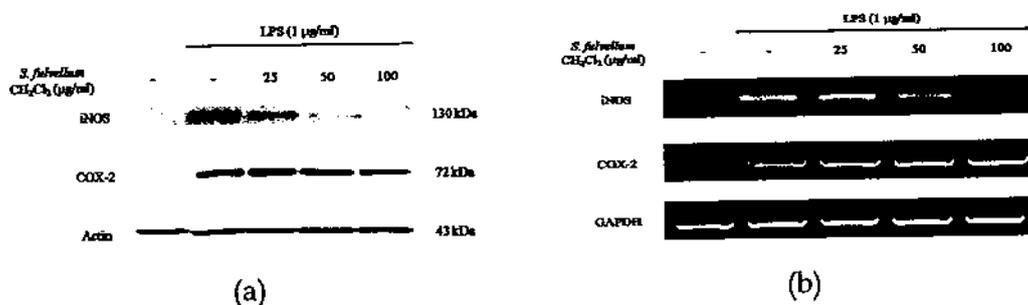


[그림 3-2-25] 모자반 *n*-hexane 획분의 염증 관련 단백질 발현 저해
(a) iNOS, COX-2 단백질 발현; (b) iNOS, COX-2 mRNA 발현

모자반의 dichloromethane 획분의 항염증 기전을 확인하기 위하여 RAW 264.7 세포에 추출물을 처리하고 1시간 후 LPS를 처리하여 16시간 배양한 다음 단백질을 추출하여 Western blot으로 NO를 발생시키는 iNOS와 PGE₂를 발생시키는 COX-2 단백질의 변화를 분석하였다. 그 결과 모자반의 dichloromethane 획분 획분은 LPS에 의하여 유발되는 iNOS 단백질의 과발현을 농도 의존적으로 억제시키는 것으로 나타났다. 하지만 COX-2 단백질의 과발현은 100 mg/ml의 농도에서 억제 활성이 나타났다(그림 3-2-26(a)).

iNOS와 COX-2 단백질 발현이 전사단계에서 일어나는지를 확인하기 위하여

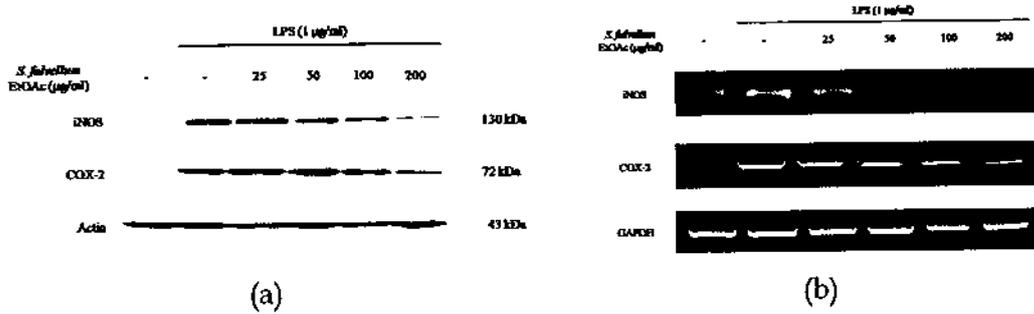
iNOS와 COX-2 특이적인 primer를 사용하여 RT-PCR를 행하였다. 그림 3-2-26(b)에 나타난 바와 같이 iNOS mRNA는 모자반의 dichloromethane 획분에 의해 농도 의존적으로 현저히 저해되고 있는 것으로 나타났다. 그러나 COX-2의 mRNA에는 유의적인 차이가 나타나지 않았다. 따라서 모자반의 dichloromethane 획분은 염증 반응에 의한 iNOS 효소 발현을 전사 단계에서 조절하여 NO의 생성을 억제시키며 COX-2의 효소 발현에도 어느 정도 관여하여 관련 cytokine의 생성을 조절하는 것으로 생각된다.



[그림 3-2-26] 모자반 dichloromethane 획분의 염증 관련 단백질 발현 저해
(a) iNOS, COX-2 단백질 발현; (b) iNOS, COX-2 mRNA 발현

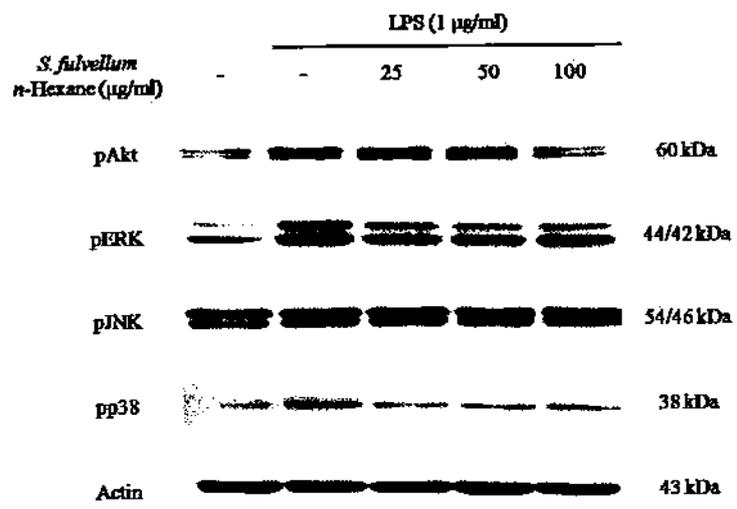
모자반의 EtOAc 획분의 항염증 기전을 확인하기 위하여 RAW 264.7 세포에 추출물을 처리하고 1시간 후 LPS를 처리하여 16시간 배양한 다음 단백질을 추출하여 Western blot으로 NO를 발생시키는 iNOS와 PGE₂를 발생시키는 COX-2 단백질의 변화를 분석하였다. 그 결과 모자반의 EtOAc 획분 획분은 LPS에 의하여 유발되는 iNOS 단백질의 과발현을 농도 의존적으로 억제시키는 것으로 나타났다. 하지만 COX-2 단백질의 과발현은 100 mg/ml의 농도에서 억제 활성이 나타났다(그림 3-2-27(a)).

iNOS와 COX-2 단백질 발현이 전사단계에서 일어나는지를 확인하기 위하여 iNOS와 COX-2 특이적인 primer를 사용하여 RT-PCR를 행하였다. 그림 3-2-27(b)에 나타난 바와 같이 iNOS mRNA는 모자반의 EtOAc 획분에 의해 농도 의존적으로 현저히 저해되고 있는 것으로 나타났다. 그러나 COX-2의 mRNA에는 유의적인 차이가 나타나지 않았다. 따라서 참모자반의 EtOAc 획분은 염증 반응에 의한 iNOS 효소 발현을 전사 단계에서 조절하여 NO의 생성을 억제시키며 COX-2의 효소 발현에도 어느 정도 관여하여 관련 cytokine의 생성을 조절하는 것으로 생각된다.



[그림 3-2-27] 모자반 EtOAc 희분의 염증 관련 단백질 발현 저해
 (a) iNOS, COX-2 단백질 발현; (b) iNOS, COX-2 mRNA 발현

RAW 264.7 세포에서 LPS에 의한 MAPKs와 Akt 활성화에 대하여 모자반의 *n*-hexane 희분이 어떠한 영향을 미치는지 알아보기 위하여 RAW 264.7 세포에 모자반의 *n*-hexane 희분을 1시간 처리한 후 LPS를 처리하여 각각 1시간 후 단백질을 추출하여 Western blot으로 단백질의 발현을 확인하였다. 그 결과 모자반의 *n*-hexane 희분은 LPS에 의한 Akt, ERK, p38의 인산화를 농도 의존적으로 억제시키는 것으로 나타났다(그림 3-2-28). 따라서 모자반의 *n*-hexane 희분은 ERK, p38 pathway와 PI3K/Akt pathway를 억제하여 여러 가지 염증성 cytokine과 iNOS, COX-2 효소의 발현을 조절하는 것이라 생각된다.

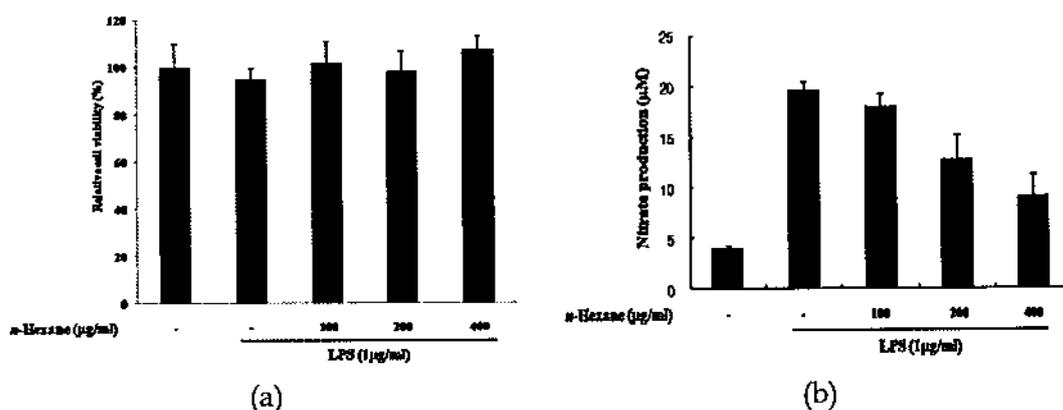


[그림 3-2-28] 모자반 *n*-hexane 희분의 MAPKs, PI3K/Akt pathway 저해 효과

(다) 곱피 분획물의 항염증 활성

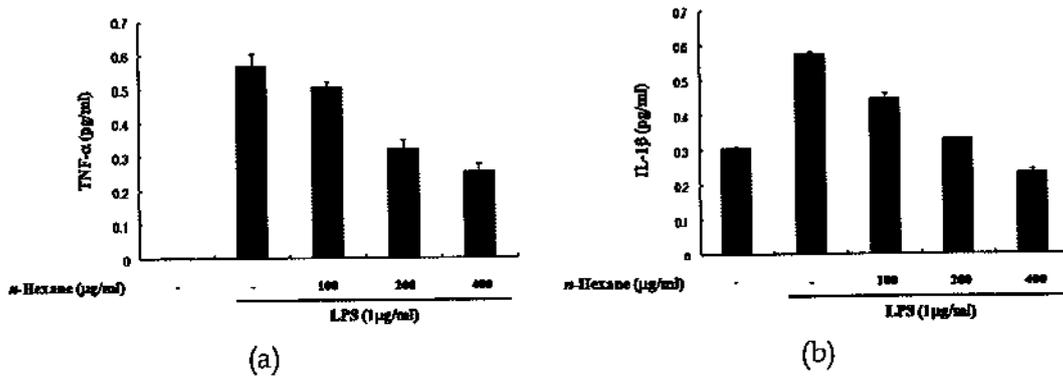
예비 실험에서 곱피의 추출물과 유기용매 분획물이 ROS 소거능이 우수한 것으로 나타났다. 본 연구개발에서에서는 곱피 추출물로부터 항염증 소재를 개발하기 위하여 LPS로 유발되는 RAW 264.7 대식세포에서의 염증 반응에 대하여 곱피 추출물의 항염증 효과를 확인하고 그 기전을 밝히고자 하였다.

곱피의 항염증 효과를 분석하기 위하여 곱피 분획물을 LPS와 함께 RAW 264.7 세포에 처리하여 실험하였다. 실험 결과 곱피 분획물 중 *n*-hexane 추출물이 세포의 생존률에 영향을 미치지 않으면서 LPS에 의한 nitrite의 생성을 농도 의존적으로 억제시키는 것으로 나타났다(그림 3-2-29).



[그림 3-2-29] 곱피 *n*-hexane 획분의 NO 생성 저해 효과 (a) 세포 생존률; (b) NO 생성

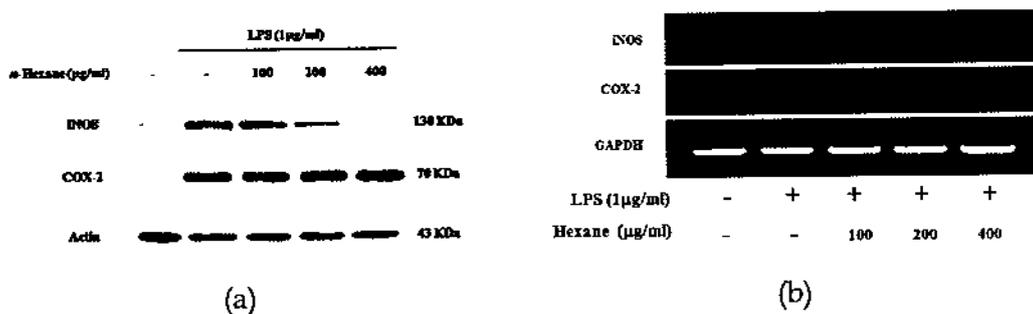
곱피의 *n*-Hexane 획분이 염증성 cytokine의 생성에 미치는 영향을 확인하기 위하여 모자반의 *n*-hexane, dichloromethane과 EtOAc 획분을 처리한 후 1시간 동안 배양하여 다시 LPS를 처리하였다. 세포를 24 시간 배양 후 상층액을 TNF- α 와 IL-1 β 를 ELISA assay를 통해 분석한 결과 LPS에 의해 다량 발생하는 TNF- α 와 IL-1 β 가 곱피의 *n*-hexane 획분에 의하여 농도 의존적으로 억제되는 것을 확인하였다(그림 3-2-30). 이러한 결과는 곱피의 *n*-hexane 획분이 LPS에 의해 발생하는 염증 반응을 억제하여 염증성 cytokine의 발생을 효과적으로 억제시킨다는 것을 의미하고 있다.



[그림 3-2-30] 곰피 *n*-hexane 획분의 염증성 cytokine 생성 저해 효과 (a) TNF-α; (b) IL-1β

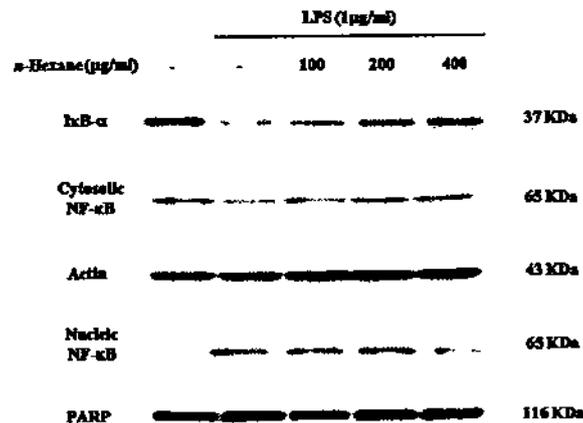
곰피의 *n*-hexane 획분의 항염증 기전을 확인하기 위하여 RAW 264.7 세포에 추출물을 처리하고 1시간 후 LPS를 처리하여 16시간 배양한 다음 단백질을 추출하여 Western blot으로 NO를 발생시키는 iNOS와 PGE₂를 발생시키는 COX-2 단백질의 변화를 분석하였다. 그 결과 곰피의 *n*-hexane 획분은 LPS에 의하여 유발되는 iNOS 단백질의 과발현을 농도 의존적으로 억제시켰으나 COX-2의 발현에는 영향을 미치지 못하는 것으로 나타났다(그림 3-2-31(a)). 이 결과는 곰피의 *n*-hexane 획분은 염증 반응에 의한 iNOS의 발현을 번역 또는 번역 후 단계에서 억제시키며 곰피의 *n*-hexane 획분은 LPS에 의해 유발되는 NO의 생성 반응을 관련 효소의 전사 단계에서 조절하고 있다는 것을 나타낸다.

iNOS와 COX-2 단백질 발현이 전사단계에서 일어나는지를 확인하기 위하여 iNOS와 COX-2 특이적인 primer를 사용하여 RT-PCR를 행하였다. 그림 3-2-31(b)에 나타난 바와 같이 iNOS mRNA는 *n*-hexane 획분에 의해 현저히 저해되었으나, COX-2 mRNA는 400 mg/ml의 농도에서도 저해효과가 나타나지 않았다.



[그림 3-2-31] 곰피의 *n*-hexane 획분의 염증 관련 단백질 발현 저해
(a) iNOS, COX-2 단백질 발현; (b) iNOS, COX-2 mRNA 발현

iNOS와 COX-2의 전사는 NF-kB를 포함한 다양한 전사 인자들에 의해 조절되는 것으로 알려져 있다. 특히 NF-kB는 세포내 IκB-a와 heterodimer를 이루고 있으며 염증 반응이 일어나면 여러 기전을 통하여 IκB-a가 인산화되어 분해됨으로써 NF-kB와 분리된다. 인산화된 IκB-a는 ubiquitin에 의하여 분해되고 유리된 NF-kB는 핵으로 이동하여 다양한 유전자의 전사를 활성화 하는 것으로 알려져 있다. 곰피의 *n*-hexane 획분에 의한 전사 인자 활성화 조절을 확인하기 위하여 시료를 처리한 후 핵 단백질과 세포질 단백질을 분리하여 추출하였다. 각각의 단백질은 Western blot으로 분석하여 IκB-a와 NF-kB의 발현 정도를 확인하였다. 그 결과 곰피의 *n*-hexane 획분은 IκB-a의 활성화를 농도 의존적으로 억제하고 NF-kB의 이동을 억제하며 NF-kB의 promoter 활성화를 억제시키는 것으로 나타났다. 이러한 결과는 곰피의 *n*-hexane 획분이 LPS에 의한 IκB-a의 활성화를 억제하여 NF-kB의 이동을 억제함으로써 염증 반응에서 발현되는 여러 가지 유전자의 발현을 전사단계에서 조절한다는 것을 의미한다(그림 3-2-32).

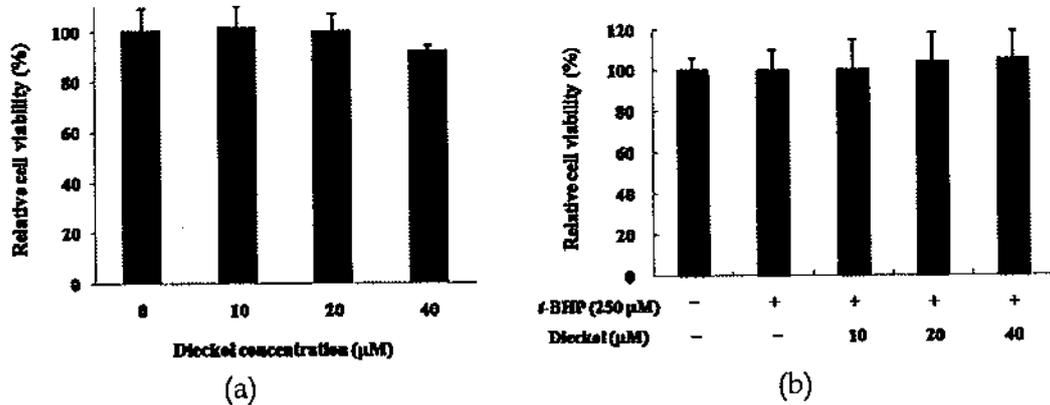


[그림 3-2-32] 곰피 *n*-hexane 획분의 NF-kB 활성화 저해 효과

(3) 곰피로부터 분리된 dieckol의 항산화 효과

곰피로부터 분리된 dieckol은 항산화, 간보호 효과 등의 생리활성과 mushroom tyrosinase 저해효과, acetylcholinesterase 저해 효과가 있는 것으로 알려져 있다. 본 실험에서는 dieckol의 항산화 효과를 살펴보고 항산화 효소의 발현과 관련된 기전을 알아보기 위하여 HepG2 간암 세포주에 *t*-butyl hydroperoxide (*t*-BHP)를 처리하여 유발된 oxidative stress를 어떻게 억제하는지 실험하였다. 실험을 위하여 HepG2 세포에 dieckol을 농도별로 처리한 후 24시간 배양하여 MTS assay로 세포의 생존률을 비교하여 dieckol이 세포에 미치는 영향을 분석하였다. 또

한 dieckol과 *t*-BHP를 동시에 처리하여 세포의 생존률을 비교하여 시료가 세포에 미치는 영향을 분석하였다. MTS assay 결과 dieckol 처리 군에서 생존률의 유의적인 차이는 없었으며, dieckol과 *t*-BHP를 동시에 처리하였을 때에도 세포의 생존률에 미치는 영향은 없는 것으로 나타났다(그림 3-2-33).

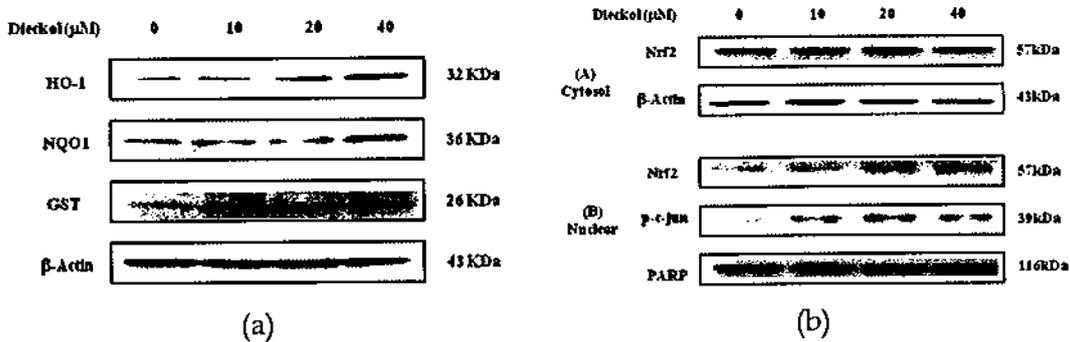


[그림 3-2-33] Dieckol이 HepG2 세포에 미치는 영향
(a) Dieckol만 처리; (b) *t*-BHP와 dieckol을 함께 처리

항산화 활성물질의 세포 보호 효과는 oxidative stress에 대한 HO-1, NQO1, GST와 같은 세포 보호 효소들의 발현에 의해 나타난다. HO-1은 oxidative stress 등의 자극에 의해 많이 발현되는 항산화 효소이며 NQO1은 quinone의 해독 과정을 촉매하고 oxidative damage에 대하여 세포를 보호하는 역할을 한다. GST는 해독 과정에서 phase II 단계의 효소로 지질 과산화물과 같은 electrophilic 화합물들에 대하여 세포를 보호하는 작용을 한다. 다양한 항산화 물질들이 세포내 HO-1 등의 발현을 증가시키는 것으로 알려져 있다. 본 실험에서는 dieckol이 항산화 효소의 발현에 미치는 영향을 알아보기 위하여 HepG2 세포에 dieckol을 16시간 처리하여 단백질을 추출한 후 Western blot으로 각각 효소의 발현양을 살펴보았다. 실험 결과 Dieckol은 HepG2 세포 내 HO-1과 NQO1의 발현을 농도 의존적으로 증가시켰다. 하지만 GST의 발현에는 크게 영향을 미치지 못하였다(그림 3-2-34(a)).

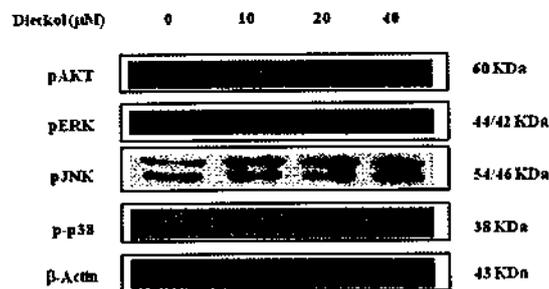
전사 인자인 Nrf2는 antioxidant response element (ARE)에 의해 조절되는 phase II 단계의 해독 효소 및 항산화 효소의 발현에 필수적인 요소이다. 세포질 내 Keap1 단백질과 결합되어 있는 Nrf2는 자극에 의해 분리되어 핵으로 이동하고 DNA의 ARE 자리에 결합하여 전사를 조절한다. 여러 가지 항산화 물질들이 Nrf2를 조절하여 HO-1, NQO1, GST 효소의 발현을 조절하는 것으로 알려져 있다. 이때 c-Jun과 small Maf 단백질이 Nrf2와 heterodimer를 이루어 항산화 효소의 발현을 돕는 것으로 알려져 있다. 본 실험에서는 dieckol을 처리한 후 핵과 세포질의 단

백질을 각각 분리하여 Western blot으로 단백질의 발현을 분석하였다. dieckol은 Nrf2의 이동을 농도 의존적으로 증가시켰으며 핵 내 c-Jun 단백질의 활성화를 증가시키는 것으로 나타났다(그림 3-2-34(b)). 따라서 dieckol은 HepG2 세포의 Nrf2 단백질의 이동을 자극하고 c-Jun 단백질을 활성화시켜 HO-1, NQO1 항산화 효소의 발현을 증가시키는 것으로 생각된다.



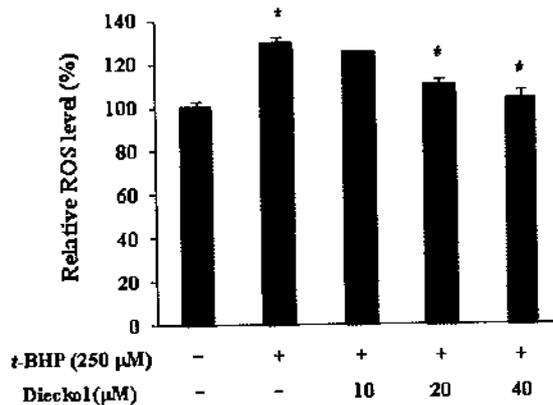
[그림 3-2-34] Dieckol의 항산화 기전
(a) 항산화 효소의 발현; (b) Nrf2 전사인자의 핵이동

Nrf2의 활성화에는 MAPKs, PI3K/Akt pathway가 관여하고 있는 것으로 알려져 있다. 특히 resveratrol은 ERK pathway를 통하여 Nrf2를 활성화시키며 pherone과 arsenite는 JNK를, curcumin은 p38을 통하여 Nrf2를 활성화시키는 것으로 보고된 바 있다. 본 실험에서는 dieckol이 어떠한 신호전달 경로를 통하여 Nrf2를 활성화 시키는지 알아보기 위하여 dieckol을 1시간 처리한 후 단백질을 추출하여 Western blot으로 단백질의 발현을 살펴보았다. 그 결과 dieckol은 pERK와 pJNK, pp38의 단백질을 농도 의존적으로 활성화 시키는 것으로 나타났으며 Akt의 인산화도 약간 증가하는 것으로 나타났다(그림 3-2-35). 따라서 dieckol은 PI3K/Akt 경로보다는 MAPKs 경로를 통하여 Nrf2를 활성화시켜 항산화 효소의 발현을 조절하는 것으로 생각된다.



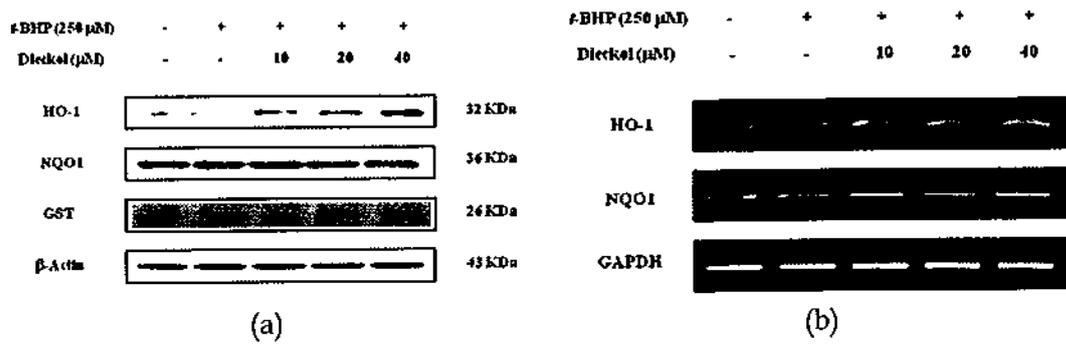
[그림 3-2-35] Dieckol이 MAPKs와 PI3K/Akt pathway에 미치는 영향

다음으로 dieckol의 항산화 효과를 검증하기 위하여 *t*-BHP를 이용하여 HepG2 세포에 oxidative stress를 일으켰다. *t*-BHP는 oxidant로 사용되어 DNA를 손상시키거나 세포의 apoptosis를 일으키고 노화를 유도하는 물질로 알려져 있다. *t*-BHP를 처리하면 세포내 ROS의 양이 증가하며 항산화 효소 또는 관련 단백질들이 정상 상태 일 때보다 감소하기도 한다. 본 실험에서 *t*-BHP를 HepG2 세포에 처리하였을 경우 유의적으로 ROS의 양이 증가하는 것으로 나타났다. 하지만 dieckol을 전처리하여 *t*-BHP를 처리하였을 경우 ROS의 생성량은 농도 의존적으로 감소하는 것으로 나타났다(그림 3-2-36). 이것은 dieckol이 anti-oxidant로 작용하여 ROS의 양을 감소시키거나 또는 항산화 효소들의 발현을 유도하여 세포내 ROS의 양을 감소시키기 때문으로 생각된다.



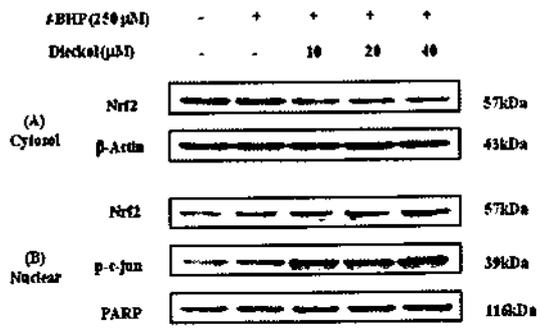
[그림 3-2-36] Dieckol의 세포내 ROS 소거능

Dieckol이 *t*-BHP에 의해 유발되는 oxidative stress에 대한 영향을 확인하기 위하여 단백질과 total RNA를 추출하여 각각 Western blot과 RT-PCR로 발현량을 살펴보았다. 그 결과 *t*-BHP에 의하여 약간 감소한 HO-1의 단백질과 mRNA 발현이 dieckol에 의하여 다시 농도 의존적으로 증가하는 것으로 나타났다(그림 3-2-37). 하지만 NQO1과 GST의 발현에는 영향을 미치지 않는 것으로 나타났다. 이것은 *t*-BHP에 의해 HO-1의 발현이 감소하여 oxidative stress가 증가하며 dieckol은 HO-1의 발현을 조절하여 세포를 oxidative stress로부터 보호한다는 것을 의미한다.



[그림 3-2-37] DieckZol이 t-BHP가 처리된 HepG2 세포내 항산화 기전에 미치는 영향
 (a) 항산화 효소 단백질의 발현; (b) 항산화 효소 mRNA의 발현

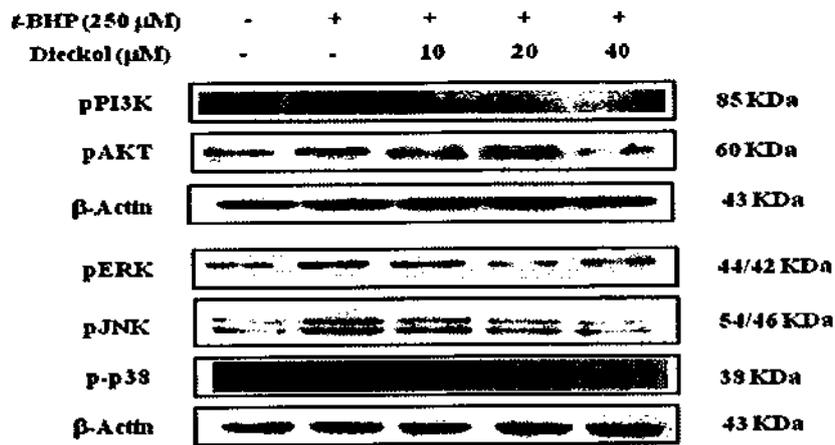
HO-1의 발현을 조절하는 Nrf2가 t-BHP와 dieckol에 의한 HO-1의 발현 조절에 관여하는지 확인하기 위하여 핵과 세포질 단백질을 분리한 후 Western blot으로 각각의 단백질 발현을 분석하였다. t-BHP는 HO-1의 발현을 감소시켰으나 Nrf2의 이동과 c-Jun의 활성화에는 영향을 미치지 않는 것으로 나타났다. 하지만 dieckol을 처리하였을 경우 Nrf2의 이동이 농도 의존적으로 증가하였으며 c-Jun의 활성화 역시 농도 의존적으로 증가하는 것으로 나타났다(그림 3-2-38). 따라서 t-BHP는 Nrf2의 이동과 c-Jun의 활성화에는 영향을 미치지 못하지만 다른 신호 전달 과정을 거쳐 HO-1의 발현을 조절하거나 HO-1 효소에 직접적으로 영향을 미쳐 감소시키고 dieckol은 Nrf2의 이동과 c-Jun의 활성화를 통하여 HO-1 효소를 전사 단계에서 조절하여 oxidative stress로부터 세포를 보호하는 것으로 생각된다.



[그림 3-2-38] Dieckol이 t-BHP가 처리된 HepG2 세포에서 Nrf2의 핵이동에 미치는 영향

전 실험에서 dieckol의 항산화 효소 발현 조절에 MAPKs가 관여할 것이라고 밝힌 바 있다. Dieckol이 t-BHP가 처리된 HepG2 세포에서도 MAPKs 또는 PI3K/Akt pathway에 어떤 영향을 미치는지 확인하고 위하여 단백질을 추출하여

Western blot으로 단백질의 발현을 살펴보았다. 그 결과 dieckol은 *t*-BHP에 의하여 증가하는 PI3K, Akt, ERK, JNK의 인산화를 농도 의존적으로 억제시키는 것으로 나타났다. 하지만 pp38에는 변화가 없었다(그림 3-2-39).



[그림 3-2-39] Dieckol이 *t*-BHP가 처리된 HepG2 세포에서 MAPKs와 PI3K/Akt pathway에 미치는 영향

본 실험에서는 dieckol만 처리되었을 경우 MAPKs와 Akt가 증가하였지만 *t*-BHP와 처리되었을 경우 활성화된 MAPKs와 Akt가 다시 감소되는 것으로 나타났다. 이러한 것은 세포마다 다양한 signaling pathway에서 반응이 일어나며 또한 아마도 dieckol과 *t*-BHP 등 주어진 자극에 대하여 세포의 생존과 보호를 위한 signaling pathway와 항산화 효소의 발현을 위한 반응이 다양하게 나타나기 때문으로 생각된다.

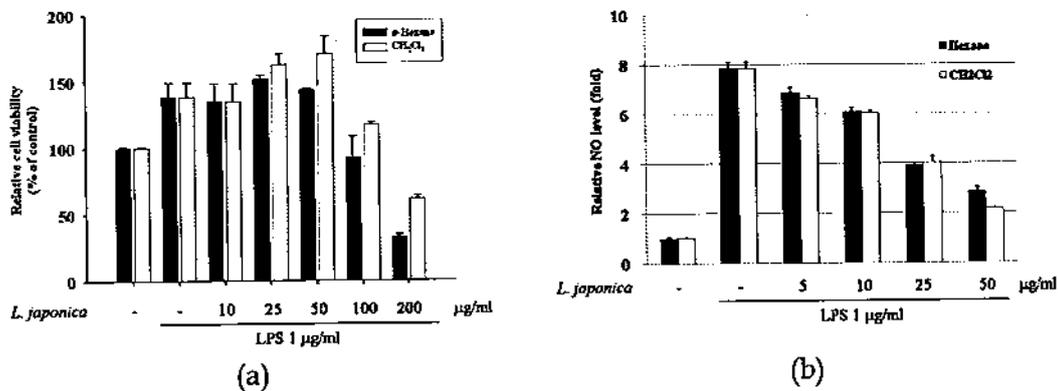
(4) 분리획분의 항치매 효과

Microglia 세포는 뇌의 대식세포로 LPS 또는 interferon-g (INF-g)에 의해 활성화되어 다양한 염증 반응을 일으킨다. Microglia 또는 neuron에서 일어나는 염증 반응은 central nerve system (CNS)에 염증을 일으키고 이 때 발생하는 염증성 cytokine(TNF- α , IL-1b, IL-6)등은 Alzheimer's disease, Parkinson's disease, trauma, sclerosis, cerebral ischemia 등과 같은 neurodegenerative disease의 병리학적 지표가 된다. 본 실험에서 다시마 추출물 중 *n*-hexane과 dichloromethane 획분, 모자반 추출물 중 *n*-hexane과 dichloromethane 획분이 macrophage에서 일어나는 염증 반응을 효과적으로 억제하는 것으로 확인되었다. 따라서 본 연구에서는 다시마 추출물과 모자반 추출물이 microglia 세포에서 발생하는 염증 반응에 어떠한 영향을 미

치는지 살펴보고 다양한 neurodegenerative disease에 대하여 효과가 있을지 알아보았다.

(가) 다시마 추출물의 항치매 활성

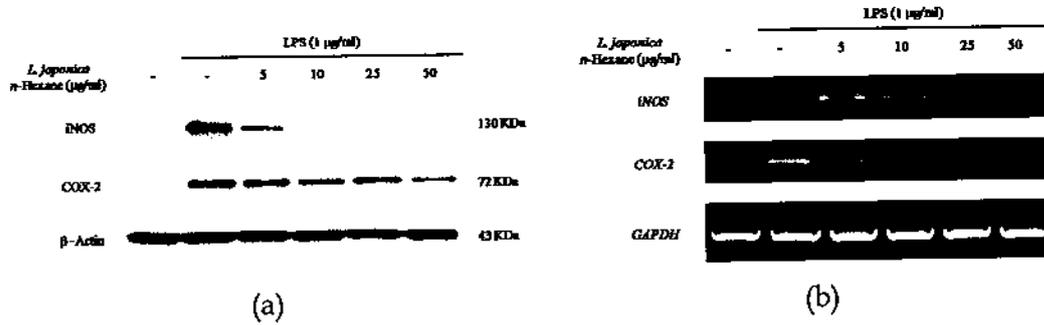
본 연구를 위해 BV2 microglia 세포를 배양하여 다양한 농도의 다시마 *n*-hexane, dichloromethane 획분을 1 mg/ml의 LPS와 함께 처리하였다. 24시간 후 MTS 분석법으로 세포의 생존률을 측정하여 세포에 미치는 영향을 살펴보았으며 상층액을 모아 Griess 분석법으로 nitrite 생성량을 비교해 보았다. 그 결과 다시마의 *n*-hexane와 dichloromethane 획분은 모두 50 mg/ml의 농도까지 BV2 세포의 생존률에는 영향을 미치지 않으며 그 이상의 농도에서는 농도 의존적으로 세포 생존률이 저해되는 것으로 나타났다. 그리고 다시마의 *n*-hexane와 dichloromethane 획분은 모두 50 mg/ml의 농도 범위 내에서 LPS에 의해 다량 생성되는 nitrite 생성을 농도 의존적으로 억제시키는 것으로 나타났다(그림 3-2-40). 이것은 다시마의 *n*-hexane와 dichloromethane 획분이 BV2 microglia 세포에서 LPS에 의한 염증 반응을 효과적으로 억제하고 있다는 것을 의미하였다.



[그림 3-2-40] 다시마 추출물에 의한 BV2 세포의 독성과 NO 생성 저해 효과
 (a) 세포 생존률; (b) NO 생성량

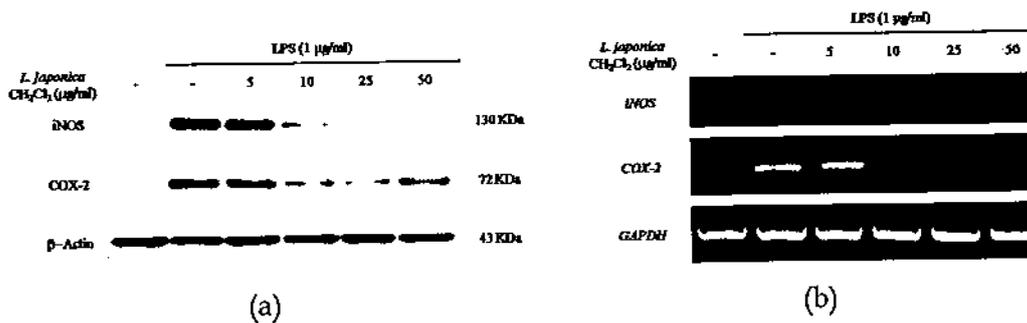
BV2 microglia 세포에서 LPS에 대한 다시마의 *n*-hexane 획분의 항염증 기전을 확인하기 위하여 Western blot과 RT-PCR로 nitrite의 생성과 PGE2 생성에 관여하는 iNOS와 COX-2의 발현을 살펴보았다. 다시마의 *n*-hexane 획분을 1시간 처리한 후 LPS를 처리하여 16시간 배양한 다음 단백질을 추출하여 Western blot으로 분석하였다. 또한, 다시마의 *n*-hexane 획분을 1시간 처리한 후 LPS를 처리하여 4시간 배양한 다음 total RNA를 추출하여 RT-PCR로 mRNA의 발현을 확인하였다. 그림 3-2-41(a) 같이 다시마의 *n*-hexane 획분은 LPS에 의한 iNOS의 과발현을 효과

적으로 차단하며 COX-2 단백질의 과발현을 농도 의존적으로 억제시키는 것으로 나타났다. 그리고 다시마의 *n*-hexane 획분은 LPS에 의한 iNOS와 COX-2 mRNA의 과발현도 농도 의존적으로 억제시키는 것으로 나타났다(그림 3-2-41(b)). 이러한 결과는 다시마의 *n*-hexane 획분이 LPS에 의하여 활성화되는 iNOS와 COX-2 단백질의 발현을 전사 단계에서 억제시키고 있음을 의미하였다.



[그림 3-2-41] 다시마 *n*-hexane 획분의 염증성 단백질 발현 저해 효과
(a) iNOS, COX-2 단백질 발현; (b) iNOS, COX-2 mRNA 발현

BV2 microglia 세포에서 LPS에 대한 다시마의 dichloromethane 획분의 항염증 기전을 확인하기 위하여 Western blot과 RT-PCR로 nitrite의 생성과 PGE₂ 생성에 관여하는 iNOS와 COX-2의 발현을 살펴보았다. 다시마의 dichloromethane 획분을 1시간 처리한 후 LPS를 처리하여 16시간 배양한 다음 단백질을 추출하여 Western blot으로 분석하였다. 또한, 다시마의 dichloromethane 획분을 1시간 처리한 후 LPS를 처리하여 4시간 배양한 다음 total RNA를 추출하여 RT-PCR로 mRNA의 발현을 확인하였다. 그림 3-2-42(a) 같이 다시마의 dichloromethane 획분은 LPS에 의한 iNOS의 과발현을 효과적으로 차단하며 COX-2 단백질의 과발현을 농도 의존적으로 억제시키는 것으로 나타났다.

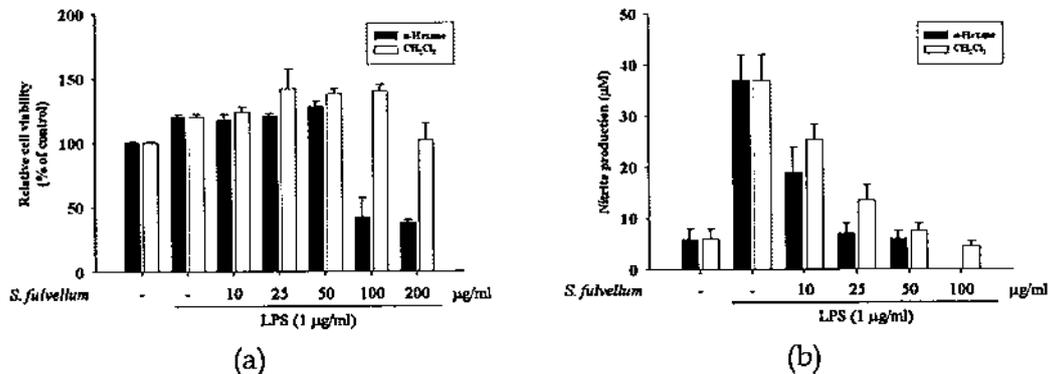


[그림 3-2-42] 다시마 dichloromethane 획분의 염증성 단백질 발현 저해 효과
(a) iNOS, COX-2 단백질 발현; (b) iNOS, COX-2 mRNA 발현

그리고 다시마의 dichloromethane 획분은 LPS에 의한 iNOS와 COX-2 mRNA의 과발현도 농도 의존적으로 억제시키는 것으로 나타났다(그림 3-2-42(b)). 이러한 결과는 다시마의 dichloromethane 획분이 LPS에 의하여 활성화되는 iNOS와 COX-2 단백질의 발현을 전사 단계에서 억제시키고 있음을 의미하였다.

(나) 모자반 추출물의 항치매 활성

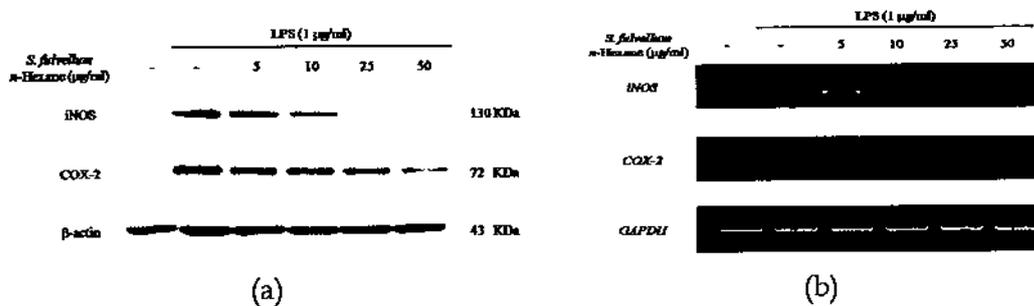
본 연구를 위해 BV2 microglia 세포를 배양하여 다양한 농도의 모자반 *n*-hexane, dichloromethane 획분을 1 µg/ml의 LPS와 함께 처리하였다. 24시간 후 MTS 분석법으로 세포의 생존률을 측정하여 세포에 미치는 영향을 살펴보았으며 상층액을 모아 Griess 분석법으로 nitrite 생성량을 비교해 보았다. 그 결과 참모자반의 *n*-hexane 획분은 50 mg/ml의 농도까지 BV2 세포의 생존률에는 영향을 미치지 않으며 그 이상의 농도에서는 세포 생존률이 저해되는 것으로 나타났다. 그러나 참모자반의 dichloromethane 획분은 200 mg/ml의 농도까지 BV2 세포의 생존률에는 유의적인 영향을 미치지 않았다. 참모자반의 *n*-hexane와 dichloromethane 획분은 모두 세포의 생존률에 영향을 미치지 않는 범위내에서 LPS에 의해 다량 생성되는 nitrite 생성을 농도 의존적으로 억제시키는 것으로 나타났다(그림 3-2-43). 이것은 참모자반의 *n*-hexane와 dichloromethane 획분이 BV2 microglia 세포에서 LPS에 의한 염증 반응을 효과적으로 억제하고 있다는 것을 의미하였다.



[그림 3-2-43] 모자반 추출물에 의한 BV2 세포의 독성과 NO 생성 저해 효과
(a) 세포 생존률; (b) NO 생성

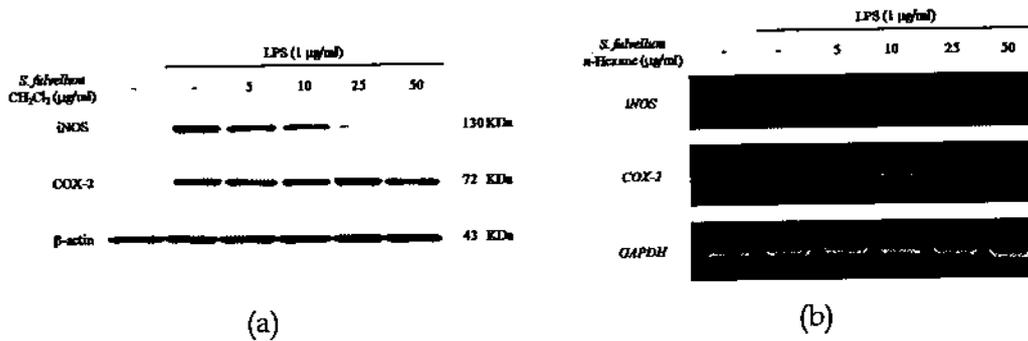
BV2 microglia 세포에서 LPS에 대한 모자반의 *n*-hexane 획분의 항염증 기전을 확인하기 위하여 Western blot과 RT-PCR로 nitrite의 생성과 PGE2 생성에 관여하는 iNOS와 COX-2의 발현을 살펴보았다. 모자반의 *n*-hexane 획분을 1시간 처리한 후 LPS를 처리하여 16시간 배양한 다음 단백질을 추출하여 Western blot으로

분석하였다. 또한, 모자반의 *n*-hexane 획분을 1시간 처리한 후 LPS를 처리하여 4시간 배양한 다음 total RNA를 추출하여 RT-PCR로 mRNA의 발현을 확인하였다. 그림 3-2-44과 같이 모자반의 *n*-hexane 획분은 LPS에 의한 iNOS의 과발현을 효과적으로 차단하며 COX-2 단백질의 과발현을 농도 의존적으로 억제시키는 것으로 나타났다. 그리고 모자반의 *n*-hexane 획분은 LPS에 의한 iNOS와 COX-2 mRNA의 과발현도 농도 의존적으로 억제시키는 것으로 나타났다. 이러한 결과는 모자반의 *n*-hexane 획분이 LPS에 의하여 활성화되는 iNOS와 COX-2 단백질의 발현을 전사 단계에서 억제시키고 있음을 의미하였다.



[그림 3-2-44] 모자반 *n*-hexane 획분의 염증성 단백질 발현 저해 효과
(a) iNOS, COX-2 단백질 발현; (b) iNOS, COX-2 mRNA 발현

BV2 microglia 세포에서 LPS에 대한 모자반의 dichloromethane 획분의 항염증 기전을 확인하기 위하여 Western blot과 RT-PCR로 nitrite의 생성과 PGE2 생성에 관여하는 iNOS와 COX-2의 발현을 살펴보았다. 모자반의 dichloromethane 획분을 1시간 처리한 후 LPS를 처리하여 16시간 배양한 다음 단백질을 추출하여 Western blot으로 분석하였다. 또한, 모자반의 dichloromethane 획분을 1시간 처리한 후 LPS를 처리하여 4시간 배양한 다음 total RNA를 추출하여 RT-PCR로 mRNA의 발현을 확인하였다. 그림 3-2-45와 같이 모자반의 dichloromethane 획분은 LPS에 의한 iNOS의 과발현을 효과적으로 차단하였지만 COX-2 단백질 발현에는 유의적인 영향을 미치지 못하는 것으로 나타났다. 그리고 모자반의 dichloromethane 획분은 LPS에 의한 iNOS의 mRNA 과발현을 농도 의존적으로 억제시키고 있으나 COX-2 mRNA의 과발현에는 영향을 미치지 못하는 것으로 나타났다. 이러한 결과는 모자반의 dichloromethane 획분은 LPS에 의한 염증 반응에 있어서 COX-2 단백질의 발현에는 영향을 미치지 못하지만 iNOS의 단백질 발현을 전사 단계에서 조절하여 NO의 생성을 억제하였다는 것을 의미하였다.



[그림 3-2-45] 모자반 dichloromethane 획분의 염증성 단백질 발현 저해 효과
(a) iNOS, COX-2 단백질 발현; (b) iNOS, COX-2 mRNA 발현

(5) 분리 획분의 항비만 효과

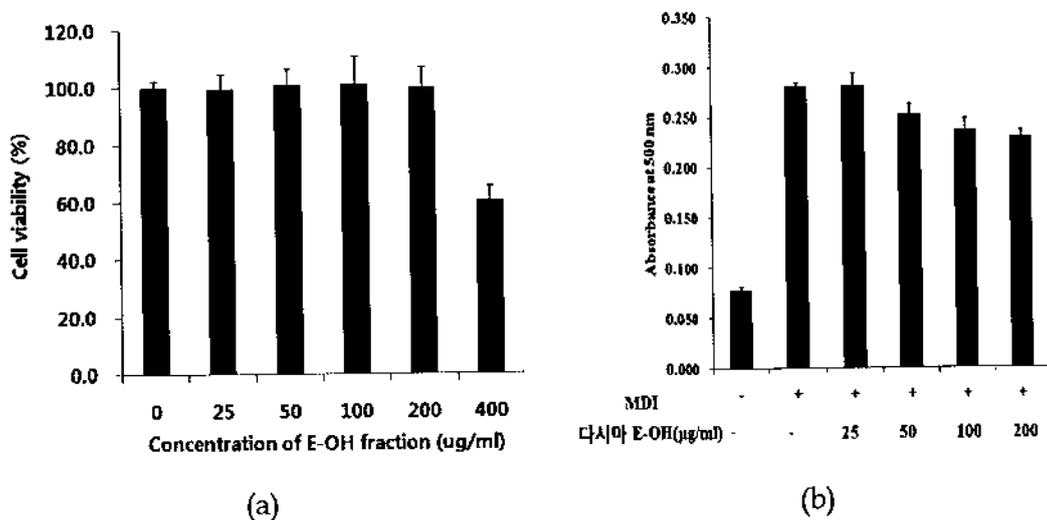
최근 세계보건협회에서는 전 세계인구 중 10억 이상이 과체중이며 그중 적어도 3억의 인구가 임상적으로 비만에 속하였다고 발표하였다. 우리나라에서도 지난 10여년간 과체중 및 비만인구가 급증하여 전체인구의 35% 가량이 과체중인 것으로 국민건강보험공단에서 발표하였다. 비만의 근본적인 유발원인은 에너지 섭취량과 소비량의 불균형에서 기인하는 것으로 유전, 환경을 포함하는 여러 가지 요인들이 복합적으로 영향을 미친다. 특히 생활환경의 변화와 고령화 사회의 진입으로 비만관련질환의 예방과 치료를 위하여 자연식품에서 그 해법을 찾으려는 연구가 고조되고 있다. 이러한 시대적 추세에 부응하여, 다시마의 저분자화합물에 의한 항비만 효과를 분석하였다. 본 연구개발에 사용된 3T3-L1 cell은 일종의 stem cell로써 지방세포로 분화되게 되어있는 소위 committed stem cell이라고 할 수 있으므로 항비만 활성을 측정하기 위하여 사용되는 세포주이다. 이 세포는 differentiation inducer를 처리하면 지방세포로 분화된다. 우선 3T3-L1 cell은 분화 전에는 10 % calf serum이 함유된 DMEM에서 유지하였다. 분화를 유도하기 전에 confluent 상태가 된 이후에 2-3일 정도 더 두었다가, "Postconfluent 2 day"에 3T3-L1 세포에 시료와 함께 3-isobutyl-1-methylxanthine, dexamethasone 및 insulin (MDI)과 함께 처리하여 시료에 의한 지방축적 저해효과를 분석하였다.

(가) 다시마 에탄올 추출물의 세포독성 및 지방합성 저해효과

3T3-L1 preadipocytes을 96-well plates에 50,000 cells/well로 배양하여 DMEM에 10 % FBS가 포함된 배지를 100 μl 분주하였다. 24시간 후, 다시마 EtOH 추출물을 0-400 mg/ml의 농도로 serum-free DMEM 배지에 처리한 후 24시간 배양한 후 MTS assay로 cell viability를 측정하였다. MTS stock solution을 5 mg/ml의

농도로 dimethyl sulfoxide (DMSO)에 녹여서 준비한 후 10 ml MTS solution (5 mg/ml) 을 90 ml serum free DMEM 배지에 섞어서 96-well plates에 각각 100 ml 씩 분주하였다. 96-well plates를 37 °C에서 1시간 동안 배양한 후 ELISA reader로 490 nm 흡광도 에서 측정하였다. 그림 3-2-46(a)의 결과를 통해 다시마 EtOH 추출물은 200 mg/ml의 농도 내에서는 3T3-L1에 독성을 미치지 않는다는 것을 확인할 수 있었다.

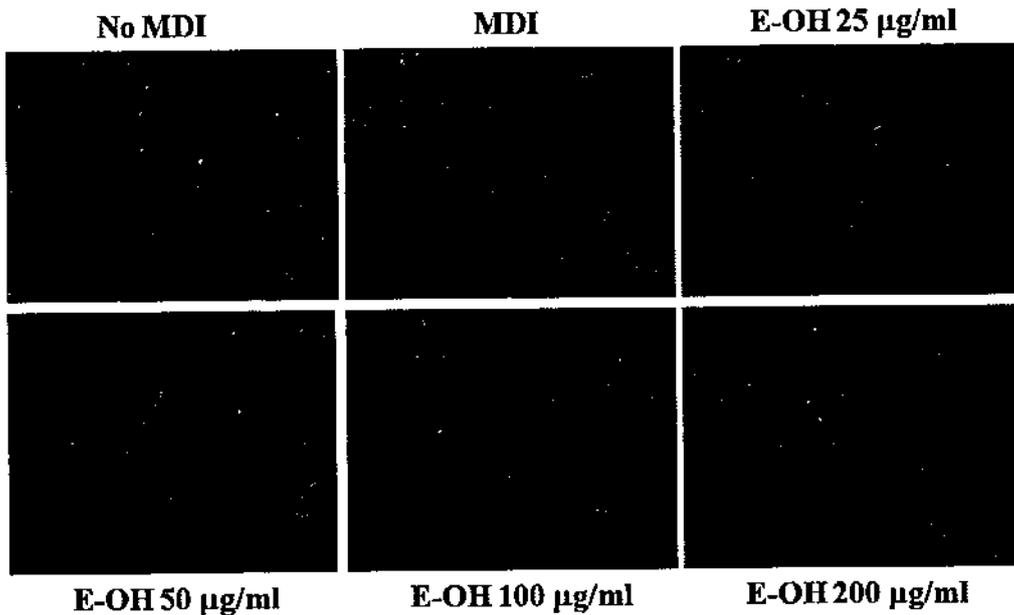
3T3-L1세포에 0-200 mg/ml의 농도로 다시마 EtOH 추출물을 3-isobutyl 1-methylxanthine, dexamethasone, insulin (MDI)과 함께 처리하였다. 처리 후 7일 째에 세포를 PBS에 두 번 씻어 내고 50 mM sodium phosphate buffer (pH 7.4) containing 2 mM EDTA and 2 M NaCl buffer를 넣고 scrsper로 scraping 하였다. 모은 세포를 40 watt에서 5초간 2번 microtip of a Branson model 250 Sonifier에서 sonication을 하였다. 14,000 rpm에서 10분간 원심분리한 후 Oil-Red O 염색법으로 지방함량을 500 nm에서 측정하였다. 지방함량을 측정한 결과 농도 의존적으로 지방의 생합성이 억제되었으며 200 µM의 경우 20% 가량의 억제 효과가 나타났다(그림 3-2-46(b)). 지방함량의 감소는 지방합성의 억제를 의미하는 것이다. 이 실험결과를 토대로 다시마 EtOH 추출물 중 지방합성 억제효과가 뛰어난 획분을 얻기 위하여 유기용매로 분획하였다.



[그림 3-2-46] 다시마 EtOH 추출물에 의한 3T3-L1 세포의 독성 및 지방합성 저해 효과

그림 3-2-47를 보면 분화전과 분화 7일 후 다시마 EtOH 추출물의 농도에 따른 지방축적을 눈으로 확인할 수 있다. 붉은 색으로 염색 되어진 부분이(그림 3-2-47) 지방구이며 다시마 EtOH 추출물을 처리하였을 경우 붉은 부분으로 염색 되

어진 부분이 농도 의존적으로 감소하는 것을 볼 수 있었다. 다시마 EtOH 추출물 농도가 200 mg/ml일 경우 20% 가량의 감소율을 확인할 수 있었다.

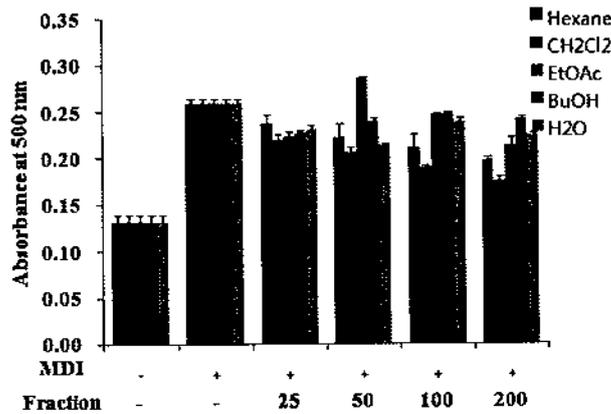


[그림 3-2-47] 다시마 에탄올 추출물에 의한 3T3-L1 세포내 지방 함량 관찰

(나) 다시마 획분에 따른 지방합성 저해능 측정

이전의 실험에서 다시마 에탄올 추출물이 지방합성 저해능이 있다는 것을 확인하였다. 지방합성 저해능이 우수한 획분을 얻기 위하여 알코올추출물을 헥산, 다이클로로메탄, 에틸아세테이트, 부탄올 및 물획분으로 분획하였다. 각 획분을 3T3-L1 세포에 0-200 mg/ml의 농도로 MDI와 함께 처리한 후 7일째에 세포를 수거하여 세포중 지방량을 Oil-Red O 염색법으로 분석하였다.

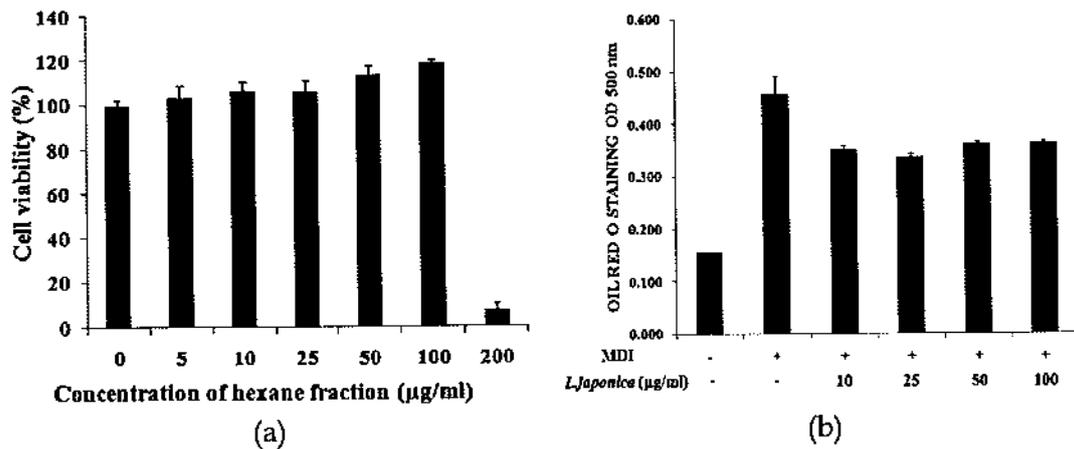
그림 3-2-48에 나타난 바와 같이 *n*-hexane과 dichloromethane 획분은 25-200 mg/ml의 농도범위에서 농도 의존적으로 지방합성을 저해함을 알 수 있었다. 그리고 EtOAc 획분은 고농도(200 mg/ml)에서만 약간의 지방합성을 저해하는 것으로 나타났다. 따라서 본 연구개발에서는 *n*-hexane과 dichloromethane 획분이 지방합성을 억제함으로써 항비만 효과가 있는 것으로 나타났으며, 이후의 연구개발은 두 획분을 대상으로 하였다.



[그림 3-2-48] 다시마 유기용매 획분에 따른 3T3-L1 세포내 지방 함량 변화

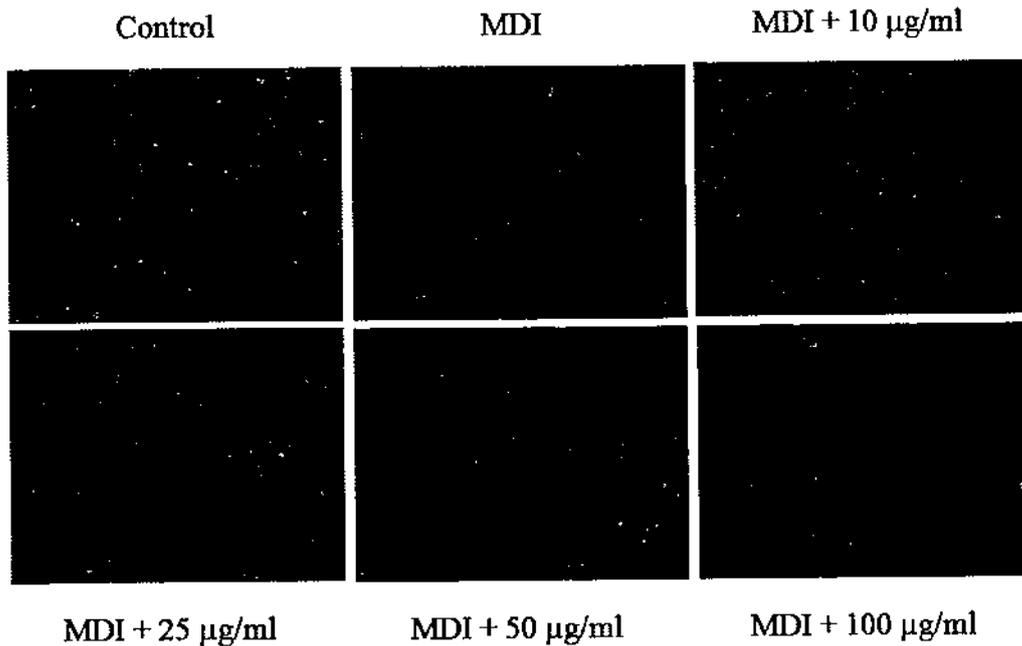
(다) 다시마의 *n*-hexane 획분에 의한 지방합성 저해효과

다시마의 *n*-hexane 획분에 의한 지방합성 저해능을 측정하기 위하여 먼저 3T3-L1 세포에 대한 다시마의 *n*-hexane의 세포독성을 분석하였다. 그림 3-2-49(a)에 나타낸바와 같이 100 mg/ml의 농도까지는 다시마의 *n*-hexane 획분에 의한 세포독성은 나타나지 않았으나, 200 mg/ml의 농도에서 다시마의 *n*-hexane 획분은 세포독성을 나타내었다. 따라서 100 mg/ml의 농도 범위 내에서 다시마의 *n*-hexane 획분의 지방합성 저해효과를 분석하였다. 그림 3-2-49(b)에 나타낸바와 같이 25 mg/ml 이상의 농도에서 강한 지방합성 저해효과가 나타났으며, 그이상의 농도에서는 비슷한 경향을 나타내었다. 이러한 결과를 그림 3-2-50에 Oil-red O 염색 후의 사진을 나타내었다.



[그림 3-2-49] 다시마의 *n*-hexane 획분에 의한 3T3-L1 세포의 독성 및 지방합성 저해 효과

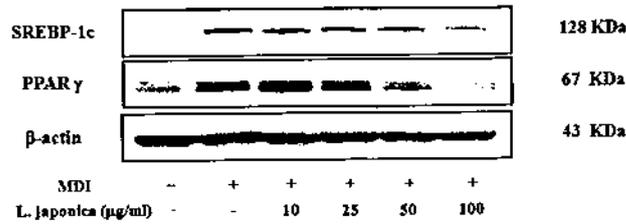
(a) 세포 생존률; (b) Oil red O staining



[그림 3-2-50] 다시마의 *n*-hexane 획분에 의한 3T3-L1 세포내 지방 함량 관찰

(라) 다시마의 *n*-hexane 획분에 의한 지방합성 단백질의 변화

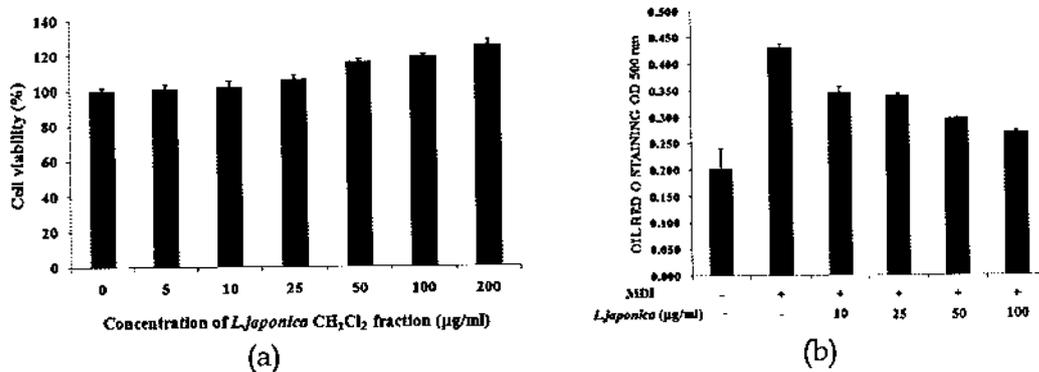
다시마의 *n*-hexane 획분은 지방합성을 농도 의존적으로 감소하였다는 것의 위의 결과를 통하여 확인할 수 있었다. 이러한 결과를 통하여 어떠한 경로를 통하여 분화 억제에 영향을 미치는 지를 확인할 필요가 있다. peroxisome proliferators-activated receptors g(PPARg)와 sterol regulatory element binding proteins(SREBPs)는 지방세포 분화과정 (adipogenesis)에 관여하는 여러 전사인자 중 지방합성에 관여하는 것으로 알려져 있다. PPARs는 type II 핵호르몬 receptor 로써 PPARs은 retinoid X receptor (RXR)와 heterodimers를 형성함으로써 전사활성이 조절되어 지기도 한다. PPARg는 지방세포의 형성에 중요한 조절인자로써, PPARg는 지방세포의 분화시에 유도되어지며 preadipocyte를 adipocyte로 유도되어 지도록 한다. 그림 3-2-51의 결과를 통하여 다시마의 *n*-hexane 획분이 지방분화과정 중 PPARg의 발현을 억제하는 것을 확인할 수 있었다. SREBP-1c는 지방세포의 분화 동안에 증가를 하며 이것은 콜레스테롤과 지방산 합성에 중요한 역할을 한다. 그림 3-2-51의 결과를 통하여 알 수 있듯이 다시마의 *n*-hexane 획분을 100 mg/ml의 농도로 처리 했을 경우 SREBP-1c 단백질이 현저하게 감소함을 알 수 있었다. 이러한 SREBP-1c와 PPARg 전사인자가 농도 의존적으로 감소함은 다시마 *n*-hexane 획분이 섬유아세포로부터 지방세포로 분화시 지방의 합성을 억제함을 의미한다. 따라서 다시마의 *n*-hexane 획분에 의한 지방합성 억제는 SREBP-1c와 PPARg 전사인자의 발현억제에 의해 일어남을 알 수 있다.



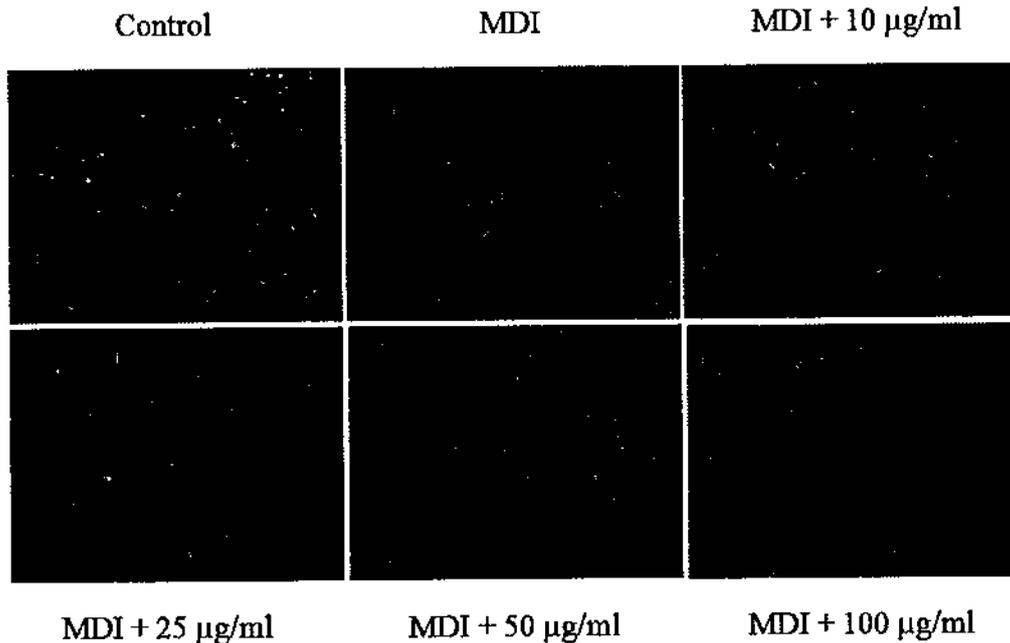
[그림 3-2-51] 다시마의 *n*-hexane 획분에 의한 3T3-L1 세포 분화시 단백질 발현 변화

(마) 다시마의 dichloromethane 획분에 의한 지방합성 저해효과

다시마의 dichloromethane 획분에 의한 지방합성 저해능을 측정하기 위하여 먼저 3T3-L1 세포에 대한 다시마의 dichloromethane 획분의 세포독성을 분석하였다. 그림 3-2-52(a)에 나타난 바와 같이 200 mg/ml의 농도까지 다시마의 dichloromethane 획분에 의한 세포독성은 나타나지 않았다. 이는 다시마의 dichloromethane 획분이 다시마의 *n*-hexane 획분에 비해 세포독성이 낮다는 것을 의미하고 있다. 따라서 200 mg/ml의 농도범위 내에서 다시마의 dichloromethane 획분의 지방합성 저해효과를 분석하였다. 그림 3-2-52(b) 나타난 바와 같이 다시마의 dichloromethane 획분은 100 mg/ml의 농도까지 농도 의존적으로 지방합성 저해효과가 나타내었다. 그 결과를 그림 3-2-53에 Oil-red O 염색 후의 사진을 나타내었다.



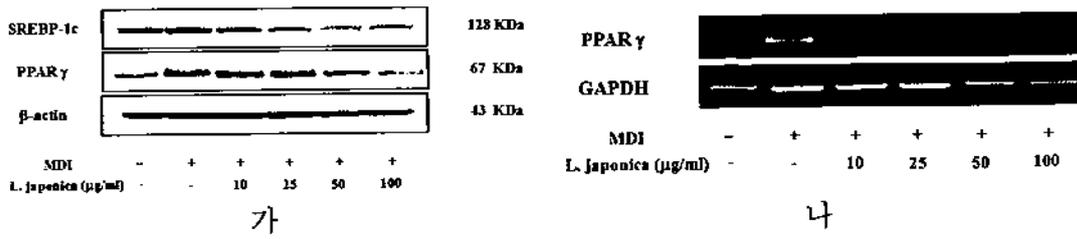
[그림 3-2-52] 다시마의 dichloromethane 획분에 의한 3T3-L1 세포의 독성 및 지방합성 저해 효과 (a) 세포 생존률; (b) Oil red O staining



[그림 3-2-53] 다시마의 dichloromethane 획분에 의한 3T3-L1 세포내 지방 함량 관찰

(바) 다시마의 dichloromethane 획분에 의한 지방합성 단백질의 변화

다시마의 dichloromethane 획분은 지방합성을 농도 의존적으로 감소하였다는 것을 위의 결과를 통하여 확인할 수 있었다. 이러한 결과를 통하여 어떠한 경로를 통하여 지방합성을 억제하는지 분석하기 위하여 지방세포 분화과정에 관여하는 SREBP-1c와 PPAR γ 전사인자의 발현을 Western blot으로 분석하였다. 그림 3-2-54에 나타낸바와 같이 다시마의 dichloromethane 획분에 의하여 SREBP-1c와 PPAR γ 는 농도 의존적으로 감소함을 알 수 있었다. 이러한 결과는 3T3-L1 preadipocyte가 adipocyte로 분화되는 과정에 다시마의 dichloromethane 획분이 SREBP-1c와 PPAR γ 의 단백질 발현을 저해함을 의미하고 있다. 따라서 SREBP-1c와 PPAR γ 단백질의 발현억제가 전사수준에서 일어나는지를 확인하기 위하여 PPAR γ 의 mRNA 발현양상을 RT-PCR로 분석하였다. 그 결과 PPAR γ mRNA는 농도 의존적으로 다시마의 dichloromethane 획분에 의하여 mRNA의 발현이 억제되었다. 이러한 결과는 PPAR γ 단백질은 전사과정 중에 다시마의 dichloromethane 획분에 의하여 발현이 억제됨을 시사하고 있다.

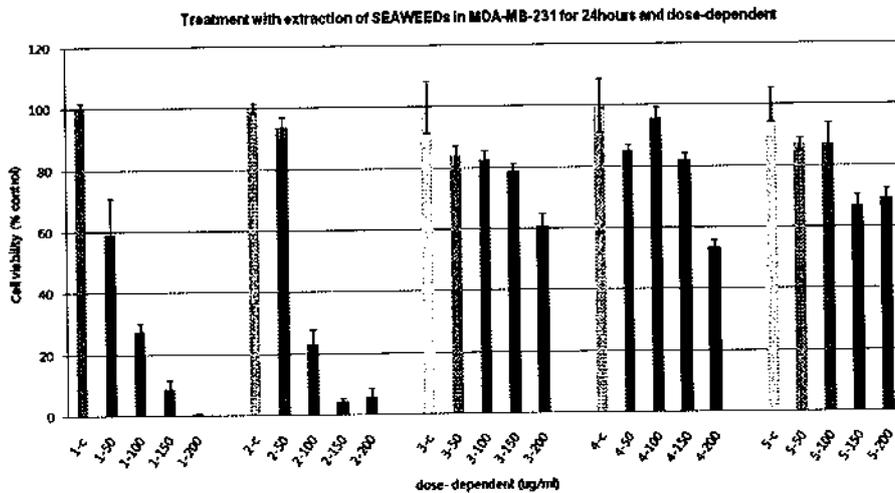


[그림 3-2-54] 다시마의 dichloromethane 획분에 의한 3T3-L1 세포 분화시 단백질과 mRNA의 발현 변화 (a) 단백질 발현; (b) mRNA 발현

(5) 다시마, 모자반, 곰피 추출물의 항암 활성

(가) 모자반, 다시마, 곰피의 각 추출물에 대한 세포 독성 테스트

해조류 추출물에 의한 항암 활성은 암세포의 성장이나 생존률에 대한 추출물의 영향으로 확인할 수 있다. 본 실험을 위하여 MDA-MB-231 유방암 세포에 각각 해조류 획분을 처리하여 세포의 생존률을 비교하였다. 그 결과 모자반의 *n*-hexane과 dichloromethane 획분이 MDA-MB-231 유방암 세포의 생존률을 농도 의존적으로 강하게 억제시키고 있는 것으로 나타났다(그림 3-2-55). 따라서 이 후 연구 개발은 두 획분을 대상으로 진행하였다.



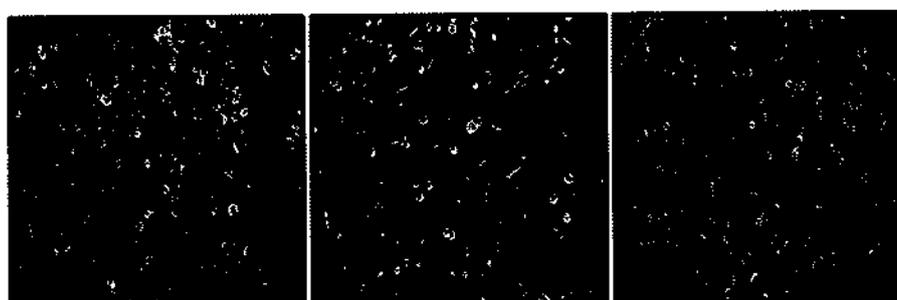
1. 모자반(*n*-hexane) 2. 모자반(dichloromethane) 3. 다시마(*n*-hexane)
4. 다시마(dichloromethane) 5. 곰피(dichloromethane)

[그림 3-2-55] 해조류 추출물에 의한 MDA-MB-231 세포의 독성

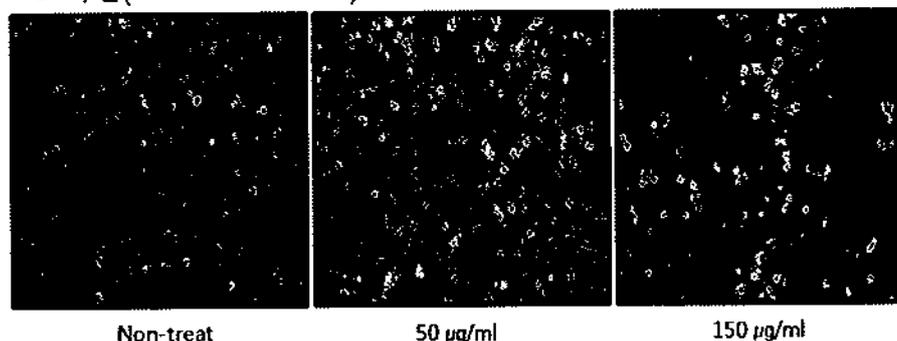
(나) 모자반 추출물에 의한 세포 형태의 변화

암세포가 apoptosis에 의하여 사멸되면 고유의 형태를 잃고 응축되는 현상이 나타난다. 본 실험에서는 모자반의 *n*-hexane 추출물과 dichloromethane 추출물을 처리하여 24시간 후에 현미경(100배)으로 세포 모양의 변화와 생존 세포수의 변화를 관찰하였다. 그 결과 두 획분 모두 농도 의존적으로 세포수가 감소하는 것을 확인할 수 있었으며 고농도에서는 세포 고유의 모양을 잃고 둥글게 말리는 것으로 나타났다(그림 3-2-56).

모자반(*n*-hexane)



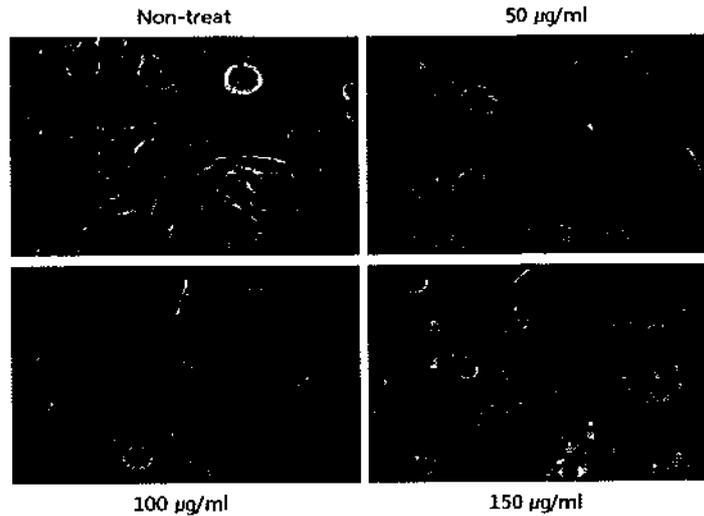
모자반(dichloromethane)



[그림 3-2-56] 모자반 획분에 의한 세포의 형태학적 변화

(다) 모자반 *n*-hexane 추출물에 대한 세포골격의 모양 변화

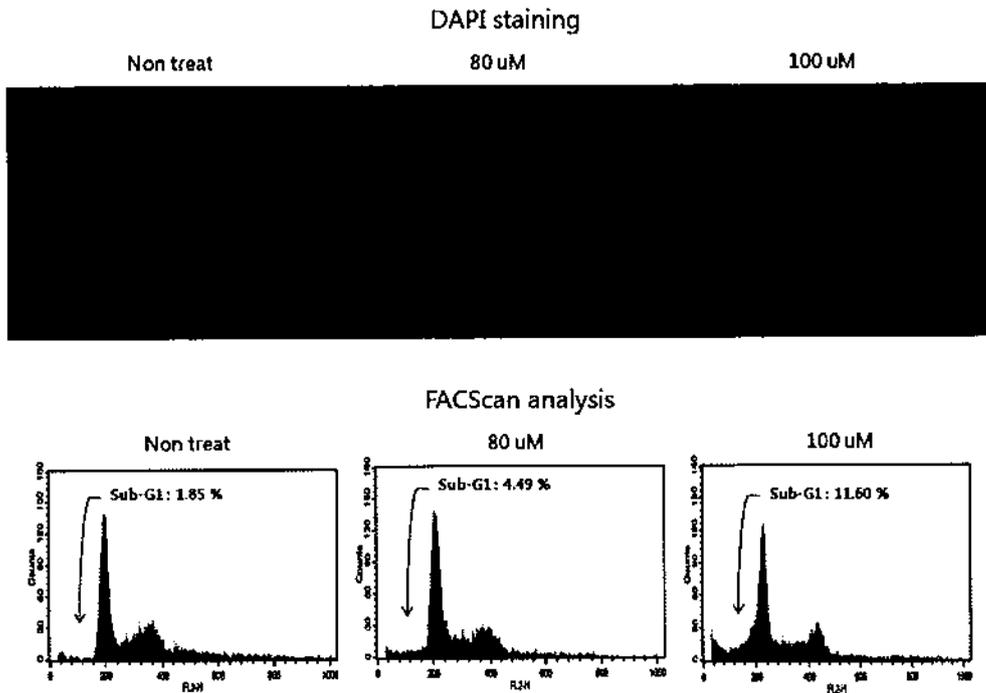
모자반 추출물 중 *n*-hexane 추출물에 대한 세포모양 변화를 400배로 확대하여 관찰함으로써, 세포 골격체가 어떻게 변화하면서 사멸하는지 알아보았다. 자가 세포사멸이 일어날 때에는 DNA가 잘려지며, 핵막이 붕괴되고 세포막이 오그라들어 둥글게 말리는 현상이 나타난다. 세포의 현미경사진에서 볼 수 있듯이 세포 골격이 오그라들어 붉은 화살표로 표시된 부분과 같이 세포막의 변형이 생기고, 세포부착 부분이 붕괴되면서 점차 둥글게 말리는 세포모양의 변화를 관찰할 수 있었다(그림 3-2-57).



[그림 3-2-57] 모자반의 *n*-hexane 희분에 의한 세포 골격의 형태학적 변화

(라) DAPI 염색을 통한 세포 내 핵막의 모양 변화, DNA 응축 관찰과 FACScan analysis를 통한 세포주기 분석

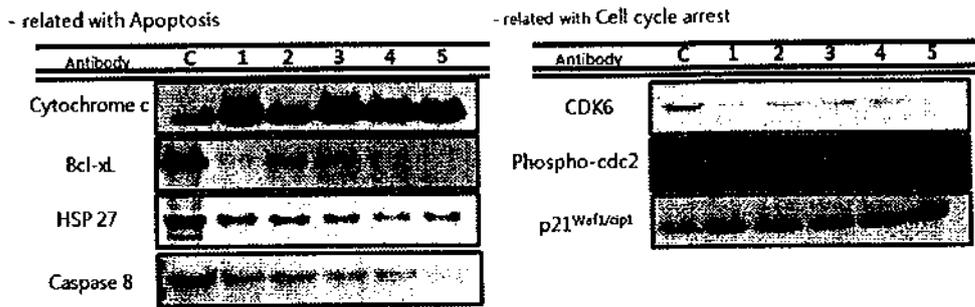
곰피의 dieckol을 암 세포에 처리한 후, DAPI 염색 방법을 활용하여 핵막과 그 내부 DNA의 변화를 관찰하였다. 80 mM에서 핵막의 유실이 일어나고, 100 mM에서는 핵막이 완전히 응축하여 작게 말려있는 것을 관찰할 수 있었다. 이는 apoptosis가 일어날 때 생기는 핵막의 붕괴와 DNA 응축과 관련이 있는 현상이므로 세포의사멸 현상이 apoptosis에 의한 것이라는 근거가 될 수 있다. 또한 FACScan analysis를 통해서 세포주기 상의 변화를 관찰해 본 결과 apoptosis가 일어나면서 DNA가 분해되어 나타나는 Sub-G1기가 추출물에 대하여 농도 의존적으로 증가함을 알 수 있었다. 이는 총 10,000개의 분리된 세포를 레이저를 이용하여 그 DNA contents를 측정, 판단하는 것이기 때문에 apoptosis가 일어난 세포가 추출물의 처리에 의하여 증가하였음을 증명하는 결과인 것이다(그림 3-2-58).



[그림 3-2-58] DAPI 염색과 FACScan 분석

(마) 참모자반, 다시마, 곰피의 각 추출물에 대한 세포내 세포사멸(apoptosis)과 세포 주기억제 관련 단백질의 발현양상

공통적으로 모든 추출물에서 cytochrome c의 방출이 두드러지게 증가하였다(그림 3-2-59). Cytochrome c의 방출은 apoptosis를 개시할 때 미토콘드리아에서 일어나는 방출과정으로 이러한 현상은 정상적으로 Bcl-xL과 HSP27이 억제하고 있다가 이 두 인자의 발현양이 감소하면서 방출이 일어난 것으로 확인할 수 있었으며, mature 형태의 caspase 8의 발현양 감소는 apoptosis active form인 cleaved form으로의 전환을 의미하므로 apoptosis를 거쳐 암 세포의 사멸이 일어나는 것을 확인할 수 있다. 또한 G1에서 S기로 세포주기가 진행되는데 중요한 역할을 하는 CDK6의 발현양이 감소하여 G1 → S기로의 억제를 유발시키는 것을 알 수 있었고 [33], G2에서 M기로 진행되는데 key factor 중 하나인 cdc2의 인산화가 현저히 감소하고 그 인산화를 억제시키는 p21^{Waf1/cip1}의 발현양이 증가한 것으로 보아 G2 → M기로의 억제도 유발하는 것을 확인할 수 있었다. 일반적으로 cdc2의 인산화가 세포주기 상의 check point에서 결정적인 역할을 하며, 인산화의 감소는 세포주기의 진행을 억제시킴으로서 세포성장을 정지시켰다.

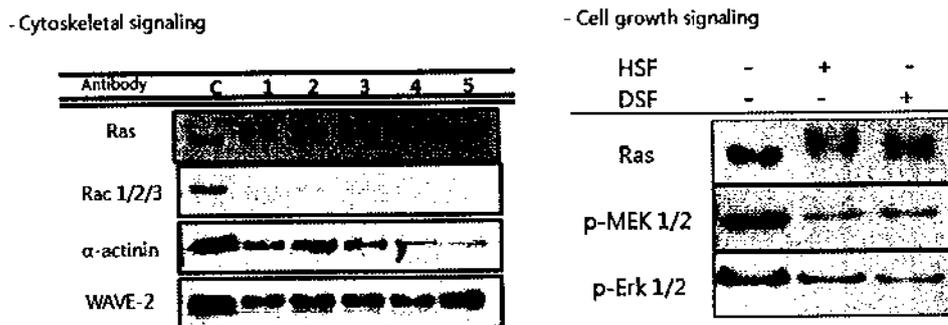


C: no treatment, 1: 모자반 (*n*-hexane), 2: 모자반 (dichloromethane), 3: 다시마 (*n*-hexane), 4: 다시마 (dichloromethane), 5: 곰피 (dichloromethane)

[그림 3-2-59] 세포사멸(apoptosis)과 세포주기억제 관련 단백질의 발현양상

(바) 모자반, 다시마, 곰피 각 추출물에 의한 세포골격과 세포성장 관련 단백질의 발현양상

세포의 모양을 결정하는 세포골격 인자들의 단백질 발현이 현저히 감소하는 것을 확인 할 수 있었다. 특히 대표적인 원암유전자로 알려진 Ras 단백질의 발현이 감소하였으며, 세포골격인자 발현을 시작하는 Rac 유전자의 발현 또한 동시에 감소하였다(그림 3-2-60). 이를 통하여 세포골격의 파괴는 Rac1/2/3 단백질의 발현량 저하에 따른 α -actinin 발현량의 감소와 WAVE-2의 감소와 더불어 일어나는 actin 재조합이나 암 전이인자들의 감소를 생각할 수 있다. 또한, 세포의 성장에서 중요한 작용을 하는 MAPKs의 인산화도 감소한 것을 확인할 수 있었다. MEK1/2의 인산화가 ERK1/2를 인산화 시키게 되고 세포성장을 이끌게 되는데, 인산화가 감소할 경우에는 더 이상 세포성장을 못하고 세포사멸 과정으로 이어져 결국 암세포의 성장은 억제되는 것이다.

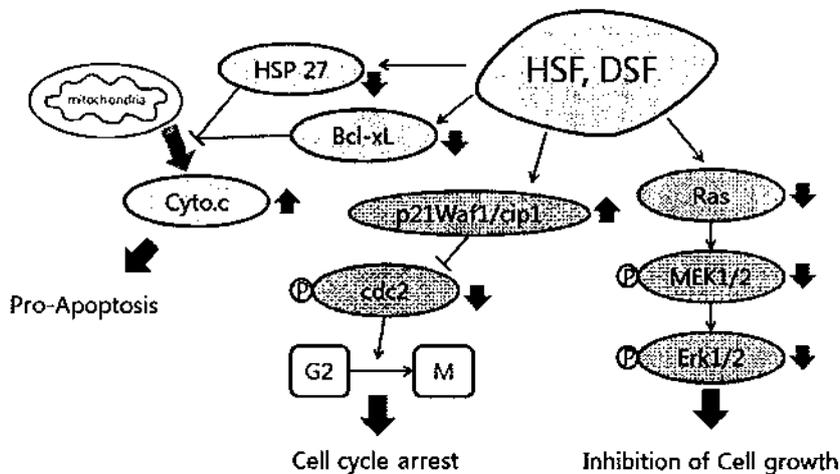


C: no treatment, 1: 모자반(*n*-hexane), 2: 모자반(dichloromethane), 3: 다시마 (*n*-hexane), 4: 다시마(dichloromethane), 5: 곰피(dichloromethane), HSF: 모자반 *n*-hexane fraction, DSF: 모자반 dichloromethane fraction

[그림 3-2-60] 세포 골격과 세포 성장 관련 단백질의 발현 양상

(사) 모자반 추출물 (*n*-hexane : HSF, dichloromethane : DSF)의 항암기작

앞서 언급되었던 다양한 단백질의 발현양 변화에 대한 western blot 분석 결과들을 토대로, 모자반 추출물들의 암세포 사멸 유도과정을 모식도로 정리 하였다(그림 3-2-61). 추출물의 항암 기작은 크게 pro-apoptosis, 세포주기 진행 억제, 세포성장 억제를 유도하는 단백질들의 발현양이나 인산화의 변화 때문에 일어나는 것이며, 이러한 결과들은 해조류 추출물이 항암제로 이용할 만한 미래 항암제 원료로서의 가치가 있음을 증명하는 것이다.

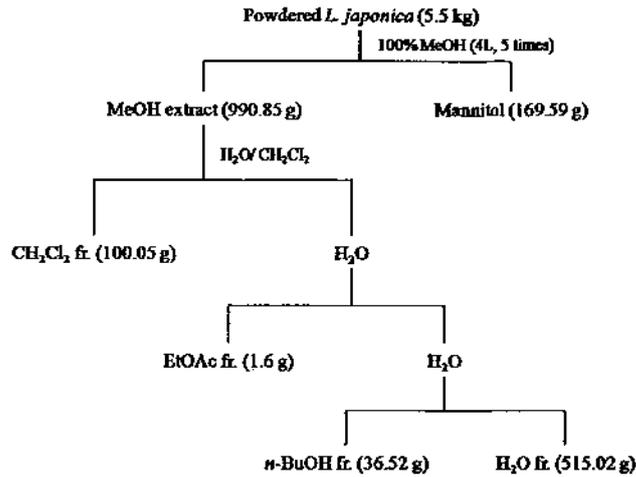


[그림 3-2-61] 모자반 획분의 예상 항암 기전

(6) 분리 획분의 당뇨합병증 치료효과

(가) 다시마 획분의 추출과 분획

건조분말상태의 다시마 5.5 kg을 매회 4 L의 MeOH로 5회 추출하여 990.85 g의 추출물을 얻었다. 이 MeOH extract를 물에 현탁한 후, CH₂Cl₂, EtOAc, BuOH의 순서로 분획하여 CH₂Cl₂ fraction(100.05 g), EtOAc fraction(1.6 g), BuOH fraction(36.52 g), water layer(515.02 g)을 얻었다(그림 3-2-62).



[그림 3-2-62] 다시마의 추출 및 분획 과정

(나) 분리획분의 당뇨합병증 치료효과

① 쥐 안구 aldose reductase(RLAR) 저해 활성 측정

당뇨병은 인슐린 분비량의 부족이나 체내의 인슐린 저항성에 의한 대사성 질환으로, 지속적인 고혈당 상태는 당뇨병성 망막증, 당뇨병성 신증, 당뇨병성 신경병증, 백내장등의 심각한 당뇨합병증을 유발하였다. 이들 당뇨합병증은 고혈당에 의한 polyol pathway의 이상, hexosamine pathway, AGE pathway, protein kinase C pathway, AGE receptor (RAGE) 의 과발현, 산화적 스트레스와 같은 몇몇의 기전을 통해 유발된다. 특히 AR-polyol pathway, AGE formation과 산화적 스트레스는 당뇨합병증 유발에 중심이 되는 기전으로 많은 연구자들이 aldose reductase inhibitors, AGE inhibitors와 같은 당뇨합병증의 예방과 치료에 효과적인 의약품 개발을 위하여 연구하고 있다.

본 연구에서 사용된 다시마(*L. japonica*)는 laminariaceae과에 속하는 갈조류로, 일본과 한국을 포함한 아시아에서 식품으로 오랫동안 섭취되어왔다. 최근 연구에 따르면, 다시마 중에 함유된 laminine은 혈압강화작용이 있는 것으로 밝혀졌으며 산성 다당류인 fucoidan은 항혈액응고 작용과 항암효과등 다양한 생리기능을 지니는 것으로 나타났다. 또한 항종양성, 항바이러스성, 항돌연변이성 및 면역증강등의 효과가 보고되고 있으며, free radical을 제거하는 능력을 가지고 있음을 실험적으로 증명하였다. 또한 최근에 다시마 추출물이 streptozotocin으로 당뇨병이 유도된 실험 쥐의 혈당강화와 항산화에 효과적이며, 산화스트레스로 인한 백내장에 대한 예방효과도 연구를 통해 밝혀졌다.

따라서 본 실험에서는 다시마를 대상으로 rat lens aldose reductase inhibitory activity assay와 AGE formation inhibition assay를 수행하여 다시마의 당뇨합병증 억제활성을 검색하고, 활성성분을 분리·정제하여 그 관계를 규명하고자 하였다. 당뇨합병증에 대한 다시마의 효과를 평가하기 위해, MeOH extract와 각 fractions의 aldose reductase 억제활성과 AGE formation 억제활성을 측정하였다. 표 3-2-3은 다시마의 AGE와 RLAR의 억제활성을 나타낸 것으로, RLAR assay에서는 오직 EtOAc fraction만이 95.16 mg/mL로 활성을 나타내었다. AGE assay에서는 EtOAc fraction이 150.32 mg/mL로 가장 높은 활성을 보였고, 다음으로 dichloromethane fraction이 167.65 mg/mL로 EtOAc fraction보다 조금 낮은 활성을 나타내었다. EtOAc fraction은 RLAR assay와 AGE assay 모두에서 가장 높은 활성을 나타내었으므로 당뇨합병증에 효과적으로 이용될 것으로 기대된다. 다시마 5.5 kg를 추출·분획 시 1.6 g의 EtOAc fraction을 얻을 수 있었으므로, 이 fraction에서 활성화합물을 분리하기 위해 50 kg 정도 더 추출하여 시도할 것이다.

② Advanced glycation End (AGE) formation inhibition assay

Dichloromethane fraction의 경우, AGE assay에서 EtOAc fraction보다는 다소 낮은 억제활성을 나타내지만 EtOAc fraction보다 수율이 높기 때문에 상대적으로 효과가 높을 것으로 예상된다. 따라서 현재 dichloromethane fraction을 chromatography를 통하여 활성화합물을 분리 중에 있다.

표 3-2-3. 다시마 획분에 의한 AGE 형성과 RLAR 저해 활성

Fractions	RLAR ^a			AGE ^b		
	IC ₅₀ (mg/mL)			IC ₅₀ (mg/mL)		
	Mean	±	SEM	Mean	±	SEM
MeOH	>100			1206.08	±	21.29
CH ₂ Cl ₂	>100			167.65	±	1.76
EtOAc	95.16	±	0.04	150.32	±	2.84
BuOH	>100			>1600		
Water	>100			>1600		
Aminoguanidine				86.77	±	0.62
Quercetin	0.53	±	0.01			

^a RLAR is the rat lens aldose reductase inhibitory activity (IC₅₀:mg/ml).

^b AGE is the advanced glycation endproducts activity (IC₅₀:mg/ml).

4. 요약 및 제언

우리나라의 대표적인 갈조류인 다시마, 모자반 및 감태의 생리활성에 관한 연구를 수행함으로써 기존의 연구에 의해 보고되지 않은 결과들이 밝혀져, 1건의 국내특허를 출원하였으며, 연구결과를 요약하면 다음과 같다.

가. 다시마

다시마의 알코올 획분을 유기용매로 분획하여 다양한 생리활성을 분석한 결과 항염증, 항비만, 항치매, 항당뇨합병증에 효과가 있는 것으로 나타났으며, 추가적인 연구로 이들을 이용한 건강기능성 식품 개발이 가능한 것으로 기대된다.

(1) 항염증 및 항치매 소재

다시마의 *n*-hexane과 dichloromethane 획분은 항염증과 항치매 효과가 우수하여, 앞으로 염증관련질환(위염, 대장염, 류마티스성 관절염 등)과 퇴행성 신경질환(알츠하이머성 치매, 파킨슨씨 질병)의 예방과 치료를 위한 식의약품의 소재로 활용될 가치가 높은 것으로 평가된다. 그러나 *n*-hexane 획분의 항염증 효과는 우수하나, 획분중에 세포독성을 일으키는 화합물이 공존하고 있으므로 이들 세포독성을 유발시키는 화합물을 효과적으로 제거됨으로써 건강기능성 식품 소재로 활용될 수 있으므로, 세포독성을 유발하는 화합물의 분리제거 공정개발과 항염증 활성성분의 분리 및 동정에 관한 추가적인 연구가 필요하다.

(2) 항비만 소재

다시마의 *n*-hexane과 dichloromethane 획분은 지방합성 저해능이 우수한 화합물으로써 이들 역시 세포독성을 일으키는 화합물의 분리제거 공정개발과 항비만 활성성분의 분리 및 동정에 관한 추가적인 연구가 필요하다.

(3) 당뇨합병증 예방 및 치료 소재

다시마의 ethylacetate 획분은 당뇨합병증 예방 및 치료효과가 우수한 획분으로 판명되어 이러한 효과를 나타내는 물질의 분리와 구조규명을 위하여 추가적인 연구가 필요하며, 분리화합물의 구조가 밝혀질 경우 의약품 선도물질로써의 가능성이 있는 것으로 판단된다.

나. 모자반

모자반의 항염증 활성은 다시마와 마찬가지로 *n*-hexane과 dichloromethane 획분에서 나타났으나, 다시마의 *n*-hexane 획분에 비해 모자반의 *n*-hexane 획분은 8배, 모자반의 dichloromethane 획분은 6배가량 낮은 것으로 나타났다. 그러나 다시마에 비해 세포독성은 4배가량 낮은 것으로 나타나 건강기능성 식품의 소재로써의 안정성은 높은 것으로 평가되었다. 특히 모자반의 항암활성은 다시마에 비해 훨씬 높은 것으로 나타나 항암활성 물질의 분리와 이들에 대한 추가적인 기능연구가 필요한 것으로 판단된다.

다. 곰피

곰피에는 다양한 생리활성 물질들이 존재하는 것으로 보고되고 있으며, 본 연구개발을 통하여 4종의 화합물을 분리하여 이들의 항산화, 항염증, 항암 기전을 규명하였다. 1차년도에서 분리된 화합물의 구조분석과 동정을 통하여 보다 다양한 생리활성 물질의 연구개발이 기대된다.

현재까지 국·내외적으로 다시마와 참모자반 등의 해조류 유래 생리활성물질에 대한 연구 보고는 미비한 실정이다. 본 연구 결과에서는 다시마와 참모자반, 곰피로부터 다양한 생리활성을 확인하였고 이들로부터 생리활성물질들을 분리하였으나, 구조결정을 위한 연구기간의 부족으로 인하여 논문투고와 특허출원이 미비하였다. 차년도부터는 새로 분리된 물질들의 구조를 분석하고 다양한 생리활성을 검토와 대량 분리 공정 확립을 위한 충분한 연구 기간과 실험 기기 및 시약 구입에 대한 경비의 지원이 이루어진다면 보다 많은 연구 보고와 국내·외 특허 출원 등이 가능할 것으로 기대된다. 또한 해조류 유래의 생리활성 물질들이 기능성 소재로 등록되어 있지 않으므로 이들 활성물질들이 건강기능성식품의 신기능성 소재로써 식품의약품안전청에 등록하기 위하여 물질의 생리활성, 안전성 등을 임상적으로 적용할 수 있는 의학자들과의 협동 연구 등 보다 다양한 연구 인프라가 필요하다고 생각된다.

제 3 절 해조류 화학적 전처리 및 당화

1. 연구 목적 및 내용

가. 연구목적

해양바이오매스의 하나인 다시마를 이용하여 alginate 등의 1차 분별물 추출 및 촉매별 전처리 시험을 수행하였으며, 이를 통하여 다시마를 이용한 화학적 및 생물학적 전처리 기술을 개발하고 전처리 공정 최적화를 위한 기초 데이터를 확보하고자 하였다.

나. 연구내용

본 연구에서는 열수처리 및 탈염처리를 통하여 다시마에 포함된 alginate 등의 1차 분별물을 추출하였다. 또한 1차 분별물이 추출된 다시마를 이용한 촉매별 전처리 시험을 진행, 전처리 후 다시마에 포함되어 있는 glucan 및 부산물의 수율을 조사하였으며, 이 중 전처리 효과가 높은 시료를 촉매별로 1, 2군 선정하여 효소가수분해도를 평가하였다.

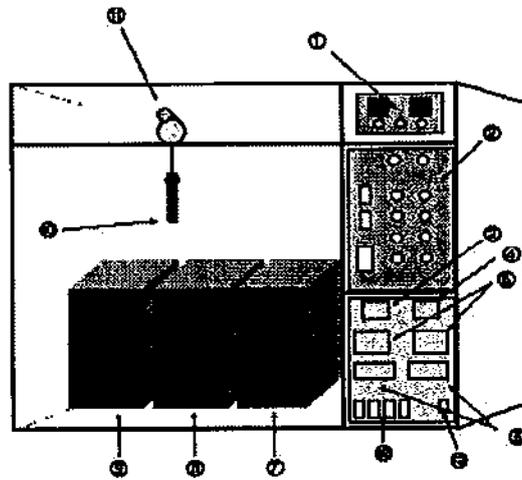
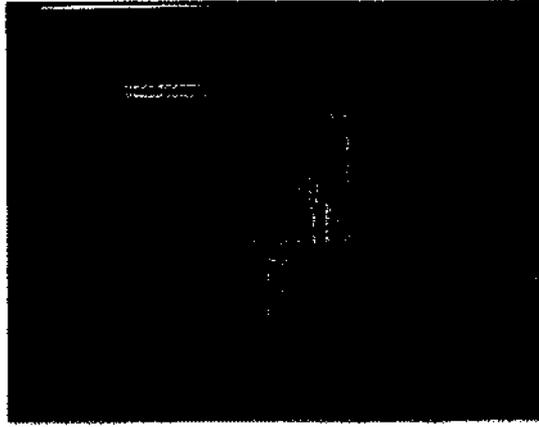
2. 연구 방법

가. 실험장치 및 재료

(1) 전처리 장치

그림 3-3-1은 바이오매스 회분식 전처리 장치 시스템을 나타낸 것이다. 전처리 장치 시스템은 반응기 (batch reactor)와 반응조 (reaction bath) 1, 2, 냉각조 (ice water bath) 및 컨트롤박스로 구성하였으며 각각의 구성요소에 대한 시스템은 아래와 같다.

- ① 반응기 (batch reactor): 용량 120 mL의 원통형으로 직경 2.5 cm, 두께 1.5 mm, 높이 36 cm로 제작하였으며, 반응기 내부의 온도를 측정하기 위해 온도계를 장착하였다.
- ② 반응조 (reaction bath): 가로, 세로, 높이가 각각 64 cm, 17 cm, 35 cm인 직육면체의 형태로 제작하였으며, 내부에 5 kW/h의 가열기를 장착하여 300 ℃까지 온도조절이 가능하도록 하였다.



[그림 3-3-1] Experimental apparatus of batch process ① timer and counter, ② operator's control box, ③ voltmerter, ④ ammeter, ⑤ digital thermo controller, ⑥ digital indicator, ⑦ bath (cooler), ⑧,⑨ bath (heater), ⑩ batch reactor, ⑪ electric motor, ⑫ power swith, ⑬ main switch

(a) 반응조 1: 반응열 전달 매개체로서 질산칼륨 (KNO_3)과 질산칼슘 ($\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$)의 용융염을 1:1 (w/w)로 혼합시킨 molten salt를 사용하였으며, 반응시키고자 하는 온도보다 약 100°C 높게 설정하여 반응기의 온도가 반응온도에 빨리 도달할 수 있도록 하였다.

(b) 반응조 2: 반응열 전달 매개체로서 실리콘 오일을 사용하였으며, 반응시키고자 하는 온도로 설정하여 반응조 1에서 해당온도에 도달 후 반응조 2로 옮겨진 반응기를 설정된 시간동안 해당온도에서 반응할 수 있도록 하였다.

- ③ 냉각조 (ice water bath): 반응조와 같은 규격으로 제작하였으며, 반응조 2에서 반응이 종료된 반응기를 냉각하기 위해 bath안에 얼음물을 넣어 사용하였다.
- ④ 컨트롤 박스: 반응시간을 조절하기 위한 타이머 및 반응기의 이동을 제어하는 운전기 조절 박스를 장착하였으며, 디지털 온도 조절기를 설치하여 반응조 1, 2의 온도확인 및 조절이 가능하도록 하였다.

(2) 실험재료

(가) 기질

본 실험에서는 완도군청으로부터 공급받은 파우더 형태의 다시마를 45 °C에서 24시간 동안 건조하여 기질로 사용하였으며, 부경대에서 공급받은 탈염처리된 다시마도 위와 같이 건조하여 전처리 기질로 사용하였다.

(나) 전처리 촉매

열수처리된 다시마 전처리 공정을 위해 0.1%~4.0%(w/v)의 H₂SO₄, HCl, NaOH, Na₂CO₃, NH₄OH 수용액을 사용하였고, 탈염처리된 다시마 전처리 공정에서는 15.0%(w/v) NH₄OH 및 1.0% (w/v) H₂SO₄ 수용액을 사용하였다.

(다) 효소

본 연구에 사용된 효소는 *T. reesei*의 배양액을 농축한 산업용 효소인 Celluclast(Novo Co., Denmark) 와 β-glucosidase를 강화한 효소인 Novozyme-188 (Novo Co., Denmark)을 한국에너지기술연구원(KIER ; Korea Institute of Energy Research)으로부터 공급받아 사용하였으며, 완충액은 pH 4.8의 citrate 버퍼(citric acid 4.83 g과 sodium citrate 7.94 g을 증류수 1 L에 용해하여 조제)를 사용하였다.

나. 실험절차

(1) 고체 분석 (탄수화물 분석)

본 실험에서 탄수화물 분석은 NREL/TP-510-42623에 따라 시행하였다. 준비된 다시마 샘플 0.3 g과 72.0% H₂SO₄ 3 mL를 20 mL test tube에 넣고 15~20분 간격으로 유리막대를 이용하여 저어주면서 30 °C 항온수조에서 2시간 동안 반응시켰다 (1차 가수분해). 반응이 끝난후 84 mL의 증류수를 가하여 산 농도를 4.0% 로 낮춘 후 autoclave(8000-DSE, Nap Co., Korea)를 이용, 121 °C에서 1시간 동안 반응사

켰다(2차 가수분해). 반응 중 분해되는 당의 양을 보정하기 위해 D-glucose, D-galactose, L-arabinose 등의 표준물질도 같은 조건에서 반응 시켰다. 반응 후 상온 까지 냉각시킨 시료를 탄산칼슘(CaCO_3)으로 중화하고 원심분리기(UNION 32R, Hanil Co., Korea)를 사용하여 8000 rpm에서 15분 동안 원심분리 후, 상등액을 여과하여 분석하였다.

(2) 전처리

(가) 다시마 열수처리

Steel 재질의 15 L 반응기에 시료 100 g과 증류수 900 mL을 넣고 90분 동안 반응을 진행하였으며(1차처리), 반응 종료 후 수분을 제거하고 동일한 조건으로 2차처리를 하였다. 2차처리가 완료된 시료는 잔여수분을 제거하여 동결건조기(FD-1000, EYELA Co., Japan)에서 48시간 동안 동결건조 한 후, 45 °C에서 12시간 동안 재건조하여 사용하였다.

(나) 촉매 전처리

그림 3-3-1에 기술된 실험장치를 이용하여 열수처리된 다시마와 농도별 H_2SO_4 , HCl, NaOH, Na_2CO_3 및 NH_4OH 촉매를 넣은 후, 설정반응조건으로 전처리 공정을 수행하였다(표 3-3-1).

탈염처리한 다시마는 같은 반응기를 이용하여 1:20의 고액비율에 맞추어 15.0% NH_4OH 및 1.0% H_2SO_4 촉매를 각각 넣고 설정된 온도(각각 165 °C, 130 °C)에서 20분 동안 반응을 진행하였다. 반응이 끝난 후의 전처리액과 잔류고체물은 따로 분리하여 전처리액의 경우, 중화 후 원심분리하여 상등액만을 채취한 다음 여과하여 분석하였으며, 잔류고체물의 경우에는 탄수화물분석을 진행하였다.

[표 3-3-1] *Laminaria japonica*의 열수 전처리 조건

Catalyst type	Catalyst conc. (wt%)	Temperature (°C)	Time (min)	S/L ratio
H_2SO_4	0.1	140	20	1:15
HCl	0.5	140	20	1:15
NaOH	1.0	140	20	1:15
Na_2CO_3	2.0	140	20	1:20
NH_4OH	4.0	140	20	1:20

(다) 효소당화

100 mL bottle에 각 촉매별로 전처리된 다시마 시료(glucan 함량이 0.5 g이 되도록 칭량함)와 citrate 완충용액을 넣어 총 부피가 50 mL가 되도록 한 후, Celluclast(Novo Co., Denmark) 0.468 mL(60 FPU, 탈염다시마 시험의 경우 30 FPU)와 Novozyme-188(Novo Co., Denmark) 0.156 mL를 넣어주었다. 효소가 넣어진 각 시료는 shaking incubator(VISION Co., Korea)를 이용하여 50 °C에서 180 rpm으로 48시간 동안 당화하였으며, 일정시간(0h, 1h, 3h, 6h, 9h, 12h, 24h, 48h)간격으로 샘플을 채취하여 10000 rpm에서 원심분리 후 상등액을 취하여 분석하였다.

(라) 당 및 과분해물 분석

전처리 시료 (전처리액 및 잔류고체물) 및 효소반응물의 단당 및 과분해물 분석은 RI 검출기가 장착된 HPLC(Breeze HPLC system, Waters Co., USA)를 사용하여 분석하였으며, 컬럼은 Aminex HPX-87H(300 X 7.8 mm, Bio-rad)를 사용하였다. 이동상은 5 mM 황산수용액을 사용하였고, 흐름 속도는 0.5 mL/min, 컬럼과 RI 검출기의 온도는 65 °C, 50 °C로 각각 설정하였다.

3. 연구수행결과

가. 열수처리 다시마

(1) 열수처리

다시마의 주된 구성성분인 alginate로부터 파생된 D-mannuronate와 L-guluronate 등의 구조성 다당류들은 그 구성 비율에 따라 겔을 형성하는 특성을 가지고 있어, 이들의 추출 또는 제거공정을 거치지 않은 다시마를 효소가수분해도 평가를 위한 전처리 공정에 적용하기에는 어려움이 따른다. 본 연구에서는 파우더 형태의 다시마로부터 alginate 및 alginate로부터 파생된 D-mannuronate와 L-guluronate를 추출하기 위해 다시마 시료와 물을 적절히 혼합(S/L ratio 약 10%) 하여 고압멸균기를 이용, 121 °C에서 3시간(1, 2차) 동안 열수처리하는 방법을 이용하였다.

표 3-3-2는 다시마의 열수처리 전, 후의 탄수화물 성분 분석결과를 나타낸 것이다. Alginate로부터 파생된 D-mannuronate 또는 L-guluronate로 추정되어지는 물질의 경우에는 표준물질을 이용한 정량이 이루어지지 않아 열수처리 전, 후의 HPLC크로마토그램 피크 높이 값을 비교하여 추출 정도를 확인하였다. 표 3-3-2에서

알 수 있듯이, alginate 추정물질의 경우에는 열수처리 후에 약 57.9%(피크높이 값으로 비교)가 제거되어진 것을 알 수 있었으며, 열수처리 후의 glucan 함량은 원시료(열수처리 전)와 비교하여 약 2.2배 증가(열수처리 전: 6.5%, 열수처리 후: 14.0%) 했음을 확인할 수 있었다. 열수처리 방법을 이용하였을 때 alginate가 부분적으로 추출되어지고 이로 인하여 다시마에 포함되어 있는 주 다당(glucan)의 함량이 증가하였으나, alginate를 완전히 추출, 제거하기 위한 방법 모색은 추가적으로 이루어져야 할 부분이다.

[표 3-3-2] 열수처리된 *Laminaria japonica*의 탄수화물 조성

	Glucan yield (%)	Galactan yield (%)	Alginate 추정피크 (height)
Untreated	6.47	1.74	4438
Hot water treated	13.97	1.20	1870

(2) 촉매별 전처리

해양바이오매스인 해조류는 목질계 바이오매스와는 다른 구조적 특성을 지니며, 목질계 바이오매스에 비해 헤미셀룰로오스 및 리그닌의 함량이 비교적 적으므로 목질계 바이오매스와는 차별화된 전처리 조건을 확립해야 한다. 본 연구에서는 다시마의 전처리 조건 확립을 위한 반응 변수 최적화를 위해 전처리 촉매 선별 시험을 진행하였으며 전처리 촉매로는 산(H_2SO_4 , 점건D) 및 알칼리(NaOH점, Na_2CO_3 , NH_4O 점) 수용액을 이용하였다.

(가) 전처리액 분석

표 3-3-3은 열수처리 다시마 파우더를 H_2SO_4 수용액 외 4가지의 촉매를 농도별로 이용하여 140 °C에서 20분 동안 반응시킨 후의 반응액을 분석한 결과이다. H_2SO_4 촉매를 이용한 경우 촉매의 농도가 높아질수록 alginate로 추정되어지는 물질의 추출량과 glucan의 함량이 급격히 증가(4% 황산촉매를 이용한 경우 alginate 피크 높이 23583, glucan 함량 57.9%)하였으며, HCl을 촉매로 이용한 경우에도 동일한 경향이 관찰되었다. NaOH 수용액을 촉매로 이용하였을 때의 glucan 함량은 촉매농도에 따라 증가하였으나 산촉매를 이용한 경우보다는 수율 증가 폭이 적었으며, 0.5% 이상의 농도에서 alginate 추정물질의 추출정도가 크게 증가하였다.

Na₂CO₃와 NH₄OH를 촉매로 사용한 경우에는 glucan이 검출되어지지 않았으며 NH₄OH의 경우에는 0.5% 이상의 농도에서 alginate 추출량이 급격히 증가함을 확인할 수 있었다. 촉매별, 농도별 전처리액에서 과분해물의 하나인 acetic acid와 5-HMF는 모두 검출되어지지 않았으며 fructose는 0.1~1.7%, formic acid는 NaOH 촉매를 이용한 경우(4.5~5.8%)를 제외하고는 1.0% 미만이 검출되어 다시마의 전처리가 비교적 온화한 조건에서 이루어졌음을 알 수 있었다.

(나) 잔류고체물 분석

표 3-3-4는 열수처리 다시마 파우더를 H₂SO₄ 수용액 외 4 가지의 촉매를 농도별로 이용하여 140℃에서 20분 동안 반응시킨 후의 잔류고체물을 고체분석(탄수화물분석)한 결과이다. 사용촉매의 농도가 높아질수록 잔류고체물에 포함되어 있는 glucan 함량은 증가하였으며 NaOH 촉매를 사용한 경우에는 최대 83.9%(4.0% NaOH)까지 증가하는 것을 확인할 수 있었다. 잔류고체물의 탄수화물 분석결과만을 고려할 경우에는 4.0% NaOH가 다시마 전처리를 위해 이용되어질 수 있는 가장 적절한 촉매로 판단되어지나, 이 경우에는 전처리액의 glucan 함량 또한 높았으므로 잔류고체물의 glucan 함량이 높은 이유를 전처리 시에 시료의 alginate 및 기타 구성물질이 추출되어지면서 glucan의 함량이 상대적으로 증가하였기 때문으로 설명할 수 있다. 이러한 결과들을 모두 고려하여, 전처리 후 잔류고체물의 glucan 함량이 높고 전처리액의 glucan 함량은 낮은(이때 alginate는 최대로 추출되어져야 함) 것을 각 촉매 중에서 1~2군 선별(H₂SO₄ 0.5%, HCl 0.5, 2.0%, NaOH 1.0, 4.0%, Na₂CO₃ 및 NH₄OH 4.0%), 효소당화를 위한 전처리 시료로 이용하였다.

(3) 효소당화

촉매별 전처리 시험을 통하여 선별된 다시마 전처리 시료를 기질로 이용, 효소에 의한 당화실험을 수행하였다. 그림 3-3-2는 전처리된 다시마 시료들의 효소 소화도 (Enzymatic Digestibility, ED)를 나타낸 그래프이다. 대조군 시료로서는 알파 셀룰로오스를 이용하였으며 각 촉매별 전처리 다시마의 glucan 함량은 0.5 g으로 고정하였다. 그림 3-3-2에서 알 수 있듯이, 각 촉매별 전처리 다시마 시료는 모두 초기 3시간 이내에 당화가 이루어져 0.5% H₂SO₄ 촉매 전처리 샘플은 99.1%, 1.0% NaOH 촉매 전처리 샘플은 96.0%의 효소 소화도를 나타내었으며, 그 외의 전처리 샘플은 79.0~89.4%의 효소 소화도를 나타내었다. 대조군인 알파셀룰로오스의 최대 당화수율이 당화 48시간 후 81.8%임을 감안하면 각 촉매별 전처리 샘플 모두 빠른 시간 안에 효율적인 당화가 이루어진 것으로 판단되어지지만, 촉매의 종류에 따른

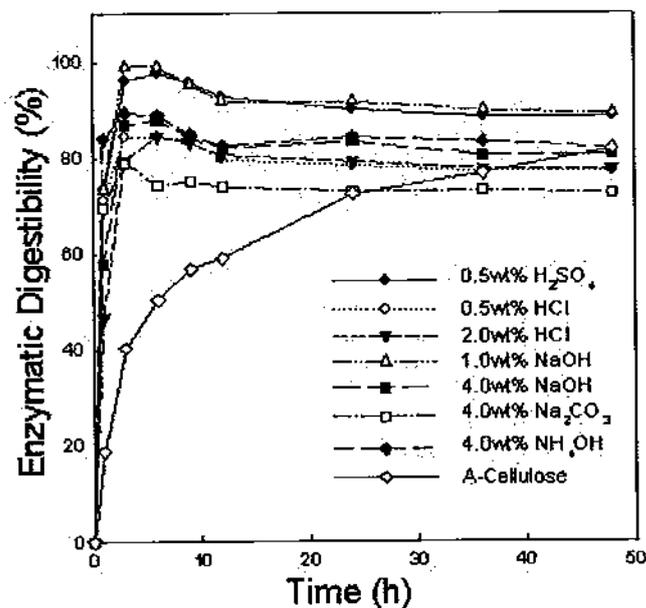
전처리 효과는 사용한 촉매의 화학적 강도가 상이하므로 CSF(combine severity factor) 등의 시험기준을 통한 비교 분석이 추가적으로 요구되어진다.

[표 3-3-3] 열수처리 *Laminaria japonica*의 다양한 촉매 및 농도 하에서 얻어진 생성물 수율(상등액 분석)

Catalyst conc. (%)	Alginate 추 정피크 (height)	Glucan yield (%)	Decomposition products yield (%)				
			Fructose	Formic acid	Acetic acid	5-HMF	
H ₂ SO ₄	0.1	8674	2.07	-	-	-	-
	0.5	14815	8.51	-	-	-	-
	1.0	21874	17.67	0.11	0.43	-	-
	2.0	20163	26.39	-	0.63	-	-
	4.0	23583	57.92	-	0.86	-	-
HCl	0.1	5542	1.49	-	-	-	-
	0.5	22367	17.06	-	0.36	-	-
	1.0	20850	40.78	-	0.93	-	-
	2.0	20935	23.69	-	0.64	-	-
	4.0	20186	53.47	-	0.60	-	-
NaOH	0.1	1489	-	-	-	-	-
	0.5	10815	4.66	0.41	4.56	-	-
	1.0	8206	9.04	0.96	5.77	-	-
	2.0	8154	47.47	1.55	6.31	-	-
	4.0	8448	21.16	1.72	5.80	-	-
Na ₂ CO ₃	0.1	1084	-	-	-	-	-
	0.5	961	-	-	-	-	-
	1.0	4408	-	-	-	-	-
	2.0	4353	-	-	0.88	-	-
	4.0	6059	0.87	-	1.97	-	-
NH ₄ OH	0.1	3269	-	-	-	-	-
	0.5	27145	-	-	0.16	-	-
	1.0	10754	-	-	-	-	-
	2.0	21295	-	-	-	-	-
	4.0	13449	-	-	-	-	-

[표 3-3-4] 열수처리 *Laminaria japonica*의 다양한 촉매 및 농도 하에서 얻어진 생성물 수율(잔류고체물 분석)

Catalyst conc. (%)	H ₂ SO ₄	HCl	NaOH	Na ₂ CO ₃	NH ₄ OH
0.1	32.93	30.37	28.39	24.83	22.28
0.5	36.32	37.71	47.45	25.55	25.90
1.0	38.77	44.29	59.05	38.42	27.06
2.0	36.57	39.47	72.11	43.38	29.81
4.0	44.88	46.79	83.90	53.97	31.84



[그림 3-3-2] 다양한 촉매 및 농도 하에서 열수처리 *Laminaria japonica*의 효소 소화도

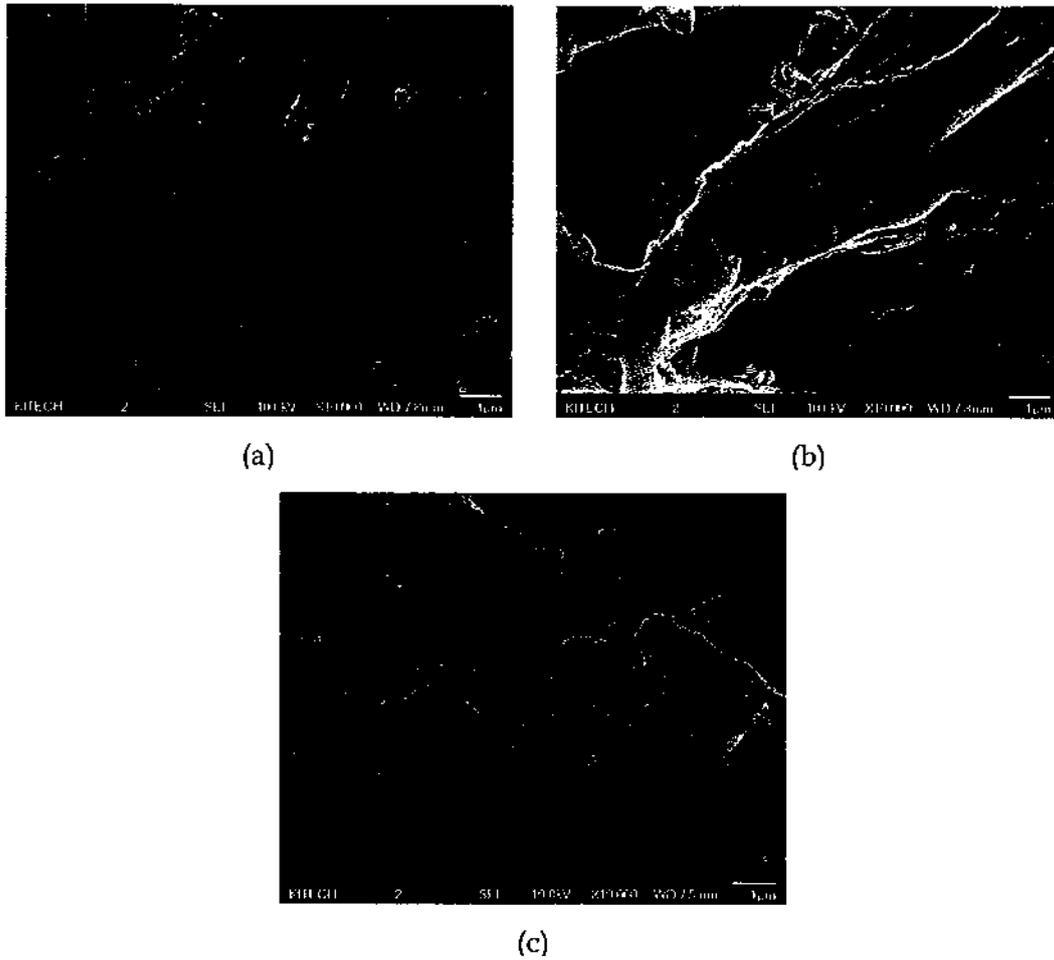
(4) 이미지 분석

(가) SEM 분석

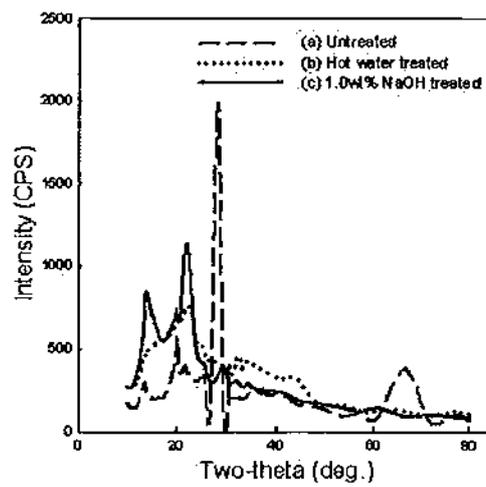
구조적 측면에서 촉매를 이용한 다시마 전처리 효과를 확인하기 위해 FE-SEM(JMS-670F, Jeol Co., Japan)을 이용하여 다시마 시료 표면을 관찰하였다. 그림 3-3-3은 미처리된 다시마 및 열수처리된 다시마, 1.0% NaOH를 이용하여 전처리한 다시마 파우더를 FE-SEM으로 관찰한 결과를 나타낸 것이다. 처리하지 않은 시료(a)와 열수처리한 시료(b)를 비교하여 본 결과, 열수처리한 시료(b)에서는 시료 표면에서 porous한 표면이 관찰되었는데, 이는 열수처리가 진행되어지는 동안 다시마의 세포벽을 이루는 alginate가 추출되면서 다시마 세포벽 부분의 물리적 파괴가 일어났기 때문으로 사료된다. 또한 1.0% NaOH 촉매 전처리 시료(c)의 경우, 처리되지 않은 원 시료(a)와 열수처리한 시료(b)에 비해 많이 부서져 있는 표면 형태를 보였는데 이는 전처리가 진행되어지는 동안 다시마 표면의 결정성이 감소되어 구조적 분해가 일어났기 때문으로 판단된다.

(나) XRD 분석

그림 3-3-4는 XRD(MAX-2500V, Rigaku Co., Japan)를 이용하여 미처리된 다시마 및 열수처리된 다시마, 1.0% NaOH를 이용하여 전처리한 다시마 파우더의 intensity 값(측정범위: 18.7°~22.5°)을 측정한 결과를 나타낸 것이다. 그림3-3-4에서 알 수 있듯이, 1.0% NaOH 촉매 전처리 시료에서 43.78으로 가장 높은 CrI (Crystallinity Index) 값이 관찰되었으며, 열수처리 시료의 경우에는 25.03, 미처리시료의 경우 4.20을 각각 나타내었다. 1.0% NaOH 촉매 전처리 시료에서 CrI 값이 가장 높게 나타난 이유는 열수처리 후 세포 표면으로부터 alginate가 제거되어져 셀룰로오스 표면이 부분적으로 노출되어 있는 상태에서 전처리공정을 통한 셀룰로오스 표면의 노출 정도가 더욱 증가하였기 때문으로 사료되며 이에 따라 pure 셀룰로오스의 양이 증가하였기 때문으로 판단된다.



[그림 3-3-3] *Laminaria japonica*의 SEM 이미지
 (a) 원 시료, (b) 열수처리 시료, (c) 1.0% NaOH 처리 시료



[그림 3-3-4] *Laminaria japonica*의 XRD 분석결과
 (a) 원 시료, (b) 열수처리 시료, (c) 1.0% NaOH 처리 시료

나. 탈염처리 다시마

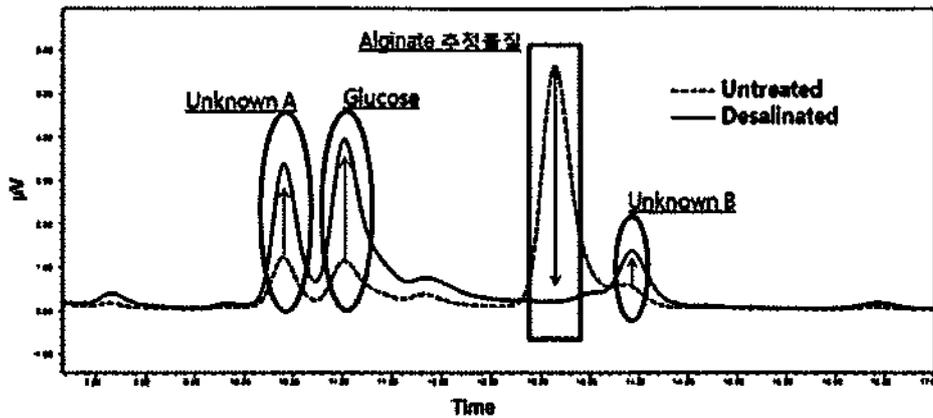
다시마는 보통 정제수 침지나 초음파 처리, 한외여과 등을 통한 탈염공정을 거친 후 가공식품 등으로 이용되어지는데 탈염공정을 거칠 경우, alginate를 포함한 30만~500만 정도의 분자량을 가진 물질들이 다시마로부터 추출되어지게 된다. 본 연구에서는 이러한 점을 반영하여 부경대학교로부터 탈염처리공정을 거친 다시마 파우더를 공급받아 전처리 및 효소당화를 수행하였으며, 이를 통한 탈염처리 다시마 시료의 효소가수분해 평가를 위한 기초적 자료를 확보하고자 하였다.

(1) 고체 (탄수화물) 분석

표 3-3-5는 처리되지 않은 원 상태(탈염처리 전)의 다시마와 탈염처리된 다시마의 고체분석(탄수화물분석) 결과를 나타낸 것이며, 그림 3-3-5는 고체분석 시 검출된 피크를 나타낸 크로마토그램이다. 표 3-3-5 및 그림 3-3-5에서 알 수 있듯이, 처리되지 않은 원 상태의 다시마에서는 alginate 추정물질이 검출되었으나 탈염처리된 다시마에서는 검출되어지지 않았으며 glucan 및 기타 구성물질의 경우에는 원 상태(탈염처리 전)의 다시마보다 탈염처리후의 다시마에서 높은 함량을 나타내었다 (glucan 함량의 경우 탈염처리 전(6.5%)보다 탈염처리 후(14.7%) 약 2.3배 증가함). 이는 탈염공정을 거친 다시마의 경우 alginate가 다량 추출되어져 상대적으로 glucan 및 기타 구성물질의 함량이 증가하였기 때문이며, alginate를 제외한 다른 물질들의 추출은 이루어지지 않았기 때문으로 사료된다(HPLC 분석결과로만 판단할 경우 추측한 결과임).

[표 3-3-5] 탈염처리 *Laminaria japonica*의 탄수화물 분석결과

	Glucan yield (%)	Galactan yield (%)	Alginic acid 추정 피크 (height)
Untreated	6.47	1.74	4438
Desalinated	14.65	-	-



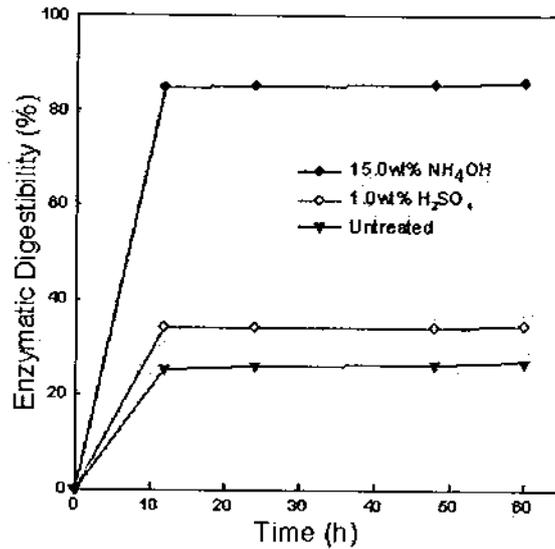
[그림 3-3-5] 탈염처리 *Laminaria japonica*의 LC 크로마토그램

(2) 전처리 및 효소당화

탈염처리된 다시마는 대표적인 산 및 알칼리 전처리 용매인 H_2SO_4 , NH_4OH 촉매를 사용하여 전처리하였으며, 각각의 전처리 조건은 표 3-3-6에 나타내었다. 전처리 후 잔류고체물은 세척 후 동결건조하여 효소적 당화에 이용하였으며, 반응이 이루어지는 동안 일정시간(0, 12, 24, 36, 48, 60 h)간격으로 샘플을 채취, 분석하여 효소당화도를 평가하였다. 그림 3-3-6은 탈염처리된 다시마를 H_2SO_4 , NH_4OH 촉매로 전처리한 후 효소당화한 결과를 나타낸 그래프이다. 미처리된 다시마 및 H_2SO_4 , NH_4OH 촉매로 전처리한 다시마 모두 당화 12시간 후에는 더 이상 반응이 일어나지 않았으며(12시간 이내에 반응이 종료된 것으로 판단됨), NH_4OH 촉매 전처리 시료의 경우에는 85.8%, H_2SO_4 촉매 전처리 시료의 경우에는 34.4%의 최대 당화수율이 관찰되어 H_2SO_4 촉매를 이용한 경우보다는 NH_4OH 촉매를 이용한 전처리가 탈염처리된 다시마의 효소당화를 위한 효율적 전처리방법임을 확인할 수 있었다. 그러나 본 실험은, 탈염처리 다시마의 효소당화 가능성을 검토하는 기초적 데이터를 확보하기 위한 것이므로 본 실험결과만으로 탈염처리 다시마의 효소당화 최적화를 위한 전처리 조건을 결정하기는 어려우며, 이를 토대로 한 세부화되고 구체화된 전처리 실험이 추가적으로 이루어져야 할 것이다.

[표 3-3-6] 탈염처리 *Laminaria japonica*의 전처리 조건

Catalyst type	Catalyst conc. (wt%)	Temperature (°C)	Time (min)	S/L ratio
H_2SO_4	1.0	130	30	1:20
NH_4OH	15.0	165	10	1:20



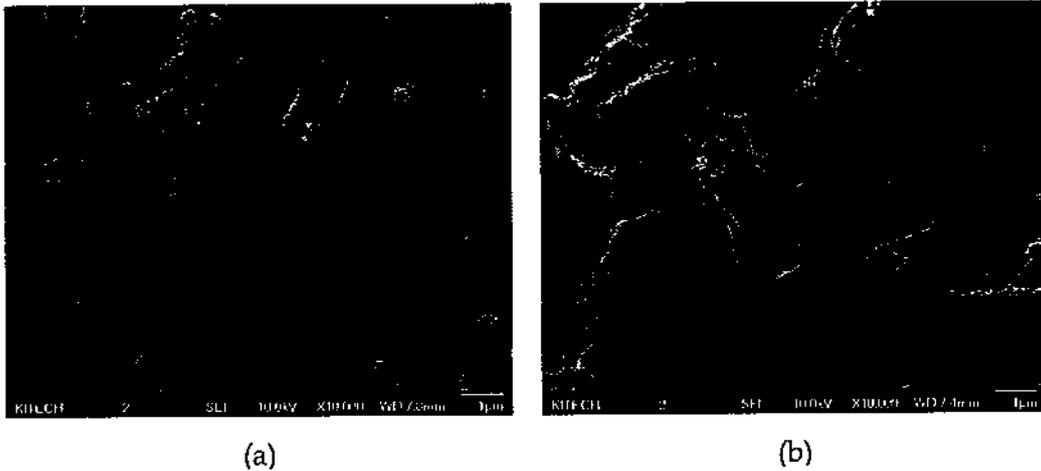
[그림 3-3-6] 탈염처리된 *Laminaria japonica*의 효소 소화도

(3) 이미지 분석

(가) SEM 분석

그림 3-3-7은 미처리된 다시마와 탈염처리 후 다시마를 FE-SEM으로 관찰한 결과를 나타낸 것이다. 탈염처리 후의 다시마 시료는 열수처리 후의 다시마 시료와 유사한 표면형태를 나타내었으나, 열수처리 후의 다시마에 비해 porous한 표면이 더 많이 관찰되었으며 이는 열수처리공정보다는 탈염처리 공정에서 alginate의 제거가 더 효율적으로 이루어졌기 때문으로 판단된다.

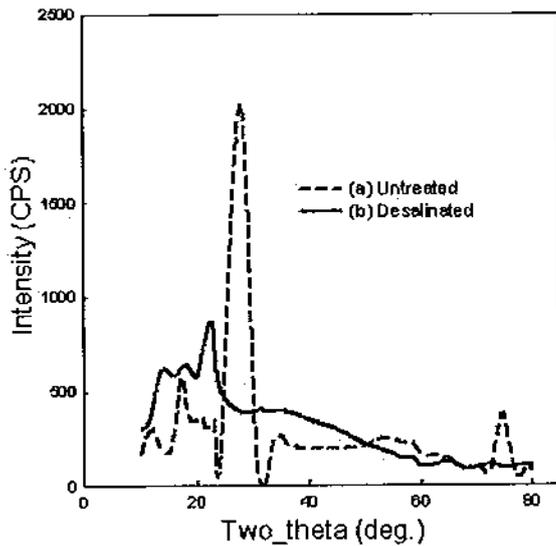
시료의 고체분석(탄수화물) 및 SEM 분석을 통하여 탈염처리가 열수처리에 비해 alginate를 제거하는 효율적 공정임을 확인하였으나, 전처리 효율 및 효소당화도를 향상시키기 위한 다시마 예비전처리 방법은 추가적 모색이 필요할 것으로 사료된다.



[그림 3-3-7] *Laminaria japonica*의 SEM 이미지 (a) 원 시료, (b) 탈염처리 시료

(나) XRD 분석

그림 3-3-8은 XRD(MAX-2500V, Rigaku Co., Japan)를 이용하여 미처리된 다시마와 탈염처리 후 다시마 파우더의 intensity 값(측정범위: 18.7°~22.5°)을 측정한 결과를 나타낸 것이다. 탈염처리 후 다시마 시료에서의 CrI(Crystallinity Index)는 열수처리 시료와 유사한 값을 나타내었으며(열수처리 시료의 CrI: 25.03, 탈염처리 시료의 CrI: 21.3), 미처리 다시마 시료보다 약 5.1배 높은 값을 나타내었다(미처리 시료의 CrI: 4.2). 열수처리 시료와 탈염처리 시료의 CrI값이 유사한 것은 각 처리에 따른 차이는 있지만 두 공정 모두에서 alginate의 추출이 일어나 이에 따른 pure한 섬유소의 양이 증가하였기 때문으로 판단된다.



[그림 3-3-8] *Laminaria japonica*의 XRD 분석결과 (a) 원 시료, (b) 탈염처리 시료

4. 요약 및 제언

해양 바이오매스의 하나인 다시마를 열수처리 및 탈염처리하여 촉매에 따른 전처리 효과 및 가수분해도를 평가하였다. 연구결과는 아래와 같이 요약할 수 있으며, 본 연구결과를 활용한 1) alginate 물질의 효율적 추출 방법 모색, 2) NaOH 등의 알칼리 촉매를 이용한 전처리 공정 최적화, 3) 최적화된 전처리 시료를 이용한 효소당화 수율 최적화 연구가 향후 진행될 예정이다.

가. 열수처리 다시마

- (1) 열수처리 후에는 처리전과 비교하여 약 60%의 alginate 추정물질이 추출되었다.
- (2) H₂SO₄ 등의 산촉매와 NaOH 등의 알칼리촉매(총 5종)를 이용하여 촉매의 종류 및 농도에 따른 전처리시험을 진행한 결과, NaOH 등의 알칼리 촉매를 사용하였을 때 전처리효과가 높은 것으로 나타났다.
- (3) (나)에서 진행하였던 전처리 시험군 중 전처리 촉매별로 1~2군을 선별하여 효소가수분해도를 평가한 결과, 1.0% NaOH 촉매를 이용한 전처리 시료에서 가장 높은 효소가수분해도(99.1%)를 나타내었다.
- (4) 열수처리 다시마 및 전처리 다시마(1.0% NaOH 처리) 시료의 SEM 분석 결과, 열수처리 다시마 시료 표면에서는 alginate가 추출되어진 것을 확인할 수 있었으며 전처리 다시마 시료 표면에서는 셀룰로오스의 노출정도가 증가하여 pure 한 셀룰로오스의 양이 증가하였음을 확인할 수 있었다. 또 XRD 분석결과에서는 미처리시료와 비교하여 열수처리시료는 약 5배, 전처리시료는 약 10배 이상 결정화도가 증가했음을 알 수 있었다(미처리 시료 CrI: 4.20, 열수처리 시료 CrI: 25.03, 전처리시료 CrI: 43.78)

나. 탈염처리 다시마

- (1) 탈염처리 후에는 alginate 추정물질이 모두 추출되었다.
- (2) H₂SO₄ 촉매와 ammonia 촉매를 이용하여 전처리 후 효소당화한 결과, H₂SO₄을 사용하였을 경우보다 ammonia를 이용하였을 때 전처리 효과가 높은 것으로 나타났다(H₂SO₄촉매 전처리 시료의 효소당화율: 34.4%, ammonia촉매 전처리 시료의 효소당화율: 85.8%).
- (3) 탈염처리 다시마 시료를 SEM으로 분석한 결과, 다시마 시료 표면에서 alginate가 추출되어진 것을 확인할 수 있었으며 XRD 분석결과에서는 열수처리 시료와 비슷한 결정화도(탈염처리 시료 CrI: 21.3)를 나타내었다.

제 4 절 해조류 생물학적 당화

1. 연구 목적 및 내용

가. 연구 목적

해조류 분해 미생물을 선정하고 선정 미생물의 갈조류 분해 산물의 대사체 및 해조류 분해효소를 프로파일링한다.

나. 연구 내용

타겟원료로 선정된 해조류 성분 분석 결과를 바탕으로 주요 성분을 배지로 만들어 문헌에서 보고된 갈조류 분해 미생물 중 분해력이 우수한 종을 선정하였다. 갈조류를 주로 구성하고 있는 탄수화물을 탄소원으로 하여 미생물에 배양하였을 때 생성되는 세포내 대사체를 scanning mode에서 대사물 대량 분석 및 동정이 가능한 LECO GC-TOF-MS를 이용하여 fragmentation pattern을 구하고 이를 Setup-X 및 BinBase 데이터 처리를 통하여 GC-MS library를 이용하여 대사물을 동정하고 확인하였다. 분석되고 동정된 대사체를 주성분 분석을 이용하여 생장기, 갈조류 구성성분 및 다른 탄소원을 주입하였을 때 탄소원에 따른 대사체 프로파일링을 통하여 분해 대사 경로를 추측하고 분석하였다. 대사체 분석 조건에서와 같이 다양한 탄소원 하에서 생장한 선정 미생물로부터 얻은 세포내 조효소액을 갈조류 탄수화물을 반응 기질로 적용하여 분해효소의 활성 및 반응산물을 TLC를 이용하여 프로파일링 하였다.

2. 연구 방법

가. 실험장치 및 재료

(1) 사용 균주

Saccharophagus degradans 2-40(ATCC 43961)을 사용하였다.

(2) 배지 조성 및 배양조건

*S. degradans*는 최소 배양 배지에서 shaking incubator를 이용하여 27 °C, 200 rpm에서 배양하였다. 최소 배양 배지 조성은 표 3-4-1과 표 3-4-2와 같다.

[표 3-4-1] 최소 배양 배지 조성

Instant ocean sea salts	23 g
Yeast extract	1.0 g
Tris HCl buffer (pH 7.4)	50 mM
Ammonium chloride	0.05% (w/v)
Carbon source	0.2% (w/v)

[표 3-4-2] 탄소원

Glucose	20% (w/v) stock solution autoclaved separately
Xylose	1/100 X dilution (i.e., 25 ml of broth + 0.25 ml of stock solution)
Cellulose	Right before Autoclave (0.2% w/v, i.e., 0.05 g in 25 ml of broth)
Xylan	

(3) GC-TOF/MS 및 column

Gas chromatography는 Agilnet 6890 GC(Hewlett-Packard, Atlanta, GA)를 이용하였다. Mass는 Pegasus III time of flight(TOF) mass spectrometer (Leco, ST. Joseph, MI)를 GC와 연결하여 사용하였다. Rtx-5Sil MS(30 m, 0.25mm I.D., 0.25 μ m film thickness, 10 m intergrated guard column)의 column을 사용하였다.

(4) 통계프로그램

주성분 분석 및 스튜던트 t-검정법을 위해 Statistica software(version 7.1, StatSoft, Tulsa, OK)를 이용하였다.

나. 실험 절차

(1) 미생물 성장 속도 및 효소 활성측정

균을 배양한 배양액의 흡광도를 측정하고, 건조 균체량으로 환산한다. cellulose 배지에서의 배양과 같이 흡광도를 측정할 수 없는 경우에, 세포 내의 단백질량을 측정함으로써 건조 균체량을 환산한다. 배양한 균주를 2.3%(w/v) 생리 식염수로 washing 하여 steel ball을 이용하여 milling으로 세포벽을 파쇄함. 파쇄된 세포 추출액을 4 °C, 16,100 rcf에서 5분간 원심 분리하여 상등액을 회수하고 이를 조

효소액으로 사용한다. Cellulase의 활성은 0.05 M sodium phosphate buffer (pH 7.0)에서 1%(w/v)의 cellulose를 기질로 하여 30 °C에서 6시간 동안 반응시킨다. Xylanase의 활성은 0.05 M sodium phosphate buffer에서 1%(w/v)의 xylan을 기질로 하여 37 °C에서 20분간 반응시킨다. 효소 반응액은 3,5-dinitrosalicylic acid (DNS)법을 이용하여 540 nm에서 환원당 정량한다. Cellulase와 xylanase의 활성은 위의 조건에서 각각 1분 동안 1 μmol의 glucose와 xylose를 유리시키는 효소의 양을 1 unit로 하여 측정한다.

(2) 대사체 추출 및 GC-TOF-MS 이용 미생물 대사체 분석

세포 내 대사 활성을 급속히 정지시키기 위해, 1 ml의 배양액을 -80°C의 70%(v/v) 메탄올에 분주하여 16,100 rcf, 4 °C에서 5분간 원심 분리 한 후 상등액을 버리고 pellet을 모아 2.3%(w/v) NaCl로 2회 세척 후 약 6시간 동안 진공건조 시킨다. 건조된 pellet에 steel ball을 넣고 ball mill(Retsch, Haan, Germany)을 이용하여 세포를 파쇄 후 각각 methanol:isopropanol:water(5:2:2), 혼합물을 분주 후 대사체를 추출한다. 추출된 대사체는 다시 acetonitrile:water(1:1)의 혼합물을 분주하여 재추출한 후 진공건조 시킨 후 GC-TOF-MS 분석을 위한 유도체화 과정을 거차기 전까지 -80°C에 보관한다. 추출된 대사체는 pyridine에 40 mg/ml로 용해시킨 methoxyamine hydrochloride를 5 μl 분주하여 30 °C에서 90분 동안 반응시킨 후, 45 μl의 MSTFA(N-methyl-N-trimethylsilyltrifluoroacetamide)를 첨가해 37 °C에서 30분간 반응시켜 유도체화 시킨다. 그 후 Internal retention index marker인, 지방산 메틸 에스테르 혼합물을 넣고 GC-TOF/MS(Agilent 6890 GC, Pegasus III time of flight)로 분석한다. GC-TOF/MS의 분석조건은 아래 표 3-4-3과 같다.

[표 3-4-3] GC-TOF/MS 분석 조건

Column	Rtx-5Sil MS (30 m, 0.25 mm I.D., 0.25 μm film thickness, 10 m integrated guard column)
Injection temp.	50°C (1 min) → ramping (20 °C/min) → 330°C (5 min)
Acquisition rate	10 spectra/sec
Ionization mode	Electron impact at 70 eV
Ion source temp.	250 °C

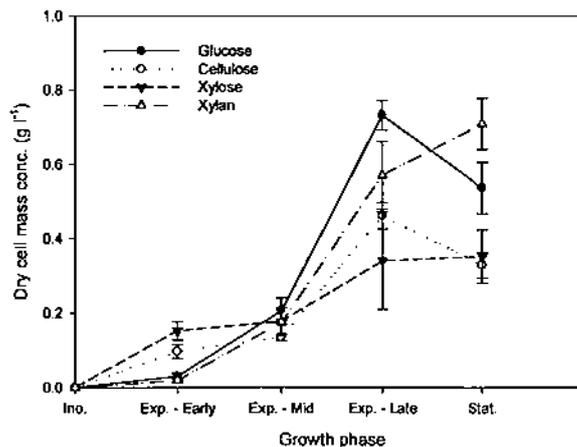
(3) 통계적 분석을 기반으로 한 대사체 프로파일링

85~500 m/z 범위의 스펙트럼을 Leco Chroma TOF software를 이용하여 피크 검출과 deconvolution을 수행한다. 프로세싱된 데이터는 BinBase database를 이용하여 library에 있는 compound의 질량 스펙트럼과 retention index를 비교함으로써 대사체를 확인 및 동정하였으며, 각각의 대사체의 intensity는 샘플의 건조 균체량으로 표준화한다. 표준화한 결과는 Statistica software(version 7.1, StatSoft, Tulsa, OK)를 이용하여 다변량 통계 분석 중 하나인 주성분 분석 (Principal components analysis)과 스튜던트 t-검정법을 통해 각각 비교군에서 차이가 나는 대사 물질을 분석한다.

3. 연구수행 결과

(1) *S. degradans*의 성장속도 측정

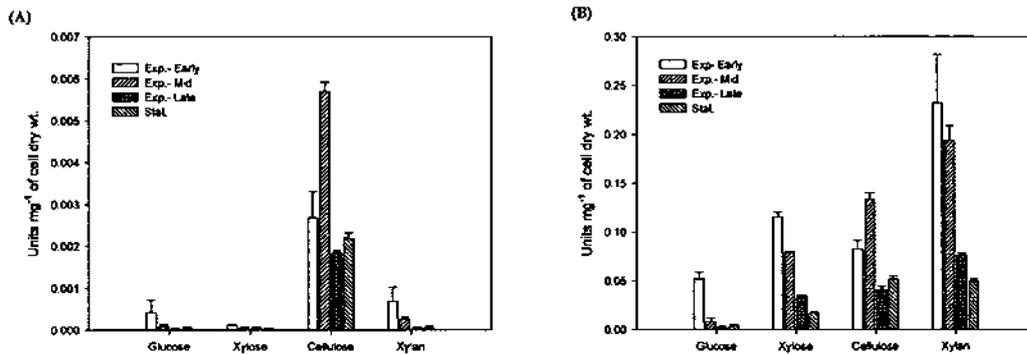
각각의 탄소원에서 *S. degradans*의 성장속도를 비교하면, glucose가 0.53 h⁻¹로 가장 높았으며, xylan(0.28 h⁻¹), cellulose(0.15 h⁻¹), xylose(0.10 h⁻¹) 순의 성장속도를 가졌다. 이 미생물이 glucose를 바로 세포 내로 유입해 이용할 수 있기 때문에 glucose로 배양 할 때 가장 높은 성장속도를 가지는 것이다. Cellulose(다당류)의 경우에는, glucose polymer로 이루어져 있기 때문에 cellulose를 분해하는 효소의 접근이 어려우므로 성장속도가 낮은 것으로 생각 할 수 있다. Xylose와 xylan의 경우, 단당류(xylose)에서 다당류(xylan) 보다 성장 속도가 낮았는데, 이는 xylan에는 glucuronic acid나 arabinose, glucose등의 당이 첨가되어 있기 때문에 상대적으로 발효가 용이한 당을 이용함으로써 *S. degradans*의 생장이 증가한 것으로 사료되어진다.



[그림 3-4-1] 탄소원에 따른 *S. degradans*의 성장속도

(2) 효소 활성 측정

Cellulase의 활성을 비교해 보면, cellulose로 배양했을 때 다른 탄소원에 비해 효소 활성이 높았으며, xylanase 활성은 xylan 뿐 아니라 xylose, cellulose에서 배양했을 때에도 xylanase의 활성이 높았다. Glucose를 탄소원으로 배양 하였을 때에는 cellulase, xylanase의 활성이 낮았는데, 이는 다당류와 관련한 효소의 발현은 glucose에 의한 catabolite repression의 영향을 받기 때문이라 사료된다. Xylose와 xylan 모두에서 xylanase가 발현되는 것은 다른 연구들에서 보고된 바와 같이 xylanase의 발현이 xylan catabolism에 의한 생성물, 즉 xylose, xylulose 등에 의해 활성화되기 때문인 것으로 생각된다.



[그림 3-4-2] 탄소원에 따른 *S. degradans*의 cellulase와 xylanase의 효소 활성

(3) GC-TOF/MS를 이용한 대사체 프로파일링

*S. degradans*를 각 4가지 탄소원 배양하여 GC-TOF/MS를 이용하여 각각 mid-exponential phase와 stationary phase의 샘플의 대사체 프로파일링을 각각 비교하였다. 총 8개의 대조군에서 6번 반복하여 48개의 샘플을 분석하였다. TCA 회로, purine과 pyrimidine 대사, 아미노산 대사 등과 관련된 다양한 종류의 대사체들이 분석되었다(표 3-4-4).

[표 3-4-4] Binbase에 의해서 동정된 대사체와 화학구조에 따른 분류

Identified metabolites	
Amino acids	
<ul style="list-style-type: none"> • Alanine_Ta(alanine+alanine3TMS) • Arginine + Ornithine • Beta alanine • Cyano-L-alanine • Glutamic acid • Glutamine • Glycine • Isoleucine_T (isoleucine + isoleucine minor) • Leucine • Lysine 	<ul style="list-style-type: none"> • Methionine sulfoxide_T (methionine sulfoxide + methionine sulfoxide major) • Oxoproline • Phenylalanine_T (phenylalanine + phenylalanine TMS 1x) • Proline • Serine_T (serine + serine 2TMS) • Suberyl glycine • Threonine • Tryptophan • Tyrosine_T (tyrosine + tyrosine minor) • Valine_T (valine + valine TMS 1x)
Amines	
<ul style="list-style-type: none"> • 5-Methoxytryptamine • Adenosine • Cytidine-5'-diphosphate deriv. • Ethanolamine • Guanine • Guanosine • Hydroxylamine • Inosine 	<ul style="list-style-type: none"> • N-Acetyl-D-hexosamine • N-Acetyl-D-mannosamine minor • Ornithine • Phosphoethanolamine • Pseudo uridine • Putrescine • Pyrazine 2,5-dihydroxy NIST • Spermidine
Organic acids	
<ul style="list-style-type: none"> • Citramalate • Citric acid • Fumaric acid • Succinic acid • 2-Hydroxybutanoic acid • 2-Hydroxyvaleric acid • 2-Isopropylmalic acid • 2-Ketoisocaproic acid • 3-Hydroxypropionic acid • Benzoic acid 	<ul style="list-style-type: none"> • Galactonic acid • Gluconic acid • Glucuronic acid • Glyceric acid • Glycolic acid • Isonicotinic acid • Lactic acid • Pipecolic acid • Ribonic acid • Threonic acid
Phosphates	
<ul style="list-style-type: none"> • Glucose-6-phosphate_T (glucose-6-phosphate 1 + glucose-6-phosphate 2) 	<ul style="list-style-type: none"> • Glycerol-alpha-phosphate • Glycerol-beta-phosphate

Sugars

- Arabinose
 - Arabitol
 - Fructose_T (fructose 1 + fructose 2)
 - Galactinol_T
(galactinol major + galactinol 2 + galactinol 3 + galactinol minor 2)
 - Galactose
 - Glucoheptulose
 - Glucose_T (glucose + glucose 1 + glucose 2)
 - Glycerol
 - Glycerol-3-galactoside NIST
 - Inositol allo-
 - Inositol myo-
 - Inulobiose_T
(inulobiose 1 + inulobiose 2)
 - Lyxitol
 - Maltotriose minor
 - Mannitol
 - Sucrose
 - Trehalose
 - Xylose_T (xylose 1 + xylose 2)
-

Fatty acids

- 2-Monopalmitin
 - Arachidic acid
 - Azelaic acid
 - Behenic acid
 - Cerotic acid
 - Dihydroabiestic acid
 - Elaidic acid
 - Heptadecanoic acid
 - Lauric acid
 - Lignoceric acid
 - Monopalmitin-1-glyceride
 - Montanic acid
 - Myristic acid
 - Octadecanol
 - Palmitic acid
 - Palmitoleic acid
 - Pelargonic acid
 - Pentadecanoic acid
 - Stearic acid
-

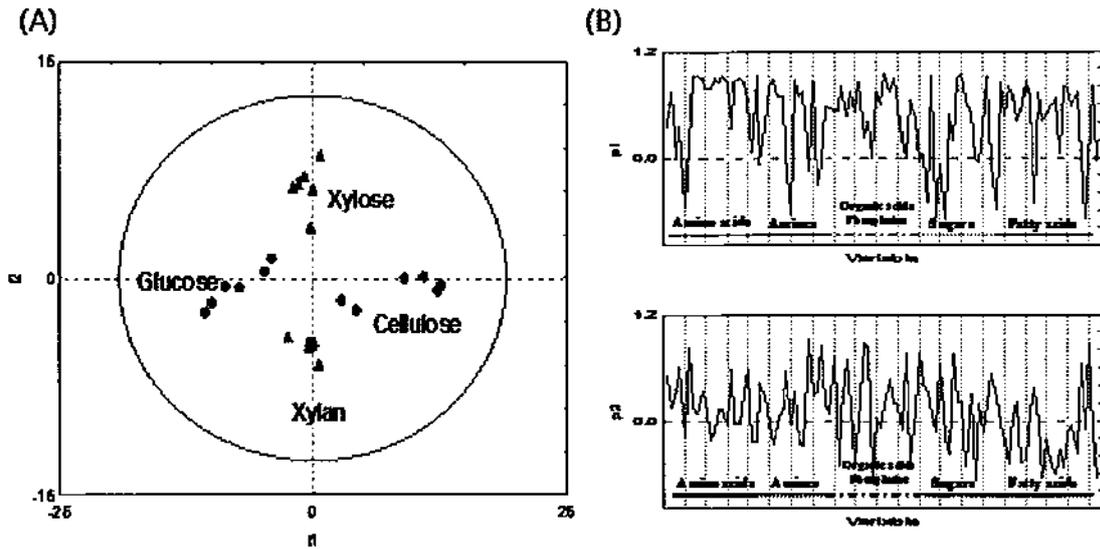
Others

- Urea
 - Hydroxycarbamate NIST
-

^a Intensities of identified metabolites with more than one peak were summed to one value.

(4) 주성분 분석을 이용한 대사체 프로파일링

각각 대조군에서의 대사체 프로파일링의 차이를 알아보기 위하여 다변량 통계 분석 방법 중의 하나인 PCA 분석(주성분분석)을 실시하였다. PCA 분석 결과, principal component(PC) 1은 glucose와 cellulose에서의 대사체 프로파일의 차이를 설명할 수 있으며, 이때의 PC1 값은 각각 -7.528, 8.680이다. 하지만 xylose와 xylan은 PC1에 의해 명확히 구분되어지지 않는다. Xylose와 xylan의 대사체 프로파일의 차이는 PC2에 의해 나누어진다. 이때의 PC2 값은 6.261-4.767이다. 반면에 glucose와 cellulose의 PC2 값은 거의 비슷한 것으로 나타났다.



[그림 3-4-3] 대사체 변화에 따른 주성분 분석의 score plot과 loading plot

(5) 단당류와 다당류의 대사체 프로파일 비교

단당류와 다당류에서의 대사체 프로파일을 비교하기 위해 스튜던트 t-검정을 이용하여 유의 수준 1% 하에서 대사체 프로파일 변화에 큰 영향을 미치는 대사 물질을 분석하였다. Glucose와 cellulose를 비교 시, 많은 대사체들이 cellulose에서 증가하는 것을 확인할 수 있었다. Xylose와 xylan 비교 시에는 xylose에서 증가하는 것을 확인하였다. 반면, 지방산들의 경우에는 xylose보다 xylan에서 증가하는 것을 확인하였다. Behenic acid, heptadecanoic acid, palmitoleic acid, pentadecanoic acid, adenosine, guanosine, pseudo uridine, 2-hydroxybutanoic acid, 3-hydroxypropionic acid, glucuronic acid, threonic acid, inulobiose, maltotriose의 13개의 대사체 들은 다당류에서 많이 증가하였지만, 2-monopalmitin, monopalmitin-1-glyceride, N-acetyl-D-mannosamine, fructose의 4개의 대사체는 단 당류에서 많이 증가하였다.

(6) 오탄당과 육탄당의 대사체 프로파일 비교

오탄당과 육탄당에서의 대사체 프로파일을 비교하기 위해 스튜던트 t-검정을 이용하여 유의 수준 1% 하에서 대사체 프로파일 변화에 큰 영향을 미치는 대사 물질을 분석하였다. 단당류인 glucose와 xylose를 비교하였을 때, 35개의 대사체가 xylose에서 더 증가한 것을 확인할 수 있었다. 다당류인 cellulose와 xylan을 비교 하였을 때에는 17개의 대사체가 xylan에서 더 증가한 것을 확인하였다. 반면 33개의 대사체가 cellulose에서 더 증가한 것으로 나타났다. Glucose-6-phosphate,

arabinose, glucoheptulose, xylose, threonic acid, 3-hydroxypropionic acid, N-acetyl-D-hexosamine, cytidine-5'-diphosphate의 대사체들은 오탄당에서 더 많이 증가한 것으로 나타났지만 pseudo uridine만 육탄당에서 더 많이 증가한 것을 확인하였다.

[표 3-4-5] 각 비교 그룹에서 높은 abundance 값을 가지는 대사체

	Cellulose ∩ Xylan ^a	Glucose ∩ Xylose ^b
Amines	Adenosine Guanosine Pseudo uridine	N-acetyl-D-mannosamine
Organic acids	Glucuronic acid Threonic acid 2-hydroxybutanoic acid 3-hydroxypropionic acid	
Sugars	Inulobiose Maltotriose	Fructose
Fatty acids	Behenic acid Heptadecanoic acid Palmitoleic acid Pentadecanoic acid	2-monopalmitin Monopalmitin-1-glyceride
	Xylose ∩ Xylan ^c	Glucose ∩ Cellulose ^d
Amines	N-acetyl-D-hexosamine Cytidine-5'-diphosphate	Pseudo uridine
Organic acids /Phosphates	3-hydroxypropionic acid Threonic acid Glucose-6-phosphate	
Sugars	Arabinose Glucoheptulose Xylose	

^{a, b} For polysaccharides vs. monosaccharides, comparisons were made between cellulose and glucose and between xylan and xylose using a Student's t-test at the 1% significance level.

^a Higher metabolites produced by cells cultured in both cellulose and xylan were selected.

^b Higher metabolites produced by cells cultured in both glucose and xylose were selected.

^{c, d} For pentoses vs. hexoses, comparisons were made between xylose and glucose and between xylan and cellulose using a Student's t-test at the 1% significance level.

^c Higher metabolites produced by cells cultured in both xylose and xylan were selected.

^d Higher metabolites produced by cells cultured in both glucose and cellulose were selected.

(7) 성장시기에 따른 대사체 프로파일의 변화

98개의 대사체 중 90개의 대사체들이 stationary phase에서 mid-exponential phase 보다 감소한 경향을 보였지만, guanine, inosine 등의 특정 대사체들은 오히려 더 증가하는 경향을 보였다. Amine은 mid-exponential phase에서 stationary phase 로 옮겨질 때 서로 다른 탄소원에서 강하게 증가하는 것을 확인하였다.

[표 3-4-6] 탄소원에 따라 mid-exponential phase와 비교하여 stationary phase에서 생성되는 대사체의 relative abundance 값

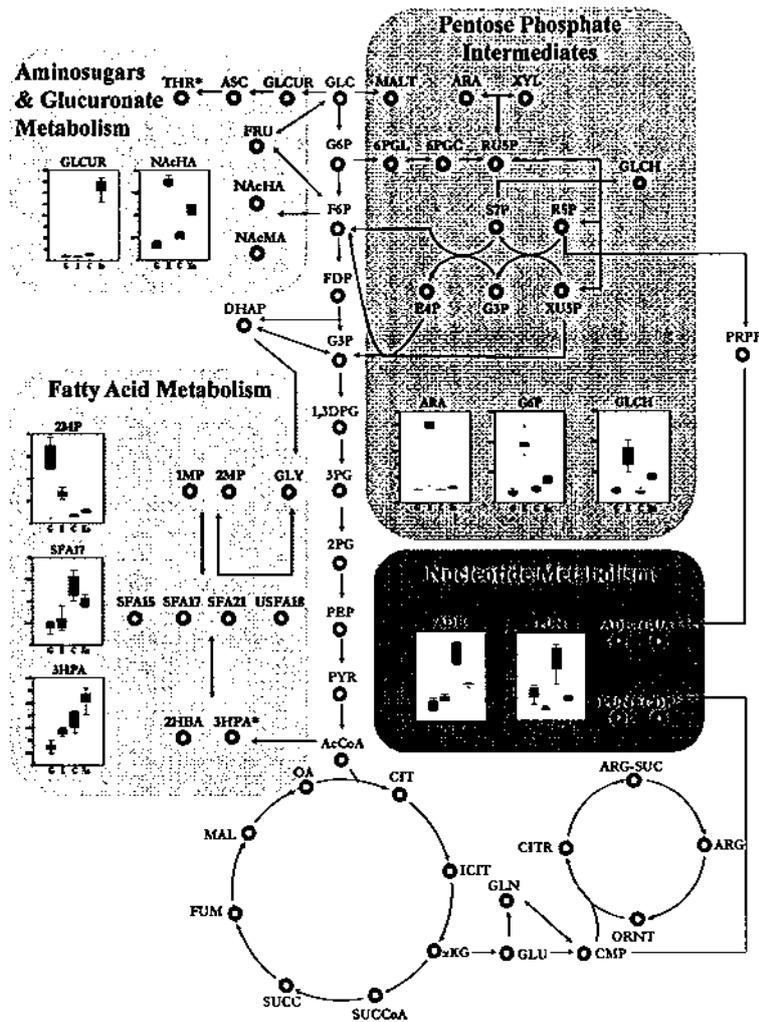
Carbon source	Metabolite	Chemical class	Relative abundance (%) ^a	p ^b
Glucose	Glutamine	Amino acid	108.29	0.72439
	Adenosine	Amine	213.50	0.00552
	Guanosine	Amine	394.37	0.00171
	Putrescine	Amine	438.90	0.00014
	2-Isopropylmalic acid	Organic acid	116.24	0.52088
	Glyceric acid	Organic acid	101.30	0.93237
	Arabinose	Sugar	102.67	0.97721
	Arabitol	Sugar alcohol	112.52	0.75441
	Glucoheptulose	Sugar	152.48	0.02566
	Glycerol-3-galactoside	Sugar	240.98	0.03220
	Inulobiose	Sugar	102.79	0.89178
Behenic acid	Fatty acid	154.32	0.02328	
Xylose	Inosine	Amine	126.79	0.19857
	Galactose	Sugar	150.81	0.26075
	Glucose	Sugar	134.34	0.33907
Cellulose	Guanine	Amine	419.38	0.00016
	Inosine	Amine	137.47	0.22444
	Xylose	Sugar	151.96	0.43438
Xylan	Guanine	Amine	1036.13	0.00000
	Inosine	Amine	373.39	0.00009
	Pseudo uridine	Amine	191.90	0.00004
	2-Isopropylmalic acid	Organic acid	141.31	0.00327
	Ribonic acid	Organic acid	344.26	0.00000
	Threonic acid	Organic acid	339.90	0.00000
	Glycerol-3-galactoside	Sugar	187.34	0.30004
	Mannitol	Sugar alcohol	119.12	0.42434

^a % abundances of metabolites in the stationary phase compared to those in the mid-exponential phase.

^b Statistical p-value determined using the Student's t-test

(8) *S. degradans*의 다당류 이용 대사경로

단당류와 다당류에서의 대사체 프로파일은 다당류 분해 효소 생산과 관련하여 크게 fatty acid 대사 관련 변화, amino sugar, glucuronic acid 대사 관련 변화, nucleotide 대사 관련 변화, pentose phosphate pathway 대사 관련 변화로 분류하여 설명할 수 있다. *S. degradans*는 다당류를 분해하기 위해 lipoprotein을 많이 생성해야 하기 때문에, 이를 위해 지방산의 생성이 증가할 것으로 생각된다. 다당류의 분해를 위한 효소 생산을 효율적으로 하기 위해서는 세포 간의 상호 작용이 필요한데 이와 관련한 extracellular polysaccharide의 합성을 증가시키기 위해 maltotriose나 inulobiose 등의 합성이 증가하는 것으로 생각된다. Nucleotide 대사와 관련하여, 많은 농도의 효소를 생산하기 위해서는 세포 내에서 에너지 및 합성 물질의 소비를 최소화하기 위해 salvage pathway가 존재하는데, 이러한 salvage pathway를 통해 nucleotide의 합성이 효율적으로 이루어지며, salvage pathway를 거치는 동안 nucleotide의 분해물인 nucleoside, nucleobase 등의 물질이 증가하는 것으로 추측된다. Xylose의 오탄당 발효의 경우에는 xylose, arabinose, glucoheptulose 등의 pentose phosphate pathway와 관련된 대사체가 증가하는 것을 확인하였으며, 이를 통해 *S. degradans*가 오탄당 발효 시 pentose phosphate pathway를 이용할 것으로 생각된다.



[그림 3-4-4] *S.degradans*의 다당류 분해 대사 경로 그림.

α KG, α -ketoglutaric acid; 1,3DPG, 1,3-diphosphoglyceric acid; 1MP, 1-monopalmitin; 2HBA, 2-hydroxybutanoic acid; 2MP, 2-monopalmitin; 2PG, 2-phosphoglyceric acid; 3HPA, 3-hydroxypropionic acid; 3PG, 3-phosphoglyceric acid; 6PGC, 6-phospho-gluconic acid; 6PGL, 6-phosphogluconolactone; AcCoA, acetyl-CoA; ADE, adenosine; ARA, arabinose; ARG, arginine; ARG-SUC, acid; ASC, ascorbic acid; CDP, cytidine-5'-diphosphate; CIT, citric acid; CITR, citruline; CMP, carbamoyl-phosphate; DHAP, dihydroxy acetone-phosphate; E4P, erythrose- 4-phosphate; F6P, fructose-6-phosphate; FDP, fructose-1,6-diphosphate; FRU, fructose; FUM, fumaric acid; G3P, glyceraldehyde-3-phosphate; G6P, glucose-6-phosphate; GLC, glucose; GLCH, glucoheptulose; GLCUR, glucuronic acid; GLN, glutamine; GLU, glutamic acid; GLY, glycerol; GUA, guanosine; ICIT, isocitric acid; MALT, maltotriose; NAcHA, N-acetyl-hexosamine; NAcMA, N-acetyl-mannosamine; OA, oxalic acid; ORNT, ornithine; PEP, phosphoenolpyruvate; PRPP, 5-phosphoribosyl-1 pyrophosphate; PUN, pseudo PYR, pyruvate; R5P, ribose-5-phosphate; RU5P, ribulose-5-phosphate; S7P, sedoheptulose-7-phosphate; SFA15, pentadecanoic acid; SFA17, heptadecanoic acid; SFA21, behenic acid; SUCCoA, succinyl-CoA; THR, threonic acid; USFA18, palmitoleic acid; XU5P, xylulose-5-phosphate; XYL, xylose.

4. 요약 및 제언

해양 salt marsh grass에서 분리한 그람 음성균인 *Saccharophagus degradans*는 김, 미역, 다시마 등의 다양한 해조류와 고등한 육상 식물들을 분해할 수 있는 것으로 알려져 있다. 이러한 해조류와 식물들은 agar, alginate, chitin, cellulose, fucoidan, laminarin, pectin, pullulan, starch, xylan 등으로 구성되어 있으며, *S. degradans*는 이러한 다양한 바이오매스 및 다당류 분해를 가능한 효소를 가지고 있다. CAZy DB 등재 생물 중에서 3번째로 많은 다당류분해 효소 보유 및 1번째로 많은 CBM 보유한 슈퍼 균주로 알려져 있으며, 2008년 미국 에너지부 Joint Genome Institute에서 유전체 서열이 밝혀졌다. 이러한 정보 등을 이용하여 생물정보학 및 미생물 스크리닝을 이용한 해조류 분해 미생물로 *S. degradans*로 선정하였다.

*S. degradans*를 다양한 탄소원으로부터 배양하여 *S. degradans*의 polysaccharide의 분해 메커니즘을 성장 속도와 효소 생산 속도를 비교하여 분석하였으며, 그 분해 산물들을 GC-TOF-MS를 이용하여 분석한 결과 아미노산, 아민류, 유기산, 인, 당류, 지질 등 총 98개의 대사체를 동정하였다. 통계학적 분석을 기반으로 한 대사체 프로파일링을 통해 *S. degradans*의 fatty acids, amino sugars, uronic acids, nucleotides 등의 대사경로의 차이를 확인할 수 있었으며, 다양한 탄소원에서 metabolic signature를 규명하였다. 미생물 대사의 생리학적, 생화학적 차이를 규명하기 위한 global 대사체 프로파일링 기법이 갖는 잠재성을 확인할 수 있었다. 앞으로 연속 배양, 동위원소 표지법, LC-MS와 NMR 등의 다양한 분석기기 등을 이용하면 미생물 대사를 좀 더 심화 있게 규명할 수 있을 것이다.

제 4 장 해조류 그린에너지화 연구개발 내용 및 결과

제 1 절 해조류 에탄올 발효

1. 연구 목적 및 내용

가. 연구 목적

전처리된 당화 해조류의 당성분을 분석하고 해조류 유래 당류 별 알코올 발효 특성을 최적조건을 결정한다. 또한, 해조류를 이용한 알코올 발효를 통해 전처리된 해조류 당화액내 존재 당과 저해물질의 프로파일링을 하고 발효에 적합한 해조류를 평가한다.

나. 연구 내용

해조류 유래 당류 별 알코올 발효 특성을 평가하기 위해 다음과 같은 연구를 수행하였다.

- (1) 기질로서 활용될 수 있는 다양한 당류들 중 선정된 균주에 따라 알코올로서 전환이 가능한 발효성당과 비발효성 당 구분 및 선호도를 조사하여 데이터베이스 구축한다. 구축한 데이터베이스를 통해 비발효성 당들의 조성을 살펴보고 일부 비발효성 당의 알코올 전환 전략을 도출하여 당화액의 전환율을 향상시킨다.
- (2) 해조류별 또는 전처리별 당화액의 발효특성 및 알코올을 비롯한 발효산물의 조성을 정량/정성적으로 분석하여 고수율 알코올로의 전환을 위한 해조류 선정과 최적화된 당화조건들을 선별할 수 있는 프로토콜을 확립한다.
- (3) 알코올을 비롯한 발효산물의 조성을 비교균을 기준으로 정량/정성적으로 분석하여 발효산물 및 수율 비교분석 및 평가한다. 또한 발효시에 사용되지 않은 비발효성 당 또는 비선호성 발효당의 발효화의 가능성을 조사하고 당화액의 효율적인 전환을 위한 다양한 접근방법을 제시하여 당화액 내의 탄수화물을 효율적으로 전환한다.
- (4) 해조류 종류별, 전처리/당화 조건별 생성되는 발효 저해물질 및 기타 비당화산물에 의한 저해물질 정성분석을 통한 저해물질 특성을 파악한다. 특히 유기산, furans, furfural, phenolics 등과 같은 대표적 저해물질의 성분별, 다성분 혼합 존재 조건별 발효저해 특성을 평가하여 확인된 발효 저해물질을 발효 가능한 당성분의 손실 없이 친환경적인 방법으로 제거할 수 있는 방안을 도출한다.

2. 연구 방법

가. 실험장치 및 재료

본 연구는 해조류의 당화를 통하여 에탄올 발효를 목적으로 하였다. 해조류의 당화를 위하여 바다에서 흔히 접할 수 있는 해조류를 선정하여 실험을 진행하였다. 본 연구에 사용된 해조류로는 갈조류인 다시마와 홍조류인 도박을 사용하여 실험을 진행하였다. 실험을 진행하기 위하여 해조류의 기본 전처리 과정을 진행하였다. 전처리 과정은 건조된 다시마 및 도박의 염분을 제거하기 위하여 수돗물로 2 ~ 3회 세척을 시행하였다. 세척 후 60 ℃ dry oven에서 완전히 건조를 시켰다. 건조된 해조류들은 분쇄기를 이용하여 분말 형태로 만들어 실험에 사용되었다.



(a)

(b)

[그림 4-1-1] (a) 갈조류 다시마 (b) 홍조식물 도박

나. 실험 절차

(1) 해조류 당화

해조류를 이용한 에탄올 발효 생산을 하기 위하여 해조류 당화 실험을 진행하였다. 전처리를 통한 분말상태의 해조류들을 당화시키기 위하여 산처리 및 열처리를 통하여 당화실험을 진행하였다. 산처리는 H_2SO_4 를 사용하였고, 열처리는 Autoclave를 사용하여 당화실험을 진행하였다. 산처리 조건은 0.5~2% H_2SO_4 를 이

용하여 실험을 진행하였으며, 열처리는 121 °C, 15 min 및 121 °C, 30 min으로 하여 당화실험을 진행하였다.

[표 4-1-1] 해조류 당화 실험조건

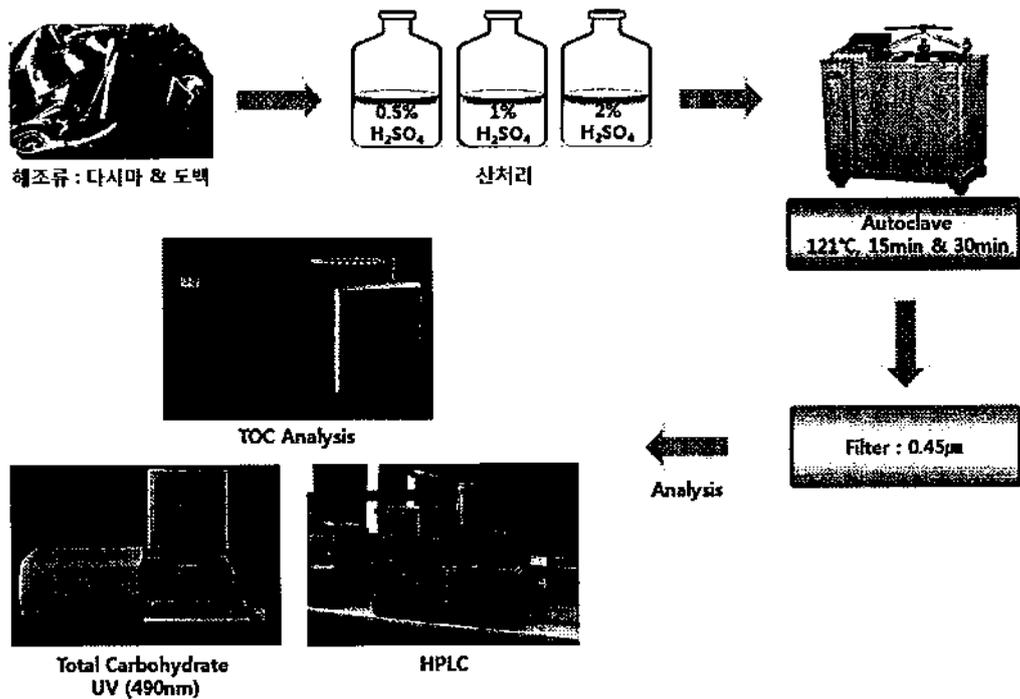
온도 (°C)	H ₂ SO ₄ 농도 (%)	반응시간 (min)
121	0.5, 1, 2	15, 30

(2) 당화 분석

전처리된 해조류의 당화를 분석하기 위하여 Total carbohydrate, TOC (Total Organic carbon) 및 HPLC(High Performance Liquid Chromatograph) 등을 이용하여 분석을 진행하였다. Total carbohydrate는 Phenol-Sulfuric Acid를 이용하여 분석을 진행하였다. 그리고 총 유기탄소를 측정하기 위하여 TOC를 사용하였고, 당화된 추출액의 성분분석을 위하여 HPLC(Agilent 1200 series, column: Aminex HPX 87H, BIO-RAD)를 이용하여 분석을 진행하였다.

(3) 해조류를 이용한 에탄올 발효 - Batch test

해조류를 이용한 에탄올 발효실험을 위하여 전처리된 당화액을 이용하여 에탄올 실험을 진행하였다. 본 실험을 진행하기 위하여 다량의 에탄올 생산을 위한 최적 조건을 확립하기 위하여 batch test를 진행하였다. 본 실험에서 사용된 발효균주는 *Saccharomyces cerevisiae* KTCT 7296을 이용하여 실험을 진행하였다. 전처리된 해조류 당화액을 1차적으로 5000 rpm, 15 min으로 원심분리를 하였고, 원심분리된 액을 2차적으로 0.45 µm Filter를 이용하여 부유물을 제거한 후 실험에 사용하였다. 발효실험을 위한 media로 YPD media를 사용하였으며, 실험대조군으로 glucose를 사용하여 비교실험을 진행하였다. Media pH의 경우 6.0으로 조절하였으며, 5%로 균을 접종하여 batch test를 진행하였다.



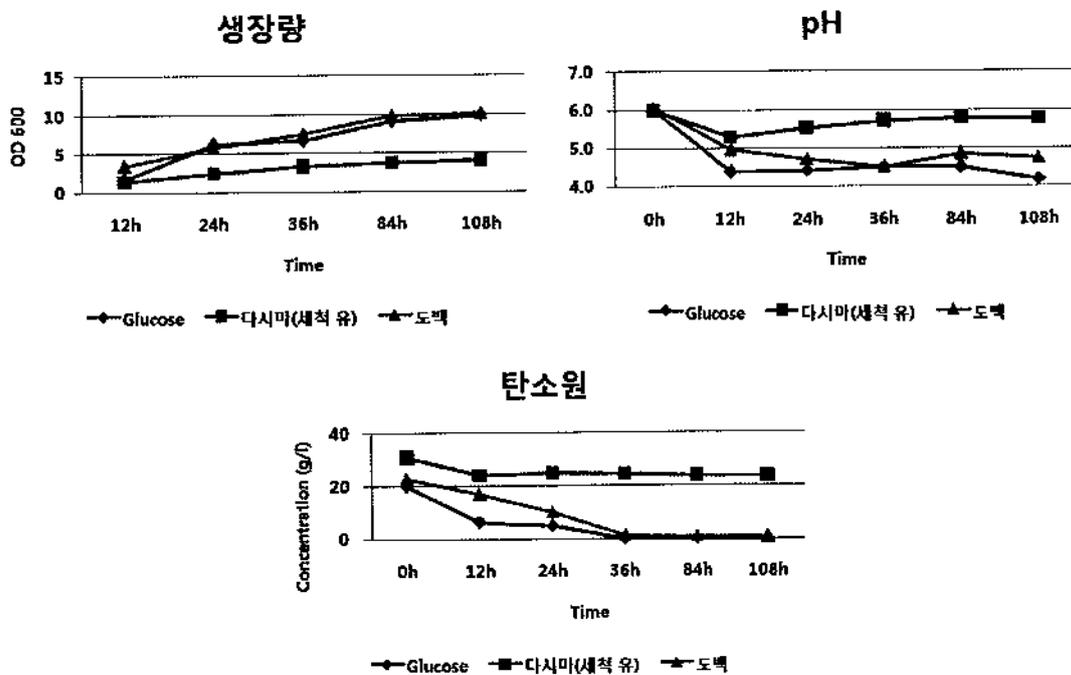
[그림 4-1-2] 해조류를 이용한 에탄올 발효실험을 위한 batch-test 모식도

3. 연구수행 결과

가. 당화 다시마 및 도박 발효시 생장 특성 및 생산물

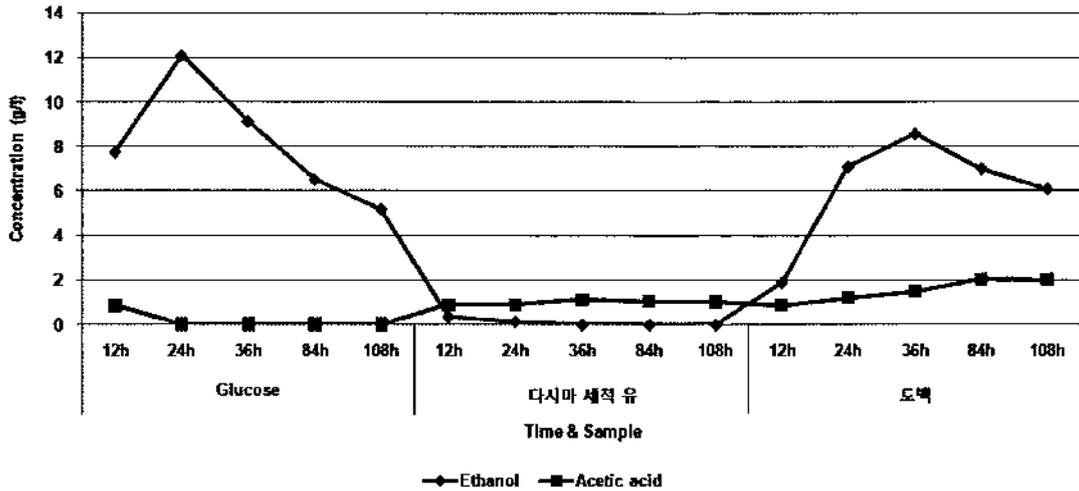
당화 해조류의 에탄올 발효 실험은 산처리를 한 해조류를 이용하여 이뤄졌다. 그림 4-1-3에 당화 다시마 및 도박 발효시 생장 특성을 나타내었다. 도박의 경우 2% 이하의 황산처리를 할 경우 탄소원 추출량이 다시마 보다 낮았으나 2% 이상의 경우에는 비슷한 수준을 보였으며 발효시에는 갈락토오스만이 알코올 발효에 사용되었으며 기타 탄소원의 경우 거의 소모되지 않았다. 당화 해조류의 발효는 반응기를 통해 *S. cerevisiae* KTCT 7296를 이용하여 이뤄졌으며 총 108시간까지 관측하였다. 포도당과 산처리 당화 도박액을 탄소원으로 사용하였을 경우 108시간까지 세포의 성장 계속 이뤄졌으며(OD600: 10) pH는 지속적으로 감소하였다. 포도당과 산처리 당화 도박액 모두 36시간에 모두 소모 되었다. 따라서 당화 도박액은 포도당과 비슷한 정도로 *S. cerevisiae* KTCT 7296의 생장에 이용될 수 있으며 비슷한 생장 패턴을 보여줬다. 반면에 산처리 당화액의 경우 포도당이나 산처리 도박액에 비교해 낮은 생장을 보여줬으며 pH의 경우도 크게 변함없이 108시간까지 유지되었다. 전체 유기탄소의 경우 12시간까지 약간 감소하였으며 그 이후로는 더 소모되지 않았다. 12시간에 소모된 탄소원은 배지에 들어 있던 펩톤과 yeast extract인 것으로 추정되며 이후에 산처리 당화 다시마액은 소모되지 않은 것으로 추천된다.

당화 해조류액을 이용한 통한 에탄올 발효는 산처리 당화 도박액을 사용했을 경우 전체 약 8 g/l의 에탄올을 생산하였으며 다시마액을 사용했을 경우에는 에탄올 생산이 거의 이뤄지지 않았으며 약간의 acetic acid를 생산하였다(그림 4-1-4). 생산된 acetic acid 역시 배지에 들어 있던 펩톤과 yeast extract을 이용해 생산된 것을 추측된다. 포도당을 이용한 발효시 24시간에 최대 에탄올(12 g/l)을 생산하였으나 산처리 당화 도박액을 사용했을 경우 36시간에 최대 에탄올(8 g/l)을 생산하였다. 포도당과 산처리 당화 도박을 사용하였을 경우 성장에는 큰 차이가 없었으나, 최대 생산량과 도달시간에서는 산처리 당화 도박액을 사용한 경우 포도당에 비해 약간 떨어지는 결과를 나타내었다. 이는 포도당과 달리 갈락토오스의 경우 에탄올 생산할 때 추가적인 대사과정이 있기 때문으로 여겨지며 산처리 당화 도박액 안에 있는 기타 물질에 의해 발효 과정이 저해 받았을 경우도 고려해볼 수 있다. 산처리 당화 도박액 이용 발효시 에탄올 생산성 40%는 포도당 이용 발효시의 에탄올 생산성 60%와 비교하면 다소 낮은 편이나 전처리 방법이 완전히 확립된 상황이 아니고, 잔류 염분 및 저해물질이 완전히 제거되지 않았기 때문에 최적화 될 경우 산처리 당화 도박액으로도 포도당 발효시와 비슷한 생산성을 낼 수 있을 것으로 기대된다.



[그림 4-1-3] 당화 다시마 및 도박 발효시 성장 특성

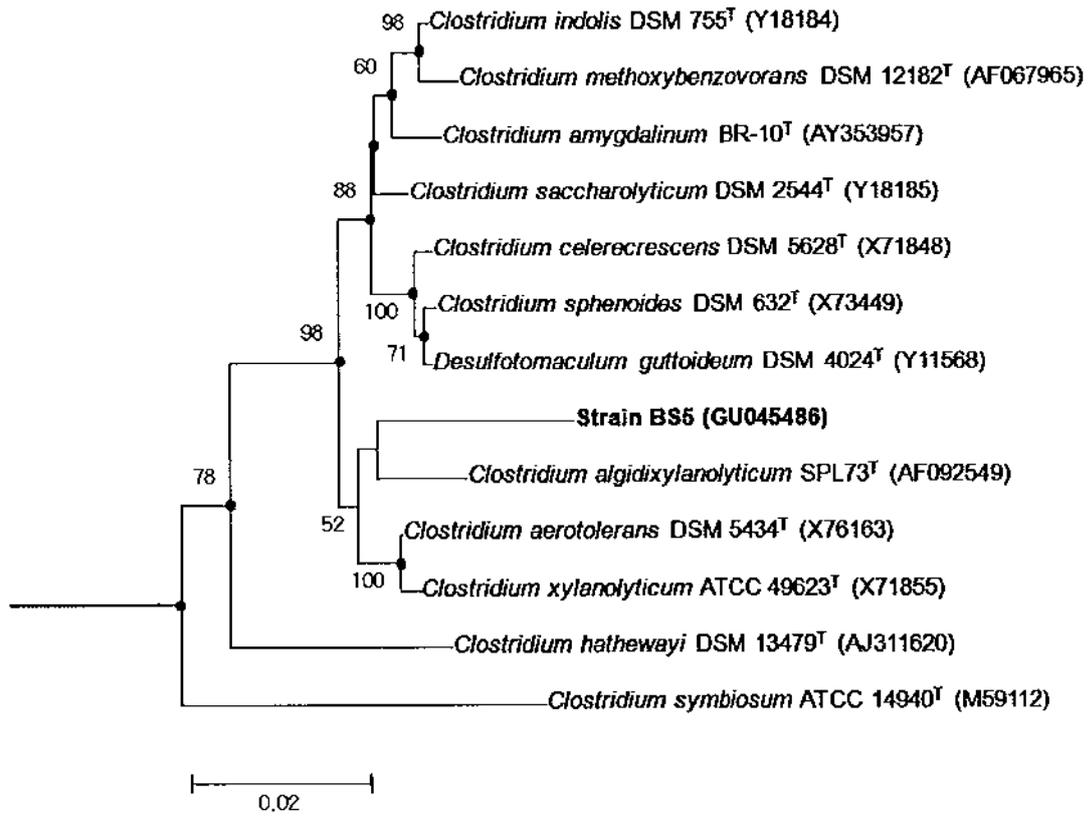
생산물



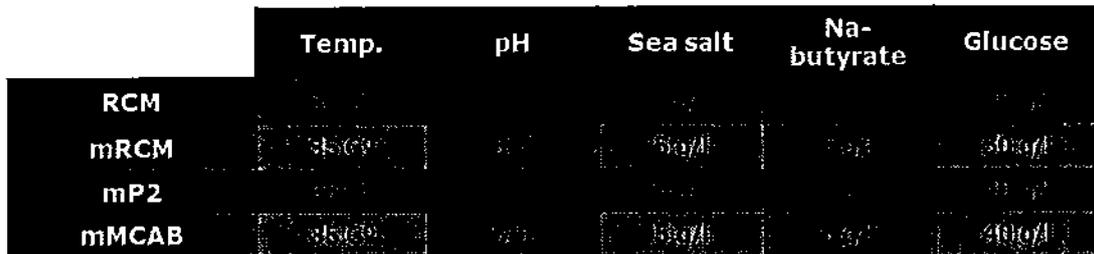
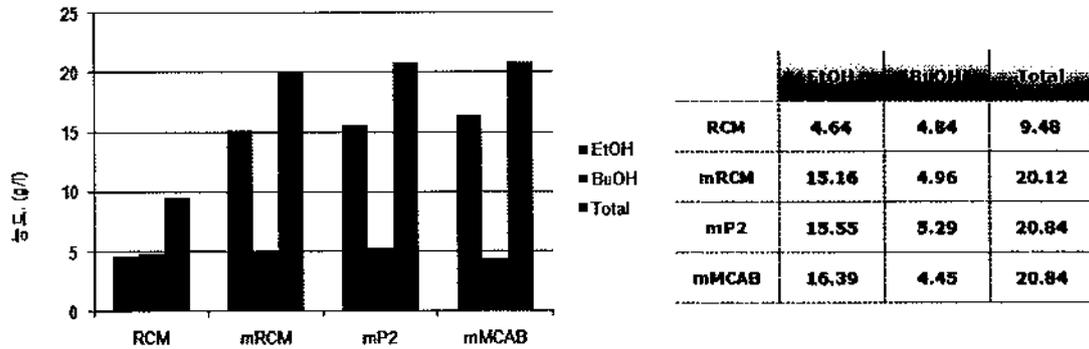
[그림 4-1-4] 당화 다시마 및 도박 발효의 생산물

나. 에탄올/부탄올 발효 균주 분리 및 알코올 생산성 확인

BS-5는(그림 4-1-5) 갯벌(N 36. 44. 461, E 126. 09. 429;태안군 서산면 파도리)에서 분리된 혐기성 균주이며 에탄올과 부탄올의 혼합알코올을 생산하는 균주로 확인되었다. 16S rRNA 분석결과 *Clostridium*에 속하는 균주로서 신종 가능성이 높은 것으로 확인되었다. API 분석결과 alginate는 이용하지 않으나 다양한 탄소원을 이용할 수 있는 것으로 확인 되었으며 *S. cerevisiae* KTCT 7296의 경우 낮은 염도에서도 성장 및 알코올 생산이 저해를 받으나 BS-5의 경우에는 높은 염도에서도 저해 받지 않고 성장 및 알코올 생산이 가능하다. 이것은 해양 유래 미생물의 특성으로 추정되며 해조류의 염분도 역시 바다에서 유래한 것으로 발효시 잔류 염류가 성장 및 발효를 저해하는 것으로 알려져 있으나 해양 유래 미생물은 이러한 영향을 별로 받지 않을 것으로 보인다. 알코올 생산성은 50%에 육박하는 생산성을 나타내었으며, 해조류의 특성상 일정정도 염분이 있을 것을 감안할 경우 염분농도에 저해 받는 효모보다 우수한 알코올 발효 성능을 낼 수도 있을 것으로 기대된다(그림 4-1-6). 또한 50% 생산성 역시 최적화된 조건이 아니므로 추가적인 생산성 향상도 가능할 것으로 예측된다.



[그림 4-1-5] BS-5의 분류학적 위치



[그림 4-1-6] BS-5의 발효조건별 알코올 생산량

4. 요약 및 제언

S. cerevisiae KTCT 7296을 이용한 당화 해조류 발효조건을 확보하였다. 산처리 당화 도박액의 경우 포도당과 비슷한 정도로 발효가 진행되나 산처리 당화 다시마액의 경우, 발효되지 않았다. 또한 갯벌에서 혼합 알코올을 생산하는 호염성 균주 BS-5를 분리하였고 다양한 당류를 이용할 수 있는 것이 확인되었다. 알코올 발효에서는 BS-5의 포도당 사용시 알코올 생산성 50%로써 *S. cerevisiae* KTCT 7296에 60%에 근접했다. 상기 결과를 토대로 하여 차년도에는 다음과 같은 연구를 수행할 계획이다.

가. *S. cerevisiae* KTCT 7296을 이용한 당화 해조류 발효

1차년도에 확립된 당화 해조류 발효조건을 토대로 *S. cerevisiae* KTCT 7296을 이용해 전처리 방법별, 해조류 종류별 발효조건을 확립하며 다양한 발효조건을 통해 전처리된 당화 해조류내 당의 이용율을 분석하여 발효당 및 비발효당 여부를 판단한다. 또한 발효조건별 알코올 생산량을 평가하여, 최대 총알코올 생산량, 최대 알코올 생산성을 나타내는 발효조건을 확립하며, 해조류별 알코올 생산량을 평가하여 각각의 목적에 적합한 해조류와 발효균주를 확립한다.

나. *Clostridium* sp. BS-5를 이용한 당화 해조류 발효

1차년도에서 확보된 균주 BS-5를 이용하여 당화 해조류 발효 조건 확립한다. 일차적으로 산처리 당화 도박과 산처리 당화 다시마를 이용하여 기초적인 당화 해조류 발효조건을 확립하며 확보된 기초 발효 조건을 토대로 처리 방법별, 해조류 종류별 발효조건을 확립한다. 또한 다양한 발효조건을 통해 전처리된 당화 해조류내 당의 이용율을 분석하여 발효당 및 비발효당 여부를 판단한다. 또한 발효조건별 알코올 생산량을 평가하여, 최대 총알코올 생산량, 최대 알코올 생산성을 나타내는 발효조건을 확립하며, 해조류별 알코올 생산량을 평가하여 각각의 목적에 적합한 해조류와 발효균주를 확립한다.

다. 해양 유래 신규 당화 해조류 알코올 발효 미생물 분리

문헌조사 및 현장탐사를 통해 해조류 알코올 발효 미생물 탐사에 적합한 갯벌 및 해수 샘플을 선정후 선정된 샘플을 다양한 배양방법을 통해 해양유래미생물을 순수 분리한다. 분리된 해양미생물중 알코올 생산능력을 가지고 있는 균주를 선택하고 선택된 균주는 16SrRNA를 분석을 이용하여 분류학적 위치를 결정하며 다상적 분석을 시행한다. 최종적으로 다상적 분석이 완료된 균주는 산처리 당화 도박과 산처리 당화 다시마를 이용하여 기초적인 당화 해조류 발효조건을 확립한다.

제 2 절 해조류 부탄올 발효

1. 연구 목적 및 내용

가. 연구 목적

본 연구에서는 1) 해조류를 기질로 이용하여 부탄올의 생산 가능성을 우선적으로 조사하고, 2) 해조류의 전처리 당화액을 이용한 알코올(에탄올/부탄올) 발효 시 고려되어야 할 당화액 내 발효성 당과 비발효성 당의 알코올 발효 특성을 평가/분석하고, 3) 당화액에 존재하는 주된 당분 및 복합당 성분을 동시에 이용하여 알코올 발효를 할 수 있는 미생물 설계 기술 개발과 4) 당화액 내에 존재하는 발효 저해물질의 독성 평가 및 독성물질의 무해화 기술을 개발하는 것을 기본 추진 목적으로 한다.

나. 연구 내용

해조류를 기질로 하여 대체 연료인 부탄올 생산 가능성과 기술을 개발하기 위해 본 연구는 다음의 핵심 내용을 진행하고자 하였다.

(1) 해조류를 기질로 이용하여 부탄올의 생산 가능성

부탄올 생산균주가 해조류를 전처리나 당화공정을 거치지 않고 직접 발효를 하여 부탄올을 생산할 수 있는지 조사함

(2) 해조류의 전처리 당화액을 이용한 알코올(에탄올/부탄올) 발효 시 고려되어야 할 당화액 내 발효성 당과 비발효성 당의 알코올 발효 특성을 평가/분석

- 기질로서 활용될 수 있는 다양한 당류들 중 선정된 균주에 따라 부탄올로써 전환이 가능한 발효성당과 비발효성 당 구분 및 선호도를 조사하여 데이터베이스 구축
- 비발효성 당들의 조성을 살펴보고 일부 비발효성 당의 알코올 전환 전략을 도출하여 당화액의 전환을 향상
- 해조류별 또는 전처리별 당화액의 발효특성 및 알코올을 비롯한 발효산물의 조성을 정량/정성적으로 분석하여 고수율 알코올로의 전환을 위한 해조류 선정과 최적화된 당화조건들을 선별할 수 있는 프로토콜 확립
- 발효산물 및 수율 비교분석 및 평가: 알코올을 비롯한 발효산물의 조성을 비교균을 기준으로 정량/정성적으로 분석

(3) 당화액에 존재하는 주된 당분 및 복합당 성분을 동시에 이용하여 알코올 발효를 할 수 있는 미생물 설계 기술 개발

- 당화액 내의 탄수화물의 효율적인 전환 : 발효시에 사용되지 않은 비발효성 당 또는 비선호성 발효당의 발효화의 가능성을 조사하고 당화액의 효율적인 전환을 위한 다양한 접근방법제시
- 당화액 내 복합당 동시 이용을 위한 유전자 탐색 및 발현기구 도출
- 문헌조사를 통하여 고수율 부탄올 생산을 위한 균주의 선별 및 발굴
- 해조류 당화액에 존재하는 주된 당성분들(비발효성당 포함)을 알코올로 전환할 수 있는 재조합 균주의 개발을 위한 gene targeting
- 맞춤형 재조합균주 생산을 위한 분자생물학적 tool의 선별 및 확보

(4) 당화액 내에 존재하는 발효 저해물질의 독성 평가 및 독성물질의 무해화 기술을 개발

- 해조류 종류별, 전처리/당화 조건별 생성되는 발효 저해물질 및 기타 비당화산물에 의한 저해물질 정성분석을 통한 저해물질 특성 파악
- 유기산, furans, furfural, phenolics 등과 같은 대표적 저해물질의 성분별, 다성분 혼합 존재 조건별 발효저해 특성 평가
- 발효 가능한 당성분의 손실 없이 발효 저해물질을 친환경적인 방법으로 제거할 수 있는 저해물질 제거 방안 도출

2. 연구 방법

가. 실험장치 및 재료

본 연구를 수행하기 위해 부탄올로 전환될 수 있는 기질로서 갈조류인 다시마와 세 가지 서로 다른 거대 해조류인 홍조류로서 도박과 진두발, 녹조류인 파래 등을 사용하였으며, 각각의 해조류들은 수확 후 건조/분쇄되어 가루(powder)의 형태로 직접 또는 당화공정을 거쳐 부탄올생산의 기질로서 사용되었다. 부탄올생산을 위한 해조류 배지는 다양한 영양성분과 당화액등으로 조제 되었으며, 배지 및 발효 기구되어 멸균을 위해 autoclave가 사용되었고, 다양한 발효용량의 발효기 및 anaerobic vials, flask등이 사용되었다. 당화공정에서는 여러 가지 종류의 산(HCl, H₂SO₄)과 염기(NaOH, NH₃), 그리고 세가지 종류의 효소(laminarase, cellulase, alginate lyase)등이 사용되었다. 배지에 필요한 영양성분들은 P2 Solution(yeast extract, vitamin, mineral, buffer solution)으로 공급되었다. 해조류배지에서의 부탄

을 생산균주의 성장은 optical density와 pH로 나타나게 되는데 이는 spectrophotometer와 pH meter로 측정하였으며, (yeast 해조류내의 GC의 발효를 조사하였다. 부탄올 생산균주로는 주로 *Clostridium beijerinckii* 가 발효성능을 조사하기 위해 사용된 반면, *Clostridium acetobutylicum* 균주는 균주개발의 모체균주로서, 재조합균주 개발연구에 주로 사용되었다. 또한 재조합균주 개발연구에서는 *E. coli*, 다른 발효균의 DNA와 다양한 분자생물학적 도구(DNA purification, plasmid isolation Kit, restriction enzymes, ligases)를 도입하였다. 구입하거나, 해외의 연구그룹에서(INSIA, France; University of Illinois, USA; Heriot-watt University, UK; University of Rostock, Germany)에게서 지원 받았다. 그 외에 gel box의 발전기영동 kit, transilluminator, 다양한 용량의 원심분리기와 동결건조기, 주사기, 분석 vial, 필터, 질소, 수소, 공기 등의 기체, incubator, anaerobic jars 등이 사용되었다.

나. 실험 절차

(1) 해조류를 기질로 이용하여 부탄올의 생산 가능성을 조사

전처리 및 당화공정을 거치지 않고 해조류의 수용액을 직접 배지로 사용하여 부탄올 생산균주가 성장할 수 있는지 조사하였다. 이 실험에서는 다시마, 도박, 진두발, 파래가 사용되었고 포도당이 기준배지로서 비교군으로 사용되었다. 각각의 해조류 가루는 50 g/L로 물에 섞은 후 영양성분을 첨가하여 멸균하였다. 이후 배지는 부탄올 생산균주의 포자로 접종되었으며 37도에서 배양하여 성장 및 발효 산물을 분석하였다.

(2) 해조류의 전처리 당화액을 이용한 알코올(에탄올/부탄올) 발효 시 고려되어야 할 당화액 내 발효성 당과 비발효성 당의 알코올 발효 특성을 평가/분석

문헌을 통하여 해조류의 알려져 있는 당 성분 조사하고 이를 바탕으로 해조류 당화액을 제조하기 위한 방법을 개발하기 위해 해조류수용액을 산 또는 염기의 가수분해를 하거나 산과 칼데일 효소(laminaranase, cellulase, alginate lyase)를 사용하여 당함량과 균주생장이 높은 당화액 조제 방법을 최적화하였다. 최적화된 방법으로 조제된 당화액의 당성분은 환원당 분석법과 LC등을 이용하여 정성 및 정량적으로 성분당을 분석하였다. 당화액내에 존재하는 구성당 성분의 분석결과에 따라 각각의 당은 배지(96 well plate) 로 구성되어 발효성능을 조사해보고 미생물 성장과 부탄올 생산 등의 발효산물을 분석하였다. 또한 단당류 혹은 이당류뿐만 아니라

다당체의 당류 또한 발효성능분석이 수행되었다.

(3) 당화액에 존재하는 주된 당분 및 복합당 성분을 동시에 이용하여 부탄올 발효를 할 수 있는 미생물 설계 기술 개발

해조류 당화액 또는 해조류 수용액내에 존재하는 주된 당의 성분을 살펴보고 보다 효율적으로 부탄올로 전환 시킬 수 있는 균주를 설계한다. 균주설계에 있어서 우선적으로 target당을 선정하고 그 당의 대사를 돕는 유전자 또는 요인을 찾아 모체 균주에 적용함으로써 고수율의 균주를 만들어낼 수 있다. 또한 본 연구는 단순한 부탄올 고수율 균주의 개발이 아닌 해조류당을 선별적 대사하는, 즉, 다당체와 다양한 혼합당을 효율적으로 부탄올로 전회하는 consolidated bioprocessing(CBP)을 추구한다. 따라서 target 당과 이에 따른 target 유전자의 선별이 매우 중요하다. 본 연구에서는 당대사를 조절하는 기작의 주된 기구인 PEP- dependent phosphotransferase system(PTS)을 gene deletion/knockout을 통해 혼합당의 비선별적 섭취의 형질을 갖는 변이주를 선별하고자한다. 또한 다시마 내에 다량 존재하는 다당체인 laminaran과 cellulose를 직접 대사할 수 있는 다시 말해 laminaranase와 cellulase를 heterologous하게 expression 할 수 있는 재조합 부탄올 생산균주를 선별하고자한다. 본 실험을 위해서 우선적으로 기질에 관계없이 부탄올을 고수율로 생산할 수 있는 균주를 NiFe hydrogenase(hupL, hypQ3Q4)의 knockout과 deletion을 통하여 선별하였다.

(4) 당화액 내에 존재하는 발효 저해물질의 독성 평가 및 독성물질의 무해화 기술개발

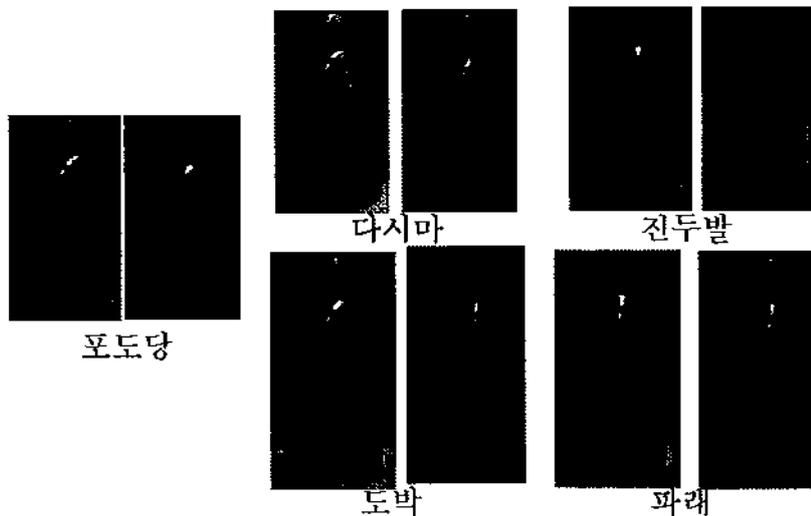
해조류는 종류별 또는 전처리/당화 조건별로 생성되는 발효 저해물질 및 기타 비당화산물에 의한 저해물질들을 정성 또는 정량분석을 통하여 해조류내의 당화액내에 존재하는 저해물질 특성을 파악하고 목질계의 그것과 비교분석 한다. 특히, 유기산, furans, furfural, phenolics 등과 같은 대표적 저해물질의 성분별, 다성분 혼합 존재 조건별 발효저해 특성을 small scale발효 및 발효산물의 분석(GC)를 통하여 평가한다. 발효 가능한 당성분의 손실 없이 발효 저해물질을 친환경적인 방법으로 제거할 수 있는 저해물질 제거 방안을 문헌을 조사하여 도출한다.

3. 연구수행 결과

가. 해조류를 기질로 이용하여 부탄올의 생산 가능성 조사(그림 4-2-1)

처리 및 당화공정을 거치지 않고 해조류의 수용액을 직접 배지로 사용하여

부탄올 생산균주가 성장할 수 있는지 조사하였다. 이 실험에서는 다시마, 도박, 진두발, 파래가 사용되었고 포도당이 기준배지로서 비교균으로 사용되었다. 그림 4-2-1에서 보여지는 것처럼 각각의 해조류 수용액에서 P2 solution이 첨가 되었을 때 포도당에서처럼 부탄올 생산균주가 gas(표면에 존재하는 거품)를 생산하며 성장할 수 있음을 알 수 있었다. 갈조류인 다시마, 녹조류인 파래, 홍조류인 진두발과 도박으로 이루어진 배지 중 균주의 생장은 도박과 다시마가 가장 많은 gas를 생산하면서 좋은 성장을 보였으나 포도당에 비하여 아직 많은 개선이 이루어져야하는 배지임을 알 수 있었다. 따라서 해조류 수용액의 당화 공정이 필수적으로 필요하다는 것을 알 수 있었다. 또한 당화 이외에 CBP의 옵션도 고려해 볼 수 있었다. 한 가지 주목할 만한 것은 다시마의 끈적이는 성분을 물로 씻어낸 수용액을 발효한 결과 상당량의 부탄올과 미생물의 성장이 관찰되었다. 이후 당분석 결과 또한 전처리와 당화공정을 통해 생산된 당화액의 발효성능에 비해 월등히 좋은 것으로 관찰되어 다시마에는 여러 가지 발효성 당이 존재하며 당수율을 높이기 위한 연구가 보다 시급하다고 사료된다.



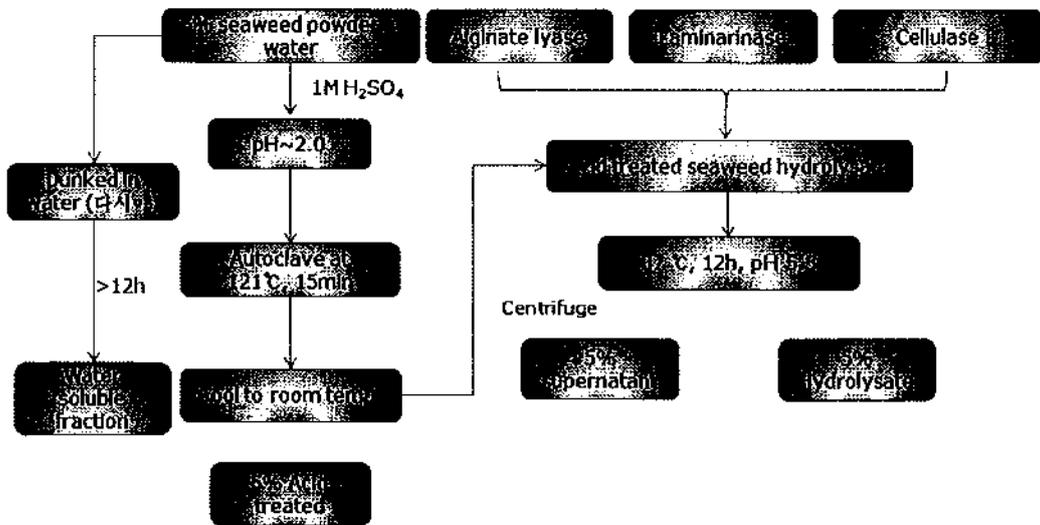
[그림 4-2-1] 해조류 수용액의 부탄올 발효

나. 해조류의 전처리 당화액을 이용한 알코올(에탄올/부탄올) 발효 시 고려되어야 할 당화액 내 발효성 당과 비발효성 당의 알코올 발효 특성을 평가/분석

(1) 당화공정의 최적화(그림 4-2-2)

해조류의 직접적인 발효를 연구함과 동시에 해조류의 당화액을 이용한 부탄올 생산의 가능성도 본 연구를 통해 확인하여 보았다. 해조류의 당화공정은 산/염

기/효소 등을 단일하게 또는 복합적으로 이용하여 발효한 후 최적화가 이루어졌으며, 최적의 당화액은 약산의 처리 후 각태일 효소를 처리하는 공정으로 약 2-7g/L의 환원당이 생산되었다. 대부분의 환원당들은 발효성당으로 부탄을 생산균주인 Clostridium에 의해 부탄올로 전환될 가능성이 높다.



[그림4-2-2] 해조류 당화액제조 공정 및 다양한 당화액의 생산

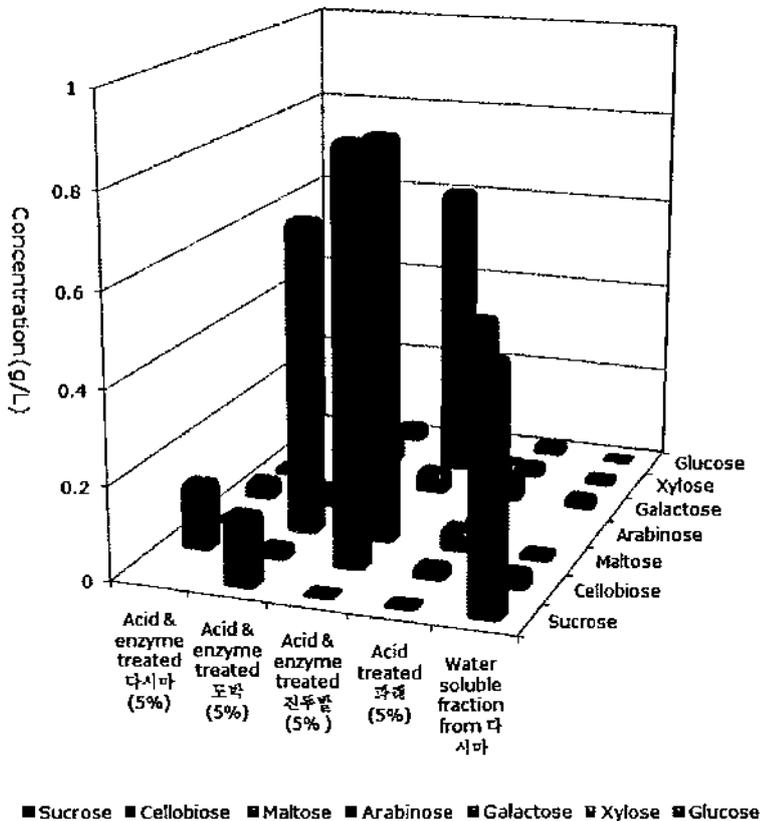
(2) 당성분분석(그림 4-2-3)

당화액의 당성분 분석은 주로 HPLC에 의해 이루어졌는데, glucose, galactose, xylose, arabinose, sucrose, cellobiose와 maltose 등의 발효성당을 중심으로 정량 및 정성 분석되었다. 당화액속에 이당류 등이 상당량 함유되어 있는 것으로 보아 분석되지 않은 다당체들이 존재할 것으로 생각된다. 따라서 본 연구에서 제조된 당화액에서 부탄올 발효는 제한된 당의 전환에 의한 것으로 보다 정성적 실험에 가깝다고 사료된다.

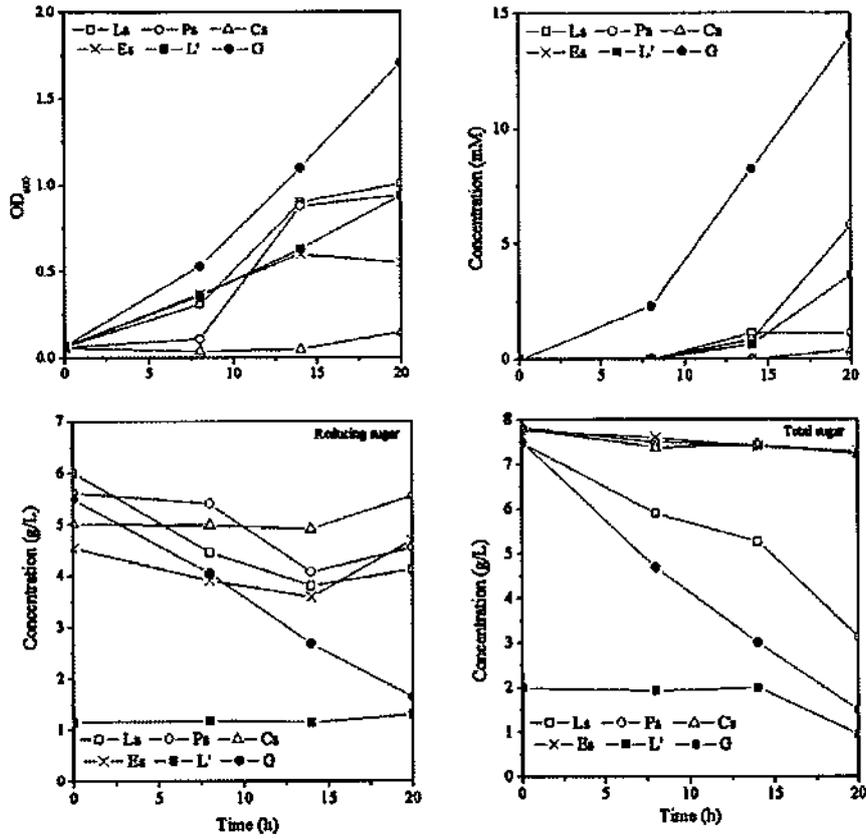
(3) 당화액에서의 부탄올 생산(그림 4-2-4)

무처리 해조류배지에 비하여 당화공정을 거쳐 생산된 해조류 당화액은 당 생산성과 부탄올의 생산성에서는 보다 향상되어짐을 보였으나, 절대적으로 그 당 함량 (total 2g/L~ 7g/L)이 적어 발효를 최적화하기에는 아직 어려움이 있었다. 또한 해조류 당화액내에 존재하여 소비된 당들은 최적 기질인 포도당에 비해 당 소비율도 떨어지고 부탄올로의 전환보다는 주로 부틸산 쪽으로 전환이 이루어짐이 관찰되어 부탄올 생산균주의 전이기작에 작용하는 저해물질 또는 요인들이 존재하는 것으로 보여 진다. 그러나 부틸산의 생산은 미생물의 성장을 의미하며, 해조류 당화액

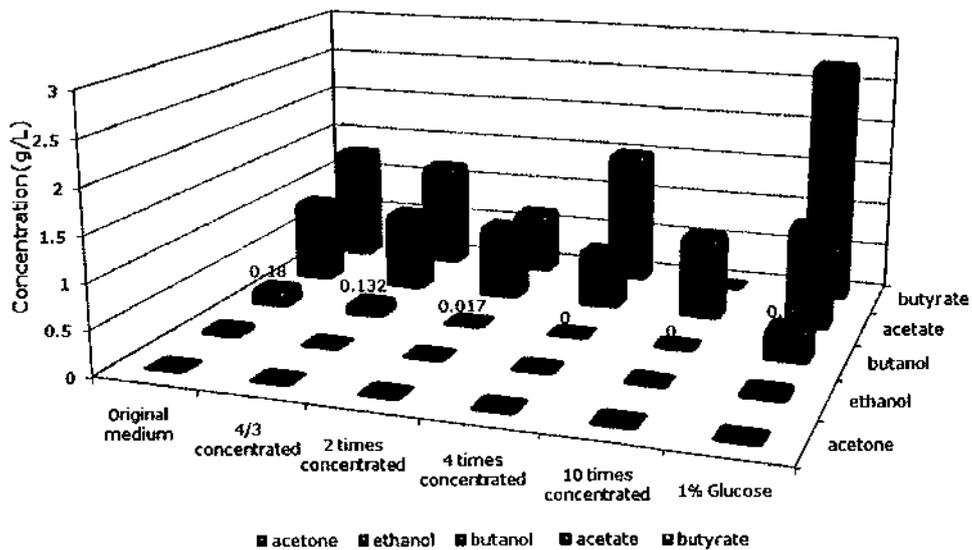
의 기질로서의 잠재성을 보여준다. 당화액별 균주생장과 발효산물 생산을 살펴보면 (그림 4-2-4), 포도당을 기준으로 비교해 볼때, 다시마의 세척 수용액(L'), 다시마 당화액(L)이 도박(Es)이나 진두발(Ps), 파래(Cs)등의 당화액에 비해 우수한 기질로서의 잠재력을 보여주었는데, 주목할 만한 점은 본 연구에서 제조된 각각의 해조류 당화액의 당 성분들이 총량대비 발효성당의 양이 서로 다를 수 있음을 알 수 있었고, 다시마세척 수용액의 경우, 총 당량과 발효성당으로 여겨지는 환원당의 양이 적었음에도 불구하고 미생물생장 및 발효산물의 생산성은 상대적으로 당 함량이 높은 다른 해조류의 당화액보다 우수한 것으로 관찰되었다(그림 4-2-5). 이것은 다시마세척 수용액 내에 다당체라 할지라도 부탄올 균주가 선호하는 당이 존재하는 것으로 여겨진다. 또한 당량을 증가시키기 위해 본액을 다양한 농도(1-10배)로 농축시켜 발효해본 결과 4배가량의 농축액에서도 균주생장이 우수하게 이루어지는 것으로 보아 발효저해제 또는 저해 요인 등의 영향이 많지 않았음을 알 수 있었다. 따라서 이 결과는 해조류, 특히 다시마를 전처리나 당화를 거치지 않고 직접적으로 부탄올로 전환시키는 CBP를 위한 발효당을 target 하는데 도움을 줄 뿐만 아니라 해조류를 부탄올로 전환시키는 CBP의 잠재성을 보여주었다.



[그림4-2-3] 다양한 해조류 당화액의 구성 당성분



[그림 4-2-4] 다양한 헤조류의 발효 프로파일
 (Ls, 다시마; Ps,진두발; Cs,파래; Es,도박; L',다시마세척수용액; G,포도당)



[그림 4-2-5] 다시마 세척 수용액의 다양한 농축액의 발효산물

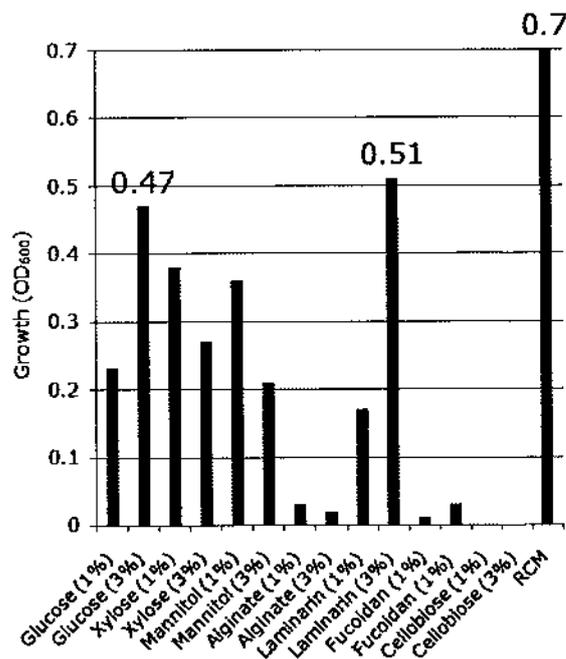
다. 당화액에 존재하는 주된 당분 및 복합당 성분을 동시에 이용하여 알코올 발효를 할 수 있는 미생물 설계 기술 개발

(1) 다양한 당의 발효성능

문헌상으로 조사된 해조류의 구성성분은 다음의 표 4-2-1과 같다. 따라서 알려져 있는 다당체 성분과 각각의 당화액 구성당들을 개별적으로 발효성능 테스트를 수행하였다(그림 4-2-6). 다시마의 주성분인 alginate, laminaran, cellobiose, fucoidan, mannitol, xylose, glucose 등이 96 well plate (200 μ l culture)에서 주로 미생물 생장이 실험되었는데 그 결과 단당류인 glucose, xylose, mannitol은 이미 잘 알려져 있는 기질로서 좋은 기질로서 판명 되었으며, 다당체들 중에서는 glucose polymer인 laminaran이 상당히 우수한 기질로서 밝혀졌다. 하지만 다시마에서 가장 많은 부분을 차지하는 alginate는 비발효성 당으로 판명되었으며, cellobiose 역시 실험상에서는 문헌상과 다르게 발효가 잘 되지 않았음을 알 수 있었다.

[표 4-2-1] 다양한 해조류의 구성당 성분

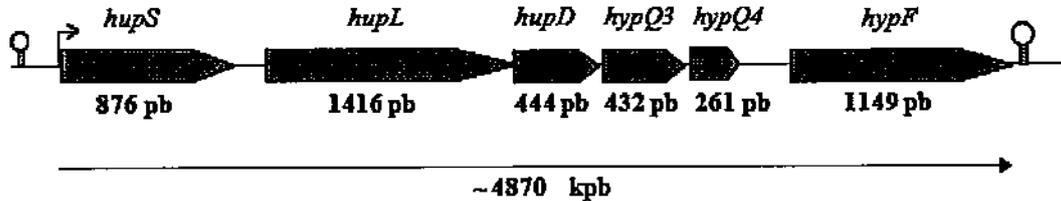
Macroalgae	Composition
다시마1	Laminarin, alginate, mannitol, cellulose, etc.
도락2	Galactose, 3,6-anhydrogalactose, sulfate residue, xylose, glucose, etc.
파래3	Heteroglycuronan, xyloglucan sulfate, glucuronan, cellulose, etc.
진두발4	Carrageenan



[그림 4-2-6] 해조류의 구성하는 당류의 개별적 발효성능 분석

(2) 부탄올 생산균주의 개발

위에서 얻은 정보를 바탕으로 해조류를 효율적으로 부탄올로 전환할 수 있는 *C. acetobutylicum*을 모체로 하는 재조합 균주의 설계 및 선별을 시작하였다. 당의 유래와 상관없이 부탄올의 생산성을 높이기 위해 hydrogenases중의 하나인 NiFe-hydrogenase genes(*hupL*, *hypQ3Q4*, 그림 4-2-7)을 deletion 및 knockout한 결과 *hypQ3Q4* deletion 변이주에서는 특이한 형질 변화가 보이지 않았으나, *hupL* 변이주를 관찰해 볼 때, 부탄올의 수율은 10% 정도 증가하였으며, 수소와 유기산의 생산은 각각 10%, 30% 정도 감소되었으며, 성장 속도 및 생장률이 모균주에 비해 1.5배 가량 증가됨을 볼 수 있었다. 다시마의 주요 당성분인 다당체 laminaran을 targeting하여 직접발효를 할 수 있는 형질을 지닌 균주를 개발하기 위해 laminaran을 glucose로 분해할 수 있는 효소(extracellular enzyme)를 다른 균주에서 찾아내서 heterologous한 expression을 부탄올 생산균주에서 하고자 분자유전학적 tool을 이용하여, gene cloning과 overexpression의 실험을 진행하고 있다. 한편 혼합당을 비선별적으로 이용하는 균주의 특성을 부여하는 유전자 혹은 인자를 선별하기 위해 PTS의 주요 gene들을 targeting하고 deletion 및 knockout을 수행중이다.



[그림 4-2-7] NiFe-hydrogenase operon의 구조

라. 당화액 내에 존재하는 발효 저해물질의 독성 평가 및 독성물질의 무해화 기술 개발

당화액의 제조 및 최적 당화액 조성이 최종적으로 연구가 되어져야만 가능한 연구로서 당해연도의 목표로 설정은 되었으나 보다 장기적인 연구가 될 것으로 사료된다. 그러나 우선적으로 현재까지 개발된 다양한 당화액과 농축액들의 발효성능을 테스트한 결과 목질계당화액과 비교해 볼때 저해 물질의 종류와 그 정도도 다른 것으로 보여지며, 그 이유 중 하나는 당화액의 낮은 당수율과 lignin의 부재로 사료 된다.

4. 요약 및 제언

다시마 등의 해조류는 전처리와 당화를 거치지 않고도 부탄올 생산을 위한 원료로서 제한적으로 사용될 수 있는데 낮은 수율 또는 당의 효율적 전환을 극복하기 위해서는 새로운 형질의 맞춤형 부탄올 균주개발을 통해 가능하다. 해조류 당화액의 제조와 기질로서의 사용은 부탄올생산에 있어서 보다 많은 양의 단당류의 공급으로 전환율의 개선을 도울 수 있으며, 보다 효율적인 당의 이용을 가능하게 하는 공정으로서 앞으로 그 최적화를 위한 많은 연구가 필요할 것으로 사료된다. 해조류의 당화액 제조시 산과 효소를 모두 사용했을 때 가장 높은 환원당 함량을 보였으며, 다시마 도박 진두발 파래 등의 네 가지 해조류 중 다시마당화액에서 가장 높은 부탄올 생산성과 미생물 성장을 관찰할 수 있었다. 당화액의 성분은 전처리와 당화공정에 따라 그 성분과 조성이 매우 다르게 변하는 것을 알 수 있었고 이는 미생물의 성장과 부탄올 생산성에 크게 영향을 미치는 것으로 사료 된다. 해조류의 조성과 그 당화액의 조성을 분석해 볼때, 구성당의 성분은 목질계 당화액과는 현저한 차이를 보였으나 저해제 및 발효저해요인들은 상대적으로 낮을 것으로 사료된다. 또한 구성당들의 종류가 cellulose가 주인 목질계에 비해 좀더 다양하여 존재하는 모든 당을 남김없이 부탄올로 전화하는 것은 또 다른 걸림돌로 예상되며 이를 해결하기 위해 새로운 당의 비선택적 섭취가 가능한 부탄올 균주의 개발이 필요하다. 해조류로부터 고수율의 부탄올을 생산하는 재조합 균주의 개발을 위하여 필요한 다양한 분자유전학적 도구와 재료들이 해외의 여러 연구그룹들로부터 지원받아 확보되어 있으며, (1) 고수율 부탄올 균주, (2) 다당체를 직접 분해하여 부탄올로 전환이 가능한 균주 (3) 당의 비선택적 섭취가 가능하여 혼합당의 이용이 용이한 균주를 우선적으로 개발하기 위한 유전자들의 targeting/ cloning 등이 수행되었다. 당화액내 저해물질 제거 및 무해화 기술의 개발은 당화공정의 최적화가 된 후에 이루어지는 것이 순차적 연구진행으로 사료된다.

제 3 절 해조류 혐기성 소화

1. 연구 목적 및 내용

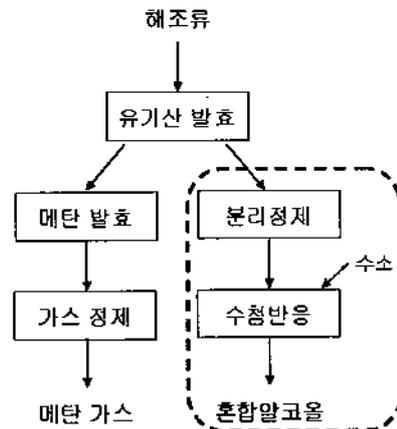
가. 연구 목적

해조류로부터 에너지를 얻기 위하여 적용가능한 플랫폼기술 중 혐기성 소화를 통하여 바이오가스를 생산하거나 혹은 유기산 생성 후 이를 화학적 방법에 의하여 혼합 알코올로 전환하는 방법의 가능성과 해결해야할 문제점들을 도출하고자 한다.

나. 연구 내용

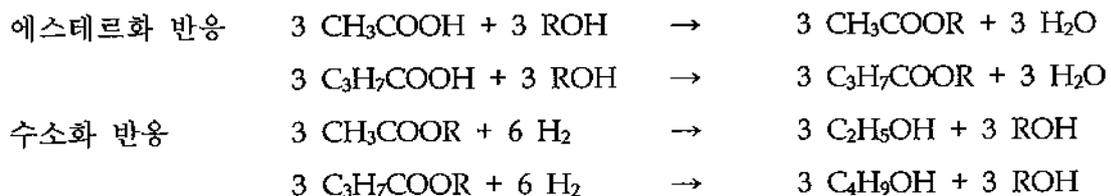
혐기성 소화(혹은 VFA; volatile fatty acid) 플랫폼은 혐기성 혼합배양에 의하여 바이오매스를 일단 유기산 혼합물로 분해한 후 이것을 필요에 따라 메탄, 수소 등 가스 상태의 연료로 전환시켜 회수하거나 수소첨가반응을 통하여 알코올혼합물 형태의 액체연료로 전환하는 방법이다. 이 때 생산되는 유기산은 초산(C2), 프로피온산(C3), 부티르산(C4) 등으로 구성되며 이들은 수소첨가반응을 통하여 각각 에탄올, 프로판올, 부탄올로 변환된다. 혐기성 혼합 배양시 메탄가스의 발생은 배양액 중에 메탄발효 저해성분을 추가하거나 반응조건을 조정함으로써 억제할 수 있다. 미국의 Texas A&M 대학교에서 개발한 MixAlco 기술은 혐기성 소화 플랫폼(혹은 VFA 플랫폼)을 이용하여 목재로부터 혼합 알코올을 생산하는 대표적인 기술로서 현재 최종 실증연구단계에 와 있다. 이 기술의 핵심적인 내용은 목재 등 바이오매스의 혐기성 소화 처리시 메탄발효를 억제하는 저해제를 투입하거나 운전조건을 도입함으로써 바이오매스에 포함된 모든 유기물질들을 일단 acetic acid, propionic acid, butyric acid 등 유기산으로 전환시킨 후 이 유기산들을 화학적인 수첨(hydrogenation) 반응을 통하여 혼합 알코올로 변환시키는 방법이다. 이들은 이 방법을 통하여 일반적인 당화플랫폼보다 1.5배 높은 수율인 바이오매스 톤당 120 gal의 혼합알코올을 얻을 수 있었다고 보고하고 있다. 본 연구팀에서는 상기 두 기술을 융합하여 해양바이오매스를 원료를 혐기성 소화를 통하여 유기산을 생성시킨 후 이를 이용하여 혼합알코올을 생성하는 공정을 개발하고자 한다(그림 4-3-1). 이 기술은 기존의 당화플랫폼에 비해서는 1) 원료(해조류의 종류)에 대한 제한이 없거나 낮고, 2) 특정 효소를 개발할 필요가 없으며, 3) 단백질, 지방 등 탄수화물 이외의 유기성분들도 원료로 이용될 수 있다는 장점이 있다. 또한 메탄가스 생성에 비해서도 1) 산발효(체류시간 2~3일)는 메탄발효(체류시간 15~25일)보다 반응속도가

5~6배 빠르므로 생산성이 높고, 2)메탄발효 단계에서 CO₂로 손실되는 carbon을 회수함으로써 높은 수율이 기대되며, 3) 궁극적으로 에너지 기준으로는 2.1 배, 가격 기준으로 메탄가스 대비 3.5배의 높은 부가가치를 가진다.



[그림 4-3-1] 개발기술 개요도

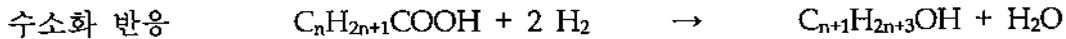
유기산으로부터 혼합 알코올을 제조하기 위하여 수소화기술이 적합한데, 이는 카르복실산이 가지는 2개의 산소 중 하나를 환원시키기 때문이다. 이와 같은 반응을 위하여 기존의 수소화기술에 대하여 조사하면 크게 2가지 2가류할 수 있다. 하나는 에스테르화 반응과 수소화 반응을 접목시킨 2단계 반응이고, 다른 하나는 유기산을 직접 알코올로 전환하는 1단계 반응이다. 2단계 반응을 구체적으로 보면, 다음과 같이 유기산과 알코올을 반응시키는 에스테르화 반응과 생성된 에스테르를 수소화시키는 반응이다.



이들 반응을 위하여 아세트산과 부티르산을 모델 화합물로 사용하였다. 이에 에탄올과 부탄올을 ROH로 활용하여 에스테르화 반응을 진행하고 생성된 에스테르를 수소화 반응으로 알코올로 전환하였다. 이때 1 분자의 알코올(에탄올 또는 부탄올)이 공급되는 경우 2 분자의 알코올이 생성되게 된다. 즉, 1 분자의 알코올은 에스테르화 반응의 반응물로 다시 공급되게 되어 결국 1 분자의 알코올이 생성되게 되는 원리이다. 본 연구에서는 아세트산과 부티르산을 산촉매 하에서 알코올과 반

용시켜 에스테르로 전환한 후 수소화 반응시켜 알코올을 제조하는 가능성을 알아보
고자 하였다.

한편 유기산을 직접 알코올로 전환하는 반응실험을 수행하였다. 이는 앞서
언급하였던 2단계 반응의 촉매 활성과 비교함이 목적이다. 반응식은 다음과 같다.



하지만 이 반응의 경우 생성된 물에 의하여 다시 에스테르화 반응 및 에스
테르의 수소화 반응이 수반될 것으로 예측된다. 이에 본 반응의 알코올 선택도를
조절하는데 물의 분압이 매우 중요한 역할을 수행할 것으로 보인다. 이에 본 연구
에서는 유기산의 직접 수소화 반응에 있어서 촉매의 활성과 연계 가능성을 타진하
고자 하였다.

2. 연구 방법

가. 실험장치 및 재료

(1) 해조류 바이오매스의 혐기성 소화 실험

본 실험에 사용된 실험장치는 flask 배양에 필요한 shaker 플라스크와 배지
의 준비 및 살균에 필요한 autoclave, 연속배양에 이용된 2 L bioreactor 등이다. 생
성된 유기산의 분석은 HPLC를 이용하였다(그림 4-3-2). 배양에 이용된 다시마 등
해조류 들은 완도로부터 얻었다. 초기실험에는 생다시마를 이용하였으나 생다시마
는 장기보관이 힘들어 분말다시마를 물에 녹여 사용하였다. 분말다시마는 탈염을
거친 것과 그렇지 않은 주 종류가 있었는데 플라스크 실험 결과 둘 사이에 차이가
없어서 탈염을 하지 않은 샘플을 주로 이용하였다. 해조류의 혐기성 소화에 사용된
seed는 부근에 있는 성남 하수처리장의 혐기성소화조 슬러지와 아산종말처리장 혐
기성소화조 공정의 산발효조에서 획득한 sludge를 이용하였다. 그 외의 시약들은
대부분 Sigma-Aldrich에서 시약급을 구입하여 사용하였다.



[그림 4-3-2] 실험에 이용된 2 L bioreactor 및 HPLC의 사진

(2) 유기산의 에스테르화 반응실험을 위한 촉매 준비

유기산과 알코올의 에스테르화 반응을 위하여 다양한 촉매가 도입되었으며, 그 결과 양이온 교환수지가 가장 우수한 활성을 보였다. 본 연구에서 사용된 촉매는 DOW에서 제조한 Dowex 50W가 주로 사용되었으며 이 촉매는 Sigma-Aldrich사에서 구매하였다. 실험에 사용되기 전에 촉매는 진공 오븐에서 70 °C의 온도에서 48시간 동안 건조하였는데, 이는 70 °C 보다 높은 온도에서 건조하는 경우 촉매의 슬럼프가 손실되기 때문이다. 사용한 촉매의 주요 특성은 다음과 같다.

[표 4-3-1] 양이온 교환수지의 주요 물성

Polymer type	Gel type	Total exchange capacity	1.7 meq/mL
Matrix type	Styrene-divinylbenzene (DVB)	Crosslinking	8% DVB
Functional group	SO ₃ ⁻ H ⁺	Moisture content	54% mass
Ionic form	H ⁺	Particle size	0.04-0.07 mm

(3) 에스테르 및 유기산의 수소화 반응을 위한 촉매 제조

구리함유 촉매는 공침법에 의하여 제조되었다. 제조에 사용된 금속전구체는 모두 질산염을 이용하였다. 먼저 Cu(NO₃)₂ 및 Zn(NO₃)₂ 수용액을 1000 mL 등근 플

라스크에 교반하면서 온도를 상승시킨다. 혼합액의 온도가 65 °C에서 침전제인 NaHCO₃(pH=8.2) 수용액을 40분 동안 방울 형태로 주입하였다. 합성된 침전액은 65 °C에서 30분 동안 교반하고 이후 1시간 동안 교반없이 숙성시킨다. 숙성된 물질은 따뜻한 물을 이용하여 5회 이상 세척 및 여과하면서 Na 이온을 제거하고자 하였다. 이후 120 °C의 오븐에서 24시간 동안 건조하고 최종적으로 공기 분위기에서 350 °C 소성로에서 소성하였다.

나. 실험 절차

(1) 해조류 바이오매스의 혐기성 소화 실험

해조류의 Flask 배양을 위해서는 먼저 표 4-3-2와 같은 조성을 가진 mineral solution을 준비한다. 증류수에 분말 다시마를 10 g/L의 농도로 분산시킨 후 상기 mineral solution을 지정한 농도가 되도록 가한다. 이 용액 90 mL을 250 mL flask에 넣은 후 질소가스를 약 10분간 purge시켜 용액 중의 산소를 제거한다. 여기에 seed 10 mL을 가한 후 입구를 고무마개로 밀봉하고 35 °C로 맞춘 shaking incubator에서 150 rpm의 속도로 shaking을 하면서 배양을 실시한다. Seed는 장기 배양실험에 사용되는 bioreactor로부터 매일 빼내주는 배양액을 10분간 자연 침전시킨 후 상등액을 취하여 사용한다.

[표 4-3-2] 본실험에 사용된 mineral solution의 조성

Component	Concentration(g/L)
NH ₄ HCO ₃	2
KH ₂ PO ₄	1
MgSO ₄ ·7H ₂ O	0.1
NaCl	0.01
Na ₂ Mo ₄ ·2H ₂ O	0.01
CaCl ₂	0.01
MnSO ₄ ·5H ₂ O	0.0131
FeCl ₂	0.0044
2-bromoethane sulfonic acid	0.01
pH	6.9~7.0

장기배양실험은 2 L bioreactor를 이용하여 실시하였다. 먼저 증류수에 20 g/L 농도의 분말다시마를 골고루 분산시킨 후 mineral solution을 가하여 최종부피를 900 mL을 만든다. 이 용액을 bioreactor에 넣은 후 10분간 질소가스를 purge시

킴으로써 용액 중의 산소를 제거한다. 여기에 종말처리장 혐기성 소화조 슬러지를 10분간 자연침전시킨 후 얻은 상등액 100 mL을 seed로 가한다. Bioreactor의 온도는 35°C, 교반속도는 300 rpm으로 조정하고 pH는 1 N NaOH 용액을 이용하여 6.5로 control하면서 매일 sampling하여 VFA 농도를 측정한다. 5일간 배양 후 bioreactor로부터 배양액 200 mL 제거한 후 상기와 동일한 조성을 가지는 feed액 200 mL을 가한다. 제거한 배양액은 일부를 취하여 VFA 분석을 하고 나머지 일부는 flask실험에서의 seed로 사용한다.

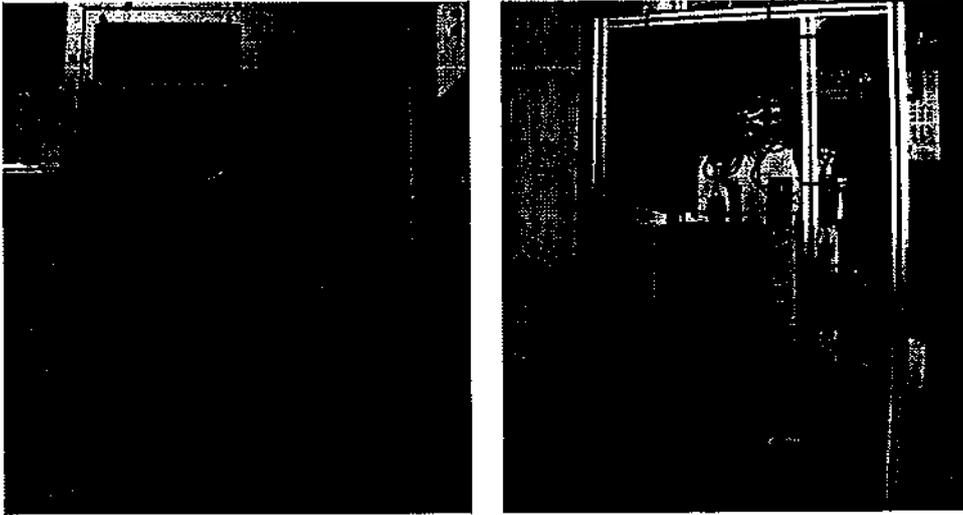
VFA분석은 HPLC를 이용하여 실시한다. 본 실험에 사용된 HPLC는 Shimatsu class VP 모델로서 column으로는 BIORAD HPX-87H, mobile phase는 H₂SO₄(0.008N, 0.6ml/min)를 사용하였다.

(2) 유기산의 에스테르화 반응실험 절차

사용된 장치는 1000 mL의 3구 플라스크이며, 반응 혼합물은 magnetic stirrer로 교반되었으며 mantle에 연결된 PID 온도조절기에 의하여 온도가 제어되었다. 먼저, 반응물인 유기산과 알코올을 반응기에 혼합하고 교반하면서 정해진 온도까지 상승시킨다. 이 때 일정 양의 촉매를 주입하여 에스테르화 반응을 개시한다. 반응 중 일정한 시간 간격을 두고 0.5 mL의 시료를 주사기로 채취하여 기체크로마토그래피(영린, Acme 6000)로 분석하였다. 이때의 검출기는 FID이며, HP-INNOWAX(30 m, 0.530 mm, 1.00 µm) 컬럼을 통하여 정량 분석을 수행하였다.

(3) 에스테르 및 유기산의 수소화 반응실험 절차

에스테르화 반응에 의하여 생성된 에스테르의 촉매 전환을 위한 반응장치를 그림 4-3-3에 나타내었다. 촉매는 외경 9 mm 및 길이 445 mm의 SUS 반응기에 지지체인 유리솜 위에 충전하였고, 촉매의 양은 0.5 g으로 고정하였다. 촉매는 300 °C에서 1 시간 동안 20% 수소를 이용하여 환원시킨 후 반응에 도입하였다. 반응 액체는 CEM(Controlled Evaporator and Mixer)를 이용하여 촉매층에 주입하였으며 생성된 물질 및 미반응 반응물들은 반응기 하단의 응축기에서 포집 및 액화하여 채취되었다. 반응기에 도입되는 반응물은 에스테르 또는 유기산이며 이들의 유속은 3.1 g/h이다. 반응실험은 10 bar의 수소 압력에서 200-300 °C까지 25 °C의 온도구간을 두고 수행하였다. 반응 후의 생성물은 기체크로마토그래피(영린, Acme 6000)로 분석하였다. 이때의 검출기는 FID이며, HP-INNOWAX(30 m, 0.530 mm, 1.00 µm) 컬럼을 통하여 정량 분석을 수행하였다.



[그림 4-3-3] 유기산 및 에스테르의 수소화반응 장치도

3. 연구수행 결과

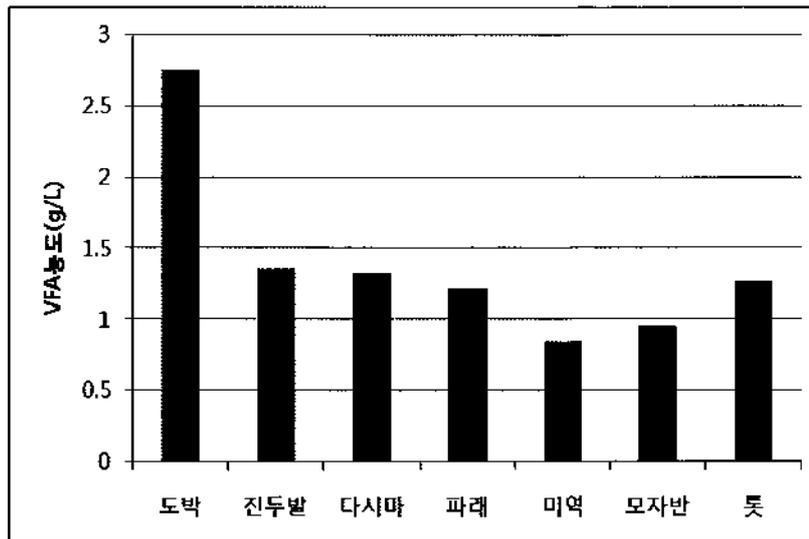
가. 해조류 바이오매스의 혐기성 소화 실험

(1) 해조류에 대한 혐기성 소화 최적조건

해조류에 대한 혐기성 소화에서의 여러 가지 parameter의 최적화 연구 결과 최적조건은 다음과 같은 결과를 얻었다.

- Seed: 아산종말처리장 혐기성 소화조 산반응기 sludge
- 온도: 35 °C
- pH: 6.5~7.0
- 체류시간: 3~5일
- 영양배지조건: Yeast extract 혹은 앞 페이지의 mineral solution 첨가
- Methane inhibitor: 2-bromoethane sulfonic acid 10 mg/L
- 약한 교반 필요(해조류 침전 방지 목적)
- 전처리: grinding
- 탈염: 필요없음

(2) 해조류 종류별 VFA 생산성



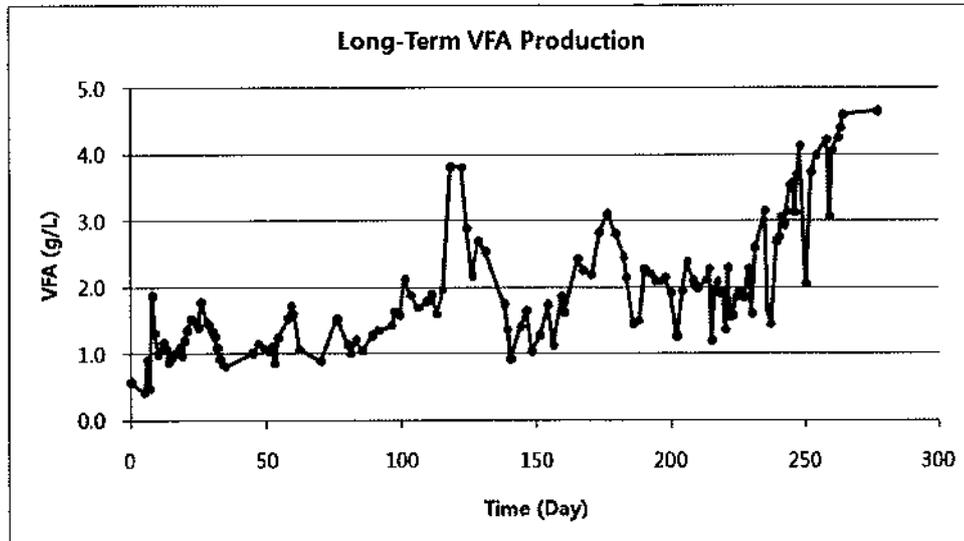
[그림 4-3-4] Flask Test 에서의 해조류 종류별 VFA 생산성
다시마 농도=10 g/L, 배양시간=5 일

Flask 배양에 의한 해조류 종류별 VFA 생산성을 비교해 본 결과는 그림 4-3-4와 같다. 갈조류에 속하는 다시마(*Laminaria japonicus*), 미역(*Undaria pinnatifida*), 모자반(*Sargassum fulvellum*), 툇(*Hizikia fusiformis*)과 녹조류에 속하는 파래(*Ulva pertusa*)와 홍조류에 속하는 진두발(*Chondrus ocellatus*)은 0.8-1.3 g/L의 상대적으로 낮은 생산성을 나타내었다. 그러나 갈조류와 녹조류는 빠른 성장속도를 나타내고 성체의 크기가 크기 때문에 바이오매스 자원으로서 장점을 가지므로 적절한 종의 선정이 필요하다. 이에 반하여 홍조류에 속하는 도박(*Pachymeniopsis elliptica*)은 2.75 g/L로 다른 종에 비하여 2배 정도 높은 VFA 생산성을 나타내었다. 그러나 도박은 우뚝가사리와 마찬가지로 성장속도가 느리며 국내의 연안환경에서는 양식이 어렵다는 단점을 가지고 있다.

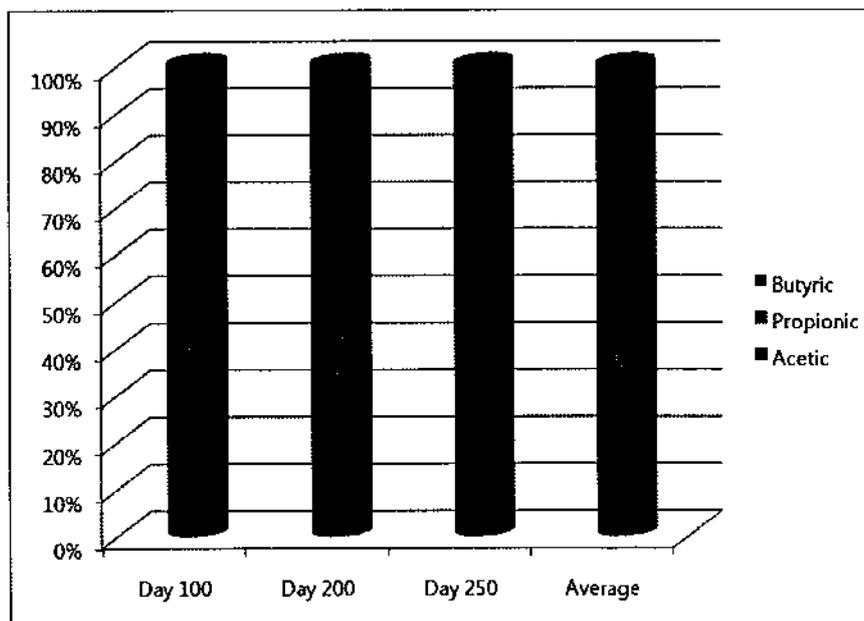
(3) 장기운전시험

1L 바이오리액터에서 장기간의 배양실험 결과는 다음과 같다. Flask 배양에 의한 해조류 종류별 VFA 생산성을 비교해 본 결과는 그림 4-3-5와 같다. 다시마 분말 20 g/L와 무기염을 녹인 feed액을 매일 일정시간에 bioreactor에 투입하고 그 이전에 동일한 부피를 bioreactor로 주터 제거하는 semi-continuous 방식으로 운전하였다. 체류시간은 3-5일로 유지하였으며, 실험기간 동안에 pH, 온도, 체류시간 등에 약간의 변화를 주면서 278일간의 장기운전실험을 실시하였다. 그 결과 VFA의 농도

는 초기의 1 g/L 부근에서 최종적으로 4.65 g/L까지 점차적으로 증가하는 결과를 얻었다. 실험기간 중 농도에 있어서 상당한 정도의 fluctuation을 나타낸 것은 실험 조건의 변화, 실험오차 외에도 알지 못하는 원인들이 개입되어 나타난 현상으로 보인다. 이러한 현상은 유사한 실험을 한 다른 논문에서도 공통적으로 관찰되는 현상이다.

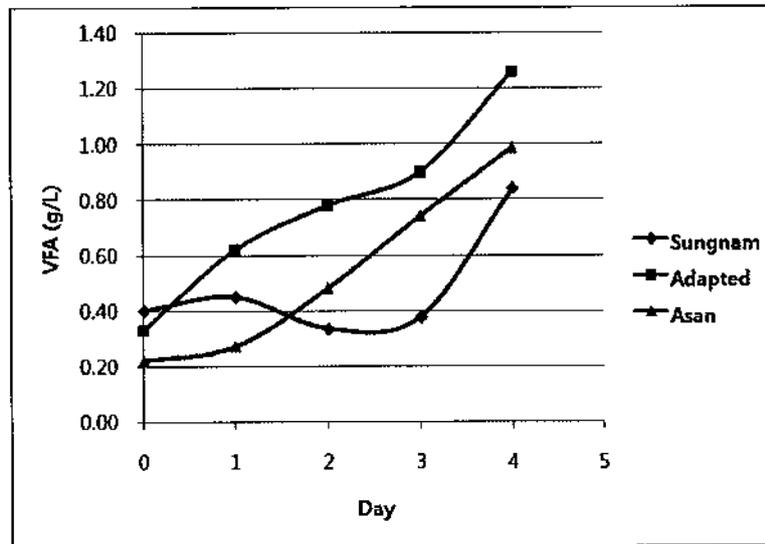


[그림 4-3-5] 장기 반연속식 혐기성 소화에 의한 다시마로부터의 VFA의 생산.
다시마 농도=20 g/L, 체류시간=3~5 일



[그림 4-3-6] 장기배양 기간 중 VFA 조성의 변화 추이

장기운전기간 중 VFA의 조성변화는 그림 4-3-6과 같다. 운전초기에는 acetic acid의 비중이 83%로 높고 butyric acid의 비율이 9%로 낮으나 시간이 갈수록 butyric acid의 함량이 27%까지 증가하고 반면에 acetic acid의 함량은 감소하는 경향을 나타내었다. Butyric acid가 증가하는 것은 이로부터 생산할 수 있는 혼합 알코올의 특성 면에서는 장점이 있으나 수율 면에서는 불리한 것으로 알려져 있다. 장기운전시험에서 VFA의 생산성이 점차적으로 증가하는 것은 당초에 축산폐수에 적응되어 있던 미생물 균총이 점진적으로 해조류 분해에 적응해 나가는 이유와 일부 운전조건이 최적화되어가기 때문인 것으로 분석된다. 이 중 미생물 균총의 adaptation 효과를 알아보기 위하여 동일한 flask 실험조건 하에서 초기 균총(아산 종말처리장 및 성남하수처리장의 혐기성소화 sludge)와 약 6개월 동안 bioreactor에서 적응된 균총의 해조류 분해성을 비교해보았다. 그 결과 초기의 아산이나 성남의 혐기성 소화 sludge보다는 bioreactor에서 장기간 해조류 분해에 적응된 균총의 해조류 분해성이 상대적으로 더 높은 것을 알 수 있었다(그림 4-3-7). 이는 미생물이 해조류 분해에 적응해나가고 있다는 점을 증명한다. 향후 초기균주와 적응기간별 균주의 미생물 균총의 변화와 alginate 분해력의 차이를 측정하여 이 관계를 확실히 입증할 계획이다.

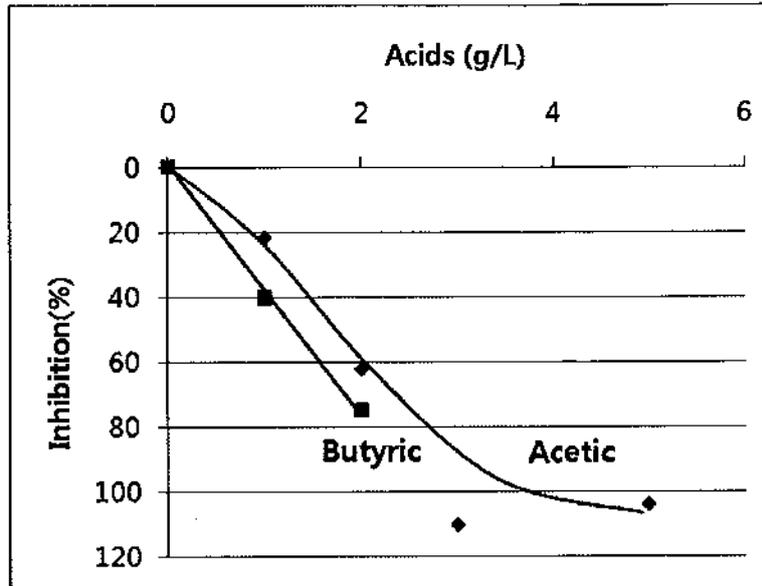


[그림 4-3-7] 미생물 균총의 해조류 분해 적응 결과

(4) 유기산에 의한 혐기성 소화의 저해

Flask에서의 VFA 배양시험 중 기질농도를 10 g/L로부터 20-40 g/L 로 증가시켜도 VFA 생산성은 증가하지 않았다. 그 이유를 규명하기 위하여 배양액에 여

러 농도의 acetic acid와 butyric acid를 미리 첨가한 후 VFA생산성을 비교하는 acid challenge실험을 실시하여 그림 4-3-8과 같은 결과를 얻었다.



[그림 4-3-8] 유기산에 의한 VFA 생산성의 저해효과

위의 결과를 보면 butyric acid나 acetic acid 존재 하에서는 농도 비례적으로 혐기성소화에서의 VFA 생산성이 저해를 받는 것을 알 수 있다. 즉 일단 혐기성소화에 의하여 VFA들이 약 2 g/L이상 축적이 되면 이 product들에 의하여 추가적인 VFA 생산이 심한 저해를 받게 되어 아무리 기질농도를 높여주어도 VFA 생산이 일정농도(flask test에서는 3 g/L, bioreactor test에서는 5 g/L) 이상 올라가지 않는 것으로 추정된다. 이러한 product inhibition을 극복하는 방법으로서 extractive fermentation의 도입을 검토하게 되었으며 이 경우 VFA의 생산성 뿐만을 높일 수 있을 뿐만 아니라 후속 농축공정에 필요한 막대한 증발에너지를 절약할 수 있는 장점도 있어서 전체 process의 경제성을 높이는데 도움이 될 것으로 전망된다.

(5) Extractant의 선정

이상적인 extractant는 다음과 같은 특성을 가져야 한다.

1. Immiscible with the aqueous phase
2. High partition coefficient for the product
3. Non-toxic to the biocatalyst

4. Easy separation of product from extractant
5. Low cost and commercial availability
6. Suppression of emulsion formation
7. Non-flammable
8. Non-toxic to personnel
9. Sterilizable

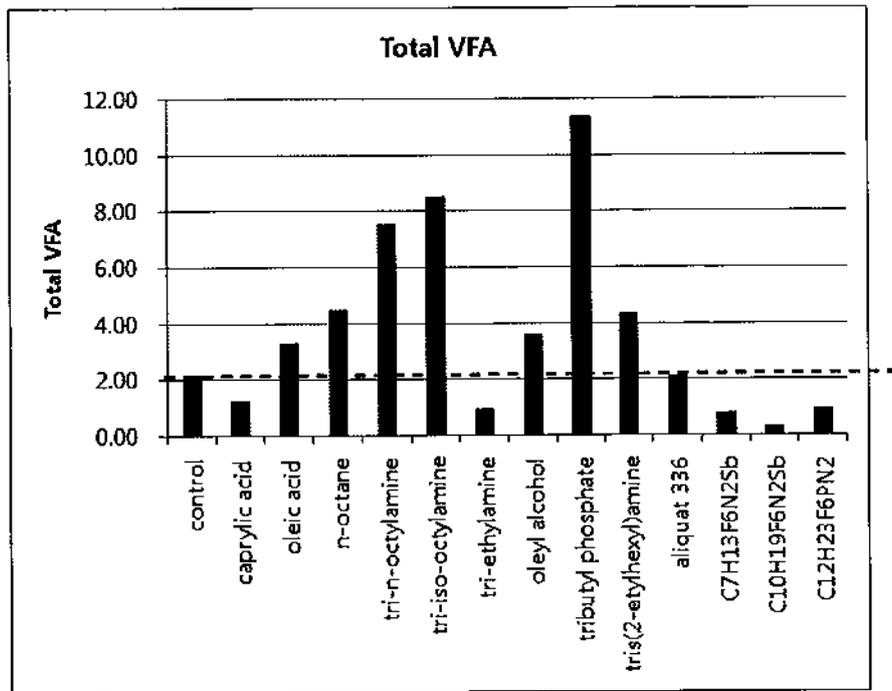
대표적인 extractant의 VFA에 대한 분배계수(distribution coefficient)를 측정하여 표 4-3-3과 같은 결과를 얻었다. 이 중에서 tributyl phosphate, aliquat 336, tri-iso-octylamine, tri-n-octylamine, caprylic acid의 순으로 높은 분배계수를 나타내었다. 모든 extractant 들은 carbon수가 많고 따라서 극성이 높지 않은 VFA에 대하여 더 높은 분배계수를 나타내었다. $C_7H_{13}F_6N_2Sb$, $C_{10}H_{19}F_6N_2Sb$, $C_{12}H_{23}F_6PN_2$ 등의 ionic liquid들은 전반적으로 낮은 분배계수를 나타내었다.

[표 4-33] 대표적인 Extractant들의 VFA에 관한 분배계수

	acetic	propionic	butyric	valeric
caprylic acid	1.11	2.81	5.85	9.31
oleic acid	0.57	1.21	3.28	10.81
n-octane	0.32	0.41	0.72	4.39
tri-n-octylamine	0.81	2.54	5.88	20.78
tri-iso-octylamine	0.88	2.91	8.18	15.76
tri-ethylamine	0.24	0.26	0.27	1.56
oleyl alcohol	0.24	0.87	2.78	5.25
tributyl phosphate	2.75	6.53	28.42	39.87
tris(2-ethylhexyl)amine	0.47	1.21	3.62	9.50
aliquat 336	2.24	6.70	19.92	26.79
$C_7H_{13}F_6N_2Sb$	0.39	0.67	1.24	3.87
$C_{10}H_{19}F_6N_2Sb$	0.60	1.09	2.27	6.23
$C_{12}H_{23}F_6PN_2$	0.21	0.42	1.04	1.69

후보 extractant 들의 혐기성 소화에 대한 독성을 측정된 결과를 그림 4-3-9에 나타내었다. 그 결과 caprylic acid와 tri-ethylamine 및 ionic liquid류들이 상당한 독성을 나타내어 본 system에는 사용하기가 부적절한 것으로 판정되었다. 이상의 판정 결과에 따라 tributyl phosphate, tri-n-octylamine, tri-iso-octylamine을 최종 후보로 선정하였으며 oleyl alcohol은 분배계수는 낮으나 일반적으로 많이 사용하는

extractant 이므로 비교 목적으로 후속평가에 포함시켰다.

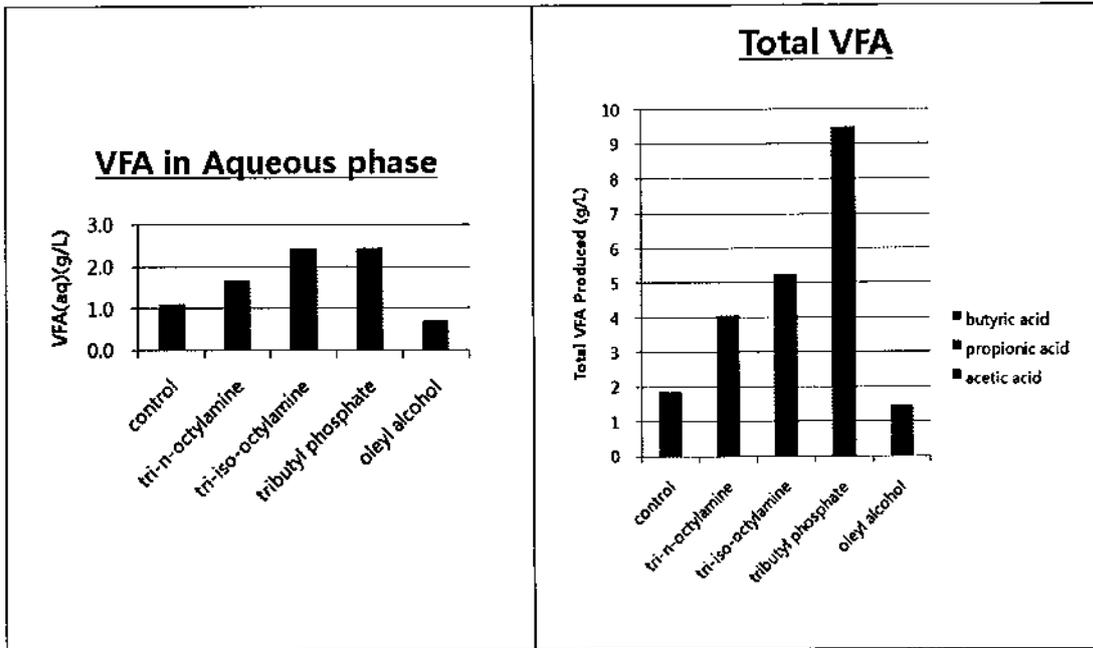


[그림 4-3-9] Extractant 들의 혐기성 소화에 대한 독성

위에서 선정된 extractant를 이용하여 flask에서 extractive fermentation을 실시하였다. Extractant를 배양액과 동일한 부피로 넣고 충분히 교반하면서 3일간 배양을 실시하였다. 그림 4-3-10은 그 결과를 나타낸다. 여기서 total VFA는 aqueous phase와 extractant phase가 평형상태인 것으로 가정하고 다음과 같은 식에 의하여 구한 값이다.

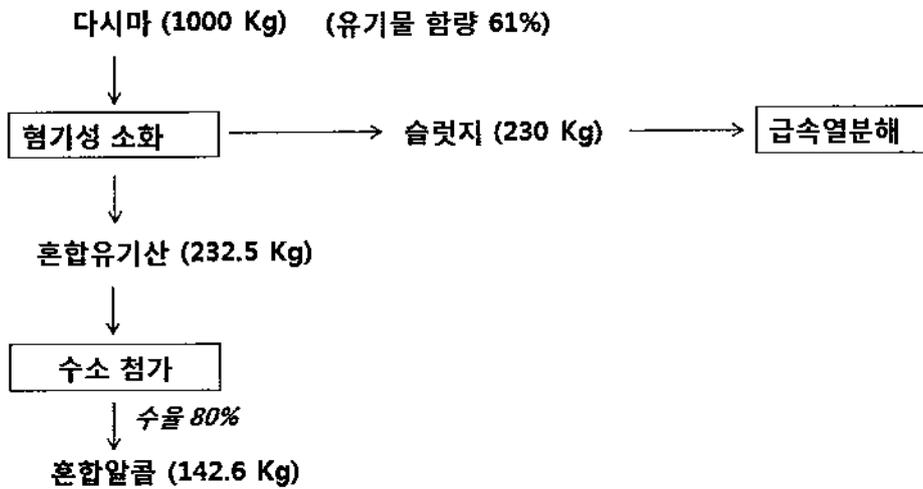
$$\text{Total VFA} = \text{VFA(Aq)} + K_D * \text{VFA(Ext)}$$

이 결과를 보면 oleyl alcohol을 제외한 세 가지 extractant 모두 control에 비하여 2-5배 높은 total VFA농도를 나타내어 이들 extractant를 이용한 extractive fermentation이 VFA 생산성 향상에 효과적임을 알 수 있다. 그러나 추가적인 실험을 통하여 이들 중 tributyl phosphate는 혐기성 소화에 이용되는 미생물에 의하여 분해되어 이 때문에 butyric acid의 농도가 높아지는 것으로 밝혀져 후보군에서 제외하고 최종적으로 tri-n-octylamine과 tri-iso-octylamine을 선정하였다.



[그림 4-3-10] Flask culture 에서의 extractive fermentation 결과
 다시마농도 = 10 g/L, 배양기간 = 3일, V(aq):V(Ext) = 1:1

(6) 정량적 연구성과 요약



[그림 4-3-11] 혐기성 소화 장기운전 결과를 토대로 한 material balance

장기운전에서 획득한 VFA 최종농도 4.65 g/L를 기준으로 material balance 수립시 그림 4-3-11과 같은 결과를 얻었다. 다시마 1000 Kg 이용시 혐기성 소화를 통하여 획득할 수 있는 VFA의 총량은 232.5 Kg 이며 여기에 수소첨가 반응수율

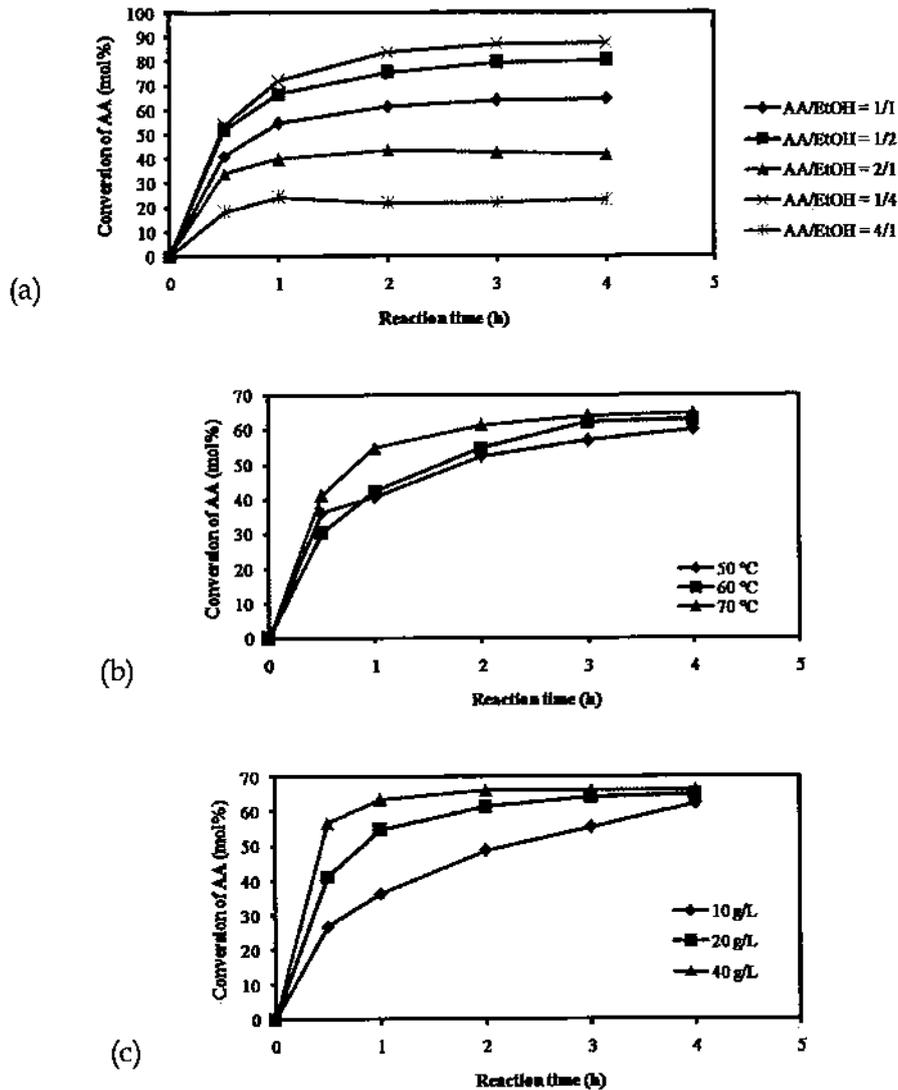
80%를 가정할 때 얻을 수 있는 혼합알코올의 양은 142.6 Kg 이다. 이 양은 부피로는 178.3 L에 해당되며 본 실험에 사용된 다시마의 VS(volatile solid) 함량이 61%인 점을 감안할 때 VS 1톤 당 혼합알코올 수율은 292 L이다. 이는 1차년도 목표 수율인 VS 톤당 300 L의 97%에 해당된다.

항목	1차년도 목표	실적
유기물 톤당 혼합알코올 수율(L/톤)	300	292

나. 유기산의 에스테르화 반응실험 결과

(1) 아세트산의 에스테르화 반응실험 결과

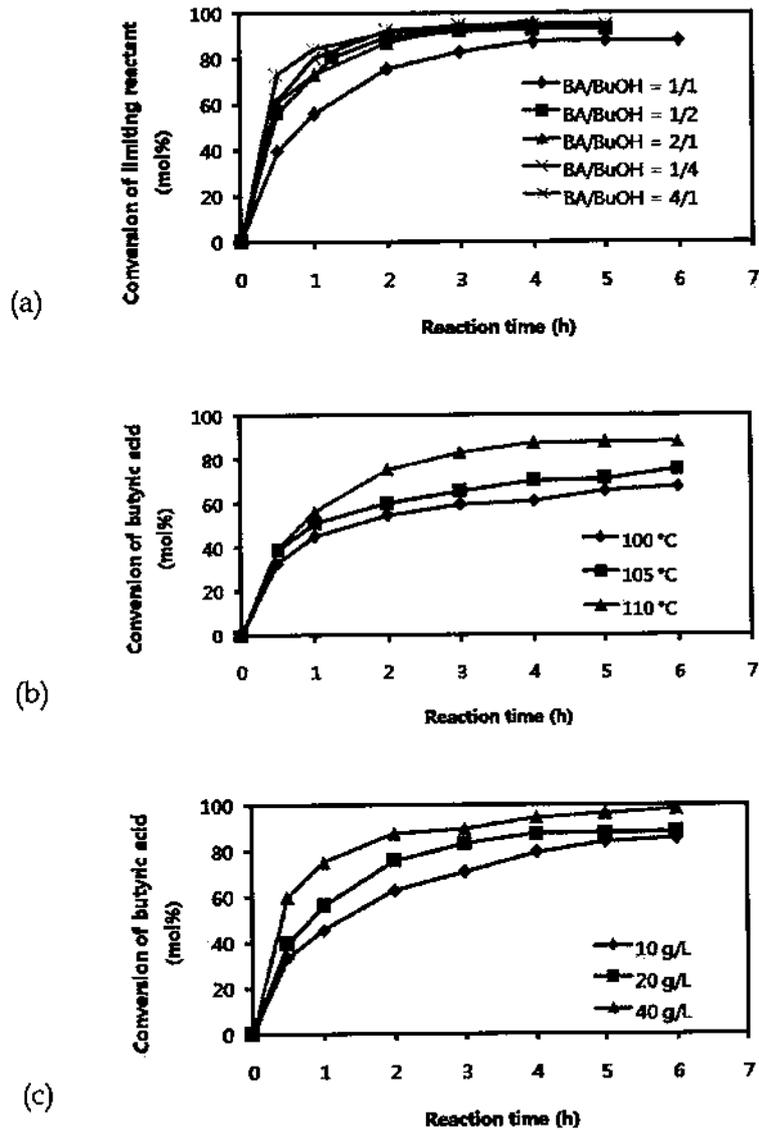
이온교환성 수지인 DOWEX 50W 촉매를 이용하여 아세트산의 에스테르화 반응을 수행하였다. 일반적으로 에스테르화 반응의 반응속도는 반응물 비, 반응온도 그리고 촉매 양 등에 의존하는 것으로 알려져 있다. 이에 아세트산과 에탄올의 몰비를 0.25에서 4까지 변화시키면서 반응을 수행한 결과를 그림 4-3-12a에 나타내었다. 그림에서 보는 바와 같이, 에탄올의 양이 증가함에 따라 아세트산의 전환율이 증가하는 경향을 보였다. 이때 원하는 생성물인 에틸아세테이트의 선택도는 거의 100%에 가까웠다. 이 결과로부터 에탄올에 비하여 아세트산의 흡착세기가 강하여 반응속도를 낮추게 됨을 알 수 있다. 다음으로 반응온도에 대한 영향을 고찰한 결과, 70 °C에서 비교적 높은 반응속도상수를 보이나 그 차이는 미미하였다(그림 4-3-12b). 마지막으로 촉매 양에 대한 실험을 수행하였다. 그림 4-3-12c에서 보는 바와 같이 촉매 양이 40 g/L로 주입하는 경우 반응 초기에 반응이 급속하게 진행됨을 알 수 있으며 이후 평형에 도달함을 알 수 있다. 이에 반하여 촉매 양이 10 g/L인 경우 아세트산의 전환율이 반응시간에 따라 점차 상승하는 것으로 보이므로 평형에 도달하는데 비교적 많이 시간이 소모됨을 알 수 있었다. 지금까지의 결과를 종합해 보면, 반응온도는 70 °C, 촉매 양은 40 g/L 그리고 아세트산/에탄올 몰비는 1/4일 때 아세트산 전환율이 최고(약 90%)에 도달할 수 있었으나, 100%에 근접하지는 못하였다. 이는 아세트산과 에탄올의 끓는점이 비교적 낮아 반응온도를 향상시키는데 제약이 따르기 때문으로 판단된다. 그러므로 100% 전환율을 얻기 위해서는 촉매 양의 증가를 통하여 초기 반응속도를 증가시킬 필요가 있다.



[그림 4-3-12] 아세트산(AA)과 에탄올(EtOH)의 에스테르화 반응실험 결과
 (a) AA/EtOH 몰비 변화, (b) 반응온도 변화, (c) 촉매양 변화

(2) 부티르산의 에스테르화 반응실험 결과

아세트산에 비하여 부티르산의 끓는점(약 110 °C)이 높으므로 부티르산의 에스테르화 반응은 보다 높은 온도에서 반응을 수행할 수 있었다. 아세트산과 마찬가지로 반응물 몰비, 반응온도 그리고 촉매 양에 따른 영향을 고찰하였다. 그림 4-3-13에서 보는 것처럼 아세트산의 에스테르화 반응결과와 거의 유사한 변화를 보였다. 특히, 반응물 몰비에 따른 실험결과를 limiting reactant의 전환율 관점에서 도시한 결과, 90% 이상에서 거의 유사한 전환율을 보였다. 이는 과량의 부탄올 또는 부티르산이 사용된다고 하더라도 공정 면에서 큰 문제가 없을 것으로 예상된다.



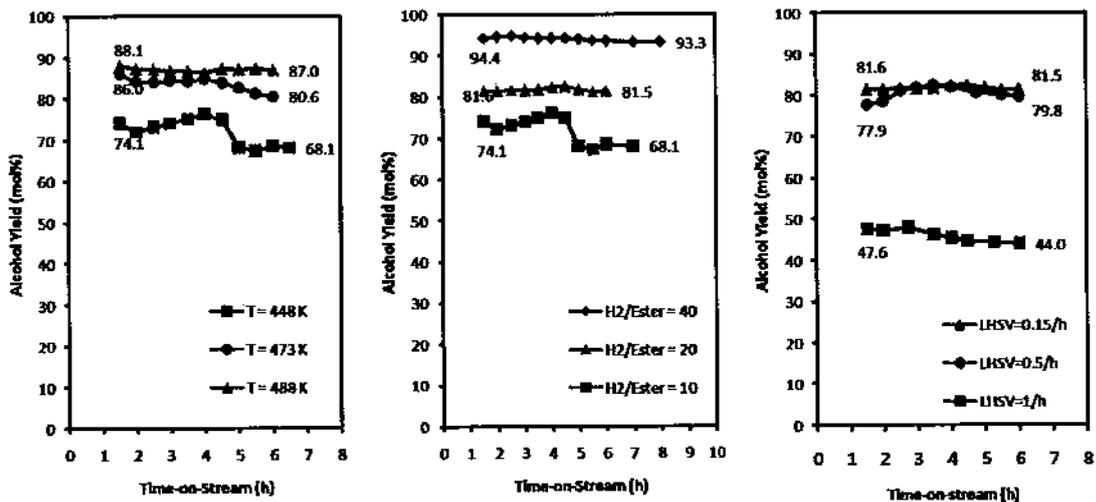
[그림 4-3-13] 부티르산(BA)과 부탄올(BuOH)의 에스테르화 반응실험 결과
(a) BA/BuOH 몰비 변화, (b) 반응온도 변화, (c) 촉매양 변화

다. 에스테르 및 유기산의 수소화 반응실험 결과

(1) 에스테르의 수소화 반응실험 결과

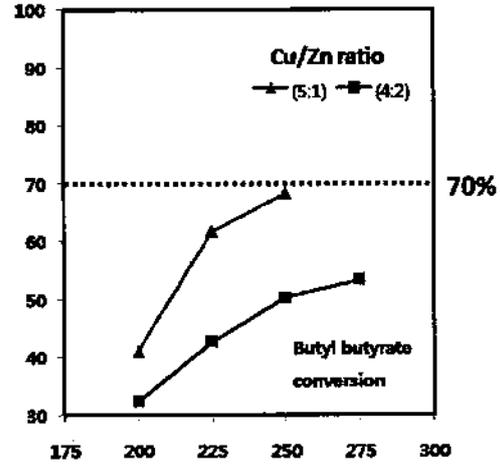
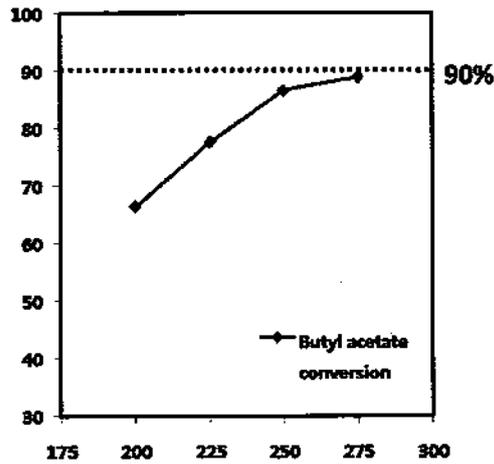
그림 4-3-3에 도시한 반응장비를 이용하여 먼저 부틸 부티레이트의 수소화 반응을 수행하였다. 이 반응 역시 주요 반응인자로 반응온도, 수소/에스테르 몰비 그리고 액체유속(LHSV) 등을 들 수 있으며 이들을 변화시키면서 얻은 반응결과를 그림 4-3-14에 나타내었다. 반응온도의 경우 200 °C 이상의 온도에서 부탄올 수율은 큰 변화 없이 85% 정도였다. 하지만 수소/에스테르의 몰비는 10에서 40으로 변화

시키면서 반응을 수행한 결과, 부탄올 수율이 93%에서 68%까지 변화하는 것을 관찰하였다. 이에 에스테르의 수소화 반응을 위해서는 과량의 수소가 필요하다고 판단된다. 반응물의 공간유속은 0.5 h^{-1} 까지는 큰 변화가 없었으나 이보다 높아지는 경우 활성이 상당히 감소하는 것으로 관찰하였다. 이 결과는 공정 면에서 매우 중요한 인자로서 부탄올의 생산성을 높이기 위하여 공간속도를 증가시키는데 있어서 제약이 따른다는 사실을 말해준다. 정리해보면, 반응온도 $175 \text{ }^\circ\text{C}$, 압력 10 bar, 수소/에스테르 몰비 40 그리고 LHSV 0.15일 때 부탄올 수율이 최대 93%에 도달할 수 있었다. 하지만 본 결과를 공정에 적용하기 위해서는 수소 공급에 대한 방법이 강구되어야만 할 것이다.



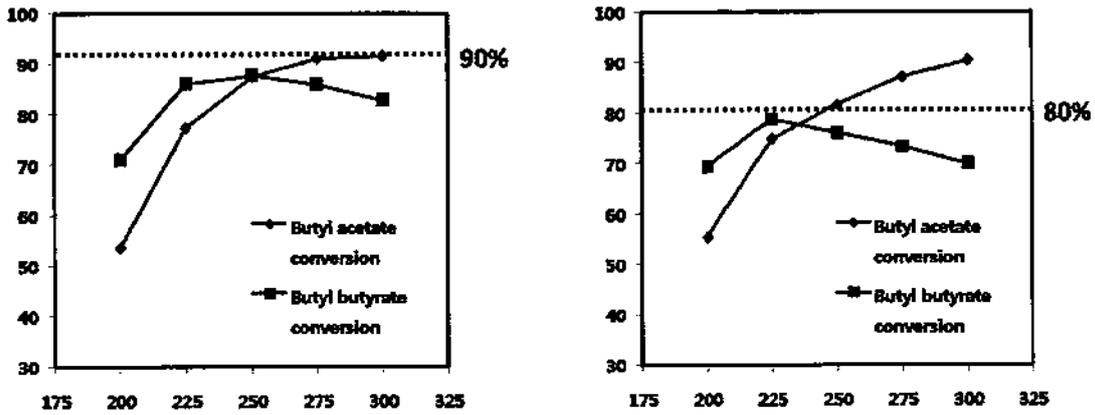
[그림 4-3-14] 부틸 부티레이트의 수소화 반응실험 결과

다음으로 부틸 아세테이트의 수소화 반응을 수행하였다. 이때는 상용촉매가 아닌 공침법으로 제조한 촉매를 사용하였다. 이때 사용한 반응조건은 10 bar, 수소/에스테르 몰비 10 그리고 LHSV 2.14 h^{-1} 로서, 앞선 실험에 비하여 비교적 가혹한 조건에서 실험을 수행하였다. 이는 촉매의 활성을 보다 면밀히 관찰하기 위해서이다. 그림 4-3-15에서 보는 것처럼, 부틸 아세테이트는 $275 \text{ }^\circ\text{C}$ 의 온도에서 90% 전환율에 도달함을 알 수 있었으나 부틸 부티레이트는 70%에 미치지 못하였다. 특히 촉매에서 Cu/Zn의 몰비를 변화시켜 촉매를 제조하고 활성을 비교한 결과 전환율이 상당히 차이가 남을 알 수 있었다. 이는 부틸 아세테이트의 활성화에너지가 낮아 보다 빨리 반응이 진행함을 말해준다. 그러므로 탄소수가 많은 에스테르의 수소화 반응을 위한 촉매의 설계 및 개발에 대한 추가 연구가 필요하다고 판단된다.



[그림 4-3-15] 부틸 아세테이트(왼쪽) 및 부틸 부티레이트(오른쪽)의 수소화 반응실험 결과

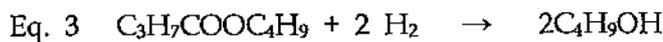
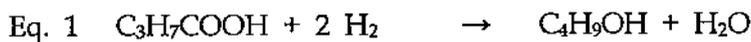
마지막으로 부틸 아세테이트와 부틸 부티레이트의 혼합물을 이용하여 수소화 반응실험을 수행하였다. 그림 4-3-16에서 보는 바와 같이 두 에스테르의 수소화 정도는 반응온도에 따라 다르게 나타났다. 앞선 결과에서 살펴본 바와 같이 부틸 아세테이트는 양에 큰 관계없이 300 °C의 반응온도에서 90%의 전환율을 보였다. 하지만 부틸 부티레이트의 경우에는 225-250 °C의 온도에서 최대 전환율을 보였다. 특히 BB의 양이 감소한 경우 예상과 달리 전환율이 감소하는 결과를 보였다. 이는 부틸 아세테이트와 부틸 부티레이트가 경쟁 흡착하는 것으로 풀이되며 부틸 아세테이트의 흡착이 보다 강함을 알 수 있다. 하지만 BA/BB가 4인 경우 butyl 작용기가 반응물에 상당히 포함되어 있어 에스테르의 해리흡착이 일어난 후 다시 에스테르화 반응이 일어나는, 즉 가역반응이 일어나 부틸 부티레이트의 전환율이 떨어지는 것으로 해석될 수도 있으므로 이에 대한 추가 연구가 필요하다고 판단된다.



[그림 4-3-16] 혼합 에스테르(부틸 아세테이트(BA) 및 부틸 부티레이트(BB))의 수소화 반응실험 결과; 왼쪽: 2BA/1BB, 오른쪽: 4BA/1BB

(2) 유기산의 수소화 반응실험 결과

앞 절에서 다른 에스테르의 수소화 반응과 달리 유기산을 수소화시켜 직접 알코올을 생산하는 실험을 수행하였다. 이를 위하여 상용 촉매를 사용하였으며, LHSV는 1 h^{-1} , 수소 압력은 40 bar이다. 표 4-3-4에서 보는 바와 같이 부티르산만을 공급한 경우 부티르산(C4-acid)의 전환율은 79%이며 이때 부탄올(C4-ol)의 선택도는 26%이고 부틸 부티레이트(BB)의 선택도는 70%이었다. 이는 부티르산이 부탄올로 전환한 후 미반응된 부티르산과 반응하여 부틸 부티레이트가 생성되는 것으로 풀이된다. 반응식은 다음과 같다.



[표 4-3-4] 부티르산(C4-acid)/물의 몰비에 따른 촉매의 활성 변화

C4-acid/H ₂ O 몰비	C4-acid 전환율	C4-ol 선택도	BB 선택도	C4-ol/BB 몰비
1/0	79%	26%	70%	0.8
1/1	65%	31%	63%	1.0
1/3	46%	47%	50%	1.9
1/15	40%	65%	30%	4.4

Eq. 2의 에스테르화 반응을 살펴보면, 물이 반응물에 공급될 경우 정반응이 억제됨을 알 수 있다. 이에 부티르산/물의 몰비를 변화시키면서 수소화 반응실험을 수행하였다. 예상한 바와 같이 부틸 부티레이트의 선택도가 감소됨을 알 수 있었다. C4-ol/BB 몰비의 변화를 보면 물이 없을 때 0.8인 반면에 물비가 1/15일 때 4.4로 증가함을 알 수 있다. 하지만 C4-ol/BB 몰비가 증가함에 따라 부티르산의 전환율이 40%까지 감소하였다. 이는 부티르산과 물이 촉매 활성점에 경쟁 흡착하게 되는데 물이 부티르산의 흡착을 방해하는 것으로 해석된다. 그러므로 본 연구를 통하여 유기산의 직접 수소화 반응을 통한 알코올 생산이 가능하나 높은 반응효율을 위해서는 유기산, 물 그리고 수소의 흡착세기를 고려하여 촉매를 설계할 필요가 있다고 판단된다. 또한 에스테르의 생성은 반응조건과 밀접한 관련이 있는 것으로 판단되므로 반응조건에 대한 최적화 연구도 추가되어야 할 것이다.

4. 요약 및 제언

본 연구를 통하여 모델 해조류로서 다시마로부터 혐기성 소화에 의하여 혼합휘발성유기산(VFA)을 생산하는 공정의 가능성과 문제점을 도출하였다. 배양조건의 최적화와 미생물 균총의 적응과정을 통하여 20 g/L의 다시마로부터 VFA의 생산농도를 4.65 g/L까지 올렸는데 이는 다시마의 휘발성 유기물질(volatile solid; VS) 톤당 232.5 g의 VFA에 해당하며 후속 수소화공정의 수율을 80%로 가정하면 292 L의 혼합알코올을 생산할 수 있는 양이다. 다시마의 주입농도를 더 높더라도 VFA의 농도는 더 올라가지 않았는데 이는 생성된 VFA가 미생물의 활성을 억제하는 feedback product inhibition 현상 때문인 것으로 밝혀졌다. 이를 극복하기 위한 방안으로서 추출발효(extractive fermentation)의 가능성을 조사해본 결과 VFA 생산성을 높일 수 있다는 긍정적인 결과를 얻었으며 이를 통하여 후속연구기간 동안 추출발효공정을 개발하고 최적화하는 연구를 중점적으로 수행할 예정이다.

다음으로 혐기성 소화를 통하여 생성되는 유기산을 알코올로 전환하는 연구를 수행하였다. 이를 위하여 에스테르화 반응 및 수소화 반응을 연계한 2단계 공정 및 유기산의 직접 수소화 반응으로 이루어진 1단계 공정에 대한 가능성을 조사하였다. 먼저 2단계 공정에서 첫 번째 단계인 유기산의 에스테르화 반응은 비교적 저온의 반응온도에서 높은 전환율을 보임을 알 수 있었다. 촉매 양을 더 넣을 경우 유기산의 전환율은 100%에 도달할 수 있을 것으로 판단된다. 두 번째 단계인 에스테르의 수소화 반응은 촉매 및 반응조건에 많이 의존함을 알 수 있었다. 반응조건에 따라 상이한 결과를 보이지만 약 80 내지 90%의 에스테르 전환율을 얻었다. 다른 한편, 유기산의 직접 수소화 반응을 수행한 결과 반응조건에서 수소화 반응 이외에

도 에스테르화 반응이 진행됨을 확인할 수 있었다. 이를 해결하기 위하여 물을 co-feed한 결과 알코올의 선택도를 높일 수 있었으나 동시에 유기산의 전환율을 낮추는 결과를 초래하였다. 요약해 보면 에스테르 및 유기산의 수소화 반응은 촉매 개발 및 반응조건 최적화와 같은 추가 연구가 진행될 경우 혐기성 소화를 통한 알코올 생산은 충분히 가능할 것으로 사료된다.

제 4 절 해조류 열분해

1. 연구 목적 및 내용

가. 연구 목적

자연계 순환의 전 과정에서 생성된 탄소, 수소, 질소 및 산소 등으로 구성되어 있는 유기성 생물체를 바이오매스라고 한다. 이러한 바이오매스를 에너지, 전기 또는 보다 유용한 화학물질로 전환시키는 방법으로는 크게 생물학적 전환 방법과 열화학적 전환 방법이 있다. 생물학적 전환 방법은 미생물에 의해 바이오매스를 알코올 또는 합산소 화합물로 전환시키는 방법이며, 열화학적 전환 방법은 열에너지를 이용하여 바이오매스를 열, 전기, 화학물질, 수송용 연료로 전환시키는 방법이다. 열화학적 전환 방법으로는 열분해, 가스화, 연소 등이 있으며, 이 중에서 열분해는 무산소 분위기에서 유기성 물질인 바이오매스가 열적으로 분해되어 기상, 액상, 고상 생성물을 얻는 공정으로 2차 오염물질의 발생이 적어 친환경적이며 다양한 종류의 연료 및 화학물질을 생산할 수 있다는 장점이 있다. 특히 급속 열분해(Fast Pyrolysis)공정은 액상 생성물인 바이오오일(열분해오일)의 수율을 최대화하기 위하여 짧은 체류시간과 높은 열 및 물질전달 속도를 특징으로 하는 공정이며, 생성된 바이오오일은 페놀류, 당류, 산, 알데히드, 케톤 등의 유용한 다양한 성분들을 함유하고 있는 것으로 알려져 있다. 하지만, 최근까지 급속 열분해공정을 이용한 바이오오일 생산 관련 연구는 주로 목질계 바이오매스를 원료로 사용한 연구가 대부분이며, 미세조류 및 거대조류를 포함하는 해조류에 관한 연구는 아직 미미한 단계이다.

따라서, 본 연구에서는 급속 열분해 공정을 이용하여 해조류 바이오매스로부터 바이오오일의 생산 가능 타당성을 확인하고 생성된 바이오오일의 물성 분석을 통하여 최종적으로 해조류 바이오매스를 이용한 고수율, 고품질 바이오오일 합성 기술을 개발하고자 한다.

나. 연구 내용

해조류 바이오매스로부터 고수율, 고품질 바이오오일 합성기술 개발을 위한 세부 연구 목표 및 내용은 다음과 같다.

(1) 해조류 바이오매스의 기초 물성 데이터 및 열적 동특성 데이터 확보

다양한 해조류 바이오매스의 원소분석, 공업분석, 금속 함량 분석 등을 통하여 다양한 해조류 바이오매스의 물리·화학적 특성을 파악하여 향후 연구과정에서

얻어지는 결과에 대한 정량적 기준이 되는 자료를 확보하였다. 또한, 열 중량 분석 (Thermogravimetric Analysis)을 통해 다양한 해조류 바이오매스의 분해 동력학적 데이터를 확보하였으며, 이를 해조류 바이오매스의 열분해 메커니즘 해석 및 바이오오일 생성을 위한 급속 열분해 공정 운전 조건의 기초자료로 활용하였다.

(2) 급속 열분해 공정을 이용한 바이오오일 생산 및 공정 조건 영향 파악

바이오오일 생산을 위한 급속 유동층 열분해 반응 시스템을 set-up 하였으며, 이를 이용하여 열분해 공정에서 바이오오일 수율에 가장 큰 영향을 미치는 공정 조건인 열분해 온도, 체류시간, 바이오매스 공급 속도 등을 변화시켜 가면서 최적의 운전 조건을 도출하고자 하였다. 또한, 다양한 실험을 통해 현 반응 시스템의 문제점을 파악하고 이를 개선하기 위한 방법을 모색하고자 하였다.

(3) 생산된 바이오오일의 분석 조건 및 기초 물성 데이터 확보

생산된 바이오오일의 GC/MS 분석을 통하여 바이오오일의 구성 성분을 확인하여 바이오오일 내에 포함된 다양한 화학물질을 확인하였으며, 또한 원소 분석, 발열량, 수분 분석 등을 통하여 연료로서의 이용 가능성을 평가하였다.

2. 연구 방법

가. 실험 재료 및 장치

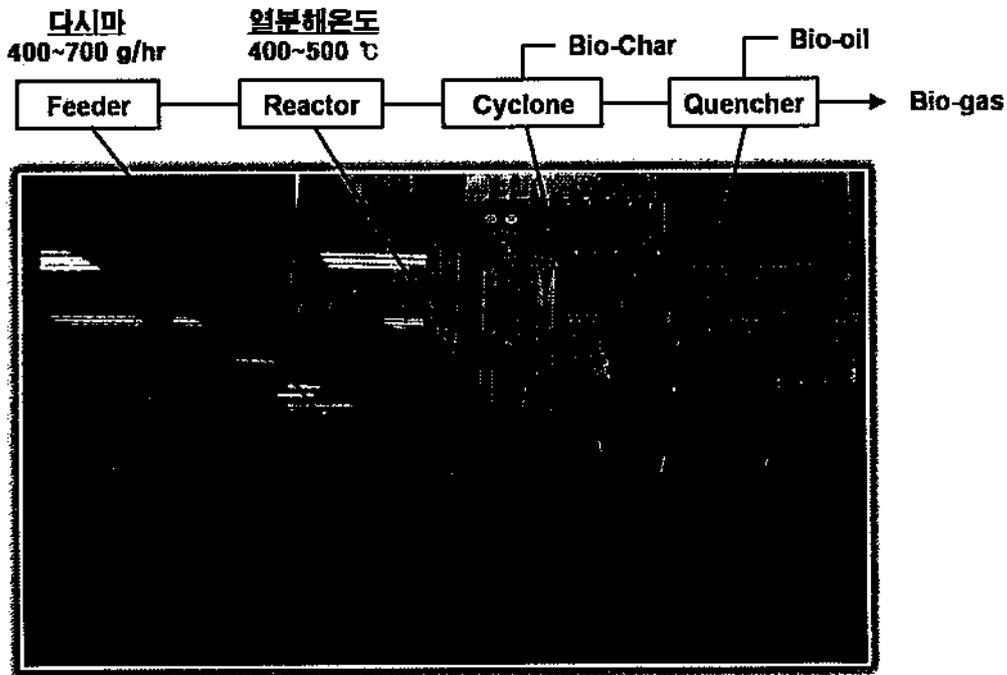
(1) 실험 재료

급속 열분해 공정을 이용한 바이오오일 생산에 가장 적합한 해조류 바이오매스를 선정하기 위해 다시마(완도산), 대왕물(기장산), 물(완도산), 파래, 미역, 서실, 도박(기장산), 곰피 등 총 8종의 해조류 샘플에 대한 원소 분석, 급속 성분 분석 및 열중량 분석을 수행하였다. 특히, 본 연구의 주 실험 재료인 다시마는 식용부위를 제외한 부분을 풍건 건조한 후에 분쇄한 샘플을 사용하였으며, 분석에 사용한 모든 시료는 105 °C에서 24시간 이상 건조한 후에 사용하였다.

(2) 바이오오일 생산용 급속 열분해 반응 시스템

바이오오일을 연속적으로 생산하기 위해 사용한 급속 열분해 반응 시스템은 유동층 반응기를 기본으로 하여 제작하였다. 유동층 반응기는 열 및 물질 전달 속도가 빠르며 온도 조절이 용이하여 급속 열분해 공정에서 가장 많이 사용되는 반응

기다. 그림 4-4-1에 나타낸 것과 같이 급속 열분해 반응시스템은 크게 control box, feeder, fluidized bed reactor, cyclone, quencher, filter로 구성되어 있다. 일반적으로 quenecher에서 회수되지 않은 바이오오일 및 tar 성분은 전기집진기에서 회수되는데 본 연구에서는 filter를 사용하여 쉽고 효과적으로 바이오오일 성분과 유동화가스를 분리하였으며, 분리된 유동화가스를 샘플링하여 열분해 기상 생성물을 분석하였다.



[그림 4-4-1] 급속 열분해 반응 시스템

(가) Screw feeder

바이오매스 시료를 연속적으로 반응기 내부에 투입하기 위해서 screw feeder를 사용하였다. Screw의 회전 속도를 통해 시간당 투입되는 시료의 양을 조절하였으며, 3ℓ 크기의 hopper를 설치하였다. Hopper내에는 원활한 시료 공급을 위해 교반기를 설치하였으며, 무 산소 조건을 만들기 위해 질소를 공급하였다.

(나) Reactor

유동층 반응기로 높이 400 mm, 내경 50 mm의 원통형 반응기를 스테인레스 재질(SUS 304)로 설계 및 제작하였다. 유동층 반응기 하단에는 유동화가스가 골고루 분산될 수 있도록 100 μm pore size를 갖는 금속 재질의 소결 filter를 설치하였다. Cold flow test를 통해 측정한 유동층 높이(반응기 하단에서 170 mm)에서 screw feeder를 연결하여 바이오매스 시료가 유동층 상단에 직접 투입되어 혼합될

수 있도록 설계하였다. 반응기의 주 열원은 유동층 반응기 상단과 하단에 설치한 ceramic heater를 통해 열 공급이 이루어지도록 하였으며 반응기 내부에 삽입된 두 개의 thermocouple을 이용하여 열분해 온도를 일정하게 유지하였다.

(다) Cyclone

열분해 시 생성되는 촉는 유동화가스에 의해 반응기 밖으로 빠져 나오게 된다. 촉는 유기 성분과 금속 산화물 형태로 존재하며 반응기에서 효과적으로 제거되지 않을 경우 관의 blocking 현상을 유발하고 액상 생성물과 함께 존재 시, 액상 성분의 화학반응을 촉진시키는 촉매 역할을 하기도 한다. 따라서 촉를 휘발분과 분리하기 위해서 고온에서 사용 가능한 cyclone을 설치하였으며 휘발분의 응축을 막기 위해 heating band와 heating jacket을 이용하여 cyclone 내부의 온도를 350 ℃ 이상으로 유지시켜 주었다. 또한, cyclone에서 분리되지 않은 미세한 촉를 제거하기 위해 stainless filter를 후단에 추가 설치하였다.

(라) Quencher

바이오오일 회수를 위하여 cyclone 후단에 pyrex 재질의 이중관 condenser를 시리즈로 2개 설치하였다. 첫 번째 condenser에서는 수돗물을 냉각수로 사용하여 생성된 바이오오일을 회수하였으며 대부분의 바이오오일은 여기서 회수되었으며 출구 온도는 20 ℃ 이하였다. 두 번째 condenser는 40 wt% 에틸렌글리콜을 냉각수로 사용하였으며 circulator를 통해 -10 ℃ 이하로 공급하였다. 바이오오일의 10~20% 내외가 응축하였으며 출구 온도는 10 ℃ 이하였다. 각 condenser의 하단에는 삼각플라스크를 설치해 응축된 오일을 회수하였다.

나. 실험 절차

(1) 열중량 분석 실험

해조류 바이오매스의 열분해 특성과 동역학적 특성을 조사하기 위하여 비등온 열중량 분석을 실시하였다. 분석에 사용한 바이오매스 시료는 105 ℃에서 건조하여 사용하였으며 분석 장비 및 조건은 표 4-4-1에 정리하였다.

[표 4-4-1] 열중량 분석 실험 조건

Item	Condition
Instrument	TGA 2050, TA instrument
Carrier gas	N ₂ , 30 ml/min
Temperature program	Room temperature → 5 °C/min → 105 °C(1 hr) → heating rate → 1000°C(30 min)
Heating rate	5, 10, 15, 20 °C/min
Sample weight	10 - 20 mg

(2) 급속 열분해 공정을 이용한 바이오오일 생산 실험

유동층 열분해 반응기의 내부 유동사는 100 g의 sea sand(<300 μm, M.D. 184 μm, KANTO)를 사용하였다. 열분해 실험을 시작하기 전에 반응기와 hopper 내부를 무산소 분위기로 만들기 위해 질소를 10 l/min의 속도로 1시간 동안 purge 하여 주었다. 이 후 냉각수를 순환시키고 air pre-heater, 반응기 상단과 하단, cyclone을 반응 온도까지 가열하였다. 모든 시스템의 온도가 안정화 되면 drying oven에서 미리 건조된 시료를 정량하여 hopper에 투입하고 유동화 가스의 유량을 실험 유량으로 조절한 후 다시 약 1시간 동안 purge하여 무 산소 분위기 및 온도, 유량이 안정화된 것을 확인하고 바이오매스 시료를 반응기에 공급하기 시작하였다. 바이오 가스의 성분을 분석하기 위해서 실험 시작 후 15분과 45분에 gas sampler를 통해 가스를 sampling하였으며 운전 종료 후 1시간 동안 실험 조건으로 purging하였다.

본 연구에서는 바이오 오일의 수율을 최대화하기 위한 공정 변수로 열분해 온도, 최소 유동화 속도 비, feeding rate 3가지를 선정하였고 이에 대한 최적 조건을 찾기 위해 열분해 온도를 400~500 °C, 최소화 유동화 속도비(U_0/U_{mf}) 3~6, feeding rate을 400~700 g/hr로 변화시켜 가면서 실험하였다.

다. 분석 방법

(1) 공업 분석

본 실험에 앞서 삼성분인 수분, 휘발분, 회분의 함량 분석을 실시하였다. 수분 함량은 간단하고 널리 사용하고 있는 건조법을 사용하였다. 삼성분 분석 방법은 도가니에 시료 약 2 g을 정량하여 넣고 105±3 °C의 항온건조기 중에서 2시간 건조시킨 후, 뚜껑을 덮고 데시케이터에서 방랭한 후 칭량한다. 다시 1시간 동안의 건조와 방랭을 반복하여 연속 2회의 중량 차가 2 mg이하가 될 때까지 건조를 계속하여

건조 전후의 무게차로 수분함량을 산정하였다. 휘발분과 회분의 경우 수분이 제거된 시료를 뚜껑을 조금 열어 서서히 가열 탄화시킨 후 600±25 °C의 oven에서 강열하여 완전히 탄화시킨다. 도가니를 2분 정도 석면판 상에서 방열시킨 후 데시케이터에서 식히고 칭량하는 것을 반복하여 강열 전후 무게차로 휘발분의 양으로 산정하였고 남은 강열잔류물을 회분으로 계산하였다.

(2) 원소 분석

해조류 바이오매스 시료의 C, H, N, S, O 원소의 함량 비를 알아보기 위해 원소분석을 실시하였다. 자동원소분석장치를 이용하였으며 분석에 관한 세부 내용은 표 4-4-2에 요약하였다.

[표 4-4-2] 원소 분석 조건.

	Condition
Instrument	Flash EA 1112 series, CE Instrument/Thermo Quest, Italia
Standard	BBOT(C, H, N, S), L-Cistina(O)
Sample weight	1~2 mg
Combustion temperature	1100 °C for analyzing C, H, N, S
Pyrolysis temperature	1060 °C for analyzing O
Coulmn	Porapak Qs(C, H, N, S), Molecula sieve 5A(O)

(3) 발열량 분석

발열량 측정을 위해 Parr 6300 Calorimeter를 이용하여 기기 분석을 실시하였다. 정확하게 중량을 측정된 바이오매스를 calorimeter를 이용해 직접 발화법으로 측정하였으며 단위중량 당 고위발열량을 계산하였다.

(4) 금속 분석

바이오매스 내에 함유하고 있는 금속 성분의 함량을 측정하기 위해 ICP와 AAS를 사용하였다. 분석기기는 Elan 6100 DRC plus를 사용하여 알칼리 금속 및 알칼리 토금속인 K, Na, Ca 의 정량 분석을 실시하였으며, 해조류 바이오매스의 특성상 다양한 금속 원소를 함유하고 있기 때문에 Li부터 U까지의 금속 원소를 정성 분석한 후 그 중에서 높은 함량을 나타내는 성분에 대한 정량 분석을 실시하였으며, 결과는 ppm로 나타내었다.

(5) 열분해 생성물 분석

생성된 바이오가스의 정성 및 정량 분석을 위해 GC 분석을 실시하였다. 검출기로는 TCD(Molecular seive 5A)와 FID(Carboxen 1000)를 사용하였으며 TCD에서는 H₂, N₂를 분석하였고, methanizer가 장착된 FID에서는 CO, CO₂, C1~C3까지의 탄화수소를 분석하였다. 생성된 바이오오일은 원소분석, 수분 함량 분석, 발열량 분석 및 정성 분석을 수행하였다. 바이오오일 내의 수분 함량 분석은 volumetric Karl Fisher(KF) titration method의 일종인 ASTM E 203법에 준하여 측정하였다. 바이오오일의 정성 분석은 GC/MS(Claus 600MS, Perkin-elmer, Column : HP-5MS 30m×0.25mm, film thickness 0.25 μ m)를 이용하였으며 Willey 276 mass spectrum library를 이용하여 각각의 peak를 확인하였다. 표 4-4-3에 자세한 분석 조건을 나타내었다.

[표 4-4-3] 바이오오일 정성 분석 조건.

Gas chromatograph	
Instrument	Claus 600MS, Perkin-elmer
Column	HP-5MS
Description	30m×0.25mm, film thickness : 0.25 μ m
Carrier gas	He, 1ml
Split ratio	1:50
Oven program	40 °C(5min)→5 °C/min→300 °C(10min)
MS detector	
MS source temperature	230 °C
MS transfer line temperature	280 °C
MS range	30~300 amu
Mass spectrum library	NIST 2.0, Willy 276

3. 연구수행 결과

가. 해조류 바이오매스의 물리 화학적 특성

(1) 원소 분석

다양한 해조류 바이오매스의 원소 분석 결과를 표4-4-4에 정리하였다. 해조류 바이오매스 종류에 따라 화학적 조성이 크게 변하였으며, CHNOS를 제외한 무기물의 함량이 해조류의 종류에 따라 약 18~44 wt%로 높은 값을 나타내었다. 이러

한 원소 분석 결과를 통해, 다시마의 탄소 함량이 35.2 wt%로 가장 높으며 무기물의 함량도 가장 낮은 값을 보여 열분해 공정에 유리할 것이라고 생각된다.

[표 4-4-4] 해조류 바이오매스 원소 분석 결과

	C (wt %)	H (wt %)	N (wt %)	O (wt %)	S (wt %)	Sum (wt %)
다시마(완도)	35.2	5.5	1.4	40.5	-	82.6
곰피	31.6	4.6	2.1	40.6	-	78.9
대왕물(기장)	32.3	4.7	2.5	44.5	-	84
도박(기장)	30.2	4.7	2.8	45.0	-	82.7
물(완도)	26.2	4.1	2.3	39.0	-	71.6
파래	30.4	4.6	3.2	49.9	-	88.1
미역	28.2	4.2	2.5	41.9	-	76.8
서실	18.7	2.8	2.3	32.2	-	56

(2) 금속 성분 분석

다양한 해조류 바이오매스의 금속 성분 분석 결과를 표4-4-5에 정리하였다. 해조류 바이오매스의 특성상 알칼리 금속 및 알칼리 토금속의 함량이 매우 높았으며, 이외에도 인과 철의 함량이 높은 것을 확인할 수 있었다. 또한 다시마를 제외한 나머지 해조류에서 리튬 및 우라늄을 각각 약 1.3~3.1 ppm, 0.05~0.47 ppm 정도를 함유하고 있는 것을 확인하였다.

[표 4-4-5] 해조류 바이오매스 금속 성분 분석 결과

	Na (ppm)	Ca (ppm)	K (ppm)	P (ppm)	Fe (ppm)	Li (ppm)	U (ppm)
다시마(완도)	21,900	6,100	60,600	1,600	110	<500ppb	<500ppb
곰피	27,100	8,400	56,100	1,500	370	1.34	0.23
대왕물(기장)	20,500	14,800	51,600	3,400	630	3.10	0.35
도박(기장)	39,000	6,400	27,200	2,400	550	1.39	0.25
물(완도)	29,900	15,000	59,000	1,800	730	2.72	0.40
파래	28,300	15,600	31,200	1,400	860	2.38	0.05
미역	29,700	11,600	67,200	6,000	200	1.50	0.47

(3) 해조류 바이오매스와 목질계 바이오매스의 물리·화학적 특성 비교

표 4-4-6에 본 연구의 주 실험재료인 다시마와 대표적인 목질계 바이오매스 중의 하나인 소나무 톱밥의 물리·화학적 특성 분석 결과를 비교하여 나타내었다. 시료의 조성 및 특성이 목질계 바이오매스인 소나무와 해조류 바이오매스인 다시마에서 큰 차이를 나타내었다. 겉보기 비중은 다시마가 소나무보다 약 3배가량 높은 비중을 보였다. 또한 공업 분석 결과를 살펴보면, 소나무와 비교하면 다시마의 휘발분의 함량은 낮고 ash의 함량이 상대적으로 높은 값을 나타내었으며, 높은 ash 함량은 향후 급속 열분해 반응에 불리한 영향을 미칠 것이라고 생각된다. 원소 분석 결과를 살펴 보면, 소나무에 비해 다시마의 탄소 및 수소 함량이 낮고 이로 인해 발열량도 낮은 것으로 판단된다. 또한, 다시마는 소나무와 달리 상당한 양의 질소 및 황을 포함하고 있어, 급속 열분해 반응 시 대기오염물질인 NO_x와 SO_x를 생성할 수 있는 가능성이 있다. 그리고 다시마의 높은 알칼리 금속 및 알칼리 토금속 함량으로 인해 급속 열분해 반응 시 생성된 바이오오일의 수율을 감소시킬 수 있는 가능성이 있다.

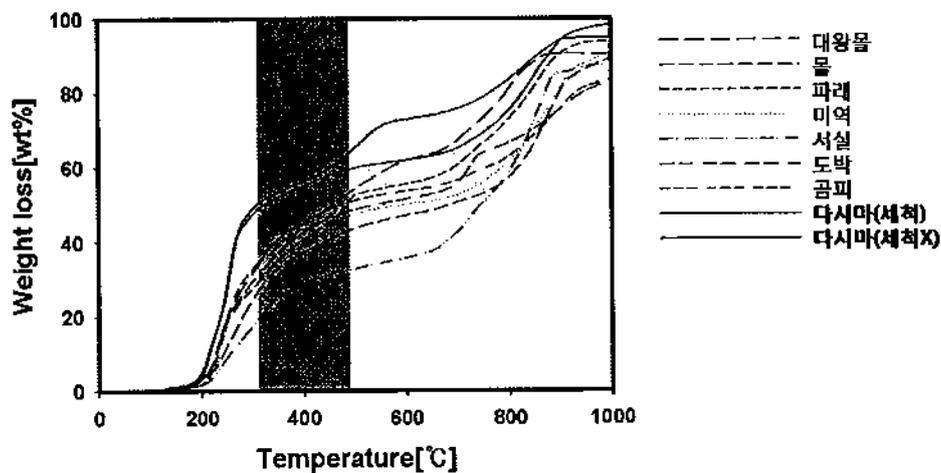
[표 4-4-6] 해조류 및 목질계 바이오매스의 물리화학적 특성 분석 결과

		소나무	다시마
물성	Bulk density [g/cm ³]	0.19	0.57
	Calorific value [kcal/kg]	4234.5	2990.98
공업 분석 [wt%]	Water	11.0	6.1
	Combustibles	75.6	71.0
	Ash	13.5	22.9
원소 분석 [wt%]	C	47.28	35.19
	H	6.19	5.51
	O	43.95	40.48
	N	0.10	1.39
	S	-	0.48
알칼리 및 알칼리 토금속 [wt%]	K	0.065	6.06
	Ca	0.10	0.61
	Na	0.031	2.19

나. 해조류 바이오매스의 열적 동특성

TGA(Thermogravimetric Analysis)를 이용한 비등온 열중량 분석은 특정한

반응 조건하에 일정 승온 속도로 열을 가하여 비교적 넓은 온도 범위에서 물질의 분해 거동을 파악할 수 있으며, 이를 동역학 해석에 손쉽게 이용할 수 있어 다양한 분야에서 널리 응용되고 있다. 본 연구에서는 다양한 해조류 바이오매스의 열분해 특성을 파악하고 이를 급속 열분해 실험의 기초 데이터로 활용하기 위해 TGA 분석을 수행하였다. 상기 언급한 총 8종의 해조류 바이오매스에 대한 분석을 실시하였으며, 다시마의 경우에는 풍건 건조한 시료와 물로 세척한 시료를 이용하여 전처리에 따른 영향을 살펴보았다. 그림 4-4-2에 해조류 바이오매스의 열중량 분석 결과를 나타내었다. 해조류 바이오매스 종류에 따라 조금씩 다른 열분해 특성을 나타내는 것을 확인할 수 있었다. 해조류 바이오매스의 열분해는 크게 3단계로 구분되었으며, 약 180 °C 이하에서는 수분의 탈착이, 180~600 °C 구간에서 해조류 바이오매스의 devolatilization이 일어나고, 600 °C 이상에서는 해조류 바이오매스의 분해가 일어나는 것을 확인할 수 있었다. 주요 열분해 구간인 400~500 °C에서의 해조류 바이오매스의 중량 감소를 계산하여 비교하였다(표4-4-7). 8종의 해조류 바이오매스 중에 다시마의 중량 감소가 59.87%(500 °C)로 가장 높았으며, 다시마를 물로 세척한 경우 약 5% 정도 중량감소가 더 일어나는 것을 알 수 있었다. 이로부터 8종의 해조류 바이오매스 중에 다시마가 급속 열분해 공정에 유리한 해조류 바이오매스라고 판단되었다.

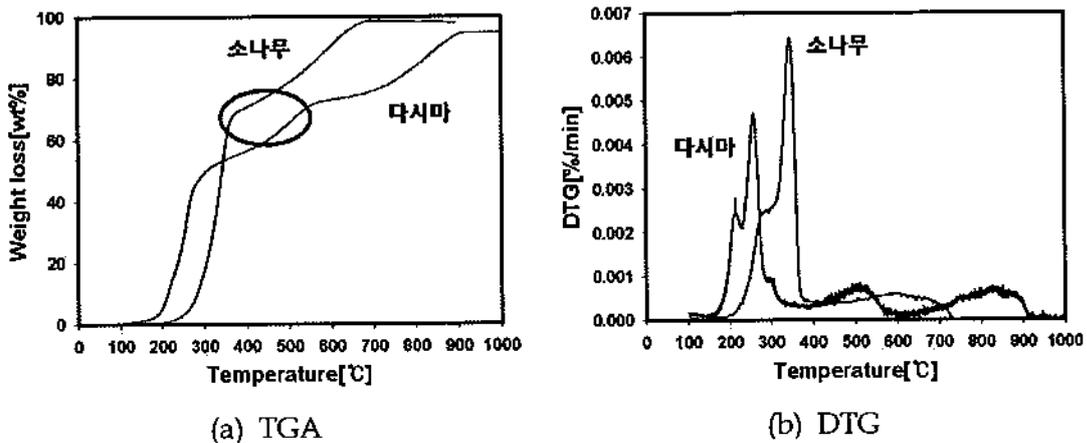


[그림 4-4-2] 해조류 바이오매스의 열중량 분석

[표 4-4-7] 중량 감소 비교

바이오매스	다시마	다시마 (세척)	대왕물	물	파래	미역	서실	도박	곰피
400°C [wt %]	55.12	56.24	45.04	37.28	40.65	41.16	28.95	42.67	45.41
500°C [wt %]	59.87	65.25	54.32	43.65	52.28	47.5	32.76	48.68	51.14

그림 4-4-3에 다시마와 목질계 바이오매스인 소나무의 TGA 분석 결과를 비교하여 나타내었다. 다시마의 경우에는 소나무보다 낮은 온도부터 분해가 시작되어 300 ℃에 도달할 때까지 급격한 분해가 일어나며 그 이후에는 서서히 분해가 일어나는 것을 알 수 있다. 다시마의 DTG 곡선을 살펴보면 230 ℃와 260 ℃ 부근에서 뚜렷한 peak이 관찰되며 이는 다시마의 구성 성분 중 당성분의 분해에 의한 것이라고 생각된다. 또한 500 ℃에서의 열중량 감소를 비교해 보면 다시마가 59.87 wt%, 소나무가 78.46 wt%로 소나무에 비해 다시마의 분해가 덜 일어나는 것을 알 수 있으며, 이러한 차이로 인해 다시마로부터 생산된 바이오오일의 수율이 소나무로부터 생산된 바이오오일의 수율보다 낮은 값을 보일 것이라고 예측할 수 있다.



[그림 4-4-3] 해조류와 목질계 바이오매스의 열중량 분석 비교

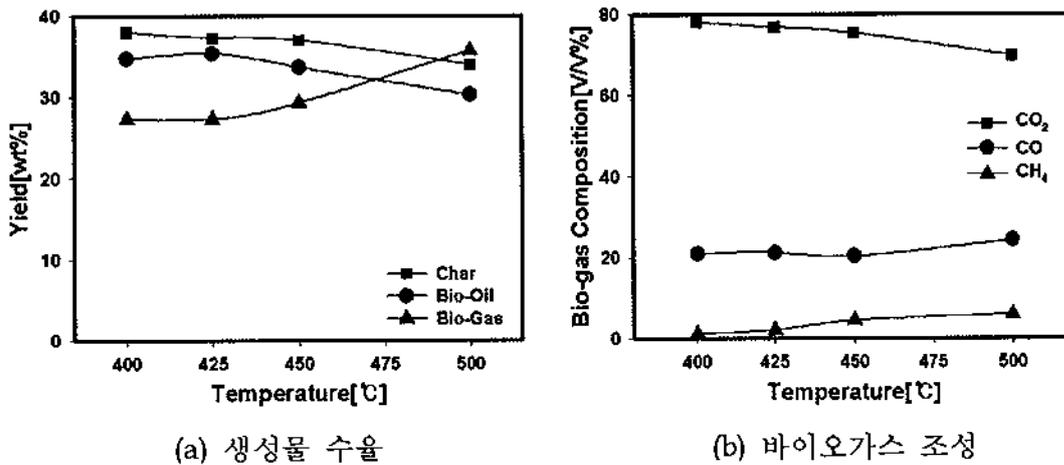
다. 급속 열분해 공정을 이용한 바이오오일 생산

다시마를 원료로 유동층 열분해 반응기를 이용하여 열분해 반응 실험을 수행하였다. 열분해 반응에 가장 큰 영향을 미치는 변수인 열분해 온도, 최소 유동화속도 비, feeding rate을 변화시키면서 생성물의 수율 변화를 관찰하였다.

(1) 열분해 온도

앞서 언급한 TGA를 통한 열분해 특성을 고려하여 열분해 온도는 400~500 ℃로 변화시켜 주었으며, Feeding rate 600 g/hr, 최소 유동화속도 비는 5로 일정하게 유지하였다. 그림 4-4-4에 열분해 온도 변화에 따른 생성물의 수율과 바이오가스의 조성을 나타내었다. 액상 생성물인 바이오오일의 수율은 열분해 온도가 400 ℃에서 425 ℃로 증가하였을 때 최대인 약 35.4 wt%를 나타내었으며, 그 이상의 온도에서는 선형적으로 감소하는 경향을 나타내었다. 최악의 수율은 온도가 증가할수록 점차 감소하였으며, 바이오가스는 425 ℃부터 온도가 증가함에 따라 수율이 크게

증가하는 경향을 나타내었다. 이는 바이오매스의 1차 열분해로 생성되는 organic vapor가 온도가 증가함에 따라 분해 또는 재결합과 같은 2차 cracking이 일어나는 반응속도가 커지기 때문이라고 생각된다. 생성된 바이오가스의 주 성분은 이산화탄소, 일산화탄소, 메탄 등이며 C2 이상의 탄화수소류는 GC 상에서 검출이 되었지만 모두 1% 미만의 소량이었다. 또한, 열분해 온도가 증가함에 따라 이산화탄소의 조성비는 감소하고 메탄의 조성비는 증가하는 경향을 나타내었다. 이산화탄소는 흡열 반응인 Boudouard reaction으로 인해 일산화탄소로 전환되어 조성비가 감소하는 경향을 나타내었다고 생각되며, 메탄은 열분해 온도가 증가함에 따라 organic vapor의 2차 cracking 반응에 의해 증가한 것이라고 생각된다.

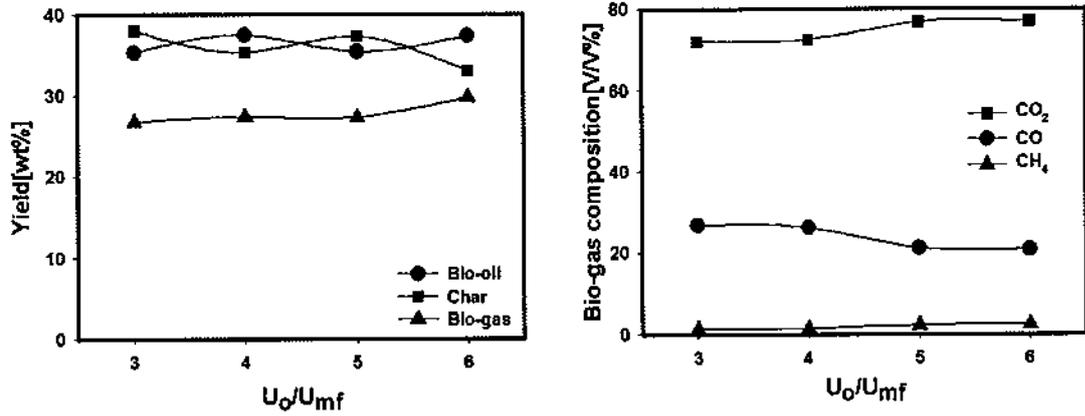


[그림 4-4-4] 생성물 수율에 대한 온도의 영향

(2) 최소 유동화속도 비

최소 유동화속도 비는 열분해 반응기내에서의 바이오매스의 체류시간에 영향을 주는 변수이다. 일반적으로 바이오오일을 생산하기 위한 급속 열분해 공정에서는 바이오매스의 1차 열분해로 생성되는 organic vapor의 2차 cracking을 억제하기 위해 1~2 초 이내의 짧은 체류시간이 요구된다. 상기 결과로부터 열분해 온도는 최대 바이오오일 수율을 보이는 425 °C, feeding rate은 600 g/hr로 고정하고 최소 유동화속도 비를 3~6으로 변화시켜 가면서 실험을 수행하였다. 그림 4-4-5에 최소 유동화속도 비가 생성물의 수율 및 바이오가스 조성에 미치는 영향을 나타내었다. 바이오오일의 수율이 최대가 되는 최소 유동화속도 비는 4 이었지만, 다시마 시료의 밀도와 ash의 함량이 높기 때문에 생성된 촉가 유동화 가스에 의해 cyclone로 넘어가지 못하고 반응기 내부에 계속 쌓이는 현상이 발생했다. 따라서, 향후 실험에서는 촉가 안정적으로 회수될 수 있는 최소 유동화속도 비가 5인 조건에서 실험을 진행하였다. 또한, 최소 유동화속도 비 6의 조건에서 바이오오일의 수율이 약간 증

가하고 최적의 수율이 4% 이상 감소한 이유는 cyclone에서 회수되지 못한 다량의 촉매가 바이오오일 및 filter에서 회수되었기 때문이다. 생성된 바이오가스의 조성도 상기 현상 때문에 최소 유동화 속도 비에 따른 영향을 정확하게 판단하기 어려웠다.



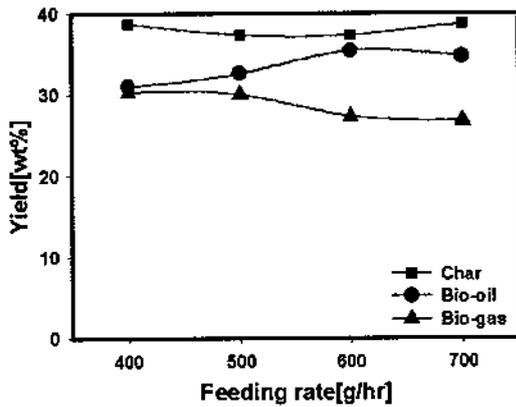
(a) 생성물 수율

(b) 바이오가스 조성

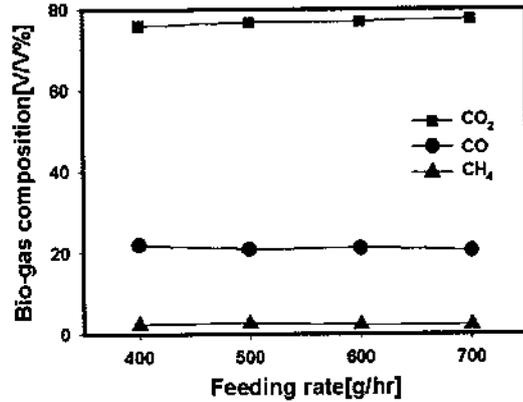
[그림 4-4-5] 생성물 수율에 대한 최소 유동화속도 비의 영향

(3) Feeding rate

상기 결과로부터 최소 유동화 속도 비는 5로, 열분해 온도는 425 °C로 고정하고 feeding rate을 400~700 g/hr로 변화시켜 가면서 실험하였다. 그림 4-4-6에 다시마의 feeding rate이 생성물의 수율 및 바이오가스 조성에 미치는 영향을 나타내었다. 다시마의 feeding rate이 400 g/hr에서 600 g/hr로 증가함에 따라 바이오오일의 수율이 약 5 wt% 정도 향상되어 600 g/hr일 때 35.4 wt% 값을 나타냈으며, feeding rate을 더 증가시키자 바이오오일 수율이 감소하였다. Feeding rate이 낮을수록 바이오오일의 수율이 감소하고 가스의 수율이 증가하는 현상은 반응기 내에 시료의 투입 속도가 느리기 때문에 유동사와 바이오매스의 열전달이 활발하게 이루어져 생성된 organic vapor가 2차 cracking에 의해 바이오가스로 전환되기 때문이라고 생각된다. 또한, feeding rate은 바이오가스 조성에 큰 영향을 미치지 않았다.



(a) 생성물 수율



(b) 바이오가스 조성

[그림 4-4-6] 생성물 수율에 대한 Feeding rate의 영향

라. 바이오오일 특성 분석

(1) 바이오오일의 물리·화학적 특성

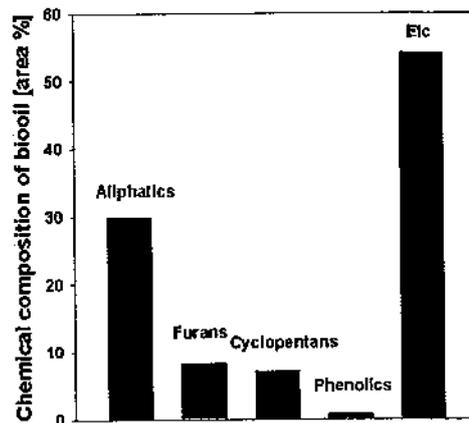
최대 바이오오일 수율을 나타낸 공정 조건에서 얻은 바이오오일의 물리·화학적 특성을 분석하였다. 소나무의 급속열분해를 통해 얻은 바이오오일은 본 연구실에서 실험을 통해 얻은 샘플이다. 표 4-4-8에 소나무와 다시마로부터 얻은 바이오오일 및 fossil oil의 물리·화학적 특성 분석 결과를 나타내었다. 소나무와 다시마 바이오오일의 원소 분석 결과, 바이오오일을 원료로 이용 시에 대기 환경에 문제를 일으킬 수 있는 질소와 황은 두 종류의 바이오오일 모두 검출한계 미만으로 극히 낮은 함량을 갖고 있었다. 하지만 다시마 유래 바이오오일은 소나무 유래 바이오오일보다 탄소의 함량은 낮고 산소의 함량은 높아 다시마 유래 바이오오일의 발열량은 1833.68 kcal/kg 이었으며, 이는 소나무 유래 바이오오일 발열량의 약 54% 수준이다. 하지만 수분을 건조한 기준에서는 다시마 유래 바이오오일의 발열량이 약간 높은 값을 나타냈으며 이는 기존 화석연료 발열량의 2/3 수준이다. 바이오오일 내에 수분 함량이 높으면 발열량이 낮아지며 화염 온도가 낮아지므로 바이오연료로 사용할 때 부정적인 영향을 끼친다. 소나무 유래 바이오오일은 일반적인 목질계 바이오오일의 수분함량(30~40wt%)과 비슷하였지만, 다시마 유래 바이오오일은 약 2배인 70.7wt% 수준이었다. 바이오오일 내 수분 함량은 시료 자체의 수분 함량과 바이오매스를 이루고 있는 구성 성분 내에 포함되어 있는 OH 작용기의 탈수반응과 관계가 있으므로 목질계 바이오매스와 해조류 바이오매스의 주요 구성 물질의 차이로 인한 결과로 생각된다.

[표 4-4-8] 바이오오일의 물리·화학적 특성 비교

		소나무	다시마	Fossil oil
Elemental analysis [wt%]	C	31.3	16.23	86.0
	H	8.21	10.18	13.6
	O	56.17	63.87	0.0
	N	-	-	0.2
	S	-	-	<0.18
Water[wt%]		36.4	70.7	0.1
High heating value[kcal/kg]		3383.0	1833.68	9727.53
Heating value on dry basis[kcal/kg]		5319.18	6258.29	

(2) 바이오오일의 조성

GC/MS를 이용하여 바이오오일 내에 있는 성분들을 분리하였고 질량 스펙트럼을 Library(NIST 2.0, Willy 276)를 통한 표준물질의 질량 스펙트럼과 일치율이 85% 이상인 성분들을 자료로 채택했다. 다시마 유래 바이오오일의 GC/MS 분석결과는 [표 4-4-9]에 정리하였다. 바이오오일을 구성하는 구성 성분의 종류가 매우 다양하여 각 구성 성분을 크게 aliphatics, furans, phenolics, cyclopentanes 및 기타 분류되지 않은 그룹으로 나누었으며(표 4-4-10), 각 그룹에 따른 조성비를 그림 4-4-7에 나타내었다. 다시마 유래 바이오오일에는 aliphatics 계열의 화합물이 가장 많이 생성되었으며, sliphatics>furans>cyclopentanes>phenolics 순이었다. 또한, 기존의 목질계 바이오매스 유래 바이오오일과 달리 phenolics 계열의 화합물이 매우 적었으며, 이는 바이오매스의 주요 구성 물질의 차이에 의한 것으로 판단된다.

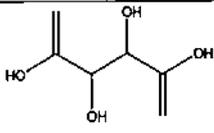
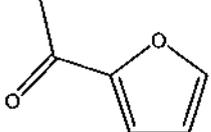
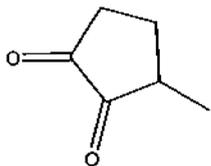
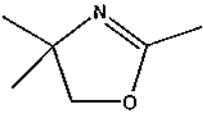


[그림 4-4-7] 다시마 유래 바이오오일내 그룹에 따른 조성비

[표 4-4-9] 다시마 유래 바이오오일의 GC/MS 분석 결과

Material	GC/MS area [%]	Match [%]
Dianhydromannitol	33.39	91.1
Oxazole, 4,5-dihydro-2,4,4-trimethyl-	11.13	81.5
Acetic acid	7.06	94.5
2-Propanone, 1-hydroxy-	6.78	90.6
Isosorbide	5.83	93.2
Ethanone, 1-(2-furanyl)-	5.68	89.6
1,2-Cyclopentanedione, 3-methyl-	4.20	84.8
α-D-Glucopyranoside, methyl 3,6-anhydro-	3.11	80.2
2-Furanmethanol	1.94	90.5
Propanoic acid	1.91	91.1
3-Pyridinol	1.49	87.7
1,2-Ethandiol	1.48	82.1
Isosorbide	1.28	87.8
2,4-Dimethyl-2-oxazoline-4-methanol	0.91	85.9
1-Hydroxy-2-butanone	0.91	87.1
2-Cyclopenten-1-one, 3-methyl-	0.89	90.1
1,3-Cyclopentanedione, 2,4-dimethyl-	0.86	84.8
2-Butanone, 3-hydroxy-	0.73	81.9
Phenol	0.71	85.2
Butyrolactone	0.68	90.7
2-Cyclopenten-1-one, 3-ethyl-2-hydroxy-	0.64	92.9
1-Methyl-1-ethoxycyclobutane	0.43	88.4
2-Cyclopenten-1-one	0.42	85.7

[표 4-4-10] 다시마 유래 바이오오일의 주요 구성 물질

	Compounds	Representative chemical
Aliphatics	Dianhydromannitol; Acetic acid; 2-propanone, 1-hydroxy-; Propanoic acid; 1,2-Ethanediol; Butanoic acid; 1-Hydroxy-2-butanone;	 Dianhydromannitol
Furans	Ethanone, 1-(2-furanyl)-; 2-Furanmethanol;	 Ethanone, 1-(2-furanyl)-
Cyclopentanes	1,2-Cyclopentanedione, 3-methyl;	 1,2-Cyclopentanedione, 3-methyl
Etc.	Oxazole, 4,5-dihydro-2,4,4-trimethyl-; Isosorbidel 1,5-Anhydroglucitol; 3-Pyridinol; 2,4-Dimethyl-2-oxazoline-4-methanol;	 Oxazole, 4,5-dihydro-2,4,4-trimethyl-

4. 요약 및 제언

다양한 해조류 바이오매스의 물리·화학적 특성을 파악하기 위하여 원소 분석, 공업 분석, 금속 성분 분석을 수행하였다. 해조류 바이오매스 종류에 따라 화학적 조성이 크게 변화였으며 Na, Ca, K, P, Fe과 같은 금속 성분을 다량 함유하고 있는 것을 확인하였다. 또한, 목질계 바이오매스와 달리 휘발분의 함량이 낮고 상대적으로 ash의 함량이 높은 것을 확인하였다. TGA 분석을 통해 해조류 바이오매스의 열분해는 크게 3단계로 이루어지는 것을 확인하였으며, 주요 열분해 구간에서 중량 감소 비교를 통해 다시마가 상대적으로 가장 높은 중량 감소가 일어나 열분해 공정에 유리할 것이라고 판단되었다. 따라서, 다시마를 원료로 하여 급속 열분해 공정을 통해 바이오오일로의 전환 가능성을 확인하고 바이오오일 수율을 최대화하기 위해 생성물 수율에 영향을 미치는 최적의 공정 조건을 찾고자 하였다. 바이오오일

수율에 영향을 미치는 주요 변수인 열분해 온도, 최소 유동화 속도 비, feeding rate 을 변화시키면서 실험하였다. 실험 결과, 최적 조건은 열분해 온도 425 °C, 최소 유동화 속도 비 5, feeding rate 600 g/hr 이었으며 이 때 바이오오일의 수율은 35.4 wt% 이었다. 생성된 바이오오일을 연료 또는 유용한 화학물질로 사용하기 위한 가능성을 확인하기 위해 최적 공정조건에서 생성된 다시마 유래 바이오오일의 물리·화학적 특성 분석 및 정성 분석을 수행하였다. 다시마 유래 바이오오일은 수분을 건조한 기준에서는 발열량이 6258.29 kcal/kg을 나타냈으며 이는 기존 화석연료 발열량의 2/3 수준이다. 또한, GC/MS를 이용한 정성 분석 결과 다시마 유래 바이오오일에는 aliphatics 계열의 화합물이 주요 구성 성분이라는 것을 확인하였다.

상기 결과로부터 바이오매스로부터 급속 열분해 반응을 통한 바이오오일 생산시 가장 큰 영향을 미치는 인자는 공정조건이외에 바이오매스의 휘발분과 ash 함량이라는 것을 확인할 수 있었다. 특히, 해조류 바이오매스의 경우에는 기존의 목질계 바이오매스와 비교하였을 때 상대적으로 낮은 휘발분과 높은 ash 함량을 가지고 있으므로 바이오오일의 수율과 품질을 향상시키기 위해서는 TGA 분석/공업분석 등을 이용하여 높은 휘발분과 낮은 ash 함량을 가지는 해조류 바이오매스를 선별하는 것과 동시에 해조류 바이오매스에 존재하는 ash 함량과 알칼리 금속 및 토금속과 같은 금속 성분의 함량을 낮출 수 있는 전처리 방법의 개발이 필요하다고 판단된다. 따라서 향후에는 다양한 전처리 방법을 이용하여 ash 및 금속 성분을 최소화할 수 있는 전처리 방법 및 조건을 최적화하고, 최적화된 전처리 시료를 이용한 바이오오일 생산 실험에 대한 연구가 진행될 것이다.

제 5 장 목표달성도 및 관련분야에의 기여도

제 1 절 연구 결과 요약

1. 연구 개발의 목표

구분	연구개발 목표	연구개발 내용 및 범위
	<p>[DB 구축 및 표준화]</p> <ul style="list-style-type: none"> - 바이오매스용 해조류의 구성당 및 생리활성물질의 database 구축 	<ul style="list-style-type: none"> - 해조류를 구성하고 있는 단당류 및 이당류의 조성을 분석하기 위하여 HPLC에 의한 단당류 및 이당류의 분석 방법 확립 - 다시마, 미역, 감태 우뚝가사리, 진두발, 도박, 파래, 서실 및 모자반의 구성당 분석을 위하여 산, 알칼리 및 플라즈마 처리 조건을 확립하여 해조류 구성당의 database를 구축 - 해조류의 기능성 물질 검색을 위해 다시마와 감태에 대한 용매 추출물에 따른 분획물 분리방법을 확립하고 검색된 생리활성물질에 대한 순수 물질 분리 방법을 확립 - 항산화활성; DPPH radical 소거능과 RAW264.7 세포를 이용한 ROS 소거능 분석방법 확립 - 항염증 활성; RAW264.7 세포를 이용한 NO 소거능 분석방법 확립 - 항비만, 항치매, 항암 및 당뇨합병증 치료 및 예방활성은 부산물 활용팀과 공동으로 확립
<p>해조류 통합 활용화</p>	<p>[부산물 활용 통합공정]</p> <ul style="list-style-type: none"> - 갈조류 저분자 유기용매분획물의 생리활성 분석 및 기능성물질 분리 	<ul style="list-style-type: none"> - 다시마, 모자반 및 감태의 알코올 추출물을 유기용매로 분획하여 각각의 양과 phlorotannin 함량을 분석 - 다시마, 모자반 및 감태의 알코올 추출물을 유기용매로 분획하여 각각의 항산화, 항염증, 항치매, 항암 효과를 분석 - 항염증 활성이 높은 다시마와 모자반의 헥산 및 dichloromethane 획분으로 항염증 효과 분석. - 다시마 유기용매 획분의 당뇨합병증 치료 및 예방효과를 분석하여, 활성물질 획분 확보 - 모자반 유기용매 획분의 항암활성을 측정하여 활성이 높은 헥산획분을 대상으로 그 기전을 규명. - 감태로부터 분리된 dieckol의 항암활성 기전 분석
	<p>[화학적 전처리 및 당화]</p> <ul style="list-style-type: none"> - 다양한 전처리 공정적용 - 1차 분별물 수율향상을 위한 분별공정 최적화 	<ul style="list-style-type: none"> - alginate 등의 1차 분별물 추출 - 대상 해조류에 대한 촉매별 전처리 적용시험 및 평가 - 전처리 공정에서 발생하는 부산물의 경시변화 조사 - 촉매별 전처리 시료의 효소가수분해도 평가
	<p>[생물학적 당화]</p> <ul style="list-style-type: none"> - 갈조류 분해 미생물 1종의 대사체 프로파일링 - 갈조류 분해효소 프로파일링 	<ul style="list-style-type: none"> - 생물정보학 및 미생물 스크리닝을 이용한 해조류 분해 미생물을 Saccharophagus degradans 로 선정하였음. 선정 미생물의 갈조류 분해 산물의 대사체 및 해조류 분해효소 프로파일링을 통해 대사 경로를 파악하였음

구분	연구개발 목표	연구개발 내용 및 범위
	<p>[알코올 발효]</p> <ul style="list-style-type: none"> - 해조류 유래 당류별 알코올 발효 특성 평가 - 당화액 내 당과 저해물질의 프로파일링 - 당화액 내 복합당 동시 이용을 위한 유전자 탐색 및 발현기구 도출 - 재조합균주개발 target 유전자 및 기술 선정 	<ul style="list-style-type: none"> - 해조류별 또는 전처리별 당화액의 발효특성 및 알코올을 비롯한 발효산물의 조성을 정량/정성적으로 분석하여 고수율 알코올로의 전환을 위한 해조류 선정과 최적화된 당화조건들을 선별할 수 있는 프로토콜 확립 - 해조류 종류별, 전처리/당화 조건별 생성되는 발효 저해물질 및 기타 비당화산물에 의한 저해물질 정성분석을 통한 저해물질 특성 파악 - 유기산, furans, furfural, phenolics 등과 같은 대표적 저해물질의 성분별, 다성분 혼합 존재 조건별 발효저해 특성 평가 - 발효시에 사용되지 않은 비발효성 당 또는 비선택성 당의 발효화의 가능성을 조사하고 당화액의 효율적인 전환을 위한 다양한 접근방법 제시 - 해조류 당화액에 존재하는 주된 당성분들을 알코올로 전환할 수 있는 재조합 균주의 개발을 위한 gene targeting 및 맞춤형 재조합균주 생산을 위한 분자생물학적 tool의 선별 및 확보
해조류 그린 에너지화	<p>[혐기성 소화]</p> <ul style="list-style-type: none"> - 혐기성 소화에 의한 유기산 생성조건 최적화 - 유기산으로부터의 혼합알코올 제조 기본 공정 구축 	<ul style="list-style-type: none"> - 해조류의 혐기성 소화에 의한 혼합알코올 생산 기본공정 조건의 확보를 위하여 발효특성을 연구하고 생산조건을 최적화하였음 (목표수율 = 300L 혼합알코올/톤-VS) - 유기산으로부터 알코올을 제조하기 위한 기술 2가지에 대하여 조사하였음. 2단계 반응인 에스테르화 반응 및 수소화 반응은 전체 공정 효율이 거의 90%에 도달하였음. 1단계 반응인 유기산의 직접 수소화 반응은 에스테르의 생성이 관찰되어 알코올 선택도가 낮게 관찰됨
	<p>[열화학적 전환]</p> <ul style="list-style-type: none"> - 해조류 바이오매스의 물리·화학적 특성 및 열적 동특성 데이터 확보 - 해조류 바이오매스의 열분해 생성물 분포 및 바이오오일 생산을 위한 공정조건 조사 	<ul style="list-style-type: none"> - 총 8종의 해조류 바이오매스를 대상으로 하여 물리·화학적 특성 및 열적 동특성 데이터를 확보하였음 - 다시마를 원료로 하여 급속 열분해 공정을 이용하여 바이오오일을 생산하는 실험을 수행하였으며, 공정 조건이 열분해 생성물의 수율에 미치는 영향을 파악함. 실험 결과 최적 조건은 열분해 온도 425 °C, 최소 유동화속도 비 5, feeding rate 600 g/hr 이며 바이오오일 최대 수율은 35.4 wt% 임 - 생성된 바이오오일의 물리·화학적 특성 및 조성을 분석하였으며 그 결과 바이오오일의 발열량은 dry basis에서 6258.29 kcal/kg으로 기존 화석연료 발열량의 2/3 수준 임. 또한 정성 분석을 통해 aliphatics 계열의 화합물이 가장 많이 생성된 것을 확인함

2. 계획대비 달성도

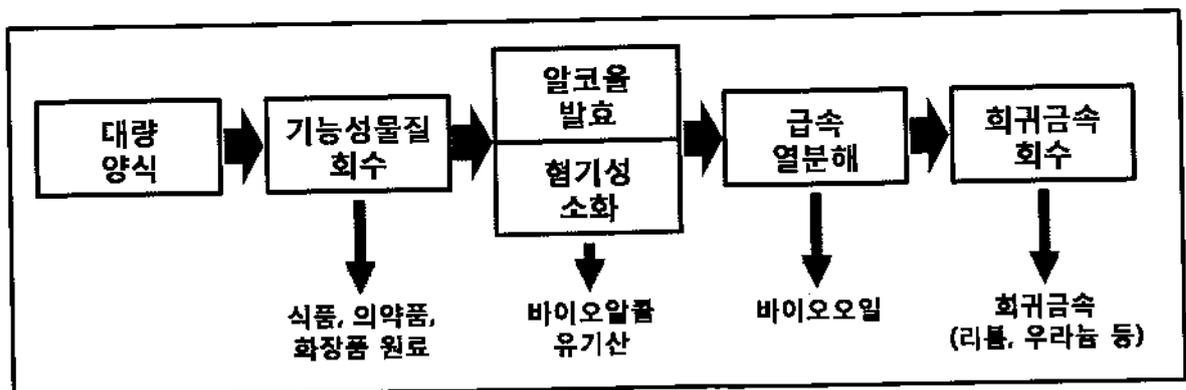
세부연구목표		달성내용	달성도 (%)
<p>해조류 바이오매스의 통합활용화</p>	<p>해조류 구성 당류의 확보 및 분석조건 확립</p>	<ul style="list-style-type: none"> - 단당류 및 이당류의 분석 방법 확립 - 10종의 해조류 구성당의 DB 구축 - 해조류 기능성 물질의 용매 추출 분획물 및 순수물질 분리 방법 확립 	100
	<p>생리활성물질의 분석방법 확립</p>	<ul style="list-style-type: none"> - 항산화활성: DPPH radical 소거능과 RAW264.7 세포를 이용한 ROS 소거능 분석방법 확립 - 항염증 활성: RAW264.7 세포를 이용한 NO 소거능 분석방법 확립 	100
	<p>갈조류 저분자 화합물의 기능성 분석</p>	<ul style="list-style-type: none"> - 다시마로부터 추출된 저분자 활성물질의 유기용매 분획에 따른 항산화, 항염증, 항치매, 항비만, 당뇨합병증 저해 및 항암활성 분석 - 항염증과 항치매 활성이 높은 다시마 핵산 획분으로부터 작용기전 규명 - 모자반으로부터 추출된 저분자 활성물질의 유기용매 분획에 따른 항염증, 항치매, 및 항암활성 분석 	100
	<p>2종 이상의 화합물 분리</p>	<ul style="list-style-type: none"> - 항염증 효과가 높은 2종의 화합물을 다시마 핵산획분으로부터 분리하여 NMR과 GC/MS로 구조 규명 - 감태로부터 추출된 저분자 활성물질의 유기용매 분획에 따른 항산화활성을 분석하여 4종의 phlorotannin 화합물의 구조를 NMR로 분석 	100
	<p>전처리 용매 결정</p>	<ul style="list-style-type: none"> - 산 촉매 2종 및 알칼리 촉매 3종에 관한 전처리 실험 및 이를 통한 전처리 용매(NaOH, Ammonia) 선정 	100
	<p>전처리 공정별 효율성 비교</p>	<ul style="list-style-type: none"> - 촉매 종류 및 농도별 전처리 후 효소 당화를 통한 각 전처리공정의 효율성 비교 완료 	100
	<p>섬유소 기준 효소가수 분해도 90% 이상</p>	<ul style="list-style-type: none"> - 효소가수분해도 99.1% 	100
	<p>선정 미생물의 갈조류 분해 산물의 대사체 및 해조류 분해효소 프로파일링</p>	<ul style="list-style-type: none"> - 탄소원에 따라 <i>S. degrandans</i>의 생장시기 별 대사체 분석을 통해 98개의 대사체를 동정하였고, 분해효소 활성 측정을 통해 분해 효소 프로파일링 완료 	100

세부연구목표		달성내용	달성도 (%)
해조류 바이오매스의 그린에너지화	해조류 유래 당류 별 알코올 발효 특성 평가	- 산처리 당화 도박의 경우 갈락토오스를 소비하여 약 40%의 알코올 생산성을 나타냄	100
	1종 이상의 동시 이용 유전자 및 발현기구 도출	- 해조류 당화액에 존재하는 주된 당성분들을 알코올로 전환할 수 있는 재조합 균주의 개발을 위한 gene targeting 및 맞춤형 재조합균주 생산을 위한 분자생물학적 tool의 선별 및 확보	95
	혐기성 소화에 의한 유기산 생성조건 최적화	- 다시마 톤당 232.5 Kg의 유기산 생산 (80%의 수소화반응 수율 가정시 혼합 알코올 수율 292 L에 해당)	97
	유기산으로부터 혼합알코올 제조 기본공정 구축	- 혼합알코올 제조 반응장비 구축 (에스테르화 반응수율: 90% 이상, 에스테르 수소화 반응수율: 80-90%, 유기산 수소화 반응수율: 56%)	100
	해조류 바이오매스의 물리·화학적 특성 및 열적 동특성 데이터 확보	- 총 8종의 해조류 바이오매스의 물리·화학적 특성 및 열적 동특성 데이터 확보 - 열분해 공정에 적합한 해조류 바이오매스로 다시마 선정	100
	해조류 바이오매스의 열분해 생성물 분포 및 바이오오일 생산을 위한 공정 조건 조사 (바이오오일 수율 50 wt% 이상)	- 바이오오일 연료 특성 분석(발열량, 원소분석) 및 구성 성분 분석 및 그룹화 - 최적 공정 조건 도출 - 바이오오일 최대 수율 35.4 wt%	85

제 2 절 기술 구성 및 연계도

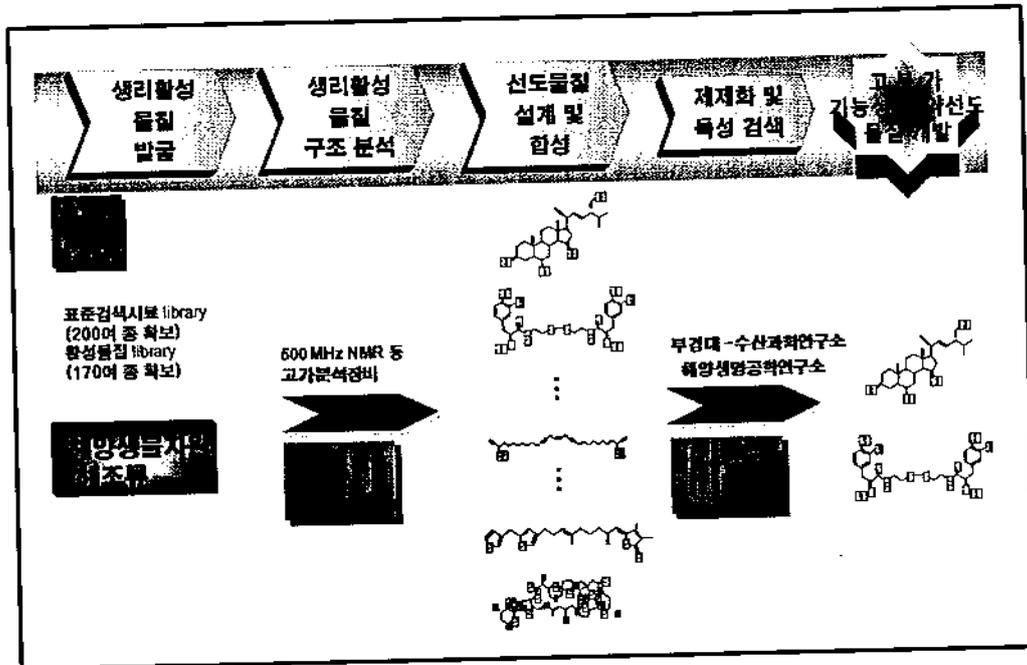
1. 해조류 바이오매스 유용성분 및 에너지 회수기술 구성

본 사업의 용역기간 동안 수행한 결과를 바탕으로 해조류 바이오매스로부터 유용성분 및 에너지를 회수하는 통합기술을 구성하였다. 먼저 외해 또는 내해 양식을 통하여 해조류 바이오매스를 대량으로 확보하는 것을 전제로 한다. 이는 해조류 바이오매스로부터 회수 가능한 물질들을 생산하기 위한 필수적인 요소일 것이다. 이렇게 획득한 해조류 바이오매스로부터 기능성 물질을 회수하여 식품, 의약품, 화장품 원료 등의 고부가 제품의 개발이 가능할 것이다. 본 용역사업을 통하여 이들 물질들은 항암, 항산화, 항염증, 항치매, 항비만 등의 효능이 있음을 확인하였고 이들 물질들이 고가인 관계로 해조류 바이오매스의 통합공정의 경제성을 담보하는데 있어 핵심적인 위치를 차지할 것이다. 이때 해조류 바이오매스에 다량으로 존재하는 일부 금속성분들의 추출도 가능할 것으로 판단된다. 1차 처리된 해조류 바이오매스는 알코올 발효 또는 혐기성 소화공정에 투입될 수 있다. 알코올 발효의 경우에는 미생물 등을 통하여 에탄올 또는 부탄올의 생산이 가능하다. 한편 혐기성 소화의 경우에는 C_2 , C_3 , C_4 등의 유기산을 생성시킨 후 화학적 촉매를 이용하여 혼합 알코올 생산이 가능함을 본 용역사업을 통하여 확인하였다. 이와 같은 생물학적 전환기술을 거치면 고상의 잔류물이 생성되므로 이들 물질을 금속 열분해공정에 투입하여 최종적으로 액상의 바이오오일을 생산할 수 있게 된다. 나아가 액화되지 않은 잔류물로부터 잔존하는 리튬, 우라늄 등의 희귀금속을 회수하는 통합공정을 구성할 수 있음을 본 용역사업을 통하여 확인하였다. 정리해 보면, 해조류 바이오매스로부터 기능성물질, 희귀금속, 유기산 등의 다양한 유용성분과 바이오알코올, 바이오오일과 같은 회수가 가능할 것이다. 그림 5-2-1에서는 상기 기술들을 정리하여 도시하였다.

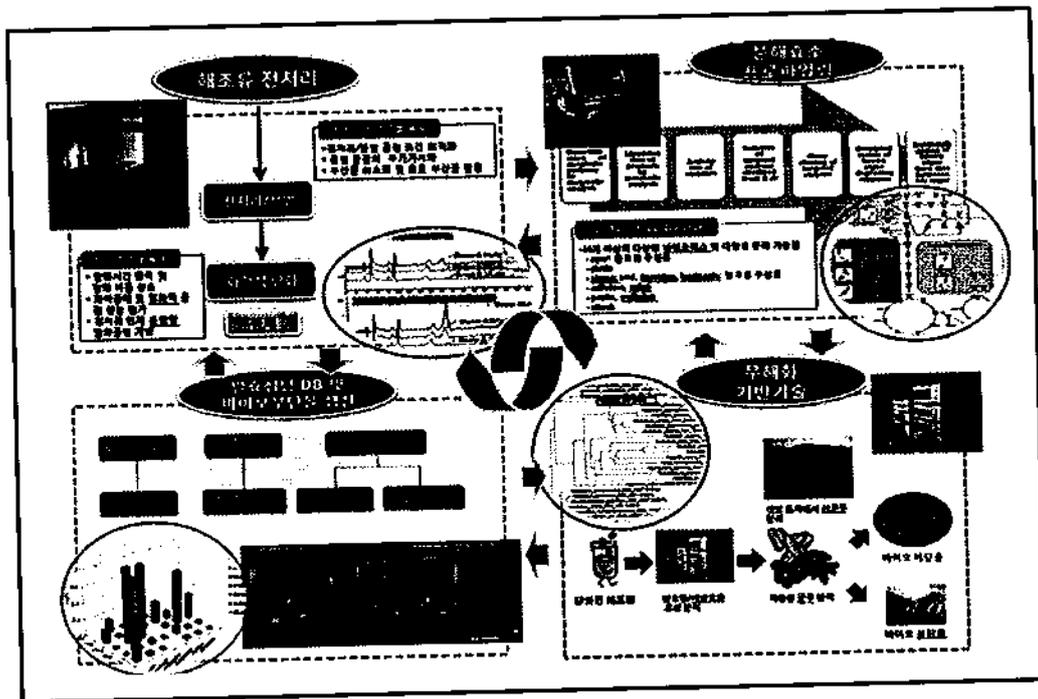


[그림 5-2-1] 해조류 바이오매스 유용성분 및 에너지 회수 통합공정 구성도

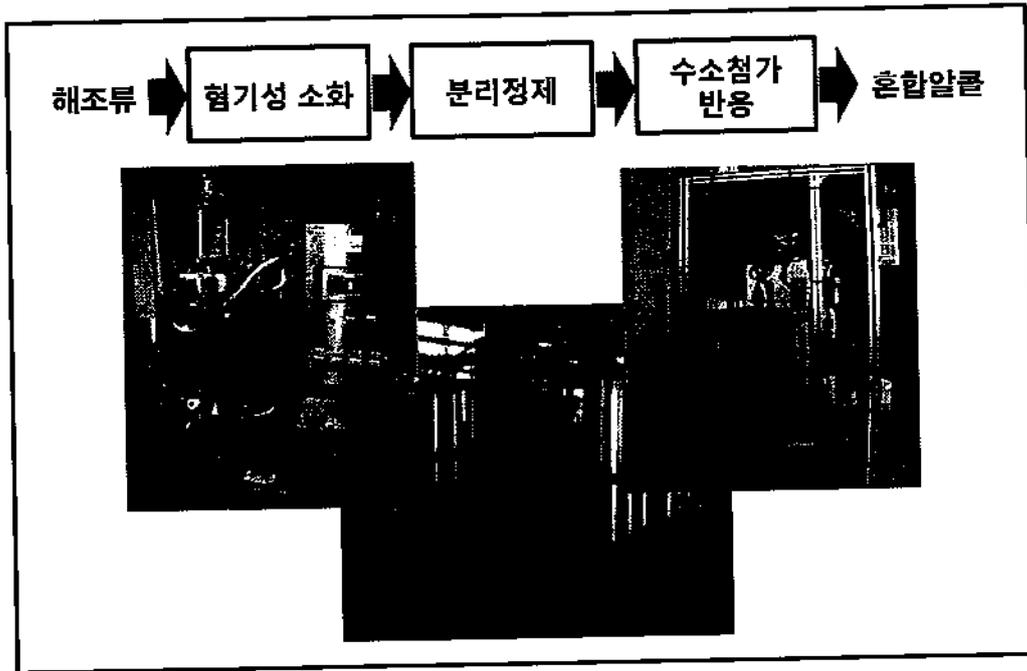
앞 장에서의 전체 구성도와 함께 유용성분 및 에너지를 회수하기 위한 각각의 단위기술 구성도를 아래의 그림과 같이 도출할 수 있었다. 크게 기능성 물질 회수, 알코올 발효, 혐기성 소화공정, 급속 열분해공정으로 구분하여 정리하였으며 단위기술을 구성하는 주요 요소들은 제 3장 및 4장에서 상술한 바 있다.



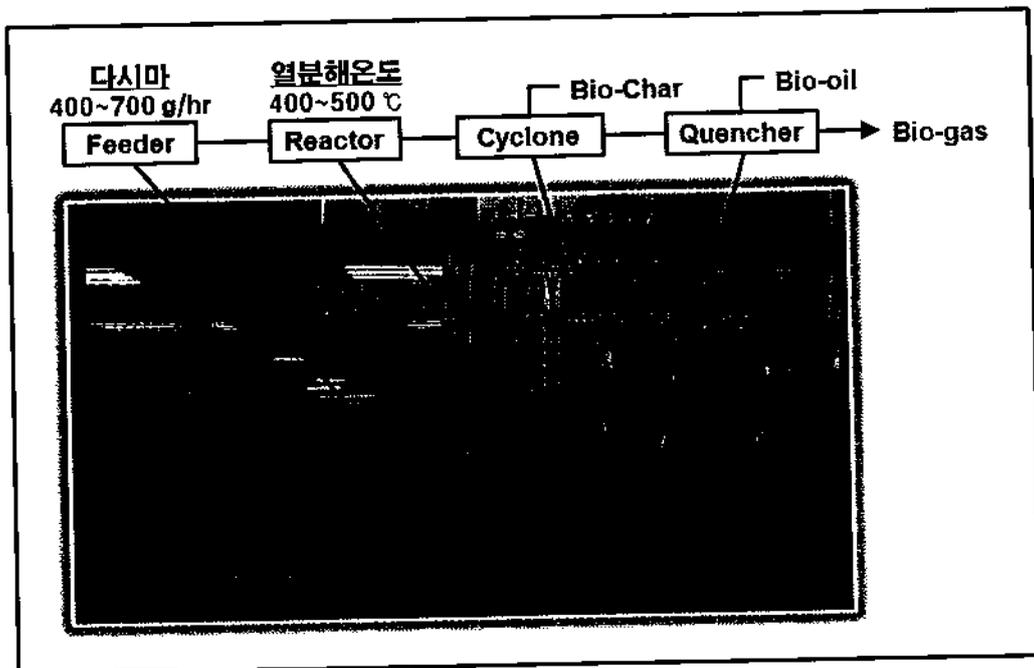
[그림 5-2-3] 기능성 물질 회수기술 구성도



[그림 5-2-4] 해조류 바이오매스 유용성분 및 에너지 회수 통합공정 구성도



[그림 5-2-5] 해조류 바이오매스 유용성분 및 에너지 회수 통합공정 구성도



[그림 5-2-6] 해조류 바이오매스 유용성분 및 에너지 회수 통합공정 구성도

2. 해조류 바이오매스의 통합적 활용기술 연계도

본 용역사업을 수행하여 확보한 결과로부터 해조류 바이오매스의 통합적 활용방안을 가시적으로 도출하였다. 사업 수행기간이 비교적 짧아 해조류 바이오매스의 통합적 활용방안의 완성도에 미흡한 면이 있을 것으로 판단된다. 하지만 아래 도표에서 보는 바와 같이 다시마 1톤으로부터 344 kg의 액체 및 고체 청정연료, 고부가 생리활성물질 5 kg의 회수가 가능하였다(회수율 = 34.9%). 세부적으로는 후코잔틴 및 폴리페놀 5 kg, 유기산 183 kg 그리고 주요 액체와 고체연료인 바이오오일 및 char 161 kg이다.

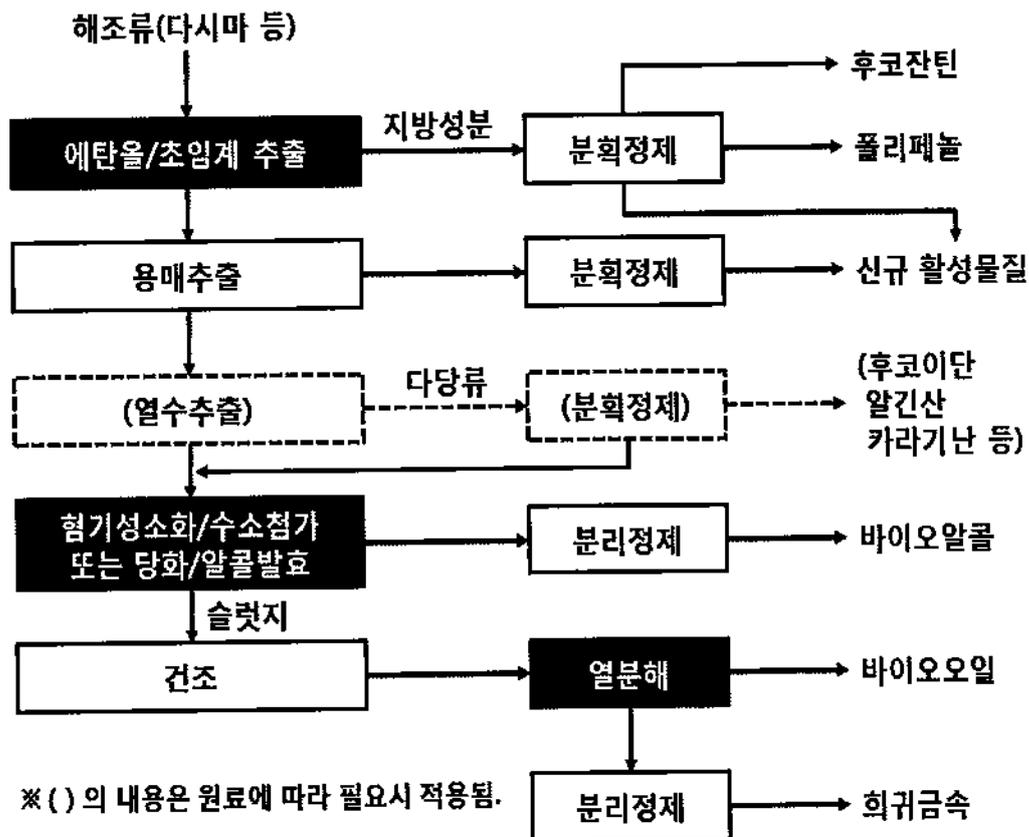
건조 다시마	원료 1톤
알코올 추출 고형물 975 kg	후코잔틴 및 폴리페놀 함유 추출물 25 kg
혐기성 소화 슬러지 224 kg	유기산 183 kg (수침반응시 혼합알코올 112 kg)
급속 열분해	바이오오일 78 kg + Char 83 kg + 바이오가스 63 kg
희귀금속 회수	리튬 3 g, 우라늄 0.4 g

특히, 육상의 목질계 바이오매스와 달리 해조류 바이오매스에는 다양한 유용 기능성성분과 희귀금속이 농축되어 있어서 에너지 전환 전·후에 이들 성분들을 선택적으로 회수하는 것은 해조류 바이오매스 사업의 경제성을 제고하기 위해서 매우 중요하다. 표 5-2-1에서와 같이 기능성 성분과 희귀금속의 부가가치는 매우 높은 것으로 알려져 있다.

[표 5-2-1] 해조류 바이오매스로부터 회수 가능한 주요 기능성 성분 및 희귀금속

성분명	함량	기능성/용도	부가가치
Fucoanthin	0.1~0.5%	항비만, 항당뇨	\$3,300~5,200/Kg
Polyphenol 류	0.2~1.0%	항산화, 노화 예방	\$200~300/Kg
Fucoidan	1~3%	항암	\$150~270/Kg
Alginate	20~30%	식품첨가물	\$6~7/Kg
리튬	3 ppm	전자 재료	\$6.6/Kg
우라늄	0.4 ppm	원자력 연료	\$89/Kg

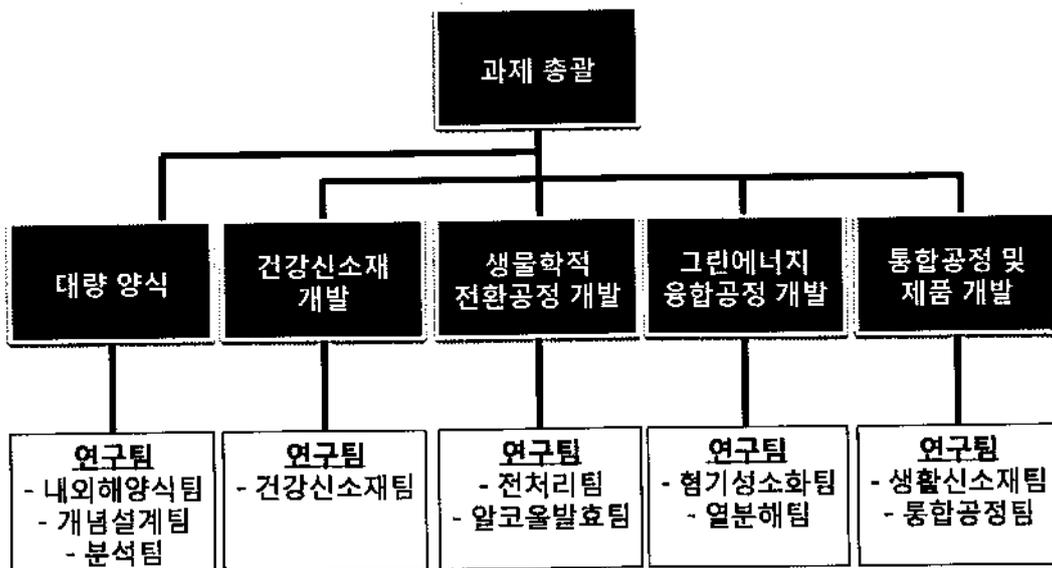
이에 해조류 바이오매스의 통합적 활용기술을 위한 가치사슬(안)을 그림 5-2-7과 같이 구축할 수 있었다. 먼저 에탄올/초임계, 용매, 열수 등의 여러 추출기술을 적용하고 분획을 정제하여 후코잔틴, 폴리페놀, 후코이단, 알긴산, 카라기난, 신규 활성물질 등을 회수할 수 있을 것이다. 이와 같이 유용성분이 제거된 해조류 바이오매스는 혐기성 소화 및 수침 분해 또는 당화 및 알코올 발효를 통하여 바이오알코올을 생산할 수 있을 것이다. 이후 슬러지를 건조하여 급속 열분해공정에 투입하여 바이오오일을 생산하고 고상 또는 액상에 농축된 희귀금속을 회수하는 통합 가치사슬을 완성하게 되었다. 지금까지의 연구결과를 바탕으로 구축하였기 때문에 향후 연구와 검증 절차를 거쳐 최종적으로 완성하고자 한다.



[그림 5-2-7] 향후 해조류 바이오매스의 통합적 활용기술의 가치사슬

제 3 절 향후 계획

본 용역사업을 통하여 다양한 기술들을 해조류 바이오매스의 통합적 활용을 위하여 적용하였으며 그 결과 여러 가능성을 확인할 수 있었다. 하지만 국내에서 처음으로 시도한 연구인 동시에 해조류 바이오매스에 대한 경험 및 학술적 지식이 다소 부족하여 지속적인 추가 연구가 필요하다고 판단된다. 특히, 본 용역사업 내에서 해조류 바이오매스를 대량으로 확보하는 것이 필수 요소 기술이므로 부분적인 연구팀 보강이 필요하다고 사료되어 향후 연구를 위하여 대량 양식 연구팀을 추가하였고 연구팀의 구성도 재조정하였다. 이에 과제 총괄 이외에도 최소 5개 연구팀을 구성하여 향후 연구를 수행하고자 한다. 아래의 그림 5-3-1에서 보는 것처럼, 1) 대량 양식, 2) 건강신소재 개발, 3) 생물학적 전환공정 개발, 4) 그린에너지 융합공정 개발, 5) 통합공정 및 제품 개발로 연구팀을 재편하였다. 먼저 대량 양식 연구팀에서는 내·외해양식팀, 개념설계팀, 그리고 분석팀으로 구성하고자 한다. 건강신소재 개발 연구팀에서는 주로 고기능성 생리활성물질을 연구할 계획이다. 다음으로 생물학적 전환공정 개발 연구팀에서는 생물학적 전환과 관련된 모든 연구들이 통합적으로 연계되도록 구성하여 향후 연구를 진행하고자 한다. 그린에너지 융합공정 개발 연구팀에서는 기존의 혐기성 소화 및 급속 열분해 관련 연구자들이 모여 융합공정을 개발하는데 주력하고자 한다. 끝으로 현재 공동연구를 수행하고자 하는 기업들의 참여를 유도하고자 통합공정 및 제품 개발 연구팀을 신설하여 연구를 진행하고자 한다.



[그림 5-3-1] 해조류 바이오매스 유용성분 및 에너지 회수 통합공정 구성도

제 6 장 참고문헌

3장 참고문헌

- F. Nanjo, K. Goto, R. Seto, M. Suzuki, M. Sakai, Y. Hara, *Free Radical Biol. Med.*, 21, 895-902 (1996).
- H. Kim, H. S. Lee, K. T. Chang, T. H. Ko, K. J. Baek, W. S. Kwon, *J. Immunol.*, 154, 4741-4748 (1995).
- Z.A. Rahman, N. Abdullah, R. Singh, W. Sosroseno, *J. Oral. Sci.*, 52, 133-136 (2010).
- S. Hayman, J.H. Kinoshita, *J. Biol. Chem.*, 240, 877-882 (1965).
- J. A. Vinson, T. B. Howard III, *J. Nutr. Biochem.*, 7, 659-663 (1996).
- F. Yang, W. J. de Villiers, C. J. McClain, G. W. Varilek, *J. Nutr.*, 128, 2334-2340 (1998).
- D. Chen, M. Nie, M. W. Fan, Z. Bian, *Pharmacology*, 82, 264-269 (2008).
- Y. J. Surh, K. S. Chun, H.H. Cha, S. S. Han, Y.S. Keum et al., *Mutat. Res.*, 1, 243-268 (2001).
- J. Y. Cho, P. S. Kim, J. Park, E. S. Yoo, K. U. Baik et al., *J. Ethnopharmacol.*, 70, 127-133 (2000).
- Y. Zou, Z.J. Qian, Y. Li, M. M. Kim, S. H. Lee et al., *J. Agric. Food. Chem.*, 56, 7001-7009 (2008).
- K. A. Kang, K. H. Lee, S. Chae, Y. S. Koh, B. S. Yoo et al., *Free Radical Res.*, 39, 883-892 (2005).
- K. A. Kang, K. H. Lee, J. W. Park, N. H. Lee, H. K. Na et al., *FEBS Lett.* 581, 2000-2008 (2007).
- Y. Okada, A. Ishimaru, R. Suzuki, T. Okuyama. *J. Nat. Prod.*, 67, 103-105 (2004).
- N. Y. Yoon, H. Y. Chung, H. R. Kim, J. S. Choi., *Fish. Sci.*, 74, 200-207 (2008).
- T. Shibata, K. Nagayama, R. Tanaka, K. Yamaguchi, T. Nakamura., *J. Appl. Phycol.*, 15, 61-66 (2003).
- A. R. Kim, T. S. Shin, M. S. Lee, J. Y. Park, K. E. Park et al., *J. Agric. Food. Chem.* 57, 3483-3489 (2009).
- Y. C. Kim, R. B. An, N. Y. Yoon, T. J. Nam, J. S. Choi., *Arch. Pharma. Res.*, 28, 1376-1380 (2005).

- C. S. Myung, H. C. Shin, H. Y. Bao, S. J. Yeo, B. H. Lee et al., *Arch. Pharma. Res.*, 28, 691-698 (2005).
- H. S. Kang, H. R. Kim, D. S. Byun, B. W. Son, T. J. Nam et al., *Arch. Pharma. Res.*, 27, 1226-1232 (2004).
- T. Primiano, T. R. Sutter, T. W. Kensler., *Adv. Pharmacol.*, 38, 293-328 (1997).
- A. K. Jaiswal, *Free Radic. Biol. Med.*, 29, 254-262 (2000).
- A. N. Kong, R. Yu, V. Hebbar, C. Chen, E. Owuor et al., *Mutat. Res.*, 480, 231-241 (2001).
- K. Itoh, K. I. Tong, M. Yamamoto, *Free Radic. Biol. Med.*, 36, 1208-1213 (2004).
- K. Itoh, T. Chiba, S. Takahashi, T. Ishii, K. Igarashi et al., *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 236, 313-322 (1997).
- J. H. Lim, H. S. Park, J. K. Choi, I. S. Lee, H. J. Choi, *Arch. Pharm. Res.*, 30, 1590-1598 (2007).
- E. D. Owuor, A. N. Kong, *Biochem. Pharmacol.*, 64, 765-770 (2002).
- F. Gonzalez-Scarano, G. Baltuch, *Annu. Rev. Neurosci.*, 22, 219-240 (1999).
- H. Green, O. Kehinde, *Cell*, 1, 113-116 (1974).
- C. S. Rubin, A. Hirsch, C. Fung, O. M. Rosen, *J. Bio. Chem.*, 253, 7570-7578 (1978).
- E. D. Rosen, C. J. Walkey, P. Puigserver, B. M. Spiegelman, *Genes Dev.*, 14, 1293-1307 (2000).
- Z. Wu, P. Puigserver, B. M. Spiegelman, *Curr. Opin. Cell. Biol.*, 11, 689-694 (1999).
- P. Li, D. Nijhawan, I. Budihardjo, S. M. Srinivasula, M. Ahmad et al., *Cell*, 91, 479-489 (1997).
- M. Zornig, A. Hueber, W. Baum, G. Evan, *Biochem. Biophys. Acta.*, 1551, 1-37 (2001).
- B. Inbal, G. Shani, O. Cohen, J. L. Kissil, A. Kimchi, *Mol. Cell. Biol.*, 20, 1044-1054 (2000).
- A. L. Gartel, A. L. Tyner, *Mol. Cancer. Ther.*, 1, 639-649 (2002).
- K. Fujiwara, S. Daido, A. Yamamoto, R. Kobayashi, T. Yokoyama et al., *J. Biol. Chem.*, 283, 388-397 (2008).
- K. Leung, A. Nagy, I. Gonzalez-Gomez, J. Groffen, N. Heisterkamp et al., *Cells. Tissues. Organs.*, 175, 72-83 (2003).

- J. Avruch, X. F. Zhang, J. M. Kyriakis, *Trends. Biochem. Sci.*, 19, 279-283 (1994).
- M. Brownlee, *Nature*. 414, 813-820 (2001).
- J. Peyrou, M. Sternberg, *Pathol. Biol.*, 54, 405-419 (2006).
- F. Haroun-Bouhedja, M. Ellouali, C. Sinquin, C. Boisson-Vodal. *Thrombosis. Res.*, 100, 453-459 (2000).
- S. Collicec, A.M. Fischer, H. Tapon-Brethaudiere, C. Boisson, P. Durand et al., *Thrombosis. Res.*, 64, 143-147 (1991).
- T. Nishino, G. Yokoyama, K. Dobashi, M. Fujihara, T. Nagumo, *Carbohydrate Res.*, 186, 119-129 (1989).
- T. Nishino, Y. Aizu, T. Nagumo, *Agric. Biol. Chem.*, 55, 791-797 (1991).
- T. Usui, K. Asari, T. Mizuno, *Agric. Biol. Chem.*, 44, 1965-1970 (1980).
- T. Nishino, Y. Aizu, T. Nagumo, *Agric. Biol. Chem.*, 55, 791-797 (1991).
- J. Han, S. Kang, R. Choue, H. Kim, K. Leem et al., *Fitoterapia*, 73, 710-712 (2002).
- K. S. Lee, Y.S . Choi, J. S. Seo, *J. Med. Food.*, 7, 130-135 (2004).
- E. T. Kim, J. H. Oh, *J. Korean. Ophthalmol. Soc.*, 50, 1555-1562 (2009).
- Standard Biomass Analytical Procedures, National Renewable Energy Laboratory, Golden, Co (2008)
- K. J. Andrews, E. C. C. Lin, *Fed. Proc.*, 35, 2185-2189 (1976).
- O. Bobleter, *Prog. Polym. Sci.*, 19, 797-841 (1994).
- R. M. Weiner, *PLoS Genet.*, 4, 1-13 (2008).
- M. Ghosh, A. Das, A. K. Mishra, G. Nanda, *Enzyme Microb. Technol.*, 15, 703-709 (1993).
- S. Zeilinger, R. L. Mach, M. Schindler, P. Herzog, C. P. Kubicek, *J. Biol. Chem.*, 271, 25624-25629 (1996).
- S. S. Dawes, V. Mizrahi, *Lepr. Rev.*, 72, 408-414 (2001).

4장 참고문헌

- B. Ray, *Carbohydr. Polym.*, 66(3), 408-416 (2006).
- D. T. Jones and D. R. Woods, *Microbiol. Rev.*, 50, 484-524 (1986).
- E. Cornillot, R. V. Nair, E. T. Papoutsakis, P. Soucaille, *J. Bacteriol.*, 179,

- 5442-5447 (1997).
- F. Hillmann, R. J. Fischer, F. Saint-Prix, L. Girbal, H. Bahl, *Mol. Microbiol.*, 68, 848-860 (2008).
- F. Sabathe P. Soucaille, *J. Bacteriol.*, 185, 1092-1096 (2003).
- I. Vasconcelos, L. Girbal, P. Soucaille, *J. Bacteriol.*, 176, 1443-1450 (1994).
- J. G. Nolling, G. Breton, M. V. Omelchenko, K. S. Makarova, Q. Zeng et al., *J. Bacteriol.*, 183, 4823-4838 (2007).
- J. Lee H. P. Blaschek, *Appl. Environ. Microbiol.*, 67, 5025-5031 (2001).
- J. Lee, W. J. Mitchell, M. Tangney, H. P. Blaschek, *Appl. Environ. Microbiol.*, 71, 3384-3387 (2009).
- J. T. Heap, O. J. Pennington, S. T. Cartman, G. P. Carter, N. P. Minton, *J. Microbiol. Methods*, 70, 452-464 (2007).
- J. Zhong, M. Karberg, A. M. Lambowitz, *Nucleic Acids Res.*, 31, 1656-1664 (2003).
- J.-I. Park, H.-C. Woo, J.-H. Lee, *Korean Chem. Eng. Res.*, 40(5), 833-844 (2008).
- M. F. Gorwa, C. Croux, P. Soucaille, *J. Bacteriol.*, 178, 2668-2675 (1996).
- P. M. Vignais B. Billoud, *Chem. Rev.*, 107, 4206-4272 (2007).
- W. J. Mitchell, *Adv. Microb. Physiol.*, 39, 31-130 (1998).
- S. Yokoyama, K. Jonouchi, K. Imou, *Proc. World Acad. Sci. Eng. Technol.*, 22, 320-323 (2007).
- K. T. Bird, D. P. Chynoweth, D. E. Jerger, *J. Appl. Physicol.*, 2, 207-213 (1990).
- A. Vergara-Fernandez, G. Vargas, N. Alarcon, A. Velasco, *Biomass and Bioenergy*, 32, 338-344 (2008).
- M. T. Holtzapple, C. B. Granda, *Appl. Biochem. Biotechnol.*, 156(1-3), 525-536 (2009).
- C. B. Granda, M. T. Holtzapple, G. Luce, K. Searcy, D. L. Mamrosh, *Appl. Biochem. Biotechnol.*, 156(1-3), 537-554 (2009).
- M. T. Holtzapple, R. R. Davidson, L. L. Lowery, C. B. Granda, US Patent Application 2008/0121359 A1.
- D. V. Verser, T. J. Eggeman, US Patent 7,351,559 (2008).

- A. Demirbas, *Energy Conversion & Management*, 50, 2782-2801 (2009).
- S. Yaman, *Energy Conversion & Management*, 45, 651-671 (2004).
- A. V. Bridgwater, *Thermal Sci.*, 8, 21-49 (2004).
- A. Demirbas, *Energy Sources Part A*, 30, 1120-1126 (2008).
- H. F. Gercel, O. Gercel, *Energy Sources Part A*, 29, 695-704 (2007).
- J. D. Gonzalez, M. R. Kim, E. L. Buonomo, P. R. Boneli, A. L. Cukierman, *Energy Sources Part A*, 30, 809-817 (2008).
- D. Meier, O. Faix, *Biosource Technol.*, 68(1), 71-77 (1999).
- B.-S. Kang, K. H. Lee, H. J. Park, Y.-K. Park, J.-S. Kim, *Journal of Analytical and Applied Pyrolysis*, 76, 32-37 (2006).
- L. Wei, S. Xu, L. Zhang, H. Zhang, C. Liu et al., *Fuel Processing Technology*, 87, 863-871 (2006).
- Mohan, J. Shi, D. D. Nicholas, C. U. Pittman Jr., P. H. Steele et al., *Chemosphere*, 71, 456-465 (2008).
- N. Ozbay, A. E. Putun, E. Putun, *Int. J. Energy Res.*, 30, 501-510 (2006).
- R. Zanzi, K. Sjöström, E. Björnbom, *Biomass and Bioenergy*, 23, 357-366 (2002).
- M. E. Sánchez, E. Lindao, D. Margaleff, O. Martínez, A. Morán, *Journal of Analytical and Applied Pyrolysis*, 85, 142-144 (2009).
- X. Shuangning, Y. Weiming, B. Li, *Biomass and Bioenergy*, 29, 135-141 (2005).
- Y. Chen, J. Duan, Y.-H. Luo, *Journal of Analytical and Applied Pyrolysis*, 83, 1657-174 (2008).
- X. Miao, Q. Wu, C. Yang, *J. Anal. Appl. Pyrolysis*, 71, 855-863 (2004).
- Y. Dote, S. Sawayama, S. Inoue, T. Minowa, S.-Y. Yokoyama, *Fuel*, 73, 1855-1857 (1994).
- A. B. Ross, K. Anastakis, M. Kubacki, J. M. Jones, *J. Anal. Appl. Pyrolysis*, 85, 3-10 (2009).
- A. B. Ross, J. M. Jones, M. L. Kubacki, T. Bridgeman, *Bioresource Technology*, 99, 6494-6504 (2008).

부록

A. 추진경과 일정표

□ 연구관리 업무 및 일정

월	연구관리 업무	대의 업무	기타 사항
6	<ul style="list-style-type: none"> ○ 연구팀 구성 및 발족 ○ 원료확보 방안협의(완도군) - 2일~3일, 우회철 외 3명 		<ul style="list-style-type: none"> ○ 생산지 방문 (완도 및 기장)
7	<ul style="list-style-type: none"> ○ 기반구축사업 착수워크샵(부산) - 15~16일, 정복철 우회철 외 12명 	<ul style="list-style-type: none"> ○ 1차 부처관계자 합동회의 (착수워크샵) 	
8	<ul style="list-style-type: none"> ○ 자문위원단 방문 미팅 	<ul style="list-style-type: none"> ○ 해외 연구기관 방문 - 22~30일 - Edinburgh(Dr. W.Mitchell) - London(Dr. H. Chase) - 기술동향 파악 및 협의 ○ 자문위원단 위촉 및 구성 	<ul style="list-style-type: none"> ○ 해조류 바이오매스의 활용방안 토의 - VFA bench scale 공정개발
9	<ul style="list-style-type: none"> ○ 1차 중간점검회의(단국대) - 8일, 우회철 외 10명 	<ul style="list-style-type: none"> ○ 평가위원단 위촉 및 구성 정부와의 간담회 	<ul style="list-style-type: none"> ○ 녹색수산업화 방안 토의
10	<ul style="list-style-type: none"> ○ 해조류 그린에너지 연구회의 - 19일, KIST 	<ul style="list-style-type: none"> ○ 2차 부처관계자 회의(27일) 	<ul style="list-style-type: none"> ○ 정책시안 토의
11	<ul style="list-style-type: none"> ○ 2차 중간점검회의 및 전문가 초청 세미나(전남대) - 6일, 우회철 외 16명 ○ 농림부 연구용역 중간보고회 - 20일, 우회철 외 	<ul style="list-style-type: none"> ○ 보도자료 작성 및 배부(23일) ○ 중간평가(중간보고회) ○ 3차 부처관계자 합동회의 	<ul style="list-style-type: none"> ○ 연구진행 점검 ○ 원료확보방안 토의(완도)
12	<ul style="list-style-type: none"> ○ 심포지엄 개최 - 4일, 부산 BEXCO - 자문위원단 연석회의(패널토론) - 전문가 초청 세미나 	<ul style="list-style-type: none"> ○ 보도자료 작성 및 배부(3일) 	
1	<ul style="list-style-type: none"> ○ 3차 중간점검회의(충남대) - 27일, 우회철 외 9명 		<ul style="list-style-type: none"> ○ 인적네트워크 토의
2	<ul style="list-style-type: none"> ○ 대량양식 연구자 회의 - 19일, 우회철 외 5명 ○ 대량양식 기술개발 초안작성 - 23일, 우회철 외 6명 	<ul style="list-style-type: none"> ○ 1차 해조류에너지화 R&D 관계부처 회의(4일) - 청와대 연풍문 회의실 	
3	<ul style="list-style-type: none"> ○ 목포 해조류연구센터 방문 - 31일, 우회철 외 1명 - 연구협의 	<ul style="list-style-type: none"> ○ 2차 해조류에너지화 R&D 관계부처 회의(15일) 	
4	<ul style="list-style-type: none"> ○ 결과종합회의(부산) - 7일~8일, 우회철 외 10명 ○ 농림부 연구용역 최종보고회 ○ 결과 및 연차보고서 발간 	<ul style="list-style-type: none"> ○ 최종 평가, 향후 계획 협의 ○ 4차 부처관계자 합동회의 	<ul style="list-style-type: none"> ○ 생산지 방문(완도)

B. 심포지엄 개최 결과 요약

1. 1차 심포지엄 개요

- 주제 : 농림수산식품부 기반구축연구
‘해조류 바이오매스 그린에너지화 및 통합적 활용 심포지엄’
- 일자 : 2009년 12월 4일(금) 10:00~16:30
- 장소 : 부산 BEXCO 2층 컨벤션홀 (203호)
- 참석자 수 : 회사 29명, 대학교 64명, 연구소 14명
- 협찬 : 전라남도 완도군, 국립수산과학원, 한국화학공학회, (사)해양산업발전협의회
- 프로그램

<프로그램>

시간	주요내용	주최/주최자
10:00~10:15	인사말	임광수 원장 (농림수산식품부 국립수산과학원장)
10:15~10:30	축사	부심시장 김영철 명예교수 (포항공과대학교) 유성희 사무총장 (해양산업발전협의회)
10:30~10:45	결과보고	우희철 교수 (부경대학교)
10:45~11:00	해조류 그린에너지화를 위한 원료분류 및 DB 구축	신태선 교수 (전남대학교)
11:00~11:15	해조류 통합활용을 위한 생리활성물질의 이용	김형학 교수 (부경대학교)
11:15~11:30	Coffee Break	
11:30~11:45	상용화성 공정에 의한 해조류 유래 바이오매를 생산기술 개발	오경근 교수 (단국대학교)
11:45~12:00	생물·화학 공학공정에 의한 해조류로부터 통합활용 생산	전영동 교수 (경성대학교)
12:00~12:15	해조류로부터 금속염분해에 의한 바이오매 생산	서동진 박사 (한국과학기술연구원)
12:15~12:30	점심: 벵스코 뷔페식당 조은상	
12:30~12:45	해조류 바이오매스의 대량양식	허동수 박사 (국립수산과학원)
12:45~13:00	해조류 유래의 항비만 신소재 후코잔틴	신용철 박사 (아미코젠 대표이사)
13:00~13:15	Antibiotic mechanism of phlorotannin from edible marine brown alga Eddoria cava in 3T3-L1 adipocytes	공창숙 박사 (부경대학교)
13:15~13:30	종합토론	최달 (지영브론지)

2. 패널 토론

- 토론자 : 장호남(KAIST), 이정의(국립수산과학원), 강신영(SK Energy), 김기협(서울대), 정광섭(GS 칼텍스), 김인철(South Pacific)
- 토론 내용 요약

이름 (소속)	내 용
장호남 (KAIST)	<ul style="list-style-type: none"> - 오늘 발표는 대체로 내용 구성이 잘 되었다. - 후코잔틴 세계적으로 도입 초기단계이므로 경쟁력 필요 - 우선 원천기술 확보가 중요하다. 특허부터 검색 후 중복기술을 확인할 필요가 있다. 산업화를 위해 중요한 부분이다. - 미역이 톤 당 약 80만원인데, 정책적 지원과 기술개발로 1/10로 줄여야 한다. - 국립수산과학원은 대량양식을 위해 pilot plant를 구축하고, 이에 원료비에 맞추어 연구개발 진행 하는 것이 좋을 것 같다. - 빠른 산업화를 위해 grand plan을 세워 추진하면 좋을 것 같다.
김기협 (서울대학교)	<ul style="list-style-type: none"> - 5개월 동안 좋은 연구결과의 성과를 올린 것 같다. - 인류에 중요한 환경과 에너지에 대해 육상 바이오매스보다 바다 바이오매스가 좋다고 생각되어진다. - 북쪽의 감차카반도 부근의 추운곳에 사는 감차카반 등 해외 해조류도 이용하자. (세계적으로 나아가 원료를 에너지화에 이용) - 미세조류는 이미 선진국에서 원천기술을 확보했다. 하지만 거대조류는 아직 무한한 블루오션 분야다.
이정의 (국립수산과학원)	<ul style="list-style-type: none"> - 해조류 바이오매스 생산의 장점은 우리나라가 3면이 바다이며, 해조류 양식기술 세계 4위로 기술적으로 우위에 있다. - 단점으로 큰 면적이 있지만 해조류를 대량양식 하기 위해 어려움이 많다. 서해안, 동해안 남해안에서는 각각 다른 어업사업을 하고 있고, 바이오매스를 생산하기 위해서는 단계적으로 계획이 필요하다. - 우선 1단계로 외해 수심 5-10m에서 pilot plant 구축하고 2단계로 100~200m로 나가야 한다. 또한 해상 풍력과 연계시키는 방안을 검토하자.
정광섭 (GS 칼텍스)	<ul style="list-style-type: none"> - 이번 심포지엄 개최 성과 보람 있다. - 정유사들도 기후변화에 대응 중에 있다. - 바이오매스를 이용한 에너지기술의 걸림들은 경제성이다. - 알코올 연료보다 소재분야로 방향을 돌리면 경쟁력을 제고 할 수 있을 것 같다. - 경제성 확보가 관건이므로, pilot plant 지어 연구결과를 보여줘야 한다.
강신영 (SK 에너지)	<ul style="list-style-type: none"> - 현재 우리 기업은 바이오부탄을 pilot plant를 구축하였고 시험가동 중에 있다. - 또한 해조류 연구로 2년 동안 특성 파악과 문제점에 대한 방안을 연구 해 왔으며 3가지 방향으로 정했으며, 내년 우리의 수행계획과 상당히 일치한다. - 처음에는 해조류 연구가 어렵다고 생각했지만 지금은 아니며 연구 진척도가 빠르고 충분한 블루오션이 있다.
김인호 (South Pacific)	<ul style="list-style-type: none"> - 탄소 배출권에 대해 말하면, 온실가스를 2020년까지 '05년 CO₂ 5.9억만 톤 대비 4%를 감축해야 한다. - 현재 정부에서는 '교통, 건물 부분에서 감축하겠다.'라고 발표했다. - 거대조류와 미세조류는 기후변화 대응에 가장 좋다고 생각되며, 자동차, 철강 산업과 연계하여 탄소 포집 저장(CCS)기술을 추진하면 좋겠다.

C. 연구성과

□ 논문게재 실적

No	제 목	학술지	발표장	발표일자	국가명 (SCI 분류)
1	Global Metabolic Profiling of Plant Cell Wall Polysaccharide Degradation by Saccharophagus degradans	Biotechnology and Bioengineering	김경현 외 6명	2010. 2	미국 (SCI)
2	Global metabolite profiling of agarose degradation by Saccharophagus degradans 2-40	New Biotechnology	김경현 외 5명	in press	네덜란드 (SCI)
3	The Extracts of Sargassum fulvellum Induce Pro-Apoptosis and Cell Cycle Arrest on MDA-MB-231 Human Breast Carcinoma Cells	CANCER PREVENTION RESEARCH	김형락 우희철 김군도 외 1명	2010. 3	한국 (SCIE)
4	Anti-inflammatory effect of n-hexane fraction from Laminaria japonica in the LPS-treated RAW 264.7 macrophages	Phytotherapy Research	김형락 신태선 우희철 외 3명	submitted	영국 (SCI)
5	Anti-inflammatory activity of dichloromethane from Laminaria japonica is mediated by inactivating nuclear factor-kappaB in the LPS-treated RAW 264.7 macrophages	Planta Medica	김형락 최재수 우희철 외 3명	submitted	독일 (SCI)
6	Bioethanol production with waste Laminaria Japonica	Applied Biochemistry and Biotechnology	오경근 외	submitted	미국 (SCI)
7	Effect of various pretreatment process on the enzymatic digestibility of Laminaria Japonica	Korean J. Chem. Eng.	오경근 외	submitted	한국 (SCIE)
8	Evaluation of butanol production using macroalgae as substates	Bioresource technology	이지은 외	submitted	미국 (SCI)

Global Metabolic Profiling of Plant Cell Wall Polysaccharide Degradation by *Saccharophagus degradans*

Min Hye Shin,¹ Do Yup Lee,² Kirsten Skogerson,² Gert Wohlgemuth,² In-Geol Choi,¹ Oliver Fiehn,² Kyoung Heon Kim¹

¹School of Life Sciences and Biotechnology, Korea University, Seoul 136-713, Republic of Korea; telephone: +82-2-3290-3028; fax: +82-2-925-1970; e-mail: khekim@korea.ac.kr

²Davis Genome Center, University of California, Davis, California 95616; telephone: +1-530-754-8258; fax: +1-530-754-9658; e-mail: ofiehn@ucdavis.edu

Received 18 June 2008; accepted 15 September 2008

Published online 3 October 2009 in Wiley InterScience (www.interscience.wiley.com). DOI 10.1002/bt.22557

ABSTRACT: Plant cell wall polysaccharides can be used as the main feedstock for the production of biofuels. *Saccharophagus degradans* 2-40 is considered to be a potent system for the production of sugars from plant biomass due to its high capability to degrade many complex polysaccharides. To understand the degradation metabolism of plant cell wall polysaccharides by *S. degradans*, the cell growth, enzyme activity profiles, and the metabolite profiles were analyzed by gas chromatography-time of flight mass spectrometry using different carbon sources including cellulose, xylan, glucose, and xylose. The specific activity of cellulase was only found to be significantly higher when cellulose was used as the sole carbon source, but the xylanase activity increased when xylan, xylose, or cellulose was used as the carbon source. In addition, principal component analysis of 98 identified metabolites in *S. degradans* revealed four distinct groups that differed based on the carbon source used. Furthermore, metabolic profiling showed that the use of cellulose or xylan as polysaccharides led to increased abundances of fatty acids, nucleotides and glucuronic acid compared to the use of glucose or xylose. Finally, intermediates in the pentose phosphate pathway seemed to be up-regulated on xylose or xylan when compared to those on glucose or cellulose. Such metabolic responses of *S. degradans* under plant cell wall polysaccharides imply that its metabolic system is transformed to more efficiently degrade polysaccharides and conserve energy. This study demonstrates that the gas chromatography-time of flight mass spectrometry-based global metabolomics are useful for understanding microbial metabolism and evaluating its fermentation characteristics.

Biotechnol. Bioeng. 2010;105: 477-488.

© 2009 Wiley Periodicals, Inc.

KEYWORDS: *Saccharophagus degradans*; metabolomics; cellulose; xylan; GC-TOF MS

Introduction

Lignocellulose, which is a complex of cellulose, hemicelluloses, and lignin, is one of the most abundant renewable resources on earth because plant biomass, especially the plant cell wall, primarily occurs in the form of lignocellulose (Bobleter, 1994; Kim and Dale, 2004; Kumar et al., 2008; Lee, 1997). Since these sugars can be fermented into ethanol, lignocellulose from plant cell walls has recently received a great deal of attention as a potent biomass resource for the production of biofuel (Jeffries and Jin, 2004; Kim et al., 2005; Lee, 1997).

Due to its abundance and ability to be converted into fermentable sugar, the hydrolysis of plant cell walls using fungi and clostridia has been extensively evaluated (Hu et al., 2008; Lynd et al., 2002; Polizzi et al., 2005). To date, studies conducted to evaluate multi-enzymatic systems for degradation of the plant cell wall have focused on fungal enzymes or cellulosomes (Bayer et al., 1994; Bélaich et al., 1997; Leonowicz et al., 1999; Ravalason et al., 2008). *Saccharophagus degradans* 2-40, which was isolated from marine salt marsh grass, was found to be capable of degrading algae and higher plant materials, and its full genome was recently sequenced by US Department of Energy's Joint Genome Institute (Andrykovitch and Marx, 1988; Weiner et al., 2008). The sequencing revealed the presence of more than 180 open reading frames that encode carbohydrases (Ekborg et al., 2005; Taylor et al., 2006).

Correspondence to: K.H. Kim and O. Fiehn
Contract grant sponsors: Korea Research Foundation Grant, Korea Ministry for Food, Agriculture, Forestry and Fisheries
Contract grant number: KRF-2007-012-F00004



Global metabolite profiling of agarose degradation by *Saccharophagus degradans* 2-40

Min Hye Shin¹, Do Yup Lee², Gert Wohlgemuth², In-Geol Choi¹, Oliver Flehn² and Kyoung Heon Kim¹

¹ School of Life Sciences and Biotechnology, Korea University, Seoul 136-713, Republic of Korea
² Genome Center, University of California, Davis, CA 95616, USA

Saccharophagus degradans is a potent degrader of marine and plant cell wall polysaccharides. In particular, it is capable of degrading and metabolizing agarose that is the main component of marine red algae. To understand its degradation and metabolism of agarose along with the agarase expression profile, *S. degradans* was grown using different carbon sources including galactose, agarose, glucose and cellulose. The metabolite profiling was conducted by using GC-TOF MS and in-house programmed database, BinBase. When the metabolite profiles of cells on galactose and agarose were compared, principal component analysis of 133 identified metabolites revealed clear separations between the groups on galactose and agarose. *S. degradans* grown on agarose was found to use different carbon catabolic pathways from that grown on other carbon sources. The metabolite profile of cells grown using galactose had increased abundances of glycerol, glycerol derivatives and fatty acids. The use of polysaccharides such as agarose or cellulose led to the increased abundances of amino acids and intermediates of nucleotide biosynthesis.

Introduction

Agar, which is usually obtained from marine red algae (Rhodophyta) such as *Gelidium* and *Gracilaria*, consists of two different components, agarose and agarpectin [1,2]. Although agar has long been used as a gelling substance and a food or pharmaceutical ingredient stabilizer, its derivatives have recently been found to possess various biological and therapeutic properties [3,4]. In addition, to avoid conflicts between biofuel and food resource production, marine macroalgae have recently received a great deal of attention as a potent feedstock for the production of biofuels [5,6]. Especially in the Far East, where seaweed has a long history for conventional usages, large-scale cultivation of macroalgae in the sea is actively being considered for the production of bioethanol [7-9]. Accordingly, if an effective bioconversion process for galactans can be developed, red algae can be considered for use in the production of biofuel or industrial chemicals [10,11].

Agarose is a neutral linear polysaccharide composed of alternating residues of 3-O-linked β -D-galactopyranose and 4-O-linked 3,6-anhydro- α -L-galactopyranose [12,13]. To effectively utilize agarose in the production of biofuel or other chemicals, it is desirable to be converted into fermentable sugars [11]. To date, agarose-degrading bacteria isolated from marine and other environments have been assigned to the genera *Agarivorans* [1,14-16], *Pseudobacteronanus* [13,17], *Saccharophagus* [18-20], *Streptomyces* [21-23] and *Vibrio* [24-28]. Although many agarolytic organisms have been isolated, only a few agarase systems have been characterized.

Saccharophagus degradans 2-40 was isolated from marine salt marsh grass and found to be capable of degrading a wide range of complex polysaccharides. The entire genome of *S. degradans* 2-40 was recently sequenced by the Joint Genome Institute of the United States Department of Energy [19,29]. The genome sequencing results revealed the presence of more than 180 open reading frames that encode carbohydrate hydrolases [19,30,31]. Furthermore, the agarolytic system was modeled based on its genomic and

Corresponding authors: Kim, K.H. (khekim@korea.ac.kr), Flehn, O. (oflehn@ucdavis.edu)

1175-0225 - doi:10.1016/j.nbt.2010.03.002

www.elsevier.com/locate/nbt

The Extracts of *Sargassum fulvellum* Induce Pro-Apoptosis and Cell Cycle Arrest on MDA-MB-231 Human Breast Carcinoma Cells

Jin-Soo Yoon¹, Hee-Chul Woo², Hyeung-Rak Kim³ and Gun-Do Kim¹

¹Department of Microbiology, College of Natural Sciences, ²Division of Applied Chemical Engineering, College of Engineering, ³Division of Food Science and Biotechnology, College of Fishery Sciences, Pukyong National University, Busan 608-737, Korea

The potential anti-cancer effects of n-hexane (HSF) and dichloromethane fractions (DSF) of a brown macro-algae, *Sargassum fulvellum* were evaluated in estrogen receptor-negative MDA-MB-231 human breast cancer cells. The effects of HSF and DSF on pro-apoptosis was assessed by studying the release of cytochrome c and the level of Bcl-xL which related with anti-adhesive effects. Cell cycle controlling proteins which associated with the level of CDK6 and phosphorylated cdc2 caused cell cycle arrest. The exposure of MDA-MB-231 cells to each fraction (HSF and DSF respectively) at concentration of 50 µg/ml for 24 hours resulted in the inhibition of cell growth and shrinking of cell morphology along with decreased expression of Rac and MAP kinases. The results suggested that the anti-cancer effects of two extracts act on pro-apoptosis, cell cycle arrest and the inhibition of cell growth. (*Cancer Prev Res* 15, 52-59, 2010)

Key Words: *Sargassum fulvellum*, Brown macro-algae, MDA-MB-231, Apoptosis, Cell cycle

INTRODUCTION

Recent studies have been carried out to find cancer chemopreventive and/or chemo-therapeutic agents from edible and natural resources such as fruits, vegetables, and terrestrial plants.^{1,2} One of the well known natural resources are seaweeds. Seaweeds are well-balanced, harmless, natural sources with a high degree of trace elements, and strongly advised for fast grown children and pregnant women.³ Edible seaweeds have high nutritional values as sources of vitamins, minerals, and non-caloric dietary fibers and as potential sources of biological active ingredients.⁴ Marine organisms also emerged as one of the important sources for dietary supplements and a number of them are potentially active and useful source of

medicine. Their metabolites such as flavonoids and other phenolic compounds are widely used in life science research and provide chances for discovery-phase of new drug development.⁵⁻⁸

Considerable number of research works explained that, sulphated polysaccharide derived from marine algae has potent antioxidant and anticancer activities.⁹ Especially, sulphated polysaccharides from *Fucus vesiculosus*, *Laminaria japonica* and *Ecklonia herveyi* were demonstrated to have good anti-oxidant activity.¹⁰ Furthermore, several investigations have been focused on the isolation and function of the polysaccharides derived from different *Sargassum* species, which revealed multiple biological activities such as anti-oxidant,^{11,12} anti-tumor, anti-angiogenic,¹³ anti-inflammatory,¹⁴ anti-coagulant,¹⁵ anti-viral¹⁶ and anti-vasculogenic¹⁷ activities.

책임저자 : 김근도, ☎ 608-737, 부산시 남구 대연3동 599-1
부경대학교 자연과학대학 미생물학과
Tel: 051-629-5618, Fax: 051-629-5619
E-mail: guodokim@pknu.ac.kr

접수일 : 2010년 2월 24일, 1차수정일 : 2010년 2월 26일,
2차수정일 : 2010년 3월 2일, 게재승인일 : 2010년 3월 5일

Correspondence to : Gun-Do Kim
Department of Microbiology, College of Natural Sciences, Pukyong National University, 599-1, Daeyeon 3-dong, Nam-gu, Busan 608-737, Korea
Tel: +82-51-629-5618, Fax: +82-51-629-5619
E-mail: guodokim@pknu.ac.kr

□ 특허출원 실적

No	산업재산권명	출원일자	출원번호	출원국가	출원자
1	곰피와 감태 추출물 유래의 플로로탄닌을 유효 성분으로 하는 염증억제용 조성물	2009.09.29	10-2009-0092697	한국	김형락, 최재수, 신태선 외 3명
2	소염효과가 우수한 다시마 에탄올, 주정 또는 아세톤 추출물과 n-헥산 및 디클로로메탄 추출물을 유효성분으로 함유하는 약학조성물	출원중	-	한국	김형락, 우희철 외 4명
3	용액 플라즈마 처리를 이용하여 해조류로부터 당류 물질을 제조하는 방법 및 이를 이용한 바이오연료의 제조방법	2010.02.19	10-2010-0015234	한국	신태선, 우희철 외 5명
4	플라즈마 처리를 이용하여 해조류로부터 당류 물질을 제조하는 방법	2010.02.19	10-2010-0015254	한국	신태선, 우희철 외 5명
5	해조류를 이용한 바이오연료 생산방법	2009.02.26	10-2009-0016535	한국	전영중 외 1명
6	해조류당 유래의 부탄올 생산공정	출원예정	-	한국	이지은 외

□ 특허첨부-(1)

출원번호통지서

관인생략

출원번호통지서

출원일자 2009.09.29
특기사항 심사청구(유) 공개신청(무)
출원번호 10-2009-0092697 (접수번호 1-1-2009-0600450-53)
출원인명칭 부경대학교 산학협력단(2-2004-016649-9)
대리인성명 이덕록(9-1998-000461-7)
발명자성명 김형락 김이름 권미성 최재수 신태선 변대석
발명의명칭 폼피와 감태 추출물 유래의 플로로탄닌을 유효성분으로 하는 염증억제용 조성물

특 허 청 장

- 출원번호통지서 출원 이후 심사진행 상황 등을 확인하실 때에는 출원번호가 필요 하오니 출원번호통지서는 출원절차가 종료될 때까지 보관하시기 바랍니다.
- 2-가. 특허 및 실용신안 출원은 심사청구 후 평균 16개월에 1차 심사처리가 이루어지고, 상표 및 디자인은 출원 후 평균 10개월에 1차 심사처리가 이루어집니다.
 - 2-나. 특허 및 실용신안은 특허청 홈페이지(<http://www.kiporo.go.kr>)의 “고객지원서비스-민원처리과정 통지 서비스” 코너에서 1차 심사결과통지 예고서비스를 신청하시면, 1차 심사처리 약 1개월 전에 해당 출원 건의 1차 심사결과통지 예정시기를 SMS 또는 E-mail 서비스로 제공 받을 수 있습니다.
 - 2-다. 상표 및 디자인은 특허청 홈페이지(공지사항)에 류별 1차 심사결과통지 예정시기를 매월 게시하고 있으며, 특허정보검색서비스 시스템(<http://www.kipris.or.kr>)을 통해 개별 출원건에 대한 1차 심사결과통지 예정시기를 알려드립니다. 또한, 출원시 1차 심사결과통지 예정시기 알림 서비스를 신청하시면, SMS 또는 E-mail 서비스로 제공해 드립니다.
※ 상기 1차 심사결과통지 예정시기는 사정에 의해 다소 늦거나 빨라 질 수 있습니다.
- 2-라. 1차 심사결과통지서(심사관이 특허결정의 등본을 송달하기 전 또는 심사

□ 특허첨부-(2)

【요약서】

【요약】

본 발명은 다시마 에탄올, 주정, 아세톤 추출물과 에탄올 추출물로 부터 분획한 n-헥산과 디클로로메탄 분획물의 유효성분이 염증매개인자인 iNOS와 COX-2 발현억제와 이 효소에 의해 생성되는 NO와 proinflammatory cytokine의 생성억제에 효과적인 것을 확인하여 염증과 관련된 질병을 예방 및 치료하는데 사용되는 유효성분을 함유한 항염증 효과가 탁월한 화합물 및 약학조성물에 관한 것이다.

【대표도】

도 1, 도2, 도3

【색인어】

다시마 추출물, 다시마 헥산획분, 항염증효과, iNOS, COX-2, cytokine

【명세서】

【발명의 명칭】

소염효과가 우수한 다시마 에탄올, 주정 또는 아세톤 추출물과 n-헥산 및 디클로로메탄 추출물을 유효성분으로 함유하는 약학 조성물

【발명의 상세한 설명】

【기술분야】

본 발명은 다시마 추출물로부터 분리한 화합물을 유효성분으로 함유하는 항염증 활성을 지닌 조성물에 관한 것이다.

【발명자】

김형락, 김아름, 이민섭, 이지영, 우희철, 원현수

【배경기술】

염증반응은 생체나 조직에 물리적 작용이나 화학적 물질, 세균감염 등의 어떠한 기질적 변화를 가져오는 침습이 가해질 때 그 손상부위를 수복 재생하려는 기전이며, 일단 자극이 가해지면 국소적으로 histamine, serotonin, bradykinin, prostaglandins, hydroxyeicosatetraenoic acid (HETE), leukotriene과 같은 혈관 활성 물질이 유리되어 혈관 투과성이 증대되면서 염증을 유발한다 (Willoughby, D.A. *Ann. Rheum. Dis.*, 34,

관인생략 출원번호통지서

출원일자 2010.02.19
 특기사항 심사청구(유) 공개신청(무)
 출원번호 10-2010-0015234 (접수번호 1-1-2010-0110938-30)
 출원인명칭 충남대학교산학협력단(2-2004-008410-4)
 대리인성명 특허법인 다나(9-2008-100121-8)
 발명자성명 최홍기 최호석 신태선 우희철 김성훈 정시인 지한승
 발명의명칭 용액 플라즈마 처리를 이용하여 해조류로부터 당류 물질을 제조하는 방법 및 이를 이용한 바이오연료의 제조방법

특 허 청 장

- 출원번호통지서 출원 이후 심사진행 상황 등을 확인하실 때에는 출원번호가 필요하오니 출원번호통지서는 출원절차가 종료될 때까지 보관하시기 바랍니다.
- 2-가. 특허 및 실용신안 출원은 **심사청구 후 평균 16개월**에 1차 심사처리가 이루어지고, 상표 및 디자인은 **출원 후 평균 10개월**에 1차 심사처리가 이루어집니다.
 2-나. 특허 및 실용신안은 **특허청 홈페이지**(<http://www.patent.go.kr>)의 "고객지원서비스-민원처리과 통지 서비스" 코너에서 1차 심사결과통지 예고서비스를 신청하시면, 1차 심사처리 약 1개월 전에 해당 출원 건의 1차 심사결과통지 예정시기를 SMS 또는 E-mail 서비스로 제공 받을 수 있습니다.
 2-다. 상표 및 디자인은 **특허청 홈페이지(공지사항)**에 류별 1차 심사결과통지 예정시기를 예월 게시하고 있으며, **특허정보검색서비스 시스템**(<http://www.kiprls.or.kr>)을 통해 개별 출원건에 대한 1차 심사결과통지 예정시기를 알려드립니다. 또한, 출원시 1차 심사결과통지 예정시기 알림 서비스를 신청하시면, SMS 또는 E-mail 서비스로 제공해 드립니다.
 ※ 상기 1차 심사결과통지 예정시기는 사정에 의해 다소 늦거나 빨라 질 수 있습니다.
 2-라. 1차 심사결과통지서(심사관이 특허결정의 등본을 송달하기 전 또는 심사관이 최초로 거절이유를 통지한 후 출원인이 그 거절이유를 받기 전 중 **특은 때**)까지 귀하께서는 특허출원서에 최초로 첨부된 명세서 또는 도면에 기재된 사항의 범위 안에서 명세서 또는 도면을 보정할 수 있습니다. 특허출원은 출원일로부터 5년 이내에 특허법시행규칙 별지 제24호서식에 의거 심사청구를 하지 않으면 그 출원은 출원취하된 것으로 간주하여 처리됨을 알려드립니다.
- 우선심사 특허(실용신안등록)출원 또는 디자인등록출원, 상표등록출원에 대해 조기에 심사를 원하시면 "우선심사제도"를 이용하실 수 있습니다.
- 주소 등 변경신고 출원인의 주소 등을 변경하고자 하는 경우에는 특허법 시행규칙 별지 제4호의 2서식에 의한 출원인 정보변경(경정) 신고서를 제출하여야 합니다.
- 산업재산권 표시, 광고요령 특허 등 산업재산권을 출원 중에 있는 경우에는 해당 산업재산이 출원상태임을 다음과 같이 표시하여야 하며, 이를 위반할 경우 특허법 제224조 및 제227조에 의거 처벌받게 됩니다.
 (예) 특허출원 10-2001-0000001, 실용신안등록출원 20-2001-0000001, 디자인등록출원 30-2001-0000001, 상표등록출원 40-2001-0000001
- 미성년자 미성년자인 출원인이 만20세에 도달하는 경우 출원인의 부모 등 법정대리인의 대리권은 소멸하게 되므로, 출원인은 직접 또는 대리인을 새로이 선임하여 특허에 관한 절차를 밟을 수 있습니다.
- 문의처 기타 문의사항이 있으시면 특허고객 콜센터(1544-8080)에 문의하시거나 특허청 홈페이지(www.kipo.go.kr)를 참고하시기 바랍니다.
- 특허청 주소 302-701 대전광역시 서구 선사로 139 정부대전청사 4동
 특허청 서울사무소 주소 135-911 서울특별시 강남구 역삼동 647-9 한국지식센터
 FAX) 대전 : 042-472-7140, 서울 : 02-566-8454

관인생략 출원번호통지서

출원일자 2010.02.19
 특기사항 심사청구(유) 공개신청(무)
 출원번호 10-2010-0015254 (접수번호 1-1-2010-0110977-11)
 출원인명칭 충남대학교산학협력단(2-2004-008410-4)
 대리인성명 특허법인 다나(9-2008-100121-8)
 발명자성명 최홍기 최호석 신태선 우희철 김성훈 정사인 지한솔
 발명의명칭 플라즈마 처리를 이용하여 해조류로부터 당류 물질을 제조하는 방법 및 이를 이용한 바이오연료의 제조방법

특 허 청 장

- 출원번호통지서 출원 이후 심사진행 상황 등을 확인하실 때에는 출원번호가 필요하오니 출원번호통지서는 출원절차가 종료될 때까지 보관하시기 바랍니다.
- 2-가, 특허 및 실용신안 출원은 **심사청구 후 평균 16개월**에 1차 심사처리가 이루어지고, 상표 및 디자인은 **출원 후 평균 10개월**에 1차 심사처리가 이루어집니다.
 2-나, 특허 및 실용신안은 **특허청 홈페이지**(<http://www.patent.go.kr>)의 "고객지원서비스-민원처리과장동지서비스" 코너에서 1차 심사결과동지 예고서비스를 신청하시면, 1차 심사처리 약 1개월 전에 해당 출원 건의 1차 심사결과동지 예정시기를 SMS 또는 E-mail 서비스로 제공 받을 수 있습니다.
 2-다, 상표 및 디자인은 **특허청 홈페이지(공지사항)**에 **별별 1차 심사결과동지 예정시기**를 매일 게시하고 있으며, **특허정보검색서비스 시스템**(<http://www.kipris.or.kr>)을 통해 개별 출원건에 대한 1차 심사결과동지 예정시기를 알려드립니다. 또한, 출원사 1차 심사결과동지 예정시기 알림 서비스를 신청하시면, SMS 또는 E-mail 서비스로 제공해 드립니다.
 ※ 상기 1차 심사결과동지 예정시기는 사정에 의해 다소 늦거나 빨라 질 수 있습니다.
 2-라, 1차 심사결과통지서(심사권이 특허결장의 등본을 송달하기 전 또는 심사권이 최초로 거절이유를 통지한 후 출원인이 그 거절이유를 받기 전 중 어느 때)까지 귀하께서는 특허출원서에 최초로 첨부된 명세서 또는 도면에 기재된 사항의 범위 안에서 명세서 또는 도면을 보정할 수 있습니다. 특허출원은 출원일로부터 5년 이내에 특허법시행규칙 별지 제24호서식에 의거 심사청구를 하지 않으면 그 출원은 출원취하된 것으로 간주하여 처리됨을 알려드립니다.
- 우선심사 특허(실용신안등록)출원** 또는 **디자인등록출원, 상표등록출원**에 대해 조기에 심사를 원하시면 "우선심사제도"를 이용하실 수 있습니다.
- 주소 등 변경신고 출원인의 주소 등을 변경하고자 하는 경우에는 특허법 시행규칙 별지 제4호의 2서식에 의한 출원인 정보변경(경정) 신고서를 제출하여야 합니다.
- 산업재산권 표시, 광고요령 특허 등 산업재산권을 출원 중에 있는 경우에는 해당 산업재산이 출원상태임을 다음과 같이 표시하여야 하며, 이를 위반할 경우 특허법 제224조 및 제227조에 의거 처벌 받게 됩니다.**
 예) 특허출원 10-2001-0000001, 실용신안등록출원 20-2001-0000001, 디자인등록출원 30-2001-0000001, 상표등록출원 40-2001-0000001
- 이성년자 미성년자인 출원인이 만20세에 도달하는 경우 출원인의 부모 등 법정대리인의 대리권은 소멸하게 되므로, 출원인은 직할 또는 대리인을 새로이 선임하여 특허에 관한 절차를 밟을 수 있습니다.**
- 문의역 기타 문의사항이 있으시면 특허고객 콜센터(1544-8080)에 문의하시거나 특허청 홈페이지(www.kipo.go.kr)를 참고하시기 바랍니다.
- 특허청 주소 302-701 대전광역시 서구 선사로 139 정부대전청사 4동
 특허청 서울사무소 주소 135-911 서울특별시 강남구 역삼동 647-9 한국지식센터
 FAX) 대전 : 042-472-7140, 서울 : 02-566-8454**

□ 특허첨부-(5)

관인생략 출원번호통지서

출원일자 2009.02.26
 특기사항 심사청구(무) 공개신청(무)
 출원번호 10-2009-0016535 (접수번호 1-1-2009-0121171-62)
 출원인 성명 김기협(4-2000-032980-1) 외 1명
 대리인 성명 백남훈(9-1998-000256-5)
 발명자 성명 김기협 전영중
 발명의 명칭 해조류를 이용한 바이오연료의 생산방법

특 허 청 장

- 출원번호통지서 출원 이후 심사진행 상황 등을 확인하실 때에는 출원번호가 필요하오니 출원번호통지서는 출원절차가 종료될 때까지 보관하시기 바랍니다.
- 2-가. 특허 및 실용신안 출원은 심사청구 후 평균 10개월에 1차 심사처리가 이루어지고, 상표 및 디자인은 출원 후 평균 6개월에 1차 심사처리가 이루어집니다.
 2-나. 특허 및 실용신안은 특허청 홈페이지(<http://www.kipo.go.kr> 이하 "홈페이지"라 함)내 "특허로(은)리인전자출원" 사이트 "나의출원등록조회"에서 1차 심사처리 1개월 전에 1차 심사결과통지 예정시기를 확인할 수 있으며, 동 사이트 코너인 "통지서비스신청"에서 1차 심사결과통지 예정시기를 알람 서비스를 신청하시면 1차 심사처리 약 1개월 전에 해당 출원 건의 1차 심사결과통지 예정시기를 SMS 또는 e-mail 서비스로 제공 받을 수 있습니다.(단 홈페이지 회원에 한하여 통지서비스 신청 가능)
 2-다. 상표 및 디자인은 특허청 홈페이지(공지사항)에 쉼달 1차 심사결과통지 예정시기를 예월 게시하고 있으며, 특허정보검색서비스 시스템(<http://www.kipris.or.kr>)을 통해 개별 출원건에 대한 1차 심사결과통지 예정시기를 알려드립니다. 또한, 출원시 1차 심사결과통지 예정시기를 알람 서비스를 신청하시면, SMS 또는 e-mail 서비스로 제공해 드립니다.
 ※ 상기 1차 심사결과통지 예정시기는 사정에 의해 다소 늦거나 빨라질 수 있습니다.
 2-라. 1차 심사결과통지서(심사관이 특허결정의 동문을 송달하기 전 또는 심사관이 최초로 거절이유를 통지한 후 출원인이 그 거절이유를 받기 전 중 특론 때)까지 귀하께서는 특허출원서에 최초로 첨부된 명세서 또는 도면에 기재된 사항의 범위 안에서 명세서 또는 도면을 보정할 수 있습니다.
3. 심사청구 특허출원은 출원일로부터 5년 이내에 특허법시행규칙 별지 제24호서식에 의거 심사청구를 하지 않으면 그 출원은 출원취하된 것으로 간주하여 처리됨을 알려드립니다.
4. 우선심사 특허출원 또는 디자인등록출원에 대해 조기에 심사받기를 원하시면 우선심사제도를 이용하실 수 있습니다.
5. 주소 등 변경신고 출원인의 주소 등을 변경하고자 하는 경우에는 특허법 시행규칙 별지 제4호의 2서식에 의한 출원인 정보변경(경정) 신고서를 제출하여야 합니다.
6. 산업재산권 표시, 광고요청 특허 등 산업재산권을 출원 중에 있는 경우에는 해당 산업재산이 출원상대 임을 다음과 같이 표시하여야 하며, 이를 위반할 경우 특허법 제224조 및 제227조에 의거 처벌 받게 됩니다.
 예) 특허출원 10-2001-0000001, 실용신안등록출원 20-2001-0000001, 디자인등록출원 30-2001-0000001, 상표등록출원 40-2001-0000001
7. 미성년자 미성년자인 출원인이 만20세에 도달하는 경우 출원인의 부모 등 법정대리인의 대리권은 소멸하게 되므로, 출원인은 직급 또는 대리인을 새로이 선임하여 특허에 관한 절차를 밟을 수 있습니다.
8. 문의처 기타 문의사항이 있으시면 특허고객 콜센터(1544-6080)에 문의하시거나 특허청 홈페이지(www.kipo.go.kr)를 참고하시기 바랍니다.
9. 특허청 주소 302-701 대전광역시 서구 선사로 139 정부대전청사 4동
 특허청 서울사무소 주소 135-911 서울특별시 강남구 역삼동 647-9 한국지식선터
 FAX) 대전 : 042-472-7140, 서울 : 02-566-8454

□ 학술발표 실적

No	제 목	회의명	발표자	발표일자	국가명
1	Anti-inflammatory effect on phlorofucofuroeckol A on lipopolysaccharide-induced RAW 264.7 macrophages	한국수산과학총연합회 공동학술대회	김형락 외 4명	2009. 11	한국
2	Hepatoprotective effect of phlorofucofuroeckol-A and dieckol on tacrine-induced HepG2 cells	한국수산과학총연합회 공동학술대회	김형락 외 3명	2009. 11	한국
3	Hepatoprotective effect of dieckol on t-BHP-induced HepG2 cells	한국수산과학총연합회 공동학술대회	김형락 신태선 외 2명	2009. 11	한국
4	Ethanol fermentation with Ammonia pretreated <i>Laminaria japonica</i>	한국화학공학회 추계 학술 대회	오경근 외 3명	2010. 04	한국
5	Evaluation of catalytic effects on the pretreatment of <i>Laminaria japonica</i>	한국화학공학회 추계 학술 대회	오경근 외 2명	2010. 04	한국
6	Evaluation of biobutanol production from Macroalga (다시마)	한국생물공학회 추계 학술대회	이지은 외 3명	2009. 11	한국
7	Production of Volatile Fatty Acids by Anaerobic Digestion of <i>Laminaria</i>	한국생물공학회 추계 학술대회	전영중 외 2명	2009. 11	한국
8	해조류 바이오매스의 열분해 동특성 및 생산된 오일의 특성 연구	한국화학공학회 추계 학술 대회	서동진 외 4명	2009. 10	한국

D. 언론 보도자료

발표일자	제 목
2009. 11. 23	농수산식품부, 해조류바이오매스 통합적활용 중간결과발표
2009. 12. 03	해조류 바이오매스 그린에너지화 및 통합적 활용 심포지엄 개최

□ 경향신문(2009. 11. 23)

다시마에서 희귀금속 뽑아낸다

김준기기자

맛글이 특이 00

· 농식품부 연구 결과… 바이오연료 등도 추출

식용으로 쓰이는 다시마에서 바이오 알코올 등 청정연료는 물론 고부가가치의 생리활성 물질과 리튬·우라늄 등 희귀금속까지 추출할 수 있다는 연구결과가 나왔다.

농림수산식품부는 23일 '해조류 바이오매스의 그린에너지화 및 통합적 활용' 기반 구축에 대한 중간 연구결과를 발표했다. 이에 따르면 건조 다시마 1t에서 부가가치가 높은 생리활성물질인 후코잔틴과 폴리페놀이 함유된 혼합물 25kg이 추출됐다. 이 물질은 건강식품과 화장품에 유용한 성분으로 활용된다. 현재 후코잔틴은 kg당 3000달러, 폴리페놀은 kg당 200~300달러에 팔리고 있다.



또 344kg의 청정연료를 생산했고, 이 중 에탄올에 비해 열량이 우수한 바이오 연료인 혼합알코올이 112kg 합성됐다. 함께 추출된 바이오오일(78kg)은 가솔린이나 디젤과 유사한 탄화수소 함량을 갖고 있어 고품질 연료로 사용될 수 있다. 이 밖에 에너지원이나 화학연료로 사용 가능한 탄소분말(83kg)과 바이오가스(63kg)도 얻어냈다.

□ 연합뉴스, 공감코리아(2009. 12. 3)

뉴스홈 > 속보 > 경제

해조류 통합활용 심포지엄 개최

연합뉴스 기사입력 2009-12-03 11:00

(서울=연합뉴스) 정성호 기자 = 농림수산식품부는 4일 부산 벡스코 컨벤션홀에서 '해조류 바이오매스 그린 에너지화 및 통합적 활용'을 주제로 한 심포지엄을 연다고 3일 밝혔다.

심포지엄에서는 해조류에서 바이오에탄올 한 가지만 생산했던 기존의 연구결과와 달리 해조류에 함유된 모든 유용물질을 우선 회수한 뒤 나머지를 다양한 형태의 에너지원으로 전환하는 통합 활용법이 소개된다.

부경대 청정생산기술연구소가 주관하고 전남 완도군, 국립수산물과학원, 해양산업발전협의회가 후원한다.

sisyphe@yna.co.kr

시각장애인자료 > [KOREA.net](#) | [KTV](#) | [회원가입](#) | [D/제출](#)

대한민국 농림수산 **공감코리아** korakr

41점 글러져 | 020 정상회의 | 서울기 | 녹색농공 | 국력 | 보급자료주요

전체 | 경제 | 사회 | 문화 | 외교/연방 | 과학 | 교육 | 정책포커스 | **보도자료**

정책정보_보도자료 [Home](#) > [정책정보](#) > [보도자료](#)

해조류 바이오매스 그린에너지화 및 통합적 활용 심포지엄 개최

인문 **특종**

농림수산식품부는 부경대학교 청정생산기술연구소가 주관하고, 전남남도 완도군, 국립수산물과학원, (사)해양산업발전협의회가 후원하는 『해조류 바이오매스 그린에너지화 및 통합적 활용』 심포지엄을 12월 4일(금) 10시부터 부산 BEXCO 2층 컨벤션홀에서 개최한다고 밝혔다.

이번 심포지엄은 수산해안분야 저탄소 녹색성장 및 산성장동력 창출을 위하여 최근 국내외적으로 많은 관심을 받고 있는 해조류 바이오매스의 효율적 활용방안에 대하여 논의하기 위하여 마련한 자리로서,

물해부터 농식품부에서 수행하고 있는 『해조류 바이오매스 그린에너지화 및 통합적 활용을 위한 기반구축연구』의 1차 중간결과 발표(09.11.20)에 대한 검증과 더불어 이 사업의 성과와 향후 추진방향에 대하여 각계 전문가들의 의견을 수렴하는 순서로 진행될 것이다.

심포지엄 1부는 해조류 통합활용화, 2부는 해조류 그린에너지화, 3부는 해조류 원료 확보 및 활용 등의 주제로 연구자들의 발표 후 마지막 순서로 권?산?학?연 전문가들



국민과 함께 자연과 함께

보도자료

제공일 : 2009. 11. 23.
제공자 : 농림수산식품부 자원환경과
과 장 : 정 복 철
사무관 : 차 태 향
전 화 : 500-2381
쪽 수 : 3P
별첨자료 : 있음(1P)

이 자료는 2009년 11월 24일 조간 이후에 보도하여 주시기 바랍니다.

농수산식품부, 해조류 바이오매스 통합적 활용 중간결과 발표

- 세계 최초로 해조류 통합활용 방향 제시
- 그린에너지 및 유용물질 회수 인건기술 확보

- 농림수산식품부는 11월 20일 「해조류 바이오매스의 그린에너지화 및 통합적 활용」 기반 구축 연구('09.6~'10.4/4.85억원) 중간결과를 발표하였다.
- 금년 2월에 발표한 로드맵에서 해조류 대량생산, 원료의 통합적 활용을 위한 데이터베이스 구축 및 그린에너지화 핵심기반기술 도출 및 타당성 평가를 제시한 바 있으며, 이에 대한 기반구축 연구를 6월부터 5개월간 수행한 중간결과는 다음과 같다.
- 국내 바다에서 대량양식이 가능하여 원료 확보 면에서 유리한 갈조류의 한 종류인 다시마(향후엔 다른 종이 될 수 있음)를 모델 종으로 선정하였다.
- ◇ 고부가가치 생리활성물질 회수
 - 원료인 건조 다시마 1톤(기준)을 가지고, 알코올로 추출하여 다시마의 부가가치 있는 유용성분 후코잔틴과 폴리페놀 등이 함유된 혼합물 25kg을 회수하였다. 이들은 건강식품, 화장품에

유용한 성분으로 활용되며, 현재 후코잔틴은 \$3,000/kg, 폴리페놀은 \$200~300/kg 수준의 원료가로 팔리고 있다.

◇ 갈조류 1톤에서 344kg 청정연료 생산

○ 알코올 추출 후 남은 잔류물을 미생물에 의해 혐기성 소화를 한 결과 혼합유기산(183kg)을 얻을 수 있었고, 이들을 수소와 반응시킴으로써 혼합알코올(112kg, 부피로는 140리터에 해당)을 합성하였다. 유기산은 분리정제해서 화학원료로도 사용할 수 있고, 혼합알코올(에탄올, 프로판올, 부탄올 등이 주된 성분임)은 가솔린과 혼합하여 사용될 수 있다. 혼합알코올은 에탄올에 비하여 열량 및 연료특성 면에서 우수한 바이오 연료이다.

○ 3번째 과정으로 혐기성 소화 후의 잔류물(230kg)을 건조, 열분해하여 바이오오일(78kg)을 얻었다. 해조류에서 얻어진 바이오오일은 목질계에서 얻어지는 오일보다 가솔린 및 디젤과 유사한 구조의 탄화수소 함량이 높은 특징을 보여 촉매반응을 거쳐 고품질 연료로 사용될 수 있다. 또한 이 과정에서 부가적으로 에너지원 또는 화학원료로 사용 가능한 탄소분말(83kg)과 바이오가스(63kg)를 얻었다.

◇ 산업용 희귀금속도 추출 가능

○ 최종적으로 남은 물질을 성분 분석한 결과 희귀금속 리튬(3g)과 우라늄(0.4g) 등이 함유되어 있음을 확인하였다.

□ 본 연구는 기존에 발표된 해조류 바이오에탄올 생산 결과와는 크게 다른 해조류의 통합 활용 방법으로써 이를 최적화시킬 경우, 목질계에 비하여 충분히 경제성이 있다는 결론을 도출하였다.

- 또한, 에너지뿐만 아니라 해조류에 특징적으로 포함되어있는 여러 가지 유용물질들을 동시에 회수함으로써 경제성을 확보해 나가는데 초점을 맞추고 있다.
- 지금까지 국내에서 우뭇가사리나 구멍갈파래와 같은 해조류로부터 바이오에탄올을 생산하였다고 발표된 바 있으나 해조류로부터 에너지만을 회수하여서는 경제성을 갖출 수가 없다는 것이 전문가들의 대체적인 시각이다.
- 현재 연구 결과, 국내에서 대량양식 가능한 해조류인 다시마를 표준원료로 하여, 먼저 고부가가치의 생리활성물질을 회수한 후, 현재의 기술로도 상당량의 혼합알코올과 바이오오일 등의 에너지를 회수하고, 최종적으로 리튬, 우라늄과 같은 희귀금속 자원을 회수할 수 있는 해조류의 통합활용 원천기술을 확보하는 성과를 올렸다.
- 에너지 전환에 있어서도 통상적인 알코올 발효기술만 적용하기에는 해조류에 함유된 구성당들이 복잡하고 분해기술을 확보하는데 상당한 시간이 걸리기 때문에, 해조류의 성분에 관계없이 단기간에 에너지화가 가능한 대안기술들의 가능성을 동시에 확인해 보고자 하였다.
- 본 연구가 성공적으로 수행될 경우 에너지 자립 기반구축 및 온실가스 저감 효과를 기대할 수 있다. 또한 각종 고부가가치 유용물질도 회수할 수 있어 영세한 해조류 양식산업을 녹색성장 산업으로 발전시키는 획기적인 계기가 될 수 있다.

<참고자료 1>

해조류 바이오매스의 그린에너지화 및 통합적 활용 방안



※ () 의 내용은 원료에 따라 필요시 적용됨.

※ 참여 연구진의 업무 역할

업무분류		인원/위원
총괄		부경대(우희철 교수)
해조류 통합활용	전처리 및 당화	단국대(오경근 교수), 고려대(김경현 교수), 충남대(최홍기 박사, 최호석 교수)
	원료 분석 및 고부가가치화	전남대(신태선 교수, 김두윤 박사), 부경대(김형택 교수, 김군도 교수, 최재수 교수)
해조류 그린에너지화	알균발효	KIST(상병인 박사), 성균관대(이지은 교수)
	혐기성 소화 (혼합 알콜 생산)	부산대(전영중 교수), KIST(서영웅 박사)
	열화학적 전환 (바이오오일 및 가스 생산)	KIST(서동진 박사)



국민과 함께 자연과 함께

보도자료

제공일 : 2009. 12. 3.
제공자 : 농림수산물부 자원환경과
과 장 : 정 복 철
사무관 : 차 태 립
전 화 : 500-2381
쪽 수 : 3P
연락처 : 있음(3P)

이 자료는 2009년 12월 4일 조간 이후에 보도하여 주시기 바랍니다.

해조류 바이오매스 그린에너지화 및 통합적 활용 심포지엄 개최

- 농림수산물부는 부경대학교 청정생산기술연구소가 주관하고, 전라남도 완도군, 국립수산물과학원, (사)해양산업발전협의회가 후원하는 『해조류 바이오매스 그린에너지화 및 통합적 활용』 심포지엄을 12월 4일(금) 10시부터 부산 BEXCO 2층 컨벤션홀에서 개최한다고 밝혔다.
- 이번 심포지엄은 수산해양분야 저탄소 녹색성장 및 신성장 동력 창출을 위하여 최근 국내외적으로 많은 관심을 받고 있는 해조류 바이오매스의 효율적 활용방안에 대하여 논의하기 위하여 마련한 자리로서,
- 올해부터 농식품부에서 수행하고 있는 『해조류 바이오매스 그린에너지화 및 통합적 활용을 위한 기반구축연구』의 1차 중간결과 발표('09.11.20)에 대한 검증과 더불어 이 사업의 성과와 향후 추진방향에 대하여 각계 전문가들의 의견을 수렴하는 순서로 진행될 것이다.

□ 심포지엄 1부는 해조류 통합활용화, 2부는 해조류 그린에너지화, 3부는 해조류 원료 확보 및 활용 등의 주제로 연구자들의 발표 후 마지막 순서로 관·산·학·연 전문가들이 참여하여 패널토론을 진행할 예정이다.

• 지명토론자 : KAIST 장호남 교수, 서울대 김기협 박사, 국립수산물연구원 이정희 박사, SK에너지 감신영 박사, GS칼텍스 정광섭 박사, South Pacific 김인철 박사 등 바이오, 수산해양, 에너지, 경제, 산업 전문가

□ 이번 심포지엄의 주요 발표내용은 해조류로부터 바이오에탄올 한 가지만 생산했던 것 발표된 연구결과들과는 달리 해조류에 함유되어 있는 모든 유용물질들을 우선적으로 회수한 후 나머지 부분을 다양한 형태의 에너지원으로 전환하는 통합 활용 방법을 제시함으로써, 이를 최적화시킬 경우 충분히 경제성을 갖출 수 있다는 가능성을 보여주고 있다.

○ 우리나라나 일본 등 주로 동양권에서 식용으로 이용되고 있는 미역, 다시마, 우뚝가사리 등의 해조류에는 비만억제, 면역증강, 항암기능 등의 다양한 생리활성물질들이 포함되어 있어서 본 연구에서는 해조류별로 포함된 성분과 기능을 데이터베이스화하고 이들을 효과적으로 회수하는 방법을 연구하고 있다.

○ 또한 해조류는 탄수화물, 단백질 등의 유기질과 소금, 미네랄 등의 무기질로 구성되어 있는데, 모든 유기질들은 일련의 물리·화학적·생물학적 처리과정을 통하여 알코올이나 고체연료, 바이오가스 등 다양한 형태의 에너지원으로 전환할 수 있고, 무기질로부터는 미네랄이나 희귀금속 등을 회수할 수 있다.

□ 농식품부는 이번 심포지엄을 통하여 『해조류 바이오매스의 그린에너지화 및 통합적 활용 기반구축연구』에 참여하고

있는 연구팀들의 중간결과 보고 및 현실 적합성, 타당성 등에 대하여 토론하고, 국내외 관련분야 전문가들의 발전적인 아이디어를 공유함으로써 사업의 질적 수준 향상과 향후 정책방향 수립에 적극 반영할 예정이다.

주 의

1. 이 보고서는 농림수산식품부에서 시행한 연구용역 사업의 결과보고서입니다.
2. 이 보고서 내용을 발표할 때에는 반드시 농림수산 식품부에서 시행한 연구용역사업의 연구결과임을 밝혀야 합니다.
3. 국가과학기술 기밀유지에 필요한 내용은 대외적으로 발표 또는 공개하여서는 아니됩니다.



농림수산식품부
Ministry for Food, Agriculture, Forestry and Fisheries