

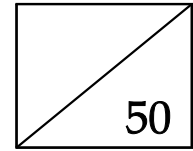
발간등록번호

11-1541000-000887-01

해조류 바이오매스의 그린에너지화 및 통합활용 기반구축 연구

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

2011. 8



해조류 바이오매스의 그린에너지화 및 통합활용 기반구축 연구

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

2011. 8

제 출 문

농림수산식품부 장관 귀하

본 보고서를 『해조류 바이오매스의 그린에너지화 및 통합활용 기반구축 연구(연구기간 : 2010. 10. 06~2011. 08. 05)』 용역사업의 결과보고서로 제출합니다.

2011. 8.

총괄연구책임자 : 우희철(부경대학교)
연 구 원 : 김경현(고려대학교)
 : 김군도(부경대학교)
 : 김두운(전남대학교)
 : 김정숙(부경대학교)
 : 김형락(부경대학교)
 : 박용철(국민대학교)
 : 서동진(한국과학기술연구원)
 : 신태선(전남대학교)
 : 엄영순(한국과학기술연구원)
 : 오경근(단국대학교)
 : 유준(부경대학교)
 : 윤현희(경원대학교)
 : 이지은(고려대학교)
 : 이철우(한밭대학교)
 : 장호남(한국과학기술원)
 : 전병수(부경대학교)
 : 전영중(경원대학교)
 : 최재수(부경대학교)
 : 최호석(충남대학교)
 : 하정명(한국과학기술연구원)
 : 한성옥(한국에너지기술연구원)

연구보조원 : 남우중(경원대학교)
 : 사윤희(경원대학교)
 : 윤은주(고려대학교)
 : 김희택(고려대학교)
 : 김인정(고려대학교)
 : 한성혁(국민대학교)
 : 이해진(국민대학교)
 : 조성은(국민대학교)
 : 최재형(부경대학교)
 : 박용범(부경대학교)
 : 이민섭(부경대학교)
 : 이지영(부경대학교)
 : 전영진(부경대학교)
 : 유동경(부경대학교)
 : 윤진수(부경대학교)
 : 김상보(부경대학교)
 : 정현일(부경대학교)
 : 손유경(부경대학교)
 : 진성은(부경대학교)
 : 문혜은(부경대학교)
 : 이은미(부경대학교)
 : Phoung T. K.(부경대학교)
 : 위혜란(부경대학교)
 : Salim Md. Uddin(부경대학교)
 : 이승미(부경대학교)
 : 심정은(부경대학교)
 : Li, Pan(성균관대학교)
 : 장인성(성균관대학교)
 : 조세영(전남대학교)
 : 심수정(전남대학교)
 : 이현우(충남대학교)
 : 정시인(충남대학교)
 : 지한솔(충남대학교)
 : 윤영현(한국과학기술연구원)
 : 류지혜(한국과학기술연구원)
 : 이초림(한국과학기술연구원)
 : 김성민(한국과학기술연구원)
 : 이미은(한국과학기술연구원)
 : 양기석(한국과학기술연구원)
 : 최재욱(한국과학기술연구원)
 : 이지명(한국과학기술연구원)
 : 윤지선(한국과학기술연구원)
 : 최진달(한국과학기술연구원)
 : 정권수(한국과학기술연구원)
 : 박권우(한국과학기술연구원)
 : 유윤중(한국에너지기술연구원)
 : 심경자(한국에너지기술연구원)
 : 박로원(한국에너지기술연구원)

요 약 문

I. 제 목

해조류 바이오매스의 그린에너지화 및 통합적 활용을 위한 기반 구축 연구

II. 연구개발의 목적 및 필요성

1. 연구 목적

- 신재생에너지 의무할당제(RPS)와 탄소배출권(CER) 의무이행제도 대비에 따른 비식용 해조류로부터 그린에너지 확보.
- 기후변화협약 대응 및 수산분야 녹색산업화에 의한 신성장동력 창출.
- 기존 화석연료 사용 시 발생하는 문제점인 공해 및 온실가스 발생의 획기적 감축과 자원고갈이라는 에너지 위기 극복 대안.
- 해조류의 통합적 활용을 통한 경제적 그린에너지 생산기반 구축.
- 해조류의 통합적 활용을 위한 부산물 응용.
- 세계 최초로 해조류 바이오매스의 통합적 활용을 통하여 그린에너지 및 고부가가치 제품 생산을 위한 기반구축.

2. 연구 필요성

- 해조류는 탄소화합물로 이루어진 에너지 저장물질이라고 할 수 있으며, 재생자원 중 유일하게 화석연료를 대신할 수 있는 대체 에너지원과 더불어 석유화학공업의 대체 원료물질 공급원(chemical feedstock)이 될 수 있는 자원임.
- 해조류는 비식량계 바이오매스로써 경작지 잠식으로 인한 식량생산 감소 및 식량 수급 불균형 문제를 야기하지 않으며, 육상바이오매스 자원에 비해 단위면적 당 생산 수율이 높아 해조류를 원료로 하는 바이오에너지 생산 및 고부가가치 물질 생산기술은 국내 실정에 매우 적합하며 경쟁력 있는 기술임.
- 국내의 경우 바이오에너지 및 고부가가치 물질 생산에 적합한 해조류 종류, 전처리 및 당화 공정, 생산공정에 대한 기초자료 및 연구결과물이 거의 전무한 실정임.

- 해조류를 이용한 바이오에너지 개발연구가 세계적으로 활발하게 진행되고 있음.
- 성별, 나이, 직업, 체형에 따라 기능성 물질의 선호도가 매우 다양하므로 다양한 생리활성 물질을 분리하여 이들의 기능성을 과학적으로 입증함으로써 맞춤형 건강기능성 식품소재 및 기초생활제품을 개발할 필요가 있음.
- 해조류의 생리활성 성분을 건강기능성 소재 및 기초생활제품으로 활용하기 위하여 이들 성분의 구조분석 및 생리활성 기전 규명이 필요함.
- 해조류 조제의 구성성분에 대한 정확한 정보의 확보 및 데이터베이스 구축이 필요함.
- 다양한 해조당으로 구성된 해조류 바이오매스의 효과적인 분별 및 회수를 위해서는 화학적 및 생물학적 전처리/당화 기술의 개발이 필요함.
- 해조류의 건조중량의 70%가 탄수화물로 구성되어 있어 이를 발효가 가능한 당류 및 대사 전구체로 전환하여 발효공정을 통하여 알콜로 전환하는 기술의 개발이 필요함.
- 해조류 바이오매스로부터 그린에너지를 생산하기 위한 융합공정이 필요하다고 판단되어 이를 위하여 혐기성 소화공정 및 급속 열분해공정을 통한 청정연료 생산공정 연구가 필요하다고 판단됨.
- 혐기성 소화에 의한 해조류로부터 유기산 생성 연구를 위하여, bench scale의 유기산 생성 공정 실증 설비가 필요함.
- 궁극적으로는 해조류의 통합적 활용을 위해 개발된 개별 단위 공정의 통합이 필요함.
- 기후변화협약 및 이산화탄소 발생저감에 기여할 수 있는, 에너지절약 및 친환경 특성의 고성능 바이오복합재료 개발이 필요함.

III. 연구개발의 내용 및 범위

1. 건강 신소재 개발

- 해조류 생리활성 물질의 항염증, 항치매, 항비만효과 및 기전분석
 - *n*-헥산과 디클로로메탄 희분은 항염증과 항치매 효과 분석
 - 모자반의 건강기능성 식품 소재로서의 안정성 평가
 - 참모자반을 이용한 체지방 감소용 건강 기능식품 개발 가능성 파악
 - 곰피의 항산화, 항염증, 항암효과 파악

- 해조류 생리활성 물질의 항암효과 및 기전 분석
 - 감태에서 추출한 diecol의 항암제로 이용할만한 원료로서의 가치 평가
 - 다시마의 n-헥산 R3 Fraction-4 추출물의 항암효과 파악
- 해조류 생리활성 물질의 항당뇨효과 및 기전 분석
 - 다시마로부터 porphyrin-related compound의 lens aldose reductase 억제 활성과 최종당화산물형성의 억제에 대해 검토
 - 다시마의 천연의약품으로서의 가치 평가
- 해조류 자원의 통합적 활용을 위한 DB 구축 및 표준화
 - 다시마로부터 기능성 물질 추출하기 위한 DB 구축
 - 경제적이고 높은 활성을 유지하는 첨가 활성물질 선정

2. 생물학적 전환공정 개발

- 해조류 성분분별 및 전처리 공정 최적화
 - 전처리 된 다시마 시료의 환원당 분석방법 개발
 - 신뢰성 있는 알긴산 정량법 개발
- 갯벌 유래 Metagenomic library로부터 알긴산 해조 다당체 분해 유전자 탐색 및 저분자 당원확보
 - 다시마 유래 알긴산 다당체 분해 유전자를 탐색
 - 해조류 다당체 분해효소 생산을 위해 발현조건을 확립하고 해조 다당으로부터 당원확보 기술개발
- 생물친화적 전처리 및 당화효소를 이용한 갈조류 당화 공정 개발
 - Alginate로부터 단당을 만드는 공정 개발
 - 당화 공정의 수율을 높이기 위한 생물 친화적 전처리 방법 확립
- 해조류 분해 부탄을 생산균주 개발 및 부탄을 발효공정의 최적화
 - Alginate로부터 단당을 만드는 공정 개발
 - 당화 공정의 수율을 높이기 위한 생물 친화적 전처리 방법 확립
- 난발효성 당류 대사형 재조합 미생물 개발
 - 난발효성 단당류를 대사할 수 있는 해양미생물 선별
 - 난발효성 단당류의 대사효소와 유전자 정보 확보 및 유전자 클로닝 및 발현벡터 제조

3. 그린에너지 융합공정 연구개발

- Next generation sequencing을 활용한 유기산 수율 향상기술

- 미생물 균집을 이용하여 해조류 바이오매스 유기산 생산 수율 향상 파악
- 해조류 이용 고수율 유기산 생산 미생물 균집의 균집구조 분석
- VFA 생산용 다단계 생물반응기 설계
 - 다단계 연속 고농도 세포배양 반응기를 이용한 VFA 생산 방법 구축
 - 해조류 전처리 및 *E.coli* KO11을 이용한 에탄올 생산 실험 미
- 혐기성 소화공정 이용 혼합 알코올 생산기술 개발
 - 유기산 생성을 위한 해조류 분해 특이균주의 Screening 및 적용
 - 유기산 생성을 위한 반응조건 최적화 및 생산성 향상 연구
- 해조류 바이오매스 유래 혼합유기산으로부터 혼합 알코올 생산하는 화학촉매 공정 개발
 - 선택적인 혼합 알코올 생산을 위한 최적 반응 조건 결정
 - 최적의 촉매 설계를 위한 촉매 스크리닝
 - 아세트산 및 혼합 유기산 모델 반응을 이용한 촉매 반응 경로 파악
- 급속 열분해를 이용한 바이오오일 생산
 - 바이오오일 수율 향상을 위한 해조류 바이오매스의 전처리 공정 연구
 - 바이오오일의 물리화학적, 연료 특성 분석 및 주요 화학성분 확인

4. 통합공정 및 제품개발

- 해조류 대용량 전처리 공정 개발
 - 다시마의 대용량 전처리 기술 개발
 - 대량 생산시 발생하는 문제점 파악 및 해결 방안 강구
- 혐기성 소화에 의한 bench scale 유기산 생성 공정 구축
 - 준 파일럿 규모의 유기산 생성장치를 설계 및 설치
 - 준 파일럿 규모의 혐기성 소화에 의한 유기산 생성 조건 검토
- 해조류의 활용을 위한 통합공정 최적설계
 - 수치최적화를 이용한 공정 통합/설계 타당성 조사
 - 경제성 분석을 위한 기초자료 수집
 - 예상되는 최적 설계안의 경제성 평가
- 해조류 유용물질 분리 및 회수 공정 개발
 - 초임계 유체 추출 공정으로 해조류 유용물질 분리 및 회수 파악
 - 고압 가수분해 공정으로 해조류 유용물질 분리 및 회수 파악
- 해조류 부산물을 이용한 바이오 복합재료 개발
 - 해조류 종류별 부산물의 특성분석 및 데이터 확보

- 해조류 부산물을 이용한 친환경 바이오복합재료 개발 기초자료 확보
- 해조류의 통합적 활용을 위한 부산물 응용분야 조사
- 해조류 추출물을 이용한 기초생활제품 설계
 - 해조류 추출물을 이용한 기초생활제품 설계를 위한 레시피 제작
 - 기초 생활 제품 제조 공정 최적화

IV. 연구개발결과

1. 건강 신소재 개발

- 해조류 생리활성 물질의 항염증, 항치매, 항비만효과 및 기전분석
 - 다시마의 n -헥산과 디클로로메탄 획분은 항염증과 항치매 효과가 우수하여, 앞으로 염증관련 질환 (위염, 대장염, 류마티스성 관절염 등)과 퇴행성 신경질환 (알츠하이머성 치매, 파킨슨씨 질병)의 예방과 치료를 위한 식의약품의 소재로 활용될 가치가 높은 것으로 평가되었다.
 - 참모자반의 n -헥산 획분은 세포실험을 통하여 섬유아세포의 지방세포로의 분화억제 뿐만 아니라 지방합성 저해능이 우수한 것으로 확인되었으며, 현재까지의 동물실험 결과에 의하면 n -헥산 획분에 의한 비만억제효과가 뛰어남을 확인하였다.
 - 다시마와 참모자반의 주정추출물과 n -헥산 획분의 미백활성은 우수한 것으로 판명되었으며, 이러한 연구 결과는 다시마와 참모자반을 이용한 미백용 화장품 개발에 기여할 것으로 판단된다.
 - 곰피에서 7종의 화합물을 분리하여 이들의 항산화, 항염증, 항암효과를 규명하였다. 분리물의 구조와 기능은 향후 곰피를 이용한 개별인정형 건강기능성 식품개발을 위한 지표물질로 활용될 수 있을 것이다.
- 해조류 생리활성 물질의 항암효과 및 기전 분석
 - 감태에서 추출한 dieckol과 다시마의 n -헥산 R3 Fraction-4 추출물의 항암 기작은 소포체 스트레스에 의한 apoptosis 유도, 미토콘드리아와 관련된 세포 내 전달기작에 의한 apoptosis 유도와 세포막에 분포하는 세포사멸 수용체에 의한 apoptosis를 동시에 일으키는 것으로 판명되었으며, 이러한 결과들은 해조류 추출물들이 항암제로 이용할만한 미래 항암제 원료로서의 잠재적 가치를 지니고 있음을 나타내고 있다.
- 해조류 생리활성 물질의 항당뇨효과 및 기전 분석
 - 다시마로부터 처음으로 분리해낸 porphyrin-related compound의 lens

aldose reductase 억제활성과 최종당화산물형성의 억제활성에 대해 최초로 검증하였으며, 본 연구 결과에 따르면 다시마와 porphyrin-related compound의 당뇨합병증의 예방과 치료에 효과적인 천연의약품으로서의 역할을 기대할 수 있었다.

■ 해조류 자원의 통합적 활용을 위한 DB 구축 및 표준화

- 다시마 핵산 추출물을 주성으로 용매 분획할 때 가장 많은 기능성물질이 추출되었다. 또한 화장품 및 비누 등에 첨가할 활성물질은 70% ethanol 용매분획으로 하면 경제적이고 높은 활성을 유지할 것으로 판단된다. 현재까지 분석한 자료에 의하면 양식 다시마의 지역별, 계절별, 수심별 구성당의 함량은 차이를 나타나지 않았다.

2. 생물학적 전환공정 개발

■ 해조류 성분분별 및 전처리 공정 최적화

- Na₂CO₃에 녹인 농도별 알긴산나트륨 용액을 140℃에서 15분 동안 반응시켜 HPLC 크로마토그램을 분석한 결과, 알긴산 농도에 따라 증가 또는 감소하는 경향을 나타내는 3개의 알긴산 유래 단량체 및 중합체 피크들을 확인할 수 있었다. 이 3개의 알긴산 유래 물질을 Refractive index와 알긴산 농도와의 관계식, CS와 알긴산 유래 물질들의 Refractive index와의 관계식을 통하여 알긴산 농도와 상관관계가 있는 물질을 최종 선정할 수 있었다. 또한 개발된 알긴산 정량법이 비교적 신뢰성 있는 결과를 제공하는 것도 파악할 수 있었다.

■ 갯벌 유래 Metagenomic library로부터 알긴산 해조 다당체 분해 유전자 탐색 및 저분자 당원확보

- Metagenomic fosmid library의 386,400 클론에 대하여 alginate lyase gene(A9mC) specific primer를 이용한 High-throughput screening (HTS) 방법으로 alginate lyase gene을 확인하였다. 그리고 cetylpyridinium chloride (CPC) assay를 통하여 alginate lyase activity를 확인하고 균주에 대한 순수분리를 하여 1종의 potential clone(AlyWL1)의 여부를 확인하였다. 또한 전복 소화기관에 존재하는 미생물의 DNA를 이용하여 Fosmid library를 제작하여, 알긴산을 저분자로 가수 분해하는 endolytic alginate lyase 활성을 가진 클론을 확보하였다.

■ 생물친화적 전처리 및 당화효소를 이용한 갈조류 당화 공정 개발

- Alginate의 효소적 당화공정을 위해서 크게 두 종류의 enzyme이 필요한

데, 본 연구 결과 endo-type의 alginate lyase를 통해 중합도가 2, 3, 4, 5의 산물을 만드는 기술을 확보하였다. 현재 exo-type alginate lyase라고 생각되는 후보 효소군을 탐색 중이고 하반기 중으로 해당 후보군 중에서 exo-type alginate lyase에 해당되는 효소를 찾을 수 있을 것이라고 생각된다.

■ 해조류 분해 부탄올 생산균주 개발 및 부탄올 발효공정의 최적화

- CBP를 위한 맞춤형 부탄올생산균주의 개발하였다. Hydrogenase gene knockout에 의한 고수율 부탄올생산플랫폼균주 2종 선별하였으며, raw material 발효공정으로 다시마의 직접 발효를 행하여, 비타민과 기타영양소의 첨가없이 5-6g/l butanol 생산가능함을 알 수 있었다. 또한, 염분에 대해 영향을 받지 않는 것도 알 수 있었다 (upto 100g dw 다시마/l).

■ 난발효성 당류 대사형 재조합 미생물 개발

- 본 연구과제를 통해서 갈조류 유래 알긴산 단당류의 미생물 대사경로를 수립하였고, 알긴산 분해형 해양미생물 라이브러리를 구축하였고, 알긴산 유사 유로닉산을 대사할 수 있는 미생물을 선별하였으며, 알긴산 단량체의 제조를 위한 화학적 분해방법을 최적화하였으며, 알긴산 단량체를 대사할 수 있는 핵심효소의 유전자 정보를 획득하였고, 해양미생물 염색체에서 그 유전자를 증폭하였다. 또한 해양미생물 유래의 염색체유전자 라이브러리의 설계 조건을 확립하였다. 상기에 언급하였듯이 난발효성 당류인 알긴산을 대사할 수 있는 대사효소의 검색과 유전자 및 미생물을 선별하였고, 알긴산 유래 단량체의 안정적인 공급을 위해서 알긴산 단량체 제조방법을 개발하였다.

3. 그린에너지 융합공정 연구개발

■ Next generation sequencing을 활용한 유기산 수율 향상기술

- 혼합배양액에서 다시마의 세척 여부와 전처리 여부에 따라 다른 발효 양상을 나타내는 것을 파악하였다. 세척의 경우 butyric acid 생산에 있어서 큰 차이를 보였는데 효과적인 발효를 위하여 염분에 저항성이 있을 것으로 예측되는 해양 유래 미생물을 사용할 필요가 있다고 보이며 순수 분리의 경우 배지 다양성을 높여 다양한 균주가 분리될 수 있도록 할 필요가 있다고 판단된다.

■ VFA 생산용 다단계 생물반응기 설계

- Fed-Batch 실험의 경우 총 VFA의 생산 농도는 40g/L의 다시마에서 최고

22.7g/L로 나타났으며, MSC-HCDC를 이용하는 다단계 반응기에 대한 시뮬레이션의 경우 최종적으로 총 VFA의 생산 농도가 13.4g/L에 도달하였다. *E.coli* KO11를 이용한 에탄올 생산하였을 때 다시마 속 당 성분인 만니톨에 대해 우수한 발효 능력이 있다는 것을 발견하였다. 그리고 다시마의 전처리 실험을 통해 가장 효과적인 전처리 방법에 대해 알아볼 수 있었다. 그러나 이제 당 생산이 아닌 VFA 생산을 위한 다시마의 전처리 방법에 대해 추가적인 실험이 필요하다고 판단된다.

■ 혐기성 소화공정 이용 혼합 알코올 생산기술 개발

- 본 연구 결과 복합적 기질이며 난분해성 당을 포함하는 해조류를 이용하여 휘발성 지방산을 만들어내는 과정에는 혐기성 소화공정이 유용성과 실용적인 것으로 판단되었다. 혐기성 소화에 해조류를 이용하였을 때 황산이나 염산 등의 산처리와 열처리에 대한 전처리는 VFA의 생산에 크게 영향을 미치지 않는 결과를 보였다. 해조류를 처리하는데 있어 염분을 제거하는 과정은 크게 효과를 미치지 않기 때문에 공정에서 제외하여도 큰 영향이 없을 것으로 판단되며 소량의 Na는 alginate의 응집을 막아주어 빠른 분해에 도움이 될 것으로 판단된다. 기질에 대한 균주의 적응시간이 상당히 느리며 혼합균주의 특성상 성장속도가 느리기 때문에 장기간 배양하며 균주를 기질에 적응시켜야 한다.

■ 해조류 바이오매스 유래 혼합유기산으로부터 혼합 알코올 생산하는 화학촉매 공정 개발

- 선택적인 혼합 알코올 생산을 위한 최적 반응 조건 결정
- 최적의 촉매 설계를 위한 촉매 스크리닝
- 아세트산 및 혼합 유기산 모델 반응을 이용한 촉매 반응 경로 파악

■ 급속 열분해를 이용한 바이오오일 생산

- 바이오오일 수율을 향상시키기 위해 약산 전처리 공정을 도입하여 다시마를 처리한 결과, 다시마의 물리·화학적 특성 및 주요 열분해온도 구간에서 열적 동특성을 개선시킬 수 있었다.
- 상기 전처리 다시마를 원료로 급속 열분해 공정을 이용하여 바이오오일을 생산하는 실험을 수행하였으며, 그 결과 바이오오일 수율이 약 9% 정도 증가되었다.
- 상기 바이오오일의 물리·화학적 특성 및 연료특성을 분석한 결과 산소 함량 및 수분 함량이 감소되어 바이오오일의 연료 특성이 개선된 것을 확인하였으며, GC-MS 분석을 통해 주로 aliphatics 계열의 화합물이 생성됨을 알 수 있었다.

4. 통합공정 및 제품개발

■ 해조류 대용량 전처리 공정 개발

- Powder 형태의 다시마를 처리할 수 있는 대용량 추출공정을 확립하였다. 대용량 추출 시 filtration 공정에서 bottle-neck으로 작용하는 것을 파악할 수 있었는데, 그 대책으로 산 처리후 여과를 행하는 것 보다 중화 반응을 마친 후 여과를 하는 것이 바람직하다고 판단된다. 또한, granule 형태의 대용량 추출공정도 수행중에 있다.

■ 혐기성 소화에 의한 bench scale 유기산 생성 공정 구축

- 본 연구를 통하여 유기산 생산을 위한 대량장치의 설계, 운전 가능성을 제시하였다. 8일의 수리학적 체류시간인 연속식 실험에서 평균 및 최고 총유기산 생성농도는 각각 7.4g/L와 8.8g/L로 나타났다. 건조 다시마 1톤당 생산된 총 유기산으로 계산을 하면 약 370kg의 유기산이 생성된 것으로 나타나므로, 정량적인 목표인 300kg은 달성하였다. 향후, 수소화 반응과 에스테르화 반응을 첨가하여 혼합알코올을 생산하는 연구의 기초자료가 될 수 있을 것으로 생각된다. 또한, 본 연구 결과, 여러 가지 화학원료로 사용될 수 있는 유기산의 대량 생산이 가능하다는 것을 제시하였다.

■ 해조류의 활용을 위한 통합공정 최적설계

- 본 연구에서 수립한 물질 수지식을 토대로 혐기성 소화에 의한 유기산 생성공정의 경제성 분석을 실시한 결과, 주어진 조건에서 원료인 다시마의 가격이 105원/kg 이하가 되어야 손익분기점을 돌파할 수 있는 것으로 분석되었다. 현재 운전중인 pilot scale의 혐기성 소화 공정의 최대 수율(40%)에서는 183원/kg까지 최소 원료가격이 높아짐을 알 수 있다. 따라서 대량양식에 의한 다시마 원료의 저가격화가 매우 중요할 것으로 판단되며, 아울러 전환공정의 수율 증대와 분리공정의 운전비용 감소 또한 중요하다고 판단된다.

■ 해조류 유용물질 분리 및 회수 공정 개발

- 초임계 이산화탄소 처리로 인한 다시마 품질의 관능적 저해 요소(VOCs) 저감 효과를 알아보기 위한 실험 결과 처리 전 다시마에 비해 초임계 이산화탄소를 처리한 다시마 내 휘발성 유기 성분의 양이 큰 폭으로 감소하였다. 이 연구의 결과, 초임계 이산화탄소의 처리로 인하여 다시마의 관능적 저해 요소인 많은 향 성분이 저감/제거 되었으므로, 초임계 이산화탄소 처리를 거친 다시마 파우더를 산업적으로 응용할 경우 그 범위가 확대 될 것으로 기대된다. 본 연구 결과, 아임계수에 의한 가수분해 반응 공정

은 다시마로부터 기능성 물질 회수에 적합한 친환경 공정으로서 다시마의 아임계수 가수분해 반응이 기존의 다른 가수분해 공정에 비하여 효율성 및 경제성, 환경적 측면에서 매우 효과적인 대안임을 제시하였다.

■ 해조류 부산물을 이용한 바이오 복합재료 개발

- 다시마의 세척 및 표백과 특성분석, 다시마 부산물 보강 바이오복합재료 제조 및 특성분석을 통해 다시마 부산물을 보강재로 이용한 바이오복합재료 개발 가능성을 제시하였다. 또한, 주정 혹은 아세톤으로 처리한 과래 시료를 보강재로 한 폴리프로필렌 바이오복합재료의 특성을 파악하였다. 다시마 혹은 다시마 부산물은 바이오복합재료의 보강재로 단독으로 사용하는 데에는 적합하지 않은 것으로 분석되었으며, 활엽수 펄프와 같이 보강 특성이 우수한 다른 천연섬유 보강재와 혼합되어 사용되는 경우에는 식물성 천연섬유의 사용을 절약하고 해조류 부산물을 활용하는 점에서는 의미가 있으나 바이오복합재료의 동역학적 특성, 기계적 특성에는 식물성 천연섬유를 단독으로 사용하는 경우에 비해 보강효과가 적은 것으로 분석되었다.

■ 해조류 추출물을 이용한 기초생활제품 설계

- 해조류 추출물을 이용하여 항산화 비누를 제작하기 위한 레시피를 확정하였다. 해조류 추출물의 함량은 1 ~ 10 중량% 로 첨가하는 것이 가능하며, 첨가량의 결정은 향후 경제성 파악과 공정모사결과에 따라 진행될 것이다. 또한, 플라즈마 처리를 통한 해조류로부터의 당류 물질 제조에 있어 다수의 실험을 통해 플라즈마 처리가 당화에 긍정적인 영향을 끼치는 것이 확인 되었으며, 진공플라즈마 처리와 용액 플라즈마 처리 2건 각각에 대해 특허가 출원하였다.

V. 연구개발결과의 활용계획

■ 국가정책 측면

- 본 연구사업은 이산화탄소를 주 기질로 하여 광합성을 하는 해조류를 원료로 이용하여 저공해 바이오연료를 생산하기 위한 기술 개발이므로 녹색 성장을 지향하고 온실가스 배출을 최소화하는 부분에서 세계를 선도하려고 하고 있는 현재의 국가정책에 적극 부합되는 과제으로써 정책수립에 활용
- 해조류 바이오매스 개발, 생산 관련 일자리 창출, 해조류 바이오매스 생산 단지 조성 등의 해조류 바이오매스 자원의 개발을 위한 국가정책을 수립

하는데 기여

- 친환경 신성장 동력으로서의 해조류 바이오매스 이용 계획을 마련하는데 일조할 것으로 판단되며 이를 통해 탄소배출권 확보를 통한 국가 경쟁력 확보 및 신성장동력원의 한 축을 담당
- 향후 고유가 시대 및 기후 변화 협약에 대비한 화석에너지를 대체할 신재생에너지가 필요함에 따라 바이오 연료 보급 활성화를 위한 정책의 대안 제시
- 해조류 통합적 활용에 대한 최적 통합공정 설계 및 경제성 평가는 국가의 정책 수립에 기여

■ 연구개발 측면

- 해조류의 탄수화물의 분해효소 및 당화공정 개발은 생화학, 분자생물학, 미생물학, 단백질공학, 생물화학공학 등 다양한 분야의 기술이 요구되므로 전세계적으로 융합형 학문 연구의 트렌드와 같이 융합연구개발이 꼭 필요.
- 전세계적으로 해조류 탄수화물의 분해효소에 대한 연구개발은 미미한 실정이므로, 새로운 효소의 개발 시 연구결과의 지적재산권 확보에 보다 유리한 환경을 조성할 것으로 예상
- 해조류 분해기술은 식품, 산업 및 환경폐기물의 재활용기술에 응용되어 다양한 폐자원의 에너지원 개발에 활용
- 본 기술개발의 완성으로 전처리/발효부산물의 생리활성물질은 기능성 소재로 활용하며, 나아가서는 기초생활 제품 및 의약품 제조를 위한 선도물질로 활용 가능. 또한 전처리/발효부산물 중의 비발효성 당류를 전환시켜 새로운 기능성을 지닌 올리고당 또는 당유도체를 상품화 가능성 제시
- BT, ET 하이브리드 환경친화성, 에너지절약성 바이오신소재 개발기술 확보
- 바이오에너지 개발에 있어서 현재까지는 주로 목질계 바이오매스를 원료를 하여 바이오연료를 생산하기 위한 전처리, 당화, 발효공정 연구가 진행. 따라서 목질계 바이오매스와는 물리적, 화학적 성상이 전혀 다른 해조류 바이오매스를 원료로 이용하기 때문에 이에 대한 연구개발 결과물은 그 신규성으로 인하여 특허 등록할 경우 국내 및 해외의 관련 기업에 대한 기술이전 및 해외 우수저널에 게재 가능성 큼
- 해양자원의 응용 및 분별/분리 공정은 기존의 석유계 소재분야의 대체뿐만 아니라, 새로운 식품 및 의약 산업에도 적용 가능하며, 이를 통한 효소

/발효 공정 모델링, 최적화 기술, 공정 설계 기술 등은 바이오 에너지 생산 공정뿐만 아니라 여타의 바이오리파이너리 (biorefinery) 기술에 광범위하게 적용 가능하여 생물 산업에 파급효과가 매우 큼.

■ 산업화 측면

- 본 연구 결과는 기능성식품으로써의 개발이 가능하며, 특히 해조 다당류를 건기식의 베이스로 사용할 경우 다이어트 식품으로의 개발이 가능.
- Phlorotannin 류의 높은 항산화성에 의한 항염증효과는 면역조절기능은 물론 뇌세포의 염증에 의한 치매 예방제로써의 활용이 가능하므로 해조류의 대량소비확대에 기여
- 해조류 추출물을 이용한 기초 생활제품으로 세제, 비누 등으로 시작하여 이후 피부 개선, 치료제 등의 의약품으로도 진출이 가능
- 바이오 에너지·소재 산업에 있어서 국내 원천기술 확보를 통한 대외무역 역조현상 해소와 해외 로열티 수입원 확보 가능성
- 해조류를 이용한 셀룰로오스계 천연섬유 대체 및 복합재료 원료로 활용 가능하며, 천연소재 보강 고분자복합재료의 경량 특성에 의한 에너지절약 효과 제시 가능
- 바이오복합재료는 자동차, 항공기 및 운송분야의 경량성 내·외장재뿐만 아니라, 휴대폰 케이스 및 컴퓨터 모니터 케이스 등 전자제품에 활용 가능하며, BT, NT, ET 하이브리드 기술에 의한 고성능화 및 고기능화로 군사용, 항공우주용 등 고부가가치 경량신소재로 활용가능
- 해조류의 그린에너지화는 부분적인 기술에 의한 단기사업이 아니며 지금까지와는 다른 차원의 해조류 대량양식 기술과 해조류 중의 모든 유용성분들의 활용을 극대화 할 수 있는 통합적인 기술의 개발이 선행되어야만 산업적으로 성공 가능함. 따라서 본 연구성과물은 해조류의 통합적 활용을 통한 에너지 및 유용물질의 제품화 로드맵으로 활용 가능
- 해조류 바이오에너지 사업은 대규모의 신규 수요의 창출을 통하여 국내 수요의 정체와 외국산 저가 제품과의 경쟁으로 침체상태에 있는 국내 해조류 양식사업에 대하여 획기적인 발전계기를 제공함. 이 사업성과물은 이에 대비한 정책을 수립하고 준비를 하는데 활용 될 것임

목 차

제 1 장 연구개발과제의 개요	17
제 1 절 연구의 목적 및 필요성	19
제 2 절 기술의 종류 및 범위	26
제 2 장 국내외 기술개발 현황	69
제 1 절 건강 신소재 개발에 대한 기술개발 동향	71
제 2 절 생물학적 전환공정 개발에 대한 기술개발 동향	79
제 3 절 그린에너지 융합공정에 대한 기술개발 동향	82
제 4 절 통합공정 및 제품개발에 대한 기술개발 동향	84
제 3 장 건강 신소재 개발	89
제 1 절 해조류 생리활성 물질의 함염증, 항치매, 항비만효과 및 기전 분석 ...	91
제 2 절 해조류 생리활성 물질의 항암효과 및 기전 분석	178
제 3 절 해조류 생리활성 물질의 항당뇨효과 및 기전 분석	190
제 4 절 해조류 자원의 통합적 활용을 위한 DB 구축 및 표준화	200
제 4 장 생물학적 전환공정 개발	217
제 1 절 해조류 성분분별 및 전처리 공정 최적화	219
제 2 절 갯벌 유래 Metagenomic library로부터 알긴산 해조 다당체 분해 유전자 탐색 및 저분자 당원확보	231
제 3 절 생물친화적 전처리 및 당화효소를 이용한 갈조류 당화 공정 개발 ...	248
제 4 절 해조류분해 부탄올 생산균주 개발 및 부탄올 발효공정의 최적화	260
제 5 절 난발효성 당류 대사형 재조합 미생물 개발	269
제 5 장 그린에너지 융합공정	285
제 1 절 Next generation sequencing을 활용한 유기산 수율 향상기술	287
제 2 절 VFA 생산용 다단계 생물반응기 설계	300
제 3 절 혐기성 소화공정 이용 혼합 알코올 생산기술 개발	322

제 4 절	해조류 바이오매스 유래 혼합유기산으로부터 혼합 알코올 생산하는 화학축매 공정 개발	337
제 5 절	급속 열분해공정 이용 바이오오일 생산기술 개발	357
제 6 장	통합공정 및 제품 개발	377
제 1 절	해조류 대용량 전처리 공정 개발	379
제 2 절	혐기성 소화에 의한 bench scale 유기산 생성 공정 구축	383
제 3 절	해조류의 활용을 위한 통합공정 최적설계	396
제 4 절	해조류 유용물질 분리 및 회수 공정 개발	410
제 5 절	해조류 부산물을 이용한 바이오 복합재료 개발	443
제 6 절	해조류 추출물을 이용한 기초생활제품 설계	467
제 7 장	목표달성도 및 관련분야에의 기여도	485
제 1 절	연구개발 목표 및 내용 요약	487
제 2 절	기술 구성 및 연계도	494
제 3 절	향후 계획	498
제 8 장	참고문헌	499
부록	515
A.	추진경과 일정표	517
B.	심포지엄 개최 결과 요약	518
C.	최종보고회 결과 요약	520
D.	연구성과물	522
E.	언론 홍보	541

제 1 장

연구개발과제의 개요

제 1 절 연구의 목적 및 필요성

제 2 절 기술의 종류 및 범위

제 1 장 연구개발과제의 개요

제 1 절 연구의 목적 및 필요성

1. 경제산업적 측면

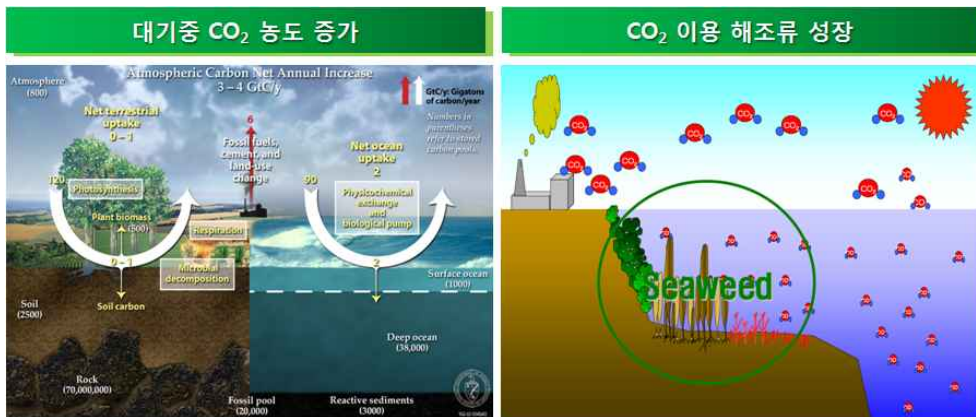
- 신재생에너지 의무할당제(RPS)와 탄소배출권(CER) 의무이행제도 대비에 따른 비식용 해조류로부터 그린에너지 확보
- 비식용 바이오매스 에너지자원으로서의 해조류 활용 가능성 조사
- 해조류의 통합적 활용을 통한 경제적 그린에너지 생산기반 구축
- 해조류의 통합적 활용을 위한 구성성분 및 적용기술 특성 조사
- 기후변화협약 대응 및 수산분야 녹색산업화에 의한 신성장동력 창출

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.

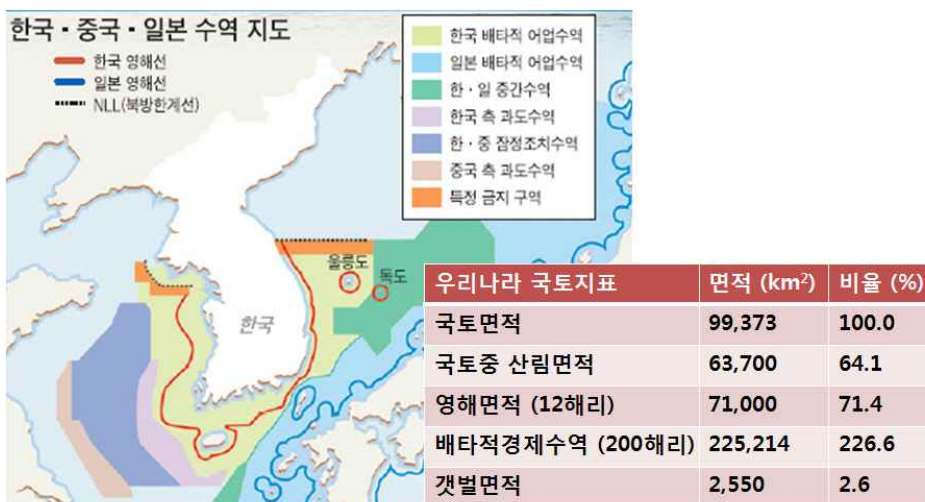
하지만 최근 바이오연료 생산에 대한 폭발적인 관심에 의하여 옥수수, 콩, 유채, 사탕수수 등의 육상 바이오매스에 대한 가격이 급격히 상승하는 효과를 보였다. 나아가 이들 곡물들은 지속적인 인구 증가를 감안할 때 앞으로 식량부족 상황을 초래할 수 있으며, 에너지 생산을 위한 원료로 사용할 경우 대량 재배 시 비료 및 살충제 사용으로 인한 제2의 환경문제를 유발시킬 수도 있다는 우려를 낳고 있다. 이에 해조류 바이오매스에 대한 관심이 최근 높아지고 있다. 해조류는 해수 중의 부영양 물질, 수중 및 대기 중 이산화탄소의 흡수 등 환경회복 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 원

료로 하는 바이오에너지 생산 및 고부가 물질 생산기술은 국내 실정에 매우 적합하며 경쟁력 있는 기술로 평가되고 있다.

특히 우리나라는 해조류 양식기술 및 생산량 측면에서 세계 4위 수준의 인프라 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 3.5만 ha재배, 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 1-1-1] 해조류의 이산화탄소 포집 및 저장 효과.



[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 『아폴로 & 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 건강신소재 개발

- 최근 식생활이 서구화됨에 따라 비만, 동맥경화, 협심증, 당뇨병 등의 여러 가지 성인성 질병에 대한 예방과 치료에 식물성 폴리페놀의 약리효과가 입증됨으로써 식물유래 저분자 화합물의 이용에 대한 관심으로 인해 많은 기능성 제품들이 개발되고 있으나, 해조류를 이용한 기능성 제품개발은 미미한 실정임.

- 현재까지 식물체의 자연식품에 풍부하게 함유되어 있는 것으로 알려진 색소 성분과 배당체를 형성하고 있는 성분들은 다양한 생리활성을 지닌다는 새로운 사실에 관심이 고조되면서 이들에 대한 많은 연구가 진행되고 있음. 이러한 연구들의 대부분은 육상의 식물체에서 발견되는 성분들에 한정되어 있는 실정임.
- 해조 중에 다량 함유되어 있는 해조다당류는 혈장 콜레스테롤 저하효과, 항혈액 응고효과, 항암효과 등의 약리효과와 식이섬유로서의 영양상의 효과가 높은 것으로 밝혀졌으나, 저분자물질인 폴리페놀 성분의 기능성과 이들의 생리적인 효과에 관한 연구가 최근 활발히 진행됨에 따라 phlorotannins의 여러 가지 생리활성 효과가 밝혀지고 있으나, 이들의 기능성 식품소재로써 개발하기 위한 연구는 미진한 실정임.
- 국내의 수산가공산업은 대부분이 단순 가공처리에 의존하는 노동집약적인 산업으로, 본 연구 개발팀의 전문지식을 활용하여 신기술을 개발하여 새로운 생물공학적인 기법을 도입함으로써 기존의 수산가공산업을 보다 기술집약적 첨단 산업으로 전환시킴으로써 수산가공산업의 수익 향상에 기여하여 국가산업 발전에 기여하고자 함.
- 해조류로부터 새로운 생리활성물질의 대량분리공정기술을 확립함으로써 식품, 의약품 등의 관련 산업분야의 활성화를 꾀하며, 대량생산에 의한 수출을 통해 건강기능성 식품소재 수입국에서 수출국으로 전환시킴으로써 해양천연물 생산 기술의 선진화를 추구함.
- 고령화 사회의 진입으로 인한 노년기 건강을 위하여 노화관련 질환의 예방과 치료를 위하여 천연식품에서 그 해법을 찾으려는 노력이 well-being 선행과 맞물려 고조되고 있으며, 이러한 시대적 조류와 함께 해조류에 함유된 생리활성 소재를 이용한 기능성 식품을 개발함으로써 맞춤형 기능성 식품 개발을 위한 선도기술 개발이 필요함.
- 바이오에너지 및 고부가가치 제품을 생산하기 위해서는 해조류 조체에 함유되어 있는 구성당 성분 및 저분자 화합물에 대한 정확한 정보의 확보 및 데이터베이스 구축이 필요함.

나. 해조류 생물학적 전환공정 개발

- 국내연안에서 대량 양식되고 있거나, 바이오에너지 대상 해조류로 가능성이 높은 다시마, 미역, 김, 툇 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 활용

할 수 있음.

- 바이오에너지 생산 과정 중 해조류의 물리적 및 화학적인 전처리 방법에 따른 당조성과 저분자 화합물들의 조성변화를 분석함으로써 알콜 발효를 위한 전처리 공정의 최적화가 필요함. 전처리 공정 과정에서 생성될 수 있는 발효 저해물질의 함량을 분석, 저해물질의 생성을 억제하는 방법을 도입하여 발효수율을 향상시킬 방안이 모색되어야 함.
- 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 때문임. 해조류 역시 이러한 문제점들이 극복되어야만 해조류로부터 생산된 연료용 에탄올이 기존의 화석연료와 경쟁하여 대체 에너지로서의 역할을 할 수 있을 것임. 이를 위해서 해조류의 효율적 전처리/당화는 물론 유용성분들의 효과적 분별 및 회수가 선행되어야 함.
- 해조류의 구성성분 및 결합 형태는 육상 바이오매스와 근본적으로 다르므로 해조류에 적합한 전처리/분별기술 개발을 통해 유용성분의 자원화 및 차세대 바이오연료생산에 기여할 수 있음.
- 다양한 종의 해조류들은 각각 서로 다른 성분비, 결합구조, 반응성 등으로 인하여 전처리 조건 또한 다양해야 함. 전처리조건이 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 있음.
- 해조류로부터 발효성 당을 얻기 위한 당화공정에는 화학적 방법과 생물학적 방법이 있음. 화학적 방법을 이용하면 비교적 쉽게 당화를 할 수 있다는 장점을 갖고 있으나 당화과정 중 대규모의 오염물질이 발생하며 이로 인해 당화율 및 발효수율의 저해가 초래됨. 따라서 당화 및 발효수율의 제고를 위하여 새로운 효소개발을 통한 당화공정의 개발이 필요함.
- 또한 해조류의 에너지 효율성 향상을 위해서는 다당류의 저분자화 전환기술과 비발효당의 발효당으로 생물전환기술이 요구되며 이 공정에 요구되는 미생물 효소자원을 국내외 특허를 출원할 수 있는 미생물 효소자원 확보기술이 요구됨.

다. 해조류 그린에너지 융합공정 개발

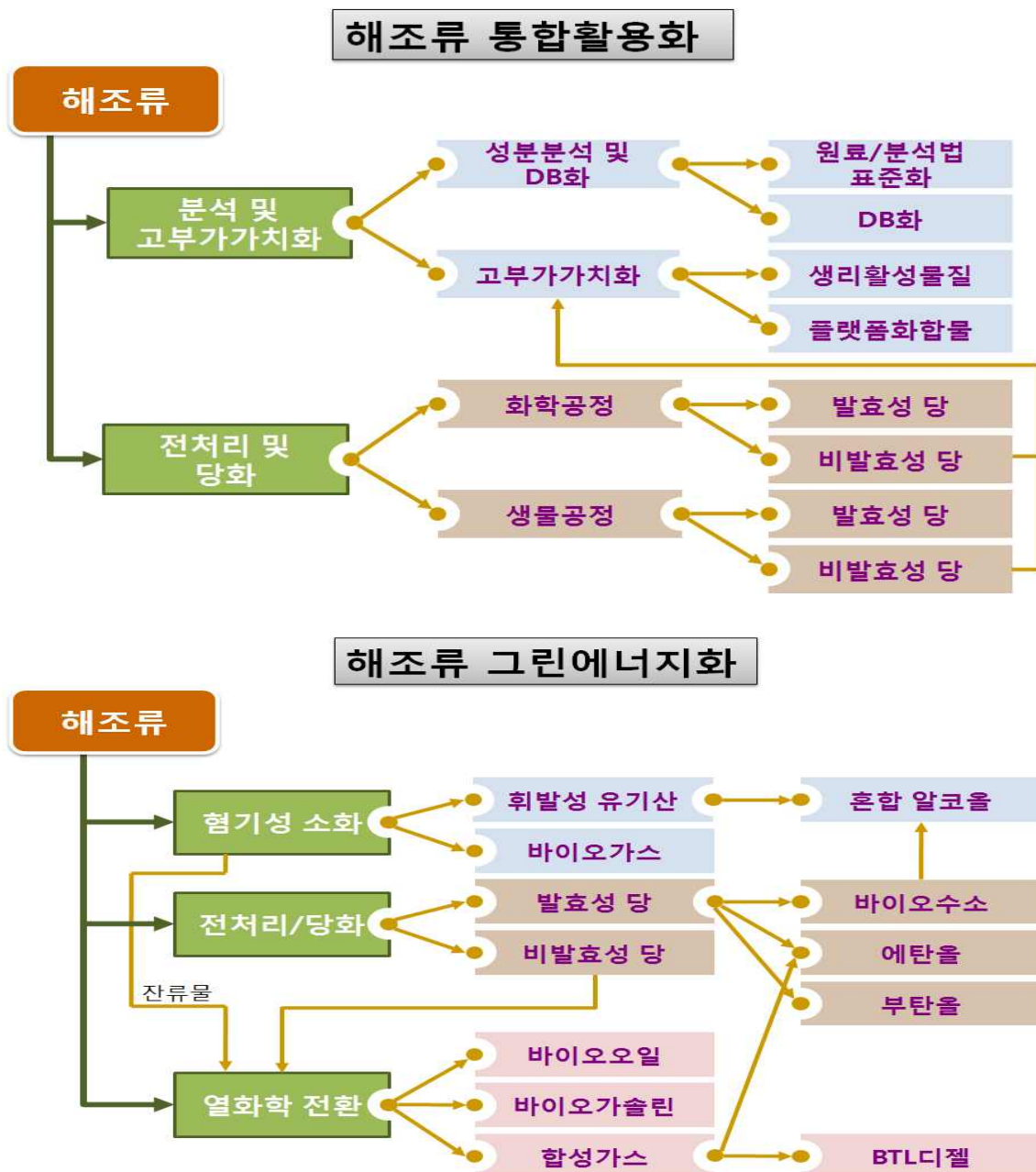
- 전년도에 수행한 연구결과로부터 혐기성 소화공정을 이용한 혼합 알코올 생산 기술 및 급속 열분해공정을 이용한 바이오오일 생산기술 개발에 대한 그린에너지 융합공정 연구가 필요하다고 판단됨.
- 특히, 혐기성 소화공정으로부터 유기산 232.5 kg (수첨반응 시 혼합 알코올 142.6 kg) 그리고 급속 열분해공정으로부터 바이오오일 78 kg, 촉 83 kg, 바이오가스 63 kg 생산이 가능함. 이는 해조류 바이오매스 1톤으로부터 약 400 kg의 에너지를 회수할 수 있어 해조류 바이오매스를 이용한 그린에너지 생산에 있어서 매우 중요한 역할을 차지할 것으로 기대됨.
- 하지만 전년도에서는 이들 그린에너지의 생산 가능성을 타진하는데 초점을 맞추고 있어 수율 향상, 융합공정 연구 등의 연구를 추가적으로 수행할 필요성이 있음.
- 혐기성 소화공정을 이용한 혼합 알코올 생산기술에서는 전체공정의 측면에서 추출발효에 대한 연구가 필요하며 동시에 균주 adaptation 연구, 공정 최적화 연구, 수소화 반응용 촉매 개발 등의 연구가 필요하다고 판단됨. 이들 연구들은 혐기성 소화공정을 이용한 알코올 생산에 있어서 공정효율을 향상시키기 위해 반드시 수행해야 할 필요성이 있는 연구임.
- 전년도에 열화학적 전환 기술의 해조류 바이오매스에 대한 적용 가능성을 검토하였으며, 그 결과 해조류 바이오매스로부터 바이오오일의 생산 가능성을 확인하였음. 하지만 바이오오일 수율이 목질계 바이오매스 보다 낮았으며 이는 해조류 바이오매스 원료 특성에 기인한 것으로 판단됨. 따라서 해조류 바이오매스 유래 바이오오일의 수율을 향상시키기 위한 해조류 바이오매스의 전처리 방안에 대한 연구가 필요함.
- 또한, 해조류 바이오매스 유래 바이오오일은 목질계 바이오매스 유래 바이오오일과 달리 aliphatic 계열의 화합물을 다량 함유하고 있음이 확인되었음. 따라서 해조류 바이오매스 유래 바이오오일을 화학물질 생산에 이용하기 위해서는 바이오오일 조성에 대한 분석 및 분리방법에 대한 연구가 필요하여, 바이오연료로 이용하기 위해서는 고품질화 방안에 대한 연구가 필요함.
- 최종적으로, 해조류 바이오매스로부터 약 40% 이상의 에너지 회수가 가능하게 하기 위해서 그린에너지를 생산하기 위한 생물학적 및 화학적 융합공정에 대한 연구는 반드시 필요하다고 판단됨.

라. 해조류 통합공정 및 제품개발

- 해조류로부터 여러 가지 화학원료로 사용될 수 있는 유기산을 얻기 위해서는, bench scale 규모의 혐기성 소화에 의한 유기산 생성 실증 설비 구축이 필요함.
- 현재까지 바이오매스에 대한 연구는 주로 에너지 전환공정 그 자체에 중점을 두고 있고 통합적 활용을 위한 경제성 평가나 통합공정 설계에 대한 연구는 상대적으로 저조함.
- 여러 개별 단위공정을 통합, 설계를 위해서는 수치최적화를 통한 체계적인 접근방법이 필요함.
- 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 있음.
- 해조류에 존재하는 항산화 물질(푸코잔틴, 색소류 등), 다당류, 지질류, 폴리페놀류 등을 효율적으로 분리/회수하기 위한 친환경 용매를 사용하는 lab. scale의 분리공정 구축이 필요함.
- 국내 사용되고 있는 고품질의 천연 소재의 대부분은 수입에 의존하고 있음. 따라서 해조류 추출부터 추출물을 이용한 제품의 완성까지의 모든 단계가 가능해질 경우, 수입대체 효과와 개발된 신제품의 해외 시장 진출에 의한 국가 기술 경쟁력 향상이 예상된다. 또한 기초 생활 제품으로 시작하여 제약, 식품, 화장품 분야 등으로의 응용가능성이 크기 때문에 본 연구는 산업인력양성 및 새로운 일자리 창출의 기회를 마련하는데도 이바지 할 것으로 판단됨.
- 해조류는 종별에 따라 나노, 마이크로 크기의 섬유를 포함하고 있는 경우가 있으며 이들은 바이오복합재료 보강재 등 다양한 신소재 원료로 활용될 수 있음.
- 바이오복합재료는 천연섬유를 보강재로 한 고분자복합재료로서 자동차, 건축, 항공기 등의 경량용 내·외장재로 사용되고 있는, 친환경 및 에너지절약 특성을 가진 신소재임.

제 2 절 기술의 종류 및 범위

본 기반구축연구에서는 해조류 바이오매스의 그린에너지화 및 통합적 활용을 위해 건강 신소재 개발, 생물학적 전환공정 개발, 그린에너지 융합공정 개발, 통합공정 및 제품 개발 등으로 크게 4개의 기술로 분류하고, 각 기술별 경쟁력 있는 세부기술들을 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 바다의 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(*Euclima*) 및 꼬시래기속(*Gracilaria*)과 갈조류에 속하는 다시마속(*Laminaria*) 및 미역속(*Undaria*)이다.

2. 건강 신소재 등의 부산물 이용 통합공정 기술 개발

가. 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 보고되었으며, 감태에서 분리된 triphloroethol-A가 γ -선에 의한 세포보호효과는 ROS 감소에 의한 미토콘드리아의 산화적 손상을 감소시킴으로서 나타난다고 보고되어 있다.

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 보고 되었고, 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 나타나는 것으로 보고되고 있다.

(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.

나. 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 고효율의 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 swelling agent로 사용되고 있다. 해조 다당류는 의약산업에도 다양하게 응용되고 있는데 chitosan은 투석시 blood plasma expanders로, alginate는 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 100-200달러, agar로부터 추출한 전기영동용 고품질 agarose는 kg당 400달러가 넘는다. 면역반응 등에 사용되는 색소인 phycobiliprotein은 1kg당 7,500만불이라는 초고가로 Cyanotech사에서 판매되고 있기도 하다. 따라서 고부가가치의 상품을 개발하기 위하여 해양 생물공학 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.

다. 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) 순

이다. 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 물성개량을 위한 수식기술은 이태리가 기술적인 우위에 있으며, 미국에서의 해조 다당류 이용에 관한 연구는 낮은 수준이다. 이는 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, 뜸부기, 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.

라. 해조류 유래의 기능성 물질

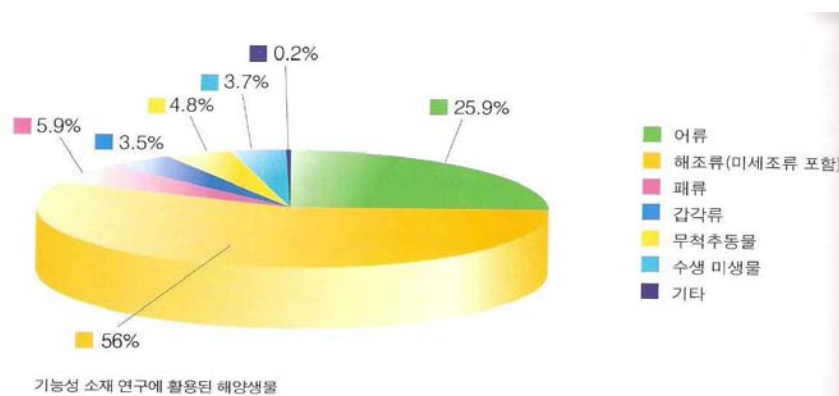
해양생물로부터 기능성 물질을 탐색하고 활용하고자 하는 연구는 1970년대 후반부터 시작되었으며, 지금까지의 연구결과 육상생물에서는 알려지지 않았던 새로운 화합물들이 다수 존재한다는 것이 밝혀짐에 따라 해양이 생물신소재의 보고로 집중 부각되고 있다.

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 클 것으로 기대되어 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, 과도로부터 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, 톳, 대황 등이 있고, 홍조류는 김, 우뚝가사리, 불등가사리, 풋가사리, 카라니긴 등이 있다.



[그림 1-2-2] 기능성 소재 연구에 활용된 해양생물.

해양미세조류는 크기가 작지만 해양의 1차 생산자로서 하부영양단계에서 매우 중요한 역할을 담당하고 있다. 전 세계적으로 10,000여 종 이상의 식물플랑크톤

이 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, 스피룰리나 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 활성화하는 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, 켈생이모자반, 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 접종시킨 마우스의 생명을 25% 이상이나 연장시켰다.

라. 보고된 해조류의 구성성분 분석기능성 유효 물질 분석

(1) 거대 해조류의 구성성분

[표 1-2-1] 거대 조류의 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

[표 1-2-2] 해조류의 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	Hls	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 향진 작용을 갖는 홀수 계열의 prostaglandin을 증가시켜 반대 작용을 하는 thromboxane를 감소

시키는 효과를 나타낸다.

(4) 탄수화물과 다당류

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

[표 1-2-3] 해조류의 알긴산 함유량

(단위 : %)

해조류	미역	다시마	톳
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

[표 1-2-4] 해조류의 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

[표 1-2-5] 해조류의 비타민 함량

구 분	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
톳	360	0.01	0.16	2.1	-

바. 보고된 해조류의 기능성 유효 물질 분석

(1) 김

[표 1-2-6] 김의 기능성 성분

생 리 활 성	기 능 성 성 분		
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 압	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

[표 1-2-7] 미역의 기능성 성분

생 리 활 성	기 능 성 성 분
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 많게 함), 만니톨(자궁 수축 작용)
어린이 성장 발육 촉진	칼슘(우유의 3배)
변비, 정상 효과	섬유질
I.Q 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

[표 1-2-8] 다시마의 기능성 성분

기 능 성 성 분	생 리 활 성
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

[표 1-2-9] 톳의 기능성 성분

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 엽록소, 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 회복
- 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
- 엽록소: 강력한 살균작용, 심장기능 강화, 변비 해소작용, 빈혈의 예방과 치료

사. 해조류의 생리 활성과 주요 기능성 성분 총괄

[표 1-2-10] 해조류의 생리 활성과 주요 기능성 성분

효 용	성 분	주된 해조류
콜레스테롤 저하	식이섬유(알긴산, 유산다당) 푸코스테롤요소	다시마, 미역, 김, 우뚝가사리, 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	톳, 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, 톳, 김
노화 방지개선	β -카로틴, n-3계 및 n-6 다가불포화지방산, 요소, 망간, 비타민E, 비타민C, 식이섬유	미역, 다시마, 톳, 팔손이풀, 김외 식용해조
피부장해 방지개선	탄닌계, 자외선흡수물질 β -카로틴, 아연	톳, 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, 우뚝가사리, 김
담석증 예방개선	식이섬유(푸노란), 타우린	참풀가사리, 김
항지방간	콜린	김

3. 해조류의 생물학적 전환공정 개발

가. 해조류 전처리

(1) 물리적 방법

(가) 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 cm 정도가 되는 분쇄(comminution) 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 발효성 당 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.

(나) 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 볏짚 등의 농경잔여물에서는 약 알칼리 팽윤 처리가 높은 효과를 보였지만, 리그닌 함량이 높은 소프트우드에서는 거의 효과를 보지 못하였다고 하였다. 알칼리 처리의 기본 원리는 비발효성 당 고

분자, 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.

(2) 화학적 방법

(가) 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 전처리 할 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.

(나) 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 psia)을 시킨 다음, 갑작스럽게 압력을 방출시키면 파열된 바이오매스를 얻을 수 있다. 이 과정에서 헤미셀룰로오스의 가수분해, 리그닌의 구조가 파괴되고 있다. 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 압력강하에 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.

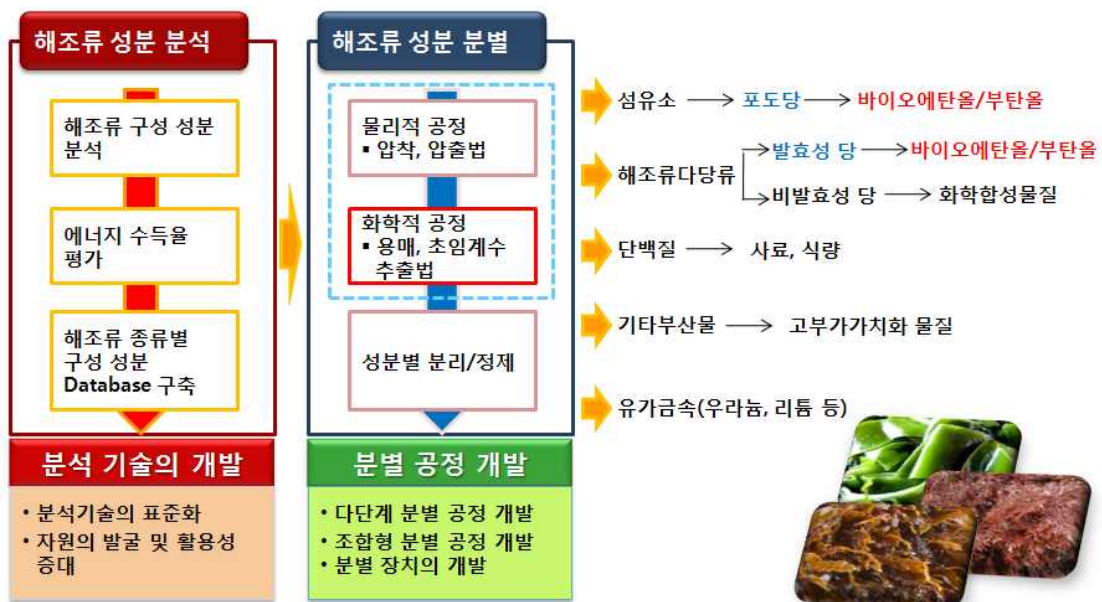
(다) 암모니아 폭쇄(AFEX; Ammonia Fiber Explosion)

바이오매스를 암모니아수로 가압 반응시킨다. 증기폭쇄 전처리와 비교하여 비교적 온화한 반응조건(상온 ~ 90°C, 150-180 psia)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 80-90%의 당수율을 나타내었지만, 하드우드나 소프트우드에서는 불과 50% 이하의 당수율을 나타내어 리그닌 함량이 높은 바이오매스에 대해서는 효과적인 결과를 얻지 못하였다. 폐신문지에 AFEX를 적용하였을 때, 역시 하드우드에서와 마찬가지로 40% 이하의 당수율을 나타냈다고 하여, AFEX는 적용 가능한 바이오매스가 한정되어 있음을 알 수 있다. AFEX 전처리는 알카리 처리에서의 기작과 마찬가지로 암모니아에 의해 섬유소의 반응성이 증가하였을 뿐만 아니라, 섬유소 결정성에도 영향을 준다고 보고되었다. 또한 암모니아의 급속한 증발속도로 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.

(라) 바이오매스 분별 (Biomass Fractionation)

바이오매스의 알카리 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. 여러 연구에 의해 알카리 추출 방법과 약산 처리 기술을 이용하여 바이오매스를 분별 방법이 제시되었고 또한, 약산 침출 공정과 암모니아 침출 공정을 조합하여 switch-grass의 구성 성분들을 분별하는 것도 가능하게 되었다. 약산을 이용하여 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 있었다고 보고하였다.

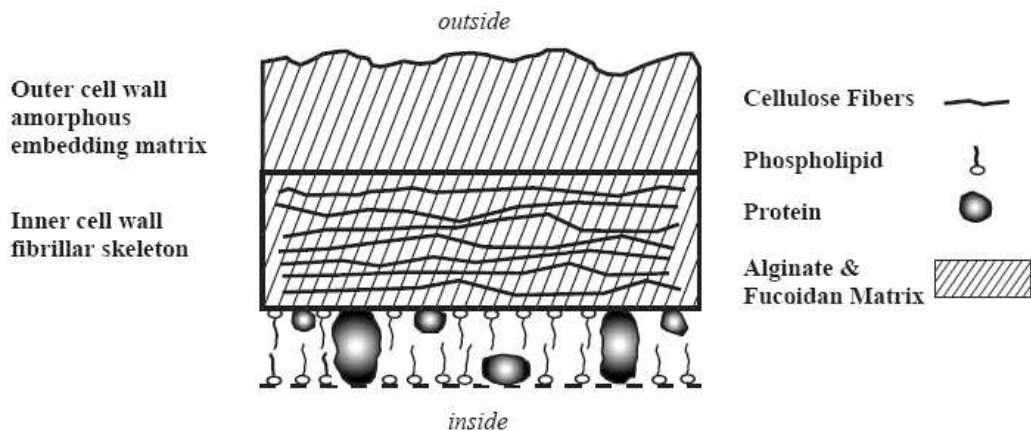


[그림 1-2-3] 화학적 해조류 전처리 기술.

(3) 생물학적 방법

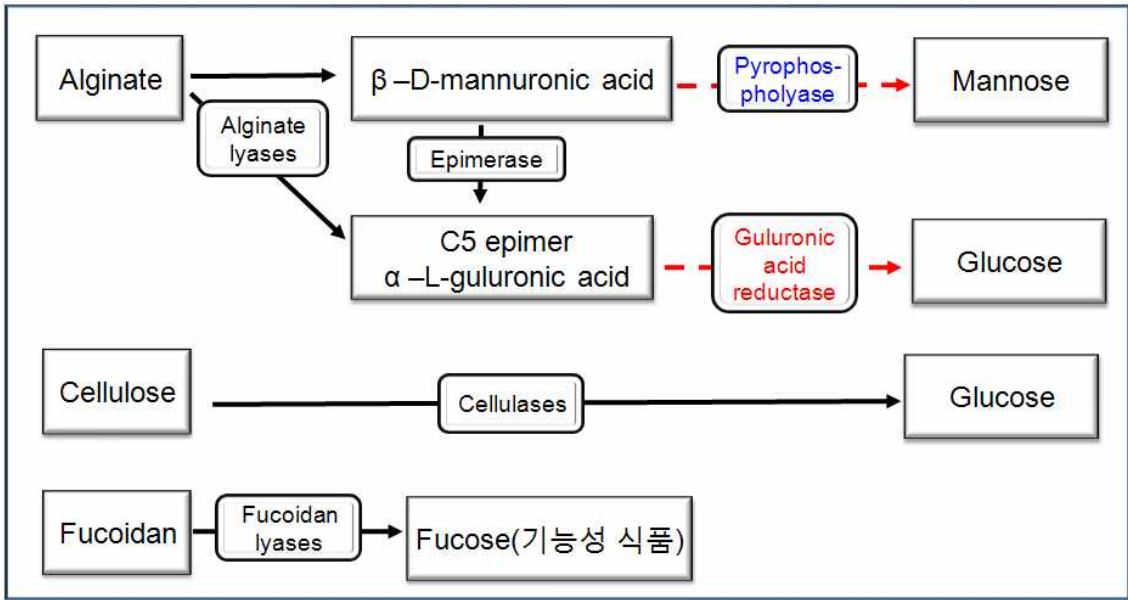
(가) 갈조류 분해효소 개요

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 1-2-4] Cell wall structure in the brown algae.

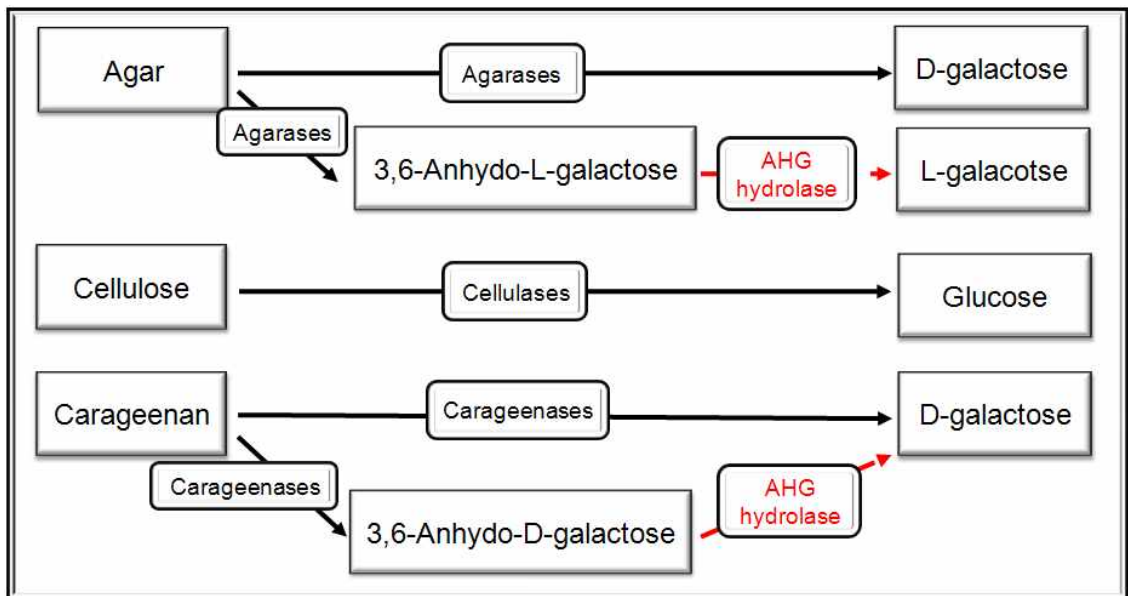
갈조류의 저장 탄수화물은 크게 두 종류로 구성되어 있는데 mannitol과 laminaran으로 구성되어 있다. Mannitol의 경우 수확시기에 따라 차이가 있지만 건중량의 최대 6.8-15%까지 존재하며 laminaran은 glucose로 이루어져 있으며 0.5-3.7%이상 존재한다고 알려져 있다.



[그림 1-2-5] 갈조류 구성성분별 생물학적 전환 과정 모식도.

(나) 홍조류 분해효소의 개요

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



[그림1-2-6] 홍조류 구성성분별 생물학적 전환 과정 모식도.

(다) 생물학적 전환 효소 개발 현황

[표 1-2-11] 해조류의 효소 개발 현황

신규 효소 ¹⁾	개발 효소 ²⁾	개량 효소 ³⁾
Glucuronic acid reductase (녹조류) AHG hydrolase (홍조류) Gululuronic 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

(라) 신규 효소개발 방법

① 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.

② 분해 효소의 분리 및 동정

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

③ 효소 개량

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

④ 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 ion 등의 보조인자들을 이용하여 반응성 증진을 시키고 RSM을 이용하여 효소들의 최적 농도를 결정하여 반응을 극대화시켜 탄수화물로부터 one-step 당화기술을 확보한다.

(마) 탄수화물 구성비 및 이론적 당화율

[표 1-2-12] 탄수화물 구성비 및 이론적 당화율

구분	탄수화물	위치	함유량 (DW기준)	주성분	발효당 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%

나. 당화 플랫폼

(1) 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, 스웨

덴 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.

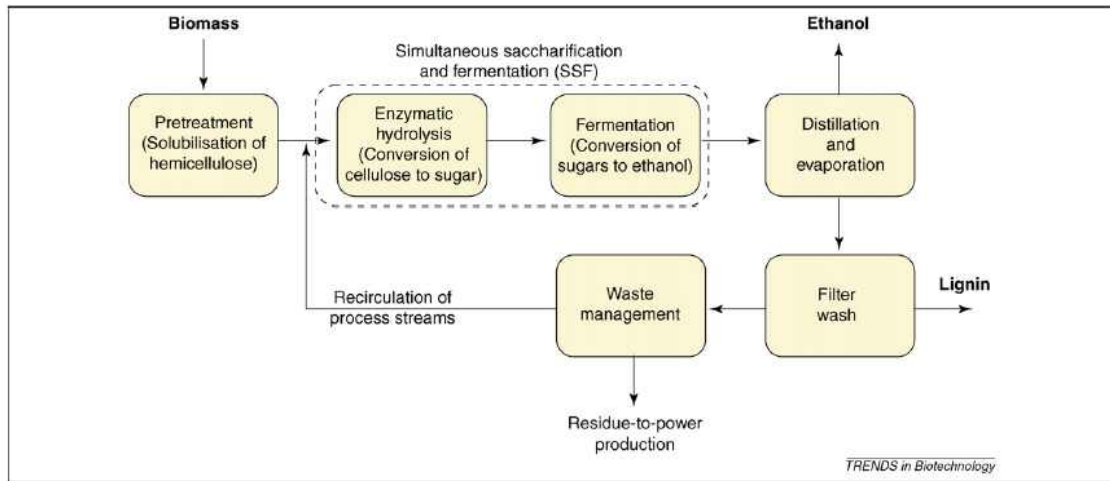
바이오에탄올 생산은 사탕수수, 옥수수, 사탕무와 밀 등 당질계 및 전분질계 식용 작물로부터 생산될 수 있으며, 현재 가동 중인 모든 상용화된 공정은 이들 원료를 사용하고 있다. 미국의 경우 옥수수 전분을 원료로 하여 바이오에탄올을 생산하고 있으며 브라질의 경우 사탕수수를 이용하여 바이오에탄올을 생산하고 있다. 하지만, 사탕수의 인류가 식량난에 허덕이고 있고 특히 경작면적이 적은 우리나라에서 식량자원을 에너지원으로 이용하는 것은 적절하지 못하며, 앞으로 급속하게 증가하게 될 수송용 에탄올의 수요량을 충족시키기 위해서는 안정적인 바이오에너지 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 충족하기 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 생장 저해 물질 제거 기술 등이 요

구되어진다. 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 바

이오매스를 당화시켜 단당류가 생성되면, 에탄올 발효미생물이 생성된 당을 사용하여 에탄올을 생산하게 되어 반응기에 글루코우즈의 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 글루코우즈를 바로 에탄올로 전환되기 때문에 이에 따른 멸균의 필요도가 적고, (5) 반응시간이 짧으며 그리고 (6) 한 개의 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.

리그노셀룰로스 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 글루코우즈 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 리그노셀룰로스의 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 주목 받고 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 상태이며, 미국의 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 1-2-13]과 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 옥탄 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 공동 연구를 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 1-2-13] 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

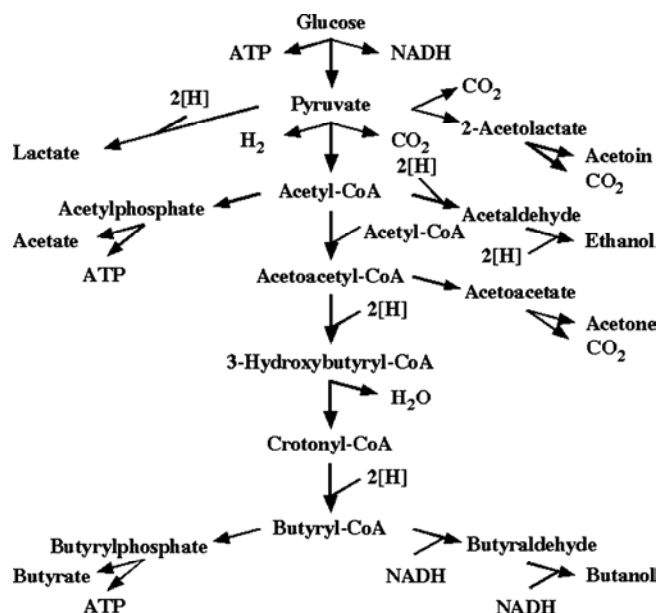
이렇게 바이오부탄올이 최근 급격하게 바이오연료로서 관심을 끌고 있으나, 사실 바이오부탄올 생산의 역사는 상당히 오래되어 이미 1차, 2차 세계대전 중에 아세톤 및 부탄올을 군사적 목적으로 생산/공급하였다. 특히 바이오부탄올을 생산하는 미생물을 발견한 와이즈만 박사는 이 공로로 후에 초대 이스라엘 대통령이 되었다. 이미 이 당시 바이오부탄올 생산량은 에탄올 다음으로 발효공정을 통하여 가장 생산을 많이 하는 제품이었다.

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 관심도가 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 1-2-8]에서 보는 바와 같다. 균의 생육단계에 따라서 유기산 생성 단계에서는 butyrate, acetate, CO₂, H₂ 등이 주로 생성되고 ethanol, acetone, lactate

가 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 증류에 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 *Clostridia*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.

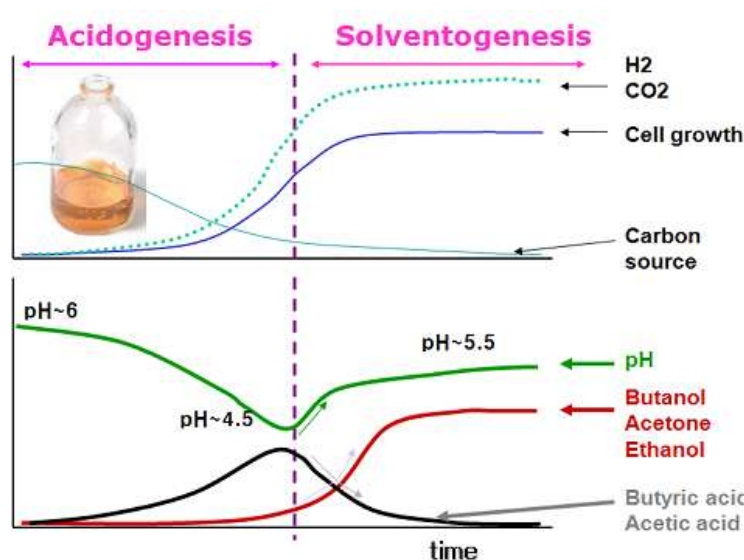
KIST 연구팀에서는 *C. acetobutylicum* 824을 이용한 부탄올 생성 및 추출연

구에서 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 현시점에서, 당이나 전분 등을 이용한 부탄올 생산이 상업 발효로 시작되겠지만, 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 현격히 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 가지 생물공학적인 연구가 진행되고 있다.

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

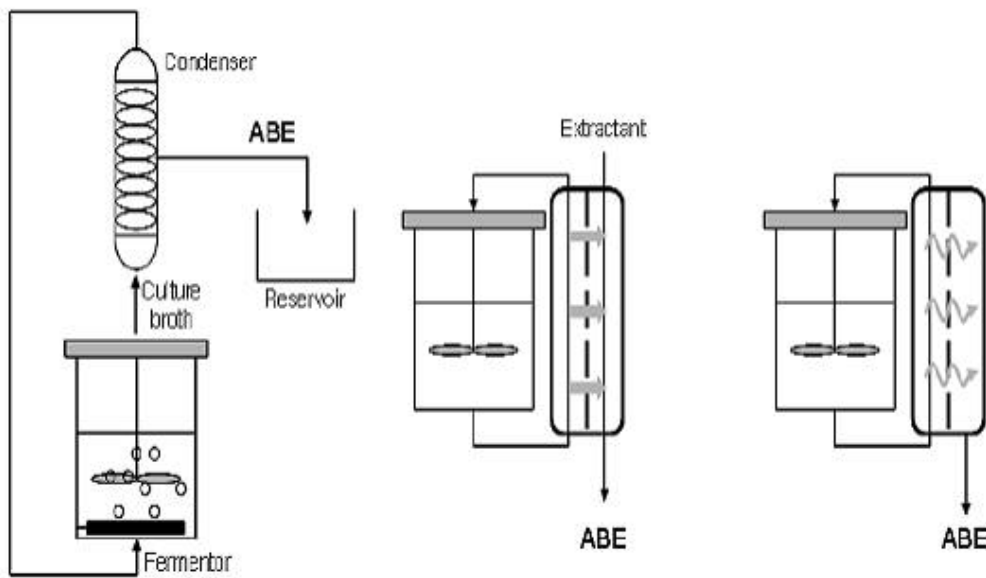
회분식으로 바이오부탄올을 생산할 경우 미생물 농도는 4 g/l 이하이며, 생산성은 0.5 g/l/hr 정도로 상당히 낮은 수준이다. 반면 연속식 발효 공정은 미생물을 배양하는데 있어서 초기 지연기, 멸균, 생물반응기의 청소 등에 소요되는 시간을 절감할 수 있어서 결과적으로 생산성을 증가시킬 수 있는 장점이 있다. 또한 생산물인 부탄올에 의한 생산물 저해 현상은 반응기에서의 연속적인 부탄올 제거(*in-situ* 생산물 제거)를 통하여 억제할 수 있다.

혐기조건 하에서 반응기내의 미생물 농도를 높이는 데는 두가지 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.

혐기성 미생물은 호기성 미생물과 달리 세포 외부로 세포외 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 생산정보보다 더 높은 생산성을 기대할 수 있을 것이다.

부탄올의 심각한 생산물 저해 현상으로 인하여 부탄올을 생성되는 즉시 생물반응기에서 제거해 줄 필요가 있다. [그림 1-2-10]은 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.

(a) Gas-stripping (b) Perstraction (c) Pervaporation

이러한 여러 가지 공정들을 조합하여 실제 부탄올 생산 결과를 정리한 결과는 [표 1-2-14]와 같다. [표 1-2-14]에서는 여러 가지 공정들을 이용하여 부탄올을 생산하였을 때 부탄올 생산농도, 생산성, 수율을 비교하고 있다. 아직 직접적인 에너

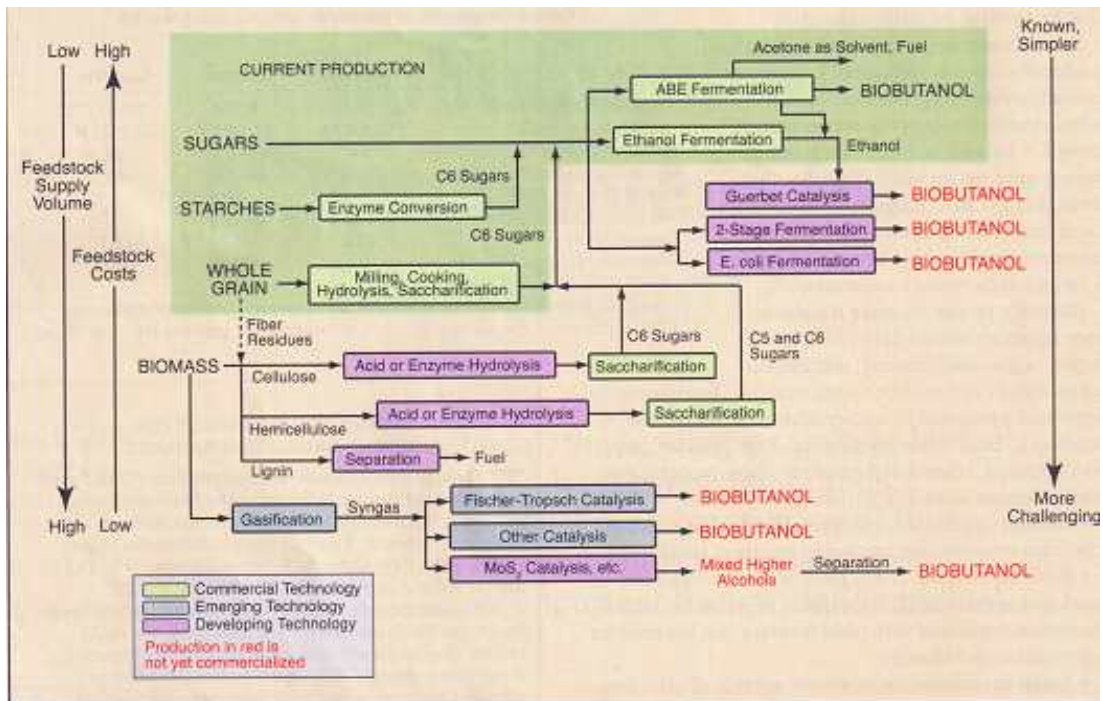
지 소모량에 대해서는 자료가 없어서 비교할 수 없기 때문에 실제 공정의 선택에 있어서는 에너지 소모량도 고려할 필요가 있다고 판단된다.

[표 1-2-14] 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 좀더 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 1-2-11]에서 알 수 있듯이 부탄올은 바이오매스로부터 다양한 반응경로를 통해 생산될 수 있다. 에탄올을 탈수반응인 Guerbet Catalysis을 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.

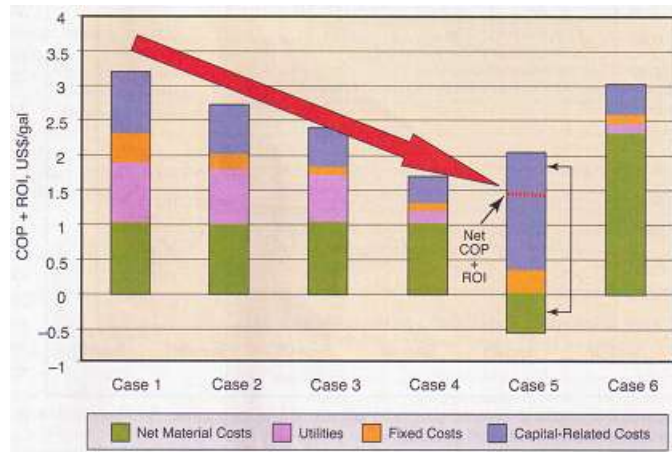
바이오 부탄올의 경제성은 현재 전 세계적으로 연간 약 10억갤론의 부탄올을 용제로써 생산/소비하는 기존 화학시장에서의 가격구조에 의해 좌우될 가능성이 높다. [그림 1-2-12]는 바이오부탄올의 생산 비용을 현재 개발되었거나 향후 생산기술로 기대가 되는 대표적인 공정별로 COP(Cost of Production)과 ROI(Return on Investment)을 비교한 것이다.

- 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 부탄을 생산공정

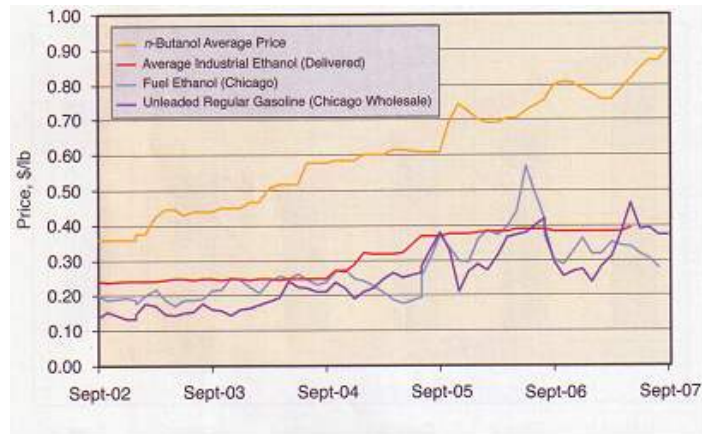
Case 6: 현재 석유화학공정에서 oxo synthesis 반응을 통한 부탄을 생산공정



[그림 1-2-12] 바이오부탄을 생산 비용 비교.

[그림 1-2-13]은 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 석유의존도를 낮추고 지속가능한 발전에 기여할 수 있을 것이다.



[그림 1-2-13] 부탄올, 무연휘발유, 에탄올 시장 가격 비교.

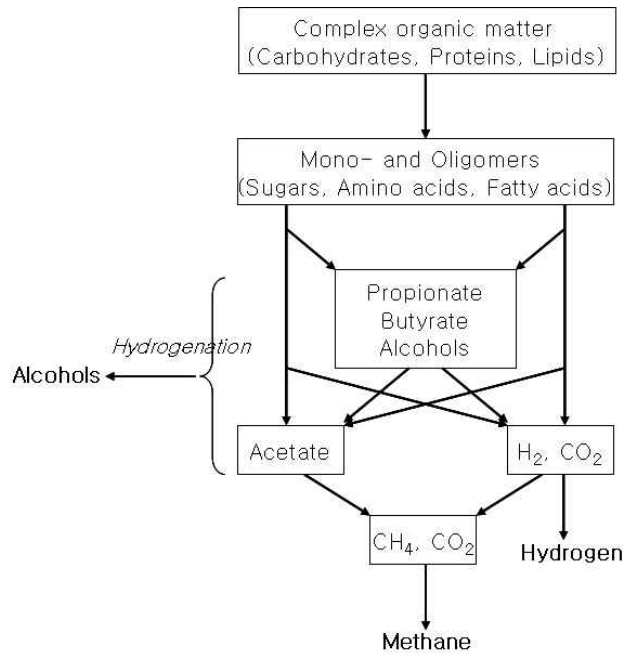
3. 그린에너지 융합공정 개발

가. 혐기성소화 플랫폼

(1) 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

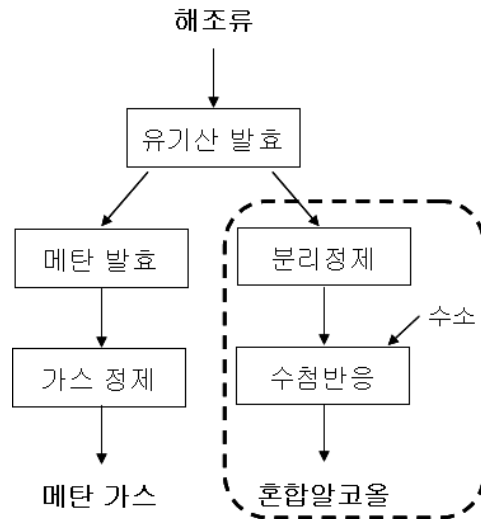
혐기성 소화 플랫폼의 가장 큰 장점은 특정미생물을 이용하는 것이 아니라 자연계에 존재하는 분해미생물을 그대로 활용하는 혼합배양이므로 별도의 살균공정이 필요 없고, 이에 따라 살균에 필요한 막대한 에너지가 절약될 수 있으며 바이오매스의 종류에 관계없이 적용이 가능하다는 점이다. 또한 바이오매스 분해를 위하여 고가의 효소를 별도로 투입할 필요가 없다.

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.

(2) 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 수행

하고 여기서 생성된 VFA들을 회수한 후 수소첨가 반응을 통하여 혼합알코올을 생산하는 기술은 아무도 시도해본 적이 없다([그림 1-2-14]).



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

VFA 플랫폼은 해조류에 특히 적합할 것으로 예측된다. 즉 Holtzaple 등 (2008)의 연구 결과에 의하면 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 보고되고 있다(Matsui et al., 2006). 또한 해조류의 경우에는 생산성이 높기 때문에 목질계와 같은 야적형 건식 소화 설비가 아니라 밀폐형 반응기의 사용도 가능하기 때문에 산 발효시에 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 수

율이 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 5~6 배 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 1-2-15]).

[표 1-2-15] 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 정제방법의 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 경제성을 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.

나. 열화학 플랫폼

(1) 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 금속축매를 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 화학축매로 생산하는 기술 및 알킬 에스테르의 부생성물인 글리세롤을 이용하여 고부가가치 화학제품을 생산하는 기술.

(2) 바이오오일 생산 급속열분해공정

열분해는 무산소 조건에서 유기성물질이 외부에서 공급되는 에너지에 의해 열적으로 분해되어 탄소성 촉(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 최 수율이 높아지는 반면에 오일, 가스 부산물의 수율이 떨어진다. 이에 반하여 fast pyrolysis는 승온속도 100-1000°C/s의 매우 빠른 속도로 450-550°C 까지 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, 최 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 함량, 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 대기환경오염문제를 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 pyrolysis기술을 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 1-2-16]에서 2002년 현재 가동 중인 바이오오일 회수 급속열분해 관련 회사들을 요약하였다.

[표 1-2-16] 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 나뉘어진다.

- 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°C 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

- 제 1 절 건강 신소재 개발에 대한 기술개발 동향
- 제 2 절 생물학적 전환공정 개발에 대한 기술개발 동향
- 제 3 절 그린에너지 융합공정에 대한 기술개발 동향
- 제 4 절 통합공정 및 제품개발에 대한 기술개발 동향

제 2 장 국내외 기술개발 현황

제 1 절 건강 신소재 개발에 대한 기술개발 동향

1. 국외의 건강 기능성소재 기술개발 동향

가. 항산화활성

- ROS 생성에 의한 산화적 스트레스는 염증, 면역억제, 노화 및 암과 같은 여러 가지 퇴행성 질병의 병인으로 주목받고 있다. ROS는 hydroxy radical, superoxide anion 및 peroxy radical의 활성전구체 등을 포함한 많은 활성 대사산물들로 구성되어 있다. 인체세포에서 ROS는 지속적으로 생성되고 생성된 ROS는 효소적 또는 비효소적인 항산화작용에 의하여 신속하게 제거됨으로써 ROS에 의한 손상을 방지하고 조직내에서의 pro-oxidant와 antioxidant 균형을 유지한다 (Svobodova et al., 2006). 그러나 스트레스, 자외선, 흡연, 공해와 같은 외적인 인자들은 산화적 stress를 증가시켜 생리적인 항산화 시스템의 교란을 초래하므로[1-3] polyphenol 화합물과 같은 천연 항산화제의 처리에 의해 산화적 스트레스로 인한 질병을 예방할 수 있다.
- 정상적인 세포는 산화적 스트레스를 제거하기 위한 다양한 효소적 비효소적 항산화 방어시스템을 지니고 있으므로, 세포는 내인성 또는 외인성의 활성 산소 종을 효과적으로 제거하여 세포내 핵산과 단백질을 보호한다[4,5]. 세포와 조직들은 대사불활성화 후 독성물질을 제거하는 일련의 제독화 효소계를 갖추고 있다[6-8]. 세포와 조직이 산화적 자극을 받으면 1차 방어계로써 항산화-제독화 시스템이 작동한다. 항산화 또는 제독화 전사조절은 주로 redox-sensitive 전사인자인 NF-E2 related factor-2 (Nrf2)에 의해 조절된다. 식물유래의 여러 가지 polyphenol 화합물들은 Nrf2 signaling을 활성화시켜 NADP(H):quinine oxidoreductase-1 (NQO1), superoxide dismutase (SOD), glutathione S-transferase (GST), hemeoxygenase (HO-1) 및 γ -glutaryl cysteine ligase (GCL)과 같은 효소들의 전사를 증진시켜 산화적 스트레스에 의한 손상된 세포의 복구에 관여한다[9,10].
- 특이적인 DNA 손상에 의한 암유발 이외에도, 산화적 stress에 의하여 세포의 성장과 증식에 주요한 역할을 하는 kinase 활성화시켜 세포의 사멸/증식 과정을 변

화시킨다. [11-14]. MAP kinase 계열은 세포생존, 사멸, 증식, 변형, 암촉진 등과 같은 여러 가지 기능에 관여하는 kinase의 일종으로. 그중에서도 MAPK/ERK1/2는 UV나 H₂O₂처리에 의해 생성되는 ROS에 의해 활성화되어 세포의 노화에 중요한 역할을 한다[14-17]. JNK와 p38과 같은 MAPK 계열의 kinase는 UV와 같은 여러 가지 외적인 stress에 의해 활성화되어 AP-1, myc, NFAT4, smad, ATFs, Stat1과 CREB와 같은 전사인자들을 활성화시킴으로써 환경적인 stress에 의한 세포사멸을 유도한다[18-21].

- 여러 가지 세포 보호효과중에 세포의 생존과 세포사멸을 억제하는 주요한 경로는 PI3K-AKT 경로가 알려져 있다. 암의 발생과 진행에 있어서 Akt의 역할에 대하여 많은 연구들이 진행되고 있다 [22,23]. MAPK와 AKT에 의한 신호전달은 이들의 하위에 있는 NF-κB와 AP-1과 같은 전사인자들을 활성화시킨다[24-26]. 산화적 스트레스에 의한 이러한 신호전달 단백질이 활성화되어 염증, 노화 및 암의 진행을 유발하는 세포내 반응에 주요한 역할을 한다[27-29]. 따라서 산화적 스트레스에 의한 이러한 신호단백질의 손상은 항산화성이 강한 phytochemical에 의해 예방될 수 있다.

나. 항염증활성

- 현재 국내외 항염증 치료제 개발 주요 방향은 크게 두 가지로 요약되어 질 수 있다. 하나는 염증 병인 인자의 대부분이 단백질로 고유의 효소 활성도를 가지고 있으므로 이들의 효소활성 억제제 개발 방향에 초점을 두고 있다. 다른 하나는 염증 유전자 발현 자체를 억제시킬 수 있는 염증 유전자 발현 억제제 개발 방향에 초점을 두고 있다. COX-2 저해를 통한 항염증 및 소염제 개발에 대한 국내외 연구는 대부분 COX-2 단백질의 효소 활성도를 억제시키는 COX-2 효소 활성도 억제제 개발에 초점을 두어왔다[30-32].
- 현재의 대표적 항염증 및 소염제로는 Aspirin과 같은 Non-Steroidal Anti-inflammatory Drugs (NSAIDs)과 선택적 COX-2 효소 활성 저해제인 celecox 등이 개발되어 시판 사용되어지고 있다. NSAIDs에 의한 항염증 효과는 이들 약물에 의한 COX의 효소 활성 저해, 즉 PGs 합성 억제를 통해 이루어진다. 하지만 최근의 많은 연구 결과로부터 NSAIDs가 항염증 효과 이외에 위궤양 등의 위장관 질환을 일으키는 부작용을 가지고 있음이 보고되었다. 이것은 NSAIDs가 COX-2 효소활성을 저해시켜 COX-2에 의한 PGs의 과다한 생성을 억제시켜 항염증 및 소염 효과를 나타내나 동시에 생체 내 유용한 생리적 기능을 가지는 COX-1 효소

활성도 또한 저해시켜 COX-1에 의해 생성되는 PGs의 양 또한 감소시켜 위궤양 등의 부작용을 일으키는 것으로 밝혀져 현재 항염증 및 소염제로서의 NSAIDs의 사용이 일부 제한적으로 사용되고 있는 실정이다[33-35].

- 이에 따라 현재 선택적 COX-2 저해제 개발 연구로 방향이 모아져 왔고 그 결과 앞서 언급한 선택적 COX-2 저해제인 celecox 등이 개발되어 항염증 및 소염제로서 현재 시판 사용되고 있다. 하지만 최근의 임상 연구 결과들로부터 몇몇 COX-2 선택적 저해제 역시 심혈관 질환의 부작용을 가지고 있음이 밝혀져 이들의 사용 또한 제한되어지고 있는 실정이다[36,37].
- 이러한 관점에서 볼 때 부작용을 전혀 일으키지 않는 새로운 COX-2 저해제 개발을 통한 항염증 치료제 개발의 필요성이 요구되어진다. 따라서 현재 국내외적으로 활발히 진행되고 있는 천연물 (식품 또는 식품 구성 성분)로부터 선택적 COX-2 발현 저해제를 통한 항염증 치료제 개발 연구는 매우 큰 의미를 가진다.
- 식품 및 식품 유래 생리활성 물질은 이미 인간이 오래전부터 일상적으로 음용, 식용 및 복용을 해서 이미 이들에 의한 부작용은 어느 정도 배제시킬 수 있기 때문이다. 따라서 천연물을 탐색하여 이들 중 주요 염증 병인 인자로 잘 알려진 COX-2와 iNOS 발현을 선택적으로 저해시킬 수 있는 천연물 유래 생리활성 물질 개발 연구 및 향후 이들을 응용한 항염증 치료제 개발 연구는 중요성이 매우 크며 그 전망은 밝다고 본다[38].
- 현재 천연물로부터 항염증소재를 개발하기 위한 많은 연구가 진행되고 있으며, in vitro 또는 in vivo 실험을 통해 COX-2 발현 억제를 통해 항염증 효과가 있다고 보고된 대표적 천연물 유래 생리활성 기능을 가진 phytochemicals들은 다음과 같다.
- EGCG는 녹차에 다량으로 함유되어있는 polyphenol phytochemical compound이다. 현재까지 알려진 연구 결과에 따르면 EGCG에 의한 항염증 효과는 I κ B 단백질 분해 억제를 통한 NF- κ B 전사인자 활성화 억제, PKC 및 JNK 활성화 감소를 통한 염증 병인 인자인 iNOS, COX-2, pro-inflammatory cytokines TNF- α 와 IL-1 β 유전자 발현 억제와 깊은 관련이 있음이 밝혀졌다. 또한 AP-1 전사인자 활성화 억제 및 세포 내 유해 활성산소 생성 감소등도 EGCG에 의한 염증 억제 효과와 관련이 있음이 알려졌다[39,40].
- Curcumin (diferuloylmethane)는 *Curcuma longa* L.에서 분리한 노란 색을 띠는 일종의 phytochemical이다. 현재까지 보고된 최근의 연구 결과에 의하면 Curcumin에 의한 항염증 효과는 NF- κ B 전사인자 활성화 억제, JNK 활성화 감소, 이로 인한 AP-1 전사인자 활성화 억제 및 세포 내 유해 활성산소 생성 감소와 관련이 있음이

알려졌다. 또한 Curcumin이 LPS에 의한 COX-2 및 iNOS 유전자 발현을 크게 억제시켜 항염증 효과를 나타낸다는 것이 최근의 연구 결과에서 밝혀졌다[41-43].

- Resveratrol (3,4,5-trihydroxy-*trans*-stilbene)은 포도 및 포도주에 다량 함유된 물질이다. 최근의 연구 결과는 Resveratrol이 LPS나 TPA에 의한 COX-2 유전자 발현을 크게 감소시키며 이것이 주로 NF- κ B 및 AP-1 전사인자 활성 억제를 통해 이루어지고 있음이 밝혀졌으며 Resveratrol에 의한 항염증 치료제로서의 가능성을 보여주었다. 또한 Resveratrol의 항염증 효과는 세포 내 유해 활성산소 생성 감소와 관련이 있다는 것이 최근의 연구 결과에서 밝혀졌다. 하지만 최근의 연구 결과로부터 Resveratrol에 의한 COX-1 발현 저해가 일어남이 밝혀져 Resveratrol 사용 시 부작용의 문제가 제기되고 있다[44-46].
- 콩류에 존재하는 flavonoid 계인 isoflavone에 관한 다양한 생물학적 활성 중에서 tectorigenin과 tectoridin은 쥐의 대식세포에서 PGE2와 COX-2의 발현을 저해함으로써 항염증효과를 나타내는 것으로 보고되고 있다[47,48]. 또한 irisolidone, tectorigenin, genistein과 glycitein은 TPA로 유도된 RAW 264.7 세포에서 PGE2의 생산을 저해하는 것으로 보고되고 있다[49-51]. Glycitein은 RAW 264.7 세포에서 LPS로 유도된 NO의 생성을 억제시키는 것으로 보고되고 있다[52].

다. 항치매활성

- Microglial은 뇌에 존재하는 대식세포로서 monocyte에서 분화되어 중추신경계에 산재하는 비신경세포로써 뇌 손상이나 감염에 대해 초기 반응을 나타내어 염증성 cytokine, 단백질 분해 효소, 활성 산소 등을 방출하여 생체를 보호하는 면역세포이다[53,54]. 알츠하이머병 (Alzheimer's disease)은 뇌 내 amyloid b (Ab) 펩타이드가 비정상적으로 다량 만들어져 뇌 조직에 노인반이라고 불리는 senile plaque가 형성되면 microglia가 이를 항원으로 인식하여 활성화되고 염증을 일으키는 proinflammatory cytokines 및 NO를 방출하여 염증 반응을 유발하는데, 이 때 뇌 조직의 산화적 손상 및 세포사를 유발하여 신경세포의 기능 손실이 발생한다고 알려져 있다[55,56]. b-amyloid peptide는 뇌에서 염증 및 산화적 스트레스를 유도하며 알츠하이머 병에 중요한 역할을 한다. 알츠하이머 병은 뇌조직 내에 neurotangle이 형성되어 뇌세포의 퇴행성 변화를 보이며 그 증상으로 기억의 손상이 일어난다.
- 콩의 isoflavone인 irisolidone은 LPS로 유도된 microglial 세포에서 NF- κ B와 AP-1의 활성화가 억제시킴으로써 뇌세포에서의 염증을 억제하는 효과를 나타내는 것으로 보고되고 있다[57,58].

- 꿀풀과(*Rabdosiarubescens*)식물은 항암과 항염증 효과를 가진다. 꿀풀과 식물에서 분리된 Oridonin은 항염증, 항박테리아, 항암과 같은 다양한 생리활성을 지닌다. Oridonin은 HepG2 세포와 RAW 264.7 세포에서 iNOS와 COX-2의 발현을 억제시키고 cytokine에 의해 활성화된 NF-kB가 Oridonin에 의해 저해되는 것으로 보고되고 있다[59,60]. 최근에는 Oridonin이 LPS로 유도된 rat primary microglia에서 NO 생성과 iNOS의 발현뿐만 아니라 TNF-a, IL-1b, IL-6와 같은 cytokine의 발현을 저해시키고, NF-kB의 활성화를 억제시키는 것으로 보고되고 있다[61]. 이러한 결과는 대식세포에 대한 항염증효과가 뇌의 microglial cell에도 유사한 효과를 나타냄으로써 항염증 물질이 알츠하이머의 진전을 억제하는 것임을 나타내고 있다.
- 중국에서 류마티스 관절염의 치료제로 사용되는 미역줄나무(*TripterygiumwilfordiiHook.f*)는 염증억제효과가 있는 것으로 보고되고 있다[62,63]. Microglia 세포에 미역줄나무에서 분리된 tripchlorolide을 처리한 결과 TNF-a, IL-1b, NO, PGE2와 같은 cytokine의 발현을 저해시키고, iNOS와 COX-2의 발현, NF-kB의 translocation, 그리고 JNK의 인산화를 억제시키는 것으로 보고되고 있다 [64].
- *Zingiberofficinale*의 뿌리인 생강에서 추출한 gingerol, shogaol 등은 항염증, 항암, 항산화, 항구토와 같은 다양한 효과를 가지고 있다. 생강 추출물은 비스테로이드계 항염증약으로 그리고 염증활성과 관련된 생화학적 경로를 조절한다고 알려져 있다[65]. Zingerone과 6-shogaol은 6-hydroxydopamine으로 유도된 dopamine depression 의 저해[66]와 신경세포의 아포토시스를 저해하는 것으로 보고되고 있다[67].
- 향신료, 채소, 과일 등에 풍부한 페놀성 phytochemical의 한 종류인 flavonoid는 항산화, 항암, 항염증 작용이 있다. Flavonoid 중에서 apigenin과 luteolin은 dendritic 세포와 basophils에서 각각 종양괴사인자인 TNF 수용체의 한 종류인 CD40와 CD40L의 발현을 감소시킨다고 보고되고 있다[68,69]. 또한 IFN-g로부터 유도된 microglia 세포에서 CD40의 발현을 농도의존적으로 감소시키고, TNF-a와 IL-6의 생성을 저해하고, STAT1의 인산화를 억제시킨다고 보고되고 있다[70].
- 분자적인 메카니즘에서 폴리페놀의 항염증 활성은 PPARg의 활성화를 통한 COX-2, LOX, iNOS 같은 pro-inflammatory의 저해, PI3K, NF-kB, c-JUN의 활성화 저해, 해독효소의 활성화, MAPK, PKC의 저해 등에 의한 것으로 보고되고 있다 [71-74]. 과일, 적양파, 포도, 블루베리를 포함한 야채, 차, 브로콜리, 적포도주 등에 존재하는 quercetin은 LPS와 IFN-g를 처리한 BV-2 microglia에서 IKK, NF-kB, AP-1, STAT1, IRF-1의 활성화를 감소시켜 iNOS 발현과 NO의 생성을 억제시킨다

고 보고되었다. 그리고 quercetin은 NF-kB의 DNA binding activity를 농도 의존적으로 저해시킴으로써 염증관련 단백질의 발현을 억제시키는 것으로 보고되고 있다[75].

- 이상과 같이 항염증활성을 나타내는 천연물들은 주로 그 활성이 항산화 활성으로부터 유래된다. 그리고 대식세포에서의 항염증 효과가 있는 물질은 뇌세포인 microglial cell의 활성화를 억제하여 proinflammatory cytokines의 생성을 억제하여 알츠하이머의 진행을 억제하는 것으로 알려져 있다.

2. 국내의 건강 신소재 기술개발 동향

- 현재까지 식물체의 자연식품에 풍부하게 함유되어 있는 것으로 알려진 색소성분과 배당체를 형성하고 있는 성분들은 다양한 생리활성을 지닌다는 새로운 사실에 관심이 고조되면서 이들에 대한 많은 연구가 진행되고 있다. 이러한 연구들의 대부분은 육상의 식물체에서 발견되는 성분들에 한정되어 있는 실정이다.
- 생리활성물질에 관한 연구는 대부분이 육상식물유래 polyphenol 화합물에 국한되어 있는 실정이다. 이는 육상식물에 비해 해조류에는 다량의 다당류가 존재함으로써 생리활성물질의 분리가 어렵기 때문이다. 본 기술개발로써 곰피 중의 항산화/항염증물질의 대량분리공정이 확립될 경우 저가의 해조류로부터 고부가가치의 항산물질을 분리하여 상품화할 경우 어민의 소득증대는 물론 미역, 다시마, 김에 한정되어 있는 양식품종을 확대함으로써 양식해조류의 다양화로 인한 양식산업의 활성화가 기대된다.
- 건강기능성식품의 원료로 활용되는 대부분의 원료는 육상식물 유래의 phytochemical이 대부분이며, 해양자원으로부터 건기식의 원료는 DHA, EPA, glucosamine 등의 일부 품목으로 제한되어 있다. 해조류의 phlorotannin을 산업적으로 이용하기 위한 대량분리공정이 확립되어 있지 않기 때문에 기능성 소재의 활용이 미진한 실정이다.
- 해조 중에 다량 함유되어 있는 해조다당류는 혈장 콜레스테롤 저하효과, 항혈액응고효과, 항암효과 등의 약리효과와 식이섬유로서의 영양상의 효과가 높은 것으로 밝혀졌으나, 저분자물질인 폴리페놀 성분의 기능성과 이들의 생리적인 효과에 관한 연구가 최근 활발히 진행됨에 따라 phlorotannins의 여러 가지 생리활성 효과가 밝혀지고 있으나, 이들의 기능성 식품소재로써 개발하기 위한 연구는 미진한 실정이다.
- 특히 해조류의 생리활성 물질에 관한 관심이 집중되면서, 여러 해조류에 대한 생리활성 분석 결과 갈조류에 다량의 phlorotannin류가 함유되어 있으며, 이들의 생

리활성에 관하여 활발한 연구가 진행되고 있다. 특히 갈조류 중에서, 감태, 곰피, 톳의 phlorotannin 함량이 높아 주로 이 3종의 해조류로부터 생리활성 물질에 관한 연구가 주로 진행되고 있다. 국내의 연구로써 감태로부터 분리된 3종의 phlorotannin 류를 분리하여 이들의 항엘러지 효과를 분석한 결과 phlorofucofuroeckol A이 효과가 높게 나타났으며[76] 톳으로부터 3종의 phlorotannin을 분리하여 이들의 항산화성을 분석 보고 하였다[77].

- 플로로탄닌류를 다량 함유하고 있는 감태 (*Ecklonia stolonifera*)에 관한 연구로는, 감태추출물이 상피세포에 있어 암전이 관련 효소인 metalloproteinase (MMP)-2와 -9의 발현을 억제하는 것으로 보고 되었고[78], 효소분획물 또한 항산화 및 암세포 사멸효과가 있음이 보고되고 있지만, 구체적인 세포내 분자 기전에 대한 연구는 아직 이루어 지지 않고 있는 실정이다[79,80].
- 곰피에서 분리된 phlorotannin류의 생리활성에 관한 연구는 eckol과 dieckol을 폐상피세포에 처리한 결과 NF-kB와 AP-1 전사활성을 감소시켰으며, 이러한 전사인자의 활성 감소로 인한 MMP-1 저해효과는 내피세포중의 collagen 분해를 억제하여 주름생성을 방지하는 효과를 보고하였다[80].
- 곰피 추출물에서 phloroglucinol, eckstolonol, eckol, phlorofucofuroeckol, dieckol 및 triphloroethol-A의 5종의 phlorotannins가 분리되어 이에 대한 항산화 효과가 보고되었으며[81], 감태에서 분리된 triphloroethol-A가 γ -선에 의한 세포보호효과는 ROS감소에 의한 미토콘드리아의 산화적 손상을 감소시킴으로서 나타난다고 보고되어 있지만[82], 구체적인 기전에 대한 연구는 아직 이루어지지 않고 있다.
- 갈조류의 에탄올 추출물을 LPS로 유도된 microglial 세포 (BV2 cell)에 처리한 결과 염증관련인자인 NO, PGE2, TNF- α , IL-1b를 농도의존적으로 저해하였고, MAPKs, NF-kB의 활성화와 ROS의 생산을 억제시키는 것으로 보고되고 있다[83]. 이러한 결과는 microglial 세포의 활성화 억제를 통하여 뇌에서의 염증반응을 억제함으로써 알츠하이머 병의 진행 억제 가능성을 시사하고 있다.
- 국내의 항산화제 시장은 노화방지 측면에서 꾸준히 증가하고 있는 추세이며, 특히 주름개선용 기능성 화장품 시장의 급속한 성장으로 인한 항산화제 시장의 성장 속도는 타 제품에 비해 빠른 성장을 지속해오고 있다. 국내의 항산화제 시장은 기존의 vit. C와 tocopherol 제품에 더하여 한약제를 포함하여 육상식물유래 항산화제의 개발에 초점이 맞추어져 있으나, 해조류를 이용한 항산화제 제품은 아직 시장 진입이 되지 않고 있는 실정이다. 해조류의 항산화제 관련 제품의 시장 진입이 늦은 이유는 항산화 성분의 대량분리의 문제점과 분리된 소재의 관능적인 기호도가 떨어지는 것이 문제점으로 대두되고 있다.

- 항염증 기능성 제품은 주로 관절염의 예방 및 치료효과가 있는 glucosamine과 항산화제를 첨가한 한약제 제품들이 주를 이루고 있으며, 해조류를 원료로 한 제품 또는 소재는 개발되지 않고 있는 실정이다. 특히 갈조류(곰피, 감태, 대화, 톳, 모자반 등)로부터 항염증 물질에 관한 연구는 최근에 phlorotannin류가 분리되어 이들의 항염증 활성이 규명되었기 때문에 그동안의 축적된 연구 data들이 부족한 원인 것으로 판단된다. 항염증 소재는 고령화와 더불어 야기될 수 있는 관절염, 동맥경화, 항혈전, 신경통 등의 다양한 질병에 적용될 수 있으며, 특히 최근에 알츠하이머성 치매 또한 뇌세포의 염증과 관련이 있다는 논문들이 나오면서, 항염증 소재개발에 관한 많은 연구개발이 진행됨으로써 향후 시장은 급속히 확대될 전망이다.

제 2 절 생물학적 전환공정 개발에 대한 기술개발 동향

해조류를 이용하여 바이오에탄올을 생산하는 방안은 EU, 일본 및 우리나라가 검토 중이나, 우리나라만이 해조류 에탄올 생산 기술 개발에 성공하였으며 다른 선진국의 해당 기술에 대한 사례는 전무한 실정이다. 현재까지 전세계적으로 해조류를 원료로 한 바이오에탄올 생산시설의 사례는 찾아볼 수 없다.

국내에서는 일부 육상자원을 활용하여 제한된 바이오매스에 대한 일부 전처리 및 분별 연구를 수행하고 있으며, 소규모의 기초 연구 및 응용에 대한 가능성을 확인하는 수준이다. 발효 균주 개발의 기초 기술 수준은 높은 편이나, 바이오알콜 이외의 탄화수소계 바이오연료 관련 균주에 대한 연구는 미진한 편이다. 현재, SK 에너지와 GS칼텍스와 같은 수요기업과 연구기관인 한국과학기술연구원, 한국화학연구원, 한국과학기술원 등에서 차세대 바이오연료인 바이오부탄올 생산기술 개발 진행 중에 있다.

1. 일본의 생물학적 전환공정 개발에 대한 기술개발 동향

일본의 경우 *Sphingomonas* sp. A1를 이용한 alginate lyase 연구가 Murata, K. 그룹에서 활발히 이루어지고 있다. 2000년 이전의 4건의 endo-type alginate lyase에 대한 보고를 하였으며 2000년 이후 단당 전환효소를 세계 최초로 보고하였다. 이 단당 전환효소는 oligoalginate lyase로 명명되었으며 문헌상으로 보고된 것은 이 효소를 포함해 두 건에 불과하다. 이와 같이 전환된 효소에 의해 생성된 DEH라는 산물을 일반 균주의 대사 경로를 통해 이용하기 위해 전환효소의 개발을 하기 위한 후속 연구를 2010년도에 발표하였으며 조만간 완전한 대사 경로에 대한 발표가 이루어 질 것이라고 예측된다.

일본 수산청이 5년(2007~2011년) 사업으로 해조류 및 수산가공부산물을 이용한 바이오연료 생산 연구를 추진하고 있으며, 기능성 성분 추출 등 고부가가치화 기술 개발, 연료·에너지 변환기술 개발, 원료 조달 등에 관련된 정보 수집·경제적 분석 등 리파이너리(Refinery) 시스템 구축 검토의 3개 과제가 계획되어 추진되고 있다. 또한, 일본 수산청은 해조류를 일반적인 효모균으로 발효하여 에탄올을 생산하는 실험을 진행하고 있으며 지금까지의 실험을 통해 원료중량 당 바이오연료 생산 가능량을 규명해 냈는데, 비용 측면에서 볼 때 아직 많은 장애물이 존재한다고 밝히고 있다.

2. 유럽의 생물학적 전환공정 개발에 대한 기술개발 동향

노르웨이 대학 소속 Horn, S. J. 그룹에서는 크게 두 가지 연구를 하였는데, 갈조류에 해당하는 *Ascophyllum nodosum*와 *Laminaria hyperborea*를 혐기적으로 소화하여 methane을 생산하는 연구와 ethanol에 대한 생산 연구를 하였다. ethanol 생산을 위해 신종 균인 *Zymobacter palmae*을 동정하여 그 균주로 mannitol의 대사를 확인하였고, seaweed extract를 통해 ethanol 생산에 대한 연구를 하고 있지만, 주성분인 alginate에 대한 분해에 대한 연구와 대사공학적 접근이 없이 alginate를 추출하여 commercial alginate로 사용하는 전략을 갖고 있기 때문에 전체적인 brown algae의 연료화나 상업적 소재화에는 제한이 따르는 실정이다.

네덜란드 Energy Research Center of the Netherlands(ECN)을 중심으로 2040년까지 네덜란드 북해 영해의 10%에 해당하는 5000 km² 해조류 양식 및 이를 이용한 바이오에너지(에탄올, 메탄, 수소 등) 생산 계획을 추진중이다.

3. 미국의 생물학적 전환공정 개발에 대한 기술개발 동향

미국은 1960년대 전후로 alginate lyase와 단당 전환효소등에 대한 연구를 하였는데, 조효소를 정제하여 활성을 측정하는 것으로서 산업적인 이용을 위해 대량 생산에 관한 연구는 아직 일본에 비해 거의 이루어지지 않고 있는 실정이다.

미국 다우케미컬(Dow Chemical)과 알게놀 바이오연료(Algenol Biofuels)는 미세조류 (microalgae)를 이용해서 이산화탄소를 에탄올로 전환하는 Pilot Plant를 통한 바이오에탄올과 플라스틱의 원료의 생산계획을 2009년에 발표. 에탄올생산비용 0.26\$/L를 목표로 하고 있다.

4. 국내의 생물학적 전환공정 개발에 대한 기술개발 동향

최근 삼성종합기술원 바이오에너지 연구팀에서 국내 특허 및 PCT 특허를 냈으나 화학적인 처리를 통해 에탄올을 생산하는 방법이다. 이와 같은 방법을 이용할 경우 갈조류의 다른 구성성분의 전환은 이루어지나 주성분인 alginate의 이용이 제한되기 때문에 경제적이지 못하고 사용된 조효소 역시 산업적인 응용을 위한 수율이나 생산성 측면에서 많은 제약이 따른다. 효소적인 분해 결과들은 현재 endo-type에 국한되어 있는 실정이다.

한국생산기술연구원(KITECH)은 다단계당화법, 직접당화법 등을 통해 우뚝가사리 등 홍조류를 이용하여 총 전환수율이 20~32%인 바이오에탄올을 제조하는데 성공하였으며, 홍조류를 이용한 바이오에탄올 생산에 관한 세계 최초 원천기술 특허를 확보하였다. 이를 기반으로, 신·재생에너지 기술개발 사업(원천기술개발)으로 2008년 10월부터 2011년 7월까지 “홍조류 유래 바이오에탄올 생산기술개발” 수행

하고 있다. (주)바이오올시스템즈에서는 국가전략사업을 통해 Pilot Plant(Batch 1,000 L/d이상, 연속식 4,000 L/d 이상) 구축하여 엔지니어링 및 생산 공정 기술을 확립하고, 조기에 홍조류 유래바이오에탄올 실용화를 위한 국가 연구개발 사업을 진행 중에 있다. 또한, 수산과학원은 갈조류 1톤에서 23리터의 수송용 바이오에탄올을 추출하는 기술을 개발하여 2009년부터 5년간 실용화 연구를 산학연 공동으로 추진할 것이라고 발표하였다. 산학연 공동개발을 추진하고 있는 해조류 바이오 연구단에는 SK에너지, 부경대 등이 참여하고 있다.

제 3 절 그린에너지 융합공정에 대한 기술개발 동향

1. 일본의 그린에너지 융합공정에 대한 기술개발 동향

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 2-3-1] 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 Yield를 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 유럽의 그린에너지 융합공정에 대한 기술개발 동향

미국의 Dupont사와 BAL 연구소는 해조류로부터 바이오부탄올 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 대체를 목표로 하고 있다. BioMara사는 European Union’s INTERREG IVA Programme 등으로부터 약 4.9백만유로를 지원받아 기후변화대응 및 CO₂ 감축을 위해 해조류 대량양식 및 바이오연료 개발 연구를 수행 중에 있다.

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

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

3. 국내의 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(대한민국 특허 “해조류로부터 알콜생산 연구는 홍조류를 이용한 바이오알코올 제조방법” 제10-2007-0018867호, “홍조류를 이용한 바이오알코올 및 아세트 제조방법” 제10-2007-0070687호, “녹조류 및 갈조류를 이용한 바이오알코올 제조방법” 제10-2007-0076030호). 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 알콜 생산 연구가 알려져 있으며, 한천을 황산으로 분해시킨 후 효모를 이용하여 알콜 생산을 위한 기술을 개발 중에 있으나, 원료 해조류로부터 알콜 생산수율이 낮아 추가적인 연구가 수행 중에 있다.

제 4 절 통합공정 및 제품개발에 대한 기술개발 동향

1. 일본의 통합공정 및 제품개발에 대한 기술개발 동향

일본의 초임계 유체 기술은 20여 년 전부터 연구되어지고 있으며, 현재 다양한 분야에 걸쳐 많은 성과를 이룩하고 있으며, 1980년대에는 초임계 이산화탄소 추출 기술을 시작으로 EOS Group에 의해서 유체의 성질과 상평형 실험을 주로 하였으며, 1990년대에는 일본 산자부 산하 동북연구소와 동북대학교의 Arai 교수를 중심으로 하는 SCF Group이 초임계 유체의 전반적인 연구를 담당하여 chemical recycle에 관한 연구와 초임계수를 이용한 난분해성 유기물 분해에 관한 연구가 주를 이루고 있으며, 1991년에는 MESC(Ministry of Education, Science and Culture)에서 초임계 유체 기술을 본격적으로 추진하여 국가적인 붐이 일어났으며, 2000년대에는 금속이나 고분자의 나노입자 제조, 초임계 에멀전 및 전해도금에 관한 연구들이 많이 수행되고 있다. 고베철강에서는 1990년 후반부터 초임계 유체를 이용한 추출분야의 산업적 응용을 위한 생산용 장치를 보급하고 있다.

일본의 바이오 복합재료 개발은 자동차 부품 개발에 사용되고 있다. 일본의 자동차 부품 메이커인 도요타 방직은 도어의 내장이나 천정 등 5종의 부품에 케나프(Kenaf)를 혼합한 소재를 적용하여 현재 도요타 자동차의 렉서스 등 고급차를 중심으로 약 20여개의 차종에 사용하고 있다[84].



[그림 2-3-1] 토요타 자동차에 사용되는 케나프 섬유 보강 바이오복합재료.

도요타는 ‘해초 자동차’ 를 2015년 출시하겠다는 계획을 발표했으며 이미 컨셉 차량을 공개한 상태이다. 500cc 하이브리드 엔진이 장착된 ‘1/X 플러그인 하이브리드’ 의 중량은 420kg에 불과한데, 이 자동차 지붕의 재료는 모시 및 열대 식물인 케나프에서 추출한 바이오 플라스틱이 사용되었다. 바이오 플라스틱이 무게가 가벼운 것은 물론 강도 또한 뛰어나고 화석 연료를 전혀 사용하지 않기 때문에

환경에도 아무런 악영향을 미치지 않는다고 발표했다. 또한 도요타는 차체의 재료로 케나프 등의 육상 식물 대신 일본 근해에서 쉽게 구할 수 있는 해초에서 추출한 바이오 플라스틱을 사용하겠다는 미래 청사진을 발표하였다[85].



[그림 2-3-2] Toyota의 모시 및 케나프를 이용한 자동차 지붕.

2. 유럽의 통합공정 및 제품개발에 대한 기술개발 동향

유럽에서 초임계 유체 관련기술은 미국이나 일본에 비해 먼저 초임계 유체 추출기술이 도입되어 상업화가 이루어지고 있으며, 초임계 이산화탄소를 이용한 추출 분야가 크게 연구 개발되어 왔다. 프랑스에서는 천연물질에서 향기성분 추출, 독일에서는 커피로부터 카페인 제거 및 담배의 니코틴 제거, 이탈리아와 스페인 등에서는 식물류에서 기능성 물질을 추출하여 식품에 적용하는 연구개발이 활발히 진행되고 있다. 영국에서는 초임계 유체를 친환경공정 개발에 중점을 두고 Green Technology에 주력하고 있으며, Environmental, Earth Friendly, Sustainable이란 단어를 사용하고 있다. 독일의 UHDE사와 LEWA사, 프랑스의 SEPAREX, 스위스의 SITEC, 오스트리아의 NATEX사에서는 초대형 초임계 유체 이용 생산 공정을 보급하고 있다. 프랑스의 ArkoPharma 제약회사에서는 대형 초임계 이산화탄소 분리공정을 설치하여 천연물질로부터 식, 의약품 기능성 원료를 생산하여 다양한 제품을 출시하고 있다.

바이오복합재료 기술개발에서 유럽은 바이오복합재료의 실용화와 고성능화에 의해 항공분야 적용 등 새로운 응용분야를 모색하고자 하는 단계에 있다. 유럽에서는 바이오복합재료를 자동차 내·외장재로 이미 실용화하고 있으며 또한, 경주용 자동차 등 특수 분야에 대한 응용가능성을 분석하고 있다. 특히, 바이오복합재료의 실용화를 가장 많이 추진하고 있는 독일 다임러 크라이슬러 회사에서는 자동차 한 대 당 평균 5~10 Kg의 천연섬유를 바이오복합재료의 보강재로 사용하고 있다. 다임러크라이슬러 회사에서 생산하는 모든 차종에 바이오복합재료가 적용되고 있어 앞으로 그 사용량은 획기적으로 증가할 것으로 예측되고 있다. 앞으로 자동차산업에

서 친환경 소재의 기조와 연비향상을 위한 경량화 소재 필요에 의해 바이오복합재료에 대한 잠재적 시장 규모는 매우 크다고 할 수 있다[86].

3. 미국 초임계 유체 추출 분야 연구현황

미국의 초임계 유체 기술은 70년대에 초임계 유체 추출기술에 관한 연구가 시작되었으며, 80~90년대를 거치면서 분리에 관한 연구들이 이루어지면서 1988년 Kraft General Foods의 자회사인 Maxwell House사에서 Huston에 카페인이 없는 커피를 제조하는 공정을 상업화하였고, 1990년에는 와이오밍 주에 Hop 추출기술이 상업화되어 초임계 기술의 전성기를 맞이하고 있다. 최근 미국의 National Center for Agricultural Utilization Research의 연구소장인 Jerry King 박사팀은 초임계 이산화탄소를 사용하여 천연물질로부터 다양한 기능성 물질을 분리 정제하는 연구가 활발히 진행되고 있다. Thar Design, Applied Separations, Prochrom, ISCO 등에서 초임계 유체 기술 연구 개발 및 산업적 규모 생산 설비용 장치를 생산하고 있다. 캐나다의 NOEAC사는 대형 초임계 이산화탄소 추출 공정을 설비하여 천연물질로부터 기능성 물질을 추출하여 식품, 의약품, 생활용품 분야의 신제품용 원료를 생산하거나, 국내외 관련 산업체의 용역을 처리해 주고 있다.

고압 유체를 이용한 연구 분야 중 고체원료로부터 특정 성분을 분리 회수하는 반회분식 흐름(semi-batch flow) 공정은 식품산업분야에서 대량으로 생산하는 기술이 개발되어 선진국에 널리 보급되고 있으며, 고압 유체를 이용한 대량생산 추출 공정은 매년 증가추세에 있다. 최근 천연물질에서 생리활성 물질을 추출하거나 유해한 물질(toxic compounds)을 제거하기 위한 대량생산용 고압 유체 분리공정이 중국에 진출하고 있어 천연 자원이 풍부한 나라에 많은 설비가 제공될 것으로 예상된다.

미국의 바이오 복합재료 개발의 일환으로, 포드 자동차는 최신 자동차 모델인 2010 포드 플렉스(Ford Flex)의 3열 내장용 저장 통에 밀짚으로 보강된 플라스틱을 사용하였으며 이는 바이오복합재료를 처음으로 적용한 예로서 밀짚 20%를 사용하였다. 보강재로 사용된 밀짚은 폐기물로서 포드 플렉스가 세워진 오타리오에서만 약 3천만 미터 톤이 폐기물로 버지는데 이를 활용함으로써 연간 20,000파운드의 석유 사용감소와 30,000 파운드의 이산화탄소 배출을 줄일 수 있다[87].



[그림 2-3-3] Ford사의 밀짚을 이용한 자동차 내장재.

4. 국내의 통합공정 및 제품개발에 대한 기술개발 동향

1990년 초에 일부 식품제조 업체에서는 초임계 이산화탄소를 이용한 추출공정을 혼합물질로부터 특정성분을 분리하기 위해 pilot scale의 장치를 국외(일본, 독일, 미국, 오스트리아 등)으로부터 수입하여 그 회사의 특정 제품을 생산하기 위한 신기술로 사용하고 있다. 대학, 연구기관에 있어서 KIST, 화학연구소, 서강대, 영남대, 수원대, 경북대, 부경대, 울산대 등에서 초임계 유체를 이용한 추출, 분리, 세정, 미립자 반응, 고분자, 염색 분야에 기초 및 응용 연구가 활발히 진행되고 있다. 최근 초임계 유체를 이용한 연구 분야가 다양하게 적용되어 활성화되고 있으나, 초임계 유체에 대한 물성에 대한 이론적 기초 연구가 활발하게 진행되고 있는 반면, 응용분야에 있어서는 반도체 분야의 세정, 섬유 분야의 염색, 화학 및 고분자 분야의 반응 등에 한정되어 있다. 천연 혼합물질로부터 특정성분의 분리공정에 있어서는 기능성 물질의 특성을 고려하고, 초임계 유체 추출 후 그 기능성 물질의 검정, 해석, 용도, 품질평가 등이 수반되므로 성공적인 연구가 수행되지 않고 있는 실정이다. 용매 재사용 시스템이 구축되지 않은 실험실 규모의 추출장치에서 확보된 연구 결과를 산업적으로 적용하는데 있어서 한계성을 가지고 있어, 일부 관련업체들은 제품생산용 추출장치를 전량 수입하여 사용하고 있으나, 운전 시 발생하는 문제점을 처리하는데 많은 어려움을 가지고 있다. 따라서 산학협동 연구개발을 통하여 기초 연구자료 확보 및 공정해석을 통하여 장비의 국산화와 더불어 초임계 유체 이용

환경 오염원 배출 저감화 신기술을 개발하여 천연원료를 대상으로 고기능성 물질을 분리·정제하는 제조 산업에 적용하고 유사분야의 연구개발, 원천 기술 확보로 바이오 소재 산업분야의 국가 기술 경쟁력을 확보하는 것이 시급한 실정이다.

초임계 유체 추출을 이용한 응용분야는 그 범위가 점점 넓어지고 있는 추세이며, 천연물질에 존재하는 기능성 물질에 대한 분리공정이 개발되어 재래식 추출 공정에서 발생하는 추출원료의 열에 대한 변성, 목적 성분의 유기용매와의 접촉에 의한 구조변형, 저 비점 물질의 높은 휘발성에 의한 포집의 어려움 등을 해결함으로써 식품, 의약품, 환경 산업 분야에 큰 기여를 하고 있다.

최근 (주)유맥스에서는 오스트리아의 NATEX사로부터 약 7톤 규모의 추출반응기가 부착된 상업용 고압추출장치를 수입하여 천연소재인 참깨로부터 고품질의 참기름을 생산 판매하고 있고, 그 밖의 식품, 화장품, 의약품 산업체에서 다양한 크기의 고압추출 장치를 국외로부터 수입하여 연구개발을 수행하고 있다. 현재 국외로부터 수입된 고압 추출장치는 천연물질로부터 essential oil 형태의 물질을 분리 회수하는 비교적 단순한 추출용으로 일반화되어 있으며, 기능성 Aroma와 Volatile Compounds를 함유하고 있는 천연물질을 처리하는데 있어서 매우 제한적이다. 그러므로 다양한 형태의 천연원료를 처리하기 위해서는 보다 효율적이고 응용성이 뛰어난 고압추출 공정 개발이 필요하다.

바이오복합재료 기술개발에서 국내의 경우에는 관련 기초기술의 확보와 자동차 부품에 실용화를 추진하기 위한 연구개발 시작점에 있다. 한국은 2003년부터 바이오복합재료 관련연구로서 출연연구원과 학계에서 천연섬유 특성분석과 프로토타입의 바이오복합재료를 제조한 후 특성을 분석하는 기초연구가 수행되고 있으며 최근에 친환경 및 경량화 소재 개발 필요성에 의해 자동차업계의 연구개발 연구도 추진되고 있다[88].

특히, 현대-기아자동차연구원은 2005년 일본 도요타 자동차에서 바이오복합재료를 적용한 사례가 발표된 후 “바이오복합재료 10개년 기술개발 로드맵”을 작성하고 관련연구를 정부지원 및 자체적으로 수행하고 있다. 이외에도 자동차, 전자재료 관련 업체들이 바이오복합재료의 경량 및 친환경 특성에 많은 관심을 표명하고 있으며 일부 중소기업에서는 바이오복합재료 개발을 위한 연구를 진행하고 있다 [89].

제 3 장

건강 신소재 개발

- 제 1 절 해조류 생리활성 물질의 함염증, 항치매,
항비만효과 및 기전 분석
- 제 2 절 해조류 생리활성 물질의 항암효과 및 기전 분석
- 제 3 절 해조류 생리활성 물질의 항당뇨효과 및 기전
분석
- 제 4 절 해조류 자원의 통합적 활용을 위한 DB 구축 및
표준화

제 3 장 건강신소재 개발

제 1 절 해조류 생리활성 물질의 항염증, 항치매, 항비만효과 및 기전 분석

1. 연구 목적 및 내용

가. 연구 목적

- 바이오매스 에너지자원으로부터 생리활성물질 분리 및 구조 규명
- 해조류의 통합적 활용을 위한 생리활성물질의 대량분리조건 확립 및 건강 기능성 식품 소재화

- (1) 저탄소 녹색성장의 핵심동력이 될 신재생에너지의 개발 및 수산해양 녹색산업 창출 그리고 기후변화협약 대응을 위하여 해조류 바이오매스의 그린에너지화 및 통합적 활용을 위한 부산물의 효과적인 활용에 기여
- (2) 선진국의 경우 성별, 나이, 직업, 체형에 따라 기능성 물질의 선호도가 매우 다양하므로 다양한 생리활성 물질을 분리하여 이들의 기능성을 과학적으로 입증함으로써 맞춤형 건강 기능성 식품 소재를 개발하고자 함

나. 연구 내용

우리나라의 대표적인 갈조류인 다시마, 모자반 및 곰피의 저분자 생리활성 물질을 주정 (EtOH)로 추출한 후 *n*-헥산, 에틸아세테이트 (EtOAc), *n*-부탄올 (*n*-BuOH) 및 물 획분으로 분리한 후 각각의 획분 함량을 분석하였으며, 각각의 획분에 대하여 항산화, 항염증, 항치매, 항비만, 항암 및 당뇨합병증 저해 효과를 규명함으로써 이들 생리활성물질들의 건강기능성 식품소재로 활용하기 위한 기초 자료를 확보하였다.

2. 연구 방법

가. 실험장치 및 재료

Rotar vacuum evaporator, 추출기, 대형 silica column, HPLC, CO₂ incubator, 전기영동장치, 무균 배양대, 액체질소탱크, 항온조, real-time PCR, 이미지 분석기, 형광 현미경, microplate reader (Promega), 건조 다시마 500 kg, 건조 모자반 10 kg, 건조 곰피 200 kg, MDA-MB-231 breast cancer cells, RAW 264.7 macrophage, HepG2 hepatoma cells, B16F10 melanoma cells (이상 ATCC), PCR용 primer (Bioneer), 2',7'-dichlorofluorescein diacetate (DCFH-DA), tacrine, dimethylsulfoxide (DMSO), lipopolysaccharide (LPS) (이상 Sigma-Aldrich), luciferase assay kit, pRL-TK DNA, reverse transcriptase, CellTiter 96[®]AQ_{ueous} One Solution Cell Proliferation Assay kit (이상 Promega), penicillin, streptomycin, Dulbecco's Modified Eagle's 배지 (DMEM), Minimum essential 배지 (MEM), trypsin-EDTA, fetal bovine serum (FBS), sodium pyruvate, non-essential amino acid (이상 GIBCO-BRL), ELISA kits (PGE₂, IL-1 β , IL-6, TNF- α , 이상 eBioscience), PARP, caspase-8, Bid, Fas, FasL, cytochrome c, COX-2, iNOS, NF- κ B p65, I κ B- α , phospho-Akt (p-Akt), Akt, phospho-ERK (p-ERK), phospho-JNK (p-JNK), phospho-p38 MAPK (p-p38 MAPK), tyrosinase, TRP-1, TRP-2, MITF, anti-rabbit 2 차 항체, anti-mouse 2 차 항체, anti-goat 2 차 항체 (이상 Santacruz), Cleaved caspase-3 (Cell Signaling Technology), PD98059, SP600125, SB203580, LY294002 (A.G. Scientific), ECL detection kit (GE healthcare).

나. 실험 절차

(1) 해조류 저분자 생리활성물질 함량 분석조건 확립

(가) 해조류 저분자 생리활성물질 추출조건 확립

건조 다시마 일정량에 5 배량의 주정을 가한 후 70°C 에서 3 시간동안 3 회 추출한 후 추출용매를 증발시켜 동결건조 후 DMSO에 녹여 추출물 중의 polyphenol 농도를 Folin-Ciocalteus 법으로 분석하였다.

(나) 다시마의 저분자 생리활성물질의 유기용매 획분 분리

분쇄된 건조다시마 분말 3 kg을 환류 냉각기를 부착한 집기병에 담은 후

9 L의 주정 (96% EtOH)을 넣은 후, 탱욕상에서 3 시간 동안 추출하였다. 추출액을 여과하여 rotary vacuum evaporator를 사용하여 40°C에서 농축하였다. 위와 같은 방법으로 다시 2 회 더 반복하여 주정추출물을 얻었다. 추출물을 H₂O:EtOH (9:1,v/v)의 혼합용매로 녹인 후, 분액 깔대기에 부어, 동량의 *n*-헥산을 넣어 분액 깔대기를 흔들어 용해시켜 평형화시킨 후 위층의 *n*-헥산 가용부를 모아 무수 황산 나트륨 (sodium sulfate, anhydrous)으로 처리한 다음 여과하여 농축하여 *n*-헥산 분획물을 분리하였다. 동일한 방법으로 H₂O층에 동량의 EtOAc를 가하여 상층의 EtOAc 가용부를 모아 EtOAc 분획물을 분리하였다. 또한 *n*-BuOH에 대해서도 동일한 방법으로 시행하여 상층의 *n*-BuOH 획분과 하층의 H₂O 획분을 분리하여 회수하였다. 각 획분의 수율은 상압건조법에 의하여 측정하였으며, polyphenol 화합물의 함량은 Folin-Ciocalteus 법으로 분석하였다. 모자반과 곰피의 유기용매 분획도 다시마와 동일한 방법으로 행하였다.

(다) 저분자 생리활성 화합물의 분리

다시마로부터 얻은 *n*-헥산 획분을 recycling HPLC system에 장착된 Asahipak GS-310 칼럼 (500 × 20 mm, Showa Denko, Japan)으로 겔여과하여 분자량에 따라 3개의 획분으로 분리하였다. 각각의 획분들에 대한 생리활성 (항산화, 항염증, 항암활성)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 획분 5 g을 methanol (MeOH)에 녹여 대형 silica column (100x10 cm)에 loading하여 디클로로메탄과 MeOH 혼합용액으로 (6:1, 5:2, 4:3, 3:4, 2:5, 1:6, v/v, 1.2 L) 용출시킨 후 분리된 획분의 항산화 또는 항염증 활성을 측정하여 활성이 높은 획분을 분리하였다. 활성이 높은 획분을 recycling HPLC system에 장착된 Asahipak GS-310 칼럼 (500 × 20 mm, Showa Denko, Japan)으로 겔여과하여 유사한 분자량의 물질들을 회수하였다. 각각의 획분들에 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 표준과 1차적으로 C₁₈과 silica TLC plate에 전개시켜 확인하였다. 확증이 안될 경우 ¹H-과 ¹³C-NMR spectrum을 비교분석하였다. 신규 화합물의 경우 부경대 공동실험실습관에 의뢰하

여 분리를 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

RAW 264.7 macrophage를 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 24 시간 배양한 후 분리된 시료를 가하여 24 시간 배양한 후 95 μl 의 배지와 5 μl 의 MTS 용액을 가하여 1 시간 반응시킨 후 생성되는 formazan을 490 nm에서 흡광도를 측정하였다.

② 염증 매개인자 (NO, PGE₂) 분석

RAW 264.7 macrophage를 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 24 시간 배양하였다. 배양된 배지성분을 회수하여 배지중의 nitrite (NO)와 prostaglandin E₂ (PGE₂)의 농도를 분석하였다. NO는 Griess 반응에 따라 분석하였다[1]. 즉, 100 μl 의 세포배양액에 동일량의 Griess 시약 (0.1% naphthylethylenediamine dihydrochloride and 1% sulfanilamide in 5% H₃PO₄)을 가한 후 10 분 후에 540 nm에서 흡광도를 microplate reader로 측정하였다. PGE₂ 농도는 PGE₂ ELISA kit (eBiosciences)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 macrophage를 6-24 시간 배양한 후에 배지 중에 분비된 cytokine을 ELISA 법으로 분석하였다.

④ Western Immunoblot

분리된 시료로 처리된 RAW 264.7 macrophage를 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 μ g/mL leupeptin, 50 mM NaF, 1 mM PMSF)를 가하여 4°C에서 1 시간 방치하여 18,000 g에서 10 분간 원심분리하여 상등액을 얻었다. 일정량의 단백질 (20-40 μ g)을 SDS-PAGE로 분리하여 nitrocellulose에 옮긴 후 1 차 항체, 2 차 항체로 순차적으로 반응시킨 후 ECL 화학발광 kit를 이용하여 특정 단백질의 발현을 확인하였다. 단백질은 iNOS, COX-2, ERK, pERK, p38, pp38, JNK, pJNK, pAkt, Akt, PI3K, NF- κ B, I κ B- α 등이다.

⑤ RNA분리 및 RT-PCR

세포내 total RNA는 RNeasy mini kit (Qiagen, USA)로 분리하였다. 분리된 total RNA 3 μ g을 이용하여 ImProm Reverse Transcription System (Promega, USA)으로 cDNA를 합성하였다. 합성된 cDNA를 이용하여 RT-PCR로써 상대적인 mRNA 발현량을 측정, 분석하였다. House keeping 유전자는 GAPDH를 사용하였다. RT-PCR 대상 유전자는 COX-2와 iNOS이다. 전사수준에서 이들 유전자의 전사량을 측정함으로써 분리된 화합물에 의한 염증 유발 단백질의 억제가 전사 수준 또는 번역수준에서 억제됨을 알 수 있다. PCR에 사용된 Primer의 서열은 다음과 같다. COX-2 sense, 5'-CCT AGG CTT CAG CCT CAC AC-3'; COX-2 antisense, 5'-CAG CCT AAT GTT CAG CGA CA-3'; iNOS sense, 5'-CAC CTT GGA GTT CAC CCA GT-3'; iNOS antisense, 5'-ACC ACT CGT ACT TGG GAT GC-3'; GAPDH sense, 5'-TGG CAC AGT CAA GGC TGA GA-3'; GAPDH antisense, 5'-CTT CTG AGT GGC AGT GAT GG-3'.

⑥ 염증관련 전사인자 활성분석

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

(나) 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 24 시간 배양한 후 분리된 시료를 (0-50 μ M) 가하여 24 시간 배양한 후 95 μ l의 배지와 5 μ l의 MTS 용액을 가한 후 1 시간 후 생성되는 formazan을 490 nm에서 흡광도를 측정하였다.

② 염증 매개인자 (NO, PGE₂) 분석

BV2 세포를 5×10^5 cell/well의 농도로 12-well plate에서 24 시간 배양하였다. 배양된 세포에 0-20 μ M의 분리된 시료와 1 μ g/mL의 LPS를 가한 후 24 시간 배양하였다. 배양된 배지성분을 회수하여 배지중의 NO와 PGE₂를 분석하였다. NO는 Griess 반응에 따라 분석하였다[1]. 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 microplate reader로 측정하였다. PGE₂ 농도는 PGE₂ ELISA kit (eBiosciences)를 사용하여 측정하였다.

③ 염증관련 cytokine의 분석

염증관련 cytokine의 분석으로 TNF- α , IL-1 β , IL-6를 ELISA kit (eBiosciences)를 사용하여 제조사의 manual에 따라서 측정하였다. 즉, 분리된 시료와 LPS로 처리된 BV2 세포를 6-24 시간 배양한 후에 배지 중에 분비된 cytokine을 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 1 시간 방치하여 18,000 g에서 10 분간 원심분리하여 상등액을 얻었다. 일정량의 단백질 (20-40 μ g)을 SDS-PAGE로 분리하여 nitrocellulose에 옮긴 후 1 차 항체, 2 차 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 B- α 등이다.

⑤ RNA분리 및 RT-PCR

세포내 total RNA는 RNeasy mini kit (Qiagen, USA)로 분리하였다. 분리된 total RNA 3 ug을 이용하여 ImProm Reverse Transcription System (Promega, USA)으로 cDNA를 합성하였다. 합성된 cDNA를 이용하여 RT-PCR로써 상대적인 mRNA 발현량을 측정 분석하였다. House keeping 유전자는 GAPDH를 사용하였다. RT-PCR 대상 유전자는 COX-2와 iNOS이다. 전사수준에서 이들 유전자의 전사량을 측정함으로써 분리된 화합물에 의한 염증 유발 단백질의 억제가 전사 수준 또는 번역수준에서 억제됨을 알 수 있다. PCR에 사용된 primer의 서열은 다음과 같다. COX-2 sense, 5'-CCT AGG CTT CAG CCT CAC AC-3'; COX-2 antisense, 5'-CAG CCT AAT GTT CAG CGA CA-3'; iNOS sense, 5'-CAC CTT GGA GTT CAC CCA GT-3'; iNOS antisense, 5'-ACC ACT CGT ACT TGG GAT GC-3'; GAPDH sense, 5'-TGG CAC AGT CAA GGC TGA GA-3'; GAPDH antisense, 5'-CTT CTG AGT GGC AGT GAT GG-3'.

(다) 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 7-9 일 배양한 후에 지방세포로의 분화억제효과를 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 7 일째에 Western blot으로 분석하였다. Western blot 조건은 항염증효과시의 분석조건과 동일하며, 1 차 항체처리시의 조건은 항체에 따라 약간의 변화가 있다.

세포내 total RNA는 RNeasy mini kit (Qiagen, USA)로 분리하였다. 분리된 total RNA 1 ug을 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. RT-PCR 대상 유전자는 PPAR γ 와 SREBP-1c이다. 전사수준에서 이들 유전자의 전사량을 측정함으로써 분리된 화합물에 의한 항비만 관련 단백질의 억제가 전사 수준 또는 번역수준에서 억제됨을 알 수 있다. PCR에 사용될 primer의 서열은 다음과 같다. SREBP-1c sense, 5'-TCA TGC CCT CCA TAG ACA CA-3'; reverse, 5'-AGC TCA AAG ACC TGG TGG TG-3'; PPAR γ sense, 5'-CCC TGG CAA AGC ATT TGT AT-3'; antisense, 5'-GAA ACT GGC ACC CTT GAA AA-3'; GAPDH sense, 5'-TGG CAC AGT CAA GGC TGA GA-3'; antisense, 5'-CTT CTG AGT GGC AGT GAT GG-3'.

(라) 미백 효과

① 세포배양 및 세포독성 시험

B16F10 melanomacytes를 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 (0-400 ug/ml) 가하여 24 시간 배양한 후 95 ul의 배지와 5 ul의 MTS 용액을 가한 후 1 시간 후 생성되는 formazan을 490 nm에서 흡광도를 측정하였다.

② Tyrosinase 활성 분석

B16 세포로부터 회수한 tyrosinase 활성 측정은 Tsuboi 등의 방법에 의해 분석하였다[2]. 즉, 3 일간 배양한 B16 세포를 회수하여 1% NP-40, sodium phosphate buffer (0.1 M, pH 6.8)를 넣고 lysis하고 4°C에서 13,000 g에서 10 분간 원심분리한 후 상층액내 효소를 회수하였다. 세포 파쇄액에 L-DOPA 용액과 시료를 넣고 30 분간 37°C에서 반응시킨 후 생성되는 dopachrome을 microplate reader를 이용하여 470 nm에서 흡광도를 측정하여 효소 활성을 측정하였다.

③ 세포내 멜라닌 생성량 분석

B16 세포내 생성되는 멜라닌의 양은 Tsuboi 등의 방법을 참고하여 분석하였다[2]. 즉, 세포에 시료와 α -MSH를 처리하여 3 일간 배양한 후, PBS로 세척한다. 세포에 2 N NaOH를 넣고 lysis한 후, 60°C에서 30 분간 가열한 후 세포 파쇄액 내 dopachrome의 양을 microplate reader를 이용하여 470 nm에서 측정하여 세포내 생

성되는 멜라닌의 양을 비교하였다.

④ Western Immunoblot

분리된 시료로 처리된 B16 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℃에서 1 시간 방치하여 18,000 g에서 10 분간 원심분리하여 상등액을 얻었다. 일정량의 단백질 (20-40 ug)을 SDS-PAGE로 분리하여 nitrocellulose에 옮긴 후 1 차 항체, 2 차 항체로 순차적으로 반응시킨 후 ECL 화학발광 kit를 이용하여 특정 단백질의 발현을 확인하였다. 분석대상 단백질은 tyrosinase, TRP-1, TRP-2, MITF, ERK, pERK, pAkt, Akt 등이다.

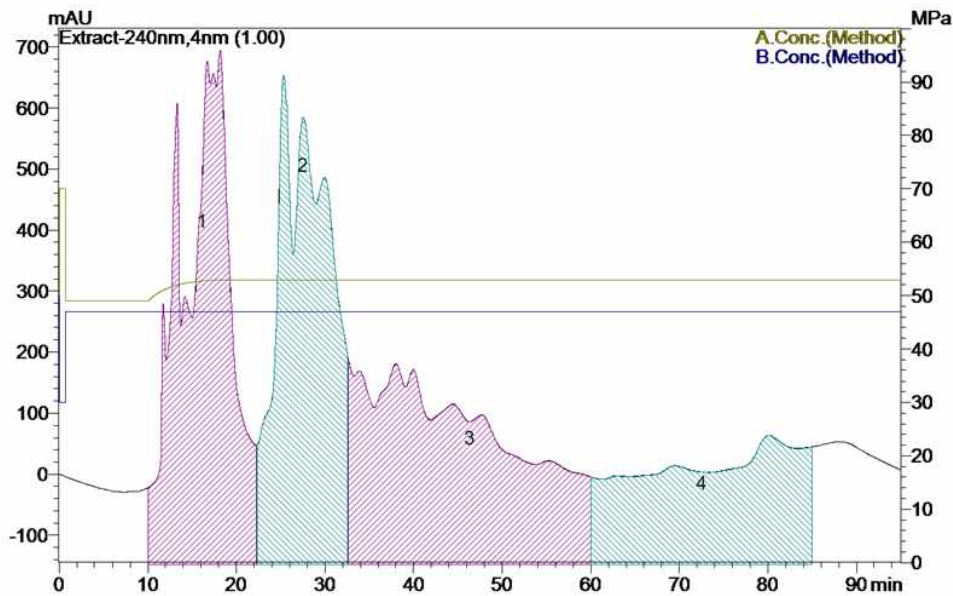
3. 연구수행 결과

가. 다시마 추출물의 생리활성

(1) 다시마로부터 분리한 lipophilic compound (LLC)의 항염증 효과

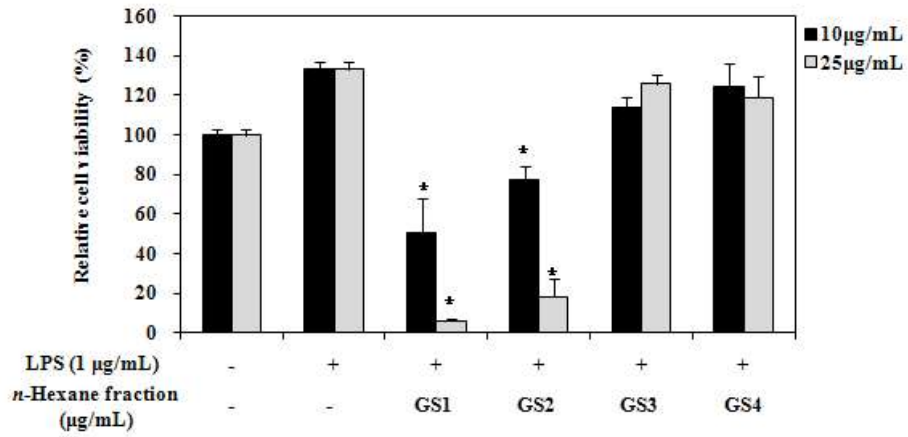
(가) 다시마로부터 LLC의 분리

전년도에서는 항염증 활성이 우수한 *n*-헥산과 디클로로메탄 획분의 항염증 기전을 밝혔다. 전년도 연구 결과를 바탕으로, 다시마 분획물 중 항염증 활성이 우수한 *n*-헥산 분획물을 Shim-pack PREP-ODS (500 mm x 21.2 mm, Shimadzu Co., Tokyo, Japan)에 의해 분자량 별로 분리하기 위하여 methanol (5.0 ml/min)로 용출시켜 분자량에 따라 4개의 획분으로 분리하였다 (GS1-GS4, [그림 3-1-1]).

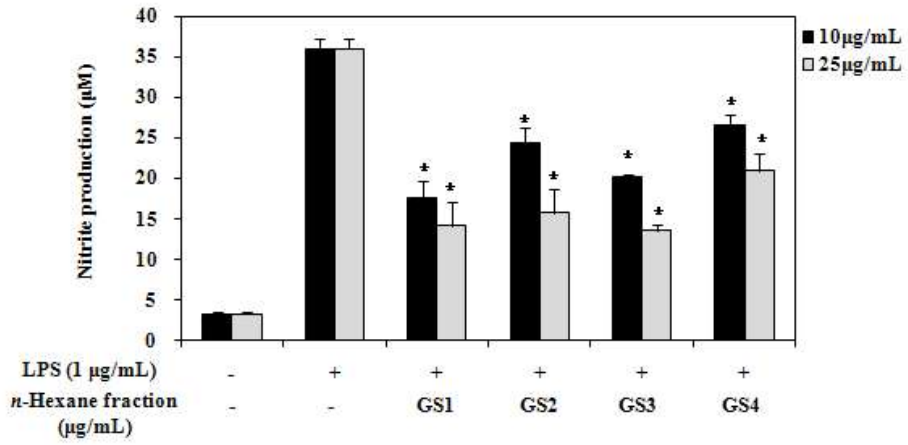


[그림 3-1-1] *n*-헥산 분획물의 크로마토그램.

GS1-GS4 분획물의 항염증 활성을 확인하기 위하여, LPS와 함께 RAW 264.7 세포에 처리하여 실험하였다. Macrophage에 LPS 처리에 의해 염증 반응이 일어나면 iNOS 효소에 의하여 NO가 생성되어 분비되며 이는 염증 반응을 나타내는 지표로 활용된다[3-6]. 실험 결과, GS3 획분은 세포 생존률에 영향을 미치지 않으면서 NO 생성을 억제시키는 것으로 나타났다([그림 3-1-2]). 따라서 항염증 활성이 우수한 것으로 생각되는 GS3 획분을 다시 ODS-HPLC system으로 크로마토그램하여 다시 15개의 하위 분획물로 나누었다 (GS3-ODS1-GS3-ODS15, [그림 3-1-3]).

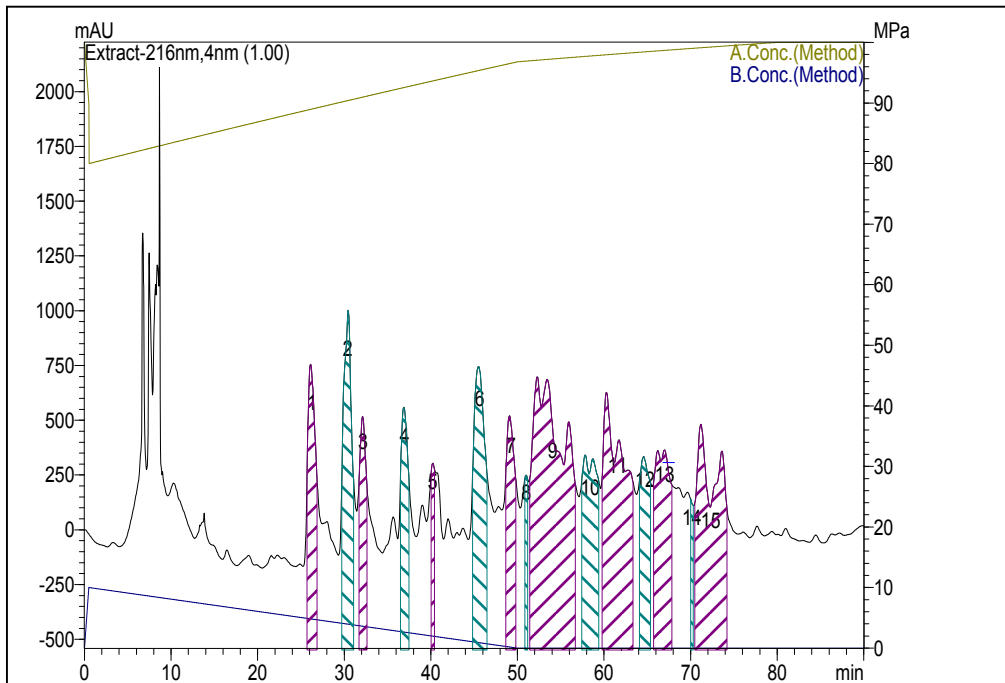


가



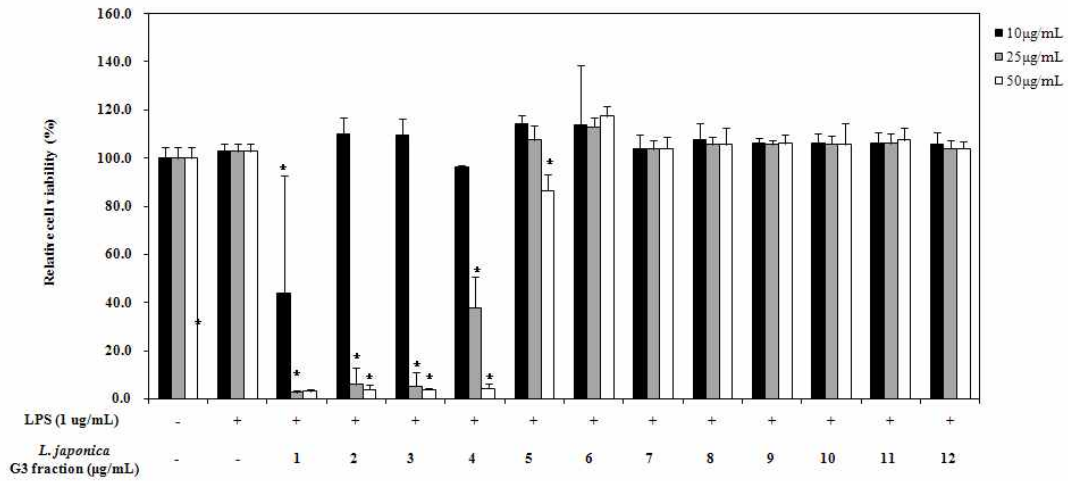
나

[그림 3-1-2] 다시마 n-헥산으로부터 분리한 GS1-GS4획분의 항염증 활성. 가, 세포 생존률; 나, NO 생성량

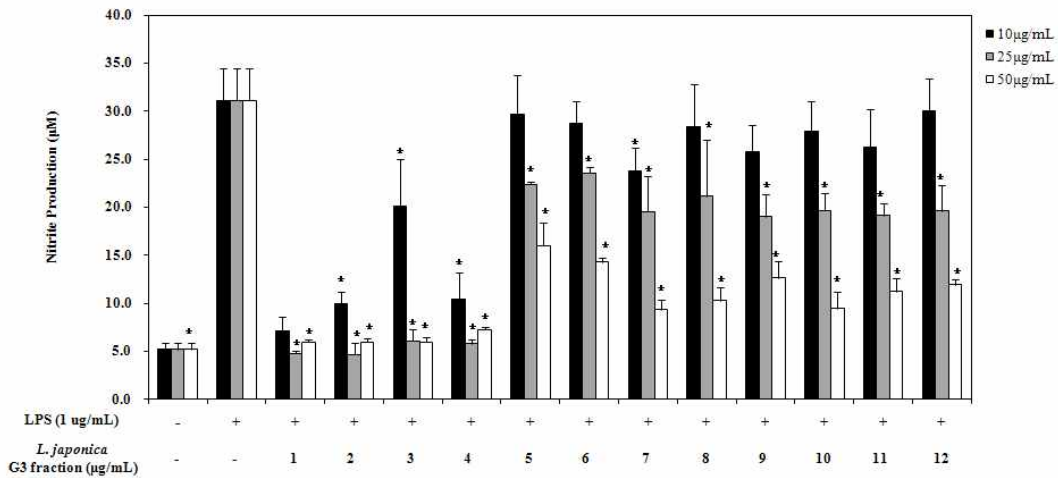


[그림 3-1-3] GS3 획분의 ODS 크로마토그램.

그 중, 획분의 양이 충분히 확보된 GS3-ODS1-GS3-ODS12 획분의 항염증 활성을 확인하기 위하여, LPS와 함께 RAW 264.7 세포에 처리하여 세포 생존률과 NO 생성량을 비교하였다. [그림 3-1-4]에 나타나듯이, GS3-ODS6 획분에서 가장 높은 항염증 활성을 확인하였으며 이후 세포 독성을 나타내지 않고 분리물의 양이 많은 GS3-ODS6 획분을 이용하여 이를 lipophilic compound (LLC)라 명명하고 항염증 활성과 그 기전을 실험하였다.



가



나

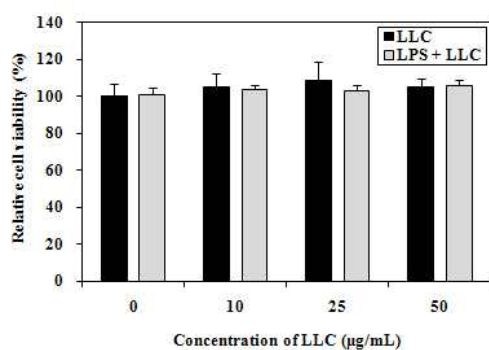
[그림 3-1-4] 다시마 n-헥산으로부터 분리한 GS3-ODS1-GS3-ODS12획분의 항염증 활성. 가, 세포 생존률; 나, NO 생성량

(나) 다시마로부터 분리된 LLC의 항염증 활성

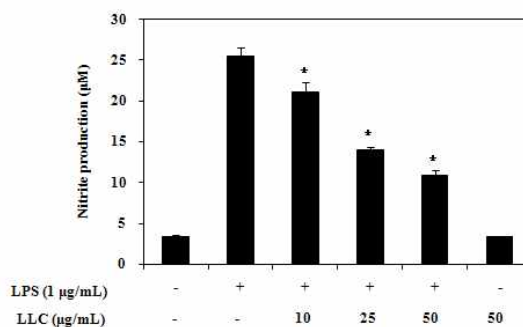
세포에서 염증반응이 일어나면 COX-2 효소가 발현되면서 아라키돈산을 PGE₂로 전환시키며 대식세포에서 생성된 PGE₂는 고통, 발열 등의 생리현상을 유발한다. 따라서 대식 세포외로 분비되는 PGE₂는 NO와 함께 염증 반응을 확인하는 지표로 활용된다[7-9].

다시마로부터 분리된 LLC의 항염증 효과를 분석하기 위하여 LLC를 LPS와 함께 RAW 264.7 세포에 처리하여 실험하였다. 우선 LLC를 단독으로, 또는 LPS와 함께 RAW 264.7 세포에 처리하여 24 시간 배양한 후 세포 생존률을 확인하였다.

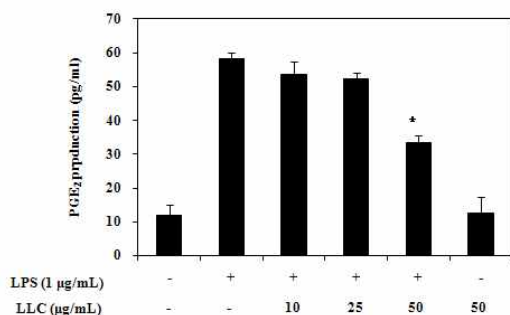
그 결과 LLC는 RAW 264.7 세포에 대하여 50 ug/ml의 농도까지 세포 생존률에 영향을 미치지 않는 것으로 나타났다([그림 3-1-5] 가). LLC의 항염증 효과를 확인하기 위하여 LLC를 LPS와 함께 RAW 264.7 세포에 처리하여 16 시간 배양한 후 배지 내 nitrite와 PGE₂의 생성량을 각각 Griess assay와 ELISA kit를 사용하여 NO와 PGE₂의 생성 억제능을 분석하였다. 그 결과 LLC는 LPS에 의한 nitrite와 PGE₂를 농도 의존적으로 저해시키는 것으로 나타났다([그림 3-1-5] 나, 다). 이러한 결과는 다시마로부터 분리된 LLC가 LPS에 의한 염증 반응을 저해시킨다는 것을 나타낸다.



가



나



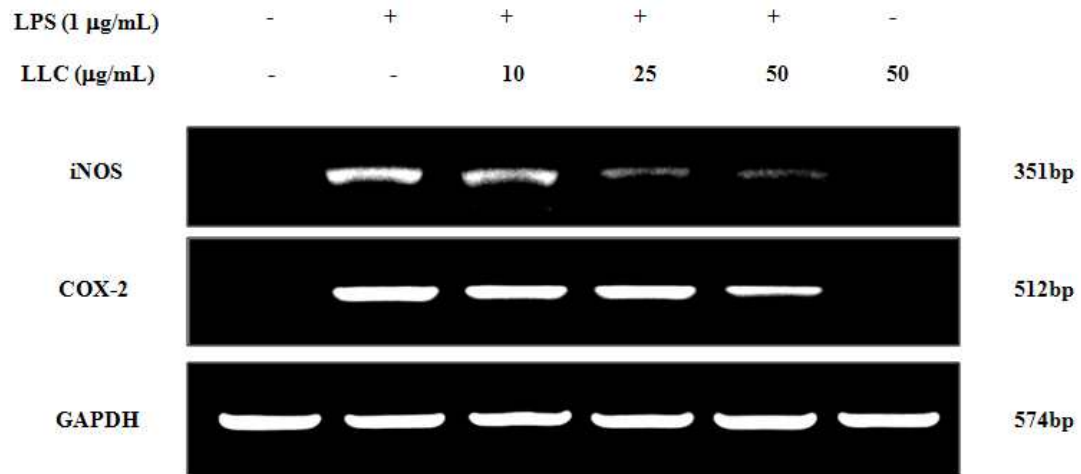
다

[그림 3-1-5] 다시마로부터 분리된 LLC의 항염증 활성. 가, 세포 생존률 분석; 나, nitrite 생성량 분석; 다, PGE₂ 생성량 분석

다시마로부터 분리된 LLC의 항염증 기전을 확인하기 위하여 RAW 264.7 세포에 LLC와 LPS를 처리하여 16 시간 배양한 다음 단백질을 추출하여 Western blot으로 NO를 발생시키는 iNOS와 PGE₂를 생산하는 COX-2 효소의 단백질 발현 변화를 분석하였다. 그리고 RAW 264.7 세포에 LLC와 LPS를 처리하여 6 시간 배양한 다음 total RNA를 추출하여 RT-PCR로 iNOS와 COX-2 효소의 mRNA 발현 변화를 분석하였다. 그 결과 LLC는 LPS에 의하여 유발되는 iNOS와 COX-2 단백질과 mRNA의 과발현을 농도 의존적으로 억제시키는 것으로 나타났다([그림 3-1-6]). 이 결과는 LLC가 iNOS와 COX-2의 발현을 전사단계에서 억제시킨다는 것을 의미한다.



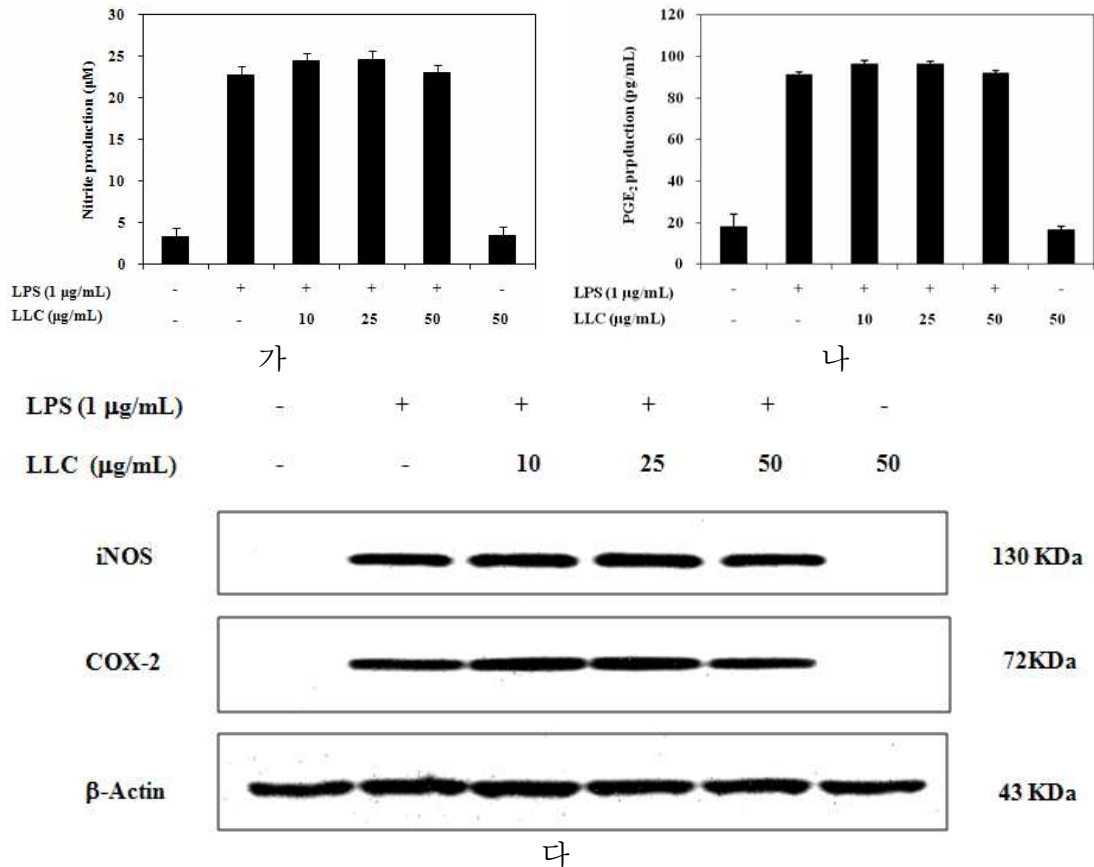
가



나

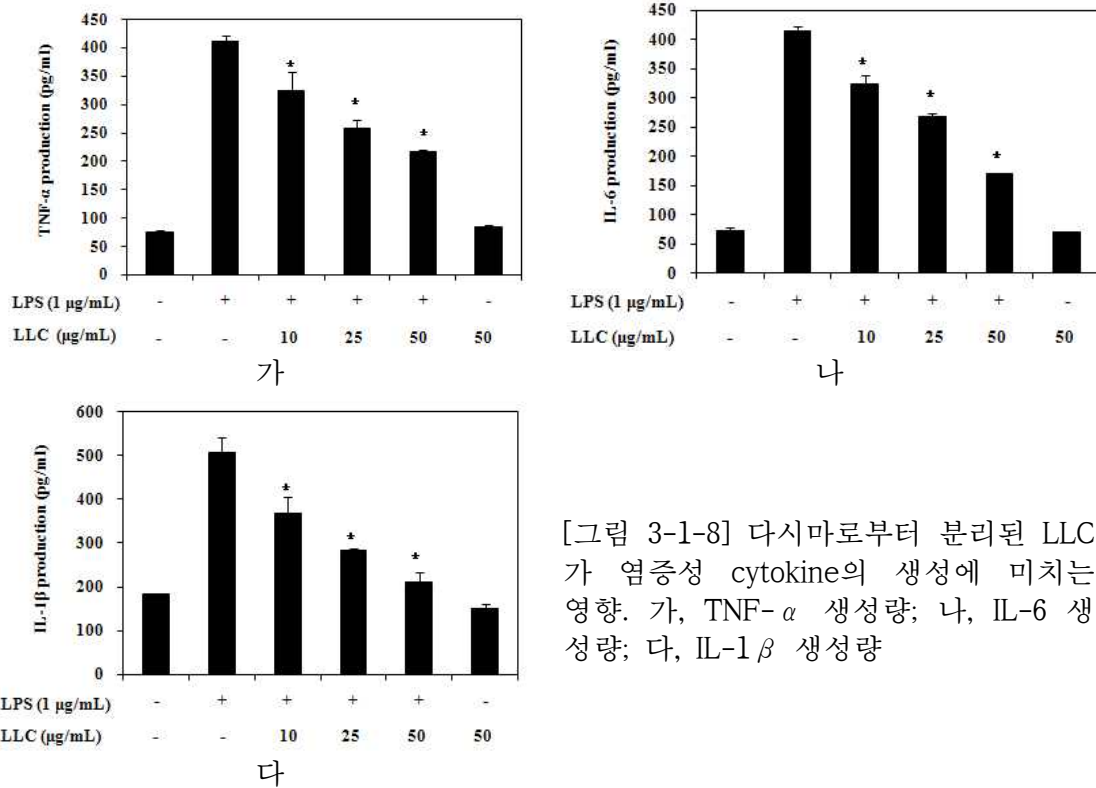
[그림 3-1-6] 다시마로부터 분리된 LLC의 iNOS, COX-2 효소 단백질 발현 저해 효과. 가, iNOS, COX-2 단백질 발현; 나, iNOS와 COX-2 mRNA 발현

다시마로부터 분리된 LLC의 iNOS, COX-2 발현 억제를 확인하기 위하여 RAW 264.7 세포에 LPS를 처리하여 12 시간 배양한 후 LLC를 처리하여 12 시간 배양하였다. 그 다음, 배양액을 회수하여 nitrite와 PGE₂ 생성량을 측정하고 세포로부터 단백질을 회수하여 Western blot으로 iNOS와 COX-2 단백질의 발현을 분석하였다. 그 결과 LLC는 LPS에 의한 nitrite와 PGE₂의 생성에 영향을 미치지 않았으며 iNOS와 COX-2 효소의 과발현 현상에도 영향을 미치지 않는 것으로 나타났다([그림 3-1-7]). 이러한 결과는 LLC가 iNOS와 COX-2 효소의 활성화 저해나 단백질 단계에서의 파괴와 같이 직접적으로 영향을 미치지 못하며 LPS에 의해 활성화되는 기전을 통하여 항염증 활성을 가진다는 것을 의미한다.



[그림 3-1-7] 다시마로부터 분리된 LLC가 iNOS, COX-2 효소에 미치는 영향. 가, nitrite 생성량; 나, PGE₂ 생성량; 다, iNOS와 COX-2 단백질 발현

Macrophage에서 LPS에 의해 염증 반응이 일어나면 여러 기전을 통하여 TNF- α , IL 등 염증 관련 cytokine이 발현되며 이는 염증 반응에 대한 민감 지표가 된다[3-6]. 다시마로부터 LLC를 LPS와 처리하여 24 시간 배양 후 상층액의 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 LLC에 의하여 농도 의존적으로 억제되는 것을 확인하였다 ([그림 3-1-8]). 이러한 결과는 다시마의 *n*-헥산 획분이 LPS에 의해 발생하는 염증 반응을 억제하여 염증성 cytokine의 발생을 효과적으로 억제시킨다는 것을 의미하고 있다.



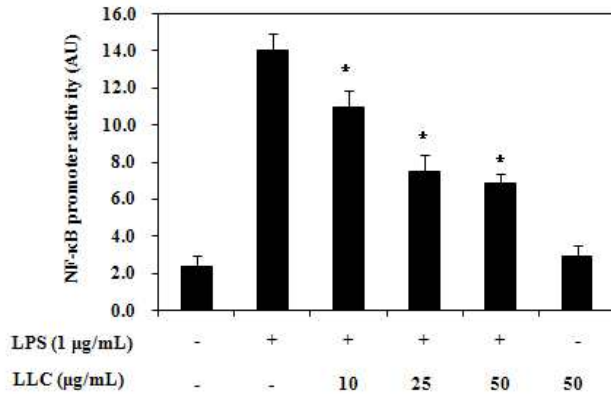
[그림 3-1-8] 다시마로부터 분리된 LLC가 염증성 cytokine의 생성에 미치는 영향. 가, TNF- α 생성량; 나, IL-6 생성량; 다, IL-1 β 생성량

(다) 다시마로부터 분리된 LLC의 항염증 기전

본 실험 결과를 통하여 다시마로부터 분리된 LLC가 LPS에 의한 nitrite와 PGE₂ 생성, 그리고 염증성 cytokine의 생성을 저해시키는 것으로 나타났다. 그리고 이는 LLC가 iNOS와 COX-2 효소의 활성이나 단백질 수준에서의 분해 등 직접적으로 영향을 미치지 못하지만 각각 효소의 발현을 mRNA 전사단계에서 억제하여 염증 반응에 나타나는 cytokine 등의 생성을 저해시킨다는 것으로 확인되었다.

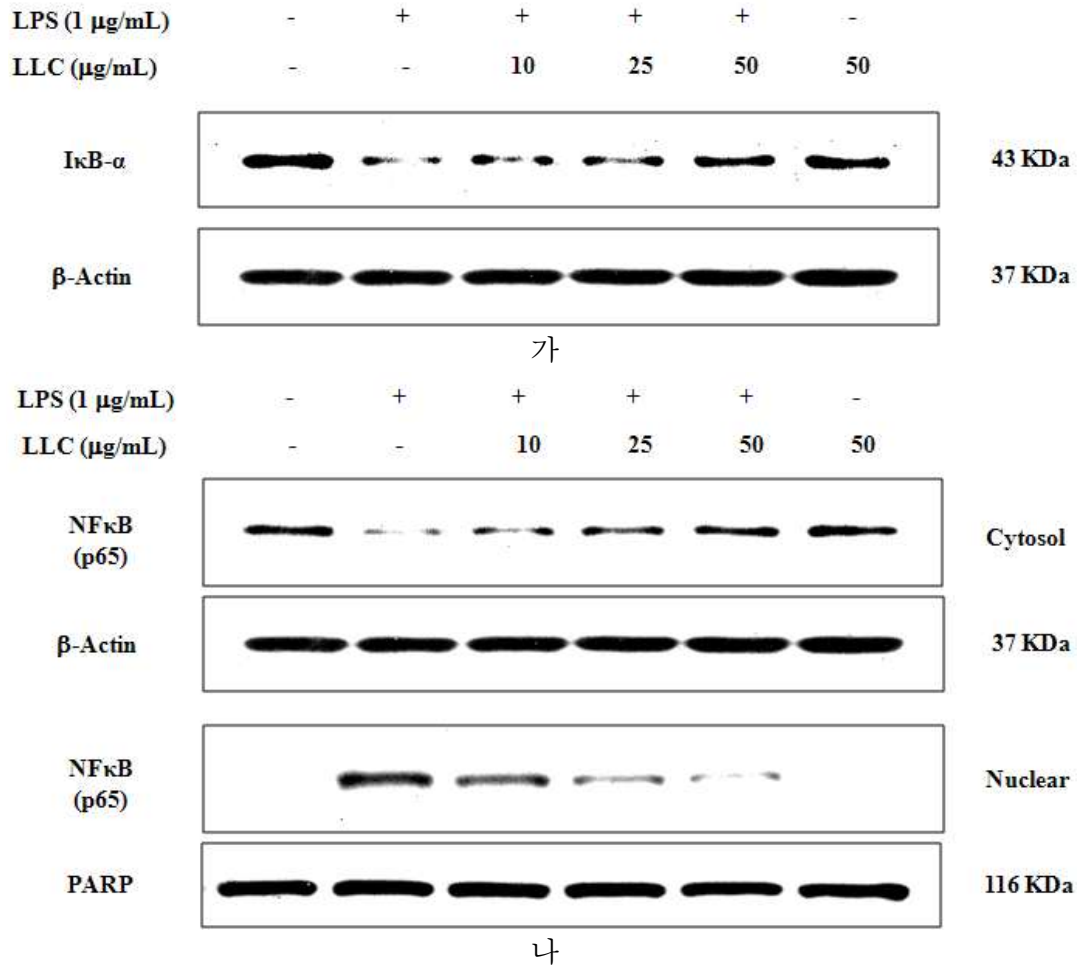
iNOS와 COX-2 등의 전사는 NF- κ B, AP-1 등의 다양한 전사 인자들에 의해 조절되는 것으로 알려져 있다[10-12]. 특히 NF- κ B는 세포내 I κ B- α 와 heterodimer를 이루고 있으며 염증 반응이 일어나면 여러 기전을 통하여 I κ B- α 가 인산화되어 분해됨으로써 NF- κ B와 분리된다. 인산화된 I κ B- α 는 ubiquitin에 의하여 분해되고 유리된 NF- κ B는 핵으로 이동하여 다양한 유전자의 전사를 활성화하는 것으로 알려져 있다[13,14].

다시마로부터 분리된 LLC에 의한 염증 억제에서 NF- κ B 전사 인자의 반응을 확인하기 위하여 RAW 264.7 세포에 NF- κ B promotor 유전자가 포함된 luciferase vector를 transfection 시킨 후 LLC를 LPS와 함께 처리하여 6 시간 배양하여 발광되는 luminescence를 측정하여 NF- κ B의 활성화 정도를 분석하였다. 그 결과, LLC는 LPS에 의한 NF- κ B의 활성화를 농도 의존적으로 억제하는 것으로 나타났다([그림 3-1-9]).



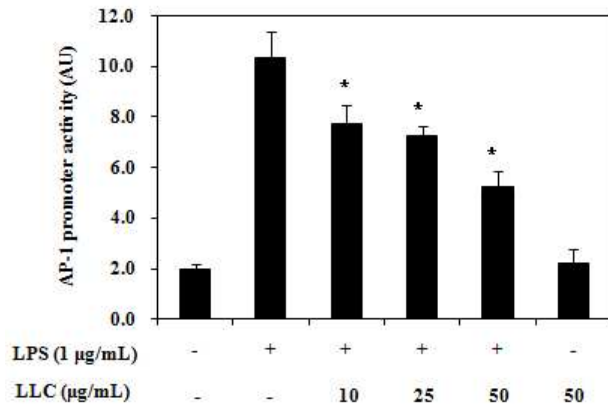
[그림 3-1-9] 다시마로부터 분리한 LLC의 NF- κ B 전사 인자 활성화에 미치는 영향.

LLC에 의한 NF- κ B 전사 인자 활성화 저해가 어떤 단계에서 일어나는지 그 기전을 확인하기 위하여 LLC와 LPS를 처리한 RAW 264.7 세포를 6 시간 배양한 후 세포질 단백질과 핵 단백질로 나누어 회수하여 Wester blot으로 분석했다. [그림 3-1-10]에서 나타난 바와 같이 LPS를 처리한 경우 세포질에서 I κ B- α 와 NF- κ B의 단백질이 감소하고 핵에서 NF- κ B의 양이 증가하였지만 LLC는 LPS에 의한 단백질의 변화를 억제하고 있는 것으로 확인되었다. 이는 LLC가 LPS에 의하여 I κ B- α 가 파괴되고 NF- κ B가 핵으로 이동하는 것을 저해시킨다는 것을 나타내며, LLC는 염증 반응에 의한 NF- κ B의 핵 이동 기전을 저해하여 NF- κ B의 전사활성을 억제시킨다는 것을 의미한다.



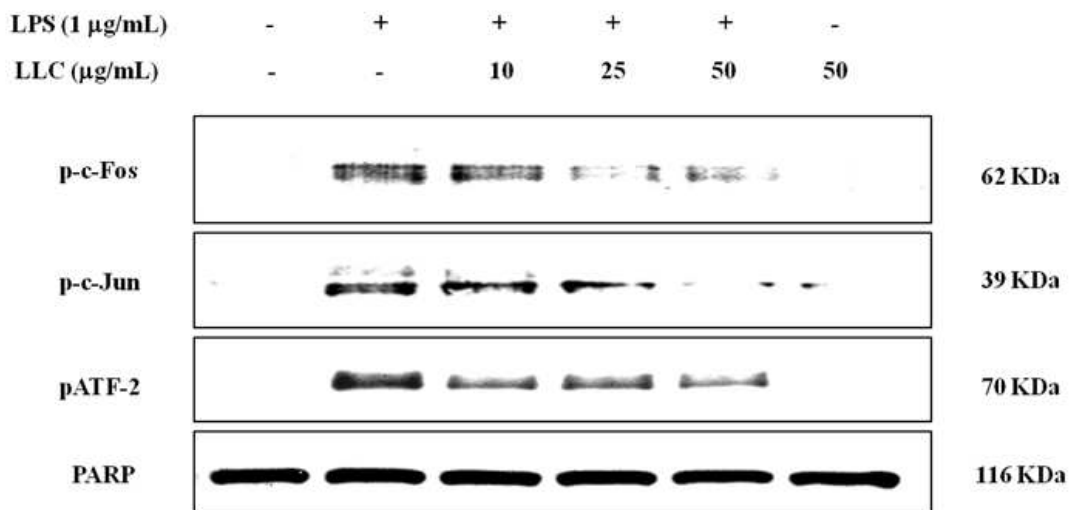
[그림 3-1-10] 다시마로부터 분리한 LLC가 NF- κ B 전사 인자에 미치는 영향. 가, 세포질의 I κ B- α 단백질 발현; 나, 세포질과 핵의 NF- κ B 단백질 발현

AP-1은 Jun, Fos, ATF (activating transcription factor) 등의 복합체로 다양한 외부 자극에 의하여 c-jun, c-fos, ATF 등이 활성화되면 서로 dimerization이 되어 다양한 cytokine의 전사 인자로서 작용하게 된다[15]. 다시마로부터 분리된 LLC에 의한 염증 억제에서 AP-1 전사 인자의 반응을 확인하기 위하여 RAW 264.7 세포에 AP-1 promotor 유전자가 포함된 luciferase vector를 transfection 시킨 후 LLC를 LPS와 함께 처리하여 6 시간 배양하여 발광되는 luminescence를 측정하여 AP-1의 활성화 정도를 분석하였다. 그 결과, LLC는 LPS에 의한 AP-1의 활성화를 농도 의존적으로 억제하는 것으로 나타났다([그림 3-1-11]).



[그림 3-1-11] 다시마로부터 분리한 LLC의 AP-1 전사 인자 활성화에 미치는 영향.

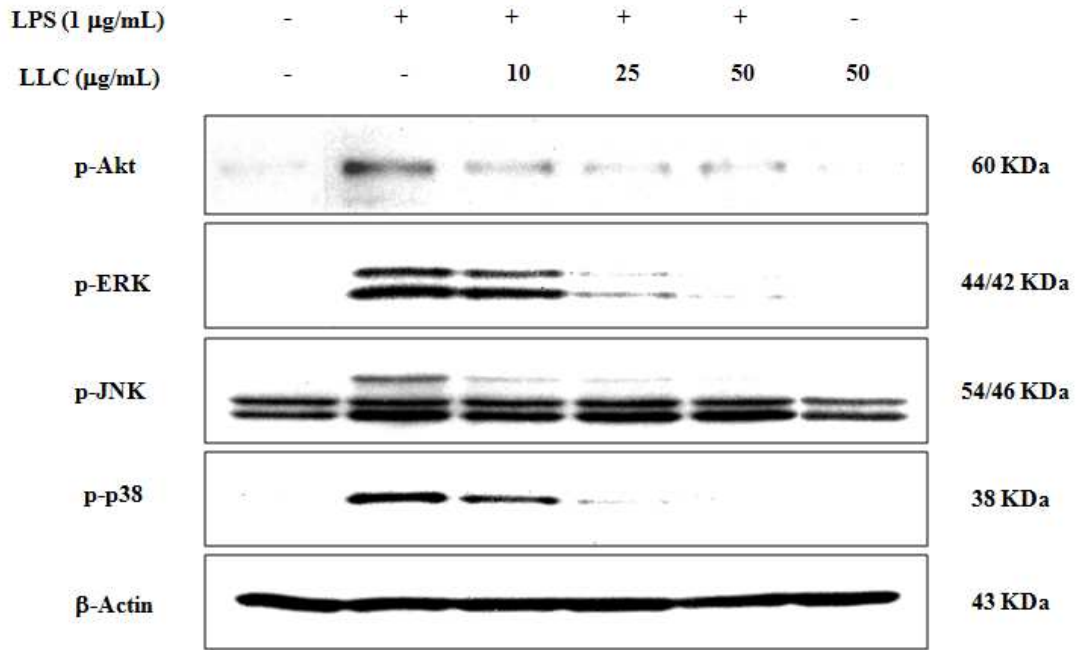
LLC에 의한 AP-1 전사활성 저해가 어떤 단계에서 일어나는지 그 기전을 확인하기 위하여 LLC와 LPS를 처리한 RAW 264.7 세포를 6 시간 배양한 후 핵 단백질을 회수하여 Wester blot으로 분석했다. [그림 3-1-12]에서 나타낸 바와 같이 LPS를 처리한 경우 핵에서 c-Fos, c-Jun 및 ATF2 등 AP-1 구성 단백질의 활성화가 증가하였지만 LLC는 LPS에 의한 AP-1 구성 단백질의 활성화를 억제하고 있는 것으로 확인되었다. 이는 LLC가 LPS에 의한 AP-1 전사 인자의 활성화 저해시킨다는 것을 나타내며, 이를 통하여 AP-1의 전사활성을 억제시킨다는 것을 의미한다.



[그림 3-1-12] 다시마로부터 분리한 LLC가 AP-1 전사 인자에 미치는 영향.

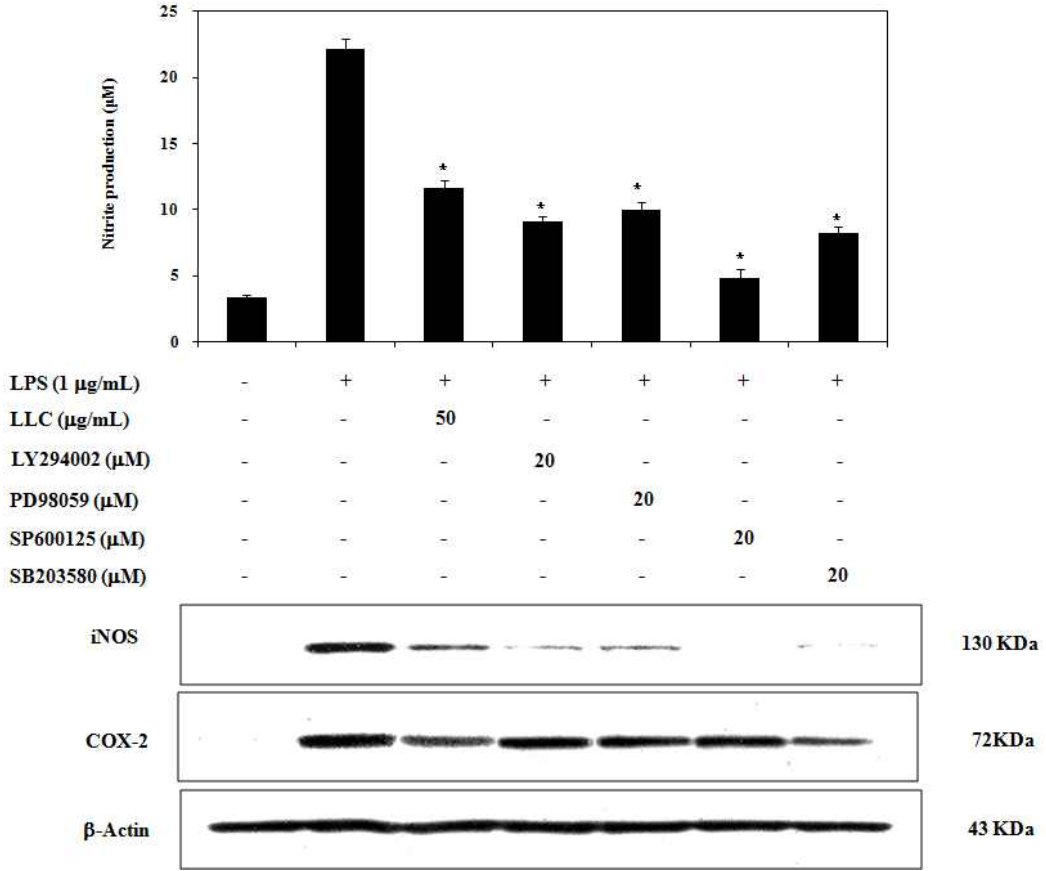
NF- κ B와 AP-1 전사 인자의 활성화는 mitogen-activated protein kinase (MAPK)와 PI3K/Akt pathway에 의해 조절되는 것으로 알려져 있다[16-18]. MAPK 단백질인 ERK (extracellular signal regulated kinase), JNK (c-Jun NH₂-terminal kinase), p38 MAPK는 염증성 유전자의 전사 조절을 증폭하며[19], PI3K와 그 하위 인자인 Akt는 mouse 대식 세포에서 NF- κ B의 활성화를 조절하는 것으로 알려져

있다[17,18]. 본 연구에서는 다시마로부터 분리된 LLC가 어떠한 pathway를 조절하여 NF- κ B와 AP-1 전사 인자의 활성화에 영향을 미치는지 확인하기 위하여 LLC를 LPS와 함께 처리하고 30 분 후 세포내 단백질을 회수하여 각 단백질의 활성화 정도를 분석하였다. 그 결과, LLC는 LPS에 의해 활성화되는 Akt, ERK, JNK, p38을 모두 억제시키는 것으로 나타났다([그림 3-1-13]).



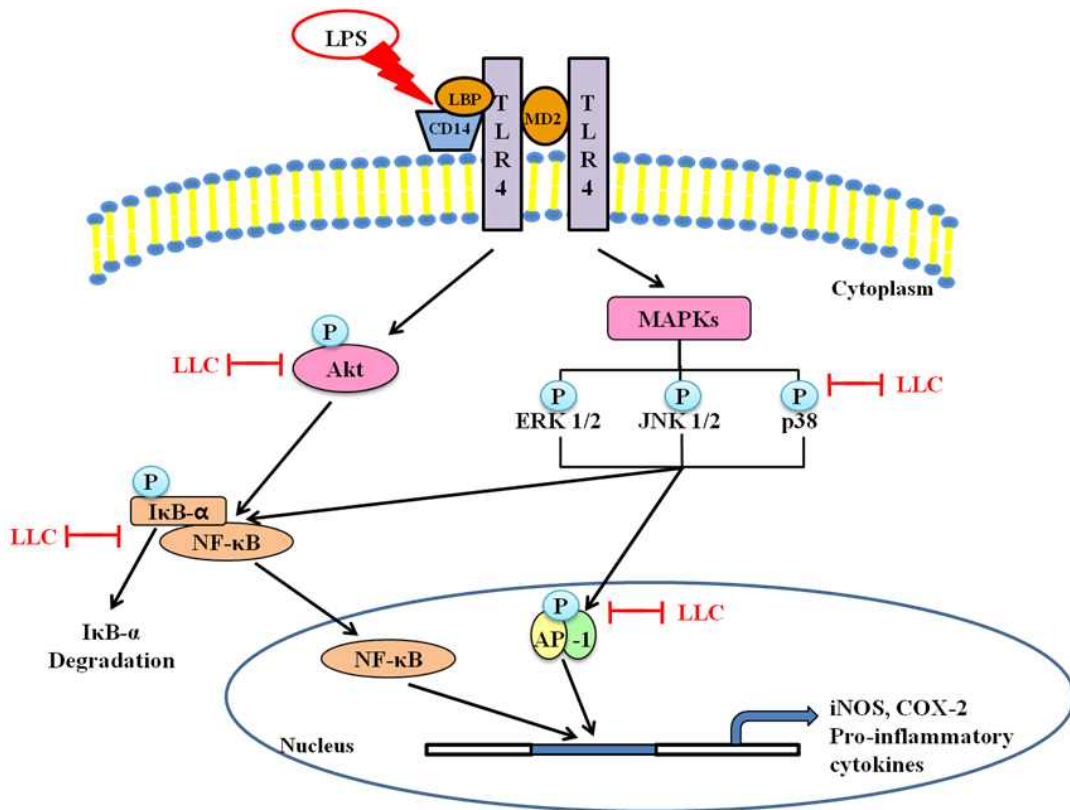
[그림 3-1-13] 다시마로부터 분리된 LLC가 PI3K/Akt와 MAPKs pathway에 미치는 영향.

또한 각각의 단백질에 대한 억제제와 LPS를 처리하여 nitrite 생성량과 iNOS, COX-2 단백질의 발현을 분석하여 염증 반응의 정도를 확인하였다. [그림 3-1-14]에 나타나듯이, Akt와 MAPKs 억제제를 처리하였을 경우 LPS에 의한 nitrite의 생성과 iNOS 단백질의 과발현은 저해되었지만 COX-2 단백질의 과발현은 p38 MAPK을 억제하였을 경우에만 저해되는 것으로 나타났다.



[그림 3-1-14] PI3K/Akt와 MAPKs pathway 억제제와 LLC가 LPS에 의한 염증 반응에 미치는 영향

이것은 p38 MAPK의 활성화가 COX-2 단백질의 발현에 중요한 영향을 미친다는 것을 의미한다. 따라서, LLC는 Akt와 MAPKs를 모두 조절하여 NF- κ B와 AP-1 전사 인자 활성을 저해하고 iNOS와 COX-2 과발현을 억제시킴으로써 항염증 활성을 나타낸다는 결론을 내릴 수 있다([그림 3-1-15]).



[그림 3-1-15] 다시마로부터 분리한 LLC의 항염증 활성 기전.

(2) LPS로 유도된 ICR 마우스에 대한 다시마 추출물의 항염증 활성

(가) 다시마 주정 추출물과 *n*-헥산 분획물의 독성 시험

본 연구에서는 다시마 주정 추출물 및 *n*-헥산 분획물을 항염증 소재로 활용하기 위하여 시료의 급성독성 시험을 ICR계 수컷 마우스를 동물모델로 실험하였다. 시료의 투여는 ICR계 수컷 마우스를 11 군으로 나누어 (n=5) 1 군은 대조군으로 20% propylene glycol을 경구 투여하였고 2-6 군은 다시마 주정추출물 투여군으로 각각 78.125, 156.25, 312.5, 625, 1250 mg/kg bw/day로 경구 투여하였다. 또한 7-11 군은 다시마 *n*-헥산 분획물 투여군으로 각각 78.125, 156.25, 312.5, 625, 1250 mg/kg bw/day로 경구 투여하였다. 급성독성 실험은 시료투여로 인하여 피실험 동물이 사망할 정도의 농도를 설정해야하나, 다시마 주정 추출물과 *n*-헥산 분획물의 용해도가 낮아 부득이 1250 mg/kg bw/day를 최고농도로 설정하였다. 두 그룹의 실험전과 후 모든 개체들의 체중을 측정하여 비교하였으며, 각각의 시료를 4 일간 투여한 후 모든 실험개체들을 에테르로 마취한 다음 해부하여 혈액과 간을 적출하였다. 혈액의 혈청을 분리하여 AST 및 ALT 효소 활성을 측정하여 시료에 의한 간독성을 확인

하였다.

[표 3-1-1]에서 나타남과 같이, 실험전과 후 실험개체들의 체중변화는 17.3%-27.0%까지 감소하는 것으로 나타났다. 대조군을 포함한 모든 실험군들은 실험전후 체중의 변화가 유의적인 차이를 보이며 감소하였으며, 특히 다시마 주정 추출물 1250 mg/kg에 노출된 실험개체들과 *n*-헥산 분획물 1250 mg/kg에 노출된 개체들은 대조군과 비교하여 유의적인 체중 감소가 나타났다. 모든 실험개체들은 실험 종료시기에 체중이 감소하였는데 이는 실험기간 동안의 단식과 약물주입에 따른 스트레스가 원인으로 생각되며, 특히 다시마 주정 추출물 1250 mg/kg과 *n*-헥산 분획물 1250 mg/kg에 노출된 개체들은 스트레스뿐만 아니라 다시마의 독성이 동시에 작용한 것으로 생각된다.

또한, 혈청의 AST, ALT 측정결과에서 나타나듯이 다시마 주정 추출물 625 mg/kg과 1250 mg/kg에 노출된 실험개체들은 정상개체군에 비하여 혈청의 AST와 ALT 효소 활성이 높게 나타났으며 *n*-헥산 분획물에 노출된 실험개체들 중 625 mg/kg과 1250 mg/kg에 노출된 개체들 역시 높은 AST와 ALT 효소 활성 수치가 나타났다([표 3-1-2]).

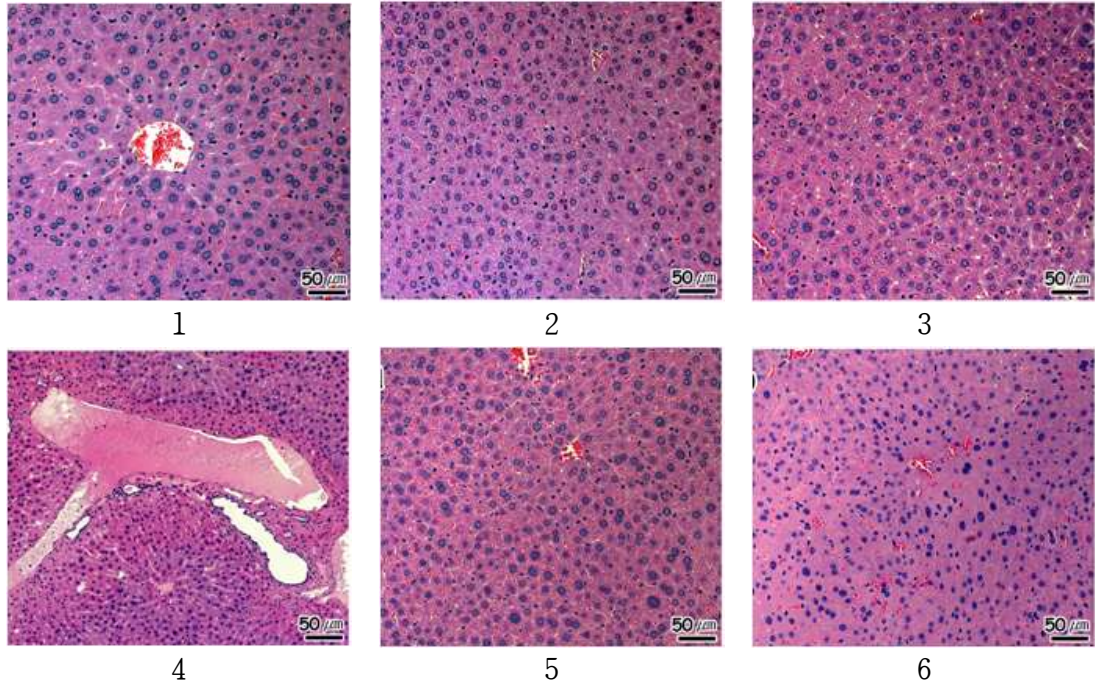
[표 3-1-1] ICR 마우스의 체중 변화

Group (mg/kg bw/day)	Total body weight (g, initial)	Total body weight (g, end-point)	Group	Total body weight (g, initial)	Total body weight (g, end-point)
대조군	28.6 ± 1.0	23.6 ± 2.1	-	-	-
2(78.13)	29.4 ± 1.2	23.6 ± 2.0	7(78.13)	29.1 ± 1.2	23.4 ± 1.6
3(156.3)	28.8 ± 1.4	23.8 ± 1.4	8	28.2 ± 1.4	23.0 ± 0.6
4(312.5)	29.4 ± 1.2	24.2 ± 0.7	9	26.9 ± 1.5	21.9 ± 1.9
5(625)	30.4 ± 1.8	24.7 ± 1.2	10	29.2 ± 1.3	22.1 ± 0.8
6(1250)	28.4 ± 1.6	20.7 ± 0.7	11	29.5 ± 1.0	19.7 ± 0.7

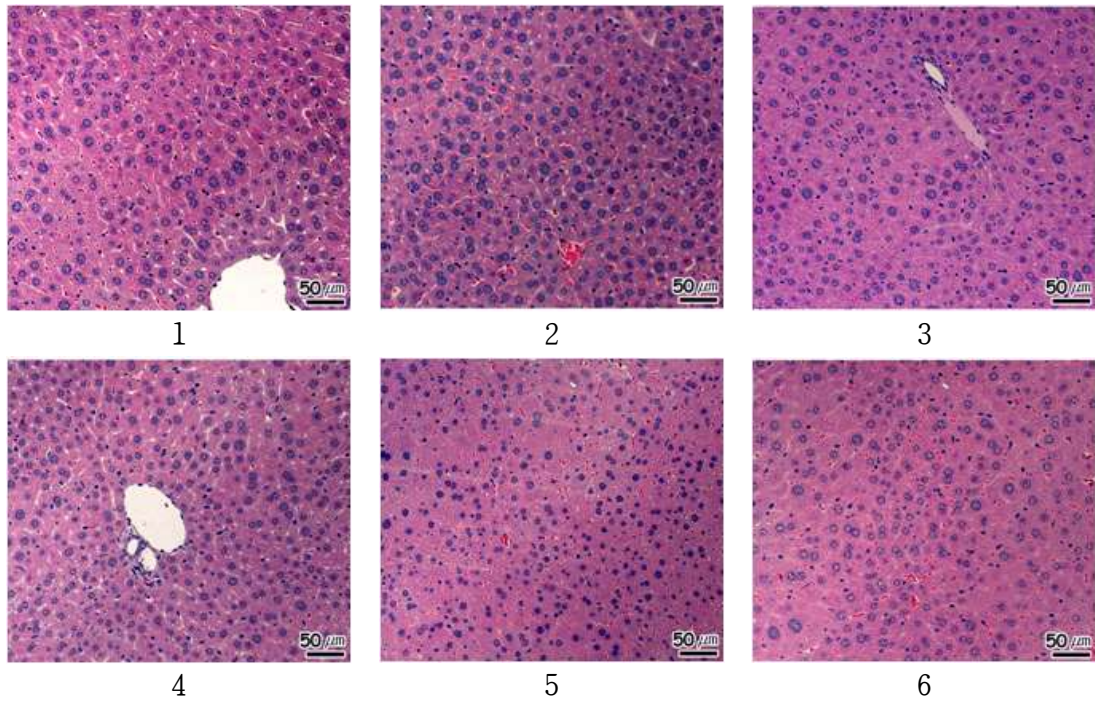
[표 3-1-2] ICR 마우스 혈청의 AST 및 ALT 활성

Group	AST (IU/L)	ALT (IU/L)	Gorup	AST (IU/L)	ALT (IU/L)
1(대조군)	78.7 ± 12.9	26.9 ± 4.9	-	-	-
2(78.13)	77.6 ± 10.7	26.9 ± 12.7	7(78.13)	74.6 ± 11.8	24.6 ± 3.9
3(156.3)	76.6 ± 15.2	31.9 ± 12.2	8(156.3)	84.6 ± 19.8	18.8 ± 7.3
4(312.5)	96.2 ± 15.0	32.8 ± 9.2	9(312.5)	89.2 ± 32.4	29.0 ± 14.3
5(625)	101.8 ± 16.2	43.0 ± 12.2	10(625)	111.2 ± 20.3	38.9 ± 4.3
6(1250)	127.3 ± 20.6	47.5 ± 4.4	11(1250)	129.3 ± 15.4	41.0 ± 8.2

조직병리학적 관찰에서도 다시마 주정 추출물과 *n*-헥산 분획물 78.125, 156.25 및 312.5 mg/kg에 노출된 실험개체들의 간은 대조구와 비슷한 조직상을 보였지만 625 mg/kg 이상의 농도에 노출된 개체들은 조직병리학적인 증상이 관찰되었다. 이들 개체들은 간세포의 핵이 비대되었으며, 세포질이 비균일화되었고, 혈관에는 다량의 혈구가 침착되는 울혈이 관찰되었다([그림 3-1-15], [그림 3-1-16]). 가장 높은 농도인 1250 mg/kg에 노출된 개체들은 핵응축 및 비대, 세포질 팽창이 관찰되었으며([그림 3-1-16], [그림 3-1-17]), 이는 심각한 간독성을 야기했다는 것을 의미하고 있다.



[그림 3-1-16] 다시마 주정 추출물이 투여된 ICR 마우스의 간조직 사진.
 1, 대조군; 2, 78.125 mg/kg; 3, 156.25 mg/kg; 4, 312.5mg/kg;
 5, 625 mg/kg; 6, 1250 mg/kg



[그림 3-1-17] 다시마 *n*-헥산 분획물이 투여된 ICR 마우스의 간조직 사진.
 1, 대조군; 2, 78.125 mg/kg; 3, 156.25 mg/kg; 4, 312.5 mg/kg;
 5, 625 mg/kg; 6, 1250 mg/kg

본 실험 결과는 다시마의 주정추출물과 *n*-헥산 분획물 625 mg/kg 이상을 섭취할 시 간독성을 야기할 수 있다는 것을 의미한다. 따라서 향후 다시마의 항염증 효과를 확인하는 동물 실험시 최고농도를 625 mg/kg 이하로 설정되어야 할 것으로 판단된다.

(나) LPS로 유도된 ICR 마우스의 염증 반응

다시마 추출물의 항염증 효과 연구를 위하여 우선 전신염증을 유발하는 LPS를 ICR계 마우스 수컷에 복강주사하여 염증 반응을 확인하고자 하였다. 시료의 투여는 ICR계 수컷 마우스를 2 군으로 나누어 (n=5) 1 군은 대조군으로 PBS를 복강 주사하였고 2 군은 LPS 투여군으로 2 mg/kg의 LPS를 복강주사하였다. 2 시간 후 모든 실험개체들을 에테르로 마취한 다음 해부하여 혈액과 간, 비장을 적출하였다.

LPS에 의한 염증 반응 정도는 적출한 각 조직내 TNF- α , IL-6 등의 염증성 cytokine의 양을 분석하여 확인하였다. 혈액은 4°C에서 3,000 rpm으로 10 분간 원심 분리하여 혈청을 분리한 후 일정량의 혈청을 ELISA kit로 분석하였다. 간과 비장은 각각 homogenate buffer로 균질화하여 일정량의 lysate를 ELISA kit로 분석하였다. 그 결과, LPS가 투여된 실험군에서 TNF- α 와 IL-6의 양이 증가된 것으로 나타났다 ([표 3-1-3]). 간조직에서 TNF- α 와 IL-6의 양이 각각 1.8 배, 1.3 배 증가한 것에 비하여 혈액과 비장에서는 TNF- α 와 IL-6의 양이 11 배에서 300 배까지 급격히 증가하는 것으로 확인되었다. 이는 LPS의 복강주사에 의하여 각 장기의 조직, 특히 면역과 관련된 비장 조직에서 급성 염증 반응이 일어나고 이에 따라 생성되는 염증성 cytokine들이 혈액을 통하여 운반되어 전신염증으로 유도되고 있다는 것을 의미한다.

[표 3-1-3] ICR 마우스의 각 조직내 염증성 cytokine의 생성량

Tissue	TNF- α (pg/mg)			IL-6 (pg/mg)		
	Control	LPS	fold	Control	LPS	fold
Liver	1028.4	1874.9	1.8	1086.4	1406.5	1.3
Spleen	35.8	1602.0	44.8	86.0	2247.2	26.1
Blood*	22.1	6822.2	308.3	18.5	205.2	11.1

*: pg/ml

ICR 마우스에서 LPS로 유도된 염증 반응에 대한 다시마 추출물의 항염증 활성을 분석하기 위하여 ICR계 수컷 마우스를 5군으로 나누어 (n=5) 1 군은 대조군으로 20% propylene glycol을 경구투여하였고 2군은 실험군으로 20% propylene

glycol을 경구투여하였다. 3-5 군은 다시마 주정추출물 투여군으로 각각 10, 40, 160 mg/kg bw/day로 경구투여하였다. 각각의 시료를 4 일간 투여하고 마지막 시료 투여 후 3 시간 뒤 1 군의 마우스에는 saline을 복강주사하였고 2-5 군의 마우스는 LPS (1 mg/kg)를 복강주사로 투여하였다. 2 시간 후 모든 실험개체들을 에테르로 마취한 후 해부하여 혈액과 간, 비장을 적출하였다.

[표 3-1-4] ICR 마우스의 체중 변화

Group	Total body weight (g, initial)	Total body weight (g, end-point)
1	32.7 ± 1.5	28.7 ± 1.4
2	33.3 ± 1.7	28.5 ± 0.4
3	34.0 ± 1.3	29.0 ± 1.1
4	34.5 ± 1.0	27.9 ± 1.3
5	33.7 ± 0.7	28.8 ± 0.4

[표 3-1-4]에서 나타난바와 같이 실험 개체들의 체중은 감소하였으나 이는 대조군도 함께 감소하고 있으므로 경구투여에 대한 스트레스로 인한 체중 감소로 생각되어지며 각 실험군 간의 체중 감소량에 대하여 유의적인 차이는 나타나지 않았다.

LPS에 의한 염증 반응 및 다시마 주정 추출물의 항염증 활성은 적출한 각 조직내 TNF- α , IL-1 β 등의 염증성 cytokine의 양을 분석하여 확인하였다. 혈액은 4°C에서 3,000 rpm으로 10 분간 원심분리하여 혈청을 분리한 후 일정량의 혈청을 ELISA kit로 분석하였다. 그 결과, LPS가 투여된 실험군에서 TNF- α 와 IL-6의 양이 증가된 것으로 나타났다([표 3-1-5]). 그리고 다시마 주정추출물을 투여한 실험군에서 TNF- α 의 양에는 유의적인 변화가 없었으나 IL-6의 양은 10, 40, 160 mg/kg 모두 유의적으로 감소하는 것으로 나타났다. 이는 LPS의 복강주사에 의하여 급성 염증 반응이 일어나 체내 염증성 cytokine들이 혈액으로 분비되어 전신 염증이 유도되지만 다시마 주정 추출물을 섭취할 경우 이러한 염증 반응이 억제되어 cytokine의 분비량이 감소하고 전신 염증의 발생을 효과적으로 차단할 수 있다는 것을 의미한다.

[표 3-1-5] ICR 마우스의 혈청내 염증성 cytokine의 생성량

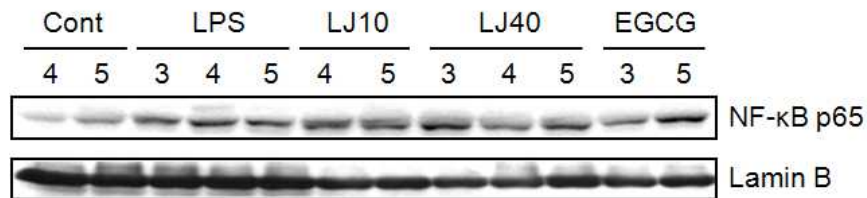
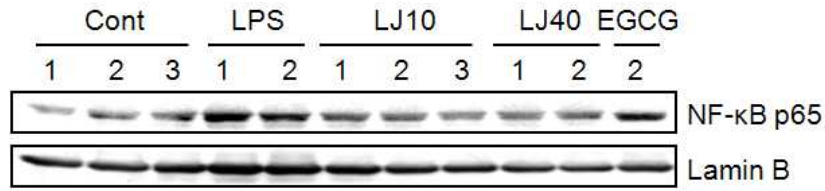
Group	TNF- α (ng/ml)	IL-6 (ng/ml)
1	0.022 \pm 0.042	0.37 \pm 0.07
2	3.59 \pm 1.39	44.59 \pm 7.71
3	4.77 \pm 1.84	30.63 \pm 3.24
4	4.38 \pm 1.64	30.55 \pm 2.77
5	5.09 \pm 1.05	30.82 \pm 2.81

조직내 LPS에 의한 염증 반응 및 다시마 추출물의 항염증 활성을 확인하기 위하여 면역 기능을 담당하고 있는 비장을 homogenate buffer로 균질화하여 일정량의 lysate를 ELISA kit로 분석하였다([표 3-1-6]). 그 결과 LPS를 투여한 실험군에서는 대조군에 비하여 비장내 염증성 cytokine의 생성량이 증가하는 것으로 나타났으며 다시마 주정 추출물을 투여한 실험군에서는 LPS만 투여한 실험군에 비하여 염증성 cytokine의 생성이 억제되고 있음을 확인할 수 있었다. 이러한 결과는 다시마 주정 추출물의 섭취가 LPS에 의해 일어나는 염증 반응을 억제하는 효과가 있다는 것을 의미한다.

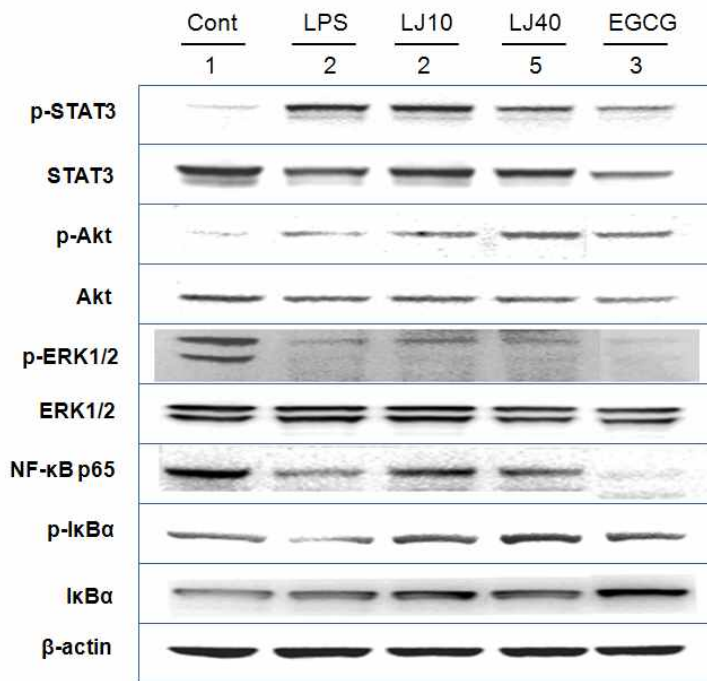
[표 3-1-6] ICR 마우스의 비장 조직내 염증성 cytokine의 생성량

Group	TNF- α (ng/mg)	IL-6 (ng/mg)	IL-1 β (ng/mg)
Control	0.01 \pm 0.05	0.07 \pm 0.08	0.37 \pm 0.07
LPS 처리구	2.46 \pm 0.48	9.57 \pm 0.13	4.62 \pm 0.33
LPS+10 mg/kg	1.73 \pm 0.28	8.34 \pm 0.41	3.93 \pm 0.08
LPS+40 mg/kg	1.49 \pm 0.15	7.29 \pm 0.04	3.25 \pm 0.49
LPS+160 mg/kg	1.76 \pm 0.14	6.81 \pm 1.78	4.24 \pm 0.51

염증관련 유전자의 전사에 주요한 역할을 하는 NF- κ B의 발현변화를 분석하기 위하여 실험동물의 비장조직 중의 NF- κ B의 발현을 Western blot으로 분석하였다([그림 3-1-18], [그림 3-1-19]).



[그림 3-1-18] 비장 핵 추출물에서의 다시마 투여에 따른 염증 조절 전사 인자 NF- κ B 단백질 양의 변화.



[그림 3-1-19] 비장 세포질에서의 다시마 투여에 따른 염증 신호 전달 단백질의 인산화 및 양의 변화.

(3) LPS로 유도된 ICR 마우스에 대한 다시마 추출물의 항치매 활성

Microglia 세포는 뇌의 대식세포로 LPS 또는 interferon- γ (INF- γ)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-1 β , IL-6)등은 Alzheimer's disease, Parkinson's disease, trauma, sclerosis, cerebral ischemia 등과 같은 neurodegenerative disease의 병리학 적 지표가 된다[20]. 이전의 실험에서 다시마 주정 추출물과 *n*-헥산과 디클로로메탄 분획물이 macrophage에서 일어나는 염증 반응을 효과적으로 억제하는 것으로 확인 되었다. 따라서 본 연구에서는 다시마 추출물이 ICR 마우스의 뇌세포에서 염증 반응에 어떠한 영향을 미치는지 알아보기 위하여 분석하였다.

(가) LPS로 유도된 ICR 마우스 뇌의 염증 반응

다시마 추출물의 항치매 효과 연구를 위하여 우선 전신염증을 유발하는 LPS를 ICR계 마우스 수컷에 복강주사하여 뇌에서 일어나는 염증 반응을 확인하고자 하였다. 시료의 투여는 ICR계 수컷 마우스를 2 군으로 나누어 (n=5) 1 군은 대조군으로 PBS를 복강주사하였고 2 군은 LPS 투여군으로 2 mg/kg의 LPS를 복강주사하였다. 2 시간 후 모든 실험개체들을 에테르로 마취한 다음 해부하여 혈액과 뇌를 적출하였다.

LPS에 의한 염증 반응 정도는 적출한 각 조직내 TNF- α , IL-1 β 등의 염증성 cytokine의 양을 분석하여 확인하였다. 혈액은 4°C에서 3,000 rpm으로 10 분간 원심분리하여 혈청을 분리한 후 일정량의 혈청을 ELISA kit로 분석하였다. 뇌는 각각 homogenate buffer로 균질화하여 일정량의 lysate를 ELISA kit로 분석하였다. 그 결과, LPS가 투여된 실험군에서 TNF- α 와 IL-1 β 의 양이 증가된 것으로 나타났다 ([표 3-1-7]). 뇌에서 TNF- α 와 IL-1 β 의 양이 각각 4.0 배, 1.8 배 증가한 것에 비하여 혈액에서는 TNF- α 와 IL-1 β 의 양이 각각 300 배, 11 배로 급격히 증가하는 것으로 확인되었다. 이는 LPS의 복강주사에 의하여 ICR 마우스의 뇌 조직에서 급성 염증이 유발된다는 것을 의미한다.

이러한 결과를 바탕으로 현재 LPS로 유도된 ICR 마우스 뇌의 염증 반응에 대한 다시마 추출물의 효과를 분석하기 위하여 다시마 주정 추출물과 *n*-헥산 분획물이 경구투여된 ICR 마우스의 염증성 cytokine의 발현 분석과 iNOS, COX-2 단백질 및 mRNA 분석을 진행하고 있다.

[표 3-1-7] ICR 마우스의 뇌 조직 내 염증성 cytokine의 생성량

Tissue	TNF- α (pg/mg)			IL-1 β (pg/mg)		
	Control	LPS	fold	Control	LPS	fold
Brain	14.2	56.4	4.0	33.8	62.5	1.8
Blood*	22.1	6822.2	308.3	18.5	205.2	11.1

*: pg/ml

(4) 다시마로부터 분리된 획분의 미백 활성

(가) 다시마 추출물이 tyrosinase 활성에 미치는 영향

피부에서 생성되는 멜라닌은 과도한 자외선 노출로부터 DNA의 손상을 보호하고 photocarcinogenesis를 억제한다. 하지만 과도한 멜라닌의 생성은 hyperpigmentation을 유발함으로써 피부 미용에 역효과를 나타낸다. 이에 따라 미백 효과에 대한 관심이 증가하면서 천연물로부터 멜라닌 생성을 조절할 수 있는 물질에 대한 연구가 활발히 진행되고 있다. 본 연구진은 다시마 추출물의 미백 활성을 연구하기 위하여 멜라닌 생성에 있어서 특이적인 반응을 보이는 마우스 유래의 B16F10 melanoma cell을 사용하여 실험을 진행하였다.

다시마 추출물의 미백 활성을 검색하기 위하여 멜라닌 생성에 중요한 역할을 하는 tyrosinase 효소 활성에 대한 영향을 실험하였다. B16 세포를 3 일간 배양한 후 세포를 회수하여 0.5% NP-40이 포함된 0.1 M phosphate buffer (pH 6.8)로 균질화한 후 13,000 g에서 10 분간 원심분리하여 상층액의 lysate를 추출하였다. Tyrosinase 효소 활성은 일정량의 lysate와 다시마 추출물, L-DOPA 용액을 넣고 37°C에서 1 시간동안 반응시킨 후 475 nm에서 흡광도를 측정하여 확인하였다[2]. [표 3-1-8]에 나타낸 바와 같이 다시마 주정 추출물과 유기용매 분획물은 저해 효과가 없는 것으로 나타났다.

[표 3-1-8] 다시마 추출물이 포유류 세포의 tyrosinase 활성에 미치는 영향

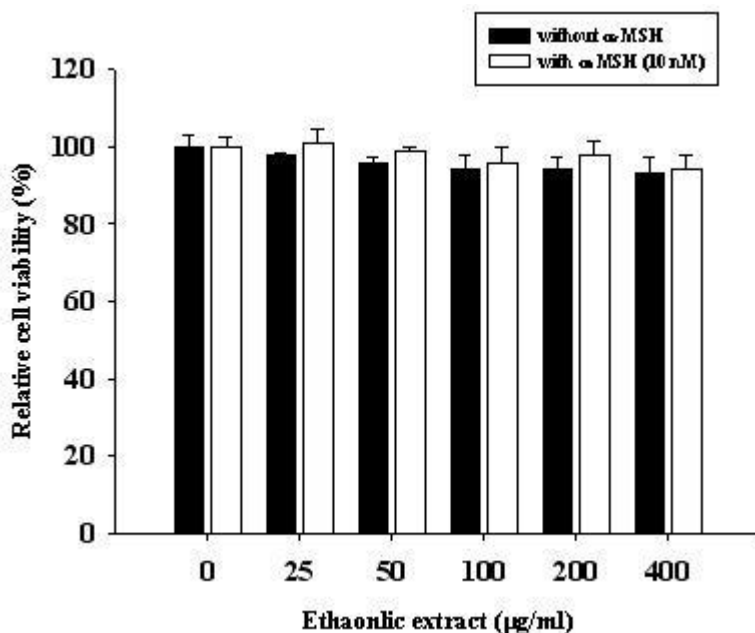
Sample	IC ₅₀ (ug/ml)
EtOH	400 <
<i>n</i> -Hexane	200 <
CH ₂ Cl ₂	200 <
EtOAc	200 <
<i>n</i> -BuOH	200 <
H ₂ O	200 <

(나) 다시마 주정 추출물의 멜라닌 생성 저해 효과

피부세포에서 멜라닌이 형성되는 과정은 α -melanomacyte stimulating hormone (α -MSH)의 자극에 의하여 G protein, adenylyl cylcase가 차례로 활성화되어 세포내 cyclic AMP (cAMP)의 생성을 촉진시킨다. cAMP는 protine kinase A (PKA)와 cAMP responseive element binding protein (CREB)를 활성화시켜 microphtahlmia-associated transcription factor (MITF)의 발현을 증가시키고 MITF는

멜라닌 형성에 중요한 역할을 하는 tyrosinase, tyrosinase related protein (TRP)-1, TRP-2 효소의 발현을 증가시킨다 [21-23]. 따라서 MITF 전사 인자의 발현을 조절하여 멜라닌 형성과 관련된 효소들의 발현을 억제시킴으로써 멜라닌 생성을 저해시킬 수 있는 천연물에 대한 연구가 많이 이루어지고 있다[22,24].

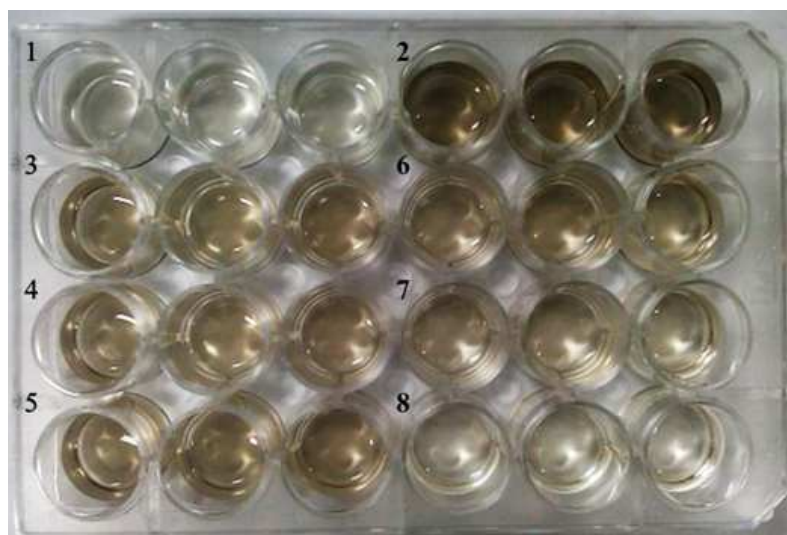
본 연구에서도 다시마 주정 추출물이 B16 세포내 멜라닌 생성에 어떠한 영향을 미치는지 확인하기 위하여 우선 시료를 세포에 처리하고 24 시간 배양한 후, MTS assay를 통하여 세포 생존률에 미치는 영향을 확인하였다. 또한 시료를 세포에 처리하고 1 시간 배양한 후, 10 nM의 α -MSH를 처리하여 24 시간 배양하여 MTS assay를 통하여 세포 생존률에 미치는 영향을 확인하였다. 그 결과 다시마 주정 추출물은 400 ug/ml의 농도까지 B16 세포의 생존률에 유의적인 영향을 미치지 않는 것으로 나타났다(그림 3-1-20).



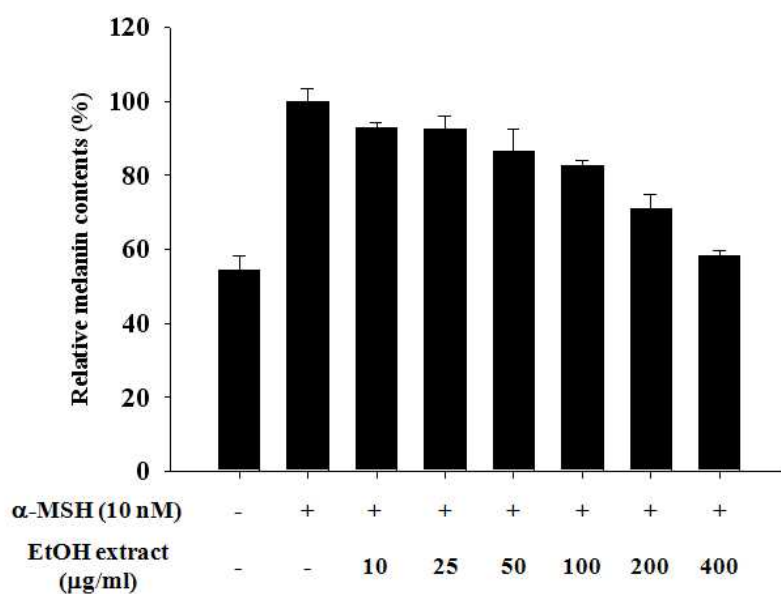
[그림 3-1-20] 다시마 주정 추출물이 B16 세포의 생존률에 미치는 영향.

다시마 주정 추출물의 세포내 멜라닌 생성에 미치는 영향을 확인하기 위하여 세포에 시료를 처리하고 1 시간 배양한 후, 10 nM의 α -MSH를 처리하여 72 시간 배양하였다. 세포내 멜라닌 함량은 Tsuboi 등 [2]의 방법을 참고하여 실험하였다. 회수된 세포를 2 N NaOH에 녹인 후, 60°C에서 30 분간 가열하고 13,000 g에서 10 분간 원심분리 후 405 nm에서 흡광도를 측정하여 세포내 멜라닌 생성량을 비교하였다. [그림 3-1-21]와 [그림 3-1-22]에서 나타나듯이 다시마 주정 추출물은 α -MSH에 의한 멜라닌 과다 생성을 농도 의존적으로 억제시키는 것으로 확인되었다. 이러한 결과는 다시마 주정 추출물이 tyrosinase 효소 활성화에는 직접적인 영향을 미치지

못하지만 세포내에서 일어나는 여러 가지 신호 전달 과정을 조절하여 멜라닌 합성과 관련된 효소의 발현에 영향을 미쳐 세포내 멜라닌 생성을 저해시킨다는 것을 의미한다.

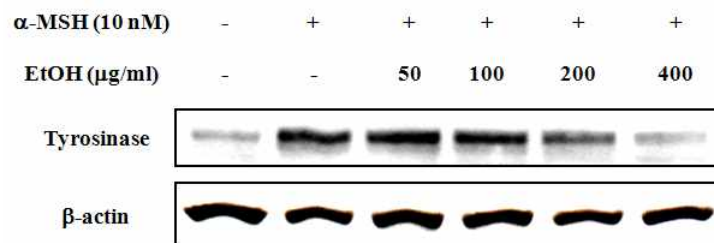


[그림 3-1-21] 다시마 주정 추출물이 B16 세포의 멜라닌 생성에 미치는 영향.
 1, 대조군; 2, α -MSH 처리군; 3, α -MSH와 다시마 주정 추출물 10 μ g/ml 처리군; 4, α -MSH와 다시마 주정 추출물 25 μ g/ml 처리군; 5, α -MSH와 다시마 주정 추출물 50 μ g/ml 처리군;
 6, α -MSH와 다시마 주정 추출물 100 μ g/ml 처리군;
 7, α -MSH와 다시마 주정 추출물 200 μ g/ml 처리군;
 8, α -MSH와 다시마 주정 추출물 400 μ g/ml 처리군



[그림 3-1-22] B16 세포내 멜라닌 함량.

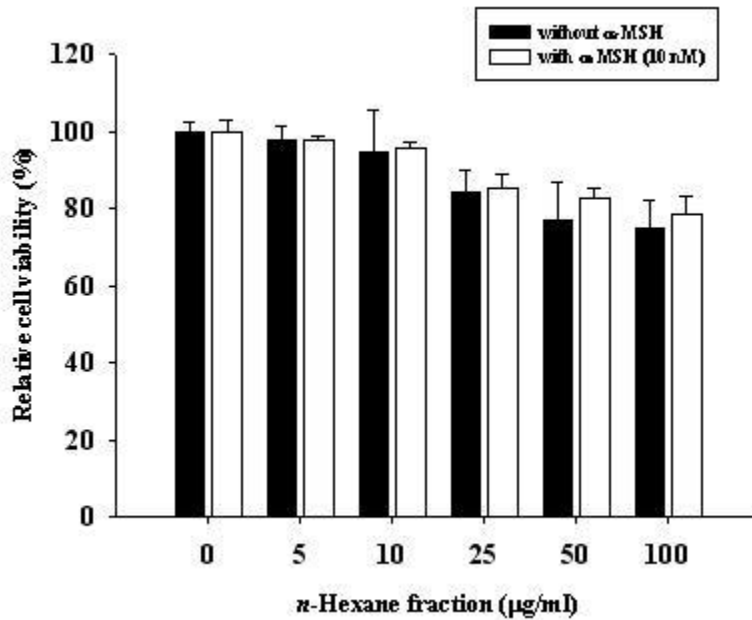
다시마 주정 추출물의 멜라닌 생성 억제와 관련하여 멜라닌 생성에 중요한 역할을 하는 tyrosinase 효소의 발현을 분석하였다. B16 세포에 다시마 주정 추출물을 1 시간 전처리한 후, 10 nM의 α -MSH를 처리하여 3 일간 배양하여 세포내 단백질을 추출하여 Western blot으로 세포내 tyrosinase 효소 단백질의 발현양을 비교하였다. [그림 3-1-23]에 나타난 바와 같이 α -MSH를 처리하였을 때 세포내 tyrosinase 효소 단백질의 발현이 증가하였지만 다시마 주정 추출물에 의하여 농도 의존적으로 발현이 감소되는 것으로 나타났다. 이전의 실험 결과에서 다시마 추출물은 tyrosinase 효소의 활성에는 영향을 미치지 못하였으나 본 실험에서는 다시마 주정 추출물이 세포내 tyrosinase 효소 단백질의 발현을 억제하고 있으며 이는 다시마 주정 추출물이 세포내 신호전달 과정을 조절하여 tyrosinase 효소 단백질의 발현을 감소시킴으로써 세포내 멜라닌 생성을 억제하고 있다는 것을 의미한다. 이 실험 결과를 토대로 다시마 주정 추출물 중 멜라닌 합성 억제 효과가 뛰어난 획분을 얻기 위하여 유기용매로 분획하여 미백 효과를 분석하였다.



[그림 3-1-23] B16 세포내 tyrosinase 효소 단백질의 발현양.

(다) 다시마 *n*-hex산 분획물의 멜라닌 생성 저해 효과

본 연구에서는 다시마 *n*-hex산 분획물이 B16 세포내 멜라닌 생성에 어떠한 영향을 미치는지 확인하기 위하여 우선 시료를 세포에 처리하고 24 시간 배양한 후, MTS assay를 통하여 세포 생존률에 미치는 영향을 확인하였다. 또한 시료를 세포에 처리하고 1 시간 배양한 후, 10 nM의 α -MSH를 처리하여 24 시간 배양하여 MTS assay를 통하여 세포 생존률에 미치는 영향을 확인하였다. 그 결과 다시마 *n*-hex산 분획물은 100 μ g/ml의 농도까지 B16 세포의 생존률에 유의적인 영향을 미치지 않는 것으로 나타났다([그림 3-1-24]).



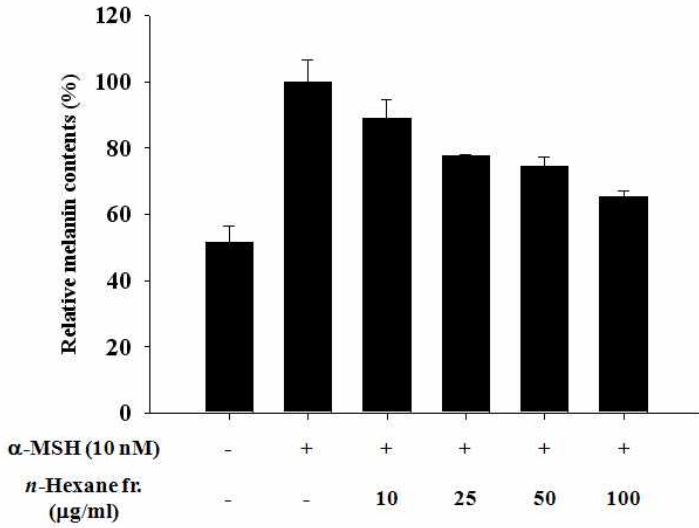
[그림 3-1-24] 다시마 *n*-헥산 분획물이 B16 세포의 생존률에 미치는 영향.

다시마 *n*-헥산 분획물의 세포내 멜라닌 생성에 미치는 영향을 확인하기 위하여 세포에 시료를 처리하고 1 시간 배양한 후, 10 nM의 α -MSH를 처리하여 72 시간 배양하였다. 회수된 세포를 2 N NaOH에 녹인 후, 60°C에서 30 분간 가열하고 13,000 g에서 10 분간 원심분리 후 405 nm에서 흡광도를 측정하여 세포내 멜라닌 생성량을 비교하였다. [그림 3-1-25]와 [그림 3-1-26]에서 나타나듯이 다시마 *n*-헥산 분획물은 α -MSH에 의한 멜라닌 과다 생성을 농도 의존적으로 억제시키는 것으로 확인되었다.

α -MSH (10 nM)	-	+	+	+	+	+	+
<i>n</i> -Hexane fr. (µg/ml)	-	-	5	10	25	50	100

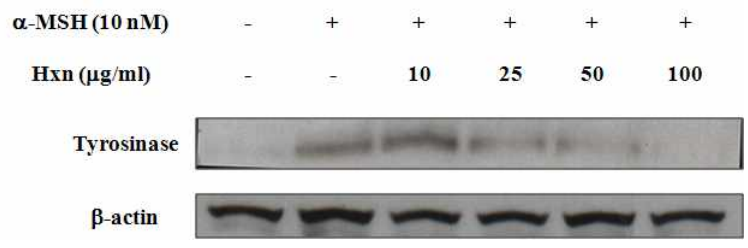


[그림 3-1-25] 다시마 *n*-헥산 분획물이 B16 세포의 멜라닌 생성에 미치는 영향.



[그림 3-1-26] B16 세포내 멜라닌 함량.

다시마 *n*-헥산 분획물의 멜라닌 생성 억제와 관련하여 멜라닌 생성에 중요한 역할을 하는 tyrosinase 효소의 발현을 분석하였다. B16 세포에 다시마 *n*-헥산 분획물을 1 시간 전처리한 후, 10 nM의 α -MSH를 처리하여 3 일간 배양하여 세포내 단백질을 추출하여 Western blot으로 세포내 tyrosinase 효소 단백질의 발현양을 비교하였다. [그림 3-1-27]에 나타난 바와 같이 α -MSH를 처리하였을 때 세포내 tyrosinase 효소 단백질의 발현이 증가하였지만 다시마 *n*-헥산 분획물에 의하여 농도 의존적으로 발현이 감소되는 것으로 나타났다. 이전의 실험 결과에서 다시마 추출물은 tyrosinase 효소의 활성화에는 영향을 미치지 못하였으나 본 실험에서는 다시마 *n*-헥산 분획물이 세포내 tyrosinase 효소 단백질의 발현을 억제하고 있으며 이는 다시마 *n*-헥산 분획물이 세포내 신호전달 과정을 조절하여 tyrosinase 효소 단백질의 발현을 감소시킴으로써 세포내 멜라닌 생성을 억제하고 있다는 것을 의미한다.

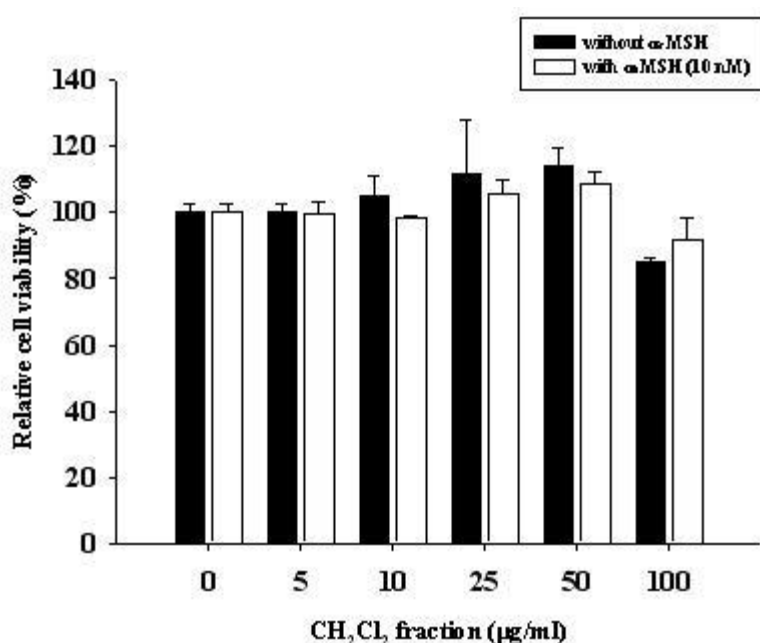


[그림 3-1-27] B16 세포내 tyrosinase 효소 단백질의 발현양.

(라) 다시마 디클로로메탄 분획물의 멜라닌 생성 저해 효과

본 연구에서는 다시마 디클로로메탄 분획물이 B16 세포내 멜라닌 생성에 어떠한 영향을 미치는지 확인하기 위하여 우선 시료를 세포에 처리하고 24 시간 배

양한 후, MTS assay를 통하여 세포 생존률에 미치는 영향을 확인하였다. 또한 시료를 세포에 처리하고 1 시간 배양한 후, 10 nM의 α -MSH를 처리하여 24 시간 배양하여 MTS assay를 통하여 세포 생존률에 미치는 영향을 확인하였다. 그 결과 다시마 디클로로메탄 분획물은 100 ug/ml의 농도까지 B16 세포의 생존률에 유의적인 영향을 미치지 않는 것으로 나타났다([그림 3-1-28]).



[그림 3-1-28] 다시마 디클로로메탄 분획물이 B16 세포의 생존률에 미치는 영향.

다시마 디클로로메탄 분획물의 세포내 멜라닌 생성에 미치는 영향을 확인하기 위하여 세포에 시료를 처리하고 1 시간 배양한 후, 10 nM의 α -MSH를 처리하여 72 시간 배양하였다. 회수된 세포를 2 N NaOH에 녹인 후, 60°C에서 30 분간 가열하고 13,000 g에서 10 분간 원심분리 후 405 nm에서 흡광도를 측정하여 세포내 멜라닌 생성량을 비교하였다. [그림 3-1-29]와 [그림 3-1-30]에서 나타나듯이 다시마 디클로로메탄 분획물은 α -MSH에 의한 멜라닌 과다 생성을 농도 의존적으로 억제시키는 것으로 확인되었다. 이러한 결과는 다시마 디클로로메탄 분획물이 tyrosinase 효소 활성화에는 직접적인 영향을 미치지 못하지만 세포에서 일어나는 여러 가지 신호 전달 과정을 조절하여 멜라닌 합성과 관련된 효소의 발현에 영향을 미쳐 세포내 멜라닌 생성을 저해시킨다는 것을 의미하며 추후 단백질과 mRNA 분석 등의 추가 실험을 통하여 다시마 디클로로메탄 분획물이 어떤 신호 전달 과정을 조절하는지 밝혀낼 계획이다.

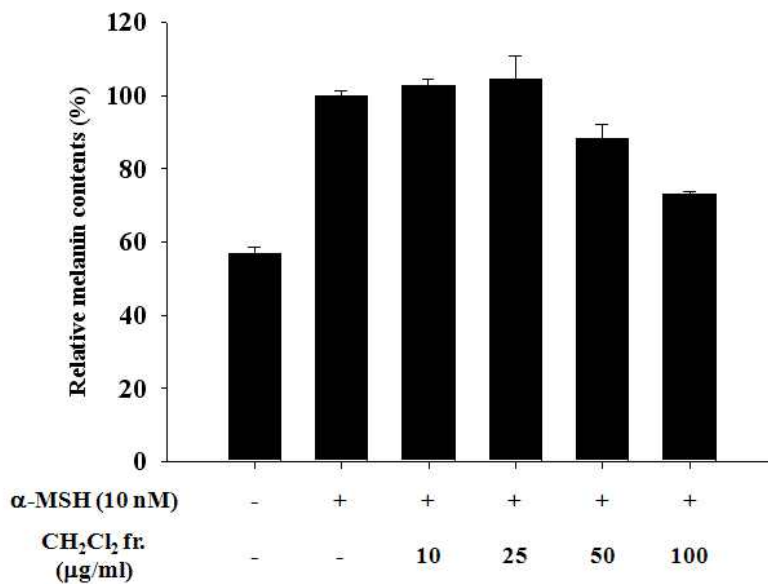
이상과 같은 결과를 바탕으로 다시마 *n*-헥산 분획물을 이용하여 미백 효과가 있는 화장품과 세제 등을 차기 연도에 시제품을 제조하여 임상 실험을 할 예정

이며 제품화로 인한 부가가치를 창출할 예정이다.

α -MSH (10 nM)	-	-	+	+	+	+	+
CH ₂ Cl ₂ fr. (μg/ml)	-	-	5	10	25	50	100



[그림 3-1-29] 다시마 디클로로메탄 분획물이 B16 세포의 멜라닌 생성에 미치는 영향.



[그림 3-1-30] B16 세포내 멜라닌 함량.

나. 참모자반 추출물의 생리활성

(1) 참모자반 추출물의 항비만 활성

우리나라에서도 지난 10여년간 과체중 및 비만 인구가 급증하여 전체인구의 35% 가량이 과체중인 것으로 국민건강보험공단에서 발표하였다. 비만의 근본적인 유발원인은 에너지 섭취량과 소비량의 불균형에서 기인하는 것으로 유전, 환경을 포함하는 여러 가지 요인들이 복합저긴 영향을 미친다. 특히 생활환경의 변화와 고

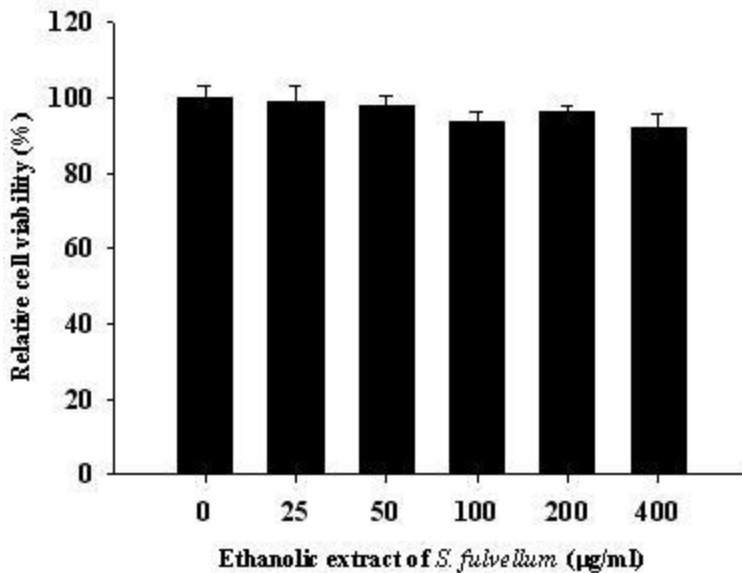
령화 사회의 진입으로 비만 관련 질병의 예방과 치료를 위하여 자연 식품에서 그 해법을 찾으려는 연구가 고조되고 있다. 이러한 시대적 추세에 부응하여 참모자반의 저분자 화합물에 의한 항비만 효과를 분석하였다.

(가) 참모자반 주정 추출물의 항비만 효과

① 참모자반 주정 추출물의 3T3-L1 세포의 분화 억제 효과

본 연구개발에 사용된 3T3-L1 세포는 일종의 줄기 세포로써 지방세포로 분화되게 되며 항비만 활성을 측정하기 위하여 주로 사용되는 세포주이다. 이 세포는 분화 유도제를 처리하면 지방세포로 분화된다. 우선 3T3-L1 세포는 분화 전에는 10% calf serum이 함유된 DMEM에서 배양하였다. 분화를 유도하기 전에 confluent 상태가 된 이후에 2-3 일정도 더 배양한 후, 3T3-L1 세포에 시료와 함께 3-isobutyl-1-methylxanthine (IBMX), dexamethasone 및 insulin (MDI)과 함께 처리하여 시료에 의한 지방세포 분화 저해효과를 분석하였다.

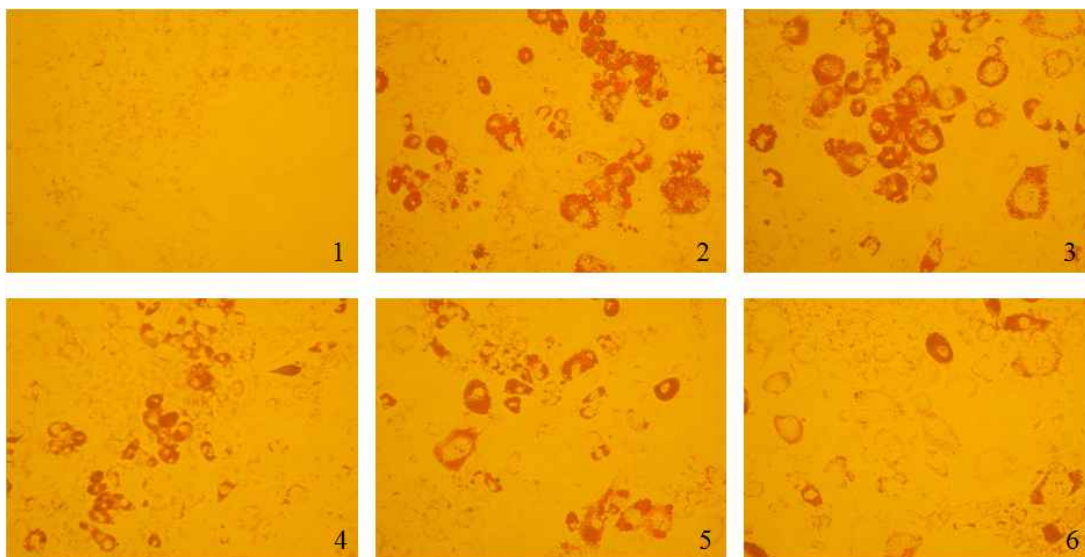
우선 3T3-L1 세포에 참모자반 주정 추출물을 처리하여 24 시간 배양한 후 MTS assay로 세포 생존율을 측정하였다. [그림 3-1-31]의 결과를 통해 참모자반 주정 추출물은 400 ug/ml의 농도 내에서는 세포 생존율에 영향을 미치지 않는다는 것을 확인할 수 있었다.



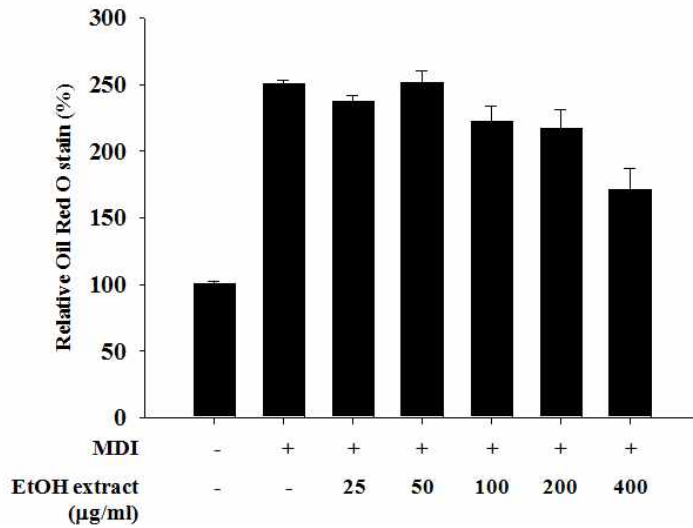
[그림 3-1-31] 참모자반 주정 추출물이 3T3-L1 세포의 생존율에 미치는 영향.

3T3-L1 세포에 참모자반 주정 추출물을 MDI와 함께 처리하여 9 일째에 세포를 PBS에 두 번 씻어 내고 10% 포르말데히드 용액으로 고정시킨 후 Oil-Red O

염색법으로 세포내 지방을 염색하였다. 그 후 세포를 위상차 현미경 (Olympus Optical Co., Tokyo, Japan)으로 관찰하고 Olympus digital video camera로 촬영하여 그림으로 나타내었다([그림 3-1-32]). 또한 세포를 lysis buffer (50 mM sodium phosphate, 2 mM EDTA, 2 M NaCl, pH 7.4)로 회수하여 40 watt에서 5 초간 2 번 sonication하였다. 세포 파쇄액을 14,000 rpm에서 10 분간 원심분리 한 후 Oil-Red O 염색법으로 염색하고 500 nm에서 흡광도를 측정하여 지방 함량을 비교 하였다. 그 결과 참모자반 주정 추출물은 농도 의존적으로 3T3-L1 세포내 지방 함량을 감소시키는 것으로 나타났다([그림 3-1-33]). 이러한 결과는 참모자반 주정 추출물이 지방 세포로의 분화에 관련된 신호 전달 과정을 조절하거나 또는 지방 세포내 지방 합성 관련된 효소들에 관여하여 지방의 생성을 억제시킬 수 있다는 것을 나타낸다.



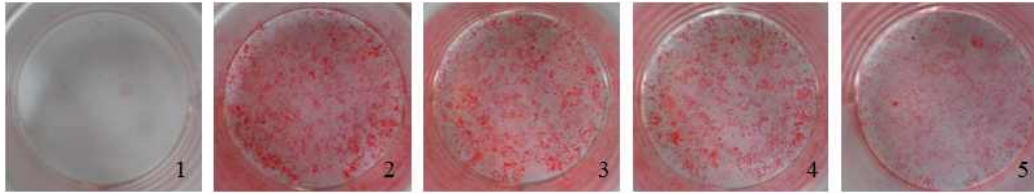
[그림 3-1-32] 참모자반 주정 추출물이 3T3-L1 세포내 지방 합성에 미치는 영향.
 1, 대조군; 2, MDI 처리군; 3, MDI + 50 ug/ml;
 4, MDI + 100 ug/ml; 5, MDI + 200 ug/ml;
 6, MDI + 400 ug/ml



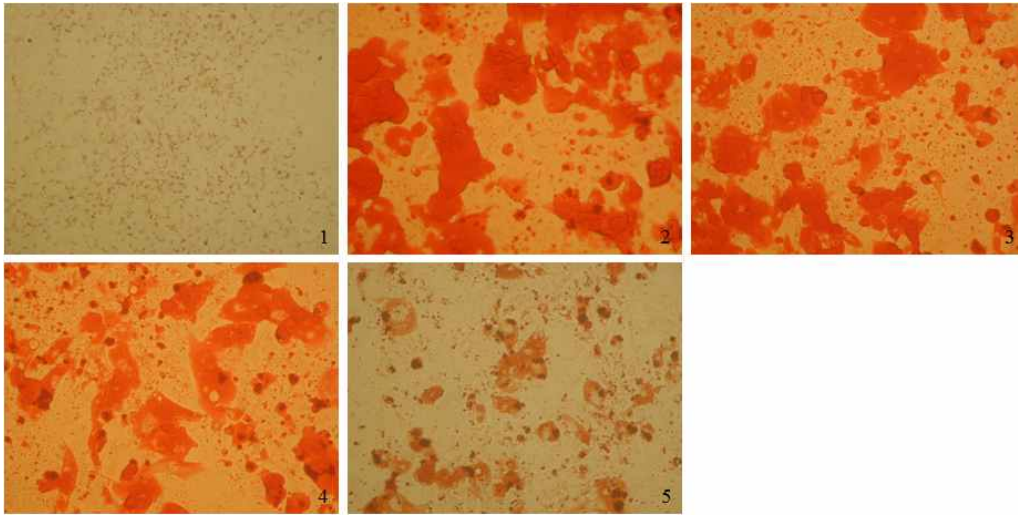
[그림 3-1-33] 참모자반 주정 추출물이 처리된 3T3-L1 세포내 지방 합량.

② 참모자반 주정 추출물의 지방 합성 억제 효과

참모자반 주정 추출물의 항비만 효과를 분석하기 위하여 3T3-L1 세포에 5일간 MDI를 처리하여 지방세포로 분화시킨 후, 다시 참모자반 주정 추출물과 인슐린이 첨가된 배지를 세포에 7일간 처리하여 분화된 3T3-L1 세포내에서 지방 합성 억제 효과를 확인하고자 하였다. 세포를 PBS에 두 번 씻어 내고 10% 포르말데히드 용액으로 고정시킨 후 Oil-Red O 염색법으로 세포내 지방을 염색하였다. 그 후 세포를 위상차 현미경으로 관찰하고 Olympus digital video camera로 촬영하여 그림으로 나타내었다([그림 3-1-34]). 또한 세포를 lysis buffer (50 mM sodium phosphate, 2 mM EDTA, 2 M NaCl, pH 7.4)로 회수하여 40 watt에서 5 초간 2 번 sonication하였다. 세포 파쇄액을 14,000 rpm에서 10 분간 원심분리 한 후 Oil-Red O 염색법으로 염색하고 500 nm에서 흡광도를 측정하여 지방 합량을 비교 하였다. 그 결과 참모자반 주정 추출물은 농도 의존적으로 3T3-L1 세포내 지방 합성을 저해시키는 것으로 나타났다([그림 3-1-35]). 이러한 결과는 참모자반 주정 추출물이 지방 세포로의 분화된 세포에서 지방 합성과 관련된 신호 전달 과정에 관여하여 지방의 생성을 억제시킬 수 있다는 것을 나타낸다.

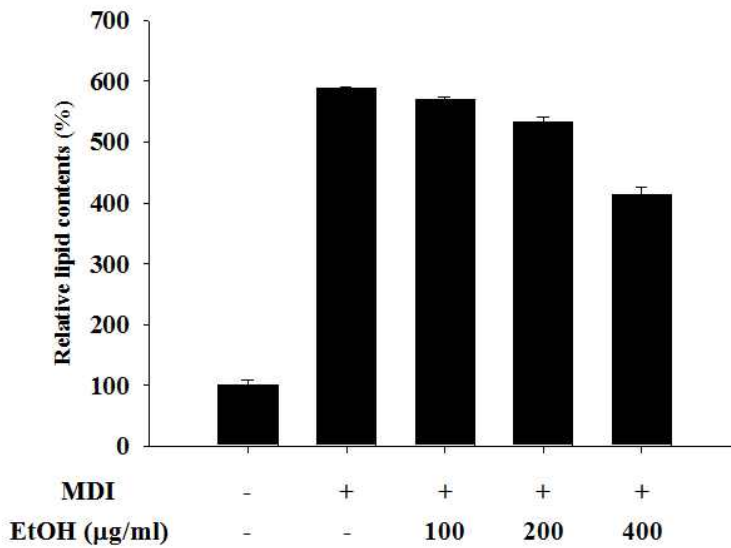


가



나

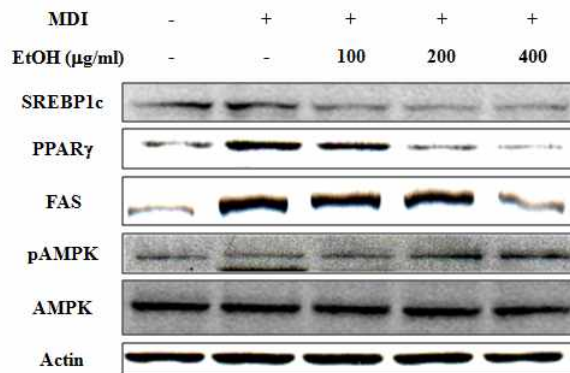
[그림 3-1-34] 참모자반 주정 추출물이 3T3-L1 세포내 지방 합성에 미치는 영향.
 가, Oil Red O stain으로 염색된 세포의 사진; 나, Oil Red O stain으로 염색된 세포의 현미경 사진; 1, 대조군; 2, MDI 처리군; 3, MDI + 100 ug/ml; 4, MDI + 200 ug/ml; 5, MDI + 400 ug/ml



[그림 3-1-35] 참모자반 주정 추출물이 처리된 3T3-L1 세포내 지방 함량.

③ 참모자반 주정 추출물이 비만 관련 단백질의 발현에 미치는 영향

참모자반 주정 추출물의 3T3-L1 세포의 분화와 지방 합성에 관련된 단백질들의 발현에 미치는 영향을 확인하기 위하여 3T3-L1 세포에 참모자반 주정 추출물을 MDI와 함께 처리하여 9 일째에 세포로부터 단백질을 추출하여 Western blot으로 단백질의 발현 정도를 분석하였다. 그 결과 3T3-L1의 분화를 조절하는 SREBP-1c와 PPAR γ , 지방 합성에 관여하는 fatty acid synthase (FAS) 효소 단백질의 발현이 참모자반 주정 추출물에 의하여 농도 의존적으로 감소하는 것으로 나타났다([그림 3-1-36]). 또한, β -oxidation 등 에너지 대사와 관련된 AMPK의 인산화가 참모자반 주정 추출물에 의하여 증가하는 것을 확인하였다. 이러한 결과는 참모자반의 주정 추출물이 3T3-L1의 분화를 억제하고 지방 합성 효소의 발현을 감소시키며 에너지 대사를 활성화하여 세포내 지방 축적을 억제하고 있다는 것을 의미한다. 이러한 실험 결과를 토대로 참모자반 주정 추출물 중 지방 합성 억제 효과가 뛰어난 획분을 얻기 위하여 유기용매로 분획하여 항비만 효과를 분석하였다.

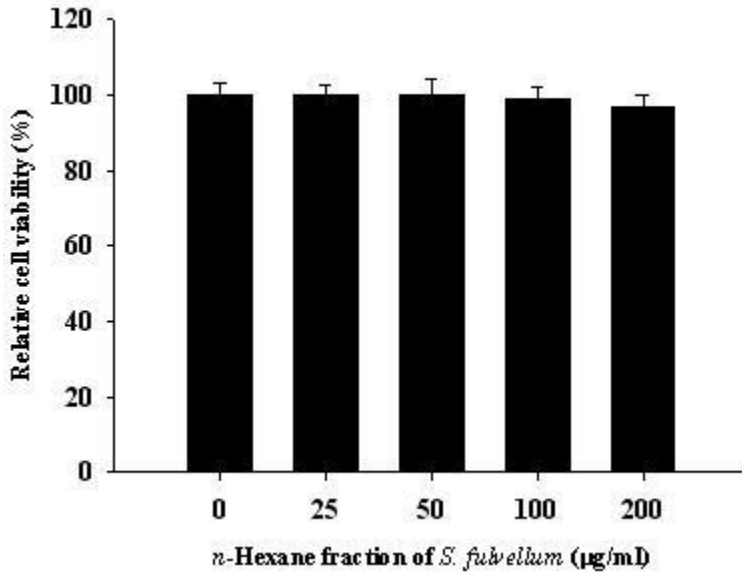


[그림 3-1-36] 참모자반 주정 추출물의 비만 관련 단백질 발현 조절.

(나) 참모자반 *n*-헥산 분획물의 항비만 효과

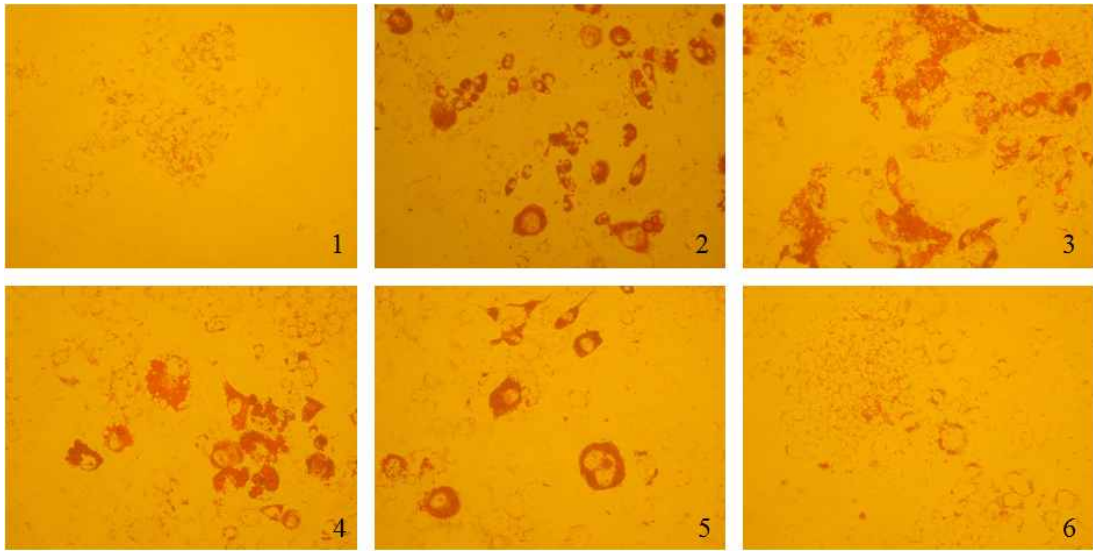
① 참모자반 *n*-헥산 분획물의 3T3-L1 세포의 분화 억제 효과

3T3-L1 세포에 참모자반 *n*-헥산 분획물을 처리하여 24 시간 배양한 후 MTS assay로 세포 생존율을 측정하였다. [그림 3-1-37]의 결과를 통해 참모자반 *n*-헥산 분획물은 200 μ g/ml의 농도 내에서는 세포 생존율에 영향을 미치지 않는다는 것을 확인할 수 있었다.

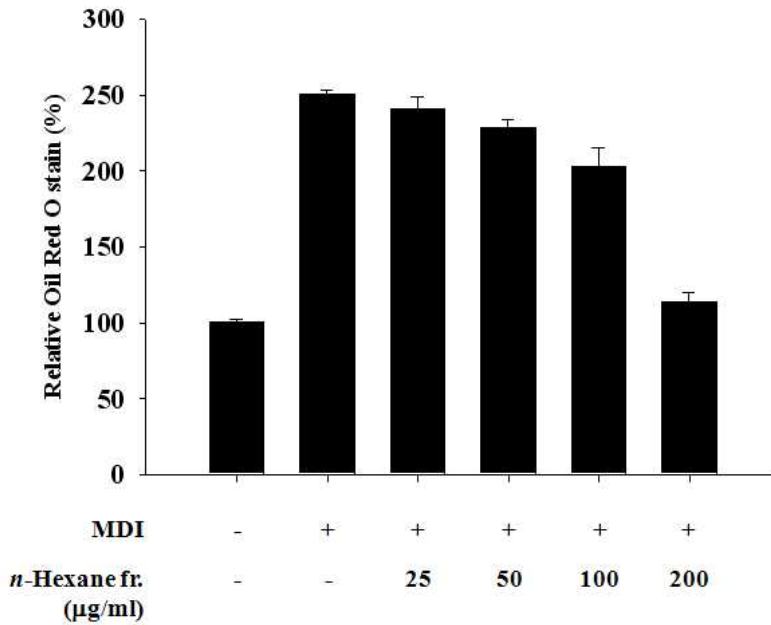


[그림 3-1-37] 참모자반 *n*-헥산 분획물이 3T3-L1 세포의 생존율에 미치는 영향.

3T3-L1 세포에 참모자반 *n*-헥산 분획물을 MDI와 함께 처리하여 9 일째에 세포를 PBS에 두 번 씻어 내고 10% 포르말데히드 용액으로 고정시킨 후 Oil-Red O 염색법으로 세포내 지방을 염색하였다. 그 후 세포를 위상차 현미경으로 관찰하고 Olympus digital video camera로 촬영하여 그림으로 나타내었다([그림 3-1-38]). 또한 세포를 lysis buffer (50 mM sodium phosphate, 2 mM EDTA, 2 M NaCl, pH 7.4)로 회수하여 40 watt에서 5 초간 2 번 sonication하였다. 세포 파쇄액을 14,000 rpm에서 10 분간 원심분리 한 후 Oil-Red O 염색법으로 염색하고 500 nm에서 흡광도를 측정하여 지방 함량을 비교 하였다. 그 결과 참모자반 *n*-헥산 분획물은 농도 의존적으로 3T3-L1 세포내 지방 합성을 저해시키는 것으로 나타났다([그림 3-1-39]). 이러한 결과는 참모자반 *n*-헥산 분획물이 지방 세포로의 분화에 관련된 신호 전달 과정을 조절하거나 또는 지방 세포내 지방 합성 관련된 효소들에 관여하여 지방의 생성을 억제시킬 수 있다는 것을 나타내며 현재 단백질과 mRNA 분석 등 추가 실험을 통하여 참모자반의 *n*-헥산 분획물이 어떠한 과정을 조절하는지 확인하고 있다.



[그림 3-1-38] 참모자반 *n*-헥산 분획물이 3T3-L1 세포내 지방 합성에 미치는 영향. 1, 대조군; 2, MDI 처리군; 3, MDI + 25 ug/ml; 4, MDI + 50 ug/ml; 5, MDI + 100 ug/ml; 6, MDI + 200 ug/ml

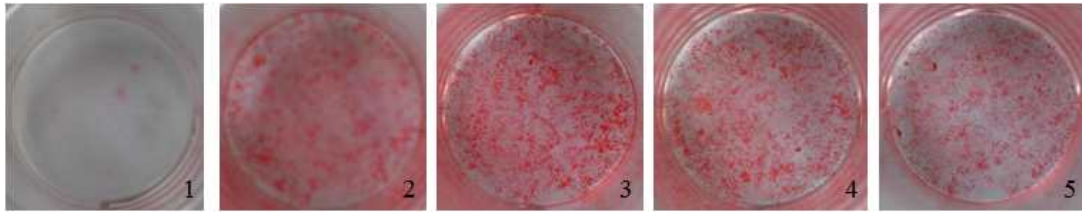


[그림 3-1-39] 참모자반 *n*-헥산 분획물이 처리된 3T3-L1 세포내 지방 함량.

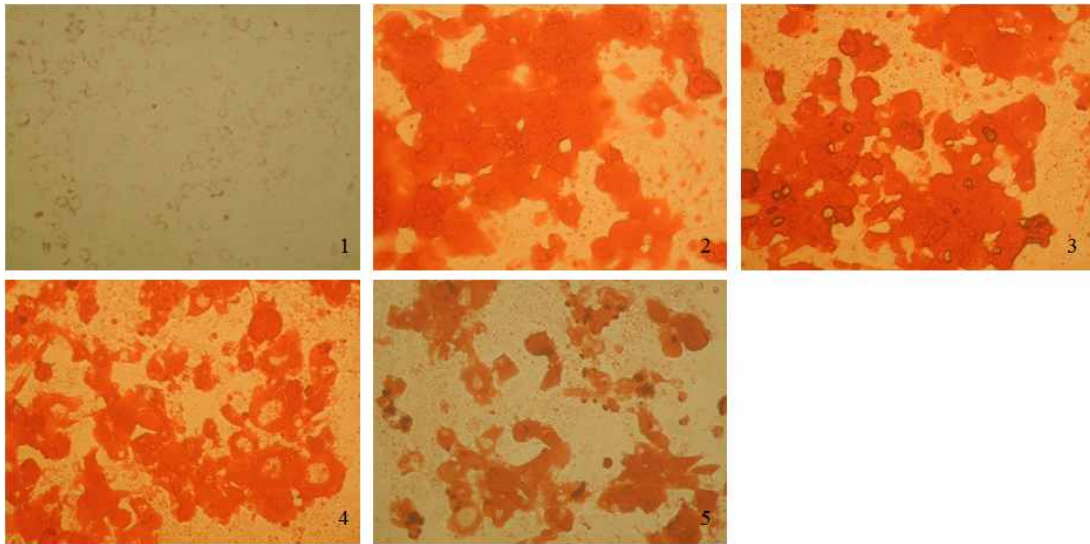
② 참모자반 *n*-헥산 분획물의 지방 합성 억제 효과

참모자반 *n*-헥산 분획물의 항비만 효과를 분석하기 위하여 3T3-L1 세포에 5 일간 MDI를 처리하여 지방세포로 분화시킨 후, 다시 참모자반 *n*-헥산 분획물과 인슐린이 첨가된 배지를 세포에 7 일간 처리하여 분화된 3T3-L1 세포내에서 지방 합성 억제 효과를 확인하고자 하였다. 세포를 PBS에 두 번 씻어 내고 10% 포름알데히드 용액으로 고정시킨 후 Oil-Red O 염색법으로 세포내 지방을 염색하였다. 그

후 세포를 위상차 현미경으로 관찰하고 Olympus digital video camera로 촬영하여 그림으로 나타내었다([그림 3-1-40]). 또한 세포를 lysis buffer (50 mM sodium phosphate, 2 mM EDTA, 2 M NaCl, pH 7.4)로 회수하여 40 watt에서 5 초간 2 번 sonication하였다. 세포 파쇄액을 14,000 rpm에서 10 분간 원심분리 한 후 Oil-Red O 염색법으로 염색하고 500 nm에서 흡광도를 측정하여 지방 함량을 비교 하였다. 그 결과 참모자반 *n*-헥산 분획물은 농도 의존적으로 3T3-L1 세포내 지방 합성을 저해시키는 것으로 나타났다([그림 3-1-41]). 이러한 결과는 참모자반 *n*-헥산 분획물이 지방 세포로의 분화된 세포에서 지방 합성과 관련된 신호 전달 과정에 관여하여 지방의 생성을 억제시킬 수 있다는 것을 나타낸다.

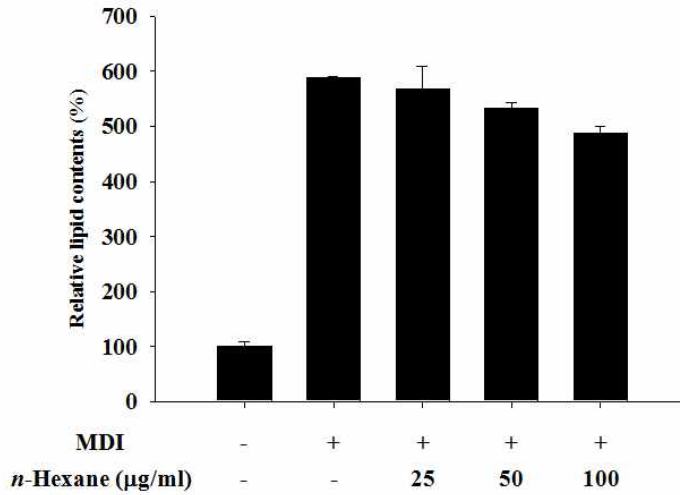


가



나

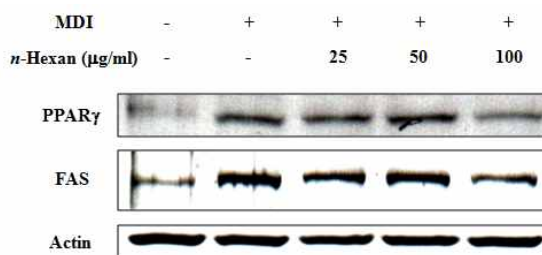
[그림 3-1-40] 참모자반 *n*-헥산 분획물이 3T3-L1 세포내 지방 합성에 미치는 영향. 가, Oil Red O stain으로 염색된 세포의 사진; 나, Oil Red O stain으로 염색된 세포의 현미경 사진; 1, 대조군; 2, MDI 처리군; 3, MDI + 25 ug/ml; 4, MDI + 50 ug/ml; 5, MDI + 100 ug/ml



[그림 3-1-41] 참모자반 *n*-헥산 분획물이 처리된 3T3-L1 세포내 지방 함량.

③ 참모자반 *n*-헥산 분획물이 비만 관련 단백질의 발현에 미치는 영향

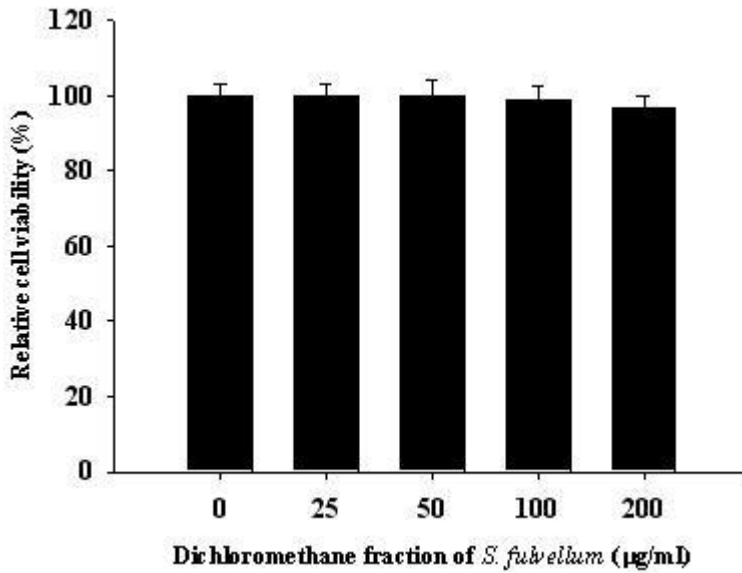
참모자반 *n*-헥산 분획물의 3T3-L1 세포의 분화와 지방 합성에 관련된 단백질들의 발현에 미치는 영향을 확인하기 위하여 3T3-L1 세포에 참모자반 *n*-헥산 분획물을 MDI와 함께 처리하여 9 일째에 세포로부터 단백질을 추출하여 Western blot으로 단백질의 발현 정도를 분석하였다. 그 결과 3T3-L1의 분화를 조절하는 PPAR γ , 지방 합성에 관여하는 fatty acid synthase (FAS) 효소 단백질의 발현이 참모자반 *n*-헥산 분획물에 의하여 농도 의존적으로 감소하는 것으로 나타났다([그림 3-1-42]). 이러한 결과는 참모자반의 *n*-헥산 분획물이 3T3-L1의 분화를 억제하고 지방 합성 효소의 발현을 감소시켜 세포내 지방 축적을 억제하고 있다는 것을 의미한다.



[그림 3-1-42] 참모자반 *n*-헥산 분획물의 비만 관련 단백질 발현 조절.

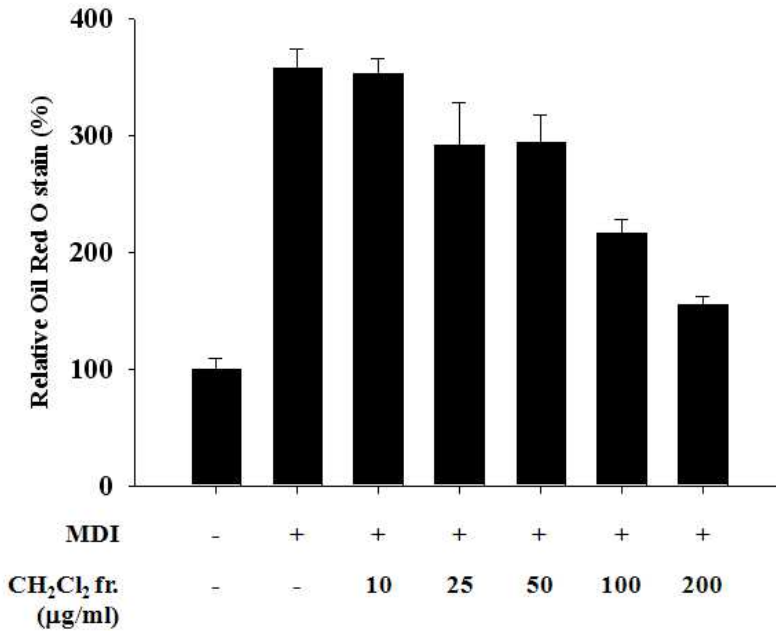
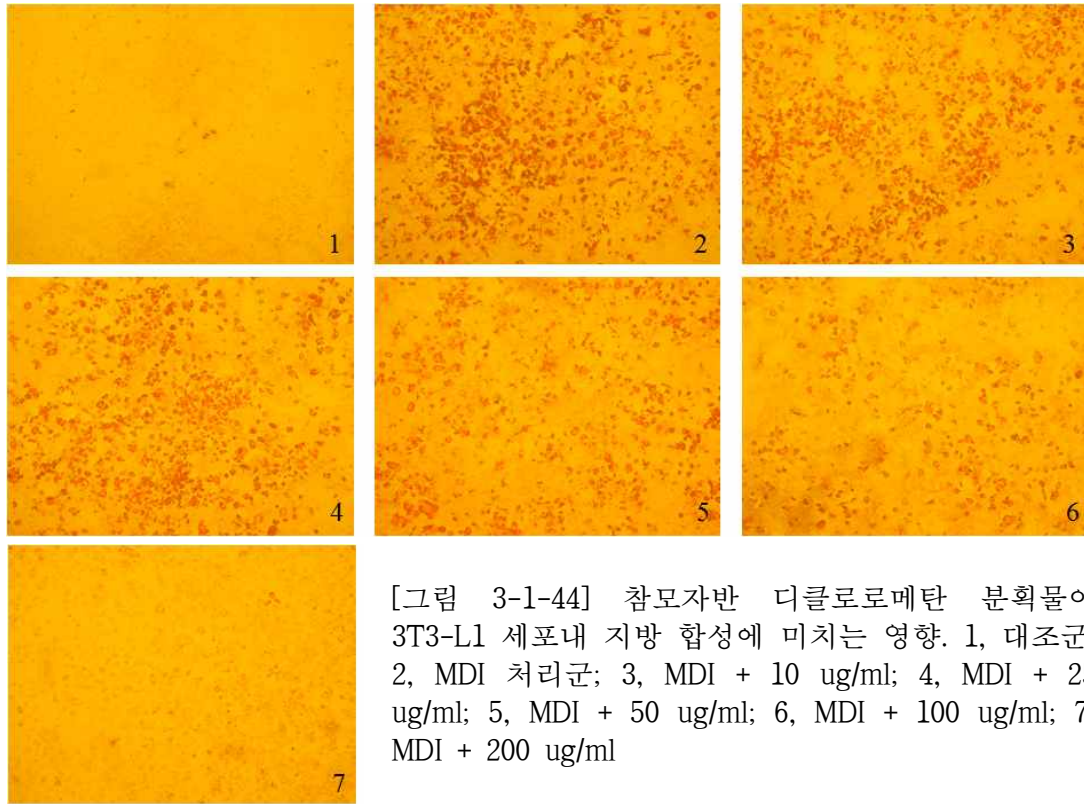
(다) 참모자반 디클로로메탄 분획물의 항비만 효과

3T3-L1 세포에 참모자반 디클로로메탄 분획물을 처리하여 24 시간 배양한 후 MTS assay로 세포 생존율을 측정하였다. [그림 3-1-43]의 결과를 통해 참모자반 디클로로메탄 분획물은 200 µg/ml의 농도 내에서는 세포 생존율에 영향을 미치지 않는다는 것을 확인할 수 있었다.



[그림 3-1-43] 참모자반 디클로로메탄 분획물이 3T3-L1 세포의 생존율에 미치는 영향.

3T3-L1 세포에 참모자반 디클로로메탄 분획물을 MDI와 함께 처리하여 9 일째에 세포를 PBS에 두 번 씻어 내고 10% 포르말데히드 용액으로 고정시킨 후 Oil-Red O 염색법으로 세포내 지방을 염색하였다. 그 후 세포를 위상차 현미경으로 관찰하고 Olympus digital video camera로 촬영하여 그림으로 나타내었다([그림 3-1-44]). 또한 세포를 lysis buffer (50 mM sodium phosphate, 2 mM EDTA, 2 M NaCl, pH 7.4)로 회수하여 40 watt에서 5 초간 2 번 sonication하였다. 세포 파쇄액을 14,000 rpm에서 10 분간 원심분리 한 후 Oil-Red O 염색법으로 염색하고 500 nm에서 흡광도를 측정하여 지방 함량을 비교 하였다. 그 결과 참모자반 디클로로메탄 분획물은 농도 의존적으로 3T3-L1 세포내 지방 합성을 저해시키는 것으로 나타났다([그림 3-1-45]). 이러한 결과는 참모자반 디클로로메탄 분획물이 지방 세포로의 분화에 관련된 신호 전달 과정을 조절하거나 또는 지방 세포내 지방 합성 관련된 효소들에 관여하여 지방의 생성을 억제시킬 수 있다는 것을 나타내며 현재 단백질과 mRNA 분석 등 추가 실험을 통하여 참모자반의 디클로로메탄 분획물이 어떠한 과정을 조절하는지 확인하고 있다.

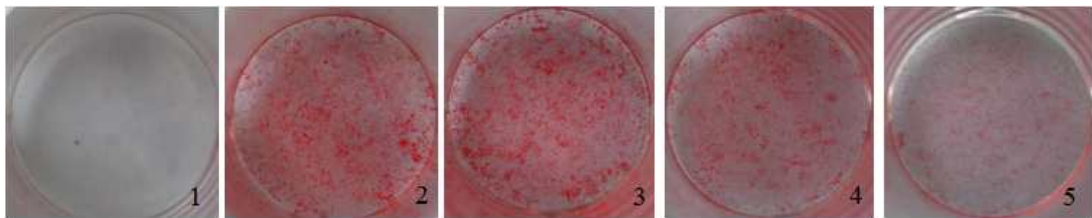


[그림 3-1-45] 참모자반 디클로로메탄 분획물이 처리된 3T3-L1 세포내 지방 함량.

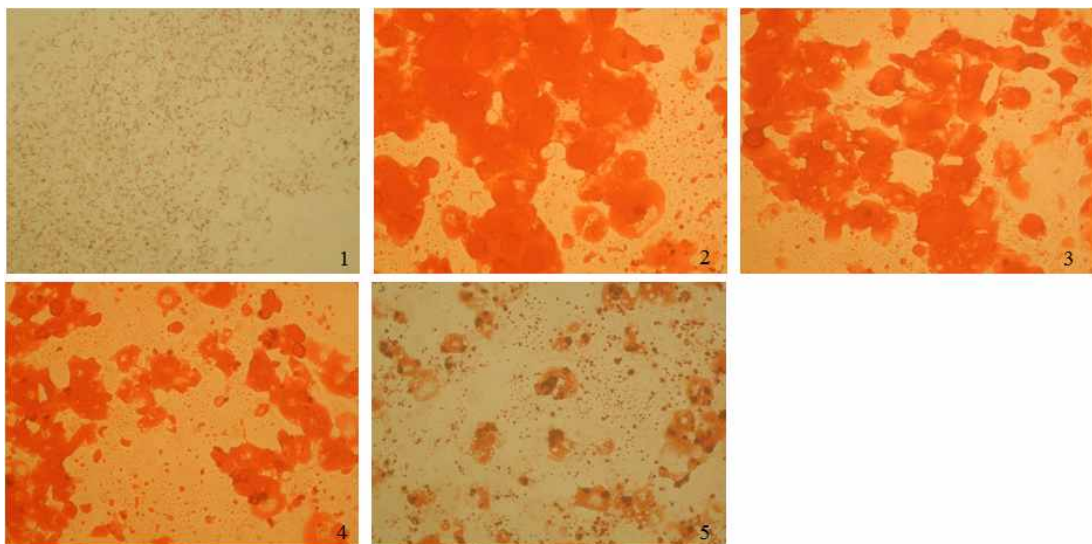
② 참모자반 디클로로메탄 분획물의 지방 합성 억제 효과

참모자반 디클로로메탄 분획물의 항비만 효과를 분석하기 위하여 3T3-L1 세포에 5 일간 MDI를 처리하여 지방세포로 분화시킨 후, 다시 참모자반 디클로로메

탄 분획물과 인슐린이 첨가된 배지를 세포에 7 일간 처리하여 분화된 3T3-L1 세포 내에서 지방 합성 억제 효과를 확인하고자 하였다. 세포를 PBS에 두 번 씻어 내고 10% 포르말데히드 용액으로 고정시킨 후 Oil-Red O 염색법으로 세포내 지방을 염색하였다. 그 후 세포를 위상차 현미경으로 관찰하고 Olympus digital video camera 로 촬영하여 그림으로 나타내었다([그림 3-1-46]). 또한 세포를 lysis buffer (50 mM sodium phosphate, 2 mM EDTA, 2 M NaCl, pH 7.4)로 회수하여 40 watt에서 5 초간 2 번 sonication하였다. 세포 과쇄액을 14,000 rpm에서 10 분간 원심분리 한 후 Oil-Red O 염색법으로 염색하고 500 nm에서 흡광도를 측정하여 지방 함량을 비교하였다. 그 결과 참모자반 디클로로메탄 분획물은 농도 의존적으로 3T3-L1 세포내 지방 합성을 저해시키는 것으로 나타났다([그림 3-1-47]). 이러한 결과는 참모자반 디클로로메탄 분획물이 지방 세포로의 분화된 세포에서 지방 합성과 관련된 신호 전달 과정에 관여하여 지방의 생성을 억제시킬 수 있다는 것을 나타낸다.

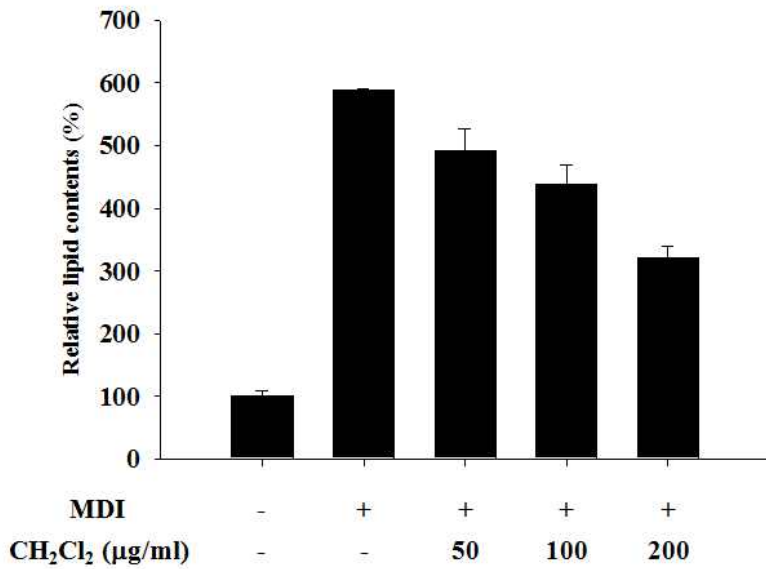


가



나

[그림 3-1-46] 참모자반 디클로로메탄 분획물이 3T3-L1 세포내 지방 합성에 미치는 영향. 가, Oil Red O stain으로 염색된 세포의 사진; 나, Oil Red O stain으로 염색된 세포의 현미경 사진; 1, 대조군; 2, MDI 처리군; 3, MDI + 25 ug/ml; 4, MDI + 50 ug/ml; 5, MDI + 100 ug/ml



[그림 3-1-47] 참모자반 디클로로메탄 분획물이 처리된 3T3-L1 세포내 지방 함량.

(2) 고지방 식이로 유도된 SD 랫드에 대한 참모자반 추출물의 항비만 활성

(가) 참모자반 *n*-헥산 분획물의 독성 시험

이상의 연구에서 참모자반 주정 추출물과 헥산 분획물의 항비만효과가 우수함을 입증하였다. 참모자반 주정 추출물과 헥산 분획물을 체지방 감소용 건강기능식품 소재로 활용하기 위하여 급성독성 시험을 ICR계 수컷 마우스를 동물모델로 실험하였다. 시료의 투여는 ICR계 수컷 마우스를 11 군으로 나누어 (n=5) 1 군은 대조군으로 20% propylene glycol을 경구 투여하였고 2-6 군은 참모자반 주정추출물 투여군으로 각각 100, 200, 400, 800, 1600 mg/kg bw/day로 경구 투여하였다. 또한 7-11군은 참모자반 *n*-헥산 분획물 투여군으로 각각 100, 200, 400, 800, 1600 mg/kg bw/day로 경구 투여하였다. 급성독성 실험은 시료투여로 인하여 피실험 동물이 사망할 정도의 농도를 설정해야하나, 참모자반 주정 추출물과 *n*-헥산 분획물의 용해도가 낮아 부득이 1600 mg/kg bw/day를 최고농도로 설정하였다. 두 그룹의 실험전과 후 모든 개체들의 체중을 측정하여 비교하였으며, 각각의 시료를 4일간 투여한 후 모든 실험개체들을 에테르로 마취한 다음 해부하여 혈액과 간을 적출하였다. 혈액의 혈청을 분리하여 AST 및 ALT 효소 활성을 측정하여 시료에 의한 간독성을 확인하였다.

[표 3-1-9]에서 나타낸바와 같이, 실험전과 후 실험개체들의 체중변화는 17.3%-27.0%까지 감소하는 것으로 나타났다. 대조군을 포함한 모든 실험군들은 실험전후 체중의 변화가 유의적인 차이를 보이지 감소하였으며, 특히 참모자반 주정

추출물 1600 mg/kg에 노출된 실험개체들과 *n*-헥산 분획물 1600 mg/kg에 노출된 개체들은 대조군과 비교하여 유의적인 체중 감소가 나타났다. 모든 실험개체들은 실험종료시기에 체중이 감소하였는데 이는 실험기간 동안의 단식과 약물주입에 따른 스트레스가 원인으로 생각되며, 특히 참모자반 주정 추출물 1600 mg/kg과 *n*-헥산 분획물 희분 1600 mg/kg에 노출된 개체들은 스트레스뿐만 아니라 참모자반의 독성이 동시에 작용한 것으로 생각된다.

[표 3-1-9] ICR 마우스의 체중 변화

Group (mg/kg bw/day)	Total body weight (g, initial)	Total body weight (g, end-point)	Group	Total body weight (g, initial)	Total body weight (g, end-point)
대조군	29.4 ± 1.2	22.5 ± 2.2	-	-	-
2(100)	28.3 ± 2.1	24.3 ± 2.2	7(100)	29.1 ± 1.2	23.4 ± 1.6
3(200)	28.9 ± 1.6	24.3 ± 2.4	8(200)	28.2 ± 1.4	24.2 ± 1.4
4(400)	28.9 ± 1.5	23.9 ± 1.3	9(400)	26.9 ± 1.5	22.6 ± 2.1
5(800)	39.2 ± 1.4	24.6 ± 1.5	10(800)	29.2 ± 1.3	23.1 ± 1.6
6(1600)	29.1 ± 1.2	21.5 ± 1.1	11(1600)	29.5 ± 1.0	20.5 ± 1.5

또한, 혈청의 AST, ALT 측정결과에서 나타나듯이 참모자반 주정 추출물 800 mg/kg과 1600 mg/kg에 노출된 실험개체들은 정상개체군에 비하여 혈청의 AST와 ALT 효소 활성이 높게 나타났으며 *n*-헥산 분획물에 노출된 실험개체들 중 800과 1600 mg/kg에 노출된 개체들이 다소 높은 AST와 ALT 효소 활성 수치가 나타났다([표 3-1-10]). 따라서 이후의 동물실험에서는 안전한 농도인 400 mg/kg bw/day의 농도까지를 설정하였다.

[표 3-1-10] ICR 마우스 혈청의 AST 및 ALT 활성

Group	AST (IU/L)	ALT (IU/L)	Group	AST (IU/L)	ALT (IU/L)
1(대조군)	80.1 ± 10.2	28.4 ± 3.6	-	-	-
2(100)	75.6 ± 8.9	26.5 ± 10.3	7(100)	76.2 ± 10.1	25.8 ± 4.1
3(200)	75.4 ± 12.1	31.9 ± 12.2	8(200)	84.6 ± 19.8	21.8 ± 7.3
4(400)	83.2 ± 13.6	32.8 ± 9.2	9(400)	80.2 ± 11.4	23.1 ± 5.6
5(800)	88.3 ± 11.3	31.4 ± 10.3	10(800)	85.4 ± 10.3	26.1 ± 5.2
6(1600)	107.3 ± 15.8	39.7 ± 6.3	11(1600)	89.6 ± 14.2	38.4 ± 6.2

(나) 참모자반 *n*-헥산 분획물의 항비만 동물실험

본 연구에서는 참모자반 *n*-헥산 분획물을 체지방 감소 기능성 신소재로 활용하기 위하여 시료의 항비만 활성 시험을 SD계 수컷 랫드를 동물모델로 실험하였다. SD계 수컷 랫드는 온도 $20 \pm 2^\circ\text{C}$, 습도 $50 \pm 10\%$ 의 환경에서 사육되었으며 1주일간 적응시킨 후 실험을 시작하였다. 시료의 투여는 SD계 수컷 랫드를 5 군으로 나누어 (n=4) 제 1군은 대조군으로 일반사료를 주었으며 20% propylene glycol (800 mg/kg)을 경구투여하였다. 제 2군은 실험군으로 고지방 사료를 주었으며 20% propylene glycol (800 mg/kg)을 경구투여하였다. 제 3, 4, 5군은 고지방 사료를 주었으며 참모자반 *n*-헥산 분획물을 각각 25 mg/kg, 100 mg/kg, 400 mg/kg을 경구투여하였다. 대조군과 실험군의 실험 식이의 조성을 [표 3-1-11]에 나타내었다.

[표 3-1-11] 실험 식이의 조성

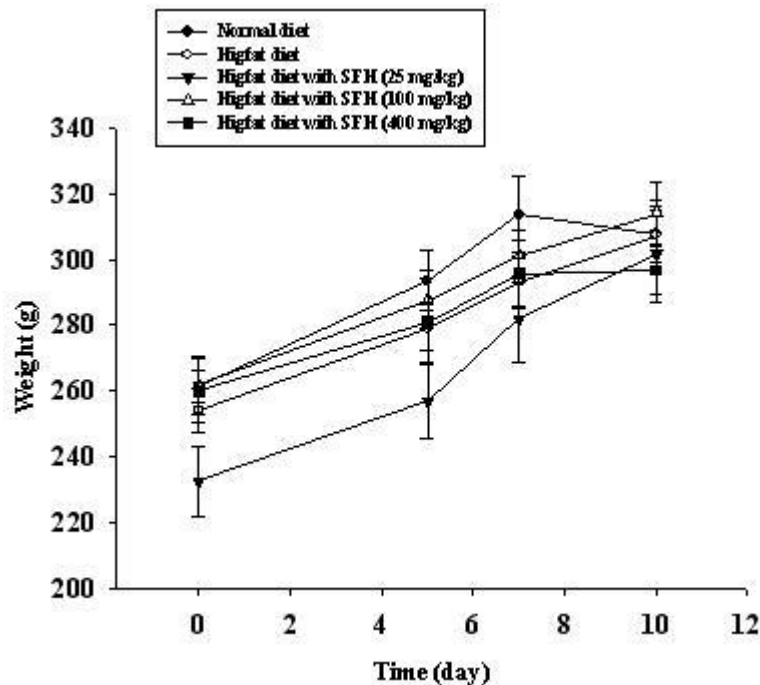
	Normal Diet	High Fat Diet
Formulation	Kcal (%)	Kcal (%)
Protein	20	20
Carbohydrate	70	20
Fat	10	60
Energy (MJ/kg)	15.9	21.8
Ingredient	g	g
Casein (from milk)	189.6	258.4
L-Cystine	2.8	3.9
Corn starch	298	0
Sucrose	331.7	88.9
Maltodextrin	33.2	161.5
Cellulose	47.4	64.6
Soybean Oil	23.7	32.3
Lard	19	316.6
Mineral Mixture	9.5	12.9
Vitamin Mixtre	9.5	12.9
Choline Bitartrate	1.9	2.6

실험 기간내 사료의 섭취량을 매일 측정하였으며 3 일 간격으로 랫드의 체중을 측정하여 각 실험군 사이의 체중 증가량을 비교하였다. 1 주일이 경과된 후

실험군 사이의 체중 증가량은 [표 3-1-12]와 같다. 참모자반 *n*-헥산 분획물을 400 mg/kg 경구 투여한 군의 랫드는 다른 실험군에 비하여 개체당 체중 증가량이 적은 것으로 나타났다. 현재 10 일째 결과를 보면 고지방식이군의 경우 비만으로 진행되는 징후를 나타내고 있으며, 특히 *n*-헥산 분획물 400 mg/kg 첨가군의 경우 고지방 식이와 정상식이군에 비해 체중감소효과가 나타나고 있다. 앞으로 6주간의 실험결과는 매우 긍정적으로 기대되며, 참모자반 헥산 획분의 체지방 감소효과에 따라 새로운 항비만 건강기능 식품이 개발될 것으로 기대된다([그림 3-1-48]).

[표 3-1-12] 10 일 후 SD계 랫드의 개체당 체중 증가량

실험군	체중 증가량 (g)	사료 섭취량 (g/day/n)
1	46.63 ± 5.29	22.84 ± 4.20
2	53.20 ± 2.72	20.03 ± 8.84
3	69.20 ± 5.63	13.88 ± 6.82
4	52.25 ± 1.87	18.85 ± 6.17
5	36.70 ± 3.64	18.38 ± 4.91



[그림 3-1-48] 참모자반 *n*-헥산 분획물 첨가식이에 의한 실험동물의 체중변화.

(3) 참모자반 추출물의 미백 활성

(가) 참모자반 추출물이 tyrosinase 활성에 미치는 영향

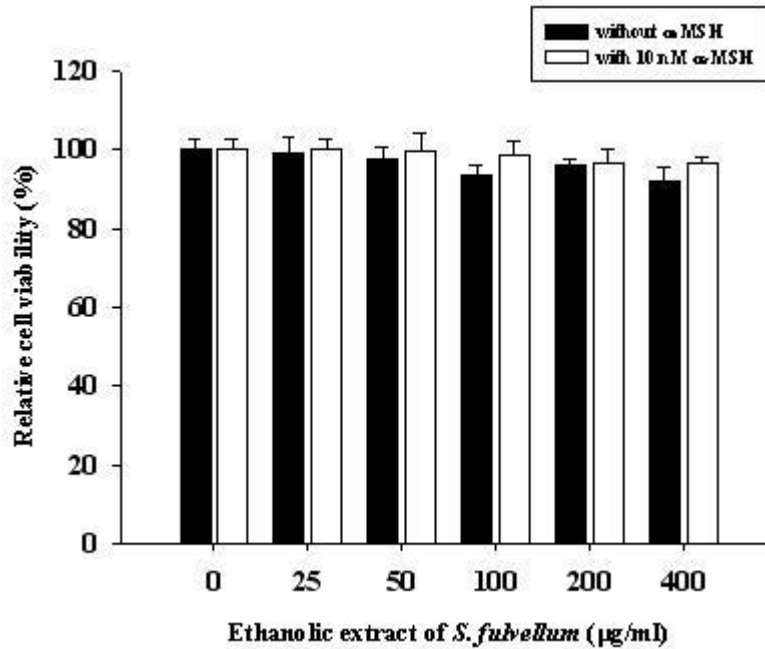
참모자반 추출물의 미백 활성을 검색하기 위하여 멜라닌 생성에 중요한 역할을 하는 tyrosinase 효소 활성에 대한 영향을 실험하였다. B16 세포를 3 일간 배양한 후 세포를 회수하여 0.5% NP-40이 포함된 0.1 M phosphate buffer (pH 6.8)로 균질화한 후 13,000 g에서 10 분간 원심분리하여 상층액의 lysate를 추출하였다. Tyrosinase 효소 활성은 일정량의 lysate와 참모자반 추출물, L-DOPA 용액을 넣고 37°C에서 1 시간동안 반응시킨 후 475 nm에서 흡광도를 측정하여 확인하였다. [표 3-1-13]에 나타난 바와 같이 참모자반 추출물은 B16 세포의 tyrosinase 효소 활성에 유의적인 영향을 미치지 못하는 것으로 나타났다.

[표 3-1-13] 참모자반 추출물이 포유류 세포의 tyrosinase 활성에 미치는 영향

Sample	IC ₅₀ (ug/ml)
EtOH	400 <
<i>n</i> -Hexane	200 <
CH ₂ Cl ₂	200 <
EtOAc	200 <
<i>n</i> -BuOH	200 <
H ₂ O	200 <

(나) 참모자반 주정 추출물의 멜라닌 생성 저해 효과

본 연구에서는 참모자반 주정 추출물이 B16 세포내 멜라닌 생성에 어떠한 영향을 미치는지 확인하기 위하여 우선 시료를 세포에 처리하고 24 시간 배양한 후, MTS assay를 통하여 세포 생존률에 미치는 영향을 확인하였다. 또한 시료를 세포에 처리하고 1 시간 배양한 후, 10 nM의 α -MSH를 처리하여 24 시간 배양하여 MTS assay를 통하여 세포 생존률에 미치는 영향을 확인하였다. 그 결과 참모자반 주정 추출물은 400 ug/ml의 농도까지 B16 세포의 생존률에 유의적인 영향을 미치지 않는 것으로 나타났다([그림 3-1-49]).



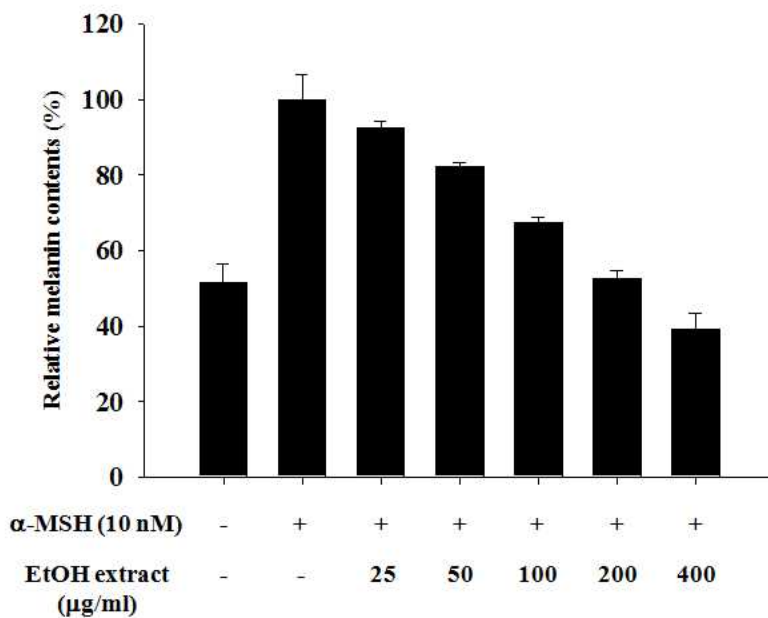
[그림 3-1-49] 참모자반 주정 추출물이 B16 세포의 생존률에 미치는 영향.

참모자반 주정 추출물의 세포내 멜라닌 생성에 미치는 영향을 확인하기 위하여 세포에 시료를 처리하고 1 시간 배양한 후, 10 nM의 α -MSH를 처리하여 72 시간 배양하였다. 세포내 멜라닌 함량은 Tsuboi 등[14]의 방법을 참고하여 실험하였다. 회수된 세포를 2 N NaOH에 녹인 후, 60°C에서 30 분간 가열하고 13,000 g에서 10 분간 원심분리 후 405 nm에서 흡광도를 측정하여 세포내 멜라닌 생성량을 비교하였다. [그림 3-1-50]와 [그림 3-1-51]에서 나타나듯이 참모자반 주정 추출물은 α -MSH에 의한 멜라닌 과다 생성을 농도 의존적으로 억제시키는 것으로 확인되었다. 이러한 결과는 참모자반 주정 추출물이 tyrosinase 효소 활성화에는 직접적인 영향을 미치지 못하지만 세포에서 일어나는 여러 가지 신호 전달 과정을 조절하여 멜라닌 합성과 관련된 효소의 발현에 영향을 미쳐 세포내 멜라닌 생성을 저해시킨다는 것을 의미하며 추후 단백질과 mRNA 분석 등의 추가 실험을 통하여 참모자반 주정 추출물이 어떤 신호 전달 과정을 조절하는지 밝혀낼 계획이다.

α -MSH (10 nM)	-	+	+	+	+	+	+
EtOH extract (μ g/ml)	-	-	25	50	100	200	400



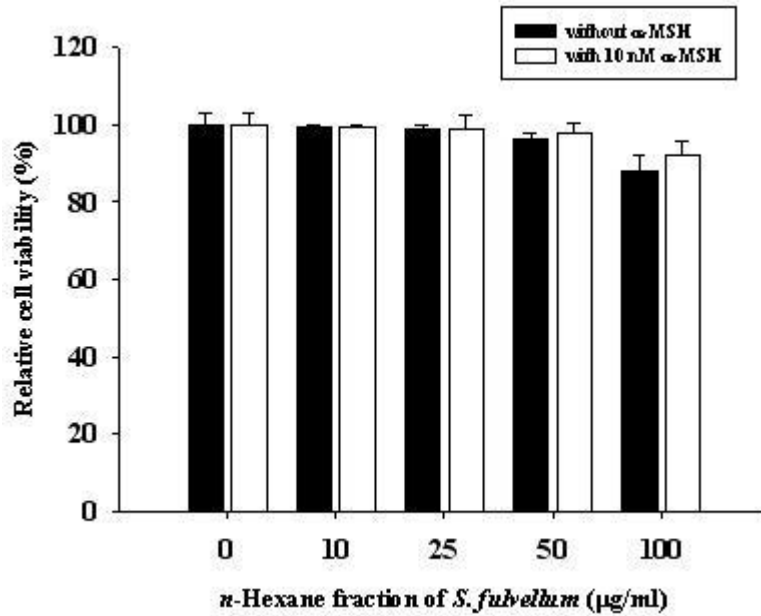
[그림 3-1-50] 참모자반 주정 추출물이 B16 세포의 멜라닌 생성에 미치는 영향.



[그림 3-1-51] 참모자반 주정 추출물이 처리된 B16세포 내 멜라닌 함량.

(다) 참모자반 *n*-헥산 분획물의 멜라닌 생성 저해 효과

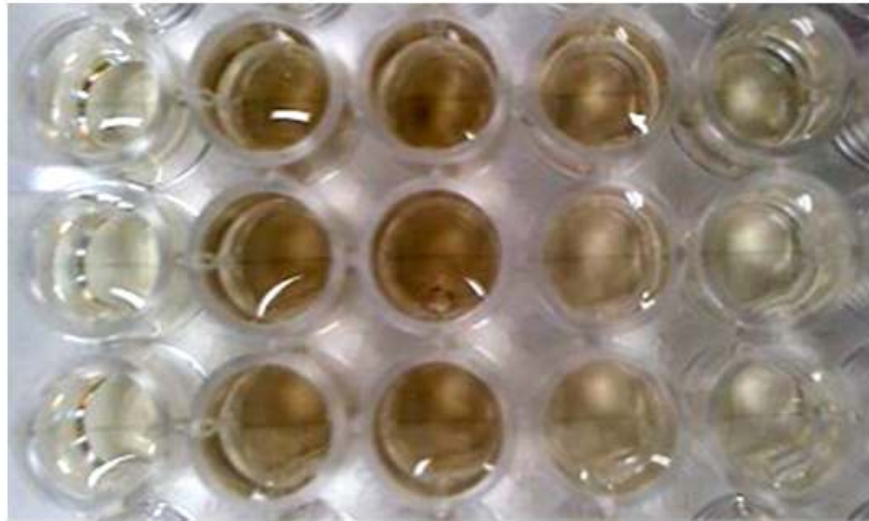
본 연구에서는 참모자반 *n*-헥산 분획물이 B16 세포내 멜라닌 생성에 어떠한 영향을 미치는지 확인하기 위하여 우선 시료를 세포에 처리하고 24 시간 배양한 후, MTS assay를 통하여 세포 생존률에 미치는 영향을 확인하였다. 또한 시료를 세포에 처리하고 1 시간 배양한 후, 10 nM의 α -MSH를 처리하여 24 시간 배양하여 MTS assay를 통하여 세포 생존률에 미치는 영향을 확인하였다. 그 결과 참모자반 *n*-헥산 분획물은 100 μ g/ml의 농도까지 B16 세포의 생존률에 유의적인 영향을 미치지 않는 것으로 나타났다([그림 3-1-52]).



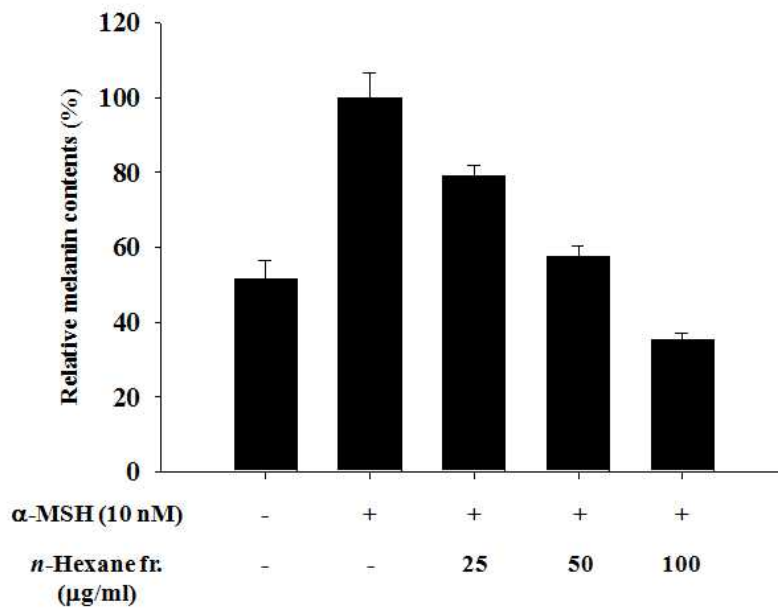
[그림 3-1-52] 참모자반 *n*-헥산 분획물이 B16 세포의 생존률에 미치는 영향.

참모자반 *n*-헥산 분획물의 세포내 멜라닌 생성에 미치는 영향을 확인하기 위하여 세포에 시료를 처리하고 1 시간 배양한 후, 10 nM의 α -MSH를 처리하여 72 시간 배양하였다. 회수된 세포를 2 N NaOH에 녹인 후, 60°C에서 30 분간 가열하고 13,000 g에서 10 분간 원심분리 후 405 nm에서 흡광도를 측정하여 세포내 멜라닌 생성량을 비교하였다. [그림 3-1-53]와 [그림 3-1-54]에서 나타나듯이 참모자반 *n*-헥산 분획물은 α -MSH에 의한 멜라닌 과다 생성을 농도 의존적으로 억제시키는 것으로 확인되었다. 이러한 결과는 참모자반 *n*-헥산 분획물이 tyrosinase 효소 활성화에는 직접적인 영향을 미치지 못하지만 세포에서 일어나는 여러 가지 신호 전달 과정을 조절하여 멜라닌 합성과 관련된 효소의 발현에 영향을 미쳐 세포내 멜라닌 생성을 저해시킨다는 것을 의미하며 추후 단백질과 mRNA 분석 등의 추가 실험을 통하여 참모자반 *n*-헥산 분획물이 어떤 신호 전달 과정을 조절하는지 밝혀낼 계획이다.

α -MSH (10 nM)	-	+	+	+	+
<i>n</i> -Hexane fr. (μ g/ml)	-	-	25	50	100



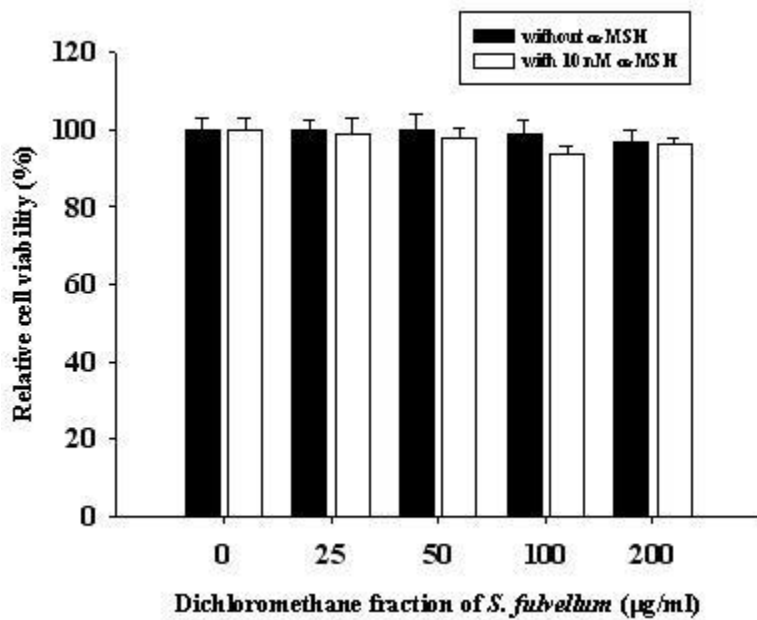
[그림 3-1-53] 참모자반 *n*-헥산 분획물이 B16 세포의 멜라닌 생성에 미치는 영향.



[그림 3-1-54] 참모자반 *n*-헥산 추출물이 처리된 B16세포내 멜라닌 함량.

(라) 참모자반 디클로로메탄 분획물의 멜라닌 생성 저해 효과

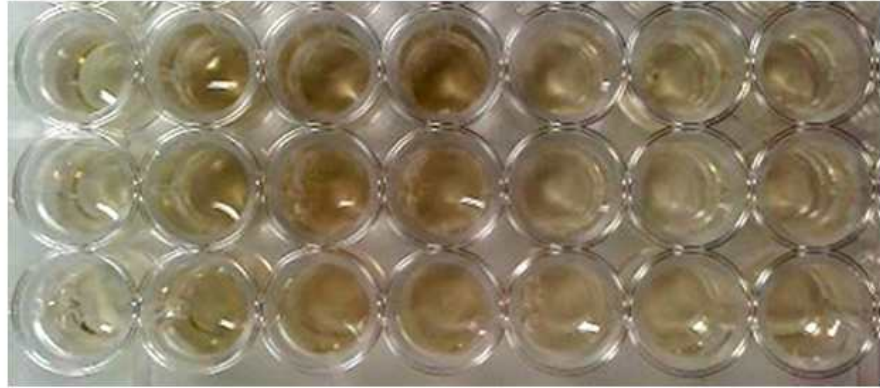
본 연구에서는 참모자반 디클로로메탄 분획물이 B16 세포내 멜라닌 생성에 어떠한 영향을 미치는지 확인하기 위하여 우선 시료를 세포에 처리하고 24 시간 배양한 후, MTS assay를 통하여 세포 생존율에 미치는 영향을 확인하였다. 또한 시료를 세포에 처리하고 1 시간 배양한 후, 10 nM의 α -MSH를 처리하여 24 시간 배양하여 MTS assay를 통하여 세포 생존율에 미치는 영향을 확인하였다. 그 결과 참모자반 디클로로메탄 분획물은 200 μ g/ml의 농도까지 B16 세포의 생존율에 유의적인 영향을 미치지 않는 것으로 나타났다([그림 3-1-55]).



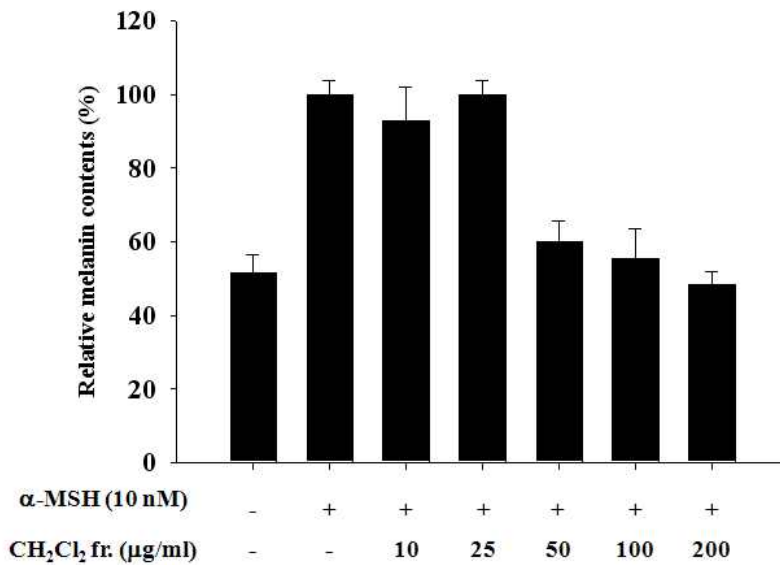
[그림 3-1-55] 참모자반 디클로로메탄 분획물이 B16 세포의 생존율에 미치는 영향.

참모자반 디클로로메탄 분획물의 세포내 멜라닌 생성에 미치는 영향을 확인하기 위하여 세포에 시료를 처리하고 1 시간 배양한 후, 10 nM의 α -MSH를 처리하여 72 시간 배양하였다. 회수된 세포를 2 N NaOH에 녹인 후, 60°C에서 30 분간 가열하고 13,000 g에서 10 분간 원심분리 후 405 nm에서 흡광도를 측정하여 세포내 멜라닌 생성량을 비교하였다. [그림 3-1-56]과 [그림 3-1-57]에서 나타나듯이 참모자반 디클로로메탄 분획물은 α -MSH에 의한 멜라닌 과다 생성을 농도 의존적으로 억제시키는 것으로 확인되었다. 이러한 결과는 참모자반 디클로로메탄 분획물이 tyrosinase 효소 활성화에는 직접적인 영향을 미치지 못하지만 세포에서 일어나는 여러 가지 신호 전달 과정을 조절하여 멜라닌 합성과 관련된 효소의 발현에 영향을 미쳐 세포내 멜라닌 생성을 저해시킨다는 것을 의미하며 추후 단백질과 mRNA 분석 등의 추가 실험을 통하여 참모자반 디클로로메탄 분획물이 어떤 신호 전달 과정을 조절하는지 밝혀낼 계획이다.

α -MSH (10 nM)	-	+	+	+	+	+	+
CH ₂ Cl ₂ fr. (μ g/ml)	-	-	10	25	50	100	200



[그림 3-1-56] 참모자반 디클로로메탄 분획물이 B16 세포의 멜라닌 생성에 미치는 영향.



[그림 3-1-57] 참모자반 디클로로메탄 분획물이 처리된 B16세포내 멜라닌 함량.

다. 곰피 추출물의 미백 활성

(1) 곰피 추출물이 tyrosinase 활성에 미치는 영향

곰피 추출물의 미백 활성을 검색하기 위하여 멜라닌 생성에 중요한 역할을 하는 tyrosinase 효소 활성에 대한 영향을 실험하였다. B16 세포를 3 일간 배양한 후 세포를 회수하여 0.5% NP-40이 포함된 0.1 M phosphate buffer (pH 6.8)로 균질화한 후 13,000 g에서 10 분간 원심분리하여 상층액의 lysate를 추출하였다. Tyrosinase 효소 활성은 일정량의 lysate와 곰피 추출물, L-DOPA 용액을 넣고 37°C

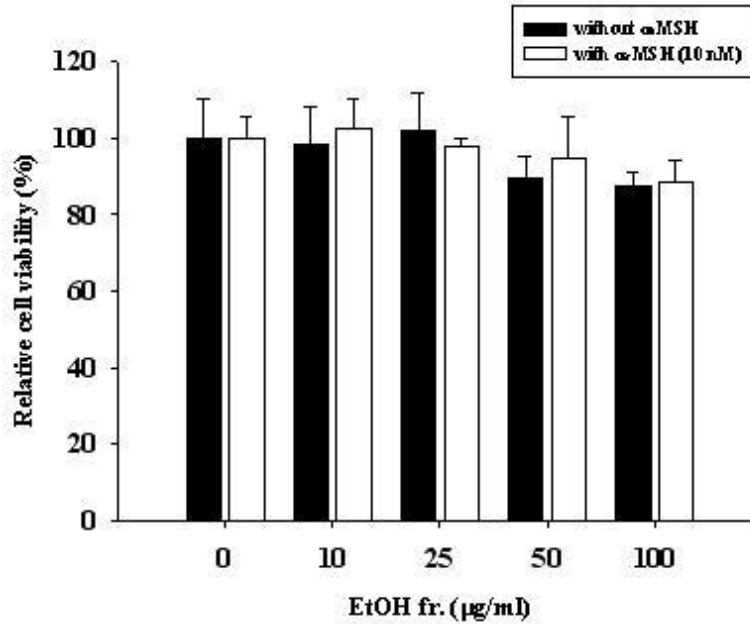
에서 1 시간동안 반응시킨 후 475 nm에서 흡광도를 측정하여 확인하였다. [표 3-1-14]에 나타난 바와 같이 곰피 주정 추출물은 B16 세포의 tyrosinase 효소 활성을 억제하는 것으로 나타났다. 그리고 곰피 주정 추출물의 희분 중 EtOAc 분획물에서만 B16 세포의 tyrosinase 효소 활성 억제를 확인하였다. 따라서 본 실험에서는 곰피의 주정 추출물과 EtOAc 분획물의 미백효과를 분석하였다.

[표 3-1-14] 곰피 추출물이 포유류 세포의 tyrosinase 활성에 미치는 영향

Sample	IC ₅₀ (ug/ml)
EtOH	294
<i>n</i> -Hexane	200 <
CH ₂ Cl ₂	200 <
EtOAc	115
<i>n</i> -BuOH	200 <
H ₂ O	200 <

(2) 곰피 주정 추출물의 멜라닌 생성 저해 효과

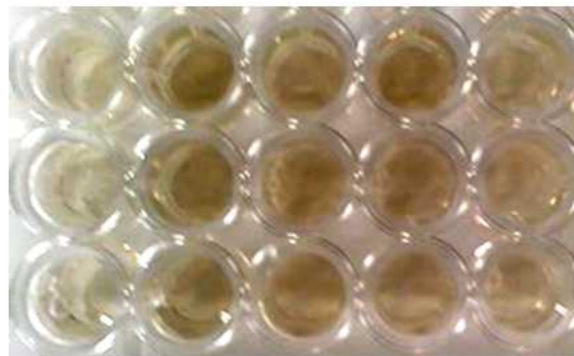
본 연구에서는 곰피 주정 추출물이 B16 세포내 멜라닌 생성에 어떠한 영향을 미치는지 확인하기 위하여 우선 시료를 세포에 처리하고 24 시간 배양한 후, MTS assay를 통하여 세포 생존률에 미치는 영향을 확인하였다. 또한 시료를 세포에 처리하고 1 시간 배양한 후, 10 nM의 α -MSH를 처리하여 24 시간 배양하여 MTS assay를 통하여 세포 생존률에 미치는 영향을 확인하였다. 그 결과 곰피 주정 추출물은 400 ug/ml의 농도까지 B16 세포의 생존률에 유의적인 영향을 미치지 않는 것으로 나타났다([그림 3-1-58]).



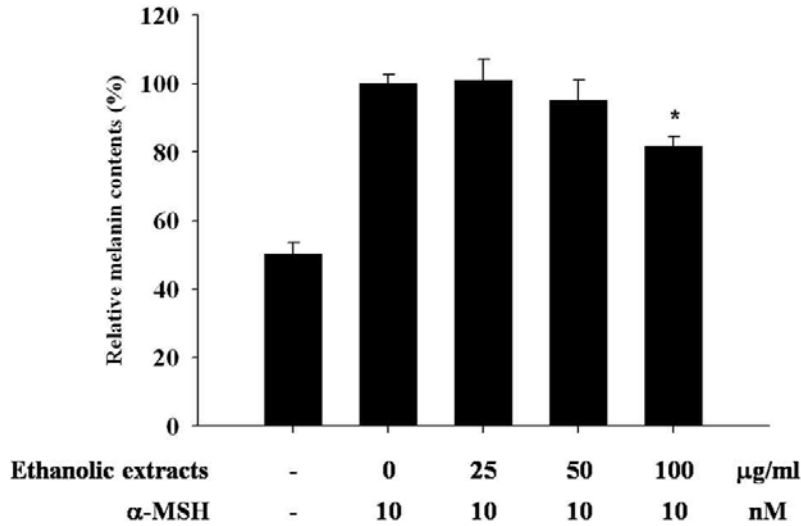
[그림 3-1-58] 곰피 주정 추출물이 B16 세포의 생존률에 미치는 영향.

곰피 주정 추출물의 세포내 멜라닌 생성에 미치는 영향을 확인하기 위하여 세포에 시료를 처리하고 1 시간 배양한 후, 10 nM의 α -MSH를 처리하여 72 시간 배양하였다. 세포내 멜라닌 함량은 Tsuboi 등[2]의 방법을 참고하여 실험하였다. 회수된 세포를 2 N NaOH에 녹인 후, 60°C에서 30 분간 가열하고 13,000 g에서 10 분간 원심분리 후 405 nm에서 흡광도를 측정하여 세포내 멜라닌 생성량을 비교하였다. [그림 3-1-59]과 [그림 3-1-60]에서 나타나듯이 곰피 주정 추출물은 α -MSH에 의한 멜라닌 과다 생성을 농도 의존적으로 억제시키는 것으로 확인되었다.

α -MSH (10 nM)	-	+	+	+	+
EtOH (µg/ml)	-	-	25	50	100

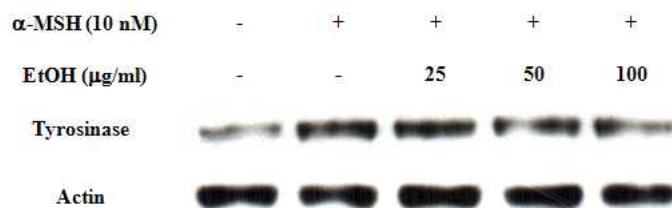


[그림 3-1-59] 곰피 주정 추출물이 B16 세포의 멜라닌 생성에 미치는 영향.



[그림 3-1-60] 곰피 주정 추출물이 처리된 B16세포내 멜라닌 함량.

곰피 주정 추출물의 멜라닌 생성 억제와 관련하여 멜라닌 생성에 중요한 역할을 하는 tyrosinase 효소의 발현을 분석하였다. B16 세포에 곰피 주정 추출물을 1 시간 전처리한 후, 10 nM의 α -MSH를 처리하여 3 일간 배양하여 세포내 단백질을 추출하여 Western blot으로 세포내 tyrosinase 효소 단백질의 발현양을 비교하였다. [그림 3-1-61]에 나타낸 바와 같이 α -MSH를 처리하였을 때 세포내 tyrosinase 효소 단백질의 발현이 증가하였지만 곰피 주정 추출물에 의하여 농도 의존적으로 발현이 감소되는 것으로 나타났다. 이는 곰피 주정 추출물이 세포내 신호전달 과정을 조절하여 tyrosinase 효소 단백질의 발현을 감소시킴으로써 세포내 멜라닌 생성을 억제하고 있다는 것을 의미한다. 이 실험 결과를 토대로 곰피 주정 추출물 중 멜라닌 합성 억제 효과가 뛰어난획분을 얻기 위하여 유기용매로 분획하여 미백 효과를 분석하였다.

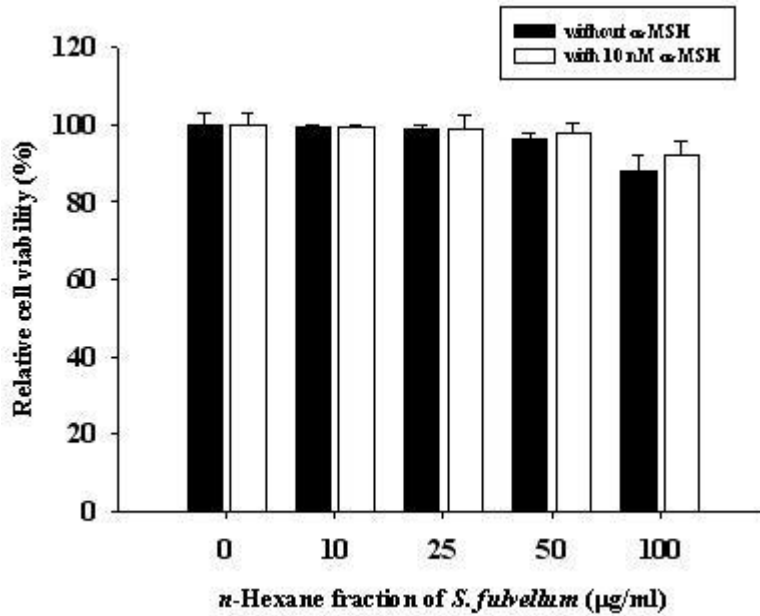


[그림 3-1-61] B16 세포내 tyrosinase 효소 단백질의 발현양.

(다) 곰피 EtOAc 분획물의 멜라닌 생성 저해 효과

본 연구에서는 곰피 EtOAc 분획물이 B16 세포내 멜라닌 생성에 어떠한 영향을 미치는지 확인하기 위하여 우선 시료를 세포에 처리하고 24 시간 배양한 후, MTS assay를 통하여 세포 생존률에 미치는 영향을 확인하였다. 또한 시료를 세포에

처리하고 1 시간 배양한 후, 10 nM의 α -MSH를 처리하여 24 시간 배양하여 MTS assay를 통하여 세포 생존률에 미치는 영향을 확인하였다. 그 결과 곱피 EtOAc 분획물은 100 μ g/ml의 농도까지 B16 세포의 생존률에 유의적인 영향을 미치지 않는 것으로 나타났다 ([그림 3-1-62]).



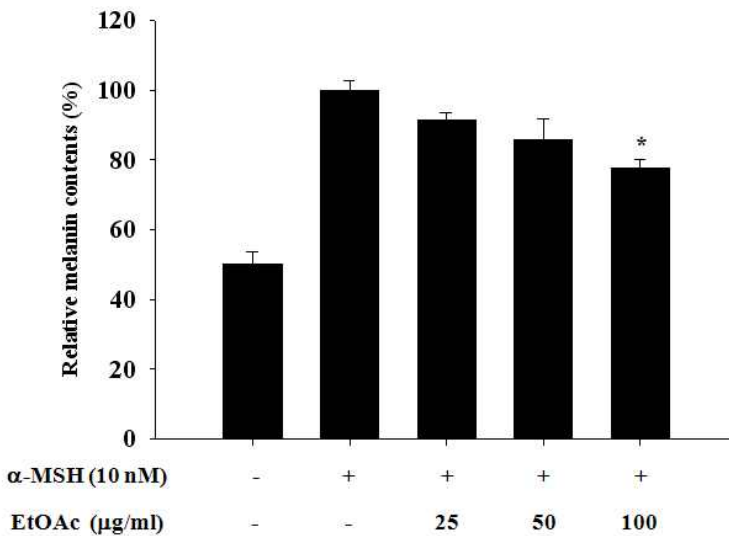
[그림 3-1-62] 곱피 EtOAc 분획물이 B16 세포의 생존률에 미치는 영향.

곱피 EtOAc 분획물의 세포내 멜라닌 생성에 미치는 영향을 확인하기 위하여 세포에 시료를 처리하고 1 시간 배양한 후, 10 nM의 α -MSH를 처리하여 72 시간 배양하였다. 회수된 세포를 2 N NaOH에 녹인 후, 60°C에서 30 분간 가열하고 13,000 g에서 10 분간 원심분리 후 405 nm에서 흡광도를 측정하여 세포내 멜라닌 생성량을 비교하였다. [그림 3-1-63]과 [그림 3-1-64]에서 나타나듯이 곱피 EtOAc 분획물은 α -MSH에 의한 멜라닌 과다 생성을 농도 의존적으로 억제시키는 것으로 확인되었다. 이러한 결과는 곱피 EtOAc 분획물이 세포에서 일어나는 여러 가지 신호 전달 과정을 조절하여 멜라닌 합성과 관련된 효소의 발현에 영향을 미쳐 세포내 멜라닌 생성을 저해시킨다는 것을 의미한다.

α -MSH (10 nM)	-	+	+	+	+
EtOAc (μ g/ml)	-	-	25	50	100

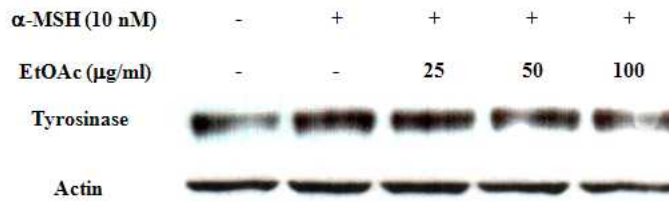


[그림 3-1-63] 곰피 EtOAc 분획물이 B16 세포의 멜라닌 생성에 미치는 영향.



[그림 3-1-64] 곰피 EtOAc 분획물이 처리된 B16세포내 멜라닌 함량.

곰피 EtOAc 분획물의 멜라닌 생성 억제와 관련하여 멜라닌 생성에 중요한 역할을 하는 tyrosinase 효소의 발현을 분석하였다. B16 세포에 곰피 EtOAc 분획물을 1 시간 전처리한 후, 10 nM의 α -MSH를 처리하여 3 일간 배양하여 세포내 단백질을 추출하여 Western blot으로 세포내 tyrosinase 효소 단백질의 발현양을 비교하였다. [그림 3-1-65]에 나타낸 바와 같이 α -MSH를 처리하였을 때 세포내 tyrosinase 효소 단백질의 발현이 증가하였지만 곰피 EtOAc 분획물에 의하여 농도 의존적으로 발현이 감소되는 것으로 나타났다. 이는 곰피 EtOAc 분획물이 세포내 신호전달 과정을 조절하여 tyrosinase 효소 단백질의 발현을 감소시킴으로써 세포내 멜라닌 생성을 억제하고 있다는 것을 의미한다.



[그림 3-1-65] B16 세포내 tyrosinase 효소 단백질의 발현양.

라. 곰피 EtOAc 획분을 함유한 미백 화장품개발

이상과 같이 곰피의 EtOAc 획분은 미백활성이 우수한 것으로 나타나 이러한 활성 획분을 이용하여 선마린바티오테크사에 의뢰하여 미백용 에센스와 로션을 제조하여 이들의 임상시험과 효능을 분석하였다.

(1) 인체 도포를 통한 미백효능의 측정

곰피 EtOAc 분획물을 함유한 화장품을 제조하기 위하여 이 분획물을 함유한 화장품을 제조하여 임상 시험을 통해 그 미백 효능을 측정하였다. 멜라닌 생성 정도의 측정은 Mexameter MX18(Courage & Khazaka, Germany)을 사용하여 측정하였다. MX18의 probe는 세 가지 파장의 빛을 발산하여 피부에 의해 반사되어지는 빛을 측정한다. Emitter와 receiver의 위치는 발산되고 흩뜨려진 빛만이 측정되어질 수 있게 설계되어 있으며 발산된 빛의 양만큼, 피부에 의해 흡수된 빛의 양을 계산하여 수치로 보여준다([그림 3-1-66]). 측정결과는 피부에 센서를 접촉한 1초 이내에 index value로 멜라닌 값을 표시한다. 곰피 EtOAc 분획물을 함유한 화장품의 미백효능을 확인하기 위하여 실지 피부에 도포하여 20대 중반에서 후반의 여성 6명을 대상으로 곰피 (*Ecklonia stolonifera*) 분획물을 함유하지 않는 크림(A)과 곰피 분획물 5%를 함유하는 크림(B)을 1일 2회, 총 8주간 팔 안쪽에 사용하게 하고 측정은 총 4회(인체 적용시험 시작 전 0주, 시험시로 사용 2주, 4주, 8주 경과 후) 실시하였다. 측정값은 매 측정시마다 10 회 반복한 값의 평균으로 하였다.



[그림 3-1-66] Mexameter의 실제 시연모습과 프로그램 화면.

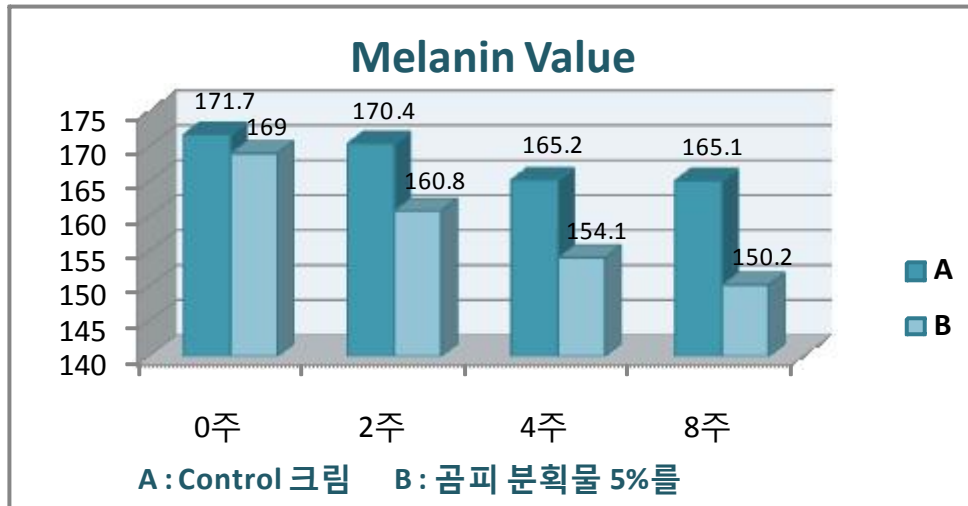
8주동안의 미백효과를 분석한 결과 곰피 분획물을 함유하지 않은 Control 크림을 사용한 결과 2주차에는 0.76%, 4주차에는 3.93%, 8주차에는 4% 정도 멜라닌 함량이 감소하는 경향을 나타냈다([표 3-1-15]). 이는 일반적인 보습제를 도포하였을 때 나타나는 정도로 생각된다. 그러나 곰피 분획물 5%를 함유하는 크림을 사용한 결과 2주차에는 5.10%, 4주차에는 9.67%, 8주차에는 12.52% 로 멜라닌 함량이 크게 감소하였다([표 3-1-16]). 이는 곰피 분획물이 멜라닌 함량을 감소시켜 피부 미백에 효과적임을 나타낸다. Control 크림과 곰피 분획물을 함유한 크림의 미백효과를 [그림 3-1-67]에 나타내었다.

[표 3-1-15] Control 크림 사용에 의한 8주 동안의 미백효과

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	평균	감소율
Before	173	173	172	172	175	170	172	171	169	170	171.7 ± 1.77	0
2주	173	171	170	171	170	173	170	168	167	171	170.4 ± 1.90	-0.76
4주	163	161	165	162	158	170	166	168	167	172	165.2 ± 4.29	-3.93
8주	172	171	167	169	158	159	166	162	162	165	165.1 ± 4.82	-4.00

[표 3-1-16] 곰피 분획물 5%를 함유하는 크림 사용에 의한 8주 동안의 미백효과

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	평균	감소율
Before	172	172	171	170	168	168	167	167	168	167	169 ± 1.77	0.00
2주	158	161	167	160	158	160	159	161	161	163	160.8 ± 1.90	-5.10
4주	160	151	152	153	156	154	159	159	147	150	154.1 ± 4.29	-9.67
8주	144	154	158	156	151	149	147	147	148	148	150.2 ± 4.82	-12.52



[그림 3-1-67] Control 크림과 곰피 분획물 5%를 함유하는 크림의 미백효과 비교.

(2) 피부 감작성 시험(피부 안전성 시험)

곰피 추출물이 함유된 화장품을 시제품으로 제조하여 피부 감작성 시험을 실시하였다.



테스트용 시제품

테스트용 샘플(에센스)

테스트용 샘플(크림)

[그림 3-1-68] 곰피 추출물이 함유된 화장품 시제품.

(가) 연구 목적

본 인체적용 시험에 관한 연구는 1차 피부자극 시험(patch test)을 실시하여 La MARINE Ageless Eternal Toner 외 2종에 대한 피부 안전성을 평가하는 것을 목적으로 한다.

(나) 연구 기간

본 연구는 피험자의 선정, 피부 안전성 평가, 데이터 분석, 결과보고서 작성의 순서로 진행되었으며 그 기간은 다음과 같다.

(다) 시료 정보

[표 3-1-17] 피부 감작성 시험에 사용된 시료명

번호	시료명	시험농도
#1	La MARINE Ageless Illuminating Serum	as is
#2	La MARINE Ageless Illuminating Cream	as is

(라) 연구 방법

① 피험자

㉠ 피험자 선정기준

- 20 ~ 58세의 성인 남녀(평균 35세)
- 시험의 목적, 내용 등에 대해 이해하고 자발적 참여 의사를 밝힌 자
- 발생 가능한 이상반응에 대해 이해하고 서면 동의서에 서명한 자
- 시험기간 동안 추적 관찰이 가능한 지원자

㉡ 피험자 선정 제외기준

- 감염성 피부질환이 있는 경우
- 임신 중이거나 수유 중인 경우
- 현저한 영양 장애자
- 약물이나 알콜 중독자
- 시험부위에 점, 여드름, 문신, 흉터, 홍반, 모세혈관확장, 화상자국 등이 있어서 육안평가에 영향을 미치는 경우
- 동일한 시험에 참여한 뒤 3개월이 경과되지 않은 경우
- 그 외 연구 책임자의 판단으로 시험에 부적합하다고 생각되는 경우

㉢ 시험 진행 중 피험자 중도 탈락 기준

- 개인 사정에 의해 추적 관찰이 어려운 경우
- 인체적용 시험 중 피부질환의 발생으로 시험을 진행할 수 없는 경우
- 본 시료의 처치 후 심각한 이상반응이 나타난 경우
- 시험부위에 과도한 자외선 노출을 한 경우
- 지나친 음주, 흡연 등으로 시험결과에 영향을 미친 경우
- 특별한 이유없이 피험자가 처치방법이나 일정을 어긴 경우

㉔ 정보의 비밀 유지와 성실 의무

- 본 시험에 참여한 피험자의 비밀은 보장된다. 단, 의학적, 학술적 연구 목적 또는 마케팅 목적으로 피험자의 신원이 밝혀지지 않는 범위에서 시험자료가 이용될 수 있다.
- 피험자는 본 시험을 통해 얻은 정보에 대하여 비밀을 유지해야 한다.
- 피험자는 성실하고 정직하게 자료를 작성한다.

② 피험자 선정

자발적으로 모집된 피험자들은 선마린바이오테크에 방문하여 문진을 실시하여 선정기준에 부합되고 제외기준에 해당되지 않는 20명을 최종 선발하였다.

③ 피부접포 시험(patch test)에 의한 안전성 평가 인체적용 시험

작성이 완료된 후 피험자의 팔 위쪽에 피부접포 시험을 실시하였다.

시험부위에 La MARINE Ageless Illuminating Serum 외 1종을 각각 25 µl씩 시험부위에 24시간 동안 피부에 접포하였으며, 접포를 제거한 후 각 30분 경과 후, 24시간 경과 후, 48시간 경과 후, 72시간 경과 후에 시험부위를 관찰하였다.

피부반응은 국제 접촉피부염연구회(ICDRG : International Contact Dermatitis Research Group)의 평가기준 ([표 3-1-18])에 따라 자극 정도를 분류하였다. 평균 피부 반응도 계산공식에 따라 mean score를 산정한 후 피부접포 시험 결과 판정표에 따라 자극 유무를 판정하였다([표 3-1-19]).

[표 3-1-18] 국제 접촉피부염연구회(ICDRG)의 평가기준

기호	score	피부반응 평가기준	
-	0	Negative reaction : 무자극	
±	0.5	Doubtful or slight reaction : 미자극	희미한 또는 가까스로 감지할 수 있는 가벼운 홍반
+	1	Weak(non-vesicular) positive reaction : 경자극	경계가 뚜렷하나 약한 홍반, 부종 및 구진
++	2	Strong(vesicular) positive reaction : 중자극	뚜렷한 홍반, 구진 및 소수포
+++	3	Extreme positive reaction : 강자극	심한 홍반 및 대수포, 가피형성

[표 3-1-19] 피부철포 시험 결과 판정표

판정(grade)	mean score
무자극(1)	0.00~0.75
미자극(2)	0.76~1.50
경자극(3)	1.51~2.50
중자극(4)	2.51~4.00
강자극(5)	4.0~

※ 평균 피부반응도 계산 공식

$$\text{mean score} = \frac{(A + B + C + D) \times 100}{3(\text{maximum score}) \times \text{No.of total subjects} \times \text{No.of evaluation}}$$

$$A = \sum_{i=1}^n \text{score}_i, B = \sum_{j=1}^n \text{score}_j, C = \sum_{k=1}^n \text{score}_k, D = \sum_{l=1}^n \text{score}_l$$

i = 철포 제거 후 30분 경과 후 피험자 수

j = 철포 제거 후 24시간 경과 후 피험자 수

k = 철포 제거 후 48시간 경과 후 피험자 수

l : 철포 제거 후 72시간 경과 후 피험자 수

score i,j,k,l = 철포 제거 후 30분 경과 후, 24시간 경과 후, 48시간 경과 후, 72시간 경과 후 각각의 평가경과를 ICDRG 평가기준에 따라 score로 표기한 점수. 홍반과 부종, 두 가지 반응에 대하여 모두 적용.

(마) 연구 결과

① 피험자

본 인체적용 시험에 참가한 사람은 총 20명 (남성 2명, 여성 18명으로 평균 연령은 35세) 이었으며, 이들을 대상으로 피부철포 시험을 진행하였다([표 3-1-20]).

[표 3-1-20] Patch Test 시험결과 기록서 및 결과

Patch Test 결과 기록서				
실험기간	24시간		판정 기준	Draize의 P.II법을 기준으로 판정
판정방법	1차 판정	patch 제거 후 30분 후	2차 판정	patch 제거 후 1일 후
	3차 판정	patch 제거 후 2일 후	4차 판정	patch 제거 후 3일 후
Test 위치	왼팔 안쪽	실험 방법		Closed patch test using Haye's test Chamber
시험제품명	1. 곰피 에센스		2. 곰피 크림	

실험결과											
번호	성명	나이	성별	곰피 에센스				곰피 크림			
				1차	2차	3차	4차	1차	2차	3차	4차
1	PSH	48	F	-	-	-	-	-	-	-	-
2	JMH	50	F	-	-	-	-	-	-	-	-
3	LHS	53	M	-	-	-	-	-	-	-	-
4	KYY	48	F	-	-	-	-	-	-	-	-
5	KSY	50	F	-	-	-	-	-	-	-	-
6	KHJ	23	F	-	-	-	-	-	-	-	-
7	KSH	27	F	-	-	-	-	-	-	-	-
8	JEJ	24	F	-	-	-	-	-	-	-	-
9	LMS	29	M	-	-	-	-	-	-	-	-
10	CHJ	25	F	±	±	±	-	±	±	-	-
11	KYG	24	F	-	-	-	-	-	-	-	-
12	KYA	27	F	-	-	-	-	-	-	-	-
13	YJS	49	F	-	-	-	-	-	-	-	-
14	LDJ	58	F	±	±	±	±	-	-	-	-
15	NHH	22	F	-	-	-	-	-	-	-	-
16	YJH	22	F	-	-	-	-	-	-	-	-
17	LSS	25	F	-	-	-	-	-	-	-	-
18	LYN	28	F	-	-	-	-	-	-	-	-
19	LYS	47	F	-	-	-	-	-	-	-	-
20	JMS	25	F	-	-	-	-	-	-	-	-
반응도			-	18	18	18	19	19	19	20	20
			±	2	2	2	1	1	1	0	0
			2+	0	0	0	0	0	0	0	0

② 판정

La MARINE Ageless Illuminating Serum 에센스 평균치 = 0.486

La MARINE Ageless Brilliant Cream 크림 평균치 = 0.139

판정표에 의해 두가지 화장품은 무자극으로 판정 되었다.

[표 3-1-21] 지원자의 피부에 대한 일반적인 정보

번호	나이	성별	이름	피부유형	비고
1	48	여	PSH	건성	
2	50	여	JMH	건성	
3	53	여	LHS	건성	민감성
4	48	여	KYY	지성	
5	50	여	KSY	중성	
6	23	여	KHJ	건성(아토피)	
7	27	여	KSH	지성	
8	24	여	JEJ	지성(여드름)	
9	29	남	LMS	지성	
10	25	여	CHJ	건성	
11	24	여	KYG	건성	민감성, 알러지
12	27	여	KYA	민감성	
13	49	여	YJS	중성	
14	58	여	LDJ	건성	민감성, 알러지
15	22	여	NHH	건성	
16	22	여	YJH	중성	
17	25	여	LSS	지성	
18	28	여	LYN	지성	
19	25	여	LYS	건성	
20	52	여	JMS	중성	

[표 3-1-22] 인체시험 결과 요약서

연구 제목	La MARINE Ageless Illuminating Serum 외 1종의 피부칩포에 의한 안전성 평가 인체적용 시험에 관한 연구
연구 기관	선마린바이오테크 경남 통영시 인평동 445 경상대학교 해양과학대학 파도관 105호
연구 기간	2011년
시료명	La MARINE Ageless Illuminating Serum 외 1종
연구 방법	24시간 폐쇄칩포 시험 1. 신체 건강한 성인 남녀 20명 선정 2. 칩포부위 : 피험자의 팔 부위에 시료를 적용하여 24시간 후 제거 3. 시험부위 관찰 : 칩포 제거 후 30분, 24시간, 48시간, 72시간 경과 후 관찰 4. 자극유무 판정 : PCPC Safety Testing Guidelines 및 ICDRG의 기준에 준하여 평가
연구 결과	1. 피험자 : 남성 2명, 여성 18명으로 21 ~ 58세의 연령분포를 가졌다. 2. 시험결과 : La MARINE Ageless Illuminating Serum 외 1종은 모두 무자극 제품군에 속하는 것으로 판단된다.
보고서 작성일	2011년 7월 21일
첨부자료	
연구책임자	박시향
연구자	이수선

(바) 소비자 만족도 조사

[표 3-1-23] 소비자 만족도 측정용 설문지 내용 (에센스와 크림 내용은 동일함)

▶ <u>에센스</u>					▶ <u>크림</u>				
<p>▶ 폼피 화장품에 대한 기호도에 대한 질문입니다. 각 세부 특성에 대해 그 정도를 말해 주세요.</p>									
1. 사용시 색상	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
	대단히 싫다	싫다	좋지도 싫지도 않다	좋다	대단히 좋다	대단히 싫다	싫다	좋지도 싫지도 않다	좋다
2. 사용시 향취	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
	대단히 싫다	싫다	좋지도 싫지도 않다	좋다	대단히 좋다	대단히 싫다	싫다	좋지도 싫지도 않다	좋다
3. 사용시 끈적임	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
	대단히 싫다	싫다	좋지도 싫지도 않다	좋다	대단히 좋다	대단히 싫다	싫다	좋지도 싫지도 않다	좋다
4. 사용시 흡수도	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
	매우 느리다	느리다	차이가 없다	빠르다	매우 빠르다	매우 느리다	느리다	차이가 없다	빠르다
5. 사용시 피부자극	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
	매우 약하다	약하다	차이가 없다	강하다	매우 강하다	매우 약하다	약하다	차이가 없다	강하다
6. 사용시 촉촉함	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
	매우 약하다	약하다	차이가 없다	강하다	매우 강하다	매우 약하다	약하다	차이가 없다	강하다
7. 사용시 번들거림	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
	매우 적다	약하다	차이가 없다	많다	매우 많다	매우 적다	약하다	차이가 없다	많다
8. 사용시 발림성	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
	매우 약하다	약하다	차이가 없다	강하다	매우 강하다	매우 약하다	약하다	차이가 없다	강하다
▶ 제품의 종합적인 의견에 대한 질문입니다.					▶ 제품의 종합적인 의견에 대한 질문입니다.				
Q. 1주일 동안 사용해 보신 후, 제품의 모든 것을 고려하여 평가해 주세요.					Q. 1주일 동안 사용해 보신 후, 전체적으로 평가할 때 어느 정도 좋아하십니까?				
<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
대단히 싫다	싫다	좋지도 싫지도 않다	좋다	대단히 좋다	대단히 싫다	싫다	좋지도 싫지도 않다	좋다	대단히 좋다
기타 의견이 있으시면 써주세요.									
()									

(사) 곰피 화장품-에센스 품평결과

① 내용

항 목	내 용		
품평기간	2011. 7.1-7.20	품평수(명)	20

② 품평 내용

결 과	항 목	1항	2항	3항	4항	5항	6항	7항	8항
	품 평 내 용	1	4	5	3	3	5	5	4
2		3	4	4	4	5	4	5	4
3		3	4	3	2	4	3	2	2
4		5	5	4	4	3	5	5	4
5		2	3	3	4	3	4	2	4
6		3	4	2	2	3	2	2	4
7		4	5	5	5	3	3	3	4
8		3	4	3	4	4	3	3	4
9		4	5	4	5	5	4	5	4
10		3	4	3	3	3	4	3	3
11		3	3	4	4	4	4	5	4
12		2	4	3	4	3	4	4	4
13		4	4	4	4	3	4	5	4
14		1	3	5	5	5	2	5	4
15		3	2	3	4	4	4	4	2
16		4	3	2	3	4	4	4	3
17		3	3	3	4	3	4	2	3
18		2	3	3	4	3	3	2	4
19		4	4	4	4	3	4	4	4
20		4	4	4	5	4	4	4	4
합계	64	76	69	77	74	74	73	73	
총계	(580/20)*2.5=72.5								

※ 각 항의 내용은 첨부된 품평서로 확인하십시오.

<p>품평 결과 산출</p> <p>1. 품평인이 항목별 선정한 번호를 더하여 그 더한 합에 2.5를 곱하여 100%를 기준으로 A, B, C, D등급으로 결과를 산출한다.</p> <p>2. 등급 : A 등급(100~80), B 등급(80~60), C 등급(60~40), D 등급(40~20), A~B 등급일 경우 소비자 만족도 우수 C 등급일 경우, 소비자 만족도 보통 D 등급일 경우, 개발 정지 및 전반적인 재 검토 요망</p>
--

③ 품평 결과

평균점수가 72.5로 A등급에 포함되지는 않으나 비교적 우수한 등급인 B등급으로 판정되었다. 약간의 수정 후 제품으로 출시할 수 있을 것으로 판정됨.

(아) 곰피 화장품 - 크림 품평결과

① 내용

항 목	내 용		
품평기간	2011.	품평수(명)	20

② 품평 내용

결과 항목		1항	2항	3항	4항	5항	6항	7항	8항
		1	4	5	5	4	5	5	4
2	3	4	4	4	3	5	4	4	4
3	3	4	3	3	3	5	2	2	3
4	4	5	4	4	4	3	5	4	4
5	2	4	4	4	3	3	4	2	4
6	4	4	4	4	3	3	3	4	3
7	2	4	4	4	4	3	3	4	2
8	3	4	3	3	3	3	4	4	2
9	4	5	5	5	5	5	5	5	5
10	3	3	3	3	4	3	4	3	3
11	2	4	3	3	2	4	4	5	2
12	3	4	3	3	3	3	3	4	3
13	3	4	4	4	4	5	4	5	4
14	3	2	5	5	5	5	5	5	4
15	2	4	4	4	4	4	4	4	3
16	4	5	4	4	4	4	4	4	4
17	2	3	3	3	4	3	4	2	3
18	2	3	3	3	4	3	3	2	4
19	4	3	4	4	4	3	4	2	4
20	4	5	5	5	4	4	4	4	4
합계	61	79	77	74	76	78	73	69	
총계	$(587/20)*2.5 = 73.4$								

품평 결과 산출

1. 품평인이 항목별 선정한 번호를 더하여 그 더한 합에 2.5를 곱하여 100%를 기준으로 A, B, C, D등급으로 결과를 산출한다.
2. 등급 : A 등급(100~80), B 등급(80~60), C 등급(60~40), D 등급(40~20),
A~B 등급일 경우 소비자 만족도 우수
C 등급일 경우, 소비자 만족도 보통
D 등급일 경우, 개발 정지 및 전반적인 재 검토 요망

③ 품평 결과

평균점수가 73.4로 A등급에 포함되지는 않으나 비교적 우수한 등급인 B등급으로 판정되었다. 약간의 수정 후 시제품으로 출시할 수 있을 것으로 판정됨.

마. 미백효능을 가지는 화장품의 제조

(1) 곰피 함유 에센스의 제조 레시피

[표 3-1-24] 곰피 함유 에센스 성분표

라 마린느 에이지리스 일루미네이팅 세럼

한글 전성분	함량(%)
정제수	82.34
부틸렌글라이콜	7.00
나이아신아마이드	4.00
베타인	2.00
변성알코올	2.00
글리세린	1.00
피이지-60하이드로제네이티드캐스터오일	0.50
트리에탄올아민	0.40
페녹시에탄올	0.30
카보머	0.27
디소듐이디티에이	0.05
에칠헥실글리세린	0.05
곰피추출물	0.05
향료	0.02
디포타슘글리시리제이트	0.01
소듐하이알루로네이트	0.01

(2) 곰피 함유 크림의 제조 레시피

[표 3-1-25] 곰피 함유 크림 성분표

라 마린느 에이지리스 브릴리언트 크림

한글전성분	함량(%)
정제수	75.36
카프릴릭/카프릭트리글리세라이드	4.00
미네랄오일	4.00
나이아신아마이드	4.00
부틸렌글라이콜	3.00
세틸알코올	2.00
글리세린	2.00
스테아릭애씨드	1.50
글리세릴스테아레이트에스이	1.00
글리세릴스테아레이트	1.00
소르비탄세스퀴올리에이트	0.50
피이지-40스테아레이트	0.40
페녹시에탄올	0.30
토코페릴아세테이트	0.20
트리에탄올아민	0.20
향료	0.15
알란토인	0.10
카보머	0.10
에칠헥실글리세린	0.05
디소듐이디티에이	0.05
곰피추출물	0.05
아데노신	0.04
소듐하이알루로네이트	0.00

(다) 화장품 시제품



[그림 3-1-69] 에센스와 크림 시제품 사진.



[그림 3-1-70] 에센스와 크림 포장제 사진.

4. 요약 및 제언

우리나라에서 대량양식 가능한 대표적인 갈조류인 다시마, 모자반 및 곰피의 생리활성에 관한 연구를 수행함으로써 기존의 연구에 의해 보고되지 않은 결과들을 밝혔으며, 2건의 국내특허를 출원하였으며, 3건의 논문을 투고중에 있다. 연구 결과를 요약하면 다음과 같다.

가. 요약

(1) 항염증 및 항치매 소재

다시마의 n -헥산과 디클로로메탄 획분은 항염증과 항치매 효과가 우수하여, 앞으로 염증관련 질환 (위염, 대장염, 류마티스성 관절염 등)과 퇴행성 신경질환 (알츠하이머성 치매, 파킨슨씨 질병)의 예방과 치료를 위한 식의약품의 소재로 활용될 가치가 높은 것으로 평가된다. 1차년도에 세포실험을 통하여 주정추출물과 n -헥산 획분이 높은 세포독성을 나타내었으나, 동물실험을 통한 독성은 나타나지 않았다. 이러한 결과는 다시마의 주정 추출물과 n -헥산 획분은 염증관련 건강기능소재로서의 활용이 기대된다.

모자반의 항염증 활성은 다시마와 마찬가지로 n -헥산과 디클로로메탄 획분에서 나타났으나, 다시마의 n -헥산 획분에 비해 모자반의 n -헥산 획분은 8 배, 모자반의 디클로로메탄 획분은 6 배 가량 낮은 것으로 나타났다. 그러나 다시마에 비해 세포독성은 4 배 가량 낮은 것으로 나타나 건강기능성 식품의 소재로서의 안정성은 높은 것으로 평가되었다.

(2) 항비만 소재

참모자반의 n -헥산 획분은 세포실험을 통하여 섬유아세포의 지방세포로의 분화억제 뿐만 아니라 지방합성 저해능이 우수한 것으로 확인되었으며, 현재까지의 동물실험 (10 일째)의 결과에 의하면 n -헥산 획분에 의한 비만억제효과가 뛰어난 것을 확인하였다. 이러한 결과는 참모자반을 이용한 체지방 감소용 건강 기능식품을 개발함으로써 해조류의 효과적인 이용에 기여할 것으로 판단된다.

(3) 미백용 화장품 소재

다시마와 참모자반의 주정추출물과 n -헥산 획분의 미백활성은 우수한 것으로 판명되어 현재 분자생물학적인 연구가 수행되고 있다. 이러한 연구 결과는 다시

마와 참모자반을 이용한 미백용 화장품 개발에 기여할 것으로 판단된다.

또한 1차년도의 곰피 에틸아세테이트 획분을 이용하여 미백용화장품을 개발하여 미백효능시험과 안전성 시험을 한 결과 인체에는 안전한 것으로 나타났으며, 미백효과 또한 우수한 것으로 나타났다. 이들 물질을 이용한 기능성 화장품 개발로 인한 부가가치가 창출될 것으로 기대된다.

(4) 곰피의 생리활성물질 분리

곰피에는 다양한 생리활성 물질들이 존재하는 것으로 보고되고 있으며, 본 연구개발을 통하여 7종의 화합물을 분리하여 이들의 항산화, 항염증, 항암효과를 규명하였다. 분리물의 구조와 기능은 향후 곰피를 이용한 개별인정현 건강기능성 식품개발을 위한 지표물질로 활용될 수 있다.

나. 제언

- (1) 본 연구개발기간이 짧은 관계로 다양한 생리활성물질들을 분리하였으나, 구조결정을 위한 연구기간의 부족으로 인한 논문투고와 특허출원이 미비하였으므로, 차년도부터는 충분한 연구기간이 필요하다.
- (2) 보다 다양한 생리활성 실험을 위한 실험기와 시약 구입을 위한 실험경비의 지원이 필요하다
- (3) 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 가능하여 원천기술 확보와 지적 독점권을 확보할 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 필요하다.

5. 향후계획

모자반 n -헥산 획득을 활용한 체지방 감소용 건강기능식품 소재 개발을 위한 기초연구 및 개별인정형 식품 등록을 위한 기초연구

제 2 절 해조류 생리활성 물질의 항암효과 및 기전 분석

1. 연구 목적 및 내용

가. 연구 목적

갈조류 유래 저분자 물질의 항암활성 효능 및 기전 규명

나. 연구 내용

- (1) 갈조류 유래 저분자 화합물 확보
- (2) 저분자 단일 물질 및 분획 물질의 암세포 증식억제효과 분석
- (3) Apoptosis (세포사멸과정) 유도인자의 작용 분석
- (4) Autophagy (자가소화작용) 작용 단백질의 변화 분석
- (5) 세포주기 (cell cycle) 조절인자 변화 분석.
- (6) 유효 항암물질들의 기전 규명

2. 연구 방법

가. 실험장치 및 재료

Human hepatocellular carcinoma Hep3B 2.1-7, 267B1/K-ras, HEK293, RPMI-1640 media (ATCC, Manassas, VA, USA), Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) supplemented with high-glucose (HyClone, Logan, UT, USA), Fetal bovine serum (HyClone), 100 U/ml penicillin and 100 µg/ml streptomycin (PAA Laboratories GmbH, PA, Austria), EZ-Cytox Cell Viability Assay Solution WST-1[®] (Daeil Lab Service, Jong-No, Korea), lysis buffer (50 mM Tris-Cl (pH 7.5), 150 mM NaCl, 1 mM DTT, 0.5% NP-40, 1% Triton X-100, 1% Deoxycholate, 0.1% SDS and proteinase inhibitors (PMSF, EDTA, Aprotinin, Leupeptin, Prostatin A) (Intron biotechnology, Gyeonggi, Korea), Protein Quantification Kit (CBB solution[®]) (Dojindo Molecular Technologies, Rockville, MD, USA), nitrocellulose membrane (PALL Life Sciences, MI, USA), 1차 항체(calpain-1, caspase-12, caspase-9, cleaved caspase-9, caspase-7, cleaved caspase-7, cleaved caspase-6, lamin-A, cleaved lamin-A, FADD, p-FADD, cleaved caspase-8, cleaved caspase-3, cleaved PARP, DFF45/DFF35, AIF, Apaf-1, cytochrome c, Bim, Bak, Bid, beta-actin; Cell Signaling Technology Inc.,

Beverly, MA, USA), 2차 항체(horseradish peroxidase-coupled anti-rabbit IgG , anti-mouse IgG; Cell Signaling Technology Inc., Enhanced chemiluminescent (ECL) detection solutions (Pierce, Rockford, IL, USA), ELISA leader (Molecular Devices, USA), Fluorescent microscopy ECLIPSE 50i (Nikon, Japan), FACS Calibur (Becton Dickinson, USA), Formaldehyde (JUNSEI Chemical Co., Ltd, JAPAN), mouse 와 rabbit normal serum (Santa Cruz Biotechnology, Inc., CA, USA), Triton X-100, primary antibodies (cleaved caspase -3 and β -actin) (Cell Signaling Technology Inc.), anti-mouse IgG (H+L), F(ab')₂ Fragment (Alexa Fluor® 555 Conjugate) and anti-rabbit IgG (H+L), F(ab')₂ Fragment (Alexa Fluor® 488 Conjugate) (Cell Signaling Technology Inc.), Prolong Gold Antifade Reagent (Invitrogen, Eugene, OR, USA), Prolong Gold Antifade Reagent (Invitrogen, Eugene, OR, USA).

나. 실험 절차

- (1) Cell viability assay (세포독성검사) : 96 well plate에 암세포와 정상세포를 1×10^5 개만큼 분주하고 해조류 추출물을 처리한 뒤 24시간 후 WST-1[®] 용액을 넣어 세포의 대사활성 여부를 효소학적으로 측정하였다.
- (2) DAPI 염색 : DAPI 염색은 DNA나 핵막에 주로 염색되어 세포사멸이 일어날 때의 DNA변화나 핵막에서 일어나는 주된 현상을 관찰하기 위한 방법으로 세포를 DAPI로 염색한 뒤 고정 처리과정을 거쳐 형광현미경으로 세포의 변화를 관찰하였다.
- (3) FACS analysis : 각각의 물질을 일정시간 처리한 뒤, trypsin-EDTA를 처리하여 암 세포를 하나씩 분리, 가는 노즐을 통과시키면서 적절한 파장으로 레이징하여 그 세포의 DNA 상태를 알아보는 실험으로서 해조류 추출물에 의한 세포의 DNA에 미치는 영향을 확률적으로 분석하여 암세포의 사멸정도를 측정하였다.
- (4) Western blot analysis : 해조류 추출물 처리한 암세포를 회수하여 세포막을 파괴하여 단백질을 추출한다. 추출한 단백질을 SDS-PAGE gel에 크기별로 분리시키고 항원-항체 반응을 유도하기 위하여 nitrocellulose membrane에 단백질을 이동시킨다. 확인하고자하는 단백질의 항원을 인식할 수 있는 항체를 처리하여 1차 항원-항체 반응을 유도시킨 뒤, 그 1차 항체를 인지할 수 있는 발광형의 2차 항

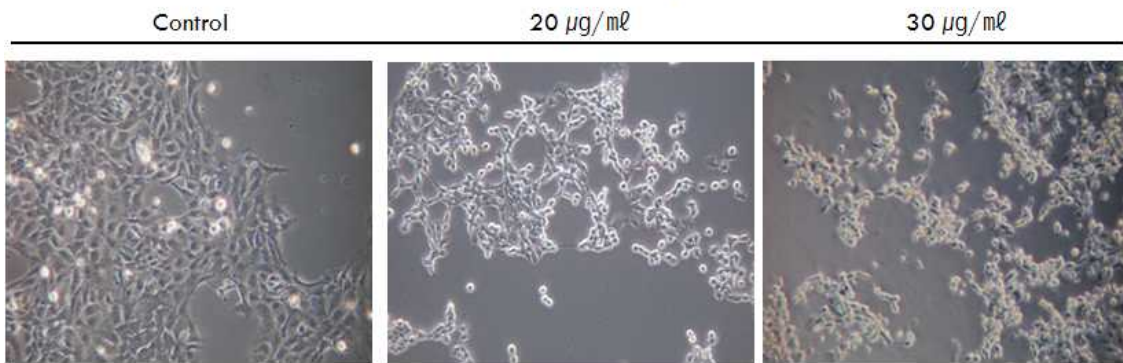
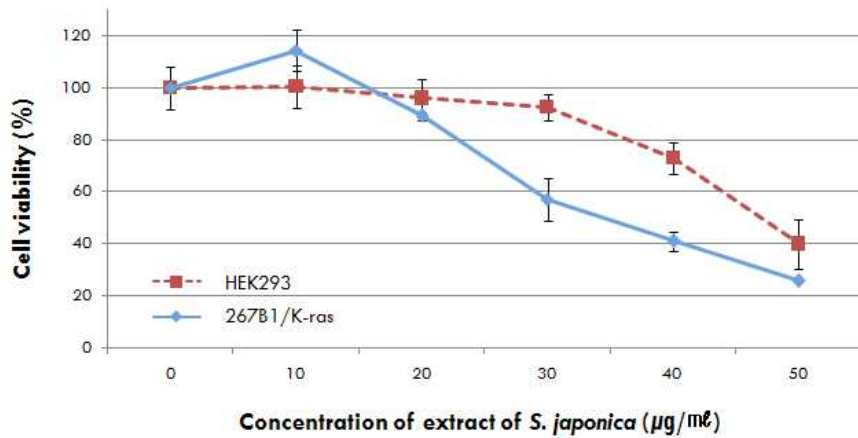
체를 처리하여 항원-항체 반응을 시키고 x-ray 필름에 노출하여 단백질 발현량의 변화를 분석하였다.

- (5) Immunofluorescence stain (면역 형광 염색) : Coverglass-bottom dishes에 267B1/K-ras cells을 배양 한 후, 다시마 추출물을 이용하여 20, 30 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 농도로 처리한 후 24시간 더 배양한 뒤, 배지를 제거 하고 DAPI 용액을 이용하여 37°C 에서 15분 염색한 후, 1X PBS를 이용하여 세척해 준다. 그 후 4% formaldehyde를 처리하여 상온에서 15분 동안 세포를 고정시킨 후 제거하고, 5% mouse and rabbit normal serum과 0.3% Triton X-100이 포함된 blocking 용액을 처리하여 상온에서 1시간 동안 반응시킨다. 고정 및 blocking이 된 세포에 0.1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ of primary antibodies (cleaved caspase -3 and β -actin)을 상온에서 3시간 처리한 후, 1X PBS를 이용하여 세포를 세척시켜 준다. 세포의 1차 항체 처리가 끝난 후에 2차 항체인 0.1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ of anti-mouse IgG (H+L), F(ab')₂ Fragment (Alexa Fluor® 555 Conjugate) and anti-rabbit IgG (H+L), F(ab')₂ Fragment (Alexa Fluor® 488 Conjugate)을 상온에서 1시간 처리한 후 마찬가지로 1X PBS를 이용하여 세포를 세척해 준다. 그리고 slideglass에 Prolong Gold Antifade Reagent (Invitrogen, Eugene, OR, USA)를 50 μl 씩 떨어뜨린 후 coverglass를 얹은 후 형광현미경을 이용하여 형광 이미지를 획득하였으며, High-Content Analysis Software를 이용하여 사진을 imaging 하였다.

3. 연구수행 결과

가. 다시마에서 추출한 n-핵산 R3 Fraction-4 (이하 Fraction-4)의 전립선암 세포주 (267B1/k-ras)에서의 항암기전 분석

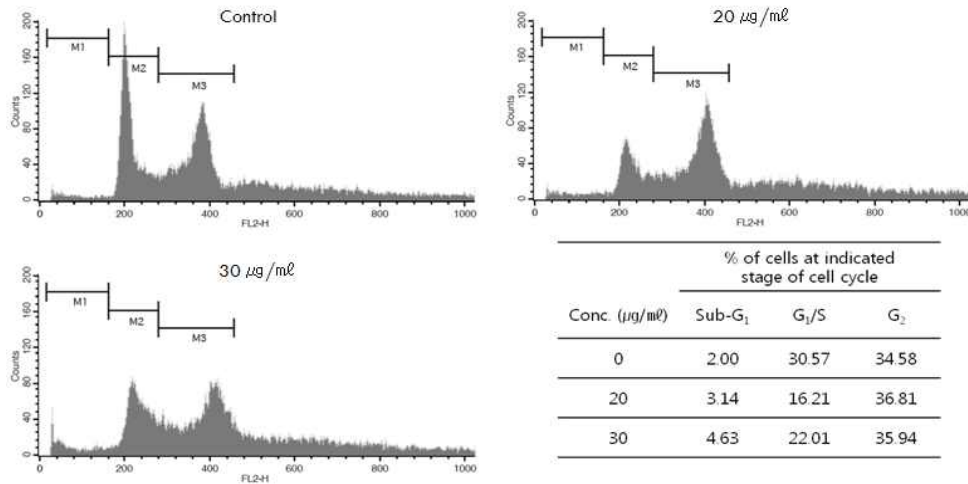
- (1) Fraction-4의 전립선암 세포주인 267B1/k-ras와 정상 신장세포주인 HEK293과의 사멸효과 비교



[그림 3-2-1] 농도에 따른 Cell viability (세포 생존율)와 현미경 관찰 (100배).

다시마에서 추출한 Fraction-4의 암세포에 대한 세포 생존율을 알아보기 위하여 물질처리 24시간 후, WST-1 용액을 처리하여 ELISA로 분석한 결과, 20 µg/ml의 농도에서 약 10%의 사멸율을, 30 µg/ml의 농도에서는 약 40%의 사멸율을 나타내었다. 이에 반하여, 인간의 정상 신장세포주인 HEK293에서 Fraction-4를 같은 농도와 시간으로 처리한 결과 유의성 있는 30 µg/ml 농도에서 약 5% 정도의 사멸율을 나타내는 것으로 보아, 정상세포에 대한 부작용은 거의 없는 것으로 나타났다. 또한 같은 농도와 처리 후에 현미경 (100배)으로 세포모양 변화와 생존 세포수의 변화를 관찰한 결과 농도의존적으로 세포수가 감소하는 것을 확인할 수 있었으며, 30 mg/ml의 농도에서는 전립선암세포 고유의 뾰족한 모양을 잃고 둥글게 말리며 사멸하는 현상을 관찰할 수 있었다.

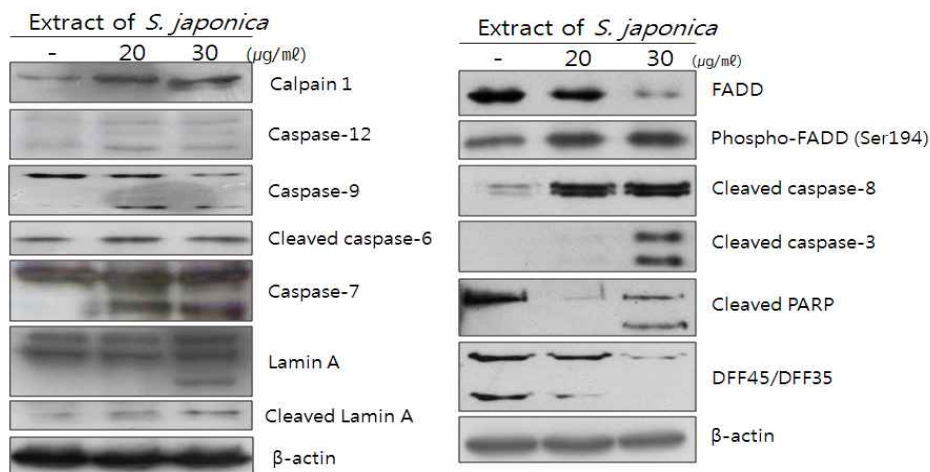
(2) FACScan 분석을 통한 apoptosis (세포사멸) 및 세포주기 변화 분석



[그림 3-2-2] 세포주기 상의 sub-G1기 분석.

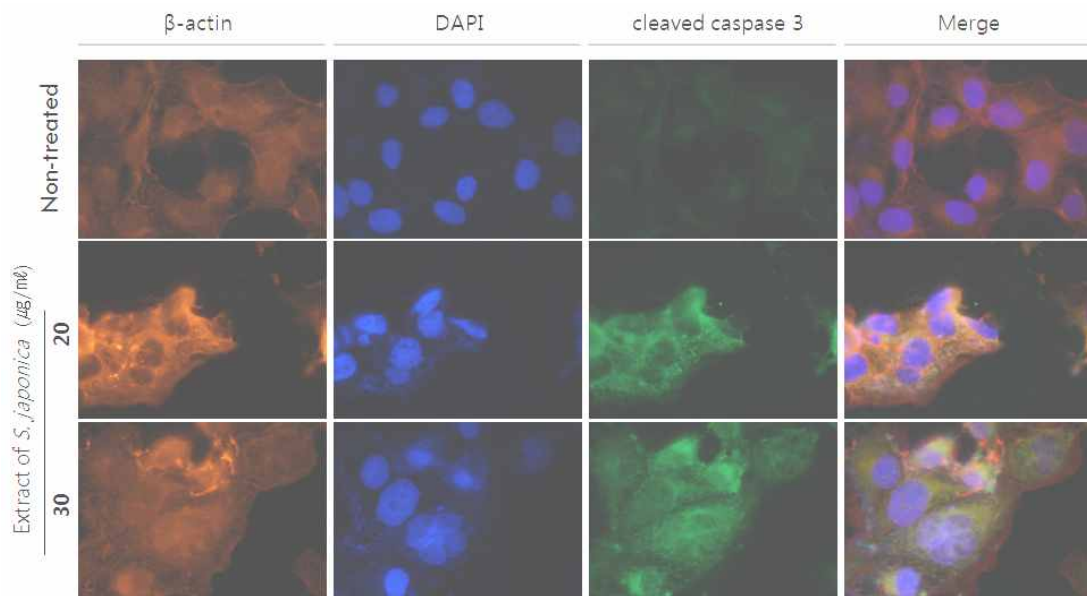
FACScan 분석을 통해서 DNA가 절편화 되면서 나타나는 Sub-G1기가 fraction-4에 의해 농도 의존적으로 증가하는 것을 확인할 수 있었다. 이는 총 10,000개의 분리된 세포를 레이저를 이용하여 그 DNA contents를 측정, 판단하는 것이기 때문에 dieckol을 처리 하였을 때 apoptosis가 일어나 DNA 분해가 된 세포 수가 증가하였음을 증명하는 결과이다.

(3) 다시마 추출물인 Fraction-4에 대한 세포 내 세포사멸(apoptosis) 및 세포사멸 관련 단백질 발현양상 분석



[그림 3-2-3] 세포사멸(apoptosis) 관련 단백질의 발현양상.

단백질 발현 양상을 분석할 수 있는 Western blot analysis를 통하여 Fraction-4를 처리하였을 때 전립선암 세포의 세포사멸 기작을 분석하였다. 첫 번째로, 소포체 스트레스를 유발하는 calpain1의 발현이 증가하여 caspase12의 발현도 증가한 것으로 보이며, 이에 따라 하위 조절인자인 caspase들의 잘림현상이 발생하여 apoptosis 활성이 나타난 것으로 판단된다. 또한 apoptosis의 기작 중 하나인 세포 외 사멸기작에 따라 세포막에 분포하는 FADD의 발현양이 감소하는 동시에 serine 194번째 잔기가 인산화 되면 아래의 caspase8을 활성화 시킴으로서 잘리게 되고, 더불어 하위 인자인 caspase 3와 caspase 7 등이 잘리며 활성을 띠게 된다. 또한 DNA가 손상을 일으켰을 때 작용하여 DNA 복구를 돕는 PARP 단백질이 잘림으로서 그 활성을 잃고, 세포골격과 핵막골격을 담당하고 있는 Lamin A 단백질이 잘려 세포 내부에서 붕괴되는 것으로 판단되어지고 있다.

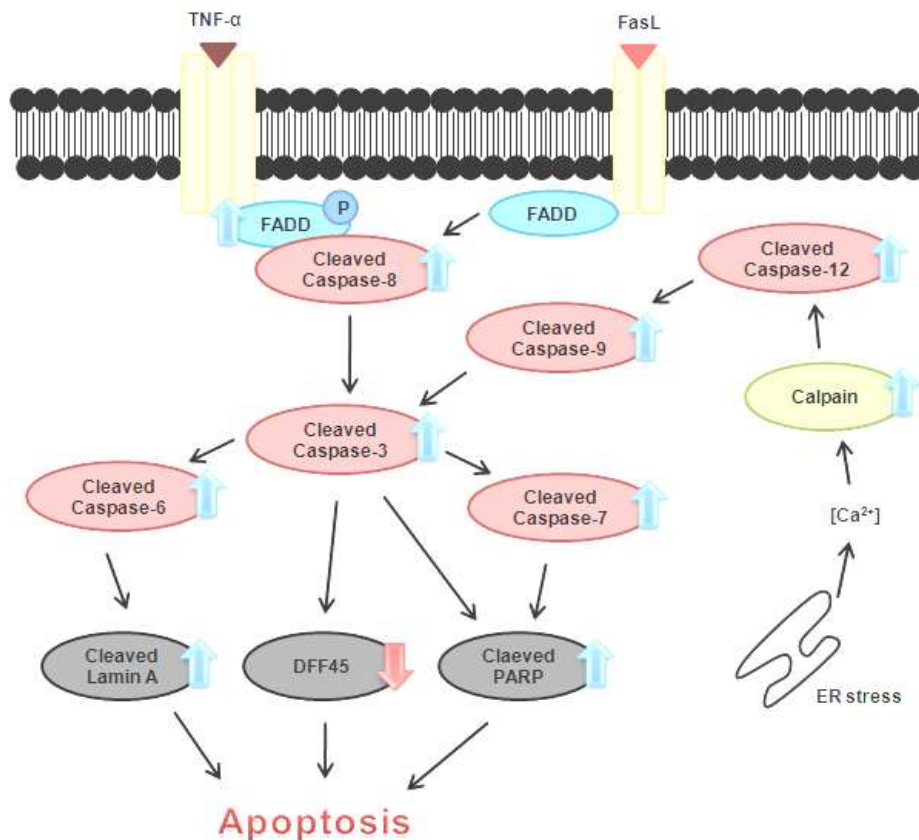


[그림 3-2-4] 세포 내 위치하는 cleaved caspase 3의 발현 양상을 확인.

최근에는 세포에서 단백질을 따로 추출하여 정량적인 값을 확인하는 Western blot 말고도 단백질을 따로 추출하지 않고 세포 그 자체에 단백질을 인식하는 항체를 넣어 형광현미경을 통하여 세포 내의 어느 위치에서 발현되고 있는지를 알아보는 immunofluorescence 라는 방법이 많이 이용되어지고 있다. 따라서 세포 내에서 apoptosis의 핵심적인 역할을 담당하고 있는 caspase 3의 발현정도를 세포 상에서 직접 확인하기 위하여 핵막과 내부 DNA를 염색할 수 있는 DAPI 염색, house keeping gene으로 널리 알려져 있는 beta-actin, 그리고 cleaved caspase3 항

체들을 세포내로 침투시켜 각각 다른 과장대로 같은 위치를 관찰한 결과 위와 같은 결과를 확인할 수 있었다. 이는 Fraction-4를 처리하지 않는 세포에서보다 20과 30 $\mu\text{g/ml}$ 로 처리한 세포 내에서 실질적인 apoptosis 활성을 가지는 잘려진 caspase 3가 많이 나타남을 직접 육안으로 관찰 할 수 있었으며, Fraction-4가 apoptosis를 일으킨다는 중요한 단서임을 확인할 수 있다[25].

(4) Fraction-4에 의한 전립선암세포의 항암기작 도식표

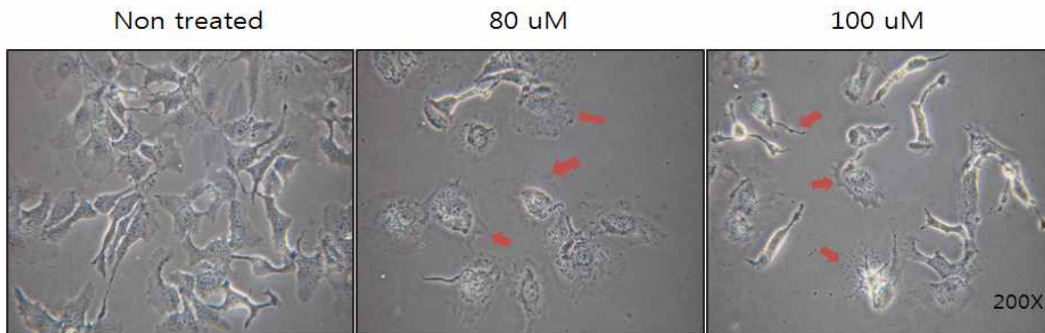
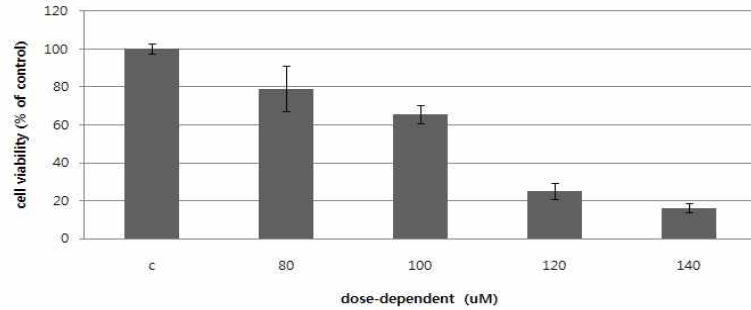


[그림 3-2-5] Fraction-4의 세포 내 항암기작.

앞에서 언급되었던 다양한 단백질의 발현양 변화에 대한 Western blot분석 결과들을 토대로, Fraction-4의 암세포 사멸 유도과정을 모식도로 정리하여 나타낸 것이다. 위와 같은 결과에 의하여 소포체 스트레스뿐만이 아니라 세포 외부의 인자에 작용하는 세포막 수용체에 의해서 전달되어지는 caspase의 활성을 통하여 apoptosis가 일어남을 확인할 수 있다.

나. 감태에서 추출한 Dieckol의 간암세포주 (Hep3B)에서의 항암기전 분석

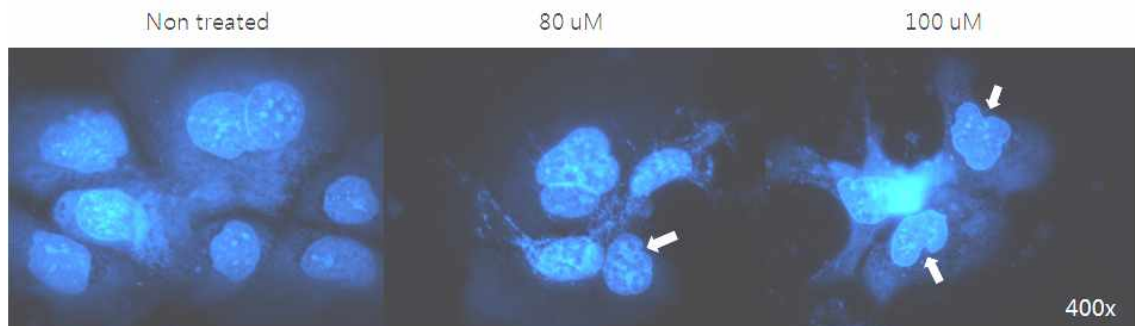
(1) Dieckol의 Hep3B 세포 사멸효과



[그림 3-2-6] 농도에 따른 Cell viability assay(세포 생존율)와 현미경 관찰.

간암세포주인 Hep3B에 대한 dieckol의 세포독성을 확인하기 위하여 dieckol 처리 24시간 후, WST-1 용액을 넣어 Cell viability assay (세포생존율 분석)를 실시한 결과 100 mM에서 약 40%, 120 mM에서 약 70%의 사멸효과를 나타내는 것으로 판명되었으며, 현미경상으로 관찰 하였을 때, 세포막의 붕괴와 세포내부의 분해가 일어나는 현상을 관찰 할 수 있다.

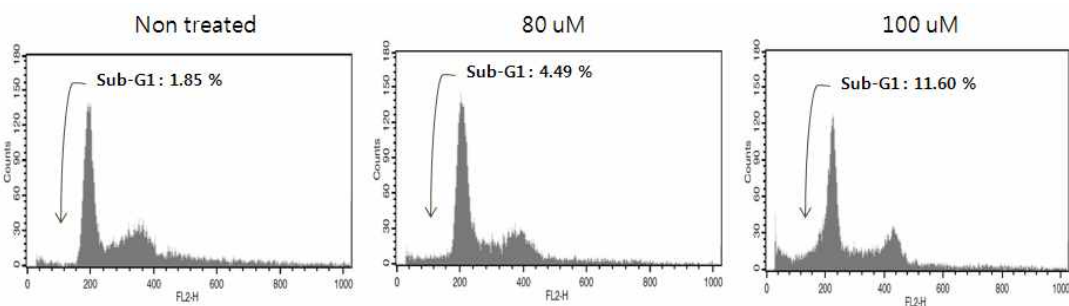
(2) DAPI 염색을 통한 세포 내 핵막의 모양 변화 관찰



[그림 3-2-7] DAPI 염색을 통한 핵막붕괴 관찰.

Dieckol을 간암세포에 처리한 후, DAPI 염색 방법을 이용하여 핵막과 그 내부 DNA 변화를 관찰하였다. 80 mM에서 핵막의 유실이 시작되고, 100 mM에서는 핵막이 완전히 응축하여 작게 말려 있는 것을 관찰할 수 있었으며, 이는 apoptosis (세포사멸)가 일어날 때 생기는 핵막의 붕괴와 DNA 응축과 관련이 있는 현상이므로 세포사멸 현상이 apoptosis에 의한 것이라는 근거가 될 수 있다[26].

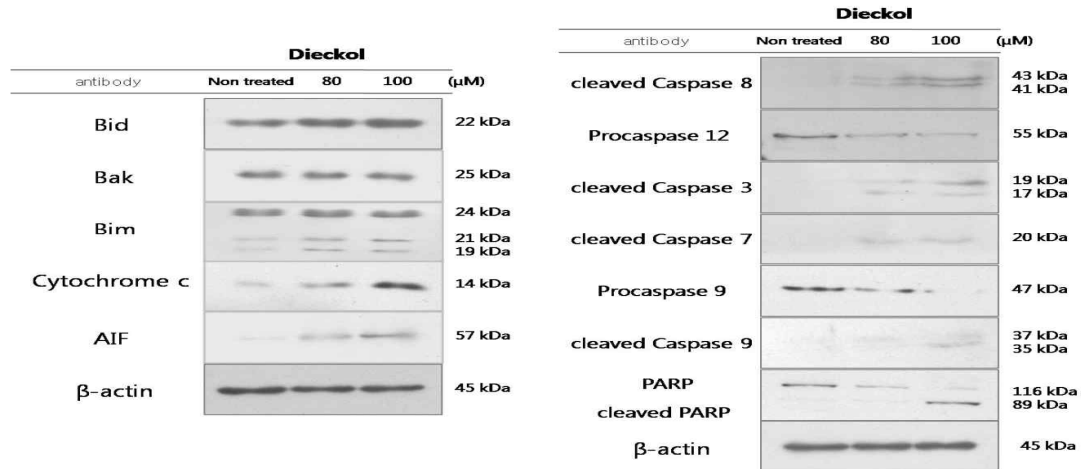
(3) DNA 응축 관찰과 FACScan 분석을 통한 apoptosis (세포사멸) 분석



[그림 3-2-8] 세포주기 상의 sub-G1기 분석.

FACScan 분석을 통해서 세포주기 상의 변화를 관찰해 본 결과 apoptosis가 일어나면서 DNA가 분해되어 나타나는 Sub-G1기가 dieckol의 농도 의존적으로 증가함을 확인 할 수 있다. 이는 총 10,000개의 분리된 세포를 레이저를 이용하여 그 DNA contents를 측정, 판단하는 것이기 때문에 dieckol을 처리 하였을 때 apoptosis가 일어나 DNA 분해가 된 세포 수가 증가하였음을 증명하는 결과이다.

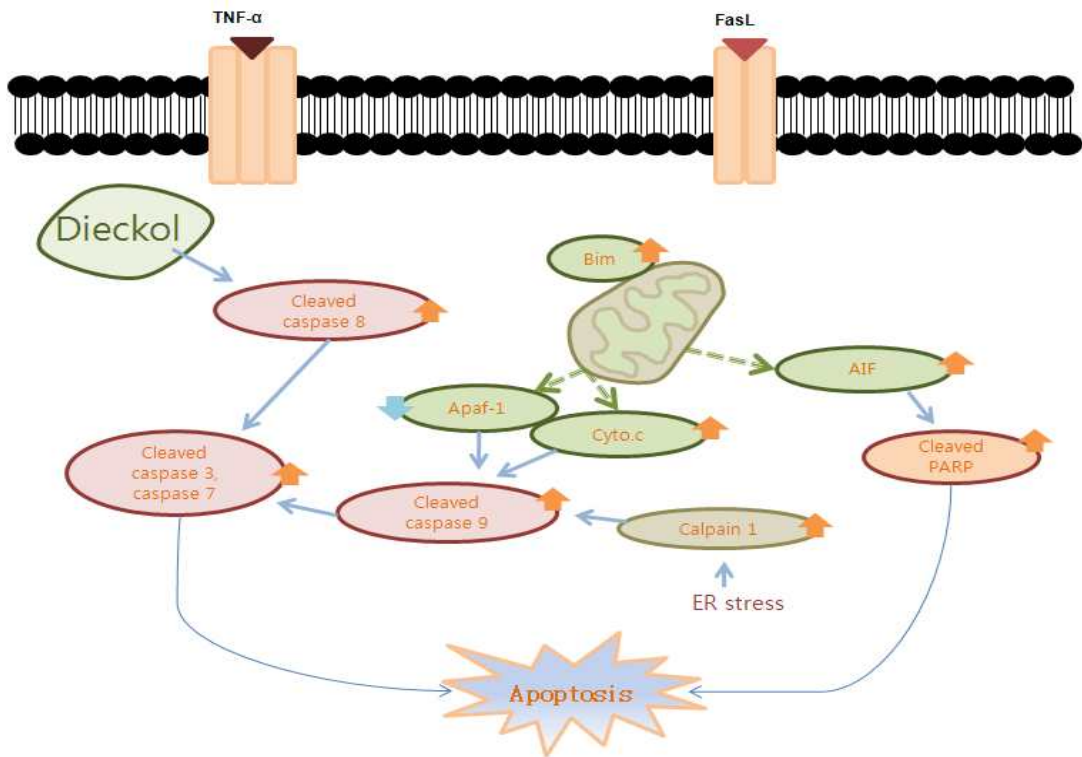
(4) Dieckol에 대한 세포 내 세포사멸 (apoptosis) 관련 단백질들의 발현변화 분석



[그림 3-2-9] 세포사멸(apoptosis)과 관련된 단백질들의 발현양상.

Western blot analysis를 통하여 apoptosis의 작동과 관련된 중요 단백질의 발현양을 조사해봄으로서, 실제 단백질 발현이 세포내에서 어떠한 경로로 변화하여 apoptosis가 일어났는지를 명확히 규명할 수 있다. Apoptosis는 크게 미토콘드리아에서부터 시작하는 세포내부기작과 세포막의 세포사멸수용체로부터 시작하는 세포외부기작으로 분류할 수 있다. 세포내부기작은 Cytochrome C의 방출로부터 시작되는데, 방출된 cytochrome c는 Apaf-1과 결합하여 caspase 9의 단편화를 촉진하여 apoptosis를 유발할 수 있으며, 미토콘드리아 막에 분포하는 Bak과 Bim의 발현이 증가하여 이 과정을 유발시켰음을 확인할 수 있었고, AIF의 방출로 세포가 위험에 처해있을 때 DNA를 수선하여 정상적으로 작동하게 하는 PARP가 잘려져 그 활성을 잃게 만든 것으로 결론지을 수 있다. 또한 세포 외부기작으로는 DAPK/ZIPK가 증가하여 촉진시킴으로서 caspase 8의 단편화에 의하여 하위 인자들이면서 apoptosis에서 핵심적인 역할을 담당하는 caspase 3와 caspase 7의 단편화가 진행되어 활성화되면 apoptosis를 유발함을 확인할 수 있었다.

또한 소포체 스트레스에 의한 apoptosis 기능을 가지는 caspase 12 또한 단편화 되어 원래의 단백질의 감소가 확인되었으므로, dieckol의 소포체의 스트레스를 유발하여 apoptosis를 일으키는 것을 확인할 수 있다.



[그림 3-2-10] Dieckol의 세포 내 항암기작.

4. 요약 및 제언

감태에서 추출한 dieckol과 다시마의 n-헥산 R3 Fraction-4 추출물의 항암기작은 소포체 스트레스에 의한 apoptosis 유도, 미토콘드리아와 관련된 세포 내 전달기작에 의한 apoptosis 유도과 세포막에 분포하는 세포사멸 수용체에 의한 apoptosis를 동시에 일으키는 것으로 판명되었으며, 이러한 결과들은 해조류 추출물들이 항암제로 이용할만한 미래 항암제 원료로서의 잠재적 가치를 지니고 있음을 제언하고 있다. 따라서 지속적인 추출물의 분리 및 분획연구를 통한 유효 선도물질의 발굴은 천연소재로부터의 항암제 개발에 기여할 것이며, 이러한 결론들을 토대로 하여 동물모델 실험과 같은 직접적인 신약개발에 필요한 향후 부차적인 연구를 진행해야 한다.

5. 향후계획

- 게재 예정 학술지

제 목	학술지	발표자	국가명 (SCI 여부)	비고
Dieckol, an isolation from <i>Ecklonia stolonifera</i> , induces apoptosis on human hepatocellular carcinoma Hep3B cells	Cancer Letters	김군도 김형락 우희철 외 6명	영국 (SCI)	현재 학술지에 제출되어 검토중임.
The Anti-Cancer Effects of <i>Laminaria japonica</i> extract on 267B1/K-ras Human Prostate Cancer Cells	Journal of Medicinal Food	김군도 김형락 우희철 외 2명	미국 (SCI)	

제 3 절 해조류 생리활성 물질의 항당뇨 효과 및 기전 분석

1. 연구 목적 및 내용

가. 연구 목적

갈조류인 다시마 (*Laminaria japonica* Areschoung, Seatangle, Kombu)는 Laminariaceae에 속하며, 한대·아한대의 연안에 분포하는 한해성(寒海性) 식물로 한국, 일본, 중국, 프랑스 등지에 분포한다. 예부터 식용으로 널리 이용되었으며, 한국에서는 임산부의 건강을 증진시키기 위한 전통치료약으로 사용되었다. 이전의 연구들에서는 다시마의 메탄올 추출물의 free radical 소거 활성효과[27]와 항돌연변이 활성[28]을 지니는 것으로 밝혀졌으며, 당뇨병 쥐에서 혈당을 낮추는 효과를 지니고 보고되었다[29]. 그리고 streptozotocin으로 유도된 쥐의 간에서 산화적 스트레스와 xanthine oxidase 활성에 대한 다시마 열수추출물의 예방효과가 검증되었으며, 고혈당으로 유도된 산화적 스트레스에 대해 BuOH 분획물이 보호 효과를 가지는 것으로 나타났다[30]. 또한, 다시마로부터 분리된 라미나린 (laminarine), 알긴산 (alginic acid), 후코이단 (fucoidan)은 다양한 생리활성을 지니는 것으로 알려져 있다. 라미나린은 혈압조절 효과를 지니며[31], 알긴산은 식품첨가물로 널리 이용되고 있으며 [32], 장내에 존재하는 유해한 미생물의 증식을 억제 한다[33]. 또한, 혈중 콜레스테롤을 저하[34], 혈당조절 작용을 하는 것으로 보고되었다[35]. 다당류인 후코이단은 혈액응고 억제활성[36,37], 항바이러스 효과[38], 항암효과[39,40], 면역조절 활성 [41,42], 항산화 효과[43], 혈중지질 강하작용[44,45], 항보체 활성[46], 위 보호작용 [47], 신장질환과 요로질환 완화 효과[48,49] 등의 생리활성에 대한 다양한 연구들이 진행되어왔으며, 추출물과 분획물 수준에서의 항당뇨 활성에 대한 연구가 발표된 바 있다. 그러나 다시마로부터 분리된 생리활성성분의 lens aldose reductase 억제활성, 최종당화산물 형성억제 활성의 검색을 통한 당뇨병과 당뇨합병증의 치료에 대해서는 연구된 적이 없다.

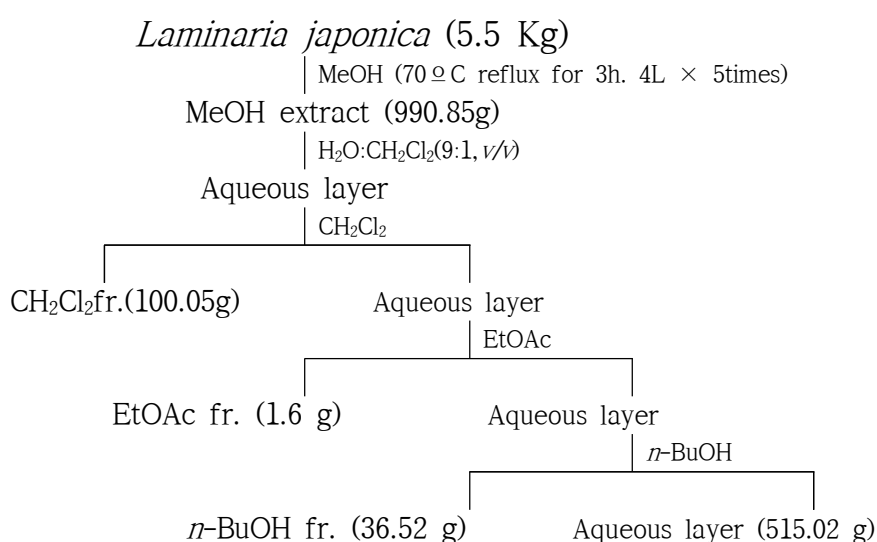
따라서, 본 연구에서는 다시마의 100% MeOH 추출물과 이를 계통적 분획법에 따라 분획하여 얻은 분획물들에 대한 lens aldose reductase 억제활성법, 최종당화산물형성 억제활성법을 in vitro에서 수행하고, 이들 중 활성을 지닌 분획물에서 silica gel, Diaion HP-20, RP-18 column chromatography를 통하여 생리활성물질을 분리 동정하였다. CH₂Cl₂ 분획물로부터 분리한 화합물을 ¹H-NMR, ¹³C-NMR 등의 분광학적 분석을 통하여 pheophorbide a와 pheophytin a로 동정하고, 이들의 lens aldose reductase 억제활성, 최종당화산물 형성억제 활성을 측정하여 항당뇨 효과를

측정하였다. 또한, HPLC-UV detector를 통하여 추출용매를 달리하여 각각의 추출물의 pheophorbide a와 pheophytin a를 정량하여 최적의 추출조건을 확립하고자 하였다. 본 연구는 다시마와 다시마로부터 처음으로 분리해낸 porphyrin-related compound의 lens aldose reductase 억제활성, 최종당화산물형성 억제활성을 통해 검증된 항당뇨 효과에 대한 최초의 보고로써, 다시마가 당뇨와 당뇨합병증의 예방과 치료에 효과적인 기능성 식품으로서의 가능성을 제시하고자 하였다.

나. 연구 내용

(1) 추출 및 분획

건조분말상태의 다시마 (*Laminaria japonica*) 5.5 kg을 환류 냉각기를 부착한 집기병에 담은 후 수욕상에서 3시간씩 5회 추출하였다. 그리고 추출액을 여과한 후 rotary vacuum evaporator로 농축하여 990.85 g의 MeOH 추출물을 얻었다. 그 후 MeOH 추출물을 H₂O:CH₂Cl₂ (9:1,v/v)로 녹인 다음 분액 여두에 붓고, 동량의 CH₂Cl₂를 넣어 분획하였다. 평형화된 아래층의 CH₂Cl₂ 가용부는 무수 망초 (sodium sulfate, anhydrous)를 처리한 후 여과하여 농축하였다. 위와 같은 방법으로 4회 더 반복하여 CH₂Cl₂ 분획물 100.05 g을 얻었다. 동일한 방법으로 EtOAc를 가하여 상층의 EtOAc 가용부를 모아 EtOAc 분획물 1.6 g을 얻었다. 또한 *n*-BuOH에 대해서도 동일한 방법으로 시행하여 상층의 *n*-BuOH 분획물 36.52 g과 하층의 H₂O 분획물 515.02 g을 얻었다([그림 3-3-1]).



[그림 3-3-1] 다시마 추출 및 분획 과정.

(2) 활성 화합물의 분리

다시마 (*Laminaria japonica*)의 MeOH 추출물과 그 분획물들에 대하여 최종 당화산물 형성 억제활성법과 lens aldose reductase 억제활성실험법을 시행한 결과, EtOAc 분획물이 가장 높은 활성을 보였고, 다음으로 CH₂Cl₂ 분획물이 높은 억제활성이 나타냈다. 그러나 CH₂Cl₂ 분획물이 EtOAc 분획물보다 다소 낮은 억제활성을 나타내지만, Scheme1에서 볼 수 있듯이 CH₂Cl₂ 분획물이 EtOAc 분획물보다 수율이 높기 때문에 상대적으로 효과가 높을 것으로 예상된다. 이에 CH₂Cl₂ 분획물을 대상으로 silica gel, dioion HP-20, RP-18 column chromatography를 수행하여 활성 성분을 분리하였다. CH₂Cl₂ 분획물 (46g)을 n-Hexane:EtOAc (20:1~0:100)의 용매로 silica gel column chromatography하여 18개의 subfractions (F1-F18)으로 나누었다.

이들 subfractions으로 최종당화산물 억제활성을 검색해본 결과, F9, F10, F13, F14에서 높은 활성을 보였다. 이에 각각의 subfractions의 양을 고려하여 F9, F10을 column chromatography하였다. F9 (2.3g)을 전개용매 EtOH, MeOH, Acetone로 Dionion HP-20 column chromatography한 후 acetone subfraction (F9-4)을 n-Hexane:Acetone (10:1~Acetone, gradient)으로 silicagel column chromatography하여 10개의 subfractions (F9-4-1~F9-4-10)을 얻었으며, compound 1 (Pheophorbidea, 5mg)을 얻었다. 이 후 F9-4-3 subfraction을 Lichroprep[®] RP-18 (CH₂Cl₂ : MeOH : Water = 8 : 22 : 1)로 정제하여 compound 2 (Pheophytina, 95mg)을 분리하였다. 동일한 분리방법으로 F10 (1.9g)에서도 Pheophytin a를 얻었다.

(3) 최종 당화산물 형성 억제 활성

최종당화산물 형성억제활성은 Vinson and Howard (1996)의 방법을 변형하여 실험하였다[50]. 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 첨가한다. AGE reaction solution 950 μ L과 10 % DMSO에 녹인 여러 농도의 sample 50 μ L를 섞은 후, 37°C에서 7일간 incubation한다. 이후 spectrofluorometric detector (FL x 800 microplate fluorescence reader, Bio-Tek Instrument, Inc., Winooski, USA)를 이용하여 350 nm (excitation wavelengths)와 450 nm(emission wavelengths)에서 반응생성물의 fluorescence intensity를 측정하였다. Positive control로는 aminoguanidine hydrochloride을 사용하였으며, AGEs 형성 억제율은 아래의 식을 통하여 구한 후, 선회귀방정식을 이용하여 통계처리 하였다.

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

(4) Lens aldose reductase 억제 활성

Lens aldose reductase 억제활성을 측정하기 위한 효소원의 조제는 Hayman 과 Kinoshita (1965)의 방법을 수정하여 실시하였다[51]. 흰쥐의 수정체를 적출하고 수정체 1개당 0.5mL의 Phosphate buffer을 가하여 균질화 한다. 이를 4℃, 10,000rpm으로 20분간 원심 분리한 후 그 상등액을 취하여 사용한다. 반응 buffer인 potassium phosphate buffer (pH 7.0) 620 μ L, 효소원 90 μ L, NADPH (1.6mM) 90 μ L, DMSO에 녹인 MeOH extract와 각각의 fractions 9 μ L, 기질로는 90 μ L의 DL-glyceraldehyde를 큐벳에 넣어 UV spectrophotometer (Ultrospec 2100pro, Amersham Biosciences, Sweden)을 이용하여 340nm에서 NADPH 흡광도의 감소율을 측정하였다. 대조군은 시료대신 DMSO를 첨가하여 측정하며, 저해율은 다음의 식으로 구하였다.

$$\text{측정값} = \{(0\text{분 흡광도} - 4\text{분 흡광도}) / 4 (\text{측정시간})\} \times 100$$

$$\text{Inhibition (\%)} = \{1 - (A_{\text{cont}} - A_{\text{sam}}) / A_{\text{cont}}\} \times 100$$

A Sam: 측정시료를 넣었을 때의 측정값

A Cont: 측정시료를 넣지 않았을 때의 측정값

각각의 측정시료의 lens aldose reductase 억제활성을 IC₅₀ value로 나타내었다. 이는 조효소인 NADPH의 감소를 50% 억제하는 농도를 μ g/ml 혹은 μ M로 나타낸 값으로 log-dose 억제 curve로부터 계산하였다.

2. 연구 방법

가. 실험장치 및 재료

본 실험에서는 2009년 5월에 기장물산(주)을 통하여 기장 연근해에서 채취하여 건조 발에 규격대로 낀 후 자연 상태로 태양 건조한 다시마 (*Laminaria japonica*)를 구입하였다. 표본은 본 연구실에 보관하고 있다.

(1) 시약

Column packing material은 silica (Si) gel 60 (70~230mesh, Merck, Darmstadt, Germany)과 Lichroprep®RP-18 (40-63 μ m, Merck), DiaionHP-20(250-850 μ m, Sigma)을 사용하였다. Thin layer chromatography는 Kieselgel 60 F₂₅₄plate (0.25mm, precoated Merck, Art. 5715)와 RP-18 F_{254s} (Merck, Art. 5685)를 사용하였으며, 발색시약은 50% H₂SO₄를 사용하였다. 추출 및 column chromatography는 1급 시약을 사용하였다. NMR 측정 시 사용한 용매는 CDCl₃ (Merck, deuterium degree 99.95%)이다. Bovine serum albumin (BSA), aminoguanidine hydrochloride, D-(-)-fructose와 D-(+)-glucose, β -nicotinamide adenine dinucleotide phosphate (NADPH), quercetin, DL-glyceraldehyde dimer, Dimethyl sulfoxide (DMSO), 그리고 Chlorophyll a, protoporphyrin IX, hemin, Hematin과 Phytol은 Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, USA)에서 구입하였고, Sodium azide는 Junsei Chemical Co. (Tokyo, Japan)에서 구입하였다. Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM)은 Hyclone Laboratories, Inc.에서 구입하였고, HPLC 분석용 MeOH와 Acetone은 각각 Merck KGaA (Darmstadt, Germany) 와 DUKSAN PURE CHEMICAL CO., LTD (Ansan, Korea)에서 구입하여 사용하였다. NaH₂PO₄, KH₂PO₄과 NaOH는 Yakuri Pure Chemicals Co., Ltd. (Osaka, Japan), Na₂HPO₄는 Junsei Chemical Co., Ltd. (Tokyo, Japan)로부터 구입하였다.

(2) 기기

¹H-NMR과 ¹³C-NMR JUN ECP-400 spectrometer (JEOL, Japan)로 각각 400 MHz와 100 MHz에서 측정하였다. 최종당화산물 측정은 microplate fluorescence reader FL800 (Bio-Tek instruments Inc.)로 하였으며, lens aldose reductase 억제 활성실험에서의 흡광도는 UV spectrophotometer (Ultrospec 2100pro, Amersham Biosciences, Sweden)로 측정하였다. NO 및 cell viability 측정은 microplate reader spectrophotometer VERSA max (Molecular Devices, CA, USA)로 하였다. TLC상의 화합물은 장파장 (356nm)과 단파장 (254nm) 검용 (Model ENT-240C, Spectroline, U.S.A)를 사용하여 검색하였다.

나. 실험 절차

(1) 추출 및 분획

(2) 화합물의 분리

- CH₂Cl₂획분의 성분 분리

(3) 최종당화산물 형성억제 활성과 lens aldose reductase 억제 활성

(4) HPLC 분석

3. 연구수행 결과

가. 다시마 CH₂Cl₂ 분획물에서 분리된 화합물의 구조결정

다시마 (*Laminaria japonica*)의 분획물 중 최종당화산물 형성 억제 활성이 가장 높은 CH₂Cl₂ 분획물에서 column chromatography를 통하여 2종의 화합물을 분리, 정제 하였으며 1D NMR (¹H-NMR, ¹³C-NMR)의 분광학적 방법을 사용하여 분석하였다. 이들 화합물은 다시마에서는 처음 분리된 화합물이다.

Compound 1 (Pheophorbidea)는 암녹색의 비결정성 고체로 분리되었으며, 용매는 CDCl₃로 ¹H-NMR과 ¹³C-NMR spectrum을 측정하여 그 data를 문헌치 (Chee *et al.*, 2005)와 비교하여 Pheophorbide a임을 확인하였다. 이 화합물은 *Scutellaria barbata*, *Ficus macrocarpa* 등으로부터 분리되었으며, 항산화 활성과 간암세포에 대한 광역학적 치료효과를 가지는 것으로 보고되었다[52]. 또한, 피부암의 일종인 색소성 흑색종, 결장암, 췌장암 세포 등의 성장을 억제하는 것으로 알려져 있으며 [53,54], ICR 마우스의 피부에서 항암효과와 항 염증효과를 지니는 것으로 밝혀졌다 [55].

Compound 2 (Pheophytina)는 암녹색의 비결정성 고체로 분리되었으며, 용매는 CDCl₃를 사용하여 ¹H-NMR과 ¹³C-NMR spectrum을 측정하였다. 그 결과 문헌의 spectrum과 일치하여 Pheophytin a로 동정하였다[56-58]. 이 화합물은 *Lonicera hypoglauca*, *Sargassum fulvellum*, *Enteromorpha prolifera* 등으로부터 분리되었으며, 항 C형 간염효과[58]와 PC12 cells의 분화를 증폭시킴으로써 알츠하이머 질환과 같은 신경퇴행성 질환에 대한 효과[59], 항산화 효과가 알려져 있다[60]. 또한, 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate (TPA)로 유도한 생쥐 포식세포에서 초과산화물 음이온 (O²⁻)의 생성을 억제하고, 생쥐 귀에서 부종과 같은 염증반응에 대해 강력한 억제효과를 가지는 것으로 밝혀졌다[61].

나. MeOH 추출물과 각 분획물들의 최종당화산물 형성억제 활성과 lens aldose reductase 억제활성

다시마의 MeOH 추출물과 MeOH 추출물을 계통적 용매 분획하여 얻은 CH₂Cl₂, EtOAc, *n*-BuOH 분획물과 H₂O층의 최종당화산물 억제 활성과 lens aldose

reductase 억제활성을 측정하여 그 결과를 [표 3-3-1]에 나타내었다.

최종당화산물 억제활성법의 대조약물로는 aminoguanidine을 사용하였으며, 활성을 검색한 결과 다시마의 MeOH 추출물과 분획물들의 IC₅₀ 값은 EtOAc 분획물 (IC₅₀ 150.32 μ g/ml) > CH₂Cl₂ 분획물 (IC₅₀ 167.65 μ g/ml) > MeOH 추출물 (IC₅₀ 1206.08 μ g/ml) > *n*-BuOH분획물 (> IC₅₀ 1600 μ g/ml) > H₂O분획물 (> IC₅₀ 1600 μ g/ml)의 순으로 나타났다. MeOH 추출물과 각 분획물들의 최종당화산물 형성 억제 활성실험에서 *n*-BuOH 분획물과 H₂O 층은 1600 μ g/ml이상에서도 전혀 효과가 나타나지 않았다. 대조군인 aminoguanidine (IC₅₀ 86.77 μ g/ml)보다는 다소 낮은 최종당화산물 형성 억제 활성을 나타내었으나, MeOH 추출물과 각 분획물 들 중에서 EtOAc 분획물이 가장 높은 활성을 보이고, 다음으로 CH₂Cl₂ 분획물이 높은 활성을 나타내었다.

[표 3-3-1] 다시마 메탄올 추출물과 하위 분획물의 활성

Samples	RLAR ^a	AGE ^b
	Inhibition (%)	IC ₅₀ (μ g/ml)
	Mean \pm S.E.M.	Mean \pm S.E.M.
MeOH extract	27.44 \pm 1.13	1206.08 \pm 21.29
CH ₂ Cl ₂ fraction	30.24 \pm 0.36	167.65 \pm 1.76
EtOAc fraction	50.83 \pm 0.12	150.32 \pm 2.84
<i>n</i> -BuOH fraction	31.85 \pm 1.01	>1600
H ₂ Ofraction	19.11 \pm 1.34	>1600
Quercetin ^c	65.89 \pm 0.95	
Aminoguanidine ^d		86.77 \pm 0.62

RLAR: rat lens aldose reductase, AGE: advanced glycation end products.

^aLens aldose reductase was determined at a concentration of 100.0 μ g/ml for the methanol extract and its fractions obtained from the methanolic extract of *L. japonica* and 1.0 μ g/ml for quercetin, dissolved in DMSO. ^bThe 50% inhibition concentration (μ g/mL) were calculated from the log dose inhibition curve and expressed as the mean \pm S.E.M. of triplicate experiments. ^cQuercetin was used as a positive control in the RLAR assay. ^dAminoguanidine was used as a positive control in the AGE assay.

다시마의 MeOH 추출물과 분획물들의 lens aldose reductase 억제활성을 측정하기 위해 대조약물로는 aldose reductase 억제제로 알려져 있는 quercetin을 사용하였다[62]. 다시마의 MeOH 추출물과 그로부터 얻은 분획물들의 lens aldose

reductase 억제활성은 100.0 $\mu\text{g/ml}$ 의 농도에서 EtOAc 분획물 ($50.83 \pm 0.12\%$) > *n*-BuOH 분획물 ($31.85 \pm 1.01\%$) > CH_2Cl_2 분획물 ($30.24 \pm 0.36\%$) > MeOH 추출물 ($27.44 \pm 1.13\%$) > H_2O 분획물 ($19.11 \pm 1.34\%$)의 순으로 나타났다. 이들은 대조군인 quercetin (1.0 $\mu\text{g/ml}$ 의 농도에서 $65.89 \pm 0.95\%$)보다는 낮은 활성을 나타내었으나, 그 중에서 EtOAc 분획물이 가장 높은 활성을 나타내었다. 그 다음으로 *n*-BuOH 분획물과 CH_2Cl_2 분획물이 높은 억제활성을 나타내었다.

이들 결과를 종합해 보면, EtOAc 분획물이 두 실험계에서 가장 강력한 억제활성을 지니고 다음으로 CH_2Cl_2 분획물이 효과적인 것을 알 수 있었다. 그러나 수을 면을 고려해볼 때, CH_2Cl_2 분획물이 EtOAc 분획물의 63배 가량 높기 때문에 CH_2Cl_2 분획물에 최종당화산물 형성과 lens aldose reductase 활성을 억제할 수 있는 성분이 다량 존재하고 있을 것으로 기대할 수 있었다. 따라서 본 연구에서는 CH_2Cl_2 분획물에서 그 생리활성성분을 분리하고자 하였다.

다. 분리된 화합물들의 최종당화산물 형성 억제활성과 lens aldose reductase 억제 활성

다시마의 CH_2Cl_2 분획물을 대상으로 silica gel, Diaion HP-20, RP 18 column chromatography 를 수행하여 2종의 porphyrin계 화합물인 pheophorbide a (1), pheophytin a (2)를 분리하였으며, 이들을 대상으로 최종당화산물형성 억제활성과 lens aldose reductase 억제활성을 평가하였다 ([표 3-3-2]). 최종당화산물형성 억제 활성 실험은 in vitro에서 glucose, fructose와 같은 당과 BSA간의 당화반응에 의해 형성된 형광성을 지닌 최종당화산물의 측정을 통해 이루어졌다. 다시마에서 분리된 pheophorbide a 와 pheophytin a는 대조군인 aminoguanidin보다 강력한 억제활성이 나타났으며, pheophorbide a의 IC_{50} 값은 $42.06 \pm 1.03 \mu\text{M}$ 로 양성 대조군인 aminoguanidin ($735.65 \pm 6.71 \mu\text{M}$)보다 약 15배정도 높은 활성을 보였다. pheophytin a의 $228.71 \pm 0.07 \mu\text{M}$ 로 양성 대조군인 aminoguanidin보다는 3배정도 강한 활성을 나타냈다.

반면, lens aldose reductase 실험에서는 오직 pheophorbide a만이 억제활성을 나타내었다. 본 실험은 Rat의 수정체를 균질화하여 효소로 사용하고 DL-glyceraldehyde를 기질로 하여 수행하였다. 양성 대조군인 quercetin ($1.17 \pm 0.17 \mu\text{M}$)과 비교하였을 때, pheophorbide a는 IC_{50} 값이 $12.31 \pm 1.19 \mu\text{M}$ 로 비교적 높은 활성을 나타내었다. 반면에 pheophytin a는 억제활성을 나타내지 않았다. 그러나, pheophorbide a는 강력한 lens aldose reductase 억제활성을 보이거나 pheophytin a는 그렇지 못한 것을 보아, porphyrin계 화합물의 lens aldose reductase 억제활성

은 porphyrin ring에 포함된 이중결합에 의한 항산화 활성에 기인한 것이 아니라 C-17²위치의 carboxyl group의 존재에 의한 것임을 알 수 있다.

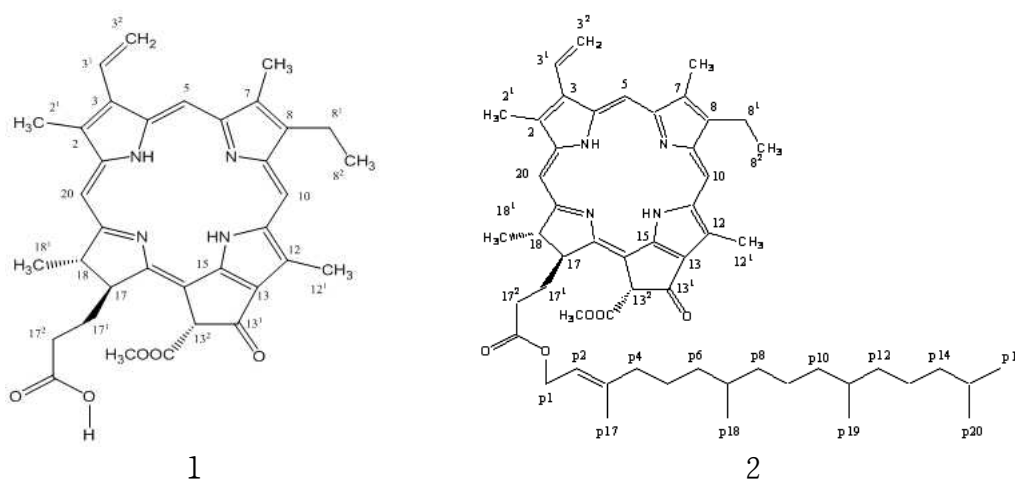
이러한 결과들을 종합해보면, 다시마와 그로부터 분리된 pheophorbide a 와 pheophytin a는 당뇨병성 합병증을 예방하고 치료할 수 있는 기능성 식품으로서의 이용이 가능할 것으로 기대된다.

[표 3-3-2] 다시마로부터 분리한 화합물의 활성

Compounds	RLAR ^a	AGE ^b
	IC ₅₀ (μ M) Mean \pm S.E.M.	IC ₅₀ (μ M) Mean \pm S.E.M.
Pheophorbide a	12.31 \pm 1.19	49.43 \pm 1.32
Pheophytin a	>100	228.71 \pm 0.07
Quercetin ^c	1.17 \pm 0.17	
Aminoguanidin ^d		735.65 \pm 6.71

RLAR: rat lens aldose reductase, AGE: advanced glycation end products.

^aThe concentration that caused 50% inhibition (IC₅₀) is given as the mean \pm S.E.M. of duplicate experiments. ^bThe 50% inhibition concentration (μ g/mL) were calculated from the log dose inhibition curve and expressed as the mean \pm S.E.M. of triplicate experiments. ^cQuercetin was used as a reference compound on lens aldose reductase inhibitory activity. ^dAminoguanidine was used as a reference compound on AGE formation inhibitory activity.



[그림 3-3-2] 다시마로부터 분리된 화합물 1과 2의 구조.

4. 요약 및 제언

식용 갈조류인 다시마의 항산화 활성[1], 항돌연변이 활성[2], 혈당강하 효과 [3]등이 이전의 연구들을 통해 밝혀졌으며, 다시마로부터 분리된 라미나린 (laminarine)의 혈압조절 효과[5], 알긴산의 장내 유해미생물의 증식억제 효과[7]와 혈중 콜레스테롤 저하[8], 혈당조절 작용[9]이 보고되었다. 또한, 다당류인 후코이단은 혈액응고 억제활성[10,11], 항바이러스 효과[12], 항암효과[13,14], 면역조절 활성 [15,16], 항산화 효과[17], 혈중지질 강하작용[18,19], 항보체 활성[20], 위 보호작용 [21], 신장질환과 요로질환 완화 효과[22,23]등의 생리활성이 나타났다. 이와 같이 다시마와 그로부터 분리해낸 성분의 다양한 생리활성에 대한 많은 연구들이 보고 되어 왔으나, 다시마와 다시마로부터 처음으로 분리해낸 porphyrin-related compound의 lens aldose reductase 억제활성과 최종당화산물형성의 억제활성에 대한 검증은 본 연구가 처음이며, 위와 같은 결과들을 미루어 보아 다시마와 porphyrin-related compound의 당뇨병증의 예방과 치료에 효과적인 천연의약품으로서의 역할을 기대할 수 있다.

5. 향후계획

추출 용매 조건에 따른 추출물의 HPLC 분석을 통한 표준화 및 규격화

제 4 절 해조류 자원의 통합적 활용을 위한 DB 구축 및 표준화

1. 연구 목적 및 내용

가. 연구 목적

다양한 기능성을 갖는 해조류를 대상으로 생리활성물질을 효율적으로 추출하는 추출법을 확립하고 유기용매로 저분자 유기물질을 추출하고 대용량 Preparative HPLC를 이용하여 생리활성물질을 분획하고 이들에 대한 기능성을 검색한다. 더불어 검색된 기능성물질을 순수 분리하여 구조를 규명하고 기능성 식품, 화장품 및 의약품으로서 활용성을 확보한다.

나. 연구 내용

- 유기용매에 의한 해조류의 기능성물질 추출방법 확립
- Prep. HPLC에 의한 생리활성물질 분획 및 검색
- 기능성물질의 순수분리 및 물질 규명
- 양식 다시마의 구성당 성분분석

2. 연구 방법

가. 실험장치 및 재료

해조류 및 Preparative HPLC, 동결건조기, rotary evaporator,

HPLC 1. 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 (500mm × 21.2 mm) Prep column.

HPLC 2. Shimadzu LC-8AD pump 1대, Syringe pump, FCV-20AH, Shimadzu Sil-20A auto-sampler, Shimadzu SPD-20A, Shimadzu FRC-10A fraction collector, Shimadzu RI-10A reflective index detector, Shimadzu CBM-20A system controller, LC Workstation software, Phenomenex Luna C18(2) (250mm × 21.2 mm) Prep column.

나. 실험 절차

- GPC에 의한 분획 조건

다시마 핵산 추출물

column: Jaigel GS 310 column(20 ϕ x 500mm) 2개 직렬 연결

유속: 5mL/min

이동상: Methanol 또는 ethanol

시료 주입량(1회): 100mg 또는 추출물 500 μ L

검출기: PDA `RI detector

다시마 핵산 용매 분획물

column: Jaigel GS 310 column(20 ϕ x 500mm) 2개 직렬 연결

유속: 6mL/min

이동상: methanol

시료 주입량(1회): 50mg 또는 추출물 500 μ L

검출기: PDA

다시마 지용성

column: Jaigel H-1 (20 ϕ x 500mm) 2개 직렬 연결

유속: 6mL/min

이동상: chloroform

시료 주입량(1회): 80mg 또는 추출물 400 μ L

검출기: UV 280nm, UV 330nm, RI detector

- GPC에 의한 분획

Shimadzu recycle preparative HPLC와 gel permeation Shodex GS 310 column을 이용하여 핵산 추출물을 다시 주정으로 용매 분획한 시료를 membrane filter로 여과하여 HPLC 시료로 사용하였다. 이동상을 HPLC용 methanol을 사용하여 8mL/min으로 흘려 8개의 분획으로 하여 분취하였다.

- Prep HPLC에 의한 분획

GPC에 의한 분획물에 대한 기능성을 검색하여 GS-6, GS-7, GS-8, GS-5의 순으로 항염증 효과가 나타났다. 따라서 GS-6 분획을 methanol에 녹여 Preparative HPLC를 이용하여 분획하였으며 이때 이동상은 methanol과 0.1% formic acid를 이용하는 gradient system으로 하였다. Prep 용 column은 Phenomenex C18(2) Luna를 사용하였으며 이동상의 흐름은 8mL/min으로 하였다.

- 다시마 핵산분획의 Ethanol 용매에 의한 분획

50mL tube에 약 1g 다시마 추출물을 헥산 10mL에 완전히 용해하고 이 용해된 다시마 추출물에 70% 40mL ethanol을 가였다. 잘 혼합하고 1000rpm에서 10분간 원심분리하여 ethanol층을 추출하여 모으고 Rotary evaporator로 완전히 건조하여 methanol로 녹이고 완전히 녹이고 membrane filter로 여과하여 분획시료로 사용하였다.

- 다시마 구성당 시료 전처리

0.1g의 다시마 분말시료를 15mL test tube에 담고 2 N HCl 2.5mL 가하여 105°C heating block를 이용하여 5시간동안 가열하였다. 가열에 의한 가수분해 후 test tube를 냉각하여 2N NaOH를 2.5mL 가하여 중화한 다음 1000rpm에서 20분간 원심분리 하였다. 상등액 2mL을 0.45 μ membrane filter로 여과하여 HPLC 시료로 사용하였다.

- 구성당 분석 조건

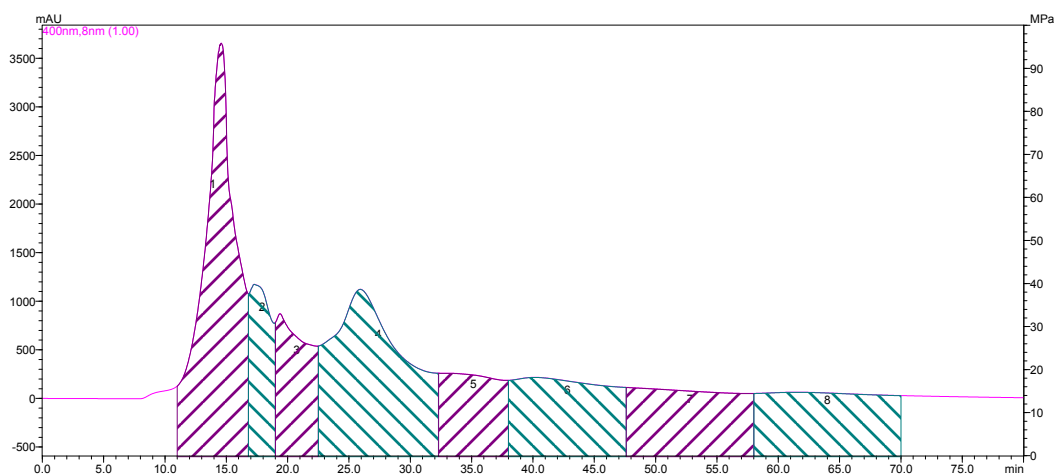
환원당 분석은 HPLC에 의하여 분석하였다. HPLC의 구성은 Shimadzu LC-20AD pump, CTO-20AC oven, Sil-20AC auto-sampler, RF-10AxI fluorescence detector, CBM-20A system controller, LC Workstation software (Shimadzu Corporation, Kyoto, Japan)를 이용한다. 환원당 분리는 ion exchange Shim-pack ISA-07 (4.0×250 mm) 분석 column과 Shim-pack ISA guard 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%으로 증가하여 15분간 100%로 유지하다가 65분 이후에 0%로 감소하여 총 90분의 분석 시간으로 하였다. injection volume는 10 μ L주입하며 post-column 방법을 이용하여 환원당을 유도체화 한 후 형광 검출기 (Ex=320, Em=430)를 사용하여 분석하였다. 반응시약으로 1% arginine과 3% boric acid를 함유하는 용액을 사용하였다. 환원당 표준물질을 탈 이온화 증류수에 용해시켜 0.5~20 μ L/mL 범위의 표준용액을 조제하여 HPLC 분석을 실시하고 peak area로부터 검량선을 작성하여 정량하였다.

3. 연구수행 결과

가. GPC 분획

해조류 GPC column을 이용하여 8개의 분획을 분취하였으며 이들에 대한 chromatogram과 분취량을 다음과 같다.

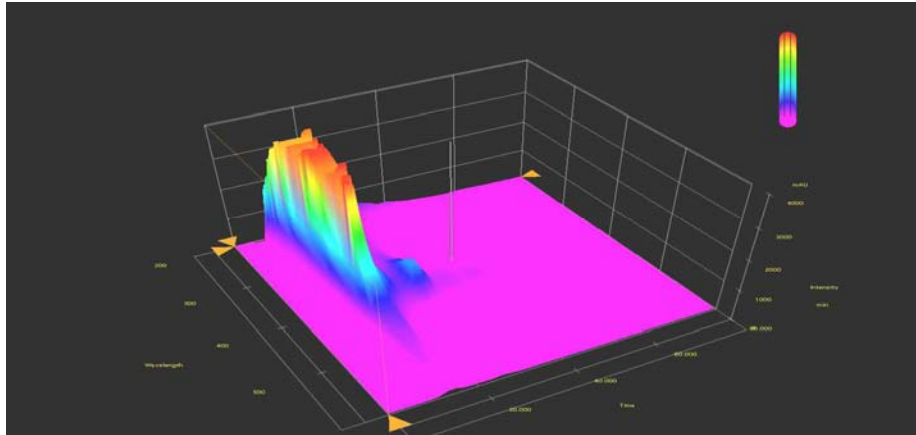
분획 chromatogram의 1번 분획은 200nm에서 430nm까지 광범위한 범위에서 흡광도를 갖는 물질로 이루어져 있으며 [표 3-4-1]에서 보는 바와 같이 두 번째로 많은 분획량을 보이고 있다. 분획시간이 짧은 두 번째 분획은 가장 많은 함량을 갖는 분획이다. 두 번째 분획도 흡광파장의 범위는 유사한 것으로 3D chromatogram에 나타난다. GS 분획에서 항염증 활성도가 가장 높은 분획은 GS 6번, GS 7, GS 8, GS 5 등의 순으로 나타났다. 따라서 GS 6번 분획에 대한 기능성 물질 탐색을 C18 column을 이용하여 하였다.



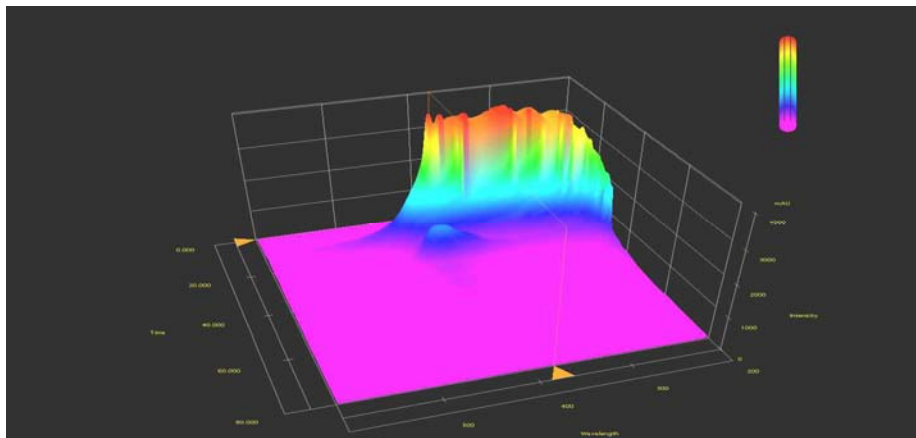
[그림 3-4-1] 다시마 hexan 추출물을 주정으로 용매분획한 시료에 대한 GS column의 chromatogram.

[표 3-4-1] 다시마 추출물 300g 시료에서 분취한 분획물의 중량

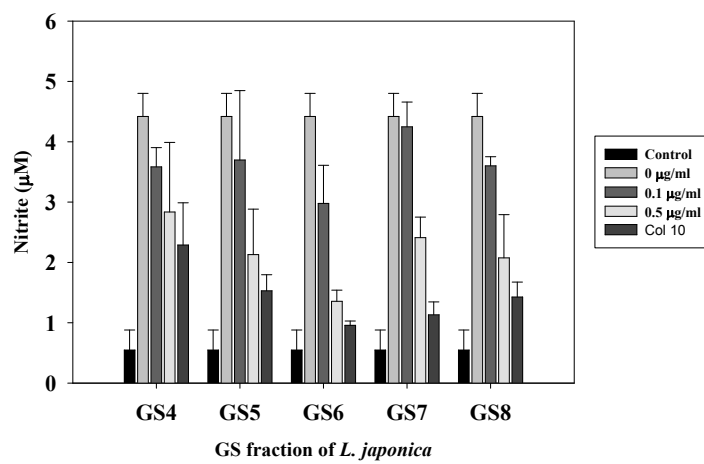
분획	Fr. 1	Fr. 2	Fr. 3	Fr. 4	Fr. 5	Fr. 6	Fr. 7	Fr. 8	elute
무게 (g)	81.98	162.95	6.20	3.14	1.86	1.26	0.41	0.72	2.73



[그림 3-4-2] 시작점을 중심으로 본 3D GS chromatogram.

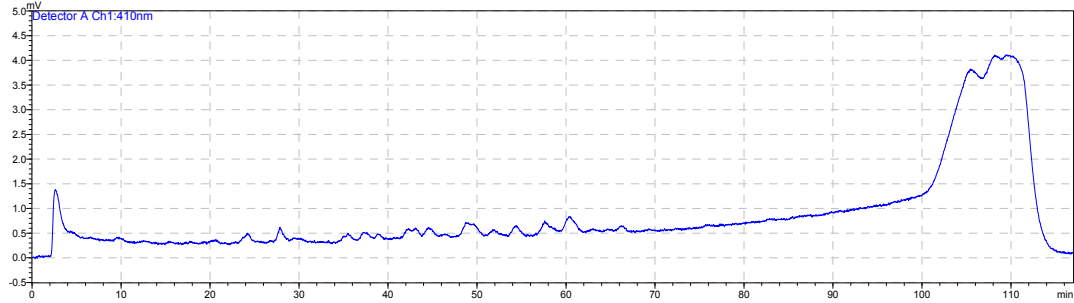


[그림 3-4-3] 분석 후반부에서 과장을 중심으로 본 3D chromatogram.

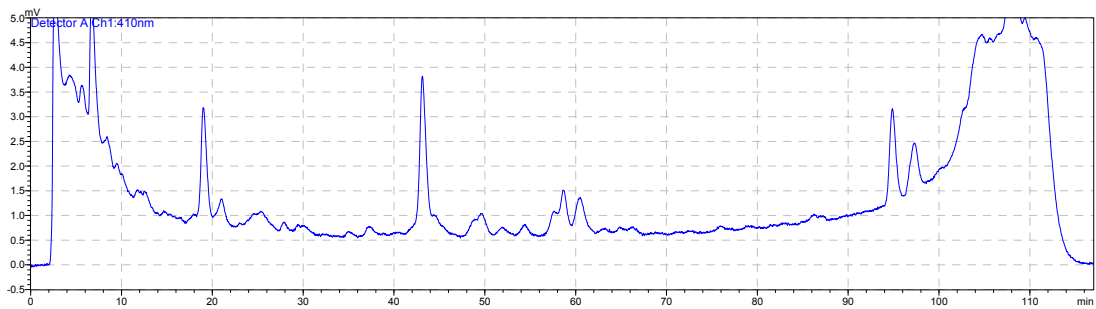


[그림 3-4-4] 분획에 대한 항염증 활성.

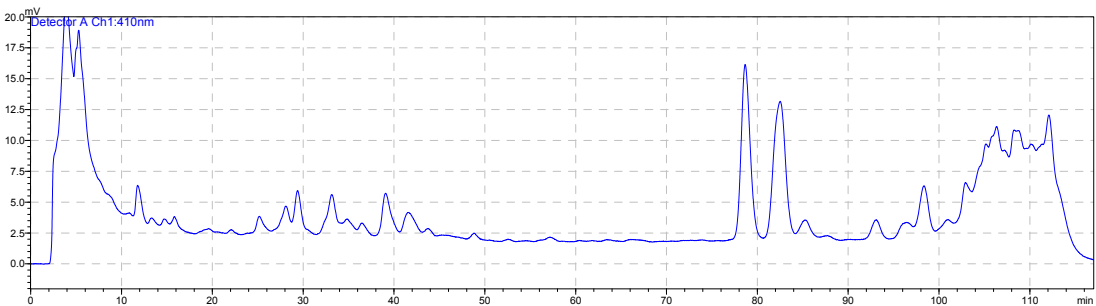
나. C18 분석용 column에 의한 GS 분획 패턴



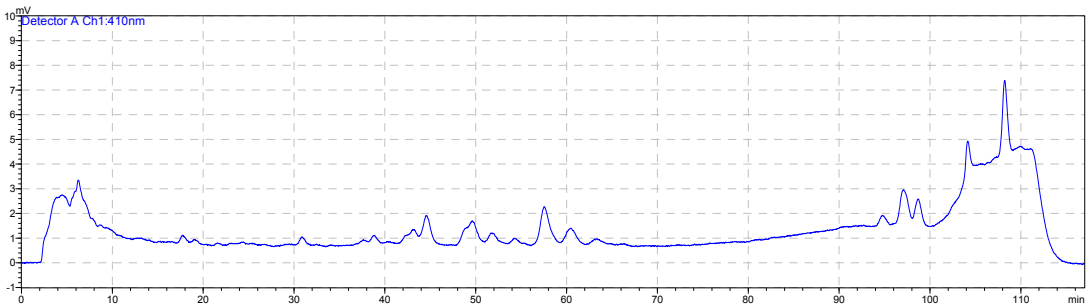
[그림 3-4-5] GPC column을 이용한 GS 1 chromatogram.



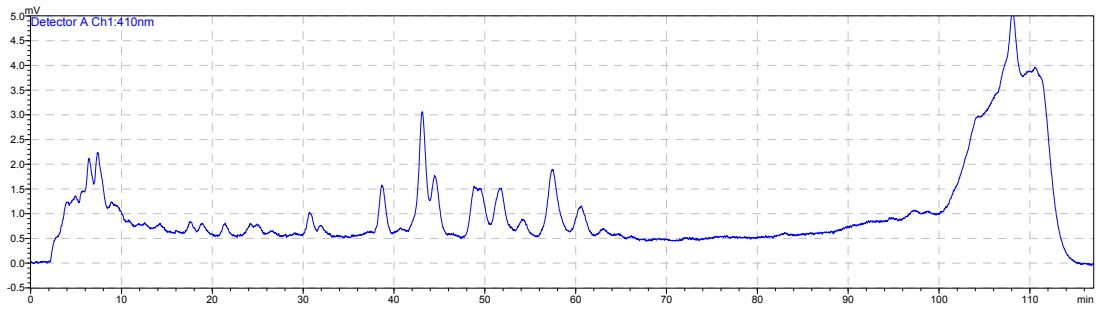
[그림 3-4-6] GPC column을 이용한 GS 2 chromatogram.



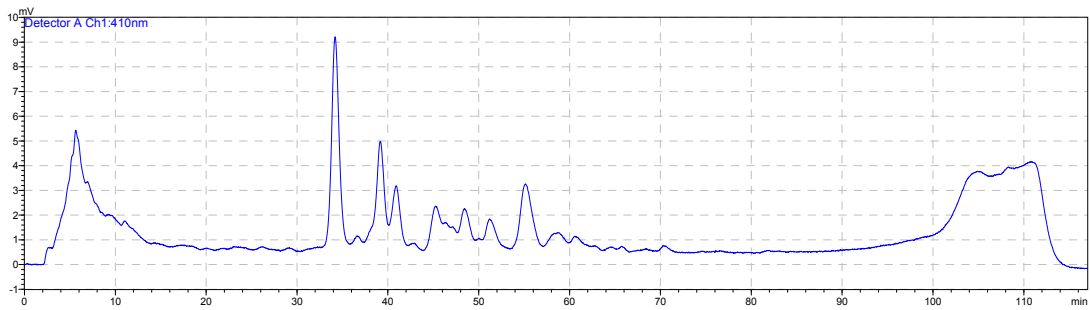
[그림 3-4-7] GPC column을 이용한 GS 3 chromatogram.



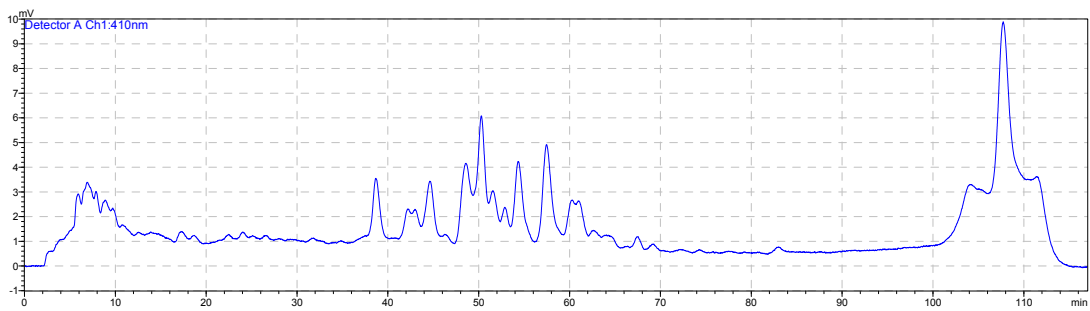
[그림 3-4-8] GPC column을 이용한 GS 4 chromatogram.



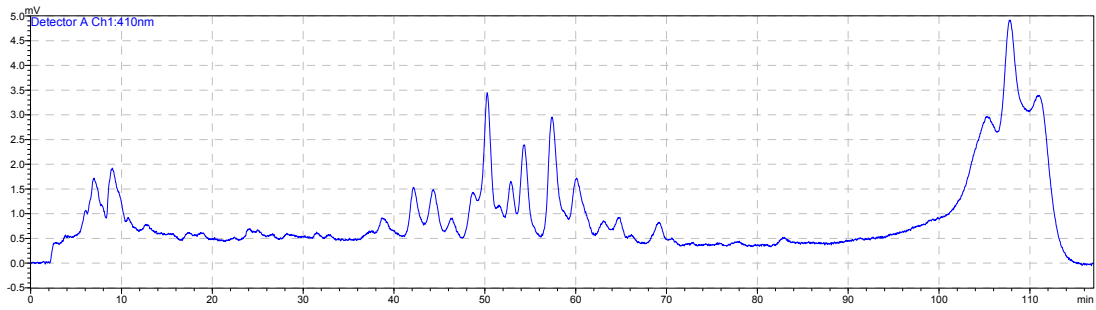
[그림 3-4-9] GPC column을 이용한 GS 5 chromatogram.



[그림 3-4-10] GPC column을 이용한 GS 6 chromatogram.



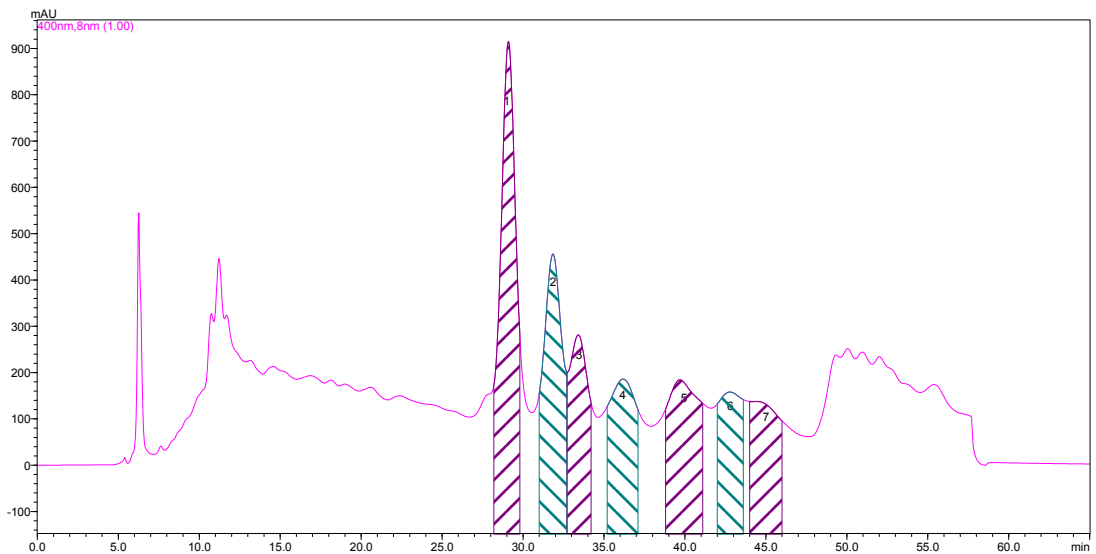
[그림 3-4-11] GPC column을 이용한 GS 7 chromatogram.



[그림 3-4-12] GPC column을 이용한 GS 8 chromatogram.

다. C18(2) 분획

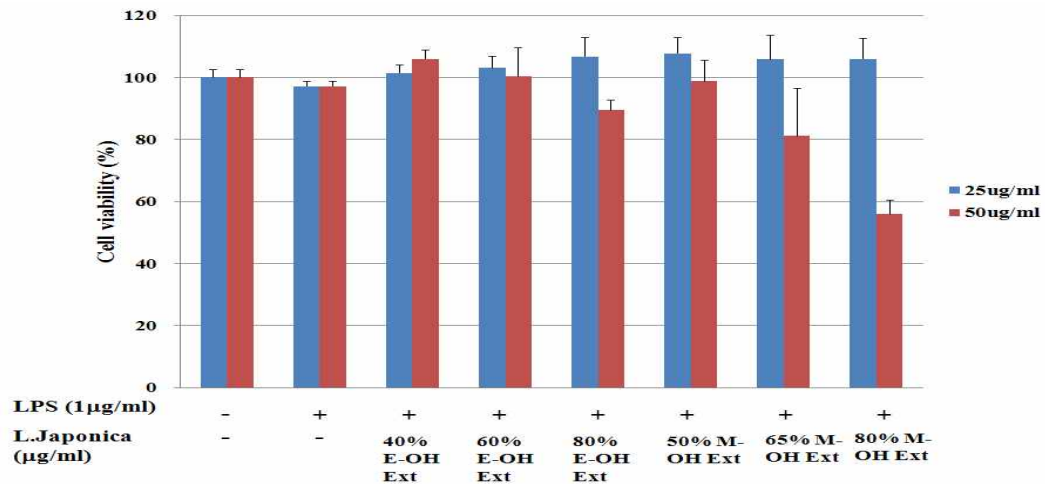
GS 6 분획은 완전히 분리하지 않고 검색할 수 용이하도록 분리하였다. 6개의 peak로 분리하고 이들을 분획하여 활성 검색예정이다.



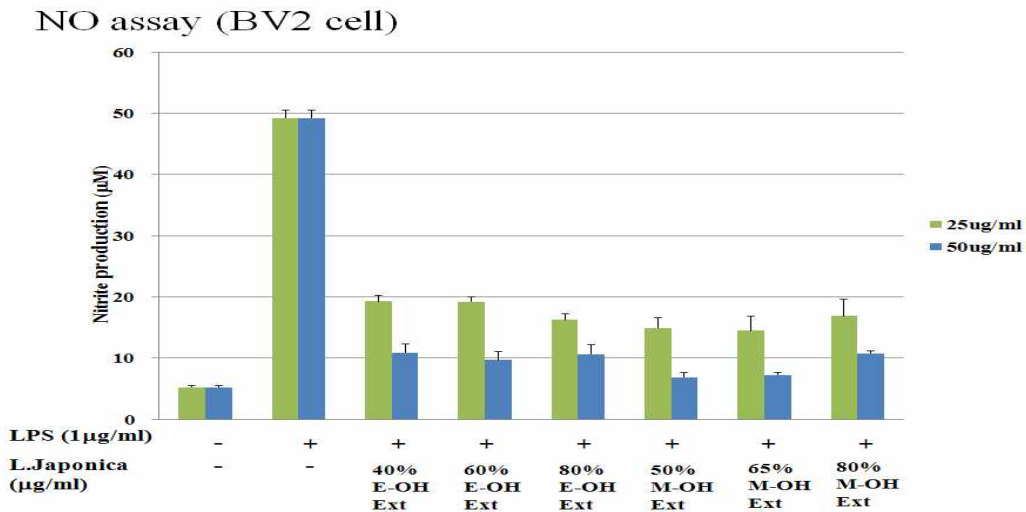
[그림 3-4-13] GS 6분획을 Prep. C18을 이용하여 분리한 chromatogram.

라. 다시마 핵산 추출물의 용매분획

GS분획은 활성물질의 분획을 정확히 분리 및 분취가 가능하나 시간과 많은 비용이 요구된다. 따라서 용매로 활성이 높은 분획을 분리할 수 있다면 기능성 물질을 활용하는데 경제성을 높일 수 있다. 다시마 핵산의 추출물에서 효율적으로 활성분획을 찾고자 methanol과 ethanol을 이용하여 용매 추출을 조건을 구하고자 하였다.



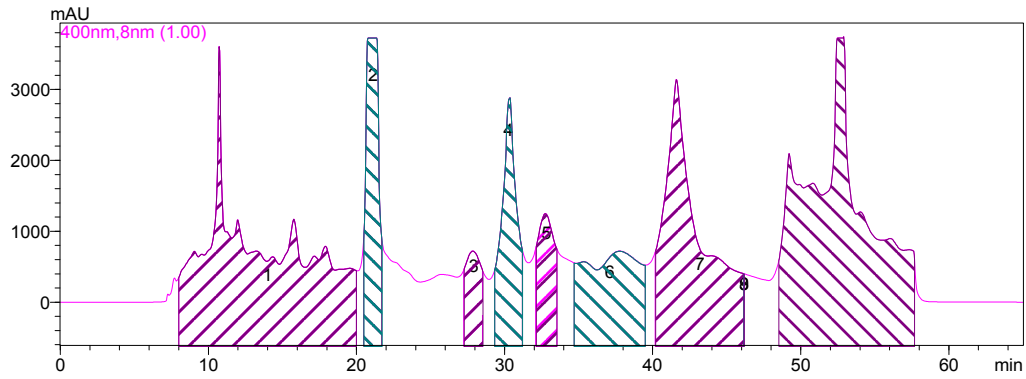
[그림 3-4-14] 용매 분획에 대한 세포독성 실험.



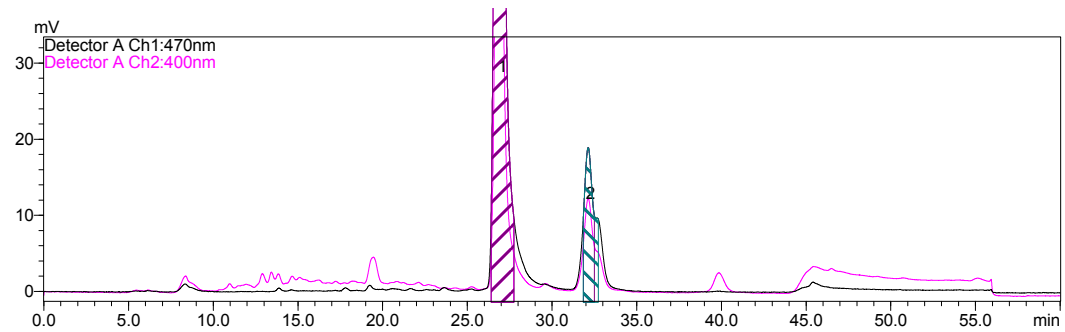
[그림 3-4-15] 용매 분획에 대한 항염증 효과.

마. 70% Ethanol 추출물 분획

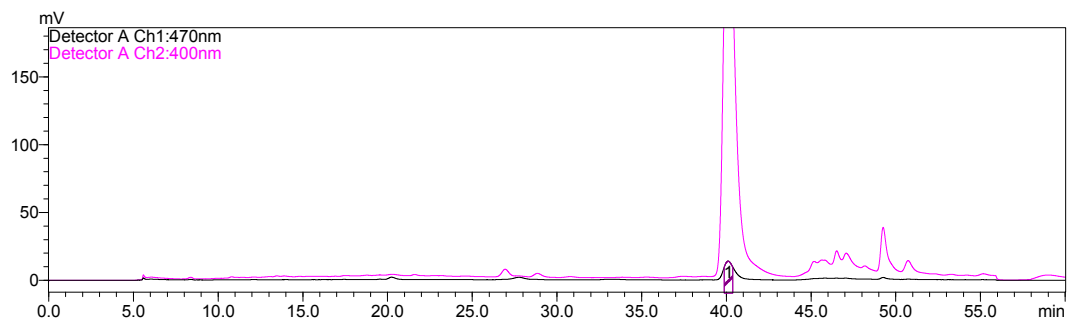
그림 13과 같이 분리하기 위하여 GS4-7번을 혼합하여 분획을 농축하였으나 Gs-310에 의한 GS fraction의 양이 부족하여 다시마 핵산 추출물 210g을 70% ethanol로 추출하여 60g의 70% ethanol 추출물을 용매 분획하였다. 이 추출물에 대한 C18 역상 column을 이용하여 8개의 분획을 설정하였고 이데 대한 chromatogram은 [그림 3-4-14]와 같다. 1번과 8번 분획은 다시 정제하기 위한 분획이고 2에서 7번 분획은 400-470nm에서 흡광도가 높은 물질이다. 앞서 GS 분획물을 C18 역상 column으로 분획한 것과 유사하였다. C18 분획물 2번을 PFP column을 이용하여 분획하여 [그림 3-4-15]와 같은 분획을 얻어 정제하였다. 2, 3, 4, 5, 6, 번을 순수 정제하고 이 물질에 대한 생리활성과 물질규명이 이루어 질 것이다.



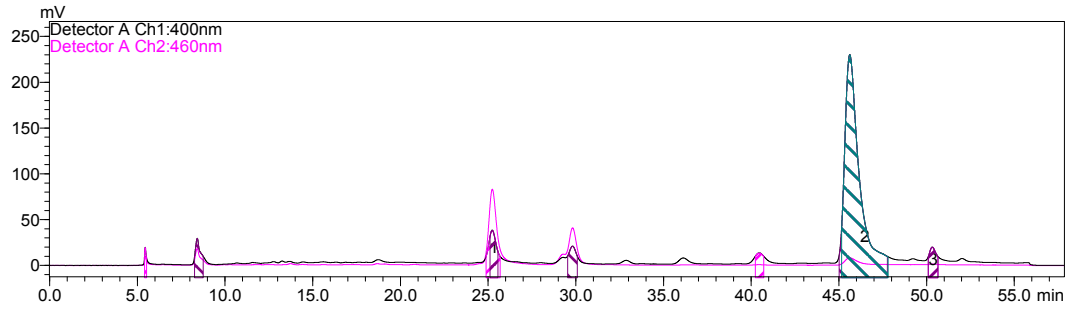
[그림 3-4-16] 다시마 헥산 추출물을 이용하여 8개 분획을 분리한 chromatogram.



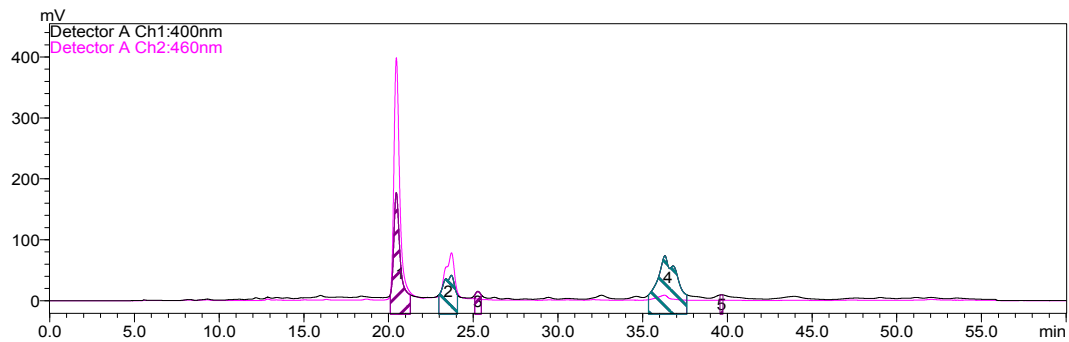
[그림 3-4-17] C18 분획물의 2번을 PFP column으로 분리한 chromatogram.



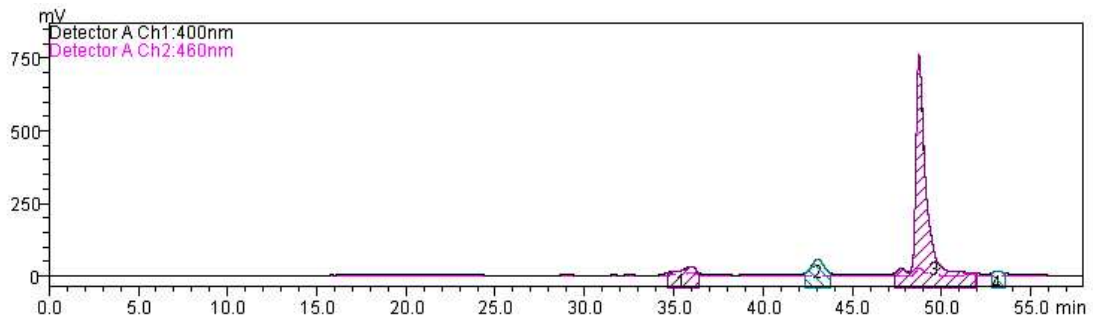
[그림 3-4-18] C18 분획물의 3번을 PFP column으로 분리한 chromatogram.



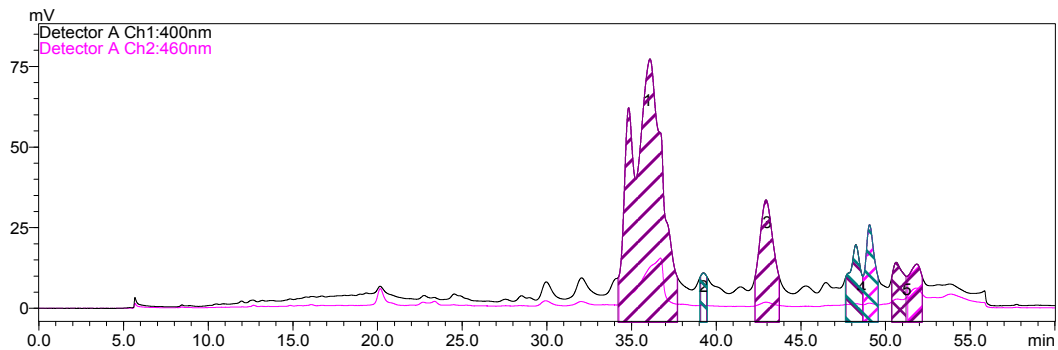
[그림 3-4-19] C18 분획물의 4번을 PFP column으로 분리한 chromatogram.



[그림 3-4-20] C18 분획물의 5번을 PFP column으로 분리한 chromatogram.



[그림 3-4-21] C18 분획물의 6번을 PFP column으로 분리한 chromatogram.



[그림 3-4-22] C18 분획물의 7번을 PFP column으로 분리한 chromatogram.

바. 양식 다시마의 구성당 분석

다시마의 대량양식을 가능성을 실험하기 위하여 수심 0.5m(기존양식법, 대조구), 1m, 2m, 3m에서 2월부터 7월까지 양식하고 이들의 구성당 성분을 분석하였다. 구성당 성분은 [표 3-4-2]~[표 3-4-9]에 나타내었으며 총 구성당은 [표 3-4-10]에 나타내었다. 가장 많이 함유하고 있는 당은 arabinose이며 그 다음으로 galactose, mannose, glucose등으로 나타났다. 부위별로 구성당 함량은 많은 차이가 없었으며 기장과 완도 간의 지역적 차도 나타나지 않았다. 또한 계절적으로도 다시마의 함량은 차이가 없었다. 아직 반복실험이 진행 중에 있으며 최종적으로 3회 반복 후 통계 처리후 결과가 나타날 것으로 판단된다.

[표 3-4-2] 대조구(수심 0.5m) 양식 다시마를 3월에 채취한 다시마의 부위별

구성당 (단위: g/100g)

구성당	기장			완도		
	상	중	하	상	중	하
Rhamnose	0.04	0.04	0.04	0.05	0.05	0.10
Ribose	0.05	0.06	0.04	0.07	0.05	0.02
Mannose	0.30	0.27	0.25	0.32	0.31	0.37
Arabinose	2.28	2.19	1.78	1.42	1.33	1.73
Galactose	1.14	1.04	0.70	1.01	0.81	0.65
Xylose	0.13	0.15	0.08	0.16	0.14	0.12
Glucose	0.34	0.30	0.31	0.27	0.29	0.43
Total	4.25	4.00	3.18	3.25	2.94	3.33

* 다시마 상중하: 다시마를 1/3하여 뿌리부분이 하, 중간 부분 상, 위의 끝부분을 상으로 분류.

[표 3-4-3] 수심 1m에서 양식한 다시마를 3월에 채취하여 분석한 다시마의
부위별 구성당 (단위: g/100g)

구성당	기장			완도		
	상	중	하	상	중	하
Rhamnose	0.03	0.04	0.04	0.04	0.04	0.06
Ribose	0.06	0.05	0.05	0.06	0.06	0.07
Mannose	0.30	0.28	0.23	0.35	0.37	0.46
Arabinose	1.95	1.85	1.77	1.55	1.56	2.03
Galactose	1.00	0.87	0.77	1.04	0.87	0.95
Xylose	0.15	0.13	0.14	0.18	0.16	0.24
Glucose	0.26	0.27	0.28	0.35	0.32	0.54
Total	3.72	3.45	3.24	3.52	3.34	4.29

* 다시마 상중하: 다시마를 1/3하여 뿌리부분이 하, 중간 부분 상, 위의 끝부분을 상으로 분류.

[표 3-4-4] 수심 2m에서 양식한 다시마를 3월에 채취하여 분석한 다시마의
부위별 구성당 (단위: g/100g)

구성당	기장			완도		
	상	중	하	상	중	하
Rhamnose	0.03	0.04	0.07	0.05	0.05	0.07
Ribose	0.05	0.05	0.03	0.05	0.06	0.05
Mannose	0.34	0.27	0.28	0.36	0.35	0.27
Arabinose	2.30	2.05	2.22	1.62	1.58	1.81
Galactose	1.03	0.88	0.76	1.01	0.74	0.80
Xylose	0.12	0.16	0.14	0.14	0.16	0.15
Glucose	0.30	0.41	0.47	0.29	0.32	0.36
Total	4.15	3.83	3.90	3.47	3.22	3.45

* 다시마 상중하: 다시마를 1/3하여 뿌리부분이 하, 중간 부분 상, 위의 끝부분을 상으로 분류.

[표 3-4-5] 수심 3m에서 양식한 다시마를 3월에 채취하여 분석한 다시마의 부위별 구성당 (단위: g/100g)

구성당	기장			완도		
	상	중	하	상	중	하
Rhamnose	0.04	0.04	0.05	0.04	0.05	0.08
Ribose	0.05	0.04	0.05	0.05	0.06	0.06
Mannose	0.31	0.23	0.25	0.36	0.42	0.37
Arabinose	2.21	1.93	1.89	1.45	1.76	2.23
Galactose	0.93	0.68	0.72	0.99	1.05	0.99
Xylose	0.10	0.07	0.09	0.13	0.22	0.23
Glucose	0.27	0.23	0.34	0.29	0.40	0.46
Total	3.88	3.18	3.33	3.27	3.91	4.34

* 다시마 상중하: 다시마를 1/3하여 뿌리부분이 하, 중간 부분 상, 위의 끝 부분을 상으로 분류.

[표 3-4-6] 대조구(수심 0.5m) 양식 다시마를 4월에 채취한 다시마의 부위별 구성당 (단위: g/100g)

구성당	기장			완도		
	상	중	하	상	중	하
Rhamnose	0.04	0.03	0.04	0.04	0.02	0.04
Ribose	0.06	0.05	0.04	0.04	0.04	0.05
Mannose	0.36	0.28	0.33	0.39	0.37	0.34
Arabinose	2.57	2.28	2.40	1.44	1.44	1.50
Galactose	1.15	0.92	0.88	1.00	0.90	0.81
Xylose	0.09	0.08	0.07	0.12	0.15	0.17
Glucose	0.35	0.31	0.36	0.39	0.35	0.36
Total	4.57	3.92	4.10	3.39	3.25	3.23

* 다시마 상중하: 다시마를 1/3하여 뿌리부분이 하, 중간 부분 상, 위의 끝 부분을 상으로 분류.

[표 3-4-7] 수심 1m에서 양식한 다시마를 4월에 채취하여 분석한 다시마의
부위별 구성당 (단위: g/100g)

구성당	기장			완도		
	상	중	하	상	중	하
Rhamnose	0.04	0.05	0.04	0.11	0.06	0.09
Ribose	0.04	0.04	0.04	0.04	0.04	0.04
Mannose	0.27	0.29	0.35	0.46	0.44	0.38
Arabinose	1.94	1.94	1.71	2.00	2.12	1.94
Galactose	0.73	0.69	0.70	1.17	1.05	0.74
Xylose	0.07	0.08	0.10	0.18	0.17	0.16
Glucose	0.26	0.25	0.37	0.55	0.36	0.42
Total	3.31	3.29	3.27	4.40	4.19	3.67

* 다시마 상중하: 다시마를 1/3하여 뿌리부분이 하, 중간 부분 상, 위의 끝부분을 상으로 분류.

[표 3-4-8] 수심 2m에서 양식한 다시마를 4월에 채취하여 분석한 다시마의
부위별 구성당 (단위: g/100g)

구성당	기장			완도		
	상	중	하	상	중	하
Rhamnose	0.03	0.04	0.07	0.03	0.04	0.07
Ribose	0.05	0.04	0.05	0.03	0.05	0.05
Mannose	0.25	0.28	0.26	0.44	0.45	0.46
Arabinose	2.00	1.93	2.07	1.94	2.08	2.38
Galactose	0.93	0.68	0.80	1.16	1.10	1.23
Xylose	0.09	0.13	0.09	0.10	0.22	0.29
Glucose	0.28	0.28	0.35	0.28	0.32	0.46
Total	3.59	3.34	3.62	3.96	4.21	4.88

* 다시마 상중하: 다시마를 1/3하여 뿌리부분이 하, 중간 부분 상, 위의 끝부분을 상으로 분류.

[표 3-4-9] 수심 3m에서 양식한 다시마를 4월에 채취하여 분석한 다시마의
부위별 구성당 (단위: g/100g)

구성당	기장			완도		
	상	중	하	상	중	하
Rhamnose	0.02	0.04	0.06	0.05	0.05	0.07
Ribose	0.06	0.05	0.05	0.06	0.05	0.05
Mannose	0.33	0.32	0.31	0.42	0.40	0.39
Arabinose	2.61	2.46	2.34	2.25	2.40	2.50
Galactose	1.14	1.02	0.88	1.42	1.17	1.13
Xylose	0.11	0.10	0.13	0.24	0.26	0.31
Glucose	0.32	0.36	0.36	0.33	0.32	0.40
Total	4.56	4.32	4.07	4.72	4.60	4.79

* 다시마 상중하: 다시마를 1/3하여 뿌리부분이 하, 중간 부분 상, 위의 끝부분을 상으로 분류.

[표 3-4-10] 양식 다시마의 총 구성당 함량 비교표

채취 시기	구성당	기장			완도		
		상	중	하	상	중	하
3월	0.5m	4.25	4.00	3.18	3.25	2.94	3.33
	1m	3.72	3.45	3.24	3.52	3.34	4.29
	2m	4.15	3.83	3.90	3.47	3.22	3.45
	3m	3.88	3.18	3.33	3.27	3.91	4.34
4월	0.5m	4.57	3.92	4.10	3.39	3.25	3.23
	1m	3.31	3.29	3.27	4.40	4.19	3.67
	2m	3.59	3.34	3.62	3.96	4.21	4.88
	3m	4.56	4.32	4.07	4.72	4.60	4.79

* 다시마 상중하: 다시마를 1/3하여 뿌리부분이 하, 중간 부분 상, 위의 끝부분을 상으로 분류.

4. 요약 및 제언

다시마 핵산 추출물을 주정으로 용매 분획할 때 가장 많은 기능성물질이 추출되었으며 이를 토대로 주정분획물을 HPLC의 분취시료로 사용하였다. 먼저 GS column으로 분취하였는데 이중에서 GS6 분획이 가장 항염증 활성도가 높았다. 따라서 Prep. C18 column을 사용하여 6개의 peak로 분획을 하였다. 또한 화장품 및 비누 등에 첨가할 활성물질은 70% ethanol 용매분획으로 하면 경제적이고 높은 활성을 유지할 것으로 판단된다. 현재까지 분석한 자료에 의하면 양식 다시마의 지역별, 계절별, 수심별 구성당의 함량은 차이를 나타나지 않았으나 향후 반복실험과 통계 처리에 의해 정확한 자료로 판단이 되어야 할 것이다.

5. 향후계획

70% ethanol 용매분획에 대한 물질 규명 및 활성 검색이 이루어져야 할 것이다.

제 4 장

생물학적 전환공정 개발

- 제 1 절 해조류 성분분별 및 전처리 공정 최적화
- 제 2 절 갯벌 유래 Metagenomic library로부터 알긴산
해조 다당체 분해 유전자 탐색 및 저분자
당원확보
- 제 3 절 생물친화적 전처리 및 당화효소를 이용한 갈조류
당화 공정 개발
- 제 4 절 해조류분해 부탄올 생산균주 개발 및 부탄올
발효공정의 최적화
- 제 5 절 난발효성 당류 대사형 재조합 미생물 개발

제 4 장 생물학적 전환공정 개발

제 1 절 해조류 성분분별 및 전처리 공정 최적화

1. 연구 목적 및 내용

가. 연구 목적

본 연구에서는 알긴산 유래 단량체 및 다당체를 분별하여 분별된 단량체 및 다당체와 알긴산과의 정량적 관계를 파악함으로써 전처리된 다시마 시료의 환원당과 알긴산 분석이 동시에 가능한 알긴산 정량법을 개발하고자 하였다.

나. 연구 내용

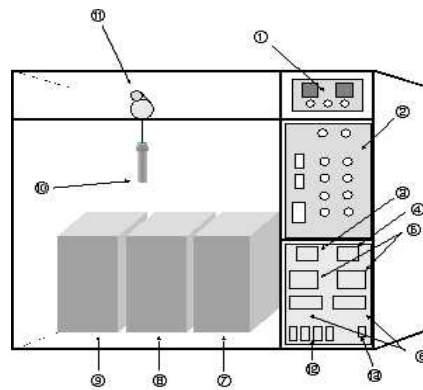
알긴산의 열화학적 처리를 통하여 파생된 알긴산 유래 단량체 및 중합체를 HPLC로 분석, 이 중 알긴산 농도와 상관관계가 있는 물질을 선정하였으며, 선정된 물질의 Refractive Index를 통해 알긴산 농도를 유추할 수 있는 수식을 정립하였다. 또한, 정립된 수식을 다시마 유래 알긴산에 적용하여 실제 알긴산 농도와 비교, 오차를 분석하여 개발된 알긴산 정량법의 신뢰성을 확인하였다.

2. 연구 방법

가. 실험장치 및 재료

(1) 실험장치

[그림 4-1-1]은 반응기, 조작기, 반응조, 냉각조로 구성된 회분식 열반응기를 나타낸 것이다. 반응기는 용량 120 mL의 원통형으로 직경 2.5 cm, 두께 1.5 mm, 높이 36 cm로 제작하였으며, 반응기 내부의 온도를 측정하기 위해 별도의 반응기에 온도계를 장착하였다. 2가지의 반응조는 각각 다른 반응열 전달 매체체를 담고 있고 가로, 세로, 높이가 각각 64 cm, 17 cm, 35 cm인 직육면체의 형태로 제작하였으며, 내부에 5 kW/h의 가열기를 장착하여 300°C까지 온도조절이 가능하도록 하였다. 조작기는 반응시간을 조절하기 위한 타이머 및 반응기의 이동을 제어하는 조절 박스를 장착하였으며, 디지털 온도 조절기를 설치하여 각각 반응조의 온도 확인 및 조절이 가능하도록 하였다.



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

(2) 실험재료

본 실험에서는 시약급 알긴산나트륨 (Sigma Aldrich, USA)과 파우더 형태의 다시마 (Wando, Korea)를 실험재료로 사용하였으며, 다시마 및 알긴산의 열화학적 분해를 위한 반응촉매로는 0.1 ~10.0(w/v)% Na_2CO_3 수용액 (다시마로부터 알긴산을 추출하는 경우 4.0 (w/v)%을 이용하였다.

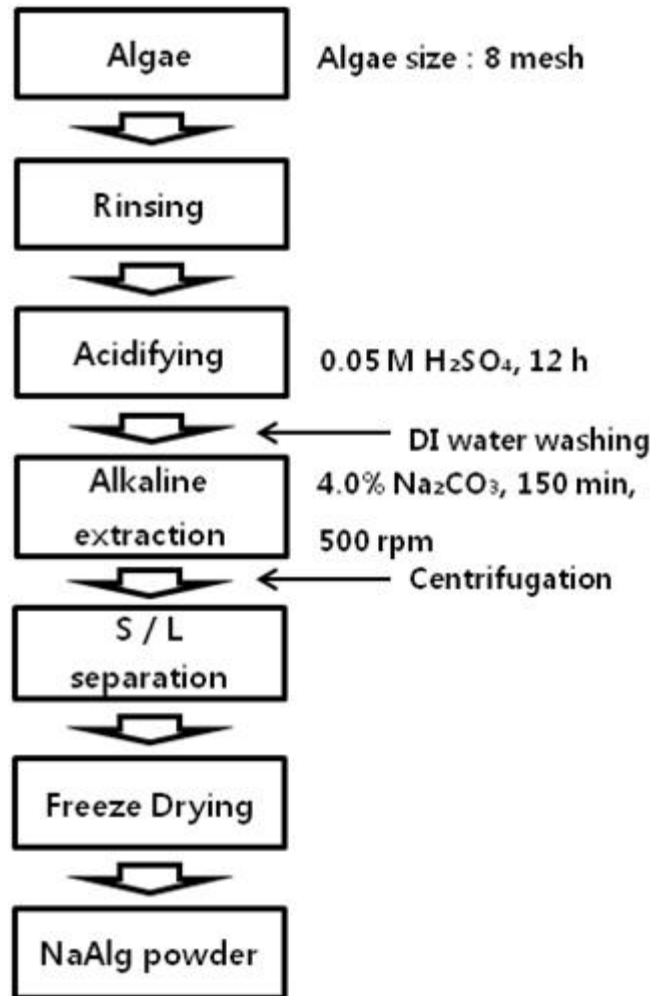
나. 실험 절차

(1) 실험조건

(가) 알긴산 추출

완도산 다시마로부터 알긴산 추출을 위해 Perez 등이 고안해 낸 알긴산 추출법 [1]을 사용하였다([그림 4-1-2]). 완도산 다시마 파우더를 0.5 M H_2SO_4 수용액에

12시간 동안 침지시킨 후 증류수로 세척하여 45°C 에서 24시간 건조하였으며, 건조된 시료 중 약 50 g을 취하여 4.0(w/v)% Na₂CO₃수용액 1 L에 넣고 상온 (약 20°C)에서 2시간 30분 동안 교반시켰다. 반응이 완료된 시료는 원심분리기 (Combi-514R, Hanil Co., Korea)를 이용, 11,000 rpm에서 20분 동안 원심분리하여 상등액을 알긴산 추출용액으로 이용하였다.



[그림4-1-2] Industrial direct method for alginic acid extraction.

(나) 알긴산 유래 단량체 및 중합체 분석

HPLC를 이용하여 분석 시 검출되는 알긴산 유래 단량체 및 중합체를 확인하기 위해, 알긴산나트륨 (Sigma Aldrich, USA)을 4.0(w/v)% Na₂CO₃ 수용액에 녹여 1, 10, 30, 50 g/L의 농도로 각각 조제하고 140°C에서 15분 동안 반응을 수행하였다. 반응이 끝난 시료는 0.45 μm filter를 이용하여 여과 후 RI detector (Waters 2414,

Waters Co., USA)가 장착된 HPLC (Breeze HPLC system, Waters Co., USA)를 사용하여 분석하였다. 컬럼은 Aminex HPX-87H (300 x 7.8 mm), 이동상으로는 5 mM H₂SO₄ 수용액을 사용하였으며, 흐름 속도는 0.5 mL/min, 컬럼과 검출기의 온도는 65°C, 50°C로 각각 설정하였다.

(다) 알긴산 유래 물질로부터 알긴산 정량분석

HPLC 분석 시 검출된 알긴산 유래 단량체 및 중합체와 알긴산 농도와의 상관관계를 도출하기 위해 2, 4, 6, 8, 10 g/L의 알긴산나트륨 (Sigma Aldrich, USA)용액을 Combined Severity (CS) 0.31 (4.0(w/v)% Na₂CO₃, 140°C, 15분)에서 반응시켰으며 10 g/L의 알긴산나트륨 (Sigma Aldrich, USA)용액을 [표 4-1-1]에 따라 각각 다른 CS에서 반응시켰다. Combined Severity는 Chum 등 [2]이 제안한 수식을 염기축매에 적용이 가능하도록 수정한 식 1에 따라 계산하였다. 각각의 반응액들은 RI detector (Waters 2414, Waters Co., USA)가 장착된 HPLC (Breeze HPLC system, Waters Co., USA)를 사용하여 분석하였으며 분석조건은 나-(1)-(나)와 동일하였다.

$$\text{Combined severity factor} = \log R_0 - pOH \quad (\text{식 1})$$

$$R_0 = tEXP \left[\frac{(T_r - T_{100})}{14.75} \right]$$

t = 시간 (분)

T_r = 온도 (°C)

T₁₀₀ = 100°C

(라) 다시마 유래 알긴산 정량

본 연구에서 개발되어진 정량법의 적용가능 여부를 확인하기 위해서 완도산 다시마로부터 추출된 알긴산을 이용, [표 4-1-2]에 따라 반응을 수행하였다. 반응 전 추출된 알긴산 농도는 Kennedy and Bradshaw 방법[3]에 따라 결정하였으며 실험절차는 다음과 같았다. 20.0(w/v)%의 Polyhexamethylenebiguanidinium chloride (PHMBH⁺Cl⁻)를 1.0(w/v)%의 sodium acetate 수용액에 넣어 최종 농도가 0.3(w/v)%가 되도록 희석한 후, 이 용액 10 mL와 완도산 다시마로부터 추출된 알긴산 용액 5 mL를 혼합하여 5분 동안 교반시켰다. 교반이 끝난 혼합용액은 10,000 rpm에서 10분 동안 원심분리 후 상등액을 취하여 100배 희석하고 UV spectrometer (UV-paraspec 1700, Shimadzu, Japan)를 이용하여 235 nm에서 흡광도를 측정하였다. Calibration curve를 작성하기 위한 표준물질로는 시약급 알긴산나트륨 (Sigma Aldrich, USA)을 사용하였다.

[표 4-1-1] Experimental design of alkali-treatment for the decomposition of sodium alginate

Temp (°C)	Time (min)	Na ₂ CO ₃ Conc.(%)	CS
130	5	1.0	-0.765
		4.0	-0.464
		6.0	-0.376
		10.0	-0.265
	15	1.0	-0.288
		4.0	0.013
		6.0	0.101
		10.0	0.212
	40	1.0	0.138
		4.0	0.439
		6.0	0.527
		10.0	0.638
140	5	1.0	-0.471
		4.0	-0.170
		6.0	-0.082
		10.0	0.029
	15	1.0	0.010
		4.0	0.307
		6.0	0.395
		10.0	0.506
	40	1.0	0.432
		4.0	0.733
		6.0	0.821
		10.0	0.932
160	5	1.0	0.118
		4.0	0.419
		6.0	0.507
		10.0	0.618
	15	1.0	0.595
		4.0	0.896
		6.0	0.984
		10.0	1.095
	40	1.0	1.021
		4.0	1.322
		6.0	1.410
		10.0	1.521

[표 4-1-2] Experimental design of alkali-treatment for the decomposition of extracted alginic acid from *Laminaria japonica*

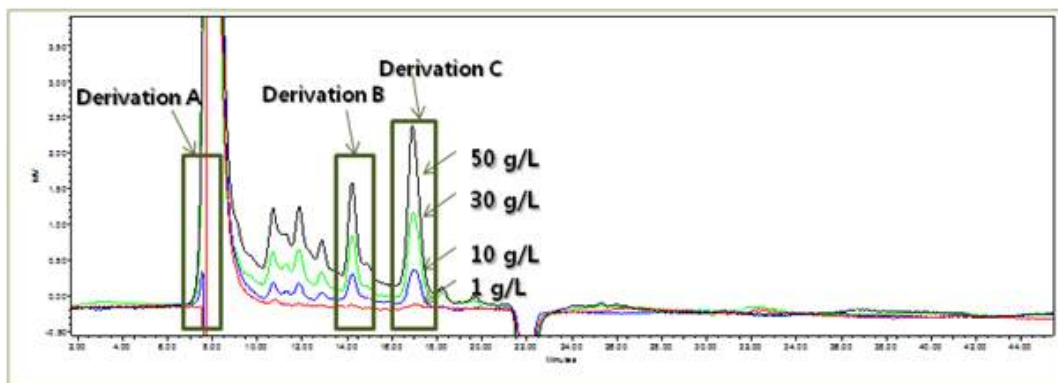
Alginic acid Conc. (g/L)	CS	Alginic acid Conc. (g/L)	CS	Alginic acid Conc. (g/L)	CS
3.02	-0.69	5.85	-0.69	10.72	-0.69
	-0.29		-0.29		-0.29
	-0.27		-0.27		-0.27
	0.1		0.1		0.1
	0.31		0.31		0.31
	0.4		0.4		0.4
	0.69		0.69		0.69

* Alginic acid concentrations were analyzed by Kennedy and Bradshaw method

3. 연구수행 결과

가. 알긴산 유래 단량체 및 중합체 분석

[그림 4-1-3]은 농도별 (1, 10, 30, 50 g/L-4.0(w/v)% Na₂CO₃)알긴산나트륨 (Sigma Aldrich, USA)용액을 140°C에서 15분 동안 반응시킨 후 HPLC (Breeze HPLC system, Waters Co., USA)를 이용하여 분석한 크로마토그램 결과이다. [그림 4-1-3]에서 알 수 있듯이, 알긴산을 반응시킨 후에 알긴산 유래 단량체 및 중합체로 추측되는 3개의 주요 피크들이 검출되었으며, 각각 피크들의 Refractive index는 알긴산 농도에 따라 비례적으로 증가, 또는 감소하는 것을 확인할 수 있었다. 본 연구에서는 이 주요 피크들을 Derivation A, B, C로 정하고, 이들의 Refractive index와 알긴산 농도와의 상관관계 도출을 위한 실험을 진행하였다.



[그림 4-1-3] HPLC chromatogram of alkali treated sodium alginate. Conditions; 4(w/v)% Na₂CO₃, 140°C, 15 min.

나. 알긴산 유래 물질로부터 알긴산 정량분석

[그림 4-1-4] ~ [그림 4-1-6]은 농도별 (2, 4, 6, 8, 10 g/L-4.0(w/v)% Na₂CO₃) 알긴산나트륨 (Sigma Aldrich, USA)용액을 CS 0.31에서 반응시킨 후 생성된 Derivation A, B, C의 Refractive index (그림 4-1-4(a), 4-1-5(a), 4-1-6(a))와 10 g/L의 알긴산나트륨 (Sigma Aldrich, USA)용액을 다양한 CS에서 반응시킨 후 생성된 Derivation A, B, C의 Refractive index ([그림 4-1-4] (b), [그림 4-1-5] (b), [그림 4-1-6] (b))를 각각 나타낸 것이다. Derivation A, B, C 중 알긴산의 농도와 상관관계가 있는 물질이 결정되면, CS 0.31에서와 실험조건에 따라 주어진 CS에서의 이론적 Refractive index들을 그림 b의 수식을 이용하여 계산한 후, 이 두 값들 간의 비율을 이용하여 주어진 CS에서의 실제 분석치인 Refractive index를 보정하고 이를 그림 a의 수식에 대입하여 알긴산의 농도를 구할 수 있다. 본 연구에서는 [그림 4-1-4] ~ [그림 4-1-6]에 나타난 결과들을 토대로 하여 Derivation A, B, C 중 알긴산 농도와 상관관계가 있는 물질을 선정하였으며, 선정된 물질과 알긴산 농도와의 관계를 수식으로 표현하여 선정된 물질의 Refractive index만으로 알긴산 정량분석이 가능하도록 하였다.

[그림 4-1-4] ~ [그림 4-1-6]에서 나타난 결과를 분석하여 보면, Derivation A, B, C 모두 알긴산 농도에 따라 Refractive index가 비례적으로 증가, 또는 감소하는 것을 확인할 수 있었으며([그림 4-1-4] (a), [그림 4-1-5] (a), [그림 4-1-6] (a)), 이와 같은 결과는 [그림 4-1-3]의 결과와 일치하는 것이었다. 그러나 Derivation A에서는 CS값에 따른 Refractive index의 경향성을 확인할 수 없었으며 ([그림 4-1-4](b)), Derivation B와 C에서 CS값이 증가함에 따라 Refractive index가 증가하는 CS와 Refractive index와의 경향성이 확인되었으나([그림 4-1-5] (b), [그림 4-1-6](b)), Derivation C의 경우 검출시간이 formic acid (glucose 과분해물질)와 유사하여 이를 이용한 알긴산 정량이 어려울 것으로 판단되었다. 그러므로 알긴산과 상관관계가 있는 알긴산 유래 물질은 Derivation B로 결정되었으며, Derivation B와 알긴산 농도와의 관계를 식 2와 같이 정립할 수 있었다.

$$w = \frac{\left(\frac{x \times y}{z} - 2280\right)}{1805.7} \quad (\text{식 } 2)$$

w = 실험조건에 따라 주어진 CS에서의 알긴산 농도 (g/L)

x = 실험조건에 따라 주어진 CS에서 Derivation B의 Refractive index (μV^*s): HPLC 분석값

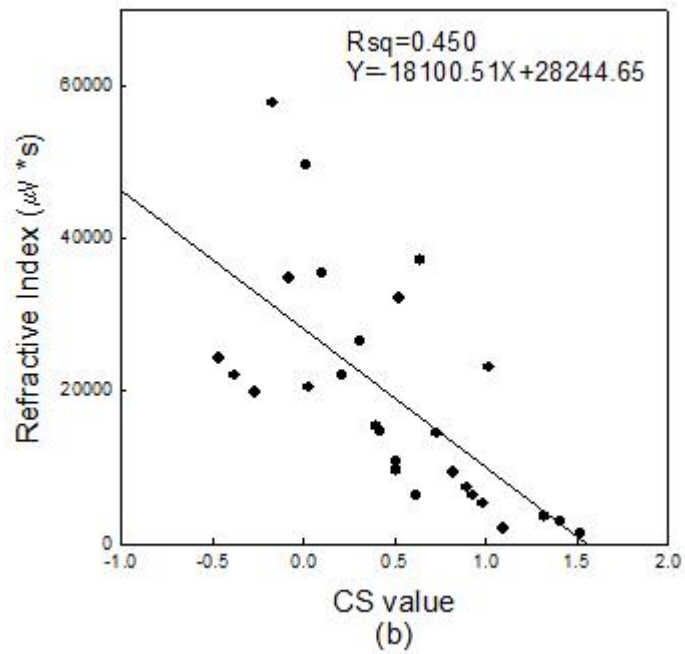
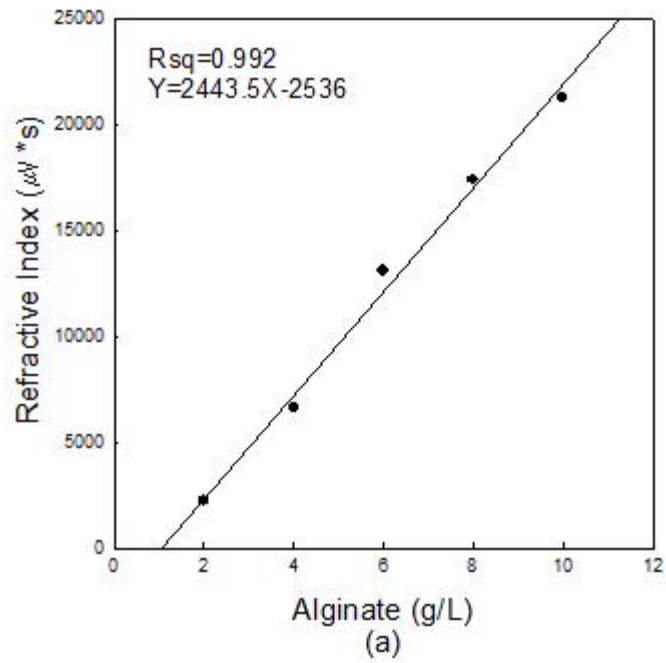
y = CS 0.31에서 Derivation B의 Refractive index (μV^*s): coefficient=12816.23,

Y-intercept=14096.86인 linear equation을 이용하여 계산 ([그림 4-1-5] (b))

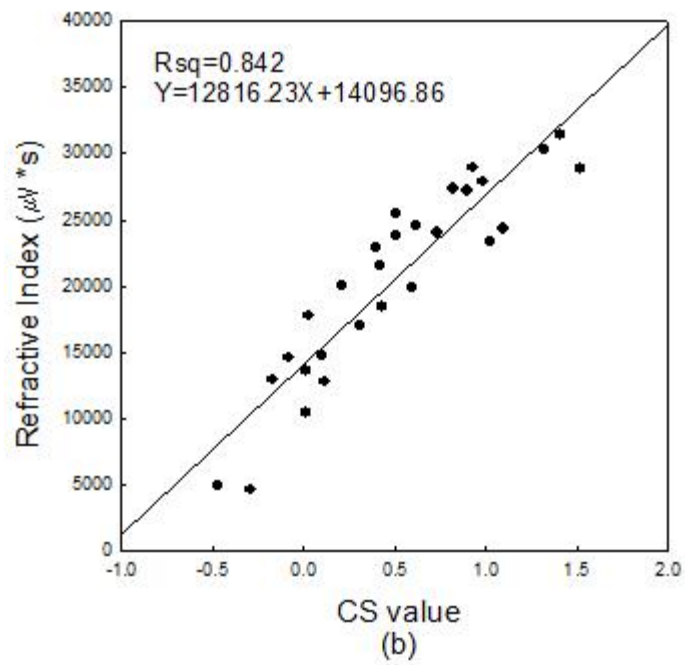
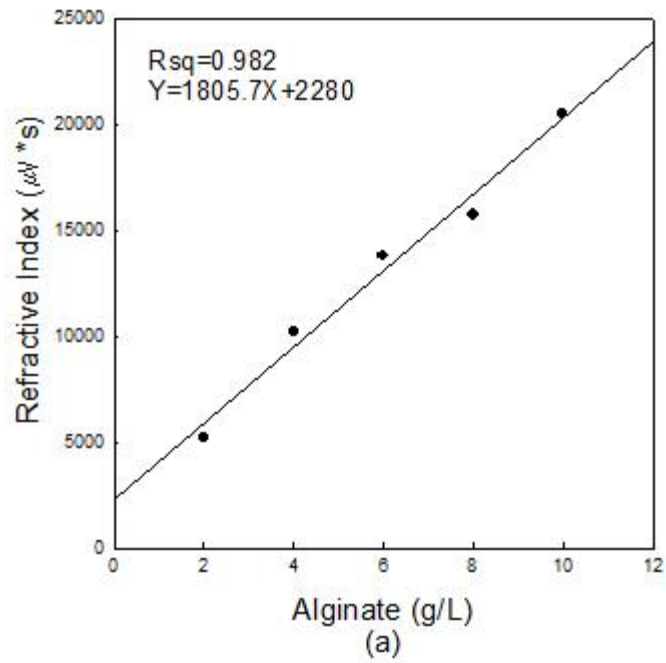
z = 실험조건에 따라 주어진 CS에서 Derivation B의 Refractive index (μV^*s):

coefficient=12816.23, Y-intercept=14096.86인 linear equation을 이용하여 계산

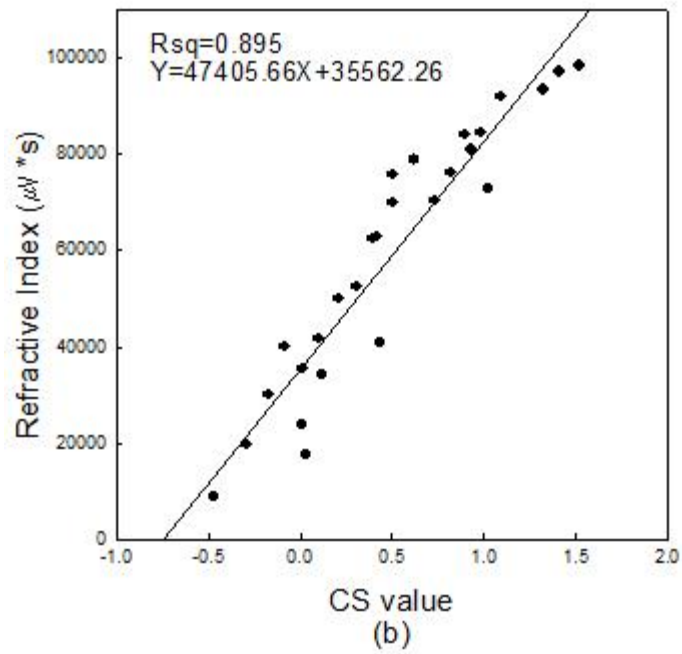
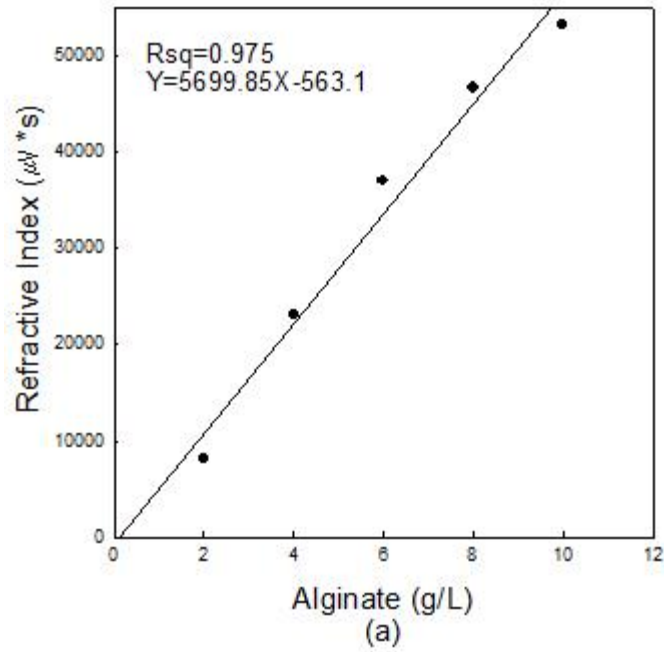
([그림 4-1-5] (b))



[그림4-1-4] Refractive index of Derivation A with (a) various alginic acid concs. and (b) various CS values.



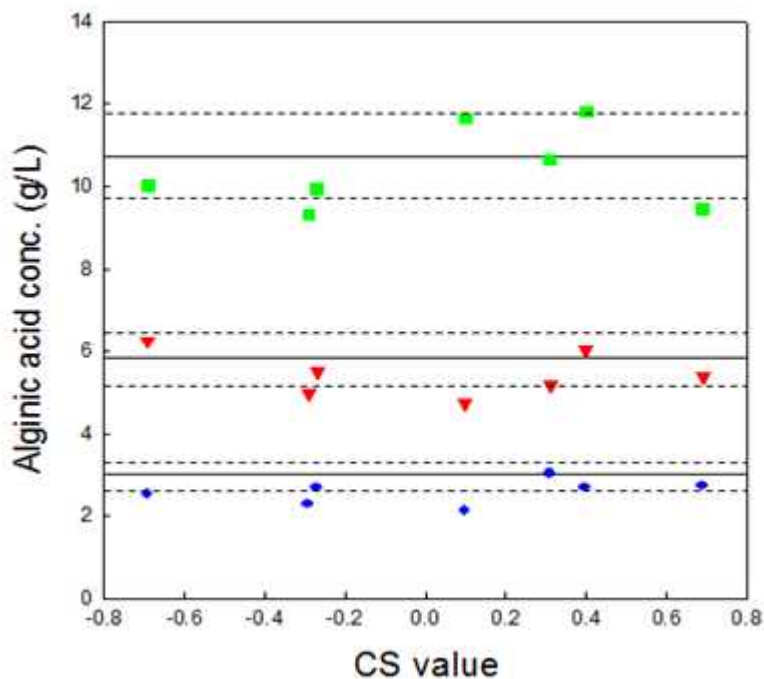
[그림4-1-5] Refractive index of Derivation B with (a) various alginic acid concs. and (b) various CS values.



[그림4-1-6] Refractive index of Derivation C with (a) various alginic acid concs. and (b) various CS values.

다. 다시마 유래 알긴산 정량

개발된 알긴산 정량법이 실제 적용가능한지를 알아보기 위해, 농도가 다른 다시마 유래 알긴산 용액 (3.02, 5.85, 10.72 g/L)들을 CS -0.69 ~ +0.69에서 반응한 후, 식 2에 따라 알긴산 농도를 정량하여 Kennedy and Bradshaw 방법에 따라 측정된 실제 농도값과 비교하여 보았다(그림 4-1-7). 알긴산의 농도가 3.02 g/L인 경우에는 14.8%, 5.85 g/L의 농도와 10.72 g/L의 농도에서는 각각 9.8%와 8.3%의 평균 오차율을 나타내었으며, 전체 시험군의 약 71.4%가 10%의 오차율 범위 내에 속하여 개발된 알긴산 정량법이 비교적 정확한 결과를 제공함을 확인하였다.



[그림 4-1-7] Application of novel method for the quantitative analysis of extracted alginic acid from *Lamnicaria japonica*.

4. 요약 및 제언

본 연구에서는 알긴산 유래 물질의 Refractive index를 통해 알긴산 농도를 결정하는, 전처리 된 다시마 시료의 환원당과 알긴산 분석이 동시에 가능한 알긴산 정량법을 개발하고자 하였다.

Na₂CO₃에 녹인 농도별 알긴산나트륨 용액을 140℃에서 15분 동안 반응시켜 HPLC 크로마토그램을 분석한 결과, 알긴산 농도에 따라 증가 또는 감소하는 경향

을 나타내는 3개의 알긴산 유래 단량체 및 중합체 피크들을 확인하였으며 이들을 Derivation A, B, C로 각각 정하였다. 알긴산 유래 물질들 (Derivation A, B, C)의 Refractive index와 알긴산 농도와의 관계식 (이 때의 CS=0.31)에서 Derivation A, B, C 모두 약 0.98의 높은 상관계수가 도출되었으나, CS와 알긴산 유래 물질들의 Refractive index와의 관계식 (CS: -0.69 ~+0.69)에서는 Derivation B와 C에서만 높은 상관계수를 나타내어 (Derivation B: 0.842, Derivation C: 0.895), Derivation B와 C가 알긴산 농도와 상관관계가 있는 물질로 선정되었으며, 이 중 Derivation C는 formic acid와 검출시간이 유사하여 Derivation B를 알긴산 농도와 상관관계가 있는 물질로 최종 선정하였다.

CS (range: -0.69~+0.69)와 Derivation B의 Refractive index와의 회귀방정식 (coefficient=12816.23, Y-intercept=14096.86) 및 Derivation B의 Refractive index와 알긴산 농도와의 회귀방정식 (coefficient=1805.7, Y-intercept=2280)을 이용, Derivation B의 Refractive index를 통해 알긴산 농도를 유추할 수 있는 수식을 정립하였으며, 이 수식을 다시마 유래 알긴산에 적용하였다. 수식으로부터 계산된 알긴산 농도와 Kennedy and Bradshaw 방법에 따라 측정된 실제 알긴산 농도를 비교하였을 때, 21개의 시험군 중 15개의 시험군이 10%의 오차율 범위 내에 속하였으며, 10.9%의 평균 오차율을 나타내어 개발된 알긴산 정량법이 비교적 신뢰성 있는 결과를 제공함을 확인하였다.

5. 향후계획

- 가. 산 촉매를 이용한 다시마로부터 알긴산 유래 단량체 및 다당체 분별
- 나. 분별 후 생성된 단량체 및 다당체의 RI를 통한 알긴산 농도 분석

제 2 절 갯벌 유래 Metagenomic library로부터 알긴산 해조 다당체 분해 유전자 탐색 및 저분자 당원확보

1. 연구 목적 및 내용

가. 연구 목적

- 기후변화협약 대응 및 수산분야 녹색산업화에 의한 신성장동력 창출
- 해조류의 통합적 활용을 통한 경제적 그린에너지 생산기반 구축
- 해조류 바이오매스 이용 그린에너지 융합공정 기반 구축
- 해조류의 혐기성 소화에 의한 bench scale 유기산 생성 공정 구축
- 해조류의 통합적 활용을 위한 최적 통합공정 설계
- 해조류의 통합적 활용을 위한 경제성 평가

나. 연구 내용

갯벌유래 Metagenomic library로부터 알긴산 해조 다당체 분해유전자 탐색 및 저분자당원 확보 :

- 갯벌 미생물 유전자원의 효율적 활용을 위해 metagenomic library를 구축하고 확립된 신속 탐색기술을 통하여 다시마 유래 알긴산 다당체 분해 유전자를 탐색
- 해조류 다당체 분해효소 생산을 위해 발현조건을 확립하고 해조 다당으로부터 당원확보 기술개발

2. 연구 방법

가. 실험장치 및 재료

연구수행에 필요한 시료 및 장치들에 대하여 명시함

- (1) 메타게놈 스크리닝 : LB broth, Agar, 15ml tube, plasmid miniprep kit, Shaking incubator, IncubatorPCR, Agarose gel, 1kb Marker, Electrophoresis, Spreader, Chemidoc™ XRS+ CPC (Hexadecylpyridinium chloride monohydrate),
- (2) 효소활성 측정: LB broth, Agar, Sodium alginate, 15ml tube, 1.5ml tute, CPC (Hexadecylpyridinium chloride monohydrate), Fermentor, Incubator, Lysis buffer,

D.W, 96well plate, Hot block, NaOH, HCl, Reducing suger Solution D(Na_2CO_3 , KNatartrate, Na_2SO_4), Solution E(96% Sulfuric acid, $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24} \cdot 4\text{H}_2\text{O}$, $\text{Na}_2\text{HASO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$), ELASA, Shaking incubator, NAD⁺, EDTA, CaCl_2 , MgCl_2 , KCl, MgSO_4 , FeSO_4 , CoCl_2 , MnCl_2 , CuCl_2 , NaCl , AgNO_3 , 대용량 냉장원심분리기, UMF(Ultra Membrane Filtration), 3k membrane, Vortex

- (3) 저분자 올리고당 제조 및 확인: LB broth, Sodium alginate, 15ml tube, 1.5ml tute, CPC (Hexadecylpyridinium chloride monohydrate), Fermentor, Incubator, NaOH, HCl, Shaking incubator, 대용량 냉장원심분리기, UMF(Ultra Membrane Filtration), 3k membrane, 전개용매통, TLC Silica gel 60 F₂₅₄, 1-propanol, nitroethanem H₂O, Anis-황산용액(p-anis aldehyde, MeOH, Acetic acid, Sulfuric acid), Hot block, Chemidoc™ XRS⁺.
- (4) 해조류 구성성분 분석: oven dryer, HCl, rotary evaporator, sodium citrate loading buffer (pH 2.2), Millipore membrane (0.2 μm pore size), amino acid analyzer (Pharmacia Biochrom 20, Biochrom Ltd. Cambrige, U.K.), centrifugal separator, ethanol, lithium citrate loading buffer (pH 2.2), Fatty acid methyl esters (FAME), GC-2010 (Shimadzu Co., Kyoto, Japan), flame ionization detector (FID), SP-2560 (Supelco, Inc., Bellefonte, PA, U.S.A.), capillary column (0.20- μm stationary phase thickness, 100 m length \times 0.25 mm i.d.), automatic injection system (AOC-20i, Shimadzu Co., Kyoto, Japan), Dionex ion chromatography system (DX500, Dionex, Sunnyvale, CA), CarboPac PA10 anion-exchange column (Dionex), CarboPac PA10 guard column (Dionex), NaOH, Duncan's multiple-range tests (SAS, SAS Institute Inc., Cary, NC, USA)

나. 실험 절차

- (1) 메타게놈 스크리닝 : 31.7kbp의 fosmid library 386,400 클론에 대하여 168개의 sample을 각각 LB brth에서 37°C, 150rpm, 16~18시간 incubation. plasmid miniprep kit를 이용하여 plasmid 분리, alginate lyase gene(A9mC) specific primer를 이용한 PCR 후, target band 부분이 나온 sample 4개를 CPC (Hexadecylpyridinium chloride monohydrate)을 이용, alginate lyase activity를 확인하고 균주에 대한 순수분리를 함.
- (2) 효소활성 측정: 순수분리를 하여 얻은 1종의 potential clone(AlyWL1)을 LB brth에서 37°C, 150rpm, 16~18시간 incubation, fermentor를 이용하여 대량배양한후,

7000rpm, 25분 원심분리, UMF이용하여 3k 이하 cut off, 0.1% Alginate기질과 37°C, 150rpm에서 반응하여 최적조건을 잡기위해 pH, Temperature, ion등 환원당 test 진행, 3k이상의 효소액은 0.1% Alginate+LB agar에 CPC (Hexadecylpyridinium chloride monohydrate)을 이용, alginate lyase activity를 확인.

- (3) 저분자 올리고당 제조 및 확인: 전복 소화기관에 존재하는 미생물의 DNA를 이용하여 Fosmid library를 제작하여, 알긴산을 저분자로 가수 분해하는 endolytic alginate lyase 활성을 가진 클론을 확보하였다. pMAL-c2X vector와 Amylose affinity column을 이용한 효소 과발현과 정제과정을 거쳐 recombinant protein(AlyDW11)을 얻어 alginate 올리고머의 다양한 크기를 thin-layer chromatography (TLC)를 이용하여 확인함.
- (4) 해조류 구성성분 분석 : 수확기간과 지역 변화에 따른 매생이의 화학 조성을 분석하는 방법으로 12월부터 2월 사이에 매생이를 Janghung, Gohung, Wando에서 각각 샘플링하여 총 아미노산, 유리 아미노산, 지방산 함량의 변화를 관찰함.

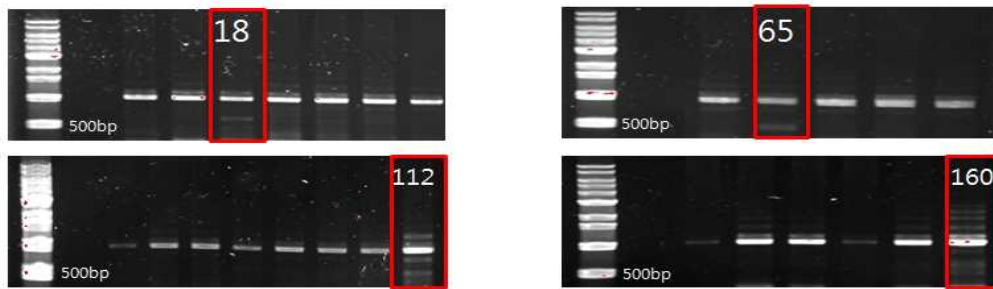
3. 연구수행 결과

가. 갯벌 미생물총으로 구성된 metagenomic fosmid library를 이용한 alginate lyase gene을 암호화한 genomic fragment 스크리닝

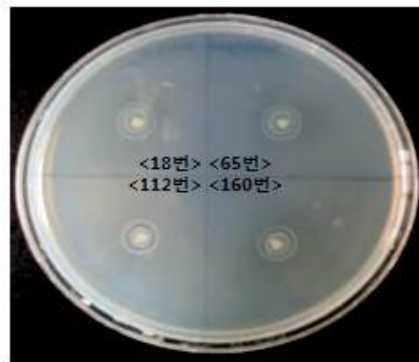
Metagenomic fosmid library는 습지대의 미생물총으로부터 genomic DNA를 분리한 것으로 구성되어졌다. 31.7kbp의 fosmid library 386,400 클론에 대하여 alginate lyase positive clone (AlyWL1)의 여부를 alginate lyase gene(A9mC) specific primer를 이용한 High-throughput screening (HTS) 방법으로 찾았다([표 4-2-1, 그림 4-2-1]). 그리고 cetylpyridinium chloride (CPC) assay를 통하여 alginate lyase activity를 확인하고 균주에 대한 순수분리를 하여 1종의 potential clone을 확보하였다([그림 4-2-2], [그림 4-2-3]).

[표 4-2-1] alginate lyase gene (A9mC) specific primer

Primer	Sequences
A9mCF	5'- TGGGGAGCTCATGCACTTTAGAGCAGATATGG-3'
A9mCR	5'- GCCGGATCCATAGTGATCTAGGTTCAAAGAACTGA-3'



[그림 4-2-1] High-throughput screening (HTS); alginate lyase gene (A9mC) specific primer를 이용한 갯벌 metagenomic library screening 결과.



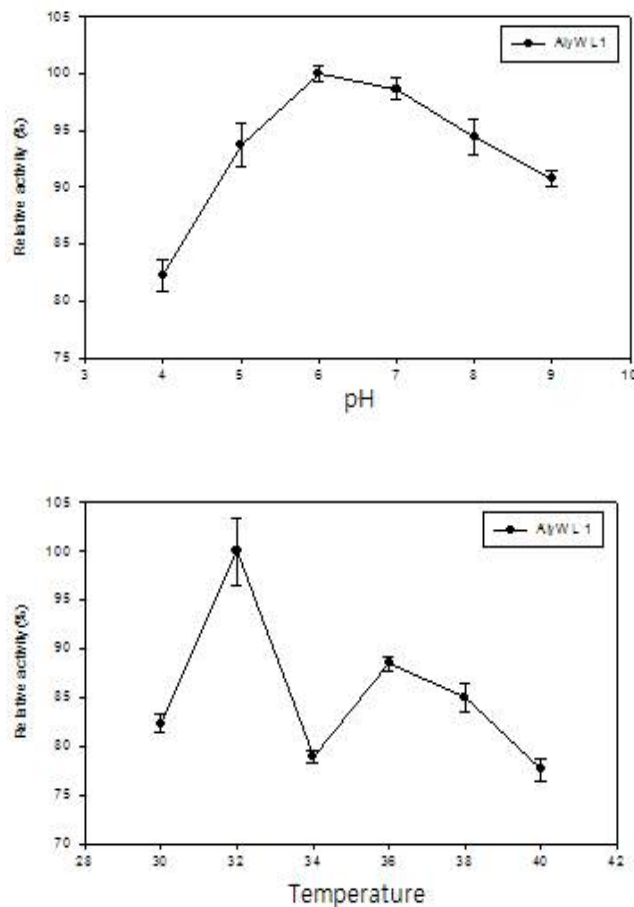
[그림 4-2-2] Alginate lyase 활성 지닌 갯벌 metagenomic library 균주의 CPC (Hexadecylpyridinium chloride monohydrate) assay 결과.



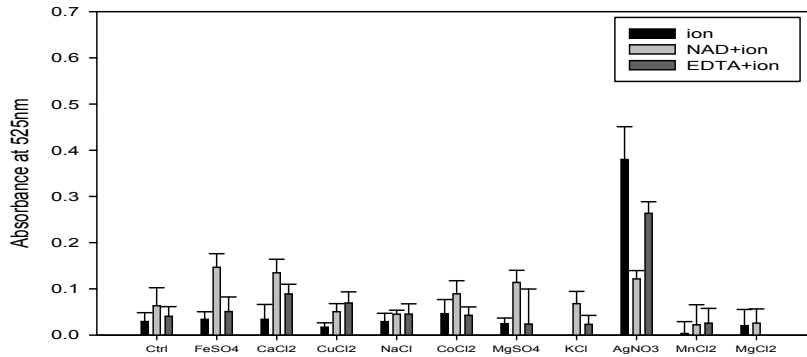
[그림 4-2-3] CPC assay를 통한 갯벌 metagenomic library 18번 균주의 순수분리 결과.

나. AlyWL 효소 최적 반응조건 측정

High-throughput screening (HTS) 방법으로 순수분리를 하여 찾은 1종의 potential clone을 이용한 AlyWL효소의 최적조건을 측정하였다. 각 효소용액에 대하여 pH 4.0-9.0 완충액에 0.1%의 sodium alginate를 용해시킨 후 적당량의 효소를 가하여 37°C 에서 2시간 반응시킨 후 유리된 환원당을 측정하여 효소의 최적 pH를 결정한다[5]. 결정된 최적 pH에서 25-50°C 의 반응온도에서 2시간 반응시킨 후 유리된 환원당을 측정하여 효소의 최적 온도를 결정한다. 이 클론을 환원당 분석법을 통하여 알긴산 분해 효소의 적정 pH와 온도를 탐색한 결과 32° C에서 95%이상으로 가장 높은 활성을 나타내었다. 최적 pH는 pH6에서 나타났고 그 이후의 pH에서 activity가 감소하였다([그림 4-2-4]). 금속 이온과 같은 보조인자는 NAD⁺ 없는 조건에서 Ag⁺와의 조합이 NAD⁺ 와 각각 이온과의 조건보다, alginate lyase 활동에 대해 확실히 높은 것을 EDTA와의 활성을 통하여 확인하였다([표 4-2-5]).



[그림 4-2-4] 환원당 분석법을 통한 metagenomic fragment (AlyDW)의 알긴산 분해 효소의 적정 pH와 온도의 탐색 결과.

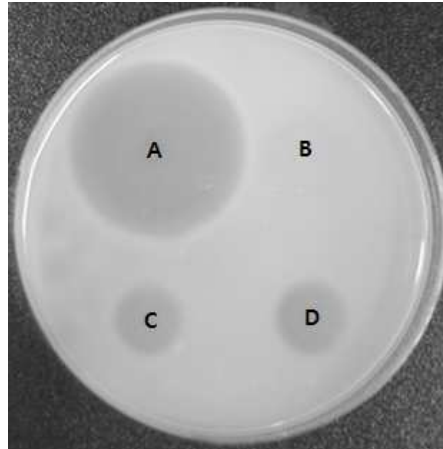


[그림 4-2-5] 금속이온과 NAD⁺, EDTA에 의한 alginate lyase 활성 효과.

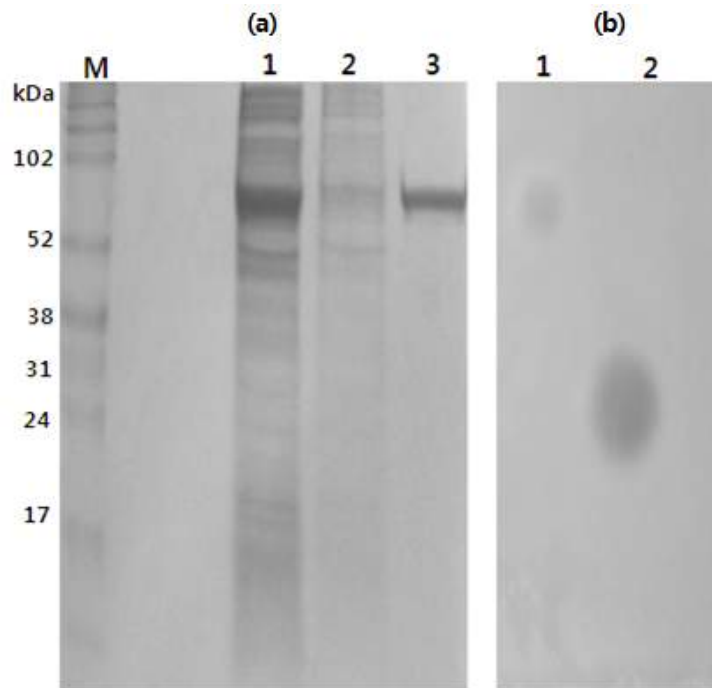
다. Alginate lyase 활성을 가진 metagenomic fosmid library 유래 clone (AlyDW)의 동정 및 특성

(1) Alginate lyase 활성의 가진 metagenomic fosmid library 스크리닝 및 효소 과발 현과 정제

전복 소화기관에 존재하는 미생물의 DNA를 추출한 후, 추출된 전체 genomic DNA를 약 32kb의 DNA 절편을 만든 후 insert DNA의 end repairing을 하고 size 선별을 한 후, CopyControl Cloning-Ready vector, pCC1FOS (Fosmid library production kit, Epicentre)에 ligation하고 대장균에 형질전환을 시킨 뒤, 항생제를 함유하고 있는 평판배지에 도말하고 배양하여 항생제 내성을 나타내는 형질전환주를 선별하여 Fosmid library를 제작하였다. Library로부터 Alginate를 분해 활성을 지닌 클론을 스크리닝 한 후 알긴산을 저분자로 가수 분해하는 endolytic alginate lyase 활성을 가진 클론을 확보하였다([그림 4-2-6]). Alginate lyase gene ORF11을 *Bam*H I 과 *Hind*III site를 가진 primer를 이용하여 증폭시킨다. pMAL-c2X vector(NEW ENGLAND BioLabs)에 ligate시켜 *E.coli* BL21(DE3)에 넣은 후, isopropyl- β -D-thiogalactopyranoside (IPTG) 를 이용하여 recombinant protein 의 expression을 유도시켜 Amylose affinity column을 이용하여 정제한 샘플을 10% SDS-PAGE로 loading한 결과 77.5kDa에서 clear한 AlyDW11 band을 확인하였다([그림 4-2-7]).



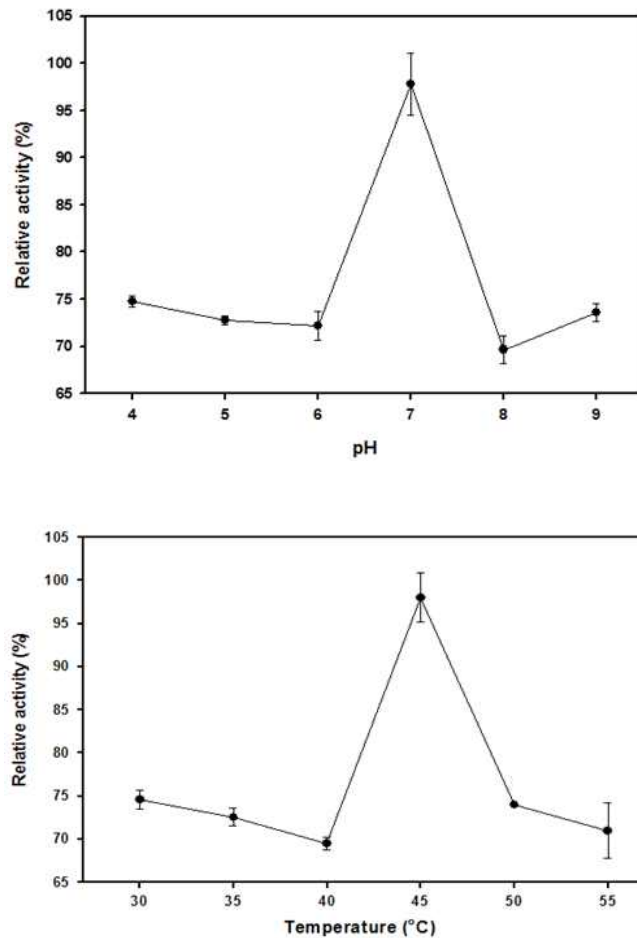
[그림 4-2-6] Cetylpyridinium chloride 법을 활용한 알긴산 분해능 평가.
 (A) 양성대조군, *Flavobacterium* sp. 유래 상업 효소(Sigma);
 (B) 음성대조군, *E. coli*;
 (C) 알긴산 분해 metagenomic fragment (AlyDW) 클론;
 (D) recombinant protein (AlyDW11)



[그림 4-2-7] Metagenomic clone (AlyDW)와 recombinant protein (AlyDW11)의 SDS-PAGE analysis 와 zymogram activity staining. (a) SDS-PAGE 후 Coomassie Brilliant Blue R-250을 이용한 염색 M: molecular weight marker protein 1: AlyDW11의 cell lysate 2: Amylose affinity column 을 이용한 washing 과정 3: 최종 elution된 recombinant protein (AlyDW11) (b) Zymogram 활성 염색 1: recombinant protein (AlyDW11) 2: *Flavobacterium* sp. (Sigma)

(2) recombinant protein (AlyDW11) 효소 최적 반응조건 측정

효소용액에 대하여 pH 4.0-10.0 완충액에 0.1%의 sodium alginate를 용해시킨 후 적당량의 효소를 가하여 37°C에서 2시간 반응시킨 후 유리된 환원당을 측정하여 효소의 최적 pH를 결정한다[5]. 결정된 최적 pH에서 15-50°C의 반응온도에서 2시간 반응시킨 후 유리된 환원당을 측정하여 효소의 최적 온도를 결정한다. AlyDW11을 환원당 분석법을 통하여 알긴산 분해 효소의 적정 pH와 온도를 탐색한 결과 45°C에서 가장 높은 활성을 나타내었다. 최적 pH는 pH7에서 나타났고 pH8 보다 큰 pH값에서 activity가 감소하였다([그림 4-2-8]). 금속 이온과 같은 보조인자는 NAD^+ 와 Mg^{2+} 와 Ag^+ 의 조합이 각각 금속 양이온과 NAD^+ 없는 조건보다, alginate lyase 활동에 대해 1.6과 2.1 배 높은 것을 확인하였다([표 4-2-2]).



[그림 4-2-8] 환원당 분석법을 통한 recombinant protein (AlyDW11)의 알긴산 분해 효소의 적정 pH와 온도의 탐색 결과.

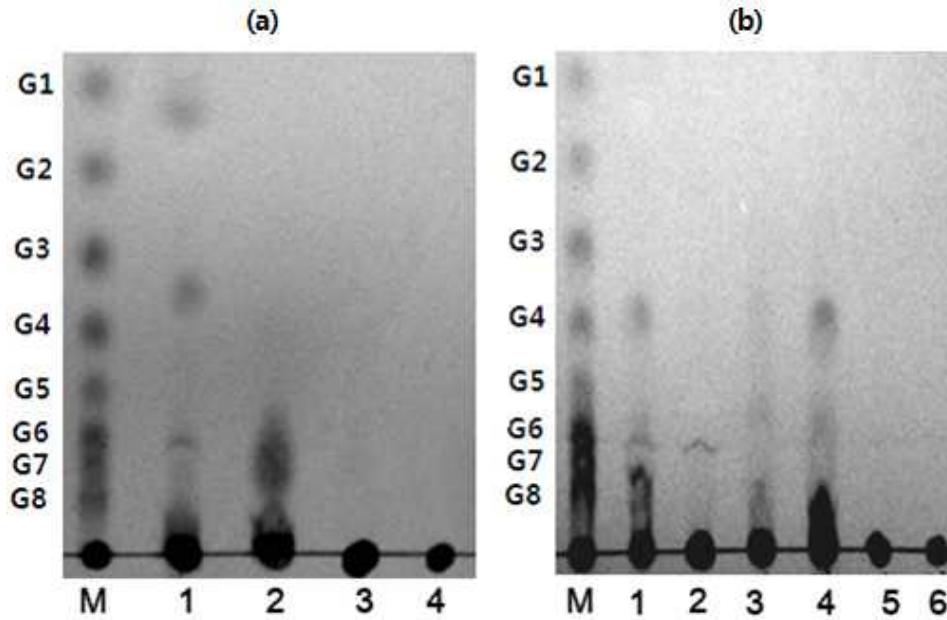
[표 4-2-2] 금속이온과 NAD⁺에 의한 alginate lyase 활성 효과

Chemicals	Single	Combination (Cation + NAD ⁺)
None	1.00±0.05	
NAD ⁺ (0.1mM)	0.96±0.01	
EDTA (1mM)	0.75±0.25	
CaCl ₂ (1mM)	0.95±0.03	1.53±0.20
MgCl ₂ (1 mM)	0.91±0.03	1.27±0.12
KCl (1 mM)	0.92±0.01	1.43±0.13
MgSO ₄ (1 mM)	0.93±0.15	1.65±0.05
FeSO ₄ (1mM)	0.90±0.14	1.20±0.04
CoCl ₂ (1 mM)	1.08±0.05	1.30±0.14
MnCl ₂ (1 mM)	0.85±0.01	1.14±0.16
CuCl ₂ (1 mM)	1.01±0.08	1.10±0.10
NaCl (1 mM)	0.96±0.06	1.20±0.05
AgNO ₃ (1mM)	1.31±0.03	2.10±0.21

¹Fold activity was measured relative to the control reading as 1. These data are representative of the mean ± standard deviation of three experiments.

(3) Recombinant protein (AlyDW11)를 이용한 반응산물의 thin layer chromatography 분석

확립된 최적반응조건하에서 분해된 alginate 올리고머의 다양한 크기는 thin-layer chromatography (TLC)에 의하여 관찰되었다[4]. recombinant protein (AlyDW11)은 endolytic activity를 가지고 poly (α -L-guluronate)보다 poly (β -D-mannuronate)의 활성이 좋은 것으로 나타났다. 이 효소는 알긴산과 반응하여 1,000 Da 이하의 alginate 저분자 올리고당을 만드는 반면, 상업효소는 poly (β -D-mannuronate) 보다 poly (α -L-guluronate) 활성이 좋았으며, alginate를 1260에서 1440Da 크기의 올리고당으로 분해하였다([그림 4-2-9]).



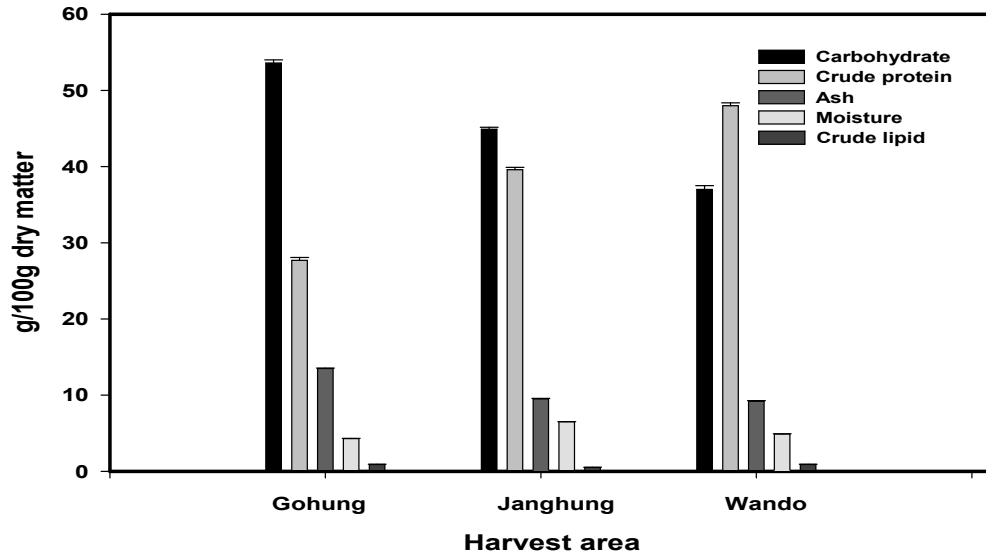
[그림4-2-9] 박막 크로마토그래피를 활용한 recombinant protein (AlyDW11)의 알긴산 분해능 탐색 결과. (a) Recombinant protein (AlyDW11) 효소를 알긴산과 45°C, 3시간 반응(lane 1) 후 알긴산 분해정도 결과. 양성대조군으로 *Flavobacterium* sp. (lane 2), 음성대조군으로 각각 alginate (lane 3), enzyme (lane 4)을 사용하였다. (b) recombinant protein (AlyDW11)을 poly(β -D-mannuronate, lane 1) 와 poly(α -L-guluronate, lane 2)를 45°C에서 3시간 반응시켰을 때 나타나는 가수분해 결과. 양성대조군으로 *Flavobacterium* sp. (poly β -D-mannuronate, lane 3, poly α -L-guluronate, lane 4), 음성대조군으로 (poly β -D-mannuronate, lane 5, poly α -L-guluronate, lane 6)을 사용하였다. M은 G1 Glucose, G2 cellobiose, G3 cellotriose, G4 cellotetraose, G5 cellopentaose, G6 cellohexaose, G7 celloheptaose, G8 cellooctaose의 혼합물을 기준으로 하였다.

라. 수확기간과 지역 변화에 따른 Green seaweed(매생이)의 성분변화

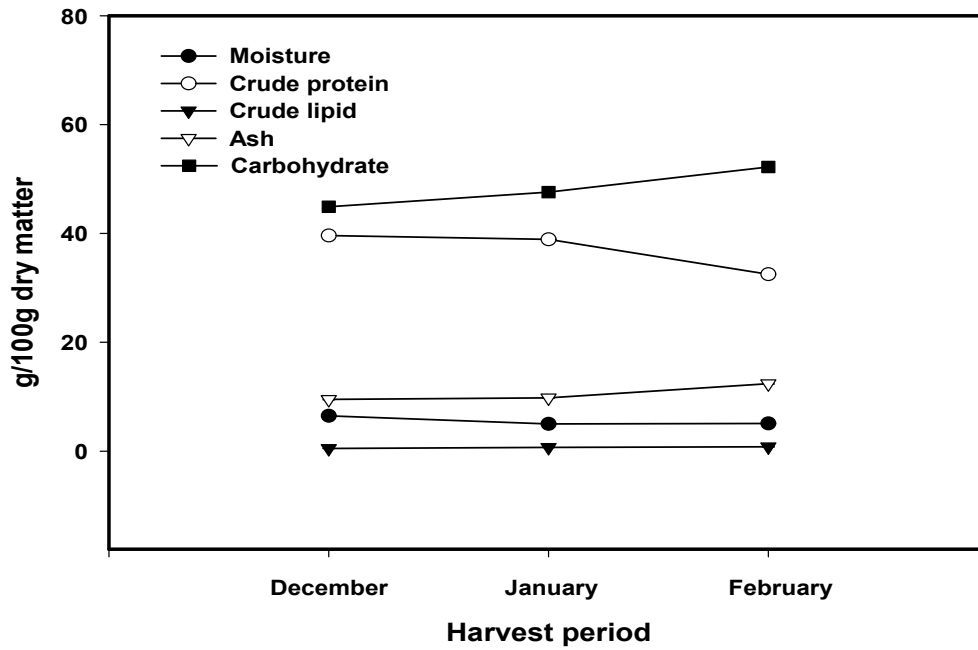
수확기간과 지역 변화에 따른 매생이의 화학 조성을 분석하였다. 2월에 수집된 샘플(Janghung-3)은 12월에 얻은 샘플(Janghung-1)보다 1.2배 탄수화물 함량을 나타내었다. 총 아미노산, 유리 아미노산, 지방산 함량의 변화는 12월부터 2월까지 관찰되었다 ($p < 0.05$). 전체 아미노산 함량은 12월 ($35,651.98 \pm 231.79$ mg/100g)부터 2월($32,939.27 \pm 178.47$ mg/100g)까지 수확기간 동안 감소하는 경향을 나타내었다. 전체적으로 Janghung과 Gohung의 샘플의 총 아미노산 함량은 Wando의 글루탐산을 제외하고 높은 함량을 나타내었다. Janghung과 Gohung의 샘플에서 주요 지방산 ($C_{18:0}$, $C_{18:1}$, $C_{18:3}$, $C_{20:2}$, $C_{20:5}$, $C_{22:6}$)이 높은 값을 가졌다 ($p < 0.05$). Wando 샘플은 Janghung과 Gohung의 샘플보다 4가지 지방산 ($C_{17:0}$, $C_{18:0}$, $C_{18:1}(n-9c)$, $C_{22:2}$)에서 높은 값을 가졌다.

[표 4-2-3] 알긴산 분해효소(AlywII) 발현 유전자(ORF) 분석

ORF No.	Homologous to BLASTP	Organism/Phylum or Domain	Position	BLAST e-value	Strand
1	ATP-dependent DNA helicase RecG	<i>Pirellula staleyi</i> DSM 6068/Planctomycetes	60...1751	0.0E-00	Forward
2	hypothetical protein Plabr_1708	<i>Planctomyces brasiliensis</i> DSM 5305/Planctomycetes	2284...4170	2.0E-21	Reverse
3	hypothetical protein Isop_3048	<i>Isosphaera pallida</i> ATCC 43644/Planctomycetes	4906...6396	2.0E-22	Forward
4	WD-40 repeat	<i>Microscilla marina</i> ATCC 23134/Bacteroidetes	6645...10253	3.0E-53	Reverse
5	von Willebrand factor, type A	<i>Rhodopseudomonas palustris</i> BisB5/Proteobacteria	10757...12805	2.0E-09	Forward
6	probable serine/threonine protein kinase	<i>Gemmata obscuriglobus</i> UQM 2246/Planctomycetes	12969...15863	6.0E-44	Reverse
7	thioredoxin	<i>Planctomyces maris</i> DSM 8797/Planctomycetes	16138...16368	8.0E-23	Forward
8	peptidase M16 domain-containing protein	<i>Truepera radiovictrix</i> DSM 17093/Deinococcus-Thermus	16385..17674	2.0E-118	Forward
9	GTP cyclohydrolase II/3,4-dihydroxy-2-butanone 4-phosphate synthase	<i>Geobacter metallireducens</i> GS-15/Deltaproteobacteria	17713...18915	1.0E-120	Forward
10	hypothetical protein M23134_01153	<i>Microscilla marina</i> ATCC 23134/Bacteroidetes	18972...19184	0.63	Forward
11	Foldase protein prsA	<i>Tepidanaerobacter</i> sp. Re1/Firmicutes	19292...20302	1.0E-10	Forward
12	transaminase	<i>Rhodopirellula baltica</i> SH 1/Planctomycetes	20309...21535	4.0E-163	Forward
13	methyl-accepting chemotaxis sensory transducer	<i>Exiguobacterium</i> sp. AT1b/Firmicutes	21572...22345	0.97	Reverse
14	hypothetical protein Hoch_5270 (NGG1p interacting factor 1, 2, 3)	<i>Haliangium ochraceum</i> DSM 14365/Deltaproteobacteria	22413...23531	6.0E-95	Forward
15	30S ribosomal protein S18	<i>Acinetobacter</i> sp. DR1/Gammaproteobacteria	23735...23992	2.0E-13	Forward
16	excinuclease ABC subunit A	uncultured microorganism/unclassified	24164...24913	1.0E-95	Forward



[그림 4-2-10] 채취 지역별 일반 성분 변화 비교.



[그림 4-2-11] 채취 시기별 일반 성분 변화 비교.

[표 4-2-4] 일반 성분

Component	Janghung-1		Janghung-2		Janghung-3		Wando		Gohung	
Moisture (%)	6.5	±0.030 ^a	5.0	±0.021 ^c	5.1	±0.036 ^b	4.9	±0.036 ^d	4.3	±0.035 ^e
Crude protein (%)	39.6	±0.301 ^b	38.9	±0.347 ^c	32.5	±0.265 ^d	48.0	±0.372 ^a	27.7	±0.363 ^e
Crude lipid (%)	0.5	±0.036 ^d	0.7	±0.026 ^c	0.8	±0.044 ^b	0.9	±0.030 ^a	0.9	±0.035 ^a
Ash(%)	9.5	±0.075 ^d	9.8	±0.056 ^c	12.4	±0.095 ^b	9.2	±0.082 ^e	13.5	±0.046 ^a
Carbohydrate(%) ^b	44.9	±0.269 ^d	47.6	±0.356 ^c	52.2	±0.392 ^b	37.0	±0.495 ^d	53.6	±0.406 ^a

[표 4-2-5] 총 아미노산 함량 (mg/100g sample)

Amino acid	Janghung-1		Janghung-2		Janghung-3		Wando		Gohung	
Asp	3862.16	±18.04 ^b	3614.08	±12.36 ^d	3816.87	±18.94 ^c	3320.13	±13.88 ^e	3956.47	±17.81 ^a
Thr	1826.29	±11.84 ^b	1765.32	±4.92 ^c	1653.90	±7.95 ^e	1726.59	±8.64 ^d	1952.47	±9.86 ^a
Ser	1625.03	±14.22 ^a	1349.28	±7.48 ^c	1328.06	±9.36 ^d	1357.30	±6.18 ^c	1430.07	±8.76 ^b
Glu	3924.10	±22.24 ^b	3695.20	±21.61 ^d	3725.50	±20.74 ^d	4125.07	±23.83 ^a	3829.38	±33.05 ^c
Pro	1959.58	±12.74 ^a	1685.36	±11.80 ^b	1675.59	±8.87 ^b	1352.46	±10.95 ^c	1270.38	±8.45 ^d
Gly	2268.50	±14.97 ^a	2256.38	±10.45 ^a	2210.36	±14.07 ^b	2001.58	±8.37 ^c	1984.35	±14.24 ^c
Ala	3624.03	±25.10 ^a	3459.26	±15.56 ^b	3661.33	±17.60 ^a	3245.21	±26.55 ^c	3024.96	±15.28 ^d
Cys	23.57	±0.23 ^b	21.26	±0.12 ^c	24.5200	±0.17 ^a	20.956	±0.10 ^d	24.40	±0.15 ^a
Val	2450.36	±15.86 ^b	2438.25	±13.97 ^b	2302.16	±15.01 ^c	1952.04	±11.28 ^d	2531.60	±16.95 ^a
Met	756.00	±4.91 ^a	716.62	±5.02 ^b	695.177	±3.68 ^c	500.24	±4.05 ^e	549.30	±3.65 ^d
Ile	1969.26	±9.20 ^a	1865.23	±6.59 ^b	1659.277	±4.24 ^c	1568.03	±6.56 ^d	1652.65	±11.70 ^c
Leu	3563.27	±26.63 ^a	3215.37	±12.10 ^c	3326.55	±15.99 ^b	2653.49	±21.71 ^e	3012.36	±15.22 ^d
Tyr	792.54	±7.83 ^a	772.04	±4.28 ^b	657.357	±3.01 ^d	549.25	±2.50 ^e	699.27	±4.28 ^c
Phe	1926.25	±12.47 ^a	1865.37	±14.41 ^b	1652.40	±12.49 ^d	1568.36	±9.06 ^e	1689.07	±14.58 ^c
His	796.29	±5.18 ^a	777.27	±5.44 ^b	725.290	±3.84 ^c	583.26	±4.72 ^e	702.35	±4.67 ^d
Lys	2563.48	±16.92 ^a	2156.32	±9.98 ^c	2298.95	±14.63 ^b	1955.63	±8.18 ^d	2153.26	±15.45 ^c
Arg	1724.27	±13.41 ^a	1657.35	±8.47 ^b	1527.98	±7.88 ^d	1357.25	±7.54 ^e	1657.24	±15.03 ^c
Total	35,651.98	±231.79 ^a	33,308.96	±164.56 ^b	32,939.27	±178.47 ^c	29,836.84	±174.10 ^e	32,119.58	±209.13 ^d

[표 4-2-6] 유리 아미노산 함량 (mg/100g sample)^a

Amino acid	Janghung-1		Janghung-2		Janghung-3		Wando		Gohung	
Taurine	17.57	±0.137 ^a	14.65	±0.119 ^c	15.49	±0.064 ^b	9.25	±0.104 ^d	14.5 5	±0.112 ^c
Aspartic acid	1.02	±0.005 ^a	0.99	±0.006 ^b	0.59	±0.003 ^d	0.59	±0.003 ^d	0.85	±0.005 ^c
Threonine	3.04	±0.024 ^b	3.21	±0.021 ^a	2.57	±0.028 ^c	1.08	±0.007 ^e	2.35	±0.012 ^d
Serine	4.65	±0.023 ^a	4.52	±0.030 ^b	3.84	±0.022 ^c	3.04	±0.014 ^d	4.62	±0.043 ^a
Glutamic acid	58.47	±0.273 ^a	46.68	±0.486 ^b	40.24	±0.171 ^d	39.47	±0.321 ^e	44.5 9	±0.523 ^c
Proline	29.84	±0.290 ^d	36.48	±0.284 ^a	32.77	±0.368 ^b	24.23	±0.158 ^e	30.4 8	±0.172 ^c
Glycine	3.62	±0.032 ^a	3.45	±0.017 ^b	3.66	±0.005 ^a	3.24	±0.008 ^c	3.02	±0.039 ^d
Alanine	23.24	±0.119 ^a	23.43	±0.185 ^a	20.59	±0.128 ^c	19.46	±0.127 ^d	22.1 6	±0.128 ^b
Valine	9.59	±0.088 ^b	11.24	±0.056 ^a	8.65	±0.070 ^c	7.09	±0.074 ^d	9.53	±0.086 ^b
Methionine	1.47	±0.013 ^b	1.75	±0.017 ^a	0.68	±0.004 ^e	1.00	±0.006 ^d	1.26	±0.013 ^c
Isoleucine	2.73	±0.013 ^c	2.44	±0.016 ^d	1.45	±0.010 ^e	3.11	±0.014 ^b	3.18	±0.054 ^a
Leucine	4.99	±0.058 ^c	2.62	±0.017 ^d	2.38	±0.042 ^e	5.13	±0.042 ^b	5.61	±0.026 ^a
Tyrosine	0.95	±0.005 ^e	2.35	±0.016 ^a	1.59	±0.011 ^c	1.20	±0.010 ^d	1.76	±0.010 ^b
Phenylalanine	1.94	±0.010 ^a	1.95	±0.019 ^a	1.33	±0.008 ^c	1.082	±0.011 ^d	1.56	±0.010 ^b
Ethanolamine	3.68	±0.037 ^b	3.59	±0.033 ^c	3.21	±0.019 ^d	2.95	±0.019 ^e	3.79	±0.025 ^a
Hydroxy lysine	3.55	±0.016 ^a	3.26	±0.038 ^b	2.26	±0.018 ^d	2.47	±0.016 ^c	3.26	±0.023 ^b
Lysine	1.35	±0.008 ^b	1.26	±0.006 ^c	0.89	±0.007 ^d	0.71	±0.007 ^e	1.62	±0.010 ^a
Histidine	1.30	±0.007 ^a	1.26	±0.008 ^b	0.92	±0.008 ^c	0.65	±0.004 ^d	0.54	±0.005 ^e
Total	170	±1.158 ^a	164.13	±1.374 ^b	141.11	±0.088 ^d	125.75	±0.945 ^e	154.7 3	±1.296 ^c

[표 4-2-7] 지방산 함량

Fatty acid	Janghung-1		Janghung-2		Janghung-3		Wando		Gohung	
C14:0	7.31	±0.098 ^a	4.77	±0.050 ^d	6.26	±0.077 ^b	5.41	±0.075 ^c	4.27	±0.087 ^e
C16:0	8.09	±0.065 ^c	8.65	±0.042 ^b	6.08	±0.045 ^e	7.94	±0.065 ^d	9.81	±0.050 ^a
C17:0	9.67	±0.061 ^c	8.49	±0.060 ^d	7.06	±0.050 ^e	12.04	±0.055 ^a	11.61	±0.071 ^b
C18:0	4.01	±0.068 ^c	3.97	±0.036 ^c	5.51	±0.036 ^b	7.15	±0.041 ^a	2.42	±0.042 ^d
C18:1 (n-9c)	5.27	±0.053 ^c	3.60	±0.042 ^d	6.96	±0.045 ^a	5.50	±0.045 ^b	5.32	±0.035 ^c
C18:3 (n-3)	9.89	±0.046 ^d	12.41	±0.079 ^b	14.43	±0.095 ^a	9.47	±0.040 ^e	11.38	±0.082 ^c
C20:2	9.76	±0.070 ^e	15.79	±0.076 ^b	11.20	±0.076 ^d	12.67	±0.104 ^c	15.95	±0.081 ^a
C22:2	10.04	±0.056 ^c	12.05	±0.085 ^a	7.04	±0.070 ^e	10.56	±0.048 ^b	7.74	±0.047 ^d
C20:5 (n-3)	12.15	±0.070 ^c	14.01	±0.098 ^a	12.41	±0.080 ^b	9.89	±0.057 ^e	10.90	±0.094 ^d
C22:6 (n-3)	24.81	±0.101 ^b	18.26	±0.081 ^e	26.05	±0.114 ^a	19.37	±0.119 ^d	20.60	±0.128 ^c

[표 4-2-8] 당 구성 (mg/100g sample)

Sugar	Janghung-1		Janghung-2		Janghung-3		Wando		Gohung	
Galactose	0.39	±0.006 ^a	0.16	±0.003 ^c	0.18	±0.003 ^b	0.09	±0.001 ^d	0.04	±0.001 ^e
Glucose	0.79	±0.019 ^a	0.46	±0.009 ^c	0.61	±0.014 ^b	0.16	±0.004 ^d	0.17	±0.004 ^d
Fructose	1.11	±0.028 ^b	0.64	±0.014 ^c	3.02	±0.067 ^a	0.17	±0.004 ^d	0.04	±0.001 ^e
Ribose			0.10	±0.002 ^a	0.099	±0.002 ^a	0.09	±0.002 ^a	0.10	±0.001 ^a
Lactose	-		-		0.93	±0.021	-		-	

4. 요약 및 제언

가. 갯벌 미생물총으로 구성된 metagenomic fosmid library를 이용한 alginate lyase gene을 암호화한 genomic fragment 스크리닝 및 clone(AlyWL)의 특성

metagenomic fosmid library의 386,400 클론에 대하여 alginate lyase gene(A9mC) specific primer를 이용한 High-throughput screening (HTS) 방법으로 alginate lyase gene을 확인하였다. 그리고 cetylpyridinium chloride (CPC) assay를 통하여 alginate lyase activity를 확인하고 균주에 대한 순수분리를 하여 1종의 potential clone(AlyWL1)의 여부를 을 확보하였다. 또한 효소의 적정 pH와 온도를 탐색한 결과 pH6, 32°C 에서 가장 높은 활성을 나타내었고, 금속 이온과 같은 보조인자는 NAD^+ 없는 조건에서 Ag^+ 와의 조합이 NAD^+ 와 각각 이온과의 조건보다, alginate lyase 활동에 대해 확실히 높은 것을 EDTA와의 활성을 통하여 확인하였다. 이 클론은 세포 외 환경으로 alginate lyase를 분비하고, alginate로부터 oligomer 생산을 위한 유용한 resource 일 것이다. 이러한 분석은 특이적인 primer를 이용하여 효소의 분리 정제 후 microtiter plate에서의 배양을 통하여 확인하는 과정을 대신하는 장점을 가지고 있고, metagenomic library screening에 적용할 수 있어서 빠르고 쉬운 분석 방법이다.

나. Alginate lyase 활성을 가진 metagenomic fosmid library 유래 clone (AlyDW)의 동정 및 특성

전복 소화기관에 존재하는 미생물의 DNA를 이용하여 Fosmid library를 제작하여, 알긴산을 저분자로 가수 분해하는 endolytic alginate lyase 활성을 가진 클론을 확보하였다. pMAL-c2X vector와 Amylose affinity column을 이용한 효소 과발현과 정제과정을 거쳐 recombinant protein(AlyDW11)을 얻었고, SDS-PAGE를 통하여 약 77.5kDa에서 overexpression된 recombinant protein(AlyDW11)을 확인하였다. AlyDW11 효소의 적정 pH와 온도를 탐색한 결과 pH7, 45°C 에서 가장 높은 활성을 나타내었다. 금속 이온과 같은 보조인자는 NAD^+ 와 Mg^{2+} 와 Ag^+ 의 조합이 각각 금속 양이온과 NAD^+ 없는 조건보다, alginate lyase 활동에 대해 1.6과 2.1 배 높은 것을 확인하였다. alginate 올리고머의 다양한 크기는 thin-layer chromatography (TLC)에 의하여 관찰되었다. AlyDW11은 endolytic activity를 가지고 poly (α -L-guluronate)보다 poly (β -D-mannuronate)의 활성이 좋은 것으로 나타났으며 이는 대부분의 해양 연체동물에서 endo-poly (M) lyase가 관찰된 점과 의미를 같이한다[5-8]. 이 효소는 알긴산과 반응하여 1,000 Da 이하의 alginate 저분자 올리고당을 만들어내며 이것은

기존 상업효소(*Flavobacterium* sp., Sigma)보다 적은 분자량을 생산할 수 있는 효소임을 보여준다.

다. 수확기간과 지역 변화에 따른 Green seaweed (매생이)의 성분변화

수확기간과 지역 변화에 따른 매생이의 화학 조성을 분석하였다. 2월에 수집된 샘플(Janghung-3)은 12월에 얻은 샘플(Janghung-1)보다 1.2배 탄수화물 함량을 나타내었다. 총 아미노산, 유리 아미노산, 지방산 함량의 변화는 12월부터 2월까지 관찰되었다 ($p < 0.05$). 전체 아미노산 함량은 12월 ($35,651.98 \pm 231.79$ mg/100g)부터 2월($32,939.27 \pm 178.47$ mg/100g)까지 수확기간 동안 감소하는 경향을 나타내었다. 전체적으로 Janghung과 Gohung의 샘플의 총 아미노산 함량은 Wando의 글루탐산을 제외하고 높은 함량을 나타내었다. Janghung과 Gohung의 샘플에서 주요 지방산 ($C_{18:0}$, $C_{18:1}$, $C_{18:3}$, $C_{20:2}$, $C_{20:5}$, $C_{22:6}$)이 높은 값을 가졌다 ($p < 0.05$). Wando 샘플은 Janghung과 Gohung의 샘플보다 4가지 지방산 ($C_{17:0}$, $C_{18:0}$, $C_{18:1}(n-9c)$, $C_{22:2}$)에서 높은 값을 가졌다. 결론적으로 매생이는 환경적 변수에 의한 영양적 가치에 영향을 받고 불포화 지방산과 유리아미노산 (taurine, glutamic acid, aspartic acid, alanine), 단당류(fructose, glucose)가 2:5:1의 비율을 지닌 균형 잡힌 식품임을 확인하였다

5. 향후계획

- 가. 갯벌유래 Metagenomic library로부터 알긴산 해조다당체 분해유전자 탐색 및 저분자 당원 확보와 분해유전자 ORF분석 및 발현확립
- 나. 효소/방사선 조사를 활용한 저분자화 기술과 알긴산 저분자 대량 확보
- 다. 저분자당의 크기별 분획 및 기능성 평가

제 3 절 생물친화적 전처리 및 당화효소를 이용한 갈조류 당화 공정 개발

1. 연구 목적 및 내용

가. 연구 목적

본 연구는 해조류 분해 타겟미생물의 대사체 프로파일링을 통한 연구를 기반으로 하여 bioinformatics tool을 이용하여 해조류의 구성성분 중 alginate, laminaran, fucoidan과 같은 탄수화물을 분해하는 효소적 당화 공정 수립과 당화 수율을 높이기 위해 생물친화적 전처리 공정을 도입하여 생물 친화적 공정을 확립하는 것이다. 이는 향후 비발효성당을 발효성당으로 전환시키는 효소의 개발과 value added metabolite의 생산을 기반이 되는 필수적인 연구이다.

나. 연구 내용

해조류 구성 성분이 alginate에서 배양이 되는 타겟미생물의 대사체 프로파일링을 통해 잠재적 효소들을 클로닝하여 발현을 확인하고 최적 효소활성의 탐색, 분해 산물에 대한 프로파일링, 효소 활성 증진을 위한 보조인자의 탐색을 기본으로 한다. alginate의 효소적 당화를 위해 endo-type alginate lyase를 통해 oligoalginate를 만드는 효소를 탐색하고 완전 당화를 위해 exo-type alginate lyase를 탐색한다. 효소적 당화 공정이 확립되면, 수율을 높이기 위해 생물 친화적 전처리 방법을 확립하여 최종적으로 생물 친화적 공정을 수립한다.

2. 연구 방법

가. 실험장치 및 재료

해당 유전자를 증폭하기 위해 pfu taq을 이용하여 증폭을 시켰으며, 증폭된 유전자를 ligation 시키기 위한 vector로서 pET21a를 사용하였다. gene preparation을 위해 사용된 host는 DH5 α 를 단백질 생산을 위한 host로는 BL21를 사용하였다. 단백질 발현의 확인을 위해 SDS-PAGE system을 사용하였고, 확인된 단백질은 His-trap으로 정제하였다. 타겟 단백질은 alginate와 반응을 시켰으며 반응 산물의 profile 확인을 위해 TLC plate를 사용하였다. 또한 반응 산물의 정확한 매스를 측정하기 위해 LC-Tof/MS를 사용하였다.

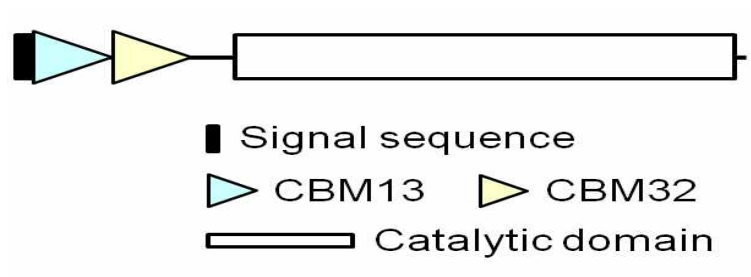
나. 실험 절차

alginate 분해 효소를 클로닝하기 위해 CAZy database에서 획득한 target gene의 염기서열을 토대로 프라이머를 제작하여 PCR을 수행하여 해당 gene을 증폭하였다. 증폭된 gene을 vector에 ligation 시킨 후 host에 transformation을 시켰다. transformant를 통해 target protein을 과발현시켰고 그것으로 해당 활성을 측정하였다. 발현된 protein은 His-trap 컬럼을 이용하여 정제하였고 한외여과를 이용하여 해당 단백질을 농축하였다. 활성을 측정하기 위해 DNS법을 이용하여 활성을 측정하였고 효소 특성 규명을 위해 온도, pH에 따른 상대적 활성을 구하였다. target protein의 산물의 profile을 확인하기 TLC를 이용하여 시간에 따른 산물의 변화를 측정하였으면 생성된 산물들의 정확한 매스를 확인하기 위해 LC/MS를 통해서 확인하였다. 또한 여러 가지 이온에 따른 활성 변화를 측정하였고 효소의 kinetics parameter를 구하기 위해 서로 다른 기질에 따른 속도 변화를 측정하여 V_m , k_m , k_{cat} 과 k_{cat}/K_m 을 구하여 효소의 kinetic value들을 확인하였다.

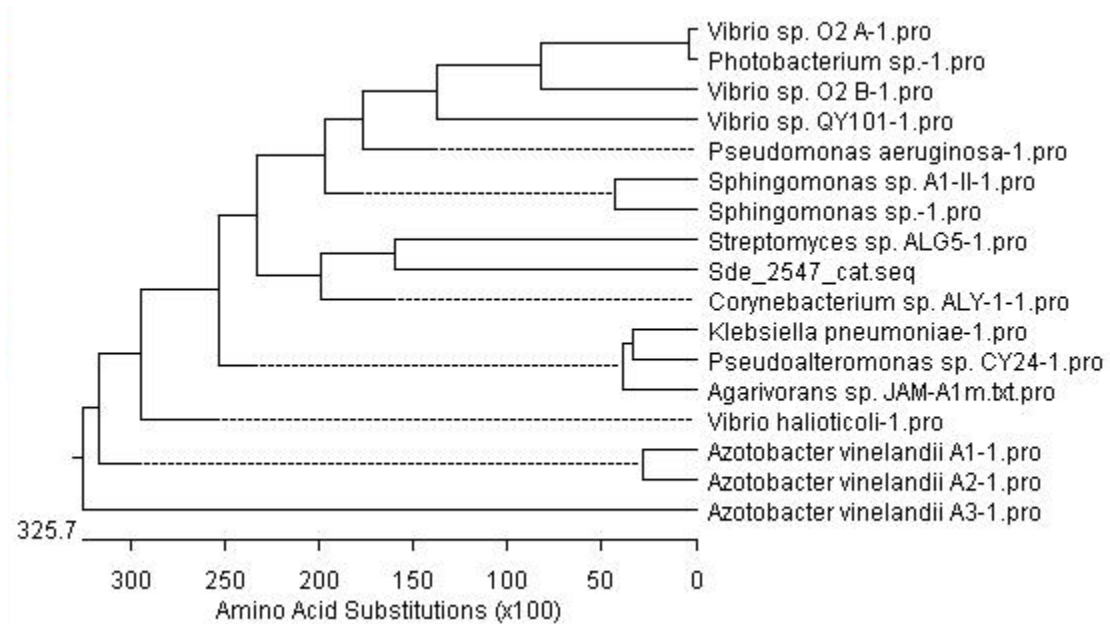
3. 연구수행 결과

가. Alg7B의 동정 및 기능의 예측

예상 활성이 기대되는 유전자를 NCBI와 CaZY database를 통해서 선별한 후 활성이 알려진 다른 미생물의 alginate lyase와의 상동성을 clustalW 프로그램을 이용하여 검토해 보았다([그림 4-3-1]). 또한 예상되는 catalytic domain과 보조 domain들의 위치와 특성을 알아보기 위해 SWISS-MODEL database와 Uniprot database등을 통해 잠재적인 domain들과 위치를 파악하였다([그림 4-3-2]). 그리고 최종적으로 가장 근접하는 다른 미생물 유래 alginate lyase를 탐색하여 Alg7B의 활성과 특성에 대해 예측하였다.



[그림 4-3-2] Alg7B의 예측구조. swiss model sever와 uniprotKB (<http://www.uniprot.org/uniprot/Q21HM2>)를 통해 그린 그림으로서, CBM13 (PF00652, <http://pfam.sanger.ac.uk/family?acc=PF00652>), CBM 32 (<http://pfam.sanger.ac.uk/family?acc=PF00754>)과 catalytic domain (PF08787,<http://pfam.sanger.ac.uk/family?acc=PF08787>)에 해당



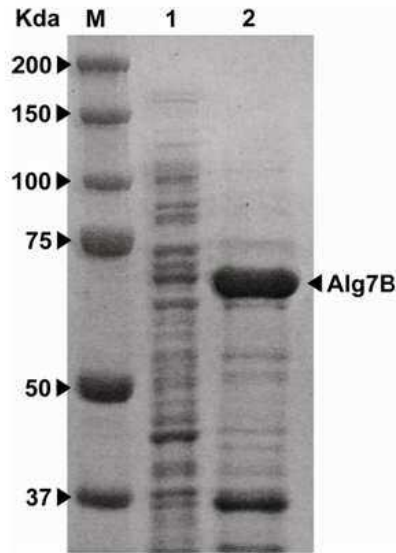
[그림 4-3-3] Alg7B의 catalytic domain과 다른 alginate lyase의 phylogenic tree.

[표 4-3-1] Phylogenic tree를 그리는데 이용된 alginate lyase 목록

Strains	Protein names	Number	EC number
<i>Agarivorans</i> sp. JAM-A1m	A1m (AlgL, 34.4 kDa)	1	4.2.2.11
<i>Azotobacter vinelandii</i> DJ ATCC BAA-1303	AlyA1(26.0 kDa) , AlyA2 (26.6 kDa) and AlyA3 (43.7 kDa)	3	4.2.2.3
<i>Corynebacterium</i> sp. ALY-1	alyPG (27.3 kDa)	1	4.2.2.11
<i>Klebsiella pneumoniae</i> ssp. <i>aerogenes</i>	AlyA (33.5 kDa)	1	4.2.2.11
<i>Photobacterium</i> sp. ATCC 43367	AlxM (32.1 kDa)	1	4.2.2.3
<i>Pseudoalteromonas</i> sp. CY24 (CBM 32)	AlyPI (57.4 kDa)	1	4.2.2.11
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> PAO1	PA1167 (25.1 kDa)	1	4.2.2.3
<i>Sphingomonas</i> sp. A1	A1-II' (Aly, 32.0 kDa) and Aly (A1-I, A1-II, A1-III, 71 kDa)	2	4.2.2.3
<i>Streptomyces</i> sp. ALG5	Alg (27.5 kDa)	1	4.2.2.11
<i>Vibrio haliotocoli</i> IAM14596T	AlyVGI (AlyVG1, 38.7 kDa)	1	4.2.2.11
<i>Vibrio</i> sp. O2	AlyVOA (31.4 kDa) and AlyVOB (32.0 kDa)	2	4.2.2.3
<i>Vibrio</i> sp. QY101	AlyVI (38.4 kDa)	1	4.2.2.3, 11

나. Alg7B의 과발현 및 정제

*E. coli*에서 재조합 Alg7B 단백질을 발현하기 위해서는 alg7B 유전자의 signal sequence를 절단하여 용이하게 발현시켰다. 최적 IPTG 농도와 induction 온도는 0.1 mM IPTG와 16°C에서 재조합 단백질 대부분이 수용성 형태로 발현되었다. 발현된 Alg7B를 His-trap으로 정제후 정제된 Alg7B를 초미세여과로 농축하였다. 그 발현된 재조합 Alg7B 분자량은 SDS-PAGE에 의하여 대략 63kDa으로 측정되었다 ([그림 4-3-4]).

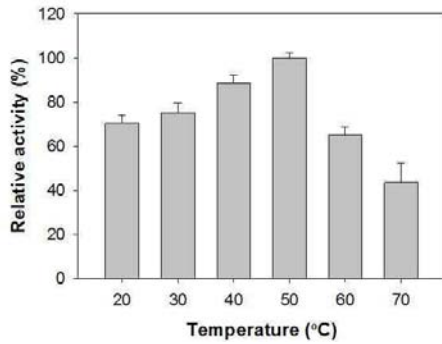


[그림 4-3-4] 재조합 Alg7B의 SDS-PAGE.

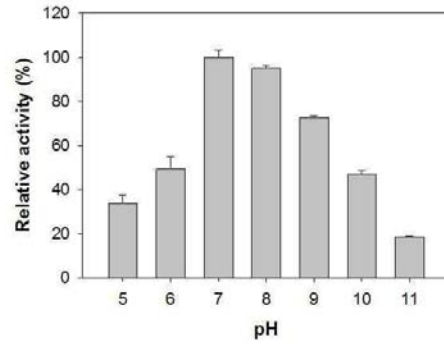
다. Alg7B의 최적 온도 및 pH

Alg7B의 최적 활성을 나타내는 온도와 pH를 측정하기 위해 각각 20에서 80°C의 여러 온도 범위([그림 4-3-5] (a))와 5-11의 범위의 pH([그림 4-3-5] (b))에서 반응을 하였다. 효소활성은 50°C에서 최대값을 보였으며, 그 이후의 온도에서는 효소 활성이 감소하였다. 또한 Alg7B는 pH 7에서 최대 활성을 나타내었으나 pH가 6 이하이거나 10 보다 높은 경우에는, 효소 활성이 pH 7에서의 활성에 비교하여 50%까지 감소하였다. 이를 통해 Alg7B의 최대 활성 온도와 pH는 각각 50°C와 pH 7임을 알 수 있다. 여기서 특징적인 사항은 Alg7B의 최적 반응 온도(50°C)는 30°C로 보고[9]된 최적 성장 온도보다 현저하게 높았다는 점이다.

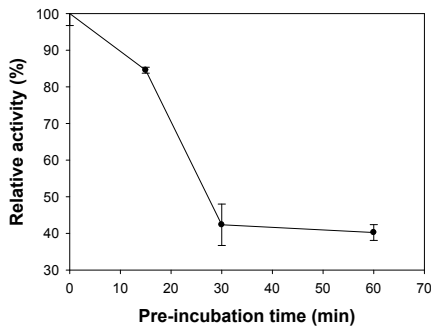
(a)



(b)



(c)



[그림 4-3-5] Alg7B의 활성에 대한 온도(a)와 pH(b)의 영향 및 최적 조건인 50도, pH 7에서의 시간에 따른 효소 안정성에 대한 그래프.

라. Alg7B의 alginate, poly M과 poly G에 대한 기질 특이성

Alginate lyase는 기질 특이성에 따라 효소그룹이 나뉘는데 poly M에 활성이 높은 alginate lyase인 EC. 4. 2. 2. 3과 α -L-guluronate lyase인 EC. 4. 2. 2. 11의 두 가지 그룹으로 나뉘는데 Alg7B는 poly M과 poly G 보다는 일반적인 alginate lyase에 활성이 더 높다는 것을 확인할 수 있었다.

[표 4-3-2] Alg7B의 기질특이성

Substrate	Sodium alginate	Poly M	Poly G
Relative activity (%)	100.0 \pm 5.1	67.4 \pm 2.4	45.9 \pm 0.8

마. Alg7B의 양이온 효과

Alg7B의 활성에 대한 양이온 효과를 조사하기 위하여 Na⁺, K⁺, Ca⁺, Mg²⁺, Mn²⁺, Cu²⁺, Zn²⁺ 및 Fe²⁺을 10 또는 100mM의 농도에서 활성을 측정하였다([표 4-3-3]). 그 결과, Na⁺의 농도가 0, 10, 100mM로 증가함에 따라 효소의 활성이 증가하는 것을 확인하였다. 그러나 K⁺를 제외한 다른 모든 양이온인, Ca²⁺, Mg²⁺, Mn²⁺, Cu²⁺, Zn²⁺ 및 Fe²⁺은 실험한 두 농도 모두에서 Alg7B의 활성이 감소하였다. 특히, 10 mM Cu²⁺ 및 Zn²⁺ 그리고 100mM Ca²⁺, Mg²⁺, Mn²⁺, Cu²⁺, Zn²⁺ 및 Fe²⁺는 대조군(양이온 미첨가)의 40% 미만으로 AlgB의 활성이 감소하였다.

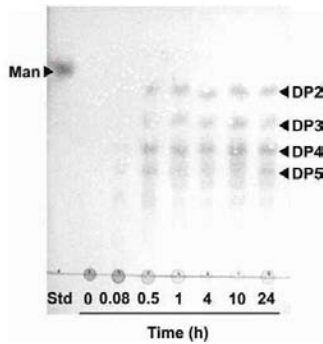
[표 4-3-3] Alg7B의 활성에 대한 여러 양이온의 효과를 나타낸 표

양이온	10mM에서 상대적 활성	100mM에서 상대적 활성
Na ⁺	108.7 ± 0.9	120.5 ± 2.3
K ⁺	99.8 ± 3.5	96.3 ± 0.5
Ca ²⁺	86.7 ± 1.3	검출안됨
Mg ²⁺	83.0 ± 3.8	27.0 ± 2.2
Mn ²⁺	65.4 ± 3.1	37.0 ± 3.0
Cu ²⁺	28.5 ± 3.9	26.0 ± 1.4
Zn ²⁺	25.2 ± 2.2	검출안됨
Fe ²⁺	66.0 ± 4.3	검출안됨
양이온 없는 대조군	100 ± 2.2	100 ± 2.2

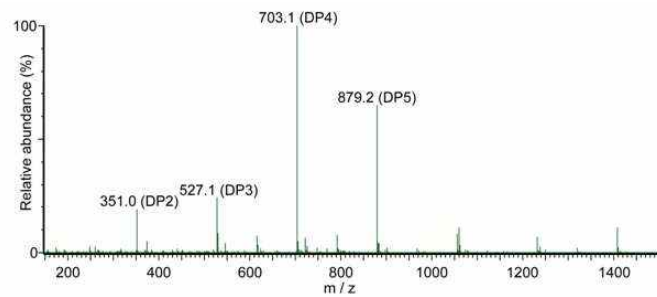
바. TLC 및 LC-MS를 사용한 반응 산물의 분석

Alg7B 반응 산물의 프로파일링의 변화를 TLC로 측정하였다. 그 결과 시간이 지남에 따라 높은 산물의 중합도를 갖는 산물들이 낮은 중합도를 갖는 산물들로 변화하였고, 결국 중합도 2, 3, 4 및 5로 예측되는 산물들이 생성되었다([그림 4-3-6] (a)). 예측된 산물들의 정확한 질량을 확인하기 위해 UPLC/Q-TOF tandem MS를 사용하였다. 그 결과 [그림 4-3-6] (b)에서 351.0, 527.1, 703.1 및 879.2m/z에서 네개의 피크가 반응 산물의 질량 스펙트럼에서 검출되었으며, 이는 각각 DP2, 352.0; DP3, 528.1; DP4, 704.1; DP5, 879.2에 해당한다[10].

(a)



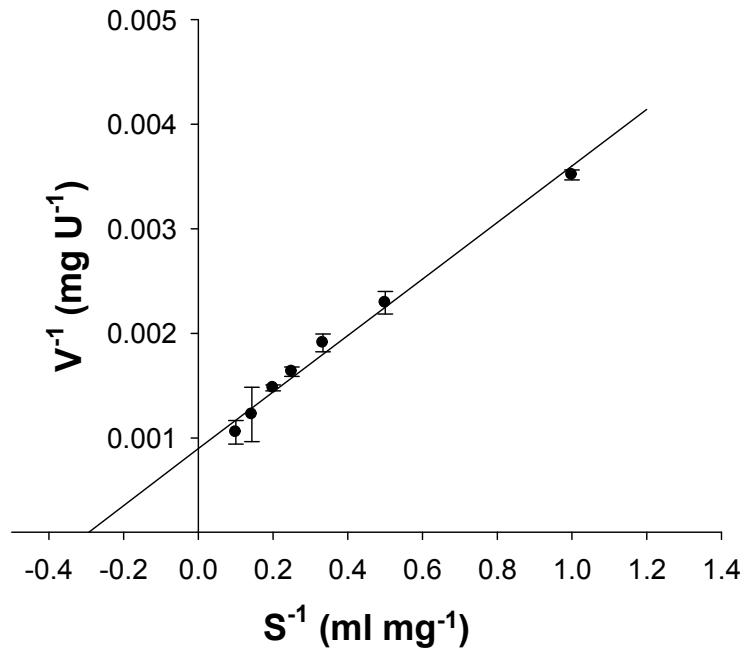
(b)



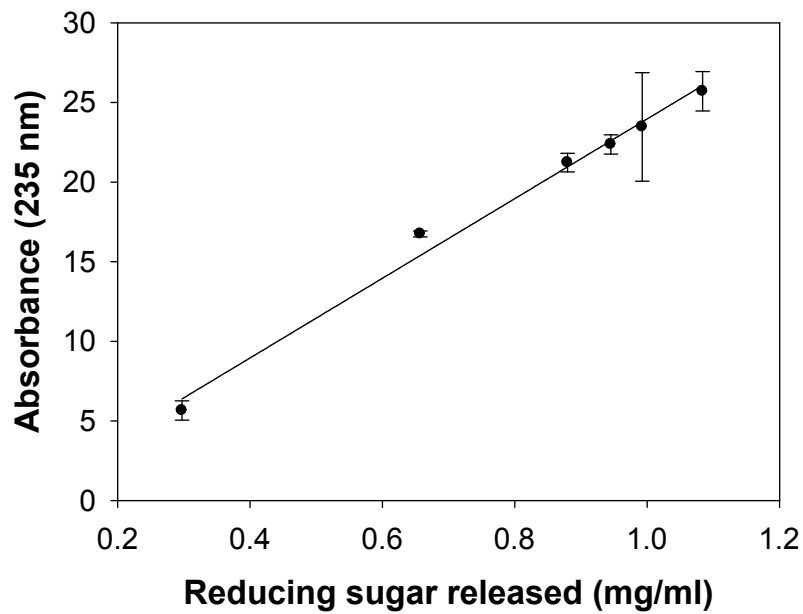
[그림 4-3-6] Alg7B 반응 산물의 TLC(a) 및 LC/MS(b) chromatogram.

사. Alg7B에 의한 알긴산 해중합(depolymerization)의 반응속도론

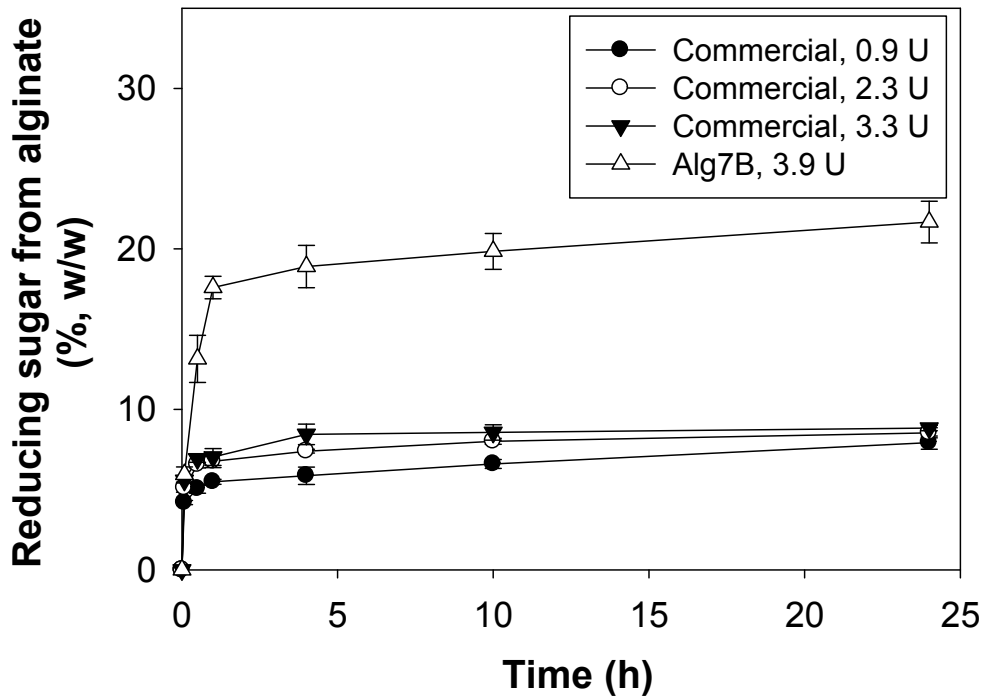
K_M 및 V_{max} 와 같은 반응속도 상수는 여러 기질 농도에서 반응 속도를 측정하여 Lineweaver-Burk 그래프로부터 얻을 수 있었다([그림 4-3-7]). 이 실험에서 산물의 정량은 환원당 정량 및 UV를 이용한 흡광도를 이용하였다([그림 4-3-8]). K_M , V_{max} , k_{cat} 및 k_{cat}/K_M 값들은 각각 3.0 mg ml^{-1} , $1.1 \times 10^3 \text{ U mg}^{-1}$, $1.9 \times 10^{-2} \text{ s}^{-1}$ 및 $6.3 \times 10^{-3} \text{ mg}^{-1} \text{ ml s}^{-1}$ 이었다. 또한 효소 활성의 우수성을 확인하기 위해 상업효소와 비교를 하였다([그림 4-3-9]). 상업적인 효소의 최적 반응 조건에서 반응한 것과 Alg7B의 활성을 최적조건에서 비교한 결과 대략 2배 이상의 환원 말단이 Alg7B에서 생성되는 것을 확인할 수 있었다. 또한, 다른 문헌상의 보고된 PL-7에 속하는 alginate lyase와 비교한 결과도 최소 비슷하거나 높은 V_{max} 값을 얻을 수 있었다([표 4-3-4]). 따라서 이와 같은 결과들을 종합한 결과 Alg7B는 alginate를 분해하는데 이용되는 endo-type 효소로서 가치가 있음을 확인할 수 있었으면, 향후 복합공정에 적용이 용이한 효소라는 것을 알 수 있다.



[그림 4-3-7] 반응 속도 지표들을 구하는데 사용된 Lineweaver-Burk 도표.



[그림 4-3-8] DNS 방법에 의해 측정된 환원말단의 농도와 235nm에서 UV로 측정한 이중결합과의 관계 그래프.



[그림 4-3-9] Alg7B와 상업효소 (*Flavobacterium* sp.) 효소간의 활성 비교.

[표 4-3-4] Alg7B와 PL-7에 해당하는 alginate lyase의 활성 비교

Alginate lyase	Substrate	End product	K_M (mg ml ⁻¹)	V_{max} (U mg ⁻¹)	k_{cat} (s ⁻¹)	k_{cat}/K_M (mg ⁻¹ mls ⁻¹)
Alg7B ^a	Alginate	DP2,3, 4 and 5	3.0	1.1×10^3	1.9×10^{-2}	6.3×10^{-3}
A1m ^b	Alginate	N.D.	3.0×10^{-1}	3.8×10^1	N.D. ^h	N.D. ^g
PA1167 ^c	Alginate	DP2, 3 and 4	9.6×10^{-2}	N.D. ^g	2.4	2.5×10^1
A1-II' ^d	Alginate	DP2,3 and 4	1.8×10^{-2}	4.3×10^2	N.D. ^h	N.D. ^g
AlyPG ^e	DP24 ^f	DP2,3 and 4	2.7×10^2	N.D. ^g	9.7×10^{-1}	3.6×10^{-3}

^a*Saccharophagus degradans* 2-40(inthisstudy)

^b*Agarivorans* sp. JAM-A1m

^c*Pseudomonas aeruginosa* PAO1

^d*Sphingomonas* sp. A1

^e

4. 요약 및 제언

Alginate의 효소적 당화공정을 위해서 크게 두 종류의 enzyme이 필요하다. alginate를 분해하여 oligoalginate를 생성하는 endo-type alginate lyase와 oligoalginate와 반응하여 이당 혹은 단당을 만드는 exo-type alginate lyase가 필요하다. 이번년도 상반기 실험 결과 endo-type의 alginate lyase를 통해 중합도가 2, 3, 4, 5의 산물을 만드는 기술을 확보하였다. 현재 exo-type alginate lyase라고 생각되는 후보 효소군를 탐색 중이고 하반기 중으로 해당 후보군 중에서 exo-type alginate lyase에 해당되는 효소를 찾을 수 있을 것이라고 생각된다. 이를 통해 alginate로부터 단당으로 만드는 공정을 확립할 수 있을 것이라 기대된다.

5. 향후계획

효소적 당화 공정으로는 alginate의 효율적인 당화가 이루어지기 힘들기 때문에 전처리 과정이 필요하다. 하지만, 일반적인 전처리 방법은 발효저해제인 furfural, HMF와 환경오염 물질들이 생성된다. 따라서, 향후 이와 같은 문제를 일으키지 않고 효율적으로 효소적 당화를 이룰 수 있게 하는 생물 친화적 전처리 방법을 개발하여, 효소적 당화 공정과 연계하여 생물 친화적 공정을 개발할 것이다. 아울러, alginate의 당화공정에 의해 생성되는 단당이 비발효성당이기 때문에 에탄올 생산을 위해 발효성당으로 전환 시키는 효소를 개발할 것이며, 그와 더불어 value-added metabolite의 생산공정의 개발을 진행시킬 예정이다.

제 4 절 해조류분해 부탄올 생산균주 개발 및 부탄올 발효공정의 최적화

1. 연구 목적 및 내용

가. 연구 목적

최종목표: 통합생물공정 (consolidated bioprocessing)을 이용하여 해조류계 바이오 부탄올을 생산하는 재조합 균주를 개발하고 공정에 응용한다

- (1) CBP를위한 고수율 부탄올생산을 위한 재조합균주개발과 핵심 설계 기술선정: 효소와 대사체 profiling에서 도출된 다양한 유전자 또는 효소들을 분석하고 과발현등을 통해 CBP에 적합한 재조합 균주를 설계한다
- (2) 해조류내에 존재하는 당의 효율적 이용과 부탄올로의 전환이 가능한 맞춤형 균주개발의 플랫폼 구축을 위한 기반을 확립한다
- (3) 해조류계 부탄올 생산의 CBP를 최적화한다

나. 연구 내용

- (1) 통합생물공정에 적합한 맞춤형 재조합 부탄올 생산균주의 조건을 도출하고 설계한다

(가) 대사공학을 이용한 고수율 내성증진 부탄올 생산균주 설계:

- hydrogenase gene knockout에 의한 고수율 부탄올생산균주 개발
- NiFE hydrogenase를 발현하는 유전자 (*hupL*, *hypQ3Q4*)들을 교란하여 2가지의 서로 다른 균주를 개발하고 부탄올 생산 수율등의 특성을 분석한다
- 연구관련 SCI논문 1편 제출 (Molecular Microbiology, IF 6.0) 중
- membrane 성분 관련 gene (fab gene)을 overexpression하여 부탄올 및 다양한 저해제에 대한 내성을 증진시킨다.

(나) 부탄올 균주가 생산하는 가수분해효소 및 대사체의 Profiling

- 외부 유전자 발현 (heterologous expression of laminaranase gene)을 통한 다시마의 주요 탄수화물 성분인 laminaran 분해 능력이 있는 부탄올 생산균주를 개발한

다.

- 다른 종의 *Clostridium* 균주 (L2-50 혹은 *beijerinackii*)에서 laminaran 분해 효소를 클로닝하여 부탄올 생산 platform 균주 (*C. acetobutylicum*)에 발현을 시켜 선별한다.
- 기존의 비활성 셀룰로솜을 보완한 활성 셀룰로솜을 재발현시켜 다시마 등의 해조류의 탄수화물 중 하나인 성분인 cellulose 분해 능력이 있는 부탄올 생산 균주를 개발한다.
- 아직까지 cellulolytic 부탄올 생산 균주는 보고된 바가 없다.
- 본 연구 관련 SCI 논문 1편 (FEMS Microbiology Letter) 제출 예정이다.

(다) 선별된 재조합 균주들의 특성을 분석하고 부탄올 생산을 최적화한다.

- Hydrogenase gene knockout 균주들의 부탄올 생산능, 발효특성 및 대사특성을 조사한다.
- Laminaran 분해하여 부탄올을 생산하는 재조합 균주의 효소 활성 및 대사특성을 분석하여 전처리 없이 다시마에서 부탄올 생산을 최적화한다.
- cellulosome의 비활성의 이해하기 위해 세 개의 서로 다른 cellulase의 특성을 분석하고 문제점을 도출한다.
- 부탄올 대사경로의 조절 (conventional pathway engineering) 및 evolution을 도입하여 Hydrogenase gene knockout 균주의 부탄올 생산능력을 보다 향상한다.

(2) CBP process 공정개발 및 최적화

- 전처리 공정 없이 raw material 해조류의 직접적인 무탄올 발효를 시도한다.
- 다양한 발효 조건에서 생산된 발효산물의 profiling 및 발효 효율을 비교한다.
- *Clostridium acetobutylicum* 이외의 가수분해 생산이 많고 alcohol을 생산할 수 있는 균주의 screening한다.

(3) 해조류 당화액의 부탄올의 효율적 전환

- 당화액 내 혼합당 비선별적 이용을 위한 target 유전자 특성 분석 및 cloning한다.
- 당대사의 주요 조절인자인 HPr, Enzyme I, Enzyme II 등의 조절 단백질의 기능을 gene deletion/knockout 등으로 알아낸다.
- 조절 단백질의 기능 및 기작을 교란하여 혼합당 비선별적 이용을 하는 변이주를 선별한다.
- 선별된 변이주의 mutation을 transcriptomic/proteomic analysis를 적용하여 알아내고 주요 인자들을 targeting한다.

- Target 유전자들을 조절하여 해조류 당화액을 효율적으로 부탄올로 전환하는 재조합 균주를 설계한다.

2. 연구 방법

가. 실험장치 및 재료

(1) 실험장치

Anaerobic chamber: 혐기균주의 배양과 유전자 조작 및 돌연변이 선별을 위한 무산소 시설

Incubator (steady, shaking): 균주배양용

refridgerated centrifuge: 다양한 실험에 적용

Anaerobic vials/jars

Gas exchange station equipped with regulator, vacumm and nitrogen tank

Autoclave 멸균기

Electrophoresis station

Electrotransformation pulser: 재조합균주를 만들기 위한 transformation 도구

Refridgerator: 시약 및 균주 보관

Freezer (-80°C):시약 및 균주 보관

Fermentor: 발효조

Anaylisis: GC, LC, Spectrophotometer 등: 발효산물 분석

pipettes, 기타 초자 및 소모품등

water bath

heating block등

(2) 실험재료

Strains: *E. coli*, *Clostridium acetobutylicum*, *Clostridium beijerinckii*, *Clostridium phytofermentans*, *Clostridium L2-50*

Restriction enzymes

Moelcular biology kit

Tools for strain engineering: cloning vector, expression/shuttle vector. gene deletion /knockout tools (commercial or MTA bases)

Media, Chemicals

oligo 합성

(3) 분석용역

sequenece analysis, fatty acid 분석, product분석 등

나. 실험 절차

(1) 통합생물공정에 적합한 맞춤형 재조합 부탄올 생산균주를 설계하고 선별한다.

(가) 대사공학을 이용한 고수율 내성증진 부탄올 생산균주 설계:

- hydrogenase gene knockout에 의한 고수율 부탄올생산균주 개발한다.
- NiFE hydrogenase를 발현하는 유전자 (*hupL*, *hypQ3Q4*)들을 교란하여 2가지의 서로 다른 균주를 개발하고 부탄올 생산 수율등의 특성을 분석한다.
- 연련 SCI논문 1편 제출 (Molecular Microbiology, IF 6.0) , review중
- membrane 성분 관련 gene (fab gene)을 overexpression하여 부탄올 및 다양한 저해제에 대한 내성을 증진한다.

(나) 부탄올 균주가 생산하는 가수분해효소 및 대사체의 Profiling

- 외부 유전자 발현 (heterologous expression of laminaranase gene)을 통한 다시마의 주요 탄수화물 성분인 laminaran 분해 능력이 있는 부탄올 생산균주의 개발한다.
- 다른 종의 Clostridium균주 (L2-50)에서 laminaran분해효소를 클로닝하여 부탄올생산균주에 발현을 시켜 선별한다.
- cellulosome의 비활성의 이해하기 위해 세 개의 서로 다른 cellulase의 특성을 분석하고 문제점을 도출한다.
- 기존의 비활성 셀룰로좀을 보완한 활성 셀룰로좀을 재발현시켜 다시마등의 해조류의 탄수화물중 하나인 성분인 cellulose 분해 능력이 있는 부탄올 생산균주의 개발한다.
- 아직까지 cellulolytic 부탄올 생산균주는 보고된 바가 없다.

(다) 선별된 재조합 균주들의 특성을 분석하고 부탄올 생산을 최적화함

- Hydrogenase gene knockout 균주들의 부탄올 생산능, 발효특성 및 대사특성을 조사한다.

- Laminaran 분해하여 부탄올을 생산하는 재조합 균주의 효소 활성 및 대사특성을 분석하여 전처리 없이 다시마에서 부탄올 생산을 최적화한다.
- cellulosome의 비활성의 이해하기 위해 세 개의 서로 다른 cellulase의 특성을 분석하고 문제점을 도출한다.
- 부탄올 대사경로의 조절 (conventional pathway engineering) 및 in vivo evolution 을 도입하여 Hydrogenase gene knockout 균주의 부탄올 생산능력을 보다 향상시킨다.

(2) CBP process (통합생물공정) 개발 및 최적화

- 전처리 공정 없이 raw material 해조류의 직접 발효한다.
- 다양한 발효 조건에서 생산된 발효산물의 profiling 및 발효율의 비교한다.
- Clostridium acetobutylicum 이외의 가수분해 효소 생산이 많고 alcohol을 생산할 수 있는 균주의 screening한다.

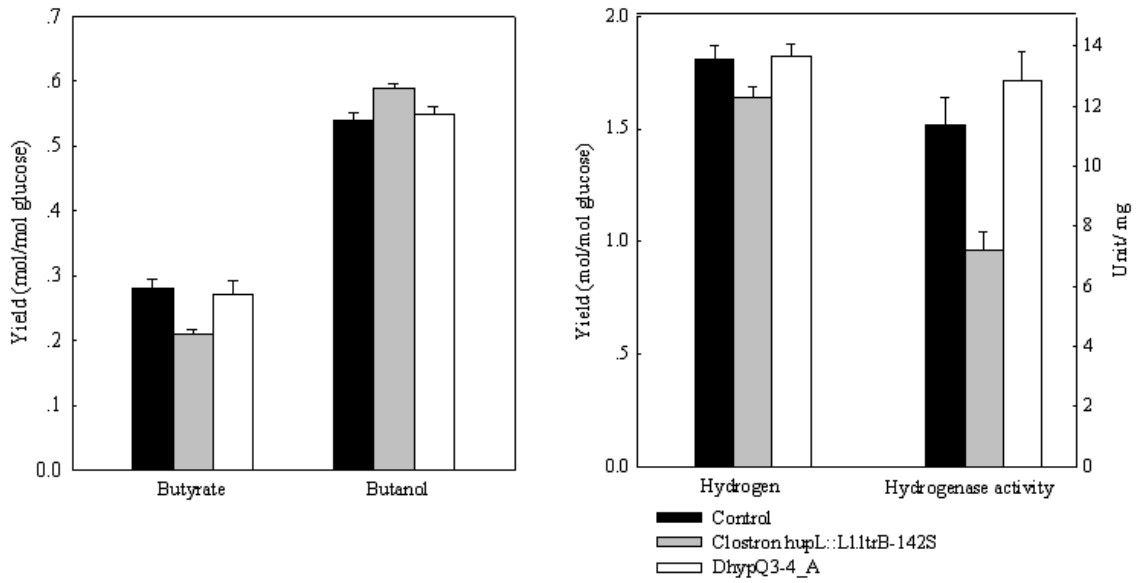
(3) 해조류 당화액의 부탄올의 효율적 전환

- 당화액 내 혼합당 비선별적 이용을 위한 target 유전자 특성 분석 및 cloning한다.
- 당대사의 주요 조절인자인 HPr, Enzyme I, Enzyme II 등의 조절 단백질의 기능을 gene deletion/knockout 등으로 알아낸다.
- 조절 단백질의 기능 및 기작을 교란하여 혼합당 비선별적 이용을 하는 변이주를 선별한다.
- 선별된 변이주의 mutation을 transcriptomic/proteomic analysis를 적용하여 알아내고 주요 인자들을 targeting한다.
- Target 유전자들을 조절하여 해조류 당화액을 효율적으로 부탄올로 전환하는 재조합 균주를 설계한다.

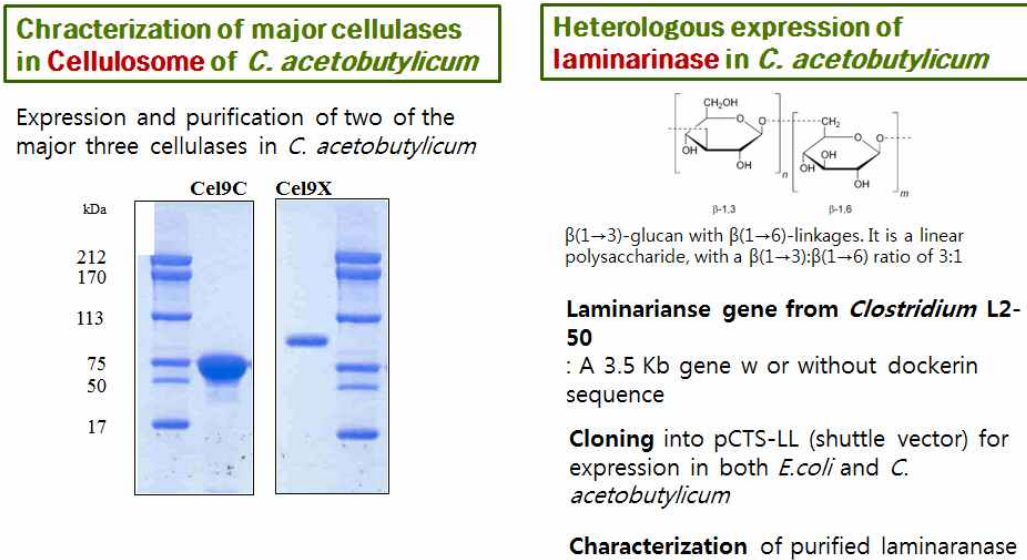
3. 연구 수행 결과

가. Hydrogenase knockout 에 의한 수율 향상: 10% yield 향상: hupL and hypQ3Q4 mutant (논문 review 중, Molecular Microbiology, SCI) ([그림 4-4-1] 참조)

나. 균주 내 이미 존재하는 비활성 cellulosome의 특성 분석(논문 제출 준비 중, FEMS Microbiology Letter, SCI) ([그림 4-4-2] 참조)

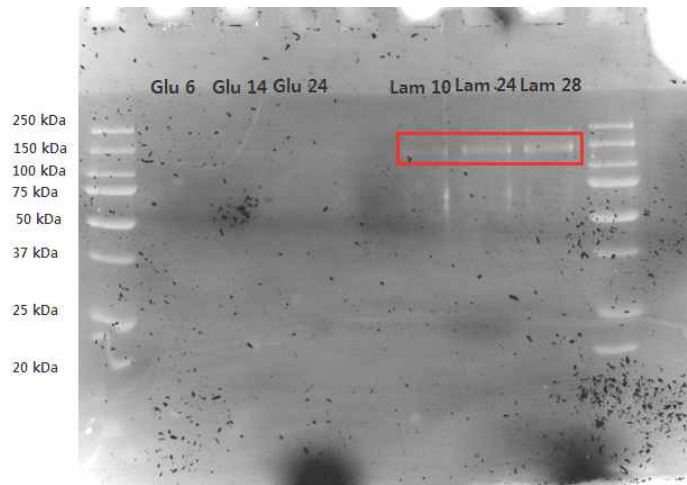


[그림 4-4-1] Hydrogenase mutants의 특성분석.



[그림 4-4-2] CBP용 부탄올 생산균주의 가수분해효소의 생산조절.

다. 다시마의 두번째 주요성분인 laminaran가수분해효소의 heterologous expression strategy를 도출하였다([그림 4-4-2]와 [그림 4-4-3] 참조).



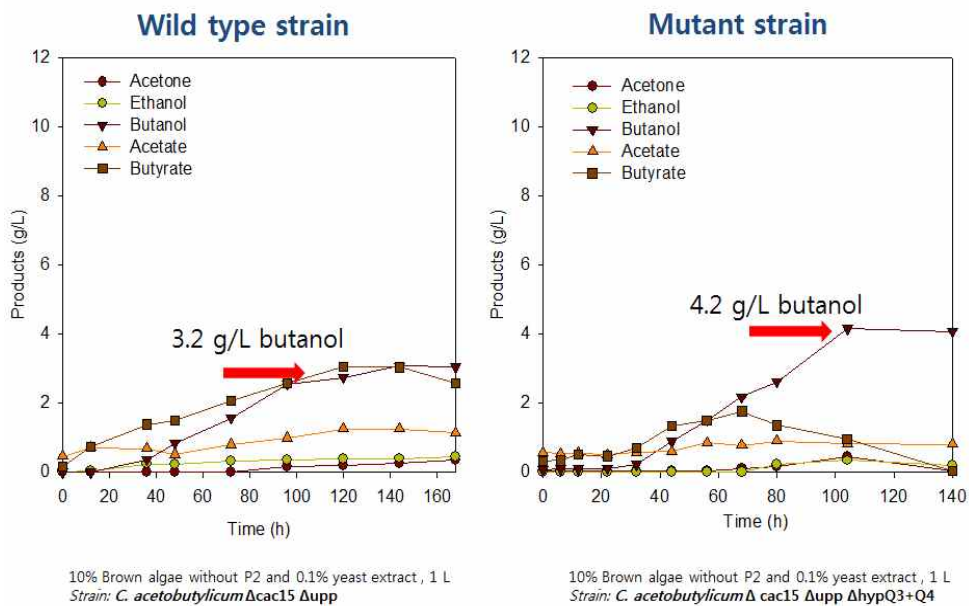
media, 15% SDS

[그림4-4-3] 부탄올 생산균주의 laminarinase효소의 유도생산.

라. 내성증진 균주설계를 위한 대사공학: 다양한 fab gene들을 cloning하고 protein의 과발현을 진행중이다.

마. 기질에 따른 효소발현의 차이점 발굴: 효소의특성을 분석중이다.

바. 다시마의 직접발효를 시도: 5-6g/L of butanol from 1L batch culture (no pH control), (비교: 10-12 g/L from 6% glucose) ([그림 4-4-4] 참조)



[그림 4-4-4] 부탄올생산균주의 다시마의 직접발효.

사. 부탄올 생산균주가 Alginate등의 다양한 당을 carbon source로 사용할 수 있는 가능성이 보여진다.

4. 요약 및 제언

가. CBP를 위한 맞춤형 부탄올생산균주의 개량하였다.

- (1) 수율향상:hydrogenase gene knockout에 의한 고수율 부탄올생산플랫폼균주 2종 선별하였다. (hupL, hypQ3Q4 mutants)
- (2) 내성증진: membrane 성분 관련 fab gene 2종 이상 도출, 클로닝 및 과발현을 진해중이다.
- (3) 해조류 당분해효소 발현: laminarinase, cellulosome에 관한 연구 진행중, laminaranase 의 heterologous expression과 고유의 cellulosome의 보수가 진행되고 있으며, 다시마의 주요 탄수화물 성분을 분해할 수 있는 재조합균주를 설계하고 특성을 분석할 예정이다.

나. CBP발효공정의 최적화

- (1) 혼합기질의 이용 인자: ptsH, ptsI, ptsG의 기능 연구를 진행중이다.
- (2) Raw material 발효공정: 다시마의 직접 발효, 5-6g/l butanol 생산가능 (9-10g/l from glucose), 비타민, 기타영양소의 첨가가 필요없음. 염분영향 (upto 100g dw 다시마/l)이 거의 없음을 알아내었다.
- (3) 다시마에 존재하는 비발효당의 혼합이용 가능성에 관한 연구를 진행중이다.

5. 향후계획

가. 해조류 바이오매스 활용 CBP부탄올 발효 기반공정 개발한다.

- (1) 해조류 및 해조류당화액을 기질로 하는 바이오 부탄올 생산 기반공정 개발한다.
- (2) 반응조건 최적화 및 생산성 향상 인자 도출한다.
- (3) 해조류를 이용한 부탄올 발효의 최적화를 시도한다.

나. 고수율 부탄올생산을 위한 재조합균주개발 (CBP)를 위한 균주의 재설계 및 특성을 분석한다.

- (1) 도출된 유전자 및 인자들의 다양한 조합을 이용하여 고수율 부탄올균주를 재설계한다.
- (2) 대사공학을 이용한 부탄올 발효 수율 향상 기술 개발한다.
- (3) 다양한 형질의 재조합 균주 설계 및 맞춤형균주 개발을 위한 플랫폼기술 구축 및 CBP에 적합한 부탄올생산 재조합균주 개발한다.

다. Pervaporation을 이용한 해조류계 바이오부탄올의 분리정제 기술 개발한다.

- (1) 다양한 membrane을 적용하고 비교하여 *in situ*-continuous 최적의 부탄올 분리정제 조건을 도출한다.
- (2) 분석 및 다양한 기술의 적용이 요구됨에 따라 국내외 경험있는 다른 우수연구그룹 및 기업/연구소와의 협력연구가 진행될 예정이다. (예, metabolomics, metabolic engineering, large scale 부탄올생산공정등)
- (3) pervaporation의 전문가인 Dr. Nasib Qureshi (USDA, Peoria, IL USA)의 자문 및 협력연구를 추진중이다.

제 5 절 난발효성 당류 대사형 재조합 미생물 개발

1. 연구 목적 및 내용

가. 연구 목적

갈조류의 최대 부산물은 알긴산(alginate)으로 일반적인 미생물은 대사할 수 없는 구조로 되어 있다. 특히 알긴산 분해 시 생성되는 만유로닉산(mannuronic acid), 글루유닉산(guluronic acid)과 같은 유로닉산(uronic acid)는 희귀성 당류로서 대사효소 및 유전자 정보 등이 극히 제한적이다. 이와 같은 배경으로, 갈조류에 존재하는 난발효성 단당류를 함유하고 있는 알긴산 분해물을 대사할 수 있는 미생물을 개발하는 것이 본 연구의 목적이다.

나. 연구 내용

난발효성 단당류를 대사할 수 있는 해양미생물을 선별하기 위해서 구체적으로 (1) 현재까지 보고된 해양미생물의 생리적 정보를 바탕으로 알긴산 분해형 해양미생물 라이브러리를 구축하고, (2) 순수 알긴산을 단당류 유로닉산으로 분해할 수 있는 화학적 처리법을 개발하며, (3) 알긴산 유사 유로닉산을 탄소원으로 이용한 희분식 배양을 통해서 유로닉산 대사가능 미생물을 선별한다.

난발효성 단당류의 대사효소 및 유전자 정보의 확보와 유전자 클로닝 및 발현벡터를 제조하기 위해서 구체적으로 (1) 유로닉산 대사효소로 mannuronate hydrogenase, 2-keto-3-deoxy-glucoaldehyde(KDG) dehydrogenase, KDG kinase, KDPG aldolase 등 대사효소 4종에 대한 후보 유전자 정보 확보 및 각 유전자 라이브러리 구축하고, (2) 이중 핵심 유전자인 2-keto-3-deoxy-glucoaldehyde(KDG) dehydrogenase, KDG kinase, KDPG aldolase의 유전자를 PCR 증폭시킨다.

2. 연구 방법

가. 실험장치 및 재료

(1) 실험장치

(가) 배양기

shaking incubator (한국종합기기제작소, 한국)

(나) 흡광도 측정기

UV-Visible Spectrophotometer (S-3100, Thermo Scientific Col., USA)

(다) High performance liquid chromatography

Agilent 1200 series, Detector (RID & UV210nm), Column (phenomix Rezex ROA-Organic acid H+(8%), 300×7.80mm), Solvent (0.005N sulfuric acid), Other conditions (60°C, 0.6 mL/min)

(라) 기타기기

① DNA 분리장치: Agarose gel electrophoresis (Bio-rad Co., USA)

② 파쇄기: Sonicator (0.5 mm I.D.)

(2) 실험재료

(가) 일반시약

glucuronic acid, Na-alginate, agarose(Sigma Aldrich Co., USA), oxalic acid dihydrate와 황산(Duksan, Korea), sodium hydroxide(Samchun chemical, Korea). Ultrapure water (B&J HPLC Certified Solvent, Burdick & Jackson Co., USA)

(나) 배지류

① LB medium: 10 g/l yeast extract, 20 g/l tryptone, 10 g/l NaCl

② M9 medium: 5x M9 salt(Na_2HPO_4 , 60 g/l, KH_2PO_4 30g/l, NaCl 5g/l, NH_4Cl 10g/l), agar 3%, sterile water, 1M MgSO_4 1ml/L, 1M CaCl_2 0.1ml/L.

③ Double-layer medium:

- upper layer : Alginate-Na, 1%; Agar 2% pH7.5

- down layer : KH_2PO_4 , 0.05%; K_2HPO_4 , 0.05%; NaCl, 2%; FeSO_4 , 0.01%; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0.05%; KCl, 0.05%; Agar, 2% pH 7.5

(다) 미생물균주

Escherichia coli MG1655, *Flavobacterium johnsoniae* ATCC17061, *Saccharophagus degradans* ATCC43961

(라) 유전자 관련 효소 및 키트

Accuprep®genomic DNA extraction kit (Bioneer Co., Korea), T4 DNA Polymerase(5 units/ul Takara Co., Japan), 제한효소 *Bam*HI(20 units/ul, Enzymomics, Korea), calf intestinal alkaline phosphatase(30 units/ul, Takara), T4 DNA ligase(350 units/ul, Takara)

나. 실험 절차

(1) Fermentation of *E. coli* MG1655

기본적으로 M9 minimal배지에서 *E. coli* MG1655의 발효데이터를 얻기 위해서 glucose와 glucuronic acid를 이용한 M9 minimal 배지에서 박테리아 발효를 수행하였다. glucose와 glucuronic acid의 농도는 각각 0.4% (4 g/L)로 제공하였다.

(2) Alginate acid treatment

alginate를 분해하여 실험에 필요한 mannuronic acid를 얻기 위해 acid treatment를 실행하였고, mannuronic acid는 시중에 판매 하지 않으므로 직접 분해하여 얻었다[11].

(가) poly- β -D mannuronic acid and poly- α -L-guluronic acid

우선 polymannuronic acid와 polyguluronic acid를 얻기 위해 alginic acid 3gram을 100ml의 1M oxalic acid로 처리하여 100°C에서 10시간 동안 열을 가한다. 10시간이 지난 후에 이 액을 falcon tube에 50ml씩 나누어 담은 후 원심분리하여 상등액만 채취한 후 filtration하였다.

(나) Precipitation of polymannuronic acid

polymannuronic acid만 분리하기 위하여 채취한 액을 sodium hydroxide (NaOH)를 이용하여 pH 1.5로 맞추었다. pH를 1.5로 올리면 침전물이 생기는 데 이것이 polymannuronic acid으로 추정되며, 이때는 1N의 NaOH를 이용하였다. 이렇게 얻어진 침전물을 액과 분리하여 dessicator안에서 48시간 동안 drying하였고, 이로서 고체의 mannuronic acid분말을 얻을 수 있었다. drying하는 과정을 거침으로서 액체와 더 확실하게 분리되었고 다음단계에서 좀 더 정제된 polymannuronic acid를 이용할 수 있었다.

(다) Acid hydrolysis and neutralization

이렇게 얻어진 polymannuronic acid분말을 monomer로 완전히 가수분해하기 위해 H₂SO₄를 이용하였다. polymannuronic acid분말 300mg을 12M의 H₂SO₄로 35°C에서 30분 동안 가수분해 하였고, 11mL의 ultrapure water를 첨가하였다. 그리고 이 혼합물을 100°C에서 2시간동안 열을 가하였다. 이렇게 얻어진 mixture를 NaOH를 이용하여 pH 6.75로 중화하였다.

(라) HPLC analysis

HPLC는 agilent 1200 series를 사용하였고, 위의 조건으로 맞추어 놓고 분석을 실시하였다.

(3) Application of alginate hydrolysate as carbon source

E. coli MG1655 wild type균주가 위의 알긴산 산처리 물질을 당원으로 이용할 수 있는지 확인하기 위하여 M9 minimal 배지에 산처리 물질을 넣어 배지를 만들었다. HPLC로 분석한 후 이 혼합물을 M9 minimal 배지의 탄소원으로 이용한다. mannuronic acid는 standard가 없으므로 glucose와 glucuronic acid로 비교하여 농도를 추정해본 후 농도에 따라서 희석하여 5 g/L로 배지에 넣었다. control실험으로는 산처리한 물질 대신 glucose를 5 g/L를 넣었다.

(4) M9 minimal medium

M9배지 제조 시 필요한 양만큼 H₂O를 따로 autoclave하고, 여기에 또 따로 autoclave된 M9 salts, MgSO₄, CaCl₂를 각각 넣어주었다. 그리고 탄소원을 농도에 맞추어 넣어주었다.

(5) Genomic library 제작

해양미생물인 *S. degradans*의 genomic DNA를 추출하여 유전자 라이브러리를 제작하였다.

(가) Genomic DNA 추출

*S. degradans*의 세포배양액을 재료로 이용하여 Accuprep[®] Genomic DNA Extraction Kit을 이용하여 *S. degradans* 세포 내에 존재하는 genomic DNA를 순수분리하였다.

(나) DNA fragmentation by sonication

50 ul로 elution한 genomic DNA를 4개씩 모아 200ul로 만들고 sonication을 위해 얼음과 물을 채운 비커에 고정시킨 후 sonication tip을 tube에 닿지 않게 solution에만 닿도록 쫓는다. 원하는 DNA size (500bp~2kb)로 절단하기 위한 sonication의 시간이 정해져야 하므로 10초, 20초, 30초, 40초 동안 sonication 실행한다. 발열을 방지하기 위해서 10초 on, 1분 off의 시간 table을 지켰다.

(다) Blunt end의 제조

sonication을 통해 원하는 크기로 절단된 genomic DNA 절편들을 blunt end로 만들어 vector에 random하게 들어갈 수 있도록 하는 과정이다. DNA의 volume을 정하기 위해 DNA 농도를 계산하여 0.077pmol/ul로 결정하였다. Insert DNA (>0.1 pmol) 2ul, 10× T4 DNA polymerase buffer 1ul, 0.1% BSA 1ul, 1.7mM dNTP mixture 1ul, dH₂O 4ul (total 9ul)를 튜브에 넣고 tapping으로 섞어준 후 70°C에서 5분, 37°C에서 5분 정치한 후, 1ul의 T4 DNA Polymerase를 넣고 섞은 후 37°C에서 5분 동안 반응시켰다. 반응이 끝난 후 vortexing을 통해 효소를 불활성화시켰다.

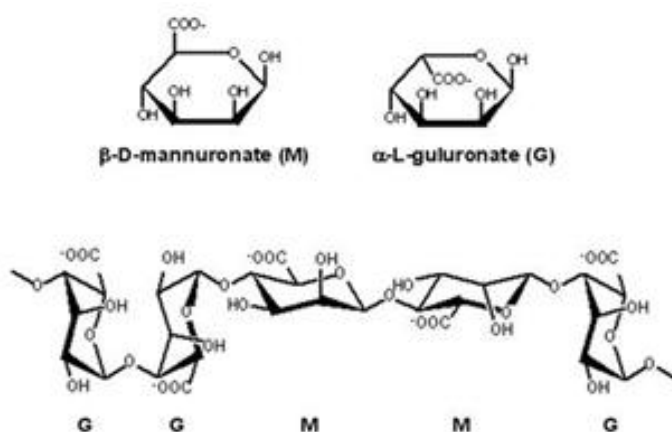
(라) 라이브러리 제조용 벡터의 효소처리

Genomic DNA 제조를 위한 벡터로 이용될 pRS424를 *Bam*HI으로 자른 후에 상기의 blunt end 제조 방법과 동일하게 pRS424에 존재하는 *Bam*HI 말단을 blunt end로 제조한 후, CIP를 처리하여 말단의 phosphate를 제거하였다.

3. 연구수행 결과

가. 갈조류 유래 알긴산 단당류의 미생물 대사 예상 경로 수립

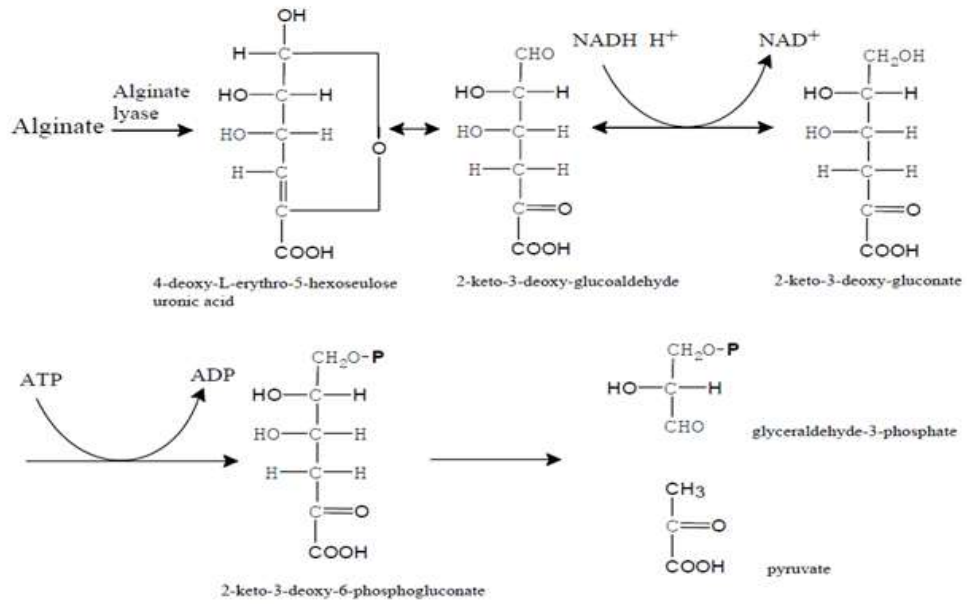
갈조류의 세포벽 주요 구성성분으로 총 건조 중량의 약 40%를 차지하는 알긴산(alginate)는 [그림 4-5-1]과 같이 2종의 유로닉산으로 구성되어 있고, 물에 잘 녹지 않은 특성을 갖고 있다.



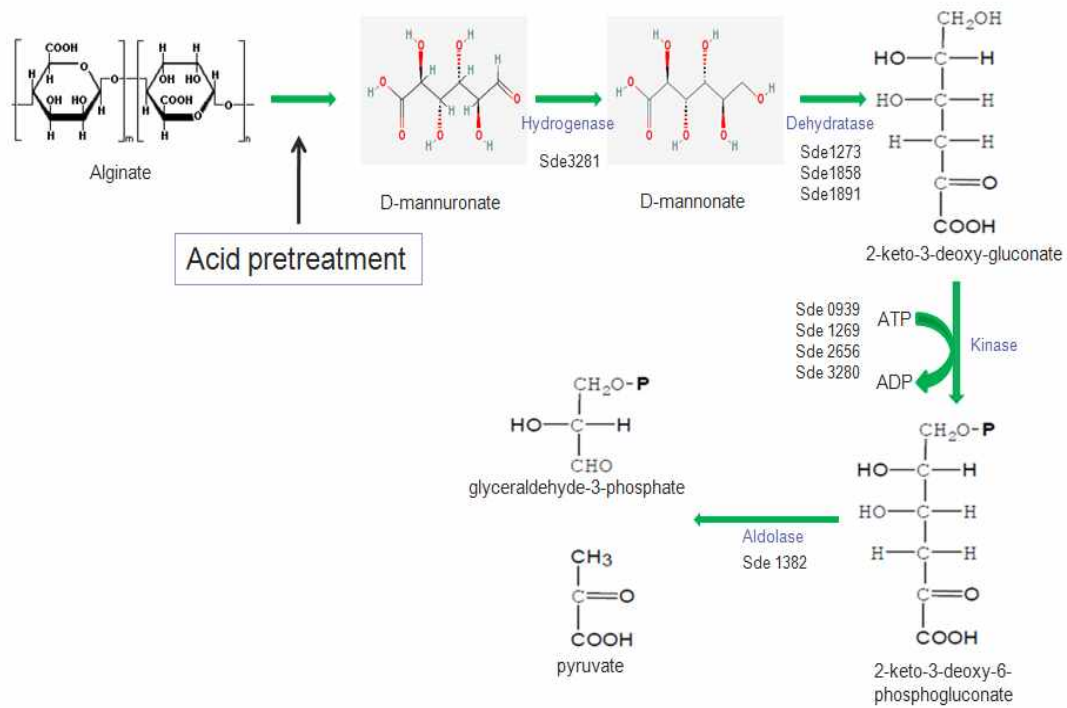
[그림 4-5-1] 갈조류 유래 알긴산의 물리화학적 구조.

알긴산을 분해하여 유로닉산 단량체로 전환시키기 위해서는 생물학적 방법과 화학적 방법을 이용할 수 있다. 생물학적 방법의 경우 알긴산 분해효소 (alginate lyase)를 이용하여 [그림 4-5-2]와 같이 4-deoxy-L-erythro-5-hexoselulose uronic acid로 전환된 이후, 자연반응으로 2-keto-3-deoxy-glucoaldehyde로 전환된다. 이후에 2-keto-3-deoxy-gluconate로 전환된 이후에 Entner-Doudoroff pathway라는 대사 경로를 따라 pyruvate와 glyceraldehyde-3-phosphate로 전환될 것으로 예상되어, 에너지원 및 building block으로 이용될 것이다[12].

한편 화학적 처리방법의 일종인 약산처리법을 이용할 경우, 알긴산은 단량체인 만유로닉산 (mannuronate)로 분해된 이후에 mannuronate hydrogenase와 dehydrogenase 효소 작용으로 인해, 2-keto-3-deoxy-gluconate로 전환되고, 상기의 대사단계와 동일하게 Entner-Doudoroff 대사경로를 통해서 대사될 것으로 예상된다 ([그림 4-5-3]). 이와 같이 생물학적 또는 화학적으로 처리되어 유리된 알긴산 단량체의 미생물 대사 예상경로를 수립하였고, [그림 4-5-2]와 [그림 4-5-3]에 나타내었다.



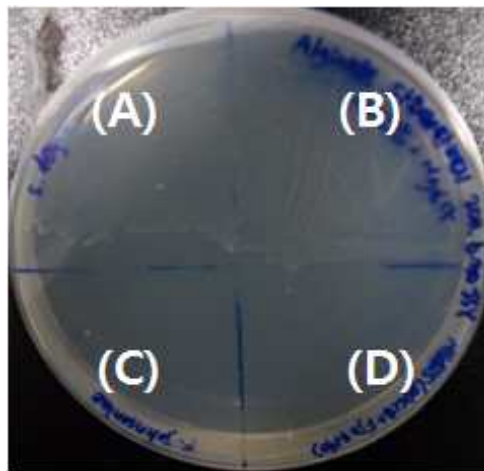
[그림 4-5-2] 생물학적으로 분해된 알긴산 단량체의 미생물 대사경로.



[그림 4-5-3] 화학적 처리된 알긴산의 미생물 대사 예상경로.

나. 알긴산 분해형 해양미생물 라이브러리를 구축

현재까지 보고된 바로는 갈조류에 함유된 알긴산을 분해하여 미생물 성장에 이용할 수 있는 미생물에 대한 보고는 전무하다. 그러나, 최근에 몇몇 보고에서 해양미생물의 일종이 다양한 고분자 탄수화물을 분해할 수 있다는 결과를 발표하였고, 이를 바탕으로 알긴산을 분해하여 대사할 수 있는 미생물 라이브러리를 구축하였음. 해양 미생물의 일종인 *Flavobacterium johnsoniae*은 과거에 *Cytophaga johnsonae*로 분류된 호기성 그람음성세균으로 토양, 진흙 등에서 발견되었고 키틴질이나 알긴산 등의 중합체를 분해할 수 있는 것으로 보고되고 있다. 대표적인 해양미생물인 *Saccharophagus degradans*은 늪지대(salt march)에서 발견된 그람음성세균으로서 agar, alginate, cellulose, chitin, fucoidan, laminarin, pectin, pullulan, starch, xylan 등 다양한 탄수화물 복합체를 분해할 수 있는 것으로 알려져 있다. 이러한 자료를 바탕으로 알긴산 분해용 대사유전자를 확보하기 위해서 *Flavobacterium johnsoniae* ATCC17061와 *Saccharophagus degradans* ATCC43961 등 2종의 미생물을 확보하였다. 확보한 2종의 미생물이 알긴산을 이용하여 대사할 수 있는지를 확인하기 위해서 제한배지에 alginate를 첨가한 고체배지를 제작하였고, 고체배지에 각 미생물을 도말하여 성장을 확인하였다([그림 4-5-4]).



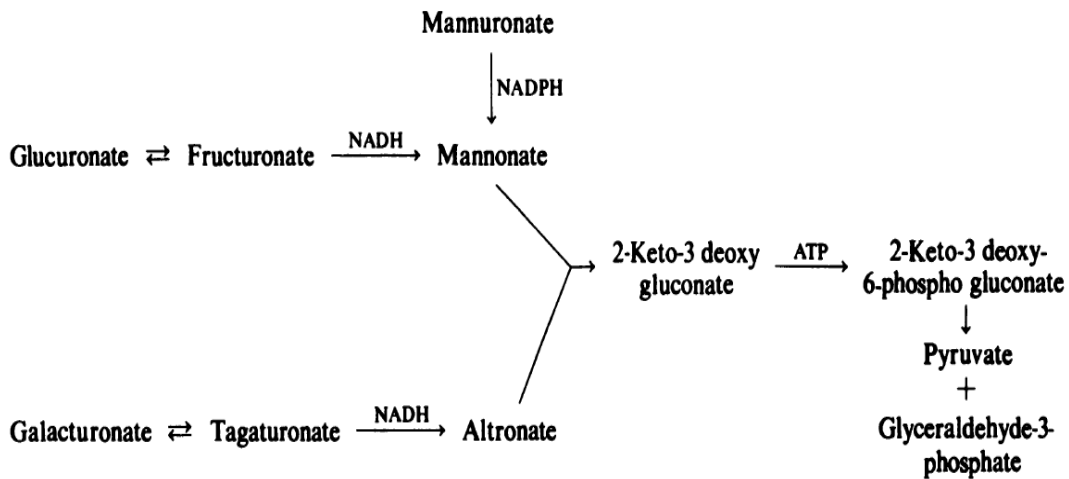
[그림 4-5-4] 알긴산 배지를 이용한 선별미생물의 알긴산 이용성능 규명.

(A) *S. degradans* (B) *E. coli* MG1655+새만금메타지놈 라이브러리 (C) *F. johnsoniae*
(D) *E. coli* MG1655

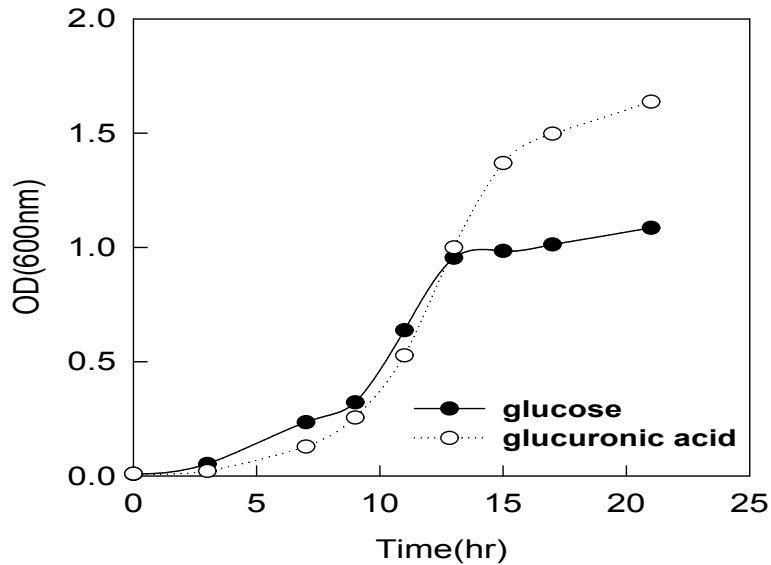
다. 알긴산 유사 유로닉산 대사형 미생물 선별

알긴산과 유사한 물리화학적 특성을 보유한 유로닉산인 글루쿠로닉산 (glucuronic acid)의 대사경로는 아래의 [그림 4-5-5]와 같이 알긴산 단량체인 만유로닉산의 대사경로 일부를 공유하고 있다. 특히 만유로닉산이 환원된 형태인 만노네이트(mannonate) 이후의 대사경로는 동일하기 때문에, 만유로닉산을 대사할 수 있는 미생물은 글루쿠로닉산을 대사할 수 있을 것으로 예상된다[13].

바이오인포메틱스 기술을 이용하여 알긴산 유사 유로닉산인 글루쿠로닉산의 대사경로를 보유한 미생물인 *Escherichia coli* MG1655를 확보하였다. 이 미생물을 글루쿠로닉산을 탄소원으로 제조한 배지를 이용한 회분식 결과는 아래의 [그림 4-5-6]과 같다. 일반적으로 미생물 발효에 이용되는 포도당을 원료로 한 발효결과와 비교할 경우, 초기 세포성장은 글루쿠로닉산을 이용할 경우와 유사하였으나 최종세포성장은 글루쿠로닉산을 이용한 경우 1.5배 더 높은 결과를 보였다. 이러한 결과를 바탕으로 만유로닉산을 대사할 수 있는 유전자를 찾기 위한 숙주세포로 이용할 예정이다.



[그림 4-5-5] 알긴산 단량체와 유사한 글루쿠로닉산의 대사 경로.



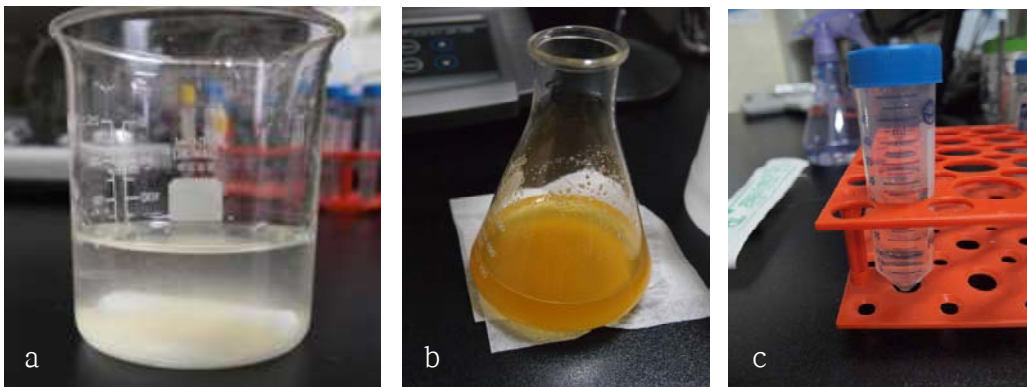
[그림 4-5-6] 알긴산 단량체와 유사한 글루크로닉산을 단일탄소원으로 이용한 *Escherichia coli* MG1655의 회분식 배양결과.

라. 알긴산의 화학적 분해방법의 최적화

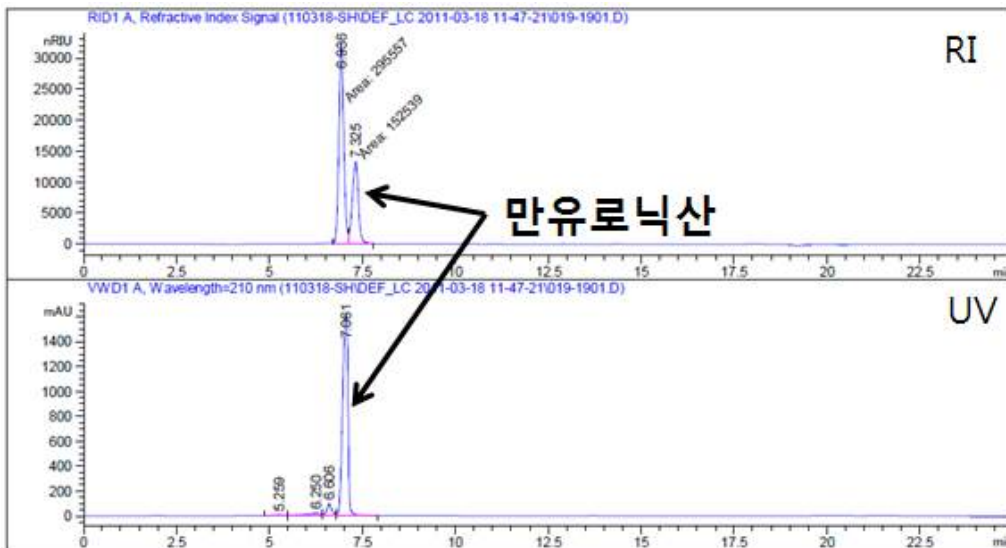
현재까지 알긴산 단량체인 만유로닉산의 상업적 공급은 이루어지지 않고 있기 때문에 화학적 분해방법을 이용하여 알긴산 단량체를 제조하고자 하였다. 그 결과로 알긴산을 1M의 oxalic acid에 넣으면 용해되지 않고 희뿌연 상태가 된다. 그 상태에서 그대로 100°C에서 10시간 동안 두면 [그림 4-5-7]의 b 상태와 같이 현탁액 상태가 되어 알긴산이 용해되어 노란 빛을 보이고, 바닥에는 침전물이 일부 가라앉는다. 이것의 상등액을 분리하여 분말로 만들고 이 분말을 12M의 H₂SO₄로 30분 처리 후 11ml의 ultrapure water를 첨가하면 [그림 4-5-7]의 c 상태가 되어 최종 결과물을 얻을 수 있었다. 이를 중화시킨 후에 HPLC를 이용하여 알긴산 분해물을 분석하였다. [그림 4-5-8]과 같이 HPLC의 크로마토그램을 분석하였을 경우, 두 개의 peak 중, 후자의 경우 알긴산 단량체인 만유로닉산으로 추정할 수 있었고, 이 양은 포도당과 글루쿠로닉산의 양과 비교하여 추정할 경우 20~30 g/L 사이로 측정된다. 본 시료에 함유된 만유로닉산의 정확한 동정을 위해서 GC-MS 분석을 의뢰하였다.

또한 가수분해물의 중화시 첨가되는 NaOH의 양을 최소화하기 위해서 컬럼 타입의 resin을 이용하여 중화반응을 대체하였다. Resin은 bio-rad사의 AG® 4×4 anion exchange resin(the resin having a mesh size of 100-200um)을 이용하였다. resin의 원리는 resin은 free base form이고 functional group 은 중성이다. 그래서 만약 mineral acid가 resin을 통과하게 되면 functional group의 nitrogen은 양성화되

고 mineral acid가 붙을 수 있게 된다. Ion-exchange과정에서 resin의 음이온은 같은 charge를 가진 sample ion으로 대체된다([그림 4-5-9]). 그래서 실험을 수행할 때에는 5g의 resin을 column에 담고 10ml의 증류수로 wash하는 과정을 거친 후 물이 resin의 표면보다 내려가기 전에 7ml의 산처리 가수분해 물을 조금씩 resin이 최대한 부유하지 않게 조심히 column안으로 흘려보냈다. 그리고 sample을 10ml언어 pH를 재었을 때 pH가 6.0정도 되는 것을 확인하였다.



[그림 4-5-7] 알긴산 산처리 과정. a.알긴산과 oxalic acid 열처리하기 전; b. 알긴산과 oxalic acid를 100℃에서 10시간 동안 열처리한 후; c. H2SO4을 넣고 2시간 동안 열처리 후 중화한 최종 product.



[그림 4-5-8] alginate acid treatment의 HPLC analysis.

<p>Kinase Fjoh 4261 (1047bp)</p>	<p>catgctgcggtttatcgacagaaagacatttacgttttcgcagtcacagcatttg gtgctacgtatggaggcggagaatttaattgatgcgtttctcttgcaaattatgg tgtaaagctgaatttgtacaagattgcctcaaaatgagattggtttatcggcat tgaaagaaatacgaaaaatgaatgtcgaatctaaaaacattgtttatggagga gagcgttttaggaatctatcttctggagaccggagccggaacacgcggcagtaa tgtagtgatgatcgcgcgcacagtgcgatggcatctattgaaaaagggcagg tagactgggagaaagttagcaggtgctgaatgggtccattggagcgggtatta cgccggctatctcaaaactgctgcagaagctgttagaagctattaaagtggc tcataaactgggaattaaaatttctgcgatttaaattacagatcaaaattatggc agtacggcaaagcgaagcgaagtatgccggaaatgtgcaatacagcaa tgttattttaggagacattgatacagctatctcatgtaggaattccgaaagtaa atccgaattatcaggacgaaaaatcgcttccggttttatgaaaaattgtttcag ttaatcccgaattaaaagtagcggcaacgacacttcgttattctgtaagtgttc acaccaaagaatcggcgggttttgtttgacggaaaagcaatttatcaggcagc tgtaaaagaggttaactcctgtgttgacagagtaggaagcgggtgacgctttat gggaggattaattatggactgttagaatcaaaataataaccagagagcttt agatgttgctgttgcggctgtgttttaaacatacaattgcaggcgactataatc tggttactttaaaagaagtgaaaatgatgattgatgggtgcttctgcattagta tcaagataa</p>	<p>taaaaaagatag tatgag r-ttatcttgatac taatgcagaacc</p>
<p>KDPG Aldolase Fjoh 0670 (648bp)</p>	<p>atgtacagcatttataaaacgcaaggtgtactccggttagtaacccaaatcaata tccaaacagcccaaactcgtattgcaatcagcggctgatgctggcataaaaatta tcgagttcgcagctcgtgcagatgatgcaaaagaagttttgctcaaatgacag cttttaaaaaagaaaacaatttagatgtaaaaatagcagtgggatcgatttaa gtgtggccgatccgaaactatcatcaattgggagcagattgtattatctgtcc gcacactgatctggaaattggcaattactgttttaaaaacaatatttactggattc cgggcgctgcaaccttaaatgaaattctcatgccaacaaactgggtgccgaa gttgtaaaacttttccggctgataaaattggcggaccgggatatgtaaaagca ataagagcgcctttcccaaatttaaaaataatgcccacaggaggcgtaacctt gaagaaagcaatttaaaatcgtggttaaatctggagtggatgcgttggatt ggttcaaatttttcaaaaagaatgcttttgaatttaattatgaagaagcgt ccaggctttcaaaatttaattgaaggagtagaaaaacaagaactaa</p>	<p>f-atgtacagcat tttaaaaacgca ag r-ttagtttctgtt tttctactcttc</p>

상기의 표에 제시한 PCR 프라이머를 이용하여 해당하는 유전자 3종을 PCR 증폭하였다. [그림 4-5-10]과 같이 PCR 증폭을 통해서 얻어진 유전자 단량체는 예상한 DNA 크기에 모두 존재하는 것으로 보아 증폭이 성공적으로 수행되었다([그림 4-5-10]).

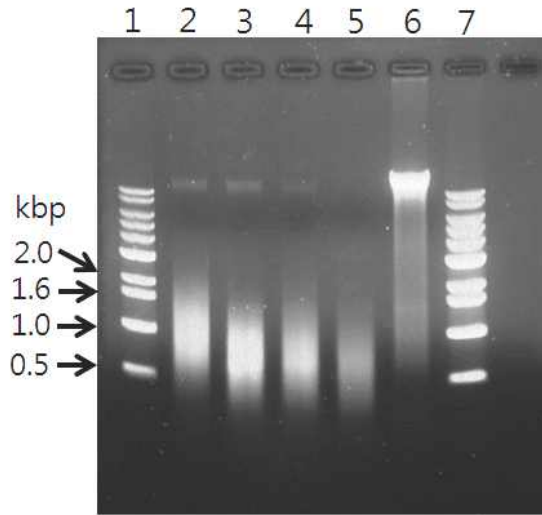
- Template : *F. johnsoniae* genomic DNA
- Taq polymerase (with proof-reading ability)
- Primers specific for individual genes
- Final gene product (estimated size)
 - (1) Dehydrogenase : Fjoh 3293 (1059bp)
 - (2) Kinase : Fjoh 4261 (1047bp)
 - (3) Aldolase : Fjoh 0670 (648bp),
Fjoh 4260 (669bp)



[그림 4-5-10] KDGA dehydrogenase, KDG kinase, KDPG aldolase 대사효소 유전자의 증폭.

마. *S. degradans*의 genomic library의 제조를 위한 gene fragmentation 조건 결정

*S. degradans*의 genome에 존재하는 알긴산 모노머의 대사과정을 생촉매하는 대사효소의 유전자를 선별하기 위해서 *S. degradans*가 보유하고 있는 genome를 이용한 유전자 library를 구축하고자 하였다[5,6]. Genomic DNA library를 만들기 위해서 *S. degradans*의 세포 genomic DNA를 추출하였고, 그 농도는 약 50 ug/ml이다. 각 tube에 분주한 DNA 시료를 10~40초 간격으로 sonication하여 gene fragmentation을 하였고, 그 결과는 [그림 4-5-11]과 같다. 10초의 sonication의 경우 0.5~2 kbp 크기의 DNA 편절을 얻을 수 있었고, 10초 이상을 시행한 경우에는 1 kbp 이하의 작은 크기의 DNA 편절을 얻을 수 있었다. 일반적으로 유전정보를 보유한 open reading frame(ORF)의 경우, 1 kbp 이상의 유전자 크기를 갖고 있다. 곧, 일반적인 ORF 크기 이상의 유전자를 보유한 library를 얻기 위해서, 10초의 sonication을 genomic library를 설계하기 위한 조건으로 결정하였고 향후 발현벡터와의 결합을 위한 DNA insert 제조과정에 이용할 것이다.



[그림 4-5-11] Isolation and fragmentation of *S. degradans* genomic DNA
 DNA ladder (lane 1 and 7), sonication for 10 sec(lane 2), 20 sec(lane 3), 30 sec(lane 4) and 40 sec(lane 5), *S. degradans* genomic DNA without sonication(lane 6)

4. 요약 및 제언

본 연구과제를 통해서 갈조류 유래 알긴산 단당류의 미생물 대사경로를 수립하였고, 알긴산 분해형 해양미생물 라이브러리를 구축하였고, 알긴산 유사 유로닉산을 대사할 수 있는 미생물을 선별하였으며, 알긴산 단량체의 제조를 위한 화학적 분해방법을 최적화하였으며, 알긴산 단량체를 대사할 수 있는 핵심효소의 유전자 정보를 획득하였고, 해양미생물 염색체에서 그 유전자를 증폭하였다. 또한 해양미생물 유래의 염색체유전자 라이브러리의 설계 조건을 확립하였다. 상기에 언급하였듯이 난발효성 당류인 알긴산을 대사할 수 있는 대사효소의 검색과 유전자 및 미생물을 선별하였고, 알긴산 유래 단량체의 안정적인 공급을 위해서 알긴산 단량체 제조방법을 개발하였다. 이러한 결과에 대한 타 기관의 선행연구는 전무하여 추가적인 연구를 통해서 강력한 특허 및 우수 논문을 발표할 수 있을 것으로 예상된다.

5. 향후계획

현재까지 진행된 성공적인 연구결과를 바탕으로 다음과 같은 연구를 계획하고 있다. 알긴산 유래의 난발효성 단당류인 만유로닉산을 대사할 수 있는 대사효소 유전자가 도입된 플라스미드의 제조 및 이로 형질전환된 재조합 미생물을 개발할

것이다. 본 연구팀이 제조한 만유로닉산을 탄소원으로 이용한 배지를 제조하여 형질 전환 미생물의 만유로닉산 대사표현형을 규명할 것이고, 이 유전자 발현의 최적화를 통해서 효율적인 만유로닉산 대사형 미생물을 개발할 것이다.

제 5 장

그린에너지 융합공정

- 제 1 절 Next generation sequencing을 활용한 유기산
수율 향상기술
- 제 2 절 VFA 생산용 다단계 생물반응기 설계
- 제 3 절 혐기성 소화공정 이용 혼합 알코올 생산기술 개발
- 제 4 절 해조류 바이오매스 유래 혼합유기산으로부터
혼합 알코올 생산하는 화학축매 공정 개발
- 제 5 절 급속 열분해공정 이용 바이오오일 생산기술 개발

제 5 장 그린 에너지 융합 공정

제 1 절 Next generation sequencing을 활용한 유기산 수율 향상기술

1. 연구 목적 및 내용

가. 연구 목적

(1) 미생물 균집을 이용하여 해조류 바이오매스 유기산 생산 수율의 향상

제 3 세대 바이오매스로 불리는 해조류 바이오매스는 주요 식량작물과 경합하는 1 세대 전분계 바이오매스나, 식량과 직접적으로는 경합하지는 않으나 분해에 어려움이 있고 식량작물과 경작지를 경합하는 2 세대 목질계 바이오매스와 달리 식량 작물과 경합하지 않으며, 목질계 바이오매스에 존재하는 리그닌과 같은 구조가 존재하지 않아 상대적으로 이용이 용이할 것으로 기대되고 있다.

해조류는 크게 녹조류, 홍조류, 갈조류로 나뉘며 종류에 따라 구성성분의 차이가 존재한다. 전년도의 녹조류, 갈조류 미생물 발효의 비교를 통해 미생물 균집을 이용한 해조류 바이오매스 유기산 발효의 경우 처리조건에 상관없이 갈조류 바이오매스를 이용한 효과적인 것으로 확인되었으며, 발효균주를 탐색하기 위하여 순수분리를 시도하였다. 분리된 균주의 경우 유기산 생산 능력이 원 미생물균집에 비해 상대적으로 낮은 편이었으며 이는 갈조류 바이오매스의 발효에 하나의 균주가 아닌 다양한 종류의 균주들이 복합적으로 작용하여 시너지 효과를 일으켜 균주가 단독으로 작용할 때보다 효과적으로 발효를 하는 것으로 추측되며 이에 따라 갈조류의 효과적인 발효를 위한 발효조건 및 미생물 균집의 최적화가 필요하게 되었다.

(2) 해조류 이용 고수율 유기산 생산 미생물 균집의 균집구조 분석

순수배양이 아닌 혼합 배양의 경우 안정적으로 동일한 미생물 균집을 확보할 는 것이 매우 중요한 문제이며 그러기 위해서 안정적으로 효율적인 해조류 유래 바이오매스 발효 미생물 균집을 얻을 수 있어야 하며 따라서 최적화된 해조류 유래 발효 미생물균집을 구성하는 미생물을 파악하고 또한 특정 미생물과 발효산물과의 상관관계 및 균주의 특성을 파악할 필요가 있다.

미생물 균집 전체의 미생물과 그 변화상을 확인할 필요가 있으며 또한 특정

균주를 분리배양하여 그 특성을 분석할 필요가 있으며 이를 통해 균주 최적화 및 starter culture를 구성할 수 있을 것으로 기대된다.

나. 연구 내용

(1) 미생물 균집을 이용하여 해조류 바이오매스 유기산 생산 수율의 향상

해조류의 특성상 해양유래 바이오매스이며 이에 따라 바다에 존재하는 염분의 존재가 미생물의 성장에 큰 영향을 미치는 요인이라 할 수 있으며 또한 2세대 바이오매스의 경우 활용의 어려움과 높은 비용이 발생하는 부분은 주로 전처리에 있으므로 이에 따른 영향을 판단할 필요가 있으며 따라서 탈염 및 전처리 여부에 따른 유기산 생산 수율 및 균주성장 양상을 파악한다.

(2) 해조류 이용 고수율 유기산 생산 미생물 균집의 균집구조 분석

확보된 미생물 균집에서 genomic DNA를 확보하여 pyrosequencing을 통하여 미생물균집의 변화상 및 발효산물등과의 상관관계를 밝히며 또한 순수배양을 시도하여 각 균주의 특성을 분석한다.

2. 연구 방법

가. 실험장치 및 재료

- 해조류 : 다시마 (갈조류)
- 접종: 하수슬러지 (열처리/비열처리)
- HPLC
- GC-FID
- TOC
- 배양기
- Autoclave

나. 실험 절차

(1) pH 및 해조류에 따른 유기산 생산 실험

- 분말화된 다시마 및 도박을 1% 황산으로 산처리
- 산처리된 해조류를 121℃에서 15분 혹은 30분동안 살균

- 0.45 μ m filter로 정제
- 정제된 당화 해조류를 이용하여 알코올 발효
- 분석장비를 이용한 발효산물 측정

다시마 분말의 경우 씻은 다시마 분말과 씻지 않은 다시마 분말로 나누어서 진행하였고 전처리를 하지않는 경우에는 다시마 분말 3g을 mineral medium 50ml 배지에 넣고 5N KOH로 pH 8로 적정한 후 autoclave후 혐기성 슬러지를 주입하였으며, 전처리를 하는 경우 다시마 분말 3g을 mineral medium 50ml 배지에 넣고 H₂SO₄를 최종농도 1%(w/v)로 첨가하여 121 C, 30분간 autoclave한후 5N KOH를 통하여 pH 8로 조절한후 다시 autoclave를 하였다.

접종을 위한 시료채취는 중량하수처리장의 혐기성 슬러지를 채취하여 2ml 씩 50ml serum bottle에 접종하였다. 다시마 분말의 경우 초기조건은 분쇄한 다시마 분말을 6% (w/v)를 사용하였으나 전처리를 하지 않은 경우 autoclave이후 점성이 너무 높아 분석을 위한 샘플 채취 및 발효산물 분석이 원활하지 않아 다시마 분말 농도를 조정하였다. 접종된 media는 30도에서 배양되었으며 주기적으로 biogas, VFA 및 solvent 생산, pH변화등이 측정되었다.

[표 5-1-1] Mineral medium 조성표

Composition	Concentration(g/L)
NH ₄ Cl	1.34
KH ₂ PO ₄	0.78
NaCl	0.292
Na ₂ SO ₄ .10H ₂ O	0.13
MgCl ₂ .6H ₂ O	0.12
CaCl ₂	0.0006
EDTA	0.05
FeSO ₄ .7H ₂ O	0.0031
H ₃ BO ₄	0.0001
Na ₂ MoO ₄ .2H ₂ O	0.0001
ZnSO ₄ .7H ₂ O	0.0032
CoCl ₂ .H ₂ O	0.0006
CuCl ₂ .2H ₂ O	0.0022
MnCl ₂ .4H ₂ O	0.0025
Ni.Cl ₂ .6H ₂ O	0.0005

enrichment에서 미생물 균주의 순수분리는 탄소원이 추가된 P2 medium 통해서 이뤄졌다. 탄소원은 각각 glucose와 galactose가 분리된 미생물은 24시간 액체 배양후 발효산물을 측정하였다.



[그림 5-1-1] 다시마 분말을 이용한 medium.

[표 5-1-2] P2 medium 조성표

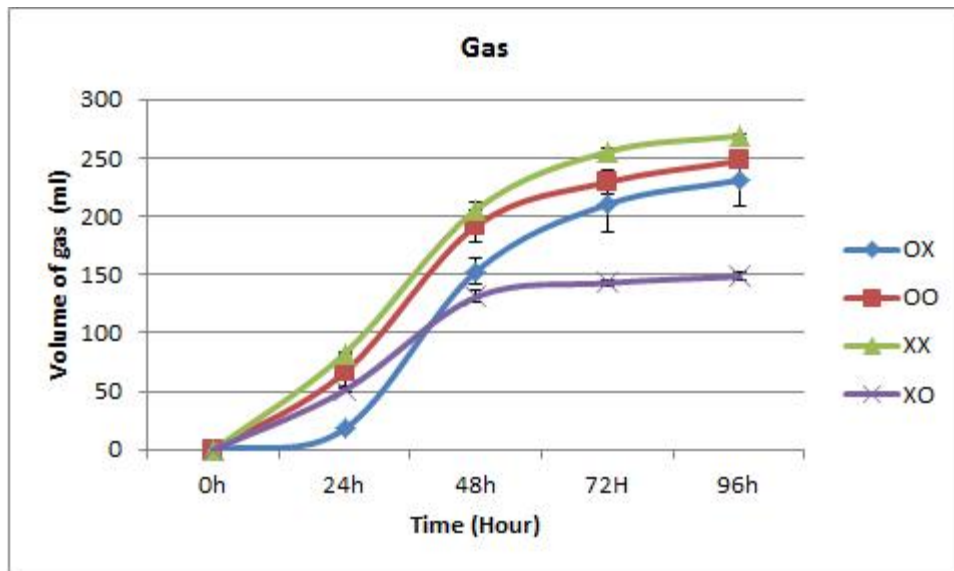
Composition	Concentration(g/L)
Yeast extract	1
K ₂ HPO ₄	0.5
KH ₂ PO ₄	0.5
ammonium acetate	2.2
p-amino-benzoic	0.001
tiamin	0.001
biotin	0.00001
MgSO ₄ ·7H ₂ O	0.2
MnSO ₄ ·H ₂ O	0.01
FeSO ₄ ·7H ₂ O	0.01
NaCl	0.01

3. 연구수행 결과

가. 혼합 배양액 분석

(1) Biogas 생산 및 pH 변화량

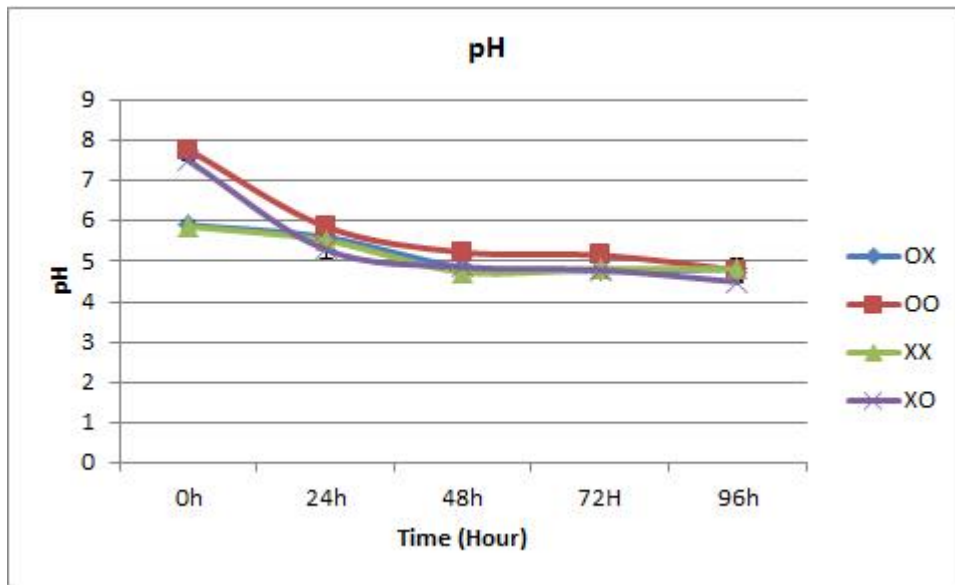
혼합 배양액에서의 Biogas 생산 및 pH 변화는 다시마의 처리 방법에 따라 크게 차이가 나지 않았다. biogas의 발생량은 비세척/전처리 다시마의 경우를 제외하고는 비슷한 생산량을 보였다. 비세척/전처리 다시마의 경우는 상대적으로 적은 biogas를 생산 하였다.



[그림 5-1-2] 혼합 배양액의 biogas 생산량.

OX: 세척/비전처리, OO: 세척/전처리, XX: 비세척/비전처리, XO: 비세척/전처리

pH의 변화의 경우 초기 네가지 모두 최종 pH에는 큰 차이가 발생하지 않았다. 네가지 샘플 모두 비슷한 양상을 보이며 pH가 감소하여 최종적으로는 pH 4.5-5.0에 도달 하였다.



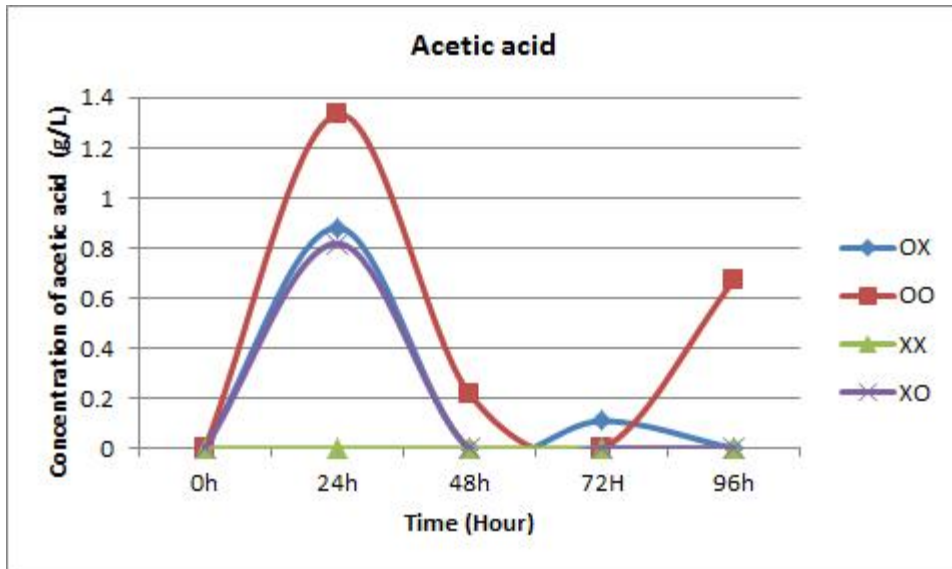
[그림 5-1-3] 혼합 배양액의 pH 변화.

OX: 세척/비전처리, OO: 세척/전처리, XX: 비세척/비전처리, XO: 비세척/전처리

(2) VFA 생산량

혼합 배양액에서의 VFA 생성은 다시마의 처리 방법에 따라 차이가 발생하였다. acetic acid의 경우 배양후 24시간후에 최고의 생산량을 나타냈으며 세척/전처리 샘플에서 가장 높은 생산량 (1.2g/l) 을 나타내었다. 비세척/비전처리 샘플에서는 전혀 생산되지 않았다. 나머지 두가지 샘플에서는 0.8g/l 정도의 생산량을 나타내었다. 48시간 시점에는 생산된 acetic acid가 감소하는 경향을 나타내었으며 72시간 시점에서는 거의 감지되지 않았다. 96시간 이후에는 가장 높은 생산량을 나타내었던 세척/전처리 샘플에서만 다시 감지되었다.

Propionic acid 생산의 경우에도 acetic acid 생산과 비슷한 양상을 나타내었다. 비세척/전처리 샘플에서 가장 높은 생산량을 보였으며 세척/비전처리 샘플에서 가장 적은양이 생성되었다. acetic acid 생산과 비슷하게 48시간, 72시간에서 감지되지 않다가 96시간 이후에 감지되었는데 가장 높은 생산량을 보였던 비세척/전처리 샘플에서는 감지되지 않았고 나머지 샘플에서는 다시 propionic acid가 생산되는 것이 관측되었다.



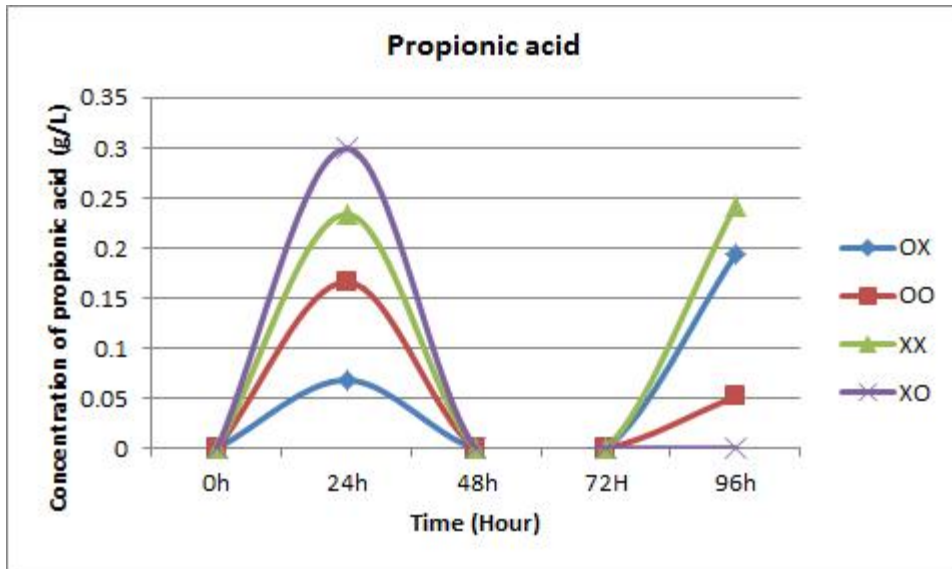
[그림 5-1-4] 혼합 배양액의 acetic acid 생산.

OX: 세척/비전처리, OO: 세척/전처리, XX: 비세척/비전처리, XO: 비세척/전처리

생산된 acetic acid와 propionic acid는 생산된 후에 다시 미생물에 의해 재 흡수되는 것으로 여겨지며 pH의 변화 양상의 큰 차이가 없는 점을 볼 때 butyric acid등의 생산에 다시 활용되는 것으로 추측된다.

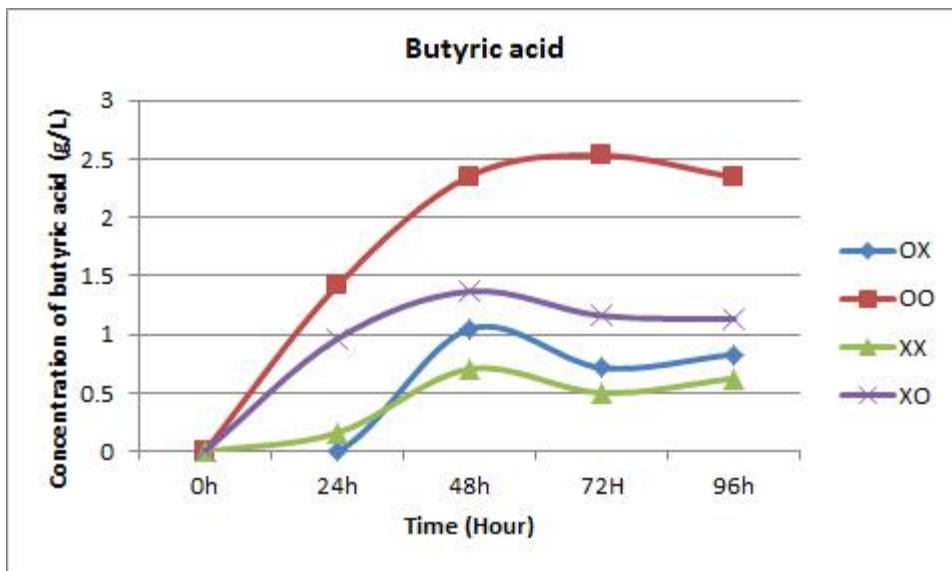
Butyric acid 생산의 경우 acetic acid의 생산이나 propionic acid의 생산과는 다른 양상이 나타났는데 중간에 크게 감소하는 일이 없이 지속적으로 생산이 되는 것이 관측되었다. 세척/전처리 샘플에서 초기부터 높은 생산량을 나타났고 최종 생산량도 가장 높았다. 비세척 샘플의 경우 전처리 여부에 상관없이 48시간 이후에 생산이 감지되었고 최종 생산량 역시 세척 샘플에 비해 낮은 생산량을 기록했다.

Butyric acid 생산 균주는 염분에 영향을 받을 가능성이 있는 것으로 보이며 이것이 초기 생산량과 최종 생산량에 영향을 미친 것으로 보인다. 이는 최초 접종 시 하수 슬러지 접종을 하였기 때문으로 추측되며 갯벌등 해양 유래 미생물을 접종할 경우 비세척 샘플이 더 우수하거나 비슷한 생산량을 보일 수 있을 것으로 기대할 수 있다.



[그림 5-1-5] 혼합 배양액의 propionic acid 생산.

OX: 세척/비전처리, OO: 세척/전처리, XX: 비세척/비전처리, XO: 비세척/전처리



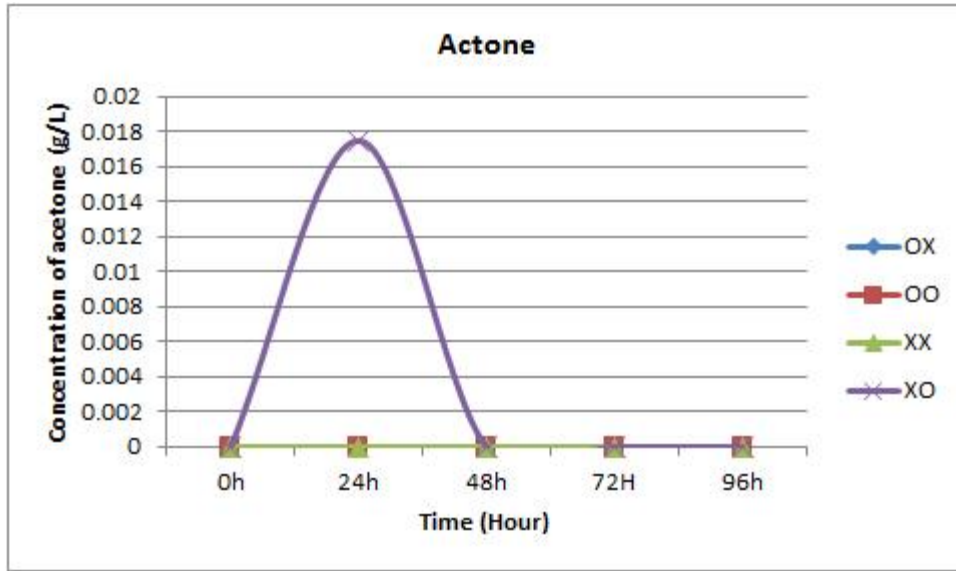
[그림 5-1-6] 혼합 배양액의 butyric acid 생산.

OX: 세척/비전처리, OO: 세척/전처리, XX: 비세척/비전처리, XO: 비세척/전처리

(3) solvent 생산량

Solvent 생산의 경우 acetone과 butanol은 각각 하나의 샘플에서만 확인되었고 ethanol의 경우 모든 샘플에서 생산이 확인되었다.

Acetone의 경우 비세척/전처리 샘플에서만 약간량이 관측되었다.

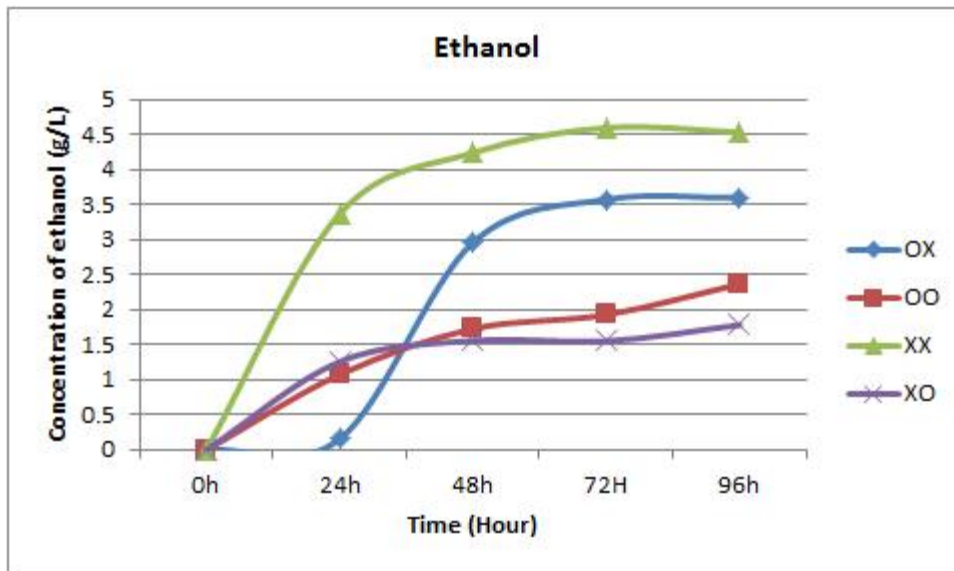


[그림 5-1-7] 혼합 배양액의 acetone 생산.

OX: 세척/비전처리, OO: 세척/전처리, XX: 비세척/비전처리, XO: 비세척/전처리

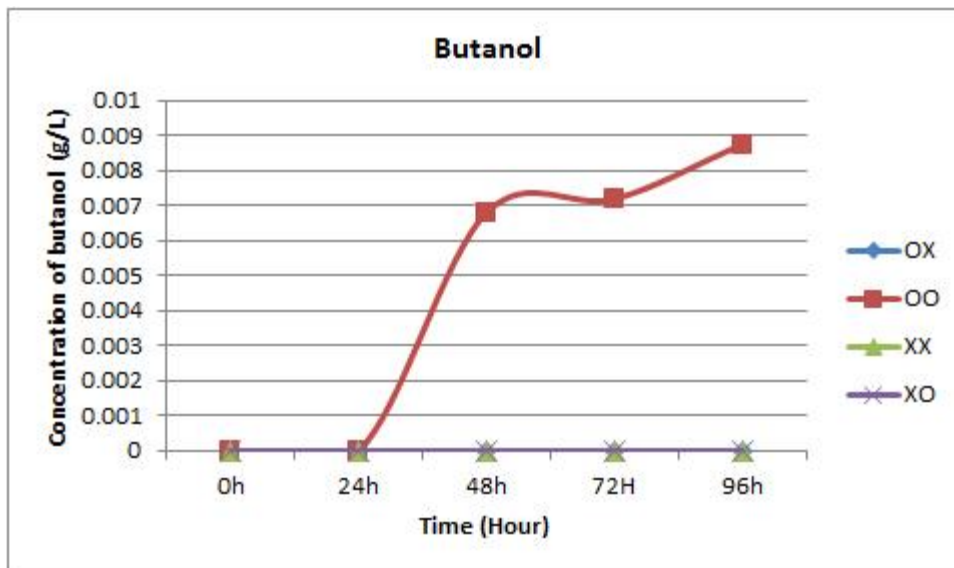
Ethanol의 경우 모든 샘플에서 관찰되었으며 비세척/비전처리 샘플에서 가장 높은 생산량이 관측되었다. 전처리를 한 샘플은 세척/비세척 모두 비전처리 샘플에 비해 낮은 생산량을 나타내었다. 전처리 샘플이 상대적으로 낮은 pH에서 배양이 시작되었고 solvent 생산은 일반적으로 pH가 낮을 때 더 활발히 일어남을 감안할 때 초기 pH에 의한 영향은 아닌 것으로 판단되며 전처리 자체가 영향을 미쳤을 것으로 판단된다.

Butanol 생산의 경우 세척/전처리 샘플에서 약간량이 관측되었다.



[그림 5-1-8] 혼합 배양액의 ethanol 생산.

OX: 세척/비전처리, OO: 세척/전처리, XX: 비세척/비전처리, XO: 비세척/전처리



[그림 5-1-9] 혼합 배양액의 butanol 생산.

OX: 세척/비전처리, OO: 세척/전처리, XX: 비세척/비전처리, XO: 비세척/전처리

나. 순수분리배양

혼합배양액을 접종액으로 하여 순수분리를 시도하였으며 총 32개의 균주중 butanol, propionic acid를 생산하는 균주는 분리되지 않았다. butyric acid를 생산하는 균주는 전처리하지 않은 샘플에서 분리된 7개의 균주에서만 확인되었다. 대부분의 균주는 acetic acid를 주 발효산물로 생산하였으며 acetone과 ethanol 역시 약간량을 생산하였다.

[표 5-1-3] Glucose를 유일 탄소원으로 하여 세척된 다시마 혼합배양액에서 분리된 균주

Strain	ST1	ST2	ST3	ST4	ST5	ST6	ST7	ST8
Acetone	0.10	0.11	0.08	0.08	0.12	0.12	0.12	0.12
Ethanol	0.71	0.57	0.56	0.55	0.56	0.56	0.50	0.47
Butanol	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
Acetic acid	1.70	1.95	1.37	1.34	1.93	1.98	1.96	1.91
Propionic acid	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
Butyric acid	1.09	0.00	3.24	4.33	0.00	0.00	0.00	0.00
Valeric acid	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
Hexanoic acid	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
초기 배지	OX	OX	OX	OX	OO	OO	OO	OO

OX: 세척/미전처리, OO: 세척/전처리

이러한 결과는 혼합배양액에서 관측된 양상과 차이가 있는 것이며 단일 균주가 아닌 복합균주 작용을 통해 해조류의 분해가 이뤄질 가능성을 나타내는 것이며 미생물군집에 대한 이해가 필요성이 있는 것으로 보인다.

[표 5-1-4] Glucose를 유일 탄소원으로 하여 미세척된 다시마 혼합배양액에서 분리된 균주

Strain	ST9	ST10	ST11	ST12	ST13	ST14	ST15	ST16
Acetone	0.07	0.07	0.09	0.08	0.09	0.08	0.07	0.06
Ethanol	0.45	0.44	0.39	0.36	0.36	0.30	0.28	0.23
Butanol	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
Acetic acid	1.08	1.26	1.93	1.94	1.88	1.88	1.86	1.86
Propionic acid	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
Butyric acid	4.94	4.14	0.05	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
Valeric acid	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
Hexanoic acid	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
초기 배지	XX	XX	XX	XX	XX	XX	XX	XX

XX: 미세척/비전처리

[표 5-1-5] Galatose를 유일 탄소원으로 하여 세척된 다시마 혼합배양액에서 분리된 균주

Strain	SG1	SG2	SG3	SG4	SG5	SG6	SG7	SG8
Acetone	0.08	0.09	0.07	0.07	0.07	0.07	0.06	0.07
Ethanol	0.43	0.42	0.37	0.37	0.38	0.36	0.33	0.36
Butanol	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
Acetic acid	1.28	1.29	1.28	1.27	1.29	1.28	1.27	1.31
Propionic acid	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
Butyric acid	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
Valeric acid	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
Hexanoic acid	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
초기 배지	OX	OX	OX	OX	OO	OO	OO	OO

OX: 세척/비전처리, OO: 세척/전처리

[표 5-1-6] Galatose를 유일 탄소원으로 하여 미세척된 다시마 혼합배양액에서 분리된 균주

Strain	SG9	SG10	SG11	SG12	SG13	SG14	SG15	SG16
Acetone	0.06	0.06	0.07	0.06	0.06	0.06	0.05	0.06
Ethanol	0.35	0.37	0.36	0.32	0.34	0.33	0.34	0.35
Butanol	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
Acetic acid	1.27	1.29	1.31	1.29	1.27	1.28	1.30	1.30
Propionic acid	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
Butyric acid	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
Valeric acid	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
Hexanoic acid	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
초기 배지	XX	XX	XX	XX	XX	XX	XX	XX

XX: 미세척/미전처리

4. 요약 및 제언

혼합배양액에서도 다시마의 세척 여부와 전처리 여부에 따라 다른 발효 양상을 나타내었다. 세척의 경우 butyric acid 생산에 있어서 큰 차이를 보였는데 효과적인 발효를 위하여 염분에 저항성이 있을 것으로 예측되는 해양 유래 미생물을 사용할 필요가 있다고 보이며 순수 분리의 경우 배지 다양성을 높여 다양한 균주가 분리될 수 있도록 할 필요가 있다.

5. 향후계획

해양 유래 미생물을 이용하여 혼합 배양액을 통한 해양유래 바이오매스 유기산 발효 최적화를 시도할 예정이며 얻어진 혼합 배양액의 미생물 군집구조를 pyrosequencing으로 분석할 예정이다. 또한 갈조류의 주성분인 alginate를 이용하여 갈조류 분해 미생물의 enrichment와 isolation을 시도할 예정이다.

제 2 절 VFA 생산용 다단계 생물반응기 설계

1. 연구 목적 및 내용

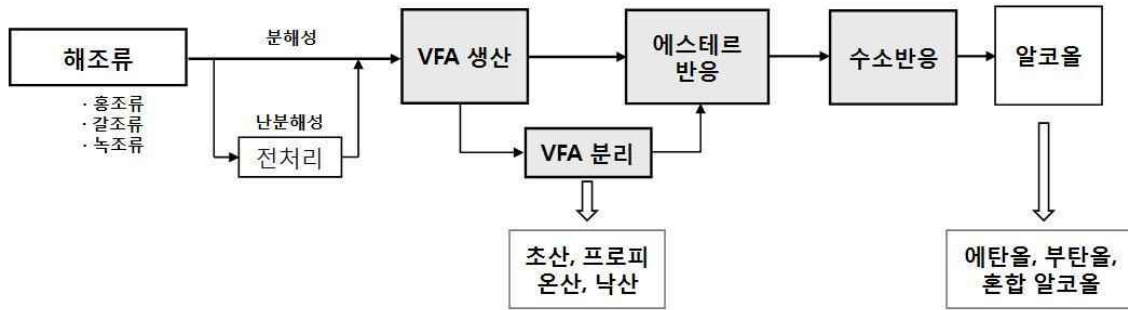
가. 연구 목적

현재 기후변화협약 대응 및 수산분야 녹색산업화에 의한 신성장동력 창출을 위한 노력이 이루어지고 있다. 그 일환으로 바이오 케미컬과 바이오 연료로 활용할 수 있는 휘발성 유기산 (VFA, volatile fatty acid)을 해조류로부터 생산하기 위해, 높은 수율과 생산성을 갖추기 위한 공정의 개발과 함께 최적화된 공정을 만들고 그 경제성을 평가하기 위한 다양한 연구를 수행하려고 한다.

나. 연구 내용

바이오연료는 바이오매스를 원료로 하여 얻어지는 에너지를 통칭하는 것으로서 Syn-gas platform, Sugar platform, VFA platform 등을 거쳐 얻어진다. 특히 혐기성 소화 공정을 이용하는 VFA platform을 통해 얻어진 휘발성 유기산 (VFA)은 통상 아세트산과 프로피온산, 부티르산을 주요 성분으로 포함하는데, 이들 각각은 매우 유용한 화학물질로 석유화학에 의해 생산되고 있다. 따라서 생산된 VFA의 효과적 분리만으로도 혐기성 소화 공정은 높은 경제성을 가질 수 있다. 또한 유기산염, 특히 칼슘염은 열적 전환을 통해 두 분자의 유기산을 결합하여 케톤을 형성할 수 있고, 케톤은 수소화 반응을 거쳐 2차 알코올로 전환이 가능하다. 정제된 유기산이 알코올과 결합하면 에스터가 형성되고, 에스터를 수소화 분해 반응시키면 1차 알코올이 생성될 수 있다. 이들 케톤과 에스터, 1차 또는 2차 알코올 등은 유용한 화학물질 및 수송용 연료 등으로 이용될 수 있다.

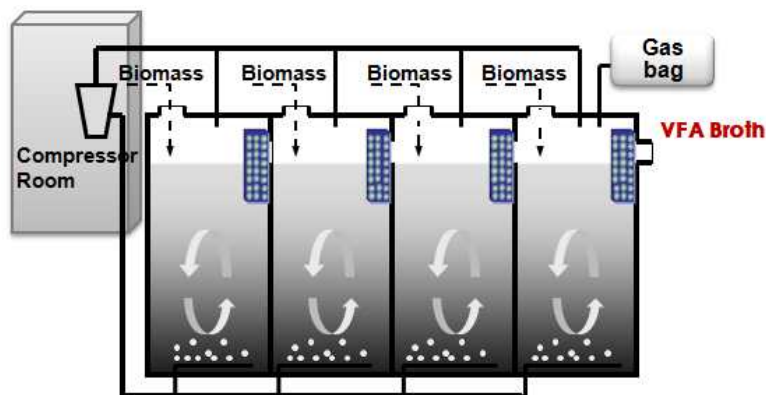
하지만 유기산의 생산은 일반적으로 이들 산의 중화를 위해 다량의 알칼리가 필요하고, 대부분 2%(w/v)이하의 낮은 농도로 생산되며, 그 자체로 세포의 성장을 저해하는 특성이 있어 고농도에서 높은 생산성을 보여주지 못한다. 따라서 경제성 있는 공정의 확립을 위해서는 유기산의 효과적인 발효공정과 함께 중화하는 물질의 효과적 재순환이 필요하고, 낮은 농도의 유기산을 농축하는 효율적인 공정의 개발의 요구된다[1].



[그림 5-2-1] 생산된 VFA의 바이오 연료로의 다양한 활용성.

본 과제에서 다루는 해조류의 경우 육상 바이오매스와는 달리 리그닌이 없어서 분해가 용이하다. 게다가 혐기성 소화 공정을 이용하는 VFA platform을 이용하면 여러 가지 미생물을 혼합적으로 사용하게 되어 멸균 공정이 필요 없으므로 다른 platform에 비해 유리한 점이 많다. 이렇게 생산된 VFA가 수소화 과정을 거치게 되는 경우 Sugar platform보다 1.5배 높은 바이오연료(에탄올, 부탄올)를 생산할 수 있다.

또한, 장호남 교수 연구팀에서는 다단계 연속 고농도 세포배양 반응기(MSC-HCDC: multi-stage continuous high cell density culture)를 개발하여 현재 널리 쓰이고 있는 유가배양식(Fed-batch) 반응기 대신 사용하기 위한 연구를 계속해 왔다. 이러한 MSC-HCDC 기술은 미생물 배양공정에서 세포농도와 생산성을 회분식에 비해 각각 10배(100g/L)와 5~10배 정도 높일 수 있으며, 유가배양식과 동등한 농도(titer)를 얻을 수 있다. 이 기술은 해조류를 이용하여 VFA를 생산하는 분야에 적용가능하며, 이 연구를 통해 현재 바이오 연료 생산에 문제가 되는 고수율, 고생산성의 달성에 기여 할 수 있다고 생각된다[2].



[그림 5-2-2] VFA 생산을 위한 다단계 연속 고농도 세포배양 반응기.

2. 연구 방법 (간이 MSC-HCDC 생물반응기 활용)

가. 실험장치 및 재료

정규 MSC-HCDC공법은 4개의 HCDC를 연결하여 운영해야 하므로 제작비와 운전 인원이 많이 필요한 반면, 간이 MSC-HCDC공법은 플라스크 4개를 서로 연결하지 않고 Fed-batch 방식으로 운영하는 공법으로 최근에 본 연구자들이 개발하였다. 본 실험에서는 정규 MSC-HCDC반응기를 제작하기 전에 간이 MSC-HCDC반응기로 필요한 실험결과를 얻은 후 정규 MSC-HCDC반응기를 제작할 예정이다.

(1) 실험 재료

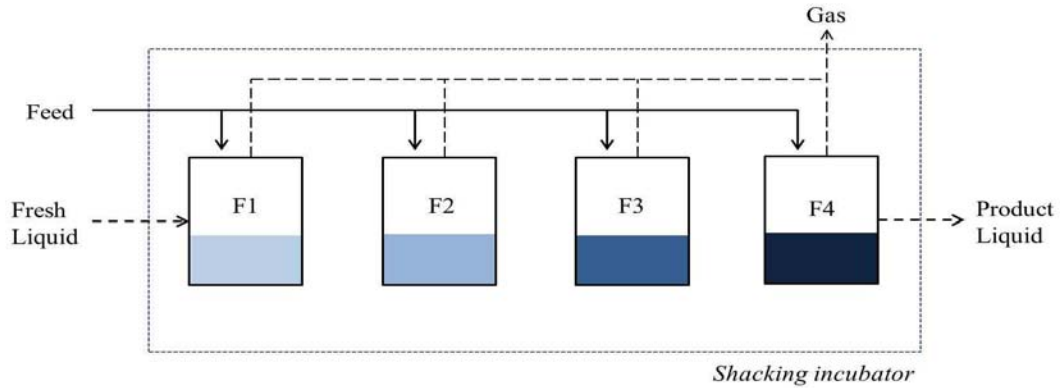
Inoculum의 성장과 번식을 위해 Bacto yeast extract와 LB broth 등을 이용하였으며 완도에서 가져온 다시마(*Saccharina Japonica*)를 VFA 생산을 위한 Raw material로 사용하였다.

그리고 생산된 VFA에 대해 Liquid chromatography(이하 LC) 분석을 위한 reference로 글루코스와 아세트산, 프로피온산, 부티르산 등을 사용하였다.

(2) 실험 장치

유가배양식(Fed-batch) 반응기의 온도 및 rpm 유지하기 위해서 Shaking Incubator를 사용하였다. 그리고 VFA의 생산 농도 분석을 위해 HPLC(Varian, Inc. USA)를 이용하였으며 Aminex HPX-87P column(Bio-Rad Laboratories, Inc. USA)으로 분석하였다.

또한 다단계 연속 고농도 세포배양(MSC-HCDC)을 위해 [그림 5-2-3]과 같이 플라스크로 제작하여 실험을 하였다. 그리고 Fed-batch와 같은 분석 장치를 사용하였다.

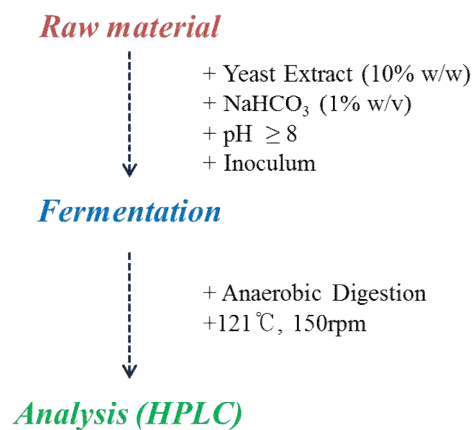


[그림 5-2-3] VFA 생산을 위한 4단계 연속 고농도 세포배양 반응기.

나. 실험 절차

(1) 다시마를 이용한 Fed-batch 실험

다시마를 세 개의 플라스크에 각각 20g/L, 30g/L, 40g/L 만큼 넣는다. 그리고 버퍼 작용을 하는 1%(w/v) NaHCO_3 와 초기에 Inoculum이 자라도록 도와주는 10%(w/w) Bacto yeast extract를 넣는다. 그 플라스크에 증류수를 넣고 Shaking incubator에서 mixing을 하여 12시간 정도 보관한다. 이렇게 만들어진 플라스크에 NaOH를 이용해 pH를 8정도로 적정하여 VFA 생산을 위한 환경을 만들어준다. 그 후 Inoculum을 10%(v/v)으로 넣어 발효한다. 이렇게 만들어진 Fed-batch 반응기에 일주일마다 총 세 번 처음과 같은 양의 다시마를 넣어 VFA 생산 정도를 알아본다. Shaking incubator에서는 40°C, 150rpm으로 조절하여 Fed-batch 반응기에 일정한 환경을 유지한다.



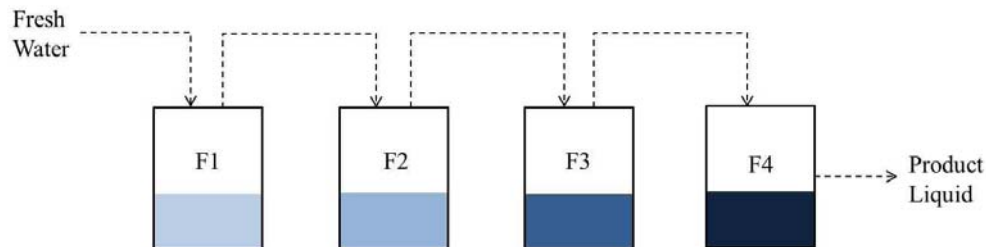
[그림 5-2-4] VFA 생산을 위한 Fed-batch 실험 방법.

(2) MSC-HCDC을 이용한 VFA 생산 모델링

참고문헌을 통해 혐기성 소화 공정에 관한 식을 찾아 VFA platform에 맞게 정리한다. 그리고 식에 필요한 parameter는 Fed-batch 반응기에서 얻은 값과 실험실에서 해왔던 실험 데이터를 토대로 하여 구한다. 이러한 식과 parameter를 가지고 MATLAB으로 시뮬레이션을 한다. 이렇게 얻은 값들을 MSC-HCDC로 실험한 값과 비교한다.

(3) 4단계 연속 고농도 세포배양 반응기를 이용한 VFA 생산

[그림 5-2-3]과 같이 플라스크를 이용하여 4단계 연속 반응기를 제작한다. 그리고 Fed-batch와 같이 다시마, 1%(w/v) NaHCO_3 , 10%(w/w) Bacto yeast extract를 넣어준다. 이 때 연속 고농도 세포배양 반응기에서 Raw material인 다시마의 체류시간을 고려하여 네 개의 플라스크 안에 있는 다시마의 농도를 4:3:2:1의 비로 조정한다. 그리고 Fed-batch와 마찬가지로 플라스크에 증류수를 넣고 NaOH를 이용해 pH를 8정도로 적정하여 VFA 생산을 위한 환경을 만들어준다. 그 후, 플라스크에 각각 10%(v/v)의 Inoculum을 넣고 Shaking incubator에서 발효한다. 이 때 Shaking incubator는 40°C, 150rpm로 조절하여 발효 환경을 일정하게 유지한다. 그리고 Fed-batch와 마찬가지로 일주일 후에 처음과 같은 양의 다시마를 넣어주며 [그림 5-2-5]와 같이 생산물을 이동시켜 VFA를 생산한다.



[그림 5-2-5] 4단계 연속 고농도 세포배양 반응기에서의 VFA 생산과정.

(4) 해조류의 전처리 및 *E.coli* KO11을 이용한 에탄올 생산 실험

Extractor를 이용하여 해조류를 0.5cm 크기의 입자로 분쇄한다. 그리고 분쇄된 algae 1g을 121°C에서 15분간 10ml의 0.05, 0.1, 0.15, 0.2, 0.3N의 산과 염산 용액과 함께 가열하여 전처리를 한다. 또한, 효소적 가수분해에서는 0.05M citrate buffer를 이용하여 산 가수분해물의 pH를 5.5로 조절한다. 그리고 50°C에서 회전식 진동기를 150rpm으로 하여 항세균제 없이 당화 반응을 시킨다. 주기적으로 1ml의 표본을 추출하여 효소적 당화의 정도를 분석한다. 24시간 후, HPLC를 이용하여

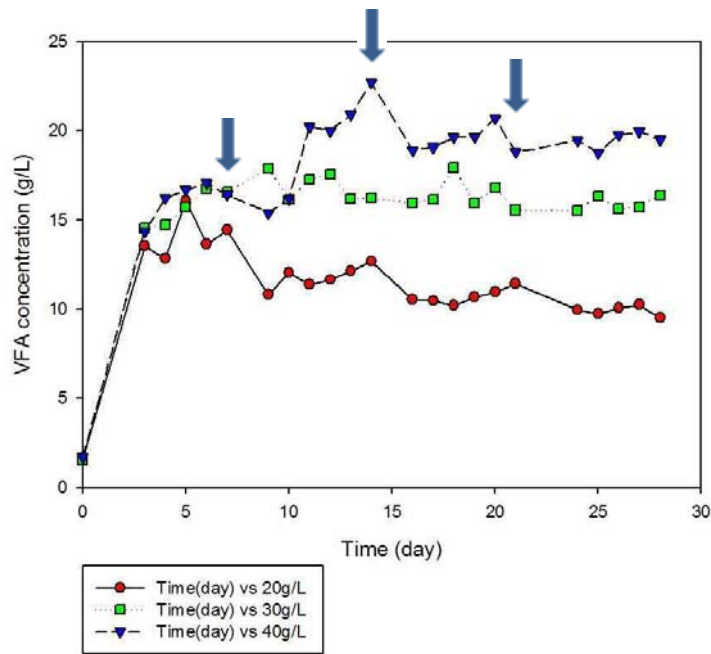
분석한다.

에탄올 생산을 위해 *Saccharomyces Cerevisiae*와 재조합된 *E.coli* K011, *pflB* 유전자에 결합된 에탄올 생성 유전자 *Zymomonas mobilis*를 함유하는 *E.coli* B의 유도체가 사용된다. *S. cerevisiae*는 250ml의 플라스크 안에서 18시간동안 30°C의 50ml MGYP 배지로 배양한다. *E. coli* K011은 역시 250ml 플라스크에서 14시간동안 30°C의 50ml LB 상태로 배양한다. 그리고 Cell 성장은 분광광도계(Utrospec 3000)를 이용하여 600nm의 흡광도를 측정하여 관찰한다.

그리고 해조류 가수분해물의 에탄올 발효를 하기위해, *S. Serevisiae*나 *E.coli* 배지 10%를 농축된 LB로 보강되고 전처리된 해조류 바이오매스 50g/L에 첨가한다. 이를 30°C의 incubator에서 150rpm으로 발효시킨다[3].

3. 연구수행 결과

가. 다시마를 이용한 Fed-batch 실험 결과



[그림 5-2-6] 20g/L, 30g/L, 40g/L의 다시마에서 생산된 VFA의 농도.

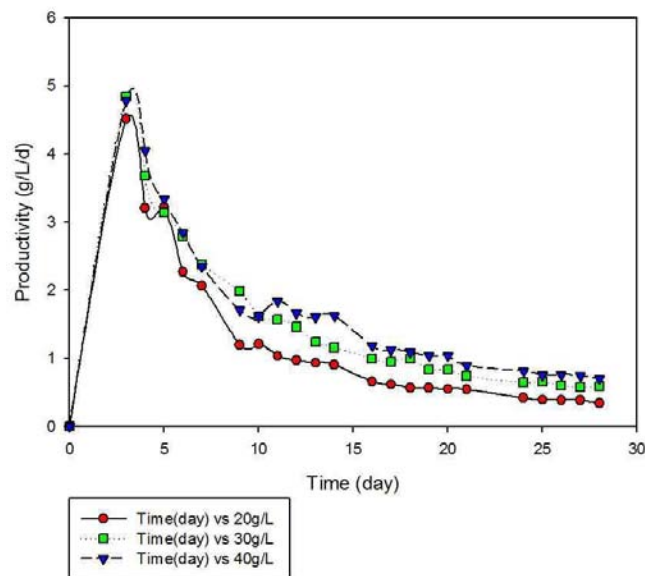
다시마를 이용한 Fed-batch 실험에서는 다시마의 양에 따른 VFA 생산의 차이를 보기위해 다시마의 양을 달리하였다. 그리고 [그림 5-2-6]에 화살표로 표시한 것처럼 일주일마다 처음과 같은 양의 다시마를 medium에 집어넣었다.

그 결과를 살펴보자면, Fed-batch 반응기들은 모두 첫 번째 주기에서

16g/L정도의 총 VFA(아세트산, 프로피온산, 부티르산의 합)를 생산하였다. 하지만 20g/L의 경우 첫 번째 주기 이후에 다시마의 양을 추가적으로 넣어주었지만 두 번째, 세 번째, 네 번째 주기 모두 첫 번째 주기보다 높은 농도의 VFA를 생산하지 못하였으며, 총 VFA의 농도가 5일 째에서 최고 16.1g/L정도까지 나왔다.

그와 달리 30g/L에서는 첫 번째 주기와 두 번째, 세 번째 주기 모두에서 비슷한 농도의 VFA를 생산하였다. [그림 5-2-6]에서 나타난 결과에서 볼 수 있듯이 총 VFA의 농도가 9일, 12일, 18일 째에서 모두 17g/L를 넘었으며 그 중 18일에서 최고 17.9g/L정도로 거의 18g/L에 육박하였다.

또한, 40g/L의 경우 첫 번째 주기에서 다시마 양에 비해 많은 양의 VFA 생산이 되지 않았으나 두 번째 주기에서 점점 VFA의 생산이 증가였으며 세 번째 주기에서 비슷한 농도의 VFA를 생산하였다. 그리고 [그림 5-2-6]에서 나타난 결과를 보면 총 VFA의 농도가 11일 째 이후부터 모두 18g/L보다 많이 나왔으며 그 중 14일 째에서 최고 22.7g/L을 생산하였다.



[그림 5-2-7] 시간에 따른 VFA의 생산성.

그러나 Raw material인 다시마를 추가로 넣어줬을 때 시간이 지날수록 생산된 VFA의 농도는 일정하거나 약간 증가하는 것과 달리 [그림 5-2-7]에서 보이는 것처럼 VFA의 생산성은 처음에 얻은 값에서 꾸준히 감소하는 걸 알 수가 있다.

따라서 Fed-batch 반응기에서 VFA의 생산 농도를 세 번째, 네 번째 주기에서 증가시키기 위한 추가적인 실험을 계속 하거나 생산성이 비교적 높은 첫

번째 주거나 두 번째 주기에서 최종 생산물 (VFA)을 얻고 남은 다시마를 재사용하는 것이 효율적이라고 본다.

나. MSC-HCDC를 이용한 VFA 생산 시뮬레이션

(1) 시뮬레이션에서 이용한 식

$$\begin{aligned} \frac{dX}{dt} &= DX_0 + (\mu - k_d - BD)X \\ \frac{dS}{dt} &= DS_0 - \left[\frac{\mu X}{Y_{x/s}} + m_s X + q \frac{X}{Y_{p/s}} \right] - DS \quad \left(m_s = \frac{k_d}{Y_{x/s}} \right) \\ \frac{dP}{dt} &= DP_0 + qX - DP \end{aligned}$$

VFA 생산에 관한 시뮬레이션 식을 세우기 위해서 2008년에 Biotechnology and Bioprocess Engineering에 수록된 High Cell Density Ethanol Fermentation in an Upflow Packed-Bed Cell Recycle Bioreactor 논문을 참조하였다[4].

(2) 시뮬레이션에서 사용한 parameter

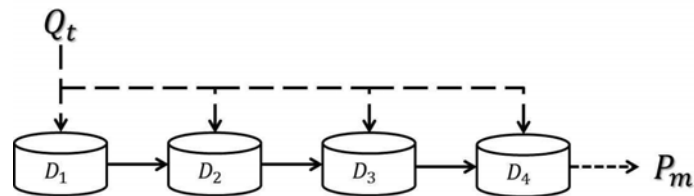
[표 5-2-1] MSC-HCDC 시뮬레이션에 사용된 parameter

Parameter	Value
μ_m	0.033/h
k_d	0.006/h
q_m	0.021g/(10 ⁹ cells)/h
$Y_{x/s}$	0.1g/g
$Y_{p/s}$	0.5g/g
S_0	35g/L
D	0.2/d
B (Bleeding ratio)	0.05/h

위 값은 DFRPS perfusion culture of rCHO CS* 13-1.00의 다단계 모델에서 사용된 parameter를 기본으로 하며 연구실에서 해왔던 시뮬레이션의 parameter를

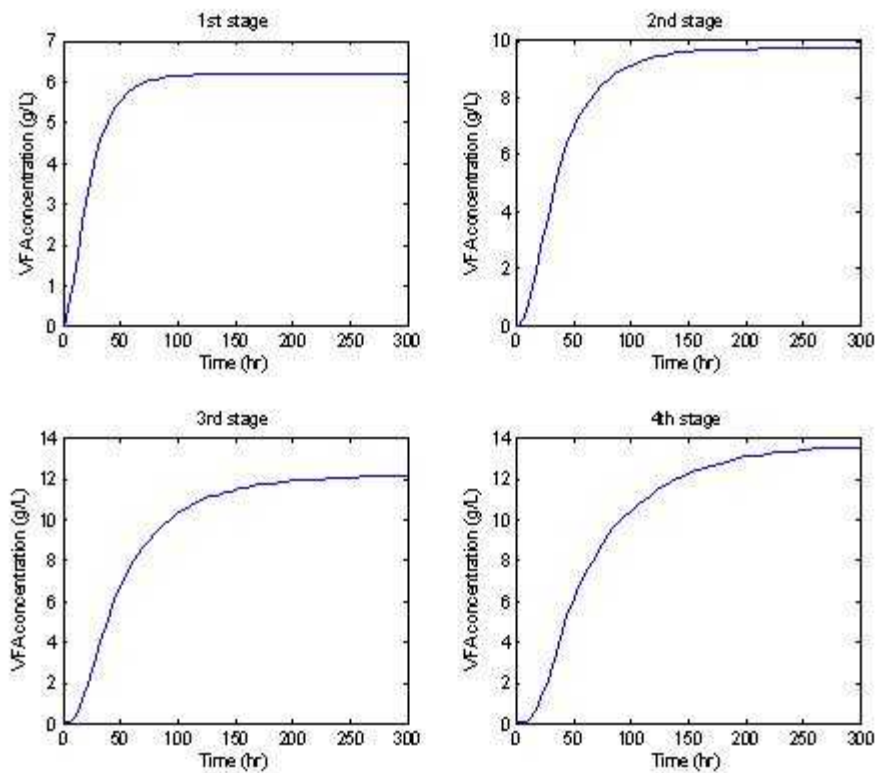
모두 고려하여 선택하였다. 특히 Fed-batch에서 반응기의 온도를 40°C로 맞췄기 때문에 위 parameter도 온도에 따른 값으로 조정하였다[5,6].

(3) 시뮬레이션 결과



[그림 5-2-8] 시뮬레이션에 사용한 MSC-HCDC 4단계 반응기.

MSC-HCDC의 식을 이용한 반응기는 위와 같이 총 4단계로 이루어져있으며 각 단계의 결과는 다음과 같다.



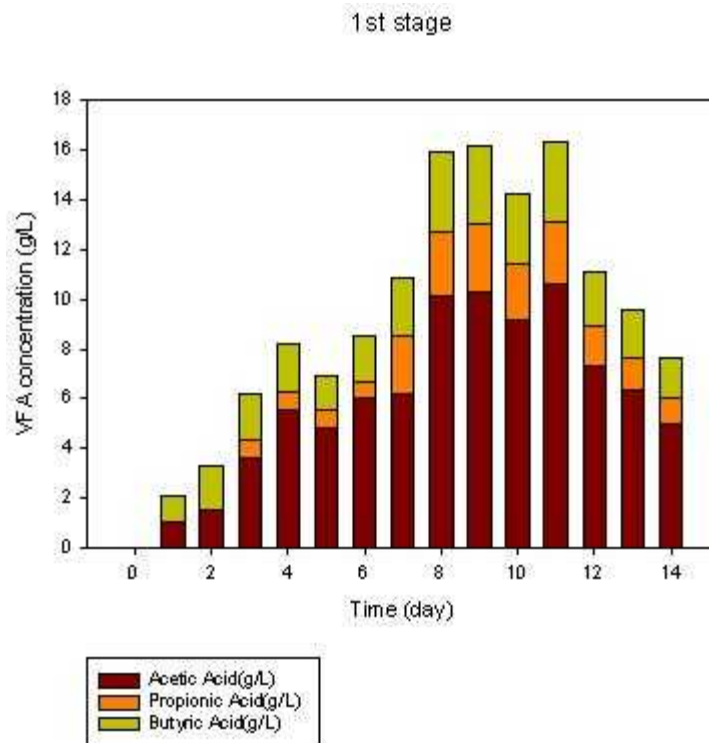
[그림 5-2-9] MSC-HCDC 사단계 반응기 시뮬레이션 결과.

시뮬레이션 결과 첫 번째 반응기에서 총 VFA의 생산 농도는 6.2g/L에 도달하였다. 그리고 총 VFA 생산 수율은 25.9%이며 생산성은 1.2g/L/d로 나타났다. 또한, 두 번째 반응기와 세 번째 반응기에서는 총 VFA의 생산 농도가 9.7g/L, 12.1g/L이었으며, 생산 수율과 생산성은 각각 40.4%와 1.9g/L/d, 50.1%와 2.4g/L/h로 나타났다. 그리고 최종 생산물이 얻어지는 네 번째 반응기의 총 VFA 생산 농도는 13.5g/L에 도달하였으며, 이 때 생산 수율과 생산성은 55.9%와 2.7g/L/d로 나타났다.

다. 4단계 연속 고농도 세포배양 반응기를 이용한 VFA 생산 결과

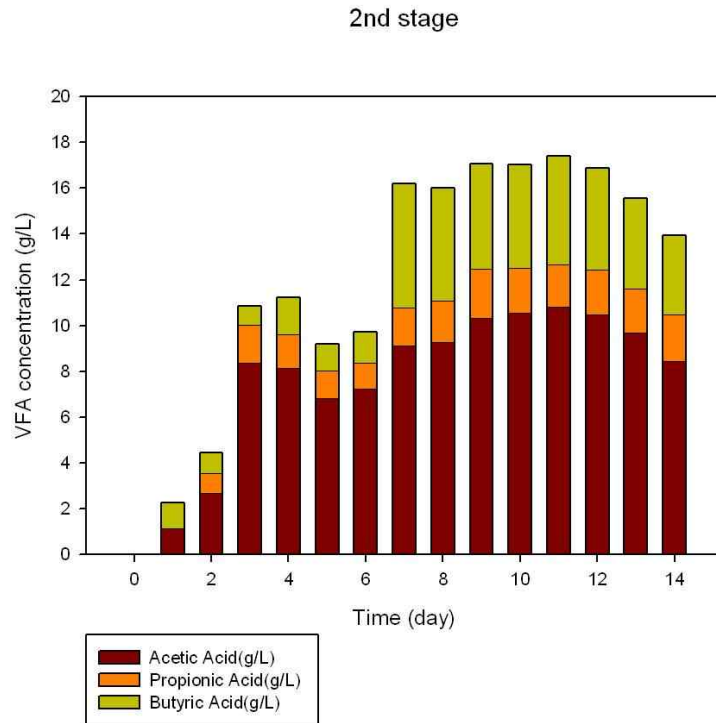
시뮬레이션 결과와 비교하기 위해 다시마의 농도 35g/L로 실험을 진행하였다. 이 때 연속 고농도 세포배양 반응기에서 Raw material인 다시마의 체류시간이 단계마다 다르기 때문에, 네 개의 플라스크 안에 있는 각 다시마의 농도가 1:1:1인 반응기 이외에 다시마의 농도를 4:3:2:1의 비로 하여 실험을 하였다.

(1) 다시마의 농도가 1:1:1인 4단계 연속 고농도 세포배양 반응기



[그림 5-2-10] 1:1:1농도의 첫 번째 반응기의 VFA 생산 농도.

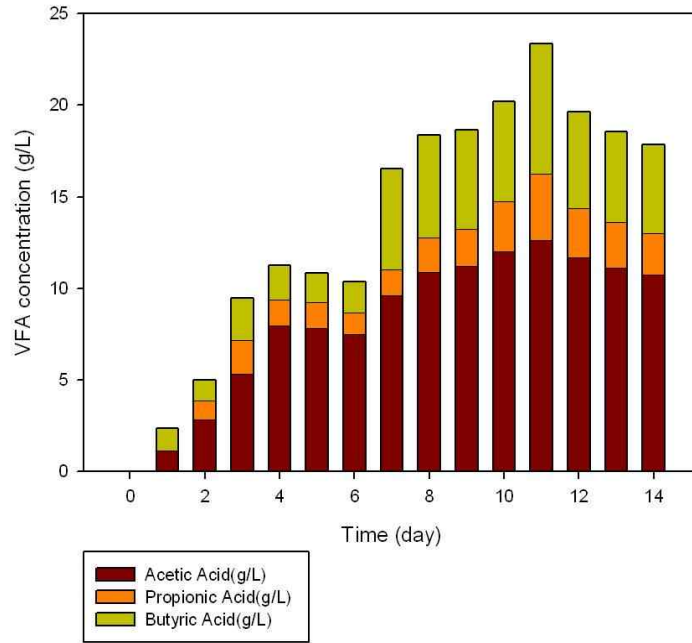
다시마의 농도가 1:1:1인 4단계 연속 고농도 세포배양 반응기 실험 결과, 첫 번째 반응기의 VFA 생산 농도는 최고 16.3g/L까지 나왔다. [그림 5-2-10]에서 볼 수 있듯이 일주일 후에 처음과 같은 양의 다시마를 넣어줬을 때 확연하게 생산 농도가 증가하는 것을 볼 수 있었다. 하지만 첫 번째 반응기에서는 빠져나간 양만큼 증류수가 주입되었기 때문에 VFA 생산 농도가 최고를 찍고 계속 내려가는 것을 볼 수 있다.



[그림 5-2-11] 1:1:1농도의 두 번째 반응기의 VFA 생산 농도.

두 번째 반응기에서는 [그림 5-2-11]에서 보는 것과 같이 최고 17.4g/L까지 나왔다. 그리고 전 단계와 마찬가지로 일주일 후 다시마를 넣어준 시점부터 확연하게 양이 증가하는 것을 볼 수 있다. 또한, 첫 번째 반응기와는 달리 실험이 끝날 때까지 16~17g/L 부근에서 생산 농도가 거의 일정하게 유지되었다.

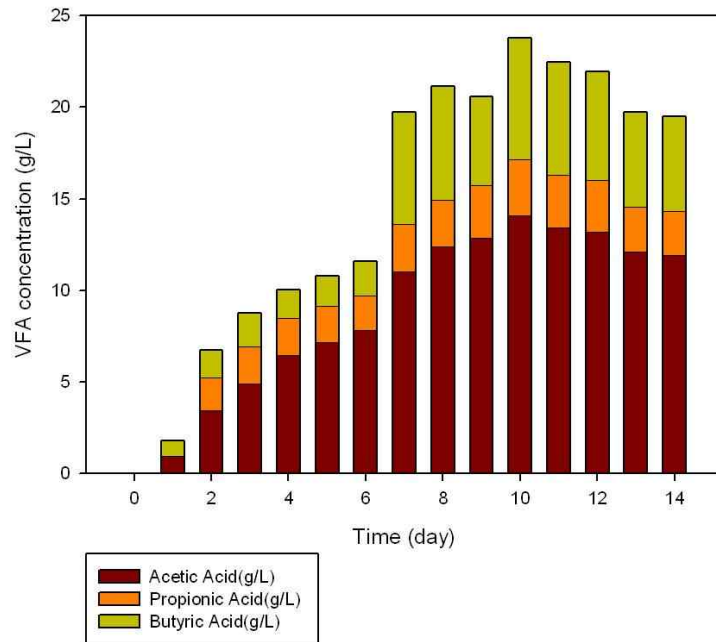
3rd stage



[그림 5-2-12] 1:1:1농도의 세 번째 반응기의 VFA 생산 농도.

세 번째 반응기도 전 단계 반응기들과 마찬가지로 일주일 후 다시마를 넣어준 시점부터 총 VFA 생산 농도가 크게 증가하였고 최고 23.3g/L 정도 나왔으며, 실험이 종료하는 시점까지 총 VFA 생산 농도는 18~19g/L 부근에서 거의 일정하게 유지되었다. 그리고 아세트산, 프로피온산, 부티르산의 비율도 6:1:3 정도로 나타났다.

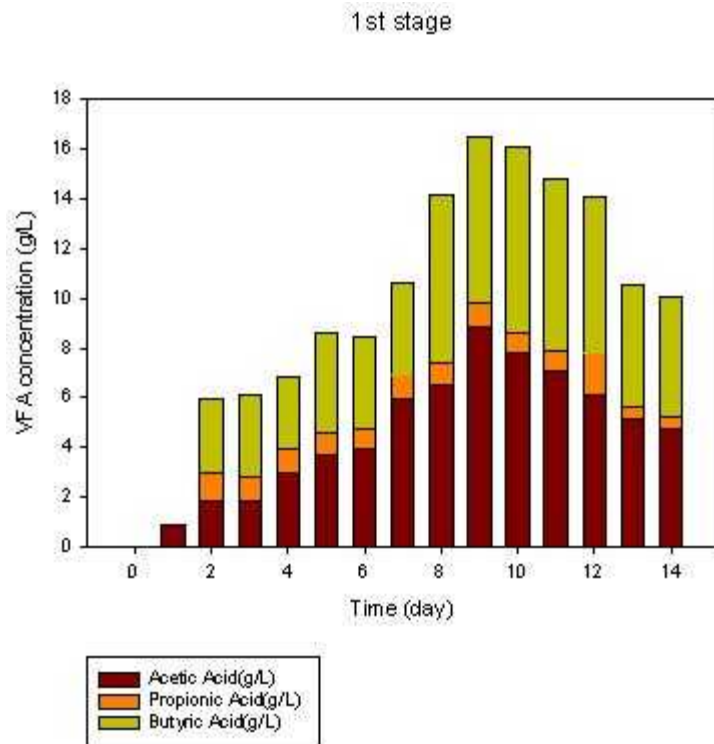
4th stage



[그림 5-2-13] 1:1:1농도의 네 번째 반응기의 VFA 생산 농도.

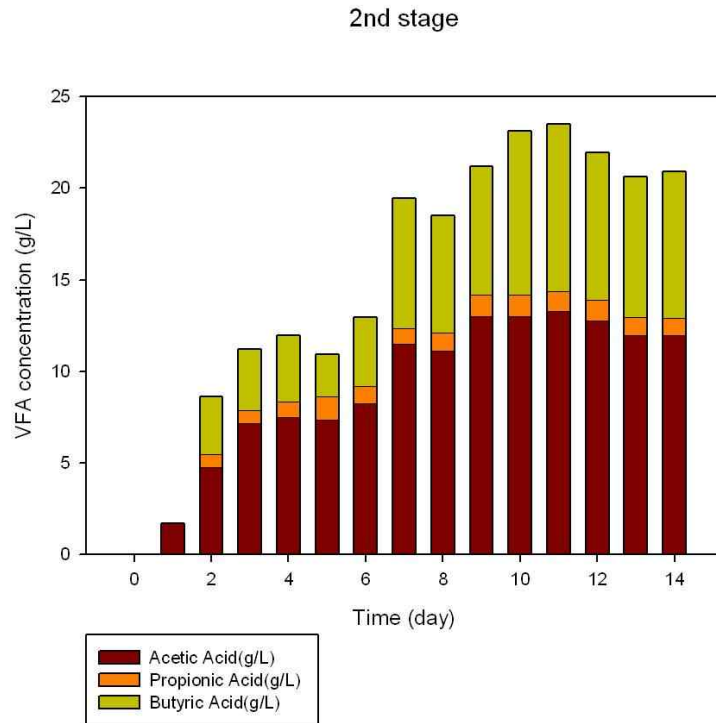
마지막 반응기에서 총 VFA 생산 농도는 최고 23.8g/L 정도 나왔으며 전 단계 반응기와 마찬가지로 일주일 이후에 넣어준 추가적인 다시마로 인해 총 VFA 생산 농도가 증가하였으며 21g/L 정도에서 꾸준히 유지되었다. 그러므로 마지막 우리가 얻는 최종 생산물에서의 수율과 생산성을 구하면 다음과 같다. 실험에서 사용한 Dilution rate는 0.1/d이며 일주일 이후 VFA가 21g/L 정도로 꾸준히 생산되었기 때문에 이를 이용하면, 수율은 45.6%로 계산되고 생산성은 평균 2.1g/L/d로 추정된다.

(2) 다시마의 농도가 4:3:2:1인 4단계 연속 고농도 세포배양 반응기



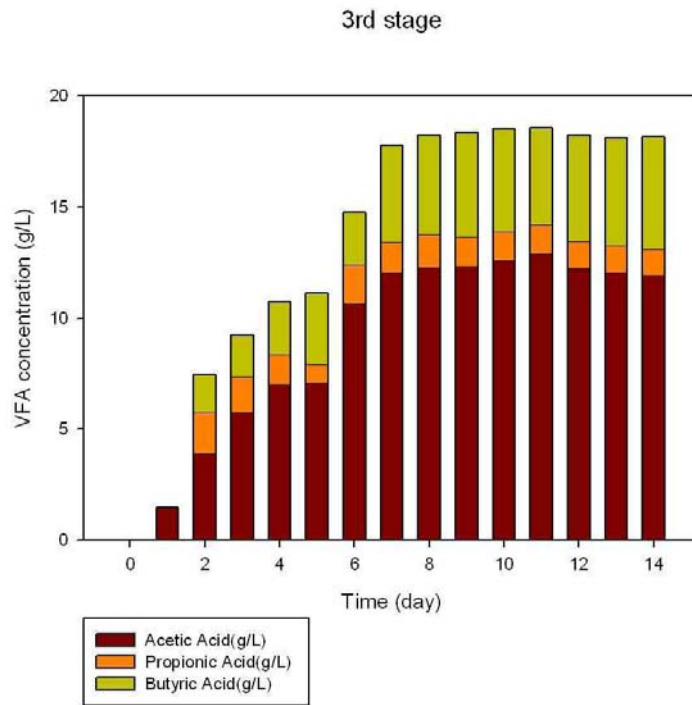
[그림 5-2-14] 4:3:2:1농도의 첫 번째 반응기의 VFA 생산 농도.

다시마의 농도가 4:3:2:1인 4단계 연속 고농도 세포배양 반응기 실험 결과, 첫 번째 반응기의 VFA 생산 농도는 최고 16.4g/L까지 나왔다. 1:1:1:1인 4단계 연속 고농도 세포배양 반응기(간이 MSC-HCDC)와 마찬가지로 일주일 후에 처음과 같은 양의 다시마를 넣어줬을 때 생산 농도가 확연하게 증가하였으며 증류수의 지속적인 주입으로 인해 총 VFA 생산 농도가 최고점을 찍은 뒤, 계속 내려가는 것을 볼 수 있다. 하지만 1:1:1:1 농도의 MSC-HCDC와 달리 부티르산이 전체의 45% 정도로 상당히 많이 나오는 것을 볼 수 있다.



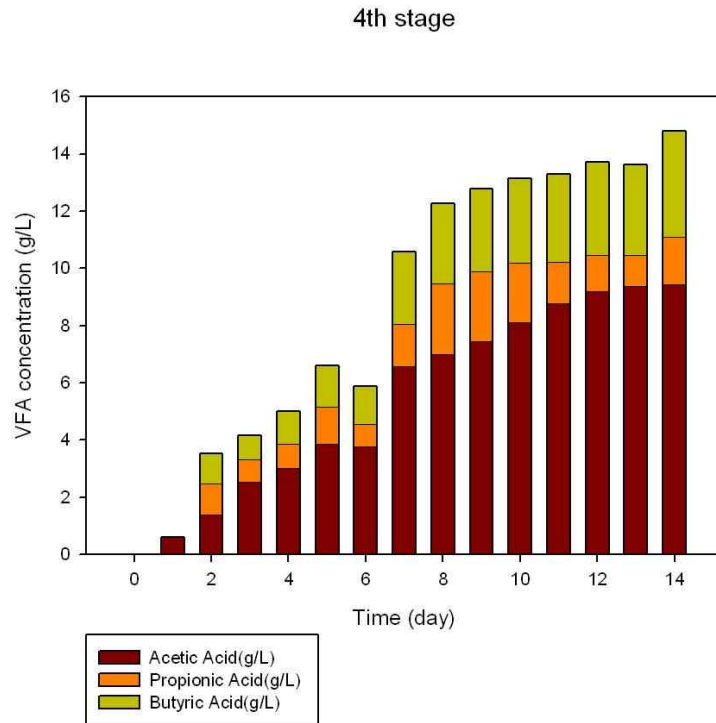
[그림 5-2-15] 4:3:2:1농도의 두 번째 반응기의 VFA 생산 농도.

두 번째 반응기에서는 [그림 5-2-15]에서 보는 것과 같이 생산 농도가 최고 23.5g/L까지 나왔다. 그리고 일주일 후 다시마를 넣어준 시점부터 확연하게 양이 증가하는 것을 볼 수 있다. 또한, 첫 번째 반응기와는 달리 실험이 끝날 때까지 21g/L 부근에서 생산 농도가 거의 일정하게 유지되었으며, 전 단계 반응기보다 그 비율은 줄었지만 35% 정도의 많은 부티르산이 나오는 것을 알 수 있다.



[그림 5-2-16] 4:3:2:1농도의 세 번째 반응기의 VFA 생산 농도.

세 번째 반응기에서도 전 단계 반응기들과 마찬가지로 일주일 후 다시마를 넣어준 시점부터 총 VFA 생산 농도가 증가하였지만 전 단계와 비교해보면 오히려 총 VFA의 생산 농도가 감소하는 것을 볼 수가 있다. 세 번째 반응기에서는 최고 18.5g/L 정도 나왔으며, 실험이 종료하는 시점까지 총 VFA 생산 농도는 18g/L 부근에서 일정하게 유지되었다.



[그림 5-2-17] 4:3:2:1농도의 네 번째 반응기의 VFA 생산 농도.

마지막 반응기에서도 전 단계 반응기보다 총 VFA 생산 농도가 감소하여 최고 14.7g/L 정도 나왔으며 마지막으로 우리가 얻는 최종 생산물의 농도가 13g/L 정도에서 꾸준히 유지되었다. 그러므로 물에서의 수율과 생산성을 구해보면 다음과 같다. 실험에서 사용한 Dilution rate는 0.1/d이며 일주일 후 VFA가 꾸준히 13g/L 부근으로 생산되었기 때문에 이를 이용하면, 수율은 27.1%로 계산되며 생산성은 평균 1.3g/L/d가 나온다.

4:3:2:1 비율의 농도인 간이 MSC-HCDC는 단계마다 다시마의 체류시간이 달라 1:1:1:1 비율의 반응기보다 더 많은 양의 VFA가 생산될 것이라고 생각었지만 결과적으로 1:1:1:1 비율의 반응기에서 더 높은 생산성이 나타났다. 이는 4:3:2:1 비율의 농도를 갖는 간이 MSC-HCDC의 세 번째, 네 번째 반응기에서 다시마의 양(질소원)이 적기 때문에 Inoculum의 생장이 완전하지 못했을 것이라 생각된다. 따라서 이에 관한 추가적인 실험이 필요하다고 본다.

라. 해조류의 전처리 및 *E.coli* KO11를 이용한 에탄올 생산 결과

(1) 해조류의 전처리 결과

[표 5-2-2] 산처리를 했을 때 Sugar의 생산량

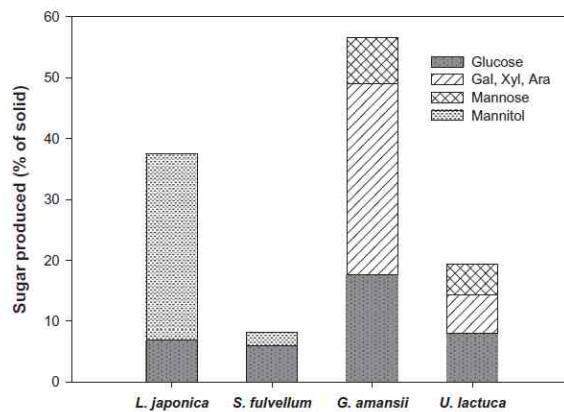
Strong acids	Concentration (N)	Sugar produced (% w/w dry biomass)			
		<i>S. japonica</i>	<i>S. fulvellum</i>	<i>U. lactuca</i>	<i>G. amansii</i>
H ₂ SO ₄	0	2.2	0.4	1.8	2.9
	0.05	5.9	3.4	6.8	5.8
	0.10	8.1	4.3	6.5	9.5
	0.15	6.9	6.1	6.8	9.7
	0.20	6.4	5.8	6.6	9.8
	0.30	5.6	5.2	5.4	8.7
HCl	0	2.2	0.4	1.8	2.9
	0.05	6.8	3.8	7.8	5.5
	0.10	9.4	5.3	7.1	11.6
	0.15	7.8	7.1	6.9	10.9
	0.20	7.3	6.6	7.9	11.0
	0.30	6.7	5.5	6.8	9.7

해조류의 전처리 실험을 산과 염기로 해보았으나 염기로 하였을 때, medium이 젤과 같은 형태로 변하여 더 이상 다루지 않았다. 그리고 산으로 전처리 하는 경우 H₂SO₄과 HCl을 사용하였다. 그 결과 [표 5-1-2]에서 보는 것과 같이 나왔으며, 우리가 다루는 다시마에서는 0.1N H₂SO₄와 0.1N HCl에서 당 생산량이 8.1%와 9.4%로 가장 높았다.

[표 5-2-3] 효소에 의한 가수분해를 했을 때 Sugar의 생산량

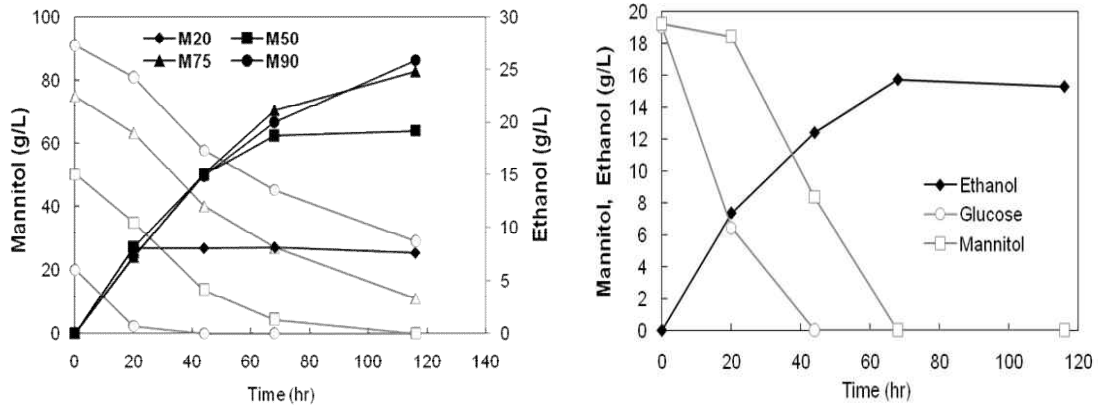
Enzyme activity	Enzymes	Sugars content (% w/w) (% of theoretical yield)			
		<i>S. japonica</i>	<i>S. fulvellum</i>	<i>U. lactuca</i>	<i>G. amansii</i>
Cellulase (Endo-glucanase)	Novoprime® B959	25.4 (48.9)	6.2 (15.7)	13.8 (25.4)	38.4 (49.7)
	Novoprime® B969	34.4 (66.3)	8.2 (20.7)	19.0 (35.0)	54.4 (70.5)
Beta-glucanase	Viscozyme® L	15.0 (28.9)	4.0 (10.1)	7.8 (14.4)	23.0 (29.8)
Amyloglucosidase	AMG® 300 L	8.2 (15.8)	4.8 (12.1)	6.4 (11.8)	11.4 (14.8)
Endo-glucanase	Celluclast® 1.5L	32.4 (62.4)	8.4 (21.2)	18.0 (33.1)	54.2 (70.2)
Endo-glucanase Beta-glucanase	Celluclast® 1.5L Viscozyme® L	37.6 (72.4)	9.6 (24.2)	19.4 (35.7)	56.6 (73.3)

0.1N HCl을 이용하여 산처리를 한 뒤에 효소를 이용하여 가수분해를 하였더니 그 결과는 [표 5-1-3]과 같이 나왔다. 다시마의 경우 Viscozyme® L와 Celluclast® 1.5L를 1:1로 섞어서 사용하였을 때 37.6%로 가장 높은 당 생산량을 보였다. 또한 당 성분을 분석해보니 아래 그림과 같이 만니톨과 글루코스가 각각 30.54%와 6.98% 정도로 나타났다.



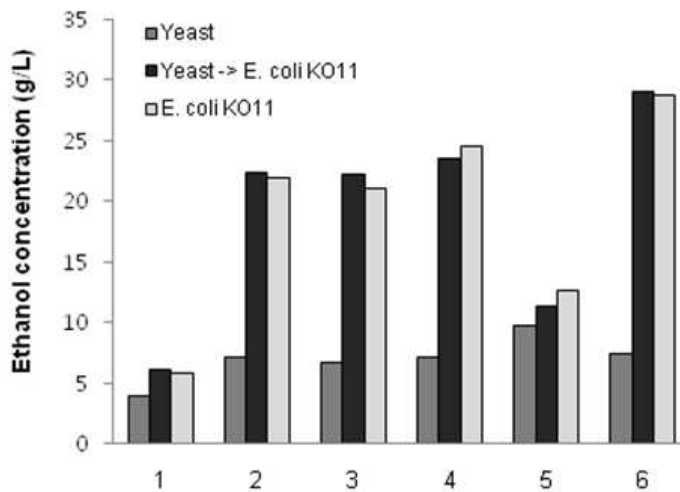
[그림 5-2-18] Viscozyme® L와 Celluclast® 1.5L의 혼합물을 이용할 때 당 성분.

(2) *E.coli* KO11를 이용한 에탄올 생산 결과



[그림 5-2-19] 만니톨에서 에탄올 발효한 결과(좌),
글루코스와 만니톨 혼합물을 에탄올 발효한 결과 (우).

E.coli KO11를 이용하여 에탄올 발효를 하였을 때 그 결과는 위 그래프와 같다. 먼저 만니톨의 경우 yeast를 이용하게 되면 발효가 되지 않지만 *E.coli* KO11를 이용하게 되면 만니톨이 90g/L있을 때 116시간 후에 25.8g/L에 도달하게 된다. 이때 에탄올의 수율은 41%로 나타난다. 또한, 만니톨 19.6g/L와 글루코스 19.5g/L 혼합물에서는 에탄올이 16g/L정도 나오는 것을 알 수 있다. 그리고 만니톨이 글루코스보다 늦게 소비 된다는 것도 나타났다.



[그림 5-2-20] 동시당화발효법(SSF)을 이용한 에탄올 생산 결과.
(1: 효소 처리 X, 2: Celluclast[®] 1.5L, 3: Novoprime[®] B959, 4: Novoprime[®] B969; 5, Viscozyme[®] L, 6 : 5개의 효소 혼합물 - Celluclast[®] 1.5L, Novoprime[®] B959, Novoprime[®] B969, Viscozyme[®] L)

또한 다시마에서 효소처리 한 뒤 SSF 공정을 이용하여 에탄올 발효를 하였더니, *S.cerevisiae*만 사용하는 경우 만니톨을 발효하지 못해 전반적으로 7.0~9.8g/L의 에탄올을 생산하였다. 그에 반해 *S.cerevisiae*를 이용하여 먼저 발효한 뒤에 제거하고 *E.coli* KO11로 남은 액을 발효 하는 경우 23~29g/L의 에탄올이 생산되었다.

따라서 이 실험을 통해 에탄올 발효 시 *E.coli* KO11의 우수한 만니톨 발효 능력과 다시마의 전처리 방법에 대해 알아볼 수 있었다. 그러나 당 생산이 아닌 VFA 생산을 위한 다시마의 전처리 방법에 대해 추가적인 실험이 필요하다고 판단된다.

4. 요약 및 제언

- (1) Fed-Batch 실험의 경우 총 VFA의 생산 농도는 40g/L의 다시마에서 최고 22.7g/L로 나타난다. 하지만 VFA가 계속 생성되는 기간 동안에 기질을 일주일마다 더 넣어주었음에도 불구하고 생산된 VFA의 농도는 일정하거나 약간 증가하는 것과 달리 Fed-batch 반응기들 모두 처음에 얻은 값에서 꾸준히 감소하는 걸 알 수가 있다. 그러므로 Fed-batch 반응기에서 VFA의 생산 농도를 세 번째, 네 번째 주기에서 증가시키기 위한 추가적인 실험을 계속 하거나 생산성이 비교적 높은 첫 번째 주거나 두 번째 주기에서 최종 생산물 (VFA)을 얻고 남은 다시마를 재사용 하는 것이 효율적이라고 본다.
- (2) MSC-HCDC를 이용하는 다단계 반응기에 대한 시뮬레이션의 경우 최종적으로 총 VFA의 생산 농도가 13.4g/L에 도달하였다. 그리고 총 VFA 생산 수율은 55.9%이며 생산성은 2.7g/L/h로 나타났다.
- (3) 4:3:2:1인 농도의 간이 MSC-HCDC는 단계마다 다른 다시마의 체류시간으로 인해 1:1:1:1인 반응기보다 더 많은 양의 VFA가 생산될 것이라고 생각되어 농도에 변화를 주었지만 결과는 1:1:1:1인 반응기에서 평균 2.1g/L/d 정도로 평균 1.3g/L/d보다 더 좋은 생산성을 얻었다. 이는 4:3:2:1인 농도의 간이 MSC-HCDC 세 번째, 네 번째 반응기에서 다시마의 양이 적기 때문에 Inoculum의 생장이 완전하지 못했을 것이라 생각된다. 그러므로 이에 고려한 추가적인 실험이 필요하다고 판단된다.

(4) *E.coli* KO11를 이용한 에탄올 생산하였을 때 다시마 속 당 성분인 만니톨에 대해 우수한 발효 능력이 있다는 것을 발견하였다. 그리고 다시마의 전처리 실험을 통해 가장 효과적인 전처리 방법에 대해 알아볼 수 있었다. 그러나 이제 당 생산이 아닌 VFA 생산을 위한 다시마의 전처리 방법에 대해 추가적인 실험이 필요하다고 판단된다.

5. 향후계획

(1) VFA 생산 농도와 생산성 향상

(가) 다시마의 VFA 농도 20g/L 달성

(2) 모델링을 통한 다단계 연속 고농도 세포배양(MSC-HCDC)의 성능 평가

(가) 다시마의 VFA 생산 성능 평가

(나) 실험을 통한 정확성 증가

(3) 다단계 연속 고농도 세포배양(MSC-HCDC) 반응기 제작

(가) 다단계 반응기 설계 및 시범 운전

(나) 연속 공정에서의 문제점 발견 및 해결

제 3 절 혐기성 소화공정 이용 혼합 알코올 생산기술 개발

1. 연구 목적 및 내용

가. 연구 목적

- 해조류는 제1세대인 전분계와 제2세대인 목질계 바이오매스를 대체할 수 있는 제 3 세대 바이오매스 자원으로서 이를 효율적으로 바이오에너지화할 수 있는 기술의 개발이 중요하다.
- 해조류 바이오매스를 에너지화하는 시도는 일본에서 파래를 이용하여 혐기성 소화 공정을 거쳐서 전력을 생산하는 시도가 산업화 가능단계까지 와 있다.
- 최근에 발표된 논문에 의하면 Cellulosic 바이오매스로부터 수송용 액체연료를 생산하는데 있어서 경쟁기술인 Sugar 플랫폼이나 열화학 플랫폼에 비하여 volatile fatty acid (VFA) 플랫폼 (Carboxylte 플랫폼)이 가장 경제성이 높다고 보고되었다.
- 본 연구를 통하여 개발하고자하는 VFA 플랫폼 기술은 경쟁기술인 sugar 플랫폼에 비하여 다음과 같은 장점을 가지고 있다.

[표 5-3-1] VFA 플랫폼과 sugar 플랫폼의 특성비교

제 품	Sugar 플랫폼	VFA 플랫폼	
	에탄올	혼합알코올	메탄가스
목표수율	300 L/톤	450 L/톤	220 Nm3/톤
원 료	제한이 있음	제한이 없음	제한이 없음
분해영양소	분해성 당	당, 단백질, 지질	당, 단백질, 지질
멸 균	필요	불필요	불필요
효소개발	필요	불필요	불필요
수소공급	불필요	필요	불필요
제조공정	간단	복잡	간단
에너지밀도	23.4 MJ/L	26.5 MJ/L	35.7 MJ/Nm3
Pipeline Shipping	불가능	가능	가능
수송용 연료	가능	가능	불가능
핵심요소기술 기술개발단계	초기단계	실용화 가능단계	실용화단계
제품의 부가가치	210천원/톤	350천원/톤	154천원/톤

- 또한 VFA 플랫폼 기술은 당화플랫폼과에 비하여 다음과 같은 장점이 있다.
 - 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.
 - 혼합알콜은 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.
- VFA 플랫폼 기술과 메탄가스생성을 비교하면 다음과 같은 장점이 있다.
 - 산발효(체류시간 2~3일)는 메탄발효(체류시간 15~25일)보다 반응속도가 5~6배 빠르므로 생산성이 높다.
 - 메탄발효 단계에서 CO₂로 손실되는 carbon을 회수함으로써 높은 수율이 기대됨. (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 알콜을 얻는 수율을 80%로 가정할 경우 해조류 1톤(수분 90%)으로부터 기대되는 혼합알콜의 양은 61 Kg이다(에탄올 기준 77 L). 이를 에너지로 환산할 경우 메탄 대비 2.1 배, 가격으로 비교할 경우 메탄 대비 3.5 배의 높은 부가가치를 가진다([표 5-3-2]).

[표 5-3-2] VFA 플랫폼에 의하여 생성되는 혼합알콜(에탄올을 대표로 가정함)과 메탄의 에너지 수율 및 부가가치 비교

	메탄	에탄올
생산량(톤당)	22 Nm ³	77 L
연소열	50 MJ/Kg	26.8 MJ/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

- VFA 플랫폼기술의 전체효율을 결정짓는 핵심요소기술은 첫 번째 단계인 해조류로부터의 유기산 생성기술로서 본 연구에서는 효율적인 유기산생성기술을 목표로 하고 있다.
- 구체적인 연구 목표는 다음과 같다.

구 분	연 구 개 발 목 표
1 차 년 도 (2009)	○ VFA 수율 : 40% (Kg VFA/KG VS) ○ 혼합알콜 수율 : 300 L/톤 VS
2 차 년 도 (2010)	○ VFA 수율 : 45% (Kg VFA/KG VS) ○ 혼합알콜 수율 : 400 L/톤 VS
3 차 년 도 (2011)	○ Scale-Up연구 ○ VFA 수율 : 50% (Kg VFA/KG VS) ○ 혼합알콜 수율 : 450 L/톤 VS
최 종 목 표	○ VFA 수율 : 50% (Kg VFA/KG VS) ○ 혼합알콜 수율 : 450 L/톤 VS

나. 연구 내용

- 유기산 발효의 경제성 악화는 순수배양 유지와 농도가 낮은 product의 정제에 고 비용이 소요되기 때문이다. 순수배양의 문제는 mixed culture를 통해 해결할 수 있는데, mixed culture를 사용하면 biomass에 함유된 많은 종류의 기질(cellulose, hemicellulose, pectin, sugar, protein, fat 등)을 유기산으로 전환시킬 수 있으며, 이들 고분자 물질의 저분자 물질로의 분해에 필요한 각종 효소도 모두 자체적으로 생산 가능하다고 알려져 있다.
- 다만, 공정을 적절히 운전하지 않으면 생성된 VFA가 메탄으로 전환되므로 유기물의 혐기발효를 통하여 VFA를 최대로 생산하되, 생산된 VFA가 더 이상 대사되지 않도록 막아야 한다. 앞서 외국 연구의 예에서 언급한 바와 같이, 산 생성 발효의 pH, 수리학적체류시간(hydraulic retention time, HRT), 고형물체류시간(solid retention time, SRT), 온도, 산화환원준위(oxido-reduction potential, ORP) 등의 조건을 최적화하여 산생성은 최대화하고 VFA의 메탄 전환은 방지하고자 한다.
- 갈조류 전처리에는 일반적 처리 방법인 물리적(ball milling, two-roll milling), 화학적(희석산, 알칼리), 물리화학적(steam explosion, ammonia fiber explosion), 생물학적(white-rot fungi)등을 사용할 수 있을 것으로 예상되지만, 전처리 공정에 의해 전체 공정의 경제성이 악화될 수 있으므로 갈조류의 유기산 전환이 적절히 담보되는 선에서 가장 경제적이며 간단한 방법을 선택하고자 한다.

- 구체적인 연구내용은 다음과 같다.

구 분	연 구 개 발 내 용
1 차 년 도 (2009)	○ 해조류의 혐기성 발효에 의한 유기산 생성 기초기술 개발 - 기존의 폐수처리용 혐기성 발효 기술의 분석 - 해조류에 대한 응용방안의 도출 - 유기산 생성 기본반응조건의 설정
2 차 년 도 (2010)	○ 유기산 생성 공정의 최적화 - 해조류 분해 특이균주의 Screening 및 적용 - 반응조건 최적화 및 생산성 향상연구
3 차 년 도 (2011)	○ Scale-Up연구

2. 연구 방법

가. 실험장치 및 재료

(1) 기질(substrate)

기질의 원활한 분해를 위하여 실험에 사용된 생미역과 생다시마 및 기타 해조류는 물에 세척하여 표면에 부착된 염분을 제거한 후, 110도의 오븐에서 건조시켜 수분을 제거한 후, 믹서기를 사용 분말화 한 후 사용하였다. 이후 실험에 사용되는 기질을 동일하게 하기 위하여 완도에서 수확되어 분말화 된 다시마를 대량으로 구매하여 기질성분의 변화를 최소화 하였다. 분말화된 다시마는 탈염, 미탈염 조건과 탈염된 다시마를 alcohol 추출을 통해 poly-phenol등이 추출된 후 건조된 다시마 분말도 포함된다. 이외로 다른 해조류와 다시마를 비교하기 위하여 도박, 진두발등의 해조류도 위와 동일한 조건에서 분말화 한 후 실험에 사용하였다.

(2) 배양미생물(sludge)

혐기성 배양에 사용된 슬러지는 성남시에 위치한 복정종말 하수처리장의 슬러지와 아산시에 위치한 대우환경사업소의 슬러지를 이용하였다. 장기배양하여 적응시킨 슬러지를 이용하여 두 슬러지와 혼합한 슬러지를 사용하여 비교하였다. 슬러지 외에 해조류의 주성분인 alginate를 효율적으로 분해할 것으로 예상되어지는 갯벌미생물과 전복내장enzyme의 효율을 알아보기 위하여 해안가 갯벌에서 20cm~50cm깊이의 갯벌을 추출한 것과 전복의 내장을 잘게 부수어 사용하였다.

(3) 배지(medium)

원활한 실험을 위하여 탄소원으로 glucose와 Na-alginate를 이용하여 기초배양였고, 이후 탄소원으로는 기질인 완도산 *Laminaria japonica*가 사용되었다. 탄소원 이외의 무기염으로 yeast extract가 사용되었으나 yeast extract가 혐기성 소화에 의해 분해되는 문제로 인하여 defined medium으로 대체되었다. Defined medium으로 사용된 배지의 조성은 $\text{NH}_4 \text{HCO}_3$ 20g, $\text{K}_2\text{H}_2\text{PO}_4$ 10g, $\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$ 1g, NaCl 0.1g, MoNa_2O_4 0.1g, CaCl_2 0.1g, MnSO_4 0.131g, Cl_2Fe 0.044g으로 10배 농도로 만든 후 배양조건에 따라 5~10배 희석되어 사용되었다.

(4) 메탄가스저해물질 (gas inhibition)

혐기성 소화발효의 최종산물인 메탄가스와 같은 바이오가스의 생성을 최소화하는 저해물질을 사용하여 반응을 저해시키는 것으로 예상되는 화학물질을 10ppm~100ppm농도로 사용하였다. 사용된 저해물질로는 iodoform과 bromoform, 2-bromoethane sulfonic acid를 사용되었고 iodoform과 bromoform은 불용성이기에 소량의 에탄올에 용해시킨 후 첨가하였고 2-bromoethane sulfonic acid는 물에 용해하여 사용하였다.

나. 실험 절차

(1) 혐기성발효 (anaerobic fermentation)

혐기성 소화공정에 사용되는 균은 일반 하수처리장등에서 슬러지의 형태로 얻을 수 있으며 기질에 적응시키기 위하여 일정한 시간을 두고 점차적으로 부하량을 늘려 배양시키면 기질에 순응되는 형태를 보이며 증가한다. 배양을 할때는 슬러지의 적응환경과 기질의 분해속도 등을 고려하여 배지성분과 온도 rpm등을 조절한다. 일반적인 플라스크 배양에서는 35도 200rpm에서 배양하였다.

발효에 사용된 반 연속식 배양기는 2L크기의 jar fermentor에 working volume을 1L로 하여 배양한 것과 1L크기의 jar fermentor에 working volume을 500ml한 것 이다. 배양조건은 최초 슬러지를 working volume만큼 채운 후 질소를 이용하여 5~10분 동안 치환하여 혐기상태로 만든후 배양액에서 20%를 sampling한 후 동일한 양의 feed를 채워 넣었다. Feed의 조건은 동일양의 volume에 90%의 DI-water와 10%의 defined medium을 혼합한 후 20g/L농도로 완도산 *Laminaria Japonica*를 넣은 후 질소를 이용하여 5~10분간 액내의 산소를 제거한 후 fermentor에 넣고 산소가 통하지 않도록 봉인 하였다. 플라스크를 규모의 실험을 할 때는

200~300ml의 플라스크에 DI-water 80ml를 넣은 후 defined medium 10ml를 넣고 혼합하고, 건조, 분말화된 기질인 laminaria japonica를 10g/L의 농도로 넣은 후 질소로 5~10분간 치환하여 혐기성 상태를 만들어주고 고무마개와 필름지를 이용하여 봉인하였다. 이후 shaking incubate에 넣고 배양한다. 극혐기성 상태를 요구하는 균주의 경우 산소와의 차단이 가능한 세륨 보틀등을 사용하여 배양하였다.

(2) VFA 추출

생성된 VFA의 추출에 효과적인 용매를 찾기 위해서 다양한 추출용매를 acetic acid, propionic acid, butyric acid 가 혼합된 수용액에 첨가하여 30분간 shaking 한 후 상 분리가 명확히 되지 않은 용매는 원심분리기를 사용하여 상 분리를 한 후에 water상에 남아있는 VFA의 농도를 측정하여 분배계수를 계산하였다. 발효액의 VFA를 추출할 경우에는 pH, 온도에 따라 분배계수에 영향을 미치기 때문에 원활한 추출을 위하여 적정량의 HCl을 가하여 pH를 3~5까지 조절한 후 추출하였다.

(3) 분석 (analysis)

분석하고자 하는 sample 1ml를 마이크로 피펫으로 정량하여 sampling tube에 넣은 후 8000rpm에서 10분간 원심분리하여 상등액을 채취한 후 0.45um의 Life Sciences의 Acrodisc(R)의 13mm LC용 syringe filter를 사용하여 불순물을 제거한 후 HPLC로 측정하였다. 분석에는 Shimadzu의 HPLC(high performance liquid chromatography)를 사용하였다. 사용된 세부 장비로는 SCL-10A, LC-10AD, DGU-14A, SPD-10A, SIL-10AD, CTO-10A이다. 이동상으로는 HPLC급의 H₂O에 0.004N의 H₂SO₄농도를 만들어 사용하였고 column은 Bio-Rad의 aminex HPX-87H ion-exchange를 사용하였다. Column oven의 온도는 40도, 이동상의 속도는 0.6ml/min이며 분석에는 20ul의 양이 사용하였다. UV-detector로 240nm에서 분석하였다. 분석된 시료로는 일반적으로 생산되는 주요 VFA인 acetic acid, propionic acid, butyric acid, valeric acid와 그 외로 혐기성발효를 할 때 나타날 수 있는 succinic acid, lactic acid, formic acid등을 분석하였다.



[그림 5-3-1] 실험에 이용된 2L Bioreactor 및 HPLC의 사진.

3. 연구수행 결과

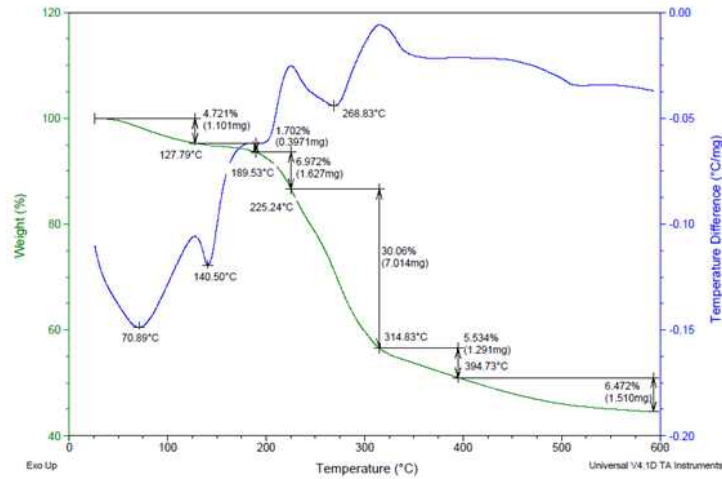
1차년도에 1) 해조류에 대한 혐기성 소화 최적조건, 2) 해조류 종류별 VFA 생산성, 3) 장기운전시험, 4) 유기산에 의한 혐기성 소화의 저해, 5) Extractant의 선정 등에 관한 연구결과를 보고하였다. 1차년도의 연구결과를 요약하면, 다시마 1000 Kg 이용시 혐기성 소화를 통하여 획득할 수 있는 VFA의 총량은 232.5 Kg 이며 여기에 수소첨가 반응수율 80%를 가정할 때 얻을 수 있는 혼합알콜의 양은 142.6 Kg 이다. 이 양은 부피로는 178.3 L에 해당되며 본 실험에 사용된 다시마의 VS 함량이 61% 인 점을 감안할 때 VS 1톤 당 혼합알콜 수율은 292L이다.

당해연도 연구에는 VFA의 생산성 향상을 위하여 발효공정에 영향을 미치는 인자를 조사하고 최적화하는 연구를 수행하였다.

가. 해조류 시료의 휘발성고형분 분석

해조류시료를 혐기성 소화로 분해시킬 수 있는 휘발성 고형분(volatile solid, VS)인 탄수화물, 지방, 단백질의 양을 분석하기 위하여 건조한 laminaria japonica의 TGA (thermogravimetric analysis)를 수행하였다. TGA 곡선(그림 5-2-3-1)에 나타난 바와 같이, 본 시료는 약 5%의 수분이 포함되어 있으며, 100~600°C의 범위에서 약 50~55%의 시료 중량이 감소한 것으로 나타났다. 따라서 본 시료의 휘발성 고형분은 시료의 건조중량 대비 약 50~55%임을 알 수 있다.

국립수산과학원의 data에 따르면 다시마의 구성성분은 총 100 g 중 수분 91 g, 단백질 1.1 g, 탄수화물 4.2 g, 지방 0.2 g, 회분 3.5 g으로 수분을 제외하고 건조된 다시마 중 이용 가능한 VS는 56%이다. 따라서 본 실험의 결과는 국립수산과학원의 data와 유사하게 나타났다. 혐기성소화공정의 이론적인 VS 비율에 대한 VFA 생산량인 70%를 여기에 적용시킬 경우 최종적으로 생산될 수 있는 VFA의 양은 0.392 g VFA/g dry sample 로 건조질량에 대하여 40%가량의 생산효율을 나타낸다.

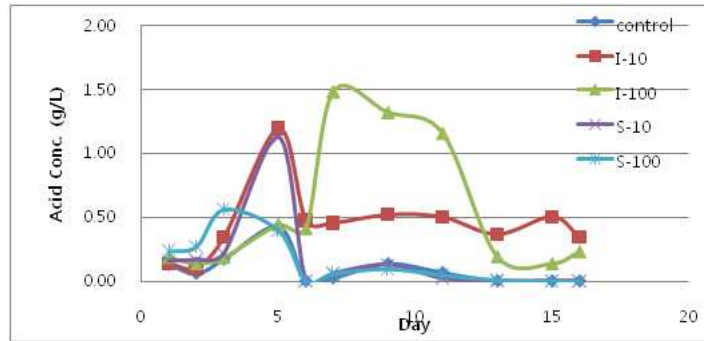


[그림 5-3-2] Laminaria japonica의 열분해 특성(TGA/DTA) 곡선.

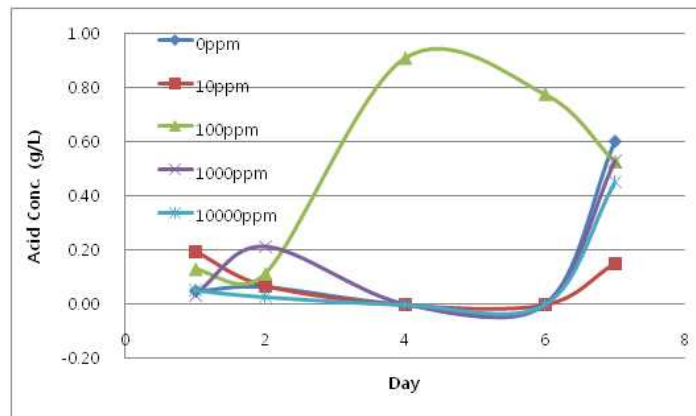
나. 메탄가스저해제의 영향

일반적으로 메탄가스 저해제로 알려져있는 2-bromo ethane sulfonate과 Iodo-form을 사용하였을 때 VFA의 생산에 미치는 영향을 알아보기 위하여 저해제를 사용하지 않은 control과 Iodo-form(I)과 2-bromo ethane sulfonate(S)의 양을 각각 10ppm과 100ppm으로 조절하여 효율을 비교하여 보았다. Control의 VFA생성량이 5일째에 0.5g/L를 생성한데 비하여 저해제를 첨가한 실험군의 VFA생성량이 상대적으로 높았고 Iodo-form을 100ppm첨가한 flask에서 1.5g/L로 가장 높은 VFA생성률을 보였다.

Iodoform이 유기용매에 용해되는 것에 비하여 물에 용해되는 2-bromoethane sulfonic acid를 사용하여 실험한 결과 목적으로 하는 메탄관련 균의 대사만에 작용하는 것이 아닌 슬러지균 전체에 작용하는 것으로 판단된다. 일반적으로 메탄저해제를 첨가하지 않거나 Iodoform을 사용하였을 때 3~5일 사이에 VFA가 생성되는 것에 비하여 생성되어 나타나야 하는 VFA의 생산이 7일이 넘어서 생성되고 있으며 생성되는 양 또한 비교적 적은 양기 때문에 결과적으로 VFA생성은 적합하지 않은 것으로 판단된다.



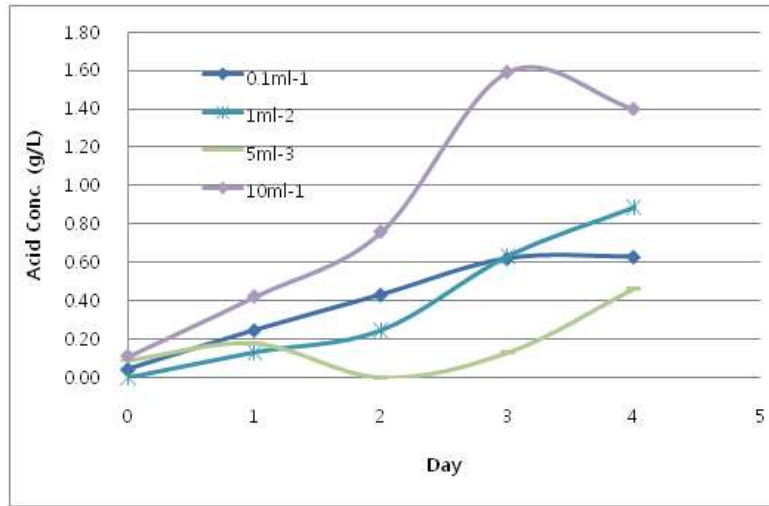
[그림 5-3-3] Iodoform 메탄가스 생성 저해제의 영향.



[그림 5-3-4] 2-Bromoethane sulfonic acid 메탄가스 생성 저해제의 영향.

다. 초기 슬러지 농도의 영향

배양에 적합한 sludge의 농도를 알아보기 위해 접종하는 sludge의 양을 0.1%, 1%, 5%, 10%로 조절하여 균의 농도에 따른 VFA의 변화를 측정하였다. 균주로 사용된 sludge의 양이 증가할수록 VFA의 생산효율도 높아지는 실험결과를 나타내었다. 혐기성 혼합균주는 순수미생물에 비하여 성장속도가 느리고 서로 경쟁적으로 성장하기 때문에 새로 발효할 경우 접종량이 중요하며 연속공정의 경우 슬러지를 되돌려 재사용하는 과정이 필요하다.

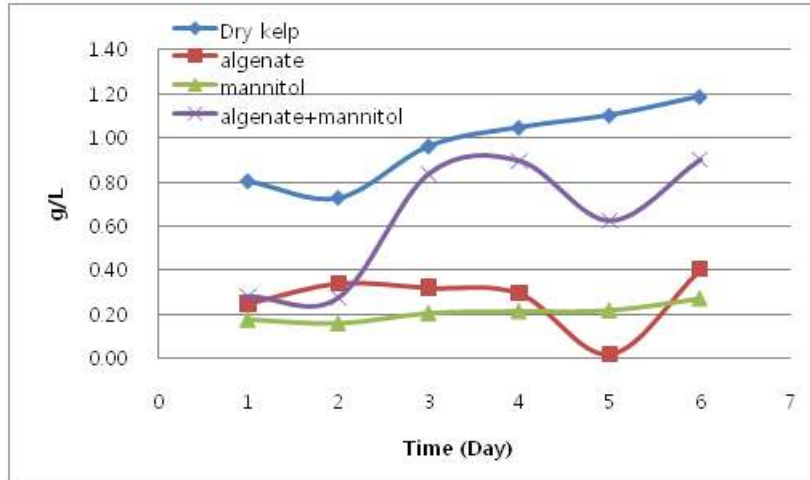


[그림 5-3-5] 슬러지 주입농도의 영향.

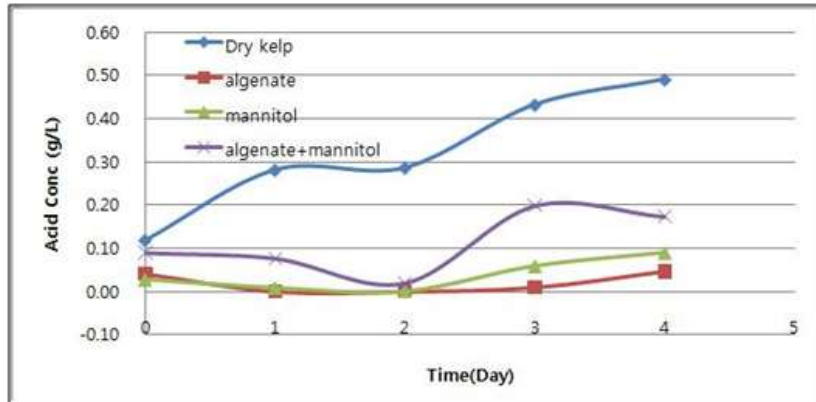
라. 전복의 분해균을 이용한 VFA변환

해조류를 먹이로 하여 성장하는 전복의 분해균을 이용하여 다시마와 다시마의 주요성분인 alginate와 alginate의 성분중 분해가 상대적으로 빠른 mannuronic acid의 환원 형태인 mannitol을 혐기성발효를 통해 VFA로의 전환 효율을 측정하였다. 극혐기성 상태를 발효중 유지할 수 있는 serum bottle에 각각 건조다시마 1%와 건조다시마성분 농도로 판단되는 alginate 0.33%, mannitol 0.06%, alginate0.33%와 mannitol 0.06%를 혼합한 배지를 각각 만들고 전복을 믹서로 분쇄한 후 10%를 접종하고 봉인한다. Mannitol과 alginate를 각기 단독으로 사용하였을 때보다 alginate와 mannitol을 혼합하여 배양하였을 때 활성이 높은 것으로 실험결과 나타났다. Mannitol의 분해로 인해 생겨난 alginate분해효소가 작용하여 alginate를 분해시킨 것으로 판단된다.

Serum bottle에 1차 배양한 전복분해균을 사용하여 2차배양을 한 결과 VFA의 생성량은 1차 배양한 발효액의 VFA양에 비하여 적은 양을 보였다. 2차배양에 첨가량인 10%인 것에 비하여 양에 대하여 VFA생성량은 10~50%정도로 측정되었다. 전복이 가지고 있는 해조류 분해균은 미생물종류가 아닌 효소종류로 판단되며 기질을 분해하며 소모되지 않는 것으로 판단된다.



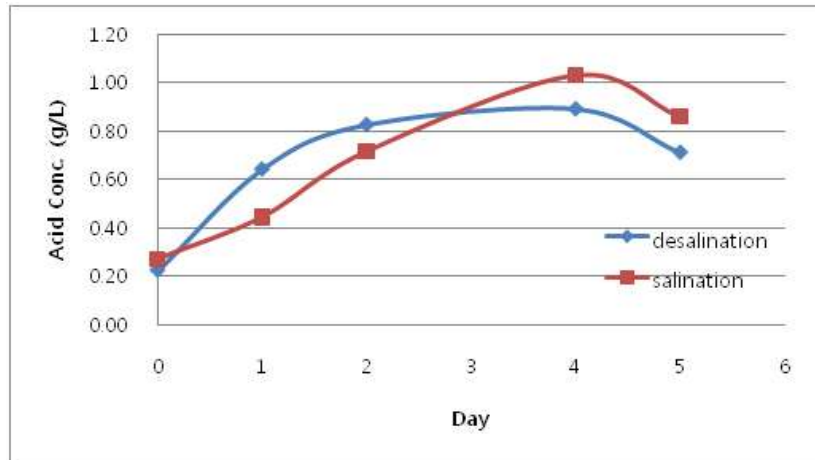
[그림 5-3-6] 전복내장의 alginate lyase 활성.



[그림 5-3-7] 전복내장 배양균주의 활성.

마. 탈염된 다시마와 미탈염 다시마의 변환효율비교

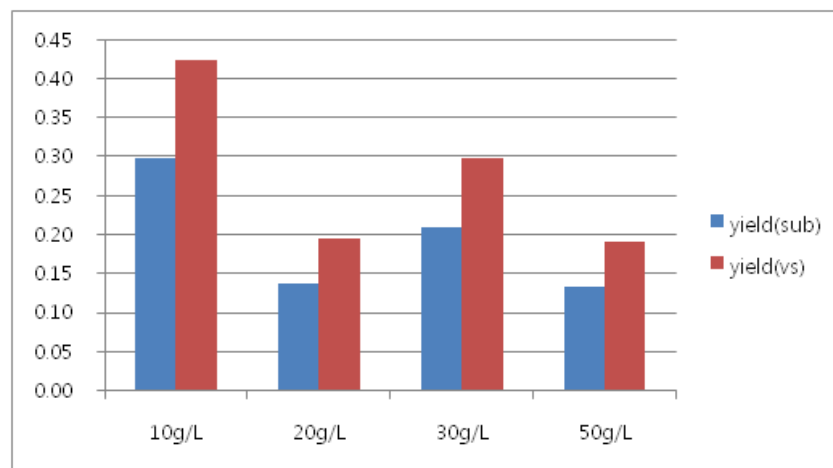
세척건조된 다시마와 미세척되어 염분성분이 포함된 분말 다시마를 플라스크 실험을 통해 염분함유에 따른 변환효율을 비교하였다. 일반적인 육지 미생물은 염분이 포함된 조건하에서는 생장에 저해작용을 일으켜 생장이 느리거나 생장 할 수 없지만 혐기성 소화공정에서는 크게 영향을 미치지 않는 것으로 판단된다. 또한 해수의 염분에 포함된 성분중 Na는 alginate의 분해에 필요한 Ca/Na의 비율을 충족시켜 줄 수 있기 때문에 염분으로 인해 약간의 저해작용을 받을지라도 좀더 나은 효율을 보여줄 수 있는 것으로 보이며 전처리에 탈염과정이 포함되지 않아도 된다는 것은 실용적인 공정에 경제적으로 유리한 효과를 가져다 줄 수 있다.



[그림 5-3-8] 기질의 염분 함량의 영향.

바. 기질농도와 배지농도에 따른 VFA양의 변화

Substrate의 농도증가에 따라 VFA생성률을 알아보았다. 10g/L~50g/L로 substrate를 조절하고 VFA생성효율을 분석하였다. 10g/L에서 50g/L로 기질의 농도가 증가할수록 VFA의 생성효율은 떨어지고 있는데 기질저해나 acid의 축적으로 인한 저해현상, pH저하로 인한 미생물의 활성저해 등으로 판단되어 50g/L에서 무기염의 농도를 더 올려 실험을 해 보았다.

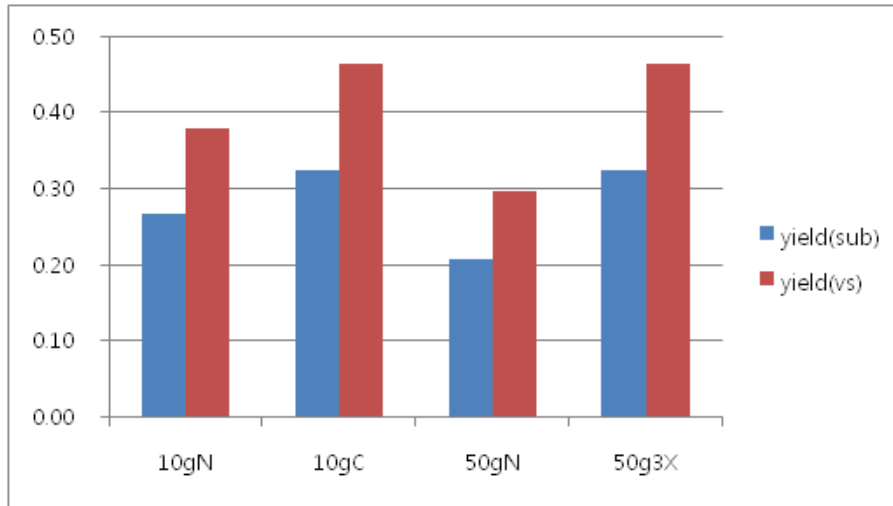


[그림 5-3-9] 기질농도에 따른 VFA 생산성.

배양 3day까지 데이터를 보면 기질농도 50g/L에서 VFA생성률이 낮았다. 기질저해로 간주되었으나 6day에서 6.66g/L로 증가하였다.

장기배양실험에서 50g/L농도일 때 2day일 때 0.73g/L였으나 VFA농도는 서서히 증가하여 6day에서 5.61g/L, 17day에서 8.59g/L의 농도를 보였다. 배지의 무기

염 농도를 3배로 하여 50g/L에서 배양하였을 경우 17day에서 12.59g/L의 VFA를 생산하였다.

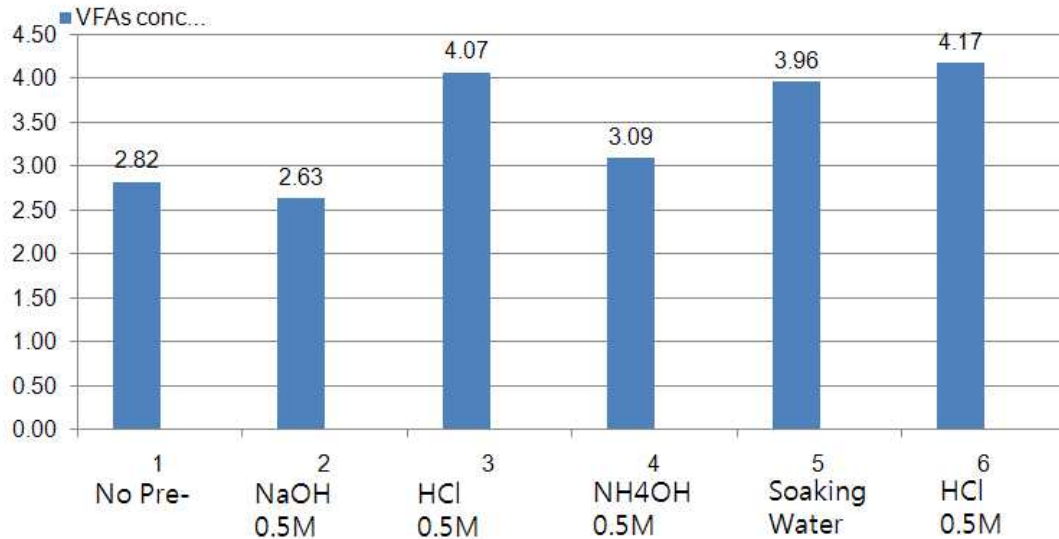


[그림 5-3-10] 기질농도와 무기물 농도에 따른 VFA 생산성.

탄소원인 다시마의 농도가 10g/L일 때 medium성분변화에 따른 변화는 그다지 차이를 보이지 않았다. 장기배양실험에서 50g/L농도일 때 2day일 때 0.73g/L였으나 VFA농도는 서서히 증가하여 6day에서 5.61g/L, 17day에서 8.59g/L의 농도를 보였다. 배지의 무기염 농도를 3배로 하여 50g/L에서 배양하였을 경우 17day에서 12.59g/L의 VFA를 생산하였고 21일째 16.24g/L로 VS효율로 46%의 전환률을 보였다. 24일 이후 농도는 감소하였다. Feed의 농도가 증가할수록 분해효율에 따라 전환되는 시간이 증가하며, medium의 농도증가에 따른 pH 버퍼역할로 인해 VFA의 양이 증가된 것으로 판단된다.

사. 기질 전처리 영향

다시마시료의 발효특성을 향상시키기 위하여 산, 알칼리 용액으로 전처리한 후 VFA생성률을 측정하였다. 전처리하지 않은 시료에 비하여, 0.5M HCl로 전처리한 시료의 VFA 생성량이 약 20-30% 증가하였다. 단순히 증류수에 12시간이상 가열한 경우에도 20%이상 VFA의 생성량이 증가하는 것으로 나타났다.



[그림 5-3-11] VFA 생산성에 대한 물리화학적 전처리의 영향.

4. 요약 및 제언

본 연구에서는 혐기성 소화공정을 이용하여 해조류의 휘발성 지방산 발효와 추출을 할 때 최적의 배양조건을 찾아내기 위한 실험을 진행하였으며 실험데이터를 종합적으로 판단하여 볼 때 결과적으로 복합적 기질이며 난분해성 당을 포함하는 해조류를 이용하여 휘발성 지방산을 만들어내는 과정에는 혐기성 소화공정이 유용성과 실용적인 것으로 판단된다.

혐기성 소화에 해조류를 이용하였을 때 황산이나 염산등의 산처리와 열처리에 대한 전처리는 VFA의 생산에 크게 영향을 미치지 않는 결과를 보였다.

해조류를 처리하는데 있어 염분을 제거하는 과정은 크게 효과를 미치지 않기 때문에 공정에서 제외하여도 큰 영향이 없을 것으로 판단되며 소량의 Na는 alginate의 응집을 막아주어 빠른 분해에 도움이 될 것으로 판단된다.

기질에 대한 균주의 적응시간이 상당히 느리며 혼합균주의 특성상 성장속도가 느리기 때문에 장기간 배양하며 균주를 기질에 적응시켜야 한다.

해조류의 장기배양 효과에 따라 접종초기 0.8~1.2g/L였던 VFA의 농도는 최종적으로 4.5g~7g/L로 증가하였으며 이후 사용된 플라스크규모 실험의 VFA 생산 효율도 증가시켰다. 플라스크실험에서는 기질의 농도를 10g/L로 하였을 때 VS에 대하여 최대57%의 VFA생산효율을 보였으며 배지성분중 무기염의 농도를 조절하여 실험한 결과 50g/L의 Feed농도에서도 비슷한 효율을 보였다.

생성되는 VFA의 농축으로 인한 저해현상은 pH를 조절하지 않을 경우 2~3g/L의 소량에서도 저해현상을 일으키나 pH를 조절하는 과정에서는 20~30g/L의 농도에서도 기질을 분해하는 효과를 보였다. 고농도의 VFA를 생산하는 과정에서는 pH인자가 중요한 영향을 미친다고 판단되므로 적절한 pH조절 물질을 첨가하여야 한다. 다시마시료의 발효특성을 향상시키기 위하여 산, 알칼리 용액으로 전처리한 후 VFA생성률을 측정하였다.

VFA 생산성을 높이는 방법으로 전처리가 필요하며, 전처리하지 않은 시료에 비하여, 0.5 M HCl로 전처리한 시료의 VFA 생성량이 약 20-30% 증가하였다. 따라서 공정상으로 최적화하는 과정과 실용적으로 이용할 수 있는 VFA의 농도까지 배양농도를 끌어올린다면 친환경적이며 기존의 화석연료를 대체할 수 있는 에너지원으로 이용될 수 있을 것으로 기대된다.

5. 향후계획

VFA 생산성 향상을 목표로 물리화학적 전처리한 결과 20-30%정도 VFA 최종농도가 향상되었다. 이와 더불어 해조류의 주성분인 alginate를 분해하는 미생물로 전처리를 시도한 결과 VFA 생산성 크게 향상되는 것을 관찰하였다. 따라서 향후 미생물을 활용한 생물학적 전처리공정을 체계적으로 개발하고자한다.

제 4 절 해조류 바이오매스 유래 혼합유기산으로부터 혼합 알코올 생산하는 화학촉매 공정 개발

1. 연구 목적 및 내용

가. 연구 목적

- 해조류 바이오매스는 육상 바이오매스와 마찬가지로 그린에너지 생산을 위한 무한한 탄소원으로 사용될 가능성이 있으며, 이를 이용하기 위한 경제성 있는 그린에너지 융합공정을 개발하고자 한다.
- 혐기성 소화공정을 이용하여 생산된 혼합유기산으로부터 촉매 화학공정을 이용하여 혼합 알코올을 생산하기 위한 촉매 설계 및 특성 분석
- 혼합 알코올 생산 수율 85% 달성 (유기산 1톤 기준 알코올 650 kg)

나. 연구 내용

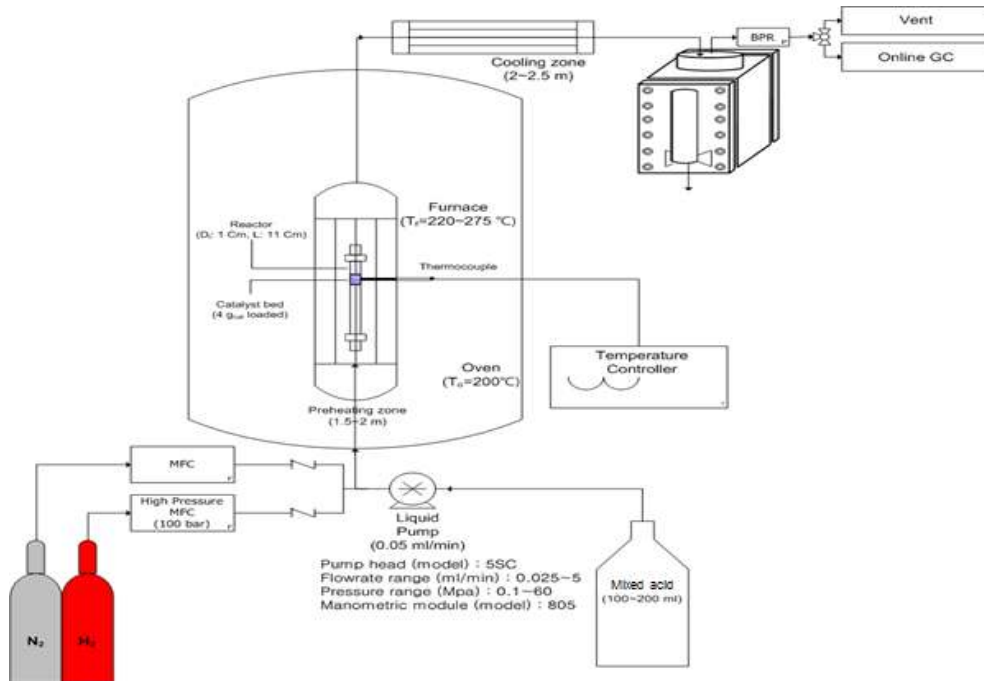
- 선택적인 혼합 알코올 생산을 위한 최적 반응 조건 결정
- 최적의 촉매 설계를 위한 촉매 스크리닝
- 아세트산 모델 반응을 이용한 촉매 반응 경로 파악
- 혼합 유기산 모델 반응을 이용한 촉매 반응 경로 파악
- 혐기성 소화 공정을 거친 혼합 유기산 모델 생성물의 전환을 통한 촉매반응 경로 파악

2. 연구 방법

가. 실험장치 및 재료

- 아세트산 (CH_3COOH), 프로피온산($\text{CH}_3\text{CH}_2\text{COOH}$), 부틸산($\text{CH}_3\text{CH}_2\text{CH}_2\text{COOH}$)은 Aldrich로부터 구매하여 정제 작업 없이 사용하였고, 상용 촉매인 Katalco 83-3M 을 사용하였다
- Katalco 83-3M 촉매의 조성은 $\text{CuO}/\text{XnO}/\text{Al}_2\text{O}_3 = 51/31/18$ wt%로 알려져 있다.
- 반응에 사용되는 수소 (H_2)와 질소 (N_2) 기체는 신양 산소에서 구매하여 사용하였다.
- [그림 5.4.1]과 같이, 수소와 질소 기체는 반응기에 들어가기 전에 혼합되며, 반응물인 아세트산은 액체 펌프를 거쳐 반응기로 주입되었다.
- 반응기는 오븐과 furnace의 이중 구조로 반응 온도를 조절하며, 반응 생성물은 냉

각되고 기상과 액상으로 분리한 후에 GC (Gas chromatography)로 조성을 분석하였다.



[그림 5-4-1] 실험 장치도.

나. 실험 절차

(1) 아세트산 모델 반응물 전환 반응

- 반응기내에 Katalco 83-3M 촉매를 분산하고, 350 ° C에서 2시간동안 수소분위기에서 환원.
- 촉매 반응기로 투입된 아세트산의 유량은 0.02-0.06 mL/min으로 촉매 투입량에 대해 WHSV(Weight-Hour-Space-Velocity)는 0.5-1.5 h⁻¹를 유지.
- 촉매 반응에 사용된 수소의 양은 아세트산의 20배(몰비)를 유지.
- 반응 온도는 250 ° C, 반응 압력은 40 bar를 유지.

(2) 혼합 유기산 모델 반응물 전환 반응

- 반응기내에 Katalco 83-3M 촉매를 분산하고, 350 ° C에서 2시간동안 수소분위기에서 환원.
- 촉매 반응기로 투입되는 혼합 유기산은 아세트산, 프로피온산, 부틸산이 1:1:1의 몰비로 혼합된 모델 반응물.

- 촉매 반응기로 투입된 혼합 유기산의 유량은 0.015 mL/min으로 촉매투입량에 대해 WHSV(Weight-Hour-Space-Velocity)는 0.35 h⁻¹를 유지.
- 촉매 반응에 사용된 수소의 양은 혼합유기산 전체 몰수의 20배(몰비)를 유지.
- 반응 온도는 250 ° C, 반응 압력은 40 bar를 유지.

(3) 혼합 유기산 반응물 전환 반응

- 반응기내에 Katalco 83-3M 촉매를 분산하고, 350 ° C에서 2시간동안 수소분위기에서 환원.
- 촉매 반응기로 투입되는 혼합 유기산은 아세트산, 1-프로피온산, 1-부틸산이 7:1:2의 질량비로 혼합된 모델 반응물.
- 촉매 반응기로 투입된 혼합 유기산의 유량은 0.05 mL/min으로 촉매 투입량에 대해 WHSV(Weight-Hour-Space-Velocity)는 1.2 h⁻¹를 유지.
- 촉매 반응에 사용된 수소의 양은 혼합유기산 전체 몰수의 20배(몰비)를 유지.
- 반응 온도는 250 ° C, 반응 압력은 40 bar를 유지.

3. 연구수행 결과

가. 아세트산 전환 모델 반응

해조류의 혐기성 소화 공정에 따른 생성물은 아세트산(CH₃COOH), 1-프로피온산(CH₃CH₂COOH), 1-부틸산(CH₃CH₂CH₂COOH) 등으로 구성된 혼합 유기산이며, 이 중 아세트산의 농도가 80% 이상으로 가장 많다. 따라서, 아세트산의 수소 첨가 탈산소화 반응에 의한 알코올화 반응은 혼합 유기산의 혼합 알코올로의 전환시에 주 반응으로 일어날 것이며 혼합 유기산의 반응을 살피기 전에 아세트산의 알코올화 반응을 모델 반응으로 그 특성을 분석하는 것은 적절할 것으로 예상되어, 아세트산의 알코올화 반응의 특성을 분석하였다.

선행연구로 진행된 부틸산(butyric acid, CH₃CH₂CH₂COOH)의 촉매 탈산소화 반응의 특성 분석으로부터[7] 아세트산의 수소 첨가 탈산소화 반응에서는 다음과 같은 반응이 일어날 것으로 예상된다.



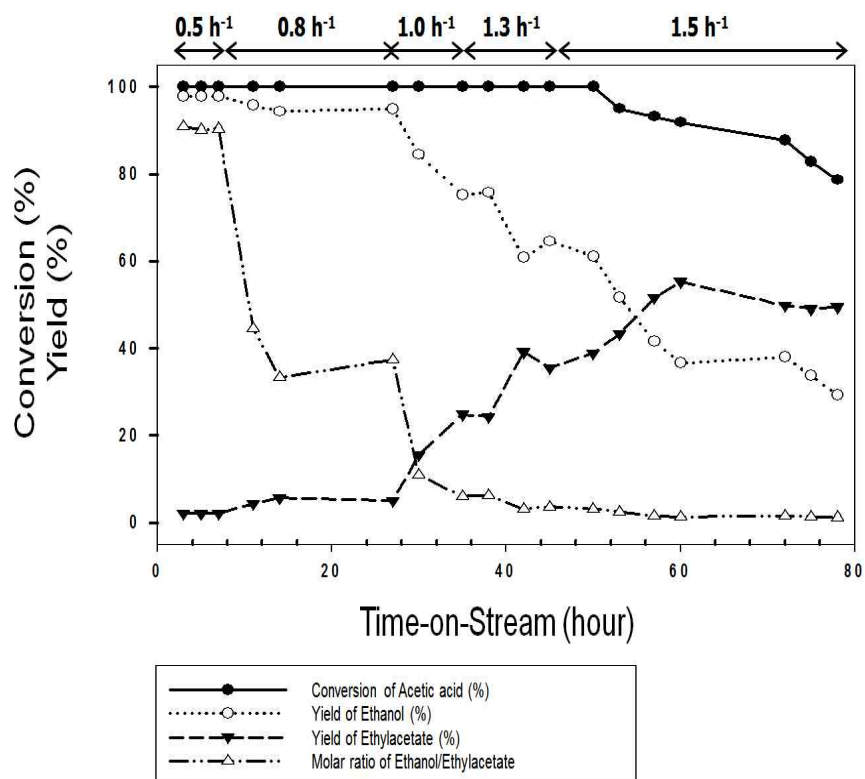
아세트산, 에탄올 결합에 의한 에틸아세테이트 생성



위의 반응 경로는 유기산의 알코올화 반응의 일반적인 경로로 알코올은 유기산과 수소의 반응으로부터 직접 생산되거나, 알코올과 유기산의 결합에 의해 생성되는 에스테르의 해리 분해후 수소와의 반응에 의해 생성되기도 한다. 따라서, 아세트산으로부터 에탄올을 선택적으로 제조하기 위해 중간 생성물인 에틸아세테이트($\text{CH}_3\text{COOCH}_2\text{CH}_3$)의 촉매화학적 전환을 촉진하여 에틸아세테이트의 수율을 낮추는 것이 필요함을 알 수 있으며, 촉매 개발은 위와 같은 반응 경로를 고려하여 이루어져야 한다. 만약, 유기산 반응물의 촉매반응기내 체류 시간이 짧으면 생성된 에스테르가 알코올로 전환할 충분한 시간을 얻지 못하여 다량의 에스테르를 얻게 된다. 본연구에서는 모델반응인 아세트산의 수소화 반응을 통해 에스테르 생성을 줄이고 알코올 생산을 늘이기 위해 유기산 반응물의 촉매반응기내 체류시간을 조절하여 최적의 반응 조건을 찾고자 한다. 이러한 결과를 통하여 혼합 유기산의 반응 연구를 위한 기초 결과를 얻어서 최적의 촉매를 제조하여 혼합 유기산으로부터 혼합 알코올을 얻는 최적 공정을 설계하고자 한다.

아세트산과 20당량의 수소를 혼합하여 촉매반응을 연속 공정으로 수행한 결과에 의하면, 촉매 존재하에 WHSV (Weight-Hour-Space-Velocity)를 조절하면서 반응을 수행하면, $\text{WHSV} < 1.3 \text{ hour}^{-1}$ 에서는 아세트산이 거의 100% 수소와 반응하여 탈산소화가 일어나는 것을 확인할 수 있었다([그림 5-4-2], [표 5-4-1]). 아세트산의 ~100% 전환율을 보여주면서 수소화 반응이 일어난다 하여도, WHSV가 증가하면 에탄올의 수율이 감소하고 에틸아세테이트의 수율이 증가하는 경향을 보였다. 연구 목표로 제시된 알코올 수율 85%를 달성하기 위해서는 0.8 또는 1.0 hour^{-1} 이하의 WHSV로 반응을 수행하여야 함을 알 수 있다. 이러한 알코올 수율 감소는 높은 WHSV에서 반응물의 반응기내 체류 시간이 짧아서, 에틸아세테이트의 분해 및 수소화가 일어날 만큼 충분한 시간동안 반응물이 촉매층에 머무르지 않아서 생기는 현상으로 에틸아세테이트의 촉매 표면에 흡착 속도를 증가시켜주거나 에틸아세테이트가 흡착할 촉매활성점을 늘여주기 위해 고분산된 촉매를 제조함으로써 해결할 수 있다. 따라서 에틸아세테이트의 해리흡착 속도를 높여주는 고분산된 촉매의 설계 및 활용을 통해 더욱 경제적인 화학촉매공정을 개발할 수 있을 것으로 예상된다. 반응물 유량을 증가시켜 WHSV를 1.0 또는 1.3 hour^{-1} 로 증가시키면 에탄올 수율이 급격히 감소하는 것을 알 수 있다. 비록 에탄올 수율은 감소하여도 아세트산의 전환율은 거의 100%에 가까워, $\text{WHSV} \leq 1.3 \text{ hour}^{-1}$ 에서 반응에 사용된 촉매의 비활성화는 거의 일어나지 않는다. 그러나, 반응물 유량을 더욱 증가시켜 WHSV가 1.5 hour^{-1} 에 이르면 아세트산의 전환율은 서서히 감소하면서 18시간이 지났을 때에 78.6%까지 감소하는 뚜렷한 촉매 비활성화를 보여주었다. 이때에 아세트산의 전환

율이 감소하면서 에틸아세테이트의 선택도와 수율이 모두 증가하는 경향을 보여주
어 촉매의 비활성화가 진행될수록 에틸아세테이트에서 에탄올로 전환하는 반응 속
도가 감소하는 것을 알 수 있다.



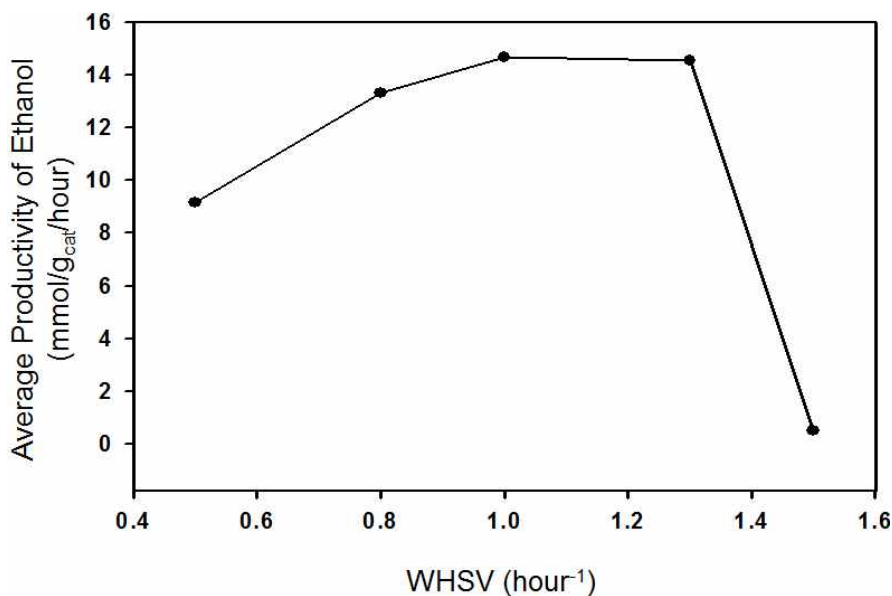
[그림 5-4-2] 아세트산의 수소화 반응 결과.

[표 5-4-1] 아세트산 수소화 반응 연속 공정 결과

시간 (hour)	WHSV (hour ⁻¹)	전환율 (%)	Ethanol 선택도 (%)	Ethyl Acetate 선택도 (%)	Ethanol 수율 (%)	Ethyl Acetate 수율 (%)	Ethanol/Ethyl Acetate 몰비	Ethanol 생산성 (mmol Ethanol/g _{cat} /hour)
3	0.5	100.0	97.8	2.15	97.8	2.2	90.8	9.16
5		100.0	97.8	2.17	97.8	2.2	90.1	9.16
7		100.0	97.8	2.17	97.8	2.2	90.4	9.16
11	0.8	100.0	95.7	4.29	95.7	4.3	44.6	13.43
14		100.0	94.3	5.66	94.3	5.7	33.3	13.24
27		100.0	94.9	5.08	94.9	5.1	37.3	13.32
30	1	100.0	84.5	15.53	84.5	15.5	10.9	15.81
35		100.0	75.2	24.85	75.2	24.8	6.0	14.07
38		100.0	75.7	24.28	75.7	24.3	6.2	14.17
42	1.3	100.0	60.8	39.18	60.8	39.2	3.1	14.23
45		100.0	64.5	35.46	64.5	35.5	3.6	15.10
50		100.0	61.1	38.88	61.1	38.9	3.1	14.30
53	1.5	95.0	54.5	45.53	51.7	43.3	2.4	14.53
57		93.2	44.7	55.33	41.6	51.5	1.6	11.69
60		91.9	39.8	60.17	36.6	55.3	1.3	10.27
72		87.7	43.2	56.77	37.9	49.8	1.5	10.65
75		82.8	40.7	59.28	33.7	49.1	1.4	9.46
78		78.6	37.1	62.87	29.2	49.4	1.2	8.20

이와 같은 반응 실험 결과로부터 화학촉매의 활성과 선택성을 측정할 수 있으나, 반응 유량 또는 WHSV의 변화를 통해 생기는 촉매화학공정의 경제성을 측정하기는 어렵다. 따라서, 본연구에 사용된 촉매의 경제성을 확인하는 한가지 방법으로 WHSV와 에탄올의 수율로부터 계산할 수 있는 에탄의 생산성을 측정하였다([그림 5-4-3]). 이때에 에탄올의 생산속도는 WHSV가 1.0과 1.3 hour⁻¹에서 1 g의 촉매에 대해 시간당 14.7과 14.5 mmol의 에탄올을 생산하여 가장 높은 에탄올 생산성을

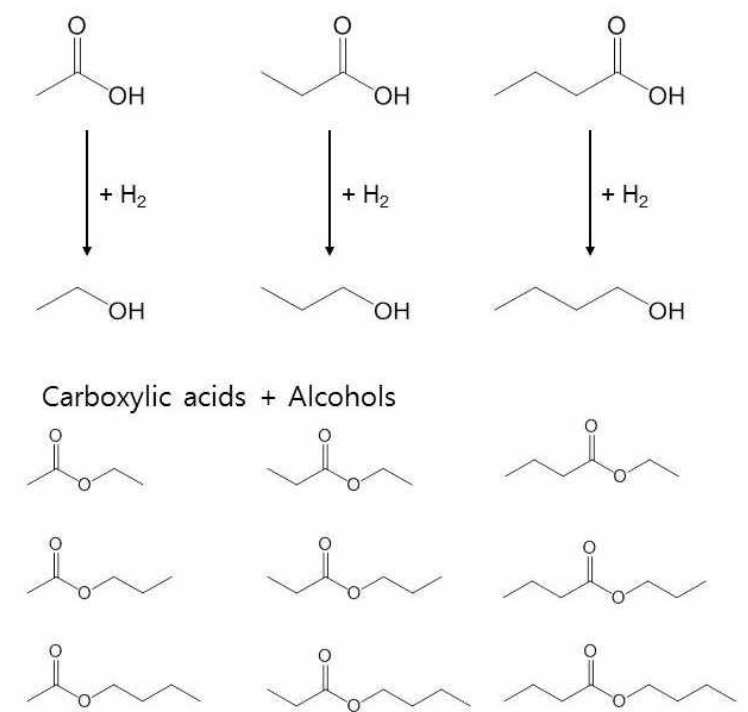
보였다. WHSV가 0.6, 0.8 hour⁻¹에서는 비록 높은 에탄올 수율과 낮은 에틸아세테이트 선택성을 보였지만 적은 반응 유량으로 인해 에탄올의 생산성은 떨어지는 결과를 보여주었다. 이러한 결과로부터 경제성있는 알코올 생산 공정 설계를 위해 단순한 에탄올 수율뿐만 아니라 전체 반응 속도와 반응물의 반응기내 체류 시간까지 고려하는 연구가 필요하다는 것을 알 수 있었다.



[그림 5-4-3] WHSV에 따른 에탄올 생성 속도.

나. 혼합유기산 전환 모델 반응

아세트산 전환 반응 결과를 바탕으로 다양한 혼합 유기산의 혼합 알코올로의 전환 반응을 확인하였다. 먼저, 유기산의 반응 조건하 수율을 확인하기 위해 Katalco 83-3M 촉매를 이용하여 아세트산, 프로피온산, 부틸산이 1:1:1의 몰비로 혼합된 모델 혼합 유기산을 혼합 알코올로 전환시켰다. 생성된 혼합 알코올은 GC를 이용하여 확인 및 정량하여 생성물 분포를 확인하였다([표 5-4-2]). 혼합산은 먼저 생성된 혼합 알코올과 반응하여 에스테르를 생성하는데, 3가지 유기산을 반응물로 이용한 본 연구에서는 9가지의 에스테르가 생성 가능하다([그림 5-4-4]).



[그림 5-4-4] 혼합 유기산의 수소화에 의한 반응 생성물.

[표 5-4-2] 연속 공정에서 혼합유기산 전환 모델 반응 결과*†

WHSV = 0.35 hour ⁻¹		2시간 후	5시간 후	7시간 후	9시간 후
전환율 (%)	C2-acid	100.0	100.0	100.0	100.0
	C3-acid	100.0	100.0	100.0	100.0
	C4-acid	100.0	100.0	100.0	100.0
수율 (%)	C2-ol	23.1	22.0	22.6	22.8
	C3-ol	28.7	27.5	26.2	28.1
	C4-ol	44.3	43.7	41.6	41.3
	(kg 알코올)/(톤 유기산)	781	756	736	751
	C2-acetate	0.4	0.7	0.5	0.5
	C3-acetate	0.5	0.7	1.1	0.8
	C4-acetate	0.5	0.7	0.9	0.7
	C2-propionate	0.5	0.6	0.9	0.8
C3-propionate	0.4	0.7	1.0	0.7	

C4-propionate	0.5	0.8	1.1	0.8
C2-butyrate	0.6	0.6	1.3	1.1
C3-butyrate	0.6	1.0	1.3	1.2
C4-butyrate	0.0	1.1	1.4	1.2
C2-ol 유래 에스테르	1.4	2.1	2.5	2.0
C2-acid 유래 에스테르	1.4	1.8	2.7	2.4
C3-ol 유래 에스테르	1.4	2.1	3.0	2.3
C3-acid 유래 에스테르	1.5	2.4	3.4	2.7
C4-ol 유래 에스테르	1.2	2.6	4.1	3.4
C4-acid 유래 에스테르	1.0	2.6	3.5	2.6

WHSV = 0.47 hour ⁻¹		1시간후	3시간후	6시간후
전환율 (%)	C2-acid	100.0	100.0	100.0
	C3-acid	100.0	100.0	100.0
	C4-acid	100.0	100.0	100.0
수율 (%)	C2-ol	18.9	17.0	15.5
	C3-ol	24.2	21.7	19.3
	C4-ol	37.2	34.2	30.7
	(kg 알코올)/(톤 유기산)	652	591	532
	C2-acetate	1.7	2.2	2.7
	C3-acetate	2.0	5.3	6.4
	C4-acetate	2.1	2.9	3.9
	C2-propionate	1.9	0.0	0.0
	C3-propionate	2.2	3.1	3.8
	C4-propionate	2.3	3.4	4.6
	C2-butyrate	2.5	2.9	3.5
	C3-butyrate	2.4	3.4	4.3
	C4-butyrate	2.6	4.0	5.4
	C2-ol 유래 에스테르	5.8	10.4	13.0

	C2-acid 유래 에스테르	6.1	5.1	6.2
	C3-ol 유래 에스테르	6.4	6.5	8.4
	C3-acid 유래 에스테르	6.7	11.7	14.5
	C4-ol 유래 에스테르	7.5	10.3	13.1
	C4-acid 유래 에스테르	7.0	10.3	13.8

WHSV = 0.7 hour ⁻¹		1시간후	2.5시간 후	4시간후	5시간후
전환율 (%)	C2-acid	82.0	80.3	78.6	65.1
	C3-acid	67.0	66.8	67.8	71.0
	C4-acid	61.4	60.6	61.4	64.9
수율 (%)	C2-ol	10.8	9.3	8.5	6.4
	C3-ol	11.7	9.5	8.5	8.1
	C4-ol	18.9	14.8	13.1	12.7
	(kg 알코올)/(톤 유기산)	337	275	247	221
	C2-acetate	2.2	2.9	3.2	3.3
	C3-acetate	4.9	6.1	6.7	7.0
	C4-acetate	3.0	3.7	4.0	4.2
	C2-propionate	0.0	0.0	0.0	0.0
	C3-propionate	2.9	3.7	4.2	4.5
	C4-propionate	3.6	4.5	5.1	5.5
	C2-butyrate	2.5	3.2	3.6	3.8
	C3-butyrate	3.2	4.1	4.6	5.0
	C4-butyrate	4.1	5.3	5.9	6.4
	C2-ol 유래 에스테르	10.1	12.7	13.9	14.5
	C2-acid 유래 에스테르	4.8	6.1	6.7	7.1
C3-ol 유래 에스테르	6.5	8.3	9.3	10.0	
C3-acid 유래 에스테르	11.0	13.9	15.6	16.6	
C4-ol 유래 에스테르	9.9	12.6	14.1	15.2	

	C4-acid 유래 에스테르	10.6	13.5	15.0	16.1
--	-----------------	------	------	------	------

WHSV = 0.94 hour ⁻¹		1시간후	2시간후	3시간후	
전환율 (%)	C2-acid	60.2	52.2	50.4	
	C3-acid	60.1	57.4	56.1	
	C4-acid	61.0	59.7	59.3	
수율 (%)	C2-ol	5.8	5.3	5.4	
	C3-ol	7.2	6.8	5.9	
	C4-ol	9.0	6.5	7.1	
	(kg 알코올)/(톤 유기산)		180	153	152
	C2-acetate	3.4	3.5	3.7	
	C3-acetate	7.2	7.2	0.0	
	C4-acetate	4.3	4.2	5.2	
	C2-propionate	0.0	0.0	0.0	
	C3-propionate	4.5	4.5	5.8	
	C4-propionate	5.5	5.5	6.0	
	C2-butyrate	3.2	3.7	5.6	
	C3-butyrate	4.2	3.8	3.0	
	C4-butyrate	6.2	6.3	8.5	
	C2-ol 유래 에스테르	14.9	14.9	8.9	
	C2-acid 유래 에스테르	6.7	7.2	9.3	
	C3-ol 유래 에스테르	10.0	10.0	11.9	
	C3-acid 유래 에스테르	15.9	15.5	8.9	
	C4-ol 유래 에스테르	13.7	13.8	17.1	
C4-acid 유래 에스테르	16.0	15.9	19.7		

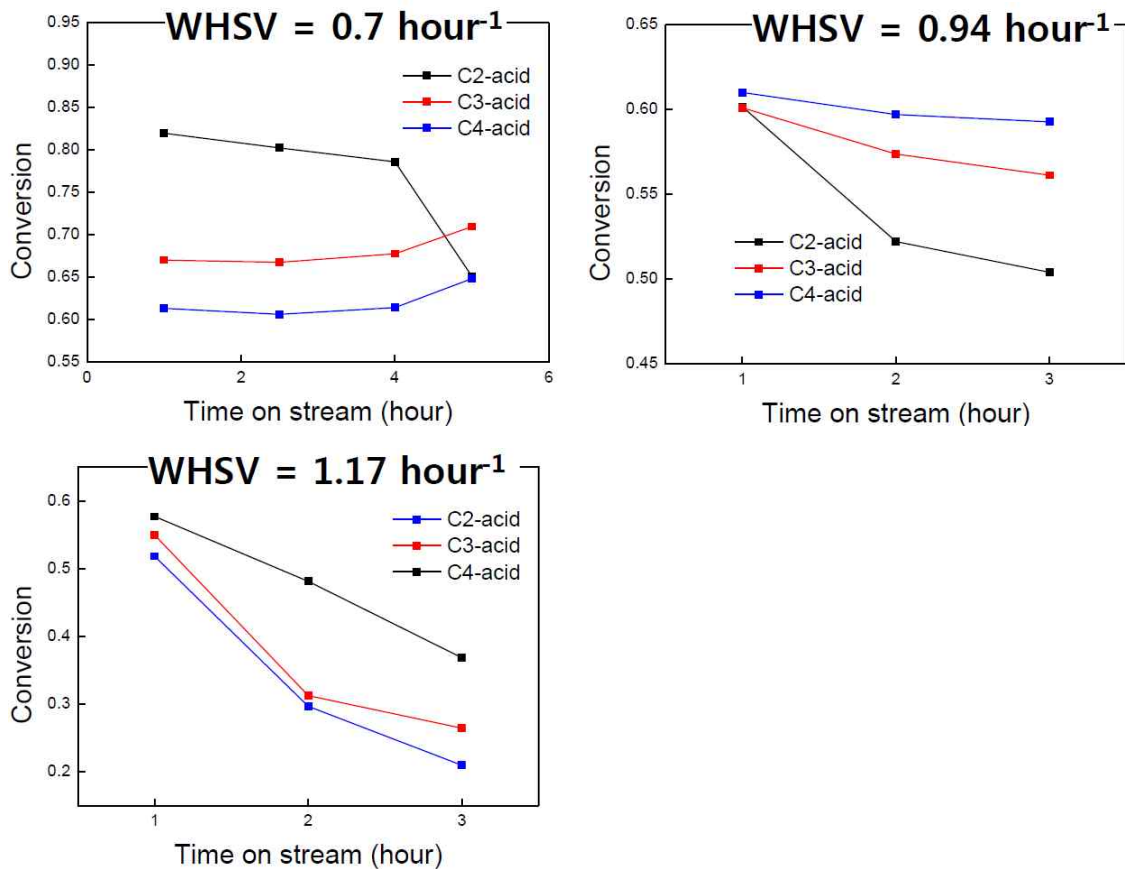
WHSV = 1.17 hour ⁻¹		0.5시간후	2시간후	3시간후
전환율 (%)	C2-acid	51.8	29.7	21.0
	C3-acid	54.9	31.3	26.5
	C4-acid	57.7	48.1	36.9

수율 (%)	C2-ol	4.2	2.5	1.8
	C3-ol	4.9	3.0	2.0
	C4-ol	6.4	3.4	2.7
	(kg 알코올)/(톤 유기산)	127	73	53
	C2-acetate	3.6	3.8	4.0
	C3-acetate	6.9	5.0	4.0
	C4-acetate	2.9	1.9	1.5
	C2-propionate	0.0	0.0	0.0
	C3-propionate	2.9	2.4	1.9
	C4-propionate	6.5	7.4	4.9
	C2-butyrate	3.7	1.8	1.3
	C3-butyrate	7.2	3.1	2.5
	C4-butyrate	6.0	4.1	3.1
	C2-ol 유래 에스테르	13.5	10.8	9.5
	C2-acid 유래 에스테르	7.4	5.6	5.3
	C3-ol 유래 에스테르	9.4	9.8	6.8
	C3-acid 유래 에스테르	17.1	10.5	8.5
C4-ol 유래 에스테르	16.9	9.0	7.0	
C4-acid 유래 에스테르	15.4	13.5	9.6	

*(선택도)=[(생성물이 포함된 탄소수)×(생성물의 농도)]/Σ[(각 반응물이 포함된 탄소수)×(반응물 투입 농도)]

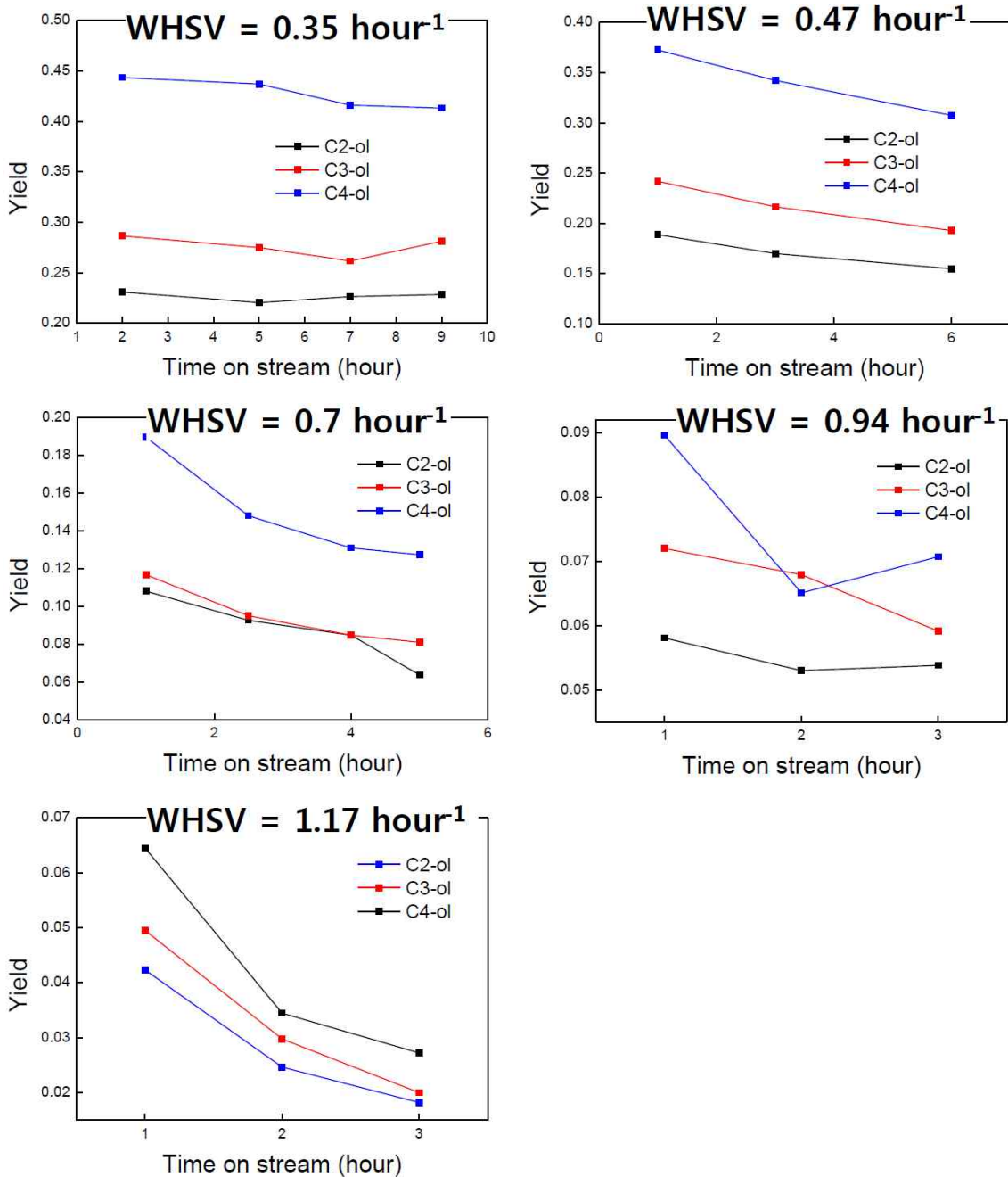
+ C2-ol: 에탄올, C3-ol: 1-프로판올, C4-ol: 1-부탄올, C2-acetate: 에틸아세테이트 (CH₃COOCH₂CH₃), C3-acetate: 프로필아세테이트 (CH₃CH₂COOCH₂CH₃), C4-acetate: 부틸아세테이트 (CH₃CH₂CH₂COOCH₂CH₃), C2-propionate: 에틸프로피오네이트 (CH₃COOCH₂CH₂CH₃), C3-propionate: 프로필프로피오네이트 (CH₃CH₂COOCH₂CH₂CH₃), C4-propionate: 부틸프로피오네이트 (CH₃CH₂CH₂COOCH₂CH₂CH₃), C2-butyrate: 에틸부티레이트 (CH₃COOCH₂CH₂CH₂CH₃), C3-butyrate: 프로필부티레이트 (CH₃CH₂COOCH₂CH₂CH₂CH₃), C4-butyrate: 부틸부티레이트 (CH₃CH₂CH₂COOCH₂CH₂CH₂CH₃), C2-acid: 아세트산, C3-acid: 1-프로피온산, C4-acid: 1-부틸산

[표 5-4-2]의 내용중 WHSV가 낮을 때에는 반응물의 촉매상 접촉 시간(contact time)이 길어서 유기산의 전환율이 100%에 도달하였다([그림 5-4-5]). 이때, 혼합 유기산 1톤에 대해 751 kg 이상의 혼합 알코올이 생산되었다. 그러나, WHSV가 0.7 hour^{-1} 이상일 때에는 유기산의 전환율이 100%에 도달하지 못하였고, 특히 WHSV가 0.94 hour^{-1} 이상일 때에는 유기산의 전환율이 시간이 흐름에 따라 점점 낮아지는 것을 확인할 수 있다. WHSV = 0.7 hour^{-1} 에서 전환율은 아세트산 > 1-프로피온산 > 1-부틸산의 순서였으며, 시간이 흐름에 따라 아세트산의 전환율이 크게 떨어졌으나 1-프로피온산과 1-부틸산의 전환율은 작은 폭으로 상승하였다. WHSV $\geq 0.94 \text{ hour}^{-1}$ 에서 전환율은 1-부틸산 > 1-프로피온산 > 아세트산의 순서였다. 초반에는 전환율이 서로 유사하나 시간이 흐름에 따라 아세트산의 전환율이 더 큰 폭으로 떨어졌다. 세 개의 유기산이 동일한 촉매 반응기 내에서 반응이 일어났으므로, 이러한 결과는 촉매의 비활성화가 진행될수록 촉매 표면 활성점이 아세트산보다 다른 두 유기산에 대해 더 선택적으로 흡착/반응을 허용하게 됨을 알 수 있다.



[그림 5-4-5] WHSV에 따른 혼합 유기산 전환율 변화 (WHSV = 0.35, 0.45 hour^{-1} 에서는 전환율 100%).

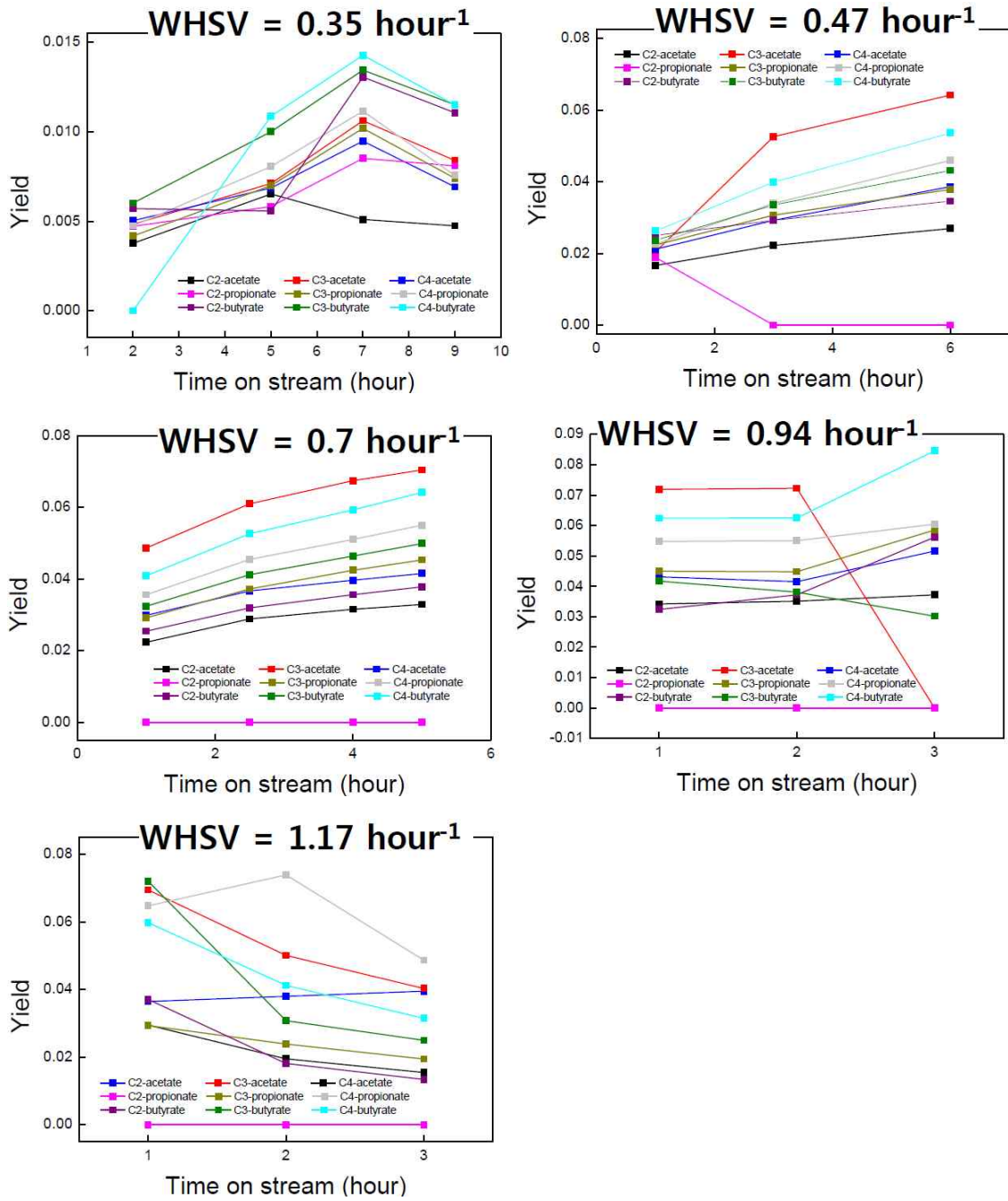
높은 WHSV에서 비활성화가 더 많이 진행되고 절대적인 반응 활성 정도도 낮음을 알 수 있는데, 혼합 유기산으로부터 얻어지는 수율도 낮아짐을 확인하였다 ([그림 5-4-6]). 유기산의 전환율이 100%였던 $WHSV = 0.35 \text{ hour}^{-1}$ 와 0.47 hour^{-1} 에서는 각각의 알코올의 수율도 이론적인 예측값인 에탄올 22.2%, 1-프로판올 33.3%, 1-부틸산 44.4%에 가까웠다. 그러나, 이때 유기산의 전환율은 실험이 진행된 시간동안 변하지 않았으나 알코올의 수율은 낮아지는 경향성을 보여서 비활성화가 어느 정도 진행됨을 확인하였다. WHSV가 0.7 hour^{-1} 에 도달하면 100%에 도달하지 못한 유기산 전환율 때문에 알코올의 수율도 낮아졌다. $WHSV = 0.7 \text{ hour}^{-1}$ 에서는 또한 1-프로판올의 수율이 상대적으로 더 낮음을 알 수 있다. WHSV가 0.94 hour^{-1} 보다 커지면 알코올의 수율이 10% 이하로 매우 낮아 졌다.



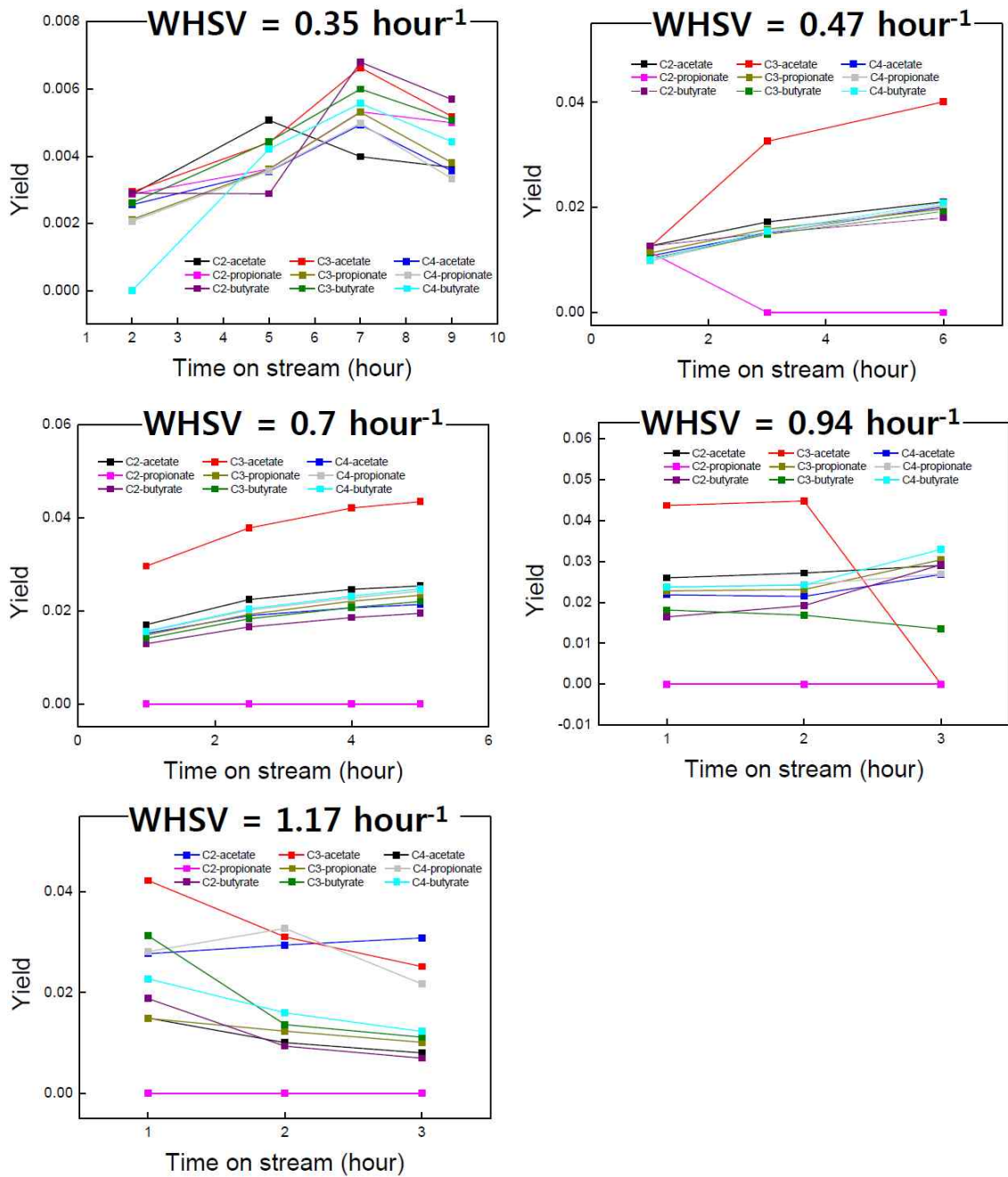
[그림 5-4-6] WHSV에 따른 알코올 수율 변화.

유기산의 알코올로의 전환에 따른 부산물로 생성되는 에스테르는 높은 유기산 전환율과 높은 알코올 수율을 나타내는 $\text{WHSV} = 0.35 \text{ hour}^{-1}$ 에서는 각 에스테르의 수율이 1.5% 미만이었다. 알코올의 수율이 낮아지기 시작하는 $\text{WHSV} = 0.47 \text{ hour}^{-1}$ 에서 각 에스테르의 수율이 최대 약 6.4%까지 증가하였으며, 시간이 흐름에 따라 에스테르의 수율이 증가하여 촉매의 비활성화가 진행됨을 확인할 수 있었다.

시간에 따라 에스테르의 수율이 증가하는 것은 $WHSV = 0.7 \text{ hour}^{-1}$ 에서도 나타나며 이때의 에스테르 수율은 $WHSV = 0.47 \text{ hour}^{-1}$ 에 비해 약간 증가하나 크게 차이가 나지 않는다. $WHSV = 0.94$ 와 1.17 hour^{-1} 에서도 각 에스테르의 수율은 유사하다. 이와 같은 결과로부터 촉매의 접촉 시간이 달라지면 알코올 수율은 크게 영향을 받으나, 에스테르의 수율은 크게 변하지 않음을 알 수 있다. 한가지 흥미로운 것은 대체로 카본기준 투입양이 상대적으로 많은 C4로부터 얻어지는 에스테르가 많으나, 이와는 달리 1-프로피온산과 에탄올로부터 유래하는 C3-acetate의 수율이 매우 높으나 반대로 에탄올과 1-프로판올로부터 유래하는 C2-propionate의 수율은 매우 낮다는 것이다. 이러한 차이는 탄소 기준 수율([그림 5-4-7])에서도 나타나지만, 몰수 기준 수율([그림 5-4-8])에서 더욱 명확히 나타난다. $WHSV = 0.45 - 1.17 \text{ hour}^{-1}$ 에서 다른 에스테르의 몰농도는 매우 유사하나, C3-acetate의 수율은 매우 높고, C2-propionate는 거의 나타나지 않는다. 이러한 반응물에 따른 촉매 반응성의 차이는 더 깊은 연구가 필요하며 이를 통해 촉매 화학 공정의 개발과 신촉매 개발에 기여할 수 있을 것으로 판단된다. 이에 더하여, 에스테르 농도는 $WHSV$ 가 0.94 hour^{-1} 보다 낮을 때에는 시간이 지나면서 증가하고, $WHSV$ 가 0.94 hour^{-1} 보다 높을 때에는 시간이 지나면서 감소한다. 이러한 경향은 에스테르의 농도가 매우 낮기 때문에 에스테르의 농도가 어떤 특별한 요소와 관련이 있다기 보다는, 알코올 수율의 변화나 유기산 전환율의 변화와 관련되어 있는 것으로 보인다.



[그림 5-4-7] WHSV에 따른 에스테르 수율 변화.

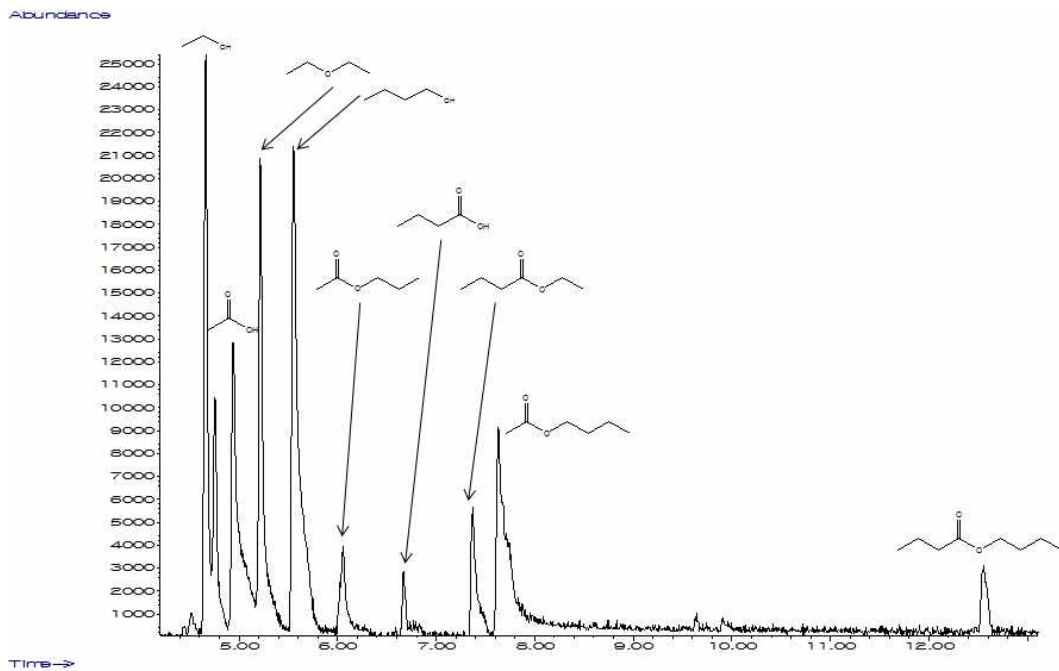


[그림 5-4-8] WHSV에 따른 에스테르 몰기준 수율 변화.

다. 혐기성 소화 공정에서 얻어진 혼합유기산 전환 모델 반응

위의 혼합 유기산 전환 모델 반응을 바탕으로 실제 혐기성 소화 공정에서 얻어지는 혼합 유기산의 구성 농도에 대해 유기산 전환 알코올 제조 공정을 실험해 보았다. 이전 생물화학공정에 의해 해조류 바이오매스를 혐기성 소화 공정으로 전환하면 아세트산, 1-프로피온산, 1-부틸산이 7:1:2의 무게비로 나옴을 확인하였다.

이 유기산 혼합물을 촉매 화학 반응을 거치게 하면, 혼합 유기산은 100% 전환되었고, 반응후 다양한 알코올과 에스테르가 생성되었다. GC/MS 결과에 의하면 에탄올, 1-프로판올, 1-부탄올이 생성되고, 그외 다양한 에스테르가 생성되지만, 1-프로피온산 반응물에서 유래하는 propionic acid ethyl ether ($\text{CH}_3\text{CH}_2\text{COOCH}_2\text{CH}_3$), propylpropionate ($\text{CH}_3\text{CH}_2\text{COOCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_3$), propionic acid butyl ether ($\text{CH}_3\text{CH}_2\text{COOCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_3$)는 검출되지 않았다. 또한 1-프로판올 유래 에스테르중 또다른 소량 물질인 1-부틸산과 반응하여 얻어지는 butyl propyl ether ($\text{CH}_3\text{CH}_2\text{CH}_2\text{COOCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_3$)도 나타나지 않았다. 이러한 결과로부터 혼합 알코올 제조시 투입되는 반응물의 양이 최종 생성물의 분포에도 영향을 줌을 알 수 있다 ([그림 5-4-9]). 정량적인 분석을 통한 실제 공정에의 적용은 모델 반응 분석과 함께 더 많은 분석이 필요하다.



[그림 5-4-9] 혼합 유기산 전환 혼합 알코올 제조 반응의 GC/MS 결과.

4. 요약 및 제언

생물학적 공정에 의해 얻어진 유기산을 알코올로 전환할 때에 혼합 유기산의 전환율은 WHSV가 감소할수록, 또는 반응물의 반응기내 체류 시간이 길수록 높아지는 결과를 보여주었다. WHSV가 증가하고 반응물의 반응기내 체류 시간이 짧아질수록 유기산의 전환율과 알코올의 수율이 모두 낮아지는 것을 확인하였다. 혼합

알코올의 수율은 아세트산의 전환율뿐만 아니라 중간 생성물 또는 부산물인 다양한 에스테르의 수율에 의해서도 결정되므로 아세트산과 에틸아세테이트가 흡착후 발생할 반응활성점의 개수를 나타내는 촉매의 표면적을 증가시키고 촉매 비활성화를 저지하여 촉매 표면적을 유지할 수 있는 촉매 설계를 시행하여 반응 공정의 활성 및 선택성을 향상시킬 수 있을 것이다.

5. 향후계획

유기산으로부터 알코올을 생산하기 위한 촉매 개발을 위해서, 혼합 유기산을 이용한 모델 반응을 통해 촉매 반응 경로 및 최적 촉매 설계를 시도하고자 한다. 이때 생성되는 최대 9개의 에스테르와 3개의 알코올의 선택성 및 수율의 변화를 연속 반응 시간, 반응물 유량, 반응 온도, 반응 압력 등의 변수에 따라 관찰하여 최적의 반응 조건을 찾을 것이다. 또한, 최대의 활성을 보여주거나 최소의 비활성화를 나타내는 촉매를 설계하여 합성하고 이를 통해 경제성과 알코올 생산성을 동시에 얻을 수 있는 촉매 반응을 설계하고자 한다.

제 5 절 급속 열분해공정 이용 바이오오일 생산기술 개발

1. 연구 목적 및 내용

가. 연구 목적

전년도 연구결과에 의하면 급속 열분해공정에서 해조류 바이오매스를 원료로 이용할 경우, 목질계 바이오매스에 비해 낮은 바이오오일 수율을 보이며 이는 해조류 바이오매스가 가지고 있는 물리·화학적 특성에 기인한다는 것을 확인할 수 있었다. 따라서 당해년도에는 바이오오일의 수율을 향상시키기 위해서 해조류 바이오매스의 물성을 효과적으로 개질할 수 있는 전처리 방안을 도출하고 또한 급속 열분해공정의 조업조건을 최적화하여, 최종적으로 해조류 바이오매스로부터 고수율 및 고품질의 바이오오일을 생산하기 위한 급속 열분해공정을 개발하고자 한다.

나. 연구 내용

해조류 바이오매스로부터 고수율 및 고품질의 바이오오일 생산기술 개발을 위한 세부 연구 목표 및 내용은 다음과 같다.

(1) 바이오오일 생산을 위한 해조류 바이오매스의 전처리 공정 도출

해조류 바이오매스의 물성을 개선하기 위해 다양한 전처리방법을 적용하여 처리전후의 해조류 바이오매스의 물리·화학적 특성 및 열적 동특성을 비교 검토하고, 이를 토대로 하여 최적의 전처리방법을 도출하고 전처리 공정변수를 최적화하고자 한다.

(2) 급속 열분해공정을 이용한 바이오오일 생산 실험 및 바이오오일 물성 분석

전처리 다시마 및 우뚝가사리를 이용하여 바이오오일 생산 실험을 수행하였으며, 공정 조건인 열분해 온도, 체류시간, 바이오매스 공급 속도 등을 변화시켜 가면서 최적의 운전 조건을 도출하고자 하였다. 또한, 생산된 바이오오일의 fractionation을 통하여 바이오오일 내에 포함된 다양한 화학물질을 확인하였으며, 또한 원소 분석, 발열량, 수분 분석 등을 통하여 연료로서의 이용 가능성을 평가하였다.

2. 연구 방법

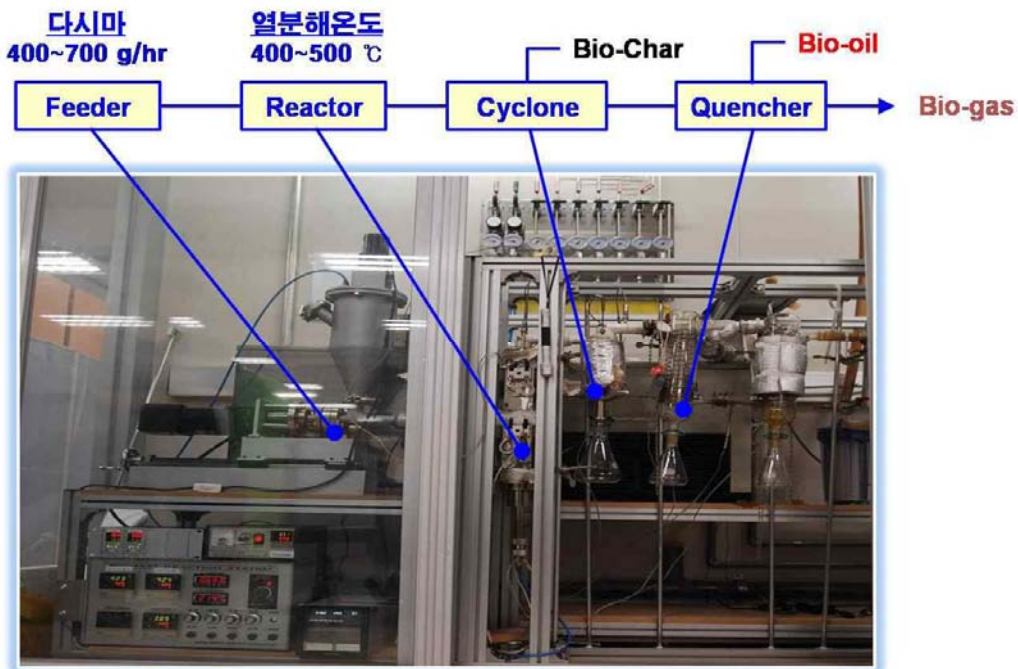
가. 실험 재료 및 장치

(1) 실험 재료

본 연구에서 사용된 해조류 바이오매스는 식용부위를 제외한 부분을 풍건 건조한 후에 분쇄한 다시마(완도산) 및 우뭇가사리(제주산)를 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 반응기다. [그림 5-5-1]에 나타난 것과 같이 급속 열분해 반응시스템은 크게 control box, feeder, fluidized-bed reactor, cyclone, quencher, filter로 구성되어 있다. 일반적으로 quencher에서 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 5-5-1] 급속 열분해 반응 시스템.

나. 실험 절차

(1) 해조류 바이오매스 전처리

Steel 재질의 반응기에 시료 5 g과 황산수용액 70 ml를 넣고 하기의 [표 5-5-1]에 조건에서 전처리 반응실험을 수행하였다. 반응이 종료된 후 여과를 통해 남은 시료를 회수하고 증류수로 세척한 후 동결건조기(Ilshin, TFD 5505)를 이용하여 잔여수분을 제거하였다.

[표 5-5-1] 전처리 실험 조건

	CS value			
	1.4	1.78	2.2	2.6
H ₂ SO ₄ Conc. (w/v)	1.6%	4%	10.25%	26%
Temperature	121 °C			
Time	180 min			

(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 10 L/min의 질소로 1시간 동안 purge하여 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. 바이오가스의 성분을 분석하기 위해서 실험 시작 후 15분과 45분에 gas sampler를 통해 가스를 sampling하였으며 운전 종료 후 1시간 동안 실험 조건으로 purging하였다.

우뭇가사리를 이용한 바이오오일 생산 실험에서는 주요 운전 변수인 열분해 온도, 최소 유동화 속도 비, feeding rate을 변화시켜가면서 그 영향을 살펴 보았으며, 전처리된 다시마의 경우에는 시료의 밀도 및 주요 열분해온도 구간을 고려하여 열분해 온도 400 °C, 최소화 유동화 속도비(U_0/U_{mf}) 14, feeding rate 300 g/hr 인 조건에서 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 정칭하여 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 mg 이하가 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 5-5-2]에 요약하였다.

[표 5-5-2] 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
Column	Porapak Qs (C, H, N, S), Molecula sieve 5A (O)

(3) 발열량 분석

바이오매스 및 바이오오일의 발열량은 원소분석 결과를 기초로 하여 아래의

Dulong's equation을 이용하여 계산하였다.

$$\text{Heatingvalue (Kcal)} = 8100 \times C + 43250 \times (H - (O \div 8)) + 2250 \times S$$

(4) 열분해 생성물 분석

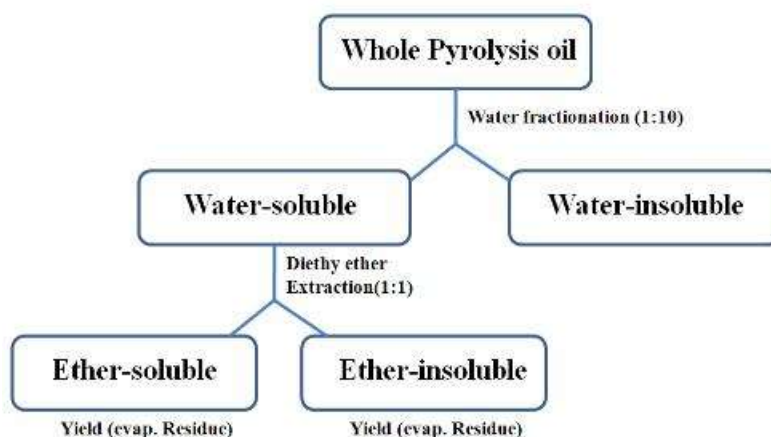
생성된 바이오가스의 정성 및 정량 분석을 위해 GC 분석을 실시하였다. 검출기로는 TCD (Molecular sieve 5A)와 FID (Carboxen 1000)를 사용하였으며 TCD에서는 H₂, N₂를 분석하였고, methanizer가 장착된 FID에서는 CO, CO₂, C1~C3 까지의 탄화수소를 분석하였다. 생성된 바이오오일은 원소분석, 수분 함량 분석, 발열량 분석 및 정성 분석을 수행하였다. 바이오오일 내의 수분 함량 분석은 Volumetric Karl Fisher (KF) titration method의 일종인 ASTM E 203법에 준하여 측정하였다.

(5) 바이오오일의 화학적 조성 분석

바이오오일은 다양한 작용기를 가지고 있는 혼합물로 바이오오일내에 포함되어 있는 다양한 화학물질을 좀 더 명확하게 확인하기 위해 생성된 바이오오일을 water-insoluble (WIS), water-soluble/ether-soluble (WS/ES), water-soluble/ether-insoluble fraction (WS/EIS) 으로 분별하였다([그림 5-5-2]). 1차적으로 회수된 바이오오일의 수용성성분과 비수용성 성분을 분리하기 위해 오일 내부에 포함된 유기물 무게의 10배의 물을 천천히 저어주며 첨가하였다. 물이 첨가된 오일을 원심분리기에 넣고 10000 rpm의 조건에서 30분 동안 분리한 후, 물에 녹은 액상 성분만 분리하였고 침전된 비수용성 물질은 vacuum oven에서 40 °C 이하의 조건으로 건조한 후 무게를 측정하여 정량하였다. 물에 용해된 바이오오일은 다시 diethylether를 이용하여 diethylether에 녹는 부분과 아닌 부분으로 분리하였다. 이때 물에 용해된 바이오오일과 diethylether의 혼합비는 1:1(v/v) 이었으며 diethylether에 용해된 부분만을 채취하여 vacuum oven에서 40 °C 이하의 조건으로 건조해 diethylether를 전부 제거하였다. 이후 건조된 샘플의 무게를 측정하여 수용성이면서 diethylether에 용해된 부분만을 정량하였다. 분리하지 않은 바이오오일은 1:10(v/v) 비로 아세톤에 희석하여 시료화 하였으며 오일 분리 후 비수용성 성분은 1:10(w/v)비로 아세톤에 희석하여 시료화 하였다. 수용성이면서 diethylether에 용해된 부분은 1:5(v/v)비로 아세톤에 희석하여 시료화 하였으며 수용성이면서 diethylether에 용해되지 않은 부분은 별도로 아세톤에 희석하지 않고 물에 녹아 있는 상태 그대로 시료화 하였다.

분별 후의 각 fraction에 포함되어 있는 화학물질은 GC/MS (Claus 600MS, Perkin-elmer, Column : HP-5MS 30 m × 0.25 mm, film thickness 0.25 μm)를 이용

하여 분석하였으며, NIST 2.0 library를 이용하여 각각의 peak를 확인하였다. 각 fraction은 100종 이상의 화합물을 포함하고 있었으며, 각각의 peak는 reference library와 비교하여 85% 이상의 일치도를 보이는 것만 정성 및 정량분석에 사용하였다. [표 5-5-3]에 자세한 분석 조건을 나타내었다.



[그림 5-5-2] 바이오오일 분별 방법.

[표 5-5-3] 바이오오일 정성 분석 조건

Gas chromatograph	
Instrument	Claus 600MS, Perkin-elmer
Column	HP-5MS
Description	30 m × 0.25 mm, film thickness : 0.25 μ m
Carrier gas	He, 1 ml
Split ratio	1:50
Oven program	40 °C (5 min)→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

[표 5-5-4]에 본 연구의 주 실험재료인 다시마와 전처리된 다시마 및 우뭇가사리의 물리·화학적 특성 분석 결과를 나타내었다. 먼저 전처리된 다시마의 물리·화학적 특성을 처리전 다시마와 비교하면, 겉보기 밀도는 전처리 후 약 65%가 감소되었으며, 공업 분석 결과 전처리된 다시마는 휘발분의 함량이 약 15% 정도 증가하였으며 회분의 함량도 약 5% 정도 감소하였으므로 실제 급속 열분해반응을 통한 바이오오일 생산시에 전처리된 다시마를 이용하면 더 높은 바이오오일 수율을 얻을 수 있을 것이라고 생각된다. 또한, 원소 분석 결과를 살펴 보면, 전처리된 다시마의 경우 탄소의 함량은 증가하고 산소의 함량은 약 10% 정도 감소하였으므로 바이오오일에 다량 포함되어 있는 수분의 함량이 감소될 것이라고 생각된다.

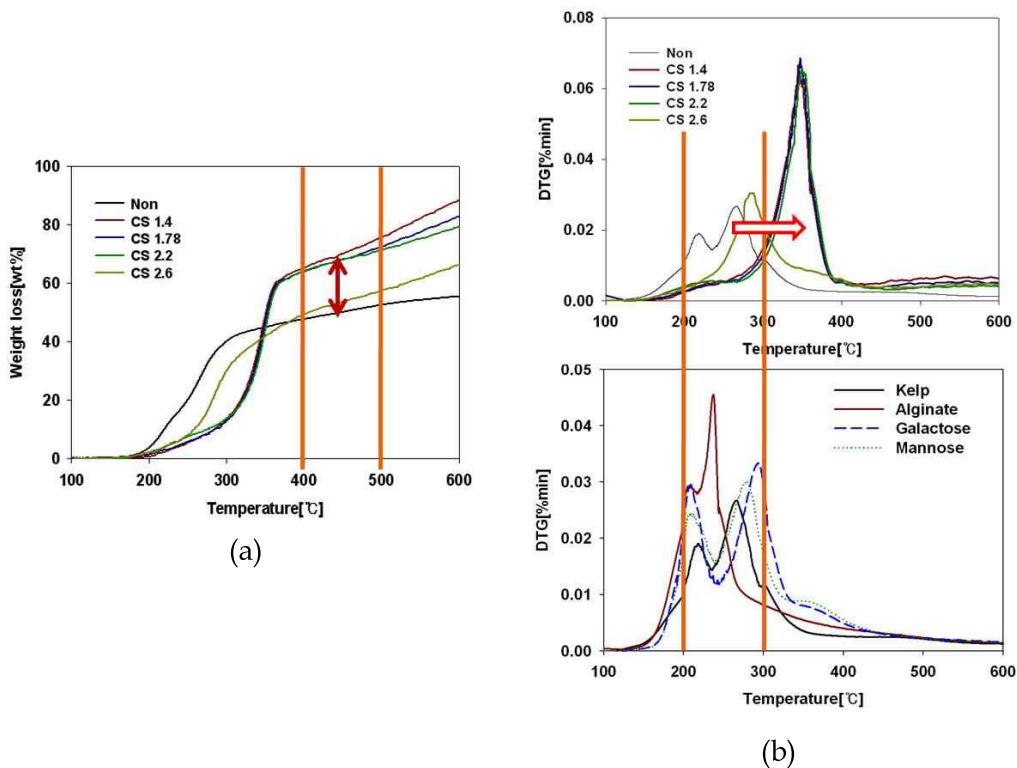
우뭇가사리의 경우에는 밀도는 처리 전 다시마와 비슷하였으며, 다시마와 비교하였을 때 휘발분의 함량이 높고 회분의 함량이 매우 낮은 결과를 나타내었다. 또한, 원소 분석 결과 산소 함량은 다시마에 비해 약간 높지만 탄소 함량이 다시마에 비해 약 7% 정도 높은 결과를 나타내었다. 따라서, 급속열분해를 이용한 바이오오일 생산에 우뭇가사리를 원료로 사용할 경우 처리 전 다시마보다 높은 바이오오일 수율을 얻을 수 있을 것이라고 판단된다.

[표 5-5-4] 다시마 및 우뭇가사리 물리화학적 특성

		다시마 (처리 전)	다시마 (처리 후)	우뭇가사리
물성	Bulk density [g/cm ³]	0.57	0.2	0.61
	HHV [kJ/kg]	12.7	18.9	15.0
공업 분석 [wt%]	수분	6.1	-	10.1
	휘발분	71.0	81.3	85.2
	회분	22.9	17.8	4.8
원소 분석 [wt%]	C	35.19	46.24	42.25
	H	5.51	5.98	6.0
	O	40.48	30.0	44.39
	N	1.39	1.29	2.7
	S	0.48	-	0.7

나. 전처리 다시마의 열적 동특성

전처리 조건에 따른 다시마의 열분해 특성을 파악하고 이를 급속 열분해 실험의 기초 데이터로 활용하기 위해 TGA 분석을 수행하였다. [그림 5-5-3]에 전처리 전 다시마와 전처리 조건에(CS 값) 따른 다시마의 열중량 분석 결과를 나타내었다. 전처리된 다시마의 경우에 급속 열분해 조업조건인 400~500 °C 구간에서의 열중량 변화가 약 20% 정도 증가하는 현상을 나타냈으며[표 5-5-5], 주요 열분해 구간도 전처리 전 다시마와 비교하였을 때 고온영역인 280~400 °C 구간으로 이동하는 것을 확인할 수 있었다. DTG 분석 결과를 살펴보면[그림 5-5-3(b)], 전처리 전 다시마의 경우에는 230 °C와 260 °C 부근에서 명확한 피크를 확인할 수 있었지만, 전처리된 다시마는 이 두 피크가 사라지면서 250 °C 부근에서의 넓은 피크와 350 °C 부근에서 뚜렷한 피크가 나타나는 것을 관찰할 수 있었다. 이는 전처리를 통해 다시마를 구성하고 있는 주요 성분에 변화가 일어났음을 의미하며 alginate, mannose, galactose 등의 DTG 곡선과 비교한 결과, 전처리 후 다시마의 주요 성분 중의 하나인 alginic acid가 추출 및 분해되었다고 생각된다. 따라서 상기결과로부터 전처리 방법이 다시마의 물리·화학적 특성을 변화시키는데 효과적이라고 판단되며, 전처리된 다시마 시료를 원료로 사용하여 바이오오일 생산 실험을 수행하였다.



[그림 5-5-3] 전처리 다시마의 열적 동특성 분석결과: (a) TG, (b) DTG.

[표 5-5-5] 중량 감소 비교

	처리전	CS 1.4	CS 1.78	CS 2.2	CS 2.6
400 °C [wt%]	47.7	65.2	64.3	64.0	49.3
500 °C [wt%]	52.6	75.8	72.3	71.4	57.5

다. 급속 열분해 공정을 이용한 바이오오일 생산

(1) 전처리 다시마를 이용한 바이오오일 생산

상기의 물리·화학적 특성 분석 및 TGA 분석을 통한 열분해 동특성을 고려하여 열분해 온도 400 °C, 최소화 유동화 속도비(U_0/U_{mf}) 14, feeding rate 300 g/hr 인 조건에서 급속 열분해실험을 수행하였다. 전처리 전후의 다시마를 이용한 급속 열분해 실험에서의 열분해 생성물 분포를 비교하면, 바이오가스의 수율은 전처리 전후에 큰 변화를 나타내지 않았으며, 바이오오일의 수율은 약 9% 정도 향상되었으며 이에 따라 좌의 수율이 약 9% 정도 감소된 결과를 얻을 수 있었다([표 5-5-6]). 따라서, 다시마를 적절한 방법으로 전처리함으로써 바이오오일의 수율을 향상시킬 수 있다는 가능성을 확인하였으며 향후에는 급속 열분해공정의 주요 변수에 대한 영향을 파악하고 최적 조건을 찾기 위한 연구를 수행할 계획이다.

[표 5-5-6] 전처리 전후 다시마의 열분해 생성물 비교

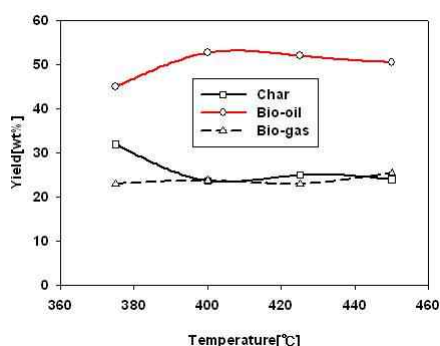
	다시마 (처리 전)	다시마 (전처리 후)
Bio-oil yield [wt%]	37.4	46.7
Bio-gas yield [wt%]	27.3	28.3
Char yiled [wt%]	35.3	25.0

(2) 우뚝가사리를 이용한 바이오오일 생산

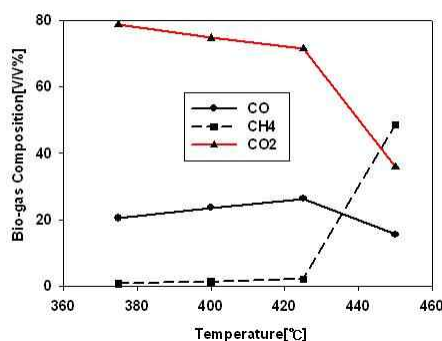
(가) 열분해 온도

우뚝가사리의 열분해 특성을 고려하여 열분해 온도는 375~450 °C로 변화시

켜 주었으며, feeding rate 600 g/hr, 최소 유동화속도 비는 21.5로 일정하게 유지하였다. [그림 5-5-4]에 열분해 온도 변화에 따른 생성물의 수율과 바이오가스의 조성을 나타내었다. 액상 생성물인 바이오오일의 수율은 열분해 온도가 375 °C에서 400 °C로 증가하였을 때 최대인 약 52.7%를 나타내었으며, 그 이상의 온도에서는 천천히 감소하는 경향을 나타내었다. 촉의 수율은 열분해 온도가 375 °C에서 400 °C로 증가하였을 때 급격히 감소하였으며 그 이상의 온도에서는 거의 일정한 값을 보였으며, 바이오가스는 온도에 상관없이 거의 일정한 값을 나타내었다. 생성된 바이오가스의 주 성분은 이산화탄소, 일산화탄소, 메탄 등이며 C2 이상의 탄화수소류는 거의 검출되지 않았다. 열분해 온도가 425 °C 이상인 구간에서 이산화탄소의 조성비가 급격히 감소하고 상대적으로 메탄의 조성비가 크게 증가하는 경향을 나타내었다. 이는 온도가 증가함에 따라 중간 생성물인 pyrolysis vapor가 cracking 되었기 때문이라고 생각된다.



(a) 생성물 수율

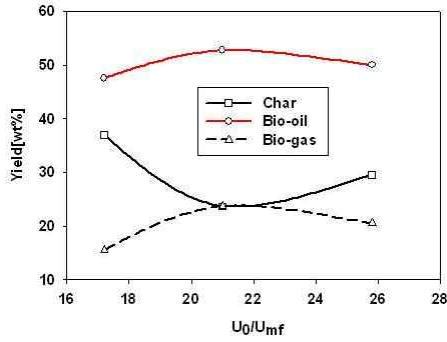


(b) 바이오가스 조성

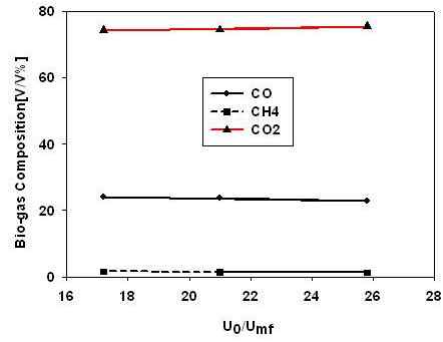
[그림 5-5-4] 생성물 수율에 대한 온도의 영향.

(2) 최소 유동화속도 비

급속 열분해 반응에서 1차 열분해로 생성되는 pyrolysis vapor의 체류시간에 영향을 주는 최소 유동화속도 비를 변화시켜 가면서 열분해 생성물의 분포를 살펴 보았다. 상기 결과에서 최대 바이오오일 수율을 보이는 열분해 온도인 400 °C, feeding rate 600 g/hr 조건에서 최소 유동화속도 비를 17~26으로 변화시켜 가면서 실험을 수행하였다. [그림 5-5-5]에 최소 유동화속도 비가 생성물의 수율 및 바이오가스 조성에 미치는 영향을 나타내었다. 최적의 최소 유동화속도 비는 21.5 이었으며 이 때 52.7%의 바이오오일을 얻을 수 있었다. 또한, 최소 유동화속도 비는 생성된 바이오가스의 조성에 큰 영향을 미치지 않음을 확인하였다.



(a) 생성물 수율

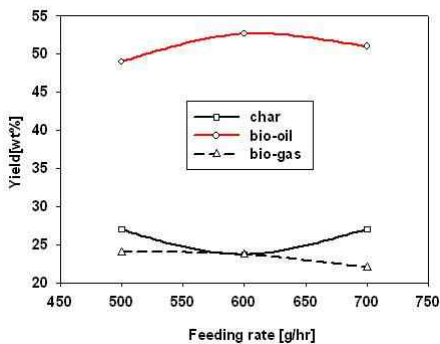


(b) 바이오가스 조성

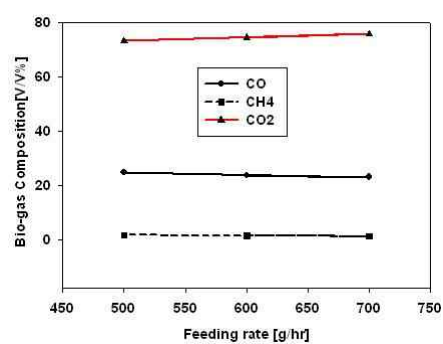
[그림 5-5-5] 생성물 수율에 대한 최소 유동화속도 비의 영향.

(3) Feeding rate

상기 결과로부터 최소 유동화 속도 비는 21.5, 열분해 온도는 400 °C로 고정하고 feeding rate을 500~700 g/hr로 변화시켜 가면서 실험하였다. [그림 5-5-6]에 다시마의 feeding rate이 생성물의 수율 및 바이오가스 조성에 미치는 영향을 나타내었다. 다시마의 feeding rate이 500 g/hr에서 700 g/hr로 증가함에 따라 바이오오일의 수율이 약 4% 정도 향상되어 600 g/hr일 때 52.7%를 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 5-5-6] 생성물 수율에 대한 feeding rate의 영향.

라. 바이오오일 특성 분석

(1) 바이오오일의 물리·화학적 특성

전처리 전후의 다시마 및 우뭇가사리로부터 생산된 바이오오일의 물리·화학적 특성을 분석하고 비교하였다([표 5-5-7]). 먼저, 전처리된 다시마로부터 생산된 바이오오일의 원소 분석 결과, 질소와 황은 모두 검출한계 미만으로 검출되지 않았으며 처리전 다시마로 생산된 바이오오일과 비교하였을 때 산소의 함량은 감소하고 탄소의 함량이 증가한 결과를 나타내었다. 이로 인해 바이오오일의 발열량도 약간 증가한 결과를 나타내었다. 또한, 전처리로 인해 바이오오일내 수분의 함량이 감소하여 수분을 제외한 유기화합물의 수율이 향상된 것을 확인할 수 있었다. 우뭇가사리 유래 바이오오일은 다시마 유래 바이오오일과 비교하였을 때 낮은 산소 및 수분 함량과 높은 탄소 함량을 나타내었으며 발열량도 약 2 kJ/kg 정도 증가하였기 때문에 연료적인 측면에서는 우뭇가사리 유래 바이오오일이 더 유리하다고 판단된다.

하지만, 기존의 화석연료와 비교하였을 때는 여전히 높은 수분 및 산소함량을 보이며 발열량도 약 1/4 수준이므로 해조류 바이오매스로부터 생산된 바이오오일을 연료로서 활용하기 위해서는 수분을 제거하고 높은 산소함량을 감소시키기 위한 연계 공정에 대한 연구가 필요하다고 판단된다.

[표 5-5-7] 다시마 및 우뭇가사리 유래 바이오오일의 물리·화학적 특성 비교

		다시마 (처리전)	다시마 (전처리 후)	우뭇가사리	Fossil oil
Elemental analysis [wt%]	C	16.23	20.38	24.33	86.0
	H	10.18	8.96	8.75	13.6
	O	63.87	56.87	54.04	0.0
	N	-	-	2.14	0.2
	S	-	-	-	<0.18
Water [wt%]		70.7	63.1	55.8	0.1
Higher heating value [kJ/kg]		8.68	9.68	11.15	40.0

(2) 바이오오일의 화학적 조성

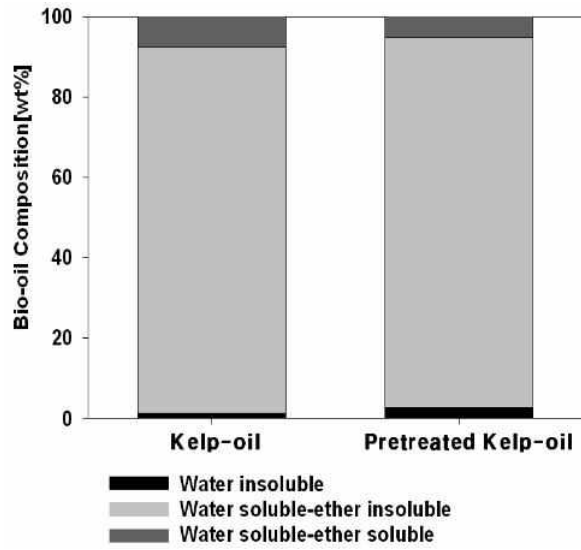
(가) 다시마 유래 바이오오일

바이오오일내에 포함되어 있는 다양한 화학물질을 좀 더 명확하게 확인하기 위해 생성된 바이오오일을 water-insoluble (WIS), water-soluble/ether-soluble (WS/ES), water-soluble/ether-insoluble fraction (WS/EIS) 으로 분별하였다. [그림 5-5-7]에서 알 수 있듯이, 다시마 유래 바이오오일은 대부분이 WS fraction이며 전처리된 다시마 유래 바이오오일도 각 fraction의 조성비가 거의 큰 차이가 없음을 확인할 수 있었다.

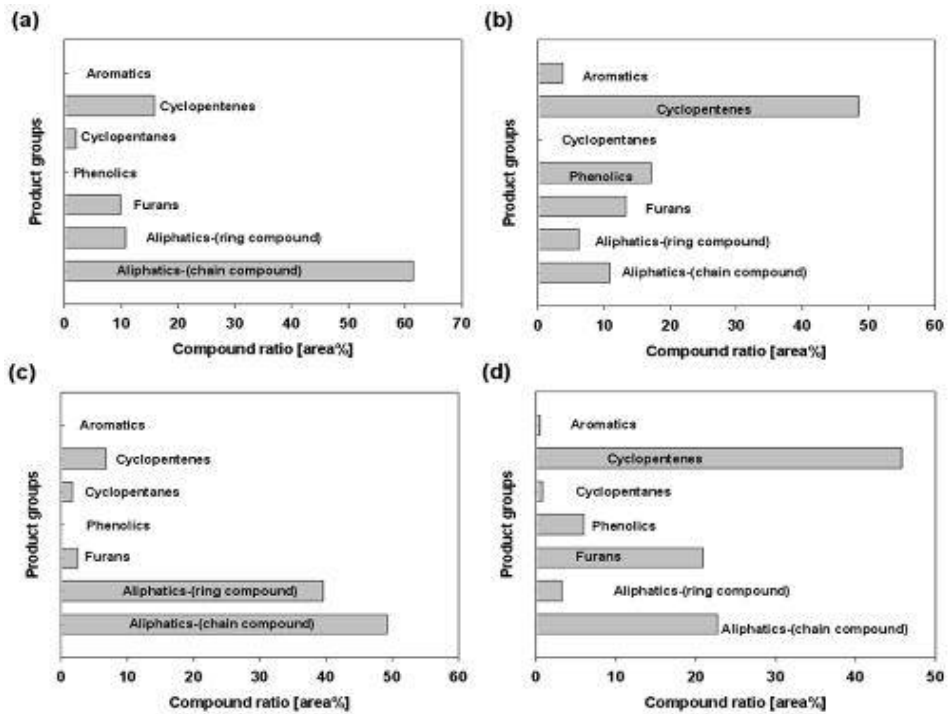
상기에서 얻은 각각의 fraction을 GC/MS를 이용하여 분석 후 구성 성분을 크게 aliphatics, aromatics로 구분하였으며, aromatics 화합물 중 phenol 그룹을 포함하는 화합물은 별도로 표시하였다. Aliphatics의 경우에는 크게 chain compound 및 ring compound로 구분하였으며, ring compound 중 cyclopentane, cyclopentene 및 furan 그룹을 포함하는 화합물은 별도로 분류하여 표시하였다.

다시마 유래 바이오오일의 경우에는 목질계 바이오매스와 달리 aromatics 계열의 화합물이 거의 검출되지 않았으며 대부분 aliphatics 계열의 화합물이 생성된 것을 확인할 수 있었으며 그 순서는 aliphatics (chain) > cyclopentanens > aliphatic (ring) > furans > cyclopentanes 이었다([그림 5-5-8, 표 5-5-8]). 이는 해조류 바이오매스와 목질계 바이오매스를 구성하고 있는 주요 구성성분의 화학 구조가 다르기 때문이다. 즉, 다시마와 같은 해조류 바이오매스는 페놀계 고분자 구조를 갖고 있는 리그닌(목질계 바이오매스의 대표적인 구성성분)과 같은 구성성분을 가지고 있지 않기 때문에 aromatics 계열의 화합물이 거의 생성되지 않았다고 생각된다.

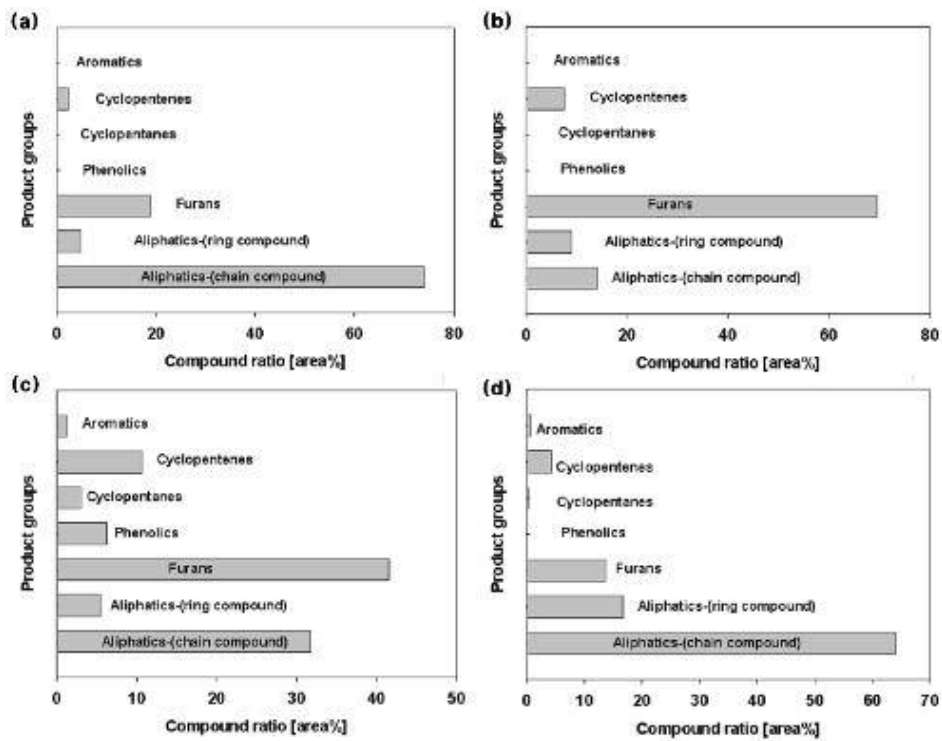
전처리된 다시마 유래 바이오오일의 경우에도 상기결과와 마찬가지로 대부분 aliphatics 계열의 화합물이 검출되었으며, 그 순서는 aliphatics (chain) > furans > aliphatic (ring) > cyclopentenes 이었다([그림 5-5-9], [표 5-5-8]). 하지만, 상기의 처리전 다시마 유래 바이오오일과 달리 aliphatics (chain) 계열 및 furan 계열의 화합물이 증가하였으며 cyclopentenes 계열 화합물이 감소하였다. 이는 전처리를 통하여 다시마의 구성성분 및 구조에 변화가 일어났기 때문이라고 생각된다. 전처리 후의 TGA 분석 결과를 살펴 보면 전처리 후 다시마의 형태를 유지하는 역할을 하는 주요 구성성분 중의 하나인 alginate가 상당부분 제거되었을 것이라고 생각되며, 즉 이로 인해 전처리된 다시마 유래 바이오오일의 주요 화학성분이 변화되었다고 생각된다. 하지만, 이를 좀 더 명확히 규명하고 전처리에 따른 바이오오일의 주요 화학물질을 예측하기 위해서는 열분해 생성물의 생성 메커니즘에 대한 연구가 필요하다고 판단된다.



[그림 5-5-7] 바이오오일 분별.



[그림 5-5-8] 분획 후 바이오오일 성분 분석(처리전 다시마): (a) whole oil, (b) water-insoluble, (c) water-soluble/ether-insoluble, (d) water-soluble/ether-soluble.



[그림 5-5-9] 분획 후 바이오오일 성분 분석(전처리 다시마): (a) whole oil, (b) water-insoluble, (c) water-soluble/ether-insoluble, (d) water-soluble/ether-soluble.

[표 5-5-8] 다시마 유래 바이오오일의 주요 구성 물질

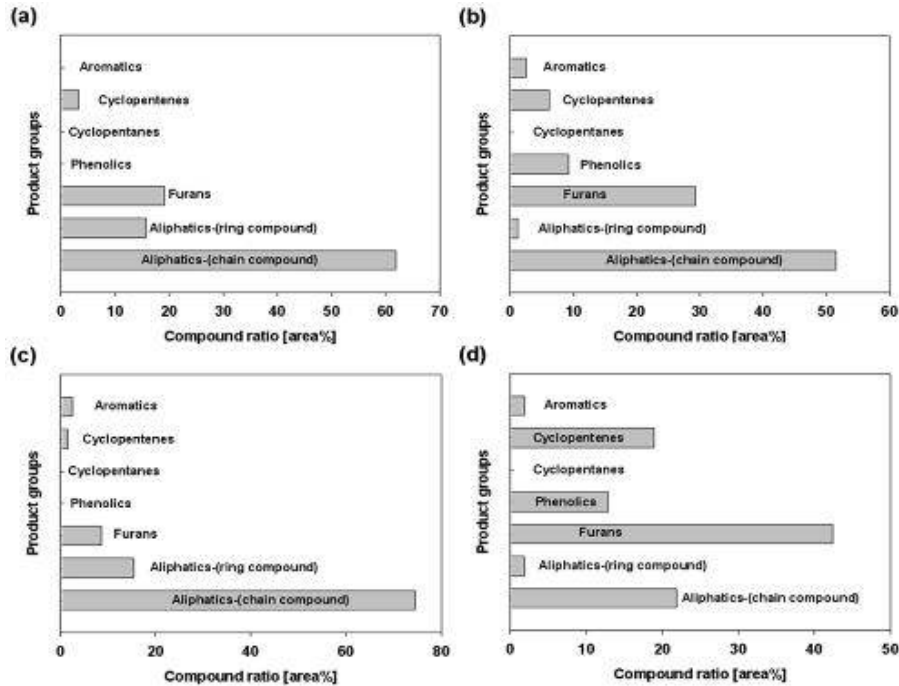
	처리전	전처리 후
Aliphatics (chain)	1,2-propandiol, 2-acetate acetic acid glycerin	Acetic acid 1,2-propandiol, 2-acetate D-allose
Aliphatics (ring)	dianhydromannitol isosorbide 1,4-anhydro-D-glucitol	1,4;3,6-dianhydro-alpha-D-glucopyranose levoglucosan 3-hydroxy-cyclohexanone
Aromatics	isopropoxyphenoxy-methane 2,3-dihydro-1H-inden-1-one	2H-benzopyran-2-one
Cyclopentanes	2,5-dimethyl-cyclopentanone cyclopentanone	trans-1,2-cyclopentanediol
Cyclopentenenes	2-hydroxy-3-methyl-2-cyclopenten-1-one 2-hydroxy-3,4-dimethyl-2-cyclopenten-1-one 2-hydroxy-5-ethyl-5-methylcyclopent-2-en-1-one	2-hydroxy-2-cyclopenten-1-one 4-ethyl-2-hydroxycyclopent-2-en-1-one 2-hydroxy-3-methyl-2-cyclopenten-1-one
Furans	1-(2-furanyl)-ethanone 2-furanmethanol; 5-methyl-2-furanmethanol	Furfural trans-tetrahydro-5-methyl-2-furanmethanol furyl hydroxymethyl ketone
Phenolics	Phenol 4-methyl-phenol 2-methyl-phenol	4-methyl-phenol 3-methyl-phenol

(나) 우뚝가사리 유래 바이오오일

상기 방법과 동일하게 우뚝가사리 유래 바이오오일을 분획하였으며 그 결과 water-insoluble, water-soluble/ether-insoluble, water-soluble/ether-soluble의 분율은 각각 25.84%, 69.1%, 5.06% 이었다. 다시마 유래 바이오오일과 비교하였을 때, water-soluble fraction이 작고 water-insoluble fraction이 높은 것을 확인할 수 있었다. GC-MS 분석 결과([그림 5-5-10, [표 5-5-9]], 다시마 유래 바이오오일과 같이 aromatics 및 phenol 계열의 화합물이 거의 검출되지 않았으며, 대부분 aliphatics 계열의 화합물이 생성되었으며 그 순서는 aliphatics (chain) > furans > aliphatic (ring)

> cyclopentanes 이었다. 다시마 유래 바이오오일과 비교하였을 때 furans 계열의 화합물이 많이 생성되었으며 이는 홍조류인 우뚝가사리의 주요 구성 물질 중의 하나인 agarose의 β -D-galactopyranose와 6-anhydro-l-galactose의 결합이 끊어지면서 furans 계열의 화합물이 생성된 것으로 생각된다. Aliphatics (chain) 계열 화합물은 galactan이 분해되면서 생성된 것으로 생각된다.

따라서 상기 결과로부터 바이오오일의 조성 및 주요 화합물질의 차이는 바이오매스를 구성하고 있는 구성 성분의 차이에 기인하는 것으로 생각되며, 이를 좀더 명확히 규명하기 위해서는 주요 구성 성분 각각에 대한 열적 동특성 및 열분해 실험을 통해 주요 생성물을 확인하고 및 이를 통해 주요 생성물의 형성 메커니즘에 대한 연구가 필요하다고 판단된다.



[그림 5-5-10] 분획 후 바이오오일 성분 분석(우뚝가사리): (a) whole oil, (b) water-insoluble, (c) water-soluble/ether-insoluble, (d) water-soluble/ether-soluble.

[표 5-5-9] 다시마 유래 바이오오일의 주요 구성 물질

Aliphatics (chain)	acetic acid, D-allose, 1,2-epoxy-3-propyl acetate
Aliphatics (ring)	6,8-dioxabicyclo[3.2.1]octan-2,3,4-triol; 2,3-anhydro-D-galactose
Aromatics	2-furancarboxylic acid, 2-methylphenyl ester
Cyclopentenes	2-hydroxy-3-methyl-2-cyclopenten-1-one, cis-3-cyclopentene-1,2-diol
Furans	furyl hydroxymethyl ketone, 1-(2-furanyl)-ethanone
Phenolics	4-methyl-phenol, Phenol, 1,2-benzendiol

마. 특성 분석

다시마를 이용한 급속 열분해 실험 후, 사이클론에서 회수된 촉의 원소분석을 실시한 결과를 [표 5-5-10]에 나타내었다. 다시마 유래 촉는 낮은 탄소 및 산소 함량을 나타내어 목질계 바이오매스인 소나무톱밥 유래 촉와 비교하였을 때 발열량이 낮았으며 (약 1/5) 또한 상대적으로 무기금속 함량이 높게 나타났다. 다시마 유래 촉의 탄소 및 산소함량이 낮은 이유는 다시마 원료에 포함되어 있는 무기금속 성분이 촉에 농축되었기 때문이라고 생각된다.

[표 5-5-10] 다시마 유래 바이오촉의 물리·화학적 특성

		다시마	소나무
Elemental analysis [wt%]	C	20.7	65.8
	H	1.3	4.0
	O	15.3	24.5
	N	1.63	0.4
	S	< 0.3	< 0.3
HHV [MJ/kg]		5.0	23.7
Inorganic elements [wt%]	K	10.5	0.4
	Ca	1.01	0.54
	Na	2.92	0.28

4. 요약 및 제언

(1) 요약

전년도 연구결과에 의하면 급속 열분해공정에서 해조류 바이오매스를 원료로 이용할 경우, 목질계 바이오매스에 비해 낮은 바이오오일 수율을 보이며 이는 해조류 바이오매스가 가지고 있는 물리·화학적 특성에 기인한다는 것을 확인할 수 있었다. 따라서 당해년도에는 바이오오일의 수율 및 품질을 향상시키기 위해 전처리 방법을 도입하였으며 전처리 전후의 물리·화학적 특성 및 열적 동특성을 비교 검토하여 그 효과를 확인하였다. 또한, 전처리된 다시마를 이용하여 바이오오일 생산 실험을 수행하였으며 그 결과, 바이오오일의 수율이 약 9% 정도 향상되었으며 수분의 함량도 감소되어 전년도보다 개선된 품질의 바이오오일을 얻을 수 있었다.

(2) 제언

상기 결과로부터 다시마의 전처리를 통해 바이오오일의 수율 및 품질을 향상시킬 수 있는 가능성을 확인하였다. 따라서 향후에는 다양한 전처리 방법을 도입하여 해조류 바이오매스에 가장 적합한 최적의 전처리 방법을 선정 및 최적화하고 이를 이용하여 바이오오일 생산을 위한 급속 열분해공정을 최적화할 계획이다. 또한, 바이오오일을 구성하고 있는 화학물질의 차이는 해조류 바이오매스의 구성 성분의 차이에 기인하는 것으로 생각되므로, 각 구성물질의 열분해 메커니즘에 대한 연구를 통하여 이를 규명하고자 한다.

제 6 장

통합공정 및 제품 개발

제 1 절 해조류 대용량 전처리 공정 개발

제 2 절 혐기성 소화에 의한 bench scale 유기산 생성
공정 구축

제 3 절 해조류의 활용을 위한 통합공정 최적설계

제 4 절 해조류 유용물질 분리 및 회수 공정 개발

제 5 절 해조류 부산물을 이용한 바이오 복합재료 개발

제 6 절 해조류 추출물을 이용한 기초생활제품 설계

제 6 장 통합공정 및 제품개발

제 1 절 해조류 대용량 전처리 개발

1. 연구 목적 및 내용

가. 연구 목적

해조류로부터 유용한 원료나 에너지를 얻기 위해서는 해조류의 생산에서부터 가공에 이르기까지 관련 분야의 기반구축 연구를 통해 경쟁력 있는 요소기술들의 통합을 도모하고 최종적으로는 해조류의 대량생산을 통한 그린에너지화 및 부산물의 활용을 위한 상용화 연구들이 체계적으로 수행되어야 한다.

해조류로부터 여러 가지 화학원료로 사용될 수 있는 유기산을 얻기 위해서는 대규모의 혐기성 소화에 의한 유기산 생성 실증 설비 구축이 필요하고 이를 위해서는 해조류의 대용량 전처리에 의한 원료의 확보가 필수적이다.

따라서 본 연구에서는 다시마의 산 처리에 의한 당화 반응을 수행하여 혐기성 소화 연구의 기초 원료를 대용량으로 제공하고자한다.



나. 연구 내용

- (1) 250L Glass 반응기를 이용하여 다시마의 대용량 전처리
- (2) 산의 농도와 반응시간에 따른 전처리 효율 극대화
- (3) 혐기성 소화 효율 극대화를 위한 해조류의 대용량 전처리 작업을 통해 산처리에 따른 혐기성 소화 수율과 해조류 종류에 따른 전처리 효율 비교
- (4) 대량 생산 시 발생하는 문제점 파악 및 해결 방안 강구
- (5) 대량 생산 시 생산 원가의 기초 자료 확보
- (6) P&ID 작성






2. 연구 방법

가. 실험장치 및 재료

(1) 재료 및 시약

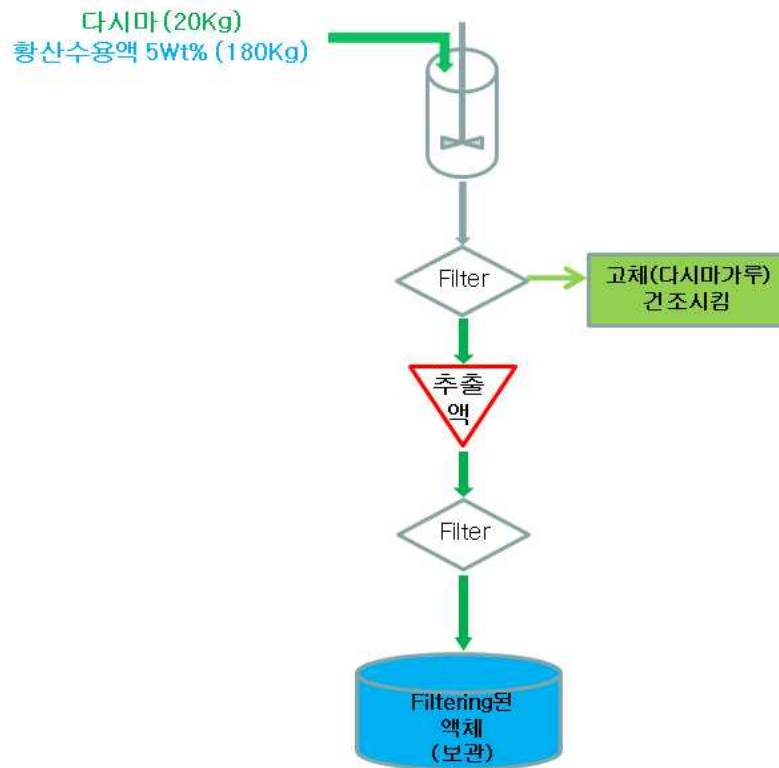
		
seaweed powder	98% CaCO ₃	95% 황산

(2) 실험장치

		
GL-250L반응기	Filtering 장치	
		
자동건조장치	필터수지	

나. 실험 절차

- (1) 다시마 20kg과 5wt% 황산수용액 180kg을 250L 반응기에 투입한다.
- (2) 반응기의 내부온도를 100℃로 승온시키고 500분 반응 시킨다.
- (3) 반응기의 내부온도를 상온으로 냉각시킨 후 반응물을 200L 플라스틱 통에 받아들인다.
- (4) 반응물을 여과한다.
- (5) 여과된 반응물에 CaCO_3 를 주입하여 중화시키고 여과하여 CaSO_4 를 제거한다.
- (6) 여과액은 모아서 보관하고, 걸러진 CaSO_4 는 폐기한다.



[그림 6-1-1] 실험절차.

3. 연구수행 결과

구분	Batch	다시마 처리량(Kg)	수행기간(일)	비 고
대용량 용매추출 (Extraction)	E-1	45Kg	24일(2 Batch)	주정추출 3회, 헥산 추출 3회
	E-2	20Kg	5일(1 Batch)	주정추출
	E-3	120Kg	17일(4 Batch)	주정 추출3회, 헥산추출 2회, EA추출 2회
대용량 전처리 (Pretreatment)	P-1	20Kg	5일	P-1 : 부정대에 발송
	P-2	20Kg	5일	P-2 : 부정대에 발송
	P-3	20Kg	5일	P-3 : 부정대에 발송
	P-4	20Kg	5일	P-4 : 부정대에 발송
	P-5	20Kg	5일	P-5 : 부정대에 발송
	P-6	20Kg	5일	P-6 : 부정대에 발송

4. 요약 및 제언

가. Powder 형태의 대용량 추출공정 확립 (다시마 185Kg 처리완료)

(주정, Hexane, Ethyl Acetate)

나. Granule 형태의 대용량 추출 수행 예정

다. 다시마 대용량 전처리 공정 완료 (다시마 120Kg 처리완료)

라. 다시마 전처리 공정에서 filtration 공정이 bottle-neck으로 작용

(1) 산처리후 Filter 불가

(2) 중화 반응 후 Filtration 가능

마. 향후 Filter press 도입이 필요

5. 향후계획 및 수행

가. 해조류의 대용량 산처리시 발생한 문제점 수정 보완

나. 고압반응기 도입으로 고압반응 및 고압추출 가능

제 2 절 혐기성 소화에 의한 bench scale 유기산 생성 공정 구축

1. 연구 목적 및 내용

가. 연구 목적

현재, 본 연구팀에서는 해조류로부터 에너지를 얻기 위하여 적용가능한 플랫폼기술 중 혐기성 소화를 통하여 여러 가지 화학원료로 사용될 수 있는 유기산의 생성 공정 기술 개발을 행하고 있다. 본 연구는 실험실 규모의 연구를 토대로 하여 해조류 바이오매스 통합공정을 위한 준 파일럿 규모(bench scale)의 기술을 개발하여 유기산의 대규모 생산기반을 구축하는 것이 목적이다. 본 연구는 해조류의 통합적 활용을 위한 부산물 응용 기술개발의 기초연구가 될 수 있을 것으로 생각된다.

나. 연구 내용

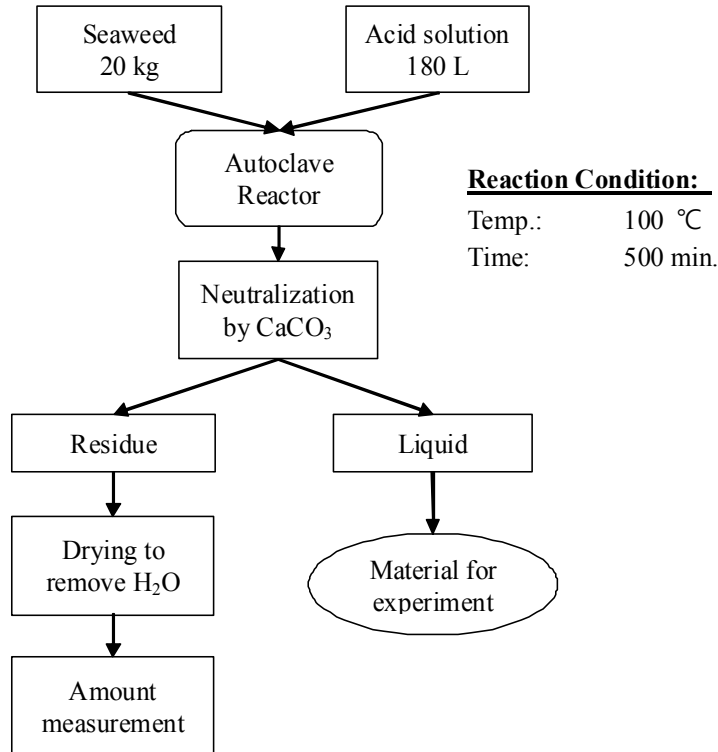
혐기성 소화는 혐기성 미생물의 대사작용에 의해 유기성폐수·폐기물을 분해하는 생물학적 공정이다. 이 기술은 오래전부터 오수·슬러지 정화처리에 이용되어 왔으며, 호기성처리에 비해 산소가 필요 없어 유지관리비가 적게 소요되는 경제적인 처리방법이다. 또한 바이오 매스에서 유기산, 수소 및 메탄을 생성하는 생물학적 에너지 분야에서도 주목을 받고 있다. 이처럼 광범위한 혐기성미생물의 기술 분야를 적절하게 나타내는 용어로서 “혐기성 바이오테크놀로지(anaerobic biotechnology)”라는 표현도 사용되고 있다. 혐기성 소화 과정에서 생산되는 유기산은 초산(C2), 프로피온산(C3), 부티르산(C4) 등으로 구성되며 이들은 수소첨가반응을 통하여 각각 에탄올, 프로판올, 부탄올로 변환된다. 따라서, 본 연구는 해조류 바이오매스 통합공정을 위한 준 파일럿 규모의 유기산 생성장치를 설치하여 혐기성 소화에 의한 유기산 생성 조건을 검토하고 시운전 조건을 선정하여 다량의 유기산을 생성하는 최적 상태를 파악하고자 한다.

2. 연구 방법

가. 실험장치 및 재료

(1) 해조류 전처리

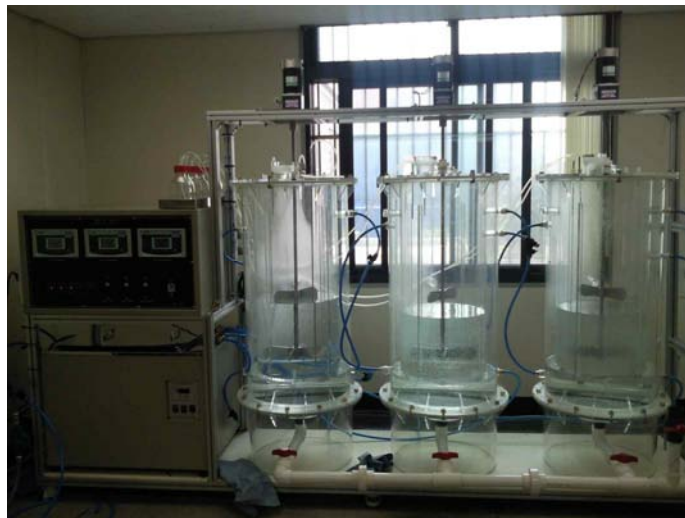
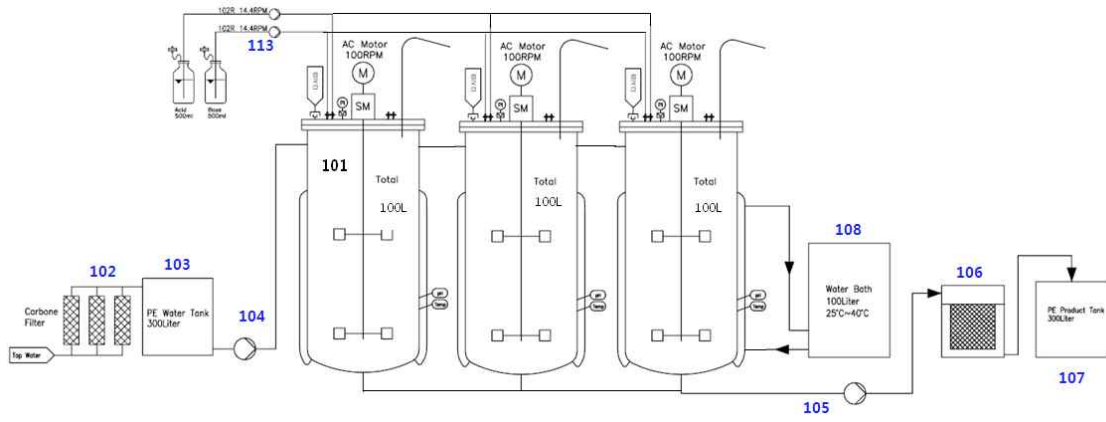
연구에 사용된 해조류는 완도에서 생산된 다시마로, 파우더 형태로 된 것을 사용하였다. 해조류는 황산(H₂SO₄)으로 전처리를 행하였으며, 황산 전처리 후 중화를 위하여 탄산칼슘(CaCO₃)을 사용하였다. 해조류의 황산 전처리는 [그림 6-2-1]과 같으며 세부 자세한 사항은 제6장 제1절의 ‘해조류 대용량 전처리 공정 개발’과 같다.



[그림 6-2-1] 해조류 전처리.

(2) 유기산 발효 장치

본 연구에 사용된 장치로서는 내경 40cm, 높이 100cm로 100L용량의 3개의 반응기가 직렬로 연결이 되어 있으며, 필요에 따라 회분식(batch)과 연속식(continuous) 어느 방법으로도 운전이 가능하도록 설계하였다. 연속식으로 운전을 할 때는 침전지를 설치하여 혐기성미생물의 반송을 유도하였다. 유입수는 상향류로 주입되며 반응기 내부에는 미생물과 해조류의 혼합을 위하여 교반장치가 설치되어있다. 반응기 상부에는 pH 및 온도 자동 조절 장치가 설치되어 있으며 필요에 따라 시료를 채취할 수 있도록 시료채취구가 설치되어 있다. [그림 6-2-2]는 유기산 발효 장치의 상세도이다.



[그림 6-2-2] 유기산 발효 장치 상세도.

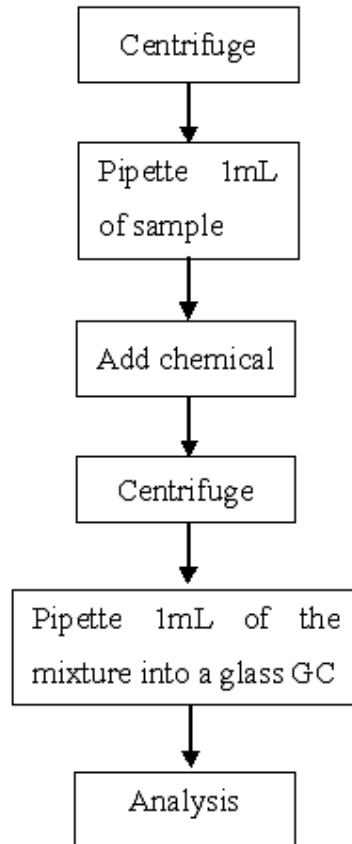
(3) 발효 미생물과 영양분

유기산 발효에 사용된 미생물은 부산시 남구 소재 하수처리장 소화조의 반송 슬러지를 사용하였다. 반송슬러지의 TS, VS 함량은 각각 mg/L였다. 이 미생물은 반응조에 각각 3, 6, 9L를 주입하였다. 실험에 사용한 영양염은 NH_4HCO_3 2g/L, KH_2PO_4 1g/L, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.01g/L, NaCl 0.001g/L, $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 0.001g/L, $\text{CaCl} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 0.001g/L, $\text{MnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.0015g/L 및 0.00278g/L 이다.

나. 실험 절차

실험은 회분식으로 운전을 먼저 행한 후, 회분식에서 얻어진 기초자료를 토대로 연속식으로 운전을 하였다. 회분식의 실험 절차는 미생물 주입량에 대한 해조류 바이오매스의 유기산 생성량을 조사하였다. 해조류의 농도는 20g/L가 되도록 주입하고 각종 영양염을 주입한 후, 산소제거를 위해 질소가스를 10분간 주입하였다. 그 후 슬러지를 각각 3, 6, 9L 주입하고, 혐기성 소화가 진행되면서 낮아지는 pH를 조절하기 위한 NaHCO_3 용액을 pH controller에서 조절되어 주입되도록 하였다. pH는 6.7~7.0을 유지시켜 주었으며 온도는 35°C로 유지하였다. 배양액을 혼합하기 위하여 교반장치를 이용하여 30rpm으로 교반시켜 주었으며, 메탄생성균에 의하여 유기산이 소비되지 않도록 억제제로서 요오드포름(indoform: CHI_3)을 에탄올(ethanol: $\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}$)에 녹인 20g CHI_3 /L $\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}$ 를 주입하였다. 반응기에서 발생하는 총 가스를 측정하기 위하여 가스를 포집기를 설치하여 분석을 행하였다. 반응기의 연속식 운전은 회분식 실험의 결과를 토대로 미생물을 9L 주입하였으며 침전지와 슬러지 반송펌프를 설치하여 반송시켰다. 연속식에서의 수리학적 체류시간(HRT)은 8시간으로 시작하여 5시간까지 변화시켜 실험을 행하였다.

분석은 유기산의 경우는 배양액의 일정량을 원심분리(3,500rpm, 5min)하여 균체와 상정액을 분리하고, 상정액 10ml에 10-mM의 메칠 발레르산(internal 4-methyl-valeric acid: ISTD)와 3-M의 인산(phosphoric acid: H_3PO_4)을 각각 1ml씩 첨가하였다. 화학약품을 첨가한 시료는 다시 원심분리(15,000rpm)을 행한 후 모세관 칼럼(capillary column, Agilent Technologies, Inc. model HP-FFAP, 50m × 0.32mm × 0.50 μm)이 장착된 GC(gas chromatograph, Shimadzu 17A)을 사용하여 측정하였다. 검출기로는 불꽃이온화 검출기(flame ionization detectot: FID)를 사용하였다. 반응기 운전 중 발생하는 가스는 열전도도 검출기(thermal conductivity detector: TCD)를 장착한 GC(Shimadzu 9A)를 이용하여 측정하였다. 메탄측정을 위한 GC의 조건은 injector 온도 200°C, detector 온도 250°C였으며, flow rate는 30cc/min로 유지하였다. 유기산의 측정절차는 [그림 6-2-3]과 같다.



[그림 6-2-3] 유기산 분석 절차.

3. 연구수행 결과

가. 회분식 실험

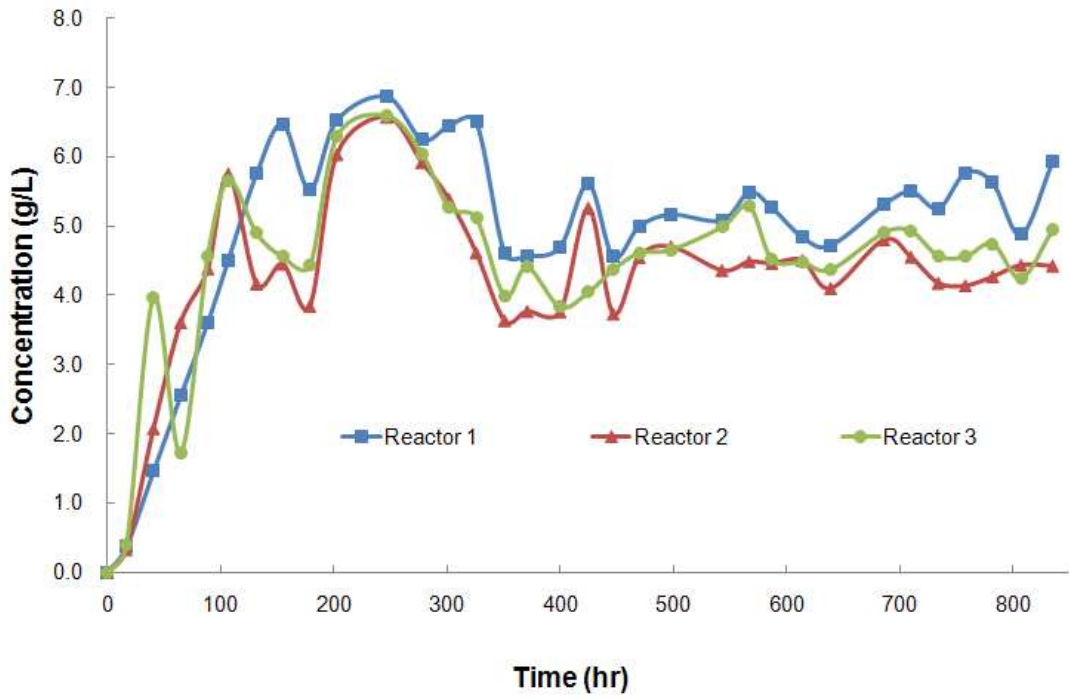
[표 6-1-2]는 각 반응기별 총 유기산 생성량을 나타낸 것이다. 각 반응기 모두 20시간 이후부터 소량의 유기산 생성이 측정되었다. 실험실 규모의 0.9L 반응기 실험에서 얻어진 결과에 따르면 18g/L의 해조류 농도에서 실험 시작 200시간 정도에서 최고 14.5g/L의 총 유기산 농도를 얻었다. 300L 규모의 준파일럿 규모의 회분식 운전에서 총 유기산의 농도는 점차 증가하여 약 200시간에서 최고치를 나타내었다. 20g/L의 해조류 농도에서 최고 6.6g/L의 총 유기산 농도를 얻었다. [그림 6-2-4]는 시간당 발생한 총 유기산량을 나타낸 것이다.

[그림 6-2-5]~[그림 6-2-7]은 각 반응기별 각종 유기산의 농도 변화를 나타낸 것이다. 혐기성 미생물을 3L 주입한 반응기 1의 경우, 최고 총유기산 농도는

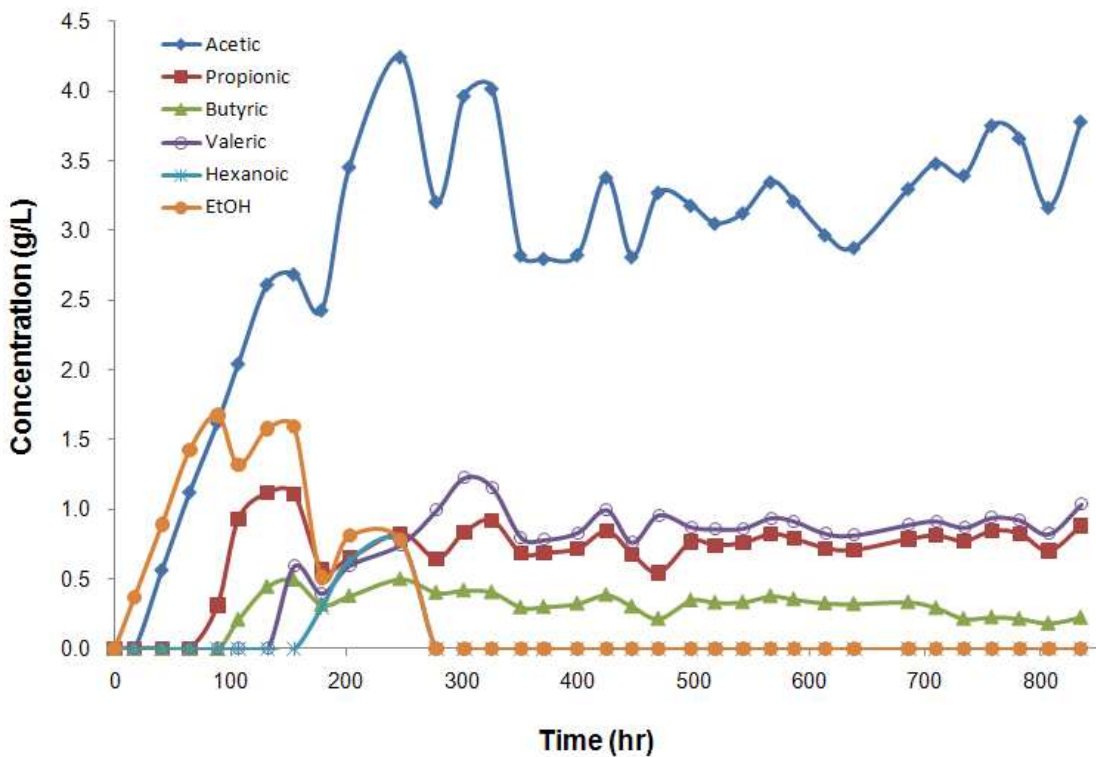
6.87g/L를 보였으며, 미생물을 6, 9L를 주입한 반응기 2, 3의 경우에는 각각 6.58, 6.59g/L로 미생물 주입량에 따라 큰 차이를 나타내지 않았다. 일반적으로 처리효율은 미생물량이 증가할수록 증가한다고 알려져 있다. 본 연구에서도 미생물을 많이 주입한 반응기 3에서의 유기산 생성량이 많을 것으로 추측하였으나 그 차이는 미비한 것으로 나타났다. 이는, 각 반응기의 미생물 순차 과정의 영향이거나 300L 규모에 비해 미생물 변화량이 적은 것에 기인한 것으로 추측한다. 모든 반응기에서 초기에 에탄올의 생성이 높게 나타났는데 이는 탄수화물의 당화 및 알코올발효가 진행된 것으로 파악된다. 생성된 유기산의 종류는 아세트산(acetic acid), 발레릭산(Valeric acid) 및 프로피온산(propionic acid)의 농도가 높게 나타난 것으로 나타났다. 유기산의 사용용도에 따라 프로피온산이나 뷰트릭산(butyric acid)의 농도를 높이기 위한 운전 절차에 대해 추후 연구를 진행시킬 예정이다.

[표 6-2-2] 회분식 실험결과

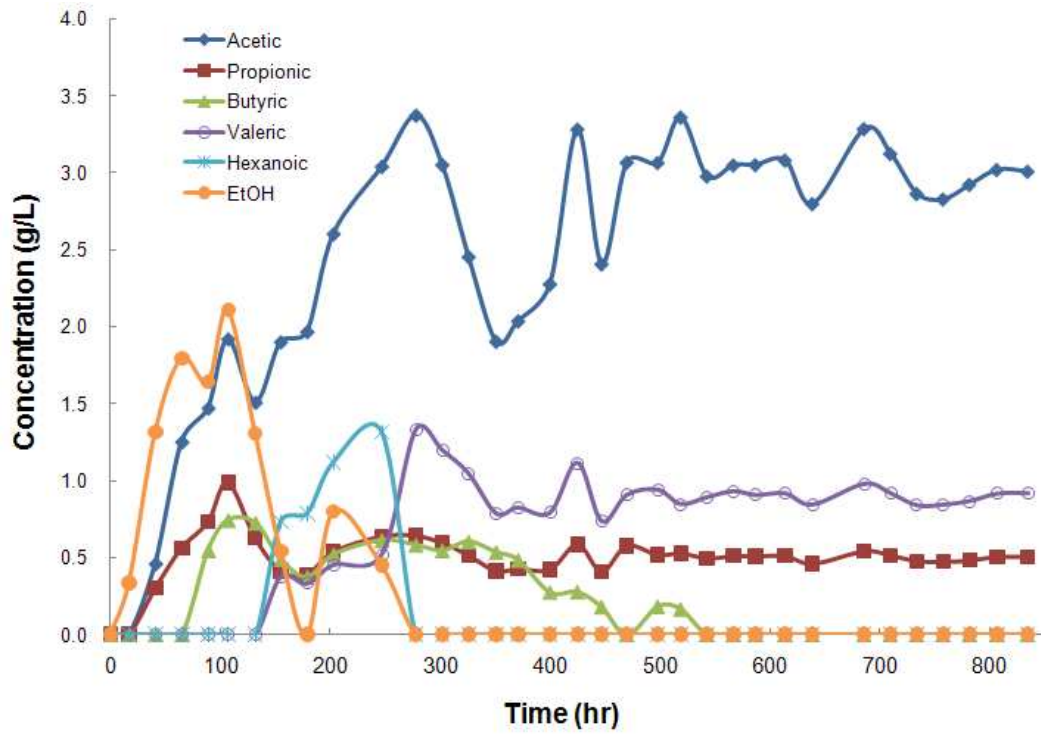
Time(hr)	Total acid concentration (g/L)		
	Reactor1	Reactor2	Reactor3
0	0.000	0.000	0.000
20	0.370	0.335	0.386
40	1.456	2.079	3.959
60	2.547	3.611	1.729
80	3.607	4.388	4.574
100	4.503	5.757	5.661
120	5.751	4.169	4.896
160	6.471	4.454	4.553
180	5.526	3.850	4.427
200	6.526	6.038	6.286
240	6.866	6.578	6.589
280	6.246	5.925	6.047
300	6.446	5.389	5.260
300	6.503	4.619	5.111
330	4.602	3.640	3.990
350	4.566	3.774	4.406
370	4.697	3.767	3.831
400	5.608	5.262	4.043
420	4.554	3.735	4.370
450	4.993	4.552	4.609
470	5.166	4.707	4.654
500	5.081	4.365	4.985



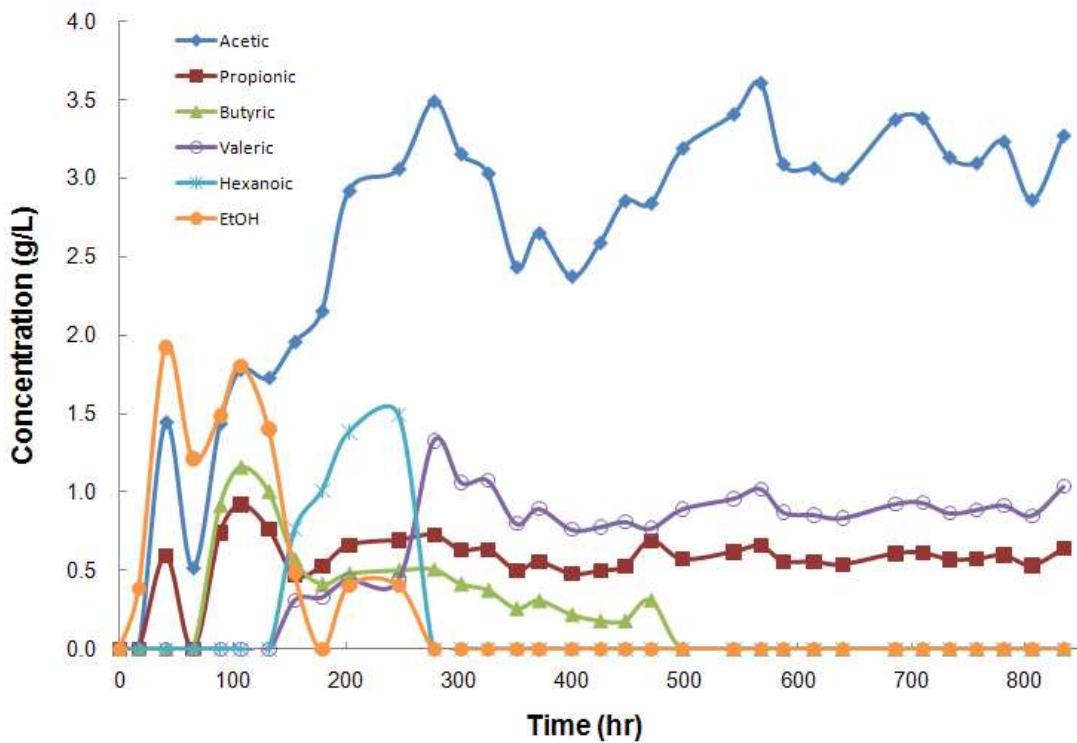
[그림 6-2-4] 회분식 실험에서의 총 유기산 생성 농도 변화.



[그림 6-2-5] 회분식 실험에서의 유기산 농도 변화 (Reactor 1).



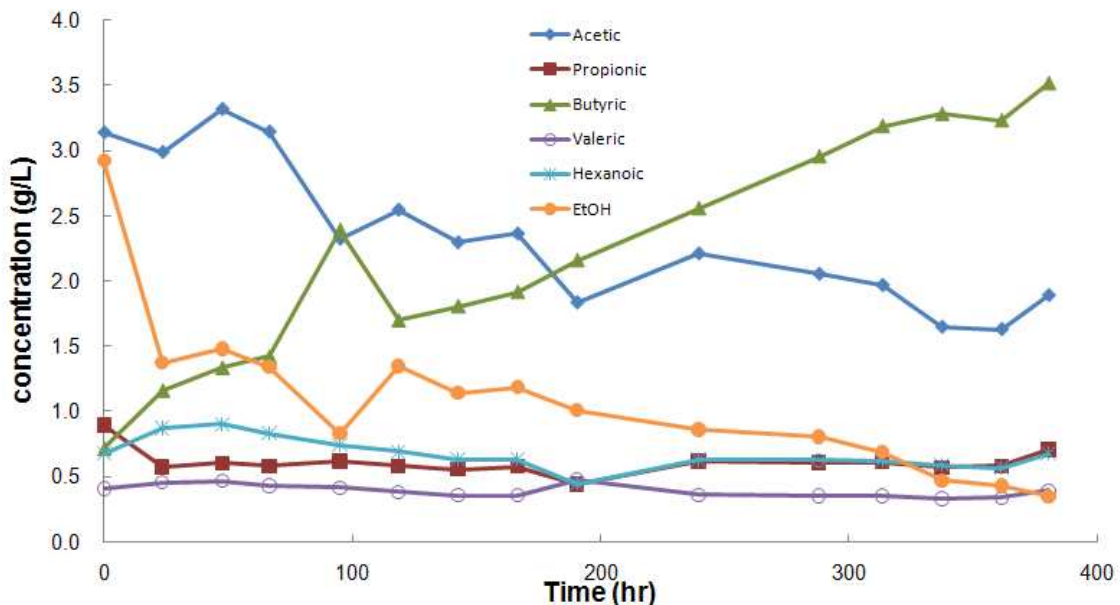
[그림 6-2-6] 회분식 실험에서의 유기산 농도 변화 (Reactor 2).



[그림 6-2-7] 회분식 실험에서의 유기산 농도 변화 (Reactor 3).

나. 연속식 실험

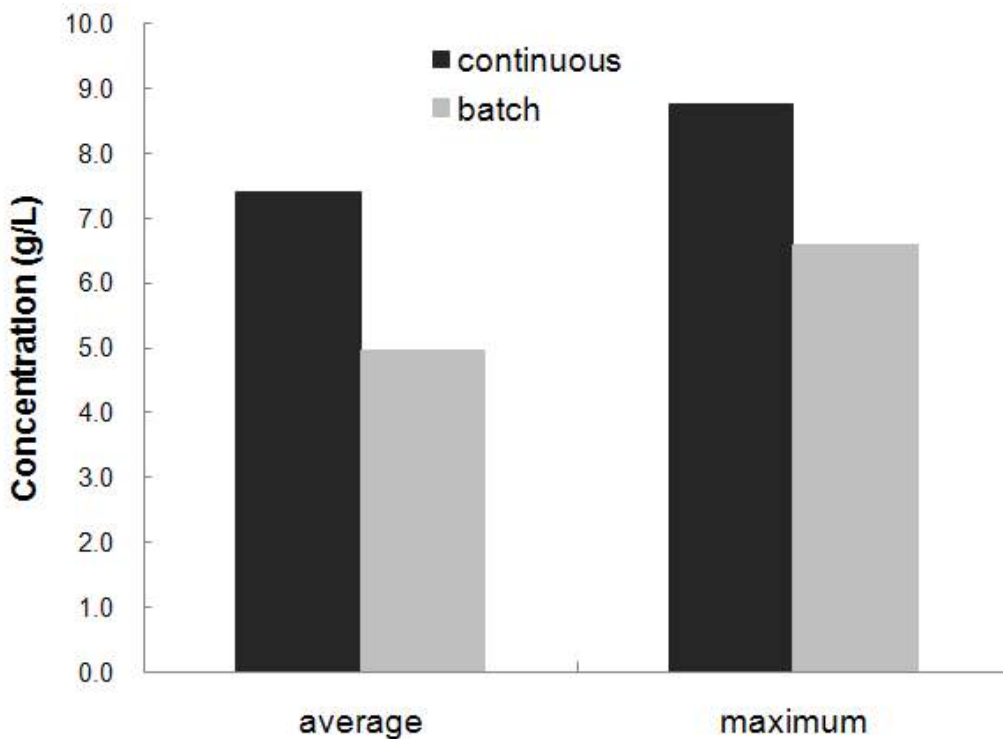
회분식 실험에서 얻어진 결과를 토대로 연속식 실험을 행하였다. 본 회분식 실험에서는 미생물 투입변화에 대해 큰 변화를 나타내지 않았지만, 일반적으로 생물 반응조에서 미생물량이 많을수록 처리효율이 높게 나타나는 것에 착안하여 연속식 실험에서의 발효효율을 높이기 위하여 미생물을 가장 많이 투입한 회분식 반응기 3과 같이 운전하였다. 연속식 실험의 관건은 생물반응기 내에 미생물을 어떻게 보유하며 유입수와 미생물의 접촉을 얼마만큼 원활하게 유지하는가에 달려있다. 본 연구에서는 별도의 침전지를 생물반응기 다음단계에 설치하고, 침전지에서 가라앉은 미생물을 반송하여 미생물의 손실이 일어나지 않도록 하였다. 연속식 실험에서의 유기산 생성은 실험 시작 직후부터 원활하게 이루어졌는데, 이는 연속식 실험에 사용한 미생물이 유입수인 해조류 추출물에 충분히 순치된 회분식에서 사용했던 미생물을 사용했기 때문으로 평가된다. 수리학적 체류시간은 회분식과 비슷한 약 8일로 운전하였다. 8일의 수리학적 체류시간인 연속식 실험에서 평균 및 최고 총유기산 생성농도는 각각 7.4g/L와 8.8g/L로 나타났다. 본 연구 결과에 의하면, 안정적으로 하루 330g의 유기산을 생성할 수 있다고 판단된다. 향후, 생물반응기의 scale-up 및 운전조건과 방법을 파악한다면 더 많은 유기산을 안정적으로 생산해 낼 수 있을 것이다. [그림 6-2-8]은 연속식 실험에서의 유기산 농도 변화를 나타낸 것이다.



[그림 6-2-8] 연속식 실험에서의 유기산 농도 변화.

다. 회분식과 연속식 실험 비교

8일의 수리학적 체류시간인 연속식 실험에서 평균 및 최고 총유기산 생성농도는 각각 7.4g/L와 8.8g/L로 나타났으나, 회분식 실험에서는 각각 5.0g/L와 6.6g/L로 나타났다. 연속식 실험에서 유기산 생성이 높게 나타난 이유는 침전지의 미생물을 반송시켜줌으로써 미생물의 활성이 촉진되었고 적정 F/M 비에 따른 정상상태 유지가 지속된 결과라고 판단된다.



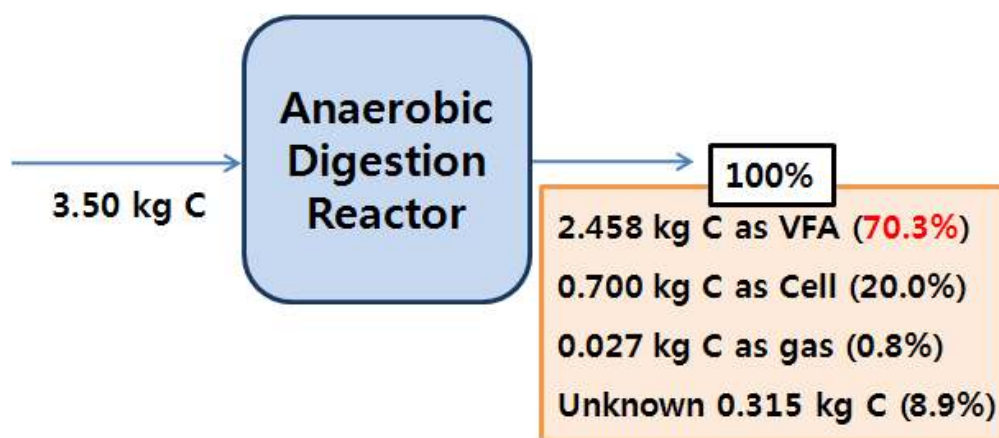
[그림 6-2-9] 회분식과 연속식 실험의 유기산 농도 비교.

라. 탄소물질 수지를 통한 해조류 바이오매스의 전환율

회분식 실험에서 전처리하여 추출한, 즉 혐기성 소화조에 유입수로 사용된 해조류의 TOC는 21g/L였다. 본 실험에서는 4배 희석하여 사용하였으므로 그 농도는 5.25g/L이다. 회분식 실험의 각 반응기(Reactor 1~3)에서 발생한 유기산을 g Carbon/L로 계산하면, Reactor의 경우 아세트산(C2), 프로피온산(C3), 뷰트릭산(낙산, C4), 발릭산(길초산 C5), 카프르산(C6) 및 에탄올(C2)은 각각 1.696, 0.401, 0.272, 0.438, 0.477 및 0.405g C/L로 총 생성된 탄소의 양은 3.689g C/L였다. 연속식의 경우에는 아세트산(C2), 프로피온산(C3), 뷰트릭산(낙산, C4), 발릭산(길초산 C5), 카프르산(C6) 및 에탄올(C2)은 각각 1.251, 0.433, 0.389, 0.239, 0.420 및 1.522g C/L로 총 생성된 탄소의 양은 4.258g C/L였다. 혐기성 소화에 의한 유기산의 전환율은 총 생

성된 탄소량을 유입시킨 탄소량에 대한 비율로 계산 가능하다. 본 연구결과 혐기성 소화에 의한 유기산 전환율은 70.3%로 나타났다. 전환되지 않은 부분은 혐기성미생물의 성장을 위한 합성과 가스 부분으로 전환되었다고 파악된다. 혐기성미생물의 합성으로 유입되는 탄소의 20%가 전환된다고 가정하면 0.7kg의 탄소가 소비된다. 실험기간동안 발생한 메탄과 이산화탄소의 가스량은 총 0.027kg이었다. 일반적인 혐기성 소화과정에서 발생하는 가스량보다 소량의 가스가 방출된 것은 가스 발생을 억제하기 위해 억제제를 주입하였기 때문으로 평가된다. [그림 6-2-10]은 탄소 물질 수지를 통한 혐기성 소화에 의한 유기산 전환율을 나타낸 것이다.

유입되는 탄소건조 다시마가 유기산으로 생성된 전환율은 혐기성 소화에 의한 유기산 전환율에 해조류의 전처리에 의한 탄소성분 전환율을 곱하여 계산할 수 있다. 향후 해조류의 전처리에 따른 탄소 성분 전환율을 전처리 방법에 따라 검토한다면, 건조 다시마가 혐기성 소화과정을 거쳐 유기산으로 전환되는 율을 계산가능하며, 유기산으로의 전환율을 높이는 전처리 방법도 파악할 수 있을 것으로 생각된다.



[그림 6-2-10] 탄소 물질 수지를 통한 혐기성 소화에 의한 유기산 전환율.

4. 요약 및 제언

300L 규모 혐기성 반응기의 회분식 실험에서 생성된 총 유기산의 농도는, 20g/L의 해조류 농도에서 6.58 ~ 6.87g C/L을 얻었다. 또한, 8일의 수리학적 체류시간인 연속식 실험에서 평균 및 최고 총유기산 생성농도는 각각 7.4g/L와 8.8g/L로 나타났다. 회분식 실험의 각 반응기별 각종 유기산의 농도 변화는 모든 반응기에서 에탄올, 아세트산, 프로피온산의 농도가 높게 나타났으나, 연속식 실험의 경우에는

아세트산과 뷰트릭산의 농도가 높게 나타났으며, 그 다음으로 에탄올이 높게 생성되는 것을 볼 수 있었다. 건조 다시마 1톤당 생산된 총 유기산으로 계산을 하면 약 370kg의 유기산이 생성된 것으로 나타나므로, 정량적인 목표인 300kg은 달성하였다. 향후, 수소화 반응과 에스테르화 반응을 첨가하여 혼합알코올을 생산하는 연구의 기초자료가 될 수 있을 것으로 생각된다. 또한, 본 연구 결과, 여러 가지 화학원료로 사용될 수 있는 유기산의 대량 생산이 가능하다는 것을 제시하였다.

5. 향후계획

향후, 안정적인 유기산 생성을 위한 대용량 장치의 설계 및 운전 방법을 파악하여 유기산 대량생산 최적화에 기술에 대해 지속적으로 연구할 계획이다.

제 3 절 해조류의 활용을 위한 통합공정 최적 설계

1. 연구 목적 및 내용

가. 연구 목적

현재까지 국내에서의 바이오매스에 대한 연구는 주로 에너지 전환공정 그 자체에 중점을 두고 있고, 통합적 활용을 위한 경제성 평가나 통합공정 설계에 대한 연구는 거의 전무한 상황이다. 미국의 신재생 에너지에 대한 모든 국가연구를 총괄하고 있는 NREL(National Renewable Energy Laboratory)과 같은 연구기관에서는 전환공정에 대한 연구 뿐 아니라, 전처리 공정 및 전환물의 분리공정을 포함한 공장 단위의 경제성 평가는 물론 여러 전환공정을 포함하는 통합공정의 설계에 대한 연구를 여러 차례에 걸쳐 수행하고 있다[1,2].

이러한 연구의 결과로 최종 바이오연료의 생산원가 및 corn stover 같은 바이오매스의 공급원가의 목표가격이 결정이 되고, 이 목표 가격이 후속 연구의 국제적인 벤치마킹 대상이 되기도 한다. (바이오에탄올의 경우 미국 Department of Energy는 2010년 목표 가격을 \$1.07/gallon으로 정한바 있다.) 여러 전환공정의 통합시 가장 우선적으로 고려되어야 할 점은 경제성이며, 여러 전환 공정의 통합 및 설계를 위해서는 개별 공정의 기본 모델과 함께 수치최적화와 같은 체계적인 접근방법이 필요하다. 이러한 연구의 결과는 국가나 기업의 정책 또는 투자계획 수립 등 중요 결정사항에 없어서는 안 될 기술적 근거를 제공함으로써 국내에서도 이러한 연구에 대한 투자가 매우 시급하다고 하겠다.

통합공정의 설계와 경제성 평가를 위해서는 최적화된 개별 단위공정의 개발은 물론 오랜 시간과 인적, 물적 자원의 투자가 필요하지만, 현 시점에서는 두가지 조건이 충족되지 않은 상태이다. 따라서, 본 연구에서는 해조류의 통합적 활용을 위한 경제성 평가와 통합공정의 설계를 궁극적 목표 삼아, 이를 위한 기반 연구를 수행하고자 한다. 당해 년도의 목표는 공정 모사기를 이용한 개별 전환공정의 모델링 기초연구와 수치최적화를 이용한 공정 통합/설계에 대한 타당성 조사이다.

나. 연구 내용

공정 모델링을 위해서는 기본적으로 해당 공정의 물질 및 에너지 수지식이 필요하며, 또한 반응 및 상평형을 수반하는 공정을 모사할 경우 열역학적 물성치가 필요하다. 해조류 바이오매스와 같은 복잡한 물질의 경우 위와 같은 수지식들과 열역학적 물성치의 계산이 매우 복잡하여 공정모사기를 이용이 필수적이며, 예로

NREL에서는 Aspen Plus™를 기본 공정모사기로 사용하여 위와 같은 연구를 수행하고 있다[1,2]. 앞서서도 언급했듯이 공정의 기본 모델, 즉 물질/에너지 수지식은 경제성 평가는 물론, 공정 통합 및 설계를 위해서도 반드시 필요하다. 공정 모델링의 기초연구는 다음과 같은 내용을 포함한다:

- 통합공정을 이루는 주요 개별 전환공정의 에너지/물질 수지식 수립
- 공정모사기內 property package의 적합성 확인 및 최적 package 선정

○ 수치최적화를 이용한 공정 통합 및 설계

바이오에탄올의 경우, 공정 통합에 대한 연구[3]는 이미 여러 연구자에 의해 수행되고 있는데, 그 이유는 보다 더 집약적이고 효율적인 공정의 설계가 바로 공정 통합에 의해서만 가능하기 때문이다. 이러한 공정 통합을 위해서는 개별 단위공정의 모델링 뿐 아니라 경제성 분석 또한 요구되며, 궁극적으로는 수치최적화를 통해서 통합공정의 설계가 가능하다. 따라서 수치최적화를 이용한 공정 통합/설계에 대한 타당성 조사는 다음의 내용을 포함한다:

- 수치최적화를 이용한 공정 통합/설계 타당성 조사
- 경제성 분석을 위한 기초자료 수집
- 예상되는 최적 설계안의 경제성 평가

2. 연구 방법

가. 자료 수집

모델링을 위한 기초 자료는 “해조류 바이오매스의 그린에너지화 및 통합적 활용을 위한 기반구축 연구 “ 1차년도 보고서[4]를 토대로 하였으며, 바이오매스 전환공정 관련 공정모사기와 경제성 분석에 대한 자료는 관련 문헌[1,2,3,5]을 참조하였다.

나. 연구 절차

- (1) 보고서로부터 바이오매스 전처리 공정 및 여러 전환공정의 물질 및 에너지 수지식을 공정 흐름도(flowchart)에 표시한다.
- (2) 공정모사기를 이용하여 공정에 사용되는 화학물질에 적합한 열역학 모델을 선택한다.
- (3) 공정모사기를 이용하여 공정 흐름도에 나타난 데이터를 입력하고 적합한 장치를 선정한다.

- (4) 공정 흐름도에 맞게 장치들을 연결한 뒤 물질 및 에너지 수지식으로 이루어진 비선형 대수방정식의 해를 구한다.
- (5) (경제성 분석의 경우) 공정 모사기가 결정한 장치의 size를 가지고 각 장치의 제작비용을 추정한다.

3. 연구수행 결과

○ 개별 전환공정의 모델링

위의 절차에 따라 우선 전처리 공정 및 여러 전환공정의 물질 및 에너지 수지식을 공정 흐름도(flowchart)에 표시하려 하였으나, 관련 정보가 부족하여 보고서의 내용만으로는 제대로 된 물질 및 에너지 수지식을 수립할 수 없었다. 1차년도 보고서에서 진행된 전처리 및 여러 전환공정에 대한 연구는 실험실 스케일의 아주 작은 규모로 진행되어 물질 및 에너지의 입/출력에 대한 정확한 값을 구하기가 어려웠을 것으로 추정되며, 공정 조건 등이 최적화되지 않았던 것 또한 주된 문제점으로 볼 수 있다. 아래의 도표에 혐기성 소화에 의한 유기산 전환에 대한 보고서 내용 요약과 본 연구에서 공정 설계 반영시 고려한 점들을 나타내었다.

공정 모사기에서 필요한 화학물질의 물성은 [표-6-3-1]과 같다. Aspen plus의 경우 1,700 가지가 순수 화학물질의 물성 데이터베이스를 가지고 있으나, 다시마와 같은 바이오매스처럼 복잡한 화학물질들로 구성되어 있는 물질의 경우는 그러한 데이터베이스에 포함되지 않는다. 하지만 공정 모사기를 사용하려면 공정에 사용되는 물질의 물성이 반드시 있어야 하므로, NREL에서는 바이오 에탄올 생산에 필요한 내부 데이터베이스를 표-6-3-2와 같이 이미 구축한 상태이다[5]. 그러므로 국내에서도 이러한 연구에 대한 투자가 반드시 이루어져야 할 것이다.

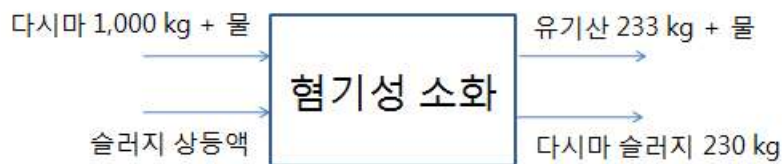
보고서 내 전처리 공정 및 여러 전환공정 중, 혐기성 소화의 경우엔 기본적인 물질 수지식에 대한 정보가 있었으며, 이와 참고문헌[3]에 있는 관련 정보를 토대로 완전하지는 않으나 분리공정까지 포함한 전체 전환공정의 물질 수지식을 수립할 수 있었다. 보고서를 토대로 혐기성 소화에 의한 유기산 생성의 장기 운전에 물질수지식을 간단한 공정도([그림 6-3-1])에 나타내었다. 또한 공정 흐름도와 이를 토대로한 공정의 개념적 설계를 [그림 6-3-2]에 나타내었다.

[표 6-3-1] Aspen plus에서 요구하는 최소 물성값

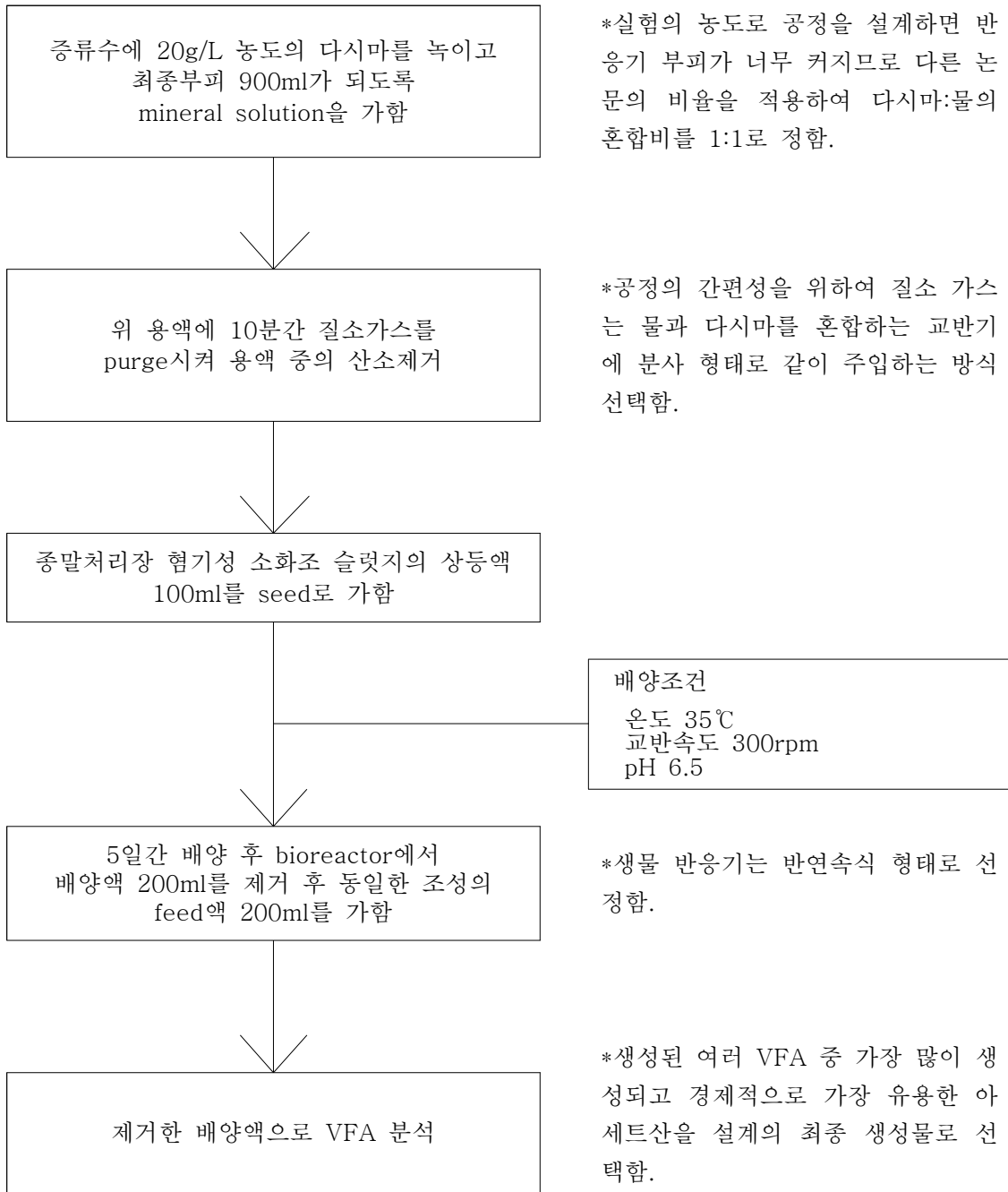
Liquids/Gases	Conventional Solids
Critical Temperature	Heat of Formation
Critical Pressure	Heat Capacity
I.G. Heat of Formation	Density
Vapor Pressure	
I. G. Heat Capacity	
Heat of Vaporization	
Liquid Density	

[표 6-3-2] NREL이 보유한 Aspen plus In House Database[5]

Compound Name	Formula	Database Name	Database Alias	Normal State
Glucose	$C_6H_{12}O_6$	GLUCOSE	C6H12O6	Liquid
Xylose	$C_5H_{10}O_5$	XYLOSE	C5H10O5	Liquid
Cellulose	$C_6H_{10}O_5$	CELLULOS	C6H10O5	Solid
Xylan	$C_5H_8O_4$	XYLAN	C5H8O4	Solid
Lignin	$C_{7.3}H_{13.5}O_{1.3}$	LIGNIN	CXHXOX	Solid
Biomass (cell mass)	$CH_{1.64}N_{0.23}O_{0.39}S_{0.0035}$	BIOMASS	CHXNXOXSX-1	Solid
Cellulase	$CH_{1.57}N_{0.29}O_{0.31}S_{0.007}$	CELLULAS	CHXNXOXSX-2	Solid
Zymo	$CH_{1.8}O_{0.5}N_{0.2}$	ZYMO	CHXOXNX	Solid
Solslds	$CH_{1.48}O_{0.19}S_{0.0013}$	SOLSLDS	CHXOXSX	Liquid
Solunkn	$C_{0.5}HO_{0.5}$	SOLUNKN	CXHOX	Liquid
Gypsum	$CaSO_4 \cdot 2H_2O$	GYPSUM	CaSO4-2H2O	Solid



[그림 6-3-1] 혐기성 소화에 의한 유기산 생성 물질 수지식[4].



*생물반응기로부터 나온 생성물에서 아세트산을 분리하기 위하여 먼저 원심분리기로부터 다시마 찌거기와 물고 아세트산 혼합물을 분리한다. 물과 아세트산 분리는 증류탑을 이용한다.

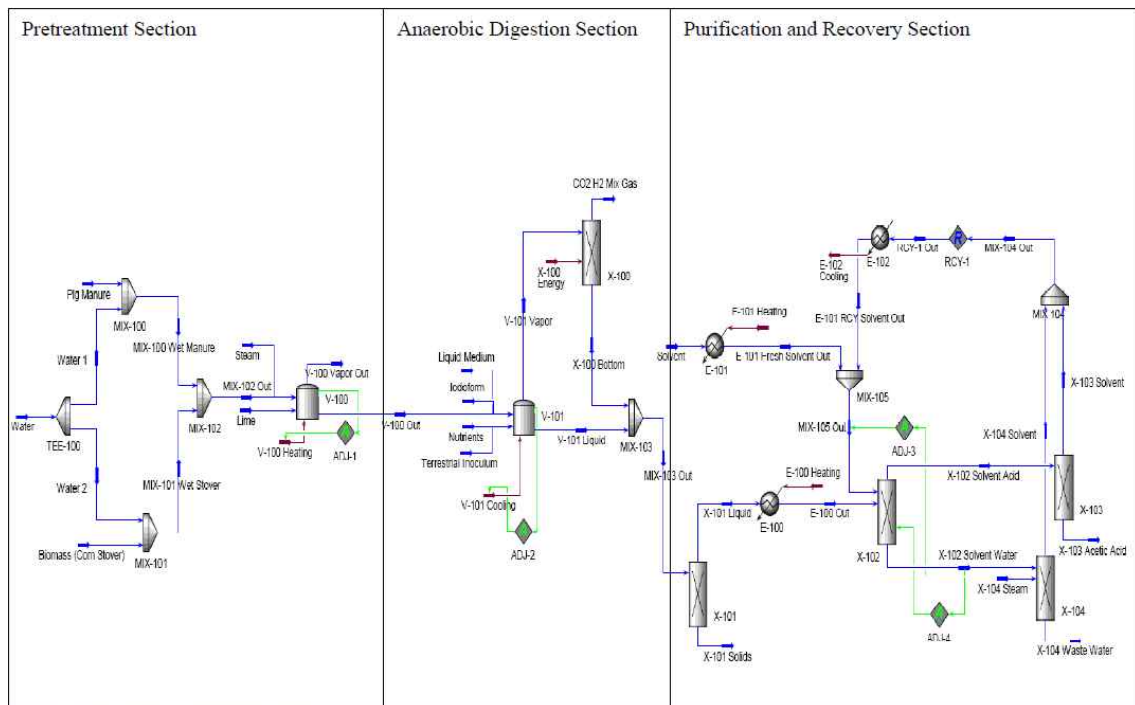
[그림 6-3-2] 혐기성 소화 전환 공정의 블록선도(block diagram)와 본 연구의 공정설계시 반영 사항.

위의 기초적인 물질 수지식과 혐기성 소화에 의한 corn stover의 유기산 전환에 관한 참고문헌[3]을 토대로 전처리 (이 경우엔 mixing & heating) 공정과 L-L extraction을 이용한 분리공정까지 포함하는 전체 공정에 대한 물질 수지식을 수립하였다. 참고문헌에서 모사한 공정의 process flow diagram을 [그림 6-3-3]에 나타내었다. 물질 수지식 수립 시에 사용한 Design basis는 다시마 (dry 기준) 100,000 (M/T /yr) 였으며, (물, steam 등 utility를 제외) 물질 수지식을 통해 구한 공정의 주요 in/out 질량 유량은 다음과 같다.

[표 6-3-3] 물질 수지식을 통해 구한 공정의 in/out 질량 유량

(Design basis: 다시마 100,000 M/T /yr)

In	kg/day	Out	kg/day
다시마	3.33E+ 05	VFA mixture	7.83E+ 04
Inhibitor	9.16		
MIBK	3.59E+ 04		



[그림 6-3-3] 혐기성 소화에 의한 전체 공정도[3].

[그림 6-3-3]에 나타난 주요 공정의 설명과 공정의 개념 설계시 선정된 장치의 설명은 다음과 같다.

(1) Mixer

혐기성소화는 밀폐된 탱크에 슬러지를 투입하면 미생물의 작용으로 슬러지 속의 유기물이 비교적 안정된 유기물 또는 불활성 무기물로 분해하는 것을 말한다. 또 이 생물작용의 과정에서 병원균(병균)과 그 매개물이 박멸됨과 동시에 슬러지 중의 유기물 절반이상이 액화, 가스화됨으로 인해 슬러지가 감량 및 안정화 된다. 고농도의 유기물을 포함하는 분뇨는 혐기성 상태에서 혐기성 세균의 활동에 의해 분해된다. 유기물을 분해시킬 때 혐기성 세균은 무기물 중의 산소 및 수중의 아질산염, 질산염, 황산염 등의 화합물 중의 산소를 이용하고 분해된 산물로서 메탄, 황화수소, 탄산가스 등을 발생시킨다. 이 슬러지의 소화과정을 단순하게 말하면 산발효와 메탄발효의 두 가지 공정으로 진행된다.

원료인 다시마와 혐기성 소화 공정을 위해 sludge를 첨가하고 혐기성 소화 과정을 위한 산소가 제거된 환경을 위해 질소를 첨가한다. Agitator Type은 Propeller, Top Entering 형태의 혼합기이며, 동력을 30kW 라 했을 때 40.2 hp의 동력으로 운영되는 혼합기 선택하였다.

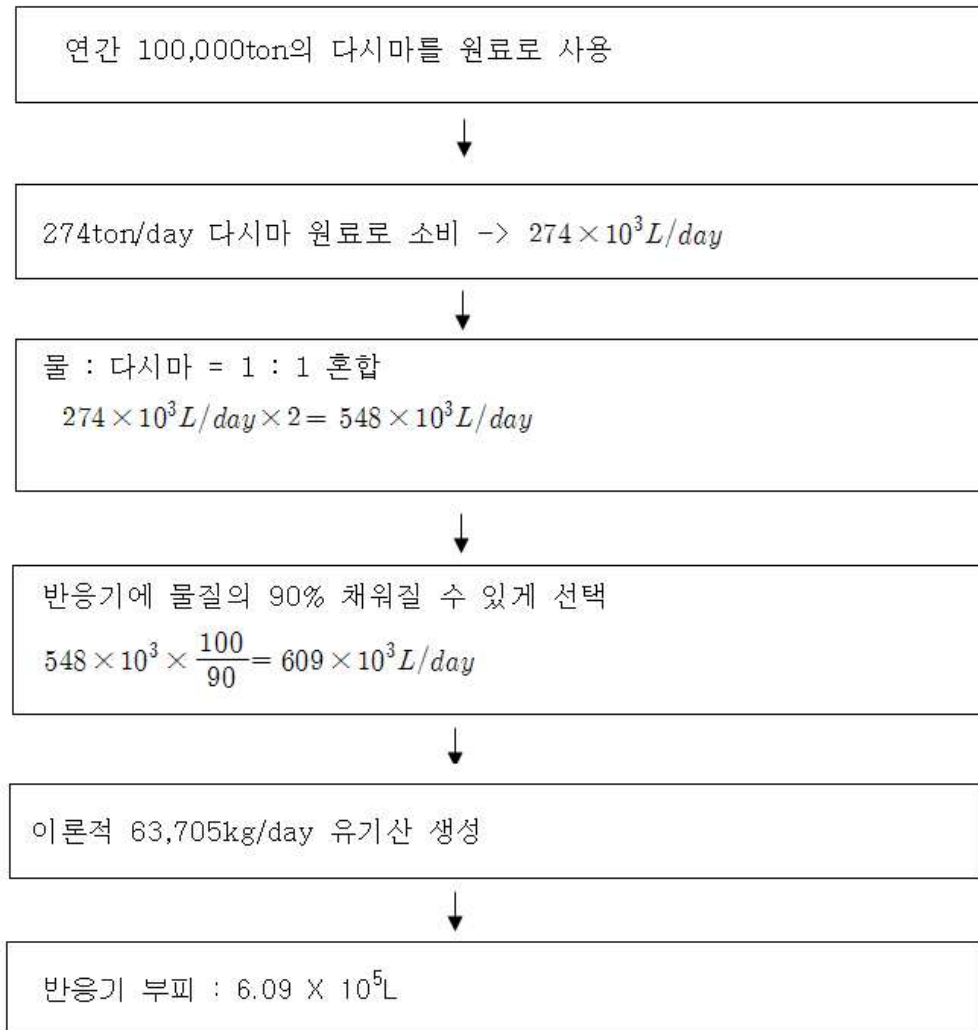
(2) Storage tank

반연속식인 생물 반응기와 연속반응기인 혼합기 사이에 저장 탱크를 두어 혼합기와 생물 반응기 연결한다. 저장탱크의 부피는 3개로 나눈 하나의 생물 반응기 크기로 한다. 가장 일반적인 Horiz, Fuel Storage Tank의 형태로 선택하고, 부피 53626.92 gallons로 결정한다.

(3) Fed-batch Bioreactor

기질은 연속적으로 또는 반연속적으로 공급되는 반면 유출액은 불연속적으로 제거되는 방식의 반응기이다. 반복 유가식 배양 (repeated fed-batch culture)이라고 한다. 단속적으로 기질을 공급함으로써 기질저해 또는 이화생성물 억제를 극복하는데 보통 사용한다. 어떤 유가식 운전에서는 반응기의 부피가 한정되어 있기 때문에 배양액의 일부를 적절한 시간 구간에서 제거한다.

하나의 반응기로 설계하기에는 크기가 너무 크기 때문에 3개의 작은 반응기를 시리즈로 연결하는 방식으로 설계하였다. 하나의 반응기 부피 = 2.03×10^5 L 정도 이므로, 이 부피를 가진 반응기 (Jacketed & Agitated) 세 개로 결정한다. 반응기 부피를 결정하는 절차를 다음의 도표에 나타내었다.



[그림 6-3-4] 혐기성 소화조 부피 결정.

(4) Centrifuge

원심력을 이용하여 성분이나 비중이 다른 물질들을 분리·정제·농축하는 기계로서 고체 성분인 바이오매스 찌꺼기와 액체 성분인 물, 아세트산의 혼합물을 분리한다. 지름 대 높이 비가 1:2인 수직 형태의 Centrifugal Separator 타입으로 결정하고, 부피를 생물 반응기의 부피와 동일하게 하여 결정함.

(5) Distillation column

아세트산과 물 공비 혼합물을 형성하지는 않지만, 간단한 증류공정을 사용하면 이 두 성분을 분리해내는데 많은 평형단(equilibrium stage)이 요구되므로 매우 비실용적이다. (끓는 점 : 118.1 °C) 공비증류는 일반적으로 상대휘발도가 비슷한 혼

합물을 분리하거나 공비물 형성을 방해할 때 이용한다. 혼합물에 제3의 물질, 즉 첨가제(entrainer)를 가해 평형을 조절하여 증류하는 방법. 첨가제가 acetic acid-물 혼합물의 한 성분(물)과 공비점을 형성하게 하여 증류 분리한다. 그래서 아세트산과 물을 분리 시 첨가제로 에틸 아세테이트를 사용하여 (70.4° C) 공비증류를 이용해 아세트산을 분리하는 것이 효과적인 방법이다.

그러므로 증류탑 2개를 이용해 물고 아세트산을 분리하고 13.72x10000 kg/hr 의 유량으로 취한다.

각 장치 별 설계 결과(크기)에 따른 장치 가격을 다음의 표에 정리하였다.

[표 6-3-4] 공정의 장치별 설계 결과와 예상가격

Mixer	<p>Agitator Type: Propeller, Top Entering Agitator Power : 40.2 hp Material: Carbon Steel Internal Pressure: Atmospheres Cost 2007 US \$: 18,000 2011년 기준 원화 환산: 19,578,683원 (20,000,000원)</p>
Storage tank	<p>Tank Type: Horiz, Fuel Storage Tank Volume : 53626.92 gallons Material: Carbon Steel Pressure: Atmospheric Cost 2007 US \$: 24,000 2011년 기준 원화 환산: 26,104,911원 (26,000,000원)</p>
Reactor	<p>Reactor Type: Jacketed & Agitated Reactor Volume : 53626.92 gallons Material: Stainless Steel Internal Pressure: Atmospheric Cost 2007 US \$: 669,700/ea 2011년 기준 원화 환산: 728,435,794원 x 3 (2,130,000,000원)</p>
Centrifuge	<p>Centrifuge Type: Centrifugal Separator, Vertical, Auto. Batch Centrifuge Diameter : 125 inches Material: Carbon Steel Pressure: Atmospheric Cost 2007 US \$: 316,900 2011년 기준 원화 환산: 344,693,599원 (340,000,000원)</p>
Distillation column	<p>증류탑 2개 13.72x10000 kg/hr Cost 2010 US \$: 1600000 2011년 기준 원화 환산: 2,043,691,200원 x 2 (4,100,000,000원)</p>
총 장치 비용	<p>약 66억 (6,616,000,000원)</p>

○ 수치최적화를 이용한 공정 통합 및 설계

물질 수지식 결과와 개념 설계를 통해 결정된 각 공정 기기의 size를 구한 total equipment cost는 약 66억원 이었다. Preliminary 분석 결과 다시마의 도매가격을 가지고는 의미 있는 경제성 분석 결과가 나오지 않으므로, 다음과 같은 방법으로 경제성 평가를 수행하였다. Utility인 Solvent나 inhibitor, 그리고 최종 제품인 아세트산과 같은 참가하는 화학물질의 경우 쉽게 가격을 찾을 수 있으므로, 단순 감가상각비용을 포함한 운전비용 (utility cost + raw material cost)이 연간 제품 판매액 같아지는 손익 분기점에서의 다시마 원료의 비용을 계산하였다. 이 때 구체적인 평가 조건은 다음과 같다:

- (1) 연간 바이오매스 처리량: 100,000 M/T/yr.
- (2) 바이오매스의 유기산 전환율: 23.3% (233 kg 아세트산/1,000kg 다시마)
- (3) 유기산은 모두 100% acetic acid로 가정.
- (4) 물과 유기산의 분리는 MIBK(Methyl Isobutyl Ketone)을 사용한 L-L extractron 사용.
- (5) 공장의 감가상각 기간: 10년 (단, 공장 건설비용은 공장부지 구입비와 장치 설치 (건설)비를 고려하지 않은 순수 장치비로만 계산)
- (6) Utility 비용은 inhibitor와 MIBK만 고려.
- (7) 공장 유지비, 공장 O/H (인건비) 등 부가적인 비용은 고려하지 않음.
- (8) 다시마 원료를 제외한 주요 원료 및 제품의 단위 판매가격/원료가격은 다음과 같다.

[표 6-3-5] 물질 수지식에 참가하는 주요 물질의 단위 판매가격/원료가격

원료/제품	판매가격/원료가격(원/kg)
Iodoform	3,500
MIBK	600
Acetic Acid	750

상세한 계산은 다음과 같다.

▶ 손익 분기점, 즉 이윤이 0이 되는 다시마의 최소 원료비를 책정

$$\text{이윤} = \Sigma \text{판매비용} - \Sigma \text{원료비} - \Sigma \text{유틸리티} - \Sigma \text{운전비용}$$

▶ 총 판매 비용 : 연간 100,000ton/yr 의 다시마 투입 기준, 연간 2,330 ton/yr의 아세트산을 생산하므로 연간 아세트산 판매가격은 약 176억원/년 (17,617,950,000원/년) 임.

▶ 물가 상승률을 고려한 가격

[표 6-3-6] 2008 ~ 2011년도의 물가 상승률

물가상승률			
2008	2009	2010	2011
4.7	2.8	2.9	4.1

2007년 100 달러 → 100*943.42=94,342원

2007년 환율 : 943.42

* 물가상승률 대비 계산한 2011년에 2007년 100달러에 대한 가치

$$(((94,432 * (1 + 0.047)) * (1 + 0.028)) * (1 + 0.029)) * (1 + 0.041) = \underline{108874.228\text{원}}$$

2007년에서 2011년 사이의 물가상승률은 15.4% 이다.

▶ 감가상각비를 고려한 장치비

정액법(定額法, Straight-line Depreciation)

각 기간마다 일정액을 감가상각하는 방법으로, 간단하다는 장점 때문에 가장 많이 쓰이고 있다. 정액법으로 감가상각하는 자산은 일반적으로 유형 자산이고, 특히 건물의 경우에는 세법상 정액법으로 감가상각하는 것을 원칙으로 하고 있다.

$$D = \frac{\text{Original Cost} - \text{Salvage Value}}{\text{Useful Life of Asset}(\text{years})}$$

D : 감가상각비, Original Cost : 취득가액, Salvage Value : 잔존가치, Useful Life of Asset : 내용연수

= 약 66억원/10년 = 6.6억원/년 (661,600,000원/년)

▶ 운전 비용 :

감가 상각비 + 공장 건설비 (장치비, 장치 설비비, 땅값, 동력비(전기 동력비, 수도 비등))에서 위의 조건에 따라 계산하면 약 71억원/년 (7,139,177,726원/년) 임.

▶ 총 유틸리티 비용 : 물, 질소 등도 있으나 위의 조건에 따라 계산하면 약 65억원 /년 (6,477,577,726원/년)

경제성 분석 결과 위와 같은 조건에서는 다시마 원료의 가격이 적어도 105 원/kg 이하가 되어야 손익분기점에 도달할 수 있다는 결과가 나왔다. 유기산의 수율 (유기산 질량/다시마 질량)을 변화시켜 경제성 분석을 한 결과는 아래 표와 같다. 예상된 바와 같이 수율이 높아질수록 높은 다시마 원료의 가격도 가능성을 알 수 있다.

[표 6-3-7] 현기성 소화 수율 증가에 따른 손익분기점에서의 다시마 원료비의 변화

수율 (유기산/다시마 질량비)	다시마 원료 가격(원/kg)
0.2	88
0.3	135
0.4	183
0.5	230

4. 요약 및 제언

1차년도 보고서를 토대로 개별 전환공정의 모델링 기초조사를 실시한 결과, 실험의 규모가 너무 작고 개별 전환공정이 최적화 되지 않은 것은 물론, 물질 및 에너지 수지식 관련 정보가 매우 불충분하여 제대로 된 수지식을 수립할 수 없었다. 이러한 수지식이 없이는 모델링은 물론 경제성 분석도 불가능하므로, 현재 수행 중인 (또는 향후 3차년도 수행시) 전처리 공정 및 전환공정(생물학적 전환공정, 혐기성 소화, 급속 열분해) 연구에서 이 점이 보완되어야 본 연구의 궁극적인 목표 달성이 가능하다. 또한 정확한 경제성 분석을 위해서는 모델링에 많은 인적 물적 자

원이 필요하므로 3차년도 수행시 반드시 반영이 필요하다고 판단된다.

혐기성 소화에 의한 유기산 생성의 경우, 보고서 내 물질 수지식에 대한 정보와 참고문헌[5]을 토대로 분리공정 까지 포함한 전체 공정의 수지식을 부분적으로 수립할 수 있었다. 현재 300L pilot scale의 혐기성 소화 공정이 운전 중이므로 향후 보다 정확하고 완전한 물질 및 에너지 수지식 수립이 가능할 것이다.

위에서 수립한 물질 수지식을 토대로 혐기성 소화에 의한 유기산 생성공정의 경제성 분석을 실시한 결과, 주어진 조건(3 연구수행 결과 참조)에서 원료인 다시마의 가격이 105원/kg 이하가 되어야 손익분기점을 돌파할 수 있는 것으로 분석되었다. 현재 운전중인 pilot scale의 혐기성 소화 공정의 최대 수율(40%)에서는 183원/kg까지 최소 원료가격이 높아짐을 알 수 있다. 따라서 대량양식에 의한 다시마 원료의 저가격화가 매우 중요할 것으로 판단되며, 아울러 전환공정의 수율 증대와 분리공정의 운전비용 감소 또한 중요하다 하겠다.

위의 경제성 분석을 토대로 볼 때, 원료 가격 절감과 공정 최적화의 영향을 어느 정도 고려하더라도 경제성을 극대화하기 위해서는 여러 전환공정의 통합이 반드시 필요하다 하겠다.

5. 향후계획

향후 연구 계획은 다음과 같다:

- (1) 전처리 및 여러 전환공정의 물질/에너지 수지식 관련 정보 수집.
- (2) 혐기성 소화에 의한 유기산 전환공정 모델의 완성도 향상.
- (3) 기초 경제성 평가 모델의 정확도 향상.

제 4 절 해조류 유용물질 분리 및 회수 공정 개발

1. 연구 목적 및 내용

가. 연구 목적

본 연구는 부가가치 및 이용률이 낮은 해조류(다시마)로부터 환경 친화적 무오염 용매인 이산화탄소를 이용한 초임계 유체 추출 기술로 해조류(다시마)로부터 부가가치가 높은 생리활성 및 유용 물질(성분)을 추출, 분리하고, 고압 가수분해 분해 공정 시스템을 구축하여 다시마로부터 신물질(아미노산, 단당류)을 생산하는 것을 목적으로 한다. 동시에 각 반응의 분리 최적조건을 확립하고, 추출 분리된 물질의 특성 파악한다. 이를 통해 각 공정에서 회수된 해조류(다시마) 유래 유용 물질의 산업적 응용을 최종적으로 검토해 본다.

(1) 해조류 유래 유용물질의 효율적 분리/생산 기술 개발

- 환경 친화적 무오염 용매를 이용한 해조류 유용 물질 분리/회수 기술 개발
- 제품 품질의 부정적 요소(VOCs, 유해물질 등) 저감화 기술
- 유용물질 특성(안전성, 안정성)파악

(2) 고압 가수분해 반응을 이용한 해조류 신물질 생산 기술 개발

- 해조류 원료/부산물의 가수분해 기술 개발 및 신물질 동정
- 분리 회수된 소재의 산업적 응용 검토

나. 연구 내용

(1) 초임계 유체 추출 공정

(가) 해조류 유래 기능성 물질 추출/분리

- 초임계 이산화탄소에 대한 기능성 물질의 용해도 측정
- 기능성 물질 분석(HPLC, UV/VIS Spectrophotometer, GC)
- 최적 추출/분리 조건 확립

(나) 제품 품질의 부정적 요소 저감 및 제어

- 휘발성 유기물질(VOCs) 분석

- 부정적 요소 최적 저감/제거 조건 확립

(2) 고압 가수분해 공정

(가) 해조류 원료의 1, 2차 부산물로부터 유용성분 생성

- 가수분해율 측정
- 단당류 생성 및 분석(HPLC)
- 아미노산 생성 및 분석(Amino Acid Analyzer)

(나) 안정성 분석

- 유용성분의 열 안정성 분석

(다) 신물질 동정 및 용도 개발

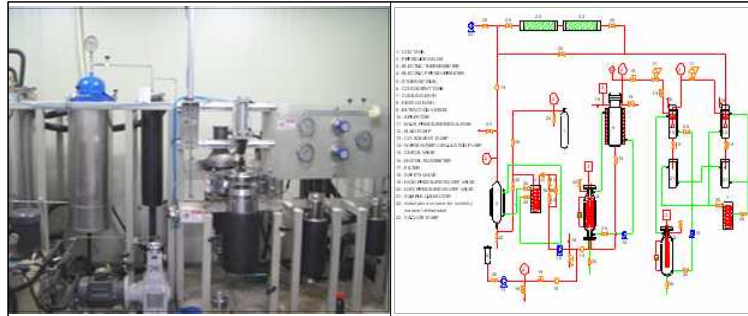
2. 연구 방법

가. 실험장치 및 재료

(1) 재료

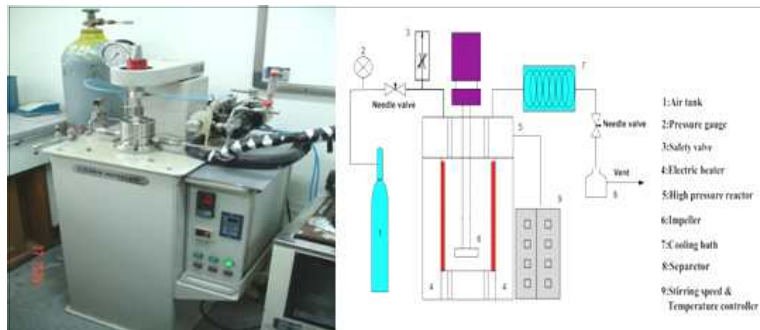
실험에 사용된 해조류는 전라남도 완도군 금일면에서 수확한 다시마 (*Laminaria japonica*)이고, 수확 후 수세된 다시마를 제공받아 동결 건조 후 500 μ m로 분쇄하여 -20 $^{\circ}$ C 암소에서 보관하며 사용하였다. 이산화탄소는 식품용 순도 99.9%를 사용하였으며, 분석 및 보조용매로 사용된 시약은 특급시약이었으며, Whatman사의 nylon membrane filter(pore size=0.2 μ m)로 여과하여 사용하였다. 다시마의 초임계 이산화탄소 처리에 사용된 슝은 의약용 탈지면을 사용하였다.

(가) 초임계 유체 추출장치



[그림 6-4-1] 초임계 이산화탄소 추출 장치 및 모식도.

(나) 회분식 및 연속식 아임계 및 초임계수 가수분해 장치



[그림 6-4-2] 회분식 아임계수 가수분해 장치 및 모식도.

(다) 분석 장비

- ① Amino acid auto analyzer(Hitachi L-8900)
- ② HPLC analyzer(Waters 600E, UV-detector)
- ③ UV/VIS Spectrophotometer(UVIKON933, KONTRON INSTRUMENTS)
- ④ GC analyzer SP™-2560, FUSED SLICA Capillary Column)

나. 실험 절차

(1) 다시마의 일반성분 분석

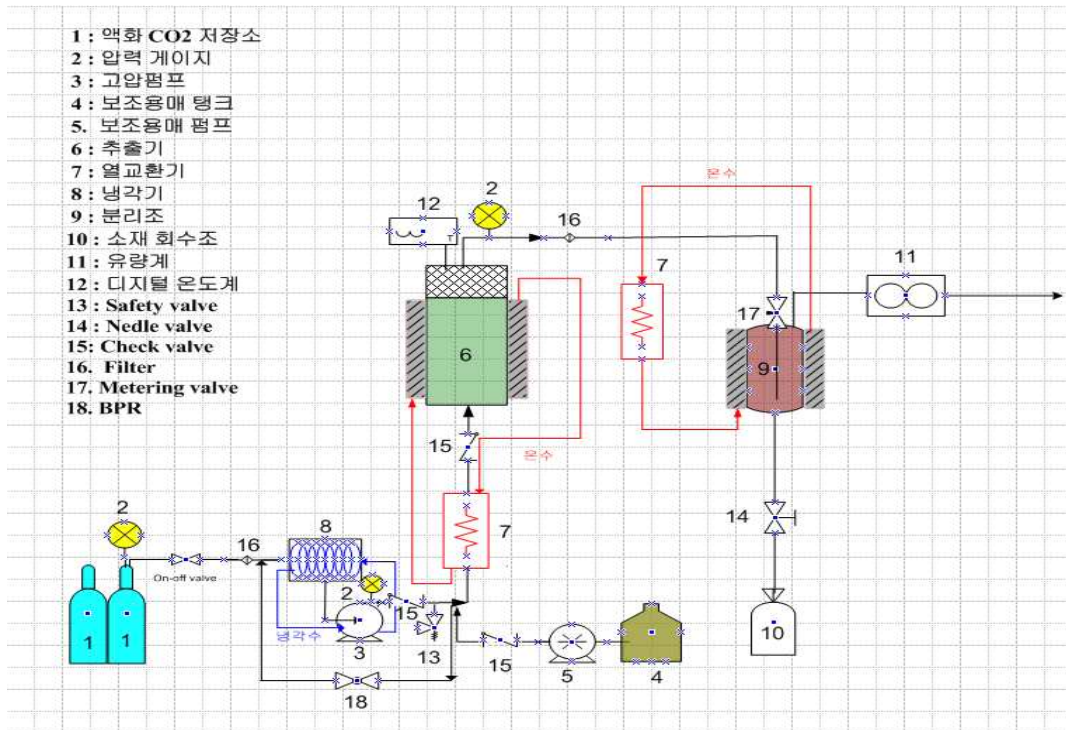
다시마의 일반성분 분석은 AOAC법(1995)에 의해 수분은 105℃ 상압가열건조법, 조지방은 soxhlet법, 조단백질은 Kjeldahl법, 조회분은 건식회화법으로 분석하

였다. 탄수화물의 정량은 고형분의 총량에서 단백질, 총 지질 및 수분과 회분의 함량을 뺀 값으로 나타내었다. 모든 분석은 3회 반복 측정하였다.

(2) 초임계 이산화탄소를 이용한 다시마의 지질 추출

초임계 이산화탄소를 이용하여 다시마로부터 지질을 추출하고, 다시마의 이취 및 휘발성 성분을 제거하기 위한 실험은 semi-continuous flow type의 장치에서 수행되었다. 포화압력 상태인 이산화탄소가 cylinder로부터 냉각기(-20℃)를 통과하여 이산화탄소 내에 존재하는 기포 제거 및 액체 상태로 상변화 후 고압 metering pump에 의해 일정한 유량으로 유입되어 system 내의 설정 압력까지 수행되어 진다. 고압펌프로부터 반응기에 유입되기 전에 추출 용매로 작용하는 이산화탄소는 설정된 추출 온도에 따라 항온조에 의해 예열되어진다. 반응기 내의 온도는 thermocouple에 의해 감지되어 추출 온도를 조절하게 되며, 반응기 외부에 heating jacket을 설치하여 반응기 내부의 온도를 일정하게 유지시켰다.

System 내의 전체 압력은 2개의 metering valve와 back pressure regulator를 부착시켜 순간 압력변화로 인한 system 내의 추출 조건변화를 방지하였다. 고압 pump와 압력 조절기 앞부분에 7 micron filter를 설치하여 추출이 진행되는 동안 용매 이산화탄소와 시료의 입자에 의한 system의 흐름이 중단되는 것을 방지시켰으며 safety valve를 부착시켜 system 내의 excess pressure를 제거하였다. 또한 실험 종료 후 system 내의 고압으로 인한 압력의 역류로 고압펌프의 손상을 방지하기 위하여 고압펌프 출구에 check valve를 설치하였다. 초임계 이산화탄소는 반응기 내의 시료로부터 휘발성 성분을 분리하여 낮은 압력 상태로 분리조 내에 유입되어 이산화탄소와 용제를 쉽게 분리시키게 하였다. 이때 추출과정 동안 사용된 CO₂의 양은 CO₂가 gas meter를 통과함으로써 측정되며 gas meter 통과 후 대기로 방출된다. 전처리 된 시료는 200g이 사용되었으며, 다양한 온도(35~45℃), 압력 조건(100~250bar)에서 2시간 동안 추출이 수행되었다. 추출된 지질은 갈색튜브에 보관하여 빛을 차단하고 질소충전 후 -20℃ 암소에서 보관하며 사용하였다. 다시마로부터 이취성분을 제거하고 기능성 물질을 추출하기 위한 초임계 이산화탄소 추출 장치는 [그림 6-4-3]에 나타내었다.



[그림 6-4-3] 초임계 CO₂를 이용한 추출 공정도.

(3) 추출 물질 분석

추출 조건에 따라 확보된 기능성 물질의 수율과 순도 검정은 GC와 HPLC를 사용하고, 총 페놀 함량 실험은 UV Spectrophotometer를 사용한다.

(가) HPLC를 이용한 다시마 추출물에 함유된 푸코잔틴 분석

푸코잔틴 분석은 Waters HPLC 600E 펌프와 484 UV/VIS 디텍터, Eclipse Plus C18 컬럼(5 μm, 4.6 x 250 mm, Agilent, USA)를 이용하여 수행되었다. 푸코잔틴 분석을 위해 사용된 이동상은 각각 methanol : acetonitrile : ethyl acetate가 사용되었다. 표준시약은 각각 250 ppm, 500 ppm, 1000 ppm 으로 제조하여 사용하였다. 사용된 이동상은 0.25μm advantec filter를 이용하여 필터링 후 용매 내의 공기를 제거하기 위해 소니케이터를 이용하여 제거한 후 사용하였다. HPLC-UV 분석을 위해 각 추출된 지질은 ethanol을 사용하여 용해시켰으며 1000ppm 으로 희석시켜 사용하였다. 희석된 지질은 0.2 μm advantec syringe filter를 이용하여 필터링 후 사용되었으며 HPLC-UV 분석조건은 [표 6-4-1]에 나타내었다.

[표 6-4-1] Fucoxanthin 분석을 위한 HPLC-UV 분석조건

HPLC condition	
Instrument	Waters HPLC 600E-484 UV/VIS
Column	Eclipse Plus C18 column (5 μ m, 4.6 x 250 mm, Agilent, USA)
Column temp.	Room temp.
Detector	484 UV/VIS detector
Wavelength	420 nm
Injection volumn	20 μ L
Flow rate	1.0 mL/min
Moble phase	MeOH : ACN : ethyl acetate (80:10:10, v/v)

(나) GC를 이용한 다시마 추출물 지방산 분석

다양한 조건에서 초임계 CO₂를 이용하여 추출한 다시마의 지방산 분석은 Metcalf 방법에 따라 BF₃-methanol을 사용하여 methyl ester화 시킨 다음 GC로 분석하였다. 분석기기는 검출기로서 FID가 부착된 Agilent Technologies 6890N을 사용하였고, 컬럼은 SPTM-2560, FUSED SLICA Capillary Column(100m×0.25mm×0.2 μ m)를 사용하였다. oven 온도는 140°C에서 5분간 유지시킨 후 3.50°C/min 씩 승온시킨 후 240°C에서 15분간 유지한다. carrier gas는 He gas를 0.9 ml/min으로 하였으며 split ratio는 10:1로 하였다. 지방산 표준품은 지방산 메틸에스터 표준품(Sigma Chemical CO.)를 사용하여 분석하였다.

[표 6-4-2] GC/FID 분석조건

Model	Agilent Technologies 6890N
Column	SP TM -2560, FUSED SLICA Capillary Column (100m×0.25mm×0.2 μ m)
Carrier gas.	He
Flow rate	0.9ml/min
Injector temperature	250°C
Detector temperature	260°C
Air/H ₂	10/1
Oven temperature	140°C (5min hold)→3.50°C/min→240°C (15min hold)

(다) 다시마 추출물의 총 폴리페놀 함량 분석

다양한 조건에서 초임계 CO₂를 이용하여 추출한 다시마의 총 페놀 함량은 Folin-Ciocalteu(Gutfinger, 1981)법을 이용하여 비색정량 하였다. 다양한 조건에서 추출한 추출물은 은 감압회전농축기 0.200± 0.001g을 vial에 넣고 70% 메탄올 5ml 가한 후 잘 섞는다. 혼합된 샘플은 70°C의 vortex에 10분간 넣어준 후 실온에서 냉각한다. 냉각 후 원심분리기에서 10분간 분리 후 상층액을 분리하고 다시 반복 작업을 행한다. 분리된 상층액을 혼합 후 70% 메탄올을 이용하여 10ml로 맞춘 후 0.25µm advantec filter로 여과하여 샘플로 사용하였다. 100ml 정용병에 샘플 용액 1 ml를 취한 후 증류수 70ml를 첨가하고, 연이어 5ml의 2N FC reagent를 넣고 5분 동안 실온에서 배양한다. 그 후 15ml의 포화 sodium carbonate solution을 첨가하여 섞고 2시간 동안 실온에서 배양하여 반응시킨 다음 UV/VIS-Spectrophotometer (UVIKON933, KONTRON INSTRUMENTS)를 이용하여 765nm에서 흡광도를 측정하다. 총 polyphenol 함량은 Gallic acid(Sigma Aldrich, USA)를 표준물질로 하여 작성한 표준검량곡선을 통해 다양한 조건에서 추출한 추출물의 총 polyphenol 함량을 환산하여 나타내었다.

(4) 다시마 품질의 관능적 저해 요소(VOCs, 이취) 제거/저감 분석

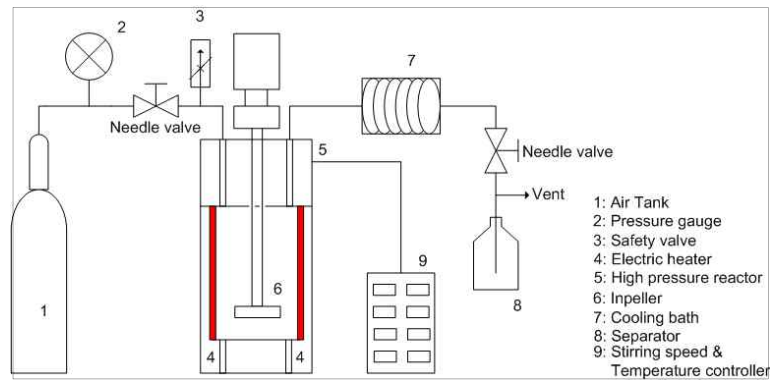
초임계 이산화탄소 처리로 인한 다시마 품질의 관능적 저해 요소(VOCs) 저감 효과를 알아보기 위한 실험은 GC/MS를 이용하여 수행되었다. 휘발 성분 물질을 동정하기 위해 자동 열탈착 시스템(ATD; Automatic Thermal Desorber, ATD-400, Perkin Elmer, USA)과 GC/MS(HP 6890/Q 2010A, Shimadzu, Japan)를 이용하였다. 다시마 원시료 및 다양한 조건에서 초임계 이산화탄소 추출 후 반응기에 잔존하고 있는 추출물의 휘발 성분의 분석은 gas chromatography/mass detector로 동정한다. 원시료 및 추출물 내 휘발 성분은 SPME holder and fibers에 의해 포집되며, SPME holder에 부착된 fiber에는 stationary phase로 polydimethylsiloxane(PDMS)이 얇은 필름으로 코팅되어 있다. 정량된 샘플 1g을 튜브에 넣은 후 heating block에 고정시키고 SPME headspace sampling은 샘플이 존재하는 tube 속에 fiber가 부착된 needle을 주입시켜 50°C에서 30분 동안 유지시켜 시료 내의 향기성분들은 fiber에 흡착되어 진다. 그 다음 SPME fiber는 headspace 샘플 튜브로부터 회수되어 GC에 부착된 injection port에 주입되어 일정 시간 동안 노출시켜 fiber에 흡착된 향기성분에 대한 분석이 진행된다. 휘발성 성분의 동정은 GCQ library search system(NIST Mass Spectra Data Base)에 의한 검색, Willey/NBS Registry of Mass Spectra Data, Eight Peak Index of Mass Spectra에 의한 문헌의 질량분석 데이터 검색으로 물질을 추정한다.

[표 6-4-3] VOCs (Volatile organic Compounds) 분석조건

Parameter	Condition
ATD-400(Perkin Elmer, USA)	
Tube Type	Tenax-TA
2nd split ratio	7:1
1st desorption	320°C (3min)
2nd desorption	340°C (1min)
25t cryo temp	-30°C
GC/MS(QP-2010, Shimadzu)	
Oven temp.	35°C (10min)
	8°C/min - 120°C (10min)
	12°C/min - 180°C (7min)
	15°C/min - 230°C (10min)
Column	AT-1(60m × 0.32m × 1.0μm)
Column flow	0.62ml/min
Interface Temp.	250°C
Mass Range	20~350m/z
Column Pressure	15.7psi
MS Det. Temp	250°C
Carrier gas	He(99.9999%)

(5) 아임계수를 이용한 다시마 가수분해

다시마 아임계 수 가수분해 장치의 공정도는 [그림 6-4-4]에 나타내었다. 가수분해 실험은 다시마 분말 3g과 증류수 150ml(W/V, 1:50)으로 시료를 준비하고 반응기에 주입하였다. 교반속도는 100rpm이며, 반응기 내 질소 충전 및 acetic acid 산 촉매 첨가 유무를 달리하여 실험조건에 변화를 주었다. 다시마의 가수분해 반응은 전열기로서 가열하여 실험 온도(200-350°C)가 정상상태에 도달하면 1분 동안 가수분해 시켰다. 가수분해 후 즉시 반응물을 회수하여 각각의 분석을 행하였다.



[그림 6-4-4] 아임계수 가수분해 장치 공정도.

(6) 아임계수를 이용한 다시마 가수 분해물 수율 및 열 안정성 분석

(가) 다시마 가수 분해물 수율

수율측정은 [(초기 샘플무게 - 가수분해 후 건조시킨 샘플무게)/초기 샘플무게] 값으로 계산한다.

(나) 다시마 가수 분해물 내 기능성물질 열 안정성 분석

아임계수 가수분해를 통해 생성된 가수분해물은 아래의 실험을 진행하기에 앞서 진공 농축기를 이용하여 수분을 제거하는 전처리 과정을 거친다.

① 지방산 열 안정성

아임계수를 이용한 다시마 가수분해물 내 존재하는 지방산 열 안정성 실험 방법은 나-3-(나)의 방법과 동일하다.

② 기능성 색소인 Fucoxanthin의 열안정성

아임계수를 이용한 다시마 가수분해물 내 존재하는 Fucoxanthin 열 안정성 실험방법은 나-3-(가)의 방법과 동일하다.

③ polyphenol 열 안정성

아임계수를 이용한 다시마 가수분해물의 총 polyphenols의 열 안정성 실험 방법은 나-3-(다)의 방법과 동일하다.

3. 연구수행 결과

가. 다시마 일반성분

동결 건조된 다시마의 일반 성분 분석 결과는 [표 6-4-4]에 나타내었다. 다시마의 일반성분 조성은 조지방 1.33%, 전당 53.503%, 수분 5.977%, 회분 28.26% 조단백 10.93%로서 지질 성분은 매우 적으나 다량의 무기질 성분을 포함하고 있음을 알 수 있었다. 그와 더불어 아임계수 가수분해를 이용한 단당류 생성에 필요한 많은 양의 기질을 함유하고 있음을 알 수 있었다.

[표 6-4-4] 다시마의 일반조성 Freezing dry basis

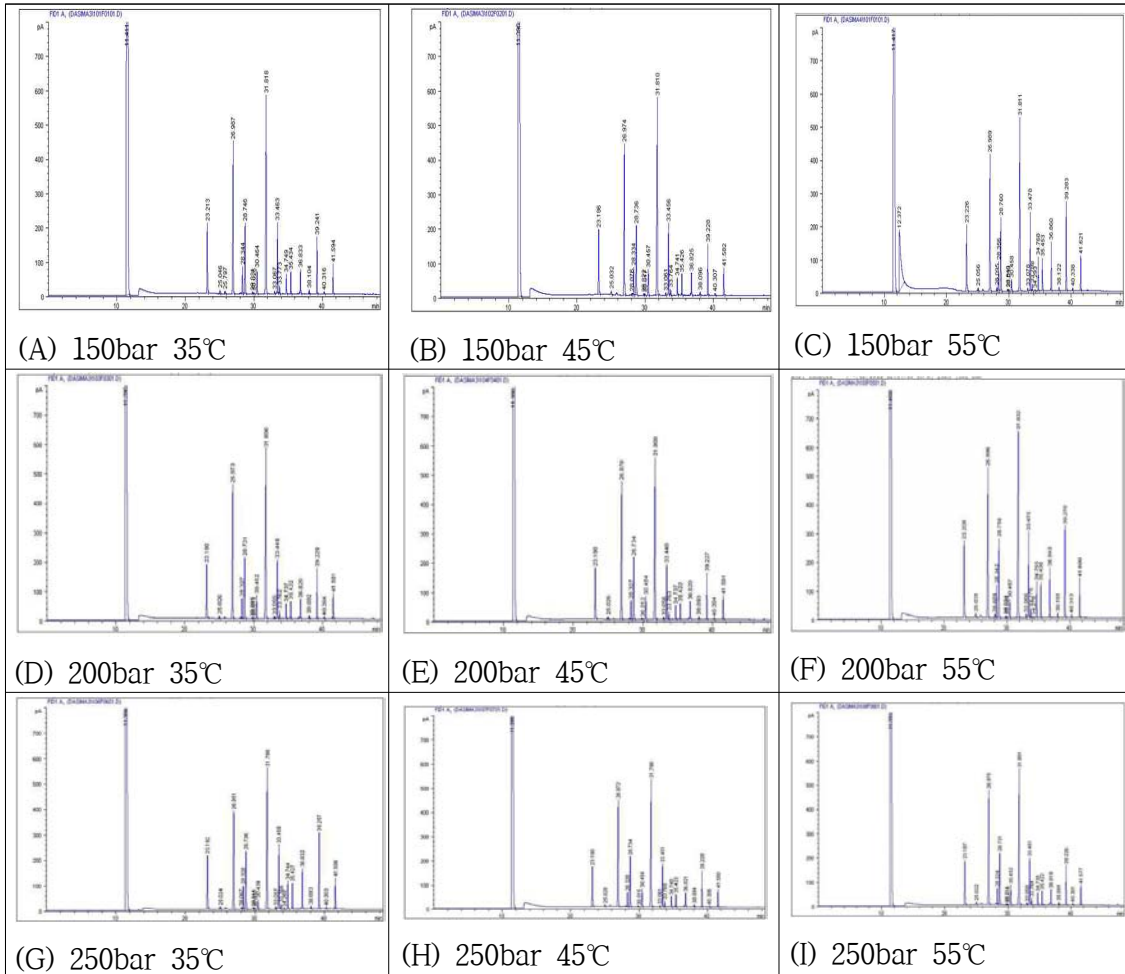
Composition	Component(%)
Moisture	5.977
Crude protein	10.93
Crude lipid	1.33
Ash	28.26
Total sugar ^a	53.503

a 100-(moisture+crude protein+crude lipid+ash)

나. 초임계 CO₂를 이용한 다시마 추출물의 지방산 조성

다시마의 일반 성분을 분석한 결과 조지방 함량이 1.24~1.49%로 지질의 함량이 매우 낮은 식품임을 알 수 있었고, 다시마의 지방산 분석 결과 일반적으로 총 18종의 지방산이 주로 동정되었다. 다양한 조건에서 추출한 오일의 지방산 크로마토그램 및 주요 지방산 조성은 아래 [그림 6-4-5]와 [표 6-4-5]에 나타내었다. 실험 조건에 따른 지방산 종류별 함량 비교 결과 차이는 거의 없었고, 온도가 높아짐에 따라 조금씩 감소하는 경향이 있었다. 이것은 같은 압력에서 온도가 높아짐에 따라 초임계 CO₂의 밀도가 낮아 용매력이 감소하여 나타난 것으로 사료된다. 특히 생리적으로 중요한 의미를 갖는 n-3 polyenes 중 linoleic acid(18:3, n-3) 함량은 최소 0.0237~2.835%, eicosapentaenoic acid(20:5, n-3)는 2.777~3.867%로 정량 되었으며, n-6 polyenes는 linoleic acid(18:2, n-6) 및 arachidonic acid(20:4, n-6)가 주요 지방산으로 정량되었다. 그 외에 다시마에서 검출되는 미량 polyenes 지방산으로는 γ -linolenic acid(18:3, n-6), eicosatrienoic acid(18:3, n-6) 등이 검출 되었다. 한편 monoenes 지방산으로는 oleic acid(C18:1) 및 palmitoleic acid(16:1) 및 cis-10-Heptadecenoic acid(C17:1)의 함량이 0.146~31.149%로 정량되었다. Saturates는

palmitic acid(16:0)과 myristic acid(14:0)가 주된 지방산이었으며, 그 외에 pentadecanoic acid(15:0), heptadecanoic acid(17:0), stearic acid(18:0) 및 arachidic acid(20:0)가 미량으로 정량되었다.



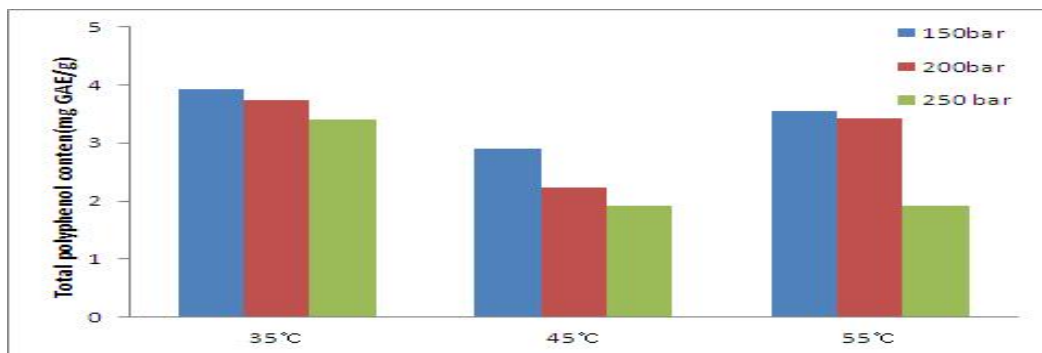
[그림 6-4-5] 다양한 조건에서 다시마로부터 추출된 오일의 지방산 크로마토그램.

[표 6-4-5] 다양한 조건에서 추출된 다시마 추출물의 지방산 조성

Pressure (MPa)	Temp (°C)	Fatty acids(%)						
		Palmitic	Stearic	Oleic	Linoleic	Linolenic	Arachidonic	EPA
15	35	21.94	2.94	30.87	6.54	1.96	5.82	3.07
	45	22.21	3.25	31.49	6.69	1.93	5.20	2.82
	55	15.28	1.18	20.07	5.83	2.29	7.75	2.78
20	35	22.82	3.32	31.15	6.28	1.81	6.01	3.08
	45	24.62	3.46	29.71	6.03	1.76	5.65	2.95
	55	19.97	1.98	26.61	7.07	2.63	9.08	3.48
25	35	16.64	1.57	26.17	7.42	2.84	10.70	3.87
	45	24.04	3.46	29.88	6.07	1.75	5.70	2.96
	55	24.30	3.45	29.88	6.09	1.79	5.72	2.97

다. 초임계 CO₂를 이용한 다시마 추출물의 총 폴리페놀 함량

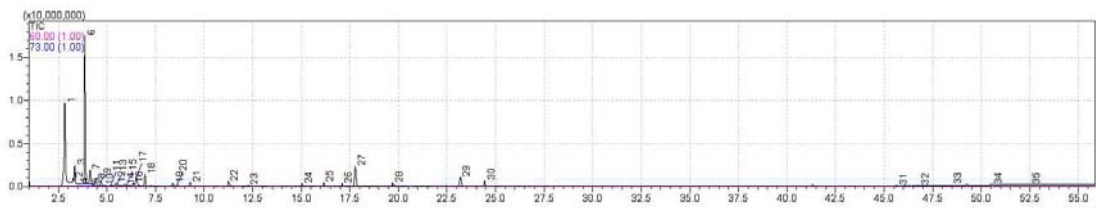
초임계 CO₂를 이용하여 다시마로부터 추출한 오일에 함유된 총 폴리페놀 함량을 [그림 6-4-6]에 나타내었다. 실험 조건 중 150bar, 35°C에서 가장 높은 폴리페놀 함량(3.92 mg/g)이 측정되었으며, 전체적으로 45°C에서 가장 낮은 폴리페놀 함량이 분석되었다. 한편, 35~45°C의 온도 조건에서 압력이 증가할수록 폴리페놀함량은 감소하였지만, 55°C에서 250 bar를 제외한 압력 조건에서 다시 폴리페놀함량이 증가하였다. 반면에 250 bar의 실험 조건에서, 온도가 증가함에 따라서 다시마 추출 오일 내 폴리페놀 함량이 감소하였는데, 이는 온도 증가에 의한 초임계 CO₂ 용매력 감소에 의한 것으로 사료된다. 이번 실험을 통해 얻은 결과는 추출 조건 변화에 따른 규칙성 및 통일성이 부족하므로, 이와 관련해 추출 조건 및 폴리페놀 함량의 상관관계에 대한 정확한 검토가 필요할 것으로 사료된다.



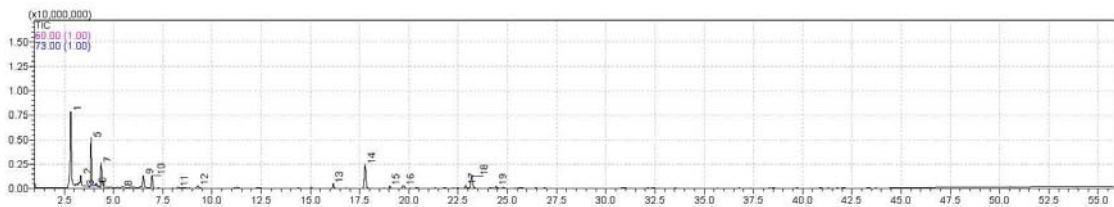
[그림 6-4-6] 실험 조건별 SCO₂ 다시마 추출 오일에 함유된 총 폴리페놀 함량.

라. 초임계 CO₂ 처리 전과 후의 이취 및 휘발성 유기 성분(VOCs) 비교

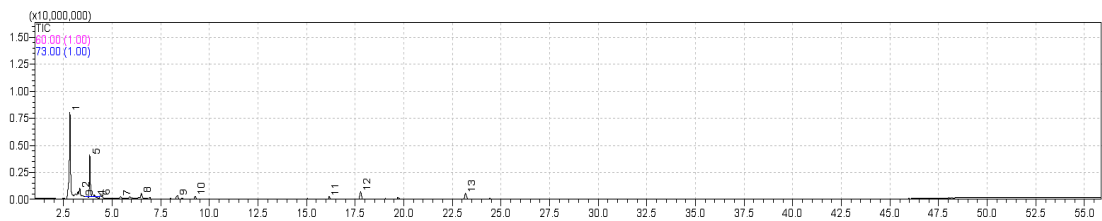
다시마에 존재하는 이취 및 휘발성 유기 성분(관능적 저해 요소)을 제거/감하기 위한 최적 조건을 설정하기 위하여 다양한 온도(35~45℃), 압력 조건(100~250bar)에서 초임계 이산화탄소를 연속적으로 처리하였다. 다음은 초임계 이산화탄소 처리 전과 후의 다시마 파우더에 대한 가스크로마토그램과 휘발성 성분을 나타낸 각각의 그림과 표이다.



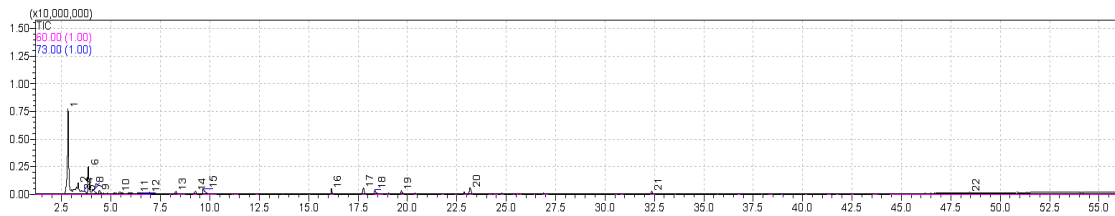
[그림 6-4-7] 다시마 원시료 내 VOCs Chromatogram.



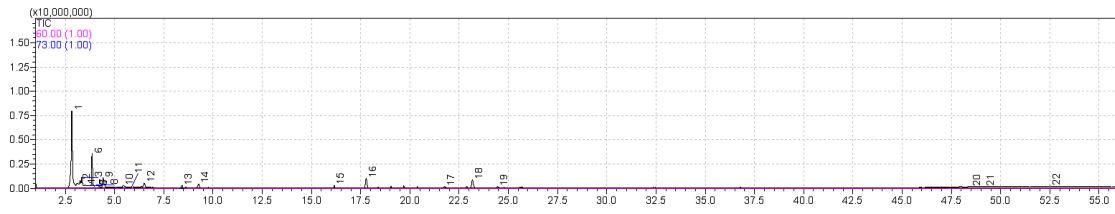
[그림 6-4-8] 초임계 CO₂처리 다시마 시료 내 VOCs Chromatogram(100bar 35℃).



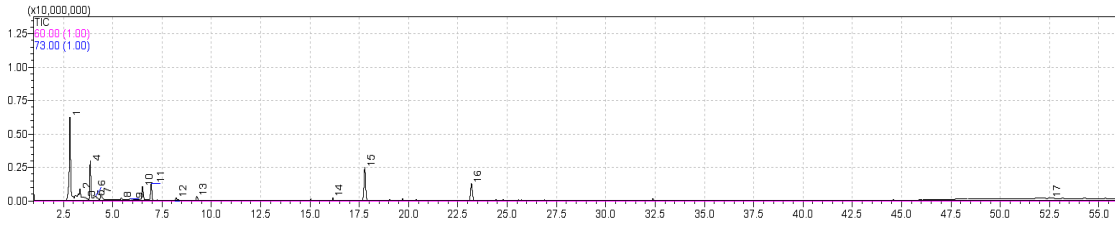
[그림 6-4-9] 초임계 CO₂처리 다시마 시료 내 VOCs Chromatogram(100bar 45℃).



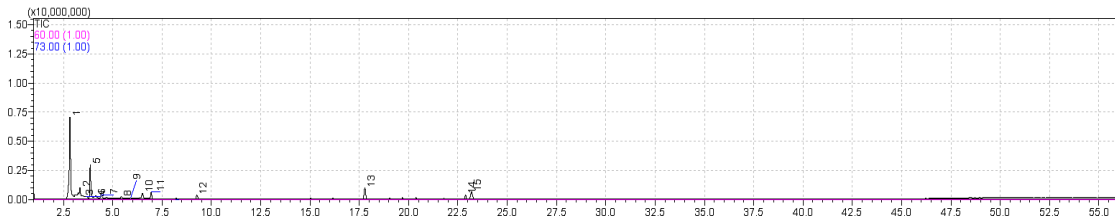
[그림 6-4-10] 초임계 CO₂처리 다시마 시료 내 VOCs Chromatogram(100bar 55℃).



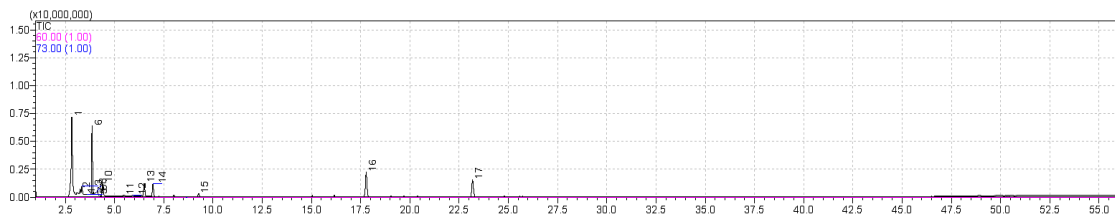
[그림 6-4-11] 초임계 CO₂처리 다시마 시료 내 VOCs Chromatogram(150bar 35°C).



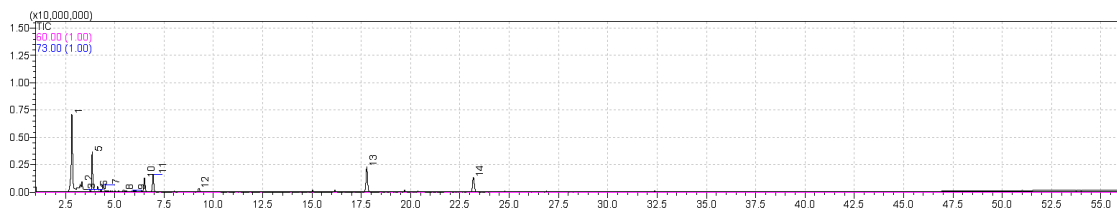
[그림 6-4-12] 초임계 CO₂처리 다시마 시료 내 VOCs Chromatogram(150bar 45°C).



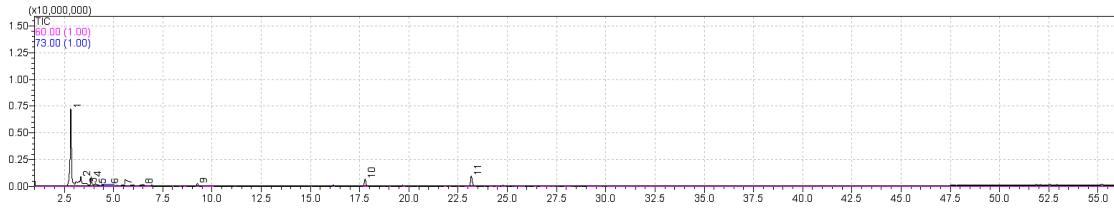
[그림 6-4-13] 초임계 CO₂처리 다시마 시료 내 VOCs Chromatogram(150bar 55°C).



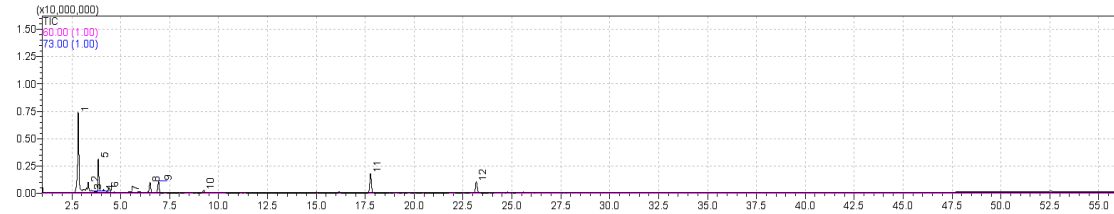
[그림 6-4-14] 초임계 CO₂처리 다시마 시료 내 VOCs Chromatogram(200bar 35°C).



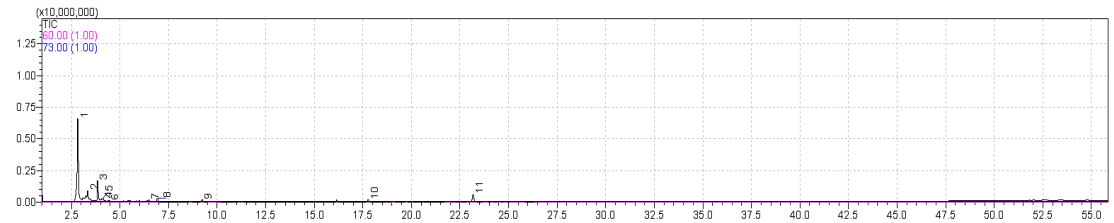
[그림 6-4-15] 초임계 CO₂처리 다시마 시료 내 VOCs Chromatogram(200bar 45°C).



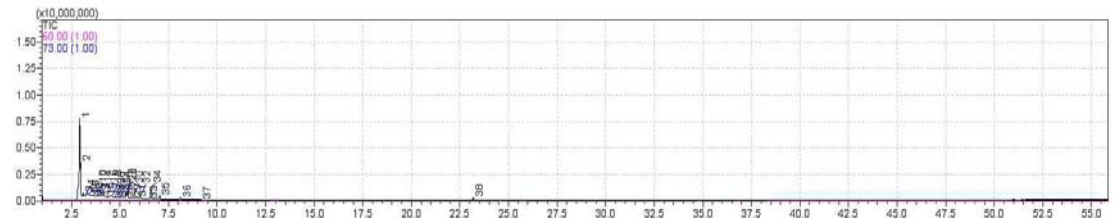
[그림 6-4-16] 초임계 CO₂처리 다시마 시료 내 VOCs Chromatogram(200bar 55°C).



[그림 6-4-17] 초임계 CO₂처리 다시마 시료 내 VOCs Chromatogram(250bar 35°C).



[그림 6-4-18] 초임계 CO₂처리 다시마 시료 내 VOCs Chromatogram(250bar 45°C).



[그림 6-4-19] 초임계 CO₂처리 다시마 시료 내 VOCs Chromatogram(250bar 55°C).

[표 6-4-6] SCO₂로 처리된 다시마 시료 내 휘발성 유기 성분의 함량 비교 분석

ID	Compound name	R.T	Area(%)			
			다시마 원시료	100bar, 35℃ 추출	100bar, 45℃ 추출	100bar, 55℃ 추출
1	Acetaldehyde	3.25	2,038,430 (1.47)	ND	ND	ND
2	Methanol	3.34	6,735,344 (4.85)	3,850,718 (4.79)	2,875,373 (8.47)	3,557,771 (8.92)
3	Oxirane	3.50	ND	ND	ND	968,550 (2.43)
4	Oxiranemethanol	3.51	37,722 (0.03)	34,749 (0.04)	30,127 (0.09)	15,835 (0.04)
5	Oxalic acid	3.61	9,281 (0.01)	ND	29,502 (0.09)	ND
6	Tetradeuteromethane	3.71	ND	687,255 (0.85)	ND	352,163 (0.88)
7	Ethanol	3.86	61,981,471 (44.59)	18,309,180 (22.77)	13,663,560 (40.24)	8,903,467 (22.33)
8	Propanal	4.07	ND	ND	ND	1,230,463 (3.09)
9	2-Propanone(Acetone)	4.13	6,484,631 (4.67)	1,588,197 (1.98)	ND	1,177,383 (2.95)
10	2-Propanol	4.36	ND	11253397 (14.00)	1,324,099 (3.90)	ND
11	Ethyl ether	4.41	3,691,945 (2.66)	ND	ND	1,304,271 (3.27)
12	Methylene Chloride	4.69	2,220,782 (1.60)	ND	ND	ND
13	Methyl acetate	4.81	112,895 (0.08)	ND	ND	ND
14	Propanal, 2-methyl-	5.19	336,326 (0.24)	ND	ND	ND
15	Methanesulfonyl chloride	5.45	1,231,451 (0.89)	823,743 (1.02)	898,656 (2.65)	942,575 (2.36)
16	Cyclopentane	5.53	614,917 (0.44)	ND	ND	ND
17	Trimethylsilanol	5.91	634,784 (0.46)	ND	ND	ND
18	Butanal	6.02	351,561 (0.25)	ND	ND	ND
19	2-Butanone	6.34	1,414,935 (1.02)	ND	ND	419,828 (1.05)
20	Hexane	6.52	5,328,333 (3.83)	6,372,751 (7.93)	2,640,030 (7.77)	577,415 (1.45)
21	Chloroform	6.96	5,881,968 (4.23)	5,922,023 (7.37)	ND	ND
22	Acetic acid	8.40	2,207,240 (1.59)	1,182,276 (1.47)	2,370,850 (6.98)	1,786,796 (4.48)

23	3-Methyl butanal	8.61	1,017,921 (0.73)	ND	ND	ND
24	Benzene	9.28	2,717,398 (1.96)	1,922,773 (2.39)	1,741,380 (5.13)	1,253,078 (3.14)
25	Chloroethanol	9.66	ND	ND	ND	3,394,352 (8.51)
26	1-Penten-3-ol	11.24	3,543,212 (2.55)	ND	ND	ND
27	Acetoin	12.26	1,356,484 (0.98)	ND	ND	ND
28	Toluene	15.04	1,125,000 (0.81)	ND	ND	ND
29	n-Hexanal	16.16	1,624,509 (1.17)	1,951,631 (2.43)	1,126,659 (3.32)	2,028,266 (5.09)
30	Acetic acid, butyl ester	17.10	1,053,149 (0.76)	ND	ND	ND
31	Cyclotrisiloxane, hexamethyl-	17.78	13,713,858 (9.87)	14,049,957 (17.48)	3,932,737 (11.58)	3,393,678 (8.51)
32	Ethanol, 2-iodo-	18.35	ND	ND	ND	2406719 (6.03)
33	1-Methoxy-2-propyl acetate	19.04	ND	1,002,518 (1.25)	ND	ND
34	Styrene	19.69	1,173,035 (0.84)	ND	ND	1,198,942 (3.01)
35	n-Heptanal	19.74	ND	1,164,893 (1.45)	ND	ND
36	Octanal	22.88	ND	1,069,234 (1.33)	ND	ND
37	Cyclotetrasiloxane, octamethyl-	23.19	6,721,583 (4.84)	8,190,608 (10.19)	3,324,985 (9.79)	3,510,669 (8.80)
38	l-Limonene	24.43	2,635,730 (1.90)	1,020,835 (1.27)	ND	ND
39	Decanal	32.37	ND	ND	ND	1,252,243 (3.14)
40	2,5-Cyclohexadiene-1,4- dione, 2,5-diphenyl-	45.66	502,298 (0.36)	ND	ND	ND
41	Acetophloroglucine	46.80	59,685 (0.04)	ND	ND	ND
42	Oxalic acid, ethyl neopentyl ester	48.44	18,038 (0.01)	ND	ND	205,185 (0.51)
43	2-Isobutyl-4,4-dimethyl -1,3-dioxane	50.54	165,320 (0.12)	ND	ND	ND
44	1,2-Benzenedicarboxylic acid, bis(2-methylpropyl) ester	52.49	250,249 (0.18)	ND	ND	ND
Total Area			138,991,485	80,396,738 (감소)	33,957,958 (감소)	39,879,649 (감소)

[표 6-4-7] SCO₂로 처리된 다시마 시료 내 휘발성 유기 성분의 함량 비교 분석

ID	Compound name	R.T	Area			
			다시마 원시료 (%)	200bar, 35℃ 추출 (%)	200bar, 45℃ 추출 (%)	200bar, 55℃ 추출 (%)
1	Acetaldehyde	3.25	2,038,430 (1.47)	1,719,058 (2.57)	ND	ND
2	Methanol	3.34	6,735,344 (4.85)	2,647,304 (3.96)	2,909,976 (5.12)	3,548,054 (18.11)
3	Oxirane	3.50	ND	87,731 (0.13)	106,681 (0.19)	ND
4	Oxiranemethanol	3.51	37,722 (0.03)	ND	ND	ND
5	Oxalic acid	3.61	9,281 (0.01)	ND	ND	ND
6	Tetradeuteromethane	3.71	ND	14,188 (0.02)	450200 (0.79)	852,036 (4.35)
7	Ethanol	3.86	61,981,471 (44.59)	19,791,734 (29.58)	11,834,070 (20.81)	2,960,103 (15.10)
8	Acetonitrile	4.00	ND	643,205 (0.96)	ND	ND
9	Propanal	4.07	ND	852,963 (1.27)	ND	ND
10	2-Propanone(Acetone)	4.13	6,484,631 (4.67)	1,176,859 (1.76)	1,568,960 (2.76)	513,842 (2.62)
11	2-Propanol	4.36	ND	5,176,341 (7.74)	ND	ND
12	Ethyl ether	4.41	3,691,945 (2.66)	ND	3,039,479 (5.35)	504,317 (2.57)
13	Methylene Chloride	4.69	2,220,782 (1.60)	ND	ND	ND
14	Methyl acetate	4.81	112,895 (0.08)	ND	ND	ND
15	Propanal, 2-methyl-	5.19	336,326 (0.24)	ND	ND	ND
16	Methanesulfonyl chloride	5.45	1,231,451 (0.89)	770,298 (1.15)	944,312 (1.66)	477,067 (2.43)
17	Cyclopentane	5.53	614,917 (0.44)	ND	ND	ND
18	Trimethylsilanol	5.91	634,784 (0.46)	397,840 (0.59)	405205 (0.71)	ND
19	Butanal	6.02	351,561 (0.25)	ND	ND	ND

20	2-Butanone	6.34	1,414,935 (1.02)	ND	ND	ND
21	Hexane	6.52	5,328,333 (3.83)	5,596,171 (8.37)	5,772,858 (10.15)	587,612 (3.00)
22	Chloroform	6.96	5,881,968 (4.23)	5,165,145 (7.72)	6,838,956 (3.46)	ND
23	Acetic acid	8.40	2,207,240 (1.59)	ND	ND	ND
24	3-Methyl butanal	8.61	1,017,921 (0.73)	ND	ND	ND
25	Benzene	9.28	2,717,398 (1.96)	1,646,735 (2.46)	1,966,328 (3.46)	1,331,304 (6.79)
26	1-Penten-3-ol	11.24	3,543,212 (2.55)	ND	ND	ND
27	Acetoin	12.26	1,356,484 (0.98)	ND	ND	ND
28	Toluene	15.04	1,125,000 (0.81)	ND	ND	ND
29	n-Hexanal	16.16	1,624,509 (1.17)	ND	ND	ND
30	Acetic acid, butyl ester	17.10	1,053,149 (0.76)	ND	ND	ND
31	Cyclotrisiloxane, hexamethyl-	17.78	13,713,858 (9.87)	12,363,214 (18.48)	12,775,360 (22.47)	3,610,467 (18.42)
32	Styrene	19.69	1,173,035 (0.84)	ND	ND	ND
33	Cyclotetrasiloxane, octamethyl-	23.19	6,721,583 (4.84)	8850898 (13.23)	8,241,788 (14.50)	5,212,210 (26.60)
34	l-Limonene	24.43	2,635,730 (1.90)	ND	ND	ND
35	2,5-Cyclohexadiene-1,4- dione, 2,5-diphenyl-	45.66	502,298 (0.36)	ND	ND	ND
36	Acetophloroglucine	46.80	59,685 (0.04)	ND	ND	ND
37	Oxalic acid, ethyl neopentyl ester	48.44	18,038 (0.01)	ND	ND	ND
38	2-Isobutyl-4,4-dimethyl- 1,3-dioxane	50.54	165,320 (0.12)	ND	ND	ND
39	1,2-Benzenedicarboxylic acid, bis(2-methylpropyl) ester	52.49	250,249 (0.18)	ND	ND	ND
Total Area			138,991,485	66,899,684 (감소)	56,854,173 (감소)	19,597,012 (감소)

[표 6-4-8] SCO₂로 처리된 다시마 시료 내 휘발성 유기 성분의 함량 비교 분석

ID	Compound name	R.T	Area5			
			다시마 원시료 (%)	150bar, 35°C 추출 (%)	150bar, 45°C 추출 (%)	150bar, 55°C 추출 (%)
1	Acetaldehyde	3.25	2,038,430 (1.47)	2,083,031 (4.39)	ND	ND
2	Methanol	3.34	6,735,344 (4.85)	3,230,785 (6.81)	3,433,637 (5.82)	3,770,697 (10.47)
3	Oxirane	3.50	ND	322,336 (0.68)	ND	ND
4	Oxiranemethanol	3.51	37,722 (0.03)	ND	ND	69,183 (0.19)
5	Oxalic acid	3.61	9,281 (0.01)	ND	ND	ND
6	Tetradeuteromethane	3.71	ND	1,254 (0.003)	843,868 (1.43)	576,985 (1.60)
7	Ethanol	3.86	61,981,471 (44.59)	11,489,267 (24.21)	10,810,502 (18.32)	9,857,582 (27.36)
8	Propanal	4.07	ND	519,804 (1.10)	1,206,444 (2.04)	ND
9	2-Propanone(Acetone)	4.13	6,484,631 (4.67)	5,430,004 (11.44)	1,219,227 (2.07)	1,032,139 (2.86)
10	2-Propanol	4.36	ND	ND	ND	ND
11	Ethyl ether	4.41	3,691,945 (2.66)	5,430,004 (11.44)	2,681,597 (4.54)	1,409,894 (3.91)
12	Methylene Chloride	4.69	2,220,782 (1.60)	ND	ND	ND
13	Methyl acetate	4.81	112,895 (0.08)	ND	ND	ND
14	Propanal, 2-methyl-	5.19	336,326 (0.24)	ND	ND	ND
15	Methanesulfonyl chloride	5.45	1,231,451 (0.89)	1,508,462 (3.18)	510,088 (0.86)	737,014 (2.05)
16	Cyclopentane	5.53	614,917 (0.44)	ND	ND	ND
17	Trimethylsilanol	5.91	634,784 (0.46)	792,869 (1.67)	426,424 (0.72)	333,094 (0.92)
18	Butanal	6.02	351,561 (0.25)	ND	ND	ND
19	2-Butanone	6.34	1,414,935 (1.02)	ND	ND	ND
20	Hexane	6.52	5,328,333 (3.83)	2,346,555 (4.94)	4,919,761 (8.34)	2,323,853 (6.45)
21	Chloroform	6.96	5,881,968 (4.23)	ND	5,730,796 (9.71)	2,486,008 (6.90)

22	Acetic acid	8.40	2,207,240 (1.59)	1,645,684 (3.47)	1,658,149 (2.81)	ND
23	3-Methyl butanal	8.61	1,017,921 (0.73)	ND	ND	ND
24	Benzene	9.28	2,717,398 (1.96)	2,665,483 (5.62)	1,867,484 (3.16)	1,992,047 (5.53)
25	1-Penten-3-ol	11.24	3,543,212 (2.55)	ND	ND	ND
26	Acetoin	12.26	1,356,484 (0.98)	ND	ND	ND
27	Toluene	15.04	1,125,000 (0.81)	ND	ND	ND
28	n-Hexanal	16.16	1,624,509 (1.17)	1,175,601 (2.48)	944,842 (1.60)	ND
29	Acetic acid, butyl ester	17.10	1,053,149 (0.76)	ND	ND	ND
30	Cyclotrisiloxane, hexamethyl-	17.78	13,713,858 (9.87)	5,868,860 (12.37)	14,468,567 (24.52)	5,829,074 (16.18)
31	1-Methoxy-2-propyl acetate	19.04	ND	ND	ND	ND
32	Styrene	19.69	1,173,035 (0.84)	ND	ND	ND
33	Benzaldehyde	21.75	ND	1,158,821 (2.44)	ND	ND
34	Octanal	22.88	ND	ND	ND	1,391,460 (3.86)
35	Cyclotetrasiloxane, octamethyl-	23.19	6,721,583 (4.84)	5,070,435 (10.69)	8,024,299 (13.60)	4,221,848 (11.72)
36	l-Limonene	24.43	2,635,730 (1.90)	981,539 (2.07)	ND	ND
37	2,5-Cyclohexadiene-1,4- dione, 2,5-diphenyl-	45.66	502,298 (0.36)	ND	ND	ND
38	Acetophloroglucine	46.80	59,685 (0.04)	ND	ND	ND
39	Oxalic acid, ethyl neopentyl ester	48.44	18,038 (0.01)	171,907 (0.36)	ND	ND
40	2-Isobutyl-4,4-dimethyl -1,3-dioxane	50.54	165,320 (0.12)	169,407 (0.37)	ND	ND
41	1,2-Benzenedicarboxylic acid, bis(2-methylpropyl) ester	52.49	250,249 (0.18)	319,457 (0.67)	272,331 (0.46)	ND
Total Area			138,991,485	47,453,403 (감소)	59,018,016 (감소)	36,030,878 (감소)

[표 6-4-9] SCO₂로 처리된 다시마 시료 내 휘발성 유기 성분의 함량 비교 분석

ID	Compound name	R.T	Area			
			다시마 원시료 (%)	250bar, 35°C 추출 (%)	250bar, 45°C 추출 (%)	250bar, 55°C 추출 (%)
1	1-Propene	3.11	ND	ND	ND	1,962,883 (9.50)
2	1,2-Propadiene	3.20	ND	ND	ND	1,369,672 (6.63)
3	Acetaldehyde	3.25	2,038,430 (1.47)	ND	ND	1,192,567 (5.77)
4	Methanol	3.34	6,735,344 (4.85)	3,407,176 (7.61)	3,282,391 (17.68)	ND
5	1-Propene, 2-methyl-	3.42	ND	ND	ND	457,617 (2.21)
6	Oxirane	3.50	ND	59,408 (0.13)	ND	382,738 (1.85)
7	Oxiranemethanol	3.51	37,722 (0.03)	ND	ND	ND
8	n-Butyl formate	3.52	ND	ND	ND	481,227 (2.33)
9	Oxalic acid	3.61	9,281 (0.01)	ND	ND	ND
10	Tetradeuteromethane	3.71	ND	553,610 (1.24)	ND	13,395 (0.06)
11	Ethanol	3.86	61,981,471 (44.59)	10,765,347 (24.04)	6,113,379 (32.93)	290,307 (1.41)
12	Acetonitrile	4.00	ND	ND	ND	ND
13	Propanal	4.07	ND	ND	779,974 (4.20)	ND
14	2-Propanone(Acetone)	4.13	6,484,631 (4.67)	ND	836,900 (4.51)	488,635 (2.37)
15	Pentane	4.34	ND	ND	ND	316,063 (1.53)
16	2-Propanol	4.36	ND	2,169,160 (4.84)	ND	ND
17	Ethyl ether	4.41	3,691,945 (2.66)	ND	383,422 (2.07)	433,020 (2.10)
18	1-Butanethiol, 3-methyl-	4.59	ND	ND	ND	142,290 (0.69)
19	Oxetane, 3-(1-methylethyl)-	4.68	ND	ND	ND	34,452 (0.17)

20	Methylene Chloride	4.69	2,220,782 (1.60)	ND	ND	22,671 (0.11)
21	Methyl acetate	4.81	112,895 (0.08)	ND	ND	ND
22	1,4-Pentadiene	4.75	ND	ND	ND	27,132 (0.13)
23	Carbon disulfide	4.89	ND	ND	ND	51465 (0.25)
24	Cyclobutane, methylene-	4.96	ND	ND	ND	17,794 (0.09)
25	Acetic acid, trifluoro-	5.02	ND	ND	ND	16,810 (0.08)
26	2-Chloropropene	5.13	ND	ND	ND	68,855 (0.33)
27	Propanal, 2-methyl-	5.19	336,326 (0.24)	ND	ND	ND
28	Formaldehyde	5.28	ND	ND	ND	111,854 (0.54)
29	Methanesulfonyl chloride	5.45	1,231,451 (0.89)	343,903 (0.77)	ND	ND
30	Cyclopentane	5.53	614,917 (0.44)	ND	ND	ND
31	2-Methylpentane	5.68	ND	ND	ND	349,294 (1.69)
32	Trimethylsilanol	5.91	634,784 (0.46)	ND	ND	2,043,82 0 (9.89)
33	Butanal	6.02	351,561 (0.25)	ND	ND	261,565 (1.27)
34	2-Butanone	6.34	1,414,935 (1.02)	ND	ND	78,791 (0.38)
35	Hexane	6.52	5,328,333 (3.83)	4,513,773 (10.08)	552,475 (2.98)	3,998,830 (19.36)
36	Chloroform	6.96	5,881,968 (4.23)	5,079,557 (11.35)	1,273,920 (6.86)	1,122,706 (5.43)
37	Ethylene chloride	8.11	ND	ND	ND	617,256 (2.99)
38	Acetic acid	8.40	2,207,240 (1.59)	ND	ND	2,414,76 4 (11.69)
39	3-Methyl butanal	8.61	1,017,921 (0.73)	ND	ND	ND

40	Benzene	9.28	2,717,398 (1.96)	1,393,650 (3.11)	931,832 (5.02)	595,329 (2.88)
41	Chloroethanol	9.66	ND	ND	ND	ND
42	1-Penten-3-ol	11.24	3,543,212 (2.55)	ND	ND	ND
43	Acetoin	12.26	1,356,484 (0.98)	ND	ND	ND
44	Toluene	15.04	1,125,000 (0.81)	ND	ND	ND
45	n-Hexanal	16.16	1,624,509 (1.17)	ND	ND	ND
46	Acetic acid, butyl ester	17.10	1,053,149 (0.76)	ND	ND	ND
47	Cyclotrisiloxane, hexamethyl-	17.78	13,713,858 (9.87)	10,347,142 (23.11)	1,010,308 (5.44)	ND
48	Styrene	19.69	1,173,035 (0.84)	ND	ND	ND
49	Cyclotetrasiloxane, octamethyl-	23.19	6,721,583 (4.84)	6,139,590 (13.71)	3,398,748 (18.31)	1,296,610 (6.28)
50	l-Limonene	24.43	2,635,730 (1.90)	ND	ND	ND
51	2,5-Cyclohexadiene-1,4-dione, 2,5-diphenyl-	45.66	502,298 (0.36)	ND	ND	ND
52	Acetophloroglucine	46.80	59,685 (0.04)	ND	ND	ND
53	Oxalic acid, ethyl neopentyl ester	48.44	18,038 (0.01)	ND	ND	ND
54	2-Isobutyl-4,4-dimethyl-1,3-dioxane	50.54	165,320 (0.12)	ND	ND	ND
55	1,2-Benzenedicarboxylic acid, bis(2-methylpropyl) ester	52.49	250,249 (0.18)	ND	ND	ND
Total Area			138,991,485	44,772,316 (감소)	18,563,349 (감소)	20,660,412 (감소)

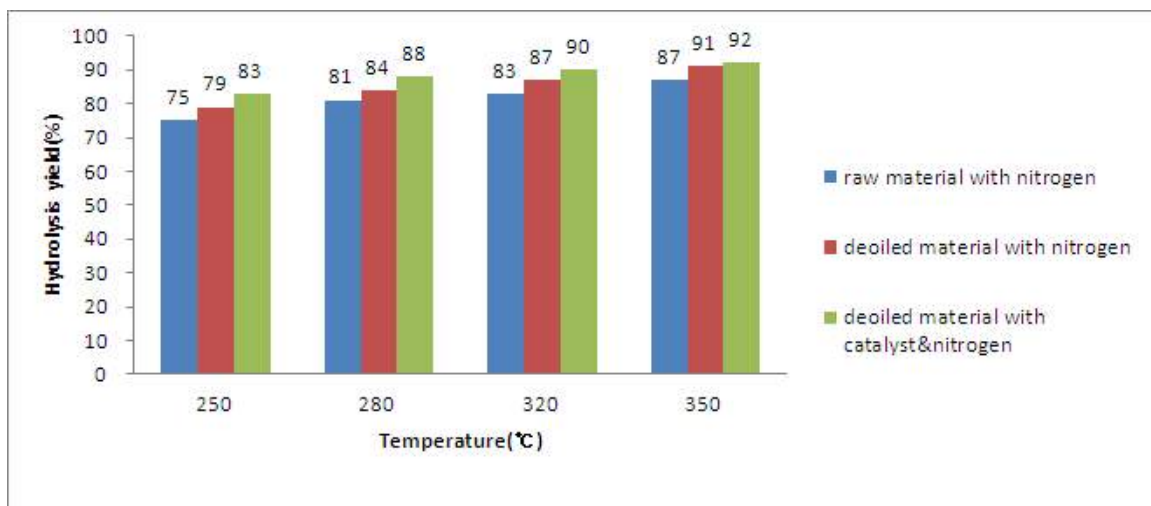
초임계 이산화탄소로 처리하기 전 다시마 원시료에서 확인된 휘발성 유기 성분은 총 34종이었다. 다시마 원시료의 휘발성 유기 성분의 경우 alcohol류 6종, aldehyde류 4종, acid류 6종, ketone류 3종 hydrocarboney류 13종, 기타화합물 2종으로 분석되었다. 분석된 화합물 중 탄화수소류가 가장 많았으며, area%로서는 [ethanol] 및 [Cyclotrisiloxane, hexamethyl-], [Cyclotetrasiloxane, octamethyl-] 등이 높은 비율을 차지하고 있는 것으로 나타났다.

초임계 이산화탄소로 처리하기 전과 후의 다시마 내 동정된 휘발성 유기 성분의 면적의 합을 비교해보면, 처리 전 다시마에 비해 초임계 이산화탄소를 처리한 다시마 내 휘발성 유기 성분의 양이 큰 폭으로 감소하였다. 이 현상은 Gracia et al.(2007)이 사탕수수 음료에 초임계 이산화탄소를 이용하여 향기 성분을 추출한 이전의 보고에서 비슷한 내용을 확인할 수 있으며, 그 연구에서 추출물에는 향이 남아있지 않고 추출물에 진한 향이 분리된다고 하였다. 이는 향기성분이 적당한 조건에서 이산화탄소에 쉽게 녹을 수 있기 때문이라고 보고한 연구로 설명될 수 있다 [6].

2시간 동안의 연속적인 초임계 이산화탄소 처리에 의한 다시마 내 휘발성 유기 성분의 제거율을 살펴보면 250bar, 45°C의 조건으로 실험을 수행하였을 때 가장 적은 총면적 값을 보이는 반면 100bar, 35°C에서 가장 높은 값을 나타내었다. 즉, 본 연구에서 고압에서 휘발성 유기성분의 제거율이 높은 것으로 나타났다. 이는 높은 압력에서 초임계 이산화탄소의 밀도가 높아진 결과, 용매력이 증가하여 다시마에 함유되어 있는 지질 성분이 추출되면서 함께 휘발성 유기 성분이 제거된 것으로 사료된다. 용매의 용해력은 밀도와 밀접한 관계를 갖고 있기 때문에 액체와 비슷한 밀도를 갖는 초임계 유체도 액체 용매와 마찬가지로 액체나 고체를 용해하는 능력을 갖게된다. 또한 고정된 압력에서 상대적으로 온도가 상승할 수록 휘발성 향기 성분의 제거율이 증가하는데, 이는 온도가 상승할수록 초임계유체가 기체의 성질을 띠게 되므로, 기체처럼 점도가 작아져 추출 대상으로의 침투성이 좋아 휘발성 유기성분을 제거한 효율이 향상된 것으로 사료된다. 각 조건에서 처리한 다시마의 휘발성 유기성분 중 methanol, ethanol, acetone, [Cyclotrisiloxane, hexamethyl-], [Cyclotetrasiloxane, octamethyl-] 등의 area%가 큰 폭으로 감소했는데, 그 중 특히 ethanol의 감소폭이 컸다. 반면, 1-Propene, 1,2-Propadiene, Oxirane 등처럼 다시마 원시료에서 동정되지 않는 물질도 다수 발견되었다. 이 연구의 결과, 초임계 이산화탄소의 처리로 인하여 다시마의 관능적 저해 요소인 많은 향 성분이 저감/제거 되었으므로, 초임계 이산화탄소 처리를 거친 다시마 파우더를 산업적으로 응용할 경우 그 범위가 확대될 것으로 기대된다.

마. 아임계수를 이용한 다시마 가수 분해물 수율분석

본 실험은 다시마의 지질성분을 제거한 시료와 원시료에 질소를 가하여 반응기 내 압력을 50bar로 설정하여 다시마와 물 혼합액의 비점을 상승시킨 후 산촉매제의 첨가 유무에 따른 다시마 가수분해 수율을 비교하였다. 수율은 전체적으로 온도가 상승함에 따라 증가하였는데, 이것은 반응 온도가 증가함에 따라 반응용매인 물의 용해력과 물질전달능력이 증가함에 따라 기질과 산소의 접촉을 활발하게 하여 기질의 산화를 촉진시키는 것으로 사료된다. 한편, 초임계CO₂ 처리에 의해 지질이 제거된 시료의 가수분해율이 원시료보다 더욱 증가하였다. 이는 초임계CO₂ 처리로 제거된 지질에 의해 아임계수가 다시마에 존재하는 단백질의 펩타이드 결합을 용이하게 분해시킴으로서 가수분해율이 증가한 것으로 사료되며, 지질이 존재하는 원시료는 지질이 단백질의 펩타이드 결합을 막처럼 감싸고 있어 물의 침투를 방해한 것으로 사료된다. 마지막으로 다시마의 아임계 수 가수분해 반응 시 촉매의 영향을 고려하여 촉매적 아임계수 가수분해와 비촉매적 아임계 수 가수분해를 수행하였다. 일반적으로 가수분해 반응시 촉매의 존재는 반응 속도와 반응 생성물을 높여 결과적으로 반응효율성을 높여준다. 아임계수 가수분해 역시 촉매적 가수분해 반응이 비촉매적 가수분해 반응에 비해 반응 온도가 낮아지며 가수분해 수율 또한 높아져서 보다 효율적으로 가수분해 반응을 이끄는 것으로 나타났으며, 이것은 사용된 초산이 아임계수 산화에서 발생하는 산소의 산화를 활성화시키기 때문인 것으로 사료된다.

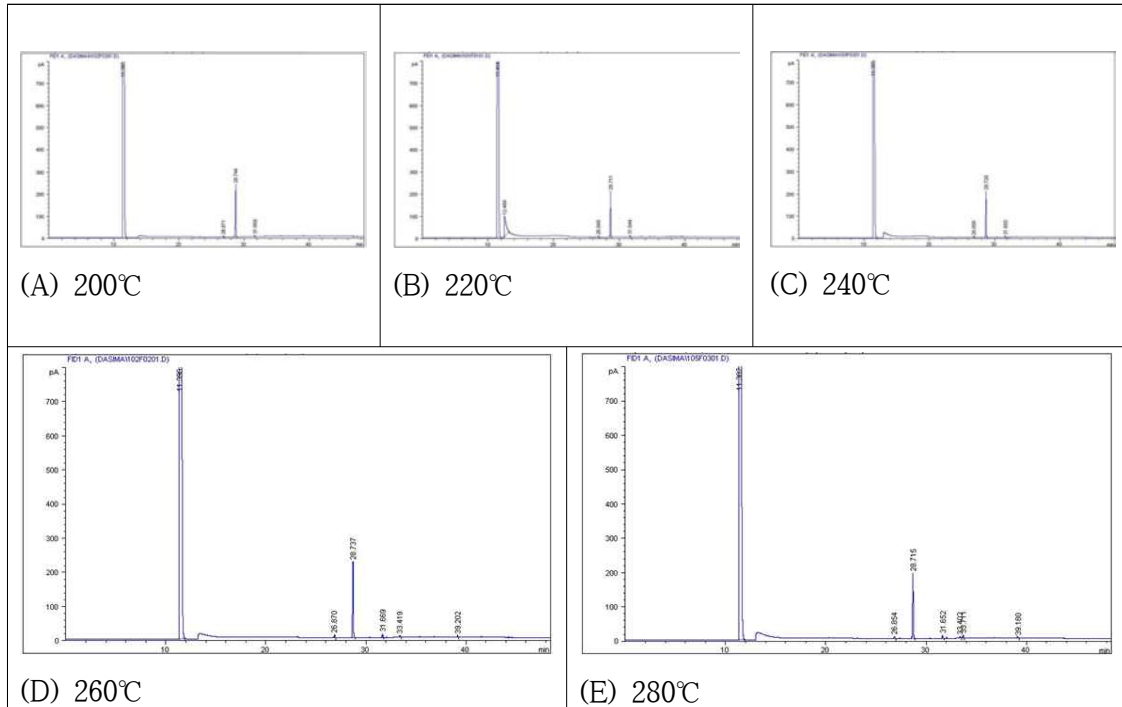


[그림 6-4-20] 온도 조건별 아임계수 가수분해에 의한 가수분해율.

바. 아임계수를 이용한 다시마 가수분해물 기능성물질 열안정성 분석

(1) 지방산 열 안정성 분석

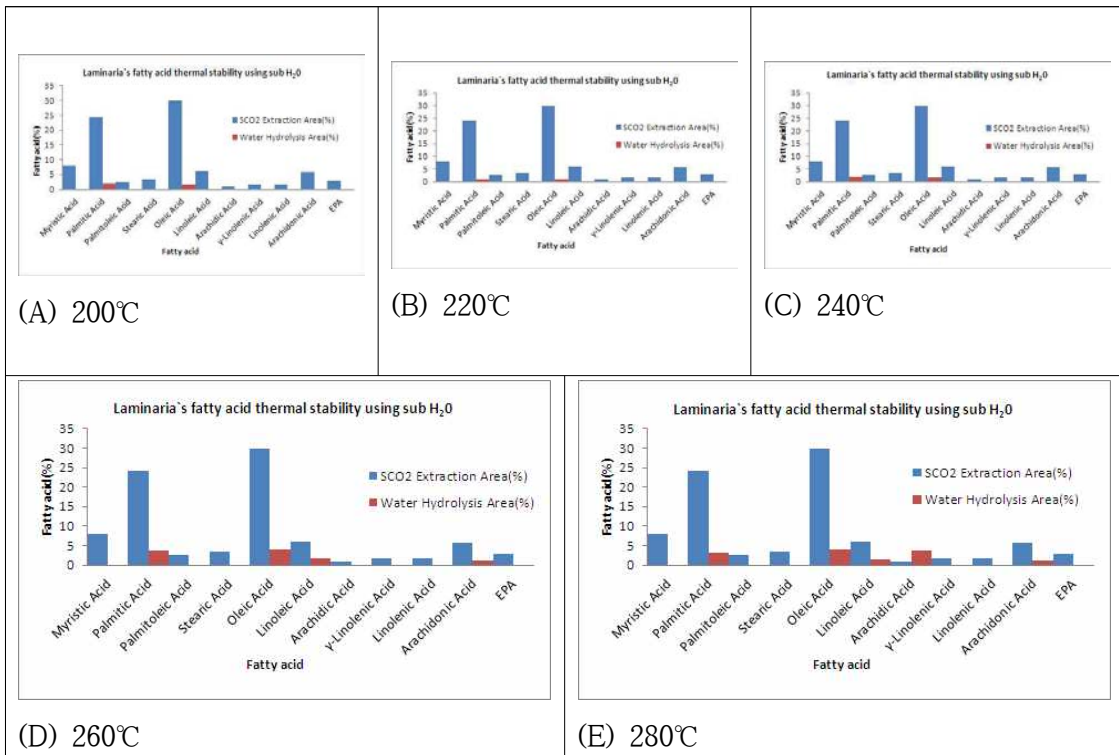
다시마 가수 분해물의 지방산 조성분석은 Metcalf 방법에 따라 BF3-methanol을 사용하여 methyl ester화 시킨 다음 GC로 분석하였다. GC를 이용하여 다시마 가수 분해물 지방산 조성을 분석한 결과 대부분의 지방산이 소실되고, 보존된 지방산 역시 그 양은 미미한 수준이었다. 자세한 내용은 아래 [그림 6-4-21] 및 [표 6-4-10]을 통해 나타내었다. 대체적으로 아임계수를 만들기 위한 조건인 고온으로 만드는 과정 중 지방산이 분해되어 소실된 것으로 사료된다. 하지만 280°C까지의 고온과정에도 불구하고 Palmitic acid 및 Heptadecanoic acid, Arachidic acid 등과 같은 Saturates와 Oleic acid 및 Linoleic acid, Arachidonic acid와 같은 monoenes과 Dienes, polyenes 지방산이 극소량 검출되었다. 이 자료를 가수분해 전과의 지방산 조성과 비교하여 가수분해 다시마 지방산의 열안정성을 분석한 결과 다시마 지방산의 열안정성이 매우 낮기 때문에 가수분해를 통해 얻을 수 있는 지방산의 양은 매우 적다는 것을 알 수 있었다. 가수분해 다시마의 열안정성에 대한 자세한 내용은 아래 [그림 6-4-22]에서 나타내었다.



[그림 6-4-21] 온도 조건 별 아임계수 가수분해 다시마 지방산 열안정성 분석.

[표 6-4-10] 아임계수 가수분해 다시마의 주요 지방산 구성

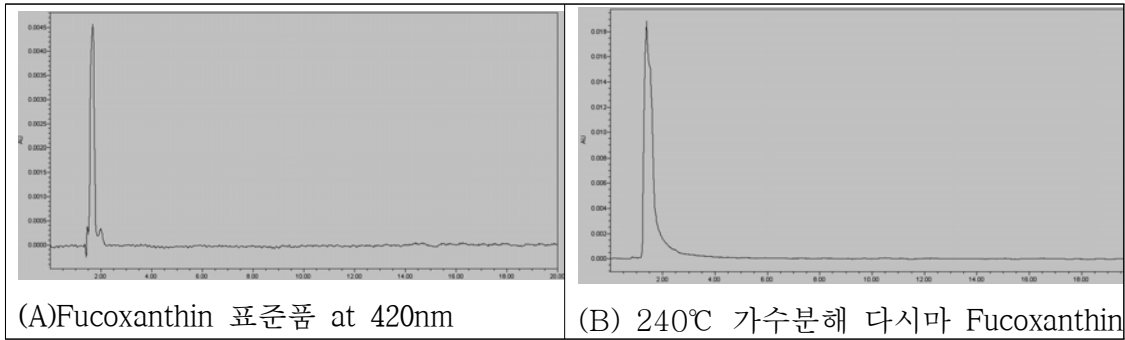
Fatty acids	200℃	220℃	240℃	260℃	280℃
	Area(%)				
Caporic	-	61.83	-	-	-
Palmitic	1.85	0.81	1.88	3.58	3.25
Heptadecanoic	96.58	36.54	96.30	89.50	86.77
Oleic	1.57	0.82	1.82	3.96	3.86
Linoleic	-	-	-	1.79	1.52
Arachidic	-	-	-	-	3.56
Arachidonic	-	-	-	1.18	1.04



[그림 6-4-22] SCO_2 추출 오일(200bar 55℃)과 조건별 아임계수 가수분해 다시마 지방산 수율 비교

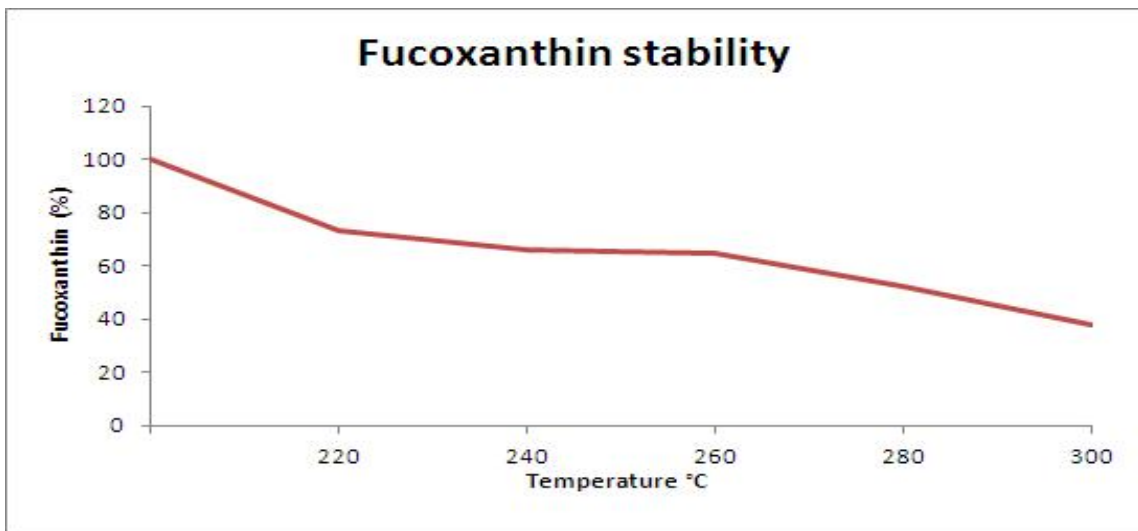
(2) Fucoxanthin의 열안정성 분석

Fucoxanthin의 가수분해 실험을 통한 각 조건별 열 안정성을 확인하기 위해 앞서 설명했던 방법으로 HPLC/UV를 이용하여 분석한다. Fucoxanthin의 정성분석을 실시한 결과는 다음과 같다.



[그림 6-4-23] Fucoxanthin 표준품과 240°C 가수분해 다시마 Fucoxanthin Peak

위의 [그림 6-4-23]을 보면 420nm 파장에서 Fucoxanthin 표준품과 240°C 에서 아임계수를 이용하여 가수분해한 다시마의 peak가 동일 시간대에 감지되는 것을 확인할 수 있다. 이를 통하여 고온에서도 기능성 색소 성분인 Fucoxanthin이 파괴되지 소실되지 않고 존재하고 있음을 알 수 있다.

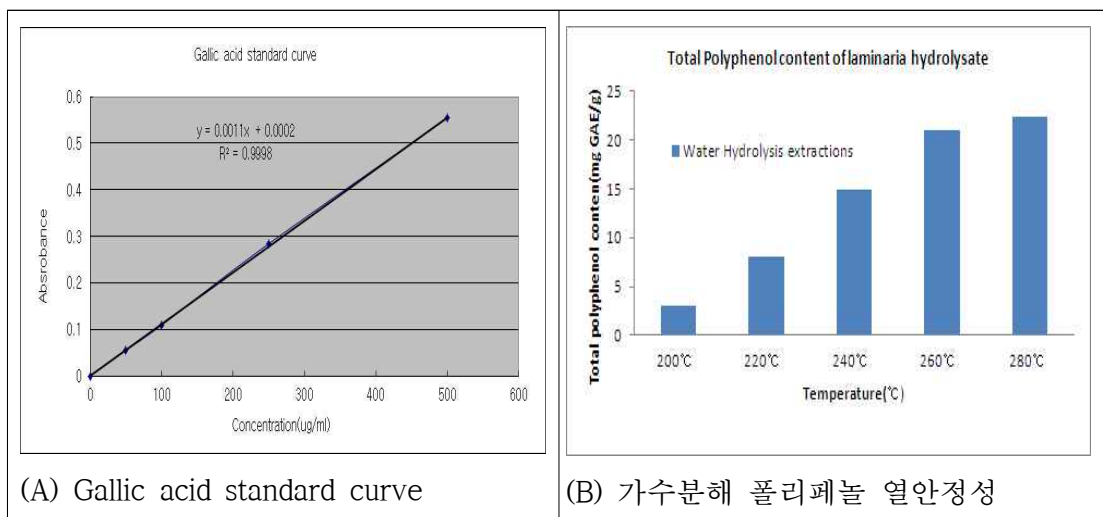


[그림 6-4-24] 각 온도별 아임계수 가수분해 후 Fucoxanthin 열 안정성 분석

한편, 위의 [그림 6-4-24]인 Fucoxanthin의 열 안정성 그래프를 보면 240°C 이상 고온의 아임계수 가수분해 조건에서도 Fucoxanthin이 존재함을 알 수 있었고, 260°C 를 기점으로 열 안정성이 급격히 떨어지는 것을 확인할 수 있었다. 이를 통해 200°C 이상의 고온에서도 Fucoxanthin이 열 안정성을 가지고 있음을 알 수 있었다.

(3) 폴리페놀의 열 안정성 분석

아임계수 가수분해 공정을 이용한 총 polyphenol의 열 안정성 실험은 실험 온도를 200, 220, 240, 260, 280°C로 달리한 조건에서 수행되었다. [그림 6-4-25]에서와 같이, 각 실험 온도(200~280°C)에서 측정된 총 폴리페놀 함량은 각각 2.99mg/g, 8.00mg/g, 14.94mg/g, 20.99mg/g, 22.32mg/g로 측정되었다. 이러한 결과는 총 폴리페놀 함량이 200°C를 제외한 모든 실험 조건에서, 초임계 이산화탄소 다시마 추출 오일에 함유된 양보다 높은 것으로, 고온의 아임계수를 이용한 가수분해 공정이 폴리페놀 추출 용매로서 효율적이라는 사실을 보여준다. 아임계수 가수분해 공정에 의한 polyphenolic compounds의 높은 추출 효율은 순수한 물을 사용하는 아임계수 추출방식에 대한 polyphenolic compounds의 높은 열 안정성으로 설명될 수 있으며 (7,8), 건조된 다시마로부터 polyphenol의 파괴나 손실 없이 최대로 추출할 수 있는 최적 온도가 260°C임을 제시하고 있다. 이는 아임계수 가수분해를 통하여 흑미강으로부터 폴리페놀 추출 효율을 연구한 결과에서도 비슷한 결과를 관찰할 수 있다[9]. 이를 통하여 Raw materials에서 유용물질을 분리 및 회수하기 위한 공정인 아임계수 가수분해 공정을 다시마뿐만 아니라 다른 해조류에 적용시킬 경우 열안정성이 우수한 기능성 물질인 polyphenolic compounds의 추출 효율을 극대화시킬 수 있을 것으로 사료된다. 이는 효율성 및 경제성, 환경적 측면에서도 다른 가수 분해법에 비하여 매우 효과적인 대안임을 제시하고 있다.



[그림 6-4-25] Gallic acid 표준 검량곡선 및 아임계수 가수분해 후 Polyphenol 열안정성 분석

4. 요약 및 제언

저이용, 저부가가치 식량자원인 해조류로부터 고부가가치 기능성 유용 물질의 회수 가능성 및 열안정성을 검토하기 위해 초임계 CO₂ 추출공정을 이용하여 지질을 추출하였고, 그 속에 함유되어 있는 기능성 색소 및 지방산, 황산화 물질 및 관능적 저해 요소(VOCs)의 저감 효과를 분석하였다. 또한 그 자료를 바탕으로 아임계수 가수분해 공정을 이용한 기능성 물질의 회수 가능성을 검토하기 위한 선행적 실험으로, 가수분해 수율실험 및 가수분해물 속 기능성물질의 열안정성 실험연구를 수행하였다. 그 결과는 다음과 같다.

다시마의 초임계 CO₂추출 및 아임계수에 의한 가수분해를 실험하기 앞서 다시마의 물성을 알아보기 위하여 다시마의 일반성분을 조사한 결과 그 조성은 조지방 1.33%, 전당 53.503%, 수분 5.977%, 회분 28.26% 조단백 10.93%로서 지질 성분은 매우 적으나 생리활성에 필요한 다량의 무기질 성분을 포함하고 있으며, 아임계수 가수분해를 이용한 단당류 생성에 필요한 많은 양의 기질을 함유하고 있음을 알 수 있었다.

한편, 지질 성분의 함량이 적은 다시마의 지방산을 분석한 결과 생리적으로 중요한 의의를 갖는 n-3 polyenes 중 linolenic acid(18:3, n-3) 함량은 1.76%, eicosapentaenoic acid(20:5, n-3)는 2.95%로 정량 되었으며, n-6 polyenes는 linoleic acid(18:2, n-6) 및 arachidonic acid(20:4, n-6)가 주요 지방산으로 정량되었다. 이를 통해 다시마의 지질 성분이 양적으로는 부족하나 질적으로 우수한 지방산이 다수 있다는 것을 알 수 있었다. 한편 실험 조건에 따른 지방산 종류별 함량 비교 결과 차이는 거의 없었고, 온도가 증가함에 따라 조금씩 감소하는 경향이 있었다. 이것은 같은 압력에서 온도가 높아짐에 따라 초임계 CO₂의 밀도가 낮아 용매력이 감소하여 나타난 것으로 사료된다.

초임계 이산화탄소 처리로 인한 다시마 품질의 관능적 저해 요소(VOCs) 저감 효과를 알아보기 위한 실험 결과 처리 전 다시마에 비해 초임계 이산화탄소를 처리한 다시마 내 휘발성 유기 성분의 양이 큰 폭으로 감소하였다. 이 연구의 결과, 초임계 이산화탄소의 처리로 인하여 다시마의 관능적 저해 요소인 많은 향 성분이 저감/제거 되었으므로, 초임계 이산화탄소 처리를 거친 다시마 파우더를 산업적으로 응용할 경우 그 범위가 확대될 것으로 기대된다.

아임계 가수분해 공정을 수행할 경우 초임계 CO₂를 이용하여 추출한 다시마 기능성 물질의 열안정성 유무를 알아보기 위한 실험에 앞서 아임계수 가수분해 수율 실험을 행하였다. 본 실험은 다시마의 지질성분을 제거한 시료와 원시료 모두

에 질소를 가하여 다시마와 물 혼합액의 비점을 상승시킨 후 산촉매제의 첨가 유무에 따른 다시마 가수분해 수율을 비교하였다. 수율은 전체적으로 온도가 상승함에 따라 증가하였고, 초임계CO₂ 처리에 의해 지질이 제거된 시료의 가수분해율이 원시료보다 더욱 증가하였다. 또한 촉매적 가수분해 반응이 비촉매적 가수분해 반응에 비해 반응 온도가 낮아지며 가수분해 수율 또한 높아져서 보다 효율적으로 가수분해 반응을 이끄는 것으로 나타났다.

마지막으로 다시마 속에 함유된 기능성 물질의 열안정성 실험에 대한 결과를 보면 다음과 같다. 지방산의 경우 GC를 이용하여 다시마 가수분해물 지방산 조성을 분석한 결과 대부분의 지방산이 소실되고, 보존된 지방산 역시 그 양은 미미한 수준이었다. 이것으로 지방산의 열안정성이 매우 낮다는 것을 확인할 수 있었다. 지방산과 비교하여 기능성 색소성분인 Fucoxanthin의 열안정성은 고온에서 비교적 높은 것으로 나타났고, 항산화물질인 Polyphenol의 경우 초임계 이산화탄소 다시마 추출물보다 아임계수 가수분해물에서 그 함량이 더 높았다. 이는 Raw materials에서 유용물질을 분리 및 회수하기 위한 공정인 아임계수 가수분해 공정을 통하여 polyphenolic compounds의 추출 효율을 극대화시킬 수 있음을 제시하고 있다.

결과적으로 아임계수에 의한 가수분해 반응 공정은 다시마로부터 기능성 물질 회수에 적합한 친환경 공정으로서 다시마의 아임계수 가수분해 반응이 기존의 다른 가수분해 공정에 비하여 효율성 및 경제성, 환경적 측면에서 매우 효과적인 대안임을 제시하고 있다.

5. 향후계획

가. 보조용매를 이용한 기능성 물질 분리 및 회수

- (1) 보조용매에 의한 추출 효율 비교
- (2) 추출/추진 물질 성분 파악
- (3) 보조용매 종류에 따른 추출 효율 비교
 - (가) 에탄올
 - (나) 이온성 액체

나. 회분식 및 연속식 아임계 가수분해 공정 적용 및 효율성 비교

- (1) 상대적 저온(100-190℃) 및 고온(200-350℃) 아임계 가수분해 공정 적용
- (2) 각 온도별 가수분해 효율성 비교
- (3) 산 종류에 따른 가수분해 효율성 비교(초산/황산/염산)

다. 가수분해물질 동정, 특성

- (1) 아미노산 분석
- (2) 당당류 분석 등

라. 공정 조건 확립

마. 다시마 유래 유용물질 산업적 응용 검토

- (1) 항산화물질의 바이오 소재로 활용
- (2) 다시마 가수분해물질의 생물 반응 영양 공급원
- (3) 관능적 저해요소(VOCs)가 제거/저감된 다시마의 산업적 적용

제 5 절 해조류 부산물을 이용한 바이오복합재료 개발

1. 연구개발 내용

본 연구에서는 바이오연료를 제조하기 위해 사용한 해조류(다시마, 감태) 부산물의 특성을 분석하고 이를 보강재로 사용한 바이오복합재료의 개발 가능성을 분석하는 기초연구를 수행하고 있다. 해조류 부산물 이용 바이오복합재료 개발기술 연계도를 [그림 6-5-1]에 나타내었다. 또한, 해조류 부산물을 신소재자원으로 활용 가능한지에 대한 분석연구도 수행하고 있으며 연구개발 내용은 다음과 같다.

- 해조류 종류별 부산물의 특성분석 및 데이터 확보
- 해조류 부산물을 이용한 친환경 바이오복합재료 개발 기초자료 확보
- 해조류의 통합적 활용을 위한 부산물 응용분야 조사



[그림 6-5-1] 해조류 부산물 이용 바이오복합재료 개발기술 연계도.

2. 연구 방법

가. 실험재료

1차 실험재료는 다시마 원시료 및 한국에너지기술연구원에서 표백과정으로 준비된 다시마 추출 부산물을 사용하였다. 2차 실험재료는 파래를 한밭대학에서 주정 및 아세톤으로 처리한 분말형의 시료를 공급받아 사용하였다. 1차 실험재료인 다시마 및 다시마 추출 부산물을 바이오복합재료의 보강재로 사용할 수 있는지에 대한 분석을 한 결과 다시마 자체를 바이오복합재료의 보강재로서 단독으로 사용한 경우에는 일정한 형상을 가지는 바이오복합재료의 제조가 어려웠다. 따라서 본 연구에서는 우수한 보강특성을 보이는 활엽수 펄프와 다시마 추출물을 혼합한 보강재

를 사용하여 바이오복합재료를 제조하고 열적, 기계적 특성을 분석하였다. 천연섬유의 전체 함유량은 50wt%로 하였으며 활엽수 펄프의 함량에 대해 다시마 추출물의 함량을 0~50wt%로 변화시키면서 바이오복합재료를 제조하고 열적, 기계적 특성을 분석하였다.

2차 실험재료인 파래 분말은 폴리프로필렌을 매트릭스로 하여 바이오복합재료를 제조하는 것이 용이하였다. 따라서 주정 및 아세톤으로 처리된 파래 분말을 보강재로 하여 함량은 200~50wt%로 변화시키면서 바이오복합재료를 제조하고 열적, 기계적 특성을 분석하였다.

활엽수는 넓은 잎을 가진 나무 그룹으로 대개 열매나 과일을 생산하고 겨울에는 잎이 떨어지는 낙엽수로서 셀룰로오스, 헤미셀룰로오스, 리그닌 등의 화합물로 구성되어 있다. 셀룰로오스 및 헤미셀룰로오스는 제지에 이용되는 주요 물질로서 펄핑 및 표백공정에 의해 셀룰로오스를 제외한 리그닌 등의 물질을 목재섬유로부터 제거하여 활엽수 펄프를 얻게 된다. 활엽수 펄프는 가격이 저렴하고 섬유장이 짧으며 부피가 큰 종이를 제조하는데 사용할 수 있다[10].

다시마는 갈조류 Laminariaceae(다시마과)의 하나로서 학명은 *Laminaria japonica*이다. 길이 1.5~3.5m, 너비 25~40cm 으로 몸이 갈색 또는 검은 갈색이며, 바탕이 두껍고 미끄럽다. 큰 바닷말이며 2~4년생인 엽체는 포자세대로서 겉보기에는 줄기·잎·뿌리의 구분이 뚜렷하다. 잎은 띠 모양으로 길고 가운데 부분보다 아래쪽이 넓다. 잎의 가운데 부분은 두께 1.8~3.5mm로서 약간 두껍다. 다시마의 성분은 수분 91%, 단백질 1.1%, 회분 3.5%, 당질 3.6%등으로 구성되어 있다[11].

파래는 녹조류 *Ulva*(파래과)에 속하는 조류로 학명은 *Enteromorpha*이다. 파래는 대부분 원통 모양을 한 엽상체가 분지하거나 단조(單條)이고, 종류에 따라서는 상부가 엽상(葉狀)으로 퍼진 모습을 하는데, 분류학적으로는 중공(中空)인 원통 모양을 한 종류를 이 속에 포함시키고 있다. 파래는 특히 민물이 흘러들어오는 곳에서 잘 자라며, 조용한 조수웅덩이 따위에서 큰 군락을 이루는 경우가 많다. 파래는 단백질 20~30%, 무기염류 10~15%, 비타민 500~1,000 IU를 포함하고 있는데 특히 알칼리성 원소가 많은 주요 무기질 식품이다[12].

바이오복합재료의 매트릭스로 사용한 폴리프로필렌은 (주)코오롱 글로텍에서 제공받아 사용하였다. 제공받은 폴리프로필렌은 니들펀칭의 원료로서 주로 자동차의 내장재용 제품을 생산하는데 사용되고 있다. 섬유형태로서 길이는 40~120mm, 비중 0.91g/cm³, 용융점 160~165°C이며 보강재와의 분산향상을 위해 가위로 세절(chopping)하여 사용하였다.

[표 6-5-1] 다시마의 구성성분

	가식부 100g당(Per 100g edible portion)									비고 Remarks
	식품열량 Food energy		수분 Moisture	단백질 Protein	지방 Fat	회분 Ash	탄수화물 Carbohydrate		가식부(%) Edible portion	
	kcal	kJ					당질 Non-fibrous	섬유 Fiber		
다시마	21	89	91.0	1.1	0.2	3.5	3.6	0.6	100.0	평균 주문진

(출처 : http://portal.nfrdi.re.kr/page?id=aq_seafood_2_7&type=tot&from=totList&fim_col_id=2009-MF0011150-6-D01)

[표 6-5-2] 파래의 구성성분

수산물명	수분 Moisture	총식이섬유 Total dietary fiber	산가용성섬유 Acid detergent fiber	셀룰로스 Cellulose	리그닌 Lignin	비고 Remarks
갈파래	13.2	35.8	13.2	7.2	6.0	

(출처 : http://portal.nfrdi.re.kr/page?id=aq_seafood_2_7&type=tot&from=totList&fim_col_id=2009-MF0010565-6-D01)

나. 다시마의 세척 및 표백

다시마 표면을 깨끗한 물로 세척하여 무기물(석회, 조개껍질 등)을 포함한 이물질을 제거하였다. 표백은 ClO₂(농도5%)를 다시마 전건중량 대비 10%를 투입하고 전체농도가 7%가 되도록 액비를 맞춘 후에 초산으로 pH 3~4 로 고정시키고 80℃의 항온수조에서 1시간 반응시킨 후에 세척하였다. 이후에 과산화수소(농도35%)를 전건중량 대비 10%투입하고, 전체 농도가 7%가 되도록 액비를 맞춘 후에 수산화나트륨수용액으로 pH를 10~11로 고정하고 80℃의 항온수조에서 1시간 30분 반응시킨 후 세척하였다. 다시마의 세척 및 표백과정을 [그림 6-5-2]에 정리하였다. 파래를 주정, 아세톤 및 황산으로 처리하여 분말로 준비한 과정은 [그림 6-5-3]에 나타내었다.

다. 다시마 및 파래 부산물의 열분해 특성

다시마 원시료와 표백한 시료 및 주정과 아세톤으로 처리한 파래분말들의 열분해온도 및 열안정성을 열중량분석기 (Thermogravimetric Analyzer, TGA Q-500,

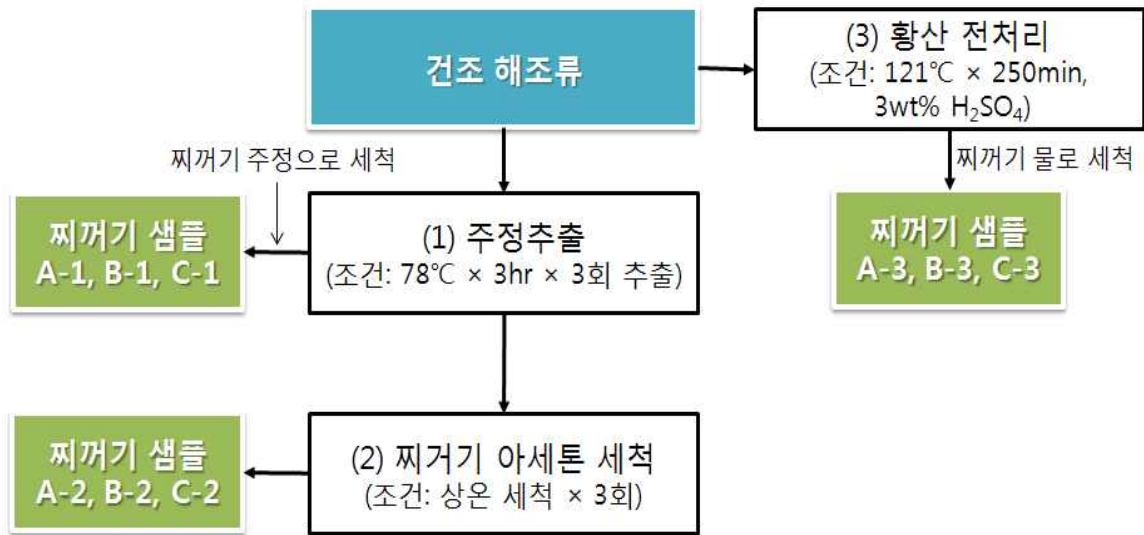
TA Instrument)를 사용하여 측정하였다. 분석시료는 분말로 만들어 TGA 측정용 백금용기에 약 20mg 정도로 담아 10°C/min의 상온서 500°C까지 측정하였다. 연소 시에 100ml/min으로 질소를 흘려보냈으며, 중량 감소율 (Decrement of weight)과 미분계수 (Derivative Thermogravimetric, DTG) 곡선 변화를 관찰하였다.

다시마 및 파래 부산물의 열분해 특성을 [그림 6-5-4]과 [그림 6-5-5]에 나타내었다. 열분석 결과에 의하면 다시마 원시료에서는 200~300°C에서 두 개의 열분해 주피크가 나타나지만 표백을 한 경우에는 200~300°C에서 하나의 열분해 피크 및 300~400°C에서 하나의 열분해 피크를 보이고 있다. 표백된 다시마에서 나타나는 350°C 부근의 열분해 온도는 셀룰로오스에 기인하는 것으로 분석할 수 있는 반면에 다시마 원시료는 섬유를 둘러싸고 있는 점액질 물질에 의한 영향으로 비교적 낮은 200~300°C에서 넓게 열분해 되는 특성을 보이고 있다. 이 결과는 홍조류 및 표백된 홍조류 섬유의 열분해 특성과 유사한 것으로 분석되었다[13].

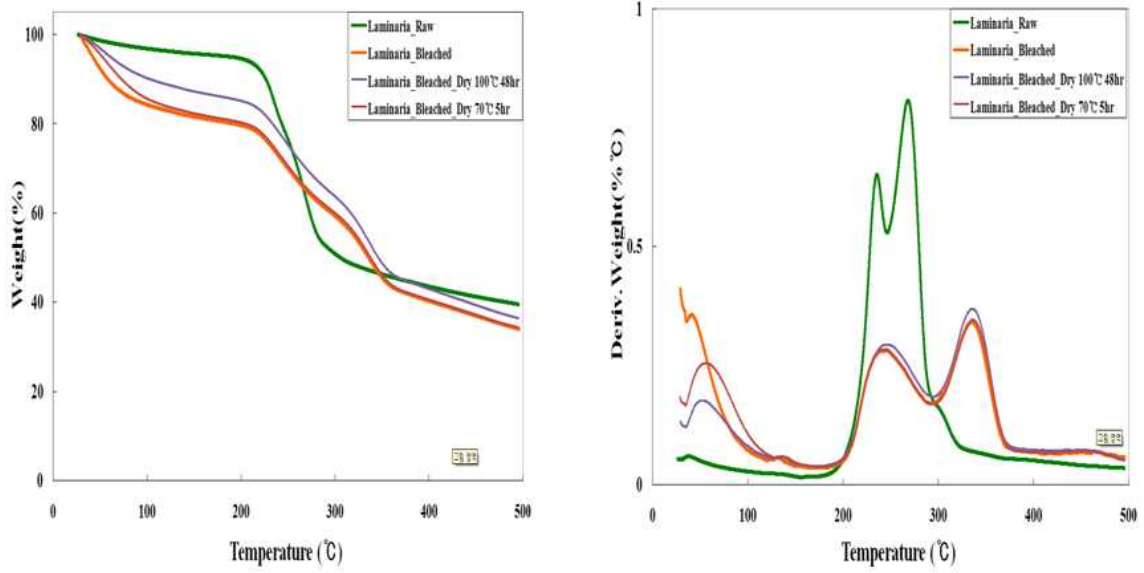
파래의 열분해 특성은 처리방법에 따라 다르게 나타났다. 주정 및 아세톤으로 세척한 경우는 200~300°C에서 두 개의 열분해 주피크가, 황산으로 처리한 경우는 350°C에서 열분해 주피크가 나타났다. 열분해 결과로만 판단하면 황산 처리한 시료의 열안정성이 우수하여 보강재로서의 사용가능성이 크지만 실제로는 황산 처리한 시료에서는 산 냄새가 많이 나고 또한 서로 단단하게 응집되어 있어 고분자 내에 분산하는 것이 어려웠다. 반면에 주정 혹은 아세톤으로 처리한 파래는 분말형태로 보강재로 사용하는 것이 용이하였다.



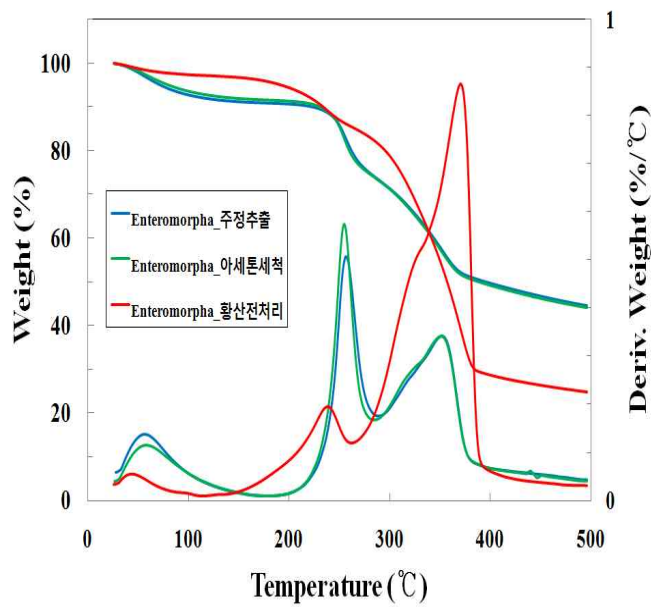
[그림 6-5-2] 다시마의 세척 및 표백과정.



[그림 6-5-3] 파래 세척 및 분말화 과정.



[그림 6-5-4] 다시마 원시료 및 표백된 다시마의 열분해 특성.



[그림 6-5-5] 다시마 원시료 및 표백된 다시마의 열분해 특성.

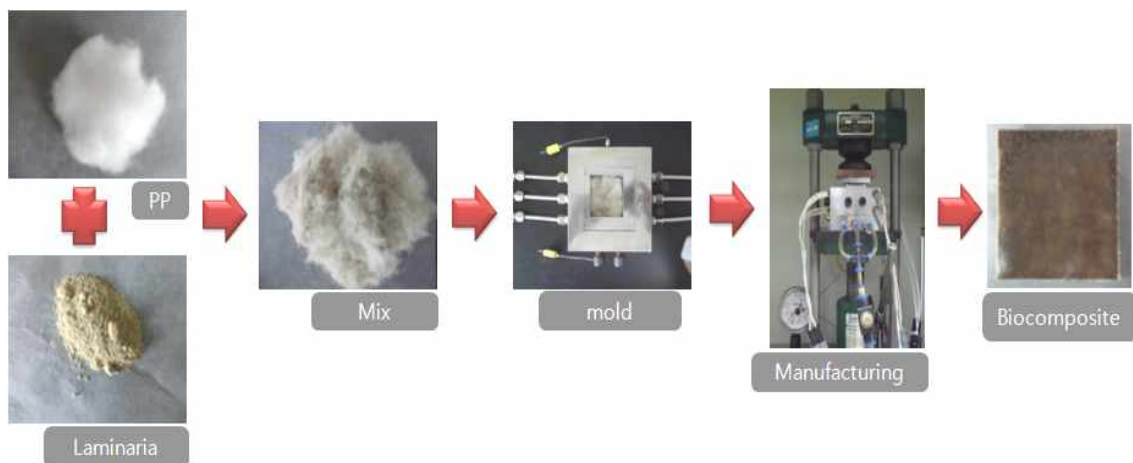
라. 바이오복합재료의 제조

바이오복합재료의 보강재로 사용한 다시마는 추출과 표백과정을 거쳐 점액질 물질이 제거되고 표백이 된 시료를 사용하였으며 수분을 제거하기 위해 활엽수 펄프와 같이 100°C의 건조기에서 24시간 이상 건조하였다. 파래의 경우에는 주정 및 아세톤으로 처리된 파래 분말을 20~50wt%까지 10wt%별로 변화시키면서 폴리프로필렌과 함께 혼합하여 제조하였다.

폴리프로필렌을 매트릭스로 하는 바이오복합재료의 제조방법은 세절된 폴리프로필렌을 가정용 믹서를 사용하여 활엽수 펄프 및 다시마 부산물을 혼합한 후 혼합물을 금속 몰드 내에 넣고 상온에서 163°C까지 40분간 약 3.8°C/min로 온도를 상승시켰다. 금속몰드의 내부가 163°C에 도달한 후 매트릭스가 충분히 용융되고, 섬유 사이에서의 수지 흐름이 원활히 이루어지도록 20분 동안 유지하고 10분간 1000psi (6.894MPa)의 압력을 가한 후 그대로 유지하면서 상온까지 냉각하였다. 바이오복합재료 시료는 50 mm × 50 mm × 2 mm 크기로 제조하였다. 바이오복합재료 제조공정을 [그림 6-5-6]에 나타내었다.

천연섬유 보강재의 함량은 50wt%로 하였으며 다시마의 함량은 활엽수 펄프 함량 대비 0~50wt%까지 10wt%별로 변화시키면서 제조하였다. 바이오복합재료가 제조된 후에 금속몰드에서 탈형시켜 24시간 이상 상온에서 냉각시킨 후 정밀절단기를 이용하여 열적 특성 및 기계적 분석을 위한 시편을 제조하였다.

파래의 경우에는 주정 및 아세톤으로 처리된 파래 분말을 20~50wt%까지 10wt%별로 변화시키면서 폴리프로필렌과 함께 혼합하여 제조하였다. 제조공정은 다시마 보강재를 사용한 경우와 같은 조건으로 하였다.



[그림 6-5-6] 바이오복합재료 제조공정.

3. 연구 결과

가. 바이오복합재료의 동역학적 특성

바이오복합재료의 저장탄성률 (storage modulus) 및 $\tan \delta$ 값과 같은 동역학적 특성을 분석하기 위해 동역학적열특성 분석기 (Dynamic mechanical Analyzer, DMA Q-800, TA Instrument)를 이용하였다. 각 시편의 크기는 길이 35mm, 너비는 약 11mm, 두께는 약 2mm로 제작하여 분당 5°C로 -100~100°C 까지 측정하였다. 시편의 온도를 -100°C 까지 낮추거나 100°C 까지 온도가 올라간 시편의 냉각을 위해 액체질소를 사용하였으며 효과적인 진동을 위해 air bearing의 gage를 60~65psi로 유지하였다. 시험은 vertical 형태로서 single cantilever mode에서 진행되었으며 사용된 진동수 (frequency)는 1Hz로 고정시키고, 진동폭 (oscillation amplitude)은 0.2mm로 유지하였다. 또한 실험을 진행하기에 앞서, 항상 clamp의 position과 compliance를 보정하여 신뢰성 있는 결과를 얻을 수 있도록 하였다.

활엽수펄프를 보강재로 사용한 폴리프로필렌에 다시마 첨가영향에 대한 동역학적 특성을 [그림 6-5-7]와 [그림 6-5-8]에 나타내었다. 다시마의 첨가 없이 활엽수 펄프만을 50wt% 첨가한 경우 저장탄성률은 5.49 GPa로 폴리프로필렌 매트릭스에 비해 47% 증가한 값을 보여준다. 저장탄성률과 손실탄성률의 비를 나타내는 $\tan \delta$ 값 또한 50wt% 활엽수 펄프를 첨가했을 경우 가장 낮은 $\tan \delta$ 값을 나타내었다. $\tan \delta$ 값이 감소하는 것은 폴리프로필렌 매트릭스 자체의 감쇠현상 (Damping)을 보강섬유가 효과적으로 보완하고 있다는 것을 의미하며 따라서 활엽수 펄프가 폴리프로필렌을 효과적으로 보강하고 있는 것으로 해석할 수 있다.

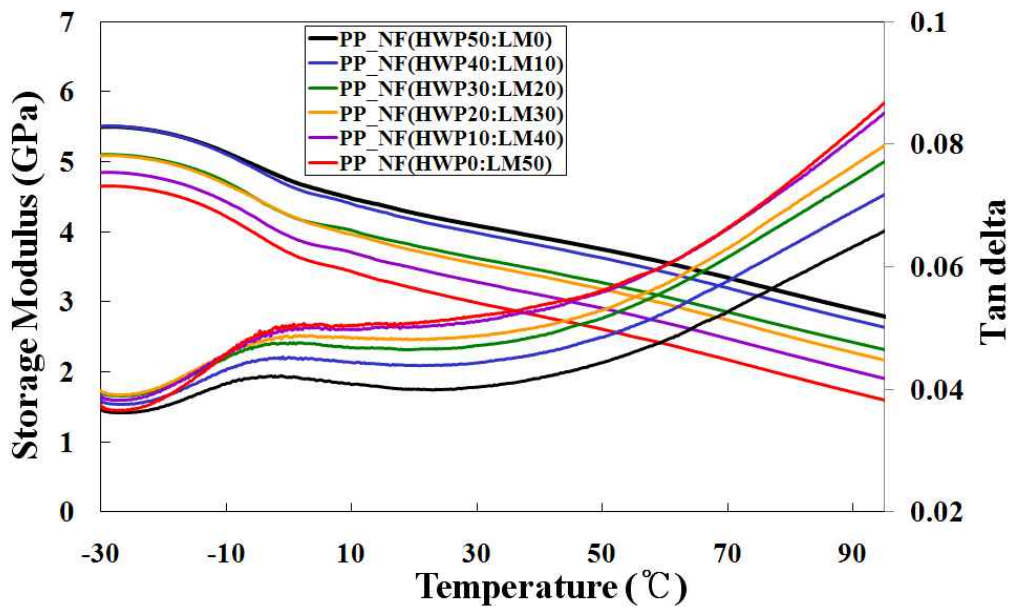
반면 활엽수 펄프에 다시마 함유량을 10wt%씩 증가시켜 50wt%까지 증가시켜 제조한 바이오복합재료의 저장탄성률은 그 증가폭이 감소하는 경향을 보이는데, 각각 10wt%, 20wt%, 30wt%, 40wt%, 50wt% 다시마를 첨가한 경우 폴리프로필렌 매트릭스에 비해 37%, 37%, 31%, 25%, 20% 증가한 반면에 활엽수 펄프를 50wt% 첨가한 바이오복합재료의 동역학적 특성에 비해서는 10%, 10%, 16%, 22%, 27% 감소하였다. 이는 표백된 다시마에 존재하는 유기물질 및 단섬유 혹은 구형 물질과 활엽수 펄프 및 폴리프로필렌과의 접착이 상대적으로 우수하지 않기 때문으로 해석할 수 있다.

주정 및 아세톤으로 처리한 파래를 보강재로 한 바이오복합재료의 동역학적 특성과 파래 함량에 따라 동역학적 특성 변화를 [그림 6-5-9], [그림 6-5-10]과 [그림 6-5-11], [그림 6-5-12]에 나타내었다. 주정 및 아세톤으로 처리한 파래 보강 바이오복합재료는 파래의 함량이나 처리조건에 따라 큰 변화를 보이지 않았으며 폴리프로필렌에 대해서는 큰 보강 효과를 나타내지 않았다.

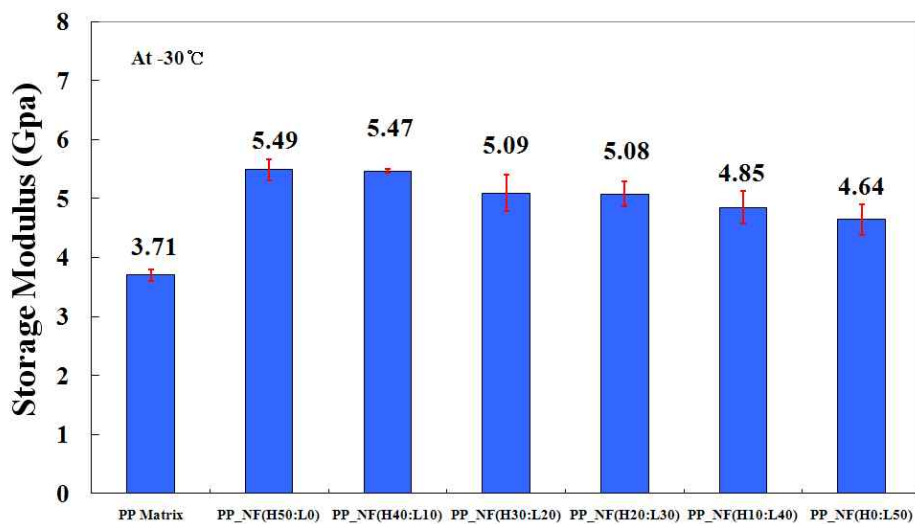
[표 6-5-3] 활엽수 펄프 보강 바이오복합재료의 동역학적 특성에 대한 다시마 추출물의 첨가 영향

보강재 비율	H50:L0	H40:L10	H30:L20	H20:L30	H10:L40	H0:L50
Storage Modulus 증가량(%)	47	37	37	31	25	20

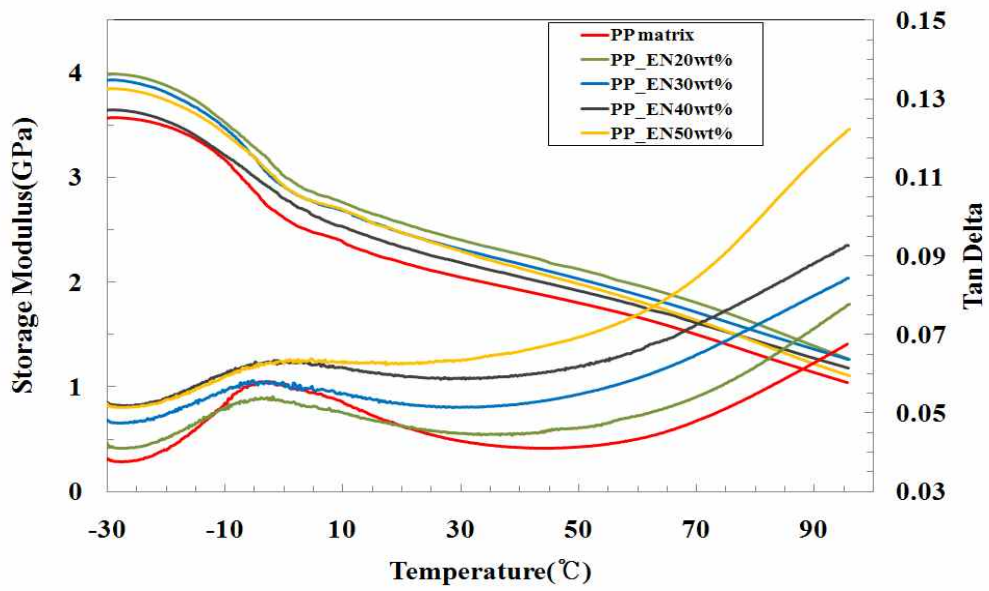
H: 활엽수 펄프, L: 다시마 추출물



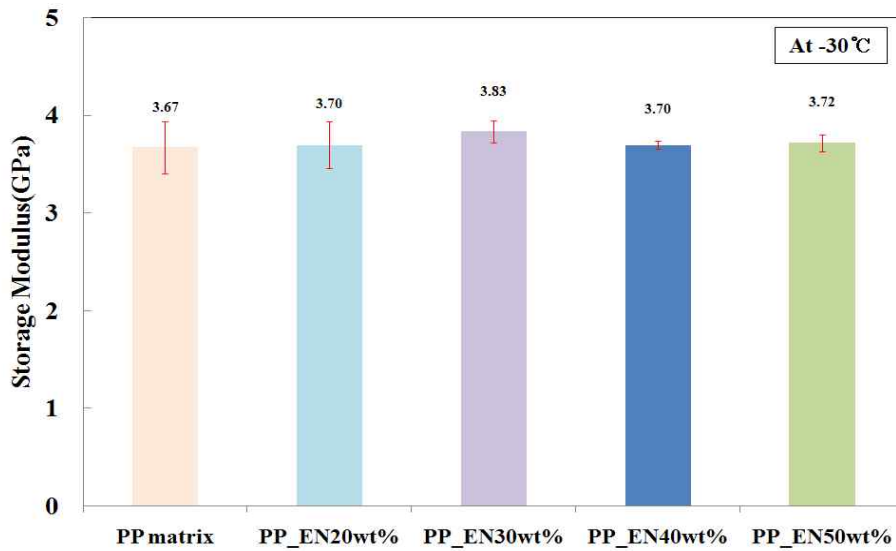
[그림 6-5-7] 바이오복합재료의 동역학적 특성.



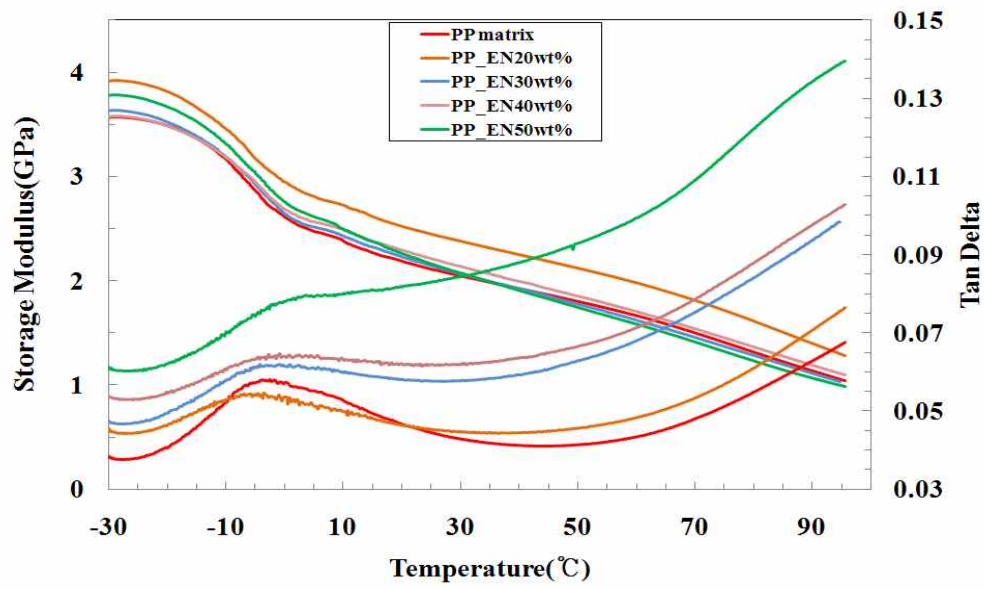
[그림 6-5-8] 활엽수펄프 보강 바이오복합재료의 동역학적 특성에 대한 다시마 첨가영향.



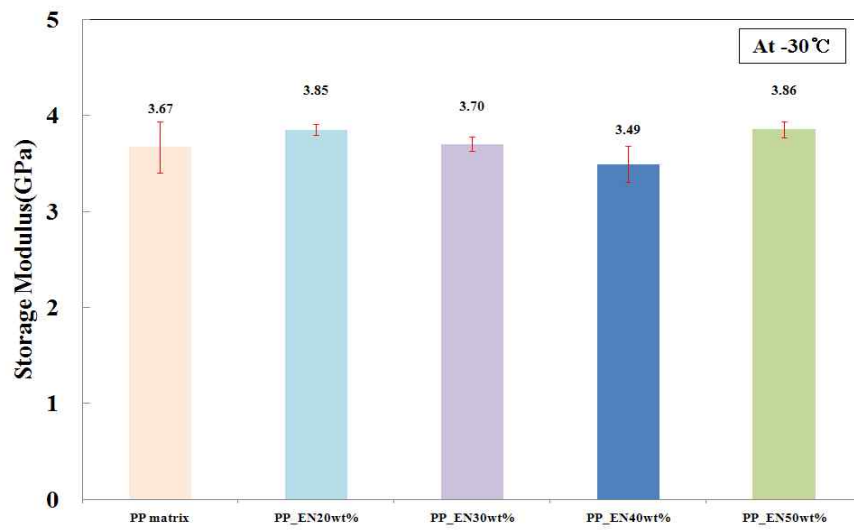
[그림 6-5-9] 주정으로 처리한 파래 보강 바이오복합재료의 동역학적 특성.



[그림 6-5-10] 주정으로 처리한 파래 보강 바이오복합재료의 동역학적 특성에 대한 파래 함량 영향.



[그림 6-5-11] 아세톤으로 처리한 파래 보강 바이오복합재료의 동역학적 특성.



[그림 6-5-12] 아세톤으로 처리한 파래 보강 바이오복합재료의 동역학적 특성에 대한 파래 함량 영향.

나. 바이오복합재료의 굴곡 특성

바이오복합재료의 굴곡특성은 만능재료시험기 (Universal Testing Machine, UTM, Tinius olsen Ltd., H-50K-S T, Redhill, England)를 사용하여 측정하였다. 굴곡 시험은 국제표준 시험법인 ASTM D 790 Method I (three-point loading)에 의거하여 3점 굴곡 (three point bending)방법으로 상온 (room temperature; $23\pm 2^{\circ}\text{C}$ and $50\pm 5\%$ relative humidity)에서 측정하였고, 시편은 $50\text{mm}\times 25\text{mm}\times 2\text{mm}$ 크기로 준비하였다. 시편의 span-to-depth 비율은 16, load cell은 50kN, cross head speed는 1 mm/min으로 설정하였다. 굴곡강도 (flexural strength)와 굴곡탄성률 (flexural modulus)은 만능시험기로 측정된 결과를 각각 식 (a) 및 식 (b)의 계산식에 대입하여 산출하였다.

$$S = \frac{3PL}{2bd^2} \dots\dots\dots (a)$$

- S = stress in the outer fibers at midspan, N/m² (psi),
- P = load at a given point on the load-deflection curve, N (lbf),
- L = support span, m (in.).
- b = width of beam tested, m (in.),
- d = depth of beam tested, m (in.).

$$E_B = \frac{L^3m}{4bd^3} \dots\dots\dots (b)$$

- E_B = modulus of elasticity in bending, N/m² (psi),
- L = support span, m (in.)
- m = slope of the tangent to the initial straight-line portion of the load-deflection curve, N/m (lbf/in.) of deflection.
- b = width of beam tested, m (in.),
- d = depth of beam tested, m (in.).

활엽수펄프 보강 바이오복합재료의 굴곡강도와 굴곡탄성률에 대한 다시마 첨가영향을 [그림 6-5-13], [그림 6-5-14]에 나타내었다. 활엽수펄프 보강 바이오복

합재료의 굴곡특성에 대한 다시마 첨가영향 결과를 살펴보면 활엽수펄프 함유량이 50wt% 에서 각각 7.6%, 110% 굴곡강도 및 굴곡탄성률 모두 증가하였다. 반면에 다시마를 첨가할수록 그 값이 감소하는 경향을 보였고 굴곡강도는 매트릭스보다도 적은 값을 나타내었다. 이는 다시마가 첨가될수록 천연섬유가 매트릭스를 보강하는 효과가 감소함에 따라 나타난 것으로 분석할 수 있다.

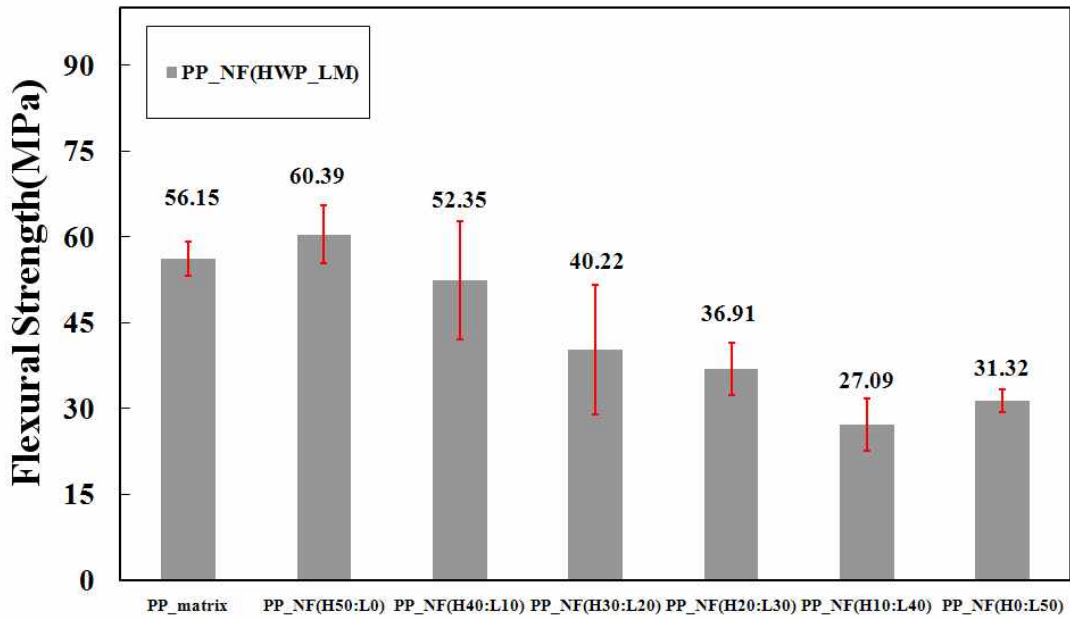
일반적으로 굴곡시험 시에 시편의 아랫부분은 인장응력을 받고 윗부분은 압축응력을 받게 되는데 실제로 여러 응용분야에서 굴곡시험은 인장시험 보다 소재의 디자인이나 표준화 목적을 고려할 때 장점도 많고 소재가 경험하는 실제 환경과 더욱 밀접한 관계가 있다. 따라서 보강재 투입량 증가에 따라 증가하는 굴곡특성이 향상되는 경향을 보이는 결과가 바람직하다고 할 수 있다.

주정으로 처리한 파래 보강 바이오복합재료의 굴곡강도 및 탄성률에 대한 주정으로 처리한 파래를 보강재로 사용한 폴리프로필렌 바이오복합재료의 굴곡강도 및 굴곡탄성률에 대한 함량 변화 특성을 분석한 결과를 [그림 6-5-15]와 [그림 6-5-16]에 나타내었다. 굴곡 강도는 파래의 함량이 증가할수록 감소한 반면에 굴곡 탄성률은 증가하였다. 파래 보강재와 폴리프로필렌 함량이 1:1이 될 경우 굴곡 강도는 55% 이상 감소하는 것으로 분석되었다. 반면에 굴곡 탄성률은 파래를 40wt% 첨가한 경우 100%, 20, 30, 50wt% 첨가한 경우에는 89~96%의 증가를 보였다. 이는 파래 보강재가 강도를 필요로 하는 분야에는 적용하기 어려우나 높은 탄성율이 필요한 분야에는 충분히 사용될 수 있다는 것을 알 수 있다.

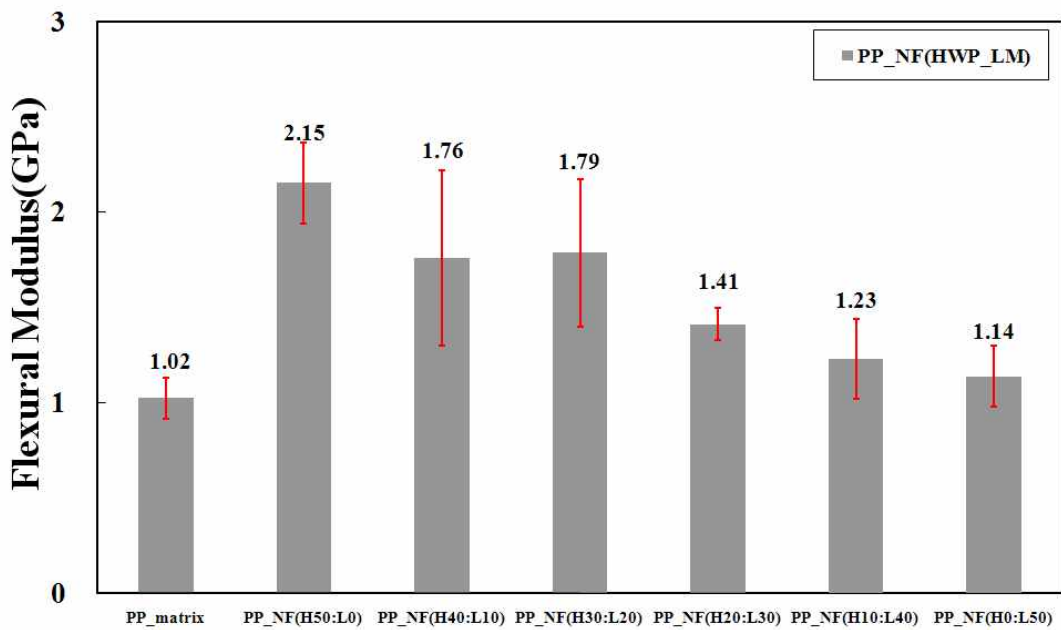
[표 6-5-4] 활엽수 펄프 보강 바이오복합재료의 굴곡 특성에 대한 다시마 추출물의 첨가 영향

보강재 비율	H50:L0	H40:L10	H30:L20	H20:L30	H10:L40	H0:L50
Flexural Modulus 증가량(%)	110	72	75	38	20	11
Flexural Strength 증가량(%)	7.6	-6.7	-28	-34	-51	-44

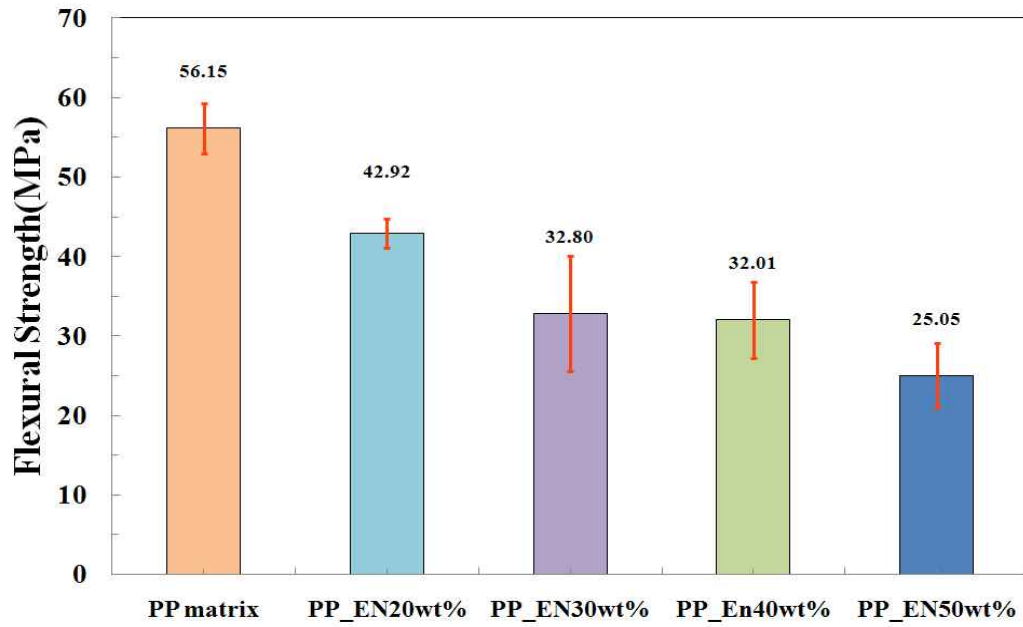
H: 활엽수 펄프, L: 다시마 추출물



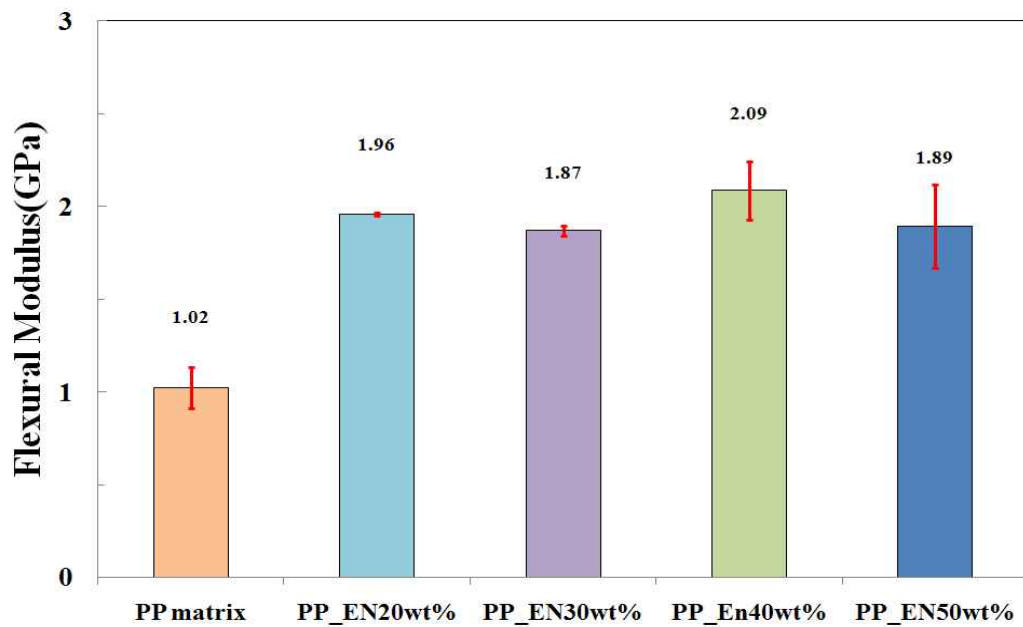
[그림 6-5-13] 활엽수펄프 보강 바이오복합재료의 굴곡강도에 대한 다시마 첨가영향.



[그림 6-5-14] 활엽수펄프 보강 바이오복합재료의 굴곡탄성률에 대한 다시마 첨가영향.



[그림 6-5-15] 주정으로 처리한 파래 보강 바이오복합재료의 굴곡강도 특성에 대한 파래 함량 영향.



[그림 6-5-16] 주정으로 처리한 파래 보강 바이오복합재료의 굴곡탄성률 특성에 대한 파래 함량 영향.

다. 바이오복합재료의 충격강도 특성

바이오복합재료의 충격강도 시험을 위해 아이조드 펜듈럼 충격 시험기 (Pendulum Impact Tester, Tinius olsen Ltd., Model - IT 504, Redhill, England)를 사용하였다. 본 실험기기는 pendulum type hammer가 장착된 형태로서 ASTM D-256에 의거하여 시편 제작 및 실험을 실시하였다. 시편의 길이는 63.5mm, 너비는 12.7mm, 두께는 약 5mm로 하였으며, 표준시험법에 맞는 notch를 만들기 위해 Automatic specimen notcher (Model-899, Tinius olsen Ltd., Redhill, England)를 사용하였다.

시험은 상온에서 Notched specimen과 Unnotched specimen을 각각 5개씩 측정하였으며, 충격강도 (impact strength)는 J/m의 단위로 환산하여 나타내었다. 실험 방법에 있어서 시험편의 위치를 [그림 6-5-17]에 모식도로 나타내었다.

활엽수 펄프를 보강재로 사용한 폴리프로필렌 바이오복합재료의 충격강도에 대한 다시마 첨가영향을 [그림 6-5-18]에 나타내었다. 활엽수 펄프를 50wt% 첨가한 바이오복합재료는 폴리프로필렌 매트릭스에 비해 충격강도가 366%로 크게 향상되었다. 반면에 활엽수 펄프 40%에 다시마를 10wt% 첨가하면 211%로 활엽수 펄프만 첨가하였을 때보다 그 값이 크게 감소하고 다시마의 함유량이 증가 할수록 활엽수 펄프만 첨가하였을 때 보다 점차적으로 감소함을 알 수 있다.

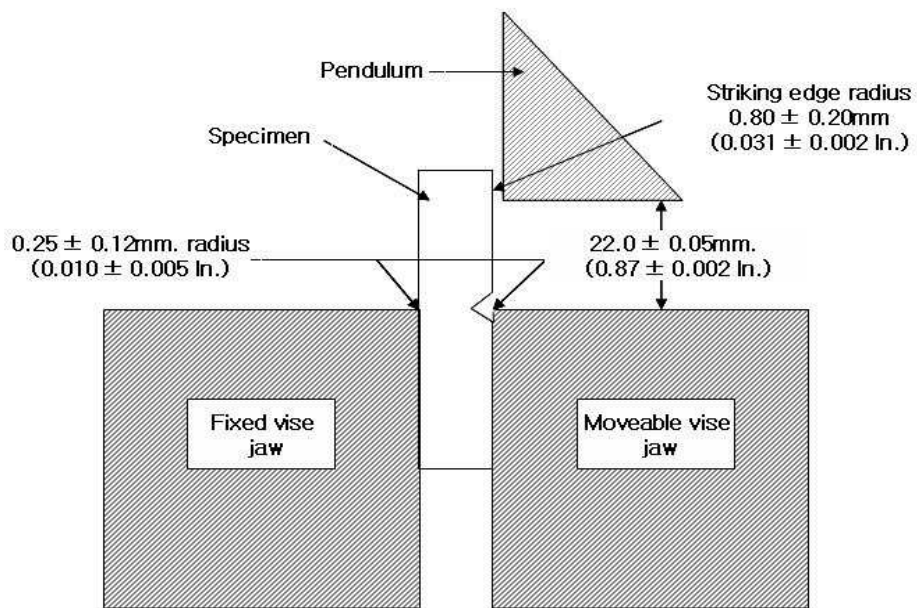
일반적으로 천연섬유를 보강재로 사용한 바이오복합재료의 경우 고분자 매트릭스에 비해 뛰어난 충격흡수성을 가지게 되지만 보강재로서 우수한 특성을 보이는 활엽수 펄프의 함유량이 낮아지고 대신 분말형태인 다시마의 함유량이 증가함에 따라 매트릭스에 대한 분산성 혹은 보강재와 매트릭스 사이의 계면 접착력이 상대적으로 좋지 않아 충격에너지를 효과적으로 흡수하지 못하는 것으로 생각할 수 있다.

반면에 주정으로 처리한 파래 보강 바이오복합재료의 충격강도에 대한 파래 첨가영향을 [그림 6-5-19]에 나타내었다. 폴리프로필렌에 파래를 20, 30wt% 첨가하면 충격강도는 50% 증가를 보이며 50wt% 첨가 시에 감소되는 것을 알 수 있다. 따라서 파래 보강재는 다시마에 비해 충격강도가 우수한 바이오복합재료를 제조하는데 효과적인 것으로 판단된다.

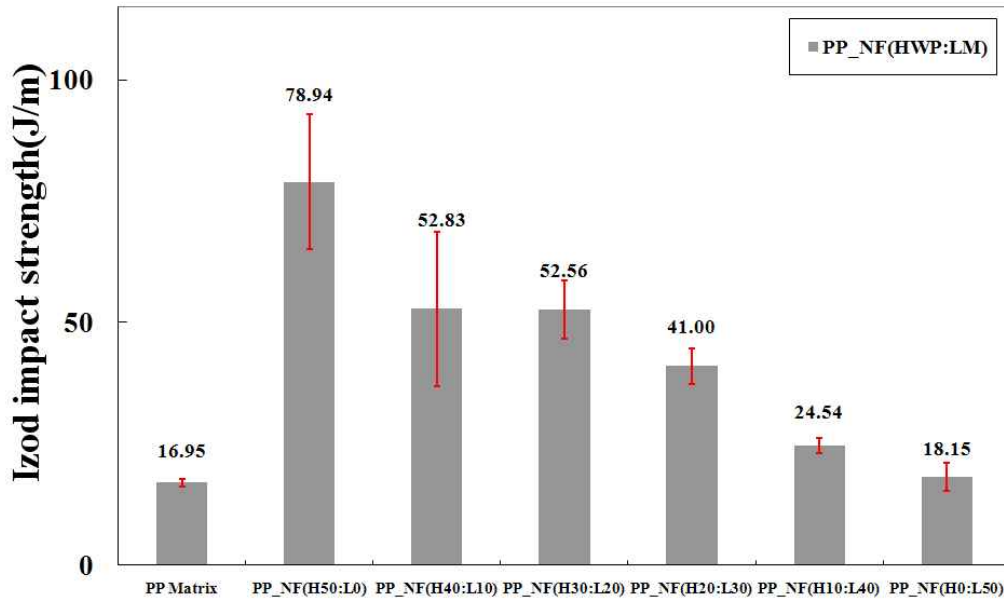
[표 6-5-5] 활엽수 펄프 보강 바이오복합재료의 굴곡 특성에 대한 다시마 추출물의 첨가 영향

보강재 비율	H50:L0	H40:L10	H30:L20	H20:L30	H10:L40	H0:L50
충격강도 증가량(%)	366	211	210	141	50	7

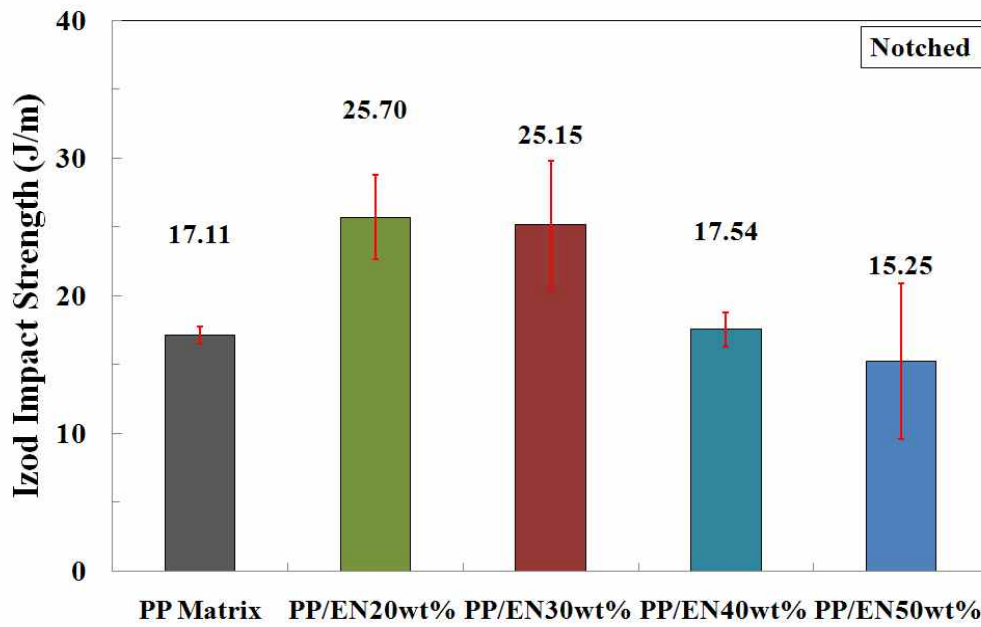
H: 활엽수 펄프, L: 다시마 추출물



[그림 6-5-17] Izod 실험장치.



[그림 6-5-18] 활엽수펄프 보강 바이오복합재료의 충격강도에 대한 다시마 첨가영향.



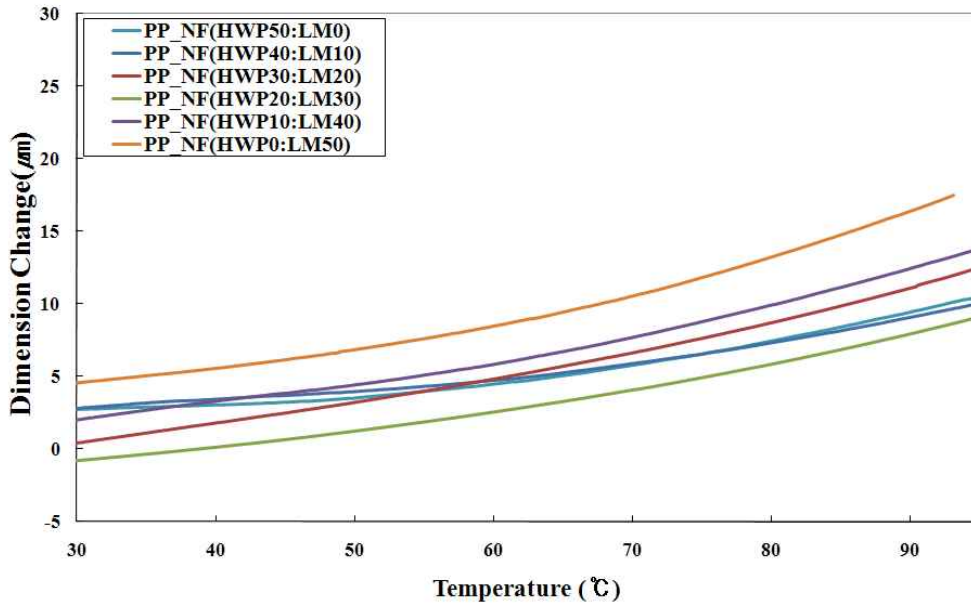
[그림 6-5-19] 주정으로 처리한 파래 보강 바이오복합재료의 충격강도에 대한 파래 첨가영향

라. 바이오복합재료의 열팽창 특성

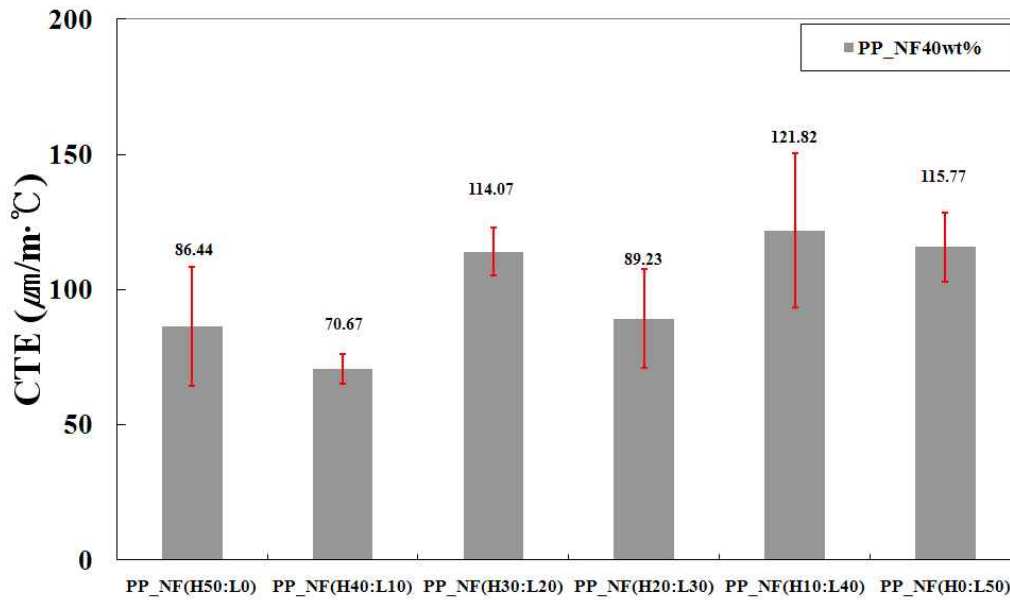
바이오복합재료의 열팽창 거동과 열팽창계수 (Coefficient of thermal expansion, CTE)를 열기계적 특성 분석기 (Thermomechanical Analyzer, TMA Q-400, TA Instrument)를 사용하여 분석하였다. 상온에서 100°C 까지 5°C/min으로 하여 승온하였으며 시편의 팽창정도를 측정하는 probe 주위는 100 ml/min의 질소 분위기로 유지하였다. 시편의 크기는 가로 7 mm, 세로 7 mm, 두께 약 2 mm로 준비하였으며, 특히 상온에서의 수분흡수를 최소화하기 위해 절단하여 데시케이터에 투입한 시편을 밀봉·보관 후 사용하였다.

활엽수 펄프를 보강재로 사용한 폴리프로필렌 바이오복합재료의 열팽창 특성에 대한 다시마 첨가영향을 [그림 6-5-20]과 [그림 6-5-21]에 나타내었다. [그림 6-5-20]은 상온에서 100°C까지의 바이오복합재료의 두께변화량을 선형으로 표시한 것이며 [그림 6-5-21]는 열팽창계수를 비교한 것으로 열팽창 계수의 감소는 온도변화에 대한 치수 안정성이 향상됨을 의미한다. 열팽창 특성분석에 의하면 활엽수 펄프에 다시마를 첨가한 영향은 일정한 패턴을 보이지 않는데 이는 다시마 추출물에 존재하고 있는 유기성 물질이 온도 상승에 따른 치수변화에 상대적으로 큰 영향을 주었기 때문으로 여겨진다.

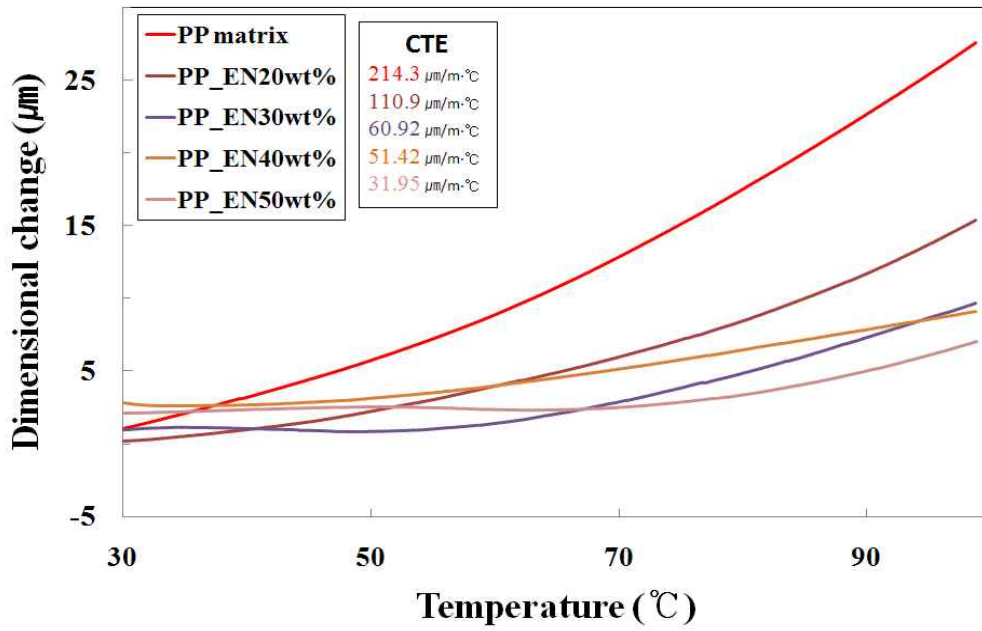
주정으로 처리한 파래를 보강재로 사용한 폴리프로필렌 바이오복합재료의 열팽창 특성에 대한 파래 첨가 함량 영향을 [그림 6-5-22]에서 [그림 6-5-23]에, 아세톤으로 처리한 파래를 보강재로 사용한 폴리프로필렌 바이오복합재료의 열팽창 특성에 대한 파래 첨가 함량 영향을 [그림 6-5-24]에서 [그림 6-5-25]에 나타내었다. 주정 혹은 아세톤으로 처리한 파래는 모두 폴리프로필렌에 대한 치수 안정에 크게 기여하는 것으로 분석되었다. 이는 프로필렌과 파래 보강재 사이의 우수한 접착과 또한 파래 보강재 자체의 우수한 열안정성에 기인한 것으로 판단된다.



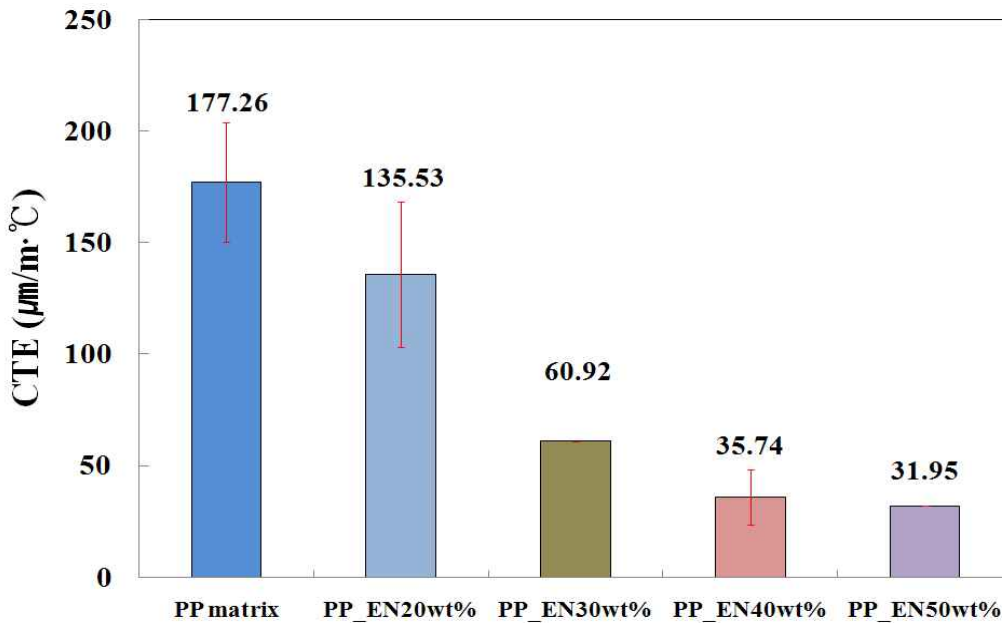
[그림 6-5-20] 활엽수펄프 보강 바이오복합재료의 치수안정성에 대한 다시마 첨가 영향.



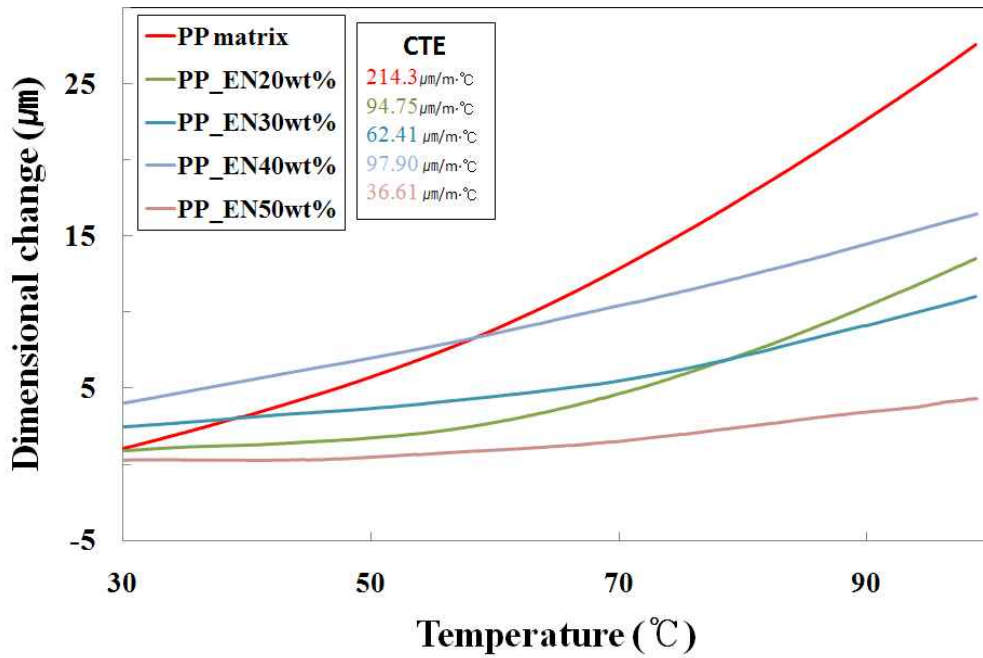
[그림 6-5-21] 활엽수펄프 보강 바이오복합재료의 열팽창계수에 대한 다시마 첨가 영향.



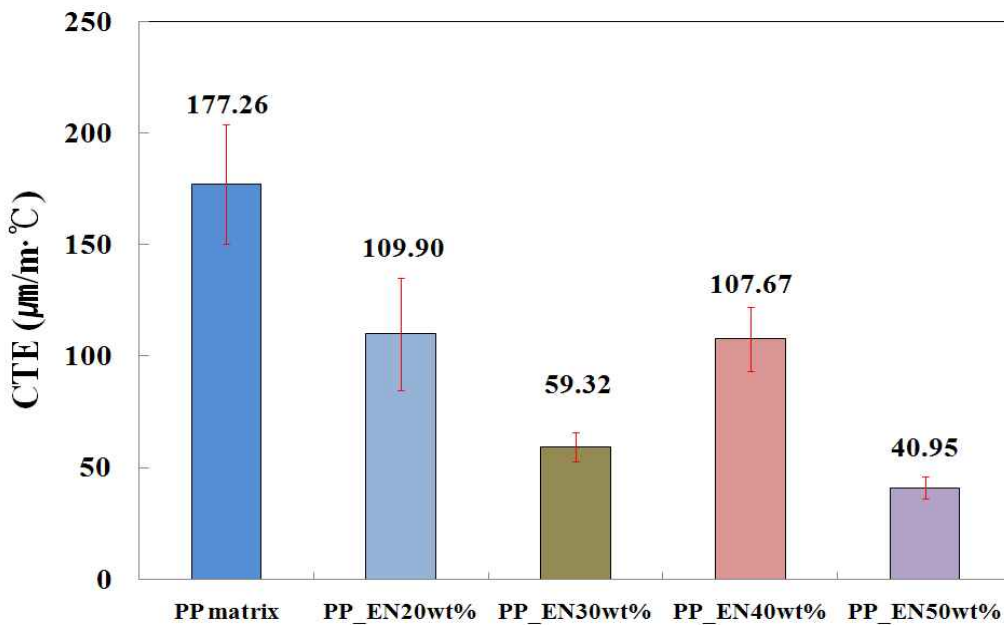
[그림 6-5-22] 주정 처리 파래 보강 바이오복합재료의 열팽창특성에 대한 파래 첨가 영향.



[그림 6-5-23] 주정 처리 파래 보강 바이오복합재료의 열팽창계수에 대한 파래 첨가 영향.



[그림 6-5-24] 아세톤 처리 파래 보강 바이오복합재료의 열팽창특성에 대한 파래 첨가영향.



[그림 6-5-25] 아세톤 처리 파래 보강 바이오복합재료의 열팽창특성에 대한 파래 첨가영향.

4. 요약 및 제언

본 연구에서는 해조류를 바이오 에너지화하는 과정에서 발생하는 부산물의 특성 및 신소재 개발 공급원으로 활용 가능한가에 대한 분석을 수행하고 있다. 또한 해조류 부산물을 이용하여 경량이며 친환경 특성을 가진 바이오복합재료를 개발하기 위한 핵심·원천 기술을 확보하는 것을 목표로 하고 있다.

바이오복합재료는 친환경 소재를 이용하고 재료, 공정, 제품 및 폐기에 이르기까지 에너지절약과 이산화탄소 배출 저감 등의 특성을 가지고 있기 때문에 저탄소 녹색상장의 대표적인 예로써 성공적인 수행에 의해 에너지안보와 환경보호에 기여하고 안정된 에너지원 확보 및 차세대성장동력에 기여할 수 있는 소재이다. 따라서 해조류 부산물을 바이오복합재료의 보강재로 효과적으로 활용할 수 있으면 친환경 신소재 개발, 에너지절약, 환경보호, 폐기물 감소등 여러 면에서 많은 장점이 될 수 있다.

1차년도 연구에서는 다시마의 세척 및 표백과 특성분석, 다시마 부산물 보강 바이오복합재료 제조 및 특성분석을 통해 다시마 부산물을 보강재로 이용한 바이오복합재료 개발 가능성을 조사하였다. 또한, 주정 혹은 아세톤으로 처리한 파래 시료를 보강재로 한 폴리프로필렌 바이오복합재료의 특성을 분석하였다.

폴리프로필렌을 기반으로 하는 바이오복합재료의 동역학적, 굴곡특성, 열팽창 특성, 충격 특성을 분석한 결과에 의하면 다시마 혹은 다시마 부산물은 바이오복합재료의 보강재로 단독으로 사용하는 데에는 적합하지 않은 것으로 분석되었다. 활엽수 펄프와 같이 보강 특성이 우수한 다른 천연섬유 보강재와 혼합되어 사용되는 경우에는 식물성 천연섬유의 사용을 절약하고 해조류 부산물을 활용하는 점에서는 의미가 있으나 바이오복합재료의 동역학적 특성, 기계적 특성에는 식물성 천연섬유를 단독으로 사용하는 경우에 비해 보강효과가 적은 것으로 분석되었다.

또한 파래에서 유용한 물질을 제거한 후 주정 및 아세톤으로 처리하고 분말로 만든 시료를 바이오복합재료의 보강재로 사용가능한지에 대한 실험을 수행하였다. 파래 부산물은 동역학적 특성에서는 폴리프로필렌을 기반으로 하는 바이오복합재료의 보강재로는 큰 역할을 하지 않는 것으로 확인되었다. 반면에, 파래 부산물을 보강재로 50%까지 혼합한 경우에도 동역학적 특성 등이 크게 감소하지 않기 때문에 폴리프로필렌과 같은 범용고분자 물질에 혼합되어 친환경 특성을 크게 향상시킬 수 있을 것으로 생각할 수 있다.

반면에 굴곡 탄성률, 충격 강도, 열안정성에서는 주정 혹은 아세톤으로 처리한 파래가 보강재로서 매우 우수한 특성을 나타내었다. 특히 바이오복합재료의

열안정성을 크게 향상시켜 이 결과는 자동차, 건축산업에서 열안정성을 크게 요구하는 분야에 충분히 응용 가능한 것으로 판단되었다. 파래 보강 바이오복합재료는 파래 부산물을 다양한 방법으로 처리하고 특성을 분석한 후 범용고분자 혹은 생분해성 고분자와 결합하여 친환경 특성이 우수한 구조재료로 개발할 수 있는 잠재성이 큰 재료로 판단된다.

5. 향후계획

해조류의 다양한 처리로 준비된 해조류 부산물의 특성 분석 및 이를 이용한 시트형 바이오 복합재료를 개발하고자 한다.

제 6 절 해조류 추출물을 이용한 기초생활 제품 설계

1. 연구 목적 및 내용

가. 연구 목적

해조류 바이오매스를 통합 활용하기 위하여 많은 연구 분야의 연구를 수행 중이지만 대부분이 중장기 연구로서 현실적으로 조기에 상업화를 달성하기 어려운 실정이다. 그러나 기초생활 제품의 경우에는 건강 신소재 팀에서 수행한 연구결과인 해조류로부터 분리한 유용 추출물을 활용하면, 비교적 단기간에 상업화가 가능한 제품 개발 연구를 수행할 수 있을 것으로 판단된다.

인류가 생활함에 있어서 기초 생활제품은 인간다운 삶을 영위하는데 필수품이라 할 수 있다. 현재 사용되고 있는 기초 생활제품은 그 종류와 성능이 매우 다양하다. 그 중 비누는 인체의 피부에서 생리적으로 분비되는 피지, 발한에 의한 잔유물과 메이크업에 의한 이물질, 대기 중의 오염물질 등으로 오염된 피부로부터 이물질을 제거하여 깨끗하고 건강한 피부를 지속시킬 수 있도록 도와주는 제품이다. 만일 피부로부터 오염물질이 제거되지 않는다면, 피부는 오염물로 각질화가 되어 피부면역력이 저하되고 각종 피부질환에 쉽게 노출되게 된다. 최종적으로는 피부에서 일어나는 호흡, 세포형성, 체온조절등과 같은 생체조절을 비롯한 많은 기능을 잃어버리게 되는 것이다. 따라서 해조류 중 특히 곰피에서 추출되는 phlorotannin(플로로탄닌)계열의 성분을 이용하여 비누를 제작, 항산화효과를 주어 피부를 보호, 개선하고자 한다.

당해 연도에는 기초 생활 제품의 설계 및 제조 공정 최적화 관련 연구를 행하며, 향후 기초 생활제품의 상업화 검토 및 두발용(헤어케어) 제품과 피부용(스킨케어) 기초제품 분야로 연구 영역을 확대하고자 하였다. 현재 국내 사용되고 있는 고품질의 천연 소재의 대부분은 수입에 의존하고 있다. 따라서 해조류 추출부터 추출물을 이용한 제품의 완성까지의 모든 단계가 가능해질 경우, 수입대체 효과와 개발된 신제품의 해외 시장 진출에 의한 국가 기술 경쟁력 향상이 예상된다. 또한 기초 생활 제품으로 시작하여 제약, 식품, 화장품 분야 등으로의 응용가능성이 크기 때문에 본 연구는 산업인력양성의 기회를 마련하는데도 이바지 할 것으로 판단된다.

또한 전 세계 적으로 차세대 연료로서 바이오 연료의 보급이 급속히 진행되는 만큼, 해조류를 통한 바이오 연료의 제조 역시 제품 개발의 일환으로 볼 수 있다. 바이오 연료를 생산하기 위해서는 크게 원료 물질의 당화, 발효 및 증류의 세

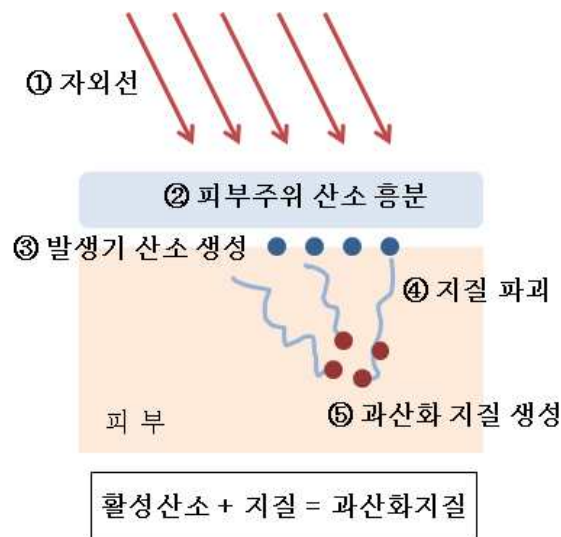
단계를 거치는데, 이중 당화 단계에 있어서 화학적 처리, 열처리, 효소에 의한 전처리 등이 이용되고 있다. 하지만, 이러한 전처리들은 생성되는 당류 물질의 수율이 낮다는 문제점이 있다. 따라서 이를 보완하고자, 해조류 추출물을 플라즈마 처리 및 산처리 하여 당류 물질 제조 수율을 높이고자 한다.

나. 연구 내용

(1) 이론적 배경 - Free Radical(프리라디칼)과 피부의 관계

100여년전 ‘프리라디칼 이론’ 이 나왔으나 주목받지 못하였고, 약 50여년 전부터 본격적인 연구가 시작되었다. 최근에는 인체노화와 질병, 죽음에 대한 요인 중 유해산소가 주요한 역할을 하고 있음이 밝혀지고 있어, 현대시대는 프리라디칼 시대를 맞이하고 있다고 하여도 과언이 아니다.

인체의 피부는 외부의 환경과 직접적으로 접촉하기 때문에 자외선이나 전자파, 방사선 등을 비롯한 대기오염 등에 쉽게 노출되어 있다. 따라서 피부는 대사과정 중 생성되는 프리라디칼이나 유리기에 의해 손상을 받게 되는데 이들을 반응성 산소물(Reactive oxygen species), 활성산소(Active oxygens), 유해산소(toxic oxygens) 혹은 산소라디칼(oxygen radicals)이라 칭한다.



[그림 6-6-1] 과산화 지질의 형성.

대기 중에서 자외선은 산소를 흥분 시키게 되는데, 피부 주위에서의 산소의 흥분은 피부표면에 발생기 산소를 생성시킨다. 발생기 산소는 지질을 파괴시켜 과산화 지질의 생성을 초래하게 된다. 생성된 과산화 지질은 프리라디칼 만큼이나 피

부에 악영향을 끼치는데, 피부를 자극하여 세포 재생을 방해하며 과색소침착 등의 현상을 야기 시키고 주로 세포 내부에 침투하여 작용한다. 결과적으로는 자가면역 질환성 피부질환을 발생시키게 되는데 이러한 질환에는 아토피 피부염, 일광 피부염, 알러지성 피부염, 피부궤양, 스트레스 피부, 노화 피부, 색소침착 피부 등이 있다[14-16].

이에 피부건강과 프리라디칼은 매우 밀접한 관계에 있으며 현재 유해산소 제거 효소인 SOD(Superoxide Dismutase)를 사용하는 여성 화장품이 상당량 개발되고 있다. 무엇보다 과산화지질로 인한 여러 악영향으로부터 피부를 보호하기 위해서는 강력한 항산화 효과를 지닌 비누의 개발이 필요하다고 판단된다.

(2) 제품의 기본 concept 선정

- 강력한 항산화 효과를 가진 천연 곰피 추출물(플로로탄닌계열)을 주성분으로 하는 세안(face) 및 세신(body)용 천연 항산화 비누(soap)
- 피부의 기본적인 오염을 제거하여 피부의 청결 유지
- 프리라디칼에 의해 손상된 피부를 개선하고 건강한 피부의 유지
- 오염으로부터의 피부의 직접적 손상에 대한 방지

(3) 제품의 특징

- 천연 항산화 성분인 곰피 추출물(플로로탄닌계열)을 주성분으로 함유
- 비누의 모든 원료를 100% 천연성분으로 사용
- CP(Cold Process Soap)비누로서 숙성비누가 가지는 효능을 최대화 함
- 중성 혹은 약산성 비누로 피부 자극을 최소화 함
- 인체 임상 테스트를 시행
- 해조류 추출물을 이용, 천연소재로서의 환경친화적인 이미지

(4) 해조류 추출물의 안정화

Phlorotannin은 phloroglucinol을 기본 구성단위로 하는 폴리페놀 화합물이다. 특히 해조류중 갈조류에서 많이 발견되며 감태 및 곰피에서 추출된다[17,18]. Phlorotannin은 항산화 효능에 뛰어난 효과를 보이는데 활성산소의 작용을 중화시켜 노화, 노폐물 방지하는 역할을 한다. 대체적으로 천연 항산화제들은 지질의 과산화 반응을 억제하는 효능이 매우 강하지만[19-21], 열과 산소에 대한 안정성이 약하다는 단점이 있다. 그 때문에 천연 항산화 물질들이 장기보존에 어렵고 지속성이 떨어지는 단점을 가지고 있어 식품, 화장품 및 의약품에 대한 활용이 제한적이라 할

수 있다[22]. 따라서 이러한 단점을 보완하기 위해 안정화가 이루어진다면 천연항산화제에 대한 활용이 수월해 질 것이다.

알긴산은 Laminaria 속 갈조류와 해초류의 세포벽에서 발견된 친수성의 콜로이드성 음이온 폴리사카라이드로서 광범위한 응용성을 가진 물질이다. 알긴산 나트륨 용액에 칼슘 이온이 첨가되면, 2개의 나트륨 이온과 1개의 칼슘 이온의 양이온 교환에 의하여 교차 결합을 형성한다[23,24]. 또한 알긴산 자체는 인체에 무해하고, 소화기관에 대해서도 안정해서 식품쪽에도 응용이 되기 때문에 플로로탄닌 성분을 안정화시키기 위한 도구로 적절하다[25].

(5) 플라즈마처리를 이용한 해조류로부터의 당류 물질의 제조

바이오연료로서 해조류는 목질계 바이오매스에서 갖는 난분해성 리그닌이 없기 때문에 분해하기 쉬운 장점이 있다. 해조류에 적합한 전처리 방법, 당화방법, 발효방법 등에 대한 연구가 필요하다. 특히, 바이오연료를 생산하기 위해서는 크게 원료 물질의 당화, 발효 및 증류의 세 단계를 거치는데, 당화단계에 있어서 화학적 처리, 열처리, 효소에 의한 전처리 등이 이용되고 있다. 하지만 이러한 전처리들은 생성되는 당류 물질의 수율이 낮다는 문제점이 있어서 플라즈마 처리를 통한 전처리로 수율을 높이고자 하였다.

플라즈마 처리를 통해 해조류에 포함된 다당류를 분해하게 되며, 이후의 산처리를 통해 분해된 이당류 등을 단당류를 분해, 또는 단당류를 단당류 및 이당류 등으로 분해하게 된다. 플라즈마 처리와 산처리를 통해 분해된 당류는 DNS 법을 통해 분석된다.

2. 연구 방법

가. 항산화 비누 개발

(1) 저온법 비누란

CP(Cold process)법은 비누 속에 피부에 보습 효과를 주는 글리세린이 그대로 녹아 있기 때문에 순하여 피부에 좋은 비누를 만들 수 있다. CP법은 여러 종류의 오일을 물에 가성소다(NaOH)를 넣어 녹인 액체를 혼합하여 반응시키는 것으로 이 과정을 비누화(Saponification)라고 한다. 비누의 품질은 여기에 사용하는 기름이나 지방의 종류, 첨가되는 허브나 향, 에센셜 오일, 보존제, 비타민 등에 의해 영향을 받는다. 반응을 통하여 비누와 글리세린이 남게 되며, 최종 비누에는 가성 소다가 전혀 남지 않게 된다. CP비누는 반응이 끝난 후에도 계속적으로 서서히 반응이 일어나며 사용하기 RK지는 약 4~8주 정도의 숙성 시간이 필요하다.

(2) 기본원리

① 베이스 오일

천연비누를 만들 때는 식물성 오일을 사용한다. 비누를 만들 때 오일은 그 특성에 따라 조절을 하여 레시피(성분비)를 만들어서 비누를 만든다. 비누 만들기를 할 때 오일과 지방은 가성소다 용액을 섞을 때 액체 상태여야 한다. 가열을 해서 액체 상태를 만들어서 가성소다와 섞는다.

② 정제수

비누를 만들 때 연수나 정제수를 사용한다. 정제수를 사용하지 않으면 심한 경우 완성된 비누가 검게 변할 수도 있다.

물의 양은 비누의 단단함에 영향을 주므로 보통 총 오일 양의 30~40% 가 적당하며, 일반적으로는 총 오일양의 33%를 사용한다.

③ 가성소다(NaOH)

가성소다는 오일과 반응하여 비누를 만들어 낸다. 이 때 각 오일마다 필요로 하는 가성소다의 양이 있는데 이를 비누화 값이라고 한다.

가성소다 양 = $\sum(\text{오일의 첨가량} \times \text{오일의 비누화값})$

*Discount : 오일을 완전히 비누화 시키는데 필요한 가성소다의 양보다 줄여 넣는

방법이다. 잔여 가성소다가 없도록 하는 것과 동시에 가성소다가 적으므로 과잉의 오일이 보습성분으로 비누에 남고 비누는 순해질 수 있다. 단, 지나치게 discount 하게 되면 오일이 산패되어 유효기간이 짧아지게 된다. 대략 5~10% 정도의 discount가 권장할 만한 수치이다.

④ 첨가물 & 에센셜 오일

첨가물은 전체 중량의 1~5%정도가 적당하며, 과다하게 첨가할 경우 비누의 단단하기와 거품의 조밀도에 영향을 끼칠 수 있다.

에센셜 오일의 경우 전체 중량의 1% 정도를 첨가하는 것이 좋다. 첨가시 너무 높은 온도에서는 향이 날라갈 수 있으므로, 온도가 좀 떨어진 뒤 고루 섞이도록 첨가한다.

(3) 제조 순서

- ① 베이스 오일이 들어있는 병을 개봉한 후 스테인리스 용기에 담아 오일을 45~55℃ 사이로 가열한다.
- ② 다른 스테인리스 용기를 준비하여 가성소다를 증류수에 넣는다. 반드시 물에 가성소다를 넣는다.
- ③ 가성소다 용액의 온도가 45~55℃ 로 떨어지면, 오일에 가성소다수를 부으면서 천천히 젓는다.
- ④ 저울 때 핸드 블렌더를 사용하면 약 5분안에 트레이스 상태가 된다.
*트레이스 상태란 핸드 블렌더로 비누 액 표면을 살짝 대어봤을 때 흔적이 남는 상태이다.
- ⑤ 옅은 트레이스가 되면 첨가물을 넣는다. 첨가물들이 골고루 잘 퍼질 수 있도록 주걱으로 살살 젓는다.
- ⑥ 표면에 확연한 트레이스가 보이면 틀에 붓는다.
- ⑦ 틀에 유산지나 비닐을 깔고 부은 뒤에 틀을 랩이나 비닐로 씌워 타올 같은 것으로 감싸준다. 이는 비누화에 필요한 열을 확보해 주기 위해서이다.
- ⑧ 1~2일 뒤 비누 틀에서 비누를 꺼내고, 무르기가 적당 할 때 원하는 사이즈로 자른다. 그 후 서늘하고 환기 잘 되는 곳에서 4~8주 정도 숙성시간을 갖고 PH 테스트 후 사용한다.

나. 해조류 추출물의 안정화

(1) 실험장치 및 재료

① 알지네이트 겔 비드 제조

- Sodium alginate (Sigma-Aldrich, Inc., USA)
- Calcium chloride (Sigma-Aldrich, Inc., USA)
- Sodium acetate (Sigma-Aldrich, Inc., USA)
- 해조류 추출물 (건강신소재팀)

② 항산화효능 테스트

- DPPH 시약 (Sigma-Aldrich, Inc., USA)
- UV/visible spectrophotometer (UNICO., USA)

(2) 실험 순서

- ① Sodium alginate를 1 wt% 하여 증류수와 혼합액을 만들고 총량의 10 wt%가 되도록 해조류 추출물을 넣어 1시간정도 교반하여 에멀전을 만든다.
- ② 비이커에 1 wt% Calcium chloride 수용액을 만들고 마그네틱 바를 넣은뒤 최저속으로 교반환경을 만들어준다.
- ③ 교반되고있는 에멀전을 실린지를 통해 역시 교반되고 있는 염화칼슘 수용액에 적하시켜 캡슐화 한다.
- ④ 만들어진 겔 비드를 경화용액인 염화칼슘 용액상에 그대로 1시간정도 침전 시킨다.
- ⑤ 증류수도 3회정도 세척하여 시료로 사용한다.

다. 플라즈마처리를 이용한 해조류로부터의 당류 물질의 제조

(1) 진공 플라즈마 처리를 이용한 방법

- ① 해조류를 진공플라즈마 반응기를 이용하여 플라즈마 처리
- ② 플라즈마 방전의 출력은 10~500 W, 처리 시간은 1~300 min 로 설정
- ③ 플라즈마 처리 후, 해조류를 50~300℃ 에서 산용액(HCl, H₂SO₄, HBr, HNO₃, CH₃COOH)에 1시간 침전 시킴
- ④ 산처리 후 용액을 원심분리 후 필터링
- ⑤ DNS법을 통해 환원당 분석
* DNS method
시료 1ml + DNS 용액 1ml-90℃ 에서 10분간 중탕 가열-10분간 상온에서 냉각
-575nm에서 흡광도 측정

(2) 용액 플라즈마 처리를 이용한 방법

- ① 해조류를 50~300℃ 에서 산용액(HCl, H₂SO₄, HBr, HNO₃, CH₃COOH)에 1시간 침전 시킴
- ② 산처리 된 시료에 음극을 담지, 양극은 혼합물과 0.5cm 로 이격시킨 후 용액플라즈마 처리
- ③ 플라즈마 처리시, 전류는 1~100mA, 처리 시간은 1~300 min 로 설정
- ④ 플라즈마 처리 후 용액을 원심분리 후 필터링
- ⑤ HPLC 이용 환원당 분석

3. 연구수행 결과

가. 항산화 비누 개발

(1) 항산화 비누를 만들기 위한 재료의 선정

① 코코넛 오일

풍부한 거품을 내는 좋은 오일이다. 비누를 단단하게 해주며 풍부하고 조밀한 거품을 기대 할 수 있다. 너무 많이 사용하면 건조해 질 수 있다. 포화 지방산이므로 산패로 인한 악취가 덜 나고 분자량이 작아서 바닷물에서도 용해도가 높고 거품이 잘 생긴다.

② 올리브 오일

올리브 오일로 만든 비누를 카스틸 비누라고 하며, 거품이 적고 조밀한 것이 단점이나 올리브 오일만으로 만든 비누는 어린 아이에게 사용해도 좋은 정도로 순하다.

③ 팜 오일

팜유를 비누에 넣으면 비누가 단단해 진다. 조밀한 거품을 만든다. 단 비누화 과정에서 글리세린이 적게 생성되므로 다른 오일과 함께 사용하는 것이 좋다. 또한 다른 오일의 비누화를 촉진시켜 주므로 비누화가 느린 불포화 지방산을 포함한 오일들과 함께 사용하면 좋다.

④ 미강유

비타민E와 미네랄이 풍부하다. 보습효과가 있고 비누화가 빠른 편이다. 가격이 싸고 구하기 쉽다.

(2) 재료의 첨가량과 추출물의 함량 결정

[표 6-6-1] 해조류 추출물을 첨가한 천연 비누 레시피 (비누 1kg 기준)

베이스 오일	첨가량	비누화값	특징
미강유	200g	0.128	비타민E, 보습, 비누화 빠름(트레이스 시점 빠름)
팜유	150g	0.141	조밀한 거품 비누를 단단하게 다른 오일의 비누화 촉진
코코넛유	150g	0.19	거품 보존 비누를 단단하게
올리브유	200g	0.134	거품이 적음, 매우 순하여 유아사용가능, 트레이스 시점 늦음
가성소다	96g		가성소다계산법 = 102.05g 6% discount → 96g
증류수	231g		총 오일 양 x 0.33
첨가물	첨가량	특징	
해조류 추출물 기타 첨가물 (울금, 울무, 녹차, 감초, 녹두, 오트밀 등)	15g	해조류 추출물 - 항산화, 노화예방 녹두 - 보습, 미백, 세정력 뛰어남, 자극x 오트밀 - 피부보호, 영양공급 울금 - 항산화, 노화예방	
아로마	라벤더, 스위트오렌지, 페퍼민트, 일랑일랑 등		

(3) 시험제작 및 레시피 보완



[그림 6-6-2] 시험제작 비누 I.



[그림 6-6-3] 시험제작 비누 II.



[그림 6-6-4] 시험제작 비누 III.



[그림 6-6-5] 시험제작 비누 IV.

(4) 시험제작한 비누들의 숙성기간(5주) 후, pH test

시험제작된 비누는 총 4가지로, 해조류 추출물의 함량은 [표 6-6-2]와 같다. 앞서 [그림 6-6-2]~[그림 6-6-5]를 보면 비누의 외형(색)이 다름을 알 수 있는데 이는 천연색소를 다르게 사용했기 때문이다. 여기서 사용된 천연색소는 효능이나 기능성에 영향을 주지 않고 단지 색을 띄는 데에만 이용되었다. 베이스 오일을 비롯한 가성소다와 증류수의 양은 모두 동일하며, 추출물 함량을 조절하여 비누를 제조해 보았다. 숙성 후 pH test 결과 모든 비누가 8.0 으로 시중에 판매되는 비누들과 비교해서 좀더 약한 염기를 띄는 것을 확인하였다. 이는 천연 오일들을 사용하고 가성소다를 discount 하며 숙성기간을 통해 천연 글리세린이 생성되어 보다 중성에 가까운 순한 비누가 제작되었음을 의미한다.

[표 6-6-2] 시험제작 비누 추출물 함량 및 pH

Number	I	II	III	IV
해조류 추출물 함량 (%)	1	1	1.5	0
pH	8	8	8	8

나. 해조류 추출물의 안정화

(1) 향후 기능성 제품으로의 응용 위한 성분의 안정화 필요

천연 비누의 경우, 추출물을 그대로 사용하여도 무방하나 향후 기능성 제품 등으로 응용 하게 될 때, 천연 항산화성분인 해조류 추출물의 안정화가 필요하다. 항산화제는 노화방지, 미백, 주름개선 등에 효과를 보이며 식품부터 화장품 등 많은 산업군에 응용이 되고있지만, 항산화라는 본연의 효과 때문에 자칫 그 기능을 쉽게 잃어버리기도 한다. 따라서 안정화를 통해 기능을 유지시키고 극대화 시키고자 한다.

(2) 안정화에 관련된 문헌 조사와 기초자료 수집

안정화와 관련하여 추출물 자체의 기초자료를 수집하였다. 추출물의 용해도를 아세톤, 에탄올, 에틸 아세테이트, 증류수 각각에 대해 측정해 본 결과가 [표 6-5-2]에 나타나 있다. 아세톤에 가장 잘 용해되고 에탄올에도 잘 용해되는 것이 확인 되었으며 증류수에는 거의 용해되지 않았다. 아세톤의 경우 0.4 ml 에 추출물 500 mg을 용해 한 후 물을 최대로 1.1 ml 까지 넣어 희석이 가능하다.

일반적으로 상용되고 있는 항산화제인 EGCG(녹차추출물)과 ascorbic acid(AA, 비타민C) 와 해조류 추출물의 항산화 효능을 DPPH TEST 로 비교한 결과가 [그림 6-6-5]에 나타나 있다. EGCG 와 AA에 비해 질량단위로 약 6~8배 정도 항산화 효능이 떨어지는 것이 확인 되었다.

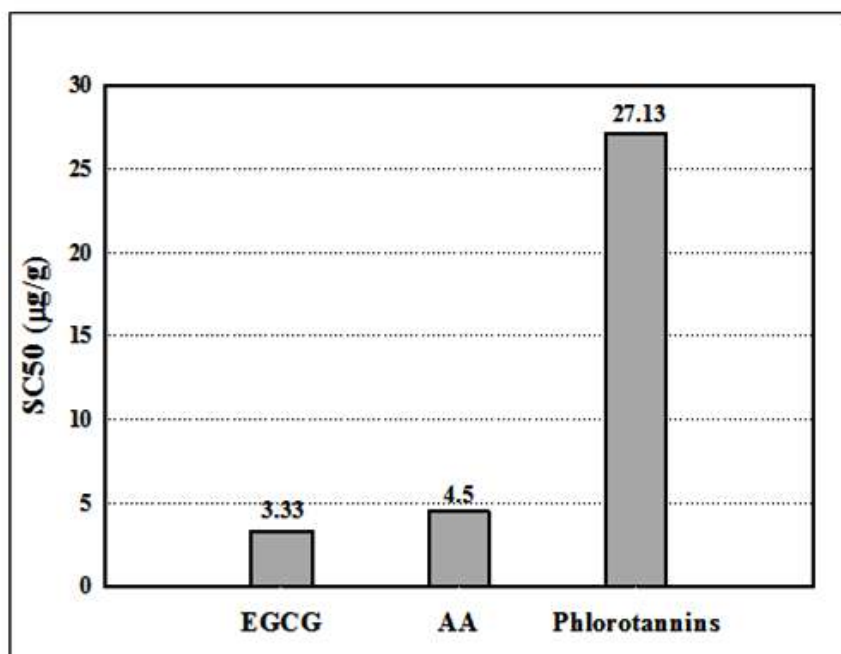
총 5주간 40℃ 환경에서 항산화효능의 안정성에 대한 결과를 [그림 6-6-6]에 서 확인 할 수 있다. 추출물을 에탄올/물의 혼합용액에 1.5%, 5% 농도로 용해한 후 용액상에서의 산화 안정성을 관측한 결과 5주 후에도 오차 범위내에서 항산화 효능을 그대로 유지함을 알 수 있었다. AA의 경우 2주가 지난 뒤에는 항산화 효능이 급격히 감소하는 것을 볼 수 있다.

같은 조건으로 용매를 아세톤/물 혼합용액으로 사용하여 안정성을 테스트

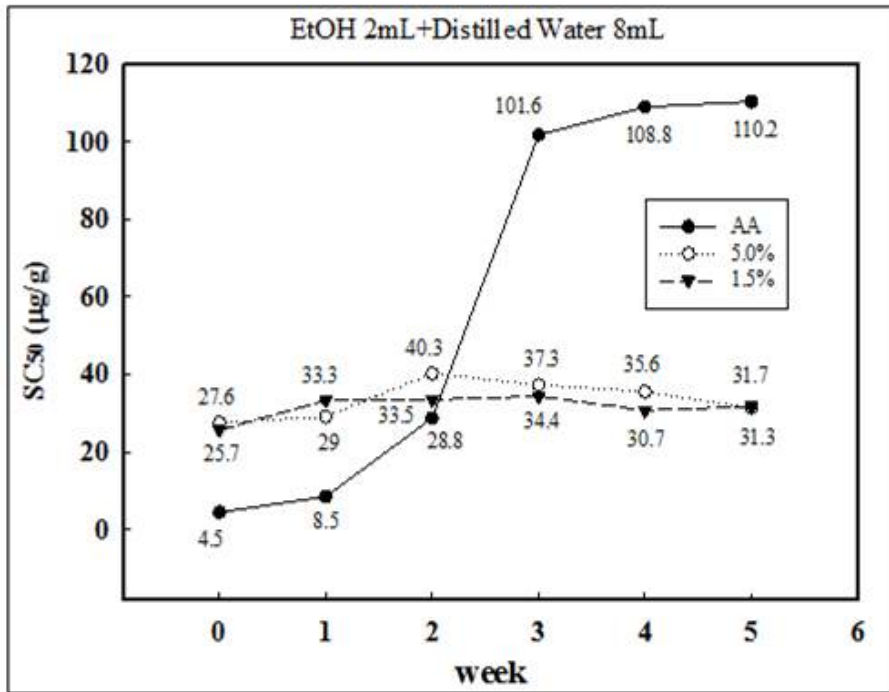
한 결과가 [그림 6-6-7]에 나타나 있다. 에탄올/물로 실험하였을때와 결과가 유사하게 나타난 것을 확인 할 수 있다.

[표 6-6-3] 용매에 따른 추출물의 용해도

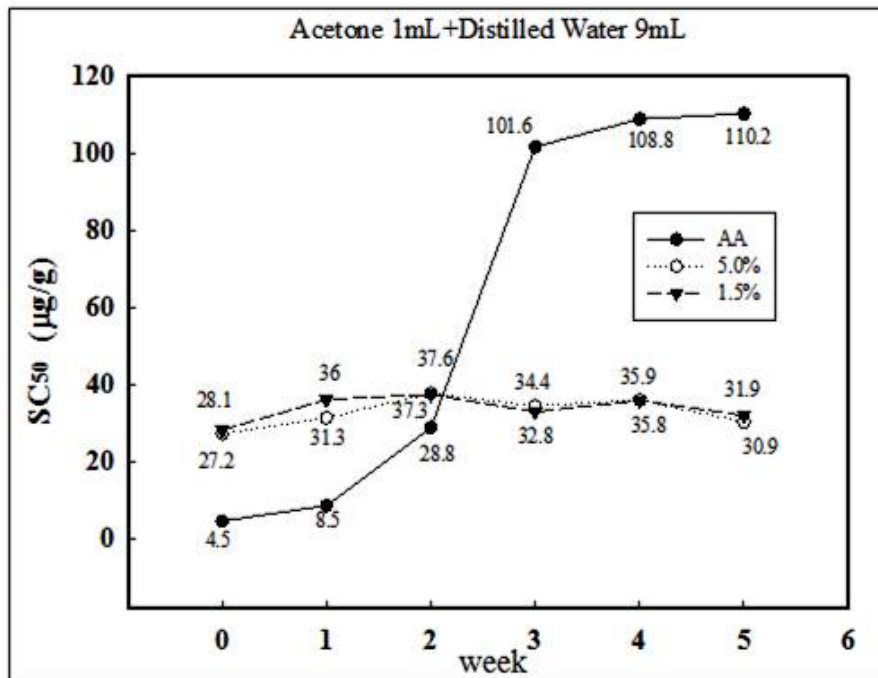
Solvent	Phlorotannin	Solubility	Dilution(D.W.)
Acetone	500 mg	0.4 ml (1.25 g/ml)	1.1 ml
Ethanol	500 mg	0.5 ml (1 g/ml)	0.3 ml
Ethyl acetate	100 mg	600 ml 이상 (0.17 mg/ml)	
Water	100 mg	500 ml 이상 (0.2 mg/ml)	



[그림 6-6-6] 세가지 항산화제의 DPPH Test 결과.



[그림 6-6-7] 40°C 에서 향산화제의 안정화 테스트 결과 (에탄올/물).



[그림 6-6-8] 40°C 에서 향산화제의 안정화 테스트 결과 (아세톤/물).

(3) Sodium alginate를 이용한 gel bead의 제조

해조류로부터 유래된 천연 항산화제의 안정화를 위해 칼슘 알지네이트 겔에 고정화 시켜보았다. 최적의 알지네이트 농도에 따른 영향을 조사하기 위해, bead를 제조하고, 물성평가를 하고자 하였다. 하지만 제조된 bead의 입자 크기가 지름 2mm가량으로 상당히 크기 때문에, 물성평가에 적합하지 않았으며 또한 응용에도 적절치 않다고 판단하였다. 따라서 향후 입자크기에 대한 보완 혹은 안정화에 대한 다른 방법을 모색해야 한다.

다. 플라즈마처리를 이용한 해조류로부터의 당류 물질의 제조

(1) 진공 플라즈마 처리를 이용한 방법

30 sccm Ar gas가 주입된 진공플라즈마 장치에서 150 W의 출력으로 10 min동안 플라즈마 처리된 다시마 추출물 2 wt%를 0.2M HCl 수용액, 120°C 하에서 10min 동안 산처리 하였다. 이를 플라즈마처리를 제외하고 산처리만 진행한 샘플과 비교한 결과가 [표 6-6-3]에 나타나있다. DNS 법을 통해 UV 흡광도를 측정한 결과, 플라즈마 처리 후 산처리를 한 경우가 산처리만 한 경우보다 높은 흡광도를 보였다.

(2) 용액 플라즈마 처리를 이용한 방법

다시마 추출물 2 wt%를 0.2M HCl 수용액, 120°C 하에서 10min 동안 산처리 하고 용액 플라즈마 처리를 하였다. 용액플라즈마 장치의 전류는 15 mA 로 고정된 뒤, 처리 시간에 변화를 주어 환원당 결과를 비교한 것이 [표 6-5-3]에 나타나있다. 플라즈마 처리 시간이 길어질수록 얻어지는 환원당이 증가함을 알 수 있으며, 산처리만 한 경우 보다 10 min 동안 플라즈마 처리를 추가로 한 경우 약 2배에 가까운 환원당을 얻을 수 있었다.

도박 추출물 2 wt%를 0.2M HCl 수용액, 120°C 하에서 10min 동안 산처리 하고 용액 플라즈마 처리를 하였다. 용액플라즈마 장치의 전류는 30 mA 로 고정된 뒤, 처리 시간에 변화를 주어 환원당 결과를 비교한 것이 [표 6-6-4]에 나타나있다. 다시마 추출물의 경우와 마찬가지로 도박 추출물 역시 산처리만 한 경우보다 용액 플라즈마 처리까지 한 경우에 더 높은 환원당을 얻을 수 있음이 확인 되었다. 하지만 플라즈마 처리 시간이 길어질수록 환원당의 농도가 낮아졌는데 이는, 플라즈마와 도박과의 반응시간이 길어질수록 다당에서 단당으로 결합을 분해시킬 뿐만 아니라, 단당으로 분해된 구조를 보다 더 분해시켜 환원당의 일부가 변화되는 것을 의미한다.

[표 6-6-3] 진공 플라즈마 처리 유무에 따른 환원당 분석

	Plasma treatment	non plasma treatment
총 환원당 (UV absorbance)	0.63	0.54

[표 6-6-4] 용액플라즈마처리 시간에 따른 다시마 추출물의 환원당 분석

Time	3 min	5 min	10 min	non plasma treatment
총 환원당(mg/L)	678	820	1167	548

[표 6-6-5] 용액플라즈마처리 시간에 따른 도박 추출물의 환원당 분석

Time	5 min	10 min	30 min	non plasma treatment
총 환원당(mg/L)	5352	5103	4959	4500

4. 요약 및 제언

항산화 비누는 최종적으로 레시피가 확정되었으며, 해조류 추출물의 함량은 1 ~ 10 중량% 로 첨가하는 것이 가능하다. 첨가량의 결정은 향후 경제성 파악과 공정모사결과에 따라 진행된다. 시험제작 결과는 사용감 테스트가 전문적으로 이루어 지지는 않았으나, 불특정 다수의 시험자들이 사용결과 부작용은 없는 것으로 드러났다. 숙성 후 pH가 점점 줄어들어 8.0에 이르게 되며 이는 피부에 자극이 적은 부드러운 비누라고 할 수 있다. 모든 재료가 천연성분으로 이루어지고 화학성분인 방부제가 전혀 들어가지 않음에 따라 시중에 판매되는 일반 비누들에 비해 상온 보관 시 사용가능한 기간이 짧은 편이다. 실제로 시험제작 후, 습한 장마기간동안 비누의 단단하기가 무르게 되었다. 이에따라 향후, 천연 방부제의 첨가를 통해 상용화함에 있어 유통기한을 늘리는데 보완이 필요하다.

플라즈마 처리를 통한 해조류로부터의 당류 물질 제조에 있어 다수의 실험을 통해 플라즈마 처리가 당화에 긍정적인 영향을 끼치는 것이 확인 되었으며, 진공플라즈마 처리와 용액 플라즈마 처리 2건 각각에 대해 특허가 출원되어 있다.

5. 향후계획

향후 기능성 제품 및 화장품 등에 응용을 위하여 해조류 추출물의 안정화 실험을 진행하였다. 항산화 효능을 강조하고 극대화하여 사용할 수 있도록 폴리탄닌 성분들의 안정화가 필요하여 칼슘 알지네이트를 이용해 gel bead를 제조하였다. 하지만 bead의 크기가 분석과 응용에 적합하지 않아 bead size를 줄일 수 있는 방안모색이 필요하다. 혹은 성분을 안정화하여 응용하는데 더 적합한 새로운 안정화 방법을 설정할 필요가 있다.

제 7 장

목표달성도 및 관련분야에의 기여도

제 1 절 연구개발 목표 및 내용 요약

제 2 절 기술 구성 및 연계도

제 3 절 향후 계획

제 7 장 목표달성도 및 관련분야에의 기여도

제 1 절 연구개발 목표 및 내용 요약

1. 연구 개발의 목표

구분	연구개발 목표	연구개발 내용 및 범위
건강 신소재 개발	해조류 생리활성 물질의 함염증, 항치매, 항비만효과 및 기전 분석	<ul style="list-style-type: none"> ○ 다시마 함염증 활성물질의 기전 규명 ○ 다시마로부터 항비만 활성물질의 기전 규명 ○ 모자반 저분자 화합물의 분획 조건 확립 ○ 모자반 저분자 화합물 희분의 생리활성 분석 및 함염증효과 규명 ○ 동물실험을 통한 다시마 함염증 물질의 독성 시험 및 효과 확인 ○ 동물실험을 통한 모자반 항비만 물질의 독성 시험 및 효과 확인
	해조류 생리활성 물질의 항암효과 및 기전 분석	<ul style="list-style-type: none"> ○ 모자반 주정 추출물의 암세포 증식억제효과 분석 ○ Homogenous <i>in vitro</i> or <i>in vivo</i> kinase 활성 분석. ○ RTK mediated angiogenesis에 대한 영향 분석 ○ 2D gel electrophoresis analysis or Microarray. ○ Apoptosis 과정 유도인자 분석 ○ Autophagy(자가소화작용) 작용 단백질의 변화 분석 ○ 세포주기(cell cycle) 조절인자 분석. ○ 모자반으로부터 항암물질의 분리 및 기전 규명
	해조류 생리활성 물질의 항당뇨효과 및 기전 분석	<ul style="list-style-type: none"> ○ 다시마로부터 당뇨합병증 치료 및 예방물질 분리 및 구조 결정 ○ 모자반 분획물의 항산화/ 당뇨합병증 치료 및 예방 활성 분석
	해조류 자원의 통합적 활용을 위한 DB 구축 및 표준화	<ul style="list-style-type: none"> ○ GPC 및 HPLC를 이용한 다시마 함염증물질의 분리 ○ GPC 및 HPLC를 이용한 모자반 저분자 유기용매 분획물의 생리활성 분리조건 확립 ○ 양식조건에 따른 다시마의 구성당 분석

구분	연구개발 목표	연구개발 내용 및 범위
생물학적 전환공정 개발	해조류 성분분별 및 전처리 공정 최적화	<ul style="list-style-type: none"> ○ 다시마로부터 알긴산 유래 단량체 및 다당체 분별 ○ 분별된 단량체 및 다당체와 알긴산과의 정량적 관계 규명 ○ 알긴산 유래 물질을 이용한 알긴산 정량분석
	갯벌 유래 Metagenomic library로부터 알긴산 해조 다당체 분해 유전자 탐색 및 저분자 당원확보	<ul style="list-style-type: none"> ○ 갯벌 미생물 유전자원의 효율적 활용을 위해 metagenomic library 1건을 구축하고 확립된 신속 탐색기술을 통하여 다시마 유래 알긴산 다당체 분해 유전자 1건 탐색 ○ 해조류 다당체 분해효소 생산을 위해 발현조건을 확립하고 해조 다당으로부터 당원확보 1건
	생물친화적 전처리 및 당화효소를 이용한 갈조류 당화공정 개발	<ul style="list-style-type: none"> ○ 해양 미생물의 alginate 하에서의 metabolite 프로파일링 결과를 바탕으로 타겟팅한 alginate lyase 클로닝 및 발현 ○ Alginate lyase의 특성 규명 및 생산 공정 최적화 ○ Alginate lyase를 이용한 alginate(갈조류 모델 바이오매스) 및 갈조류 바이오매스의 물리화학적 전처리 공정의 최적화 및 당화 공정 개발
	해조류분해 부탄올 생산균주 개발 및 부탄올 발효공정의 최적화	<ul style="list-style-type: none"> ○ 부탄올생산균주의 해조류 분해효소 및 대사체의 profiling ○ 당화액 내 혼합당 비선별적 이용을 위한 target 유전자 특성분석 및 cloning ○ 고수율 부탄올생산을 위한 재조합균주개발 (CBP) 과 핵심 설계 기술 선정: 해조류내에 존재하는 당의 효율적 이용과 부탄올로의 전환이 가능한 맞춤형균주개발의 플랫폼 구축을 위한 기반확립
	난발효성 당류 대사형 재조합 미생물 개발	<ul style="list-style-type: none"> ○ 난발효성 단당류를 대사할 수 있는 해양미생물의 선별 ○ 난발효성 단당류의 대사효소 및 유전자 정보의 확보와 유전자군의 증폭

구분	연구개발 목표	연구개발 내용 및 범위
그린 에너지 융합 공정	Next generation sequencing을 활용한 유기 산 수율	<ul style="list-style-type: none"> ○ 미생물 균집을 이용하여 해조류 바이오매스 유기산 생산 수율 향상 파악 ○ 해조류 이용 고수율 유기산 생산 미생물 균집의 균집구조 분석
	VFA 생산용 다단계 생물반응기 설계	<ul style="list-style-type: none"> ○ 해조류 통한 VFA생산을 위한 다단계 생물 반응기 설계 (시뮬레이션 및 다단계 생물 반응기 시범 운전) ○ 효과적인 VFA생산을 위한 해조류의 전처리 공정 도출 (전처리 방법에 따른 해조류의 성분 변화 조사)
	혐기성 소화공정 이용 혼합 알코올 생산기술 개발	<ul style="list-style-type: none"> ○ 추출 발효 실험 ○ 혐기성 소화균주 adaptation 분석 ○ 혐기성 소화공정 최적화 ○ 혐기성 소화 슬러지 처리기술개발 ○ 유기산 이용 알코올 생산촉매 개발
	해조류 바이오매스 유래 혼합유기산으로부터 혼합알코올 생산하는 화학촉매 공정 개발	<ul style="list-style-type: none"> ○ 해조류 바이오매스는 육상 바이오매스와 마찬가지로 그린에너지 생산을 위한 무한한 탄소원으로 사용될 가능성이 있으며, 이를 이용하기 위한 경제성 있는 그린에너지 융합공정을 개발 ○ 혐기성 소화공정을 이용하여 생산된 혼합유기산으로부터 촉매 화학공정을 이용하여 혼합 알코올을 생산하기 위한 촉매 설계 및 특성 분석 ○ 혼합 알코올 생산 수율 85% 달성 (유기산 1톤 기준 알코올 650 kg)
	급속 열분해공정 이용 바이오오일 생산기술 개발	<ul style="list-style-type: none"> ○ 바이오오일 수율 향상을 위한 해조류 바이오매스의 전처리 공정 연구 및 최적 조건 도출 ○ 바이오오일의 물리화학적, 연료 특성 분석 및 주요 화학성분 확인 ○ 바이오오일 최대 수율 46.7%

구분	연구개발 목표	연구개발 내용 및 범위
통합공정 및 제품개발	해조류의 대용량 전처리 공정 개발	<ul style="list-style-type: none"> ○ 다시마의 대용량 전처리 기술 개발 ○ 대량 생산시 발생하는 문제점 파악 및 해결 방안 강구
	협기성 소화에 의한 bench scale 유기산 생성 공정 구축	<ul style="list-style-type: none"> ○ 준 파일럿 규모의 유기산 생성장치를 설계 및 설치 ○ 준 파일럿 규모의 협기성 소화장치의 유기산 생성 조건 검토
	해조류의 활용을 위한 통합공정 최적 설계	<ul style="list-style-type: none"> ○ 공정 모사기를 이용한 개별 전환공정의 모델링 ○ 수치최적화를 이용한 공정 통합/설계에 대한 타당성 조사
	해조류 유용물질 분리 및 회수 공정 개발	<ul style="list-style-type: none"> ○ 환경 친화적 무오염 용매인 초임계 CO₂를 이용한 추출/분리 공정을 확립함. ○ 초임계 CO₂를 이용해 해조류(다시마)로부터 유용물질을 분리/회수하고, 유용물질 특성을 분석하여 최적 추출/분리 조건을 확립함. ○ 초임계 CO₂ 추출 공정을 통한 제품 품질의 부정적 요소(VOCs, 유해성 물질 등) 저감 및 제거 조건 확립. ○ 아임계/초임계 수 가수분해 공정을 확립하고, 가수분해 물질에 함유되어 있는 기능성 물질 동정을 통해 기능성 물질에 대한 열안정성을 평가함. ○ 분리 회수 된 가수분해물의 산업적 용도 검토
	해조류 부산물을 이용한 바이오복합재료 개발	<ul style="list-style-type: none"> ○ 해조류 부산물 특성분석 <ul style="list-style-type: none"> - 해조류 부산물의 열적, 형상학적 및 작용기 분석 - 해조류 종별 부산물의 특성분석 데이터 확보 ○ 바이오복합재료 제조 및 특성분석 <ul style="list-style-type: none"> - 고온가압 성형법을 이용한 바이오복합재료 제조 조건 확립 - 판상형 및 시트형 바이오복합재료 제조실험 - 바이오 복합재료 동역학적 특성분석 - 바이오 복합재료 계면 특성 분석
	해조류 추출물을 이용한 기초생활제품 설계	<ul style="list-style-type: none"> ○ 제품의 기본 concept 선정 ○ 제품의 구성성분 및 해조류 추출물 선정 ○ 제품 제조 공정 검토 및 최적화

2. 계획대비 달성도

번호	세부연구목표 (연구계획서상에 기술된 연구목표)	달성내용	달성도 (%)
1	다시마 항염증물질의 기전규명	<ul style="list-style-type: none"> - 다시마 주정추출물로부터 분획된 핵산획분의 항염증 기전 확인 - 국내특허 출원 - 동물실험을 통하여 항치매 활성 확인 	100
2	다시마 항비만물질의 기전 규명	<ul style="list-style-type: none"> - 다시마의 항비만화성이 낮게 나타나 실용화에는 어려울 것으로 판단 - 대안으로 다시마 핵산획분을 이용한 미백효능을 세포실험으로 규명 - 미백용 화장품 소재로의 활용이 가능할 것으로 판단 	100
3	모자반 저분자화합물의 생리활성 분석 및 항염증 효과 규명	<ul style="list-style-type: none"> - 참모자반을 주정으로 추출하여 실험한 결과핵산 및 다이클로로메탄획분에서 항염증, 항비만 및 미백효능이 우수한 것으로 판명 	100
4	동물실험을 통한 다시마 항염증 물질의 독성 시험 및 효과 확인	<ul style="list-style-type: none"> - ICR 마우스를 이용하여 다시마 주정추출물과 핵산 획분의 독성을 시험한 결과 625 mg/kg bw/day 이하에서는 안전한 것을 파악 	100
5	동물실험을 통한 모자반 항비만 물질의 독성 시험 및 효과 확인	<ul style="list-style-type: none"> - 모자반 항비만 물질의 독성 시험 결과, 800 mg/kg bw/day 이하에서는 안전한 것으로 파악. 	100
6	다시마, 모자반, 곰피 주정추출물과 핵산획분의 항미백효능	<ul style="list-style-type: none"> - 다시마, 모자반, 곰피 주정추출물과 핵산획분의 항미백효능을 입증 - 다시마와 곰피의 미백효능을 특허출원. 	추가 연구 합
7	알긴산 정량법 모색	<ul style="list-style-type: none"> - 알긴산 유래물질 분별 및 이를 이용한 알긴산 정량법 개발 	100
8	갯벌유래 Metagenomic library로부터 알긴산 해조다당체 분해유전자 탐색	<ul style="list-style-type: none"> - Fosmid library 386,400 클론에 대하여 alginate lyase positive clone (AlyWL1)을 탐색 완료 - shot-gun sequencing 분석을 통한 Open Reading Frame 분석 	100

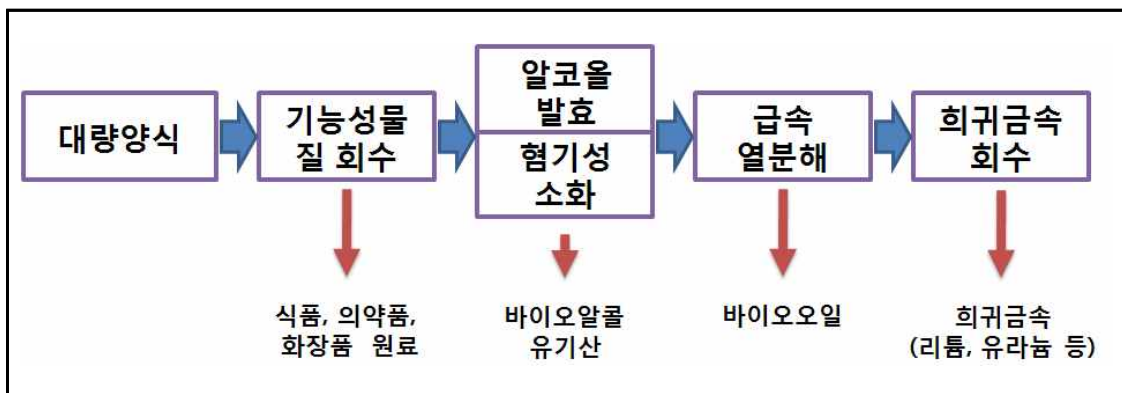
번호	세부연구목표 (연구계획서상에 기술된 연구목표)	달성내용	달성도 (%)
9	전복유래 Metagenomic library로부터 저분자당원 확보	- Poly (β -D-mannuronate) 생산 특이성이 있는 효소의 발효기를 활용한 대량생산 조건 확립 - 1,000 Da 이하 단당 추정 물질 생산 및 991-1,153 Da 크기의 alginate 저분자 올리고당 확보	100
10	alginate lyase 클로닝	- 세 개의 alginate lyase 클로닝	100
11	alginate lyase 특성 분석	- Alg7B alginate lyase의 단백질 발현 확인, 특성 분석 및 반응산물 확인 완료	100
12	monosugar 전환 효소 탐색	- 잠재적 monosugar 전환효소 단백질 발현 확인 완료	90
13	난발효성 단당류 대사형 미생물 1종	- 난발효성 단당류 대사형 미생물 2종 확보	100
14	난발효성 단당류 대사유전자 정보 및 유전자 각각 3개 이상	- 난발효성 단당류 대사유전자 정보 및 유전자 각 4개 확보	100
15	다시마에서 VFA 생산 농도 목표치 10g/L 이상	- 다시마에서 VFA 생산 농도 18g/L	100
16	프로판암옥시화 반응 아크릴로니트릴 수율 40% 이상	- 아크릴로니트릴 수율 41%	100
17	혼합 알코올 생산 수율 85% 달성 (유기산 1톤 기준 알코올 650 kg)	- 유기산 1톤 기준 알코올 751 kg 생산	100
18	바이오오일 수율 40% 이상	- 바이오오일 수율 46.7%	100
19	건조 다시마 1ton 당 유기산 300kg 이상 생성	- 건조 다시마 1ton 당 유기산 370kg 생성	100

번호	세부연구목표 (연구계획서상에 기술된 연구목표)	달성내용	달성도 (%)
20	초임계 CO ₂ 추출/분리 공정 구축 및 안전성 검토	- 초임계 CO ₂ 추출/분리 공정 구축 및 안전성 확립	100
21	아임계수 가수분해 공정 시스템 구축 및 안전성 검토	- 아임계수 가수분해 공정 시스템 구축 및 안전성 확립	100
22	다시마 관능적 저해요소(VOCs) 80% 이상 저감/제거	- 다시마 관능적 저해요소(VOCs) 86% 저감	100
23	아임계수 가수분해 수율 다시마 가수분해 수율 70% 이상	- 다시마 가수분해 수율 75% 이상	100
24	아임계수를 이용한 다시마 가수분해 물질의 열안정성 검토	- 아임계수를 이용한 다시마 가수 분해 물질의 열안정성 확인	100
25	다시마 성분 조성 및 기능성 물질 특성 파악 및 동정	- 일반 성분, 총 폴리페놀 함량, 푸 코잔틴 정성, 지방산 조성 확인	100
26	항산화 비누 제작 1종	- 항산화 비누 최종 레시피 완성 - 시험제작 완료	100
27	칼슘알지네이트 겔 비드를 이용한 해조류 추출물의 안정화	- 비드 제조 성공 - 입자크기의 문제로 안정화 방법 보완 필요	90
28	해조류 추출물 유래의 화장품 조성물에 관한 특허 출원	- “곰피와 감태 추출물 유래의 플 로로탄닌을 포함하는 화장품 조 성물 “ 특허 출원 완료	100

제 2 절 기술 구성 및 연계도

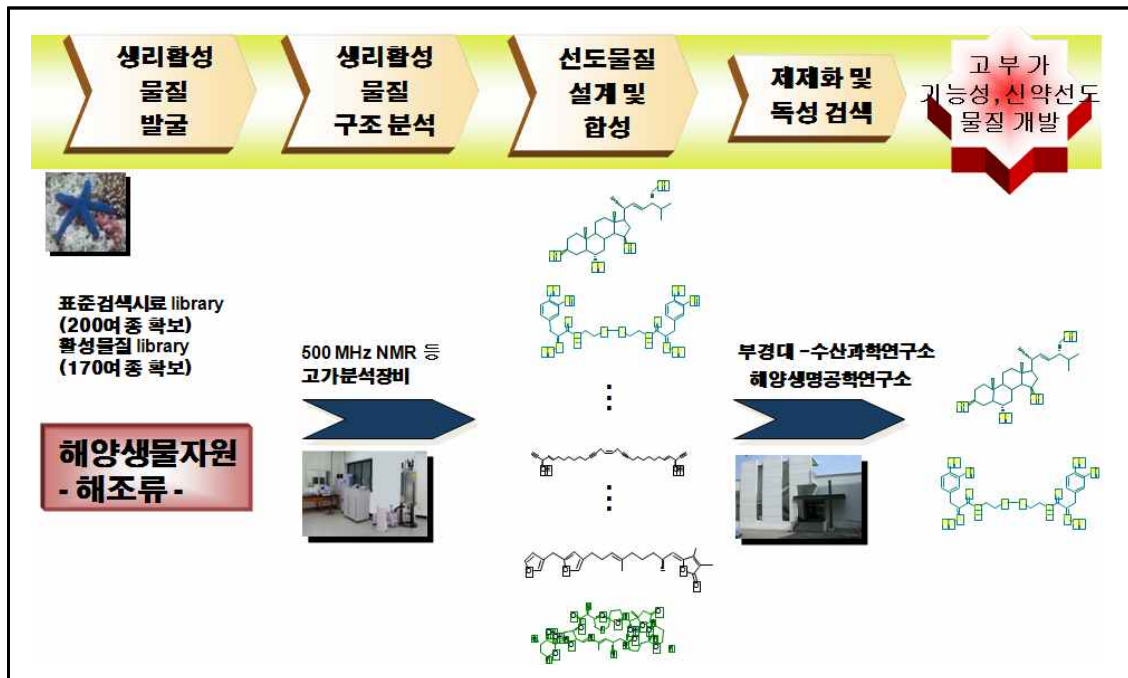
1. 해조류 바이오매스 유용성분 및 에너지 회수기술 구성

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 다량을 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 C2, C3, C4 등의 유기산을 생성시킨 후 화학적 촉매를 이용하여 혼합 알코올 생산이 가능함을 본 용역사업을 통하여 확인하였다. 이와 같은 생물학적 전환 기술을 거치면 고상의 잔류물이 생성되므로 이들 물질을 급속 열분해공정에 투입하여 최종적으로 액상의 바이오오일을 생산할 수 있게 된다, 나아가 액화되지 않은 잔류물로부터 잔존하는 리튬, 우라늄 등의 희귀금속을 회수하는 통합공정을 구성할 수 있다. 정리해 보면, 해조류 바이오매스로부터 기능성물질, 희귀금속, 유기산 등의 다양한 유용성분과 바이오알코올, 바이오오일과 같은 회수가 가능하게 된다. [그림 7-2-1]은 상기 기술들을 정리하여 도식화 한 것이다.

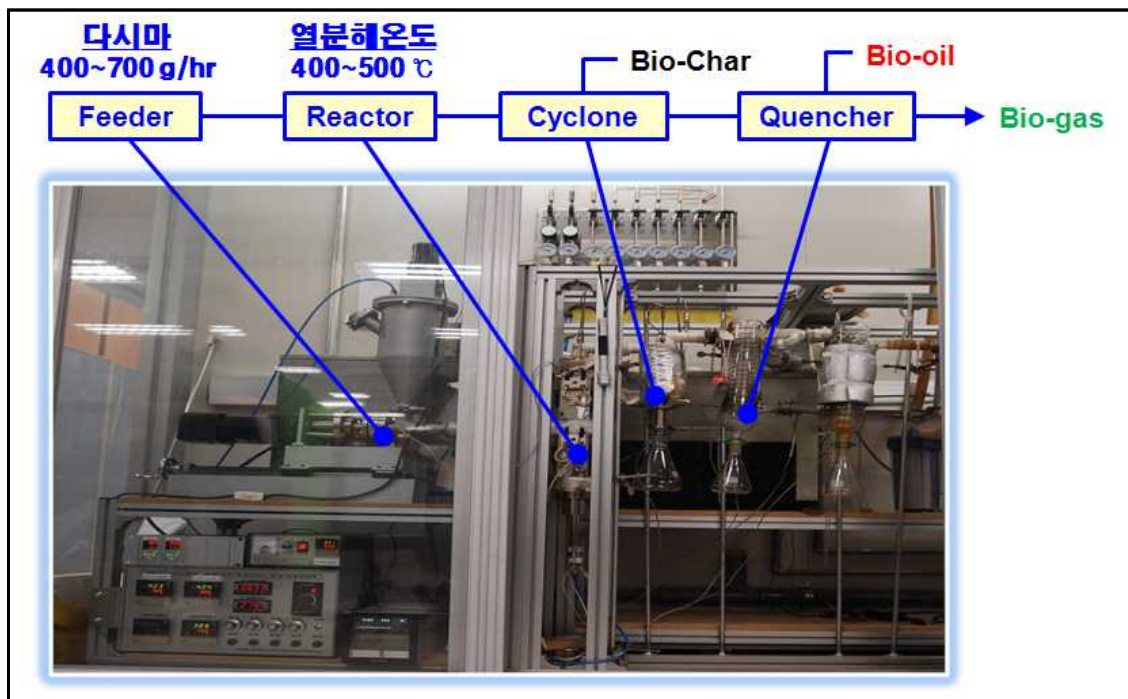


[그림 7-2-1] 해조류 바이오매스 유용성분 및 에너지 회수 통합공정 구성도.

앞 장에서의 전체 구성도와 함께 유용성분 및 에너지를 회수하기 위한 각각의 단위기술 구성도를 [그림 7-2-2]와 같이 도출할 수 있다. 크게 기능성 물질 회수, 알코올 발효, 혐기성 소화공정, 급속 열분해공정으로 구분하여 정리할 수 있으며, 단위 기술을 구성하는 주요 요서들은 제3장 ~ 제6장에 상세하게 기술하였다.



[그림 7-2-2] 기능성 물질 회수기술 구성도.



[그림 7-2-3] 해조류 바이오매스 유용성분 및 에너지 회수 통합공정 구성도.

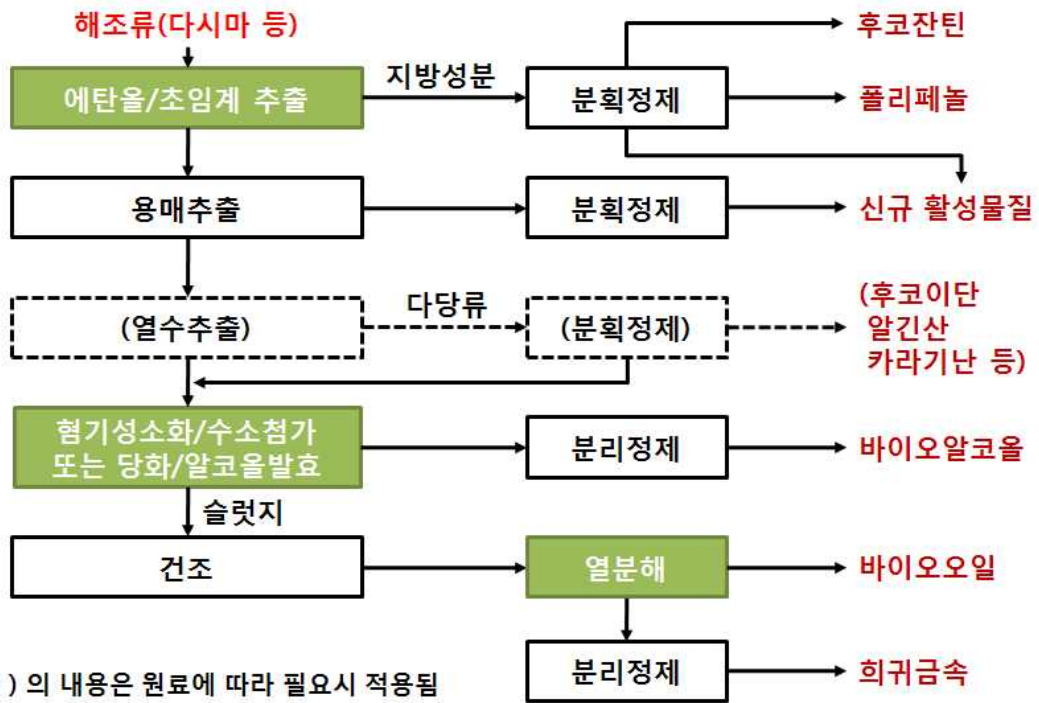
2. 해조류 바이오매스의 통합적 활용기술 연계도

본 사업을 수행하여 확보한 결과로부터 해조류 바이오매스의 통합적 활용방안을 가시적으로 도출하였다. 통합적 활용방안은 [그림 7-2-4]와 같이 다시마 1톤으로부터 휘발성 유기산 350kg, 혼합알코올 215kg을 얻을 수 있는 것으로 파악되었다. 또한 급속 열분해 과정을 통해 바이오오일도 95kg 회수가 가능한 것으로 파악되었다.

해조류 바이오매스의 통합적 활용기술을 위한 체계도를 [그림 7-2-5]와 같이 구축할 수 있다. 먼저 에탄올/초임계, 용매, 열수 등의 여러 추출기술을 적용하고 분획을 정제하여 후코잔틴, 폴리페놀, 후코이단, 알긴산, 카리기난, 신규 활성물질 등을 회수할 수 있을 것이다. 이와 같이 유용성분이 제거도니 해조류 바이오매스는 혐기성 소화 및 수소 첨가 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 통합적 활용기술 체계도를 완성할 수 있다. 연구가 지속될수록 체계도는 더욱 상세한 형태를 갖추게 될 것으로 기대한다.



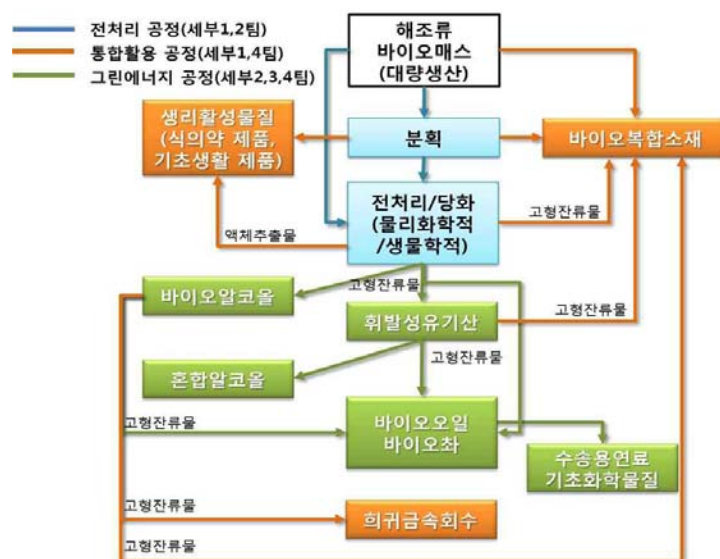
[그림 7-2-4] 해조류 바이오매스 에너지화 통합공정도.



[그림 7-2-5] 향후 해조류 바이오매스의 통합적 활용기술의 가치사슬.

제 3 절 향후 계획

본 용역사업을 통하여 해조류 바이오매스의 통합적 활용을 위하여 1차년도 연구결과에 이어 보다 구체적이고 다양한 기술을 적용하였으며, 그 결과 보다 구체적인 기술통합연계도를 도출하여 [그림 7-3-1]과 같이 나타내었다. 본 연구의 목적 달성을 위해 4가지 분야의 세부연구로 구성하였다. 세부1연구의 건강신소재 개발팀에서는 해조류의 통합적 활용을 위한 원료의 데이터베이스 구축과 해조류로부터 생리활성물질의 대량분리조건 확립 및 건강기능성 식품 소재화를 통한 고부가가치화 기술개발을 수행하며, 세부2연구의 생물학적 전환공정개발팀에서는 해조류에 포함된 탄수화물 또는 당으로부터 생물학적 전처리 및 당화공정의 개발을 통한 고수율 발효성 당류 및 바이오알코올 생산기술 개발 연구를, 세부3연구의 그린에너지 융합공정개발팀에서는 그린에너지를 생산하기 위한 탄소원인 해조류로부터 경제성 있는 공정을 개발하고, 현재까지 가장 높은 에너지 회수율을 보이는 혼합알코올 생산 기술개발 연구, 또한, 알코올로는 만족시킬 수 없는 다양한 품질의 연료 확보가 가능한 바이오오일 생산기술 개발 및 고품질화 방안 도출 연구수행, 세부4연구의 통합 활용 및 제품개발팀에서는 해조류 바이오매스로부터 통합적 활용을 위한 최적의 통합공정 설계 및 경제성을 평가하고, 단위공정에서 발생하는 해조류 부산물을 활용하여 기초생활제품 및 친환경 바이오복합재료 개발 연구, 또한, 조기 상용화를 위한 Demo(pilot) 플랜트 공정 구축을 위한 연구를 수행하고 있다. 3차년도 연구에서는 2 단계 사업의 기술통합(2013년~2016년, 4년)을 위해 집중과 선택으로 각 단위기술들을 연계하며 기술을 확립할 예정이다.



[그림 7-3-1] 해조류 바이오매스 활용을 위한 기술통합공정도

제8장

참 고 문 헌

제 8 장 참고문헌

2장 참고문헌

- [1] E.V. Kalinina, N.N. Chernov, A.N. Saprin, Y.N. Kotova, Y.A. Andreev, V.S. Solomka, N.P. Scherbak, *Biochemistry (Mosc)* 71 (2006) 1200-1206.
- [2] L.M. Sanders, C.E. Henderson, M.Y. Hong, R. Barhoumi, R.C. Burghardt, N. Wang, C.M. Spinka, R.J. Carroll, N.D. Turner, R.S. Chapkin, J.R. Lupton, *J Nutr* 134 (2004) 3233-3238.
- [3] F. Vanderbist, P. Maes, J. Neve, *Arzneimittelforschung* 46 (1996) 783-788.
- [4] D.Y. Rhyu, K.S. Kang, M. Sekiya, T. Yokozawa, *Am J Chin Med* 35 (2007) 127-137.
- [5] S.T. Mayne, *J Nutr* 133 Suppl 3 (2003) 933S-940S.
- [6] V. Paskova, O. Adamovsky, J. Pikula, B. Skocovska, H. Band'ouchova, J. Horakova, P. Babica, B. Marsalek, K. Hilscherova, *Sci Total Environ* 398 (2008) 34-47.
- [7] M. Citelli, F.A. Lara, I. da Silva Vaz, Jr., P.L. Oliveira, *Mol Biochem Parasitol* 151 (2007) 81-88.
- [8] H. Fiander, H. Schneider, *Cancer Lett* 156 (2000) 117-124.
- [9] D. Vauzour, M. Buonfiglio, G. Corona, J. Chirafisi, K. Vafeiadou, C. Angeloni, S. Hrelia, P. Hrelia, J.P. Spencer, *Mol Nutr Food Res* 54 (2010) 532-542.
- [10] M. McMahon, K. Itoh, M. Yamamoto, S.A. Chanas, C.J. Henderson, L.I. McLellan, C.R. Wolf, C. Cavin, J.D. Hayes, *Cancer Res* 61 (2001) 3299-3307.
- [11] C. Mitchell, A.R. Joyce, J.T. Piper, R.J. McKallip, M.W. Fariss, *Toxicol Lett* 195 (2010) 23-30.
- [12] W.S. Choi, D.S. Eom, B.S. Han, W.K. Kim, B.H. Han, E.J. Choi, T.H. Oh, G.J. Markelonis, J.W. Cho, Y.J. Oh, *J Biol Chem* 279 (2004) 20451-20460.
- [13] Y. Zhou, Q. Wang, B. Mark Evers, D.H. Chung, *Biochem Biophys Res Commun* 350 (2006) 860-865.
- [14] S. Dhingra, A.K. Sharma, D.K. Singla, P.K. Singal, *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 293 (2007) H3524-3531.
- [15] S.K. Mantena, S.K. Katiyar, *Free Radic Biol Med* 40 (2006) 1603-1614.
- [16] S. Kurata, *J Biol Chem* 275 (2000) 23413-23416.

- [17] M. Eguchi, K. Monden, N. Miwa, *J Cell Biochem* 90 (2003) 219-226.
- [18] K.G. Mendelson, L.R. Contois, S.G. Tevosian, R.J. Davis, K.E. Paulson, *Proc Natl Acad Sci U S A* 93 (1996) 12908-12913.
- [19] I. Qadri, M. Iwahashi, J.M. Capasso, M.W. Hopken, S. Flores, J. Schaack, F.R. Simon, *Biochem J* 378 (2004) 919-928.
- [20] C. Maziere, V. Savitsky, A. Galmiche, C. Gomila, Z. Massy, J.C. Maziere, *Biochim Biophys Acta* 1802 (2010) 1013-1019.
- [21] N. Kumashiro, Y. Tamura, T. Uchida, T. Ogihara, Y. Fujitani, T. Hirose, H. Mochizuki, R. Kawamori, H. Watada, *Diabetes* 57 (2008) 2083-2091.
- [22] Y. Lu, J. Zhou, C. Xu, H. Lin, J. Xiao, Z. Wang, B. Yang, *Cell Physiol Biochem* 21 (2008) 305-314.
- [23] Z. Faghiri, N.G. Bazan, *Exp Eye Res* 90 (2010) 718-725.
- [24] Y.D. Jung, F. Fan, D.J. McConkey, M.E. Jean, W. Liu, N. Reinmuth, O. Stoeltzing, S.A. Ahmad, A.A. Parikh, N. Mukaida, L.M. Ellis, *Cytokine* 18 (2002) 206-213.
- [25] S. Bamba, A. Andoh, H. Yasui, J. Makino, S. Kim, Y. Fujiyama, *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 285 (2003) G529-538.
- [26] T.T. Chowdhury, D.M. Salter, D.L. Bader, D.A. Lee, *Inflamm Res* 57 (2008) 306-313.
- [27] A.M. Abushamaa, T.A. Sporn, R.J. Folz, *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 283 (2002) L336-345.
- [28] N. Khansari, Y. Shakiba, M. Mahmoudi, *Recent Pat Inflamm Allergy Drug Discov* 3 (2009) 73-80.
- [29] J.Y. Yeon, Y.J. Suh, S.W. Kim, H.W. Baik, C.J. Sung, H.S. Kim, M.K. Sung, *Nutrition* (2011).
- [30] D. Tardieu, J.P. Jaeg, A. Deloly, D.E. Corpet, J. Cadet, C.R. Petit, *Carcinogenesis* 21 (2000) 973-976.
- [31] N. Turull, J. Queralt, *Inflammation* 24 (2000) 533-545.
- [32] H.J. Yang, H. Youn, K.M. Seong, Y.J. Yun, W. Kim, Y.H. Kim, J.Y. Lee, C.S. Kim, Y.W. Jin, B. Youn, *Biochem Pharmacol* (2011).
- [33] G.S. Geis, *J Rheumatol Suppl* 56 (1999) 31-36.
- [34] J.A. Tibble, G. Sigthorsson, R. Foster, I. Bjarnason, *Scand J Gastroenterol* 35 (2000) 802-807.

- [35] C. Martin-Garcia, M. Hinojosa, P. Berges, E. Camacho, R. Garcia-Rodriguez, T. Alfaya, *J Investig Allergol Clin Immunol* 13 (2003) 20-25.
- [36] J.D. Greenberg, M.C. Fisher, J. Kremer, H. Chang, E.D. Rosenstein, M. Kishimoto, S. Lee, Y. Yazici, A. Kavanaugh, S.B. Abramson, *Clin Exp Rheumatol* 27 (2009) 395-401.
- [37] D. Layton, P.C. Souverein, E.R. Heerdink, S.A. Shakir, A.C. Egberts, *Drug Saf* 31 (2008) 143-158.
- [38] S.M. Jachak, *Curr Med Chem* 13 (2006) 659-678.
- [39] E. Navarro-Peran, J. Cabezas-Herrera, L. Sanchez-Del-Campo, F. Garcia-Canovas, J.N. Rodriguez-Lopez, *Inflamm Res* 57 (2008) 472-478.
- [40] C. Kurbitz, D. Heise, T. Redmer, F. Goumas, A. Arlt, J. Lemke, G. Rimbach, H. Kalthoff, A. Trauzold, *Cancer Sci* 102 (2011) 728-734.
- [41] K.M. Kim, H.O. Pae, M. Zhung, H.Y. Ha, Y.A. Ha, K.Y. Chai, Y.K. Cheong, J.M. Kim, H.T. Chung, *Biomed Pharmacother* 62 (2008) 630-636.
- [42] S. Wessler, P. Muenzner, T.F. Meyer, M. Naumann, *Biol Chem* 386 (2005) 481-490.
- [43] D. Chen, M. Nie, M.W. Fan, Z. Bian, *Pharmacology* 82 (2008) 264-269.
- [44] S.K. Manna, A. Mukhopadhyay, B.B. Aggarwal, *J Immunol* 164 (2000) 6509-6519.
- [45] F.C. Liu, L.F. Hung, W.L. Wu, D.M. Chang, C.Y. Huang, J.H. Lai, L.J. Ho, *Arthritis Res Ther* 12 (2010) R167.
- [46] F. Shen, S.J. Chen, X.J. Dong, H. Zhong, Y.T. Li, G.F. Cheng, *J Asian Nat Prod Res* 5 (2003) 151-157.
- [47] B.H. Kim, E.Y. Chung, J.C. Ryu, S.H. Jung, K.R. Min, Y. Kim, *Arch Pharm Res* 26 (2003) 306-311.
- [48] T.M. Chiu, C.C. Huang, T.J. Lin, J.Y. Fang, N.L. Wu, C.F. Hung, *J Ethnopharmacol* 126 (2009) 108-113.
- [49] J.S. Park, M.S. Woo, D.H. Kim, J.W. Hyun, W.K. Kim, J.C. Lee, H.S. Kim, *J Pharmacol Exp Ther* 320 (2007) 1237-1245.
- [50] A.E. Valsecchi, S. Franchi, A.E. Panerai, A. Rossi, P. Sacerdote, M. Colleoni, *Eur J Pharmacol* 650 (2011) 694-702.
- [51] T. Sakai, S. Furoku, M. Nakamoto, E. Shuto, T. Hosaka, Y. Nishioka, S. Sone, *Biosci Biotechnol Biochem* 75 (2011) 593-595.

- [52] K.T. Lee, I.C. Sohn, Y.K. Kim, J.H. Choi, J.W. Choi, H.J. Park, Y. Itoh, K. Miyamoto, *Biol Pharm Bull* 24 (2001) 1117-1121.
- [53] C.A. Colton, O.N. Chernyshev, *Neurochem Int* 29 (1996) 43-53.
- [54] S.T. Dheen, C. Kaur, E.A. Ling, *Curr Med Chem* 14 (2007) 1189-1197.
- [55] L. Meda, M.A. Cassatella, G.I. Szendrei, L. Otvos, Jr., P. Baron, M. Villalba, D. Ferrari, F. Rossi, *Nature* 374 (1995) 647-650.
- [56] S.W. Barger, A.D. Harmon, *Nature* 388 (1997) 878-881.
- [57] B.J. Ding, W.W. Ma, L.L. He, X. Zhou, L.H. Yuan, H.L. Yu, J.F. Feng, R. Xiao, *Int J Dev Neurosci* 29 (2011) 537-542.
- [58] D.J. Jenkins, C.W. Kendall, P.W. Connelly, C.J. Jackson, T. Parker, D. Faulkner, E. Vidgen, *Metabolism* 51 (2002) 919-924.
- [59] T. Ikezoe, Y. Yang, K. Bandobashi, T. Saito, S. Takemoto, H. Machida, K. Togitani, H.P. Koeffler, H. Taguchi, *Mol Cancer Ther* 4 (2005) 578-586.
- [60] Y. Lu, C. Sun, Y. Pan, *J Sep Sci* 29 (2006) 314-318.
- [61] Y. Xu, Y. Xue, Y. Wang, D. Feng, S. Lin, L. Xu, *Int Immunopharmacol* 9 (2009) 360-365.
- [62] X. Tao, P.E. Lipsky, *Rheum Dis Clin North Am* 26 (2000) 29-50, viii.
- [63] X. Tao, J. Younger, F.Z. Fan, B. Wang, P.E. Lipsky, *Arthritis Rheum* 46 (2002) 1735-1743.
- [64] X.D. Pan, X.C. Chen, *Yao Xue Xue Bao* 43 (2008) 1179-1185.
- [65] E.C. Kim, J.K. Min, T.Y. Kim, S.J. Lee, H.O. Yang, S. Han, Y.M. Kim, Y.G. Kwon, *Biochem Biophys Res Commun* 335 (2005) 300-308.
- [66] M.H. Pan, M.C. Hsieh, P.C. Hsu, S.Y. Ho, C.S. Lai, H. Wu, S. Sang, C.T. Ho, *Mol Nutr Food Res* 52 (2008) 1467-1477.
- [67] M.H. Pan, M.C. Hsieh, J.M. Kuo, C.S. Lai, H. Wu, S. Sang, C.T. Ho, *Mol Nutr Food Res* 52 (2008) 527-537.
- [68] T. Hirano, J. Arimitsu, S. Higa, T. Naka, A. Ogata, Y. Shima, M. Fujimoto, T. Yamadori, T. Ohkawara, Y. Kuwabara, M. Kawai, I. Kawase, T. Tanaka, *Int Arch Allergy Immunol* 140 (2006) 150-156.
- [69] M. Kawai, T. Hirano, S. Higa, J. Arimitsu, M. Maruta, Y. Kuwahara, T. Ohkawara, K. Hagihara, T. Yamadori, Y. Shima, A. Ogata, I. Kawase, T. Tanaka, *Allergol Int* 56 (2007) 113-123.
- [70] K. Rezai-Zadeh, J. Ehrhart, Y. Bai, P.R. Sanberg, P. Bickford, J. Tan, R.D.

- Shytle, J Neuroinflammation 5 (2008) 41.
- [71] H. Harizi, F. Chaabane, K. Ghedira, L. Chekir-Ghedira, Cell Immunol 267 (2011) 94-101.
- [72] G.A. Bonaterra, E.U. Heinrich, O. Kelber, D. Weiser, J. Metz, R. Kinscherf, Phytomedicine 17 (2010) 1106-1113.
- [73] W. Yi, H.Y. Wetzstein, J Sci Food Agric 90 (2010) 1063-1070.
- [74] N.H. Nam, Mini Rev Med Chem 6 (2006) 945-951.
- [75] K. Stalinska, A. Guzdek, M. Rokicki, A. Koj, J Physiol Pharmacol 56 Suppl 1 (2005) 157-169.
- [76] Y. Li, S.H. Lee, Q.T. Le, M.M. Kim, S.K. Kim, J Agric Food Chem 56 (2008) 12073-12080.
- [77] Y. Zou, Z.J. Qian, Y. Li, M.M. Kim, S.H. Lee, S.K. Kim, J Agric Food Chem 56 (2008) 7001-7009.
- [78] M.M. Kim, Q.V. Ta, E. Mendis, N. Rajapakse, W.K. Jung, H.G. Byun, Y.J. Jeon, S.K. Kim, Life Sci 79 (2006) 1436-1443.
- [79] Y. Athukorala, K.N. Kim, Y.J. Jeon, Food Chem Toxicol 44 (2006) 1065-1074.
- [80] M.J. Joe, S.N. Kim, H.Y. Choi, W.S. Shin, G.M. Park, D.W. Kang, Y.K. Kim, Biol Pharm Bull 29 (2006) 1735-1739.
- [81] Y.C. Kim, R.B. An, N.Y. Yoon, T.J. Nam, J.S. Choi, Arch Pharm Res 28 (2005) 1376-1380.
- [82] K.A. Kang, R. Zhang, K.H. Lee, S. Chae, B.J. Kim, Y.S. Kwak, J.W. Park, N.H. Lee, J.W. Hyun, J Radiat Res (Tokyo) 47 (2006) 61-68.
- [83] W.K. Jung, Y.W. Ahn, S.H. Lee, Y.H. Choi, S.K. Kim, S.S. Yea, I. Choi, S.G. Park, S.K. Seo, S.W. Lee, I.W. Choi, Food Chem Toxicol 47 (2009) 410-417.
- [84] http://www.global-autonews.com/board/view.php3?table=bd_chae_war&gubun=7&page_num=4&idx=5883&key
- [85] <http://www.igreenspot.com/toyotas-lightweight-1x-concept-car/>
- [86] Advanced Materials & Processes, DLR ECOCOMP 발표자료 (2001).
- [87] <http://radar.ndsl.kr/radDetail.do?cn=GTB2009110280>
- [88] 한성옥, “천연섬유를 이용한 자연순환형 복합재료“, 섬유공학회 추계학술발표회 특별심포지움 프로시딩(자연순환형 섬유복합재료), 제41권, 제2호, pp.30-32, 한국섬유공학회 IN2-3 (2008).
- [89] 현대-기아 자동차연구원, “바이오복합재료 10개년 기술개발 로드맵“,

내부발표자료 (2005).

3장 참고문헌

- [1] H. Kim, H.S. Lee, K.T. Chang, T.H. Ko, K.J. Baek, N.S. Kwon, *J Immunol* 154 (1995) 4741-4748.
- [2] S. Dhingra, A.K. Sharma, D.K. Singla, P.K. Singal, *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 293 (2007) H3524-3531.
- [3] E.V. Kalinina, N.N. Chernov, A.N. Saprin, Y.N. Kotova, Y.A. Andreev, V.S. Solomka, N.P. Scherbak, *Biochemistry (Mosc)* 71 (2006) 1200-1206.
- [4] L.M. Sanders, C.E. Henderson, M.Y. Hong, R. Barhoumi, R.C. Burghardt, N. Wang, C.M. Spinka, R.J. Carroll, N.D. Turner, R.S. Chapkin, J.R. Lupton, *J Nutr* 134 (2004) 3233-3238.
- [5] F. Vanderbist, P. Maes, J. Neve, *Arzneimittelforschung* 46 (1996) 783-788.
- [6] D.Y. Rhyu, K.S. Kang, M. Sekiya, T. Yokozawa, *Am J Chin Med* 35 (2007) 127-137.
- [7] J.R. Vane, Y.S. Bakhle, R.M. Botting, *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 38 (1998) 97-120.
- [8] M. Murakami, Y. Nakatani, T. Tanioka, I. Kudo, *Prostaglandins Other Lipid Mediat* 68-69 (2002) 383-399.
- [9] J. Claria, *Curr Pharm Des* 9 (2003) 2177-2190.
- [10] C. Chen, Y.H. Chen, W.W. Lin, *Immunology* 97 (1999) 124-129.
- [11] A. von Knethen, D. Callsen, B. Brune, *Mol Biol Cell* 10 (1999) 361-372.
- [12] J. Shan, J. Fu, Z. Zhao, X. Kong, H. Huang, L. Luo, Z. Yin, *Int Immunopharmacol* 9 (2009) 1042-1048.
- [13] F. Chen, M. Ding, Y. Lu, S.S. Leonard, V. Vallyathan, V. Castranova, X. Shi, *J Environ Pathol Toxicol Oncol* 19 (2000) 231-238.
- [14] D. Krappmann, E. Wegener, Y. Sunami, M. Esen, A. Thiel, B. Mordmuller, C. Scheidereit, *Mol Cell Biol* 24 (2004) 6488-6500.
- [15] J.M. Kyriakis, *Gene Expr* 7 (1999) 217-231.
- [16] M. Guha, N. Mackman, *Cell Signal* 13 (2001) 85-94.
- [17] E. Herlaar, Z. Brown, *Mol Med Today* 5 (1999) 439-447.
- [18] A.B. Granado-Serrano, M.A. Martin, G. Haegeman, L. Goya, L. Bravo, S.

- Ramos, Br J Nutr 103 (2010) 168-179.
- [19] X. Yang, Y. Chen, D. Gabuzda, J Biol Chem 274 (1999) 27981-27988.
- [20] F. Gonzalez-Scarano, G. Baltuch, Annu Rev Neurosci 22 (1999) 219-240.
- [21] C. Bertolotto, P. Abbe, T.J. Hemesath, K. Bille, D.E. Fisher, J.P. Ortonne, R. Ballotti, J Cell Biol 142 (1998) 827-835.
- [22] H.Y. Park, C. Wu, L. Yonemoto, M. Murphy-Smith, H. Wu, C.M. Stachur, B.A. Gilchrest, Biochem J 395 (2006) 571-578.
- [23] R.A. Newton, A.L. Cook, D.W. Roberts, J.H. Leonard, R.A. Sturm, J Invest Dermatol 127 (2007) 2216-2227.
- [24] H.D. Lee, W.H. Lee, E. Roh, C.S. Seo, J.K. Son, S.H. Lee, B.Y. Hwang, S.H. Jung, S.B. Han, Y. Kim, Exp Dermatol (2011).
- [25] Inbal B, Shani G, Cohen O, Kissil JL, Kimchi A. Death-associated protein kinase-related protein 1, a novel serine/threonine kinase involved in apoptosis. Mol Cell Biol 20, 1044-1054 (2000)
- [26] Li P, Nijhawan D, Budihardjo I, Srinivasula SM, Ahmad M et al. Cytochrome c and dATP-dependent formation of Apaf-1/caspase-9 complex initiates an apoptotic protease cascade. Cell 91, 479-489 (1997)
- [27] J. Han, S. Kang, R. Choue, H. Kim, K. Leem, et al. Free radical scavenging effect of *Diospyros kaki*, *Laminaria japonica* and *Undaria pinnatifida*. *Fitoterapia*, **73**, 710-712 (2002).
- [28] Y. Okai, K. Higashi-Okai, S. Nakamura. Identification of heterogenous antimutagenic activities in the extract of edible brown seaweeds, *Laminaria japonica* (Makonbu) and *Undaria pinnatifida* (Wakame) by the umu gene expression system in *Salmonella typhimurium* (TA1535/pSK1002). *Mutat. Res.*, **303**, 63-70 (1993).
- [29] K.S. Lee, B.S. Bae, M.J. Bae, M.A. Jang, J.S. Seo, et al. Effect of Sea Tangle and Metformin on Lipid Peroxide and Antioxidants Levels in Diabetic Rats, *Korean. J. Nutr.* ,**32**, 230-238 (1999).
- [30] D.Q. Jin, G. Li, J.S. Kim, C.S. Yong, J.A. Kim, et al. Preventive Effects of *Laminaria japonica* Aqueous Extract on the Oxidative Stress and Xanthine Oxidase Activity in Streptozotocin-induced Diabetic Rat Liver. *Biol. Pharm. Bull.*, **27**, 1037-1040 (2004).
- [31] K.W. Chiu, A.Y. Fung. The cardiovascular effects of green beans

- (*Phaseousaureus*), commonrue (*Rutagravelens*), and kelp (*Laminar iajaponica*) in rats. *Gen. Pharmacol.*, **29**, 859-862 (1997).
- [32] A.T. Critchley. Introduction: seaweed resources. In: Seaweed cultivation and marine ranching, *Japan International Cooperation Agency (JICA)*, **1**, 6 (1993).
- [33] H. Hidaka, T. Eida, T. Takizawa, Y. Tashiro. Effect of fructo oligosaccharide on intestinal flora and human health. *Bifidobacteria Microflora*, **5**, 37-50 (1986).
- [34] Y.Y. Kim, K.W. Lee, G.B. Kim, Y.J. Cho. Studies on physicochemical and biological properties of depolymerized alginate from sea tangle, *Laminaria japonicus* by thermalde composition. *J. Kor. Fish. Soc.*, **33**, 393-398 (2000).
- [35] H.s. Lee, M.S. Choi, S.H. Park, Y.J. Kim. A study on the development of high-fiber supplements for the diabetic patients (1)-Effect of seaweed supplementation on the gastrointestinal function and diabetic symptom control in streptozotocin-induced diabetic rats, *Korean J. Nutr.*, **29**, 286-295 (1996).
- [36] Collic, S., Fischer, A. M., Tapon-Breaudiere, H., Boisson, C., Durand, P., Jozefonvicz, J. (1991), Anticoagulant of a fucoidan fraction, *ThrombosisRes.*, **64**, 143-147.
- [37] Nishino, T., Yokoyama, G., Dobashi, K., Fujihara, M., Nagumo, T. (1989), Isolation, purfication and characterization of fructose-containing sulfated polysaccharides from the brown seaweed *Ecklonia jurome* and their blood-anti coagulant activities, *Carbohydrate. Res.*, **186**, 119-129.
- [38] Li, F., Tian, T. C., Shi, Y. C. (1995), Study on anti-virus effect of fucoidan *in vitro*, *J. N. Bethune Univ. Med. Sci*, **21**, 255-257.
- [39] Song, J. Q., Xu, Y. T., Zhang, H. K. (2000), Immunomodulation action of sulfate polysaccharide of *Laminaria japonica* on peritoneal macrophages of mice, *Chin. J. Immunol.*, **16**, 70-70.
- [40] Shi, Z. Y., Guo, Y. Z., Wang, Z. (2000), Pharmacological activity of fucoidan from *Laminariajaponica*, *J.ShanghaiFish.Univ.*, **9**, 268-271.
- [41] Wang, W. T., Zhou, J. H., Xing, S. T., Guan, H. S. (1994), Immunomodulating action of marine algae sulfated polysaccharides on normal and immunosuppressed mice, *Chin. J. Pharm. Toxicol.*, **8**, 199-202.
- [42] Wu, X. W., Yang, M. L., Huang, X. L., Yan, J., Luo, Q. (2004), Effect of *Laminaria japonica* polysaccharides on radio protection and splenic lymphocyte

- apoptosis, *Med. J. Wuhan Univ.*, **25**, 239-241.
- [43] Li, D. Y., Xu, R. Y., Zhou, W. Z., Sheng, X. B., Yang, A. Y., Cheng, J. L. (2002), Effects of fucoidan extracted from brown seaweed on lipid peroxidation in mice, *Acta. Nutr. Sin.*, **24**, 389-392.
- [44] Li, D. Y., Xu, Z., Zhang, S. H. (1999), Prevention and cure of fucoidan of *L. japonica* on mice with hypercholesterolemia, *Food Sci.*, **20**, 45-46.
- [45] Li, D. Y., Xu, Z., Huang, L. M., Wang, H. B., Zhang, S. H. (2001), Effect of fucoidan of *L. japonica* on rats with hyperlipidaemia, *Food Sci.*, **22**, 92-95.
- [46] Zvyagintseva, T., Shevshenko, N., Nazarova, I., Scobun, A., Luk'yanov, P., Elyakova, L. (2002), Inhibition of complement activation by water-soluble polysaccharides of some far-eastern brown seaweeds, *Comp. Biochem. Phys. C.*, **126**, 209-215.
- [47] Shibata, H., Kimura-Takagi, I., Nagaoka, M., Hashimoto, S., Aiyama, R., Iha, M., Ueyama, S., Yokokura, T. (2000), Properties of fucoidan from *Cladosiphono kamuranus* okida in gastric mucosal protection, *Bio Factors.*, **11**, 235-245.
- [48] Liu, J. C., Zheng, F. L., Liu, Y. P. (2008), Effect of fucoidan on renal interstitial fibrosis in adenine-induced chronic renal failure in rats, *Nephrology*, **13**, 158.
- [49] Zhang, Q. B., Li, N., Zhao, T. T., Qi, H. M., Xu, Z. H., Li, Z. E. (2005), Fucoidan inhibits the development of proteinuria in active Heymann nephritis, *Phytother. Res.*, **19**, 50-53.
- [50] Vinson, J. A., and Howard III, T. B. (1996), Inhibition of protein glycation and advanced glycation end products by ascorbic acid and other vitamins and nutrients, *J. Nutr. Biochem.*, **7**, 659-663.
- [51] Hayman, S., Kinoshita, J. H. (1965), Isolation and properties of lens aldose reductase, *J. Biol. Chem.*, **240**, 877-882.
- [52] Hsu, C. Y., Yang, C. M., Chen, C. M., Chao, P. Y., Hu, S. P. (2005), Effects of Chlorophyll-Related Compounds on Hydrogen Peroxide Induced DNA Damage within Human Lymphocytes. *J. Agric. Food Chem.*, **53**, 2746-2750.
- [53] Hajri, A., Wack, S., Meyer, C., Smith, M. K., Leberquier, C., Keding, M., Aprahamian, M. (2002), In vitro and in vivo efficacy of photofrin and pheophorbide a, a bacteriochlorin, in photodynamic therapy of colonic cancer cells, *Photochem Photobiol.*, **75**, 140-148.

- [54] Hajri, A., Coffy, S., Vallat, F., Evrard S., Marescaux, J., Aprahamian, M. (1999), Human pancreatic carcinoma cells are sensitive to photodynamic therapy in vitro and in vivo, *Br. J. Surg.*, **86**, 899-906.
- [55] Nakamura, Y., Murakami, A., Koshimizu, K., Ohigashi, H. (1996), Inhibitory effect of pheophorbide a, a chlorophyll-related compound on skin tumor promotion in ICR mouse, *Cancer Lett.*, **108**, 247-255.
- [56] Lawson, T., Nunnally, J., Walker, B., Bresnick, E., Wheeler, D., and Wheeler, M. (1989), Isolation of Compounds with Antimutagenic Activity from *Savoy Chieftain Cabbage*, *J. Agric. Food Chem.*, **37**, 1363-1367.
- [57] Hargus, J. A., Fronczek, F. R., Vicente, M. G., and Smith, K. M. (2007), Mono-(L)-aspartylchlorin-e6, *Photochemistry and Photobiology*, **83**,1006-1015.
- [58] Wanga, S. Y., Tseng, C. P., Tsai, K. C., Lin, C. F., Wen, C. Y., Tsay, H. S., Wu, C. H. and Yen, G. C. (2005), Inhibitory effect of naturally occurring flavonoids on the formation of advanced glycation endproducts, *J. Agric. Food Chem.*, **53**, 3167-3173.
- [59] Ina, A., Hayashi, K. I., Nozaki, H., Kamei, Y. (2007), Pheophytin a, a low molecular weight compound found in the marine brown alga *Sargassum fulvellum*, promotes the differentiation of PC12 cells, *Int. J. Devl Neuroscience*, **25**, 63-68.
- [60] Higashi-Okai, K., Yamazaki, M., Nagamori, H., Okai, Y. (2001), Identification and antioxidant activity of several pigments from the residual green tea (*Camelli asinensis*) after hot water extraction, *J. OEH*, **23**, 335-344.
- [61] Okai, Y. and Higashi-Okai, K. (1997), Potent anti-inflammatory activity of heophytin a derived from edible green alga, *Enteromorpha prolifera* (*Sujiao-Nori*), *Int. J. Immunopharmac.*, **6**, 355-358.
- [62] Varma, S. D., Mizuno, A. and Kinoshita, J. H. (1977), Diabetic cataracts and lavonoids, **195**, 205-206.

4장 참고문헌

- [1] R. Perez, R. Kaas, F. Campello, S. Arbault, O. Barbaroux, La culture des algues marines dans le monde. Editions IFREMER, Plouzane, France, p163 (1992).
- [2] H. L. Chum. D. K. Johnson, S. K. Black, R. P. Overend, *Appl. Biochem. Biotechnol.*, **24/2**, 1-14 (1990).
- [3] J. F. Kennedy, I. J. Bradshaw, *British polymer J.*, **16**, 95-101 (1984).
- [4] Voget S, Steele HL, Streit WR. *J Biotechnol*, 126,26-36 (2006)
- [5] Wong TY, Preston LA, Schiller NL. *Annu Rev Microbiol*, 54,289-340 (2000)
- [6] Larsen B, Hoen K, Ostgaard K. *Hydrobiologia*, 260,557-561 (1993)
- [7] Nakada HI, Sweeny PC. *J Biol Chem*, 242,845-851 (1967)
- [8] Leemhuis H, Euverink GW, Dijkhuizen L. *Biotechnol Lett*, 25,1643-1645 (2003)
- [9] N.A. Ekborg, J.M. Gonzalez, M.B. Howard, L.E. Taylor, S.W. Hutcheson et al., *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, **55**, 1545-1549 (2005)
- [10] Z.Q. Zhang, G.L. Yu, H.S. Guan, X. Zhao, Y.G. Du, X.L. Jiang, *Carbohydr. Res.*, **339**, 1475-1481 (2004)
- [11] D.I. Sanchez-Machado, J. Lopez-Cervantes, J. Lopez-Hernandez, P. Paseiro-Losada, J. Simal-Lozano, *Biomed. Chromatogr.*, **18**, 90-97 (2004).
- [12] J. Preiss, G. Ashwell, *J. Biol. Chem.* **237**, 309-316 (1962).
- [13] S.H. Yoon, T.S. Moon, P. Iranpour, A.M. Lanza, K.J. Prather, *J. Bacteriol.*, **191**, 1565-1573 (2009).
- [14] <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>

5장 참고문헌

- [1] H.N. Chang, N.J. Kim, J. Kang, C.M. Jeong, *Biotechnol. Bioproc. E.*, **15**, 1-10 (2010)
- [2] H.N. Chang, N.J. Kim, J. Kang, C.M. Jeong, J. Choi et al., *Bioproc. Biosyst. Eng.*, **34**, 419-431 (2011)
- [3] N.J. Kim, H. Li, K. Jung, H.N. Chang, P.C. Lee, *Bioresour. technol.*, **102**, 7466-7469 (2011)
- [4] H.N. Chang, B.J. Kim, J.W. Kang, C.M. Jeong, N.J. Kim et al., *Biotechnol. Bioproc. E.*, **13**, 123-135 (2008)

- [5] J.C. Lee, D.Y. Kim, D.J. Oh, H.N. Chang, *Biotechnol. Bioproc. E.*, 13, 560-565 (2008)
- [6] M. L. Shuler, F. Kargi, *Bioprocess Engineering Basic Concepts*, Prentice Hall PTR (2002)
- [7] I.B. Ju, W. Jeon, M.-J. Park, Y.-W. Suh, D.J. Suh, *Appl. Catal. A.*, 387, 100-106 (2010).

6장 참고문헌

- [1] A. Aden, M. Ruth, K. Ibsen, J. Jechura, K. Neeves, J. Sheehan and B. Wallace, NREL/TP-510-32438, Golden, CO. (2002).
- [2] R. Wooley, M. Ruth, J. Sheehan, K. Ibsen, H. Majdeski and A. Galvez, NREL/TP-580-26157, Golden, CO. (1999).
- [3] D. Sengupta, INTEGRATING BIOPROCESSES INTO INDUSTRIAL COMPLEXES FOR SUSTAINABLE DEVELOPMENT, Ph.D Thesis, Louisiana State University (2010)
- [4] 우희철 외, 11-1541000-000439-01(용역사업 결과보고서), 농수산식품부 (2010)
- [5] R. Wooley and V. Putsche, NREL/MP-425-20685, Golden, CO. (1996).
- [6] Senorans, F. J., A. R. Rodriguez, E. Ibanez, J. Tabera and Reglero, G., Optimization of countercurrent supercritical fluid extraction conditions for spirit fractionation, *J. Supercrit. Fluids*, 21, 41.(2001).
- [7] Smith RM, Extractions with superheated water. *J. Chromatogr. A.* 975: 31-46.(2002)
- [8] Andersson T, Parameters affecting the extraction of polycyclic aromatic hydrocarbons with pressurised hot water, Academic dissertation, University of Helsinki, Finland.(2007)
- [9] Chan-Ick Cheigh, Eun-Young Chung, Min-Jung Ko, Sang-Woo Cho, Pahn-Shick Chang et al., *Food Engineering Progress*, Vol.14, No. 4, 335-341(2010).
- [10] [http://www.sanrimji.com/pdf/2003/12/200312076\(1\).pdf](http://www.sanrimji.com/pdf/2003/12/200312076(1).pdf)
- [11] <http://www.keckorea.com/board/board.php?board=pds&page=23&command=body&no=62>
- [12] <http://user.chol.com/~ansick2/sea/fish/fish622.htm>
- [13] 이민우, 충남대학교 석사학위 논문, 홍조류 섬유를 이용한 바이오복합재료 제

조 및 특성분석 (2008).

- [14] J. C. Fantone and P. A. Ward, *Ann. J. Path.*, **107**, 397 (1982)
- [15] S. N. Park, *Korean J. Food Sci. Technol.*, **35**(3), 510 (2003)
- [16] C. S. Foote, Photosensitized oxidation and singlet oxygen; consequences in biological systems, ed. W. A. Pryor, 2, 85, Academic press, New York (1976)
- [17] J. A. Kim, J. M. Lee, D. B. Shin and N. H. Lee, *Food Sci. Biotechnol.*, **13**, 476-480 (2004)
- [18] H. J. Bu, Y. M. Ham, J. M. Kim, S. J. Lee, J. W. Hyun et al., *Kor. J. Pharmacogn*, **37**(2), 92-96 (2006)
- [19] J. Giese, *Food Technol.*, **5**, 73-81 (1996)
- [20] D. E. Pszczola, *Food Technol.*, **55**, 51-59 (2001)
- [21] K. H. Kim and M. H. Choi, *Korean J. Posthavest*, **5**, 121-135 (1999)
- [22] T. K. Kim, H. D. Shin and Y. H. Lee, *Korean J. Food Sci. Technol.*, **35**(2), 266-271 (2003)
- [23] A. Hang and B. Larsen, *Acta Chem. Scand.*, **16**, 1908 (1962)
- [24] A. Haug and O. Smidsrod, *Acta Chem. Scand.*, **19**, 341-347 (1965)
- [25] C. Stancia and J.R. Bennet, *Lancet*, **1**, 109-112 (1974)

부 록

- A. 추진경과 일정표
- B. 심포지엄 개최 결과 요약
- C. 최종보고회 결과 요약
- D. 연구성과물
- E. 언론 홍보

부록 A 추진경과 일정표

□ 연구관리 업무 및 일정

월	연구관리 업무	대외 업무	기타 사항
10	○ 운영위원회 회의	○ 해조류 원료 확보 관련 협의 (완도군, 해조류바이오연구센터) ○ 내외해 다시마 비교양식	○ 원료 확보방안 토의 ○ 대량생산업무 추가
11	○ 홍보전시회 개최(2건) - 한국생물공학회(7-9일) - 한국화학공학회(20-22일)	○ 국내 유관 연구단지 방문/미팅	○ 인적네트워크 토의 ○ 전시회 부스 설치
12	○ 1차 워크샵 개최 (16일-17일) - 장소: 제주도 KAL 호텔 - 자문위원단 패넬토론	○ 폐자원 및 바이오매스 에너지 대책 실행계획, 추진실적 보고 (2일) ○ 보도자료 작성 및 배부 (15일, 21일)	○ 연구진행 점검
1	○ 세부과제팀별 점검회의	○ 수산 폐기물 현황조사(29일)	
2	○ 세부과제팀별 점검회의	○ 국내 유관 연구단지 방문/미팅	○ 인적네트워크 토의
3	○ 추진실적 보고(2일)		
4	○ 추진실적 보고(13일) ○ 중간보고회 개최(15일-16일) - 장소: 통영 경상대학교 - 자문위원단 패넬토론 ○ 자문위원단 회의(22일)	○ 경과보고 및 부처관계자 미팅(8일) ○ 보도자료 작성 및 배부 (16일)	○ 연구진행 점검 ○ 향후계획 검토
5	○ 운영위원회 회의(19일) ○ 자문위원단 회의(24일)	○ 언론홍보 - KBS 9시 뉴스 촬영 ○ 한국청정기술학회지 홍보	
6	○ 자문위원단 회의 ○ 운영위원회 회의(11일) ○ 결과종합회의 ○ 실적정리(논문, 특허 등)	○ 국가위 R&D 사업설명회 ○ 해외 연구기관 방문 및 회의 - 미국 BAL 연구소 및 Algen Sustainables 회사 - 기술동향 파악 및 MOU 협의	○ 해조류 바이오매스의 활용방안 토의
7	○ 국제 심포지엄 개최 (3일-5일) - 장소: 완도군 장보고관 - 해외연사초청(미국, 일본) - 자문위원단 연석회의 (패넬토론) ○ 최종보고회 ○ 결과보고서 발간	○ 보도자료 작성 및 배부(6일) ○ 해외 연구기관 방문 및 회의 - 인도네시아 발리 및 자카르타 ○ 지자체와 MOU 체결(완도군) ○ 최종 평가, 향후 계획 협의 ○ 부처관계자 미팅	○ 연구진행 점검 ○ 생산지 방문(완도) ○ 향후방안 토의

부록 B 심포지엄 개최 결과 요약

1. 국제 심포지엄 개요

- 일자 : 2011년 7월 3~5일(일~화)
- 심포지엄 명 : 해조류 바이오매스 대량생산 및 바이오에너지 국제심포지엄
(International Symposium on Seaweed Biomass Production & Bioenergy)
- 참석자 수 : 회사 22명, 대학교 75명, 연구소 29명
- 주최 : 농림수산식품부
- 주관 : 부경대학교 청정생산기술연구소 , 완도군

2. 발표자 및 발표내용

- 가. 신명교(바이올시스템스, 연구원) : 홍조류로부터 바이오알콜 생산
- 나. Yuki Kashiya(BAL Chile 바이오 설계연구소, CEO, 미국) : 거대조류로부터 재생가능한 연료와 화합물 생성을 위한 생물합성
- 다. James Coke(Algen Sustainables, CEO, 미국) : 연안 자생 바이오매스의 활용(매콩델타에서의 기회와 도전)
- 라. Kazuo Miyashita(홋카이도 대학, 교수) : 건강 기능소재로서의 갈조류 지방
- 마. 우희철(부경대학교, 교수) : 한국의 해조류 바이오매스 기술현황과 연구개발 계획
- 바. 김남길(경상대학교 교수) : 한국의 다시마 대량생산 기술 개발
- 사. 김경현(고려대학교 교수) : 해조류의 생물학적 전환공정 개발
- 아. 김형락(부경대학교 교수) : 기능성 식품원으로서 해조류 이용
- 자. 서동진(KIST 청정에너지센터, 책임연구원) : 급속 열분해 및 혐기성 소화를 이용한 해조류의 바이오오일 생산기술 개발

3. 패널토론

- 가. 토론자 : 정해봉(에코프론티어), 박종문(포항공과대학교), 김화용(서울대학교), 이진석(한국에너지기술연구원), 배정환(전남대학교), 김진석(한국화학연구원), 김형락(부경대학교), 우희철(부경대학교), 류청로(부경대학교), 홍정표(수산자원사업단)

나. 토론 내용 요약

- (1) 바이오에너지 생산공장을 항시 가동하기 위한 원료의 대량공급과 지속적인 해조류 바이오매스 공급을 위한 연중 생산 가능한 해조류 바이오매스 개발
- (2) 정부의 RPS (Renewable Portfolio Standard) 제도 실시에 따라 신재생에너지원으로 해조류 바이오매스를 활용하기 위한 정책적인 지원이 필요
- (3) 석유자원 고갈에 따른 바이오에너지 개발뿐만 아니라 바이오자원에서부터 석유화학제품 원료를 대체하기 위한 연구개발을 위한 정책적인 지원이 필요
- (4) 해조류 양식산업이 왕성한 일본, 중국과 공동으로 해조류양식으로 인한 이산화탄소 감축효과를 입증받기 위한 국제적인 노력이 필요
- (5) 해조류 바이오매스로부터 바이오에너지 생산공정비용을 절감하기 위하여 고부가가치 제품의 생산과 공정의 단순화에 대한 심층적인 기술개발이 필요
- (6) 해조류바이오매스의 대량생산과 수송의 자동화와 자연재해에 대비한 친환경 대량생산 시설구축이 필요

이번 심포지엄에서 패널토론을 통해, 2012년부터 신재생에너지 의무할당제(RPS) 시행과 2015년부터 탄소배출권(CER) 의무이행 제도에 따라 신재생에너지 확보가 중요함을 강조하였으며, 이에 육상 바이오매스로부터 액체연료 생산은 한계가 있어, 비식용 해조류를 이용한 액체연료 생산이 유리할 것이라는 의견을 제시하였다. 또한 국가 경쟁력 확보와 바이오에너지 분야 선도를 위해 정부의 지원이 중요함을 강조하였다.

4. 프로그램

International Symposium on Seaweed Biomass Production & Bioenergy July 3-5, 2011 / ChangPoGo Memorial Hall, Wando, Korea

- Supported by : Ministry for Food, Agriculture, Forestry and Fisheries
- Hosted by : The Institute of Cleaner Production Technology, Pukyong National University, Wando County

Program

Date	Time	Subject	Lecturer	
7. 3	18:30~20:30	• Welcome Reception		
	08:30~09:00	• Registration		
	09:00~09:10	• Opening Remark		
	09:10~09:30	• Congratulatory Remark		
	Session 1	Chairman	Dr. Kyeongkeun Oh (Prof. Dankook University)	
	09:30~10:20	• Production of Bioethanol from Macro Red Algae	Dr. Myung Kyo Shin (Vice-President, Biolsystems)	
	10:20~11:10	• Synthetic Biology for Renewable Fuels and Chemical Production from Macroalgae	Mr. Yuki Kashiya (Co-founder & CEO of BAL Chile, Bio Architecture Lab, USA)	
	11:10~11:20	Coffee Break		
	11:20~12:10	• On-shore Aquatic Biomass: Opportunities and Challenges in the Mekong Delta	Mr. James Coke (CEO, Algen Sustainables, USA)	
	12:10~13:30	Lunch		
	7. 4	Session 2	Chairman	Dr. Heon-Tae Kim (Prof. Pukyong National University)
		13:30~14:20	• Brown Seaweed Lipids as Nutraceutical Ingredients	Dr. Kazuo Miyashita (Prof. Hokkaido University, Japan)
		14:20~14:40	• Current Status and R&D Roadmap of Seaweed Biomass Technology in Korea	Dr. Hee Chul Woo (Prof. Pukyong National University)
		14:40~15:00	• Introduction to the Mass Culture System of Kelp in Korea	Dr. Nam-Gil Kim (Prof. Gyeongsang National University)
15:00~15:10		Coffee Break		
Session 3		Chairman	Dr. Yong-Cheol Park (Prof. Kookmin University)	
15:10~15:30		• Biological Conversion of Seaweed Biomass into Fuels and Chemicals	Dr. Kyoung Heon Kim (Prof. Korea University)	
15:30~15:50		• Potential Utilization of Seaweed Biomass as Nutraceuticals	Dr. Hyeung-Rak Kim (Prof. Pukyong National University)	
15:50~16:10		• Green Liquid Fuel Production from Seaweed by Fast Pyrolysis and Anaerobic Digestion	Dr. Dong Jin Suh (Researcher, Clean Energy Center, Korea Institute of Science & Technology)	
16:10~17:00		Panel Discussion	Chairman Dr. Hyeung-Rak Kim, (Prof. Pukyong National University)	
7. 5	09:00~	Discussion and Seaweed Farm Tour		

5. 국제심포지엄 자료집

**해조류 바이오매스 대량생산 및
바이오에너지 국제심포지엄**

International Symposium on Seaweed
Biomass Production & Bioenergy

- 일 시 : 2011년 7월 3-5일(일-화)
- 장 소 : 장보고기념관(전남 완도군)
- 주 최 : 농림수산식품부
- 주 관 : 부경대학교 청정생산기술연구소
완 도 군

부경대학교 청정생산기술연구소 / 완도군

부록 C 최종보고회 결과 요약

1. 최종보고회 개요

- 일자 : 2011년 8월 3일(수)
- 발표자 : 연구책임자 우희철 교수
- 참석자 수 : 평가위원 4명, 부처관계자 7명, 연구위원 14명, 외부참석자 5명
- 토론 평가 요약

구분	소속	성명	내용
평가 위원	(주)해양 생태기술 연구소	손민호 박사	<ul style="list-style-type: none"> - 적은 연구자금에 비해 많은 연구성과를 도출함. - 현재 해조류 바이오매스 연구와 관련하여 각 부처간에 중복성이 있다고 범부처에서는 바라보고 있으며, 향후 2020년까지의 국가 장기 프로젝트로 전환시 타부처 경쟁에서 선점하기 위해 독창적이고, 우수한 성과를 이루어 미리 준비할 필요가 있음.
	충북대	신채호 교수	<ul style="list-style-type: none"> - 본 과제는 최종목표를 이루기 위해 기획연구에서 이루어진 로드맵에 맞추어 충실히 수행되고 있는 것으로 보임. - 본 과제는 연속적으로 이루어져야 시너지 효과가 나올 것이며, 공백기간이 있다면 연구가 일시적으로 중단되는 문제가 발생해 연구목표 달성에 차질 있을 것임. - 향후 Demo(pilot) plant 구축을 위해 장치비가 많이 들어감으로 많은 연구자금을 투입 및 확보가 필요함.
	한국화학 연구원	정순용 박사	<ul style="list-style-type: none"> - 부족한 연구자금에도 불구하고 많은 연구자들과 함께 전체적으로 우수한 연구성과를 이루어 낸 것 같음. - 현재까지 연구결과는 해조류 바이오매스의 그린에너지화 및 통합활용을 위해 여러 가지 단위기술들을 도출하였고, 기술의 수준도 많이 올라온 것 같음. - 앞으로는 bench scale 및 pilot plant로 가기 위해 많은 연구비가 필요함. 또한 부처관계자와 연구책임자는 도출된 여러 기술들에 대해 선택과 집중으로 투자할 필요가 있음.
	경북대	박중곤 교수	<ul style="list-style-type: none"> - 본 연구는 해조류 feed stock 확보와 해조류 활용기술이 함께 이루어져야하며, 현재 투자되는 연구자금을 볼 때 (대량생산 약 5억, 통합활용 약 11억) balance가 맞지 않아 장기적으로 연구진행이 불균형해질 우려가 있어 균형적으로 투자와 연구개발이 이루어져야함. - 해조류 바이오매스 VFA 플랫폼은 현재 우수한 연구결과를 도출하고 있으며, 국제적인 기술선점을 위해 집중적으로 투자할 필요가 있다고 판단됨. - 해조류 대량생산과 관련하여 생산량 단위의 기준이 필요할 것 같음. wt. weight 단위를 사용할 때 수분함량 비율에 대한 기준이 필요함. - 해조류 바이오매스의 생산성을 높이기 위해 종개발, 수거 시스템 등의 분야외에도 기후변화인자도 고려되어야 됨.

구분	내용
부처관계자	<ul style="list-style-type: none"> - 바이오에너지는 현재 경제성이 없지만, 화석연료 고갈과 함께 연료의 생산비용이 증가하고 있으며, 향후 어느 시점에서 본 연구사업이 새로운 시장을 선점할 것으로 기대함. - 현재 본 부처는 해조류 바이오매스 개발에 대한 법적기반을 갖추고 있으며, 본 부처의 주도로 해조류 바이오매스 개발을 실현할 예정임.
외부참석자	<ul style="list-style-type: none"> - 해조류는 기후변화 대응 및 온실가스 감축을 위해 바다 숲 조성 등 다양한 연구를 수행하고 있음. - 향후 본 사업 역시 크게 기여할 것으로 예상됨.
연구위원	<ul style="list-style-type: none"> - 해조류는 열대지방보다 온대지방에서 잘 자라며, 우리나라에서 갈조류를 대상으로 바이오매스를 확보하는 것이 유리하다고 봄. - 미세조류는 거대조류보다 대량생산하기에 현재 경제적으로 많은 문제점이 있음. - 또한, 육상바이오매스는 해조류에 비해 경작 및 수거비용이 많이드는 단점이 있음. - 현재 해조류를 대량생산을 위해서 내해는 다양한 양식장으로 포화되어 있어, 외해 대량생산을 구축할 것임.

부록 D 연구성과

■ 특허출원 실적 : 총 10건(출원중 2건 포함)

순번	산업재산권명	출원 일자	출원번호	출원 국가	출원자
확정					
1	다시마의 추출물을 유효성분으로 함유하는 함염증용 약학조성물	2010.04.21	10-2010-0037042	한국	김형락, 우희철 외 4명
2	곰피와 감태 추출물 유래의 플로로탄닌을 포함하는 화장품 조성물	2010.10.19	10-2010-0101940	한국	최호석, 김형락 우희철, 신태선 외 4명
3	다시마 추출물 또는 이로부터 분리된 폴리페놀계 화합물을 유효 성분으로 함유하는 당뇨성 합병증의 예방 및 치료용 약학 조성물	2011.03.10	10-2011-0021388	한국	최재수, 우희철 김형락 외 1명
4	피부세포에서 멜라닌 생합성 억제 효과를 갖는 곰피 또는 감태 주정 추출물 또는 그로부터 분리된 플로로탄닌류를 함유하는 피부미백용 조성물	2011.04.01	10-2011-0030402	한국	김형락, 신태선 최재수 외 2명
5	신규한 알긴산 분해 효소 및 그 분해방법	2011.04.13	10-2011-0034150	한국	김경현 외 1명
6	알지네이트 라이아제 활성을 가진 신규 효소 AlyDW	2011.05.17	10-2011-0046207	한국	김두운, 신태선 외 3명
7	피부세포에서 멜라닌 생합성 억제 효과를 갖는 다시마(laminaria japonica) 주정 추출물 및 그로부터 분리된 n-헥산 가용 추출물 또는 디클로로메탄 가용 추출물을 함유하는 피부미백용 조성물	2011.05.25	10-2011-0049714	한국	김형락, 신태선, 우희철 외 1명
8	전처리된 해조류 추출물을 이용한 휘발성 지방산 제조 방법	2011.08.02	10-2011-0077148	한국	우희철, 오경근 전병수, 김두운 장호남, 전영중 김경현, 서동진 외 1명
예정					
9	알지네이트 라이아제 활성을 가지는 메타지놈 라이브러리	- 11년 유망기술발굴 및 사업화지원사업 해외 권리화 과제선정 (특허청 지원) - 2011년 11월 출원예정 (첨부자료)		해외 (미국)	김두운, 신태선 외 3명
10	식용갈조류 다시마의 최종당화산물과 흰쥐 망막 알도스 환원효소에 대한 억제효과	출원중		한국	최재수, 우희철 외 4명

■ 특허첨부-(1)

출원번호통지서

관인생략

출원번호통지서

출원일자 2010.04.21
특기사항 심사청구(유) 공개신청(무)
출원번호 10-2010-0037042 (접수번호 1-1-2010-0256207-63)
출원인명칭 부경대학교 산학협력단(2-2004-016649-9)
대리인성명 이덕록(9-1998-000461-7)
발명자성명 김형락 김아름 이민섭 이지영 우희철 원현수
발명의명칭 다시마의 추출물을 유효성분으로 함유하는 항염증용 약학조성물

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 특허로 홈페이지(<http://www.patent.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 심사관이 최초로 거절이유를 통지한 후 출원인이 그 거절이유를 받기 전 중 빠른 때)

관인생략
출원번호통지서

출원일자 2010.10.19
특기사항 심사청구(무) 공개신청(무)
출원번호 10-2010-0101940 (접수번호 1-1-2010-0674753-63)
출원인명칭 충남대학교산학협력단(2-2004-008410-4)
대리인성명 특허법인 다나(9-2008-100121-8)
발명자성명 최홍기 최호석 김형락 우희철 신태선 이현우 지한솔 정시인
발명의명칭 공피와 감태 추출물 유래의 플로로탄닌을 포함하는 화장품 조성물

특 허 청 장

<< 안내 >>

1. 귀하의 출원은 위와 같이 정상적으로 접수되었으며, 이후의 심사 진행상황은 출원번호를 통해 확인하실 수 있습니다.
2. 출원에 따른 수수료는 접수일로부터 다음날까지 동봉된 납입영수증에 성명, 납부자번호 등을 기재하여 가까운 우체국 또는 은행에 납부하여야 합니다.
* 납부자번호 : 0131(기관코드) + 접수번호
3. 귀하의 주소, 연락처 등의 변경사항이 있을 경우, 즉시 [출원인코드 정보변경(경정), 정정 신고서]를 제출하여야 출원 이후의 각종 통지서를 정상적으로 받을 수 있습니다.
* 특허로(patent.go.kr) 접속 > 민원서비스다운로드 > 특허법 시행규칙 별지 제5호 서식
4. 특허(실용신안등록)출원은 명세서 또는 도면의 보정이 필요한 경우, 등록결정 이전 또는 의견서 제출기간 이내에 출원서에 최초로 첨부된 명세서 또는 도면에 기재된 사항의 범위 안에서 보정할 수 있습니다.
5. 국내출원건을 외국에도 출원하고자 하는 경우에는 국내출원일로부터 일정한 기간 내에 외국에 출원하여야 우선권을 인정 받을 수 있습니다.
* 우선권 인정기간 : 특허·실용신안은 12월, 상표·디자인은 6월 이내
* 미국특허상표청의 선출원을 기초로 우리나라에 우선권주장출원 시, 선출원이 미공개상태이면, 우선권로부터 16개월 이내에 미국특허상표청에 [전자적교환허가서(PTO/SB/39)]를 제출하거나 우리나라에 우선권 증명 서류를 제출하여야 합니다.
6. 본 출원사실을 외부에 표시하고자 하는 경우에는 아래와 같이 하여야 하며, 이를 위반할 경우 관련법령에 따라 처벌을 받을 수 있습니다.
* 특허출원 10-2010-0000000, 상표등록출원 40-2010-0000000
7. 기타 심사 절차에 관한 사항은 동봉된 안내서를 참조하시기 바랍니다.

관공생략
출원번호통지서

출원일자 2011.03.10
특기사항 심사청구(유) 공개신청(무)
출원번호 10-2011-0021388 (접수번호 1-1-2011-0174571-01)
출원인명칭 부경대학교 산학협력단(2-2004-016649-9)
대리인성명 김태선(9-2005-000764-8)
발명자성명 최재수 우희철 김형락 손유경
발명의명칭 다시마 추출물 또는 이로부터 분리한 폴리린계 화합물을 유효 성분으로 함유하는 당뇨병 합병증의 예방 및 치료용 약학 조성물

특 허 청 장

<< 안내 >>

1. 귀하의 출원은 위와 같이 정상적으로 접수되었으며, 이후의 심사 진행상황은 출원번호를 통해 확인하실 수 있습니다.
2. 출원에 따른 수수료는 접수일로부터 다음날까지 동봉된 납입영수증에 성명, 납부자번호 등을 기재하여 가까운 우체국 또는 은행에 납부하여야 합니다.
※ 납부자번호 : 0131(기관코드) + 접수번호
3. 귀하의 주소, 연락처 등의 변경사항이 있을 경우, 즉시 [출원인코드 정보변경(경정), 정정 신고서]를 제출하여야 출원 이후의 각종 통지서를 정상적으로 받을 수 있습니다.
※ 특허로(patent.go.kr) 접속 > 민원서식다운로드 > 특허법 시행규칙 별지 제5호 서식
4. 특허(실용신안등록)출원은 명세서 또는 도면의 보정이 필요한 경우, 등록결정 이전 또는 의견서 제출기간 이내에 출원서에 최초로 첨부된 명세서 또는 도면에 기재된 사항의 범위 안에서 보정할 수 있습니다.
5. 국내출원건을 외국에도 출원하고자 하는 경우에는 국내출원일로부터 일정한 기간 내에 외국에 출원하여야 우선권을 인정 받을 수 있습니다.
※ 우선권 인정기간 : 특허·실용신안은 12월, 상표·디자인은 6월 이내
※ 미국특허상표청의 선출원을 기초로 우리나라에 우선권주장출원 시, 선출원이 미공개상태이면, 우선일로부터 16개월 이내에 미국특허상표청에 [전자적교환허가서(PTO/SB/39)]를 제출하거나 우리나라에 우선권 증명서류를 제출하여야 합니다.
6. 본 출원사실을 외부에 표시하고자 하는 경우에는 아래와 같이 하여야 하며, 이를 위반할 경우 관련법령에 따라 처벌을 받을 수 있습니다.
※ 특허출원 10-2010-0000000, 상표등록출원 40-2010-0000000
7. 기타 심사 절차에 관한 사항은 동봉된 안내서를 참조하시기 바랍니다.

■ 특허첨부-(4)

관인생략

출원번호통지서

출원일자 2011.04.01
특기사항 심사청구(유) 공개신청(무)
출원번호 10-2011-0030402 (접수번호 1-1-2011-0241242-45)
출원인명칭 부경대학교 산학협력단(2-2004-016649-9)
대리인성명 김일성(9-2005-000417-6)
발명자성명 김형락 이민섭 신태선 변대석 최재수
발명의명칭 피부세포에서 멜라닌 생합성 억제 효과를 갖는 공피 또는 감태 주정 추출물 또는 그로부터 분리된 플로로탄닌류를 함유하는 피부미백용 조성물

특 허 청 장

<< 안내 >>

1. 귀하의 출원은 위와 같이 정상적으로 접수되었으며, 이후의 심사 진행상황은 출원번호를 통해 확인하실 수 있습니다.
2. 출원에 따른 수수료는 접수일로부터 다음날까지 동봉된 납입영수증에 성명, 납부자번호 등을 기재하여 가까운 우체국 또는 은행에 납부하여야 합니다.
※ 납부자번호 : 0131(기관코드) + 접수번호
3. 귀하의 주소, 연락처 등의 변경사항이 있을 경우, 즉시 [출원인코드 정보변경(경정), 정정신고서]를 제출하여야 출원 이후의 각종 통지서를 정상적으로 받을 수 있습니다.
※ 특허로(patent.go.kr) 접속 > 민원서식다운로드 > 특허법 시행규칙 별지 제5호 서식
4. 특허(실용신안등록)출원은 명세서 또는 도면의 보정이 필요한 경우, 등록결정 이전 또는 의견서 제출기간 이내에 출원서에 최초로 첨부된 명세서 또는 도면에 기재된 사항의 범위 안에서 보정할 수 있습니다.
5. 국내출원건을 외국에도 출원하고자 하는 경우에는 국내출원일로부터 일정한 기간 내에 외국에 출원하여야 우선권을 인정 받을 수 있습니다.
※ 우선권 인정기간 : 특허·실용신안은 12월, 상표·디자인은 6월 이내
※ 미국특허상표청의 선출원을 기초로 우리나라에 우선권주장출원 시, 선출원이 미공개상태이면, 우선일로부터 16개월 이내에 미국특허상표청에 [전자적교환허가서(PTO/SB/39)]를 제출하거나 우리나라에 우선권 증명서류를 제출하여야 합니다.
6. 본 출원사실을 외부에 표시하고자 하는 경우에는 아래와 같이 하여야 하며, 이를 위반할 경우 관련법령에 따라 처벌을 받을 수 있습니다.
※ 특허출원 10-2010-0000000, 상표등록출원 40-2010-0000000
7. 기타 심사 절차에 관한 사항은 동봉된 안내서를 참조하시기 바랍니다.

관인생략
출원번호통지서

출원일자 2011.04.13
특기사항 심사청구(유) 공개신청(무)
출원번호 10-2011-0034150 (접수번호 1-1-2011-0270337-53)
출원인명칭 고려대학교 산학협력단(2-2004-017068-0)
대리인성명 구현서(9-2000-000082-0)
발명자성명 김경현 최인걸 김희택
발명의명칭 신규한 알긴산 분해 효소 및 그 분해방법

특 허 청 장

<< 안내 >>

1. 귀하의 출원은 위와 같이 정상적으로 접수되었으며, 이후의 심사 진행상황은 출원번호를 통해 확인하실 수 있습니다.
2. 출원에 따른 수수료는 접수일로부터 다음날까지 동봉된 납입영수증에 성명, 납부자번호 등을 기재하여 가까운 우체국 또는 은행에 납부하여야 합니다.
* 납부자번호 : 0131(기관코드) + 접수번호
3. 귀하의 주소, 연락처 등의 변경사항이 있을 경우, 즉시 [출원인코드 정보변경(경정), 정정 신고서]를 제출하여야 출원 이후의 각종 통지서를 정상적으로 받을 수 있습니다.
* 특허로(patent.go.kr) 접속 > 민원서식다운로드 > 특허법 시행규칙 별지 제5호 서식
4. 특허(실용신안등록)출원은 명세서 또는 도면의 보정이 필요한 경우, 등록결정 이전 또는 의견서 제출기간 이내에 출원서에 최초로 첨부된 명세서 또는 도면에 기재된 사항의 범위 안에서 보정할 수 있습니다.
5. 국내출원 건을 외국에도 출원하고자 하는 경우에는 국내출원일로부터 일정한 기간 내에 외국에 출원하여야 우선권을 인정 받을 수 있습니다.
* 우선권 인정기간 : 특허·실용신안은 12월, 상표·디자인은 6월 이내
* 미국특허상표청의 선출원을 기초로 우리나라에 우선권주장출원 시, 선출원이 미공개상태이면, 우선일로부터 16개월 이내에 미국특허상표청에 [전자적교환허가서(PTO/SB/39)]를 제출하거나 우리나라에 우선권 증명 서류를 제출하여야 합니다.
6. 본 출원사실을 외부에 표시하고자 하는 경우에는 아래와 같이 하여야 하며, 이를 위반할 경우 관련법령에 따라 처벌을 받을 수 있습니다.
* 특허출원 10-2010-0000000, 상표등록출원 40-2010-0000000
7. 기타 심사 절차에 관한 사항은 동봉된 안내서를 참조하시기 바랍니다.

당소관리번호 : PN110243

特許出願書

출원인 : 전남대학교 산학협력단

발명자 : 김두운, 신태선, 성치남, 백근식, 심수정

출원번호 : 10-2011-0046207

출원일자 : 2011년 05월 17일

심사청구 : 2011년 05월 17일

발명의명칭 : 알지네이트 라이아제 활성을 가진

신규 효소 AlyDW

 제니스 국제특허법률사무소
ZENITH Patent & Law Firm

151-832 서울시 관악구 인현동 1659-2 청동빌딩 301호
전화 : 02-888-3066 팩스 : 02-888-3678
홈페이지: www.ipnlaw.com 이메일: zenith@ipnlaw.com

관인생략
출원번호통지서

출원일자 2011.05.25
 특기사항 심사청구(유) 공개신청(무)
 출원번호 10-2011-0049714 (접수번호 1-1-2011-0392604-77)
 출원인명칭 부경대학교 산학협력단(2-2004-016649-9)
 대리인성명 김일성(9-2005-000417-6)
 발명자성명 김형락 이민섭 신태선 우희철
 발명의명칭 피부세포에서 멜라닌 생합성 억제 효과를 갖는 다시마 (*Laminaria japonica*) 주정 추출물 또는 그로부터 분리된 n-핵산 가용 추출물 또는 디글로로메탄 가용 추출물을 함유하는 피부미백용 조성물

특 허 청 장

<< 안내 >>

1. 귀하의 출원은 위와 같이 정상적으로 접수되었으며, 이후의 심사 진행상황은 출원번호를 통해 확인하실 수 있습니다.
2. 출원에 따른 수수료는 접수일로부터 다음날까지 동봉된 납입영수증에 성명, 납부자번호 등을 기재하여 가까운 우체국 또는 은행에 납부하여야 합니다.
 * 납부자번호 : 0131(기관코드) + 접수번호
3. 귀하의 주소, 연락처 등의 변경사항이 있을 경우, 즉시 [출원인코드 정보변경(경정), 정정신고서]를 제출하여야 출원 이후의 각종 통지서를 정상적으로 받을 수 있습니다.
 * 특허로(patent.go.kr) 접속 > 민원서식다운로드 > 특허법 시행규칙 별지 제5호 서식
4. 특허(실용신안등록)출원은 명세서 또는 도면의 보정이 필요한 경우, 등록결정 이전 또는 의견서 제출기간 이내에 출원서에 최초로 첨부된 명세서 또는 도면에 기재된 사항의 범위 안에서 보정할 수 있습니다.
5. 국내출원건을 외국에도 출원하고자 하는 경우에는 국내출원일로부터 일정한 기간 내에 외국에 출원하여야 우선권을 인정 받을 수 있습니다.
 * 우선권 인정기간 : 특허·실용신안은 12월, 상표·디자인은 6월 이내
 * 미국특허상표청의 선출원을 기초로 우리나라에 우선권주장출원 시, 선출원이 미공개상태이면, 우선일로부터 16개월 이내에 미국특허상표청에 [전자적교환허가서(PTO/SB/39)]를 제출하거나 우리나라에 우선권 증명서류를 제출하여야 합니다.
6. 본 출원사실을 외부에 표시하고자 하는 경우에는 아래와 같이 하여야 하며, 이를 위반할 경우 관련법령에 따라 처벌을 받을 수 있습니다.
 * 특허출원 10-2010-0000000, 상표등록출원 40-2010-0000000
7. 기타 심사 절차에 관한 사항은 동봉된 안내서를 참조하시기 바랍니다.

관인생략
출원번호통지서

출원일자 2011.08.02
특기사항 심사청구(무) 공개신청(무) 참조번호(YP110042N)
출원번호 10-2011-0077148 (접수번호 1-1-2011-0598909-62)
출원인명칭 부경대학교 산학협력단(2-2004-016649-9)
대리인성명 특허법인 이상(9-2008-100021-0)
발명자성명 우희철 장호남 전영중 서동진 전병수 오경근 김경현 김두운 최재형
발명의명칭 전처리된 해조류 추출물을 이용한 휘발성 지방산 제조 방법

특 허 청 장

<< 안내 >>

1. 귀하의 출원은 위와 같이 정상적으로 접수되었으며, 이후의 심사 진행상황은 출원번호를 통해 확인하실 수 있습니다.
2. 출원에 따른 수수료는 접수일로부터 다음날까지 동봉된 납입영수증에 성명, 납부자번호 등을 기재하여 가까운 우체국 또는 은행에 납부하여야 합니다.
 ※ 납부자번호 : 0131(기관코드) + 접수번호
3. 귀하의 주소, 연락처 등의 변경사항이 있을 경우, 즉시 [출원인코드 정보변경(경정), 정정신고서]를 제출하여야 출원 이후의 각종 통지서를 정상적으로 받을 수 있습니다.
 ※ 특허로(patent.go.kr) 접속 > 민원서비스다운로드 > 특허법 시행규칙 별지 제5호 서식
4. 특허(실용신안등록)출원은 명세서 또는 도면의 보정이 필요한 경우, 등록결정 이전 또는 의견서 제출기간 이내에 출원서에 최초로 첨부된 명세서 또는 도면에 기재된 사항의 범위 안에서 보정할 수 있습니다.
5. 국내출원건을 외국에도 출원하고자 하는 경우에는 국내출원일로부터 일정한 기간 내에 외국에 출원하여야 우선권을 인정 받을 수 있습니다.
 ※ 우선권 인정기간 : 특허·실용신안은 12월, 상표·디자인은 6월 이내
 ※ 미국특허상표청의 선출원을 기초로 우리나라에 우선권주장출원 시, 선출원이 미공개상태이면, 우선일로부터 16개월 이내에 미국특허상표청에 [전자직교환허가서(PTO/SB/39)]를 제출하거나 우리나라에 우선권 증명서류를 제출하여야 합니다.
6. 본 출원사실을 외부에 표시하고자 하는 경우에는 아래와 같이 하여야 하며, 이를 위반할 경우 관련법령에 따라 처벌을 받을 수 있습니다.
 ※ 특허출원 10-2010-0000000, 상표등록출원 40-2010-0000000
7. 기타 심사 절차에 관한 사항은 동봉된 안내서를 참조하시기 바랍니다.

■ 논문게재 실적 : 총 14건 (예정 5건 포함)

순번	제 목	학술지	발표자	발표 일자	국가명 (SCI여부)
확정					
1	The Extracts of Sargassum fulvellum induce Pro-Apoptosis and Cell Cycle Arrest on MDA-MB-231 Human Breast Carcinoma Cells	Cancer Prevention Research Vol. 15, No. 1, 52-59, 2010	우희철, 김형락, 김군도 외 1명	2010. .04	한국 (SCIE)
2	Ethanol production from marine algal hydrolysates using <i>Escherichia coli</i> KO11	Bioresource Technology 102, 7466-7469	장호남 외 4명	2011. 04	네덜 란드 (SCI)
3	Characterization of an endo-alginate lyase, Alg7B, cloned from <i>Saccharophagus degradans</i> 2-40 for the depolymerization of alginate	Carbohydrate Polymer	김경현 외 7명	Submitted	영국 (SCI)
4	Chemical composition of <i>Capsosiphon fulvescens</i> in different habitats and harvesting periods	Journal of Applied Phycology.	김두운 외 4명	Submitted	캐나다 (SCI)
5	Effects of NADH-preferring xylose reductase expression on ethanol production from xylose in xylose-metabolizing recombinant <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Journal of Biotechnology	박용철 외 5명	Submitted	네덜 란드 (SCI)
6	Effects of overexpression of acetaldehyde dehydrogenase 6 and acetyl-CoA synthetase 1 on xylitol production in recombinant <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	New Biotechnology	박용철 외 4명	Submitted	네덜 란드 (SCI)
7	Identification and characterization of genomic fragment encoding alginate lyase genes from a metagenomic fosmid library	Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology	신태선, 우희철, 김두운 외 6명	submitted	미국 (SCI)

(계속)

순번	제 목	학술지	발표자	발표 일자	국가명 (SCI여부)
확정					
8	Feasibility of <i>Laminaria japonica</i> as a feedstock for fast pyrolysis in a bubbling fluidized-bed reactor	Bioresource Technology	서동진 외 4명	Submitted	영국 (SCI)
9	Potential of <i>Laminaria japonica</i> as a feedstock for fast pyrolysis in a bubbling fluidized-bed reactor	Bioresource Technology	서동진 외 3명	Submitted	영국 (SCI)
예정					
1	Dieckol, an isolation from <i>Ecklonia stolonifera</i> , induces apoptosis on human hepatocellular carcinoma Hep3B cells.	Nutrition and Cancer-aninternational Journal	김군도, 김형락 우희철 외 6명	심사중	미국 (SCI)
2	The Anti-Cancer Effects of <i>Laminaria japonica</i> extract on 267B1/K-ras Human Prostate Cancer Cells	Cancer Prevention Research	김군도, 김형락, 우희철 외 2명	심사중	한국 (SCIE)
3	Characterization of a recombinant alginate lyase cloned from <i>Saccharophagus degradans</i> for the hydrolysis of brown algae	Carbohydrate Polymers	김경현 외 3명	심사중	England (SCI)
4	Molecular characterization of <i>Clostridium acetobutylicum</i> hydrogenases	Molecular Microbiology	이지은 외 2명	심사중	미국 (SCI)
5	Butanol fermentation by <i>Clostridium beijerinckii</i> NCIMB 8052 using Macroalgae as substrates	Bioresource Technology	이지은 외 2명	심사중	미국 (SCIE)

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 kurume* 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 : 김군도, (☎) 608-737, 부산시 남구 대연3동 599-1
부경대학교 자연과학대학 미생물학과
Tel: 051-629-5618, Fax: 051-629-5619
E-mail: gundokim@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: gundokim@pknu.ac.kr



Ethanol production from marine algal hydrolysates using *Escherichia coli* KO11

Nag-jong Kim^{a,1}, Hui Li^a, Kwonsu Jung^a, Ho Nam Chang^{a,*}, Pyung Cheon Lee^{b,*}

^a Department of Chemical and Biomolecular Engineering (BK21 program), KAIST, 291 Daehak-ro, Yuseong-gu, Daejeon 305-701, Republic of Korea
^b Department of Molecular Science and Technology, Ajou University, Woncheon-dong, Yeongtong-gu, Suwon 443-749, Republic of Korea

ARTICLE INFO

Article history:

Received 18 February 2011
 Received in revised form 13 April 2011
 Accepted 21 April 2011
 Available online 24 April 2011

Keywords:

Ethanol
 Marine algae
 Mannitol

ABSTRACT

Algae biomass is a potential raw material for the production of biofuels and other chemicals. In this study, biomass of the marine algae, *Ulva lactuca*, *Gelidium amansii*, *Laminaria japonica*, and *Sargassum fulvellum*, was treated with acid and commercially available hydrolytic enzymes. The hydrolysates contained glucose, mannose, galactose, and mannitol, among other sugars, at different ratios. The *Laminaria japonica* hydrolysate contained up to 30.5% mannitol and 6.98% glucose in the hydrolysate solids. Ethanogenic recombinant *Escherichia coli* KO11 was able to utilize both mannitol and glucose and produced 0.4 g ethanol per g of carbohydrate when cultured in *L. japonica* hydrolysate supplemented with Luria-Bertani medium and hydrolytic enzymes. The strategy of acid hydrolysis followed by simultaneous enzyme treatment and inoculation with *E. coli* KO11 could be a viable strategy to produce ethanol from marine alga biomass.

© 2011 Elsevier Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

Marine alga biomass is a potential resource for biofuel production because algae can exhibit high productivity. Cultivation of marine algae would likely also not face the same food vs. biofuel issues that concern land-based biomass production (Singh et al., 2011). Compared with terrestrial plants, macroalgae (i.e. seaweeds) have a high water content of approximately 70–90%, a relatively high protein content of approximately 10%, and contain varying levels of carbohydrates (Park et al., 2008). Microalgae are comprised of 28–63% protein, 4–57% carbohydrates, and 2–40% lipids/oils by weight. Conversion of biomass from marine algae into ethanol could be economically feasible since some algae hydrolysates can contain more total carbohydrate and hexose sugars than some terrestrial, lignocellulosic biomass feedstock (Chynoweth, 2002; John et al., 2011; Sluiter, 2006).

The purpose of this study was to investigate the effect of pre-treating algae for ethanol fermentation by ethanogenic *Escherichia coli* KO11 (Ohta et al., 1991). We report that algal hydrolysates with a high amount of mannitol can be used as cost-effective substrates for microbial ethanol production.

2. Methods

2.1. Sources of algae and determination of their composition

Fresh brown algae, *L. japonica* and *Sargassum fulvellum*, were purchased from a seaweed market in Wando-gun, Jeollanam-do, South Korea. Dried red alga, *Gelidium amansii*, and green alga, *Ulva lactuca*, were purchased from the Agricultural and Marine Products Market at Noeun-dong, Yuseong-gu, Daejeon, South Korea. Algae were ground, sieved, and stored at –20 °C for further use.

Carbohydrate and moisture content of algae was determined using analytical methods established by the National Renewable Energy Laboratory (NREL) (Horn et al., 2000b; Sluiter, 2005).

To determine the composition of algae, dried algal biomass was finely ground with a blender, and the fraction sieved with a 35 mesh screen was collected for further use. Ash content was determined by weighing samples before and after heating in a muffle furnace at 550 °C for 12 h. Protein content was measured with the micro-Kjeldahl method using a factor of $N = 6.25$ (AOAC, 2000; method 976.05). Lipid content was determined with the Soxhlet method (AOAC, 2000; method 920.39).

2.2. Preparation of algal hydrolysates

Algae were crushed with an extractor to <0.5 cm particle size. For chemical hydrolysis, 1 g of crushed algae (dry base) was heated at 121 °C for 15 min in the presence of 10 ml of 0.05, 0.1, 0.15, 0.2, or 0.3 N Ca(OH)₂, HCl, or H₂SO₄. For enzymatic hydrolysis, acid-generated hydrolysates were adjusted to pH 5.5 with 0.05 M citrate buffer. Celluclast® 1.5L, Viscozyme® L, Novoprime® 959,

* Corresponding authors. Tel.: +82 42 350 3912; fax: +82 42 350 3910 (H.N. Chang), tel.: +82 31 219 2461; fax: +82 31 219 1610 (P.C. Lee).

E-mail addresses: hnchang@kaist.edu (H.N. Chang), pctee@ajou.ac.kr (P.C. Lee).
¹ Present address: Samsung Petrochemical Co., Ltd.

■ 학술발표 실적 : 국외 8건/국내 27건

순번	제목	학술지	박표자	발표일자	국내외
1	Characterization of [NiFe]-hydrogenase in <i>Clostridium acetobutylicum</i> ATCC 824	한국미생물생명공학회	이지은 외 3명	2010. 06	한국
2	Multi-omics approach for the elucidation of degradation and metabolism of plant cell wall and macroalgal polysaccharides by a biomass super-degrader, <i>Saccharophagus degradans</i> .	14th International Biotechnology Symposium and Exhibition.	김경현	2010. 09	이탈리아 Rimini
3	Bio-oil production from fast pyrolysis of kelp in the southern coast of Korea	19th International conference on chemical reactors	서동진 외 2명	2010. 09	오스트리아
4	The induction of pro-apoptosis and cell cycle arrest on MDA-MB-231 human breast carcinoma cells by the extracts of <i>Sargassum fulvellum</i>	한국분자세포생물학회	김군도 외 4명	2010. 10	한국
5	Extract of <i>Laminaria japonica</i> induce apoptotic cell death on 267B1/K-ras human prostate cancer cells	한국생명과학회	김형락, 김군도 외 4명	2010. 10	한국
6	Perturbation of membrane compositions in <i>Clostridium acetobutylicum</i> ATCC 824 for a higher solvent tolerance	한국화학공학회	이지은 외 2명	2010. 10	한국
7	Butanol fermentation using macroalgae as substrates	11th <i>Clostridium</i> meeting	이지은 외 2명	2010. 10	미국
8	Volatile fatty acids production from the solid residue <i>Laminaria japonica</i>	KSBB Fall Meeting & International Symposium	장호남 외 2명	2010. 10	한국

(계속)

순번	제목	학술지	박표자	발표일자	국내외
9	Anaerobic digestion of red algae (<i>Gelidium amansii</i>) for volatile fatty acids production	KSBB Fall Meeting & International Symposium	장호남 외 2명	2010. 10	한국
10	바이오매스의 조성성분에 따른 급속열분해 공정으로 생산된 오일의 특성	한국화학 공학회	서동진 외 4명	2010. 10	한국
11	Volatile Fatty Acid Production by Anaerobic Fermentation Using Sewage Sludge	한국화학 공학회	우희철 외 4명	2010. 10	한국
12	Mixed VFAs Production using Sewage Sludge from Kelp under Anaerobic Fermentation	한국청정 기술학회	우희철 외 4명	2010. 11	한국
13	Metabolomics of Saccharophagus degradans, the super-degrader of marine biomass.	한국미생물 연합회	김경현	2010. 10	한국
14	Methodology development and implementation of microbial metabolomics	한국생명 과학회	김경현	2010. 10	한국
15	해조류 유래 비발효성당의 효소전환 기술	해양바이오 에너지 국제포럼	김경현.	2010. 11	한국
16	Anti-inflammatory activity of lipophilic fraction from <i>Laminaria japonica</i> in the LPS-treated RAW 264.7 macrophages	한국수산 과학회	김형락 외 6명	2010. 11	한국
17	Volatile fatty acids production from marine biomass	유기성 자원학회	장호남 외 3명	2010. 11	한국
18	Production of Volatile Fatty Acids by Extractive Anaerobic Digestion of Laminaria	한국생물 공학회	윤현희 외 2명	2010. 11	한국

(계속)

순번	제목	학술지	박표자	발표일자	국내외
19	Hydrolysis yield from Laminaria by Subcritical Water Hydrolysis	한국해양 바이오학회	전병수 외 1명	2010. 11	한국
20	Eco-separation Technology for Bio-active Materials from Marine Resources	한국해양 바이오학회	전병수	2010. 11	한국
21	Short-chain Fatty acids from Kelp Using Sewage Sludge	한국화학 공학회	우희철 외 4명	2010. 12	한국
22	Economic Evaluation of heterotropic Microbial lipid (C. albidus) production using low-cost volatile fatty acids in SC-HCDC bioreactor system	BIT's 1st Annual World Congress of Bioenergy	장호남 외 3명	2011. 04	중국
23	Microbial production of fuels and chemicals from macro algae	한국 생물공학회	박용철	2011. 04	한국
24	Study on the Thermal Stability of the Bio-Materials Produced from Laminaria by Subcritical Water Hydrolysis	JSFS 2011	전병수 외 2명	2011. 03	일본
25	Effect of Ammonia Pretreatment in Anaerobic Digestion of Red Algae (Gelidium Amansii) for Volatile Fatty Acids Production	한국생물공학 회	장호남 외 3명	2011. 04	한국
26	The Reaction Condition of Hydrogenolysis of Esters to Mixed-Alcohols by Using Cu-Based Catalyst	한국생물공학 회	장호남 외 3명	2011. 04	한국
27	The laminaria effect on the hardwood pulp reinforced polypropylene biocomposites	에너지공학회	한성욱 외 3명	2011. 04	한국

(계속)

순번	제목	학술지	박표자	발표일자	국내외
28	해조류의 용매 추출	한국화학공학회	이철우 외 4인	2011. 04	국내
29	해양식물의 용매 추출	한국공업화학회	이철우 외 4인	2011. 05	국내
30	A high throughput fermentation process for high volume low value products	Asian Congress on Biotechnology	장호남	2011. 05	중국
31	Screening of genomic fragment encoding alginate lyase genes using a metagenomic fosmid library constructed from wetland microflora	International meeting of the microbiological society of Korea	김두운 외 8인	2011.05	한국
32	협기성 소화에 의한 bench scale 유기산 생성 공정	한국청정기술 학회	김정숙, 우희철 외 3인	2011.05	한국
33	Volatile Fatty Acid platform for biofuel-biorefinery	BioECO-2011	장호남	2011. 06	중국
34	Identification and characterization of genomic fragment encoding alginate lyase genes from a metagenomic fosmid library	한국식품 과학회	김두운, 신태선, 우희철 외 6인	2011.06	한국
35	Chemical composition of <i>Capsosiphon fulvescens</i> in different habitats and harvesting periods	4 th Congress of the International Society for Applied Phycology	김두운, 신태선 외 2인	2011.06	캐나다

부록 E 언론 홍보

구분	발표일자	제 목
보도 자료	2010. 12. 15	해조류 바이오매스 대량생산 및 통합활용 워크숍 개최 - 청정연료 혼합알콜 생산의 상용화 시동 - 해조류 유래 신소재 및 항장 시제품 생산 착수 - 비식용 해조류 대량생산 기술 연구 착수
	2010. 12. 27	해조류 바이오매스 통합 활용을 위한 대량생산 기술개발 체제 출범 - 외해 해조류 대량양식 시험가동 및 자동화 개념설계 착수 - 준파일럿 규모의 유기산 및 고부가가치 바이오소재 시제품 생산
	2011. 06. 30	미국, 일본의 선진 바이오에너지 기업 국내 해조류 에너지화 기술수준 인정, 파트너쉽 원해 - 해조류 바이오매스 대량생산 및 바이오에너지 국제심포지엄 개최 - 미국을 비롯 해외 네트워크 본격 가동 - 해외 연구진과의 상호보완적 관계 정립의 계기
	2011. 07. 06	국내 해조류 대량생산 및 에너지화 기술수준 인정, 국제협력구축 기틀 마련 - 2차년도 연구결과 유기산 생산수율 약 2배 증가 성공 - 국내외 기관과 실질적 MOU 체결 추진(미국-한국-일본)
방송 매체	2011. 05. 20	- KBS 9시 뉴스 부산방송
	2011. 07. 05	- KBS 9시 뉴스 목포방송 - MBC 9시 뉴스 목포방송



KBS 9시 뉴스 부산방송
2011.5.20



KBS 9시 뉴스 목포방송
2011.7.5



MBC 9시 뉴스 목포방송
2011.7.5

건조 다시마에서 바이오 에너지 추출 성공

부경대 우희철 교수팀
휘발성 유기산, 희귀 금속 등
"1년 내 생산수율 80% 이룰 것"

오상준 기자 lettbe@kookje.co.kr

해조류에서 자동차 연료를 비롯한 청정 바이오 에너지를 뽑아내는 연구를 부산이 주도하고 있다. 그 중심에는 부경대 용당캠퍼스 청정생산기술연구소가 있다. 이 대학 화학공학과 우희철(55) 교수와 연구원들은 최근 건조 다시마에서 휘발성 유기산, 바이오 오일은 물론 부산물로 리튬 우라늄 같은 희귀금속을 추출해내는 데 성공했다. 우 교수는 "건조 다시마 1t에서 휘발성 유기산 400kg(혼합알코올을 280kg), 바이오 오일 95kg, 소량의 희귀금속을 생산함에 따라 바이오 에너지 생산수율을 55%까지 끌어올렸다"며 "1년 안에 생산수율이 70~80%에 이를 것"이라고 말했다. 초산 등이 포함된 휘발성 유기산은 기초 화학연료로 사용될 수 있다. 이를 촉매로 이용해 환원 반응을 거치면 혼합알코올로 전환되는데, 이는 기존 에탄올보다 우수한 가솔린 자동차



부경대 화학공학과 우희철 교수가 용당캠퍼스 청정생산기술연구소에서 건조 다시마를 활용해 휘발성 유기산을 추출하는 방법을 설명하고 있다. 김동희 기자 kimsh@kookje.co.kr

연료로 쓸 수 있다.

우 교수는 농림수산식품부에서 수행하는 해조류를 그린 에너지로 만드는 '해조류 바이오매스 연구'의 총책임자다. 우 교수는 다양한 에너지원을 동시에 생산하는 '해조류 바이오매스 에너지화 통합공정 원천기술'을 세계 최초로 개발했다. 미국은 아직 해조류에서 에탄올, 부탄올 등 한 종류의 에너지를 생산하는 수준이다. 이 연구에는 국립수산물연구원, 한국과학기술연구원(KIST) 등 14개 기관 25명의 교수 및 석·박사가 참여하고 있다.

과제는 경제성을 확보하기 위해 바

이오 에너지 원료인 해조류를 대량 생산하는 것이다. 우 교수는 "현재 kg당 4000원선인 건조 다시마 가격으로는 경제성이 부족하다"며 "먼 바다에 자동화생산시스템을 구축해 고밀도 대량 양식으로 해조류 가격을 10분의 1 가량 낮추면 경제성을 갖춰 상용화가 가능하다"고 설명했다. 농림수산식품부는 이를 위해 기장, 통영, 완도에서 모자반 등 4종의 비식용 해조류에 대한 양식실험을 하고 있다. 이를 통해 외해 대량양식에 적합한 종을 찾아 해조류 바이오매스 생산단지 클러스터를 구축할 계획이다.

국내 해조류 대량생산 및 에너지화 기술수준 인정, 국제협력체 제 구축 기틀 마련

차년도 연구결과 해조류 유기산 생산수율 약 2배 증가 성공

2011년 07월 14일 (목) 08:52:53

안희민 기자 eewn@chol.com

농림수산식품부(장관 서규용)는 7월 3일부터 5일까지 전남 완도군 장보고기념관에서 「해조류 바이오매스 대량생산 및 바이오에너지 국제심포지엄」 개최를 통하여, 우리나라 해조류 바이오매스 활용이 세계적인 수준에 있음을 다시금 확인했다.

이번 심포지엄은 우리나라 해조류 주 생산지인 완도군에서 개최됐고, 미국과 일본의 선진 해조류 바이오에너지 분야관련 CEO와 학자를 초청, 현재 연구 성과를 및 기술내용의 수준을 짚어보는 장으로 활용됐다.

특히, 바이오에너지 선진국인 미국 기업들의 해조류 원료 확보 방안 및 바이오에너지 기술개발 수준과 일본의 해조류 고부가가치화 기술을 국내에서 최초로 공개했으며, 현재 농림수산식품부 등 국내 연구기관에서 추진하고 있는 해조류 바이오매스 확보 및 에너지화 기술개발 수준을 홍보하였다. 또, 국제협력 연구를 위해 MOU를 체결하기로 합의했다.

미국의 바이오 아키텍처협사는 칠레에서의 40헥타르 규모의 해조류 시범 생산과 이를 이용한 에너지 생산기술에 대해 발표했으며, 미국 서스테이너블즈사는 “베트남 메콩델타에서의 기회와 도전”이라는 주제로 메콩델타 지역을 활용한 해조류의 생산 및 이를 이용한 에너지 생산 계획을 발표했다.

농림수산식품부에서 연 10억원을 지원받아 연구과제를 수행하고 있는 「해조류 바이오매스 연구그룹」(책임자 : 부경대 우희철 교수)은 “해조류 바이오매스로부터 청정연료와 고부가 가치소재를 동시에 생산하는 통합공정 원천기술”에 대한 2차년도 연구성과를 발표했고, 국내기업 (주)바이올시스템즈는 “해조류로부터 바이오 알코올 생산”에 대한 연구성과를 발표했다.

해조류 바이오에너지 국제심포지엄 개최

입력시간 : 2011. 06.30. 00:00



해조류 양식장.

7월 4일부터 이틀동안 완도읍 장보고기념관 일원

해양생물 활성화 기대

완도군과 부경대학교가 공동으로 주최하는 '해조류 바이오에너지 국제심포지엄'이 내달 4일 완도에서 열린다.

완도군은 29일 "해양생물을 이용한 '해조류 바이오매스 대량생산 및 바이오에너지'란 주제로 국제심포지엄이 내달 4일부터 양일간 완도읍 장짜리에 위치한 장보고기념관 일원에서 개최된다"고 밝혔다.

이번 심포지엄은 농림수산식품부가 바이오에너지(Bio-Energy) 개발 사업을 추진, 부경대학교 청정기술연구소가 연구사업의 일환으로 국내외 해조류 바이오에너지 관련 CEO와 학계가 모여 그동안의 성과를 발표하고, 상호간 정보를 교환하는 자리를 마련하기 위해 열린다.

이날 심포지엄은 미국의 Algen Sustainables사의 경영자인 James Coke씨를 비롯한 외국 전문가 3명과 국내 바이오에너지 전문분야 대학교수 6명이 국내외 해조류 대량생산 방안과 바이오연료 생산기술 현황 등에 대한 발표와 토론으로 이뤄진다.

완도군은 부경대학교와 인하대학교, 조선대학교 등 학계와 연구소를 통해 해양바이오 에너지 개발에 협력기관으로 참여하고 있으며, 김과 미역·다시마 등 해조류를 이용한 바이오에너지 타운을 조성한다는 전략을 세웠다.

완도군 관계자는 "완도해역에서 연간 25만톤의 해조류를 생산, 전국에서 60~70%정도 차지한다"며 "완도에서 열린 국제 규모의 해조류 바이오에너지 관련 연구 사례발표를 계기로 해양생물 산업이 활성화되기를 기대한다"고 말했다.

완도=조성근기자 완도=조성근기자의 다른 기사 보기

‘해조류 바이오에너지 국제심포지엄’

각계 전문가 참석, 완도 장보고기념관서 열려

2011년 07월 05일 (화) 16:01:48

완도/김재일기자 ✉ jikim@shinailbo.co.kr



해조류 바이오에너지 국제심포지엄이 지난4일부터 2일간에 걸쳐 완도군 장보고기념관 일원에서 열렸다.

심포지엄은 완도군과 부경대학교가 공동으로 주관하고 1백여명의 국내외 해조류 바이오에너지 관련 CEO와 학자들이 참석했으며, 농림수산식품부의 바이오에너지 개발사업을 추진하는 부경대학교 청정생산기술연구소가 그동안의 성과를 발표하고 국내외 정보를 교환하는 자리가 되었다.

이날 발표는 미국의 ALGen Sustainables사의 경영자인 James Coke씨를 비롯한 외국 전문가 3명과 국내 바이오에너지 전문 대학교수 등이 했으며, 국내외 해조류 대량생산 방안과 바이오연료 생산기술 현황 등의 주제로 이루어졌다.

미국의 James Coke씨는 매콩델타에서의 기회와 도전이라는 주제로 육상의 수생 바이오매스에 대해 소개했으며, 일본 홋카이도 대학 Kazuo Miyashita 교수는 기능성 식품 성분인 갈조류 지질에 대해 발표를 했다.

국내에서는 부경대학교 우희철 교수의 한국의 해조류바이오매스 기술현황과 연구개발, 경상대학교 김남길 교수의 한국의 다시마 대량생산체계, 한국과학기술연구소 청정에너지센터 서동진박사의 해조류의 빠른 열분해와 합기성 소화를 통한 청정역체연료 생산 등에 대한 발표가 이어졌다.

이날 심포지엄에 참석한 김종식 완도군수는 “완도에서 생산되는 연간 해조류 생산량은 25만톤으로 전국에서 가장 많은 양이 생산되고 있다”면서 “최적의 지리적 여건을 활용 해조류 바이오에너지 타운을 조성해 나가겠다”고 말했다.

이 밖에도 둘째날에는 완도군의 해조류 생산현장을 직접방문 체험하기도 했다.

세계화로 가는 우리 해조류 바이오매스 기술

[97호] 2011년 07월 07일 (목)

수협중앙회



▲ 바다숲 해조류

**미국·일본 선진 바이오에너지 기업 국내 해조류 에너지 기술 인정
파트너십 희망, 워크숍 개최 미국 등 해외 네트워크 구성 본격 가동**

미국과 일본의 선진 바이오에너지 기업들이 우리나라 해조류 에너지화 기술 수준을 인정, 파트너십을 원하고 있는 것으로 알려졌다. 이에 따라 국내외 해조류바이오매스 에너지화 연구동향과 연구성과를 발표하는 심포지엄이 개최된 주목된다.

이번 심포지엄에서는 미국 등 바이오에너지 선진 기업의 해조류 원료 확보방안과 에너지 기술개발수준이 국내 최초로 공개됐다. 농림수산식품부는 7월 3일부터 5일까지 전남 완도군 장보고기념관에서 ‘해조류 바이오매스 대량생산 및 바이오에너지 국제심포지엄’을 개최했다고 밝혔다.

이번 심포지엄은 해조류 주 생산지인 완도군과 해조류바이오매스 에너지화 연구를 총괄하고 있는 부경대학교 청정생산기술연구소가 공동으로 주관하는 것으로 국내외 해조류 바이오에너지 관련 기업의 CEO와 학자들을 대거 초청해 그 동안의 연구 성과를 발표하고 국내외 정보를 상호 공유하기 위하여 마련됐다.

특히 바이오에너지 선진국인 미국 기업들에서의 해조류 원료 확보 방안과 에너지 기술개발 수준을 국내 최초로 공개, 이를 토대로 농림수산식품부 등 국내 연구기관에서 추진하고 있는 해조류바이오 에너지 관련 연구 결과와 비교함으로써 국내 상업화를 보다 앞당길 수 있는 계기가 될 것으로 기대된다.

주요 참석자는 미국의 바이오에너지 기업의 알젠 서스테인어블즈사(Aigen Sustainable)의 경영자인 제임스 콕(James Coke), 바이오 아키텍처 랩사(Bio Architecture Lab)의 공동 설립자이자 경영자인 유키 카시야마(Yuki Kashiyama)와 일본 홋카이도(Hokkaido)대학의 가즈오 미야시타(Kazuo Miyashita) 교수 등이다.



잘사는 농어촌 행복한 국민

보도자료

제공일 : 2010. 12. 15.
제공자 : 농림수산식품부 자원환경과
과 장 : 박 범 수
사무관 : 차 태 황
전 화 : 02-500-2381
쪽 수 : 2P
별첨자료 : 있음(3P)

이 자료는 2010년 12월 16일 조간 이후에 보도하여 주시기 바랍니다.

해조류 바이오매스 대량생산 및 통합 활용 워크숍 개최

- 청정연료 혼합알콜 생산의 상용화 시동
- 해조류 유래 신소재 및 망장 시제품 생산 착수
- 비식용 해조류 바이오매스 대량생산기술 연구 착수

- 농림수산식품부는 『해조류 바이오매스 대량생산 및 통합 활용』 워크숍을 12월 16일(목)부터 17일(금)까지 이틀간 제주도 서귀포 KAL 호텔에서 개최한다고 밝혔다.
- 이번 워크숍은 부경대 청정생산기술연구소가 주관이 되어 관련분야 산학관련 전문가들이 참여하며 연구결과의 공유와 질적 수준 향상을 위해 개최하는 것이다.
- 1차년도 연구결과('09.6~'10.4)에서는 세계 최초로 해조류 바이오매스로부터 청정연료와 고부가가치 소재를 동시에 생산하는 통합공정 원천기술을 발표한 바 있다.
- 2차년도 연구내용은 “에너지화 수율 향상, 바이오소재 고부가가치 시제품 생산, 준파일럿 규모의 유용물질 및 혼합알콜 생산공정 구축” 등 상용화에 초점을 둔 연구를 수행할 예정이다.

- 섹션별 발표 주제는 1부 해조류 대량생산기술, 2부 해조류 그린에너지개발, 3부 통합공정 및 제품개발에 대한 것이며, 4부 종합토론에서 농식품부 관계자와 자문위원들이 연구내용의 적합성에 대해 논의한다.
- 본 연구는 온실가스 저감 효과를 통한 기후변화대응에 기여할 뿐만 아니라 고부가가치 유용물질의 활용도 가능해 새로운 녹색 수산산업 창출에도 기여할 것으로 기대된다.
- 한편, 이번 워크숍에는 농식품부에서 수습중인 새내기 공무원들이 대거 참여(16명)할 예정인데 해조류바이오매스의 신성장동력화 방안에 대한 열띤 토론이 기대된다.

<별첨>

2010년 농림수산물부 기반구축연구

해조류 바이오매스 대량생산 및 통합 활용 워크숍

□ 개요

- 일 시 : 2010년 12월 16일(목) - 17일(금)
- 장 소 : 제주도 서귀포 KAL 호텔
- 주 최 : 농림수산물부
- 주 관 : 부경대학교 청정생산기술연구소
- 프로그램 :

12월 16일(목)			
구분	시간	발표주제	발표자(소속 및 직위)
개회	14:00-14:30	등록	
	14:30-14:40	인사말	어업자원관
	14:40-14:50	총괄보고	우희철 교수(부경대)
1부	14:50~16:00	대량 생산 기술	국립수산물과학원 경상대, 부경대 전남대, 단국대
2부	16:00~17:40	그린에너지 개발	한국과학기술연구원 한국과학기술원 고려대, 국민대 전남대, 경원대 성균관대
3부	17:40~18:50	통합공정 및 제품개발	한국에너지기술연구원 부경대, 충남대 한밭대
토의 및 정리	18:50~22:00	세부과제별 자유토론	
12월 17일(금)			
4부	09:00~11:00	종합토론	

<참고자료 1>

□ 1차년도 연구결과('09.6~'10.4)

◇ 통합적 활용 기술에 의한 고부가 유효성분 및 청정연료 생산

- 건조 다시마 1톤(기준)을 가지고, 용매추출하여 부가가치가 높은 유용 성분인 후코잔틴 및 폴리페놀 추출물 5kg을 회수하였고, 남은 고형물 975kg을 미생물로 무산소 발효시켜 혼합유기산 233kg(혼합알코올 전환시 143kg)을 생산하였다. 유기산은 분리정제해서 화학원료로도 사용할 수 있고, 혼합알코올(에탄올, 프로판올, 부탄올 등이 주된 성분임)로 간단한 화학적 처리에 의해 전환되어 자동차의 청정연료로 사용될 수 있다.
- 혼합유기산을 얻은 후 남은 슬러지 230kg을 급속열분해시켜 바이오 오일 81kg을 얻었다. 해조류에서 얻어진 바이오오일은 목질계에서 얻어지는 오일보다 가솔린 및 디젤과 유사한 구조의 탄화수소로 구성되어 있어 화학적처리 공정을 거쳐 석유대체 연료로 사용될 수 있다. 또한 이 과정에서 부가적으로 에너지원 또는 화학원료로 사용 가능한 탄소분말 83kg과 바이오가스 60kg를 얻었다.

◇ 산업용 희귀금속도 회수 가능

- 최종적으로 남은 물질을 성분 분석한 결과 희귀금속 리튬(3g)과 우라늄(0.4g) 등이 농축 함유되어 있음을 확인하였다. 이는 앞으로 본 연구 프로그램속의 대량생산과 연계시킴으로서 희귀금속 자원의존국에서 자원자립국으로 도약하는데 일조할 것이다.

◇ 해조류 구성 당류 데이터베이스 구축

- 이들 결과는 앞으로 해조류의 통합적 활용을 위한 데이터베이스 구축을 진행하여 국내 거대해조류 10여종에 대한 구성성분 및 조성을 조사 파악하였으며, 앞으로는 해외종에 대해서도 데이터베이스화 함으로서 국가 해조류 바이오매스 자원 확보 및 활용에 이용될 예정이다.

<참고자료 2>

해조류 바이오매스 유용성분 및 에너지 회수 통합공정 개요도



해조류 바이오매스 확보 및 통합적 활용 방안





잘사는 농어촌 행복한 국민

보도자료

제공일 : 2010. 12. 21

제공자 : 농림수산식품부 자원환경과

과 장 : 박 범 수

사무관 : 차 태 황

전 화 : 02-500-2381

쪽 수 : 2P

별첨자료 : 있음(3P)

이 자료는 2010년 12월 22일 조간 이후에 보도하여 주시기 바랍니다.

해조류 바이오매스 통합 활용을 위한 대량생산 기술개발 체제 출범

- 외해 해조류 대량양식 시험가동 및 자동화 개념설계 착수
- 존파일럿 규모 유기산 및 고부가 바이오소재 시제품 생산

- 농림수산식품부는 12월 16일(목)부터 17일(금)까지 이틀간 제주도 서귀포 KAL 호텔에서 『해조류 바이오매스 대량생산 및 통합 활용』 워크숍을 통해 2차년도 연구성과 목표 및 계획을 발표하였다.
- 부경대 청정생산기술연구소(연구책임자 우희철 교수)가 주관한 이번 워크숍을 통해 산학관연의 관련분야 전문가들이 참여하여, 현재까지 연구성과를 토론하고 향후 연구방향에 대해 조율하였다.
- 2차년도의 핵심 연구내용으로, 바이오매스용 해조류를 안정적으로 생산 공급하기 위한 대량생산기술의 연구가 본격적으로 시작된다.
- 우리나라 서남해 인근 해역에서 외해(外海) 대량양식이 시험가동되며, 외해에서 잘자라는 비식용 해조류를 포함하여 최적의 해조류 종을 선별한다고 밝혔다. 또한, 외해 자동화 대량생산 시설 및 자동화 이송시스템 개발 연구를 수행한다.

- 해조류를 통합활용 하기 위한 기술개발연구는 1차년도에 실험실 수준에서 벗어나 준파일럿 규모로 유기산 300kg/톤(갈조류 1톤 기준)을 생산하고, 바이오소재 고부가가치 시제품 제작을 통해 가시적인 성과를 선보일 것이라고 밝혔다.
- 농식품부는 지난 5월 10일 발표한 『해조류 바이오매스의 그린 에너지화 및 통합적 활용』 기반구축 1차년도 연구를 통하여, “해조류 바이오매스로부터 청정연료와 고부가가치 소재를 동시에 생산하는 통합공정 원천기술을 국내외 최초로 확보한 바 있다.
- 이러한 연구를 통해 얻어질 성과물은 지적재산권으로 확보 (특허 8건, 논문 16편)할 예정이며, 국제심포지엄 개최 및 국제학술지 게재를 통하여 해조류 바이오매스 통합활용의 주도권을 확보할 계획이다.
- 본 연구는 장기적으로 국가핵심전략 중 하나인 탄소배출저감에 기여할 뿐만 아니라 수산 및 바이오분야의 새로운 녹색산업 창출에도 기여할 것으로 기대 된다.

<참고자료 1>

해조류 바이오매스 유용성분 및 에너지 회수 통합공정 개요도



해조류 바이오매스 확보 및 통합적 활용 방안



<참고자료 2>

『해조류 바이오매스의 그린에너지화 및 통합적 활용』 기반구축
1차년도('09.6~'10.4) 연구성과

- ◇ 통합적 활용 기술에 의한 고부가 유효성분 및 청정연료 생산
 - 건조 다시마 1톤(기준)을 가지고, 용매추출하여 부가가치가 높은 유용성분인 후코잔틴 및 폴리페놀 추출물 5kg을 회수
 - 남은 고형물 975kg을 미생물로 무산소 발효시켜 혼합유기산 233kg(혼합알코올 전환시 143kg)을 생산
 - * 유기산은 분리정제해서 화학원료로도 사용할 수 있고, 혼합알코올(에탄올, 프로판올, 부탄올 등이 주된 성분임)로 간단한 화학적 처리에 의해 전환되어 자동차의 청정연료로 사용 가능
 - 혼합유기산을 얻은 후 남은 슬러지 230kg을 급속 열분해시켜 바이오오일 81kg 생산
 - * 해조류류에서 얻어진 바이오오일은 목질계에서 얻어지는 오일보다 가솔린 및 디젤과 유사한 구조의 탄화수소로 구성되어 있어 화학적 처리 공정을 거쳐 석유대체 연료로 사용될 수 있으며, 또한 이 과정에서 부가적으로 에너지원 또는 화학원료로 사용 가능한 탄소분말 83kg과 바이오가스 60kg를 생산
- ◇ 산업용 희귀금속도 회수 가능
 - 최종적으로 남은 물질을 성분 분석한 결과 희귀금속 리튬(3g)과 우라늄(0.4g) 등이 농축 함유되어 있음을 확인하였으며, 이는 앞으로 본 연구 프로그램속의 대량생산과 연계시킴으로서 희귀금속 자원의존국에서 자원자립국으로 도약하는데 일조할 것으로 기대

◇ 육상 목질계에 비하여 충분히 경제성이 있음을 확인

- 이러한 가시적 결과를 바탕으로, 기존에 발표된 해조류 바이오에탄올 생산 결과와는 크게 다른 해조류 바이오매스 통합적 활용공정을 구축하였으며, 해조류가 육상 목질계에 비하여 충분히 경제성이 있다는 확신을 가질 수 있도록 하였다.



잠자는 농어촌 행복한 국민

보도자료

제공일 : 2011. 6. 30.
제공자 : 농림수산식품부 자원환경과
과 장 : 박 범 수
서기관 : 차 태 황
전 화 : 500-2389
쪽 수 : 5P
별첨자료 : 있음(3P)

이 자료는 2011년 7월 1일 조간 이후에 보도하여 주시기 바랍니다.

미국,일본의 선진 바이오에너지 기업 국내 해조류 에너지화 기술 수준 인정, 파트너십 원해

- 해조류 바이오매스 대량생산 및 바이오에너지 국제심포지엄 개최
- 미국을 비롯 해외 네트워크 구성 본격 기동
- 해외 연구진과의 상호 보완적 관계 정립의 계기

《 주 요 내 용 》

- ◇ 국내외 해조류바이오매스 에너지화 연구동향과 연구성과 발표
- ◇ 미국 등 바이오에너지 선진 기업의 해조류 원료 확보방안과 에너지 기술개발수준 국내 최초 공개

※미국의 알젠 서스테이너블즈사 (Algen Sustainables)의 경영자 제임스 콕 (James Coke), 미국 바이오 아키텍처 랩사(Bio Architecture Lab)의 경영자 유키 카시야마(Yuki Kashiyama), 일본 홋카이도(Hokkaido) 대학 가즈오 미야시타(Kazuo Miyashita) 교수

- 농림수산식품부(장관 : 서규용)는 7월 3일부터 5일까지 전남 완도군 장보고기념관에서 『해조류 바이오매스 대량생산 및 바이오에너지 국제심포지엄』을 개최한다고 밝혔다.(참고자료 1)

- 이번 심포지엄은 해조류 주 생산지인 완도군과 해조류바이오 매스 에너지화 연구를 총괄하고 있는 부경대학교 청정생산기술연구소가 공동으로 주관하는 것으로 국내외 해조류 바이오 에너지 관련 기업의 CEO와 학자들을 대거 초청하여 그 동안의 연구 성과를 발표하고 국내외 정보를 상호 공유하기 위하여 마련되었다.
- 특히, 바이오에너지 선진국인 미국 기업들에서의 해조류 원료 확보 방안과 에너지 기술개발 수준을 국내 최초로 공개하며, 이를 토대로 **농림수산식품부** 등 국내 연구기관에서 추진하고 있는 해조류바이오 에너지 관련 연구 결과와 비교함으로써 국내 상업화를 보다 앞당길 수 있는 계기가 될 것으로 기대된다.
- 주요 참석자는 미국의 바이오에너지 기업인 알젠 서스테이너블즈사(Algen Sustainable)의 경영자인 제임스 콕(James Coke), 바이오 아키텍처 랩사(Bio Architecture Lab)의 공동 설립자이자 경영자인 유키 카시야마(Yuki Kashiya)와, 일본 홋카이도(Hokkaido)대학의 가즈오 미야시타(Kazuo Miyashita) 교수 등이며 미국과 일본의 해조류 대량생산 및 바이오에너지 관련 기술 및 산업 현황에 대해 발표하게 된다.
- 미국의 바이오 아키텍처랩사는 칠레에서의 40헥타르 규모의 해조류 시범 생산과 이를 이용한 에너지 생산기술에 대해 발표할 예정이며, 미국 서스테이너블즈사는 “베트남 메콩델타

에서의 기회와 도전”이라는 주제로 메콩델타 지역을 활용한 해조류의 생산 및 이를 이용한 에너지 생산 계획을 발표할 예정이다.

- 한편, 국내 바이오에너지 연구팀으로는 **농림수산식품부** 연구과제를 수행하고 있는 『해조류 바이오매스 연구그룹』(책임자 : 부경대 우희철 교수)에서 “해조류 바이오매스로부터 청정연료와 고부가 가치소재를 동시에 생산하는 통합공정 원천기술”에 대한 연구 성과를 발표하며, 바이올시스템즈에서 “홍조류로부터 바이오 알콜 생산”에 대한 연구성과를 발표한다.
- 부경대 『해조류 바이오매스 연구그룹』은 지난해 일괄공정으로 다종류의 에너지를 동시 생산하는 “해조류바이오매스 에너지화 통합공정 원천기술”을 세계 최초로 개발하여 경제성 확보 가능성을 제시한 바 있다. 금년도 가시적 성과로는 건조 다시마 1톤으로부터 휘발성 유기산 350kg, 바이오오일 95kg을 생산하는 데 성공함으로써, 전년대비 바이오에너지 생산수율을 약 50%까지 향상시키는 공정을 구축하였다.(참고자료 2)
- 또한, 바이오에너지 원료로서의 해조류를 대량생산하기 위하여 모자반 외 3종의 비식용 해조류를 완도를 비롯한 기장과 통영에서 양식실험을 행하고 있으며, 에너지원이 될 수 있는 대상종과 고밀도 양식방법을 개발하는 등, 해조류 바이오매스 생산단지 클러스터를 구축해 나가고 있다. (참고자료 3)

- (주)바이올시스템즈는 동남아에서 생산되는 홍조류(우무가사리)에서 바이오에탄올을 생산한 바 있으며 현재 전남 고흥에서 대규모 현장 실험(pilot plant)을 실시하고 있다. 또한, 사탕수수과 옥수수 등과 같은 대표적인 육상 바이오매스와 해양 바이오매스와의 에탄올 생산 경제성 검토를 하고 있다.
- 농림수산식품부 관계자는 앞으로 해조류바이오매스 통합매스와 에너지화에 대한 국제간 정보공유와 인적네트워크 확대를 위하여 국내외 석학과 관련기업이 참여하는 국제 **심포지엄을 매년** 정례적으로 개최할 계획이라고 밝혔다.
- 이러한 노력은 향후 국가 에너지 자립 기반구축 및 온실가스 저감 효과를 통한 기후변화대응에 선제적으로 대처할 수 있는 초석이 될 뿐 아니라, 유용물질의 고부가가치화를 통해 새로운 녹색산업 창출에 기여할 것으로 기대된다.
- 농림수산식품부에서 수행하고 있는 해조류 바이오매스관련 사업은 비식용 해조류의 통합적 활용을 통해 그린에너지 생산 및 유용 활성 물질의 고부가가치화 창출하기 위한 기술개발에 그 목적이 있다.
- 해조류 바이오매스는 육상 바이오매스(특히, 옥수수, 목질계 등)와 경쟁하지 않는 재생에너지 자원임과 동시에 고부가가치 산업을 창출하는 “블루오션”이 될 수 있다.
- 현재 영국, 미국, 일본 등 선진국들도 본 연구와 유사한 기술

개발 프로그램을 계획하고 바이오에너지 시장을 조기 선점하기 위하여 정부와 기업에서 막대한 예산을 투입하고 있는 것으로 알려지고 있다.

- 심포지엄에 참석한 과학자들은 현재 본 연구 프로그램이 세계적으로 선도적인 위치를 계속 유지하면서 원천기술의 조기 확보와 상용화를 앞당기기 위해서는 정부의 전폭적인 연구재원 지원이 절실하다는 입장이며
- **농림수산식품부** 관계자는 앞으로도 해조류바이오매스 통합활용 기술의 조기 상용화 실현을 위하여 지속적으로 예산을 확대할 계획이라고 밝혔다.

<참고자료 1>

□ 해조류 바이오매스 대량생산 및 바이오에너지 국제심포지엄

(2011년 7월 4일)

시 간	주 제	발 표
08:30~09:00	등 록	
09:00~09:10	개 회 사	
09:10~09:30	축 사	
Session 1	좌 장	오경근 교수 (단국대학교)
09:30~10:20	홍조류로부터 바이오알콜 생산	신명교 박사 (바이올시스템스)
10:20~11:10	거대조류로부터 재생가능한 연료와 화합물 생성을 위한 생물합성	Mr. Yuki Kashiya (BAL Chile 바이오 설계연구소 CEO, 미국)
11:10~11:20	휴 식	
11:20~12:10	연안 자생 바이오매스의 활용 (매콩델타에서의 기회와 도전)	Mr. James Coke (Algen Sustainable, CEO, 미국)
12:10~13:30	중식	
Session 2	좌 장	김헌태 교수 (부경대학교)
13:30~14:20	건강 기능소재로서의 갈조류	Kazuo Miyashita 교수 (홋카이도 대학, 일본)
14:20~14:40	한국의 해조류 바이오매스 기술현황과 연구개발 계획	우희철 교수 (부경대학교)
14:40~15:00	한국의 다시마 대량생산 기술 개발	김남길 교수 (경상대학교)
15:00~15:10	휴 식	
Session 3	좌 장	박용철 교수 (국민대학교)
15:10~15:30	해조류의 생물학전 전환공정 개발	김경현 교수 (고려대학교)
15:30~15:50	기능성 식품원으로서 해조류 이용	김형락 교수 (부경대학교)
15:50~16:10	급속 열분해 및 혐기성 소화를 이용한 해조류의 바이오오일 생산기술 개발	서동진 박사 (KIST, 청정에너지센터)
16:10~17:00	토 론	좌장: 김형락 교수 (부경대학교)

International Symposium on Seaweed Biomass Production & Bioenergy

July 3-5, 2011 / ChangPoGo Memorial Hall, Wando, Korea

- Supported by : Ministry for Food, Agriculture, Forestry and Fisheries
- Hosted by : The Institute of Cleaner Production Technology, Pukyong National University, Wando County

Program

Date	Time	Subject	Lecturer
7. 3	18:30~20:30	- Welcome Reception	
	08:30~09:00	- Registration	
	09:00~09:10	- Opening Remark	
	09:10~09:30	- Congratulatory Remark	
	Session 1	Chairman	Dr. Kyeongkeun Oh (Prof. Dankook University)
	09:30~10:20	- Production of Bioethanol from Macro Red Algae	Dr. Myung Kyo Shin (Vice-President, BiolSystems)
	10:20~11:10	- Synthetic Biology for Renewable Fuels and Chemical Production from Macroalgae	Mr. Yuki Kashiwara (Co-founder & CEO of BAL Chile, Bio Architecture Lab, USA)
	11:10~11:20	Coffee Break	
	11:20~12:10	- On-shore Aquatic Biomass: Opportunities and Challenges in the Mekong Delta	Mr. James Coke (CEO, Algen Sustainable, USA)
	12:10~13:30	Lunch	
	Session 2	Chairman	Dr. Heon-Tae Kim (Prof. Pukyong National University)
	13:30~14:20	- Beneficial Health Effect of Seaweed Bio-actives	Dr. Kazuo Miyashita (Prof. Hokkaido University, Japan)
	14:20~14:40	- Current Status and R&D Roadmap of Seaweed Biomass Technology in Korea	Dr. Hee Chul Woo (Prof. Pukyong National University)
	14:40~15:00	- Introduction to the Massculture System of Kelp in Korea	Dr. Nam-Gil Kim (Prof. Gyeongsang National University)
	15:00~15:10	Coffee Break	
	Session 3	Chairman	Dr. Yong-Cheol Park (Prof. Kookmin University)
	15:10~15:30	- Development of Biological Conversion Process for Utilizing Brown Macroalgae	Dr. Kyoung Heon Kim (Prof. Korea University)
	15:30~15:50	- Potential Utilization of Seaweeds as Nutraceuticals	Dr. Hyeung-Rak Kim (Prof. Pukyong National University)
	15:50~16:10	- Green Liquid Fuel Production from Seaweed by Fast Pyrolysis and Anaerobic Digestion	Dr. Dong Jin Suh (Researcher, Clean Energy Center, Korea Institute of Science & Technology)
	16:10~17:00	Panel Discussion	Chairman Dr. Hyeung-Rak Kim, (Prof. Pukyong National University)
7. 5	09:00~	Discussion and Seaweed Farm Tour	

<참고자료 2>



<참고자료 3>





잘사는 농어촌 행복한 국민

보도자료

제공일 : 2011. 7. 6.
제공자 : 농림수산물부 자원환경과
과 장 : 박 범 수
서기관 : 차 태 황
전 화 : 500-2389
쪽 수 : 4P
별첨자료 : 있음(1P)

이 자료는 2011년 7월 7일 조간 이후에 보도하여 주시기 바랍니다.

국내 해조류 대량생산 및 에너지화 기술수준 인정, 국제협력체제 구축 기틀 마련

- 2차년도 연구결과 해조류 유기산 생산수율 약 2배 증가 성공
- 국내외 기관간 실질적 MOU 체결 추진(미국-한국-일본)

《 주 요 내 용 》

- ◇ 국내 해조류 바이오매스 에너지화 2차년도 연구결과 유기산 생산수율 약 2배 증가 성공
- ◇ 미국 선진기업의 바이오에너지 기술과 일본의 해조류 고부가가치화 기술, 우리나라의 해조류 대량생산 및 통합활용기술의 연계를 통한 Win-Win 효과 기대, MOU 체결 추진

- 농림수산물부(장관 서규용)는 7월 3일부터 5일까지 전남 완도군 장보고기념관에서 『해조류 바이오매스 대량생산 및 바이오에너지 국제심포지엄』 개최를 통하여, 우리나라 해조류 바이오매스 활용이 세계적인 수준에 있음을 다시금 확인하였다.

- 이번 심포지엄은 우리나라 해조류 주 생산지인 완도군에서 개최되었고, 미국과 일본의 선진 해조류 바이오에너지 분야 관련 CEO와 학자를 초청, 현재 연구성과 및 기술내용 발표를 통하여 국내외 정보를 상호 교류하는 장이 마련되었다.
- 특히, 바이오에너지 선진국인 미국 기업들의 해조류 원료 확보 방안 및 바이오에너지 기술개발 수준과 일본의 해조류 고부가가치화 기술을 국내에서 최초로 공개하였으며, 현재 농림수산식품부 등 국내 연구기관에서 추진하고 있는 해조류 바이오매스 확보 및 에너지화 기술개발 수준 PR을 통해 국내기술의 독창성을 알리고, 국제협력 연구를 위해 MOU를 체결하기로 합의하였다.
- 미국의 바이오 아키텍처랩사는 칠레에서의 40헥타르 규모의 해조류 시범 생산과 이를 이용한 에너지 생산기술에 대해 발표하였으며, 미국 서스테인러블즈사는 “베트남 메콩델타에서의 기회와 도전”이라는 주제로 메콩델타 지역을 활용한 해조류의 생산 및 이를 이용한 에너지 생산 계획을 발표하였다.
- 국내 바이오에너지 연구팀으로는 농림수산식품부 연구과제를 수행하고 있는 『해조류 바이오매스 연구그룹』(책임자 : 부경대 우희철 교수)에서 “해조류 바이오매스로부터 청정연료와 고부가가치소재를 동시에 생산하는 통합공정 원천기술”에 대한 2차년도 연구성과를 발표하였고, 국내기업으로 바이올시스템즈에서 “홍조류로부터 바이오 알코올 생산”에 대한 연구성과를 발표하였다.

- 부경대 『해조류 바이오매스 연구그룹』은 지난해 일관공정으로 다종류의 에너지를 동시 생산하는 “해조류바이오매스 에너지화 통합공정 원천기술”을 세계 최초로 개발하여 경제성 확보 가능성을 제시한 바 있다. 금년도(2차년도) 가시적 성과로는 건조다시마 1톤으로부터 휘발성 유기산 400kg(혼합알코올 260kg), 바이오오일 95kg을 생산하는 데 성공함으로써, 전년대비 바이오에너지 생산수율을 약 55%까지 향상시키는 공정을 구축하였다. 초산등을 포함하는 휘발성 유기산은 기초 화학원료로 사용될 수 있으며, 이를 총매를 이용하여 환원 반응을 그치면 혼합알코올로 전환되는데 이는 기존의 에탄올보다 우수한 성질을 가진 가솔린 자동차 연료로 사용할 수 있다.(참고자료 1)
- 또한, 바이오에너지 원료로서의 해조류를 대량생산하기 위하여 모자반 외 3종의 비식용 해조류를 완도를 비롯한 기장과 통영에서 양식실험을 행하고 있으며, 에너지원이 될 수 있는 대상종과 고밀도 양식방법을 개발하는 등, 해조류 바이오매스 생산단지 클러스터를 구축해 나가고 있다.(참고자료 2)
- (주)바이올시스템즈는 동남아에서 생산되는 홍조류(우무가사리)에서 바이오에탄올을 생산한 바 있으며, 현재 전남 고흥에서 대규모 현장 실험(pilot plant)을 실시하고 있다. 또한, 사탕수수과 옥수수 등과 같은 대표적인 육상 바이오매스와 해양 바이오매스와의 에탄올 생산 경제성 검토를 하고 있다.

- 농림수산식품부 관계자는 향후 해조류 바이오매스 대량생산 및 에너지화에 대한 국제간 정보공유와 인적네트워크 확대를 위하여 MOU를 체결할 예정이며, 국내외 석학과 관련기업이 참여하는 국제 심포지엄을 매년 정례적으로 개최할 계획이라고 밝혔다.
- 농림수산식품부에서 수행하고 있는 해조류 바이오매스관련 사업은 비식용 해조류의 통합적 활용을 통해 그린에너지 생산 및 유용 활성 물질의 고부가가치화 창출하기 위한 상용화 기술 개발에 그 목적이 있으며, 미국, 영국, 일본 등 선진국에 맞서 바이오에너지 시장을 조기 선점하기 위해 정부의 전폭적인 재정 지원을 추진할 계획이라고 밝혔다.
- 이러한 노력은 향후 국가 에너지 자립 기반구축 및 온실가스 저감 효과를 통한 기후변화대응에 선제적으로 대처할 수 있는 초석이 될 뿐 아니라, 유용물질의 고부가가치화를 통해 새로운 녹색산업 창출에 기여할 것으로 기대된다.

<참고자료 1>



<참고자료 2>



주 의

1. 이 보고서는 농림수산식품부에서 시행한 연구용역사업의 결과 보고서입니다.
2. 이 보고서 내용을 발표할 때에는 반드시 농림수산식품부에서 시행한 연구용역사업의 연구결과임을 밝혀야 합니다.
3. 국가과학기술 기밀유지에 필요한 내용은 대외적으로 발표 또는 공개하여서는 아니됩니다.