

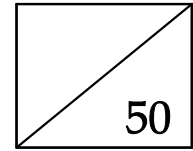
발 간 등 록 번 호

11-1541000-001445-01

# 해조류 바이오매스의 에너지화 및 통합적 활용 기반구축 연구

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

2012. 8



# 해조류 바이오매스의 에너지화 및 통합적 활용 기반구축 연구

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

2012. 8



# 제 출 문

농림수산식품부 장관 귀하

본 보고서를 『해조류 바이오매스의 에너지화 및 통합적 활용 기반구축 연구(연구기간 : 2011. 10. 05~2012. 08. 03)』 용역사업의 최종보고서로 제출합니다.

2012. 8.

총괄연구책임자 : 우희철(부경대학교)  
연 구 원 : 김경현(고려대학교)  
          : 김군도(부경대학교)  
          : 김두운(전남대학교)  
          : 김형락(부경대학교)  
          : 박용철(국민대학교)  
          : 서동진(한국과학기술연구원)  
          : 신태선(전남대학교)  
          : 엄영순(한국과학기술연구원)  
          : 오경근(단국대학교)  
          : 유  준(부경대학교)  
          : 유윤종(한국에너지기술연구원)  
          : 윤현희(가천대학교)  
          : 이지은(성균관대학교)  
          : 장호남(한국과학기술원)  
          : 전병수(부경대학교)  
          : 전영중(경기바이오센터)  
          : 최재수(부경대학교)  
          : 하정명(한국과학기술연구원)  
          : 한성욱(한국에너지기술연구원)

연구보조원 : 사윤희(가천대학교)  
: N.P. Thi(가천대학교)  
: 박형석(고려대학교)  
: 이선희(고려대학교)  
: 정영훈(고려대학교)  
: 정재혁(고려대학교)  
: 이정은(국민대학교)  
: 조성은(국민대학교)  
: 전수영(국민대학교)  
: 류현진(단국대학교)  
: 손재욱(단국대학교)  
: 이지예(단국대학교)  
: 최창호(단국대학교)  
: 김령희(부경대학교)  
: 김순진(부경대학교)  
: 김영희(부경대학교)  
: 박용범(부경대학교)  
: 박정남(부경대학교)  
: 이성찬(부경대학교)  
: 이현정(부경대학교)  
: 정현일(부경대학교)  
: 조미정(부경대학교)  
: 조현용(부경대학교)  
: 최유정(부경대학교)  
: 최재형(부경대학교)  
: 황도원(부경대학교)  
: Lamiae Talioua(부경대학교)  
: Md. Nurul Islam(부경대학교)  
: Pham H. D.(부경대학교)  
: Sabiha Sultana Chowdhury(부경대학교)

연구보조원 : 백근식(순천대학교)  
: 황예슬(전남대학교)  
: 김초록(한국과학기술원)  
: 박권우(한국과학기술원)  
: 정권수(한국과학기술원)  
: 심이나(한국에너지기술연구원)  
: 장영훈(한국에너지기술연구원)  
: 김세일(한국과학기술연구원)  
: 류지혜(한국과학기술연구원)  
: 양기석(한국과학기술연구원)  
: 오현주(한국과학기술연구원)  
: 윤영현(한국과학기술연구원)  
: 윤지선(한국과학기술연구원)  
: 이지혜(한국과학기술연구원)  
: 이화정(한국과학기술연구원)  
: 최재욱(한국과학기술연구원)



# 요 약 문

## I. 제 목

해조류 바이오매스의 에너지화 및 통합적 활용 기반구축 연구

## II. 연구개발의 목적 및 필요성

### 1. 연구 목적

- 신재생에너지 의무할당제(RPS) 및 신재생연료 의무혼합제(RFS) 대비에 따른 비식용 해조류 바이오매스 유래 그린에너지 확보
- 국제기후변화협약 이행의 탄소배출권(CER) 대비에 따른 해조류 바이오매스 에너지화 이산화탄소 제로-에미션(zero-emission) 공정 기반 구축
- 저탄소 녹색성장에 부응한 신재생에너지 상용화 및 CDM 사업에 적극 대처.
- 해조류의 통합적 활용을 통한 경제적 그린에너지 생산기반 구축
- 해조류의 통합적 활용을 위한 부산물 이용으로 공정 내 폐기물 발생 저감.
- 세계 최초로 해조류 바이오매스의 통합적 활용을 통하여 그린에너지 및 고부가 가치 제품 생산을 위한 기반구축
- 수산분야 녹색산업화에 의한 신성장동력 창출

### 2. 연구 필요성

- 해조류 바이오매스는 탄소화합물로 이루어진 에너지 저장물질로, 재생자원 중 유일하게 화석연료를 대신할 수 있는 대체 에너지원이며 또한 석유화학공업의 대체 원료물질 공급원(chemical feedstock) 가능 자원임
- 해조류 바이오매스는 비식량계 바이오매스으로써 육상 바이오매스(옥수수, 유채 등)에 비하여 경작지 잠식으로 인한 식량생산 감소 및 식량 수급 불균형 문제를 야기하지 않으며, 빠른 성장성, 높은 생산성, 외해 대량양산의 용이성 및 온실가스 저감의 탁월성 등의 장점이 있음
- 해조류 바이오매스는 단위면적 당 생산 수율이 높으며, 해조류를 원료로 하는 바이오에너지 생산 및 고부가 물질 생산기술은 지형학적 위치의 국내 실정에 매우 적합하여 경쟁력 있는 바이오매스 이용 기술임
- 국내의 경우 바이오에너지 및 고부가 물질 생산에 적합한 해조류 종류, 전처리 및 당화 공정, 생산공정에 대한 기초자료 및 연구결과물이 거의 전무한 실정임.



- 최근 미국, EU 등 선진국을 중심으로 해조류 바이오매스를 이용한 바이오에너지 개발연구가 세계적으로 활발하게 진행되고 있음
- 기능성 물질 생산연구의 경우, 성별, 나이, 직업, 체형에 따라 기능성 물질의 선호도가 매우 다양하므로 해조류 바이오매스의 다양한 생리활성 물질을 분리하여 이들의 기능성을 과학적으로 입증함으로써 맞춤형 건강기능성 식품소재 및 기초생활제품을 개발이 필요함
- 해조류 바이오매스의 생리활성 성분을 건강기능성 소재 및 기초생활제품으로 활용을 위하여 이들 성분의 구조분석 및 생리활성 기전 규명이 필요함
- 해조류 바이오매스 에너지화 및 통합적 활용을 위한 해조류 조체의 구성성분에 대한 정확한 정보의 확보 및 데이터 베이스(DB) 구축이 필요함
- 바이오에너지 생산 원료인 해조류 내 함유된 당성분의 효과적인 분별 및 회수를 위해서는 화학적 및 생물학적 전처리/당화 기술의 개발이 필요함
- 해조류 바이오매스 건조중량의 70%가 탄수화물로 구성되어 있어 이를 발효 가능한 당류 및 대사 전구체로 전환하여 발효공정을 통하여 바이오연료(바이오에탄올, 바이오유기산 및 혼합알콜 등)로 전환하는 기술 개발이 필요함
- 해조류 바이오매스를 이용한 혐기성 발효, 혐기성 소화 및 급속 열분해 공정을 이용한 청정연료 생산을 통합한 그린에너지 생산 융합공정 구축이 필요하다고 판단됨
- 해조류 바이오매스 에너지화 공정에서 발생된 부산물을 활용한 친환경 특성의 고성능 바이오복합재료 개발로 경제성 보완이 필요함
- 해조류 바이오매스의 에너지화 및 통합적 활용을 위해서는 개발된 개별 단위공정의 기술통합에 따른 일관된 통합공정 개발 및 구축이 필요함

### III. 연구개발의 내용 및 범위

#### 1. 건강 신소재

- 해조류 생리활성 물질의 항염증 효과 및 기전분석, DB 구축 및 표준화
  - 다시마 *n*-헥산과 디클로로메탄 획분의 항염증 효과 분석
  - 다시마 *n*-헥산으로부터 분리된 fucoxanthin의 항염증 활성 및 기전 분석
  - 다시마 주정추출물의 표준 크로마토그래프 확립
- 해조류 생리활성 물질의 항비만 효과 및 기전분석
  - 참모자반 주정추출물과 *n*-헥산 획분의 항비만 활성 및 기전 분석
  - C57BL/6 mouse를 이용한 비만 동물 실험 모델 확립

- 해조류 생리활성 물질의 항암효과 및 기전분석
  - 다시마의 *n*-헥산 R3 fraction-2를 이용, 암세포에서의 항암 효능 분석
  - 항암 효능의 기전 분석을 위한 세포사멸기작(apoptosis) 및 세포주기(cell cycle) 조절 인자들의 활성화도 분석 및 신호전달 과정 규명
- 해조류 생리활성 물질의 항당뇨효과 및 기전 분석
  - 다시마 EtOAc 분획물로부터 당뇨합병증 치료 및 예방물질 분리 및 구조결정과 작용기전 연구
  - 메생이 분획물의 항산화/ 당뇨합병증 치료 및 예방물질 분리 및 구조결정

## 2. 생물학적 전환공정

- 해조류 성분분별 및 전처리 공정 최적화
  - 다시마의 탈알긴산/전처리 통합공정 개발
  - 연속공정을 통한 다시마 전처리 최적화
- 생물친화적 전처리 및 당화효소를 이용한 갈조류 당화 공정 개발
  - 다시마 구성성분 중 알긴산의 효소적 완전 당화공정의 수립
  - 단당 생성 효소의 클로닝 및 특성 분석으로 통한 최적 반응 조건의 확립
- 해조류 해조 다당체 분해미생물 유전자원확보
  - 전북 내장유래 미생물효소(AlyDW11) 및 감마선조사를 이용한 해조 다당체 저분자화 기술 개발
  - 성계 장내 미생물 screening을 통한 해조 다당체 분해 우수 유전자 확보
- 해조류 분해 부탄올 생산균주 개발 및 부탄올 발효공정의 최적화
  - 부탄올생산균주의 해조류 분해효소 및 대사체의 profiling
  - 고수율 부탄올생산을 위한 재조합균주개발 (CBP)과 핵심설계기술 도출 : 효소와 대사체 profiling에서 도출된 다양한 유전자 또는 효소들을 분석하고 과발현등을 통해 CBP에 적합한 재조합 균주를 설계
  - pervaporation에 의한 부탄올의 분리정제 핵심기술 도출
- 난발효성 당류 대사형 재조합 미생물 개발
  - 해양미생물 유전체 라이브러리 구축
  - 난발효성 당류 대사효소 유전자 스크리닝
  - 대사유전자 클로닝 및 발현벡터구축

### 3. 그린에너지 융합공정

- Next generation sequencing을 활용한 유기산 수율 향상기술
  - 미생물 균집을 이용하여 해조류 바이오매스 유기산 생산 수율 향상
  - 해조류 이용 고수율 유기산 생산 미생물 균집의 균집구조 분석
- VFA 생산용 다단계 생물반응기 설계
  - 다단계 생물 반응기 설계 및 문제점을 발견하고 해결방안 파악
  - Cell growth를 높이기 위한 배지 환경 실험
- 혐기성 소화공정 이용 VFA 생산기술 개발
  - Alginate 분해균주를 이용한 해조류 (다시마, 미역, 모자반, 우뚝가사리, 파래 등)의 전처리 및 VFA 발효 조건 최적화
  - 축산폐수를 이용한 VFA 발효배지 조성 최적화
- VFA 이용 혼합 알코올 생산 화학 촉매 공정 개발
  - 유기산으로부터 알코올을 생산하기 위한 고효성 화학 촉매 개발
  - 알코올 생산 화학 촉매 공정 최적화
- 급속 열분해공정 이용 바이오오일 생산기술 개발
  - 공정부산물의 바이오오일 생산원료로서의 활용가능성 평가
  - 바이오오일 수율 향상을 위한 전처리 공정 최적화
  - 바이오오일 생산 및 업그레이딩 기초 연구

### 4. 통합공정 및 제품개발

- 공정 통합 및 설계
  - 대상: 전처리, 혐기성소화, 수소화공정, 분리공정을 포함한 전체 공정
  - 통합공정을 이루는 개별 주요 공정의 에너지 및 물질 수지식 수립
  - 공정 모사기를 이용한 개념설계
  - 통합공정의 경제성 분석
- 혐기성 소화에 의한 bench scale 유기산 생성 공정 구축
  - 300L 규모의 유기산 생산 연속식 공정 설계 및 구축
  - 유기산 생산 연속식 공정 시운전 및 문제점 조사 및 해결
- 해조류 유래 유용물질의 추출/분리/회수를 위한 환경 친화적 공정 최적화
  - 친환경 무오염 용매인 아임계수를 이용한 회분식 가수분해 공정 최적화
  - 아임계수 가수분해 공정에 대한 해조류 유용물질 추출/분리/회수율 확인
- 해조류 추출물 (바이오 소재) 기능성 확인 및 산업적 응용 모색
  - 기능성 물질 동정 및 그 기능성 확인
  - 다시마 유래 유용물질 산업적 응용 검토

- 해조류 부산물을 이용한 바이오복합재료 개발
  - 해조류 부산물의 종류별, 화학 전처리별 특성분석
  - 해조류 부산물의 종류별, 화학 전처리별 바이오복합재료 제조 및 특성분석
  - 해조류 부산물을 이용한 시트형 바이오복합재료 제조

## IV. 연구개발결과

### 1. 건강 신소재

- 해조류 생리활성 물질의 항염증 효과 및 기전분석, DB 구축 및 표준화
  - 다시마의 n-헥산과 디클로로메탄 획분은 항염증 효과가 우수하며, 염증관련 질환의 예방과 치료를 위한 식의약품 소재로 활용될 가치가 높은 것으로 평가되었음
  - 다시마로부터 fucoxanthin 분리 및 HPCL 표준 크로마토그램의 확립
  - 다시마 n-헥산 획분으로부터 분리된 fucoxanthin의 뛰어난 항염증 활성과 그 기전을 확인하였으며, 다시마 추출물의 품질 관리에 활용될 지표물질로서의 활용이 기대됨
  - 참모자반의 주정추출물과 n-헥산 획분은 지방세포 분화 및 지방축적 관련 전사인자와 효소 단백질 발현 저해 효과가 우수하며, 앞으로 비만 관련 질환 예방을 위한 기능성 식품 소재로 활용될 수 있을 것이라 판단됨
- 해조류 생리활성 물질의 항암효과 및 기전분석
  - 다시마의 n-헥산 R3 fraction-2는 간암 세포에서 높은 세포 독성을 나타내면서 정상세포에서는 독성을 나타내지 않고, 일련의 신호전달을 통해서 간암세포를 사멸시키는 것으로 보아 항암제로써 높은 잠재력을 가지고 있는 것으로 확인됨
- 해조류 생리활성 물질의 항당뇨효과 및 기전 분석
  - 메생이  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  분획물에서 분리된 화합물의 구조결정
  - MeOH 추출물과 각 분획물들의 최종당화산물 형성억제 활성과 lens aldose reductase 억제활성 검증
  - 분리된 화합물들의 최종당화산물 형성 억제활성과 lens aldose reductase 억제 활성 검증

### 2. 생물학적 전환공정

- 해조류 성분분별 및 전처리 공정 최적화
  - 다시마 약산, 극저산 및 열수 전처리공정 개발
  - 연속공정을 통한 다시마 전처리 가능성 탐색

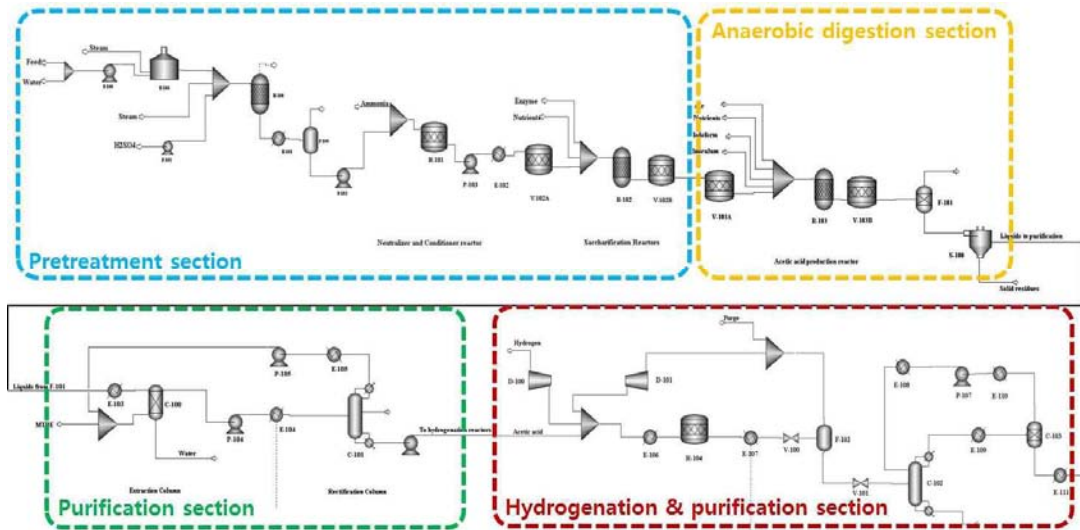
- 생물친화적 전처리 및 당화효소를 이용한 갈조류 당화 공정 개발
  - 알긴산 및 올리고 알긴산을 이용하여 알긴산 단당을 효소적으로 생산하는 기술
  - 단당 생성 효소의 생화학적 특성 분석 및 반응 속도론을 이용한 최적 활성 조건의 확립
- 해조류 해조 다당체 분해미생물 유전자원 확보
  - 미생물 효소 및 감마선 병합 최적조건 확립을 통해 단일 처리보다 효소처리의 효율성 향상 및 해조 다당체 저분자화 증진 효과를 가지는 새로운 방법임을 확인하였음
  - 성게 장내 미생물의 screening을 통해 해조다당체 분해 우수 균주(AlyHP32)를 확보하였으며, 저분자 당원 생산을 위한 효소당화 공정에서 활용될 가치가 높은 것으로 평가 되었음
- 해조류분해 부탄올 생산균주개발 및 부탄올 발효공정의 최적화
  - 해조류 분해효소 (laminarinase) 발현 재조합 부탄올생산균주 선별 및 생화학적 특성분석
  - fatty acid synthesis 의 교란에 의한 내성증진 재조합 부탄올 생산균주 선별 및 특성분석
  - 부탄올 생산균주내의 repaired cellulosome의 발현 (협력연구: INSA, France)
  - pervaporation에 의한 부탄올 분리 및 정제 공정 설계 요소기술 도출
- 난발효성 당류 대사형 재조합 미생물 개발
  - 알긴산 분해효소의 발현조건을 확립하고, 알긴산 분해효소를 이용한 알긴산 단당류 생산조건을 확립하였음
  - *E. coli* 내부에 알긴산 대사효소 유전자를 cloning하기 위해 DEH reductase을 탐색하였음. DEH-reductase를 host균주 내에서 발현하여 SDS-PAGE로 확인하였고, 활성을 측정하였을 때 대조군보다 2배 높은 활성을 보였음
  - 또한 알긴산의 세포 내 이송체를 암호화하는 유전자를 *Vibrio splendidus* 미생물로부터 탐색하고 PCR을 이용하여 oligoalginate transporter의 두 가지 유전자인 toaA와 toaC를 증폭한 후, DEH reductase 유전자와 toaA, toaC 유전자를 발현할 수 있는 벡터시스템을 구축하였음
  - 알긴산 단량체를 단일탄소원으로 이용하여 성장할 수 있는 토양 미생물을 선별하였음

### 3. 그린에너지 융합공정

- Next generation sequencing을 활용한 유기산 수율 향상기술
  - 다시마 이용 부티르산 생산 미생물 균집을 확보
  - 전처리하지 않은 다시마를 이용하여 상대적으로 높은 수준의 부티르산을 생성
  - 해당 미생물 균집에서 유전체를 분석하여 구조 분석 및 균집 천이 연구
  - 이를 이용한 유기산 수율 향상을 기대
- VFA 생산용 다단계 생물반응기 설계
  - 단순 MSC-HCDC (다단계 고농도 생물 반응기) system에서 VFA 생산 농도 30g/L 이상 달성
  - 발효기와 4단계 연속 반응기에서 20일 이상 운전 및 문제점 발견
- 혐기성소화 공정을 VFA 생산공정 개발
  - Algenate 분해균주를 이용하여 해조류를 전처리한 결과 VFA 생산성 50% 이상 증가함
  - VFA 발효배지로 축산폐수의 활용가능성을 조사함
- VFA 이용 혼합 알코올 생산 화학 촉매 공정 개발
  - 혼합 용액 이용 공침법을 이용한 세계 최대 Cu 표면적을 가지는 Cu/Zn/Al 촉매 개발
  - 혼합 유기산으로부터 혼합 알코올을 생산하는 반응 공정 최적화
- 급속 열분해공정 이용 바이오오일 생산기술 개발
  - 다양한 공정 부산물의 물리·화학적 특성 및 열적 동특성을 분석한 결과, VFA 공정 부산물이 바이오오일 생산에 이용가능하다고 판단됨
  - 바이오오일 수율을 향상시키기 위해 다양한 전처리 공정을 도입하여 다시마 처리 후, 물리·화학적 특성 및 열적 동특성을 분석한 결과 황산을 촉매로 사용한 경우 다시마의 물성 및 주요 열분해온도 구간에서 열적 동특성을 개선시킬 수 있었으며, 그 조건을 최적화하였음
  - 상기 전처리 다시마를 원료로 바이오오일을 생산시 수율을 향상시킬 수 있었으며, 촉매 개질 공정을 이용하여 바이오오일을 고품질 연료로 전환시키는 기초 연구를 수행하였음

### 4. 통합공정 및 제품개발

- 통합공정의 개념설계 및 경제성분석 완료
  - 해조류→혼합유기산→혼합알콜 생산 통합공정 설계
  - 경제성분석 결과, 허용 가능한 최대 다시마 바이오매스 원료 가격은 \$153/ton 임. (건조 다시마 100,000 ton/yr 처리 기준. 공장운전 10년 후 break-even-point 도달 기준)



[설계된 통합공정의 공정 흐름도]

- 혐기성 소화에 의한 bench scale 유기산 생성 공정 구축
  - 300L 규모 bench scale 유기산 생산 연속식 공정 구축 1건
  - 100 L 규모 혐기성 반응기의 회분식 실험에서 생성된 총 유기산의 농도는 최대 약 25 g/L 생산하였으며, 유기산 농도가 안정화된 180시간 이후부터는 100 L 규모의 혐기성 반응기를 2단계로 연결하여 200 L 규모로 연속식 혐기성 발효 실험을 실시하였음
  - 그 결과 324시간 이후부터 총 유기산 농도가 반응조 1에서는 약 20 g/L 범위의 총 유기산 생산 농도를 보였으며, 반응조 2에서는 약 25 g/L 범위의 총 유기산 생산 농도를 보였다. 또한, 반응조 1과 2에서 유기산 조성이 일정한 경향을 보이는 연속식 운전시간은 400시간에서 800시간 구간이었으며, 향후 3단계 반응조 연결 300 L 규모 연속식 운전 및 장시간운전에 대한 운전결과를 살펴볼 계획임
  - 유기산 생산 수율 40% 이상 (45.5% 달성)
- 해조류 유래 유용물질의 추출/분리/회수를 위한 환경 친화적 공정 최적화
  - 회분식 가수분해 공정을 이용하여 각 유용물질(환원당, 아미노산, 폴리페놀, 플라보노이드)을 추출/생성하여 분리/회수할 수 있었고, 항산화 물질의 경우 기존의 에탄올-물 이성분계 용매 추출법과 비교함으로써, 아임계수 가수분해 공정이 항산화물질을 추출/회수하는데 기존의 전통적 유기용매 추출법에 비해 효율적이며, 환경 친화적 공정이므로 기존의 공정을 대체하기 위한 기술로 활용할 수 있음
  - 아임계수 가수분해 공정에 대한 해조류 유용물질 추출/분리/회수율 확인

■ 해조류 추출물 (바이오 소재) 기능성 확인 및 산업적 응용 모색

- 이번 연구에서 아임계수 가수분해 공정을 통해 회수한 항산화 물질의 항산화능인 라디칼 소거능을 분석하였다. 그 결과, 아임계수 추출물의 항산화능이 기존의 전통적 유기용매 추출법에 비하여 높은 항산화능을 가지고 있음이 확인됨
- 아임계수 가수분해 공정을 통해 생성된 환원당은 바이오 에너지의 전구체 및 생명공학 분야에서 미생물 영양원으로 사용될 수 있을 것으로 사료되며, 아미노산의 경우 아임계수 가수분해물 내에서 측정된 주요 아미노산들이 맛의 근원 아미노산이기 때문에 이는 식품 산업에 응용할 수 있을 것으로 사료되어 진다. 마지막으로 항산화 물질인 폴리페놀 및 플라보노이드는 용매로서 순수한 물을 이용하였기 때문에, 기존의 유기용매보다 안전할 것으로 생각되며 추출 효율 및 그 생리활성도 기존의 유기용매 추출법보다 높았으므로 기능성 식품, 의약품 및 화장품 산업에 이용될 수 있을 것으로 사료 됨

■ 해조류 부산물을 이용한 바이오복합재료 개발

- 해조류의 종류별(다시마, 파래), 화학 전처리별(에탄올, 아세톤, 황산)에 따른 부산물의 열적, 형상학적 특성분석 데이터 확보
- 해조류의 종류별(다시마, 파래), 화학 전처리별(에탄올, 아세톤, 황산)에 의해 얻어진 부산물을 보강재로 사용한 바이오복합재료 제조기술 확립
- 해조류의 종류별(다시마, 파래), 화학 전처리별(에탄올, 아세톤, 황산)에 따라 얻어진 부산물을 보강재로 이용한 바이오복합재료의 동역학적, 기계적, 계면 특성분석 데이터 확보
- 시트형 바이오복합재료 제조조건 확립

## 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 수립하는데 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 생리활성물질을 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 의약품분야로도 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·외장재뿐 만이 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

|  |     |
|--|-----|
| 요약문 .....  | 1   |
| 제 1 장 연구개발과제의 개요 .....   | 15  |
| 제 1 절 연구의 목적 및 필요성 .....   | 17  |
| 제 2 절 기술의 종류 및 범위 .....  | 25  |
| 제 2 장 국내외 기술개발 현황 .....  | 69  |
| 제 1 절 건강 신소재 .....   | 71  |
| 제 2 절 생물학적 전환공정 .....  | 79  |
| 제 3 절 그린에너지 융합공정 .....   | 83  |
| 제 4 절 통합공정 및 제품개발 .....  | 85  |
| 제 3 장 건강 신소재 .....   | 91  |
| 제 1 절 해조류 생리활성 물질의 함염증, 항치매, 항비만효과 및 기전 분석,<br>DB 구축 및 표준화 ..... | 93  |
| 제 2 절 해조류 생리활성 물질의 항암효과 및 기전 분석 .....                            | 133 |
| 제 3 절 해조류 생리활성 물질의 항당뇨효과 및 기전 분석 .....                           | 143 |
| 제 4 장 생물학적 전환공정 .....  | 155 |
| 제 1 절 해조류 성분분별 및 전처리 공정 최적화 .....                                | 157 |
| 제 2 절 생물친화적 전처리 및 당화효소를 이용한 갈조류 당화 공정 개발 ...                     | 175 |
| 제 3 절 해조류 해조 다당체 분해미생물 유전자원 확보 .....                             | 181 |
| 제 4 절 해조류분해 부탄올 생산균주 개발 및 부탄올 발효공정의 최적화 .....                    | 195 |
| 제 5 절 난발효성 당류 대사형 재조합 미생물 개발 .....                               | 201 |
| 제 5 장 그린에너지 융합공정 .....   | 223 |
| 제 1 절 Next generation sequencing을 활용한 유기산 수율 향상기술 .....          | 225 |
| 제 2 절 VFA 생산용 다단계 생물반응기 설계 .....                                 | 235 |

|  |     |
|--|-----|
| 제 3 절 혐기성 소화공정 이용 VFA 생산기술 개발 .....                          | 253 |
| 제 4 절 해조류 바이오매스 유래 혼합유기산으로부터 혼합 알코올 생산하는<br>화학축매 공정 개발 ..... | 265 |
| 제 5 절 급속 열분해공정 이용 바이오오일 생산기술 개발 .....                        | 277 |
| <br>   |     |
| 제 6 장 통합공정 및 제품개발 .....                                      | 291 |
| 제 1 절 해조류의 활용을 위한 통합공정 최적설계 .....                            | 293 |
| 제 2 절 혐기성소화에 의한 bench scale 유기산 생성 공정 구축 .....               | 303 |
| 제 3 절 해조류 유용물질 분리 및 회수 공정 개발 .....                           | 319 |
| 제 4 절 해조류 부산물을 이용한 바이오 복합재료 개발 .....                         | 335 |
| <br>   |     |
| 제 7 장 목표달성도 및 관련분야에의 기여도 .....                               | 359 |
| 제 1 절 연구개발 목표 및 내용 요약 .....                                  | 361 |
| 제 2 절 기술 구성 및 연계도 .....                                      | 371 |
| 제 3 절 향후 계획 .....  | 373 |
| <br>   |     |
| 제 8 장 참고문헌 .....   | 377 |
| <br>   |     |
| 부록 .....   | 391 |
| A. 추진경과 일정표 .....  | 393 |
| B. 심포지엄 개최 결과 요약 .....                                       | 395 |
| C. 최종보고회 개최 요약 .....   | 397 |
| D. 연구성과물 .....   | 399 |
| E. 홍보실적 .....  | 443 |

## 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. 사회정책적 측면

- 신재생에너지 의무할당제(RPS) 및 신재생연료 의무혼합제(RFS) 대비에 따른 해조류 바이오매스 유래 그린에너지 확보
- 국제기후변화협약에 이행의 탄소배출권(CER) 대비에 따른 해조류 바이오매스 에너지화 이산화탄소 제로-에미션 (zero-emission) 공정 기반 구축
- 저탄소 녹색성장에 부응한 신재생에너지 상용화 및 CDM 사업에 적극 대처

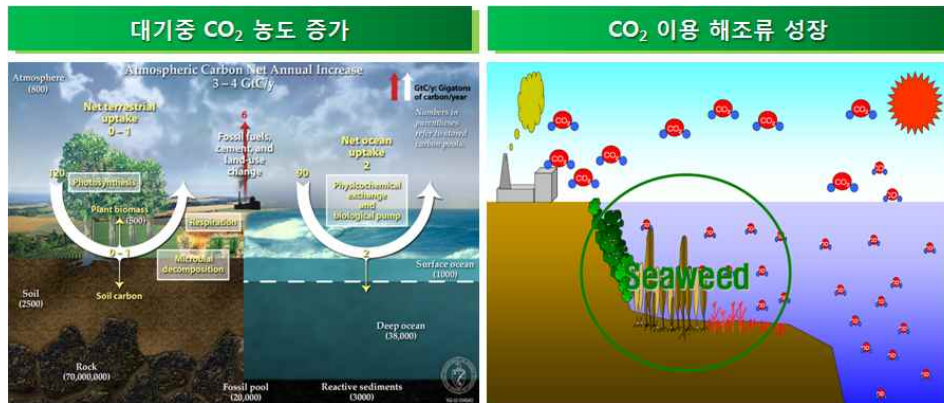
전 세계적으로 지구온난화 규제·방지를 위한 기후변화협약(United Nations Framework Convention on Climate Change, UNFCCC)에 대응하기 위하여, 온실가스 감축 및 탄소흡수원 확보를 위한 국가 정책 개발에 주력하고 있다. 특히, 미국의 경우 해조류 바이오연료가 신재생연료 의무혼합제(Renewable Fuel Standard, RFS) 목표치를 맞추는데 중요한 기여를 할 것이라 믿고 있다. 미국의 RFS에 따르면, 미국 에너지 공급자들은 2020년까지 매년 300억 갤런, 2022년까지 360억 갤런의 바이오연료를 의무적으로 제공해야 한다. 미국 에너지부(Department of Energy, DOE)에 따르면, 해조류 바이오매스 기술의 잠재력은 에이커 당 매년 1,000~6,500 갤런의 오일을 생산할 수 있으며, 이는 팜유(palm oil) 635 갤런, 야트로파(jatropha) 202 갤런, 해바라기 102 갤런보다 많은 양이다.

국내의 경우 농림수산식품부, 지식경제부, 국토해양부 및 교육과학기술부를 중심으로 화석연료 고갈에 대비한 바이오에너지 연구 분야에 ‘해조류 및 미세조류 바이오매스의 에너지화’을 두어 해조류 바이오에너지 생산 연구의 활성화를 위한 정책적 지원을 실시하고 있다. 특히, 농림수산식품부는 ‘농림수축산 자원 활용 바이오에너지 기술 개발’에서 바이오에너지 작물개발 및 생산기술 확보를 위하여 해조류 바이오매스를 이산화탄소 흡수원으로 활용하여 청정개발체계(Clean Development Maganism, CDM) 사업과 연계하고 있다[그림 1-1-1].

최근 이산화탄소 저감을 위한 해조류 바이오매스 활용 방안 및 교토의정서에서 해조류가 ‘이산화탄소 배출저감 식물’로 인정받기 위한 부처별 추진계획을 모색하는 정책자료집이 발간되어, 해조류 바이오매스 바이오에너지화 관련 연구를 장려하고 있다. 정책자료집에서는 해조류가 ‘이산화탄소 배출저감식물’로 지정받



는다면, 우리나라의 탄소배출권(Certified Emission Reduction, CER)을 증가하여 국가 간에 거래될 매년 200억불 이상의 탄소거래권에서도 수익 창출이 가능할 것이며, 해조류 바이오에너지화에 의한 수산바이오 산업 육성을 기대할 수 있어 경제적 이익뿐만 아니라 자연환경보호 및 수산자원개발, 국가 경쟁력 향상 등의 부대 효과를 기대할 수 있을 것으로 전망하고 있다. 이에, 해조류가 기후변화협약에서 이산화탄소 흡수원으로서 인정받기 위한 체계적인 정부 정책 수립을 모색하고 있다.



[그림 1-1-1] 해조류의 이산화탄소 포집 및 저장 효과

## 2. 경제산업적 측면

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

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

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

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 1-1-2] 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.

### 3. 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 실정이다. 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 있으며, 이러한 연구들의 대부분은 육상의 식물체에서 발견되는 성분들에 한정되어 있다. 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 실정으로 해조류 바이오매스로부터 건강신소재 물질 개발 연구가 필요하다.

국내의 수산가공산업은 대부분이 단순 가공처리에 의존하는 노동집약적인 산업으로, 본 연구 개발팀의 전문지식을 활용하여 신기술을 개발하여 새로운 생물공학기법을 도입함으로써 기존의 수산가공산업을 보다 기술집약적 첨단산업으로 전환시킴으로써 수산가공산업의 수익 향상에 기여하여 국가산업 발전에 기여하고자 한다. 또한, 해조류로부터 새로운 생리활성물질의 대량분리공정기술을 확립함으로써 식품, 의약품 등의 관련 산업분야의 활성화를 꾀하며, 대량생산에 의한 수출을 통해 건강기능성 식품소재 수입국에서 수출국으로 전환시킴으로써 해양천연물 생산기술의 선진화를 추구하고자 한다. 한편, 고령화 사회의 진입으로 인한 노년기 건강을 위하여 노화관련 질환의 예방과 치료를 위하여 천연식품에서 그 해법을 찾으려는 노력이 well-being 선풍과 맞물려 고조되고 있으며, 이러한 시대적 조류와 함께 해조류에 함유된 생리활성 소재를 이용한 기능성 식품을 개발함으로써 맞춤형 기능성 식품 개발을 위한 선도기술 개발이 필요하다.

#### 나. 해조류 생물학적 전환공정 개발

바이오에너지 생산 과정 중 해조류의 물리적 및 화학적인 전처리 방법에 따른 당조성과 저분자 화합물들의 조성변화를 분석함으로써 알코올 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 한다. 특히, 섬유소계 에탄올 생산이 지금까지 산업화되지 못하는 이유는 전체 에탄올 생산 공정에 있어서 섬유소의 당화가 차지하는 공정비용이 너무 높고, 당화수율이 낮아 바이오매스자원으로서 효과적으로 이용되지 못하

고 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 선행이 필수적이다.

해조류의 구성성분 및 결합 형태는 육상 바이오매스와 근본적으로 다르므로 해조류에 적합한 전처리/ 분별기술 개발을 통해 유용성분의 자원화 및 차세대 바이오연료생산에 기여할 수 있다. 특히, 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 있다.

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 필요하다. 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 요구된다.

#### 다. 해조류 그린에너지 융합공정 개발

전년도에 수행한 연구결과로부터 혐기성 소화공정을 이용한 혼합 알코올 생산기술 및 급속 열분해공정을 이용한 바이오오일 생산기술 개발에 대한 그린에너지 융합공정 연구가 필요하다고 판단된다. 특히, 혐기성 소화공정으로부터 유기산 232.5 kg (수첨반응 시 혼합 알코올 142.6 kg) 그리고 급속 열분해공정으로부터 바이오오일 78 kg, 찌 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 기대된다.

그러나 전년도에서는 이들 그린에너지의 생산 가능성을 타진하는데 초점을 맞추고 있어 수율 향상, 융합공정 연구 등의 연구를 추가적으로 수행할 필요성이 있으며, 혐기성 소화공정을 이용한 혼합 알코올 생산기술에서는 전체공정의 측면에서 추출발효에 대한 연구가 필요하며 동시에 균주 adaptation 연구, 공정 최적화 연

구, 수소화 반응용 촉매 개발 등의 연구가 필요하다고 판단된다. 이들 연구들은 혐기성 소화공정을 이용한 알코올 생산에 있어서 공정효율을 향상시키기 위해 반드시 수행해야 할 필요성이 있는 연구이다.

전년도에 열화학적 전환 기술의 해조류 바이오매스에 대한 적용 가능성을 검토하였으며, 그 결과 해조류 바이오매스로부터 바이오-오일의 생산 가능성을 확인하였음. 하지만 바이오오일 수율이 목질계 바이오매스 보다 낮았으며 이는 해조류 바이오매스 원료 특성에 기인한 것으로 판단됨. 따라서 해조류 바이오매스 유래 바이오-오일의 수율을 향상시키기 위한 해조류 바이오매스의 전처리 방안에 대한 연구가 필요하다. 또한, 해조류 바이오매스 유래 바이오-오일은 목질계 바이오매스 유래 바이오-오일과 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 필요하다. 최종적으로, 해조류 바이오매스로부터 약 40% 이상의 에너지 회수가 가능하게 하기 위해서 그린 에너지를 생산하기 위한 생물학적 및 화학적 융합공정에 대한 연구는 반드시 선행되어야 한다.

#### 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 필요하며, 현재까지 바이오매스에 대한 연구는 주로 에너지 전환공정 그 자체에 중점을 두고 있고 통합적 활용을 위한 경제성 평가나 통합공정 설계에 대한 연구는 상대적으로 저조하다. 따라서 여러 개별 단위공정을 통합, 설계를 위해서는 수치최적화를 통한 체계적인 접근방법이 필요하다.

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 필요하다. 해조류에 존재하는 항산화 물질(푸코잔틴, 색소류 등), 다당류, 지질류, 폴리페놀류 등을 효율적으로 분리/회수하기 위한 친환경 용매를 사용하는 lab. scale의 분리공정 구축이 필요하다.

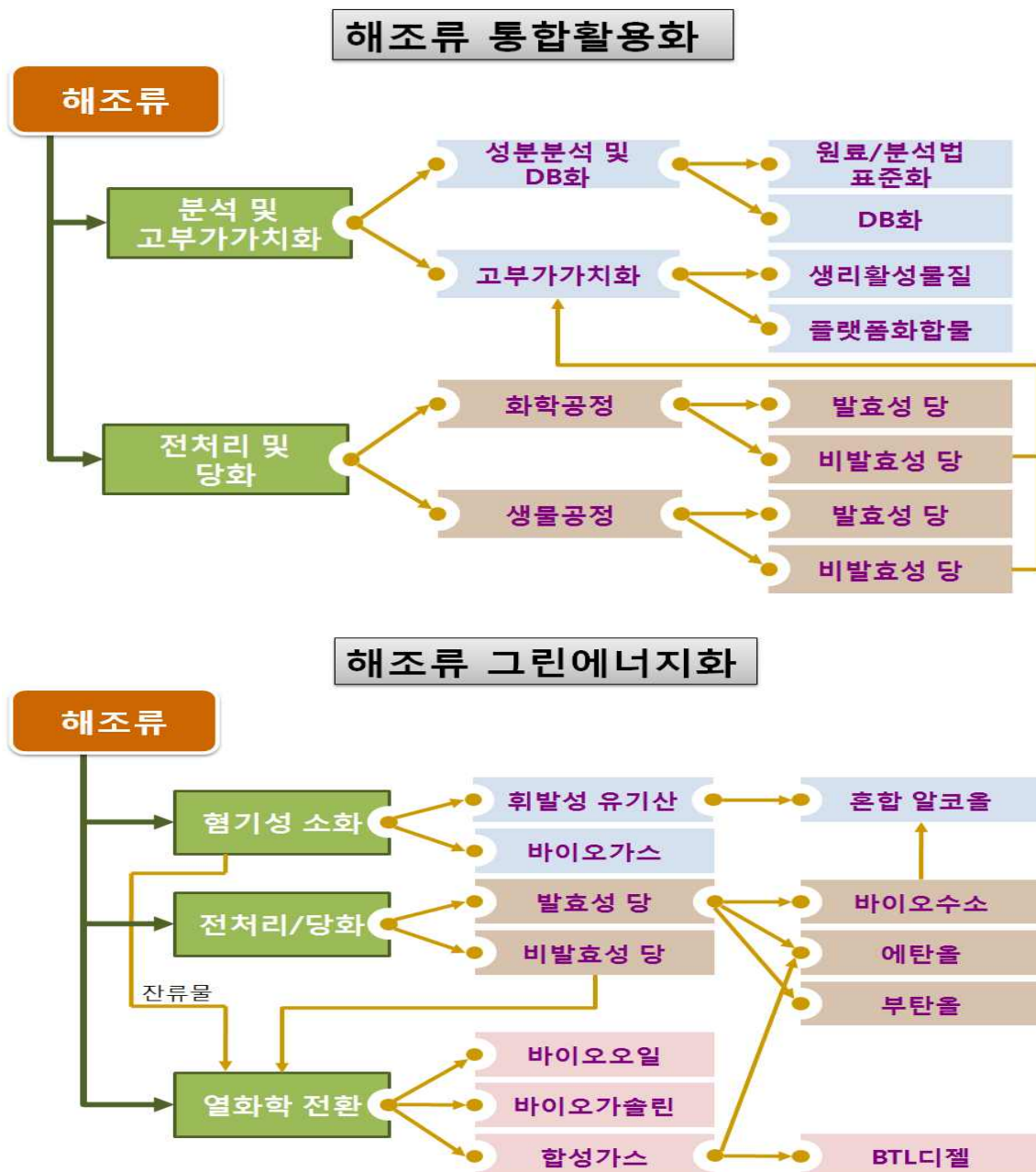
국내 사용되고 있는 고품질의 천연 소재의 대부분은 수입에 의존하고 있으며, 해조류 추출부터 추출물을 이용한 제품의 완성까지의 모든 단계가 가능해질 경우, 수입대체 효과와 개발된 신제품의 해외 시장 진출에 의한 국가

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 판단된다.

해조류는 종별에 따라 나노, 마이크로 크기의 섬유를 포함하고 있는 경우가 있으며 이들은 바이오복합재료 보강재 등 다양한 신소재 원료로 활용될 수 있다. 특히, 바이오복합재료는 천연섬유를 보강재로 한 고분자복합재료로서 자동차, 건축, 항공기 등의 경량용 내·외장재로 사용되고 있는, 친환경 및 에너지절약 특성을 가진 신소재로 고부가가치를 생산하여 해조류 바이오매스 에너지화 연구의 경제성 보완에 기여할 것으로 사료된다.

## 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  $\gamma$ -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- $\kappa$ 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- $\kappa$ 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  $\gamma$ -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. 해조다당류는 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, 툇, 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

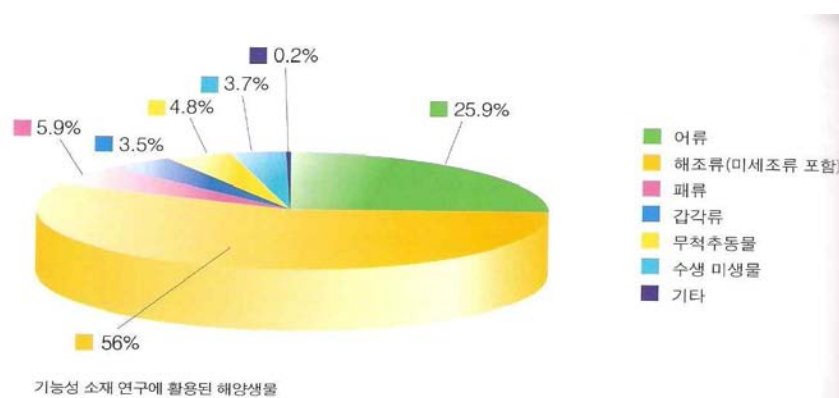
해양생물로부터 기능성 물질을 탐색하고 활용하고자 하는 연구는 1970년대 후반부터 시작되었으며, 지금까지의 연구결과 육상생물에서는 알려지지 않았던 새로운 화합물들이 다수 존재한다는 것이 밝혀짐에 따라 해양이 생물신소재의 보고로 집중 부각되고 있다.

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  $\alpha$ -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 prostagrandin을 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+단당류): 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<br>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<br>(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<br>갑상선 장애 방지<br>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,<br>식이섬유에 의한<br>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<br>담즙산과 콜레스테롤을 흡착, 배출하여 혈중 콜레스테롤 저하                  |
| 칼슘(Ca)              | 뼈 강화   |
| 섬유질                 | 소화기관 및 장내 영양분의 흡수를 조절<br>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.<br>β-카로틴<br>(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<br>저하     | 식이섬유(알긴산, 유산다당)<br>푸코스테롤요소  | 다시마, 미역, 김, 우뚝가사리,<br>모자반, 팽생이모자반, 참풀가사리 |
| 고혈압 저하          | 식이섬유(알긴산, 유산다당)<br>라미닌(아미노산일종) EPA와 n-3계<br>다가불포화지방산              |  |
| 동맥경화<br>예방개선    | 푸코스테롤인 푸코이단 EPA와<br>n-3계 다가불포화지방산                                 |  |
| 갑상선종<br>예방개선    | 요소  | 다시마, 미역                                  |
| 항 압             | 식이섬유(알긴산, 유산다당), $\beta$ -카로틴,<br>인지질, 당지질 EPA와 n-3계<br>다가불포화지방산  | 다시마, 미역, 김, 모자반,<br>팽생이모자반, 팔손이풀         |
| 골다공증<br>예방개선    | 칼슘  | 톳, 미역, 다시마, 김                            |
| 당뇨병<br>예방개선     | 식이섬유(알긴산, 유산다당), 단백질  | 다시마, 미역, 김,<br>개우무                       |
| 심근및뇌 경색<br>예방개선 | EPA와 n-3계 다가불포화지방산,<br>타우린, 푸코스테로인.                               | 미역, 김, 다시마                               |
| 빈혈<br>예방개선      | 철, B12  | 다시마, 미역, 톳, 김                            |
| 노화<br>방지개선      | $\beta$ -카로틴, n-3계 및 n-6<br>다가불포화지방산, 요소, 망간,<br>비타민E, 비타민C, 식이섬유 | 미역, 다시마, 톳, 팔손이풀, 김외<br>식용해조             |
| 피부장해<br>방지개선    | 탄닌계, 자외선흡수물질<br>$\beta$ -카로틴, 아연                                  | 톳, 김, 모자반, 팽생이모자반                        |
| 정장작용            | 식이섬유(해조다당)  | 미역, 다시마, 김외의 식용해조                        |
| 시력장해<br>예방개선    | $\beta$ -카로틴, 타우린   | 김, 파래                                    |
| 성기능장해<br>예방개선   | 세렌, 아연, 비타민E  | 김, 팔손이풀                                  |
| 위장염<br>예방개선     | 식이섬유(알긴산, 카라기난)   | 미역, 다시마, 우뚝가사리, 김                        |
| 담석증<br>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(commiution) 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.

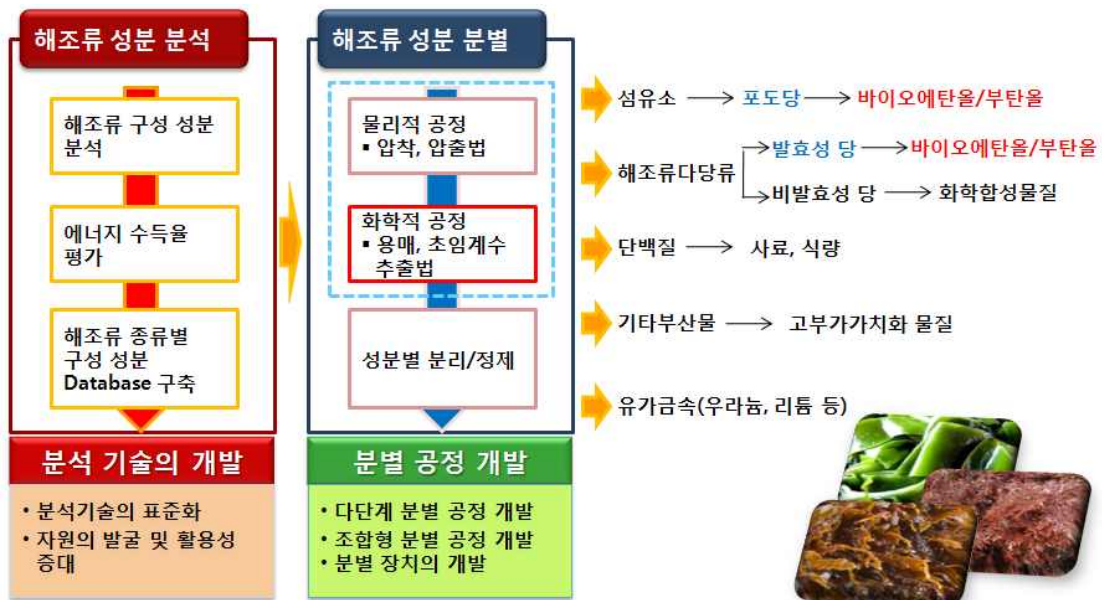
#### (다) 암모니아 폭쇄(AFEX; Ammonia Fiber Explosion)

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.



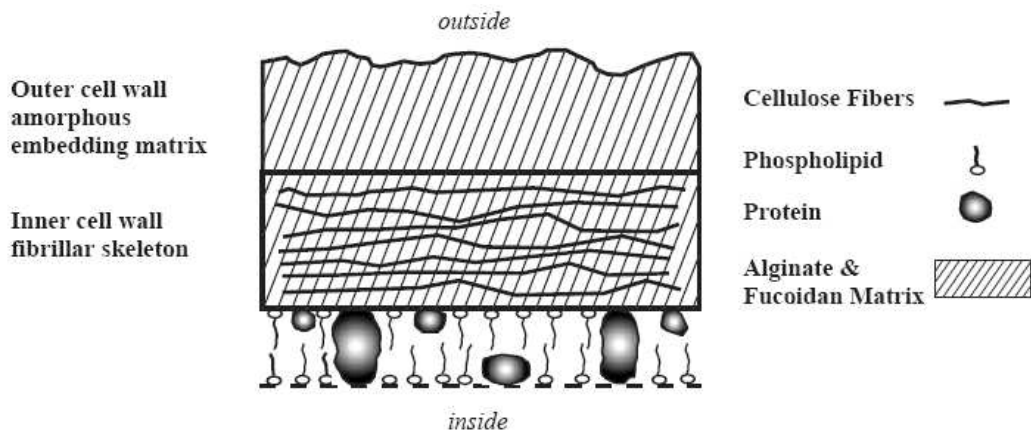
[그림 1-2-3] 화학적 해조류 전처리 기술.



### (3) 생물학적 방법

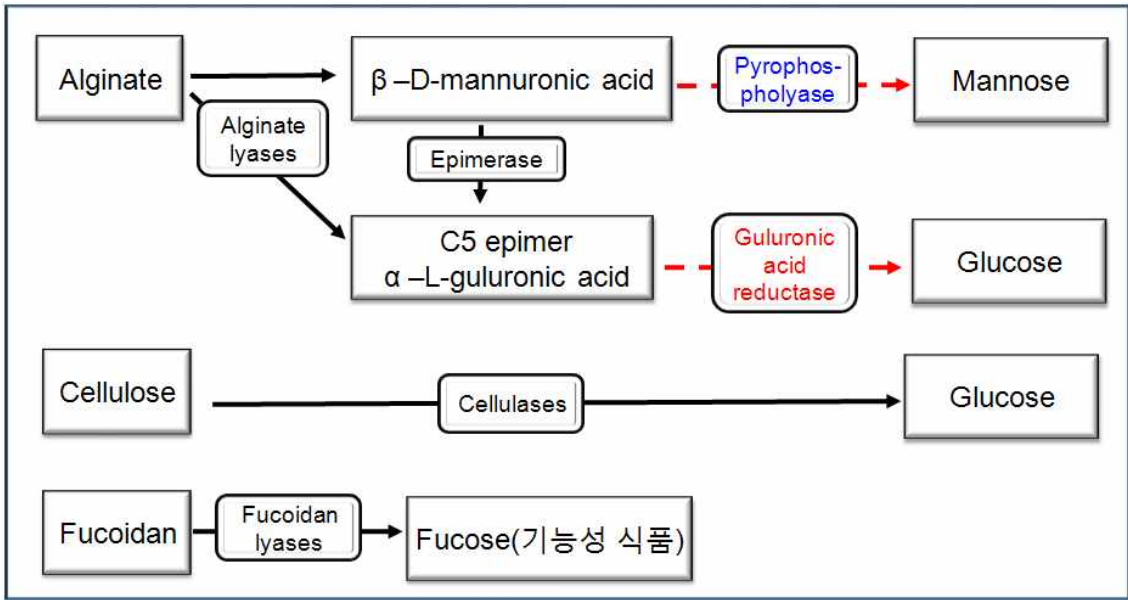
#### (가) 갈조류 분해효소 개요

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.

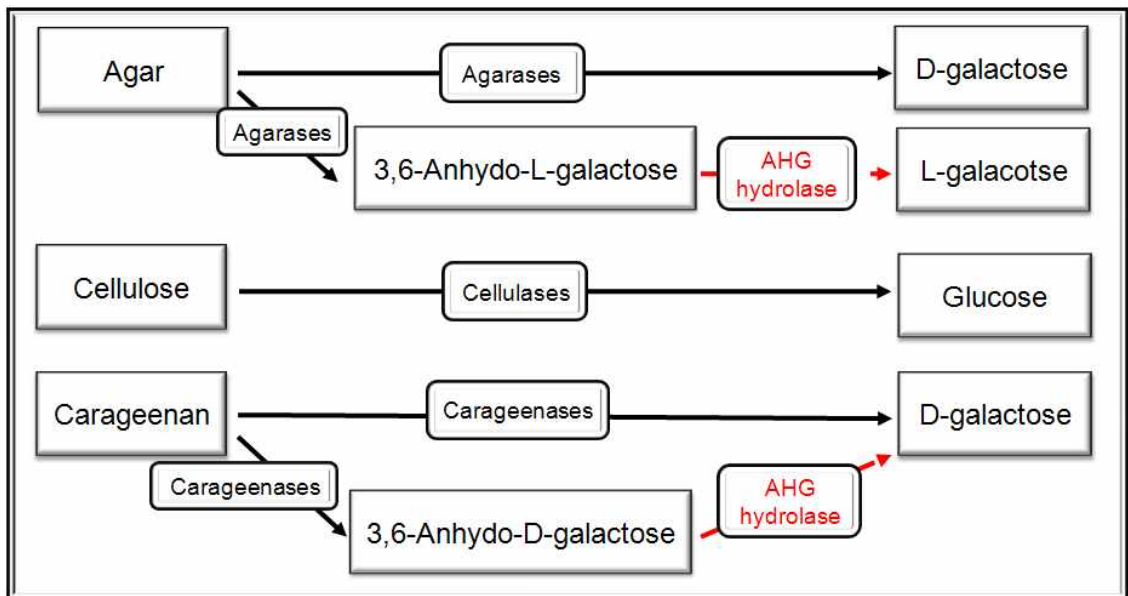
갈조류의 저장 탄수화물은 크게 두 종류로 구성되어 있는데 mannitol과 laminaran으로 구성되어 있다. Mannitol의 경우 수확시기에 따라 차이가 있지만 건중량의 최대 6.8-15%까지 존재하며 laminaran은 glucose로 이루어져 있으며 0.5-3.7%이상 존재한다고 알려져 있다.



[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 <sup>1)</sup>  | 개발 효소 <sup>2)</sup>                            | 개량 효소 <sup>3)</sup>  |
|--|--|--|
| Glucuronic acid reductase (녹조류)<br>AHG hydrolase (홍조류)<br>Gululuronic acid reductase (갈조류) | C-5 epimerase (갈조류)<br>Pyrophosphorylase (갈조류) | Cellulase (공통)<br>Glucuronase (녹조류)<br>Xyloglucanase (녹조류)<br>Alginate lyase (갈조류)<br>Agarase (홍조류)<br>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<br>guluronate    | guluronic acid<br>reductase<br>(glucose) | 0%<br>(12-34%) |
|     | fucoidan          | 세포벽     | 8-15%                   | fucose                       | X  | 8-15%          |
|     | laminaran         | 저장 탄수화물 | 0.5-3.7%<br>(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<br>hydrolase                         | 30%<br>(60%)   |
|     | agaran            |         |                         | L-galactose                  |  |                |
|     | cellulosic fibril | 세포벽     | 약 20%                   | glucose<br>xylose<br>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.

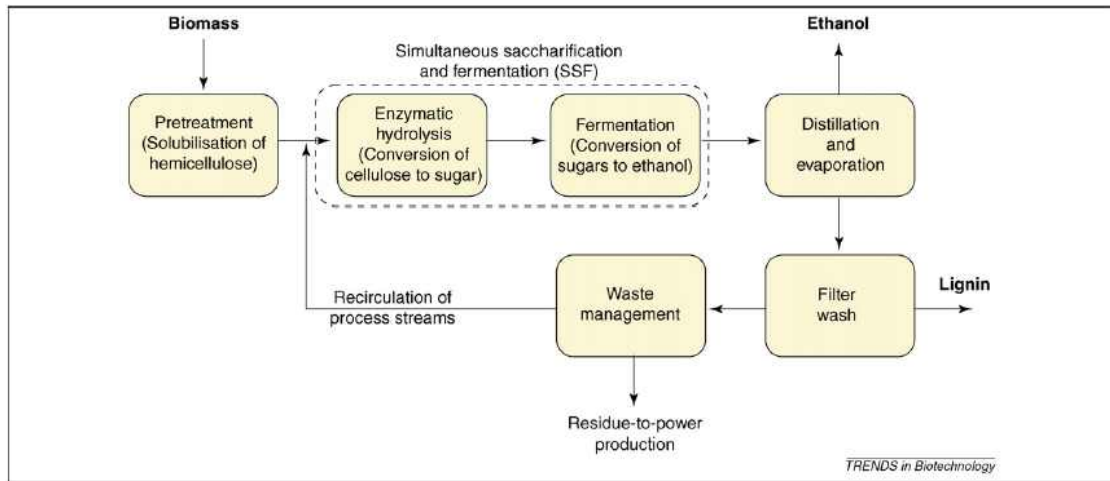
바이오에탄올 생산은 사탕수수, 옥수수, 사탕무와 밀 등 당질계 및 전분질계 식용 작물로부터 생산될 수 있으며, 현재 가동 중인 모든 상용화된 공정은 이들 원료를 사용하고 있다. 미국의 경우 옥수수 전분을 원료로 하여 바이오에탄올을 생산하고 있으며 브라질의 경우 사탕수수를 이용하여 바이오에탄올을 생산하고 있다. 하지만, 사탕수의 인류가 식량난에 허덕이고 있고 특히 경작면적이 적은 우리나라에서 식량자원을 에너지원으로 이용하는 것은 적절하지 못하며, 앞으로 급속하게 증가하게 될 수송용 에탄올의 수요량을 충족시키기 위해서는 안정적인 바이오에너지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

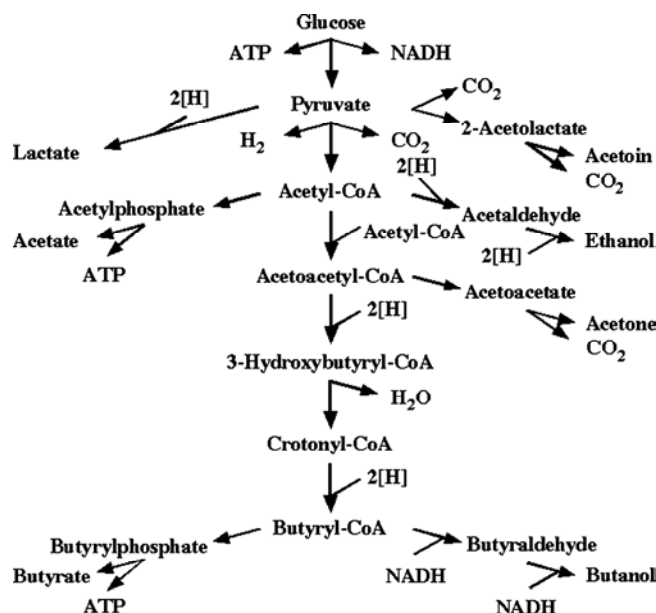
이렇게 바이오부탄올이 최근 급격하게 바이오연료로서 관심을 끌고 있으나, 사실 바이오부탄올 생산의 역사는 상당히 오래되어 이미 1차, 2차 세계대전 중에 아세톤 및 부탄올을 군사적 목적으로 생산/공급하였다. 특히 바이오부탄올을 생산하는 미생물을 발견한 와이즈만 박사는 이 공로로 후에 초대 이스라엘 대통령이 되었다. 이미 이 당시 바이오부탄올 생산량은 에탄올 다음으로 발효공정을 통하여 가장 생산을 많이 하는 제품이었다.

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, CO<sub>2</sub>, H<sub>2</sub> 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.

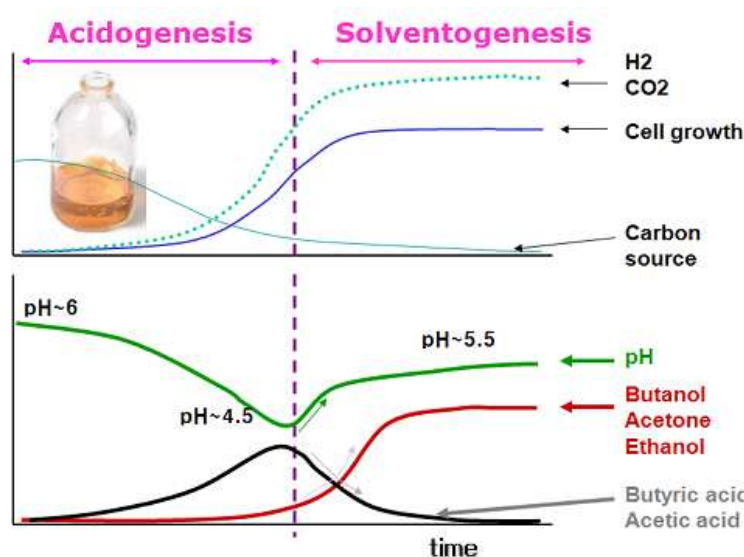
KIST 연구팀에서는 *C. acetobutylicum* 824을 이용한 부탄올 생성 및 추출연

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.

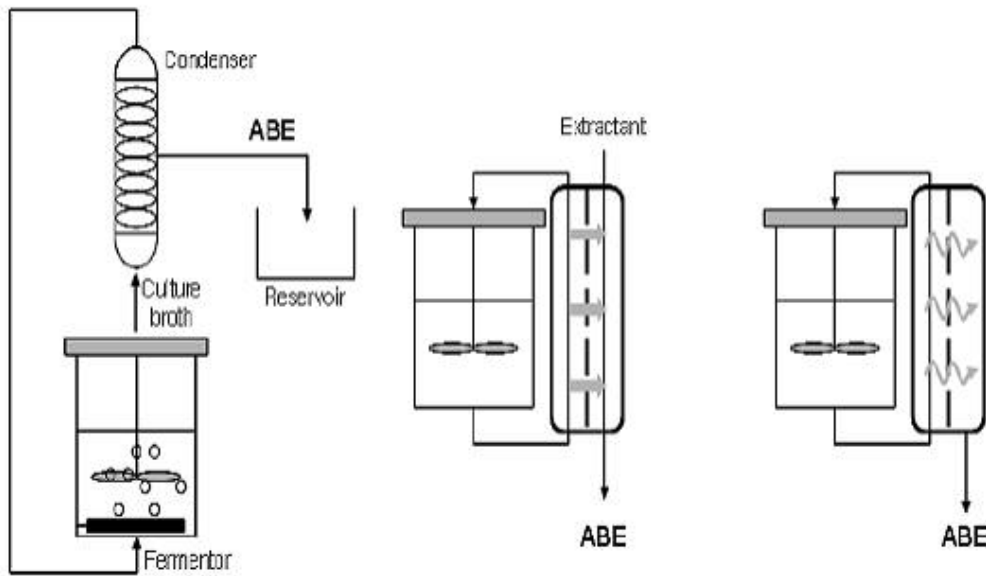
회분식으로 바이오부탄올을 생산할 경우 미생물 농도는 4 g/l 이하이며, 생산성은 0.5 g/l/hr 정도로 상당히 낮은 수준이다. 반면 연속식 발효 공정은 미생물을 배양하는데 있어서 초기 지연기, 멸균, 생물반응기의 청소 등에 소요되는 시간을 절감할 수 있어서 결과적으로 생산성을 증가시킬 수 있는 장점이 있다. 또한 생산물인 부탄올에 의한 생산물 저해 현상은 반응기에서의 연속적인 부탄올 제거(*in-situ* 생산물 제거)를 통하여 억제할 수 있다.

협기조건 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.

협기성 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 생산정보 다 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

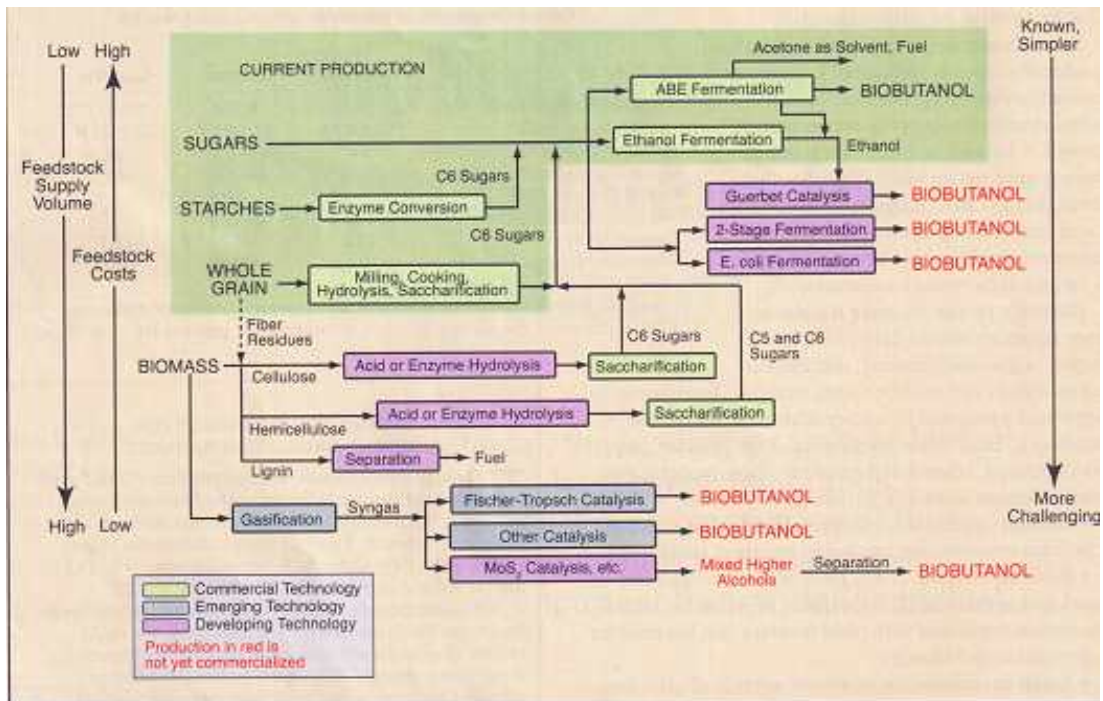
지 소모량에 대해서는 자료가 없어서 비교할 수 없기 때문에 실제 공정의 선택에 있어서는 에너지 소모량도 고려할 필요가 있다고 판단된다.

[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.

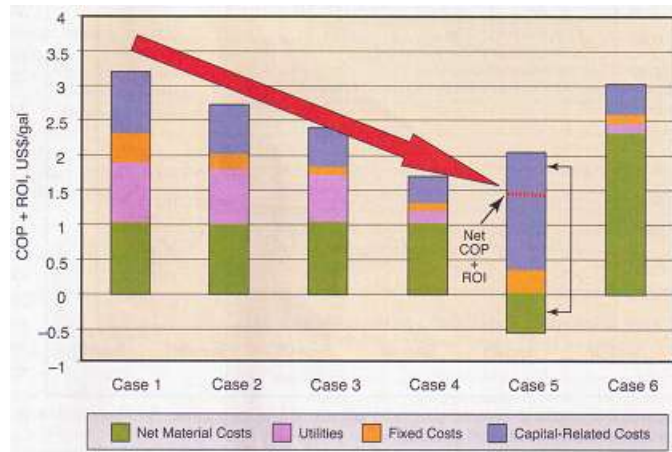
- Case 1: 목재칩을 탄소원으로 하는 *Clostridium acetobutyricum*에 의한 ABE 발효공정
- Case 2: Illinois 대학의 Blascheck 교수에 의해 개발된 돌연변이 균주인 *Clostridium beijerinckii* BA101이 옥수수 전분을 탄소원으로 하여 발효액에서의 부탄올 연속 추출공정없이 부탄올을 생산하는 공정 (기존 옥수수 전분을 이용하는 에탄올 공장을 용이하게 부탄올 생산공정으로 전환할 수 있는 유망한 공정임)
- Case 3: 옥수수전분을 탄소원으로 하여 Environmental 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

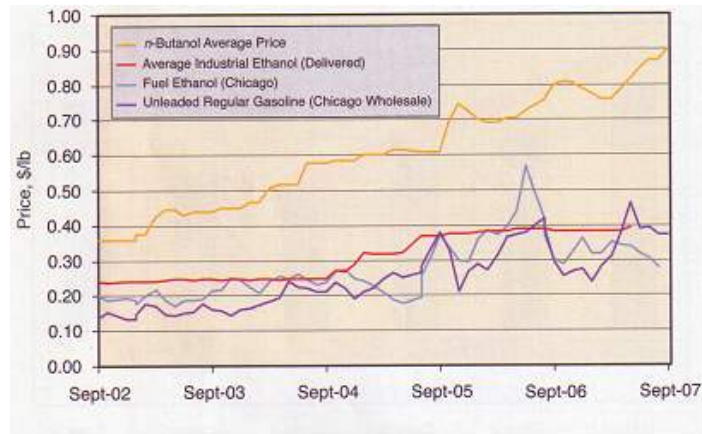
Case 6: 현재 석유화학공정에서 oxo synthesis 반응을 통한 부탄을 생산공정



[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.

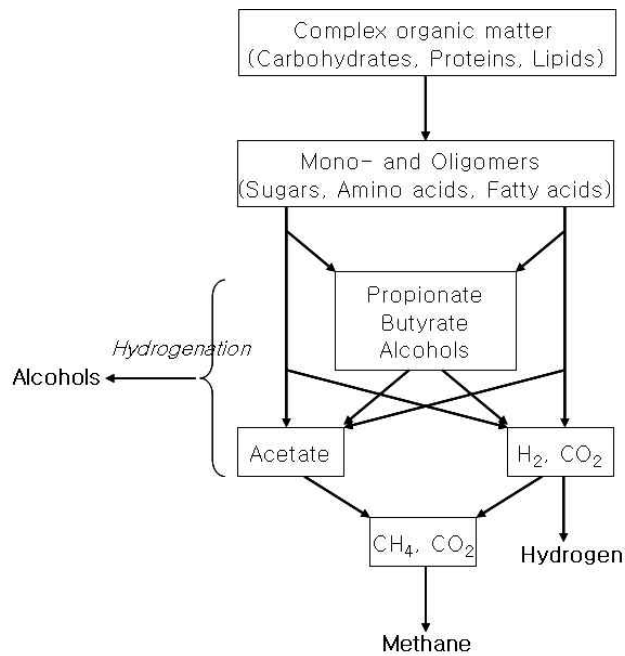
### 3. 그린에너지 융합공정 개발

#### 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

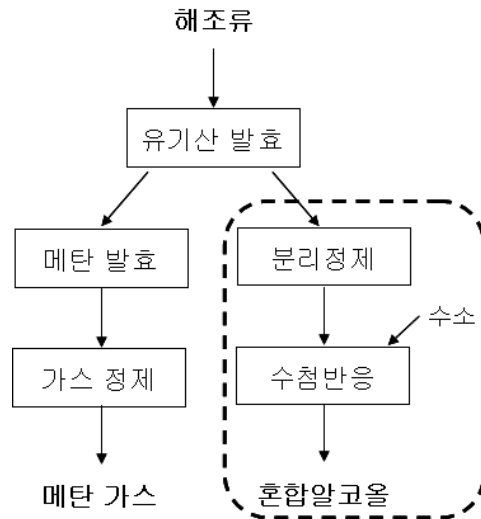
혐기성 소화 플랫폼의 가장 큰 장점은 특정미생물을 이용하는 것이 아니라 자연계에 존재하는 분해미생물을 그대로 활용하는 혼합배양이므로 별도의 살균공정이 필요 없고, 이에 따라 살균에 필요한 막대한 에너지가 절약될 수 있으며 바이오매스의 종류에 관계없이 적용이 가능하다는 점이다. 또한 바이오매스 분해를 위하여 고가의 효소를 별도로 투입할 필요가 없다.

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 Holtzapple 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 5~6배 빠르므로 생산성이 높다.
- 메탄발효 단계에서 CO<sub>2</sub>로 손실되는 carbon을 회수함으로써 높은 수율이 기대된다.  
(일본에서의 실증시험 결과로는 100 kg의 유기산으로부터 22 Nm<sup>3</sup>의 메탄을 회수하여 Carbon 회수율은 50%에 불과하다. 즉 유기산 중의 carbon의 50%가 미전환 혹은 CO<sub>2</sub>로 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 <sup>3</sup>     | 77 l      |
| 연소열          | 50MJ/Kg               | 26.8MJ/Kg |
| 에너지 수율(MJ/톤) | 786                   | 1628      |
| 비율           | 1                     | 2.1       |
| 단가           | 700 원/Nm <sup>3</sup> | 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 저절로 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, H<sub>2</sub>, CO<sub>2</sub>, N<sub>2</sub> 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 C<sub>1</sub> ~ C<sub>15</sub> 등의 다양한 유분을 생산하는 기술.
- 바이오디젤 원료 활용기술: 유지작물, 미세조류, 해조류 등의 바이오매스에서 추출가능한 식물성 오일 및 동물성 지방을 이용하여 알킬 에스테르, C<sub>1</sub>-C<sub>18</sub> 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<sub>x</sub>, SO<sub>x</sub> 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<br>400 kg/h(2000 kg/h 설계)<br>20 kg/h | Wellman<br>Dynamotive<br>RTI                     |
| Transported bed           | 약 2×1500kg/h<br>650 kg/h<br>20 kg/h           | Red Arrow (Ensyn)<br>ENEL (Ensyn)<br>VTT (Ensyn) |
| CFB(Circulated Fluid bed) | 10 kg/h                                       | CRES   |
| Rotating cone             | 150 kg/h                                      | BTG  |
| Ablative                  | 20 kg/h<br>20 kg/h                            | NREL<br>Aston                                    |
| Vacuum                    | 3500 kg/h                                     | Provac   |
| Unspecified               | 350 kg/h                                      | Fortum   |

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

- ZSM-5와 Y 같은 제올라이트 촉매는 Å 단위의 기공 크기로 인해 바이오매스 열분해를 통해 생성된 거대 분자들을 반응시키는데 어려움이 있다. 또한 다량의 강산점의 존재는 과도한 크래킹을 야기시키는 반면에 MCM-41, MCM-48, SBA-15 등과 같은 메조포러스 촉매는 기공의 크기가 나노미터 수준에서 매우 균일하며, 그 기공의 배열이 일정한 특징을 가진다. 또한 기공의 크기를 합성 조건에 따라 1 nm에서 30 nm까지 정밀하게 조절할 수 있다는 장점을 갖고 있으며 기공의 연결 구조도 조절이 가능하다. 메조포러스 촉매들은 산도가 제올라이트에 비하여 낮은 편으로 바이오매스 열분해에서 재료의 과도한 분해반응을 방지할 수 있으며 기공 크기가 ZSM-5, Y 등과 같은 제올라이트에 비해 큰 범위이므로, 바이오오일 개질에 아주 적합하여 기술 개발이 진행되고 있다. 그러나 MCM-41 같은 메조포러스 물질은 수열안정성이 현저히 낮기 때문에 바이오오일 내 30% 정도의 수분 함량과 500°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

제 2 절 생물학적 전환공정

제 3 절 그린에너지 융합공정

제 4 절 통합공정 및 제품개발



## 제 2 장 국내외 기술개발 현황

### 제 1 절 건강 신소재

#### 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):quinone oxidoreductase-1 (NQO1), superoxide dismutase (SOD), glutathione S-transferase (GST), hemeoxygenase (HO-1) 및  $\gamma$ -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 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>처리에 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 $\kappa$ B 단백질 분해 억제를 통한 NF- $\kappa$ B 전사인자 활성화 억제, PKC 및 JNK 활성화 감소를 통한 염증 병인 인자인 iNOS, COX-2, pro-inflammatory cytokines TNF- $\alpha$ 와 IL-1 $\beta$  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- $\kappa$ 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- $\kappa$ 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- $\kappa$ 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- $\kappa$ B의 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  $\gamma$ -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- $\alpha$ , 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

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, 바이오알코올 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 대사공학적인 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 km<sup>2</sup> 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 측정할 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 우뭇가사리 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” 수행하고 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 융합공정

#### 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 Nm<sup>3</sup>의 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 Nm<sup>3</sup>/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 Nm<sup>3</sup>/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 CO<sub>2</sub> 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 알코올생산 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 바이오에탄올을 제조하는 데 성공했는데 현재 목질계의 에탄올 전환 수율은 20~25%인 것과 비교하면 충분한 경제성이 있다고 생각된다. 또한 질소(N)를 영양분으로 삼는 홍조류의 특성상 연안해역의 해수정화 효과가 탁월하고, 이산화탄소 배출감축 제도가 본격 시행되는 2013년부터는 환경과 에너지 문제를 동시에 해결할 수 있는 가용자원으로 급부상할 전망이다.

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

## 제 4 절 통합공정 및 제품개발

### 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 도요다는 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, DB 구축 및 표준화

제 2 절 해조류 생리활성 물질의 항암효과 및 기전 분석

제 3 절 해조류 생리활성 물질의 항당뇨효과 및 기전

분석



## 제 3 장 건강신소재 개발

### 제 1 절 해조류 생리활성 물질의 항염증, 항치매, 항비만효과 및 기전 분석, DB 구축 및 표준화

#### 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

저탄소 녹색성장의 핵심동력이 될 신재생에너지의 개발 및 수산해양 녹색산업 창출 그리고 기후변화협약 대응을 위하여 해조류 바이오매스의 그린에너지화 및 통합적 활용을 위한 부산물의 효과적인 활용에 기여하고자 한다.

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 한다.

##### 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 희분으로 분리한 후 각각의 희분 함량을 분석하였으며, 각각의 희분에 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, CO<sub>2</sub> 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, 3T3-L1 preadipocyte, B16F10 melanoma cells (이상 ATCC), PCR용 primer (Macrogen), 2',7'-dichlorofluorescein diacetate (DCFH-DA), dimethylsulfoxide (DMSO), lipopolysaccharide (LPS),  $\alpha$ -MSH, insulin, IBMX, dexamethasone (이상 Sigma-Aldrich), luciferase assay kit, pRL-TK DNA, reverse transcriptase, CellTiter 96<sup>®</sup>AQ<sub>ueous</sub> One Solution Cell Proliferation Assay kit (이상 Promega), penicillin, streptomycin (Gibco), 1차 항체, 2차 항체 (이상 Santacruz), ECL 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, 탕욕상에서 3 시간 동안 추출하였다. 추출액을 여과하여 rotary vacuum evaporator를 사용하여 40°C 에서 농축하였다. 위와 같은 방법으로 다시 2 회 더 반복하여 주정추출물을 얻었다. 추출물을 H<sub>2</sub>O: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 H<sub>2</sub>O층에 동량의 EtOAc를 가하여 상층의 EtOAc 가용

부를 모아 EtOAc 분획물을 분리하였다. 또한 *n*-BuOH에 대해서도 동일한 방법으로 시행하여 상층의 *n*-BuOH 획분과 하층의 H<sub>2</sub>O 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*-hexan 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, 항암 활성)을 측정하여, Shim-pack PREP-ODS (5 mm, 100 Å, 250 mm × 20 mm, Shimadzu Co., Tokyo, Japan) 칼럼으로 순수하게 분리하였다.

곰피의 경우 항산화활성이 높은 EtOAc 획분 5g을 methanol (MeOH)에 녹여 대형 silica column (100 × 10 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 mm, 100 Å, 250 mm × 20 mm, Shimadzu Co., Tokyo, Japan) 칼럼으로 순수하게 분리하였다.

#### (라) 활성 화합물의 구조/기능분석

분리된 화합물의 동정은 본 연구진이 확보하고 있는 표품과 1차적으로 C<sub>18</sub> 과 silica TLC plate에 전개시켜 확인하였다. 확증이 안될 경우 <sup>1</sup>H-과 <sup>13</sup>C-NMR spectrum을 비교분석하였다. 신규 화합물의 경우 부경대 공동실험실습관에 의뢰하여 분리물을 동정하였다. 분리된 화합물은 화학적 방법에 의한 유도체의 제조 및 분해산물을 얻었다. 2D-NMR spectroscopy로서 <sup>1</sup>H-<sup>1</sup>H, <sup>1</sup>H-<sup>13</sup>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 Titer<sup>96</sup> 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 ml의 배지와 5 ml의 MTS 용액을 가하여 1 시간 반응 시킨 후 생성되는 formazan을 490 nm에서 흡광도를 측정하였다.

#### ② 염증 매개인자 (NO, PGE<sub>2</sub>) 분석

RAW 264.7 macrophage를  $5 \times 10^5$  농도로 12-well plate에서 24시간 배양하였다. 배양된 세포에 각기 다른 농도의 분리된 시료와 1 mg/mL의 LPS를 가한 후 24 시간 배양하였다. 배양된 배지성분을 회수하여 배지중의 nitrite (NO)와 PGE<sub>2</sub>의 농도를 분석하였다. NO는 Griess 반응에 따라 분석하였다 [32]. 즉, 100 ml의 세포배양액에 동일량의 Griess 시약 (0.1% naphthylethylenediamine dihydrochloride and 1% sulfanilamide in 5% H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>)을 가한 후 10 분 후에 540 nm에서 흡광도를 microplate reader로 측정하였다. PGE<sub>2</sub> 농도는 PGE<sub>2</sub> ELISA kit (eBiosciences)를 사용하여 측정하였다.

#### ③ 염증관련 cytokine의 분석

염증관련 cytokine (TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , 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 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 mg)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-kB, Ikb-a 등이다.

#### ⑤ RNA분리 및 RT-PCR

세포내 total RNA는 RNeasy mini kit (Qiagen, USA)로 분리하였다. 분리된 total RNA 3 mg을 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-kB의 전사활성은 NF-kB 결합부위를 함유하는 plasmid를 이용하여 분석하였다. NF-kB 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 mg 단백질과 substrate를 첨가하여 luminometer로 luciferase 활성을 측정하였다.

#### (나) 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 $\gamma$ 와 SREBP-1c와 같은 전사인자의 발현량을 시료처리 후 7 일째에 Western blot으로 분석하였다. Western blot 조건은 항염증효과시의 분석조건과 동일하며, 1 차 항체 처리시의 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 $\gamma$ 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 $\gamma$  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'.

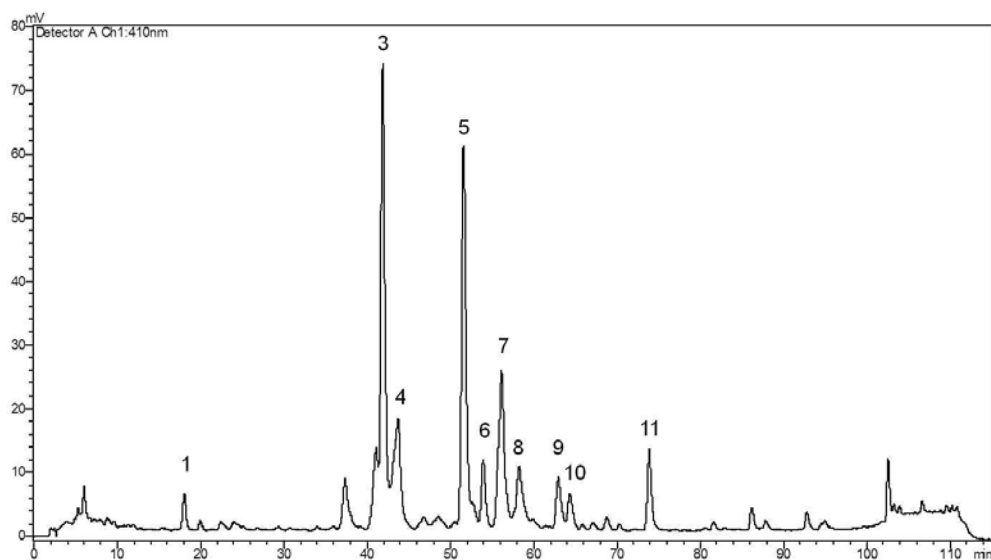
### 3. 연구수행 결과

#### 가. 다시마 추출물의 생리활성

##### (1) 다시마로부터 분리한 fucoxanthin의 항염증 효과

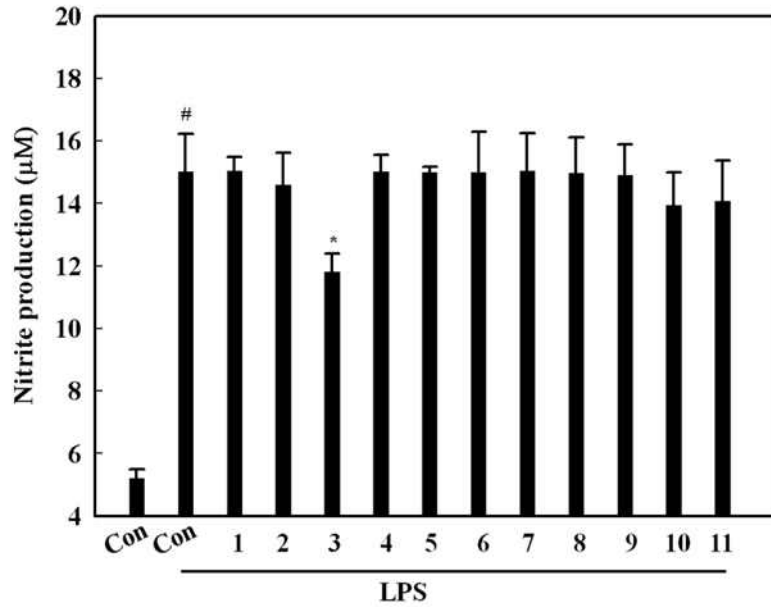
###### (가) 다시마로부터 fucoxanthin 분리

전년도에서는 항염증 활성이 우수한 *n*-헥산 획분과 *n*-헥산 획분으로부터 분리된 GS3-ODS6 획분 [lipophilic compound (LLC)]의 항염증 활성과 그 기전을 밝혔다. 전년도 연구 결과를 바탕으로 항염증 활성이 우수한 GS3-ODS6 획분을 Luna RP-18 [Luna C18(2), 5  $\mu$ m, 250  $\times$  10 mm, Phenomenex, Torrence, CA, USA]와 Shimadzu HPLC에 의해 분자량 별로 분리하기 위하여 methanol (0.34 ml/min)로 용출시켜 분자량에 따라 11개의 획분으로 분리하였다 (그림 3-1-1).



[그림 3-1-1] GS3-ODS6 획분의 Shimadzu HPLC 크로마토그램

각 획분의 항염증 활성을 확인하기 위하여, 25  $\mu$ g/ml의 시료와 LPS를 함께 RAW 264.7 세포에 처리하여 NO 생성량을 비교하였다. 그림 3-1-2에 나타나듯이, 3번 획분에서 가장 높은 항염증 활성을 확인하였으며 반복적인 HPLC를 수행한 후 NMR 분석을 통하여 저분자 화합물의 구조를 확인하였다(표 3-1-1).

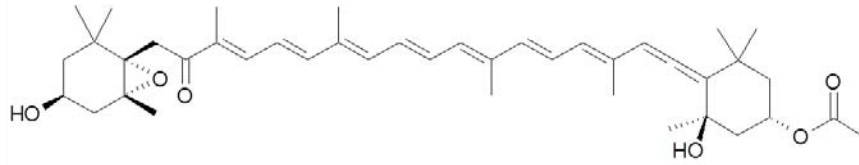


[그림 3-1-2] Shimadzu HPLC로 분리된 각 획분의 항염증 활성

[표 3-1-1] 다시마로부터 분리된 fucoxanthin의  $^{13}\text{C}$ -NMR과  $^1\text{H}$ -NMR 결과

| Position | $^{13}\text{C}$ (ppm) | $^1\text{H}$ (ppm) (multiplicity, J in Hz)              | Position               | $^{13}\text{C}$ (ppm) | $^1\text{H}$ (ppm) (multiplicity, J in Hz)        |
|----------|-----------------------|---|------------------------|-----------------------|---|
| 1        | 35.33                 |   | 1'                     | 35.97                 |   |
| 2        | 45.65                 | 1.35 (1H, <i>m</i> ), 1.48 (1H, <i>d</i> , 12.11)       | 2'                     | 45.61                 | 1.4 (1H, <i>d</i> , 11.94), 1.97 (1H, <i>m</i> )  |
| 3        | 64.57                 | 3.8 (1H, <i>d</i> , 10.00)                              | 3'                     | 68.19                 | 5.35 (1H, <i>d</i> , 4.43)                        |
| 4        | 41.82                 | 1.76 (1H, <i>d</i> , 17.19), 2.3 (1H, <i>d</i> , 17.19) | 4'                     | 45.41                 | 1.48 (1H, <i>m</i> ), 2.26 (1H, <i>d</i> , 15.22) |
| 5        | 66.33                 |   | 5'                     | 72.88                 |   |
| 6        | 67.25                 |   | 6'                     | 117.68                |   |
| 7        | 40.98                 | 2.58 (1H, <i>d</i> , 10.60), 3.6 (1H, <i>d</i> , 18.23) | 7'                     | 202.22                |   |
| 8        | 198.29                |   | 8'                     | 103.57                | 6.03 (1H, <i>s</i> )                              |
| 9        | 134.7                 |   | 9'                     | 132.69                |   |
| 10       | 139.32                | 7.13 (1H, <i>d</i> , 10.60)                             | 10'                    | 128.72                | 6.11 (1H, <i>d</i> , 11.24)                       |
| 11       | 123.55                | 6.54 (1H, <i>d</i> , 13.14)                             | 11'                    | 125.89                | 6.58 (1H, <i>m</i> )                              |
| 12       | 145.24                | 6.65 (1H, <i>d</i> , 14.91)                             | 12'                    | 137.29                | 6.33 (1H, <i>d</i> , 11.05)                       |
| 13       | 135.62                |   | 13'                    | 138.3                 |   |
| 14       | 136.83                | 6.39 (1H, <i>d</i> , 11.56)                             | 14'                    | 132.38                | 6.25 (1H, <i>d</i> , 11.98)                       |
| 15       | 129.61                | 6.61 (3H, <i>s</i> )                                    | 15'                    | 132.71                | 6.73 (1H, <i>m</i> )                              |
| 16       | 25.21                 | 1.01 (3H, <i>s</i> )                                    | 16'                    | 31.49                 | 1.05 (3H, <i>s</i> )                              |
| 17       | 28.32                 | 0.94 (3H, <i>s</i> )                                    | 17'                    | 31.49                 | 1.33 (3H, <i>s</i> )                              |
| 18       | 20.76                 | 1.2 (3H, <i>s</i> )                                     | 18'                    | 29.39                 | 1.36 (3H, <i>s</i> )                              |
| 19       | 12.06                 | 1.92 (3H, <i>s</i> )                                    | 19'                    | 14.2                  | 1.79 (3H, <i>s</i> )                              |
| 20       | 12.99                 | 1.97 (3H, <i>s</i> )                                    | 20'                    | 13.12                 | 1.97 (3H, <i>s</i> )                              |
|          |                       |   | 3'OAc, CH <sub>3</sub> | 170.87                |   |
|          |                       |   | 3'OAc, C=O             | 21.35                 | 2.02 (3H, <i>s</i> )                              |

기존의 연구 자료와 비교하여 다시마로부터 분리된 저분자 화합물은 fucoxanthin으로 확인되었으며(그림 3-1-3), 이를 이용하여 항염증 활성과 그 기전을 실험하였다.



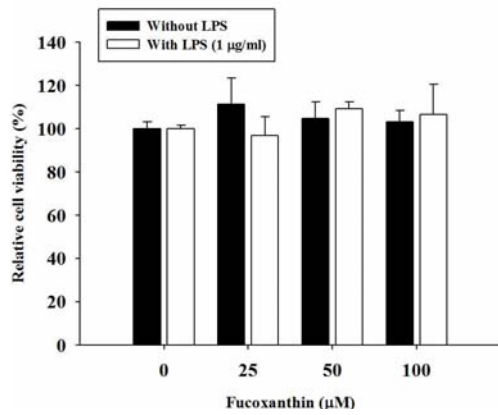
Fucoxanthin,  $C_{42}H_{58}O_6$ , FW=658.91

[그림 3-1-3] 다시마로부터 분리된 fucoxanthin

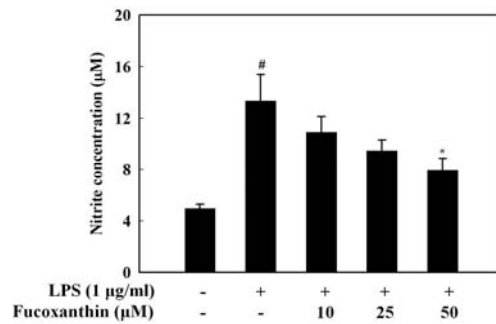
(나) 다시마로부터 분리된 fucoxanthin의 항염증 활성

세포에서 염증반응이 일어나면 COX-2 효소가 발현되면서 아라키돈산을 PGE<sub>2</sub>로 전환시키며 대식세포에서 생성되는 PGE<sub>2</sub>는 고통, 발열 등의 생리현상을 유발한다. 따라서 대식 세포외로 분비되는 PGE<sub>2</sub>는 NO와 함께 염증 반응을 확인하는 지표로 활용된다[33-35].

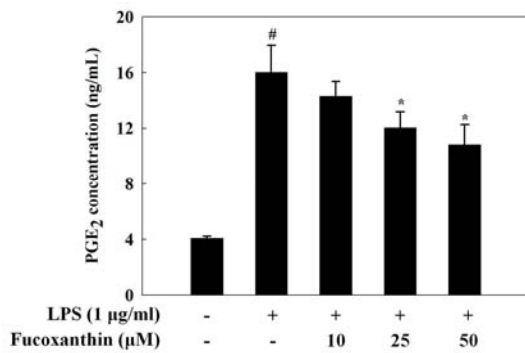
다시마로부터 분리된 fucoxanthin의 항염증 효과를 분석하기 위하여 fucoxanthin을 LPS와 함께 RAW 264.7 세포에 처리하여 실험하였다. 우선 fucoxanthin을 단독으로, 또는 LPS와 함께 RAW 264.7 세포에 처리하여 24 시간 배양한 후 세포 생존률을 확인하였다. 그 결과 fucoxanthin은 RAW 264.7 세포에 대하여 100  $\mu$ M의 농도까지 세포 생존률에 영향을 미치지 않는 것으로 나타났다(그림 3-1-4 가). Fucoxanthin의 항염증 효과를 확인하기 위하여 fucoxanthin을 LPS와 함께 RAW 264.7 세포에 처리하여 16 시간 배양한 후 배지내 nitrite와 PGE<sub>2</sub> 생성량을 각각 Griess assay와 ELISA kit를 사용하여 NO와 PGE<sub>2</sub>의 생성 억제능을 분석하였다. 그 결과 fucoxanthin은 LPS에 의한 nitrite와 PGE<sub>2</sub>를 농도 의존적으로 저해시키는 것으로 나타났다(그림 3-1-4 나, 다). 이러한 결과는 다시마로부터 분리된 fucoxanthin이 LPS에 의한 염증 반응을 저해시킨다는 것을 나타낸다.



가



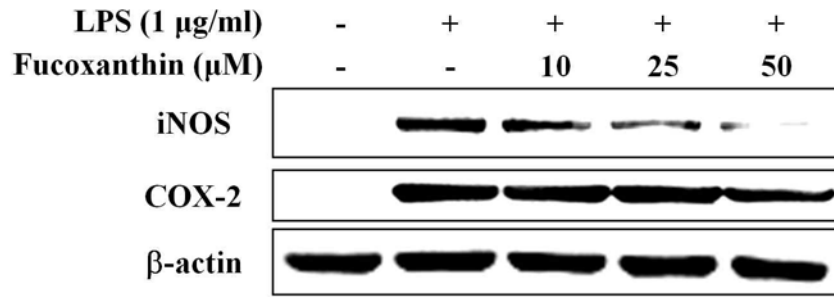
나



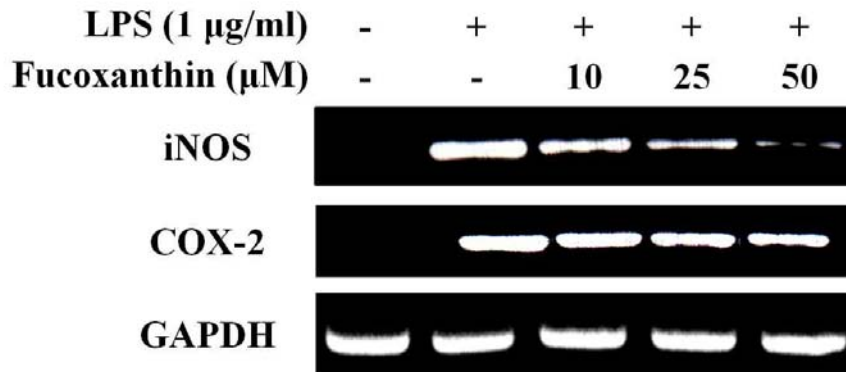
다

[그림 3-1-4] 다시마로부터 분리된 fucoxanthin의 항염증 활성. 가, 세포 생존률 분석; 나, nitrite 생성량 분석; 다, PGE<sub>2</sub> 생성량 분석

다시마로부터 분리된 fucoxanthin의 항염증 기전을 확인하기 위하여 RAW 264.7 세포에 fucoxanthin과 LPS를 처리하여 16 시간 배양한 다음 단백질을 추출하여 Western blot으로 NO를 생성시키는 iNOS와 PGE<sub>2</sub>를 생성하는 COX-2 효소의 단백질 발현 변화를 분석하였다. 그리고 RAW 264.7 세포에 fucoxanthin과 LPS를 처리하여 6 시간 배양한 다음 total RNA를 추출하여 RT-PCR로 iNOS와 COX-2 효소의 mRNA 발현 변화를 분석하였다. 그 결과 fucoxanthin은 LPS에 의하여 유발되는 iNOS와 COX-2 단백질과 mRNA의 과발현을 농도 의존적으로 억제시키는 것으로 나타났다(그림 3-1-5). 이 결과는 fucoxanthin이 LPS에 의해 유도되는 iNOS와 COX-2의 발현을 전사단계에서 억제시킴으로써 nitrite와 PGE<sub>2</sub>의 생성을 감소시킨다는 것을 나타낸다.



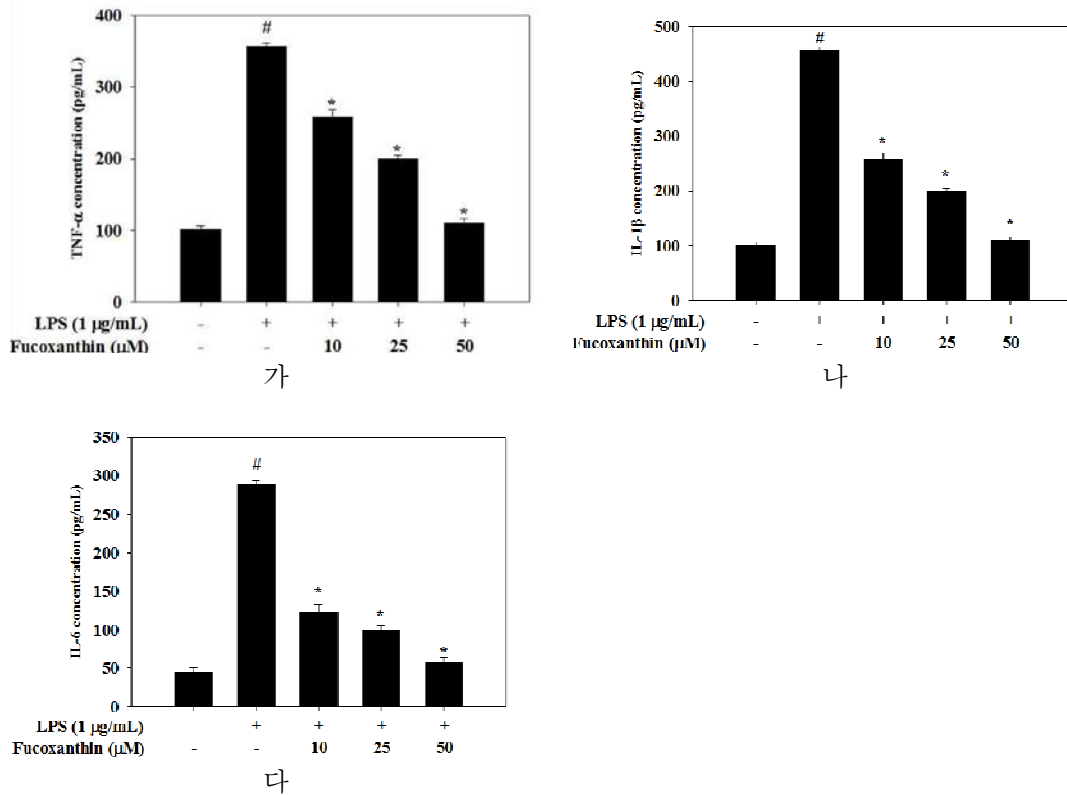
가



나

[그림 3-1-5] 다시마로부터 분리된 fucoxanthin의 iNOS와 COX-2 효소 단백질 발현 저해 효과. 가, iNOS와 COX-2 단백질 발현; 나, iNOS와 COX-2 mRNA 발현

Macrophage에서 LPS에 의해 염증 반응이 일어나면 여러 기전을 통하여 TNF- $\alpha$ , IL 등 염증 관련 cytokine이 발현되며 이는 염증 반응에 대한 민감 지표가 된다[3-6]. 다시마로부터 분리된 fucoxanthin을 LPS와 처리한 16 시간 배양한 후 상층액의 염증성 cytokine을 ELISA kit를 통하여 분석한 결과 LPS에 의해 다량 발생되는 TNF- $\alpha$ 와 IL-1 $\beta$ , IL-6가 fucoxanthin에 의하여 농도 의존적으로 억제되는 것을 확인하였다(그림 3-1-6). 이러한 결과는 다시마로부터 분리된 fucoxanthin이 LPS에 의해 일어나는 염증 반응을 억제한다는 연구 결과를 뒷받침해준다.



[그림 3-1-6] 다시마로부터 분리된 fucoxanthin의 염증성 cytokine 생성 저해 효과. 가, TNF- $\alpha$ ; 나, IL-1 $\beta$ ; 다, IL-6

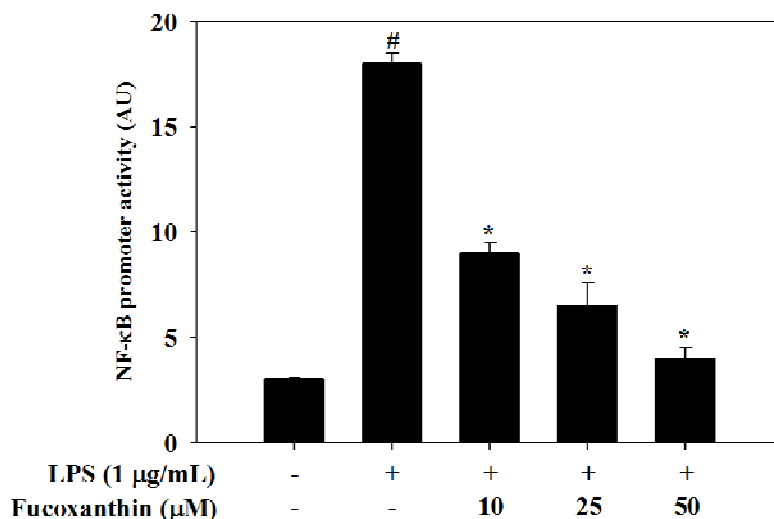
#### (다) 다시마로부터 분리된 fucoxanthin의 항염증 기전

본 실험 결과를 통하여 다시마로부터 분리된 fucoxanthin이 LPS에 의한 nitrite와 PGE<sub>2</sub> 생성을 저해시키며 이는 fucoxanthin이 iNOS와 COX-2 효소의 발현을 mRNA 전사 단계에서 조절할 수 있기 때문으로 나타났다. 또한, TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6 등 염증성 cytokine의 생성도 억제되는 것을 확인할 수 있었다. 따라서 다시마로부터 분리된 fucoxanthin의 항염증 활성이 세포내 어떠한 경로를 조절하여 일어나는지 분석이 요구된다.

세포내 중요한 역할을 하는 전사인자 NF- $\kappa$ B는 염증 반응이 일어나면 활성화되어 iNOS와 COX-2, 그리고 염증성 cytokine들의 발현을 조절하는 것으로 알려져 있다[36-38]. 정상 상태에서 NF- $\kappa$ B는 세포내 I $\kappa$ B- $\alpha$ 와 heterodimer를 이루고 있으며 염증 반응 등 자극이 일어나면 여러 기전을 통하여 I $\kappa$ B- $\alpha$ 의 인산화가 일어나며 이는 ubiquitin에 의해 분해가 유도된다. 이때 I $\kappa$ B- $\alpha$ 로부터 분리된 NF- $\kappa$ B는 핵으로 이동하여 다양한 유전자의 전사를 촉진시키는 것으로 알려져 있다[39, 40].

다시마로부터 분리된 fucoxanthin의 항염증 활성이 NF- $\kappa$ B 전사인자의 조절을 통하여 나타나는 것인지 확인하기 위하여 RAW 264.7 세포에 NF- $\kappa$ B promoter

유전자가 포함된 luciferase vector를 transfection 시킨 후 fucoxanthin을 LPS와 함께 처리하여 6 시간 배양한 후 발광되는 luminescence를 측정하여 NF- $\kappa$ B promoter의 활성화 정도를 분석하였다. 그 결과, fucoxanthin은 LPS에 의한 NF- $\kappa$ B promoter의 활성화를 농도의존적으로 억제하는 것으로 나타났다(그림 3-1-7).



[그림 3-1-7] 다시마로부터 분리된 fucoxanthin이 NF- $\kappa$ B promoter 활성화에 미치는 영향

LPS에 의한 NF- $\kappa$ B promoter 활성화에 대하여 다시마로부터 분리된 fucoxanthin의 저해 작용이 어떤 단계에서 일어나는지 확인하기 위하여 fucoxanthin과 LPS를 처리한 RAW 264.7 세포를 30 분간 배양한 후 세포질과 핵을 구분하여 단백질을 회수하였다. 변형시킨 단백질은 Western blot을 통하여 I $\kappa$ B- $\alpha$ 와 NF- $\kappa$ B의 단백질 발현 정도를 분석하였다. 그림 3-1-8에서 나타낸 바와 같이 LPS를 처리한 경우 세포질에서 I $\kappa$ B- $\alpha$ 와 NF- $\kappa$ B의 단백질이 감소하였으며 핵에서는 NF- $\kappa$ B 단백질의 양이 증가하는 것으로 나타났다. 이는 LPS가 I $\kappa$ B- $\alpha$ 의 분해를 유도하여 NF- $\kappa$ B의 핵이동을 증가시킨다는 것을 나타낸다. Fucoxanthin을 처리하였을 경우, 세포질에서 I $\kappa$ B- $\alpha$  단백질이 LPS만을 처리하였을 때보다 증가하였으며 NF- $\kappa$ B 단백질의 양도 증가함을 확인할 수 있었다. 또한 핵에서 NF- $\kappa$ B 단백질의 양이 LPS만 처리하였을 때보다 감소하는 것으로 나타났다. 이러한 결과는 다시마로부터 분리한 fucoxanthin이 LPS에 의한 I $\kappa$ B- $\alpha$ 의 분해를 억제함으로써 NF- $\kappa$ B의 핵이동을 저해하여 관련 유전자들의 전사를 조절할 수 있다는 것을 의미한다.



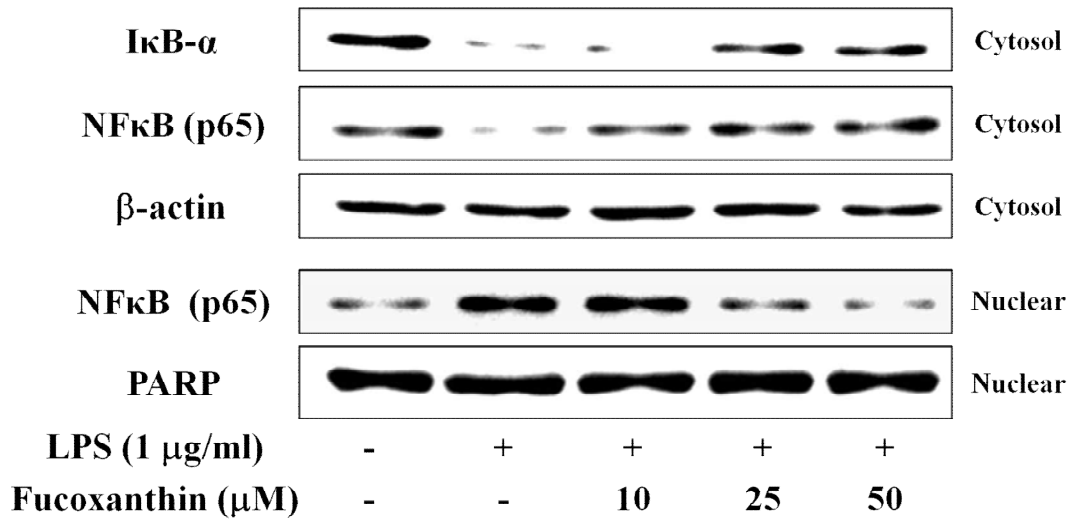
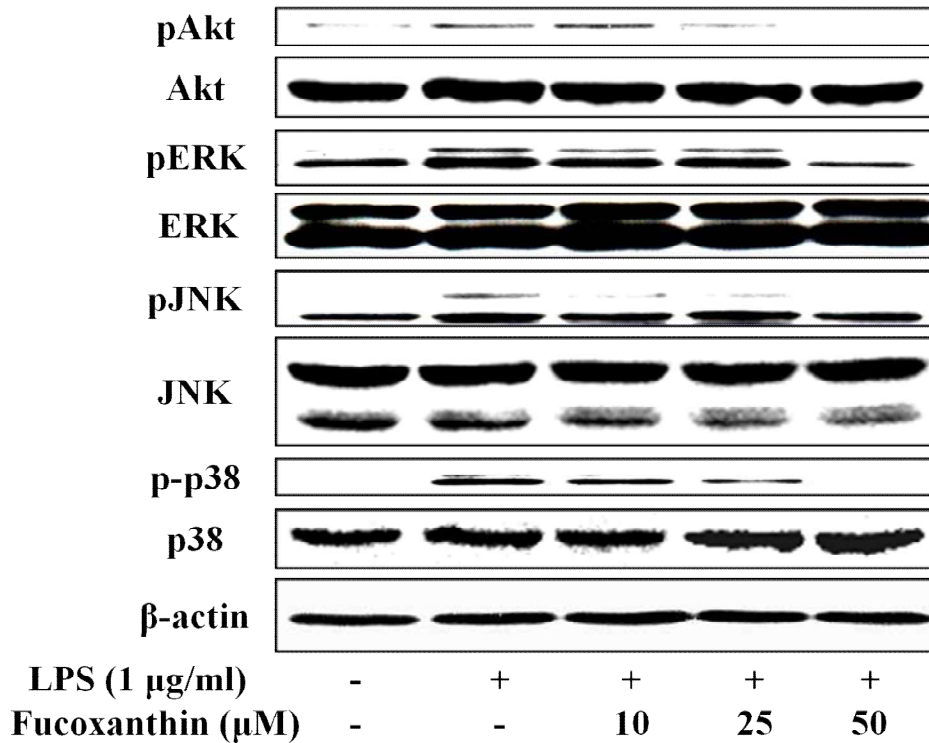


그림 [3-1-8] 다시마로부터 분리한 fucoxanthin이 NF-κB 전사인자의 활성화에 미치는 영향

세포내 NF-κB 전사인자의 활성화에는 MAPK와 PI3K/Akt signaling pathway에 의해 조절되는 것으로 알려져 있다[41-43]. 특히 이들은 IκB-α의 인산화에 영향을 미쳐 NF-κB의 유리를 증가시킨다. 그 중, MAPK 단백질인 ERK, JNK, p38 MAPK는 염증성 유전자의 전사 조절을 증폭시키며[44], PI3K와 그 하위 인자인 Akt는 mouse 유래 대식 세포에서 NF-κB의 활성화를 조절하는 것으로 잘 알려져 있다[42, 43]. 본 연구에서는 다시마로부터 분리된 fucoxanthin이 NF-κB의 활성화를 억제하는 것으로 나타났기 때문에 이와 관련된 상위 인자들을 분석하여 fucoxanthin의 항염증 기전을 확인하고자 하였다. 이를 위하여, fucoxanthin을 LPS와 함께 처리하여 30 분 후 세포내 단백질을 회수하였으며 이를 Western blot으로 분석하였다. 실험 결과, fucoxanthin은 LPS에 의한 Akt와 ERK, JNK, p38 MAPK의 인산화를 모두 저해하는 것으로 확인되었다(그림 3-1-9). 이러한 결과는 fucoxanthin이 LPS에 의해 활성화되는 Akt와 MAPK 단백질들을 조절함으로써 IκB-α의 분해를 억제하고 NF-κB의 핵이동을 저해할 수 있다는 것을 의미한다.

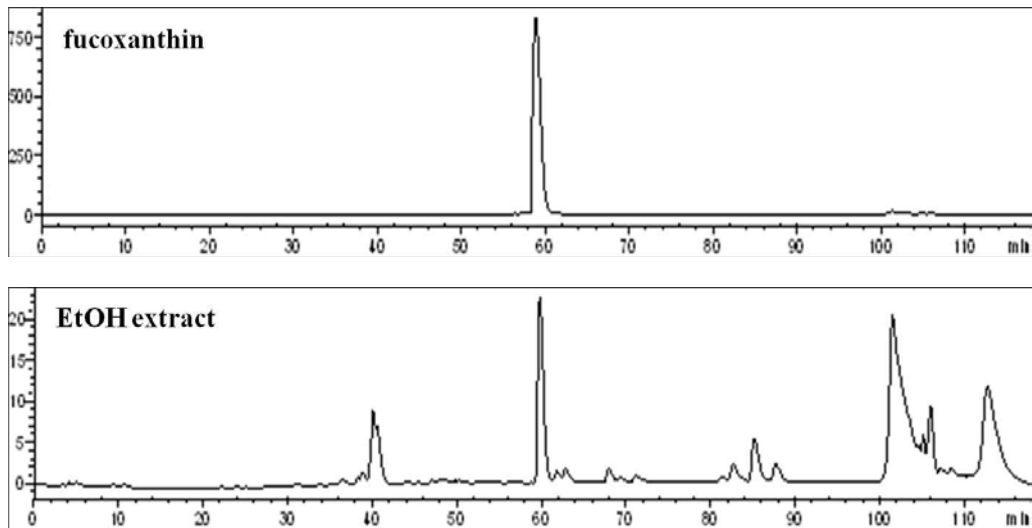


[그림 3-1-9] 다시마로부터 분리된 fucoxanthin이 MAPKs와 Akt의 활성화에 미치는 영향

본 연구결과에서 항염증 활성을 보이는 다시마 주정추출물의 *n*-헥산 획분으로부터 분리된 fucoxanthin의 우수한 항염증 활성을 확인하였다. Fucoxanthin은 mouse 유래 대식세포에서 LPS에 의해 유도되는 MAPK와 Akt의 활성화를 억제함으로써 NF-κB 전사인자의 활성화를 억제하여 관련 유전자들의 전사를 조절하고 염증 반응에 의해 나타나는 지표들의 생성을 감소시키는 것으로 판단된다.

(라) 다시마 추출물의 표준화를 위한 HPLC 표준 크로마토그램의 확립

이상의 연구 결과에서 다시마 주정추출물이 우수한 항염증 활성을 확인하였으며 주정추출물로부터 항염증 활성을 보이는 저분자 화합물 fucoxanthin을 분리하였다. 연구 결과를 바탕으로 추후 다시마 주정추출물의 제품화를 위하여 표준화 작업의 핵심 기술인 HPLC 표준화 크로마토그램을 확립하고자 하였다. 표준물질인 fucoxanthin과 다시마 주정추출물을 Shiseido capcellpak C18 (4.6 × 250 mm, 5 μm)에 co-injection하고 ACN (1.0 ml/min)으로 용출시켜 크로마토그램을 확인하였다(그림 3-1-10). 크로마토그램에서 다시마 주정추출물에 fucoxanthin이 다량 함유되어 있는 것을 확인할 수 있었으며, 다시마 주정추출물의 표준화 및 품질관리를 위한 지표성분으로 fucoxanthin이 우선적으로 검토되어야 할 것으로 판단된다.



[그림 3-1-10] 다시마 주정추출물과 fucoxanthin의 HPLC 크로마토그램.

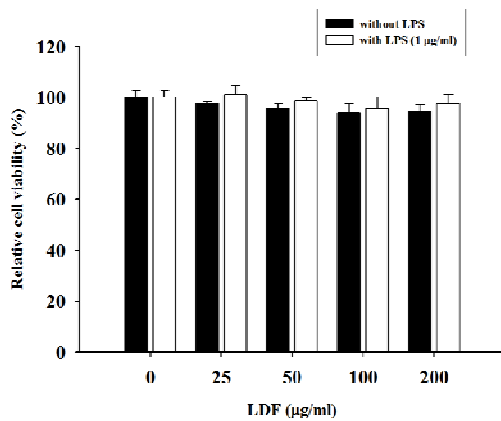
현재까지의 연구 결과에서 다시마 주정추출물 및 *n*-헥산, 디클로로메탄 분획의 우수한 항염증 활성을 분석하였다. 다시마 추출물의 항염증 활성은 LPS에 의해 활성화되는 Akt 및 MAPK를 차단하여 I $\kappa$ B- $\alpha$ 의 분해를 억제하고 이에 따른 NF- $\kappa$ B 전사인자의 활성화를 저해함으로써 염증 관련 유전자들의 전사를 조절시킨다는 것을 본 연구를 통하여 밝혀내었다. 또한, 주정추출물의 *n*-헥산 분획으로부터 분리한 fucoxanthin의 항염증 활성과 그 기전을 확인할 수 있었다. 그리고 HPLC 분석을 통하여 다시마 주정추출물내 존재하는 fucoxanthin의 크로마토그램을 확인할 수 있었다. 본 연구 결과는 차년도 다시마 주정추출물을 이용한 항염증용 기능성 소재 개발과 제품화에 대한 연구에 참고할 수 있을 것으로 생각된다.

## (2) 다시마 디클로로메탄 분획물의 항염증 효과

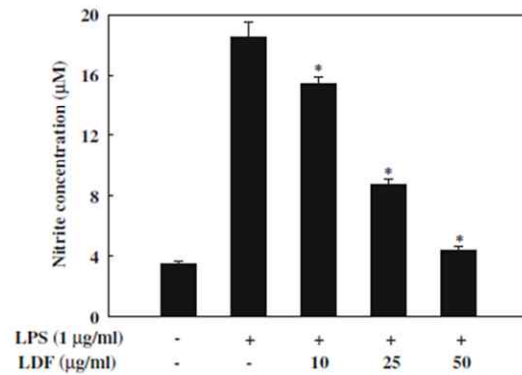
### (가) 다시마 디클로로메탄 분획물의 항염증 활성

전년도까지의 연구결과에서 다시마 주정추출물의 디클로로메탄 분획물에서 우수한 항염증 활성을 확인할 수 있었다. 따라서 본 연구에서는 다시마의 디클로로메탄 분획물의 항염증 활성을 분석하고 이로부터 우수한 생리활성을 나타내는 저분자 화합물을 분리하고자 하였다. 우선, 다시마 디클로로메탄 분획물(LDF)의 항염증 효과를 분석하기 위하여 시료를 LPS와 함께 RAW 264.7 세포에 처리하여 MTS 실험으로 세포 독성을 실험하였다. 우선 다시마 디클로로메탄 분획물을 단독으로, 또는 LPS와 함께 RAW 264.7 세포에 처리하여 24 시간 배양한 후 세포 생존률을 확인하

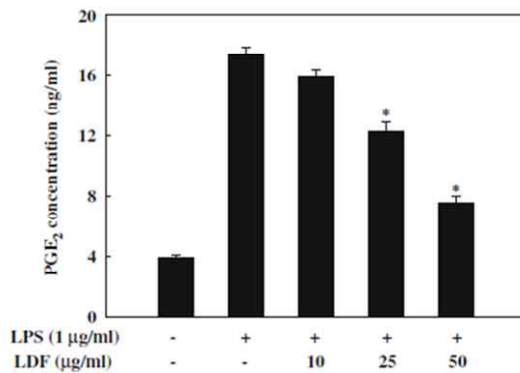
였다. 그 결과 다시마 디클로로메탄 분획물은 RAW 264.7 세포에 대하여 50  $\mu\text{g/ml}$ 의 농도까지 세포 생존률에 영향을 미치지 않는 것으로 나타났다(그림 3-1-11가). 다시마 디클로로메탄 분획물의 항염증 효과를 확인하기 위하여 다시마 디클로로메탄 분획물을 LPS와 함께 RAW 264.7 세포에 처리하여 16 시간 배양한 후 배지내 nitrite와  $\text{PGE}_2$ 의 생성량을 각각 Griess assay와 ELISA kit를 사용하여 확인하였다. 그 결과 다시마 디클로로메탄 분획물은 LPS에 의한 nitrite와  $\text{PGE}_2$ 를 농도 의존적으로 저해시키는 것으로 나타났다(그림 3-1-11나, 다). 이러한 결과는 다시마 디클로로메탄 분획물이 LPS에 의한 염증 반응을 저해시킨다는 것을 나타낸다.



가



나

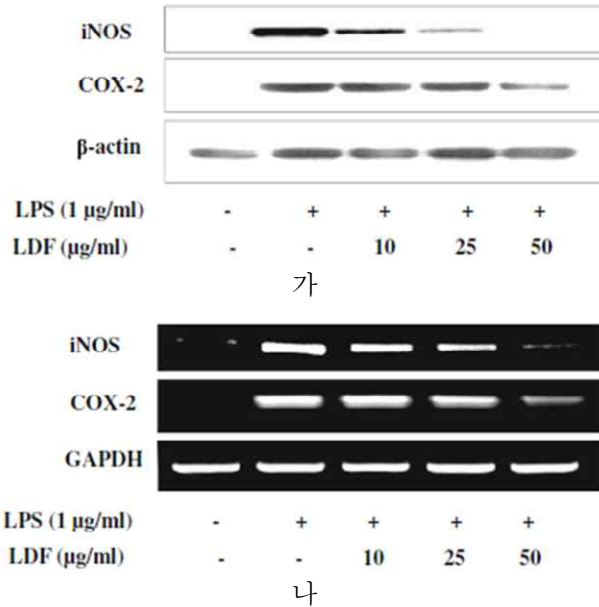


다

[그림 3-1-11] 다시마 디클로로메탄 분획물의 항염증 활성. 가, 세포 생존률 분석; 나, nitrite 생성량 분석; 다,  $\text{PGE}_2$  생성량 분석

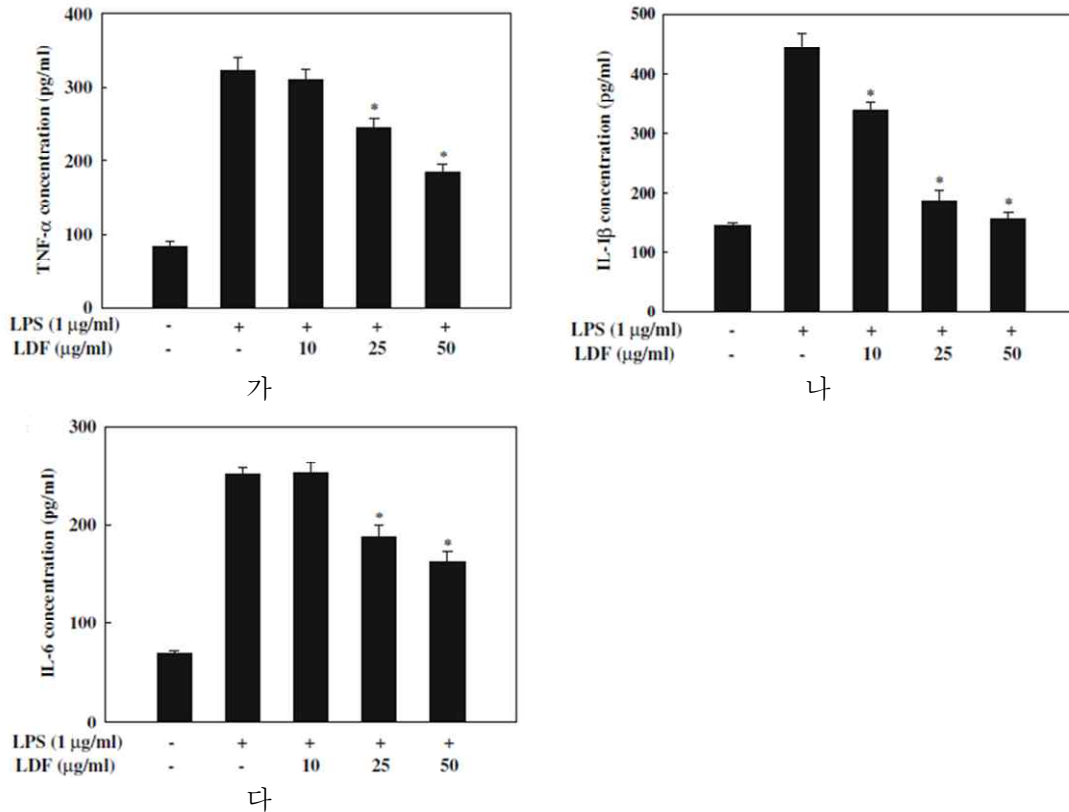
다시마 디클로로메탄 분획물의 항염증 기전을 확인하기 위하여 RAW 264.7 세포에 시료와 LPS를 처리하여 16 시간 배양한 다음 단백질을 추출하여 Western blot으로 NO를 생성시키는 iNOS와  $\text{PGE}_2$ 를 생성하는 COX-2 효소의 단백질 발현 변화를 분석하였다. 그리고 RAW 264.7 세포에 시료와 LPS를 처리하여 6 시간 배양한 다음 total RNA를 추출하여 RT-PCR로 iNOS와 COX-2 효소의 mRNA 발현 변화를

분석하였다. 그 결과 다시마 디클로로메탄 분획물은 LPS에 의하여 유발되는 iNOS와 COX-2 단백질과 mRNA의 과발현을 농도 의존적으로 억제시키는 것으로 나타났다 (그림 3-1-12). 이 결과는 다시마 디클로로메탄 분획물이 LPS에 의해 유도되는 iNOS와 COX-2의 발현을 전사단계에서 억제시킴으로써 nitrite와 PGE<sub>2</sub>의 생성을 감소시킨다는 것을 나타낸다.



[그림 3-1-12] 다시마 디클로로메탄 분획물의 iNOS와 COX-2 효소 단백질 발현 저해 효과. 가, iNOS와 COX-2 단백질 발현; 나, iNOS와 COX-2 mRNA 발현

다시마 디클로로메탄 분획물을 LPS와 처리한 16 시간 배양한 후 상층액의 염증성 cytokine을 ELISA kit를 통하여 분석한 결과 LPS에 의해 다량 발생되는 TNF-α와 IL-1β, IL-6가 다시마 디클로로메탄 분획물에 의하여 농도 의존적으로 억제되는 것을 확인하였다(그림 3-1-13). 이러한 결과는 다시마 디클로로메탄 분획물이 LPS에 의해 일어나는 염증 반응을 억제한다는 연구 결과를 뒷받침해준다.

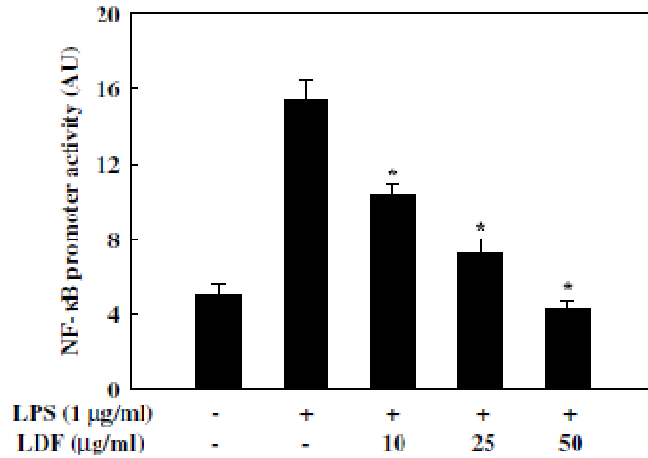


[그림3-1-13] 다시마 디클로로메탄 분획물의 염증성 cytokine 생성 저해 효과. 가, TNF-α; 나, IL-1β; 다, IL-6

(다) 다시마 디클로로메탄 분획물의 항염증 기전

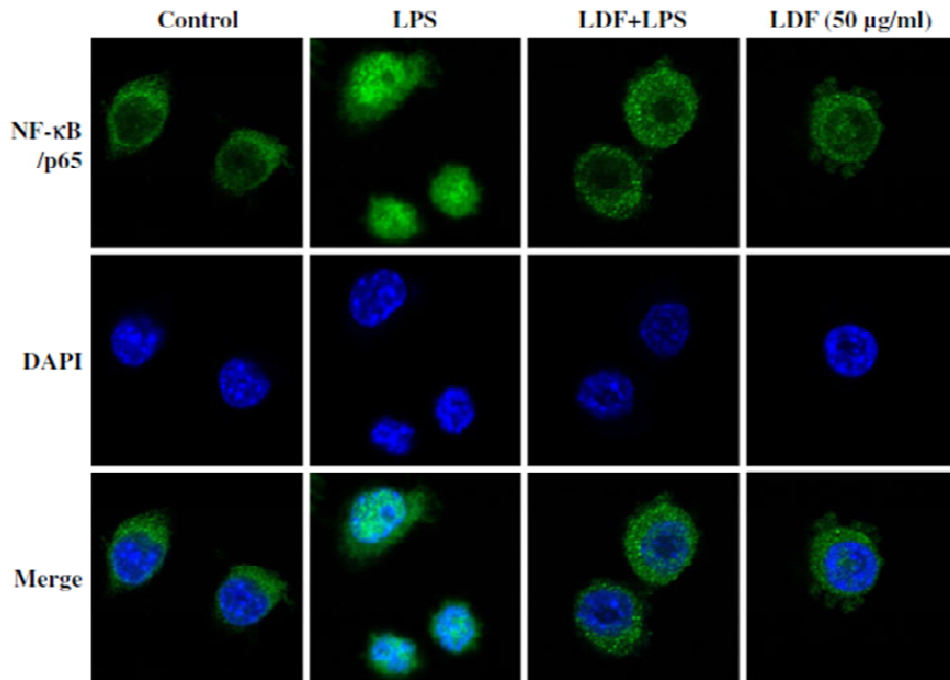
본 실험 결과를 통하여 다시마 디클로로메탄 분획물이 LPS에 의한 nitrite와 PGE<sub>2</sub> 생성을 저해시키며 이는 디클로로메탄 분획물이 iNOS와 COX-2 효소의 발현을 mRNA 전사 단계에서 조절할 수 있기 때문으로 나타났다. 또한, TNF-α, IL-1β, IL-6 등 염증성 cytokine의 생성도 억제되는 것을 확인할 수 있었다. 따라서 다시마 디클로로메탄 분획물의 항염증 활성이 세포내 어떠한 경로를 조절하여 일어나는지 분석이 요구된다.

다시마 디클로로메탄 분획물의 항염증 활성이 NF-κB 전사인자의 조절을 통하여 나타나는 것인지 확인하기 위하여 RAW 264.7 세포에 NF-κB promoter 유전자가 포함된 luciferase vector를 transfection 시킨 후 fucoxanthin을 LPS와 함께 처리하여 6 시간 배양한 후 발광되는 luminescence를 측정하여 NF-κB promoter의 활성화 정도를 분석하였다. 그 결과, 다시마 디클로로메탄 분획물은 LPS에 의한 NF-κB promoter의 활성화를 농도의존적으로 억제하는 것으로 나타났다(그림 3-1-7).



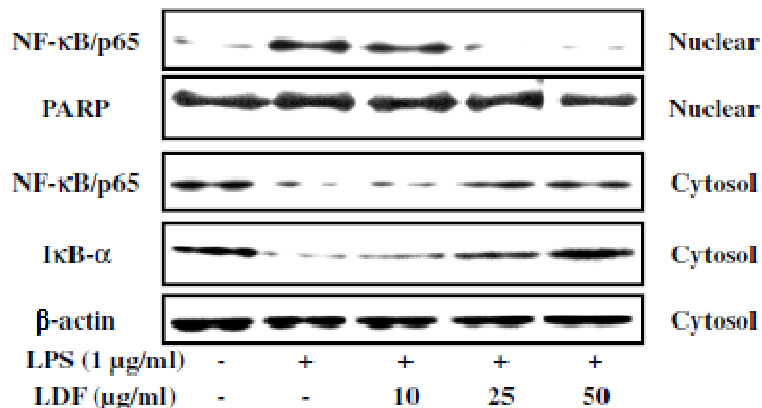
[그림 3-1-14] 다시마 디클로로메탄 분획물이 NF-κB promoter 활성화에 미치는 영향

LPS에 의한 NF-κB promoter 활성화에 대하여 다시마 디클로로메탄 분획물의 저해 작용이 어떤 단계에서 일어나는지 확인하기 위하여 디클로로메탄 분획물과 LPS를 처리한 RAW 264.7 세포를 1 시간 배양한 후 면역형광법 (Immunofluorescence)으로 세포를 NF-κB 항체로 염색하여 confocal 현미경으로 관찰한 결과 LPS에 의해 핵으로 이동된 NF-κB가 디클로로메탄 분획물에 의해 핵으로의 이동이 현저하게 저하됨을 알 수 있었다(그림 3-1-15).



[그림 3-1-15] 다시마 디클로로메탄 분획물이 NF-κB 핵이동에 미치는 영향

다시마 디클로로메탄 분획물이 NF-κB의 활성화에 미치는 영향을 분자생물학적으로 확인하기 위하여, 디클로로메탄 분획물과 LPS를 처리한 RAW 264.7 세포를 30 분간 배양한 후 세포질과 핵을 구분하여 단백질을 회수하였다. 변성시킨 단백질은 Western blot을 통하여 IκB-α와 NF-κB의 단백질 발현 정도를 분석하였다. 그림 3-1-16에서 나타낸 바와 같이 LPS를 처리한 경우 세포질에서 IκB-α와 NF-κB의 단백질이 감소하였으며 핵에서는 NF-κB 단백질의 양이 증가하는 것으로 나타났다. 이는 LPS가 IκB-α의 분해를 유도하여 NF-κB의 핵이동을 증가시킨다는 것을 나타낸다. 다시마 디클로로메탄 분획물을 처리하였을 경우, 세포질에서 IκB-α 단백질이 LPS만을 처리하였을 때보다 증가하였으며 NF-κB 단백질의 양도 증가함을 확인할 수 있었다. 또한 핵에서 NF-κB 단백질의 양이 LPS만 처리하였을 때보다 감소하는 것으로 나타났다. 이러한 결과는 다시마 디클로로메탄 분획물이 LPS에 의한 IκB-α의 분해를 억제함으로써 NF-κB의 핵이동을 저해하여 관련 유전자들의 전사를 조절할 수 있다는 것을 의미한다.



[그림 3-1-16] 다시마 디클로로메탄 분획물이 NF-κB 전사인자의 활성화에 미치는 영향

세포내 NF-κB 전사인자의 활성화에는 MAPK와 PI3K/Akt signaling pathway에 의해 조절되는 것으로 알려져 있다[41-43]. 특히 이들은 IκB-α의 인산화에 영향을 미쳐 NF-κB의 유리를 증가시킨다. 그 중, MAPK 단백질인 ERK, JNK, p38 MAPK는 염증성 유전자의 전사 조절을 증폭시키며[44], PI3K와 그 하위 인자인 Akt는 mouse 유래 대식 세포에서 NF-κB의 활성화를 조절하는 것으로 잘 알려져 있다[42, 43]. 본 연구에서는 다시마 디클로로메탄 분획물이 NF-κB의 활성화를 억제하는 것으로 나타났기 때문에 이와 관련된 상위 인자들을 분석하여 디클로로메탄 분획물의 항염증 기전을 확인하고자 하였다. 이를 위하여, 디클로로메탄 분획물을 LPS와 합



께 처리하여 30 분 후 세포내 단백질을 회수하였으며 이를 Western blot으로 분석하였다. 실험 결과, 디클로로메탄 분획물은 LPS에 의한 Akt와 ERK, JNK, p38 MAPK의 인산화를 모두 저해하는 것으로 확인되었다(그림 3-1-9). 이러한 결과는 다시마 디클로로메탄 분획물이 LPS에 의해 활성화되는 Akt와 MAPK 단백질들을 조절함으로써 I $\kappa$ B- $\alpha$ 의 분해를 억제하고 NF- $\kappa$ B의 핵이동을 저해할 수 있다는 것을 의미한다.

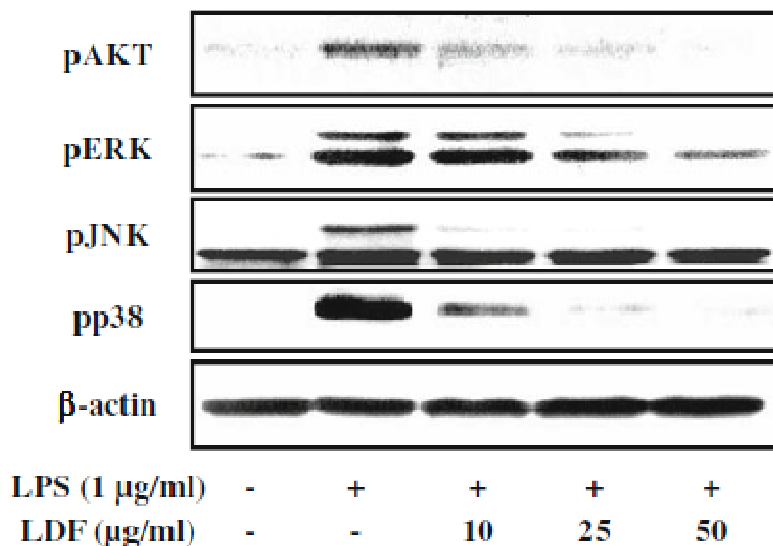


그림 [3-1-17] 다시마 디클로로메탄 분획물이 MAPKs와 Akt의 활성화에 미치는 영향

본 연구결과에서 항염증 활성을 보이는 다시마 주정추출물의 디클로로메탄 분획물의 우수한 항염증 활성을 확인하였다. 다시마 디클로로메탄 분획물은 mouse 유래 대식세포에서 LPS에 의해 유도되는 MAPK와 Akt의 활성화를 억제함으로써 NF- $\kappa$ B 전사인자의 활성화를 억제하여 관련 유전자들의 전사를 조절하고 염증 반응에 의해 나타나는 지표들의 생성을 감소시키는 것으로 판단된다.

## 나. 참모자반 추출물의 생리활성

### (1) 참모자반 추출물의 항비만 활성

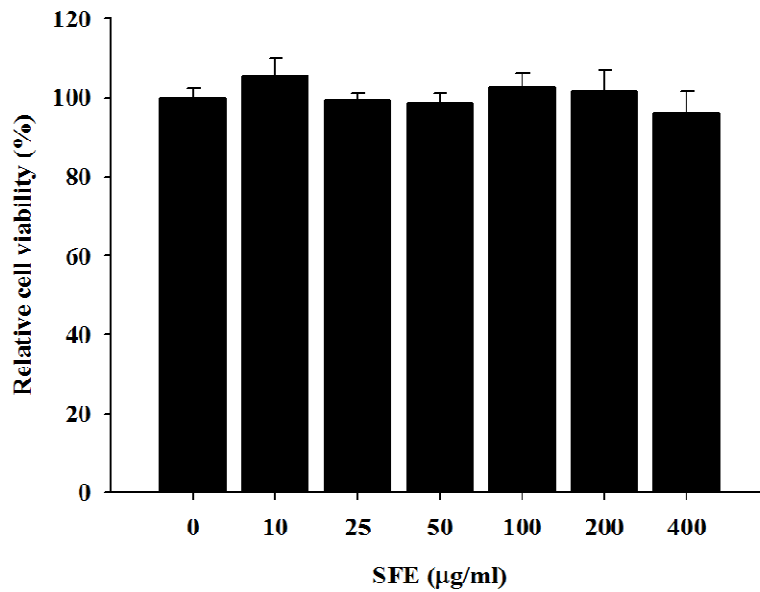
우리나라에서도 지난 10여년간 과체중 및 비만 인구가 급증하여 전체인구의 35% 가량이 과체중인 것으로 국민건강보험공단에서 발표하였다. 비만의 근본적인 유발원인은 에너지 섭취량과 소비량의 불균형에서 기인하는 것으로 유전, 환경을 포함하는 여러 가지 요인들이 복합저긴 영향을 미친다. 특히 생활환경의 변화와 고령화 사회의 진입으로 비만 관련 질병의 예방과 치료를 위하여 자연 식품에서 그 해법을 찾으려는 연구가 고조되고 있다. 이러한 시대적 추세에 부응하여 참모자반의 저분자 화합물에 의한 항비만 효과를 분석하였다.

#### (가) 참모자반 주정추출물의 항비만 효과

##### ① 참모자반 주정추출물의 3T3-L1 세포의 분화 억제 효과

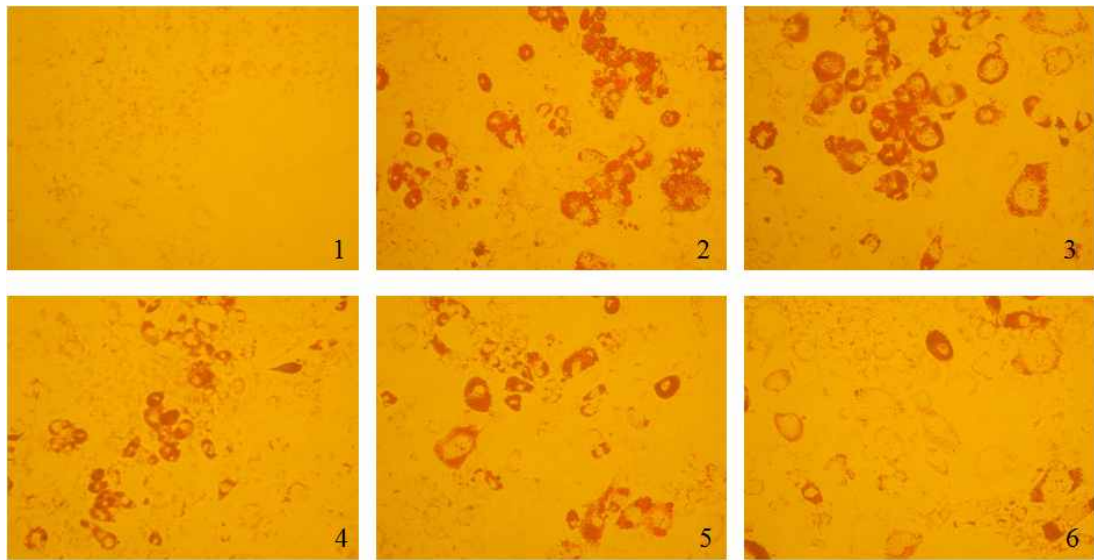
본 연구개발에 사용된 3T3-L1 세포는 일종의 줄기 세포로써 지방세포로 분화되게 되며 항비만 활성을 측정하기 위하여 주로 사용되는 세포주이다. 이 세포는 분화 유도제를 처리하면 지방세포로 분화된다[45-47]. 우선 3T3-L1 세포는 분화 전에는 10% calf serum이 함유된 DMEM에서 배양하였다. 분화를 유도하기 전에 confluent 상태가 된 이후에 2-3 일정도 더 배양한 후, 3T3-L1 세포에 시료와 함께 3-isobutyl-1-methylxanthine (IBMX), dexamethasone 및 insulin (MDI)과 함께 처리하여 시료에 의한 지방세포 분화 저해효과를 분석하였다.

우선 3T3-L1 세포에 참모자반 주정추출물을 처리하여 24 시간 배양한 후 MTS assay로 세포 생존율을 측정하였다. 그림 3-1-18의 결과를 통해 참모자반 주정추출물은 400 µg/ml의 농도 내에서는 세포 생존율에 영향을 미치지 않는다는 것을 확인할 수 있었다.

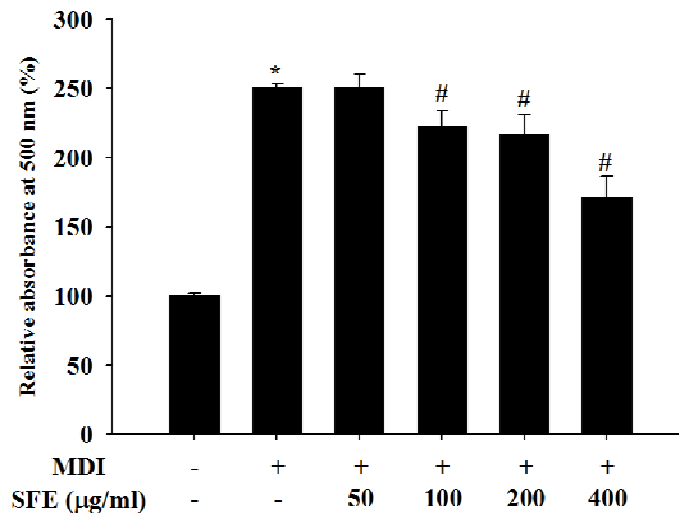


[그림 3-1-18] 참모자반 주정추출물이 3T3-L1 세포의 생존율에 미치는 영향.

3T3-L1 세포에 참모자반 주정추출물을 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 3-1-19). 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 주정추출물은 농도 의존적으로 3T3-L1 세포내 지방 함량을 감소시키는 것으로 나타났다(그림 3-1-20). 이러한 결과는 참모자반 주정추출물이 지방 세포로의 분화에 관련된 신호 전달 과정을 조절하거나 또는 지방 세포내 지방 합성 관련된 효소들에 관여하여 지방의 생성을 억제시킬 수 있다는 것을 나타낸다.



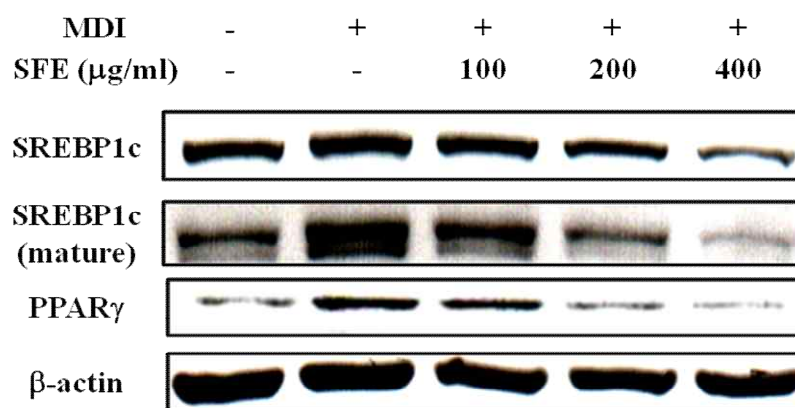
[그림 3-1-19] 참모자반 주정 추출물이 3T3-L1 세포내 지방 합성에 미치는 영향  
 1, 대조군; 2, MDI 처리군; 3, MDI + 50 µg/ml; 4, MDI + 100 µg/ml; 5, MDI + 200 µg/ml; 6, MDI + 400 µg/ml



[그림 3-1-20] 참모자반 주정 추출물이 처리된 3T3-L1 세포내 지방 함량

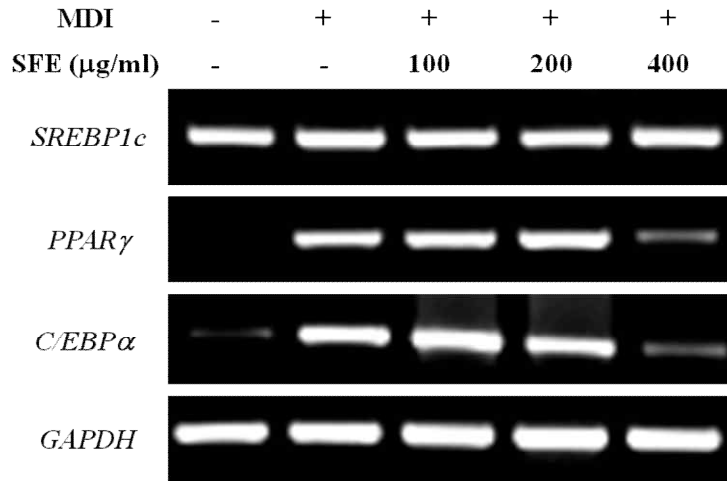
참모자반 주정 추출물의 3T3-L1 세포의 분화와 지방 합성에 관련된 단백질들의 발현에 미치는 영향을 확인하기 위하여 3T3-L1 세포에 참모자반 주정 추출물을 MDI와 함께 처리하여 9 일째에 세포로부터 단백질과 total RNA를 추출하여 Western blot과 RT-PCR로 단백질 및 mRNA의 발현 정도를 분석하였다. 그 결과 3T3-L1 세포에서 분화를 조절하는 것으로 알려진 전사인자 precursor SREBP-1c와 mature SREBP-1c의 단백질 양이 참모자반 주정추출물에 의하여 농도 의존적으로

감소함을 확인하였다 (그림 3-1-21). 또한, MDI에 의하여 증가하는 PPAR $\gamma$ 의 단백질 양이 참모자반 주정추출물에 의하여 효과적으로 감소하는 것을 확인할 수 있었다. 이는 참모자반 주정추출물이 전사인자인 SREBP-1c의 활성화를 억제하고 PPAR $\gamma$ 의 발현을 저해하여 3T3-L1 세포의 분화를 억제시키고 있음을 의미한다.



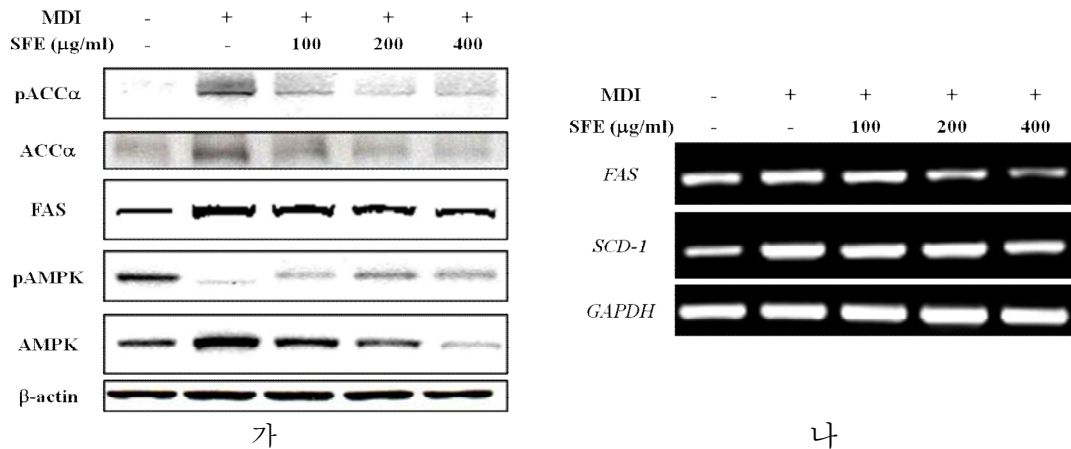
[그림 3-1-21] 참모자반 주정 추출물의 비만 관련 전사인자 단백질의 발현 조절

같은 방법으로 배양된 세포의 mRNA 발현을 분석한 결과, SREBP-1c의 mRNA 발현에는 실험군과 대조군 사이의 유의적인 차이가 나타나지 않았으나 PPAR $\gamma$ 의 mRNA 발현은 참모자반 주정추출물에 의하여 효과적으로 억제됨을 확인할 수 있었다 (그림 3-1-22). 또한, 비만세포로의 분화에 중요한 역할을 하는 또 다른 전사인자 C/EBP $\alpha$ 의 mRNA 발현 역시 참모자반 주정추출물에 의하여 효과적으로 억제되는 것으로 나타났다. 이러한 결과는 참모자반 주정추출물이 C/EBP $\alpha$ 와 PPAR $\gamma$ 의 전사 발현을 조절하고 SREBP-1c의 활성화를 저해함으로써 3T3-L1 세포의 지방세포로의 분화에 영향을 미친다는 것을 의미한다.



[그림 3-1-22] 참모자반 주정 추출물의 비만 관련 전사인자의 mRNA 발현 조절

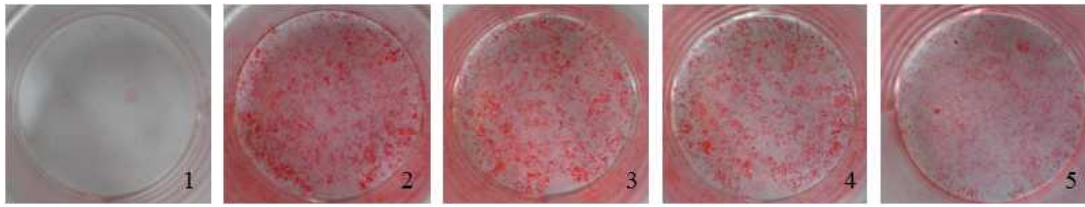
지방 세포내에서는 ACC $\alpha$ 와 FAS, SCD-1 효소 단백질들의 작용으로 인하여 지방 합성이 증가하게 된다. 또한  $\beta$ -oxidation 등 에너지 대사와 관련된 AMPK의 활성이 감소함으로써 지방 축적이 일어난다. 본 연구에서 참모자반 주정추출물이 세포내 지방 합성 및 축적에 어떠한 영향을 미치는지 확인하기 위하여 3T3-L1 세포에 참모자반 주정 추출물을 MDI와 함께 처리하여 9 일째에 세포로부터 단백질과 total RNA를 추출하여 Western blot과 RT-PCR로 단백질 및 mRNA의 발현 정도를 분석하였다. 실험 결과, 참모자반 주정추출물이 처리된 세포에서 지방 합성에 관여하는 FAS 단백질이 감소하는 것을 확인할 수 있었다 (그림 3-1-23). 그리고 ACC $\alpha$ 의 불활성화에는 영향을 미치지 못하지만 전체적인 ACC $\alpha$ 의 단백질 발현량을 저해하는 것으로 나타났다. 또한 AMPK의 인산화가 참모자반 주정추출물에 의하여 효과적으로 증가함을 확인하였다. 세포내 FAS와 SCD-1의 mRNA 발현도 참모자반 주정추출물에 의하여 감소되고 있음을 확인할 수 있었다. 이러한 결과는 참모자반 주정추출물이 FAS와 ACC $\alpha$  및 SCD-1의 발현을 저해하고 AMPK를 활성화시킴으로써 지방 합성을 저해하고 지방 산화를 촉진시킬 수 있다는 것을 의미한다.



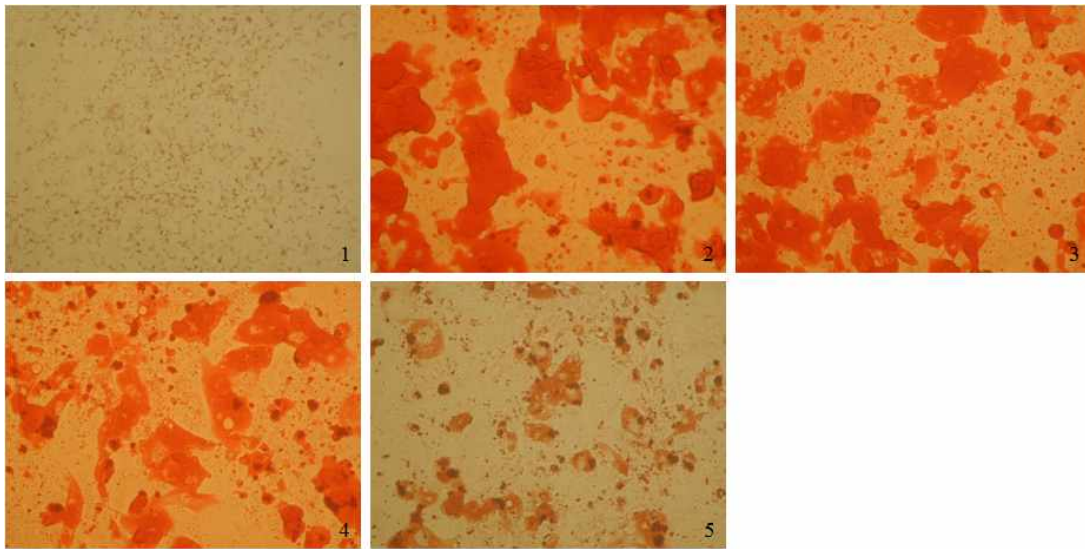
[그림 3-1-23] 참모자반 주정추출물의 지방 합성 및 산화 관련 기전에 미치는 영향. 가, 단백질 발현; 나, mRNA 발현.

## ② 참모자반 주정추출물의 지방 합성 억제 효과

이상의 연구에서 참모자반 주정추출물이 3T3-L1의 지방세포 분화를 효과적으로 저해함은 물론 지방 합성 및 산화와 관련된 효소들에도 영향을 미치는 것으로 확인되었다. 따라서 참모자반 주정추출물이 이미 분화된 지방세포에서 지방 축적에 어떠한 영향을 미치는지 확인하기 위하여 3T3-L1 세포에 5일간 MDI를 처리하여 지방세포로 분화시킨 후, 다시 참모자반 주정추출물과 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 3-1-24). 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 주정추출물은 농도 의존적으로 3T3-L1 세포내 지방 축적을 저해시키는 것으로 나타났다 (그림 3-1-25). 이러한 결과는 참모자반 주정추출물이 지방 세포로 분화된 세포에서 지방의 축적에 영향을 미칠 수 있다는 것을 의미한다.

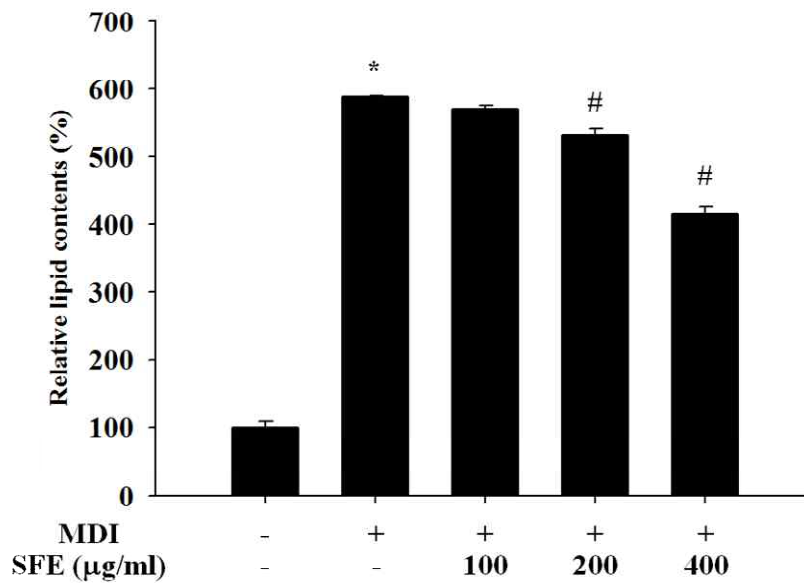


가



나

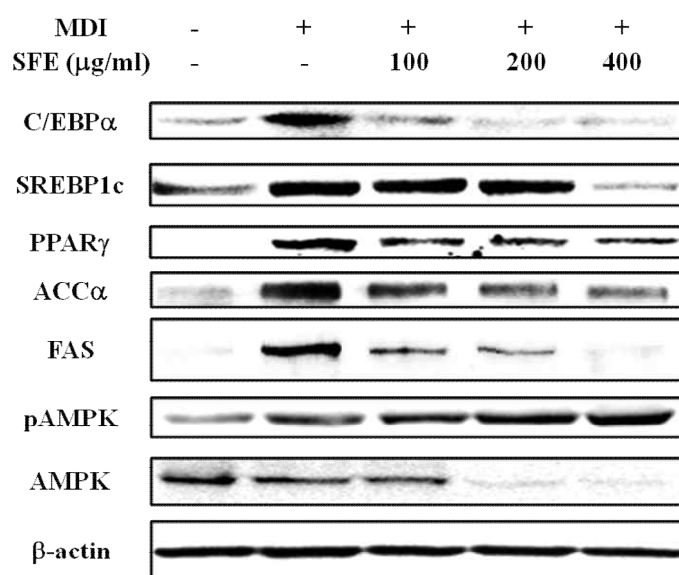
[그림 3-1-24] 참모자반 주정 추출물이 분화된 지방 세포내 지방 축적에 미치는 영향. 가, Oil Red O stain으로 염색된 세포의 사진; 나, Oil Red O stain으로 염색된 세포의 현미경 사진; 1, 대조군; 2, MDI 처리군; 3, MDI + 100  $\mu\text{g/ml}$ ; 4, MDI + 200  $\mu\text{g/ml}$ ; 5, MDI + 400  $\mu\text{g/ml}$



[그림 3-1-25] 참모자반 주정추출물이 분화된 지방세포에서 지방 축적에 미치는 영향



참모자반 주정추출물의 분화된 3T3-L1 세포의 지방 축적과 관련된 단백질들의 발현에 미치는 영향을 확인하기 위하여 동일한 방법으로 세포를 배양한 후, 세포로부터 단백질을 추출하여 Western blot으로 단백질의 발현 정도를 분석하였다. 그 결과 전사인자 C/EBP $\alpha$ 와 SREBP-1c, PPAR $\gamma$  단백질이 모두 참모자반 주정추출물에 의하여 효과적으로 감소함을 보였다 (그림 3-1-26). 또한 세포내 지방 합성에 관여하는 ACC $\alpha$ 와 FAS 단백질의 발현이 억제되었으며 지방 산화를 조절하는 AMPK의 활성화가 참모자반 주정추출물에 의하여 증가함을 확인할 수 있었다. 이러한 결과는 참모자반 주정추출물이 비만 관련 전사인자의 발현을 억제하고 지방 합성과 산화에 관여하는 단백질의 발현을 조절함으로써 분화된 지방 세포에서 지방 축적을 억제할 수 있음을 시사한다.



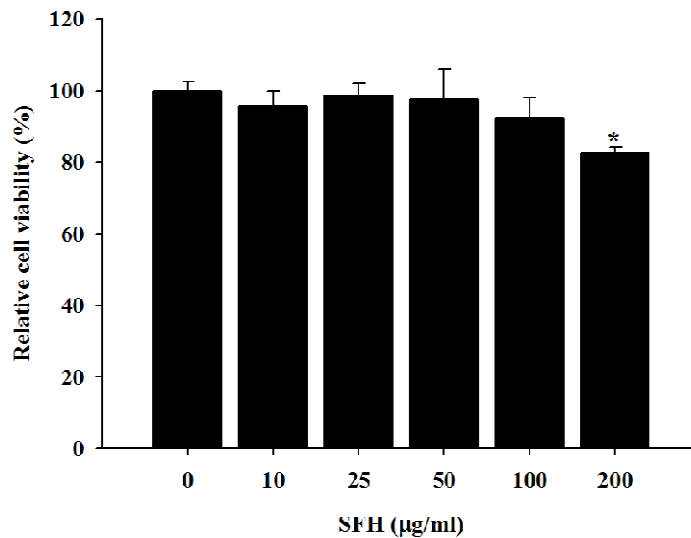
[그림 3-1-26] 참모자반 주정추출물이 분화된 지방세포에서 지방 축적 관련 단백질의 발현에 미치는 영향

이상의 결과에서 참모자반 주정추출물은 3T3-L1 세포의 지방 세포 분화 과정과 분화된 지방세포에서 지방 생성 및 산화에 관여하는 것으로 확인되었다. 특히 참모자반 주정추출물은 지방 세포의 분화와 지방 축적에 중요한 역할을 하는 단백질과 이들을 조절할 수 있는 전사인자들의 발현을 조절할 수 있는 것으로 나타났다. 이러한 결과는 참모자반 주정추출물이 비만을 억제하고 체지방을 조절할 수 있다는 것을 의미한다. 따라서 참모자반 주정추출물을 이용한 체지방 조절 기능성 소재를 개발하기 위하여 유기용매를 사용한 분획을 수행하고 지방 세포 분화와 지방 축적을 보다 효과적으로 억제시킬 수 있는 획분을 찾고자하였다.

(나) 참모자반 *n*-헥산 분획물의 항비만 효과

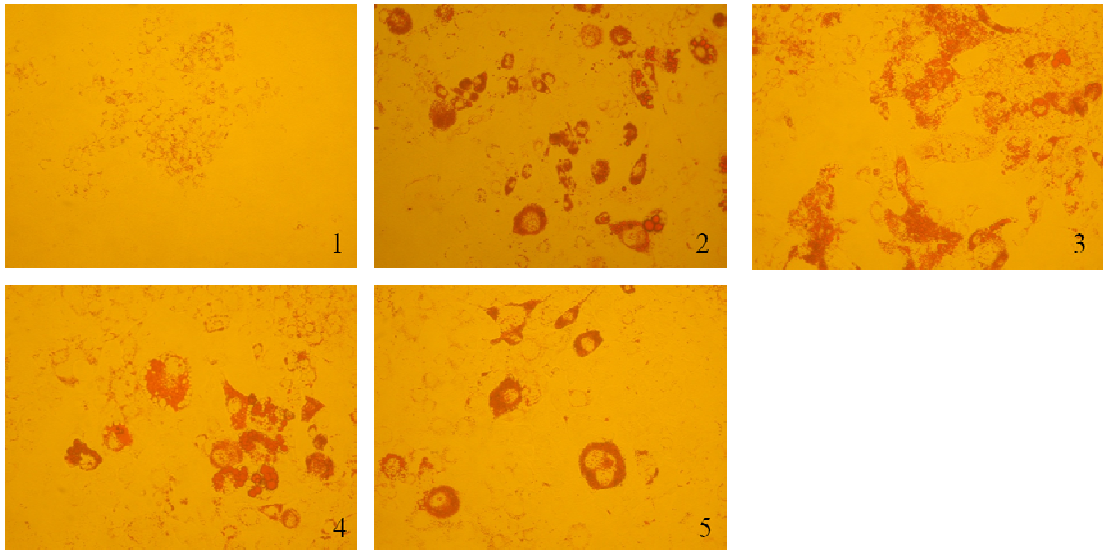
① 참모자반 *n*-헥산 분획물의 3T3-L1 세포의 분화 억제 효과

본 연구에서는 참모자반 주정추출물로부터 *n*-헥산 분획물 (SFH)을 회수하여 항비만 효과를 확인하고자 하였다. 우선 3T3-L1 세포에 참모자반 *n*-헥산 분획물을 처리하여 24 시간 배양한 후 MTS assay로 세포 생존율을 측정하였다. 그림 3-1-27의 결과를 통해 참모자반 *n*-헥산 분획물은 100 µg/ml의 농도 내에서는 세포 생존율에 영향을 미치지 않는다는 것을 확인할 수 있었다.

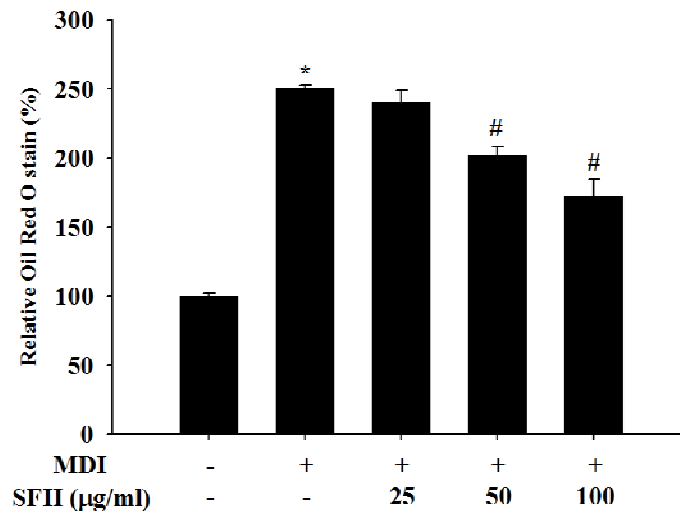


[그림 3-1-27] 참모자반 *n*-헥산 분획물이 3T3-L1 세포의 생존율에 미치는 영향.

3T3-L1 세포에 참모자반 *n*-헥산 분획물을 MDI와 함께 처리하여 9 일째에 세포를 PBS에 두 번 씻어 내고 10% 포르말린 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 3-1-28). 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 함량을 감소시키는 것으로 나타났다 (그림 3-1-29). 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 나타낸다.



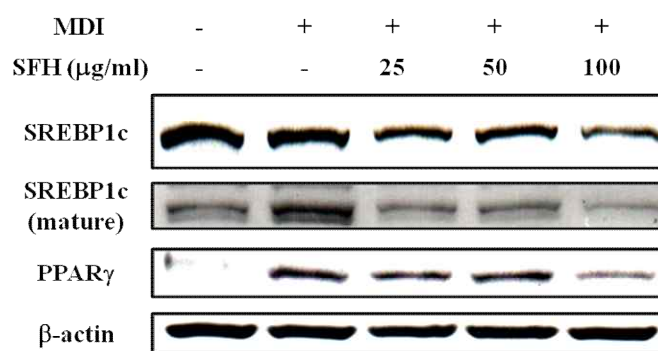
[그림 3-1-28] 참모자반 *n*-헥산 분획물이 3T3-L1 세포 분화에 미치는 영향. 1, 대조군; 2, MDI 처리군; 3, MDI + 25 µg/ml; 4, MDI + 50 µg/ml; 5, MDI + 100 µg/ml



[그림 3-1-29] 참모자반 *n*-헥산 분획물이 3T3-L1 세포 분화에 미치는 영향

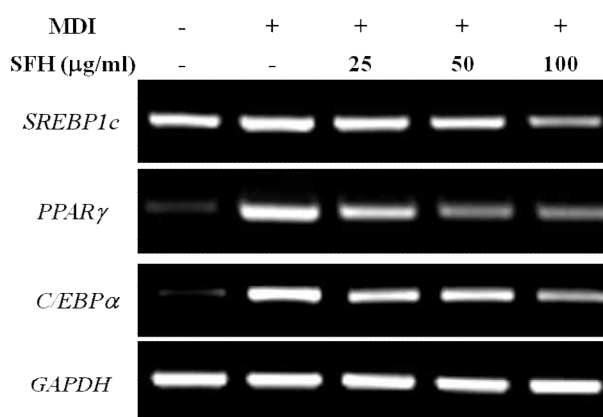
참모자반 *n*-헥산 분획물의 3T3-L1 세포의 분화와 지방 합성에 관련된 단백질들의 발현에 미치는 영향을 확인하기 위하여 3T3-L1 세포에 참모자반 *n*-헥산 분획물을 MDI와 함께 처리하여 9 일째에 세포로부터 단백질과 total RNA를 추출하여 Western blot과 RT-PCR로 단백질 및 mRNA의 발현 정도를 분석하였다. 그 결과 3T3-L1 세포에서 분화를 조절하는 것으로 알려진 전사인자 precursor SREBP-1c와 mature SREBP-1c의 단백질 양이 참모자반 *n*-헥산 분획물에 의하여 농도 의존적으

로 감소함을 확인하였다 (그림 3-1-30). 또한, MDI에 의하여 증가하는 PPAR $\gamma$ 의 단백질 양이 참모자반 *n*-헥산 분획물에 의하여 효과적으로 감소하는 것을 확인할 수 있었다. 이는 참모자반 *n*-헥산 분획물이 전사인자인 SREBP-1c의 활성화를 억제하고 PPAR $\gamma$ 의 발현을 저해하여 3T3-L1 세포의 분화를 억제시키고 있음을 의미한다.



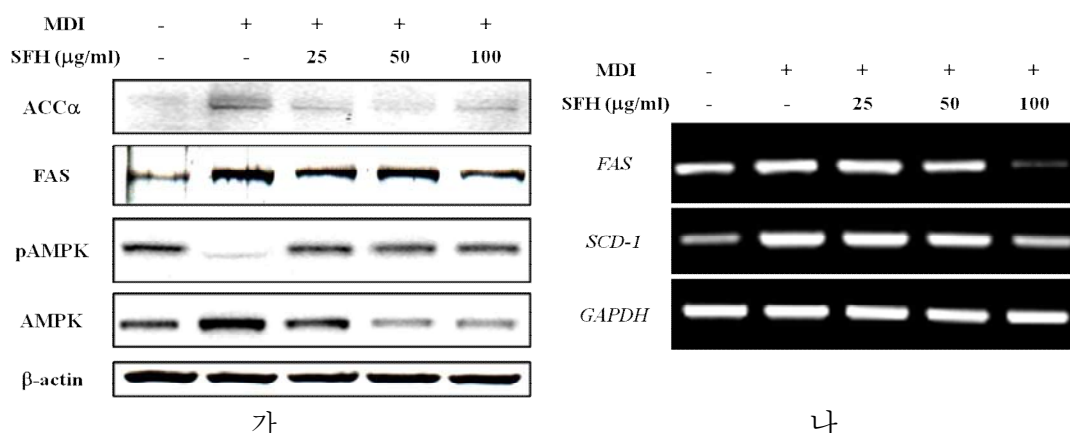
[그림 3-1-30] 참모자반 *n*-헥산 분획물의 비만 관련 전사인자 단백질의 발현 조절

같은 방법으로 배양된 세포의 mRNA 발현을 분석한 결과, SREBP-1c의 mRNA 발현에는 실험군과 대조군 사이의 유의적인 차이가 나타나지 않았으나 PPAR $\gamma$ 의 mRNA 발현은 참모자반 *n*-헥산 분획물에 의하여 효과적으로 억제됨을 확인할 수 있었다 (그림 3-1-31). 또한, 비만세포로의 분화에 중요한 역할을 하는 또 다른 전사인자 C/EBP $\alpha$ 의 mRNA 발현 역시 참모자반 *n*-헥산 분획물에 의하여 효과적으로 억제되는 것으로 나타났다. 이러한 결과는 참모자반 *n*-헥산 분획물이 C/EBP $\alpha$ 와 PPAR $\gamma$ 의 전사 발현을 조절하고 SREBP-1c의 활성화를 저해함으로써 3T3-L1 세포의 지방 세포로의 분화에 영향을 미친다는 것을 의미한다.



[그림 3-1-31] 참모자반 *n*-헥산 분획물의 비만 관련 전사인자의 mRNA 발현 조절

본 연구에서 참모자반 *n*-헥산 분획물이 세포내 지방 합성 및 축적에 어떠한 영향을 미치는지 확인하기 위하여 3T3-L1 세포에 참모자반 *n*-헥산 분획물을 MDI와 함께 처리하여 9 일째에 세포로부터 단백질과 total RNA를 추출하여 Western blot과 RT-PCR로 단백질 및 mRNA의 발현 정도를 분석하였다. 실험 결과, 참모자반 *n*-헥산 분획물이 처리된 세포에서 지방 합성에 관여하는 FAS 단백질이 감소하는 것을 확인할 수 있었다 (그림 3-1-32). 그리고 ACC $\alpha$ 의 불활성화에는 영향을 미치지 못하지만 전체적인 ACC $\alpha$ 의 단백질 발현량을 저해하는 것으로 나타났다. 또한 AMPK의 인산화가 참모자반 주정추출물에 의하여 효과적으로 증가함을 확인하였다. 세포내 FAS와 SCD-1의 mRNA 발현도 참모자반 *n*-헥산 분획물에 의하여 감소되고 있음을 확인할 수 있었다. 이러한 결과는 참모자반 *n*-헥산 분획물이 FAS와 ACC $\alpha$  및 SCD-1의 발현을 저해하고 AMPK를 활성화시킴으로써 지방 합성을 저해하고 지방 산화를 촉진시킬 수 있다는 것을 의미한다.

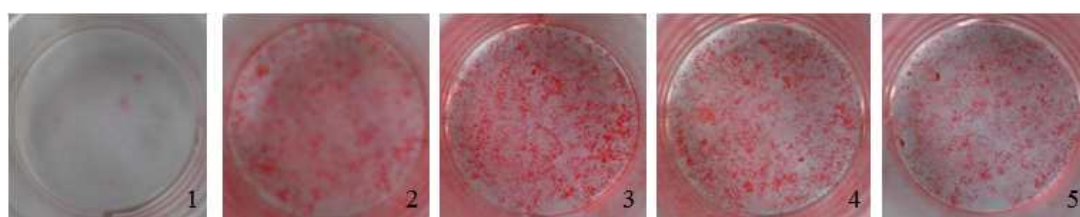


[그림 3-1-32] 참모자반 *n*-헥산 분획물의 지방 합성 및 산화 관련 기전에 미치는 영향. 가, 단백질 발현; 나, mRNA 발현.

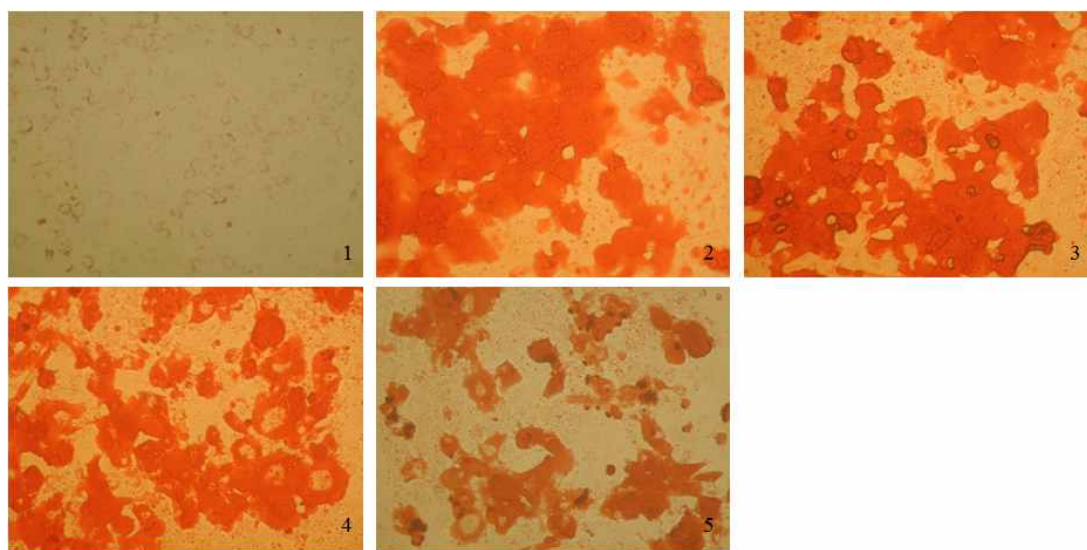
## ② 참모자반 *n*-헥산 분획물의 지방 합성 억제 효과

이상의 연구에서 참모자반 *n*-헥산 분획물이 3T3-L1의 지방세포 분화를 효과적으로 저해함은 물론 지방 합성 및 산화와 관련된 효소들에도 영향을 미치는 것으로 확인되었다. 따라서 참모자반 *n*-헥산 분획물이 이미 분화된 지방세포에서 지방 축적에 어떠한 영향을 미치는지 확인하기 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% 포르말린 용액으로 고정시킨 후 Oil-Red O 염색법으로 세포내 지방을 염색하였다. 그 후 세포를 위

상차 현미경으로 관찰하고 Olympus digital video camera로 촬영하여 그림으로 나타내었다 (그림 3-1-33). 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 축적을 저해시키는 것으로 나타났다 (그림 3-1-34). 이러한 결과는 참모자반 주정추출물이 지방 세포로 분화된 세포에서 지방의 축적에 영향을 미칠 수 있다는 것을 의미한다.

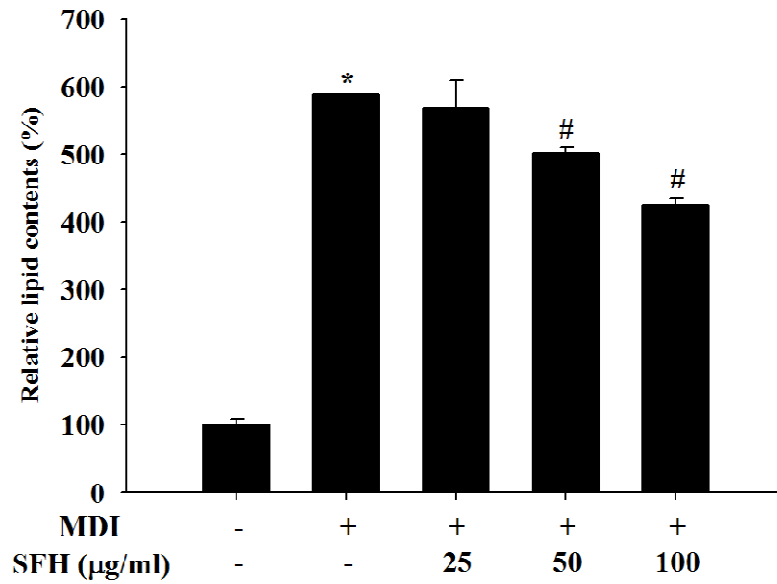


가



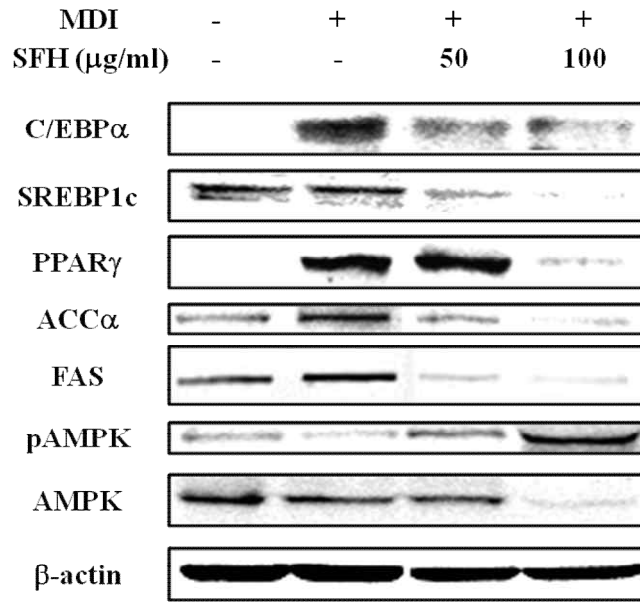
나

[그림 3-1-33] 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 ( $\times 100$ ); 1, 대조군; 2, MDI 처리군; 3, MDI + 25 ug/ml; 4, MDI + 50 ug/ml; 5, MDI + 100 ug/ml



[그림 3-1-34] 참모자반 *n*-헥산 분획물이 3T3-L1 세포내 지방 합성에 미치는 영향

참모자반 *n*-헥산 분획물의 분화된 3T3-L1 세포의 지방 축적과 관련된 단백질들의 발현에 미치는 영향을 확인하기 위하여 동일한 방법으로 세포를 배양한 후, 세포로부터 단백질을 추출하여 Western blot으로 단백질의 발현 정도를 분석하였다. 그 결과 전사인자 C/EBP $\alpha$ 와 SREBP-1c, PPAR $\gamma$  단백질이 모두 참모자반 *n*-헥산 분획물에 의하여 효과적으로 감소함을 보였다 (그림 3-1-35). 또한 세포내 지방 합성에 관여하는 ACC $\alpha$ 와 FAS 단백질의 발현이 억제되었으며 지방 산화를 조절하는 AMPK의 활성화가 참모자반 *n*-헥산 분획물에 의하여 증가함을 확인할 수 있었다. 이러한 결과는 참모자반 *n*-헥산 분획물이 비만 관련 전사인자의 발현을 억제하고 지방 합성과 산화에 관여하는 단백질의 발현을 조절함으로써 분화된 지방 세포에서 지방 축적을 억제할 수 있음을 시사한다.



[그림 3-1-35] 참모자반 *n*-헥산 분획물이 분화된 지방세포에서 지방 축적 관련 단백질의 발현에 미치는 영향

이상의 결과에서 참모자반 *n*-헥산 분획물은 3T3-L1 세포의 지방 세포 분화 과정과 분화된 지방세포에서 지방 생성 및 산화에 관여하는 것으로 확인되었다. 특히 참모자반 *n*-헥산 분획물은 지방 세포의 분화와 지방 축적에 중요한 역할을 하는 단백질과 이들을 조절할 수 있는 전사인자들의 발현을 조절할 수 있는 것으로 나타났다. 본 결과를 바탕으로 현재 참모자반 *n*-헥산 분획물로부터 지방 세포 분화 및 지방 축적을 조절할 수 있는 저분자 화합물을 분리하기 위하여 크로마토그래피 등 실험을 수행 중에 있다.



다. 동물 실험을 통한 비만 실험 모델 확립

이상의 결과를 바탕으로 참모자반 추출물의 체지방 감소 효과를 알아보기 위하여 우선 실험 동물을 사용한 비만 실험 모델을 확립하고자 하였다. 체지방 증가에 특이적인 결과를 보이는 C57BL/6 수컷 mouse (4 주령)을 준비하여 1 주일간 사육실에 적응 시킨 후, 정상식이군 (10% fat)과 고지방식이군 (60% fat)으로 나누어 12 주간 사육하였다. Mouse의 식이 조성은 표 3-1-2에 나타내었다. 사료는 냉동보관하였으며 매일 식수와 함께 교환하였으며, mouse의 체중을 1 주일마다 측정하여 체중 증가량을 비교하였다. 12 주 후, 모든 실험개체들을 에테르로 마취한 다음 혈액을 적출하였다.

[표 3-1-2] Mouse 식이의 조성

|                | Control diet |       | High fat diet |       |
|----------------|--------------|-------|---------------|-------|
|                | gm%          | kcal% | gm%           | kcal% |
| Protein        | 19.2         | 20    | 26.2          | 20    |
| Carbohydrate   | 67.3         | 70    | 26.3          | 20    |
| Fat            | 4.3          | 10    | 34.9          | 60    |
| <b>Total</b>   |              | 100   |               | 100   |
| <b>kcal/gm</b> | 3.85         |       | 5.24          |       |

| Ingredient               | gm      | kcal | gm     | kcal  |
|--------------------------|---------|------|--------|-------|
| Casein, 80 Mesh          | 200     | 800  | 200    | 800   |
| L-Cystine                | 3       | 12   | 3      | 12    |
| Corn Starch              | 315     | 1260 | 0      | 0     |
| Maltodextrin 10          | 35      | 140  | 125    | 500   |
| Sucrose                  | 350     | 1400 | 68.8   | 275.2 |
| Cellulose, BW200         | 50      | 0    | 50     | 0     |
| Soybean Oil              | 25      | 225  | 25     | 225   |
| Lard                     | 20      | 180  | 245    | 2205  |
| Mineral Mix S10026       | 10      | 0    | 10     | 0     |
| Dicalcium Phosphate      | 13      | 0    | 13     | 0     |
| Calcium Carbonate        | 5.5     | 0    | 5.5    | 0     |
| Potassium Citrate, 1 H2O | 16.5    | 0    | 16.5   | 0     |
| Vitamin Mix V10001       | 10      | 40   | 10     | 40    |
| Choline Bitartrate       | 2       | 0    | 2      | 0     |
| FD&C Yellow Dye #5       | 0.05    | 0    | 0      | 0     |
| FD&C Yellow Blue #5      | 0       | 0    | 0.05   | 0     |
| <b>Total</b>             | 1055.05 | 4057 | 773.85 | 4057  |

Formulated by Research Diet, Inc. (New Brunswick, NJ, USA).

표 3-1-3에 나타난 바와 같이 정상식이군은 체중이  $11.37 \pm 1.65$  g 증가하였으나 고지방식이군은  $29.72 \pm 0.20$  g 증가한 것으로 확인되었다.

[표 3-1-3] C57BL/6 마우스의 체중 변화량

|                   | 0 weeks          | 12 weeks         | Growth weight (g)  |
|-------------------|------------------|------------------|--------------------|
| ND <sup>1)</sup>  | $20.51 \pm 0.33$ | $30.55 \pm 2.16$ | $11.37 \pm 1.65$   |
| HFD <sup>2)</sup> | $19.98 \pm 0.31$ | $47.56 \pm 1.06$ | $29.72 \pm 0.72^a$ |

<sup>1)</sup>ND: Nomal diet

<sup>2)</sup>HFD: High fat diet

실험한 마우스로부터 적출된 혈액은 헤파린이 처리된 시험관에서 냉장보관하여 4°C 에서 3,000 rpm으로 10분간 원심분리하여 혈장을 분리하였다. 분리된 혈장을 일정량 취하여 간독성의 생리활성 지표인 AST와 ALT 수치를 측정하고 비만 정도의 생리활성 지표로 사용할 수 있는 중성지방의 양을 측정하였다. 실험결과, 고지방식이군의 혈청에서 중성지방의 양이 정상식이군과 비교하여 유의적으로 상승하는 것으로 나타났으며 AST 수치가 유의적으로 증가하는 것으로 나타났다 (표 3-1-4).

[표 3-1-4] C57BL/6 마우스의 혈청내 생리활성 지표 변화량

|                   | AST (IU/L)       | ALT (IU/L)     | TG (mg/dl)         |
|-------------------|------------------|----------------|--------------------|
| ND <sup>1)</sup>  | $78.7 \pm 1.9$   | $26.9 \pm 2.9$ | $31.54 \pm 2.65$   |
| HFD <sup>2)</sup> | $96.2 \pm 5.0^a$ | $32.8 \pm 5.2$ | $52.72 \pm 1.72^a$ |

<sup>1)</sup>ND: Nomal diet

<sup>2)</sup>HFD: High fat diet

본 연구결과를 바탕으로 참모자반 추출물의 항비만 효과를 실험하기 위하여 C57BL/6 mouse에 고지방식이와 함께 일정량의 참모자반 추출물을 함께 투여하여 12 주간 사육하여 체중 감소 효과와 혈청내 중성지방의 양 및 조직내 여러 가지 전사인자와 효소들의 발현을 분석 할 예정이다.

#### 4. 요약 및 제언

##### 가. 요약

###### (1) 항염증 소재

다시마의 *n*-헥산으로부터 분리된 fucoxanthin은 우수한 항염증 효능을 나타내었으며, HPLC를 통하여 주정추출물의 표준 크로마토그램을 확립하였다. 다시마 주정추출물의 표준화 및 품질관리를 위한 지표성분으로 fucoxanthin이 우선적으로 검토되어야 할 것을 제안하며, 앞으로 다시마 주정추출물을 이용한 염증관련 질환(위염, 대장염, 류마티스성 관절염 등)과 퇴행성 신경질환(알츠하이머성 치매, 파킨슨씨 질병)의 예방과 치료를 위한 식의약품의 소재로의 개발 가능성이 높은 것으로 평가된다.

###### (2) 항비만 소재

참모자반 주정추출물과 *n*-헥산 획분은 세포실험을 통하여 섬유아세포의 지방세포로의 분화억제 뿐만아니라 지방합성 저해능이 우수한 것으로 확인되었다. 참모자반 추출물은 지방세포 분화와 지방 축적에 중요한 역할을 하는 전사인자 및 지방 생성에 관여하는 단백질의 발현을 조절하는 것으로 확인되었다. 예비 동물실험 결과를 통하여 비만 실험 모델을 확립하였으며 현재 참모자반 추출물의 항비만 효과에 대한 동물 실험을 준비 중에 있다. 차년도 연구를 통하여 참모자반 추출물의 항비만 효과를 동물 실험을 통하여 분석하고 참모자반을 이용한 체지방 감소용 건강기능식품을 개발함으로써 해조류의 효과적인 이용에 기여할 것으로 판단된다.

##### 나. 제언

현재까지 곰피와 다시마로부터 다양한 저분자 생리활성물질을 확보하였으나 이들의 다양한 생리활성을 분석하기까지의 기간이 부족하여 논문 투고 등이 미비하였다.

차년도부터는 연구 결과를 바탕으로 해조류 추출물을 기능성 소재로 개발하기 위하여 물질의 생리활성, 안전성 등을 임상적으로 적용할 수 있는 다양한 분야의 인적 자원과 연구 인프라가 요구된다.

항비만 소재 개발을 위한 동물 실험에는 3개월~6개월의 많은 기간이 소요됨으로써 보다 많은 시료와 인적 자원이 필요함. 이를 완료할 수 있도록 충분한 연구기간과 실험경비의 지원이 필요하다.

#### 5. 향후계획

모자반 *n*-헥산 획분을 활용한 체지방 감소용 건강기능식품 소재 개발을 위한 동물실험 등의 기초연구와 개별인정형 식품 등록을 위한 연구

## 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

- 다시마 저분자 화합물의 암세포 증식억제효과 분석.
- 암세포 세포사멸(apoptosis)과정 유도인자 분석.
- 세포 스트레스에 의한 kinase를 포함하는 작용 단백질들의 변화 분석.
- 세포주기(cell cycle) 조절인자들의 작용분석.
- 다시마 저분자 화합물의 항암활성 기전 규명.

### 2. 연구 방법

#### 가. 실험재료 및 시약

갈조류 유래 물질: 다시마(*Saccharina japonica*)의 n-Hexane R3 fraction-2 추출물; 세포주: Human hepatocellular carcinoma SK-Hep1 cells, non-cancerous human embryonic kidney HEK293 cells과 human liver THLE-3 cells (ATCC, Manassas, VA, USA); 배지: Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) supplemented with high-glucose (Cellgro, by Mediatec, Inc., Manassas, VA, USA), BEBM (Lonza), fetal bovine serum (Cellgro), 100 U/ml penicillin and 100 µg/ml streptomycin (Cellgro); 1차 항체: Bax, Bak, Bad, Cytochrome C, caspase-3, caspase-8, caspase-9, cleaved PARP, ATF6  $\alpha$ , CHOP, p-eIF2  $\alpha$ , calnexin, Bip, TRAF2, p-JNK, CDK2, p-Rb, p-cdc2, AIF and  $\beta$ -actin) (Cell Signaling Technology Inc., Danvers, MA, USA), 2차 항체: anti-rabbit IgG, anti-mouse IgG (horseradish peroxidase-coupled), anti-mouse IgG (H+L), F(ab')<sub>2</sub> Fragment (Alexa Fluor<sup>®</sup> 555 Conjugate), anti-rabbit IgG (H+L), F(ab')<sub>2</sub> Fragment (Alexa Fluor<sup>®</sup> 488 Conjugate) (Cell Signaling Technology Inc.), mouse and rabbit normal serum (Santa Cruz Biotechnology Inc., Santa Cruz, CA, USA), 시약: Amersham<sup>™</sup> ECL Advance<sup>™</sup> Western Blotting Detection Kit (GE healthcare, Buckinghamshire, UK), Hyperfilm<sup>™</sup> ECL (GE healthcare), DAPI (4', 6-diamidino-2'-phenylindole dihydrochloride, Roche

Applied Science, Indianapolis, IN, USA), Prolong Gold Antifade Reagent (Invitrogen, Grand Island, NY, USA), EZ-Cytox Cell Viability Assay Solution WST-1<sup>®</sup> (Daeil Lab Service, Seoul, Korea), ribonuclease (RNase A, Biosesang Inc., Gyeong-gi, Korea), 20X PBS buffer (Biosesang Inc.), PRO-PREP<sup>™</sup> protein extraction solution (iNtRON biotechnology, Gyeonggi, Korea), 37% formaldehyde (Junsei Chemical Co., Ltd, Tokyo, Japan); Sigma-Aldrich(St. Louis, MO, USA)사의 시약: Ethanol, methanol, dimethylsulfoxide, Triton X-100, protease inhibitor cocktail, Tween<sup>®</sup>-20, Z-VAD-FMK, propidium iodide.

#### 나. 실험 방법

##### (1) Cell viability assay(세포독성검사)

96 well plate에 암세포와 정상세포를  $1 \times 10^5$  cells/ml 만큼 분주하여 해조류 추출물을 처리한 뒤 24시간 후 WST-1<sup>®</sup> 용액을 넣어 세포의 증식억제 여부를 효소학적으로 측정하였다.

##### (2) TUNEL assay

DNA를 염색시켜 세포사멸이 일어날 때의 DNA 분절을 확인하기 위한 방법으로 세포를 propidium iodide와 TUNEL로 염색한 뒤 형광현미경으로 세포의 변화를 관찰하였다.

##### (3) FACS analysis

암세포에 해조류 유래 물질을 일정시간 처리한 뒤, trypsin-EDTA를 처리하여 암 세포를 하나씩 분리, 가는 노즐을 통과시키면서 적절한 과장으로 레이징하여 그 세포의 DNA 상태를 알아보는 실험으로서, 해조류 추출물에 의한 세포의 DNA에 미치는 영향을 분석하여 암세포의 사멸정도를 측정하였다.

##### (4) Western blot analysis

해조류 추출물을 처리한 암세포를 회수하여 세포막을 파괴하여 단백질을 추출한다. 추출한 단백질을 SDS-PAGE를 거쳐 분리시키고 nitrocellulose membrane에 단백질을 이동시킨다. Nitrocellulose membrane에 존재하는 단백질에 항원-항체 반응을 유도하기 위하여 확인하고자하는 단백질의 항원을 인식할 수 있는 항체를 처리하여 1차 항원-항체 반응을 유도시킨 뒤, 그 1차 항체를 인지할 수 있는 발광형의 2차 항체를 처리하여 항원-항체 반응을 시키고 x-ray 필름에 노출하여 단백질 발현량 및 활성화 변화를 분석하였다.

#### (5) Immunofluorescence staining (면역형광염색)

Cover glass-bottom dishes에 암세포를 배양 한 후, 다시마 추출물을 적정 농도로 처리한 후 시간대 별로 더 배양한 뒤, 배지를 제거 하고 DAPI 용액을 이용하여 37°C 에서 15분 염색한 후, 1X PBS buffer를 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 µg/ml의 1차 항체(cleaved caspase -3 and  $\beta$ -actin)를 상온에서 3시간 처리한 후, 1X PBS buffer를 이용하여 세포를 세척시켜 준다. 세포의 1차 항체 처리가 끝난 후에 2차 항체인 0.1 µg/ml의 anti-mouse IgG (H+L), F(ab')<sub>2</sub> Fragment (Alexa Fluor® 555 Conjugate)와 anti-rabbit IgG (H+L), F(ab')<sub>2</sub> Fragment (Alexa Fluor® 488 Conjugate)를 상온에서 1시간 처리한 후 마찬가지로 1X PBS buffer를 이용하여 세포를 세척해 준다. 그리고 slide glass에 Prolong Gold Antifade Reagent를 50µl 떨어뜨린 후 cover glass를 얹은 후 형광현미경을 이용하여 형광 이미지를 획득하고, High-Content Analysis Software를 이용하여 사진을 imaging 하였다.

#### (6) 세포내 Ca<sup>2+</sup> influx 확인

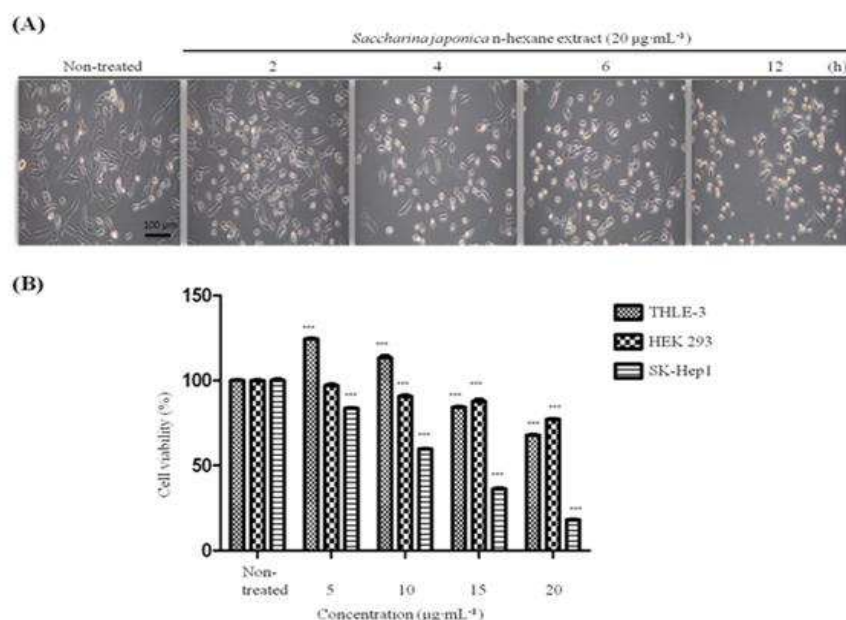
세포 스트레스에 따른 세포내 Ca<sup>2+</sup> influx를 확인하기 위하여, cover glass-bottom dish에 암세포를 배양한 후, 적정 농도의 해조류 추출물을 처리한 후, FLUO-3/AM 시약을 이용하여 세포를 염색하여 추출물의 다양한 처리시간에 따른 세포내 Ca<sup>2+</sup> influx를 형광 현미경을 통해 확인하였다.

### 3. 연구수행 결과

가. 다시마에서 추출한 n-hexane R3 fraction-2 (이하 Fraction-2로 기술)의 간암 세포주 (SK-Hep1 cells)에 대한 항암기전 분석

(1) 간암 세포주 SK-Hep1, 정상 간세포주 THLE-3, 정상 신장세포주 HEK293에 대한 fraction-2의 세포 증식 억제효과 비교

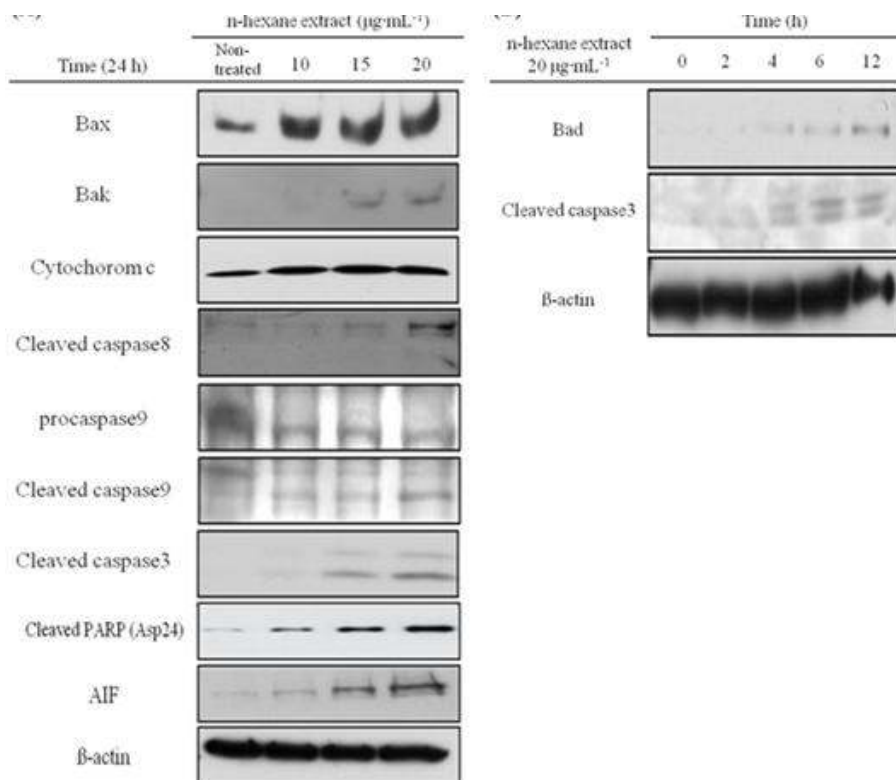
간암세포(SK-Hep1)에 대한 다시마에서 추출한 fraction-2의 증식억제(세포독성) 효능을 알아보기 위하여, 이 물질을 24시간 세포에 처리한 후 WST-1<sup>®</sup> 용액을 처리하여 ELISA로 세포의 증식억제 효과를 분석하였다. 간암세포(SK-Hep1)의 경우, 5 µg/ml의 농도에서 약 20%의 사멸율을, 10 µg/ml의 농도에서는 약 40%의 사멸율을 나타내었다. 암세포와는 상반적으로, 인간의 정상 신장세포주 HEK293와 정상 간세포주 THLE-3에 fraction-2를 같은 농도와 시간으로 처리한 결과 간암세포(SK-Hep1)에 대하여 유의성 있는 10 µg/ml 농도에서 간세포주의 경우에는 더 좋은 생존률을 나타내었으며, 신장세포주에서는 약 5% 정도의 사멸율을 나타내는 것을 관찰하였다. 이 결과로 이 물질은 정상세포에 대해서는 부작용이 거의 없으며 간암세포(SK-Hep1)를 targeting할 수 있을 것으로 추정할 수 있었다. 20 µg/ml의 농도로 다양한 처리 시간에 따른 세포의 모양 변화와 생존 세포수의 변화를 현미경 (100배)으로 관찰한 결과, 시간 의존적으로 암세포의 수가 감소하는 것을 확인할 수 있었으며, 12시간 처리 하였을 때에는 SK-Hep1 고유의 뾰족한 모양을 잃고 둥글게 말리며 암세포가 사멸하는 현상을 관찰할 수 있었다.



[그림 3-2-1] Fraction-2의 암세포 증식 억제 효과 및 세포 변화의 현미경 관찰

(2) 다시마 fraction-2에 대한 암세포의 세포사멸(apoptosis)과정 및 관련 단백질들의 발현양상 분석

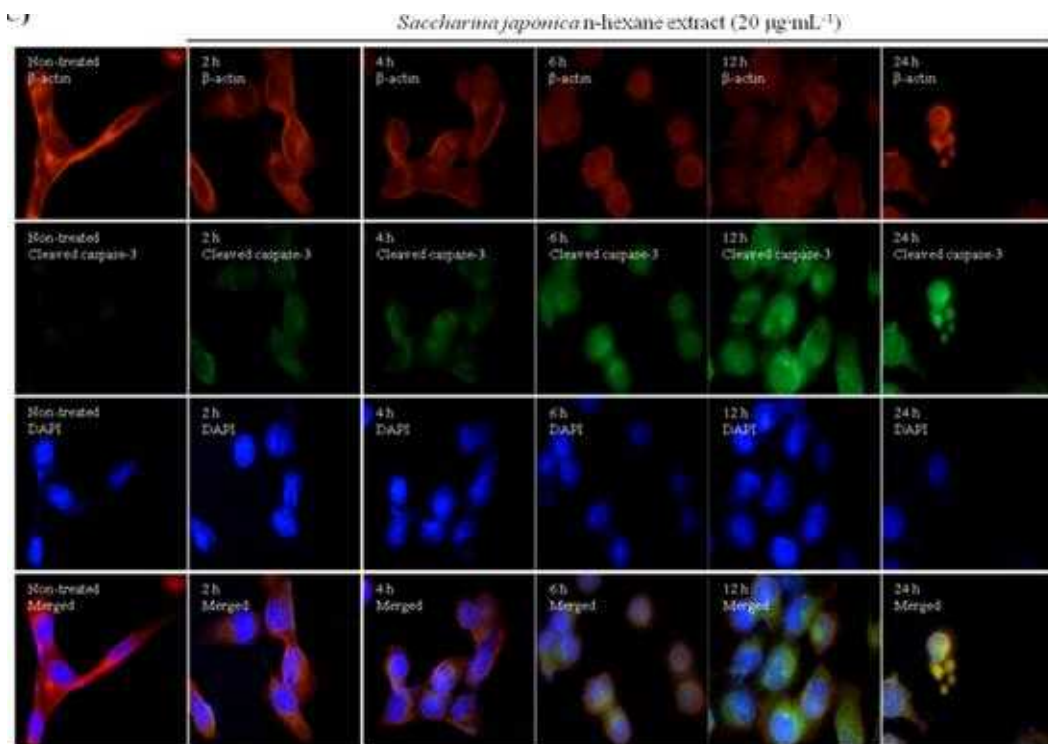
Western blot analysis를 통하여 fraction-2를 처리하였을 때 간암 세포의 세포사멸(apoptosis)의 작동과 관련된 중요 단백질의 발현양상을 분석함으로써, 단백질들의 발현과 활성화가 세포내에서 어떠한 경로로 영향을 미쳐 apoptosis가 일어났는지를 규명할 수 있다. Apoptosis는 크게 미토콘드리아에서부터 시작하는 세포내부기작과 세포막의 세포사멸수용체로부터 시작하는 세포외부기작으로 분류할 수 있다. 세포내부기작은 cytochrome c의 방출로부터 시작되는데, 방출된 cytochrome c는 caspase 9의 단편화를 촉진하여 apoptosis를 유발할 수 있으며, 미토콘드리아 막에 분포하는 Bak과 Bax의 발현이 증가하여 이 과정을 유발시킬 수 있고, AIF의 방출로 세포가 위험에 처해있을 때 DNA를 수선하여 정상적으로 작동하게 하는 PARP가 잘려져 그 활성을 잃게 만들 경우에도 caspase 9의 활성화로 하위 단백질인 caspase 3가 작용하여 apoptosis를 촉진할 수 있다 [7]. 추출물을 20  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 의 농도에서 다양한 시간으로 처리하여 단백질들의 발현을 확인한 결과, 기 보고된 연구의 결과들과 비슷한 양상을 확인 할 수 있었으며, 미토콘드리아 관련 세포사멸 단백질인 Bad의 발현량 또한 증가하였고 apoptosis의 중요 단백질인 caspase-3의 잘림 현상(활성화)이 증가하는 것을 확인 할 수 있다. 이는 다시마 추출물이 농도 및 시간 의존적으로 간암 세포에 대하여 항암 작용을 한다고 생각할 수 있다.



[그림 3-2-2] Fraction-2에 의한 세포사멸(apoptosis) 관련 단백질들의 발현 분석



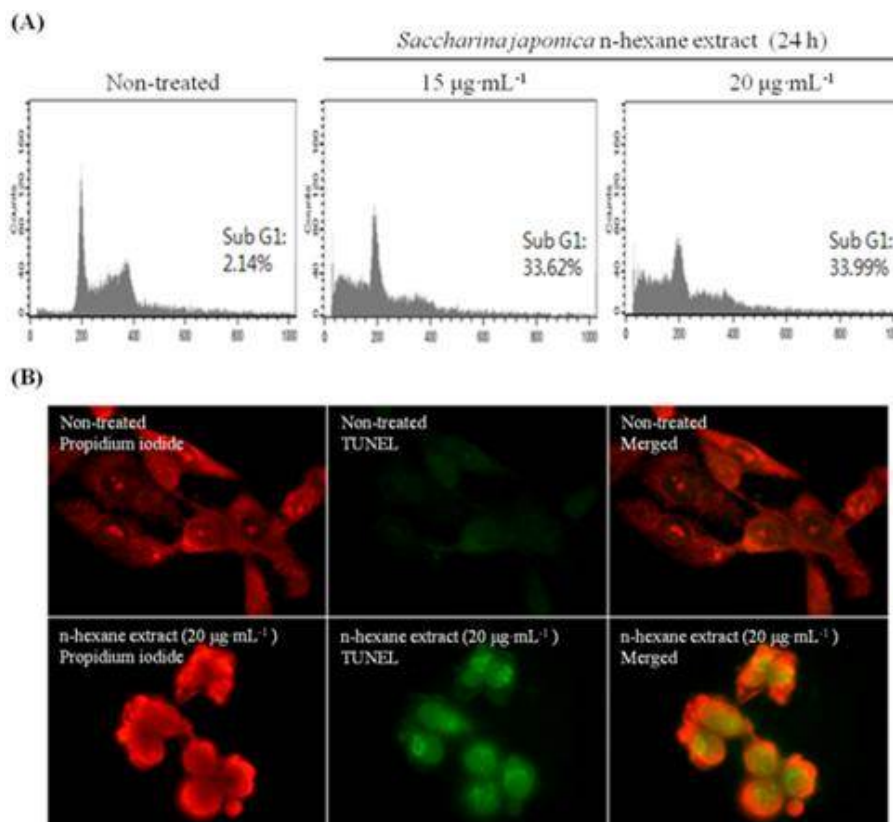
세포에서 단백질을 따로 추출하지 않고 세포 그 자체에 단백질을 인식하는 항체를 넣어 형광현미경을 통하여 세포 내의 어느 위치에서 특정 단백질이 발현되고 있는지를 알아보는 immunofluorescence라는 방법을 이용하여, 세포 내에서 apoptosis의 핵심적인 역할을 담당하고 있는 caspase 3의 발현정도를 확인하였다 [8]. 세포 상에서 직접 확인하기 위하여 핵막과 핵 내부의 DNA를 염색할 수 있는 DAPI 염색(*blue*), house keeping gene으로 널리 알려져 있는 beta-actin (*red*), 그리고 cleaved caspase 3 (*green*)항체들을 세포내로 침투시켜 각각 다른 파장대로 각 인자들의 위치를 관찰하였다. Fraction-2 (20  $\mu\text{g/ml}$ )를 처리하지 않는 세포에서보다 처리한 세포 내에서 실질적인 apoptosis 활성을 가지는 cleaved caspase 3가 많이 나타남을 직접 관찰 할 수 있었으며, 이는 fraction-2가 apoptosis를 일으킨다는 것을 보여주는 직접적 결과라고 할 수 있다.



[그림 3-2-3] 세포 내 위치하는 cleaved caspase 3의 발현 분석

(3) FACScan analysis 및 TUNEL assay를 통한 apoptosis (DNA 절편화) 및 세포주기 분석

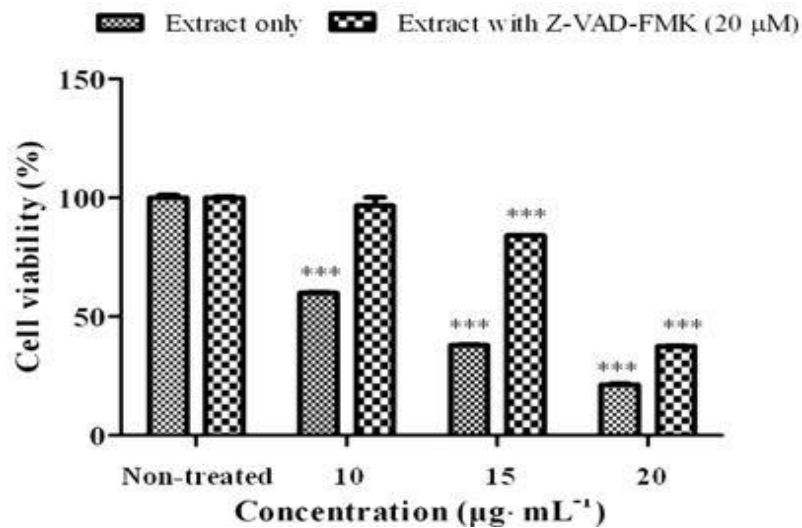
FACScan analysis를 이용하여 세포의 핵 내부 DNA가 절편화 되면서 나타나는 sub-G1기가 fraction-2의 처리에 의하여 농도 의존적으로 증가하는 것을 확인할 수 있었으며, 세포주기 상의 변화는 크게 없는 것으로 나타나 세포증식과 분화를 저해하지는 않는 것으로 나타났다. 결과는 총 10,000개의 분리된 세포를 레이저를 이용하여 그 DNA contents를 측정하여 판단하는 것으로, fraction-2를 처리 하였을 때 sub-G1기의 비율이 2.14%에서 33.99%로 증가한 것으로 보아 apoptosis가 일어나 핵 내부의 DNA가 분해가 된 세포 수가 증가하였음을 증명하는 결과이다. 또한 fraction-2가 간암세포에 있어 DNA 분절에 미치는 영향을 조사하기 위해 분절된 DNA를 염색시켜 현미경상에서 확인 할 수 있는 TUNEL assay를 진행하였다. 확인한 결과, 20  $\mu\text{g/ml}$ 의 fraction-2를 처리하였을 때, DNA를 염색하는 propidium iodide 뿐만 아니라 분절된 DNA를 염색하는 TUNEL이 추출물을 처리하지 않은 세포보다 더 강하게 형광을 나타내는 것을 관찰할 수 있었다. 이 결과로 fraction-2가 apoptosis의 중요 단계인 핵 내부 DNA의 분절을 일으켰음을 알 수 있다. 이러한 현미경적 세포의 관찰은 결국 세포내에 존재하는 여러 관련단백질들의 활성화 및 발현 양상의 분석 결과가 일치한다고 볼 수 있었다.



[그림 3-2-4] Fraction-2에 의한 세포주기 변화 및 DNA 분절 확인  
A: FACScan analysis; B: TUNEL assay.

(4) Caspase inhibitor를 이용한 fraction-2에 의한 apoptosis 기작 분석

세포의 사멸과정(apoptosis)은 caspase라는 cysteine protease에 의해 주로 진행되지만, 한편으로는 caspase의 작용이 없이 세포사멸이 진행되기도 한다. 따라서 fraction-2가 간암세포에 있어서 caspase에 의존적 또는 비 의존적인 apoptosis를 유발하는지 확인하기 위하여, caspase inhibitor인 Z-VAD-FMK를 이용하여 세포사멸효과를 조사하였다. Z-VAD-FMK를 20  $\mu$ M의 농도로 다시마 추출물 처리 1시간 전에 미리 처리하여 세포에 대한 독성검사를 진행하였다. 그 결과, 추출물만을 처리하였을 때에는 농도가 증가 할수록 세포의 사멸율이 증가하는 것을 관찰할 수 있었지만 caspase inhibitor를 함께 처리하였을 때에는 상대적으로 낮은 세포 사멸율을 나타내는 것을 관찰할 수 있었다. 이는 caspase inhibitor에 의해 caspase의 작용이 억제되면서 세포사멸 또한 감소하였음을 의미하는 것으로서, 따라서 fraction-2는 간암세포에서 주로 caspase 의존적 경향으로 apoptosis를 유발한다고 판단된다.

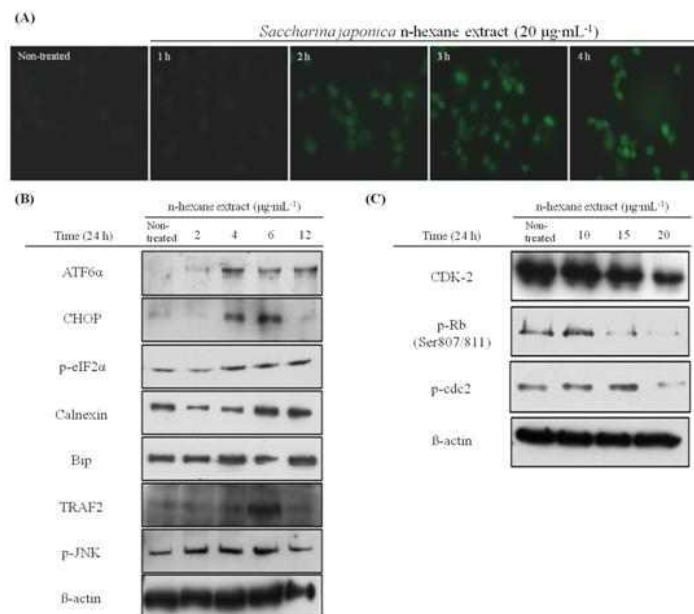


[그림 3-2-5] Fraction-2의 caspase 의존적 세포사멸 유도

(5) Fraction-2 처리에 따른 소포체 스트레스에 의한 세포사멸 관련 단백질들의 발현 양상 분석

다른 세포사멸기작인 소포체 스트레스는 세포 내 단백질의 합성에 관여하는 소기관인 소포체에서 외부 스트레스에 의해 칼슘이 배출되고 이에 따라 소포체 스트레스 관련 단백질의 활성화를 통하여 세포의 사멸이 일어나는 것을 말한다. Fraction-2가 간암세포에서 나타내는 세포사멸에 소포체 스트레스를 통한 세포사멸이 관련될 수 있는지를 조사하기 위해 먼저 세포내에서 소포체를 통한 칼슘 배출의 정도를 확인하였다. 다시마 추출물 (20 µg/ml)을 1, 2, 3, 4시간 동안 처리 후 칼슘 배출을 확인 한 결과, 처리 후 2시간째부터 형광이 높게 발광되는 것을 확인 하였으며 이는 추출물이 소포체를 통한 칼슘 배출에 영향을 주었을 것으로 판단되는 결과이다. 이 결과를 바탕으로 소포체 스트레스에 의한 세포사멸과 관련된 단백질들의 발현량을 Western blot analysis를 통하여 물질의 처리 시간에 따라 분석하였다. CHOP 단백질은 ATF6 $\alpha$ 의 하위 단백질로써 결과에서 보면, ATF6 $\alpha$ 가 먼저 활성화 된 후 시간이 경과 되고 CHOP 단백질이 활성화 되는 것을 알 수 있다. Bip과 calnexin은 소포체의 샤페론 단백질로서 이 단백질들의 활성화는 소포체 스트레스가 활성화되었음을 말한다. eIF2 $\alpha$ 의 인산화는 스트레스 신호를 전달하는 인자로 ATF4의 번역을 증가시키는 역할을 한다. 또한 TRAF2, p-JNK의 발현량이 증가한 것으로 보아 fraction-2는 간암세포에서 소포체의 스트레스를 유발한 것을 확인할 수 있었다.

한편, fraction-2가 간암세포의 세포주기(cell cycle) 조절에 관여하여 세포주기를 arrest시켜 암세포의 증식이 억제되는지를 확인하기 위하여 관련 단백질들의 발현을 조사하였다. 추출물을 다양한 농도로 24시간 처리한 결과, 세포주기의 조절에 관여하는 cell cycle-dependent kinase (CDK)2, phospho-cdc2, phospho-RB의 발현량이 모두 감소하였음을 알 수 있으며 이는 세포주기에 영향을 미쳐 세포의 분열을 억제함으로써 결국 암세포가 세포사멸 작용과 더불어 사멸로 이어질 수 있다는 것을 추정할 수 있는 결과이다.



[그림 3-2-6] 소포체 스트레스에 의한 칼슘 배출 및 관련 단백질들 그리고 세포주기 조절 단백질들의 발현 분석

A: 세포내 Ca<sup>2+</sup> influx 확인; B: 소포체 스트레스 관련 단백질; C: 세포주기 조절 단백질

#### 4. 요약 및 제언

다시마의 *n*-핵산 R3 fraction-2 추출물의 항암기작은 소포체 스트레스에 의한 세포사멸(apoptosis)의 유도와 미토콘드리아가 관련된 세포 내 전달기작에 의한 세포사멸의 유도를 동시에 일으키는 것으로 판명되었으며, 세포주기의 진행을 억제하여 암세포의 증식을 억제하는 것으로 추정할 수 있었다. 더욱이 *n*-핵산 R3 fraction-2 추출물은 정상 간 세포와 신장 세포에는 세포독성을 나타내지 않기 때문에 항시 문제시 되는 항암제의 세포독성과 같은 부작용을 완화시킬 수 있다는 점에서 보다 더 정제된 물질의 분리는 해조류 추출물이 항암제로 이용할만한 미래 항암제 원료로서의 충분한 잠재적 가치를 지니고 있음을 제언하고 있다. 따라서 지속적인 추출물의 분리 및 분획연구를 통한 유효 선도물질의 발굴은 천연소재로부터의 항암제 개발에 기여할 것이며, 이러한 결론들을 토대로, 동물모델 실험과 같은 직접적인 신약개발에 필요한 향후 부차적인 연구의 필요성을 제시하고 있다고 볼 수 있다.

#### 5. 향후계획

- 게재 예정 학술지

| 제 목   | 학술지                               | 발표자                       | 국가명<br>(SCI 여부) | 비고                         |
|---|-----------------------------------|---------------------------|-----------------|----------------------------|
| Dieckol, an isolation from <i>Ecklonia stolonifera</i> , induces apoptosis on human hepatocellular carcinoma Hep3B cells  | Journal of Natural Medicines      | 김군도<br>김형락<br>우희철<br>외 6명 | 일본<br>(SCI)     | 현재<br>학술지에<br>투고되어<br>심사 중 |
| The anti-cancer effects of <i>Saccharina japonica</i> extract on 267B1/K-ras human prostate cancer cells  | International Journal of oncology | 김군도<br>김형락<br>조미정         | 그리스<br>(SCI)    |                            |
| Induction of apoptosis accompanied by cell cycle arrest and endoplasmic reticulum stress by extract of <i>Saccharina japonica</i> in SK-Hep1 human hepatocellular carcinoma cells | Journal of Phycology              | 김군도<br>김형락<br>정현일         | 미국<br>(SCI)     |                            |

## 제 3 절 해조류 생리활성 물질의 항당뇨 효과 및 기전 분석

### 1. 연구 목적 및 내용

#### 가. 연구 목적

녹조류인 매생이 (*Capsosiphon fulvescens*)는 Ulvaceae에 속하며, 우리나라 남·서해안 연안 지역과 전세계에 분포한다. 예부터 식용으로 널리 이용되었으며, 한국에서는 기능성 식품으로 위장 기능 개선효과와 숙취해소 등 건강을 증진시키기 위한 전통치료약으로 사용되었다. 이전의 연구들에서는 매생이의 추출물의 항산화, 항 종양 활성, 면역증진 효과를 나타내는 것으로 밝혀졌으며, 골다공증 예방 효과, 피부자극 경감효과, 멜라닌 생성 억제 작용, 숙취 해소 및 간보호작용 등의 생리작용이 알려져 있다. 하지만 매생이 추출물과 매생이로부터 분리된 생리활성 성분의 lens aldose reductase 억제활성, 최종당화산물 형성억제 활성의 검색을 통한 당뇨병과 당뇨합병증의 치료에 대해서는 연구된 적이 없다.

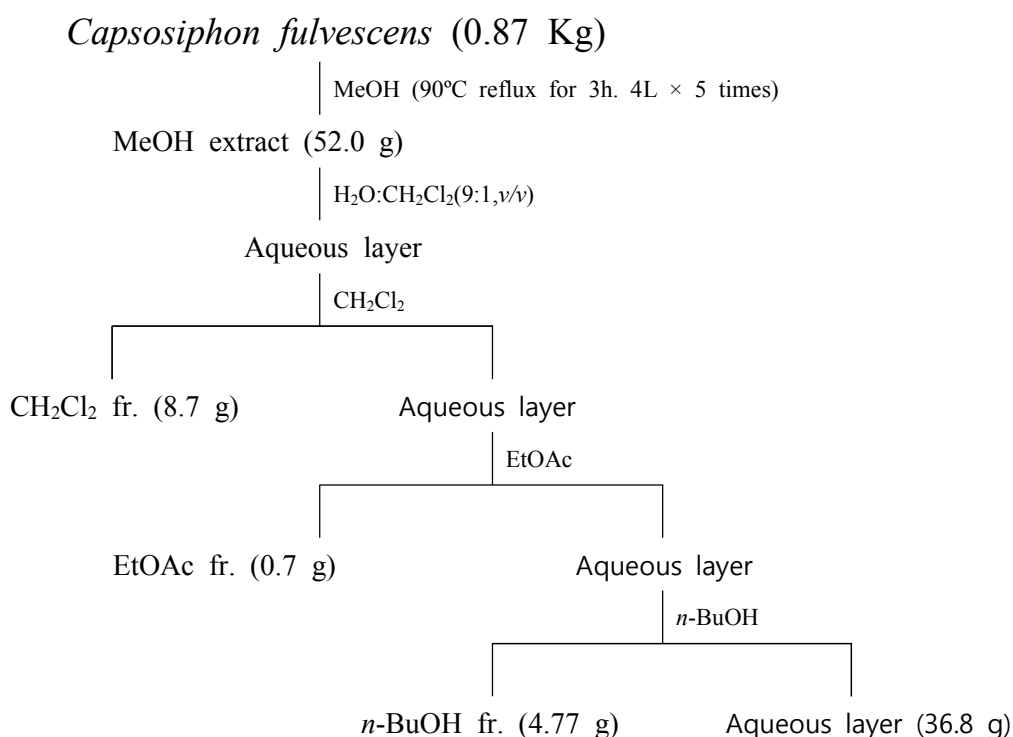
따라서, 본 연구에서는 매생이의 100% MeOH 추출물과 이를 계통적 분획법에 따라 분획하여 얻은 분획물들에 대한 lens aldose reductase 억제활성법, 최종당화산물형성 억제활성법을 in vitro에서 수행하고, 이들 중 활성을 지닌 분획물에서 silica gel, Diaion HP-20, RP-18 column chromatography를 통하여 생리활성물질을 분리 동정하였다. CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> 분획물로부터 분리한 화합물을 <sup>1</sup>H-NMR, <sup>13</sup>C-NMR 등의 분광학적 분석을 통하여 capsosulvesin A, B와 chalinasterol로 동정하고, 이들의 lens aldose reductase 억제활성, 최종당화산물 형성억제 활성을 측정하여 항당뇨 효과를 측정하였다. 본 연구는 매생이와 매생이로부터 처음으로 분리해낸 capsosulvesin 화합물과 chalinasterol의 lens aldose reductase 억제활성, 최종당화산물형성 억제활성을 통해 검증된 항당뇨 효과에 대한 최초의 보고서, 매생이가 당뇨와 당뇨합병증의 예방과 치료에 효과적인 기능성 식품으로서의 가능성을 제시하고자 하였다.

#### 나. 연구 내용

##### (1) 추출 및 분획

본 실험에 사용한 매생이는 전남 완도에서 채집하여 사용하였다. 건조 매생이를 마쇄하여 얻은 분말 870 g을 메탄올 2 l를 넣고 95 °C에서 3시간으로 3회 반복하여 환류냉각추출한 후 감압 여과한 다음, 여과 추출물은 진공회전농축기로

40 °C에서 메탄올을 제거한 후 추출된 잔사로서 메생이 메탄올 추출물 52.0 g을 얻었다. 그 후 MeOH 추출물을 H<sub>2</sub>O:CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (9:1, v/v)로 녹인 다음 분액 여두에 붓고, 동량의 CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>를 넣어 분획하였다. 평형화된 아래층의 CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> 가용부는 무수 망초 (sodium sulfate, anhydrous)를 처리한 후 여과하여 농축하였다. 위와 같은 방법으로 4회 더 반복하여 CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> 분획물 8.7 g을 얻었다. 동일한 방법으로 EtOAc를 가하여 상층의 EtOAc 가용부를 모아 EtOAc 분획물 0.7 g을 얻었다. 또한 n-BuOH에 대해서도 동일한 방법으로 시행하여 상층의 n-BuOH 분획물 4.77 g과 하층의 H<sub>2</sub>O 분획물 36.8 g을 얻었다(그림 3-3-1).



[그림 3-3-1] Extraction and fractionation of *Capsosiphon fulvescens*

## (2) 활성 화합물의 분리

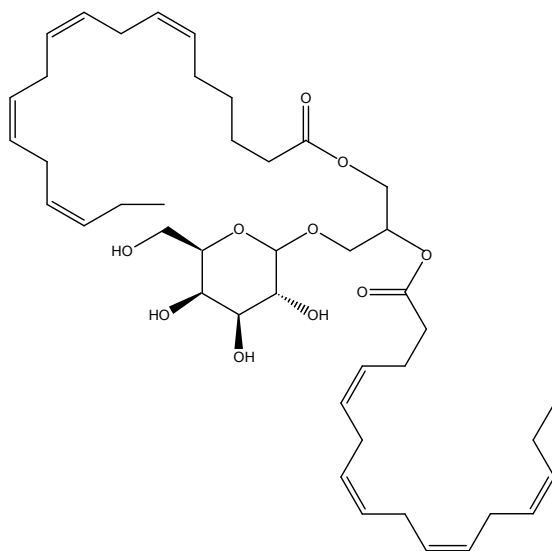
메생이 (*Capsosiphon fulvescens*)의 MeOH 추출물과 그 분획물들에 대하여 최종당화산물 형성 억제활성법과 lens aldose reductase 억제활성실험법을 시행한 결과, EtOAc 분획물이 가장 높은 활성을 보였고, 다음으로 CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> 분획물이 높은 억제활성이 나타났다. 그러나 CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> 분획물이 EtOAc 분획물보다 다소 낮은 억제활성을 나타내지만, Scheme 1에서 볼 수 있듯이 CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> 분획물이 EtOAc 분획물보다 수율이 높기 때문에 상대적으로 효과가 높을 것으로 예상된다. 이에

CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> 분획물을 대상으로 silica gel, dioion HP-20, RP-18 column chromatography를 수행하여 활성 성분을 분리하였다. CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> 분획물 8.0g을 전개용매로서 디클로로메탄 : 메탄올의 100:1 → 1:1의 혼합용매를 사용하여 칼럼 크로마토그래피를 수행하였다. 고정상으로는 키에셀 겔 60 (Kiesel gel 60, 230-400 매쉬)을 사용하여 시간당 1000 ml씩 분획을 수행하여 18개의 하부 분획물 (CF01~CF18)로 나누었다. CF09 (0.87 g)을 디클로로메탄 : 메탄올의 100:1 → 1:1의 혼합용매를 키에셀 겔 칼럼 크로마토그래피를 수행하여 화합물 1을 분리하였으며, CF11 (0.6 g)을 디클로로메탄 : 메탄올의 40:1 → 1:1의 혼합용매를 키에셀 겔 칼럼 크로마토그래피와 메탄올로 세파덱스 LH-20 (st. Louis, MO, 시그마 사)으로 정제하여 화합물 2, 3을 분리하였다.

분리한 각각의 화합물을 NMR 및 MS 등과 같은 각종 분석기기로 분석한 결과는 하기와 같다.

(가) 화합물 1 : 카프소플베신 A (capsosulvesin A; 분자식: C<sub>43</sub>H<sub>66</sub>O<sub>10</sub>.)

【화학식 1】



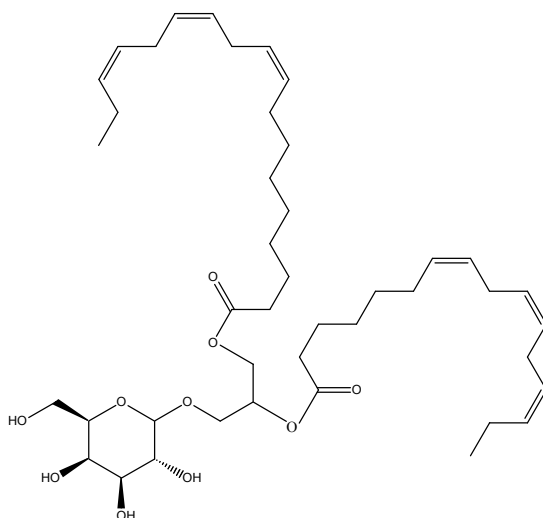
(2S)-1-O-(6z,9z,12z,15z-octadecatetraenoyl)-2-O-(4z,7z,10z,13z-hexadecatetraenoyl)-3-O-β-D-galactopyranosyl glycerol (1): [α] -31.3 (c 0.1, MeOH); UV (MeOH) λ<sub>max</sub> (logε) 205 (4.21), 235 (3.76) nm; IR (KBr) ν<sub>max</sub> 3424 (O-H), 3012 (H-C=C), 1737 (C=O), 1638 (C=C), 1079 (C-O) cm<sup>-1</sup>; FABMS m/z 765 [M+ Na]<sup>+</sup>, 563 [M+ H-galactose]<sup>+</sup>, 495 [M+ H-R1]<sup>+</sup>, 467 [M+ H-R2]<sup>+</sup>, 333 [M+ H-R1-galactose]<sup>+</sup>, 305 [M+ H-R2-galactose]<sup>+</sup>; HRFABMS m/z 765.4547 (calcd. for C<sub>43</sub>H<sub>66</sub>O<sub>10</sub>Na, 765.4544); <sup>1</sup>H NMR



(CDCl<sub>3</sub>, 400 MHz) δ 4.21 (1H, dd, J=12.0, 6.8Hz, H-1a), 4.40 (1H, dd, J=12.0, 2.8Hz, H-1b), 5.29 (1H, m, H-2), 3.70 (1H, dd, J=10.4, 5.8Hz, H-3a), 3.93 (1H, dd, J=10.4, 5.8Hz, H-3b), 5.28-5.46 (16H, H-4", 5", 7", 8", 10", 11", 13", 14", 6', 7', 9', 10', 12', 13', 15', 16'), 2.81-2.84 (12H, H2-6", 9", 12", 8", 11", 14"), 2.41 (4H, br s, H2-2", 3"), 2.36 (2H, t, J=7.6Hz, H2-2'), 2.05-2.10 (6H, H2-15", 17', 5'), 1.66 (2H, q, J=7.6Hz, H2-3'), 1.43 (2H, q, J=7.6Hz, H2-4'), 0.97 (6H, t, J=7.6Hz, H3-16', H3-18'), 4.26 (1H, d, J=7.2Hz, H-1'''), 3.63 (1H, dd, J=10.2, 7.2Hz, H-2'''), 3.53 (1H, dd, J=10.2, 3.5Hz, H-3'''), 4.04 (1H, dd, J=3.5, 1.5Hz, H-4'''), 3.65 (1H, t, J=6.3Hz, H-5'''), 3.80 (1H, dd, J=10.2, 6.3 Hz, H-6''a), 3.63 (1H, dd, J=10.2, 6.3 Hz, H-6''b); <sup>13</sup>CNMR (CDCl<sub>3</sub>, 100 MHz) δ 63.1 (C-1), 71.2 (C-2), 68.2 (C-3), 173.8 (C-1''), 172.9 (C-1'), 129.8a, 128.8a, 128.5a, 128.1a, 128.0a, 127.8a, 127.3, 132.3 (C-4", 5", 7", 8", 10", 11", 13", 14"), 129.5a, 128.3a, 128.1a, 128.0a, 127.9a, 127.8a, 127.1, 131.3 (C-6', 7', 9', 10', 12', 13', 15', 16'), 34.2 (C-2", 2'), 22.8 (C-3"), 24.6 (C-3'), 29.3 (C-4'), 27.0 (C-5'), 25.8 (C-6", 9", 12", 8', 11', 14'), 20.7 (C-15", 17'), 14.5 (C-16", 18'), 104.2 (C-1'''), 70.6 (C-2'''), 73.6 (C-3'''), 68.9 (C-4'''), 74.7 (C-5'''), 61.4 (C-6''').

(나) 화합물 2 : 카프소플베신 B (capsosulvesin B, 분자식: C<sub>43</sub>H<sub>70</sub>O<sub>10</sub>)

【화학식 2】

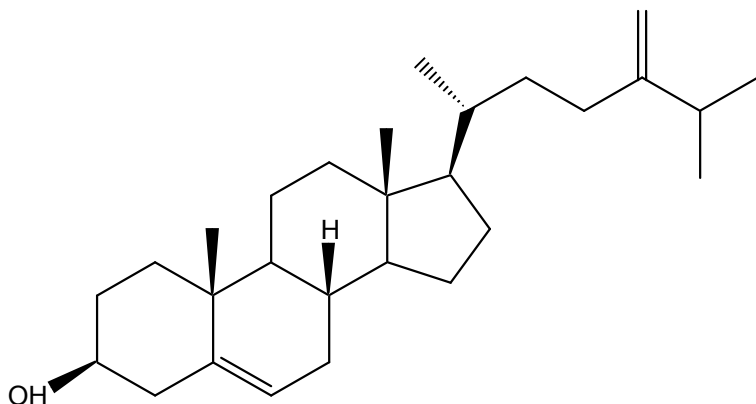


(2S)-1-O-(9z,12z,15z-octadecatrienoyl)-2-O-(7z,10z,13z-hexadecatrienoyl)-3-O-β-D-galactopyranosyl glycerol (2): [α] -35.0 (c 0.1, MeOH); UV

(MeOH)  $\lambda_{\max}$  (log  $\epsilon$ ) 206 (4.22), 236 (3.76) nm; IR (KBr)  $\nu_{\max}$  3423 (O-H), 3012 (H-C=C), 1740 (C=O), 1638 (C=C), 1071 (C-O)  $\text{cm}^{-1}$ ; FABMS  $m/z$  769 [M+Na]<sup>+</sup>, 567 [M+H-galactose]<sup>+</sup>, 497 [M+H-R1]<sup>+</sup>, 469 [M+H-R2]<sup>+</sup>, 335 [M+H-R1-galactose]<sup>+</sup>, 307 [M+H-R2-galactose]<sup>+</sup>; HRFABMS  $m/z$  769.4867 (calcd. for C<sub>43</sub>H<sub>70</sub>O<sub>10</sub>Na, 769.4872); <sup>1</sup>H NMR (CDCl<sub>3</sub>, 400MHz)  $\delta$  4.21 (1H, dd, J=12.0, 6.8Hz, H-1a), 4.40 (1H, dd, J=12.0, 2.8Hz, H-1b), 5.30 (1H, m, H-2), 3.71 (1H, dd, J=10.4, 5.8Hz, H-3a), 3.94 (1H, dd, J=10.4, 5.8Hz, H-3b), 5.28-5.43 (12H, H-7'', 8'', 10'', 11'', 13'', 14'', 9', 10', 12', 13', 15', 16'), 2.79-2.82 (8H, H2-9'', 12'', 11', 14'), 2.35 (4H, t, J=7.6Hz, H2-2'', 2'), 1.65 (2H, q, J=7.6Hz, H2-3''), 1.63 (2H, q, J=7.6Hz, H2-3'), 2.03-2.11 (8H, m, H2-15'', 6'', 8', 17'), 1.26 (8H, br s, H2-4', -H2-7', 0.98 (6H, t, J=7.6Hz, H3-16'', 18'), 4.26 (1H, d, J=7.2Hz, H-1'''), 3.63 (1H, dd, J=10.2, 7.2Hz, H-2'''), 3.53 (1H, dd, J=10.2, 3.5Hz, H-3'''), 4.04 (1H, dd, J=3.5, 1.5Hz, H-4'''), 3.65 (1H, t, J=6.3Hz, H-5'''), 3.80 (1H, dd, J=10.2, 6.3Hz, H-6'''a), 3.63 (1H, dd, J=10.2, 6.3Hz, H-6'''b); <sup>13</sup>C NMR (CDCl<sub>3</sub>, 100 MHz)  $\delta$  63.1 (C-1), 71.3 (C-2), 68.3 (C-3),  $\delta$  173.0 (C-1'), 174.0 (C-1''), 130.4a, 128.6a, 128.1a, 127.9a, 127.3, 132.2 (C-7'', 8'', 10'', 11'', 13'', 14''), 130.0a, 128.6a, 128.1a, 128.0a, 127.3, 132.2 (C-9', 10', 12', 13', 15', 16'), 34.3 (C-2'', 2'), 25.0 (C-3'', 3'), 29.3 (C-5''), 27.2 (C-6''), 25.8 (C-9'', 12'', 11', 14'), 20.7 (C-15'', 17'), 14.5 (C-16'', 18'), 104.3 (C-1'''), 70.6 (C-2'''), 73.7 (C-3'''), 68.9 (C-4'''), 74.8 (C-5'''), 61.5 (C-6''').

(다) 화합물 3 : 카리나스테롤 (chalinasterol, 분자식: C<sub>25</sub>H<sub>26</sub>O<sub>7</sub>)

【화학식 3】



Chalinasterol - <sup>1</sup>H NMR (CDCl<sub>3</sub>, 400 MHz) δ: 0.65 (3H, s, H-18), 0.87 (3H, s, H-19), 1.24 (3H, d, J=7.0Hz, H-21), 1.57 (6H, m, H-26, H-27), 3.52 (3r-H), 5.32 (1H, m, H-5), 5.34 (2H, s, H-28); <sup>13</sup>C NMR (CDCl<sub>3</sub>, 100 MHz) δ: 34.29 (C-1), 29.76 (C-2), 73.36 (C-3), 38.59 (C-4), 146.96 (C-5), 126.42 (C-6), 32.17 (C-7), 35.74 (C-8), 53.69 (C-9), 35.77 (C-10), 20.99 (C-11), 28.59 (C-12), 41.98 (C-13), 55.92 (C-14), 24.17 (C-15), 40.11 (C-16), 50.03 (C-17), 12.03 (C-18), 12.21 (C-19), 34.29 (C-20), 19.53 (C-21), 37.15 (C-22), 22.33 (C-23), 144.64 (C-24), 29.76 (C-25), 20.99 (C-26), 22.27 (C-27), 123.45 (C-28).

### (3) 최종 당화산물 형성 억제 활성

최종당화산물 형성억제활성은 Vinson and Howard (1996)의 방법을 변형하여 실험하였다. 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 μL과 10 % DMSO에 녹인 여러 농도의 sample 50 μL를 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 Hayman과 Kinoshita (1965)의 방법을 수정하여 실시하였다. 흰쥐의 수정체를 적출하고 수정체 1개당 0.5mL의 Phosphate buffer을 가하여 균질화 한다. 이를 4 °C, 10,000rpm으로 20분간 원심 분리한 후 그 상등액을 취하여 사용한다. 반응 buffer인 potassium phosphate buffer (pH 7.0) 620μL, 효소원 90 μL, NADPH (1.6mM) 90 μL, DMSO에 녹인 MeOH extract와 각각의 fractions 9 μL, 기질로는 90 μL의 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  $\mu\text{g/ml}$  혹은  $\mu\text{M}$ 로 나타낸 값으로 log-dose 억제 curve로부터 계산하였다.

## 2. 연구 방법

### 가. 실험장치 및 재료

본 실험에서는 2010년 5월에 완도 연근해에서 채취하여 건조 발에 규격대로 1년 후 자연 상태로 태양 건조한 메생이 (Capsodiphon fulvescens)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 $\mu\text{m}$ , Merck), DiaionHP-20(250-850  $\mu\text{m}$ , Sigma)을 사용하였다. Thin layer chromatography는 Kieselgel 60 F254plate (0.25mm, precoated Merck, Art. 5715)와 RP-18 F254s (Merck, Art. 5685)를 사용하였으며, 발색시약은 50% H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>를 사용하였다. 추출 및 column chromatography는 1급 시약을 사용하였다. NMR 측정 시 사용한 용매는 CDCl<sub>3</sub> (Merck, deuterium degree 99.95%)이다. Bovine serum albumin (BSA), aminoguanidine hydrochloride, D-(-)-fructose와 D-(+)-glucose,  $\beta$ -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. NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>과 NaOH는 Yakuri Pure Chemicals Co., Ltd. (Osaka, Japan), Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>는 Junsei Chemical Co., Ltd. (Tokyo, Japan)로부터 구입하였다.

## (2) 기기

<sup>1</sup>H-NMR과 <sup>13</sup>C-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 억제활성실험에서의 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

#### (가) CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>획분의 성분 분리

### (3) 최종당화산물 형성억제 활성과 lens aldose reductase 억제 활성

### 3. 연구수행 결과

#### 가. 메생이 CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> 분획물에서 분리된 화합물의 구조결정

메생이 (*Capsosiphon fulvescens*)의 분획물 중 최종당화산물 형성 억제 활성이 가장 높은 CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> 분획물에서 column chromatography를 통하여 3종의 화합물을 분리, 정제 하였으며 1D NMR (1H-NMR, 13C-NMR)의 분광학적 방법을 사용하여 분석하였다. 이들 화합물들은 다시마에서는 처음 분리된 화합물로서 각각 capsosulvescin A, B와 chalinasterol로 동정하였다.

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

메생이의 MeOH 추출물과 MeOH 추출물을 계통적 용매 분획하여 얻은 CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, EtOAc, n-BuOH 분획물과 H<sub>2</sub>O층의 최종당화산물 억제 활성과 lens aldose reductase 억제활성을 측정하여 그 결과를 Table 1에 나타내었다.

최종당화산물 억제활성법의 대조약물로는 aminoguanidine을 사용하였으며, 활성을 검색한 결과 메생이의 MeOH 추출물과 분획물들의 IC<sub>50</sub> 값은 EtOAc 분획물 (IC<sub>50</sub> 145.32  $\mu$ g/ml) > CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> 분획물 (IC<sub>50</sub> 193.98  $\mu$ g/ml) > MeOH 추출물 (IC<sub>50</sub> 350.4  $\mu$ g/ml) > n-BuOH분획물 (IC<sub>50</sub> 96.65  $\mu$ g/ml) > H<sub>2</sub>O분획물 (> IC<sub>50</sub> 400  $\mu$ g/ml)의 순으로 나타났다. MeOH 추출물과 각 분획물들의 최종당화산물 형성 억제 활성실험에서 H<sub>2</sub>O 층은 400  $\mu$ g/ml이상에서도 전혀 효과가 나타나지 않았다. 대조군인 aminoguanidine (IC<sub>50</sub> 53.82  $\mu$ g/ml)보다는 다소 낮은 최종당화산물 형성 억제활성을 나타내었으나, MeOH 추출물과 각 분획물 들 중에서 BuOH 분획물이 가장 높은 활성을 보이고, 다음으로 EtOAc, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> 분획물의 순으로 높은 활성을 나타내었다.

메생이의 MeOH 추출물과 분획물들의 lens aldose reductase 억제활성을 측정하기 위해 대조약물로는 aldose reductase 억제제로 알려져 있는 quercetin (Varma et al., 1975; Varma et al., 1977; Leuenberger, 1978)을 사용하였다. 메생이의 MeOH 추출물과 그로부터 얻은 분획물들의 lens aldose reductase 억제 활성의 나타내는 IC<sub>50</sub> 값은 EtOAc 분획물 (IC<sub>50</sub> 20.61  $\mu$ g/ml) > CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> 분획물 (IC<sub>50</sub> 41.69  $\mu$ g/ml) > MeOH 추출물 (IC<sub>50</sub> 61.81  $\mu$ g/ml) > n-BuOH분획물 (IC<sub>50</sub> 32.78  $\mu$ g/ml) > H<sub>2</sub>O분획물 (> IC<sub>50</sub> 100  $\mu$ g/ml)의 순으로 나타났다. 이들은 대조군인 quercetin (IC<sub>50</sub> 0.49  $\mu$ g/ml)보다는 낮은 활성을 나타내었으나, 그 중에서 EtOAc 분획물이 가장 높은 활성을 나타내었다. 그 다음으로 n-BuOH 분획물과 CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> 분획물이 높은 억제활성을 나타내었다.

이들 결과를 종합해 보면, EtOAc 분획물이 두 실험계에서 가장 강력한 억제활성을 지니고 다음으로 CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> 분획물이 효과적인 것을 알 수 있었다. 그러나 수을 면을 고려해볼 때, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> 분획물이 EtOAc 분획물의 11배 가량 높기 때문에 CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> 분획물에 최종당화산물 형성과 lens aldose reductase 활성을 억제할 수 있는 성분이 다량 존재하고 있을 것으로 기대할 수 있었다. 따라서 본 연구에서는 CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> 분획물에서 그 생리활성성분을 분리하고자 하였다.

[표 3-3-1] In vitro inhibitory activities of methanolic extract and its fractions from *C. fulvescens*

| Samples                                  | RLAR <sup>a</sup>        | AGE <sup>a</sup>         |
|--|--------------------------|--------------------------|
|  | IC <sub>50</sub> (μg/ml) | IC <sub>50</sub> (μg/ml) |
|  | Mean ± S.E.M.            | Mean ± S.E.M.            |
| MeOH extract                             | 61.81 ± 2.10             | 350.40 ± 1.73            |
| CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> fraction | 41.69 ± 1.83             | 193.98 ± 0.66            |
| EtOAc fraction                           | 20.61 ± 0.36             | 145.32 ± 0.25            |
| <i>n</i> -BuOH fraction                  | 32.78 ± 0.93             | 96.65 ± 0.26             |
| H <sub>2</sub> O fraction                | >100                     | >400                     |
| Quercetin <sup>b</sup>                   | 0.49 ± 0.03              |                          |
| Aminoguanidine <sup>c</sup>              |                          | 53.82 ± 0.10             |

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

<sup>a</sup>The 50% inhibition concentration (μg/mL) were calculated from the log dose inhibition curve and expressed as the mean ± S.E.M. of triplicate experiments.

<sup>b</sup>Quercetin was used as a positive control in the RLAR assay.

<sup>c</sup>Aminoguanidine was used as a positive control in the AGE assay.

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

메생이의 CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> 분획물을 대상으로 silica gel, Diaion HP-20, RP 18 column chromatography를 수행하여 3종의 화합물, 즉 capsosulvesin A, B와 chalinasterol를 분리하였으며, 이들을 대상으로 최종당화산물형성 억제활성과 lens aldose reductase 억제활성을 평가하였다 (Table 2). 최종당화산물형성 억제활성 실험은 in vitro에서 glucose, fructose와 같은 당과 BSA간의 당화반응에 의해 형성된 형광성을 지닌 최종당화산물의 측정을 통해 이루어졌다. 메생이에서 분리된 capsosulvesin A, B와 chalinasterol은 200 μM 이상의 농도에서도 활성이 나타나지 않았다. 반면, lens aldose reductase 실험에서는 3종의 화합물 모두 억제활성을 나타내었다. 본 실험은 Rat의 수정체를 균질화하여 효소로 사용하고 DL-glyceraldehyde를 기질로 하여 수행하였다. 양성 대조군인 quercetin (6.80 ± 0.87 μM)과 비교하였을 때, capsosulvesin A와 B는 IC<sub>50</sub> 값이 52.53 ± 2.82과 100.92 ± 7.34 μM로 비교적 높은 활성을 나타내었다. 반면에 chalinasterol은 IC<sub>50</sub> 값이 345.27 ± 8.68 μM로 낮은 억제활성을 나타내었다.

이러한 결과들을 종합해보면, 메생이와 그로부터 분리된 capsosulvesin A와 B, 그리고 chalinasterol은 당뇨병성 합병증을 예방하고 치료할 수 있는 기능성 식품으로서의 이용이 가능할 것으로 기대된다.

[표 3-3-2] In vitro inhibitory activities of capsosulvesin A, B and chalinasterol from *C. fulvescens*

| Compounds                  | RLAR <sup>a</sup>                      | AGE <sup>b</sup>                       |
|----------------------------|--|--|
|                            | IC <sub>50</sub> (μM)<br>Mean ± S.E.M. | IC <sub>50</sub> (μM)<br>Mean ± S.E.M. |
| Capsosulvesin A            | 52.53 ± 2.82                           | >200                                   |
| Capsosulvesin B            | 100.92 ± 7.34                          | >200                                   |
| Chalinasterol              | 345.27 ± 8.68                          | >200                                   |
| Quercetin <sup>c</sup>     | 6.80 ± 0.87                            |  |
| Aminoguanidin <sup>d</sup> |  | 67.63 ± 1.22                           |

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

aThe concentration that caused 50% inhibition (IC<sub>50</sub>) is given as the mean ± S.E.M. of duplicate experiments. bThe 50% inhibition concentration (μg/mL) were calculated from the log dose inhibition curve and expressed as the mean ± 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.



#### 4. 요약 및 제언

식용 녹조류인 매생이 (*Capsosiphon fulvescens*)는 항산화, 항 종양 활성, 면역증진 효과를 나타내는 것으로 밝혀졌으며, 골다공증 예방효과, 피부자극 경감효과, 멜라닌 생성 억제 작용, 숙취 해소 및 간보호작용 등의 생리작용이 알려져 있다. 하지만 매생이 추출물과 매생이로부터 분리된 생리활성성분의 lens aldose reductase 억제활성, 최종당화산물 형성억제 활성의 검색을 통한 당뇨병과 당뇨합병증의 치료에 대해서는 연구된 적이 없다. 이와 같이 매생이와 그로부터 분리해낸 성분의 다양한 생리활성에 대한 많은 연구들이 보고 되어 왔으나, 매생이로부터 처음으로 분리해낸 capsifulvesin A와 B, chalinasterol 화합물의 lens aldose reductase 억제활성과 최종당화산물형성의 억제활성에 대한 검증은 본 연구가 처음이며, 위와 같은 결과들을 미루어 보아 매생이와 그로부터 분리된 capsifulvescin A와 B, 그리고 chalinasterol은 당뇨합병증의 예방과 치료에 효과적인 천연의약품으로서의 역할을 기대할 수 있다.

#### 5. 향후계획

추출 용매 조건에 따른 추출물의 HPLC 분석을 통한 표준화 및 규격화

## 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 황산 촉매를 이용한 다시마의 전처리 공정조건을 모색하여 전처리된 다시마 시료의 발효성당 함유율 및 효소가수분해도를 향상시키고자 하였다. 또한 연속공정 장치 운용을 통하여 공정변수 (온도, 촉매, 체류시간, 투입속도 등)의 영향을 평가하고 이와 동시에 연속전처리 가능성을 탐색하고자 하였다.

##### 나. 연구 내용

약산 및 극저산 촉매를 이용한 전처리 공정을 시험하였고 각 독립변수 (온도, 촉매, 시간 등)에 따른 발효성당 및 byproduct를 조사한 후 반응표면 분석법 등을 통한 최적조건을 예측하였으며, 열수처리 등의 전처리 방법과 함께 효율성을 비교하였다. 또한, 연속장치를 이용한 다시마의 전처리를 위하여 연속공정변수 (온도, 촉매, 체류시간, 투입속도 등)를 조사하고 이들 중 매개변수를 결정하여 각 매개변수에 따른 전처리 영향을 평가하였으며, 전처리 된 시료의 효소가수분해도 시험을 진행하였다.

#### 2. 연구 방법

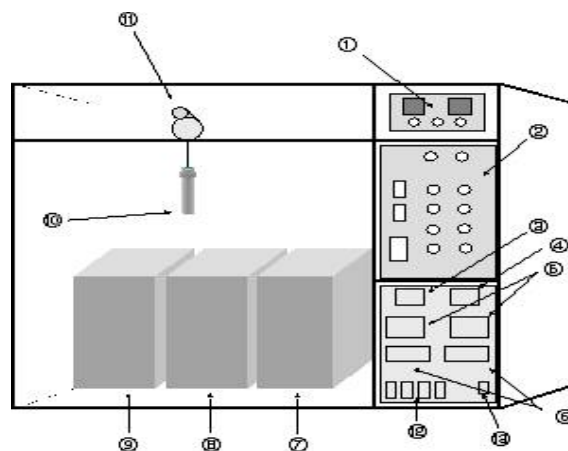
##### 가. 실험장치 및 재료

##### (1) 실험장치

##### (가) 회분식 공정 장치

[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℃까지 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.

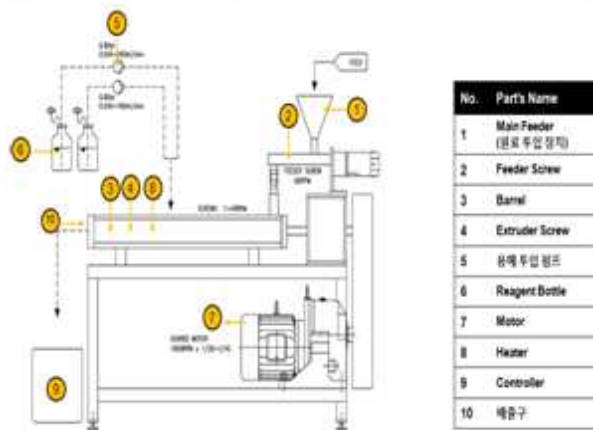


[그림 4-1-1] Experimental apparatus of batch process ① timer and counter, ② operator's control box, ③ voltmeter, ④ ammeter, ⑤ digital thermo controller, ⑥ digital indicator, ⑦ bath (cooler), ⑧,⑨ bath (heater), ⑩ batch reactor, ⑪ electric motor, ⑫ power switch, ⑬ main switch.

#### (나) 연속식 공정 장치

본 연구에서는 thermo-mechanical and extrusion pretreatment가 가능한 쌍축 동방향 연속장치 (DK-EXT-01, Biotron Co., In-cheon, Korea)를 자체 제작하여 사용 하였다 [그림 4-1-2]. 연속장치는 바렐, 스크류와 축, 시료 투입장치, 촉매 투입장치, 구동모터로 이루어져 있으며, 사용된 스크류들의 길이는 1000 mm, 직경은 36 mm 이고, 길이와 직경의 비 (L/D ratio)는 27.78 이었다. 바렐과 스크류의 재질은

sus316 으로 제작 하였다. 스크류는 forward screw, forward kneading block, reverse kneading block 의 조합으로 이루어져 있다. 스크류의 길이는 18, 28, 38, 48 mm 로 개별적으로 조합이 가능하였다. 스크류는 conveying zone, kneading block, reaction zone, final compression zone 의 4개 부분으로 나뉜다. Conveying zone 은 시료와 촉매를 kneading block 까지 이동시켜 주고, kneading block 은 시료와 촉매를 mixing 하면서 시료의 particle size를 감소시킨다. Reaction zone 은 mixing 이 된 시료와 촉매를 barrel 의 온도와 내부의 압력으로 반응시키는 역할을 하며, final compression zone 은 스크류의 pitch size 를 줄여 압력을 가하는 역할을 한다.



[그림 4-1-2] Experimental apparatus of continuous twin screw-driven process.

## (2) 실험재료

본 실험에서는 분말 상태의 다시마 (Wando, Korea)를 실험재료로 사용하였으며, 다시마의 열화학적 분해를 위한 반응촉매로는 0.02 ~ 5.0 (w/v)% 황산수용액을 이용하였다.

나. 실험 절차

(1) 실험조건

(가) 회분식 전처리 공정

① 약산 및 극저산 전처리

다시마의 약산 및 극저산 전처리 시험을 위해 Response Surface Methodology (RSM)을 사용하였으며, 이를 위해 예비실험을 바탕으로 한 Central Composite Design (CCD)을 실시하였다. 독립변수 ( $X_n$ )는 반응온도 ( $X_1$ )와 반응시간 ( $X_2$ ) 및 촉매농도 ( $X_3$ )로 설정하였고, 이를 -1.68, -1, 0, 1, 1.68의 5단계로 부호화하였으며, 3변수 3수준 분류인자 설계 ( $3^3$ -fractional factorial design)에 따라 6개의 star point와 3개의 center point에 관한 실험을 3회 반복 수행하였다. 실험결과는 SAS (Statistical Analysis System 9.0)를 이용, 통계적으로 분석하여 식 1과 같이 종속변수 ( $Y_n$ )에 대한 회귀방정식을 구함으로써 최적 반응조건을 예측하였다.

$$Y = b_0 + \sum_{i=1}^k b_i x_i + \sum_{i=1}^k b_{ii} x_i^2 + \sum_{i < j} b_{ij} x_i x_j \quad (\text{식 1})$$

여기서  $Y$ 는 response,  $b_0$ 는 constant,  $b_i$ 는 linear coefficient,  $b_{ii}$ 는 quadratic coefficient,  $b_{ij}$ 는 interactive coefficient 이다.

[표 4-1-1] Coded levels and real values of tested variables in the central composite design (CCD) for the pretreatment of *L. japonica* using extremely low acid

| Variable   | Coded factor level |      |      |      |       |
|--|--------------------|------|------|------|-------|
|  | -1.68              | -1   | 0    | 1    | 1.68  |
| Temperature (°C)                                 | 143.2              | 150  | 160  | 170  | 176.8 |
| Time (min)                                       | 8.2                | 15   | 25   | 35   | 41.8  |
| H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> concentration (%) | 0.03               | 0.06 | 0.10 | 0.14 | 0.17  |

[표 4-1-2] Coded levels and real values of tested variables in the central composite design (CCD) for the pretreatment of *L. japonica* using dilute acid

| Variable   | Coded factor level |      |      |      |       |
|--|--------------------|------|------|------|-------|
|  | -1.68              | -1   | 0    | 1    | 1.68  |
| Temperature (°C)                                 | 133.2              | 140  | 150  | 160  | 166.8 |
| Time (min)                                       | 3.2                | 10   | 20   | 30   | 36.8  |
| H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> concentration (%) | 0.00 <sup>a</sup>  | 0.10 | 0.30 | 0.50 | 0.64  |

<sup>a</sup> coded factor level 이 -1.68일 때 실제값은 음의 값이므로 0으로 나타냄

## ② 열수 전처리 공정

촉매를 사용하지 않고 열수처리한 다시마와 산을 촉매로 이용하여 전처리된 다시마의 전처리 효과를 비교하기 위해 열수처리 실험을 실시하였으며, 시료 1 g과 DI water 9 mL를 반응기에 넣고 반응온도 150, 170°C, 반응시간 20 ~ 40분의 조건으로 반응을 수행하였다.

### (나) 연속공정을 이용한 전처리 공정

바렐의 온도는 150 ~ 200°C, 스크류의 속도는 20 rpm으로 설정하였으며, 촉매는 0.5 ~ 5.0 % 황산수용액을 사용하였다. 바이오매스와 촉매의 투입속도는 각각 12.5 g/min, 22 mL/min (S : L = 1 : 1.17)으로 하였으며, 이때, 시료의 residence time은 약 3 min 이었다.

### (다) 효소가수분해도 시험

100 mL 삼각플라스크에 1.0 g-glucan (연속식전처리 시험의 경우 0.25 g-glucan)을 기준으로 하는 양만큼의 시료와 0.1 M sodium citrate buffer 25 mL, 2.0% sodium azide 0.5 mL를 넣은 후 DI water를 넣어 부피가 50 mL가 되도록 하였다. Cellulase인 celluclast (Novo Co., Denmark)의 양은 15 FPU/g-glucan, Novozyme-188 (Novo Co., Denmark)의 양은 70 pNPGU/g-glucan으로 하여 첨가한 후, 50°C에서 48 시간 동안 반응시켰다. 반응시료는 일정시간 간격으로 채취한 후, 11180 g에서 10분간 원심분리하여 HPLC (Breeze HPLC system, Waters Co., USA)로 분석하였다.



## (2) 분석방법

### (가) 탄수화물 분석

다시마의 탄수화물 정량분석은 NREL/TP-510-42623 [1]에 따라 수행하였다. 준비된 시료 0.3 g과 72.0% 황산수용액 3 mL를 test tube에 넣고 15~20분 간격으로 유리막대를 이용하여 저어주면서 30°C에서 2시간 동안 반응시켰다 (1차 가수분해). 반응이 끝난 후 84 mL의 증류수를 가하여 산 농도를 4.0%로 낮추고 autoclave (8000-DSE, Nap Co., Korea)를 이용, 121°C에서 1시간 동안 반응시켰다 (2차 가수분해). 2차 가수분해가 끝난 시료는 탄산칼슘 ( $\text{CaCO}_3$ )으로 중화한 후, RI detector (Waters 2414, Waters Co., USA)가 장착된 HPLC (Breeze HPLC system, Waters Co., USA)를 이용하여 분석하였다. Column은 Aminex HPX-87H (Bio-rad, USA, 300 x 7.8 mm)를 사용하였고, 이동상은 5mM 황산수용액을 사용하였으며, 흐름속도는 0.5 mL/min, column과 detector의 온도는 각각 60°C, 50°C로 설정하였다. 반응 중 분해되는 당의 양을 보정하기 위해서는 Sigma Aldrich사의 표준시약을 사용하였다.

### (나) 전처리액 및 효소가수분해액 분석

다시마의 전처리 여액 및 전처리물을 효소가수분해한 여액은 RI detector (Waters 2414, Waters Co., USA)가 장착된 HPLC (Breeze HPLC system, Waters Co., USA)를 이용하여 분석하였으며 (전처리 여액의 경우 탄산칼슘 ( $\text{CaCO}_3$ )으로 중화한 후 분석), 분석조건은 탄수화물 분석조건과 동일하였다.

## 3. 연구수행 결과

### 가. 회분식 전처리 공정

#### (1) 약산 전처리

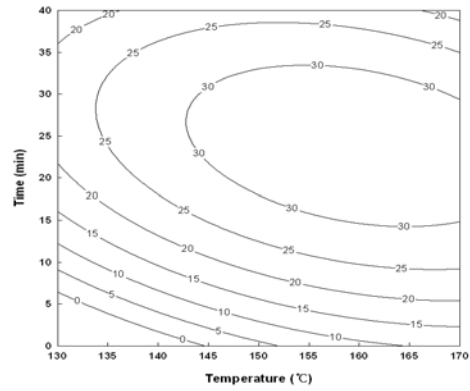
반응온도, 반응시간 및 촉매농도를 독립변수로 하여 이 변수들 간의 상호작용을 Central Composite Design (CCD)을 통해 관찰하였다. 도출된 결과의 회귀분석을 통하여 반응표면방정식인 식 2를 얻었고, 그에 대한 회귀계수  $R^2$ 은 0.81 이었다.

$$Y = 31.43 + 3.19X_1 + 4.70X_2 + 1.40X_3 - 0.86X_1^2 - 4.73X_1X_2 - 3.85X_2^2 + 3.61X_1X_3 - 0.72X_2X_3 - 2.80X_3^2 \quad (\text{식 2})$$

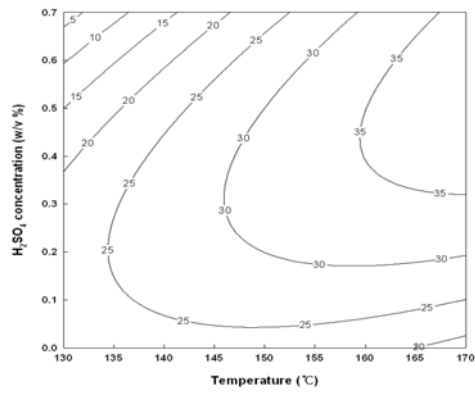
유의수준 P는 반응온도의 경우 0.0373으로 5.0% 이내였고, 반응시간의 경우 0.0052로 1.0% 이내의 유의수준을 보여 반응온도보다 반응시간이 glucan 함량에 대해 영향을 미칠 수 있는 중요한 변수임을 알 수 있었다. 촉매농도의 경우 유의수준이 0.1828로 다른 두 변수와 비교했을 때 영향을 거의 미치지 않는 것으로 판단되었다.

[그림 4-1-3 (a)]에서 알 수 있듯이, 반응온도 160℃ (coded value : 1.00), 반응시간 24분 (coded value : 0.40)에서 제일 높은 glucan 함량을 보였고, 그 값은 33.7%였다. 반응온도의 변화에 따른 glucan 함량의 변화보다 반응시간에 따른 glucan 함량변화가 더 큰 것으로 나타났으며, 이는 앞서 조사된 유의수준 P 값을 통해 얻은 결과와 일치하는 것이었다. 반응온도 및 촉매농도의 상호작용에 따른 glucan 함량을 [그림 4-1-3 (b)]에 contour로 나타내었다. 반응온도는 촉매농도보다 glucan의 함량에 더 큰 영향을 미치는 것을 알 수 있었으며, 반응온도 및 촉매농도가 증가할수록 glucan 함량이 점점 증가하는 것을 알 수 있었다. 또한 두 변수가 함께 증가할 때 glucan 함량변화에 많은 영향을 주는 것으로 확인되어 두 변수간의 상호작용이 중요한 것으로 사료되었다. [그림 4-1-3 (c)]는 반응온도와 촉매농도에 대한 glucan 함량에 대한 contour를 나타낸 것이다. Glucan 함량은 반응시간 27분 (coded value : 0.7), 촉매농도 0.34% (coded value : 0.2)일 때 최대값을 나타냈고, 그 값은 32.5%였다. 반응시간의 변화에 따른 glucan 함량의 변화는 촉매농도의 변화에 의한 것보다 더 큰 것으로 확인되어, 반응시간에 대한 유의수준 (0.0052)과 촉매농도에 대한 유의수준 (0.1828) 결과와 일치하는 것으로 나타났다.

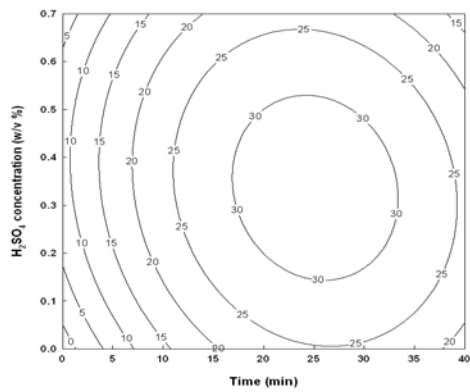
SAS (Statistical Analysis System)를 이용, 통계적으로 분석하여 종속변수 ( $Y_n$ )에 대한 회귀방정식을 구함으로써 다시마의 약산 전처리를 위한 최적 반응조건을 예측한 결과, 반응온도 147.1℃, 반응시간 27.9분, 촉매농도 0.30%였고, 이 때의 glucan 함량은 32.8%인 것으로 예측되었다.



(a)



(b)



(c)

[그림 4-1-3] Contour plot of the variation on the glucan contents of fractionated *L. japonica* using a dilute acid as a function of (a) the temperature and time, (b) temperature and H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> concentration, and (c) time and H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> concentration.

(2) 극저산 전처리

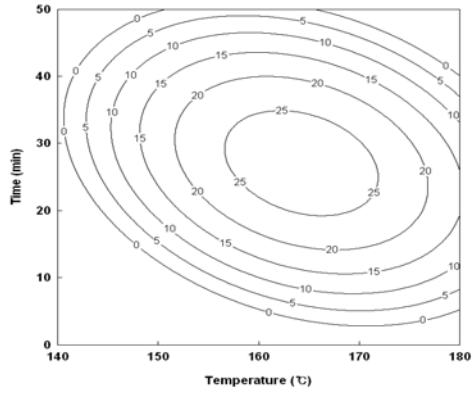
반응온도, 반응시간 및 촉매농도를 독립변수로 하여 이 변수들 간의 상호작용을 Central Composite Design (CCD)을 통해 관찰하였다. 도출된 결과의 회귀분석을 통하여 반응표면방정식인 식 3을 얻었고, 그에 대한 회귀계수  $R^2$ 은 0.80 이었다.

$$Y = 26.49 + 5.17X_1 + 3.27X_2 + 2.71X_3 - 5.39X_1^2 - 2.87X_1X_2 - 5.12X_2^2 - 0.42X_1X_3 + 0.58X_2X_3 - 0.59X_3^2 \quad (\text{식 } 3)$$

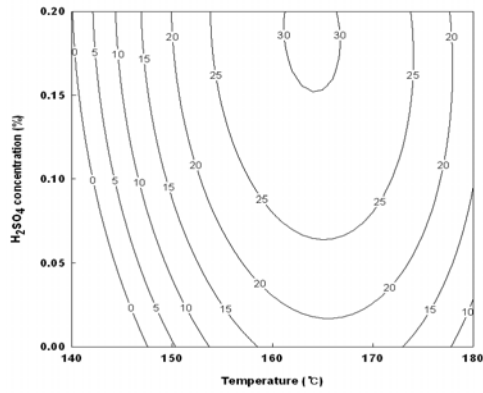
[그림 4-1-4 (a)] ~[그림 4-1-4 (c)]는 각 변수들 (반응온도, 반응시간, 촉매농도)에 따른 glucan 함량을 contour로 나타낸 것이다. [그림 4-1-4 (a)]의 경우, 반응온도 164℃, 반응시간 27분에서 제일 높은 glucan 함량을 보였고, 그 때의 값은 27.9%였다. 그림 [그림 4-1-4 (a)]과 [그림 4-1-4 (b)]는 유사한 형태로 나타났는데, 각각 산농도보다 반응온도, 반응시간에 의한 영향이 더 큰 것으로 보여졌다. 제일 높았던 glucan 함량은 [그림 4-1-4 (b)]에서 최대 glucan 함량을 보인 조건 (반응온도 164℃, 산농도 0.19%)에서 30.4%, [그림 4-1-4 (c)]에서는 최대 glucan 함량을 보인 조건은 반응시간 30분, 산농도 0.20%에서 30.7%였다.

유의수준 P를 조사한 결과, 반응온도의 경우 0.0298, 촉매농도는 <0.0001로 1% 이내로 glucan 함량에 대해 영향을 미칠 수 있는 중요한 변수임을 알 수 있었으나 반응시간의 경우, 0.5498로 유의수준이 높아 다른 두 변수와 비교했을 때 영향이 거의 미치지 않을 것으로 판단되었다.

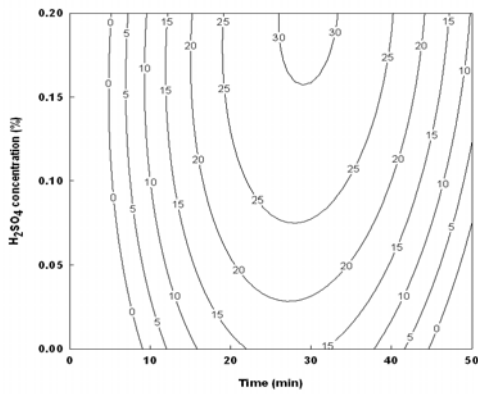
SAS (Statistical Analysis System)를 이용, 통계적으로 분석하여 종속변수 ( $Y_n$ )에 대한 회귀방정식을 구함으로써 다시마의 극저산 전처리를 위한 최적 반응조건을 예측한 결과, 반응온도 162.9℃, 반응시간 28.8분, 촉매농도 0.19%였고, 이 때의 glucan 함량은 31.1%인 것으로 예측되었다.



(a)



(b)



(c)

[그림 4-1-4] Contour plot of the variation on the glucan contents of fractionated *L. japonica* using a extremely low acid as a function of the (a) temperature and time, (b) temperature and H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> concentration., and (c) time and H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> concentration.

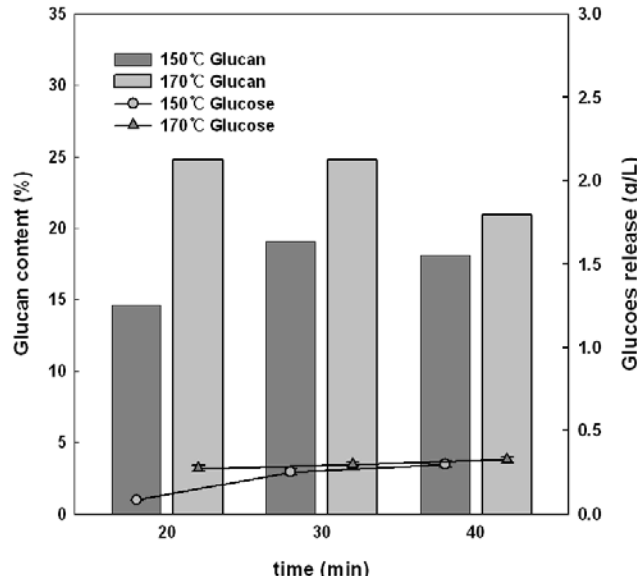
### (3) 열수 전처리

열수 전처리 시 온도 및 시간에 따른 glucan 함량의 변화 및 glucose의 손실량을 조사하여 [그림 4-1-5]에 나타내었으며, 이 때 반응온도는 150℃와 170℃, 반응시간은 20 min, 30 min, 40 min으로 설정하였다. 산 촉매를 사용했을 때보다 더 긴 시간을 반응했음에도 불구하고 150℃에서 glucan 함량은 20 min: 14.6%, 30 min: 19.0%, 40 min: 18.1%를 나타내었으며, 170℃에서 20 min: 24.8%, 30 min: 24.1%, 40 min: 20.9%로 다소 낮은 glucan 함량을 보였다. Hydrolyzate 내에서 glucose 손실량은 150℃, 20min에서 0.08 g/L (1.3%)였으며, 30 min에서는 0.25 g/L (3.2%)로 급격하게 증가하는 경향을 보였고, 30 min이후로 변화가 거의 없었으며, 170℃에서는 반응시간에 따른 변화를 보이지 않았다. 하지만 과분해물 중 하나인 formic acid의 농도는 150℃, 20 min에서 0.04g/L, 30 min에서 0.23 g/L, 40 min에서는 0.37 g/L로 증가하였으며, 170℃, 20 min에서는 1.37 g/L, 30 min, 40 min에서는 1.74 g/L, 2.06 g/L를 각각 나타내어 150℃에서보다 증가율이 더 큰 것으로 나타났으며, 온도가 증가함에 따라 과분해물의 생성량이 증가하여 glucan 함량은 감소되어진 것으로 판단된다. 그러므로 glucan 함량이 높고, 과분해물 생성이 상대적으로 적은 170℃, 20 min을 시험한 열수 전처리 조건 중 최적조건으로 결정하였다.

### (4) 약산 및 극저산, 열수 전처리 효율 비교

#### (가) glucan 함량 및 잔여고체 함량

원시료, 극저산 또는 약산 전처리 및 열수처리의 최적조건에서의 glucan 함량과 잔여고체량은 [표 4-1-3]에 나타내었다. Glucan 함량분석 결과, 약산 처리된 다시마의 glucan 함량은 32.7%, 극저산 전처리된 시료의 glucan 함량은 29.1%로 원시료의 glucan 함량 (6.9%)보다 약 4배 이상 높은 값을 나타내었고, 열수처리된 시료의 glucan 함량 (24.8%)의 약 0.8배 높은 값을 나타내었다. 잔여고체량의 경우, 약산 전처리된 시료는 10.7%, 극저산 전처리된 시료는 20.8%로 약산보다 극저산을 사용하였을 때 잔여고체량이 높아 산의 농도가 높을수록 시료에서 손실되는 물질이 많다는 것을 알 수 있었으며, 열수처리된 시료는 18.0%로 약산 및 극저산 처리에 비해 손실되는 glucose 양 및 과분해물의 생성이 더 많은 것을 확인할 수 있었다. 위의 결과들로, 극저산을 이용한 전처리 방법이 다시마의 glucan 함량을 높이기 위한 효율적인 방법이라고 판단된다.



[그림 4-1-5] The glucan content and glucose release of hot water treated *L. japonica* (conditions : 0.06% (w/v) H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 150 ~ 170°C, 20 ~ 40 min).

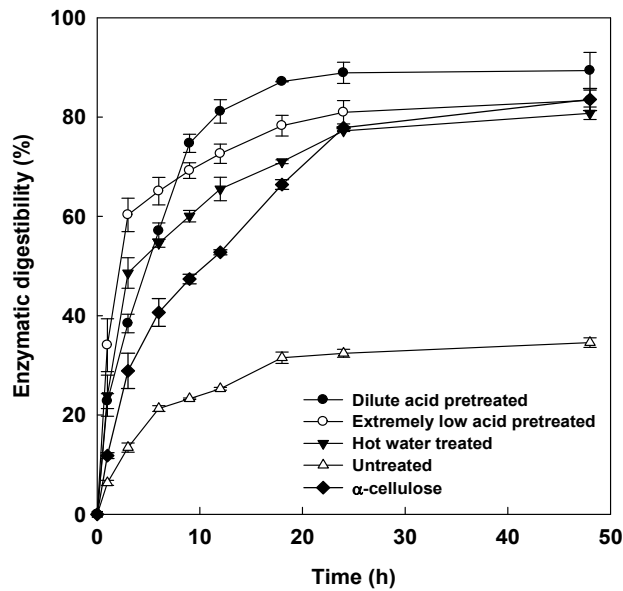
[표 4-1-3] Solid remaining amounts and glucan contents of dilute acid pretreated, extremely low acid pretreated and hot water pretreated *L. japonica*

|                     | Untreated | Extremely low acid pretreated | Dilute acid pretreated | Hot water treated |
|---------------------|-----------|-------------------------------|------------------------|-------------------|
| Solid remaining (%) | 100       | 20.8                          | 10.7                   | 18.0              |
| Glucan (%)          | 6.9       | 29.1                          | 32.7                   | 24.8              |

(나) 효소가수분해도

[그림 4-1-6]은 약산, 극저산 및 열수처리된 다시마로부터 남은 잔여 고체물을 기질로 이용, 효소 가수분해한 실험결과를 나타낸 것이다. 당화반응은 24시간 이내에 이루어졌고 약산 처리된 다시마의 효소소화도가 89.4%로 최대값을 보였으며, 이는 원시료 효소소화도 (34.6%)보다 약 55%의 차이로 2.6배 높은 값을 나타내었다. 또한, 극저산 전처리된 다시마와 열수처리 된 다시마의 효소소화도는 각각 83.4%, 80.2%를 나타내었으며 원시료와는 각각 약 50%, 46%의 차이를 보여 효소소화도는 glucan 함량에 따라 비례하게 차이가 난다는 것을 확인할 수 있었다. 반응속도의 경우, 약산 전처리 시료에 비하여 극저산 전처리된 시료가 더 빠르게 증가하다가 서서히 증가하는 것으로 나타났고, 열수처리된 시료 또한 동일한 경향을 나타냄을

알 수 있었다. 대조군인  $\alpha$ -cellose의 효소소화도는 당화 48시간에 83.54%를 나타내어 전처리된 다시마가 상대적으로 더 빠른 시간 안에 효소당화가 진행됨을 확인할 수 있었다. 약산 전처리, 극저산 전처리나 열수처리를 통한 잔여고체물의 효소소화도는 원시료보다 더 효과적인 효소소화도를 보였으며, 이를 통해 전처리 효과를 입증할 수 있었다.



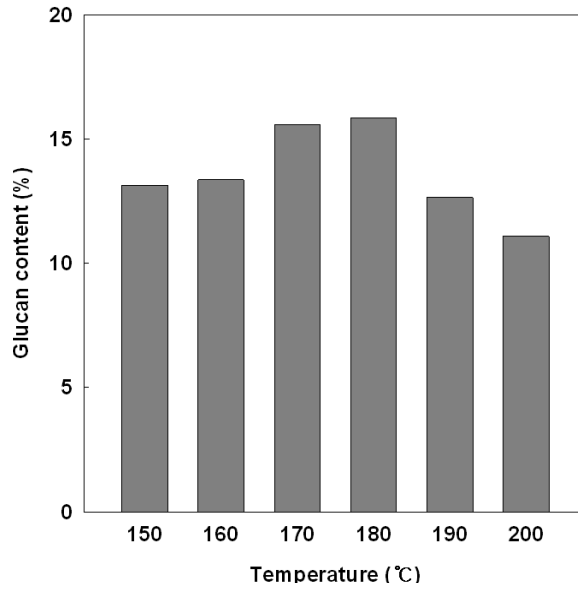
[그림 4-1-6] Enzymatic digestibilities of dilute acid pretreated, extremely low acid pretreated and hot water pretreated *L. japonica*.

#### 나. 연속식 전처리 공정

##### (1) 온도변화에 따른 연속식 전처리

[그림 4-1-7]은 연속식 장치를 이용, 산농도를 5.0%로 고정된 후 온도를 변화 (150 ~ 200°C)시켜 보았을 때의 glucan 함량을 나타낸 것이다. 온도변화에 따라 glucan 함량은 11.1 ~ 15.8%의 범위를 나타내었으며, 170, 180°C에서 높은 glucan 함량 (170°C: 15.6%, 180°C: 15.8%)을 나타내었다. 온도가 증가할수록 glucan 함량은 증가하였으나, 180°C 이후에는 급격히 감소하는 경향을 보였으며, 이는 온도가 증가하면서 glucan이 hydrolyzate의 glucose로 전환된 것으로 판단된다. 따라서 온도변화에 따른 연속식 전처리 시 최적 반응온도는 170°C로 결정하였다.

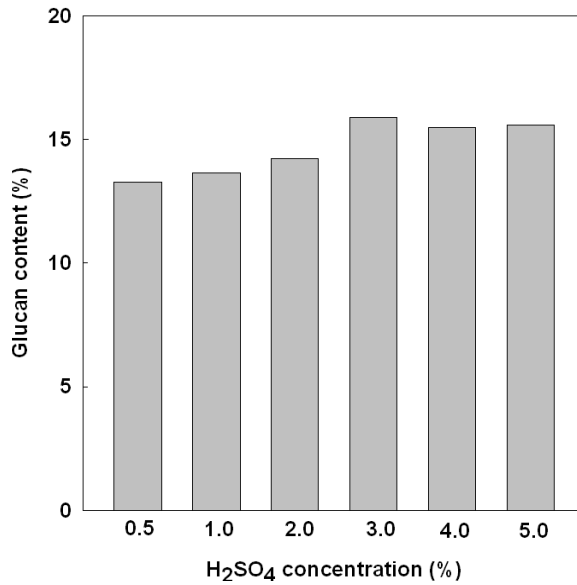




[그림 4-1-7] Effect of temperature on the glucan content of pretreated *L. japonica* using a continuous twin screw-driven equipment.

(2) 산농도에 따른 연속식 전처리

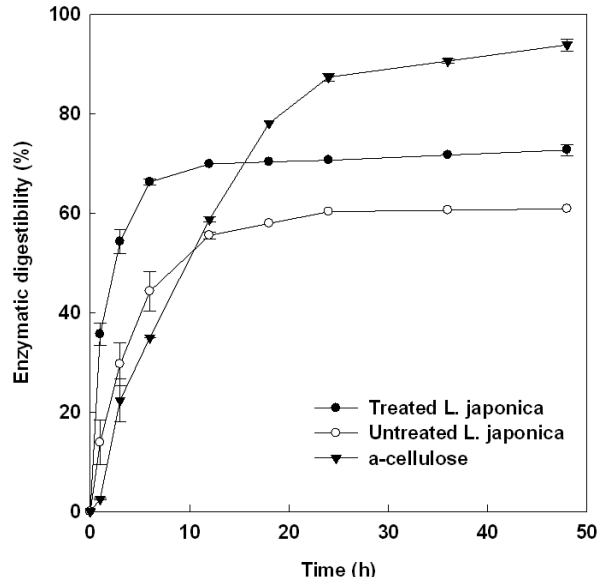
최적온도로 결정된 반응온도 170°C에서 산농도별로 연속식 전처리를 수행하였으며, 그 결과를 [그림 4-1-8]에 나타내었다. [그림 4-1-8]에서 알 수 있듯이, 산농도가 증가할수록 전처리된 다시마의 glucan 함량은 증가하였으며, 3.0%의 산 촉매를 이용하였을 때 최대 glucan 함량인 15.9%를 나타냄을 확인할 수 있었다. 산농도 3.0% 이후에는 glucan 함량이 감소하는 것을 알 수 있었는데 이는 3.0% 이상의 산농도에서는 glucan이 hydrloyzate의 glucose로 전환되거나 formic acid 와 같은 과분해물로 전환되어지기 때문으로 판단된다. 연속장치를 이용한 다시마의 전처리 최적조건은 반응온도 170°C, 산농도 3.0%으로 결정하였다.



[그림 4-1-8] Effect of acid concentration on the glucan content of pretreated *L. japonica* using a continuous twin screw-driven equipment.

### (3) 효소가수분해도 시험

최적화된 반응조건에서 분별된 다시마의 효소가수분해도를 평가하기 위해 전처리 후 남은 잔여 고체물로 효소가수분해를 실시하였다. [그림 4-1-9]는 연속장치를 이용하여 전처리된 다시마를 기질로 이용, 효소 가수분해한 실험결과를 나타낸 것이다. 당화반응은 12시간 이내에 이루어졌으며, 전처리된 다시마의 효소소화도는 15 FPU/g-glucan의 효소량을 사용했을 때 최대 72.8%로, 비교군이었던 원시료 다시마 (60.9%)보다 약 1.2 배의 높은 값을 나타내었다. 이는 연속 전처리 과정으로 인한 다시마의 분별 후 원시료에 비하여 효소의 접근이 더 쉬워져 효소가수분해도가 더 향상된 것으로 사료된다. 대조구인  $\alpha$ -cellulose의 효소가수분해도는 당화 48시간에 83.5%를 나타내어 전처리된 다시마와 원시료 다시마가 상대적으로 더 빠른 시간 안에 효소당화가 진행되는 것을 확인할 수 있었다.



[그림 4-1-9] Enzymatic digestibility of pretreated *L. japonica* using a continuous twin screw-driven equipment at optimized fractionation conditions.

#### 4. 요약 및 제언

##### 가. 요약

##### (1) 회분식 전처리 공정

약산, 극저산을 촉매로 이용한 전처리 및 열수 전처리를 실시하였다. 약산 및 극저산 전처리의 경우 중심합성계획 (Central Composite Design)을 통해 최적반응 조건 및 glucan 함량을 예측할 수 있었다. 극저산을 이용한 경우의 최적 반응조건은 반응온도 162.9℃, 반응온도 28.8분, 촉매농도 0.19%였으며, 이 때의 예측된 glucan 함량은 31.1%였고, 약산을 이용한 경우의 최적 반응조건은 반응온도 147.1℃, 반응온도 27.8분, 촉매농도 0.30%, 이 때의 예측된 glucan 함량은 32.8%인 것을 알 수 있었다. 열수전처리 최적 조건은 170℃, 20 분으로 결정되었으나 이 때의 glucan 함량은 24.8%, 잔여고체함량은 18.0%, 효소소화도는 80.2%로, 약산 및 극저산 전처리를 실시하였을 때보다 효율이 떨어짐을 확인하였으며 (극저산 전처리 시 glucan 함량: 29.1%, 잔여고체함량: 20.8%, 효소소화도: 83.4%, 약산 전처리 시 glucan 함량: 32.8%, 잔여고체함량: 10.7%, 효소소화도: 89.4%), glucan 함량, 잔여고체함량 및 효소소화도를 고려한 가장 효율적인 전처리 방법은 극저산 전처리방법임을 확인할 수 있었다.

## (2) 연속식 전처리 공정

연속장치를 이용한 최적 전처리 조건은 반응온도 170℃, 산농도 3.0%로 결정되었으며, 전처리 다시마의 glucan 함량은 15.9%, 효소소화도는 72.8%를 나타내었어 회분식 공정과 비교하였을 때 낮은 효율을 나타내었다.

### 나. 제언

산 촉매를 이용하여 다시마를 전처리하게 되면 이 때 추출된 알긴산의 경우 미생물이 이용을 하지 못하는 것으로 확인되었으며, 연속장치를 이용한 전처리 시, 추출된 알긴산으로 인해 스크류의 구동이 멈추고, 시료가 역류하는 등 여러 문제점이 발생하여 연속식 전처리 공정을 다양한 조건에서 실시하지 못하였다. 차년도에는 다시마 시료의 2단계 전처리(1단계에서 알긴산을 추출하고 2단계에서 알긴산 추출 후의 다시마 시료를 이용하여 전처리를 수행함) 및 연속 장치 보완하여 다시마 전처리 조건을 확립해야 할 것으로 사료된다.

## 5. 향후계획

- 다시마의 2단계 전처리 (1단계: 알긴산 추출, 2단계: 전처리)
- 연속공정의 매개변수에 따른 다시마 전처리 및 이를 통한 다시마 연속공정개발



## 제 2 절 생물친화적 전처리 및 당화효소를 이용한 갈조류 당화 공정 개발

### 1. 연구 목적 및 내용

#### 가. 연구 목적

해조류 탄수화물을 생물친화적 전처리 및 효소적 당화와 전환공정을 통하여 바이오연료 생산 및 고부가가치 화합물 생산기술 개발

#### 나. 연구 내용

해양유래 미생물의 유전체 분석을 통한 알긴산의 단당 전환효소의 탐색하여 해양유래 미생물 단당 전환효소 후보 유전자를 선별한 후 클로닝 및 발현을 통한 단백질 확보 및 활성 검증하고 이를 통해 해양유래 미생물 단당 전환효소 유전자의 알긴산 분해 및 단당 생성 특성 규명 및 효소공정 최적화함

### 2. 연구 방법

#### 가. 실험장치 및 재료

알긴산 단당 생산 유전자를 타겟팅하여 해당 유전자를 증폭을 시켰으며, 증폭된 유전자를 ligation 시키기 위한 vector로서 pET21a를 사용하였다. gene preparation을 위해 사용된 host는 DH5a를 단백질 생산을 위한 host로는 BL21(DE3)를 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

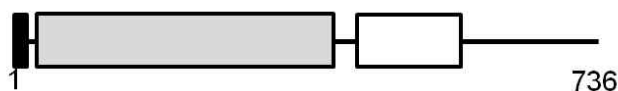
Alginate 분해 효소를 클로닝하기 위해 CAZy database에서 획득한 target gene의 염기서열을 토대로 프라이머를 제작하여 PCR을 수행하여 해당 gene을 증폭하였다. 증폭된 gene을 vector에 ligation 시킨 후 host에 transformation을 시켰다. transformant를 통해 target protein을 과발현시켰고 그것으로 해당 활성을 측정하였다. 발현된 protein은 His-trap 컬럼을 이용하여 정제하였고 한외여과를 이용하

여 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  $V_M$ 과  $K_M$ 을 구하여 효소의 kinetic value들을 확인하였다.

### 3. 연구수행 결과

#### 가. Alg17C의 동정 및 기능의 예측

엑소타입 알긴산 분해효소로 알려진 효소들은 PL-15에 해당한다고 알려져 있는데(1), *S. degradans*의 경우 이 그룹에 해당되는 효소들이 없기 때문에 해당 활성을 갖는 효소를 찾기 위해 PL-15 그룹의 특이적인 도메인이 heparinase II/III-like의 서열을 이용하여 Alg17C를 찾았고 이를 클로닝하여 해당 활성의 유무를 측정하였다. [그림 4-2-1]

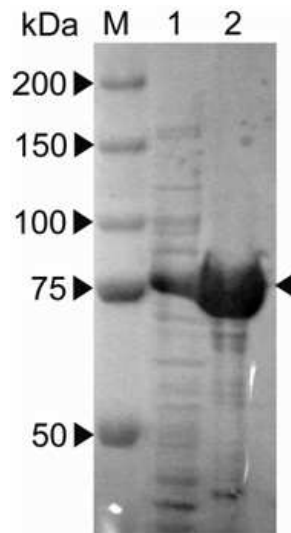


**Signal peptide: 1 – 23**  
**Chondroitin AC/alginate lyase, Domain:**  
 31 – 362 (Chondroitin\_lyas )  
**Heparinase II/III-like, Family**  
 383 - 543 (Hepar\_II\_III)

[그림 4-2-1] Alg17C의 예상 도메인

#### 나. Alg17C의 과발현 및 정제

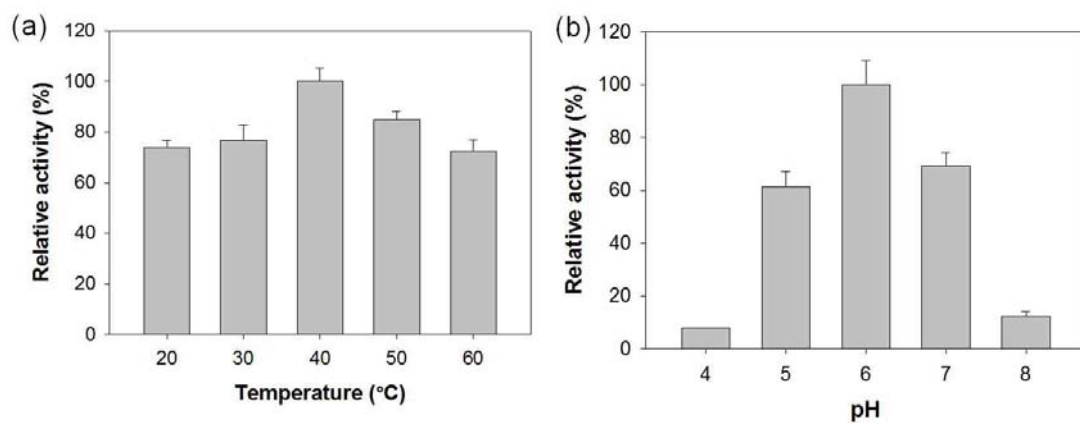
*E. coli*에서 재조합 Alg17C 단백질을 발현하기 위해서는 alg17C 유전자의 signal sequence를 절단하여 용이하게 발현시켰다. 최적 IPTG 농도와 induction 온도는 0.1 mM IPTG와 16°C에서 재조합 단백질 대부분이 수용성 형태로 발현되었다. 발현된 Alg17C를 His-trap으로 정제후 정제된 Alg17C를 초미세여과로 농축하였다. 그 발현된 재조합 Alg17C 분자량은 SDS-PAGE에 의하여 대략 79.1kDa으로 측정되었다. [그림 4-2-2]



[그림 4-2-2] Alg17C의 SDS-PAGE

다. Alg17C의 최적 온도 및 pH

Alg17C의 최적 활성을 나타내는 온도와 pH를 측정하기 위해 각각 20에서 60°C의 여러 온도 범위[그림 4-2-3-(a)]와 4-8의 범위의 pH[그림 4-2-3-(b)]에서 반응을 하였다. 효소활성은 40°C에서 최대값을 보였으며, 그 이후의 온도에서는 효소 활성이 감소하였다. 또한 Alg17C는 pH 6에서 최대 활성을 나타내었으나 pH가 5 이하이거나 7 보다 높은 경우에는, 효소 활성이 pH 6에서의 활성에 비교하여 50%미만으로 감소하였다. 이를 통해 Alg17C의 최대 활성 온도와 pH는 각각 40°C와 pH 6임을 알 수 있다.

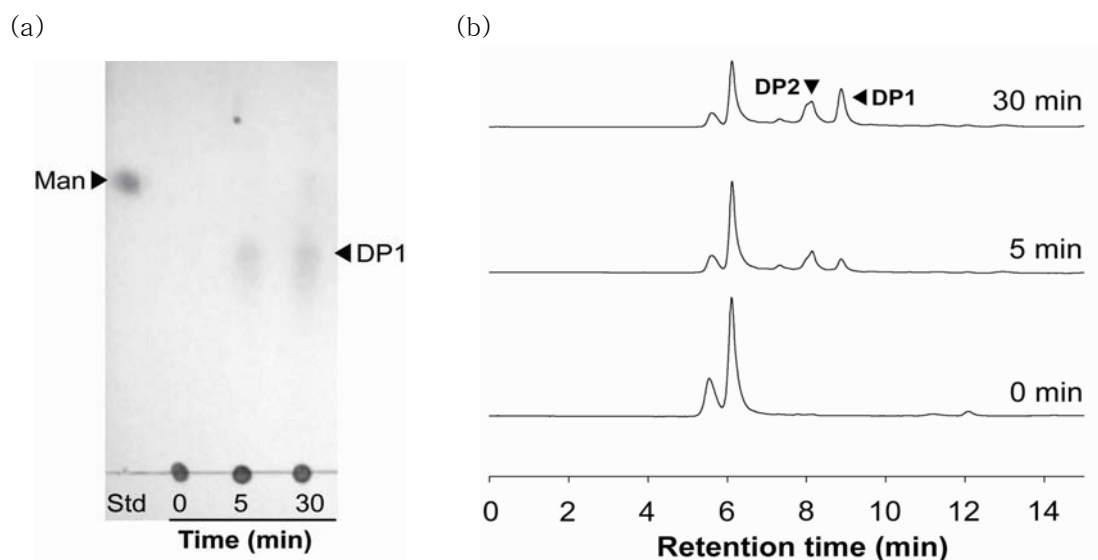


[그림 4-2-3] Alg17C의 (a) 온도 및 (b) pH에 대한 상대적 활성 비교

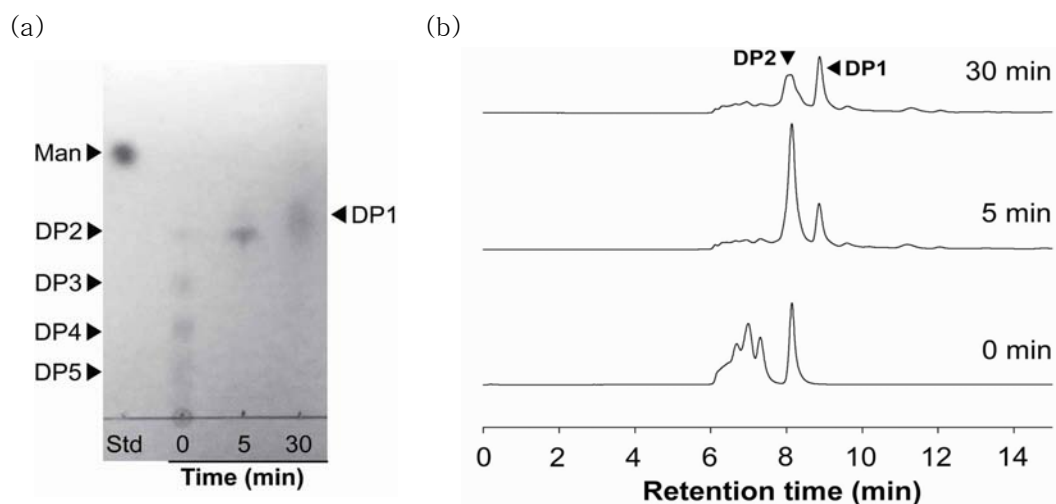


라. TLC, HPLC 및 LC-MS를 사용한 반응 산물의 분석

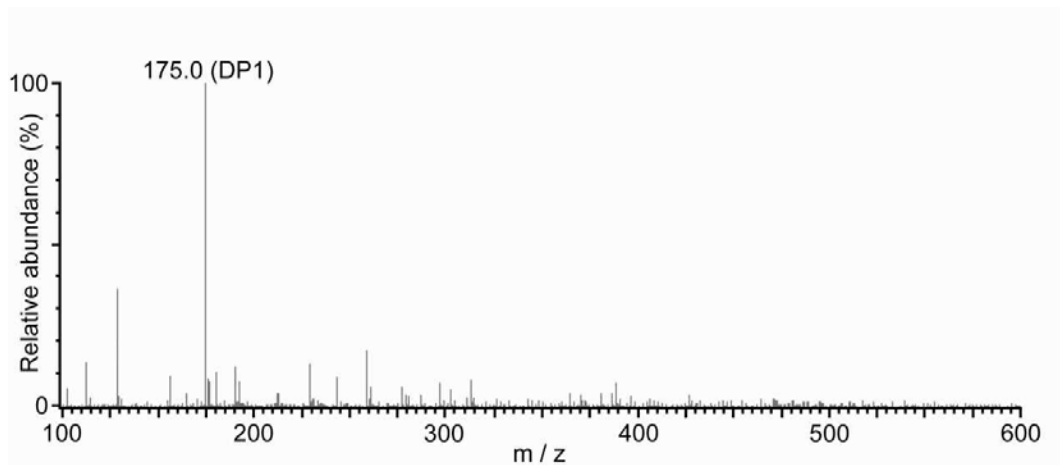
Alg17C 반응 산물의 프로파일링의 변화를 TLC, HPLC 및 LC-MS로 측정하였다. 알긴산과 Alg17C를 반응시 DP1에 해당하는 산물이 생성되는 것을 확인할 수 있었다.[그림 4-2-4]. 또한 Alg7D에 의해 생성되는 DP2-5에 해당하는 올리고알긴산 역시 Alg17C에 의해 분해 되어 DP1에 해당하는 산물이 생성되는 것을 확인할 수 있었다. 이와 같이 생성되는 산물의 정확한 분자량을 확인하기 위해 LC-MS를 통해서 측정하였는데, 175 m/z에 해당하는 peak이 검출되었다. 검출된 peak은 DEH의 peak에 해당하는 것임을 알 수 있었다.



[그림 4-2-4] 알긴산과 Alg17C의 반응 산물의 시간에 따른 (a) TLC 및 (b) HPLC 크로마토그램



[그림 4-2-5] Alg7D와 알긴산의 반응산물인 DP 2, 3, 4, 5를 Alg17C와 반응 후 생성되는 산물의 시간에 따른 (a) TLC 및 (b) HPLC 크로마토그램



[그림 4-2-6] 알긴산과 Alg17C의 반응산물의 LC-MS 크로마토그램

마. Alg17C에 의한 알긴산 해중합(depolymerization)의 반응속도론

$K_M$  및  $V_M$ 와 같은 반응속도 상수는 여러 기질 농도에서 반응 속도를 측정하여 Lineweaver-Burk 그래프로부터 얻을 수 있었다. 그 결과,  $K_M$ 과  $V_M$ 값들은 각각  $35.2 \text{ mg ml}^{-1}$ ,  $41.7 \text{ U mg}^{-1}$ 이었다.

#### 4. 요약 및 제언

본 연구를 통해 개발한 Alg17C는 엑소 타입의 효소로서 단당을 생산할 수 있는 novel한 효소이다. 고부가 가치 화학물질로의 전환을 위해서는 특정 전구체가 필요한데, 이와 같은 전구체의 대부분은 단당에 해당되기 때문에 본 연구를 통해 개발한 Alg17C는 향후 최적당화공정 수립 및 기타 물질로의 전환을 위한 기본적인 키효소로 활용할 수 있을 것이라 기대한다.

#### 5. 향후계획

본 연구를 통해 효소적 당화공정을 확립하였는데, 경제적이고 효율적인 당화공정 수립을 위해 생물학적 전처리를 기반으로 하는 통합적 당화공정을 통해 당화물질인 DEH의 최적 생산 공정을 수립을 할 것이며, 이와 같은 플랫폼으로 생산된 DEH를 통해 바이오 연료 및 고부가 가치 물질을 생산할 수 있는 대사 경로의 탐색 방법을 모색할 것이다.



## 제 3 절 해조류 해조 다당체 분해미생물 유전자원 확보

### 1. 연구 목적 및 내용

#### 가. 연구 목적

- 해조자원으로부터 기능성 식품소재 및 바이오에너지 생산분야의 활용성을 위하여 생물학적 전처리 당화공정의 개발을 통한 고수율 저분자 당원을 생산하고자 한다.
- 효율적인 당화 및 발효 수율의 제고를 위해 감마선 조사와 생물학적 방법인 효소를 활용하여 최적 전처리 조건 확립을 통한 저분자 알긴산 당원을 확보하고자 한다.
- 해양유래 생물로부터 유용한 미생물 효소자원을 개발하여 바이오에탄올 생산을 위한 중간 단당기질을 생산함으로써 하부공정에서 에탄올생산을 위한 충분한 핵심 당원을 확보하고자 한다.
- 해양조류 바이오매스로부터 바이오연료를 생산하는 공정에서 부산물의 적극적 활용 및 알긴산 저분자화를 생산을 위한 친환경적인 기술을 개발하고자 한다.

#### 나. 연구 내용

- 저분자 해조 다당체 생산을 위해 전복내장유래 미생물효소(AlyDW11) 및 감마선조사 융합 최적조건을 확립하고 융합기술을 활용한 저분자 알긴산 당원을 확보한다.
- 해조 다당체 분해 우수 활성 균주 확보를 위한 성게 장내 미생물 screening 및 특성을 규명한다.
- 성게 내장 유래 알긴산 분해 미생물(AlyHP32)의 효율적 활용을 위해 Fosmid library를 구축하고 확립된 신속탐색 기술을 이용하여 해조 다당체 분해 우수 유전자를 탐색한다.

### 2. 연구 방법

#### 가. 실험장치 및 재료

##### (1) 효소 및 감마선 조사 최적조건 확립:

건조다시마, Sodium alginate, NAD<sup>+</sup>, AgNO<sub>3</sub>, IPTG, 대용량 냉장원심분리기, UMF(Ultra Membrane Filtration), Vortex, Fermentor, Shaking incubator, Incubator,

Loop, NaOH, HCl, Hot plate, Polyethylene glycol (PEG), 동결건조기, Petridish, D.W, LB broth, Agar, Monobasic sodium phosphate, Dibasic sodium phosphate

(2) 해조류 분해 미생물 스크리닝:

Bacto peptone, Yast extract, Sea water, Agar, 1.5ml tube, 15ml tube, 50ml tube, Shaking incubator, Incubator, Spreader, Loop, CPC (Hexadecylpyridinium chloride), D.W, 96well plate, Vortex, NaOH, HCl, Hot plate, 원심분리기

(3) 신종 미생물 특성규명:

Agar, 15ml tube, 50ml tube, CTB-DNA extraction kit, Shaking incubator, Incubator, PCR, Agarose gel, 1kb Marker, Electrophoresis, Spreader, Chemidoc™ XRS<sup>+</sup>, *atpA*, *pyrH*, *recA*, *rpoA*, *rpoD* primer, 27F.1492R primer, API 20NE, API ZYM kits (bioMérieux), D.W, NaCl, JAMES Reagent, NIT1, NIT2, ZYM A Reagent, ZYM B Reagent, Oxidase test, Mineral oil, McFarland Standard, Gram staining

(4) 효소활성 측정:

LB broth, Agar, Sodium alginate, 15ml tube, 1.5ml tube, CPC (Hexadecylpyridinium chloride monohydrate), Fermentor, Incubator, Lysis buffer, D.W, 96well plate, Hot block, NaOH, HCl, Reducing suger Solution D(Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, KNatartrate, Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>), Solution E(96% Sulfuric acid, (NH<sub>4</sub>)<sub>6</sub>Mo<sub>7</sub>O<sub>24</sub> · 4H<sub>2</sub>O, Na<sub>2</sub>HASO<sub>4</sub> · 7H<sub>2</sub>O), ELASA, Shaking incubator, NAD<sup>+</sup>, EDTA, CaCl<sub>2</sub>, MgCl<sub>2</sub>, KCl, MgSO<sub>4</sub>, FeSO<sub>4</sub>, CoCl<sub>2</sub>, MnCl<sub>2</sub>, CuCl<sub>2</sub>, NaCl, AgNO<sub>3</sub>, 대용량 냉장원심분리기, UMF(Ultra Membrane Filtration), 3k membrane, Vortex

(5) Fosmid library 스크리닝 :

LB broth, chloramphenicol, Agar, 15ml tube, 50ml tube, Tray plate, 96well plate, D.W, Shaking incubator, Incubator, Spreader, Lysis buffer, CPC (Hexadecylpyridinium chloride)

(6) 해조 다당체 분해도 확인:

LB broth, Sodium alginate, 15ml tube, 1.5ml tube, CPC (Hexadecylpyridinium chloride monohydrate), Fermentor, Incubator, NaOH, HCl, Shaking incubator, 대용량 냉장원심분리기, UMF(Ultra Membrane Filtration), 3k membrane, 전개용매통, TLC

Silica gel 60 F<sub>254</sub>, 1-propanol, nitroethanem H<sub>2</sub>O, Anis-황산용액(p-anis aldehyde, MeOH, Acetic acid, Sulfuric acid), Hot block, Chemidoc™ XRS<sup>+</sup>

#### 나. 실험 절차

##### (1) 효소 및 감마선 조사 최적조건 확립:

건조 다시마를 이용하여 액상으로 조제한 후 <sup>60</sup>Co선원으로 10, 25, 50, 75, 100, 200, 300kGy의 흡수선량을 얻도록 조사함(10kGy/hr). 10kGy 감마선 조사와 효소처리의 단일 처리구와 감마선조사한 0.6%의 다시마액상과 전복 내장유래 미생물 효소(AlyDW11)를 NAD<sup>+</sup>, AgNO<sub>3</sub>와 같은 보조인자가 첨가된 최적조건 (pH 7.0, 45℃)에서 72시간 동안 반응을 시켜 생성된 최종산물을 TLC 및 GPC를 통하여 분석하였다.

##### (2) 해조류 분해 미생물 스크리닝:

성게 내장을 분리하여 으갠 후에 희석법을 이용하여 Zobell agar에 spreading 후, 20℃, 12시간 배양, 각각 배양하여 분리한 colony를 Zobell broth에서 20℃, 180rpm, 12시간 배양하여 0.1% Alginate+Zobell agar에 CPC (Hexadecylpyridinium chloride monohydrate)을 이용, alginate lyase activity를 통해 고활성 균주를 탐색하였다.

##### (3) 신종 미생물 특성규명:

우수균주(AlyHP32)의 동정을 위해 형태적 특징, 배양 특성을 확인하였고, 전자현미경 사진을 이용하여 세포의 형태와 운동성을 조사하였다. 그리고 API 20NE, API ZYM kits (bioMérieux)를 이용하여 탄소원 이용 및 효소 생성을 조사하고 Phylogenetic analysis와 comparative sequencing analysis 경우, 16S rRNA gene 및 8종의 house keeping gene을 이용하여 sequence 분석을 실시함. DNA full sequence 간의 유전적 유사성 정도를 측정하기 위하여 DNA-DNA hybridization을 진행하였다.

##### (4) 효소활성 측정:

순수분리를 하여 얻은 1종의 신규미생물(AlyHP32)을 Marine brth에서 20℃, 180rpm, 24시간 incubation, fermentor를 이용하여 대량배양한후, 10,000rpm, 15분 원심분리, UMF 이용하여 10k 이하 cut off, 0.1% Alginate기질과 15℃, 180rpm에서 반응하여 최적조건을 잡기위해 pH, Temperature, ion등 환원당 test 진행, 효소액은

0.1% Alginate+Marine agar에 CPC (Hexadecylpyridinium chloride monohydrate)을 이용, alginate lyase activity를 확인하였다.

(5) Fosmid library 스크리닝 :

평균 38kbp의 fosmid library 3,860 클론에 대하여 LB+chloramphenicol broth에서 37°C, 180rpm, 12~14시간 incubation 후, sonication(30sec/30sec)을 진행하여 원심분리를 통해 얻은 효소를 CPC assay, 환원당 test, GPC(Gel Permeation Chromatography)를 진행하여 potential clone 1종을 확보하였다.

(6) 해조 다당체 분해도 확인:

Fosmid library 스크리닝을 통해 얻은 신규미생물(AlyHP32)유래 1종의 potential clone(AlyHP32-F3)을 LB+chloramphenicol broth에서 37°C, 180rpm, 14~16시간 incubation, fermentor를 이용하여 대량배양한 후, 10,000rpm에서 15분 원심분리, UMF를 이용하여 10K 이하 cut off, 0.1% Alginate기질과 37°C, 180rpm, 24시간 반응시킨 후, 최종 산물인 alginate 올리고머의 다양한 크기를 thin-layer chromatography (TLC)를 이용하여 확인하였다.

### 3. 연구수행 결과

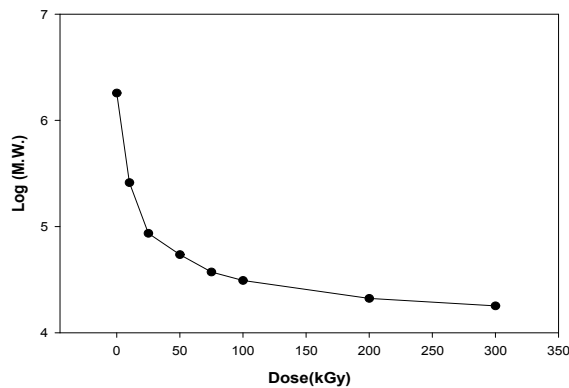
#### 가. 효소 및 감마선 조사를 병합한 알긴산 저분자화 조건 최적화

##### (1) 감마선 조사량에 따른 다시마 분해도 측정

해조류인 다시마를 건조 분말화 시킨 후, pH 7.0 phosphate buffer를 이용하여 액상으로 조제한 후  $^{60}\text{Co}$ 을 선원으로 이용하여 실온에서 시간당 10kGy의 일정한 선량률로 10, 25, 50, 75, 100, 200, 300kGy의 흡수선량을 얻도록 조사하였다. 감마선 조사를 한 다시마의 조사선량에 따른 분자량 변화를 측정하기 위해 GPC (Gel Permeation Chromatography)를 이용하여 분자량(Mw)을 측정하였고, 분자량 산출을 위한 표준품으로 Polyethylene glycol ( $5 \times 10^2 - 2.74 \times 10^6$ , SIGMA-ALDRICH Co., Ltd., USA)을 사용하여 standard curve를 그려 샘플의 분자량 측정에 이용하였다. 샘플의 분자량을 측정 한 결과 감마선 조사를 하지 않은 다시마의 경우 분자량이 1,800 kDa 정도 였으나 25kGy에서 86.4 kDa으로 급격하게 감소하였고, 조사량이 증가할수록 분자량이 감소하여 100kGy 조사구에서 3.1 kDa까지 저분자화 되었으나, 200kGy에서는 분자량이 2.1 kDa으로 분자량 감소가 둔화되는 결과를 보였다[그림 4-3-1, 표 4-3-1].

(2) 감마선 조사 및 효소처리 후 알긴산 분해도 증진효과 측정

위의 결과를 바탕으로 미생물효소와 10kGy의 감마선 조사 융합기술을 적용함으로써 25kGy의 다시마 분해도 효과를 얻고자 10kGy 감마선조사를 실시한 0.6%의 다시마액상과 미생물효소를 NAD<sup>+</sup>, AgNO<sub>3</sub>와 같은 보조인자가 첨가된 최적조건 (pH 7.0, 45°C)에서 72시간 동안 반응하였다. GPC를 이용하여 관찰된 평균 분자량 변화의 경우, 단일 전처리시 다시마 분자량은 10kGy의 감마선 조사의 경우 259 kDa, 미생물 효소의 경우 175 kDa으로 확인되었으며, 감마선 조사 및 미생물 효소 융합 처리시 81.1 kDa의 분자량을 확인하였다[그림 4-3-2]. TLC (Thin-layer chromatography)를 통해 알긴산 분해도 증진 효과를 확인하였다[그림 4-3-3].

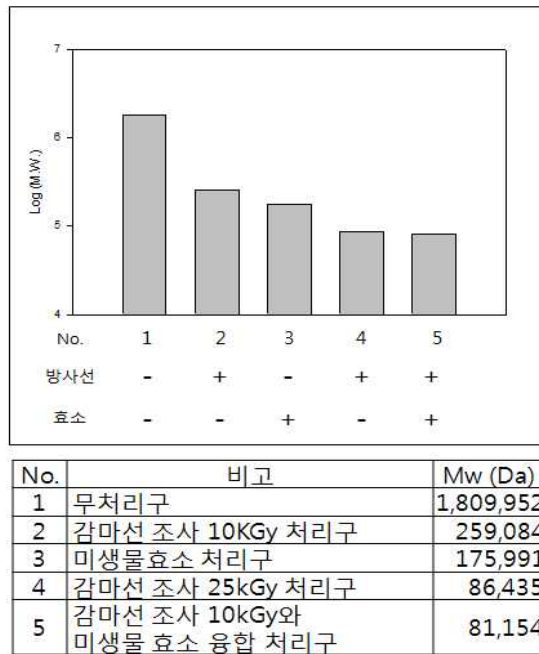


[그림 4-3-1] GPC (Gel Permeation Chromatography)를 이용하여 10, 25, 50, 75, 100, 200, 300kGy의 감마선 조사량에 따른 알긴산 분해도 결과이다.

[표 4-3-1] GPC (Gel Permeation Chromatography)를 이용하여 10, 25, 50, 75, 100, 200, 300kGy의 감마선 조사량에 따른 알긴산 평균 분자량을 분석한 결과이다.

| Dosage of irradiation(kGy) | Mw(Da)    |
|----------------------------|-----------|
| 0                          | 1,809,952 |
| 10                         | 259,084   |
| 25                         | 86,435    |
| 50                         | 54,396    |
| 75                         | 37,361    |
| 100                        | 31,090    |
| 200                        | 21,078    |
| 300                        | 17,901    |





[그림 4-3-2] GPC (Gel Permeation Chromatography)를 이용하여 감마선 조사 및 미생물 효소 융합 전처리 적용시 알긴산 평균 분자량을 분석한 결과이다.

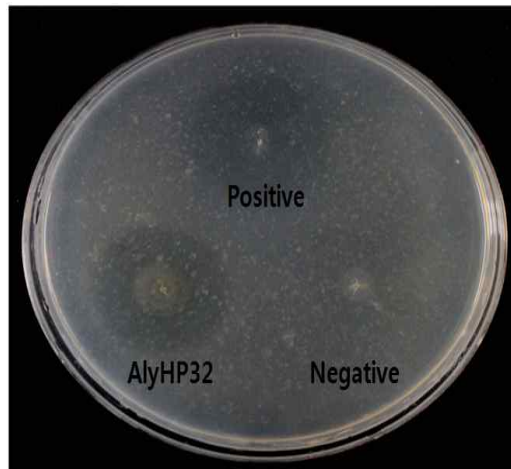


[그림 4-3-3] 박막 크로마토그래피를 활용한 감마선 조사 및 미생물 효소 융합 전처리 적용시 알긴산 올리고당 생산 수율 증진을 확인한 결과이다. 무처리 대조군 (lane 1), 감마선조사 10kGy 처리구(lane 2), 미생물 효소 처리구(lane 3), 미생물 효소 및 감마선조사 융합기술 처리구(lane 4)이며, M은 G1(글루코즈), G5(셀로펜타오즈), G8(셀로옥타오즈)의 표준혼합물이다.

나. 성게 내장유래 해조 다당체 분해 미생물 유전자원 확보

(1) 성게 내장유래 고활성 알긴산 분해 미생물 스크리닝

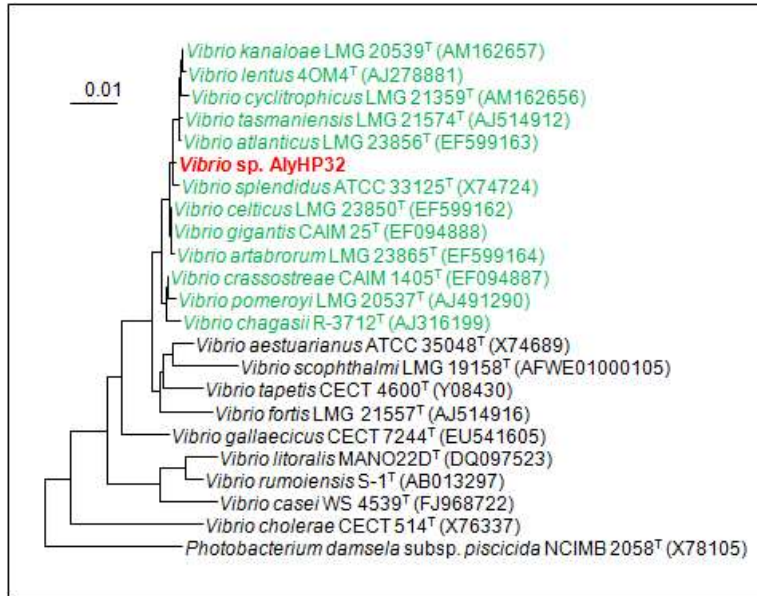
2011년 5월 전남 여수에서 얻은 말뚝성게의 내장을 분리하여 으갠 후에  $10^0$ 에서  $10^7$ 까지 멸균D.W에 희석하고 Zobell agar에 spreading하여 20°C, 12시간 배양 후, colony를 96well plate에 각각 분리하여 같은 조건에서 배양한다. 그 후에 colony를 따서 Zobell broth에서 20°C, 180rpm, 12시간 배양하여 0.1% Alginate+Zobell agar에 CPC (Hexadecylpyridinium chloride monohydrate)를 이용하여 alginate lyase activity를 탐색하고, 균주에 대한 순수분리를 하여 1종의 고활성 균주(AlyHP32)를 확보하였다[그림 4-3-4].



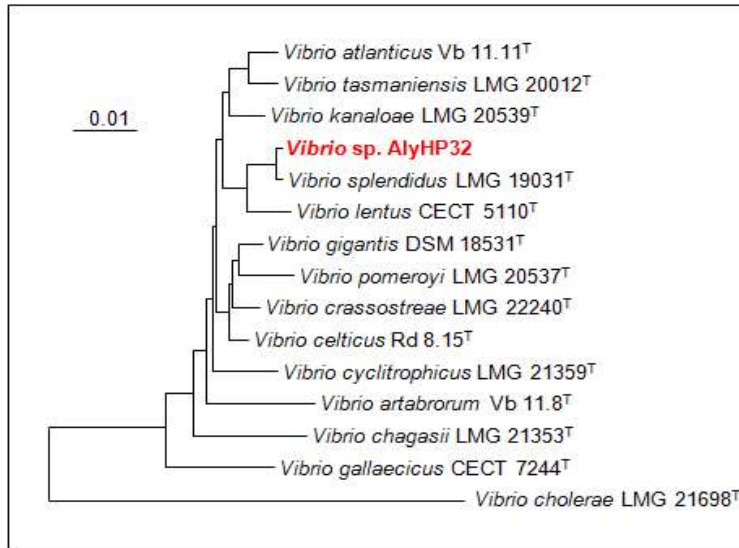
[그림 4-3-4] Alginate lyase 활성을 지닌 성게 내장유래 AlyHP32 균주의 CPC assay 결과

(2) 스크리닝을 통해 얻은 고활성 신종 미생물(AlyHP32) 특성규명

고활성 신종 미생물(AlyHP32)의 동정을 위해 형태적 특징, 배양 특성을 확인하였다. Phylogenetic analysis와 comparative sequencing 분석을 진행, 16S rRNA gene 및 6종의 house keeping gene(*atpA*, *pyrH*, *recA*, *rpoA* and *rpoD*)을 이용하여 sequence 분석을 실시한 결과, *V.splendidus*와 가장 유사성이 높은것을 확인하였으나[그림 4-3-5, 그림 4-3-6], API 20NE, API ZYM kits (bioMérieux)를 이용하여 *Vibrio* sp. AlyHP32와 계통도에서 근접하게 위치했던 *Vibrio* 4종과의 탄소원 이용 및 효소 생성을 조사한 결과, 유사도가 가장 높았던 *V.splendidus*와 Trypsine, Urea, *N*-acetyl-glucosamine 이용 부분에서 차이를 확인하였다[표 4-3-2]. DNA-DNA hybridization을 이용하여 DNA full sequence간의 유전적 유사성 정도를 측정한 결과, 예상과 달리 *V.splendidus*와 59%의 낮은 유사도를 확인하였다[그림 4-3-8].



[그림 4-3-5] 16S rRNA gene sequences를 이용한 계통도 분석결과.



[그림 4-3-6] 16S rRNA gene 및 house keeping gene(*atpA*, *pyrH*, *recA*, *rpoA* and *rpoD*)을 이용한 계통도 분석결과.

[표 4-3-2] API 20NE, API ZYM test를 통한 AlyHP32의 생리화학적 활성 평가 결과. Strains: 1, AlyHP32; 2, *V. splendidus* KCTC 12679<sup>T</sup> 3, *V. tasmaniensis* KCTC 12831<sup>T</sup> 4, *V. cyclitrophicus* KCTC 12678<sup>T</sup> 5, *V. lentus* KCTC 12743<sup>T</sup>. +, 양성; -, 음성; w, 약한 활성. 활용된 모든 균주는 4-7% NaCl, oxidase, catalase, alkaline phosphatase, leucine arylamidase에 대해 양성 결과를 가졌으며, 또한 lipase (C14), valine arylamidase, cystine arylamidase,  $\alpha$ -chymotrypsin,  $\alpha$ -galactosidase,  $\beta$ -galactosidase,  $\beta$ -glucuronidase,  $\beta$ -glucosidase, *N*-acetyl- $\beta$ -glucosaminidase,  $\alpha$ -mannosidase,  $\alpha$ -fucosidase에 대해 음성 결과를 확인함.

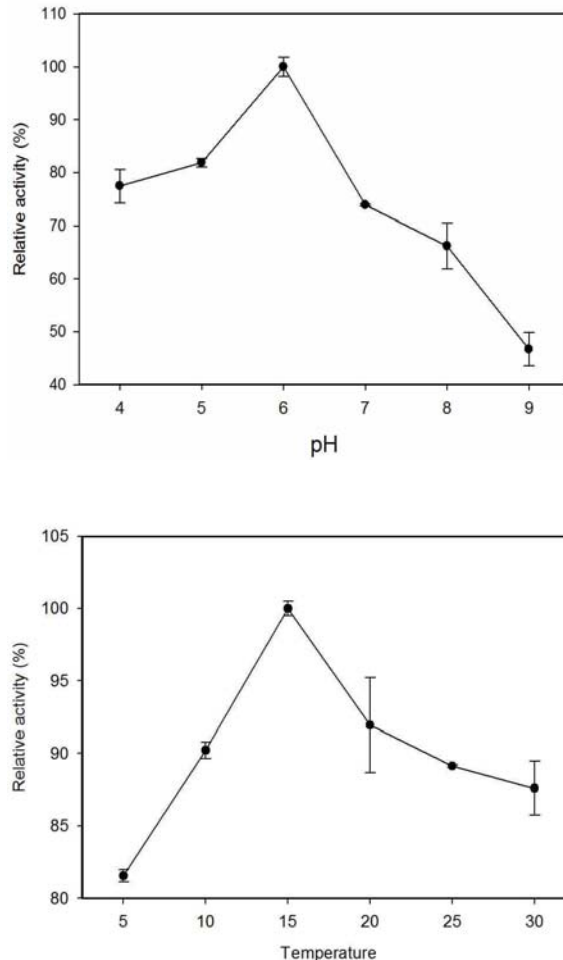
| Substrate   | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 |
|---|---|---|---|---|---|
| <b>Enzyme activity</b>                              |   |   |   |   |   |
| Trypsine  | - | w | + | - | - |
| Acid phosphatase                                    | + | + | + | + | - |
| Naphthol-AS-BI-phosphohydrolase                     | + | + | + | - | - |
| $\alpha$ -Glucosidase                               | - | - | - | - | + |
| <b>Hydrolysis of:</b>                               |   |   |   |   |   |
| Potassium nitrate                                   | + | + | - | + | - |
| Tryptophase   | + | + | - | - | - |
| Glucose   | + | + | w | + | + |
| Urea  | - | + | w | - | - |
| Esculin   | + | + | w | + | + |
| Gelatin   | + | + | - | - | - |
| <i>p</i> -Nitrophenyl- $\beta$ -D-galactopyranoside | + | + | - | - | - |
| <b>Assimilation of:</b>                             |   |   |   |   |   |
| Glucose   | - | - | + | - | - |
| <i>N</i> -acetyl-glucosamina                        | - | w | - | - | - |
| Maltose   | - | - | + | - | + |
| Gluconate   | - | - | + | + | + |
| caprate   | - | - | w | - | - |
| Adipate   | - | - | w | - | - |
| Malate  | - | - | + | + | + |
| Citrate   | - | - | + | + | + |

|        | Strain                  | Hybridization (%) with: |
|--------|-------------------------|-------------------------|
| 100.0% | <b>AlyHP32</b>          | -                       |
| 63.6%  | <i>V.cyclitrophicus</i> | <b>63.6</b>             |
| 2.3%   | <i>V.lentus</i>         | <b>2.3</b>              |
| 59.0%  | <i>V.splendidus</i>     | <b>59</b>               |
| 8.6%   | <i>V.tasmaniensis</i>   | <b>8.6</b>              |

[그림 4-3-7] DNA-DNA hybridization을 통해 DNA full sequence간의 유전적 유사성 정도를 측정된 결과.

### (3) AlyHP32 효소 최적 반응조건 측정

스크리닝을 통해 얻은 1종의 고효율 균주(AlyHP32)를 이용하여 효소의 최적 조건을 측정하였다. 각 효소용액에 대하여 pH 4.0-9.0 완충액에 0.1%의 sodium alginate를 용해시킨 후 적당량의 효소를 가하여 20°C에서 3시간 반응시킨 후 유리된 환원당을 측정하여 효소의 최적 pH를 결정한다. 결정된 최적 pH에서 5-30°C의 반응온도에서 3시간 반응시킨 후 유리된 환원당을 측정하여 효소의 최적 온도를 결정한다. 이 균주를 환원당 분석법을 통하여 알긴산 분해 효소의 적정 pH와 온도를 탐색한 결과 15°C에서 가장 높은 활성을 나타내었다. 최적 pH는 pH 6.0에서 나타났고 그 이후의 pH에서 activity가 감소하였다.[그림 4-3-8] 금속 이온과 같은 보조 인자는 AgNO<sub>3</sub>가 첨가되었을 때 첨가하지 않았을 때 보다 활성이 높은 것을 EDTA와의 활성을 통하여 확인하였다[표 4-3-3].



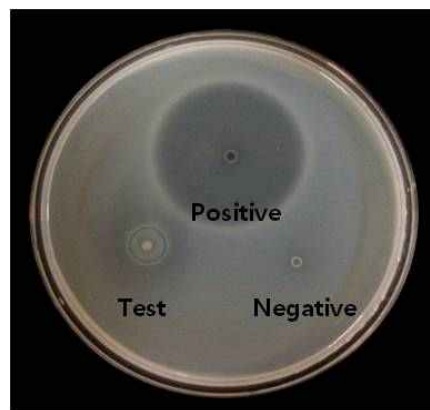
[그림 4-3-8] 환원당 분석법을 통한 AlyHP32의 알긴산 분해 효소의 적정 pH와 온도의 탐색 결과

[표 4-3-3] 금속이온과 NAD<sup>+</sup>, EDTA에 의한 alginate lyase 활성 효과

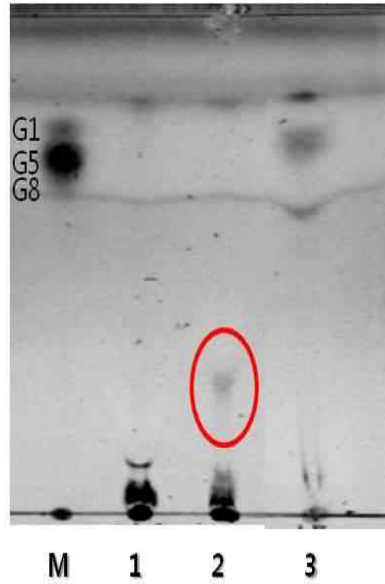
| Chemicals                     | Fold activity     |                                |
|-------------------------------|-------------------|--------------------------------|
|                               | Single            | Combination<br>(Cation + EDTA) |
| None                          | 1.0±0.01          | -                              |
| FeSO <sub>4</sub> (1mM)       | 6.84±0.03         | 6.21±0.02                      |
| CaCl <sub>2</sub> (1mM)       | 3.68±0.07         | 2.95±0.07                      |
| CuCl <sub>2</sub> (1mM)       | 3.95±0.04         | 4.37±0.05                      |
| NaCl (1mM)                    | 2.0±0.14          | 6.58±0.03                      |
| COCl <sub>2</sub> (1mM)       | 2.16±0.05         | 0.26±0.02                      |
| MgSO <sub>4</sub> (1mM)       | 0.74±0.04         | 2.42±0.02                      |
| KCl (1mM)                     | 4.47±0.06         | 2.21±0.01                      |
| <b>AgNO<sub>3</sub> (1mM)</b> | <b>10.58±0.02</b> | <b>7.63±0.03</b>               |
| MnCl <sub>2</sub> (1mM)       | 6.16±0.04         | 1.42±0.01                      |
| MgCl <sub>2</sub> (1mM)       | 5.11±0.04         | 2.68±0.03                      |

다. 성계 내장 유래 AlyHP32의 Fosmid library를 이용한 Alginate lyase 활성 클론 스크리닝

성계 내장유래 고효능 균주인 AlyHP32의 전체 genomic DNA를 추출한 후, 평균 38kb의 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 분해활성을 지닌 클론을 CPC assay, TLC를 통해 스크리닝 한 후 알긴산을 저분자로 가수 분해하는 alginate lyase 활성을 가진 1종의 클론을 확보하였다 [그림 4-3-9, 그림 4-3-10].



[그림 4-3-9] CPC(Cetylpyridinium chloride) assay를 활용한 AlyHP32-F3의 알긴산 분해능 평가



[그림 4-3-10] 박막 크로마토그래피를 활용한 AlyHP32-F3의 알긴산 분해능 평가  
 AlyHP32-F3 효소를 알긴산과 37°C, 24시간 반응(lane 1), 반응 샘플을 50% 회석(lane 2), LB+chloramphenicol broth(lane 3)이며, M은 G1(글루코즈), G5(셀로펜타오즈), G8(셀로옥타오즈)의 표준혼합물이다.

라. 갯벌 유래 분해유전자 (AlyWL1)의 Open Reading Frame (ORF) 분석

갯벌 유래 메타게놈 라이브러리를 이용하여 CPC assay를 통해 알긴산 분해 활성을 가지는 클론을 탐색하여 선별하고, AlyWL1 이라고 명명함. 유전자원의 효율적인 활용을 위하여 Open Reading Frame 분석을 통해 기존에 미확인된 ORF 2, 3, 10 유전자를 확인함.

[표 4-3-4] AlyWL1 클론의 ORF 분석 결과

| 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>Rhodospseudomonas 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>Truspera radovictric</i> DSM 17093/Demococcus-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. Rel1/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>Halitangium ochraceum</i> DSM 14365/Deltaproteobacteria | 22413...23531 | 6.0E-95       | Forward |
| 15      | 30S ribosomal protein S18   | <i>Achetobacter</i> sp. DR1/Gammaproteobacteria            | 23735...23992 | 2.0E-13       | Forward |
| 16      | excinuclease ABC subunit A  | uncultured microorganism/unclassified                      | 24164...24913 | 1.0E-95       | Forward |

#### 4. 요약 및 제언

##### 가. 효소 및 감마선 조사를 병합한 알긴산 저분자화 조건 최적화

액상 다시마를 기질로 하여 저준위 감마선 조사( $^{60}\text{Co}$ )를 이용하여 실온에서 시간당 10kGy의 일정한 선량률로 10, 25, 50, 75, 100, 200, 300kGy까지 조사를 하였고, GPC를 이용하여 샘플의 분자량을 측정한 결과 25kGy에서 분자량이 급격하게 감소하였다. 또한 200kGy에서는 분자량 감소가 둔화되는 결과를 확인하였다. 이와 같은 결과를 이용하여 10kGy의 감마선 조사와 미생물 효소 융합 전처리 방식을 적용함으로써 25kGy의 분해도 증진 효과를 얻고자 하였고, GPC를 이용하여 관찰된 평균 분자량 변화의 경우, 단일 전처리시 다시마 분자량은 10kGy의 감마선 조사의 경우 259 kDa, 미생물 효소의 경우 175 kDa으로 확인되었으며, 감마선 조사 및 미생물 효소 융합 처리시 81.1 kDa으로 분해되어 25kGy의 단일 감마선 조사구보다 더 낮은 분자량을 확인하였다. 알긴산 올리고당 생성 효율을 TLC (Thin-layer chromatography)를 통해 분석한 결과, 단일 전처리 조건보다 저준위 감마선 조사 (10kGy) 후 미생물 효소를 처리한 경우에 알긴산 올리고당 생산수율이 증진된 결과를 확보하였다. 이와 같은 결과는 감마선 및 효소 병합 전처리 방법의 경우, 기존의 단일 처리보다 효소처리의 효율성 향상 및 알긴산 저분자화 증진 효과를 가지는 새로운 방법임을 보여준다.

##### 나. 성게 내장유래 해조 다당체 분해 고활성 균주 확보 및 특성 규명

성게 내장유래 미생물을 스크리닝하여 우수한 알긴산 분해활성을 가지는 균주(AlyHP32)를 확보하였고, 16s rRNA gene를 이용하여 Phylogenetic 분석을 진행하였을 때, *Vibrio*종의 경우 1~10개 정도의 차이만 날만큼 서로간의 유사도가 매우 높기 때문에 16s rRNA gene분석방법으로는 동정이 불가하여 16S rRNA gene 및 모든 세균이 가지고 있는 *atpA*, *pyrH*, *recA*, *rpoA* and *rpoD* 등 6종의 house keeping gene을 이용하여 Phylogenetic analysis를 진행하였고, *V.splendidus*와 가장 유사성이 높은것을 확인하였다. API 20NE, API ZYM kits (bioMérieux)를 이용한 생리생화학적 실험의 경우, *V.splendidus*와 Trypsine, Urea, *N*-acetyl-glucosamine 이용 부분에서 차이를 확인할 수 있었으며, DNA full sequence간의 유전적 유사성 정도를 측정하는 방법인 DNA-DNA hybridization을 진행한 결과, 예상과 달리 *V.splendidus*와 유사도가 59%로 낮게 확인되었으며, Hybridization결과 가장 유사도가 높은 *V.cyclitrophicus*와도 신종균주의 기준인 70%이하의 유사성을 통해 신종 미생물로 확인할 수 있었다.



다. 성게 내장 유래 AlyHP32의 Fosmid library를 이용한 Alinate lyase 활성 클론 스크리닝

고활성의 알긴산 분해 효소 생성이 확인된 성게내장유래 AlyHP32 균주를 이용하여 평균 38kb insert size의 Fosmid library를 구축하였으며, 3,840 클론에 대하여 CPC assay를 통해 Alginate lyase 활성을 가지는 클론을 스크리닝하여 알긴산 분해 활성이 우수한 potential clone을 확보하고, AlyHP32-F3으로 명명하였다. 또한 CPC, TLC(Thin layer chromatography)를 통해 알긴산 분해도를 측정된 결과 AlyHP32-F3의 경우, 알긴산 분해활성이 우수한 효소를 생산하는 클론임을 확인하였다.

라. 갯벌 유래 메타게놈 클론(AlyWL1) Open Reading Frame(ORF)분석

갯벌 유래 메타게놈 라이브러리 중 알긴산 분해활성을 지닌 메타게놈 클론(AlyWL1)의 Open Reading Frame 분석을 통해 기존에 미확인된 ORF 2, 3, 10 유전자를 확인하였다.

## 5. 향후계획

- 성게 내장유래 해조 다당체분해유전자 (AlyHP32-F3) shot-gun library 구축 및 screening
- Shot-gun sequencing 분석을 통한 해조다당체 분해 유전자 ORF 분석 및 최적발현조건 확립

## 제 4 절 해조류분해 부탄올 생산균주 개발 및 부탄올 발효공정의 최적화

### 1. 연구 목적 및 내용

#### 가. 연구 목적

부탄올을 생산 할 수 있는 균주를 이용하여 균주의 해조류 분해효소와 대사체의 profiling을 분석하고 고수율 부탄올 생산을 위하여 재조합균주의 개발하며 해조류를 전처리 및 당화과정 없이 직접적으로 부탄올로 전환하는 통합생물공정(CBP) 기반기술을 확립하며 pervaporation에 의한 부탄올 분리정제 핵심기술 도출이 이번 연구의 목적이다.

#### 나. 연구 내용

해조류의 전처리과정과 당화과정 없이 직접적으로 부탄올로 전환하는 통합 생물공정(CBP)를 위한 algal 부탄올을 생산하는 대조합 clostridia균주를 설계한 후에 부탄올에 대한 내성이 어느정도 있으면서 고수율 부탄올을 생산하며 가수분해효소를 발현하는 균주를 선별하여 algal hydrolysates를 이용하여 부탄올을 생산한다.

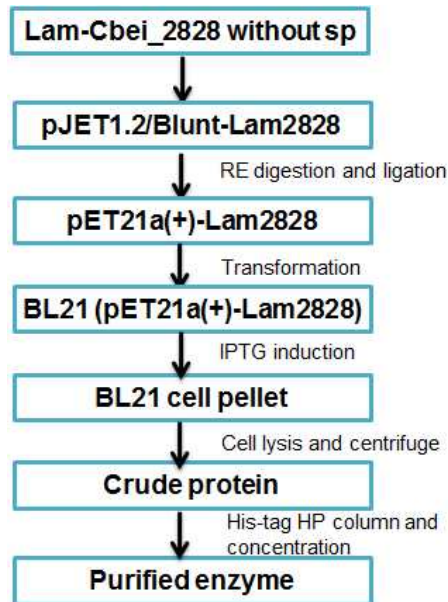
### 2. 연구 방법

#### 가. 실험장치 및 재료

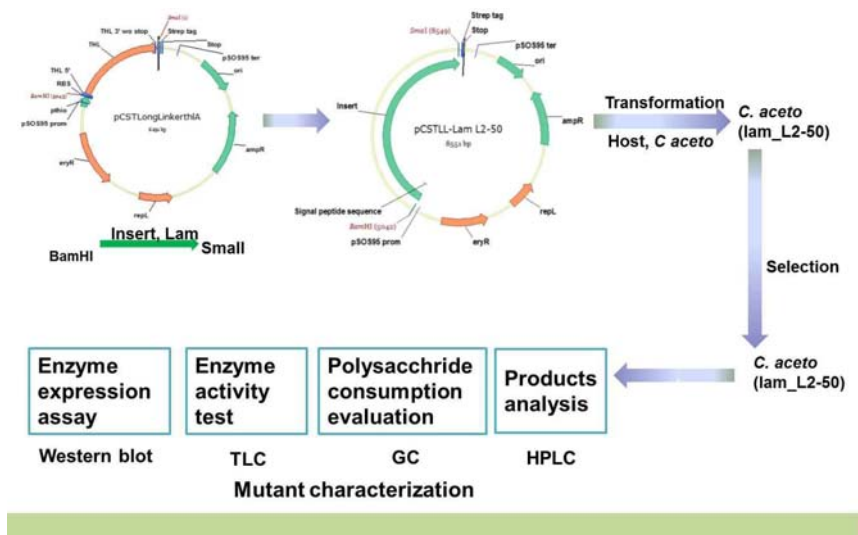
본 실험에서는 다시마 (*Laminaria japonica*)를 구입하여 사용하였으며 *Clostridium beijerinckii*를 다시마 가수분해효소인 laminarinase 효소의 발굴 및 발현 실험 1에 사용하였으며 sub-cloning과 cloning을 위하여 pJET(Fermentans)와 pET21a를 사용하였으며 발현테스트를 위하여 *E. coli* BL21을 사용하였다. 또한 효소의 분리 및 정제를 위하여 His-tag HP column을 사용하였다. 다시마 가수분해효소인 laminarinase 효소의 발굴 및 발현실험 2에서는 *Clostridium acetobutylicum* 을 균주로 이용하여 TLC, HPLC, GC, Westren blot kit을 통하여 characterization을 하였다.

나. 실험 절차

(1) 다시마 가수분해효소 laminarinase 효소의 발굴 및 발현 실험 1



(2) 다시마 가수분해효소 laminarinase 효소의 발굴 및 발현 실험 2



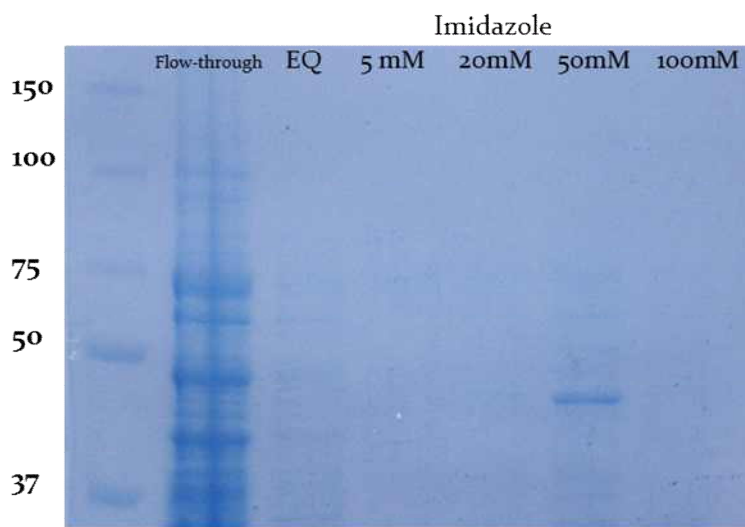
(3) 고수울 부탄올 생산균주의 가수분해효소 발현 및 내성 증진 균주 선별

### 3. 연구수행 결과

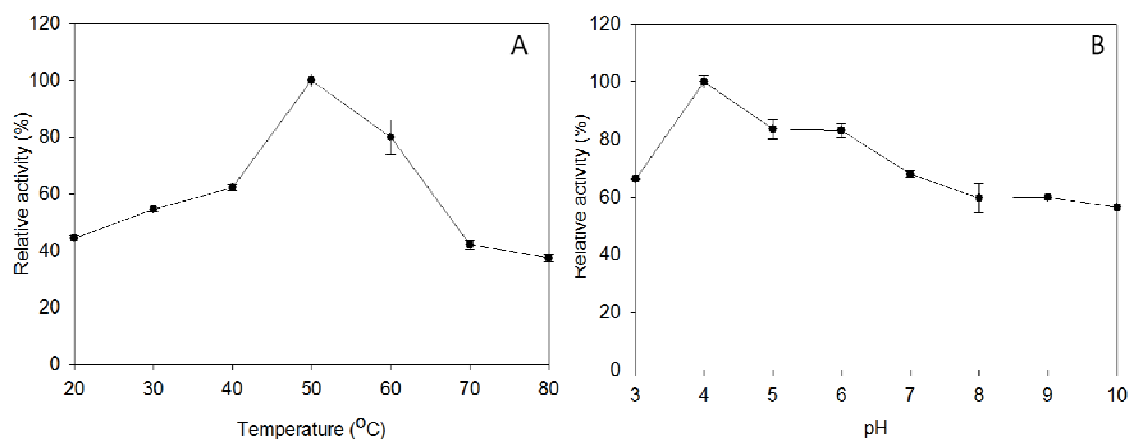
#### 가. 다시마 가수분해효소 laminarinase 효소의 발굴 및 발현 실험 1

##### Laminarinase (Cbei\_2828) chemical characterization

#### (1) Laminarinase (Cbei\_2828) purification



#### (2) Optimum temperature and pH

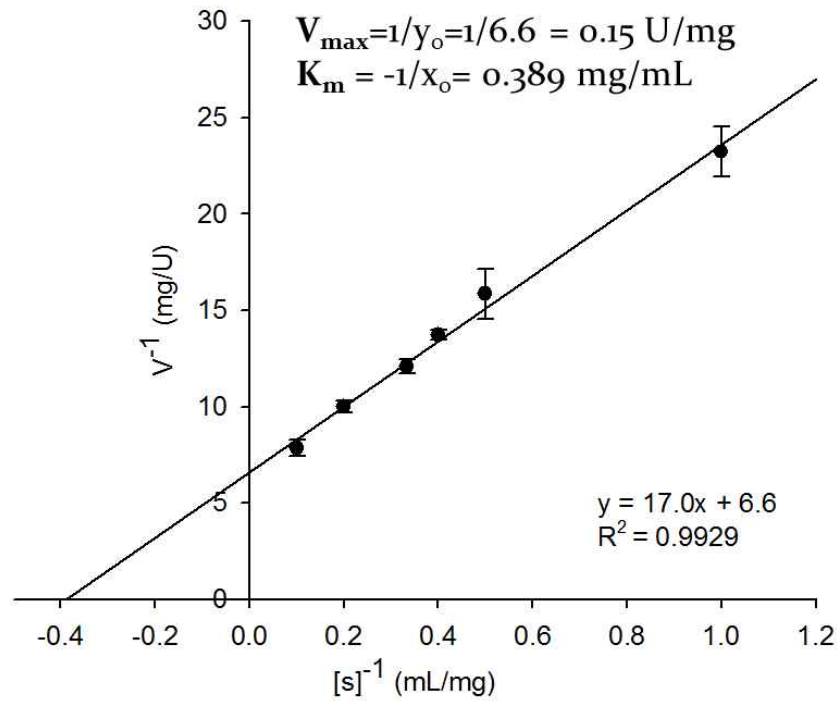


[그림 4-4-1] Relative activity of Lam at different temperatures (A) and pH (B).

In Fig. A, the reaction mixture was incubated in 25 mM Citrate-phosphate buffer at pH 4.0 for 1 h at temperatures ranging from 20 ° C to 70 ° C.

In Fig (B), the enzyme reaction was performed at 50 ° C for 1 h at pH2.0-5.0 using 25 mM citrate-phosphate buffer and at pH 6.0-8.2 using 25 mM phosphate buffer

(3)  $V_{\max}$  and  $K_m$

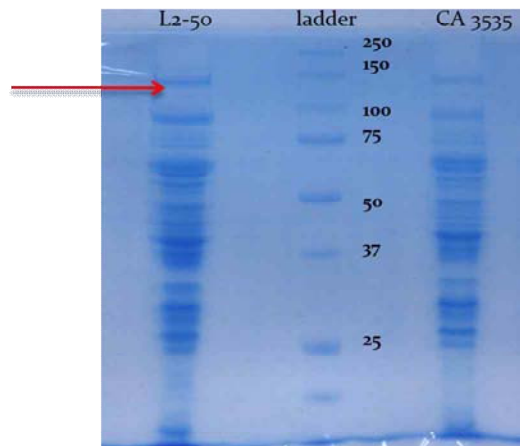


[그림 4-4-2] Lineweaver-Burk plot of the hydrolysis reaction with laminaran from Eiseniabiciclisbypurifiedlaminarinase(Cbei\_2828)in20mMCitrate-phosphatebufferbuffer(pH4.0)at50oCfor30min.Theexperimentswereconductedintriplicate,the data were expressed as mean  $\pm$  standard deviation

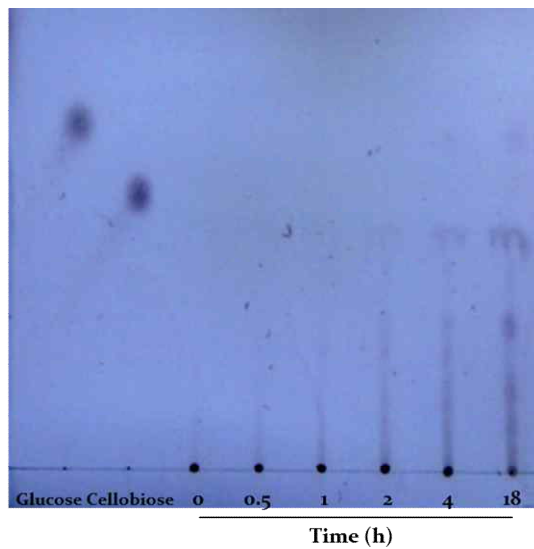
나. 다시마 가수분해효소 laminarinase 효소의 발굴 및 발현 실험 2

Expression of laminarinase gene (L2-50) in butanol-producing strain *Clostridium acetobutylicum*

(1) Crude enzyme profile of *C. acetobutylicum* (lam-L2-50) cell



(2) Enzyme reaction of crude enzymes from *C. acetobutylicum* (lam-L2-50)



TCL. Condition: 0.5 mg crude enzyme (concentrated by 30 kDa filter) pH: 5.0 Temp: 37 °C, [S]:10g/L

#### 4. 요약 및 제언

Laminarinase (Cbei\_2828) encoding gene을 expression vector인 pET21a(+)에 cloning하였고 *E. coli* BL21에 overexpression 시켰다. Laminarinase (Cbei\_2828)을 정제하였고 화학적 특성과 활성또한 확인하였다. *Clostridium* sp.에서 유래한 다른 laminarinase인 L2-50는 *Clostridium acetobutylicum* ATCC 824에 heterologous expression 시켰고 부탄올생산을 위한 균주 isolation 진행하고 있다.

#### 5. 향후계획

Laminarinase (L2-50)는 recombinant strain *C. acetobutylicum* (pCSTLL-lam) 으로부터 분리 정제하여 화학적 특성을 확인하였다. *C. acetobutylicum*는 laminarin medium에 적용 가능하며 갈조류인 *Laminaria japonica*를 통합생물공정(CBP)에서 효율적 처리 없이 부탄올을 생산하는데 이용하는 것이다.

## 제 5 절 난발효성 당류 대사형 재조합 미생물 개발

### 1. 연구 목적 및 내용

#### 가. 연구 목적

갈조류의 최대 부산물은 알긴산(alginate)로 일반적인 미생물은 대사할수 없는 구조로 되어 있음. 특히 알긴산의 분해 시 생성되는 만유로닉산(mannuronic acid)와 글루유닉산(guluronic acid)와 같은 유로닉산(uronic acid)는 희귀성 당류로서 대사효소 및 유전자 정보 등이 극히 제한적임. 이와 같은 배경으로, 갈조류에 존재하는 난발효성 단당류를 함유하고 있는 알긴산 분해물을 대사할 수 있는 미생물을 개발하는 것이다.

#### 나. 연구 내용

난발효성 단당류의 대사효소 유전자를 포함한 발현벡터의 제작을 위해 (1) 4-deoxy-L-erythro hexoseulose uronic acid(DEH) reductase 유전자 확보 및 유전자 클로닝 수행 (2) oligoalginate transporter 유전자의 PCR 증폭 및 유전자 클로닝 (3) 알긴산을 대사하는 새로운 미생물의 발견하는 것이다.

### 2. 연구 방법

#### 가. 실험장치 및 재료

##### (1) 실험장치

##### (가) 배양기 :

미생물 배양을 위해 shaking incubator (한국종합기기제작소, 한국)를 사용하였다.

##### (나) 흡광도 측정기 :

미생물의 균체량을 측정하기 위해서 Spectrophotometer (S-3100, Thermo Scientific Col., USA)를 사용하였다.



(다) High performance liquid chromatography :

배지 내에 존재하는 다양한 대사물질의 측정을 위해서 사용함. 상세한 조건은 다음과 같다.

- 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) Thin layer chromatography :

알긴산 다당류의 분해물의 분석을 위해서 사용함. 상세한 조건은 다음과 같다.

- TLC silica 60 F254 25 Aluminium sheets 20 x 20 cm, Mobile phase (N-Butanol : Acetic acid : water = 3:2:2), Development (spray 10% H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (in Ethanol))

(마) 기타기기

- ① DNA 분리장치: Agarose gel electrophoresis (Bio-rad Co., USA)
- ② 파쇄기: Sonicator (0.5 mm I.D.)
- ③ 단백질 분리장치: SDS-PAGE (Bio-rad Co. USA)

(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<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 60 g/l, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 30g/l, NaCl 5g/l, NH<sub>4</sub>Cl 10g/l), agar 3%, sterile water, 1M MgSO<sub>4</sub> 1ml/L, 1M CaCl<sub>2</sub> 0.1ml/L.
- ③ R medium: (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 4 g/L; KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 13.5 g/L; citric acid, 1.7 g/L; MgSO<sub>4</sub>•7H<sub>2</sub>O, 1.4 g/L; trace metal solution (5M HCl, FeSO<sub>4</sub>•7H<sub>2</sub>O, 10 g; ZnSO<sub>4</sub>•7H<sub>2</sub>O, 2.25 g; CuSO<sub>4</sub>•5H<sub>2</sub>O, 1g; MnSO<sub>4</sub>•4H<sub>2</sub>O, 0.5 g; Na<sub>2</sub>B<sub>4</sub>O<sub>7</sub>•10H<sub>2</sub>O, 0.23g; CaCl<sub>2</sub>, 2g; (NH<sub>4</sub>)<sub>6</sub>Mo<sub>7</sub>O<sub>24</sub>, 0.1g), 10 mL/L

(다) 미생물균주 :

*Escherichia coli* MG1655, *Saccharophagus degradans* ATCC43961, *Vibrio splendidus* KCTC12679

(라) 유전자 관련 효소 및 키트 :

Accuprep®genomic DNA extraction kit (Bioneer Co., Korea), Accuprep®gel extraction kit (Bioneer Co., Korea), Accuprep®PCR purification kit (Bioneer Co., Korea), Plasmid preparation kit (Axygen Biosciences, USA), 제한효소 *Bam*HI (20 units/ul, Enzynomics, Korea), *Xba*I (20 units/ul, Fermentas, USA), *Eco*RI (20 units/ul, NEB, U.K.), *Nde*I (20 units/ul, NEB, U.K.), T4 DNA ligase(350 units/ul, Takara)

나. 실험 절차

(1) 알긴산의 효소적 분해

(가) 알긴산 분해 효소 발현

고려대학교에서 기증받은 미생물 *Saccharophagus degradans*의 Alg7D (*sde\_2547*)은 Endotype의 알긴산 분해효소로 알긴산을 올리고머의 형태로 분해하는 역할을 한다.

이 유전자는 pET21a+에 삽입되어 *E. coli* BL21(DE3)에 형질 전환되어 있으며, 또한 Exotype의 알긴산 분해효소인 Alg17C(*sde\_3284*)은 알긴산을 단당류로 분해하는 역할을 하고 이 또한 pET21a+에 삽입되어 *E. coli* BL21(DE3)에 형질 전환 되어있다.

따라서 이를 발현하기 위해 working volume, 1 L의 LBA medium에서 37°C, 200 rpm의 조건에서 배양하였다. OD(600nm)값이 0.5가 되면 IPTG, 0.1mM으로 induction하였고, 조건을 16°C, 150 rpm으로 변경 후 12시간 이상 배양하였다.

(나) SDS-PAGE analysis

단백질 발현의 결과를 확인하기 위하여 SDS-PAGE를 이용하였다.

세포 내의 효소를 실험에 이용하기 위해 crude extract형태로 만듦. crude extract의 형태로 만들기 위해서 cell down(centrifuge 12000 rpm, 10 min.)을 하였다.

Cell down 후 KPB (potassium phosphate buffer, pH 7.4), 100 mM, 50 mL로 resuspension하고 sonication으로 세포를 파쇄하였다..

파쇄 후 원심분리기를 이용해 soluble protein과 insoluble protein을 분리하였고, 두 종류의 단백질을 SDS-PAGE를 이용한 분석에 이용하였다.

Alg7D와 Alg17C를 각각 위와 같은 방법으로 처리하였다.

#### (다) 알긴산의 분해 효소 처리

알긴산을 단당류로 분해하기 위해서 Alg7D와 Alg17C 효소를 각각 발현하는 재조합 대장균에서 추출한 조효소액을 이용하였다.

알긴산 5 gram과 Alg7D 조효소액 50 mL을 멸균된 삼각 플라스크에 넣고 50 °C에서 6 시간동안 반응함. 6 시간 후에 Alg17C 조효소액 50 mL을 넣고 40 °C에서 10시간 이상 반응하였다.

#### (라) Thin Layer Chromatography

TLC silica 60 F254 25 Aluminium sheets(merck, Germany), Development에 시간 대 별 샘플을 1 ul씩 점적한 후 용매 (N-Butanol : Acetic acid : water = 3 : 2 : 2)로 전개하고, 전개된 후에 에탄올에 녹인 10 % 황산용액(sulfuric acid)을 plate에 뿌린 후 130 °C에서 그을림 이용하여 development하였다.

### (2) DEH reductase유전자의 클로닝

#### (가) Constitutive vector로의 전환

*E. coli* MG1655는 T7 expression system이 존재하지 않는다.

따라서 DEH reductase가 삽입되어져 있는 플라스미드 pET21b+-A1-R을 이용하여 MG1655 숙주세포에서는 A1-R 유전자를 발현시킬 수 없어,

본 실험에서는 pUC19유래의 벡터 중 lac operator가 제거되고 lac promoter만이 존재하는 플라스미드 pUCmodII를 발현벡터로 선정하였다.

*Bam*HI과 *Xba*I를 이용하여 플라스미드 pET21b+-A1-R에 존재하는 DEH reductase유전자를 절단하고 pUCmodII에 T4 ligase를 이용해 삽입하였다.

이렇게 재조합 된 플라스미드를 pDEHRY으로 명명하였다.

#### (나) Transformation

재조합된 플라스미드는 증폭을 위해 *E. coli* DH5  $\alpha$ 에 형질 전환되었고,

plasmid preparation과정과 subcloning과정을 거쳐 최종적으로 host균주인 *E. coli* MG1655에 형질전환 되었다.

(3) 배양조건

(가) R 제한 배지의 제조

(NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, citric acid, MgSO<sub>4</sub>•7H<sub>2</sub>O을 H<sub>2</sub>O에 녹여 살균하였다.

trace metal solution은 5M의 HCl에 각 성분을 차례로 넣어주어 제조한 후 따로 autoclave하였다. 멸균된 두 용액을 섞어 용액을 제조하였다.

(나) 탄소원

탄소원은 앞서 분해한 알긴산 단당류를 5 g/L의 농도로 첨가하였고, 대조군으로서 glucose 5 g/L을 첨가한 배지도 제조하였다.

(다) 균주

Wild type의 *E. coli* K strain MG1655, pDEHRY이 삽입된 재조합 *E. coli* MG1655, *E. coli* B strain BL21(DE3)을 균주로 이용하여 배양하였다.

(라) Fermentation conditions

- 37 °C, 200 rpm으로 약 25시간 동안 배양하였다.

(4) Oligoalginate transporter 유전자의 클로닝

(가) Polymerase chain reaction

*Vibrio splendidus* 미생물의 genomic DNA로부터 *toaA*와 *toaC* 유전자를 PCR을 이용하여 분리해 내었다.

분리한 유전자를 각각 pDEHRY의 DEH-reductase 유전자 downstream에 삽입하였다.

| primer              | sequence   |
|---------------------|--|
| <i>toaA</i> forward | 5'-CGGAATTCAAGGAGATATACATATGACTATCGATACTTTTGTGTTCTC-3' |
| <i>toaA</i> Reverse | 5'-CATGCCATGGCTACTTAGCAACTGACTCGTTGTTTCATCTT-3'        |
| <i>toaC</i> forward | 5'-CGGGATCCAAGGAGATATACATATGCTGTGGTGGATGGTAGGTGCA-3'   |
| <i>toaC</i> Reverse | 5'-CGGAATTCCTTAGCCTTCGGCTGGAGTCACTT-3'                 |

(나) Transformation

Oligoalginate transporter 유전자를 삽입한 pDEHRY를 *E. coli* DH5  $\alpha$  에 클로닝 한 후 증폭과정을 거치고 *E. coli* MG1655에 subcloning과정을 거쳐 최종적인 형질전환 균주를 제작하였다.

(다) Fermentation of recombinant *E. coli*

형질전환된 균주를 M9 medium에서 배양하였다.

3. 연구수행 결과

가. 알긴산의 효소적 분해

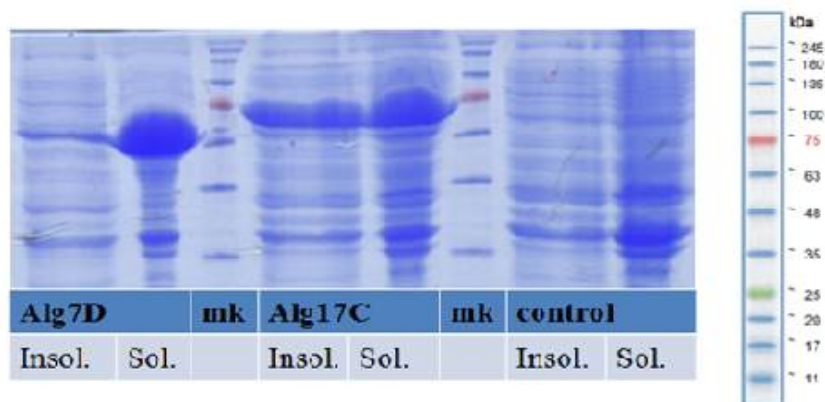
(1) 알긴산 분해효소의 발현 및 알긴산 분해조건의 결정

각 효소의 아미노산서열을 이용하여 이론크기를 측정한 결과, Alg7D의 단백질 크기는 63kDa이고, Alg17C의 단백질 크기는 79kDa 이다.

각 유전자를 보유한 재조합 대장균을 회분식법으로 배양하고 IPTG 첨가를 통해서 각 유전자의 발현을 유도한 이후에, 대장균의 세포 내에서 Alg7D와 Alg17C 단백질의 발현을 확인하기 위하여 SDS-PAGE로 세포파쇄물을 분석하였다[그림 4-5-1].

대조구는 *E. coli* BL21(DE3)에 모벡터인 pET21a+가 삽입된 재조합 균주를 동일한 조건을 통해서 발효를 하였고, 이 재조합 균주의 세포파쇄액을 대조구로 이용하였다.

SDS-PAGE의 결과에서 보듯이 각 단백질의 band는 이론크기 부위에서 확인할 수 있었고, 두 효소 모두 대부분 수용액 형태로 발현하고 있음을 확인하였다.



[그림4-5-1] Alg7D와 Alg17C의 SDS-PAGE결과

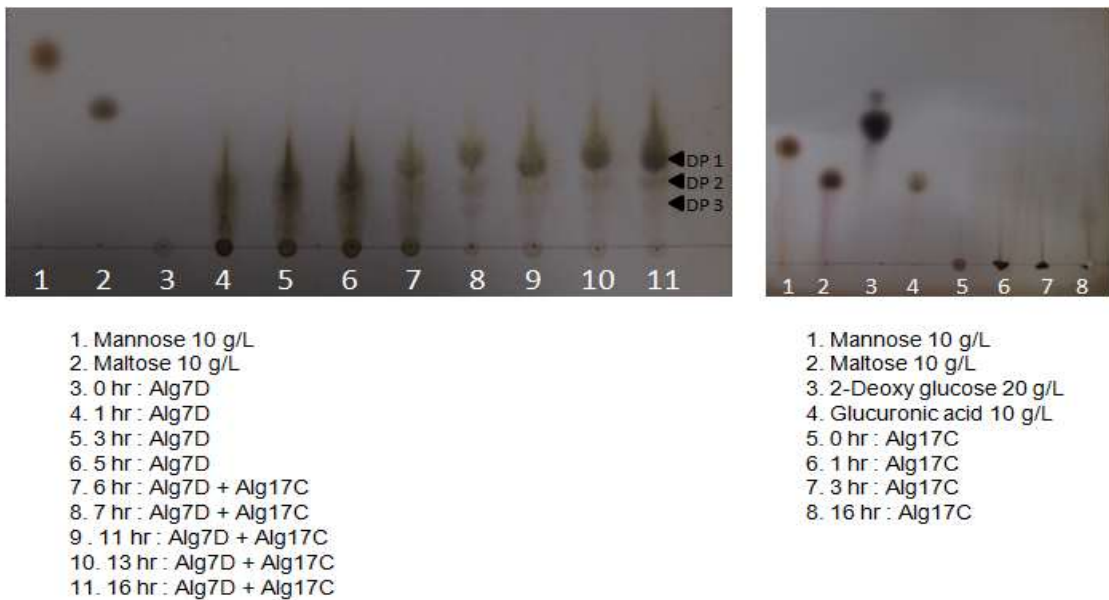
단백질의 SDS-PAGE 분석에 이용하였던 Alg7D와 Alg17C 조효소를 이용하여 알긴산 단량체를 제조하는 방법을 개발하였다.

재료 및 방법에서 기술한 것과 같이 알긴산(sodium alginate)에 Alg7D와 Alg17C가 함유된 조효소를 첨가한 이후, 각 시간에 따른 시료를 TLC를 이용하여 분석하였다[그림4-5-2].

알긴산을 알긴산 분해효소로 처리한 결과 Alg7D만 반응했을 때(A. 3, 4, 5, 6)에는 최대 이당류로 분해가 되었고, Alg17C만 반응했을 때(B. 5, 6, 7, 8)에는 대부분의 알긴산이 분해되지 않았다.

하지만 Alg7D와 Alg17C를 함께 알긴산과 반응했을 때 대부분의 알긴산이 단당류로 분해된 것(A. 7, 8, 9, 10)을 확인하였다.

최종적으로 Alg7D와 Alg17C를 함께 이용하고 16시간 동안의 반응을 통한 방법을 향후 알긴산 단량체의 생산방법으로 이용하였다.



[그림4-5-2]알긴산의 효소적 분해 TLC 결과

## (2) DEH-reductase의 A1-R 유전자의 발현

### (가) DEH-reductase 유전자의 클로닝

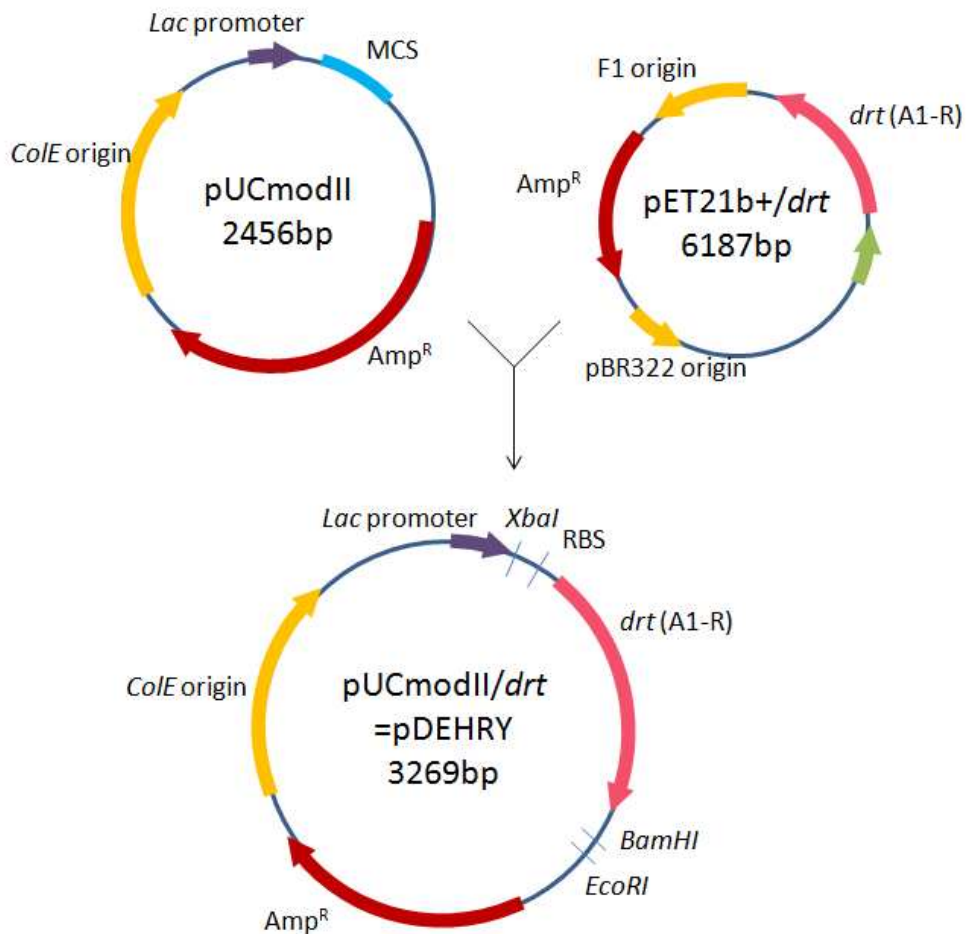
pET21b+-A1-R 플라스미드로부터 DEH reductase 유전자인 A1-R 유전자를 분리하여 pUCmodII 벡터에 삽입하여 DEH reductase를 constitutive 한 방법으로 발현할 있는 플라스미드 pDEHRY를 제작하였고 *E. coli* DH5  $\alpha$  에 형질전환 하였다.

형질전환 후 콜로니 3개를 선택하여 plasmid preparation과정을 통해 플라스미드를 세포로부터 분리하였고, 제한효소 *NdeI*을 이용하여 플라스미드를 절단하였다.

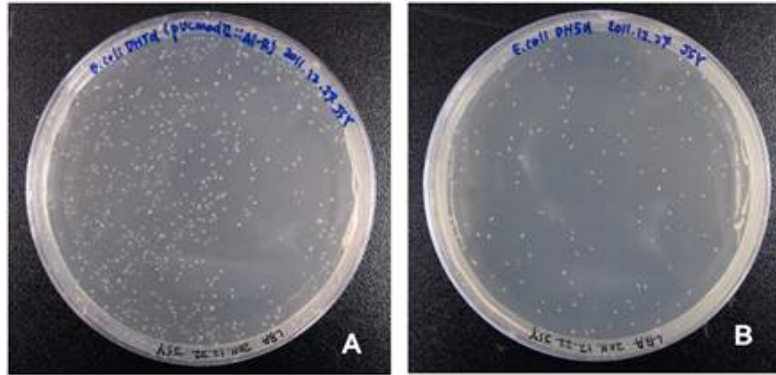
pDEHRY는 유전자의 삽입으로 인해 *NdeI* 제한효소 자리가 두 개이므로 전기영동 시 두 개의 밴드(약 0.8 kb, and 2.4 kb)가 나타나는 것이 원하는 유전자가 삽입된 플라스미드라고 할 수 있다.

따라서 colony 1, 2, 3 번 중 3번만이 원하는 유전자가 삽입된 플라스미드가 형질전환된 세포임을 확인하였다.

곧, 3번 콜로니에서 얻은 플라스미드 pDEHRY를 이용하여 *E. coli* MG1655에 형질전환 하였다.



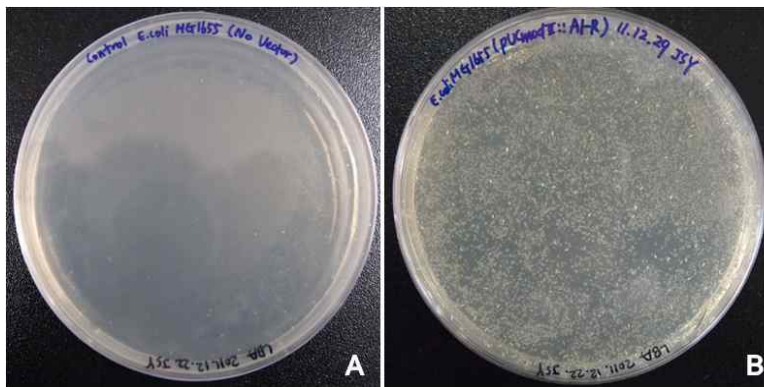
[그림 4-5-3] 재조합 플라스미드(pDEHRY) 제작 모식도



[그림4-5-4] Transformation of pDEHRY into *E. coli* DH5  $\alpha$



[그림4-5-5] vector의 self ligation 확인



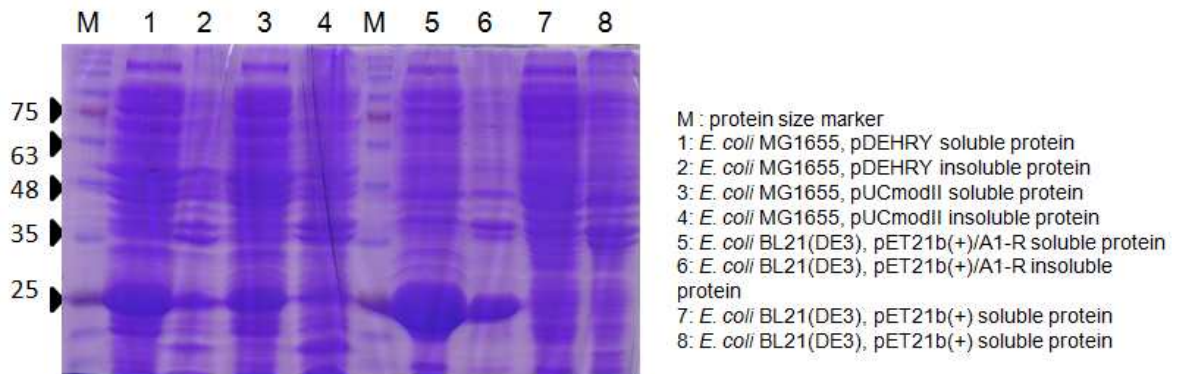
[그림4-5-6] Transformation of pDEHRY into *E. coli* MG1655



(나) DEH-reductase의 발현

DEH-reductase인 A1-R의 발현결과는 SDS-PAGE를 이용하여 확인하였음. A1-R의 단백질 크기는 27 kDa로 예측하였고, 예측크기에 단백질 밴드가 위치하는 것으로 보아 DEH-reductase의 발현은 잘된 것으로 예측하였다.

한편, DEH-reductase의 발현 정도는 MG1655를 숙주세포로 쓴 경우가, *E. coli* BL21(DE3)의 T7 promoter system 보다 낮았다.



[그림4-5-7] DEH-reductase인 A1-R 발현 SDS-PAGE 결과

(다) Enzyme activity assay

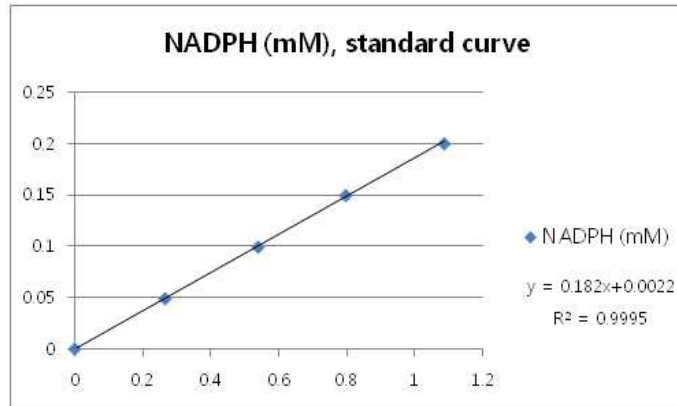
A1-R은 NADPH의존적인 reductase으로서 DEH를 KDG로 전환하는 대사를 매개한다.

따라서 Alg7D와 Alg17C를 이용하여 분해한 알긴산 분해 당당류를 DEH대신 이용하였다.

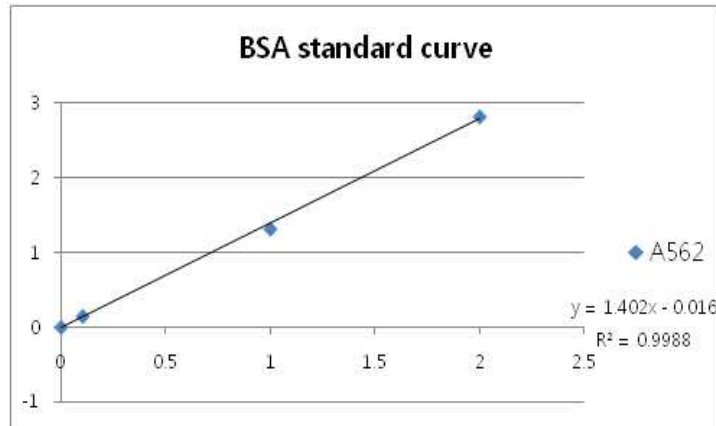
340nm의 파장에서 흡광도를 측정하여 DEH가 KDG로 변화하면서 감소하는 NADPH의 변화를 관찰하였다. 또한 BSA standard curve와 비교하여 실험군과 대조군의 단백질 양을 측정하고, NADPH standard 흡광도의 curve와 비교하여 효소활성을 측정하였다. 측정된 결과들을 가지고 전체단백질의 specific activity를 구하였다.

NADPH와 단백질 농도의 standard curve는 각각 [그림4-5-8]과 [그림4-5-9]이었고, A1-R을 발현하는 재조합 대장균과 대조군의 조효소를 이용하여 A1-R의 반응을 시간별로 측정한 결과는 [그림4-5-10]과 같았다.

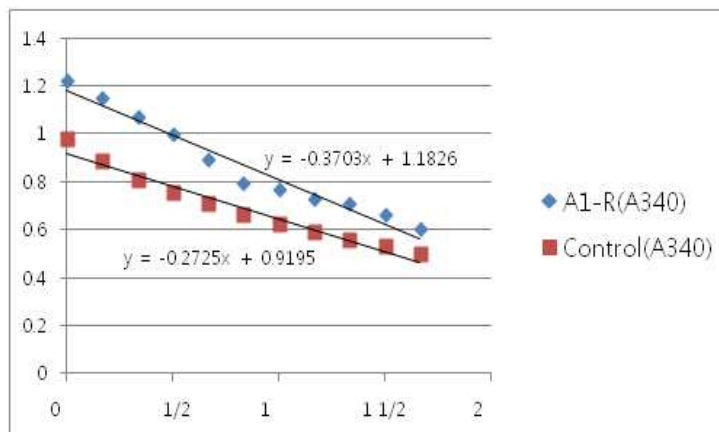
그 결과, A1-R이 발현된 세포의 효소 활성은 5.96 mU/mg protein으로 A1-R을 발현하지 않은 control보다 약 2배정도 높았다[그림4-5-11].



[그림4-5-8] NADPH standard curve (흡광도 at 340 nm)



[그림4-5-9] BSA standard curve (흡광도 at 340 nm)



[그림4-5-10] A1-R의 NADPH 감소양상 측정.

DEH reductase 효소의 total activity계산은 다음과 같다.

|                  | A1-R | Control |
|------------------|------|---------|
| A <sub>562</sub> | 7.9  | 13.0    |

A1-R protein concentration (mg/mL) ≒ 5.65

Control protein concentration (mg/mL) ≒ 9.28

DEH reductase, A1-R activity (Unit(μmol/min.))

=NADPH conversion factor(mM/Abs) X slope (Abs/min.) X total reaction vol.(mL) X df

\*df :crude extract 희석배수

따라서,

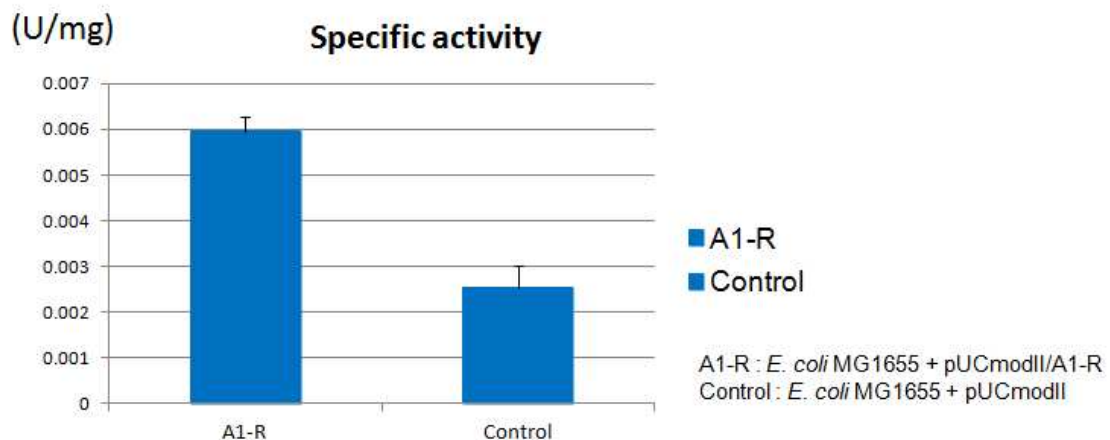
A1-R activity (Unit) = 0.182 (mM/Abs) X 0.3703(Abs/min) X 1 mL ≒ 0.0674 Unit

Control activity (Unit) = 0.182 (mM/Abs) X 0.2725(Abs/min) X 1 mL ≒ 0.0496 Unit 이고, 각각의 specific activity 계산식은 activity 를 단백질의 무게로 나눈 값이다. 따라서,

Specific A1-R activity(Unit/mg)

= (0.0674(unit) / 0.1 mL / 5.65 (mg/mL)) X (1/20) = **0.00596 U/mg**

Control specific activity (Unit/mg) = (0.0496 (unit) / 0.1 mL / 9.28 (mg/mL)) X (1/20) = **0.00253 U/mg**



[그림4-5-11] A1-R specific activity

### (3) 알긴산 단량체를 탄소원으로 이용한 회분식 배양

#### 가. 플라스크 배양

R 배지에서 키운 회분식 배양의 결과, *E. coli* MG1655와 A1-R이 삽입된 *E. coli* MG1655가 약 20~25 시간 사이에 glucose를 모두 소모하였고, OD값은 약 5 까지 증가하였다[그림 4-5-12].

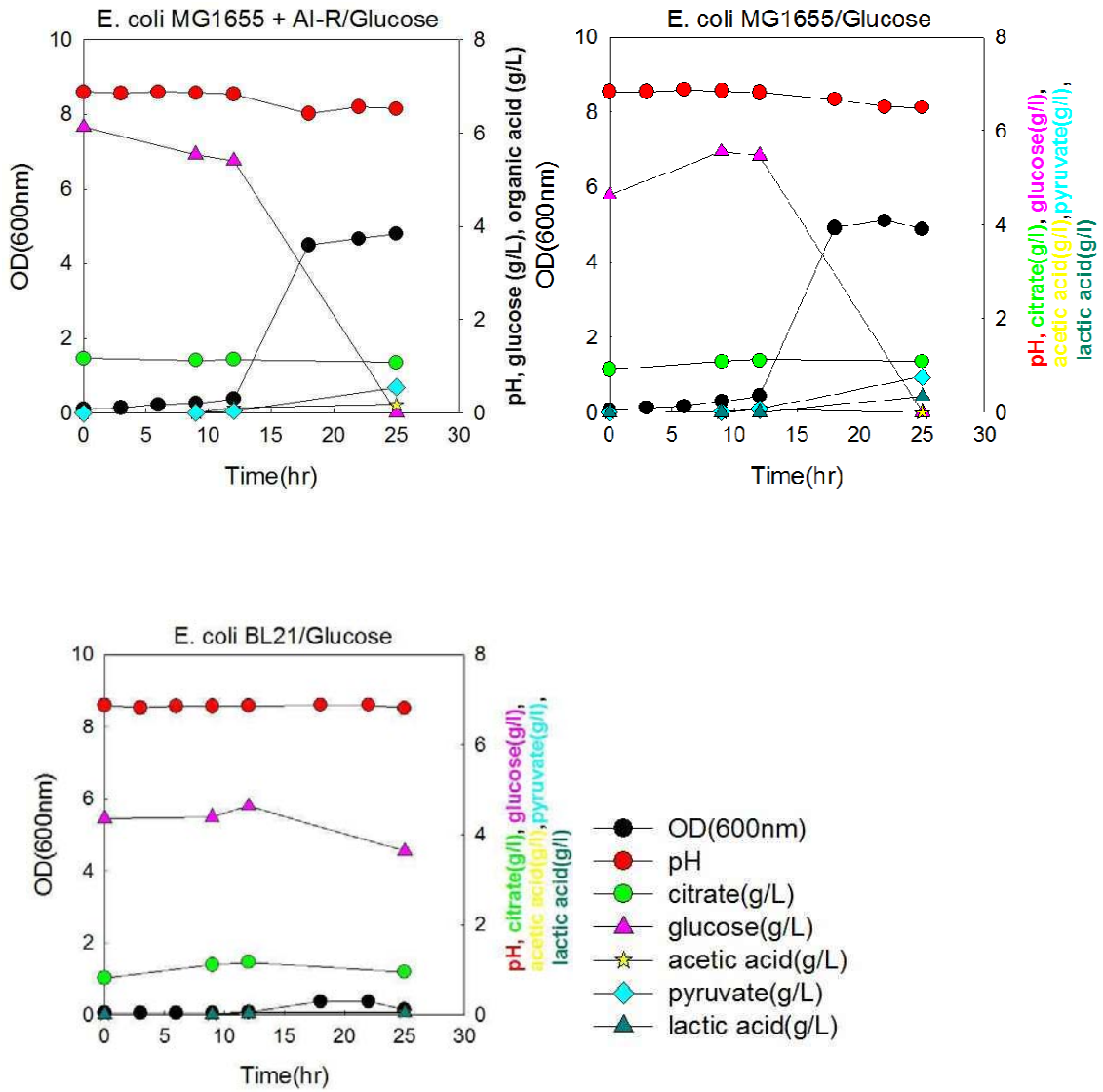
Glucose가 대사되면서 pyruvate이 부산물로 생성되었고, citrate의 농도는 변함이 없었다. 또, 야생형 *E. coli* MG1655에서 소량의 lactic acid가 생성되었다. 하지만 *E. coli* BL21의 경우 R 배지에서 대사를 하지 못하고 glucose의 소모도 하지 못하였다. 균의 성장 또한 이루어지지 않았고, 따라서 pyruvate도 생산하지 못하였다.

탄소원을 알긴산 분해 단당류로 이용한 배양에서는 세 균주 모두 OD(600nm)가 약 2 까지 증가하였고 비슷한 패턴을 보이며 성장하였다[그림4-5-13].

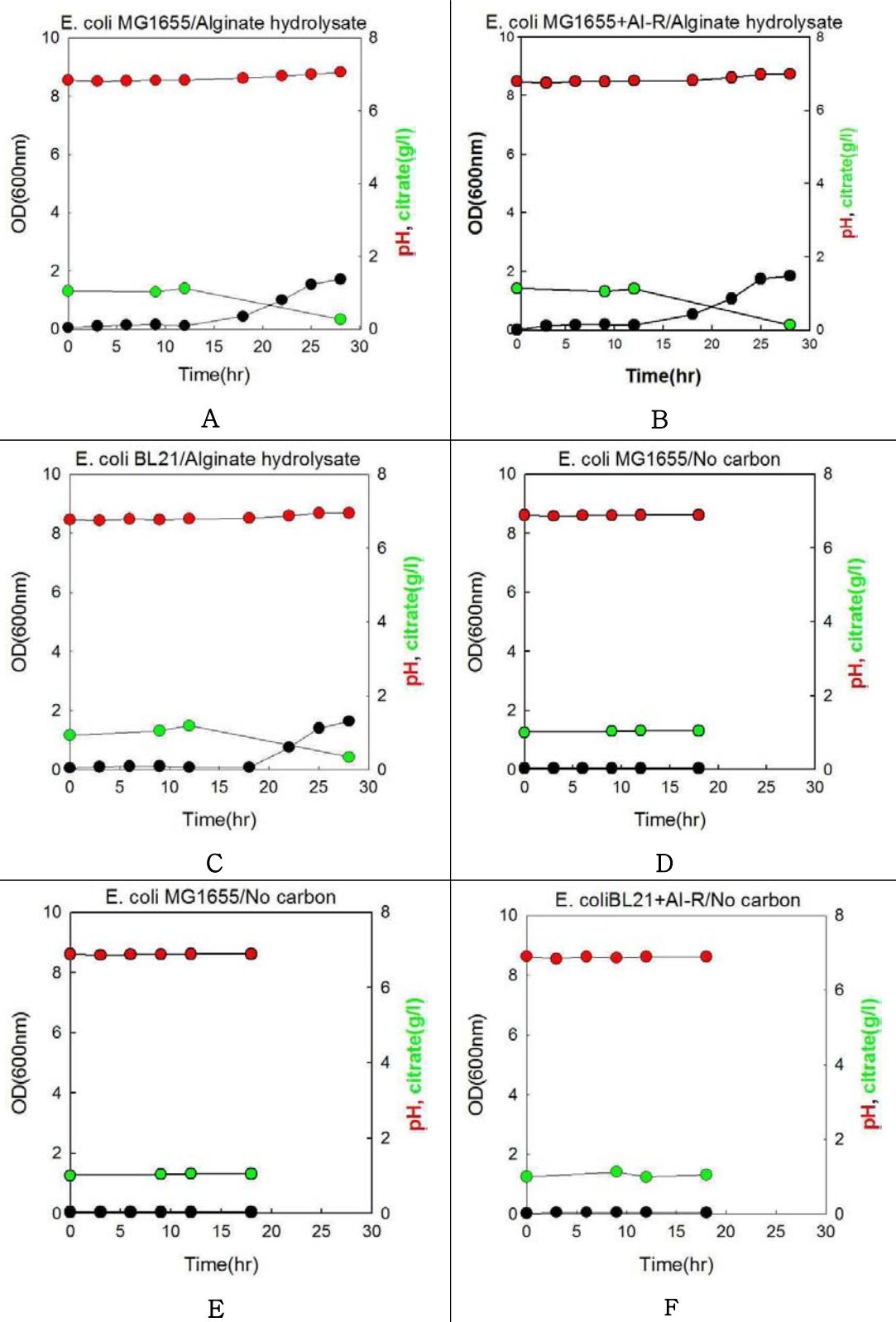
이 때 glucose를 당원으로 사용했을 때와는 달리 Citrate를 28시간 동안 약 1 g/L정도 소모하며 균이 성장하였다.

전체적으로 약 0.5 정도의 pH값이 상승하였고, 다른 부산물은 생성되지 않았다.

탄소원 없이 R 배지에서의 균이 성장하지 못하였다. 또한 citrate 없이 알긴산 분해물을 넣은 배지에서도 균이 성장하지 못하였다.



[그림 4-5-12] Glucose를 탄소원으로 이용한 *E. coli* 균주의 flask culture



[그림4-5-13]알긴산 분해물을 탄소원으로 이용한 *E. coli* 균주의 flask culture (A, B, C)와 탄소원이 없이 배양한 *E. coli* 균주의 Flask culture (D, E, F) 결과

(4) Oligoalginate transporter 유전자의 클로닝

ToaA와 ToaC는 *Vibrio* 미생물에 존재하는 alginate 올리고머의 세포 내 이송체로 알려져 있고, 알긴산 단량체의 세포 내 이송에도 관여하고 있는 것으로 예상된다.

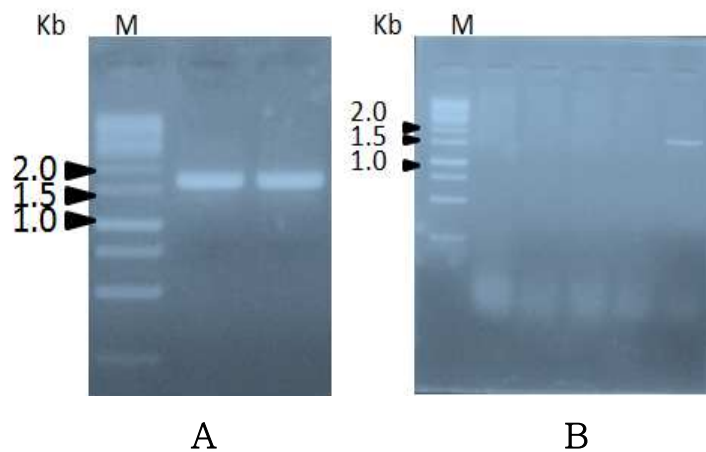
ToaA와 ToaC의 유전자를 재조합 대장균에 도입하기 위하여 PCR을 이용하여 각 유전자를 증폭하였다.

각 유전자에 특이적인 primer를 이용하고 *Vibrio* 미생물의 염색체를 template로 이용하여 각 유전자를 증폭하였고, 그 결과 *toaC* (1659bp)와 *toaA* (1767bp) 유전자의 성공적인 증폭을 확인하였다[그림4-5-14].

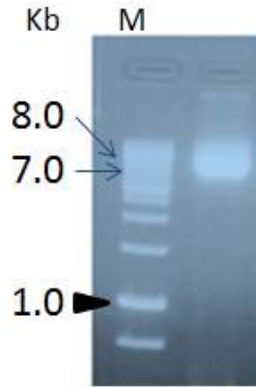
각 유전자를 gel extraction 기법을 이용하여 분리한 후 *toaC*는 제한효소 *Bam*HI과 *Eco*RI를 이용하여 절단하였고, *toaA*는 *Bam*HI과 *Nco*I를 이용하여 절단하였고, 각 유전자를 플라스미드 pDEHRY에 삽입하였다.

삽입한 후 *E. coli* DH5  $\alpha$ 에 형질전환하였고, 콜로니로부터 plasmid preparation과정을 거쳐 전기영동을 통하여 pDEHRY+*toaA*+*toaC* (약 7.5 kb)의 크기를 확인하였다.

이후에 알긴산 단량체를 대사하기 위한 숙주세포인 *E. coli* MG1655에 플라스미드 pDEHRY+*toaA*+*toaC* 를 형질전환하였고, agarose gel electrophoresis를 통하여 성공적 도입을 확인하였다[그림4-5-15].



[그림4-5-14] PCR 결과 (*toaC* :A ; *toaA* :B)



[그림4-5-15] pDEHRY +*toaA*+*toaC*

(5) 알긴산 모노머 대사형 신규 미생물의 선별

본 연구실이 보유하고 있는 다양한 토양미생물을 이용하여 알긴산 모노머의 대사능을 보유한 신규 미생물을 선별하였다.

M9 minimal media에서 알긴산분해산물을 10 g/L 넣은 배지를 사용하였고, 토양미생물 라이브러리를 접종한 이후, 37도에서 배양을 하였다.

이중에서 선별한 신규 미생물을 균주로 이용하고, M9 minimal media에 알긴산 분해물 10 g/L를 첨가한 배지에서의 배양을 하였고, 그 회분식 발효경향은 [그림4-5-16]와 같다.

이전의 야생의 세균과 다르게 발효 20시간 이후에 급격한 성장을 보여 최종적으로 약 OD 4의 균체농도를 얻었다.

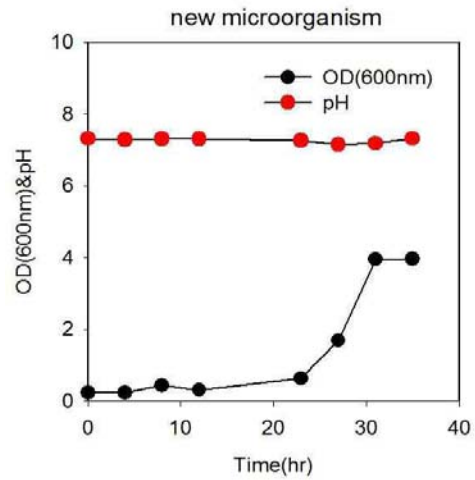
신규 미생물의 알긴산 단량체 소모를 확인하기 위해서 시간별로 발효액을 채취하여 발효액에 함유된 알긴산 단량체의 양을 TLC[그림4-5-17]와 HPLC[그림4-5-18]를 이용하여 확인하였다.

TLC 결과 초기에 첨가한 약 10 g/L의 알긴산 단량체를 31시간 이내에 모두 소모하였다.

또한 배양액의 HPLC 분석결과 알긴산 단량체로 예상되는 물질의 peak가 발효시작 후 31시간 이후에 모두 소모된 것을 확인하였다.

결론적으로 토양에서 유래한 신규 미생물은 알긴산 단량체를 단일 탄소원으로 이용하여 성장할 수 있었다.



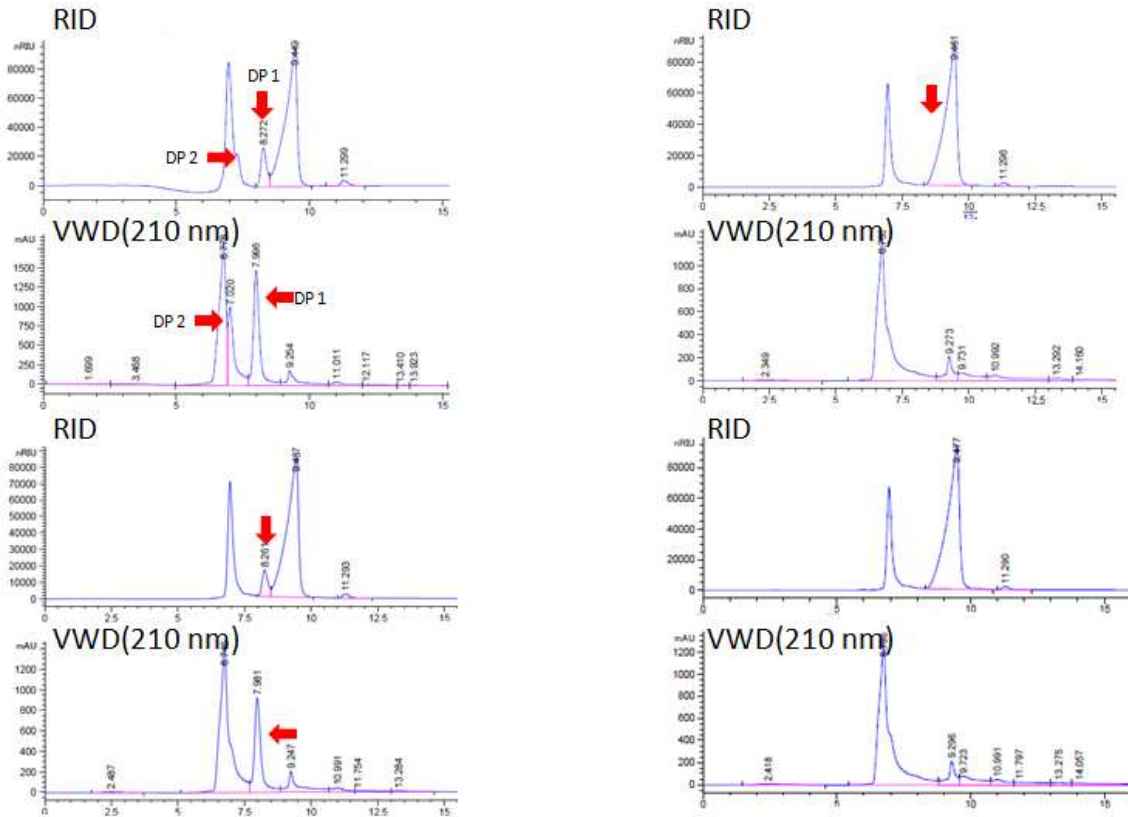


[그림4-5-16] Unknown new microorganism의 growth curve



- 1: Alginate hydrolysates
- 2: New microorganism 0 hr
- 3: New microorganism 23 hr
- 4: New microorganism 31 hr
- 5: New microorganism 35 hr
- 6: *E. coli* MG1655 (pDEHRY) 0 hr
- 7: *E. coli* MG1655 (pDEHRY) 31 hr
- 8: *E. coli* MG1655 (pDEHRY) 35 hr

[그림 4-5-17] 신규미생물 배양액의 TLC 결과



[그림 4-5-18] 새로운 미생물을 배양한 배양액의 HPLC분석 결과

#### 4. 요약 및 제언

알긴산을 대사할 수 있는 재조합 *E. coli* 균주를 제작하기 위하여 먼저 알긴산 분해효소를 발현하여 알긴산을 단당류로 분해한다. 또한 *E. coli* 내부에 알긴산 대사효소 유전자를 cloning하기 위해 DEH-reductase를 탐색하였다. DEH-reductase를 host균주 내에서 발현하여 SDS-PAGE로 확인하였고, 활성을 측정하였을 때 대조군보다 2배 높은 활성을 보였다. 또한 알긴산의 세포 내 이송체를 암호화하는 유전자를 *Vibrio splendidus* 미생물로부터 탐색하고 PCR을 이용하여 oligoalginate transporter의 두 가지 유전자인 toaA와 toaC를 증폭한 후, DEH reductase 유전자와 toaA, toaC 유전자를 발현할 수 있는 벡터시스템을 구축하였다. 한편 알긴산 단량체를 단일탄소원으로 이용하여 성장할 수 있는 토양 미생물을 선별하였다.

## 5. 향후계획

### 가. 난발효성 알긴산 단량체 대사 유전자의 형질전환 미생물 개발

알긴산 단량체인 만유로닉산은 생물학적 당화공정을 통해서 4-deoxy-L-erythro hexoseulose uronic acid(DEH)로 전환되고, 이 물질은 세포 내로 이송된 이후에 2-keto-3-deoxygluconic acid(KDG)로 전환되고, 이후에 2-keto-3-deoxyphosphogluconate(KDPG)로 전환되어 Entner-Doudoroff 경로로 대사가 되는 것으로 예상된다.

알긴산 단량체 만유로닉산의 첫 번째 대사경로를 촉매하는 DEH reductase(*AI-R*)의 유전자 발현벡터는 3차년도에 구축을 완료하였다.

곧, 두 번째와 세 번째 단계를 각각 촉매하는 KDG kinase 유전자 (*kdgK*)와 KDPG aldolase 유전자(*kdgA*)의 유전자를 증폭하여 확보한다.

*KdgK*와 *kdgA*를 대장균에서 발현하기 위한 유전자 발현시스템을 구축함. 특히 *AI-R* 유전자와 동시에 발현되고, 안정적으로 발현할 수 있는 벡터 시스템을 이용한다.

상기의 *AI-R*, *kdgK*, *kdgA* 유전자의 발현시스템을 대장균 MG1655에도입하여, 알긴산 단량체 대사이전자의 발현량이 증가된 형질전환 미생물을 개발한다.

### 나. 알긴산 단량체 대사형 미생물 개발

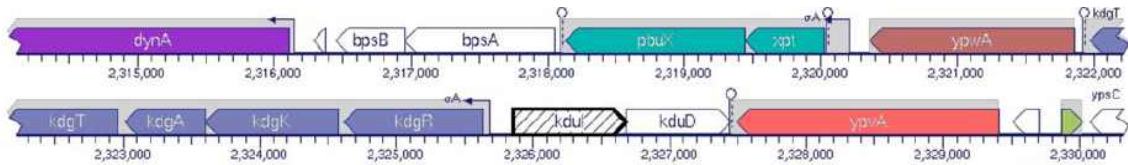
현재까지 다양한 해양유래의 미생물이 알긴산을 분해할 수 있는 능력을 보유하고 있다고 보고된다.

하지만 알긴산 단량체인 만유로닉산은 DEH로 전환되는데, DEH는 펙틴의 단량체인 갈락투로닉산의 전환체와 유사한 구조를 갖고 있다.

곧, 펙틴 또는 알긴산 단량체를 대사할 수 있는 해양 또는 토양미생물을 선별한다.

토양미생물 중에서 바실러스 미생물은 다양한 탄수화물 중합체를 분해할 수 있는 효소들은 다량 분비하며, 또한 바실러스 지놈시퀀싱을 통해서 바실러스 미생물(특히, *Bacillus subtilis* 또는 *B. licheniformis*)은 알긴산 단량체 전환물인 DEH를 대사할 수 있는 대사효소의 유전자군을 보유하고 있을 것으로 예측된다.

곧, 바실러스 미생물이 보유한 알긴산 단량체 대사이전자 후보군의 제거 또는 증폭을 통해서 각 유전자의 알긴산 대사 특성을 규명한다.



<바실러스 미생물이 보유한 알긴산 단량체 대사유전자 후보군의 염기서열 구조>

#### 다. 알긴산 단량체 대사특성의 규명

일반적인 미생물은 알긴산 단량체의 대사와 관련된 대사유전자를 보유하고 있지 않기 때문에, 알긴산 단량체를 단일탄소원으로 하는 제한배지를 이용하여 일반 미생물은 배양할 경우, 성장하지 않는다.

곧, 알긴산 단량체를 단일탄소원으로 첨가한 제한배지를 이용하여 알긴산 대사유전자가 도입된 재조합 미생물의 성장 특성을 규명한다.

대사유전자의 발현을 정량화하기 위해서, 알긴산 대사유전자인 *Al-R*, *kdgK*, *kdgA*가 도입된 형질전환 미생물에서 각 유전자의 발현량 증가를 RT-PCR 등을 이용하여 확인한다.

다양한 발효조건(산도, 온도, 첨가물, 염류)의 결정을 통해서 재조합 미생물의 알긴산 단량체 대사 특성을 규명한다.



## 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.

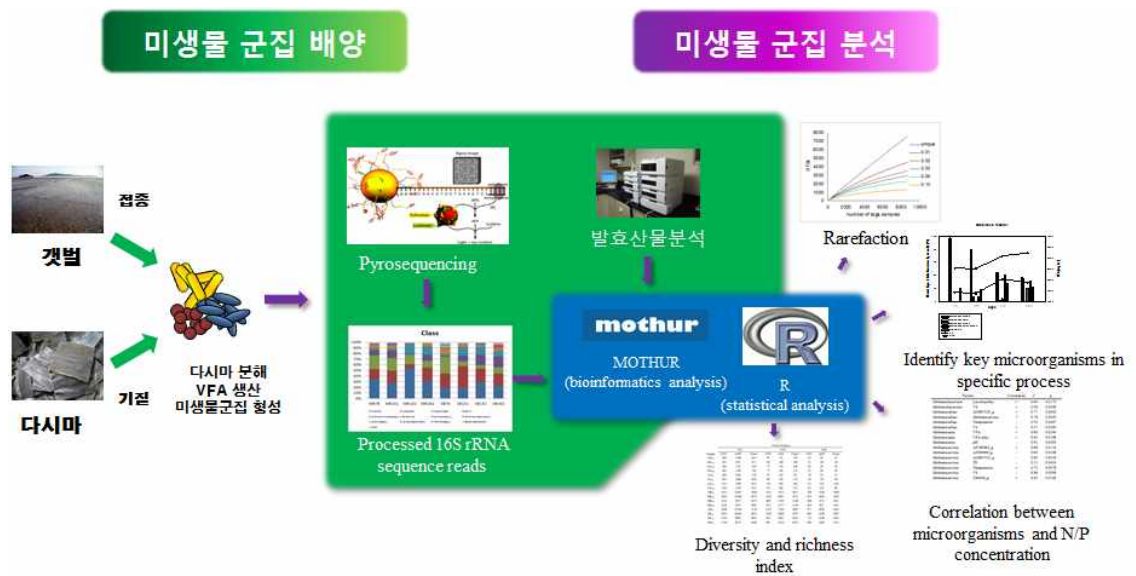
## 2. 연구 방법

### 가. 실험장치 및 재료

본 연구에서는 갈조류인 다시마를 건조 분쇄하여 해조류 시료로 사용하였으며, 갯벌 시료를 접종하였다. 유기산 생산 실험을 위해 멸균기와 배양기를 사용하였으며, 실험 결과 분석을 위해 HPLC, GC-FID를 이용하여 분석하였다.

### 나. 실험 절차

- 분말화된 다시마를 121℃에서 15분 동안 살균
- 살균된 해조류를 이용하여 부티르산 발효
- 분석장비를 이용한 발효산물 측정
- 형성된 미생물 균집에서 유전체 획득
- 생물정보학을 통한 미생물 균집구조 분석



[그림 5-1-1] 연구의 흐름

(1) pH 및 해조류에 따른 유기산 생산 실험

실험에 사용한 다시마 시료는 수확 후 1차 자연 건조 하였으며, 60 °C 이하의 열풍 건조기를 이용하여 2차 건조 후 분쇄기를 통해 분쇄 후 분말 다시마를 실험에 이용하였다. 분말 다시마 2 g을 mineral medium 50 ml 배지에 첨가한 후 아르곤 가스를 이용하여 배지를 혐기상태로 제조하였다. 이 때 사용한 mineral medium의 조성은 아래 [표 5-1-1]에 나타내었다. 혐기 상태의 다시마 배지는 121 °C에서 15분 동안 멸균한 후 갯벌 시료를 접종하였으며, 접종한 갯벌 시료는 강화도 동막의 갯벌 시료로 2 ml을 접종하여 실험을 진행하였다. Serum bottle을 이용하여 30 °C에서 혐기적으로 배양하였으며, 24시간 간격으로 7일 간 바이오 가스 생산량, VFA, solvent 생산 및 pH 변화를 측정하였다.

[표 5-1-1] Mineral medium 조성

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

유전체 핵산은 미생물 균집체에서 유전체 추출 키트를 이용하여 매일 추출되었으며 이 중 1-4일에 얻어진 유전체 핵산은 16S rRNA gene 유전자 증폭을 위한 주형으로 활용되었다. 16S rRNA 유전자 증폭은 barcode를 포함한 primer를 사용하여 이루어 졌으며 증폭된 유전자는 pyrosequencing을 통하여 염기서열을 확보하였다. 얻어진 염기서열은 생물정보학적인 처리를 거쳐 분석에 사용될 염기서열을 확보하였으며 이 염기서열은 Eztaxon-e database를 기반으로하여 분류학적인 위치가 결정되었다. diversity index등의 분석은 균집 분석용 소프트웨어 MOTHUR를 이용하여 계산되었다.

### 3. 연구수행 결과

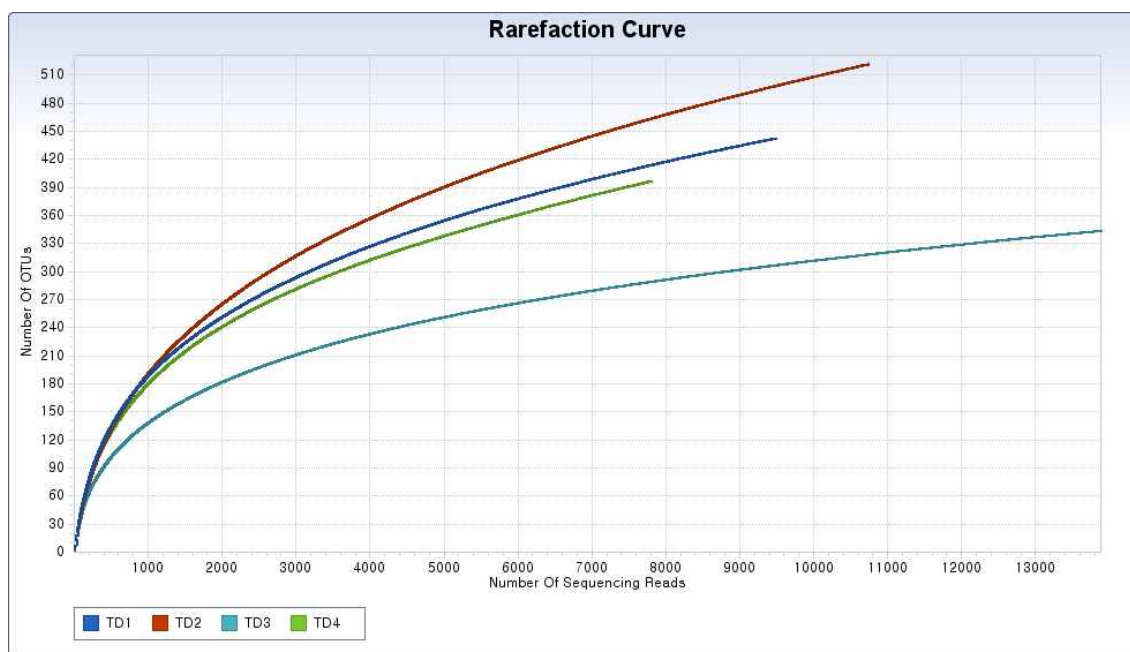
미생물 균집체는 초기 1-2일의 유기산 및 에탄올의 생산량은 높지 않았으나 3일째부터 생산량이 증가하기 시작하였으며 특히 부티르산이 크게 증가하였다. 4일째에는 아세트산이 크게 증가하였으나 바이오가스의 생산은 상대적으로 줄었으며 5일째부터는 바이오가스의 생산이 중단되었다. 한편 아세트산은 5일이후부터 점진적

으로 감소하는 양상을 보였으나 부티르산의 경우 점진적으로 증가하는 양상을 나타내었다.

[표 5-1-2] 미생물 군집체의 생산물

|                       | 1일   | 2일   | 3일   | 4일   | 5일   | 6일   | 7일   |
|-----------------------|------|------|------|------|------|------|------|
| Gas<br>(ml/50ml)      | 55   | 105  | 182  | 206  | 220  | 224  | 224  |
| pH                    | 5.59 | 5.1  | 4.8  | 4.88 | 4.87 | 4.91 | 4.83 |
| Ethanol<br>(g/l)      | 0.93 | 0.93 | 1.34 | 1.51 | 1.72 | 1.59 | 1.83 |
| Acetic acid<br>(g/l)  | 0.96 | 0.80 | 1.68 | 3.12 | 2.83 | 2.41 | 2.52 |
| Butyric acid<br>(g/l) | 0.21 | 0.27 | 1.39 | 2.07 | 3.02 | 3.26 | 4.14 |

1-4일의 4개 샘플에서 총 43,976개의 barcode에 의해 분류된 염기서열을 얻었으며 이중 primer가 일치하지 않는 것 828개, 비 16S rRNA 유전자인 것 42개, 키메라 1271개를 제외하여 총 41835개의 염기서열이 분석에 활용되었다.



[그림 5-1-2] 얻어진 염기서열의 rarefaction curve

[표 5-1-3] Pyrosequencing을 통해 얻어진 미생물 군집체의 16S rRNA 유전자 염기서열 정보

|            | 1일    | 2일    | 3일    | 4일    |
|------------|-------|-------|-------|-------|
| 바코드 분류     | 9819  | 11686 | 14440 | 8031  |
| Primer 불일치 | 169   | 257   | 306   | 96    |
| 비 16S rRNA | 0     | 16    | 26    | 0     |
| 키메라        | 175   | 697   | 242   | 157   |
| 최종         | 9475  | 10716 | 13866 | 7778  |
| 평균길이 (bp)  | 456.3 | 454.9 | 453.5 | 454.3 |

[표 5-1-4] 유전적 거리에 따른 미생물 군집구조의 다양성 지표

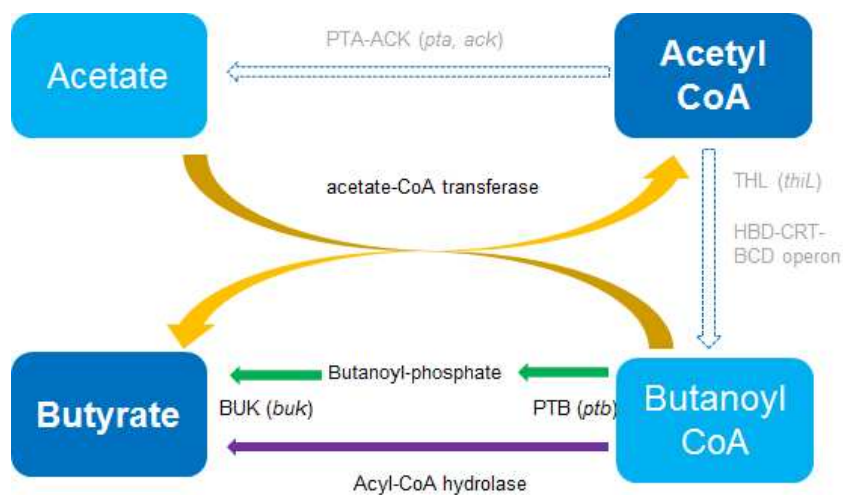
|    | 0.01             |                  |        |         |         |
|----|------------------|------------------|--------|---------|---------|
|    | OTU <sup>1</sup> | ACE <sup>2</sup> | Chao1  | Shannon | Simpson |
| 1일 | 2649             | 22561            | 11222  | 5.5973  | 0.0444  |
| 2일 | 2533             | 22750            | 11241  | 5.7046  | 0.0279  |
| 3일 | 1936             | 21396            | 9170   | 4.6179  | 0.1143  |
| 4일 | 2670             | 28638            | 11928  | 6.0068  | 0.0222  |
|    | 0.03             |                  |        |         |         |
|    | OTU              | ACE              | Chao1  | Shannon | Simpson |
| 1일 | 656              | 3041             | 1608.9 | 2.749   | 0.2336  |
| 2일 | 729              | 3889.2           | 2168   | 3.3047  | 0.1322  |
| 3일 | 477              | 2638.8           | 1476.9 | 2.0922  | 0.3074  |
| 4일 | 838              | 4407.6           | 2326.9 | 3.7653  | 0.0765  |
|    | 0.06             |                  |        |         |         |
|    | OTU              | ACE              | Chao1  | Shannon | Simpson |
| 1일 | 201              | 609.67           | 423    | 1.4754  | 0.3912  |
| 2일 | 276              | 802.6            | 590    | 1.9694  | 0.2972  |
| 3일 | 159              | 698.62           | 480.18 | 0.6365  | 0.8263  |
| 4일 | 296              | 796.11           | 562.14 | 2.1115  | 0.2813  |

1-4일의 4개 샘플에서 총 43,976개의 barcode에 의해 분류된 염기서열을 얻었으며 이중 primer가 일치하지 않는 것 828개, 비 16S rRNA 유전자인 것 42개, 키메라 1271개를 제외하여 총 41835개의 염기서열이 분석에 활용되었다. 분석에 사용된 염기서열의 평균 길이는 450bp 이상이 되었다. rarefaction 분석에 의하면 다시마 이용, 부티르산 생산 미생물 군집체의 군집구조는 상대적으로 단순한 편이며 분석하기에 충분한 염기서열 숫자를 확보했음을 확인할 수 있다. 미생물 군집의 다양

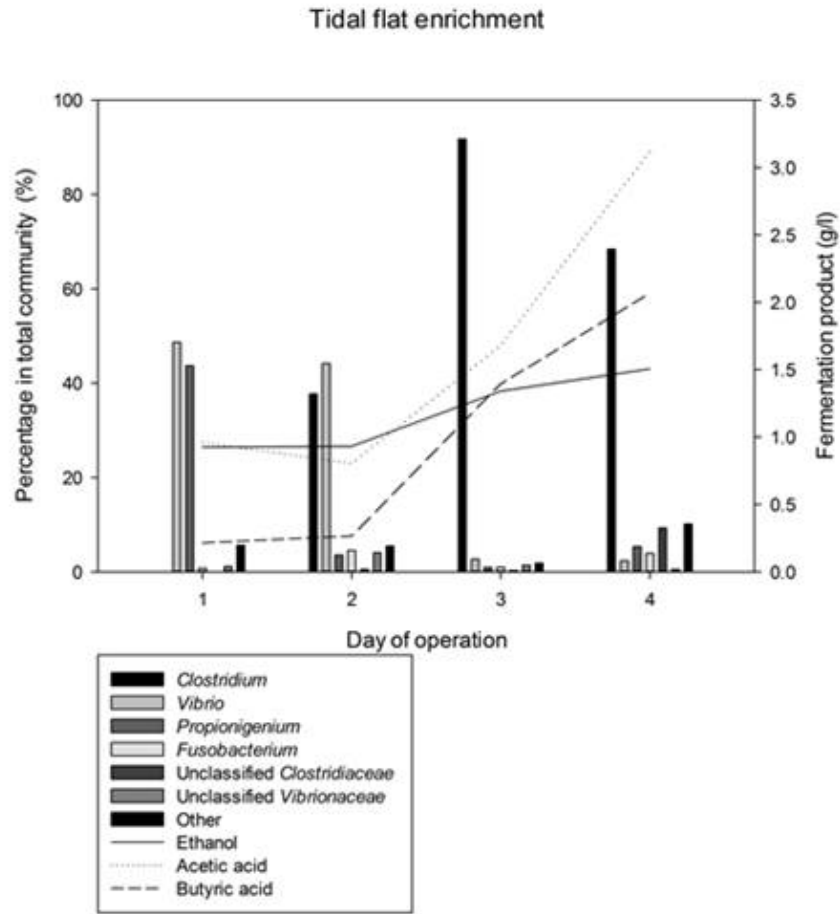
성 지표는 7778개로 표준화한 샘플에서 계산되었으며 다양성이 높지 않음을 나타내고 있다. 특히 3일 째에는 대부분의 균주가 *Clostridium*으로 다양성이 제일 낮았다.

[표 5-1-5] 미생물 군집체내 주요 분류군 및 각 분류군의 분포

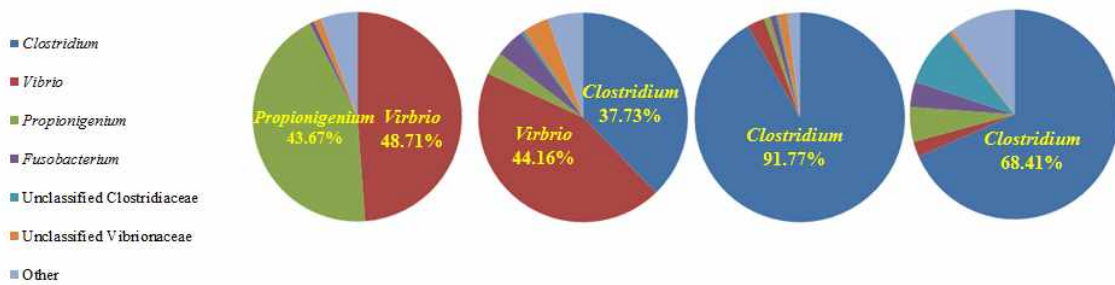
| Taxonomic rank | Name                | 1일 (%) | 2일 (%) | 3일 (%) | 4일 (%) |
|----------------|---------------------|--------|--------|--------|--------|
| Phylum         | Firmicutes          | 0.37   | 39.73  | 92.69  | 81.38  |
| Class          | Clostridia          | 0.37   | 39.73  | 92.69  | 81.23  |
| Order          | Clostridiales       | 0.37   | 39.54  | 92.64  | 80.29  |
| Family         | Clostridiaceae      | 0.12   | 38.30  | 92.13  | 78.52  |
| Genus          | Clostridium         | 0.09   | 37.73  | 91.77  | 68.41  |
| Genus          | Clostridiaceae_uc   | 0.01   | 0.51   | 0.31   | 9.31   |
| Phylum         | Proteobacteria      | 52.98  | 50.15  | 4.90   | 3.77   |
| Class          | Gammaproteobacteria | 52.11  | 49.70  | 4.72   | 3.29   |
| Order          | Vibrionales         | 51.82  | 48.68  | 4.44   | 2.96   |
| Family         | Vibrionaceae        | 51.59  | 48.30  | 4.14   | 2.88   |
| Genus          | Vibrio              | 48.71  | 44.16  | 2.70   | 2.37   |
| Genus          | Vibrionaceae_uc     | 1.14   | 4.08   | 1.44   | 0.51   |
| Phylum         | Fusobacteria        | 46.35  | 9.17   | 2.32   | 10.84  |
| Class          | Fusobacteria_c      | 46.35  | 9.16   | 2.32   | 10.84  |
| Order          | Fusobacteriales     | 46.30  | 9.00   | 2.30   | 10.61  |
| Family         | Ilyobacter_f        | 43.97  | 3.65   | 0.97   | 5.79   |
| Genus          | Propionigenium      | 43.67  | 3.54   | 0.92   | 5.36   |
| Family         | Fusobacteriaceae    | 0.92   | 4.97   | 1.27   | 4.51   |
| Genus          | Fusobacterium       | 0.74   | 4.52   | 0.97   | 3.90   |



[그림 5-1-3] *Clostridium*의 VFA 생산 경로



[그림 5-1-4] 미생물 군집체내 주요 분류군 과 생산물의 상관관계



[그림 5-1-5] 미생물 군집체내 주요 분류군의 pie-chart

미생물 유전체내의 미생물 군집은 매우 급격하게 변하였다. 1일에는 *Vibrio* 와 *Propionigenium*이 우점종이었다. *Vibrio*는 상당수의 균주가 해양에서 유래하였으며 또한 많은 균주가 해조류의 주성분중 하나인 alginate 분해 효소를 가진 것으로

알려져 있다. 따라서 *Vibrio*의 초기 우점은 다른 탄소원이 없는 상황에서 다시마를 효율적으로 분해할 수 있는 특성에 의한 것으로 보인다. *Propionigenium*의 경우  $\text{Na}^+$  이온에서도 에너지를 얻을 수 있는 것으로 알려져 있는데 이는 초기에는 다시마 이외에 에너지원 및 탄소원이 없기 때문에 이에 적응할 수 있는 이 초기에 우점종이 될 수 있었던 것으로 보인다. 2일째에는 *Propionigenium*이 크게 감소하고 대신에 *Clostridium*이 크게 증가한다. 이 경우 여전히 우점종을 차지하고 있는데 1일째와 마찬가지로 다시마 분해를 하는 역할 일 것으로 추정된다. 한편 *Clostridium*의 경우 주요한 부티르산 생산 균주로 알려져 있는데 일반적으로 해조류 분해효소가 없는 것으로 알려져 있고 따라서 순수배양으로 해조류를 발효할 경우 자체적으로 해조류를 분해할 수 없어서 해조류를 분해하는 전처리를 거친후에 발효를 시작하게 된다. 따라서 2일째의 *Clostridium*의 우점은 *Vibrio*가 분해한 다시마산물을 이용하여 성장한 것으로 추정된다. 3일째의 경우 *Clostridium*이 전체 미생물의 90% 이상을 차지하며 *Vibrio*의 비중은 크게 감소한다. 에 의해 충분히 해조류가 분해되어 이 크게 증가할 수 있었던 것으로 보이며 부티르산 및 아세트산, 바이오가스도 크게 증가하였다. 4일째의 경우는 *Clostridium*이 여전히 우점종이지만 비중이 70%이하로 줄었으며 바이오가스 생산량 역시 크게 감소하였다. 부티르산 생산은 크게 늘었지만 다양성이 증가한 것을 확인할 수 있다. 1-2일째에 *Vibrio*가 분해한 다시마 분해 산물이 많이 소모된 것으로 추정되며 낮은 바이오 가스 생산을 통해 군집내에서 성장 자체는 크게 증가하지 않은 것으로 추정된다. 부티르산은 군집내 우점종인 *Clostridium*에 의해 생산된 것으로 추정된다. 5일째 이후에는 바이오가스 생산이 없고 아세트산이 점진적으로 감소하며 부티르산이 늘어나는데 이것은 미생물 군집이 더 이상 성장하지 않고 이미 생성된 아세트산으로부터 부티르산을 생성하는 것으로 추정된다.

#### 4. 요약 및 제언

갯벌시료를 접종액으로 사용하여 다시마 이용, 부티르산 생산하는 미생물 군집을 확보하였으며 이 미생물 군집의 군집구조를 분석한 결과, 1-2일에 *Vibrio*가 다시마를 분해하여 우점종으로 존재하며 이후 2-4일에 *Clostridium*이 다시마 분해산물을 이용하여 발효산물을 생산하는 것으로 추정된다.

*Propionigenium*은  $\text{Na}^+$  이온만으로 ATP 에너지를 생산할 수 있는 것으로 알려져 있으며 따라서 유기물이 부족한 상황에서도 에너지를 생산할 수 있음. 이러한 특성으로 인해 사용할 수 없는 유기물이 적었던 1일에 우점했던 것으로 추정되며 *Clostridium*은 butyric acid를 생산하는 주요 균주이나 문헌을 통한 실험 및 유전체



(genome) 분석 결과 butyric acid를 생산하는 중 alginate 분해 유전자를 가진 것은 없는 것으로 확인되었다.

따라서 *Vibrio*는 초기에 다시마 분해 균주로 작용하고 이후에 이를 통해 얻어진 분해 산물을 통해 *Clostridium*이 butyric acid를 생산하는 것으로 추정된다.

##### 5. 향후계획

*Clostridium*과 *Vibrio*에 대한 추가적인 균집분석이 진행되어야 하며 미생물 균집구조 분석을 통해 얻어진 정보를 바탕으로 고효율 다시마 이용 부티르산 생산 공생배양체를 개발할 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[1, 2].

#### 나. 연구 내용

##### (1) Cell growth를 높이기 위한 배지 환경 실험

- VFA에 영향을 주는 질소원 및 기타 원소 조사
- 다시마의 C/N ratio에 따른 VFA 생산 실험

##### (2) 해조류를 이용한 VFA생산 다단계 생물 반응기 설계

- 단순 MSC-HCDC(다단계 고농도 생물반응기)를 이용한 VFA 생산 실험
- 다단계 생물 반응기에 맞는 배지 환경 조사
- 다단계 생물 반응기 운전 및 최적화

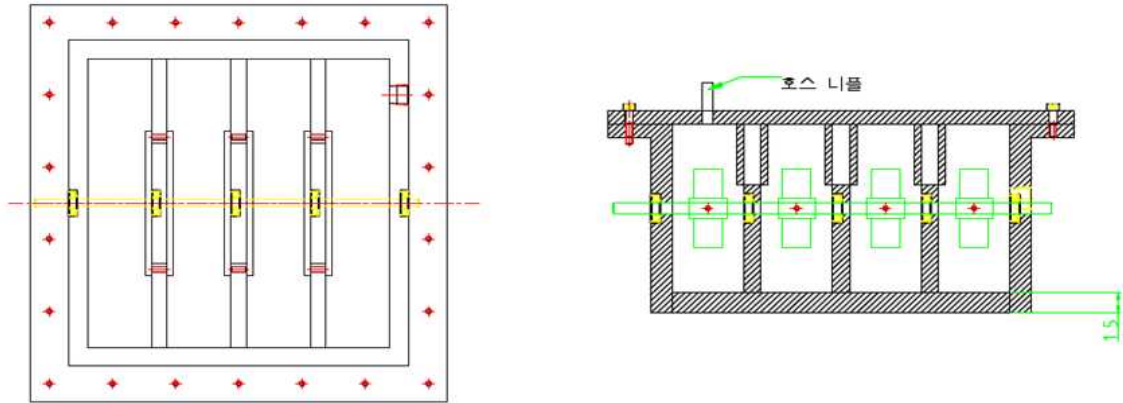
### 2. 연구 방법

#### 가. 실험장치 및 재료

##### (1) 배지 성분

Bacto yeast extract, Ammonium Chloride, Trace element solution(HCl,  $\text{FeCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ ,  $\text{ZnCl}_2$ ,  $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ ,  $\text{H}_3\text{BO}_3$ ,  $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ ,  $\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ,  $\text{NiCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ ,  $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ ), Vitamin solution(Vitamin B12, 4-Amino benzoic acid, Nicotinic acid, Calcium pantothenate, Pyridoxin hydrochloride, Thiamine-HCl, B(+)-Biotin)

## (2) 실험장치



[그림 5-2-1] VFA 생산을 위한 4.8L 4단계 연속 반응기

### 나. 실험 절차

#### (1) 다시마 C/N Ratio 측정

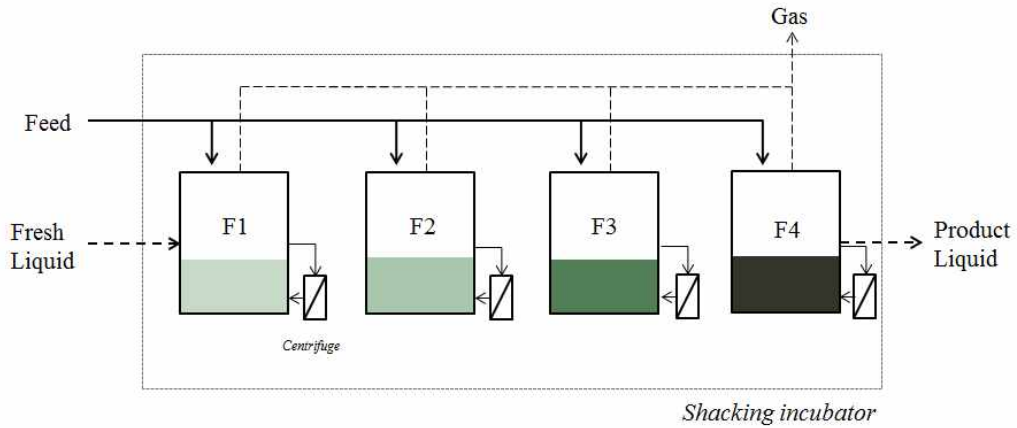
다시마 전사시료 분말을 원소 분석기 (모델명 EA 1108, NA 2000)를 이용하여 C, H, O, N을 측정하였다.

#### (2) 다시마 질소원 조사

다시마 이외에 질소원이 VFA 생산에 영향을 미치는 지에 대한 실험을 위해서 5가지의 황산암모늄( $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ), 질산암모늄( $\text{NH}_4\text{NO}_3$ ), 질산나트륨( $\text{NaNO}_3$ ), 질산칼륨( $\text{KNO}_3$ ), 염화암모늄( $\text{NH}_4\text{Cl}$ )을 1w/v% 넣어주었다. 그 외 다시마 35g/L와 버퍼 작용을 하는 1%(w/v)  $\text{NaHCO}_3$ , 초기에 mixed culture Inoculum(대전 하수 처리장)이 빠르게 자라도록 도와주는 10%(w/w) Bacto yeast extract을 이용하여 발효를 진행하였다.

#### (3) 단순 MSC-HCDC (다단계 고농도 생물반응기)를 이용한 VFA 생산 [2, 3]

그림 5-2-2와 같이 플라스크를 이용하여 4단계 연속 고농도 세포배양 반응기를 제작하여, 다시마 발효에 사용한다. 이 때 바이오매스인 다시마의 경우 1:1:1:1형태로 똑같은 조건으로 넣어주고, 발효를 통해 얻은 발효액이 다음 단계에 가기 전에 원심분리를 통해 세포와 발효되지 않은 다시마는 recycle한다. 그리고 VFA 생산에 적합한 환경을 만들어주기 위해 pH를 8로 적정하여 맞춰주며, Shaking incubator 안은  $40^\circ\text{C}$ , 150rpm으로 유지한다.



[그림 5-2-2] 4단계 연속 고동 세포배양 반응기에서의 VFA 생산 과정

#### Feeding 방법

- 1 일째 : 15g/L 다시마, 배지,  $\text{NaHCO}_3$
- 2~5 일째 : 5g/L 다시마 (5일마다 반복)

#### Dilution rate

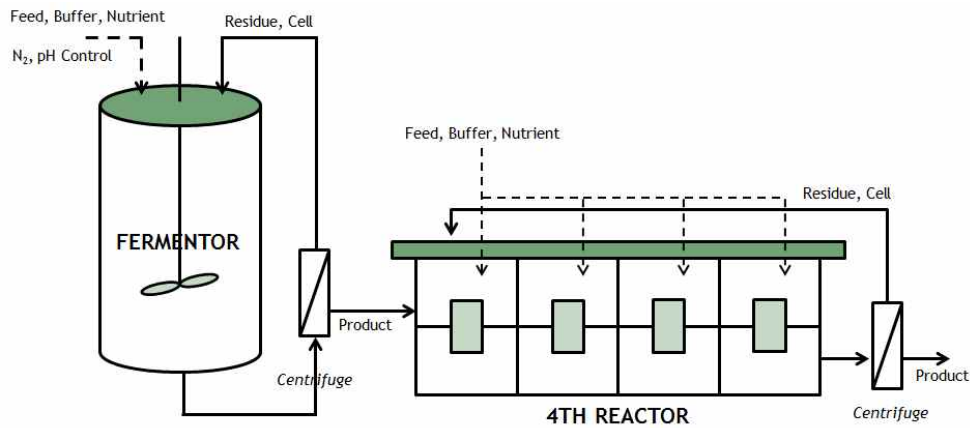
- 0.05, 0.1, 0.2/day

#### pH control (pH $\geq$ 8)

- 5N NaOH

#### (4) 4.8L 4단계 연속 반응기와 발효기를 통해 VFA생산

그림 5-2-3과 같이 발효기와 4.8L 4단계 연속 반응기를 이용하여 VFA 생산한다. 다시마의 점도 때문에 4.8L 4단계 연속 반응기에 분리막을 설치하지 않았으며, 발효기에서 고농도 세포 배양을 진행한다. 그리고 4 단계 연속 반응기에서 VFA 발효를 진행하고 세포와 발효되지 않은 다시마를 원심분리하여 다시 1단계로 recycle한다. 또한 4단계 연속 반응기에서 다시마는 1:1:1형태로 똑같은 조건으로 넣어주며, pH 조절이 힘들기 때문에 1%(w/v)  $\text{NaHCO}_3$ 로 pH를 올려준다. 반응기 안의 온도는 40°C, 혼합 속도는 150rpm으로 유지한다.



[그림 5-2-3] 4.8L 4단계 연속 반응기와 발효기를 통한 VFA 생산 과정

#### Feeding 방법

- 1 일째 : 15g/L 다시마, 배지,  $\text{NaHCO}_3$
- 2~5 일째 : 5g/L 다시마 (5일마다 반복),  $\text{NaHCO}_3$

#### Dilution rate

- 0.1/day

#### pH control (pH $\geq$ 8)

- 5N NaOH (발효기)

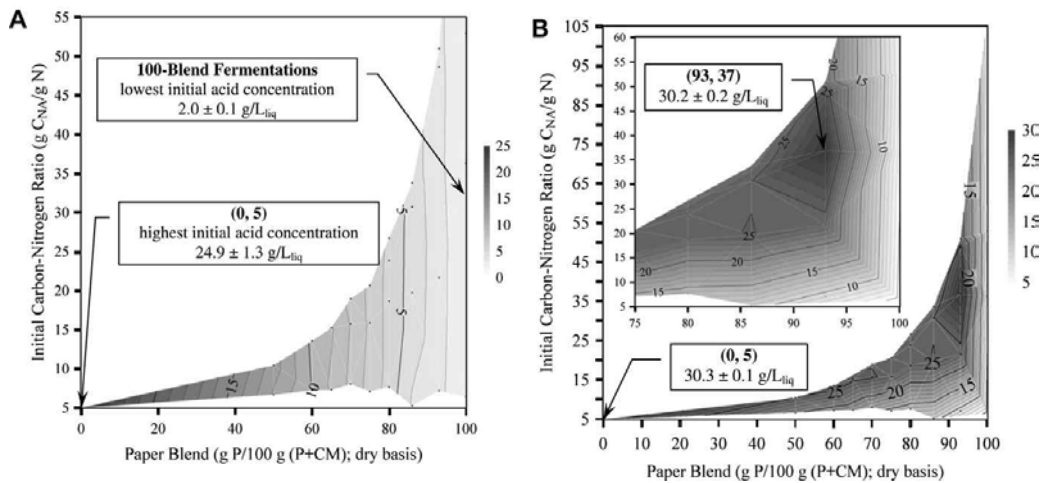
### 3. 연구수행 결과

#### 가. 다시마 C/N ratio

Texas A&M 대학의 Mark T. Holtzapple 교수가 Bioresource Technology에 낸 논문에 종이와 닭 배설물로 만든 거름을 섞어서 blend로 만들어 Feedstock으로 쓰기 위해서 성분 검사를 하였다. [4] 그 데이터를 이용하여 다양한 C/N ratio 수치의 Feedstock으로 발효를 진행하였다. 그 결과 C/N ratio가 30 근처에서 가장 높은 카르복실산 농도가 나타났다.

[표 5-2-1] 종이와 닭 배설물로 만든 거름의 성분[4]

|  | Office paper | Wet manure  |
|--|--------------|-------------|
| Moisture content, M<br>(gH <sub>2</sub> O/100g wet sample) | 4.4 ± 1.0    | 76.2 ± 3.0  |
| Ash content, I<br>(g ash/100g dry sample)                  | 16.9 ± 0.5   | 41.7 ± 0.5  |
| Carbon content, C<br>(gC/100g wet sample)                  | 37.16 ± 0.08 | 8.48 ± 0.03 |
| Nitrogen content, N<br>(gN/100g wet sample)                | 0.16 ± 0.04  | 1.31 ± 0.04 |
| Carbon-nitrogen ratio<br>(gC <sub>NA</sub> /gN)            | 249.3 ± 55.0 | 6.5 ± 0.2   |



[그림 5-2-4] C/N ratio에 따른 카르복실산 생산 결과 [4]

(A) 초기 카르복실산 농도 (B) 최종 카르복실산 농도

그래서 우리가 쓰는 Feedstock의 C/N ratio를 알고자 정확하지는 않지만 원석분석기를 통해서 다시마의 성분을 검사하였다.

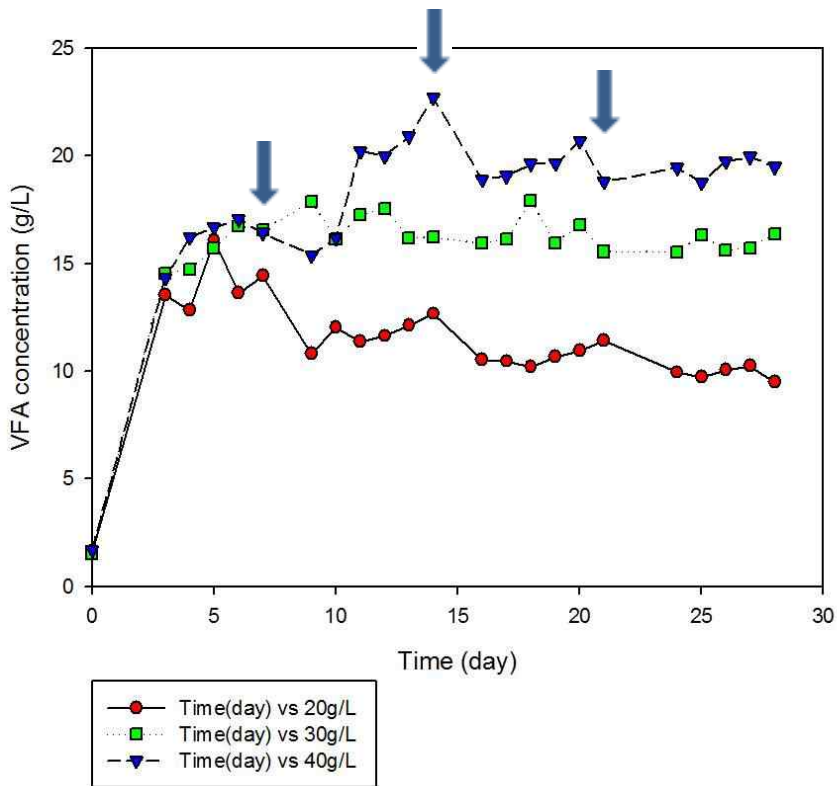
[표 5-2-2] 다시마의 원석 분석 결과

| Sample               | Nitrogen | Carbon  | Hydrogen | Oxygen  | Ash     |
|----------------------|----------|---------|----------|---------|---------|
| <i>S. japonica</i> 1 | 1.1539   | 30.7035 | 3.5727   | 34.9361 | 29.6338 |
| <i>S. japonica</i> 2 | 1.1837   | 29.9843 | 5.1892   | 40.9281 | 22.7147 |
| <i>S. japonica</i> 3 | 1.4135   | 31.7465 | 5.7276   | 39.9944 | 21.118  |
| Average              | 1.2504   | 30.8114 | 4.8298   | 38.6195 | 24.4888 |

실험결과, C/N ratio는 26근처로 계산되었다. 하지만 위 C/N ratio에 비해 약간 C의 양이 적은 것을 보아, 추가적으로 탄소가 많은 물질을 넣어 blend 형태로 실험을 해보는 것도 좋은 결과를 나타낼 것이라 판단된다.

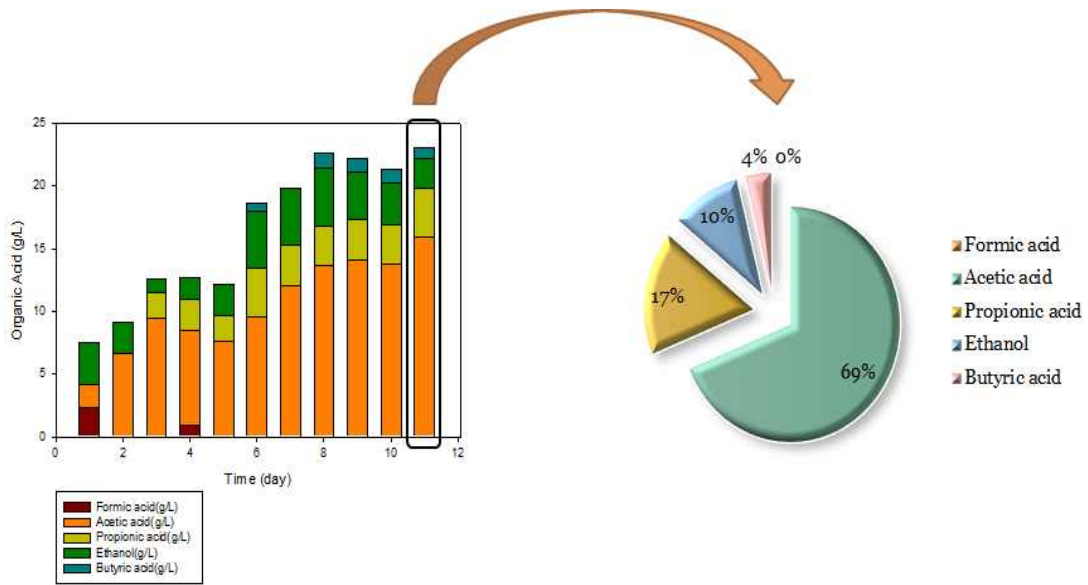
나. 질소원에 따른 VFA 생산 결과

원석 분석결과에서 보이는 다시마에 들어있는 질소만이 아닌 추가로 질소원을 첨가하여 실험을 해보았다. 처음 목표는 추가로 첨가한 질소원에 의해 미생물이 기존보다 빠르게 성장하는 것과 높은 VFA 생산을 이루는 것이다. 그러나 질소원을 넣었을 때 VFA 생산은 처음 목표와는 다른 결과를 나타냈다.



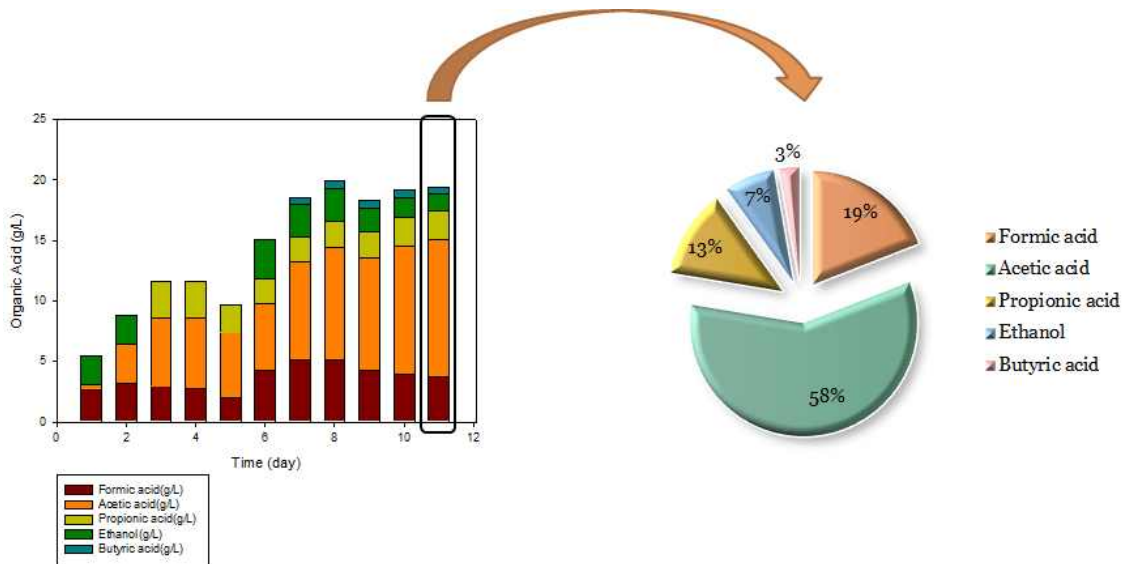
[그림 5-2-5] 2차년도 Fed-batch에서 생산된 VFA의 농도  
(빨) 20g/L, (초) 30g/L, (파) 40g/L

(1) 황산암모늄( $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ )



[그림 5-2-6] 질소원이 황산암모늄일 때 다시마 발효 결과

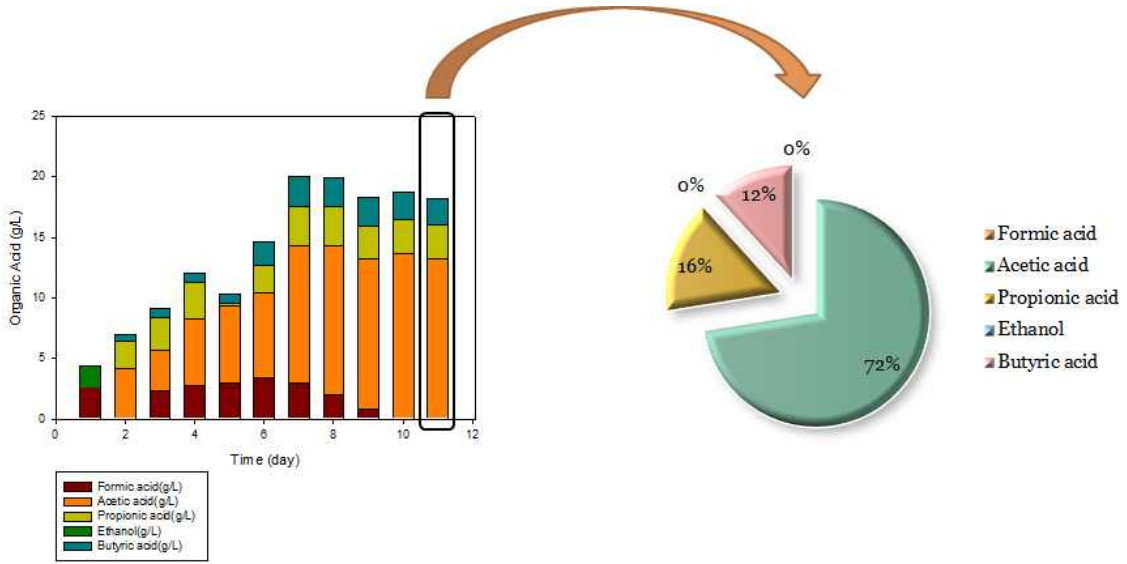
(2) 질산암모늄( $\text{NH}_4\text{NO}_3$ )



[그림 5-2-7] 질소원이 질산암모늄일 때 다시마 발효 결과

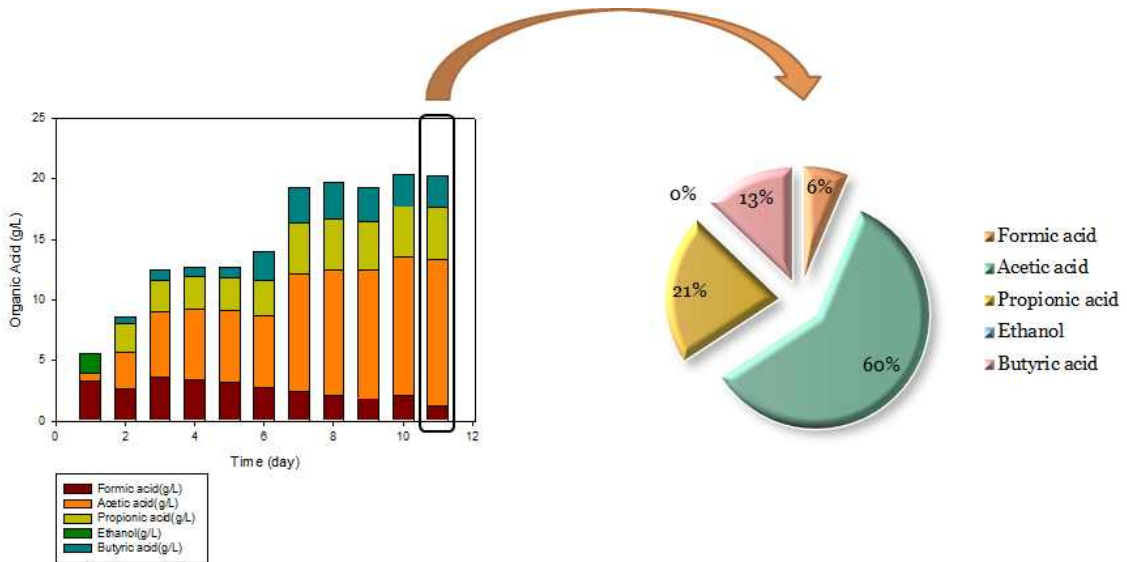


(3) 질산나트륨( $\text{NaNO}_3$ )



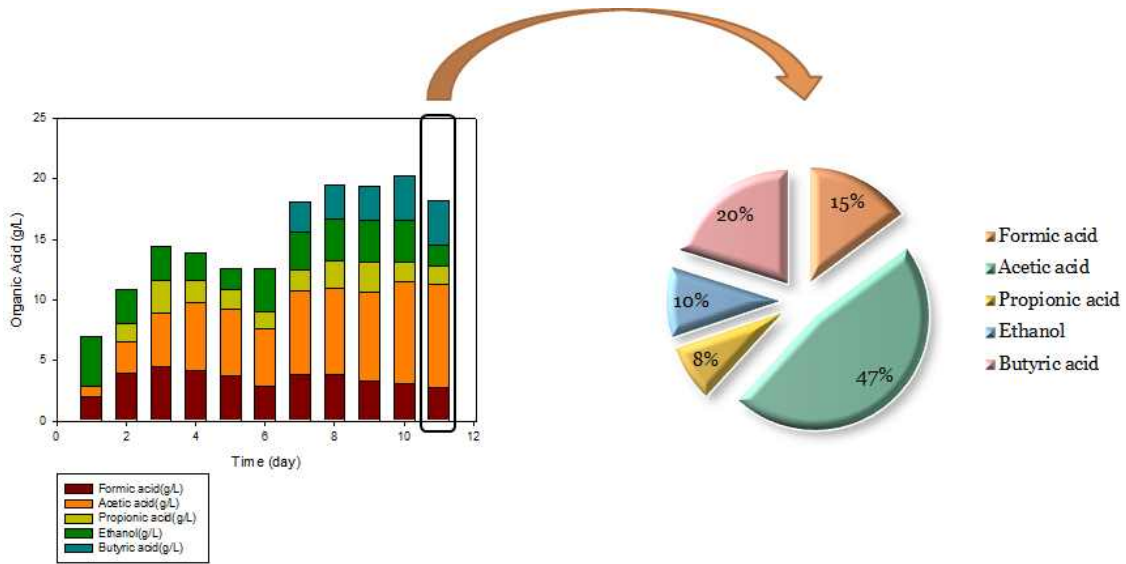
[그림 5-2-8] 질소원이 질산나트륨일 때 다시마 발효 결과

(4) 질산칼륨( $\text{KNO}_3$ )



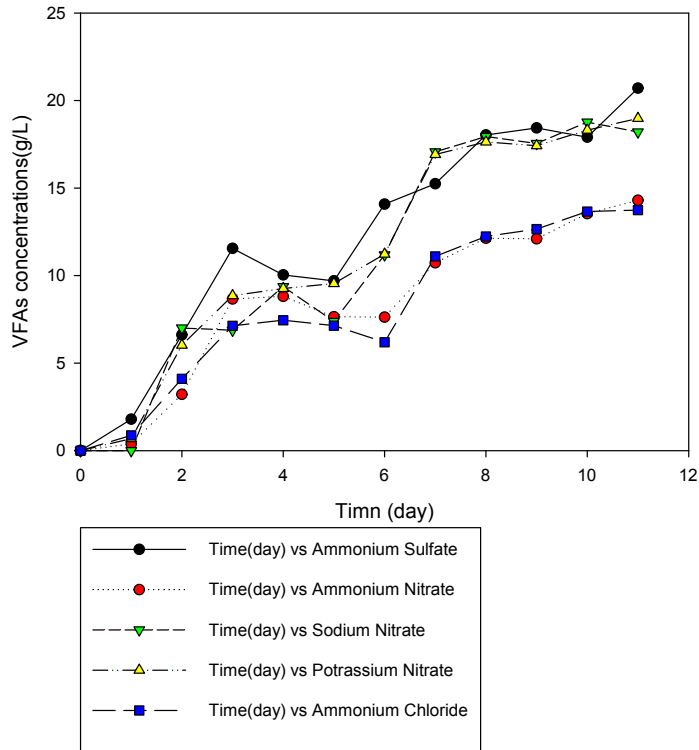
[그림 5-2-9] 질소원이 질산칼륨일 때 다시마 발효 결과

(5) 염화암모늄(NH<sub>4</sub>Cl)



[그림 5-2-10] 질소원이 염화암모늄일 때 다시마 발효 결과

질소원에 따른 VFA 생산을 위한 실험 결과를 보면, 질소원에 따라 VFA의 아세트산, 프로피온산, 부티르산 비율이 달라졌다. 또한 특정 질소원을 사용했을 때, 우리가 얻고자 하지 않은 부산물이 생산되었다. 우선 황산암모늄의 경우 가장 높은 20.70g/L 농도의 VFA를 생산하였지만, 에탄올이 일부 생산되었으며 비율이 기존의 6:1:3이 아닌 7.5:2.5:1로 아세트산, 프로피온산이 더 많이 생산되었다. 질산암모늄일 때는 농도도 낮지만 부산물인 포름산과 에탄올이 많이 생산되었다. 반면 질소원이 질산나트륨과 질산칼륨의 경우, 포름산은 나타나지 않았으며 18g/L 근처의 VFA 생산을 보였다. 마지막 염화암모늄의 경우는 부산물도 많이 나왔을 뿐만 아니라 VFA 생산 농도도 낮았다. 2차년도 Fed-batch 실험에서 30g/L, 40g/L의 다시마 경우, 각각 16.16g/L, 22.71g/L 나온 것에 비하면 VFA 생산 결과가 좋다고는 볼 수는 없지만 질소원에 따라 VFA의 비율과 부산물이 나오는 것이 관찰된 점은 기초 실험으로 좋은 결과라고 판단된다.

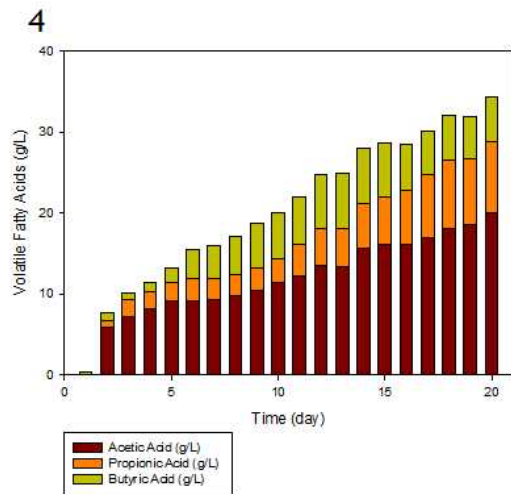
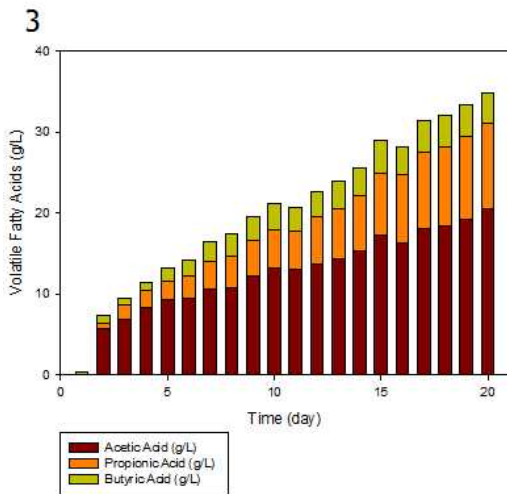
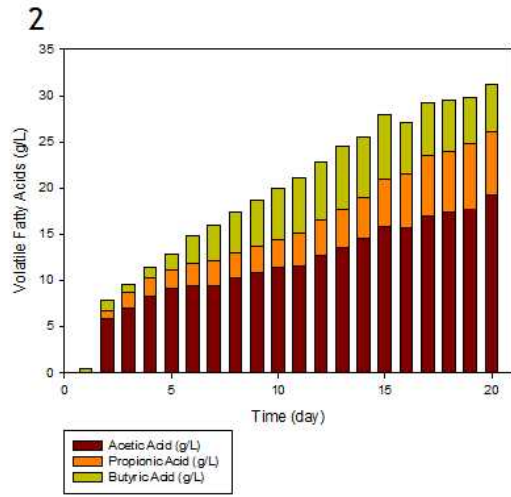
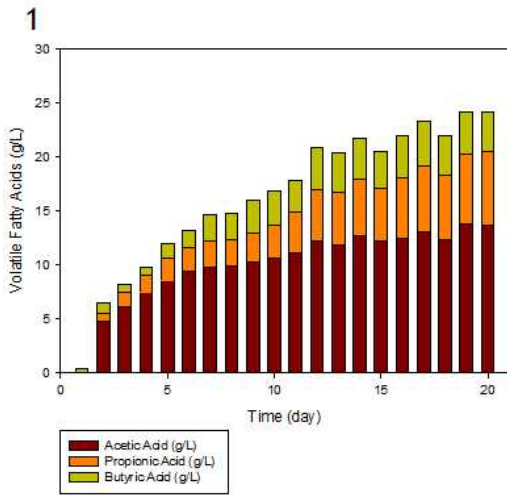


[그림 5-2-10] 질소원에 따른 VFA 생산 농도 결과

다. Dilution rate에 따른 단순 MSC-HCDC(다단계 고농도 생물반응기) 결과

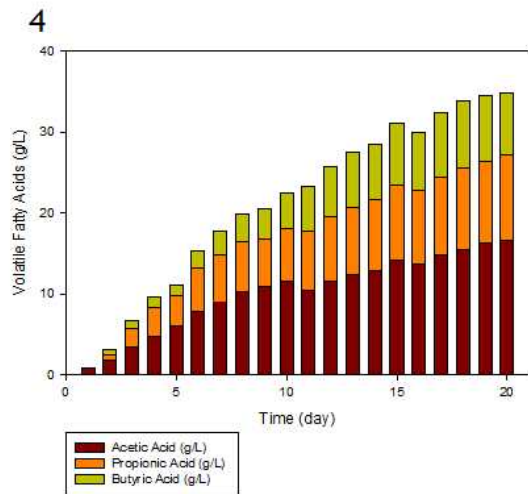
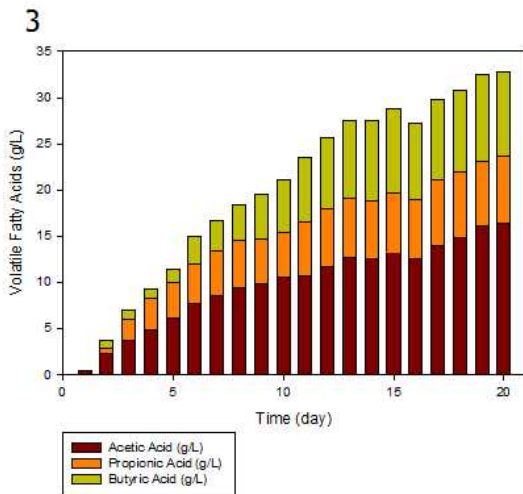
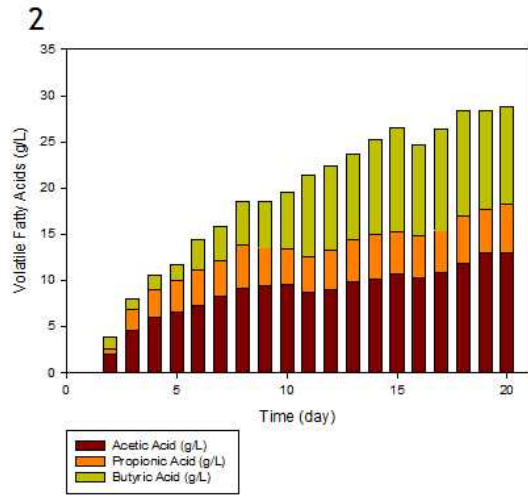
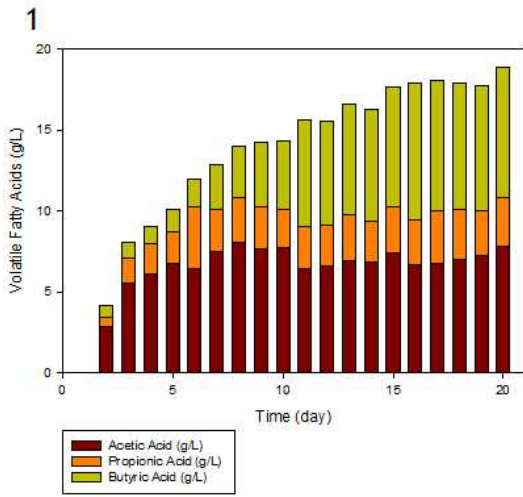
2차년도 플라스크를 이용한 단순 MSC-HCDC 방법으로 VFA 생산 농도가 1:1:1:1의 다시마 비율에서 높게 나왔기 때문에 이 비율에서 Dilution rate에 따른 VFA 생산 실험을 하였다. 그리고 Bacto yeast extract의 농도를 낮추기 위해서 추가적으로 Trace element나 Vitamin을 섞어 배지를 만들었다. 이를 통해 Bacto yeast extract의 첨가 비율을 10w/v%에서 1w/v%로 낮췄다. 그리고 발효는 3번 더 추가적으로 Feeding을 하여 20일 동안 발효하였다. [5]

(1) Dilution rate가 0.05/day일 때



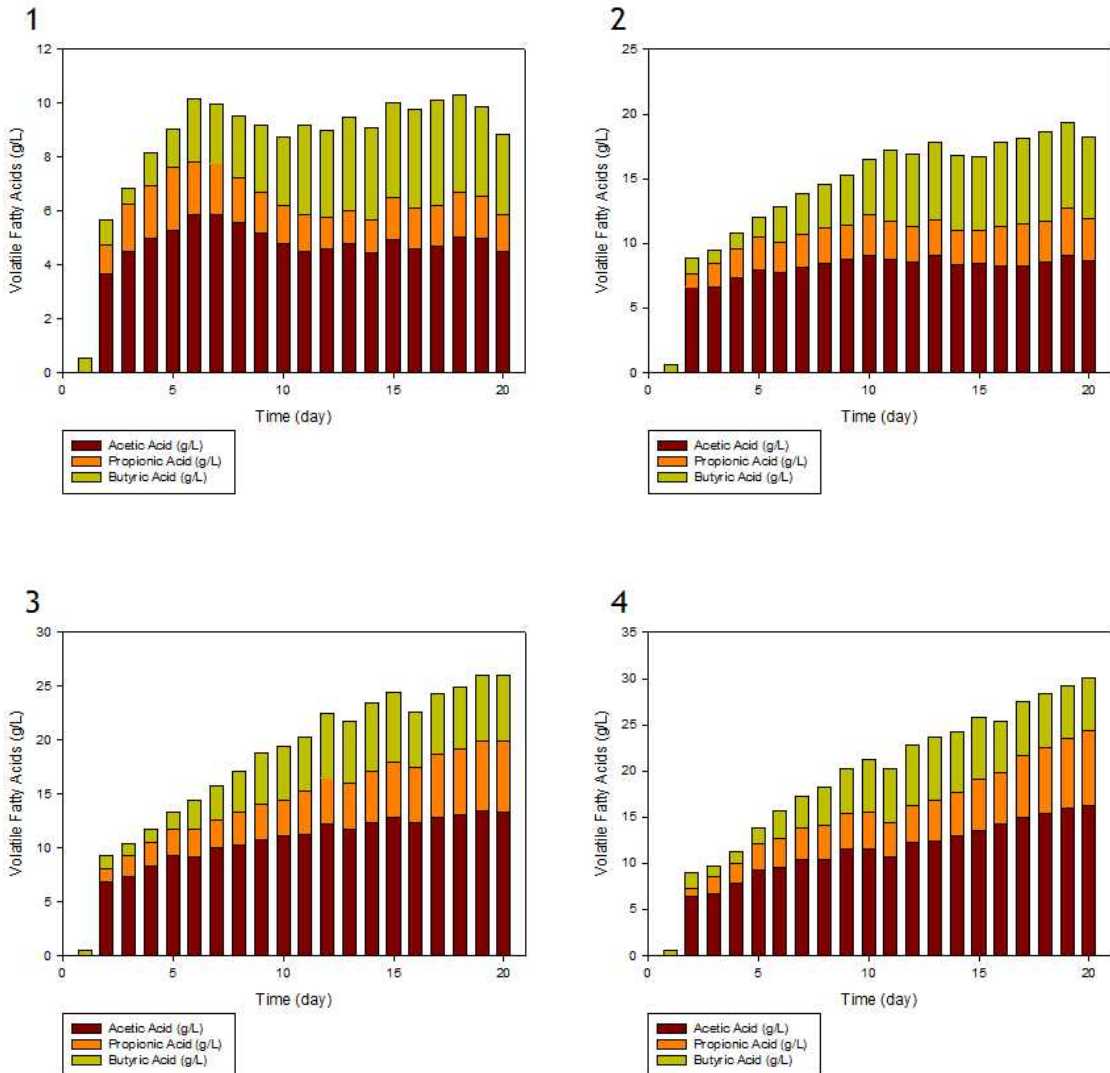
[그림 5-2-11] Dilution rate가 0.05/day일 때 VFA 생산 농도 결과  
(1 : 첫 번째 2: 두 번째, 3: 세 번째 4: 네 번째 반응기)

(2) Dilution rate가 0.1/day일 때



[그림 5-2-12] Dilution rate가 0.1/day일 때 VFA 생산 농도 결과  
(1 : 첫 번째 2: 두 번째, 3: 세 번째 4: 네 번째 반응기)

(3) Dilution rate가 0.2/day일 때



[그림 5-2-13] Dilution rate가 0.2/day일 때 VFA 생산 농도 결과  
(1 : 첫 번째 2: 두 번째, 3: 세 번째 4: 네 번째 반응기)

단순 MSC-HCDC로 진행하였을 때 Feedstock인 다시마를 첫 날 전부 넣어주는 것보다 5일에 걸쳐 나눠서 Feeding을 하니 처음에 농도가 높게 올라가고 나머지 4일 동안 조금씩 올라가는 것 대신 매일 꾸준히 VFA 생산되었다. 그리고 다시마가 물에 들어가면 부피가 늘어나는데 나눠서 넣는 것이 부피가 늘어나는 정도가 기존보다 적어서 단순 MSC-HCDC system을 진행하기 수월했다.

실험 결과를 보면, Dilution rate가 커질수록 단계마다의 농도차이가 커졌다. 0.05/day인 단순 MSC-HCDC에서는 세 번째와 네 번째의 차이가 거의 없었으며

오히려 20일 이후에 세 번째의 농도가 컸다. 그에 반해 0.2/day인 경우 단계마다의 차이가 꽤 컸으며 첫 번째 반응기에서 10g/L 정도의 낮은 VFA 농도를 유지했다. 그리고 20일 이후에 최종 생산 농도를 분석해보니 0.05/day에서 34.35g/L의 VFA가 생산되었고, 0.1/day와 0.2/day에서는 각각 34.83g/L의 VFA, 30.13g/L의 VFA가 생산되었다. 그러므로 최종 농도에 Dilution rate를 곱해서 얻는 생산성의 경우 0.2/day에서 6.03g/L/day로 압도적으로 높았다. 또한 생산된 VFA의 평균 비율은 5:3:2였다.

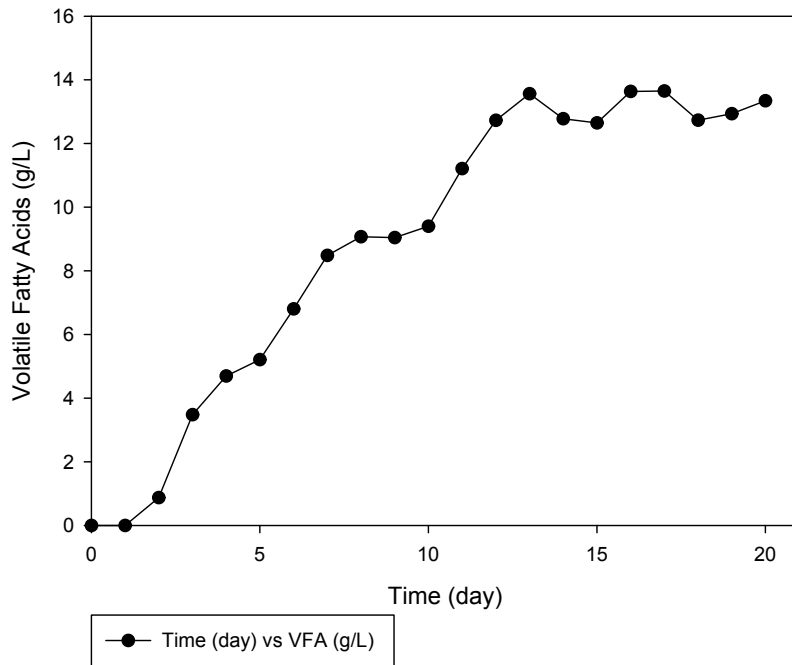
[표 5-2-3] 20일 이후 단순 MSC-HCDC system에서 VFA 생산 농도와 생산성

| Dilution rate(/d) | 1st   | 2nd   | 3rd   | 4th (g/L) | Productivity (g/L/d) |
|-------------------|-------|-------|-------|-----------|----------------------|
| 0.05              | 24.26 | 31.26 | 34.93 | 34.35     | 1.72                 |
| 0.1               | 18.91 | 28.75 | 32.74 | 34.83     | 3.48                 |
| 0.2               | 8.83  | 18.24 | 26.03 | 30.13     | 6.03                 |

라. 4단계 연속 반응기와 발효기를 통해 VFA생산

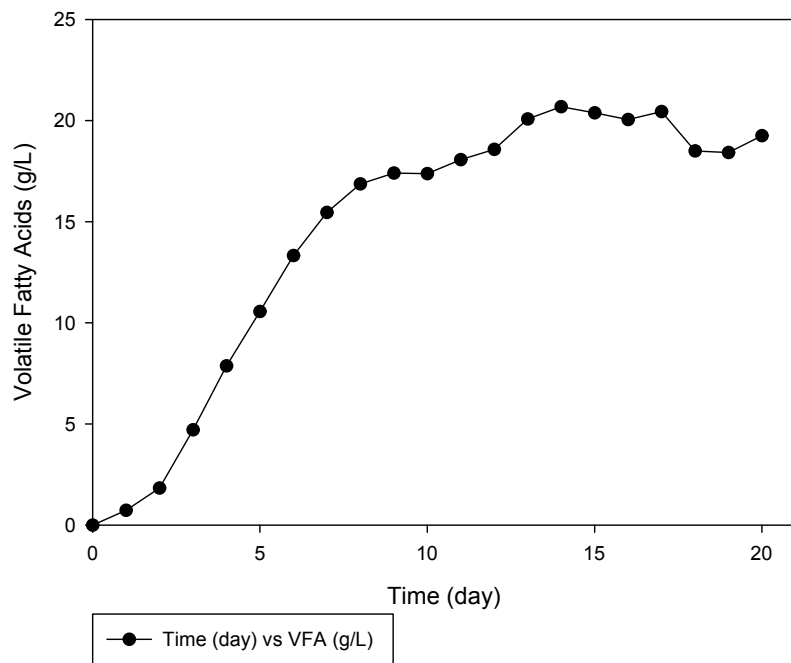
4.8L 크기의 4단계 연속 반응기만으로 발효를 진행하려 했으나 다시마의 부피가 물 안에 꽤 많이 증가하여 단계사이에 설치한 분리막을 통과하지 못했다. 그래서 미생물 recycle을 위한 분리막을 제거하고 분리막 대신 recycle을 하기 위해 발효기를 사용하였다. 그 결과 처음 발효기에 고농도 세포 배양을 위해 recycle을 진행하고 나머지 발효액을 4단계 연속 반응기로 넘겨 VFA를 생산하였다.

(1) 발효기에서 VFA 생산



[그림 5-2-14] 발효기에서 VFA 생산 농도

(2) 4단계 연속반응기에서 VFA 생산 (최종 VFA 생산)



[그림 5-2-15] 4단계 연속반응기에서 VFA 생산 농도



20일 동안 발효기와 4단계 연속 반응기를 같이 발효한 결과는 위 그래프와 같다. 발효기에서는 13.34g/L까지 올라왔으며, 4단계 연속반응기에서는 15일 전후로 20g/L까지 올라갔으나 최종 농도는 19.26g/L가 생산되었다. 하지만 20일 이후 Feeding을 하지 못했는데 플라스크로 진행한 단순 MSC-HCDC에 비해 분해되지 못한 다시마의 양이 늘어서 발효액의 점도가 너무 커져 혼합이 제대로 진행되지 못했다. 그로인해 VFA 생산 농도도 위 실험보다 상당히 낮았다. 이러한 문제점들이 발견되어 일단 단계마다의 Feeding 농도를 4:3:2:1와 같이 발효기에서 다시마의 양을 많이 넣어주고 4단계 연속 반응기에서는 조금 넣어주는 쪽으로 진행할 예정이다. 또한 Dilution rate도 0.1/day에서 높여서 진행해 볼 것이다.

#### 4. 요약 및 제언

(1) Texas A&M 대학의 Mark T. Holtzapple 교수가 종이와 닭 배설물로 만든 거름의 blend 형태로 C/N ratio를 조절하여 발효를 진행하였으며, C/N ratio가 30 근처에서 가장 높은 카르복실산 농도가 나타났다. 그리고 다시마를 원소 분석기를 이용하여 분석하였을 때 C/N ratio가 26 근처로 계산됐다.

(2) 질소원에 따른 VFA 생산을 위한 실험을 하였을 때, 질소원에 따라 VFA의 아세트산, 프로피온산, 부티르산 비율이 달라졌으며, 특정 질소원을 사용하면 VFA가 아닌 얻고자 하지 않은 부산물이 생산되었다. 게다가 생산 농도가 크게 증가하는 것은 아니었기 때문에 부산물이 필요하거나 혹은 특정 VFA 생산 비율이 필요할 때의 경우에만 유용한 데이터로 사용될 것이다.

(3) Dilution rate가 커질수록 단계마다의 농도차이가 커졌으며 Dilution이 낮은 경우 오히려 마지막 반응기보다 그 전 반응기의 VFA 농도가 커졌다. 그리고 최종 생산 농도는 0.05/day에서 34.35g/L이며 0.1/day와 0.2/day에서는 각각 34.83g/L의 VFA, 30.13g/L 이었다. 그러므로 최종 농도가 30g/L로 비슷한 상황에서 Dilution rate에 최종 농도를 곱해서 얻는 생산성의 경우 0.2/day에서 6.03g/L/day로 압도적으로 높았다.

(4) 발효기와 4단계 연속반응기를 같이 사용하였을 때, 발효기에서는 13.34g/L까지 생산되었으며, 4단계 연속반응기에서는 19.26g/L가 생산되었다. 하지만 20일 이후 분해되지 못한 다시마의 양이 점점 늘어서 발효액의 점도가 점점 커지는 현상이

나타났다. 이로 인해 혼합이 제대로 진행되지 못했다. 게다가 이러한 문제점들로 인해 VFA 생산 농도도 위 실험보다 상당히 낮았다. 따라서 시급한 Feeding 문제를 해결하고 나서 추가적으로 계속 발생할 수 있는 문제들을 발견하고 차례로 해결해 나가야 할 것이다. 따라서 발효기와 4단계 연속반응기에서 40일 이상 오랫동안 운전이 필요하다고 판단된다.

## 5. 향후계획

### (1) 발효기와 다단계 연속반응기 운전

- VFA 생산 농도 25g/L
- 다단계 반응기 scale-up
- 40일 이상 운전

### (2) 다단계 연속 반응기에서 문제점 발견 및 해결

- 문제점 및 해결방안 지적



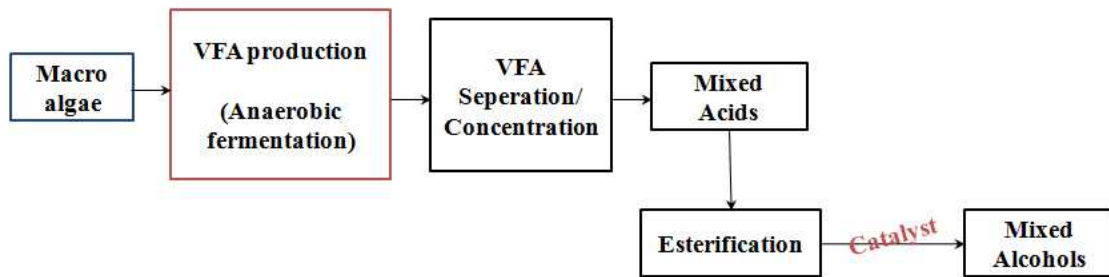
### 제 3 절 혐기성 소화공정 이용 VFA 생산기술 개발

#### 1. 연구 목적 및 내용

##### 가. 연구 목적

해조류는 제1세대인 전분계와 제2세대인 목질계 바이오매스를 대체할 수 있는 제3 세대 바이오매스 자원으로서 이를 효율적으로 바이오에너지화할 수 있는 기술의 개발이 중요하다.

본 연구를 통하여 개발하고자하는 VFA 플랫폼 기술은 그림에 나타낸바와 같이 해조류의 혐기성소화과정에서 메탄가스가 생성되기 전단계에서 생성되는 유기산(acetic, propionic, and butyric acid)를 회수하여 촉매를 이용한 수소화반응을 거쳐 혼합알코올을 제조하는 것이다.



[그림 5-3-1] VFA 플랫폼 공정도

또한 VFA 플랫폼 기술은 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.
- 혼합알코올은 순수 에탄올보다 연료 특성이 우수하다.
- 유기산발효(체류시간 2~3일)는 메탄발효(체류시간 15~25일)보다 반응속도가 5~6배 빠르므로 생산성이 높다.

VFA 플랫폼기술의 전체효율을 결정짓는 핵심요소기술은 첫 번째 단계인 해조류로부터의 유기산 생성기술로서 본 연구에서는 효율적인 유기산생성기술을 목표로 하고 있다.

구체적인 연구 목표는 다음과 같다.

- 해조류의 전처리를 통한 VFA 생산성 향상: (목표치) 30%이상 향상
- VFA 발효공정의 비용절감을 위한 축산폐수의 질소원으로서 활용 가능성 조사: 발효특성자료 확보

#### 나. 연구 내용

유기산 발효의 주요 비용은 순수배양 유지와 농도가 낮은 product의 정제에서 기인한다. 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(heat treatment), 화학적(희석산, 알칼리), 생물학적(alginate 분해 미생물)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.

유기산 발효의 또다른 비용은 발효배지 특히, 질소원의 비용이다. 본 연구에서는 질소원으로 축산폐수의 사용가능성을 조사하였다.

구체적인 연구수행내용은 다음과 같다.

- 해조류 (다시마, 미역, 파래)를 열처리, 알카리처리, 미생물처리 등을 수행하고 VFA 생산성을 측정하여 전처리 효과를 분석한다.
- 축산폐수의 성분을 분석하고 질소원 또는 보조 탄소원으로서의 가능성을 조사하였다.

## 2. 연구 방법

### 가. 실험장치 및 재료

#### (1) 기질(substrate)

본 실험에 사용한 다시마 (*Laminaria japonica*), 미역 (*Pachymeniopsis elliptica*), 실과래 (*Enteromorpha crinita*)는 각각 갈조류, 홍조류, 녹조류에 속하는 대표적인 해조류이다. 이러한 해조류 시료는 공기중에서 건조한 후 약 1 mm 크기 로분쇄된 상태로 완도수산협동조합에서 공급받았다.

#### (2) 배양미생물(sludge)

혐기성 배양에 사용된 슬러지는 성남시에 위치한 복정종말 하수처리장의 슬러지를 장기배양하여 사용하였다.

#### (3) 배지(medium)

기질은 공급받은 상태로 그대로 사용하였다. 탄소원 이외의 무기염으로 yeast extract가 사용되었으나 yeast extract가 혐기성 소화에 의해 분해되는 문제로 인하여 defined medium으로 대체되었다. Defined medium으로 사용된 배지의 조성은 배지용액 1 L당  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$  4.0 g,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  2.0 g,  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0.2 g, NaCl 0.02 g,  $\text{MoNa}_2\text{O}_4$  0.021 g,  $\text{CaCl}_2$  0.02 g,  $\text{MnSO}_4$  0.026 g,  $\text{FeCl}_2$  0.008 g 이었다.

#### (4) 메탄가스저해물질 (gas inhibition)

혐기성 소화발효의 최종산물인 메탄가스와 같은 바이오가스의 생성반응을 저해시키는 저해제로 것으로 iodoform을 10 ppm~100 ppm 농도로 사용하였다.

### 나. 실험 절차

#### (1) 혐기성발효 (anaerobic fermentation)

종균을 기질에 적응시키기 위하여 2 L 크기의 jar fermentor에 working volume은 1 L로 연속배양하였다. 매일 배양액의 10%를 새로운 기질을 포함한 배양액으로 갈아주었다. VFA 발효실험은 300 mL 혐기성 플플라스를 사용하여 35°C, 150 rpm조건으로 shaking incubator에서 수행하였다. 기질 농도와 종균액주입량은 각각 30 g/L 와 종균 10% 이었다. 메탄가스생성 저해제 iodoform는 30-70 ppm, pH 조절을 위한  $\text{CaCO}_3$  는 1 g/(g 기질) 을 주입하였다.



[그림 5-3-2] 실험에 이용된 2L Bioreactor 및 HPLC의 사진

## (2) 분석

발효액의 VFA 성분 (acetic, propionic, butyric acid) 분석은 HPLC (Shimadzu) 를사용하였다. 시료는 8000 rpm에서 10분간 원심분리하여 상등액을 채취한 후 0.45 um의 syringe filter를 사용하여 불순물을 제거한 후 HPLC에 주입하였다. Column은 Bio-Rad의 aminex HPX-87H를 사용하였고 검출기는 UV를 사용하였다. 이동상으로는 0.004 N H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>를 사용하였고, oven의 온도는 40℃, 이동상의 속도는 0.6 ml/min 이었다. 며 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.

발효도중 생성된 메탄가스는 gas chromatography-thermal conductivity detector (GC-TCD; Agilent)를 사용하여 분석하였다. Column은 HP PLOTQ, carrier gas는 helium을 사용하였다. Injector, column, detector의 온도는 각각 150℃, 35℃, 260℃ 이었다.

해조류시료의 C, H, N 함량을 원소분석기를 사용하여분석하였으며, 휘발성 성분은 TGA를 사용하여 분석하였다. 105-550℃ 에서 감소한 중량으로부터 휘발성성

분 함량을 계산하였고, 남아 있는 중량을 회분으로 간주하였다. 단백질 함량은 Kjeldahl 방법으로 측정하였다. 지방함량은 HCL을 사용하여 산분해하고 ether를 추출제로 사용하여 측정하였다. 탄수화물함량은 전체 건조시료무게에서 잔백질, 지방, 회분함량을 제외시켜 계산하였다.

### 3. 연구수행 결과

1,2차년도에 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. 1,2차년도의 연구결과를 요약하면, 다시마 1000 Kg 이용시 혐기성 소화를 통하여 획득할 수 있는 VFA의 총량은 232.5 Kg이며 여기에 수소첨가 반응수율 80%를 가정할 때 얻을 수 있는 혼합알코올의 양은 142.6 Kg 이다. 이 양은 부피로는 178.3 L에 해당되며 본 실험에 사용된 다시마의 VS 함량이 61% 인 점을 감안할 때 VS 1톤 당 혼합알코올 수율은 292L이다.

당해연도 연구에는 VFA의 생산성 향상을 위하여 전처리공정의 효과와 축산 폐수의 활용 가능성을 조사하였다.

#### 가. 해조류 시료의 성분분석 및 해조류 종류별 VFA 발효특성 분석

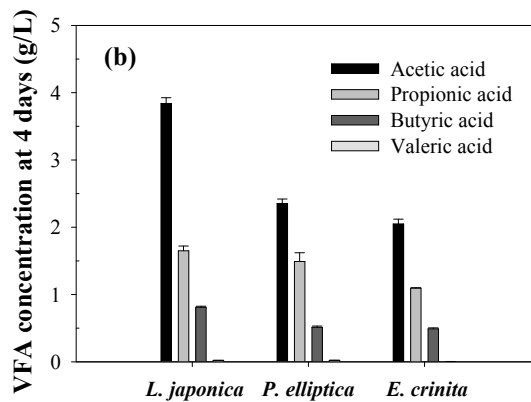
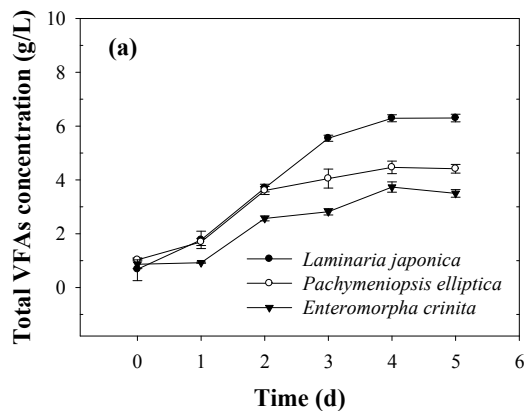
해조류시료로 갈조류, 홍조류, 녹조류에서 각각 다시마 (*Laminaria japonica*), 미역 (*Pachymeniopsis elliptica*), 실파래 (*Enteromorpha crinita*) 등 한 종류씩을 선정하여 사용하였다. 각 시료의 성분은 표 1과 같이 분석되었다.

각 해조류 시료를 사용하여 VFA 생산성을 조사한 결과 그림 2(a)와 같이 기질농도 30 g/L 일때, 다시마는 6.3 g/L, 미역은 4.4 g/L, 실파래는 3.6 g/L의 VFA를 생산하였다. 생성된 VFA의 주성분은 acetic acid, propionic acid, butyric acid이고, acetic acid가 가장 높은 함량을 나타내었다 (그림 2(b)). 해조류에 포함된 휘발성 고형분, 탄수화물, 단백질, 지방 등의 함량과 VFA 생산성과의 관계를 예측하였으나, 표 1과 그림 2의 자료로부터 상관관계를 찾을 수 없었다. 따라서, 해조류 탄수화물의 구조에 따라 VFA의 발효특성이 변하는 것으로 판단된다.



[표 5-3-1] Compositions of biomass sample (as-received)

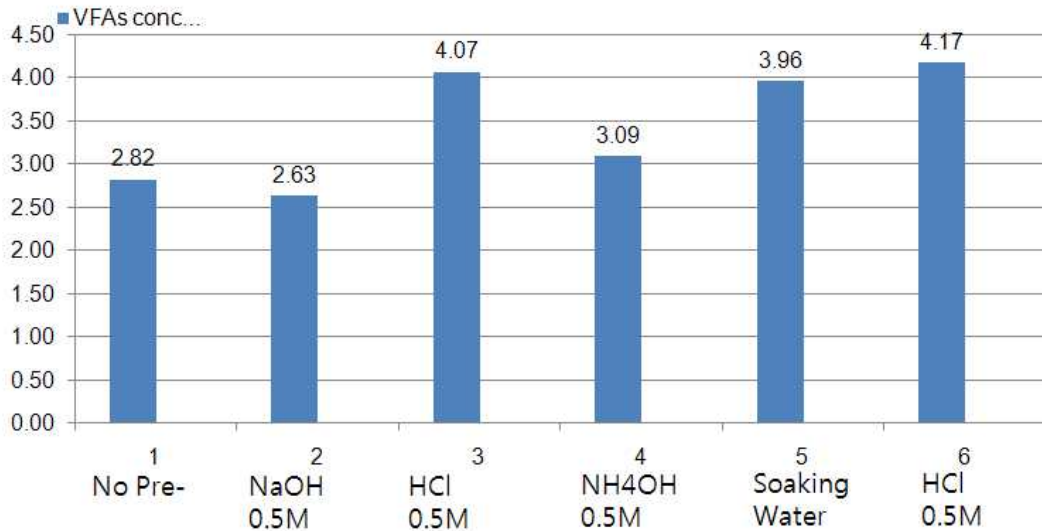
|                      | <i>L. japonica</i> | <i>P. elliptica</i> | <i>E. crinita</i> |
|----------------------|--------------------|---------------------|-------------------|
| TGA analysis         |                    |                     |                   |
| (wt.%)               |                    |                     |                   |
| Moisture             | 4.4                | 9.6                 | 4.3               |
| Volatile matter      | 59.9               | 66.9                | 60.0              |
| Ash                  | 35.7               | 23.5                | 35.7              |
| Elemental analysis   |                    |                     |                   |
| (wt.%, dry)          |                    |                     |                   |
| C                    | 27.76              | 31.95               | 29.16             |
| H                    | 4.16               | 4.49                | 4.15              |
| N                    | 1.74               | 2.06                | 2.85              |
| Composition analysis |                    |                     |                   |
| (wt.%)               |                    |                     |                   |
| Carbohydrate         | 48.4               | 53.8                | 41.2              |
| Protein              | 10.0               | 12.1                | 17.0              |
| Lipid                | 1.5                | 1.0                 | 1.8               |



[그림 5-3-3] VFAs production from macroalgae; (a) Total VFAs production, (b) Composition of VFA at 4 days of fermentation; Substrate concentration, 30 g/L.

#### 나. 기질 전처리 영향

다시마시료의 발효특성을 향상시키기 위하여 산, 알칼리 용액으로 전처리한 후 VFA 생성률을 측정하였다. 다시마기질 농도 10 g/L 일때 전처리한 결과 그림 5-3-4에 나타난바와 같이 VFA 생산량이 전처리 방법에 따라 약 20-30% 증가하였다.



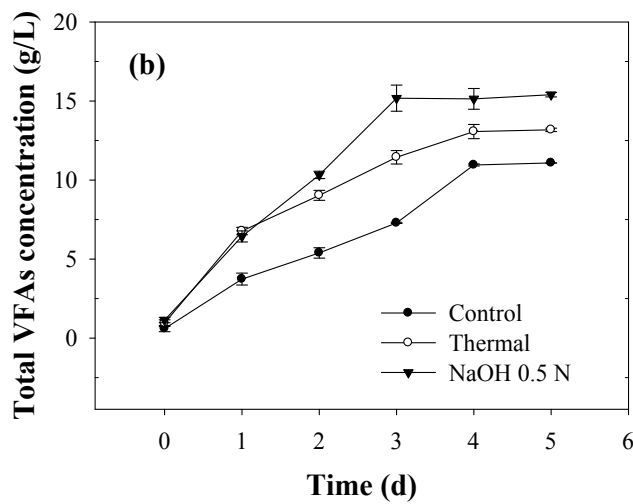
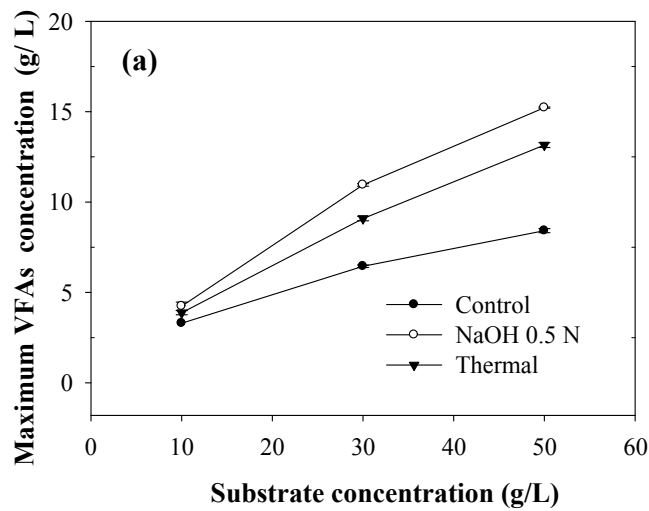
[그림 5-3-4] VFA 생산성에 물리화학적 전처리의 영향

전처리 공정의 영향을 체계적으로 조사하기 위하여 다시마, 미역, 실파래를 기질로 사용하고 기질농도를 변화시켜 전처리한 후 VFA 발효실험을 수행하였다. 그림 5-3-5(a) 다시마기질의 농도에 따라 전처리효과를 나타낸 것이다. 낮은 기질 농도에서는 전처리 효과가 미미하나 기질 농도가 높아질 수록 전처리 효과가 크게 나타났다. 예를 들면, 다시마 기질 농도 50 g/L에서, 전처리하지않은 경우 최대 VFA 농도는 11.4 g/L이었으나, 알칼리전처리한 경우 15.2 g/L, 열처리한 경우 13.5 g/L의 최대 VFA 농도를 나타내었다. 전처리효과는 최대 VFA농도 향상이외에, 발효반응속도도 증가시켰다. 그림 5-3-5(b)에 나타난바와 같이, 최대 VFA 농도가 전처리하지 않은 경우 5일후에 나타났으나 전처리한 경우 3일후에 나타났다. VFA의 수율(yield)은 기질농도에 따라 30.7-41.2%이었다 [그림 5-3-6]. 다시마기질이 미역 또는 실파래에 비하여 상대적으로 높은 VFA 생산성을 나타내었으나, 전처리 효과의 경향은 모두 유사한 것으로 나타났다.

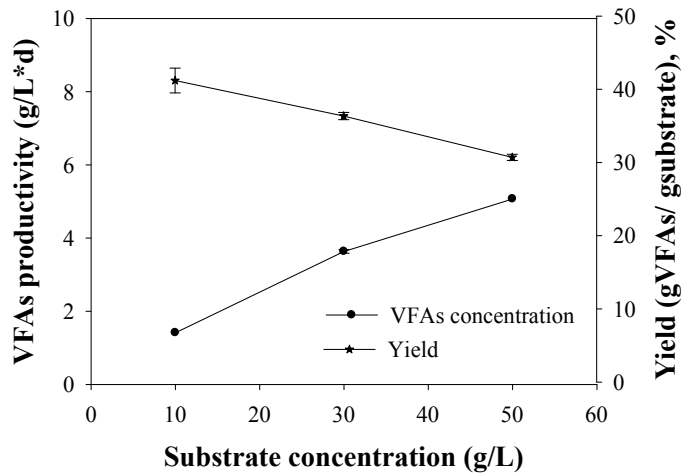
미국 UT A&M의 연구결과 sugacane bagasse와 chicken manure 혼합물로부터 1.69 g/(L·d)의 생산성으로 32.4 g/L의 VFA 농도를 생산하였다. 본 연구에서는 최대 VFA 농도 15.2 g/L이었으나, 생산성은 5.1 g/(L·d)로 높게 나타났다. 따라서 해조류는 육상바이오매스에 비하여 타당성이 높은 바이오에너지자원으로 사용할 수

있을 것이다.

그러나 해조류로부터 VFA 생산하는 공정의 실용화를 위해서는 VFA 농도향상기술개발과 최종제품인 혼합알코올의 품질을 조절하기위한 VFA의 조성에 영향을 미치는 인자에 대한 체계적인 연구가 요구된다.

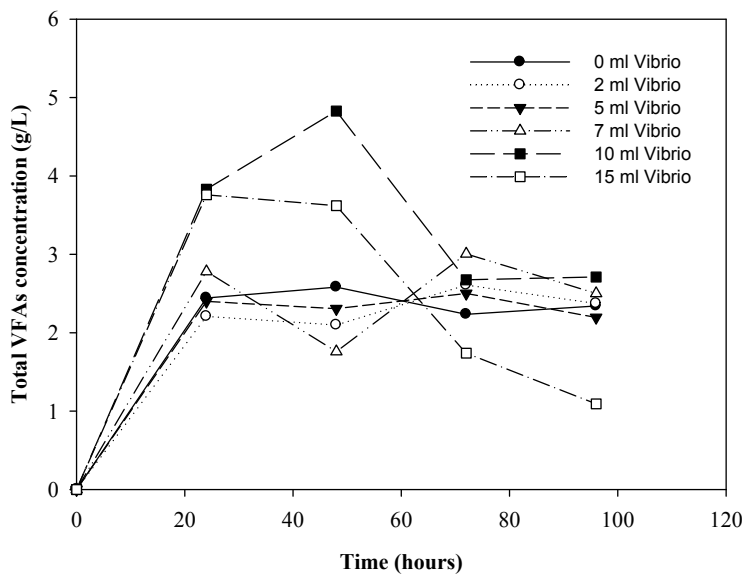


[그림 5-3-5] Effect of pretreatments on VFAs product concentration; (a) Maximum VFAs concentration obtained at different substrate loadings, (b) Time course of VFAs concentration at 50 g/L of substrate concentration. The *Laminaria japonica* sample was pretreated with 0.5 M NaOH at room temperature for 24 h, or thermally pretreated at 120°C for 20 min.



[그림 5-3-6] VFA productivity and yield in VFA fermentation at different substrate (*Laminaria japonica*) loadings. The sample was pretreated with 0.5 N NaOH at room temperature for 24 h.

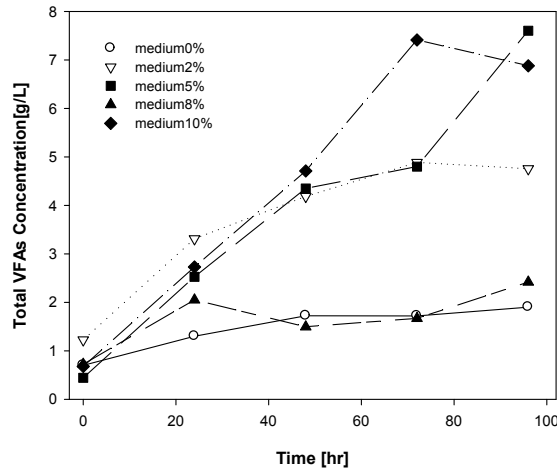
해조류의 VFA 발효에 영향을 미치는 alginate 성분을 분해하여 VFA 발효속도를 향상시키고자, alginate 분해능이 우수한 vibrio type의 미생물을 이용하여 전처리 실험을 수행하였다. 그림 5-3-7은 *Vibrio harveyi* 접종액 첨가량에 따라 VFA 생산성을 보여주는 것으로 *Vibrio harveyi* 를 이용한 전처리에 의하여 두배 정도의 VFA 생산성 향상을 나타내었다.



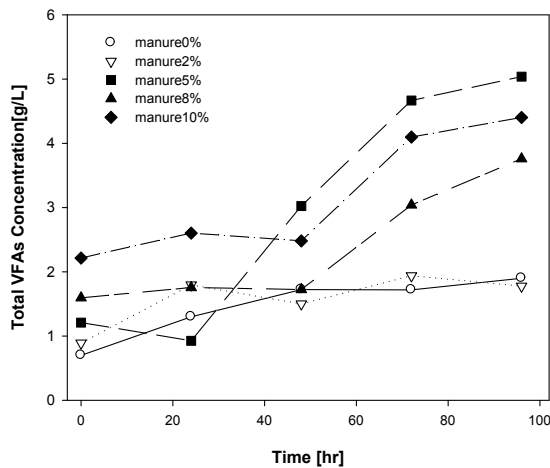
[그림 5-3-7] Effect of biological pretreatment using *Vibrio harveyi* on VFAs fermentation.

다. 축산폐수 사용효과

VFA 발효공정에서 질소원 및 무기물의 공급은 VFA 생산에 중요한 역할을 한다. 그림 5-3-8에서 나타낸바와 같이 영양성분의 함량에 따라 VFA의 생산이 변하고 있으며, 적절한 농도의 영양성분이 필요한 것을 알 수 있다. 본 연구에서는 이와 같은 영양성분을 축산폐수로 대체하고자 축산폐수를 발효액에 포함시켜 VFA의 발효실험을 수행하였다. 그림 5-3-9은 축산폐수 첨가량 증가에 따라 VFA 생산성이 높아지는 것을 보여주고 있다. 이러한 결과로부터 축산폐수를 VFA 발효에서 요구되는 영양성분을 일부 대체할 수 있다는 것을 알 수 있다.



[그림 5-3-8] Effect of nutrient addition on VFAs product concentration.



[그림 5-3-9] Effect of pig-manure addition on VFAs product concentration.

#### 4. 요약 및 제언

본 연구에서는 혐기성 발효공정을 이용하여 해조류기질 종류별 휘발성 지방산(VFA) 발효특성을 조사하였으며, VFA 생산성에 미치는 전처리효과와 축산폐수를 질소원으로의 사용가능성을 조사하였다.

갈조류인 다시마가 홍조류인 미역, 녹조류인 실과래에 비하여 상대적으로 높은 VFA 생산성을 나타내었다.

물리화학적 전처리에 의하여 VFA 최대 농도를 50% 이상 향상시킬 수 있었으며, alginate 분해미생물을 이용하여 전처리 한 경우 약 두배정도의 VFA 생산성이 향상되었다. 본 실험에서 50 g/L의 다시마기질로부터 3일간의 발효에 의하여 최대 VFA 농도 15.2 g/L를 얻을 수 있었다.

해조류를 이용한 VFA 생산공정의 경제성 향상을 위하여 축산폐수를 배지성분으로 첨가한 결과 축산폐수를 VFA 발효에서 요구되는 영양성분을 일부 대체할 수 있는 것으로 나타났다.

현재까지의 연구결과, 해조류로부터 VFA 생산하는 공정의 실용화를 위해서는 VFA 농도향상기술개발과 최종제품인 혼합알코올의 품질을 조절하기위한 VFA의 조성에 영향을 미치는 인자에 대한 체계적인 연구가 요구된다.

#### 5. 향후계획

VFA 생산성 향상을 목표로 전처리공정 및 축산폐수첨가방법을 최적화하고자 하며, VFA의 회수 및 농축공정을 위한 기본공정을 설계하고 기초실험을 수행하고자한다. 또한 VFA 발효과정에서 생성되는 메탄가스의 생산성을 조사하여 VFA 플랫폼의 경제성을 향상시키고자한다.



## 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 경제성있는 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 90% 달성 (유기산 1톤 기준 알코올 690 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 촉매 반응 경로 파악

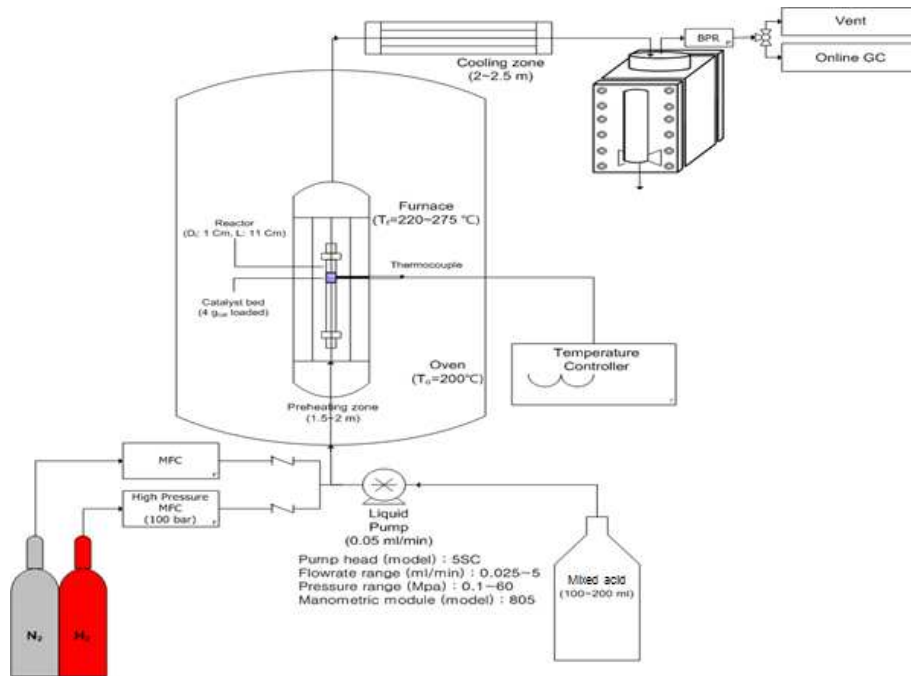
### 2. 연구 방법

#### 가. 실험장치 및 재료

- 아세트산 ( $\text{CH}_3\text{COOH}$ ), 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 83-3M을 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 ( $\text{H}_2$ )와 질소 ( $\text{N}_2$ ) 기체는 신양 산소에서 구매하여 사용하였다.
- 그림 5-4-1과 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 냉각되고 기상과 액상으로 분리한 후에 GC (Gas chromatography)로 조성을 분석하였다.



[그림 5-4-1] 실험 장치도

#### 나. 실험 절차

##### (1) 고표면적 Cu/Zn/Al 촉매 제조 및 특성 분석

- 1.2 M의 NaHCO<sub>3</sub> 수용액 제조 (pH = 8.9)하여, 0.02 M의 금속 나이트레이트 에틸렌 클리콜 용액(pH = 5, 68 - 69 °C)에 첨가.
- 2시간동안 69 - 70 °C에서 교반.
- DI water로 필터 및 세척.
- 105 °C에서 48시간동안 건조.
- 350 °C에서 3시간동안 소성.
- XRD, N<sub>2</sub>O-화학흡착, TG 등을 통해 촉매 특성 분석.

##### (2) 혼합 유기산 모델 반응물 전환 반응

- 반응기내에 촉매를 분산하고, 350 °C에서 2시간동안 수소 분위기에서 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 촉매 투입량에 대해 WHSV(Weight-Hour-Space-Velocity)는 0.35 h<sup>-1</sup>를 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. 고표면적 Cu/Zn/Al 촉매 제조 및 특성 분석

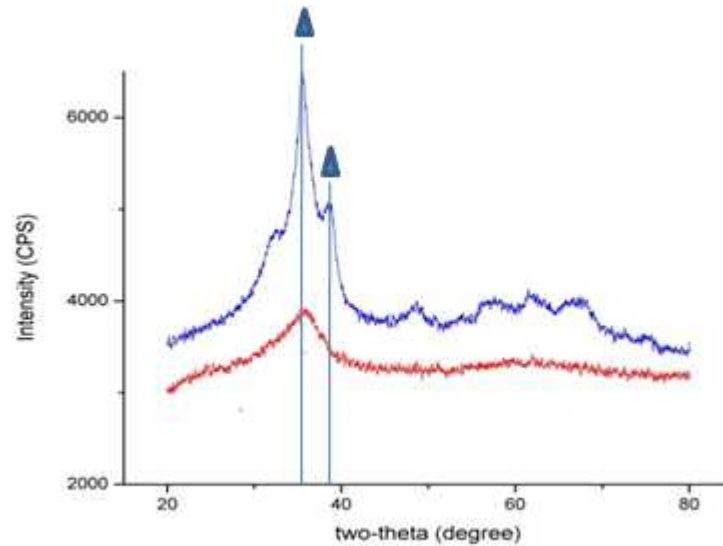
Cu/Zn/Al 촉매는 기존의 방법으로는 물을 용매로 하여 제조하였다. 이렇게 제조된 Cu/Zn/Al 촉매는 각 구성 원소의 비에 따라 17.11 - 31.68 m<sup>2</sup>/g의 구리 활성 표면적을 보였다. 이에 대비하여 에틸렌글리콜-물(에틸렌글리콜/물 = 4/1) 용액에서 제조된 촉매의 구리 표면적은 45.54 m<sup>2</sup>/g이었다.

[표 5-4-1] Cu/Zn/Al의 각 구성 원소의 비에 따른 구리 표면적

| Cu/Zn/Al ratio | NaHCO <sub>3</sub> concentration (M) | solvent                    | Cu surface area (m <sup>2</sup> /g) |
|----------------|--------------------------------------|----------------------------|-------------------------------------|
| 4/2/1          | 1.2                                  | water                      | 17.2                                |
| 2/4/1          | 1.2                                  |                            | 21.8                                |
| 4/2/1          | 0.1                                  |                            | 20.4                                |
| 3/3/1          | 0.1                                  |                            | 19.8                                |
| 2/4/1          | 0.1                                  |                            | 20.3                                |
| 2/4/1          | 0.1                                  |                            | 17.1                                |
| 3/3/1          | 1.2                                  |                            | 31.7                                |
| 3/3/1          | 1.2                                  | Ethylene Glycol/Water =4/1 | 45.5                                |

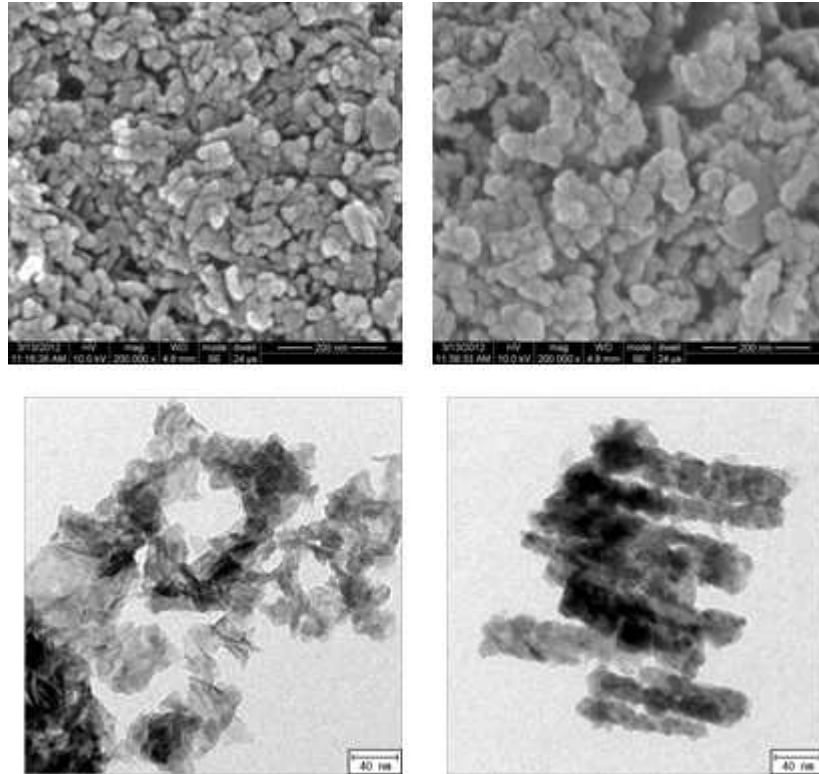
에틸렌글리콜-물 용액에서 제조된 촉매(EG촉매)가 높은 표면적을 가지는 것은 공합침범으로 제조된 초기 Cu/Zn/Al 촉매 전구체가 매우 낮은 결정성을 가지는 것으로부터 확인할 수 있다. 수용액에서 침전된 Cu/Zn/Al 복합체가 소성된 후의 CuO 결정성이 뚜렷하게 확인되는 것과 비교하여 에틸렌글리콜-물 용액에서 침전된 Cu/Zn/Al 복합체가 소성된 후의 CuO 결정성은 뚜렷하지 않다. 이렇게 명확하지 않은 결정성은 CuO 입자가 매우 작거나 비정형으로 형성되었음을 의미한다. 비정형

입자도 알루미나에 담지된 촉매에서는 매우 작은 입자에서 얻어질 수 있으므로 이러한 XRD 결과는 소성후 얻어진 CuO 입자가 매우 작아서 높은 비표면적을 가지게 된다는 것을 의미한다.



[그림 5-4-2] 소성을 거친 Cu/Zn/Al 촉매 전구체의 XRD 결과 (위: 수용액에서 제조된 촉매, 아래: 에틸렌글리콜-물 용액에서 제조된 촉매, Cu/Zn/Al = 3/3/1)

제조된 촉매 나노 입자는 아래 그림과 같은 SEM 및 TEM 사진으로 관찰되었다. N<sub>2</sub>-물리흡착 실험으로 측정된 촉매의 BET 표면적은 EG촉매의 경우 147 m<sup>2</sup>/g, 수용액으로부터 얻어진 촉매(W촉매)의 경우 85 m<sup>2</sup>/g이었다. EG촉매의 Cu 표면적은 45.5 m<sup>2</sup>/g, W촉매의 Cu 표면적은 31.7 m<sup>2</sup>/g으로, Cu 표면적의 비 (45.5:31.7 = 1.44:1) 는 BET 표면적비(147:85 = 1.73:1)와 비슷한 양상을 보인다. 이러한 결과로부터 EG촉매의 높은 표면적은 공침된 촉매의 나노 구조와도 관련되는 것으로 보인다.



[그림 5-4-3] 에틸렌글리콜-물 용액으로부터 얻어진 Cu/Zn/Al 촉매(왼쪽)와 수용액으로부터 얻어진 Cu/Zn/Al 촉매(오른쪽)의 SEM(위), TEM(아래) 사진

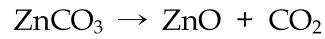
EG촉매가 혼합용액에서 침전된 후, 소성하기 전의 열화학적 특성을 TG로 분석하였다. 100 °C 부근의 넓고 큰 열분해 피크는 촉매 제조중에 사용된 액체 용매의 증발로 보인다. 용액중에 생성된 촉매 전구체는 235 - 280 °C 부근에서 열분해하여 다양한 금속 카보네이트와 금속 산화물을 형성하는 것으로 알려져있다.



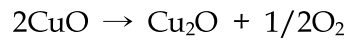
생성된  $CuCO_3$ 는 394 °C 부근에서  $CuO$ 와  $CO_2$ 로 분해되는 것으로 알려져 있다.



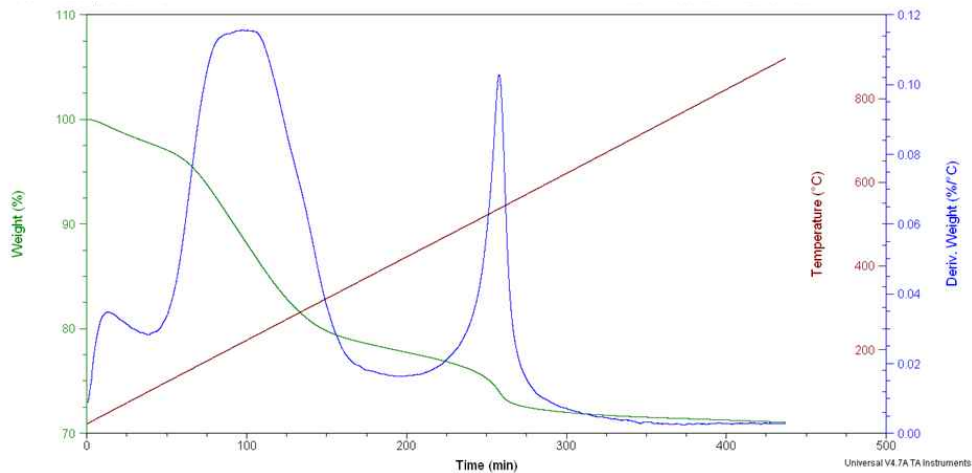
생성된  $ZnCO_3$ 는 428 °C 부근에서  $ZnO$ 와  $CO_2$ 로 분해되는 것으로 알려져 있다.



이후 생성된 CuO는 Cu<sub>2</sub>O와 Cu로 805 °C 부근의 고온에서 수소 없이도 환원되는 것으로 알려져 있다.



이러한 결과로부터 본 촉매 제조 과정에서 350 °C 부근에서 촉매를 소성할 경우 ZnCO<sub>3</sub>와 CuCO<sub>3</sub>가 일부 잔류하여 반응에 참여할 수도 있음을 보여준다.



[그림 5-4-4] 에틸렌글리콜-물 용액으로부터 침전된 Cu/Zn/Al 촉매 전구체의 TG 분석 결과

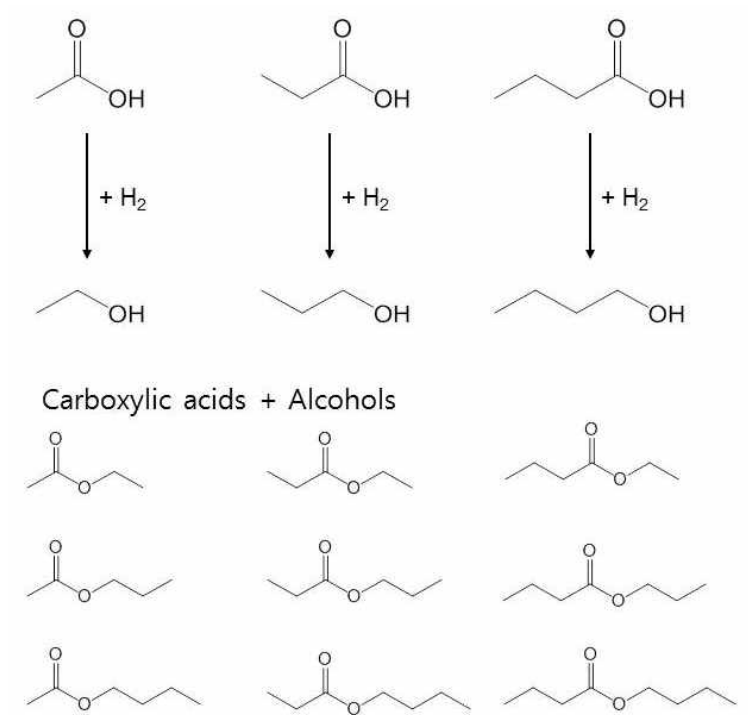
최종적으로 생성된 EG 촉매의 높은 표면적은 지금까지 문헌에서 알려진 촉매중 최대의 표면적으로 세계 최대 표면적의 촉매를 제조하였다고 할 수 있다.

[표 5-4-2] Cu 표면적 비교

| 근거                                       | 촉매(원자비)                 | 촉매제조법            | Cu 활성표면적 (m <sup>2</sup> /g) |
|--|-------------------------|------------------|------------------------------|
| <i>J. Catal.</i> 2005, 229, 136.         | Cu/Zn/Si (2.8:1:tiny)   | Co-precipitation | 23                           |
| <i>J. Power Sources</i> 2006, 159, 1296. | Cu/Zn/Zr/Al (3:3:1:0.4) | Co-precipitation | 25.9                         |
| <i>J. Catal.</i> 2004, 228, 43.          | Cu/Zn/Al (2:4:5)        | Co-precipitation | 10.1                         |
| <i>J. Catal.</i> 2003, 219, 389.         | Cu/Zn/Zr/Al (10:5:12:4) | Co-precipitation | 23.3                         |
| <i>Appl. Catal. A</i> 2003, 253, 201.    | Cu/Zn (4:6)             | Co-precipitation | 21.5                         |
| <i>Appl. Catal. A</i> 1998, 174, 231.    | Cu/Zn/Al (10:11:2)      | Co-precipitation | 29.1                         |
| <i>Catal. Lett.</i> 1997, 48, 55.        | Cu/Zn (3:7)             | Co-precipitation | 20.3                         |
| KIST 연구팀 (W촉매)                           | Cu/Zn/Al (4:2:1)        | Co-precipitation | 10-23                        |
| 상용촉매 (ICF 83-3M)                         | Cu/Zn/Al                | -                | 9.85                         |
| KIST 연구팀 (EG 촉매)                         | Cu/Zn/Al (3:3:1)        | Co-precipitation | 45.5                         |

나. 혼합유기산 모델반응물 전환 반응

혼합유기산의 반응조건하 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. 혼합산은 먼저 생성된 혼합 알코올과 반응하여 에스테르를 생성하는데, 3가지 유기산을 반응물로 이용한 본연구에서는 9가지의 에스테르가 생성 가능하다.



[그림 5-4-5] 혼합 유기산의 수소화에 의한 반응 생성물

이러한 혼합 유기산의 수소화 반응 결과는 아래 표와 같다. 낮은 반응물 유량에 대해 유기산 1톤당 652 kg의 혼합 알코올이 생산됨을 알 수 있다. 그러나, 반응물 유량이 높아질수록 반응 활성이 급격히 떨어지는 것을 확인할 수 있는데, 이것은 촉매의 급격한 비활성화와 관련 있다.

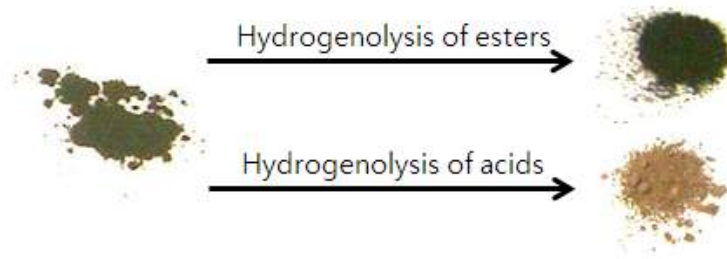
[표 5-4-3] 혼합 유기산 모델 화합물의 수소화 반응

| WHSV            |                  | 0.47 hour <sup>-1</sup> | 0.94 hour <sup>-1</sup> | 1.17 hour <sup>-1</sup> |
|-----------------|------------------|-------------------------|-------------------------|-------------------------|
| 전환율<br>(%)      | C2-acid          | 100.0                   | 60.2                    | 51.8                    |
|                 | C3-acid          | 100.0                   | 60.1                    | 54.9                    |
|                 | C4-acid          | 100.0                   | 61.0                    | 57.7                    |
| 수율<br>(%)       | C2-ol            | 18.9                    | 5.8                     | 4.2                     |
|                 | C3-ol            | 24.2                    | 7.2                     | 4.9                     |
|                 | C4-ol            | 37.2                    | 9.0                     | 6.4                     |
|                 | (kg 알코올)/(톤 유기산) | 652                     | 180                     | 127                     |
|                 | C2-acetate       | 1.7                     | 3.4                     | 3.6                     |
|                 | C3-acetate       | 2.0                     | 7.2                     | 6.9                     |
|                 | C4-acetate       | 2.1                     | 4.3                     | 2.9                     |
|                 | C2-propionate    | 1.9                     | 0.0                     | 0.0                     |
|                 | C3-propionate    | 2.2                     | 4.5                     | 2.9                     |
|                 | C4-propionate    | 2.3                     | 5.5                     | 6.5                     |
|                 | C2-butyrate      | 2.5                     | 3.2                     | 3.7                     |
|                 | C3-butyrate      | 2.4                     | 4.2                     | 7.2                     |
|                 | C4-butyrate      | 2.6                     | 6.2                     | 6.0                     |
|                 | C2-ol 유래 에스테르    | 5.8                     | 14.9                    | 13.5                    |
|                 | C2-acid 유래 에스테르  | 6.1                     | 6.7                     | 7.4                     |
|                 | C3-ol 유래 에스테르    | 6.4                     | 10.0                    | 9.4                     |
|                 | C3-acid 유래 에스테르  | 6.7                     | 15.9                    | 17.1                    |
|                 | C4-ol 유래 에스테르    | 7.5                     | 13.7                    | 16.9                    |
| C4-acid 유래 에스테르 | 7.0              | 16.0                    | 15.4                    |                         |

혼합 유기산의 수소화에 의한 혼합 알코올 생산 반응에서 반응 촉매가 지속적으로 유기산 및 물과 접촉함으로써 금속 촉매의 용해가 발생하고 이로부터 촉매의 비활성화가 급속하게 발생한다. 또한, 실제 반응에서 먼저 일부 유기산이 느린 속도로 알코올로 변환되면 투입된 유기산과 반응물인 알코올이 서로 반응하여 에스테르를 생성하고 이 에스테르는 빠른 속도로 알코올로 수소화된다. 따라서, 유기산



의 직접 수소화를 피하여도 결국 에스테르의 수소화를 다루게 된다. 따라서, 유기산의 직접 수소화는 촉매의 안정성과 반응 공정의 실질적인 측면에서 에스테르의 수소화에 의한 알코올 생산으로 변경하는 것이 유리할 것으로 보인다.



[그림 5-4-6] 에스테르 수소화 반응 및 유기산 수소화 반응 전후의 Cu/Zn/Al 촉매 변화

유기산의 수소화에 비해 에스테르의 수소화는 촉매 비활성화가 훨씬 덜하고, 유기산의 수소화의 경우에는 초기 촉매 반응이 유기산의 느린 직접 수소화 이후 알코올과 유기산의 반응에 의한 에스테르화, 그리고, 생성된 에스테르의 수소화로 진행되는 데에 비해, 에스테르의 수소화에서는 먼저 유기산과 알코올의 촉매 반응 또는 열역학적 평형에 의해 에스테르를 생산하고 생산된 에스테르가 수소화에 의해 알코올로 변화되는 2단계 반응 시스템으로 구성된다. 유기산 직접 수소화 반응의 장점은 1단계 반응으로 고정비와 운전 비용이 절감된다는 것이나, 단점으로는 촉매의 급격한 비활성화로 상용공정화에 어려움이 있고 Cu 계열 촉매의 월등한 반응활성으로 인해 다른 신촉매 개발의 어려움이 있다는 것이다. 또한 유기산으로부터 생산된 바이오알코올의 경제성 확보에 어려움이 있다. 이에 비해 에스테르의 수소화 반응은 촉매의 완만한 비활성화로 반응 공정이 안정되며, 에스테르에서 알코올로 전환되는 반응이 높은 활성을 가진다는 점이다. 이에 반해 에스테르 수소화 반응의 단점으로는 기존에 개발된 반응 공정이 존재하여 연구 개발의 폭이 좁으며 2단계 반응 시스템을 가짐으로써 고정비와 운전 비용이 증가한다. 또한, 수용액 반응물에서 유기산과 알코올로부터 에스테르를 생산하는 것이 비교적 어렵다는 단점이 있다. 이러한 장단점에도 불구하고 촉매의 심각한 비활성화는 유기산의 직접 수소화 공정의 실증화에 어려움이 있을 것을 보여주며, 이러한 결과로부터 유기산의 직접 수소화 공정보다 에스테르 생산 후 수소화에 의한 알코올 생산 공정을 개발하는 것이 공정의 실증화 및 촉매의 장기 사용에 따른 경제성 확보 등을 위해 유리할 것이다.

이러한 결과는 향후 혐기성 발효에 의한 유기산 생산 공정과 수소화에 의한

알코올 생산 촉매화학공정을 연계시킬 때에 유리하게 공정을 연결할 수 있을 것으로 보인다. 수용액에 용해된 유기산은 소수성 알코올로 추출하면 에스테르로 전환할 수 있고, 이로부터 안정적인 알코올 생산 공정이 가능할 것으로 추측된다.

#### 4. 요약 및 제언

새로운 혼합 용액 이용 촉매 제조 공정을 통해 문헌에 나타난 세계 최대 표면적을 가지는 Cu/Zn/Al 촉매를 제조하였다. 유기산의 수소화를 통한 알코올 생산 공정에서 유기산 1톤당 알코올 652 kg을 생산하였다. 유기산의 수소화 과정에서 촉매의 비활성화가 급격히 일어나는 문제로 인해 유기산의 직접 수소화보다 에스테르를 거치는 경로를 통한 수소화 반응이 더 효율적일 것으로 보인다.

#### 5. 향후계획

새로운 혼합 용액 이용 촉매 제조 공정을 최적화하여 최적화된 촉매를 생산하고, 유기산에 알코올을 혼합하여 에스테르를 생산하고, 이로부터 수소화 촉매화학 공정을 통한 알코올 생산 공정을 개발 및 최적화하고자 한다. 에스테르의 생산을 위한 유기산, 알코올 반응에 의한 에스테르의 평형 농도를 확인하여 에스테르 수소화 반응에 활용하고자 한다.



## 제 5 절 급속 열분해공정 이용 바이오오일 생산기술 개발

### 1. 연구 목적 및 내용

#### 가. 연구 목적

전년도 연구결과에 의하면 해조류 바이오매스에 전처리 공정을 도입하면 급속 열분해공정을 이용한 바이오오일의 생산 수율을 향상시킬 수 있다는 것을 확인할 수 있었다. 따라서, 당해년도에는 바이오오일의 수율을 향상시키기 위해서 해조류 바이오매스의 물성을 급속 열분해공정에 적합한 상태로 개질할 수 있는 전처리 방안 및 조건을 최적화하고, 전처리된 해조류 바이오매스를 이용하여 바이오오일 생산 조건을 최적화하고자 하였다.

#### 나. 연구 내용

##### (1) 공정부산물의 바이오오일 생산원료로서의 활용가능성 평가

해조류 바이오매스의 통합적 활용을 위해 다양한 공정에서 배출된 부산물이 바이오오일 생산에 활용가능한지를 평가하였다.

##### (2) 바이오오일 수율 향상을 위한 전처리 공정 도출

해조류 바이오매스로부터 생산되는 바이오오일의 수율을 향상시키기 위해 전처리 방법 및 조건을 변화시켜 처리 후, 해조류 바이오매스의 물리화학적 특성 및 열적 동특성을 비교하여 최적의 전처리 방법 및 조건을 도출하고자 하였다.

##### (3) 바이오오일 생산 및 업그레이딩 기초 연구

최적 조건에서 전처리된 다시마를 이용하여 바이오오일 생산 실험을 수행하였으며, 다시마로부터 생성된 바이오오일의 고품질화를 위한 반응장치 set-up 및 기초 실험을 수행하였다.

## 2. 연구 방법

### 가. 실험장치 및 재료

#### (1) 실험 재료

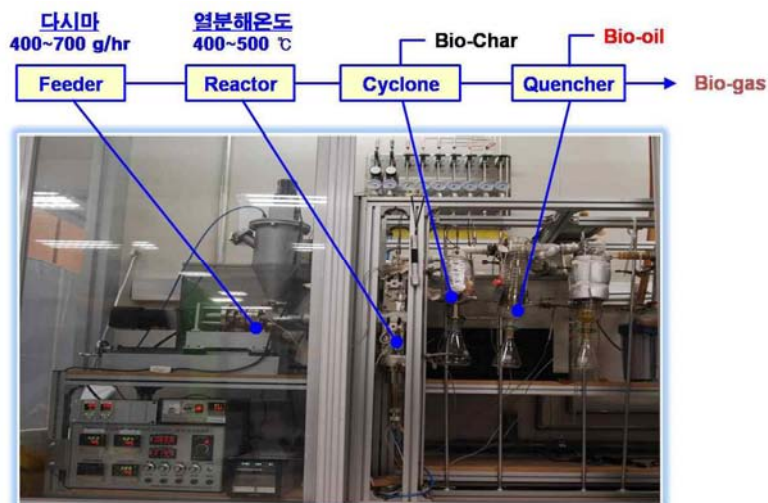
본 연구에서 사용된 해조류 바이오매스 및 공정부산물물은 45 °C에서 24시간 건조한 후 사용하였으며 [표 5-5-1]에 요약하였다.

[표 5-5-1] 실험 재료

| 시료            | 출처 및 처리방법                           |
|---------------|-------------------------------------|
| 다시마           | 완도, 풍건 건조                           |
| GC-110615-E1  | 부경대, 주정 추출 후 주정으로 세척                |
| GC-110615-E2  | 부경대, 주정 추출 후 아세톤으로 세척               |
| BJ-110617-E1  | 부경대, 주정 추출 후 주정으로 세척                |
| BJ-110617-E2  | 부경대, 주정 추출 후 아세톤으로 세척               |
| RL-110610-E1  | 부경대, 주정 추출 후 주정으로 세척                |
| RL-110610-E2  | 부경대, 주정 추출 후 아세톤으로 세척               |
| BJ-AP2-111117 | 한밭대, 황산 전처리 (5 wt% 황산, 100°C, 500분) |

#### (2) 바이오오일 생산용 급속 열분해 반응 시스템

급속 열분해 반응 시스템은 크게 control box, feeder, fluidized-bed reactor, cyclone, quencher로 구성되어 있다. 유동화 기체는 질소를 이용하였으며, 유동매체로는 sea sand를 사용하였다.



[그림 5-5-1] 급속 열분해 반응 시스템

## 나. 실험 절차

### (1) 전처리 실험

Steel 재질의 반응기에 시료 5 g과 solvent 50 ml를 넣고 하기의 [표5-5-2]와 같은 조건에서 전처리 반응실험을 수행하였다. 반응이 종료된 후 여과를 통해 남은 시료를 회수하고 증류수로 세척한 후 오븐 또는 동결건조기에서 잔여수분을 제거하였다.

[표 5-5-2] 전처리 실험 조건

|                  |  |
|------------------|--|
| Sample           | 5 g of Kelp, dried (150 $\mu\text{m}$ )                          |
| Solvent          | H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> , HCl, NaOH, NH <sub>3</sub> (aq) |
| Conc. (w/v)      | 0.1, 4%  |
| Temperature (°C) | 25, 50, 75   |
| Time (hr)        | 0.5, 24  |

### (2) 급속 열분해 공정을 이용한 바이오오일 생산 실험

유동층 열분해 반응기의 내부 유동사는 100 g의 sea sand (< 300  $\mu\text{m}$ , M.D. 184  $\mu\text{m}$ , KANTO)를 사용하였다. 열분해 실험을 시작하기 전에 반응기와 hopper 내부를 무산소 분위기로 만들기 위해 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 5-5-3]에 요약하였다.

[표 5-5-3] 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 H<sub>2</sub>, N<sub>2</sub>를 분석하였고, methanizer가 장착된 FID에서는 CO, CO<sub>2</sub>, C1~C3까지의 탄화수소를 분석하였다. 생성된 바이오오일은 원소분석, 수분 함량 분석, 발열량 분석 및 정성 분석을 수행하였다. 바이오오일 내의 수분 함량 분석은 Volumetric Karl Fisher (KF) titration method의 일종인 ASTM E 203법에 준하여 측정하였다.

### 3. 연구수행 결과

#### 가. 공정부산물의 바이오오일 생산원료로서의 활용가능성 평가

먼저, 해조류 바이오매스의 통괄적 활용을 위해 다양한 공정에서 배출되는 다시마 부산물의 바이오오일의 원료로서 활용가능성을 평가하였다. 평가에 사용한 부산물은 [표 5-5-1]와 같으며, 원소 분석, 공업 분석 및 열중량 분석 결과를 통해 이를 통해 활 결과를 나타내었다.

먼저 다시마와 각 공정 부산물의 원소 분석 결과를 살펴 보면, 에탄올 추출 후 다시마 부산물은 다시마 원재료와 탄소, 수소, 질소 및 산소의 함량이 거의 유사한 결과를 나타내었다 ([표 5-5-4]). 반면에, VFA 공정 원료로 사용하기 위해 산처리된 다시마(BJ-AP2-111117)의 경우에는 탄소의 함량이 약 17% 정도 증가하였으며 거의 목질계 바이오매스와 유사한 값을 나타내었다.

[표 5-5-4] 공정부산물의 원소 분석 결과

| Sample        | C (wt%) | H (wt%) | N (wt%) | S (wt%) | O (wt%) | Total (wt%) |
|---------------|---------|---------|---------|---------|---------|-------------|
| Kelp          | 29      | 4.8     | 1.6     | <0.3    | 38.4    | 73.8        |
| GC-110615-E1  | 31.6    | 4.2     | 2.7     | <0.3    | 37.4    | 75.9        |
| GC-110615-E2  | 32.7    | 4.6     | 2.6     | <0.3    | 37.1    | 78          |
| BJ-110617-E1  | 31.9    | 5.0     | 1.8     | <0.3    | 39.3    | 77          |
| BJ-110617-E2  | 31.3    | 4.8     | 1.9     | <0.3    | 40.1    | 77          |
| RL-110610-E1  | 30.5    | 4.6     | 2.3     | 1.6     | 38.4    | 77.4        |
| RL-110610-E2  | 29.8    | 4.5     | 2.2     | <0.3    | 40.5    | 78.1        |
| BJ-AP2-111117 | 46.9    | 5.8     | 0.8     | <0.3    | 41.2    | 94.7        |



공업 분석 결과를 살펴 보면 ([표 5-5-5]), 다시마 원재료와 비교하였을 때 에탄올 추출 후 다시마 부산물은 휘발분의 함량이 약 5% 정도 증가하였으며 이에 따라 회분의 함량도 약 5% 감소하였으며, VFA 공정 부산물의 경우에는 휘발분의 함량이 약 30% 정도 증가하였으며 회분의 함량도 1% 이하로 감소하였다. 따라서, VFA 공정 부산물이 다시마 원재료보다 열분해 공정에 유리할 것으로 판단된다.

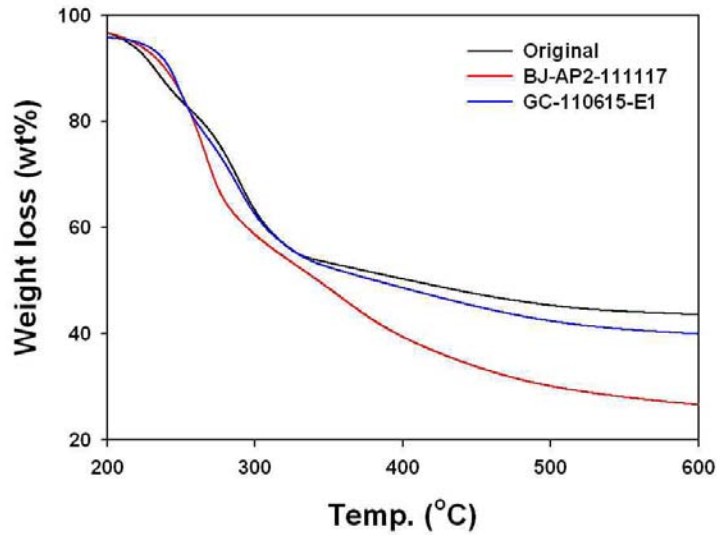
[그림 5-5-2]에 대표적인 공정부산물 및 다시마 원재료의 열중량 분석 결과를 나타내었다. 주요 열분해 구간인 400 ~ 500 °C 에서의 열중량 감소를 살펴보면, 에탄올 추출 후 다시마 부산물의 경우에는 다시마 원재료와 큰 차이를 보이지 않았지만, VFA 공정 부산물의 경우에는 400 °C에서 약 10%, 500 °C에서 약 15% 정도 열중량 변화가 증가하는 현상을 관찰할 수 있었다 ([표5-5-6]). 따라서, 상기의 원소 분석, 공업 분석 및 열중량 분석 결과를 토대로 살펴보면, 급속열분해를 이용한 바이오오일 생산에 VFA 공정 부산물이 원료로서 이용가능하다고 판단되며, 다시마 원재료와 비교했을 때 바이오오일 수율 측면에서도 유리할 것이라고 생각된다.

[표 5-5-5] 공정부산물의 공업 분석 결과

| Sample        | Water (wt%) | Volatile (wt%) | Ash (wt%) |
|---------------|-------------|----------------|-----------|
| Kelp          | 4.66        | 65.17          | 30.18     |
| GC-110615-E1  | 4.12        | 68.81          | 27.06     |
| GC-110615-E2  | 4.12        | 69.86          | 25.72     |
| BJ-110617-E1  | 3.99        | 70.73          | 25.27     |
| BJ-110617-E2  | 4.62        | 69.03          | 26.35     |
| RL-110610-E1  | 6.38        | 69.04          | 24.59     |
| RL-110610-E2  | 6.4         | 69.4           | 24.15     |
| BJ-AP2-111117 | 3.62        | 95.91          | 0.43      |

[표 5-5-6] 열중량 감소 비교

| Weight loss (wt %) | Kelp as received | After EtOH extraction | After acid treatment |
|--------------------|------------------|-----------------------|----------------------|
| 400 °C             | 49.7             | 51.4                  | 60.6                 |
| 500 °C             | 54.7             | 57.6                  | 69.9                 |



[그림 5-5-2] 공정부산물 TG 분석 결과

#### 나. 바이오오일 수율 향상을 위한 전처리 공정 도출

전년도 연구 결과, 다시마의 전처리를 통하여 물리화학적 특성을 변화시킬 수 있으며, 전처리 다시마 이용시 바이오오일의 수율 또한 향상시킬 수 있다는 가능성을 확인하였다. 따라서, 당해년도에는 바이오오일 생산을 위한 최적의 전처리 공정을 탐색하기 위하여, 전처리 방법 및 조건을 변화시켜 가면서 실험한 후 물리화학적 특성 및 열적 동특성을 비교 분석하였다.

동일한 농도 (4 wt%), 반응 온도 (25 °C) 및 반응 시간 (30분)에서 각각의 전처리 방법에 따른 원소 분석 결과를 [표 5-5-7]에 나타내었다. 처리 전과 비교하였을 때, 모두 상대적으로 탄소 및 산소의 함량이 증가하였으며 무기물의 함량이 감소한 것을 확인할 수 있었다. 특히, 염기 처리보다 산 처리 시 그 효과가 높았으며, 앞서 언급한 VFA 공정 부산물 (5 wt% 황산, 100 °C, 500분)과 거의 유사한 원소 분석 결과를 나타내었다.

공업 분석 결과를 살펴 보면, NaOH를 사용한 경우에는 다시마 원재료와 거의 유사한 수분, 휘발분, 회분 함량을 나타내었다. 하지만, NH<sub>3</sub>(aq)를 사용한 경우에는 휘발분의 함량이 약 7% 증가하였으며 회분의 함량은 약 7% 정도 감소하였으며, 황산을 사용한 경우에는 휘발분의 함량이 약 30% 증가하였으며 회분의 함량이 약 29% 정도 감소하여 거의 목질계 바이오매스와 유사한 결과를 나타내었다. 따라서, 실제 급속 열분해반응을 통한 바이오오일 생산시에 황산으로 처리된 다시마를 이용하면 바이오오일 수율이 향상될 것으로 기대되며, 이를 확인하기 위해 각 전처리 방법에 따른 열적 동특성 분석을 수행하였다.

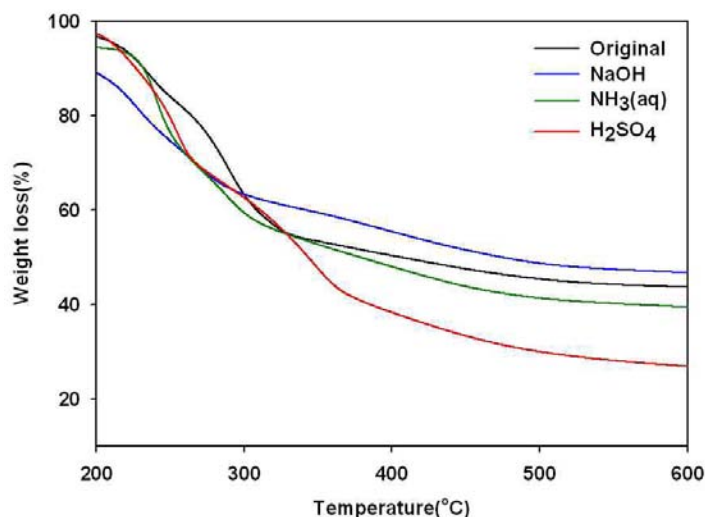
[표 5-5-7] 전처리 다시마의 원소 분석 결과

| Sample                              | C (wt%) | H (wt%) | N (wt%) | S (wt%) | O (wt%) | Total (wt%) |
|-------------------------------------|---------|---------|---------|---------|---------|-------------|
| Kelp                                | 29      | 4.8     | 1.6     | <0.3    | 38.4    | 73.8        |
| 4wt% H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> | 42.1    | 5.5     | 2.1     | <0.3    | 46.7    | 96.4        |
| 4wt% NH <sub>3</sub> (aq)           | 30.9    | 4.4     | 1.2     | <0.3    | 46.7    | 83.2        |
| 4wt% NaOH                           | 33.1    | 4.6     | 2.0     | <0.3    | 43.8    | 83.5        |

[표 5-5-8] 전처리 다시마의 공업 분석 결과

| Sample                              | Water (wt%) | Volatile (wt%) | Ash (wt%) |
|-------------------------------------|-------------|----------------|-----------|
| Kelp                                | 4.66        | 65.17          | 30.18     |
| 4wt% H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> | 3.42        | 95.35          | 1.23      |
| 4wt% NH <sub>3</sub> (aq)           | 6.0         | 72.16          | 22.83     |
| 4wt% NaOH                           | 6.56        | 62.59          | 30.85     |

[그림 5-5-3]에 각각의 전처리 방법에 따른 열중량 분석 결과를 나타내었다. 염기 촉매인 NaOH 및 NH<sub>3</sub>(aq)를 사용한 경우에는 다시마 원재료와 거의 유사한 열적 동특성을 나타냈으며, 반면에 H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>를 사용한 경우에는 일반적인 급속 열분해 온도 조건인 400~500 °C 구간에서의 열중량 변화가 약 20% 정도 증가하는 현상을 보였다. 따라서 상기의 원소 분석, 공업 분석 및 열중량 분석 결과로부터 산처리 방법이 급속 열분해에 유리하도록 다시마의 물성을 변화시키는데 효과적이라고 판단 되었으며, 최적 조건을 탐색하기 위하여 산의 농도, 반응 온도 및 반응 시간을 변화 시켜 가면서 전처리 실험을 수행하였다.



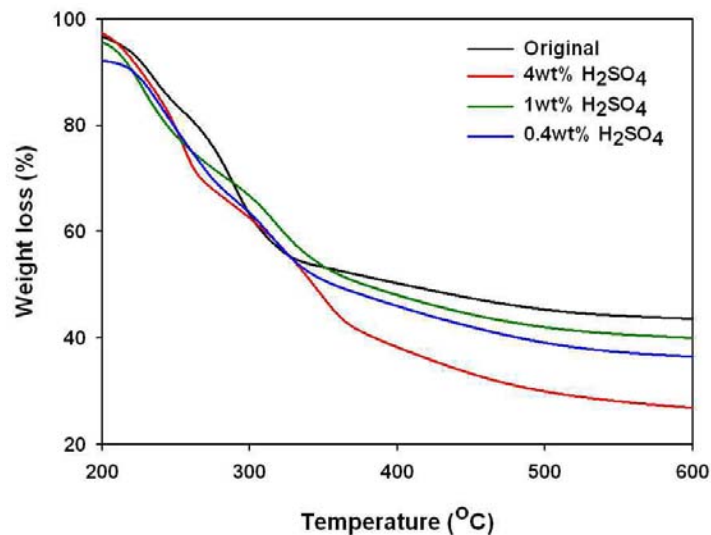
[그림 5-5-3] 전처리 방법에 따른 TG 분석 결과

먼저, 동일한 반응 온도 및 시간에서 황산의 농도를 0.4 ~ 4 wt%로 변화시켜 가면서 산 농도가 다시마의 열적 동특성에 미치는 영향을 살펴보았다. [그림 5-5-4]에서 알 수 있듯이, 황산 농도가 증가함에 따라 열중량 패턴이 급격히 감소하는 것을 확인할 수 있었다. 즉, 다시마의 열적 동특성을 변화시키려면 어느 정도 이상의 산 농도가 요구된다는 것을 확인할 수 있었으며, 향후 전처리 시 발생하는 폐수 처리 문제, 비용 등을 고려하면 황산 농도 4 wt% 정도가 적합하다고 생각된다.

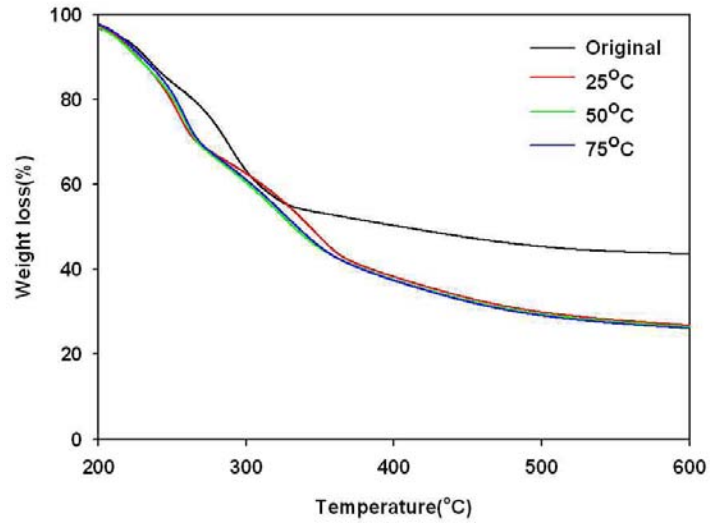
상기 황산 농도에서 반응 온도 및 전처리 반응 시간이 다시마의 열적 동특성에 미치는 영향을 살펴보았다. [그림 5-5-5]에서 알 수 있듯이, 100 °C 이하의 낮은 온도에서는 반응 온도가 다시마의 열적 동특성에 크게 영향을 미치지 않음을 확인할 수 있었다. 즉, 낮은 온도에서는 다시마의 주요 구성 성분들이 분해되기에 충분한 에너지가 공급되지 않기 때문으로 생각된다.

[그림 5-5-6]에 상기 황산 농도 및 반응 온도에서 전처리 반응 시간에 따른 다시마의 열적 동특성 변화를 나타내었다. 전처리 반응 시간이 증가함에 따라 열중량 감소가 줄어드는 경향을 나타내었으며, 이는 반응 시간이 길어질수록 산에 의해 다시마를 구성하고 있는 성분이 추출 또는 분해가 일어나기 때문이라고 생각된다. 하지만, 주요 열분해 온도 구간에서 그 차이도 크지 않고, 분해가능한 탄소 및 수소를 유지해야 되기 때문에 짧은 전처리 시간이 바이오오일 생산에 유리하다고 판단된다.

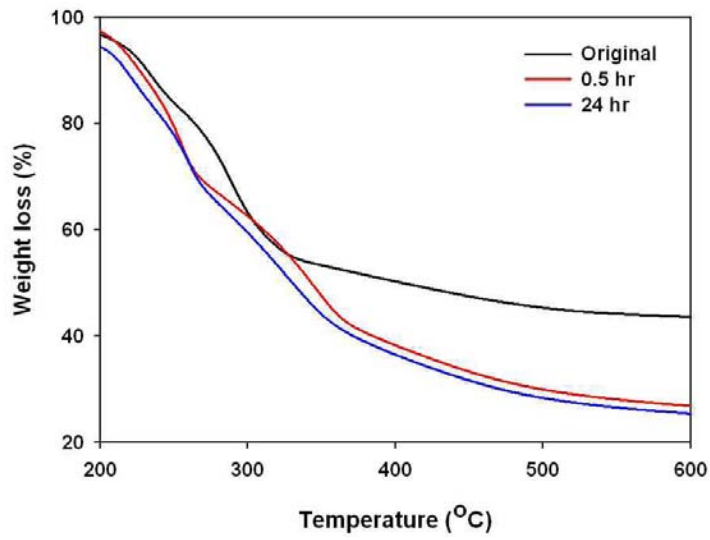
따라서, 상기 결과로부터 바이오오일 생산에 가장 적합한 다시마의 전처리 방법은 산을 촉매로 사용한 경우로 판단되며, 이 때 전처리 최적 조건은 산 농도 4 wt%, 상온 및 전처리 시간이 30분인 경우이다.



[그림 5-5-4] 황산 농도에 따른 TG 분석 결과



[그림 5-5-5] 반응 온도에 따른 TG 분석 결과



[그림 5-5-6] 전처리 시간에 따른 TG 분석 결과

#### 다. 바이오오일 생산 및 업그레이딩 기초 연구

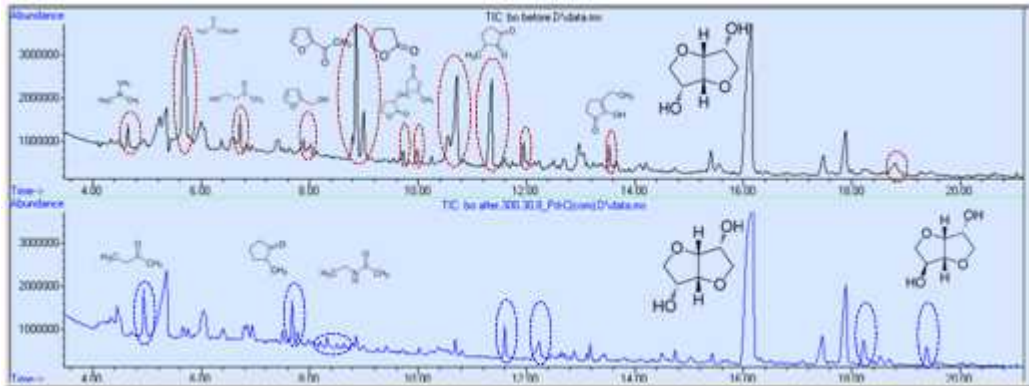
상기의 결과를 토대로 산처리된 다시마를 이용하여 바이오오일 수율의 향상 여부를 확인하였다. 열분해 온도 425 °C, 최소화 유동화 속도비( $U_0/U_{mf}$ ) 18, feeding rate 400 g/hr인 조건에서 급속 열분해 실험을 수행하였다. 산처리 전후의 다시마를 이용한 급속 열분해 실험 결과, 바이오오일의 수율은 37%에서 46%로 약 9% 정도 향상되는 것을 확인할 수 있었다. 현재 앞 절에서 언급한 최적 조건에서 대량으로 산처리를 통해 급속 열분해 실험을 위한 원료를 제조하고 있으며, 향후 산처리된 다시마를 이용하여 바이오오일 생산을 위한 최적 공정 조건을 도출할 계획이다.

또한, 생산된 바이오오일을 기존 화석연료를 대체할 수 있는 고품질의 연료로 전환하기 위해 고온고압 회분식 반응장치를 set-up 하였다 ([그림 5-5-7]). 문헌조사 결과, 최근에 많은 연구가 진행되고 있는 카본담체 촉매 중에 Pd/C를 이용하여 기초 실험을 수행하였다. 먼저, 촉매 1 g과 30 mL 다시마 유래 바이오오일 주입한 후 수소로 충분히 purge하여 반응기내의 공기를 제거하였다. 이 후 반응기를 수소로 채워 반응 압력인 50 bar까지 올리고 반응 온도인 300 °C까지 승온시켰다. 반응 온도에서 20시간동안 반응실험을 수행하였다. 반응이 끝난 후, 냉각수를 이용하여 반응기를 상온까지 냉각시키고 시료를 채취하여 HP-5 capillary column(60 m × 0.25 mm × 0.25 $\mu$ m)이 부착된 GC-MS(Agilent Technologies, 7890A)로 반응 생성물을 정성적으로 분석하였다 ([그림 5-5-8]).

실험 결과, 반응 후 바이오오일의 상태를 관찰해 보았을 때 처리 전 바이오오일에 비해 색깔이 짙은 갈색에서 옅은 갈색으로 변화한 것을 확인하였으며 ([그림 5-5-9]), 이는 바이오오일내 고분자 화합물이 저분자 화합물로 전환되었으며 동시에 바이오오일내에 포함되어 있는 산소 함량이 줄어들었기 때문이라고 생각된다. 현재, 이를 확인하기 위해 반응 전후의 바이오오일의 물성 분석을 수행중이다.



[그림 5-5-7] 바이오오일 업그레이딩 실험 장치



[그림 5-5-8] GC-MS를 이용한 바이오오일의 구성 성분 분석



[그림 5-5-9] 수첨탈산소 반응에 따른 바이오오일의 변화

#### 4. 요약 및 제언

7가지의 공정 부산물의 물리·화학적 특성 및 열적 동특성을 분석하여 바이오오일 생산원료로서의 이용가능성을 평가하였으며, 그 결과 VFA 공정 부산물이 바이오오일 생산에 이용가능하다고 판단되었다. 또한, 바이오오일 수율을 향상시키기 위해 다양한 전처리 공정을 도입하여 다시마 처리 후, 물리·화학적 특성 및 열적 동특성을 분석한 결과 산을 촉매로 사용한 경우 다시마의 물성 및 주요 열분해 온도 구간에서 열적 동특성을 효과적으로 개선시킬 수 있었으며, 전처리 온도, 반응 시간과 같은 전처리 조건을 최적화하였다. 마지막으로, 상기 전처리 다시마를 원료로 바이오오일 생산 실험을 수행한 결과, 바이오오일의 수율을 향상시킬 수 있었으며, 촉매 개질 공정을 이용하여 다시마로부터 생산된 바이오오일을 고품질 연료로 전환시키는 기초 연구를 수행하였다.

## 5. 향후계획

차기년도에서는 당해연도 연구를 토대로 전처리된 다시마를 이용하여 바이오오일 생산 조건을 최적화하고, 또한 생산된 바이오오일을 고품질 연료로 전환시키기 위한 수침탈산소 반응용 촉매 개발 및 반응조건 최적화에 대한 연구를 수행할 계획이다.





## 제 6 장

# 통합공정 및 제품 개발

- 제 1 절 해조류의 활용을 위한 통합공정 최적설계
- 제 2 절 해조류 유용물질 분리 및 회수 공정 개발
- 제 3 절 해조류 부산물을 이용한 바이오 복합재료 개발



## 제 6 장 통합공정 및 제품개발

### 제 1 절 해조류의 활용을 위한 통합공정 최적설계

#### 1. 연구 목적 및 내용

##### 가. 연구 목적

해조류 바이오매스의 에너지화 및 통합적 활용을 위한 공정의 통합 및 설계

##### 나. 연구 내용

해조류 바이오매스의 에너지화 공정 중 하나인 혼합알코올 생산공정, 전처리, 혐기성소화, 수소화공정, 분리공정을 포함한 전체 공정을 대상으로 한

- 통합공정을 이루는 개별 주요 공정의 에너지 및 물질 수지식 수립
- 공정 모사기를 이용한 개념설계
- 통합공정의 경제성 분석

#### 2. 연구 방법

##### 가. 자료수집

모델링을 위한 기초 자료는 “해조류 바이오매스의 그린에너지화 및 통합적 활용을 위한 기반구축 연구” 보고서[1]를 토대로, 바이오매스 전환공정 관련 공정모사와 경제성 분석에 대한 자료는 관련 문헌[2-6]을 참조하였다.

##### 나. 실험 절차

(1) 수집한 자료로부터 전체 생산공정을 이루고 있는 여러 단위의 물질 및 에너지 수지식을 공정 흐름도(flowchart)에 표시한다.

(2) 공정모사기 Aspen plus를 이용하여 공정에 사용되는 화학물질에 적합한 열역학 모델을 선택한다.

(3) 공정모사기 Aspen plus를 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) 공정 모사기가 결정한 장치의 size를 가지고 각 장치의 제작비용을 추정하고 경제성분석을 한다.

### 3. 연구수행 결과

#### 가. 열역학 모델링

일반적인 화학물질과는 달리 거대 해조류와 그 구성 물질은 상용 공정모사기의 열역학 물성 데이터베이스에 포함되어 있지 않기 때문에, 거대 해조류 전환공정 및 분리공정 중 액-액 또는 기-액 평형이나 혼합물의 엔탈피 등을 공정모사기로 계산하기 위해서는 열역학 모델링을 통해서만 가능하다.

[표 6-1-1] 갈조류의 구성 성분

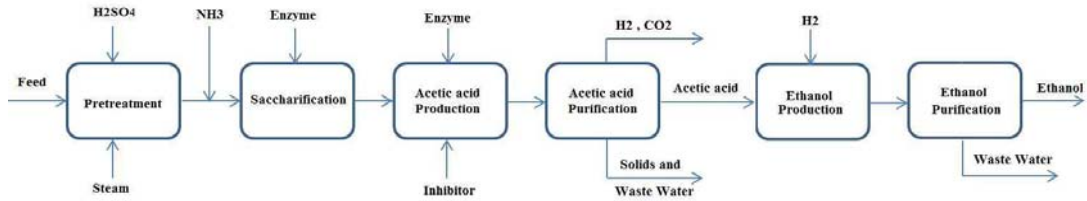
| Component | Base of design | Used in simulation |
|-----------|----------------|--------------------|
|           | Dry wt %       | Dry wt %           |
| Ash       | 23.63          | 25.48              |
| Algin     | 27.78          | 27.78              |
| Laminaran | 16.67          | 18.52              |
| Mannitol  | 14.81          | 14.81              |
| Fucoidan  | 3.7            | -                  |
| Cellulose | 6              | 6                  |
| Protein   | 7.41           | 7.41               |

이를 위하여 여러 문헌들에 나타난 갈조류의 구성성분들의 평균값을 base로 하여 소량의 성분 (fucoidan)을 제외한 나머지 성분을 공정모사에 사용하였다 (표 6-1-1 참조). 즉, 갈조류는 mannitol, alginate, laminaran, ash, protein, cellulose의 혼합물이며 물성 열역학 모델링을 요약하면 다음과 같다.

- ✓ mannitol과 sorbitol은 이성질체이며 sorbitol은 aspen database에 기본적으로 제공되는 물질이므로 mannitol의 물성은 sorbitol의 것을 사용하였다
- ✓ Alginate는 고체로만 존재하며 ascorbic acid( $C_6H_8O_6$ , aspen database에 존재함)로 간주하였다.
- ✓ (가수분해 후) alginate의 단량체는 화학식이  $C_6H_{10}O_7$ 이며 유사한 화학식을 갖는 D-galacturonic-acid-monohydrate(aspen database에 존재함)의 물성을 사용하였다.
- ✓ Laminaran은 cellulose로 간주하여 aspen database에 존재하는 cellulose의 물성을 사용하였다.
- ✓ Ash는 calcium-oxide로 간주하였다. (NREL[8]과 동일)
- ✓ Protein은 aspen database에 존재하는 물질이다.

나. 물질 및 에너지 수지식 모델링

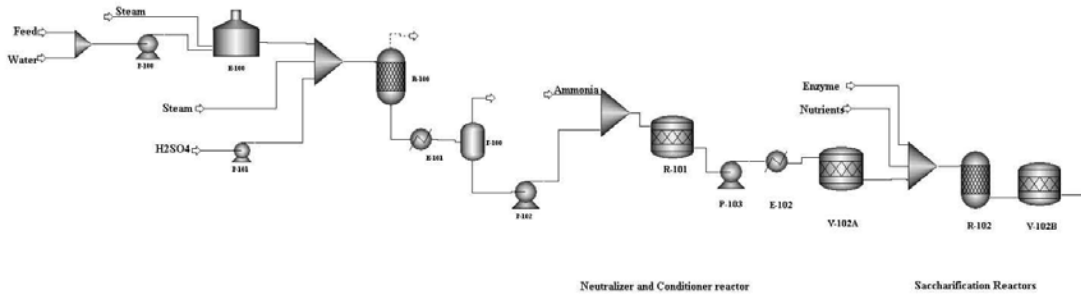
수집한 여러 자료들을 통하여 혼합알코올을 생산하는 전체 공정의 개념설계를 하였고, 그 결과를 다음의 간략한 공정 흐름도를 통해 나타내었다. 이 때 공정의 설계 기준은 연간 100,000 톤의 건조 다시마를 처리하는 것으로 하였다.



[그림 6-1-1] 해조류로부터 혼합알코올을 생산하는 공장의 공정 흐름도.

○ 전처리 및 당화공정

다음의 그림에 Aspen plus를 사용하여 구현한 전처리 및 당화공정을 나타내었다. 우선 건조 다시마 파우더를 10%(w/v) 슬러리로 만들기 위해 물을 첨가하였고 164.3℃, 689.5KPa의 steam을 이용한 열분해 후 황산농도가 40 mM가 되도록 황산을 첨가하였다.

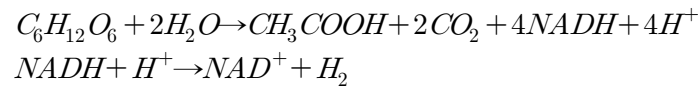


[그림 6-1-2] 전처리 및 당화 공정의 공정 흐름도.

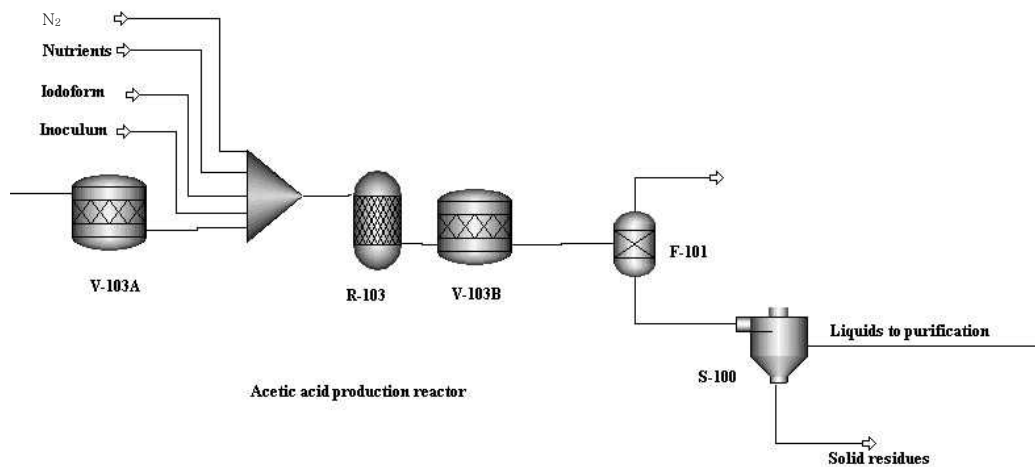
효소당화 공정으로 투입되기 전 산성의 슬러리를 중화하기 위해 NH<sub>3</sub>를 사용하였는데, 석회보다 비싸지만 당화시 당의 손실이 적고, 점도가 낮은 슬러리를 만들 수 있기 때문에 원심분리기와 같은 고-액 분리단계를 없앨 수 있기 때문이다. 효소당화 공정을 거친 생성물은 다음의 혐기성 소화장치로 보내진다.

○ 혐기성 소화공정

혐기성 소화장치에서 당당류들은 아세트산, 뷰티릭 산 등 휘발성 유기산으로 전환되는데, 물질 수지식 모델링을 위해 본 연구에서 사용한 반응식은 다음과 같다. 또한 모든 바이오매스가 메탄 생성균에 의해 메탄으로 전환되는 것을 막기 위해 iodoform을 첨가하였다.



혐기성 소화로 생성된 수소와 이산화 탄소를 액상 생성물과 고체상 미반응물과 분리하기 위해 flash drum을 설치하였고, 아세트산을 포함한 액상 생성물은 원심분리기를 사용하여 고체상 미반응물과 분리 후 분리공정으로 보내진다.

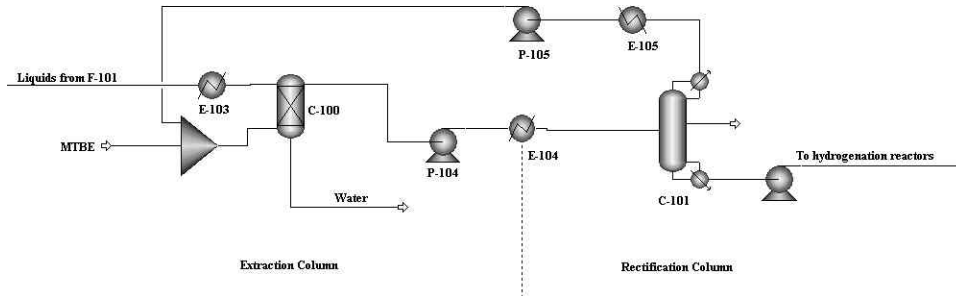


[그림 6-1-3] 혐기성소화 장치.

○ 혼합유기산 분리공정

아세트산을 포함한 혼합유기산과 물이 공비 혼합물을 형성하지는 않지만, 일반적인 증류공정을 단독으로 사용하면 이 두 성분을 분리해내는데 많은 평형단 (equilibrium stage)이 요구되므로 매우 비실용적이다. 제 3의 물질을 혼합물에 넣어 물의 증발을 쉽게 하면 보다 적은 에너지로 분리가 가능해지고 특히 혼합유기산의 농도가 40 % (w/w) 이하일 때는 액-액 추출 공정이 혼합물로 물을 분리해내는데 많이 사용된다. 본 연구에서도 액-액 추출공정을 혼합유기산 분리에 사용하였는데 추출 용매로서는 다른 추출용매보다 끓는 점이 낮고 분리에 보다 적은 에너지를 필

요로하는 MTBE(Methyl-Tert.-Butyl Ether)를 사용하다. 다음 그림에 혼합유기산 분리공정의 공정흐름도를 나타내었다.

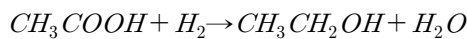


[그림 6-1-5] 혼합유기산 분리공정

MTBE는 재순환 흐름과 함께 추출탑의 하단부로 들어가고 MTBE 대비 높은 밀도를 갖는 혼합유기산-물 혼합물은 탑 상부로 들어간다. 최종적으로 정제된 혼합유기산 흐름은 수소화공정으로 보내져 에탄올을 만들게 된다.

○ 에탄올 생성 및 분리공정

혼합유기산은 높은 압력하에 수소와 반응하여 혼합알코올로 전환되는데 주요 반응은 아래와 같다.



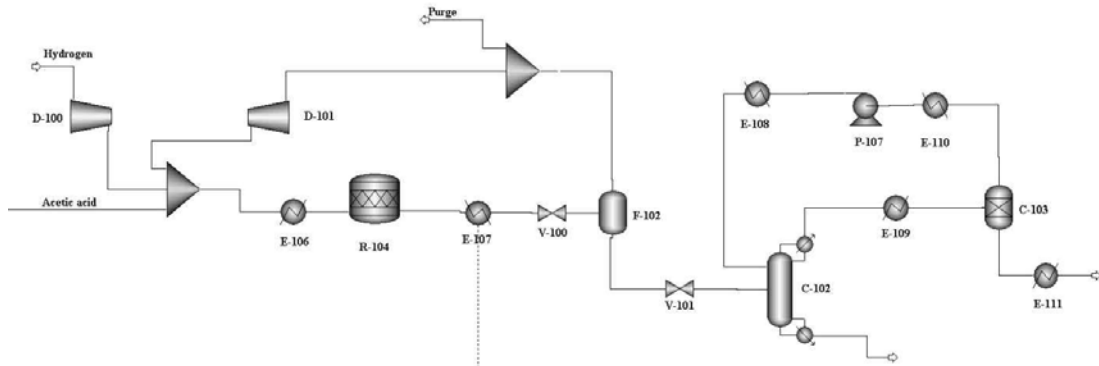
아세트산 수소화에 의한 에탄올 합성의 연속적인 과정은 Schuster 등에 의해 개발되었고[6] 본 연구에서 에탄올 합성과정의 기본 설계로 선택되었다. 이 과정의 특징은 97%의 높은 에탄올 수율과 다른 아세트산 수소화 과정과 비교했을 때 낮은 반응 압력이다[6].

Schuster 등에 의해 개발된 이 과정은 높은 압력과 높은 온도에서 기체상의 수소화 과정인데 반응온도는 230~270℃, 반응 압력은 40~120bar 이며 액상은 이 조건에서 형성되지 않는다. 정제되지 않은 반응물 흐름은 68 wt% 혼합유기산, 29 wt% 물 그리고 적은 양의 아세트산을 포함한다. 에탄올은 C-102에서 증류에 의해 물-에탄올 공비 혼합물로 정제된다. 그런 다음 분자여과기 C-103에서 더 건조된다. 생산물은 99.5%의 에탄올이다. 주요 공정흐름의 질량유속과 전체 수소화 및 분리공정의 흐름을 다음의 표와 그림에 나타냈다.

[표 6-1-2] 주요 공정흐름의 질량 유속

| Dry seaweed  | Hydrogen  | VFA produced | Ethanol produced |
|--------------|-----------|--------------|------------------|
| 11,415 kg/hr | 312 kg/hr | 4,757 kg/hr  | 3,540 kg/hr      |





[그림 6-1-6] 에탄올 생성과 분리공정의 흐름도.

#### 다. 경제성 분석

본 연구에서 경제성 분석은 위의 설계 결과로 얻은 공정 흐름도를 토대로 Aspen Economic analyzer를 사용하여 수행하였다. 현재 다시마의 도매가격 수준을 가지는 의미 있는 경제성 분석 결과가 나오지 않으므로, 전년도와 마찬가지로 단순 감가상각비용을 포함한 운전비용 (utility cost + raw material cost)이 연간 제품 판매액 같아지는 손익 분기점에서의 다시마 원료의 비용(maximum dry seaweed price, MDSP)을 계산하였다. 이 때 사용한 가정 및 조건들은 다음과 같다.

- ✓ 설비 기본 용량은 건조 해조류 바이오매스 100,000MT/year이다.
- ✓ 우발 위험 준비금은 전체 프로젝트 비용의 18%이다.
- ✓ 설비운전의 10년 간 자본비의 가치가 떨어진다.
- ✓ 운전 자본은 매년 전체 자본비의 5%이다.
- ✓ 세율은 매년 24.75%이다.
- ✓ 내부 수익률은 15%이다.

생산비는 다양한 운영비(화학 처리 공정, 영양소 등)와 운전비 고정분(고용자 급여, 간접비, 유지보수 및 보험)을 포함한다. 화학 물질 가격은 문헌 자료와 ICIS와 같은 공공의 이용 가능한 자료로부터 얻었다. 다음의 표는 본 연구에 사용된 원료 가격과 제품 가격을 보여준다.

[표 6-1-3] 원료와 제품의 단위 가격

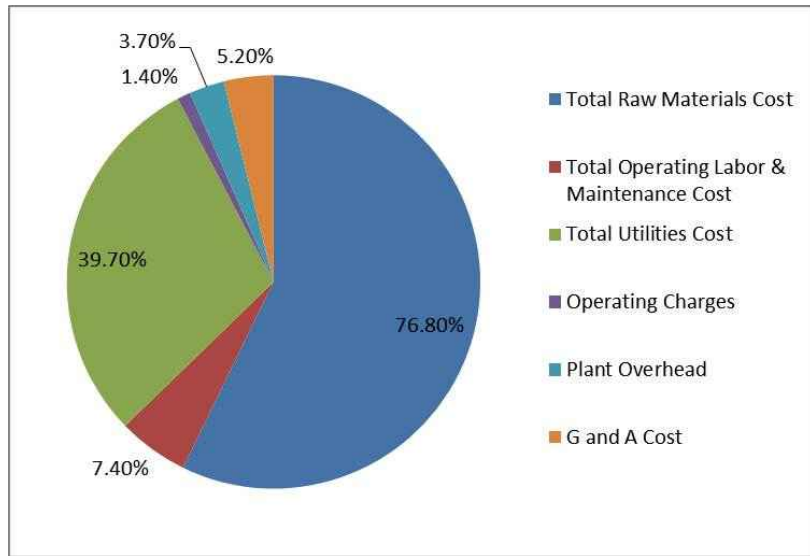
| Raw material           | Cost (US\$/kg)          |
|------------------------|-------------------------|
| Ammonia                | 0.392                   |
| Sulphuric acid         | 0.093                   |
| HP Steam @ 165 PSI     | 0.0179                  |
| Nutrient               | 0.786                   |
| Hydrogen               | 5.9 \$/1000scf          |
| Hydrogenation catalyst | 18.975 \$/lb catalyst   |
| Solvent (MTBE)         | 1.29 \$/Kg              |
| Inhibitor (Iodoform)   | 3.3 \$/Kg               |
| Products               | Selling Price (US\$/kg) |
| Ethanol 99.5%          | 0.891                   |

총 프로젝트 자본비는 시설의 economic life 10년간 직선 감가상각의 방법을 통해 가치가 떨어질 것으로 간주하였다. 위의 가정들과 원료, 제품의 단위가격에 근거해서 10년 공장 운전후 손익분기점에 도달할 수 있는 최대 해조류 바이오매스 원료 가격(MDSP)은 연간 해조류 처리량 100,000MT에 기초하여 153\$/ton으로 계산되었다. 아래 표는 손익 분기점에서의 생산 비용을 보여준다.

[표 6-1-3] 10년 운전 후 손익분기점에서의 생산비(US\$).

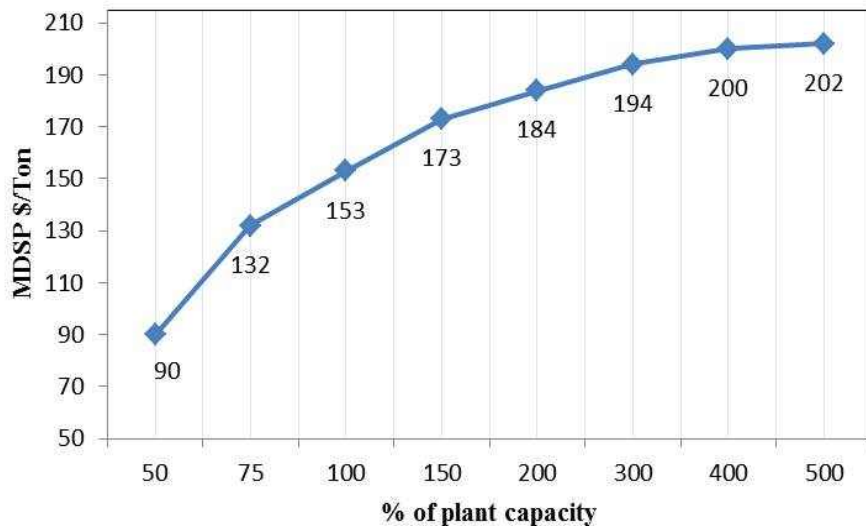
|   |            |
|---|------------|
| Total Project Cost                                  | 18,341,000 |
| Total operating labor and maintenance cost per year | 1,854,000  |
| Total raw material cost per year                    | 18,297,200 |
| Total product sales per year                        | 36,256,600 |
| Total utilities cost per year                       | 9,921,120  |

10년간 운영비용의 분포를 파이 차트로 다음 그림에 나타내었다. 차트에서 원자재는 전체 운영비용의 76.8%을 구성하는 것을 볼 수 있다. 운영비용의 39.7%는 유틸리티가 차지했는데 이러한 높은 유틸리티 비용은 특히 두 개의 분리공정—혼합 유기산 분리공정, 혼합알코올 분리공정—에서의 에너지 요구량의 결과로 볼 수 있다.



[그림 6-1-7] 공장운영비의 파이차트

생산비용에 관한 공장 크기(capacity)의 효과를 조사하기 위해, 기본 설계 (100,000 MT/Year of dry seaweeds)의 50%에서 500%까지 규모를 확대한 공장을 Aspen Process Economic Analyzer를 사용하여 분석 하였다. 그 결과, 본 연구에서 사용한 기본 설계 대비 약 400% 더 큰 용량의 공장을 건설할 경우 공장전체의 경제성을 향상시킬 수 있다는 것을 알 수 있었다. 다음의 그림에 MDSP와 공정크기의 상관관계를 나타내는 그래프를 나타내었다.



[그림 6-1-8] 최대 허용 건조 해조류 가격과 공장크기와의 상관관계

#### 4. 요약 및 제언

혐기성 소화에 의한 해조류의 혼합유기산 전환과 수소화를 통한 혼합유기산의 혼합알코올로의 전환에 대해 수집한 물질 수지식에 대한 정보들을 토대로 전체 공정의 물질 및 에너지 수지식을 공정모사기 Aspen plus로 수립할 수 있었다. 실험실 규모 이상의 실험에서 얻은 실험데이터가 수집되면 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 조건에서 원료인 다시마의 가격이 153\$/ton 이하가 되어야 손익분기점을 돌파할 수 있는 것으로 분석되었고 공장의 규모를 기본 설계의 400%로 확장했을 경우엔 200\$/ton으로 향상되는 것을 알 수 있었다.

경제성 분석의 정확도는 물질 및 에너지 수지식의 정확도에 달려있으므로 현재 수행중인 (또는 향후 수행 시) 전처리 공정 및 전환공정(생물학적 전환공정, 혐기성 소화, 급속 열분해) 연구에서 보다 정확한 물질 수지식에 대한 정보가 수집되어야 할 것이다. 또한 정확한 경제성 분석을 위해서는 모델링에 많은 인적 물적 자원이 필요하므로 향후 연구 계획 수립 시 이점에 대한 반영이 필요하다고 판단된다.

#### 5. 향후계획

연구 결과의 정확도를 향상시키기 위한 향후 연구 계획은 다음과 같다:

- ✓ 전처리 및 전환공정의 물질/에너지 수지식 관련 정보 추가 수집.
- ✓ 혐기성 소화에 의한 유기산 전환공정 모델의 완성도 향상.
- ✓ 수소화에 의한 혼합알코올 전환공정 모델의 완성도 향상.
- ✓ 기초 경제성 평가 모델의 정확도 향상.



## 제 2 절 혐기성소화에 의한 bench scale 유기산 생성 공정 구축

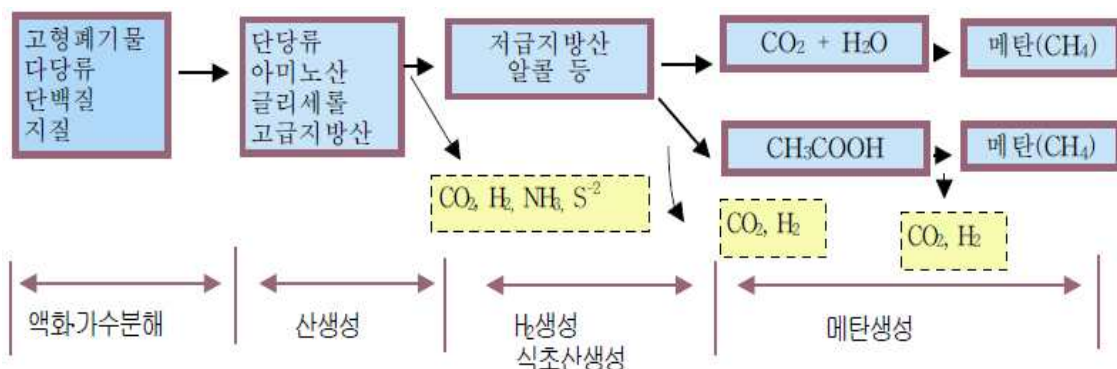
### 1. 연구 목적 및 내용

#### 가. 연구 목적

본 연구에서는 해조류로부터 혐기성 소화를 통하여 다양한 화학원료로 이용될 수 있는 준 파일럿 규모(bench scale) 유기산 생성 공정 기술 개발을 목표로 한다. 이는 향후 해조류 바이오매스 통합공정 구축을 위한 미니 파일럿 규모(mini scale; 반응조 사이즈가 10~100 L 규모인 플랜트) 운전의 기초자료로 활용될 계획이다. 특히, 유기산을 생성하고 난 해조류 부산물은 해조류 바이오매스의 통합적 활용을 위한 부산물 응용 기술개발에 적용될 것으로 사료된다.

#### 나. 연구 내용

혐기성 소화는 산소가 없는 조건에서 성장하는 혐기성 미생물의 의해, 고농도 유기성 물질(예 : 유기성폐기물, 가축분뇨, 음식물류폐기물, 유기성 폐수 등)을 최종적으로 대체에너지로 활용 가능한 바이오메탄(methane, CH<sub>4</sub>) 가스로 전환하는 일련의 대사과정이다. 혐기성 소화는 크게 4단계로 구분되는데 우선, 고분자의 유기화합물(예 : 탄수화물, 단백질, 지질 등)의 가수분해과정, 가수분해 산물(예 : 단당류, 아노산, 글리세롤, 고급지방산 등)을 이용한 휘발성유기산(volatile fatty acids, VFAs) 생성과정, 이들을 식초산 및 수소(H<sub>2</sub>) 가스로 분해하는 과정, 그리고 최종적으로 식초산 및 수소를 이용하여 메탄가스를 생성하는 일련의 과정이다(그림 6-2-1).



[그림 6-2-1] 혐기성소화에 의한 유기물 분해단계

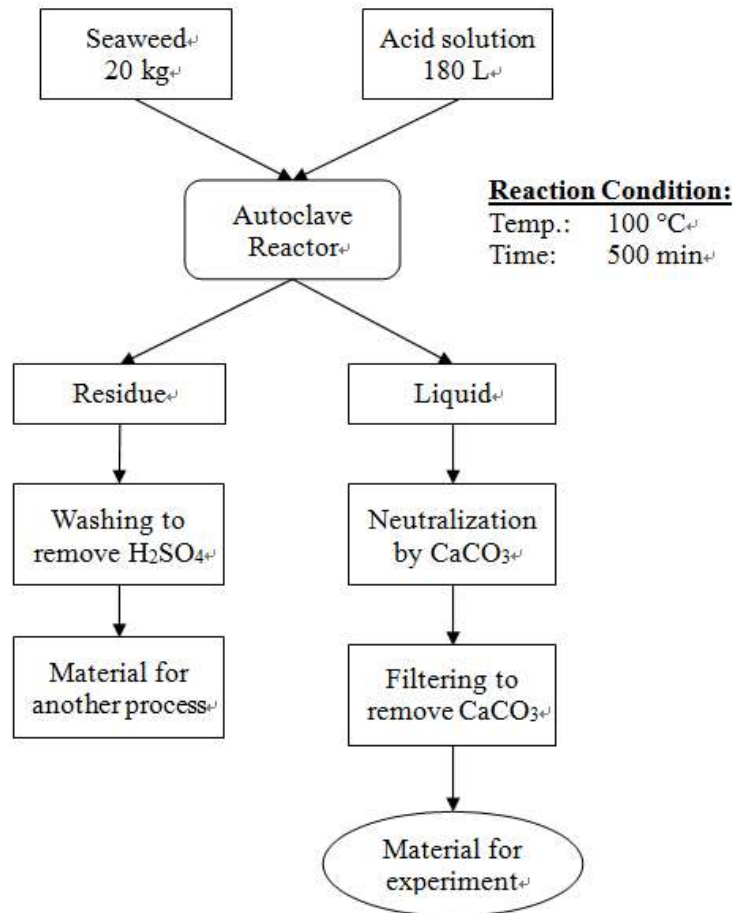
혐기성 소화 과정에서 생산되는 유기산은 초산(C2), 프로피온산(C3), 부티르산(C4) 등으로 구성되며 이들은 수소첨가반응을 통하여 각각 에탄올, 프로판올, 부탄올로 변환할 수 있다. 따라서, 본 연구는 해조류 바이오매스 통합공정을 위한 준파일럿 규모의 유기산 생성장치를 설치하여 혐기성 소화에 의한 유기산 생성 조건을 검토하고 시운전 조건을 선정하여 다량의 유기산을 생성하는 최적 상태를 파악하고자 한다.

## 2. 연구 방법

### 가. 실험장치 및 재료

#### (1) 황산 전처리에 의한 해조류 추출물 준비

본 연구에 사용된 해조류는 전라남도 완도에서 생산된 다시마(*Laminara japonica*)이며, 자연건조시킨 후 약 1 mm 크기로 분쇄된 분말을 사용하였다. 해조류 분말을 유기산 생산 기질형태로 만들기 위하여 [그림 6-2-2]와 같이 황산 전처리를 하여 해조류 추출물을 확보하였다. 황산 전처리 과정은 우선, 환류기가 장착된 250 L 용량의 유리반응기에 다시마 20 kg과 5 wt% 황산수용액 180 L를 넣고 100 °C에서 500분 동안 교반하며 반응시킨 후, 반응 완료물을 필터프레스(filter press)로 여과하여 액상 반응물을 회수한다. 이후 황산칼슘( $\text{CaSO}_4$ )으로 중화시키고 필터프레스로 여과하여 해조류 추출물을 확보하였다.



[그림 6-2-2] 황산 전처리에 의한 해조류 추출물 기질 준비과정

얻어진 해조류 추출물의 농도는 하기의 식으로 계산하여, 55 g/L의 해조류 추출물 농도를 bench scale 유기산 생산을 위한 기질로 사용하였다.

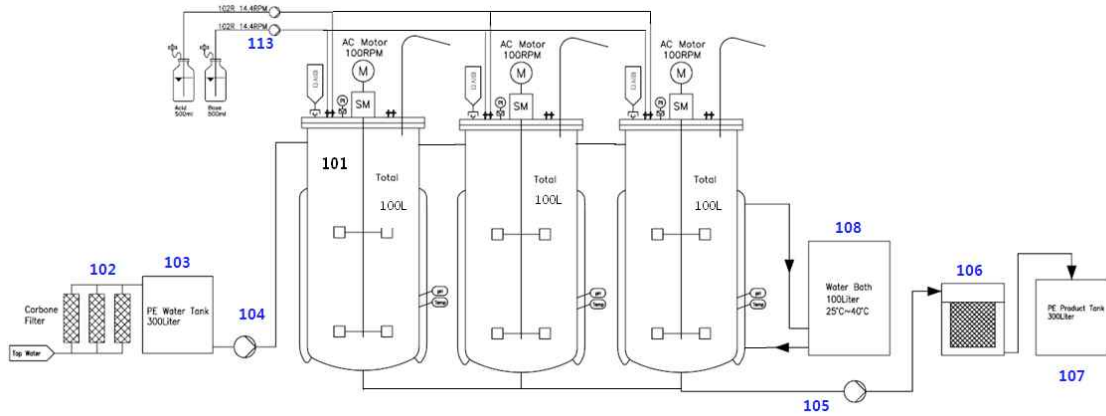
$$\text{추출물농도}(g/L) = \frac{\text{추출전건조해조류총중량}(g) - \text{추출후건조해조류총중량}(g)}{\text{용매부피}(L)}$$

## (2) Bench scale 혐기성 소화 장치

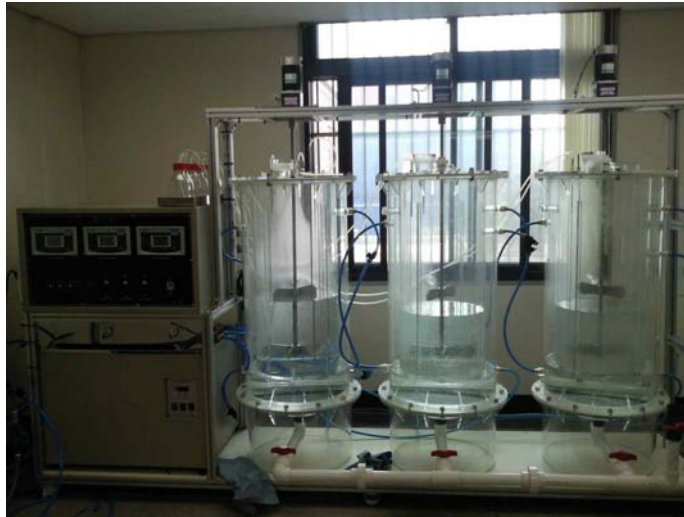
본 연구에 사용된 bench scale 혐기성 소화 공정 장치는 내경 40 cm, 높이 100 cm로 100 L 용량의 3개의 반응기가 직렬로 연결이 되어 있으며, 회분식(batch) 과 연속식(continuous) 방법의 호환이 가능하도록 설계되었다[그림 6-2-3]. 연속식으로 운전할 때는 침전지를 설치하여 혐기성 미생물의 반송을 유도하였다. 유입수



는 상향류로 주입되며 반응장치 내부에는 미생물과 해조류의 혼합을 위하여 교반장치가 설치되었다. 또한, 반응장치 상부에는 pH 및 온도 자동 조절 장치가 설치되어 있고, 시료를 채취할 수 있도록 시료채취구를 반응장치 상단에 설치하였다. [그림 6-2-4]는 실제 유기산 생산 300 L 용량의 bench scale 혐기성 소화 공정의 실제 모습이다.



[그림 6-2-3] 유기산 생산 300 L 용량의 bench scale 혐기성 소화 공정 상세도



[그림 6-2-4] 혐기성 발효 장치 도면 및 사진

### (3) 미생물 접종원과 영양염

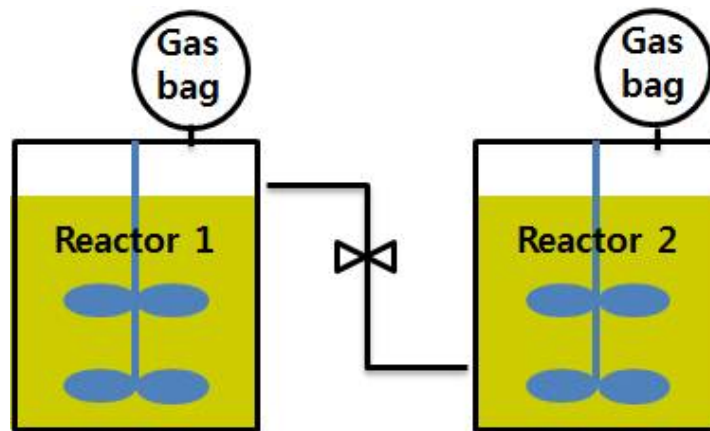
혐기성 발효에 사용된 미생물은 부산시 남구 소재 수영 하수종말처리장의 소화조 반송 슬러지를 사용하였으며, 영양염은 1.1 g/L의  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ 를 사용하였다.

### 나. 실험 절차

#### (1) 회분식 실험

연속식 실험을 위해서는 우선 회분식 실험 수행을 통하여 기질이 완전히 분해되어 유기산이 축적되고, 더 이상 분해되지 않는 시점에서 펌프를 가동하여 기

질을 일정 속도(단위 : 1109 g VS/day)로 유입시켜 유기산 생산량을 확인하여야 한다, 본 실험에 이용된 회분식 장치는 [그림 6-2-5]와 같으며, 실험절차는 반응조 (reactor) 1과 2에 [표 6-2-1]과 같은 조건으로 하여, 반응시간에 따른 총 유기산 생산량 및 유기산 조성에 대해 분석하였다. 회분식 반응장치에 황산 전처리된 해조류 추출물 55 g/L과 1.1 g/L의  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  영양염을 주입한 후, 산소제거를 위해 질소가스를 10분간 주입하였다. 이후 미생물 접종원인 반응슬러지를 각각 10%(v/v, 10 L) 주입하고, pH를 조절하기 위해 3 M의  $\text{NaHCO}_3$  pH 완충용액을 이용하였다. 유기산 생산 반응은 pH 6.7~7.0에서 35℃, 30 rpm으로 유지하였다[표 6-2-1]. 반응이 진행되는 동안 반응장치에서 발생하는 가스량을 측정하기 위하여 가스 포집기를 설치하여 분석을 실시하였다.



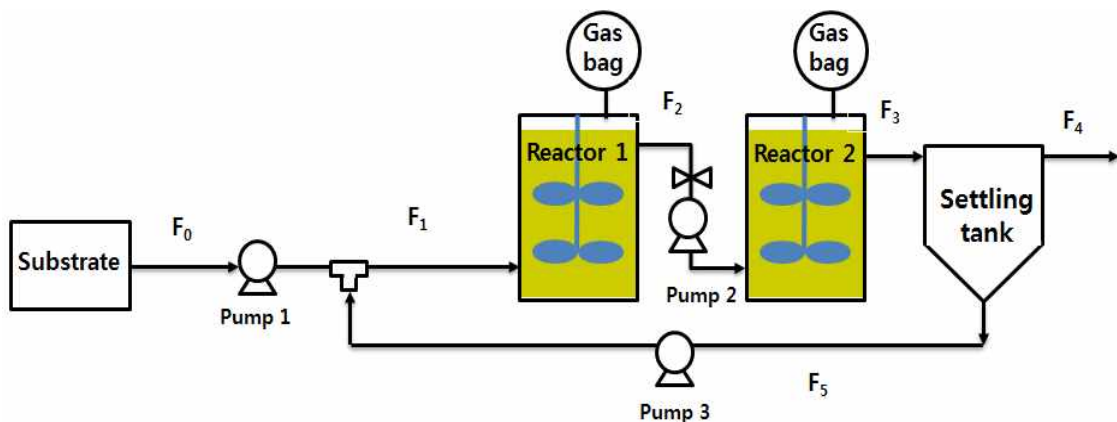
[그림 6-2-5] 회분식 실험 장치

[표 6-2-1] 회분식 실험 조건

|                          | Reactor 1                             | Reactor 2 |
|--------------------------|---------------------------------------|-----------|
| Feed Concentration (g/L) | 55                                    |           |
| Temperature (°C)         | 35                                    |           |
| Nutrient                 | $\text{KH}_2\text{PO}_4$              |           |
| Buffer solution          | 3 M $\text{NH}_4\text{CO}_3$ solution |           |
| Sludge ratio             | 1/10 (Sludge volume/Working volume)   |           |
| Working volume (L)       | 100                                   |           |

## (2) 연속식 실험

연속식 실험 장치는 [그림 6-2-6]과 같이 구성하였다. 연속식 실험은 회분식으로 실험하여 해조류 추출물이 더 이상 분해되지 않고 유기산 생산량이 정상상태에서, 펌프를 가동하여 기질을 연속식으로 주입하여 반응시간에 따른 총 유기산 생산량 및 유기산 조성을 분석하였다. 유입되는 기질의 농도는 회분식 반응장치와 동일한 황산 전처리된 해조류 추출물 55 g/L와 1.1 g/L의  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  영양염을 이용하였다. 슬러지 반송은 침전조의  $F_4$  유량과 같이 정상상태에 도달하였을 때, 슬러지를 반송하였으며, 반송유량은 8 mL/min으로  $F_4/F_5$ 의 비가 4/7로 되도록 설정하였다[표 6-2-2]. 반응장치 운전은 회분식과 동일한 3 M의  $\text{NaHCO}_3$  완충용액을 이용하여 pH 6.7~7.0로 조절하였으며, 35°C에서 30 rpm으로 운전하였다[표 6-2-1]. 반응이 진행되는 동안 반응장치에서 발생하는 가스량을 측정하기 위하여 가스 포집기를 설치하여 분석을 실시하였다.



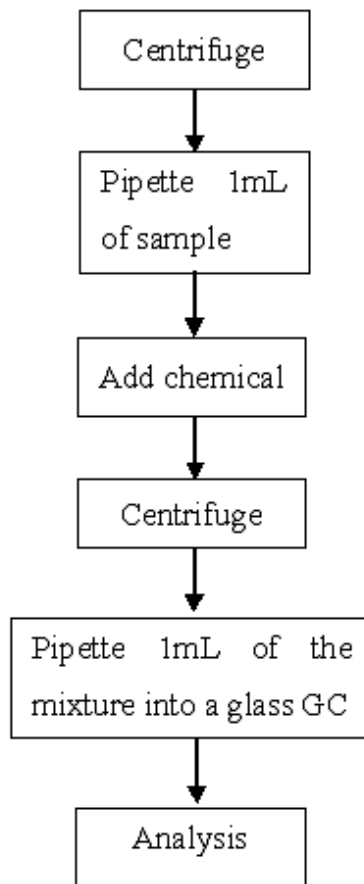
[그림 6-2-6] 연속식 실험 장치

[표 6-2-2] 연속식 실험 장치의 유입 속도 조건

|                 | Flow rate (mL/min) |
|-----------------|--------------------|
| $F_0$           | 14                 |
| $F_1, F_2, F_3$ | 22                 |
| $F_4$           | 14                 |
| $F_5$           | 8                  |

## (3) 반응생성물 분석

반응이 진행되는 동안 배양액의 일정량을 원심분리(3,500 rpm, 5 min)하여 균체와 상등액을 분리하고, 상등액 10 mL에 10 mM의 메틸 발레르산(internal 4-methyl-valeric acid: ISTD)과 3 M의 인산(phosphoric acid: H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>)을 각각 1 mL씩 첨가한 뒤 다시 원심분리(15,000rpm)를 실시하였다. 유기산 측정을 위하여 모세관 칼럼(capillary column, Agilent Technologies, Inc. model HP-FFAP, 50m × 0.32mm × 0.50μm)이 장착된 GC(gas chromatograph, Shimadzu 17A)에 불꽃이온화 검출기(flame ionization detectot: FID)를 장착하여 분석을 실시하였다. 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 30 mL/min로 유지하였다. 유기산의 분석절차는 [그림 6-2-7]과 같다.



[그림 6-2-7] 유기산 분석 절차

### 3. 연구수행 결과

#### 가. 회분식 실험

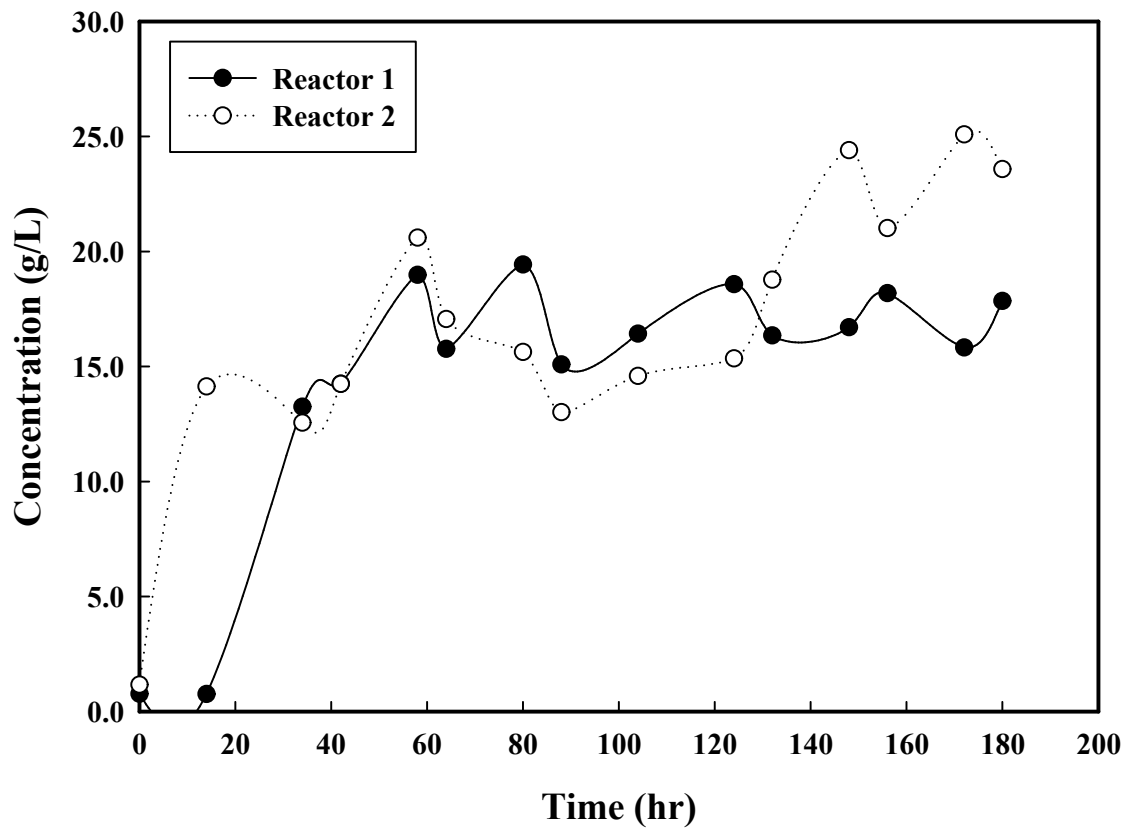
각각의 회분식 반응장치에서 황산 처리된 해조류 추출물 55 g/L로부터 혐기성 소화 반응을 통해 생산된 총 유기산 생산 농도를 [표 6-2-3]에 나타내었다. 각 반응기 모두 58시간 동안에 각각 18.98 g/L와 20.60 g/L로 높은 유기산 생산 농도를 나타내었다[그림 6-2-8]. 이후 180시간 동안 각각의 반응조의 유기산 생산 농도가 더 이상 증가하지 않음을 확인 후 펌프를 가동하여 연속식 운전을 실시하였다.

[그림 6-2-9]과 [그림 6-2-10]은 반응기 1과 2에서 반응시간에 따른 C1~C6 유기산의 조성 변화를 나타낸 것이다. 반응기 1과 2는 같은 실험조건으로 운전되었으며, 반응기 1의 경우 156시간에서 최고 26.12 g/L의 유기산 농도를 나타내었으며, 반응기 2는 172시간에 최고 총유기산 농도 25.08 g/L를 나타내었다. 각 반응기에 대한 유기산 생산 조성은 상대적으로 아세트산(acetic acid), 프로피온산(propionic acid) 및 부트릭산(butanoic acid)의 농도가 높게 나타났으며, 발레르산(valeric acid)과 헥사노익산(hexanoic acid)은 상대적으로 낮은 농도를 보였다. 하지만, 아세트산과 프로피온산의 경우 반응기 1과 2에 대해 서로 다른 경향을 보였으며, 이와 같은 현상은 단일 종의 순수 미생물이 아닌 슬러지 형태의 혼합 미생물을 미생물 접종원으로 사용하여, 각기 다른 미생물들이 유기산 생성 역할을 수행함에 따라 생산된 유기산 조성이 차이를 보인 것으로 사료된다.

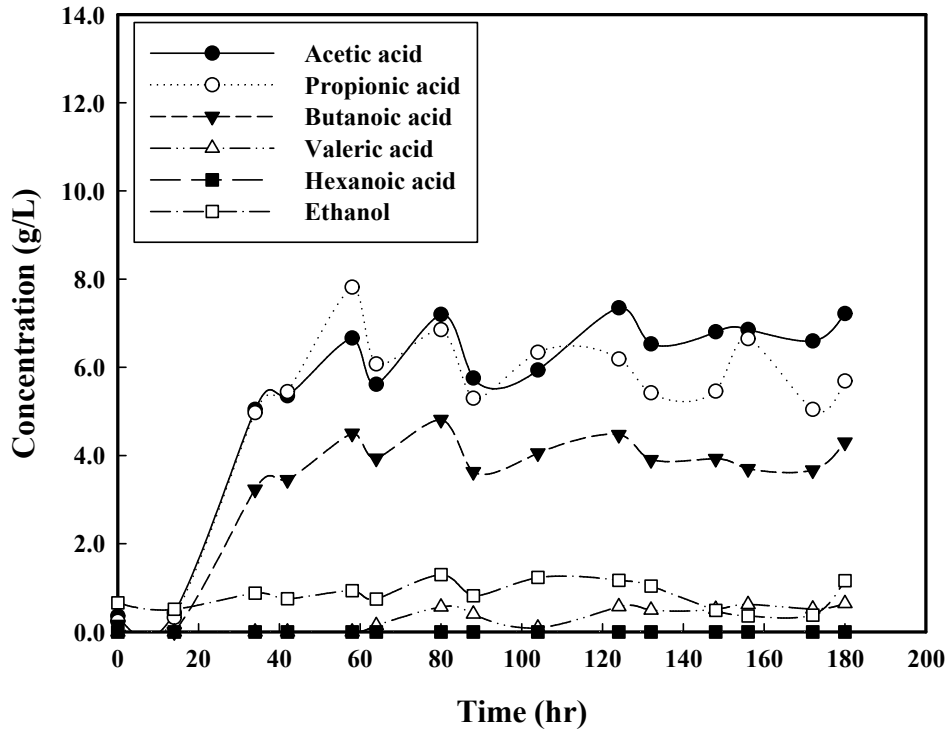
[표 6-2-3] 회분식 실험에 대한 총 유기산 생산 농도결과

| Time(hr) | Total acid concentration (g/L) |          |
|----------|--------------------------------|----------|
|          | Reactor1                       | Reactor2 |
| 0        | 0.77                           | 1.16     |
| 14       | 0.76                           | 14.13    |
| 32       | 13.25                          | 12.55    |
| 42       | 14.25                          | 14.23    |
| 58       | 18.98                          | 20.60    |
| 64       | 15.77                          | 17.06    |
| 80       | 19.43                          | 15.63    |
| 88       | 15.09                          | 13.01    |

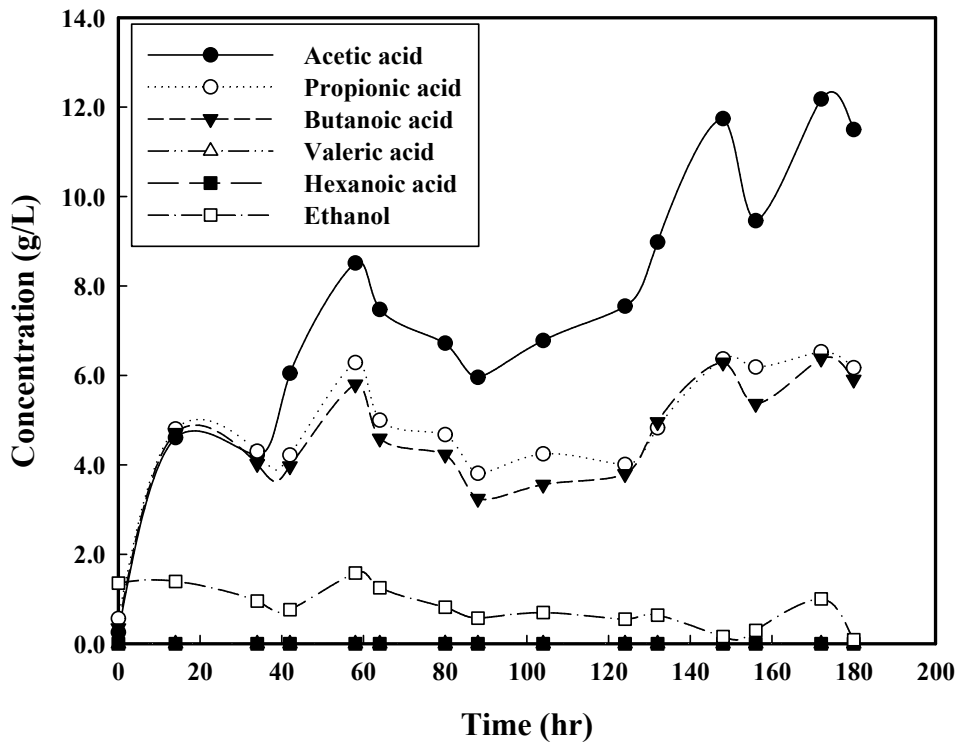
|     |       |       |
|-----|-------|-------|
| 104 | 16.42 | 14.58 |
| 124 | 18.58 | 15.35 |
| 132 | 16.35 | 18.77 |
| 148 | 16.70 | 24.40 |
| 156 | 26.12 | 21.01 |
| 172 | 15.82 | 25.08 |
| 180 | 17.85 | 23.57 |



[그림 6-2-8] 회분식 실험에서의 총 유기산 생산 농도 변화



[그림 6-2-9] 회분식 실험에서 반응조 1의 유기산 조성 변화



[그림 6-2-10] 회분식 실험에서 반응조 2의 유기산 조성변화



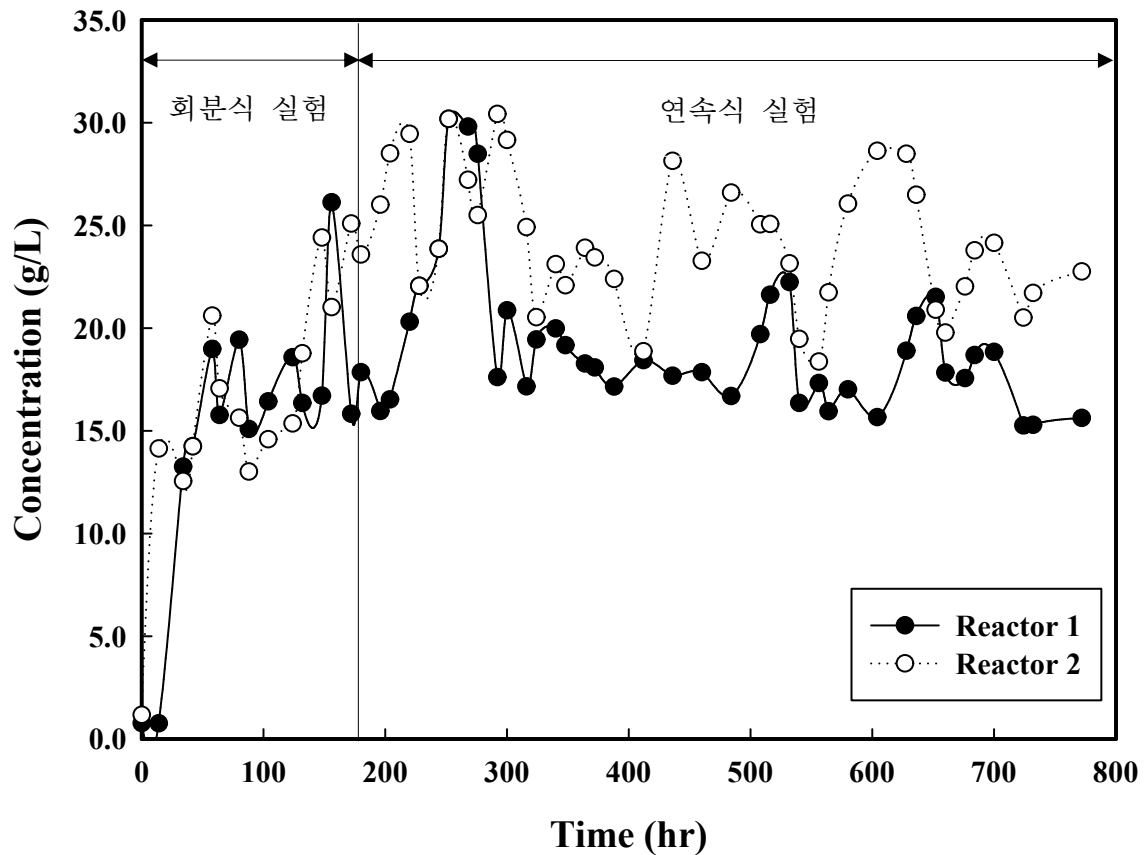
#### 나. 연속식 실험

회분식 실험에서 총 유기산 생산 농도가 일정하게 안정화 된 이후, 펌프를 가동하여 일정한 유속의 기질 주입으로 연속식 유기산 생산 실험을 진행하였다. 연속식 실험은 상기에서 수행한 회분식 실험에서 얻어진 총 유기산의 생산농도에 대해 일정하고 안정하게 지속적으로 유기산을 생산하는 것이 목적이다. 이를 위해 연속식 실험장치 내의 미생물 유실을 방지하고 성장환경을 일정하게 유지하고자 침전조를 두어 슬러지를 일정한 유속으로 반송시켜 운전하였다. 연속식 실험 결과 총 유기산 생산 농도를 [표 6-2-4]와 [그림 6-2-11]에 나타내었다. 회분식에서 연속식으로 기질을 일정하게 주입 후 연속식 운전시간 276시간 동안 약 30 g/L까지 총 유기산 생산량이 증가한 후에 반응조 1에서는 772시간까지 약 20 g/L 범위의 총 유기산 생산 농도를 보였으며, 반응조 2에서는 약 25 g/L 범위의 총 유기산 생산 농도를 보였다. 반응조 2에서 반응조 1보다 높은 약 5 g/L의 총 유기산 생산 농도를 보인 것은 상대적으로 체류시간이 증가함에 따라 총 유기산 생산 농도가 증가한 것으로 사료된다.

[표 6-2-4] 연속식 실험결과

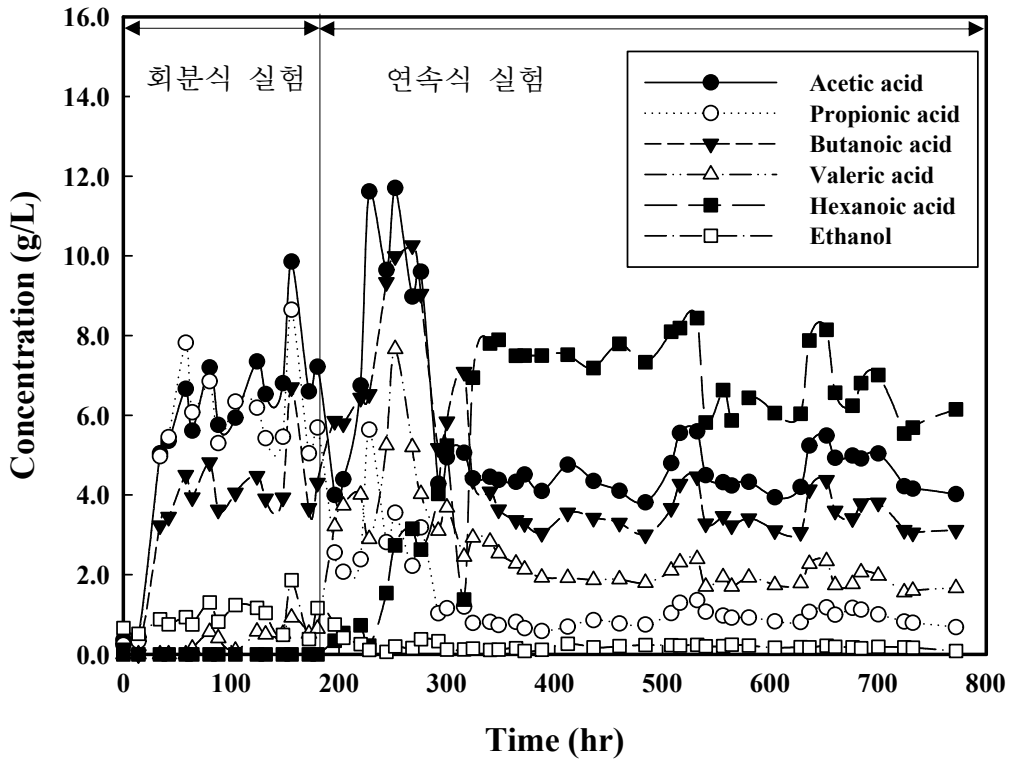
| Time(hr) | Total acid concentration (g/L) |           |
|----------|--------------------------------|-----------|
|          | Reactor 1                      | Reactor 2 |
| 0        | 0.77                           | 1.16      |
| 14       | 0.76                           | 14.13     |
| 32       | 13.25                          | 12.55     |
| 42       | 14.25                          | 14.23     |
| 58       | 18.98                          | 20.60     |
| 64       | 15.77                          | 17.06     |
| 80       | 19.43                          | 15.63     |
| 88       | 15.09                          | 13.01     |
| 104      | 16.42                          | 14.58     |
| 124      | 18.58                          | 15.35     |
| 132      | 16.35                          | 18.77     |
| 148      | 16.70                          | 24.40     |
| 156      | 26.12                          | 21.01     |
| 172      | 15.82                          | 25.08     |
| 180      | 17.85                          | 23.57     |
| 196      | 15.96                          | 26.01     |

|     |       |       |
|-----|-------|-------|
| 204 | 16.52 | 28.50 |
| 220 | 20.30 | 29.45 |
| 228 | 22.05 | 22.05 |
| 244 | 23.85 | 23.85 |
| 252 | 30.18 | 30.18 |
| 268 | 29.81 | 35.02 |
| 276 | 28.48 | 25.49 |
| 292 | 17.60 | 30.41 |
| 300 | 20.86 | 29.15 |
| 316 | 17.16 | 24.91 |
| 324 | 19.44 | 20.53 |
| 340 | 19.97 | 23.10 |
| 348 | 19.16 | 22.08 |
| 364 | 18.27 | 23.91 |
| 372 | 18.08 | 23.43 |
| 388 | 17.15 | 22.39 |
| 412 | 18.43 | 18.86 |
| 436 | 17.68 | 28.14 |
| 460 | 17.85 | 23.27 |
| 484 | 16.68 | 26.59 |
| 508 | 19.70 | 25.04 |
| 516 | 21.62 | 25.06 |
| 532 | 22.23 | 23.15 |
| 540 | 16.35 | 19.47 |
| 556 | 17.32 | 18.36 |
| 564 | 15.95 | 21.73 |
| 580 | 17.01 | 26.05 |
| 604 | 15.66 | 28.62 |
| 628 | 18.89 | 28.48 |
| 636 | 20.58 | 26.48 |
| 652 | 21.51 | 20.89 |
| 660 | 17.83 | 19.77 |
| 676 | 17.56 | 22.02 |
| 684 | 18.68 | 23.78 |
| 700 | 18.83 | 24.14 |
| 724 | 15.25 | 20.50 |
| 732 | 15.28 | 21.70 |
| 772 | 15.62 | 22.75 |

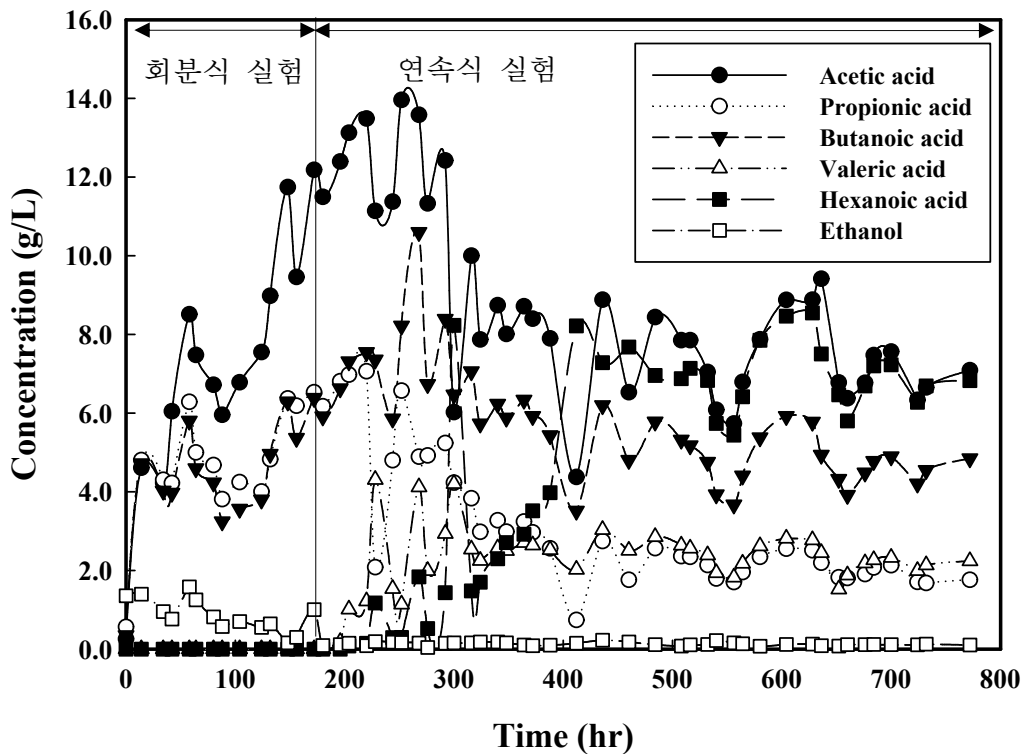


[그림 6-2-11] 연속식 실험에서의 총 유기산 생성 농도 변화.

반응조 1과 2의 연속식 운전에 대한 유기산 조성 변화를 [그림 6-2-12]과 [그림 6-2-13]에 나타내었다. 반응조 1에서는 연속식 운전시간 276시간까지 아세트산과 부트릭산이 각각 약 12 g/L와 약 10 g/L까지 증가하였으며, 이후 324시간까지 급격히 감소함을 보였다. 이에 반해 헥사노익산은 최대 8 g/L까지 증가함을 보였다. 아세트산과 부트릭산이 감소된 현상은 혐기성 소화 반응이 장시간 pH 6.7~7.0으로 유지되어 진행됨에 따라 일부 메탄생성 미생물(최적 pH 조건 7.0~7.5)에 의해 생산된 아세트산과 부트릭산이 분해되어 가스로 전환되었을 것으로 사료된다. 한편, 높은 분자량을 가진 헥사노익산의 증가 현상은 해조류 추출물에 함유된 고분자 유기물질(예 : 고급 지방산 등)의 분해속도가 상대적으로 느려 장시간의 운전에 일부 분해 산물로 확인되었을 것이라 판단된다. 반응조 2에서도 반응조 1과 같은 경향으로 276시간까지 아세트산과 프로피온산, 부트릭산이 증가하였으며, 이후 서서히 감소하는 경향을 보였다. 이에 반해 헥사노익산의 농도는 412시간까지 서서히 증가하여 최대 약 8 g/L까지 증가함을 보였다. 반응조 1과 2에서 유기산 조성이 일정한 경향을 보이는 연속식 운전시간은 400시간에서 800시간 구간이었다. 향후 장시간 운전에 대한 연속식 운전결과를 확인하고 안정적인 공정 운전조건을 확립하여 공정확대 시 기초자료로 적용될 공정확대 계수 및 설계인자 산출에 이용할 계획이다.



[그림 6-2-12] 연속식 실험에서 반응조 1의 유기산 조성 변화



[그림 6-2-13] 연속식 실험에서 반응조 2의 유기산 조성 변화

#### 4. 요약 및 제언

100 L 규모 혐기성 반응기의 회분식 실험에서 생성된 총 유기산의 농도는 최대 약 25 g/L 생산하였으며, 유기산 농도가 안정화된 180시간 이후부터는 100 L 규모의 혐기성 반응기를 2단계로 연결하여 200 L 규모로 연속식 혐기성 발효 실험을 실시하였다. 그 결과 324시간 이후부터 총 유기산 농도가 반응조 1에서는 약 20 g/L 범위의 총 유기산 생산 농도를 보였으며, 반응조 2에서는 약 25 g/L 범위의 총 유기산 생산 농도를 보였다. 또한, 반응조 1과 2에서 유기산 조성이 일정한 경향을 보이는 연속식 운전시간은 400시간에서 800시간 구간이었으며, 향후 3단계 반응조 연결 300 L 규모 연속식 운전 및 장시간운전에 대한 운전결과를 살펴볼 계획임

#### 5. 향후계획

향후, 3단계의 300L 규모 다단계 연속식 혐기성 발효 실험을 실시할 계획이며, 안정적인 유기산 생성을 위한 대용량 장치의 설계 및 운전 방법을 파악하여 유기산 대량생산 최적화에 기술에 대해 지속적으로 연구할 계획이다.

## 제 3 절 해조류 유용물질의 효율적 분리 및 회수 공정 개발

### 1. 연구 목적 및 내용

#### 가. 연구 목적

본 연구는 이용률이 낮은 해조류에 환경 친화적 무오염 용매인 물을 이용하는 아임계수 가수분해 공정을 접목시켜, 높은 부가가치 및 생리활성을 갖는 유용물질을 효율적으로 추출/분리/회수하는 것을 목적으로 한다. 또한 각 유용물질의 최적 분리 조건을 확립과 추출 분리된 물질의 특성을 파악을 통하여 아임계수 가수분해 공정에서 회수된 해조류 유래 유용물질의 산업적 응용을 최종 목적으로 한다.

#### 나. 연구 내용

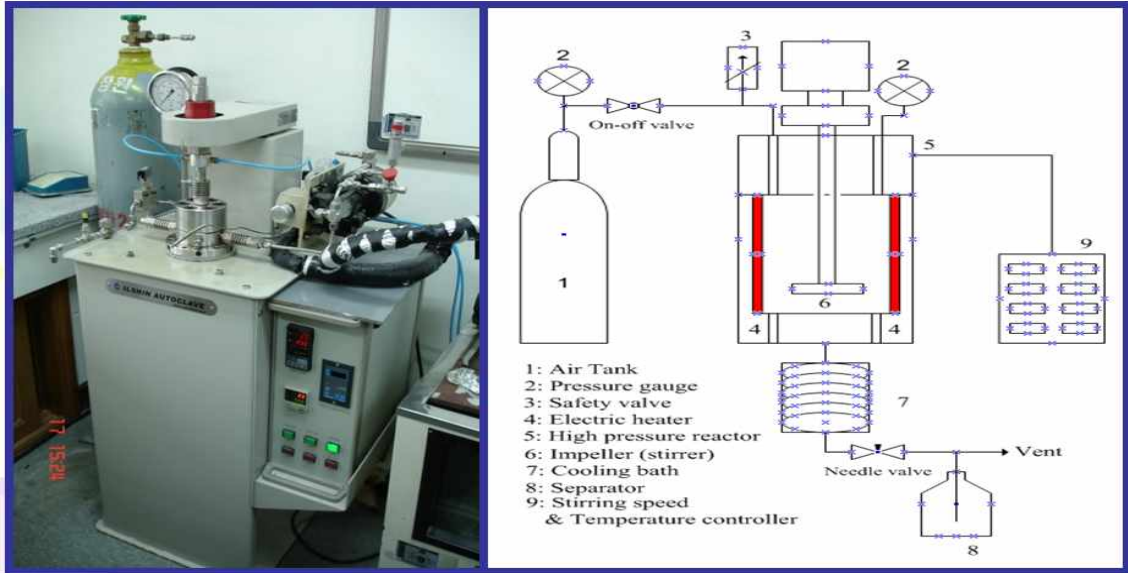
본 연구에서는 회분식 고압 반응기를 사용하여 다양한 실험변수를 적용시켜 해조류 유래 유용물질의 추출/분리/회수를 위한 환경 친화적 아임계수 가수분해 공정 최적화와 생산된 해조류 추출물에 존재하는 바이오 소재를 동정하고 그 기능성 확인 및 회수된 해조류 유래 유용물질의 산업적 응용에 대한 검토를 주요 연구로 하였다.

### 2. 연구 방법

#### 가. 실험장치 및 재료

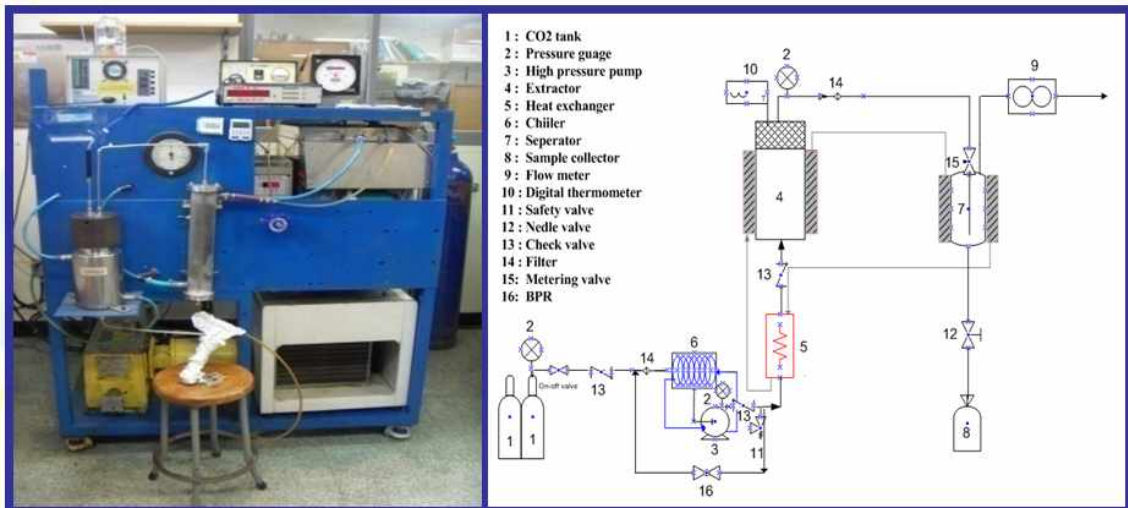
실험에 사용된 해조류는 전라남도 완도군 금일면에서 수확된 다시마 (*Laminaria japonica*)로서, 수세 후 열풍 건조하여 불균일한 입자로 분쇄된 샘플로 제공받았으며, 이 샘플을 균일화하기 위하여 자체적으로 재분쇄한 후 710  $\mu\text{m}$  크기로 샘플 입자를 균일화 하였다. 그 후 실험에 사용되기 전까지  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  심온 저장고에 보관하였다. 이산화탄소는 식품용 순도 99.9%를 사용하였으며 초임계 이산화탄소 처리에 사용된 솜은 의약품 탈지면을 사용하였다. 그 외 분석에 사용된 모든 시약은 특급 시약이었으며, Whatman 社의 Nylon Membrane Filters (0.45  $\mu\text{m}$ ,  $\varnothing$  47 mm)를 이용하여 회수된 가수분해물을 여과하였다.

(1) 회분식 아임계수 가수분해 장치



[그림 6-3-1] 회분식 아임계수 가수분해 장치 및 모식도

(2) 초임계 이산화탄소 추출 장치



[그림 6-3-2] 초임계 이산화탄소 추출 장치 및 모식도

(3) 분석 장비

- ① Amino acid auto-analyzer (S433-H, SYKAM, Germany)
- ② High Performance Liquid Chromatography (Shimadzu, Japan)
- ③ UV/VIS Spectrometer (UVIKON933, Kontron Instruments, Italy)

## 나. 실험 절차

### (1) 아임계수를 이용한 해조류 가수분해 공정

해조류 (다시마)로부터 유용물질 추출/생산하기 위한 아임계수 가수분해 장치의 공정도는 [그림 6-3-1]에 나타내었다. 아임계수 가수분해는 온도 조절기(9)기를 가진 Hastelloy 재질로 이루어진 200 cm<sup>3</sup> 반응기(5)에서 수행되었다. 가수분해 실험은 건조된 다시마 분말 3 g과 증류수 150 mL (1:50, W/V)를 혼합하여 시료(slurry)를 준비하고 반응기(5)에 주입하였다. 그 후 전열기(4)를 이용하여 설정 온도까지 반응시킨다. 각 실험의 반응기 내 온도와 압력은 온도 조절기(9)와 압력계(2)로 각각 측정되었다. 반응기 내 반응물은 교반기에 의하여 150 rpm의 일정한 속도로 교반되었다. 실험 온도는 200 °C~280 °C로 설정되었고, 반응 압력은 설정된 각 온도에서의 수증기 포화압력으로 추정되었으며, 압력계(2)를 통하여 1.3~6.0 MPa 범위를 알 수 있었다. 온도 상승 시간은 28~42분이었고, 설정 온도에 도달하면 반응시간을 2분으로 고정하였다. 한편 유용물질 생성에 대한 촉매제의 영향을 알아보기 위하여 촉매제로서 1% acetic acid를 반응에 첨가하였다. 반응 종료 후 높은 열에 의해 회수된 유용 물질의 분해를 방지하기 위하여 생성된 가수분해물을 cooling bath(7)로 통과시켜 열을 식혔으며, 회수된 가수분해물을 주사기에 취하여 Membrane Filter(0.45 μm)로 여과한 뒤 그 후 다른 실험의 분석 시료로 사용하였다.

### (2) 초임계 이산화탄소 추출에 의한 해조류 지질 제거

유용물질을 회수/생산하는데 대한 시료 내 지질 유무에 따른 효과를 분석하기 위하여, 실험실 규모의 초임계 이산화탄소 추출 장치를 이용하여 샘플 내 지질을 제거하였다. 초임계이산화탄소 추출 장치의 공정도는 [그림 6-3-2]에 나타내었다. 250 g의 건조된 해조류 시료는 스테인레스 스틸로 이루어진 500 mL 추출기(4)에 충전되었다. 이산화탄소는 상압에서 고압 펌프(3)에 설정 압력까지 가압되어 추출기(4)로 주입되고, 시스템 내 압력은 back pressure regulator(16)에 의하여 조절된다. 실험은 설정 압력/온도 조건에서 2시간 동안 수행되었으며, 온도 및 압력 범위는 각각 35~55°C와 15~25 MPa이었다. 이산화탄소 유속은 26.81 g/min로 고정되었다.

### (3) 가수분해물 내 환원당 함량 분석

가수분해물 내 환원당 함량은 HPLC를 사용하여 분석하였다[1]. HPLC의 구성은 Shimadzu LC-20AD pump, CTO-20AC oven, Sil-20AC auto-sampler, RF-10Ax1 fluorescence detector, CBM-20A system controller, LC Workstation software를 이용



하였다. 환원당 분리 ion exchange Shim-pack ISA-07(4.0 mm×250 mm) 분석 column과 Shim-pack ISA guard column(4.0 mm ×50.0 mm)을 사용하였다. 이동상은 A용액으로 potassium borate (pH 8)와 B용액으로 potassium borate(pH 9)를 사용하였는데 B용매를 0분에서 0%로 시작하여 30분에 50%로 증가시키고 50분에 100%로 증가하여 15분간 100%로 유지하다가 65분 이후에 0%로 감소하여 총 90분의 분석시간으로 하였다. 주입량은 10 µl 주입하며 post-column 방법을 이용하여 환원당을 유도체화한 후 형광검출기(Ex=320, Em=430)를 사용하여 분석하였다. 반응시약으로 1% arginine과 3% boric acid를 함유하는 용액을 사용하였다. 환원당 표준물질을 탈이온화 증류수에 용해시켜 0.5~20 µl/mL 범위의 표준용액을 조제하여 HPLC(Shimadzu Co.) 분석을 실시하고 peak area로부터 검량선을 작성하여 정량하였다.

#### (4) 가수분해물 내 구성아미노산 분석

구성아미노산 분석은 아미노산 자동분석기(S433-H, SYKAM Co., Germany)로 정량 분석하였다[1]. 아미노산 분석 조건은 cation separation column(LCA K06/Na)으로, size는 4.6 mm×150 mm, 온도는 57~74 °C, flow rate는 buffer 0.45 mL/min, reagent 0.25 mL/min, buffer pH range는 3.45~10.85, wavelength 440 nm와 570 nm로 분석하였다.

#### (5) 가수분해물 내 총 페놀 함량 분석

각 가수분해물의 총페놀 함량(Total Phenolic content, TPC)은 Folin-Ciocalteu 비색분석법을 이용하여 측정하였다[2-4]. 즉, 50배 희석(v/v, in 증류수)된 가수분해물 1 mL에 Folin-Ciocalteu reagent(FCR)을 1 mL를 혼합하고 4분 후 7.5% sodium carbonate solution(w/v)를 가하여 5초 동안 진탕하고 암실에서 2시간 실온 방치하였다. 한편, blank는 1 mL의 희석된 가수분해물을 1mL의 증류수로 교체함으로써 준비되었다. 가수분해물의 흡광도는 UV/VIS Spectrometer (UVIKON933, Kontron Instruments, Italy)를 이용하여 blank에 대한 765 nm에서의 흡광도로 측정하였다. 측정은 3회 반복하여 평균치로 표시하였고 표준물질로는 gallic acid를 다양한 농도로 조제하여 검량곡선을 작성하였다. 결과들은 100 g 건조 샘플 당 gallic acid에 해당하는 mg 값(mg GAE/100 g DW)으로 표시하였다. Gallic acid에 대한 검량 방정식은  $y=0.0398x$  ( $R^2=0.9984$ )이었다.

#### (6) 가수분해물 내 총 플라보노이드 함량 분석

각 가수분해물의 총 플라보노이드 함량(Total flavonoid content, TFC)은 Karadeniz et al (2005) 및 Ozsoy et al. (2007)에 묘사된 방법에 의해 측정되었다 [5-6]. 먼저, 1.25 mL의 증류수에 0.25 mL의 가수분해물을 혼합하고, 5%(w/v) sodium nitrite solution을 75  $\mu$ l 첨가하여 6분 동안 방치시킨다. 그 후 10%(w/v) aluminium chloride solution을 150  $\mu$ l 첨가하여 5분 동안 방치시킨다. 마지막으로 0.5 mL의 1 M sodium hydroxide solution과 275  $\mu$ l의 증류수를 연속적으로 첨가한 후, 최종적으로 만들어진 혼합물을 5초 동안 진탕시킨다. 혼합물의 흡광도는 blank에 대한 510 nm에서의 흡광도로 측정하였다. blank는 0.25 mL의 가수분해물을 동량의 증류수로 교체함으로써 준비되어진다. 측정은 3회 반복되었고, 표준물질로는 catechin을 다양한 농도로 조제하여 검량곡선을 작성하였다. 결과들은 100 g 건조 샘플 당 catechin에 상당하는 mg 값(mg CE/100 g DW)으로 표시하였다. Catechin에 대한 검량 방정식은  $y=0.0031x$  ( $R^2=0.9985$ )이었다.

#### (7) 가수분해물의 DPPH 라디칼 소거능 분석

각 가수분해물의 DPPH 라디칼 소거능은 Miliauskas et al (2004), Saha et al. (2004) 및 Cai et al. (2006)에 묘사된 방법을 기초로 측정되었다[4, 7-9]. 3.9 mL의 에탄올 DPPH 용액에 0.1 mL의 가수분해물 또는 에탄올(control)을 혼합한 후 암실에서 30분 동안 실온에서 방치시킨다. 그 후 가수분해물과 control의 흡광도는 UV/VIS Spectrometer (UVIKON933, Kontron Instruments, Italy)를 이용하여 에탄올(blank)에 대한 517 nm에서의 흡광도로 측정하였다. 흡광도는 세 번 반복하여 측정되었고, 표준물질로는 Trolox를 다양한 농도로 조제하여 검량곡선을 작성하였다. 결과들은 100 g 건조 샘플 당 Trolox의 항산화능에 상당하는  $\mu$ mol 값( $\mu$ mol TEAC/100 g DW)으로 표시하였다. Trolox에 대한 검량 방정식은  $y=-0.0006+0.6697(R^2=0.9960)$ 이었다.

#### (8) 가수분해물의 ABTS 라디칼 소거능 분석

각 가수분해물의 ABTS 라디칼 소거능은 Cai et al. (2006), Wtewitayaklung et al. (2006), Cuimarães et al. (2007) 및 Surveswaran et al. (2007)에 묘사된 방법에 따라 측정하였다[9-12]. 먼저, ABTS 라디칼 용액은 250 mL 갈색 병에 10 mL의 7  $\mu$ M ABTS 용액과 같은 양의 2.45 mM potassium persulphate 용액을 혼합한다. 그 후 ABTS 라디칼 용액은 암실에서 12-16 시간 동안 실온에서 dark blue 용액이 될 때까지 방치된다. ABTS 라디칼 용액은 사용 전 denatured ethanol로 734 nm에서 흡광도가  $0.7 \pm 0.02$ 로 평형을 유지될 때까지 희석되어진다.

먼저, 3.9 mL의 ABTS 라디칼 용액에 0.1 mL의 가수분해물 또는 에탄올(control)을 혼합한 후 암실에서 6분 동안 실온에서 방치한다. 그 후 가수분해물과 control의 흡광도는 UV/VIS Spectrometer (UVIKON933, Kontron Instruments, Italy)를 이용하여 에탄올(blank)에 대한 734 nm에서의 흡광도로 측정하였다. 흡광도는 세 번 반복하여 측정되었고, 표준물질로는 Trolox를 다양한 농도로 조제하여 검량곡선을 작성하였다. 결과들은 100 g 건조 샘플 당 Trolox의 항산화능에 상당하는  $\mu\text{mol}$  값 ( $\mu\text{mol TEAC}/ 100 \text{ g DW}$ )으로 표시하였다. Trolox에 대한 검량 방정식은  $y=-0.0007+0.6276(R^2=0.9966)$ 이었다.

### (9) 항산화 물질 추출에 대한 아임계수 가수분해 공정 적용의 효율성 분석

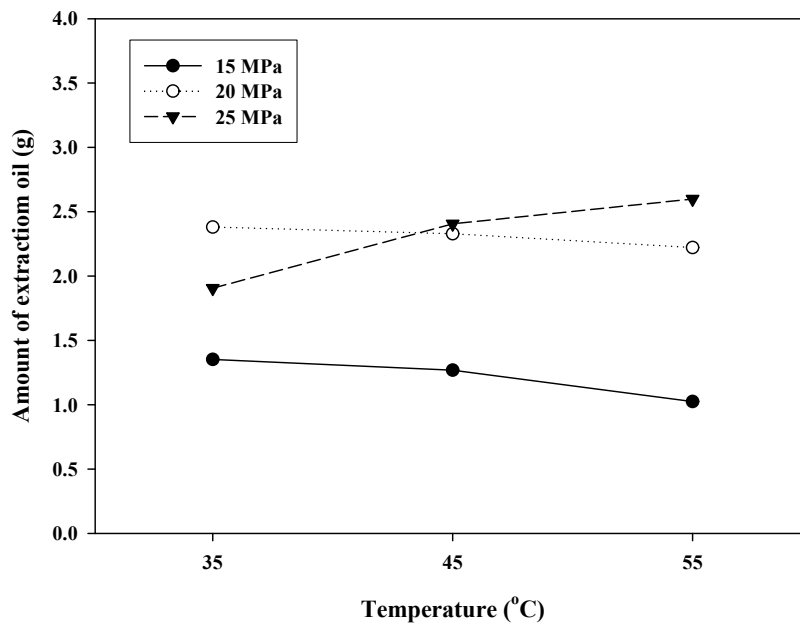
항산화 물질 추출에 대한 아임계수 가수분해 공정의 효율성을 알아보기 위하여 에탄올과 물로 구성된 이성분계 용액을 추출 용매로 사용하였고, 25 °C에서 180분 동안 추출 용매를 이용하여 샘플로부터 항산화 물질을 추출하였다. 추출 용매는 용매 내 에탄올과 물의 구성을 조절함으로써 다섯 가지의 다른 농도의 용매를 (20, 40, 60, 80 100%, v/v)를 사용하였다.

추출 후, 조추출물의 항산화 물질 함량 (TPC, TFC) 및 황산화능(DPPH 라디칼 소거능, ABTS 라디칼 소거능)을 분석하여 아임계수 가수분해물의 값들과 비교함으로써 아임계수 가수분해공정의 효율성을 알아보았다.

## 3. 연구수행 결과

### 가. 초임계 이산화탄소 추출에 의한 해조류 지질 제거

실험 조건 중 초임계 이산화탄소 추출 공정에 의하여 다시마로부터 지질이 가장 많이 제거된 실험 조건은 55 °C, 25 MPa이었고, 그 양은 2.59 g이었다. [그림 6-3-3]은 각 온도 및 압력 조건에 따라 초임계 이산화탄소에 추출 공정에 의하여 다시마로부터 추출된 지질 양을 비교한 것이다. 일정한 온도에서, 다시마로부터 추출된 지질의 양은 압력의 상승과 함께 증가하였다. 이는 높은 압력에서 초임계 이산화탄소의 밀도가 높아진 결과, 용매력이 증가하여 다시마에 함유되어 있는 지질 성분이 많이 추출된 것으로 사료되어진다. 유사한 결과는 초임계 이산화탄소를 이용하여 그린 커피[13]와 삶은 멸치[14]로부터 지질을 추출한 연구에서 발견되어진다. 위의 조건에서 처리된 다시마 잔여물은 다시마 내 지질 유무에 따른 유용물질 수율에 대한 영향을 알아보기 위하여 아임계수 가수분해에 사용될 것이다.



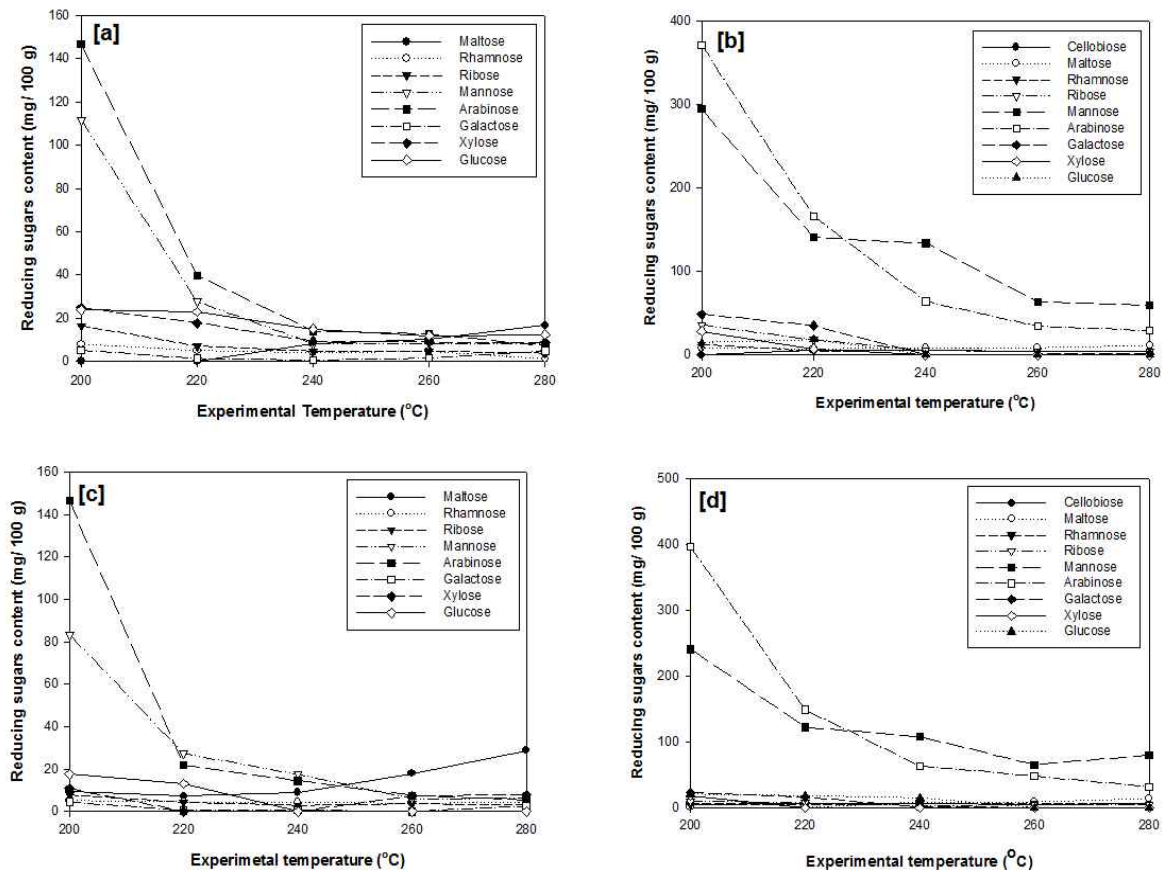
[그림 6-3-3] 각 실험 조건에 따른 다시마 내 오일 추출 양 비교

#### 나. 가수분해물 내 환원당 함량 분석

다시마로부터 바이오 에너지의 전구체 및 생명공학 분야에서 미생물 영양원으로서 이용될 수 있는 환원당을 생성하기 위한 실험에서 다시마 가수분해물에서 측정된 환원당 함량 및 조성을 나타낸 결과는 [그림 6-3-4]와 같다. 총 환원당 함량은 200 °C 온도 조건 및 1% acetic acid를 첨가한 생다시마에서 100 g당 814.10 mg으로 가장 많았고, 다음으로는 같은 조건에서의 초임계 이산화탄소로 처리한 다시마가 719.09 mg으로 많았다. 아임계수 다시마 가수분해물에서의 환원당 조성은 cellobiose, maltose, rhamnose, ribose, mannose, arabinose, galactose, xylose, glucose로 총 9 가지의 환원당이 측정되었는데, 각 환원당 중 가장 높은 함량을 가진 것은 arabinose와 mannose였다. 한편, 모든 실험군에서 온도의 증가와 함께 환원당이 감소하는 경향이 발견되었는데, 이는 상승된 온도와 함께 상대적으로 온도를 상승시키기 위해 길어진 반응 시간 때문인 것으로 사료되어진다. 반응시간의 효과에 대한 유사한 결과는 콩 찌꺼기 폐기물을 아임계수 가수분해 한 연구에서 나타난다[15].

촉매제로서 1% acetic acid의 첨가는 다시마 생원료 및 지질이 제거된 다시마 가수분해물 모두에서 환원당의 함량을 증가시켰다. 이는 촉매제를 첨가함으로써 다당류의 가수분해를 더욱 용이하게 만들어 더 많은 환원당을 생성시킨 것으로 사료되어진다. 마지막으로 다시마 내 지질 존재 유무에 따른 환원당 생성에 미치는 효과

는 다시마에 지질이 존재할 때 그 생성량이 많은 것으로 나타났다. 이 결과는 다시마로부터 지질을 제거함으로써, 용매인 아임계수와 다시마 내 다당류가 직접적으로 반응하는 시간이 길어졌기 때문으로 사료되어 진다.

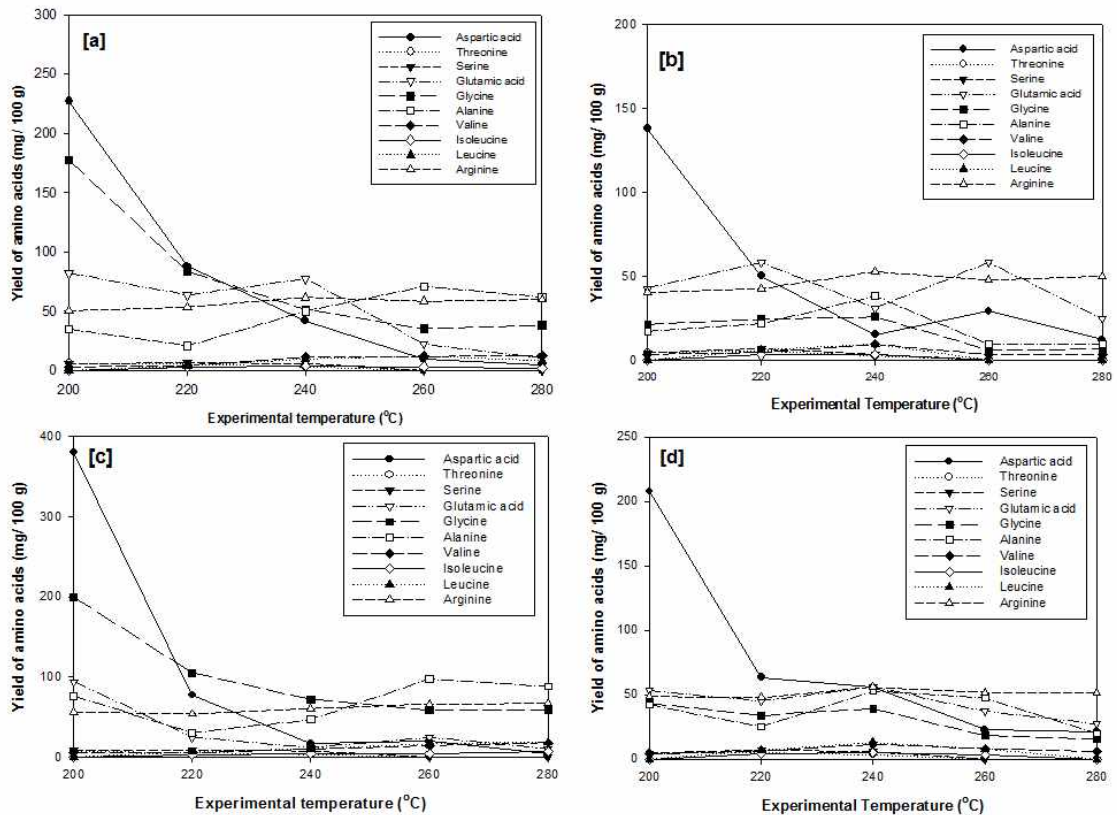


[그림 6-3-4] 다양한 실험 조건에 따른 다시마 가수분해물의 환원당 함량 비교  
(a) 생다시마 (b) 생다시마+1% acetic acid (c) 지질 제거 다시마 (d) 지질 제거 다시마+1% acetic acid

#### 다. 가수분해물 내 구성아미노산 분석

[그림 6-3-5]는 각 실험 조건에 따른 아임계수 다시마 가수분해물의 구성 아미노산 함량 및 조성을 나타낸 결과이다. 총 구성 아미노산 함량은 초임계 이산화탄소로 처리한 다시마 시료를 사용한 200 °C 온도 조건에서 100 g당 826.59 mg으로 가장 많았고, 다음으로는 같은 조건에서의 생다시마가 586.94 mg으로 많았다. 아임계수 다시마 가수분해물에서의 구성 아미노산 조성은 aspartic acid, threonine, serine, glutamic acid, glycine, alanine, valine, isoleucine, leucine, arginine으로 총 10 가지의 아미노산이 측정되었다. 각 아미노산 중 가장 높은 함량을 가진 것은 aspartic acid, glycine, glutamic acid였다. 아임계수 가수분해물 내 높은 함량의 아미

노산들은 해조류의 맛의 근원 아미노산으로서, 이는 식품 산업에 응용할 수 있을 것으로 사료되어 진다. 실험 결과 환원당과 마찬가지로 온도 증가와 함께 아미노산 생성량이 감소하는 것을 확인할 수 있었으며, 이는 마찬가지로 온도 증가에 소요되는 시간이 증가함으로써 반응 시간이 길어졌기 때문으로 사료되어진다. 한편 환원당의 결과와는 반대로 시료 내 지질 제거 및 촉매제를 첨가하지 않은 조건이 아미노산의 생성량을 증가시키는 것으로 나타났다.



[그림 6-3-5] 다양한 실험 조건에 따른 다시마 가수분해물의 구성아미노산 함량 비교  
(a) 생다시마 (b) 생다시마+1% acetic acid (c) 지질 제거 다시마 (d) 지질 제거 다시마+1% acetic acid

#### 라. 항산화 물질 추출에 대한 아임계수 가수분해 공정 적용의 효율성 분석

폴리페놀 및 플라보노이드 등과 같은 식이성 항산화 물질은 산화적 스트레스와 관련 있는 질병의 예방에 효과가 있는 것으로 알려져 있다. 이 화합물들은 라디칼 소거능과 강력한 항산화능을 포함한 폭넓은 생물학적 활성을 가지는 것으로 알려져 있으며, 많은 선행 연구에서 이 화합물들과 항산화 활성의 양의 상관관계가 있다가 보고하였다. 식물류로부터 폴리페놀계 화합물 및 플라보노이드류를 얻기 위한 방법으로는 에탄올과 메탄올 등의 유기용매 추출법을 주로 사용하여 왔는데, 이

러한 방법은 식품제조 및 산업화에 있어 여러 가지 적용 한계를 보이고 있는 실정이다[16-18]. 이러한 한계를 극복할 수 있는 대안으로서 제시된 방법이 아임계 상태의 물을 추출용매로 사용하는 방법이다.

추출 매체로서 물의 사용은 오랜 역사를 가지고 있지만 대기압 하에서의 100 oC 이하의 물을 이용한 추출방법은 물질의 전기적인 특성을 나타내는 상대 유전율이 매우 높기 때문에 오로지 극성 화합물의 추출에만 이용되어 왔다. 그러나 아임계수 추출은 상온, 상압의 물을 압력 및 온도의 조절을 통하여 아임계 상태로 만듦으로써 낮은 상대 유전율을 부여하므로 플라보노이드와 같은 비극성 화합물을 추출하는데 매우 효과적인 것으로 알려지고 있다 [19]. 아임계 추출은 일반적인 추출방법보다 매우 짧은 시간 안에 유용물질을 선택적으로 얻을 수 있는 환경 친화적 공정으로서 현재 매우 활발하게 연구되고 있다 [20-22].

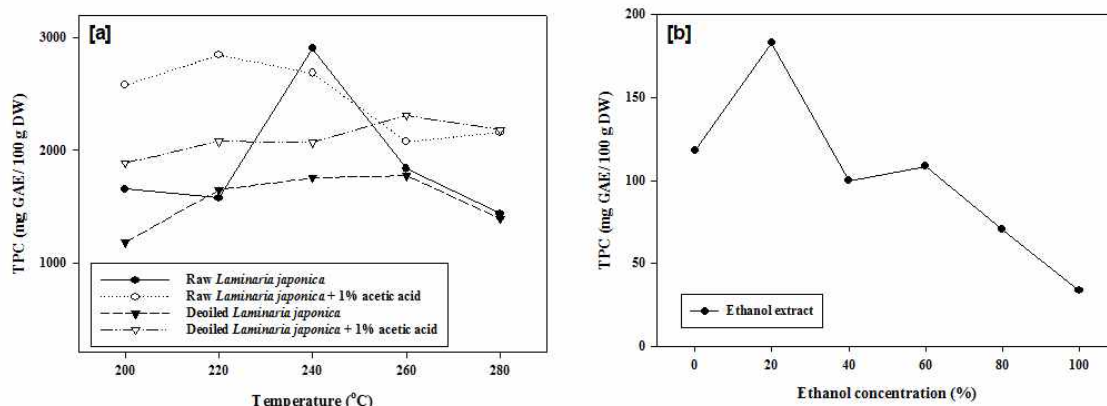
본 연구는 해조류의 효과적인 이용 방안을 제시하기 위하여, 다시마에 에탄올과 증류수를 농도별로 섞은 이성분계 용매와 조건별 아임계수 추출법을 적용하여 각 추출방법에 따른 다시마 유래 항산화물질인 phenolic compounds와 flavonoids의 추출 효율을 비교 분석하고, 이들 추출물의 항산화 효과를 비교 평가하였다.

#### (1) 총 페놀 함량 비교

건조 다시마로부터 total phenolic compounds가 새로운 추출방법인 아임계수 가수분해 공정을 통해 추출되었고, 에탄올 및 물을 이성분계로 하는 기존 추출법과의 추출 효율이 비교 분석되었다. [그림 6-3-6]에서와 같이, 240 oC 온도 및 무촉매 조건에서 최적으로 polyphenol이 추출되었으며, 건조된 생다시마 100 g 당 추출된 polyphenol의 함량은 2908.5 mg gallic acid equivalent(GAE)로 관찰되었다. 이 결과는 190 oC 조건에서 아임계수 추출방법을 이용하여 건조된 흑미강으로부터 추출한 총 폴리페놀 함량 ( $35.06 \pm 1.28$  mg Quercetin equivalent/ 1 g Dried material)보다 적었지만[22], 다시마로부터 그와 비슷한 양을 추출할 수 있다는 것을 확인 할 수 있었다. 200 oC를 시작으로 추출 온도를 280 oC까지 높임에 따라 실험 조건에 따라 상이하였으나 240 oC 이상의 온도에서 polyphenol의 추출 수율이 대체적으로 감소하였다. 이러한 결과는 240 oC 부근이 polyphenol을 추출하는데 최적 조건임을 나타내고 있으며, 이는 또한 고온의 추출 조건에서 수행되는 고압용매 추출법과는 달리, 추출 용매로서 순수한 물을 사용하는 아임계수 추출방식에 대한 polyphenolic compounds의 높은 열안정성을 보여주고 있다[21,23]. 촉매체로서 1% acetic acid의 첨가 효과는 240 oC 온도 조건의 생다시마를 제외한 모든 조건에서 무첨가군에 비하여 그 추출 효율이 높았다. 이 결과는 적은 양의 촉매체로도 polyphenolic

compounds를 효율적으로 높일 수 있다는 것을 보여주었다. 한편, 다시마 유래 지질 제거는 polyphenolic compounds의 추출 양을 감소시켰으며, 지질 제거가 추출 효율에 부정적인 영향을 끼침을 알 수 있었다.

기존 추출법인 이성분계 용매의 최적 추출 조건은 에탄올 농도가 20%일 때, 건조된 다시마 100 g 당 추출된 polyphenol 함량이 183.1 mg GAE로 나타났다. 이 결과는 이성분계 용매 시스템이 단일 용매 시스템보다 식물로부터 phenolic compounds를 추출하는데 더 효과적이라는 Nawaz et al. (2006), Turkmen et al. (2006), Kim et al. (2007) 및 Yang and Zhang (2008)의 연구 결과를 뒷받침 하였다 [24-27]. 그러나 이성분계 용매 추출물의 최적 조건에서의 polyphenol 함량은 아임계수 가수분해 공정과의 비교 시 최적 아임계수 가수분해 조건에서 회수한 아임계수 추출물에 비해 약 16배 낮은 것으로서, 아임계수 가수분해 공정이 기존의 전통적 추출법에 비하여 매우 우수하다는 것을 확인할 수 있었다. 그림 6-2-6의 결과는 추출 용매로서 물을 이용하는 아임계수 가수분해 공정이 다시마로부터 phenolic compounds를 추출하는 데 매우 적합한 방법이며 기존의 전통적 추출법에 대한 효과적인 대안임을 제시하고 있다.



[그림 6-3-6] TPC에 대한 아임계수 가수분해 공정 적용의 효율성 비교 (a) 아임계수 가수분해물 (b) 에탄올-물 이성분계 용매 추출물

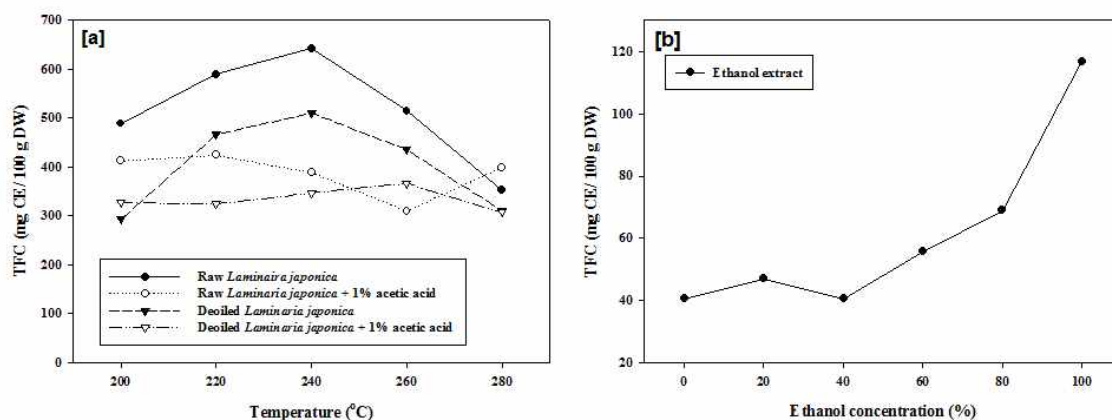
## (2) 총 플라보노이드 함량 비교

건조 다시마 시료로부터 아임계 가수분해 공정 및 이성분계 용매 추출법을 통해 회수한 추출시료의 총 플라보노이드 함량을 비교 분석하였고 이를 바탕으로 서로 다른 추출 방법에 따른 플라보노이드의 추출효율을 평가하였다. 서로 다른 조건에서 회수한 아임계수 추출물의 경우, [그림 6-3-7] (a)에서 보여지는 것과 같이 최적의 추출 효율을 나타내는 조건은 총 페놀함량과 마찬가지로 240 °C 온도 및 무촉매 조건에서 최적으로 플라보노이드가 추출되었으며, 건조된 생다시마 100 g 당



추출된 플라보노이드의 함량은 642.1 mg catechin equivalent(CE)으로 관찰되었다. 200 °C를 시작으로 추출 온도를 280 °C까지 높임에 따라 실험 조건에 따라 상이하였으나, polyphenol의 함량 변화와 마찬가지로, 240 °C 이상의 온도에서 추출 수율이 대체적으로 감소하였다. polyphenol과 마찬가지로 샘플 내 지질 제거 시 플라보노이드 추출 수율이 감소한 반면, 촉매제 첨가 시에는 polyphenol과는 반대의 결과를 나타내었다.

[그림 6-3-7] (b)에서 보여지는 것과 같이 농도에 따른 에탄올-물 이성분계 용매 추출물의 플라보노이드 함량은 앞선 polyphenol의 함량과는 다르게 에탄올 100% 농도에서 가장 높게 측정되었다. 100% 에탄올 추출물에 함유된 건조 다시마 100 g 당 플라보노이드의 함량은 116.8 mg CE으로 이성분계 용매 추출물 중 가장 높게 나타났으나, 최적 추출 조건에서 회수된 아임계수 추출물(240 °C, 생다시마, 촉매 무첨가)에 비해 플라보노이드 추출 효율이 약 6배 낮게 측정되었다. 이 결과는 아임계수 가수분해 공정이 기존의 전통적 추출법인 유기 용매 추출법에 비하여 다시마의 polyphenol 뿐만 아니라 플라보노이드를 추출함에 있어서 매우 유용한 방법임을 제시하고 있다.



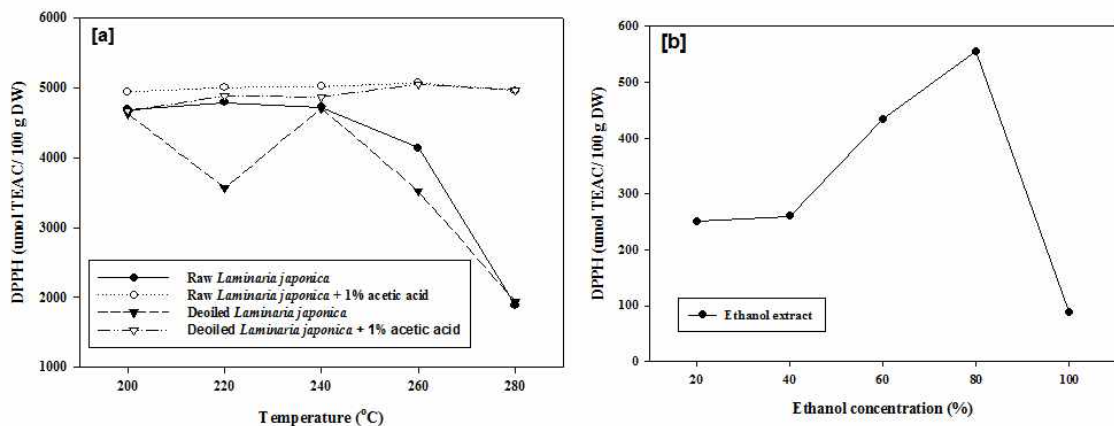
[그림 6-3-7] TFC에 대한 아임계수 가수분해 공정 적용의 효율성 비교 (a) 아임계수 가수분해물 (b) 에탄올-물 이성분계 용매 추출물

### (3) DPPH 라디칼 소거능 비교

항산화물질은 free radical에 전자나 수소를 공여하여 복합체를 만든다. DPPH는 항산화물질로부터 전자나 수소를 받아 불가역적으로 안정한 분자를 형성하므로 전자공여능으로부터 항산화 활성을 추정할 수 있는데 항산화 활성이 있는 물질과 만나면 radical이 소거되며 이때의 DPPH 고유의 자주색이 없어지는 특성이 있고 이 색차를 비색 정량하여 전자공여능력을 측정한다[28-31]. [그림 6-3-8]은 다시마의 아임계수 및 에탄올-물 이성분계 용매 추출물 DPPH 라디칼 소거능을 비교한 것을 나타낸 것이다.

서로 다른 조건에서 회수한 아임계수 추출물의 경우, DPPH 라디칼 소거능을 나타낸 최적 조건은 240 °C 온도 및 무첨매 조건이었으며, 건조된 생다시마 100 g 당 5071.9  $\mu\text{mol trolox equivalent antioxidant capacity}$ 를 나타내는 것으로 관찰되었다. 한편, 다시마 내 지질은 항산화능에 큰 영향을 미치지 않았지만, 대체적으로 지질이 제거된 다시마의 항산화능이 감소되는 것을 확인할 수 있었다. 한편, 첨매제의 첨가는 생다시마 및 지질 제거 다시마 모두에서 항산화능을 증가시키는 것으로 관찰되었는데, 온도의 증가와 함께 감소되는 첨매 무첨가군에 비하여, 첨매 첨가군에서는 온도의 증가와 함께 소폭 상승하였다. [그림 6-3-6] (a) 및 [그림 6-3-7] (a)에서 첨매제로서 1% acetic acid의 첨가는 TPC와 TFC 모두에서 온도 증가와 함께 그 함량이 첨매 무첨가군에 비하여 소폭 감소하였거나 그 함량이 증가한 것이 관찰되었는데, 이것이 높은 온도에서도 항산화능을 유지하거나 소폭 상승시킨 것으로 보인다. 또한 이번 연구를 통하여 오직 항산화능을 나타내는 항산화 물질로는 TPC와 TFC만을 주요 인자로 설정하고 분석하였는데, 실험 결과 다시마 아임계수 추출물에 함유되어 있는 그 이외의 물질들이 생성되거나 존재하여 DPPH 라디칼 소거능에 관여한 것으로 생각되어 진다.

기존 추출법인 이성분계 용매 추출법에서 항산화능이 최적으로 나타난 조건은 에탄올 농도가 80%일 때로, 건조된 다시마 100 g 당 554.8  $\mu\text{mol trolox equivalent antioxidant capacity(TEAC)}$ 를 나타내는 것으로 나타났다. 그러나 아임계수 가수분해 공정에서 최적 조건으로 회수된 추출물에 비하여 약 9배나 낮은 라디칼 소거능을 보여주었으며, 이는 아임계수 가수분해 공정이 다시마로부터 TPC 및 TFC와 같은 항산화물질을 추출하는데 효율적일 뿐만 아니라, 그 생리활성도 유지할 수 있다는 것을 확인시켜 주었다.



[그림 6-3-8] DPPH 라디칼 소거능에 대한 아임계수 가수분해 공정 적용의 효율성 비교 (a) 아임계수 가수분해물 (b) 에탄올-물 이성분계 용매 추출물

### (3) ABTS 라디칼 소거능 비교

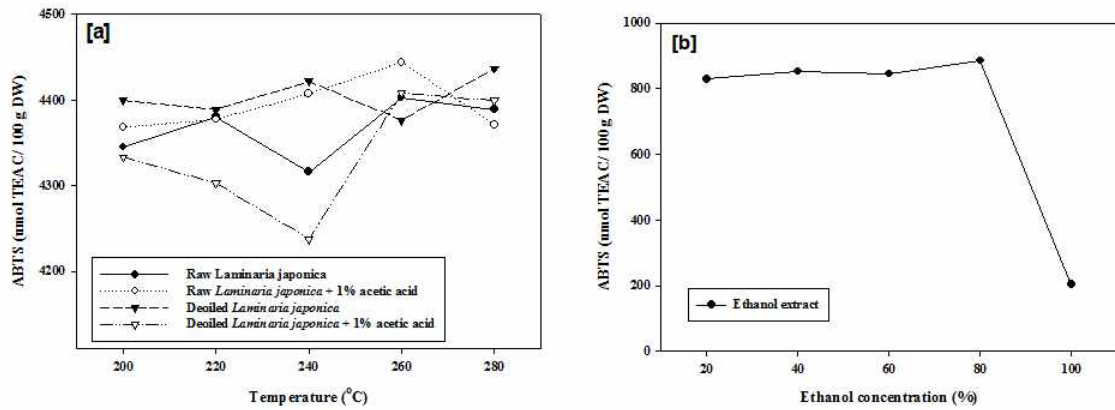
ABTS assay 또는 TEAC assay는 Milller et al. (1993) 및 Rice-Evans et al. (1994)에 의해 처음 보고된 측정법으로 ABTS+ 에 대한 항산화제의 소거능을 측정하는 방법이다. DPPH 라디칼과 마찬가지로 합성된 라디칼로서 ABTS는 potassium persulfate와 반응하여 녹색의 ABTS 라디칼을 형성하고, 생성된 ABTS 라디칼은 항산화력을 가진 물질로부터 전자를 받아 무색의 물질로 환원되는데, 녹색이 옅어지는 정도를 분광광도계를 이용하여 흡광도를 측정함으로써 얻을 수 있다 [32-34].

서로 다른 조건에서 회수한 아임계수 추출물의 경우, ABTS 라디칼 소거능을 나타낸 최적 조건은 260 °C 온도 및 촉매 첨가 조건이었으며, 건조된 다시마 100 g 당 4444.3  $\mu\text{mol}$  trolox equivalent antioxidant capacity(TEAC)를 나타내는 것으로 관찰되었다. 한편, DPPH 라디칼과는 다른 경향을 보였는데, 라디칼 소거능이 조금의 차이는 있으나 모든 조건에서 건조 다시마 100 g 당 4237~4444.3  $\mu\text{mol}$  TEAC 사이의 값을 보여주었다. 즉, 모든 군에서 4200  $\mu\text{mol}$  TEAC 이상에 상당하는 항산화능을 가지고 있었다. 여기서 주목할 점은 아임계수 가수분해 공정의 실험 조건에 관계없이 아임계수 추출물은 높은 항산화능을 가지고 있다는 것이다. 항산화 물질인 TPC와 TFC는 280 °C로 증가할수록 대체적으로 감소하는 경향을 보인 반면, ABTS 라디칼 소거능은 증가하거나, 소폭 감소하였다. 이 결과는 다음과 같은 이유 때문인 것으로 사료된다. ABTS 라디칼은 DPPH 라디칼과 마찬가지로 라디칼이나, 물과 유기용매 모두에 용해되므로 극성 시료뿐만 아니라 비극성 시료의 항산화능 측정에 모두 사용 가능하다[35]. 그러므로 DPPH 라디칼에 비해 다양한 시료의 항산화능 측정에 사용된다. 또한 ABTS assay는 넓은 범위의 pH에서 측정이 가능하므로 pH에 따른 항산화제의 활성이나 메카니즘 연구에 사용이 가능하다 [36].

“like dissolve like“의 원리에 따라, 용매는 오직 용매와 비슷한 극성을 가진 화합물들을 추출한다[37-38]. 유기 용매 추출의 경우 에탄올의 농도에 따라 회수되는 폴리페놀 및 플라보노이드의 추출 효율이 달랐으므로, 여기서 우리는 다시마가 다른 극성을 가진 다양한 페놀 화합물로 구성되어 있다는 것을 알 수 있었다. 아임계수는 상온, 상압의 물을 압력 및 온도의 조절을 통하여 아임계 상태로 만듦으로써 다양한 상대 유전율을 부여할수 있으며, 플라보노이드와 같은 비극성 화합물을 추출하는데 매우 효과적이므로 아임계수 가수분해 공정에 의하여 회수된 추출물이 모든 실험 조건에서 높은 ABTS 라디칼 소거능을 가진 것으로 사료되어 진다.

한편, 기존 추출법인 이성분계 용매 추출법에서 ABTS 라디칼 소거능이 최적으로 나타난 조건은 DPPH 라디칼 소거능과 마찬가지로 에탄올 농도가 80%일 때로, 건조된 다시마 100 g 당 885.4  $\mu\text{mol}$  trolox equivalent antioxidant

capacity(TEAC)를 나타내는 것으로 나타났다. 그러나 아임계수 가수분해 공정에서 최적 조건으로 회수된 추출물에 비하여 약 5배나 낮은 라디칼 소거능을 보여주었다. 이 결과는 아임계수 가수분해 공정이 다시마로부터 TPC 및 TFC와 같은 항산화 물질을 추출하는데 매우 적합한 방법임을 제시하고 있으며, 기존의 유기용매 추출법보다 생리활성도 뛰어나다는 것을 확인시켜 주었다.



[그림 6-3-9] ABTS 라디칼 소거능에 대한 아임계수 가수분해 공정 적용의 효율성 비교 (a) 아임계수 가수분해물 (b) 에탄올-물 이성분계 용매 추출물

#### 4. 요약 및 제언

본 연구에서는 다시마로부터 유용물질을 추출/생성/회수하기 위하여 아임계수 가수분해 공정을 접목시켰으며, 유용물질로는 환원당, 아미노산, 및 항산화물질인 폴리페놀과 플라보노이드를 목적 물질로 설정하였다. 또한 아임계수 가수분해 공정을 통하여 유용물질을 추출/생성하기 위한 최적 조건을 설정하기 위하여 온도(200~280 °C), 시료 내 오일 및 촉매제 첨가 유무를 달리하여 실험을 수행하였다.

환원당 함량은 200 °C 온도 조건 및 1% acetic acid를 첨가한 생다시마에서 100 g당 814.10 mg으로 가장 많았고, 아미노산 함량은 초임계 이산화탄소로 처리한 다시마 시료를 사용한 200 °C 온도 조건에서 100 g당 826.59 mg으로 가장 많았다.

한편, 아임계수 가수분해 공정에 의한 다시마로부터 항산화 물질인 폴리페놀 및 플라보노이드의 추출 효율을 알아보기 위하여 기존 추출 방법인 에탄올과 물을 이용한 이성분계 용매 추출법이 비교 분석되었다. 건조된 다시마 시료로부터 폴리페놀(2908.5 mg GAE/ 100 g DW) 및 플라보노이드(642.1 mg CE/ 100 g DW)에 대한 최대 수율이 아임계수 가수분해 공정(240 °C 온도 및 무촉매, 생다시마 조건)에 의해 측정되었고, 기존의 추출법인 에탄올-물 이성분계 용매 추출법을 통한 폴리페놀(183.1 mg GAE/ 100 g DW) 및 플라보노이드(116.8 mg CE/ 100 g DW) 수율 대비 약 16배와 6배 이상 더 높았다. 추출 방법에 따른 다시마 추출물의 항산화 활성은

아임계수 가수분해 공정을 통해 회수한 추출물에서 가장 높았으며, 이것은 에탄올-물 이성분계 추출물의 황산화능에 비해 DPPH 및 ABTS 라디칼 소거능의 경우 각각 약 9배, 5배 더 높았다. 이상의 결과들은 아임계수 가수분해 공정이 다시마로부터 환원당, 아미노산, 폴리페놀, 플라보노이드와 같은 유용물질을 추출/생성/회수하는데 매우 적합한 방법이며, 기존의 전통적 추출법인 유기용매 추출법에 비해 매우 효과적임을 확인할 수 있었다.

## 5. 향후계획

- 해조류 유래 유용물질 생산을 위한 환경 친화적 연속식 아임계/초임계 가수분해 공정 설계 및 구축
  - 유용물질을 효율적으로 회수하기 위한 친환경 연속식 아임계/초임계수 가수분해 공정 설계
  - 설계를 바탕으로 한 친환경 연속식/초임계 수 가수분해 공정 구축 (안전성 및 안정성 확립)
- 친환경 아임계/초임계 수 가수분해 공정 조건 적용 다양화
  - 온도 및 압력
  - 반응 시간
  - 샘플 혼합 비율 등
- 연속식 아임계/초임계 수 가수분해 공정을 통한 신물질 생산/동정 및 공정 조건 확립
  - 아미노산 및 단당류 분석
  - 폴리페놀 및 플라보노이드류 분석 등
  - 연속식 및 회분식의 유용물질 생성 수율 비교
- 해조류 유래 추출물의 유효성분 특성 규명
  - DPPH 라디칼 및 ABTS 라디칼 소거능 등 (항산화능 분석)
- 해조류 가수분해물질의 항균 활성
  - food born 미생물 성장 억제
- 다양한 실험 조건에서의 기능성 지표 물질 확인 및 열안정성 평가
  - 지표물질의 열안정성 평가
- 해조류 유용물질 산업적 용도 검토
  - 바이오 소재 및 산업적 응용 분야 검토

## 제 4 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 6-4-1]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 6-4-1] 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 50 wt%로 하였으며 활엽수 펄프의 함량에 대해 다시마 추출물의 함량을 0~50 wt%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 200~50 wt%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 1.5~3.5 m, 너비 25~40 cm 으로 몸이 갈색 또는 검은 갈색이며, 바탕이 두껍고 미끄럽다. 큰 바닷말이며 2~4년생인 엽체는 포자세대로서 걸보기에는 줄기·잎·뿌리의 구분이 뚜렷하다. 잎은 띠 모양으로 길고 가운데 부분보다 아래쪽이 넓다. 잎의 가운데 부분은 두께 1.8~3.5 mm로서 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 40~120 mm, 비중 0.91 g/cm<sup>3</sup>, 용융점 160~165 °C이며 보강재와의 분산향상을 위해 가위로 세절(chopping)하여 사용하였다.

[표 6-4-1] 다시마의 구성성분

|     | 가식부 100g당(Per 100g edible portion) |    |                |                |           |           |                      |             | 비고<br>Remarks |                          |
|-----|------------------------------------|----|----------------|----------------|-----------|-----------|----------------------|-------------|---------------|--------------------------|
|     | 식품열량<br>Food energy                |    | 수분<br>Moisture | 단백질<br>Protein | 지방<br>Fat | 회분<br>Ash | 탄수화물<br>Carbohydrate |             |               | 가식부(%)<br>Edible portion |
|     | kcal                               | kJ |                |                |           |           | 당질<br>Non-fibrous    | 섬유<br>Fiber |               |                          |
| 다시마 | 21                                 | 89 | 91.0           | 1.1            | 0.2       | 3.5       | 3.6                  | 0.6         | 100.0         | 평균<br>주문진                |

(출처 : [http://portal.nfrdi.re.kr/page?id=aq\\_seafood\\_2\\_7&type=tot&from=totList&fim\\_col\\_id=2009-MF0011150-6-D01](http://portal.nfrdi.re.kr/page?id=aq_seafood_2_7&type=tot&from=totList&fim_col_id=2009-MF0011150-6-D01))

[표 6-4-2] 파래의 구성성분

| 수산물명 | 수분<br>Moisture | 총식이섬유<br>Total dietary fiber | 산가용성섬유<br>Acid detergent fiber | 셀룰로스<br>Cellulose | 리그닌<br>Lignin | 비고<br>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](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 ClO<sub>2</sub>(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 6-4-2]에 정리하였다. 파래를 주정, 아세톤 및 황산으로 처리하여 분말로 준비한 과정은 [그림 6-4-3]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,



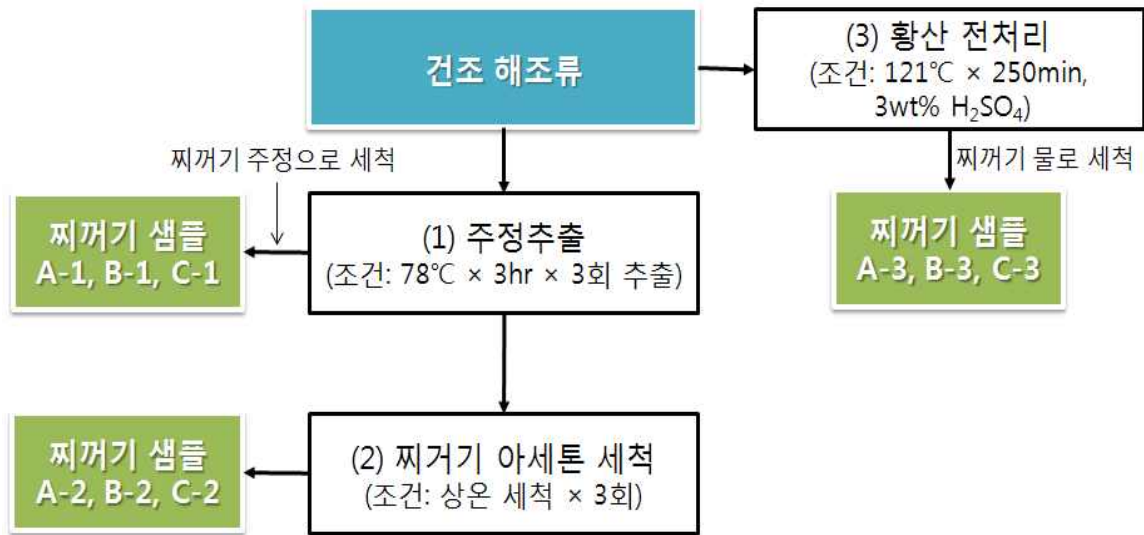
TA Instrument)를 사용하여 측정하였다. 분석시료는 분말로 만들어 TGA 측정용 백금용기에 약 20 mg 정도로 담아 10 °C/min의 상온서 500 °C까지 측정하였다. 연소시에 100 ml/min으로 질소를 흘려보냈으며, 중량 감소율 (Decrement of weight)과 미분계수 (Derivative Thermogravimetric, DTG) 곡선 변화를 관찰하였다.

다시마 및 파래 부산물의 열분해 특성을 [그림 6-4-4]과 [그림 6-4-5]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].

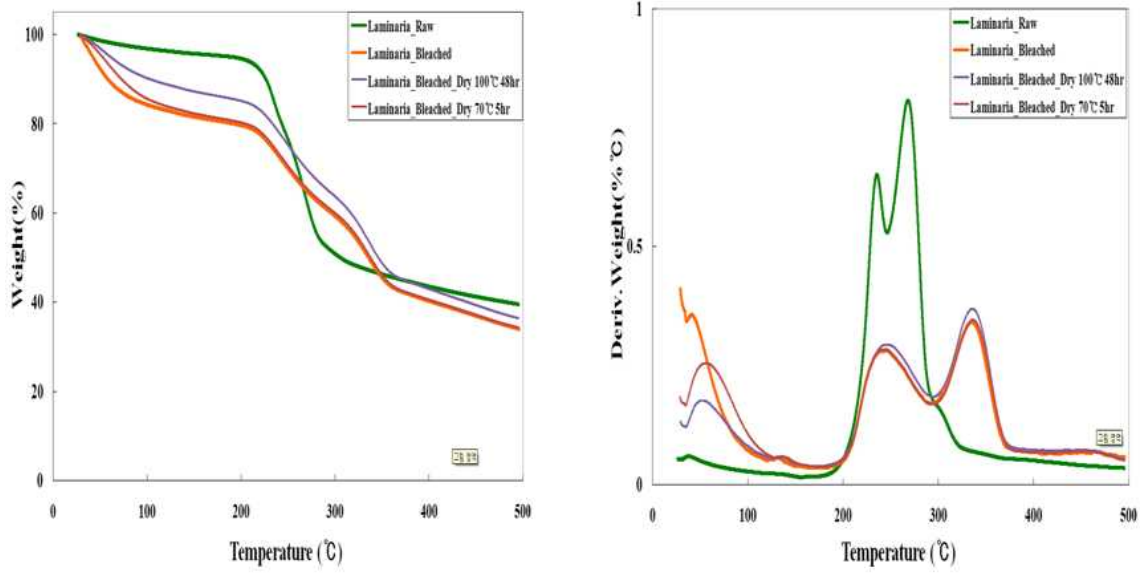
파래의 열분해 특성은 처리방법에 따라 다르게 나타났다. 주정 및 아세톤으로 세척한 경우는 200~300 °C에서 두 개의 열분해 주피크가, 황산으로 처리한 경우는 350 °C에서 열분해 주피크가 나타났다. 열분해 결과로만 판단하면 황산 처리한 시료의 열안정성이 우수하여 보강재로서의 사용가능성이 크지만 실제로는 황산 처리한 시료에서는 산 냄새가 많이 나고 또한 서로 단단하게 응집되어 있어 고분자 내에 분산하는 것이 어려웠다. 반면에 주정 혹은 아세톤으로 처리한 파래는 분말형태로 보강재로 사용하는 것이 용이하였다.



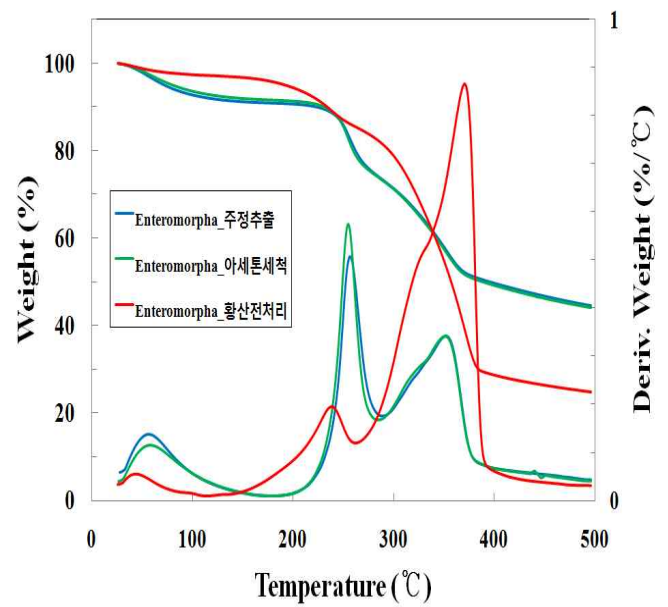
[그림 6-4-2] 다시마의 세척 및 표백과정.



[그림 6-4-3] 파래 세척 및 분말화 과정.



[그림 6-4-4] 다시마 원시료 및 표백된 다시마의 열분해 특성.



[그림 6-4-5] 다시마 원시료 및 표백된 다시마의 열분해 특성.

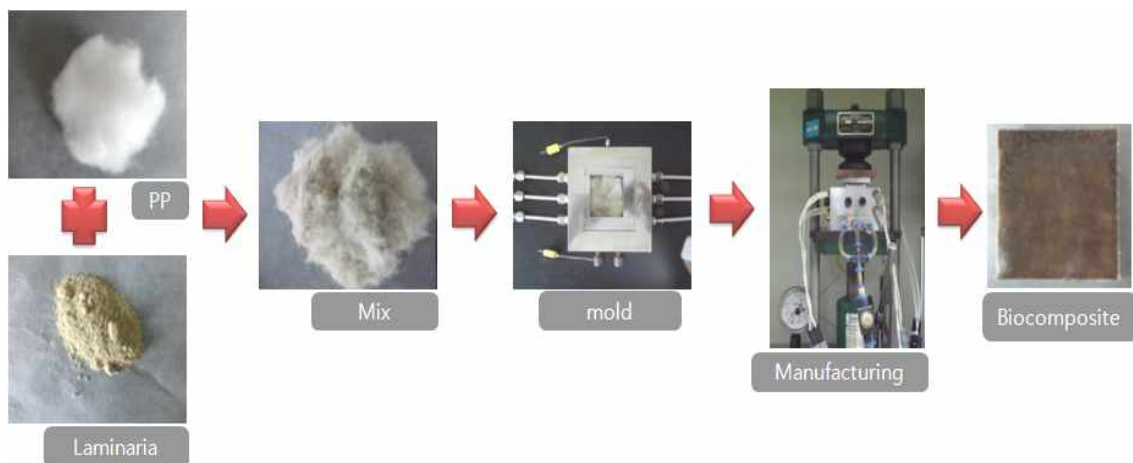
#### 라. 바이오복합재료의 제조

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. 과래의 경우에는 주정 및 아세톤으로 처리된 과래 분말을 20~50 wt%까지 10 wt%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 1000 psi(6.894MPa)의 압력을 가한 후 그대로 유지하면서 상온까지 냉각하였다. 바이오복합재료 시료는 50 mm × 50 mm × 2 mm 크기로 제조하였다. 바이오복합재료 제조공정을 [그림 6-4-6]에 나타내었다.

천연섬유 보강재의 함량은 50 wt%로 하였으며 다시마의 함량은 활엽수 펄프 함량 대비 0~50 wt%까지 10 wt%별로 변화시키면서 제조하였다. 바이오복합재료가 제조된 후에 금속몰드에서 탈형시켜 24시간 이상 상온에서 냉각시킨 후 정밀절단기를 이용하여 열적 특성 및 기계적 분석을 위한 시편을 제조하였다.

과래의 경우에는 주정 및 아세톤으로 처리된 과래 분말을 20~50 wt%까지 10 wt%별로 변화시키면서 폴리프로필렌과 함께 혼합하여 제조하였다. 제조공정은 다시마 보강재를 사용한 경우와 같은 조건으로 하였다.



[그림 6-4-6] 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 35 mm, 너비는 약 11 mm, 두께는 약 2 mm로 제작하여 분당 5 °C로 -100~100 °C까지 측정하였다. 시편의 온도를 -100 °C까지 낮추거나 100 °C까지 온도가 올라간 시편의 냉각을 위해 액체질소를 사용하였으며 효과적인 진동을 위해 air bearing의 gage를 60~65 psi로 유지하였다. 시험은 vertical 형태로서 single cantilever mode에서 진행되었으며 사용된 진동수 (frequency)는 1 Hz로 고정시키고, 진동폭 (oscillation amplitude)은 0.2 mm로 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 6-4-7]와 [그림 6-4-8]에 나타내었다. 다시마의 첨가 없이 활엽수 펄프만을 50 wt% 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.

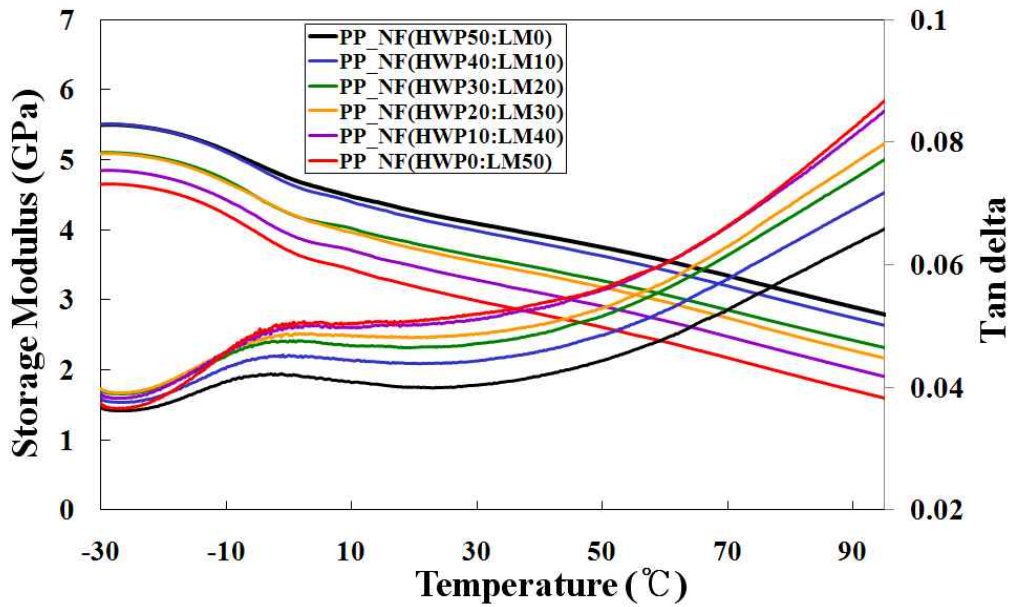
반면 활엽수 펄프에 다시마 함유량을 10 wt%씩 증가시켜 50 wt%까지 증가시켜 제조한 바이오복합재료의 저장탄성률은 그 증가폭이 감소하는 경향을 보이는데, 각각 10 wt%, 20 wt%, 30 wt%, 40 wt%, 50 wt% 다시마를 첨가한 경우 폴리프로필렌 매트릭스에 비해 37%, 37%, 31%, 25%, 20% 증가한 반면에 활엽수 펄프를 50wt% 첨가한 바이오복합재료의 동역학적 특성에 비해서는 10%, 10%, 16%, 22%, 27% 감소하였다. 이는 표백된 다시마에 존재하는 유기물질 및 단섬유 혹은 구형 물질과 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 6-4-9], [그림 6-4-10]과 [그림 6-4-11], [그림 6-4-12]에 나타내었다. 주정 및 아세톤으로 처리한 파래 보강 바이오복합재료는 파래의 함량이나 처리조건에 따라 큰 변화를 보이지 않았으며 폴리프로필렌에 대해서는 큰 보강 효과를 나타내지 않았다.

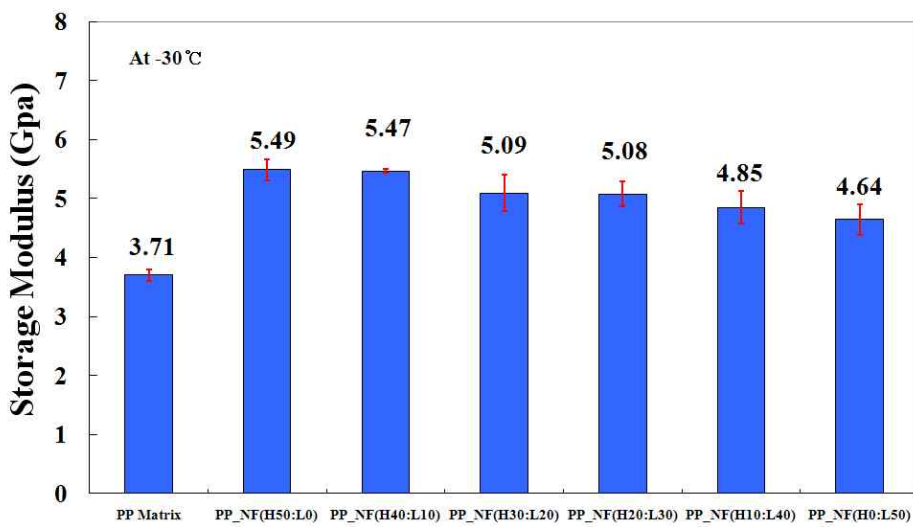
[표 6-4-3] 활엽수 펄프 보강 바이오복합재료의 동역학적 특성에 대한 다시마 추출물의 첨가 영향

| 보강재 비율                 | H50:L0 | H40:L10 | H30:L20 | H20:L30 | H10:L40 | H0:L50 |
|------------------------|--------|---------|---------|---------|---------|--------|
| Storage Modulus 증가량(%) | 47     | 37      | 37      | 31      | 25      | 20     |

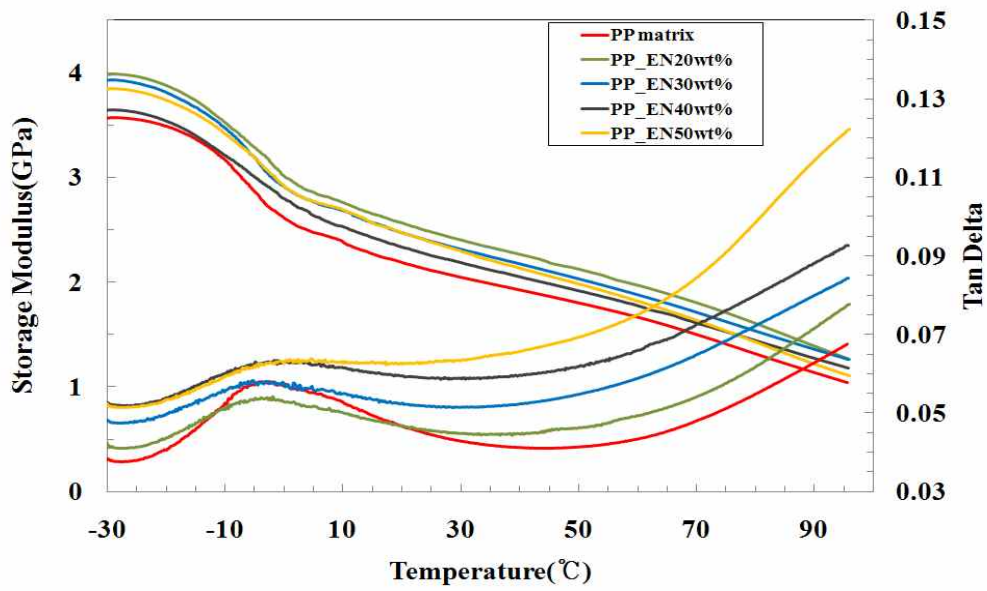
H: 활엽수 펄프, L: 다시마 추출물



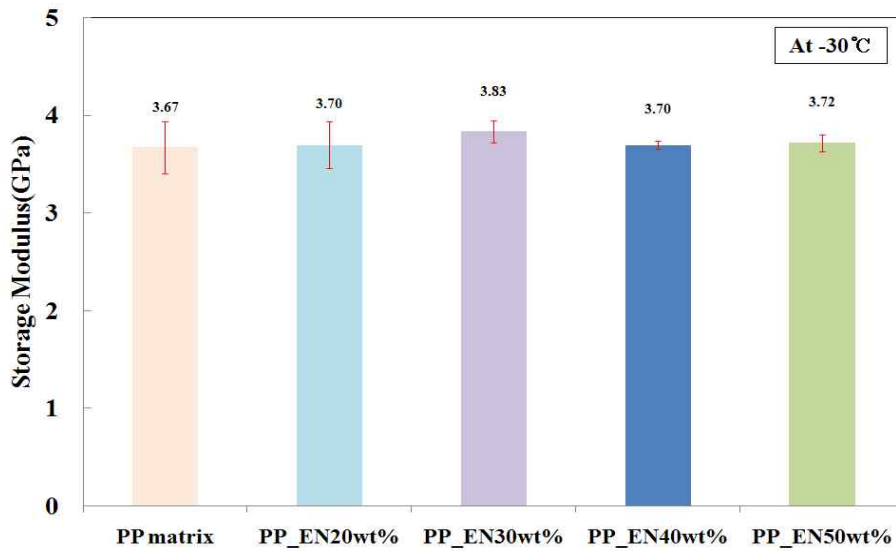
[그림 6-4-7] 바이오복합재료의 동역학적 특성



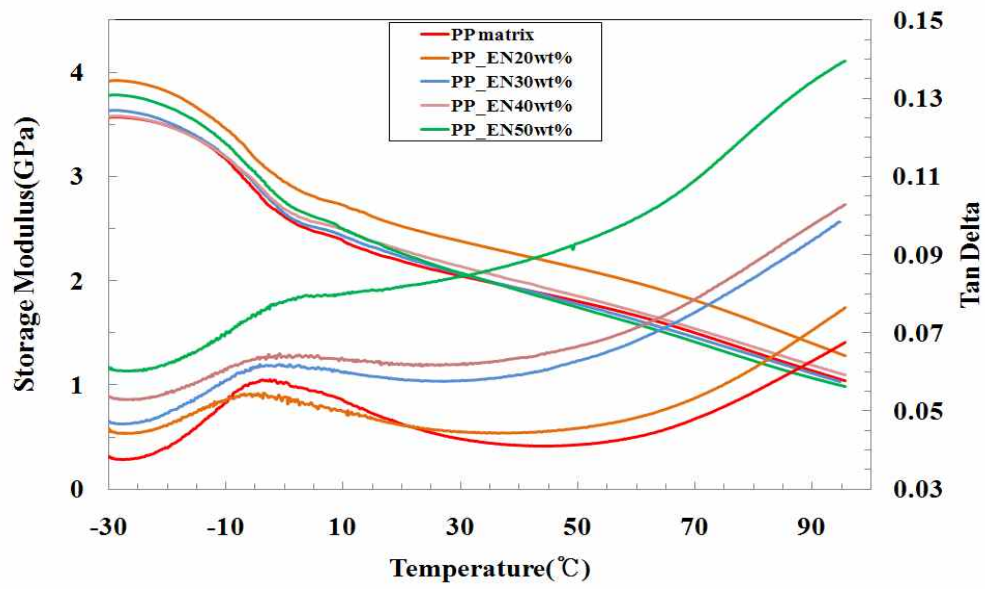
[그림 6-4-8] 활엽수펄프 보강 바이오복합재료의 동역학적 특성에 대한 다시마 첨가영향



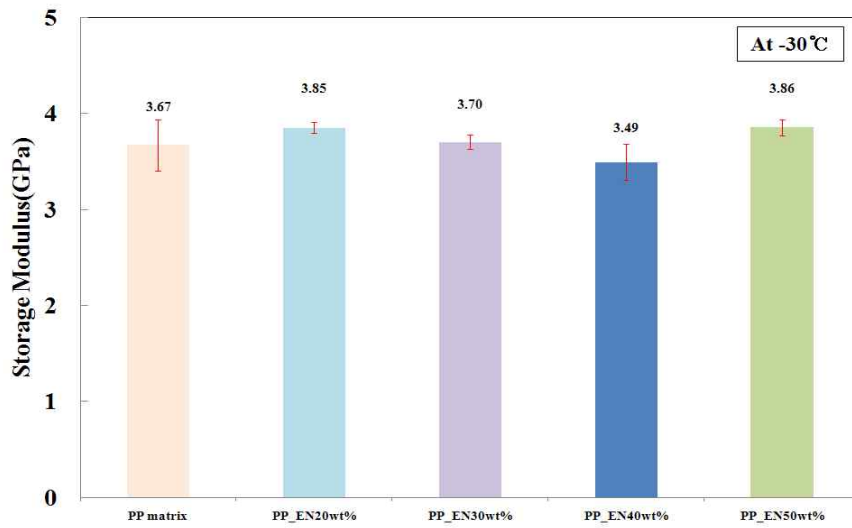
[그림 6-4-9] 주정으로 처리한 파래 보강 바이오복합재료의 동역학적 특성.



[그림 6-4-10] 주정으로 처리한 파래 보강 바이오복합재료의 동역학적 특성에 대한 파래 함량 영향.



[그림 6-4-11] 아세톤으로 처리한 파래 보강 바이오복합재료의 동역학적 특성



[그림 6-4-12] 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;  $23 \pm 2$  °C and  $50 \pm 5\%$  relative humidity)에서 측정하였고, 시편은 50 mm×25 mm×2 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/m<sup>2</sup> (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/m<sup>2</sup> (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 6-3-13], [그림 6-3-14]에 나타내었다. 활엽수펄프 보강 바이오복

합재료의 굴곡특성에 대한 다시마 첨가영향 결과를 살펴보면 활엽수펄프 함유량이 50 wt% 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.

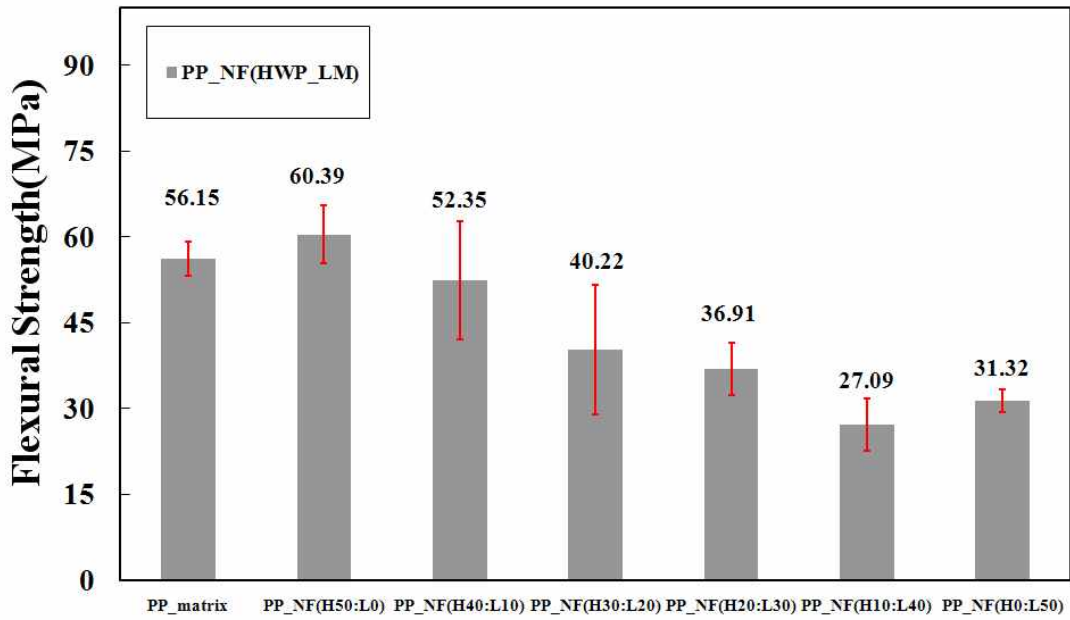
일반적으로 굴곡시험 시에 시편의 아랫부분은 인장응력을 받고 윗부분은 압축응력을 받게 되는데 실제로 여러 응용분야에서 굴곡시험은 인장시험 보다 소재의 디자인이나 표준화 목적을 고려할 때 장점도 많고 소재가 경험하는 실제 환경과 더욱 밀접한 관계가 있다. 따라서 보강재 투입량 증가에 따라 증가하는 굴곡특성이 향상되는 경향을 보이는 결과가 바람직하다고 할 수 있다.

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 6-4-15]와 [그림 6-4-16]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 40 wt% 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.

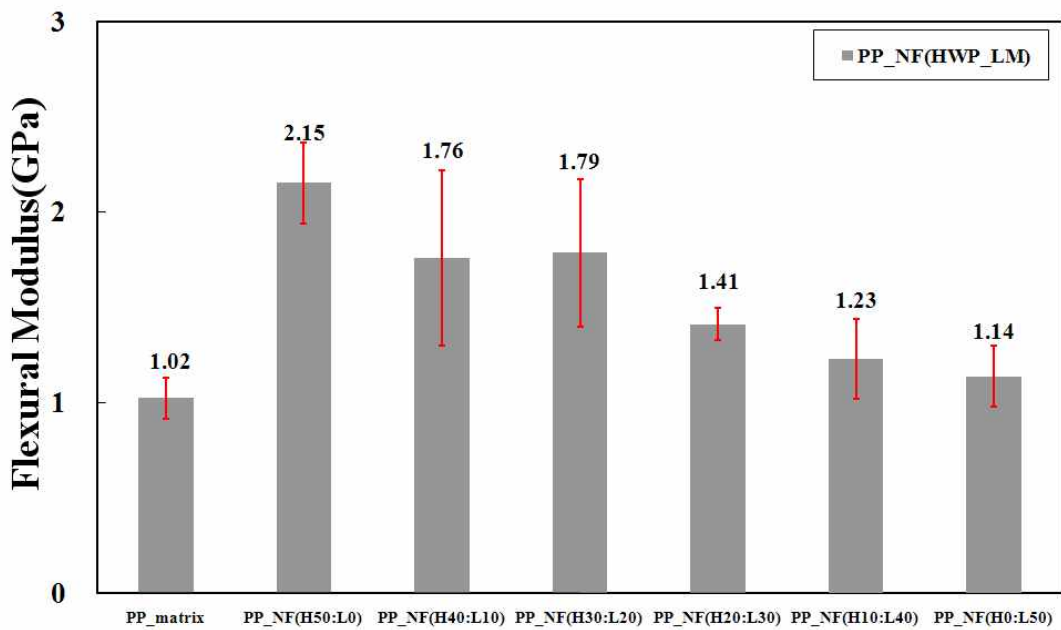
[표 6-4-4] 활엽수 펄프 보강 바이오복합재료의 굴곡 특성에 대한 다시마 추출물의 첨가 영향

| 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    |

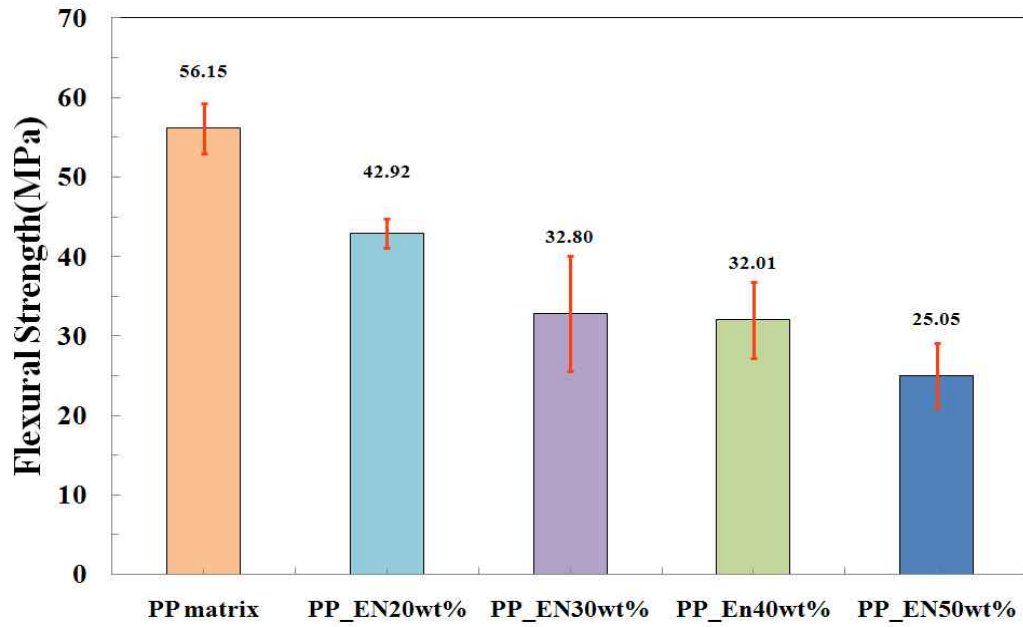
H: 활엽수 펄프, L: 다시마 추출물



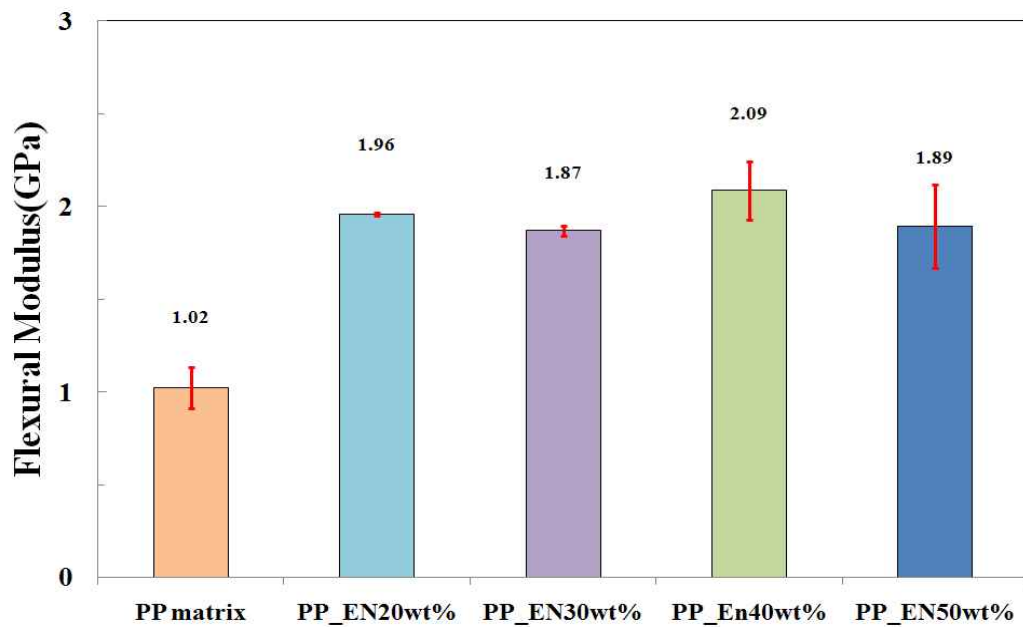
[그림 6-4-13] 활엽수펄프 보강 바이오복합재료의 굴곡강도에 대한 다시마 첨가영향



[그림 6-4-14] 활엽수펄프 보강 바이오복합재료의 굴곡탄성률에 대한 다시마 첨가영향



[그림 6-4-15] 주정으로 처리한 파래 보강 바이오복합재료의 굴곡강도 특성에 대한 파래 함량 영향



[그림 6-4-16] 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 12.7 mm, 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 6-4-17]에 모식도로 나타내었다.

활엽수 펄프를 보강재로 사용한 폴리프로필렌 바이오복합재료의 충격강도에 대한 다시마 첨가영향을 [그림 6-4-18]에 나타내었다. 활엽수 펄프를 50 wt% 첨가한 바이오복합재료는 폴리프로필렌 매트릭스에 비해 충격강도가 366%로 크게 향상되었다. 반면에 활엽수 펄프 40%에 다시마를 10 wt% 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.

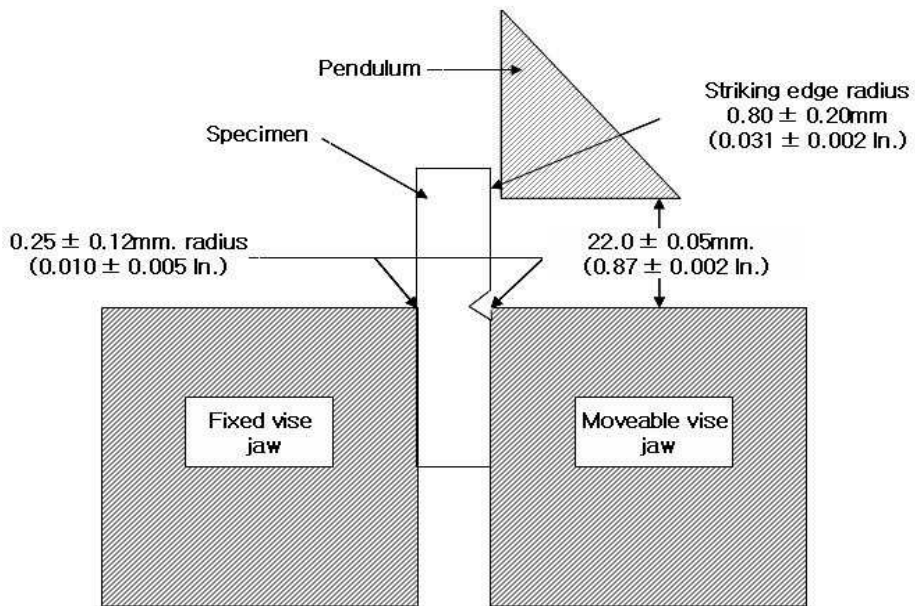
일반적으로 천연섬유를 보강재로 사용한 바이오복합재료의 경우 고분자 매트릭스에 비해 뛰어난 충격흡수성을 가지게 되지만 보강재로서 우수한 특성을 보이는 활엽수 펄프의 함유량이 낮아지고 대신 분말형태인 다시마의 함유량이 증가함에 따라 매트릭스에 대한 분산성 혹은 보강재와 매트릭스 사이의 계면 접착력이 상대적으로 좋지 않아 충격에너지를 효과적으로 흡수하지 못하는 것으로 생각할 수 있다.

반면에 주정으로 처리한 파래 보강 바이오복합재료의 충격강도에 대한 파래 첨가영향을 [그림 6-4-19]에 나타내었다. 폴리프로필렌에 파래를 20, 30 wt% 첨가하면 충격강도는 50% 증가를 보이며 50 wt% 첨가 시에 감소되는 것을 알 수 있다. 따라서 파래 보강재는 다시마에 비해 충격강도가 우수한 바이오복합재료를 제조하는데 효과적인 것으로 판단된다.

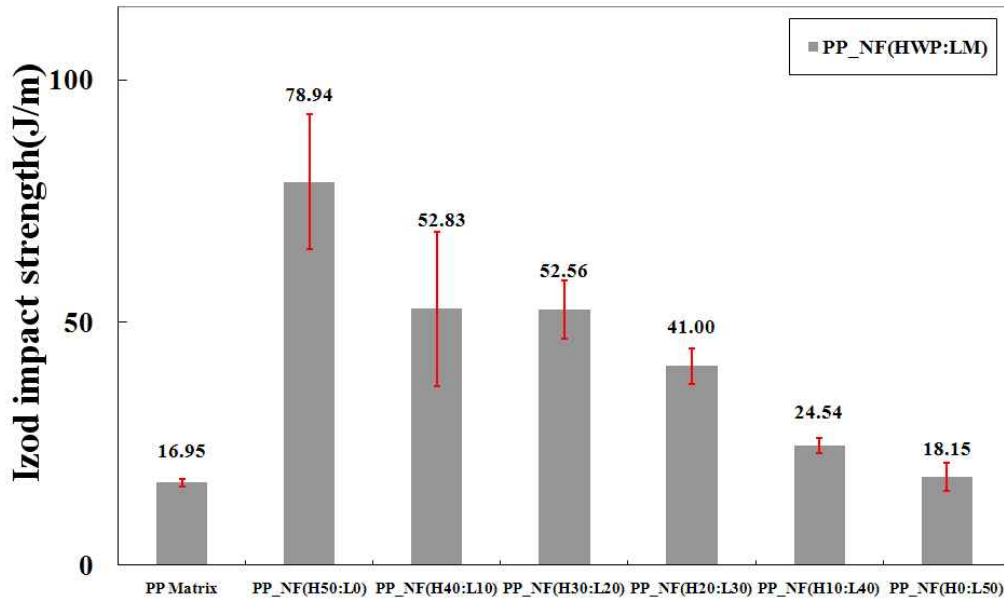
[표 6-4-5] 활엽수 펄프 보강 바이오복합재료의 굴곡 특성에 대한 다시마 추출물의 첨가 영향

| 보강재 비율      | H50:L0 | H40:L10 | H30:L20 | H20:L30 | H10:L40 | H0:L50 |
|-------------|--------|---------|---------|---------|---------|--------|
| 충격강도 증가량(%) | 366    | 211     | 210     | 141     | 50      | 7      |

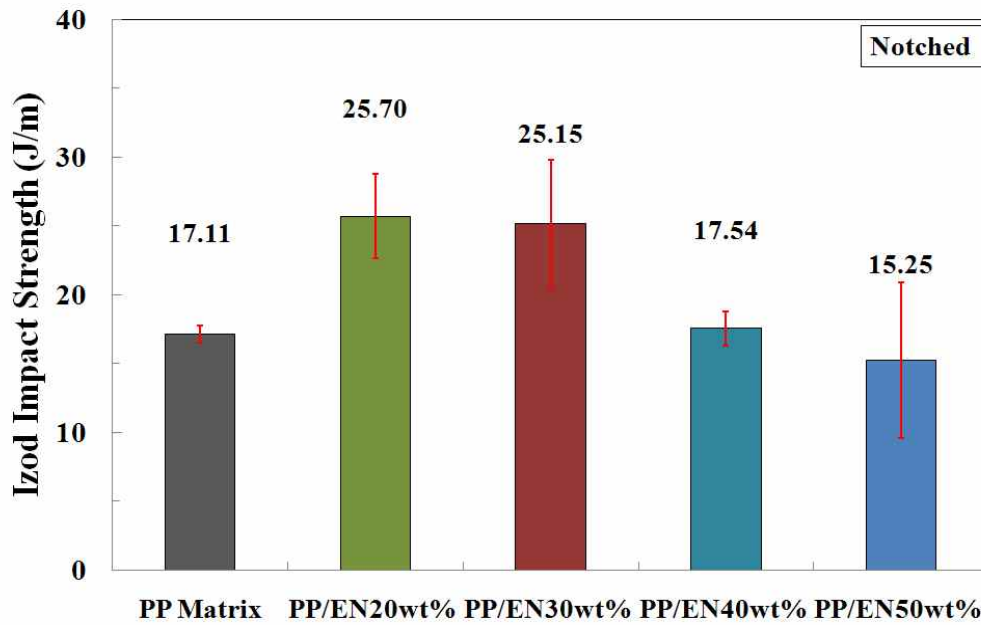
H: 활엽수 펄프, L: 다시마 추출물



[그림 6-4-17] Izod 실험장치



[그림 6-4-18] 활엽수펄프 보강 바이오복합재료의 충격강도에 대한 다시마 첨가영향



[그림 6-4-19] 주정으로 처리한 파래 보강 바이오복합재료의 충격강도에 대한 파래 첨가영향

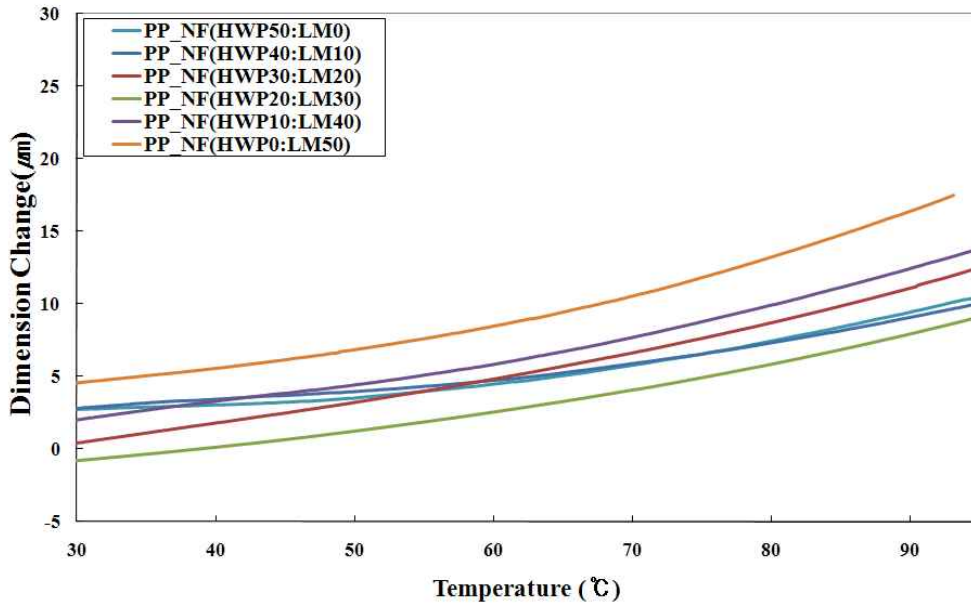
#### 라. 바이오복합재료의 열팽창 특성

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 °C까지 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.

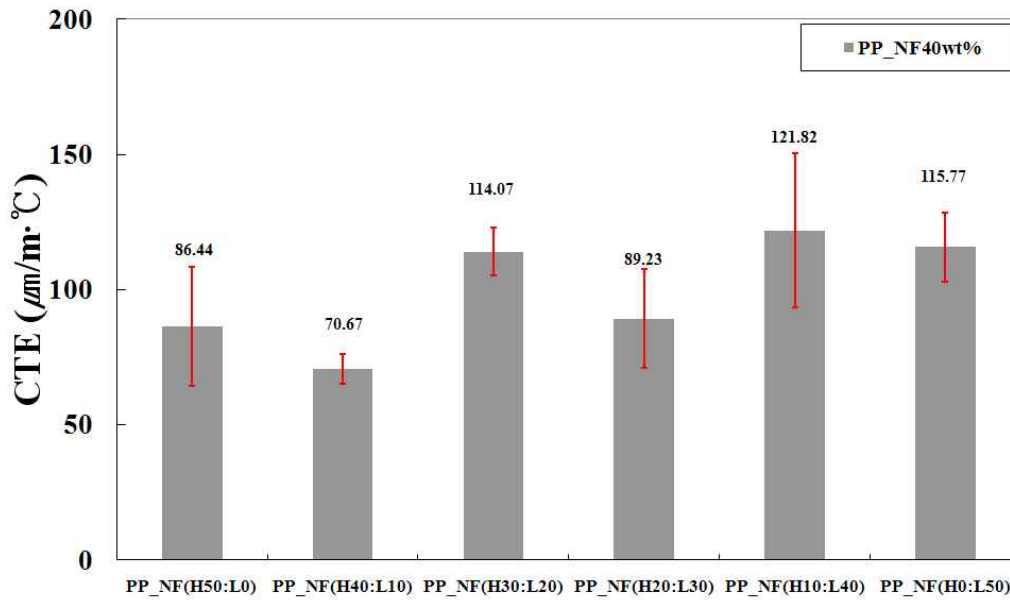
활엽수 펄프를 보강재로 사용한 폴리프로필렌 바이오복합재료의 열팽창 특성에 대한 다시마 첨가영향을 [그림 6-4-20]과 [그림 6-4-21]에 나타내었다. [그림 6-4-20]은 상온에서 100 °C까지의 바이오복합재료의 두께변화량을 선형으로 표시한 것이며 [그림 6-4-21]는 열팽창계수를 비교한 것으로 열팽창 계수의 감소는 온도변화에 대한 치수 안정성이 향상됨을 의미한다. 열팽창 특성분석에 의하면 활엽수 펄프에 다시마를 첨가한 영향은 일정한 패턴을 보이지 않는데 이는 다시마 추출물에 존재하고 있는 유기성 물질이 온도 상승에 따른 치수변화에 상대적으로 큰 영향을 주었기 때문으로 여겨진다.

주정으로 처리한 파래를 보강재로 사용한 폴리프로필렌 바이오복합재료의 열팽창 특성에 대한 파래 첨가 함량 영향을 [그림 6-4-22]에서 [그림 6-4-23]에, 아세톤으로 처리한 파래를 보강재로 사용한 폴리프로필렌 바이오복합재료의 열팽창 특성에 대한 파래 첨가 함량 영향을 [그림 6-4-24]에서 [그림 6-4-25]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.

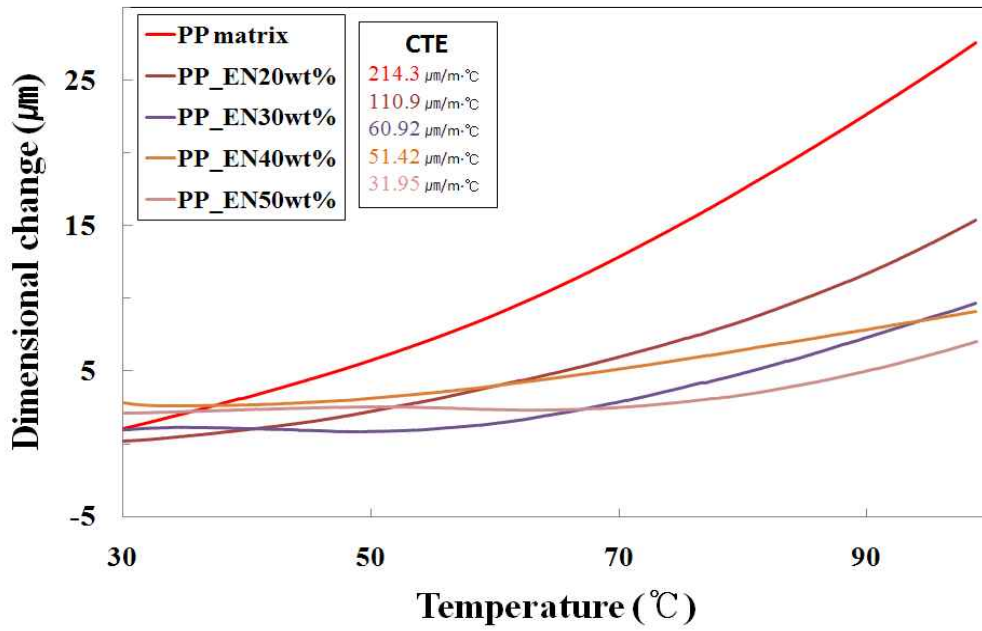




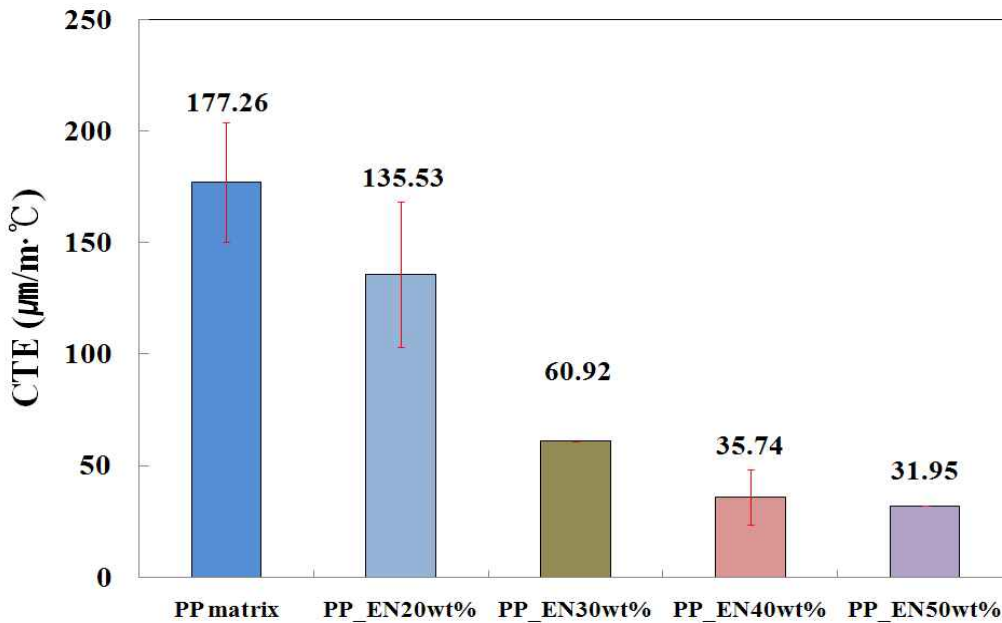
[그림 6-4-20] 활엽수펄프 보강 바이오복합재료의 치수안정성에 대한 다시마 첨가 영향



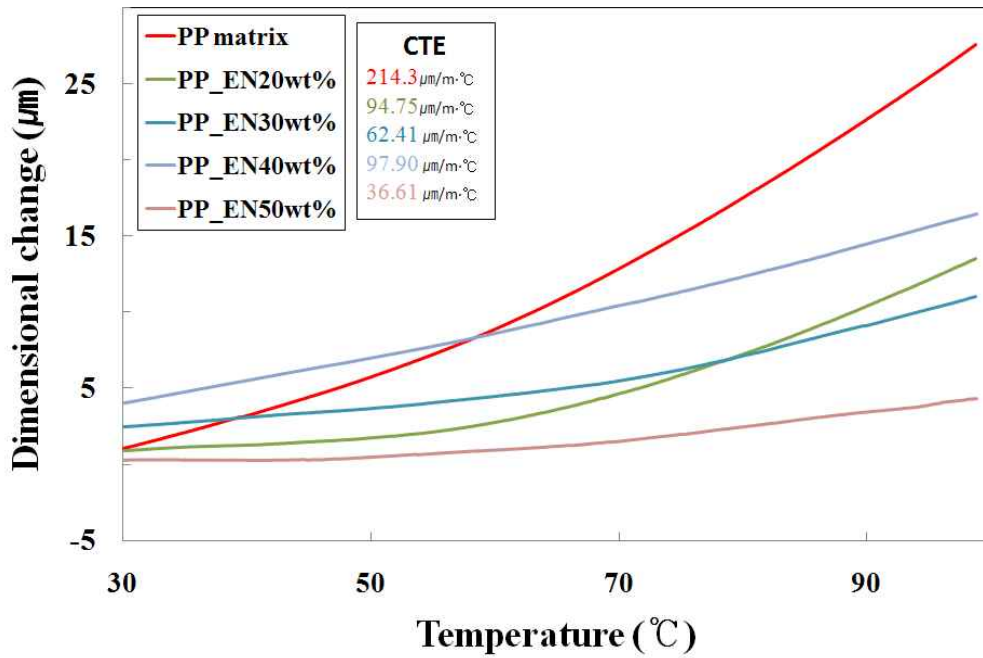
[그림 6-4-21] 활엽수펄프 보강 바이오복합재료의 열팽창계수에 대한 다시마 첨가 영향



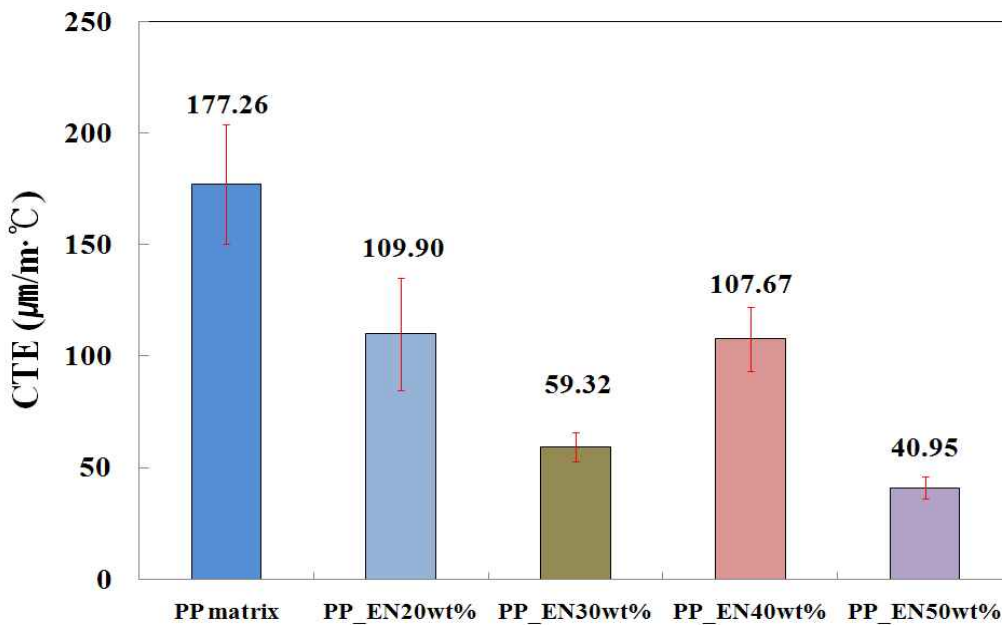
[그림 6-4-22] 주정 처리 파래 보강 바이오복합재료의 열팽창특성에 대한 파래 첨가 영향



[그림 6-4-23] 주정 처리 파래 보강 바이오복합재료의 열팽창계수에 대한 파래 첨가 영향



[그림 6-4-24] 아세톤 처리 파래 보강 바이오복합재료의 열팽창특성에 대한 파래 첨가영향



[그림 6-4-25] 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 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  |
|-----------|---|---|
|           | 해조류 생리활성 물질의 함염증, 항치매, 항비만효과 및 기전 분석, DB 구축 및 표준화 | <ul style="list-style-type: none"> <li>○ 다시마 함염증 활성물질의 분리</li> <li>○ 다시마 함염증 활성물질의 효능 및 기전 확인</li> <li>○ 다시마 추출물의 표준 크로마토그램 확립</li> <li>○ 참모자반 항비만 활성 효능 및 기전 확인</li> <li>○ 참모자반 항비만 활성물질 분리</li> <li>○ 항비만 활성 효능 검증을 위한 실험 동물 모델 확립</li> </ul>                       |
| 건강 신소재 개발 | 해조류 생리활성 물질의 항암효과 및 기전 분석                         | <ul style="list-style-type: none"> <li>○ Homogenous <i>in vitro</i> or <i>in vivo</i> kinase 활성 분석.</li> <li>○ RTK mediated angiogenesis에 대한 영향 분석</li> <li>○ Apoptosis 과정 유도인자 분석</li> <li>○ 세포주기(cell cycle) 조절인자 분석.</li> <li>○ 갈조류로부터 항암물질의 분리 및 기전 규명</li> </ul> |
|           | 해조류 생리활성 물질의 항당뇨효과 및 기전 분석                        | <ul style="list-style-type: none"> <li>○ 다시마 EtOAc 분획물로부터 당뇨합병증 치료 및 예방물질 분리 및 구조 결정과 작용기전 연구</li> <li>○ 메생이 분획물의 항산화/ 당뇨합병증 치료 및 예방물질 분리 및 구조결정</li> </ul>   |



| 구분                 | 연구개발 목표  | 연구개발 내용 및 범위   |
|--------------------|--|--|
| 생물학적<br>전환공정<br>개발 | 해조류 성분분별<br>및 전처리 공정<br>최적화                    | <ul style="list-style-type: none"> <li>○ 다시마 약산, 극저산 및 열수 전처리공정 개발</li> <li>○ 연속공정을 통한 다시마 전처리 가능성 탐색</li> </ul>   |
|                    | 생물친화적<br>전처리 및<br>당화효소를<br>이용한 갈조류<br>당화 공정 개발 | <ul style="list-style-type: none"> <li>○ 생물정보학 방법을 이용하여 알긴산의 단당 생성 효소의 스크리닝 및 클로닝</li> <li>○ 단당 생성 효소의 발현 및 특성 분석</li> <li>○ Alginate의 생물학적 당화공정의 확립</li> </ul>  |
|                    | 해조류 해조<br>다당체<br>분해미생물<br>유전자원확보               | <ul style="list-style-type: none"> <li>○ 저분자 해조다당체 생산을 위해 전복내장유래 미생물효소(AlyDW11) 및 감마선조사 융합 최적조건을 확립하고 융합기술을 활용한 저분자 알긴산 당원 확보</li> <li>○ 성게 장내 미생물 screening을 통한 해조다당체 분해 우수 균주 1건 확보(AlyHP32) 및 특성 규명</li> <li>○ 성게 내장 유래 알긴산 분해 미생물(AlyHP32)의 효율적 활용을 위해 Fosmid library 1건을 구축하고 확립된 신속탐색 기술을 이용하여 해조 다당체 분해 우수 유전자 1건 탐색완료</li> </ul> |
|                    | 해조류분해<br>부탄올 생산균주<br>개발 및 부탄올<br>발효공정의<br>최적화  | <ul style="list-style-type: none"> <li>○ 부탄올생산균주의 해조류 분해효소 및 대사체의 profiling</li> <li>○ 고수율 부탄올생산을 위한 재조합균주개발 (CBP) 과 핵심설계기술 도출 : 효소와 대사체 profiling 에서 도출된 다양한 유전자 또는 효소들을 분석하고 과발현등을 통해 CBP에 적합한 재조합 균주를 설계</li> <li>○ pervaporation에 의한 부탄올의 분리정제 핵심기술 도출</li> </ul>  |
|                    | 난발효성 당류<br>대사형 재조합<br>미생물 개발                   | <ul style="list-style-type: none"> <li>○ 알긴산 모노머 대사형 해양미생물 유전체 라이브러리 구축</li> <li>○ 유전체 라이브러리를 이용한 난발효성 당류인 알긴산 모노머의 대사유전자 스크리닝</li> <li>○ 선별된 대사유전자의 발현벡터 구축</li> </ul>  |

| 구분           | 연구개발 목표                                     | 연구개발 내용 및 범위  |
|--------------|---|---|
| 그린 에너지 융합 공정 | Next generation sequencing을 활용한 유기산 수율 향상기술 | <ul style="list-style-type: none"> <li>○ 해조류 발효 미생물 균집 획득</li> <li>○ 미생물 균집내 유전 자원 분석</li> </ul>  |
|              | VFA 생산용 다단계 생물반응기 설계                        | <ul style="list-style-type: none"> <li>○ Cell growth를 높이기 위한 배지 환경 실험</li> <li>○ 해조류를 이용한 VFA생산 다단계 생물 반응기 설계</li> <li>- 다단계 생물 반응기에 맞는 배지 환경 조사</li> <li>- 다단계 생물 반응기 운전 및 문제점 발견</li> </ul>   |
|              | 혐기성 소화공정 이용 VFA 생산 기술 개발                    | <ul style="list-style-type: none"> <li>○VFA 생산성 향상을 위한 생물학적전처리공정 <ul style="list-style-type: none"> <li>- Alginate 분해미생물을 이용한 전처리실험</li> </ul> </li> <li>○VFA 발효공정의 비용절감을 위한 축산폐수의 질 소원으로서 활용 가능성 조사 <ul style="list-style-type: none"> <li>- 축산폐수 첨가에 따른 VFA 생산성 측정</li> </ul> </li> </ul> |
|              | 혐기성 소화공정 이용 혼합 알코올 생산기술 개발                  | <ul style="list-style-type: none"> <li>○ 혼합유기산 1톤으로부터 혼합알코올 652 kg 생산 가능</li> <li>○ 세계 최대 활성표면적(45.5 m<sup>2</sup>/g, N<sub>2</sub>O-화학흡착법 측정)을 가진 Cu/Zn/Al 촉매 개발</li> </ul>  |
|              | 급속 열분해공정 이용 바이오오일 생산기술 개발                   | <ul style="list-style-type: none"> <li>○ 공정 부산물의 바이오오일 원료로서의 활용가능성 평가</li> <li>○ 바이오오일 수율 향상을 위한 최적 전처리 공정 선정 및 최적 조건 도출</li> <li>○ 바이오오일을 고품질 연료로 전환시키기 위한 기초 연구 수행</li> <li>○ 바이오오일 최대 수율 약 46%</li> </ul>  |

| 구분                | 연구개발 목표   | 연구개발 내용 및 범위  |
|-------------------|---|---|
| 통합공정<br>및<br>제품개발 | 해조류의 활용을<br>위한 통합공정<br>최적설계                     | <ul style="list-style-type: none"> <li>○범위: 전처리, 혐기성소화, 수소화공정, 분리공정을 포함한 전체 공정</li> <li>○통합공정을 이루는 개별 주요 공정의 에너지 및 물질 수지식 수립</li> <li>○공정 모사기를 이용한 개념설계 및 통합공정의 경제성 분석</li> </ul>         |
|                   | 혐기성 소화에<br>의한 bench<br>scale 유기산<br>생성 공정<br>구축 | <ul style="list-style-type: none"> <li>○ bench scale 유기산 생산 연속식 공정 설계 및 구축</li> <li>- 300L 규모의 유기산 생산 연속식 공정 설계 및 구축</li> <li>- 유기산 생산 연속식 공정 시운전 및 문제점 조사 및 해결</li> </ul>                |
|                   | 해조류<br>유용물질의<br>효율적 분리 및<br>회수 공정 개발            | <ul style="list-style-type: none"> <li>○해조류 유래 유용물질의 추출/분리/회수를 위한 환경 친화적 아임계수 가수분해 공정 최적화</li> <li>○해조류 추출물 (바이오 소재) 기능성 물질 동정 및 그 기능성 확인</li> <li>○회수된 해조류 유래 유용물질의 산업적 응용 검토</li> </ul> |
|                   | 해조류 부산물을<br>이용한 바이오<br>복합재료 개발                  | <ul style="list-style-type: none"> <li>○해조류 종별, 화학적 전처리별 부산물의 특성분석</li> <li>○해조류 부산물을 이용한 친환경 바이오복합재료 제조 및 특성분석</li> <li>○시트형 바이오복합재료 제조</li> </ul>                                       |

2. 계획대비 달성도

가. 정성적 달성도

| 구분       | 연구개발 목표   | 세부연구목표<br>(연구계획서상에 기술된 연구목표)  | 달성내용  | 달성도 (%) |
|----------|---|---|---|---------|
| 건강신소재 개발 | 해조류 생리활성 물질의 항염증, 항치매, 항비만효과 및 기전 분석, DB 구축 및 표준화 | - 해조류 저분자 생리활성 물질의 기능성 분석<br>- 항염증 지표물질 1종 확보   | - 다시마로부터 분리된 fucoxanthin의 항염증 활성: 다시마로부터 분리된 fucoxanthin의 LPS에 의한 NO와 PGE <sub>2</sub> 및 염증성 cytokine 생성 억제 효능 확인, MAPK와 Akt 조절을 통한 NF-kB 전사인자 활성 억제 효능 확인.<br>- 참모자반 추출물의 항비만 활성: 참모자반 주정추출물 및 n-헥산 분획물의 지방세포 분화 억제와 세포내 지방 축적 억제 효능 확인, 각 추출물의 비만 관련 전사인자 (PPAR $\gamma$ , SREBP-1c, C/EBP $\alpha$ )와 지방 합성 관련 효소 (FAS, SCD-1, ACC $\alpha$ , AMPK)에 미치는 영향 확인 | 100     |
|          | 해조류 생리활성 물질의 항암효과 및 기전 분석                         | - 갈조류 내 항암활성물질 효능 분석 1건 이상<br><br>- 갈조류 저분자의 항암활성기전 규명 1건 이상  | - 갈조류 내 항암활성 물질 효능분석 4건 (Cell cycle arrest, apoptosis 유도, 스트레스 관련 kinase 활성 및 발현 분석, Anti-angiogenesis에서는 효과가 나타나지 않음)<br>- 갈조류 저분자의 항암 활성 기전 규명 3건 (Dieckol의 세포사멸 기전 분석, n-헥산 fraction-2, 4의 세포 사멸 기전 분석)  | 100     |
|          | 해조류 생리활성 물질의 항당뇨효과 및 기전 분석                        | - 다시마 EtOAc 분획물의 당뇨 합병증 치료 및 예방물질의 구조분석 및 기전 규명<br>- 메생이 추출물 및 분획물의 당뇨합병증 치료 및 예방 물질의 구조 분석 및 기전 규명 | - 활성성분 2종 이상 분리 및 구조 결정<br>- 효소 Kinetic 최적화 설정<br>- 항당뇨 및 항당뇨합병증 물질 분리조건 확립   | 100     |
|          | 해조류 자원의 통합적 활용을 위한 database 구축 및 표준화              | - 다시마 항염증물질의 분리<br><br>- 참모자반 저분자 유기용매분획물의 생리활성 분리조건 확립   | - 다시마 n-헥산 분획물로부터 fucoxanthin 분리.<br>- 다시마 주정추출물의 표준 크로마토그램 확립.<br>- 참모자반 추출물의 유기용매 희분 분리   | 100     |

| 구분           | 연구개발 목표                            | 세부연구목표<br>(연구계획서상에 기술된 연구목표)  | 달성내용   | 달성도 (%) |
|--------------|------------------------------------|---|--|---------|
| 생물학적 전환공정 개발 | 해조류 성분분별 및 전처리 공정 최적화              | - 전처리 다시마의 glucan 함량 25% 이상<br><br>- 효소소화도 70% 이상   | - 회분식 전처리 약산 전처리: 32.8%, 극저산 전처리: 29.1%, 열수전처리: 24.8%<br>- 연속식전처리: 15.9%<br>- 회분식 전처리 약산 전처리: 89.4%, 극저산 전처리: 83.4%, 열수전처리: 80.2%<br>- 연속식전처리: 72.8%   | 100     |
|              | 생물친화적 전처리 및 당화효소를 이용한 해조류 당화 공정 개발 | - 생물정보학 방법을 이용하여 알긴산의 단당 생성효소의 스크리닝 및 클로닝<br>- 단당 생성 효소의 특성 분석<br>- Alginate의 생물학적 당화공정의 확립                                 | - 단당 생성 효소의 클로닝<br>- 단당 생성 효소의 최적반응 조건 확립<br><br>- Alg7D와 Alg17C를 이용한 효소적 당화공정 수립  | 100     |
|              | 해조류 해조다당체 분해미생물 유전자원 확보            | - 분해유전자 ORF분석<br><br>- 효소 및 방사선조사를 병합한 저분자화 기술<br><br>- Metagenomic library 및 해양미생물로부터 해조다당체 분해 우수 균주 screening             | - 갯벌 유래 알긴산 분해유전자 (AlyWL1) ORF 확보 및 분석 1건<br>- 미생물 효소 및 감마선 조사 융합기술 최적화 기술 확보 1건 및 관련 내용 특허출원신청 1건<br>- 성게 내장유래 신종 우수 활성 균주(AlyHP32) 확보 1건 및 Fosmid library유래 alginate lyase positive clone (AlyHP32-F3) 탐색 1건   | 100     |
|              | 해조류분해 부탄올 생산균주 개발 및 부탄올 발효공정의 최적화  | - 부탄올생산균주의 해조류 분해효소 및 대사체의 profiling<br>- 고수율 부탄올생산을 위한 재조합균주개발 (CBP)과 핵심 설계 기술 선정<br>- pervaporation에 의한 부탄올의 분리정제 핵심기술 도출 | - 해조류 분해효소 발현 및 재조합 균주 선별<br><br>- 내성증진재조합균주의선별 및 특성 분석<br><br>- 기술 선정 및 기본 설계완성   | 80      |
|              | 난발효성 당류 대사형 재조합 미생물 개발             | - 알긴산 모노머 대사형 해양미생물 유전체 라이브러리 구축<br><br>- 유전체 라이브러리를 이용한 난발효성 당류인 알긴산 모노머의 대사유전자 스크리닝<br><br>- 선별된 대사유전자의 발현벡터 구축           | - 알긴산 단량체를 제조하기 위하여 해양미생물 Saccharophagus 균주가 보유한 알긴산 분해효소인 Alg7D와 Alg17C를 재조합 대장균에서 발현하고 이 효소를 이용한 알긴산 단량체 생산기술을 확립하였음<br>- 해양미생물인 Spingomonas 와 Vibrio 균주에서 알긴산 대사단백질인 DEH reductase(A1-R), ToaA와 ToaC,Alg7D를 암호화하는 유전자를 증폭하여 확보하였음<br>- 각 유전자를 대장균에서 발현하기 위한 유전자 벡터 2종을 제작완료함<br>- 알긴산 단량체를 대사하여 성장할 수 있는 신규 토양 미생물을 선별하였음 | 100     |

| 구분                  | 연구개발 목표                                     | 세부연구목표<br>(연구계획서상에 기술된<br>연구목표)  | 달성내용   | 달성도<br>(%) |
|---------------------|---|--|--|------------|
| 그린에너지<br>융합공정<br>개발 | Next generation sequencing을 활용한 유기산 수율 향상기술 | <ul style="list-style-type: none"> <li>- 미생물 군집 정보 획득</li> <li>- 미생물간 및 발효산물간의 상관관계 분석</li> </ul>                                      | <ul style="list-style-type: none"> <li>- 4개 샘플에 대한 미생물 군집 정보 획득 (41,835 sequence read)</li> <li>- <i>Vibrio</i>와 <i>Clostridium</i>의 우점 확인 및 해조류 분해와 부티르산 생산과 상관관계 분석</li> </ul> | 100        |
|                     | VFA 생산용 다단계 생물반응기 설계                        | <ul style="list-style-type: none"> <li>- 해조류 통한 VFA생산을 위한 다단계 생물반응기 설계</li> <li>- 다단계 생물 반응기 운전 및 최적화</li> </ul>                       | <ul style="list-style-type: none"> <li>- 다단계 생물 반응기 설계 완료</li> <li>- 다단계 생물 반응기 20일 운전</li> <li>- 단순 MSC-HCDC에서 VFA 농도 30g/L 이상 달성</li> </ul>                                    | 100        |
|                     | 혐기성 소화공정 이용 VFA 생산 기술 개발                    | <ul style="list-style-type: none"> <li>- VFA 수율 향상을 위한 생물학적전처리기술개발</li> <li>- 축산폐수를 활용한 발효배지 최적화</li> </ul>                            | <ul style="list-style-type: none"> <li>- VFA 수율 60% 이상 달성</li> <li>- 축산폐수 활용가능성 자료 확보</li> </ul>   | 100        |
|                     | VFA 이용 혼합 알코올 생산 촉매반응 기술 개발                 | <ul style="list-style-type: none"> <li>- 혼합 알코올 수율 90% (유기산 1톤 기준 알코올 650 kg 생산)</li> <li>- 혐기성 소화공정 및 화학적 알코올 생산공정 연계방안 도출</li> </ul> | <ul style="list-style-type: none"> <li>- 유기산 1톤 기준 알코올 652 kg 생산</li> <li>- 혐기성 소화공정과 화학적 알코올 생산공정 연계 위한 실제 발효액 활용 방안 협의</li> </ul>  | 100        |
|                     | 급속 열분해공정 이용 바이오오일 생산기술 개발                   | <ul style="list-style-type: none"> <li>- 바이오오일 수율 향상을 위한 단위 공정 개선 및 공정 조건 최적화</li> <li>- 바이오오일 고품질화 공정 도출</li> </ul>                   | <ul style="list-style-type: none"> <li>- 바이오오일 수율 향상을 위한 최적 전처리 공정 도출 및 공정조건 최적화</li> <li>- 화학촉매이용 수침탈산소공정을 이용한 바이오오일 고품질화 기초 실험 수행</li> <li>- 바이오오일 수율 약 46%</li> </ul>         | 100        |

| 구분                | 연구개발 목표  | 세부연구목표<br>(연구계획서상에 기술된<br>연구목표)                                    | 달성내용  | 달성도<br>(%) |
|-------------------|--|--|---|------------|
| 통합공정<br>및<br>제품개발 | 해조류의<br>활용을 위한<br>통합공정<br>최적설계                           | - 개별 단위공정의 모<br>델링 및 최적 통합공<br>정 설계                                | - 공정모사기를 이용<br>한 단위공정의 에<br>너지 및 물질수지<br>식 모델링 완료<br>- 공정모사기를 이용<br>한 통합공정의 개<br>념설계 완료<br>- 통합공정의 경제성<br>분석 완료           | 100        |
|                   | 협기성<br>소화에<br>의한<br>bench<br>scale<br>유기산<br>생성 공정<br>구축 | - 300L bench scale의<br>유기산 생산<br>연속식 공정 설계 및<br>구축                 | - bench scale 유기산<br>생산 연속식 공정<br>1건<br>- 유기산 생산<br>수율 40% 이상<br>(45.5% 달성)   | 100        |
|                   | 해조류<br>유용물질의<br>효율적 분리<br>및 회수 공정<br>개발                  | - 해조류 유래 유용물질<br>의 추출/분리/회수를<br>위한 환경 친화적 아<br>임계수 가수분해 공<br>정 최적화 | - 해조류 추출물 (바이<br>오 소재) 기능성 물<br>질 동정<br>- 해조류 추출물의 기<br>능성 확인<br>- 회수된 해조류 유래<br>유용물질의 산업적<br>응용 검토                       | 100        |
|                   | 해조류<br>부산물을<br>이용한<br>바이오<br>복합재료<br>개발                  | - 해조류 부산물의 특성<br>분석<br><br>- 해조류 부산물 보강<br>바이오복합재료<br>및 응용연구       | -해조류 부산물의 열<br>적, 형상학적 특성분<br>석자료 확보<br>-해조류 바이오복합재<br>료 제조 조건 및 동<br>역학적, 기계적 특성<br>분석자료 확보<br>-시트형 바이오복합재<br>료 제조 조건 확립 | 100        |

나. 정량적 달성도

| 구 분         |   | 목표 건수     |           |           | 성과 건수     |          |           | 달성도 평가        | 가중치 (%)          | 세부 <sup>1)</sup> 달성도 (%) | 전체 <sup>2)</sup> 달성도 (%) |
|-------------|---|-----------|-----------|-----------|-----------|----------|-----------|---------------|------------------|--------------------------|--------------------------|
|             |   | 논문        | 특허        | 학술발표      | 논문        | 특허       | 학술발표      |               |                  |                          |                          |
| 건강신소재 개발    | 해조류 생리활성 물질의 항염증, 항치매, 항비만효과 및 기전 분석, DB 구축 및 표준화 | 1         | 1         | 2         | 2         | 1        | 4         | 초과달성          | 20               | 140                      | 124                      |
|             | 해조류 생리활성 물질의 항암효과 및 기전 분석                         | 1         | 0         | 2         | 3         | 0        | 2         | 초과달성          |                  |                          |                          |
|             | 해조류 생리활성 물질의 항당뇨효과 및 기전 분석                        | 2         | 1         | 2         | 3         | 1        | 0         | 부분달성          |                  |                          |                          |
|             | <b>소 계</b>  | <b>4</b>  | <b>2</b>  | <b>6</b>  | <b>8</b>  | <b>2</b> | <b>6</b>  | <b>초과달성</b>   |                  |                          |                          |
| 생물학적 전환공정   | 해조류 성분분별 및 전처리 공정 최적화                             | 2         | 0         | 2         | 2         | 0        | 4         | 초과달성          | 25               | 125                      |                          |
|             | 생물친화적 전처리 및 당화효소를 이용한 해조류 당화 공정 개발                | 2         | 1         | 1         | 3         | 1        | 2         | 초과달성          |                  |                          |                          |
|             | 해조류 해조다당체 분해미생물 유전자원확보                            | 1         | 1         | 1         | 2         | 1        | 1         | 초과달성          |                  |                          |                          |
|             | 해조류분해 부탄올 생산균주 개발 및 부탄올 발효공정의 최적화                 | 1         | 0         | 0         | 0         | 0        | 0         | 미달성           |                  |                          |                          |
|             | 난발효성 당류 대사형 재조합 미생물 개발                            | 2         | 0         | 2         | 4         | 0        | 2         | 초과달성          |                  |                          |                          |
|             | <b>소 계</b>  | <b>8</b>  | <b>2</b>  | <b>6</b>  | <b>11</b> | <b>2</b> | <b>9</b>  | <b>초과달성</b>   |                  |                          |                          |
| 그린에지 융합공정   | Next generation sequencing을 활용한 유기산 수율 향상기술       | 1         | 0         | 1         | 0         | 0        | 0         | 미달성           | 30               | 35                       |                          |
|             | VFA 생산용 다단계 생물반응기 설계                              | 2         | 2         | 4         | 1         | 0        | 3         | 미달성           |                  |                          |                          |
|             | 혐기성 소화공정 이용 VFA 생산 기술 개발                          | 1         | 1         | 2         | 1         | 1        | 2         | 달성            |                  |                          |                          |
|             | VFA 이용 혼합 알코올 생산 촉매반응 기술 개발                       | 1         | 1         | 1         | 0         | 0        | 0         | 미달성           |                  |                          |                          |
|             | 급속 열분해공정 이용 바이오오일 생산기술 개발                         | 1         | 1         | 1         | 0         | 0        | 1         | 미달성           |                  |                          |                          |
|             | <b>소 계</b>  | <b>6</b>  | <b>5</b>  | <b>9</b>  | <b>2</b>  | <b>1</b> | <b>6</b>  | <b>미달성</b>    |                  |                          |                          |
| 통합공정 및 제품개발 | 해조류의 활용을 위한 통합공정 최적설계                             | 1         | 0         | 1         | 1         | 0        | 2         | 초과달성          | 25 <sup>3)</sup> | 217                      |                          |
|             | 혐기성 소화에 의한 bench scale 유기산 생성 공정 구축               | 0         | 0         | 0         | 1         | 2        | 3         | 초과달성          |                  |                          |                          |
|             | 해조류 유용물질의 효율적 분리 및 회수 공정 개발                       | 1         | 1         | 2         | 1         | 1        | 1         | 부분달성          |                  |                          |                          |
|             | 해조류 부산물을 이용한 바이오 복합재료 개발                          | 1         | 0         | 3         | 2         | 0        | 3         | 초과달성          |                  |                          |                          |
|             | <b>소 계</b>  | <b>3</b>  | <b>1</b>  | <b>6</b>  | <b>5</b>  | <b>3</b> | <b>9</b>  | <b>초과달성</b>   |                  |                          |                          |
| <b>총 합계</b> |   | <b>21</b> | <b>10</b> | <b>27</b> | <b>26</b> | <b>8</b> | <b>30</b> | <b>초과부분달성</b> | 100              | -                        |                          |

1) 세부달성도 = (성과논문/목표논문×0.4+성과특허/목표특허×0.4+성과학술발표/목표학술발표×0.2)×100

2) 전체달성도 = (세부달성도×가중치)의 합

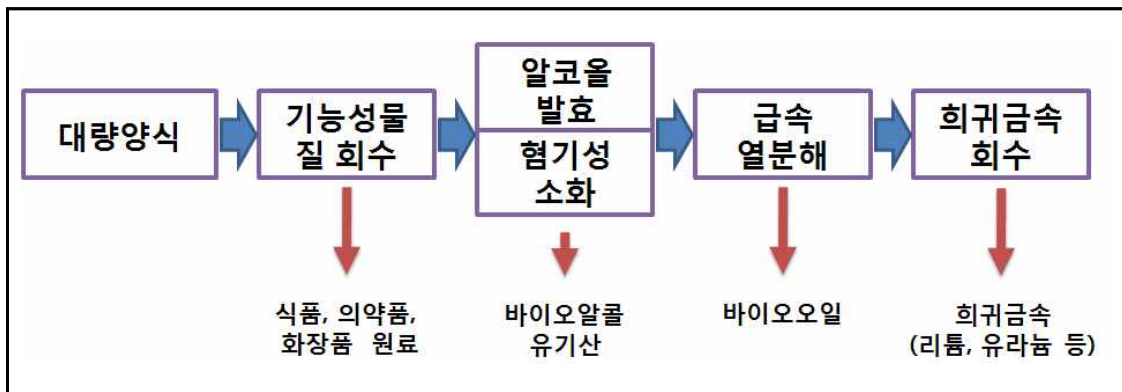
3) “총괄연구” 가중치가 “혐기성 소화에 의한 bench scale 유기산 생성 공정 구축” 분야에 포함됨





## 제 2 절 기술 구성 및 연계도

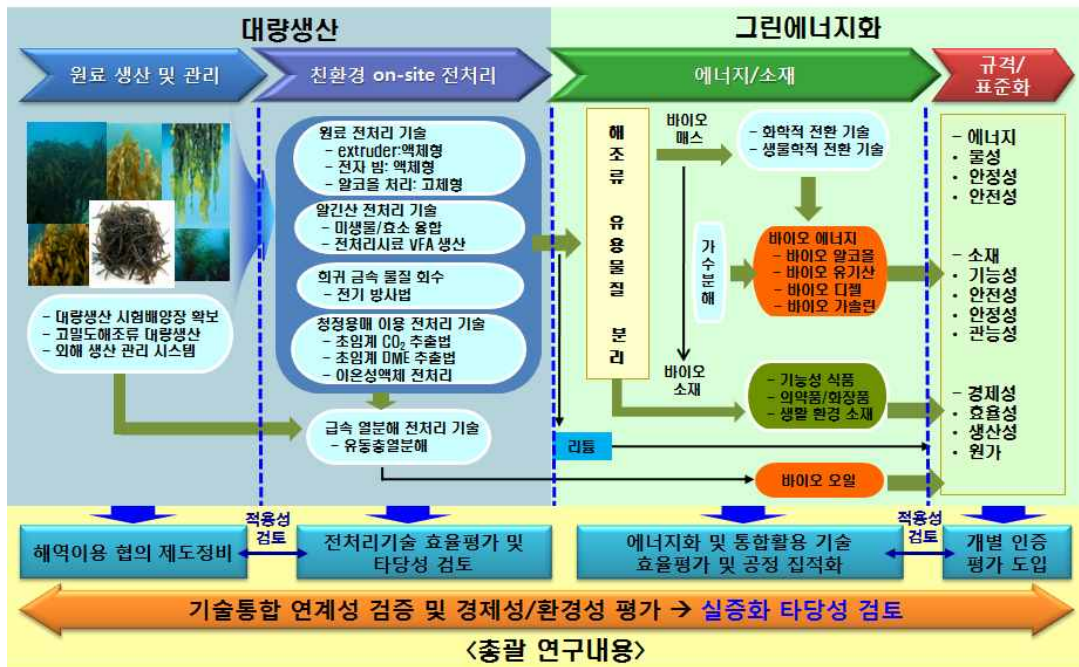
본 사업의 용역기간 동안 수행한 결과를 바탕으로 해조류 바이오매스로부터 고부가 바이오소재 및 에너지를 회수하는 통합기술을 구성하였다. 먼저 외해 또는 내해 양식을 통하여 해조류 바이오매스를 대량으로 확보하는 것을 전제로 한다. 이는 해조류 바이오매스로부터 회수 가능한 물질들을 생산하기 위한 필수적인 요소일 것이다. 이렇게 획득한 해조류 바이오매스로부터 생리활성물질을 회수하여 식품, 의약품, 화장품 원료 등의 고부가 제품의 개발이 가능할 것이다. 본 용역사업을 통하여 이들 물질들은 항암, 항산화, 항염증, 항치매, 항비만 등의 효능이 있음을 확인하였고, 이들 물질들이 고가인 관계로 해조류 바이오매스의 통합공정의 경제성을 담보하는데 있어 핵심적인 위치를 차지할 것이다. 이때 해조류 바이오매스에 다량 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 전환기술을 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 고부가 바이오소재 및 에너지 회수 통합공정도

본 사업에서 저탄소 녹색성장에 부응하는 비식용 해조류 바이오매스의 그린 에너지화 및 통합적 활용을 위해서 앞에서 언급했듯이 비식용 해조류 바이오매스 대량생산이 전제되어야만 한다. 현재 농림수산물식품부 수산자원관리공단에서 “바이오매스용 해조류 대량생산 기술개발” 연구용역이 추진되고 있으며, 기반구축 단계(2010년~2013년)에서 10 ha 규모의 시험양식장 시설을 구축하고자 하고, 해조류 대량양식 첨단융합기술을 적용하여 최초의 친환경 외해 해조류 자동화양식시스템을 기본설계를 제시할 계획에 있다.

앞에서 기술된 내용을 정리하여, 해상의 업스트림(원료)에서부터 육상의 다운스트림(제품)까지 일관공정에 의해 경제성이 확보된 해조류 유래 바이오연료 생산 및 고부가 바이오소재 개발, 희귀금속 회수에 대한 통합기술연계도를 [그림 5-2-1]에 제시하였다. 앞으로 연구가 지속될수록 체계도는 더욱 상세한 형태를 갖추게 될 것이며, 본 사업의 목표 성공시 향후 해조류 바이오매스 생산단지 클러스터를 구축하여 수산분야 녹색산업 신성장동력 창출에 기여할 것으로 기대된다.



[그림 7-2-3] 해조류 바이오매스 대량생산 및 통합활용 추진체계도

### 제 3 절 향후 계획

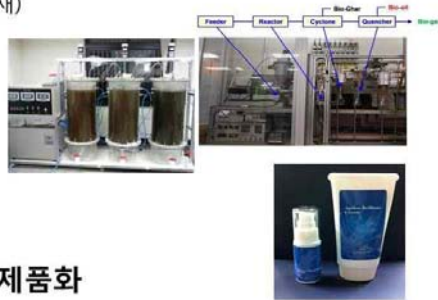
본 용역사업의 ‘09년 선행연구 단계에서부터 ‘10~ ‘12년 기반구축 단계에서는 단위 공정별 세부 요소기술의 기초·원천기술 개발 단계로, 해조류 바이오매스의 에너지화를 위한 통합적 일관공정 개발 연구를 수행하였다. 일관공정은 갈조류 바이오매스(건조다시마)로부터 1차적으로 알코올을 추출 및 기능성 물질(후코잔틴 및 폴리페놀) 회수한 뒤 2차적으로 1차 공정의 해조류 부산물 이용 혐기성발효 과정에서 바이오유기산(휘발성유기산) 및 혼합알코올을 생산하고, 2차 공정의 해조류 부산물 이용 3차적으로 급속 열분해 과정에서 바이오오일을 생산하며, 마지막으로 3차 공정의 해조류 부산물 이용 희귀금속(리튬, 우라늄) 회수로 수행되었다[그림 7-3-1].



[그림 7-3-1] 본 연구에서 수행된 해조류 바이오매스 에너지화 통합공정도

본 용역사업의 기반구축 단계에서 수행된 해조류 바이오매스 에너지화 통합 공정에서는 수분 10% 함유 갈조류(건조 다시마) 원료 1톤으로부터 바이오유기산 400 kg(혼합알코올 260 kg 전환치) 및 바이오오일 95 kg를 동시에 생산하여 바이오에너지화 수율 약 55%(산출근거:  $(400+95)/(1,000 \times 95) \times 100$ )를 달성하였다. 또한, 기반구축 단계 연구 수행에 따른 국내·외 지적재산권 확보 및 우수한 학술적 성과를 [그림 7-3-2]과 같이 발표하였다. 발표된 연구는 해조류 바이오매스의 생물학적 전환을 위한 국내최초 비식용 갈조류 알지네이트 분해 신규 효소인 Alg 17C, Alg 17D 개발, 해조류 바이오매스로부터 휘발성유기산 생산, 해조류 부산물 바이오매스를 이용한 기능성 생리활성물질 추출 및 고부가가치 제품 관련 기초연구 및 원천기술 확보 수행 결과이다.

- 일관공정에 의한 갈조류 바이오매스 활용 극대화 및 경제성 확보**
  - 세계 최초로 비식용 갈조류로부터 통합활용 공정에 의한 **바이오에너지 수율 55% 달성**
  - 건조 다시마 1톤(수분10%)으로부터 **바이오유기산 400 kg, 바이오오일 95 kg 동시생산**
- 국내최초 비식용 갈조류의 알지네이트 분해 신규 효소(Alg 17C, 17D) 개발**
  - 국내특허출원 2건(10-2011-0034150, 10-2011-0130425)
  - 논문 2건 게재(Biotechnology, Appl. Microbiol. Bioethanol 게재)
- 혐기성 발효 연속공정 바이오유기산 생산**
  - 바이오유기산 40%이상 수율 달성
  - 국제특허출원 1건(PCT/KR/2011/009701)
  - 국내특허출원 2건(10-2011-0136032, 10-2012-0057446)
- Crude 바이오오일의 고품질화 촉매 공정 도출**
  - 해조류 유래 바이오연료 인증을 위한 연구 착수(바이오디젤)
- 기능성 생리활성물질 추출 및 고부가가치 제품 시제품화**
  - 국내특허등록 2건(2011-0035127, 2011-0117531)
  - 국내특허출원 4건(10-2010-0037042, 10-2011-0030402, 10-2011-0049714, 10-2011-0095573)



[그림 7-3-2] '09~'12년 6월(현재) 주요성과 요약

향후, '13~' 16년 기술통합 단계에서는 기반구축 단계에서 개발된 단위 공정별 세부 요소기술 집적화를 통한 통합공정을 구축하고 안정적인 운전조건 확립을 통해 성능평가를 실시한 후, Demo 플랜트 설치를 위한 설계 계수 도출 및 물질 수지식을 수립하고자 한다. 이를 바탕으로 Demo 플랜트를 설치하여 시험운전 및 성능평가를 통하여 실증규모 공정확대(scale-up) 계수를 도출하고자 한다. 단위 공정별 세부 요소기술 집적화 세부 연구내용으로는 해조류 다당체의 생물학전 전환기술(바이오부탄올/바이오에탄올 생산 융합 공정) 확립을 실시하고, 바이오유기산 및 혼합알코올 생산을 위한 Demo 플랜트 혐기성 발효 플랫폼을 구축( '16년까지 처리용량 200 kg/day, 혼합알코올 생산시설 300 L/d 이상)하고자 한다. 또한, 수송용 차세대 연료(그린가솔린, 그린디젤, 혼합알코올 등) 생산을 위한 파일럿 규모 열화학적 플랫폼을 구축( '16년까지 처리용량 200 kg/day)하고자 한다.

특히, 단위 공정별 세부 요소기술 집적화를 통한 통합공정 구축은 미니파일럿플랜트 규모(반응조 크기가 10~100 L 규모의 플랜트, U.S. DOE, 2005)로 구축할 계획이다. '13년부터 '15년까지 순차적으로 세부 요소기술 단위공정인 바이오유기산 생산 공정, 바이오오일 생산 및 업그레이딩 공정, 비발효성당 활용 바이오에탄올 생산 공정, 해조류 부산물 활용 소재 및 제품개발 공정을 통합하여 일관공정을 구축하고 ' 16년에는 구축된 일관공정의 운전조건 확립 및 최적화를 실시하고자 한다 [표 7-3-1]. 이를 통해 세부 요소기술 단위공정을 통합한 일관공정 구축의 기술통합 단계 연구를 수행하고자 한다.

[표 7-3-1] 기술통합단계 연구내용

| 세부연구             | ‘13년   | ‘14년  | ‘15년   | ‘16년   |
|------------------|--|---|--|--|
| 생물학적 전환공정        | 비발효성당 활용 바이오에탄올 생산 기반기술 확립                   | 비발효성당 활용 바이오에탄올 생산 규모 확대를 위한 기반기술확립         | 미니파일럿플랜트 규모의 비발효성당 활용 바이오에탄올 생산 공정 운전 조건 최적화           | 미니파일럿플랜트 규모의 비발효성당 활용 바이오에탄올 생산 공정 세부운전기술 최적화          |
| 그린에너지 융합공정       | 바이오오일 규모확대를 위한 미니파일럿플랜트 규모의 바이오유기산 생산공정 확립   | 미니파일럿플랜트 규모의 바이오유기산, 바이오오일 통합공정 확립          | 미니파일럿플랜트 규모의 바이오에탄올, 바이오유기산, 바이오오일 일관공정 조건 최적화         | 미니파일럿플랜트 규모의 바이오에탄올, 바이오유기산, 바이오오일 일관공정 세부운전기술 최적화     |
| 부산물 활용 소재 및 제품개발 | 미니파일럿플랜트 규모의 바이오유기산 생산공정 부산물 활용 유용물질 회수 및 분리 | 미니파일럿플랜트 규모의 바이오오일 생산공정 부산물 활용 유용물질 회수 및 분리 | 미니파일럿플랜트 규모의 비발효성당 활용 바이오 에탄올 생산공정 부산물 활용 유용물질 회수 및 분리 | 미니파일럿플랜트 규모의 공정 발생 부산물별 유용물질 회수 및 분리의 경제성 평가 및 일관공정 적용 |
| 미니 파일럿 플랜트* 구축   | 바이오유기산 생산공정                                  | 바이오오일 생산 및 업그레이딩 공정                         | 비발효성당 활용 바이오에탄올 생산공정                                   | 일관공정 최적화 규모확대 설계자료 확보, 경제성·환경성 평가 공정유지 및 보수            |

\*미니파일럿플랜트 규모의 정의 : 반응조 사이즈가 10~100 L 규모인 플랜트(출처: U.S. Department of Energy (DOE), “Energy Efficiency and Renewable Energy“, Biomass Program, July, 2005)



제8장

참 고 문 헌





## 제 8 장 참고문헌

- [1] E.V. Kalinina, N.N. Chernov, A.N. Saprin, Y.N. Kotova, Y.A. Andreev, V.S. Solomka and 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 and J.R. Lupton, *J Nutr* **134** (2004) 3233-3238.
- [3] F. Vanderbist, P. Maes and J. Neve, *Arzneimittelforschung* **46** (1996) 783-788.
- [4] D.Y. Rhyu, K.S. Kang, M. Sekiya and T. Yokozawa, *Am J Chin Med* **35** (2007) 127-137.
- [5] S.T. Mayne and *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 and 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](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-lx-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).
- [90] H. Kim, H.S. Lee, K.T. Chang, T.H. Ko, K.J. Baek, N.S. Kwon, *J Immunol* **154**

- (1995) 4741-4748.
- [91] S. Dhingra, A.K. Sharma, D.K. Singla, P.K. Singal, *Am J Physiol Heart Circ Physiol* **293** (2007) H3524-3531.
- [92] 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.
- [93] 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.
- [94] F. Vanderbist, P. Maes, J. Neve, *Arzneimittelforschung* **46** (1996) 783-788.
- [95] D.Y. Rhyu, K.S. Kang, M. Sekiya, T. Yokozawa, *Am J Chin Med* **35** (2007) 127-137.
- [96] J.R. Vane, Y.S. Bakhle, R.M. Botting, *Annu Rev Pharmacol Toxicol* **38** (1998) 97-120.
- [97] M. Murakami, Y. Nakatani, T. Tanioka, I. Kudo, *Prostaglandins Other Lipid Mediat* **68-69** (2002) 383-399.
- [98] J. Claria, *Curr Pharm Des* **9** (2003) 2177-2190.
- [99] C. Chen, Y.H. Chen, W.W. Lin, *Immunology* **97** (1999) 124-129.
- [100] A. von Knethen, D. Callsen, B. Brune, *Mol Biol Cell* **10** (1999) 361-372.
- [101] J. Shan, J. Fu, Z. Zhao, X. Kong, H. Huang, L. Luo, Z. Yin, *Int Immunopharmacol* **9** (2009) 1042-1048.
- [102] F. Chen, M. Ding, Y. Lu, S.S. Leonard, V. Vallyathan, V. Castranova, X. Shi, *J Environ Pathol Toxicol Oncol* **19** (2000) 231-238.
- [103] D. Krappmann, E. Wegener, Y. Sunami, M. Esen, A. Thiel, B. Mordmuller, C. Scheidereit, *Mol Cell Biol* **24** (2004) 6488-6500.
- [104] J.M. Kyriakis, *Gene Expr* **7** (1999) 217-231.
- [105] M. Guha, N. Mackman, *Cell Signal* **13** (2001) 85-94.
- [106] E. Herlaar, Z. Brown, *Mol Med Today* **5** (1999) 439-447.
- [107] A.B. Granado-Serrano, M.A. Martin, G. Haegeman, L. Goya, L. Bravo, S. Ramos, *Br J Nutr* **103** (2010) 168-179.
- [108] X. Yang, Y. Chen, D. Gabuzda, *J Biol Chem* **274** (1999) 27981-27988.
- [109] F. Gonzalez-Scarano, G. Baltuch, *Annu Rev Neurosci* **22** (1999) 219-240.
- [110] C. Bertolotto, P. Abbe, T.J. Hemesath, K. Bille, D.E. Fisher, J.P. Ortonne, R. Ballotti, *J Cell Biol* **142** (1998) 827-835.

- [111] H.Y. Park, C. Wu, L. Yonemoto, M. Murphy-Smith, H. Wu, C.M. Stachur, B.A. Gilchrest, *Biochem J* **395** (2006) 571-578.
- [112] R.A. Newton, A.L. Cook, D.W. Roberts, J.H. Leonard, R.A. Sturm, *J Invest Dermatol* **127** (2007) 2216-2227.
- [113] 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).
- [114] 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** (2000) 1044-1054
- [115] 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** (1997) 479-489
- [116] J. Han, S. Kang, R. Choue, H. Kim, K. Leem, et al. Free radical scavenging effect of *Diospyroskaki*, *Laminaria japonica* and *Undaria pinnatifida*. *Fitoterapia*, **73** (2002) 710-712
- [117] 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).
- [118] 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).
- [119] 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).
- [120] K.W. Chiu, A.Y. Fung. The cardiovascular effects of green beans (*Phaseous aureus*), commonrue (*Rutagravelens*), and kelp (*Laminar iajaponica*) in rats. *Gen. Pharmacol.*, **29**, 859-862 (1997).
- [121] A.T. Critchley. Introduction: seaweed resources. In: Seaweed cultivation and marine ranching, *Japan International Cooperation Agency (JICA)*, **1**, 6 (1993).
- [122] H. Hidaka, T. Eida, T. Takizawa, Y. Tashiro. Effect of fructo oligosaccharide



- on intestinal flora and human health. *Bifidobacteria Microflora*, **5**, 37-50 (1986).
- [123] 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).
- [124] 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).
- [125] Collic, S., Fischer, A. M., Tapon-Brethaudiere, H., Boisson, C., Durand, P., Jozefonvicz, J. (1991), Anticoagulant of a fucoidan fraction, *ThrombosisRes.*,**64**, 143-147.
- [126] Nishino, T., Yokoyama, G., Dobashi, K., Fujihara, M., Nagumo, T. (1989), Isolation, purification and characterization of fructose-containing sulfated polysaccharides from the brown seaweed *Ecklonia jurome* and their blood-anti coagulant activities, *Carbohydrate. Res.*, **186**, 119-129.
- [127] 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.
- [128] 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**, 70-80.
- [129] Shi, Z. Y., Guo, Y. Z., Wang, Z. (2000), Pharmacological activity of fucoidan from *Laminariajaponica*,*J.ShanghaiFish.Univ.*, **9**, 268-271.
- [130] 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.
- [131] 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.
- [132] 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. Nutrim. Sin.*, **24**, 389-392.
- [133] 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.
- [134] 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.
- [135] 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.
- [136] Shibata, H., Kimura-Takagi, I., Nagaoka, M., Hashimoto, S., Aiyama, R., Iha, M., Ueyama, S., Yokokura, T. (2000), Properties of fucoidan from *Cladosiphono kamuranust* okida in gastric mucosal protection, *Bio Factors.*, **11**, 235-245.
- [137] 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.
- [138] 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.
- [139] 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.
- [140] Hayman, S., Kinoshita, J. H. (1965), Isolation and properties of lens aldose reductase, *J. Biol. Chem.*, **240**, 877-882.
- [141] 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.
- [142] Hajri, A., Wack, S., Meyer, C., Smith, M. K., Leberquier, C., Kedingier, 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.
- [143] 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.
- [144] 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.
- [145] 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.
- [146] Hargus, J. A., Fronczek, F. R., Vicente, M. G., and Smith, K. M. (2007), Mono-(L)-aspartylchlorin-e6, *Photochemistry and Photobiology*, **83**, 1006-1015.
- [147] Wang, 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.
- [148] 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.
- [149] 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.
- [150] 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.
- [151] Varma, S. D., Mizuno, A. and Kinoshita, J. H. (1977), Diabetic cataracts and flavonoids, **195**, 205-206.
- [152] R. Perez, R. Kaas, F. Campello, S. Arbault, O. Barbaroux, La culture des algues marines dans le monde. Editions IFREMER, Plouzane, France, p163 (1992).
- [153] H. L. Chum. D. K. Johnson, S. K. Black, R. P. Overend, *Appl. Biochem. Biotechnol.*, **24/2**, 1-14 (1990).
- [154] J. F. Kennedy, I. J. Bradshaw, *British polymer J.*, **16**, 95-101 (1984).
- [155] Voget S, Steele HL, Streit WR. *J Biotechnol*, **126**, 26-36 (2006)
- [156] Wong TY, Preston LA, Schiller NL. *Annu Rev Microbiol*, **54**, 289-340 (2000)
- [157] Larsen B, Hoen K, Ostgaard K. *Hydrobiologia*, **260**, 557-561 (1993)
- [158] Nakada HI, Sweeny PC. *J Biol Chem*, **242**, 845-851 (1967)

- [159] Leemhuis H, Euverink GW, Dijkhuizen L. *Biotechnol Lett*, **25**, 1643-1645 (2003)
- [160] 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)
- [161] Z.Q. Zhang, G.L. Yu, H.S. Guan, X. Zhao, Y.G. Du, X.L. Jiang, *Carbohydr. Res.*, **339**, 1475-1481 (2004)
- [162] D.I. Sanchez-Machado, J. Lopez-Cervantes, J. Lopez-Hernandez, P. Paseiro-Losada, J. Simal-Lozano, *Biomed. Chromatogr.*, **18**, 90-97 (2004).
- [163] J. Preiss, G. Ashwell, *J. Biol. Chem.* **237**, 309-316 (1962).
- [164] S.H. Yoon, T.S. Moon, P. Iranpour, A.M. Lanza, K.J. Prather, *J. Bacteriol.*, **191**, 1565-1573 (2009).
- [165] <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>
- [166] H.N. Chang, N.J. Kim, J. Kang, C.M. Jeong, *Biotechnol. Bioproc. E.*, **15**, 1-10 (2010)
- [167] H.N. Chang, N.J. Kim, J. Kang, C.M. Jeong, J. Choi et al., *Bioproc. Biosyst. Eng.*, **34**, 419-431 (2011)
- [168] N.J. Kim, H. Li, K. Jung, H.N. Chang, P.C. Lee, *Bioresour. technol.*, **102**, 7466-7469 (2011)
- [169] H.N. Chang, B.J. Kim, J.W. Kang, C.M. Jeong, N.J. Kim et al., *Biotechnol. Bioproc. E.*, **13**, 123-135 (2008)
- [170] J.C. Lee, D.Y. Kim, D.J. Oh, H.N. Chang, *Biotechnol. Bioproc. E.*, **13**, 560-565 (2008)
- [171] M. L. Shuler, F. Kargi, *Bioprocess Engineering Basic Concepts*, Prentice Hall PTR (2002)
- [172] I.B. Ju, W. Jeon, M.-J. Park, Y.-W. Suh, D.J. Suh, *Appl. Catal. A.*, **387**, 100-106 (2010).
- [173] A. Aden, M. Ruth, K. Ibsen, J. Jechura, K. Neeves, J. Sheehan and B. Wallace, NREL/TP-510-32438, Golden, CO. (2002).
- [174] R. Wooley, M. Ruth, J. Sheehan, K. Ibsen, H. Majdeski and A. Galvez, NREL/TP-580-26157, Golden, CO. (1999).
- [175] D. Sengupta, INTEGRATING BIOPROCESSES INTO INDUSTRIAL COMPLEXES FOR SUSTAINABLE DEVELOPMENT, Ph.D Thesis, Louisiana State University (2010)
- [176] 우희철 외, 11-1541000-000439-01(용역사업 결과보고서), 농수산식품부 (2010)

- [177] R. Wooley and V. Putsche, NREL/MP-425-20685, Golden, CO. (1996).
- [178] 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).
- [179] Smith RM, Extractions with superheated water. *J. Chromatogr. A*. **975**: 31-46.(2002)
- [180] Andersson T, Parameters affecting the extraction of polycyclic aromatic hydrocarbons with pressurised hot water, Academic dissertation, University of Helsinki, Finland.(2007)
- [181] 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).
- [182] [http://www.sanrimji.com/pdf/2003/12/200312076\(1\).pdf](http://www.sanrimji.com/pdf/2003/12/200312076(1).pdf)
- [183] <http://www.keckorea.com/board/board.php?board=pds&page=23&command=body&no=62>
- [184] <http://user.chol.com/~ansick2/sea/fish/fish622.htm>
- [185] 이민우, 충남대학교 석사학위 논문, 홍조류 섬유를 이용한 바이오복합재료 제조 및 특성분석 (2008).
- [186] J. C. Fantone and P. A. Ward, *Ann. J. Path.*, **107**, 397 (1982)
- [187] S. N. Park, *Korean J. Food Sci. Technol.*, **35**(3), 510 (2003)
- [188] C. S. Foote, Photosensitized oxidation and singlet oxygen; consequences in biological systems, ed. W. A. Pryor, 2, 85, Academic press, New York (1976)
- [189] J. A. Kim, J. M. Lee, D. B. Shin and N. H. Lee, *Food Sci. Biotechnol.*, **13**, 476-480 (2004)
- [190] 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)
- [191] J. Giese, *Food Technol.*, **5**, 73-81 (1996)
- [192] D. E. Pszczola, *Food Technol.*, **55**, 51-59 (2001)
- [193] K. H. Kim and M. H. Choi, *Korean J. Postharvest*, **5**, 121-135 (1999)
- [194] T. K. Kim, H. D. Shin and Y. H. Lee, *Korean J. Food Sci. Technol.*, **35**(2), 266-271 (2003)
- [195] A. Hang and B. Larsen, *Acta Chem. Scand.*, **16**, 1908 (1962)
- [196] A. Haug and O. Smidsrod, *Acta Chem. Scand.*, **19**, 341-347 (1965)
- [197] 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. 홍보실적



## 부록 A 추진경과 일정표

### □ 연구관리 및 대외 업무

| 년 월      | 연구관리 업무  | 대외 업무   | 기타 사항                   |
|----------|--|---|-------------------------|
| '11. 10. | ○운영위원회 1차 회의(31일)  | ○해수중의 희귀금속(리튬, 우라늄) 회수 기술 관련 전문가 미팅(24일)<br>-경북대학교 이광필 교수   |                         |
| '11. 11. | ○연구수행 계획 발표<br>-착수워크샵 개최(9일~10일)   | ○해양에너지 국제포럼 개최 지원(9일)<br>-송도컨벤시아 3F<br>○생리활성물질 회수 및 개별인증 전문가 미팅(24일)<br>-전북대학교 채수완 교수<br>○초청 세미나(21일)<br>-주제: 해조류 바이오매스 통합적 활용<br>-경북대학교  | 해조류 바이오매스 활용방안 토의       |
| '11. 12. | ○운영위원회 2차 회의(19일)  | ○해양플랜트 관련 전문가 미팅<br>-(주)대우조선해양 중앙연구소(1일)<br>-KAIST 장대준 교수(5일)<br>○생리활성물질 개별인증을 위한 전북대학교 병원과의 업무협약(MOU) 체결(16일)  |                         |
| '12. 01. | ○외부 전문가 초청세미나(30일)<br>-해양바이오매스 열분해 특성 연구<br>-오사카대학교 강봉문 박사   | ○지자체(완도군) 업무협약(17일)<br>-해조류 바이오매스 원료확보를 위한 10 ha 시험양식장 확보   | 원료 확보 및 녹색 수산 산업화 방안 토의 |
| '12. 02  | ○중간점검 워크샵 개최(23일)<br>-한밭대학교 RIC센터<br>○외부 전문가 초청세미나(23일)<br>-바이오매스의 에너지활용에 대한 경제성 평가<br>-전남대 배정환 교수   | ○해외유관기관 네트워크 구축<br>-해외 해조류 바이오매스 종 확보를 위한 베트남 NITRA 및 나트랑 대학교 방문 및 연구협약(8일~14일)<br>○AFOB Regional Symposium 참석(10일)<br>-해양 바이오에너지 분야 학술 논문 발표 및 교류  | 인적네트워크 연구진행 점검          |
| '12. 03  | ○국가과학기술위원회 연구 개발사업 자체평가(29일)   |   |                         |
| '12. 04  | ○중간보고회(20일)<br>-서울 KNCPC 회의장<br>○자문위원 회의(11일)<br>-서울대 차세대융합기술연구원 김기협 박사, 경기바이오센터장 전영중 박사   | ○부처관계자(국장) 미팅(20일)<br>- 사업경과 보고 및 국내외 기술개발 동향 점검  | 주요 정책 사안 토의             |
| '12. 05  | ○운영위원회 3차 회의(31일)  | ○완도 장보고 축제 참가 (4일~6일)<br>-전시회 부스설치 및 실적홍보   | 해조류 바이오매스 생산지 방문        |
| '12. 06  | ○결과종합회의(28일)<br>○해조류 바이오매스의 에너지화 및 통합적 활용 심포지엄 개최(29일)<br>-부경대학교 VISTAS 4층<br>○연구실적정리(논문게재, 지적재산권 출원(등록), 학술회의 발표 등)   | ○2th Algal Biomass, Biofuel & Bioproducts(10일~13일)<br>-San Diego, USA<br>-Algal Research journal의 Dr.Olivares 편집장과 국제공동학술회의 개최 협의<br>○공청회 참석(15일)<br>-바이오매스 에너지기술개발 전략로드맵 수립<br>-서울 시립대학교 21세기관 |                         |
| '12. 07  | ○외부 전문가 초청세미나(9일)<br>-국가위 자체평가 대비 방안<br>-국립수산과학연구원 김영혜 박사<br>○해조류 바이오매스 연구단 (ABRC) 홈페이지 구축(10일)<br>○운영위원회 4차 회의(12일)<br>○최종보고회(17일)<br>-경기도 과천시민회관<br>○운영위원회 5차 회의(17일)<br>○운영위원회 6차 회의(18일)<br>○결과보고서 발간(31일) | ○부처관계자 미팅(17일)<br>-최종 평가, 향후 계획 협의<br>○부처관계자 미팅(18일)<br>- '13년 국가위 예산심의 논의<br>○해조류 유래 바이오연료 품질최적화 및 상용화방안 연구미팅(26일)<br>- 한국석유관리원 임의순 박사, 민경일 박사<br>○부처관계자 미팅(30일)<br>- '13년 국가위 예산심의 논의         |                         |





## 부록 B 심포지엄 개최 결과 요약

### 1. 심포지엄 개요

- 장소 : 부산 부경대학교 대연캠퍼스 VISTAS 4층 비스타홀
- 일자 : 2012년 6월 28(목)~29일(금)
- 심포지엄 명 : 해조류 바이오매스의 통합적 활용기술 심포지엄
- 참석자 수 : 농림수산식품부 관계자 1명, 대학 35명, 연구소 7명
- 주최 : 농림수산식품부
- 주관 : 부경대학교 청정생산기술연구소

### 2. 종합토의 내용 요약

| 구분  | 토론 내용  |
|---|--|
| <p style="text-align: center;"><b>농림수산식품부<br/>관계자</b></p> | <ul style="list-style-type: none"> <li>○ 해조류 바이오매스 에너지화를 위해서는, 바이오매스용 해조류의 대량생산 기술 개발을 통한 원료확보와 함께 에너지화 사업의 협력체계가 구축되어야만 연구 개의 실효성을 거둘 것 것이라 사료됨</li> <li>○ 해조류 바이오매스 연구 관련 국제저널 논문 투고, 특허기술 확보, 국제학회 참여 등 해조류 바이오매스 연구 전문가들과 학술적 교류에 의해 해조류 바이오매스 에너지화 사업의 중요성을 부각 시킬 수 있음</li> </ul>   |
| <p style="text-align: center;"><b>연구위원</b></p>            | <ul style="list-style-type: none"> <li>○ 해조류 바이오매스의 에너지화 및 통합적 활용 연구가 기초 및 원천기술을 확보하여 상용화되기 위해서는, 원료 확보를 위한 대량생산 기술 개발의 중요성에 공감</li> <li>○ 비식용 해조류 바이오매스로부터 수송용 대체연료(그린가솔린, 그린디젤)의 제품화 및 부산물 활용 고부가가치 기능성 물질 생산을 위하여 국가 공인 인증기관의 시험분석 의뢰 및 품질 인증 및 획득이 필요함</li> <li>○ 향후 계획되어 있는 국회 설명회를 통해 정부와의 소통으로 해조류 바이오매스 연구의 중요성을 제시할 수 있으며, 국제 심포지엄 개최를 통해 국외 해조류 바이오매스 전문 연구 기관과의 학술교류 및 인적 네트워크를 구축할 수 있음. 따라서 농림수산식품부 관계자, 자문위원단 및 연구위원들의 상호 협력체계 유지로 해조류 바이오매스 연구의 시사성 및 중요성을 부각시키며 지속적인 연구를 위한 재원확보가 필요함</li> </ul> |

3. 발표자 및 발표내용 프로그램

**2011년 기반구축연구  
해조류 바이오매스 에너지화 및 통합적 활용 심포지엄**

■ 개요

- 일 시 : 2012년 6월 28일(목) ~ 29일(금)
- 장 소 : 프로그램 내 개별 공지
- 주 최 : 농림수산식품부
- 주 관 : 부경대학교 청정생산기술연구소
- 프로그램 :

| 6월 28일 (목)                             |  | 장소 : 부경대 용당캠퍼스 6공학관 부속건물 2층 235호 |
|--|--|----------------------------------|
| 시 간                                    | 발표주제   | 발표자(소속 및 직위)                     |
| <b>1부 분야별 결과발표 및 종합 토의</b>             |  |                                  |
| 14:00~17:00                            | <b>분야별 결과발표</b> <ul style="list-style-type: none"> <li>▪ 건강신소재</li> <li>▪ 생물학적 전환공정</li> <li>▪ 그린에너지 융합공정</li> <li>▪ 통합공정 및 제품개발</li> </ul> <b>종합 토의</b> | 세부책임자 결과 요약발표 (발표시간 15분 내외)      |
| 17:00~19:00                            | 저녁식사   |                                  |
| 6월 29일 (금)                             |  | 장소 : 부경대 대연캠퍼스 VISTAS 4층         |
| 시 간                                    | 발표주제   | 발표자(소속 및 직위)                     |
| <b>2부 해조류 바이오매스 에너지화 및 통합적 활용 심포지엄</b> |  |                                  |
| <b>좌장 : 유 준 교수(부경대)</b>                |  |                                  |
| 09:30~09:50                            | 등록   |                                  |
| 09:50~10:00                            | <b>인사말</b>   | 농림수산식품부                          |
| 10:00~10:40                            | 목질계 바이오매스 열분해반응 특성과 급속열분해를 통한 crude 바이오-오일 생산  | 김승수 교수(강원대)                      |
| 10:40~11:20                            | Urinium/Litium ions recovery by nanofusion technology  | Prof. A. Gopalan (경북대)           |
| 11:20~12:00                            | 유기성폐자원의 바이오가스 에너지 생산기술 상용화를 위한 선도기술 분석   | 송민경 교수(부경대)                      |
| 12:00~13:30                            | 점심식사   |                                  |
| <b>좌장: 오경근 교수(단국대)</b>                 |  |                                  |
| 13:30~14:10                            | 해조류 유래 바이오알코올 생산기술   | 박용철 교수(국민대)                      |
| 14:10~14:50                            | 해조류 다당체 분해미생물 유전자원 확보 기술   | 김두운 교수(전남대)                      |
| 14:50~15:00                            | 폐회   |                                  |

## 부록 C 최종보고회 결과 요약

### 1. 최종보고회 개요

- 장소 : 경기도 과천시 중앙동 과천시민회관 2층 회의실
- 일자 : 2012년 7월 17일(화)
- 심포지엄 명 : 11년도 해조류 바이오매스 에너지화 및 통합적 활용 최종보고회
- 참석자 수 : 농림수산식품부 관계자 5명, 대학 11명, 연구소 3명
- 주최 : 농림수산식품부
- 주관 : 부경대학교 청정생산기술연구소

### 2. 종합토의 내용 요약

| 구분  | 토론 내용   |
|---|---|
| <p style="text-align: center;"><b>농림수산식품부<br/>관계자</b></p> | <ul style="list-style-type: none"> <li>○ 기반구축 단계의 기초연구 결과를 바탕으로 그린에너지화(바이오에탄올, 바이오오일 등)분야의 가시적 성과 도출이 필요함</li> <li>○ 각 세부연구책임자, 연구관련 전문가, 경제·사회적 분야의 전문가들의 연구결과 점검 및 향후 연구방향 설정을 위한 회의 진행이 필요함</li> </ul>   |
| <p style="text-align: center;"><b>평가위원</b></p>            | <ul style="list-style-type: none"> <li>○ 갈조류를 이용한 기반구축 단계의 기초연구 결과는 기존 미세조류 및 홍조류 에너지화 연구에 비하여 에너지 생산에서부터 부산물을 활용한 고부가가치 물질 생산을 통하여 경제성 보완으로 연구의 실효성을 거두었으며, 세부 연구결과물의 연구 진전 및 발전 모습을 확인하였음</li> <li>○ 기반구축 단계에서 기술통합 단계로 진행하는 과도기적 위치에서, 정부 부처의 전폭적 연구비 지원으로 연구의 질적 수준을 향상시킬 수 있는 방안 모색이 필요함 또한, 타 부처와의 연구 범위가 중복되지 않고 해조류 바이오매스 에너지화 연구의 가장 큰 문제점인 경제성을 보완할 수 있는 통합적 활용 연구를 에너지화와 동시에 수행함으로써, 향후 개발 기술의 원천성 및 우수성 입증에 가능할 것으로 사료됨</li> <li>○ 각 세부연구과제의 연결성과 상호보완성이 요구됨</li> </ul> |
| <p style="text-align: center;"><b>연구위원</b></p>            | <ul style="list-style-type: none"> <li>○ 다양한 조류 바이오매스 중 거대조류(갈조류) 바이오매스의 에너지화의 효율성이 미세조류, 홍조류 등 다른 조류 바이오매스와 비교하여 가장 높은 결과를 나타내었으며, 기술통합 단계 도입을 위한 바이오에탄올 및 바이오-오일을 파일럿 플랜트 규모의 생산 시설 설치를 위한 기초 연구 수행 중에 있음</li> <li>○ 향후, 기술통합 단계의 목표 달성 및 원활한 연구진행을 위해서는 전폭적인 연구비 지원이 시급함</li> </ul>  |



## 부록 D 연구성과

### 1. 논문게재

#### 가. SCI급 논문

- SCI Impact factor 오름차순 기준,
- Published 12편, Accepted 1편, Revised 3편, Submitted 8편

| No | 제 목   | 학술지  | 발표자         | 발표<br>일자 | 권(호),<br>페이지         | 국가명<br>(SCI)<br><Impact<br>Factor> |
|----|---|--|-------------|----------|----------------------|------------------------------------|
| 1  | Global profiling of ultraviolet-induced metabolic disruption in <i>Melissa officinalis</i> by using gas chromatography-mass spectrometry                    | Analytical and Bioanalytical Chemistry               | 김경현<br>외 4명 | 2012.8   | 404(2),<br>553-562   | 미국<br>(SCI)<br><3.841>             |
| 2  | Depolymerization of alginate into a monomeric sugar acid using Alg17C, an exo-oligoalginate lyase cloned from <i>Saccharophagus degradans</i> 2-40          | Applied Microbiology and Biotechnology               | 김경현<br>외 6명 | 2012. 3  | 93(5),<br>2233-2239  | 미국<br>(SCI)<br><3.280>             |
| 3  | Effects of Trx2p and Sec23p expression on stable production of hepatitis B surface antigen S domain in recombinant <i>Saccharomyces cerevisiae</i>          | Journal of Biotechnology                             | 박용철<br>외 5명 | 2012. 8  | 160(3-4),<br>151-160 | 네덜란드<br>(SCI)<br><3.045>           |
| 4  | Effects of overexpression of acetaldehyde dehydrogenase 6 and acetyl-CoA synthetase 1 on xylitol production in recombinant <i>Saccharomyces cerevisiae</i>  | Biocatalysis and Agricultural Biotechnology          | 박용철<br>외 4명 | 2012. 1  | 1(1),<br>15-19       | 네덜란드<br>(Scopus)                   |
| 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<br>외 3명 | 2012. 4  | 158(4),<br>184-191   | 네덜란드<br>(SCI)<br><3.045>           |
| 6  | Characterization of alginate lyase gene using a metagenomic library constructed from the gut microflora of abalone  | Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology | 김두운<br>외 8명 | 2011. 11 | 39,<br>585-593       | 네덜란드<br>(SCI)<br><2.416>           |
| 7  | Variation in the chemical composition of <i>Capsosiphon fulvescens</i> with area and during the harvest period  | Journal of Applied Phycology                         | 김두운<br>외 4명 | 2012. 3  | 24,<br>459-465       | 미국<br>(SCI)<br><1.792>             |

|    |  |   |             |          |                                    |                          |
|----|--|---|-------------|----------|------------------------------------|--------------------------|
| 8  | Characterization of a recombinant endo-type alginate lyase (Alg7D) originating from <i>Saccharophagus degradans</i> 2-40   | Biotechnology Letters                                 | 김경현<br>외 8명 | 2012. 4  | 34(5).<br>1087-1092                | 네덜란드<br>(SCI)<br><1.789> |
| 9  | Inhibitory activities of the edible brown alga <i>Laminaria japonica</i> on glucose-mediated protein damage and rat lens aldose reductase  | Fisheries Science                                     | 최재수<br>외 5명 | 2011. 11 | 77,<br>1069-1079                   | 일본<br>(SCI)<br><0.819>   |
| 10 | Hexane fraction from <i>Laminaria japonica</i> exerts anti-inflammatory effects on lipopolysaccharide-stimulated RAW 264.7 macrophages via inhibiting NF-kappaB pathway                                | European journal of nutrition                         | 김형락<br>외 7명 | 2012. 4  | (DOI:10.1007/s00394-012-0345-1)    | 독일<br>(SCI)<br><3.343>   |
| 11 | Dichloromethane fraction of <i>Laminaria japonica</i> ethanolic extract inhibits lipopolysaccharide-induced nitric oxide synthase and cyclooxygenase-2 expression in RAW 264.7 cells via NF-kB pathway | Inflammation  | 김형락<br>외 5명 | 2012. 5  | (DOI:10.1007/s10753-012-9481-2)    | 미국<br>(SCI)<br><1.777>   |
| 12 | Thermal Stabilities of Polyphenols and fatty acids in <i>Laminaria japonica</i> hydrolysates produced using subcritical water  | Korean Journal of Chemical Engineering                | 전병수<br>외 3명 | 2012. 4. | (DOI:10.1007/s11814-012-0051-y)    | 미국<br>(SCI)<br><0.991>   |
| 13 | Pretreatment of <i>Laminaria japonica</i> for bioethanol production with extremely low acid concentration  | Renewable Energy                                      | 오경근<br>외 3명 | 2012. 4  | Accepted (RENE-D-12-00206)         | 미국<br>(SCIE)<br><2.978>  |
| 14 | Volatile fatty acids production from marine macroalgae by anaerobic fermentation   | Bioresource Technology                                | 윤현희<br>외 3명 | 2012. 6  | Revised (BITE-D-12-00484R2)        | 미국<br>(SCI)<br><4.98>    |
| 15 | Bioethanol production <i>Saccharina japonica</i> using an optimized extremely low acid pretreatment followed by simultaneous saccharification and fermentation   | Bioresource Technology                                | 오경근<br>외 4명 | 2012. 7  | final revision (BITE-D-12-01626R1) | 미국<br>(SCI)<br><4.980>   |
| 16 | Multistage Continuous High Cell Density Culture Bioreactors  | Biotechnology Advances                                | 장호남<br>외 5명 | 2011. 12 | Submitted (Under-review)           | 네덜란드<br>(SCI)<br><9.646> |
| 17 | Construction and characterization of recombinant <i>Bacillus subtilis</i> JY123 able to transport xylose efficiently   | Journal of Biotechnology                              | 박용철<br>외 2명 | 2012. 7  | Revised (JBIOTE C-D-12-00321R1)    | 네덜란드<br>(SCI)<br><3.045> |
| 18 | Chemical treatment effect on thermal and mechanical properties of seaweed/polypropylene biocomposites  | Composites Part A : Applied Science and Manufacturing | 한성옥<br>외 3명 | 2012. 5  | Submitted (CSTE-D-12-00834)        | 네덜란드<br>(SCI)<br><2.695> |

|    |  |                                   |          |         |                             |                    |
|----|--|-----------------------------------|----------|---------|-----------------------------|--------------------|
| 19 | Pretreatment effects of seaweed on thermal and mechanical properties of seaweed/polypropylene biocomposites  | Composites Part A (2.695)         | 한성옥 외 3명 | 2012. 6 | Submitted (JCOMA-12-614)    | 네덜란드 (SCI) <2.695> |
| 20 | The anti-cancer effects of <i>Saccharina japonica</i> on 267B1/K-ras human prostate cancer cells   | International Journal of Oncology | 김군도 외 2명 | 2012. 5 | Submitted (105566)          | 미국 (SCI) <2.899>   |
| 21 | THE EXTRACT OF <i>SACCARINA JAPONICA</i> INDUCES APOPTOSIS COMPANIED BY CELL CYCLE ARREST AND ENDOPLASMIC RETICULUM STRESS IN SK-HEP1 HUMAN HEPATOCELLULAR CARCINOMA CELLS | Journal of Phycology              | 김군도 외 2명 | 2012. 7 | Submitted (JPY-12-157-ART)  | 미국 (SCI) <2.490>   |
| 22 | Dieckol, isolated from <i>Ecklonia stolonifera</i> , induces apoptosis in human hepatocellular carcinoma Hep3B cells   | Journal of Natural Medicines      | 김돈도 외 5명 | 2012. 7 | Submitted (JONM-D-12-00429) | 미국 (SCI) <1.869>   |
| 23 | Neuroprotective effect of edible brown algae <i>Eisenia bicyclis</i> on amyloid beta peptide-induced toxicity in PC12 cells  | Archives of Pharmacal Research    | 최재수 외 3명 | 2012. 6 | Submitted (ARPR-D-12-00289) | 미국 (SCI) <1.592>   |
| 24 | Promising antidiabetic potential of fucoxanthin isolated from edible brown algae, <i>Eisenia bicyclis</i> and <i>Undaria pinnatifida</i>                                   | Fisheries Science                 | 최재수 외 5명 | 2012. 7 | Submitted (FISC-D-12-00167) | 일본 (SCI) <0.819>   |



## Global profiling of ultraviolet-induced metabolic disruption in *Melissa officinalis* by using gas chromatography-mass spectrometry

Sooah Kim · Eun Ju Yun · Md. Aktar Hossain ·  
Hojoung Lee · Kyoung Heon Kim

Received: 13 February 2012 / Revised: 21 May 2012 / Accepted: 23 May 2012 / Published online: 24 June 2012  
© Springer-Verlag 2012

**Abstract** *Melissa officinalis* contains various secondary metabolites that have health benefits. Generally, irradiating plants with ultraviolet (UV)-B induces the accumulation of secondary metabolites in plants. To understand the effect of UV-B irradiation on the metabolism of *M. officinalis*, metabolomics based on gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS) was used in this study. The GC-MS analysis revealed 37 identified metabolites from various chemical classes, including alcohols, amino acids, inorganic acids, organic acids, and sugars. The metabolite profiles of the groups of *M. officinalis* irradiated with UV-B were separated and differentiated according to their irradiation times (i.e., 0, 1, and 2 h), using principal component analysis (PCA) and hierarchical clustering analysis (HCA), respectively. The PCA score plots of PC1 and PC2 showed that the three groups with different irradiation times followed a certain trajectory with increasing UV-B irradiation. HCA revealed that metabolic patterns differed among the three groups, and the 1 h-irradiated group was more similar to the control group (0 h) than the 2 h-irradiated group. In particular, UV-B irradiation of plants led to a decrease in sugars such as fructose, galactose, sucrose, and trehalose and an increase in metabolites in the tricarboxylic acid cycle, the proline-linked pentose phosphate pathway, and the phenylpropanoid pathway. This study demonstrated that metabolite profiling with GC-MS is useful for gaining a holistic understanding of UV-induced changes in plant metabolism.

**Keywords** Metabolomics · Metabolite profiling · *Melissa officinalis* · Ultraviolet · Gas chromatography-mass spectrometry

### Introduction

*Melissa officinalis* (lemon balm), a member of the family *Lamiaceae*, is a perennial herb that grows in East Asia. It has been used in traditional medicine to treat headaches, digestive disorders, rheumatism, and hypersensitivity [1, 2]. Aqueous extracts of lemon balm have been found to alleviate Alzheimer's disease and regulate the central nervous system [3]. It is widely known that *M. officinalis* contains various secondary metabolites exhibiting many health benefit activities [4, 5].

In plants, both primary and secondary metabolites are intermediates or end-products of cellular regulatory pathways, and their total number is estimated to be over 200,000 [6]. Since the abundance of each metabolite changes in response to various types of environmental or genetic stresses, profiling of metabolite levels is a key for relating an external stimulus with possible changes in metabolism [7]. Metabolite profiling is a valuable tool for quantitative or qualitative determination of such changes particularly, in plants [8, 9]. Gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS) is the most commonly used instrumental analytical platform for metabolite profiling because it is highly reliable, relatively inexpensive, and easy to use [10].

Many studies have indicated that there are significant changes in the growth, productivity, and morphology of plants following damage to their DNA, RNA, proteins, and cell membranes after exposure to ultraviolet radiation (UV-B; 280–320 nm) [11–13]. Because UV light has such adverse effects, UV defense mechanisms, including leaf thickening,

S. Kim · E. J. Yun · M. A. Hossain · H. Lee · K. H. Kim (✉)  
School of Life Sciences and Biotechnology, Korea University,  
Seoul 136-713, Republic of Korea  
e-mail: khkim@korea.ac.kr

## Depolymerization of alginate into a monomeric sugar acid using Alg17C, an exo-oligoalginate lyase cloned from *Saccharophagus degradans* 2-40

Hee Taek Kim · Jae Hyuk Chung · Damao Wang ·  
Jieun Lee · Hee Chul Woo · In-Geol Choi ·  
Kyoung Heon Kim

Received: 23 October 2011 / Revised: 28 December 2011 / Accepted: 30 December 2011 / Published online: 27 January 2012  
© Springer-Verlag 2012

**Abstract** Macroalgae are considered to be promising biomass for fuels and chemicals production. To utilize brown macroalgae as biomass, the degradation of alginate, which is the main carbohydrate of brown macroalgae, into monomeric units is a critical prerequisite step. *Saccharophagus degradans* 2-40 is capable of degrading more than ten different polysaccharides including alginate, and its genome sequence demonstrated that this bacterium contains several putative alginate lyase genes including *alg17C*. The gene for Alg17C, which is classified into the PL-17 family, was cloned and overexpressed in *Escherichia coli*. The recombinant Alg17C was found to preferentially act on oligoalginates with degrees of polymerization higher than 2 to produce the alginate monomer, 4-deoxy-L-erythro-5-hexoseulose uronic acid. The optimal pH and temperature for Alg17C were found to be 6 and 40 °C, respectively. The  $K_M$  and  $V_{max}$  of Alg17C were 35.2 mg/ml and 41.7 U/mg, respectively. Based on the results of this study, Alg17C could be used as the key enzyme to produce alginate monomers in the process of utilizing alginate for biofuels and chemicals production.

**Keywords** Oligoalginate lyase · Alg17C · Polysaccharide lyase-17 · Exo-type alginate lyase · *Saccharophagus degradans* 2-40

### Introduction

Recently, the use of marine algal biomass for biofuels production has gained increased attention as a potential replacement for terrestrial biomass (Singh et al. 2011). In particular, since macroalgae including red, brown, and green algae are primarily composed of polysaccharides, the enzymatic and fermentative conversion of these polysaccharide into biofuels may be possible (John et al. 2011). Compared to terrestrial biomass, the carbohydrate composition of marine biomass is unique. For example, the carbohydrates of brown macroalgae are mainly composed of alginate, laminaran, fucoidan, and cellulose (Shekharam et al. 1987; Jensen 1993; Jiao et al. 2011). To utilize macroalgae as the biomass for fuel production, the right depolymerizing enzymes for algal biomass and metabolically engineered microorganisms that are capable of converting the algal polysaccharide-derived sugars into fuels would be necessary. In regard to brown macroalgae, there have been several attempts to produce bioethanol using brown algae and their major polysaccharide component, alginate (Aizawa et al. 2007; Adams et al. 2009).

Alginate is a linear polysaccharide composed of  $\alpha$ -L-guluronic acid (G) and its C5 epimer,  $\beta$ -D-mannuronic acid (M), as monomeric units (Garron and Cygler 2010). These units are linked in three different configurations: blocks of consecutive Gs; consecutive Ms; and heteropolymeric random Gs and Ms (Gacesa 1988). Alginate is depolymerized by an alginate lyase through a  $\beta$ -elimination reaction to form a double bond between C4 and C5 at the non-

**Electronic supplementary material** The online version of this article (doi:10.1007/s00253-012-3882-x) contains supplementary material, which is available to authorized users.

H. T. Kim · J. H. Chung · D. Wang · J. Lee · I.-G. Choi ·  
K. H. Kim (✉)  
School of Life Sciences and Biotechnology, Korea University,  
Seoul 136-713, South Korea  
e-mail: khekim@korea.ac.kr

H. C. Woo  
Department of Chemical Engineering,  
Pukyong National University,  
Busan 608-739, South Korea



## Effects of Trx2p and Sec23p expression on stable production of hepatitis B surface antigen S domain in recombinant *Saccharomyces cerevisiae*

Young-Kyoung Park<sup>a,b</sup>, Sang-Min Jung<sup>a</sup>, Hyung-Kwon Lim<sup>c</sup>, Young-Jin Son<sup>d</sup>, Yong-Cheol Park<sup>e,\*</sup>, Jin-Ho Seo<sup>a,\*\*</sup>

<sup>a</sup> Department of Agricultural Biotechnology, Seoul National University, Seoul 151-921, Republic of Korea

<sup>b</sup> Emerging Technology Research Center, Samsung Advanced Institute of Technology, Yongin 446-712, Republic of Korea

<sup>c</sup> Mogam Biotechnology Research Institute, Yongin, Kyunggi 446-799, Republic of Korea

<sup>d</sup> Department of Pharmacy, Suncheon National University, Suncheon, Jeonnam 540-742, Republic of Korea

<sup>e</sup> Department of Advanced Fermentation Fusion Science and Technology, Kookmin University, Seoul 136-702, Republic of Korea

### ARTICLE INFO

#### Article history:

Received 7 December 2011

Received in revised form 14 March 2012

Accepted 4 May 2012

Available online 15 May 2012

#### Keywords:

Hepatitis B virus surface antigen

S domain, *Saccharomyces cerevisiae*

Accessory proteins

SEC23

TRX2

### ABSTRACT

The S domain of hepatitis B virus surface antigen (sHBsAg) is the primary component for vaccine development against virus infection. For stable expression of sHBsAg in recombinant *Saccharomyces cerevisiae*, new accessory genes necessary for foreign protein expression were screened by DNA microarray. Among 600 genes of interest, genes coding for an activating protein of ATPase in Hsp90 (Aha1p), *S. cerevisiae* DnaJ (Scj1p), thioredoxin 2 (Trx2p) and a GTPase-activator specific for Sar1 (Sec23p) as well as Pdi1p were selected in transcriptome analysis, which are known to facilitate disulfide bond formation or induce protein transport in the secretion pathway. Individual and combinatorial expression of SEC23, TRX2 and PDI1 increased total sHBsAg concentration by 1.9–6.5-fold, relative to the control strain expressing sHBsAg only. Additionally, moderate expression of Kex2p protease able to cut off the signal peptide enhanced the portion of the authentic sHBsAg to total sHBsAg. Fed-batch fermentation of the *S. cerevisiae* 2805 strain coexpressing the sHBsAg, SEC23, PDI1 and KEX2 genes resulted in 70.6 mg/L final sHBsAg concentration which was 5.6 times higher than that of the control. Transmission electron microscopic analysis of the yeast cells elucidated the effects of the accessory gene coexpression on the intracellular localization of sHBsAg. Like PDI1, coexpression of both SEC23 and/or TRX2 newly isolated in this study is expected to improve the target protein expression in *S. cerevisiae*.

© 2012 Elsevier B.V. All rights reserved.

### 1. Introduction

Hepatitis B virus (HBV) is a member of the hepadnavirus family causing the acute and chronic diseases of the liver. HBV is an enveloped DNA virus consisting of 3.2 kb DNA, core proteins and envelope proteins (Valenzuela et al., 1982). The envelope proteins referring to HBV surface antigen (HBsAg) is composed of three structurally related large (L), middle (M) and small (S) proteins. These proteins share a common carboxyl terminus; the L protein harbors pre-S1, pre-S2 and S domains, and the M protein possesses pre-S2 and S domains. The S protein equal to the S domain is called small HBV surface antigen (sHBsAg) and consists of 226 amino acids, which is antigenically most significant from vaccine development point of view (Bruss and Ganem, 1991; Shiosaki et al., 1991).

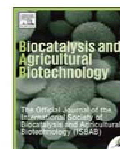
The proper orientation of the N-terminus of sHBsAg is assigned to be important to allow lateral interactions between the S proteins in their assembly pathway (Bruss and Ganem, 1991). To show high immunogenicity, recombinant sHBsAg produced in heterologous systems should gain a typical particle structure with 20–22 nm size (Valenzuela et al., 1982). Currently, such a ~22 nm particle form of HBsAg was produced in various eukaryotic systems including CHO cell (Lee et al., 2008). Heterologous expression of sHBsAg in *Escherichia coli* has failed because recombinant sHBsAg is unstable in *E. coli* and deleterious to the host cell (Miyanojara et al., 1983). Transgenic tobacco and soybean plant cells produced sHBsAg at a basal level (Sojikul et al., 2003) and suspension cultures of soybean resulted in 20–22 mg/L of maximum sHBsAg concentration (Smith et al., 2002). A recombinant *Aspergillus* strain was able to produce 0.4 mg/L sHBsAg by simple culture (Pluddemann and van Zyl, 2003). *Pichia pastoris* could express and secrete sHBsAg in a particulate form and a fed-batch culture using glycerol and methanol resulted in 6 µg/g sHBsAg specific content (Vassileva et al., 2001).

*Saccharomyces cerevisiae* is a popular eukaryotic microorganism recognized as safe for food and pharmaceutical production, and

\* Corresponding author. Tel.: +82 2 910 5462; fax: +82 2 910 5739.

\*\* Corresponding author. Tel.: +82 2 880 4855; fax: +82 2 873 5095.

E-mail addresses: [ycpark@kookmin.ac.kr](mailto:ycpark@kookmin.ac.kr) (Y.-C. Park), [jhseo94@snu.ac.kr](mailto:jhseo94@snu.ac.kr) (J.-H. Seo).



## Effects of overexpression of acetaldehyde dehydrogenase 6 and acetyl-CoA synthetase 1 on xylitol production in recombinant *Saccharomyces cerevisiae*

Eun-Joong Oh<sup>a</sup>, Yi-Hyun Bac<sup>a</sup>, Kyoung-Hoon Kim<sup>b</sup>, Yong-Chool Park<sup>c,\*</sup>, Jin-Ho Seo<sup>a,\*</sup>

<sup>a</sup> Department of Agricultural Biotechnology, Seoul National University, Seoul 151-921, Republic of Korea

<sup>b</sup> School of Life Sciences and Biotechnology, Korea University, Seoul 136-713, Republic of Korea

<sup>c</sup> Department of Advanced Fermentation Fusion Science and Technology, Kookmin University, Seoul 136-702, Republic of Korea

### ARTICLE INFO

Available online 30 August 2011

#### Keywords:

Xylitol  
*Saccharomyces cerevisiae*  
NAD(P)H  
Xylose reductase  
Acetaldehyde dehydrogenase 6  
Acetyl-CoA synthetase 1

### ABSTRACT

Supply of NAD(P)H is a key factor in microbial production of xylitol from xylose. To facilitate NAD(P)H supplementation, acetaldehyde dehydrogenase 6 (*ALD6*) and acetyl-CoA synthetase 1 (*ACS1*) were overexpressed in recombinant *Saccharomyces cerevisiae* harboring the *Pichia stipitis* xylose reductase (*XR*) gene. *In vitro* activity analysis confirmed the functional expression of both enzymes. Glucose-limited fed-batch fermentations of *Saccharomyces cerevisiae* BJ3505- $\delta$ XR strains overexpressing *ACS1* and/or *ALD6* were performed by feeding 600 g/L glucose in the presence of 100 g/L xylose. Among them, *ACS1* overexpression gave the best result of xylitol production: 91.3 g/L xylitol concentration and 1.76 g/L h xylitol productivity, which were 25% and 11% increase, relative to those of the control and *ALD6*-overexpressing strains. Considering the changes of cell growth, ethanol and acetate production, a remarkable enhancement of xylitol production by *ACS1* overexpression seemed to be ascribed to energy and NAD(P)H generation through a metabolism from acetaldehyde to acetyl-CoA and TCA cycle.

© 2011 Elsevier Ltd. All rights reserved.

### 1. Introduction

Xylitol is a popular sugar substitute with low calorie, cooling taste and high quality sweetness (Lee et al., 2009). The annual xylitol market is estimated to be \$340 million in 2008 (Akinterinwa et al., 2008). To date, various microorganisms have been developed to produce xylitol from xylose: *Candida tropicalis*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Escherichia coli* and *Corynebacterium glutamicum* (Akinterinwa et al., 2008; Kim et al., 2010; Lee et al., 2000). Among them, a GRAS-grade yeast *S. cerevisiae* (Ries, 2009) does not have xylose metabolic pathways so its genetic engineering has been adopted to express xylose reductase (*XR*), the first enzyme for xylose metabolism (Fig. 1) and hence recombinant *S. cerevisiae* strains are able to produce xylitol with almost 100% conversion yield (Akinterinwa et al., 2008; Lee et al., 2000; Chung et al., 2002). Meanwhile, *XR*-mediated xylose conversion to xylitol requires NAD(P)H as a cofactor, of which sufficient supply is a crucial factor for efficient production of xylitol (Granström et al., 2007).

In our previous works, direct and indirect modulation of NAD(P)H pools was carried out in recombinant *S. cerevisiae* expressing the *XYL1* gene coding for *P. stipitis* *XR*. For example, soluble

transhydrogenase (EC 1.6.1.1) catalyzing the reversible conversion of NADH to NADPH, and glucose-6-phosphate dehydrogenase (EC 1.1.1.49) which is a main metabolic enzyme to generate NADPH in the oxidative pentose phosphate pathway were overexpressed in recombinant *S. cerevisiae* able to produce xylitol (Jeun et al., 2003; Kwon et al., 2006). Simultaneous attenuation of phosphoglucose isomerase (EC 5.3.1.9) activity and improvement of glucose-6-phosphate dehydrogenase activity increased xylitol productivity via the change of glucose flux from the glycolysis to the pentose phosphate pathway producing NADPH (Oh et al., 2007). Meanwhile, because of the absence of metabolic enzymes to catalyze further oxidation of xylitol, recombinant *S. cerevisiae* expressing *XR* must require co-substrates for cell growth and xylitol production. Under this background, a glucose-limited fed-batch fermentation was designed to maintain a basal level of glucose concentration in culture broth for prevention of the catabolite repression of xylose uptake and generation of energy and NAD(P)H (Lee et al., 2000; Chung et al., 2002; Bae et al., 2004).

In this study, two metabolic enzymes related to direct or indirect cofactor regeneration, NADPH-dependent acetaldehyde dehydrogenase 6 (*ALD6*, EC 1.2.1.4) and acetyl-CoA synthetase 1 (*ACS1*, EC 6.2.1.1) were overexpressed in recombinant *S. cerevisiae* containing the *P. stipitis* *XR* gene to investigate their actions on xylitol production (Fig. 1). Their activity assay confirmed the functional expression of both enzymes. Fed-batch fermentation with a strategy to maintain the glucose concentration at a basal

\* Corresponding author. Tel.: +82 2 880 4855; fax: +82 2 873 5095.

\*\* Co-corresponding author. Tel.: +82 2 910 5462; fax: +82 2 910 5739.

E-mail addresses: [ycpark@kookmin.ac.kr](mailto:ycpark@kookmin.ac.kr) (Y.-C. Park), [jhseo94@snu.ac.kr](mailto:jhseo94@snu.ac.kr) (J.-H. Seo).



## Effects of NADH-preferring xylose reductase expression on ethanol production from xylose in xylose-metabolizing recombinant *Saccharomyces cerevisiae*

Sung-Haeng Lee<sup>a</sup>, Tsutomu Kodaki<sup>b</sup>, Yong-Cheol Park<sup>c,\*\*</sup>, Jin-Ho Seo<sup>a,d,\*</sup>

<sup>a</sup> Interdisciplinary Program for Bioengineering, Seoul National University, Seoul 151-742, Republic of Korea

<sup>b</sup> Institute of Advanced Energy, Kyoto University, Gokasho, Uji, Kyoto 611-0011, Japan

<sup>c</sup> Department of Advanced Fermentation Fusion Science and Technology, Kookmin University, Seoul 136-702, Republic of Korea

<sup>d</sup> Department of Agricultural Biotechnology, Seoul National University, Seoul 151-742, Republic of Korea

### ARTICLE INFO

#### Article history:

Received 31 January 2011

Received in revised form 26 May 2011

Accepted 7 June 2011

Available online 15 June 2011

#### Keywords:

Ethanol

Xylose

*Saccharomyces cerevisiae*

NADH-preferring xylose reductase

### ABSTRACT

Efficient conversion of xylose to ethanol is an essential factor for commercialization of lignocellulosic ethanol. To minimize production of xylitol, a major by-product in xylose metabolism and concomitantly improve ethanol production, *Saccharomyces cerevisiae* D452-2 was engineered to overexpress NADH-preferring xylose reductase mutant (XR<sup>MUT</sup>) and NAD<sup>+</sup>-dependent xylitol dehydrogenase (XDH) from *Pichia stipitis* and endogenous xylulokinase (XK). *In vitro* enzyme assay confirmed the functional expression of XR<sup>MUT</sup>, XDH and XK in recombinant *S. cerevisiae* strains. The change of wild type XR to XR<sup>MUT</sup> along with XK overexpression led to reduction of xylitol accumulation in microaerobic culture. More modulation of the xylose metabolism including overexpression of XR<sup>MUT</sup> and transaldolase, and disruption of the chromosomal *ALD6* gene encoding aldehyde dehydrogenase (SX6<sup>MUT</sup>) improved the performance of ethanol production from xylose remarkably. Finally, oxygen-limited fermentation of *S. cerevisiae* SX6<sup>MUT</sup> resulted in 0.64 g l<sup>-1</sup> h<sup>-1</sup> xylose consumption rate, 0.25 g l<sup>-1</sup> h<sup>-1</sup> ethanol productivity and 39% ethanol yield based on the xylose consumed, which were 1.8, 4.2 and 2.2 times higher than the corresponding values of recombinant *S. cerevisiae* expressing XR<sup>MUT</sup>, XDH and XK only.

© 2011 Elsevier B.V. All rights reserved.

### 1. Introduction

Ethanol is a promising biochemical to be used as a biofuel itself and gasoline additive. As a resource for ethanol production, lignocellulosic biomass has been intensively studied by several research groups because it is the most abundant and non-food oriented resource and is autotrophically renewed by solar energy and carbon dioxide fixation (Bak et al., 2009; Hahn-Hägerdal et al., 2007; Matsushika et al., 2009; Saha, 2003). Lignocellulosic biomass consists of cellulose, hemicelluloses, lignin and small ashes. By physical, chemical and/or biological treatment, the biomass is decomposed mainly into several monosaccharides such as glucose, xylose, arabinose, mannose and byproducts (Bak et al., 2009; Saha, 2003). As xylose, the second abundant mono-saccharide, is a representative five-carbon sugar and should be utilized as a

carbon source in order to realize the commercial application of cellulosic ethanol (Jin et al., 2000). Several research groups have developed wild and/or recombinant microbial systems to produce ethanol from xylose; *Escherichia coli*, *Zymomonas mobilis*, *Pichia stipitis* and *Saccharomyces cerevisiae* (Asghari et al., 1996; Jin et al., 2000; Lee et al., 2000; Zhang et al., 1995). Among them, *S. cerevisiae* has been used traditionally for ethanol production from starch- and sugar-based feedstocks. But it does not have catabolic pathways for the utilization of pentoses (xylose and arabinose) (Jin et al., 2000). Some research groups have engineered *S. cerevisiae* able to metabolize xylose and produce ethanol (Ha et al., 2011; Hahn-Hägerdal et al., 2007; Ho et al., 1998; Jin et al., 2000). Key metabolic enzymes for xylose utilization in yeast but, absent in *S. cerevisiae*, are two cofactor-dependent enzymes of xylose reductase (XR, EC 1.1.1.21) and xylitol dehydrogenase (XDH, EC 1.1.1.9). In yeast, XR converts xylose into xylitol and then XDH catalyzes xylitol oxidation for xylulose production (Fig. 1). Xylose is converted by the two enzymes to xylulose, an intermediate in the endogenous pentose phosphate (PP) pathway, and then xylulose is metabolized into ethanol via the PP pathway and glycolysis (Fig. 1) (Matsushika et al., 2009). Among them, cofactor-utilizing systems of XR and XDH have been studied thoroughly. Mainly, *S. cerevisiae* was engineered to express XR and XDH from *P. stipitis*, a xylose-utilizing yeast (Ha et al., 2011; Ho et al., 1998; Jin et al., 2000,

\* Corresponding author at: Department of Agricultural Biotechnology, Seoul National University, Seoul 151-742, Republic of Korea. Tel.: +82 2 880 4855; fax: +82 2 873 5095.

\*\* Corresponding author at: Department of Advanced Fermentation Fusion Science and Technology, Kookmin University, Seoul 136-702, Republic of Korea. Tel.: +82 2 910 5462; fax: +82 2 910 5739.

E-mail addresses: [ycpark@kookmin.ac.kr](mailto:ycpark@kookmin.ac.kr) (Y.-C. Park), [jhseo94@snu.ac.kr](mailto:jhseo94@snu.ac.kr) (J.-H. Seo).

## Characterization of alginate lyase gene using a metagenomic library constructed from the gut microflora of abalone

Su-Jung Sim · Keun Sik Baik · Seong Chan Park ·  
Han Na Choe · Chi Nam Seong · Tai-Sun Shin ·  
Hee Chul Woo · Jeong-Yong Cho · Duwoon Kim

Received: 23 July 2011 / Accepted: 28 October 2011  
© Society for Industrial Microbiology and Biotechnology 2011

**Abstract** A metagenomic fosmid library was constructed using a genomic DNA mixture extracted from the gut microflora of abalone. The library gave an alginate lyase positive clone (AlyDW) harboring a 31.7-kbp insert. The AlyDW insert consisted of 22 open reading frames (ORFs). The deduced amino acid sequences of ORFs 11–13 were similar to those of known alginate lyase genes, which are found adjacent in the genome of *Klebsiella pneumoniae* subsp. *aerogenes*, *Vibrio splendidus*, and *Vibrio* sp. belonging to the phylum *Gammaproteobacteria*. Among the three recombinant proteins expressed from the three ORFs, alginate lyase activity was only observed in the recombinant protein (AlyDW11) coded by ORF 11. The expressed protein (AlyDW11) had the highest alginate lyase activity at pH 7.0 and 45°C in the presence of 1 mM AgNO<sub>3</sub>. The alginate lyase activity of ORF 11 was confirmed to be endolytic by thin-layer chromatography. AlyDW11 preferred poly( $\beta$ -D-mannuronate) as a substrate over poly( $\alpha$ -L-guluronate).

AlyDW11 contained three highly conserved regions, RSEL, QIH, and YFKAGVYNQ, which may act to stabilize the three-dimensional conformation and function of the alginate lyase.

**Keywords** Abalone · Alginate lyase · Metagenomic library ·  $\beta$ -D-Mannuronate ·  $\alpha$ -L-Guluronate

### Introduction

The need for new microbial enzymes is on the rise due to increased industrial demand for novel functional foods and fermentable bio-resources from seaweed. Intestinal microbes from some marine animals that produce a mixture of seaweed-degrading enzymes, including agarase, laminarase, cellulase, and alginate lyase, have been screened [24]. Recently, an enzymatically degraded alginate was found to exhibit certain biological activities, such as promotion of root growth in higher plants, acceleration of the growth rate of *Bifidobacterium* sp., induction of the production of cytotoxic cytokines in human mononuclear cells, suppression of IgE, and antihypertensive effects [1, 6, 11, 12]. Accordingly, both alginate lyase and alginate oligosaccharides have attracted the attention of researchers in the food and pharmaceutical industries [11]. There have been many reports on microbial alginate lyases, which have been classified as polysaccharide lyases, and these lyases can cleave polysaccharides through the  $\beta$ -elimination mechanism, resulting in the formation of a 4-deoxy-L-erythrohex-4-enopyranosyluronate at the new nonreducing terminus [10, 25]. On the basis of the enzymatic cleavage specificity of a nonregular distribution of mannuronic (M) and guluronic (G) acid units, alginate lyase has been primarily classified into poly(M)-lyase (EC 4.2.2.3) and poly(G)-lyase

Su Jung Sim and Keun Sik Baik contributed equally to this study.

S.-J. Sim · J.-Y. Cho · D. Kim (✉)  
Department of Food Science and Technology and Functional Food  
Research Center, Chonnam National University,  
Gwangju 500-757, Republic of Korea  
e-mail: dwkim@jnu.ac.kr

K. S. Baik · S. C. Park · H. N. Choe · C. N. Seong  
Department of Biology, Suncheon National University,  
Suncheon 540-742, Jeonnam, Republic of Korea

T.-S. Shin  
Department of Food Science and Nutrition, Chonnam National  
University, Yeosu 550-757, Republic of Korea

H. C. Woo  
Department of Chemical Engineering, Pukyong National  
University, Busan 608-739, Republic of Korea

## Variation in the chemical composition of *Capsosiphon fulvescens* with area and during the harvest period

Sang-Mi Sun · Se-Yeong Cho · Tai-Sun Shin ·  
Gyu-Hwa Chung · Chang-Bum Ahn · Duwoon Kim

Received: 23 July 2011 / Revised and accepted: 23 February 2012  
© Springer Science+Business Media B.V. 2012

**Abstract** In this study, variations in *Capsosiphon fulvescens* composition with area and during the harvest period were assessed by analysis of crude protein, ash, and carbohydrate content. *C. fulvescens* in Janghung showed the highest crude protein content in December and the highest carbohydrate content in February. Changes in total amino acid, free amino acid, and fatty acid content were observed between December and February. Total amino-acid content of Janghung samples tended to decrease over the course of the harvest period, from  $35.7 \pm 0.2$  g 100 g<sup>-1</sup> in December to  $32.9 \pm 0.2$  g 100 g<sup>-1</sup> in February. Total amino-acid content in Janghung and Gohung samples was higher than that in Wando, except for glutamic acid. Significant increases in the major fatty acids (C12:0, C14:1 n-5, C18:0, C18:1 n-9, C18:2 n-6, C18:3 n-3, C20:0, C20:1 n-9, C22:1 n-9, C22:6 n-3, and C24:1 n-9) in Janghung were observed as the harvest period progressed. Fructose was the most abundant and glucose the second most abundant in the monosaccharide composition profiles, while galactose, ribose, and lactose were present in low quantities and mannitol, fucose, and arabinose were not detected.

**Keywords** *Capsosiphon fulvescens* · Chlorophyta · Chemical composition · Harvest period · Habitat · Nutritional values

### Introduction

According to a survey conducted on worldwide aquaculture production of aquatic plants, there are approximately 16 million tons of aquatic plants, of which 14.9 million tons were produced by aquaculture (FAO 2009). Of these, China, Japan, and the Republic of Korea are the largest consumers of edible seaweeds (Zemke-White and Ohno 1999). Algal production in Korea is mainly limited to *Porphyra tenera* and *Undaria pinnatifida*, which comprise 89% of the total seaweed harvested (Park et al. 2008). Recently, considerable attention has been given to *Capsosiphon fulvescens* as an alternative resource to create new economic opportunities in Korea and its market has continued to increase with increasing consumer preference for healthy foods. The green alga *C. fulvescens* (*C. Agarthi*) Setchell and Gardner is a filamentous chlorophycean seaweed cultivated in the intertidal zone with about 5–6 h exposure time per one tidal cycle (Hwang et al. 2008; Sun et al. 2011). About 650,000 t (wet weight) were cultivated in 1997 (Informatization Officer 1998) along the southern cultivation coast of Korea in a short period between December and the following February (Hwang et al. 2008; Sun et al. 2011). In recent years, many studies on macroalgae have been carried out and their proximate composition differs according to species, geographic origin and seasonal conditions (Patarra et al. 2011). However, detailed studies have not been conducted to evaluate the effects of the time of harvest or area on the chemical composition of *C. fulvescens*. This study was performed to assess changes to amino acid, fatty acid, monosaccharide, ash, and moisture content of *C. fulvescens*

S.-M. Sun · G.-H. Chung  
Department of Biotechnology, Chonnam National University,  
Yeosu, Chonnam, South Korea

S.-Y. Cho · D. Kim (✉)  
Department of Food Science and Technology and Functional  
Food Research Center, Chonnam National University,  
Gwangju 500-757, South Korea  
e-mail: dwkim@jnu.ac.kr

T.-S. Shin · C.-B. Ahn  
Division of Food Science and Nutrition,  
Chonnam National University,  
Yeosu, Chonnam, South Korea

Published online: 13 March 2012

 Springer

## Characterization of a recombinant endo-type alginate lyase (Alg7D) from *Saccharophagus degradans*

Hee Taek Kim · Hyeok-Jin Ko · Nahyun Kim ·  
Duwoon Kim · Dongho Lee · In-Geol Choi · Hee Chul Woo ·  
Myoung Dong Kim · Kyoung Heon Kim

Received: 11 December 2011 / Accepted: 6 February 2012  
© Springer Science+Business Media B.V. 2012

**Abstract** A gene, *alg7D*, from *Saccharophagus degradans*, coding for a putative alginate lyase belonging to the family of polysaccharide lyase-7, was overexpressed in *Escherichia coli*. The properties of the recombinant Alg7D were characterized. The enzyme endolytically depolymerized alginate by  $\beta$ -elimination into oligo-alginates with degrees of polymerization of 2–5. Its activity was maximal at 50°C and pH 7 and was slightly increased in the presence of Na<sup>+</sup>. The  $K_M$ ,  $V_{max}$ ,  $k_{cat}$ , and  $k_{cat}/K_M$  values were: 3 mg ml<sup>-1</sup>, 6.2 U mg<sup>-1</sup>,  $1.9 \times 10^{-2}$  s<sup>-1</sup>, and  $6.3 \times 10^{-3}$  mg<sup>-1</sup> ml s<sup>-1</sup>, respectively.

**Keywords** Alg7d · Endo-type alginate lyase · Polysaccharide lyase-7 · *Saccharophagus degradans*

**Electronic supplementary material** The online version of this article (doi:10.1007/s10529-012-0876-9) contains supplementary material, which is available to authorized users.

H. T. Kim · H.-J. Ko · N. Kim · D. Lee ·  
I.-G. Choi · K. H. Kim (✉)  
School of Life Sciences and Biotechnology,  
Korea University, Seoul 136-713, Korea  
e-mail: khekim@korea.ac.kr

D. Kim · H. C. Woo  
Department of Food Science and Technology,  
Chonnam National University, Gwangju 500-757, Korea

M. D. Kim  
Department of Chemical Engineering, Pukyong National  
University, Busan 608-739, Korea

### Introduction

Alginate is a linear hetero-polyuronic acid composed of  $\alpha$ -L-guluronic acid (G) and  $\beta$ -D-mannuronic acid (M) as monomeric units. These units are linked by  $\alpha$ -1,4 bonds to form homopolymeric regions of either a consecutive G or M block and heteropolymeric random regions of alternating G and M blocks (Wong et al. 2000). Recently, brown algae, which are the main source of alginate, are being considered as a biomass feedstock for the production of ethanol (Adams et al. 2009). However, specific enzymes for saccharification of brown algal polysaccharides have not been used for bioethanol production (Kim et al. 2011). For the conversion of alginate into biofuels, the depolymerization of alginate into oligomers and then into monomers is an important prerequisite step. Alginate is depolymerized into guluronic acid or mannuronic acid by forming a double bond between C4 and C5 at the non-reducing end through a  $\beta$ -elimination reaction by an alginate lyase, and the monomers are then non-enzymatically converted into 4-deoxy-L-erythro-hex-4-enopyranosyluronic acid (Kim et al. 2012). Depending on the substrate specificity of alginate lyases, the enzymes can be classified into two categories: polyguluronate lyase (EC 4.2.2.11) and polymannuronate lyase (EC 4.2.2.3) (Wong et al. 2000).

For the saccharification of polysaccharides into fermentable sugar, the enzyme loading and activity are critical for the final production cost of bioethanol



## Inhibitory activities of the edible brown alga *Laminaria japonica* on glucose-mediated protein damage and rat lens aldose reductase

You Kyung Son · Seong Eun Jin · Hyeung-Rak Kim ·  
Hee Chul Woo · Hyun Ah Jung · Jae Sue Choi

Received: 10 June 2011 / Accepted: 25 August 2011 / Published online: 22 September 2011  
© The Japanese Society of Fisheries Science 2011

**Abstract** Increased aldose reductase (AR)-related polyol pathway activity and the subsequent formation of advanced glycation end-products (AGEs) have been implicated in the onset of diabetic complications. We have evaluated the inhibitory effects of the methanolic extract and its fractions of *Laminaria japonica* on rat lens AR (RLAR) and AGE formation. The CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> fraction was separated by high-performance liquid chromatography to yield active porphyrin derivatives, including pheophorbide a (1) and pheophytin a (2), which were assayed for their anti-diabetic complications and yield. Compound 1 exhibited potent inhibitory activities against both AGE formation and RLAR, with respective half-maximal inhibitory concentration (IC<sub>50</sub>) values of 49.4 and 12.3 μM. Conversely, compound 2 was found to be active against AGE formation, with an IC<sub>50</sub> of 228.7 μM. For further elucidation of

the structure–inhibitory activity relationship of the porphyrin derivatives, the inhibitory activities of four commercially available porphyrin derivatives on AGE formation and RLAR were measured. The presence of a carboxyl group and the absence of a phytol group at the C-17<sup>2</sup> position of the porphyrin were found to contribute to the inhibitory effects towards both AGE formation and RLAR. These results suggest that the *L. japonica* and its porphyrin derivatives may represent a potential functional food resource for further prevention of diabetic complications.

**Keywords** *Laminaria japonica* · Aldose reductase · Advanced glycation end products · Diabetic complication · Pheophorbide a · Pheophytin a

Y. K. Son · S. E. Jin · H.-R. Kim · J. S. Choi (✉)  
Division of Food Science and Biotechnology,  
Pukyong National University, Busan 608-737, Korea  
e-mail: choijs@pknu.ac.kr

Y. K. Son  
e-mail: morn5050@hanmail.net

S. E. Jin  
e-mail: noellajin@hanmail.net

H.-R. Kim  
e-mail: hrkim@pknu.ac.kr

H. C. Woo  
Division of Applied Chemical Engineering,  
Pukyong National University, Busan 608-739, Korea  
e-mail: woohe@pknu.ac.kr

H. A. Jung (✉)  
Department of Food Science and Human Nutrition,  
Chonbuk National University, Jeonju 561-756, Korea  
e-mail: jungha@jbnu.ac.kr

### Introduction

Long-term diabetes gives rise to serious complications, including atherosclerosis, cardiac dysfunction, retinopathy, neuropathy, and nephropathy. All of these conditions are associated with a diminished quality of life and significant morbidity and mortality in diabetic patients. Accordingly, the prevention of such complications could potentially improve the quality of life and reduce the mortality rate of diabetic patients. Previous experimental findings suggest that hyperglycemia can cause diabetic complications via several pathways, such as increased aldose reductase (AR)-related polyol pathway flux, increased formation of advanced glycation end-products (AGEs), activation of protein kinase C (PKC) isoforms, increased hexosamine pathway flux, and excessive oxidative stress, including superoxide overproduction, glycooxidation, and glucose autooxidation [1, 2]. AGEs in particular have been shown to

## Hexane fraction from *Laminaria japonica* exerts anti-inflammatory effects on lipopolysaccharide-stimulated RAW 264.7 macrophages via inhibiting NF-kappaB pathway

Ji-Young Lee · Min-Sup Lee · Hee-Jeon Choi ·  
Ji-Woong Choi · Taisun Shin · Hee-Chul Woo ·  
Jae-Il Kim · Hyeung-Rak Kim

Received: 19 November 2011 / Accepted: 15 March 2012  
© Springer-Verlag 2012

### Abstract

**Purpose** *Laminaria japonica* is a representative marine brown alga used as a culinary item in East Asia. *L. japonica* extract was shown to exert various biological activities; however, its anti-inflammatory activity has not been reported. The aim of this study is to investigate the molecular mechanisms underlying its anti-inflammatory action.

**Methods** Anti-inflammatory mechanisms of *L. japonica* *n*-hexane fraction (LHF) were assessed using lipopolysaccharide (LPS)-stimulated RAW 264.7 macrophages. An anti-inflammatory compound isolated from LHF by reverse-phase chromatography was identified using nuclear magnetic resonance (NMR) spectroscopy.

**Results** Our results indicate that LHF significantly inhibited LPS-stimulated nitric oxide (NO) and prostaglandin E<sub>2</sub> (PGE<sub>2</sub>) secretion in a dose-dependent manner and suppressed the expression of inducible nitric oxide synthase (iNOS) and cyclooxygenase-2 (COX-2) with no cytotoxicity. As results, levels of pro-inflammatory cytokines were significantly reduced by pretreatment of LHF in LPS-stimulated RAW 264.7 cells. Treatment of LHF

strongly suppressed nuclear factor- $\kappa$ B (NF- $\kappa$ B) promoter-driven expression and nuclear translocation of NF- $\kappa$ B by preventing proteolytic degradation of inhibitor of  $\kappa$ B (I $\kappa$ B)- $\alpha$  in LPS-stimulated RAW 264.7 cells. Moreover, LHF inhibited the phosphorylation of Akt and mitogen-activated protein kinase (MAPK) in LPS-stimulated RAW 264.7 cells. One of the anti-inflammatory compounds was isolated from LHF and identified as fucoxanthin.

**Conclusions** These results indicate that the LHF-mediated inhibition of NO and PGE<sub>2</sub> secretion in LPS-stimulated macrophages is regulated by NF- $\kappa$ B inactivation through inhibition of I $\kappa$ B- $\alpha$ , MAPKs, and Akt phosphorylation. LHF may be considered as a functional food candidate for the prevention or treatment of inflammatory diseases.

**Keywords** Anti-inflammation · Fucoxanthin · *Laminaria japonica* · MAP kinases · NF-kappaB · RAW 264.7 cells

### Introduction

Inflammation is a complex response of host defense against harmful stimuli, such as microbial infection, endotoxin exposure, or tissue injury, and ultimately leads to the restoration of normal cell structure and function. Macrophages are key regulators of the immune response to foreign invaders, such as infectious microorganisms, and are activated by exposure to interferon- $\gamma$ , pro-inflammatory cytokines, and bacterial lipopolysaccharides (LPS) [1, 2]. Stimulated macrophages play a pivotal role in inflammatory diseases via excess production of cytokines, including tumor necrosis factor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ), interleukin-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ), and IL-6, and other inflammatory mediators such as nitric oxide (NO) and prostaglandin E<sub>2</sub> (PGE<sub>2</sub>) [3, 4]. Excessive

J.-Y. Lee · M.-S. Lee · H.-J. Choi · J.-W. Choi · J.-I. Kim ·  
H.-R. Kim (✉)  
Department of Food Science and Nutrition,  
Pukyong National University, 599-1, Daeyeon-dong,  
Nam-gu, Busan 608-737, South Korea  
e-mail: hrkim@pknu.ac.kr

T. Shin  
Department of Food Science and Nutrition,  
Chonnam National University, Yeosu 550-749, South Korea

H.-C. Woo  
Division of Applied Chemical Engineering,  
Pukyong National University, Busan 608-739, South Korea

## Dichloromethane Fraction of *Laminaria japonica* Ethanolic Extract Inhibits Lipopolysaccharide-Induced Nitric Oxide Synthase and Cyclooxygenase-2 Expression in RAW 264.7 Cells *via* NF- $\kappa$ B Pathway

Ji-Young Lee,<sup>1</sup> Min-Sup Lee,<sup>1</sup> Ji-Woong Choi,<sup>1</sup> Tai Sun Shin,<sup>2</sup> Hee-Chul Woo,<sup>3</sup> and Hyeon-Rak Kim<sup>1,4</sup>

**Abstract** Strong anti-inflammatory activity has been found in *Laminaria japonica* dichloromethane fraction (LDF); however, the molecular mechanisms underlying its anti-inflammatory activity are not reported. Our results indicated that LDF inhibited LPS-induced nitric oxide and prostaglandin E<sub>2</sub> production in a dose-dependent manner and suppressed the expression of inducible nitric oxide synthase (iNOS) and cyclooxygenase 2 (COX-2) in RAW 264.7 cells. Also, levels of pro-inflammatory cytokines such as tumor necrosis factor- $\alpha$ , interleukin (IL)-1 $\beta$  and IL-6 were remarkably reduced by LDF in LPS-treated RAW 264.7 cells. LDF greatly inhibited promoter activity of nuclear factor- $\kappa$ B (NF- $\kappa$ B) and translocation of NF- $\kappa$ B subunits by prevention of the degradation of inhibitor  $\kappa$ B- $\alpha$  in LPS-treated RAW 264.7 cells ( $p < 0.05$ ). Moreover, LDF inhibited activation of mitogen-activated protein kinases and AKT in LPS-treated RAW 264.7 cells. These results indicate that the LDF downregulates iNOS and COX-2 expressions through the suppression of NF- $\kappa$ B pathway associated with inhibition of multiple signaling proteins.

**KEY WORDS:** *Laminaria japonica*; anti-inflammation; NF- $\kappa$ B; MAP kinases; RAW 264.7 cells.

### INTRODUCTION

Inflammation is a complex process regulated by a cascade of cytokines, growth factors, nitric oxide (NO), and prostaglandins (PGs) produced by activated macrophages. Macrophages are major inflammatory cells and immune effector cells. Macrophages are activated by the exposure of interferon- $\gamma$ , pro-inflammatory cytokines, and bacterial lipopolysaccharide (LPS) [1–3]. Activated macrophages play pivotal roles in inflammatory diseases

*via* excess production of cytokines, including tumor necrosis factor (TNF)- $\alpha$ , interleukin (IL)-1 $\beta$ , IL-6, and other inflammatory mediators such as NO and PGE<sub>2</sub> [4, 5]. Hence, substances which inhibit the productions of these inflammatory mediators or cytokines are considered as potential anti-inflammatory agents.

Nuclear factor  $\kappa$ B (NF- $\kappa$ B) plays pivotal roles in the early stages of immune and acute phase inflammatory responses, as well as in cell survival [6, 7]. NF- $\kappa$ B activation mediates expression of inducible nitric oxide synthase (iNOS), cyclooxygenase 2 (COX-2), and various pro-inflammatory genes [6, 8]. Activation of NF- $\kappa$ B induced by LPS involves the phosphorylation of inhibitor of  $\kappa$ B (I $\kappa$ B)- $\alpha$  kinase, which phosphorylates I $\kappa$ B- $\alpha$  on serines 32 and 36, leading to subsequent ubiquitination and degradation of I $\kappa$ B- $\alpha$ , and translocation of NF- $\kappa$ B into the nucleus [9]. Also, the activation of NF- $\kappa$ B is regulated by cellular kinases such as mitogen-activated protein kinases (MAPKs) [2] and phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K)/protein kinase B

<sup>1</sup>Department of Food Science and Nutrition, Pukyong National University, 599-1, Daeyeon-dong, Nam-gu, Busan 608-737, South Korea

<sup>2</sup>Department of Food Science and Nutrition, Chonnam National University, Yeosu 550-749, South Korea

<sup>3</sup>Division of Applied Chemical Engineering, Pukyong National University, Busan 608-739, South Korea

<sup>4</sup>To whom correspondence should be addressed at Department of Food Science and Nutrition, Pukyong National University, 599-1, Daeyeon-dong, Nam-gu, Busan 608-737, South Korea. E-mail: hrkim@pknu.ac.kr

## Thermal stabilities of polyphenols and fatty acids in *Laminaria japonica* hydrolysates produced using subcritical water

Jung-Nam Park\*, Abdelkader Ali-Nehari\*, Hee-Chul Woo\*\*, and Byung-Soo Chun\*\*†

\*Department of Food Science and Technology, Pukyong National University, Yongso-ro 45, Nam-gu, Busan 608-737, Korea

\*\*Department of Chemical Engineering, Pukyong National University, Yongso-ro 45, Nam-gu, Busan 608-737, Korea

(Received 2 January 2012 • accepted 17 April 2012)

**Abstract**—We investigated the thermal stability of polyphenols and fatty acids from *Laminaria japonica* powder by subcritical water hydrolysis among the range of the experimental conditions. The experiment was carried out at temperatures and pressures ranging from 200 to 280 °C and 13 to 60 bar, respectively for 28 to 42 min. Polyphenol and fatty acids in hydrolysates obtained from different conditions were analyzed by GC and UV-spectrophotometer. The results were compared with those obtained from *Laminaria japonica* oils extracted by supercritical CO<sub>2</sub>. Polyphenol and several fatty acids in hydrolysates produced by subcritical water showed high thermal stability.

**Key words:** Fatty Acid, *Laminaria japonica*, Polyphenol, Subcritical Water Hydrolysis, Supercritical Carbon Dioxide, Thermal Stability

### INTRODUCTION

Seaweed is a potential renewable resource in the marine environment. It provides an excellent source of bioactive compounds, such as carotenoid, dietary fiber, protein, vitamins, essential fatty acid, and minerals [1,2]. Interest in seaweed lipid has been on the rise owing to the recognition of important bioactive molecules like conjugated fatty acids, pigments that have profound physiological effects in the treatment of tumors and other cancer related problems [3-5]. In addition, polyunsaturated fatty acids (PUFAs) are reported to share more than 30% of the total fatty acid in diatom or brown algae [6]. *Laminaria japonica* is a sort of brown seaweed that contains carotenoids. It has the ability to rapidly colonize disturbed or new surfaces. This seaweed is widely used as a human food in different countries, especially in Korea and Japan.

Polyphenols of plant origin may act as antioxidants in human and animal diets, thereby reducing the risk of atherosclerosis and coronary heart disease. They can also protect against some forms of cancer [7]. It is widely accepted that significant antioxidant activity of food is related to high total phenolic content. Plants and foods contain a large variety of phenolic derivatives, including simple phenols, phenylpropanoids, benzoic acid derivatives, flavonoids, stilbenes, tannins, lignans, and lignins [8].

Currently, the most common method of extraction is liquid solvent extraction using many organic solvents. However, the conventional method involves the discharge of potentially hazardous solvents to the environment and can also damage the functional properties of the extracts by hydrothermal stress [9,10]. Therefore, alternative extraction techniques with better selectivity and efficiency are sought. Supercritical fluid extraction (SFE) is an alternative separation technology. The extract obtained from SFE contains fewer polar impurities than the current organic liquid extract and so subse-

quent purification steps become easier [11]. The most commonly used supercritical fluid is supercritical carbon dioxide (SCO<sub>2</sub>) because it has a favorable critical temperature and pressure (304.1 K and 73.8 bar) that enables heat labile materials such as biomolecules to be processed. In particular, SCO<sub>2</sub> has further processing advantages such as low viscosity, low surface tension, high diffusivity and good density, which play key roles in enabling the solvent to readily penetrate the solid biomass matrix as well as in extracting the solutes. SCO<sub>2</sub> is also non-toxic, nonflammable, inexpensive, widely available and chemically inert under many conditions [12-15].

Subcritical water (SW) is also an effective solvent for both polar and non-polar compounds. As the temperature of water increases, the polarity of water decreases. As a result, the solubility of non-polar organic compound increases, and the solubility of polar organic compound decreases [16]. By achieving low polarities at elevated temperatures, subcritical water hydrolysis (SWH) has proved high ability to produce high yields with short extraction time for a number of hydrophobic organic compounds [17]. For this reason, both SCO<sub>2</sub> and SW are considered very useful solvents for many industries such as the nutraceuticals and pharmaceuticals. The aim of the present work was to investigate the thermal stability of useful materials such as polyphenol and fatty acid from freeze-dried *Laminaria japonica* powder after subcritical water hydrolysis among the range of the experimental conditions.

### MATERIALS AND METHODS

#### 1. Materials

*Laminaria japonica* was collected from Guemil-eup, Wando-gun, Jeonnam, South Korea. Food grade carbon dioxide was pure in 99.9%. Gallic acid was purchased from Sigma Aldrich Co. (USA). All reagents were of analytical grade.

#### 2. Sample Preparation

Fresh *Laminaria japonica* samples were thoroughly washed with water and their holdfasts and epiphytes were removed. The cleaned

†To whom correspondence should be addressed.  
E-mail: bschun@pknu.ac.kr

<증빙자료 13>

단국대학교 | 웹메일

DKU > 홈페이지 | 웹하드 | e-Paper SEARCH

DKU 단국대학교 웹메일

공지사항 | 운영자에게 | 회원정보수정 | 로그아웃

메일 | 편지쓰기 | 편지읽기 | 수신확인 | 환경설정 | 주소록

편지함 [추가관리]

받은 편지함 13  
보낸 편지함  
임시 보관함  
지운 편지함 1  
차단 편지함

스팸관리  
단체메일발송

외부메일 받기  
메일 가져오기  
웹메일 도움말

DKU > 홈페이지 | 웹하드 | e-Paper SEARCH

편지함 > 받은 편지함 > 편지 읽기

편지목록 | 이전편지 | 다음편지

외국어 메일보기

답장 | 전체답장 | 전달 | 삭제 | 완전삭제 | 선택된 편지함 | 보낸 편지함 | 이동 | 스팸 차단 | 인쇄 | 원문보기

보낸 사람 Renewable Energy <asayigh@wrenmk.co.uk> [수신기록] [주소록에 추가]  
받는 사람 kkoh@dankook.ac.kr [주소록에 추가]  
참조 hgyoon@kier.re.kr  
받은 날짜 2012년 04월 20일 15시 04분  
제목 Your Submission

Ms. Ref. No.: RENE-D-12-00206  
Title: Pretreatment of Laminaria japonica for bioethanol production with extremely low acid concentration  
Renewable Energy

Dear Dr. Kyeong Keum Oh,

I am pleased to inform you that your paper has been accepted for publication provided that you amend it according to the concerns raised in the review report given below. You should resubmit the paper when you have addressed these issues.

The first sentence of paragraph 4 should be amended to commence:

When you submit the revised manuscript, please also:

- a) outline each change made (point by point) as raised in the reviewer comments
- AND/OR
- b) provide a suitable rebuttal to each reviewer comment not addressed

To submit your revision, please do the following:

- 1. Go to: <http://ees.elsevier.com/rene/>
- 2. Enter your login details
- 3. Click [Author Login]  
This takes you to the Author Main Menu.
- 4. Click [Submissions Needing Revision]  
I look forward to receiving your revised manuscript.

Yours sincerely,

Hyungkee Yoon, Ph.D.  
managing guest editor  
Renewable Energy

Reviewers' comments:

Reviewer #1: The manuscript presented the pretreatment of Laminaria japonica for bioethanol production with extremely low acid concentration. This paper addresses the use of extremely low acid ( 0.06% H2SO4) as a reagent for carrying out pretreatment for seaweeds. In this case, pretreatment consists of improving the glucan content is being examined. Since ELA pre-treatment is known to reduce decomposition products, this study give a good contribution to this research field. The structure of the paper meets the standards set for a scientific paper and the result is of interest. I do recommend some revising the manuscript as follows.

- 1. p. 5 line 51~54:  
It is better to remove this phrase.

<증빙자료 14>

|                                       |                             |                                       |
|---------------------------------------|-----------------------------|---------------------------------------|
| Fwd:Your Submission BITE-D-12-00484R2 |                             | <a href="#">인쇄</a> <a href="#">취소</a> |
| 보낸사람                                  | "윤현희" <hhyoon@gachon.ac.kr> |                                       |
| 받는사람                                  | jhchoe@pknu.ac.kr           |                                       |
| 참조                                    |                             |                                       |
| 보낸날짜                                  | 2012-07-31 17:19:55         |                                       |

----- Original Message -----  
From: "Bioresource Technology" <bite@elsevier.com>  
To: hhyoon@kyungwon.ac.kr  
Date: 2012-07-10 00:43:56  
Subject: Your Submission BITE-D-12-00484R2

Manuscript Number: BITE-D-12-00484R2  
Manuscript Title: Volatile fatty acids production from marine macroalgae by anaerobic fermentation  
Article Type: Short communication

Dear Professor Yoon

Your revised manuscript submitted to Bioresource Technology needs a few additional, mostly minor modifications. Please see my corrections and suggestions in the attached file and resubmit the revised manuscript within 30 days.

When submitting your revised manuscript, please highlight the changes made in revised version and ensure that you upload the source files (Word doc files). To submit your revision, please do the following:

1. Go to: <http://ees.elsevier.com/bite/>
2. Your username is: hhyoon  
If you need to retrieve password details, please go to: [http://ees.elsevier.com/bite/automail\\_query.asp](http://ees.elsevier.com/bite/automail_query.asp).
3. Click [Author Login]  
This takes you to the Author Main Menu.
4. Click [Submissions Needing Revision]  
I look forward to receiving your revised manuscript.

Yours sincerely,



Rolf D. Joerger  
Editor  
Bioresource Technology

Reviewers' comments:

\*\*\*\*\*  
Please note that the editorial process varies considerably from journal to journal. To view a sample editorial process, please click [here](#):

<증빙자료 15>

Elsevier Editorial System™

**BIORESOURCE TECHNOLOGY** Contact us  Help ?  >> 19-hour Scopus & ScienceDirect outage, 28-29 July ... [more](#)

[home](#) | [main menu](#) | [submit paper](#) | [guide for authors](#) | [register](#) | [change details](#) | [log out](#) Username: KOH-445 Role:  Version: EES 2012.1

**Revisions Being Processed for Author Kyeong Keun Oh, Ph.D**

Page: 1 of 1 (1 total revisions being processed) Display  results per page.

| Action                       | Manuscript Number | Title  | Date Submission Began | Status Date  | Current Status |
|------------------------------|-------------------|--|-----------------------|--------------|----------------|
| <a href="#">Action Links</a> | BITE-D-12-01626R1 | Bioethanol production from Saccharina japonica using an optimized extremely low acid pretreatment followed by simultaneous saccharification and fermentation | Jul 11, 2012          | Jul 13, 2012 | With Editor    |

Page: 1 of 1 (1 total revisions being processed) Display  results per page.

[<< Author Main Menu](#)

[Help](#) | [Privacy Policy](#) | [Terms and Conditions](#) | [About Us](#) Copyright © 2012 Elsevier B.V. All rights reserved. Cookies are set by this site. To decline them or learn more, visit our [Cookies](#) page.

<증빙자료 16>

| Re: Submission Confirmation |                                  | 인쇄 | 취소 |
|-----------------------------|----------------------------------|----|----|
| 보낸사람                        | Ho Nam Chang <hnchang@kaist.edu> |    |    |
| 받는사람                        | 최재형 <jhchoe@pknu.ac.kr>          |    |    |
| 참조                          |                                  |    |    |
| 보낸날짜                        | 2012-07-31 18:04:46              |    |    |

On Tuesday, July 31, 2012, Ho Nam Chang <hnchang@kaist.edu> wrote:

>  
>  
> ----- Forwarded message -----  
> From: Biotechnology Advances <mooyoung@uwaterloo.ca>  
> Date: Mon, Dec 12, 2011 at 12:28 AM  
> Subject: Submission Confirmation  
> To: hnchang@kaist.edu  
>  
>  
> Dear Dr. Ho Nam Chang,  
>  
> We have received your article "Multistage Continuous High Cell Density Culture Bioreactors" for consideration for publication in Biotechnology Advances.  
>  
> Your manuscript will be given a reference number once an editor has been assigned.  
>  
> To track the status of your paper, please do the following:  
>  
> 1. Go to this URL: <http://ees.elsevier.com/jba/>  
>  
> 2. Enter these login details:  
> Your username is:  
> Your password is:  
> 3. Click [Author Login]  
> This takes you to the Author Main Menu.  
>  
> 4. Click [Submissions Being Processed]  
>  
>  
> Thank you for submitting your work to this journal.  
>  
> Kind regards,  
>  
> Elsevier Editorial System  
> Biotechnology Advances  
>  
>  
> \*\*\*\*\*  
> Please note that the editorial process varies considerably from journal to journal. To view a sample editorial process, please click here:  
> [http://ees.elsevier.com/eeshelp/sample\\_editorial\\_process.pdf](http://ees.elsevier.com/eeshelp/sample_editorial_process.pdf)  
>  
> For any technical queries about using EES, please contact Elsevier Author Support at [authorsupport@elsevier.com](mailto:authorsupport@elsevier.com)



Elsevier Editorial System(tm) for Journal of Biotechnology  
Manuscript Draft

Manuscript Number: JBIOTEC-D-12-00321R1

Title: Construction and characterization of recombinant *Bacillus subtilis* JY123 able to transport xylose efficiently

Article Type: Short Communication

Section/Category: Biochemical Engineering / Bioprocess Engineering

Keywords: *Bacillus subtilis*; xylose; AraE; xylose transporter; xylA promoter

Corresponding Author: Prof. Yong-Cheol Park, Ph.D.

Corresponding Author's Institution: Kookmin University

First Author: Yong-Cheol Park, Ph.D.

Order of Authors: Yong-Cheol Park, Ph.D.; Soo Young Jun; Jin-Ho Seo, Ph.D.

Abstract: It has been known that wild type *Bacillus subtilis* cannot grow rapidly in a minimal medium containing xylose as a sole carbon source because it does not have a xylose-specific transporter. In this study, the arabinose:H<sup>+</sup> symporter, AraE protein from *B. subtilis* was expressed in *B. subtilis* 168 in order to transport xylose efficiently. The AraE expression cassette was constructed to contain the xylose-inducible xylA promoter, araE gene and fba terminator, and integrated into the chromosomal amyE gene in *B. subtilis* 168. Batch cultures in a defined medium with xylose only or a mixture of xylose and glucose showed that expression of AraE led to fast and complete consumption of initially added xylose and hence a considerable increase in cell growth of the recombinant *B. subtilis* JY123 expressing AraE. Considering the systematic analysis of cell growth, sugar consumption, respiratory quotient and xylulokinase activity, it was certain that AraE protein could transport xylose into *B. subtilis* efficiently.

Elsevier Editorial System(tm) for Composites Science and Technology  
Manuscript Draft

Manuscript Number: CSTE-D-12-00834

Title: Ceramic sheet hybrid kenaf reinforced polypropylene biocomposites

Article Type: Full Length Article

Section/Category: Materials science including physical and mechanical properties

Keywords: A. Ceramics; A. Hybrid composites; B. Mechanical Properties; B. Thermal properties; D. Scanning electron microscopy (SEM)

Corresponding Author: Scientist Seong Ok Han, Ph.D.

Corresponding Author's Institution: Korea Institute of Energy Research

First Author: I Na Sim, Master

Order of Authors: I Na Sim, Master; Seong Ok Han, Ph.D; Young Hun Jang, bachelor; Yoon Jong Yoo, Ph.D

**Abstract:** Hybrid biocomposites are one of the emerging fields in polymer composites. The purpose of this study is the development of natural fiber and ceramic sheet reinforced polypropylene (PP) hybrid biocomposites for broadening of the field of potential applications of biocomposites. Hybrid PP biocomposites were manufactured with 20wt% loadings of kenaf and the addition of a ceramic sheet (single or double sided) by melting and compression molding. The effects of the ceramic sheet on the mechanical and thermal properties of the hybrid PP biocomposites were analyzed in terms of tensile, flexural, and impact properties, and inflammability, smoke optical density, and toxicity of the combustion gas. Also, the surface morphology of fractured hybrid PP biocomposites was observed by SEM and AFM. In spite of the brittle properties of the ceramic, the mechanical properties of the hybrid PP biocomposites were improved and, also, the inflammability of the hybrid PP biocomposites with the ceramic sheet was highly improved. As a result, full impregnation of ceramic sheets into the kenaf reinforced biocomposite can contribute to the improvement of both the mechanical properties and the inflammability of biocomposites, resulting in a broadening of the field of potential applications of biocomposites such as aerospace.

**Suggested Reviewers:** Kyriaki Kalaitzidou Ph.D  
professor, Woodruff School of Mechanical Engineering, Georgia Institute of Technology  
kyriaki.kalaitzidou@me.gatech.edu  
She is an expert in the biocomposites field.

Lawrence T. Drzal Ph.D  
Professor, Chemical Engineering and Materials Science, Michigan State University  
drzal@egr.msu.edu  
He is an expert in the biocomposites field.

Elsevier Editorial System(tm) for Composites Part A  
Manuscript Draft

Manuscript Number: JCOMA-12-614

Title: Pretreatment effects of seaweed on thermal and mechanical properties of seaweed/polypropylene biocomposites

Article Type: Research Paper

Keywords: A . Polymer-matrix composites (PMCs); B. Mechanical properties; B. Thermal properties; E. Compression moulding.

Corresponding Author: Dr Seong Ok Han, Ph.D

Corresponding Author's Institution: Korea Institute of Energy Research

First Author: Young Hun Jang, bachelor

Order of Authors: Young Hun Jang, bachelor; Seong Ok Han, Ph.D; I Na Sim, master; Hyung Il Kim, Professor

Abstract: The seaweed (SW) was derived from the residue in bioenergy production processing. SW/polypropylene (PP) biocomposites were prepared to investigate the SW species and pretreatment effects on the characteristics of biocomposites. Laminaria japonica of brown algae (BA) and Enteromorpha crinite of green algae (GA) were examined by pretreatment with ethanol, acetone, and sulfuric acid, respectively. SW/PP biocomposites were manufactured with various contents of SW by compression molding and the thermal and mechanical properties of biocomposites were investigated. GA/PP biocomposites showed higher thermal stability and impact strength than BA/PP biocomposites. The pretreatment of GA with sulfuric acid gave the highest thermal stability among various pretreatments. Sulfuric acid-treated GA/PP biocomposites showed the generally improved thermal and mechanical properties.

Suggested Reviewers: Kyriaki Kalaitzidou Ph.D  
Professor, Woodruff School of Mechanical Engineering, Georgia Institute of Technology  
kyriaki.kalaitzidou@me.gatech.edu  
She is an expert in the biocomposites field.

Amar K Mohanty Ph.D  
Professor, School of Engineering, University of Guelph  
mohanty@uoguelph.ca  
He is an expert in the biocomposites field.

Donghwan Cho Ph.D  
Professor, Department of Polymer Science and Engineering, Kumoh National Institute of Technology  
dcho@kumoh.ac.kr  
He is an expert in the biocomposites field.

Lawrence T Drzal Ph.D  
Professor, Department of Chemical Engineering and Materials Science, Michigan State University  
drzal@egr.msu.edu

<증빙자료 20>

**Sender** : Spandidos Publications Esubmission < noreply@spandidos-publications.com >

**To** : Gun-Do Kim < gundokim@pknu.ac.kr >

**Date** : 2012-05-31 14:51:03

**Subject** : [FWD]Spandidos Publications, submission finalized

<http://www.spandidos-publications.com> || [contact@spandidos-publications.com](mailto:contact@spandidos-publications.com)

31 May 2012

Dear Gun-Do Kim,

Thank you for submitting your manuX-X-SCRIPT to  
International Journal of Oncology.

Your submission has been received successfully, and has been assigned the electronic  
submission number: 105566.

Please click on the link below and log in to access and track the progress of your  
submission:

[http://www.spandidos-publications.com/pages/esub/esub\\_index.jsp?submissionId=105566&view=4](http://www.spandidos-publications.com/pages/esub/esub_index.jsp?submissionId=105566&view=4)

The submission is currently being verified. Changes are not possible at this stage. You  
will be notified shortly if any corrections are required. If the submission is determined  
to be complete, it will be sent for evaluation by our Editorial Office.

Yours sincerely,

Spandidos Publications

<증빙자료 21>

**Preview**

**From:**jphycol@mml.calstate.edu

**To:**jung1004s@naver.com

**CC:**

**Subject:**Thank you for your manuscript submission - Journal of Phycology

**Body:**@@date to be populated upon sending@@

Dear Mr. JUNG:

Your manuscript entitled "THE EXTRACT OF SACCARINA JAPONICA INDUCES APOPTOSIS COMPANIED BY CELL CYCLE ARREST AND ENDOPLASMIC RETICULUM STRESS IN SK-HEP1 HUMAN HEPATOCELLULAR CARCINOMA CELLS" has been successfully submitted online and is presently being given full consideration for publication in the Journal of Phycology.

Your manuscript ID is JPY-12-157-ART.

Please mention the above manuscript ID in all future correspondence or when calling the office for questions. If there are any changes in your street address or e-mail address, please log in to Manuscript Central at <http://mc.manuscriptcentral.com/jpy> and edit your user information as appropriate.

You can also view the status of your manuscript at any time by checking your Author Center after logging in to <http://mc.manuscriptcentral.com/jpy>.

NOTE: If you have not already done so, please complete the attached Copyright Agreement Form and mail the signed original to the Editorial Office. Be sure to write your manuscript number at the top of the page.

Thank you for submitting your manuscript to the Journal of Phycology.

Sincerely,

Journal of Phycology Editorial Office

**Date Sent:**20-Jul-2012

**File 1:**\* JPY-copyright-form-2012.pdf

<증빙자료 22>

**Sender** : "Journal of Natural Medicines (JONM)" < arun.sundar@springer.com >

**To** : Gun-Do Kim < gundokim@pknu.ac.kr >

**Date** : 2012-07-10 16:54:23

**Subject** : [FWD]JONM: A manuX-X-SCRIPT number has been assigned to Dieckol, isolated from Ecklonia stolonifera, induces apoptosis in human hepatocellular carcinoma Hep3B cells.

Dear Mr. Kim,

Your submission entitled "Dieckol, isolated from Ecklonia stolonifera, induces apoptosis in human hepatocellular carcinoma Hep3B cells." has been assigned the following manuX-X-SCRIPT number: JONM-D-12-00429.

You will be able to check on the progress of your paper by logging on to Editorial Manager as an author.

The URL is <http://jonm.edmgr.com/>.

Thank you for submitting your work to this journal.

Kind regards,

Editorial Office

Journal of Natural Medicines

<증빙자료 23>

[FWD]ARPR: A manuscript number has been assigned to Neuroprotective effect of edible brown alga Eisenia bicyclis on amyloid beta peptide-induced toxicity in PC12 cells

인쇄 | 취소

|      |                                   |
|------|-----------------------------------|
| 보낸사람 | 최재수 <choijs@pknu.ac.kr>           |
| 받는사람 | Minkyung Song <songmk@pknu.ac.kr> |
| 참조   |                                   |
| 보낸날짜 | 2012-08-01 11:25:53               |

[ Original Message ]

Sender : Editorial Office Archives of Pharmacal Research <pskor@korea.com >  
To : Jae-Sue Choi <choijs@pknu.ac.kr >  
Date : 2012-08-25 16:28:13  
Subject : [FWD]ARPR: A manuX-X-SCRIPT number has been assigned to Neuroprotective effect of edible brown alga Eisenia bicyclis on amyloid beta peptide-induced toxicity in PC12 cells

Dear Dr. Choi,

Your submission entitled "Neuroprotective effect of edible brown alga Eisenia bicyclis on amyloid beta peptide-induced toxicity in PC-12 cells" has been assigned the following manuX-X-SCRIPT number: ARPR-D-12-00289.

You will be able to check on the progress of your paper by logging on to Editorial Manager as an author. The URL is <http://arpr.edmgr.com/>.

Thank you for submitting your work to this journal.

Kind regards,

Editorial Office  
Archives of Pharmacal Research

부산광역시 남구 대연 3동 599-1  
부경대학교 식품영양학과  
교수 최재수

Jae Sue CHOI, Ph.D.  
Professor of Department of Food Science & Nutrition  
Pukyong National University  
599-1 Daeyeon-3 Dong, Namgu, Busan 608-737.

<증빙자료 24>

[FWD]FISC: A manuscript number has been assigned to Promising antidiabetic potential of fucoxanthin isolated from edible brown algae, *Eisenia bicyclis* and *Undaria pinnatifida*

인쇄 | 취소

|      |                                   |
|------|-----------------------------------|
| 보낸사람 | 최재수 <chojs@pknu.ac.kr>            |
| 받는사람 | Minkyung Song <songmk@pknu.ac.kr> |
| 참조   |                                   |
| 보낸날짜 | 2012-08-01 11:28:41               |

[ Original Message ]

Sender : Editorial Office <fsjpubl@d1.dion.ne.jp >  
To : Jae Sue Choi <chojs@pknu.ac.kr >  
Date : 2012-07-08 10:38:10  
Subject : [FWD]FISC: A manuX-X-SCRIPT number has been assigned to Promising antidiabetic potential of fucoxanthin isolated from edible brown algae, *Eisenia bicyclis* and *Undaria pinnatifida*.

Dear Dr. Choi,

Your submission entitled "Promising antidiabetic potential of fucoxanthin isolated from edible brown algae, *Eisenia bicyclis* and *Undaria pinnatifida*" has been assigned the following manuX-X-SCRIPT number: FISC-D-12-00187.

You will be able to check on the progress of your paper by logging on to Editorial Manager as an author. The URL is <http://fisc.edmgr.com/>.

Thank you for submitting your work to this Journal.

Kind regards,

Editorial Office  
Fisheries Science

부산광역시 남구 대연 3동 599-1  
부경대학교 식품영양학과  
교수 최재수

Jae Sue CHOI, Ph.D.  
Professor of Department of Food Science & Nutrition  
Pukyong National University  
599-1 Daeyeon-3 Dong, Namgu, Busan 608-737,



나. 비SCI급 논문

| No | 제 목  | 학술지       | 발표자         | 발표<br>일자 | 권(호),<br>페이지    | 국가명<br>(SCI)<br><Impact<br>Factor> |
|----|--|-----------|-------------|----------|-----------------|------------------------------------|
| 1  | 해조류 바이오매스로부터 고부가<br>유용물질 회수 및 청정연료<br>생산기술 | CATALYSIS | 우희철<br>외 2명 | 2011. 10 | 27,<br>10-30    | 한국<br>(비SCI)                       |
| 2  | 적외선 분광분석을 이용한 바이오<br>에탄올 on-line용 정량분석법 개발 | 공업화학      | 유준<br>외 2명  | 2012. 2  | 23(1),<br>35-41 | 한국<br>(비SCI)                       |

전문분야 소개

### 해조류 바이오매스로부터 고부가 유용물질 회수 및 청정연료 생산기술

최재형 · 김정숙 · 우희철\*

부경대학교 화학공학과  
(\*E-mail: woohc@pknu.ac.kr)

#### 1. 서 론

세계는 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, 이를 통하여 유엔 기후변화협약 (UNFCCC) 대응 및 에너지 자립을 달성하고 장차 그린에너지 산업을 국가발전의 한 축으로 성장시키고자 하고 있다. 현재 우리나라에서는 2012년부터 신재생에너지 의무할당제(PRS)와 2015년부터 탄소배출권 (CER) 의무이행제도가 시행됨에 따라 국내 실정에 맞는 지속가능형 바이오매스를 활용한 수송용 청정연료 및 고부가 바이오소재 개발의 중요성이 부각되고 있다.

지구상의 바이오매스는 광합성에 의하여 이산화탄소를 고정화시켜 연간 약 775억 톤의 바이오매스 탄소를 생산하고 있다. 표 1의 바이오매스 탄소 분포를 살펴보면, 지구의 29.2% 육상면적에서 529억 톤의 바이

오매스 탄소가 생산되고 있으며, 해양의 경우는 지구의 70.8% 면적에서 246억 톤의 바이오매스 탄소를 생산하고 있다. 이러한 육상과 해상에 존재하는 바이오매스를 에너지화하기 위해서는 풍부함과 지속가능성, 친환경성 등의 요소들을 만족시켜야 한다. 육상 바이오매스 활용 측면에서는 농업 부산물과 산림 폐자원 등의 활용을 생각할 수 있으나, 새로운 육상 바이오매스 생산을 위한 땅의 이용은 지구 생태학적 측면에서 바람직하지 않은 것으로 되어 제한적일 수밖에 없다. 그러나 해양의 경우엔 넓은 바다를 개척할 수 있고, 다양한 종의 바이오매스 잠재성, 빠른 성장과 높은 생산성, 온실가스 저감 효과 등 이러한 장점이 있어 해양 바이오매스를 대량생산 할 수 있다면 새로운 돌파구가 될 수 있을 것이다.

우리나라의 경우에 연간 생산되는 바이오매스 양을 살펴보면 약 1.1억 톤(dry wt)이며, 육상이 92.7%, 해양이 7.3%를 차지한다[2]. 특히, 우리나라 자원 환경을 살펴볼 때 국토의 65%가 산지의 개발과 여기에서 얻은 산림자원, 농촌의 볏짚 등의 농업부산물, 그리고 도시의 수많은 폐기물 등의 폐자원이 발생하고 있으며, 이를 이용하여 바이오에너지로 전환하여 에너지 자급

표 1. 지구상의 바이오매스 탄소 분포[1]

|   | Forests | Grasslands | Swamp | Other Terrestrial | Marine |
|---|---------|------------|-------|-------------------|--------|
| Surface Area (10 <sup>6</sup> km <sup>2</sup> ) | 48.5    | 24.0       | 2.0   | 74.5              | 361    |
| % of Total Area                                 | 9.5     | 4.6        | 0.4   | 14.6              | 70.8   |
| Net Carbon production (Gt/year)                 | 33.3    | 8.5        | 2.7   | 8.4               | 24.6   |
| % of Total                                      | 42.9    | 11.0       | 3.5   | 10.8              | 31.8   |

## 적외선 분광분석을 이용한 바이오 에탄올 on-line용 정량분석법 개발

김형욱 · 류준형\* · 유 준†

부경대학교 화학공학과, \*동국대학교 원자력 및 에너지공학부  
(2011년 9월 2일 접수, 2011년 9월 21일 심사, 2011년 10월 26일 채택)

### Development of On-line Quantitative Analysis for Bioethanol Using Infrared Spectroscopy

Hyeonguk Kim, Jun-Hyung Ryu\*, and J. Jay Lin†

Department of Chemical Engineering, Pukyong National University, Busan 606-739, Korea

\*Department of Nuclear and Energy System Engineering, Dongguk University, Gyeongju 780-714, Korea

(Received September 2, 2011; Revised September 21, 2011; Accepted October 26, 2011)

본 논문에서는 바이오연료 제품 품질 분석의 저가격화와 시간단축, 그리고 궁극적으로 바이오연료 생산 공정의 모니터링 실시간화를 해결하기 위해 적외선 분광분석과 화학계량학(Chemometrics)을 융합한 on-line 분광 모니터링 시스템을 제안하고자 한다. 화학계량학 중 부분최소자승법을 사용하여 적외선 spectrum과 성분 농도 간의 정량분석을 실시하였다. 몇 가지 전처리법과 변수 중요도척도를 이용하여 모델링한 결과 spectrum의 보정, 노이즈 감소, 검량선의 유지보수 등의 측면에서 Savitzky-Golay 전처리가 가장 우수함을 보였다. 본 연구의 결과를 통해 실시간 품질 측정뿐만 아니라 하나의 분광분석 장치로 여러 성분들의 동시 측정이 가능함을 확인함으로써 비용의 절감도 예상된다. 뿐만 아니라 결정계수  $R^2$ 이 0.99 이상으로 실험실분석의 대체도 가능하다.

This paper proposes a new methodology for the real-time on-line quality monitoring of biofuel processes through the integration of infrared spectroscopy and chemometrics. A method of Partial Least Squares (PLS) in Chemometrics is employed for quantitative analysis of key components in bioethanol products. After a number of preprocessing methods and variable importance in projection (VIP) are used, Savitzky-Golay method showed the best performance in terms of spectrum correction, noise reduction, and model maintenance. The proposed method allows us to economically forecast the concentration of multiple impurities encountered with the production of bioethanol. The proposed system is also accurate enough ( $R^2 > 0.99$ ) to replace the laboratory analysis.

**Keywords:** bioethanol, Partial least squares, spectrum preprocessing, variable importance in projection, Infrared spectroscopy

### 1. 서 론

화석연료를 연소시킴으로써 대량으로 배출되는 이산화탄소가 지구 온난화를 일으키는 온실가스의 주범으로 지목되면서 화석연료의 사용에 대한 환경적, 경제적 및 사회적 논란이 거세지고 있음은 주지의 사실이다[1]. 따라서 화석연료를 대체할 수 있는 재생에너지의 도입에 대한 필요성이 강조되었고, 태양광, 풍력, 바이오매스 등 다양한 재생 에너지가 개발되고 있다. 특히 바이오매스는 재생에너지원 중에 유일하게 액체탄소 연료를 공급할 수 있기 때문에 유망한 자원이다. 브라질, 미국, EU 등 바이오연료 강국들은 이미 1970~1980년대부터 바이오연료 도입을 앞장서 왔다. 다양한 바이오매스 공정개발은 거의 완료된 상태이며 대량생산 체계를 위한 기술개발 또한 매우 성숙된 단계이다.

반면에 한국의 경우 전반적인 재생에너지에 대하여 뚜렷한 기술적 우위성을 확보하지 못하고, 여전히 선진국과 큰 격차를 보이고 있다 [2]. 이 격차를 줄이기 위해서는 개별적인 새로운 전환공정의 개발도 필요하지만, 동시에 개발된 기술을 확장(scale-up) 시키는 대량생산 기술개발이 동시에 이루어져야 한다. 현재까지의 바이오연료 관련 국가 규모 연구과제 현황을 살펴보면 대부분의 연구 공정개발에 국한되고 있으며 바이오연료의 대량생산 기술개발은 그 기술적 잠재력에 상응하는 관심을 받지 못하고 있다.

바이오 연료 중 바이오 에탄올에 대해 많은 관심이 집중되고 있다. 바이오 에탄올은 당을 포함하거나 당으로 전환될 수 있는 녹말 또는 섬유소로부터 생산된다. 바이오 에탄올은 주로 옥수수 전분을 주원료로 하여 미생물과 효소를 이용한 생물학적 공정으로 생산되고 있으며, 가솔린 대체 연료 혹은 첨가제, 연료전지의 연료로 사용되고 있다. 에탄올은 주로 당 화합물로부터 만들어지므로 전분 이외의 탄수화물을 이용하여도 생산이 가능한데, 자연계에 가장 풍부한 물질 중의 하나

† 교신저자(e-mail: jayliu@pknu.ac.kr)

2. 특허 실적

가. 국제특허

| No | 출원(특허)명                         | 출원일자<br>(등록일자) | 출원번호<br>(등록번호)    | 출원국가<br>(등록국가) | 출원자      |
|----|---------------------------------|----------------|-------------------|----------------|----------|
| 1  | 전처리된 해조류 잔사의 추출물을 이용한 지방산 제조 방법 | 2011. 12. 16   | PCT/KR2011/009701 | PCT 출원         | 우희철 외 8명 |

<증빙자료 1>

YP110042PCT  
1/8  
PCT 출원서  
출력(전자적 형태가 원본)

|              |   |   |
|--------------|---|---|
| <b>0</b>     | 수리관청 전용   |   |
| <b>0-1</b>   | 국제출원번호  |   |
| <b>0-2</b>   | 국제출원일자  |   |
| <b>0-3</b>   | 수리관청 명칭 및 "PCT 국제출원"                            |   |
| <b>0-4</b>   | 서식 PCT/RO/101 - PCT 출원서                         |   |
| <b>0-4-1</b> | 우측에 기재된 바와 같이 작성되었다.                            | <b>PCT-SAFE</b><br>버전 3.51.051.227 MT/FOP 20111001/0.20.5.19                  |
| <b>0-5</b>   | 신청<br>아래 서명인은 본 국제출원서가 특허협력조약에 의해 처리될 것을 청구합니다. |   |
| <b>0-6</b>   | 출원인이 지정한 수리관청                                   | 대한민국 특허청 (RO/KR)  |
| <b>0-7</b>   | 출원인 또는 대리인의 서류참조기호                              | <b>YP110042PCT</b>  |
| <b>I</b>     | 발명의 명칭  | 전처리된 해조류 잔사의 추출물을 이용한 휘발성 지방산 제조 방법   |
| <b>II</b>    | 출원인   |   |
| II-1         | 이 사람은   | 오직 출원인  |
| II-2         | 우측 지정국에 관한 출원인                                  | 미국을 제외한 모든 지정국  |
| II-4ko       | 성명  | 부경대학교 산학협력단   |
| II-4en       | Name:   | <b>PUKYONG NATIONAL UNIVERSITY INDUSTRY-UNIVERSITY COOPERATION FOUNDATION</b> |
| II-5ko       | 주소  | 부산광역시<br>남구 용당동 산 100<br>608-080<br>대한민국                                      |
| II-5en       | Address:  | <b>San 100, Yongdang-dong, Nam-gu, Busan 608-080 Republic of Korea</b>        |
| II-6         | 국적  | 대한민국 KR   |
| II-7         | 거주국   | 대한민국 KR   |
| II-11        | 출원인 코드  | 2-2004-016649-9   |

나. 국내특허

- 출원 6건, 출원예정(심사중) 1건

| No | 출원(특허)명  | 출원일자<br>(등록일자) | 출원번호<br>(등록번호)  | 출원국가<br>(등록국가) | 출원자         |
|----|--|----------------|-----------------|----------------|-------------|
| 1  | 전처리된 해조류 잔사의 추출물을 이용한 휘발성 지방산 제조 방법  | 2011. 12. 16   | 10-2011-0136302 | 한국             | 우희철<br>외 8명 |
| 2  | 해조류로부터 휘발성 유기산을 생산하는 방법  | 2012. 5. 30    | 10-2012-0057446 | 한국             | 윤현희<br>외 2명 |
| 3  | 신규한 올리고알긴산 분해 효소 및 이를 이용한 알긴산 유래 단당의 효소적 생산방법  | 2011. 12. 7    | 10-2011-0130425 | 한국             | 김경헌<br>외 3명 |
| 4  | 초임계 또는 아임계 이산화탄소를 이용한 해조류의 이취 성분 제거 방법   | 2012. 6. 12    | 10-2012-0062721 | 한국             | 전병수<br>외 3명 |
| 5  | 피부세포에서 멜라닌 생합성 억제 효과를 갖는 참모자반(Sargassum fulvellum)주정 추출물 및 그로부터 분리된 n-헥산 가용 추출물 또는 디클로로메탄 가용 추출물을 함유하는 피부미백용 조성물 | 2011. 9. 22    | 10-2011-0095573 | 한국             | 김형락<br>외 4명 |
| 6  | 매생이 추출물 또는 이로부터 분리된 화합물을 유효성분으로 포함하는 당뇨병 합병증 예방 또는 치료용 약제학적 조성물  | 2012. 6. 14    | 10-2012-0063862 | 한국             | 최재수<br>외 4명 |
| 7  | 감마선 조사 및 알긴산 분해효소를 이용한 알긴산 올리고당의 제조방법  | 2012. 7        | 출원예정<br>(심사중)   | 한국             | 김두운<br>외 3명 |

## 관인생략 출원번호통지서

**출원일자** 2011.12.16  
**특기사항** 심사청구(유) 공개신청(무) 참조번호(YP110042NR)  
**출원번호** 10-2011-0136032 (접수번호 1-1-2011-1000473-78)  
**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 잔사의 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 > 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 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 2012.05.30  
특기사항 심사청구(유) 공개신청(무)  
출원번호 10-2012-0057446 (접수번호 1-1-2012-0433117-84)  
출원인명칭 가천대학교 산학협력단(2-2004-037632-4) 외 1명  
대리인성명 이처영(9-2003-000118-9)  
발명자성명 팜티난 전영중 윤현희  
발명의명칭 해조류로부터 휘발성 유기산을 생산하는 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 > 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 권을 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** 2011.12.07  
**특기사항** 심사청구(유) 공개신청(무)  
**출원번호** 10-2011-0130425 (접수번호 1-1-2011-0972891-02)  
**출원인명칭** 고려대학교 산학협력단(2-2004-017068-0) 외 1명  
**대리인성명** 특허법인 다나(9-2008-100121-8)  
**발명자성명** 김경현 우희철 김희택 최인걸  
**발명의명칭** 신규한 올리고알긴산 분해효소 및 이를 이용한 알긴산 유래 단당의 효소적 생산방법

**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 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 2012.06.12  
특기사항 심사청구(유) 공개신청(무)  
출원번호 10-2012-0062721 (접수번호 1-1-2012-0466414-02)  
출원인명칭 부경대학교 산학협력단(2-2004-016649-9)  
대리인성명 최한수(9-2002-000123-0)  
발명자성명 전병수 박정남 윤준호 우희철  
발명의명칭 초임계 또는 아임계 이산화탄소를 이용한 해조류의 이취 성분 제거방법

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 정보 변경(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. 외국으로 출원하고자 하는 경우 PCT 제도(특허·실용신안)나 마드리드 제도(상표)를 이용할 수 있습니다. 국내출원일을 외국에서 인정받고자 하는 경우에는 국내출원일로부터 일정한 기간 내에 외국에 출원하여야 우선권을 인정받을 수 있습니다.  
※ 제도 안내 : <http://www.kipo.go.kr>-특허마당-PCT/마드리드  
※ 우선권 인정기간 : 특허·실용신안은 12개월, 상표·디자인은 6개월 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.

<증빙자료 5>

**출원명칭 :**

피부세포에서 멜라닌 생합성 억제 효과를 갖는 참모자반  
(*Sargassum fulvellum*) 주정 추출물 및 그로부터 분리된 *n*-헥산  
가용 추출물 또는 디클로로메탄 가용 추출물을  
함유하는 피부미백용 조성물

---

---

**출원번호 : 10-2011-0095573**

---

---

**출원인 : 부경대학교 산학협력단**

---

---

관인생략  
출원번호통지서

출원일자 2012.06.14  
특기사항 심사청구(유) 공개신청(무)  
출원번호 10-2012-0063862 (접수번호 1-1-2012-0474401-41)  
출원인명칭 부경대학교 산학협력단(2-2004-016649-9) 외 1명  
대리인성명 위병갑(9-2004-000155-3)  
발명자성명 정현아 우미희 김형락 우희철 최재수  
발명의명칭 매생이 추출물 또는 이로부터 분리된 화합물을 유효성분으로 포함하는 당뇨병 합병증 예방 또는 치료용 약제학적 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 정보 변경(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. 외국으로 출원하고자 하는 경우 PCT 제도(특허·실용신안)나 마드리드 제도(상표)를 이용할 수 있습니다. 국내출원일을 외국에서 인정받고자 하는 경우에는 국내출원일로부터 일정한 기간 내에 외국에 출원하여야 우선권을 인정받을 수 있습니다.  
※ 제도 안내 : <http://www.kipo.go.kr>-특허마당-PCT/마드리드  
※ 우선권 인정기간 : 특허·실용신안은 12개월, 상표·디자인은 6개월 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 관련 법령에 따라 처벌을 받을 수 있습니다.  
※ 특허출원 10-2010-0000000, 상표등록출원 40-2010-0000000
7. 기타 심사 절차에 관한 사항은 동봉된 안내서를 참조하시기 바랍니다.



## 조사결과 보고서

### 접수정보

2012. 07. 13

접수번호 W2012-SR01699  
 의뢰처 전남대학교 산학협력단  
 발명자/출원인 김두운 교수님  
 작성자 이윤희 (T. 02-3153-7660)  
 과제명 감마선 조사 및 알긴산 분해효소를 이용한 알긴산 올리고당의 제조방법

기술요지 본 의뢰발명은 감마선 조사 및 알긴산 분해효소를 이용한 알긴산 올리고당의 제조 방법에 관한 것으로, 알긴산 분해를 위해 (A) 알긴산에 10kGy 범위의 감마선을 조사한 후, (B) 신규 미생물 효소를 처리하여 올리고당을 제조하는 것을 특징으로 한다.

### 선행문헌정보

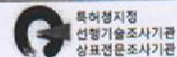
| 연번 | 문헌번호              | 출원인<br>(저자)       | 제목                              | 관련도 |
|----|-------------------|-------------------|---------------------------------|-----|
| 1  | KR 1083608 B1     | 한국원자력연구원          | 방사선 조사를 이용한 해조류로부터 바이오 연료의 제조방법 | X   |
| 2  | KR 2000-0012173 A | 김공수; 조석형          | 저 분자다당류 및 올리고당의 제조 방법           | A   |
| 3  | KR0873700 B1      | 한국가속기 및 플라즈마 연구협회 | 전자빔을 이용한 바이오 연료 제조 방법           | A   |

[ 관련도 표시기호 ]

X : 신규성 또는 진보성 부정 사유 문헌  
 P : 출원일과 우선권주장일 사이에 공표된 문헌  
 A : 동일기술분야의 선행기술

Y : 다른 문헌과 조합에 의해 진보성 부정 사유 문헌  
 E : 출원일 이후에 발행된 유사 선행문헌  
 T : 출원일 이후에 발행된 일반 선행문헌

정보조사 의뢰에 대한 모든 비밀은 철저히 보장되며, 의뢰인의 의견을 최대한 반영하여 실시됩니다.  
 단, 조사결과는 의뢰인의 의뢰목적에 대하여 어떠한 법적 책임도 지지 않습니다.



### 3. 학술대회발표

#### 가. 국외 (16건)

| No | 제 목   | 학술대회명  | 발표자         | 발표일자                            | (장소, 국가명)       |
|----|---|--|-------------|---------------------------------|-----------------|
| 1  | Anaerobic Digestion of brown algae ( <i>Saccharina japonica</i> ) for Volatile Fatty Acids Production in Simple Multi-stage Continuous System | 2011년<br>한국생물공학회<br>추계학술발표대회<br>및 국제심포지움                                       | 장호남<br>외 2명 | 2011.10.6.<br>-<br>2011.10.8.   | 창원컨벤션센터,<br>한국  |
| 2  | Production of Mixed Alcohol by VFA platform   | 2011년<br>한국생물공학회<br>추계학술발표대회<br>및 국제심포지움                                       | 장호남<br>외 2명 | 2011.10.6.<br>-<br>2011.10.8.   | 창원컨벤션센터,<br>한국  |
| 3  | Bioconversion of <i>Laminaria japonica</i> Using De-Alginate Process as a Pretreatment Strategy   | 2011년<br>AIChE ANNUAL<br>MEETING   | 오경근<br>외 3명 | 2011.10.16.<br>-<br>2011.10.21. | Minneapolis, 미국 |
| 4  | Volatile fatty acids production from marine seaweed by anaerobic fermentation   | 18th RSCE 2011   | 윤현희<br>외 3인 | 2011.10.27.<br>-<br>2011.10.28. | 호치민공대,<br>베트남   |
| 5  | Volatile Fatty Acid Production in bench Scale Anaerobic Digestion   | 2011 Joint of<br>Korea/ Japan/<br>Taiwan Chemical<br>Engineering<br>Conference | 우희철 외<br>3명 | 2011.11.10-<br>2011.11.11.      | 부산 센텀호텔,<br>한국  |
| 6  | Production of volatile fatty acids from macroalgae by anaerobic fermentation  | 2011 Joint of<br>Korea/ Japan/<br>Taiwan Chemical<br>Engineering<br>Conference | 우희철 외<br>4명 | 2011.11.10.<br>-<br>2011.11.11. | 부산 센텀호텔,<br>한국  |
| 7  | Pretreatment of <i>Laminaria japonica</i> with Extremely Low Acid   | Asia-Pacific<br>Forum on<br>Renewable Energy                                   | 오경근<br>외 2명 | 2011.11.16.<br>-<br>2011.11.19. | 부산 그랜드호텔,<br>한국 |
| 8  | Anaerobic fermentation of macroalgal biomass for short-chain fatty acids  | AFOB Regional<br>Symposium   | 우희철<br>외 4명 | 2012.2.9.<br>-<br>2012.2.11.    | 호치민공대, 베트남      |
| 9  | Production of monomeric sugars from alginate using two types of alginate lyases   | 34th Symposium<br>on Biotechnology<br>for Fuels and<br>Chemicals               | 김경현<br>외 1명 | 2012.4.30.<br>-<br>2012.5.3.    | New Orleans, 미국 |

|    |   |  |             |                               |  |
|----|---|--|-------------|-------------------------------|--|
| 10 | Production of alginate monomer using two alginate lyases from <i>Saccharophagus degradans</i> 2-40  | 2012<br>한국생물공학회<br>춘계학술발표대회 &<br>국제심포지움                  | 박용철<br>외 1명 | 2012.4.12.<br>-<br>2012.4.13. | 창원컨벤션센터,<br>한국   |
| 11 | Adsorption and Desorption Optimization of Allyl Isothiocyanate on Dried <i>Laminaria japonica</i>   | 2012<br>한국생물공학회<br>춘계학술발표대회 &<br>국제심포지움                  | 전병수<br>외 3명 | 2012.4.12.<br>-<br>2012.4.13. | 창원컨벤션센터,<br>한국   |
| 12 | Extrusion Pretreatment of <i>Laminaria japonica</i> using Dilute Acid for the Production of Bioethanol through Simultaneous Saccharification and Fermentation | 20th European<br>Biomass<br>Conference and<br>Exhibition | 오경근<br>외 2명 | 2012.6.18.<br>-<br>2012.6.22. | Milano Convention<br>Center,<br>이탈리아                                     |
| 13 | Molecular mechanisms of fucoxanthin isolated from <i>Laminaria japonica</i> in lipopolysaccharide-stimulated RAW 264.7 macrophages                            | Institute of Food<br>Technologists                       | 김형락<br>외 3명 | 2012.6.26.<br>-<br>2012.6.28. | 라스베가스,<br>미국   |
| 14 | Overexpression of AraE protein facilitates xylose transport in <i>Bacillus subtilis</i>   | 2012년<br>한국미생물<br>생명공학회<br>국제심포지움 및<br>학술대회              | 박용철<br>외 6명 | 2012.6.27.<br>-<br>2012.6.29. | 부산 벅스코,<br>한국  |
| 15 | Process simulation of bioethanol production from brown algae  | ADCHEM 2012  | 유준<br>외 1명  | 2012.7.10.<br>-<br>2012.7.13. | Fumara Hotel,<br>싱가포르  |
| 16 | Techno-economic analysis of volatile fatty acids production from marine biomass   | PSE 2012   | 유준<br>외 2명  | 2012.7.15.<br>-<br>2012.7.19. | Singapore<br>International<br>Convention &<br>Exhibition Centre,<br>싱가포르 |

나. 국내 (14건)

| No | 제 목  | 학술대회명                         | 발표자         | 발표일자                            | (장소, 국가명)       |
|----|--|-------------------------------|-------------|---------------------------------|-----------------|
| 1  | Characterization of an Endo-alginate lyase, Alg7B, Cloned from <i>Saccharophagus degradans</i> 2-40 for the Depolymerization of Alginate                         | 2011년<br>한국생물공학회<br>추계학술발표대회  | 김경현<br>외 1명 | 2011.10.6.<br>-<br>2011.10.8    | 송도 컨벤션센터,<br>한국 |
| 2  | Optimization of Dilute acid Fractionation of <i>Laminaria japonica</i> to Enhance Glucan Content   | 2011년<br>한국화학공학회<br>추계학술발표대회  | 오경근<br>외 2명 | 2011.10.26.<br>-<br>2011.10.28. | 송도 컨벤션센터,<br>한국 |
| 3  | Apoptosis of human hepatocellular carcinoma by dieckol isolated from <i>Ecklonia stolonifera</i>   | 2011년<br>한국생명과학회<br>추계학술발표대회  | 김군도<br>외 5명 | 2011.10.27<br>-<br>2011.10.28   | 부산 벅스코,<br>한국   |
| 4  | Induction of apoptosis on SK-Hep1 human hepatocellular carcinoma cells by extract of <i>Saccharina japonica</i>  | 2011년<br>한국생명과학회<br>추계학술발표대회  | 김군도<br>외 5명 | 2011.10.27<br>-<br>2011.10.28   | 부산 벅스코,<br>한국   |
| 5  | Anaerobic Fermentation of Marine Biomass for Volatile Fatty Acids Production   | 2011년<br>공업화학회<br>추계학술발표대회    | 윤현희<br>외 3명 | 2011.11.2.<br>-<br>2011.11.4.   | 가천대학교,<br>한국    |
| 6  | Influence of chemical treatments on surface properties of marine algae   | 2011년<br>한국신재생에너지<br>추계학술발표대회 | 한성욱<br>외 1명 | 2011.11.16.<br>-<br>2011.11.17. | 부산 그랜드호텔,<br>한국 |
| 7  | Thermal stability and dynamic mechanical properties of polypropylene biocomposites reinforced marine algae by-product  | 2011년<br>한국신재생에너지<br>추계학술발표대회 | 한성욱<br>외 1명 | 2011.11.16.<br>-<br>2011.11.17. | 부산 그랜드호텔,<br>한국 |
| 8  | Ethanol extracts of <i>Ecklonia stolonifera</i> inhibit LPS-induced inflammation by suppressing NF- $\kappa$ B, MAPK and Akt activation in RAW 264.7 macrophages | 한국수산과학<br>총연합회<br>공동학술발표대회    | 김형락<br>외 4명 | 2011.11.18                      | 부산 벅스코,<br>한국   |
| 9  | Anaerobic Digestion of brown algae ( <i>Saccharina japonica</i> ) by nitrogen sources  | 2012년<br>한국화학공학회<br>춘계학술발표대회  | 장호남<br>외 4명 | 2012.4.25.<br>-<br>2012.4.27.   | 제주 컨벤션센터,<br>한국 |

|    |  |   |             |                               |                 |
|----|--|---|-------------|-------------------------------|-----------------|
| 10 | 바이오매스 전처리를 통한 특성 분석 및 급속열분해를 이용한 바이오오일 제조  | 2012년<br>한국화학공학회<br>춘계학술발표대회  | 서동진<br>외 5명 | 2012.4.25.<br>-<br>2012.4.27. | 제주 컨벤션센터,<br>한국 |
| 11 | 해조류 부산물을 보강제로 이용한 폴리프로필렌 바이오복합재료의 기계적 및 동역학적 특성 분석   | 2012년<br>한국고분자<br>춘계학술발표대회  | 한성욱<br>외 1명 | 2012.4.12.<br>-<br>2012.4.13. | 대전컨벤션센터,<br>한국  |
| 12 | Hexane fraction from <i>Sargassum fulvellum</i> extract inhibits adipogenesis and lipogenesis in 3T3-L1 adipocytes   | 2012년<br>생화학<br>분자생물학회<br>춘계학술발표대회  | 김형락<br>외 7명 | 2012.5.30.<br>-<br>2012.6.1.  | 서울 코엑스홀,<br>한국  |
| 13 | Hexane fraction of <i>Sargassum fulvellum</i> ethanolic extract inhibits the ipopolysaccharide-induced inducible nitric oxide synthase and cyclooxygenase 2 in RAW 264.7 cells via inhibition of nuclear factor kappaB pathway | 2012년<br>생화학<br>분자생물학회<br>춘계학술발표대회  | 김형락<br>외 7명 | 2012.5.30.<br>-<br>2012.6.1.  | 서울 코엑스홀,<br>한국  |
| 14 | Screening and characterization of alginate lyase from <i>Vibrio</i> sp. AlyHP32 isolated from the gut microflora of <i>Hemicentrotus pulcherrimus</i>  | 2012<br>Annual meeting<br>korean society of<br>food science and<br>technology | 김두운<br>외 3명 | 2012.6.13.<br>-<br>2012.6.15. | 대구 엑스코,<br>한국   |



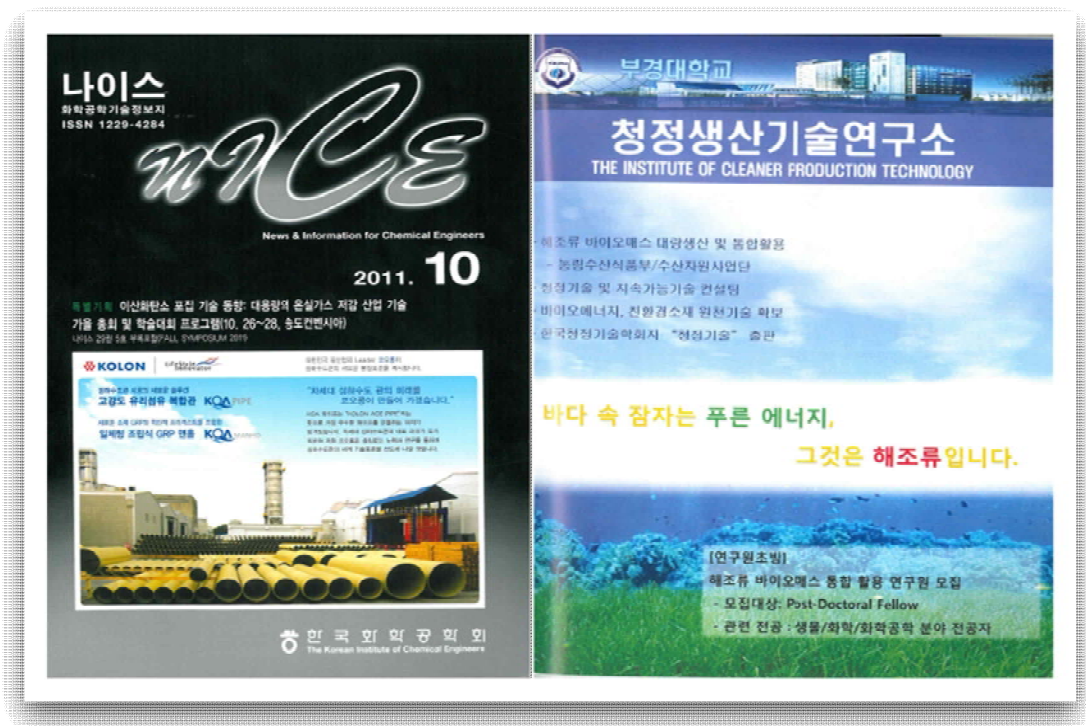


## 부록 E 홍보실적

□ 전문기술정보지 및 학회지 연구홍보

| 순번 | 내용                            | 발표일자           | 장소, 국가명 |
|----|-------------------------------|----------------|---------|
| 1  | NICE 한국화학공학기술정보지, 29(5), 2011 | 2011. 10. 1    | 서울, 한국  |
| 2  | 2011년 추계 한국청정기술학회 총회 및 학술 발표회 | 2011. 11. 25   | 전북대, 한국 |
| 3  | 2012년 제25회 촉매연구토론회            | 2012. 6. 25-27 | 안면도, 한국 |
| 4  | 완도 장보고 축제                     | 2012. 5. 4-6   | 완도, 한국  |

□ NICE 한국화학공학기술정보지 해조류 바이오매스 연구 홍보, 29(5), 2011(2011년 10월)



□ 2011년 추계 한국청정기술학회 총회 및 학술 발표회 해조류 바이오매스 연구 홍보 (2011년 11월 25일)

**KCT 한국청정기술학회**  
The Korean Society of Clean Technology

**2011년 추계  
한국청정기술학회 총회 및 학술 발표회**  
그린프로세스 녹색기술 GTNet 이수세미나  
바이오공정 부산물 고도이용 기술 심포지움

●일시 : 2011년 11월 24~25일  
●장소 : 전북대학교 공대 8호관(2-8건물)  
●주최 : 한국청정기술학회  
●후원 : 사익경제부

**한국청정기술학회**  
The Korean Society of Clean Technology

**부경대학교**  
**청정생산기술연구소**  
THE INSTITUTE OF CLEANER PRODUCTION TECHNOLOGY

- 해조류 바이오매스 대량생산 및 통합 활용
- 농업수산식품부/수산자원사업단
- 청정기술 및 지속가능기술 컨설팅
- 바이오에너지, 친환경소재 원천기술 확보
- 한국청정기술학회지 "청정기술" 출판

**바다 속 잠자는 푸른 에너지,  
그것은 해조류입니다.**

[연구원초빙]  
해조류 바이오매스 통합 활용 연구원 모집  
- 모집대상: Post-Doctoral Fellow  
- 관련 전공: 생물/화학/화학공학 분야 전공자

부산광역시 남구 용당로 선 100 부경(대연교) 용당캠퍼스 4공학관 204호 청정생산기술연구소  
Tel: 051.829.6436, Fax: 051.829.6428, http://myweb.pknu.ac.kr/cleantech

□ 2012년 제25회 촉매연구토론회 해조류 바이오매스 광고(2012년6월 25일~27일)

**부경대학교**

**바다 속 잠자는 푸른 에너지,  
그것은 해조류입니다.**

**청정생산기술연구소**  
The Institute of Cleaner Production Technology

- 해조류 바이오매스 대량생산 및 통합 활용
- 농업수산식품부/수산자원사업단
- 청정기술 및 지속가능기술 컨설팅
- 바이오에너지, 친환경소재 원천기술 확보
- 한국청정기술학회지 "청정기술" 출판

부산광역시 남구 용당로 선 100 부경(대연교) 용당캠퍼스 4공학관 204호 청정생산기술연구소  
Tel: 051.829.6436 / Fax: 051.829.6428 / http://myweb.pknu.ac.kr/cleantech

**제25회 촉매연구토론회**  
**· 에코이노베이션을 위한 촉매기술**

**2012. 6. 25 (월) - 6. 27 (수)**

- 장소 : 리솔루션캐슬
- 주최 : 한국화학공학회 촉매부문위원회
- 후원 : (주)화성촉매  
(주)솔렉트레이징  
한밭대학교 RIC  
부경대학교 청정생산기술연구소

**한국화학공학회촉매부문위원회**  
Division of Catalysis and Reaction Engineering  
The Korean Institute of Chemical Engineers

□ 2012년 완도 장보고 축제 참가(2012년 5월 4일~6일)







## 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.