BSPE15140-020-3

내한성 극지생물을 이용한 바이오에너지 생산 연구

Production of bioenergy using cold resistance polar organisms

2016. 2. 29

한 국 해 양 과 학 기 술 원
부 설 극 지 연 구 소

제 출 문

극지연구소장 귀하

본 보고서를 “내한성 극지생물을 이용한 바이오에너지 생산 연구” 과제의 최종보고서로 제출합니다.

2016. 02. 29

연 구 책 임 자 : 한 세 종

참 여 연 구 원 : 최 한 구

참 여 연 구 원 : 김 상 희

참 여 연 구 원 : 정 웅 식

참 여 연 구 원 : 김 은 재

참 여 연 구 원 : 김 민 주

KOPRI 극지연구소

보고서 초록

과제관리번호	PE15140	해당단계 연구기간	2013. 01. 01 ~ 2015. 12. 31	단계 구분	최종 (3년)
연구사업명	중 사 업 명	극지연구소 창의연구 사업			
	세부사업명	Seed형 선행과제			
연구과제명	중 과 제 명	내한성 극지생물을 이용한 바이오에너지 생산 연구			
	세부(단위)과제명	내한성 극지생물을 이용한 바이오에너지 생산 연구			
연구책임자	한세종	해당단계 참여연구원수	총 : 6 명 내부 : 3 명 외부 : 3 명	해당단계 연구비	정부: 200,000 천원 기업: 천원 계: 200,000 천원
연구기관명 및 소속부서명	극지연구소 극지생명과학연구부		참여기업명	해당 없음	
국제공동연구	상대국명 :		상대국연구기관명 :		
위 탁 연 구	연구기관명 :		연구책임자 :		
요약(연구결과를 중심으로 개조식 500자 이내)				보고서 면수	73

1. 극지유래 내한성 미생물의 탐색
   - 남극 세종과학기지 근처에서 채취하여 분리한 33종의 극지 미생물 균주의 성장속도를 비교하여 생산함
   - 내한성 극지 미생물 5종의 온도 및 배지 성분에 다른 성장 속도 측정함
   - 극지 미세조류 10종의 온도 별 성장 속도를 비교하여 바이오매스 확보용 균주로 *Chlamydomonas* sp. ArF0008을 선정함

2. 바이오매스 생산 및 지질 분석
   - ArF0008 균주의 온도, 광량, CO_2 영향 조사
   - 질소 (nitrogen)가 결핍된 BBM 배지에서 지질생성
   - 지질 추출하여 FAME (fatty acid methyl ester) 형태로 전환한 후 지방산 분석한 결과 바이오디젤의 원료로 사용가능한 C16~C18등을 확인
   - ArF0008의 FAME 생산량은 1g 건조 세포 중량 당 88-230 mg으로 분석됨

3. 바이오에탄올 생산
   - 지질 추출 후 남은 cell debris를 이용하여 에탄올 생산
   - 전처리 효율은 α-amylase 처리한 경우가 가장 높았음
   - 최대 에탄올 생산량은 28 mg/ g ArF0008 cell로 분석됨

색 인 어 (각 5개 이상)	한 글	극지, 내한성, 미세조류, 지질, 바이오에너지, 바이오에탄올
	영 어	Polar, Cold resistance, Microalgae, Lipid, Bioenergy, Bioethanol

KOPRI 극지연구소

요 약 문

Ⅰ. 제 목

내한성 극지생물을 이용한 바이오에너지 생산 연구

Ⅱ. 연구개발의 목적 및 필요성

화석연료를 기초원자재로 사용하면서 발생한 문제를 해결하기 위하여 친환경 대체에너지 생산 기술이 필요하다. 바이오에너지는 탄소순환이 가능한 대체에너지로 인식되어 많은 연구가 진행되었으나 극지생물을 기반으로 하는 연구는 아직 미진한 실정이다. 우리나라는 계절에 따른 기온차가 크고 특히 겨울철에 바이오에너지 생산이 어려워 내한성 생물의 바이오매스 생산 가능성을 연구할 필요가 있다. 극지생물 기반 청정바이오에너지 연구를 통해 신재생에너지 수요를 충족하고 궁극적으로 지구온난화 문제를 근본적으로 해결하는 방법을 제시할 수 있다.

KOPRI 극지연구소

Ⅲ. 연구개발의 내용 및 범위

내한성 극지 생물을 선정하기 위해 온도에 따른 성장속도와 최종 균체량을 비교하고 배지성분, CO_2 공급 농도 등에 따른 성장조건을 조사하였다. 선정된 미세조류를 배양하여 바이오매스를 얻고 지질을 추출하여 성분을 분석하였다. 지질을 얻고 남은 바이오매스를 전처리하여 발효 가능한 당질로 전환시킨 후 효모를 이용하여 바이오에탄올을 생산하였다.

Ⅳ. 연구개발결과

1. 극지유래 내한성 미생물의 탐색

남극 세종과학기지 근처에서 채취하여 분리한 33종의 극지 미생물 균주의 성장속도를 비교하여 이 중 5종을 선정하여 온도 및 배지 성분에 따른 성장 속도 측정하였다. *Kluyvera* sp. 의 경우 대장균에 비해 35℃에서 성장속도가 거의 같고 25℃이하에서는 2배 이상임을 확인하였다.

극지 미세조류 10종의 온도 별 성장 속도를 비교하여 바이오매스 확보용 균주로 *Chlamydomonas* sp. ArF0008을 선정하였다.

2. 바이오매스 생산 및 지질 분석

온도, 광량, CO_2 등이 ArF0008 균주의 성장에 미치는 영향을 조사한 결과 12-16℃, 100 μmol/m^2/s, 공기를 공급할 때가 최적의 조건으로 나타났다. 질소(nitrogen)가 결핍된 BBM 배지에서 지질생성을 유도하여 지질 고생산 균주로 알려진 *Botryococcus braunii*와 거의 유사한 정도로 지질을 함유하고 있다는 것을 밝혔다.

지질 추출하여 FAME (fatty acid methyl ester) 형태로 전환한 후 지방산 분석한 결과 바이오디젤의 원료로 사용가능한 C16, C18등을 생산함을 확인하였고, ArF0008의 FAME 생산량은 1g 건조 세포 중량 당 88-230 mg으로 분석되었다.

3. 바이오에탄올 생산

지질 추출 후 남은 ArF0008 cell debris를 이용하여 에탄올을 생산하였다. 우선 전처리 효율은 α-amylase 처리한 경우가 가장 높았고, *Saccharomyces cerevisiae*를 접종하여 24시간 배양 후 에탄올의 농도를 분석한 결과 최대 28 mg/ g ArF0008 cell로 분석되었다. 결론적으로 ArF0008의 건조세포 중량 중 25% 이상이 바이오에너지로 전환될 수 있음을 확인하였다.

KOPRI 극지연구소

V. 연구개발결과의 활용계획

극지 유래 미세조류로부터 바이오매스를 확보하는 기술은 극지유래 생물의 배양 및 다양한 바이오매스 전처리 공정에 활용가능하다. 극지 생물의 배양에서 최적의 배양 조건을 확보하는 기술은 광투과 및 물질 전달이 우수한 옥외 생물배양시스템의 개발로 식품, 의약 및 환경 산업에 응용될 수 있을 것으로 기대된다. 대체에너지 개발로 수행된 바이오에너지 생산연구는 다양하나 극지생물을 이용한 연구결과는 세계적으로 매우 드물다. 특히 우리나라 겨울철에 배양 가능한 미세조류를 이용한 바이오디젤 등의 생산은 사계절 모두 생산 가능한 시스템을 구축하는데 일조할 것으로 예상된다.

SUMMARY

Ⅰ. Title

Production of bioenergy using cold resistance polar organisms

Ⅱ. Purpose and Necessity of R&D

The eco-friendly alternative energy production technologies are needed to solve the problem with fossil fuel uses. Bioenergy is one of the renewable energies that can fast recycle the carbon. Even a lot of studies on the bio-energies are performed and progressed, the research on polar organisms is not active now. Korea has the four seasons, therefore there are particularly large temperature difference between summer and winter. Also, it is difficult to produce bioenergy in the winter. The microorganisms from polar regions can be the strongest candidate for bio-energy producer in cold winter season. This study suggests that the bioenergy from polar microorganism fulfill renewable energy need and fundamentally solve the problem of global warming.

Ⅲ. Contents and Extent of R&D

In order to select the cold resistance polar organism, the effects of temperature, medium components, light intensity, and CO_2 concentration on the growth rate and final cell density were investigated. The lipids were extracted and transformed to FAME (fatty acid methyl ester) and then analyzed by using GC. The residue biomass was pretreated to make the fermentable carbohydrates, and then used in producing bio-ethanol by yeast *Saccharomyces cerevisiae*.

Ⅳ. R&D Results

1. Selection of the cold-resistance polar microorganisms

The 33 species of polar microorganisms collected from the Antarctic King Sejong station were compared in growth rate at low temperature and the 5 species were selected as the fast growing microorganism. Especially, *Kluyvera* sp. showed almost equal growth rate at 35℃ and more than twice below 25℃ when compared with *E. coli*.

Chlamydomonas sp. ArF0008 was selected as the biomass producer among 10 microalgae from the Arctic and the Antarctic.

2. Biomass production and lipid analysis

The best conditions for the production of ArF0008 biomass was 12-16 ℃, 100 μmol/m^2/s, and air supply without additional CO_2. It was found that nitrogen deficient conditions induced lipid-producing of ArF0008 as much as *Botryococcus braunii*, known as high lipid producer.

We confirmed that ArF0008 produced C16 and C18 compounds can be used as raw materials for biodiesel, The FAME production of ArF0008 was 88-230 mg per 1 g of dry cell weight.

3. Bioethanol production

The residue of ArF0008 after extracting lipids was used for ethanol production. The efficiency of pretreatment was investigated and the α-amylase treatment showed the highest. *Saccharomyces cerevisiae* was inoculated and cultured in the pretreated samples for 24 h and then ethanol concentration was analyzed up to 28 mg/g ArF0008 cell. In conclusion, it was found that more than 25% of the dry cell weight of ArF0008 can be converted into bio-energy.

KOPRI 극지연구소

V. Application Plans of R&D Results

The biomass technology for the polar microalgae can be utilized in a variety of culture and biomass pretreatment process of the polar microorganisms. The optimal culture conditions for polar organisms can be applied to the food, pharmaceutical and environmental industry where the development of outdoor cultivating system with light transmission and excellent mass transfer is needed. In particular, the production of biodiesel using microalgae during cold winter season is expected to contribute to confirm availability of the production systems for four seasons.

CONTENTS

ABSTRACT ····· 2
SUMMARY ····· 5
CONTENTS ····· 7
List of Tables ····· 11
List of Figures ····· 12

Chapter 1. Introduction ····· 14
Section 1. Objective of this study ····· 14
Section 2. Necessity of this study ····· 15
1. Technical aspects ····· 15
2. Economic and industrial aspects ····· 16
3. Social and cultural aspects ····· 17

Chapter 2. Current R&D Status in Korea and Other Nations ····· 19
Section 1. Current R&D status in Korea ····· 19
Section 2. Current R&D status in other nations ····· 21
1. USA ····· 21
2. EU ····· 22
3. Japan ····· 23
4. China ····· 24
5. Brazil ····· 24

Chapter 3. R&D Implementation Contents and Results ····· 27
Section 1. Materials and Methods ····· 27
1. Collection of cold-resistance polar organisms ····· 27
2. Culture conditions for bacteria and microalgae ····· 28
3. Pre-treatment of biomass ····· 30
4. Analysis of lipid and bioethanol ····· 31

KOPRI 극지연구소

Section 2. Results ····· 32
1. Selection of the cold-resistance polar microorganisms ····· 32
2. Biomass production and lipid analysis ····· 41
3. Bioethanol production ····· 52

Chapter 4. Degree of R&D Goal Achievement and Degree of Contribution to Outside Research Institute ····· 57
Section 1. Degree of R&D goal achievement ····· 57
1. R&D goal and contents ····· 57
2. R&D achievement ····· 58
Section 2. Degree of contribution ····· 60
1. Technical aspects ····· 63
2. Economic and industrial aspects ····· 64

Chapter 5. Application Plans of R&D Results ····· 66

Chapter 6. Overseas Information ····· 67

Chapter 7. References ····· 71

KOPRI
극지연구소

목 차

초록 ····· 2
요약문 ····· 3
목차 ····· 9
표 목록 ····· 11
그림 목록 ····· 12

제 1 장 서론 ····· 14
제 1 절 연구개발의 목적 ····· 14
제 2 절 연구개발의 필요성 ····· 15
1. 기술적 측면 ····· 15
2. 경제·산업적 측면 ····· 16
3. 사회·문화적 측면 ····· 17

제 2 장 국내외 기술개발 현황 ····· 19
제 1 절 국내 연구동향 ····· 19
제 2 절 국외 연구동향 ····· 21
1. 미국 ····· 21
2. 유럽연합 ····· 22
3. 일본 ····· 23
4. 중국 ····· 24
5. 브라질 ····· 24

제 3 장 연구개발수행 내용 및 결과 ····· 27
제 1 절 연구개발 방법 ····· 27
1. 내한성 극지생물의 수집 ····· 27
2. 극지 박테리아 및 미세조류의 배양 ····· 28
3. 극지 바이오매스의 전처리 ····· 30
4. 지방산 및 바이오에탄올 분석 ····· 31

KOPRI 극지연구소

제 2 절 연구개발 결과 ····· 32
1. 극지유래 내한성 미생물의 탐색 ····· 32
2. 바이오매스 생산 및 지질 분석 ····· 41
3. 바이오에탄올 생산 ····· 52

제 4장 연구개발목표 달성도 및 대외기여도 ····· 57
제 1 절 연구목표 달성도 ····· 57
1. 연구목표 및 연구내용 ····· 57
2. 연구개발 성과 ····· 58
제 2 절 연구개발에 따른 대외기여도 ····· 60
1. 기술적 측면 ····· 63
2. 경제·산업적 측면 ····· 64

제 5 장 연구개발결과의 활용계획 ····· 66

제 6 장 연구개발과정에서 수집한 해외과학기술정보 ····· 67

제 7 장 참고문헌 ····· 71

KOPRI
극지연구소

표 목록 (List of Tables)

Table 1-1. OECD와 우리나라의 신재생에너지원별 비교 ····· 17
Table 2-1. 국내 기업별 바이오에너지 개발 주요 현황 ····· 20
Table 2-2. 국내 바이오에너지 산업경쟁력 ····· 21
Table 2-3. 바이오에너지 관련 국내외 연구 현황 요약 ····· 25
Table 3-1. 내한성 극지생물 확보에 사용한 배지조성 ····· 28
Table 3-2. 극지 박테리아 배양에 사용한 배지의 조성 ····· 29
Table 3-3. 극지 미세조류 배양에 사용한 배지의 조성 ····· 30
Table 3-4. 본 연구에서 사용한 극지 박테리아 ····· 33
Table 3-5. 저온에서 성장이 빠른 5종의 균주와 대장균 ····· 34
Table 3-6. 클라미도모나스 ArF0008의 주요 지질 구성 성분 추정 ····· 50
Table 4-1. 본 연구개발의 최종목표 ····· 57
Table 4-2. 연차별 연구개발 목표 및 내용 ····· 58
Table 4-3. 본 연구개발의 정성적 성과 ····· 59
Table 4-4. 본 연구개발의 정량적 목표 및 성과 ····· 60
Table 4-5. 본 연구결과의 대외적 기여도 수준 비교 ····· 63
Table 6-1. 해외 민간기업의 바이오연료 개발 현황 ····· 68

KOPRI 극지연구소

그림 목록 (List of Figures)

Fig. 1-1. 석유기반 화학산업과 바이오 화학산업에서의 탄소순환 ····· 16
Fig. 1-2. 본 연구과제의 사회·문화적 필요성 ····· 18
Fig. 2-1. 전 세계 바이오디젤의 생산량 ····· 23
Fig. 2-2. 주요국의 바이오에탄올 생산 현황 ····· 25
Fig. 3-1. 내한성 극지생물시료 채취지역 ····· 27
Fig. 3-2. 지질 추출 후 바이오에탄올 생산을 위한 전처리 방법 ····· 31
Fig. 3-3. 온도에 따른 극지유래 박테리아의 성장속도 비교 ····· 34
Fig. 3-4. R2A 배지에서 극지유래 박테리아 5종과 대장균의 온도별 성장 비교 ····· 35
Fig. 3-5. LB 배지에서 극지유래 박테리아 5종과 대장균의 온도별 성장 비교 ····· 35
Fig. 3-6. M9 배지에서 극지유래 박테리아 5종과 대장균의 온도별 성장 비교 ····· 36
Fig. 3-7. 온도에 따른 *Kluyvera* sp.와 대장균의 비성장속도 ····· 37
Fig. 3-8. CO_2 농도조절이 가능한 배양 시스템 ····· 38
Fig. 3-9. CO_2 공급에 따른 *Kluyvera* sp. 성장 ····· 38
Fig. 3-10. 배양온도에 따른 극지 미세조류의 성장속도 ····· 39
Fig. 3-11. 극지 미세조류의 성장량 비교 ····· 40
Fig. 3-12. 극지 미세조류의 건조 중량 비교 ····· 40
Fig. 3-13. ArF0008 SSU rDNA 서열목록 ····· 43
Fig. 3-14. ArF0008의 계통도 ····· 44
Fig. 3-15. ArF0008 균주의 온도에 따른 성장 속도 비교 ····· 45
Fig. 3-16. 미세조류 배양 장치 ····· 45
Fig. 3-17. 광량 및 CO_2가 ArF0008의 성장이 미치는 영향 ····· 46
Fig. 3-18. ArF0008의 흡광도와 건조중량의 상관관계 ····· 46
Fig. 3-19. ArF0008의 세포내 지질 함량 분석 ····· 47
Fig. 3-20. 질소결핍 조건에서 ArF0008에 의한 지질 함량 분석 ····· 48
Fig. 3-21. 지방산 분석을 위한 전처리 과정 ····· 49
Fig. 3-22. 가스 크로마토그래피에 의한 ArF0008의 지방산 생산 프로파일 분석 ····· 50
Fig. 3-23. 질소결핍 조건 적용 시기에 따른 ArF0008의 세포 당 지질 생산량 비교 ·· 51
Fig. 3-24. 질소결핍 조건 적용 시기에 따른 단위 부피 당 지질 생산량 비교 ····· 52
Fig. 3-25. 전처리 조건에 따른 포도당 생산량 비교 ····· 53
Fig. 3-26. 전처리 조건에 따른 에탄올 생산량 비교 ····· 54

KOPRI 극지연구소

Fig. 3-27. ArF0008의 바이오에너지 구성 비율 ····· 55
Fig. 3-28. BBM 배지에서 미세조류의 지질 생산성 비교 ····· 56
Fig. 4-1. 극지 미세조류 기반 바이오에너지 생산의 개념도 ····· 61
Fig. 4-2. 주요 에너지 자원별 특징 비교 ····· 64

KOPRI
극지연구소

제 1 장 서론

제 1 절 연구개발의 목적

산업혁명 이후 인류는 석유화학 시대에 물질적 풍요를 누리고 있지만 그 피해도 함께 떠안고 있다. 전 세계적으로 석유, 석탄, 천연가스 등 화석에너지를 과다하게 사용하고 있다. 우리나라 총 에너지 소비량 170,854,000 TOE 중 석유 96,891,000 TOE, 석탄 22,659,000 TOE로 광물에너지 사용량이 전체 에너지 사용량의 약 70%를 차지하고 있다 (Hong and Choi, 2007). 광물에너지 사용에 따른 CO_2 배출 및 온실효과, 광학스모그, 오존층파괴, 토양 및 환경오염의 문제와 함께 매장량이 한계에 도달했다는 문제가 제기되고 있다. 또한 원자력 발전을 포함하여 약 97%의 에너지를 수입에 의존하고 있는 우리나라의 경우, 유가 불안정, 기후변화협약의 규제 등으로 국가적 에너지 위기 문제에 적극적으로 대비할 필요가 있다. 따라서 태양에너지, 풍력, 바이오에너지 등 친환경적이며 지속적으로 사용 가능한 대체 에너지 개발이 필요하다. 이 중 바이오매스를 원료로 사용하는 바이오에너지는 광물에너지에 비해 환경오염을 유발하는 물질을 적게 배출하고, 태양력 및 풍력에 비해 부산물을 얻을 수 있는 장점이 있어 주요한 대체에너지로 각광 받고 있다 (Hong and Choi, 2007).

극지연구소는 2006년부터 5년간 주요사업인 '극지 생물 재현 및 활용 기반 구축' 과제를 수행하면서 남극과 북극에서 미세조류를 채집하여 순수 분리한 210개 이상의 균주를 극지저온배양실에서 계대배양하고 있고, 한국생명공학연구원 및 충남대학교의 공동연구로 '북극 해양에서 분리한 지질 고생산 미세조류 클라미도모나스 세포주'란 특허를 출원, 등록하였다 (출원번호: 10-2010-0109292, 등록번호: 10-1351281). 극지연구소의 중기전략계획 및 경영목표에서 "실용 가능한 극지 응용기술 기반 구축"을 주요 연구 사업으로 설정하고 바이오신소재, 동결보존 시스템을 개발 중이나 아직 바이오에너지에 대한 본격적인 연구는 수행되지 않고 있는 실정으로 본 연구는 극지생물자원 활용기술의 기반 마련을 목표의 하나로 하고 있다. 기후변화와 환경오염 등 글로벌 환경변화에 따른 문제의 해결을 위해 극지 중요성이 증대되고 있으며 에너지 수요 증가에 따른 차세대 친환경 에너지 및 재생에너지에 대한 관심 증대로 극지연구소의 기능이 부각되고 있다. 연구의 목표는 지구 온난화와 기후협약 등에 대비하기 위하여 화석연료의 사용 비중을 절감할 **바이오에**

너지의 경제적인 생산방법에 관한 기초자료를 확보하는 것으로 구체적으로 **내한성 극지유래 생물**을 이용한 효율적인 에너지 전환방법을 탐색하고 관련기술을 확보하는 것이다.

제 2 절 연구개발의 필요성

1. 기술적 측면

화석연료를 기초원자재로 사용하는 석유화학시대 (Petrochemical era)는 고유가와 화석연료의 고갈에 따라 점차 쇠퇴의 길을 가고 있으며 대체에너지 생산기술의 개발이 필요하다. 산업화 과정에서 배출되는 온실가스에 의한 지구온난화 가속으로 국제사회에서는 CO_2 배출규제를 강화하고 있으며 이에 대응하는 친환경 에너지 연구가 필요하다. 화학산업도 지속가능 (sustainable)한 구조로의 변모가 필요하며, 그 해결책으로 화석연료가 아닌 환경 친화적인 생물자원을 원자재로 사용하는 기술의 개발이 필요한 실정이다.

바이오에너지는 바이오매스를 원료로 직접 또는 생화학적, 물리적 변환과정을 통해 만든 에너지를 뜻하며 동, 식물과 그로부터 파생된 모든 물질을 바이오매스로 지칭한다 (Lee and Park, 2011). 바이오에너지는 탄소순환이 가능한 대체에너지 (Fig. 1-1)로 인식되어 많은 연구가 진행되었으나 극지생물을 기반으로 하는 바이오에너지 연구는 아직 미진한 실정이므로 이 분야 기초 기술의 개발이 시급하다.

KOPRI 극지연구소

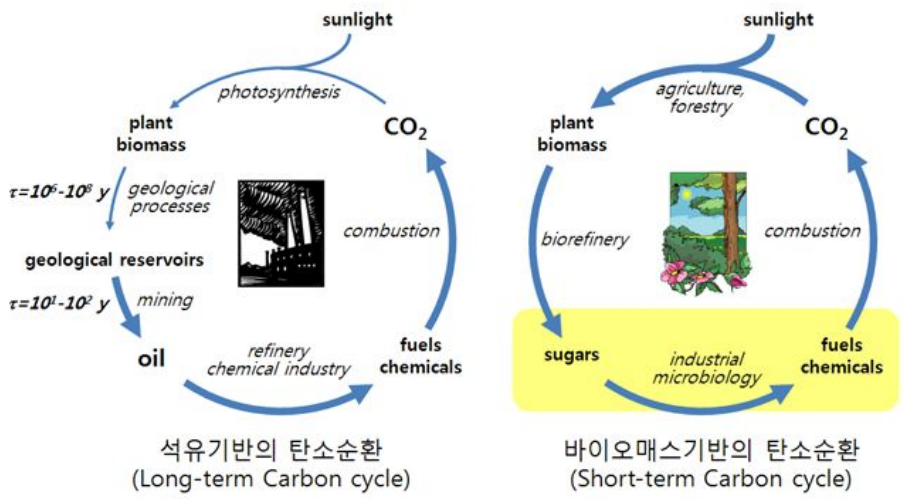

Fig. 1-1. 석유기반 화학산업과 바이오 화학산업에서의 탄소순환 (Seo, 2011)

바이오에너지 생산을 위해서는 바이오매스의 확보, 바이오에너지로의 전환, 바이오에너지의 분리 기술을 개발해야 하며 각 단계를 통합하는 융합기술의 연구가 추진될 시점에 있다. 극지의 생물은 에너지를 효율적으로 관리하고 사용하는 시스템을 가질 가능성이 높으므로 이를 이용한 핵심융합기술이 확보될 수 있다. 우리나라는 계절에 따른 기온차가 커 특히 겨울철 바이오에너지 생산에 불리하므로 내한성 생물을 이용한 바이오매스의 생산 가능성도 연구되어야 한다.

2. 경제·산업적 측면

지구 온난화 현상과 관련된 환경 문제들이 크게 이슈화 되고 있는 가운데 언젠가는 고갈될 화석연료를 대체하기 위한 다음 세대 에너지에 대한 연구가 활발히 이루어지고 있고, 세계 경제의 불안도 높아져가고 있어 바이오에너지 등 신재생에너지에 대한 수요와 관심이 증가하고 있다. 우리나라의 경우 현재 이산화탄소 배출량이 세계 9위이고 그 증가율은 세계 2위에 달할 만큼 심각한 수준에 도달해 있어 이러한 상황 배경 하에 지난 정부에서 “저탄소 녹색성장”이 국가의 차세대 신 성장 동력으로 공표된 바 있다. 바이오연료의 보급시장은 2030년까지 연평균 6.3%로 성장 전망되나, 최근 원유값이 하락하고 있어 바이오에너지 전망을 크게 밝지 않은 상황

이다. 비록 연구 동력이 크게 저하되었으나 머지않아 경쟁력있는 바이오에너지 생산 연구가 필요할 것으로 예측된다.

우리나라의 에너지 수입의존도는 97%에 달하여 (한국 석유공사) 현실적으로 자원개발보다는 신재생에너지의 개발을 통한 에너지 자급률을 높이는 방안이 필요하다. 신재생에너지의 비중은 2.3%로 OECD 평균보다 4.4% 낮으며 이중 바이오에너지의 비율은 6.6%에 불과하여 바이오에너지의 비중을 OECD 수준인 50%정도로 높일 필요가 있다 (Table 1-1).

Table 1-1. OECD와 우리나라의 신재생에너지원별 비교 (Lee, 2009)

종류	OECD		우리나라	
	공급량 (백만toe)	비중(%)	공급량 (천toe)	비중(%)
태양열(광)	3.9	1.0	44	0.8
풍력	12.7	3.4	81	1.4
수력	108.5	29.0	781	13.9
지열	31.8	8.5	11	0.2
바이오	187.2	50.0	370	6.6
폐기물	30.5	8.1	4,319	77.0
계	374.7	100	5,607	100

KOPRI 극지연구소

현재 사용 중인 수송용 바이오연료 곡물 원료는 곧 한계에 도달할 것으로 예측되므로 비식용원료로부터 바이오연료 생산기술 확보가 필요하다.

3. 사회·문화적 측면

바이오에너지는 탄소순환을 원활하게 하므로 화석연료 사용에 의한 지구온난화 문제의 근본적인 해결방법을 제시할 수 있다. 화석연료의 사용으로 인한 대기오염, 수질 및 환경오염을 일정부분 해소할 것으로 기대되며 청정에너지라는 인식으로 사회적인 지지를 받을 수 있다. UN 세계인구 전망에 의하면 세계 인구는 2030년 약 81억 명이며 환경과 에너지자원 문제가 심화될 것으로 예상된다. 본 연구개발에서 목표로 하는 기술은 친환경에너지 개발에 직접 이용 가능한 한편, 부산물을 다방면

에 사용할 수 있는 등 건강하고 행복한 사회를 만드는데 일익을 담당할 것으로 기대된다. 바이오에너지는 에너지 안보, 국제적 환경 규제 강화 등에 힘입어 국제 상품시장으로 지속적으로 발전할 것으로 전망된다. 바이오에너지를 토지 및 식량 자원으로부터 생산할 경우 곡물가격의 상승에 따른 애그플레이션 (Agflation)의 위험이 상존할 것으로 예상되나 본 기술의 경우 극지생물을 이용하므로 이에 대한 우려가 없어 극지생물 기반 청정바이오에너지에 대한 사회·문화적적인 지지와 활성화가 기대된다.

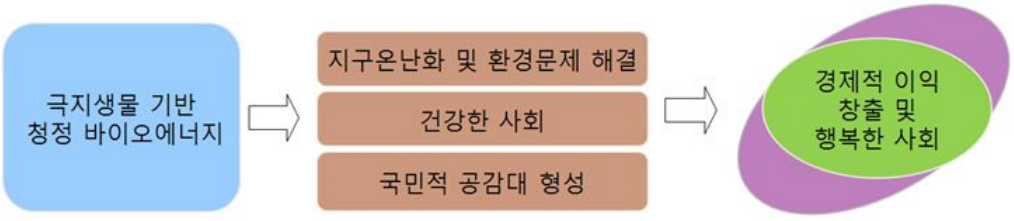

Fig. 1-2. 본 연구과제의 사회・문화적 필요성

KOPRI
극지연구소

제 2 장 국내외 기술개발 현황

제 1 절 국내 연구동향

바이오에탄올은 창해에탄올 등에서 생산을 추진하고 있으며, SK케미컬, 코오롱건설에서 바이오디젤을 생산 중인 것으로 알려졌다. 우리나라의 기술수준은 선진국 대비 수송용 바이오연료 부분에서는 43-74%, 목질계 에너지부분은 41%, 유기성폐자원 에너지는 68%로 나타났다. 바이오에너지 부분은 원료가격이 최종 제품 가격에서 50% 이상을 차지하고 있는 실정이므로 전분 및 목질계 에탄올 생산 기술 개발에 치중하고, 파일로트 플랜트 운전 및 기술개발 축적이 필요하다. 목질계 바이오매스의 당화 최적 효소, 형질전환을 통한 고효율 효소 개발 및 대량 생산 및 동시당화발효 (SSF)를 기반으로 한 분자생물학적 접근과 물리, 화학, 생물학적 방법을 이용한 리그닌 바이오매스의 전처리 기술을 개발하고 있다.

서울대학교 농생명공학부 서진호 교수 연구팀은 섬유소 바이오매스로부터 포도당과 자일로스 동시 발효공정 구현에 성공하였다 (Ha et al, 2011). 한국화학연구원은 베트남에 식물유와 지방유에서 고체촉매를 적용해 바이오디젤을 만들어내는 연간 200톤 규모의 플랜트를 설치하였다. 한국화학연구원이 총괄하고 바이오연료 플랜트 제조기업인 SMPOT, 한경대학교와 베트남 화학기술연구소 (VIIC)가 참여하고 있다. ㈜창해에탄올과 ㈜한택엔지니어링은 각각 바이오에탄올 생산을 위한 파푸아뉴기니 농장 개발하고, 막분리 기술을 이용한 고속의 바이오에탄올 발효기술 및 에너지를 절감형 바이오에탄올 농축기술을 개발하고 있다. 삼성물산은 인도네시아에 대규모 팜 농장 (서울시 40% 면적)을 인수하고 바이오디젤 사업에 본격 진출하는 한편, 아테나 홀딩스와 합작법인을 설립, 5,500만 달러를 투자하고, 브라질 국영 에너지기업인 페트로브라스와 바이오에탄올 사업협력을 위한 양해각서 (MOU)를 체결하였다. SK케미칼은 중국 현지법인을 설립하고, 자트로파 재배사업을 시작하였으며 국내 생산업체 등록을 마치고 바이오디젤 생산과 공급을 시행하는 한편, SK에너지와 에쓰오일에 바이오디젤을 제공하고 있다. GS칼텍스는 바이오부탄올 생산 균주 개발하는 등 가시적인 성과를 거두고 있다. 바이올시스템즈(주)는 연간 120만 리터의 해조류 바이오에탄올을 생산하기 위해 전남 고흥에 파일럿 플랜트를 구축 중인 것으로 알려졌다 (Table 2-1).

Table 2-1. 국내 기업별 바이오에너지 개발 주요 현황

분야		기업명	주요 기술개발 및 사업화 활동
바이오 알콜	바이오 에탄올	창해에탄올	- 2006년 국내 최대 규모의 바이오에탄올 증류, 탈수 설비를 독자 개발 - 바이오 연료물질 및 바이오 화학물질 제조방법으로 미국, 중국, 브라질, 인도네시아, 태국 등 해외 5개국 특허 출원
		바이올시스템즈	- 홍조류에서 바이오에탄올을 만드는 실증 공장을 세계 최초로 준공
		퓨넥스	- 경기 평택시 포승공단에 바이오에탄올 연료유 생산 및 저장 공장 완공
	바이오 부탄올	GS칼텍스	- 2007년 바이오연료 개발을 위한 연구를 시작한 이래 바이오부탄올 상업화에 매진
		SK이노베이션	- 바이오부탄올을 중심으로 한 2세대 바이오연료 생산기술 개발에 주력
바이오디젤		SK케미칼	- 국내 최대 바이오디젤 생산 기업 (생산능력 연간 12만 톤)
		단석산업	- 연간 8만톤 생산하며 최하급 폐식용유를 바이오디젤 원료인 정제유로 변환하는 정제설비 (연산 6만 톤)을 건설 중
		애경유화	- 바이오디젤 상업화에 이어 바이오디젤 부산물로 발생하는 비정제 글리세린을 활용하여 공업용/식품용 정제 글리세린을 연간 1만 톤 제조하는 시설 완공
		M에너지	- 비균질 복합고체촉매를 이용한 차세대 바이오디젤 생산기술 개발

국내 연구개발 실적 중 폐수처리를 위한 biofuel cell 기술이 대표적이며 국내의 관련 논문은 바이오디젤과 바이오에탄올을 중심으로 미생물연료전지 분야에서도 개발실적 있다 (Roh et al, 2012). Table 2-2은 국내 바이오에너지의 산업경쟁력을 분석한 자료이다.

Table 2-2. 국내 바이오에너지 산업경쟁력

주요제품・서비스군	가격경쟁력	국산화율(%)	기술확보 여부
연료용 바이오 알코올 (에탄올, 부탄올 등)	동등 (비슷)	40%	×
바이오 디젤	동등 (비슷)	70%	×
바이오 탄화수소 및 고형연료	동등 (비슷)	60%	×
바이오 가스 (메탄, 수소)	높음	80%	×
종합경쟁력	중간	59.3%	

제 2 절 국외 연구동향

세계 바이오연료 총생산량은 연간 약 620억 리터로 석유환산단위 (Ton of Oil Equivalent)로 계산하면 35,000 KTOE이며, 이 중 바이오에탄올이 전체의 80%이상을 차지한다. 바이오에탄올은 미국과 브라질의 생산비중이 전체 80% 이상을, 바이오디젤은 EU의 생산비중이 전체의 약 60% 이상을 차지한다. 미국, EU, 일본 등 주요 선진국은 현재 식용 바이오매스를 원료로 사용하는 1세대 바이오연료의 원료 수급 불안정성 문제를 해결하기 위해서 목질계 바이오매스를 원료로 하는 2세대 및 미세조류, 수소를 적용하는 3세대 바이오연료 생산기술 개발 연구를 수행 중에 있다.

1. 미국

2007년 2300만 kL 바이오에너지를 2017년까지 127백만 kL로 (이중 10%는 목질계) 가솔린 소비를 15% 감축을 추진하였다 (Renewable fuel standard, 2007. 1. 23). ‘수소, 연료전지, 바이오에너지 강국 건설’ 선언하고 관련 기술개발에 5년간 17억불을 투자하고 있다. 수소경제 국제 파트너십 (IPHE) 등 세계 주도권 선점하고 있으며 수송용 바이오에너지 생산량이 7배 증가했다. 2025년 가솔린소비량의 25%를 바이오에탄올로 전환 (바이오에탄올 목표생산량 2012: 120억, 2015: 150억, 2025: 350

억 갤런)할 예정이다 (Kim, 2008). Aventine Renewable Energy Holding Inc.에서 연간 20억 리터 바이오에탄올 생산하고 있다. 바이오에탄올의 원료 중 목질계를 제외하고 당질계 또는 전분질계는 식량문제나 가격의 문제를 야기할 수 있기 때문에 다른 바이오매스에 비해 훨씬 생장성이 우수한 해양의 해조류 (홍조류)를 바이오연료로 생산하는 기술개발을 하고 있다.

2. 유럽연합

2020년까지 에너지소비량의 20%를 줄이고자 '20% Energy Savings by 2020'을 슬로건으로 걸고 구체적 계획 작성하였고, 총에너지 소비의 12%, 총발전량의 22%를 바이오에너지로 공급하는 것을 목표로 하고 있다. R&D지원으로는 전략적 에너지기술 계획, 프레임워크 프로그램, 인텔리전트 에너지 유럽 프로그램이 시행 중이다. 영국은 '환경 친화적 에너지정책 비전'을 발표하고 약 180억 달러를 투자하고 있으며 독일은 바이오디젤을 수송용 에너지의 5.75% 대체, 일반차량 5% 혼합, BMW, VW 등에서 개조차량 100% 가능하도록 BTL, bioDME 등 디젤 적용시도 중이다. 유럽에서 사용하는 바이오연료는 바이오에탄올이나 바이오디젤이나 5%까지 혼합될 수 있으며, 최근 대부분 승용차는 이 혼합연료를 사용할 수 있고 PSA가 출시할 디젤모델들은 30% 바이오디젤 연료사용 가능하다. 유럽연합에서는 바이오연료 보급 확산을 위해 혼합 경유 과세경감조치 및 에너지 작물 재배에 대한 국가보조프로그램을 운영하고 있다. 유채, 폐식용유, 목질계 바이오매스를 활용한 바이오디젤 및 바이오 가스 생산이 활성화되어 있으며 특히 바이오디젤은 전세계 공급량의 41%를 점유하고 있다 (Jeon and Han, 2014).

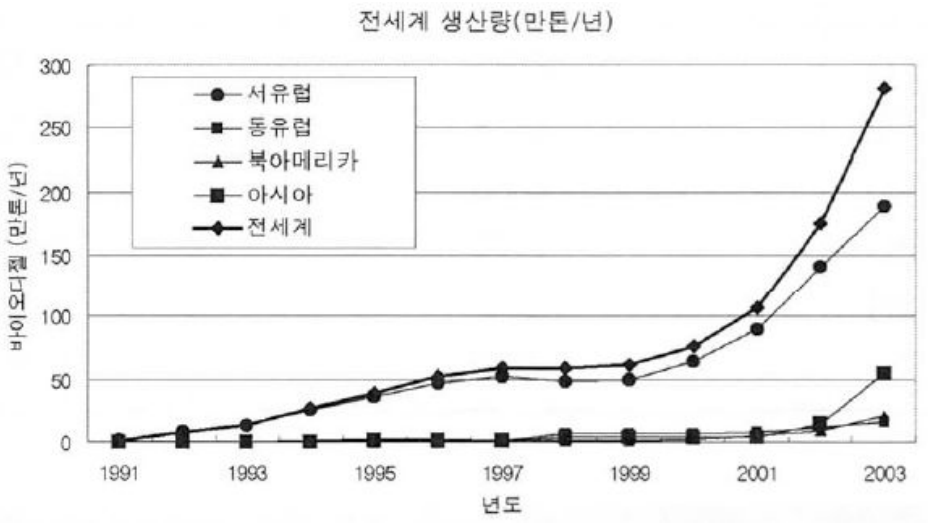

Fig. 2-1. 전 세계 바이오 디젤의 생산량 (Lee, 2014)

3. 일본

2013년 E3 전면도입 (환경성)으로 모든 가솔린에 3% 투입하는 것으로 알려졌으며 자국 농업 적용 가능성을 평가하고 있다. 바이오연료 정책은 전국을 지역단위로 나눠 각 지역에서 바이오매스 수집에서부터 바이오연료 생산, 사용에 이르기까지 모든 단계를 유기적으로 하는 '바이오매스 타운' 설립하였다. 일본신에너지, 산업기술종합개발기구 (NEDO), 과학기술진흥기구 (JST) 등의 지원 하에 혁신적인 차세대 연료 개발 및 바이오에너지 상용화 연구를 추진 중으로, NEDO는 2014년 바이오매스에너지기술개발 및 바이오매스 에너지의 지역자립시스템화 실증사업 과제를 지원하고 있다 (Jeon and Han, 2014). JST는 첨단 탄소화 기술개발사업 등을 통해 바이오매스의 비약적인 증산, 이산화탄소로부터 직접 에너지 및 물질 생산이 가능한 기술기반 확립, 미생물을 활용한 고효율 에너지 생산 등의 연구 과제를 지원하고 있다. 특히, 바이오 연료 분야를 크게 미세조류 유래의 연료제조기술개발과 셀룰로오스계 연료제조기술개발로 나누고 있으며, 실용화 기술개발 대상으로서 셀룰로오스계 연료 생산 시스템을 제시하였다.

4. 중국

2020년까지 바이오에탄올 등으로 석유 대체에너지 비중을 15%까지 높인다는 계획 하에 국가발전개혁위원회 (NDRC)는 바이오에너지 분야에 대해 13억불 규모의 정부지원 방침을 발표하였다. 국영석유사인 "Petro China"는 바이오에탄올 원료인 곡물가격 급등에 대비, 우드칩·볏짚 등을 사용한 제 2세대 바이오 연료를 제조 기술 개발에 주력해 2010년부터 연간 20만 톤의 바이오 연료를 생산하고 있다. 재생에너지 이용을 촉진하기 위하여 재생에너지법을 제정하였고 광활한 경작지 및 다양한 기후대로 인하여 바이오매스 생산량 및 다양성에서 우위에 있다. 국가 에너지 수급 안정성 및 환경개선, 농촌 발전에 바이오에너지의 중요성을 인식하고 바이오매스 에너지 개발을 위한 중장기 발전계획과 구체적인 생산량 목표를 수립하였는데 2020년 1000만 톤을 목표로 하고 있다 (Jeon and Han, 2014).

KOPRI
극지연구소

5. 브라질

원료의 가격이 낮아 이미 생산된 수송용 바이오연료의 가격 경쟁력이 석유를 능가하고 있으며 바이오에탄올 산업을 국가차원에서 육성하며 중장기계획 'ProAlcohol' 수립하였다. 가솔린 차량은 20~25%의 바이오에탄올 혼합사용을 의무화 했으며 바이오에탄올 생산을 위한 공장은 400여개에 달한다. 에탄올의 높은 잠재력으로 국제상품시장 형성에 대한 점증하는 기대감으로 21세기 들어 외국기업들의 브라질 진출이 쇄도하였다. 브라질의 바이오에탄올 생산 능력은 2010년 1일 48만 6천 배럴로 86만 7천 배럴인 미국에 이어 세계 2위를 차지하고 있다 (Fig. 2-1). 브라질의 에탄올 수출은 세계 1위로 2000년대 들어 지속적인 증가세를 보이고 있으며 미국은 에탄올을 수입하고 있다 (Yoon and Shim, 2012).

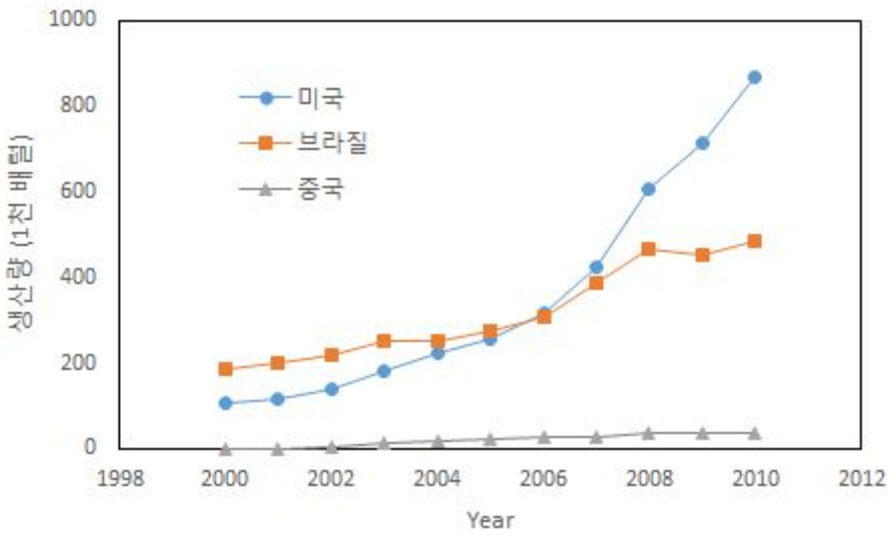

Fig. 2-2. 주요국의 바이오에탄올 생산 현황

아래 Table 2-3은 국내외 연구 현황에 대한 요약 자료이다.

KOPRI 극지연구소

Table 2-3. 바이오에너지 관련 국내외 연구 현황 요약

연구수행 기관	연구개발의 내용	연구개발성과의 활용현황
미국 BESC (BioEnergy Science Center)	바이오매스 형성, 변형, 분해와 전환	식물세포벽 생합성 특징 이해 및 바이오매스 전환을 위한 생물학적 촉매의 개발
ERRMA (European Renewable Raw Materials Association)	영국-프랑스-독일-이탈리아의 바이오매스 공동연구기관	식물성 oil의 화학적, 공업적 활용 polyglycol의 경비절감 연구
New Mexico State Univ. (Pete Lammers)	광합성미세조류	광합성 미세조류 *Nannochloropsis salina*의 성장속도 향상
미국 듀폰, 영국 BP	부탄올 생산 공정	부탄올 내성 및 생산성이 우수한 균주 개발, 부탄올 분리/정제 기술 개발
유타 주립대 (Jeff Moody)	옥외 미세조류 배양시설로부터 바이오연료 생산	연간 1Acre에서 생산되는 연료량이 9,464리터로 옥수수의 182, 대두의 68리터에 비해 압도적으로 높은 수치를 보임
IHI NeoG Algae 합작회사	미세조류 대량 배양	$100m^2$에 걸쳐 안정적으로 배양 성공, $1000m^2$ 규모 양산화 프로세스 개선

KAIST (이상엽)	바이오가솔린	대장균에서 직접 가솔린을 생산하는 원천기술을 세계 최초로 개발, 휘발유 구성 성분을 0.58 g/L 수준으로 생산하였음
KAIST (장용근)	차세대 바이오매스 연구사업	미세조류 고농도 배양을 위한 내부광원/분사판 일체형 광생물반응기 개발
인하대 (이철균)	극지미세조류 in silico 모델의 GTPMR-Association을 이용한 고유동성 지질생합성 분석과 응용방법 개발	in silico 모델의 구축 해양극지미세조류의 대사 재설계 모델 검증 및 분석
가천대학교 (이후근)	단백체학과 시스템 생물학을 이용한 해양극지미세조류의 지질합성 연구	극지미세조류의 단백질 데이터베이스 구축 지질생합성 조절 단백질의 발굴 및 신호전달기전 규명
한국생명공학연구원 (정원중)	북극해양에서 분리한 지질 고생산 미세조류 활용 기술 개발	에이스하이텍(주)에 기술이전 2억원 (경상실시료: 순이익의 15%)
경북대학교 (윤호성)	남조류 셀룰로오스 합성 조절 및 고효율 발효 유전자를 이용한 바이오에탄올 대량 생산	셀룰로오즈의 고효율 고저항성 발효균주 도입 및 에탄올 생산 응용연구
중앙대 (최형균)	지질대사체학과 시스템생물학적 접근에 의한 해양극지미세조류의 지질 생합성 연구	극지미세조류의 metabolome 분석 지질생합성 경로 규명 바이오에너지자원으로서의 효율성 평가
건국대 (조재순)	기능적 사료첨가제 생산을 위한 신규 남극세균 유래 α-galactosidase의 고정화	극지토양으로부터 신규 α-galactosidase 분리 생화학적 특성 분석
한국에너지기술연구원	이산화탄소 저감 바이오에너지	화력발전소의 이산화탄소와 공장의 폐수를 활용한 미세조류 바이오연료 개발 중
한국생산기술연구원	해조류 바이오 에탄올	국내특허, 세계특허
한국해양연구원	해조류 바이오에탄올	구멍갈파래이용 바이오에탄올 생산, 제주도에 시험기지 건설 추진
한국화학연구원	바이오디젤	베트남 식물유와 지방유에서 고체촉매를 이용한 200톤급 플랜트 설치
농촌진흥청	60-80만 리터의 바이오에탄올 생산 가능	억새 '거대1호"를 148ha 단지에서 수확하여 한 해 3-4천톤 공급 가능
KRIBB (손정훈)	비식용 바이오매스를 이용한 D-lactic acid 생산기술	원료 유연형 복합당질 활용 효모개발 효모 기반 대사공학 기술 적용 내산성 효모 신균주 스크리닝 저가 원료 기반 저비용 공정 개발

제 3 장 연구개발 수행 내용 및 결과

제 1 절 연구개발 방법

1. 내한성 극지생물의 수집

내한성 박테리아는 2010년 12월부터 2011년 12월까지 남극세종과학기지 주변의 해수, 토양, 지의류 등의 시료에서 얻었다 (Fig. 3-1). 시료는 증류수에 현탁하여 적당한 비율로 희석한 후 각종 고체 배지 (Table 3-1)에 도말하여 15℃에서 배양한 후 형성된 colony를 획득하여 보존하였다.

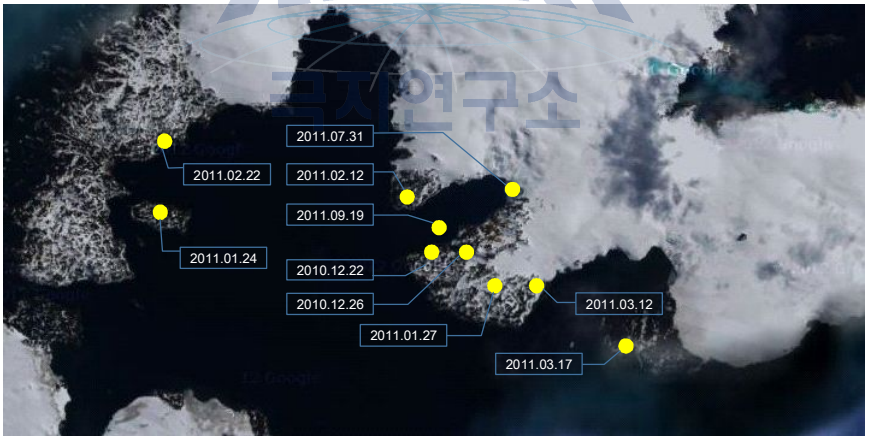

Fig. 3-1. 내한성 극지생물시료 채취지역

Table 3-1. 내한성 극지생물 확보에 사용한 배지조성

Medium	GYE	TSB	L&V
Composition	Yeast extract 10 g/L, Glucose 10 g/L, Agar 15 g/L	Tryptone 17 g/L, Phytone 3 g/L, NaCl 5 g/L, K_2HPO_4 2.5 g/L, Glucose 2.5 g/L, Agar 15 g/L	Cellulose 10 g/L, Yeast extract 1 g/L, $(NH_4)_2SO_4$ 2.5 g/L, K_2HPO_4 0.25 g/L, NaCl 0.1 g/L, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.125 g/L, $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.0025 g/L, $MnSO_4 \cdot 4H_2O$ 0.025 g/L, Agar 15 g/L

내한성 미세조류는 극지연구소가 보유하고 있는 미세조류 200여종 중에서 북극다산과학기지 주변에서 채취한 10종 (ArF0004, ArF0006, ArF0008, ArF0013, ArF0022, ArF0024, ArF0026, ArF0030, ArF0032, ArF0048)을 선정하여 이중 저온에서 성장속도가 높은 종을 선정하였다.

KOPRI 극지연구소

2. 극지 박테리아 및 미세조류의 배양

가. 극지 박테리아의 배양

남극 세종과학기지 주변에서 채취하여 확보한 균주는 10 mL의 R2A 배지 (Table 3-2)에서 접종하여 10℃, 15℃, 20℃에서 각각 배양하였다.

Table 3-2. 극지 박테리아 배양에 사용한 배지의 조성

Medium	R2A	M9	LB
Composition	Yeast extract 0.5 g/L, Proteose peptone 0.5 g/L, Casamino acid 0.5 g/L, Dextrose 0.5 g/L, Soluble starch 0.5 g/L, Sodium pyruvate 0.3 g/L, K_2HPO_4 0.3 g/L, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.05 g/L	$Na_2HPO_4 \cdot 7H_2O$ 12.8 g/L, KH_2PO_4 3 g/L, NH_4Cl 1 g/L, $MgSO_4$ 0.24 g/L, Glucose 4 g/L, $CaCl_2$ 0.011 g/L,	Tryptone 10 g/L, Yeast extract 5 g/L, NaCl 10 g/L,

각 온도에서 비성장속도를 구한 후 (10℃의 비성장속도)^2/(20℃의 비성장속도) 값을 구하여 저온에서 성장이 빠른 5종 선정하였다. 선정한 5종과 대장균 (*Escherichia coli* BL21 (DE3))은 각각 R2A, M9, LB (Table 3-2) 배지에서 15℃, 20℃, 25℃, 30℃, 35℃에서 각각 배양하여 온도별 성장속도를 비교하였다.

KOPRI 극지연구소

나. 극지 미세조류의 배양

대한민국 북극다산과학기지 (78° 55′ N, 11° 56′ E) 주변의 담수에서 채집한 클로렐라 및 클라미도모나스 속의 미세조류 10종을 BBM 배지 (Table 3-3)에서 4℃, 8℃, 12℃, 20℃에서 각각 14일 간 배양하여 비성장 속도와 건조세포 중량을 비교하였다.

Table 3-3. 극지 미세조류 배양에 사용한 배지의 조성

Medium	BBM (Bolds Basal Medium
Composition	$NaNO_3$ 250 mg/L, $CaCl_2 \cdot 2H_2O$ 25 mg/L, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 75 mg/L, K_2HPO_4 75 mg/L, KH_2PO_4 175 mg/L, NaCl 25 mg/L, EDTA / KOH 50 mg/L / 31 mg/L, $FeSO_4 \cdot 7H_2O$, H_2SO_4 4.98 mg/L, 1.0 mg/L, H_3BO_3 11.42 mg/L, Micro-nutrients 13.03 mg/L, ($ZnSO_4 \cdot 7H_2O$ 8.82 mg/L, $MnCl_2 \cdot 4H_2O$ 1.44 mg/L, MoO_3 0.71 mg/L, $CuSO_4 \cdot 5H_2O$ 1.57 mg/L, $Co(NO_3)_2 \cdot 6H_2O$ 0.49 mg/L)

KOPRI 극지연구소

극지 미세조류는 광합성을 유도하기 위하여 빛을 16 시간 동안 공급하고 8 시간 동안 공급하지 않는 조건에서 배양하였다. 경우에 따라 공기를 공급하거나 이산화탄소를 공급하기도 하였다.

3. 극지 바이오매스의 전처리

각 미세조류는 2-4℃에서 배양, 유지되었고 1내지 2개월의 간격을 두고 계대를 위해 신선한 배지에 접종되고 남은 균주를 나일레드(nile red)로 염색하여 형광현미경으로 분석하였다. 미세조류의 지질체를 검출하기 위해 나일레드 시약(9-diethylamino-5-benzo[α]phenoxazinone)을 아세톤에 녹여 최종 농도 1 μg/mL 하여 상온에서 미세조류와 10분간 반응시켰다. 염색된 지질체를 분석하기 위해 형광현미경 (Zeiss Axio Imager 2, Germany)과 AxioVision 4 software (Jena, Germany) 프로그램을 사용하였다. 형광 검출을 위한 파장의 여기(勵起, excitation)와 이미션 (emission)은 488 nm와 550 nm였다. 나일레드로 염색하였을 경우 노란

색으로 보이는 지질이 많을수록 지질 고생산 균주가 된다.

배양한 미세조류는 4℃, 3500 rpm에서 30분간 원심 분리하여 수거하였다. 동결건조 후 지질을 추출하고 남은 잔사를 30분 동안 초음파 파쇄하거나, 0.1% α-amylase 첨가하여 90℃에서 30분간 처리하거나, 초음파 파쇄 후 α-amylase 처리를 하였다 (Fig. 3-2). 각 시료는 멸균한 후 *Saccharomyces cerevisiae*를 접종하여 에탄올 생성을 유도하였다.

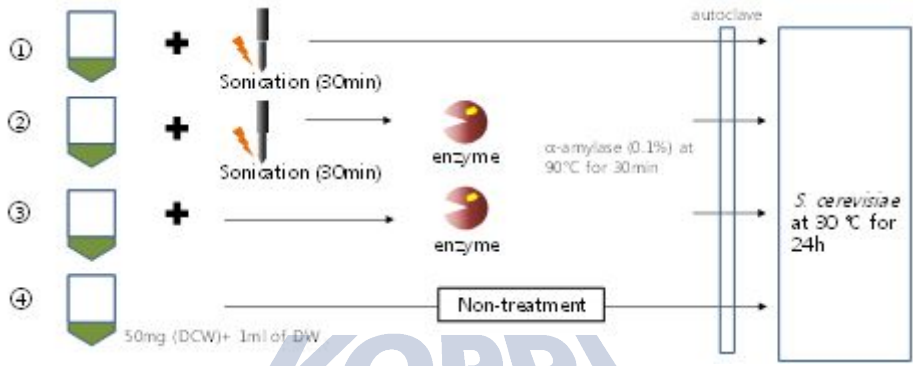

Fig. 3-2. 지질 추출 후 바이오에탄올 생산을 위한 전처리 방법

KOPRI 극지연구소

4. 지방산 및 바이오에탄올 분석

메틸화된 지방산 (Fatty acid methyl ester, FAME) 분석을 위해 가스 크로마토그래피 (YL-6100GC, Young Lin Science, Korea)를 사용하였고 불꽃이온화검출기 (flame ionized detector, FID)와 HP-FFAP 캐필러리 컬럼 (capillary column, 30 m × 0.32 mm × 0.25 μm, Agilent, USA)으로 검출하였다. 질소결핍 조건에서 2주간 배양된 미세조류 (ArF0008) 균주를 원심분리 (3500 rpm, 30분, 4℃)하여 회수한 후 증류수로 2회 세척하고 다시 원심분리하여 균체를 확보한 후 동결건조하였다. 20 mg의 동결 건조된 ArF0008 시료를 사용하여 Sasser 실험법 (Sasser 1990. Microbial ID Inc., Newark, Del.)으로 지질을 추출하였다. 비누화 (saponification)는 2 mL의 비누화 용액 (7.5 M NaOH:CH_3OH, 1:1 v/v)을 시료와 혼합하고, 100℃에서 30분 반응시켰다. 반응액을 냉각시킨 후, 4 mL의 메틸화 용액 (CH_3OH:6N HCl, 1:1 v/v)을 넣고 80℃에서 10분 반응시켰다. 이 반응액을 곧바로 냉각시킨 후, 추출

용액 (hexane:methyl tert-butyl ether, 1:1 v/v) 2.5 mL를 첨가하고 10분 간 인버팅 (inverting) 하였다. 피펫으로 하단의 수층 (aqueous phases)을 제거하였고, 6 mL의 0.5 M NaOH를 유기 용매 층에 넣었다. 5분 간 인버팅을 한 후, 상단층을 회수하여 GC 분석용으로 사용하였다. GC 프로그램은 100℃에서 5분, 분당 승온율 4℃로 240℃까지 도달하도록 설정하였다. FAME 분석을 위한 표준시료는 Supelco 37 Component FAME Mix (Sigma, USA)을 사용하였다.

바이오에탄올의 분석은 발효액을 원심분리하여 상등액을 취한 후 가스 크로마토그래피 (YL-6100GC, Young Lin Science, Korea)를 사용하여 수행되었다. GC 프로그램은 injector 220℃, column 45℃, 10분, FID detector 240℃로 설정하였다. 바이오에탄올 분석을 위해 HP-FFAP column (Agilent technologies, Inc, USA)을 사용하였다.

제 2 절 연구개발 결과

KOPRI 극지연구소

1. 극지유래 내한성 미생물의 탐색

가. 극지 박테리아의 배양 및 우수 균주 선별

내한성 균주를 선별하기 위하여 R2A배지를 이용하여 각 온도, 10℃, 15℃, 20℃에서 21 균주 (Table 3-4.)를 배양하면서 성장속도를 비교하였다. 균주는 PAMC (Polar and Alpine Microbial Collection)에 기탁하였다.

Table 3-4. 본 연구에서 사용한 극지 박테리아

번호	PAMC No.	Strain No.	예상 균주명
1	27369	L&V 7-5-GYE	*Pseudomonas trivialis*
2	27370	L&V 9-9-YW	*Hafnia* sp.
3	27371	MB sw 1-B1-Y2	*Arthrobacter* sp.
4	27372	TSB 3-8	*Pseudomonas* sp.
5	27373	TSB ww H2O	*Enterobacter* sp.
6	27374	TSB ww shiny	*Kluyvera* sp.
7	27375	TSB 9-14-W-La	*Pseudomonas* sp.
8	27376	GYE 5-12-RW	*Pseudomonas* sp.
9	27377	L&V 5-12-Y-Spr	*Pseudomonas* sp.
10	27378	MB sw 2-T1-RY	-
11	27379	MB sw 1-B1-W	-
12	27380	MB sw 1-B1-Y1	-
13	27381	MB 1-B1-R	-
14	27382	TSB 9-13-Y	*Pseudomonas* sp.
15	27383	L&V 5-8-W-Spr	*Pseudomonas* sp.
16	27384	L&V 3-3-Spr	*Flavobacterium* sp.
17	27385	MB-sw-Y	-
18	27386	L&V 3-9-Br	*Chryseobacterium jeonii*
19	27387	MB-sw-RY	-
20	27388	MB sw 1-B1-R	*Arthrobacter agilis*
21	27389	L&V 5-8-W	*Rhodobacter* sp.

각 온도에서 24시간 동안 성장한 세포농도를 조사한 결과 배양 온도가 높을수록 세포농도가 높았다 (Fig. 3-3). 극지 유래 박테리아이지만 20℃ 정도 까지는 성장이 원활하게 이루어짐을 알 수 있다.

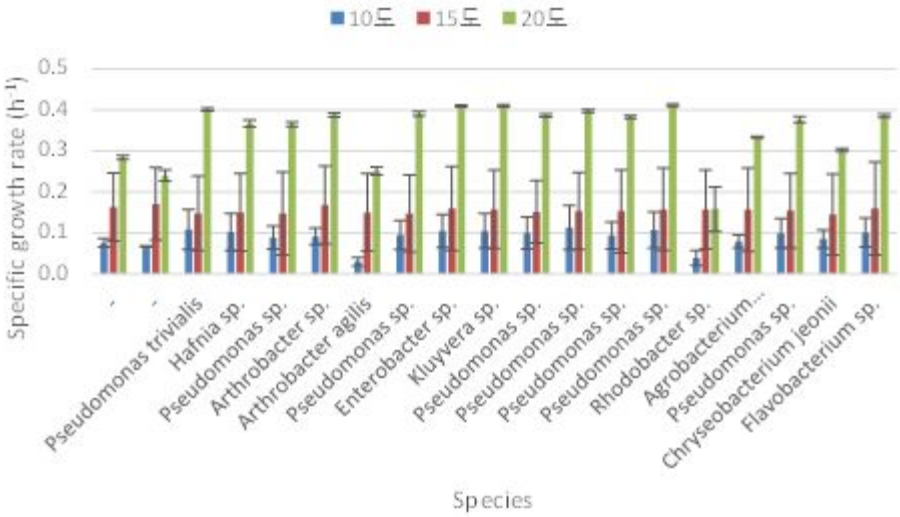

Fig. 3-3. 온도에 따른 극지유래 미생물의 성장속도 비교

나. 극지 박테리아와 대장균의 성장 비교

저온에서 성장이 빠른 5종을 선정하였다 (Table 3-5). 선정된 5종과 대장균 (*E. coli* BL21 (DE3))을 각각 R2A, LB, M9 배지에서 15℃, 20℃, 25℃, 30℃, 35℃에서 배양하면서 세포농도를 비교하였다.

Table 3-5. 저온에서 성장이 빠른 5종의 균주와 대장균

번호	PAMC No.	Strain No.	예상 균주명
1	-	GYE 5-3 Spr	-
2	27369	L&V 7-5-GYE	*Pseudomonas trivialis*
3	27370	L&V 9-9-YW	*Hafnia* sp.
4	27383	L&V 5-8-W-Spr	*Pseudomonas* sp.
5	27374	TSB ww shiny	*Kluyvera* sp.
6	-	대장균	*E. coli* BL21(DE3)

R2A 배지에서 1, 2, 3, 4번 균주는 35℃에서 거의 성장하지 않았고, 6번 대장균은 15℃에서 성장이 늦은 반면, 5번 *Kluyvera* sp.는 온도별로 고른 성장을 보였다 (Fig. 3-4).

Fig. 3-4. R2A 배지에서 극지유래 박테리아 5종과 대장균의 온도별 성장 비교 (각 균주는 15℃, 20℃, 25℃, 30℃, 35℃에서 24시간 배양 후 600nm 에서 흡광도를 측정하여 세포 농도를 비교하였다.)

KOPRI 극지연구소

LB 배지에서 1, 2번 균주는 35℃에서 거의 성장하지 않았고, R2A배지보다 15℃ 에서 성장이 느렸다 (Fig. 3-5).

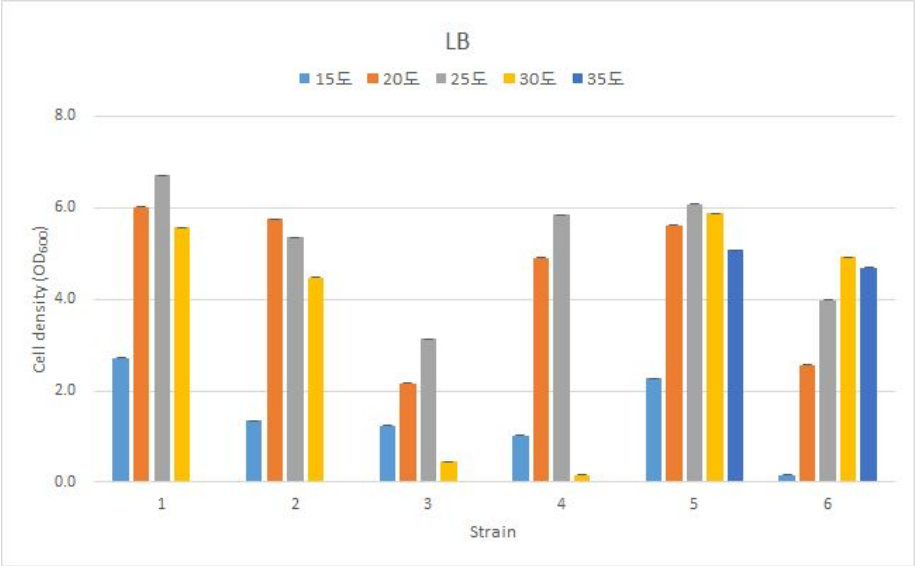

Fig. 3-5. LB 배지에서 극지유래 박테리아 5종과 대장균의 온도별 성장 비교 (각 균주는 15℃, 20℃, 25℃, 30℃, 35℃에서 24시간 배양 후 600nm 에서 흡광도를 측정하여 세포 농도를 비교하였다.)

M9 배지에서 3번 균주는 거의 자라지 않은 반면 5번 균주는 20, 25℃에서 빠르게 성장하였다 (Fig. 3-6).

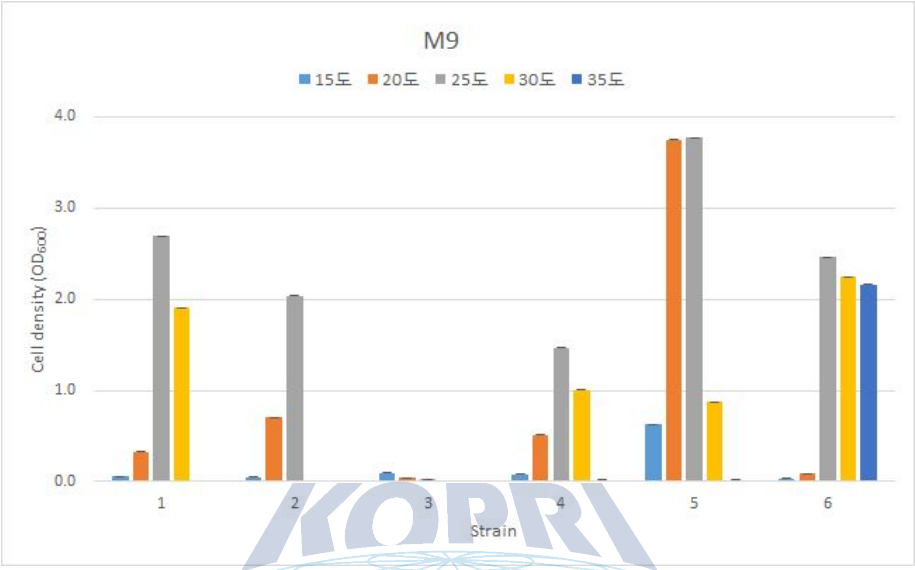

Fig. 3-6. M9 배지에서 극지유래 박테리아 5종과 대장균의 온도별 성장 비교 (각 균주는 15℃, 20℃, 25℃, 30℃, 35℃에서 24시간 배양 후 600nm에서 흡광도를 측정하여 세포 농도를 비교하였다.)

KOPRI 극지연구소

각 배지, 각 온도에서 성장실험을 한 결과, 5번 *Kluyvera* sp.가 저온 및 중온에서 성장이 우수한 것으로 판명되어 이 후 대장균과 각 온도에서 비성장속도를 비교하는데 이용되었다. R2A 배지에 *Kluyvera* sp.와 대장균을 각각 접종하여 15℃, 20℃, 25℃, 30℃, 35℃에서 배양하면서 비성장속도를 구하였다 (Fig. 3-7). 대장균의 최대 비성장속도는 35℃에서 배양하였을 때 1.386 h^{-1} 이었고, *Kluyvera* sp.의 최대 비성장속도는 30℃에서 배양하였을 때 1.430 h^{-1} 으로 계산되었다. 35℃에서 *Kluyvera* sp.의 비성장속도는 1.348 h^{-1}로 대장균과 거의 유사하였고, 15℃에서 대장균은 0.146 h^{-1}인 반면 *Kluyvera* sp.는 0.362 h^{-1}로 2배 이상 성장이 빨랐다. *Kluyvera* sp.는 저온 및 중온에서 대장균보다 성장이 빠른 것으로 확인 되었다.

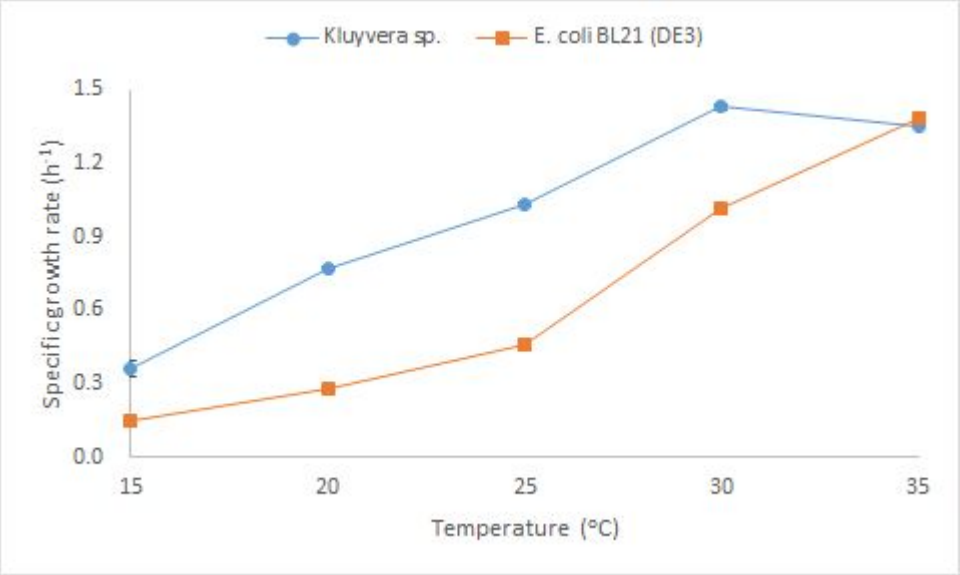

Fig. 3-7. 온도에 따른 *Kluyvera* sp. 와 대장균의 비성장속도 (35℃를 제외하고 그 미만의 온도에서 *Kluyvera* sp.가 대장균보다 높은 성장속도를 보였다.)

Kluyvera sp.를 R2A 배지에서 배양하면서 CO_2를 공급하여 그에 따른 세포농도 변화를 조사하였다. 배양은 250 mL 삼각플라스크를 이용하였으며, 150 rpm에서 진탕배양하면서 공기 또는 5% CO_2가 포함된 공기를 공급하였다 (Fig. 3-8). 배양초기에는 공기를 공급해 주면서 배양한 경우가 가장 높은 세포농도 값을 보였으며 5% CO_2를 공급하면 세포농도가 낮았다. 24시간 후에는 거의 동일한 수준의 세포농도를 얻었다 (Fig. 3-9).

KOPRI 극지연구소

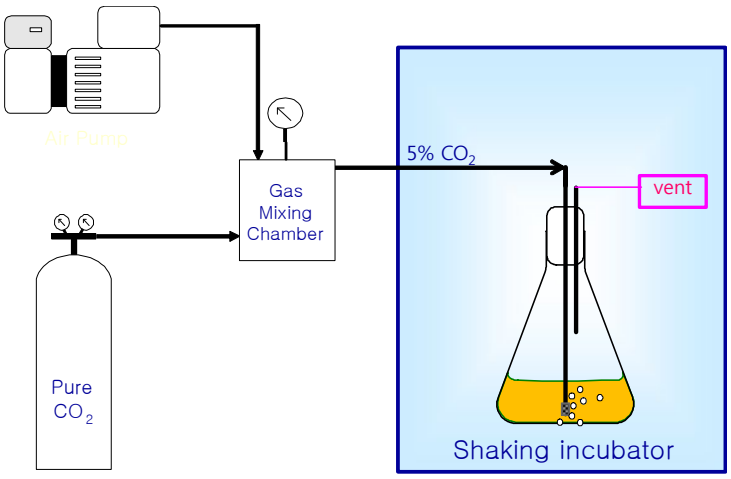

Fig. 3-8. CO_2 농도조절이 가능한 배양시스템

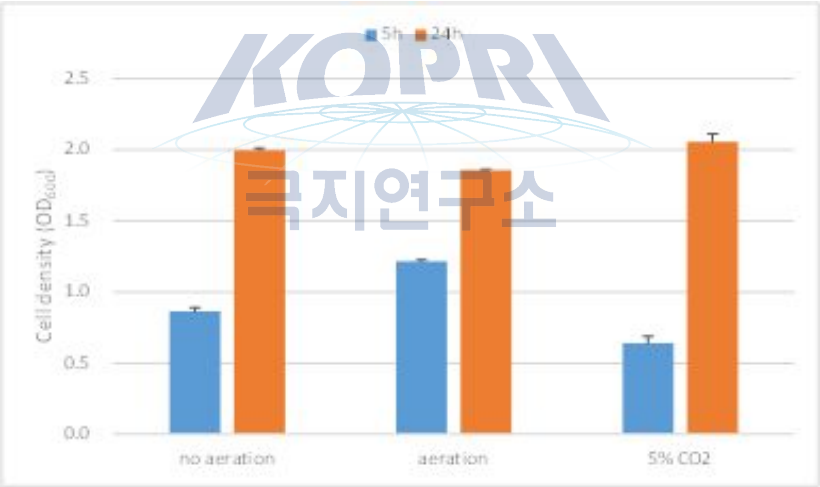

Fig. 3-9. CO_2 공급에 따른 *Kluyvera* sp. 성장

다. 극지 미세조류의 탐색 및 우수 균주 선별

미세조류는 광합성이 가능하여 에너지원을 공급해 주어야 하는 박테리아에 비해 저렴한 비용으로 바이오매스를 생산할 수 있는 장점이 있다. 우리나라 겨울철에 성장이 가능한 내한성 미세조류를 이용하여 바이오매스를 생산할 수 있다면 4계절 가동 가능한 바이오에너지 생산 시스템이 구축되는 효과가 있다. 극지연구소가 보유하고 있는 미세조류 중 ArF0004, ArF0006, ArF0008, ArF0013, ArF0022, ArF0024,

ArF0026, ArF0030, ArF0032, ArF0048의 10종을 BBM 배지에서 하루 16시간 동안 빛을 주는 조건에서 4℃, 8℃, 12℃, 20℃에서 각각 배양하면서 온도별 성장속도를 측정하였다. ArF0004, ArF0013, ArF0028등이 온도별로 고르게 성장하였고, ArF0030, ArF0032, ArF0048은 10℃ 이상에서 성장속도가 급속히 감소하였다 (Fig. 3-10).

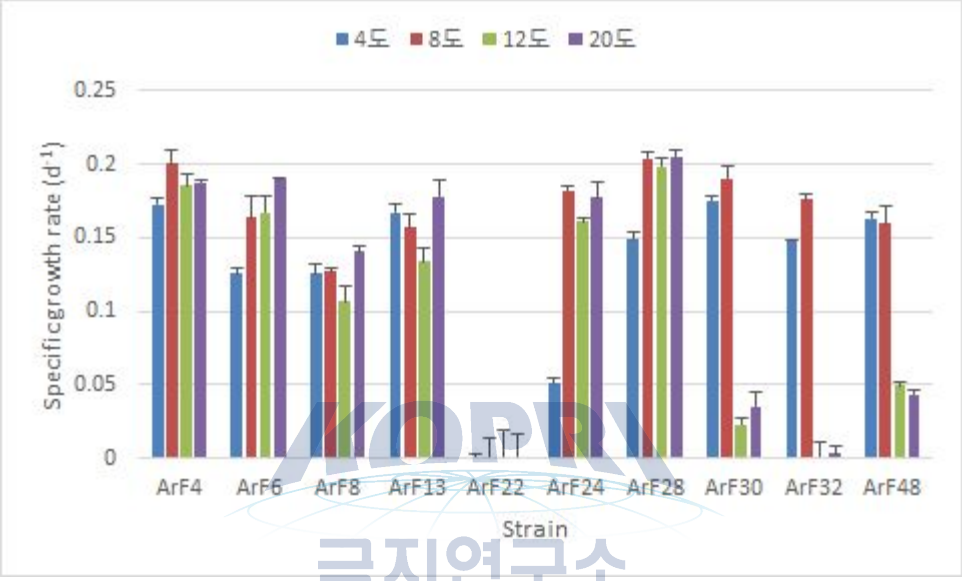

Fig. 3-10. 배양온도에 따른 극지 미세조류의 성장속도

10종의 미세조류를 각각 12℃에서 39일 동안 배양한 결과, 세포 크기가 큰 ArF0008과 ArF0024가 고농도를 보였다 (Fig. 3-11).

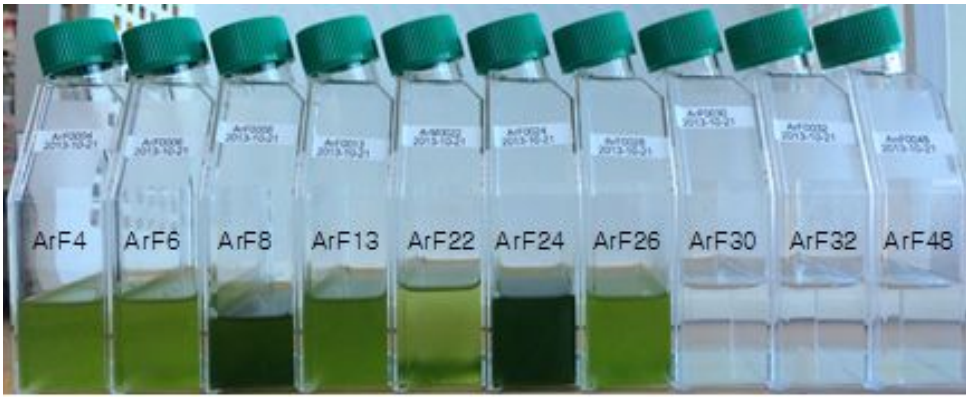

Fig. 3-11. 극지 미세조류의 성장량 비교 (ArF0008, ArF0024가 고농도임을 알 수 있다.)

건조중량은 ArF0008의 경우 0.65 g/L, ArF0024의 경우 0.41 g/L였다 (Fig. 3-12). ArF0008을 바이오매스 생산 균주로 선정하였다.

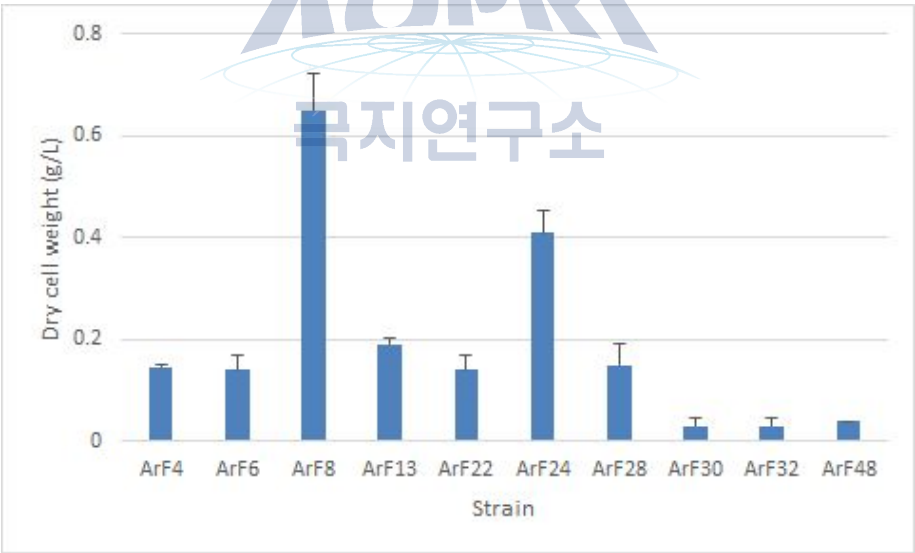

Fig. 3-12. 극지 미세조류의 건조 중량 비교 (12℃, 39일 배양 후 일정량을 여과하여 건조 후 질량을 측정하였다.)

2. 바이오매스 생산 및 지질 분석

가. 극지 미세조류 ArF008 계통 분석

극지 미세조류 ArF0008 균주는 분리 배양 후, 형태적인 분석과 분자적인 방법을 통해 분석이 이루어졌다. 분자 계통 분석은 이들의 DNA를 사용하여 분석하였다. Genomic DNA는 DNeasy Plant Mini Kit (DNeasy Plant Mini, Qiagen, MD, USA)로 추출하였다. 추출한 DNA는 중합 효소 연쇄 반응을 통해 핵의 SSU rDNA (small-subunit ribosomal DNA) 유전자를 대상으로 증폭하였다. 중합 효소 연쇄 반응액의 구성은 추출한 DNA 40-50 ng, 10X EX TaqTMbuffer 5 μL, dNTP mixture 4 μL, 정방향과 역방향의 프라이머를 각각 0.7 μL, TaKaRa EX TaqTM (TaKaRa BioInc., Otsu, Shiga, Japan), DNA 증폭효소 0.25 μL로 하였다. DNA 증폭은 94℃에서 2분 동안 DNA 이중가닥을 단일가닥으로 변성시키는 과정, 45℃에서 2분 동안 프라이머가 DNA 가닥에 결합하는 반응, 72℃에서 4분 동안 DNA 가닥에 상보적인 dNTP들이 결합하여 DNA 가닥이 길게 신장되어 합성되는 과정으로 변성 과정에서 신장되는 과정까지 모두 35번 반복하였고, 72℃ 에서 5분 동안 마지막 신장과정을 끝으로 수행하였다.

KOPRI 극지연구소

염기서열 분석은 정제한 PCR 산물을 이용하였다. 염기서열 분석은 ABI 3730 xl DNA Sequencer (Perkin-Elmer Applied Biosystems, Foster City, CA, USA)를 이용하였고, 자동염기서열 장치로 분석한 핵의 SSU rDNA 유전자의 염기서열을 Genetic Data Environment 2.2 (Mac GDE) Program (Smith et al., 1994)을 이용하여 정리하였다. 각 유전자의 염기서열은 이전에 발표된 염기서열과 비교하여 정렬하였다. 정렬된 핵의 SSU rDNA 유전자의 염기서열은 European Ribosomal RNA Database의 클라미도모나스 레인하드티 (*Chlamydomonas reinhardtii*, M32703)의 2차 구조에 맞추어 편집하였다. 완전히 보존적인 구간은 분류군간 염기서열 정렬이 가능했으며, 이 부분을 분자 계통 분석에 이용하였다. 이들의 분자 계통 분석은 베이지언 (Bayesian)과 RAxML (Randomized Axelerated Maximum Likelihood) 방법을 이용하였다.

베이지언 분석 방법은 MrBayes 3.1.2 (Huelsenbeck and Ronquist, 2001; Ronquist and Huelsenbeck, 2003; Alterkar et al., 2004)을 이용하였다. 분석 선행 과정으로 MODELTEST v. 3.7 (Posada and Crandall, 1998)을 하였다. 단계적 우도비 테스트 (Hierarchical Likelihood Ratio Tests, hLRTs) 결과 GTR + I + G

model 모델이 선정되었다. 베이지언 분석은 선정된 진화모델로 1,000회 반복하였으며, GTR + I + G 진화모델을 이용하여 2,000,000회의 무작위 추론계통수를 구축하였다. 구축한 계통수에서 우도 스코어(Likelihood scores)를 기준으로 버닌 포인트(burnin point)를 정하여 버닌 포인트 이후에 계통수만을 20% 다수 컨센서스(majority consensus) 하였다.

RAxML 7.0.3 (Stamatakis, 2006) 방법은 PAUP*4.0b 10 (Swofford, 2002. Sunderland, MA: Sinauer Associates)을 이용하여 분석하였다. RAxML 분석에 이용할 계산된 변수를 RAxML 분석에 사용하였다. RAxML 분석은 TrN + G + I 진화모델, 100회 랜덤 시퀀스 어디션 (random sequence addition), TBR 브랜치 스와핑 (TBR branch swapping)으로 발견적 탐색 (heuristic search)을 수행하였다.

ArF0008는 핵의 SSU rDNA 염기서열 (Fig. 3-13)을 선행 연구된 1687 bp 내지 2670 bp의 29속 48종의 염기서열과 비교하여 분자계통 분석하였다. 이들은 클라미도모나스(Chlamydomonas) 목(order)과 클로렐라(Chlorella) 목, 두 개의 목으로 나누어졌으며, ArF0008 배양주는 클라미도모나스 속과 강하게 지지되었다 (B=1 and ML=100%, Fig. 3-14). 상기 ArF0008는 한국생명공학연구소 (KCTC 12698BP)에 2014년 11월 03일에 기탁되었다.

KCPRI
극지연구소

TAAAGAATTAAGCCATGCATGTCTAAGTATAAACTGCTTATACTGTGAAACTG
CGAATGGCTCATTAAATCAGTTATAGTTTATTTGATGGTACCTCTACTCGGAT
AACCGTAGTAATTCTAGAGCTAATACGTGCGCACATCCCGACTTCTGGAAGGGA
CGTATTTATTAGATAAAAGGCCAGCCGGGCTCACGCCCGACCTGCGGTGACTCA
TGGTAACTTCACGAATCGCACGGCCTTGCGCCGGCGATGTTTCATTCAAATTTC
TGCCCTATCAACTTTCGATGGTAGGATAGAGGCCTACCATGGTGGTAACGGGTG
ACGGAGGATTAGGGTTCGATTCCGGAGAGGGAGCCTGAGAAACGGCTACCACAT
CCAAGGAAGGCAGCAGGCGCGCAAATTACCCAATCCCGACACGGGGAGGTAGTG
ACAATAAATAACAATACCGGGCGTTCTACGTCTGGTAATTGGAATGAGTACAA
TCTAAATCCCTTAACGAGGATCCATTGGAGGGCAAGTCTGGTGCCAGCAGCCGC
GGTAATTCCAGCTCCAATAGCGTATATTTAAGTTGTTGCAGTTAAAAAGCTCGt
AGTtGGATTTCGGgCgtgTCGCGgCGGTCcGCcTCTGGTGTGCAcTGCTGTCGATGC
GCcTTTctGTCGgGGACGGGCTCcTGGGCTtCACTGTtCGGGACTCGGGCTCGACGaG
gTtACTTTGAGTAAaTtAGAGTGTtCAAAGCAGgCGATCGcCctGAATACATTAGCA
TGGAATAGCACGATAGGACTCTGGCcTATCTTGCTGGTCTGTAGGACCGGAGTA
ATGATTAAGAGGGACAGTCGGGGGCATTCGTATTTCAATGTCAGAGGTGAAAT
TCTTGGATTTTTGAAAGACGAACTTCTGCGAAAGCATTTGCCAAGGATGTTTT
CATTGATCAAGAACGAAAGTTGGGGGCTCGAAGACGATTAGATACCGTCGTAG
TCTCAaCCATAAACGATGCCGACCAGGGATCGGCGGGTGTTCTTTTGATGACCCC
GCCGGCACCTTGAGAGAAATCAGAGTCTTTGGGTTCCGGGGGGAGTATGGTCGC
AAGGCTGAAACTTAAAGGAATTGACGGAAGGGCACCACCAGGCGTGGAGCCTGC
GGCTTAATTTGACTCAACACGGGAAAACTTACCAGGTCCAGACACGGGGATGAT
GAACAGATTGAGAGCTCTTTTTTGATTCTGTGGGTGGTGGTGCATGGCCGTTCT
TAGTTGGTGGGTTGCCTTGTCAGGTTGATTCCGGTAACGAACGAGACCTCAGCC
TGCTAAATAGTCGGCGTTCCTTTTGGATCGCTTCGACTTCTTAGAGGGACTATT
GTCGTTTAGGCAATGGAAGTGTGAGGCAATAACAGGTCTGTGATGCCCTTAGA
TGTTCTGGGCCGCACGCGCGCTACACTGATGCATTCAACGAGCCTATCCTTGGCC
GAGAGGCCCGGGTAATCTTTGAAACTGCATCGTGATGGGGATAGATTATTGCA
ATTATTAGTCTTCAACGAGGAATGCCTAGTAAGCGCGAGTCATCAGCTCGCGTT
GATTACGTCCCTGCCCTTTGTACACACCGCCCGTCGCTCCTACCGATTGGGTGTG
CTGGTGAAGTGTTCGGATTGGCCCCGGTTGGTGGCAACATTGACCGGAGCCGAG
AAGATCATTAAACCCTCCCACCTAGAGGAAGGAGAAGTCGTAACAAGGTTTCCG
TAGGTGAACTTGGCGGGAAGGA

Fig. 3-13. ArF0008 SSU rDNA 서열목록

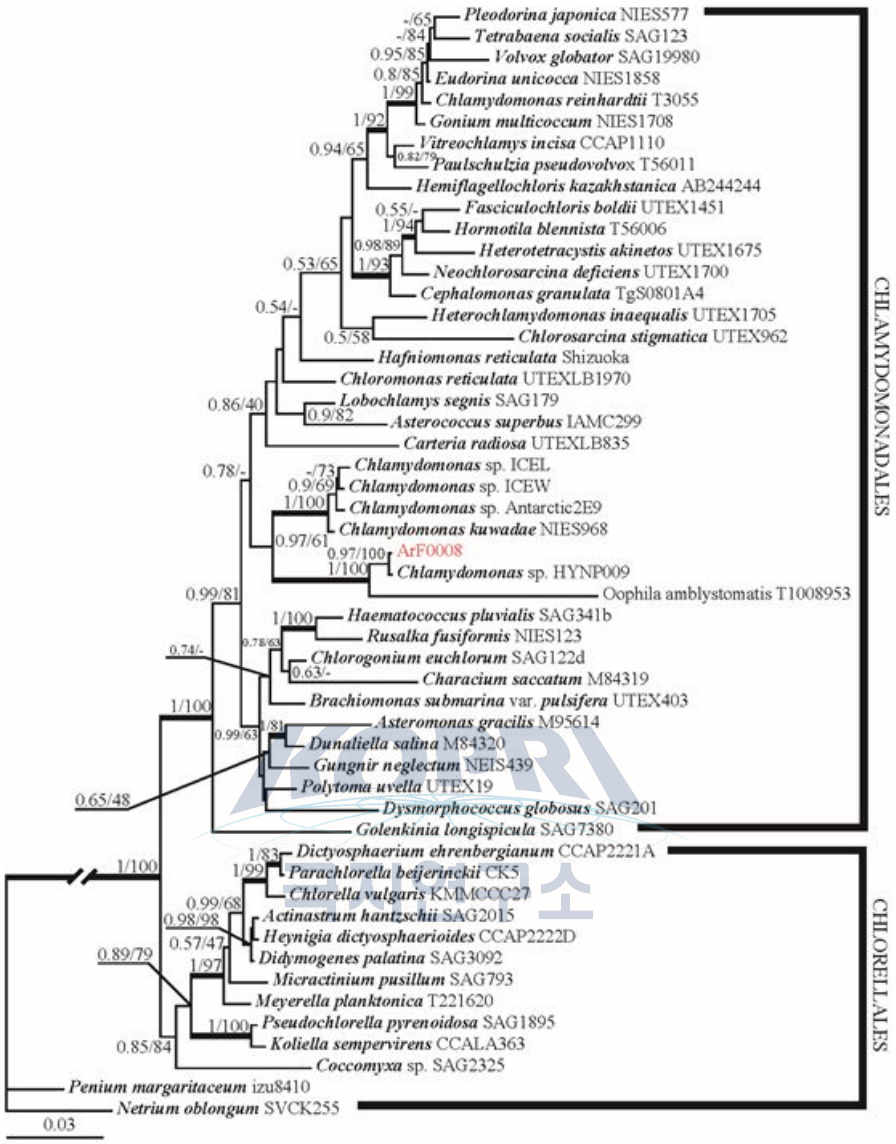

Fig. 3-14. ArF0008의 계통도

나. 극지 미세조류 바이오매스 확보

ArF0008을 다양한 온도에서 배양하면서 서로 다른 광도의 빛을 공급하여 성장에 미치는 영향을 확인하였다. ArF0008은 BBM에서 각 온도(4, 8, 12, 16, 20, 25℃) 별로, 100 μmol/m^2/s의 광도에서 2주간 배양한 후 상대적인 세포농도를 측정 비교하였다. 그 결과, 12-16℃에서 최적의 성장속도를 나타냈고 25℃가 되면 거의 사멸하였으며 4℃에서도 최적온도의 50%이상 성장함을 확인하였다(Fig. 3-15). 이 후

ArF0008을 이용한 지질생산 온도를 15℃로 유지하였다.

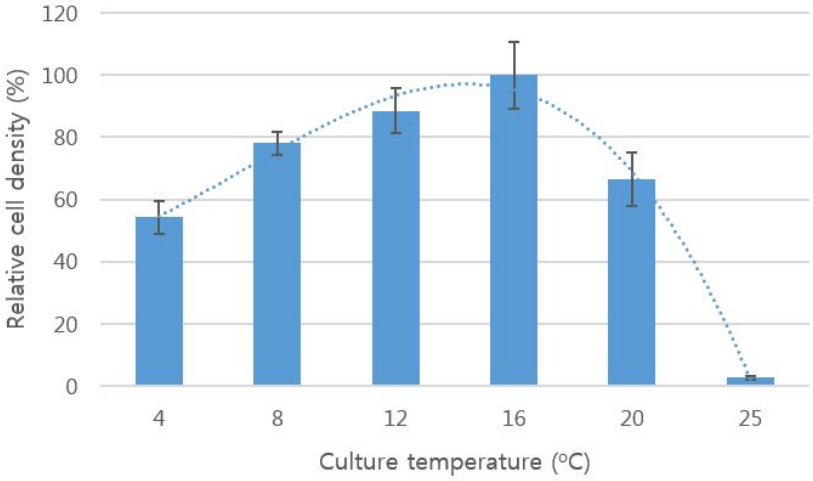

Fig. 3-15. ArF0008 균주의 온도에 따른 성장속도 비교

ArF0008의 성장에 대한 광량 및 이산화탄소의 영향을 확인하기 위하여 15℃에서 50 또는 100 μmol/m^2/s의 광도에서 1) 이산화탄소를 공급하거나 2) 공기만 공급하거나 3) 진탕(shaking)만을 하면서 2주간 배양 후 세포농도를 측정하였다 (Fig. 3-16). 그 결과 높은 광도에서 세포성장이 우수했으며 이산화탄소를 공급하는 것보다 공기만을 공급하는 경우 더 높은 세포농도를 얻을 수 있었다 (Fig. 3-17).

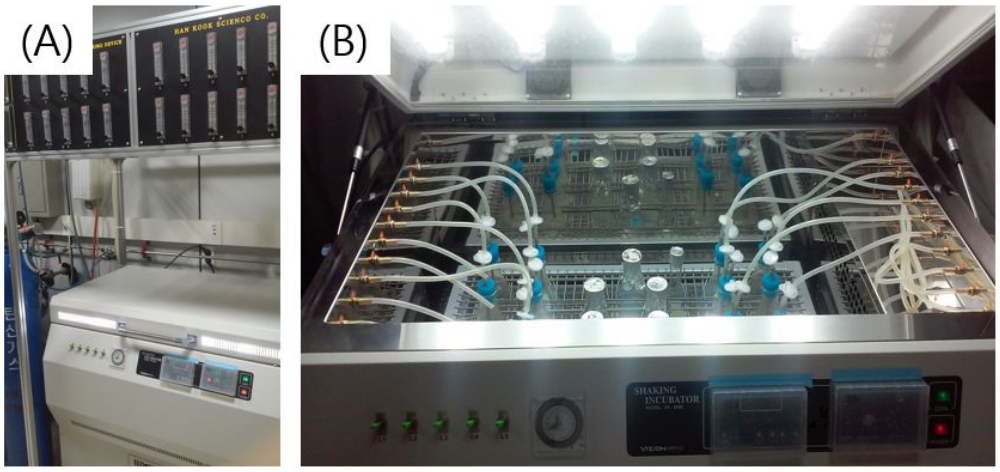

Fig. 3-16. 미세조류 배양 장치 (A) 기체공급 장치 및 외부모습 (B) 광량조절 장치 및 내부 모습

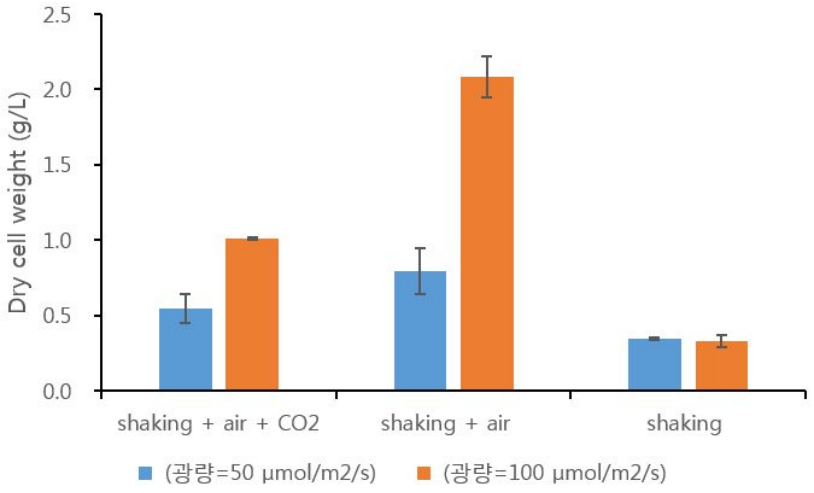

Fig. 3-17. 광량 및 CO_2가 ArF0008의 성장에 미치는 영향

ArF0008 시료는 채취하여 680 nm에서 흡광도 및 건조중량을 측정하여 관계식을 구하였다. OD_{680}=1일 때, 예상 건조 중량은 약 0.4 g/L 였다 (Fig. 3-18).

KOPRI 극지연구소

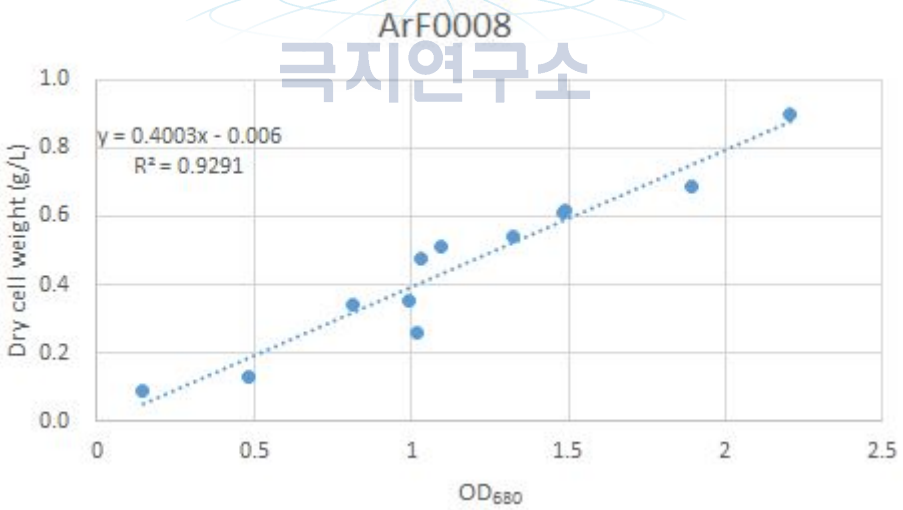

Fig. 3-18. ArF0008의 흡광도와 건조중량의 상관관계

다. 지질 생성 유도 및 분석

클라미도모나스 ArF0008 균주의 배양기간에 따른 생체 내 지질생성을 공초점 현미경으로 비교 분석하였다. 지질분석을 위해 BODIPY 505/515 (4,4-difluoro-1,3,5,7-

tetramethyl-4-bora-3a,4a-diaza-s-indacene, Invitrogen, USA)를 DMSO (Dimethylsulfoxide)에 녹여 최종 농도 0.2 μg/mL로 첨가하여 상온에서 미세조류와 10분간 반응시켰으며, 공초점 현미경 (Laser Scanning Microscope LSM 510 version 4.2, Zeiss, Oberkochen, Germany)을 이용하여 염색된 세포를 관찰하였다. 엽록소와 BODIPY 505/515 형광신호를 분석하기 위해 여기 파장을 각각 633 nm와 488 nm 를 사용하였다. 그 결과, 2주 배양한 ArF0008에 의한 지질 생성은 거의 관찰할 수 없었지만, 4주 배양한 경우 상당량의 지질 생성이 이루어짐을 알 수 있었다 (Fig. 3-19).

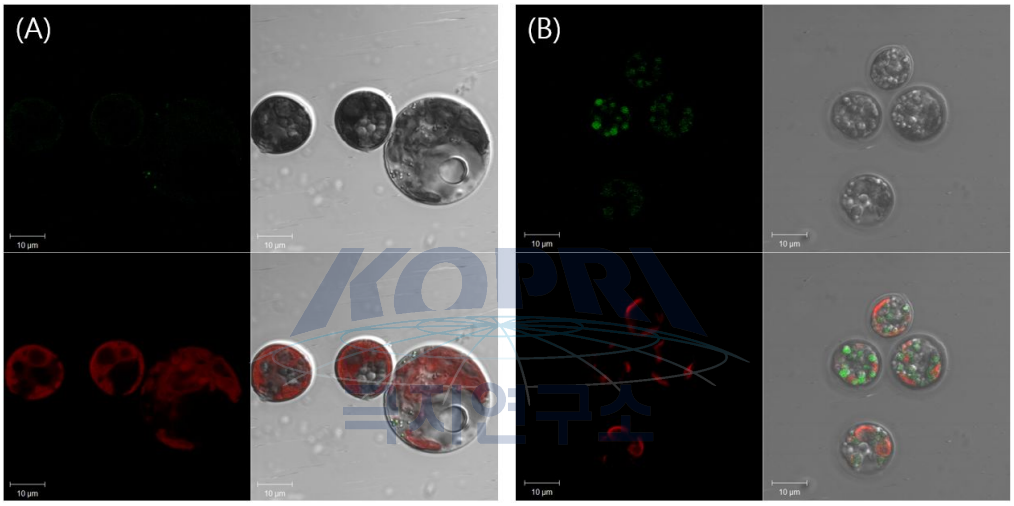

Fig. 3-19. ArF0008의 생체 내 지질 함량 분석 (A) 2주 배양한 ArF0008 균주 (B) 4주 배양한 ArF0008 균주 (각 그림의 왼쪽 위는 지질 (녹색)을 볼 수 있는 형광사진, 왼쪽 아래는 chlorophyll (적색)을 볼 수 있는 형광사진, 오른쪽 위는 DIC 사진, 오른쪽 아래는 나머지 세 개의 사진을 합친 것이다.)

빠른 시간 내에 지질생성을 유도하기 위하여 질소 결핍조건을 적용하여 배양하였다. 온전한 BBM 배지와 질소가 결핍된 BBM 배지에서 ArF0008을 2주간 배양한 후 공초점 현미경으로 관찰한 결과, 질소 결핍조건에서 지질생성이 크게 증가함을 확인하였다. 또한, 지질 고생산 균주로 알려진 보트리오코쿠스 브라우니 (*Botryococcus braunii*)와 거의 동일한 양으로 지질이 생성되는 것을 확인하였다 (Fig. 3-20).

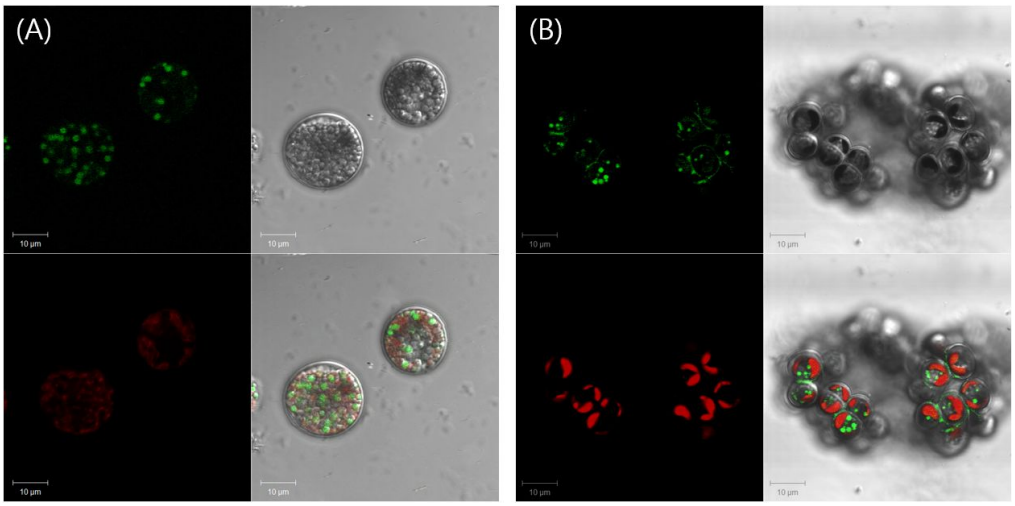

Fig. 3-20. 질소결핍 조건에서 ArF0008에 의한 지질 함량 분석 (A) *Chlamydomonas* sp. ArF0008 (B) *B. braunii.* (각 그림의 왼쪽 위는 지질 (녹색)을 볼 수 있는 형광사진, 왼쪽 아래는 chlorophyll (적색)을 볼 수 있는 형광사진, 오른쪽 위는 DIC 사진, 오른쪽 아래는 나머지 세 개의 사진을 합친 것이다.)

KOPRI 극지연구소

지질을 추출하여 saponification 시킨 후에 methylation 하여 FAME (Fatty acid methyl ester) 형태로 제조하였다 (Fig. 3-21).

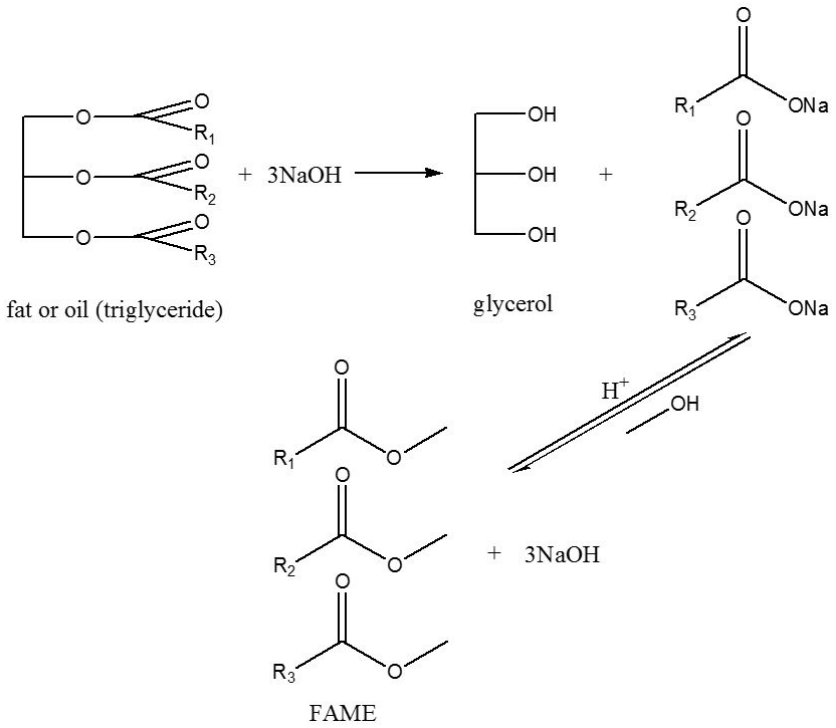

Fig. 3-21. 지방산 분석을 위한 전처리 과정

가스크로마토그래피로 지방산을 분석한 결과, ArF0008 균주는 탄소수가 17이고 이중결합수가 3으로 추정되는 지방산 (5,8,11-Heptadecatrienoic acid methyl ester (C17:3)) 및 탄소수가 18이고 이중결합수가 3인 지방산 (α-Linolenic acid methyl ester (C18:3n3))이 대부분을 차지하는 것으로 나타났다. 그 외 16:0 (Palmitic acid methyl ester), 18:1 (Oleic acid methyl ester), 17:1 (cis-10-Heptadecenoic acid methyl ester) 등이 검출되었다 (Table 3-6, Fig. 3-22).

Table 3-6. 클라미도모나스 ArF0008의 주요 지질 구성 성분 추정

FAME	추정 물질명	Retention time (min)	면적비율(%)
C14:0	Myristic acid methyl ester	18.72	3.51 ± 0.05
C16:0	Palmitic acid methyl ester	23.45	10.13 ± 0.02
C16:1	Palmitoleic acid methyl ester	23.84	2.52 ± 1.19
C16:2	7,10-Hexadecadiennoic acid methyl ester	24.85	1.12 ± 0.34
C17:1	Dis-10-Heptadecenoic acid methyl ester	26.27	5.60 ± 0.06
C17:3	5,8,11-Heptadecatrienoic acid methyl ester	26.93	24.79 ± 0.82
C18:1	Oleic acid methyl ester	28.16	8.46 ± 0.17
C18:2	Linoleic acid methyl ester	29.12	2.58 ± 0.60
C18:3	α-Linoleic acid methyl ester	30.46	20.62 ± 0.47

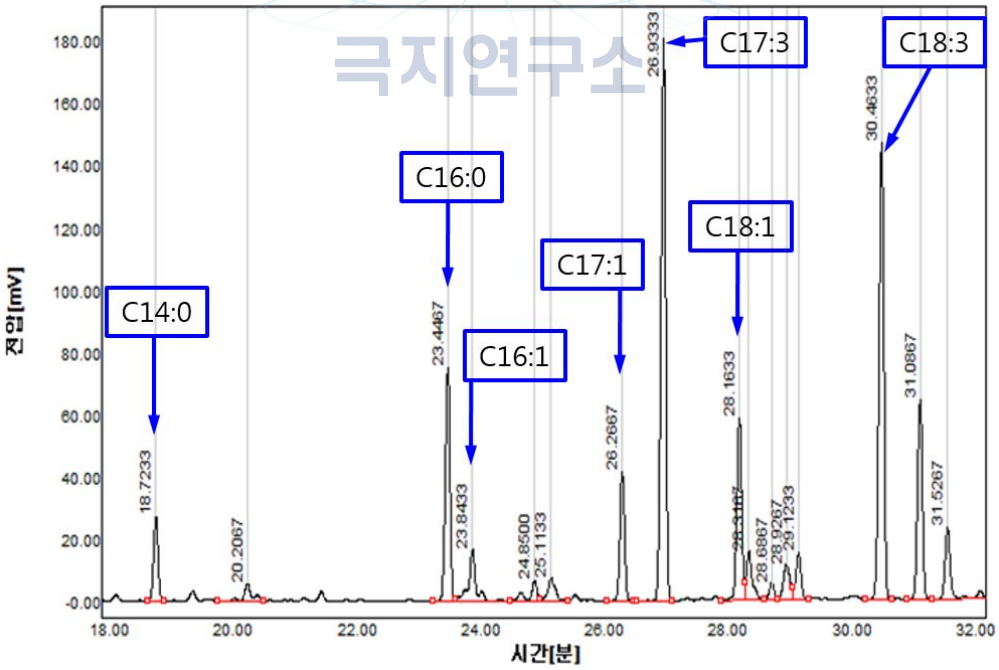

Fig. 3-22. 가스 크로마토그래피에 의한 ArF0008의 지방산 생산 프로파일 분석

질소가 결핍된 조건은 지질 생산 측면에서는 좋은 조건이지만 세포 성장에는 좋

은 조건이 되지 못한다. 가능한 세포성장을 빠르게 유도한 후 질소결핍 조건을 적용하여 지질 생성을 유도하는 전략이 필요하다. 너무 이른 시간에 질소결핍 조건을 적용하면 세포가 충분히 성장하지 못하고 너무 늦은 시간에 질소결핍 조건을 적용하면 배양기간이 오래 걸리는 단점이 있다. 전체 배양기간을 4주로 고정시키고 1) 질소결핍 조건을 적용하지 않은 경우, 2) 1주 배양 후 질소결핍 조건을 3주간 적용한 경우, 3) 2주 배양 후 질소결핍 조건을 2주간 적용한 경우, 4) 3주 배양 후 질소결핍 조건을 3주간 적용한 경우에 대해 ArF0008의 지질 생산량을 비교하였다. ArF0008은 BBM 배지에서 배양되었고, 질소결핍 조건은 BBM 성분 중 nitrogen 성분을 제외한 BBM-N 배지를 이용하여 적용시켰다. 단위 세포당 지질의 생산량은 1주 BBM에서 배양 후 3주간 질소결핍 조건을 적용한 경우 약 228 mg/ g cell로 가장 높았다 (Fig. 3-23). 단위 배양기 부피당 지질의 생산량도 같은 경우 약 72 mg/L로 가장 높았다 (Fig. 3-24).

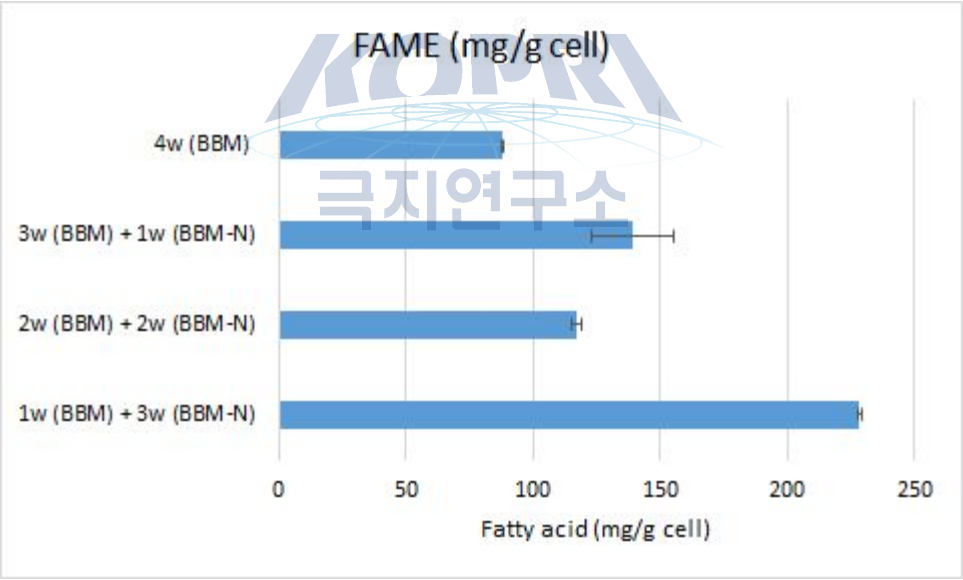

Fig. 3-23. 질소결핍 조건 적용 시기에 따른 ArF0008의 세포 당 지질 생산량 비교

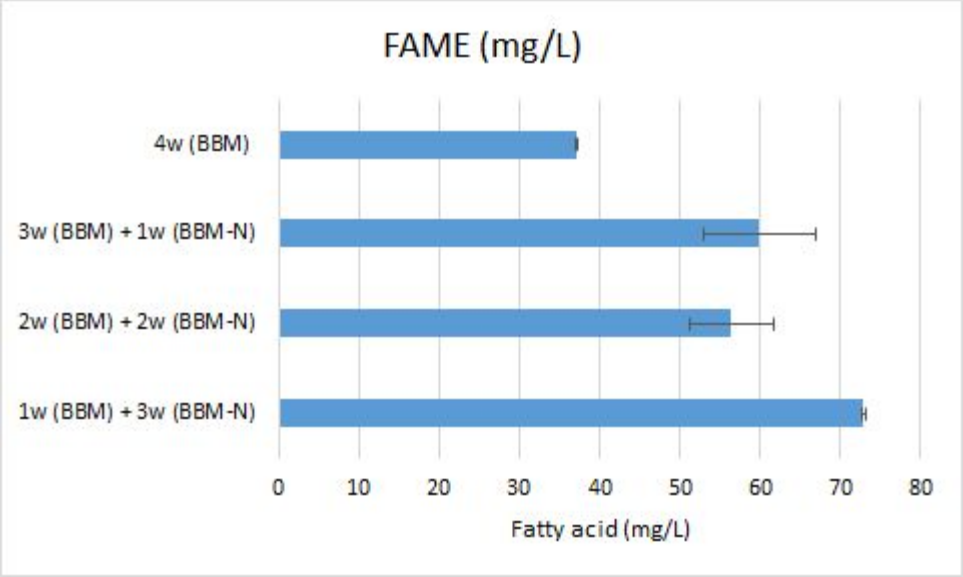

Fig. 3-24. 질소결핍 조건 적용 시기에 따른 단위 부피 당 지질 생산량 비교

3. 바이오에탄올 생산

KOPRI 극지연구소

가. 전처리 방법에 따른 포도당 생산성

지질을 추출하고 남은 ArF0008 잔사를 이용하여 바이오에탄올을 생산하였다. 우선, 건조된 잔사 50 mg씩 4개를 준비한 후에 증류수 1 mL씩 각각 첨가한 후 1) 초음파 파쇄 30분, 2) 초음파 파쇄 30분 후 α-amylase (Termamyl) 0.1% 첨가하여 90℃에서 30분 처리 3) α-amylase (Termamyl) 0.1% 첨가하여 90℃에서 30분 처리 4) 처리하지 않은 경우로 나누어 실험하였다. 각 전처리 후 생성된 포도당을 분석한 결과, 효소만 처리한 경우 약 0.25 g/L의 포도당이 생성됨을 알 수 있었고 처리하지 않은 경우는 0.02 g/L에 미치지 못했다 (Fig. 3-25 (A)). ArF0008 세포 건조 중량당 최대 5 mg/ g cell의 포도당 생성을 확인하였다 (Fig. 3-25 (B)).

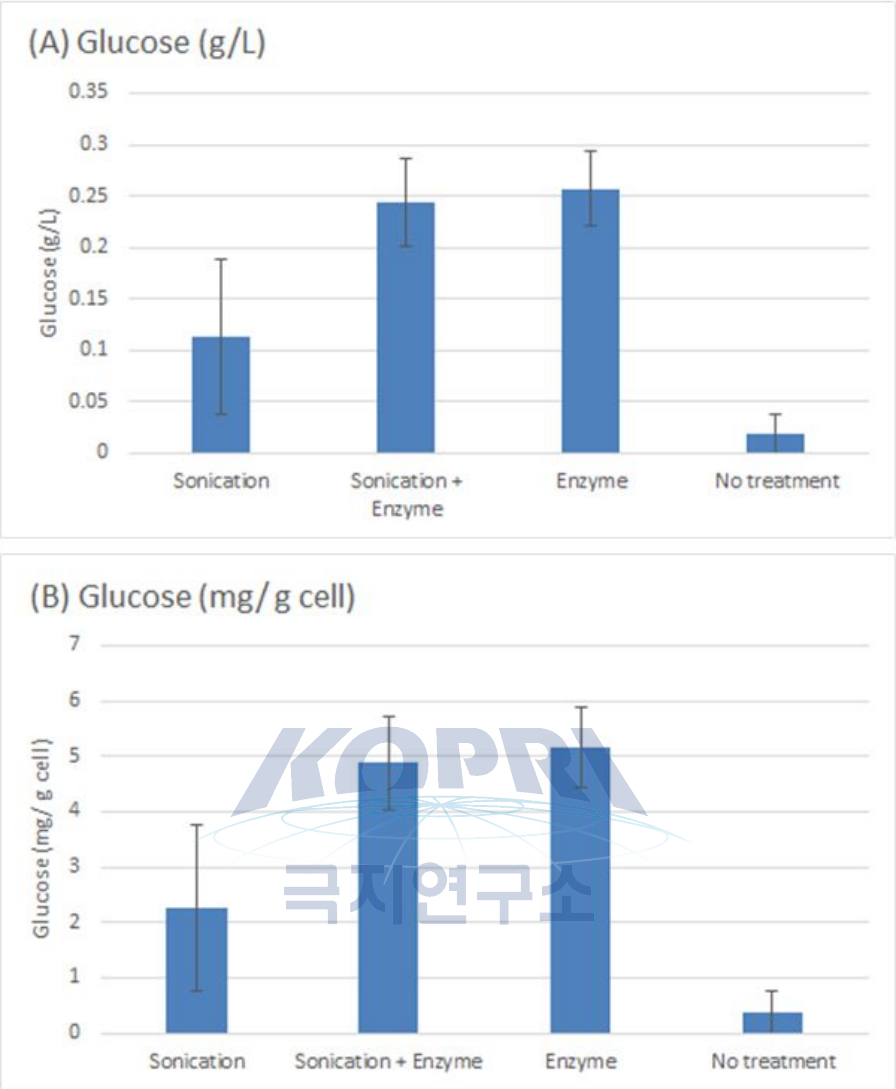

Fig. 3-25. 전처리 조건에 따른 포도당 생산량 비교

나. 바이오에탄올 생산

전처리한 시료에 증류수 1mL 첨가한 후 121℃, 15분간 멸균하였다. 여기에 효모 *Saccharomyces cerevisiae*를 OD_{600}=0.2에 맞추어 접종 후 24시간 후에 시료를 채취하여 에탄올의 생산량을 측정하였다. 생산량의 비교하기 위하여 1 g/L의 포도당과 0.5 g/L의 yeast extract가 첨가된 배지에서도 함께 배양하여 분석하였다. 효소처리하여 얻은 시료에서 *S. cerevisiae*를 배양한 경우 약 0.7 g/L의 에탄올을 얻을 수 있었다 (Fig. 3-26 (A)). 전처리하지 않은 시료에서도 약 0.3 g/L의 에탄올을 얻을

수 있었다. 1 g/L의 포도당과 0.5 g/L의 yeast extract가 첨가된 배지에서는 약 0.57 g/L의 에탄올을 얻었다. ArF0008 세포 건조 중량당으로 계산하면 약 28 mg ethanol이 생산되었다 (Fig. 3-26 (B)).

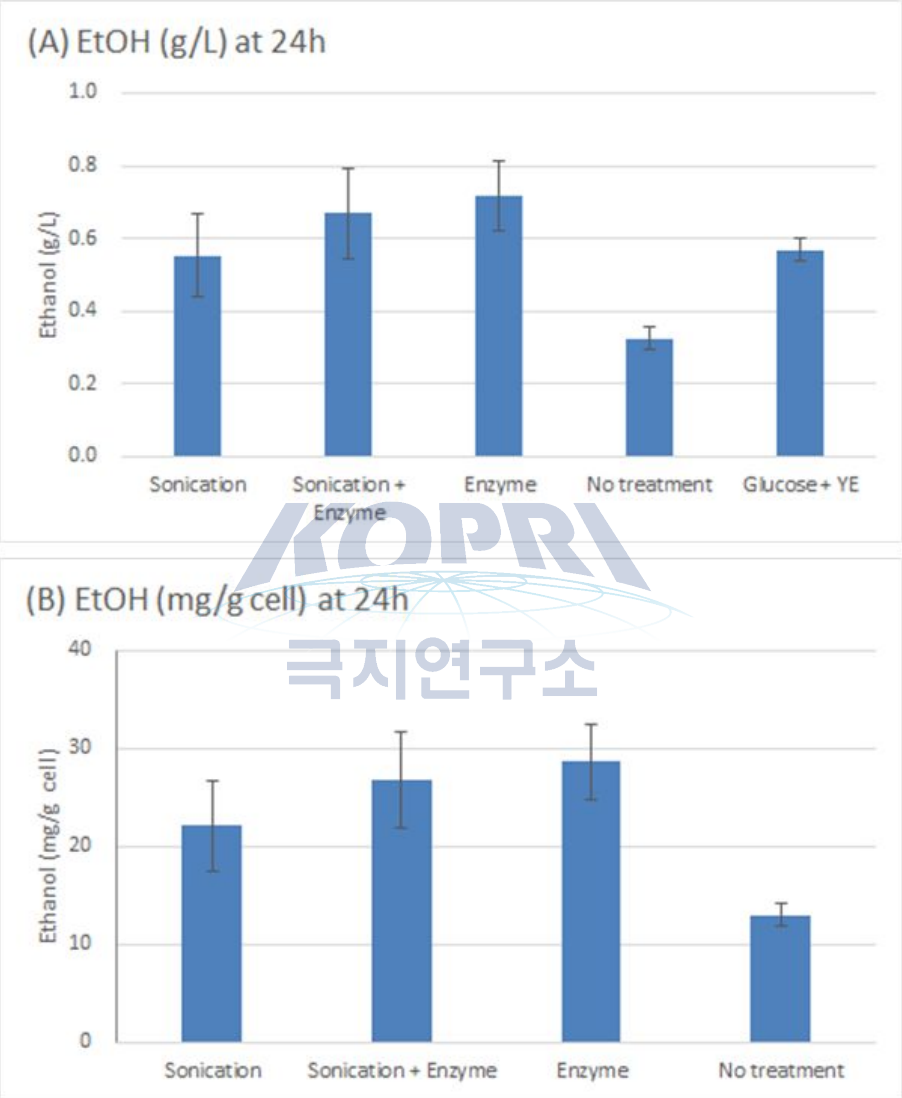

Fig. 3-26. 전처리 조건에 따른 에탄올 생산량 비교

다. 극지 바이오에너지 생산

ArF0008 균주에서 생산된 지질의 최대값은 1주 BBM에서 배양한 후 3주간 질소 결핍조건을 적용한 경우에 약 228 mg/ g cell이었다. 이 후 지질을 추출하고 남을 잔사를 이용하여 에탄올을 생산하였을 경우 효소 처리한 후 효모를 이용하여 발효

한 경우 약 28 mg/ g cell의 에탄올을 얻었다. 전체적으로 256 mg 바이오에너지/ g ArF0008 cell의 생산량을 보였다 (Fig. 3-27). ArF0008의 약 25%가 바이오에너지로 전환될 수 있음을 의미한다.

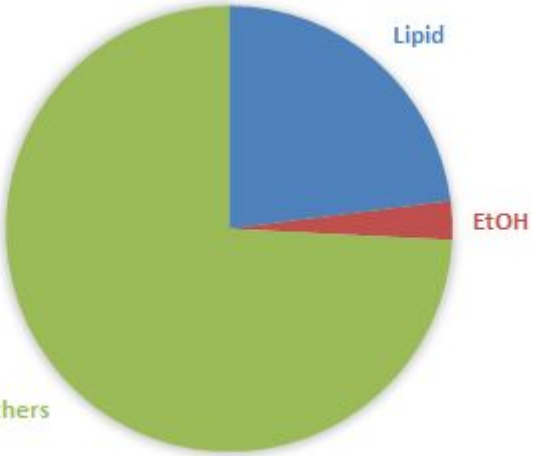

Fig. 3-27. ArF0008의 바이오에너지 구성 비율

KOPRI 극지연구소

ArF0008의 지질 생산성을 다른 균주와 비교하기 위하여 KNM0029C, *Chlamydomonas* CC-125를 BBM 배지에서 15℃ 2주간 배양한 후 같은 온도에서 BBM-N 배지에서 배양하여 지질 생성을 유도하였다. 단위 부피당 지질 생산량은 ArF0008, CC-125, KNM0029C 순이었고 단위 세포당 지질 함량은 ArF0008과 CC-125가 거의 유사하였다 (Fig. 3-28). KNF0029C의 경우 최적 온도와 최적 배지가 맞지 않아서 지질 생산성이 낮게 나온 것으로 해석 된다 (Kim et al., 2016).

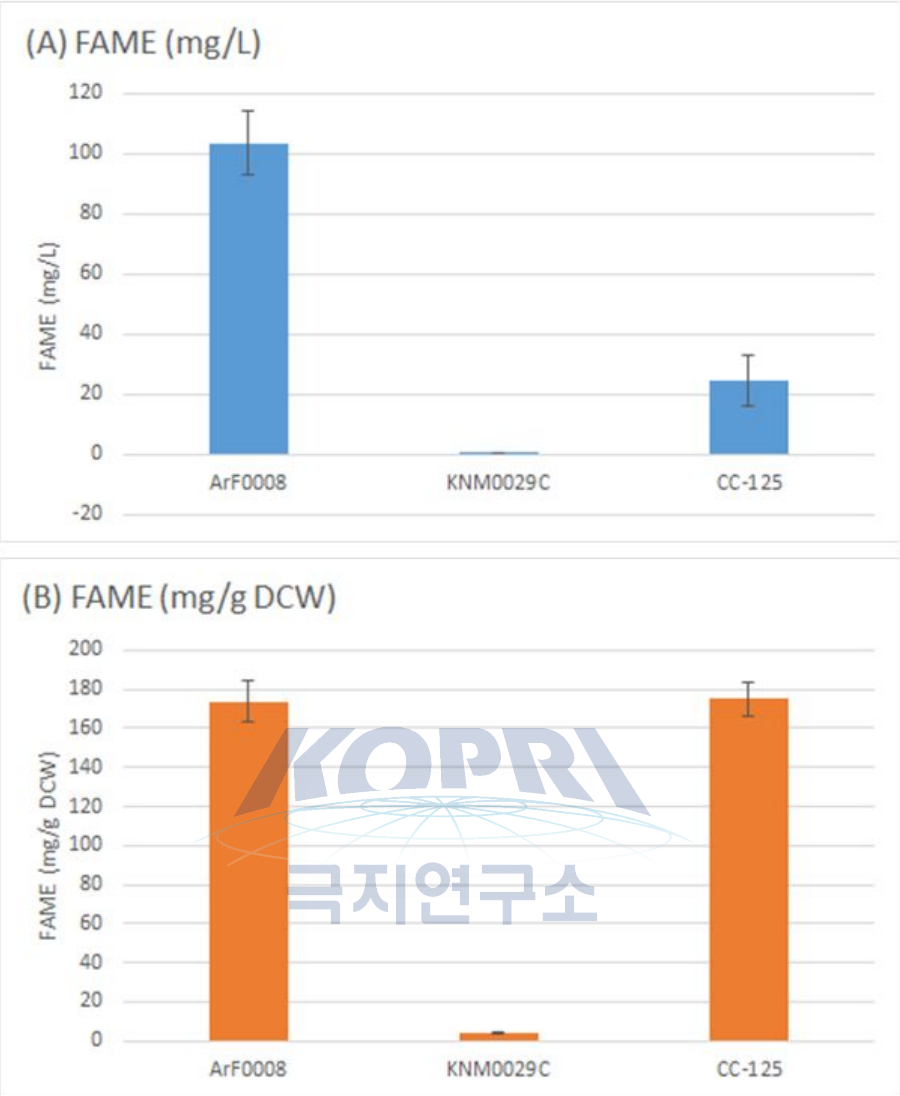

Fig. 3-28. BBM 배지에서 미세조류의 지질 생산성 비교

제 4 장 연구개발목표 달성도 및 대외 기여도

제 1 절 연구목표 달성도

1. 연구목표 및 연구내용

가. 연구개발의 최종목표

본 연구개발의 최종 목표는 바이오에너지의 경제적인 생산방법에 관한 기초 자료를 확보하고 내한성 극지생물을 이용한 효율적인 에너지 전환방법을 탐색하고 관련 기술을 확보하는 것이다 (Table 4-1).

Table 4-1. 본 연구개발의 최종목표

○ 최종목표	
- 온난화와 기후협약 등에 대비하기 위한 바이오에너지의 경제적인 생산방법에 관한 기초 자료 확보 - 내한성 극지유래 생물을 이용한 효율적인 에너지 전환방법의 탐색 및 관련 기술 확보	
○ 연차별 목표	
1차년도	내한성 극지 생물 선별 및 배양 조건 시험
2차년도	효율적인 극지 바이오매스의 생산 및 전처리 방법의 탐색
3차년도	극지 바이오매스로부터 바이오에탄올의 생산

나. 연차별 연구개발 목표 및 내용

연차별 연구개발 목표는 1차년도에 내한성 극지 생물을 선별하고 배양조건을 시험하고 2차년도에 효율적인 극지 바이오매스를 생산하고 전처리 방법을 탐색하며, 3차년도에 극지 바이오매스로부터 바이오에탄올을 생산하는 것이다 (Table 4-2).

Table 4-2. 연차별 연구개발 목표 및 내용

구분	년도	연구개발목표	연구개발내용
1차년도	2013	내한성 극지생물의 탐색 및 균주개량	- 온도에 따른 성장속도와 최종 균체량의 비교 분석 - 내한성 우수 균주개량
		배양조건 시험	- 배지성분, CO_2 공급 농도 등에 따른 성장조건 조사 - 내한성 극지생물 배양에 관한 기초자료 확보
2차년도	2014	극지생물을 이용한 바이오매스 확보	- 성장조절 인자의 영향 조사 - 통계적 방법을 통한 바이오매스 확보 최적화 구현 - 균주개량을 통한 바이오매스 증대 시도
		극지바이오매스 전처리 방법의 탐색	- 물리적, 화학적 방법을 통한 극지 바이오매스의 전처리 - 바이오매스를 발효 가능한 당질로 전환
3차년도	2015	극지생물 기반 바이오에탄올 생산	- 발효 가능한 당질로부터 바이오에탄올 생산 - 생산수율 향상을 위한 전처리 방법의 선정
		탄소순환율 계산	- 전체 공정의 수율 계산 - 탄소순환율 계산

KOPRI 극지연구소

2. 연구개발 성과

가. 정성적 성과

본 연구개발의 주요내용은 내한성 극지 미세조류 *Chlamydomonas* sp. ArF0008을 선정하여 지질생성 최적조건을 찾고 지방산을 분석하였으며 지질 추출 잔사로부터 바이오에탄올을 생산한 것이다 (Table 4-3). 본 연구개발 성과는 연구목표를 달성한 것으로 판단된다.

Table 4-3. 본 연구개발의 정량적 성과

정성적 목표		주요 연구개발 실적	달성도
1차년도 (2013)	내한성 극지생물의 탐색	- *Kluyvera* sp.와 *Chlamydomonas* sp. ArF0008의 온도에 따른 성장속도, 최종 균체량 비교 분석 완료	100%
	배양조건 실험	- ArF0008 균주 성장에 대한 온도, 광량, CO_2 영향 조사 - 최적조건: 12-16℃, 100 μmol/m2/s	
2차년도 (2014)	극지생물을 이용한 바이오매스 확보	- ArF0008 바이오매스 확보 후 지질생성 유도 - 질소 (nitrogen)가 결핍된 BBM에서 *Botryococcus braunii*와 유사한 정도로 지질 생성 - GC 분석을 통해 바이오디젤 원료인 C16~C18 등 확인	100%
	극지 바이오매스 전처리 방법의 탐색	- 미세조류 지질 추출 및 지방산 분석 - 추출된 지질을 FAME (fatty acid methyl ester) 형태로 제조	
3차년도 (2015)	극지생물 기반 바이오에탄올 생산	- 지질 추출 후 남은 cell debris를 이용하여 EtOH 생산 - Cell debris → glucose → *S. cerevisiae* 접종 → EtOH 생산 - 28 mg EtOH/g ArF0008 cell	100%
	탄소순환율 계산	- 세포 구성 성분 중 약 25%가 바이오에너지로 전환가능	

나. 정량적 성과

본 연구개발의 정량적 연구 성과 목표와 달성 내용은 아래 Table 4-4에 정리하였다. 특허 2건 출원 및 논문 4건 발표를 목표로 하였고 수정중인 논문까지 더하면 목표를 달성하였다.

Table 4-4. 본 연구개발의 정량적 목표 및 성과

계획 (단위: 건)

구분	국외논문		국내논문		특허출원		소계
	SCI(E)	기타	SCIE	기타	국외	국내	
1차년도						1	1
2차년도	1			1		1	3
3차년도	1		1				2

실적 (단위: 건)

구분	국외논문		국내논문		특허출원		소계
	SCI(E)	기타	SCIE	기타	국외	국내	
1차년도							0
2차년도	1			1		1	3
3차년도			1*	1		1	3

1. Han et al., J Pure Appl Microbiol 8: 3531-3536. ISSN=0973-7510, 2014. 10. 31.
2. Kim et al., Kor Soc Biotechnol Bioeng J 29: 303-306. ISSN=1225-7117, 2014. 08. 31.
3. Kim et al., Kor Soc Biotechnol Bioeng J 30: 345-349. ISSN=1225-7117, 2015. 12. 31.
4. Han et al., Korea patent pending No. 10-2014-0182384, 2014. 12. 17.
5. Choi et al., Korea patent pending No. 10-2015-0016792, 2015. 02. 03.
6. Kim et al., Algae, ISSN=1226-2617, in revision*

KOPRI 극지연구소

제 2 절 연구개발에 따른 대외기여도

미세조류는 50마이크로미터 이하의 단세포 조류로 고등식물에 비해 성장속도가 빠르고 광합성을 통해 증식하므로 이산화탄소를 고정화하는 능력을 가지고 있으며 바이오디젤의 원료가 되는 오일을 생산한다. 미세조류는 곡식 경작이 어려운 지역에서도 배양이 가능하고 광합성 효율이 높아 단위 면적당 오일의 생산성이 우수하다 (Demirbas and Demirbas, 2011). 오일 중에서 지방산의 함량이 바이오디젤의 특성을 결정하는데, 미세조류가 생산하는 지방산은 불포화 정도가 높아 어는점이 낮아 낮은 온도에서도 사용 가능하여 바이오디젤의 좋은 원료가 될 수 있다. 미세조

류의 오일은 에스테르교환반응 (transesterification)을 통해 바이오디젤로 전환되는데 에스테르교환반응은 산 또는 알카리 촉매하에서 트리글리세리드와 알콜을 결합시켜 지방산메틸에스터로 전환시키는 반응이며 이때 부산물로 글리세롤이 생성된다. 알콜로는 주로 메탄올을 사용하는데 다른 알콜은 경제성이 떨어진다. 본 연구에서는 극지 미세조류를 배양하여 바이오디젤의 원료인 지방산과 바이오에탄올을 생산하였다. 빛과 무기염류를 이용하여 극지 미세조류를 배양하였고 이로부터 지질을 생산하였다. 지질을 추출하고 남은 잔사를 전처리한 후 효모를 이용하여 바이오에탄올을 생산하였다 (Fig. 4-1).

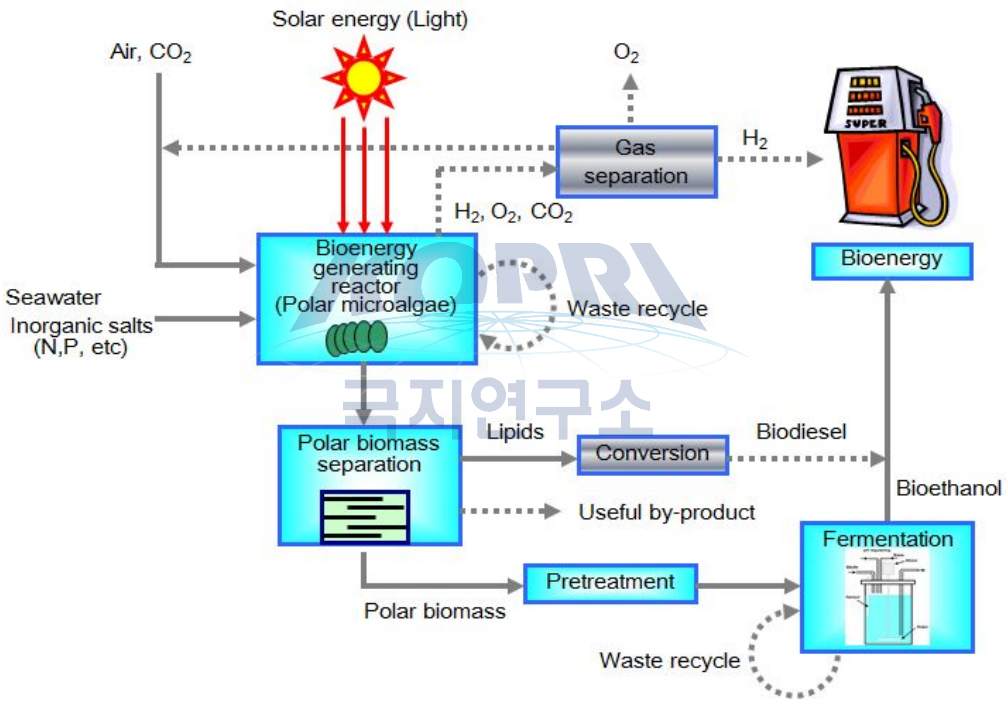

Fig. 4-1. 극지 미세조류 기반 바이오에너지 생산의 개념도

지구의 수권에는 10만종에 달하는 미세조류가 존재하는 것으로 추정되고 있는데 1970년대 석유파동을 계기로 미세조류를 이용한 신재생에너지 생산연구가 시작되었다. 교토의정서 이후 각국은 지구온난화 주범인 이산화탄소 저감과 탄소배출권 거래에 대비하여 미세조류 연구에 많은 투자를 하고 있다. 미국 NREL에서는 1978에서 1996년까지 ASP (Aquatic Species Program)를 수행한 바 있으며 규조류 (diatoms) 약 10만종, 녹조류 (green algae) 약 8천종, 황금녹조 (golden-brown algae) 약 1천종, 착편모조류 (prymnesiophytes) 약 500 종 및 남조류 약 2천종을

보고한 바 있다 (Sheehan et al., 1998). 이 중 오일 생산을 위한 배양주로 300종 이상을 확보하였고, 세포내 지방 함량은 건조중량 대비 1~70% 범위를 보였다. 미세조류의 지방질 함량은 영양염에서 질소가 결핍되거나 염분 스트레스를 받으면 증가한다(Mata et al., 2010). 바이오디젤 생산에서 가장 주목을 받은 균주는 지질함량이 높은 *Botryococcus*이며 주로 지질 함량을 높이기 위한 최적조건을 찾는 연구가 진행되고 있다.

본 연구에서 사용한 ArF0008은 *Chlamydomonas* sp.로 최적 배양온도는 12-16℃로 우리나라 겨울철에 배양가능 할 것으로 판단된다. ArF0008 균주에서 생산된 지질의 최대값은 1주 BBM에서 배양한 후 3주간 질소 결핍조건을 적용한 경우에 약 228 mg/ g cell이었다. 이 값을 다른 연구 결과와 비교하면 같은 *Chlamydomonas*인 KNM0029C와 *reinhardtii*에 비해 약 50%이상 지질을 더 생산하였고, *Chlorella vulgaris*의 약 2/3 수준에 머물렀다 (Table 4-5). 최적 배양온도는 ArF0008이 15℃, KNM0029C가 4℃, *C. reinhardtii*가 25℃, *C. vulgaris*가 30℃로 각각 달랐다.

KOPRI
극지연구소

Table 4-5. 본 연구결과의 대외적 기여도 수준 비교

구분	본 연구	Kim et al., 2016	Davey et al., 2014	Choi et al., 2014
균주명	*Chlamydomonas* sp. ArF0008	*Chlamydomonas* sp. KNM0029C	*Chlamydomonas reinhardtii*	*Chlorella vulgaris*
지질 생산량	230 mg/g cell	165.4 mg/g cell	167 mg/g cell	334.7 mg/g cell
배지	BBM, BBM-N	TAP, TAP-N	TAP, TAP-N	KNO_3,3 mM KH_2PO_4, 5.44 mM Na_2HPO_4, 1.83 mM $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, 0.20 mM $CaCl_2$, 0.12 mM; FeNaEDTA, 0.03 mM; $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$, 0.01 mM; $MnCl_2 \cdot 4H_2O$, 0.07 mM; $CuSO_4$, 0.07 mM; and $Al_2(SO_4)_3 \cdot 18H_2O$, 0.01 mM
배양 온도	15℃	4℃	25℃	30℃

KOPRI 극지연구소

1. 기술적 측면

본 연구개발에 따라 다음과 같은 기술적 기여가 기대된다.

첫째, 극지생물을 포함하는 바이오매스를 이용한 바이오에너지 생산은 기존의 석유화학에너지에 비해 CO_2 발생을 줄이므로 기후변화 대응 지구온난화 방지에 일조할 것으로 예상된다. 둘째, 극지생물은 바이오매스 뿐 만 아니라 다양한 유용부산물이 생산되므로 이를 추가로 획득하는 기술이 개발될 것으로 예상된다. 미세조류 기반의 바이오에너지는 태양광, 풍력 등의 천연에너지에 비해 산업소재가 생산가능하

다는 장점이 있어 화석연료를 대체할 수 있을 것으로 기대된다 (Fig. 4-2).

주요 에너지 자원별 특징 비교

	미세조류	석유	석탄	천연가스	원자력	태양광	풍력
산업소재 생산	가능	가능	가능	가능	불가	불가	불가
온실가스 배출량[1]	저	고	고	중	저	저	저
가채 연수[2]	무제한	54년[3]	112년[3]	64년[3]	79년[4]	무제한	무제한
경제성 확보시기	2020년[5]	현재	현재	현재	현재	2020년[5]	현재

주: 1) 온실가스는 생산과 사용 후 폐기 등 전 과정에서 나오는 총 배출량을 고려
2) 천연가스에 셰일가스와 같은 비전통가스는 불포함
3) BP (2012). BP Statistical Review of World Energy. 확인매장량 기준
4) IAEA (2010). Red Book - Uranium: Resources, Production and Demand.
5) 각종 자료를 토대로 삼성경제연구소 추정

Fig. 4-2. 주요 에너지 자원별 특징 비교 (Cho, 2012)

셋째, 우리나라 겨울철에 노지에서 배양 가능한 생물로부터 바이오매스를 생산할 수 있으므로 안정적이며 생산성이 향상된 바이오에너지 기술을 축적할 수 있다. 넷째, 극지생물을 배양하기 위한 특화된 생물반응기의 개발을 촉진하고 이 분야 기술 발전에 공헌하며, 대규모 공정의 개발로 순수 극지기초과학 발전에 정보 제공할 수 있을 것이다.

2. 경제·산업적 측면

본 연구개발의 완료에 따라 다음과 같은 경제·산업적 기여가 기대된다.

첫째, 바이오매스 에너지 이용 시 탄소배출권 획득이 가능하고, 바이오에탄올 사용 시 휘발유 대비 TOE 당 1.8~2.9 t 이산화탄소 저감 효과를 얻을 수 있다. 둘째, 노지배양이 가능하여 대규모 생산시스템 구축으로 지역 기반의 고용 창출이 가능해지고 지역 특성화 사업으로 연계 가능하여 지역경제를 활성화시킬 것으로 기대된다. 셋째, 환경·에너지절감 측면으로 2020년 기준으로 수송부문 연료수요 년 5% 증

가, 수송부문 바이오연료 점유율 10% 가정 시 연간 3,650 만 톤의 CO_2 절감 효과가 기대된다. 넷째, 기존에너지원 대비 가격경쟁력 확보 시 바이오에너지 산업은 IT, BT, NT, ET 산업과 더불어 미래 산업, 차세대산업으로서 급성장할 것으로 전망된다.

KOPRI
극지연구소

제 5 장 연구개발결과의 활용계획

ㅇ 본 기술의 개발로 극지유래 미세조류 또는 박테리아를 고농도 배양하여 최대의 유용 바이오매스를 확보할 수 있으므로 극지유래 생물의 배양에 활용 가능하다.

ㅇ 극지 바이오매스의 이용 시 전처리 공정을 개발하므로 이러한 연구의 결과는 기존의 다양한 바이오매스 전처리 방법과 함께 이 분야의 기술 발전을 앞당길 수 있을 것으로 기대된다.

ㅇ 극지 생물의 배양에서 최적의 배양조건을 찾아내고, 광투과 및 물질전달이 우수한 옥외 생물배양시스템을 개발할 수 있어 이를 식품, 의약 및 환경 산업에 응용할 수 있을 것을 기대된다.

ㅇ 배양 시스템에 해수를 직접 이용하여 경제적인 배양방법을 제시하고, 질소, 인이 다량 함유된 폐수와의 접목을 통한 환경오염 방지 및 신산업 창출에 이바지할 수 있다.

ㅇ 다양한 독극물의 생분해와 연관된 바이오에너지 생성경로의 규명과 응용을 통한 새로운 환경 산업을 창출할 수 있을 것으로 기대된다.

ㅇ 극지미세조류의 고농도 배양을 통해 유용이차대사산물을 생산하는 균주의 먹이로도 활용 가능하고, 인간의 건강을 위한 식품 및 동물의 사료로도 이용가능하다.

ㅇ 에너지 자급률 향상에 기여하는 극지연구소의 공익적 기능의 중요성에 대한 국민적 공감대를 확산시킨다.

ㅇ 극지생물의 특성을 이용한 바이오에너지 연구 분야의 대형 R&D 사업화 추진에 일조할 수 있다.

KOPRI 극지연구소

제 6 장 연구개발과정에서 수집한 해외과학기술정보

바이오디젤은 경유와 특성이 유사하여 경유용 자동차라면 엔진구조 변경 없이 사용할 수 있다. 우리나라를 비롯한 많은 국가에서 일반 디젤에 바이오디젤을 혼합하는 정책 (Renewable Fuel Standard, RFS)을 운영 중이며 2012년 기준으로 국내에는 16개의 바이오디젤 제조업체가 등록되어 있다 (Kang, 2015).

세계적으로는 바이오에너지 시장이 현재 827억 달러에서 2021년에는 1853억 달러로 두 배 이상 증가할 것이라는 예측이 있다. 전체 바이오에너지 가운데 15%를 미세조류 바이오에너지가 차지할 것이라는 전망을 고려하면 2021년 미세조류 바이오에너지의 세계시장규모는 278억 달러로 추정된다. 미세조류 바이오에너지 생산량의 50%를 해양바이오에너지가 차지한다고 가정하면, 2021년 해양바이오에너지 시장규모는 약 139억 달러 수준이 될 것이다 (Kang, 2015).

미국은 DOE (Department of Energy)를 중심으로 미세조류로부터 수송용 연료 생산에 대한 기반 및 응용 기술 개발을 추진하고 있다 (Oh and Na, 2015). 생물 유전체 연구와 관련된 장기 연구 프로그램인 DOE "Genomes to Life (GTL, 2001-2020)"에서도 *Synechococcus* 등 여러 광합성 미생물의 유전체 구조 및 기능을 밝히는 연구가 수행되고 있다. DOE는 2020년 까지 미세조류 연료의 1리터 당 가격을 1.5 달러 수준으로 낮추는 기술개발 계획안을 제시하였고, 2022년까지 조류 오일 10억 갤런/년 생산 시스템 정립 및 테스트베드 구축을 추진하고 있다. "Advancement in Sustainable Algal Production (ASAP)" 사업으로 옥외배양 (90일 이상 실증) 및 500 kg 조류 바이오매스/년 설비를 구축할 예정이다 (2012-2017, 2.1천만 달러). "Targeted Algal Biofuels and Bioproducts (TABB)" 프로그램을 통해 효율적인 이산화탄소 공급 및 오염방지와 함께 미세조류 이용 고부가가치 바이오제품 동시 생산기술 분야에 1.3-2.5천만 달러를 투자할 계획이다 (2015-2019). 군용 연료의 전략적 대체 목표 달성을 위해 2013년부터 미세조류, 비식용 바이오매스, 폐기물로부터 바이오연료 생산기술도 추진하고 있다 ("Biorefinery projects for Mil-spec renewable hydrocarbon fuels", 1.8천만 달러 투자). 최근에는 시아노박테리아 바이오디젤 연구 프로젝트를 추진하였는데, 바이오디젤 생산의 원료로 이용될 시아노박테리아 남조식물을 최적화하는 연구 프로젝트가 많이 진척된 상황이다 (Planning & Budge Office, 2015).

KOPRI 극지연구소

미 해군은 2020년까지 전체 연료의 절반을 대체에너지로 충당한다는 목표로, 유망한 대체연료 중의 하나로 미세조류 바이오연료의 시험사용을 확대하고 있다. 2011년 미세조류 항공유를 이용한 헬리콥터 시험비행, 2012년 미세조류 디젤의 구축함 운행을 추진하였다. 미국 오바마 대통령은 조류에서 생산한 휘발유, 경유, 제트연료가 수송용 석유 수입량의 17%를 대체할 수 있을 것으로 언급하였다. 미 민간기업도 적극적으로 미세조류 바이오연료 개발에 나서고 있다 (Table 6-1).

Table 6-1. 해외 민간기업의 바이오연료 개발 현황

기업명	내용
Chevron사	NREL (National Renewable Energy Laboratory)과 공동으로 'Algaeto-Biofuel Research' (조류이용 제트연료 및 바이오디젤 전환공정연구, 2006-2011) 연구를 수행
엑손모빌	Synthetic genomics와 함께 미세조류 기반 연료를 개발하는데 6억 달러 규모의 투자계획을 발표
Sapphire Energy사	사막에 22 에이커 규모의 대규모 개방형 미세조류 배양 시스템을 운전 중
BIOX Corp.	바이오연료제조업체 6700만 리터 규모의 바이오디젤 생산 라인 보유
IGPC사	15천 리터 바이오에탄올 생산이 가능하며, 캐나다 연방정부의 연간 생산목표의 11%에 달하는 대규모 생산라인임
Iogen Co.사	캐나다 바이오연료 생산업체 중 가장 높은 매출액을 기록하며 바이오에탄올, 펄프, 섬유에 이르기까지 다양한 바이오 제품을 생산하고 있음
Kior Inc.	목질계 에탄올을 생산하는 기업, 국제유가 하락에 따른 경쟁력 약화로 2014년 말 파산

미국은 셀룰로오스계 바이오에탄올 생산에 의한 수송용 연료 대체에너지 개발에도 주력하고 있다. 일종의 순환작물 또는 전 국토 내에서 함께 수용할 수 있는 바이오 에너지 연구를 위해 미국 내 18개 대학과 7개의 정부연구소를 한데 묶어 3개의 Bioenergy Research Center를 설립하였다. 옥수수 전분을 이용한 바이오에탄올 생산에 필요한 생산기술이 수년 간 빠르게 성장한 상황이며 학계나 공공연구기관을 중심으로 이루어지는 BT, NT 등 기초 분야와는 달리 정부와 산업계의 공동출자

연구를 장려하고 있다 (Planning & Budge Office, 2015).

프랑스는 GreenStars 프로그램으로 미세조류 바이오리파이너리 기술 개발을 (2012-2022, 1.6억 유로), 영국은 2020년까지 2.6천만 유로를 Algal Biofuels Challenges (ABC)에 투자할 계획이다 (Oh and Na, 2015). 프랑스는 Shamash 프로그램에 배정하여 해조류 활용에 대한 활발한 연구를 추진 중에 있다. Shamash 프로그램은 국립 연구청이 실현 가능한 생산모델의 개발을 위해서 프랑스 대학의 7개 연구팀으로 구성하여 미세조류에서 나온 지방산의 생산과 이를 바이오연료로 변형하는 연구를 수행하도록 지원하는 것이다 (Planning & Budge Office, 2015). 독일 Fraunhofer Institute for Interfacial Engineering and Biotechnology (IGB)는 조류 바이오매스 생산공정의 자동화 연구를 진행하고 있다 (Oh and Na, 2015). 프랑스, 스페인, 스웨덴에서 밀과 사탕수수를 주원료로 하여 약 50만 톤(전 세계 생산량의 약 3%, 2004년)의 바이오에탄올을 합성하고 있다. 스페인은 EU회원국 가운데 가장 많은 바이오에탄올을 생산(24만 톤, 2005년)하고 있으며, 그 밖에 스웨덴이 13만 톤으로 2위, 핀란드, 독일 순이다 (Planning & Budge Office, 2015). “Biofuel vision for 2030”에서는 섬유질계 바이오매스 확보 및 에탄올 생산을 강조하고 있다. 유럽의 운송연료의 25%까지 바이오연료 사용량 증가를 목표로 하고 있다. 주요내용 으로 ① Phase I (2006년~2010년) : 기존의 기술의 증가 및 섬유질계 바이오에탄올 생산기술을 위한 기술 개발이 핵심이며, ② Phase II (2010년~2020년) : 섬유질계 바이오에탄올 생산기술 확보 및 안정적인 섬유질계 바이오매스 확보가 핵심이며, ③ Phase III (2020년 이후) :대단위 섬유질계 바이오에탄올 생산기술 기반 확보를 목표로 하고 있다 (Planning & Budge Office, 2015).

일본은 1990-1999년에 대체에너지 신기술로 미세조류를 이용한 이산화탄소 고정화 및 탄화수소 생산에 관한 대형 연구프로그램을 국제공동연구로 진행하였다 (1990-1999, 1억 2천만 달러). 2000년 중반 이후 NIES와 Tsukuba 대학을 중심으로 미세조류 바이오디젤 연구가 다시 활성화되고 있다 (Oh and Na, 2015). 중국의 경우 Xinao SCI & Technology Dev Co., China Petro, Zhao Kai Biological Engineering Research and Development Center Co., Inner Mongolia Baotou Jinjiao Group, Yangpu Green Energy Technology Co., Jiaxing Chi Bio Energy Co. 등 다양한 미세조류 바이오에너지 회사가 운영 중이다. National Key Technology R&D Program, National Natural Science Foundation of China 등을 통해 적극적인 산학연 협력연구가 진행 중이다 (Oh and Na, 2015). 중국은 바이오부탄올 생산기술 (아세톤-부탄올 발효공정)이 산업적 수준에서 운영되고 있다. 전분

설탕, 셀룰로오스로부터 아세톤, 부탄올, 에탄올 생산을 위한 대규모 실용화 기술을 적용하고 있으며, 세계적으로 산업적 수준에서 부탄올생산이 가능한 나라는 중국이며, 국내 수요의 50%를 공급하고 있는 것으로 추측된다 (Planning & Budge Office, 2015). 참고로 태국의 경우에탄올과 바이오디젤생산량이 모두 늘어 총 16억 리터에 달했는데, 이는 2011년보다 40% 상승한 양이다. 인도는 에탄올 생산량이 25%으로 상승하여 5억 리터를 넘겼다 (Planning and Budget Office, 2015).

KOPRI
극지연구소

제 7 장 참고문헌

Altekar G, Dwarkadas S, Huelsenbeck JP, Ronquist F, 2004. Parallel Metropolis coupled Markov chain Monte Carlo for Bayesian phylogenetic inference. Bioinformatics 20 (3), 407-415.

Cho SJ, 2012. Microalgae spotlighted as the future resources. SERI Management Notes 170, 1-13.

Choi SA, Lee JS, Oh YK, Jeong MJ, Kim SW, Park JY, 2014. Lipid extraction from *Chlorella vulgaris* by molten-salt/inoic-liquid mixtures. Algal Research 3, 44-48.

Davey MP, Horst I, Duong GH, Tomsett EV, Litvinenko ACP, Howe CJ, Smith AG, 2014. Triacylglyceride production and autophagous responses in *Chlamydomons reinhardtii* depend on resource allocation and carbon source. Eukaryot Cell 13, 392-400.

Demirbas A, Demirbas MF, 2011. Importance of algae oil as a source of biodiesel. Energ Convers Manage 52, 163-170.

Ha SJ, Galazka JM, Kim SR, Choi JH, Yang X, Seo JH, Glass NL, Cate JHD, Jin YS, 2011. Engineered *Saccharomyces cerevisiae* capable of simultaneous cellobiose and xylose fermentation. Proc Natl Acad Sci USA 108 (2), 504-509.

Hong EM, Choi JY, 2007. Biomass and bioenergy: Potential estimation and current status and outlook. Korean National Committee on Irrigation and Drainage Journal 14 (2), 255-260.

Huelsenbeck JP, Ronquist F, 2001. MRBAYES: Bayesian inference of phylogenetic trees. Bioinformatics 17 (8), 754-755.

Jeon EJ, Han SH, 2014. Green Tech Review No. 2, Green Technology Center, Seoul

Kang DH, 2015. International trend of bioenergy from marine microalgae. SEE the SEA, 2015. 09.

KOPRI 극지연구소

Kim EJ, Jung W, Lim S, Kim S, Han SJ, Choi HG, 2016. Growth and lipid content at low temperature of Arctic alga *Chlamydomonas* sp. KNM0029C. Bioprocess Biosyst Eng 39, 151-157.

Kim KM, 2008. Bio-energy and biogas plant technology trend. KIC News 11 (3), 11-21.

Lee CG, 2009. Marine bioenergy derived from marine-algae. BT News 16 (1), 19-33.

Lee JS, 2014. Status and prospects of commercialization of biodiesel. The Magazine of the Society of Air-Conditioning and Refrigerating Engineers of Korea 33 (10), 45-49.

Lee JW, Park CH, 2011. Types and production methods of bioenergy. News & Information for Chemical Engineers 29 (4), 493-499.

Mata TM, Martins AA, Caetano NS, 2010. Microalgae for biodiesel production and other applications: A review. Renew Sust Eng Rev 14, 217-232.

Oh YK, Na JG, 2015. Microalgal biodiesel production process. KIC News 18 (3) 1-14.

Planning & Budge Office, 2015. Technical and industrial trends of agricultural bioenergy. International R&D Trends in Agriculture and Food 2015-5, 1-17.

Posada D, Crandall KA, 1998. MODELTEST: testing the model of DNA substitution. Bioinformatics 14, 817-818.

Roh SH, Lee SW, Kim KR, Kim SI, 2012. Electricity generation from dairy wastewater using microbial fuel cell. Appl Chem Eng 23 (3), 297-301.

Ronquist F, Huelsenbeck JP, 2003. MrBayes 3: Bayesian phylogenetic inference under mixed models. Bioinformatics 19 (2), 1572-1574.

Sasser M, 1990. Identification of bacterial by gas chromatography of cellular fatty acids. Technical #101, M. I. Inc., Newark. DE.

Seo JH, 2011, Necessity of biochemical industry developments and strategies. BT News 18 (2), 8-12.

Sheehan J, Dunahay T, Benemann J, Roessler P, 1998. A Look Back at the

KOPRI 극지연구소

U.S. Department of Energy's Aquatic Species Program: Biodiesel from Algae, NREL/TP-580-24190 (Golden, CO: NREL) www1.eere.energy.gov/biomass/pdfs/biodiesel_from_algae.pdf.

Smith SW, Overbeek R, Woese CR, Gilbert W, Gillevet PM, 1994. The genetic data environment an expandable GUI for multiple sequence analysis. Comput Appl Biosci 10, 671-675.

Stamatakis A, 2006. RAxML-VI-HPC: maximum likelihood-based phylogenetic analyses with thousands of taxa and mixed models. Bioinformatics 22, 2688-2690.

Yoon TD, Shim YJ, 2012. A review on Brazilian bioethanol researches. Iberoamerica 14 (1), 143-177.

KOPRI
극지연구소