

발간등록번호

11-1543000-001695-01

기능성 천연 감미료 소재 글로벌 상용화 기술 개발 최종보고서

2017. 7

주관연구기관 / 씨제이제일제당(주)
협동연구기관 / 건국대학교
경북대학교

고부가가치식품사업 R&D Report

농림축산식품부

제 출 문

농림축산식품부 장관 귀하

본 보고서를 “기능성 천연 감미료 소재 글로벌 상용화 기술 개발”(개발기간: 2011. 9. 29 ~ 2016. 9. 28)과제의 최종보고서로 제출합니다.

2017. 7.

주관연구기관명 : 씨제이제일제당(주) 김 철 하 (인)

협동연구기관명 : 건국대학교 산학협력단 서 정 향 (인)

경북대학교 산학협력단 최 제 용 (인)

위탁연구기관명 : 조선대학교 산학협력단 이 인 화 (인)

참 여 기 업 명 : 씨제이제일제당(주) 김 철 하 (인)

주관연구책임자 : 김 성 보

협동연구책임자 : 오 덕 근, 이 동 우

위탁연구책임자 : 이 성 행

참여기업책임자 : 김 성 보

국가연구개발사업의 관리 등에 관한 규정 제18조에 따라 보고서 열람에 동의합니다.

보고서 요약서

과제고유번호	311042-5	해당단계 연구기간	2011.09.29 ~2016.09.28	단계구분	5차년도(종료)/5년
연구사업명	중사업명	농식품기술개발사업			
	세부사업명	고부가가치식품기술개발사업			
연구과제명	대과제명	기능성 천연 감미료 소재 글로벌 상용화 기술 개발			
	세부과제명				
연구책임자	김성보 오덕근 이동우	해당단계 참여 연구원 수	총: 명 내부: 명 외부: 명	해당단계 연구개발비	정부: 천원 민간: 천원 계: 천원
		총연구기간 참여 연구원 수	총: 55명 내부: 55명 외부: 명	총연구개발비	정부: 1,300,000천원 민간: 1,300,000천원 계: 2,600,000천원
연구기관명 및 소속부서명	씨제이제일제당(주) 건국대학교 경북대학교			참여기업명 씨제이제일제당(주)	
위탁연구	연구기관명: 조선대학교			연구책임자: 이성행	
<p>타가토스 생산 원료인 유당의 가격 및 수급 불안정으로 인하여 이를 대체할 원료를 탐색하였음. 식품가용 부산물인 탈단백 유청과 자연계에 존재하는 바이오매스인 낙엽송을 후보 원료로 선정하여, 갈락토스를 추출하는 공정을 개발하였음. 또한, 원료 수급을 위한 해외 업체와의 협력관계를 구축하고 타당성 검토를 통하여 제조원가를 산출하였음.</p> <p>일반 범용원료인 포도당이나 과당으로부터 타가토스를 생산하기 위한 신규효소를 확보하기 위한 연구를 진행하였으며, 그 결과 세계 최초로 원전효소를 확보하여 특허화 하였음. 효소탐색 및 선별을 위한 다양한 스크리닝 방법을 개발하였고, 효소의 결정구조분석을 통하여 단시간에 개량효소를 확보하고자 하였음. 최종 확보한 효소의 인체 및 환경에 대한 안전성을 평가하고 이를 이용하여 타가토스를 생산하기 위한 LMO승인 심사를 진행 중에 있음.</p>				<p>보고서 면수 116면</p>	

국문 요약문

		코드번호	D-01			
연구의 목적 및 내용	<p>[연구 개발의 최종목표]</p> <p>타가토스의 원료물질인 갈락토스의 안정적인 공급은 타가토스의 경제적 생산을 위한 필수적 요소임. 이에 본 과제에서는 저가의 대체원료를 이용한 타가토스의 일반 식품 원료로서의 실질 범용화·상용화함을 기술적 핵심 목표로 함. 씨제이제일제당은 기존에 개발·보유하고 있는 “타가토스 생산 효소 및 분리/정제 공정 기술”을 기반으로 개발된 세부 핵심 기술을 상용화 기술 단계로 완성하고자 하였으며, 이와 함께 개발 신소재의 시장 개척(확대)을 위한 응용 특성 연구를 심화할 뿐 아니라 타가토스 신소재를 “일류 국가 상품”으로 지속 발전시키고자 함.</p> <p>[연구 개발의 주요내용]</p> <ul style="list-style-type: none"> ○ 대체원료 소재 추출 공정 기술 개발 <ul style="list-style-type: none"> • 바이오매스 원료별 전처리 공정 조건 최적화, 공정 시뮬레이션을 통한 원가 산출 및 최적 기반 원료 선정 • 선정 원료의 단위 공정 scale-up 최적화, 통합 공정 시스템 최적화, 시제품 제작 ○ 갈락토스 추출 부산물 유래 신규 기능성 당류 소재 발굴, 공정 최적화, 시제품 제작 ○ 대체원료 가수분해 효소 개발 및 상용화 <ul style="list-style-type: none"> • 신규 효소 자원 스크리닝, 기질 반응 특성 데이터베이스화 및 갈락토스 생산 효소 반응 조건 최적화 • 단백질 구조기반 도메인 통합 분석 및 플랫폼 구축, 초고속 스크리닝을 이용한 공정효소 개량 • 최적 개발 효소 유전자의 식품미생물 고발현 최적화, scale-up, LMO안전성 평가 연구 결과 확보 ○ 반응 부산물 재활용 기술 개발 <ul style="list-style-type: none"> • 합성 생물학 기반 신규 당전환 효소 개발 및 이를 이용한 갈락토스 수율 개선 반응 공정 최적화 ○ 일반 감미료 소재 완전 대체를 위한 감미/관능 특성 연구 및 복합 감미제 개발 <ul style="list-style-type: none"> • 타가토스 기반 복합감미제 포뮬러 개발, 국/내외 가공식품회사와의 공동 응용 제품 개발 					
	연구개발성과	<ul style="list-style-type: none"> ○ 타가토스 제조원가 3\$/kg이하 달성: 현재 약 2.7~3\$/kg수준 ○ 글로벌 Hit상품 출시: 씨제이제일제당 감미료 통합브랜드인 ‘스위트리’ 런칭. 스위트리 제품군에 타가토스와 타가토스-설탕 혼합감미료가 포함되어 있음 ○ 부산물 유래 기능성 소재 개발: 낙엽송으로부터 갈락토스를 추출하고 남은 부산물로부터 기능성 소재인 taxifolin을 제조하였으며, taxifolin의 항산화 기능성 결과 확보 				
	연구개발성과의 활용계획 (기대효과)	<ul style="list-style-type: none"> ○ 국내 식품 소재의 글로벌 Hit 상품화(국가 초일류 상품) ○ 건강기능성 감미료 소재 적용 가공식품 확대로 국민 건강 기여 ○ 국내 바이오매스 유래 대체에너지 기술의 사업 경쟁력 강화의 기반 요소 기술 확보 				
중심어 (5개 이내)	감미료	효소	대체원료	상용화	항당뇨	

〈 SUMMARY 〉

	코드번호	D-02
Purpose & Contents	<p>[Purpose of study]</p> <p>Stable supply of galactose, the raw material for tagatose synthesis, is important for economical production of tagatose. Our research goal is to develop a novel method to produce tagatose from an inexpensive raw material so that tagatose becomes a widely used/commercially available general food ingredient. CJ is currently trying to advance the already existing “tagatose synthesizing enzyme and separation/purification technology” to a more complete commercializable technology level. In addition, trying to intensify research which can be applied to find new materials that could act as a new market frontier. And based on this, continuously develop tagatose as a ‘leading national product’.</p> <p>[Contents of study]</p> <ul style="list-style-type: none"> ○ Alternative raw material extraction technology development <ul style="list-style-type: none"> • Optimization of biomass material preconditioning process, estimation of cost and selection of best base material by process simulation • Optimizing scaling-up of unit process of the selected material, optimization of the integrated process system, production of the prototype. ○ Discovery of new functional sugar derived from galactose extraction by-product, process optimization, prototype production(to be used for material evaluation) <ul style="list-style-type: none"> • Development and commercialization of substitution material hydrolyzing enzyme • Novel enzyme screening and reactive substrate database creation, optimization of galactose producing enzyme reaction condition • Protein structure based domain analysis and platform construction, improvement of enzymes by HTS • Optimization of high bacterial expression of the best designed enzyme gene, Scale-up, procurement of GM safety evaluation research ○ Development of by-product recycle technology <ul style="list-style-type: none"> • Novel sugar converting enzyme development based on synthetic biology and utilizing this enzyme to optimize reaction process which improves galactose yield • Sweetness/Sensory characteristic research and complex sweetener development which will replace the common sweetener • Develop tagatose based sweetener mix formula, development of application products by collaborating with national/international processed food companies 	

Results	<ul style="list-style-type: none"> ○ Achieve tagatose production cost that is under \$3/kg: current production cost is between \$2.7 and \$3/kg ○ Launching a global hit product: launched CJ sweetener brand 'Sweet tree' which include tagatose and tagatose-sugar mixture products. ○ Development of functional material which originate from by-products: manufactured taxifolin from the by-product of galactose extraction from cypress tree, acquired result which shows that taxifolin is an antioxidant 				
Expected Contribution	<ul style="list-style-type: none"> ○ Domestic food material becoming a global hit product ○ Contribute to the national health level by utilizing healthy sweetener to processed food ○ Procure fundamental technology to produce alternative energy from biomass 				
Keywords	sweetener	enzyme	substitution raw material	commercialization	anti-diabetic

Table of contents

1. Introduction	1
2. Status of the art	7
3. Contents and result of the project	8
4. The extent of research achievement and contribution	91
5. The application of research results	97
6. The advanced technical information collected during research	98
7. Security level for research products	100
8. Status of research facility.equipment registered at the national science and technology information system	100
9. Performance results of safety measure at laboratories during research	101
10. Research achievements	108
11. The others	108
12. References	109

〈 목 차 〉

1. 연구개발과제의 개요	1
2. 국내외 기술개발 현황	7
3. 연구수행 내용 및 결과	8
4. 목표달성도 및 관련분야에의 기여도	91
5. 연구결과의 활용계획 등	97
6. 연구과정에서 수집한 해외과학기술정보	98
7. 연구개발성과의 보안등급	100
8. 국가과학기술종합정보시스템에 등록된 연구시설·장비현황	100
9. 연구개발과제 수행에 따른 연구실 등의 안전조치 이행실적	101
10. 연구개발과제의 대표적 연구실적	108
11. 기타사항	108
12. 참고문헌	109

<별첨> 자체평가의견서

1. 연구개발과제의 개요

코드번호	D-03
------	------

1-1. 연구개발 목적

- 타가토스의 원료물질인 갈락토스의 안정적인 공급은 타가토스의 경제적 생산에 큰 비중을 차지함. 본 연구에서는 저가의 대체원료를 이용한 타가토스 제조방법을 독자적으로 개발하여 일반 식품 원료로서의 실질 범용화·상용화함을 기술적 핵심 목표로 하고자 함. 씨제이제일제당이 기존에 개발하여 보유하고 있는 ‘타가토스 생산 효소 및 분리·정제 공정 기술’을 기반으로 하여 개발된 세부 핵심 기술을 상용화 기술 단계로 완성하고자 하며, 이에 더하여 개발 신소재의 시장 개척(확대)을 위한 응용 특성 연구를 심화하고 이를 토대로 타가토스 신소재를 “일류 국가 상품”으로 지속 발전시키고자 함.

1-2. 연구개발의 필요성

- 지난 반세기 동안 고도의 산업화와 함께 의학·의료기술, 생명공학의 비약적인 발전에 따른 현대인의 건강하고 행복한 삶에 대한 관심이 크게 증가하고 있음. 최근 들어 건강에 가장 중요한 부분을 차지하는 식품도 단순히 영양 및 감각에 영향을 주는 1, 2차적인 기능의 제공에서 여러 생리활성 성분에 의한 ‘생체조절 기능’ 및 ‘건강증진’을 나타내어 질병예방 및 건강향상에 도움을 주는 3차적인 기능을 나타내는 기능성 식품으로 그 패러다임이 바뀌고 있음. 대표적으로 충치 예방 효과로 널리 알려진 ‘자일리톨’에 대한 소비자의 폭발적인 반응만 보더라도 현대인의 건강한 삶에 대한 관심과 열의가 대단히 크다는 것을 알 수 있음. 이러한 관점에서 모든 식품의 주원료로 사용되고 있는 설탕이나 과당과 같은 자연 당질 감미료의 칼로리 과잉과 이로 인한 비만, 당뇨, 면역력 약화 및 충치 유발 등 수 없이 많은 건강에 대한 부정적인 측면이 널리 알려져 있어, 이를 대체할 수 있는 기능성 신감미료 개발은 시대가 요구하는 맛, 영양 및 건강을 증진시킬 수 있는 식품의 기능성 부여에 필수적임.
- 이미 지난 수십 년간 설탕을 대체할 감미료의 개발 및 판매가 전 세계적으로 이루어져 왔음. 개발된 설탕대체 감미료는 크게 설탕보다 단맛이 훨씬 강한 ‘비탄수화물 고감미도 감미료’(예: 스테비오사이드, 아스파탐, 수크랄로스 등)와 단맛은 약하나 생리적 기능을 지닌 ‘탄수화물 감미료’(당알코올류, 올리고당류 등)로 구분됨. 그러나 그 어느 것도 설탕대체감미료로써 설탕과 유사한 ‘단맛’은 물론 설탕이 지니는 식품에서의 ‘풍미’와 ‘물성’에 미치는 영향을 나타낼 수 없어, 범용 소재로서 그 성장의 한계가 큼.
- 최근 학계 및 식품업계에서 설탕 대체감미료 소재로써 가장 각광을 받고 있는 타가토스(tagatose)는 자연계에 존재하는 갈락토스(galactose)의 이성체인 keto-hexose로 설탕과 거의 동등한 수준 감미도(설탕의 92%)를 가지고 있는 저칼로리(1.5kcal/g) 감미료임. 또한 설탕과 가장 유사한 물리적 성질(맛, 물리화학적 특성)을 가진 탄수화물 감미료로서 정상효과, 풍미증진효과가 있어 다이어트 제품의 저칼로리화, 당뇨병 환자용 식품(저혈당 치료 효과: 미국에서 제약 3상 임상실험성공), 껌, 초콜렛의 무설탕 제품 등 기능성 식품에 광범위하게 사용될 수 있으며, 설탕의 직접

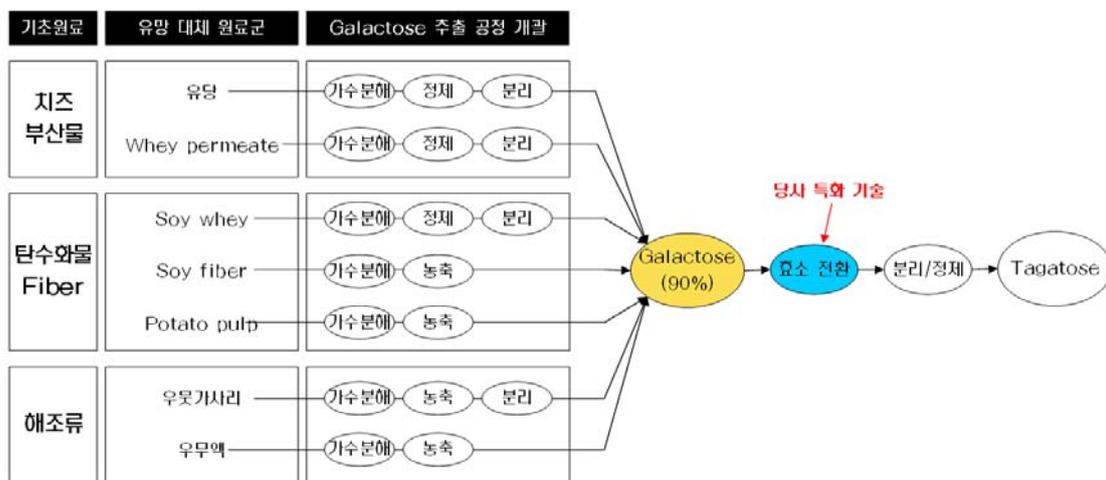
대체품으로 table-top sweetener로도 사용될 수 있음. 이와 더불어 화장품, 의약품 제제의 bulking agent, 여러 가지 광학활성 화합물의 합성을 위한 중간체 등 용도가 다양하여 세계시장은 약 70조원에 달할 것으로 추정.

- 그러나 타가토스는 자연계에 미량으로 존재하는 희소당(rare sugar)이기에 대량수득에 한계가 있음. 타가토스는 갈락토스로부터 Ca(OH)₂를 촉매로한 화학적 이성화법으로 생산이 가능하나 회수 및 정제가 어렵고 공정이 복잡하여 고순도의 제품을 얻기가 여의치 않으며, 화학공정의 특성상 부산물 발생으로 인한 환경문제가 대두되기에, 시대가 요구하는 환경친화적 저에너지 고효율의 녹색생물공정으로의 전환이 절실히 요구됨.
- 실질 상용화 및 글로벌 소재화를 위해서는 단순한 ‘기술 차별성’이 아닌 ‘실질 사업화를 위한 핵심 기술 요소’의 확보가 무엇보다 중요함. 감미료는 가공식품(설탕함량 10 ~ 35%)의 주원료로서 제조원가에 직접적으로 영향을 주기 때문에 범용화의 필수인 경제성에서 자유롭지 못함. 따라서 향후 직접적인 설탕대체 감미료로서의 타가토스 생산은 ‘저가 대체원료’의 안정적 확보와 ‘출발물질의 고효율적 이용기술개발’이 필수적으로 해결되어야 함.
- 유당(Lactose)은 타가토스를 상용화할 수 있는 유일한 원료로 현재 평가받고 있으나, 유당의 수급 불안정성과 고가인 가격은 타가토스의 제조원가에 직접적으로 영향을 주어 보다 안정된 가격의 저가 원료로의 전환은 양산화의 필수 요건임.

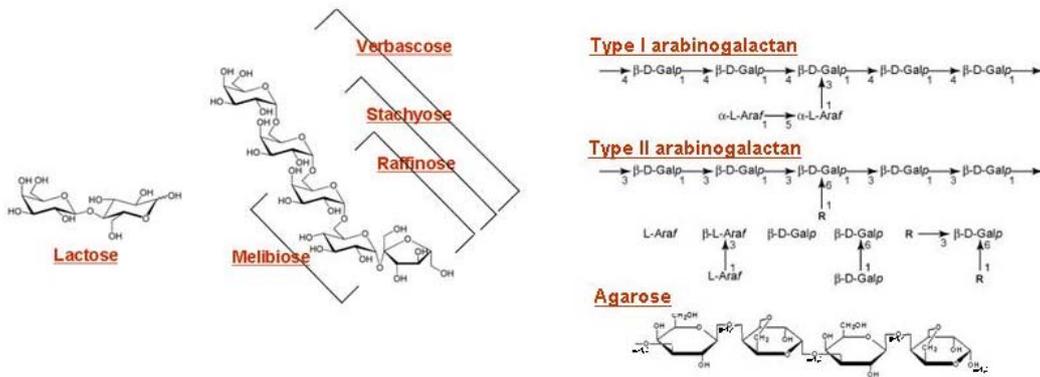
1-3. 연구개발 범위

가. 대체 원료 소재 스크리닝 및 추출 기술 개발

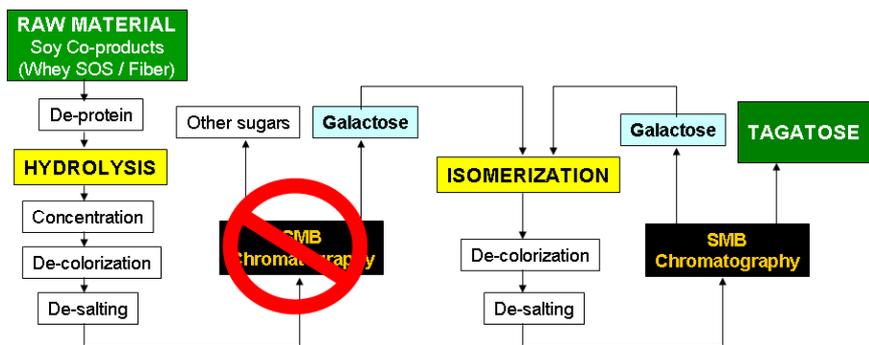
- 씨제이제일제당은 타가토스 생산의 핵심 차별화 기술인 “이성화 효소 전환 기술”은 보유하고 있으나, 원료 물질인 갈락토스의 생산은 유당에 의존하고 있음. 따라서 아래 그림과 같이, 다양한 대체 원료로부터 갈락토스를 경제적으로 공급 가능한 기술 플랫폼 구축은 최종 제품의 가격 경쟁력 뿐만 아니라, 원료 공급 안정성 및 선택성을 부여할 수 있는 매우 중요한 사업화 요소가 될 것임.



- 현재까지 자연계에 존재하는 갈락토스는 대부분 불용성 첨유소(유당, 대두올리고당 제외)로 존재하고 있으며, 아직까지 일부 제약용 당으로의 사용 외에는 산업적 활용도가 대단히 낮음. 또한 지금까지의 바이오매스 전처리 기술의 경우 셀룰로오스 기반의 대체 에너지 생산 기술에 한정되어 있어, 식품용 갈락토스를 수득하기 위한 요소 기술의 개발은 그 완성도가 매우 낮은 상황임.
- 자연계에 갈락토스를 과량 함유하고 있는 탄수화물을 전체적으로 분류하면, 동물의 젖 내 유당 및 콩과 식물체 내에 함유된 라피노스(raffinose)와 같은 수용성 당, 육상계 식물체의 구조 탄수화물 성분인 아라비노갈락탄(arabino-galactan), 해조류 일부의 구조 탄수화물 성분인 아가로갈락탄(agarogalactan) 등이 있음. 이에 대한 구조적 특성은 아래 그림에 정리하였음.



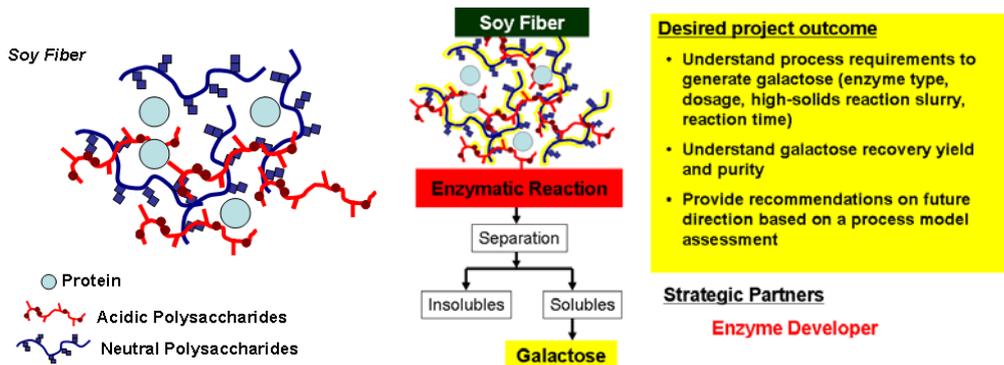
- 상대적으로 쉽게 수득할 수 있는 공정 부산물인 유당 및 올리고당(Raffinose, Stachyose 등)류는 대부분 수용성 물질로서, 매우 낮은 농도로 존재. 이는 실질적으로 분리·정제 공정을 통하여 고순도·고농도로 갈락토스를 수득하기 위하여 대단히 많은 비용의 가공비가 발생하는 구조적 한계점을 가지고 있음.
- 당사의 경우 대두 유청 내 존재하는 올리고당류(Raffinose, Stachyose, Verbascose 고농도 함유)를 고순도·고농도로 정제하고 이를 이용하여 타가토스를 생산하는 기술을 신규 개발하고 특허기술[1] 선점을 하였으나, 그 실질적인 생산 원가는 유당보다 다소 높은 수준임. 특히 공정 제조원가 분석을 수행한 결과, 제조원가 상승의 주된 요인은 가수분해로 생성된 다른 당류(포도당, 과당 등)의 분리·정제에 사용된 유틸리티비용임. 공정시뮬레이션은 SuperPro simulation program(MIT, USA)을 이용하였음.



- 이러한 다년간의 갈락토스 생산용 바이오매스 자원 탐색의 경험을 바탕으로, 씨제이제일제당은 원가 경쟁력을 가진 갈락토스의 생산을 위한 핵심 요소는 ‘고순도 갈락토스 수득을 위한 전처리 기술’로 정의하고, 이를 확보할 수 있는 원료 및 기술 요소를 아래와 같이 도출하였음.

Key Success Factor: 갈락토스를 선택적으로 추출하여 갈락토스 고함량(80% 이상) 상등액 회수

- 유망 원료: 불용성 식이섬유(type I & II arabino-galactan, agarose)



- 기술 요소:

- 갈락토스 함량이 높은 바이오매스 원료소재 스크리닝 및 Cellulose Matrix 구조 규명
- 원료소재 탄수화물 구조에 적합한 선택적 가수분해 효소 유전자원 확보
- 식품미생물을 기반으로 한 효소 대량 생산 및 GM 효소 안전성 확보
- 전처리·추출 공정 기술 개발 및 분리·정제공정 설계 최적화

- 본 연구개발과제에서는 대체원료 기술을 중심으로 하여, 기초 연구 및 상용화를 효율적으로 추진하기 위하여 필요 협력 기술 분야인 효소 개발 분야를 전문 연구 컨소시엄화 하고자 하였음.

나. 식품 상용당(포도당, 과당)의 효소적 전환 기술 개발

- 갈락토스는 현재 타가토스를 상용화할 수 있는 유일한 생산원료로 현재 평가받고 있으나, 이러한 원료생산을 위한 유당 수급 및 원가의 불안정은 타가토스의 제조원가에 직접적으로 영향을 줌. 따라서 보다 안정된 원료의 수급 및 타가토스 생산원가의 저감 및 안정화로의 사업전환은 향후 글로벌 양산화를 위한 선행 필수 요건임.
- 포도당 및 과당은 오랫동안 식품산업 상용당으로 광범위하게 활용되고 있어, 식품소재로서 글로벌 상용화를 위한 선결 요건인 생산 기술(바이오매스 전처리 및 효소 이성화) 및 원가 면에서 소재의 범용화를 위한 최고의 수준에 도달해 있음. 그러나 이러한 상용당의 고부가가치화를 위한 국내외 선행의 연구개발은 주로 기능성 올리고당류 생산 개발 및 그 식품응용 연구에 편중 되어 있어, 기존과 차별화된 고부가가치를 창출하는 신사업 아이템 및 그에 따른 핵심기술 개발이 요구됨.

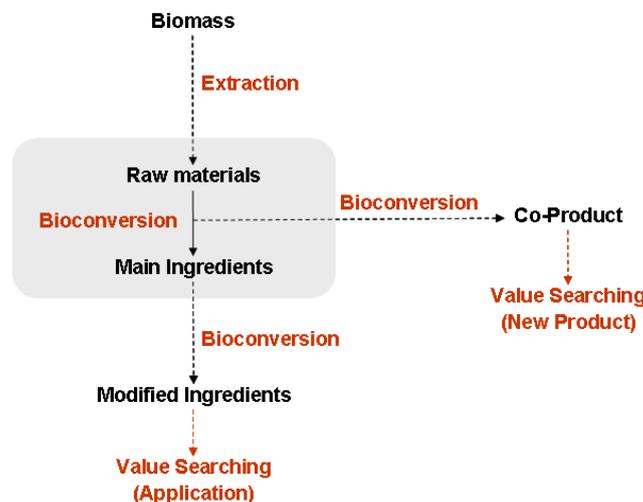
○ 따라서, 향후 타가토스를 초일류 국가기술식품소재로 개발하고, 글로벌 상용화하기 위하여, 본 연구과제에서는 상기 목적으로 원천 사업화를 확보할 수 있는 차별화된 핵심 효소기술개발을 아래와 같이 도출하였음.



- 기술 요소 포도당/과당 4-에피머화 효소활성 보유 효소 종 스크리닝 및 유전자원 확보 (미생물배양/유전체상 관련 유전자 발현 후, 조효소액 추출액 이용 상기 효소활성 스크리닝)
- 선정 후보 효소 종의 특성 분석 및 반응 메커니즘 분석
- 산업적 효소개량 (site-directed mutagenesis/rational design & HTS 이용 gene shuffling/directed evolution)
- 식품미생물 기반 효소 대량 생산기술 및 GM 효소 안전성 확보
- 효소반응 및 분리·정제과정 설계 최적화

다. 반응 부산물(포도당 등) 재활용 기술 개발

○ 갈락토스는 산업적으로 활용성이 거의 없어, 대체 원료로서 개발 시 ‘기술 선점’ 효과를 기대할 수 있으나, 대부분의 후보 대체 원료 소재 내 함유된 갈락토스는 상대적으로 낮은 함량(문헌값 기준 10 ~ 20 %)으로 존재함. 따라서 비록 이를 최대한 고순도로 추출하기 위한 요소 기술을 중점적으로 개발한다 하여도, 가수분해 시 생성되는 반응 부산물(포도당, 아라비노스 등)을 효율적으로 제거하는 기술은 매우 중요하며 필수적임. 바이오매스를 원료 기반으로 한 탄수화물(감미료) 소재의 개발 포트폴리오는 다음과 같이 종합적으로 정리됨.



이러한 기술 개발 flow를 바탕으로, 타가토스 연계 기술 개발 목표를 설정하면 아래와 같음.

<반응 부산물 재활용 기술 개발 목표>

- 1단계: 추출 공정 산물 내 불순물(기타 당류) 저감화 기술(발효 또는 막분리 기술 등)
- 2단계: 부산물 고부가가치 신소재 개발
- 3단계: 일반 당류(포도당, 과당 등)의 갈락토스·타가토스 전환 기술(발효 또는 효소 기술)

라. 일반 감미료 소재 완전 대체를 위한 감미 / 관능 특성 연구 자산화

- 식품에서 설탕이나 과당 등의 고열량 자연당을 타가토스로 대체하기 위해서는 감미질 뿐만 아니라 농도에 따른 단맛 강도 및 관능적 특성에 대한 연구 자산화가 필요.
 - 감미료 소재 종류별 감미도 및 관능적 특성 데이터베이스화
 - 기타 감미료 소재와의 혼합 감미 특성 및 상승 효과 연구

마. 안전성 확보 및 시제품 생산

- 대체원료의 상용화에는 신규한 효소 개발(가수분해 효소, 당전환효소 등)이 필수적임.
 - 신규 개발 효소의 GM 안전성 평가 연구 및 시제품 생산

2. 국내외 기술개발 현황

코드번호

D-04

2-1. 국내 제품생산 및 시장 현황

- 씨제이제일제당 외 국내 타가토스 제조사 없음.
- 최근 고탄수화물 식이행태로 인해 발생하는 여러 생활습관병의 예방, 관리 목적으로 타가토스의 낮은 칼로리와 Anti-hyperglycemic 효과를 활용한 기능성 음료, 커피, table-top 감미료 등의 일반 가공식품 출시예정.

2-2. 국외 제품생산 및 시장 현황

- Arla Foods(덴마크)의 화학적 합성 제품이 2000년 상용화 되었으나, 화학적 전환공법의 한계로 인한 품질 및 원가의 이슈로 사업이 중단되었음(2006년).
- Nutrilab(벨기에)이 효소전환반응을 이용한 제품 사업화를 2010년 말까지 실현할 것이라 공표하였으나, 지금까지 확인된 내용 없음.

(<http://www.foodnavigator.com/Financial-Industry/Tagatose-production-expected-by-end>)

현재까지 글로벌 시장에서 타가토스를 상용화 할 수 있는 경쟁사는 없음.

- 씨제이제일제당은 개발중인 타가토스의 Pre-marketing을 위해 글로벌 식품 회사들에게 제품 제안활동을 진행하였으며, 타가토스의 상품화를 위한 과정으로서 미국 FDA GRAS 및 유럽 Novel Food를 취득하였음.
- 세계적으로 연간 8%씩 꾸준히 증가하는 당뇨병자와 비만환자로 인해 야기되는 사회적 이슈에 대비하여 '고열량 저영양 식품'에 대한 규제가 강화되고 있으며 이에 따른 기능성 감미료의 시장 잠재성은 매우 높다고 판단할 수 있음.

3. 연구수행 내용 및 결과

설탕 대체제로서의 타가토스 생산에 있어 원료의 안정적인 확보와 효율적 이용 기술 개발은 필수적임. 현재 사용하고 있는 유당은 타가토스를 상용화 할 수 있는 유일한 원료로 평가받고 있으나, 유당의 수급 불안정성과 높은 가격 변동폭은 타가토스의 제조원가에 직접적인 영향을 주고 있음. 이에 보다 안정된 가격의 저가원료로의 전환은 타가토스 양산화에 있어 필수 요건이라 할 수 있음. 총 5년의 연구기간동안 세부기관 씨제이제일제당과 협동기관 건국대학교, 경북대학교는 각 기관이 보유하고 있는 연구 능력을 기반으로 하여 다음과 같은 연구를 수행하였음.



연구 분야는 크게 사용원료를 기준으로 하여 바이오매스기반 기술 상용화와 일반당 원료기반 기술상용화로 나눌 수 있음. 바이오매스기반 기술 상용화는 식품 가용 부산물 또는 식물성 바이오매스로부터 대체원료 소재를 발굴, 이를 활용한 타가토스 제조 공정기술 개발과 원료의 수급가능성 및 타당성평가를 통하여 실제 타가토스 생산에 사용 가능한 원료를 확보하는 것을 목표로 연구가 진행되었음. 동시에, 기존 타가토스 생산효소인 L-arabinose isomerase(L-AI)의 특성을 개량하는 연구도 병행하였음.

일반당 원료 기반 기술 상용화는 범용원료인 포도당 또는 과당으로부터 타가토스를 생산하기 위한 신규효소를 발굴하고 이를 개량하여 산업화에 적용 가능한 수준의 효소를 확보하는 것과, 대사공학기술을 적용한 생물전환기술을 개발하는 것을 목표로 연구가 진행되었음.

1장. 대체원료 기술 개발

바이오매스 중 갈락토스 함량이 높다고 알려진 탈단백 유청과 낙엽송의 전처리 공정조건의 최적화, 원료 수급성 및 타당성평가를 통하여 적용 가능한 원료를 선별하고자 하였음.

1. 탈단백 유청 (DWP; Dry Whey Permeate)

가. 탈단백 유청 활용 갈락토스 생산을 위한 추출, 분리, 정제공정 개발

유청 분리 단백질의 제조공정 중 발생하는 부산물인 탈단백 유청(DWP; Dry Whey Permeate)의 성분 분석을 진행함. 탈단백 유청의 성분분석 결과는 아래 표 1과 같음. 탈단백 유청 내에 85% 이상 당을 함유하고 있음(유당 85%, 갈락토스 1.6%). 당 성분 외 단백질, 지방, 여러 종류의 무기염, 중금속을 포함. 당 성분을 제외한 상기 나머지 성분에 대하여 물리 화학적 전처리를 통하여 이를 제거하는 것이 필요함.

표 1. 탈단백 유청의 성분

총 성분	총 탄수화물	86.9%
	총 단백질	3.6%
	총 지방	0.2%
	수분	-
	회분	9.5%
염	칼슘 이온	742.99mg/100g
	마그네슘 이온	135.54mg/100g
	나트륨 이온	563.99mg/100g
	칼륨 이온	2231.12mg/100g
	철	0.22mg/100g
	인	113.1mg/100g
	아연	0.05mg/100g
	구리	0.03mg/100g
	망간	0.01mg/100g
	셀레늄	36.23µg/100g
당	유당	85.1%
	갈락토스	1.6%

(1) 탈단백 유청 내 불용성 물질 제거를 위한 전처리 공정

- Hilmar사 탈단백 유청 4g을 물 20ml에 현탁, 용해(~20%, w/v)시켜 탈단백 유청 용해액을 제조하고, 물리.화학적 전처리를 통하여 탈단백 유청 내 당 함량 변화 및 반응부산물의 생성 없이 고형 불용성 침전을 유도하여 불순물만을 제거하고자 함. 열처리 및 pH 조건 변화에 따른 탈단백 유청 용해액 내 불용성 물질 침전 제거정도를 평가하기 위해서 상기 제조된 탈단백 유청 용해액을 50~80°C에서 1시간 동안 열처리를 실시. 또한, pH조건별 평가시료는 현탁액을 HCl 및 NaOH로 pH 4.0~8.0로 적정 후, 상온(~25°C)에서 1시간 동안 처리하였음. 원심분리를 통하여 상등액을 회수하였고, pH(pH meter 사용), 전도도(conductivity meter 사용), Brix(Brix meter 사용), 유당(HPLC 사용 당조성 정성 및 정량 분석) 및 단백질 함량(Bradford Protein Assay 사용 단백질 함량 정량분석법 이용), 침전물 생성 정도 변화를 분석하였음(표 2).

표 2. 전처리 조건에 따른 pH, 전도도, Brix, 유당, 단백질 농도

분석항목	온도 (°C)-60분 반응 ^a				pH(HCl/NaOH로 pH보정)-상온 60분 반응				
	50	60	70	80	4.0	5.0	6.0	7.0	8.0
pH	5.745 (5.778) ^b	5.712 (5.763)	5.6 (5.796)	5.449 (5.781)	3.9	5.0	6.1	7.0	7.7
전도도 ($\mu\text{s}/\text{cm}$)	11980 (12040)	11670 (12130)	11630 (12220)	11850 (12200)	14030	12500	11720	12390	12910
Brix (%)	16.82 (16.82)	16.75 (16.49)	16.65 (16.61)	16.76 (16.76)	16.2	16.7	16.5	16.4	16.6
Lactose (g/L)	159.3 (153.1)	153.7 (156.0)	154.8 (153.3)	155.9 (155.5)	145.8	157.5	155.4	153.1	151.5
단백질 (g/L)	0.230 (0.227)	0.2233 (0.227)	0.229 (0.227)	0.228 (0.228)	0.217	0.232	0.238	0.237	0.239

^a 20% (w/v) DWP용해액의 pH는 5.7임

^b 괄호안 각수치는 가열 처리되지 않은 반응 전 시료의 분석치임

○ 표 2 에서 알 수 있듯이, 열처리(50~80°C) 온도 조건 변화에 따라 유당 함량 및 그 외 단백질 함량, Brix, pH, 전도도 변화는 나타나지 않음. pH4~8의 변화에 따라서도 유당 함량 및 그 외 단백질 함량, Brix, pH, 전도도의 유의적 변화는 나타나지 않음. 상기 결과는 열처리 온도 및 pH 조건 변화의 전처리 시 탈단백 유청 용해액내 당 함량의 변화가 없고, 또한 단백질 변성이나 반응부산물의 생성이 없음을 보여줌.

○ 그러나 열처리 온도 증가에 따라 원심분리 후 단백질 및 탄수화물(유당) 성분이 아닌 고형 불용성물질 침전화 정도가 증가함을 관찰할 수 있었으며, 특히 20%(wt/v) 탈단백 유청 용해액의 pH를 증가시킴에 따라 불용성물질의 침전이 가속화되어, 원심분리 후 불용성물질의 침전 정도가 확연히 증가함을 관찰할 수 있었음. 20%(wt/v) 탈단백 유청 용해액의 효소 가수분해 조건을 고려하여, pH 6.8로 보정하여 70°C에서 30분간 열처리, 원심분리 한 결과 당 함량 변화 및 반응부산물 생성 없이 상기 불용성물질 약 4.5 중량%(건조침전물 무게/탈단백 유청 무게)를 제거할 수 있었음.

(2) 효소를 이용한 유당 가수분해

○ 탈단백 유청 용해액 중 유당의 효소적 가수분해를 위해 상용 효소인 DSM사 Maxlact® LG 5000을 사용. 앞서 전처리된 시료와 1%(wt/v) 농도의 효소를 넣고 38°C, 100rpm으로 조절된 반응기를 이용하여 효소가수분해를 실시.

○ 가수분해율을 측정하기 위하여 효소 가수분해가 시작된 후 0, 10, 24, 31, 48, 58 시간에 해당 샘플을 채취하여 생성된 포도당과 갈락토스의 함량을 계산. 포도당과 갈락토스의 함량은 BioRad사 Aminex HPX-87C 컬럼이 장착된 HPLC를 이용하여 정량적으로 계산.

표 3. 가수분해 시간에 따른 당 함량

반응조건	반응시간 (hr)	유당함량 (g/L)	포도당 (g/L)	갈락토스 (g/L)	총 당함량 (g/L)	가수분해율 (%)
20L DWP 용해액 (200g DWP / L water)	0	227.5			227.5	
	10	28.4	97.4	78.7	204.5	77.4
	24	13.1	104.6	97.8	215.5	89.0
	31	10.5	106.3	102.3	219.1	91.7
	48	7.4	108.1	107.5	223.1	94.8
	58	6.9	109.6	109.8	226.3	96.5

(3) 탈단백 유청 용해액 내 단백질 제거 및 탈색 과정

: 탈단백 유청 용해액의 활성탄 처리를 통하여 단백질 및 색가물질을 제거하고자 함.

- 6종(A~E) 분말 활성탄의 단백질 제거 가능성 평가를 위해 탈단백 유청 ~20% (w/v)을 물에 현탁, 용해 후, 용해액을 NaOH로 pH 6.8 적정. 약 70°C에서 30분간 열처리를 실시하고 원심분리 후 상등액을 회수하여 6종 분말활성탄(2 g 분말활성탄/20% DWP 용해액L)으로 처리. 상온 및 50°C에서 일정 시간 동안 반응하고 원심분리하여 상등액을 회수한 후 단백질 함량 변화를 정량 분석하고 그 결과를 그림 1에 도시하였음.

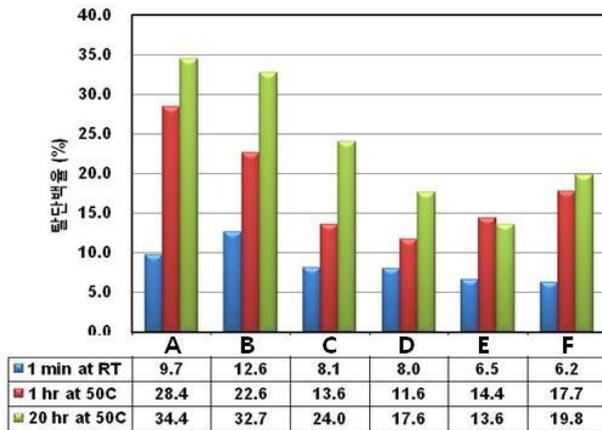


그림 1. 활성탄 종류에 따른 탈 단백질율

- 그림 1에서 알 수 있듯이, 6종 활성탄(A~F) 모두 단백질 제거 효과를 보였고, 그 중에서도 A로 명시한 Norit사의 DARCO® KB-B 및 B로 명시한 Norit사의 NORIT® CGSP가 단백질 제거 효과 면에서 가장 우수한 결과를 나타냄. 또한, 대부분의 활성탄에서 50°C에서 반응시간이 증가함에 따라 탈단백율이 증가하는 경향을 보임.
- 분말활성탄으로 처리 후, 온도 및 시간 조건 변화에 따른 단백질 제거 및 탈색을 최적화하기 위해 탈단백 유청을 ~20%(w/v)되게 물에 현탁, 용해시킨 후, 제조된 용해액을 NaOH로 pH6.8 적정, 약 70°C에서 30분간 열처리, 원심분리, 상등액 회수 후, 2종 분말활성탄 A 및 B(2g 분말활성탄/20% DWP 용해액L)로 처리하고 0~6시간 동안 40-70°C에서 반응. 반응액을 원심분리 후 상등액을 회수하여 단백질 함량 변화 정량 분석 및 색도변화에 대한 정성적 평가를 실시 (그림 2, 그림 3).

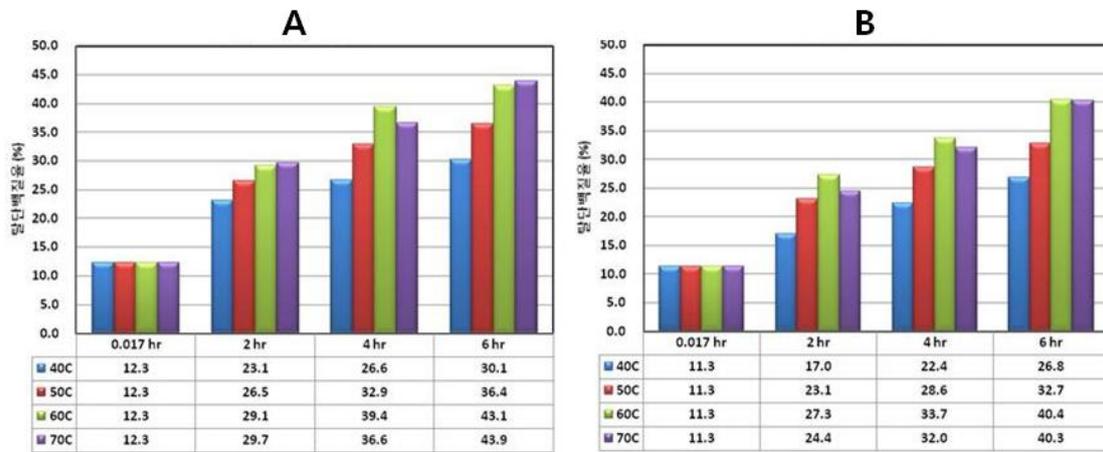


그림 2. 활성탄 A 및 B로 처리 후, 온도 및 시간 조건 변화에 따른 단백질 제거율

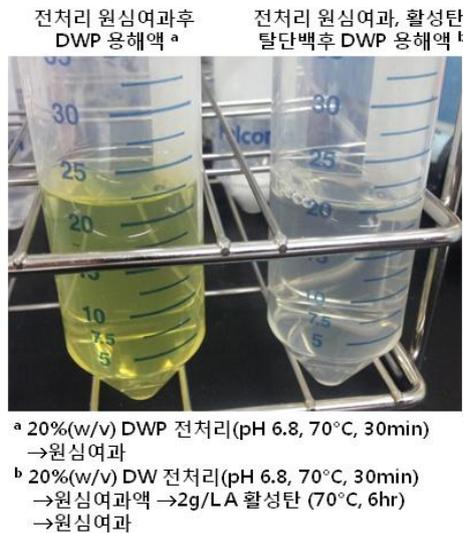


그림 3. 활성탄 A처리시 탈단백질 및 탈색 전 후 비교

○ 그림 2에서 알 수 있듯이, A활성탄 처리(2g 분말활성탄/20% DWP 용해액L) 후 60~70°C에서 약 6시간 반응 시 43~44% 탈단백율을 보였고, B활성탄 처리(2g 분말활성탄/20% DWP 용해액L) 후 60~70°C에서 약 6시간 반응 시 40% 탈단백율을 보임. 또한, 상기 A활성탄 처리 시 탈색 효과가 있음을 그림 3에 나타냄.

(4) 탈염 전기투석 (Electrodialysis)

○ 탈단백 공정을 통하여 제조된 유당 가수분해액을 탈염 전기투석 장치를 통한 정제 시, 이온(salt)의 탈염율 및 유기물(sugar)의 손실율 등 탈염 전기투석 공정의 경제성을 고려하여 에너지 소모량, 오염 정도 등을 조사함. 전기투석기는 3-compartment 형태의 장치를 사용하였으며, 세부적인 전기투석기의 사양 및 운전조건은 아래 표 4와 같음.

표 4. 전기투석기의 사양 및 운전조건

구분	내용
장치	Micro Acilyzer S3
총 유효면적	0.55dm ² /cell
카트리지	AC-220-550
전극	Ti/Pt (anode), SUS316L (cathode)
운전전압	9V~12V
운전온도	23°C~32°C
샘플액	500ml
전극액	5% Na ₂ SO ₄

○ 이온교환막은 상용화된 제품(CMX, AMX, 아스톰사, 일본)을 사용함(표 5).

표5. 이온교환막의 특성

항목	양이온교환막(CMX)	음이온교환막 (AMX)
종류	강산성 양이온 투과성	강염기성 음이온 투과성
특징	높은 기계강도 (Na-form)	높은 기계강도 (Cl-form)
전기 저항 (Ω)	1.8~3.8	2.0~3.5
브랏(Burat) 강도	≥0.40	≥0.30
두께 (mm)	0.14~0.20	0.12~0.15

○ 실시간으로 전기투석장치의 전도도값을 측정하면서 원수의 전도도가 목표하는 값으로 떨어지면 전기투석장치의 스택에 대한 전원공급을 중단하는 회분(batch)운전 조건으로 화학세정 없이 연속적으로 수행하였음(표 6, 그림 4).

표 6. 원수 및 처리수의 수질 데이터

항목	원수	처리수	제거율 (%)
pH	6.8	6.2	-
Brix (%)	15.8	12.6	20.0
전기 전도도 (μS/cm)	15600	300	98.10
단백 함량 (%)	0.23	0.18	21.74
조지방 함량 (%)	0.20	0.15	25.00

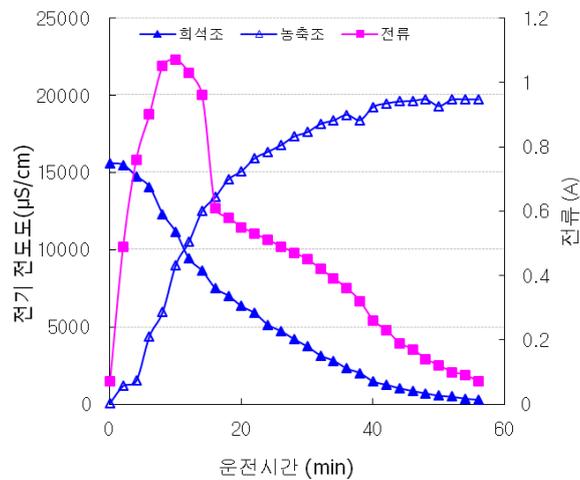


그림 4. 운전 시간에 따른 전류 및 전기전도도의 변화

- 이온(salt) 제거율은 원수의 전기전도도 값으로 구할 수 있고, 당(sugar)의 회수율은 Brix 값 변화로 확인할 수 있음(표 7). 이온의 탈염율은 평균 98%였으며, 당(갈락토스)의 회수율은 평균 80%임.

표 7. 연속 전기투석 batch수에 따른 당 회수율과 이온제거율

연속운전 (batch수)	운전전압 (V)	탈염시간 (min)	당회수율 (%)	이온제거율 (%)	탈염제거속도 (LMH)	에너지소비량 (Wh)
1	9~12	56	77	98.1	9.9	6.9
2	9~12	50	80	97.6	11.3	4.6
3	9~12	50	79	98.0	11.2	4.3
4	9~12	50	82	97.8	11.3	4.8
5	9~12	50	81	98.1	11.2	4.9

* 이온 제거율 = 100-((원수 전기 전도도값/처리수 전기 전도도값)*100)

- 그림 5에서 보듯이 본 연구에서는 pH조정 및 열처리 등의 물리·화학적 전처리를 통하여 유청 막 투과액으로 부터 당 함량 변화 및 반응 부산물의 생성 없이 고형화 반응을 유도하여 침전물을 제거하였으며, 이를 위하여 기존에 비교적 고 비용을 요구하는 공정인 흡착법이나 이온 크로마토그래피법 등을 이용하지 않고, 활성탄을 이용함으로써 경제적으로 단백질을 제거하였음. 고형물 및 단백질이 제거된 유청 막 투과액의 염이나 회분은 전기투석에 의해 제거되었으며, 전기투석의 전 단계인 고형 침전물과 단백질의 제거 공정은 전기투석막의 오염정도를 최소화 하고 탈염 효율을 증가시키는 결과를 나타내었음.



그림 5. 유청 분리 단백질의 제조부산물로부터 갈락토스를 생산하는 공정 모식도

나. 탈단백 유청의 수급 가능성 및 타당성 분석

- 탈단백 유청(whey permeate)은 치즈 부산물인 유청(whey)으로부터 유단백(whey protein)을 막분리 공정으로 수득하는 과정에서 발생하는 분리여액(ultra-filtration permeate)으로, 주 용도는 유당(lactose)의 제조임. 현재 유당의 국제 시세가 매우 높아(평균 유당의 시세가 2010년도 약 850 \$/ton → 2012년도 약 1,800 \$/ton → 2013년 현재 약 1,600 \$/ton → 2016년 현재 약 1,000 \$/ton) 상대적으로 탈단백 유청을 저가로 대량 구매하는 것은 현 시점에서 어렵다고 판단됨. 그러나 탈단백 유청(whey permeate)은 전 세계적으로 150,000,000톤/년이 잉여부산물로 생산되고 있으며, 아직까지 탈단백유청의 약 40%는 산업적으로 활용되지 못하고 사료 혹은 폐수처리로 버려지고 있는 현황임(2008년도, 유럽 현황 기준). 따라서 유청단백(whey protein) 제조사를 중심으로, 잉여 폐기물(혹은 사료로 저가 판매)을 확보 가능한지 평가하고 있음.
- 탈단백 유청은 액상 형태로 발생하여 쉽게 부패가 되므로, 식품 제조용 원료로의 안정적 수급이 핵심임. 따라서 탈단백 유청이 생산되는 치즈 혹은 카제인(casein) 제조자가 아닌 이러한 원료를 수급하여 2차 가공품인 유청단백(whey protein)을 제조하는 전문 회사를 대상으로 수급 가능성을 평가함이 타당함.
- 이에, 본 연구팀은 독일 Fraunhofer IVV와 협력 관계를 새로 구축하고, Fraunhofer IVV의 네트워크를 활용하여 whey processor를 조사함.

(1) Open market에서의 수급 가능성

- 식품원료로서 탈단백 유청은 분무건조가공(spray dry)된 제품으로 유통됨. 2013년도 유럽과 독일 시장에서의 각 유당 함유 부산물 소재의 가격은 아래 표 8과 같음. 탈단백 유청은 0.72 EUR/kg 이며, 유당은 1.09 EUR/kg으로 가격의 차이가 보이나, 유당의 표준 함량이 각각 80% 이상, 99% 이상임(표 9)을 감안하면 open market에서의 탈단백 유청의 원료로의 수급은 유당에 비하여 경쟁력을 갖기 어려움.

표 8. Prices of characteristic whey products in the Europe and German market

Product	Price EUR / kg
Whey (liquid)	0.1
Whey powder (sweet)	1.06
Whey powder (acid)	0.76
Whey protein concentrate (35% protein)	1.95
Whey protein concentrate (80% protein)	8.0
Whey protein isolate (90% protein)	12.0
Whey permeate	0.72
Lactose	1.09

표 9. Typical compositions of whey permeate from various suppliers

Dry matter [%]	Protein [%]	Lactose [%d.m.]	Fat [%d.m.]	Minerals [%d.m.]
97.0	3.1	80.8	0.2	8.5
96	8	55	---	23
96.0	4.0	80.0	0.2	8.0
96.0	4.5	84.0	1.0	6.5
30	0.1	80.0	---	---

(2) 유청 가공자(whey processor)로부터의 잉여 물량 수급 가능성 조사

: 독일 Fraunhofer IVV 연구소를 통하여 총 24개 유청 가공사(whey processor)에게 탈단백 유청을 이용한 신규 기능성 감미료 공동 개발에 대한 의향을 서면 조사하였음.

- 응답자의 신뢰도 및 성실도를 위하여, 의향서는 독일 Fraunhofer IVV 연구소를 대표명으로 하여 조사를 진행하였으며, 제조자의 탈단백 유청 잉여물량의 유무 및 생산량, 외국회사와의 협력 의사(새로운 기능성 감미료를 생산하기 위한 협력), 탈단백 유청의 주요성분 정보를 포함하였음.
- 최종 조사결과(24개 업체에서 모두 의향서 회신을 받았음), 총 3개 유럽 업체에서 협력 모델에 대한 의향이 있고, 잉여 탈단백 유청을 보유하고 있는 것으로 확인하였음. 3개 업체의 탈단백 유청의 품질을 평가하기 위하여 표준 샘플을 각 1kg 씩 입수하였고, 본 연구팀이 개발한 탈단백 유청 전처리 조건에서 처리 가능한 품질인지 여부를 평가하였음.

다. 탈단백 유청 원료 공급을 위한 해외 협력사 발굴

- 기존 씨제이제일제당의 타가토스를 구매하여 B2C 제품을 개발, 판매하고 있는 관계사를 대상으로 추가적인 사업 협력 모델의 제안을 추진하였음. 이는 타가토스가 신소재임을 감안하여, 적극적인 마케팅을 추진할 수 있는 협력사가 상대적으로 원료만 공급 가능한 회사에 비하여, 사업 확장을 보다 적극적으로 추진할 수 있다는 사업적 방향성에 따른 것임.
- 일련의 활동 결과, 당사의 타가토스를 구매하여 사용하고 있는 유럽 D社 로부터 사업 협력에 대한 제안을 받았음. D社는 현재 씨제이제일제당을 제외하고 효소 사용 식품용 타가토스를 생산하고 있는 유일한 업체이나, 대량 생산기술이 미흡하여 자사 제조 물량 이외에 씨제이제일제당으로부터 타가토스를 식품원료로 구매하여 제품으로 판매하고 있음. 현재 D社는 유럽을 대상으로 약 7개 타가토스 사용 B2C 제품군(쿠키, 초콜렛, 아이스크림, 잼, Stick, Tablet, 프리믹스)을 상용화하여 판매하고 있음. 씨제이제일제당은 2014년 6월 D社와의 정보보안협약을 체결하고, 다양한 모델에서의 사업협력 모델을 상호 검토 중임.

- D社와 씨제이제일제당은 탈단백 유청을 원료로 타가토스를 제조하기 위한 사업 모델을 구축하기 위하여, 양사 R&D의 보유 기술 수준을 상호 평가하였고, 그 결과 탈단백 유청으로 부터 갈락토스까지의 생산은 D社가, 갈락토스로부터 타가토스로의 제조기술은 씨제이제일제당이 우위임을 확인할 수 있었음. 타가토스 제조기술의 핵심은 효소와 크로마토분리 기술로, 특히 효소기술 경쟁력 차이가 명확하였음. 검토 주요 결과는 아래 표 10에 기술함.

표10. 타가토스 제조 핵심기술 상호 비교 표

	D社	씨제이제일제당	비고
원료	탈단백 유청	유당	D社 원료 우위
가수분해	자체개발 효소 사용	상용효소 구매 사용	
SMB 크로마토분리	외부 설비기술 도입	외부 설비기술 도입	CJ 기술 우위
이성화	자체개발 효소 사용 회분식반응	자체개발 효소 사용 고정화연속반응	
	CJ 이성화 반응 생산성 약 8배 높음		
결정화	냉각 결정 (연속식)	냉각 결정 (회분식)	CJ 품질 우위

- 특히 타가토스 제조의 핵심인 이성화효소 기술은 생산성(g/L/hr)의 경우 약 8배의 차이가 있으며, 씨제이제일제당의 경우 특화된 고정화 균체반응기술[2, 3]을 사용하여 효소 단가에서 우위임을 확인할 수 있었음.
- 대체원료기반 사업 확장을 위한 타당성 검토를 위하여 상호양해각서(LOI)를 2015년 6월 체결하여, 양사는 탈단백 유청 등 대체원료를 기반한 타가토스의 제조 기술과 투자비 규모를 세부적으로 평가하고, 이를 바탕으로 협력 사업을 구체화하고자 하였음. 현지 맞춤형 제조기술 최적화 등의 연구개발을 적극 추진하는 중임.

(1) 원료 수급 및 생산 모델 개발

: 수립된 사업모델에 따라, 주관기관은 갈락토스를 원료로 제공받았을 경우 씨제이제일제당 안산 Commercial plant 에서의 현장 생산 효율성 및 제조가공비 수준을 평가하였음.

- 타가토스의 제조공정은 회분식이 아닌 연속식 반응 공정을 채택. L-arabinose isomerase를 이용하여 갈락토스를 타가토스로 전환하는 반응은 가역 반응으로 상평형상태(equilibrium ratio)가 존재하며, 지금까지 다양한 내열성 L-arabinose isomerase 효소를 이용하여 연구 보고된 갈락토스의 타가토스로의 한계전환율은 약 48~50% 수준임. 따라서 이성화 반응 이후 단계에서 갈락토스와 타가토스를 분리하기 위한 크로마토분리 공정이 사용됨. 크로마토분리를 통하여 수득된 타가토스는 농축 및 결정화 공정을 거쳐 제품으로 제조되며, 한편 분리되어 나온 갈락토스는 다시 이성화 반응의 앞단계에 재투입하여 사용할 수 있음. 이러한 재순환(recycle) 공법의 사용을 통하여 이성화 반응의 한계전환율보다 약 1.5 ~ 1.8배 높은 총괄 제조공정수율 확보가 가능함.
- 현재 보유하고 있는 제조기술의 단위공정별 수율, 생산성 데이터를 기반으로 재순환(recycle) 공정의 시뮬레이션을 진행하였음. 계산에 필요한 각 공정별 수율, 속도,

처리량 데이터는 실생산 데이터를 참고자료로 사용하였음. 시뮬레이션 확인 결과, 갈락토스를 사용한 타가토스의 제조는 현재 보유하고 있는 Commercial plant 보유 설비의 약 70% 설비를 활용하여 기존과 동일한 물량으로 제조가 가능함을 검증하였음 (이론수율평가 시뮬레이션 결과).

(2) 공정 최적화 연구개발

- 탈단백 유청을 이용한 타가토스의 제조는 원료 저장·운송 중의 변패를 최소화하기 위하여 유럽 현지에서의 제조를 목표로 하고 있음. 그러나 전체 공정 설비를 신규 투자하는 것은 과도한 설비투자를 요구하므로, 원료공급예정지 인근의 유희 유당 제조공장의 인수 및 보수를 통한 투자비 절감이 필수적이라 평가되어, 기술 최적화 방향을 현지 유희설비에 최적화하는 연구를 중점 수행하였음.
- 탈단백 유청을 이용한 유당의 제조 공정은 전형적으로 '전처리(탈단백·탈염) → 감압농축 → 냉각결정 → 원심분리(결정 회수) → 수세 → 건조 → 체별·포장'로 구성되어 있으며, 특히 냉각결정 및 원심분리 공정조건 및 설비의 종류는 기존의 일반적인 당류 제조공정에 사용되는 것과 상이한 것으로 평가되었음. 일반적으로 유당은 용해도가 매우 낮고 결정성이 좋아, 저온냉각결정공정과 Decantor형 원심분리기를 생산설비로 채택하고 있었음.

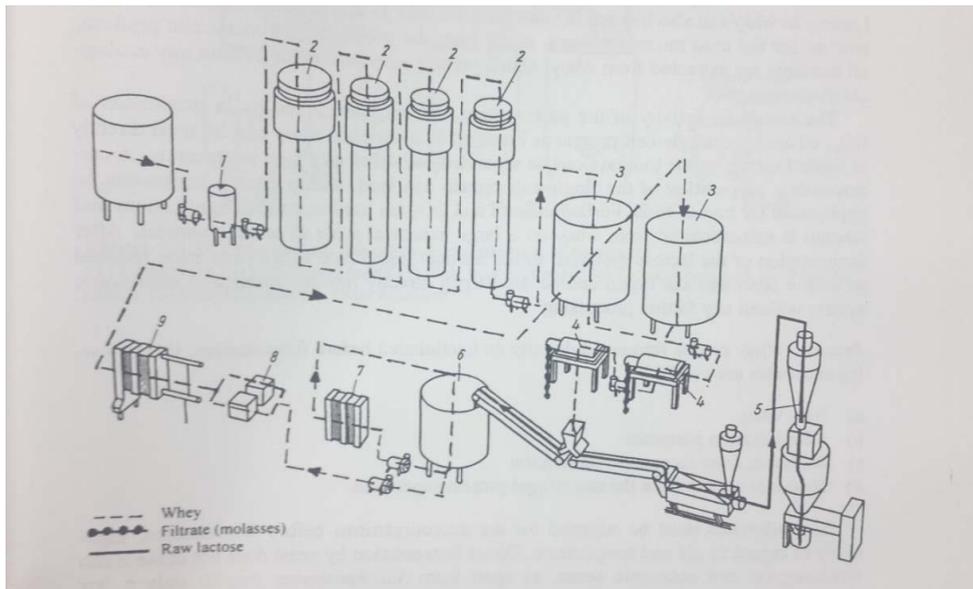


그림 6. 탈단백 유청으로 부터 유당을 제조하는 공정 개요

- 갈락토스→타가토스 제조공정 조건 중 결정화 및 원심분리 방식을 유당을 제조하는 방식인 저온냉각공정으로 조건 최적화 연구를 수행하였음. 최적화 연구개발 결과 기존 결정 회수율 54%에 비하여 훨씬 높은 약 75~80% 수준의 결과를 확인할 수 있었음.

표 11. 타가토스 결정공정 조건 변경의 최종 결과

	기존 조건	변경 조건
결정 조건	Δ(출발온도-종결온도): 20~30도 냉각속도: 0.6도/시간 총 공정시간: 40 ~ 45시간	Δ(출발온도-종결온도): 20~30도 냉각속도: 1도/시간 총 공정시간: 60~70시간
결정화 반복 횟수	2회 반복	3회 반복
총 공정 수율 합계	54%	75~80%

(3) 유럽 현지 생산을 위한 제조기술 최적화 결과 평가(유럽 현지 생산 모델)

본 연구결과를 바탕으로 유럽 현지의 매입 예정인 유당제조공장의 현장 실사를 2015년 5월 3일 ~ 6일 실시하였음.

- 효소반응, 분리정제(탈색·탈염·크로마토분리) 전체 공정 및 일부 농축설비는 추가 투자가 필요하며, 결정화, 원심분리(회수), 건조, 포장은 기존의 유당 제조설비를 활용하여 약 5,000톤/년 규모의 타가토스 생산이 가능한 것으로 평가되었음 (현지 설비 단독 테스트를 통한 평가도 진행하였음).
- 모든 기존 보유 및 추가 최적화 연구결과를 종합하면 크게 4개 기술 요소로 요약할 수 있음. 핵심 부재료인 가수분해효소와 이성화효소의 기술 최적화 결과를 평가한 결과, 고정화 가수분해 효소를 자체 개발하여 생산하는 D社 기술 도입이 단위원가에서 약 0.2 \$/kg 유리하며, 씨제이제일제당의 이성화효소가 D社에 비하여 약 0.3 \$/kg 유리함을 확인할 수 있었음. 또한 앞서 최적화하여 개선된 결정회수율 80% 및 유당 가수분해 부산물인 포도당(glucose)의 유럽 내 판매 가능성 등이 원가 절감의 핵심 요소로 평가되었음. 이에 대한 주요 결과는 아래 정리하였음.

표 12. 기술 최적화 결과 종합 결과

유럽 현지 CJ-D社 협력 제조 시 핵심 경쟁력

	한국 생산	유럽 생산	주요 요과
가수분해 요소	단위원가 XXX 원/kg	단위원가 XXX 원/kg	고정화 가수분해 요소 자체 생산(D社), 원가 최소화 및 CJ 370 원/kg vs 280 원/kg 절감 효과
이성화 요소	단위원가 XXX 원/kg	단위원가 XXX 원/kg	CJ 이성화 요소 기술 현지 적용 시 원가 최소화 및 기술 실효성 여부를 보다 면밀히 검증할 필요 있음
결정 공정 수율	결정 회수율 XX%	결정 회수율 80%	ΔT= 25 → 40, 1차 결정 회수율 40→50% 극대화 총 2차 결정 회수 → 3차 결정 회수 Recycle 물량 최소화로 SMB 투자비 규모 최소화 효과 有
액상시럽 재평가	-	부산물공제액 364 원/kg	D社 자소 및 유럽내 액상시럽 판매로 부산물 공제 可 DS기준 액상시럽액가 = 3.5 B.R × 68%(순도) × 70% 가치 계산

- 현재 확보된 제조기술의 단위공정별 수율, 생산성 데이터를 기반으로 재순환(recycle) 공정 시뮬레이션을 진행하였음. 계산에 필요한 각 공정별 수율, 순도, 처리량 데이터는 실생산 데이터를 참고자료로 하였음. 또한 현지실사를 통하여 확보한 유희설비 및 추가 신규투자 건적 금액을 원가산출 정보에 포함하였음. 공정에 사용한 부재료 및 에너지 단가(전기·LNG)는 '14년 기준 유럽 현지의 단가정보를 D社로부터 제공받아 적용하였음.

인건비 기준은 국가별 생산인력의 인건비 비율 통계 결과를 반영하여 국내 인건비의 1.7배를 적용하였음.

- 최종 평가 결과 탈단백 유청 원료기반 타가토스 제조원가는 결정과당원료 기반 타가토스 제조원가와 10% 내에서 동등 수준임을 확인하였음(10% 수준은 추가적인 연구 최적화 및 현지 적용 결과에 따라 충분히 변동될 수 있는 예측 원가 범위 내에 있다고 판단).

2. 낙엽송(Larch)

가. 낙엽송활용 갈락토스 생산을 위한 추출, 분리, 정제공정 개발

- 갈락토스 함량이 상대적으로 높은 낙엽송을 확보하기 위하여, 산지별로 낙엽송의 갈락토스 함량을 평가. 국내(강원, 전북), 러시아, 중국산 낙엽송 21종을 분석(표 13). 국내산 및 중국산과 비교하여 러시아산 낙엽송이 비교적 고 함량의 갈락토스를 함유하고 있음을 확인함.

표 13. 낙엽송 내 갈락토스 함량

	시료	갈락토스 함량 (% DS 기준)
대한민국	강원	9.22 ± 0.89
	전북	10.96 ± 3.44
러시아	1	21.17 ± 0.93
	2	16.53 ± 2.02
	3	16.98 ± 0.50
	4	22.13 ± 1.85
	5	20.48 ± 2.80
	6	21.99 ± 2.85
	7	21.10 ± 0.31
	8	13.05 ± 0.40
	9	18.31 ± 0.30
	10	17.11 ± 0.87
	11	16.54 ± 2.27
	12	20.43 ± 0.44
	13	12.04 ± 1.22
	14	10.55 ± 1.31
	15	12.61 ± 0.38
	16	17.97 ± 0.70
	17	16.80 ± 0.71
중국	1	7.88 ± 2.03
	2	8.75 ± 0.85

(1) 아라비노갈락탄의 열수추출

: 고 함량의 갈락토스를 가지고 있는 러시아산 낙엽송으로부터 갈락토스를 생산하기 위한 원료물질인 아라비노갈락탄을 열수추출 함. 추출수율을 높이기 위하여 원료가공 형태, 온도, 시간 등 조건을 변화시키며 실험을 수행하였음.

- 원료 형태별로 톱밥, 작은 크기의 칩(1cm×0.5cm 미만), 큰 크기의 칩 (1cm×5cm 미만) 3종류로 나누어 진행하였음. 낙엽송 20g 에 증류수를 첨가하여 추출을 진행. 톱밥의 경우, 증류수를 120ml 첨가하였으며, 두 종류 칩의 경우, 증류수를 100 ml을 첨가하여 70°C, 정치로 24시간 동안 추출함 (그림 7). 추출 결과는 표 14과 같으며, 원료의 크기가 작을수록 추출수율이 높은 경향을 보임.



그림 7. 본 실험에 사용된 낙엽송 형태

표 14. 원료 크기별 추출수율 비교

원료크기	아라비노갈락탄 추출수율 (% wt/wt)
톱밥	93.0
칩(1cm × 0.5cm 미만)	85.9
칩(1cm × 5cm 미만)	73.4

- 상기 원료 형태별 실험에서 최종 선정된 톱밥형태로 온도에 따른 추출수율을 확인하였음. 온도범위는 실온에서부터 90°C이며, 톱밥형태의 낙엽송 20g 에 증류수 120ml을 가하여 정치로 24시간 동안 추출(그림 8). 추출온도 70°C 이상에서 갈락토스 함량 및 수율이 더 이상 증가하지 않음. 경제성과 함량변이를 종합적으로 고려하여 추출온도를 70°C로 선정.

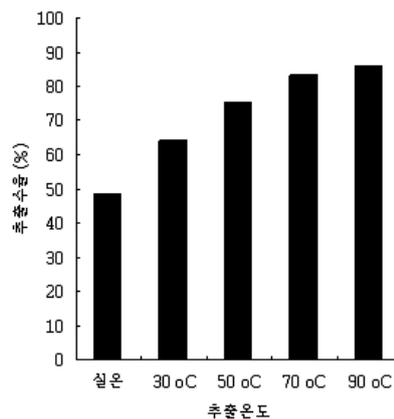


그림 8. 추출온도에 따른 추출수율

- 위 실험에서 최종 선정된 추출조건으로 추출시간 및 추출횟수에 따른 추출수율을 확인하였음. 톱밥형태의 낙엽송 200g에 증류수 1.2L을 가하여 70°C, 정치로 30분 간격으로 2시간 동안 추출. 추출시간에 따른 추출수율을 확인한 결과, 그림 9와 같이, 추출시간이 증가할수록 추출물의 수율과 함량은 일정 수준까지 증가한 후 유지되는 경향을 보임. 2시간 이후에는 수율의 증가량이 거의 없어 추출시간은 2시간으로 선정.

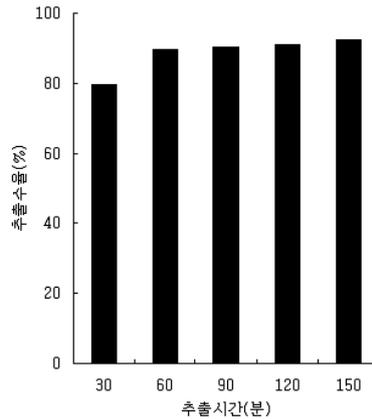


그림 9. 시간에 따른 열수추출수율

- 그림 8과 같이 1차 추출에서 대부분 추출되지만(약 90% 수준), 추출되지 못한 10%의 함량을 확보하기 위하여 2차 추출 실험을 진행하였음. 1차 추출 조건과 동일 조건으로 실험을 진행하여 추출수율을 확인한 결과, 5% 미만으로 경제적으로 유리하지 않다고 판단하여 추출횟수는 1회로 선정하였음.
- 위의 실험에서 선정된 최적추출 조건에서 확보한 아라비노갈락탄과 표준품인 Megazyme사 아라비노갈락탄(Larch, lot20701) 비교 분석(그림 10)한 결과 추출된 아라비노갈락탄은 표준품과 유사한 체류시간분포를 가지고 있음을 확인. 두 물질이 정확한 체류시간이나 피크높이에서 차이를 보이는 것은 표준품과 추출된 아라비노갈락탄의 중합형태에 따른 차이로부터 기인한 것으로 보임. ㅎ

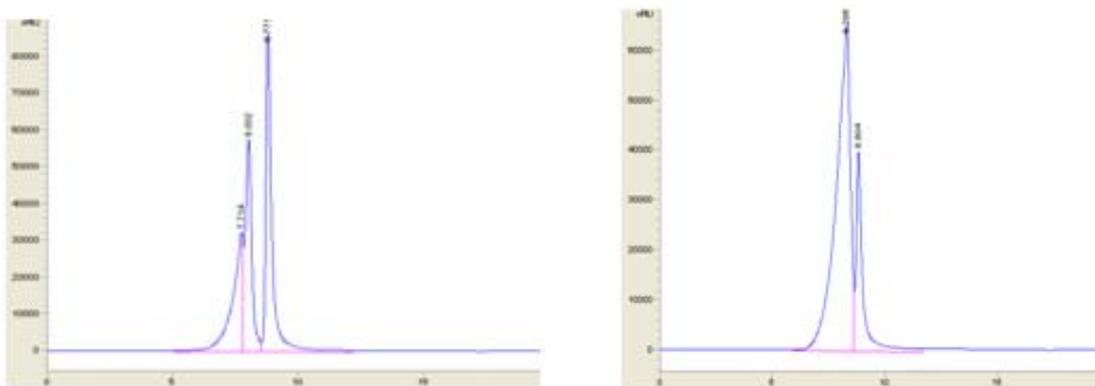


그림 10. 아라비노갈락탄 크로마토그램 (A. 낙엽송으로부터 추출된 아라비노갈락탄, B. 표준품)

(2) 아라비노갈락탄의 가수분해

: 낙엽송에서 추출된 아라비노갈락탄으로부터 갈락토스를 얻기 위하여 산 가수분해방법을 이용

- 추출된 아라비노갈락탄을 농축기를 이용하여 30 Brix까지 농축. 농축된 아라비노갈락탄 추출액에 최종 농도가 0.5~10% (w/v)이 되도록 황산을 첨가해 주고 이를 125°C 고압멸균기에 넣어 1시간 반응. 가수분해 종료 후 중화반응을 수행하기 위하여 탄산칼슘을 넣어 pH를 6~7사이로 맞춰 줌. 중화된 가수분해액을 8,000 rpm으로 원심분리하고 상등액만 회수.

- 황산 농도에 따른 아라비노갈락탄의 가수분해율과 survival ratio는 표 15와 같음. 반응 조건범위인 0.5~10% (w/v)농도에서는 가수분해율이 거의 비슷하였으며, 황산 농도가 증가할수록 survival ratio가 감소하는 경향을 보임. 위의 결과를 통하여, survival ratio가 어느 정도 보장되면서 높은 가수분해율을 보이는 황산농도는 0.5 % (w/v)로 결정.

표 15. 황산 농도에 따른 아라비노갈락탄의 가수분해율

황산농도 (% wt/v)	가수분해율 (% wt/wt)	Survival Ratio (%)
0.5	96.6	89
1	96.7	88
1.5	96.7	86
2	97.1	82
3	98.2	76
10	100	46

(3) 아라비노갈락탄 가수분해 용액의 탈색, 이온정제, 크로마토분리

- 아라비노갈락탄 가수분해 용액에 분말활성탄(powder activated carbon) 0.5~2.0% (wt/v)을 첨가하여 0.5~1.0시간, 10~100rpm으로 교반하고 여과지(Whatman Filter paper 5)로 여과하여 유색물질을 제거.
- 유색물질이 제거된 아라비노갈락탄 가수분해 용액 내 갈락토스와 아라비노스의 효율적인 크로마토분리를 위해서는 용액 중의 이온 제거가 필요. 만약 이온 성분이 존재하면 분리 수지의 활성기와 이온 성분이 치환되어 분리능이 저하되므로 분리 수지를 이용한 반복적인 분리가 불가능. 따라서 상기에서 탈색된 아라비노갈락탄 가수분해 용액을 수소기로 치환된 양이온교환수지와 수산화기로 치환된 음이온교환수지가 충전된 컬럼을 통과시켜 상기 용액 중의 이온성분을 제거하였음. 이온성분 제거의 확인은 전기전도계로 측정하여 단위 cm 당 10 μ S 이하가 되도록 함.
- 탈색 및 탈염으로 유색 물질 및 이온 성분 등의 불순물을 제거한 아라비노갈락탄 가수분해 용액을 60%(g/g 용액)까지 농축하여 칼슘기로 치환시킨 이온교환수지(Amberlite CR1310 Ca)에 통과시키고 탈이온수로 용출시킨 용액을 분획, 크로마토분리하여 정제된 갈락토스 용액을 수득.

나. 낙엽송활용 갈락토스 생산을 위한 추출, 분리, 정제공정 파일럿 개발

(1) 아라비노갈락탄의 열수추출

- 고 함량의 갈락토스를 가지고 있는 러시아산 낙엽송으로부터 갈락토스를 생산하기 위한 원료물질인 아라비노갈락탄을 얻기 위해 재재목을 구입한 후 추출효율이 높은 톱밥형태로 분쇄하여 낙엽송과 증류수의 비율이 1:5로 하여 70°C에서 counter-current 방식으로 5회 반복 열수추출함.

(2) 아라비노갈락탄의 가수분해

○ 아라비노갈락탄 추출액에 최종 농도가 0.5%(w/v)이 되도록 황산을 첨가하여 주고, 이를 125°C 고압멸균기에 넣어 1시간 반응.

(3) 아라비노갈락탄 가수분해 용액의 탈색, 중화, 이온정제, 농축, 결정화

○ 아라비노갈락탄 가수분해 용액에 분말활성탄(powder activated carbon, 신기) 4% (w/v)을 첨가하여 1시간, 100rpm으로 교반하고 필터프레스로 여과하여 유색물질을 제거하였음.

○ 유색물질이 제거된 아라비노갈락탄 가수분해 용액에 탄산칼슘을 첨가하여 pH5로 조절하여 중화함. 용액중에 이온 성분이 존재하면 결정화 수율 및 순도의 저하에 원인이 되므로, 갈락토스와 아라비노스의 분별 결정화를 위해서는 용액 중의 이온 제거가 필요. 따라서 상기 과정을 통하여 탈색 및 중화된 아라비노갈락탄 가수분해 용액을 수소기로 치환된 양이온교환수지와 수산화기로 치환된 음이온교환수지가 충전된 컬럼을 순차적으로 통과시켜 전기전도계로 측정하여 cm 당 2,500 μ S에서 10 μ S 이하가 되도록 함.

○ 탈색, 중화 및 탈염으로 유색 물질 및 이온 성분 등의 불순물을 제거한 아라비노갈락탄 가수분해 용액을 67%(g/g, 용액)까지 농축하여 1차 냉각결정화 진행. 1차 결정화 후 원심·여과하여 1차 결정을 회수하고, 그 모액을 농축하여 재결정화를 진행하는 방식으로 4차 결정화까지 진행하여 결정 갈락토스 수득. 낙엽송으로부터 갈락토스의 최종 회수율은 82.7%임.

낙엽송 원료	열수추출		가수분해 탈색/중화/탈염	분별결정
	추출 후 펠렛	열수침지 추출액		
				
▪ 러시아산 낙엽송	▪ 70°C, 열수침지추출 (100L 반응기) ▪ 열수침지추출액(아라비노갈락탄) 회수		▪ 아라비노갈락탄 산분액 ▪ 탈색, 중화, 탈염	▪ 농축, 저온결정 ▪ 탈수, 건조 (순도 99%)

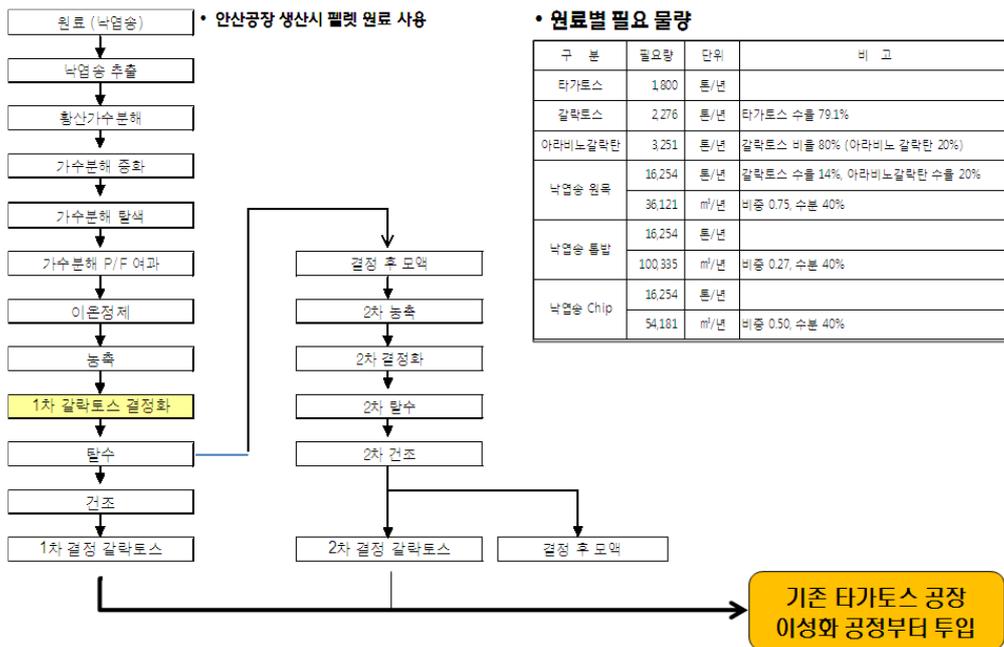


그림 11. 낙엽송활용 갈락토스 및 타가토스 생산 공정도

3. 고부가가치 부산물 소재의 생산 및 활용 기술 개발

낙엽송으로부터 아라비노갈락탄을 열수추출하고 남은 톱밥을 활용하여, 항산화능력을 가지고 있다고 알려진 고부가가치의 dihydroquercetin(taxifolin)을 추출하여 고순도로 분리/정제하고 결정화 시키는 공정을 설계하고 그 기능성을 평가하였음.

가. 반응기 type에 따른 taxifolin의 제조

(1) Taxifolin제조방법

○ 낙엽송 톱밥으로 부터 taxifolin 열수 추출 결과(회분식)

: 톱밥형태의 낙엽송과 물의 비율이 1:4이고, 온도 70°C에서 2시간 열수추출을 3회에 걸쳐 실시한 결과 낙엽송 내 taxifolin의 함량은 약 0.77% (wt/wt)임을 확인.

표 16. 낙엽송 내 taxifolin함량

Larch (kg)	1차 추출액				2차 추출액				3차 추출액				Total Tax (g)	3차 추출액 내 Tax 함량 (%w/w)
	Brix (%)	Tax 농도 (g/L)	액량 (L)	Taxifolin (g)	Brix (%)	Tax 농도 (g/L)	액량 (L)	Taxifolin (g)	Brix (%)	Tax 농도 (g/L)	액량 (L)	Taxifolin (g)		
2.1	4.6	1	5.95	5.95	1.4	0.78	6.45	5.031	0.2	0.77	6.7	5.159	16.14	0.77

○ 아라비노갈락탄을 추출하고 남은 낙엽송의 톱밥에 물 또는 에탄올을 고액비 1:4로 첨가하여 70도에서 2시간 추출. 추출액으로부터 낙엽송 톱밥을 분리하기 위하여 0.45µm 필터를 이용하였으며, 톱밥이 분리된 추출액에 흡착수지인 PVPP (polyvinylpolypyrrolidone) 또는 Amberlite XAD4를 사용하여 taxifolin만 선택적으로 흡착시킴. 흡착제와 추출액량은 약 1:50의 비율로 사용하였으며, 이 때 추출액 내 taxifolin의 농도는 약 1g/L임. 상온에서 30분정도 교반시키며 taxifolin을 충분히 흡착시키고, 0.45µm 필터를 이용하여 흡착수지에 흡착된 taxifolin을 분리시킴. 흡착수지로부터 taxifolin을 elution하기 위하여 흡착수지로 PVPP를 사용한 경우 70%아세톤, Amberlite XAD4를 사용한 경우 20%아세톤을 첨가하여 20분 동안 교반시킴. 다시 0.45µm 필터를 이용하여 흡착수지와 elution된 taxifolin을 분리하고, evaporator를 이용하여 분리된 taxifolin으로부터 아세톤을 제거하고 taxifolin을 농축함. 농축된 taxifolin을 4도에서 3시간 반응하여 냉각 결정함.

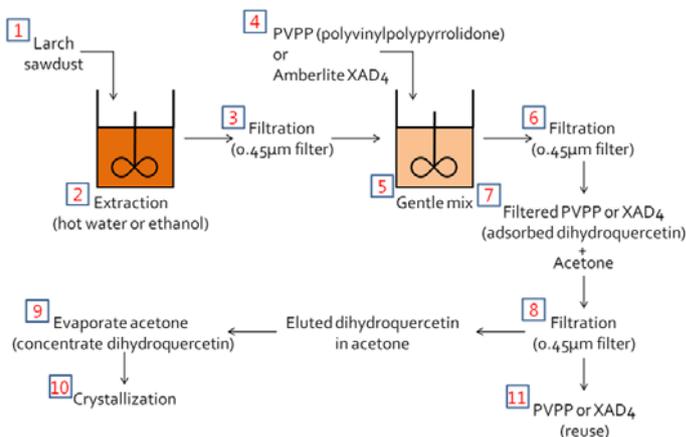


그림 12. Taxifolin의 회분식 제조공정

(2) Taxifolin의 Counter-current 식 제조

○ 아라비노갈락탄을 추출하고 남은 낙엽송 톱밥을 컬럼형태의 반응기에 충전하고 용매인 물을 흘려주어 counter-current 방식으로 taxifolin을 제조, 컬럼자켓의 온도는 70도로 유지하였으며, 용매는 시간당 5 bed volume 통과시킴. 세 번의 컬럼을 거치며 추출된 추출액은 흡착수지로 PVPP (polyvinylpolypyrrolidone) 또는 Amberlite XAD4가 충전되어 있는 column으로 이동하며, 흡착수지컬럼을 통과하면서 taxifolin만 선택적으로 흡착시켜 줌. 이 때 컬럼의 온도는 상온임. 추출액이 통과 된 컬럼은 물을 이용하여 5~10 bed volume 세척하고, 아세톤을 이용하여 taxifolin을 elution시킴. 아세톤의 농도는 batch식 제조방법에서 사용한 농도와 동일. 이후 농축 및 결정화 공정도 batch식 제조방법과 동일함.

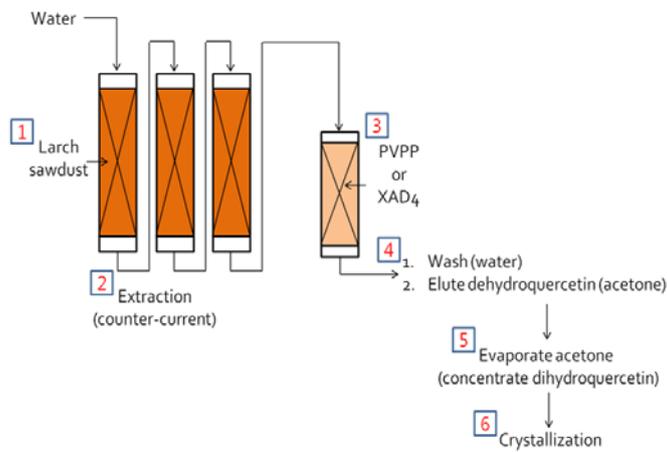


그림 13. Taxifolin의 Counter-current식 제조공정

표 17. 흡착수지의 종류에 따른 taxifolin의 순도(%)

	PVPP	XAD4
Extraction	70.4	70.4
Elution	83.1	80.9
1 st Crystallization	91.6	96.5
2 nd Crystallization		99.0
3 rd Crystallization	98.1	

나. 낙엽송으로부터 제조된 taxifolin의 기능성 평가

본 연구를 통해 제조된 taxifolin의 기능성을 평가하기 위하여 아모레퍼시픽에 분석 의뢰.

(1) Taxifolin의 항산화능 평가(DPPH assay)

- 아래 그래프와 같이 낮은 농도조건(1~20 ppm)에서도 우수한 라디칼 소거능이 확인됨. 동일한 농도 조건이라면 Vitamin C 대비 더 높은 항산화능 보임.
- Flavonoid계열이고, 기존에 항산화능이 검증된 quercetin과 유사한 구조의 물질이므로 항산화능을 기대할 수 있을 것으로 판단됨.

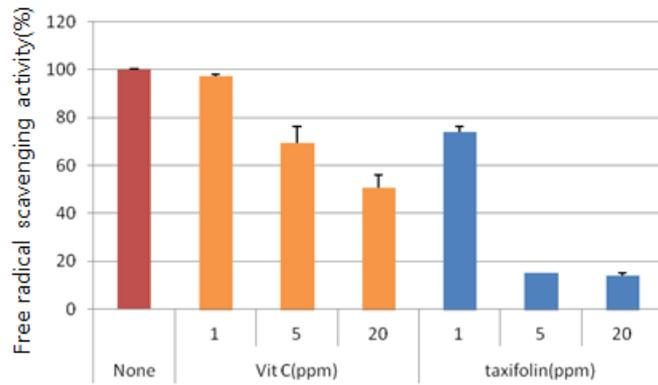


그림 14. 낙엽송 유래의 taxifolin과 Vitamin C의 항산화능 비교

(2) Taxifolin의 미백효능 평가(Melanin assay)

- 멜라닌 생성 저해평가 실험에서는 세포 독성이 없는 농도(50 ppm 이하, 우측 Protein 양 그래프 참조)에서 효능을 평가함.
- 25, 50 ppm taxifolin사용 시 멜라닌 생성 저해능 확인 안 됨. B16 세포에서는 a-MSH 자극 조건에서 quercetin을 비롯, taxifolin이 melanogenesis를 억제한다는 논문이 보고된 바 있으나[4], 본 melan-a 실험에서는 효능 없음. 항산화능이 우수하지만 미백효능이 없는 소재군이 많기 때문에, 이와 유사한 경우라고 생각됨.

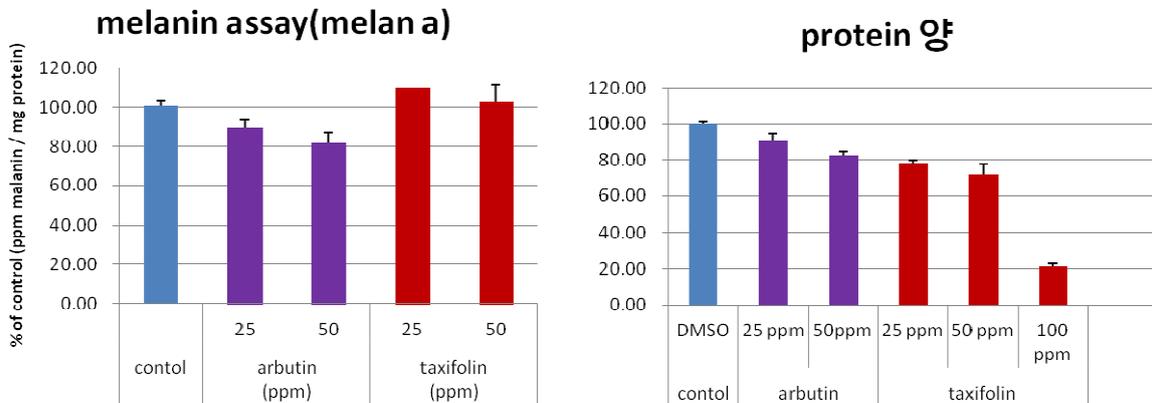


그림 15. 낙엽송 유래 taxifolin의 미백효능 평가

다. 낙엽송(larch) 수급 가능성 및 타당성 분석

○ 산지별 낙엽송 21종을 수집하여 갈락토스 함량 평가를 수행하였고, 러시아산 낙엽송이 국내 및 중국산에 비하여 갈락토스 함량이 월등히 높은 것을 확인한 바 있음. 식물계 바이오매스의 원료로 활용은 상대적으로 높은 물류비가 소요되므로, 원료 내 함량이 매우 중요한 결정인자임. 따라서 러시아 지역에서의 낙엽송의 수급 가능성 평가를 위하여 원료 임목량, 물류, 수출입 현황, 현지 원료 수급 및 갈락토스 함량 평가를 진행함. 또한 낙엽송의 현지 수급을 위하여 임목가공업체와의 협력 모델이 필수이므로, 현지 업체(제재소) 방문을 통한 환경 평가를 진행하였음.

(1) 러시아 낙엽송 임목량

○ 현재 타가토스 생산에 필요한 낙엽송은 원목 기준 36,000m³/년이며, 러시아 지역의 낙엽송임목량은 충분한 것으로 판단되나, 낙엽송 용도가 특수용도(wood house, 요트 등)이기 때문에 벌목량과 제재량은 부족한 것으로 판단됨.

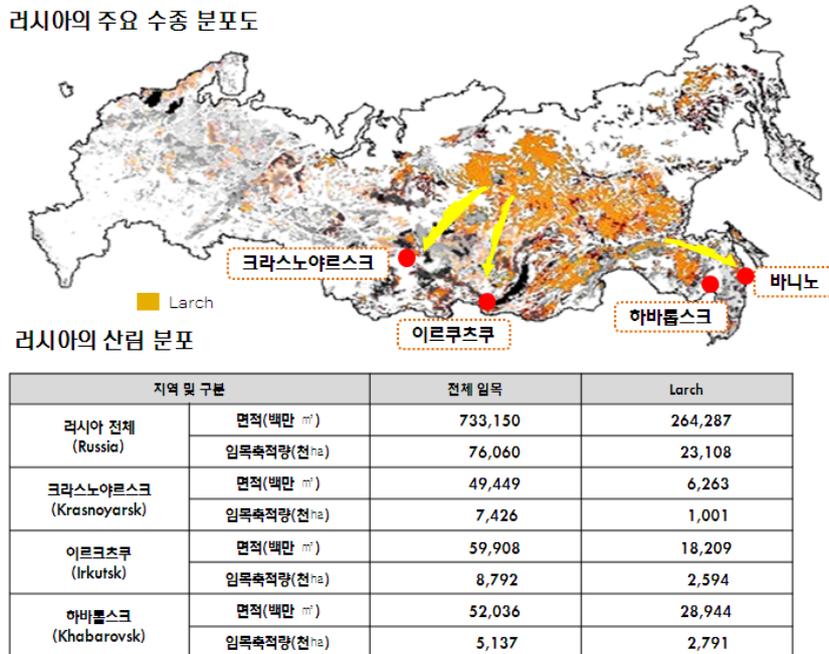


그림 16. 러시아 지역에 따른 낙엽송 분포

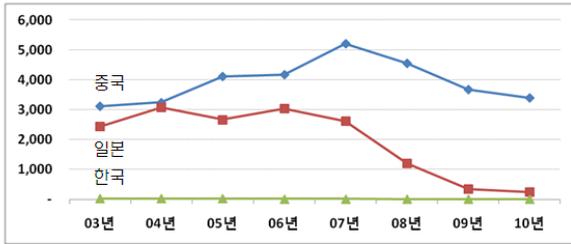
(2) 러시아 낙엽송 물류 환경

○ 러시아 낙엽송 제조목은 대부분 내수 또는 중국(극동 larch 한정)으로 수출되고 있고, 부산물(톱밥/칩)의 수출은 현재 없는 것으로 파악되며, 톱밥가격(\$10~15) 대비 물류비 비중이 매우 높음. 육로 및 해상 등 운송 경로는 크게 4가지 경로로 파악됨.

(3) 러시아 낙엽송 수출입 트렌드 분석

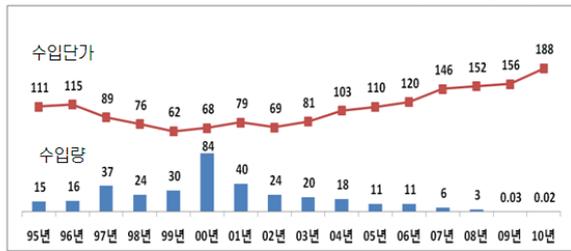
○ '09년 유럽 경제위기 및 '08년 베이징올림픽 이후 유럽 및 중국의 수요가 감소하였고, 러시아의 산업 활성화를 위한 원목 수출세 상향 정책(현재 25%, 80%까지 상향 목표)으로 수출량이 감소하는 추세임.

[수출 대상 국가별 수출량]



- 러시아: 수출세 80%까지 상향하였으나, 핀란드의 반대로 연재 25%로 재조정 (향후 80%까지 상승될 가능성 在)
- 중국: 최대 수입국이나 08년부터 부과된 수출세로 인해 수입량 감소 추세 (미국으로부터의 수입량 급증 中)
- 일본: 수출세, 건설경기 침체로 큰 폭 감소
- 한국: 7년 간 1/10 수준으로 감소 (03년 20천m³ → 10년 2천m³)

[국내 수입단가 및 수입량]



- 08년까지 지속적으로 상승하였으며, 09년 이후는 연 30톤 이하로 시세미미 없음
- 최근 3년간 실질적인 원목 수입량이 없어 국내 가공에서 발생하는 부산물 소싱 불가

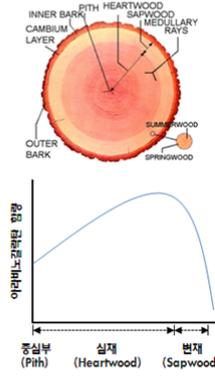
그림 17. 낙엽송의 국가별 수출량 및 국내 수입단가/수입량

(4) 현지 원료 수급 및 갈락토스 함량 평가

- 낙엽송의 헤미셀룰로오스에 아라비노갈락탄형태로 존재하는 갈락토스의 함량은 목재의 중심부, 심재, 변재에서 부위별로 함량의 편차가 큰 것으로 알려져 있음. 또한 제재목이 아닌 제재소에서 잉여부산물로 얻어지는 톱밥/칩의 저가 공급을 목표로 하였으므로, 여러 부위의 목질이 섞여 있는 톱밥/칩의 평균 함량을 평가하였음(사업 타당성 검토를 위한 현지 파견 진행).
- (출장시) 확보한 샘플 분석 결과 러시아 동부 원료 함량은 톱밥 기준으로 약 18% 갈락토스 함량이 예상되며, 극동 원료 함량 기준은 이번 샘플 분석 결과와 한국 소싱 샘플 함량이 큰 차이를 보여 재검증을 실시하였음.

표18. 지역별 낙엽송의 갈락토스 함량 비교

지역	No	시료 정보	원재료 수분함량 (%)	당함량 (% w/w, 건조중량 기준)			
				글루코스	자일로스	갈락토스	아라비노스
러시아	1	메르디앙 건조진 톱밥 (심재+변재+수피)	39.9	44.3	6.9	17.6	4.2
	2	메르디앙 건조후 톱밥 (심재+변재+수피)	6.6	45.3	6.8	17.2	4.0
	3	메르디앙 아착지 톱밥 (심재+변재+수피)	37.8	41.6	6.5	18.5	4.5
	4	시블레스 아착지 톱밥 A (심재+변재)	6.6	43.8	6.1	18.0	4.1
	5	시블레스 아착지 톱밥 B (심재+변재)	7.1	40.1	5.9	18.9	4.5
	6	메르디앙 A	6.2	43.0	8.7	8.5	4.0
	7	메르디앙 B	7.1	38.6	5.7	13.1	2.8
	8	제재목 시블레스 A	9.3	47.1	5.0	20.7	4.0
	9	제재목 시블레스 B	3.3	45.2	6.0	12.0	2.9
	10	제재목 시블레스 C	7.8	40.0	7.7	11.5	3.5
	11	칩 메르디앙 아착지 칩 A	21.7	41.4	6.4	12.6	3.9
	12	칩 메르디앙 아착지 칩 B	20.4	48.1	6.0	4.3	2.3
	13	수피 메르디앙 수피 A	11.8	26.6	6.0	4.1	5.3
	14	수피 메르디앙 수피 B	9.0	26.5	3.7	3.2	3.7
극동 러시아	15	칩 아르카임 칩	50.2		6.7	4.7	1.9
	16	말뚝 연료용 목탄	6.3		6.0	4.5	1.1
중국	1	중국산 11년 겨울벌목 (비노출 부위)	13.1		5.8	7.9	2.2
	2	중국산 11년 겨울벌목 (노출 부위)	13.0		7.3	8.8	2.7
	3	러시아산 10년 겨울벌목 (비노출 부위)	11.7		7.7	6.0	2.0
	4	러시아산 10년 겨울벌목 (노출 부위)	17.2			5.1	7.6
	5	톱밥 A	37.9			10.4	
	6	톱밥 B	37.9			11.0	
	7	칩 A	41.6			14.0	
러시아	1	이르쿠츠크 A (목재장터)	4.2	39.2		21.3	2.7
	2	이르쿠츠크 B (목재장터)	5.1	39.1		22.1	2.4
	3	이르쿠츠크 C (목재장터)	4.7	36.6		16.5	1.6
	4	이르쿠츠크 D (푸른우드)	4.7	40.8		17.0	2.9
	5	제재목 하바로브스크, 블라스톤 A (목재장터)	4.3	42.8		20.5	4.1
	6	제재목 하바로브스크, 블라스톤 B (대봉실업)	8.8	35.9		22.0	2.4
	Unknown	7	제재목 대봉실업	4.4	42.3		21.1



○ 낙엽송의 임목량은 충분하나 러시아 내 넓은 지역에 산재되어 있고, 경쟁력 있는 원료(톱밥/칩)의 수급 가능성, 투자비(현지 인프라 파악), 물류 리스크를 평가하기 위하여, 낙엽송 제재목을 주로 하는 러시아 제재소를 중심으로 러시아 동부, 서부, 극동 지역에 걸쳐 현지 조사를 실시하였음.



그림 18. 현지조사 실시지역

5) 타당성(feasibility) 평가

○ 낙엽송의 경우 국내로의 원료 수급에 필요한 물류비 비중이 원가에 미치는 영향이 높아, 다양한 수입 경로에 대한 타당성을 평가하였음. 러시아, 중국하얼빈, 안산공장 기준 검토 결과 러시아에서 펠릿 제조 후, 안산공장 갈락토스/타가토스 생산이 수급 모델 중 경쟁력이 있을 것으로 판단되나, 전반적으로 원가절감 기대효과 대비 높은 투자비, 사업 리스크 등이 한계점으로 평가됨.

표 19. 제조원가 평가결과

	안산공장 러시아 Larch 펠릿 → 타가토스			하얼빈/러시아 Larch → 갈락토스 시럽		비 고
	1) Larch 20%	2) Larch 60%	3) Larch 100%	4)하얼빈 갈락토스 (20%생산)	5)러시아 갈락토스 (원목 4 : 톱밥 6)	
Larch 가격	\$ 177 - 산지가 \$92 - 펠릿제조: \$85	\$ 245 -원목 \$188 - 톱밥 \$57	1번~3번 케이스) 20%~100% 톱밥소량 펠릿으로 가공 가정 4번 케이스) 톱밥20% 하얼빈공장 가공 5번 케이스) 톱밥60%, 원목40% 러시아가공			
Larch → 갈락토스 시럽				\$ XXX - 원재료 \$2,506 - 가공비 \$2,530	\$ XXX - 원재료 \$2,826 - 가공비 \$1,478	수출)Larch-갈락토스분말 15%, 갈락토스시럽 18% 러시아 부산물)연료용 톱밥으로 재판매 \$63 안산공장 부산물) 목분 생산 판매
투자비 (순위)	2	3	4	1	5	
펠릿/갈락토스 입고단가 (러시아-안산)	\$ 396 - 철도운송비 \$138 - 해상운임, 관세	\$ 396 - 철도운송비 \$138 - 해상운임, 관세	\$ 396 - 철도운송비 \$138 - 해상운임, 관세	\$ 5,196 - 해상운임, 관세등	\$ 4,407 - 해상운임, 관세등	갈락토스) 수출관세 0%, 수입관세 6.5% 펠릿) 수출관세 0%, 수입관세 2% 원목) 수출관세 25%, 수입관세 0%
타가토스	₩XXX	₩XXX	₩XXX	₩XXX	₩XXX	·러시아에서 펠릿 가공 수입하여 국내생산시 목분원료 60원/kg 차감 [안산공장, 유당-타가토스] · Full Capa(1,800톤)연속생산설비
원재료비	₩XXX	₩XXX	₩XXX	₩XXX	₩XXX	
변동비	₩XXX	₩XXX	₩XXX	₩XXX	₩XXX	
고정비	₩XXX	₩XXX	₩XXX	₩XXX	₩XXX	
제조원가 계	₩XXX	₩XXX	₩XXX	₩XXX	₩XXX	
(순위만 표시)	3	2	1	4	5	

대다수의 제재소에서는 톱밥/칩을 구분, 관리하지 않으며 자체 연료로 사용하거나 그대로 폐기함. (일부 펠릿 생산)

톱밥/칩 관리 현황



• 톱밥/칩 구분 없이 야적 (Sibles)



• 대형업체의 톱밥관리 (Ikstral)
; 단 다품종 간 톱밥 필터링은 불가능
단일 품종을 생산하면서 구분 가능



• 폐목 관리: 야적 후 연료사용 (Meridan)

운송/적재현황



• 산판(벌목지)



• 크레인 이용 Wagon에 적재 후 철도로 내륙 운송 후 해상 운송



업체 규모 비교



• 중,대규모 업체: 연간 10만톤 ↑
ex. Arkaim, Sibles, Merdian



• 소규모 제재소: 연간 10만톤 ↓
ex. Sibstroyexport, Alians



그림 19. 현지 제재소의 부산물 및 적재, 가공 현황 예시, 현장 방문 사진

2장. 타가토스 생산효소 개량

갈락토스를 원료로 하는 타가토스 생산에 이용되는 효소인 L-arabinose isomerase를 개량하기 위하여 단백질 구조 및 서로 다른 특성을 가지고 있는 단백질의 구조기반 기능적 도메인 분석을 통한 효소개량을 수행하였음. 또한, 변이주 라이브러리로부터 효소를 고속선별하기 위한 세포성장기반 플랫폼 균주를 개발하였음.

1. 호열균 *Geobacillus thermodenitrificans* 유래의 L-arabinose isomerase의 개량

- 사전연구결과 검토를 통해, 갈락토스-타가토스 전환에 관여하는 효소인 L-arabinose isomerase (L-AI) 에 관한 특성이 보고된 후, 분자적 관점으로 역가 향상을 위한 연구 이루어지지 않은 점을 착안하여, 호열균 *G. thermodenitrificans* 유래 L-arabinose isomerase 의 homology modeling을 진행, active site 주변 잔기를 모색하는 실험을 진행하였음(그림1). 그 결과 본래 기질인 오탄당 L-아라비노스와 구조적 배열은 일치하나, 탄소수가 다른 육탄당 D-갈락토스의 적용을 위해 기질의 5번 탄소 위치에 관여하는 잔기들을(Met186, Phe280, Ile371) mutation하여 cavity를 넓히는 작업을 수행함.

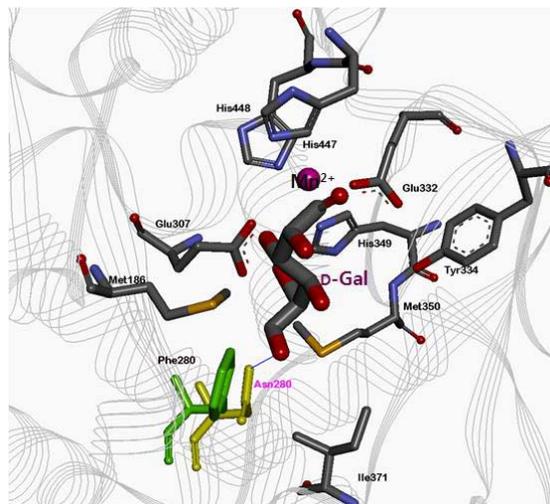


그림 1. Homology modeling을 통해 예측된 호열균 유래 L-AI의 active site 구조

- 육탄당인 갈락토스의 5번 탄소와 근접한 잔기(Met186, Phe280, Ile371)의 변이주 평가결과 F280N variant(F280N-C450S-N475K)에서 가장 큰 역가 향상을 보였고, 기존에 보고된 C450S-N475K 변이주 보다 약 2.3배 활성이 증가. 효소의 생산성을 기준 문헌 결과와 비교한 결과, $4.92 \text{ g}^{-1} \text{ h}^{-1}$ 로 매우 향상되었음을 알 수 있음(그림2, 표1).

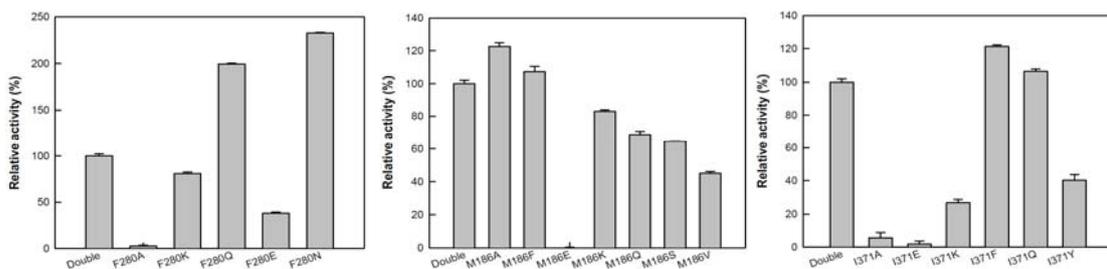


그림 2. 변이주 활성평가 결과

표1. L-AI 생산성 비교

Strain for enzyme source	Substrate (g l ⁻¹)	Enzyme (g l ⁻¹)	Product (g l ⁻¹)	Volumetric productivity (g l ⁻¹ h ⁻¹)	Specific productivity (g g ⁻¹ h ⁻¹)
<i>Acidothermus cellulolyticus</i>	9.01	0.10	4.77	0.40	3.98
<i>Alicyclobacillus acidocaldarius</i>	1.80	0.50	0.79	0.13	0.26
<i>Anoxybacillus flavithermus</i>	0.90	0.18	0.54	0.54	3.00
<i>Bacillus stearothermophilus</i> US100	0.90	3.00	0.43	0.06	0.02
<i>Geobacillus thermonitrificans</i>	1.80	1.00	0.83	0.17	0.17
<i>Lactobacillus fermentum</i>	9.01	1.00	4.95	0.21	0.21
<i>Lactobacillus sakei</i>	9.01	1.00	3.24	0.46	0.46
<i>Pediococcus pentosaceus</i>	5.04	1.50	2.62	0.11	0.07
<i>Thermoanaerobacterium saccharolyticum</i>	9.01	0.61	3.69	0.07	0.11
<i>Thermotoga neapolitana</i>	1.80	0.50	1.23	0.06	0.12
<i>Thermotoga maritima</i>	1.80	5.00	1.01	0.17	0.03
<i>G. thermonitrificans</i> C450S-N475K	18.0	1.00	5.37	2.15	2.15
<i>G. thermonitrificans</i> F280N-C450S-N475K	18.0	1.00	9.84	4.92	4.92

○ 변이주에 대한 갈락토스-타가토스전환 실험을 수행한 결과, 반응 30분 후 약 3배의 역가 차이를, 150분 후에는 C450S-N475K는 29.8%, F280N-C450S-N475K는 54.6%의 전환율을 보임.

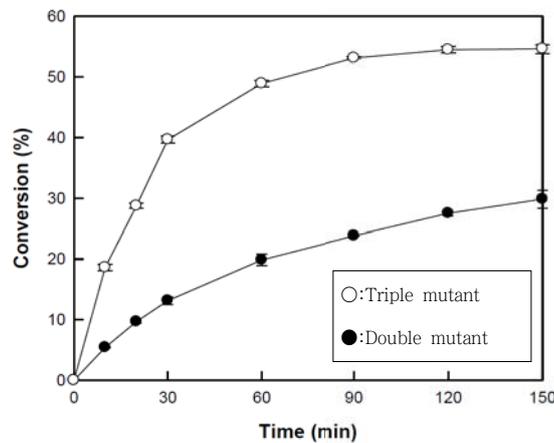


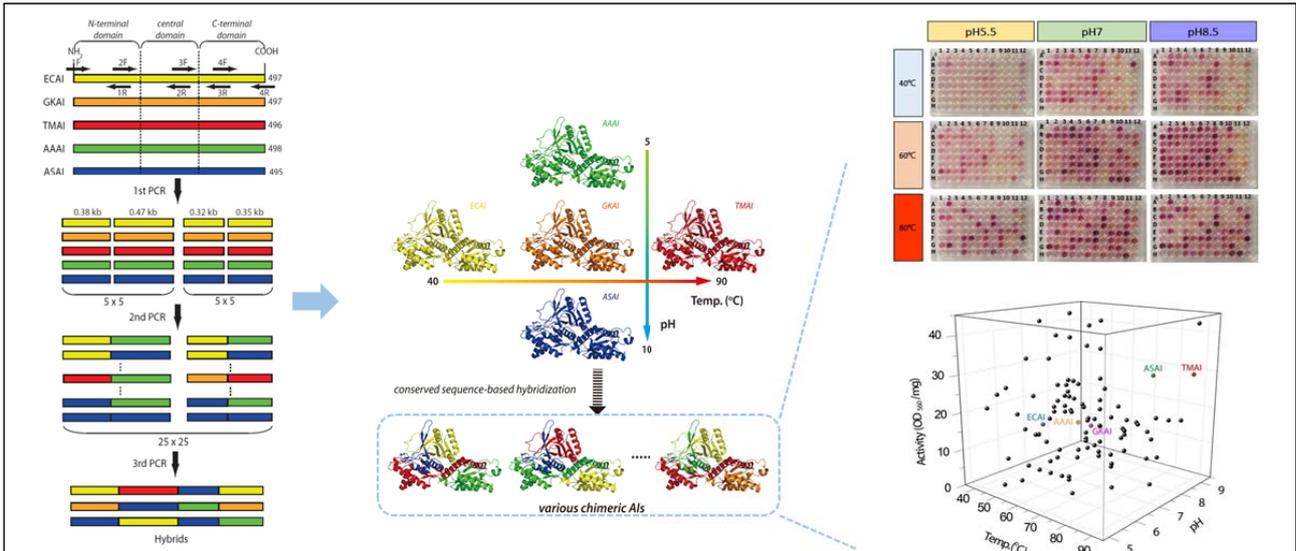
그림 3. 반응시간에 따른 갈락토스-타가토스 전환율

2. 구조기반 기능도메인 분석을 통한 당전환효소의 물리화학적 특성(온도 및 pH) 변이부위결정 가. 도메인 분석을 위한 각 특성별 효소선별 및 구조기반 도메인 분석 원리

○ 여러 특성의 L-arabinose isomerase 확보 및 구조기반 기능적 도메인 분석을 위해 온도, pH, 올리고머화, 메탈요구성, 기질친화도 측면에서 각기 서로 다른 성질을 갖는 5개의 L-arabinose isomerase(AAAI, *Alicyclobacillus acidocaldarius*; ASAI, *A. sp.* TP7; ECAI, *Escherichia coli*; GKAI, *Geobacillus kaustophilus*; TMAI, *Thermotoga maritima*)를 선별하고(표2) 이들의 보존서열을 바탕으로 chimeric L-arabinose isomerase library를 제작함(그림4).

표2. Properties of Microbial AIs

AIs	T _{opt} (°C)	pH _{opt}	t _{1/2} (min)	K _m (mM)	V _{max} (U/mg)	k _{cat} /K _m (mM/min)
TMAI	90	7-7.5	90	31/60	41/9	75/9
AAAI	65	6		48/	36/	42/
ASAI	70	8.5-9		61/	57/	51/
ECAI	37-45	7		60/		
GKAI	70	7				



Library size is very small!!
5×5×5×5 = 625

Shin and Lee et al. (2016) unpublished data

그림 4. 다양한 특성을 지닌 공정효소의 스와핑을 통한 스마트 라이브러리 제작 및 탐색

○ 표 2와 같이 선별된 각각의 특성을 지닌 L-arabinose isomerase는 그림 4와 같은 개념으로 기존의 L-arabinose isomerase 관련 논문, 자료, 및 분석을 통해 올리고머화, pH 안정성, 최적 반응온도, pH, 기질친화도, 금속 요구성 순서대로 L-arabinose isomerase의 각 특성상 conserved domain을 분석하였음.

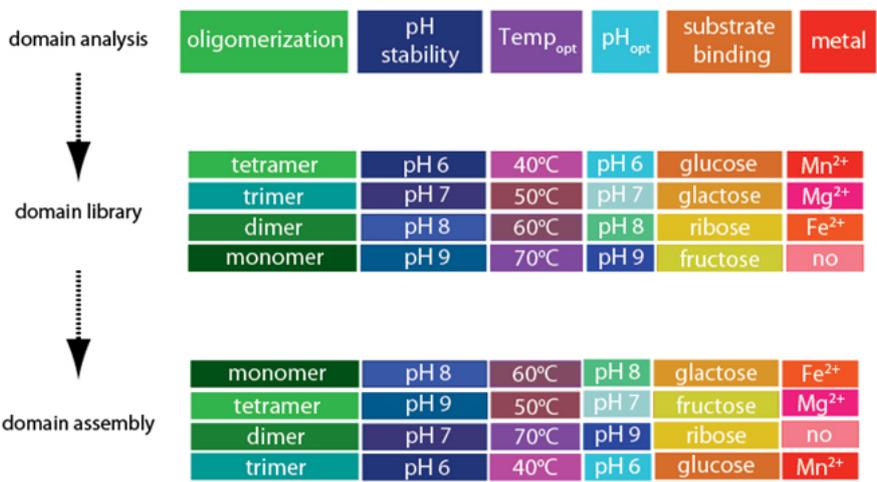


그림 5. Concept of protein (AIs) structure based-domain analysis

나. L-arabinose isomerase hybrid library 구축

○ Semi-rational design의 한 방법인 overlapping PCR을 이용하여 L-arabinose isomerase hybrid library 구축을 위해, PCR을 이용하여 4개의 DNA fragments로 각각 증폭하였음. 증폭된 fragment의 size는 순서대로 약 380, 470, 320, and 350 bp임. 이때 사용된 primers는 이웃단편들과 overlapping되도록 작성되었고 사용된 primer는 표 3과 같음.

표3. Hybrid AI제조를 위한 프라이머

번호		Primer name	Primer sequence (좌>우= 5' >3')	T _m	Length
1		AA NdeI for	CAT ATG ATG CTG TCA TTA CGT CCT TAT GAA TTT	63.0	33
2		AS NdeI for	CAT ATG AAG ATG CCG GCT TAT GAA TTC	61.6	27
3	1F	ECAI NdeI-F	CAT ATG ATG ACG ATT TTT	39.2	18
4		GKAI NdeI-F	CAT ATG ATG CTG TCA TTA CGT CCT TAT GAA	61.2	30
5		TM	CAT ATG ATA GAT CTC AAG	32.0	18
6	1R	AI Hyb 1R	GTG NGC CGA CTG GTT CAG GTT CAT	64.3	24
7	2F	AI Hyb 2F	ATG AAC CTG AAC CAG TCG GCN CAC	64.5	24
8	2R	AI Hyb 2R	GCA RRT CCT CRA ACG TSG TSG TG	62.8	23
9	3F	3F	ACG ACG ACG TTT GAG GAC	50.0	18
10	3R	3R	AAG ACG GGC CGG ATC	50.5	15
11	4F	AI Hyb 4F	GAT CCK GCC CGB CTK GTS TT	61.4	20
12	4R	AAAI-R HindIII	CCA AGC TTT CAC CGC CCC CGC CAA AA	61.6	26
13		AS	AAG CTT TCA GCG GCC GTA CAC CGC CTC GTT	75.9	30
14		EC	CCA AGC TTT TAG CGA CGA AAC CCG TAA TAC ACT TCG	72.3	36
15		GK	AAG CTT TTA CCG CCC CCG	58.5	18
16		TM	AAG CTT TCA TCT TTT CAA AAG CCC	58.1	24

○ 각 L-arabinose isomerase의 4개 단편이 증폭되었음을 agarose gel 분석을 통해 확인하였고, 증폭된 20개의 단편을 overlapping PCR[5]을 수행하여 최종 hybrid L-arabinose isomerase library를 얻음. 구축된 library(1.2×10^6)는 DNA sequencing 분석을 통해 diversity 및 shuffling efficiency를 결정하였음(표 4, 표 5).

표 4. Diversity of chimeric L-arabinose isomerase library

번호	AI hybrid	AI hybrid	번호	AI hybrid	AI hybrid
1	Hybrid #1	AAGE	11	Hybrid #11	ETTE
2	Hybrid #2	ATET	12	Hybrid #12	SSAT
3	Hybrid #3	SEGT	13	Hybrid #13	GAAE
4	Hybrid #4	GATT	14	Hybrid #14	TTSG
5	Hybrid #5	AGTA	15	Hybrid #15	AAGG
6	Hybrid #6	EEGT	16	Hybrid #16	SSTG
7	Hybrid #7	SAES	17	Hybrid #17	TAGE
8	Hybrid #8	AAGG	18	Hybrid #18	AGST
9	Hybrid #9	TASS	19	Hybrid #19	EAST
10	Hybrid #10	TGAA	20	Hybrid #20	SGGG

표 5. Frequency (shuffling efficiency) of chimeric L-arabinose isomerase

Enzyme	Relative frequency (%)
ECAI	14.5
GKAI	19.7
TMAI	23.7
AAAI	26.3
ASAI	15.8

다. L-arabinose isomerase hybrid library로부터 활성형 선별

○ 이에 5개의 서로 다른 L-arabinose isomerase의 온도 차이를 구분 지을 수 있는 조건하에서 구축된 1.2×10^6 개의 L-arabinose isomerase hybrid library 중 1차적으로 선별한 활성형 hybrid를 L-arabinose를 기질로 하여 enzyme activity assay를 96well plate상에서 실시함. 1차에서 선별된 78개의 활성형 hybrid와 wild-type L-arabinose isomerase가 포함된 clone을 발현 후 온도 40~80°C, pH 6~9에 따른 활성을 측정 및 비교함(그림 6).

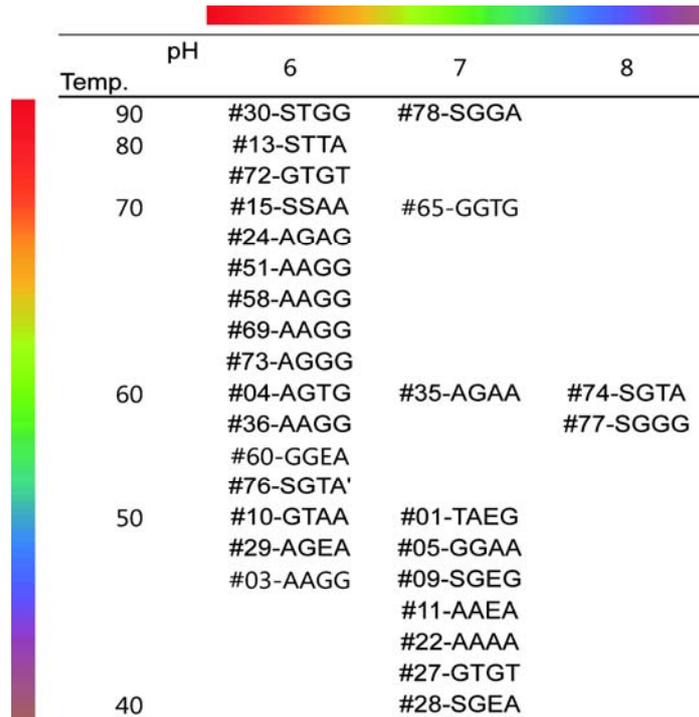


그림 6. 온도, pH에 대해 활성을 보이는 다양한 clone을 선택하여 hybrid L-arabinose isomerase sequence, 도메인 분석 및 제작된 Hybrid L-arabinose isomerase의 분포도

- 구축된 1.2×10^6 개의 L-arabinose isomerase hybrid library 중 활성형 hybrid를 선별하기 위해 hybrid의 이론적 개수 625개의 5배수인 3,125개의 콜로니를 무작위로 선택하여 아라비노스를 기질로 하여 효소활성측정을 96-well plate상에서 실시함(그림 7). 이를 통해 3,125개의 콜로니 중에서 약 78개의 콜로니를 1차 선별함.
- Hybrid L-arabinose isomerase mutant의 변이된 활성을 측정하기 위해 선별된 콜로니와 각각의 wild-type과 함께 96 well plate에 배양한 후, 다양한 온도(40~80°C)/pH(5.5~8.5) 범위에서 library mutants의 활성을 측정함. 각각의 온도/pH에 따른 mutant의 활성을 비교하여, 활성의 경향성을 파악하고 이를 분석된 유전자 서열과 비교·분석함으로써 물리적인 특성(온도/pH)과 활성에 주는 아미노산 서열과 도메인을 분석하였음.

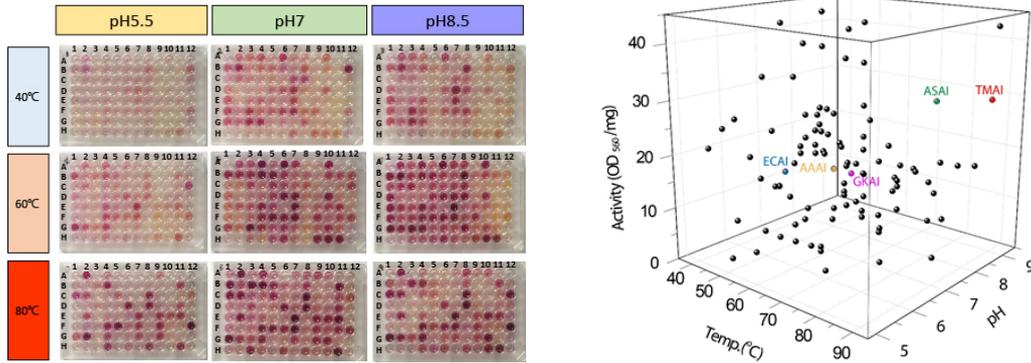


그림 7. 다양한 온도 및 pH에 대한 L-arabinose isomerase library mutants의 효소활성 측정 및 분포도

○ 기존의 야생형에서 나타나지 않는 특이한 물리화학적 특성을 보이는 L-arabinose isomerase chimera를 대상으로 8종을 선별하여 순수분리 및 정제를 수행함. 정제된 non-natural L-arabinose isomerase 효소들의 온도 및 pH에 대한 특성을 조사 분석함(그림 8). 이들의 특성 및 3차 구조기반 도메인 분석을 통해 L-arabinose isomerase의 물리화학적 특성개량(열안정성, pH의존성 등)을 위한 핵심부위를 밝혀냄.

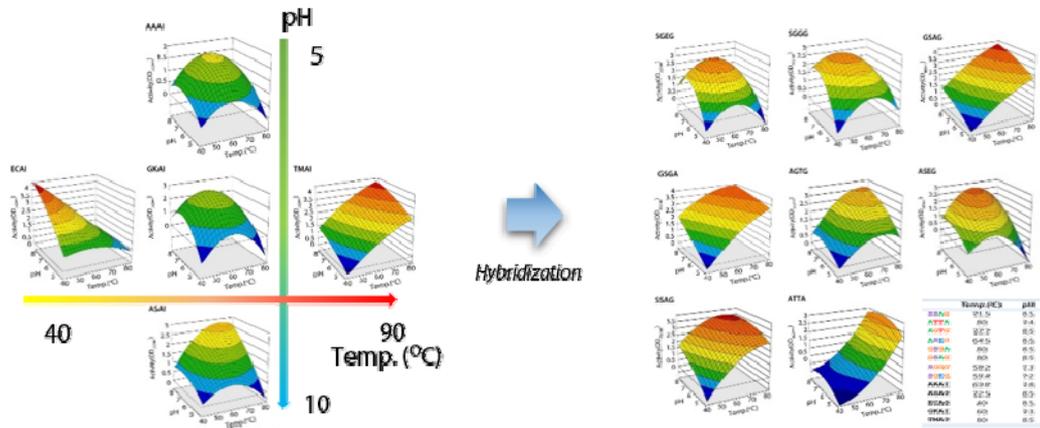


그림 8. 선별된 이성화효소 mutant 8종의 최적활성 온도 및 pH

○ 이들의 특성 및 3차 구조기반 도메인 분석을 통해 공정효소(L-arabinose isomerase)의 물리화학적 특성개량(열안정성, pH의존성 등)을 위한 핵심부위-열안정성 결정부위 4개, 최적활성을 위한 pH변이 부위 2개를 찾음.

라. 공정효소로의 변이부위 적용을 통한 비교 및 검증

○ 단백질 구조기반 도메인 분석을 통한 이성화효소의 최적활성 온도 및 pH에 영향을 줄 것으로 예측된 잔기를 야생형에 적용하고자, site-directed mutagenesis를 통해 변이주를 제작한 후, 이들의 발현 및 정제를 통해 순수분리된 변이주 6종을 확보하여 야생형과 비교분석함(그림 9).

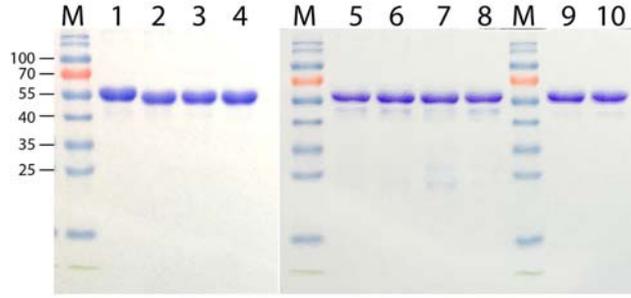


그림 9. 온도 및 pH조절부위 비교 및 검증을 위한 순수분리된 변이체 효소

- 이성화효소의 최적활성 pH약산성화를 위한 변이체제작의 template로 ASAI(최적활성 pH7.0)를 선택하고, ASAI M1, ASAI M2 변이체를 제작함. 변이체 이성화효소의 최적활성을 확인하기 위해 pET vector 발현시스템을 이용, 친화 크로마토그래피(Ni^{2+} affinity chromatography)방법으로 정제. 순수 분리된 변이체 이성화효소의 활성 최적 pH 확인을 위해 다양한 범위(pH4~10)에서 반응 후, 발색법을 통해 활성을 측정함. 제작된 변이체의 활성 최적pH가 pH5.58~9.59(ASAI M1), pH5.52~9.52(ASAI M2)로 야생형 보다 더 넓은 범위에서 높은 이성화효소활성이 유지됨을 확인함(그림 10).

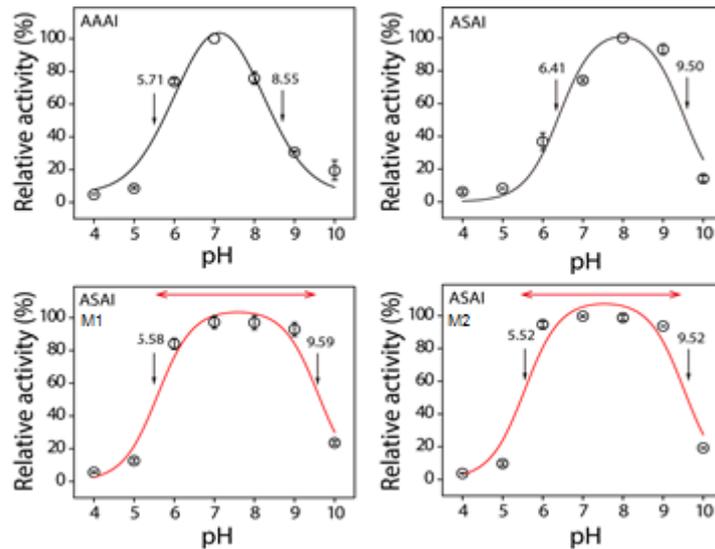


그림 10. 변이체 이성화효소의 활성 최적 pH 그래프

- 이성화효소의 최적활성 온도의 저온화를 위한 변이체제작의 template로 공정효소와 같은 초호열균 유래의 *T. maritima* L-arabinose isomerase(TMAI)를 선택 TMAI M3 변이체 제작함. 변이체이성화효소의 최적온도를 확인하기 위해 pET vector 발현시스템을 이용, 친화 크로마토그래피(Ni^{2+} affinity chromatography) 방법으로 정제. 순수 분리된 변이체 이성화효소의 활성 최적 온도를 측정을 위해 다양한 온도범위 (30~90°C)에서 반응 후, 발색법을 통해 활성을 측정함.
- 야생형 ECAI와 TMAI의 최적활성 온도가 각각 45, 90°C로 기존의 보고된 최적활성 온도와 동일한 결과를 보인 반면, TMAI M3 변이체의 경우 최적활성 온도가 80°C로 야생형에 비해 10°C 저온화 됨을 확인함. 또한, 50~70°C 구간에서 변이체의 활성이

야생형에 비해 10~25% 증가됨. 이를 통해 M3 적용이 이성화효소의 활성온도 저온화에 중요한 잔기임을 확인함으로써 공정효소로의 적용 가능한 부위를 성공적으로 결정함.

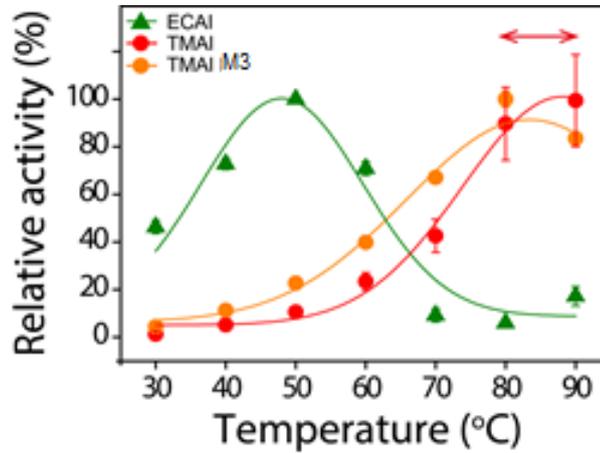


그림 11. 변이체 이성화효소의 활성 최적 온도 그래프

3. 고온성 당전환 효소 탐색을 위한 초고속 세포성장기반 플랫폼 균주 개발

가. 갈락토스 자화능이 결여된 대장균 이용한 타가토스 auxotroph 세포공장 개발

○ 갈락토스 이성화 효소의 기질특이성이 개량된 변이주 라이브러리 탐색을 위한 균체성장기반탐색시스템(cellular growth-associated screening system)개발을 위해 아래와 같은 전략을 택함(그림 12). 간단히 설명하면, 갈락토스 자화능이 결여된 타가토스 auxotroph인 숙주세포에 L-arabinose isomerase발현이 일어나도록 형질전환시킴. 그 후 형질전환된 숙주세포를 갈락토스가 유일탄소원으로 함유된 배지에 균체성장을 유도하여, L-arabinose isomerase발현에 따른 타가토스로의 이성화 반응이 일어난 균주 혹은 갈락토스에 대한 기질특이성이 개량된 효소를 발현시킨 균주만 효소의 반응생성물(즉, 타가토스)을 유일탄소원으로 이용하여 우선적으로 성장가능하게 됨. 이러한 균주를 우선적으로 선별할 경우, 1일 이내에 10^8 개 이상의 mutant 라이브러리를 탐색 및 선별할 수 있게 됨. 이는 기존의 효소활성에 기반한 high-throughput screening공정에서 소요되는 시간을 효과적으로 단축시키는 혁신적인 cell growth-associated ultra high-throughput screening 기술임.



그림 12. 타가토스 auxotroph을 활용한 growth-associated screening 모식도

○ 타가토스 대사에 필수한 외래 유전자 탐색 및 도입을 통한 타가토스 자화균주 개발

- 세포성장기반 시스템 구축을 위해 갈락토스 자화능이 없는 숙주세포에 타가토스만을 유일탄소원으로 자화할 수 있는 숙주세포 개발이 핵심임. 이를 위해 첫째로, *E. coli* BL21(DE3)는 탄수화물대사경로 중 갈락토스 대사에 관여하는 효소인 galK(EC 2.7.1.6, galactokinase), galT(EC 2.7.1.12, galactose 1-phosphate uridylyltransferase), 그리고 galE(EC 5.1.3.2 UDP-galactose 4-epimerase)가 결핍되어 있음. 이를 확인하고자 gal operon을 갖고 있는 *E. coli* DH5 α 와 gal operon이 존재하지 않는 *E. coli* BL21(DE3)를 복합(LB)배지와 5g/L 포도당 및 5g/L 갈락토스가 각각 포함된 제한(M9)배지에 배양하여 35시간 동안 균체생장을 확인함. 그 결과 *E. coli* DH5 α 는 포도당과 갈락토스를 탄소원으로 사용할 수 있는 반면, *E. coli* BL21(DE3)는 갈락토스 첨가배지에서 균체생장을 못하는 것을 확인함(그림 13).

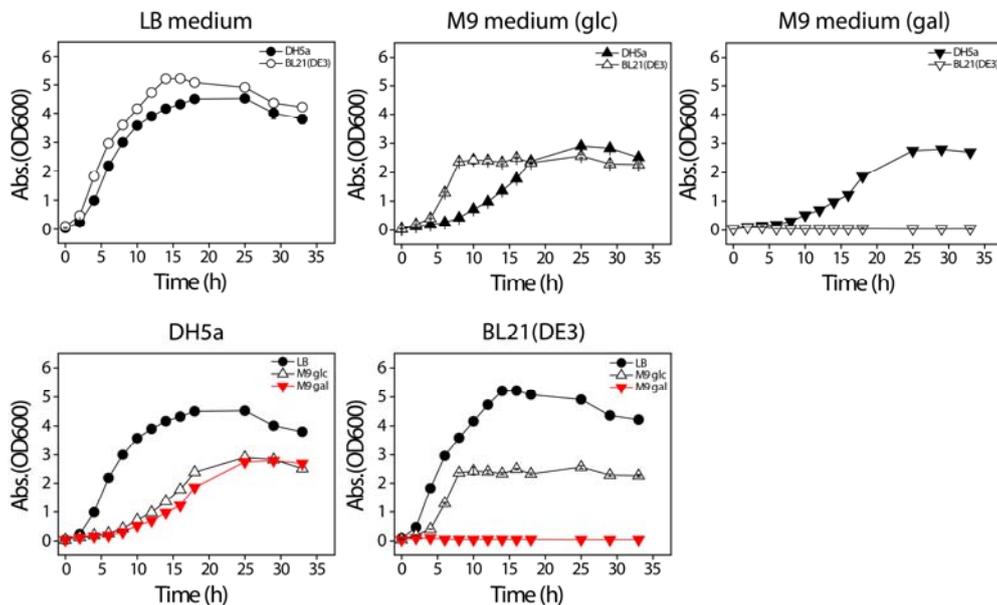


그림 13. LB와 포도당 및 갈락토스가 유일탄소원으로 첨가된 배지에서의 대장균 균체성장곡선

- 둘째로, 갈락토스 자화능이 결여된 대장균에 타가토스 대사에 필수한 외래 유전자 도입을 통한 타가토스 자화능을 지닌 대장균 세포공장을 개발함. 타가토스 대사에 관여하는 유전자를 선별하는 방법으로, 타가토스 자화능이 결여된 *E. coli* BL21(DE3)와 타가토스 자화능이 있는 미생물의 타가토스 이용성 유전자 또는 유전자군의 비교를 통해 결여된 외래유전자를 선별함.
- 타가토스 자화능이 있는 균체의 genomic DNA로부터 타가토스 대사에 필수적인 요소로 예측되는 유전자를 선별, 증폭 및 over-expression vector인 pET vector에 클로닝한 후, SDS-PAGE를 통해 발현여부를 확인함. 재조합 유전자의 발현에 따른 대장균 숙주세포의 타가토스 자화능 획득을 확인하고자, 형질전환된 신규 대장균 숙주세포를 유일탄소원으로 타가토스(5g/L)가 포함된 M9배지에서 균체생장을 확인함. 야생형 대장균은 타가토스 자화능이 없기에 타가토스를 유일탄소원으로 사용할 수 없음. 반면에 타겟유전자가 형질전환된 대장균 숙주세포는 발현에 따라 타가토스

자화능을 갖게 됨을 확인함. 이는 성공적으로 발현된 Y가 타가토스 비이용성 숙주세포를 타가토스 이용능을 지니게 함(그림 14).

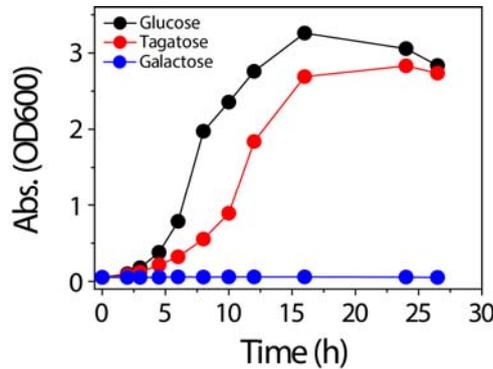


그림 14. 외래유전자 발현을 통한 타가토스 자화능을 갖는 호스트 균주개발

- 결론적으로, L-arabinose isomerase 개량을 목적으로 돌연변이 라이브러리 탐색을 하기 위해 사용되는 기존의 황산발색법을 대체할 수 있게 됨으로써, 초고속 대량탐색이 가능한 균체성장기반 탐색법을 개발함.

나. 갈락토스 자화능이 결여된 고온균을 이용한 타가토스 auxotroph 세포공장 개발

○ 고온성 신규 당전환 효소탐색을 위한 타가토스에 대한 자화능을 지닌 맞춤형 고온성 플랫폼 균주를 개발하고자, 경북대학교에서 보유하고 있는 고온성 미생물인 *Geobacillus* 균주를 플랫폼 균주로 선정한 후, 유전체 염기서열 분석을 완료함. *Geobacillus* 균주의 유전자 조작을 위해 *E. coli-Bacillus* shuttle vector인 pNW33N에 대한 각 균주별 형질전환조건을 확립함. 유전체 분석 및 당자화능 실험을 통해 갈락토스 자화능이 결여된 균주(*G. subterraneus*, *G. lituanicus* 및 *G. caldxylosilyticus*)를 확보한 후, 재조합 분자기술을 확립함.

표 6. *Geobacillus* strains 의 표현형(phenotype), 유전형(genotype) 특징

	<i>Geobacillus</i>						<i>Aeribacillus</i>
	<i>kaustophilus</i>	<i>thermoleovorans</i>	<i>thermocatenulatus</i>	<i>subterraneus</i>	<i>caldxylosilyticus</i>	<i>lituanicus</i>	<i>Pallidus</i> ClCa
	HTA426	ID-1	KCTC3921	KCTC3922	CIC9	N-3	
Phenotypic features							
Morphology	Rod						
Cell wall structure	Gram Positive						
Cell size (µm)	1.5 × 3.5	1.5 × 3.5	0.9 × 8.0	1.0 × 7.0	0.1 × 6.0	1.4 × 5.8	0.8 × 5.0
Anaerobic Growth	+ / -						
Temp. _{opt}	60	65	55	60	55	60	60
pH _{opt}	8.0	6.5	7.0	7.5	7.0	6.5	7.8
Genotypic features							
Contig	2	309	467	395	82	49	70
Genome Size (Mbp)	3.54	3.66	3.70	3.40	3.82	3.27	2.88
G+C contents (%)	52.1	52.3	52.1	53.2	44.2	48.8	41.3
No. coding seq.	3,653	3,980	3,869	3,512	4,019	3,548	3,071
No. RNAs	114	104	98	107	76	91	71
Seq. technology	Illumina HiSeq						

○ 위의 7가지의 균주를 대상으로 고온성 당전환효소탐색용 플랫폼 숙주세포를 선별하기 위해 유전체 분석(illumina Hiseq) 및 당자화능 실험을 시행함. 균주의 당자화능을 확인하기 위해 complete media NB(nutrient broth)와 5 g/L의 다양한 당 (D-glucose, D-galactose, D-xylose, D-tagatose, L-arabinose, D-fructose, D-Sucrose, D-mannose, D-ribose, D-psicose, lactose)이 포함된 minimal salt (MS) media에서 각 균주를 60°C에서 15시간 동안 균체생장을 확인함(표 7 및 그림 15). 이를 통해 갈락토스 자화능이 결여된 균주를 확보함 : *Geobacillus lituanicus* N-3, *Geobacillus caloxylosilyticus* CIC 9.

표 7. *Geobacillus* strains의 당자화능의 표현형(phenotype), 유전형(genotype)의 비교

Sugar Strain	Glucose	Galactose	Ribose	Arabinose	Mannose	Tagatose	Sucrose	Xylose	Lactose
GK	+	+	+	+	+	-	+	+	-
GT-1	+	+	+	-	+	-	+	+	-
GT-K	+	+	+	-	+	-	+	-	-
GS	+	W	-	-	+	-	+	W	-
GC	W	W	W	-	-	-	W	W	-
GL	+	-	W	-	+	-	+	+	-
AP	+	+	-	-	-	-	+	+	+

Compare the ability of carbohydrate utilization of *Geobacillus* strains. GK; *G. kaustophilus* HTA426, GT-1; *G. thermoleovorans* ID-1, GT-K; *G. thermocatenulatus* KCTC3921, GS; *G. subterraneus* KCTC3922, GC; *G. caloxylosilyticus* CIC9, GL; *G. lituanicus* N-3, AP; *Aeribacillus pallidus* C1Ca, 1; Results of growth profile under the carbon condition, 2; Other paper published carbon utilization for each strains, 3; Genotyping data, +; Growth, -; Not growth, n.d; Not determined, V; variable within group, W; weak growth

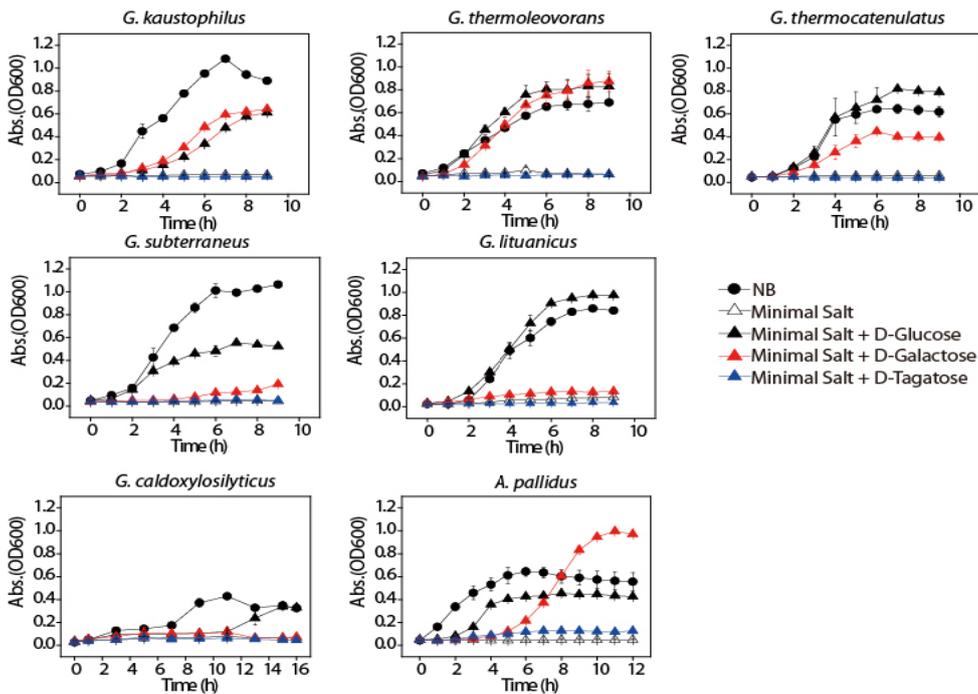


그림 15. *Geobacillus* 균주들의 유일탄소원별 균체생장곡선

- Geobacillus균주의 유전자 조작을 위해 *E. coli*-Bacillus shuttle vector인 pNW33N에 대한 각 균주별 형질전환조건을 확립함. Competent Geobacillus균주 제작을 위해 각 균주를 protoplast형태로 만들어서 외래 유전자의 도입을 용이하게 만들. Protoplast제작은 광학 현미경을 통해 확인하였으며, selection marker인 chloramphenicol이 포함된 배지에서 균체생장확인을 통해 각 Geobacillus균주의 형질전환을 확인함(그림 16).

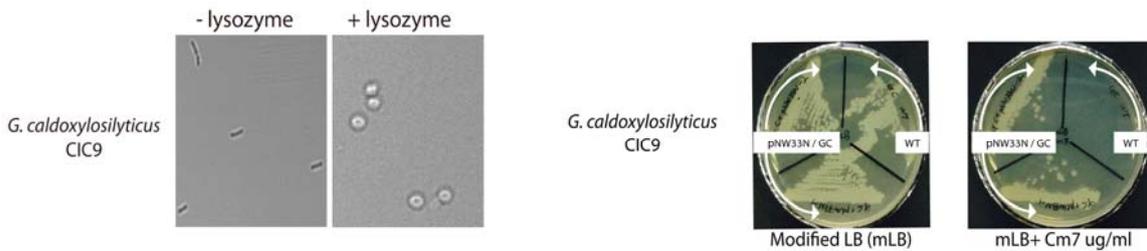


그림 16. (좌) *Geobacillus caldoxylosilyticus* N-3 균주의 protoplast (우) 형질전환된 *Geobacillus*균주의 chloramphenicol 내성확인

다. 신규 초고속 당전환 활성탐색법을 활용한 초고온성 공정효소 돌연변이 라이브러리제작 및 개량방법 구축

- 갈락토스 자화능이 결여된 타가토스 auxotroph인 숙주세포에 L-arabinose isomerase발현이 일어나도록 형질전환시킴. 그 후 형질전환된 숙주세포를 갈락토스가 유일탄소원으로 함유된 배지에 균체성장을 유도하여, L-arabinose isomerase발현에 따른 타가토스로의 이성화 반응이 일어난 균주 혹은 갈락토스에 대한 기질특이성이 개량된 효소를 발현시킨 균주만 효소의 반응생성물(즉, 타가토스)을 유일탄소원으로 이용하여 우선적으로 성장가능하게 됨. 이러한 균주를 우선적으로 선별할 경우, 1일 이내에 10^8 이상의 변이주 라이브러리를 탐색 및 선별하게 됨. 이는 기존의 효소활성 기반 high-throughput screening 공정에서 소요되는 시간을 효과적으로 단축시키는 혁신적인 cell growth-associated ultra high-throughput screening기술임. 결론적으로, L-arabinose isomerase개량을 목적으로 돌연변이 라이브러리 탐색을 위해 사용되는 기존의 황산발색법을 대체할 수 있게 됨으로써, 초고속 대량탐색이 가능한 균체성장기반 탐색법을 개발하였음.
- Double plasmid expression system을 활용한 플랫폼 호스트 시스템을 구축하고자, 타가토스 자화능을 지닌 신규 대장균 숙주세포에 L-arabinose isomerase 라이브러리를 도입한 후, 발현유도를 통해 갈락토스 제한배지에서 균체성장을 보이는 균주를 선별하고자 함. 이를 위해 pET28a-Y plasmid DNA와 pET22b-araA plasmid DNA를 도입하여 double plasmid expression system pET28a-Y, pET22b-araA/*E. coli* BL21(DE3)을 제작함. 본 형질전환된 균주에서의 L-arabinose isomerase발현을 유도한 후, SDS-PAGE를 통해 타가토스 대사를 위한 Y 유전자의 발현 및 araA유전자(56

kDa)의 co-expression을 확인하였으며, 이를 통해 갈락토스 비자화능을 지닌 숙주세포의 균체생장곡선을 확인하여 당전환 이성화효소의 라이브러리 탐색을 위한 *in vivo* growth-associated 플랫폼 호스트 시스템을 확인하였음(그림 17).

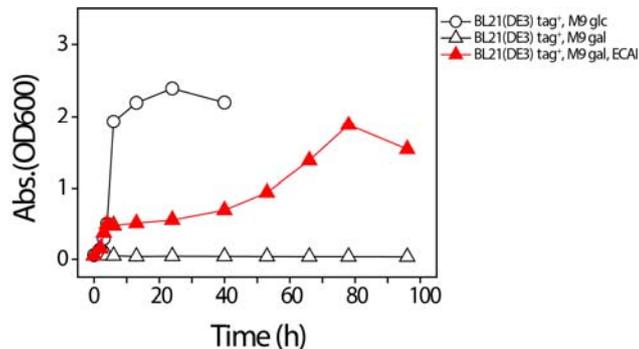


그림 17. 갈락토스 비자화능을 지닌 숙주세포의 균체생장곡선

- 당전환 이성화효소의 라이브러리 탐색을 위한 *in vivo* growth-associated 플랫폼 호스트 시스템의 최적화를 위해서는 *E. coli* 숙주세포의 형질전환의 효율 (transformation efficiency 또는 competent cell efficiency)이 핵심임. 그러나 앞선 double plasmid system으로는 *E. coli* BL21(DE3)의 transformation efficiency가 최대 5.0×10^5 CFU/ μ g 으로 유전자 라이브러리를 스크리닝하기에 부적절함. 이에 이중발현 벡터 시스템 pET Duet-1(노바젠) 를 이용하여 2가지 유전자를 동시에 발현하고자 함. 이를 통해 1) 당전환 이성화효소의 라이브러리 탐색을 위한 *in vivo* growth-associated 플랫폼 호스트 시스템을 위해 필수적인 L-arabinose isomerase, Y 두 단백질의 동시발현이 가능하게 하였고, 2) 유전자 라이브러리 스크리닝 숙주세포의 '형질전환 고효율'이 가능하도록 하였음.
- 이를 위해 pET Duet-1 araA MSC1, pET Duet-1 araA MSC2, pET Duet-1 Y MSC1, pET Duet-1 Y MSC2, pET Duet-1 Y MCS1, araA MCS2, 및 pET Duet-1 araA MCS1, Y MCS2 plasmid DNA를 구축함. 구축된 plasmid DNA를 BL21(DE3) 에 형질전환하여 SDS-PAGE를 통해 발현되는 양상을 확인하였으며, 황산발색법을 이용한 활성 확인을 통해 발현된 이성화효소의 활성형을 확인함.
- 또한 구축된 plasmid DNA의 형질전환 및 Y의 발현에 따른 타가토스 자화능을 확인하기 위해 타가토스 배지에서 자화능을 확인한 결과 Dual expression system을 이용하여 타가토스 배지에서 숙주세포의 성장을 확인하였음.

3장. 범용원료로부터의 타가토스 생산

범용원료인 포도당이나 과당으로부터 타가토스를 생산하기 위하여, 이를 위한 전환효소 연구개발을 진행하였음. 현재 사용하고 있는 원료인 갈락토스는 유당의 가수분해를 통하여 얻고 있으나, 유당의 원료가격이나 수급성을 고려하였을 때 포도당과 같은 범용원료로 부터 갈락토스를 만들 수 있다면 매우 경제적이라 할 수 있음. 또한, 타가토스는 과당 4번 탄소의 수소와 수산화기 위치가 다른 에피머의 형태로, 4번 탄소위치의 수소와 수산화기 위치를 변경할 수 있는 에피머화 효소를 확보할 수 있다면, 원료가격 측면뿐만 아니라 제조공정도 기존에 비해 간소화 시킬 수 있는 장점을 가지고 있음.

1. 미생물자원 및 메타지놈 라이브러리로부터 목적효소 스크리닝

포도당을 갈락토스로 전환하거나 과당을 타가토스로 전환시키는 C4에피머화 효소를 주관연구기관 및 주관연구기관과 협력관계를 가지고 있는 기관으로부터 확보한 다양한 미생물자원 및 메타지놈 라이브러리로부터 스크리닝 하고자 함.

가. 미생물자원

(1) 주관기관 보유 미생물

기존에 알려진 sugar-epimerase, -isomerase 효소 반응 조건을 기초로 하여 스크리닝 방법을 구축 (그림 1). 미생물이 목적하는 활성효소를 보유하고 있는지 확인하기 위하여 특정 배양 조건하에 배양된 미생물의 조효소액 확보, 효소반응, 활성분석 진행.

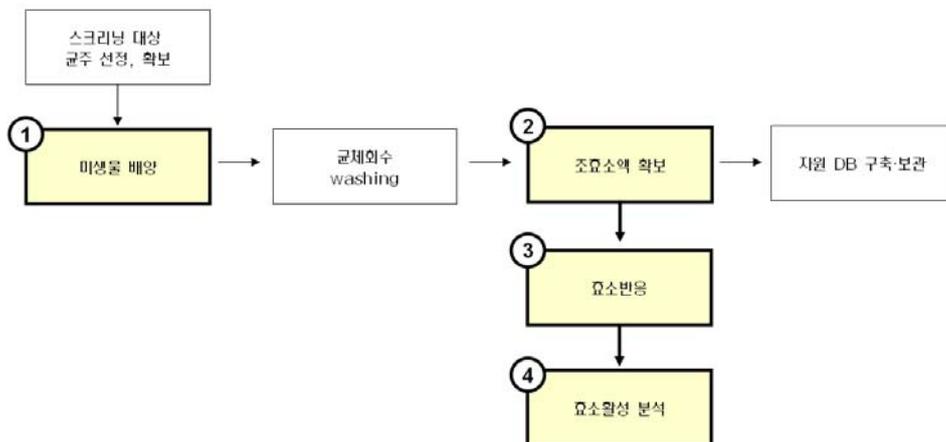


그림 1. 일반당 전환 활성보유 효소 발굴을 위한 미생물 스크리닝

- 다양한 미생물의 성장과 생성물 형성을 최적화 시킬 수 있는 배양조건을 확보하기 위하여 Prokaryotes(5종), Eukaryotes(5종)을 각각 LB, M9 배지조성으로, 배지농도를 1/2, 1/4, 1/6로 희석하고 탄소원으로 포도당과 타가토스를 0.3% 농도로 첨가한 후 미생물별 최적 배양온도에서 24시간 배양 진행. 그 결과, 10종의 미생물이 LB 배지조성에서, 1/2 희석된 배지농도와 1/4희석된 배지 농도에서의 배양 정도에 차이를

보이지 않았으며, M9 배지에서는 미생물 배양이 잘 되지 않았음. 최종 배지는 1/4로 희석된 LB 배지를 사용. 미생물은 OD600에서 2이상이 되었을 때 회수.

- 조효소액을 확보하기 위하여 미생물을 25 mM Tris-HCl (pH7.5) 완충용액으로 4회 washing한 후 20배 농축. 이를 chemical reagent 또는 sonicator를 이용하여 세포파쇄하고 상등액을 회수. BCA protein assay kit를 이용하여 조효소액의 단백질을 정량한 결과, 0.5~1.5mg/ml 정도.
- 이미 연구되고 있는 여러 종류의 에피머화, 이성화 효소 반응 조건을 기초로 하여 반응 온도별(37°C와 45°C), buffer 조성별(HEPPS, Tris-Cl, potassium phosphate), pH 범위별(6.8~8.5), 기질농도별(5~100 mM), 금속이온(망간) 첨가 유무 등의 실험을 통해 C4에피머화 활성 보유효소 반응조건을 결정. 최종 반응 조건은 5 mM 갈락토스 또는 5mM 타가토스와 2 mM Mn²⁺이 함유된 50mM Tris-HCl (pH7.5)에서 3시간, 24시간 반응. 반응 온도는 37°C.
- 갈락토스 또는 타가토스를 기질로 3시간, 24시간 효소반응한 반응산물을 TLC, HPLC, HPAEC를 통해 갈락토스로부터 포도당으로의 전환, 타가토스로부터 과당으로의 전환 여부를 확인함으로써 C4에피머화 반응을 확인하였음.
- 상기 효소스크리닝 방법을 통해 하단 표 1에 작성된 균주 약 400종에 대하여 각각의 기질에서 목적 활성 보유 효소를 확보할 수 없었음. C4에피머화 반응에 대한 활성을 보이는 균주가 없는 것으로 확인.

표 1. 스크리닝 균주목록

<i>Aeromonas hydrophila</i> ATCC 7966	<i>Bacillus infantis</i> strain ML-6	<i>Bacillus subtilis</i> subsp. <i>subtilis</i>
<i>Aeromonas hydrophila</i> subsp. <i>Hydrophila</i> KCCM 11533	<i>Bacillus licheniformis</i>	<i>Bacillus subtilis</i> subsp. <i>subtilis</i>
<i>Aeromonas hydrophila</i> subsp. <i>Hydrophila</i> KCCM 32586	<i>Bacillus licheniformis</i>	<i>Bacillus subtilis</i> subsp. <i>subtilis</i>
<i>Agrobacterium</i> sp. ATCC31750	<i>Bacillus licheniformis</i>	<i>Bacillus subtilis</i> subsp. <i>subtilis</i>
<i>Agrobacterium tumefaciens</i>	<i>Bacillus licheniformis</i>	<i>Bacillus subtilis</i> subsp. <i>subtilis</i>
<i>Agrococcus baldi</i>	<i>Bacillus licheniformis</i>	<i>Bacillus thuringiensis</i>
<i>Alcaligenes faecalis</i>	<i>Bacillus licheniformis</i>	<i>Bacillus vallismortis</i>
<i>Arthrobacter atrocyaneus</i> KCCM 41106	<i>Bacillus licheniformis</i>	<i>Bacillus vallismortis</i>
<i>Arthrobacter aurescens</i> KCCM 41109	<i>Bacillus licheniformis</i>	<i>Bacillus vallismortis</i>
<i>Arthrobacter crystallopoietes</i> KCCM 41107	<i>Bacillus licheniformis</i>	<i>Bacillus velezensis</i>
<i>Arthrobacter globiformis</i> KCCM 40800	<i>Bacillus licheniformis</i>	<i>Bacillus velezensis</i>
<i>Arthrobacter oxydans</i> KCCM 11369	<i>Bacillus licheniformis</i>	<i>Bacillus velezensis</i>
<i>Arthrobacter protophormiae</i>	<i>Bacillus licheniformis</i> KCCM 12145	<i>Bacillus velezensis</i>
<i>Arthrobacter protophormiae</i> KCCM 11409	<i>Bacillus licheniformis</i> strain ACO1	<i>Bacillus velezensis</i>
<i>Arthrobacter</i> sp. KCCM 12190	<i>Bacillus licheniformis</i> strain NJ-5	<i>Bacillus velezensis</i>
<i>Arthrobacter</i> sp. KCCM1194	<i>Bacillus malacitensis</i>	<i>Bacillus velezensis</i>
<i>Arthrobacter sulfureus</i> KCCM 12457	<i>Bacillus malacitensis</i>	<i>Bacillus velezensis</i>
<i>Arthrobacter ureafaciens</i> KCCM 40801	<i>Bacillus megaterium</i> strain KCCM 11938	<i>Bacillus velezensis</i>
<i>Arthrobacter viscosus</i> KCCM 11708	<i>Bacillus megaterium</i> strain TOBCMDU-1	<i>Bacillus velezensis</i>
<i>Aspergillus nidulans</i> KCCM 60240	<i>Bacillus nematocita</i>	<i>Bacillus velezensis</i>
<i>Aspergillus nidulans</i> KCCM 60342	<i>Bacillus nematocita</i>	<i>Bacillus velezensis</i>
<i>Aspergillus nidulans</i> var. <i>dentatus</i> KCCM 60116	<i>Bacillus nematocita</i>	<i>Bacillus velezensis</i>
<i>Azospirillum brasiliense</i> KCCM 40261	<i>Bacillus patagoniensis</i> strain PAT 05	<i>Bacillus velezensis</i>
<i>Bacillus acidovorans</i>	<i>Bacillus selenatarsenatis</i> strain T-36	<i>Bacillus velezensis</i>
<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	<i>Bacillus simplex</i>	<i>Bacillus velezensis</i>
<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	<i>Bacillus simplex</i>	<i>Bacillus velezensis</i>
<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	<i>Bacillus simplex</i>	<i>Bacillus velezensis</i>
<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	<i>Bacillus simplex</i> strain BCHCNZ282B	<i>Bacillus velezensis</i>
<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	<i>Bacillus sonorensis</i>	<i>Bacillus velezensis</i>
<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	<i>Bacillus sonorensis</i>	<i>Bacillus velezensis</i>

표 1. 스크리닝 균주목록(계속)

<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	<i>Bacillus sonorensis</i>	<i>Bacillus velezensis</i>
<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	<i>Bacillus sonorensis</i>	<i>Bacillus velezensis</i>
<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	<i>Bacillus sonorensis</i>	<i>Bacillus velezensis</i>
<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	<i>Bacillus sonorensis</i>	<i>Bifidobacterium bifidum</i> KCCM 12096
<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	<i>Bacillus sonorensis</i>	<i>Brachy bacterium</i> sp. M-6-3
<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	<i>Bacillus sonorensis</i>	<i>Campylobacter jejuni</i> KCTC5327
<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	<i>Bacillus sonorensis</i> strain NRRL B-23160 (AF302124)	<i>Campylobacter jejuni</i> subsp. <i>Jejuni</i> KCCM 41772
<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	<i>Bacillus</i> sp. KCCM4043	<i>Campylobacter jejuni</i> subsp. <i>Jejuni</i> KCCM 41773
<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	<i>Bacillus</i> sp. MB-7	<i>Candida albicans</i> KCCM 50573
<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	<i>Bacillus</i> sp. SY4	<i>Candida albicans</i> KCCM 50618
<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	<i>Bacillus</i> sp. SY4	<i>Cellulomonas cellulans</i> ATCC21606
<i>Bacillus amyloliquefaciens</i> strain Lx-11	<i>Bacillus</i> sp. SY4	<i>Cellulomonas turbata</i> ATCC25835
<i>Bacillus amyloliquefaciens</i> strain Lx-11	<i>Bacillus subtilis</i> 168 ATCC 23857	<i>Cellulosimicrobium cellulans</i> ATCC15921
<i>Bacillus amyloliquefaciens</i> strain x11-20 (GQ480499)	<i>Bacillus subtilis</i> strain Pab02	<i>Chromohalobacter beyerinckii</i>
<i>Bacillus atrophaeus</i>	<i>Bacillus subtilis</i> strain S64	<i>Chromohalobacter canadensis</i>
<i>Bacillus atrophaeus</i>	<i>Bacillus subtilis</i> strain S64	<i>Chromohalobacter israelensis</i> strain Ba1
<i>Bacillus atrophaeus</i>	<i>Bacillus subtilis</i> subsp. <i>subtilis</i>	<i>Chromohalobacter japonicus</i> (AB105159)
<i>Bacillus atrophaeus</i>	<i>Bacillus subtilis</i> subsp. <i>subtilis</i>	<i>Chromohalobacter mansmortui</i> strain ATCC 17056
<i>Bacillus atrophaeus</i>	<i>Bacillus subtilis</i> subsp. <i>subtilis</i>	<i>Chromohalobacter mansmortui</i> strain GSP58
<i>Bacillus atrophaeus</i>	<i>Bacillus subtilis</i> subsp. <i>subtilis</i>	<i>Chromohalobacter nigradesensis</i>
<i>Bacillus atrophaeus</i>	<i>Bacillus subtilis</i> subsp. <i>subtilis</i>	<i>Clostridium acetobutylicum</i> KCCM 12159
<i>Bacillus atrophaeus</i>	<i>Bacillus subtilis</i> subsp. <i>subtilis</i>	<i>Clostridium butyricum</i> KCCM 35433
<i>Bacillus atrophaeus</i>	<i>Bacillus subtilis</i> subsp. <i>subtilis</i>	<i>Clostridium clostridiforme</i> KCCM 12099
<i>Bacillus atrophaeus</i>	<i>Bacillus subtilis</i> subsp. <i>subtilis</i>	<i>Clostridium cylindrosporium</i> KCCM 12160
<i>Bacillus atrophaeus</i>	<i>Bacillus subtilis</i> subsp. <i>subtilis</i>	<i>Clostridium difficile</i> KCCM 12115
<i>Bacillus atrophaeus</i>	<i>Bacillus subtilis</i> subsp. <i>subtilis</i>	<i>Clostridium paraputrificum</i> KCCM 11493
<i>Bacillus atrophaeus</i>	<i>Bacillus subtilis</i> subsp. <i>subtilis</i>	<i>Clostridium pasteurianum</i> KCCM 41692
<i>Bacillus axarquiensis</i>	<i>Bacillus subtilis</i> subsp. <i>subtilis</i>	<i>Clostridium perfringens</i> KCCM 12098
<i>Bacillus axarquiensis</i>	<i>Bacillus subtilis</i> subsp. <i>subtilis</i>	<i>Clostridium perfringens</i> KCCM 40947
<i>Bacillus benzoovorans</i>	<i>Bacillus subtilis</i> subsp. <i>subtilis</i>	<i>Clostridium ramosum</i> KCCM 11494
<i>Bacillus benzoovorans</i>	<i>Bacillus subtilis</i> subsp. <i>subtilis</i>	<i>Clostridium sporogenes</i> KCCM 40858
<i>Bacillus cereus</i>	<i>Bacillus subtilis</i> subsp. <i>subtilis</i>	<i>Clostridium sporogenes</i> KCCM 12161
<i>Bacillus cereus</i> ATCC21606	<i>Bacillus subtilis</i> subsp. <i>subtilis</i>	<i>Clostridium sporogenes</i> KCCM 35434
<i>Bacillus cereus</i> strain S45 (GQ462533)	<i>Bacillus subtilis</i> subsp. <i>subtilis</i>	<i>Clostridium sticklandii</i> KCCM 41745
<i>Bacillus circulans</i> ATCC21367	<i>Bacillus subtilis</i> subsp. <i>subtilis</i>	<i>Cobetia marina</i>
<i>Bacillus circulans</i> WL-12 KCCM41401	<i>Bacillus subtilis</i> subsp. <i>subtilis</i>	<i>Cobetia marina</i>
<i>Bacillus clausii</i>	<i>Bacillus subtilis</i> subsp. <i>subtilis</i>	<i>Cobetia marina</i> isolate marina 2,3,4,5
<i>Bacillus clausii</i> KCCM4044	<i>Bacillus subtilis</i> subsp. <i>subtilis</i>	<i>Corynebacterium ammoniagenes</i> KCCM 11740
<i>Bacillus gibsonii</i>	<i>Bacillus subtilis</i> subsp. <i>subtilis</i>	<i>Corynebacterium ammoniagenes</i> KCCM 11741
<i>Bacillus halodentificans</i> strain SF-121	<i>Bacillus subtilis</i> subsp. <i>subtilis</i>	<i>Corynebacterium ammoniagenes</i> KCCM 40472
<i>Corynebacterium callunae</i> KCTC 1444	<i>Mucor hiemalis</i> forma <i>hiemalis</i> KCCM 12347	<i>Staphylococcus equorum</i> subsp. <i>Equorum</i> strain PA 231 (NR_027520)
<i>Corynebacterium flavescescens</i> KCCM 41095	<i>Mucor hiemalis</i> forma <i>hiemalis</i> KCCM 12349	<i>Staphylococcus equorum</i> subsp. <i>linens</i>
<i>Corynebacterium glutamicum</i> KCCM 11318	<i>Mucor javanicus</i> KCCM60262	<i>Staphylococcus equorum</i> subsp. <i>linens</i>
<i>Corynebacterium glutamicum</i> KCCM 11945	<i>Mucor racemosus</i> forma <i>racemosus</i> KCCM12352	<i>Staphylococcus lentus</i>
<i>Corynebacterium glutamicum</i> KCCM 40245	<i>Oceanobacillus theyensis</i> HTE831 KCTC 3954	<i>Staphylococcus lentus</i>
<i>Corynebacterium glutamicum</i> KCCM 41424	<i>Oceanobacillus picturae</i> strain JL85	<i>Staphylococcus lentus</i>
<i>Corynebacterium glutamicum</i> KCCM 41425	<i>Oceanobacillus profundus</i> strain CL-MP28	<i>Staphylococcus lentus</i>
<i>Deinococcus radiopugnans</i> ATCC 19172	<i>Oceanobacillus</i> sp. AC13	<i>Staphylococcus lentus</i>
<i>Deinococcus radiopugnans</i> ATCC 19172 (NR_026403)	<i>Odoribacter splanchnicus</i> KCTC5490	<i>Staphylococcus lentus</i>
<i>Dietzia cinnamea</i>	<i>Pachysolen tannophilus</i> KCCM 35474	<i>Staphylococcus saprophyticus</i>
<i>Emmericella nidulans</i> KCCM 60326	<i>Paenibacillus</i> sp. KCTC3893	<i>Staphylococcus saprophyticus</i>
<i>Emmericella nidulans</i> var. <i>nidulans</i> KCCM 11349	<i>Pantoea agglomerans</i>	<i>Staphylococcus saprophyticus</i>
<i>Enterobacter aerogenes</i> KCTC 2190	<i>Pantoea ananatis</i>	<i>Staphylococcus saprophyticus</i>
<i>Enterococcus faecalis</i>	<i>Planococcus citreus</i> strain TF-16 Gaps = 3/1101	<i>Staphylococcus saprophyticus</i>
<i>Enterococcus faecalis</i>	<i>Planococcus rifletensis</i>	<i>Staphylococcus saprophyticus</i>
<i>Enterococcus faecium</i>	<i>Plesiomonas shigelloides</i>	<i>Staphylococcus saprophyticus</i>
<i>Enterococcus faecium</i>	<i>Pseudomonas plecoglossicida</i>	<i>Staphylococcus saprophyticus</i> strain BMSZ711
<i>Enterococcus faecium</i>	<i>Pseudomonas oleovorans</i> KCTC2872	<i>Staphylococcus sciuri</i>
<i>Enterococcus faecium</i>	<i>Pseudomonas</i> sp. wp33	<i>Staphylococcus sciuri</i>
<i>Enterococcus faecium</i>	<i>Psychrobacter alimentarius</i> strain JG-102	<i>Staphylococcus sciuri</i>
<i>Enterococcus faecium</i>	<i>Psychrobacter celer</i>	<i>Staphylococcus sciuri</i>
<i>Enterococcus inusitatus</i>	<i>Psychrobacter faecalis</i> strain Iso-46	<i>Staphylococcus sciuri</i>
<i>Escherichia coli</i> K12-W3110 ATCC 31277	<i>Psychrobacter faecalis</i> strain Iso-46	<i>Staphylococcus sciuri</i>
<i>Escherichia coli</i> K12-W3110 KCCM 12181	<i>Psychrobacter marincola</i> strain KMM 277	<i>Staphylococcus sciuri</i>
<i>Escherichia fergusonii</i> KCCM 41428	<i>Psychrobacter marincola</i> strain KMM 277	<i>Staphylococcus sciuri</i>
<i>Escherichia coli</i> MG1655	<i>Psychrobacter marincola</i> strain KMM 277	<i>Staphylococcus sciuri</i>
<i>Flavobacterium dormitator</i> KCCM12188	<i>Psychrobacter marincola</i> strain KMM 277 Gaps = 2/955	<i>Staphylococcus sciuri</i>
<i>Flavobacterium</i> sp. ATCC21044	<i>Psychrobacter maritimus</i>	<i>Staphylococcus sciuri</i>
<i>Halobacillus salinus</i> strain HSL-3	<i>Psychrobacter maritimus</i> strain P2-20 (NR_027225)	<i>Staphylococcus sciuri</i>
<i>Halobacillus trueperi</i>	<i>Psychrobacter psychrophilus</i> NP42	<i>Staphylococcus xylosum</i>

표 1. 스크리닝 균주목록(계속)

<i>Halobacillus trueperi</i> strain R177	<i>Psychrobacter pulmonis</i> strain T-15 (JFsequencing)	<i>Staphylococcus xylosum</i>
<i>Halomonas halodurans</i>	<i>Psychrobacter</i> sp. Cobs2Tis44	<i>Staphylococcus xylosum</i>
<i>Halomonas indaliniina</i> strain CG2.1	<i>Rhizobium leguminosarum</i> KCCM 11912	<i>Staphylococcus xylosum</i>
<i>Halomonas indaliniina</i> strain CG2.1	<i>Rhizobium phaseoli</i> KCCM 11332	<i>Staphylococcus xylosum</i>
<i>Halomonas indaliniina</i> strain CG2.1	<i>Rhizobium rhizogenes</i> KCCM 11683	<i>Staphylococcus xylosum</i>
<i>Halomonas</i> sp. KM-1	<i>Rhizopus microsporus</i> var. <i>oligosporus</i> KCCM11275	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>
<i>Halomonas</i> sp. jh-12	<i>Rhizopus oryzae</i> KCCM11606	<i>Streptomyces avermitilis</i> MA-4680 ATCC31267
<i>Halomonas</i> sp. ny1-3	<i>Rhizopus stolonifer</i> KCCM 35486	<i>Streptomyces coelicolor</i> A3 ATCC10147
<i>Hyphomicrobium</i> sp. YAAJ-4 Gaps = 11/1180	<i>Rhizopus stolonifer</i> KCCM32398	<i>Streptomyces lividans</i> TK24 ATCC69441
<i>Idiomarina loihiensis</i> L2TR	<i>Rhodobacter capsulatus</i> KCCM 40222	<i>Streptomyces matensis</i> DIC-108
<i>Janibacter anophelis</i> strain CCGU-49715	<i>Rhodobacter sphaeroides</i> KCCM 35488	<i>Streptomyces matensis</i> IF012889
<i>Jannaschia rubra</i> strain CECT5088	<i>Roseovarius</i> sp. NH52.J	<i>Streptomyces thermophilus</i> KCCM 40327
<i>Klebsiella pneumoniae</i> KCTC 2242	<i>Ruella stlthyformis</i> ATCC 29530	<i>Streptomyces venezuelae</i> ATCC15439
<i>Klebsiella pneumoniae</i> subsp. <i>Pneumoniae</i> KCCM 11418	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> KCCM 11304	<i>Sulfobacter</i> sp. ZS3-8
<i>Klebsiella pneumoniae</i> subsp. <i>Pneumoniae</i> KCCM 11788	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> KCCM 11351	<i>Tetragenococcus halophilus</i> strain TC-1 (NR_037055)
<i>Kocuna palustris</i> strain K22-46	<i>Salinicoccus jeotgali</i> strain S2R53.5	<i>Virgibacillus necropolis</i> strain LMG 19488 (NR_025472)
<i>Kocuna palustris</i> strain K22-46	<i>Salinicoccus jeotgali</i> strain S2R53.5 (Gaps = 5/1007)	<i>Virgibacillus picturae</i> strain IV9
<i>Kocuna palustris</i> strain K22-46	<i>Salinicoccus roseus</i>	<i>Virgibacillus picturae</i> strain IV9 -> <i>Oceanobacillus picturae</i> (DQ089688)
<i>Kocuna palustris</i> strain TAGA27	<i>Salinicoccus roseus</i> strain M1S5-10	
<i>Kocuna palustris</i> strain TAGA27	<i>Salinicoccus salsiriae</i> strain RH-1	
<i>Kocuria rosea</i>	<i>Salinicoccus salsiriae</i> strain RH-1	
<i>Kushneria marisflavi</i> strain SW32	<i>Salinicoccus salsiriae</i> strain RH-1	
<i>Kushneria</i> sp. X49	<i>Salinivibrio</i> sp. 18AG	
<i>Lactobacillus brevis</i>	<i>Salinivibrio</i> sp. S2	
<i>Lactobacillus casei</i>	<i>Schizosaccharomyces pombe</i> KCCM 11527	
<i>Lactobacillus casei</i> ATCC 334	<i>Schizosaccharomyces pombe</i> KCCM 32588	
<i>Lactobacillus plantarum</i> KCTC3108	<i>Sericoccus</i> sp. 0714S6-1 Gaps = 10/1098	
<i>Lactobacillus rhamosus</i> GG	<i>Sinorhizobium meliloti</i> KCCM 11231	
<i>Lactobacillus salivarius</i> ATCC 11741	<i>Sinorhizobium meliloti</i> KCCM 11232	
<i>Leifsonia xyli</i>	<i>Sphingobium chlorophenicum</i> L-1 ATCC 39723	
<i>Leucobacter iarius</i>	<i>Sporosarcina equimarina</i> strain SF237	
<i>Lysinibacillus fusiformis</i> strain VC-1	<i>Sporosarcina saromensis</i>	
<i>Marihabitans asiaticum</i>	<i>Staphylococcus arlettae</i> strain LCR34	
<i>Marinilactibacillus psychrotolerans</i>	<i>Staphylococcus equorum</i>	
<i>Marinococcus halophilus</i> strain M14-5	<i>Staphylococcus equorum</i> strain MPU34 (AB334773)	
<i>Mesorhizobium loti</i> KCCM 13333	<i>Staphylococcus equorum</i> strain MPU34 (AB334773)	
<i>Microbacterium paraoxydans</i>	<i>Staphylococcus equorum</i> strain T-53	
<i>Microbacterium paraoxydans</i> strain C57-33	<i>Staphylococcus equorum</i> strain T-53	
<i>Morganella morganii</i>	<i>Staphylococcus equorum</i> strain T-53	
<i>Morganella morganii</i>	<i>Staphylococcus equorum</i> subsp. <i>equorum</i> strain PA 23	

(2) 협동기관 보유 미생물

표 2에 포함된 균주 95종에 대하여 스크리닝을 진행하였으며 그 일련의 과정은 다음과 같음 (그림 2).

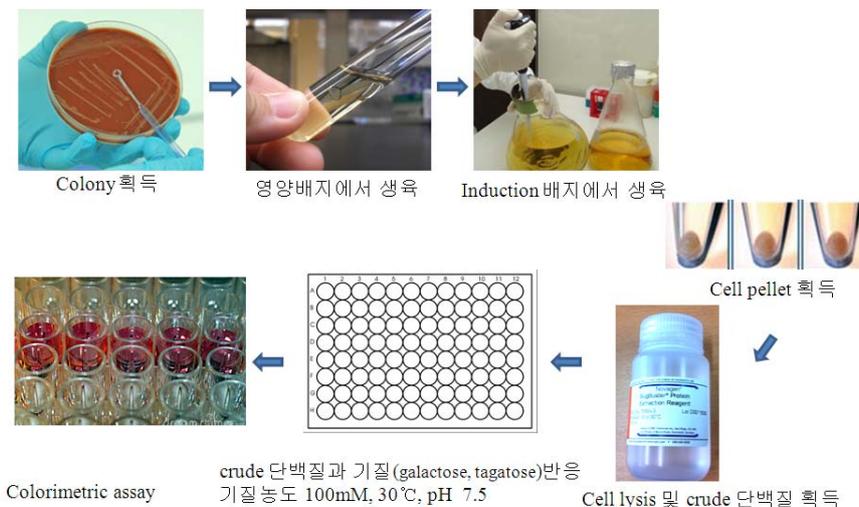


그림 2. 스크리닝 방법

- 각 균주의 생육 최적 배지와 온도에서 24시간 배양.
 - 질소공급원으로서 최소 배지 성분인 yeast extract 0.1%를 갖고 나머지 탄소원으로 단당류인 갈락토스 또는 타가토스를 2%농도로 공급 (Induction medium KH₂PO₄ (2.4g/l), K₂HPO₄ (5.6g/l), (NH₄)₂SO₄ (2.6g/l), MgSO₄ (0.1g/l), Yeast extract (1.0g/l), 갈락토스 또는 타가토스 (20.0g/l))
 - 36-48시간 배양 후 OD_{600nm}=2-3 구간에서 cell 회수.
 - Cell pellet을 chemical reagent로 파쇄 후 갈락토스 또는 타가토스 0, 20, 50, 100 mM 에 대해 30°C와 60°C 두 온도에서 pH 7.5 PIPES, EPPS, McIlvine buffer variation을 이용 1, 6, 12, 24시간 반응
 - 반응 결과는 갈락토스로부터 포도당으로의 전환 여부를 확인함으로써, 갈락토스와 포도당 사이의 에피머화 여부 확인
- 각 기질 농도 20, 50, 100 mM 에 대하여 전환율 0.5% 이상(0.1, 0.25, 0.5 mM)의 에피머화 활성을 보이는 전환 균주 미확인.

표 2. 스크리닝 대상 균주 목록

Actinobacteria	<i>Arthrobacter aurescens, Corynebacterium, Corynebacterium glutamicum, Corynebacterium jeikeium, Clavibacter michiganensis, Gordonia aichiensis, Gordonia bronchialis, Gordonia rubripertincta, Gordonia terrae, Gordonia sputi, Janibacter sp., Mycobacterium chlorophenolicum, Propionibacterium acnes, Streptomyces sp., Streptomyces avermitilis, Streptomyces scabiei, Rhodococcus coprophilus, Rhodococcus fascians, Rhodococcus jostii, Rhodococcus maanshanensis, Rhodococcus opacus, Rhodococcus percolatus, Rhodococcus rhodnii, Rhodococcus rhodochrous, Rhodococcus ruber, Rhodococcus wratislaviensis</i>
Firmicutes	<i>Algoriphagus sp., Bacillus cereus, Bacillus coagulans, Bacillus licheniformis, Bacillus subtilis, Bacillus smithii, Enterococcus faecium, Geobacillus thermodenitrificans, Geobacillus thermoleovorans, Geobacillus kaustophilus, Geobacillus stearothermophilus, Leuconostoc argentinum, Leuconostoc citreum, Leuconostoc fallax, Leuconostoc ficulneum, Leuconostoc fructosum, Leuconostoc garlicum, Leuconostoc gasicomitatum, Leuconostoc inhae, Leuconostoc mesenteriod, Leuconostoc pseudomesenteroides, Pediococcus pentosaceus, Paenibacillus polymyxa, Weissella paramesenteroides</i>
Bacteroidetes /Chlorobi group	<i>Chitinophaga pinensis, Flavobacterium flevense, Pedobacter haparinus, Photobacterium profundum, Rhodothermus marinus</i>
Proteobacteria	<i>Bradyrhizobium bacteroides, Brevibacterium japonicum, Brevundimonas ketoglutamicum, Brevundimonas subvibrioides, Comamonas koreensis, Comamonas testosteroni, Enterobacter sakazaki, Enterococcus faecium, Erythrobacter gaetbuli, Erythrobacter longus, Escherichia fergusonii, Escherichia hermanii, Escherichia vulneris, Halobacterium salinarum, Macroccoccus caseolyticus, Providencia stuartii, Pseudomonas aeruginosa, Pseudomonas caliphila, Pseudomonas aureofaciens, Pseudomonas kilonensis, Pseudomonas putida, Pseudomonas sp., Pseudomonas stutzeri, Pseudomonas syringae, Xanthomonas campestris pv. campestris, Zobellialgalactanovorans, Zymomonas mobilis</i>
Archea	<i>Sulfolobus acidocaldarius, Sulfolobus solfataricus</i>
Eukaryota	<i>Candida tropicalis, Lodderomyces elongisporus, Botryozyma nematodophila, Arxiozyma telluris, Pachysolen tannophilus, Kluyveromyces lactis</i>

(3) 협력기관 보유 미생물

- 일본 교토대학교에서 보유하고 있는 미생물 중 약 740종의 건조균체 (125종의 세균, 125종의 젖산균, 66종의 사상균, 167종의 효모, 167종의 방선균, 48종의 담자균, 42종의 곤충세포)로부터 과당을 타가토스로 전환하는 활성을 가지는 균주를 1차 스크리닝 하였음. 50 mM 과당, 1 mM MnCl₂이 함유된 50 mM Tris-HCl(pH 7.5)에서 37 °C에서 18시간 반응시킨 후 HPLC로 분석하였음. 활성 분석을 진행한 미생물의 리스트는 다음 표 3과 같음.

표 3. 스크리닝 대상 균주 목록

Microorganism	Genus
Bacteria (125)	<i>Escherichia, Klebsiella, Aerobacter, Citrobacter, Erwinia, Serratia, Proteus, Salmonella, Alcaligenes, Flavobacterium, Bacillus, Agrobacterium, Micrococcus, Corynebacterium, Staphylococcus, Arthrobacter, Brevibacterium, Cellulomonas, Curtobacterium, Acinetobacter, Pseudomonas, Ochrobactrum, Klebsiella, Aeromonas, Protaminobacter, Acetobacter, Zoogloea, Blastobacter</i> (28)
Lactic acid bacteria (125)	<i>Lactobacillus, Pediococcus, Leuconostoc, Streptococcus, Propionibacterium, Enterococcus</i> (6)
Molds (66)	<i>Mucor, Rhizopus, Absidia, Aspergillus, Penicillium, Neurospora, Armillaria, Syncephalis, Fusarium, Gibberella, Keratinomyces, Sporotrichum, Trichophyton, Beauveria, Exophiala, Aureobasidium, Caldariomyces, Helicostylum, Zygorhynchus, Phycomyces, Cladosporium, Mortierella, Tricoderma, Backusella, Syncephalostrum, Circinella, Cunninghamella, Actinomucor, Gongronella, Delacroxia, Syzygites, verticillium, Umbelopsis, Mycotypha</i> (34)
Yeasts (167)	<i>Saccharomyces, Endomyces, Schizosaccharomyces, Zygosaccharomyces, Pichia, Hansenula, Schwanniomyces, Debaryomyces, Saccharomycodes, Hanseniaspora, Lipomyces, Sporobolomyces, Cryptococcus, Torulopsis, Brettanomyces, Candida, Torulaspora, Klöckera, Wickerhamia, Kluyveromyces, Bullera, Rhodotorula, Trichosporon, Geotrichum</i> (24)
Actinomycetes (125)	<i>Mycobacterium, Nocardia, Nocardioideis, Rhodococcus, Actinomyces, Streptomyces, Micromonospora, Streptosporangium, Microellobosporia, Actinoplanes, Microbispora, Streptoverticillium, Amorphosporangium, Actinomadura</i> (14)
Basidiomycetes (48)	<i>Gloeophyllum, Schizophyllum, Trametes, Coriolus, Laetiporus, Lentinus, Lenzites, Lyophyllum, Pleurotus, Flavolus, Pholiota, Coprinus, Psilocybe, Strobilurus, Agrocybe, Panaeolus, Panaeolus, Poria, Fistulina, Flammulina, Polyporus, Panus, Agaricus, Pholiota, Tyromyces, Spangiporus, Chlorosplenium, Fomitopsis</i> (28)
Nocardia (42)	<i>Nocardia, Rhodococcus, Rothia, Acinetobacter</i> (4)
Insect (42)	<i>Cordyceps, Isaria, Gibellula, Sporotrichum, Cephalosporium, Acremonium, Paecilomyces, Verticillium, Pitomyces, Monosporium</i> (10)

- 미생물의 배양에는 minimal salt medium을 사용, 28 °C, 180 rpm 조건에서 진탕 배양을 하였음. seed는 배지량의 5%를 사용하였고, 성장된 배지를 대수증식기(O.D. 0.8 이상)에 획득하여 원심분리 회수한 균체를 50 mM Tris-HCl(pH 7.5) 용액에 현탁.
- 1차 스크리닝 결과, 총 10종의 Nocardia 속 미생물(*N. gardneri, N. autotrophica, 2종의 Rhodococcus erythropolis, N. carcarea, N. erythropolis, 2종의 N. minima, N. opaca, N. asteroides*)에서 과당으로부터 타가토스 전환 활성 보유 가능성을 확인하였음. 이들을 최적 배양 조건에서 확보된 휴면 세포를 이용한 효소 반응을 진행한 결과, *N. gardneri*의 경우 목적 효소 보유 가능성이 높음을 확인. 반응 시간에 따른 타가토스 생산량 변화를 확인한 결과, 시간에 따른 타가토스 피크의 양적 변화가 거의 없음을 확인하였음(그림 3)

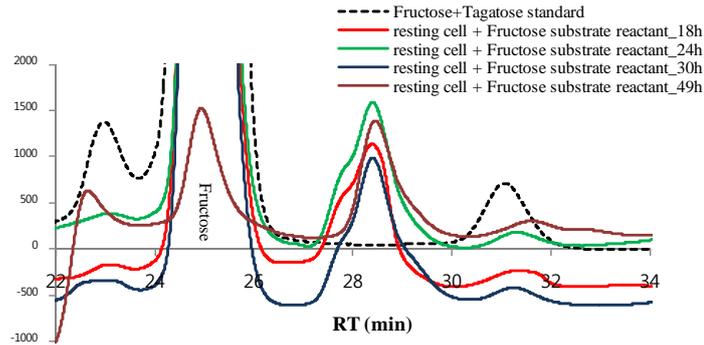


그림 3. D-fructose로부터 반응 시간에 따른 타가토스 생산성 평가

○ 기질농도에 따른 타가토스 생산성을 확인한 결과, 과당 농도가 증가해도 목적 산물인 타가토스의 농도는 증가하지 않음. 과당으로부터 타가토스를 생성하는 전환효소를 보유하고 있다면 역반응도 일어나야 하므로, 타가토스를 기질로 하여 과당의 생성여부를 확인하였음. 기질로 50 mM 타가토스를 이용한 것을 제외하고, 과당기질 반응 조건은 동일하게 진행하여 반응산물을 HPLC와 HPAEC로 분석한 결과, 적은 양이지만 표준물질인 과당과 동일한 retention time에서 피크가 보임을 확인하였음. 추가적으로 과당기질-휴면세포 반응산물이 타가토스임을 교차 검증하기 위하여 반응 완료액에 L-arabinose isomerase를 넣어 추가 반응한 결과, 갈락토스가 생성됨을 확인할 수 있었음(그림 4).

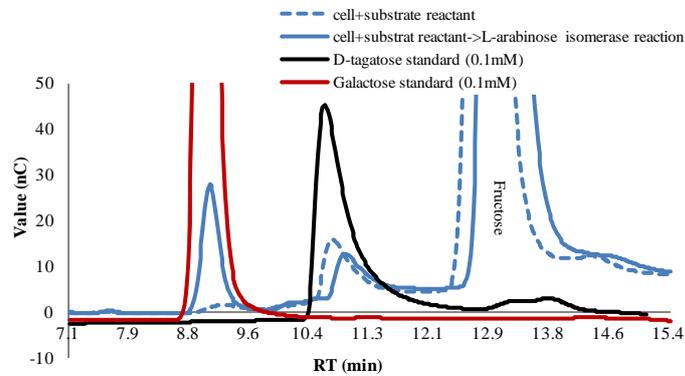


그림 4. HPAEC 분석 결과

○ 마지막으로 단일 효소 반응에 의하여 일어나는 것인지를 검증하기 위하여, 미생물 배양액을 french press로 파쇄한 후, 4°C에서 13,000 × g로 20분간 원심분리하고 상등액을 0.45 μm filter로 여과한 후 이 여과액을 crude extract로 사용하여 효소 반응 유무를 판별함. 조효소액 10 mg/ml, 25 mM 과당, 1 mM MnCl₂, 50 mM Tris-HCl(pH 7.5)에서 37°C, 18시간 반응 후 여과하여 HPLC분석한 결과, 타가토스의 생산을 최종적으로 확인할 수 없었음.

나. 메타지놈 라이브러리(Metagenome library)

- 과당을 타가토스로 전환하는 C4에피머화 원천효소 탐색을 위하여 표 4와 같이 다양한 환경으로부터 확보된 1156종의 메타지놈 라이브러리를 활용하였음. 벡터가 삽입된 대장균 형태의 라이브러리를 씨제이제일제당 바이오연구소와 KCTC로부터 제공받아 효소탐색에 이용하였음.

표 4. 실험에 사용된 메타지놈 라이브러리 정보

채취장소 및 분리원	해당 장소 별 sample stock 수
새만금 간척지(전라북도 부안군) 갯벌	158
-	430
Bloom water	20
경북 영양 식물근권-suppressive soil	14
충주시 충주호 reservoir water	10
대전 용두해수욕장 해수	5
아산시 둔포호 reservoir water	10
청주시 대청호 reservoir water	10
경기 화성 팔탄 매곡 축사 바닥 soil	60
시화호 soil	40
충남 서해안 염전 토양	7
관악산 소나무 뿌리 토양	200
강원도 인제군 점봉산 진동계곡 초지및 산림토양	51
부산 강서구 대저동 식물근원 토양	40
목재폐기장 토양	3
주유소 토양	13
유류오염토양	2
완도 갯벌	10
여수 전복 내장	10
한국화학연구원 토양	27
상주 낙동강 유역 토양	12
대전 계룡산 수통골 토양	24
	1156

- 효소탐색에 앞서, 숙주미생물인 대장균을 LB배지, M9배지, M9에 탄소원으로 포도당, 과당, 타가토스를 첨가한 배지에서 배양하여 성장여부를 확인하였음. LB배지, M9에 탄소원으로 포도당이나 과당을 넣어준 경우 대장균이 성장하는 것에 비해 M9배지와 M9에 탄소원으로 타가토스를 첨가한 경우 대장균이 성장하지 않는 것을 확인할 수 있었음.
- 만약, 라이브러리에 과당을 타가토스로 전환하는 효소를 발현시키는 유전자가 포함되어 있다면, M9에 타가토스를 첨가한 배지에서도 대장균의 생장이 일어날 수 있음. 항생제로 chloramphenicol을 포함하고 있는 LB배지에 메타지놈라이브러리를 포함하고 있는 대장균을 8시간 배양하여 이를 M9, M9+과당, M9+타가토스(선택배지)에 1/50농도로

접종하여 37도에서 재 배양하였음. 하루가 지난 후 시료의 optical density 측정을 통하여 성장여부를 확인하였음.

- 1156종의 메타지놈라이브러리 중 183종은 LB배지에서 성장하지 않았으며, 나머지 973종 중 optical density의 변화가 있는 것은 확인할 수 없었음. (973종 중 11종에서 선택배지 사용 시 대장균의 생장이 일어나는 것으로 보이나, 재검증 결과 탄소원이 없는 M9배지와 차이 없음으로 확인됨)

2. 기존 C4 에피머화 효소 평가

본 연구에서 목적하는 기질-생성물이 아닌 다른 물질의 C4위치를 에피머화하는 효소가 포도당 또는 과당을 기질로 인식하여 에피머화 반응을 유도할 수 있는지 평가하였음.

가. 유전체 정보 기반 C4에피머화 효소로부터 포도당 또는 과당 C4에피머화 활성 효소 탐색

- 포도당 또는 과당 전환 효소 탐색을 위해 C4 에피머화가 가능할 것으로 예측되는 4종의 C4에피머화 효소를 선정하였고 각 효소에 대해 활성을 가지고 있는 유전체 자원을 탐색. 선정된 4종의 C4에피머화 효소는 총 56종이었으며, 그 중 국내에서 확보가 가능한 균주 및 C4에피머화가 문헌으로 보고된 유전체 자원을 우선적으로 선별하여 연구를 진행. 56종의 효소 중 클로닝 및 soluble한 형태로 효소가 확보된 27종에 대하여 활성평가를 진행하였으며, 그 결과를 표 5에 정리하였음.

표 5. Glucose/galactose- 4-epimerase 활성 보유 유전자 탐색 결과

Enzyme	Classification	No.	Strain	Cloning	Expression	Purification	Enzymatic activity
UDP-glucose-4-epimerase(EC 5.1.3.2)	Bacteria	1	<i>Aeromonas hydrophila</i>	○	○	○	
		2	<i>Azospirillum brasilense</i>	x	-		
		3	<i>Bacillus subtilis</i> 168	○	○	○	
		4	<i>Bifidobacterium bifidum</i> S17	○	○	○	x
		5	<i>Corynebacterium glutamicum</i>	○	○	○	x
		6	<i>Escherichia coli</i>	○	Weak	○	x
		7	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	○	○	○	x
		8	<i>Lactobacillus casei</i>	○	○	○	
		9	<i>Bacillus thuringiensis</i>	○	○	○	
		10	<i>Campylobacter jejuni</i>	○	○	○	
		11	<i>Arabidopsis thaliana</i>	○	○	○	x
L-ribulose-5-phosphate-4-epimerase(EC 5.1.3.4)	Bacteria	1	<i>Bacillus subtilis</i> 168	○	-	-	
		2	<i>Escherichia coli</i> K12-W3110	○	○	-	
		3	<i>Enterobacter aerogenes</i>	○	○	○	x
		4	<i>Lactobacillus plantarum</i>	○	Weak	○	x
		5	<i>Escherichia fergusonii</i>	○	○	○	x
		6	<i>Bacillus licheniformis</i>	○	○	○	x
		7	<i>Oceanobacillus iheyensis</i> HTE831	○	Weak	○	x
		8	<i>Bifidobacterium longum</i> JCM1217	○	○	○	x
		9	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	○	○	○	x
		10	<i>Clostridium acetobutylicum</i>	○	Weak	○	x
UDP-arabinose-4-epimerase(EC 5.1.3.5)	Plant	1	<i>Arabidopsis thaliana</i> (애기장대)	-	-	-	
		2	<i>Oryza sativa</i> subsp. <i>Japonica</i> (쌀)	○	Weak	○	x
UDP-glucuronate-4-epimerase(EC 5.1.3.6)	Bacteria	1	<i>Odoribacter splanchnicus</i>	○	Weak	○	
		2	<i>Runella slithyformis</i>	○	-	-	
		3	<i>Sphingobium chlorophenolicum</i> L-1	○	○	-	
		4	<i>Lactobacillus salivarius</i>	○	-	-	

○ 연구 과정 및 방법

- Cloning: 선별된 27종의 C4에피머화 활성효소 유전체의 염기서열을 NCBI에서 확인하였으며 유전체 자료의 Genomic DNA로부터 target 유전체를 PCR을 통해 증폭. 증폭된 유전자 산물은 pET28a 발현벡터에 cloning하여 *E. coli* 유래의 BL21(DE3) host에서 발현.

- Protein expression: Cloning 된 유전체의 단백질 발현을 위해 0.1mM IPTG를 inducer로 사용하였으며, 16°C에서 15시간 배양하여 단백질이 발현된 cell을 회수.
- Protein purification: 발현된 단백질의 정제는 Ni-NTA affinity chromatography를 이용하였고 SDS-PAGE를 통해서 정제된 정도를 확인.
- Enzyme activity 측정: 선별된 C4에피머화 활성효소는 크게 UDP-sugar를 이용한 에피머화 반응과 phosphate-sugar를 이용한 에피머화 반응으로 나눌 수 있음.

○ UDP-sugar C4 에피머화

- UDP-sugar C4에피머화 활성효소에 대한 평가는 총 6종을 수행. 일반당 기질에 대한 반응성을 확인하기 위해 10 mM 포도당 또는 과당을 사용하였고, 재조합 된 유전체가 제대로 활성을 나타내는지 확인하기 위해 본래의 기질인 1 mM UDP-glucose를 사용. 이 때 사용 된 효소 농도는 1mg 정도였으며 효소 반응은 37°C, pH7.5에서 24시간 동안 수행. 또한 UDP-sugar C4에피머화 활성 효소에 cofactor로 작용하는 NAD⁺를 0.1 mM 첨가.

○ phosphate-sugar C4에피머화

- Phosphate-sugar C4에피머화 활성효소에 대한 평가는 총 8종을 수행. 일반당 기질에 대한 반응성을 확인하기 위해 10 mM 포도당 또는 과당을 사용하였으며, 본래의 효소활성은 본래 기질인 L-ribulose-5-phosphate를 확보하지 못해 확인하지 못함. 반응에 사용 된 효소 농도는 1mg 정도였으며 효소 반응은 37°C, pH7.5에서 24시간 동안 수행. 또한 Phosphate-sugar C4에피머화 활성효소는 metal dependent한 효소로 알려져 있어 1 mM의 Mn, Co, Zn 금속이온을 각각 첨가.
- 반응 산물 분석: 반응 산물은 HPLC를 이용하여 기질과 산물의 변화를 분석. UDP-sugar를 기질로 사용한 반응 산물의 경우 C18 column을 이용하여 UV 260nm에서 분석하였으며 포도당 또는 과당과 같은 일반당을 기질로 사용한 경우 Ca²⁺ type column을 이용하여 RID로 분석.

나. 기존 C4에피머화 효소의 변이체 평가

(1) L-ribulose-5-phosphate 4-epimerase

- 본 연구에서는 단당 C4에피머화 반응을 위하여 기존에 메커니즘이 보고된 효소를 선정. 선정된 효소는 중온균 *E. coli*, 고온균 *G. thermodentrificans* 유래의 L-ribulose-5-phosphate 4-epimerase이며 반응 메커니즘은 그림 5와 같음.

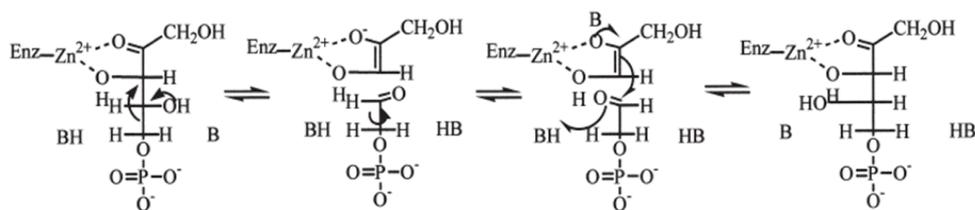


그림 5. L-ribulose-5-phosphate 4-epimerase의 반응메커니즘

○ 먼저 4번 탄소위치 수산화기의 proton abstraction 후 3번 탄소와 4번 탄소의 cleavage가 일어남. 그리고 엔다이올레이트와 글라이코알데하이드가 생성되며 글라이코알데하이드의 C-C결합에서 로테이션이 일어나 3번 탄소와 4번 탄소의 결합이 재형성. Active site내에서는 glutamate와 세 개의 histidine잔기가 에피머화 반응에 관여. 과당을 이 반응메커니즘에 적용시키기 위하여 기존 기질의 phosphate binding잔기를 조사하고 mutation을 하여 active site 내에서 cavity를 막아주는 point mutation 작업을 진행하였음(그림 6, 표 6. 변이주의 활성평가 결과 과당을 기질로 한 C4에피머화 반응에 대한 활성은 보이지 않았음.

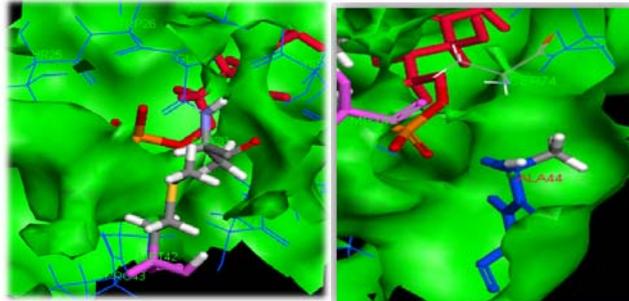


그림 6. Docking과 modeling 과정을 통한 phosphate binding residue 분석

표 6. phosphate binding residue mutation에 따른 단당 효과

	ECRPE4	GTRPE4
<i>N28A</i>	N.D	N.D
<i>K42M</i>	N.D	N.D
<i>S44A</i>	N.D	N.D
<i>S45A</i>	N.D	N.D
<i>S73A</i>	N.D	N.D
<i>S74A</i>	N.D	N.D

○ 무작위적인 염기서열의 변화를 일으켜 단백질을 구성하는 아미노산의 변이를 유도하고 결과적으로는 단백질의 일부 구조의 변형을 일으키도록 error prone PCR 수행 (그림 7). PCR Random Mutagenesis Kit (Clonetech, USA)을 이용하여 단백질을 coding하고 있는 nucleotide 1000bp당 5-7개의 error rate로 replication 일어나도록 PCR을 진행. Error-prone PCR을 통해 만들어진 유전자를 pTrc99A에 ligation 하여 변이주 라이브러리를 구축. 총 3,500주를 평가하였으며, 기질 농도 10, 50, 100 mM 에 대하여 전환율 0.5%이상의 C4에피머화 반응을 보이는 변이주가 확인되지 않음.

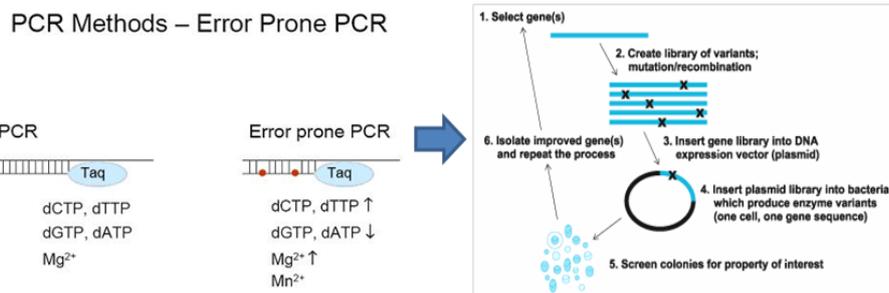


그림 7. error-prone PCR 원리

(2) UDP-glucose 4-epimerase

효소의 물리화학적 특성과 도메인 구조기반 합성생물학적 접근 방법으로 에피머화 활성이 증대된 효소 확보

- 초호열균인 *Thermotoga maritima* 유래의 UDP-glucose 4-epimerase 효소(TMGalE)를 암호화하는 인산화 육탄당 C4에피머화 효소의 특성을 알아보기 위해 효소를 정제하고, 에피머화 활성을 측정하기 위해 기질 UDP-galactose와 80°C에서 10분간 반응 후, HPLC분석을 실시함.

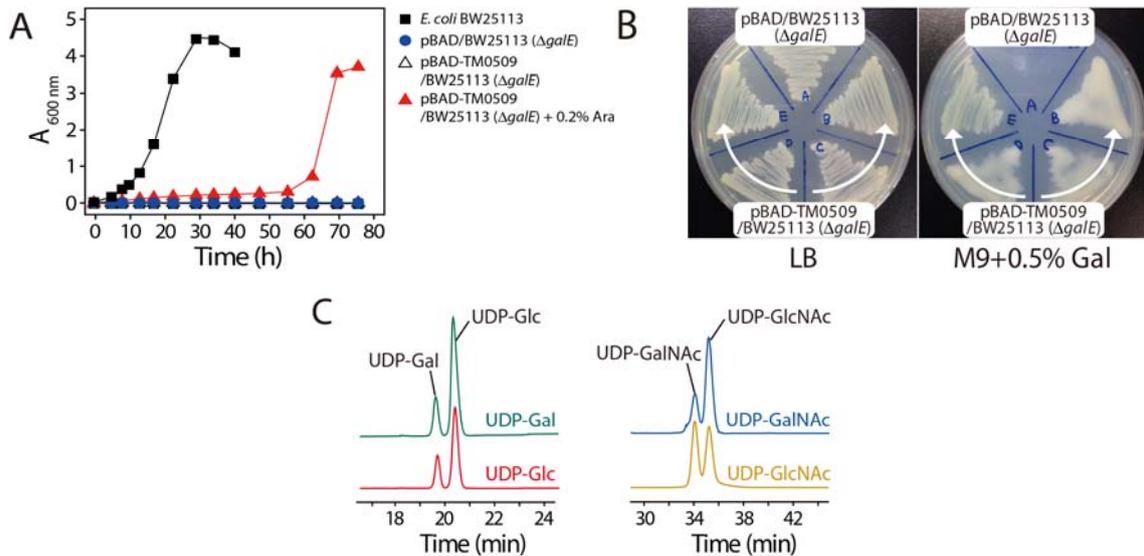


그림 8. (A) TMGalE 유전자 발현에 따른 갈락토오스를 자화능을 지닌 형질전환된 대장균의 세포생장곡선, (B) 한천배지에서의 균체생장, (C) TMGalE에 의한 C4-에피머화 활성

- 당전환 에피머화효소의 3차 구조 규명을 위해 단백질 구조결정수준의 고순도 정제를 수행함. 단백질은 Hampton Research 및 home-made crystal screening solution (200 여종)을 활용하여 단백질 크리스탈 확보, diffraction map획득, MR분석을 통해 기질이 포함되지 않은 에피머화효소 2.69Å와 기질 UDP-Glucose가 포함된 2.7Å의 인산화 육탄당 에피머화효소의 3D 구조를 결정함

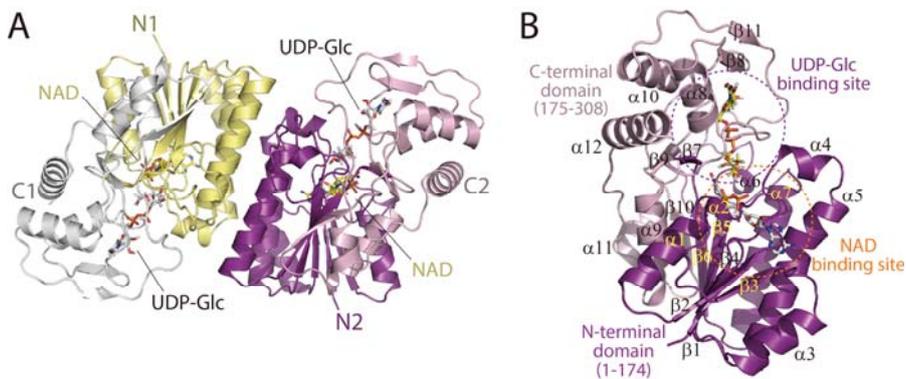


그림 9. 인산화 육탄당 C4에피머화 효소(TMGalE)의 3D 구조

○ *T. maritima* 유래의 인산화 육탄당 C4에피머화 효소(TMGalE)의 최적 활성온도, 최적 활성 pH, 열안정성 등 효소의 물리화학적 특성연구를 수행함(그림 10). 최적 활성온도는 80°C이며, 최적 활성 pH는 pH7.0임. 70, 80, 90°C에서 열안정성을 확인한 결과, 90°C에서 40분 동안 최대 활성의 50%이상 유지됨.

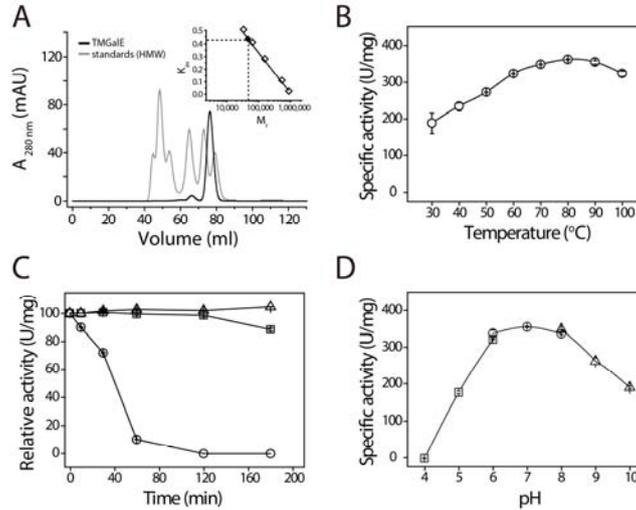


그림 10. 육탄당 C4에피머화 효소(TMGalE)의 물리화학적 특성

(A. Gel-filtration chromatography, B. 온도 의존성, C. 효소의 열안정성, 및 D. pH 의존성)

○ TMGalE의 물리화학적 특성(고온, 열안정성) 및 기질특이성에 관여하는 부위를 예측하고자, 3차 결정구조를 기초로 *in silico* 분석을 수행함. 또한, 상동성이 유사한 중온성 인산화 에피머화 효소(human, UDP-galactose 4-epimerase, HUGalE)와의 3차 구조 비교분석을 통해, 기질결합부위의 열안정성 및 기질친화도에 관여하는 주요 결정인자를 조사함. (A) 기질이 결합되지 않은 상태에서, 아미노산 Arg210과 Asp270 사이에 salt bridge와 H-bonds 관찰됨. (B) 기질 결합에 의해 아미노산 Asp270은 물분자(W2)대신에 기질에 직접적으로 결합함. 중온효소인 HUGalE는 초호열균유래의 TMGalE와는 다르게 기질이 결합되지 않은 상태에서 단백질의 구조를 유지하기 위한 물분자의 결합이 비교적 적게 관찰됨(그림 11).

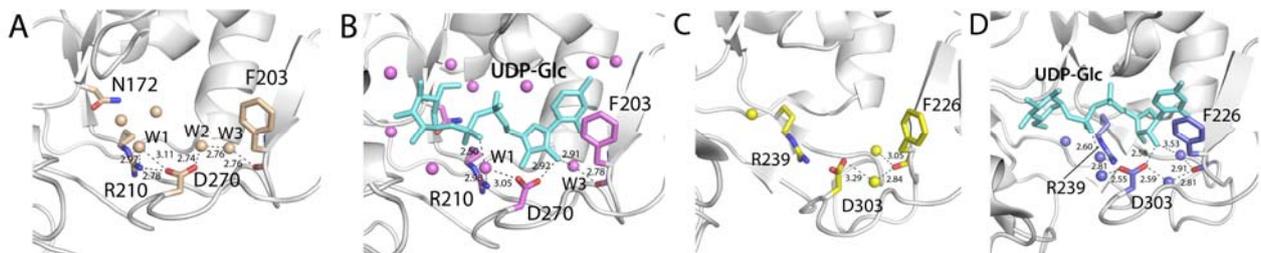


그림 11. 기질결합에 의한 결합부위 주변의 물분자간의 상호작용변화 분석, TMGalE (Top panel) HUGalE (Bottom panel)

- 3차구조기반 *in silico* 모델링을 통해 TMGalE의 기질특이성을 규명하고 기질특이성 변이부위를 예측함(그림9). 대장균 및 Human유래의 인산화 육탄당 C4에피머화 효소(각각 ECGalE, HUGalE)의 기질결합부위를 비교분석함(그림 12).

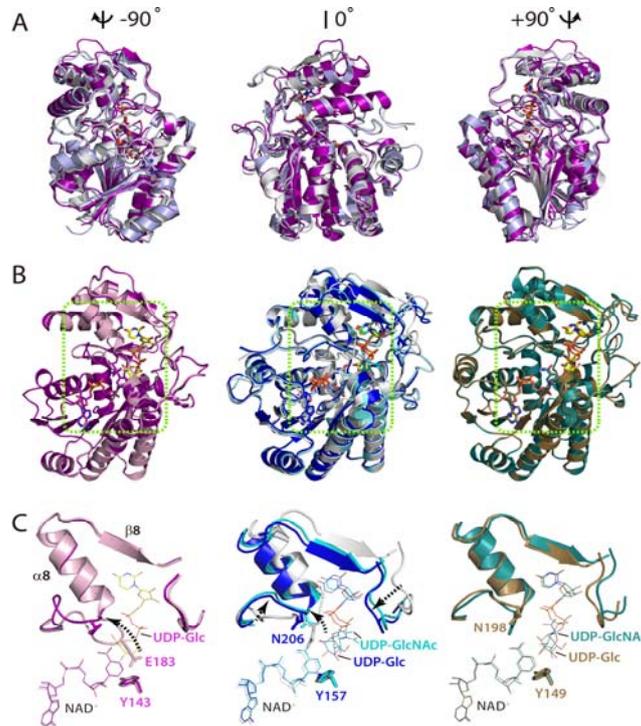


그림 12. 대장균, Human, 및 초고온균 유래의 에피머화 효소 기질결합부위에 대한 구조적 비교분석 (좌.TMGalE, 중. HUGalE, 우.ECGalE)

- 이를 통해, Y143과 E183은 수소결합을 통해 NADH와 인산화당 결합부위를 구분짓는 역할을 하며, 육탄당 기질이 효소에 결합될 때 크게 열려서 화학촉매반응이 쉽게 일어날 수 있게 함. 또한, 결합된 육탄당(리간드)의 기능기의 종류 및 크기에 따라 동종 효소간의 아미노산 잔기의 변화가 있음. 특히, TMGalE의 경우 S274 및 A184가 다른 종의 효소들과 달리 기질 결합부위의 물리적 공간을 상대적으로 크게 제공함으로써 다양한 기질 특이성을 보임(그림 13).

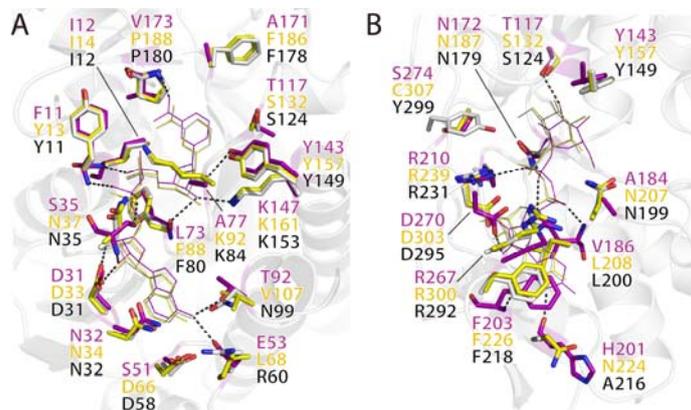


그림 13. ECGalE(흰색), HUGalE(노란색) 및 TMGalE(보라색)의 기질결합부위 비교 (A. 조효소 NADH 결합, B. 기질 UDP-glucose 결합부위)

3. 효소 반응메커니즘 기반 신규 전환효소 탐색 및 개량

가. 원천효소 탐색 및 선정

- Tagatose-1,6-bisphosphate aldolase (EC 4.1.2.40; Class II) 및 fructose-1,6-bisphosphate aldolase (EC 4.1.2.13) 촉매 메커니즘과 유사하게 과당의 탄소 C2-C3 간 retro-aldol cleavage 및 aldol condensation (stereospecific C4-epimerization) 촉매 반응을 통하여 타가토스 제조가 가능하다고 예측하였음.

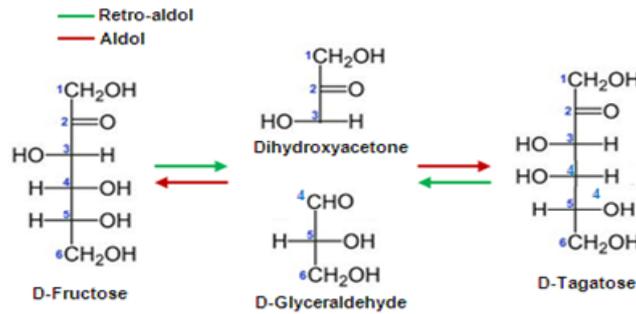


그림 14. 과당전환 타가토스생산 가능 효소 메커니즘

- 상기 촉매 메커니즘(deprotonation/reprotonation, metal coordination) 및 기질(hexokinase)과의 구조 유사성을 기반으로 유사 효소종 유전체를 탐색하였으며, 최종 내열성 보유 예상 14종 효소 유전자를 선정하였음. 선정된 내열성 미생물의 genomic DNA를 확보하고, 목표 유전자 14종을 PCR cloning 및 재조합효소 발현(*E. coli*) 후 정제(affinity His-tag) 하여 과당을 기질로 효소반응 후 타가토스생성 여부를 분석(HPLC, HPAEC, 효소적 정성분석)한 결과, 전환활성 보유 효소 4종을 선별하였음. 선별 4종 재조합효소에 의한 타가토스생성 전환을 분석 결과, 10%이하의 수준으로 평가되었고, 그 중 1종(이하 효소 D-fructose 4-epimerase라 명명함)을 선별하여 활성 부위 구조를 분석함.

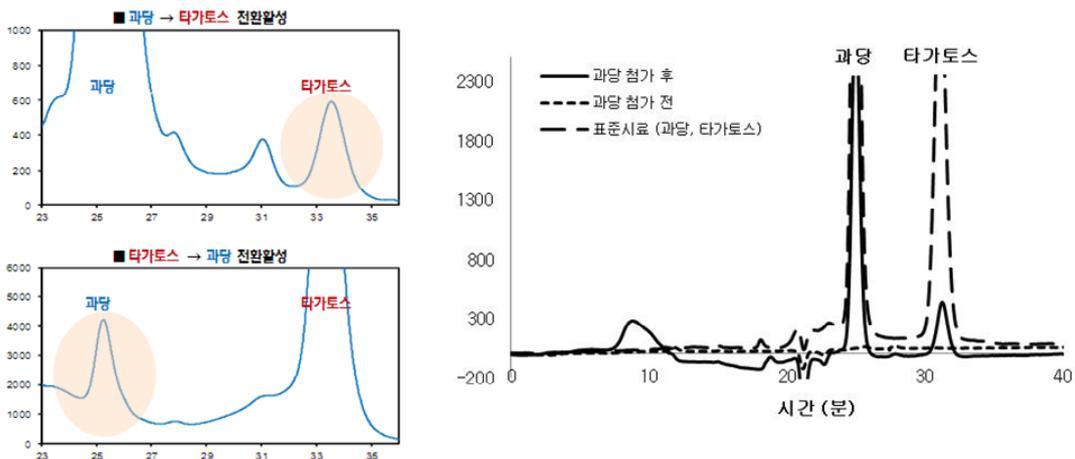


그림 15. 선별 4종 재조합효소 중 1종 효소 반응산물 HPLC 분석 결과

나. D-fructose 4-epimerase 구조 분석

(1) HMM-HMM 비교분석법 기반 유사 단백질 탐색 및 D-fructose 4-epimerase 구조 예측 (HHpred alignments → MODELLER → 3D 모델구조)

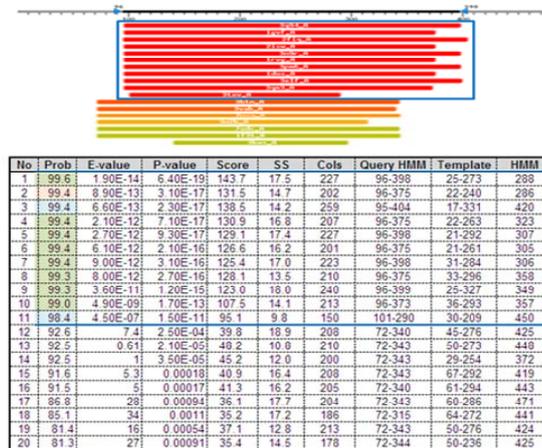


그림 16. D-fructose 4-epimerase의 HHpred 분석 결과 (HMM database - pdb70_2Fe13)

- Probability 95% 이상의 Hit 단백질 및 D-fructose 4-epimerase 활성 부위간의 구조 비교 분석 결과, retro-aldol cleavage 및 aldol condensation 반응의 proton transfer 및 metal coordination을 위한 아미노산 잔기(catalytic residues)는 보존(conservation)되어 있으나, 기질결합에 관여한다고 보고된 아미노산 잔기는 상이하였음. 이러한 활성부위 구조 비교 분석 결과에서 D-fructose 4-epimerase 및 aldose 효소종간에 상이한 아미노산 잔기들이 D-fructose 4-epimerase 효소종의 기질 특이성을 부여하는데 중요한 기능을 할 것으로 사료됨.
- D-fructose 4-epimerase 모델구조 및 기질간의 도킹(Rigid & Flexible Docking) 시뮬레이션 및 메커니즘(proton transfer 및 cofactor coordination 등) 분석 결과에 기반하여 가능 결합모드를 선정하였고, 기질결합 및 촉매 아미노산 잔기들을 선정함.

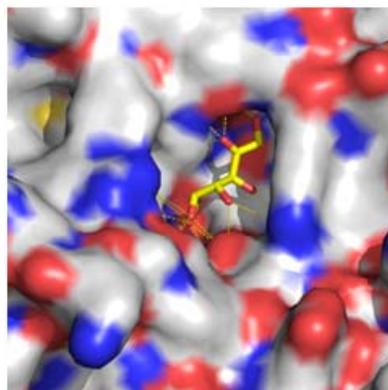


그림 17. D-fructose 4-epimerase(DFE) 모델구조와 과당간의 도킹 결과
DFE 모델구조: solvent-protein contact surface display mode D-fructose: yellow stick
DFE 및 D-fructose간 수소결합: dashed-yellow lines (예측된 binding affinity -4.8 kcal/mol)

(2) 단백질 결정 구조학기반 효소구조규명

(가) 단백질 과량 발현 조건 확립

- 야생형 D-fructose 4-epimerase 효소를 Seleno-methionine (SeMet)이 포함된 배지에서 발현시킴.
- His-tag을 이용한 affinity chromatography를 이용하여 순도 80%이상의 단백질을 대량으로 분리하고, 단백질 절단효소인 thrombin 처리를 통하여 His-tag을 제거. His-tag이 제거 및 분리된 순수한 단백질을 얻기 위해 gel-sizing exclusion chromatography를 실시하였고, 분리된 효소를 ion-exchange chromatography를 추가 실시하여 고순도의 단백질 확보함 (그림18).

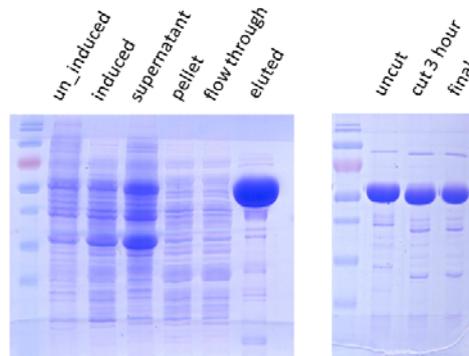
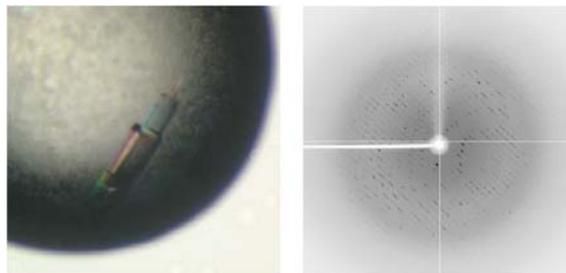


그림 18. SDS-PAGE analysis

(나) 단백질 결정 확보

- 순수 분리 정제된 단백질의 결정을 얻기 위하여, 상품화 되어있는 Hampton Research 스크리닝 키트, Wizard 스크리닝 키트 및 본 연구실에서 제조한 키트를 포함한 약 ~1000 종의 조건을 20°C와 4°C에서 각각 결정화 스크리닝을 시도하였음.
- 앞서 확보한 조건들이 포함하고 있는 여러 요소들 (pH, salt 종류 및 농도, precipitant 농도)을 조합, 한 조건 당 약 50~70 종류의 조합을 home-made로 제조하여 결정화를 재시도하고, 각 조건에서 가장 질이 좋은 결정을 생산하는 조건을 확보하여 많은 단백질 결정을 확보하였음. 구조분석을 위한 단백질 결정화 조건 스크리닝 결과 2.3Å resolution을 보이는 단백질 결정을 확보하였음 (그림 19).



Crystal image and Diffraction image of CTN wild-type (SeMet)
• Crystals were grown in condition Hampton Index No.21: 1.5M Ammonium Citrate tribasic pH 7.0
• The cryo-solution was made of well-solution adding 10% 2-methyl-2,4-pentanediol

그림 19. 단백질 결정 및 회절 이미지

(다) 단백질 3차원 구조 모델 결정

- 앞서 확보된 단백질 회절 데이터를 프로세싱하여 성공적으로 Se-Met의 위치와 개수(8개)를 정확히 찾아내었고, 연이어서 위상차를 찾아 electron density map을 찾음과 동시에, 단백질 서열을 이용하여 backbone carbon을 자동으로 찾아주는 프로그램을 이용하여 초기 구조 모델을 확립하였음 (그림 20).

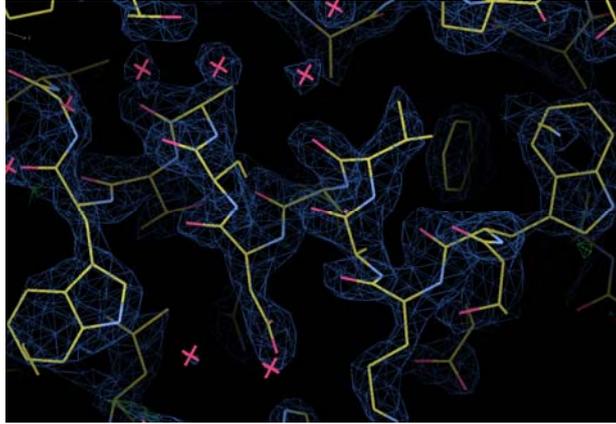


그림 20. electron density map

- 초기 모델을 기초로 하여 통계적으로 받아들여지는 수준의 모델을 확립하고자, 각 아미노산을 electron density map에 일치시키는 작업을 수행하여 최종적인 야생형 단백질의 구조 모델을 확보 할 수 있었음 (그림 21).



그림 21. D-fructose 4-epimerase의 3차 구조

- 이 구조는 aldolase에서 발견되는 기본적인 core structural domain, 즉 중앙에 베타-배럴 도메인(blue) 을 알파 나선(green)들이 둘러싸고 있는 부분을 가지고 있음(그림22). 거의 대부분의 aldolase 는 본 연구의 대상인 D-fructose 4-epimerase보다 단량체의 사이즈가 작고, crystallographic asymmetric unit에 다량체(multimer)로 packing되어 있는 형태로 구조가 얻어짐(그림에는 단량체만 나타내었음). 이는 세포내에서 활성을 나타내기 위하여 대부분의 aldolase 효소는 다량체로 functional unit이 될 수 있는 가능성을 제시함. 활성 부위는 베타-배럴 안쪽이 일반적으로 친수성이기 때문에 sugar가 docking 하기에 편리하므로 그 안쪽이 될 것으로 판단됨. 예상대로 기질의 이성체인 pyruvate(slate) 가 그 안쪽에 자리 잡고 있는 형태로 나타남.
- 본 구조의 특이한 사항은, 기존의 aldolase는 설명한 기본 구조만 가지고 있지만, 이 단백질은 주위에 새로운 도메인들을 가지고 있음(그림 22). 그림에서 보는 바와 같이, 기존의 aldolase의 구조에서 발견되는 베타-배럴(b-barrel) 구조(green)과 helix(red) core domain 외에 약 3가지의 domain이 추가로 발견되고 있음. 두 개의 도메인(orange , cyan)은 helix와 b-sheet로 구성되어진 도메인 구조를 가지며, 나머지는 주로 긴 loop과 helix bundle(gray)로 이루어져 있음. 이 단백질 결정의 asymmetric unit 에서는 단 한 개의 단백질이 발견되고 있으며. 이는 단백질은 단량체로 그 기능을 수행할 것으로 예측됨.

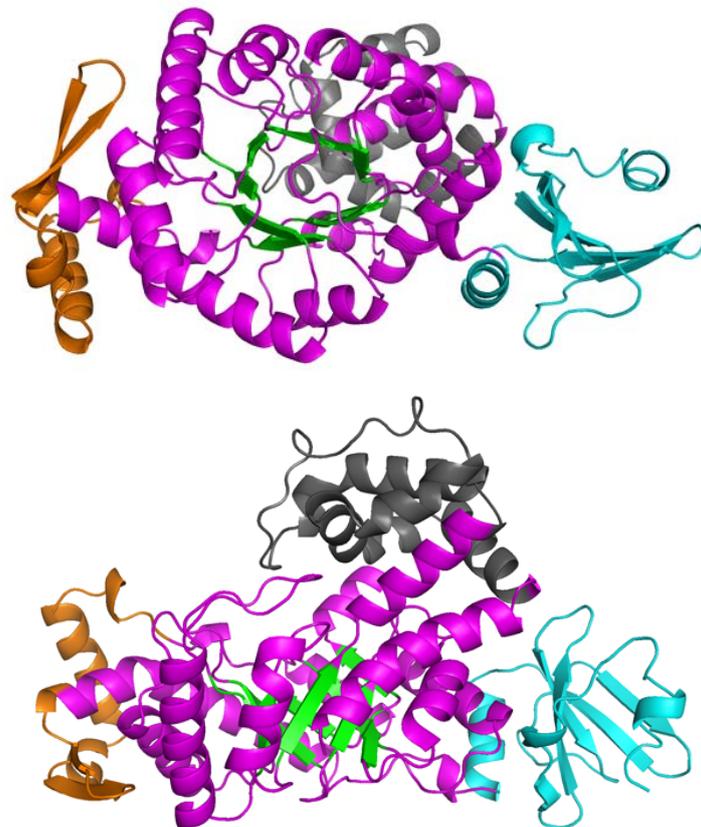


그림 22. D-fructose 4-epimerase의 core b-barrel 주위의 도메인 배열 구분

다. D-fructose 4-epimerase의 활성 개량

D-fructose 4-epimerase의 활성을 높이기 위하여 무작위돌연변이법과 효소의 구조정보를 기반으로 한 방향적진화법을 적용하여 변이주를 제작, 평가하였음.

(1) 무작위돌연변이

(가) 대용량 고속 선별법을 활용한 우수 개량주 선별

- 기존 cystein-carbazole-sulfuric acid 방법을 개선한 HTS(High Throughput Screening)법을 디자인하여 개량주 선별에 도입.
- Mutant library로부터 확보된 변이주를 96 deep well plate에 배양한 후 원심분리를 이용하여 배양균체를 회수. 배양균체에 과당 전환반응을 위한 반응액(과당, 완충용액, 금속이온)을 투입하여 반응온도 60°C에서 전환반응을 수행. 반응 종료 후 glucose isomerase를 첨가하여 반응하지 않고 남아있는 과당을 포도당으로 일부 전환시킴.
- Cystein-carbazole-sulfuric acid반응을 이용하여 타가토스+과당을 측정하고, 상대 흡광도 비교를 통하여 개량주 선별. cystein-carbazole-sulfuric acid법은 타가토스 뿐만 아니라 과당도 함께 detection하나, 이전 glucose isomerase반응을 통하여 일부를 포도당으로 전환시켜, 타가토스의 농도가 높을수록 전체 흡광도는 증가하게 됨 (그림 23).

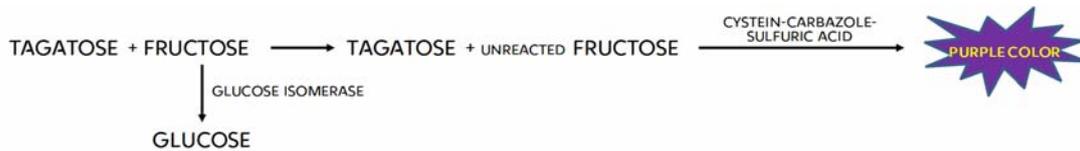


그림 23. 변이주 라이브러리로부터 고효율성 효소를 찾기 위해 사용된 대용량 고속탐색법

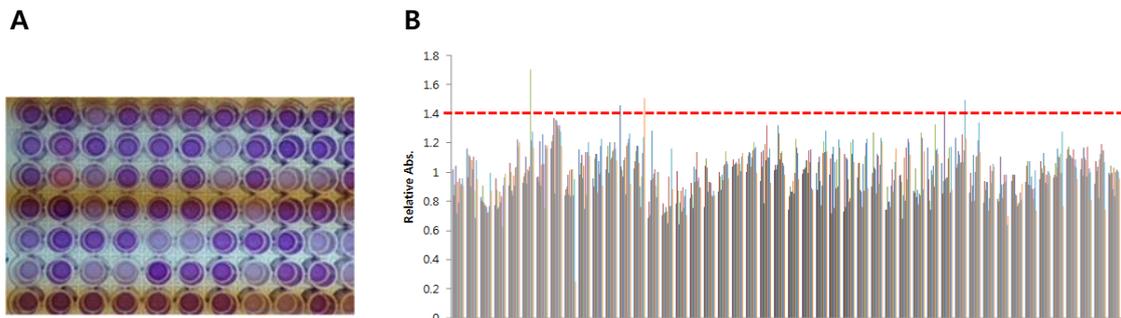


그림 24. (A) 발색법을 이용한 개량주 스크리닝, (B) 변이주별 흡광도 차이

(나) Error-prone PCR library 제작

- 매우 낮은 활성을 가지고 있는 C4에피머화 효소의 활성을 증가시키기 위하여 error-prone PCR기반 mutant library를 구축. 특정 유전자의 염기서열을 PCR로 증폭시킬 때 생길 수 있는 point mutation을 인위적으로 일으킴으로써 특정 단백질의 아미노산 서열을 무작위로 변이시키는 방법으로, dGTP와 MnSO₄의 농도 조절을 통하여 변이율의 조절이 가능함.

- 무작위로 변이된 PCR product를 발현벡터(pET28a)에 클로닝하고, *E. coli* BL21(DE3)에 형질전환시켜 mutant library 구축하였음. 제작된 라이브러리의 quality평가 결과 1,000 bp당 1-8개의 mutation이 발생하였으며, 라이브러리 개수는 1.6×10^6 개로 전체 라이브러리의 97% 수준으로 변이유전자가 삽입됨을 확인.

(다) DNA shuffling

- 염기 서열이 유사하거나, 변이에 의해 발생한 유전자들의 다양한 조합을 위해 DNA shuffling방법을 이용하였음. 조합하고자 하는 유전자들을 DNaseI으로 자르면 random한 DNA 조각들이 만들어지고, PCR을 통하여 DNA조각들은 유사한 염기서열을 가지고 있는 다른 조각에 대해 primer로 작용하여 reassemble되며, 이들은 2차 PCR을 통해 원래의 유전자와 동일한 크기의 유전자 library를 형성하게 됨.
- semi-rational 및 무작위 돌연변이법을 통하여 3차년도에 확보한 개량주 20종을 template로 하여 DNA shuffling을 수행. DNA shuffling kit(Jena Bioscience)을 이용하여 라이브러리를 제작하였으며, 그 결과 라이브러리 개수는 2.0×10^5 로 전체 라이브러리 중 83%수준으로 shuffling이 일어남을 확인.
- 확보된 DNA shuffle library로부터 변이주를 선별하기 위하여 대용량 고속탐색법(HTS)을 이용하였음.

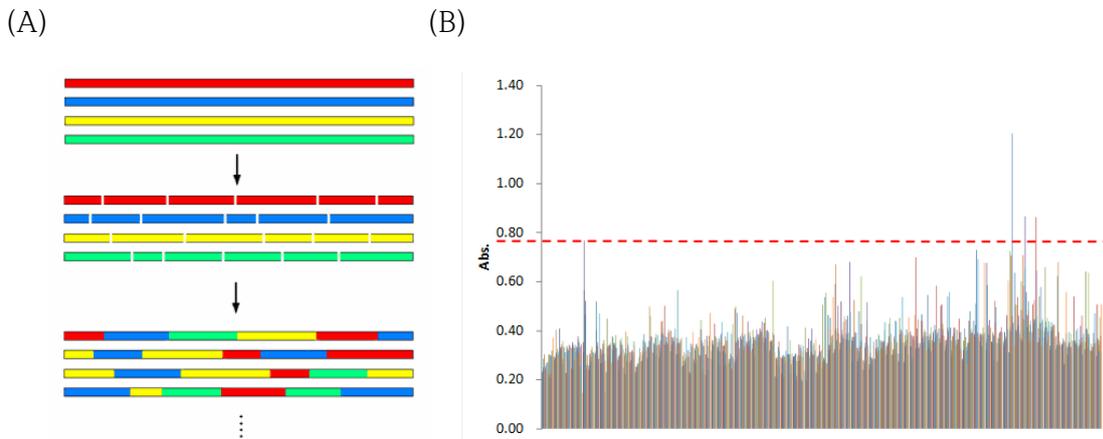


그림 25. (A) DNA shuffling원리, (B) shuffle변이주 별 흡광도 차이

(2) 효소의 구조정보를 기반으로 한 방향적진화법을 통한 효소 활성 개량

(가) 효소활성부위 예측정보기반

① 개량목표부위(target residues) 선정

- Semi-rational design을 위한 개량 목표부위 선정을 위해 원천효소의 아미노산 서열정보를 기반으로 하여, 유사효소종(orthologs)간 보존 아미노산서열 분석, 구조모델 기반 활성부위 구성 보존 아미노산 분석, 선정 활성부위 아미노산의 Alanine 변이주 활성 분석, 활성부위 구조모델 Refining, 최적화 효소모델구조 및 기질간 도킹(rigid &

flexible docking) 시뮬레이션 분석 등의 결과를 확보하고, 이를 기반으로 촉매 아미노산 잔기(proton 전이 및 금속이온결합 관여 catalytic residues) 및 기질 결합 관여 아미노산 잔기를 예측하여, 최종 개량목표부위를 선정함(그림 26).

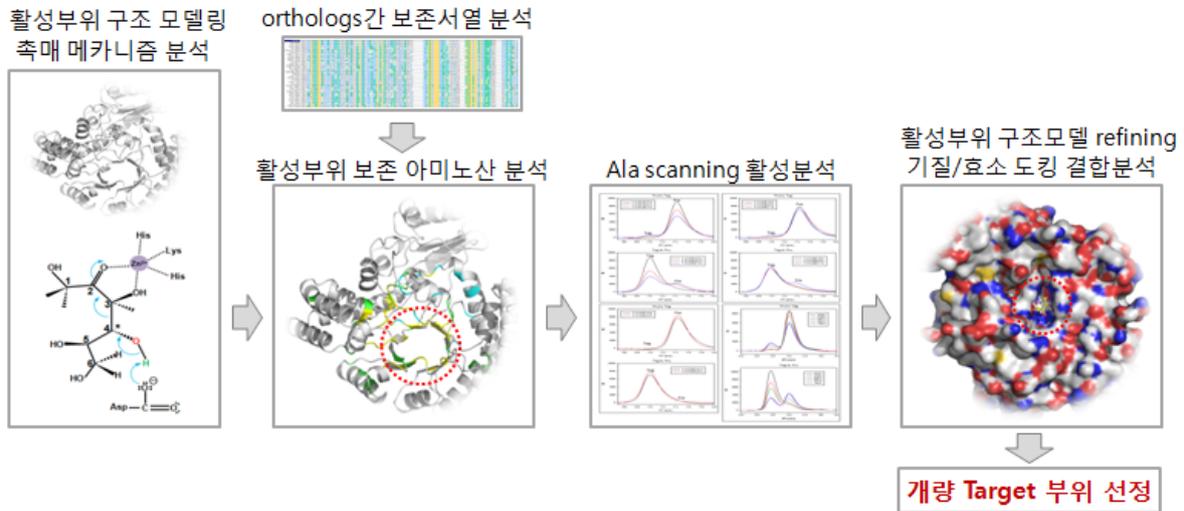


그림 26. Semi-rational design을 위한 개량목표부위(target residues) 선정 개요

② Site-Specific Mutant library 제작

- 선정 개량목표부위(target residue)에 대한 mutant library 제작을 위해 포화 돌연변이법(saturation mutagenesis)을 사용하였고, 변이분포 다양성 및 변이체 수율 등을 고려 inversed PCR 기반 포화 돌연변이법을 사용함(그림 27)[6].
- 제작된 mutant library에서 screening size를 최소화하기 위해 stop codons 배제, rare codons 최소화하는 NDT/VMA/ATG/TGG 혼합 primer를 사용하였음 (포화돌연변이시 도입되는 codons의 수를 최소화)[7].

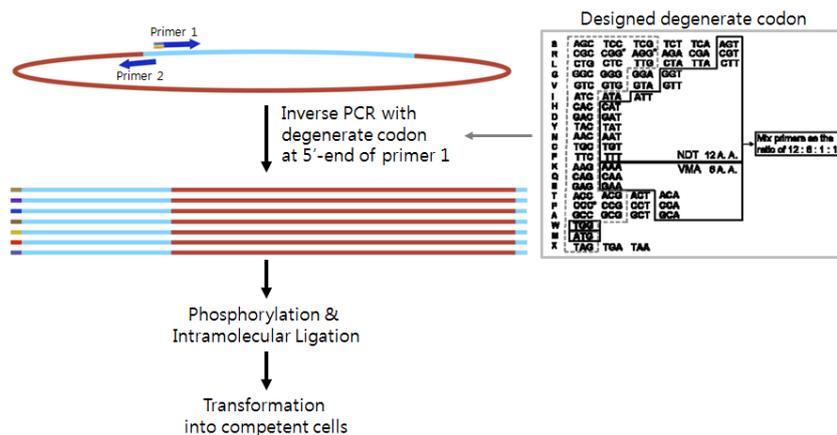


그림 27. 개량목표부위(target residues)에 대한 site-saturation mutant library 제작

- 10개 개량목표부위별 saturation mutant library를 제작 후 library별 mutant를 무작위 선별(<10)한 염기서열을 분석하여 아미노산 변이분포 등을 평가함. 분석결과를 기반으로 library별 sequence coverage $\geq 90\%$ 의 screening size를 설정함 [8].

③ 변이주 평가

- 발색법을 이용하여 site-saturation mutagenesis의 template와 상대 활성 비교 시 활성(타가토스 전환 과당 생성)이 증가된 변이효소들을 1차 선발하였고, 유전자들은 염기서열 분석 후 아미노산 변이정보 확인함.
- 1차 선발 변이효소들은 *E. coli* 에서 발현, 정제하여 template효소 대비 과당 전환 타가토스 생성 활성(HPLC 분석법)이 증가된 변이주를 2차 선발하였고, 14종 개량 변이주를 확보함(표 7).

표 7. 개량목표부위별 선발 활성개량 변이주

개량목표부위 (Target residue)	아미노산 변이주 (Mutant)
A	-
B	b1, b2, b3, b4, b5, b6
C	-
D	d1, d2
E	-
F	-
G	-
H	h1, h2, h3
I	-
J	-

- 선발 활성개량 변이주들의 아미노산 변이 정보를 활용하여 site-directed mutagenesis법으로 다중 변이주(multiple mutant)들을 제작하고 *E. coli* 에서 발현, 정제하여 과당 전환 타가토스 생성 활성(HPLC 분석법)을 비교 분석함(그림 28).

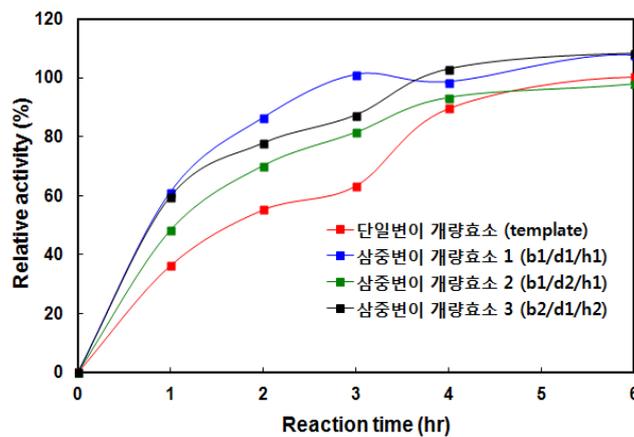


그림 28. 개량주간 활성 비교평가 결과

- 최적 활성개량 변이주를 선발하기 위해 상기 변이주들간 재조합을 통해 chimeric mutant library를 제작하고, 최대 활성개량 변이주 screening을 진행하였음.

(나) 효소 3차 구조 정보기반

- D-fructose 4-epimerase의 활성을 개량하기 위해 밝혀진 효소의 구조를 기반으로 기질-효소 결합부위를 재해석하여 기질과 금속이온이 결합하고 있는 부위 주변의 아미노산을 1차 타겟으로 하여 21개의 개량위치를 선정하였음.
- 선정한 21개의 개량 목표부위에 대한 변이주 제작·평가와 활성이 증가된 아미노산들의 조합을 통하여 개량효과를 높이는 연구를 진행하였음.

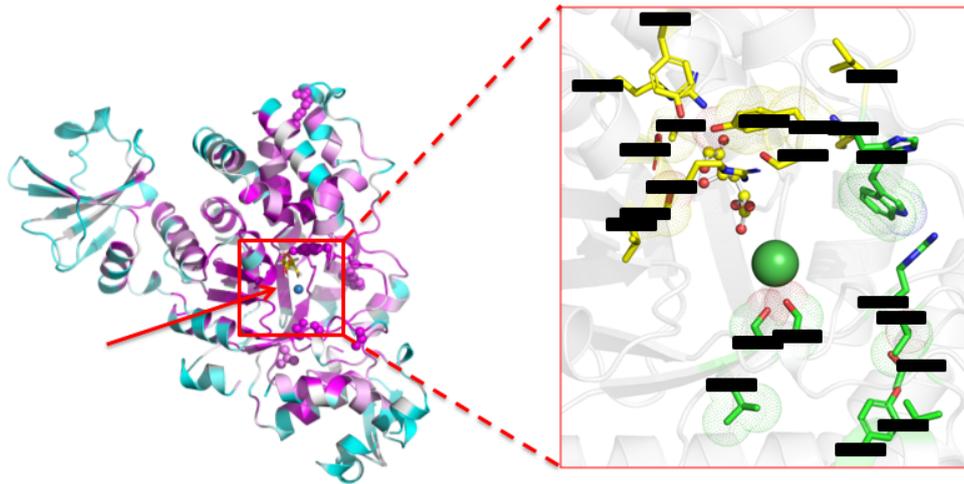


그림 29. D-fructose 4-epimerase의 구조 및 선정 개량부위의 위치

(3) 개발효소의 생산균주 도입 및 발효생산 최적화

- 타가토스를 생산하기 위해 식품소재의 생산균주로서 널리 사용되어온 *Corynebacterium glutamicum*을 숙주미생물로 선정하였으며, D-fructose 4-epimerase개량효소를 암호화하는 유전자(FE)의 과발현을 위한 단백질 발현벡터인 pCJ1을 사용하여 최종 CJ1-FE를 만들었음. 이 재조합 plasmid DNA를 *Corynebacterium glutamicum*에 형질전환한 후 재조합 미생물을 확보함.
- 추가적으로 발효 생산 최적조건 확립을 위해 배지 최적화(탄소원, 질소원, 무기염류 등 조절) 및 배양조건 최적화(pH, 온도 및 교반속도 등)를 실시. 이를 통해 최종 배지 조성으로 glucose, polypeptone, yeast extract, L-cystein, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, Urea, KH_2PO_4 , K_2HPO_4 , MgSO_4 , D-biotin을 사용하였으며, 30°C, 200rpm, 24시간 배양하여 고농도의 균체를 얻음.
- 최적조건에서 배양된 균체 내 재조합 단백질의 발현여부는 SDS-PAGE를 통해 확인하였으며(그림 30A), 아울러 조효소액을 이용한 과당전환 타가토스 생성을 확인하였음(그림 30B). 그 결과, 재조합 단백질의 발현률이 매우 낮아 타가토스 생성량도 높지 않았음. 따라서 재조합 단백질의 과발현을 위한 조건 확립이 필요하였고, 다양한 프로모터 도입을 통하여 이를 해결하고자 하였음.

- 기존의 단백질 발현벡터인 pCJ1 내 개량 효소(FE) 발현율이 미미하여 씨제이제일제당에서 자체 제작한 다양한 프로모터(CJ2, CJ3, CJ4)를 활용하여 재조합 단백질의 발현율을 비교 평가하였음.
- 그림 30은 SDS-PAGE 결과(목적 단백질 분자량: 53kDa) 및 각각의 재조합 미생물로부터 확보한 조효소액을 이용하여 과당으로부터 타가토스 전환을 비교평가를 나타낸 것으로, CJ2-FE 이 가장 우수함을 확인하였음(그림 30B).

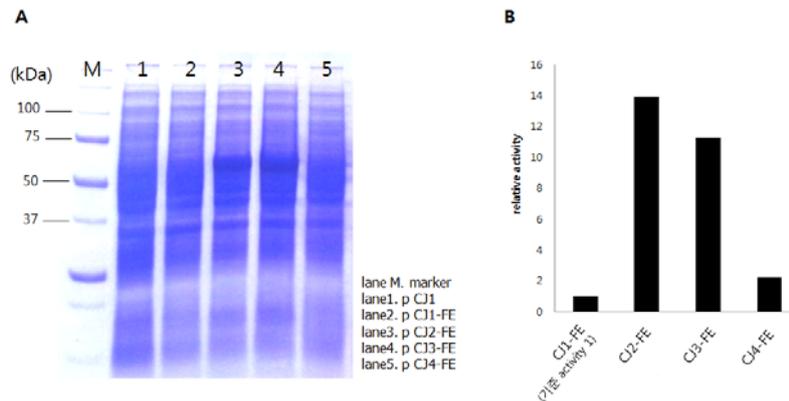


그림 30. 프로모터 종류별 (A)SDS-PAGE 분석과 (B)전환율 비교 평가

4. 발효법을 통한 갈락토스 또는 타가토스 생산

가. 미생물 대사경로 탐색을 통한 포도당-갈락토스 전환법 구축

포도당에서 갈락토스를 생산하는 경로는 그림 31과 같음. 각 단계의 필수 효소인 phosphoglucomutase, pyrophosphorylase, UDP-glucose/galactose 4-epimerase 유전자를 클로닝하여 각 효소별 과발현을 유도하고, 최종 갈락토스를 다량 생산할 수 있는 후보군을 선정하였음.

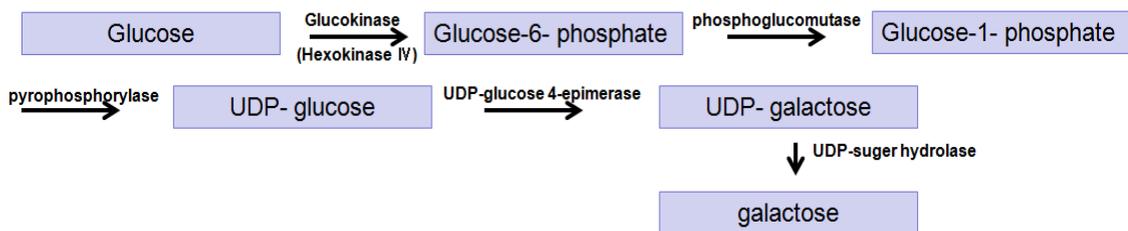


그림 31. 포도당-갈락토스 대사경로

(1) 원천효소 탐색

효소후보군은 활성이 보고된 균주의 효소구조를 기반으로 sequence align을 통해 active site 및 binding site를 포함한 주요 잔기가 잘 보존되어진 것으로 선정하였음.

(가) Phosphoglucomutase (EC 5.4.2.2)

- Phosphate sugar에서 인산기를 다른 탄소로 옮겨주는 효소로써 glucose-6-phosphate (G6P)에서 6번 탄소의 인산기를 1번 탄소로 옮겨 glucose-1-phosphate(G1P)를 생성함.

대개 이 효소는 glucose-1-phosphate를 기질로 하여 glucose-6-phosphate를 생산하여 포도당을 합성하는 효소로 작용하지만, 이와 달리 *Bacillus subtilis*의 phosphoglucomutase는 G6P를 기질로 G1P를 생산한다고 알려져 있음.

- *B. subtilis*의 phosphoglucomutase는 세린잔기가 인산기를 인식하는 active site로 작용하고, 페닐알라닌/글라이신/트레오닌/알라닌이 기질인 glucose-1-phosphate의 binding site로 작용하며, 아스팔트산이 인산기의 binding site로 보고되어 있음. 이를 통해 이 모든 잔기를 중심으로 sequence align을 한 결과 아래 표 8과 같이 3개의 후보군이 선정되었음.

표 8. Phosphoglucomutase candidate 목록

Strain	Uniprot number	KCTC number
<i>Bacillus subtilis</i>	P18159	KCTC 1027
<i>Escherichia coli</i> (K-12)	P36938	KCTC 2020
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	Q5HLD2	KCTC 1917

- 각 후보효소의 최적 반응 pH와 최적 반응온도에서 활성평가를 진행한 결과 *Escherichia coli* (K-12)유래의 효소가 가장 활성이 높았음. 그러나 균체 내 효소 발현량과 효소의 활성을 고려하여 *Staphylococcus epidermidis*유래 효소를 최종 선별하였음.

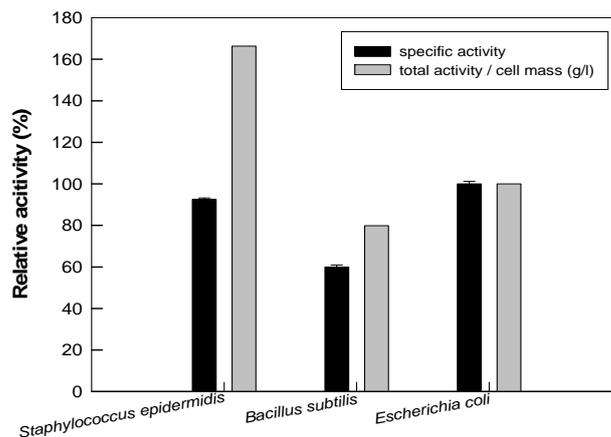


그림 32. Phosphoglucomutase 활성 비교

(나) Pyrophosphorylase (UTP-glucose-1-phosphate uridylyltransferase, EC 2.7.7.9)

- 대개 이 효소는 UDP-glucose를 기질로 하여 glucose-1-phosphate를 생성하는 효소로 작용하지만, *Sphingomonas paucimobilis*유래 효소의 경우 glucose-1-phosphate를 UDP-glucose로 바꾸어주는 반응을 한다고 알려져 있음.
- *S. paucimobilis* 유래의 pyrophosphorylase는 glucose-1-phosphate에서 phosphate가 떨어지고 UDP가 결합되도록 하는데, 이 작용에 라이신잔기(VEKP motif)가 glucose-1-phosphate와 결합하는 주요 잔기로 작용한다고 알려져 있음. 또한 GXGTRXLPXTK motif라 불리는 글라이신/any amino acid/글라이신/트레오닌/아르기닌/any amino acid/류신/프롤린/any amino acid/트레오닌/라이신 잔기가

주요한 활성잔기로 알려져 있으며, 이를 통해 위의 두 가지 motif를 기준으로 하여 sequence align 을 한 결과 모든 motif가 잘 보존된 아래 표 9와 같이 4개의 후보균을 선정함.

표 9. Pyrophosphorylase 후보목록

Strain	Uniprot number	KCTC number
<i>Bacillus subtilis</i>	P0AEP3	KCTC 1027
<i>Escherichia coli</i> (K-12)	Q05852	KCTC 2020
<i>Staphylococcus aureus</i>	P58313	KCTC 1621
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	Q5HD54	KCTC3932

- 각 후보효소의 최적 반응pH와 최적 반응온도에서 활성평가를 진행한 결과 *Streptococcus pneumoniae* 유래 효소가 활성 및 균체 내 효소 발현양이 가장 높았음.

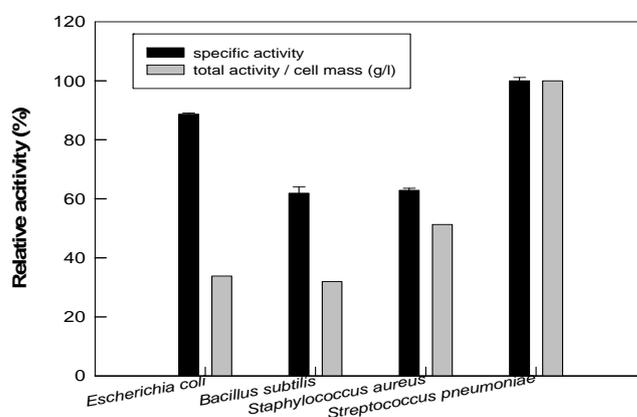


그림 33. Pyrophosphorylase 활성 비교

(다) UDP-glucose/galactose 4-epimerase (EC 5.1.3.2)

- UDP-glucose를 UDP-galactose로 전환시켜 주는 효소로 dehydrogenase/reductase superfamily에 속하고 cofactor로 NADPH가 필요한 효소로 알려짐. 현재 *Escherichia coli* (K-12) 유래 UDP-glucose/galactose 4-epimerase의 구조와 잔기 및 메커니즘이 보고되어 있음.
- 에피머화 반응은 효소의 TXXXL(티로신/any amino acid/any amino acid/any amino acid/라이신), GXGXXG(글라이신/any amino acid/글라이신/any amino acid/any amino acid/글라이신)과 같은 잔기가 작용하여 일어나며, 티로신잔기가 4번 탄소위치 수산화기의 deprotonation작용을 하는 것으로 밝혀져 있음. 또한 UDP기질전환에서 UDP 는 anchoring역할을 하는 것으로 알려져 있음. *Escherichia coli* (K-12) 유래의 효소를 기준으로 하여 sequence align을 한 결과 모든 site가 잘 보존된 아래 표 10과 같이 2개의 후보를 선정함.

표10. UDP-galactose/glucose 4-epimerase 후보목록

Strain	Uniprot number	KCTC number
<i>Escherichia coli</i> (K-12)	Q05852	KCTC 2020
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	P45602	KCTC 22057

- 각 후보효소의 최적 반응pH와 최적 반응온도에서 활성평가를 진행한 결과 *Escherichia coli* (K-12)유래 효소가 활성 및 균체 내 효소 발현양이 가장 높음.

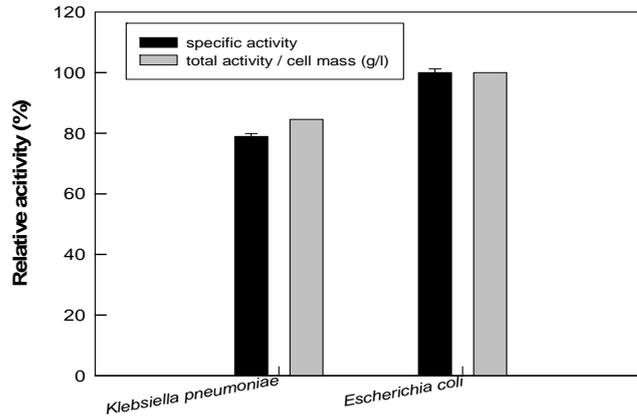


그림 34. UDP-glucose/galactose 4-epimerase 활성 비교

나. 미생물 대사경로 탐색을 통한 포도당·과당-타가토스 전환법 구축

포도당 또는 과당을 시작물질로 하는 타가토스 생산 신규 대사경로를 개발하고자 함.

(1) 과당 → 타가토스 전환 대사경로

- Hexokinase를 과당과 반응시켜 fructose 6-phosphate로 전환 → fructose 6-phosphate 4-epimerase효소를 이용하여 fructose 6-phosphate에서 tagatose 6-phosphate로 에피머화 → phytase 효소를 이용하여 tagatose 6-phosphate를 타가토스로 전환(그림 35).

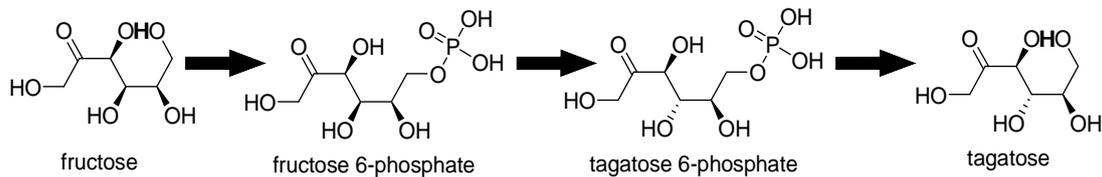


그림 35. 과당→타가토스 대사경로 모식도

- 각 단계별 효소를 확보하여, 전환율 평가를 진행하였음(표 11). 이들 효소를 혼합하여 반응한 결과 과당의 80%가 타가토스로 전환되는 것을 확인.

반응 세 번째 단계에 관여 하는 효소는 phosphatase로 tagatose 6-phosphate를 타가토스로 dephosphorylation 하기 위하여 phosphatase를 *Caldicellulosiruptor saccharolyticus*로부터 cloning을 진행함. 그러나 phosphate sugar들에 대한 무작위적 특이성 때문에 이는 enzyme expression을 조정하거나, tagatose 6-phosphate 특이적인 cleavage를 유도하도록 variant제작이 필요함. 따라서 본 과제에서는 tagatose 6-phosphate생산 최적화를 목표로 하여 연구를 진행함.

- 타겟으로 한 tagatose 6-phosphate를 축적시키기 위한 방안으로 1) 반응 intermediate 분해를 막거나, 생산을 증가 시키고, 2) 생성물 분해를 저해, 생산을 증가하며 3) 반응 중간에 필요한 cofactor를 충분히 활용할 수 있도록 byproduct에 사용되는 cofactor를 막기 위하여 해당 반응을 blocking 하는 방법을 제안함. 위의 knock out을 위하여 선정된 효소 군은 다음 표 12와 같음.

표 12. Knock out 대상 유전자(효소) 정보 및 예상 결과

	Knock out 효소	예상 결과
Intermediate 관련, cofactor save	Dihydroxyacetone (DHA) kinase	Tagatose 6-phosphate으로의 축합시 필요한 DHA 생산 증대 및 불필요한 ATP 소모 방지
	Phosphofructo kinase	Tagatose 6-phosphate 의 전단계 물질인 F6P 분해 방지 및 ATP 소모 방지
Product 분해 방지	Tagatose 6-phosphate kinase	Tagatose 6-phosphate 분해 방지 및 불필요한 ATP 소모 방지
	Tagatose bisphosphate aldolase	product 분해 예방
Fructose byproduct 방지	Fructose kinase	Cell내 free fructose 유입을 증가 시켜서 fructose 6-phosphate생산 극대화 및 불필요한 ATP 소모 방지

- 탄소원으로 글리세롤 2%와 기질인 과당 2%, riesenberg medium을 이용하여 tagatose 6-phosphate로의 생산성을 비교하였음. 그 결과 fructose 6-phosphate가 fructose bisphosphate가 되는 효소 phosphofructo kinase를 knock out 하였을 때 가장 많은 phosphate sugar가 생산됨을 확인.

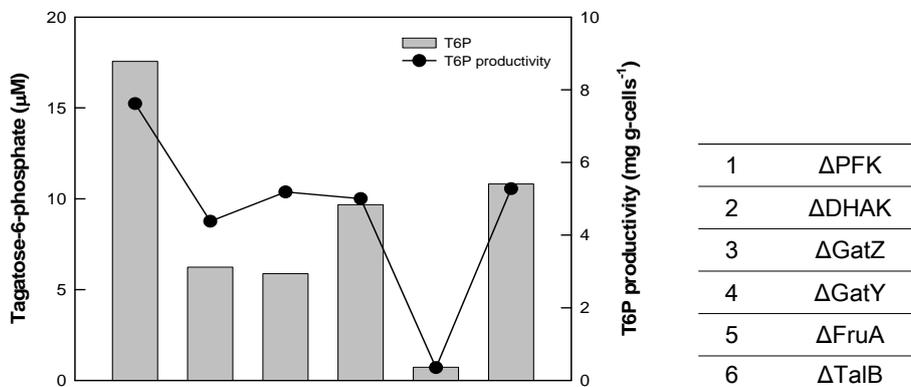


그림 37. knock 유전자별 tagatose 6-phosphate생산 비교

○ 그러나 이 실험 결과로부터 추가적인 knock out host의 구축이 필요함을 판단하여 time course 실험을 진행함과 동시에 phage를 이용한 knock out host 구축 실험을 진행. 실험군인 Δ FruA 에서는 당원을 sucrose로 하였을 때, 대조군으로 knock out 을 진행하지 않은 wild cell(ER) 과 또 다른 실험군인 Δ pfk 에서는 당원을 글리세롤과 과당으로 하였을 때 더 높은 cell mass 결과를 보였으며(그림 38), tagatose 6-phosphate의 세포 내 생산량은 Δ pfk 균주에서 글리세롤과 과당을 당원으로 한 결과 5시간 후 $25\text{mg g}^{-1}\text{cell}^{-1}$ 로 가장 높게 나타남(그림 39).

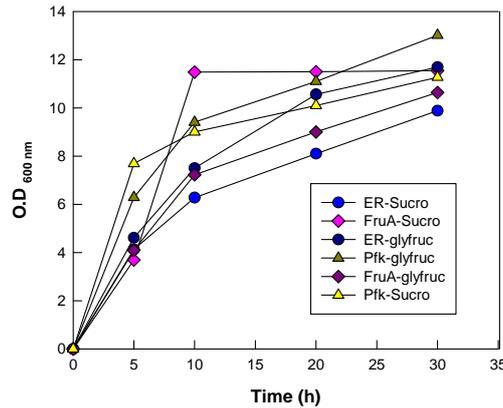


그림 38. knock out 균주별 세포농도

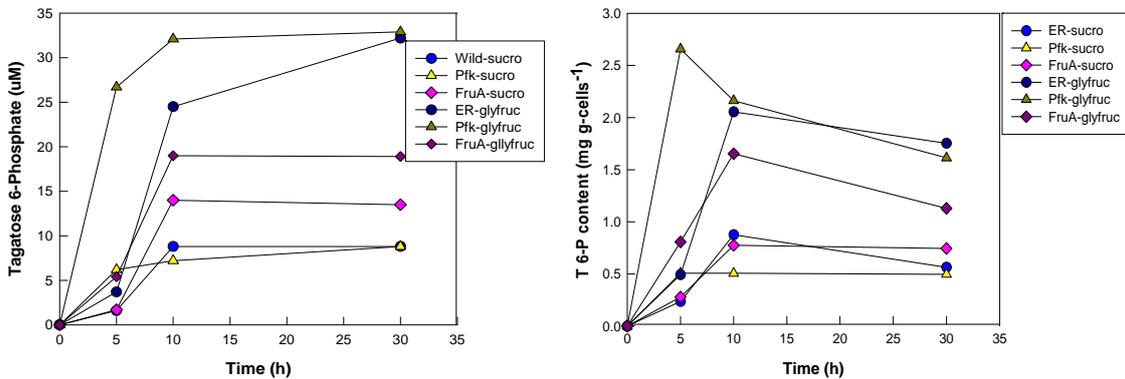


그림 39. tagatose 6-phosphate의 세포 내 생산량 비교

(2) 포도당 → 타가토스 전환 대사경로

○ Hexokinase를 포도당과 반응시켜 glucose 6-phosphate를 생산 → glucose 6-phosphate isomerase를 이용하여 glucose 6-phosphate 에서 fructose 6-phosphate 로의 이성화반응을 진행 → fructose 6-phosphate 4-epimerase를 이용하여 fructose 6-phosphate에서 tagatose 6-phosphate로의 에피머화를 수행 → phytase효소를 이용하여 tagatose 6-phosphate를 타가토스로 전환(그림 40).

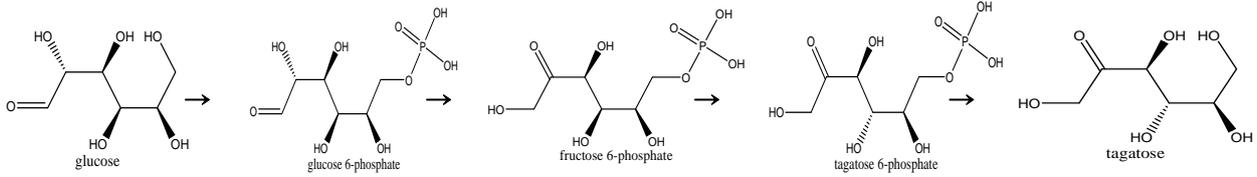


그림 40. 포도당 → 타가토스 대사경로 모식도

○ 각 단계별 효소를 확보하여, 전환율 평가를 진행하였음(표 13). 또한 이들 효소를 혼합하여 반응한 결과 포도당의 50%가 tagatose 6-phosphate로 전환되는 것을 확인(그림 41).

표 13. 각 단계별 효소의 전환율

Step	Enzyme	Source	Conversion (%)
Phosphorylation	Glucose kinase	<i>Bacillus subtilis</i>	90 %
Isomerization	G 6-P isomerase	<i>Bacillus subtilis</i>	30 %
Epimerization	Fructose 6-phosphate 4-epimerase	<i>Escherichia coli</i> (K-12)	80 %
Dephosphorylation	Phytase	<i>Escherichia coli</i> (K-12)	100 %
ATP regeneration	Polyphosphate kinase	<i>Escherichia coli</i> (K-12)	확인예정

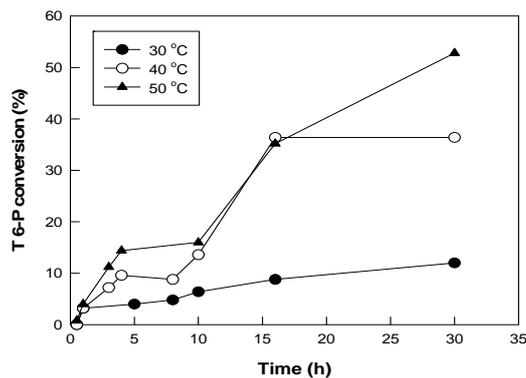


그림 41. 반응 온도에 따른 포도당으로부터 tagatose 6-phosphate로의 전환율 비교

5. LMO효소 안전성 평가를 위한 모니터링 기법 개발

효소 인허가 연구 관련 시험평가에 사용된 연구는 결과의 신뢰도 확보를 위하여 다양한 외부 전문기관과의 위탁연구로 수행되었으며, 이는 본 국책과제 연구비가 아닌 씨제이제일제당의 자체 연구비를 사용하여 진행하였음.

가. ELISA법을 활용한 개발된 효소 검출법 개발

○ D-fructose-epimerase 는 타가토스 생산의 중간 과정에서 효소로서 활용되고, 정제과정을 통하여 제거되어 최종 제품에는 재조합 미생물자체 혹은 이로부터 기인한 외래 단백질이 잔류하지 않음을 시험 검증하기 위해 Rabbit polyclonal antibody를 이용한 ELISA 정량 검출의 방법을 사용하고자 하였으며, 시판되는 항체가 없어 항체의 제작을 위한 준비에서 시작하여 단계별로 연구를 수행하였음.

연구의 단계는 아래와 같음.

- D-fructose-4-epimerase 효소의 고순도 분리, 정제
 - Rabbit polyclonal antibody 의 제작
 - Antibody의 정량 검출 한계 산출 및 ELISA 분석법 최적화
 - 타가토스 공정 단계별 파일럿 샘플의 D-fructose-4-epimerase 정량 검출 시험
- 즉, 항체 제작의 항원으로 사용할 단백질 D-fructose-4-epimerase를 고순도 정제 시험을 수행하여 최종 단백질의 순도는 약 95%로 이를 항원 단백질로 사용하였음. 항원은 총 3차 immunization수행을 통하여 제작되었으며, 최종적으로 Rabbit Serum을 수득, 표준 ELISA 법으로 항원/항체 반응의 민감도를 시험 평가하였음.
- 제작한 항체의 LLD(Lower Limit of Detection) 값은 0.0055ng/ml(5.5ppb)로 계산되었으며, 이를 이용하여 타가토스 공정 단계별 파일럿 샘플 내의 단백질을 ELISA 방법으로 정량 분석을 수행 한 결과, 아래 표 14와 같이 에피머화 효소반응 단계 후 부터는 항원 D-fructose-4-epimerase가 존재하지 않음을 확인.

표 14. 제품 생산 공정 단계 별 균주 유래 외래 단백질의 정량 분석 결과

공정 단계	O.D. 값 (Average)	ng/mL	결과
에피머화 공정	0.710	2.881	검출
탈색 공정	0.058	< Lower limit	미검출
이온정제 공정	0.059	< Lower limit	미검출
크로마토분리 공정	0.059	< Lower limit	미검출
결정화 공정(최종품)	0.059	< Lower limit	미검출

나. 개발된 발현벡터를 특이적으로 검출할 수 있는 PCR정성 검출법 디자인

- 신규 유전물질에 대하여 특이성을 가지는 정성 분석법을 개발하고자 도입된 재조합 플라스미드의 에피머화 효소 유전자와 발현 벡터 접합부위의 염기서열을 이용하여 신규 에피머화 효소 유전자 특이 정성 검출 PCR 키트를 디자인하였음.
- 재조합 플라스미드의 에피머화효소 유전자의 start codon의 양쪽으로 특이적인 염기서열을 가지는 real-time PCR용 한 쌍의 primer/probe를 디자인하고(표 15), probe는 5'에 fluorescence dye로 FAM을 사용하였음. 제작한 primer/probe를 이용하여 재조합 플라스미드(positive control)과 그 외 미생물, 병원성 세균, GMO, animal DNA 등을 포함하는 총 44종의 시료를 대상으로 특이도 시험 평가를 한 결과 재조합 플라스미드를 제외하고 모든 시료에서 반응성을 보이지 않았으며, 검출한계는 1.0×10^1 copies/ μ l(Ctvalue=35.9)로 확인하였음.

표 15. Real-time PCR/probe 염기서열

Primer	Sequence	Product size
Forward	5'-AATGGAAACGTGCAAAAGCAT-3'	96 bp
Reverse	5'-GTATCCCCTTCCAAAGTGATCTTTG-3'	
Probe_R	5'-CTTTCAAGACCATGATATCTGTTTTGATCTCCTCC-3'	

- 앞서 디자인 된 primer/probe를 사용하여 타가토스 공정 단계별 파일럿 샘플 내에 잔존하는 유전물질(발현벡터)을 real-time PCR 방법으로 정량 분석을 수행 한 결과, 아래 표 16과 같이 에피머화효소반응 단계 이후부터는 유전물질이 존재하지 않음을 확인.

표 16. 제품 생산 공정 단계 별 균주 유래 재조합 외래 단백질의 정량 분석 결과

공정 단계	<i>UxaE-2</i> (Ct value)	결과
에피머화 공정	26.3	검출
탈색 공정	No amplification	미검출
이온정제 공정	No amplification	미검출
크로마토분리 공정	No amplification	미검출
결정화 공정(최종품)	No amplification	미검출

(다) 효소의 기존 독성 및 알러젠과의 구조적 상동성 평가

- 생산균주 내 도입단백질인 D-fructose 4-epimerase와 단백질이 일으킬 수 있는 잠재적 독성을 확인하기 위하여 알려진 독소들 간의 아미노산 서열의 상동성을 BLASTP(Basic Local Alignment Search Tool for Protein) 2.3.0+버전 (2015년 11월 30일: <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>)의 BLOSUM62 알고리즘으로 NCBI/GenBank의 77,704,848개의 단백질 서열을 이용하여 분석하였음. 독성유발성의 경우에는 단백질 전체 아미노산 서열이 E-value(Expectation value)가 0.001이하(Pearson WR. 2013)에서 50% 이상의 similarity(Martens, M.A. 2000)와 30% 이상의 identity(Chothia C, Lesk AM. 1986)를 가지는 경우 유의성이 있다고 판단하였으며 실제 검색에서는 E-value를 0.1로 검색범위를 넓혀 결과의 신뢰성을 높였음. 이런 조건에 따라 분석한 결과 FIS003 도입유전자의 발현산물인 D-fructose 4-epimerase 단백질과 이미 알려진 독소와의 아미노산 서열 상동성 검색에서 유의성을 나타내는 단백질이 검출되지 않아 이미 알려진 독성 단백질과의 구조적 상동성이 없는 것으로 분석되었음.
- 생산균주의 도입단백질인 D-fructose 4-epimerase가 일으킬 수 있는 잠재적 알레르기 유발 가능성을 확인하기 위하여 알려진 알레르겐들 간의 아미노산 서열의 상동성을 알아보았음. 이를 위하여 FAO/WHO (2001)에서 권장한 방법에 따라 FASTA 및 연속된 8개의 아미노산 서열과의 상동성에 대한 검색을 실시. D-fructose 4-epimerase와 알레르겐과의 아미노산 서열 상동성 검색을 위해 이용한 site는 아래와 같음.

<http://www.allermatch.org/>
<http://fermi.utmb.edu/>
<http://allergenonline.org/databasefasta.shtml>
<http://allergen.nihs.go.jp/ADFS/index.jsp>

D-fructose 4-epimerase 단백질의 아미노산 서열을 80개 단위로 구분하여 35% 이상의 서열 상동성을 갖는 알레르겐에 대한 FASTA 검색을 실시한 결과 상동성을 보이지 않음.

또한, 짧고 국지적인 아미노산 상동성 부분들이 일반적인 IgE-binding epitope을 나타내는지 스크리닝하기 위하여 여러 데이터베이스 상에서 8개의 인접한 아미노산 서열들을 서로 비교한 결과 8개의 연속된 아미노산 서열에 일치하는 경우는 없는 것으로 나타남. 이를 통하여 도입단백질인 D-fructose 4-epimerase와 이미 알려진 알레르겐과의 구조적 상동성을 나타내지 않는 것으로 분석되었음.

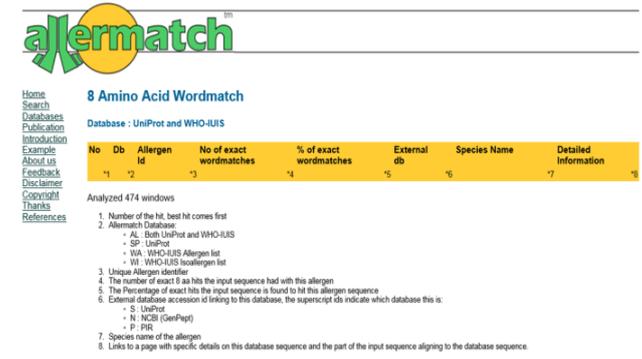
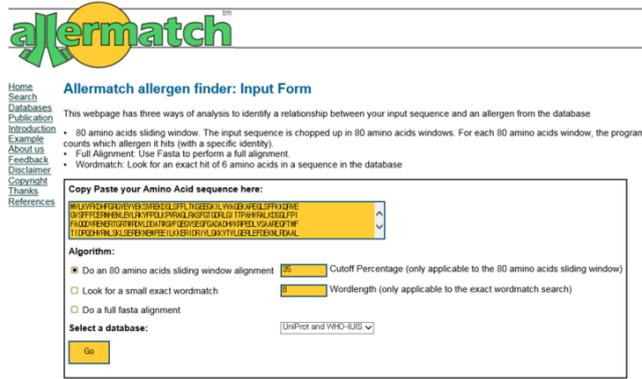


그림 42. allermatch (<http://www.allermatch.org/>)에서의 검색 결과 예시

(라) 효소 및 균주의 독성 안전성 평가(동물 시험)

- 주관기관과 협동2기관에서 개발한 D-fructose 4-epimerase 효소 및 이를 도입한 균주(숙주 미생물)의 안전성을 확보하기 위하여, 다양한 항목의 안전성 평가 연구를 수행하였음. 단순 분석평가 연구를 제외한 주요한 평가 데이터는 향후 인허가 심사에서의 활용을 위하여 GLP 기관인 (주) 켄온사에 의뢰하여 시험평가를 진행하였으며,

모든 실험의 설계는 국내·미국·유럽에 공통으로 적용하기 위하여 OECD guideline for Testing of Chemicals(2001)에 따라 행하여 해당 시험의 실시과정에서 발생한 시험기초자료가 보고서에 정확하게 반영되도록 하였음. 또한 국내 식품의약품안전처 고시 제 2014-67호(2014년 2월 12일) ‘비임상시험관리기준’ 및 OECD Principle of Good Laboratory Practice (1997) ENV/MC/CHEM(98)17에 따라 실시되었음.

표 17. 주요 안전성 평가 동물 실험 항목 및 결과

항목	시험평가	보고서 발행일	주요 결과*
효소	단회투여 독성	2015. 12.	> 5000 mg/kg BW (최대용량에서 안전함)
	복귀 돌연변이	2015. 3	이상 소견 관찰되지 않음
	염색체 이상	2015. 3	이상 소견 관찰되지 않음
균주	LD50	2015. 6	> 5000 mg/kg BW (최대용량에서 안전함)

* CJ제일제당 자체 연구투자 결과로, 세부적인 방법 및 고찰은 별도 상세 수록하지 않았음

(마) 최종제품 내 효소 잔존 여부 평가(고도정제품)

- 과당 → 타가토스로의 효소반응 이후 공정의 구성은 ‘탈색 → 이온정제 → 농축 → SMB 크로마토분리 → 농축 → 결정화 → 원심분리(회수) → 건조 → 체별’의 과정을 거치도록 설계되었음. 따라서 고정화 균체(효소) 반응 공정을 거친 후 제조공정액 내 혼입된 균주 및 효소 유래 유전물질(DNA)의 최종제품내 잔존여부를 평가하기 위하여, 공정별 시료를 제조한 후 단계별 시료를 채취하여 분석의 시료로 사용함.

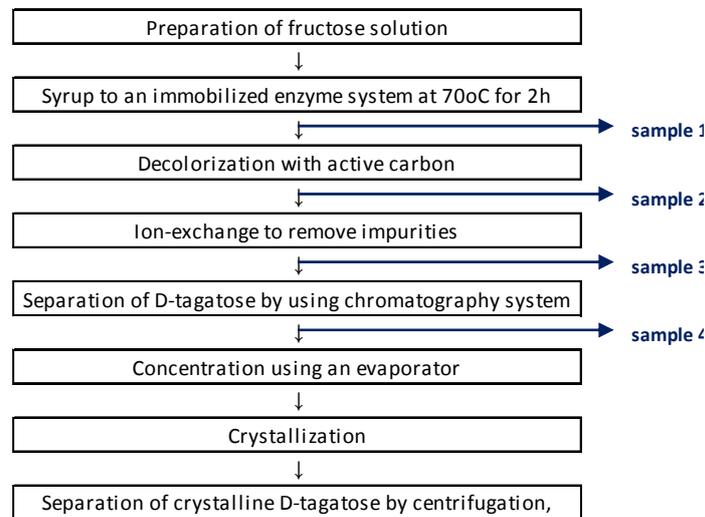


그림 43. 공정 단계 및 시료 채취 모식도

- DNA 잔존 여부는 D-fructose 4-epimerase의 코딩 유전자와 이를 도입한 벡터의 접합부위를 걸치도록 디자인하였음. 이는 균주(숙주)인 *Corynebacterium glutamicum* 혹은 기타 환경미생물에 존재할 수 있는 유사 DNA 염기서열과의 분별력을 부여하기 위한 방법으로 사용함. PCR primer의 서열정보는 ‘Forward primer : TACAATGGAAC GTGCAAAGC’, ‘Reverse primer : TGGAAAGTATTTTCTGAGAACTTCAA’로 구성하였음. PCR 반응조건 및 평가 결과는 아래 표시함. 단 한 개의 template이 존재하여도 PCR 검출이 가능하도록 40cycle로

PCR 반응 반복수를 설정하였음. PCR 분석의 결과 효소 반응 단계에서는 유전자가 검출되었으나, 활성탄 처리 이후 단계부터는 DNA가 검출되지 않음을 확인, 제조과정 중 유입된 DNA 물질이 최종제품까지 잔존할 가능성이 없음을 확인하였음.

표 18. 시험평가에 사용한 PCR 반응 조건

PCR condition

Composition	Concentration (pmol/μl)	Volume (μl)
Primer(forward+Reverse)	10	1
2x master mix		10
Template		5
DW		4
Total		20

Temp.	Time	Cycle
95°C	10 min	1 cycle
95°C	30 sec	40 cycle
60°C	30 min	
72°C	30 sec	
72°C	10 min	1 cycle
4°C	∞	

그림 44. 공정샘플 별 PCR 반응 및 전기영동 판독 결과



- 상기와 같이 안전성 여부 판단의 핵심이 되는 주요 항목에 대한 연구개발 결과를 모두 확인한 결과, D-fructose 4-epimerase는 식품 제조과정에서 공정보조제(Processing Aids)로 사용이 가능한 효소임을 확인할 수 있었음. 이에 따라, 2015년 8월 D-fructose 4-epimerase효소의 안전성(LMO 안전성) 심사를 국내 식품의약품안전처에 신청하였으며 현재 심사 과정 중에 있음.

4장. 복합감미제 포뮬러 개발

1. 혼합감미 특성에 대한 관능 특성 연구

- 타가토스의 천연고감미료와의 혼합 시 맛 특성을 평가하였음. 특히 기존의 고감미료의 경우 후미의 쓴 맛이 관능적으로 가장 큰 단점으로 지적되고 있으므로, 타가토스(5.0%)와 Sucralose (5.0% SEV, Sucrose Equivalent Value)의 혼합 형태와 타가토스(5.0%)와 Reb A(5.0% SEV)의 혼합형태에서의 bitter taste의 관능적 강도를 측정하고, 이들을 2.5% 혼합한 형태에서의 bitter taste 강도와 비교를 통하여 간접적으로 평가하고자 하였음. 경쟁제품인 대체감미료 에리스리톨에서도 동일한 설계의 실험을 수행, 타가토스의 상대적인 masking effect 특성 보유 여부를 가늠하고자 하였음.
- 평가 결과 타가토스와 Reb A의 혼합감미제는 Reb A의 후미의 쓴맛(bitter taste)을 유의적으로 감소시키는 효과를 확인함. 반면 에리스리톨의 경우는 이러한 특징이 나타나지 않을 뿐만 아니라 (유의차는 없었으나) 오히려 Reb A와 Sucralose의 쓴맛을 오히려 증가시키는 결과였음.

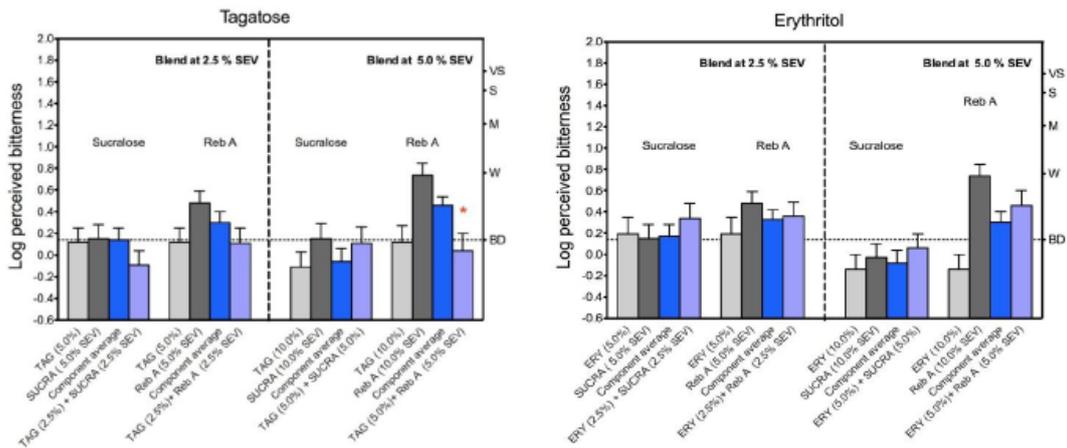


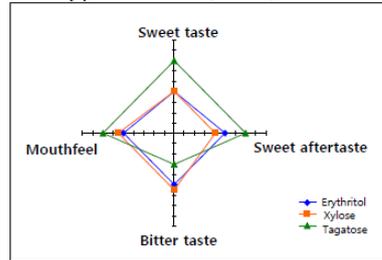
그림 1. 타가토스 및 에리스리톨의 고감미료에 대한 masking effect 평가 결과

- 앞선 데이터를 바탕으로 타가토스와 Reb A와의 혼합 포뮬러 중심의 복합감미제 연구를 위한 관능품질적 기초 연구를 수행함. 즉, 복합감미제를 적용한 다양한 프로토타입의 시제품(Mixed berry flavored water, 100% pure fruit drink, dietary fiber drink, drink fermentable milk, chocolate 등)을 개발하여 타가토스의 관능특성에 대한 객관적 비교 결과를 확인하고자함. 이에 Reb A의 대체 감미료소재와의 혼합 특성을 비교 평가하였음. 그 결과 칼로리에 민감한 식이섬유 음료에 타가토스를 고감미료와 Blending 적용 관능 시, 입촉감에서 낮은 경향을 보였으나, 향기호도, 단맛 기호도에서 높은 선호 관능을 보임.

❖ Mixed berry flavored water

	Control (Reb A + Erythritol)	Test 1 (Reb A + Xylose)	Test 2 (Reb A + Tagatose)
Reb A	0.02	0.02	0.02
Erythritol	2.50	-	-
Xylose	-	2.70	-
Tagatose	-	-	1.75
Berry mixed juice	0.30	0.30	0.30
Berry mixed flavor Concentrate	0.15	0.15	0.15
Citric acid	0.02	0.02	0.02
Malic acid	0.01	0.01	0.01
Sodium citrate	0.01	0.01	0.01
Vitamin premix	0.05	0.05	0.05
Water	96.94	96.74	97.69
total	100.00	100.00	100.00

❖ Sensory profile test result (n = 25)

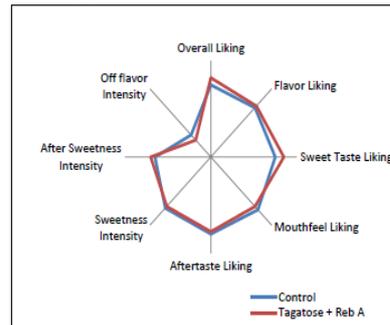


	Sweet taste	Sweet aftertaste	Bitter	Mouth feel
T + RA	7.0	7.0	3.0	7.0
X + RA	4.0	4.0	5.5	5.5
E + RA	4.0	5.0	5.0	5.0

❖ 100% Pure Fruit Drink (Grape flavor)

Ingredients	Formula (% w/w)	
	Control	Tagatose+Reb-A ¹⁾
Grape Conc.(68Brix)	16.18	16.18
HFCS	4	-
Tagatose	-	3
Reb-A	-	0.003
L-Ascorbic Acid	0.010	0.010
Citric Acid	0.140	0.140
Grape Flavor	0.100	0.100
Water	-	-
Total(g)	100	100
Sugars kcal/100 mL	12	4.5(-7.5 Down)

❖ Sensory profile test result (n = 25)



❖ Dietary fiber Drink

Ingredients	Formula (% w/w)	
	Control	Tagatose + Reb-A ¹⁾
Polydextrose	4.000	4.000
HFCS	9.100	-
Crystallized Fructose	0.650	-
Citrus Sweetner(natural)	0.004	-
Tagatose	-	5.000
Reb-A	-	0.022
Citric Acid	0.280	0.280
Trisodium Citrate	0.080	0.08
L-Ascorbic Acid	0.070	0.070
DL-Alanine	0.02	0.02
Cochineal Extract	0.003	0.003
Orange Flavor	0.12	0.12
Water	85.678	90.410
Total(g)	100	100
Sugars kcal/100 mL	30	7.5(-22.5 Down)

¹⁾ Tagatose contents: 5%

❖ Sensory profile test result (n = 25)

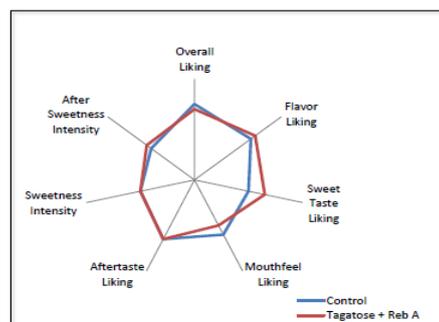


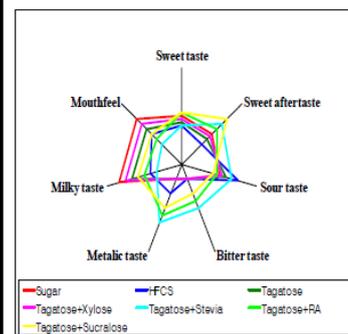
그림 2. 관능평가결과 (n=25)

- 저칼로리 음료의 적용을 위한 고감미료와 타가토스의 혼합감미제 이외에 dairy drink류 및 chocolate과 같은 confectionary에서 적용을 위한 일반당류와의 혼합 형태의 혼합감미제 유형으로 범위를 보다 확장하여 적용 평가 진행함. 그 결과 drink fermentable milk에서는 과당과의 혼합 형태보다 타가토스를 base로 한 혼합감미제가 관능특성이 보다 우수함을 확인하였음. 특히 타가토스와 자일로스의 혼합감미 형태가 매우 뛰어난 관능 특성을 나타냄을 확인함.
- 또한 chocolate 형태에서의 적용의 경우 타가토스가 고유의 풍미를 강화하는 특성을 부여함을 확인할 수 있었으며, 타가토스를 함유한 chocolate의 경우 설탕을 사용한 경우와 매우 흡사한 관능특성을 보임을 확인하였음.

♣ [Drink Fermentable Milk]

Ingredients	Sucrose	HFCS	Tagatose	Tagatose + Xylose	Tagatose + Stevia	Tagatose + RA	Tagatose + Sucralose
Raw milk	77.600	77.600	77.600	77.600	77.600	77.600	77.600
Skim milk powder	2.400	2.400	2.400	2.400	2.400	2.400	2.400
Sucrose	6.400	-	-	-	-	-	-
HFCS	-	9.200	-	-	-	-	-
Tagatose	-	-	8.000	4.000	6.000	5.000	6.000
Xylose	-	-	-	6.000	-	-	-
Stevia	-	-	-	-	0.020	-	-
RA	-	-	-	-	-	0.008	-
Sucralose	-	-	-	-	-	-	0.003
Water	13.600	10.800	12.000	11.000	14.960	14.992	14.997
Lactic acid bacteria	0.2unit/kg						
Sum	100.000	100.000	100.000	100.000	100.000	100.000	100.000

♣ Sensory profile test result (n = 25)



▪ Sweetness Profile :

- White sugar ≥ tagatose > HFCS (HFCS is mostly used in fermentable drink.)
- tagatose/xylose > tagatose > tagatose/sucralose > tagatose/RebA > tagatose/stevia

□ Tagatose chocolate

Ingredient	Sugar (%)	Tagatose (%)	Tagatose + Fructose + stevia(%)	Tagatose + Xylose + Sucralose(%)
Sugar	40.6	-	-	-
Tagatose	-	44.00	30.49	30.48
Crystalline fructose	-	-	10.00	-
Nutravia M80(stevia)	-	-	0.01	-
Xylose	-	-	-	10.00
Sucralose	-	-	-	0.02
Whole milk Powder	15.00	14.00	15.00	15.00
Skim milk powder	4.90	4.40	4.90	4.90
Cocoa butter	24.60	23.00	24.60	24.60
Cocoa mass	14.60	13.60	14.60	14.60
Lecithin.	0.60	0.60	0.60	0.60
PGPR	0.06	0.05	0.05	0.06
Vanillin	0.06	0.05	0.05	0.06
Total	100.00	100.00	100.00	100.00

□ Sensory profile test result (n = 25)

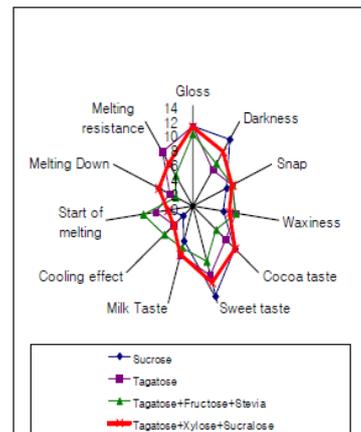


그림 3. Sensory profile test result, n=25

- 이러한 결과를 바탕으로 타가토스와 다른 감미료(고감미료, 일반당류 등)를 혼합하여 제품 유형별 관능특성을 강화할 수 있는 다양한 혼합감미 특성 연구를 지속적으로 수행하여, 타가토스의 글로벌 제품화를 위한 기초 제안 자료로 활용하고자 함.

2. 제품 유형별 레시피 개발

- 본 연구과제의 최종 목표는 글로벌 Hit 제품 출시이며, 이는 씨제이제일제당 단독으로 상품화를 포함할 뿐 아니라, 타가토스를 적용한 다양한 application 회사의 제품까지 포함함. 이에 제품 제안을 위한 개발 결과의 레시피 자료화를 지속적으로 수행하고자 함. 현재 관능특성평가를 수행한 mixed berry flavored water, 100% pure fruit drink, dietary fiber drink, drink fermentable milk, chocolate에서 확보한 결과를 바탕으로 application 제품의 기초 정보로 제공하고자 함.

Nutrition Facts	
Serving Size 1g	
Servings Per Carton 5	
Amount Per Serving	
Calories 1.5	
	% Daily Value*
Total Fat 0g	0%
Saturated Fat 0g	0%
Trans Fat 0g	0%
Cholesterol 0g	0%
Sodium 0mg	0%
Total Carbohydrate 0g	0%
Tagatose 1g	0%
Protein 0g	0%
* Percent Daily Values (DV) are based on 2,000 calorie diet.	

■ Ingredients

- Tagatose, Rebamioside A

* Tagatose

Tagatose is a low calorie functional sweetener.

- Anti-hyperglycemic, Synergistic, Non-tooth decaying

It is naturally occurring and can be found in some dairy products. Tagatose has a physical bulk similar to sucrose and has almost as relative sweetness, sweetness profile.

* Rebamioside A

Rebamioside A, also referred to as Reb A or reb A, is one of the common trisaccharide glycosides found in nature.

Reb A can be used in products such as protein powders, nutritional bars, beverages, cereals, desserts, yogurts, gum, candies, chocolates and any other product that can benefit from sweetness without extra calories.

TagaSweat I (Stevia/5Brix /1g)

- Natural Healthy Tabletop Sweetener



TagaSweat is natural low-calorie tabletop sweetener. It is made with tagatose and rebamioside A.

TagaSweat is your best choice when you drink your coffee or tea.

■ Benefits

- Low Calorie / Low GI
- Perfectly similar to sugar
- Anti-hyperglycemic effect
- Good for diabetics and Obese person

■ Tip for use

- 100% substitutive for sugar
- Flavors coffee, black tea enhancing
- Clean sweet taste

Nutrition Facts	
Serving Size 1g	
Servings Per Carton 5	
Amount Per Serving	
Calories 1.5	
	% Daily Value*
Total Fat 0g	0%
Saturated Fat 0g	0%
Trans Fat 0g	0%
Cholesterol 0g	0%
Sodium 0mg	0%
Total Carbohydrate 0g	0%
Tagatose 1g	0%
Protein 0g	0%
* Percent Daily Values (DV) are based on 2,000 calorie diet.	

■ Ingredients

- Tagatose, Sucralose

* Tagatose

Tagatose is a low calorie functional sweetener.

- Anti-hyperglycemic, Synergistic, Non-tooth decaying

It is naturally occurring and can be found in some dairy products. Tagatose has a physical bulk similar to sucrose and has almost as relative sweetness, sweetness profile.

* Sucralose

Sucralose is the high intensity non-caloric sweetener made from sugar. Relative sweetness is 600 times sweeter than sucrose and tastes like sugar. It has a clean, quickly perceptible, sweet taste that does not leave an unpleasant aftertaste. Sucralose is exceptionally heat stable, making it ideal for use in baking, cooking, pasteurization, aseptic processing and other manufacturing processes that require high temperatures.

TagaSweat II (Sucralose/5Brix /1g)

- Low calories Tabletop Sweetener



TagaSweat is natural low-calorie tabletop sweetener. It is made with tagatose and Sucralose.

TagaSweat is your best choice when you drink your coffee or tea.

■ Benefits

- Low Calorie / Low GI
- Perfectly similar to sugar
- Anti-hyperglycemic effect
- Good for diabetics and Obese person

■ Tip for use

- 100% substitutive for sugar
- Flavors coffee, black tea enhancing
- Clean sweet taste

Tagatose
- In vitamin water



Berry Mix / Lemon Vitamin Water

Berry mix / Lemon Vitamin Water is a low calorie beverage using only natural sweeteners including Tagatose and Rebaudioside A.

- Ingredients :**
 - **Berry Mix Vitamin Water**
Filtered Water, Tagatose, Berry Mix Concentration (Blueberry, Raspberry, Cranberry), Citric Acid, Berry Flavor, L-Ascorbic Acid, Rebaudioside A, Trisodium Citrate, Natural Color (Elderberry), Calcium Pantothenate, Niacin, Pyridoxine Hydrochloride, Cyanocobalamin
 - **Lemon Vitamin Water**
Filtered Water, Tagatose, Lemon Concentration Juice, Citric Acid, Lemon Lime Flavor, L-Ascorbic Acid, Rebaudioside A, Green Tea Extract, Trisodium Citrate, Calcium Pantothenate, Niacin, Pyridoxine Hydrochloride, Cyanocobalamin
- Benefits**
 - Sugarless drinks
 - Low Calorie / Low G.I.
 - Perfectly similar to sugar containing drinks
 - Anti-hyperglycemic effect
 - Good for diabetics and Obese person
- Tip for use**
 - 100% substitutive for sucrose
 - Flavor enhancing
 - Synergy effect with high-intensive sweet.
 - Masking effect for Stevia sweetener etc.

Nutrition Facts

Serving Size 8 fl oz (240 mL)
Serving Per Container about 2

Amount Per Serving		
Calories 8	Calories from Fat 0	
		% Daily Value*
Total Fat 0g		0 %
Saturated Fat 0g		0 %
Trans Fat 0g		0 %
Cholesterol 0 mg		0 %
Sodium 10mg		0 %
Total Carbohydrate 5g		2 %
Dietary fiber 0g		0 %
Sugars 5g		
Protein 0g		
Vitamin C		100 %
Niacin		10 %
Vitamin B6		10 %
Vitamin B12		10 %
Pantothenic Acid		10 %

Not a significant source Vitamin A, Calcium, Iron.
* Percent Daily Values are based on a 2,000 calorie diet.

Tagatose
- In Black Tea Beverage



Black Tea Beverage is a low calorie beverage using only natural sweeteners including Tagatose, Xylose and Rebaudioside A.

- Ingredients**
 - **Black Tea Beverage**
Filtered Water, Xylose, Tagatose, Black tea leaf (CEYLON), Lemon Juice Concentration, Black Tea Powder, Citric Acid, Artificial Flavor (Lemon, Black Tea), Rebaudioside A, L-Ascorbic Acid
- Benefits**
 - Sugarless drinks
 - Low Calorie / Low G.I.
 - Perfectly similar to sugar containing drinks
 - Anti-hyperglycemic effect
 - Good for diabetics and Obese person
- Tip for use**
 - 100% substitutive for sucrose
 - Flavor enhancing
 - Synergy effect with high-intensive sweet.
 - Masking effect for Stevia sweetener etc.

Nutrition Facts

Serving Size 8.5 fl oz (250 mL)
Serving Per Container about 1

Amount Per Serving		
Calories 45	Calories from Fat 0	
		% Daily Value*
Total Fat 0g		0 %
Saturated Fat 0g		0 %
Trans Fat 0g		0 %
Cholesterol 0 mg		0 %
Sodium 10mg		0 %
Total Carbohydrate 14g		5 %
Dietary fiber 0g		0 %
Sugars 14g		
Protein 0g		
Vitamin C		33 %

Not a significant source Vitamin A, Calcium, Iron.
* Percent Daily Values are based on a 2,000 calorie diet.

Tagatose
- In Nutrition Beverage



Vanilla Shake Nutrition Beverage

Vanilla Shake Nutrition Beverage is designed for people with diabetes using tagatose, one carbohydrate source of sweetener

- Ingredients :**
 - Water, Maltodextrin, Sodium Caseinate, Tagatose, Soy protein isolate, Canola oil, Resistant maltodextrin(FIBERSOL-2), Corn oil
- LESS THAN 1% OF:**
 - Potassium citrate, Calcium phosphate, Natural and artificial flavors, Soy lecithin, Cellulose gel, Phosphate potassium, Sodium citrate, Ascorbic acid, Magnesium chloride, Magnesium oxide, Acesulfame potassium, Gelatin, Sucralose, di-alpha-tocopheryl acetate, Zinc sulfate, Nicotinamide, Manganese sulfate, Citric acid, Vitamin A palmitate, Pyridoxine hydrochloride, Riboflavin, Folic acid, Thiamine hydrochloride
- Benefits**
 - No Sugar drinks and Low GI
 - Application to Abbott CARB STEADY®
 - Perfectly similar to sugar containing drinks
 - Anti-hyperglycemic effect
 - Good for diabetics and Obese people
- Tip for use**
 - 100% substitutive for Sucrose & Fructose
 - Flavor enhancing
 - Synergy effect with sucralose
 - Masking effect: bitterness of sweeteners

그림 4. 관능특성평가 결과를 바탕으로 최적화, 제작된 레시피 정보 예

■ 논문게재성과

게재 년도	논문명	학술지명 Vol. (No.)	주저자명	국내·외 구분	SCI 구분
2012	Draft Genome Sequence of <i>Bacillus endophyticus</i> 2102	Journal of Bacteriology 197(20)	이용직; 이상재	국외	SCI
	Draft Genome Sequence of <i>Virgibacillus halodenitrificans</i> 1806	Journal of Bacteriology 194(22)	이상재; 이용직	국외	SCI
	Homologous Alkalophilic and Acidophilic L-Arabinose Isomerases Reveal Region-Specific Contributions to the pH Dependence of Activity and Stability	Applied and Environmental Microbiology 78(24)	이상재; 이상준	국외	SCI
	Draft Genome Sequence of the Thermophilic Bacterium <i>Anoxybacillus kamchatkensis</i> G10	Journal of Bacteriology 194(23)	이상재; 이용직	국외	SCI
2013	Design and development of synthetic microbial platform cells for bioenergy	Frontiers in Microbiology 4(92)	이상준	국외	SCI
2014	Structural insights into conserved L-arabinose metabolic enzymes reveal the substrate binding site of a thermophilic L-arabinose isomerase	FEBS Letters 588	이용직	국외	SCI
	Characterization of a F280N variant of L-arabinose isomerase from <i>Geobacillus thermodenitrificans</i> identified as a d-galactose isomerase	Applied Microbiology and Biotechnology 98	김백중	국외	SCI
2015	The structural basis of substrate promiscuity in UDP-hexose 4-epimerase from the hyperthermophilic Eubacterium <i>Thermotoga maritima</i>	Archives of Biochemistry and Biophysics 585	신선미	국외	SCI
2016	Structure of the thermophilic L-Arabinose isomerase from <i>Geobacillus kaustophilus</i> reveals metal-mediated intersubunit interactions for activity and thermostability	Archives of Biochemistry and Biophysics 596	최진명; 이용직	국외	SCI

■ 특허성과

출원 년도	출원등록명	출원인	출원국가	등록· 기탁번호	출원번호
2012	유청 막 투과액 또는 유청 막 투과 분말로부터 타가토스의 제조 원료가 되는 갈락토스를 제조하는 방법	씨제이제일제당(주)	대한민국		10-2012-0006262
	낙엽송으로부터 갈락토스를 제조하는 방법 및 상기 갈락토스를 이용한 타가토스의 제조 방법	씨제이제일제당(주)	대한민국		10-2012-0080975
	발효산물 고생성능을 가지는 변이 미생물 및 이를 이용한 발효산물의 제조방법	한국생명공학연구원	대한민국		10-2012-0064525
2013	향상된 전환 활성을 가지는 L-아라비노스 이성화효소 변이체 및 이를 이용한 D-타가토스의 생산 방법	씨제이제일제당(주)	대한민국	KCCM11378P KCCM11379P KCCM11380P	10-2013-0023933 (소멸)

	유청 막 투과액 또는 유청 막 투과 분말로부터 타가토스의 제조 원료가 되는 갈락토스를 제조하는 방법	씨제이제일제당(주)	PCT		PCT/KR2013/004544
	타가토스 제조방법	씨제이제일제당(주)	대한민국	KCCM11542P KCCM11544P	10-2013-0065002 (소명)
	유청 막 투과액 또는 유청 막 투과 분말로부터 타가토스의 제조 원료가 되는 갈락토스를 제조하는 방법	씨제이제일제당(주)	아르헨티나		20130102556
	커피추출후 잔여물로부터 타가토스를 제조하는 방법	씨제이제일제당(주)	대한민국		10-2013-0147652
2014	향상된 전환 활성을 가지는 L-아라비노스 이성화효소 변이체 및 이를 이용한 D-타가토스의 생산 방법	씨제이제일제당(주)	PCT	KCCM11378P KCCM11379P KCCM11380P	PCT/KR2014/003658
	향상된 전환 활성을 가지는 L-아라비노스 이성화효소 변이체 및 이를 이용한 D-타가토스의 생산 방법	씨제이제일제당(주)	PCT	KCCM11378P KCCM11379P KCCM11380P	PCT/KR2014/003658
	타가토스 제조방법	씨제이제일제당(주)	대한민국	KCCM11542P KCCM11544P	10-2014-0067867
	타가토스 제조방법	씨제이제일제당(주)	PCT	KCCM11542P KCCM11544P	PCT/KR2014/004970
	호열균유래당에피머화효소를포함하는, 비인산핵소오스의에피머화용조성물	경북대학교 산학협력단	대한민국		10-2014-0051618
	낙엽송으로부터 갈락토스를 제조하는 방법 및 상기 갈락토스를 이용한 타가토스의 제조 방법	씨제이제일제당(주)	PCT		PCT/KR2013/006603
	유청 막 투과액 또는 유청 막 투과 분말로부터 타가토스의 제조 원료가 되는 갈락토스를 제조하는 방법	씨제이제일제당(주)	우크라이나		a201409069
	유청 막 투과액 또는 유청 막 투과 분말로부터 타가토스의 제조 원료가 되는 갈락토스를 제조하는 방법	씨제이제일제당(주)	호주		2013378056
	유청 막 투과액 또는 유청 막 투과 분말로부터 타가토스의 제조 원료가 되는 갈락토스를 제조하는 방법	씨제이제일제당(주)	미국		14/386771
	타가토스 제조용 조성물 및 과당으로부터 타가토스를 제조하는 방법	씨제이제일제당(주)	대한민국	KCCM11576P KCCM11577P KCCM11578P KCCM11579P KCCM11580P KCCM11581P KCCM11582P	10-2014-0143703
	유청 막 투과액 또는 유청 막 투과 분말로부터 타가토스의 제조 원료가 되는 갈락토스를 제조하는 방법	씨제이제일제당(주)	유럽		13882627.6
	유청 막 투과액 또는 유청 막 투과 분말로부터 타가토스의 제조 원료가 되는 갈락토스를 제조하는 방법	씨제이제일제당(주)	중국		201380023775
	호열균유래당에피머화효소를포함하는, 비인산핵소오스의에피머화용조성물	경북대학교 산학협력단	PCT		PCT/KR2014/011139
커피추출후 잔여물로부터 타가토스를 제조하는 방법	씨제이제일제당(주)	PCT		PCT/KR2014/011507	

2015	낙엽송으로부터 갈락토스를 제조하는 방법 및 상기 갈락토스를 이용한 타가토스의 제조 방법	씨제이제일제당(주)	캐나다		2879209
	낙엽송으로부터 갈락토스를 제조하는 방법 및 상기 갈락토스를 이용한 타가토스의 제조 방법	씨제이제일제당(주)	러시아		2015106220
	낙엽송으로부터 갈락토스를 제조하는 방법 및 상기 갈락토스를 이용한 타가토스의 제조 방법	씨제이제일제당(주)	유럽		13822921.6
	타가토스 제조용 조성물 및 과당으로부터 타가토스를 제조하는 방법	씨제이제일제당(주)	PCT	KCCM11576P KCCM11577P KCCM11578P KCCM11579P KCCM11580P KCCM11581P KCCM11582P	PCT/KR2015/011007
	도메인 스와핑을 통한 당전환효소 라이브러리의 제조방법 및 그의 이용	경북대학교 산학협력단	대한민국		10-2015-0108928 (소명)
	타가토스 제조방법	씨제이제일제당(주)	캐나다	KCCM11542P KCCM11544P	2912540
	타가토스 제조방법	씨제이제일제당(주)	미국	KCCM11542P KCCM11544P	14/892710
	타가토스 제조방법	씨제이제일제당(주)	브라질	KCCM11542P KCCM11544P	BR1120150299334
	타가토스 제조방법	씨제이제일제당(주)	멕시코	KCCM11542P KCCM11544P	MX/a/2015/016535
	타가토스 제조방법	씨제이제일제당(주)	중국	KCCM11542P KCCM11544P	201480031914
타가토스 제조방법	씨제이제일제당(주)	일본	KCCM11542P KCCM11544P	2016-518272	
2016	호열균유래당에피머화효소를포함하는, 비인산핵소오스의에피머화용조성물	경북대학교 산학협력단	미국		15/037,274
	호열균유래당에피머화효소를포함하는, 비인산핵소오스의에피머화용조성물	경북대학교 산학협력단	중국		201480073499.7
	호열균유래당에피머화효소를포함하는, 비인산핵소오스의에피머화용조성물	경북대학교 산학협력단	유럽		14863258.1
	아미노산 보존서열기반 도메인 스와핑을 이용한 당전환효소 라이브러리의 제조방법 및 그의 이용	경북대학교 산학협력단	대한민국		10-2016-0098138
	아미노산 보존서열기반 도메인 스와핑을 이용한 당전환효소 라이브러리의 제조방법 및 그의 이용	경북대학교 산학협력단	PCT		PCT/KR2016/008463
	타가토스 제조방법	씨제이제일제당(주)	유럽	KCCM11542P KCCM11544P	14807891.8
	커피추출후 잔여물로부터 타가토스를 제조하는 방법	씨제이제일제당(주)	미국		15/100284
	커피추출후 잔여물로부터 타가토스를 제조하는 방법	씨제이제일제당(주)	유럽		14865999.8
향상된 전환 활성을 가지는 L-아라비노스 이성화효소 변이체 및 이를 이용한 D-타가토스의 생산 방법	씨제이제일제당(주)	유럽	KCCM11378P KCCM11379P KCCM11380P	14884327.9	

	향상된 전환 활성을 가지는 L-아라비노스 이성화효소 변이체 및 이를 이용한 D-타가토스의 생산 방법	씨제이제일제당(주)	미국	KCCM11378P KCCM11379P KCCM11380P	15/112232
	전환 활성이 향상된 헥수론산 C4-에피머화 효소 변이체 및 이를 이용한 D-타가토스의 제조 방법	씨제이제일제당(주)	대한민국	KCCM11731P	10-2016-0097499
	전환 활성이 향상된 헥수론산 C4-에피머화 효소 변이체 및 이를 이용한 D-타가토스의 제조 방법	씨제이제일제당(주)	대한민국	KCCM11731P	10-2016-0097500
	전환 활성이 향상된 헥수론산 C4-에피머화 효소 변이체 및 이를 이용한 D-타가토스의 제조 방법	씨제이제일제당(주)	PCT	KCCM11731P	PCT/KR2016/008412
	향상된 전환 활성을 가지는 L-아라비노스 이성화효소 변이체 및 이를 이용한 D-타가토스의 생산 방법	씨제이제일제당(주)	러시아	KCCM11378P KCCM11379P KCCM11380P	2016135530
	향상된 전환 활성을 가지는 L-아라비노스 이성화효소 변이체 및 이를 이용한 D-타가토스의 생산 방법	씨제이제일제당(주)	중국	KCCM11378P KCCM11379P KCCM11380P	201480076842
등록 연도	출원등록명	출원인	등록국가	등록 기탁번호	등록번호
2013	발효산물 고생성능을 가지는 변이 미생물 및 이를 이용한 발효산물의 제조방법	한국생명공학연구원	대한민국		10-1464656
2014	유청 막 투과액 또는 유청 막 투과 분말로부터 타가토스의 제조 원료가 되는 갈락토스를 제조하는 방법	씨제이제일제당(주)	대한민국		10-1368731-0000
	유청 막 투과액 또는 유청 막 투과 분말로부터 타가토스의 제조 원료가 되는 갈락토스를 제조하는 방법	씨제이제일제당(주)	뉴질랜드		628831
2015	커피추출후 잔여물로부터 타가토스를 제조하는 방법	씨제이제일제당(주)	대한민국		10-1488844-0000
	타가토스 제조방법	씨제이제일제당(주)	대한민국	KCCM11542P KCCM11544P	10-1550796-0000
2016	유청 막 투과액 또는 유청 막 투과 분말로부터 타가토스의 제조 원료가 되는 갈락토스를 제조하는 방법	씨제이제일제당(주)	호주		2013378056
	발효산물 고생성능을 가지는 변이 미생물 및 이를 이용한 발효산물의 제조방법	한국생명공학연구원	미국		9441251 B2
	타가토스 제조용 조성물 및 과당으로부터 타가토스를 제조하는 방법	씨제이제일제당(주)	대한민국	KCCM11576P KCCM11577P KCCM11578P KCCM11579P KCCM11580P KCCM11581P KCCM11582P	10-1638024

4. 목표달성도 및 관련분야 기여도

		코드번호	D-06
4-1. 목표달성도			
구분 (연도)	세부연구목표	달성도 (%)	연구개발 수행내용
1차 년도	산업 부산물 및 식물계 바이오매스 자원 활용 상용화 가능 자원 발굴, 선정	100	◦산업화 가능 1차 바이오매스 라이브러리 구축 및 실질 원료 내 함량 분석, 최종 개발목표 자원 선정
	선정 자원 활용 갈락토스 및 타가토스 생산 공정 개발	100	◦탈단백 유청 활용 갈락토스 생산 추출, 분리, 정제 공정 개발 ◦낙엽송활용 갈락토스 생산 추출, 분리, 정제 공정 개발
	식품 상용당 전환 타가토스 및 갈락토스 생산 원천효소 탐색	100	◦유전체 정보 기반 sugar epimerase 관련 유전자 클로닝, 재조합 단백질 발현, 분리정제 효소의 Glc/Gal 4-epimerase 활성 보유 유전자 탐색 ◦미생물 배양, 균체 확보, 조효소액 추출, Glc/Gal 4-epimerase 활성 보유 미생물 탐색
	Glc/Fru C-4 에피머화 활성효소 종 스크리닝 및 특성연구 (미생물배양/유전체상 관련 유전자 발현)	100	◦균주 배양 및 효소 반응 최적화 ◦C4 에피머화 활성효소 종 error-prone PCR 및 활성 스크리닝
	갈락탄 분해 효소인 Galactanase를 이용한 갈락토스생산	50	◦선정 바이오매스에서 선택적 갈락토스 추출 활성효소 종 스크리닝 및 특성연구 (미생물배양/유전체의 유전자 발현, endo-/exo-galactanase /galactosidase 등)
	Cellobiose 2-epimerase를 이용한 단당 생산	100	◦cellobiose 2-epimerase를 이용하여 포도당으로부터 만노스와 과당생산
	선정 후보 효소 종의 산업적 효소개량(site-directed mutagenesis/rational design)	100	◦L-ribulose-5-phosphate 4-epimerase의 phosphate binding site와 UDP-glucose 4-epimerase 의 UDP binding site mutation
	단백질 구조기반 도메인 통합분석 및 플랫폼 구축	100	◦당전환단백질의 구조기반 도메인 분석 및 기능별 라이브러리구축을 기반한 초고속 단백질융합기술 개발
	초고속 스크리닝기술을 이용한 공정효소의 개량	100	◦공정효소(TNAI)대상 초고속 분자진화기술을 통한 고농도 기질(갈락토스)친화도 향상을 위한 효소개량
합성생물학기반 신규 당전환효소 개발	100	◦신규 당전환 (Glc/Fru C2, C4에피머화)효소의 개발을 위한 PCR-based gene screening시스템 구축 및 탐색을 통한 당전환(에피머화) 단백질 유전자 라이브러리제작	
2차 년도	선정 자원의 실질 수급 가능성 및 타당성 분석	100	낙엽송, 탈단백유청 평가 ◦러시아 낙엽송 수급 가능성 분석, 현지 원료 함량 평가, 파일럿 공정개발 결과 활용 원가 평가 ◦유럽 whey processor(24개사) 탈단백유청 수급 가능성 조사, 원료 품질 평가(선별 3개사)
	원료 추출, 분리, 정제, 파일럿 공정 개발 및 최적화	100	◦낙엽송으로부터 고순도 갈락토스를 생산하기 위한 파일럿 제조공정 최적화 수행 → 낙엽송 내 총 갈락토스의 82.7% 회수 - 아라비노갈락탄 열수추출 공정 최적화 - 아라비노갈락탄 저농도 산가수분해 최적화 - 가수분해액의 탈색, 중화, 이온정제, 농축, 결정화 - 시제품 제작 완료 (순도 99%, 백색 결정) - 공정 M/B 수립 완료 (예상 원가 산출)

	고부가가치 부산물 소재의 생산 및 활용기술 개발	100	<ul style="list-style-type: none"> 열수추출 후 잔사로부터 항산화물질 Taxifolin 추출 및 정제 조건 최적화 및 시제품 제작, 평가 - Taxifolin 추출 공정 최적화 - 흡착 수지를 이용한 선택적 분리,정제 최적화 - 시제품 제작 완료 (순도 99% 수준) - Taxifolin 기능성 (항산화, 미백) 평가
	대용량 미생물 자원 DB 및 HTS 기술 활용 목표 달성 보유 미생물 탐색	100	<ul style="list-style-type: none"> 분류학적으로 폭넓게 선별된 미생물 146속 740종에 대한 과당 → 타가토스 전환활성 평가 - 740종 건조균체 활성 평가 - 10종 Nocardia속의 배양균체 제조 및 역가평가 HTS을 위한 타가토스 정량분석법(발색법) 개발
	Genome정보 및 Metagenome자원 활용 신규 기능성 효소 탐색	100	<ul style="list-style-type: none"> 국내 토양, 해수, 담수, 갯벌로부터 수집된 1156종의 메타지놈라이브러리를 활용한 과당 → 타가토스 전환활성 평가
	분자설계기반 플랫폼 합성효소 개발	100	<ul style="list-style-type: none"> Tagatose-1,6-bisphosphate aldolase 및 fructose-, 6-bisphosphate aldolase 촉매 반응 메커니즘 기반 탐색으로 과당 → 타가토스로 전환 유전자 확보 retro-aldol cleavage 및 aldol condensation 촉매 반응 (C4-epimerization) 유사 유전체 탐색 내열성 보유 예상 유전체 14종 선정, 재조합 생산, 특성 평가 → 전환활성 보유 효소 4종 선별 D-fructose 3-epimerase 활성 부위 구조 분석 과당 → 타가토스 전환 활성에 중요한 아미노산 선정 및 치환변이주 재조합 생산, 효소 특성 평가
	최적 반응 경로 설계 및 반응공정 타당성 분석	90	<ul style="list-style-type: none"> Metabolic engineering기술을 통한 고부가가치 산물의 생합성을 위한 다유전자 클로닝 및 조합 클로닝 포도당을 시작물질로 하여 유전자 재조합 세포 반응 후 각 효소반응에 의한 단계별 생성물 정량을 통한 역가 비교
	단위 반응경로별 촉매활성 및 안전성 우수 효소 유전자 분석 및 확보	100	<ul style="list-style-type: none"> Pathway 구축을 위한 phosphoglucomutase, pyrophosphorylase, UDP-glucose 4-epimerase 유전자 선정 및 클로닝 진행 Cloning 된 유전자를 지닌 재조합 대장균 세포의 해당 유전자 발현 및 단백질 정제, 역가 비교 테스트
	Cellobiose 2-epimerase의 C1,4 에피머화반응 가능성 조사	100	<ul style="list-style-type: none"> Crystallization을 통하여 cellobiose 2-epimerase의 구조를 밝히고 catalytic domain을 C3에피머화 반응에 적합하게 적용
	최적 반응공정 구축 및 상용화 타당성 분석	100	<ul style="list-style-type: none"> Metabolic engineering설계 시 각 반응 단계별 고효율 유전자 조합을 통한 생산성 증대 생산의 현실화 및 상용화를 위해 대사경로 재조합 균주의 배양을 통한 생산성 확인, 생산성 증대 실험 수행
3차 년도	부산물 및 식물계 바이오매스 자원 활용 상용화 모델 개발	100	<ul style="list-style-type: none"> 탈단백 유청 원료 공급을 위한 해외 협력사 발굴하였으며, 협력사와의 사업모델 검토 추진 중 제조공정 시뮬레이션을 통하여, 갈락토스를 원료로 수급받을 경우 생산 효율성 및 제조가공비 수준 평가 과당원료 타가토스 제조기술 타당성 검토
	신규 에피머화 효소의 구조 결정 및 Active site- modelling을 통한 효소 활성 개량	100	<ul style="list-style-type: none"> 효소의 활성부위 구조모델 기반 선정된 개량목표부위에 포화돌연변이를 도입(saturation mutagenesis) 후 개량주를 선별하는 semi-rational 단백질 공학 기술을 이용하여 개량주 선별

			<ul style="list-style-type: none"> ◦ error-prone PCR을 이용한 무작위돌연변이 라이브러리 제작 및 대용량고속탐색법(HTS)를 이용한 개량주 선별
개발 효소의 생산균주 도입 및 발효 생산 최적화	100		<ul style="list-style-type: none"> ◦ 타가토스 생산균주로서 <i>C. glutamicum</i>을 선정하였으며, 개발효소를 암호화하는 유전자 도입을 통한 생산균주 확보 ◦ 최적 균체농도 확보를 위한 배양조건 최적화 ◦ 다양한 프로모터 도입을 통한 효소 과발현 조건 확립
LMO 효소 안전성 평가를 위한 모니터링 기법 개발	100		<ul style="list-style-type: none"> ◦ ELISA법을 활용한 단백질 검출법 개발 ◦ 개발된 발현벡터를 특이적으로 검출할 수 있는 PCR정성 검출법 디자인
최적 반응 경로 설계 및 우수 효소 유전자의 탐색	100		<ul style="list-style-type: none"> ◦ 대사공학기술을 통한 고부가가치 산물의 생합성을 위한 우수 유전자 클로닝 및 다유전자 조합 클로닝 ◦ 포도당을 시작 물질로 하여 유전자 재조합 발효 반응 후 각 효소반응에 의한 단계별 생성물 정량을 통한 역가 비교 ◦ 선정된 우수 효소를 이용한 발효 반응 진행 및 효과적인 발효반응을 위한 조건의 최적화
단위 반응경로별 촉매활성 및 안전성 우수 효소 유전자 분석 및 확보	100		<ul style="list-style-type: none"> ◦ 갈락토스 pathway 구축을 위한 3가지 효소 유전자 선정 및 클로닝 진행 (phosphoglucomutase, pyrophosphorylase, UDP-glucose 4-epimerase) ◦ Cloning 된 유전자를 지닌 재조합 대장균 세포의 해당 유전자 발현 및 단백질 정제, 역가 비교 평가
최적 반응공정 구축 및 상용화 타당성 분석	100		<ul style="list-style-type: none"> ◦ Metabolic engineering설계시 각 반응 단계별 고효율성 유전자 조합을 위한 다효소 조합 벡터의 구축 ◦ 다효소 조합 벡터를 이용한 대사공학 설계 및 생산성 증대 ◦ 생산의 현실화 및 상용화를 위해 대사경로 재조합 균주의 배양을 통한 생산성 확인, 기타 조건의 최적화를 통한 생산성 증대 실험 수행
반응 효소 연쇄 반응	90		<ul style="list-style-type: none"> ◦ 포도당, 과당에서 타가토스로 변환하는 반응 경로 구축 ◦ 관여 효소인 hexokinase, G6-P isomerase, F6-P 4-epimerase, phytase의 후보군 선정 및 클로닝 진행 ◦ 관련 효소 발현 확인 및 역가 확인 ◦ One-pot reaction 을 이용한 연쇄반응 유도 및 반응 산물 타가토스 생성 ◦ 과당 → 타가토스 전환 활성에 중요한 아미노산 선정 및 치환변이주 재조합 생산, 효소 특성 평가
단백질 구조기반 도메인 분석 및 플랫폼 표준화 구축을 통한 공정효소 개량	100		<ul style="list-style-type: none"> ◦ 아미노산 보존서열을 이용한 semi-rational 단백질공학기술을 활용하여 제작한 smart chimeric L-arabinose isomerase library의 물리·화학적 특성연구를 통한 기능부위·도메인 규명 및 L-arabinose isomerase적용부위 최종 결정 -제작된 chimeric L-arabinose isomerase library의 물리화학적 특성(온도, pH 등)연구 및 도메인 분석을 완료하여, 구조기반 단백질 개량을 위한 효소의 기능요소별 구조 모듈화(modularity)를 통한 맞춤형 합성효소 제작을 위한 표준화 작업 - 현재 타가토스 생산공정에 사용되는 TNAI효소의 갈락토스 친화도가 향상된 개량효소를 얻기 위하여 분자진화기술을 활용하여 야생형대비 3배 이상 친화도가 개량된 공정효소 확보

	신규 에피머화 효소발굴 및 개량효소의 특성 연구	100	<ul style="list-style-type: none"> ○ 신규 당전환효소를 나타내는 4-에피머화 효소의 발굴, 발현, 정제 및 생물리·화학적 특성조사 ○ 신규 non-phosphate sugar epimerase 활성을 나타내는 4-에피머화효소 (putative <i>Thermotoga maritima</i> UDP-glucose 4-epimerase)의 X-ray crystallography를 이용한 3D-구조 결정 ○ 분자진화기술을 기반으로 개량된 에피머화 효소의 물리화학적 특성조사
	신규 초고속 당전환효소 탐색법 개발	100	<ul style="list-style-type: none"> ○ 당전환효소의 초고속 탐색이 불가능한 기존 황산법을 대체할 cell-based assay(growth-associated screening) system을 활용한 신규 초고속 당전환효소 탐색법 개발 -초고속 탐색을 위해 갈락토스 자화능이 없는 숙주세포에 유일 탄소원으로 갈락토스 첨가 시 (초)고온성 L-arabinose isomerase library의 발현을 통해 전환된 타가토스만을 자화할 수 있는 균주를 개발 -개발된 고온효소(TNAI & TMAI) 변이주 라이브러리의 선별 host로 사용하기 위한 신규 고온성 L-arabinose isomerase 탐색균주개발
4차 년도	부산물 원료 활용 제조기술 최적화	100	<ul style="list-style-type: none"> ○ 타겟 원료 탈단백 유형의 최종 선정 및 제조공정 최적화 완료 ○ 원료 수급성을 위한 해외 생산모델 구축을 위한 해외 선진사와의 협력 연구 추진
	신규 에피머화효소의 결정 기반 단백질 구조 분석 (위탁연구)	100	○ D-fructose 4-epimerase의 단백질 3차 구조 최초규명
	신규 에피머화효소 개량	100	<ul style="list-style-type: none"> ○ DNA shuffling ○ 단백질 3차 구조를 이용한 효소 개량
	과당 유래 타가토스 제조기술 단위공정별 최적화	100	<ul style="list-style-type: none"> ○ 개량된 에피머화효소의 대장균 도입 및 반응 특성 평가 ○ 분리·정제 단위공정별 조건평가 및 최적공정 balance산출, 예상 제조원가 수준 평가 ○ 추가 개량된 에피머화 효소의 <i>Corynebacterium</i> 균주 도입을 위한 연구
	효소 인허가 연구	100	<ul style="list-style-type: none"> ○ 인체위해성 평가, 효소 대량 정제 및 기초독성 평가 ○ 인체위해성 평가, 균주 자체의 LD50 독성 평가 ○ 인체위해성 평가, 균주 내 플라스미드의 안정성 여부 평가 ○ 환경위해성 평가, 균주 유래 플라스미드의 환경미생물로의 전달 유무 평가 ○ 제품 안전성 평가(고도정제품), 분리·정제 공정 단계별 진행 및 공정액 내 GM물질 제거 여부 평가
	복합감미제 포물러 개발	100	<ul style="list-style-type: none"> ○ 타가토스와 천연고감미료 Reb A의 혼합감미 특성 평가 및 최적 혼합 비율 선정 ○ 개발 복합감미제와 기존 고감미료(Truvia, Splenda)와의 감미 우수성(bitter taste 중심) 평가
	UDP-galactose 대사를 활용한 glucose로부터 UDP-galactose 및 갈락토스, 타가토스의 단계적 생산	100	<ul style="list-style-type: none"> ○ 갈락토스생산을 위한 반응 경로에 사용되는 효소 phosphoglucomutase, pyrophosphorylase, UDP-glucose 4-epimerase 유전자 선정 및 클로닝 진행 ○ 구축된 벡터를 통한 발효 반응 과 이에 소모되는 조효소 및 cofactor의 효과적 공급방법의 탐색

			<ul style="list-style-type: none"> ○ 효과적인 발효를 목표로 차단 가능한 겉가지 경로의 탐색 및 관련 효소의 결실 탐색진행 ○ 발효 반응에 의한 UDP-sugar 및 갈락토스, 타가토스의 단계적 생산 및 반응 공정의 최적화 진행
	최적 반응경로설계 및 반응 단위 경로별 촉매활성 확인 및 우수 효소 유전자 확보	100	<ul style="list-style-type: none"> ○ 재조합 유전자의 박테리아 유래별 단백질 정제 및 역가 비교 및 우수효소 확보 ○ 선발된 각 단계별 우수효소를 이용한 one-vector/multi-gene system 구축 ○ Metabolic engineering 기술을 통한 고부가가치 산물의 생합성을 위한 우수 유전자 클로닝 및 다유전자 조합 클로닝 ○ 포도당을 시작물질로 유전자 재조합 발효 반응 후 각 효소반응에 의한 단계별 생성물 정량을 통한 역가 비교 ○ 선정된 우수 효소를 이용한 발효반응 진행 및 조건 최적화
	타가토스 생산 효소의 특성 규명 및 효소 활성 개량	100	<ul style="list-style-type: none"> ○ 갈락토스로부터 타가토스로 전환하는 효소의 활성 및 반응법 개량을 통한 생산 최적화
	최적 반응공정 구축 및 상용화 타당성 분석	100	<ul style="list-style-type: none"> ○ 포도당과 과당으로 시작하여 타가토스를 생산하는 신규 대사 경로 개발하고 대사공학적 pathway 설계 시 각 반응 단계별 고효율 유전자 조합을 위한 다효소 조합 벡터의 구축, 이를 통한 생산성 증대 ○ 생산의 효율화 및 상용화를 위하여 대사경로 재조합균주의 배양을 통한 생산성 확인
	신규 에피머화 효소의 단백질 공학기술을 활용한 효소 활성 및 기질 친화도 증가	100	<ul style="list-style-type: none"> ○ 신규 당전환효소 활성을 나타내는 4-에피머화 효소(UxaE 및 GalE)의 단백질 3차 구조 규명 ○ 구조기반 물리화학적 특성 및 기질결합부위 규명을 통한 신규 에피머화효소의 개량부위 결정 ○ 단백질 공학기술을 활용한 신규 에피머화효소의 활성, 열안정성 및 기질 친화도 증가
	초고속 당전환효소 탐색법 개발 및 효소 활성 개량	100	<ul style="list-style-type: none"> ○ 기존 당전환 효소의 라이브러리 탐색법을 대체할 수 있는 초고속 <i>in vivo</i> (growth-associated) 플랫폼 호스트 균주 개발 ○ 신규 초고속 당전환 활성 탐색법을 활용한 고온성 공정효소 ○ 돌연변이 라이브러리제작 및 개량방법 구축
5차 년도	효소 인허가 연구	100	<ul style="list-style-type: none"> ○ 인체위해성 평가, 균주 내 플라스미드의 안정성 여부 평가 완료 ○ 식약처 LMO인허가 서류 접수 완료
	포도당, 과당으로부터 타가토스를 생산하는 신규 대사경로 개발	100	<ul style="list-style-type: none"> ○ tagatose 6-phosphate 생산을 위한 knock out 균주 도입하여 과당으로부터 tagatose 6-phosphate 생산성 비교평가
	최적 반응공정 구축 및 상용화 타당성 분석	100	<ul style="list-style-type: none"> ○ dual stage fermentation process 개발 및 최적화 ○ 타가토스의 세포 외 수송을 위한 수송단백질 적용평가
	타가토스 생산을 위한 공정 효소 개량	100	<ul style="list-style-type: none"> ○ 구조기반 기능도메인 분석을 바탕으로 밝혀낸 온도 및 pH 개량 부위를 내열성 공정효소(L-arabinose isomerase)에 적용을 통한 개량효소의 생산수를 비교
	고온성 공정효소개발을 위한 세포성장기반 초고속 당전환효소 탐색법 개발	100	<ul style="list-style-type: none"> ○ 고온성 당전환효소 개량을 위한 세포성장기반 초고속 효소 탐색법 개발

4-2. 관련분야 기여도

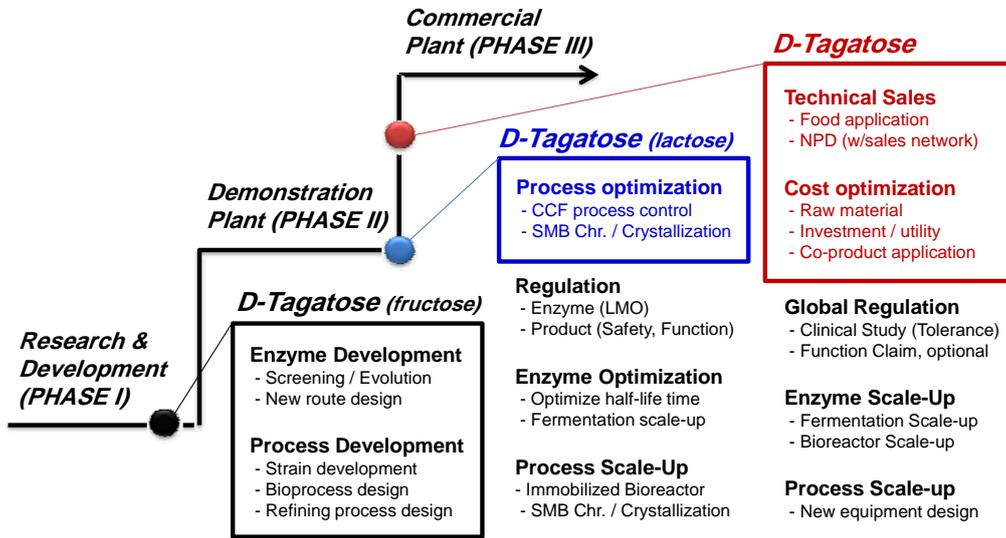
- 식품가용 부산물 및 식물계 바이오매스를 활용한 타가토스 생산 공정 개발을 통하여 기존보다 낮은 원가로 타가토스를 제조할 수 있는 기반기술을 확보하였으며, 글로벌 기업과의 협력관계를 구축함으로써 타가토스의 글로벌 상품화의 초석을 마련하였음.
- 범용원료인 포도당이나 과당을 원료물질로 하여 타가토스를 제조할 수 있는 효소 및 발효공정을 최초로 제안하였으며, 관련된 효소기술을 자산화 하였음.

5. 연구결과의 활용계획

코드번호 D-07

○ 단계별 양산화 기술개발로 타가토스 기술 양산

: 유당-타가토스로 시장을 개척하고, 과당-타가토스로 기술 상용화하겠음.



○ 신감미료 신규 통합브랜드를 통하여 타가토스에 대한 소비자 제품 인지도를 높이고자 함.

: 씨제이제일제당의 기능성 감미료 통합브랜드 ‘스위트리’ 런칭 (자일로스 설탕, 타가토스, 타가토스 설탕블렌드, 알룰로스, 알룰로스 설탕블렌드, 알룰로스(액상), 알룰로스 올리고당, 결정과당)

브랜드	CI(신규)			
제품명	알룰로스	타가토스	알룰로스 설탕블렌드	타가토스 설탕블렌드
이미지				

6. 연구과정에서 수집한 해외과학기술정보

코드번호	D-08
<p>○ 덴마크의 Arla Foods社가 제품을 2000년 상용화 하였으나, 화학적 생산 공법의 한계로 인해 품질 및 제조원가의 문제로 2006년 사업을 중단하였고, 이후로 벨기에 Nutrilab社는 화학적 공법의 단점을 개선한 효소적 공법을 이용하여 제품 사업화를 계획, 실현할 것이라 공표하였음. 최근 보도에 따르면, Nutrilab社는 이탈리아 소재의 유청 처리업체와 전략적 협력모델을 구축할 것이라 발표하였음.</p> <p>○ 현재 타가토스를 상용화할 수 있는 유일한 원료인 유당(lactose)은 국외에서 생산되는 원료에 전적으로 의존하는 실정임. 국제 시장에서의 원유(原乳) 및 유당의 생산량, 수요, 공급량 등에 따른 불안정하고 유동적인 유당 가격은 지속적인 사업 안정성의 리스크로 평가되고 있음. 실제 평균 유당 시세가 2010년도 약 850원/kg → 2012년도 약 1,800원/kg → 2013년도 약 1,600 원/kg → 2014년 현재 약 1,300 원/kg 수준으로 가격의 변동폭이 매우 큼. 이에, 저가 안정화된 permeate)을 원료로 유청단백(whey protein)과 탈단백 유청(whey permeate)을 제조하는 글로벌 제조업체의 수익 구조에도 영향을 주고 있으므로, 탈단백 유청(whey permeate)를 이용하여 제조하는 새로운 고부가가치 소재사업에 대한 관심이 높아지고 있음.</p> <p>○ 세계보건기구(WHO)가 당 섭취에 따른 질병(비만) 우려에 따라 일일 당 섭취량을 기존 일일 50g에서 25g으로 낮출 것을 권고하였으며, 선진국을 중심으로 정부 주도하에 다양한 당류 섭취량을 줄이기 위한 정책이 활발히 논의 중에 있음[9]. 또한, 미국을 중심으로 비만·당뇨 우려에 따른 고과당(High Fructose Corn Syrup) 시장은 연평균 20만톤 수준으로 지속 감소. 미국 고과당 시장은 2001년부터 감소 추세에 있고, 2030년에는 전체의 30% 까지 감소될 것으로 예상되며, 이를 대체하기 위한 새로운 대체감미료 소재의 잠재 시장은 최소 1조원 규모로 성장할 것으로 전망되고 있음[10].</p> <p>○ 국제적으로도 당류 저감화 트렌드는 권고 형태를 벗어나 구체적인 세금 규제화(첨가당 함유 음료에 경고 문구 및 Sugar Tax 부과 등)를 통한 적극적인 정책 입안으로까지 발전 중이어서 향후 지속적으로 강화될 것으로 전망(표 1). 이러한 정부 주도의 당류 저감화 정책에 대하여 미국 대형 음료회사들은 2025년까지 음료 제품 내 칼로리를 20%까지 점진적으로 줄여나갈 것을 선언. 이에 따라 기존의 설탕·고과당과 가까운 맛을 구현할 수 있는 대체감미료 소재에 대한 지속적인 관심이 증가하고 있으며, 이는 하나의 큰 트렌드로 자리 잡고 있음. 이에 타가토스는 1.5kcal/g의 열량을 가지는 저칼로리 기능성 당류대체 소재로 그 가능성이 매우 큼.</p>	

표 1. 국가별 설탕관련 세금

국가	지역	규제명	일자	규제내용
WHO		WHO Guidelines on Sugar Intake as Finalized in March 2015	15년	· 첨가당 섭취비율을 칼로리 섭취량의 10% 이하로 저감 권고 · 칼로리 섭취량의 5% 이하로 저감할 경우 추가적 health benefit이 있다고 제시
미국		Dietary Guidelines Advisory Committee (DGAC) Recommendations Released during early 2015 (US)	15년	· 2015 Dietary Guidelines for Americans(미국인 식생활 지침)에 포함될 내용임 · 칼로리 섭취량의 10% 이하로 첨가당 섭취 저감 권고 · 첨가당 섭취 저감을 통해 비만, 당뇨, 충치 방지 가능할 것으로 예상
		Sugar-Sweetened Beverages Tax Act of 2014	15년	· 음료내 첨가당 1티스푼(4.2g)당 \$0.01 세금 부과 * 콜라 1캔(355ml)내 첨가당 39g 가정시 \$0.09 Tax 부과 · 현재 보건부가위원회 검토중
미국	버클리	Berkeley Tax on Sugar-sweetened Beverages (Berkeley, California, US)	14년	· Sugar가 첨가된 음료내 1온스당 \$0.01 세금 부과 · 75% 찬성으로 법안 가결됨(14년 11월) * 콜라 1캔(12온스, 355ml)당 \$0.12 Tax 부과 · 1온스 당 2칼로리 이하는 면세 대상에 포함(기준 음료 온스 당 13칼로리)
	버몬트	Vermont Tax on Sweetened Beverages (Vermont, US)	15년	· 첨가당 함유 Soft drink에 판매 금액기준 6% 주판매세 부과 (15년 7월 시행, 천연/저칼로리 감미료 사용했어도 부과) · 주판매세가 식품에 부과된 첫 사례
	샌프란시스코	San Francisco Proposed Warning Label (San Francisco, California, US)	15년	· 샌프란시스코 첨가당의 옥외광고판에 경고 문구 표시 ("첨가당 함유 음료는 비만, 당뇨, 충치의 원인이 됨") · 샌프란시스코 감리 위원회 승인(15년 6월)
	필라델피아	Sugar Tax (Philadelphia, Pennsylvania, US)	16년	· Sugar가 첨가된 음료내 1온스(28.35g)당 30cent 세금 부과 고려
멕시코		Mexico Tax on Sugar-sweetened Beverages Enacted in January 2014	14년	· 첨가당 함유 음료 리터당 \$0.07 세금 부과(14년 1월 제정) → 세금부과 음료 판매 전년대비 평균 6% 감소(세금이 소비자에게 부과) * 콜라 1캔(12온스, 355ml)당 \$0.025 Tax 부과
영국		Sugar Tax	16년	· 런던 시장 시행 내 카페 음료에 10% Sugar Tax 과세 추진 (2016년 1월 발표, 판매 금액 기준) · 보건복지부 영국 장관 병원내 카페 음료 20% Sugar Tax 과세 2020년 도입(2016년 1월 발표) * 영국은 4개의 보건 복지부가 있는데 1개 복지부에서만 시행 · 탄산 음료회사 주주들이 새로운 재무장관의 Tax 발표에 따라 큰 타격을 입고 있음 * Britvic(영국내 펄시와 로빈슨 음료를 제조하는 회사) 추가 3% 하락, TFL 추가 2% 하락 · 당류 저감 제품 재배합 유예기간 2년, 2018년에는 생과일주스(Pure Fruit Juice), 유제품 (Milk-based drink), 소형 음료업체 제품을 제외한 나머지 음료 과세 적용 - 당 함유 5g/100ml 초과 제품에 1리터 음료당 18p(304원)과세, 8g/100ml 초과 제품은 1리터 당 24p(401원) 과세 예상
캐나다		Canada Proposed Changes to the Nutrition Facts Table (www.healthycanadians.gc.ca)		· 첨가당 함량을 별도 표기하는 안은 기각되었으나, 영양성분표시에 일일권고섭취량비율 함량 표기
루마니아		Junk-food tax	10년	· 고당, 나트륨, 지방이 함유된 식품에 24%의 과세 * 그러나, 2015년에 과세 9%로 낮춤
핀란드		Sweet Tax	11년	· 1999년까지 존재한 Sweet Tax(95cents/kg) 부활 (초코릿, 시탕, 코코아, 아이스크림 등 간식류) · 기존 음료과세 4.5cents에서 7.5cent로 증가
프랑스		Sugar-sweetened drinks tax	11년	· 1euro cent 과세에 따라서, 제품의 10% 가격 증가 · 인공감미료에 관해 €7.16/hectolitre 과세 추진중
스페인		Sugar Tax	11년	· 학교내에서 높은 설탕, 소금, 지방 등을 함유하는 식음료 판매 규제
인도		Sugar Tax	14년	· Sugary 탄산음료에 5% 특별세 부과
인도네시아		Sugar Tax		· 과거 Tax를 음료에 부과하였으나, 로컬 음료 및 설탕 회사 압력으로 2004년 해제 · 정부에서 탄산음료 소비량을 조절 목적으로 리터당 1,000 ~ 5,000루피 세금 부과 * 만약 탄산음료 리터당 3,000루피(31cent) 세금 부과면 연간 72.4% 손실 추정
필리핀		Sugar Tax		· Sugar가 첨가된 음료에 리터당 10페소(210cent) 세금을 부과
남아프리카		Sugar Tax	16년	· 2016년 예산 연설에서 재무장관은 설탕 첨가 음료에 Tax 부과하는 계획을 발표함 · "과도한 설탕 섭취를 줄이기" 위해 2017년 4월 1일에 Tax를 소개 예정임 · 정부에서는 일일음 수익이 증가할지 언급하지 않았으나, M&G에서는 당류가 첨가된 음료에 20% Tax 부과는 70억랜드/년(0.5조원) 추가 수익을 가져올 수 있다고 보도
태국		Sugar tax to be proposed to cabinet	16년	MNSA(National Reform Steering Assembly) 태국의 국회에서 찬성 153, 반대 2, 기권6표로 설탕세 검토안 가결. 이후 프로세스는 Cabinet 에 의해 최종 결정 예정 - 타이인들의 당 저감화를 위한 설탕세 검토 - 설탕세 부과 항목으로는 탄산음료, 녹차, 커피, 에너지드링크, 우유, 두유, 주스 - 음료 100ml 당 6g-10g 함유 시 2%, 10g 이상 함유 시 25% 소비자가격 증가 - 과세 적용시 3,250억원 세금수익 예상

7. 연구개발결과의 보안등급

	코드번호	D-09
<p>최근 전 세계적으로 당류 저감화 정책이 활성화되고 있으며, 본 연구 주관기관의 선행적 기술 상용화 사례 (알룰로스)로 타가토스 제조 신기술에 대한 경쟁사의 기술 도용 및 개량 등에 대한 정보보안 리스크가 높다고 판단되어, 본 연구개발 결과 보고서 및 구체적인 실적은 비공개로 유지되어야 함.</p>		
<p>○ 대표적인 기능성 희소당으로는 알룰로스, 타가토스가 있으며, 과제의 시작 시점인 2011년도에는 두 개의 소재 모두 상용화 사례가 없었음. 그러나 본 과제의 수행 과정 중 주관기관이 주도적으로 유사 기능성당 제품인 알룰로스를 국내 및 미국에서 출시하여, 유사 경쟁사의 당사 기술에 대한 관심도가 높아졌음. 특히 당사의 알룰로스 제품 상용화 시점 이후에 다양한 국내·외 기업의 기술 개발 및 상용화 시도가 급증하고 있음. 그 실례로 삼양사, 대상, Tate & Lyle, Matsutani 등이 공식적으로 희소당 제품에 대한 개발 및 제품 출시를 선언했으며, 대체감미료 글로벌 업체인 Roquette, ADM 등은 잠재경쟁사로 제품 개발을 위한 본격적인 연구개발을 추진하고 있음.</p>		
<p>○ 타가토스는 알룰로스와 같이 제품화할 경우, 그 제품의 판매 시너지가 매우 높다고 평가되고 있어, 타가토스의 기술적 허들인 제조경쟁력(원가)을 높일 수 있는 원천기술에 대한 경쟁이 심화되고 있음. 따라서 새로운 메커니즘의 효소를 활용한 제조 신기술의 연구 성과는 높은 수준의 정보보안으로 관리되어야 타당함.</p>		

8. 국가과학기술종합정보시스템에 등록된 연구시설·장비 현황

					코드번호		D-10	
구입 기관	연구시설/ 연구장비명	규격 (모델명)	수량	구입 연월일	구입 가격 (천원)	구입처 (전화번호)	비고 (설치 장소)	NTIS장비 등록번호
해당없음								

9. 연구개발과제 수행에 따른 연구실 등의 안전조치 이행실적

코드번호	D-11
------	------

9-1. 씨제이제일제당

I. 씨제일제일제당 안전조치 이행계획

가. 연간 업무 계획

1. 통합연구소의 연간 안전보건경영계획에 의거, 각 연구소 안전스텝 및 라인부서는 다음 각 호에 정한 연간 업무계획을 수립, 시행하여야 한다.
 - 1) 안전보건관리 방침 및 목표 설정
 - 2) 안전보건관계 예산책정
 - 3) 화재 및 각종 재해의 예방 또는 감소대책
 - 4) 안전보건시설 및 소방시설의 보완 계획
 - 5) 안전보건교육 및 훈련계획
 - 6) 무재해운동의 추진계획
 - 7) 기타 안전보건활동의 세부추진계획
2. 연구소의 안전스텝 및 라인부서는 제1항에 정한 계획을 안전관리자와 사전 협의하여 작성하고, 작성된 계획의 설명회(발표)를 년1회 이상 개최한다.

[방침 및 목표관리지침]

대상	교육시간	비고
1) 전 사원	6hr ↑/분기	-매 분기별 집합교육 실시(6시간)
2) 관리감독자	16hr ↑/년	-외부전문위탁 원칙(안전환경유지자 포함, 웹+집합교육)
3) 신, 전일사원	배치前 8hr ↑	-입사 2년차가 되기까지 반기 2hr ↑ 재교육 실시
4) 공정 변경자	배치前 2hr ↑	-변경부분에 대한 위험요소 교육 실시
5) 유해위험취급 작업	16hr ↑ (최초) 그 외 2시간/반기	-관계법에서 정한 유해위험작업에 종사하는 자 (특별관리물질 취급자 등_외부위탁 포함)

나. 안전 보건 평가

1. 운영팀은 각 연구소의 관리목표를 책임 달성토록 하기 위해 목표 대 실적을 평가하여, 각 연구소 업적에 반영할 수 있다
2. 각 연구소 관리감독자 및 안전스텝, 안전유지자는 연간 업무계획에 반영하여야 하며 기타 운영 사항은 「성과측정관리 지침」에 따른다.

다. 교육 훈련

1. 사업장은 다음의 내용을 감안하여 교육·훈련계획을 수립, 이행하여야 한다.

교육명	교육시간	교육방법	비고
정기안전보건교육	6HR/분기	- 전 사원 집합교육(안전/보건관리자 주관, 외부강사 초빙_1회/년) - 분기별 안전보건교육의 날 지정(3, 6, 9, 11월_시간 별도 지정) - 미 이수자 패널티 부여 및 재교육 실시	결과보고
관리감독자교육 (연구실책임자)	16HR/년	- 외부 위탁교육(외부 집체+월교육_4월) - 센터장, 팀장, 연구실안전관리담당자 必 이수	이수증 必
신규사원 교육	8HR/발생시	- 교육 이수 후 각 실험실 배치 및 특수 건강검진 실시	결과보고
MSDS교육 (특별교육)	1HR/발생시	- 연구실 자체 교육 실시(관리감독자&안전관리담당자) - 신규 및 전환 배치 시 & 신규 화학물질 도입된 경우 실시	결과보고
유해위험취급 작업(특별교육)	16HR (최초 배치 시)	- 관계법에서 정한 유해위험작업에 종사하는 자 (특별관리물질 취급자_외부위탁&월교육)	이수증 必
합동소방훈련	1회/년	- 훈련시나리오에 의한 종합 소방훈련(11월) - 관할 소방서 연계 민관 합동훈련	결과보고
피난대피훈련	3회/년	- 화재 및 비상사태 대비 피난대피(4, 6, 9월) - 초기화재 및 유독물질 유출 대비 비상대응훈련	결과보고

2. 기타 교육·훈련과목 및 내용에 대한 세부사항은 통합연구소 「교육 및 훈련관리지침」 및 「그룹 산업안전 기본지침」을 따른다.

라. 안전 점검

관련 법령 및 전사 규정의거 다음 각 호와 같은 내용의 점검계획을 수립, 시행하여야 한다.

1. 점검자 및 점검실시 빈도는 다음에 의한다.

점검명	점검자	점검회수	비고
그룹 안전의 날	CEO 및 주요 경영진 (매월 첫째 주 화요일)	월 1회	지주사 보고
환경안전 점검의 날	안전보건관리 책임자, 팀 및 파트 책임자 관리감독자, 안전스텝(매주 화)	매주 1회	자체
계절이슈 점검	안전스텝, 팀 및 파트 책임자 육안점검 (풍수해, 하절기, 동절기)	분기 1회 이상	자체
정기점검	안전점검기기를 이용한 세부적인 점검	매년 1회	법정
정밀안전진단	안전점검기기를 이용한 세부적인 점검	2년 1회	법정
일상점검	관리감독자	매주 1회 이상	자체
	심험실 담당자 및 안전유지자 육안점검	매일 1회 이상	법정

2. 점검 내용에는 다음 사항을 포함하여야 한다.

- 1) 업무계획의 추진실적 및 안전지표 추진사항
- 2) 제3장에서 정한 업무분장 내용의 이행여부
- 3) 소방시설의 유지관리 상태
- 4) 안전보건관계 시설의 유지관리 및 보호구의 착용여부
- 5) 불안정한 행동 및 작업환경
- 6) 안전관계 규정, 기준, 표준, 수칙 등의 숙지도 및 이행여부

3. 점검방법은 점검기준 및 체크리스트에 의해 점검을 원칙으로 하고, 그 결과를 기록 유지하여, 관리계획에 반영하여야 한다.

4. 각 점검자가 점검한 결과는 스텝부서에 보고하고, 해당 부서장에게 시정지시서를

통보하여야 한다.

5. 시정 지시서를 접수 한 해당 센터(팀)장은 원인을 규명, 근원적인 재발방지 대책을 수립, 조속히 시행하여야 한다.
6. 기타 안전점검 관련 세부사항은 「그룹 산업안전 기본지침」 및 자체 「실험실안전관리 및 점검지침」을 따른다.

라. 연구소 사고유형(상황)별 행동절차 수립

구분	사고유형	사고 상황(예)	비고
화학	<ul style="list-style-type: none"> ✓ 화학물질 누출 및 접촉 ✓ 화학물질 화재·폭발 및 화상 	<ul style="list-style-type: none"> ▶ 시약병(황산 등)이 바닥에 떨어져 파손되어 바닥에 누출된 상태 ▶ 유기화합물(톨루엔 등) 용기 내 압력 증가로 용기 파열되어 화재 발생 ▶ 폐액 용기를 운반하는 중 폐액 용기 파열로 운반자 화상사고 발생 	
가스	<ul style="list-style-type: none"> ✓ 가연성 가스누출 및 폭발 ✓ 독성가스 누출 	<ul style="list-style-type: none"> ▶ 분석장비의 가스배관 이음부에서 가연성가스(수소 등)누출되는 상태 ▶ 독성가스(암모니아 등) 사용 실험실 내 누출로 경보음 작동 	
전기	<ul style="list-style-type: none"> ✓ 감전 ✓ 전기화재 	<ul style="list-style-type: none"> ▶ 누전차단기의 작동 불량인 상태에서 절연불량의 전기기기(or 전선피복의 노출부) 접촉으로 감전 ▶ 많은 플러그가 꽂혀 있어 정격용량을 초과하여 멀티콘센트 과열 화재 	
생물 (LMO)	<ul style="list-style-type: none"> ✓ 병원성 물질 유출(병원체) 	<ul style="list-style-type: none"> ▶ 병원체, 유전자변형생물체의 유출로 인한 감염 발생 	
기계	<ul style="list-style-type: none"> ✓ 실험기기의 끼임 및 절단 등 	<ul style="list-style-type: none"> ▶ 실험기기를 이용한 실험 중 기기에 신체의 끼임, 물림, 접촉 등에 의한 안전사고 발생 	
기타	<ul style="list-style-type: none"> ✓ 상처 및 출혈 ✓ 유해광선 접촉 	<ul style="list-style-type: none"> ▶ 비이커 운반 및 세척 중 깨짐으로 인한 베임, 실험기기와의 충돌 및 낙하에 의한 상처 발생 ▶ 방사선 등 유해광선에 의한 시력 및 인체 장애 발생 	

9-2. 건국대학교

연구실정보 [분자효소공학실험실2 중앙실험실]

기본정보

연구실명	분자효소공학실험실2 중앙실험실	호실	208
소속	교학부총장실>대학>생명특성화대학		
건물명	입학정보관	층정보	지상 2 층
용도	학부생/대학원생 교과과정 실험실습실	분류	생명·생물
전화번호	010-9436-3767	코드	208

특성정보

정기점검	대상	정밀안전진단	대상	건강검진	대상	
방사성	취급	LMO	미취급	L M O 등급 -	유해인자 	0개
유해 . 위험성 	건강유해성					
	인화성					
	불안정성/반응성					
	특수위험성					
주요연구내용			중앙실험실			

연구실 안전조치 이행계획

※ 연구실 안전조치 이행계획(해당 연구실 안전점검 및 정밀안전진단실시, 참여연구원의 교육훈련 및 건강검진실시, 보험가입 등) 및 기타 당해 국가연구개발사업 수행 시 필요한 연구실안전 확보 계획 등을 기술함

※ 학교에서 실시하고 있는 연구실 안전조치 관련 현황 및 계획을 요약한 자료입니다. 해당 연구실별로 내용을 편집하여 기술하시기 바랍니다. 추가적인 내용은 건국대학교 관재처/설비안전팀 홈페이지(<http://safety.konkuk.ac.kr>)에서 확인 가능합니다.

1. 연구실 안전 점검 체계 및 실시

1) 실험실 안전 점검

위험등급	점검주기	분류 기준
A등급	분기 1회	가연성가스, 인화성 시약, 유해화학물질, 다량의 폐액배출, 독극물, 생물 및 동물의 취급, 방사성 동위원소, 위험성이 높은 기계장비가 설치된 실험실
B등급	반기 1회	일반시약, 소규모 인화성 시약, 불연성가스, 소량의 폐수발생 실험실
C등급	연 1회	이화학실험을 수행하지 않는 전기, 설계, 컴퓨터 관련 실험실

2) 실험실 정밀안전진단 실시

실험실안전관리규정에 의거 실험실의 위험정도에 따라, A,B,C로 관리등급을 분류하여, 실험실환경안전점검을 실시하고 있으며, 안전점검실시 결과 실험실의 재해예방과 안전성 확보 등을 위하여 필요하다고 인정되는 경우에는 전무기관에 의뢰하여 정밀 안전진단을 실시함.

2. 교육 훈련

1) 관련근거 : 연구실 안전환경 조성에 관한 법령 제 18조, 동법 시행령 제 17조 및 동법 시행규칙 제 9조 실험실 안전관리 규정 제 16조(안전교육), 제 17조(안전교육의 관리)

2) 교육대상 : 실험실을 출입하는 모든 이용자 (교수, 대학원생, 실험조교, 전문직원, 소속연구원, 실험참여 학부생 및 업체직원 등)

3) 안전교육 시간 및 수료인정기간

- 출입하는 실험실의 위험등급(A,B,C등급) 및 전공특성에 따라 안전교육을 받아야 하며, 1년에 8 시간 이상 교육이수 필수

- 수료인정기간은 수료증의 수료인정기간 까지(유효기간이 지나면 재교육 이수)

4) 안전교육 과정

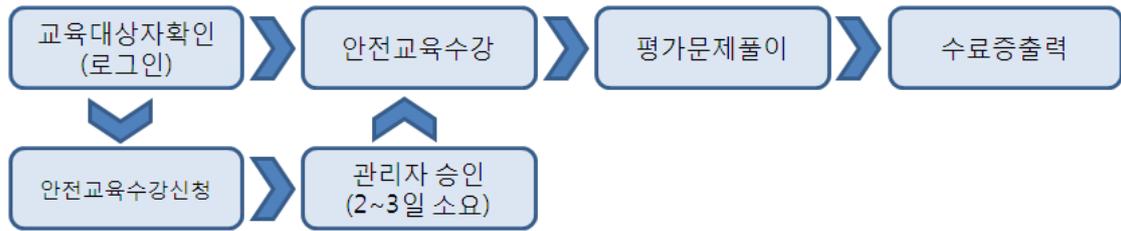
- 전공특성에 따라 A,B,C 코스로 구분하여 교육 실시

- A코스 : 생물·방사선 취급

- B코스 : 화학·가스 취급

- C코스 : 전기·기계 취급

5) 안전교육절차



3. 보험 현황

- 보험회사명 : 교육시설재난공제회
- 보험기간 : 2012.05.02. ~ 2013.05.02 (366일간)
- 가입금액 : ₩56,988,000
- 가입대상자수 : 11,682명

4. 안전관리추진계획

- 각 실험 단과대학별 안전관리실무위원회 구성 및 운영
- 교내 전체 건물 소방시설 통합관리체계(FMS) 구성
- 실험실 내부 점검실시 후 실험등급 지정표찰 부착
- 건물별 복도 및 비상계단 통로 확보와 불법 사무실 철거
- 사이버 안전 교육 훈련

9-3. 경북대학교

1. 경북대학교 응용생명과학부 응용생화학연구실은 본 과제 수행에 있어서 「경북대학교 연구실 안전관리 규정」을 준수하고 안전한 연구환경 조성을 위하여 적극 협조한다.

2. 연구실 안전관리 총괄

가. 전담 기관명 : 연구실안전관리센터

나. 담당자

소 속		구 분	성 명	연 락 처	업 무
대구캠퍼스	연구실안전관리센터	총괄담당자	이영호	053-950-7662	안전관리 총괄
	연구실안전관리센터	연구실안전환경관리자	박선민	053-950-7663	안전교육, 안전공제보험, 위원회
	연구실안전관리센터	연구실안전환경관리자	허원준	053-950-7665	정기점검, 정밀안전진단, 화학안전
	연구실안전관리센터	연구실안전환경관리자	정재현	053-950-7666	건강검진, 작업환경수시점검, 가스안전
	연구실안전관리센터	생물안전관리자/연구실/안전환경관리자	김정화	053-950-7664	LMO관리, 안전교육, 의료폐기물, 생물안전
	연구실안전관리센터	연구실안전환경관리자	안호석	053-950-7667	안전사고, 안전관련제, 규정, 전기안전
상주캠퍼스	행정지원부	연구실안전환경관리자	이창섭	054-530-1591	상주캠퍼스 안전관리 총괄
	행정지원부	연구실안전환경관리자	고범진	054-530-1597	상주캠퍼스 안전관리 전반

3. 연구실 안전관리 계획

가. 안전관리규정 연구실 비치 및 준수

1) 본 과제의 연구책임자 및 연구실안전관리담당자는 해당 연구실에 **경북대학교 연구실안전관리 규정 및 MSDS, 비상연락망, 연구실사고 매뉴얼** 등을 비치하고, 과제 참여자들에게 이를 숙지하고 준수하도록 교육한다.

2) 연구실 안전점검

구 분	점 검 대 상	점검방법	점검시기	점검기관
일상점검 연안법 제8조	· 과학기술분야 전체 실험실	육안점검	연구활동시 (매일)	연구실책임자 연구실안전관리담당자
정기점검 연안법 제8조	· 과학기술분야 전체 실험실	위탁점검	년 1회	연구실안전관리센터 안전점검 전문기관
정밀안전진단 연안법 제9조	· 과학기술분야 전체 실험실	위탁점검	2년 1회	연구실안전관리센터 안전점검 전문기관

3) 교육 훈련

구 분	교 육 대 상	교육방법	교육시기	교육기관
신규교육 연안법 제18조 시행령 제17조 시행규칙 제9조	· 과학기술분야 신규채용 연구활동 종사자(교수, 연구원, 대학(원)생 등)	집합교육	채용시 2시간 이상	연구실안전관리센터 대학, 학과, 연구실 자체 (대학의 조교수 이상)
정기교육 연안법 제18조 시행령 제17조 시행규칙 제9조	· 과학기술분야 대학생(수료등록생, 시간제등록생 포함), 교수, 연구원(이하 "연구활동종사자"라 함)	온라인교육 집합교육	반기 6시간 이상 (월 1시간 이상)	연구실안전관리센터 대학, 학과, 연구실 자체 (대학의 조교수 이상)
특별안전교육 연안법 제18조 시행령 제17조 시행규칙 제9조	· 중대 연구실사고 발생 및 연구내 용 변경 등의 연구활동종사자	집합교육	총장이 필요하다고 인정할 시	연구실안전관리센터 대학, 학과, 연구실 자체 (대학의 조교수 이상)

가) 온라인 교육 : 경북대학교 연구실안전관리시스템(<http://safe.knu.ac.kr/>) 활용

4) 보험가입 현황

구 분	대 상	주요내용	가입시기	관리기관
보험가입 연안법 제14조 시행령 제15조 시행규칙 제8조	· 과학기술분야 대학(원)생, 수료등록 생, 시간제등록생, 비급여 연구원 등	· 상해사망 : 1억원 · 후유장애 : 1억원 · 의료비 : 1천만원	년 1회	연구실안전관리센터 안전공제보험기관

가) 연구활동종사자(학생) 안전공제보험

- 가입기간 : 2016. 6. 1. 16:00 ~ 2017. 6. 1. 16:00
- 대 상 자 : 과학기술분야 대학(원)생, 수료후등록생, 시간제등록생, 인문/사회계열생중
실험실습과목 수강생
- 가입내역 : 250개 학과(부, 전공) / 20,314명(대학생 : 16,283명, 대학원생 : 4,031명)
- 보험사명 : 교육시설재난공제회

나) 연구활동종사자(연구원) 안전공제보험

- 가입기간 : 2016. 6. 1. 16:00 ~ 2017. 6. 1. 16:00
- 대 상 자 : 과학기술분야 연구과제 참여 연구원, 연구보조원 (산재보험 가입자 제외)
- 가입내역 : 214명(연구원 : 51명, 대학원생 : 163명)
- 보험사명 : 교육시설재난공제회

5) 건강검진

구 분	대 상	주요내용	시기	관리기관
일반건강검진 연안법 제18조 시행규칙 제10조	· 연구활동종사자	· 모든 연구활동종사자	년 1회	연구실안전관리센터 건강검진전문기관
특수건강검진 연안법 제18조 시행규칙 제10조	· 연구활동종사자	· [산업안전보건법 시행규칙 별표12의3] 특수위험인자 취급 연구활동종사자 · 특수건강검진 결과 질병이 의심되는 연구활동종사자	산업안전보건법 시행규칙 별표12의3 참조 산업안전보건법 시행규칙 별표13의 추가 검사	연구실안전관리센터 건강검진전문기관 건강검진담당 의사

가) 검진대상자 : 위험물질 취급 상시 연구 대학원생 및 연구원 등

나) 2015년도 대상인원 : 1,511명(박사과정 : 368명, 석사과정 : 864명, 연구원 : 281명)

다) 2015년도 검진기관 : 계명대학교 동산의료원

4. 수행과제 및 연구실별 추가 이행계획

※ 수행과제의 성격상 조치가 필요한 연구실 추가 안전조치 계획 및 연구실안전 확보 계획 등을 기술함
 ※ 아래 예시를 참조하여, 해당 연구실의 실정에 맞게 필요사항을 기술하도록 함

구 분	직 위	성 명	연락처	지정일	
응용생화학연구실	연구실책임자	조교수	이동우	053-950-5718	매달 10일
	연구실안전관리담당자	조 교	김가희	053-950-5714	매달 25일

추가 이행계획 항목	세부이행내역
■ 연구활동종사자 건강검진 및 보험 추가가입	■ 건강검진(특수실험실) ■ 상해보험 추가가입 검토(특수실험실)
■ 연구실내 공기질 관리, 환기	■ 유해물질농도 측정관리, 환기대책수립
■ 연구실 환경개선공사 계획	■ 노후 실험실 개선공사 시행(세부사항 기술)
■ 특수위험 연구실의 별도 소화설비 설치	■ 위험성이 큰 실험실에 별도의 특수소화 설비를 설치하여 사고 확산을 예방
■ 유기용매 보관시설 설치 및 액체질소 통합관리	■ 보관창고를 설치하여 통합관리 ■ 액체질소를 시약센터에서 통합관리
■ 연구실 성격에 맞는 자체 안전지침 작성	■ 자체 안전지침 작성, 비치
■ 고압가스 안전관리	■ 안전시설 설치
■ 안전보호장비 및 시설 보완	■ 안전보호장비와 안전표지 설치
■ 안전점검 결과 보완	■ 안전점검(일상/정기/정밀) 개선사항 적극조치 ■ 시설보완 및 건강검진 후속조치 등

10. 연구개발과제의 대표적 연구실적

번호	구분 (논문/ 특허/ 기타)	논문명/특허명/기타	소속 기관명	역할	논문게재지/ 특허등록국 가	코드번호		D-12	
						Impact Factor	논문게재일 /특허등록일	사사여부 (단독사사 또는 중복사사)	특기사항 (SCI여부/인 용횟수 등)
1	특허	유청 막 투과액 또는 유청 막 투과 분말로부터 타가토스의 제조 원료가 되는 갈락토스를 제조하는 방법	씨제이 제일제당	-	대한민국	-	2014.02.24	-	-
2	특허	타가토스 제조방법	씨제이 제일제당	-	대한민국	-	2015.09.01	-	-
3	논문	The structural basis of substrate promiscuity in UDP-hexose 4-epimerase from the hyperthermophilic Eubacterium <i>Thermotoga maritima</i>	경북대학교	제1저자, 교신저자	Archives of Biochemistry and Biophysics	2.807	2015.09.03	중복	SCI
4	논문	Structural insights into conserved L-arabinose metabolic enzymes reveal the substrate binding site of a thermophilic L-arabinose isomerase	경북대학교	제1저자, 교신저자	FEBS Letters	3.519	2014.02.20	중복	SCI
5	논문	Characterization of a F280N variant of l-arabinose isomerase from <i>Geobacillus thermodenitrificans</i> identified as a d-galactose isomerase	건국대학교	제1저자, 교신저자	Applied Microbiology and Biotechnology	3.376	2014.06.01	중복	SCI

11. 기타사항

코드번호	D-13
○ 없음	

12. 참고문헌

코드번호	D-14
<p>[1] 대한민국 특허 등록번호 10-0964091</p> <p>[2] 대한민국 특허 출원번호 10-2011-0141641</p> <p>[3] 대한민국 특허 출원번호 10-2012-0052385</p> <p>[4] <i>Phytother Res</i> (2008) 22(9):1200-1207</p> <p>[5] <i>J Agric Food Chem</i> (2011) 59(24):12939-47</p> <p>[6] <i>Anal Biochem</i> (2014) 449:90-98</p> <p>[7] <i>Biotechniques</i> (2012) 52:149-158</p> <p>[8] <i>Nucleic Acids Res.</i> (2003) 31(6):e30</p> <p>[9] WHO. Healthy diet. Available from: http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs394/en/. Accessed 2016.</p> <p>[10] Sugar and Sweeteners Yearbook Tables. Available from: http://www.ers.usda.gov/data-products/sugar-and-sweeteners-yearbook-tables.aspx. Accessed 2016.</p>	

주 의

1. 이 보고서는 농림축산식품부에서 시행한 고부가가치식품기술개발사업의 연구보고서입니다.
2. 이 보고서 내용을 발표하는 때에는 반드시 농림축산식품부에서 시행한 고부가가치식품기술 개발사업의 연구 결과임을 밝혀야 합니다.
3. 국가과학기술 기밀유지에 필요한 내용은 대외적으로 발표 또는 공개하여서는 아니됩니다.