

발간등록번호

11-1543000-001612-01

마이크로캡슐화된 난황항체(IgY)를 함유한 고부가가치 제품 개발 최종보고서

2017. 03. 31.

주관연구기관 / (주)단바이오텍

농림축산식품부

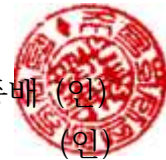
제 출 문

농림축산식품부 장관 귀하

본 보고서를 “마이크로캡슐화된 난황항체(IgY)를 함유한 고부가가치 제품 개발”(개발기간 : 2015. 10.23 ~ 2016 .10. 22)과제의 최종보고서로 제출합니다.

2017 . 03. 31 .

주관연구기관명 : (주)단바이오텍 (대표자)박종배 (인)
협동연구기관명 : (대표자) (인)
참여기관명 : (대표자) (인)



주관연구책임자 : 박 종 배

협동연구책임자 :

참여기관책임자 :

국가연구개발사업의 관리 등에 관한 규정 제18조에 따라 보고서 열람에 동의합니다.

보고서 요약서

과제고유번호	115022-1	해당단계 연구기간	2015.10.23. ~ 2016.10.22	단계구분	(1/1)
연구사업명	중사업명	고부가가치식품기술 개발사업			
	세부사업명				
연구과제명	대과제명	마이크로캡슐화된 난황항체(IgY)를 함유한 고부가가치 제품 개발			
	세부과제명				
연구책임자	박종배	해당단계 참여 연구원 수	총: 3 명 내부: 3 명 외부: 0 명	해당단계 연구개발비	정부:50,000천원 민간:16,667천원 계:66,667천원
		총연구기간 참여 연구원 수	총: 3 명 내부: 3 명 외부: 0 명	총연구개발비	정부:50,000천원 민간:16,667천원 계:66,667천원
연구기관명 및 소속부서명	(주)단바이오텍 생명과학연구소			참여기업명	
위탁연구	연구기관명:			연구책임자:	
<ul style="list-style-type: none"> ● Microcapsulation 최적조건 확립 <ul style="list-style-type: none"> - 5% 난황항체 , 1.0% alginate, 100 mM CaCl₂ , 1% Chitosan 농도값이 최적 조건인 것으로 확인하였으며, 최적 조건에서 제조된 난황항체 함유 캡슐의 포집 효율은 약 90%임 ● microencapsulelation을 이용한 난황항체 함유 캡슐 제조 <ul style="list-style-type: none"> - 키토산, 알지네이트 등의 천연 다당류를 이용하여 이온결합을 이용한 캡슐화 방법을 통해 난황항체를 함유한 캡슐을 제조하여 제조조건에 따른 입자특성을 연구하였음. - 피복물질인 알지네이트의 농도, 알지네이트와 ionic 				보고서 면수	

gelation을 유발하는 칼슘이온의 농도, 경화시간에 따른 포집효율 및 방출패턴의 유의적인 영향을 확인 함

- 특허출원 - 특이 난황항체를 함유하는 키토산 -알지네이트 캡슐의 생산방법
- 시제품 제작 - *Helicobacter pylori*에 대한 특이 난황항체를 마이크로캡슐화하여 시제품을 제작함

<p>연구의 목적 및 내용</p>	<p>1.연구개발의 목적 마이크로 캡슐화를 통해 안정성이 향상된 난황항체를 개발하고 이를 함유한 정장작용 및 체중조절 등에 유익한 고부가가치 식품개발</p> <p>2. 연구내용</p> <p>1) 난황항체 추출 생산공정 확립 산란계 접종을 통하여 얻어진 면역란을 이용하여 고 순도의 IgY(Anti lipase IgY, Anti Coli IgY, Anti Sal IgY, Anti Helico IgY) 함유 난황분말을 생산하였다.</p> <p>2) 난황항체(IgY) 마이크로캡슐화 공정 확립 및 평가 코팅제로 식용가능하며 캡슐화 수율이 높은 Sodium Alginate를 선정하였고, 2차 코팅제로 Chitosan을 선정하였다.</p> <p>3) 난황항체 원료표준화 SEM을 이용하여 캡슐의 크기 및 표면의 균일성을 확인하였으며, BCA assay와 ELISA를 통하여 IgY가 장내 환경에서 활성을 가지고 있는 것을 확인하였다.</p> <p>4) 시제품제작 마이크로 캡슐화된 IgY의 대량생산을 통하여 식품 뿐 아니라 동물용의약품, 으로 시제품을 개발하였다.</p>
<p>연구개발성과</p>	<p>경구 수동면역제의 문제점인 생체 내 이용률 저하를 획기적으로 극복할 수 있다. 따라서 이러한 수동면역제의 문제점 때문에 활성화되지 못했던 난황항체시장이 활성화 될 것으로 기대한다.</p> <p>저비용으로 고 순도 난황항체를 대량생산하고 안정화시키는 기술을 개발함으로써 기존제품이나 타 제품과 차별화할 수 있고 시장경쟁력을 강화</p> <p>다양한 기능성식품 뿐만 아니라 동물용의약품 등 적용범위를 확대가 가능해졌다.</p>

<p>연구개발성과의 활용계획 (기대효과)</p>	<ul style="list-style-type: none"> ○ 본 연구 과제를 통해 기존제품으로 해결하지 못한 난황항체의 안정성을 획기적으로 개선하여 고부가가치 식품생산이 가능하다. ○ 마이크로캡슐화 된 난황항체를 사용한 제품은 전 세계적으로 상용화되지 않고 있어 성공적으로 본과제가 개발되면 국내뿐 만 아니라 해외시장 진출도 용이하다. 더군다나 난황항체 생산업체는 세계적으로 많지 않고, 특히 시장을 주도하는 글로벌 기업이 없는 블루오션시장이다. 따라서 적극적인 해외 마케팅 전략을 가지고 추진하면 글로벌 성장기업으로 도약할 수 있을 것으로 기대한다. ○ 저비용으로 고 순도 난황항체를 대량생산하고 안정화시키는 기술을 개발함으로써 기존제품이나 타 제품과 차별화할 수 있고 시장경쟁력을 강화할 수 있다 . ○ 근래 미국, 캐나다 등 FTA 협정 등에 의해 농가 수익이 감소되고 있는 실정에서 정부에서는 여러 정책을 통해 이를 보전해주고, 고부가가치 농축산물을 장려하고 있다. 일반계란에 비해 특정항체가 함유된 면역란은 고부가가치 계란으로 양계농가 수익성이 개선될 것으로 기대한다. 				
<p>중심어 (5개 이내)</p>	<p>난황항체</p>	<p>마이크로캡슐</p>	<p>단백분해효소</p>	<p>알지네이트</p>	<p>키토산</p>

< SUMMARY >

<p style="text-align: center;">Purpose& Contents</p>	<p>1. Purpose of the Study Development The development of stability-improved egg yolk by microencapsulation and the development of food beneficial on the intestine condition and body weight control by using the microcapsules containing egg yolk</p> <p>2. Content of the study</p> <p>1) Extraction of the egg yolk and Determine of the Process Through the using of immunized egg of hen immunized by injection, egg yolk powder containing high purified IgY(Anti Lipase IgY, Anti Coli IgY, Anti Sal IgY, Anti Helico IgY) was produced.</p> <p>2)Determine of the microencapsulation process of igY and its evaluation For the use of coating materials, the edible and high encapsulation efficiency-having sodium alginate was selected, and as the second coating material, chitosan was chosen.</p> <p>3) Standardization of egg yolk as thr raw material By using SEM, the size and surface consistency of egg yolk was confirmed and through BCA assay and ELISA, it was also confirmed that the egg yolk was maintaing its activity in the intestinal environment</p> <p>4) Manufacturing of the test product Through the mass production of microencapsulated igY, not only food for human but also medical therapy products for animal were developed.</p>
<p style="text-align: center;">Results</p>	<ul style="list-style-type: none"> • The problematic low availability of the oral passive immunization could be overcame. Thus, it is expected that the present market of egg yolk antibody is activated. • By mass production of the high purified egg yolk with low cost and development of stabilization, it became possible that this present product can be differentiated from the other similar products and have an more fortified market competitive ability. in the field of various functional foods and animal medical products.

<p style="text-align: center;">Expected Contribution</p>	<p>Through this study performance, the unstability of the existing present egg yolk antibody products can be highly improved and high qualified food production could be possible.</p> <p>Products using microencapsulation techniques still are not in the market, if this study can be developed successfully, a new exploitation could be possible into not only domestic but also international market. For the more, there are not many egg yolk antibody companies in the world, especially it is a blue ocean market without any special leading global company. Thus, it is expected that an positive propulsion can promise an global growing company.</p> <ul style="list-style-type: none"> ○ By exploitation of an mass production technique of egg yolk antibody with low cost and high purified stability, this new product can be differentiated from the other existing products have more fortified competitive ability. ○ Recently, due to FTAs with USA, Canada etc, and at the present status of the decreasing income of the agricultural household, the government has been supplementing their deficits and recommending more beneficial agricultural items. Compared to the general eggs, the immunized eggs including special antibodies are expected to improve the income of the hen-feeding agricultural household. 				
<p style="text-align: center;">Keywords</p>	<p style="text-align: center;">Immunoglobul in Yolk</p>	<p style="text-align: center;">Microencapsul ation</p>	<p style="text-align: center;">protease</p>	<p style="text-align: center;">Sodium alginate</p>	<p style="text-align: center;">Chitosan</p>

CONTENTS

1. Introduction	1
(1) Purpose	1
(2) Necessity	1
(3) Scope	4
2. Current status of technology development	6
3. Research contents and results	7
(1) Research and development background	7
(2) Content and results of research and development.	8
(3) Performance and Review	28
4. Achievement and contribution	34
5. Application plan	36
6. Foreign information references of science technology	37
7. Security level of research and developments output	38
8. Status of Research Facilities and Equipments in national science and technology information system	39
9. Safety performance of laboratory	40
10. Key Achievements	41
11. Other detail	42
12. References	43

< 목 차 >

1. 연구개발과제의개요	1
제 1절. 연구개발 목적	1
제 2절. 연구개발의 필요성	1
제 3절. 연구개발 범위	4
2. 국내외 기술개발 현황	6
3. 연구수행 내용 및 결과	7
제 1절. 연구개발의 배경 및 수행내용	7
제 2절. 연구 내용 및 결과	8
제 3절. 연구 성과 및 고찰	28
4. 목표달성도 및 관련분야에의 기여도	34
5. 연구결과의 활용계획 등	36
6. 연구과정에서 수집한 해외과학기술정보	37
7. 연구개발성과의 보안등급	38
8. 국가과학기술종합정보시스템에 등록된 연구시설·장비현황	39
9. 연구개발과제 수행에 따른 연구실 등의 안전조치 이행실적	40
10. 연구개발과제의 대표적 연구실적	41
11. 기타사항	42
12. 참고문헌	43

1. 연구개발과제의 개요

코드번호	D-03
------	------

제1절. 연구개발 목적

○ 마이크로 캡슐화를 통해 안정성이 향상된 난황항체를 개발하고 이를 함유한 정장작용 및 체중조절 등에 유익한 고부가가치 식품개발

제 2절. 연구개발의 필요성

1. 난황항체 (Immunoglobulin yolk, IgY)

조류의 알(egg)은 하나의 생명이 태어나서 완성된 개체로 자라는데 필요한 모든 영양소와 방어체계를 위한 물질들을 보유하고 있다는 점에서 그 중요성이 인식되고 있다. 국내외에서 계란 전체를 발효시키거나, 다양한 부재료를 혼합하여 가공하거나, 난황과 난백을 분리하여 각각의 특성을 살려 가공하여 산업적으로 많이 이용하고 있다. 그 중 난황에 함유되어 있는 항체를 이용하여 특정 병원균에 대한 항체를 대량 생산하려는 연구가 진행되고 있다. 이와 같이 난황항체는 경구투여를 통한 수동면역제로 연구되고 있으며 활발히 사용되고 있다.

2. 난황항체의 이화학적 특성

가금류 등 난생동물의 면역 시스템 중 항체는 알을 구성하는 난황에 전달, 축적이 되어 다음 세대로 전달되며, 난황에 포함되어 있는 항체는 포유류의 IgG (immunoglobulin G) 항체와 물리적으로 비슷한 구조이지만 단백질의 화학적 성질이 조금 다르기 때문에 난황에 포함되어 있는 항체는 비교면역학에서 IgY (immunoglobulin-yolk)라고 부른다(Leslie G.A. and Clem L.W., 1969). IgY의 분자량은 180 kDa이고, 등전점(pI) 범위는 6.5~7.5이다(Lim S. et al., 1998). 일반적인 계란의 노른자라 불리는 난황은 수용성 단백질인 livetin과 인지질 성분(LDL, HDL)으로 구성되어 있으며, 그 중에 livetin은 α -livetin, β -livetin, γ -livetin으로 분류된다. α -livetin은 혈청알부민, β -livetin은 α -당단백질, γ -livetin은 글로불린으로 분류되며, γ -livein은 64 kDa의 heavy chain과 28 kDa의 light chain으로 이루어져 있고, IgG와 비교하여 상대적으로 등전점이 산성에 가깝고 닭의 혈액에서 분리한 IgG와 같은 전기영동 결과를 보인다.

3. 난황항체의 시장성

닭과 같은 조류의 난황 내에 축적된 면역물질 중에서 면역글로블린 G(IgG)를 난황항체(Immunoglobulin of egg yolk; IgY)라 한다. 이러한 난황항체는 사람이나 가축에 있어서 각종 질병의 예방 및 치료, 그리고 진단을 위하여 사용되어져 왔는데, 그 원리는 질병의 원인체로부터 분리된 항원을 산란계에 면역하여 산란된 계란의 난황 내에 항체가 축적되고 이것을 가축 등에 급여하면 수동면역을 기대할 수 있다.

난황항체는 산란계에 특정 항원을 면역하고 이에 특이적인 항체를 계란의 난황에서 확보하

기 때문에 일정 면역 수준에 따라 쉽고 효율적이고 저비용으로 대량생산이 가능하다. 주관기업인 (주)단바이오텍은 2000년 창업 이래 항생제 대체제 개발의 일환으로 사람과 가축에 질병을 일으키는 병원체(미생물, 바이러스)에 대한 난황항체 생산연구를 시작하였다. 그 동안의 연구결과 각 병원체에서 면역원성 항원을 분리 또는 재조합하여 항원을 생산하고 이들에 대한 난황항체를 생산하는 특허기술을 다수 보유하고 있으며 또한 난황항체를 대량생산, 대량 분리하는 독보적인 기술을 보유하고 있다.

4. 체중조절에 유익한 소재 (Lipase inhibitor - Lipase 저해제)

최근 지방분해효소 저해제를 활용한 비만억제에 관한 연구가 활발히 진행되고 있다. 지방분해효소인 리파제(Lipase)를 억제하여 장에서의 지방흡수를 억제하는 작용을 통해 작용하는 것으로 제니칼이라는 상품명으로 알려져 있는 orlistat가 대표적이다. 그러나 제니칼의 경우 유방암 위험으로 1997년 8월 유방암 때문에 FDA 승인이 자진 취소되기도 하였으며, 지용성 비타민과 베타카로틴 흡수를 저해하여 2년 이상의 치료기간에 대한 안전성, 유효성 자료가 없어 치료기간은 2년을 넘지 않도록 하고 있다. 현재 FDA 승인을 받아 비만치료의 대표적인 약물인 Sibutramine과 Orlistat의 경우 체질량지수(Body Mass Index, BMI) 30 kg/m² 이상 또는 다른 위험인자(고혈압, 당뇨, 이상지방혈증)가 있는 체질량지수 27 kg/m² 이상의 비만환자에게 적용하는 것으로 일반적인 과체중을 포함한 비만 위험이 예상되는 사람들이 이용하기는 어렵다. 따라서 안전성과 기능성이 인정되는 천연물 유래 소재 개발이 크게 요구되고 있다. 대표적인 천연물 소재로 가르시니아, 캄보지아, 녹차카테킨, 포도씨 추출물, 검정콩, 죽력, 홍삼 등을 들 수 있으며 주로 지방분해 효소인 리파제 활성 억제에 초점을 두고 있다. 따라서 지방 분해 효소인 리파제를 불로킹 할 수 있는 항체를 개발하는 연구도 진행되고 있으며 본 연구소에서는 이미 지방분해효소에 대한 난황항체(Lipase 저해제)를 개발한 상태이다.

5. 정장작용에 유익한 소재 (Anti Coli IgY, Anti Sal IgY)

대장균과 살모넬라 같은 식중독균은 상한 음식, 지저분한 물, 사람과 동물의 배설물에 오염된 육류 등을 먹을 때 음식이나 물을 통해 우리 몸에 감염된다.

이러한 세균성 장염 때문에 설사나 배앓이로 고통 받는 유아와 성인 들이 증가 하고 있다. 더운 여름철에는 식중독균이 증식하기도 쉽고 여행을 많이 다니는 시기이기 때문에 위생적이지 않은 환경에 노출될 가능성이 많아 특히 주의를 요한다.

설사나 배앓이 시 주로 복용하는 대부분의 경우 지사제는 오히려 증상을 악화시키기 쉽다. 지사제를 먹어서 장의 운동이 줄어들면 빨리 몸 밖으로 배출돼야 할 병원균이 장내에 더 오래 머무르게 되고 결과적으로 독소도 더 많이 만들어내게 된다. 또한 무분별한 항생제의 사용은 더욱 주의를 요한다. 배가 아프다고 환자 마음대로 항생제나 진통제를 먹는 것은 금물이다. 위와 장에 불필요한 자극을 줘서 배앓이가 더 심해질 수 있다.

이러한 문제점의 대안으로 병원균에 대한 항체를 섭취하는 것은 유용한 방법이다. 난황항체는 이미 많은 연구에서 설사유발 병원균에 대한 수동면역체로서 널리 사용되고 있다.

본 연구소에서는 이미 설사원인균인 대장균, 살모넬라, 로타바이러스에 대한 난황항체 (Anti Coli IgY, Anti Sal IgY)를 개발한 상태이다.

; 이외에도 난황항체의 특성에 따라 다양한 식품 등에 사용할 수 있다.

6. 문제점 : 난황항체의 안정성

그러나 난황항체를 경구 투여하여 실질적인 효과를 나타내기 위해서는 상대적으로 대량의 활성항체가 필요하며, 제조공정상 가공 온도, 위산 pH, 분해효소 등에 대해서 어떠한 안정성을 가지고 있느냐 하는 것이 중요하다. 일반적으로 난황항체는 pH 2.0에서 pepsin에 의해서 완전하게 불활성 되지만, trypsin이나 chymotrypsin에는 아무런 영향도 받지 않는다. 또한 이화학적 특성에 있어서 IgY는 60°C 이상에서 변성이 시작되며 pH 2 ~ 3의 산성에서는 불활성화 된다.

따라서 경구 투여되는 난황항체가 장에서 효과적으로 작용하기 위해서는 위산의 산도와 단백분해효소 등으로부터 보호받을 수 있는 장치가 필요하다.

7. Microencapsulation

이러한 문제점들을 해결하기 위해 phospholipid liposome, egg lecithin/cholesterol liposome, Chitosan-Alginate를 이용한 마이크로캡슐화를 통해 난황항체의 불안정성을 해결하기 위한 노력이 진행되고 있다.

리포솜은 생체막의 주요성분인 인지질로 만들어지기 때문에 포집된 물질을 체내로 흡수 시키며, 의약품이나 화장품 등에 가장 적합하게 응용될 수 있는 제형이다.

리포솜은 친수성과 소수성 약물 모두 수용 가능하고, 좋은 호환성, 낮은 독성, 면역계활성화, 표적화 등 많은 장점을 갖고 있어 화합물 운반 시스템으로 폭 넓게 연구 되어 지고 있다.

또한, 리포솜은 자연적으로 생성하는 물질이기 때문에 무독성이고 생분해성이다.

리포솜 제조 시 막의 안정성을 높이기 위해 포스파티딜콜린에 콜레스테롤을 혼합하면 안정하고 작은 단일 라멜라 리포솜을 생성할 수 있다.

본 과제에서는 methacrylic acid copolymer, beta cyclodextrin 같은 코팅기재를 활용하는 방법과 lecithin/cholesterol liposome, whey protein based 그리고 Chitosan alginate 마이크로캡슐화 공정을 비교하여 공정이 간단하고, 경제적인 코팅제를 개발하여 위산과 단백분해효소에 안전한 난황항체를 개발하고자 한다.

8. 관련논문 및 특허

마이크로캡슐화 기술은 오래전부터 알려져 있지만 난황항체에 관한 마이크로캡슐화 관련 논문과 특허는 많지 않고 근래에 개발되기 시작하였다.

관련 논문과 특허는 다음과 같다

가. 관련 논문

* Chitosan-Alginate Microencapsules for oral delivery of egg yolk IgY.

[Veterinary Immunology and Immunopathology 129 (2009) 132 - 136]

- Chitosan, Sodium Alginate 기재를 이용

- 소화효소 와 pH에 안정한 미세캡슐 화 난황항체 제조 , 포집율 75%,

- *In vitro* 용출시험 검증, *In vivo* 효능시험 검증

* Encapsulation of Chicken Egg Yolk Immunoglobulin G(IgY) by liposomes.

[Biosci. Biotech. Biochem., 57 (9), 1445-1449, 1993]

- Lecithin/ cholesterol liposome 을 이용한 포집
- 최적 조건의 포집율 이 50% 이하

나. 관련특허

* 난황항체의 캡슐 제조방법 및 용도 (한국 야쿠르트 10-0543110)

- 난황면역항체를 열, 소화효소, pH에 안정한 미세캡슐 형태로 제조
- 유화제(span60)와 whey protein 으로 피복시켰으며 열안정성에 중점
- 본 과제의 사용 기재와 다름, 본 과제는 온도보다 산도와 효소에 대한 안정성에 중점

* 산도에 민감한 중합체를 이용한 달걀 면역항체의 캡슐화 방법 (씨트리, 등록 거절)

- 난황항체를 메타크릴레이트 단원체 또는 중합체를 이용하여 계란 항체를 캡슐화
- 위산 pH와 단백 분해효소에 대한 안정성이 증가
- 본 과제의 사용기재와 다름, 메타크릴레이트는 주로 정제용 코팅에 사용되고, 공정이 복잡함

; 위의 논문과 특허기술을 참조하여 본과제를 통해 기술성이 진보된 즉 생산성이 향상되고 체내 안정성이 증가된 마이크로캡슐화 기술을 개발하고자 한다.

제 3절. 연구개발 범위

1. 난황항체 추출 생산 공정 확립

고 순도 난황항체 생산 (Anti coli IgY, Anti sal IgY, Lipase 저해제)

2. 난황항체(IgY) 마이크로캡슐화 공정 확립

식용 가능, 적은 첨가량의 조건에서 안정화 물질 선정

- methacrylic acid copolymer, beta cyclodextrin
- lecithin/cholesterol liposome, whey protein based microencapsulation
- Chitosan-Alginate based microcapsulation
- 마이크로캡슐화 공정 확립
- 마이크로캡슐화 수율 및 생산성평가

3. 마이크로캡슐화 된 난황항체 평가

- *In vitro* 용출시험 및 항체역가 측정
- pH 2 ~ 3에서 IgY 활성 평가
- pepsin 용액에서의 활성평가

- 기존의 캡슐화-소재화 기술과 비교실험
- *In vivo* 용출시험 및 항체역가 측정
- 실험동물(rat)에서 IgY 활성평가

4. 난황항체 원료표준화

- 지표물질(항체) 확인 및 검출방법 확립
- 최적 활성조건 확립(온도, pH, 제형)
- 안정화 조건 확립(온도, pH, 유효기간)

5. 시제품제작

- 마이크로캡슐화 된 IgY를 함유한 제품개발

2. 국내외 기술개발 현황

코드번호

D-04

*** Chitosan-Alginate Microencapsules for oral delivery of egg yolk IgY.**

[Veterinary Immunology and Immunopathology 129 (2009) 132 - 136]

- Chitosan, Sodium Alginate 기재를 이용
- 소화효소 와 pH에 안정한 미세캡슐 화 난황항체 제조 , 포집율 75%,
- *In vitro* 용출시험 검증, *in vivo* 효능시험 검증

*** Encapsulation of Chicken Egg Yolk Immunoglobulin G(IgY) by liposomes.**

[Biosci. Biotech. Biochem., 57 (9), 1445-1449, 1993]

- Lecithin/ cholesterol liposome 을 이용한 포집
- 최적 조건의 포집율이 50% 이하

- 관련특허 -

*** 난황항체의 캡슐 제조방법 및 용도 (한국 야쿠르트 10-0543110)**

- 난황면역항체를 열, 소화효소, pH에 안정한 미세캡슐 형태로 제조
- 유화제(span60)와 whey protein 으로 피복시켰으며 열안정성에 중점
- 본 과제 의 사용 기재와 다름, 본 과제는 온도보다 산도와 효소에 대한 안정성에 중점

*** 산도에 민감한 중합체를 이용한 달걀 면역항체의 캡슐화 방법 (씨트리 , 등록거절)**

- 난황항체를 메타크릴레이트 단원체 또는 중합체를 이용하여 계란 항체를 캡슐화
- 위산 pH와 단백 분해효소에 대한 안정성이 증가
- 본 과제의 사용기재와 다름 , 메타크릴레이트는 주로 정제용 코팅에 사용되고, 공정이 복잡함

3. 연구수행 내용 및 결과

코드번호

D-05

제 1절. 연구개발의 배경 및 수행내용

1. 주요 연구개발 수행 내용

마이크로 캡슐화를 통해 안정성이 향상된 난황항체를 개발하고 이를 함유한 정장작용 및 체중조절 등에 유익한 고부가가치 식품개발

가. 난황항체의 선정 및 항원 생산

- (1) 항원생산
 - (가) Salmonella
 - (나) Helicobacter pylori
 - (다) Escherichia coli
 - (라) Lipase
- (2) 산란계 면역
- (3) 난황항체 생산(분말)
- (4) 항체 역가 확인 (면역란, 난황분말)

나. Microcapsule 난황항체 생산 표준화

- (1) Microcapsulation을 위한 피복물질 선정
- (2) 맛에 미치는 영향 조사
- (3) 생산 조건의 표준화
- (4) 건조 조건의 표준화
- (5) SEM 측정을 통한 구조 확인

다. *In vitro* 실험을 통한 Microcapsule 의 기능성 평가

- (1) Chitosan Alginate 캡슐의 pH별 시간에 따른 육안 변화
- (2) BCA assay를 통한 Chitosan-Alginate 캡슐의 단백질 방출량 확인
- (3) ELISA를 통한 Chitosan-Alginate 캡슐의 항체 캡슐의 항체 용출실험 결과

라. 생산공정 확립

- (1) 시제품 제작

제 2절. 연구내용 및 결과

1. 항원생산

가. 항원제조

본 과제에 원료로 사용된 항원단백질의 생산 과정은 다음과 같다.

(1) Salmonella

살모넬라 티피뮤리움(*Salmonella typhimurium*, ST) 및 살모넬라 듀블린 (*Salmonella dublin*, SD)(Manitoba Animal Health Centre)으로부터 편모 단백질(flagella protein)을 분리하기 위하여, 살모넬라 티피뮤리 및 살모넬라 듀블린을 각각 Trypicase soy broth(Difco)에 접종하여 37°C에서 48시간 동안 정치 배양한 후 균체를 회수한 다음, Ibrahim GF 등(1985. *Methods for the isolation of highly purified Salmonella flagellin*. *J. Clin. Microbiol.* 22:1040-1044)의 방법을 수정·보완하여 편모 단백질을 분리하여 항원으로 사용하였다.

(2) Helicobacter pylori

항원으로 사용한 균주는 *Helicobacter pylori* KCTC 2691를 생명공학연구소 유전자원센터로부터 분양 받아 사용하였다. 균주는 37°C에서 48시간 동안 mueller hiton broth(MHB)에서 배양하여 균체회수 3시간 전에 0.5% formalin으로 처리하였다. 0.12M phosphate와 0.01M NaCl이 함유된 phosphate buffer saline(PBS pH 7.2)으로 초음파 파쇄기 3분 동안 1분 간격으로 3회 파쇄한 후 항원으로 사용하였다.

(3) Escherichia coli

이전에 (주)단바이오텍에서 만든 양성클론을 10ml의 Ampicillin을 포함한 LB 배지에 접종 후 하룻밤동안 37°C에서 진탕 배양하였다. 준비된 1000ml의 LB 배지에 밤새 배양된 대장균을 접종하여 흡광도(600 nm)가 0.6이 되도록 진탕배양하고 발현을 유도하기 위해 0.3 mM의 IPTG (이소프로필-베타-D-티오갈락토피라노시드)를 가하여 37°C에서 3시간 더 배양하였다. 원침(8,000 rpm, 20분, 4°C)하여 대장균을 얻은 다음 초음파 파쇄한 후 약 4°C에서 5,000 내지 9,000Xg, 10분 내지 40분 원심분리하여 상청액을 회수하고 회수한 상청액을 아밀로즈 컬럼을 이용하여 순수한 *cfaB* 단백질 분획을 분리한 다음 항원으로 사용하였다.

(4) Lipase

제조된 3종류의 재조합 플라스미드를 각각 *E. coli* BL21(DE3) 균에 형질전환 시킨 후 200 ml배지에 접종하여 28°C에서 배양하였다. 흡광도(600 nm)가 0.5로 증가될 때까지 진탕배양기 (230 rpm) 에서 배양한 후, IPTG를 최종 농도가 1mM이 되도록 첨가하고, 20시간 동안 발현유도배양을 수행하였다. 배양액을 원심분리(5,000Xg, 10분) 하여 균체를 모은 후, 인산완충액(10 mM, pH 7.5) 5 ml로 현탁하였다. 현탁된 균체를 초음파분해법을 통해 파쇄한 후, 원

심분리(10,000×g, 10분)를 통해 세포추출액과 침전물을 각각 얻었다. 침전물을 동일 부피(5 ml)의 증류수에 현탁하여 항원으로 사용하였다.

나. 산란계 면역

(1) 실험방법

본 과제에 사용한 원료로 사용된 Lipase 저해제, Anti Coli IgY, Anti Sal IgY의 항원은 (주) 단바이오텍 생명과학연구소에서 이전에 개발된 항원을 사용하여 만들었으며, 주요 원료로 생산되는 면역란은 28주령의 ISA-brown계의 산란계를 사용하였고, 산란계의 사육 및 사양관리는 충남 천안시 H농장에서 2015년 11월 11일부터 약 3개월간 수행하였으며, 면역방법은 정제된 Lipase저해제, Anti Coli IgY, Anti Sal IgY의 항원과 MONTANIDE ISA 70 VG을 3:7 비율로 혼합하여 유화하였다. 상기 유화액 1ml를 산란계의 흉근에 0.5ml씩 2곳에 근육주사하였으며, 추가 접종은 1차 접종 후 2주 간격으로 1차 접종과 동일한 방법으로 총 3회 실시하였다. 면역란은 매일 회수하여 5°C 이하의 저온시에 저장하고 실험에 사용하였다.

다. 난황항체 생산 (분말)

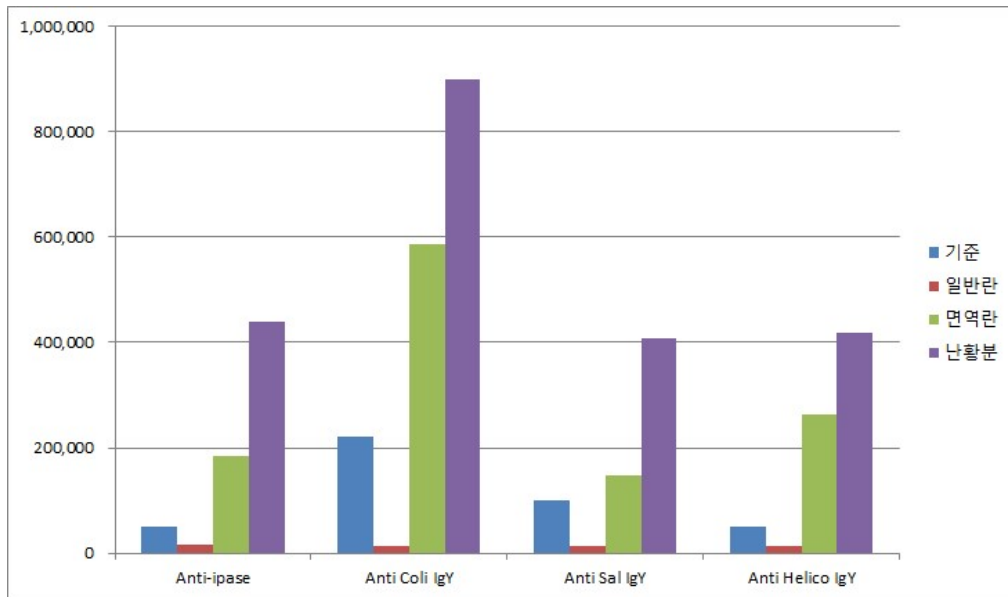
(주)단바이오텍에서 수거한 면역란을 할란 작업을 통하여 난황액을 생산하고, 충남 논산시 위치한 P업체의 분무 건조기를 사용하여 위탁하여 생산하였다. 분무건조기의 조건은 Inlet temperature 270°C 10초, Outlet temperature 60도로 하여 생산하였다.

라. 일반란, 면역란, 면역난황분의 기능성 확인

(1) 실험방법

면역한 산란계의 난황에 Lipase 저해제, Anti Coli IgY, Anti Sal IgY, Anti Helico IgY가 잘 생성이 되었는지에 대한 항체가를 분석하기 위해 ELISA를 실시하였다. 비교를 위해 시중에 시판되는 일반란과 면역란을 비교실험하였다. Lipase, E.Coli, Salmonella, Helicobacter pylori 항원을 5µg/ml이 되도록 carbonate-biscarbonate buffer(pH9.6)로 희석하여 plate의 각 well에 100µl씩 분주하여 4°C에서 overnight으로 coating을 하였다. Coating이 완료된 plate를 washing buffer(PBST, 0.02M NaH₂PO₄, 0.13M NaCl, 0.05% Tween 20, pH 7.2)로 3회 세척한 후 5% Skim milk/PBS를 각 well당 175µl씩 분주후 2시간 동안 37°C에서 배양하였다. PBST로 5번 세척하고 5% Skim milk/PBS와 washing buffer를 동량으로 섞은 dilution buffer을 이용하여 수득한 난황을 각각 2,000배로 희석하여 3배씩 단계희석한 후, coating된 well에 분주하여 37°C에서 1시간 30분 동안 반응시켰다. 2차 항체로는 alkaline phosphatase conjugated rabbit anti-chicken IgG(jackson ImmunoResearch Laboratories Inc. USA)를

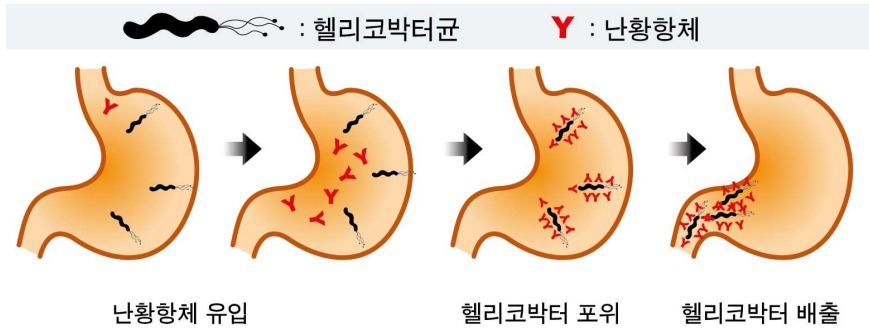
5,000배로 희석하여 37°C에서 1시간 30분 동안 상기 plate의 well에 분주하여 반응시켰다. Substrate buffer로는 phosphate substrate tablets을 0.5mM MgCl₂ 가 포함된 10% diethanolamine(pH9.8)에 용해시킨 용액을 사용하여 37°C에서 20분간 반응시켰다. 반응중지 시약으로 5M NaOH을 사용하여 반응을 blocking시킨 후 microplate reader(EL-800, BIO-TEK instrument Inc. USA)를 이용하여 405nm에서 흡광도를 측정하여 분석하였다.



	기준	일반란	면역란	난황분
Lipase 저해제	50,000	16,435	183,606	440,689
Anti Coli IgY	220,000	13,762	586,829	899,061
Anti Sal IgY	100,000	12,157	146,743	408,055
Anti Helico IgY	50,000	12,511	263,245	417,988

Fig 1. Antibody titer in the egg or egg yolk powder.

체내에 감염된 세균(헬리코박터 파이로리, 대장균 O157, 살모넬라 균 등)은 위와 장내 세포를 파괴하여 위, 십이지장 질환과 설사를 유발하게 되는데 이때 난황항체는 위 뿐만 아니라 장내의 세균에 경쟁적으로 부착하여, 세균의 위와 장내 세포파괴 및 증식 억제는 물론 체외로 배설시켜주는 역할을 할 것으로 예측된다.



또한 본 연구에 사용한 lipase의 경우 이전의 논문에서 담즙산염(bile salt)의 저해작용을 억제하는 코리파아제(colipase) 결합도메인에 의한 항체가가 가장 높으며, 코리파아제 결합도메인 난황항체가 첨가된 지방을 실험동물에게 급여하고 혈중 주요 성분을 분석한 결과, 코리파아제 결합도메인에 의한 난황항체를 섭취한 경우에 혈중 중성지방의 수치가 대조군에 비해서 유의적으로 감소했음을 확인하였다. 이전의 논문의 결과를 토대로 lipase 저해제 역할을 하는 난황분말이 들어간 경우 장에서 소화 흡수를 방해하여 혈중 중성지방의 수치를 감소시켜줄 것으로 예상된다.

(2) 실험결과

일반 면역란의 항체 역가는 Lipase 저해제 : 16435 , Anti Coli IgY 13762 , Anti Sal IgY 12157, Anti Helico IgY 12,511의 항체가 나타났으며, 항원을 면역한 산란계에서 나온 면역란의 경우 183,606, 586,829, 146,743, 263,245 순으로 측정되었다. 또한 면역란을 분말화 시킨 군에서는 440,689, 899,061 408,055, 417,988 순으로 나타났다. 일반란의 측정된 항체가의 경우 ELISA 실험 진행시 발생하는 background로 보여지며, 면역란과 난황분의 경우 기준보다 높은 항체 역가가 나타나는 것을 확인할 수 있었다. 또한 일반 면역란에 비해 분말화 작업을 통하여 고밀도의 항체 역가를 가진 생성물을 얻어내어 진행되는 실험에 사용하였다.

2. Microcapsule 난황항체 생산 공정표준화

가. Microcapsulation을 위한 피복물질선정

(1). 실험재료 선정

가소제 첨가조건과 가소제의 종류 및 캡슐의 표면장력 등을 고려하여 점착력과 응집력을 향상시킬 수 있도록 하였고, 캡슐의 외부뿐만 아니라 내부도 gel화 시켜 위산에서 IgY의 생존율을 높이고 장에서 높은 항체 방출을 보이는 microcapsule을 만들 수 있게 하였다.

문헌을 통하여 Methacrylic acid copolymer, Beta cyclodextrin, Whey protein based microencapsulation, Lecithin/cholesterol liposome, Chitosan - Alginate 등을 후보 피복물질 군으로 선정하였다.

선정된 후보 물질 군에 따라 성질을 조사하였으며, Methacrylic acid copolymer의 경우 장용 코팅제로 주로 정제 코팅에 사용하며 가열공정이 있어 IgY 포집에 부적절 한 것으로 확인되었고, Beta cyclodextrin은 주로 소수성 물질 (지방성분) 포집에 사용, Whey protein based microencapsulation은 gel 제조 시 가열공정(80°C 이상)으로 인하여 IgY의 항체 능력을 저하시키는 것으로 확인 되었다. 또한 Lecithin/cholesterol liposome의 경우 포집율이 50% 이하로 포집수율 떨어짐을 확인하여 최종 피복물질로 Chitosan-Alginate를 선정하게 되었다. Calcium 이온을 도입하여 만든 Alginate gel는 protein, drug, peptide, 세포등을 캡슐화하여 사용목적에 적합하게 널리 응용되어 왔다.

수용성 난황분말의 마이크로 캡슐화를 위한 피복물질(coating material)로 사용된 Sodium Alginate는 조류의 골격을 이루는 다당류를 추출한 것으로 $\beta(1-4\text{-linked})\text{-D-mannuronic acid}$ 와 $\alpha(1-4\text{-linked})\text{-L-guluronic acid}$ 를 단량체로 가지는 random copolymer 이며 물에 넣으면 gel화 되는 성분을 가지고 있다.

(2) 실험재료

본 과제에 주 원료로 사용되는 알긴산 나트륨 원료는 화학적합성 식품첨가물인 알긴산나트륨 (QINGDAO BRIGHT MOON SEAWEED GROUP CO., LTD, China)을 구입하여 사용하였으며, 키토산의 경우 원료는 10 cps의 분자량 30,000(avg.)의 키토산 (Glentham Life Sciences, Corsham, England)을 사용하여 구입하였다.

(3) 실험방법

실험적인 유의성을 위해서 난황분말을 0.5~10%까지 멸균된 증류수에 섞어 확인하였다. Sodium Alginate의 농도는 5% 난황분말 수용액과 1:1 비율로 혼합하여 최종 농도가 0.5~2%가 되도록 하여 4°C에서 overnight 시켜, 수화 시킨 후 사용 하였다.

분무 장치는 Xiao-Yu Li의 논문을 참고하여 교반속도 200 rpm, 주사바늘 0.7mm (외직경), 공기압 0.3 m³/h, 교반에 사용된 Chitosan/CaCl₂ 수용액과 분무장치의 높이는 8 cm 의 조건으로 실험을 진행하였다. 봉입된 Alginate-IgY의 양의 경우 capsule 생산에 사용한 CaCl₂ 수용액을 수거하여 남아있는 IgY 단백질을 BCA 정량을 통하여 확인하였다. BCA의 경우 Bovine Serum Albumin Standard(Thermo Scientific, Hudson, NH, USA)를 사용하여

Standard를 0, 10, 25, 50, 75, 100 μ g/ml로 하여 준비하였고, Sodium Alginate 농도별로 사용된 CaCl₂ 수용액을 각각 채취하여 double dilution시켜 원액부터 64배 희석 sample을 만들어 주었으며, BCA Protein Assay Kit (Thermo Scientific, Hudson, NH, USA)의 용액과 1:1 비율로 섞어서 37 $^{\circ}$ C에서 1시간 30분 동안 반응 시킨 후 microplate reader(EL-800, BIO-TEK instrument Inc. USA)를 이용하여 흡광도 562nm에서 측정하였다. BCA assay의 경우 Standard와 Sample은 3반복으로 실험하였다. BCA assay를 통한 단백질정량을 이용하여 IgY-leded Egg yolk powder (X1), Sodium Alginate의 농도(X2)를 독립변수로 두고 IgY-leded Egg yolk powder의 포집효율을 종속변수로 하여 봉입 농도를 계산하였다.

(4) 실험결과

난황분말 수용액의 농도 결정을 위하여 물과 난황분말의 비율을 0.5~10%까지를 설정하여 실험을 진행하였다. 실험 결과 난황분말의 농도가 5%가 넘어가게 되면 수용성 난황분말이 녹지 않는 문제가 발생하여 난황분말의 최종농도를 5%로 선정하였다. Sodium Alginate의 농도는 5%의 난황분말 수용액과 1:1비율로 섞어 최종농도를 0.5~2%로 하여 마이크로 캡슐화를 한 결과 캡슐의 형태 및 포집효율을 고려하여 농도를 1%로 선정하였다. 피복물질인 Sodium Alginate의 농도에 따른 포집효율 및 유의적인 영향 확인을 위하여 BCA assay를 통한 단백질정량 측정결과 Sodium Alginate 농도에 따른 IgY-leded Egg yolk powder의 봉입효율은 평균 93% 수준으로 값의 차이는 크지 않으나, Sodium Alginate의 농도가 높아짐에 따라 포집효율도 증가되는 것을 확인하였다. Sodium Alginate의 첨가 농도가 높아질수록 IgY의 봉입효율이 높아지는 것을 보여주지만, 2%가 넘어가게 되면 nozzle의 크기와 분무 압력, IgY 분말 수용액과의 혼합으로 인한 점성 등의 증가로 인해 실타래와 같은 형태의 결과물이 나타나 건조 시 형태가 균일하지 못하거나 날카로운 형태로 생산되는 단점이 있다. 그 결과 사진에서 보는 바와 같이 생산 시 분사가 쉽고 경제성도 고려하여 구강이나 기도에 문제를 주지 않는 형태인 구형의 형태를 만들어 줄 수 있는 최적의 Sodium Alginate 농도로 1%로 결정하였다.

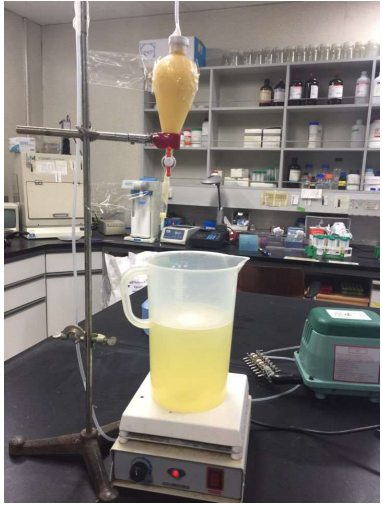
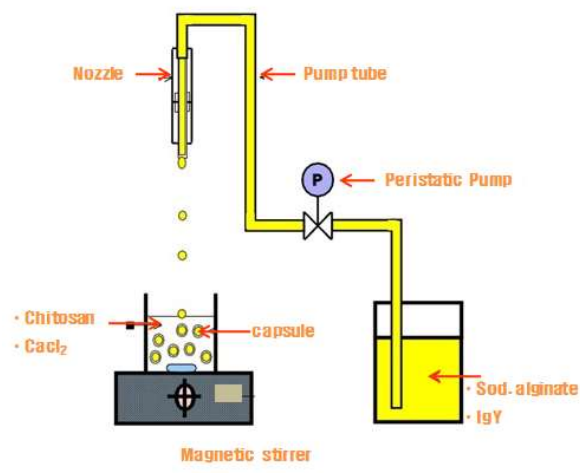


Fig 2. Simplified schematic diagram to prepare the experimental capsules using single nozzle.

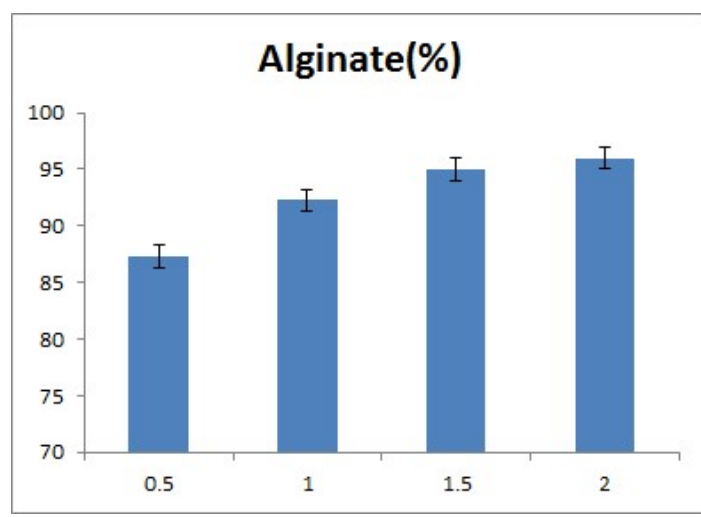


Fig 3. Entrapment efficiency of IgY-loaded Sodium Alginate gel beads prepared under different conditions. Different letters on the bars indicate significant difference ($P < 0.05$).

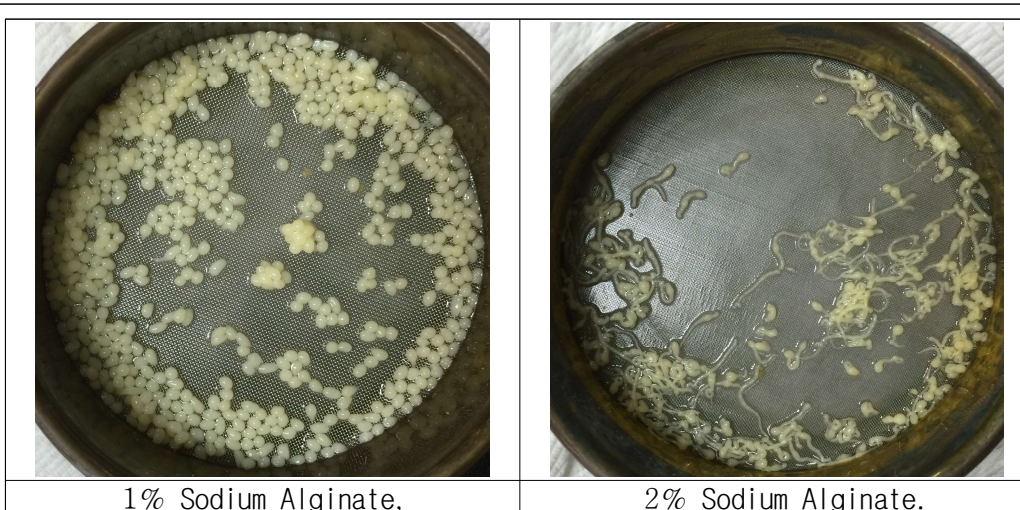


Fig 4. Morphology of bead with Sodium Alginate Concentration.

Gaserod 등에 따르면, Chitosan은 중합도가 310 이상이 되면 Alginate gel 내부로 확산이 어렵고, Alginate gel 표면에 흡착되어 membrane을 형성하는 것으로 보고되어 있다 [Gaserod et al., 1998]. 본 연구에서 사용된 Chitosan은 Mw 300K 이므로 electrostatic interaction에 의한 Chitosan과 Alginate의 결합은 Alginate gel 표면에서 일어나는 것으로 가정하였다. 2차적인 Coating solution인 Chitosan의 경우 장까지 가는 동안 외부 표면에 부착되어 있던 Alginate와 IgY 난황분말의 연결 또는 노출되어있는 공극 사이에 존재하는 분말을 보호 할 수 있다.

Chitosan은 Alginate gel의 표면에 흡착되어 이온결합을 형성하고 그 결과 polyelectrostatic interaction에 의해 불용성막을 형성한다. Chitosan의 농도의 경우 CaCl₂수용액과 혼합 하였을 때 1%가 넘어가게 되면 Chitosan 분말이 녹지 않는 성향을 나타냈다. Alginate와 Alginate/Chitosan의 봉입 효율은 각각 92.25%와 89.2%로 나타났으며, Chitosan의 첨가가 봉입 효율에 미치는 영향은 봉입효율이 다소 저하되는 경향을 보여준다. 이는 음이온 고분자인 Alginate와 양이온 고분자인 Chitosan 사이에 형성되는 ionic complex의 dehydration으로 인해 Alginate bead의 제조시 제형의 표면에 존재하는 Egg yolk powder의 유출에 기인하는 것으로 추정된다.

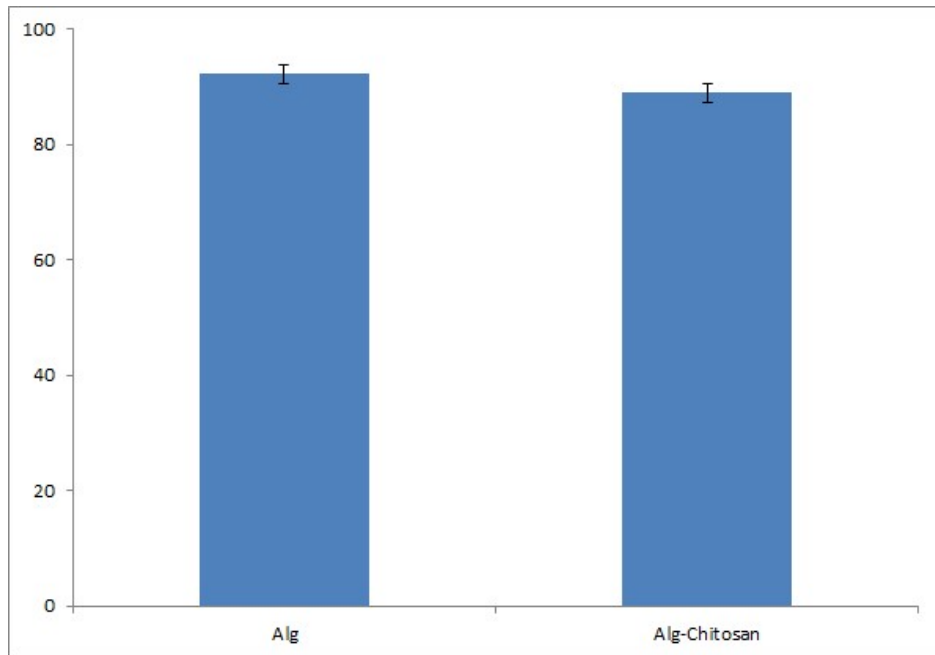


Fig 5. Entrapment efficiency of IgY in Alginate and/or Chitosan-reinforced Alginate bead.

나. Sodium Alginate와 염화칼슘이 맛에 미치는 영향 조사

Sodium Alginate와 염화칼슘 농도가 캡슐의 맛에 미치는 영향을 조사하였다.

결과에도 알 수 있듯이 알긴산 나트륨의 농도는 캡슐의 쓴맛에 관여하지 않고 염화칼슘의 농도에 따라 좌우되는 것을 보였으며, 특히 염화칼슘 농도가 1.5%이상인 경우 유의적인 차이가 있는 것으로 나타나 기 때문에 식감에 문제가 없는 농도로 1.0% 이하로 선정하였다.

Table 1. sensory evaluation for the bitterness of experimental capsules as affected by the Sodium Alginate and calcium chloride.

Conc. of Sodium Alginate (%)	intensity of bitterness					
	Conc. of calcium chloride(mM)					
	10	50	100	200	300	500
0.5	5.0	5.0	5.0	4.3	3.3	1.1
1.0	5.0	5.0	5.0	4.1	3.4	1.2
1.5	5.0	5.0	5.0	4.2	3.4	1.0
2.0	5.0	5.0	5.0	4.2	3.3	1.0

다. 생산 조건의 표준화

앞에서 진행한 실험들의 모두 종합한 결과 난황항체 Microencapsulation의 조건은 Table 2. 에 제시된 바와 같이 1차 coating solution으로 수용성 난황분말 5%, Sodium Alginate 1.0 %을 사용하였고, hardening solution으로 CaCl₂ 100mM을 사용하였으며 2차 coating solution으로 Chitosan 1.0%, Acetic acid 1.0%를 표준화 하였다. dripping 방식을 통하여 캡슐의 모양이 구형이며 약 1mm이하 정도로 작게 만들 수 있고, 균일한 크기로 대량생산을 할 수 있게 하였다. Chitosan 첨가로 인한 크기의 변화는 없었다.

Table 2. Compositions of encapsulation

Composition	Concentration(%)
Sodium Alginate	1%
IgY 난황분말	5%

Composition	Concentration
CaCl ₂	100mM

Composition	Concentration(%)
Chitosan	1
Acetic acid	1

Stirring	200 rpm
Needle.	0.7 mm (outer diameter)
Air volume	0.3 m ³ /h
Distance	8 cm

라. 건조 조건의 표준화

(1) 실험방법

Dry oven을 이용하여, 온도를 37℃와 50℃로 설정하여 동일한 날에 생산된 캡슐을 이용하여 2일간 건조시험을 진행하였다.

(2) 실험결과

건조 수행 시 시간의 흐름과 건조 온도에 따라 형태나 생산물의 상태가 변화되는 것을 알 수 있다. 50℃ 이상의 온도에서 1일간 건조 하였을 시 구형의 microcapsule이 녹으며 본래의 형태를 잃거나 생산물끼리 엉켜지는 것을 볼 수 있었으며, 37℃의 경우 형태는 유지되지만 수분이 남아있어 1일간 더 건조과정을 거치게 되었다. 그 결과 건조 37℃에서 2일간 건조과정을 거친 군에서는 수분이 보이지 않으며 원형의 캡슐이 생산되는 것을 볼 수 있었다. 이러한 결과를 통하여 건조 조건으로는 37℃로 2일간 건조하는 것을 택하였다.



Fig 5. Change of bead shape according to drying temperature.

마. SEM 측정을 통한 구조 확인

(1) 실험방법

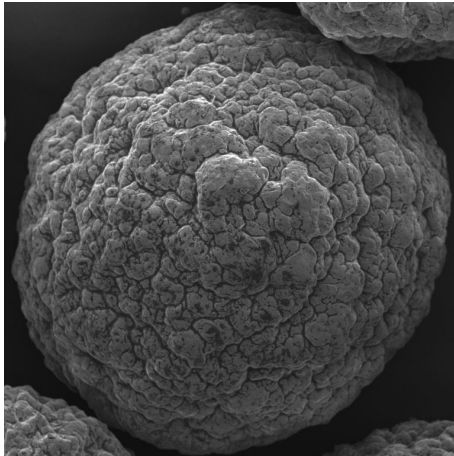
생산된 Chitosan-Alginate bead를 대전의 M사에 의뢰하여 전자주사현미경으로 구조를 확인하였다.

(2) 실험결과

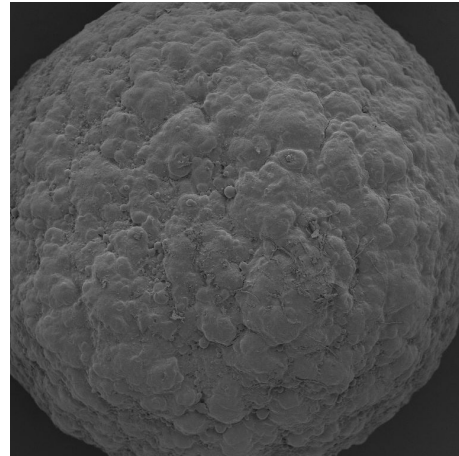
37℃에서 건조한 캡슐의 표면구조를 전자주사현미경(SEM)으로 관찰하였다.

캡슐의 크기 및 형태, 표면의 균일성을 확인하였으며, 건조된 bead의 크기는 600~800 μ m정도이며, 형태는 구형을 나타낸다. 표면의 경우 키토산을 처리하지 않은 bead에 비해 균일하며 매끈함을 보여주는 것으로 보아 Chitosan이 결합이 잘 된 것으로 판단된다.

(A)

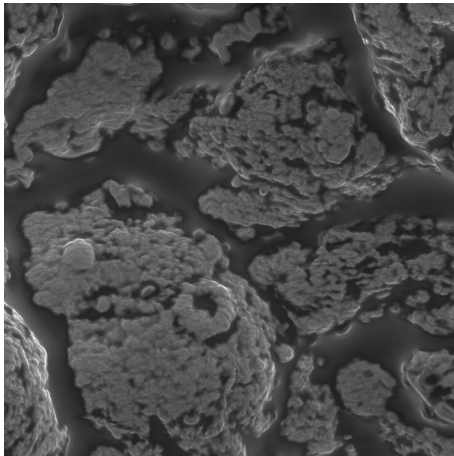


Sodium Alginate Beads

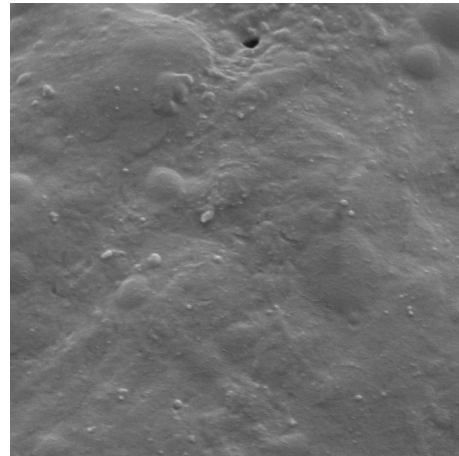


Chitosan-Sodium Alginate beads

(B)



Sodium Alginate beads



Chitosan-Sodium Alginate beads

Fig 6. Scanning electron micrographs of microencapsulation of IgY-loaded (A) Chitosan/Sodium Alginate beads, (B) surface of Chitosan/Sodium Alginate beads

3. *In vitro* 실험을 통한 Microcapsule 의 기능성 확인

가. Chitosan Alginate 캡슐의 pH별 시간에 따른 육안 변화

(1) 실험방법

인공 장액과 인공위액 용액은 미국약전(U.S. pharmacopeia)의 시험 방법을 이용하여 제작하였다. 또한 다른 pH조건에서의 형태적 변화를 관찰하기 위하여 pH4, pH6의 조건에서도 시험을 진행하였다.

Table 3. condition of simulated gastric fluid and simulated intestinal fluid buffer.

USP SGF(simulated gastric fluid)	USP SIF(simulated intestinal fluid)
NaCl 2.0g	Monobasic potassium phosphate 6.8g in DW
purified pepsin 3.2 g	NaOH(0.2N) 77ml and DW 500ml
HCl 7.0ml	pancreatin 10.0g
purified water qs. 1000ml	adjust with either 0.2N NaOH or 0.2N HCl to a pH 6.8±0.1.
Media has a pH of about 1.2	purified water qs. 1000ml

(2) 실험결과

인체에 들어갔을 때의 캡슐의 성상 변화를 확인하기 위하여 1g의 캡슐화 된 샘플을 인공위액과 인공장액, pH4, 6 용액에 처리한 후 37°C incubator에 넣고 1시간 간격으로 release 정도를 측정하였다. 또한 인공장액 조건은 인공위액에서 3시간 방치 후 인공장액으로 변화시켜 주어 실제 인체에서 일어나는 소화시간과 유사한 형태의 만들어 주었다. 시간의 경과에 따른 sample 별 bead의 성상을 확인한 결과 인공위액에서 변화는 거의 없으며, 인공위액에서 3시간 방치 후 인공장액으로 변화시킨 bead의 경우 2시간 이후부터 수분을 흡수하며 크기의 변화를 나타내기 시작하였으며, 4시간 이후부터 bead의 형태가 풀어지며 죽상의 형태로 단백질 대부분 방출되는 것을 육안으로 확인할 수 있었다. pH4, 6의 경우 수분을 머금고 부피가 커지는 것을 확인하였지만 그 이후에는 변화를 관찰할 수 없었다.

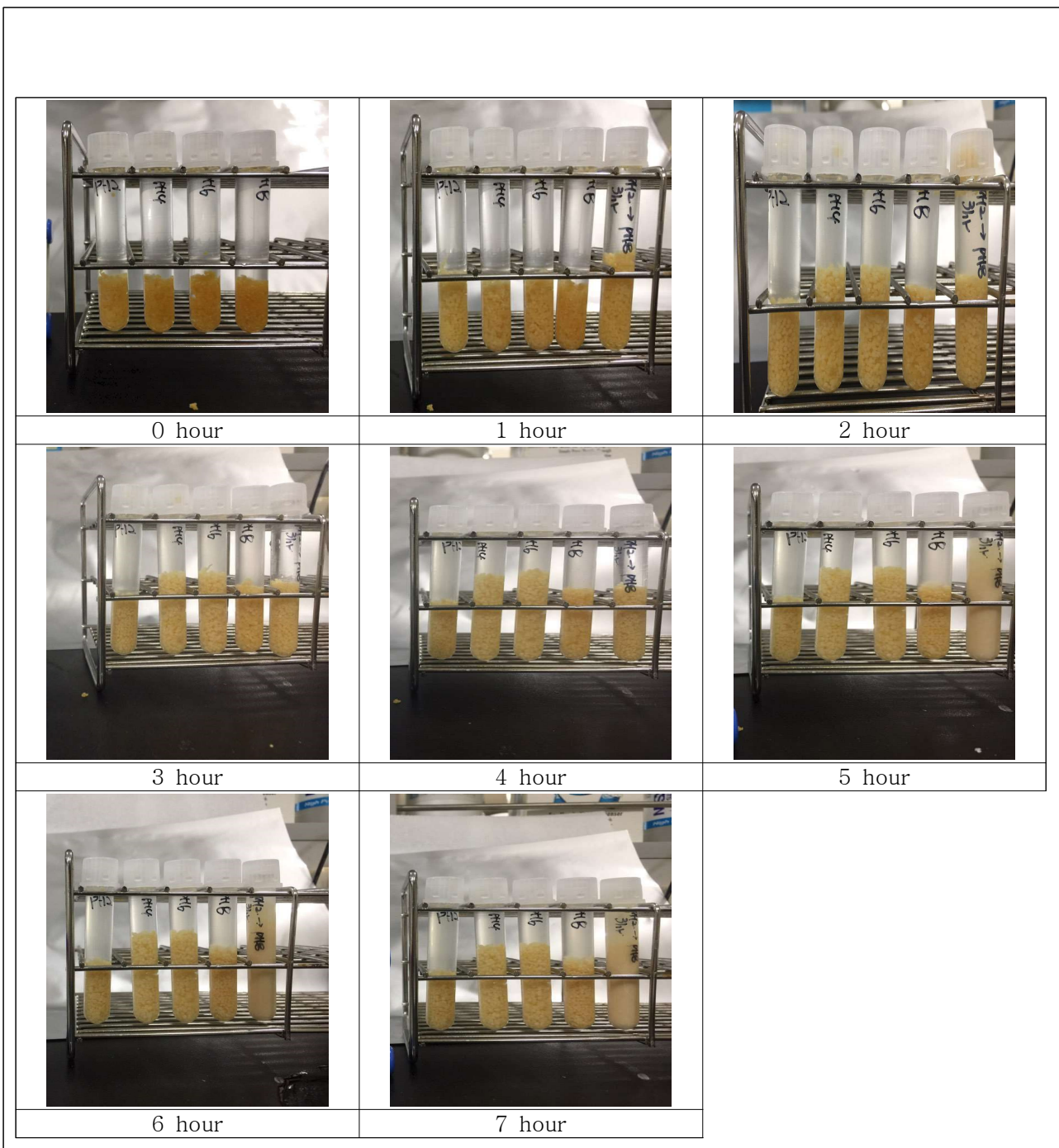


Fig 7. modification of Chitosan-Sodium Alginate beads in simulated gastric fluid/simulated intestinal fluid buffer

나. BCA assay를 통한 Chitosan-Alginate 캡슐의 단백질 방출량

(1) 실험방법

인공 장액과 인공위액 용액은 미국약전(U.S. pharmacopeia)의 시험 방법을 이용하였으나, 소화효소의 경우 BCA assay 진행시 BSA를 분해하기 때문에 제외시키고 용액을 만들었다.

(2) 실험결과

인체에 들어갔을 때의 항체 방출능을 확인하기 위하여 1g의 캡슐을 인공위액, 인공장액용액에 처리한 후 37°C incubator에 넣어두고 1시간 간격으로 release 정도를 측정하였다. 또한 인공장액 조건은 인공위액에서 3시간 방치 후 인공장액 조건으로 변화시켜주어 실제 인체에서 일어나는 소화과정과 유사한 형태의 만들어 주었다. 실제 방출되는 성상을 BCA를 통한 단백질 정량을 통하여 확인한 결과 인공위액 조건에서는 평균 136.85 $\mu\text{g/ml}$ 정도의 단백질 방출이 일어났고, 인공장액 조건에서는 변화시킨 후에는 382.59 $\mu\text{g/ml}$ 정도의 방출을 보여주었다. 하지만 인공위액에서의 방출이 Chitosan-Alginate bead의 제조 시 제형의 표면에 존재하는 Egg yolk powder의 유출에 기인하는 것으로 판단되기 때문에 실제 방출되는 양은 더 적을 것으로 추정된다.

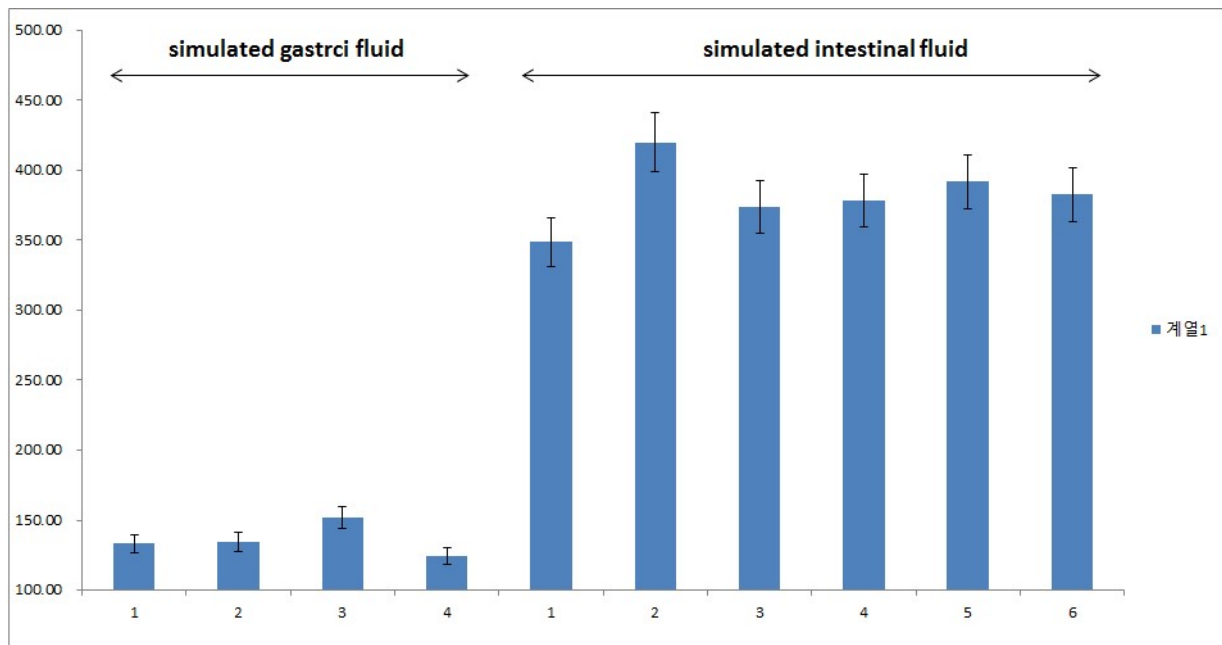


Fig 8. *In vitro* protein release from IgY loaded microcapsules.

다. ELISA를 통한 Chitosan-Alginate 캡슐의 항체 용출실험 결과

(1) 실험방법

인공 장액과 인공위액 용액은 미국약전(U.S. pharmacopeia)의 시험 방법을 이용하였으나, 소화효소의 경우 ELISA의 blocking시에 skim milk를 응집시키기 때문에 제외하고 진행하였다. 또한 인공 장액 조건의 경우 인공위액조건에서 3시간 방치후 인공장액 조건으로 변화시켜 실험을 진행하였다. Lipase, E.Coli, Salmonella, Helicobacter pylori 항원을 5 μ g/ml이 되도록 carbonate-biscarbonate buffer(pH9.6)로 희석하여 plate의 각 well에 100 μ l씩 분주하여 4 $^{\circ}$ C에서 overnight으로 coating을 하였다. Coating이 완료된 plate를 washing buffer(PBST, 0.02M NaH₂PO₄, 0.13M NaCl, 0.05% Tween 20, pH 7.2)로 3회 세척한 후 5% Skim milk/PBS을 각 well당 175 μ l씩 분주 후 2시간 동안 37 $^{\circ}$ C에서 배양하였다. PBST로 5번 세척하고 5% Skim milk/PBS와 washing buffer를 동량으로 섞은 dilution buffer을 이용하여 수득한 난황을 각각 2,000배로 희석하여 3배씩 단계희석한 후, coating된 well에 분주하여 37 $^{\circ}$ C에서 1시간 30분 동안 반응시켰다. 2차 항체로는 alkaline phosphatase conjugated rabbit anti-chicken IgG(jackson ImmunoResearch Laboratories Inc. USA)를 5,000배로 희석하여 37 $^{\circ}$ C에서 1시간 30분 동안 상기 plate의 well에 분주하여 반응시켰다. Substrate buffer로는 phosphate substrate tablets을 0.5mM MgCl₂ 가 포함된 10% diethanolamine(pH9.8)에 용해시킨 용액을 사용하여 37 $^{\circ}$ C에서 20분간 반응시켰다. 반응중지 시약으로 5M NaOH을 사용하여 반응을 blocking시킨 후 microplate reader(EL-800, BIO-TEK instrument Inc. USA)를 이용하여 405nm에서 흡광도를 측정하여 분석하였다.

(2) 실험결과

캡슐화에 따른 항체활성 및 저장안정성 향상을 ELISA를 이용하여 인체에 들어갔을 때의 항체 방출능을 확인하기 위하여 1g의 캡슐화 된 샘플을 인공위액에 처리한 후 37 $^{\circ}$ C incubator에 넣어두고 1시간 간격으로 release 정도를 측정하였다. 또한 인공장액 조건은 인공위액에서 3시간 방치 후 인공장액 조건으로 변화시켜주어 실제 인체에서 일어나는 소화과정과 유사한 형태의 만들어 주었다. 그 결과 인공위액을 넣어 둔 sample에서는 약 13,500정도의 평균 항체 방출 값이 나타난 반면 인공장액 조건에서는 361,000 정도의 평균 방출 값이 나타났다. 인공위액 조건에 비해 인공장액 조건에서 약 27배정도의 항체가 방출되는 것을 보아 위에서는 항체 방출이 일어나지 않으며, 장에서 대부분의 항체의 방출이 일어난다는 것을 알 수 있다.

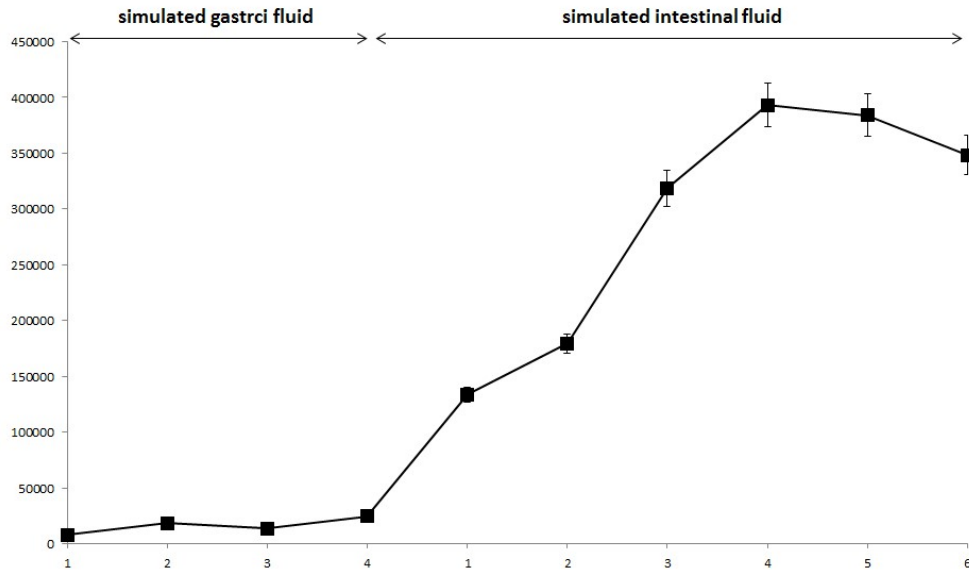


Fig 9. *In vitro* release of IgY from IgY loaded microcapsules.

라. 생산공정 확립

(1) 시제품 생산

다양한 포장 용기가 존재하지만 간편한 파우치 포장을 활용하여 특이난황항체 함유 마이크로 캡슐화 된 난황분말을 제조하였다.

식품첨가를 위한 캡슐형 분말 제조

용량 : 1kg

식품의 유형 : 알가공품

용기 형태 : 식품용 파우치

(2) 시제품 제조공정도

(가) 키토산 함유 마이크로캡슐화 된 난황분말 제조공정도

순서	공정	세부공정 및 설비	용량	공정조건 및 작업요령
1	생산 준비	라인 및 탱크CIP		스팀 및 온수이용 살균세척
2	원란 출고	오란 및 파란제거		육안검사
3	원란 적제	TABLE LIFTER	2ton	원란 적제 후 순서대로 세척조 투입
4	세척	세척조	지하수: 300ℓ/회	15,000개 단위로 세척수 교체
		브러쉬세척(2단)	살균제:1ℓ/회	차아염소산 나트륨 희석
		물기제거	Air 노즐(6홀2개)	지하수 분무 원란표면물기 제거
5	원란 할란	수작업	15,000개/HR	난황분리
6	난각 처리	스크류컨베어 난각분쇄기		할란 후 액상과 분리된 난각 이송 이송된 난각 분쇄후 외부처리
7	균질 조	이송펌프 여과기line filter 균질기	Rotary pump 난황용	펌프 이용하여 여과기로 이송 이송된 액란 균질기로 이송 이송된 액란 균질
8	액 저장	저장탱크	500ℓ	균질된 액란 살균 전 온도유지 저장탱크
9	살균 조	이송펌프	Rotary pump	살균기 발란스 탱크로 액란이송
		Balance tank	50ℓ	살균기 내 액란을 일정하게 공급유지
		이송펌프	Rotary pump	난황: Pump 분당 17-19
		플레이트 열교환기	가열 Hot water tank	Hot water 제조 순환(64℃-65℃) 난황 64℃-65℃,5분
		홀딩튜브 냉각	2"/10M Chiller (40RT)	살균된 난황 Chiller로 이송 Chiller water 제조 순환(4℃-6℃) 살균 후 제품 온도(7℃-10℃)
10	분무 건조	spray dry기	노즐형태	규격 포장제이용 알루미늄 캔, 비닐 이중 포장
11	혼합 및 교반	교반기	tank형태	난황분말 수용액 5% : 알지네이트 1%를 배합탱크에 투입하여 25℃로 충분히 혼합 및 교반
11	캡슐화	교반기	노즐형태	Stirring 200rpm, Needle 0.7mm, Air volume 0.3m ³ /h, Distance 8cm

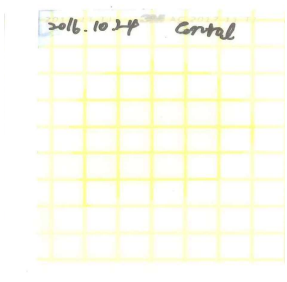


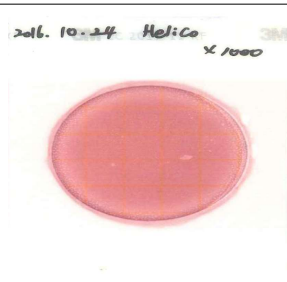
11	캡슐회수	교반기	노즐형태	Chitosan 4kg, acetic acid 4kg, CaCl2 20 kg 투입 교반 장치에 spray 분사
11	건조	dry oven		분말로 건조 후 포장
10	포장			규격 포장재이용 포장공정검사 : 정상, 이물, 냄새
11	출고			제품품질검사(역가,미생물등) 규격검사 합격 시 출고

(3) 세균검사

난황항체 함유 마이크로캡슐의 기준 및 규격

본 연구과제 결과물인 난황항체 함유 마이크로캡슐에 대하여 정상, 역가, 수분, 세균수 및 대장균을 분석한 결과 모두 적합하였다.

시험항목(Test)	시험기준(Specification)	시험결과(Results)	시험방법(Test Method)
1. 외관 및 색상	황색의 분말	적 합	육안검사
2. 냄새 및 맛	고유의 향미가 있으며, 이미, 이취가 없다.	적 합	관능검사
3. 수 분	3.5%이하	적 합	식품공전
4. IgY역가	1.0(*1)이상	적 합	(주)단.바이오텍 SOP
5. 총세균수	1×10^4 CFU/g이하	적 합	식품공전
6. 대장균군	10개/g 이 하	적 합	식품공전
7. 효모 및 곰팡이	음 성	음 성	식품공전
8. 살모넬라균	n=5, c=0, m=0/25g	적 합	식품공전
9. 황색포도상구균	음 성	음 성	식품공전
10. 비 소	0.3mg/kg 이 하	-	식품공전
11. 중 금 속	10mg/kg 이 하	-	식품공전

Name	멸균수 (Control)	2016.10.24 Helico
일반세균		
세균수	0	1,000
Name	멸균수 (Control)	2016.10.24 Helico
대장균		
세균수	-	-

(5) 제품 디자인 선정

DAN HELICO IGY



DAN

Bio

HELICO-IGY

HELICO-IGY

효능 및 효과

위염, 위궤양, 위궤양의 예방
병원성 대장균에 의한 식중독의 예방
살모넬라균에 의한 식중독 및 설사증 예방
항생제를 대처할 수 있는 차세대 친환경적 제품

용법 및 용량

건강보조식품, 음료 및 식품첨가제,
유제품 첨가제 외(분말(spray dried powder))

유통기한

제조일로부터 24개월(-18℃ 보관)



(주)단바이오텍
충북 청주시 흥덕구 2동 151-15
www.danbio.com



(5) 제품 샘플



제 3절. 연구성과 결과 및 고찰

1. 기술적 성과

가. 마이크로 난황향체 생산 기술체계 확립

난황향체에 대한 연구는 약 20년 전 부터 국내외 대학 및 연구소에서 다수의 거쳐 다년간 연구되었으나, 장까지 향체의 효능이 유지되는 기술은 실현되지 못하였으나, 본 연구진의 microcapsulation 기술을 기초로 본 연구를 수행한 결과 인체의 소화과정에서 안정성이 강화된 기술 등을 개발하여 가능성을 제시하였다. 더 나아가 고기능성캡슐제의 자체 생산 함으로써 원가절감 요인으로 작용하여 소비자가 다양한 건강기능성 유제품을 선택할 수 있도록 폭을 넓혀 줄 것으로 기대된다.

2. 연구개발 성과

가. 특허

특이 난황향체를 함유하는 키토산-알지네이트 캡슐 기능성 연구 및 원천기술 확보

국내 개발 된 난황향체를 이용한 제품의 경우 과학적 근거가 불충분한 문제점을 포함하고

있음. 하지만 본 연구 에서 특이 난황항체를 함유하는 키토산-알지네이트 캡슐의 생산기술을 확립하고 위, 장내 환경 등에 효과적임을 확인함에 따라 식품첨가물로 활용가능하다는 과학적 근거를 제시하였다. (특허출원 10-2017-0005805).

관인생략

출원번호통지서

출원일자 2017.01.13
특기사항 심사청구(무) 공개신청(무)
출원번호 10-2017-0005805 (접수번호 1-1-2017-0041811-07)
출원인명칭 주식회사 단바이오택(1-2000-034310-1)
발명자성명 박종배 강병화 윤덕규
발명의명칭 특이 난황항체를 함유하는 키토산-알지네이트 캡슐의 생산방법

특 허 청 장

<< 안내 >>

1. 귀하의 출원은 위와 같이 정상적으로 접수되었으며, 이후의 심사 진행상황은 출원번호를 통해 확인하실 수 있습니다.

국내, 외 특허 및 연구는 진행되어있으나 실제 판매되고 있지 않은 제품들에 비해 시기적 기술적인 경쟁력을 가지고 있으며, 기술적으로도 체중조절보조제, 장 기능 개선제 등의 건강기능개선제에 응용할 수 있는 기술적 가치를 확보하였다. 또한 제품으로는 유제품 등의 식품첨가제의 시제품제작이 이루어 졌으며 이를 통하여 현재 당사의 신제품 및 사업의 다각화에 기여할 것으로 예측된다.

나. 박람회를 통한 제품 전시 및 홍보

(1) 전시회 일정

(가)전시회 명 : 2016 제4회 친환경축산 페스티벌

(나)일시 : 2016년 11월 11일 (금) ~ 2016년 11월 13일 (일)

(다)장소 : 농협성남유통센터 하나로클럽 옥외행사장
 (라)전시품목 : 헬리코IGY(제품), HELICO-MC(시제품)



(2). 참가현수막



(3). 참가확인서

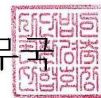
참가확인서

업 체 명 : 주식회사 단바이오텍
대 표 명 : 박 종 배

귀사는 농림축산식품부 주최, (사)친환경축산협회 주관으로 2016년 11월 11일(금)~13일(일)까지 3일간 성남 농협유통센터 하나로클럽에서 개최된 '제4회 대한민국 친환경축산 페스티벌'에 참가하였음을 확인합니다.

2017년 1월 18일

사단법인 친환경축산협회 사무국



다. 제품화 : 2건

	
<p style="text-align: center;">HELICO-MC (식품첨가물 시제품)</p>	<p style="text-align: center;">헬리코 IGY (식품첨가물)</p>

3. 경제적성과

본 과제의 결과들을 통하여 마이크로캡슐화 된 제품 생산을 할 수 있게 되었고, 매출증대를 기대하게 되었다. 이러한 결과들로 국내 소비량의 약 10%정도를 공급할 수 있으며, 또한 본 과제를 진행함에 있어 고용창출 1명이 이루어 졌으며, 사업의 확대에 따른 고용효과 및 양계농가 수익성이 개선 및 제품의 다양화가 예상된다.

4. 사업화 성과

항목	세부항목		성 과	
사업화 성과	매출액	개발제품	개발후 현재까지	0.03 억원
			향후 3년간 매출	2 억원
		관련제품	개발후 현재까지	0.5 억원
			향후 3년간 매출	1 억원
	시장 점유율	개발제품	개발후 현재까지	국내 : 5 % 국외 : 0 %
			향후 3년간 매출	국내 : 10 % 국외 : 1 %
		관련제품	개발후 현재까지	국내 : 0 % 국외 : 0 %
			향후 3년간 매출	국내 : 10 % 국외 : 1 %
세계시장 경쟁력 순위	현재 제품 세계시장 경쟁력 순위		10 위	
	3년 후 제품 세계 시장경쟁력 순위		4 위	

5. 사업화 계획 및 매출 실적

항 목	세부 항목	성 과			
사업화 계획	사업화 소요기간(년)	1 년			
	소요예산(백만원)	150			
	예상 매출규모 (억원)	현재까지	3년후	5년후	
		0	2	5	
	시장 점유율	단위(%)	현재까지	3년후	5년후
		국내	5	10	20
		국외	0	1	5
향후 관련기술, 제품을 응용한 타 모델, 제품 개발계획		건강기능식품(장건강 등), 동물용의약품(설사 예방제 등)			
무역 수지 개선 효과	(단위: 억원)	현재	3년후	5년후	
	수입대체(내수)				
	수 출				

4. 목표달성도 및 관련분야 기여도

코드번호	D-06
------	------

4-1. 목표달성도

세부연구목표 (연구계획서상의 목표)	비중 (%)	달성도 (%)	자체평가
항원조제(Helicobacter, E.coli, salmonella, Lipase)	10	100	<ul style="list-style-type: none"> 4종의 특정 항원을 성공적으로 생산함
난황항체 생산(Anti coli IgY, Anti sal IgY, Lipase 저해제)	10	100	<ul style="list-style-type: none"> 항원을 산란계에 주사하여 계란으로 부터 특이 난황항체를 생산함.
난황항체 Microencapsulation	30	100	<ul style="list-style-type: none"> Chitosan - Alginate 마이크로캡슐레이션을 이용한 난황항체 생산조건 확립
난황항체 원료 표준화	20	100	<ul style="list-style-type: none"> 항체역가, 캡슐크기, 용출조건에 대한 규격 설정을 통한 표준화확립
난황항체 대량생산 및 시제품 생산	30	80	<ul style="list-style-type: none"> 대량생산을 통한 시제품제작 제품화를 통한 수익창출

마이크로캡슐화된 난황항체(IgY)를 함유한 고부가가치 제품 개발을 통하여

- 1) 항원조제 및 난황항체 생산공정 확립
- 2) 난황항체(IgY) 마이크로캡슐화 공정 확립
- 3) 마이크로캡슐화된 난황항체 평가
- 4) 난황항체 원료표준화
- 5) 시제품제작 등 계획했던 연구목표는 모두 달성하였다.

4-2. 관련분야 기여도

■ 캡슐화 기술을 이용한 차세대 고기능성 식품의 개발

본 연구과제에서 IgY에 적용하고자 하는 체내 방출조절 기술은 기존에 생리활성이 입증된 난황항체와 같은 기존의 천연 생리활성 소재를 캡슐화 기술을 이용하여 체내 외에서 안정한 상태로 보호하여 인체의 흡수부위까지 전달하도록 함으로써 생리활성의 발현을 극대화시키는 기술로, 차세대의 고기능성 식품을 개발할 수 있는 핵심 기술이 될 것으로 판단됨.

■ 특이난황항체 IgY의 활용성 증진

IgY는 우수한 항생제 대체제 임에도 불구하고 극히 저평가되고 있는 대표적 천연성분임.

IgY의 활용성을 증진시키기 위해서는 인체의 장기의 산화적 환경에 대한 불안정성이라는 문제들이 선결되어야 함. 마이크로캡슐화 된 난황항체의 개발이 경구 수동면역제의 문제점인 생체 내 이용률 저하를 획기적으로 극복할 수 있으며, 수동면역제의 문제점 때문에 활성화되지 못했던 난황항체시장이 활성화 될 것으로 기대한다.

■ 양계농가의 수익성 개선

일반계란에 비해 특정항체가 함유된 면역란은 고부가가치 계란으로 양계농가 수익성이 개선될 것으로 기대한다.

5. 연구결과의 활용계획

코드번호	D-07
<ul style="list-style-type: none"><li data-bbox="169 297 1433 376">○ 현재 만들어진 Chitosan-Alginate bead의 경우 건조과정에서 시간이 오래 걸리는 단점을 가지고 있다. 공장화 기계설비 확충 및 시설 개선을 하여 산업화한다.<li data-bbox="169 439 1433 562">○ 가공 및 대량 생산된 제품을 이용하여 식품첨가물, 조제분유, 아이스크림 및 유제품에 첨가하여 기능이 강화된 제품으로서의 거래처 확보를 통한 사업화를 통하여 수익 창출을 이끌어 낸다.<li data-bbox="169 624 1059 658">○ 동물용 의약품의 원료로 사용하여 제품 사업화의 다양화를 한다.<li data-bbox="169 721 1433 750">○ 현재 활성화 되어있지 않은 관련 시장을 이끌어 갈수 있도록 국내, 국외의 판로를 개척한다.	

6. 연구과정에서 수집한 해외과학기술정보

코드번호	D-08
○	

7. 연구개발결과의 보안등급

		코드번호	D-09
보안등급분류	일반과제		
결정사유	「국가연구개발사업의 관리 등에 관한 규정」 제24조의4에 해당하지 않음		

8. 국가과학기술종합정보시스템에 등록된 연구시설·장비 현황

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

9. 연구개발과제 수행에 따른 연구실 등의 안전조치 이행실적

	코드번호	D-11
<p>○ 연구실별 안전관리담당자를 지정하고 책임과 권한을 부여해 주기적으로 안전교육을 실시 및 안전표식의 설치 또는 부착</p> <p>○ 연구주체의 장은 안전점검을 일정 요건을 갖춘 전문기관으로 하여금 대행 하였음</p> <p>○ 연구주체의 장은 연구실의 안전관리에 관한 정보를 연구활동종사자에게 제공한다.</p> <p>○ 연구주체의 장은 연구 활동 종사자에 대하여 연구실 사용에 따르는 안전성 확보 및 사고 예방에 필요한 교육·훈련을 실시</p> <p>○ 연구주체의 장은 인체에 치명적인 위험물질 및 바이러스 등에 노출될 위험성이 있는 연구활동종사자에 대하여 정기적인 건강검진을 실시</p> <p>○ (주)단바이오텍은 2013년 대한산업안전협회에서 기술지도를 받았으며, 2013년 11월 26일 개선 완료 결과를 받았습니다.</p> <p>○ 대한산업안전협회 지도 내용 :</p> <ul style="list-style-type: none"> - 보호구 정의 및 선택, 보호구의 종류와 적용작업, 보호구의 관리방법 - 직무교육, 근로자 정기교육, 신규채용교육, 관리감독자교육, 연구활동종사자 정기교육 - 관리감독자 교육, 고용보험 환급과정, 고용보험 비환급과정 - 대형사고예방 6대 집중점검 항목 <p>상기지도내용을 숙지하고 이행하고 있음.</p>		

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 출원	특이 난항항체를 함유하는 키토산 -알지네이트 캡슐의 생산방법	주식회사 단바이오 텍	출원인	대한민국		2017.01.13		
2									
3									
4									
5									

11. 기타사항

코드번호	D-13

12. 참고문헌

코드번호	D-14
<p>○ Meera George, T. Emilia Abraham. Polyionic hydrocolloids for the intestinal delivery of protein drugs: Alginate and Chitosan – a review .Journal of Controlled Release 114 (2006) 1 - 14</p> <p>○ Sun-Ah Park, Jun-Bae Ahn, Suk-Hyun Choi, Ji-Soo Lee, Hyeon Gyu Lee, The effects of particle size on the physicochemical properties of optimized astaxanthin-rich Xanthophyllomyces dendrorhous-loaded microparticles. LWT - Food Science and Technology.LWT - Food Science and Technology 55 (2014) 638e644</p> <p>○ Ji-Soo Leea, Sun-Ah Parka, Donghwa Chungb, Hyeon Gyu Lee. Encapsulation of astaxanthin-rich Xanthophyllomyces dendrorhous for antioxidant delivery. International Journal of Biological Macromolecules 49 (2011) 268 - 273</p> <p>○ Xiao-Yu Li, Li-Ji Jin, Jude E. Uzonna, Shu-Ying Li, Jun-Jun Liu, Hua-Qiang Li, Ya-Nan Lu, Yu-Hong Zhen, Yong-Ping Xu. Chitosan - Alginate microcapsules for oral delivery of egg yolk immunoglobulin (IgY): <i>In vivo</i> evaluation in a pig model of enteric colibacillosis Veterinary Immunology and Immunopathology 129 (2009) 132 - 136</p> <p>○ Liang Li, Linlin Wang, Yang Shao, Rui Ni, Tingting Zhang, Shirui Mao. Drug release characteristics from Chitosan - Alginate matrix tablets based on the theory of self-assembled film. International Journal of Pharmaceutics 450 (2013) 197 - 207</p> <p>○ Fwu-Long Mia, Hsing-Wen Sungb, Shin-Shing Shyuc. Drug release from Chitosan - Alginate complex beads reinforced by a naturally occurring cross-linking agent .Carbohydrate Polymers 48 (2002) 61-72</p> <p>○ Li XY, Jin LJ, McAllister TA, Stanford K, Xu JY, Lu YN, Zhen YH, Sun YX, Xu YP. Chitosan-Alginate microcapsules for oral delivery of egg yolk immunoglobulin (IgY). J Agric Food Chem. 2007 Apr 18;55(8):2911-7.</p> <p>○ Li XY, Jin LJ, McAllister TA, Stanford K, Xu JY, Lu YN, Zhen YH, Sun YX, Xu YP. Chitosan-Alginate microcapsules for oral delivery of egg yolk immunoglobulin (IgY): effects of Chitosan concentration. Appl Biochem Biotechnol. 2009 Dec;159(3):778-87.</p> <p>○ Shimizu M, Miwa Y, Hashimoto K, Goto A. Encapsulation of Chicken Egg Yolk Immunoglobulin G(IgY) by liposomes. Biosci Biotechnol Biochem. 1993 Sep;57(9):1445-9</p>	

○ Olav Gaserod, Olav Smidsrod and Gudmund Skjak-Brek, Microcapsules of Alginate-Chitosan-I A quantitative study of the interaction between Alginate and Chitosan. Biomaterials, 1998,19:1815-1825.

[별첨 1]

연구개발보고서 초록

과 제 명	(국문) 마이크로캡슐화된 난황항체(IgY)를 함유한 고부가가치 제품 개발				
	(영문) Development of higher value-added food containing microencapsulated IgY				
주관연구기관	(주)단바이오텍		주 관 연 구 책 임 자	(소속) (주)단바이오텍	
참 여 기 업			(성명) 박 종 배		
총연구개발비 (66,667 천원)	계	66,667	총 연구 기간	2015. 10.23 ~2016. 10.22 (1년 0월)	
	정부출연 연구개발비	50,000	총 참 여 수	총 인 원	3
	기업부담금	1,667		내부인원	3
	연구기관부담금	0		외부인원	0
<p>○ 연구개발 목표 및 성과 마이크로 캡슐화를 통해 안정성이 향상된 난황항체를 개발하고 이를 함유한 정장작용 및 체중조절 등에 유익한 고부가가치 식품개발</p> <p>○ 연구내용 및 결과</p> <p>1) 난황항체 추출 생산공정 확립 산란계 접종을 통하여 얻어진 면역란을 이용하여 고 순도의 IgY(Anti lipase IgY,Anti Coli IgY, Anti Sal IgY, Anti Helico IgY)함유 난황분말을 생산하였다.</p> <p>2) 난황항체(IgY) 마이크로캡슐화 공정 확립 및 평가 코팅제로 식용가능하며 캡슐화 수율이 높은 Sodium Alginate를 선정하였고, 2차 코팅제로 Chitosan을 선정하였다.</p> <p>3) 난황항체 원료표준화 SEM을 이용하여 캡슐의 크기 및 표면의 균일성을 확인하였으며, BCA assay와 ELISA를 통하여 IgY가 장내 환경에서 활성을 가지고 있는 것을 확인하였다.</p> <p>4) 시제품제작 마이크로 캡슐화된 IgY의 대량생산을 통하여 식품 첨가물로 시제품을 개발하였다.</p>					

○ 연구성과 활용실적 및 계획

본 과제의 결과로 국내,외 특허 및 연구는 진행되어있으나 실제 판매되고 있지 않은 제품들에 비해 시기적 기술적인 경쟁력을 가지고 있으며, 기술적으로도 체중조절보조제, 장 기능 개선제 등의 건강기능개선제에 응용할 수 있는 기술적 가치를 확보하였다. 또한 제품으로는 유제품 등의 식품첨가제의 시제품제작이 이루어 졌으며 이를 통하여 현재 당사의 신제품 및 사업의 다각화에 기여할 것으로 예측된다. 국내 소비량의 약 10%정도를 공급할 수 있으며, 앞으로 고기능성캡슐제의 자체 생산함으로써 원가절감 요인으로 작용하여 소비자가 다양한 건강기능성 유제품을 선택할 수 있도록 폭을 넓여 줄 것으로 기대된다.

또한 본 과제를 진행함에 있어 고용창출 1명이 이루어 졌으며 사업의 확대에 따른 고용효과 및 양계농가 수익성이 개선 및 제품의 다양화가 예상된다.

[별첨 2]

자체평가의견서

1. 과제현황

			코드번호	D-15	
			과제번호	115022-01-1-SB010	
사업구분	자유응모과제				
연구분야	식품 > 식품공학 > 식품공학		과제구분	단위	
사업명	고부가가치식품기술 개발사업			주관	
총괄과제	기재하지 않음		총괄책임자	기재하지 않음	
과제명	마이크로캡슐화된 난황항체(IgY)를 함유한 고부가가치 제품 개발		과제유형	(기초,응용,개발)	
연구기관	(주)단바이오텍		연구책임자	박종배	
연구기간 연구비 (천원)	연차	기간	정부	민간	계
	1차년도	15.10.23.~16.10.22	50,000	16,667	66,667
	2차년도				
	3차년도				
	4차년도				
	5차년도				
	계	15.10.23.~16.10.22	50,000	16,667	66,667
참여기업					
상대국	상대국연구기관				

※ 총 연구기간이 5차년도 이상인 경우 셀을 추가하여 작성 요망

2. 평가일 : 2016.11.15

3. 평가자(연구책임자) :

소속	직위	성명
(주)단바이오텍	대표이사	박종배

4. 평가자(연구책임자) 확인 :

본인은 평가대상 과제에 대한 연구결과에 대하여 객관적으로 기술하였으며, 공정하게 평가하였음을 확약하며, 본 자료가 전문가 및 전문기관 평가 시에 기초자료로 활용되기를 바랍니다.

확약	
----	--

I. 연구개발실적

1. 연구개발결과의 우수성/창의성

■ 등급 : (아주우수, 우수, 보통, 미흡, 불량)

마이크로캡슐화 된 난황항체의 개발이 경구 수동면역제의 문제점인 생체 내 이용율 저하를 획기적으로 극복할 수 있으며, 수동면역제의 문제점 때문에 활성화되지 못했던 난황항체시장이 활성화 될 것으로 기대한다.

2. 연구개발결과의 파급효과

■ 등급 : (아주우수, 우수, 보통, 미흡, 불량)

농가 수익이 감소되고 있는 실정에서 정부에서는 여러 정책을 통해 이를 보전해주고, 고부가가치 농축산물을 장려하고 있다. 일반계란에 비해 특정항체가 함유된 면역란은 고부가가치 계란으로 양계농가 수익성이 개선될 것으로 기대한다.

3. 연구개발결과에 대한 활용가능성

■ 등급 : (아주우수, 우수, 보통, 미흡, 불량)

- 기존제품으로 해결하지 못한 난황항체의 안정성을 획기적으로 개선하여 고부가가치 식품생산이 가능하며 활성화되지 못했던 난황항체시장이 활성화 될 것으로 기대
- 난황항체 마이크로캡슐화 시스템이 확립되면 다양한 기능성식품 뿐만 아니라 동물용의약품 등 적용범위를 확대할 수 있다.

4. 연구개발 수행노력의 성실도

■ 등급 : (아주우수, 우수, 보통, 미흡, 불량)

연구과제를 진행함에 있어 전과정에 대해서 충실히 이행하였으며, 그로인한 결과물을 특허출원을 하였음.

5. 공개발표된 연구개발성과(논문, 지적소유권, 발표회 개최 등)

■ 등급 : (아주우수, 우수, 보통, 미흡, 불량)

현재 연구개발 성과로 시제품 개발을 하였으며, 특히 난황항체를 함유하는 키토산-알지네이트 캡슐의 생산방법 으로 특허출원을 하였음.

II. 연구목표 달성도

세부연구목표 (연구계획서상의 목표)	비중 (%)	달성도 (%)	자체평가
항원조제(E.coli, salmonella, lipase)	20	20	항원 조제기술을 보유하고 있었기에 특정항원조제는 성공적으로 수행됨.
난황항체 생산(Anti coli IgY, Anti sal IgY, Anti lipase IgY)	20	20	생산된 항체의 효과를 확인한 결과 높은 순도의 항체를 확인됨.
난황항체 냉수추출	10	0	난황항체 생산에서 안정성 및 고순도의 난황분말을 얻음
난황항체 Microencapsulation	20	20	난황분말을 이용한 Microencapsulation 조건 확립
난황항체 원료 표준화	20	20	원료의 배합 비율, 식용가능한 성분의 표준화를 수행함
난황항체 대량생산 및 시제품 생산	10	10	대량생산을 통한 시제품 생산을 완료함.
합계	100	90	과제 수행이 성공적으로 이루어짐

III. 종합의견

1. 연구개발결과에 대한 종합의견

- 저비용으로 고순도 난황항체를 대량생산하고 안정화시키는 기술을 개발함.
- 식용 가능한 원료를 사용함으로써 제품화도 빠르게 진행될 수 있음.
- 예측한 결과보다 높은 수준의 항체 방출능을 보여줌으로서 개발된 제품의 우수성이 드러남.

2. 평가시 고려할 사항 또는 요구사항

냉수 추출단계의 경우 비용적, 관리적 측면에서 효율성이 떨어지게 되어단계를 제외시켰으며, 고 순도의 난황분말을 이용하여 실험을 진행하였음.

3. 연구결과의 활용방안 및 향후조치에 대한 의견

- 기계적 대량생산 기술을 확립하여 기능성식품, 동물용의약품 등 적용범위 확대를 모색
- 특허출원 및 등록을 통하여 기술의 보호받고 제품화 함

IV. 보안성 검토

--

※ 보안성이 필요하다고 판단되는 경우 작성함.

1. 연구책임자의 의견

--

2. 연구기관 자체의 검토결과

--

연구성과 활용계획서

1. 연구과제 개요

사업추진형태	<input checked="" type="checkbox"/> 자유응모과제 <input type="checkbox"/> 지정공모과제	분 야	식품 > 식품공학 > 식품공학	
연구과제명	마이크로캡슐화된 난황항체(IgY)를 함유한 고부가가치 제품 개발			
주관연구기관	(주) 단바이오텍	주관연구책임자	박 종 배	
연구개발비	정부출연 연구개발비	기업부담금	연구기관부담금	총연구개발비
	50,000,000	16,667,000	0	66,667,000
연구개발기간	2015.10.23. ~ 2016.10.22			
주요활용유형	<input type="checkbox"/> 산업체이전 <input type="checkbox"/> 교육 및 지도 <input type="checkbox"/> 정책자료 <input checked="" type="checkbox"/> 기타(제품출시) <input type="checkbox"/> 미활용 (사유:)			

2. 연구목표 대비 결과

당초목표	당초연구목표 대비 연구결과
① 마이크로 캡슐화를 통해 안정성이 향상된 난황항체생산 및 이를 이용한 고부가가치 식품개발	난황항체 생산을 공정은 확립하였으며, 신제품 출시를 위한 시제품 제작을 하였다.
②	
③	
·	
·	
·	

3. 연구목표 대비 성과

성과목표	사업화지표										연구기반지표							
	지식 재산권			기술 실시 (이전)		사업화					기술 인증	학술성과		교육 지도	인력 양성	정책 활용-홍보		기타 (타 연구 활용 등)
	특허 출원	특허 등록	품종 등록	건수	기술료	제품화	매출액	수출액	고용 창출	투자유치		논문				학술 발표	정책 활용	
											SC I	비 SC I						
최종목표	1	1		1		2	1						1				1	
연구기간내 달성실적	1	0		1		0	0		1				0				0	
달성율(%)	100	0		100		0	0		100				0				0	

4. 핵심기술

구분	핵심 기술 명
①	난황항체 추출 시스템을 이용한 고순도 난황항체 생산공정 확립
②	난황항체(IgY) 마이크로캡슐화 공정확립 및 평가
③	난황항체 원료표준화
·	
·	
·	

5. 연구결과별 기술적 수준

구분	핵심기술 수준					기술의 활용유형(복수표기 가능)				
	세계 최초	국내 최초	외국기술 복제	외국기술 소화·흡수	외국기술 개선·개량	특허 출원	산업체이전 (상품화)	현장애로 해결	정책 자료	기타
①의 기술								v		
②의 기술				v		v	v			
③의 기술					v			v		
·										
·										

* 각 해당란에 v 표시

6. 각 연구결과별 구체적 활용계획

핵심기술명	핵심기술별 연구결과활용계획 및 기대효과
①의 기술	신제품 및 현재 판매중인 제품에 접목하여 성능 개량
②의 기술	마이크로캡슐화 공정 확립을 통한 신제품 출시
③의 기술	항체 역가 확인 및 제품 품질관리에 활용
·	
·	

7. 연구종료 후 성과창출 계획

성과목표	사업화지표										연구기반지표							
	지식 재산권			기술실시 (이전)		사업화					기술인증	학술성과		교육지도	인력양성	정책 활용·홍보		기타 (타 연구 활용 등)
	특허출원	특허등록	품종등록	건수	기술료	제품화	매출액	수출액	고용 창출	투자유치		논문				학술 발표	정책 활용	
											SC I	비 SC I						
최종목표	1	1		1		2	1		0				1				1	
연구기간 내 달성실적	1	0		1		0	0		1				0				0	
연구종료 후 성과창출 계획	0	1		0		0	0		0				1				1	

8. 연구결과의 기술이전조건(산업체이전 및 상품화연구결과에 한함)

핵심기술명 ¹⁾	특이난황항체를 함유하는 키토산-알지네이트 캡슐의 생산방법		
이전형태	<input checked="" type="checkbox"/> 무상 <input type="checkbox"/> 유상	기술료 예정액	천원
이전방식 ²⁾	<input type="checkbox"/> 소유권이전 <input type="checkbox"/> 전용실시권 <input type="checkbox"/> 통상실시권 <input type="checkbox"/> 협의결정 <input checked="" type="checkbox"/> 기타(상품화)		
이전소요기간		실용화예상시기 ³⁾	2017년 10월
기술이전시 선행조건 ⁴⁾			

주 의

1. 이 보고서는 농림축산식품부에서 시행한 고부가가치식품기술 개발사업의 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.