

821022-  
3

보안 과제( ), 일반 과제( O ) / 공개( O ), 비공개( )발간등록번호( O )  
기술사업화 지원사업 2023년도 최종보고서

발효에  
의한

식품용  
인삼  
사포닌

컴파  
운드  
케이의

제조  
공정  
개발

및

사업화

2024

농림식품기술기획평가원  
농림축산식품부

발간등록번호

11-1543000-004687-01

# 발효에 의한 식품용 인삼사포닌 컴파운드 케이의 제조공정 개발 및 사업화

2024.07.09.

주관연구기관 / 아미코젠(주)  
공동연구기관 / 건국대학교

농림축산식품부  
(전문기관)농림식품기술기획평가원

제출문

## 제 출 문

농림축산식품부 장관 귀하

본 보고서를 “발효에 의한 식품용 인삼사포닌 킴파운드 케이의 제조공정 개발 및 사업화” (개발기간 : 2021.04.01 ~ 2023.12.31.) 과제의 최종보고서로 제출합니다.

2024. 07. 09.

주관연구기관명 : 아미코젠(주) (박 철)

공동연구기관명 : 건국대학교 산학협력단 (윤동열)

주관연구책임자 : 리 흥 선

공동연구책임자 : 오 덕 근



국가연구개발사업의 관리 등에 관한 규정 제18조에 따라 보고서 열람에 동의합니다.

최종보고서				보안등급											
				일반[ <input checked="" type="checkbox"/> ], 보안[ <input type="checkbox"/> ]											
중앙행정기관명	농림축산식품부			사업명		기술사업화 지원사업									
전문기관명 (해당 시 작성)	농림식품기술기획평가원			내역사업명 (해당 시 작성)		[공공기술사업화촉진]지원분야 식품									
공고번호	제 농축2021-41호			총괄연구개발 식별번호 (해당 시 작성)		-									
				연구개발과제번호		821022-3									
기술분류	국가과학기술 표준분류	1순위 LB1702 식품미생물학	40%	2순위 LB1709 효소/생물전환 반응	35%	3순위 LA0906 기능성 식품소재	25%								
	농림식품과학기술분류	1순위 PA0102 식품미생물·발효	50%	2순위 PA0201 기능성식품 및 소재	30%	3순위 c403039 인삼	20%								
총괄연구개발명 (해당 시 작성)		국문		-											
		영문		-											
연구개발과제명		국문		발효에 의한 식품용 인삼사포닌 컴파운드 케이의 제조공정 개발 및 사업화											
		영문		Development and commercialization on the manufacturing process of edible ginseng saponin compound K by fermentation											
주관연구개발기관		기관명		아이코젠 (주)		사업자등록번호		613-81-21213							
		주소		(우)(52818)경상남도 진주시 동부로 169번길12 원스타워 B401		법인등록번호		191111-0019783							
연구책임자		성명		리홍선		직위		수석연구원							
		연락처		직장전화 070-4266-2167		휴대전화									
						전자우편		국가연구자번호							
연구개발기간		전체		2021. 04. 01 - 2023. 12. 31 (2년 9개월)											
		단계 (해당 시 작성)		1단계		2021. 04. 01 - 2022. 12. 31 (1년 9개월)									
				2단계		2023. 01. 01 - 2023. 12. 31 (1년 0개월)									
연구개발비 (단위: 천원)		정부지원 연구개발비		기관부담 연구개발비		그 외 기관 등의 지원금				연구개발 외 지원금					
		현금		현금		지방자치단체		기타( )				합계			
		총계		825,000		6,000		144,000		831,000		144,000		975,000	
1단계		1년차		225,000		0		45,000		225,000		45,000		270,000	
		2년차		300,000		0		45,000		300,000		45,000		345,000	
2단계		1년차		300,000		6,000		54,000		306,000		54,000		360,000	
		2년차													
공동연구개발기관 등 (해당 시 작성)		기관명		책임자		직위		휴대전화		전자우편		비고			
		건국대학교		오덕근		교수						역할 공동			
		위탁연구개발기관										기관유형 대학			
		연구개발기관 외 기관													
연구개발담당자 실무담당자		성명		김지원		직위		연구원							
		연락처		직장전화 070-4266-5391		휴대전화									

이 최종보고서에 기재된 내용이 사실임을 확인하며, 만약 사실이 아닌 경우 관련 법령 및 규정에 따라 연구개발 과제 중단, 협약 해약, 제재처분 등의 불이익도 감수하겠습니다.

2024년 05월 30일

연구책임자: 리홍선

주관연구개발기관의 장: 박철 (직인)

공동연구개발기관의 장: 문동열 (직인)

위탁연구개발기관의 장: (직인)

농림축산식품부장관·농림식품기술기획평가원장 귀하



최종보고서				보안등급					
				일반[ <input checked="" type="checkbox"/> , 보안[ <input type="checkbox"/> ]					
중앙행정기관명		농림축산식품부		사업명		기술사업화 지원사업			
전문기관명 (해당 시 작성)		농림식품기술기획평가원		내역사업명 (해당 시 작성)		[공공기술사업화촉진]지원분야 식품			
공고번호		제 농축2021-41호		총괄연구개발 식별번호 (해당 시 작성)		-			
				연구개발과제번호		821022-3			
기술분류	국가과학기술 표준분류	1순위 LB1702 식품미생물학	40%	2순위 LB1709 효소/생물전환 반응	35%	3순위 LA0906 기능성 식품소재	25%		
	농림식품과학기술분류	1순위 PA0102 식품미생물·발효	50%	2순위 PA0201 기능성식품 및 소재	30%	3순위 c403039 인삼	20%		
총괄연구개발명 (해당 시 작성)		국문	-						
		영문	-						
연구개발과제명		국문	발효에 의한 식품용 인삼사포닌 컴파운드 케이의 제조공정 개발 및 사업화						
		영문	Development and commercialization on the manufacturing process of edible ginseng saponin compound K by fermentation						
주관연구개발기관		기관명	아미코젠 (주)		사업자등록번호	613-81-21213			
		주소	(우)52818경상남도 진주시 동 부로 169번길12 힐스타워 B401		법인등록번호	191111-0019783			
연구책임자		성명	리홍선		직위	수석연구원			
		연락처	직장전화	070-4266-2167		휴대전화			
			전자우편	국가연구자번호					
연구개발기간		전체	2021. 04. 01 - 2023. 12. 31 (2년 9개월)						
		단계 (해당 시 작성)	1단계	2021. 04. 01 - 2022. 12. 31 (1년 9개월)					
			2단계	2023. 01. 01 - 2023. 12. 31 (1년 0개월)					
연구개발비 (단위: 천원)		정부지원 연구개발비	기관부담 연구개발비		그 외 기관 등의 지원금		연구개발 외 지원금		
		현금	현금	현물	현금	현물		합계	
총계		825,000	6,000	144,000			831,000	144,000	975,000
1단계	1년차	225,000	0	45,000			225,000	45,000	270,000
	2년차	300,000	0	45,000			300,000	45,000	345,000
2단계	1년차	300,000	6,000	54,000			306,000	54,000	360,000
	2년차								
공동연구개발기관 등 (해당 시 작성)		기관명	책임자	직위	휴대전화	전자우편	비고		
		건국대학교	오덕근	교수			역할	기관유형	
							공동	대학	
연구개발담당자 실무담당자		성명	김지원		직위	연구원			
		연락처	직장전화	070-4266-5391		휴대전화			
			전자우편	국가연구자번호					

이 최종보고서에 기재된 내용이 사실임을 확인하며, 만약 사실이 아닌 경우 관련 법령 및 규정에 따라 연구개발 과제 중단, 협약 해약, 제재처분 등의 불이익도 감수하겠습니다.

2024년 05월 30 일

연구책임자: 리 홍 선 (인)

주관연구개발기관의 장: 박 철 (직인)

공동연구개발기관의 장: 윤 동 열 (직인)

위탁연구개발기관의 장: (직인)

농림축산식품부장관·농림식품기술기획평가원장 귀하

## < 요약 문 >

※ 요약문은 5쪽 이내로 작성합니다.

사업명	기술사업화지원사업	총괄연구개발 식별 번호 (해당 시 작성)	-				
내역사업명 (해당 시 작성)	공공기술 사업화촉진	연구개발과제번호	821022-3				
기술 분류	국가과학기술 표준분류	1순위 LB1702 식품미생물학	40%	2순위 LB1709 효소/생물전환 반 응	35%	3순위 LA0906 기능성 식품소재	25%
	농림식품 과학기술분류	1순위 PA0102 식품미생물·발효	50%	2순위 PA0201 기능성식품 및 소재	30%	3순위 c403039 인삼	20%
총괄연구개발명 (해당 시 작성)	-						
연구개발과제명	<b>발효에 의한 식품용 인삼사포닌 컴파운드 케이의 제조공정 개발 및 사업화</b>						
전체 연구개발기 간	2021. 04. 01 - 2023. 12.31 (2년 9개월)						
총 연구개발비	총 975,000 천원 (정부지원연구개발비: 825,000 천원, 기관부담연구개발비: 150,000 천원, 지방자치단체: 0 천원, 그 외 지원금: 0 천원)						
연구개발단계	기초[ ] 응용[ ] 개발[ <input checked="" type="checkbox"/> ] 기타(위 3가지에 해당되지 않는 경우)[ ]		기술성숙도 (해당 시 기재)		착수시점 기준(2단계) 종료시점 목표(9단계)		
연구개발과제 유 형 (해당 시 작성)							
연구개발과제 특 성 (해당 시 작성)							
연구 개발 목표 및 내용	최종 목표	발효에 의한 식품용 컴파운드 케이의 제조공정 개발 및 사업화					
	전체 내용	<ul style="list-style-type: none"> <li>- 컴파운드 케이 생산을 위한 식품용 산업배지 개발</li> <li>- 컴파운드 케이 생산을 위한 산업용 인삼추출물 개발</li> <li>- 컴파운드 케이 생산을 위한 식품용 곰팡이의 배양 환경 조건 최적화</li> <li>- 컴파운드 케이 생산을 위한 유가식 배양: 탄소원 및 인삼추출물 첨가 조건 최적화</li> <li>- 컴파운드 케이 정제 조건 최적화</li> <li>- 공장 생산 규모 (10톤)에서 컴파운드 케이 제조 및 산업화 연구</li> <li>- 컴파운드 케이의 시제품 생산, 경제성 분석 및 공인 분석</li> </ul>					
	1 단 계  (해 당 시 작 성)	목 표	<ul style="list-style-type: none"> <li>- 발효에 의한 컴파운드 케이 생산 농도, 생산성 및 수율 :: 실험실 규모 (5L): 컴파운드 케이 생산 농도: 5 g/L, 컴파운드 케이 생산성: 40 mg/L-h. 프로토포낙사디올에 대한 물전환 수율: 95% 이상.</li> <li>:: Pilot 규모 (50L): 컴파운드 케이 생산 농도: 4 g/L, 컴파운드 케이 생산성: 35 mg/L-h. 프로토포낙사디올에 대한 물전환 수율: 93% 이상.</li> <li>(세계 최고 수준: 중국, Fudan 대학교, 농도: 1.24 g/L, 생산성: 8.6 mg/L/h, 발효시간: 144 시간 프로토포낙사디올에 대한 물전환 수율: 82.6%)</li> <li>- 컴파운드 케이 정제 수율 및 순도 :: 정제수율 70%; 컴파운드 케이 함량 60% 이상 (세계 최고 수준: 국내 ACT사, 정제수율 60%, 컴파운드 케이 함량 40%)</li> <li>- 매출 확보(연구기간 내 8천만원, 사업 종료 5년 후 연매출 50억원 목표)</li> </ul>				
내 용	내 용	<ul style="list-style-type: none"> <li>■ <b>1차년도: 식품용 산업배지 및 식품용 산업인삼추출물 개발</b> <ul style="list-style-type: none"> <li>- 컴파운드 케이 생산 최적 인삼 원료 선정</li> <li>- 식품용 산업인삼추출물 개발</li> <li>- 식품용 산업배지 개발 및 배지성분 최적화</li> <li>- 인삼추출물 첨가 조건 최적화</li> <li>- 5L 발효조에서 컴파운드 케이 전환효소 발효최적화</li> <li>- 인삼추출물을 이용한 컴파운드 케이 전환 테스트</li> <li>- 컴파운드 케이 정제 조건 최적화 (순도 함량 공인 분석)</li> </ul> </li> <li>■ <b>2차년도: 50L pilot 규모에서 컴파운드 케이 생산 발효 및 정제 조건 최적화</b> <ul style="list-style-type: none"> <li>- 미생물 배양 환경 조건 최적화 (5 L 발효조)</li> <li>- 유가식 배양에 의한 균체 농도 및 컴파운드 케이 생산 최대화</li> <li>- 식품용 산업배지 및 식품용 산업인삼추출물 적용 발효 최적화</li> <li>- 5L에서 50L pilot 규모로 스케일-업 발효 생산</li> </ul> </li> </ul>					

2 단계 (해당시 작성)	목표	<ul style="list-style-type: none"> <li>- 50L pilot 규모에서 컴파운드 케이 생산 발효조건 최적화</li> <li>- 50L pilot 규모에서 컴파운드 케이 생산 정제 조건 최적화</li> <li>- 50L pilot 규모에서 컴파운드 케이 전환 공정 확립(공인기관 순도, 함량 분석)</li> </ul>
	내용	<ul style="list-style-type: none"> <li>- 발효에 의한 컴파운드 케이 생산 농도, 생산성 및 수율 :: 공장 생산 규모 (10톤): 발효시간 120 시간, 연속 추가방법의 한계 존재 컴파운드 케이 생산 농도: 3 g/L, 컴파운드 케이 생산성: 25 mg/L-h. 프로토파낙사디올에 대한 물전환 수율: 90% 이상. (세계 최고 수준: 중국, Fudan 대학교, 농도: 1.24 g/L, 생산성: 8.6 mg/L/h, 발효시간: 144 시간 프로토파낙사디올에 대한 물전환 수율: 82.6%)</li> <li>- 컴파운드 케이 정제 수율 및 순도 :: 정제수율 70%, 컴파운드 케이 함량 50% 이상 (세계 최고 수준: 국내 ACT사, 정제수율 60%, 컴파운드 케이 함량 40%)</li> <li>- 매출 확보(연구기간 내 8천만원, 사업 종료 5년 후 연매출 50억원 목표)</li> </ul> <p><b>■ 3차년도: 10톤 공장 생산 규모에서 컴파운드 케이 제조 및 식품 인허가</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- 컴파운드 케이 제조방법 확립</li> <li>- 10톤 공장 생산 규모 발효공정 확립</li> <li>- 인삼 추출물에서 컴파운드 케이 제조 수율 최대화</li> <li>- 10톤 공장 규모 정제공정 확립</li> <li>- 10톤 공장 생산 규모에서 시제품 생산 (생산 SOP 확립, COA 발행)</li> <li>- 10톤 공장 생산된 제품 공인 분석 (순도, 함량)</li> </ul>

연구개발성과	<ul style="list-style-type: none"> <li>- 발효에 의한 컴파운드 케이 생산 농도, 생산성 및 수율 :: 실험실 규모 (5L): 컴파운드 케이 생산 농도: 6.14 g/L. 컴파운드 케이 생산성: 42.6 mg/L-h. 프로토파낙사디올에 대한 물전환 수율: 61.3%.</li> <li>:: Pilot 규모 (50L): 컴파운드 케이 생산 농도: 4.44 g/L, 컴파운드 케이 생산성: 20.6 mg/L-h. 프로토파낙사디올에 대한 물전환 수율: 80.2%.</li> <li>:: 공장 생산 규모 (10톤): 컴파운드 케이 생산 농도: 5.15 g/L, 컴파운드 케이 생산성: 29.9 mg/L-h. 프로토파낙사디올에 대한 물전환 수율: 95.5%. (세계 최고 수준: 중국, Fudan 대학교, 농도: 1.24 g/L, 생산성: 8.6 mg/L/h, 발효시간: 144 시간 프로토파낙사디올에 대한 물전환 수율: 82.6%)</li> <li>- 컴파운드 케이 정제 수율 및 순도 (50L) :: Pilot 규모 (50L): 컴파운드 케이 정제수율 72%; 컴파운드 케이 함량 60.9%</li> <li>:: 공장 생산 규모 (10톤): 컴파운드 케이 정제수율 70.4%, 컴파운드 케이 함량 56.8% (세계 최고 수준: 국내 ACT사, 정제수율 60%, 컴파운드 케이 함량 40%)</li> <li>- 매출 (1~2단계): 976 만원</li> </ul>
--------	--

연구개발성과 활용계획 및 기대효과	<ul style="list-style-type: none"> <li>- 기존 방법 대비 유가식 발효법은 생산성이 높고 물에 녹지 않는 컴파운드 케이의 특성으로 인하여 정제가 용이하며 우수한 품질의 컴파운드 케이를 값싸게 공급할 수 있고, 친환경 생산기술 개발이 가능하여 고순도 컴파운드 케이를 경제적으로 대량 생산 가능하여 산업화와 시장접근이 용이함.</li> <li>- 이 기술이 개발되면 버려지는 인삼 부산물 및 저품질 인삼을 이용하여 컴파운드 케이를 생산하여 홍삼제품에 추가하여 효능강화 제품을 만듦으로써 인삼의 고부가가치화 기술이 확보될 수 있음.</li> <li>- 스위스의 Pharmaton사는 고려인삼과 중국삼에서 추출한 사포닌의 함량(Rg1과 Rb1)을 규격화하고 표준화하여 Ginsana 제품으로 해마다 약 3억 달러의 매출을 기록하고 있어 가능성이 Rg1과 Rb1보다 가능성이 우수한 컴파운드 케이가 제품화되면 큰 시장을 형성 할 수 있음.</li> <li>- 특정 고순도 진세노사이드는 가격이 매우 고가이지만 본 과제에서는 가능성이 우수한 컴파운드 케이를 프로토파낙사디올로부터 100% 근처의 수율로 생산하고 정제가 용이하여 저가로 확보할 수 있어 건강 기능성 식품 주성분, 식품 첨가물 뿐만 아니라 기능성 화장품, 천연물 의약품에 적용이 가능하여 시장 활성화와 거대 시장의 형성이 예상된다.</li> </ul>
--------------------	--

연구개발성과의 비공개여부 및 사유												
연구개발성과의 등록·기탁 건수	논문	특허	보고서 원문	연구시설·장비	기술요약 정보	소프트웨어	표준	생명자원		화학물	신품종	
	3	2						생명정보	생물자원		정보	실물
연구시설·장비 종합정보시스템 등록 현황	구입기관	연구시설·장비명	규격(모델명)	수량	구입연월일	구입가격(천원)	구입처(전화)	비고(설치장소)	ZEUS 등록번호			
국문핵심어 (5개 이내)	컴파운드 케이		산업용 식품 미생물		진세노사이드		미생물 전환법		상용화			
영문핵심어 (5개 이내)	Compound K		Industrial food microorganism		Ginsenoside		Microbial bioconversion		Commercialization			

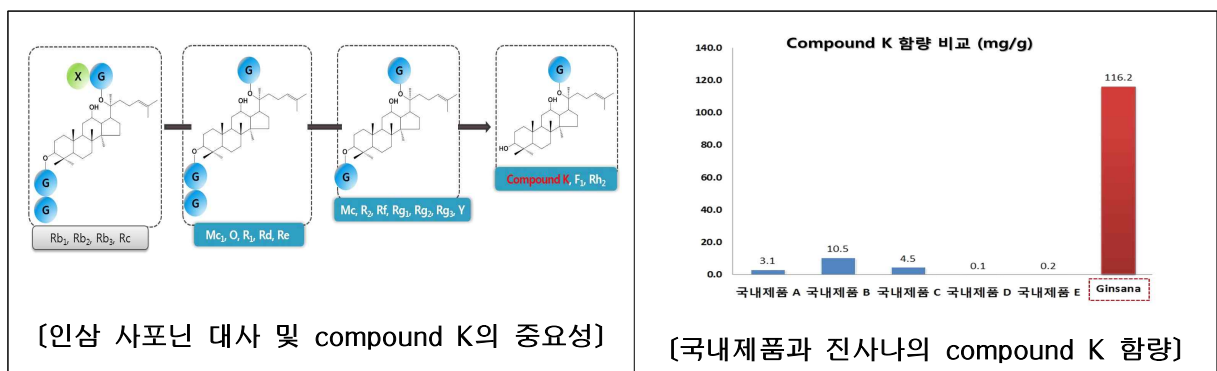
## < 목 차 >

1. 연구개발과제의 개요
2. 연구개발과제의 수행 과정 및 수행내용
3. 연구개발과제의 수행 결과 및 목표 달성 정도
4. 목표 미달 시 원인분석(해당 시 작성)
5. 연구개발성과 및 관련 분야에 대한 기여 정도
6. 연구개발성과의 관리 및 활용 계획

별첨 자료 (참고 문헌 등)

# 1. 연구개발과제의 개요

- 인삼 사포닌(진세노사이드)은 인삼의 가장 중요한 약리성분으로 그 중 major 진세노사이드 Rb1, Rb2, Rc, Rd, Re, Rg1의 6종 사포닌이 총 사포닌의 80%이상을 차지하고 있음.
- 인삼 사포닌은 파낙사다이올계(protopanaxadiol)와 파낙사트리올계(protopanaxatriol)로 구분되고 이중 compound K는 파낙사다이올계로 인삼내에 다량으로 존재하는 파낙사다이올계 진세노사이드인 글루코스, 아라비노스와 같은 당이 3-4개 붙어있는 Rb1, Rb2, Rc, Rd로부터 당이 분해되어 생성되는 당이 1개 붙어있는 사포닌임.
- Compound K는 인삼사포닌 중에 가장 활성이 우수한 사포닌으로 콜레스테롤 저하, 혈압강하, 세포독성 및 암 억제, 면역력 증가, 기억력 증가, 혈액순환 개선, 항스트레스, 항산화, 항노화, 운동기능 향상, 피로회복 등과 같은 여러 활성을 가지고 있음.
- 당이 3-4개 붙어있는 Rb1, Rb2, Rc, Rd 인삼 사포닌은 장내에서 대사가 잘 일어나지 못해 체내로 흡수 잘되지 않지만 compound K는 체내에 흡수가 잘되어 효능이 큼.
- Major 진세노사이드를 섭취할 경우 장내 미생물에 의해 당이 적게 붙어있는 minor 진세노사이드로 일부 전환되어 체내로 흡수되게 됨. 하지만 개인마다 장내 미생물 군집이 상이하여 장내에서 사포닌 전환의 정도가 다르고 일부 사람은 사포닌의 당을 분해하는 장내미생물이 없어 major 진세노사이드 섭취 시 큰 약리효과를 없는 경우가 존재함.
- 본 연구팀의 분석결과 스위스 Pharmaton사의 Ginsana가 핵심성분인 compound K의 함량이 국내제품 대비 10-500배 높음 (판매량이 높은 원인으로 추정됨).



[그림 1. compound K 소개]

- 현재의 compound K 산업용 생산은 주로 효소법을 사용하여 생산되고 있으나 효소법은 산물농도, 몰수율 및 생산성이 높으나 효소 제조를 위하여 별도의 발효과정이 필요하며, 세포내 효소를 활용하지 못하고, 세포 외 효소를 얻는 과정에서 효소의 손실이 생겨 경제적 생산에 한계가 있음. 발효법은 산물농도, 몰수율 및 생산성이 낮으나 반응을 위하여 별도의 과정이 필요하지 않고 세포의 모든 효소를 활용하여 손실이 없어 산물농도, 몰수율 및 생산성을 높일 수 있다면 경제적 산업 생산에 적합한 방법임.
- 컴파운드 케이는 아모레퍼시픽의 대표 화장품 설화수 (2015년 매출액 1조원)의 주성분으로 원료 단가 기준으로 약 85억원 정도이고, 컴파운드 케이가 적용된 제품의 매출은 약 2,000억원 (2015년 예상)에 이르고 총 사용량은 약 100억원 정도임 (아모레퍼시픽 자료). 하지만 최근 몇 년간 한중 양국간의 갈등 및 중국에서의 한류 프리미엄이 사라지면서 아모레퍼시픽이 중국에서의 설화수 매장을 철수함으로써 현재 국내에서의 컴파운드 케이의 시장도 많이 주춤하는 모습을 보이고 있음.

# 2. 연구개발과제의 수행 과정 및 수행 내용

<공동연구개발기관명: 건국대>

## 1. Compound K 생산 최적 인삼원료 및 생산균주 선정

### 1. Compound K 생산 최적 인삼원료 선정

Alcohol extract of North American ginseng (*Panax quinquefolius*) reduces fatty liver, dyslipidemia, and other complications of metabolic syndrome in a mouse model (Singh et al,



2007), Ginsenosides from American ginseng: Chemical and pharmacological diversity (Qi et al, 2011)의 선행 연구 참고하여 American ginseng의 PPD type ginsenoside 함량이 우수한 것 확인함.

Table 1. PPD type ginsenoside 함량 비교.

Ginsenosides	Korean ginseng root extract		American ginseng extract	
	Concentration (mg/mL, w/v)	Content (% , w/w)	Concentration (mg/mL, w/v)	Content (% , w/w)
Rb <sub>1</sub>	0.92	29.9	2.15	55.8
Rb <sub>2</sub>	0.79	25.6	0.1	2.6
Rc	0.77	25.0	0.65	16.9
Rd	0.6	19.5	0.95	24.7
Total	3.08	100	3.85	100

Table 1. Substrate Specificity of Extracellular Enzymes From *A. tubingensis* for PPD-Type Ginsenosides<sup>a</sup>

substrate <sup>b</sup>	specific activity <sup>c</sup> (U/mg)
Rb <sub>1</sub>	4070 ± 62
Rb <sub>2</sub>	865 ± 30
Rc	1110 ± 21
Rd	1670 ± 29
F <sub>2</sub>	403 ± 10
compound O	996 ± 26
compound Y	78 ± 4.7
compound Mc <sub>1</sub>	534 ± 18
compound Mc	125 ± 4.0
compound K	0.5 ± 0.03

<sup>a</sup>Data represent the means of triplicated separate experiments, and error bars are expressed as the standard deviation. <sup>b</sup>Substrate concentration is 0.4 mM. <sup>c</sup>Unit is nanomoles per minute (nmol/min).

(Complete bioconversion of protopanaxadiol-type ginsenosides to compound K by extracellular enzymes from the isolated strain *Aspergillus tubingensis*; Se-A Kim et al.; J. Agric. Food Chem.; 2021, 69, 315–324)

위 *Aspergillus tubingensis* 유래 extracellular enzyme의 비활성도는 4가지 major PPD-type ginsenoside (Rb<sub>1</sub>, Rb<sub>2</sub>, Rc, Rd) 중 Rb<sub>2</sub>에서 가장 낮은 것을 확인하였음.

American ginseng extract 구입하여 성분 비교 시, compound K로의 전환이 상대적으로 낮은 ginsenoside Rb<sub>2</sub> 비율이 2.6%로 낮으며, 전환이 잘되는 Rb<sub>1</sub>비율이 55.8%로 가장 높은 비율을 확인함. 추가적으로 Total PPD type ginsenoside 함량이 Korean ginseng root extract보다 높아 American ginseng extract를 사용하기로 결정함.

## 2. Compound K 생산 최적 생산균주 선정

여러 개의 plate에서 *A. tubingensis*(AT)를 배양 후 전환이 가장 어려운 Rb<sub>2</sub>를 기질로 반응하여 가장 활성이 좋은 stock에 대해 계대 배양한 후 활성을 확인하는 방식으로 screening 진행함.

Table 2. 배양 배지 조성 및 배양 조건

배지 조성	
배지 성분	g/L
Pectin from citrus	20
Corn steep solids	10
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	2
CaCl <sub>2</sub>	0.3
CoCl <sub>2</sub> ·6H <sub>2</sub> O	0.0037
FeSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	0.005
MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	0.3
MnSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	0.0013
ZnSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	0.0014
배양 조건	
Spore concentration of pre-culture	1.0 x 10 <sup>6</sup> spores/mL
Temperature	26 °C
Agitation	150 rpm
pH	5.0

Table 3. screening 실험 반응 조건

Substrate concentration	0.4 mg/mL Rb <sub>2</sub>
Extracellular enzyme concentration	0.05 mg/mL
pH	pH 4.0 (0.2 M citrate-phosphate buffer)
Temperature	55 °C
Reaction time	30 min

### 1) 1차 계대 배양

여러 개의 *A. tubingensis*(AT) stock에 대해 1차 계대배양을 진행하여 각각의 stock의 전환율을 확인하여 균주 screening을 진행함.

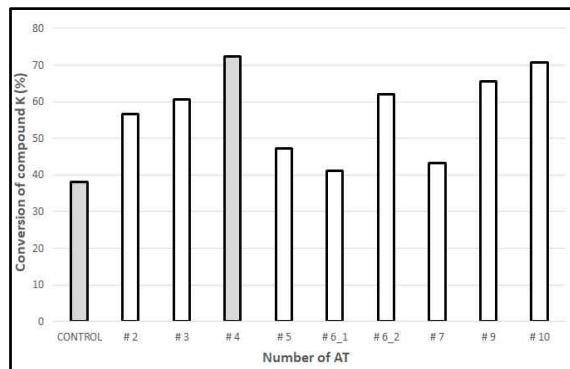


Fig 1. 1차 계대배양에 따른 compound K 전환율

기존 실험실 보유 AT stock을 control로 했을 때 38 %의 전환율을 보였으며, stock에 따라 38~72% 차지 폭 넓은 전환율을 보임. 가장 높은 72%의 전환율을 보인 #4 stock을 이용한 균주 screening 진행함.

### 2) 2차 계대 배양

전환율이 가장 높은 것으로 확인된 #4 stock에 대해 계대 배양 진행하여, 10개의 stock을 제작하여 각각 전환율을 확인함.

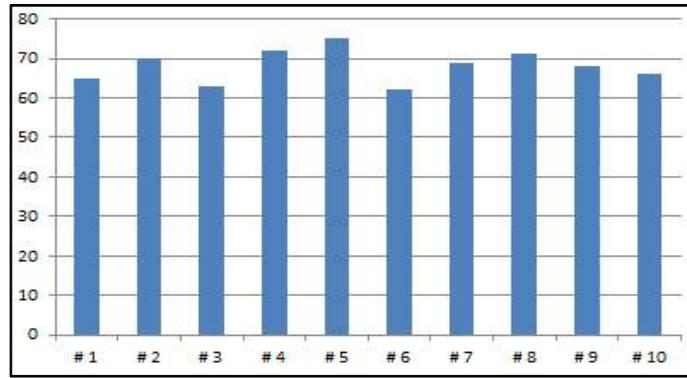


Fig 2. 2차 계대배양에 따른 compound K 전환율

2차 계대배양 결과 #5 stock에서 전환율이 75 %로 가장 높은 것 확인했으며, 1차 계대 배양의 전환율의 차이(38~72%) 보다 2차 계대배양을 진행한 결과(61~75%) 전환율의 차이가 많이 줄어든 것으로 확인함. 추가 계대 배양 지속적으로 진행하여 전환율이 높은 stock을 실험 및 생산에 사용할 예정이다.

## II. 미생물 배양 배지 성분 및 배양 조건 최적화

### 1. 탄소원 배지 성분 최적화

#### 1) 탄소원 종류별 테스트

탄소원은 세포증식과 당분해 효소 유도에 중요하므로 citrus pectin, cellulose, sucrose 등 여러 가지 탄소원 종류별 세포를 배양하고 세포 생장이 멈출 때 인삼추출물을 추가하여 compound K가 가장 많이 나오는 탄소원을 선정하기 위한 실험을 진행함.

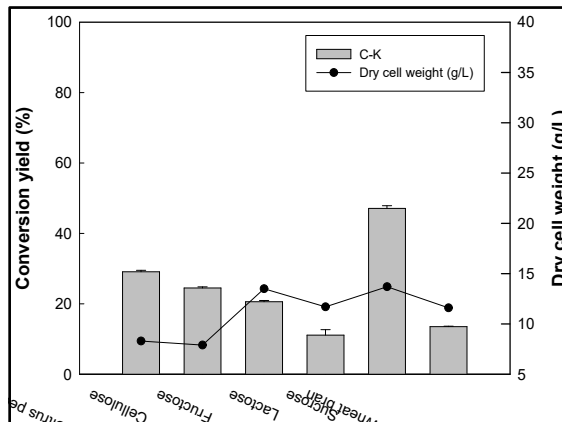


Fig 3. 배지 내 탄소원에 따른 compound K 전환율

탄소원 6종(citrus pectin, cellulose, fructose, lactose, sucrose, wheat bran)을 이용하여, 최적 탄소원 실험을 진행함. 동일한 20 g/L의 탄소원을 이용하여 flask scale로 동시전환배양을 하였을 때 sucrose에서 약 50%의 가장 높은 전환율을 확인함. 균체 성장을 보이는 Dry cell weight(DCW)은 fructose 와 sucrose가 비슷한 결과를 보였으나, fructose는 낮은 전환율을 보임. 균체의 성장과 전환율이 완전히 비례하지 않음.

#### 2) Sucrose 농도별 flask 테스트

선정된 sucrose의 최적 농도를 결정하기 위한 최적화 실험을 flask scale로 진행함.

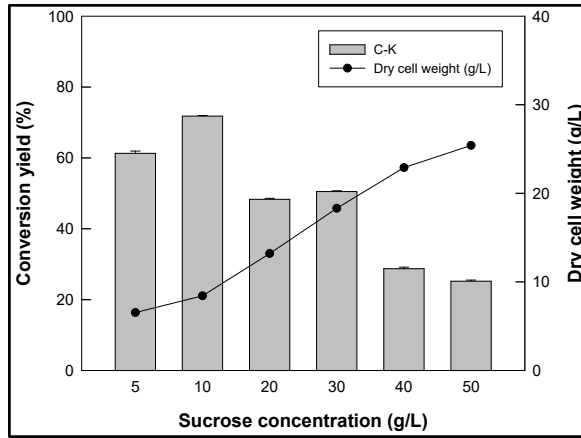


Fig 4. Sucrose 농도에 따른 compound K 전환율

Sucrose를 5, 10, 20, 30, 40, 50 g/L 농도별로 flask scale 실험을 진행함. 10 g/L에서 약 70%의 최대 전환율을 확인 하였으며, 농도가 더 높아질 시 전환율을 떨어지는 것으로 확인 되었으며, 50 g/L 까지 약 25%까지 낮아지는 것으로 확인. 이는 sucrose의 농도가 낮기에 기질인 American ginseng extract를 소모하여 높은 농도의 compound K를 생산한 것으로 사료됨. DCW는 5 g부터 50 g 까지 sucrose가 증가함에 따라 비례적으로 증가하는 패턴을 확인함.

### 3) Sucrose 농도별 3 L 발효기 테스트

Flask 탄소원 결과를 확인 하여, 3 L 발효기를 이용하여 탄소원 농도별 실험을 진행하였으며, 조건은 sucrose 농도를 20, 30, 40, 50 g/L으로 진행함. 배양 중 인삼추출물을 10 g/L 첨가하여 동시전환배양을 진행함. Working volume 1 L로 진행 하였으며, 질소원은 SPC로 진행 하였으며, 진행 시 시간별로 sucrose 농도와 DCW, compound K의 농도를 확인함.

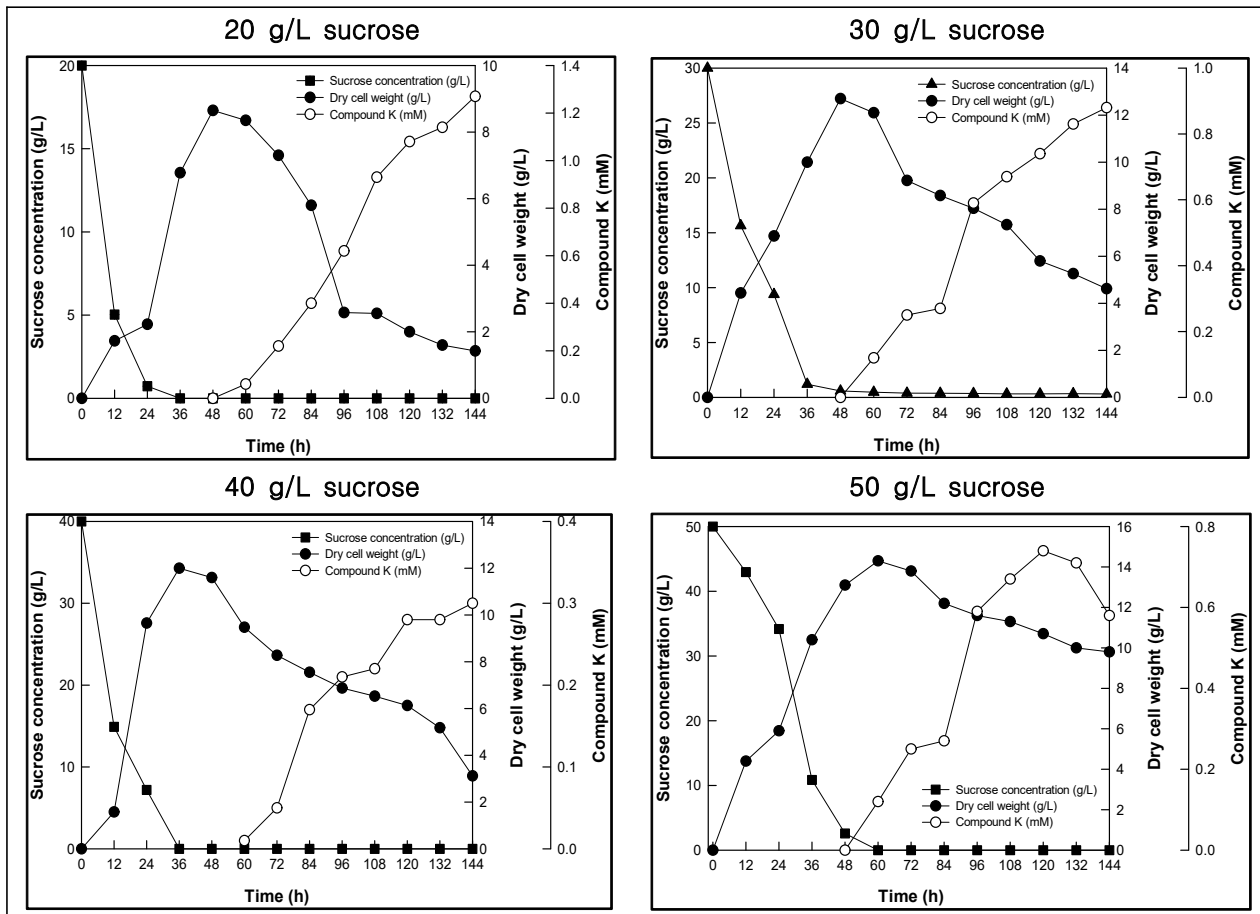


Fig 5. Fermenter에서 탄소원 농도에 따른 compound K 전환율

4가지 sucrose 농도에 대한 실험에서 각각 20 g/L는 36 h, 30 g/L는 48 h, 40 g/L는 36 h, 50 g/L는 60 h에 배양 중 sucrose를 모두 소진함. 40 g/L 와 30 g/L의 sucrose 시간이 차이가 나는 것을 보였지만 이는 배양 및 측정에 대한 오차로 사료됨. 모든 조건에서 DCW가 36~60 h내 최고점을 찍고 점점 떨어지는 패턴을 보였으며, 이는 sucrose농도가 낮은 조건이 더 급격하게 떨어지는 모습을 보임.

인삼추출물 투입 후 배양 48~60 h부터 compound K의 농도를 확인할 수 있었으며, 각각 20 g/L가 144 h에 1.3 mM, 30 g/L가 0.9 mM, 40 g/L가 0.3 mM, 50 g/L가 0.7 mM의 농도를 생산함. 실험 결과 20 g/L에서 최적 농도인 것을 확인하였지만, 성장보다는 생산 조건을 먼저 결정 후 재실험 진행 예정. 기질이 고갈된 후 균체증식이 감소하고 이에 따라 compound K 생산의 증가가 둔화됨. 이러한 문제점은 향후 sucrose의 유가식 배양으로 해결할 예정임.

## 2. 질소원 배지 성분 최적화

### 1) 질소원 종류별 테스트

질소원은 세포증식과 당분해 효소 생산에 중요하므로 corn steep solid, soybean powder, yeast extract 등 여러 가지 질소원 종류별 세포를 배양하고 세포 생장이 멈출 때 인삼추출물을 추가하여 compound K가 가장 많이 나오는 질소원을 선정하기 위한 실험을 진행함.

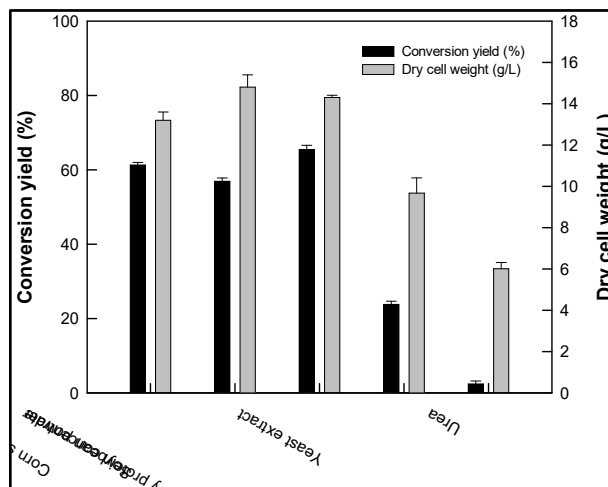


Fig 6. 질소원에 따른 compound K 전환율

식품에 사용할 수 있는 질소원을 이용하여 organic nitrogen source를 선정하였고, 5가지 fermentation으로 전환 반응 비교 시, 아미코젠에서 전달받은 soy protein concentrate가 가장 높은 전환율인 약 65%를 보여 최적 질소원 배지인 것으로 확인함.

### 2) Soy protein concentrate (SPC) 농도별 flask 테스트

아미코젠에서 받은 SPC를 앞선 실험을 통하여 최적 질소원 배지로 선택하여, 최적 농도를 확인하기 위하여 농도별로 동시전환 배양실험을 진행함.

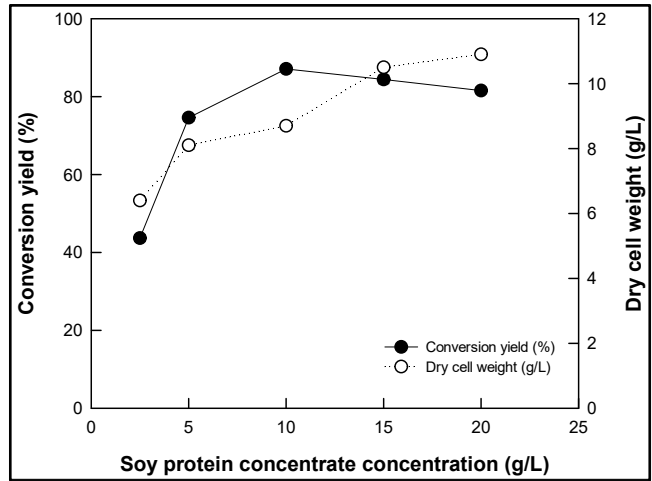


Fig 7. Soy protein concentrate 농도에 따른 compound K 전환율

SPC 농도를 각각 2.5, 5, 10, 15, 20 g/L로 선정하여 flask scale로 실험을 진행한 결과 2.5 ~ 10 g/L 까지 SPC 농도를 증가 시켰을 때 compound K의 전환율이 증가하는 것을 확인 하였으며, 이는 10 g/L에서 약 85%로 최대 전환율로 확인함. 15, 20 g/L에서 10 g/L보다 더 낮은 전환율을 보였으며, DCW은 SPC농도를 증가시킴에 더 증가되는 패턴을 확인함.

### 3. 기타 배지 성분 최적화

#### 1) 인산염 비율별 테스트

KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 등 여러 가지 인산염 종류별 세포를 배양하고 세포 생장이 멈출 때 인삼추출물을 추가하여 compound K가 가장 많이 나오는 인산염을 선정하기 위한 실험을 진행함.

Table 4. 인산염 최적화 배지 조성.

	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> (g/L)	Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> (g/L)	Total concentration (g/L)	Feeding AGE (g/L)
Control	2	0	2	2
2	1	1	2	2
4	2	2	4	2
6	3	3	6	2
10	5	5	10	2
14	7	7	14	2

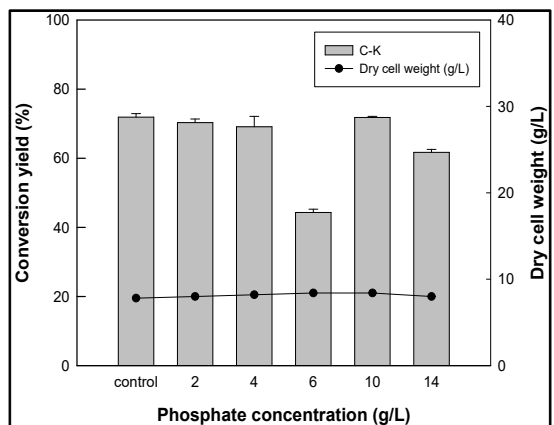


Fig 8. 인산염 농도의 따른 compound K 전환율

Control과 5 g/L KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 각각 넣어주는 것과 비교했을 때 전환율이 크게 차이 나지 않았

지만 cell mass가 증가한 total 10 g/L를 최적으로 선정함.

### 3) 미량원소 농도별 테스트

Table 5. 미량원소 배지 조성.

Metal ion (control)	0.3 g/L CaCl <sub>2</sub>
	3.7 mg/L CoCl <sub>2</sub> ·6H <sub>2</sub> O,
	5 mg/L FeSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O
	0.3 g/L MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O,
	1.3 mg/L MnSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O
	1.4 mg/L ZnSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O

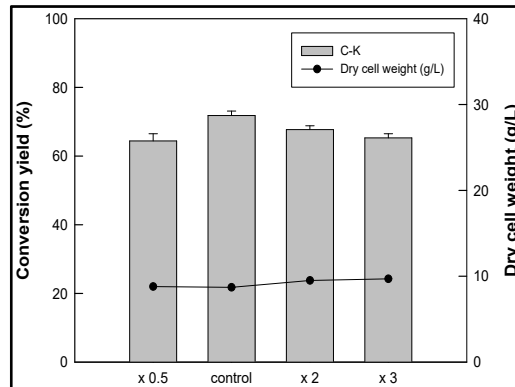


Fig 9. 미량원소 농도의 따른 compound K 전환율

현재 사용중인 metal ion을 control로 하여 배수 별 test 진행 시 농도를 배수로 높일수록 cell mass는 증가했지만, conversion이 낮아지기 때문에 위 control과 같은 농도를 최적으로 선정함.

### 4) Inducer 종류별 테스트

$\alpha$ -L-Arabinopyranosidase 활성 유도에 대한 inducer test 진행하기 위해 arabinose가 함유되어 있거나 glucosidase 활성이 좋았던 배지성분 8가지에 대해 Inducer로 사용 가능성을 compound K 전환율을 확인하여 실험을 진행함.

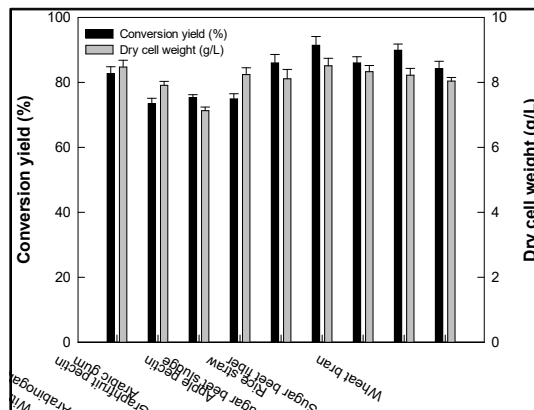


Fig 10. Inducer 종류에 따른 compound K 전환율

각각의 배지성분은 0.2% 농도로 진행했으며 결과 0.2% rice straw에서 가장 높은 전환율을 보여 inducer로 선정함.

### 5) 배양 온도별 테스트

Compound K 생산 최적 온도를 확인하기 위해 온도별로 온도에 따른 compound K의 전환율 실험을 진행함.

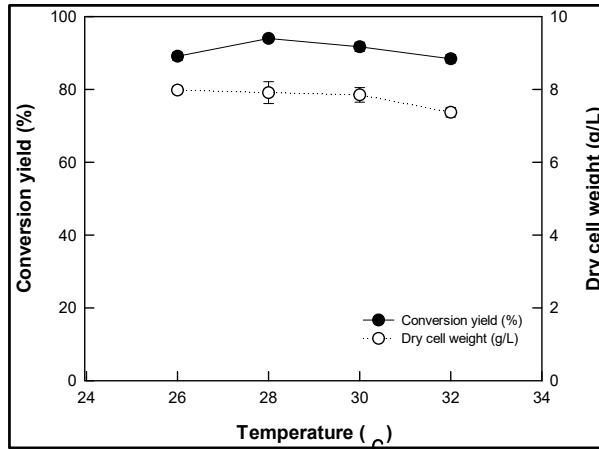


Fig 11. 온도에 따른 compound K 전환율

Compound K 생산온도를 26, 28, 30, 32°C 까지 비교해 본 결과 28 °C에서 전환율이 가장 높은 것 확인하였으며, 균체 성장은 온도가 증가함에 따른 소량 감소하는 패턴을 보임. 추후 실험은 28°C 로 진행함.

### III. 인삼추출물 첨가 조건 최적화

#### 1. 인삼추출물 첨가 시간별 테스트

인삼추출물을 초기에 추가하면 곰팡이 성장을 저해하므로 인삼추출물 추가시기를 달리하여 추가하여 compound K가 가장 많이 나오는 시간을 선정하기 위한 실험 진행함.

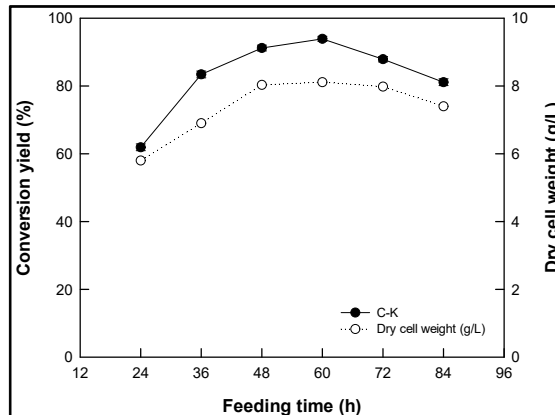


Fig 12. 인삼추출물 첨가시간에 따른 compound K 전환율

세포 성장과 동시에 전환반응을 진행하기에 최적인 기질 첨가 시간을 확인해보기 위하여 12 시간 간격으로 24 ~ 84 h 까지 2 g/L ginseng extract를 feeding 하여 확인. 전환반응을 확인해 본 결과 60 h에 첨가해주는 것이 가장 최적임을 확인함.

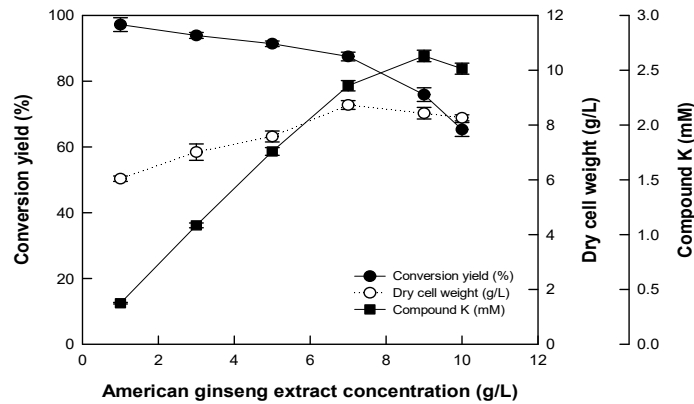
#### 2. 인삼추출물 첨가 농도별 테스트

인삼추출물을 일시적으로 많은 양을 추가하면 곰팡이 성장 및 compound K 생산이 저해되므로 나누어 추가하는 방법을 사용하고, 이때 다양한 농도 및 추가시간을 변화하여 실험한 후 최적의 농도 및 추가 시간을 결정함.

Fig 13. 인삼추출물 첨가 농도에 따른 compound K 전환율

American ginseng extract 농도가 세포 성장 및 전환반응에 영향을 미치는지와 최적 농도를 확인하기 위하여 1~10 g/L 농도로 비교 실험 진행함. 9 g/L에서 전환율은 낮은 기질 농도에서보다 낮지만, compound K 생산 농도에 대해서는 높기에 9 g/L를 최적으로 선정하였고 추후 intermittent





feeding 진행하여 농도 높일 예정임.

### 3. 인삼추출물 분할 첨가 농도별 테스트

기질로 사용하는 American ginseng extract를 낮은 농도로 12 시간 간격으로 2번 첨가 했을 때, 세포 성장 및 전환반응저해가 감소하는지에 대해 확인하기 위하여 실험 진행함.

Table 5. 인삼추출물 분할 첨가 농도에 따른 compound K 전환율

run	Feed time			Total AGE concentration (g/L)	Conversion yield (%)	C-K (g/L)	C-K (mM)	Productivity (mg/L/h)
	48 h	60 h	72 h					
1	0	9	0	9	73.6	1.59	2.55	11.0
2	4.5	4.5	0	9	82.3	1.78	2.85	12.3
3	0	4.5	4.5	9	83.4	1.80	2.89	12.5
4	5	5	0	10	86.2	2.07	3.32	14.4
5	0	5	5	10	85.6	2.05	3.30	14.3
6	6	6	0	12	78.3	2.25	3.62	15.7
7	7	7	0	14	68.4	2.30	3.69	16.0
8	8	8	0	16	61.3	2.35	3.78	16.3
9	9	9	0	18	52.5	2.27	3.64	15.7
10	10	10	0	20	41.2	1.98	3.17	13.7

이전 실험에서 60 h에 9 g/L 첨가했을 때, 최적이었지만, 48 h, 60 h 두 번에 걸쳐 8 g/L, total 16 g/L를 첨가했을 때가 이전 실험보다 약 1.5배 생산 농도 증가. 산업적으로 많은 compound K 생산 농도와 높은 생산성을 얻는 조건으로 기질 농도 최적화 진행 완료. Flask 에서의 최적 조건을 토대로 compound K 생산과 관련하여 현재 특허 출원 완료.

### 4. 인삼추출물 첨가 3 L 발효기 테스트

#### 1) 동시전환배양 시 feeding 방법에 따른 compound K 생산 테스트

생산 조건을 먼저 확인해야할 것으로 판단하여 36~84 h에 연속 feeding 조건과 36, 48 h에 shot feeding 조건으로 3 L 발효기를 이용한 인삼추출물 첨가 조건 test를 진행함.

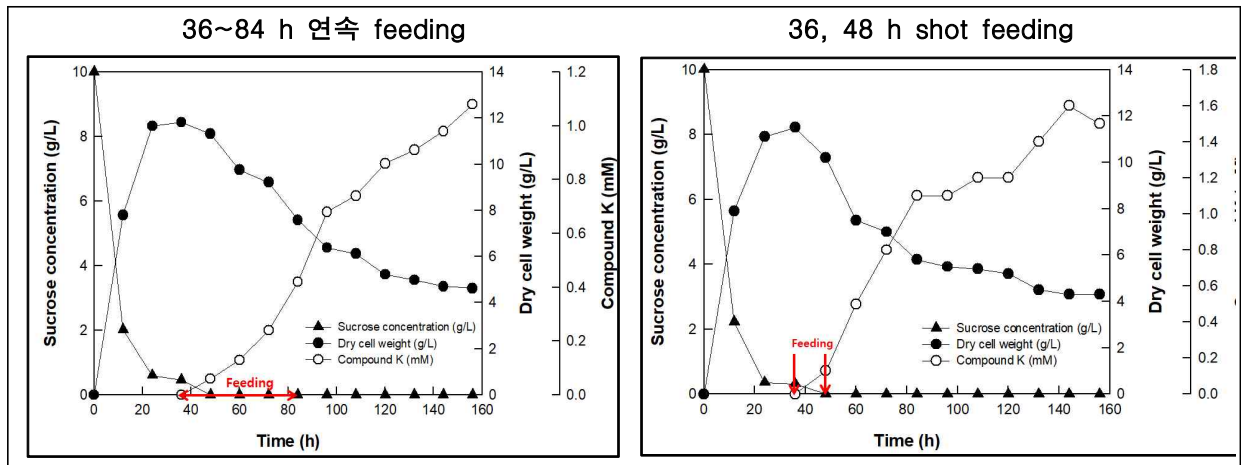


Fig 14. Fermenter에서 인삼추출물 첨가 조건에 따른 compound K 전환율

10 g/L sucrose로 feeding 조건 확인 중에 있으며, 추후 성장, 생산 조건을 따로 결정하여 비교할 예정. 인삼추출물의 분할첨가가 연속첨가 보다 초기 compound K 생산 속도가 높았는데 이는 연속 첨가가 초기에 당부족이 더 크게 일어난 현상으로 파악됨. 발효 말기에 분할첨가와 연속첨가 모두 compound K 생산 속도가 감소하고 이 compound K 생산량이 거의 같았음. 이러한 문제점은 향후 인삼추출물과 함께 sucrose의 첨가하는 방법으로 해결할 예정임.

2) 탄소원 feeding 유가식 배양에서의 인삼추출물 feeding방법에 따른 compound K 생산 테스트

기존 sucrose를 이용한 배지 조건에서 기질을 균이 사용함에 따른 낮은 생산성을 보이는 것으로 사료되어 sucrose를 연속으로 feeding 하는 방식으로 인삼추출물과 함께 feeding 하는 2가지 조건 실험을 진행함. 초기 sucrose 20 g/L, SPC 10 g/L, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> g/L, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 5 g/L와 미량원소를 넣어 배양을 진행 하였으며, 28℃에서 pH 5.0으로 배양을 진행함. Sucrose 소모가 거의 일어난 12 h부터 96 h까지 40 g/L의 sucrose를 300 ml에 feeding 배지를 만들어 연속 feeding 하였으며, feeding 배지에 16 g/L의 인삼추출물을 첨가한 조건과 feeding 진행시 36, 48 h에 각각 8 g/L씩 인삼추출물을 투입한 두 가지 조건으로 실험을 진행함. 배양 진행 시 배양 96 h이후 균체 성장 보다는 효소반응을 위하여 pH 4.5에 맞춰 유지 시켜줌.

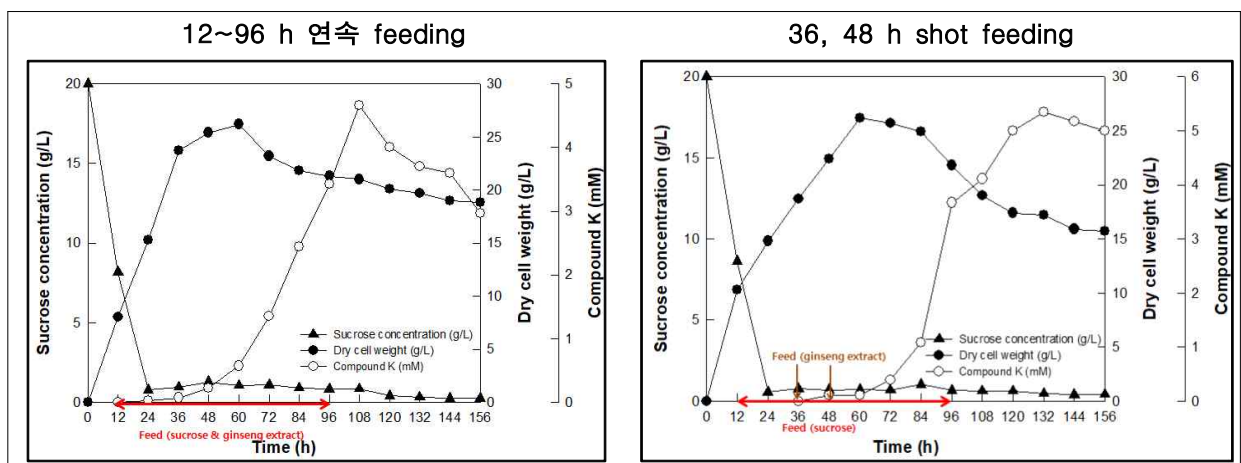


Fig 15. 탄소원 feeding 배양에서 인삼추출물 첨가 조건에 따른 compound K 전환율

두 가지 조건으로 배양 결과 인삼추출물을 연속 feeding한 조건에서 108 h에 4.66 mM의 최대 compound K 생산을 보였으며, 이는 2.9 g/L의 생산이며 27 mg/L/h의 생산성을 보임. 인삼추출물의 분할 shot feeding한 조건에서 132 h에 5.35 mM의 최대 compound K의 생산을 보였으며, 이는

3.3 g/L의 생산이며 25 mg/L/h의 생산성을 보임. 투입한 인삼추출물의 ginsenoside의 물전환율은 87%로 확인됨. 생산성이 약 2 mg/L/h 정도 차이를 보이거나 1 batch 배양에 더 많은 전환율과 compound K를 얻을 수 있는 shot feeding법으로 최적을 확인 하는 것으로 지속된 배양조건 최적화로 더 높은 생산성 및 전환율을 얻을 계획임.

#### IV. Compound K 정제 조건 최적화

##### 1. 선행 연구에 따른 Compound K 정제 조건 최적화

대표적인 사포닌 정제 방법으로 silica gel column chromatography와 결정화가 있으며 각각의 정제 방법은 다음과 같음.

###### ① Silica gel column chromatography

1. Fermentation 이후 culture broth를 원심분리 (3000 rpm, 10 min, 4 °C)
2. Broth와 동량의 EtOH로 추출
3. Ethanolic extract를 evaporation으로 powder화 한 다음 n-BuOH로 3번 정도 추출
4. Organic layer를 silica gel column chromatography에 흘려 CK 정제  
용매비율 : CHCl<sub>3</sub> -MeOH- EtOAc- H<sub>2</sub> O = 2 : 1 : 4 : 1

###### ② 결정화

1. 반응 sample을 4 °C에서 보관하여 반응 정지 및 CK 결정화
2. Filtering을 통한 결정화 된 CK 및 mycelia 회수
3. EtOH로 용해
4. Filtering을 통해 에탄올에 용해되어 있는 ginsenoside 회수 및 mycelia 제거
5. Evaporation으로 powder화

두가지 방법 중 식품용 compound K는 균체 제거액에 물을 첨가하여 저온에서 결정화를 시키고 여과한 후, 고체부분을 회수하여 에탄올에 녹인 후, 다시 여과하여 여과물을 회수하여 고체 불순물을 제거하고 에탄올을 증발 건조하여 제조함. 선행 연구로 재조합 효소를 이용한 compound K를 100% 전환 후 정제 시 60%의 순도로 정제했으며 추후 식품용 발효액 (AT 반응물)을 이용하여 정제할 경우 불순물이 더 많고 전환수율을 고려했을 때 정제 수율이 40~50%로 예상하고 있음. 이를 해결하기 위하여 compound K 전환율을 상승시킨 후 물 첨가량, 에탄올량, 결정화, 여과 및 건조 등의 조건을 최적화할 예정임.

Table 6. 재조합 효소의 조합반응을 이용한 compound K 전환과 정제 (선행 연구)

Step	Total PPD mg (mM)	Total PPT mg (mM)	Total CK mg (mM)	Total mg	Purity (%)	Step yield (%)	Total yield (%)
Ginseng powder	670.3 (3.2)	388.2 (2.3)	0	2021	0	-	-
Enzyme reaction	0.0	388.2 (2.3)	404.6 (3.2)	2021	20.02	100	100
Crystallization & Filtration	0.0	84.6 (0.86)	317.2 (2.5)	583	56.89	78	78
Evaporation	0.0	62.3 (0.62)	243.7 (1.9)	428	56.93	76	60.2

##### 2. 식품용 Compound K 정제

기존 연구에 사용된 Compound K 정제 방법은 식품용 Compound K 생산에는 사용이 불가하여, 새로운 정제실험을 진행함. 아미코젠 결과 내 III. 2. 2) shot feeding을 이용한 동시전환 배양실험에서 추출한 1차, 2차 추출액을 사용하여 Compound K 정제 실험을 진행함. 동시전환 배양액을 원심분리 하여, pellet을 모아 에탄올로 2회 추출하여, 추출액의 Compound K를 기준으로 실험을 진행함. 추출액을 micro filter를 사용하여 에탄올에 녹지 않는 물질을 정제함. 감압 농축하여 에탄올을 모두 제거 후 물을 첨가하여 물에 녹는 성분을 제거하여 정제함. 물을 이용한 정제 후 에탄올에 다시 녹여 compound K를 회수 하여, 고정화를 위한 부형제(Beta-cyclodextrin)을 넣어 건조시켜 분말화

된 compound K 제형을 계획함.

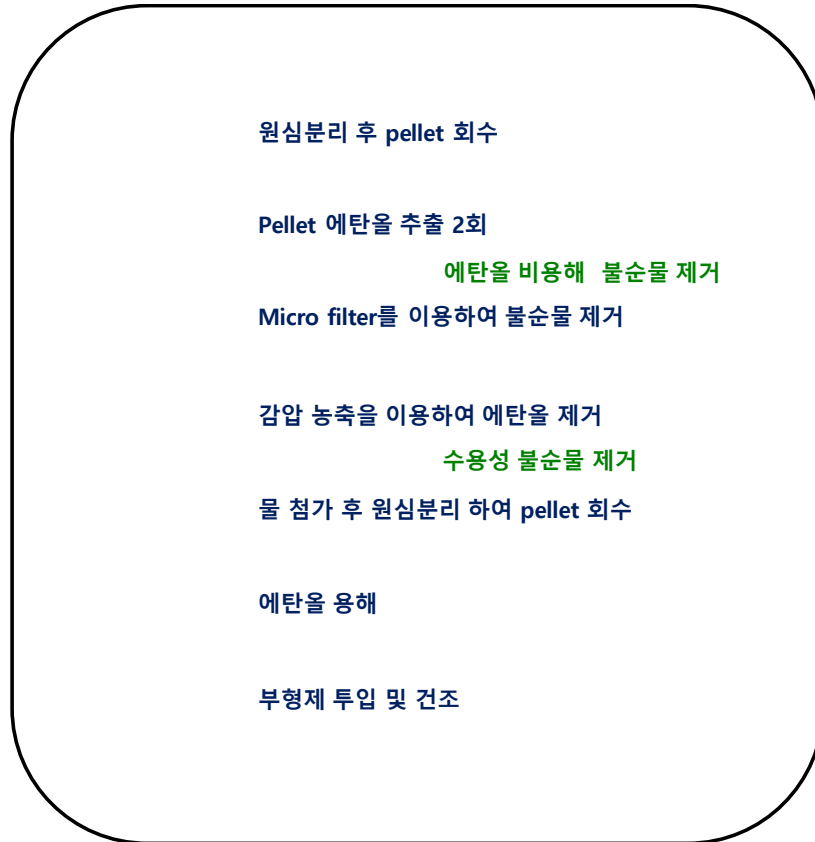


Fig 16. 식품용 compound K 정제 실험 과정.

추출액의 측정 시 고형분은 0.5% 이었으며, 추출액 내 compound K는 0.075%로 고형분의 15%의 함량을 가짐. Compound K의 건조 함량을 증가시키기 위해 추출액을 감압 농축하여 추출액 내 에탄올을 증발시킨 후 물을 첨가하여 물에 녹는 수용성 성분을 제거함. Compound K는 물에 녹지 않으며, 물에서 결정화를 함으로 물을 첨가하였을 때 추출에 사용한 95% 에탄올에 5% 물에 녹여 함께 추출한 물질을 정제 가능함. 물로 수용성 성분을 제거한 정제성분에 결정화된 compound K를 회수 하기 위해 소량의 에탄올을 이용하여 용해하였으며, 측정 시 정제액의 고형분은 2%이었으며, 고형분 내 compound K의 함량은 52%로 확인되었다. 정제액 건조 시 compound K의 보존과 제형을 위하여 부형제(Beta-cyclodextrin)를 첨가하려 하였으나, 현재 실험에 사용된 배양액의 scale이 작아 정제된 정제액 이 극소량을 가지고 있어 부형제를 첨가 후 건조를 위한 실험을 진행 시 건조된 compound K의 회수가 불가능 하여, 배양액을 충분히 모아 회수 가능한 부피의 compound K 달성 시 부형제를 첨가한 건조를 계획함. 부형제를 첨가하지 않은 건조를 통하여 제형이 잡혀있지 않은 정제 시 정제된 고형분의 함량은 52%로 확인 되었으며, 이는 최초 추출한 compound K의 정제수율이 53%임을 확인함. Scale up 및 부형제를 첨가한 건조를 진행 시 함량 및 정제수율이 감소 할 것으로 예상되며, 첨가된 정제 방안 및 공정실험을 계획함.

## V. Scale-up에 의한 탄소원 농도 및 공급 최적화

### 1. 탄소원 초기 농도 최적화

Flask에서 fermenter로 scale-up을 통한 균 성장 속도 변화를 고려하여 동일한 탄소원을 이용하여 농도 최적화를 재진행 하였음

Table 7. Fermenter로의 scale-up에 의한 초기 탄소원 (sucrose) 농도 별 테스트

initial	$X_{max}$	$\mu_{max}$	activity <sup>a</sup>	C-K <sub>max</sub>	q <sub>P,max</sub>	molar	$f_t$
---------	-----------	-------------	-----------------------	--------------------	--------------------	-------	-------

sucrose (g/L)	(g/L)	(1/h)	(U/mL)	(g/L)	(mg/L/h)	conversion (%)	(h)
10	18.6 ± 0.2	0.31 ± 0.003	5.64 ± 0.05	0.99 ± 0.01	6.88 ± 0.06	25.7 ± 0.26	144
20	19.8 ± 0.3	0.33 ± 0.006	6.43 ± 0.04	1.29 ± 0.02	8.96 ± 0.10	33.6 ± 0.39	144
30	23.7 ± 0.4	0.33 ± 0.006	3.65 ± 0.04	0.83 ± 0.02	5.32 ± 0.13	21.6 ± 0.52	156
40	31.2 ± 0.5	0.52 ± 0.004	1.76 ± 0.05	0.71 ± 0.02	4.55 ± 0.09	18.5 ± 0.39	156
50	26.4 ± 0.3	0.44 ± 0.006	0.94 ± 0.04	0.29 ± 0.02	1.86 ± 0.02	7.55 ± 0.65	156

<sup>a</sup>  $\beta$ -Glucosidase activity was measured by the release of *para*-nitrophenol (*p*NP) from *para*-nitrophenyl  $\beta$ -D-glucopyranoside (*p*NPGLc).  $\mu_{max}$ : maximum specific growth rate,  $Y_{P/S}$ : C-K yield from sucrose,  $Y_{P/AGE}$ : C-K yield from AGE,  $q_{P,max}$ : volumetric production rate of C-K,  $f$ : fermentation time.

실험 결과 20 g/L의 초기 자당농도에서 compound K 생산량 및 glucosidase의 활성이 가장 높았음. 또한 탄소원이 증가하면서 비성장 속도는 증가하나, 균체 성장과 compound K의 전환율이 비례하지 않는 것을 확인하였음.

## 2. 회분식 및 유가식 배양과, 유가식 배양에서 탄소원 공급 전략 최적화

회분식과 유가식 배양 조건 및 유가식 배양에서 탄소원 공급에 따른 생산량 차이가 있는지 확인하기 위하여 실험을 진행함.

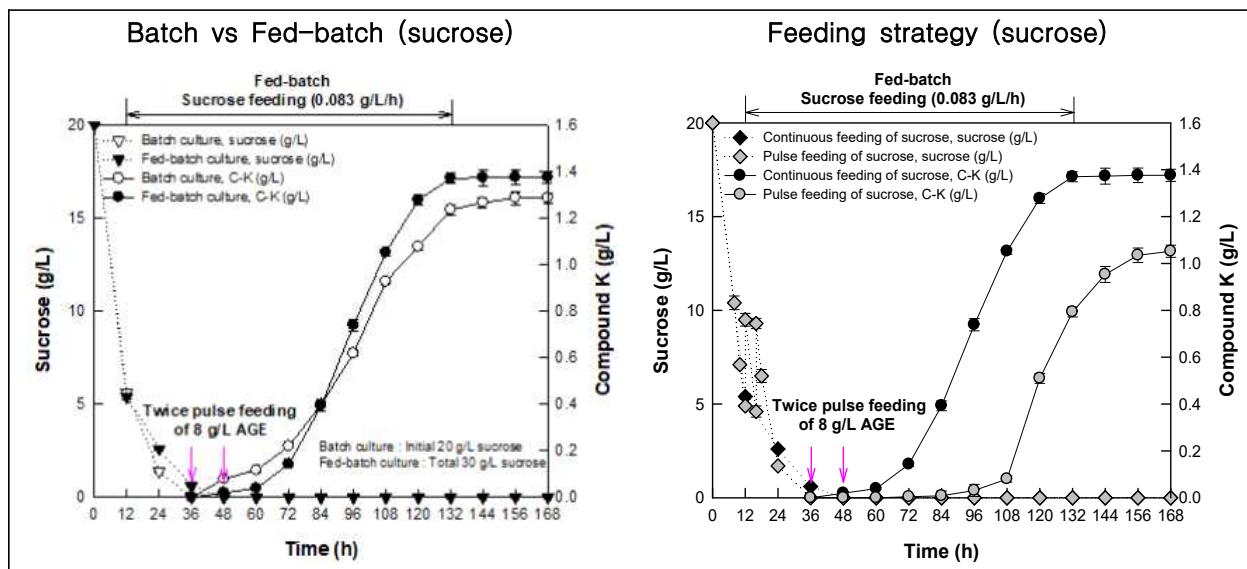


Fig 17. Fermenter에서 회분식과 유가식 배양 조건 및 공급 방식에 따른 compound K 전환율 비교

초기 자당농도를 20 g/L로 고정 후, 자당에 대한 회분식과 유가식 배양을 비교한 결과, 초기 20 g/L, 공급 10 g/L로써 총 30 g/L의 자당을 첨가한 유가식 배양에서 더 높은 전환율을 확인하였음. 이는 초기 30 g/L 자당의 농도보다 생산량이 높은 점을 확인하여 초기 30 g/L 이상의 고농도의 자당 농도는 compound K 생산 효소의 생산에 대한 inhibition이 있는 것으로 확인.

유가식 배양에서 자당의 continuous와 pulse feeding을 비교 한 결과 pulse feeding을 진행했을 때 역시 continuous 보다 생산량이 감소하는 것을 확인. 이는 5 g/L 자당 농도보다 낮은 농도로 sucrose를 첨가했을 때, 2차 대사산물을 생산하는데에 더욱 효과적인 것을 확인.

## 3. 탄소원 공급 기간 및 총 농도 최적화

탄소원인 자당이 연속적으로 발효조로 공급됨에 따라서 공급 기간 및 총 농도를 최적화 하기 위해 실험을 진행하였음. 자당은 12시간에 공급을 시작하였고, 108 - 144 h 까지 공급 중단 시간을 달리하여 진행하였음. 최적의 공급 시간에 따른 농도 최적화를 진행하기 위하여 초기 20 g/L 자당

을 포함한 총 자당 농도를 30 - 80 g/L 까지 최적화 하였음.

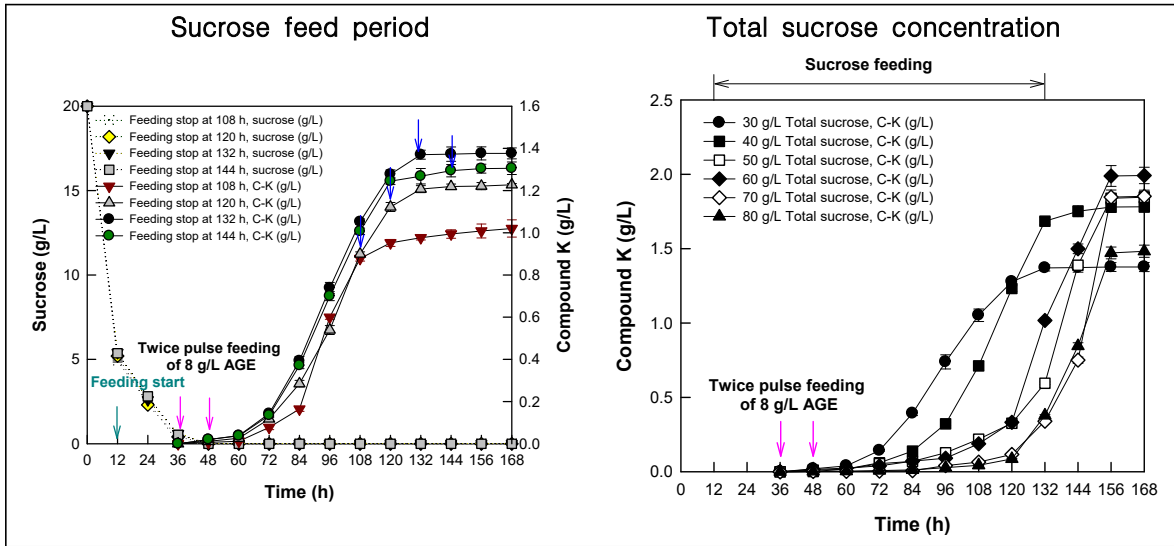


Fig 18. Fermenter에서 유가식 배양에 따른 sucrose 공급 시간 및 총 농도 별 테스트

실험 결과 자당은 발효 12시간부터 132시간까지 연속적으로 첨가하는 것이 compound K 생산이 가장 높은 것을 확인. 추가적으로 12 시간부터 132시간까지 초기 자당을 포함한 총 자당 농도 최적화를 진행하였으며 실험 결과 12시간부터 132시간까지 총 60 g/L (초기 20, 공급 40 g/L) 농도에서 가장 생산량이 좋은 것을 확인. 이는 0.33 g/L/h의 유속으로 자당을 첨가했을 때, Compound K를 생산하는 효소 생산이 많으며, 이는 2차 대사산물인 compound K 생산에 가장 적합한 농도로 결정하였음. 추후 모든 실험에서 자당은 발효 12시간부터 132시간까지 0.33 g/L/h의 유속으로 첨가하였음

## VI. 인삼 추출물 공급 전략 테스트

### 1. 인삼 추출물 공급 전략 비교

유가식 배양을 진행함에 따라 고농도의 기질에 대한 세포 성장 및 반응 억제반응을 감소시키기 위한 목적으로 반응물로서 미국삼 추출물의 첨가 전략을 비교하기 위한 실험을 진행함

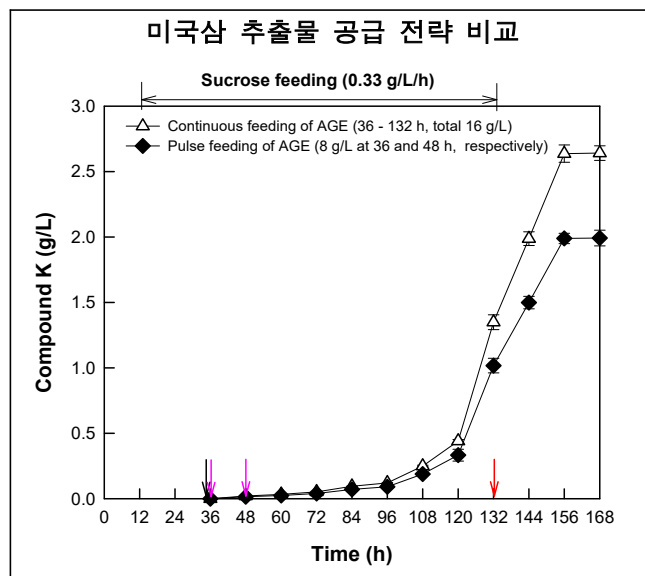


Fig 19. Fermenter에서 유가식 배양에 따른 미국삼 추출물 공급 전략 테스트

Pulse feeding의 경우 배양 36 및 48시간에 8 g/L 농도로 각각 첨가하였으며, continuous feeding의 경우 36-132시간 까지 총 16 g/L를 첨가하여 compound K 생산량을 비교하였음. 실험

결과 continuous의 경우에 생산량이 1.3배 증가 한 것으로 확인되었으며, 이는 고농도의 기질을 오랜 기간 첨가하는 것이 올바른 방법으로 생각 됨. 추가적으로 세포 성장 및 반응에 대한 최적의 기질 첨가 시간을 확인할 예정.

## 2. 미국삼 추출물의 연속 첨가에 의한 최적 기간 테스트

반응물로서 미국삼 추출물이 일정 농도로 천천히 첨가되는 것에 대한 효과를 확인하여, 추가적인 최적의 기질 공급 기간을 확인하기 위해 실험을 진행함.

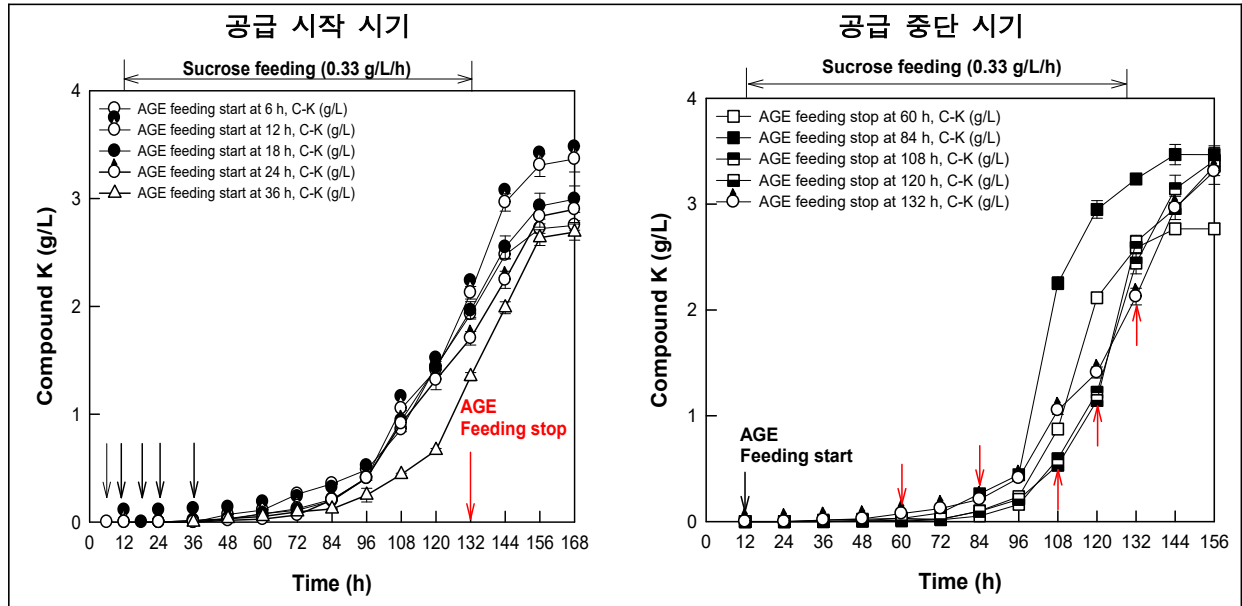


Fig 20. Fermenter에서 미국삼 추출물 공급 기간 테스트

Table 8. Fermenter에서 미국삼 추출물 공급 기간 테스트 결과 표

No.	$F_{start}$ (h)	$F_{stop}$ (h)	C-K <sub>max</sub> (g/L)	$q_{P,max}$ (mg/L/h)	molar conversion (%)	$f_t$ (h)
1	6	132	2.72 ± 0.02	17.4 ± 0.14	70.8 ± 0.57	156
2	12	132	3.31 ± 0.06	21.2 ± 0.38	86.2 ± 1.56	156
3	18	132	2.93 ± 0.05	18.8 ± 0.32	76.3 ± 1.29	156
4	24	132	2.83 ± 0.05	18.2 ± 0.32	73.7 ± 1.29	156
5	36	132	2.63 ± 0.04	16.9 ± 0.23	68.5 ± 0.95	156
6	12	60	2.77 ± 0.03	19.2 ± 0.18	72.1 ± 0.68	144
7	12	84	3.47 ± 0.05	24.1 ± 0.33	90.4 ± 1.24	144
8	12	108	3.41 ± 0.07	21.8 ± 0.45	88.8 ± 1.83	156
9	12	120	3.35 ± 0.02	21.4 ± 0.13	87.2 ± 0.53	156
10	12	132	3.31 ± 0.06	21.2 ± 0.39	86.2 ± 1.59	156

$F_{start}$ : feeding-start time,  $F_{stop}$ : feeding-stop time.

실험은 공급 시작 및 중단 기간을 나눠서 비교 실험을 진행하였음. 공급 시작 시기는 132 시간에 중단하는 것으로 고정하여 6-36 시간 사이에 공급을 시작하여 비교하였음. 공급 중단 시기는 최적의 공급 시작 시간을 고정하여 중단 시간을 60 - 132시간 까지 달리하여 비교하였음. 실험 결과 12시간에서 84시간까지 미국삼 추출물을 첨가하였을 때, 가장 이상적인 생산 결과를 확인하였으며, 공급 중단 시간이 늦춰질수록 발효 기간이 연장되어 생산성이 감소되는 것을

확인하였음. 따라서 최적 기질 공급 기간은 발효 12시간부터 84시간까지 일정 유속으로 첨가하는 것으로 결정하였음.

### 3. 최적 기질 공급 기간에서의 공급 농도 최적화

이전 확인한 최적의 기질 공급 기간에서 최대 전환율 및 생산을 확인하기 위하여 기질 농도 최적화 실험을 진행함.

Table 9. Fermenter에서 미국삼 추출물 최적 농도 테스트

AGE (g/L)	C-K <sub>max</sub> (g/L)	q <sub>P,max</sub> (mg/L/h)	molar conversion (%)	f <sub>i</sub> (h)
8	1.91 ± 0.00	13.2 ± 0.00	100 ± 0.0	144
12	2.69 ± 0.08	18.6 ± 0.52	93.4 ± 2.6	144
16	3.47 ± 0.03	24.1 ± 0.21	90.4 ± 0.8	144
20	3.94 ± 0.01	27.4 ± 0.07	82.1 ± 0.2	144
24	3.56 ± 0.03	22.8 ± 0.16	61.8 ± 0.4	156
32	3.54 ± 0.02	21.1 ± 0.12	46.1 ± 0.3	168

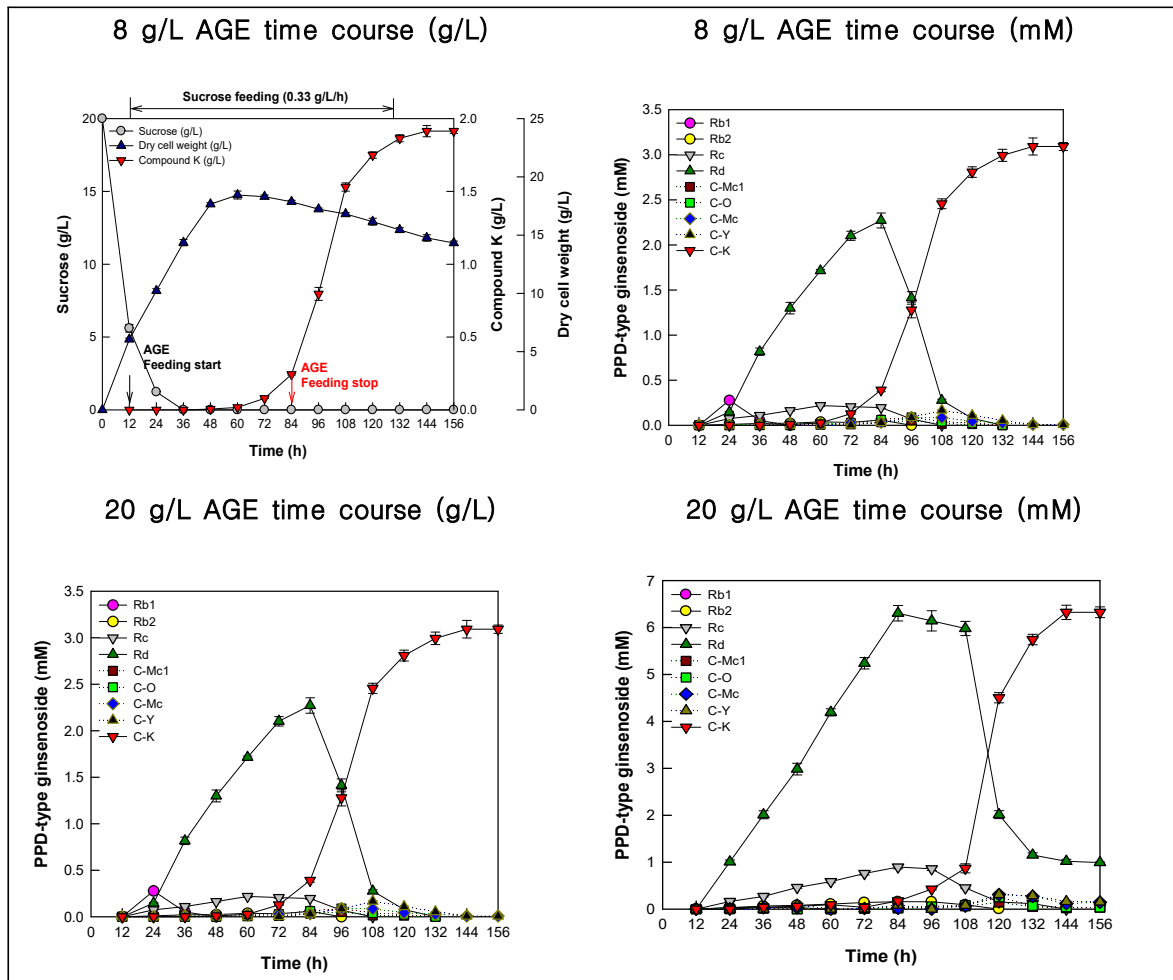


Fig 21. Fermenter에서 미국삼 추출물 최적 농도 시간 별 변화



실험은 발효 12-84시간 사이 8-32 g/L의 미국삼 추출물을 각각 일정한 농도로 첨가하여 비교실험을 진행하였음. 실험결과 8 g/L에서 100 % 의 최대 전환율을 확인하였으며 그 이후의 농도에서는 전환율이 감소하는 것을 확인하였음. 하지만 20 g/L의 미국삼 추출물 농도에서 전환율은 82.1 %로 비교적 감소하였지만, 생산 농도 및 생산성이 각각 3.94 g/L와 27.4 mg/L/h로서 가장 생산량이 높은 것을 확인하였음. 20 g/L 이상의 농도에서는 전환율이 현저히 감소하였으며, 발효 기간 또한 연장되어 생산성이 매우 감소하는 것을 확인하였음. 미국삼 추출물 내 프로토파낙사트리올계 진세노사이드의 시간 별 변화를 통해 확인 한 결과, 20 g/L의 미국삼 추출물 농도에서도 Rd가 발효 84시간에 약 6.5 mM 정도 축적 되는 것을 확인하였음. 이는 고농도의 미국삼 추출물에서 초기 반응물인 Rb1, Rb2, Rc가 모두 Rd로 축적이되며, Rd의 축적으로 인한 inhibition을 받는 것으로 사료되며, 생산 농도를 증가시키기 위해서는 별도의 추가적인 실험이 필요 할 것으로 생각되어짐.

## VII. 발효액으로부터 식품용 컴파운드 케이 정제 조건 최적화

### 1. 발효액으로부터 컴파운드 케이 정제를 위한 상층액 처리

발효액은 원심분리를 통하여 침전물과 상층액을 나눠 두 부분에서의 정제를 모두 진행하였으며 추후 합쳐주었음.

침전물의 경우 100 % EtOH 1 L로 3번 반복하여 추출하였으며, 추출액은 모두 농축기를 통해 농축하였음. 농축 된 상층액 및 침전물 추출액의 불순물을 제거하기 위해 Whatman filter paper No.1, 0.45  $\mu$ m, 0.25  $\mu$ m filter size으로 여과 및 한외여과를 진행하였다. 한외여과 이후 octadecyl-silica (ODS) A column (3  $\times$  60 cm, 50  $\mu$ m particle size; YMC, Kyoto, Japan) 처리를 통하여 추가적인 정제를 진행하였다. Column은 55% acetonitrile을 10 mL/min으로 흘려 C-K를 제외한 부산물을 제거하였고, 75 % acetonitrile을 흘려 C-K를 수득하였다. 75 % acetonitrile을 흘려 얻은 sample은 농축하였고 C-K는 Hydrosphere C18 preparative column이 결합 된 preparative high-performance liquid chromatography를 통해 수득하였다. (Flow rate : 5 mL/min; Temperature : 30°C; Absorbance: 203 nm)

Table 10. 발효액으로부터 EtOH 와 수지 처리를 통한 compound K 정제

Step	Volume (L)	Dried solid (g)	C-K (g)	C-K concentration (g/L)	Purity (%)	Yield (%)	Recovery (%)
Fermentation broth	1.00			1.92 $\pm$ 0.00			100
1 <sup>st</sup> ethanol extraction	1.00	2.35 $\pm$ 0.02	0.87 $\pm$ 0.01	0.87 $\pm$ 0.01	37.0 $\pm$ 0.11	45.3 $\pm$ 0.52	45.3 $\pm$ 0.52
2 <sup>nd</sup> ethanol extraction	1.00	0.98 $\pm$ 0.01	0.34 $\pm$ 0.01	0.34 $\pm$ 0.01	34.7 $\pm$ 0.16	32.4 $\pm$ 0.95	63.0 $\pm$ 1.76
3 <sup>rd</sup> ethanol extraction	1.00	0.60 $\pm$ 0.01	0.13 $\pm$ 0.02	0.13 $\pm$ 0.01	21.7 $\pm$ 1.23	18.3 $\pm$ 2.82	69.8 $\pm$ 3.12
Supernatant extraction	1.00	0.31 $\pm$ 0.02	0.08 $\pm$ 0.01	0.08 $\pm$ 0.01	25.8 $\pm$ 0.05	4.17 $\pm$ 0.52	74.0 $\pm$ 1.74
All extraction	0.20	4.24 $\pm$ 0.05	1.42 $\pm$ 0.01	7.10 $\pm$ 0.05	33.5 $\pm$ 0.65	74.0 $\pm$ 0.52	74.0 $\pm$ 0.52
Ultrafiltration	0.05	1.85 $\pm$ 0.03	1.09 $\pm$ 0.01	218 $\pm$ 6.00	58.9 $\pm$ 0.43	76.8 $\pm$ 0.70	56.8 $\pm$ 0.56
Octadecyl-silica resin	0.03	1.21 $\pm$ 0.03	0.85 $\pm$ 0.01	28.3 $\pm$ 0.33	70.2 $\pm$ 1.08	77.9 $\pm$ 0.92	44.3 $\pm$ 0.64
C18 resin in prep-HPLC	0.01	0.50 $\pm$ 0.01	0.48 $\pm$ 0.01	48.0 $\pm$ 1.10	96.0 $\pm$ 0.04	56.4 $\pm$ 1.18	25.0 $\pm$ 0.59

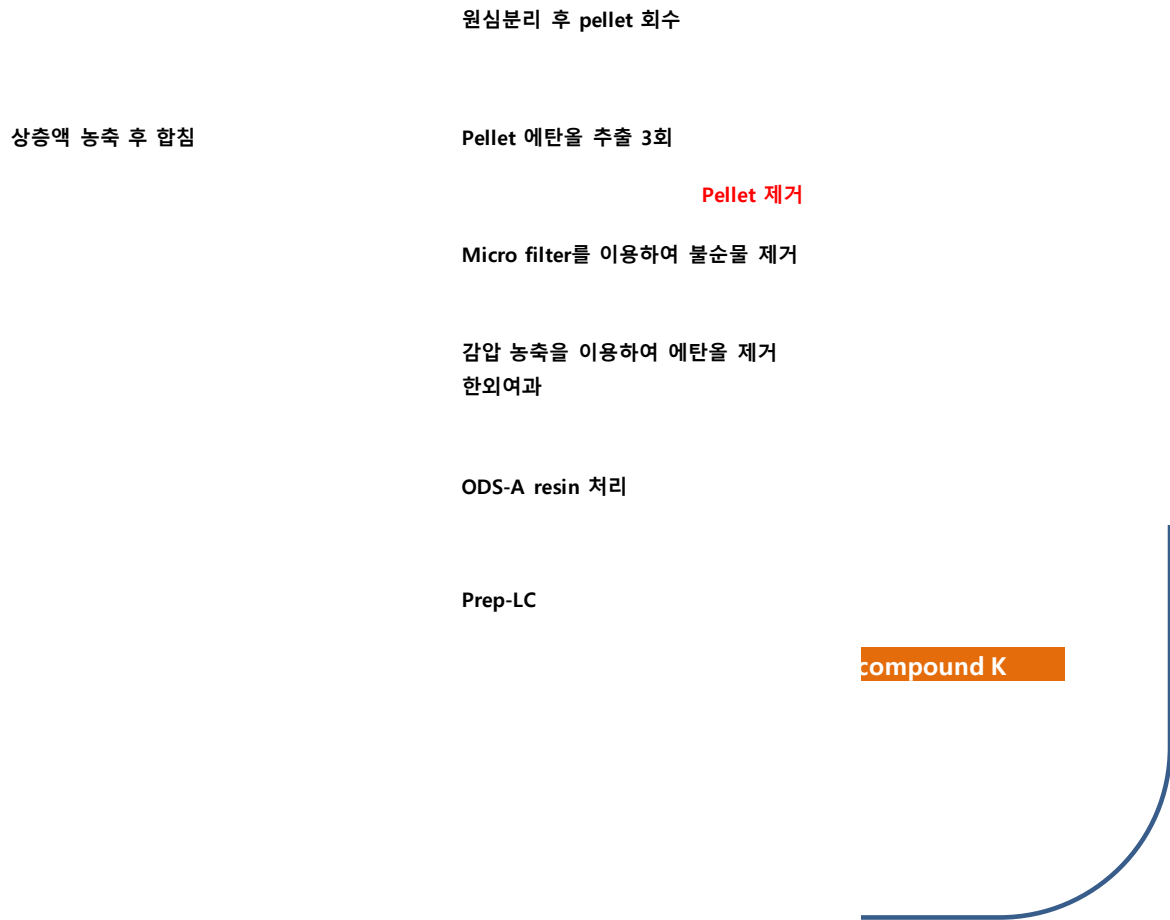


Fig 22. 식품용 compound K 정제 실험 과정

### VIII. 컴파운드 케이 제조방법 확립

- CK 과제 1단계 평가 보고서' 의 유가식 발효법 결과에 따르면, Rd의 축적으로 인하여 CK 전환에 inhibition을 가하는 것으로 생각됨. 따라서 Rd의 축적으로 인한 inhibition을 해소하여 CK 생산성을 증가시키기 위해 상업용 효소를 첨가함.

#### I. Flask level 최적화

##### 1. 상업용 효소별 전환율 비교

실험에 사용할 상업용 효소를 선정하기 위해 4종의 상업용 효소(Pectinex SP-L, Viscozyme, Cellulosin AL8, Pluszyme)의 비교 실험을 진행하였음.

상업용 효소 비교실험 반응조건	
Substrate (g/l)	16
Enzyme (mg/ml)	0.4
Temperature (°C)	55

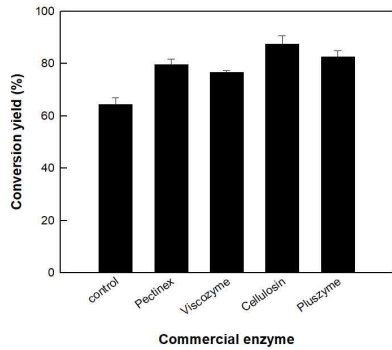


Fig 23. 상업용 효소별 CK 전환율

Commercial enzyme	Conversion yield (%)
Control (Fermentation)	64.3
Pectinex SP-L	79.6
Viscozyme	76.7
Cellulosin AL8	87.6
Pluszyme	82.5

Table 10. 상업용 효소별 CK 전환율

4종의 상업용 효소의 CK 전환수율을 비교한 결과, Cellulosin AL8이 가장 높은 전환수율을 보이는 것을 확인함.

## 2. 상업용 효소 최적화

선정한 상업용 효소 Cellulosin AL8의 American ginseng extract에 대한

### 1) 효소 첨가 시점

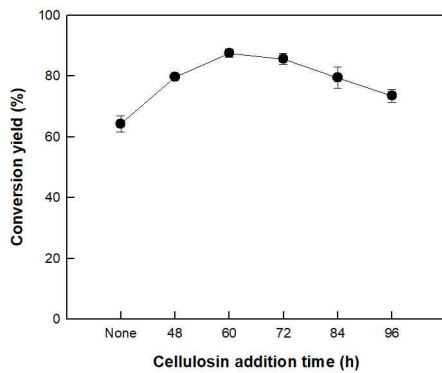
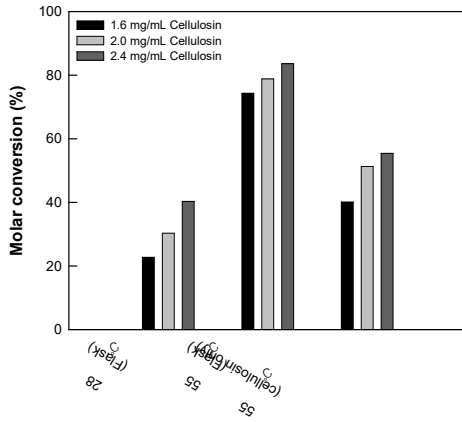


Fig 24. Cellulosin 첨가시간별 CK 전환율

Reaction conditions	
AGE	16 g/l
Cellulosin	0.4 mg/ml
Fermentation time	144 h

Fermentation 진행 도중 CK를 가장 많이 전환시키는 Cellulosin 첨가시점을 확인하기 위해 시간별 효소 첨가 비교실험을 진행함. 총 5개의 point를 실험하였으며, *A. tubingensis*가 stationary phase에 도달한 시점 전후로 진행하였음. 실험 결과 발효 시작 후 60h에서 가장 높은 전환율을 보였음.

### 2) 효소 농도 최적화



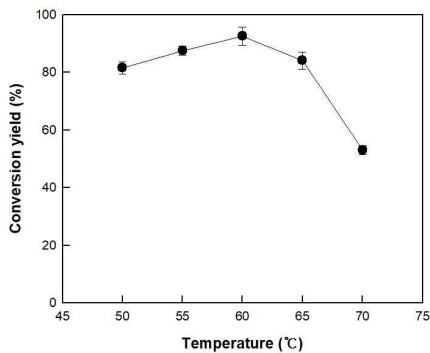
Reaction conditions	
AGE	24 g/l
Cellulosin	1.6 ~ 2.4 mg/ml
Temperature change time	60 h (28 □ 55 °C)
Fermentation time	144 h

Fig 25. 효소 농도별 CK 전환율

Cellulosin의 첨가량과 온도변화의 효과를 확인하기 위해 1.6, 2.0, 2.4 mg/ml까지 높혀 비교 실험을 진행함. 실험 결과 발효 시작 후 60 h에 온도를 55 °C로 증가시켰을 때 전환율이 약 3배 증가함을 확인함. 온도변화가 효소의 activity를 증가시킨 것으로 생각됨. 효소의 농도를 더 높여도 limitation이 일어나진 않았지만, fermentation과 enzyme의 synergy effect라는 meaning이 되색되어 더 높은 농도의 실험은 진행하지 않음.

### 3) 효소 온도 최적화

Cellulosin의 CK 생산 최적 온도를 확인하기 위해 온도에 따른 CK 전환율 실험을 진행함.



Reaction conditions	
Cellulosin	0.4 mg/ml
AGE	16 g/l
pH	5.0 of 50mM MC buffer
Reaction time	48 h

Fig 26. 온도별 Cellulosin 활성

CK 생산온도를 50, 55, 60, 65, 70°C 까지 비교한 결과, 60°C 에서 전환율이 가장 높은 것을 확인함. 추후 Cellulosin을 첨가한 후 60°C에서 반응을 진행함.

## II. Fermentor level 적용

3) 기질농도 26, 32 g/l 와 Cellulosin 1.2 mg/ml 반응조건의 fermenter 실험을 진행함.

26 g/L AGE		32 g/L AGE	
28 ℃	60 ℃	28 ℃	60 ℃
	Cellulosin addition		Cellulosin addition

	26 g/L AGE	32 g/L AGE
C-K (g/L)	5.18	4.13
C-K (mM)	8.32	6.63
Conversion yield (%)	83.1	53.7
Productivity (mg/L/h)	39.2	31.3

실험 결과, flask level에서와 다르게, fermenter level에서는 반응 시간이 길어지는 것을 확인. 또한 F2가 전환되지 않고 축적되는 것을 확인.

## IX. 인삼 추출물에서 컴파운드 케이 제조 수율 최대화

### I. Flask level 최적화

#### 1. 상업용효소 첨가 실험

##### 1) 효소 첨가 방법 최적화

효소 농도 test 전, F2가 축적되는 문제를 해결하기 위해 Cellulosin의 첨가 방법에 대한 실험을 진행함. 첨가한 Cellulosin의 총 농도는 동일하되, 시간에 따른 분할 첨가를 통해 CK 전환율에 나타나는 차이를 확인함.

1		2	
28℃	55℃ 4.76 mM	28℃	55℃ 4.21 mM
3		4	
28℃	55℃ 4.41 mM	28℃	55℃ 4.57 mM
5		6	
28℃	55℃ 3.81 mM	28℃	55℃ 4.94 mM

Control				
28℃	55℃ 5.71 mM			
		효소 첨가 시간		
		48 h	60 h	72 h
1		0.2	0.2	0.2
2		0.2	0.2	
3		0.2		0.2
4		0.1	0.3	
5		0.3	0.1	
6			0.4	
cont			0.4	
		1 - 6 72 h 온도 change		
		cont 60 h 온도 change		

Fig 27. 효소 첨가 시간 및 방법별 CK 전환율

실험 결과, Control에 비해 1 ~ 6 실험에서 F2가 감소하지 않음. 또한 Cellulosin의 분할첨가에 따

른 CK 생산도 60h에 한 번에 첨가한 control에 비해 낮은 수치를 가짐. *A. tubingensis*의 extracellular enzyme 생산 시간은 72 h 이후의 시간으로 예상되지만, 시간을 늦출수록 productivity가 감소하는 경향을 보여 온도 변경 시간을 빠르게 가져가는 것이 좋을 것이라 판단함.

2) 온도변화시점 최적화

*A. tubingensis*의 효소 생산은 고려하지 않고, productivity에 초점을 맞춰 3) 효소 첨가 최적화 실험에서 확인하지 않았던 앞쪽 시간대에서 확인하기 위해 추가적으로 효소 분할첨가 및 온도변화시점 실험을 진행함.

	24h	36h	48h	60h	72h
1		Enz 0.2 AGE 8	Enz 0.2 AGE 8		
2			Enz 0.2 AGE 8	Enz 0.2 AGE 8	
3				Enz 0.2 AGE 8	Enz 0.2 AGE 8
4			Enz 0.2 AGE 8	Enz 0.2 AGE 8	
5			Enz 0.2 AGE 8	Enz 0.2 AGE 8	Enz 0.2
6 (cont)			AGE 8	Enz 0.4 AGE 8	
7			Enz 0.4 AGE 8	AGE 8	
8		AGE 8	Enz 0.4 AGE 8		

온도변화시점

Table 12. Cellulosin 농도 및 첨가방법별 실험

Result	Fermentation time (h)	C-K (g/L)	C-K (mM)	Productivity (mg/L/h)	Conversion yield (%)
1	84	2.11	3.39	25.1	55.0
2	120	3.18	5.10	26.5	82.8
3	108	2.91	4.67	26.9	75.8
4	96	2.67	4.29	27.8	69.6
5	84	3.05	4.90	36.4	79.5
6 (cont)	96	3.46	5.55	36.0	90.1
7	84	2.34	3.76	27.9	60.9
8	84	3.01	4.83	35.8	78.4

Table 13. Cellulosin 온도변화 실험별 최대 productivity

Result	132 h 기준			
	C-K (g/L)	C-K (mM)	Productivity (mg/L/h)	Conversion yield (%)
1	2.71	4.35	20.5	70.6
2	3.31	5.31	25.1	86.2
3	3.15	5.06	23.9	82.1
4	2.94	4.72	22.3	76.6
5	3.54	5.68	26.8	92.2
6 (cont)	3.56	5.72	27.0	92.9
7	2.71	4.35	20.5	70.6
8	3.22	5.17	24.4	83.9

Table 14. 132h 기준 실험별 CK 전환정도

실험 결과, 각 실험의 최대 productivity를 비교했을 때, 총 0.6 mg/ml Cellulosin을 첨가한 5번에서 최대임을 확인함. 하지만 132h 기준으로 6번 control에서 productivity가 가장 높은 것을 확인함. 5번과 6번 실험의 최대 productivity 또한 0.4 mg/l/h 정도 차이기 때문에 6번 조건에서 Cellulosin 농도를 0.6 mg/ml 으로 높인다면 5번의 결과보다 높은 결과일 것으로 예상하였음. 따라서 이후 실험은 Cellulosin을 한 번에 첨가하는 것으로 진행함.

## 2. 기질 및 효소 조건 최적화

### 1) 기질 및 효소 농도 최적화

성립된 최적 효소 온도, 첨가 방식을 기준으로 최대의 productivity를 보이는 기질과 Cellulosin 농도를 확인하기 위해 기질, 효소 농도 최적화 실험을 진행함.

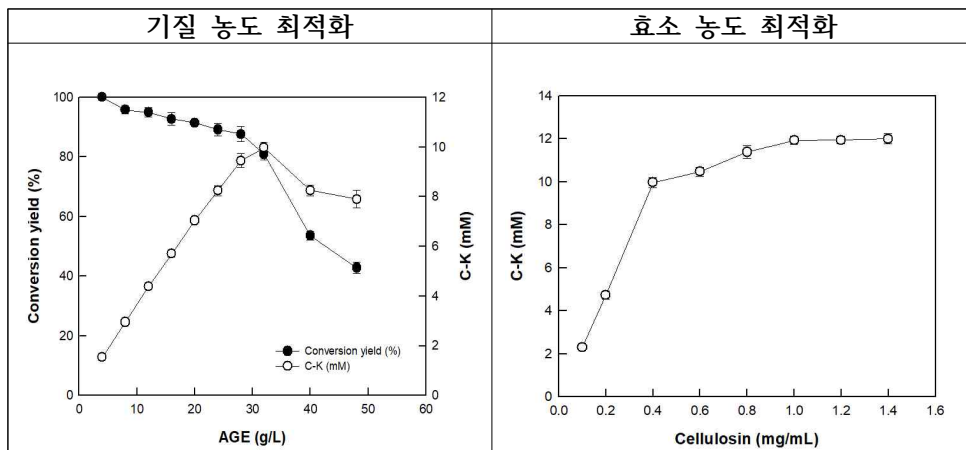
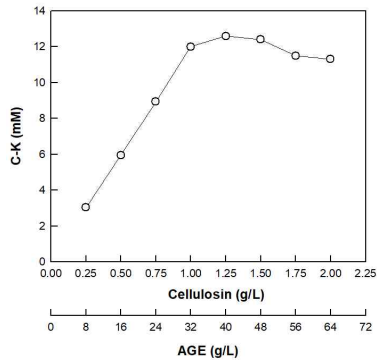


Fig 28. 발효 중 Cellulosin 첨가실험 내 기질 및 효소 농도 최적화

실험 결과, 최대 productivity를 보이는 기질과 Cellulosin의 농도는 각각 32 g/l, 1.0 mg/ml 인 것으로 확인됨.

### 2) 기질/효소 비율 최적화





Cellulosin (mg/mL)	AGE (g/L)	C-K (mM)	C-K (g/L)	Conversion yield (%)
0.25	8	3.04	1.89	98.7
0.50	16	5.96	3.71	96.8
0.75	24	8.93	5.56	96.7
1.00	32	12.0	7.47	97.4
1.25	40	12.6	7.88	82.1
1.50	48	12.4	7.74	67.2
1.75	56	11.5	7.15	53.2
2.00	64	12.3	7.04	45.8

Fig 29. 발효 중 Cellulosin 첨가실험 기질/효소 ratio test

Table 15. 기질/효소 ratio test별 CK 전환정도

기질 : Cellulosin 비율을 32 : 1 으로 하여 ratio test 진행함. 앞선 기질 및 Cellulosin 농도 최적화 실험에서 확인한 기질 32 g/l, Cellulosin 1.0 mg/ml 조건을 기준으로 함. 실험 결과, Cellulosin 1.25 mg/ml, 기질 40 g/l 조건에서 최대 productivity를 확인함.

3) 최적 기질/효소 비율일 때의 time course

Ratio test에서 확인한 기질 40 g/l, Cellulosin 1.25 mg/ml 조건에서 각 ginsenosides가 CK로 전환되는 양상을 확인하기 위해 최적 ratio에서 time course 실험을 진행함.

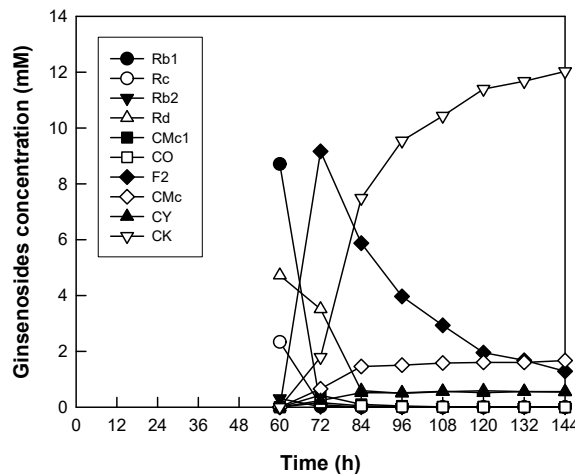


Fig 30. 최적 ratio 조건 CK 전환 time course

3. 두 효소의 Synergy effect 확인

1) 효소의 기질별 비활성도 측정

Substrate	Specific activity (nmol/min/mg)	
	<i>A. tubingensis</i>	Cellulosin
Rb <sub>1</sub>	4070 ± 62	1202 ± 43
Rb <sub>2</sub>	865 ± 30	594 ± 61
Rc	1110 ± 21	705 ± 19
Rd	1670 ± 29	725 ± 21
F <sub>2</sub>	403 ± 10	582 ± 39
Compound O	996 ± 26	448 ± 33
Compound Y	78 ± 4.7	276 ± 9.4
Compound Mc <sub>1</sub>	534 ± 18	581 ± 17
Compound Mc	125 ± 4.0	210 ± 13
Compound K	0.5 ± 0.03	0.00 ± 0.0

Reaction conditions	
Cellulosin	0.001 ~ 0.1 mg/ml
Substrate	0.4 mg/ml
pH	5.0 of 50 mM MC buffer
Temperature	55 °C
Reaction time	10 min

**Table 16. Ginsenosides별 *A. tubingensis* enzyme과 Cellulosin의 enzyme activity**

*A. tubingensis* enzyme과 Cellulosin의 synergistic effect가 있음을 확인하기 위해 ginsenosides 기질별 enzyme activity 측정실험을 진행함. 실험 결과, Cellulosin은 *A. tubingensis* enzyme과 비교하면 상대적으로 activity가 낮았지만, 4가지 기질 (F<sub>2</sub>, CY, CMc<sub>1</sub>, CMc)에 대해서는 활성이 더 높은 것을 확인함.

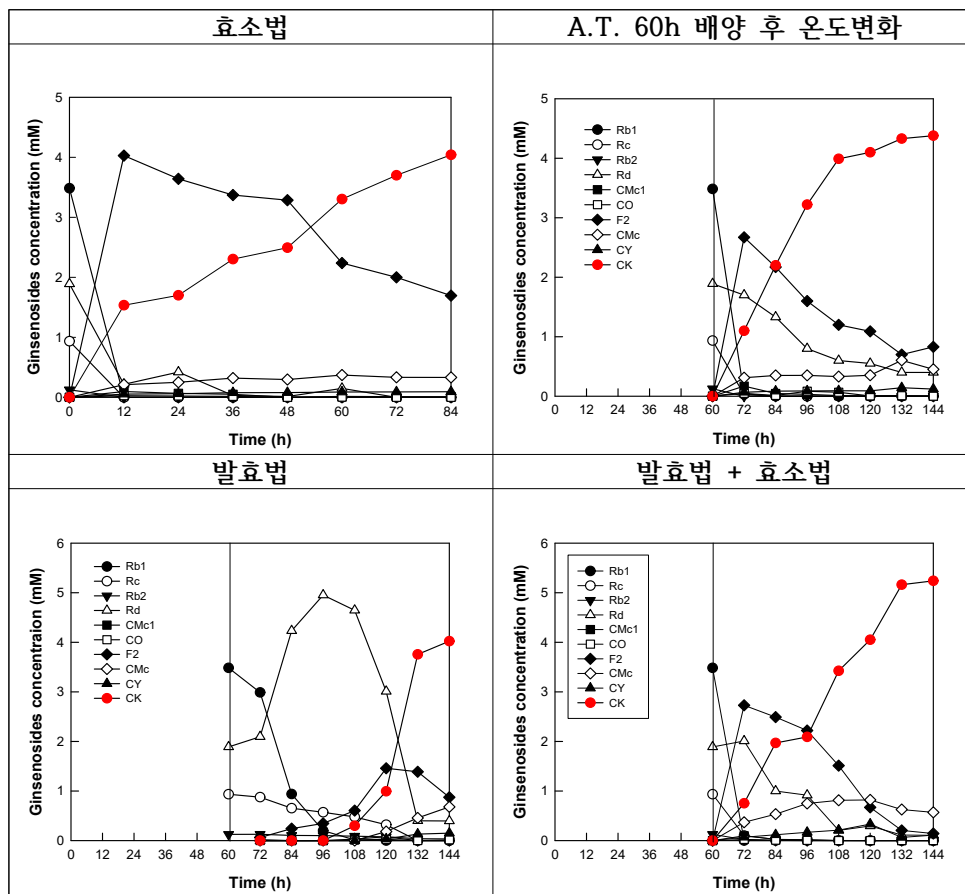


Fig 31. 반응방법에 따른 CK 전환 time course

효소 처리별 compound K 전환비교 (AGE 16 g/l)				
	C-K (mM)	C-K (g/l)	Conversion yield (%)	Productivity (mg/l/h)
Cellulosin	4.0	2.5	65.5	30.0
A.T. 60h 온도변화	4.4	2.7	71.0	18.9
A.T. fermentation	4.0	2.5	65.2	17.4
<b>A.T + Cellulosin</b>	<b>5.2</b>	<b>3.3</b>	<b>85.0</b>	<b>22.7</b>

Table 17. 반응방법에 따른 CK 전환 결과

효소별로 기질 16 g/l 조건에서 CK를 얼마나 전환시키는지, 어떤 양상으로 전환이 이뤄지는지를 확인하기 위해 Cellulosin 효소법, *A. tubingensis*를 60h까지 배양 후 60°C로 온도변화, fermentation, 60h에 Cellulosin 첨가와 온도변화를 한 실험을 진행함.

실험 결과, Cellulosin이나 A.T. extracellular enzyme 단독으로 반응을 진행하였을 때보다 *A. tubingensis*의 배양 중 Cellulosin을 첨가하고 60°C로 온도를 올리는 방법이 CK 생산을 증가시킨다는 것을 확인함.

Time course에서 보여지듯이, Cellulosin 단독으로 반응했을 때는 major ginsenosides (Rb1, Rc, Rb2, Rd)가 초반 12h 이내에 모두 F2로 전환되고, F2에서 CK로의 전환은 남은 72h 동안 천천히 이뤄지는 것을 확인함. 반면 A.T enzyme이 사용되었을 때는 바로 소모되지 않고 축적된 후 F2로 전환되는 모습을 보임.

## X. 스케일-업 미생물 배양 및 컴파운드 케이 정제의 문제점 보완

### I. Continuous feeding 비교

	Jar 1	Jar 2
Initial sucrose	20 g/l	20 g/l
Feeding sucrose	10 g/l	10 g/l
Feeding time	12 ~ 42 h	12 ~ 48 h

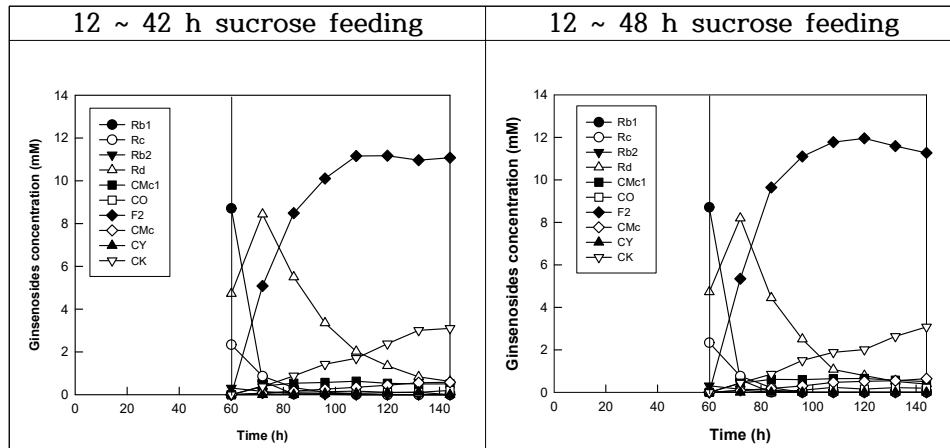


Fig 32. Sucrose feeding 시간에 따른 CK 전환 time course

	CK (mM)	CK (g/l)	Conversion yield (%)	Productivity (mg/l/h)
12 ~ 42 h	3.10	1.93	19.3	13.4
12 ~ 48 h	3.08	1.91	19.1	13.2

Table 18. Sucrose feeding 시간에 따른 CK 전환 결과

CK의 대량생산을 위해 3L fermenter에서 scale-up 실험을 진행함. Fermenter level에서 CK 생산에 적합한 배양 방법을 찾기 위해 continuous feeding 방식으로 실험을 진행함.

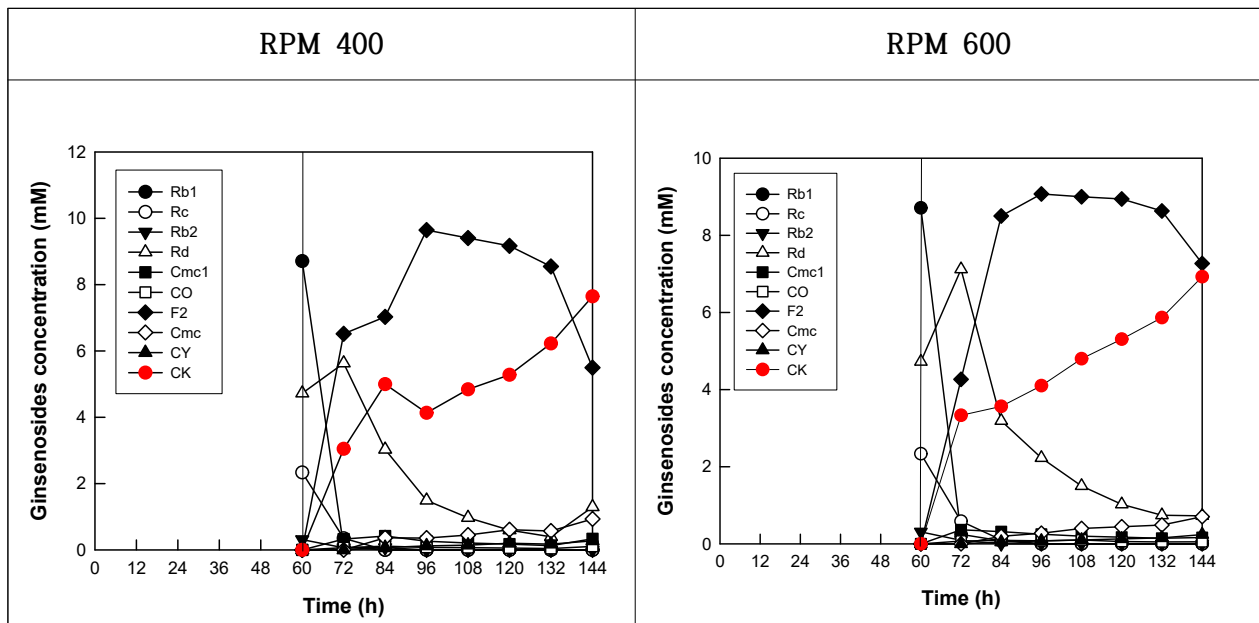
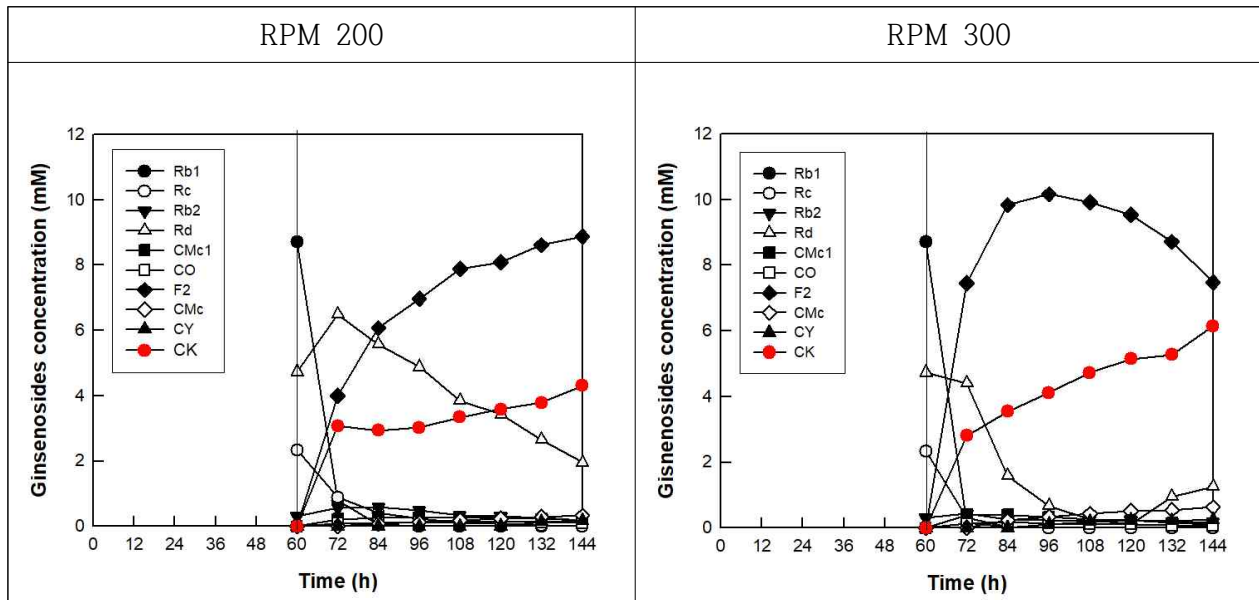
Continuous feeding 실험에서 60 h 전까지 최대한 *A. tubingensis*의 enzyme을 생산하려는 목적으로 sucrose feeding 시간을 짧게 하여 실험을 진행함. 실험 결과 CK 전환이 저조함을 확인. Sucrose feeding을 6시간 먼저 종료한 실험에서 6시간 늦게 종료한 실험보다 소량이지만 더 높은 CK 전환율을 보임. Carbon source starvation이 빠르게 일어날수록 A.T. enzyme activity가 증가하는 것이라 생각됨. Rd □ F2 전환은 정상적으로 이뤄지지만, F2 □ CK로의 전환은 잘 일어나지 않아 F2가 다량 축적되는 결과를 확인함. 해당 조건으로는 *A. tubingensis*의 enzyme이 충분히 생성되지 않아 전환이 낮은 수준인 것으로 생각됨.

Continuous feeding보다 pH stat fed batch를 진행하였을 때 효소 activity가 증가한다는 타 논문 내용을 참고하여 *A. tubingensis*의 enzyme을 최대한 생성하기 위해 이후의 fermenter 실험을 pH stat fed batch 방식으로 진행하는 것으로 결정. 또한 sucrose accumulation을 방지하기 위해 initial sucrose 농도를 10 g/l 로 설정하고 실험을 진행함.

II. pH stat fed batch 최적화

1. RPM별 CK 전환율 비교

반응 조건	
초기 sucrose 농도 (g/l)	10
추가 sucrose 농도 (g/l)	15
최대 rpm	400
AGE 농도 (g/l)	40
Cellulosin 농도 (mg/ml)	1.25
AGE, Cellulosin 첨가 및 온도변화 시간 (h)	60



최대 RPM	C-K (mM)	Conversion yield (%)	Total activity (U/ml)
200	2.7	26.8	13.0
300	6.1	38.8	13.6
400	7.6	47.6	14.5
600	6.9	43.1	12.5

pH stat fed batch 실험을 진행하기 전 CK를 최대로 전환시킬 수 있는 agitation rate을 확인하는 실험을 진행함. Sucrose feeding할 때 배양액 내 sucrose 축적을 방지하기 위해 initial sucrose 농도를 기존 continuous feeding의 20 g/l에서 10 g/l로 변경하였음. Sucrose feeding은 sucrose assay kit를 사용하여 0.5 g/l 이하의 농도임을 확인한 후 시작하였음. 실험 결과, agitation rate가 최대 400rpm인 조건에서 CK로의 전환이 가장 높은 것을 확인함. 따라서 pH stat fed batch 실험에서 최대 agitation rate을 400rpm으로 설정하고 실험함.

## 2. 온도 변경 시간 최적화

반응 조건	
초기 sucrose 농도 (g/l)	10
추가 sucrose 농도 (g/l)	15
최대 rpm	400
AGE 농도 (g/l)	40
Cellulosin 농도 (mg/ml)	1.25
AGE, Cellulosin 첨가 및 온도변화 시간 (h)	60, 72, 84

효소법으로 전환시간(h)	CK (mM)	CK (g/l)	Conversion yield (%)	Productivity (mg/l/h)
60	7.40	4.61	45.8	32.0
72	8.08	5.03	50.2	34.9
<b>84</b>	<b>9.85</b>	<b>6.14</b>	<b>61.26</b>	<b>42.61</b>

pH stat fed batch 실험을 진행. 이전 실험결과에서, 배양 후 60h에서 기질 및 효소첨가를 하였을 때, 중간물질인 ginsenoside F2가 축적되어 compound K로의 전환이 원활하게 일어나지 않는 모습을 보임. 따라서 flask 조건과 다르게 fermenter 조건에선 배양시간을 연장하여 *A. tubingensis*의 세포 외효소를 더 생성한 후 반응을 시작하는 방식이 compound K 전환에 적합한지에 대한 실험을 계획하고 실행하였음. AGE와 Cellulosin을 첨가, 반응 온도를 60℃로 변경하는 시간을 각각 배양 시작 후 60, 72, 84h로 설정하였음. 실험 결과, 배양 시작 후 84h에서 가장 높은 compound K로의 전환을 확인함.

### III. Compound K 정제의 문제점 보완

- CK 과제 1단계 평가 보고서' 의 Compound K 정제 조건 최적화 및 발효액으로부터 식품용 컴파운드 케이 정제 조건 최적화 결과에 따라 이미 기존 연구 목표를 달성 완료.

<주관연구기관 : 아미코젠>

I. 식품용 산업배지 개발

1. 산업 배지 개발을 위한 탄소원 테스트

1) 탄소원 flask 테스트

*Aspergillus tubingensis* 배양 효소를 이용한 compound K 생산의 기존 탄소원 배지인 대정화금 제품의 Pectin의 제조과정의 변경으로 인한 compound K의 전환율 감소 및 수급에 어려움이 있어, flask volume을 이용한 탄소원 종류별 테스트를 진행함. 총 10개의 실험군(Control 1개 포함)을 이용하여 500 ml flask에 60 ml의 배양액으로 26°C, 180 rpm (Shaking Incubator) 조건으로 6일차 배양 샘플을 이용함. 배양샘플을 원심분리 하여 인삼추출액으로 compound K 전환반응을 진행함.

Table 1. 탄소원 종류에 따른 compound K 전환율.

탄소원 (식품용)	종류	전환율 (%)	
		5 day	6 day
Pectin	D 제품	81	92
	B 제품	95	101
	SF560	93	96
	SD580	82	83
	CF	53	69
	JD	71	79
	LC	90	96
	RS	93	96
Sugar beet fiber	YF	79	101
	SBF	87	91

인삼추출고형분 1%의 기질로 배양상등액 10 ml씩 투입하여 최종부피를 30 ml로 조절하고 55°C에서 180 rpm으로 5, 6일간 전환반응을 진행한 결과. 전환율이 높은 Pectin B사 제품, Pectin RS를 선택함. 또한, 배양 시 점성이 낮으며, 공급이 편리하여 Scale up 진행 시 무리가 없는 sugar beet fiber와 Sucrose도 함께 5 L 배양의 실험군으로 선택함.

2) 5 L 발효기를 이용한 탄소원 테스트

선행연구로 진행된 flask 테스트에서 선택된 4가지 탄소원 (pectin B사, pectin RS, sugar beet fiber, sucrose)으로 5 L 발효기를 이용한 테스트를 진행함. 배양은 탄소원 20 g/L, CSL 20 g/L와 극소량의 미량원소를 사용하여 진행함. 배양을 진행하며 compound K 전환에 핵심이 되는 2가지 효소인 β-glucosidase, arabinofuranosidase의 효소활성을 시간별 측정함. 배양 종료 후 원심분리를 통하여 상등액을 회수하였으며, 회수한 상등액을 7, 14 ml 씩 인삼추출액기질에(고형분 1%) 투입하여 최종부피를 30 ml로 하고, 55°C에서 180 rpm으로 3일간 전환반응을 진행함.

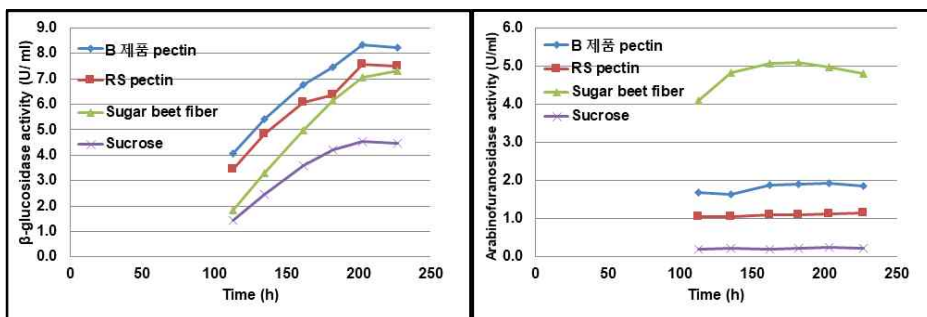


Fig 1. 다양한 탄소원별 배양시간에 따른 β-glucosidase, arabinofuranosidase 효소활성

발효시간별 2가지 효소의 활성을 측정 결과 pectin B사의 제품에서 가장 높은 β-glucosidase 활성을 확인하였으며, arabinofuranosidase 활성은 sugar beet fiber에서 가장 높은 것으로 확인함.

Sugar beet fiber의 arabinofuranosidase 활성이 기존 B사 제품의 pectin 보다 약 2.5배 높은 결과를 보임.

Table 2. 탄소원 종류에 따른 효소활성 및 compound K 전환율.

	B 제품 pectin	RS pectin	Sugar beet fiber	Sucrose
$\beta$ -glucosidase activity (U/ ml)	8.2	7.5	7.3	4.5
Arabinofuranosidase activity (U/ml)	1.9	1.1	4.8	0.2
전환율 (상등액 7 ml, %)	34.8	16.7	68.8	29.6
전환율 (상등액 14 ml, %)	45.5	28.9	89.8	49.8

Sucrose에서는 배양에 대한 편의성이나 원료에 대한 구매가 쉬울 수 는 있으나, 낮은 효소활성과 그에 따른 낮은 전환율을 보임. 가장 높은 compound K 전환율을 보인 sugar beet fiber에 대한 배지 조성 테스트 및 변경될 질소원과 함께 최적배지 테스트를 지속적으로 진행하여 최대 효소활성 및 최대 compound K 전환율 조건을 탐색할 예정.

## 2. 산업 배지 개발을 위한 질소원 테스트

### 1) 질소원 배지 Yeast extract 농도 별 테스트

기존 사용 예정인 질소원 배지 CSL(Corn Steep Liquor)의 식품용 배지에 사용이 제한적으로 판명되어 질소원 변경을 위한 실험을 진행함. 1차 적으로 질소원으로 많이 사용되는 YE(Yeast Extract)의 농도별 실험을 진행함. 5 L 발효기를 이용하여 YE를 0.5, 1, 1.5, 2%의 농도비로 실험을 진행하여, compound K 전환의 대표적인 효소  $\beta$ -glucosidase활성을 기준으로 선별함.

Table 3. Yeast extract 비율에 따른 최대  $\beta$ -glucosidase 효소활성.

YE 0.5%		YE 1 %		YE 1.5%		YE 2%	
Time (h)	Uint (U/ml)	Time (h)	Uint (U/ml)	Time (h)	Uint (U/ml)	Time (h)	Uint (U/ml)
207	8.24	230	9.62	230	10.28	230	9.46

YE 1.5% 비율로 230 h 발효 시, 10.28 U/ml의  $\beta$ -glucosidase의 최대 활성을 확인하였으며, 전환반응 시 CSL보다 낮은 전환율을 확인함.

### 2) CSL 대체를 위한 질소원 종류 테스트

앞선 실험에서 YE test에서 기존의 CSL보다 낮은 전환율을 보이는 것으로 확인되어, CSL의 대체를 위한 질소원 종류별 배양 테스트를 진행함. 대량배양에서 쉽게 사용되는 질소원을 탐색하여 질소원 4개 대조군(CSL, YE, SPC(농축대두단백),  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ )을 이용한 실험을 5 L 발효기로 진행함. 배양을 진행하면서 시간별  $\beta$ -glucosidase 효소활성과, 배양 종료 후 compound K의 전환율을 분석함.

Table 4. 질소원 종류에 따른 최대  $\beta$ -glucosidase 효소활성.

CSL		YE		SPC		$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	
Time (h)	Uint (U/ml)	Time (h)	Uint (U/ml)	Time (h)	Uint (U/ml)	Time (h)	Uint (U/ml)
280	9.8	280	9.3	280	9.2	280	5.9

$\beta$ -glucosidase 최대 활성은 CSL에서 가장 높은 수치인 9.8 U/ml을 보였으며, YE와 SPC(농축대두단백)에서도 동등 수준인 9.3, 9.2 U/ml을 확인함.



Table 5. 질소원 종류에 따른 Compound K 전환율.

CSL		YE		SPC		(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	
Time(day)	전환율 (%)	Time(day)	전환율 (%)	Time day)	전환율 (%)	Time(day)	전환율 (%)
6	4.0	6	0.5	6	9.0	6	4.2

인삼추출액기질에(고형분 1%) 배양상등액 2 ml씩 투입하여, 55℃에서 180 rpm으로 3일간 전환반응을 진행한 결과 SPC에서 가장 높은 전환율을 보임. 이에 생산에서 사용될 질소원을 SPC로 선택하였으며, 질소원 농도 및 최적 배지 실험을 지속적으로 계획함.

## II. 산업용 인삼추출물 개발

### 1. 인삼추출 온도 테스트

인삼 세근을 이용한 compound K의 전구체인 ginsenoside (Rb1, Rb2, Rc, Rd)의 추출실험을 진행함. 국내산 인삼세근을 사용하여 진행 하였으며, 150 g의 국내산 인삼세근을 75%의 에탄올에 1(인삼세근 w):10(75% 에탄올 w) 무게비로 침지하여 상온(25℃)조건과 60℃ 조건에서 15 h, 4회 추출을 진행함.

Table 6. 국내산 인삼 세근을 이용한 온도에 따른 Ginsenoside 함량 비교.

온도	고형분 (g)	Ginsenoside (mg)
상온 (25℃)	48	5,337
60℃	42	7,698

온도조건에 따른 인삼세근 추출 테스트 진행결과, 60℃ 추출조건에서 상온(25℃)조건 대비 69% 더 높은 함량의 ginsenoside를 확인함. 이에 추출온도를 60℃로 결정함.

### 2. 인삼추출 횟수 테스트

인삼세근을 이용한 추출횟수에 따른 ginsenoside 추출실험을 진행함. 실험은 인삼세근 100 g을 75%의 에탄올에 1(인삼세근 w):10(75% 에탄올 w) 무게비로 침지하여 각각 상온(25℃)조건과 60℃ 조건에서 15 h, 총 4회 추출을 진행함.

Table 7. 국내산 인삼 세근을 이용한 추출횟수에 따른 결과.

추출 횟수	고형분 (g)	Ginsenoside (mg)	Ginsenoside 추출율 (%)
1 회	21.2	3,177	66.6%
2 회	8.7	1,099	23.0%
3 회	3.5	346	7.2%
4 회	1.8	152	3.2%
합계		4,774	100%

총4회의 추출을 진행한 결과 1, 2회 차에서 약 90%의 ginsenoside가 추출되는 것을 확인함. 4회차 추출에서는 3%로 적은 ginsenoside의 추출량으로 최대 4회까지 진행하며, 필요 시 3회로 진행 하는 것이 효율적으로 판단함.

### 3. 인삼세근 원료별 추출 테스트

구매 가능한 인삼 세근 원료를 이용한 추출 테스트를 진행함. 총 6개(국내산, 중국산1, 중국산2, 미국산1, 미국산2, 캐나다산)의 인삼 세근을 75 g씩 75% 에탄올을 이용하여 1:10으로 60℃에서 15시간동안 최대 4회 추출을 진행함.

Table 8. 국내산 인삼 세근을 이용한 추출횟수에 따른 결과.

원료	고형분 (g)	Rb1 (mg)	Rb2 (mg)	Rc (mg)	Rd (mg)	총 Ginsenoside (mg)
국내산	18.9	548.0	484.9	211.2	80.2	1,324
중국산 1	13.1	356.9	389.4	295.9	180.5	1,223
중국산 2	11.5	225.2	265.4	195.8	136.6	823
미국산 1	20.7	1,594.7	612.9	99.6	538.8	2,846
미국산 2	20.0	1,346.7	425.4	73.3	839.0	2,684
캐나다산	18.0	1,767.2	702.8	115.7	563.1	3,149

총 6개의 인삼 세근 추출 결과 캐나다산에서 다른 원료 보다 더 높은 ginsenoside를 얻을 수 있었으며, 원료의 가격 또한 다른 것에 비해 저렴하여, 캐나다산 건조 인삼 세근을 최적 원료로 정함. 아미코젠(주)은 2018.06.20 인삼추출분말-CK에 대한 품목제조 등록을 완료 후 현재까지 캐나다산 건조 인삼세근을 구매하여 컴파운드 케이를 제조 및 판매하고 있으며, 원료수급이 문제없이 꾸준하게 이루어지고 있음.

### III. 5 L 발효조에서 compound K 전환 발효 최적화

#### 1. 5 L 발효조 배지 조건 최적화

##### 1) 탄소원 농도 최적화 및 접종량 증가 테스트

앞선 선행 실험에서 탄소원은 SBF(Sugar beet fiber), 질소원은 SPC(Soy Protein Concentrate, 농축대두단백)로 결정함. 배지 원료들의 농도비와 Seed 접종량에 따른 영향을 검토함. SPC는 1.5%로 결정되었으며, SBF 농도를 기존 2% -> 3%로 증가, Seed 접종량은 기존 2% -> 3%로 증가시켜 5 L 발효기를 이용하여, 3 L working volume으로 진행함. 발효시간별 샘플링한 발효액을 원심분리하여 얻은 상등액 7 ml을 인삼추출액기질에 (고형분 1%) 투입하여 최종부피를 30 ml로 하여, 55°C에서 180 rpm으로 3일간 전환반응을 진행함.

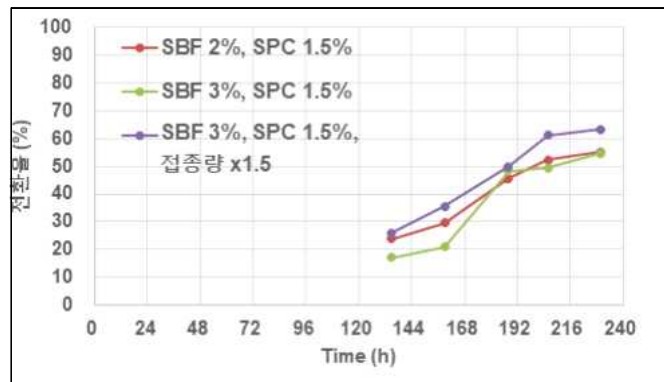


Fig 2. Sugar beet fiber 농도와 균체 접종량에 따른 시간별 compound K 전환율.

130 h부터 200 h 까지 compound K 전환율이 증가하는 패턴을 보였으며, 200 h 이후 증가폭이 감소하는 것으로 확인됨. SBF 3%, SPC 1.5%에 3%로 균체를 접종한 대조군에서 가장 높은 compound K 전환율을 보였으며, 230 h에 compound K 전환율 63.3%로 확인함.

##### 2) 탄소원, 질소원 농도 최적화 테스트

앞선 선행 실험으로 접종량을 증가 시켰을 때, 증가된 전환율과 좀 더 짧은 배양시간 내 전환율이 증가 하는 것을 확인 할 수 있었으며, 탄소원 농도를 2%에서 3%로 증가 시 차이를 확인하지 못하여, 탄소원, 질소원의 배지농도를 변화시켜 실험을 진행함. 2가지의 실험을 진행 하였으며, SBF 4%, SPC 2%로 탄소원과 질소원을 모두 증가한 것과 SBF 3%, SPC 3%로 질소원만을 증가시켜 진행함. 균체 접종량은 모두 3%로 5 L 발효기, 3 L working volume으로 실험을 진행함. 탄소원과 질소원의 배지 내 백분율 합이 6% 초과로 증가 시 배지 점성 및 배양기내 환경이 발효가 어려워져 최대 6%로 실험을 진행함. 배양 중 시간별 샘플을 원심 분리하여,  $\beta$ -glucosidase, arabinofuranosidase의 효소활성과 compound K의 전환율을 측정함.

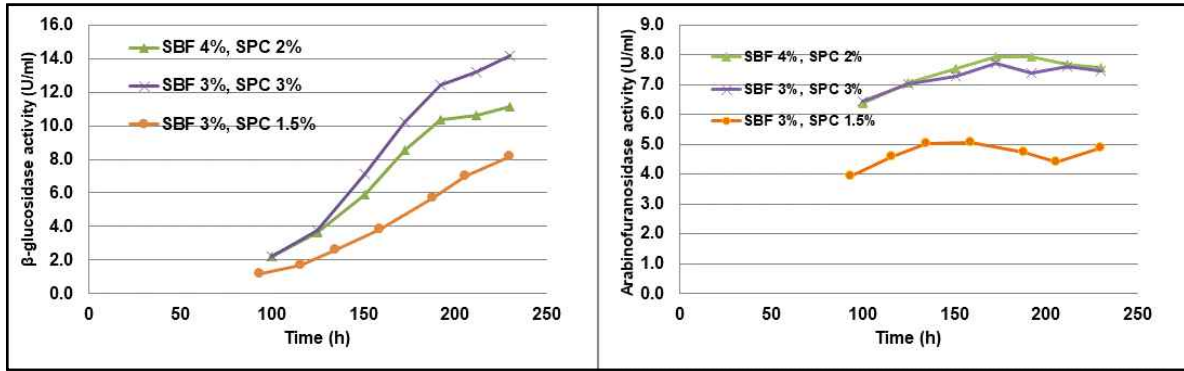


Fig 3. Sugar beet fiber와 soy protein concentrate 농도에 따른 배양시간에 따른  $\beta$ -glucosidase, arabinofuranosidase의 효소활성.

2개의 실험군과 앞선 실험의 SBF 3%, SPC 1.5%의  $\beta$ -glucosidase, arabinofuranosidase의 효소 활성을 시간별로 확인함. 그 결과 배지를 증가시킨 2가지 실험군에서 더욱 높은 효소활성을 확인할 수 있었으며, 2가지 효소 모두 170~190 h까지 효소활성이 증가하였으며, 이후 소량 증가 하거나 비슷한 효소활성을 보임.

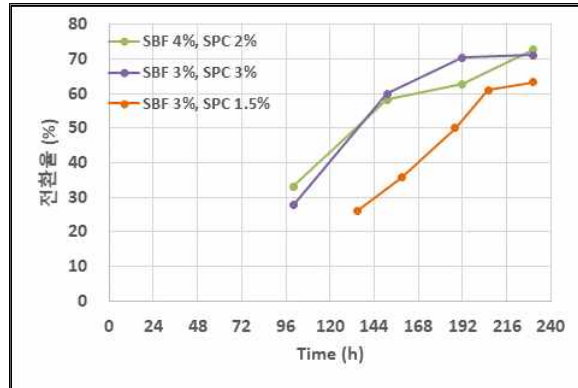


Fig 4. Sugar beet fiber와 soy protein concentrate 농도별 배양시간에 따른 전환율.

배양 시간별 발효액 샘플을 원심분리하여 얻은 배양 상등액 7 ml을 인삼추출액기질에 (고형분 1%) 투입하여 최종 부피를 30 ml로 맞춘 후, 55°C에서 180 rpm으로 3일간 전환반응을 진행함. SBF와 SPC를 증가시킨 2가지 실험군에서 더 높은 compound K 전환율을 확인하였으며, compound K 전환율은 SBF 4%, SPC 2% 조건에서 230 h에 72.7%로 SBF 3%, SPC 1.5%의 전환율 63.3%보다 9.4% 더 증가한 것으로 확인함. Compound K 전환율이 증가하는 패턴 또한 짧은 배양시간에 더 많이 증가하는 것으로 확인함. 2가지 효소와 비교하면 정확히 정비례 하는 것은 아니나, 비례적으로 전환율이 증가하는 것으로 확인되어짐. Compound K의 전환이 2가지 효소의 활성을 제외하고도 배양 상등액의 있는 여러 요인의 영향을 받는 것으로 사료됨. 또한, 지속적인 배지 최적화로 배양액 내 compound K 전환율을 증가시키는 실험을 진행할 예정.

## 2. 5 L 발효조 인삼세균 추출액 feeding rate 최적화

### 1) 연속 feeding법을 이용한 Compound K 동시전환 발효

과제목표인 *Aspergillus tubingensis* 균주를 이용한 발효로 효소를 생산하는 동시에 배양액의 인삼 추출액을 투입하여, compound K를 동시에 전환시키는 발효방법을 확립하기 위한 실험을 진행함. SBF 3%, SPC 1.5% 배지조건에서 발효 140~200 h에 인삼 추출물 120 ml(Compound K 100% 전환 시 659.8 mg)을 연속 feeding 방법으로 투입함. 즉 인삼추출액의 투입속도 약 2 ml/h로 60 h feeding함.

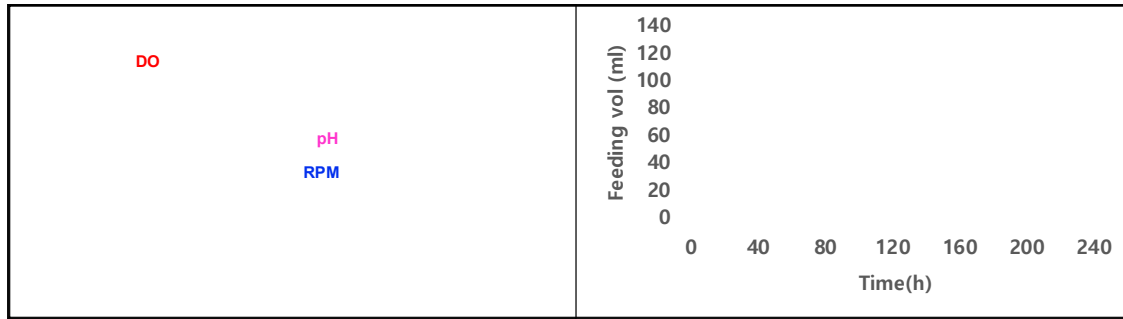


Fig 5. Compound K 동시전환 발효 트렌드 및 인삼추출액 Feeding rate.

인삼추출액을 초기부터 feeding 시 균체성장에 저해를 일으킬 수 있어 곰팡이 성장이 안정적으로 완료된 140 h 이후로부터 인삼추출액 feeding을 연속적으로 증가시켜 점진적으로 feeding을 진행함. 시간별 발효액 샘플의  $\beta$ -glucosidase, arabinofuranosidase 효소활성과 compound K 전환율을 분석하였으며, 발효 종료 후 원심분리하여 얻은 pellet에 75% 에탄올을 1 L 첨가하여 1일간 상온에서 compound K 추출을 진행함. 1일 경과 후 추출액을 원심분리하여 상등액에 포함된 compound K 농도를 분석하여 전환율을 확인함.

Table 9. 연속 feeding법을 이용한 compound K 동시전환 발효 상등액의 발효시간에 따른  $\beta$ -glucosidase, arabinofuranosidase의 효소활성과 compound K 전환율

발효 시간 (h)	$\beta$ -glucosidase activity (U/ml)	Arabinofuranosidase activity (U/ml)	compound K 전환율 (%)
134	2.9	6.1	19.4
152	4.1	6.2	29.3
180	5.6	6.2	44.6
206	7.0	6.1	65.7
232	7.9	6.0	61.9

Table 10. 연속 feeding법을 이용한 compound K 동시전환 배양의 compound K 동시전환율

	첨가한 인삼추출액의 100% 전환 시 compound K 함량 (mg)	추출 한 상등액의 compound K 함량 (mg)	Compound K 동시전환율 (%)
1차 추출	659.8	472.6	71.6
2차 추출		40.0	6.1
합계	659.8	512.6	77.7

동시전환 발효 후 원심분리하여 얻은 상등액을 이용한 전환실험을 통하여, 동시전환 발효 후 상등액 또한 compound K 전환에 사용이 가능함을 확인함. 동시전환은 1차 추출시 71.6%의 전환율을 확인하였으며, 추출 후 원심분리한 pellet을 2차 추출 시 약 40 mg의 compound K를 더 추출하여 2차 추출 시 77.7%의 전환율을 확인함. 배양상등액과 추출 상등액에서 나머지 ginsenoside의 분석이 안되는 것으로 확인함. 전환 중간체로 확인이 불가하거나, 온도가 현재 전환실험에 사용하는 55°C보다 낮은 26°C에서 동시전환배양을 하여 ginsenoside가 물에서 녹지 못하여 적절히 전환반응이 일어나지 못한 것으로 사료됨. 배양 온도 및 동시전환 배양 조건을 최적화하여 더 높은 전환율을 얻을 수 있을 것 이라 사료됨.

## 2) 인삼추출액 feeding법에 따른 Compound K 동시전환 발효

현재 고품분이 있는 배지를 이용한 *Aspergillus tubingensis*의 발효는 배양 중 기포 및 교반에 뒤어 배양기 벽면 및 baffle에 배지가 소량 붙어 그곳에서 균체가 성장하여 균체 및 포자층을 형성하게 됨. 이러한 경우 인삼추출액의 feeding이 연속적으로 소량 들어갈 시 위쪽 균체 및 포자층에 막혀 배양액까지 떨어지는 것을 막아 적절한 전환이 불가함. 또한, feeding방법에 따른 동시전환 배양실험을 진행하고자 shot feeding법(일정량을 한꺼번에 feeding)과 연속 feeding법(소량 지속적으로 feeding)의 2가지 feeding 방법에 따른 동시전환 배양실험을 진행함. 진행함에 앞서 균체 및 포자층에 인삼추출액이 막힐 수 있는 연속 feeding법은 feeding 라인을 길게 만들어 배양액에 잠겨 직접적으로

feeding이 되도록 실시함. SBF 3%, SPC 1.5% 배지에 배양 중에 인삼 추출물 100 ml (Compound K 100% 전환 시 658.7 mg)을 100, 125, 150, 175 h 4회 나누어 shot feeding 하였으며, 연속 feeding은 100 h부터 175 h 까지 지속적으로 feeding함.

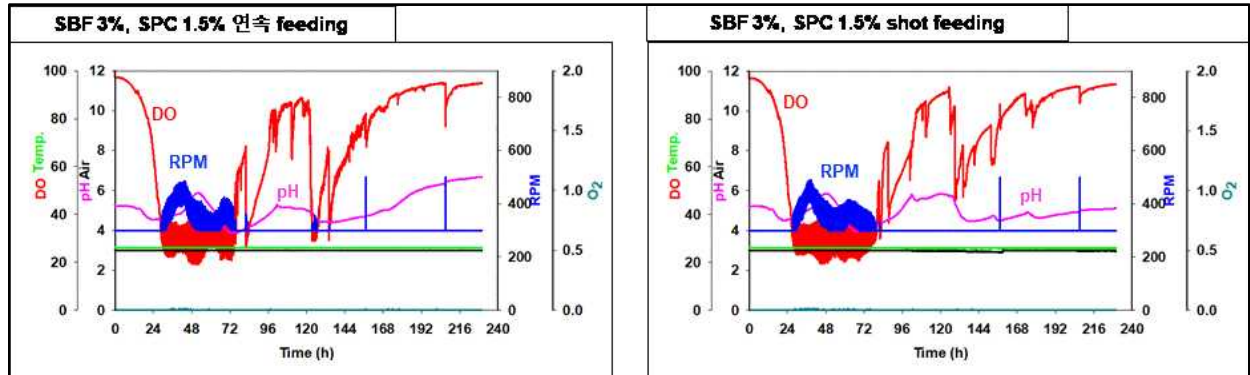


Fig 6. 5 L 발효조에서 인삼추출액 feeding 방법에 따른 Compound K 동시전환 발효 트렌드

배양 트렌드상 큰 차이점은 없었으며, 80 h 이후 DO가 갑자기 떨어지는 것은 배양기 벽면에 붙어서 자라던 균체 및 포자가 배양액으로 한꺼번에 떨어져 DO가 급격히 올라간 것으로 확인함. 발효 중 샘플링을 하여 시간별로  $\beta$ -glucosidase, arabinofuranosidase의 효소활성과 compound K 전환율을 측정함. 발효 시간별 발효액을 원심분리하여 얻은 상등액 7 ml을 인삼추출액기질에 (고형분 1%) 투입하여 최종부피를 30 ml로 조절하였으며, 55°C에서 180 rpm으로 3일간 전환반응을 진행함. 발효 종료 후 원심분리하여 얻은 pellet에 75% 에탄올을 1 L 첨가하여 1일간 상온에서 추출을 진행함. 추출한 추출액을 원심분리하여 상등액에 포함된 compound K의 함량을 확인함. 이후 동일한 방법으로 2차 추출까지 진행하여 compound K 전환율을 분석함.

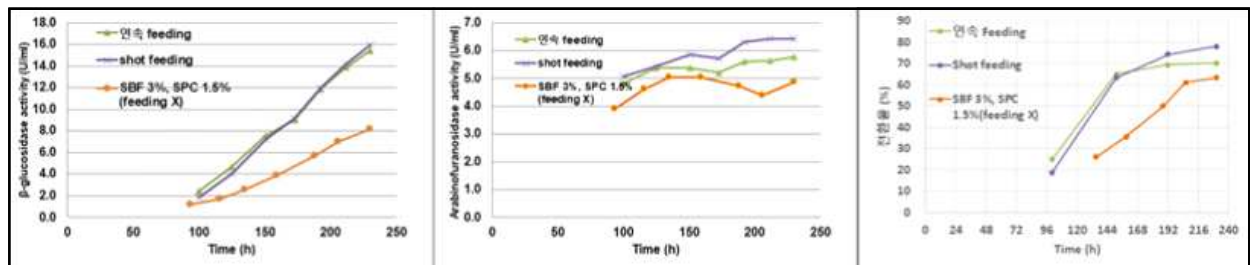


Fig 7. 인삼추출액 feeding 방법에 따른 Compound K 동시전환 발효에서 배양시간별  $\beta$ -glucosidase, arabinofuranosidase의 효소활성 및 compound K 전환율

인삼추출액을 feeding한 조건에서 기존의 추출액을 첨가하지 않은 조건 보다 더 높은  $\beta$ -glucosidase, arabinofuranosidase의 효소활성을 확인할 수 있었으며, 이는  $\beta$ -glucosidase활성이 연속 feeding 15.4 U/ml, shot feeding 16.0 U/ml으로 기존에 인삼추출물을 첨가 하지 않은 조건 보다 효소활성이 105% 증가함. Arabinofuranosidase의 효소활성은 약간 증가하여 약 30% 증가한 6.4 U/ml을 shot feeding 조건에서 확인함.

Compound K 전환율 또한 인삼추출액을 feeding한 조건에서 더 높은 결과를 확인 하였으며, 이는 인삼추출액을 연속 feeding한 조건에서 70.3%, shot feeding 조건에서 78.0%로 확인함. 동시배양조건인 효소발효공정과 Compound K 전환반응공정을 동시에 수행하는 이 발효공정은, 발효가 종료된 상등액에 효소활성이 대부분 유지하고 있어서, 효소를 재활용하여 다시 인삼추출물을 전환 시킬 수 있는 이점을 확인할 수 있었음. 이는 기존에 효소배양 후 효소를 정제하여 compound K 전환공정에 그대로 사용함은 물론, 동시배양 후 Compound K도 동시에 얻을 수 있어 기존 배양에 비해 효소발효/전환반응 시간을 대폭 줄일 수 있어서 compound K 제조원가를 대폭 줄일 수 있는 생산공정으로 사료됨.

Table 10. Feeding 방법에 따른 compound K 동시전환발효의 compound K 동시 전환율

인삼추출액 Feeding 조건	첨가한 인삼추출액의 100% 전환 시 compound K 함량 (mg)	추출 한 상등액의 compound K 함량 (mg) (1차 / 2차)	Compound K 동시전환율 (%)
연속 feeding	658.7	447.2 / 54.6	76.2
Shot feeding	658.7	517.0 / 56.7	87.1

Feeding법에 따른 compound K의 동시전환율을 확인한 결과, Shot feeding에서 더 높은 전환율을 확인할 수 있었음. Shot feeding법에 동시전환율은 87.1%로 확인됨(2차 추출까지 진행한 결과). 생산한 Compound K는 3 L 배양 기준 573.7 mg으로 191.2 mg/L의 낮은 생산량 일수 있으나, 이는 인삼추출액을 이용한 동시배양으로 인한 것으로 사료됨. 인삼추출액 투입량, 시간, 온도, pH 등의 조건을 최적화 시 더 높은 생산량을 얻을 수 있을 것으로 예상함.

3. 공인분석 기관 분석

III. 2. 1) 연속 feeding법을 이용한 Compound K 동시전환 발효실험에서 원심분리한 pellet을 추출한 샘플을 한국기능식품연구원에 분석의뢰를 하여 현재 측정하고 있는 당사의 분석값과 비교함. 분석 샘플은 1차 추출, 2차 추출과 배양종료 후 상등액 샘플 까지 총 3개의 샘플을 의뢰함.



Fig 8. 연속 feeding법을 이용한 Compound K 동시전환배양 발효 원심분리 pellet 1차 추출액, 2차 추출액 분석의뢰 결과

Table 11. 자사 분석결과와 분석기관 의뢰결과 비교

	1차 추출 Compound K 함량 (mg)	2차 추출 Compound K 함량 (mg)	추출한 compound K 함량 비교 <sup>1)</sup>	Compound K 동시전환율 (%)
자사 분석	472.6	46.5	519.1 mg / 1.00	78.7
분석 기관	858.8	111.7	970.5 mg / 1.87	79.4

※ 1) 추출한 compound K 함량 비교는 자사 분석을 1로 기준한 비교 비율.

한국기능식품연구원에 분석의뢰 결과 1차 추출의 compound K가 78.07 mg/100 ml로 1차 추출액의 1,100 ml의 volume 기준 858.8 mg의 compound K가 확인되었으며, 2차 추출은 11.28 mg/100 ml로 990 ml의 2차 추출액 volume 기준 111.7 mg의 compound K가 확인됨. 자사에서

정량한 1차 추출(compound K 472.6 mg)과 2차 추출(compound K 46.5 mg)과 차이가 큰 결과를 보임. 그러나 자사에서 측정한 전환율을 확인 시 78.7%이며, 한국기능식품연구원의 결과에 compound K와 전환 되지 못한 ginsenoside의 전환 가능한 총 compound K를 이용한 물 전환수를 계산 시 79.4%의 수치가 확인됨. 이러한 결과를 보아 자사의 정량의 사용된 표준물질의 정량수치가 한국기능식품연구원의 표준물질보다 오래되어 오차가 발생하는 것으로 사료됨. 표준물질을 재구입하여 자사의 정량수치 확인 및 재측정 예정.

페이지(1) / (총 1)

제 D2021111516 호  
문서번호 09C2-05Q2-110F

### 참고용 시험성적서

본 성적서는 식품의약품안전처 「식품·의약품분야 시험·검사 등에 관한 법률」에 따른 것이 아닙니다.

제출일	상동액	제출일자 (유효기간)	2021-10-05	
피뢰인	업체명	이리코해주식회사	성명	신용철
	주소	경상남도 진주시 진성면 동부로1259번길 64		
제출연호		검수년월일	2021-11-11	
시험목적	참고용	검수번호	D0201111516	

귀하가 우리 연구원에 시험의뢰한 결과는 다음과 같습니다.  
 시험 - 검사 완료일: 2021-12-08  
 시험 - 검사 책임자: 김영경  
 시험관련 총 책임자: 김원희

시험 항목	시험 결과	시험-검사원
Rb1mg/100mL	1.05 mg/100mL	최유정
Rb2mg/100mL	불검출	최유정
Rc1mg/100mL	불검출	최유정
Rd1mg/100mL	불검출	최유정
Compound K(mg/100mL)	불검출	최유정

분석법-일체제공 불

※ 피뢰는 피뢰된 시험 항목만을 대상으로 한 것입니다.  
 ※ 본 성적서는 왕복을 정하여 정합니다. 시험 결과는 시험 목적 이외의 참고 및 홍보, 재가공목적사용 등에 사용될 수 없습니다.  
 ※ 법적 효력이 없으며, 영구적인 세출용소문 사용할 수 없습니다.  
 ※ 본 성적서는 KS Q 150/IEC 17025 및 KOLAS 인증의 유효성이 있습니다.  
 ※ 피뢰의 무효한 경우 시험 및 결과관은 영제로 가장 가능합니다.

2021년 12월 08일  
**한국기능식품연구원**

(사)한국기능식품협회 국세 및 관세청 등록번호 http://www.khsl.or.kr 전화번호 031-658-0400-1



Fig 9. 연속 feeding법을 이용한 Compound K 동시전환발효의 상등액 분석의뢰 결과

발효종료 후 원심분리 상등액 분석 결과를 확인결과 상등액에서 compound K가 측정되지 않았으며, 극소량의 Rb1만 측정이 됨. 원심분리 시 전환된 compound K가 모두 pellet과 함께 모여서 추출 과정을 거쳐 손실 없이 회수가 가능한 것을 확인함.

#### IV. 미생물 배양 환경 조건 최적화 (5 L 발효조)

##### 1. 유가식 배양에 의한 균체 농도 및 컴파운드 케이 생산 최대화

##### 1) 건국대 sucrose 탄소원 조건 5 L배양기 test

공동연구중인 건국대학교에서 탄소원을 sucrose로 이용 시 더 높은 전환율을 보인다는 연구를 이용하여 동일한 배양배지를 사용하여 현재 자사에서 사용하는 배지와 비교 실험을 진행함. SBF 4%, SPC 2%인 control과 동일한 조건에서 KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0.5%, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 0.5%로 증가시킨 후 인산과 암모니아수를 이용하여 pH 5.0 으로 조절하는 대조군과 건국대조건(sucrose 2%, SPC 1%, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0.5%, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 0.5%, pH 5.0조절) 그리고 건국대조건에서 sucrose를 4%로 증가시킨 조건까지 총 4개 실험군으로 실험을 진행함.

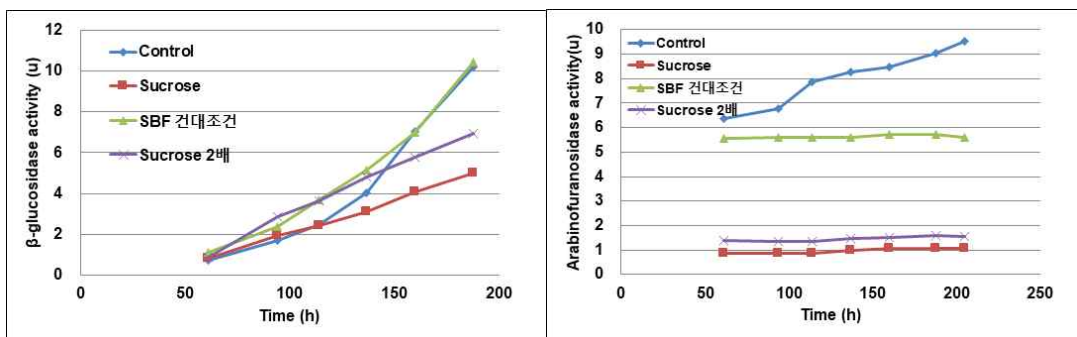


Fig 10. 탄소원에 따른 배양시간별 β-glucosidase, arabinofuranosidase 효소활성

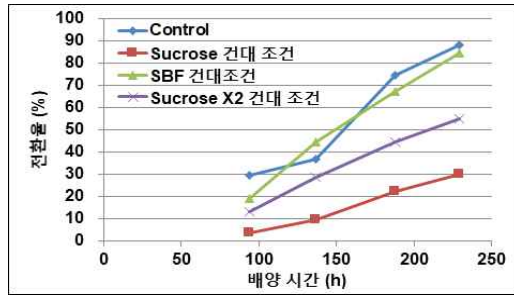


Fig 11. 탄소원에 따른 4가지 조건의 배양 시간별 상등액을 이용한 전환율

Table 12. 탄소원 조건에 따른 compound K 전환율.

	control	sucrose 건국대 조건	SBF 건국대 조건	Sucrose 4% 건국대 조건
최대 $\beta$ -glucosidase 활성시간 (h)	118	118	188	188
최대 $\beta$ -glucosidase 활성 (U/ml)	10.2	5.0	10.4	7.0
최대 Arabinofuranosidase 활성시간 (h)	205	205	205	205
최대 Arabinofuranosidase 활성 (U/ml)	9.5	1.1	5.6	1.6
최대 전환율 시간 (h)	229	229	229	229
최대전환율 (%)	88.2	29.8	84.5	55.2

Sucrose를 이용한 배양에서 Arabinofuranosidase 효소활성이 현저히 떨어지는 것을 확인하였으며,  $\beta$ -glucosidase 효소활성 또한 SBF를 이용한 조건보다 낮은 활성을 보임. 전환율 또한 현재 사용중인 SBF를 이용한 배양보다 sucrose를 이용한 배양에서 더 낮은 전환율을 나타냄. SBF를 이용한 배양에서 pH 5.0 조절 시 전환율이 약간 떨어지는 것을 확인하였으며, 현재까지 pH 조절에 따른 실험을 진행한 적이 없어 pH 및 온도에 대한 영향을 확인하는 최적화 실험이 필요함.

## 2) pH 조절 및 온도 조건 5 L 배양기 test

앞선 실험에서 pH를 5.0으로 조절했을 때 전환율의 차이를 확인할 수 있었으며, 이에 따른 pH 조절 및 온도에 따른 실험으로 그에 따른 영향을 평가함. pH 조절에 대한 조건을 세분화하여, 건국대조건 ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$  증가 및  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  첨가 조건) 그리고 인산, 암모니아수를 이용한 pH 5.0 유지 조건 2가지로 나누었으며, 기존 Control 조건과 온도 조절에 따른 전환율을 보기 위한 배양 온도를 26°C에서 30°C로 증가시킨 조건까지 하여 총 4가지 조건을 이용한 실험을 진행함.

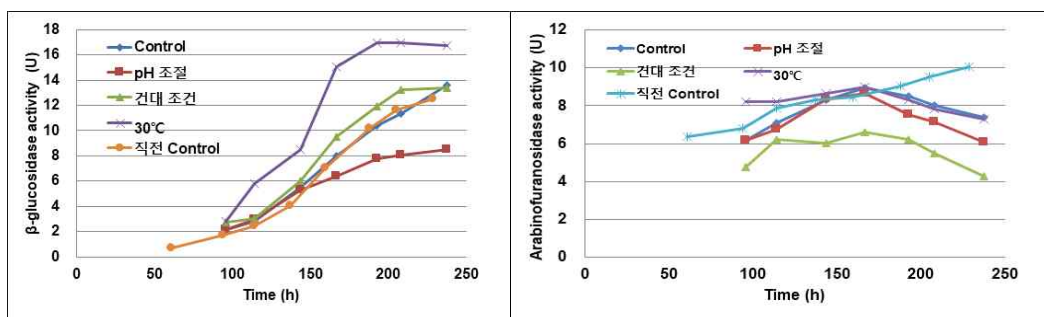


Fig 12. pH와 온도별 배양시간에 따른  $\beta$ -glucosidase, arabinofuranosidase 효소활성



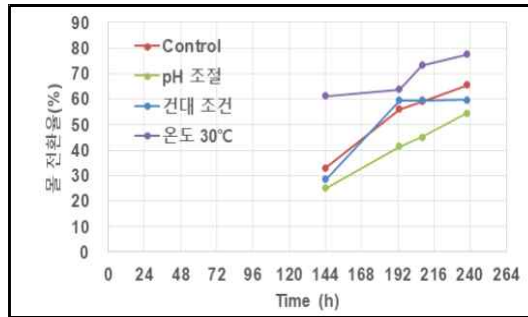


Fig 13. pH와 온도에 따른 4가지 조건의 배양 시간별 상등액을 이용한 전환율

Table 13. pH와 온도에 따른 효소활성 및 compound K 전환율.

	control	pH조절	건국대조건	온도 30°C
최대 β - glucosidase 활성시간 (h)	238	238	238	193
최대 β - glucosidase 활성 (U/ml)	13.6	8.5	13.4	17.0
최대 Arabinofuranosidase 활성시간 (h)	167	167	167	167
최대 Arabinofuranosidase 활성 (U/ml)	9.0	8.7	6.6	9.0
최대 전환율 시간 (h)	238	238	238	238
최대전환율 (%)	65.5	54.6	59.8	77.5

앞서 실험을 진행한 control배양과 비슷한 결과를 보이거나 전체적으로 Arabinofuranosidase 효소 활성이 후반에 떨어지는 현상을 나타냄. 지난 배양에서 control조건은 계속적으로 효소활성이 계속적으로 증가하는 패턴이었고 테스트를 진행한 다른 조건들은 활성이 후반에 떨어지는 경향을 보였음. pH조절시 β - glucosidase 효소활성이 감소하는 것으로 확인되었음. 건국대 조건인 KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 증가 및 Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 첨가 조건 발효 시 Arabinofuranosidase 효소 활성이 감소하는 것으로 확인됨. 배양온도를 26°C에서 30°C로 증가시킨 조건에서는 배양속도가 증가하고 최대 Arabinofuranosidase 효소활성과 전환율이 증가하는 것으로 확인되어 더욱 세분화된 배양 온도 최적화 실험이 필요할 것으로 사료됨.

### 3) 배양온도 최적화 test

앞선 실험에서의 결과로 하여금 배양 온도가 26°C에서 30°C로 상승한 조건에서 효소활성 및 전환율이 증가하는 것이 확인되어 세분화된 최적온도 test를 진행함. 배지의 조성은 모두 동일하게 SBF 4%, SPC 2%로 통일하고 26°C (control), 28°C, 30°C, 32°C 총 4가지 실험군으로 발효를 진행함.

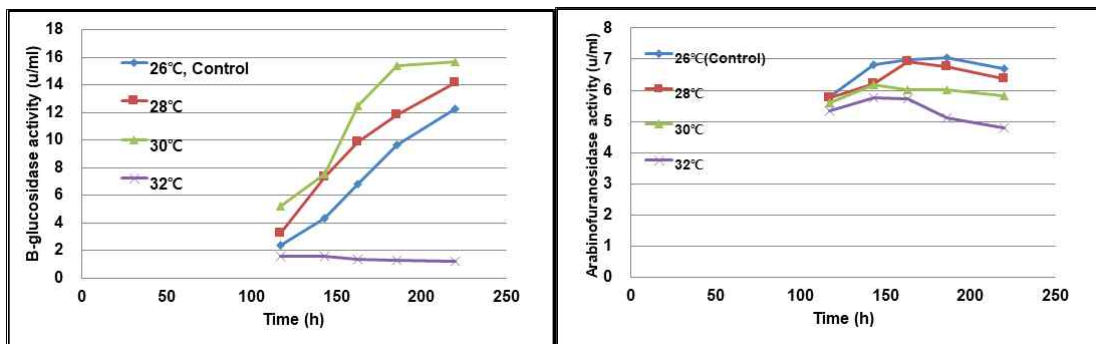


Fig 14. 배양온도별에 따른 배양시간별 β-glucosidase, arabinofuranosidase 효소활성

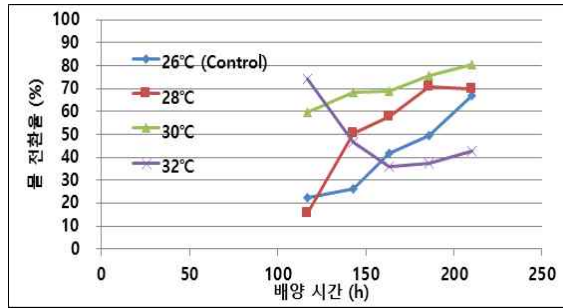


Fig 15. 배양온도에 따른 배양 시간별 상등액을 이용한 전환율

Table 14. 배양온도에 따른 효소활성 및 compound K 전환율.

	26°C	28°C	30°C	32°C
최대 $\beta$ -glucosidase 활성시간 (h)	220	220	220	117
최대 $\beta$ -glucosidase 활성 (U/ml)	12.2	14.2	15.7	1.6
최대 Arabinofuranosidase 활성시간 (h)	163	163	143	143
최대 Arabinofuranosidase 활성 (U/ml)	7.0	6.9	6.2	5.7
최대 전환율 시간 (h)	220	186	220	117
최대전환율 (%)	67.2	70.6	80.4	74.4

온도 차이에 따른  $\beta$ -glucosidase 효소 활성은 26, 28, 30°C에서 큰 차이를 보이지 않았지만, 32°C에서 효소 활성이 급격히 떨어졌고 Arabinofuranosidase 효소 활성은 온도가 높아질수록 떨어짐. 온도 증가에 따라 26, 28, 30°C순으로 최대 전환율이 증가하였으며, 32°C 배양에서는 초기 배양이후 배지의 넘침 현상이 심하여 이상배양 현상이 확인됨. 최적배양 온도는 최대 효소 활성과 최대 전환율을 보이는 30°C로 확인됨.

## 2. 식품용 산업배지 및 식품용 산업인삼추출물 적용 발효 최적화

### 1) 식품용 산업인삼추출물 적용 발효 최적화

과제목표인 *Aspergillus tubingensis* 균주를 이용한 발효로 효소를 생산하는 동시에 배양액의 인삼추출액을 투입하여, compound K를 동시에 전환시키는 발효방법을 확립하기 위한 실험을 진행함. 실험 조건은 기존 인삼추출물을 첨가하지 않는 조건을 control로 하고 30°C, pH는 조절하지 않고 SBF 4%, SPC 2%, 인삼추출물 1 L를 48~120 h 동안 연속 feeding하는 Amicogen 조건과 28°C, pH 5.0에서 pH 4.8로 shift하고 SBF 0.2%, SPC 1%, 80g sucrose를 12~132 h 동안 연속 feeding 하면서 인삼추출물 1 L를 12~84 h 동안 연속 feeding하는 건대 조건을 비교 실험함.

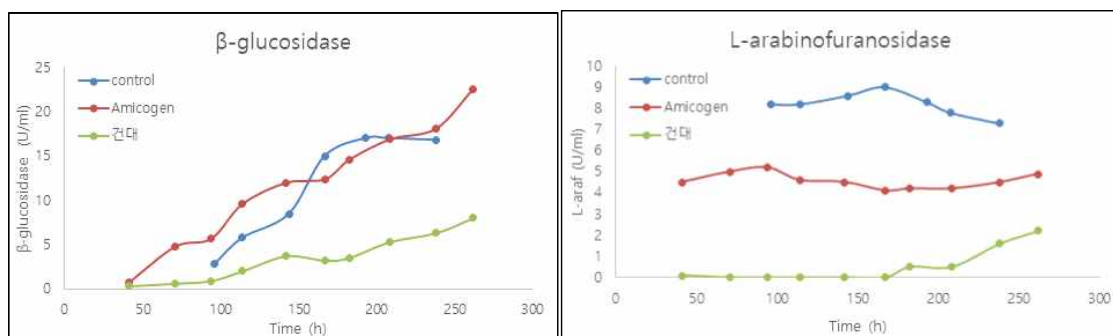


Fig 16. feeding조건에 따른 배양시간별  $\beta$ -glucosidase, arabinofuranosidase 효소활성

식품용 산업인삼추출물을 연속feeding 하면서 동시전환 발효하였을 때 Amicogen조건은  $\beta$ -glucosidase 효소 활성이 control조건과 유사하였고 Arabinofuranosidase 효소 활성은 감소하는 것으로 확인됨. 건대조건에서는  $\beta$ -glucosidase와 Arabinofuranosidase 효소 활성이 모두 감소하였고 compound K가 생성되지 않았음. 이러한 차이는 건대에서는 인삼추출물을 구입하여 사용하므로 성분 의 차이와 건대조건 feeding rate 2 ml/h로 빨랐던 점에서 기인했을 것으로 사료됨.

### 2) 식품용 산업배지 적용 발효 최적화 1

공동연구 기관인 건국대학교와 배양 조건에 따른 차이를 보이고 있음. 현재 주관기관인 아미코젠 조건은 탄소원을 SBF로 질소원을 SPC로 사용하고 진행하고 있으나, 공동기관인 건국대는 탄소원을 sucrose로 사용하며, 쌀겨 0.2%를 inducer로 사용함. 각각의 조건을 이용한 배양을 통하여 생산되는 효소활성과 전환율을 확인함. 조건은 control조건과 sucrose 2%에 배양 온도 28°C에 각각 쌀겨 0.2%, SBF 0.2% 2가지 조건에 sucrose 2%, SBF 0.2%, 배양 온도 30°C조건으로 총 4가지로 실험을 진행.

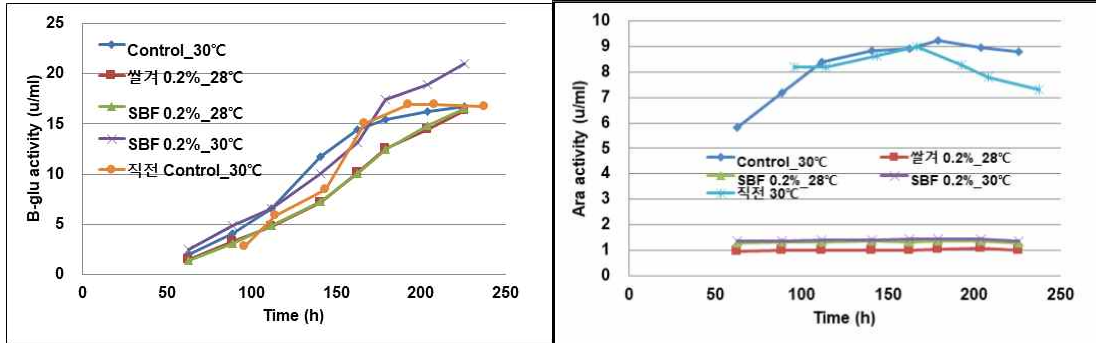


Fig 17. 배지조건에 따른 배양시간별  $\beta$ -glucosidase, arabinofuranosidase 효소활성

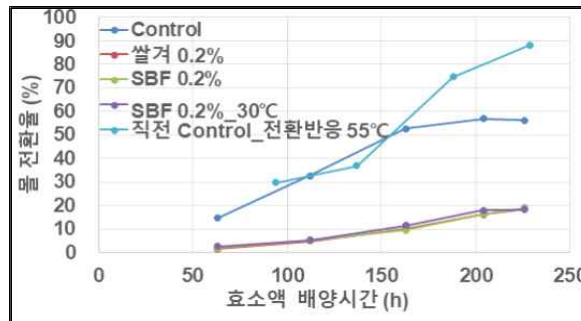


Fig 18. 배지조건에 따른 배양시간별 전환율

Table 15. 배양조건에 따른 효소활성 및 compound K 전환율.

	control	쌀겨 0.2%	SBF 0.2%	SBF 0.2%_30°C
최대 $\beta$ -glucosidase 활성시간 (h)	226	226	226	226
최대 $\beta$ -glucosidase 활성 (U/ml)	16.8	16.3	16.5	21.1
최대 Arabinofuranosidase 활성시간 (h)	179	204	179	63
최대 Arabinofuranosidase 활성 (U/ml)	9.2	1.1	1.4	1.4
최대 전환율 시간 (h)	204	226	226	226
최대전환율 (%)	56.8	18.5	19.0	18.1

실험조건들은 전체적으로  $\beta$ -glucosidase 효소 활성이 높아졌음. 건국대 조건인 sucrose,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  증가 및  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  첨가 후 쌀겨 및 SBF를 0.2% 첨가시 Arabinofuranosidase 효소 활성이 감소하는 것으로 확인됨. 동일한 조건에서 배양온도를 30°C로 높였을 때  $\beta$ -glucosidase 효소 활성이 빠르고 높게 증가하는 것을 확인. 이는 앞서 실험한 배양 온도 테스트에서 30°C조건에서 효소 활성이 가장 높고 전환율이 높은 결과와 유사함. 전환반응 후 상등액의 효소 잔존활성을 측정했을 때  $\beta$ -glucosidase 효소 활성이 sucrose를 이용한 배양에서 30% 까지 떨어지는 것을 확인했고 전환반응 3 일차 분석결과 compound K로 전환되지 못한 PPD는 대부분 F2로 남아 있는 것으로 확인됨.

### 3) 식품용 산업배지 적용 발효 최적화 2

앞선 실험에서 inducer로 사용된 쌀겨 및 SBF의 농도가 낮아서 Arabinofuranosidase 효소 활성 및 전환율이 낮았던 것인지 확인하기 위하여 sucrose 2%, inducer인 SBF 농도에 따른 비교 테스트를 진행함. 이를 위한 테스트 조건은 inducer 중 약간 높은 수치를 보였던 SBF 0.5, 1%, 2%의 농도로 실험을 진행함.

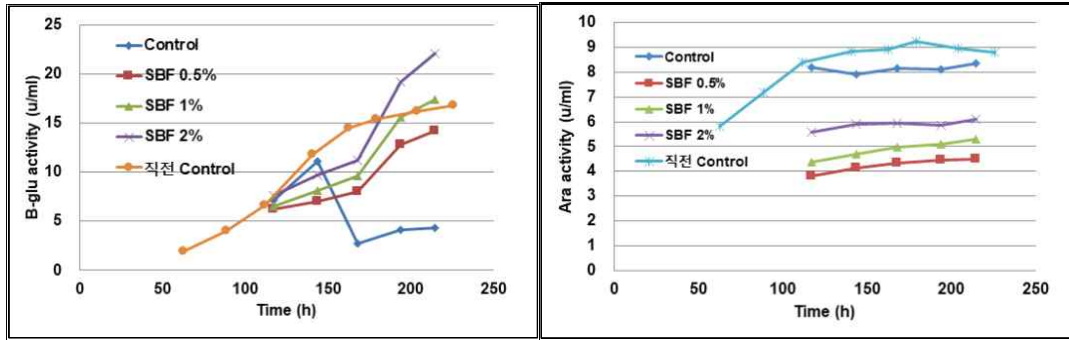


Fig 19. 배지조건에 따른 배양시간별  $\beta$ -glucosidase, arabinofuranosidase 효소활성

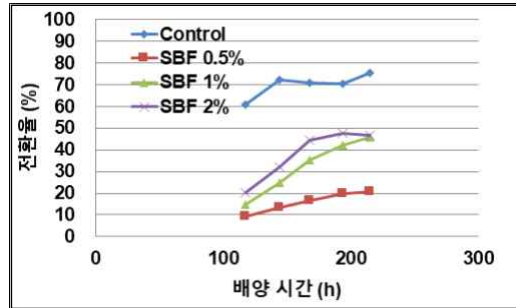


Fig 20. 배지조건에 따른 배양시간별 전환율

Table 16. 배양조건에 따른 효소활성 및 compound K 전환율.

	control	SBF 0.5%	SBF 1%	SBF 2%
최대 $\beta$ -glucosidase 활성시간 (h)	144	215	215	2158
최대 $\beta$ -glucosidase 활성 (U/ml)	11.1	14.3	17.4	22.0
최대 Arabinofuranosidase 활성시간 (h)	215	215	215	215
최대 Arabinofuranosidase 활성 (U/ml)	8.3	4.5	5.3	6.1
최대 전환율 시간 (h)	215	215	215	194
최대전환율 (%)	75.4	20.7	45.9	47.7

Control은 직전 배양과 비슷한 결과를 보이거나 배양 후기  $\beta$ -glucosidase 효소 활성이 낮아짐. 활성은 다소 낮아지는 결과였으나 전환율로 보았을 때 비슷한 결과를 나타냄. Sucrose를 탄소원으로 사용 시  $\beta$ -glucosidase 효소 활성이 증가하는 것을 확인하였으나, Arabinofuranosidase 효소 활성이 감소하고 전환반응 시 낮은 전환율을 보임. Sucrose, SBF 혼합으로 배양 시에는 SBF 농도가 증가할수록 전환율이 증가하는 경향이 나타났지만 control조건의 전환율과 비교했을 때 낮게 확인됨.

#### V. 5L에서 50L pilot 규모로 스케일-업 발효 생산

##### 1. 50L pilot 규모에서 컴파운드 케이 생산 발효조건 최적화

##### 1) 5 L 배양 최적화 조건을 이용한 50 L 배양

5L scale에서 최적 조건으로 확립된 SBF 4%, SPC 2%, 배양온도 30°C를 이용하여 2개의 50L pilot scale 발효 실험을 진행함. feeding은 식품용 산업인삼추출물을 연속feeding하면서 동시 전환 발효를 수행하였음.

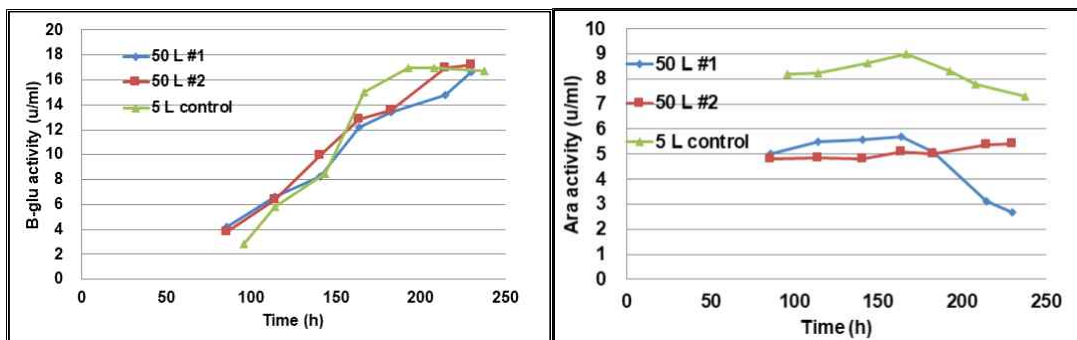


Fig 21. 50 L 발효조에서의 배양시간별  $\beta$ -glucosidase, arabinofuranosidase 효소활성

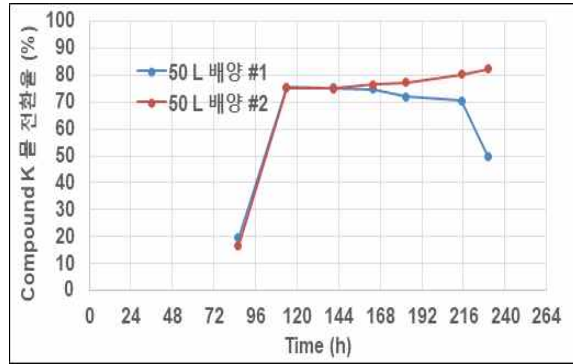


Fig 22. 50 L 발효조에서의 배양시간별 전환율

Table 17. 50 L 발효조에서의 효소활성 및 compound K 전환율.

	5 L	50 L-#1	50 L-#2
최대 $\beta$ -glucosidase 활성시간 (h)	193	230	216
최대 $\beta$ -glucosidase 활성 (U/ml)	17.0	16.7	17.2
최대 Arabinofuranosidase 활성시간 (h)	167	164	216
최대 Arabinofuranosidase 활성 (U/ml)	9.0	5.7	5.4
최대 전환율 시간 (h)	238	114	216
배양상등액 CK농도(g/L)	5.54	3.89	4.44 (4.03)
CK 생산성 (mg/L.h)	28.7	16.9	20.6
몰 전환 수율 (%)	85.4	76	80.2
최대전환율 (%)	77.5	75.5	82.3

50 L 배양 결과  $\beta$ -glucosidase 효소 활성은 5 L 와 유사한 수준을 보였으나, Arabinofuranosidase 효소 활성은 다소 낮게 확인됨. 50 L #1에서 배양 중 배기 라인에 막힘 현상이 커져 후반 배양 이상이 발생됨. 현재 자사에서 사용 중인 50L 배양기의 배기 라인이 좁으며, 배지 넘침 현상이 심하게 일어나 이상 배양이 진행된 것으로 사료되므로 생산 scale로 발효를 진행할 때에는 배기관 관련 이슈는 없을 것으로 보임.

5 L 배양 결과와 비교시 최대 효소 활성에 도달하는 시간은 약 40 h 정도 늦어졌지만, 최대 전환율은 5 L와 동등수준으로 확인됨. 50 L 배양 시 seed 배양조건을 flask 이후 Jar seed 배양을 추가하게 되면 접종량 및 접종 균체 농도가 증가되어 최대 효소 활성 및 접종 균체 농도가 증가되어 최고 효소활성 및 배양이 빨라질 것으로 사료됨.

## 2. 10 ton scale up을 위한 Jar seed 공정 확립 테스트 (5L 발효조)

### 1) 1차 Jar seed test

10 ton 발효 scale up을 위해 Jar seed 공정의 최적화가 필요해짐에 따라 5 L scale에서 테스트를 거쳐 공정 확립을 수행. 기존 공정은 flask에서 균주 배양 후 main 5 L로 접종하였으나 5 L Jar를 이용하여 1차 seed를 시간별로 12, 16, 20, 24 h 4개의 조건으로 배양 후 main접종을 진행함.

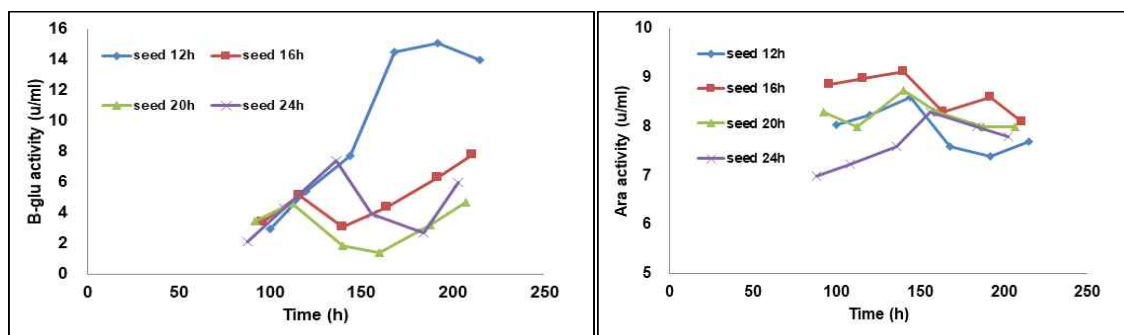


Fig 23. Jar seed 배양시간에 따른 배양시간별  $\beta$ -glucosidase, arabinofuranosidase 효소활성

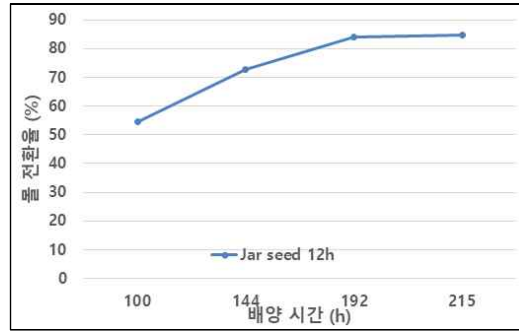


Fig 24. Jar seed 12 h 조건의 배양시간별 전환율

Table 18. Jar seed 배양시간에 따른 효소활성 및 compound K 전환율.

	Jar seed 12 h	Jar seed 16 h	Jar seed 20 h	Jar seed 24 h
최대 $\beta$ -glucosidase 활성시간 (h)	192	211	207	136
최대 $\beta$ -glucosidase 활성 (U/ml)	15.1	7.8	4.7	7.4
최대 Arabinofuranosidase 활성시간 (h)	144	140	140	156
최대 Arabinofuranosidase 활성 (U/ml)	8.6	9.1	8.7	8.3
최대 전환율 시간 (h)	215	-	-	-
최대전환율 (%)	84.6	-	-	-

Jar seed 12 h 조건에서 jar seed가 없는 control조건과 가장 유사한  $\beta$ -glucosidase 효소 활성을 나타냈고 12 h 이상 Jar seed를 배양하는 모든 조건에서는  $\beta$ -glucosidase 효소 활성이 발효 중반부터 감소하는 것으로 확인됨.  $\beta$ -glucosidase와 대비하여 Arabinofuranosidase 효소 활성은 모든 조건에서 크게 차이가 나지 않았고, 16 h Jar seed 배양 조건에서는 동등 이상의 Arabinofuranosidase 효소 활성을 나타내었음. 그리고 Jar seed 공정이 추가되었을 때 Arabinofuranosidase의 최대 효소 활성이 대체로 160시간에서 140시간으로 앞당겨짐을 확인함.

## 2) 1차, 2차 Jar seed test

앞선 jar seed 테스트 조건의 결과로 보았을 때 12h에서 가장 적합한 결과를 나타내었으며 더 짧은 시간으로 배양 테스트와 2차 Jar seed 테스트를 진행해볼 필요성이 있음. 최적화 발효 진행 조건은 1차 Jar seed와 2차 Jar seed를 각각 9 h-13 h, 9 h-16 h, 12 h-16 h(3%접종), 12 h-16 h(5%접종)으로 진행하였음.

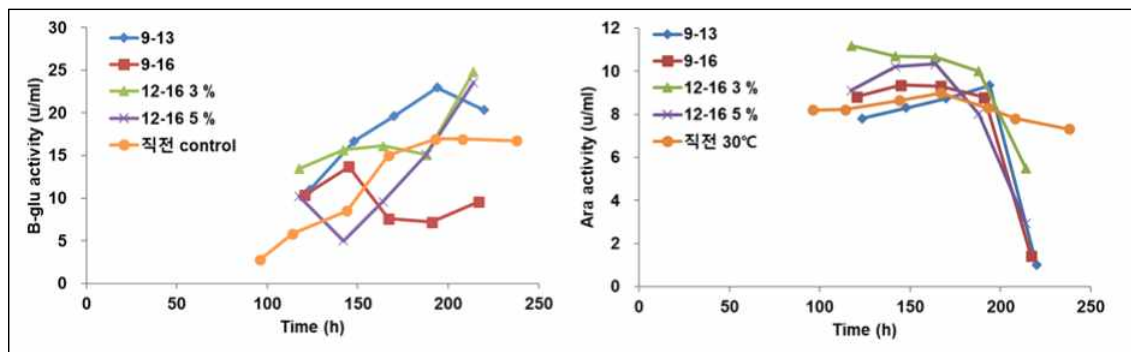


Fig 25. 1차, 2차 Jar seed 조건에 따른 배양시간별  $\beta$ -glucosidase, arabinofuranosidase 효소활성

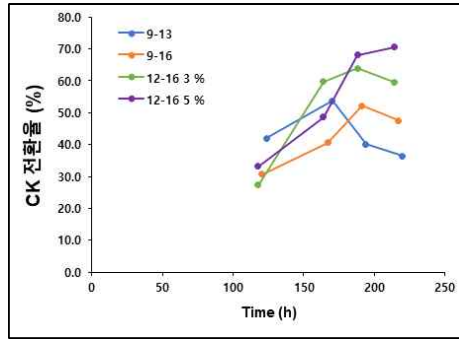


Fig 26. 1차, 2차 Jar seed 최적화 조건의 배양시간별 전환율

Table 19. 1차, 2차 Jar seed 배양시간에 따른 효소활성 및 compound K 전환율.

	1차 9h, 2차 13h	1차 9h, 2차 16h	1차 12h, 2차 16h (3%접종)	1차 12h, 2차 16h (5%접종)
최대 $\beta$ -glucosidase 활성시간 (h)	194	145	214	214
최대 $\beta$ -glucosidase 활성 (U/ml)	23.0	13.7	24.8	23.6
최대 Arabinofuranosidase 활성시간 (h)	194	145	118	164
최대 Arabinofuranosidase 활성 (U/ml)	9.3	9.4	11.2	10.3
최대 전환율 시간 (h)	170	191	188	214
최대전환율 (%)	53.8	52.2	63.9	70.5

compound K의 10 ton scale 생산 발효를 위한 Jar seed 최적화 조건 확립을 위해 4가지 조건으로 1차 및 2차 jar seed 배양 시간을 테스트함.  $\beta$ -glucosidase 효소 활성은 1차 9 h, 2차 13 h 배양 조건과 1차 12 h, 2차 16 h (3%접종)조건이 control보다 높게 확인된 반면, 1차 9 h, 2차 16 h 배양 조건은 지속적으로 낮은  $\beta$ -glucosidase 효소 활성을 나타냄. Arabinofuranosidase 효소 활성은 발효 초기에 모든 조건에서 control과 유사한 수준으로 나타났지만, 발효 후반이 되면 활성이 급격하게 감소하는 것으로 확인됨. 전환율 관점에서는 앞서 진행한 jar seed 최적화 테스트와 유사하게 1차 jar seed 12 h 이 가장 적합한 조건이었으며 최종으로 flask - 1<sup>st</sup> jar seed 12 h - 2<sup>nd</sup> jar seed 16 h - main순으로 최적화 조건이 확립됨.

## VI. 50 L pilot 규모에서 컴파운드 케이 생산 정제 조건 최적화

### 1) 식품용 Compound K 정제

식품용 Compound K 생산에 사용할 수 있는 Compound K 정제 방법을 구축하기 위하여 새로운 정제 실험을 진행함. 50L pilot 규모의 발효액을 사용하여 Compound K 정제 방법을 최적화함. 발효액을 원심분리하여, pellet을 모아 ethanol로 2회 추출하여, 추출액의 Compound K를 기준으로 실험을 진행함. 추출액을 micro filter를 사용하여 에탄올에 녹지 않는 물질을 정제함. 에탄올을 모두 제거하기 위해 감압 농축한 후 물을 첨가하여 물에 녹는 성분을 제거하여 정제함. 물을 이용한 정제 후 에탄올에 다시 녹여 compound K를 회수하여, 고정화를 위한 부형제(Beta-cyclodextrin)을 넣어 건조시켜 분말화된 compound K 제형을 얻음.

추출액의 고형분은 0.69% 였으며 추출액 내 compound K는 0.22%로 고형분의 31% 함량을 가짐. compound K의 건조 함량을 증가시키기 위해 추출액을 감압 농축하여 추출액 내 에탄올을 증발시킨 후 물을 첨가하여 물에 녹는 수용성 성분을 제거함. compound K는 물에 녹지 않으므로 물에서 결정화하여 결정화된 compound를 회수하기 위해 소량의 에탄올을 이용해 용해하였고, 측정시 정제액의 고형분은 13.6%이었으며, 고형분 내 compound K의 함량은 65%로 확인됨.

### 2) 발효액으로부터 컴파운드 케이 정제를 위한 상층액 처리

건국대의 정제 조건최적화를 기초로 50L pilot 규모의 발효액을 이용하여 실험을 진행함. 발효액은 원심분리기를 통하여 침전물과 상등액을 나눠 두 부분에서의 정제를 모두 진행한 후에 다시 합쳐 주었음. 침전물은 100 % EtOH 1 L로 2번 반복하여 추출하였으며, 추출액은 모두 농축기를 통해 농

축하였음. 농축된 상등액 및 침전물 추출액의 불순물을 제거하기 위해 Whatman filter paper No.1, 0.45  $\mu\text{m}$ , 0.25  $\mu\text{m}$  filter size으로 여과 및 한외여과를 진행하였음. 한외여과 이후 octadecyl-silica (ODS) A column (3 × 60 cm, 50  $\mu\text{m}$  particle size; YMC, Kyoto, Japan) 처리를 통하여 추가적인 정제를 진행하였음. Column은 55 % acetonitrile을 10 mL/min으로 흘려 C-K를 제외한 부산물을 제거하였고, 75 % acetonitrile을 흘려 C-K를 수득하였음. 75% acetonitrile을 흘려 얻은 sample은 농축하였고 C-K는 Hydrosphere C18 preparative column이 결합된 preparative high-performance liquid chromatography를 통해 수득하였음. (Flow rate : 5 mL/min; Temperature : 30 °C; Absorbance: 203 nm)

**Table 20. 50L 발효액으로부터 EtOH과 수지처리를 통한 compound K 정제**

Step	Volume (L)	Dried solid (g)	C-K (g)	C-K concentration (g/L)	Purity (%)	공정별 Yield (%)	Recovery (%)
Fermentation broth	20			5.54±0.00			100
1 <sup>st</sup> ethanol extraction	20	137.6±0.04	50.2±0.01	2.51±0.01	36.48±0.15	45.31±0.25	45
2 <sup>nd</sup> ethanol extraction	20	56.8±0.01	19.6±0.01	0.98±0.01	34.50±0.11	17.69±0.46	63
Supernatant extraction	20	28.4±0.01	13.4±0.01	0.67±0.01	47.18±0.45	12.10±0.69	72
Ultrafiltration	0.8	108.8±0.01	66.2±0.01	629.02±9.00	60.92±0.37	72.80±0.17	72
Octadecyl-silica resin	0.4	72.4±0.02	59.8±0.01	81.75±0.21	82.59±0.60	76.94±1.18	65
C18 resin in prep-HPLC	0.2	34.6±0.01	30.8±0.01	138.50±2.30	89.00±0.01	59.03±0.78	41

건국대의 정제조건을 기초로 실험한 결과 1L EtOH 2회 추출 및 상등액 추출결과 72%의 회수율을 확인하였으며, 한외여과 이후 82.6%의 순도 (CK함량), 65%의 Yield를 갖는 식품용 컴파운드 케이를 정제하였음.

더 높은 순도를 위하여 resin처리 및 prep-LC를 통하여 89%의 순도를 갖는 제약용 컴파운드 케이를 정제하였으나 Yield는 감소하는 경향을 나타냄.

### VII. 50 L pilot 규모에서 컴파운드 케이 전환 공정 확립(공인기관 순도, 함량 분석)

여러 조건 실험을 통해 최적화된 compound K 생산 발효법으로 5L와 50L의 발효를 진행하였다. 발효의 최종배양 상등액 샘플을 한국기능식품연구원에 분석의뢰하여 결과를 확인함.



페이지(1) / (총 1)

제 D2022092868 호  
문서확인번호: LMS-0270

### 참고용 시험성적서

본 성적서는 식품의약품안전처 「식품·의약품분야 시험·검사 등에 관한 법률」에 따른 것이 아닙니다.

제출명	5L 배양액	제출일자 (유형기관, 품질유지 기관 또는 소제기관)	2022-10-27
제출인	이씨로푸드회사 주소: 경상남도 진주시 문성읍 통안로550번길 14-10	성명	안종필
제출번호		접수년월일	2022-10-28
시험목적	제품용	접수번호	D2022092868

귀하가 우리 연구원에 시험뢰한 결과는 다음과 같습니다.

시험·검사 완료일: 2022-10-27  
 시험·검사 책임자: 정은숙  
 시험관련 총 책임자: 김찬희

시험 항목	시험 결과	시험-검사법
Compound K(mg/g)	7.66 mg/g (7.73, 7.59, 7.67)	양도법

※ 이 시험 결과는 지뢰리가 제의한 시료 및 시료량에만 한정됩니다.  
 ※ 본 성적서는 결과용 성격이 아닙니다. 시험 결과는 시험 목적 이외의 광고 및 홍보, 허가증발령서류 등에 사용될 수 없습니다.  
 ※ 법적 효력이 없으며, 정부기관 제출용도인 사용될 수 없습니다.  
 ※ 본 성적서는 202년 10월 27일 17:00:00 및 2022년 10월 27일 17:00:00 이후에 유효합니다.  
 ※ 시험이 무효한 경우 시험 및 결과받은 시료도 사용 가능합니다.

2022년 10월 27일  
**한국기능식품연구원**

141(한국기능식품연구원) 서울특별시 강남구 테헤란로 152 한국기능식품연구원 http://www.khfi.co.kr 전화번호 02-551-3030~0430-1

페이지(1) / (총 1)

제 D2022092869 호  
문서확인번호: LMS-0270

### 참고용 시험성적서

본 성적서는 식품의약품안전처 「식품·의약품분야 시험·검사 등에 관한 법률」에 따른 것이 아닙니다.

제출명	50L 배양액	제출일자 (유형기관, 품질유지 기관 또는 소제기관)	2022-10-27
제출인	이씨로푸드회사 주소: 경상남도 진주시 문성읍 통안로550번길 14-10	성명	안종필
제출번호		접수년월일	2022-10-28
시험목적	제품용	접수번호	D2022092869

귀하가 우리 연구원에 시험뢰한 결과는 다음과 같습니다.

시험·검사 완료일: 2022-10-27  
 시험·검사 책임자: 정은숙  
 시험관련 총 책임자: 김찬희

시험 항목	시험 결과	시험-검사법
Compound K(mg/g)	4.44 mg/g (4.41, 4.45, 4.43)	양도법

※ 이 시험 결과는 지뢰리가 제의한 시료 및 시료량에만 한정됩니다.  
 ※ 본 성적서는 결과용 성격이 아닙니다. 시험 결과는 시험 목적 이외의 광고 및 홍보, 허가증발령서류 등에 사용될 수 없습니다.  
 ※ 법적 효력이 없으며, 정부기관 제출용도인 사용될 수 없습니다.  
 ※ 본 성적서는 2022년 10월 27일 17:00:00 및 2022년 10월 27일 17:00:00 이후에 유효합니다.  
 ※ 시험이 무효한 경우 시험 및 결과받은 시료도 사용 가능합니다.

2022년 10월 27일  
**한국기능식품연구원**

141(한국기능식품연구원) 서울특별시 강남구 테헤란로 152 한국기능식품연구원 http://www.khfi.co.kr 전화번호 02-551-3030~0430-1

Fig 27. 5 L와 50 L scale에서 Compound K 발효 상등액의 분석 의뢰 결과

Table 21. 자사 분석결과와 분석기관 의뢰결과 비교

	5L Compound K 함량 (g/L)	50L Compound K 함량 (g/L)
자사 분석	5.54	4.03
분석 기관	7.66	4.44

한국기능식품연구원에 분석의뢰한 결과 5 L 배양 상등액의 compound K농도는 분석을 3반복 진행한 결과 평균이 7.66 mg/g이고 L로 환산하면 7.66 g/L로 확인되었으며, 50 L 배양 상등액의 compound K는 3반복 분석을 진행하여 4.44 mg/g이고 L로 환산하면 4.44 g/L로 확인됨. 자사에서는 정량한 결과 5L 배양액 5.54 g/L와 50 L 배양액 4.03 g/L의 결과를 확인함. 대체적으로 한국기능식품연구원의 분석결과가 동등 이상 수준이었고 이는 표준품의 검량선 차이인 것으로 예측됨.

## VIII. 10톤 공장 생산 규모 발효공정 확립

### 1. 10톤 배양 전 600 L 생산 규모 적용

#### 1) 600 L 생산 규모 test 1

10톤 공장 생산 규모 적용 전 배양 조건으로 확립된 SBF 4%, SPC 2%,로 300 L가 되게 하였으며, 배양온도 30°C, seed time은 Flask 16 h, 1<sup>st</sup> 12 h, 2<sup>nd</sup> 12 h를 이용하여 접종량은 각각 1<sup>st</sup> 3%, 2<sup>nd</sup> 5%, main 5%가 되게 접종하였으며, 볼륨은 각각 1<sup>st</sup> 2 L, 2<sup>nd</sup> 20 L로 하여 600L scale 발효 실험을 진행함. pH는 따로 control하지 않고, DO 30%, Air 0.5 vvm, 내압 0.2 bar를 유지하여 진행함. feeding은 식품용 산업인삼추출물을 연속feeding하면서 동시 전환 발효를 수행하였음. 인삼추출물 feed는 발효 48 h 이후 1.38 L/h의 속도로 100 h 까지 최종 100 L가 투입되게 하였음.

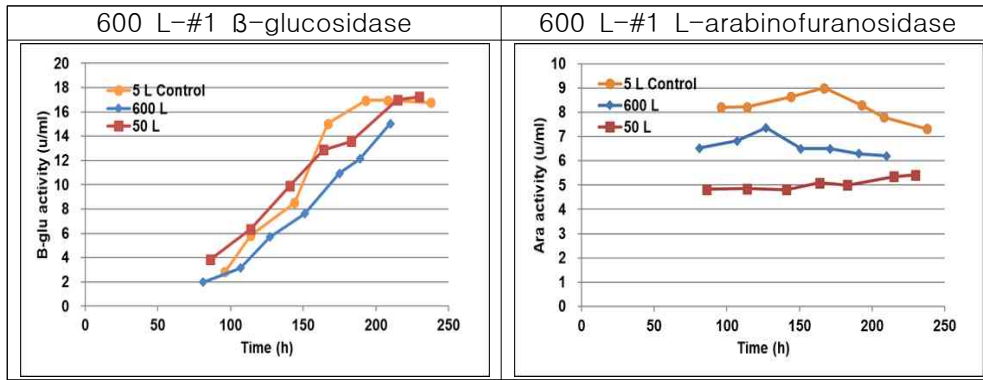


Fig 28. 600 L-#1 규모 생산에 따른  $\beta$ -glucosidase, Arabinofuranosidase 효소활성

600 L 규모 적용 결과  $\beta$ -glucosidase 효소활성은 5 L, 50 L와 유사한 수준으로 확인되었으며, L-arabinofuranosidase 효소활성은 5 L와 50 L 사이의 약 6 U/mL 수준으로 나타나며, 이는 50 L 배양 시 문제점으로 나타났던 배기라인 막힘 현상이 발생하지 않기 때문에 L-arabinofuranosidase 활성이 증가한 것으로 판단됨.

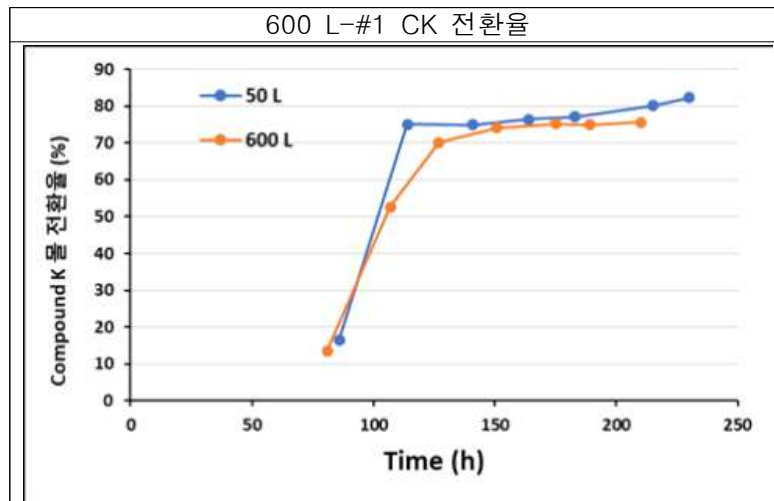


Fig 29. 600 L-#1 규모 생산에 따른 compound K 물 전환율

600 L 배양결과 compound K의 전환율은 50 L 수준과 비교시 약 200 h 까지 유사한 수준을 유지하며, 배양 후반부에 차이가 나기 시작하며, 종료 시의 차이는 약 7%p임.

Table 22. 600 L-#1 규모 생산에 따른 최대 효소활성, 배양 시간 및 compound K 전환율

	50 L	600 L 규모 생산
최대 $\beta$ - glucosidase 활성시간 (h)	230	210
최대 $\beta$ - glucosidase 활성 (U/ml)	17.2	15.0
최대 Arabinofuranosidase 활성시간 (h)	230	127
최대 Arabinofuranosidase 활성 (U/ml)	5.4	7.4
최대 전환율 시간 (h)	230	210
최대전환율 (%)	82.3	75.6
배양상등액 CK 농도 (g/L)	4.44	4.08
CK 생산성 (mg/L·h)	20.6	19.4

50 L 배양결과와 비교 시 최대 효소활성 및 전환율에 도달하는 시간은 약 20 h 단축되었으며, 최대 전환율은 약 7%p 낮은 수준임. jar seed 배양 최적화로 인하여 시간이 빨라진 것으로 판단되며, 데이터의 신뢰성을 위해 동일 조건으로 배양을 진행하여 평가함.

## 2) 600 L 생산 규모 test 2

600 L 생산 규모의 전환을 및 CK 생산성을 높이기 위해 기존 조건에서 공동연구기관인 건국대에서 사용한 cellulysin을 첨가하여 추가 배양을 수행하였음. cellulysin의 농도는 1.2 g/L로 사용하였으며, 배양 100 h 시점에 투입하였음.

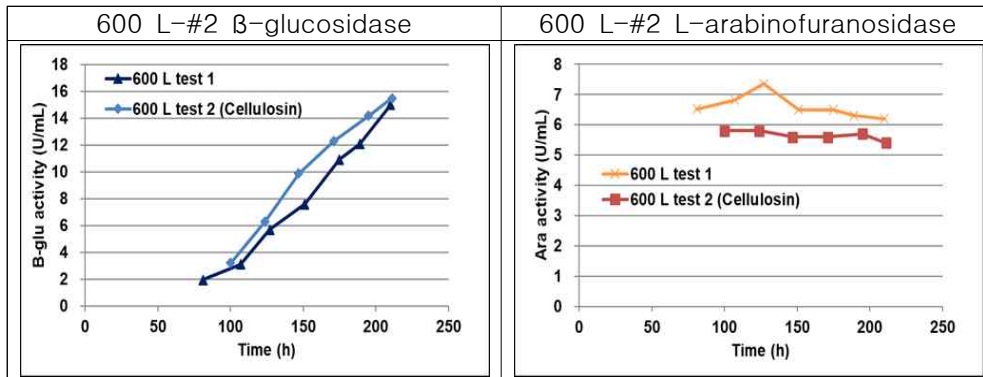


Fig 30. Cellulysin 첨가 600 L β-glucosidase, Arabinofuranosidase 효소활성

2번째의 600 L 규모 재현성 평가 결과 β-glucosidase 효소활성은 크게 달라지지 않는 것으로 확인하였으며 최대 활성 15.0 U/mL 수준임.

L-arabinofuranosidas 효소활성은 직전 결과보다 최대 활성이 약 2.0 U/mL 낮은 수준으로 나타나며, 배양 종료의 차이는 약 1.0 U/mL 정도임.

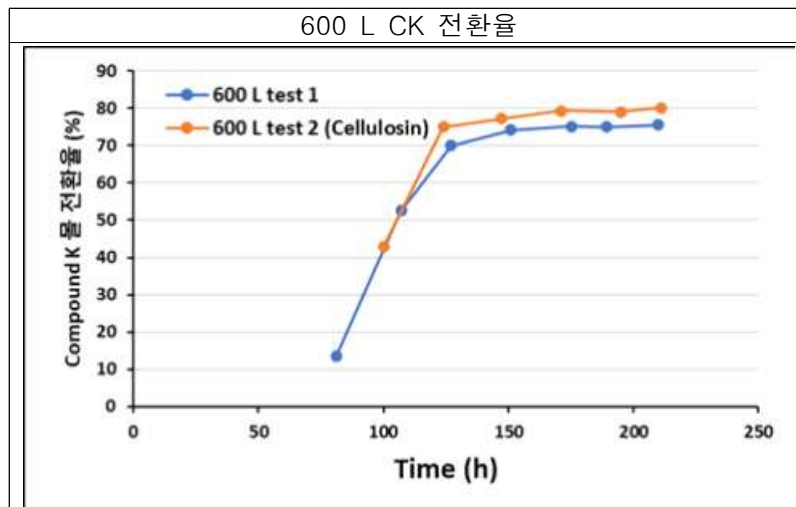


Fig 31. Cellulysin 첨가 600 L compound K 물 전환율

compound K 전환율에 대한 비교 결과 cellulysin이 첨가된 발효조에서 compound K 전환율이 상승되었으며, 기존 조건 대비 약 5%p 증가된 수치를 확인하였음.

Table 23 Cellulysin 첨가 600 L 최대 효소활성, 배양 시간 및 compound K 전환율

	600 L (Cellulysin 첨가)
최대 β- glucosidase 활성시간 (h)	211
최대 β- glucosidase 활성 (U/ml)	15.5
최대 Arabinofuranosidase 활성시간 (h)	124
최대 Arabinofuranosidase 활성 (U/ml)	5.8
최대 전환율 시간 (h)	211
최대전환율 (%)	78.5
배양상등액 CK 농도 (g/L)	4.15
CK 생산성 (mg/L·h)	19.6

cellulysin이 첨가된 600 L 규모 생산 실험의 결과로 효소 활성은 기존 조건 대비 유사한 수준을 보

이나, CK 전환을 및 농도의 경우 기존 600 L 배양과 비교 시 증가된 수치를 확인하였음.

## 2.10톤 배양 생산 규모 적용

### 1) 10톤 생산 규모 배양

앞선 600 L 규모 예비 실험 결과 기존조건에 cellulosein 첨가시 상승된 compound K 전환율을 확인 하였으며, 이를 적용하여 10톤 배양 생산 규모에 적용하여 실험을 진행함. 배지 성분은 SBF 4%, SPC 2%로 3 kL가 되게 하였으며, 배양온도 30°C에 seed 조건은 기존 확립된 조건인 Flask 16 h, 1<sup>st</sup> 12 h, 2<sup>nd</sup> 12 h으로 진행하여, 접종량은 각각 1<sup>st</sup> 3%, 2<sup>nd</sup> 5%, main 5%가 되게 접종하였으며. 볼륨은 1<sup>st</sup> 20 L, 2<sup>nd</sup> 200 L로 하여 10톤 발효 생산을 진행하였음. pH는 control 하지 않고, DO 30%, Air 0.5 vvm, press 0.2 bar를 유지하며 진행되었음. 인삼추출물 feed는 발효 48 h 이후 13.8 L/h의 속도로 100 h 까지 총 1,000 L가 투입되게 하였으며, cellulosein은 100 h 이후 1.2 g/L의 농도로 투여 되었음.

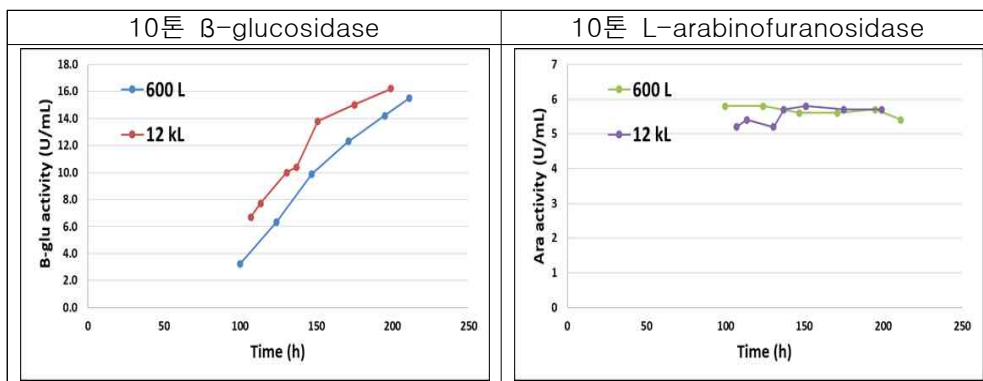


Fig 32. 10톤 규모 생산에 따른  $\beta$ -glucosidase, Arabinofuranosidase 효소활성

10톤 배양 생산 규모 적용 결과 600 L와 비교하면  $\beta$ -glucosidase 효소활성은 전체적으로 더 높은 활성을 나타내며, 발효 종료 시의 활성은 약 16.0 U/mL 수준임.

L-arabinofuranosidas 효소활성은 배양 중반부에 600 L 보다 활성이 낮지만, 점차 증가하여 후반부 및 종료 시 600 L 보다 동등 이상의 활성을 확인하였음.

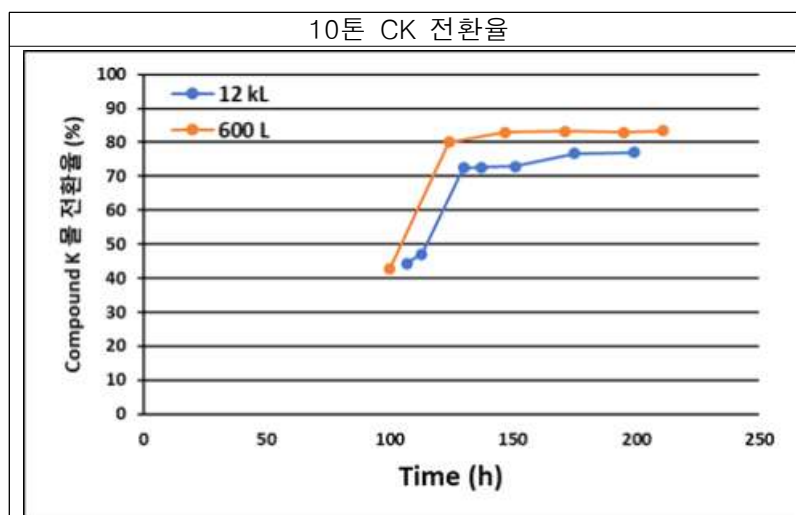


Fig 33. 10톤 규모 생산에 따른 compound K 물 전환율

10톤 배양 생산 규모 배양결과 compound K의 전환율은 600 L 수준과 비교 시 전체적으로 낮은 패턴의 전환율이 확인되며, 이는 낮은 효소활성의 원인으로 생산 scale up시 발효조 내의 배양액의 균질화 및 교반정도에서 차이나 나는 것으로 판단됨. 종료시점 compound K의 전환율은 77% 수준

임.

Table 24. 10톤 규모 생산에 따른 최대 효소활성, 배양 시간 및 compound K 전환율

	10톤 규모 생산
최대 $\beta$ -glucosidase 활성시간 (h)	199
최대 $\beta$ -glucosidase 활성 (U/ml)	13.0
최대 Arabinofuranosidase 활성시간 (h)	175
최대 Arabinofuranosidase 활성 (U/ml)	5.4
최대 전환율 시간 (h)	199
최대전환율 (%)	77.0
배양상등액 CK 농도 (g/L)	3.41
CK 생산성 (mg/L·h)	17.1

10톤 배양 생산 규모 적용 결과  $\beta$ -glucosidase 효소활성은 600 L와 비교 시 약 1 U/mL 증가하였으며, L-arabinofuranosidas 효소활성은 동등 이상의 수준임.

반면, compound K의 전환율의 경우 L-arabinofuranosidas의 최대활성 시점에서 최대 전환율을 보이며, 이 후 점차 감소하는 패턴을 확인함.

L-arabinofuranosidas 효소의 활성감소가 전환율의 감소로 이어지는 것으로 판단되며, 10톤 배양 생산 규모에서 두 효소활성의 활성을 감소시키지 않고 종료시점에 최대 활성을 갖도록 배양 조건을 조절할 필요가 있음. 해당 샘플을 공인분석 기관에 맡겨 순도 및 성분 분석을 의뢰함.

## 2) acid 별 pH 조절 테스트

발효 후반부에 상승하는 pH가 L-arabinofuranosidas 효소의 활성감소의 원인으로 판단되어 발효 시 acid를 이용한 pH 조절을 평가하기 위해 각각 Citric acid, phosphoric acid, sulfuric acid를 사용하여 공정평가 함. pH는 6.0을 넘지 않도록 조절하였음.

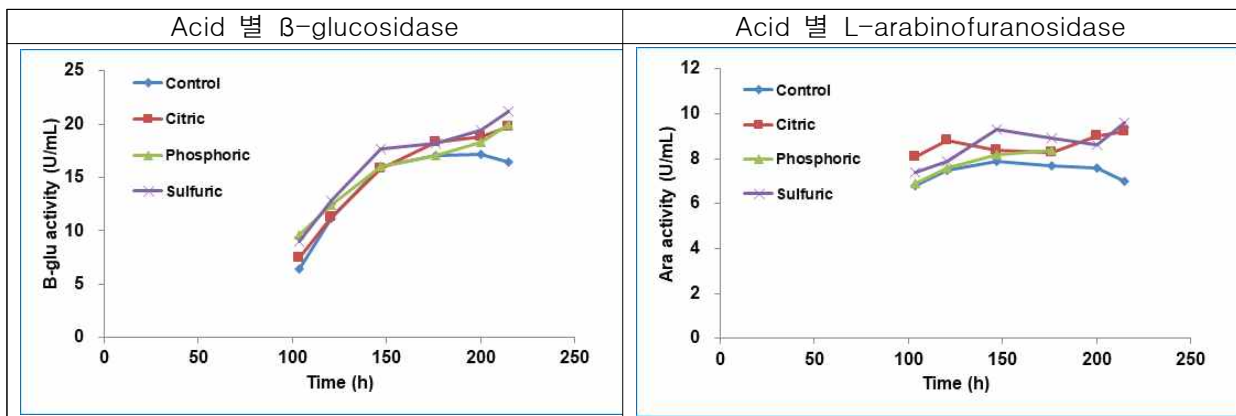


Fig 34. pH 조절을 위한 acid별  $\beta$ -glucosidase, arabinofuranosidase 효소활성

기존 조건에서 pH control 6.0 이하로 유지하기 위한 조건으로 5 L scale에서 평가를 진행 함. acid 투여 시 모든 조건에서 control 조건대비 상승된 활성을 나타내어, acid 투여에 따른 pH조절 결과 효소 활성에 영향을 끼치지 않는 것으로 판단 됨.

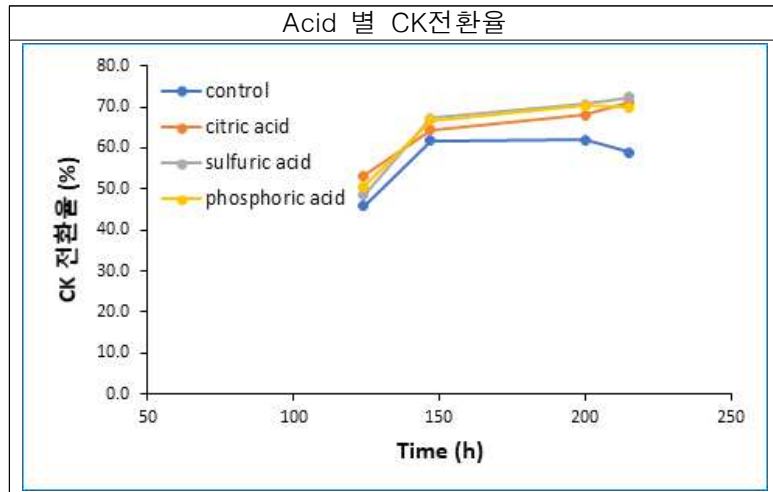


Fig 35. pH 조절을 위한 acid별 compound K 물 전환율

전환율의 경우 phosphoric acid 조건에서 발효 종료 전환율 72.3%를 확인하였으며, control 대비 높은 전환율을 보이며, citric acid 및 sulfuric acid 또한 비슷한 수준의 전환율을 확인 함. 위의 결과로 발효 중 acid 투여가 효소 활성 및 전환율을 크게 감소시키지 않고 발효 후반부 상승하는 pH를 조절하여 효소 활성 감소를 막을 수 있다고 판단됨.

위의 결과를 적용하여 10톤 발효 생산에 가장 좋은 전환율을 보이는 phosphoric acid를 투여하여 발효 중 pH를 조절하여 진행하기로 함.

### 3) 발효 중 온도 shift 테스트

건국대 조건의 발효 60 h 이후 배양 온도를 55°C로 shift 하는 조건을 참고하여 5 L scale 발효조로 테스트를 진행함. 조건은 건대 조건인 60 h 온도 shift를 control로 하여, 80 h, 100 h, 120h으로 지정하였음. 모든 조건에서 pH 조절 조건을 추가하여 pH 6 이하로 유지되게 하였음.

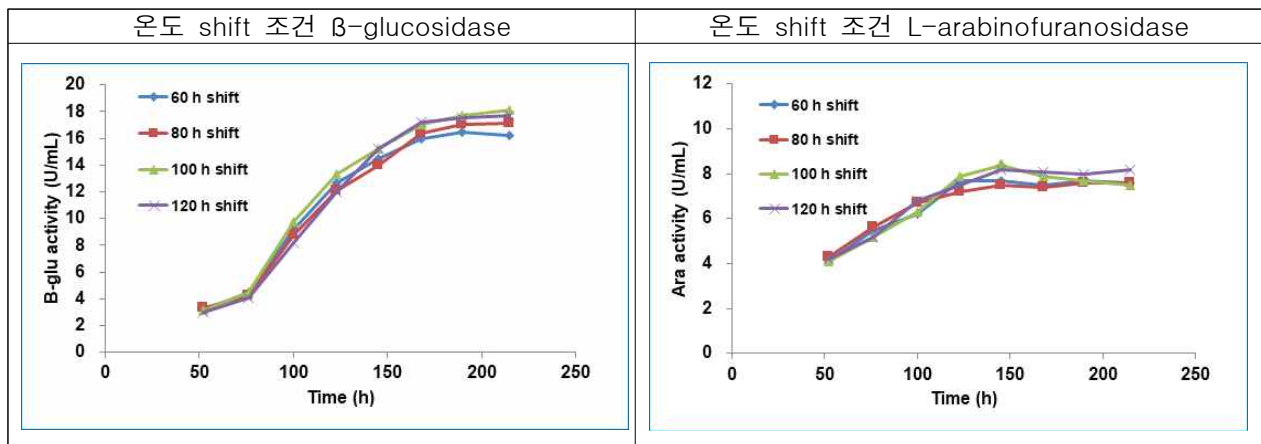


Fig 36. 온도 shift 조건 β-glu, arabinofuranosidase 효소활성

효소 활성의 경우 시간별 온도 shift 결과 조건별 큰 차이를 나타내지는 않았으나, 온도 shift가 빠를수록 발효 후반부에 효소 활성이 조금씩 감소되는 것으로 보여지며, 이는 높은 배양 온도에 대한 효소의 열안정성에 의한 차이로 보여짐.

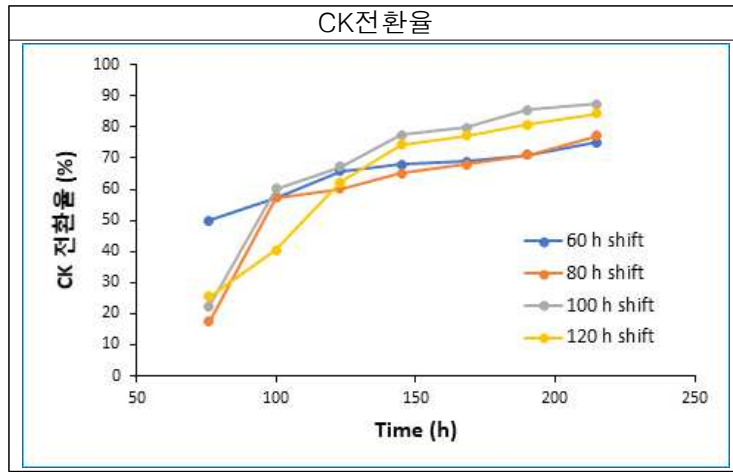


Fig 37. 온도 shift 조건 compound K 물 전환율

효소 활성과 달리 CK 전환율에서 조건별 차이가 나타나며, 전체적으로 모든 조건에서 기존 조건에 비해 CK 전환율이 증가됨을 확인함. 이는 효소의 최적 활성 온도에 의해 CK 전환율이 증가된 것으로 판단 됨. 각 조건에서 온도 shift가 이루어지는 시간이 늦어질수록 더 높은 전환율로 이어지며, 아미코젠 발효 조건에서 100 h에 투여하는 조건이 CK 전환율 87.5% 수준으로 가장 높은 전환율을 나타냄.

건대조건의 발효중 온도 shift 적용 결과 기존 조건보다 전체적으로 동등 이상의 compound K의 생산량이 증가됨을 확인하였음. 하지만 건대 조건과 달리 아미코젠의 생산 조건은 배양 시간이 길고, 인삼 추출물의 feed가 모두 종료되는 100 h 이후 지점에서 온도 shift가 이루어지는 100 h, 120 h의 조건이 높은 compound K 생산량을 나타내었으며, 이 중 100 h 조건이 가장 높은 전환율을 보여 이후 10톤 배양 생산규모에 적용하기로 함.

## 2-1.10톤 배양 생산 규모 적용

### 1) Acid 및 온도 shift를 이용한 pH 조절 10톤 생산 규모 배양

앞선 10톤 배양 발효 결과 발효 후반부 감소하는 전환율과, CK 생산량을 증가시키기 위해 기존 확립된 10톤 배양 조건에 추가로 5 L scale에서 진행된 acid를 이용한 pH 조건과 배양 100h 이후 온도를 55°C로 shift하고 cellulysin을 1.2 g/L농도로 투여하여 진행한 조건을 적용하여 10톤 배양 발효를 진행함.

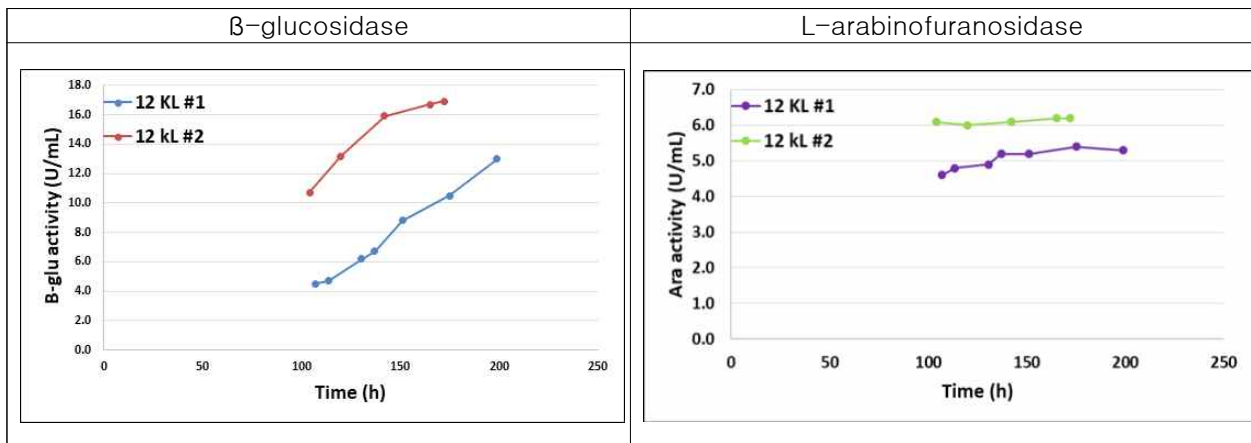


Fig 38. 10톤 규모 생산에 따른 β-glucosidase, arabinofuranosidase 효소활성

acid를 통한 pH 조절 및 온도 shift 조건을 10톤 배양 생산 규모 적용 결과 기존 직전 배양과 비교하면 β-glucosidase 효소활성은 전체적으로 더 높은 활성을 나타내며, 발효 종료 시의 활성은 약 16.9 U/mL 수준임.

L-arabinofuranosidas 효소활성은 초기 모든 시간대에 직전 배양보다 높은 활성을 유지하는 것을 확인할 수 있음. 또한 높은 효소 활성으로 배양시간이 27 h 단축되었음.

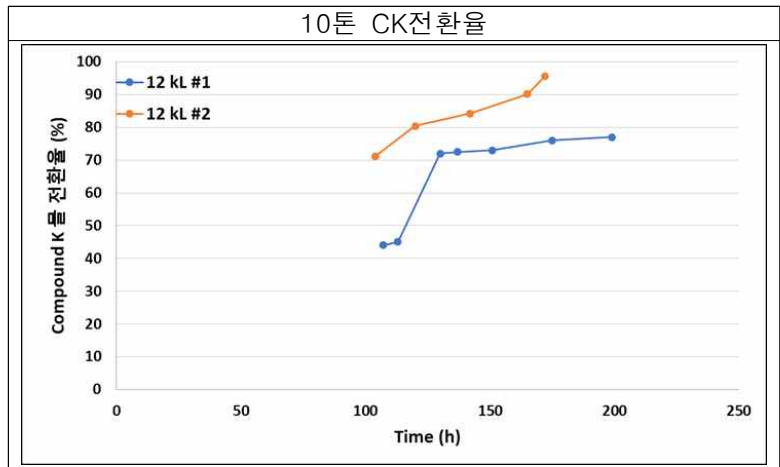


Fig 39. 10톤 규모 생산에 따른 compound K 물 전환율

compound K의 전환율은 직전 10톤 배양과 비교 시 전체적으로 크게 향상된 전환율이 확인되며, 발효종료 시간인 172 h 기준 전환율 95.5%로 확인됨. 이는 세계 최고수준인 중국 Fudan 대학의 82.6%와 비교 시 116%의 수준이며, CK 물전환율이 95.5%로 이론수율인 100%에 근접하여 세계 최고 수준보다 더욱 우수한 기술력을 확보하였음.

Table 25. 10톤 규모 생산에 따른 최대 효소활성, 배양 시간 및 compound K 전환율

	10톤 #1	10톤 #2 (pH <6.0)
최대 β- glucosidase 활성시간 (h)	199	172
최대 β- glucosidase 활성 (U/ml)	13.0	16.9
최대 Arabinofuranosidase 활성시간 (h)	175	172
최대 Arabinofuranosidase 활성 (U/ml)	5.4	6.2
최대 전환율 시간 (h)	199	172
최대전환율 (%)	77.0	95.5
배양상등액 CK 농도 (g/L)	3.41	5.15
CK 생산성 (mg/L·h)	17.1	29.9

10톤 생산 배양시 전환율의 감소의 원인은 배양 후반부에 상승하는 pH의 원인으로 acid를 투여한 pH 조절이 향상된 전환율을 나타내며, 이는 증가된 효소 활성과 배양 시간의 단축으로 이어진 것으로 보임. 해당 조건으로 발효 최적화 조건을 확립하여 compound K를 생산할 수 있을 것으로 사료 됨.

## IX. 10톤 공장 정제공정 확립

### 1) 식품용 Compound K 정제

식품용 Compound K 생산에 사용할 수 있는 Compound K 정제 방법을 50L pilot 규모의 발효액을 사용하여 정립된 Compound K 정제 방법을 반영하여 진행하였으며, 생산 규모에 맞추기 위해 발효액을 원심분리가 아닌 필터 패드를 이용하여, pellet을 모아 ethanol로 2회 추출하여, 추출액의 Compound K를 기준으로 실험을 진행함. 추출액을 micro filter를 사용하여 에탄올에 녹지 않는 물질을 정제함. 에탄올을 모두 제거하기 위해 감압 농축한 후 물을 첨가하여 물에 녹는 성분을 제거하여 정제함. 물을 이용한 정제 후 에탄올에 다시 녹여 compound K를 회수하여, 고정화를 위한 부형제 (Beta-cyclodextrin)을 넣어 건조시켜 분말화된 compound K 제형을 얻음.

2회 추출이 진행된 총 추출액의 고형분은 0.89% 였으며 추출액 내 compound K는 0.32%로 고형분의



36% 함량을 가짐. compound K의 건조 함량을 증가시키기 위해 추출액을 감압 농축하여 추출액 내 에탄올을 증발시킨 후 물을 첨가하여 물에 녹는 수용성 성분을 제거함. compound K는 물에 녹지 않으므로 물에서 결정화하여 결정화된 compound를 회수하기 위해 소량의 에탄올을 이용해 용해하였고, 측정시 정제액의 고형분은 11.5%이었으며, 고형분 내 compound K의 함량은 62.8%로 확인됨.

## 2) 10톤 생산 발효액으로부터 컴파운드 케이 정제

기존 건국대의 정제조건을 사용한 50 L pilot 규모의 정제 공정을 반영하여 10톤 생산 규모의 컴파운드 케이 정제를 진행함, 발효액은 필터패드를 이용하여 1차적으로 침전물을 걸러 상등액과 침전물을 분리함. 침전물은 95% 에탄올을 이용하여 2회 추출 진행하였으며, 상등액은 농축하여 추출액에 합쳐 진행함. 추출물의 불순물을 제거하기 위해서 0.45 um, 0.2 um micro filter를 이용하여 제거하였으며, 한외여과를 통해 농축하였음.

Table 26. 10톤 생산 발효액으로부터 EtOH을 이용한 compound K 정제

Step	Volume (kL)	Dried solid (kg)	C-K (kg)	C-K concentration (g/L)	Purity (%)	공정별 Yield (%)	Recovery (%)
Fermentation broth	4			5.15±0.00			100
1 <sup>st</sup> ethanol extraction	4	25.10±0.03	9.32±0.01	2.33±0.01	37.12±0.16	45.24±0.42	45
2 <sup>nd</sup> ethanol extraction	4	10.41±0.01	3.48±0.01	0.87±0.01	33.42±0.10	16.90±0.40	62
Supernatant extraction	4	5.14±0.01	2.20±0.01	0.55±0.01	42.75±0.24	10.68±0.51	72
Ultrafiltration	0.2	23.08±0.01	14.51±0.01	72.55±0.22	62.87±0.43	70.43±0.76	70

정제과정 결과 에탄올 추출 및 상등액 추출 시 72%의 회수율을 확인하였으며, 한외여과시 CK 함량 순도 62.9% 및 70.0% yield를 갖는 컴파운드 케이를 정제하였음.

## X. 10톤 공장 생산 규모에서 시제품 생산

2번의 10톤 생산 발효액으로부터 얻어진 정제된 compound K를 이용하여 시제품 생산을 진행하였음. 50%이상의 compound K의 농도를 맞추기 위해 정제된 compound K를 농축하여 볼륨을 200 L에서 50 L 수준까지 최대한 줄인 뒤, 베타 사이클로 덱스트린, 물을 첨가하여 동결건조를 4일간 진행하였음. 최종적으로 건조된 샘플은 분쇄하여 자사분석결과 563.2 g/kg의 농도의 compound K 시제품을 제작 및 COA 발행 완료함.



Fig 40. compound K 시제품 제조 공정도

CERTIFICATE OF ANALYSIS

Compound K (10kL Pilot-Product)

Compound K for Food Raw Material

General Information

Producer	AMICOGEN, Inc.
Accreditation	ISO9001:2015
Lot No.	N/A
Manufacturing date	Oct 20, 2023
Properties	Powder

Release Test Result

	Specifications	Analysis Methods	Result	
Appearance	beige	Visual Observation	Confirm	Pass
Compound K Purity	> 500 mg/g	HPLC Method	563.2	Pass

Date of Release Oct 21, 2023

  
Responsible  
Enzyme & Pharmaceuticals QC

  
Responsible  
Enzyme & Pharmaceuticals  
QA Manager



Quality Management System Certification  
ISO 9001:2015 Certificate No. : QI392123  
Development, Manufacture of Antibiotics synthesis enzymes and Food enzymes



AMICOGEN, Inc.  
Enzyme & Biopharmaceuticals  
14-10, Worasan-ro 950beon-gil, Munsan-eup, Jinju-si, Gyeongsangnam-do, Republic of Korea  
TEL: +82-55-759-6161 / E-mail: order@amicogen.com

Certificate Version 02.000  
Page 1 of 1

Fig 41. compound K 시제품 COA

## XI. 10톤 공장 생산 제품 공인 분석

여러 조건 실험을 통해 최적화된 compound K 생산 발효법으로 10톤 생산 규모의 발효와 시제품 생산을 진행하였다. 발효의 최종배양 상등액 샘플 및 시제품을 한국기능식품연구원에 분석 의뢰하여 결과를 확인함.

페이지(1) / 총(1)

제 D2023110142 호 문서확인 QPWN-374L-0VUS									
<b>참고용 시험성적서</b>									
본 성적서는 식품의약품안전처 「식품·의약품분야 시험·검사 등에 관한 법률」에 따른 것이 아닙니다.									
내용명	10톤배양액	제조일자 (유동기한, 품질유지 기한 또는 소비기한)	2023-10-20						
의뢰인	업체명 아미코젠(주)회사	성명	안용필						
	주소 경상남도 진주시 문산읍 월야산로950번길 14-10	제조번호	2023-11-01						
시험목적	제품용	검사번호	E0825110142						
<p>귀하가 우리 연구원에 시험의뢰한 결과는 다음과 같습니다.</p> <p>시험·검사 완료일: 2023-11-23                  시험·검사 책임자: 정은숙                  시험관련 총 책임자: 김진희</p> <table border="1"> <thead> <tr> <th>시험 항목</th> <th>시험 결과</th> <th>시험·검사원</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>Compound K(mg/g)</td> <td>3.89 mg/g (3.88, 3.90, 3.90)</td> <td>양효린</td> </tr> </tbody> </table> <p>참.</p> <p>※ 이 시험 결과는 의뢰자가 제시한 시료 및 시료명에만 한정됩니다.                  ※ 본 성적서는 참고용 성격입니다. 시험 결과는 시험 목적 이외의 광고 및 홍보, 허가불법행위 등에 사용될 수 없습니다.                  ※ 법적 효력이 없으며, 영구기관 제출용으로 사용할 수 없습니다.                  ※ 본 성적서는 KS Q ISO/IEC 17025 및 KOLAS 인증과 관련이 없습니다.                  ※ 시험이 부속한 경우 시험 및 결과받은 날짜로 작성 가능합니다.</p> <p style="text-align: right;">2023년 11월 23일  <b>한국기능식품연구원</b></p> <p style="font-size: small;">(4)한국안정기능식품협회 부설 한국기능식품연구원 http://www.khff.re.kr 전화번호 031)3028-0400~1</p>				시험 항목	시험 결과	시험·검사원	Compound K(mg/g)	3.89 mg/g (3.88, 3.90, 3.90)	양효린
시험 항목	시험 결과	시험·검사원							
Compound K(mg/g)	3.89 mg/g (3.88, 3.90, 3.90)	양효린							

페이지(1) / 총(1)

제 D2023110143 호 문서확인 3LW3-G084-054S									
<b>참고용 시험성적서</b>									
본 성적서는 식품의약품안전처 「식품·의약품분야 시험·검사 등에 관한 법률」에 따른 것이 아닙니다.									
내용명	GK배출물	제조일자 (유동기한, 품질유지 기한 또는 소비기한)	2023-10-20						
의뢰인	업체명 아미코젠(주)회사	성명	안용필						
	주소 경상남도 진주시 문산읍 월야산로950번길 14-10	제조번호	2023-11-01						
시험목적	제품용	검사번호	E0825110143						
<p>귀하가 우리 연구원에 시험의뢰한 결과는 다음과 같습니다.</p> <p>시험·검사 완료일: 2023-11-24                  시험·검사 책임자: 정은숙                  시험관련 총 책임자: 김진희</p> <table border="1"> <thead> <tr> <th>시험 항목</th> <th>시험 결과</th> <th>시험·검사원</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>Compound K(mg/g)</td> <td>568.10 mg/g (566.71, 569.12, 568.47)</td> <td>양효린</td> </tr> </tbody> </table> <p>참.</p> <p>※ 이 시험 결과는 의뢰자가 제시한 시료 및 시료명에만 한정됩니다.                  ※ 본 성적서는 참고용 성격입니다. 시험 결과는 시험 목적 이외의 광고 및 홍보, 허가불법행위 등에 사용될 수 없습니다.                  ※ 법적 효력이 없으며, 영구기관 제출용으로 사용할 수 없습니다.                  ※ 본 성적서는 KS Q ISO/IEC 17025 및 KOLAS 인증과 관련이 없습니다.                  ※ 시험이 부속한 경우 시험 및 결과받은 날짜로 작성 가능합니다.</p> <p style="text-align: right;">2023년 11월 24일  <b>한국기능식품연구원</b></p> <p style="font-size: small;">(4)한국안정기능식품협회 부설 한국기능식품연구원 http://www.khff.re.kr 전화번호 031)3028-0400~1</p>				시험 항목	시험 결과	시험·검사원	Compound K(mg/g)	568.10 mg/g (566.71, 569.12, 568.47)	양효린
시험 항목	시험 결과	시험·검사원							
Compound K(mg/g)	568.10 mg/g (566.71, 569.12, 568.47)	양효린							



Fig 42. 10톤 발효 상등액과 시제품에서 Compound K 분석 의뢰 결과

Table 27. 자사 분석결과와 공인분석기관 의뢰결과 비교

	10kL Compound K 함량 (g/L)	시제품 Compound K 함량 (g/kg)
자사 분석	3.41	563.2
공인분석 기관	3.89	568.1

한국기능식품연구원에 분석의뢰한 결과 10톤 배양 상등액의 compound K농도는 분석을 3반복 진행한 결과 평균이 3.89 mg/g이고 L로 환산하면 3.89 g/L로 확인되었으며, 시제품의 compound K는 3반복 분석을 진행하여 568.1 mg/g이고 kg로 환산하면 568.1 g/kg로 확인됨. 자사에서는 정량한 결과 10톤 배양액 3.41 g/L와 시제품 563.2 g/kg의 결과를 확인함. 대체적으로 한국기능식품연구원의 분석결과가 동등한 수준으로 오차 범위 내에 일치한다고 볼 수 있음.

## XII. 컴파운드 케이 안정성 시험 결과서

아미코젠(주)은 컴파운드 케이 사업화를 위하여 2018년부터 안정성 시험을 시작하였으며, 36개월까지 대장균군, 이물 불검출 등 안정성 자료를 확보하였음.

## 안정성 시험 결과서

제 품 명	인삼추출분말-CK	제 조 번 호	5470010	제 조 일	2018.07.18		
보관조건	실온	유형	기타가공품(살균제품)				
시험항목	기준규격	결 과					
		0개월	3개월	6개월	12개월	24개월	36개월
		2018.07.18~ 2018.07.19	2018.10.18~ 2018.10.19	2019.01.18~ 2019.01.19	2019.07.18~ 2019.07.19	2020.07.18~ 2020.07.20	2021.07.18~ 2021.07.19
성상	미황색의 분말로 고유의 향미를 가지고 이 미, 이취가 없다.	적합	적합	적합	적합	적합	적합
이물	불검출	불검출	불검출	불검출	불검출	불검출	불검출
대장균군	n=5, c=1, m=0, M=10	적합	적합	적합	적합	적합	적합
판 정		적합	적합	적합	적합	적합	적합
판 정 자		유연석	유연석	유연석	유연석	유연석	유연석
판 정 일 자		2018.11.19	2018.10.19	2019.01.19	2019.07.19	2020.07.20	2021.07.19
작 성 자		김민정	이승아	유주은	유주은	김민정	김민정
확 인 자		유연석	유연석	유연석	유연석	유연석	유연석

AMMS-FSOP-QC-0210-01(00)

아미코젠㈜ 문산공장

### XIII. 컴파운드 케이 제품화 방안과 시장 확대 전략

○ **화장품 원료로 사업화:** 본 연구를 통해서 생산된 컴파운드 케이 제품은 함량 3%로 규격화하여 화장품 원료로 아미코젠(주)에서 판매 중에 있음. 하지만 현재 시점에서는 매출액이 적은 편이지만, 소비자의 니즈 및 품질에 대한 요구사항이 강화됨에 따라 시장에서 화장품 원료도 식품 기준으로 생산된 원료를 많이 요구하고 있어서, 추후에는 시장이 많이 확대될 것으로 전망됨.

○ **표준품으로 사업화:** 본 연구를 통해 정제한 순도 96%의 고농도의 컴파운드 케이는 표준품, 시약 및 의약품으로 사용이 가능할 것으로 사료되어, 시그마 등 업체를 통해 판매가 가능한지 문의할 예정임. 중국산 순품의 경우 가격이 1,000 달러/gram으로 고가이므로, 본 기술을 통해 제조원가를 많이 낮출 수 있어서 컴파운드 케이의 기능성 연구가 활성화되어 시장 확대가 예상됨.

○ **발효 홍삼으로 사업화:** 홍삼과 홍삼가공품이 6,400억원, 백삼 및 백삼 가공품이 1,900억 원, 수삼이 6,400억원 정도를 차지하고 (프로슈머, 한경비즈니스. 2007. 4. 제 6호), 이 중에서 최근에 시장 성장률이 가장 높은 것은 발효 홍삼임. 시중의 발효 홍삼은 프로토파낙사디올 중 컴파운드 케이의 함량이 약 30% 이하이고 컴파운드 케이의 농도도 0.2 g/l이하로 낮음. 본 기술로 생산한 발효 홍삼은 생산 농도가 5 g/L로 높아 최종 고농도의 컴파운드 케이로 용이하게 만들 수 있어 차별화된 제품으로 경쟁력이 높아 발효 컴파운드 케이 홍삼원료로 사업화 가능한지 여러 업체를 탐색 중.

### 3. 연구개발과제의 수행 결과 및 목표 달성 정도

#### 1) 연구수행 결과

##### (1) 정성적 연구개발성과

<공동연구개발기관명: 건국대>

##### ○ Compound K 생산 최적 인삼 원료 선정

선행 연구를 참고하여 American ginseng extract의 total PPD type ginsenoside 함량이 높은 것을 확인하여 compound K 생산에 최적인 인삼 추출물로 선정함.

---

○ **미생물 배양 배지 성분 최적화**

Flask 실험을 통하여 탄소원 (10 g/L sucrose), 질소원 (10 g/L soy protein concentrate), 인산염 (5 g/L  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 5 g/L  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ ), 미량원소 (0.3 g/L  $\text{CaCl}_2$ , 3.7 mg/L  $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ , 5 mg/L  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , 0.3 g/L  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , 1.3 mg/L  $\text{MnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , 1.4 mg/L  $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ), Inducer (0.2 % rice straw), 온도 28 °C 로 미생물 배양 배지 성분 및 조건 최적화 완료.

○ **인삼추출물 첨가 조건 최적화**

Flask 실험을 통하여 인삼추출물을 한번에 첨가하게 될 경우 60 h에 9 g/L 인삼추출물 첨가했을 때 전환이 가장 잘되는 것을 확인함. 인삼추출물을 분할 첨가할 경우 48, 60 h에 8 g/L 인삼추출물을 각각 첨가했을 때 compound K 전환이 가장 잘되는 것 확인.

3L 발효조에서 인삼추출물의 분할 shot feeding한 조건에서 132 h에 5.35 mM의 최대 compound K의 생산을 보였으며, 이는 3.3 g/L의 생산이며 25 mg/L/h의 생산성을 보임. 투입한 인삼추출물의 ginsenoside의 물전환율은 87%로 확인됨.

○ **Compound K 정제 조건 최적화**

선 행 연구인 재조합 효소를 이용한 compound K 결정화 정제 조건을 기반으로 하여 식품용 발효액 (AT 반응물)을 이용하여 정제할 때 MF 및 물을 첨가하여 정제 시 약 53%의 정제수율 및 52%의 compound K를 확인함. 물 첨가량, 에탄올량, 결정화, 여과 및 건조 등의 조건을 최적화할 예정.

○ **미생물 배양 환경 조건 최적화 (5L 발효조)**

Flask 실험을 통하여 최적화 된 배양액 조성을 참고하여 실험을 진행하였음. Fermenter로의 scale-up을 통한 균체성장 속도를 고려하여 초기 탄소원 농도 최적화 결과 20 g/L에서 최적임을 확인 완료.

탄소원 (초기 20 g/L, 공급 40 g/L sucrose), 질소원 (10 g/L soy protein concentrate), 인산염 (5 g/L  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 5 g/L  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ ), 미량원소 (0.3 g/L  $\text{CaCl}_2$ , 3.7 mg/L  $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ , 5 mg/L  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , 0.3 g/L  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , 1.3 mg/L  $\text{MnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , 1.4 mg/L  $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ), Inducer (0.2 % rice straw), 온도 28 °C

○ **유가식 배양에 의한 균체 농도 및 컴파운드 케이 생산 최대화**

유가식 배양 중 탄소원 농도 최적화를 진행 시 균체 농도에 따른 컴파운드 케이 생산이 비례하지 않는 것을 확인. 이는 고농도의 탄소원으로 인한 glucosidase 활성 억제로 예상하여 최적의 공급 기간에서의 최적의 공급 농도를 확인하였음. 유가식 배양 중 공급되는 탄소원으로 초기 20 g/L, 공급 40 g/L (발효 12 h - 132 h)가 C-K 생산에 최적의 농도로 확인. 즉 탄소원 농도가 낮게 유지 될수록 2차 대사산물에 대한 반응성이 높아 지는 것을 확인.

○ **식품용 산업배지 및 산업용 인삼추출물 적용 발효 최적화**

앞서 최적화 된 산업배지 조건을 통하여 컴파운드 케이 생산 최대화를 진행하였음. 생산 최대화를 위해서는 미국삼 추출물의 공급 최적화가 우수한 것으로 확인 됨. 미국삼 추출물을 연속 공급법을 통하여 12시간부터 84시간까지 일정한 유속으로 첨가하였고, 100 % 전환율과 최대 생산성인 27.3 mg/L/h을 보임.

○ **컴파운드 케이 제조방법 확립**

CK 과제 1단계 평가 보고서의 유가식 발효법 결과를 미루어볼 때 Rd의 축적이 CK 전환에 저해를 가하는 것으로 생각되어 Rd 축적을 해소하고 CK 생산성 증가를 위해 상업용 효소를 첨가함. Flask 실험을 통해 Cellulosin AL8이 CK 전환에 적합한 것을 확인 후 발효 시작 후 60 h 후 0.6 g/L의 Cellulosin AL8 첨가, 온도 60°C로 효소 첨가 조건 최적화 완료.

○ **인삼 추출물에서 컴파운드 케이 제조 수율 최대화**

Flask 실험을 통하여 Cellulosin AL8을 60 h에 0.6 mg/ml 첨가할 때 최대 생산성 확인했으며 기질과 Cellulosin AL8의 농도는 각각 32 g/L, 1.0 mg/ml에서 최대 생산성을 보였으며 이 기준을 토대로 기질과 효소 비율별 실험을 통해 최종적으로 40 g/L, 1.25 mg/ml에서 최대 생산성 확인하여 기질과 효소의 반응 조건 최적화 완료.

---

---

○ **스케일-업 미생물 배양 및 컴파운드 케이 정제의 문제점 보완**

pH stat fed batch를 통하여 최대 agitation rate으로 확인되는 400rpm에서 84 h 후 Cellulosin AL8을 1.25 mg/ml 추가했을 때 CK 농도, 전환율, 생산성이 각각 9.85 mM (6.14 g/L), 61.26 %, 42.61 mg/L/h로 가장 높게 확인됨.

1 L EtOH 3회 추출 및 상층액 추출 후 한외여과로 58.9% 순도로 76.7% 회수율의 식품용 컴파운드 케이를 정제하였고 resin 처리 및 prep-LC를 이용하여 96.0 % 순도의 제약용 컴파운드 케이를 정제함.

<주관연구기관: 아미코젠>

○ **식품용 산업배지 개발**

기존 탄소원인 citrus pectin과 질소원인 CSL은 식품용 compound K 생산에 사용이 불가능하여, 탄소원 질소원 배지 탐색을 실시함. 여러 가지 탄소원과 질소원 조건으로 5 L 발효기를 이용한 실험을 통하여, 탄소원은 SBF (sugar beet fiber), 질소원은 SPC (soy protein concentrate)로 결정함.

○ **산업용 인삼추출물 개발**

산업용 인삼추출물개발을 위해 여러 종류의 인삼세근 중 캐나다산 인삼세근추출액을 55℃에서 24 h, 3회 추출 시 최대 ginsenoside 효율을 얻는 것을 확인함.

○ **5L 발효조에서 컴파운드 케이 전환효소 발효최적화**

5L 발효기 규모에서 배지최적화 실험을 통해 SBF 4%, SPC 2%에서 최대 효소활성과 최대 compound K 전환율을 얻음. 이를 통하여 동시전환배양을 통하여 연속 feeding법과 shot feeding법을 이용한 인삼추출액 전환 배양에서 shot feeding을 통하여 87.1%의 compound K 전환율을 확인함.

○ **컴파운드 케이 전환 테스트 (순도 함량 공인 분석\_1차년도)**

한국기능식품연구원에 분석의뢰를 하여 분석결과 현재 자사에 정량수치와 차이를 보였으며, 수치상 compound K의 함량이 1.8배 이상 더 높은 것으로 확인됨. 정량 표준물질의 차이로 사료되며, 표준물질 재구입 및 재측정으로 정량 수치 확인 예정.

○ **미생물 배양 환경 조건 최적화**

기존 control조건에서 건국대에서 배양하는 조건과 비교하여 컴파운드 케이의 생산이 증대될 수 있는지 확인하고 미생물의 배양 환경 중 온도 및 pH의 최적화 실험을 통하여 배양온도를 30℃로 증가시켜 배양하는 것으로 조건을 확립함.

○ **5 L에서 50 L pilot 규모로 스케일-업 발효 생산**

5 L scale에서 최적화 실험을 통해 확립한 SBF 4%, SPC 2%, 배양온도 30℃ 조건을 이용하여 50 L pilot 규모로 발효 생산을 진행함. β-glucosidase 효소 활성은 5 L 와 유사한 수준이었고 Arabinofuranosidase 효소 활성이 다소 낮게 확인되었으나, CK농도는 4.44 g/L, 생산성 20.6 mL/L.h, 80.2% 의 물전환율을 확인함.

○ **10 ton scale up을 위한 Jar seed 공정 확립**

compound K의 10 ton scale 생산 발효를 위한 Jar seed 최적화 조건 확립 테스트를 진행함. 1차 및 2차 jar seed 배양 시간을 테스트하였을 때 최종적으로 전환율이 70.5%로 5 L scale발효와 가장 유사한 flask - 1<sup>st</sup> jar seed 12 h - 2<sup>nd</sup> jar seed 16 h - main순으로 최적화 조건이 결정됨.

○ **5 L, 50 L 배양액의 컴파운드 케이 전환 테스트 (공인분석\_2차년도)**

한국기능식품연구원에 분석의뢰를 하여 분석결과 5 L에서 7.66 mg/g (g/L)로 확인되었으며, 50 L에서 4.44 mg/g (g/L)으로 확인되었음.

○ **50 L Pilot 규모에서의 CK 정제수율 및 CK 함량**

---

CK 정제수율 72%; CK 함량은 60.9% (최대 89%)

○ 10톤 공장 생산 규모 발효공정 확립

10톤 공장 생산 규모공정 확립을 위해 2번의 600 L scale의 발효조와 2번의 10 kL 발효조를 이용한 생산공정을 진행함. 기존 조건에서 cellulose AL8을 추가로 사용하였을 시 전환율의 상승 효과를 확인하였으며, acid를 첨가하여 pH를 조절할 시 효소의 활성을 방지하고 전환율이 상승하는 것을 확인하여 최종 CK농도 5.15 g/L, 물 전환율 95.5%, CK 생산성 29.9 mg/L·h를 달성하여 해당 발효 조건으로 생산 규모 발효공정을 확립함.

○ 10톤 공장 생산 규모 정제공정 확립

기존 50 L pilot scale에서 적용한 정제공정을 변형하여, 원심분리 대신 필터패드를 이용한 침전물 분리 및, ethanol 추출과 ultrafiltration을 통해 회수율 70.0% CK 순도 62.9%를 확인함.

○ 시제품 생산 (생산 SOP 확립, COA 발행)

10톤 공장 생산 규모로 2차례 얻어진 정제된 compound K를 이용하여 시제품을 생산하였으며, 563.2 g/kg의 CK 함량을 가진 시제품 생산 완료함.

○ 제품 공인 분석 (순도, 함량 공인분석\_3차년도)

한국기능식품연구원에 10톤 발효 생산 배양상등액과 시제품에 대한 분석의뢰를 하여 분석결과 10톤 발효 배양상등액에서 3.89 mg/g로 확인되었으며, 시제품에서 568.1 mg/g으로 확인되었음. (자사 분석결과: 컴파운드케이 농도 3.41 mg/g, 컴파운드케이 함량: 563.2 mg/g)

1차년도																
일련 번호	연구내용	월별 추진 일정												연구 개발비 (단위: 천원)	책임자 (소속 기관)	
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12			
1	컴파운드 케이 생산 최적 인삼 원료 선정				■	■	■								10,000	오덕근 (건축대)
2	미생물 배양 배지 성분 최적화				■	■	■	■	■						25,000	오덕근 (건축대)
3	인삼추출물 첨가 조건 최적화										■	■	■	■	25,000	오덕근 (건축대)
4	컴파운드 케이 정제 조건 최적화				■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	30,000	오덕근 (건축대)
5	식품용 산업배지 개발				■	■									25,000	리홍선 (아미코젠)
6	산업용 인삼추출물 개발					■	■	■	■						35,000	리홍선 (아미코젠)
7	5L 발효조에서 컴파운드 케이 전환효소 발효최적화						■	■	■	■					35,000	리홍선 (아미코젠)
6	컴파운드 케이 전환 테스트 (순도 함량 공인 분석)							■	■	■	■	■	■	■	40,000	리홍선 (아미코젠)

2차년도															
일련 번호	연구내용	월별 추진 일정												연구 개발비 (단위: 천원)	책임자 (소속 기관)
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12		
1	미생물 배양 환경 조건 최적화 (5 L 발효조)													50,000	오덕근 (건국대)
2	유가식 배양에 의한 균체 농도 최대화													25,000	오덕근 (건국대)
3	유가식 배양에 의한 컴파운드 케이 생산 최대화													25,000	오덕근 (건국대)
4	식품용 산업배지 및 식품용 산업인삼추출물 적용 발효 최적화													20,000	오덕근 (건국대)
5	50L pilot 규모 발효 생산													50,000	리홍선 (아미코젠)
6	50L pilot 규모에서 컴파운드 케이 생산 전환조건 최적화													50,000	리홍선 (아미코젠)
7	50L pilot 규모에서 컴파운드 케이 생산 정제 조건 최적화													50,000	리홍선 (아미코젠)
8	50L pilot 규모에서 컴파운드 케이 전환조건 확립 (공인기관 순도, 함량 분석)													30,000	리홍선 (아미코젠)

3차년도															
일련 번호	연구내용	월별 추진 일정												연구 개발비 (단위: 천원)	책임자 (소속 기관)
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12		
1	컴파운드 케이 제조방법 확립													50,000	오덕근 (건국대)
2	인삼 추출물에서 컴파운드 케이 제조 수율 최대화													35,000	오덕근 (건국대)
3	스케일-업 미생물 배양 및 컴파운드 케이 정제의 문제점 보완													35,000	오덕근 (건국대)
1	10톤 공장 생산 규모 발효공정 확립													80,000	리홍선 (아미코젠)
2	10톤 공장 생산 규모 정제공정 확립													80,000	리홍선 (아미코젠)
3	시제품 생산 (생산 SOP 확립, COA 발행)													75,000	리홍선 (아미코젠)
4	제품 공인 분석 (순도, 함량)													5,000	리홍선 (아미코젠)

(2) 정량적 연구개발성과(해당 시 작성하며, 연구개발과제의 특성에 따라 수정이 가능합니다)



### < 정량적 연구개발성과표 >

(단위 : 건, 천원)

성과지표명			연도	1단계 (2021~2022)	2단계 (2023)	계	가중치 (%)
전담기관 등록·기탁 지표 <sup>1)</sup>	특허	목표(단계별)	1	1	2	30%	
		실적(누적)	1	1	2		
	논문	목표(단계별)	1	1	2	-	
		실적(누적)	1	2	3		
	학술발표	목표(단계별)	1	1	2	5%	
		실적(누적)	0	2	2		
연구개발과제 특성 반영 지표 <sup>2)</sup>	매출액	목표(단계별)	30,000	50,000	80,000	25%	
		실적(누적)	7,760	2,000	9,760		
	기술실시 (이전)	목표(단계별)	-	1	1	10%	
		실적(누적)	1	0	1		
	기술료	목표(단계별)	-	20,000	20,000	5%	
		실적(누적)	-	0	0		
	제품화	목표(단계별)	-	1	1	5%	
		실적(누적)	1	0	1		
	인력양성	목표(단계별)	1	2	3	15%	
		실적(누적)	1	3	4		
	고용창출	목표(단계별)	0	0	0		
		실적(누적)	10	0	10		
	홍보전시	목표(단계별)	1	1	2	5%	
		실적(누적)	1	1	2		
	계						100%

\* 1) 전담기관 등록·기탁 지표: 논문[SCI Expanded(SCIE), 비SCIE, 평균Impact Factor(IF)], 특허, 보고서원문, 연구시설·장비, 기술요약정보, 저작권(소프트웨어, 서적 등), 생명자원(생명정보, 생물자원), 표준화(국내, 국제), 화합물, 신물질 등을 말하며, 논문, 학술발표, 특허의 경우 목표 대비 실적은 기재하지 않아도 됩니다.

\* 2) 연구개발과제 특성 반영 지표: 기술실시(이전), 기술료, 사업화(투자실적, 제품화, 매출액, 수출액, 고용창출, 고용효과, 투자유치), 비용 절감, 기술(제품)인증, 시제품 제작 및 인증, 신기술지정, 무역수지개선, 경제적 파급효과, 산업지원(기술지도), 교육지도, 인력양성(전문 연구인력, 산업연구인력, 졸업자수, 취업, 연수프로그램 등), 법령 반영, 정책활용, 설계 기준 반영, 타 연구개발사업에의 활용, 기술무역, 홍보(전시), 국제화 협력, 포상 및 수상, 기타 연구개발 활용 중 선택하여 기재합니다  
(연구개발과제 특성별로 고유한 성과지표를 추가할 수 있습니다).

### < 연구개발성과 성능지표 >

평가 항목 (주요성능 <sup>1</sup> )	단위	전체 항목에서 차지하는 비중 (%)	세계 최고수준 보유국/보유기관	연구개발 전 국내 수준	연구개발 목표치	연구개발 달성치	달성률	연구개발 목표치	연구개발 달성치	달성율 (10 kL 기준)
			성능수준	성능수준	1단계 (2021.04.01.~ 2022.12.31)			2단계 (2023.01.01.~ 2023.12.31)		
컴파운드 케이 생산농도	g/L	20	중국 / Fudan Univ.	0.4	5 (5 L 발효기)	5.54 (5 L 발효기)	111%	3 (10 KL 발효조)	6.14 (5 L 발효기)	172%
			1.24		4 (50 L 발효기)	4.44 (50 L 발효기)			5.15 (10 kL 발효기)	
컴파운드 케이 생산성	mg/L/h	20	중국 / Fudan Univ.	3.3	40 (5 L 발효기)	28.7 (5 L 발효기)	59%	25 (10 KL 발효조)	42.6 (5 L 발효기)	120%
			8.6		35 (50 L 발효기)	20.6 (50 L 발효기)			29.9 (10 kL 발효기)	
물전환 수율	%	20	중국 / Fudan Univ.	54	95 (5 L 발효기)	90.4 (5 L 발효기)	86%	90 (10 KL 발효조)	61.3 (5 L 발효기)	106%
			82.6		93 (50 L 발효기)	80.2 (50 L 발효기)			95.5 (10 kL 발효기)	
정제수율	%	20	한국/ ACT	60	70 (5 L 발효기)	74 (5 L 발효기)	103%	70 (10 KL 발효조)	76.7 (5 L 발효기)	100%
			60		70 (50 L 발효기)	72 (50 L 발효기)			70.0 (10 kL 발효기)	
컴파운드 케이 함량	%	20	한국/ ACT	40	60 (5 L 발효기)	58.9 (5 L 발효기)	102%	50 (10 KL 발효조)	58.9 (5 L 발효기)	114%
			40		60 (50 L 발효기)	60.9 (50 L 발효기)			56.8 (10 kL 발효기)	

\* 1」 정밀도, 인장강도, 내충격성, 작동전압, 응답시간 등 기술적 성능판단기준이 되는 것을 의미합니다.

\* 2」 비중은 각 구성성능 사양의 최종목표에 대한 상대적 중요도를 말하며 합계는 100%이어야 합니다.

210mm×297mm[(백상지(80g/m<sup>2</sup>) 또는 증질지(80g/m<sup>2</sup>)

(23쪽 중 7쪽)

(3) 세부 정량적 연구개발성과(해당되는 항목만 선택하여 작성하되, 증빙자료를 별도 첨부해야 합니다)

[과학적 성과]

□ 논문(국내외 전문 학술지) 게재

번호	논문명	학술지명	주저자명	호	국명	발행기관	SCIE 여부 (SCIE/비SCIE)	게재일	등록번호 (ISSN)	기여율
1	Increased production of ginsenoside compound K by optimizing the feeding of American ginseng extract during fermentation by <i>Aspergillus tubingensis</i>	Journal of microbiology and biotechnology	Woo seok song	7	아스퍼질러스 튜빙겐시스에 의한 발효 중 미국삼 추출물의 공급 최적화에 의한 진세노사이드 컴파운드 케이의 증가 된 생산	한국미생물생명공학회	SCIE	2022.06.07	PISSN: 1017-7825 eISSN: 1738-8872	100
2	Production of ginsenoside compound K from American ginseng extract by fed-batch culture of <i>Aspergillus tubingensis</i>	AMB Express	Woo seok song	13	아스퍼질러스 튜빙겐시스의 유가식 배양에 의한 미국산 추출물로부터 컴파운드 케이의 생산	Springer	SCIE	2023.06.25	ISSN : 2191-0855	100
3	Biotransformation of Platycosides, Saponins from Balloon Flower Root, into Bioactive Deglycosylated Platycosides	antioxidants	Kyung-Chul Shin	12	도라지 뿌리 사포닌인 플라티코사이드를 생체 활성이 있는 탈당화된 플라티코사이드로 생체변환	MDPI	SCIE	2023.01.31	EISSN : 2076-3921	100

□ 국내 및 국제 학술회의 발표

번호	회의 명칭	발표자	발표 일시	장소	국명
1	2023 한국생물공학회 춘계학술발표대회 및 국제심포지엄 (2023 KSBB Spring Meeting and International Symposium)	Yong-In Lee	2023.04.14	ICC 제주	진세노사이드 컴파운드 케이의 생산 증가를 위해 아스퍼질러스 튜빙겐시스를 이용한 발효 중 미국산 인삼 추출물의 공급 전략 최적화
2	2023 한국생물공학회 춘계학술발표대회 및 국제심포지엄 (2023 KSBB Spring Meeting and International Symposium)	Yong-In Lee	2023.04.14	ICC 제주	아스퍼질러스 튜빙겐시스를 이용한 유가식 발효에서 공급 최적화를 통한 진세노사이드 컴파운드 케이의 생산 증가

□ 기술 요약 정보

연도	기술명	요약 내용	기술 완성도	등록 번호	활용 여부	미활용사유	연구개발기관 외 활용여부	허용방식

□ 보고서 원문

연도	보고서 구분	발간일	등록 번호

□ 생명자원(생물자원, 생명정보)/화합물

번호	생명자원(생물자원, 생명정보)/화합물 명	등록/기탁 번호	등록/기탁 기관	발생 연도

[기술적 성과]

□ 지식재산권(특허, 실용신안, 의장, 디자인, 상표, 규격, 신품종, 프로그램)

번호	지식재산권 등 명칭 (건별 각각 기재)	국명	출원				등록			기여율	활용 여부
			출원인	출원일	출원 번호	등록 번호	등록인	등록일	등록 번호		
1	특허	컴파운드 케이 생산용 배지 조성물 및 이의 용도	건국대학 교 산학협력 단	2022.02 .23.	10.2022 .002382 2	1-1-202 2-02054 02-01				100	
2	특허	아스퍼질러스 튜빙겐시스 발효물에 아스퍼질러스 나이거 유래 효소를 첨가한 효소 반응에 의한 고수율 진세노사이드 컴파운드 케이 제조용 조성물 및 제조방법	건국대학 교 산학협력 단	2023.08 .16	10-2023 -010728 3	1-1-202 3-09018 68-23				100	

○ 지식재산권 활용 유형

※ 활용의 경우 현재 활용 유형에 √ 표시, 미활용의 경우 향후 활용 예정 유형에 √ 표시합니다(최대 3개 중복선택 가능).

번호	제품화	방어	전용실시	통상실시	무상실시	매매/양도	상호실시	담보대출	투자	기타

□ 저작권(소프트웨어, 서적 등)

번호	저작권명	창작일	저작자명	등록일	등록 번호	저작권자명	기여율

□ 신기술 지정

번호	명칭	출원일	고시일	보호 기간	지정 번호

기술 및 제품 인증

번호	인증 분야	인증 기관	인증 내용		인증 획득일	국가명
			인증명	인증 번호		

210mm×297mm[(백상지(80g/m<sup>2</sup>) 또는 중질지(80g/m<sup>2</sup>)  
(23쪽 중 8쪽)

표준화

○ 국내 표준

번호	인증구분 <sup>1)</sup>	인증여부 <sup>2)</sup>	표준명	표준인증기구명	제안주체	표준종류 <sup>3)</sup>	제안/인증일자

- \* 1) 한국산업규격(KS) 표준, 단체규격 등에서 해당하는 사항을 기재합니다.
- \* 2) 제안 또는 인증 중 해당하는 사항을 기재합니다.
- \* 3) 신규 또는 개정 중 해당하는 사항을 기재합니다.

○ 국제 표준

번호	표준화단계구분 <sup>1)</sup>	표준명	표준기구명 <sup>2)</sup>	표준분과명	의장단 활동여부	표준특허 추진여부	표준개발 방식 <sup>3)</sup>	제안자	표준화 번호	제안일자

- \* 1) 국제표준 단계 중 신규 작업항목 제안(NP), 국제표준초안(WD), 위원회안(CD), 국제표준안(DIS), 최종국제표준안(FDIS), 국제표준(IS) 중 해당하는 사항을 기재합니다.
- \* 2) 국제표준화기구(ISO), 국제전기기술위원회(IEC), 공동기술위원회1(JTC1) 중 해당하는 사항을 기재합니다.
- \* 3) 국제표준(IS), 기술시방서(TS), 기술보고서(TR), 공개활용규격(PAS), 기타 중 해당하는 사항을 기재합니다.

[경제적 성과]

시제품 제작

번호	시제품명	출시/제작일	제작 업체명	설치 장소	이용 분야	사업화 소요 기간	인증기관 (해당 시)	인증일 (해당 시)

기술 실시(이전)

번호	기술 이전 유형	기술 실시 계약명	기술 실시 대상 기관	기술 실시 발생일	기술료 (해당 연도 발생액)	누적 징수 현황

- \* 내부 자금, 신용 대출, 담보 대출, 투자 유치, 기타 등

사업화 투자실적

번호	추가 연구개발 투자	설비 투자	기타 투자	합계	투자 자금 성격*

사업화 현황

번호	사업화 방식 <sup>1)</sup>	사업화 형태 <sup>2)</sup>	지역 <sup>3)</sup>	사업화명	내용	업체명	매출액		매출 발생 연도	기술 수명
							국내 (천원)	국외 (달러)		
1	자기실시	신제품 개발	국내	농림축산식품부 기술사업화 지원사업	식품용 컴파운드 케이	코스맥스엔비티	3,760	-	2021년	
2	자기실시	신제품 개발	국내	농림축산식품부 기술사업화 지원사업	식품용 컴파운드 케이	코스맥스엔비티 외 2곳	4,000	-	2022년	
3	자기실시	신제품 개발	국내	농림축산식품부 기술사업화 지원사업	식품용 컴파운드 케이	코스맥스엔비티	2,000	-	2023년	

\* 1) 기술이전 또는 자기실시

\* 2) 신제품 개발, 기존 제품 개선, 신공정 개발, 기존 공정 개선 등

\* 3) 국내 또는 국외

### □ 매출 실적(누적)

사업화명	발생 연도	매출액		합계	산정 방법
		국내(천원)	국외(달러)		
농림축산식품부 기술사업화 지원사업	2021년	3,760	-	3,760	판매가 1,000,000 원/kg_3% CK
	2022년	4,000	-	4,000	
	2023년	2,000	-	2,000	
합계				9,760	

210mm×297mm[(백상지(80g/m<sup>2</sup>) 또는 중질지(80g/m<sup>2</sup>)

(23쪽 중 9쪽)

### □ 사업화 계획 및 무역 수지 개선 효과

성과		식품용 컴파운드 케이 매출			
사업화 계획	사업화 소요기간(년)	3~5년			
	소요예산(천원)	1,980,000,000			
	예상 매출규모(천원)	현재까지	3년 후	5년 후	
		9,760	1,000,000	5,000,000	
	시장 점유율	단위(%)	현재까지	3년 후	5년 후
			-	10%	30%
국내					
국외					
향후 관련기술, 제품을 응용한 타 모델, 제품 개발계획		본 과제를 통해 개발한 동시전환발효공정을 이용하여 식품용 컴파운드 케이 판매 뿐만아니라, 효소도 컴파운드 케이생산 업체에 추가로 판매 가능하여 부수적인 이익창출이 기대됨.			
무역 수지 개선 효과(천원)	수입대체(내수)	현재	3년 후	5년 후	
	수출				

### □ 고용 창출

순번	사업화명	사업화 업체	고용창출 인원(명)		합계
			2021년	2022년	
1	농림축산식품부 기술사업화 지원사업	자기실시 (아미코젠)	5명	5명	10명
합계					

### □ 고용 효과

구분		고용 효과(명)
고용 효과	개발 전	연구인력
		생산인력
	개발 후	연구인력
		생산인력

비용 절감(누적)

순번	사업화명	발생연도	산정 방법	비용 절감액(천원)
합계				

경제적 파급 효과

(단위: 천원/년)

구분	사업화명	수입 대체	수출 증대	매출 증대	생산성 향상	고용 창출 (인력 양성 수)	기타
해당 연도							
기대 목표							

산업 지원(기술지도)

순번	내용	기간	참석 대상	장소	인원

210mm×297mm[(백상지(80g/m<sup>2</sup>) 또는 중질지(80g/m<sup>2</sup>)

(23쪽 중 10쪽)

기술 무역

(단위: 천원)

번호	계약 연월	계약 기술명	계약 업체명	계약업체 국가	기 징수액	총 계약액	해당 연도 징수액	향후 예정액	수출/ 수입

[사회적 성과]

법령 반영

번호	구분 (법률/시행령)	활용 구분 (제정/개정)	명 칭	해당 조항	시행일	관리 부처	제정/개정 내용

정책활용 내용

번호	구분 (제안/채택)	정책명	관련 기관 (담당 부서)	활용 연도	채택 내용

설계 기준/설명서(시방서)/지침/안내서에 반영

번호	구분 (설계 기준/설명서/지침/안내서)	활용 구분 (신규/개선)	설계 기준/설명서/ 지침/안내서 명칭	반영일	반영 내용

전문 연구 인력 양성

번호	분류	기준 연도	현황										
			학위별				성별		지역별				
			박사	석사	학사	기타	남	여	수도권	충청권	영남권	호남권	기타
1		2021년											
2		2022년		1				1	1				
3		2023년		3			1	2	3				

산업 기술 인력 양성

번호	프로그램명	프로그램 내용	교육 기관	교육 개최 횟수	총 교육 시간	총 교육 인원

다른 국가연구개발사업에의 활용

번호	중앙행정기관명	사업명	연구개발과제명	연구책임자	연구개발비

국제화 협력성과

번호	구분 (유치/파견)	기간	국가	학위	전공	내용

홍보 실적

번호	홍보 유형	매체명	제목	홍보일
1	전시회	바이오플러스-인터팩스 코리아 2022	발효제품 컴파운드 케이	2022.08.03.~ 08.05
2	전시회	2023년도 한국응용생명화학회 국제학술대회	발효제품 컴파운드 케이	2023.06.18.~ 06.20

포상 및 수상 실적

번호	종류	포상명	포상 내용	포상 대상	포상일	포상 기관

210mm×297mm[(백상지(80g/m<sup>2</sup>) 또는 중질지(80g/m<sup>2</sup>)  
(23쪽 중 11쪽)]

[인프라 성과]

연구시설·장비

구축기관	연구시설/ 연구장비명	규격 (모델명)	개발여부 (○/×)	연구시설·장비 종합정보시스템* 등록여부	연구시설·장비 종합정보시스템* 등록번호	구축일자 (YY.MM.DD)	구축비용 (천원)	비고 (설치 장소)

\* 「과학기술기초법 시행령」 제42조제4항제2호에 따른 연구시설·장비 종합정보시스템을 의미합니다.

[그 밖의 성과](해당 시 작성합니다)

---



---

(4) 계획하지 않은 성과 및 관련 분야 기여사항(해당 시 작성합니다)

---



---



## 2) 목표 달성 수준

추진 목표	달성 내용	달성도(%)
<ul style="list-style-type: none"> <li>○ 실험실 규모 (5L): 컴파운드 케이 생산 농도: 5 g/L. 컴파운드 케이 생산성: 40 mg/L-h. 프로토파낙사디올에 대한 몰전환 수율: 95% 이상.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>○ 실험실 규모 (5L): 컴파운드 케이 생산 농도: 6.14 g/L. 컴파운드 케이 생산성: 42.6 mg/L-h. 프로토파낙사디올에 대한 몰전환 수율: 61.3%.</li> </ul>	○91%
<ul style="list-style-type: none"> <li>○ Pilot 규모 (50L): 컴파운드 케이 생산 농도: 4 g/L, 컴파운드 케이 생산성: 35 mg/L-h. 프로토파낙사디올에 대한 몰전환 수율: 93% 이상.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>○ Pilot 규모 (50L): 컴파운드 케이 생산 농도: 4.44 g/L, 컴파운드 케이 생산성: 20.6 mg/L-h. 프로토파낙사디올에 대한 몰전환 수율: 80.2%.</li> </ul>	○85%
<ul style="list-style-type: none"> <li>○ 컴파운드 케이 정제 수율 (50L): 정제수율 70%,</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>○ 컴파운드 케이 정제 수율 (50L): 정제수율 72%</li> </ul>	○103%
<ul style="list-style-type: none"> <li>○ 컴파운드 케이 함량 (50L): 60% 이상</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>○ 컴파운드 케이 함량 (50L): 컴파운드 케이 함량 60.9%</li> </ul>	○102%
<ul style="list-style-type: none"> <li>○ 컴파운드 케이 농도 (10 KL): 컴파운드 케이 생산 농도: 3 g/L</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>○ 컴파운드 케이 농도 (10 KL): 컴파운드 케이 생산 농도: 5.15 g/L</li> </ul>	○172%
<ul style="list-style-type: none"> <li>○ 컴파운드 케이 생산성 (10 KL): 컴파운드 케이 생산성: 25 mg/L-h</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>○ 컴파운드 케이 생산성 (10 KL): 컴파운드 케이 생산성: 29.9 mg/L-h</li> </ul>	○120%
<ul style="list-style-type: none"> <li>○ 컴파운드 케이 몰전환 수율 (10 KL): 프로토파낙사디올에 대한 몰전환 수율: 90% 이상.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>○ 컴파운드 케이 몰전환 수율 (10 KL): 프로토파낙사디올에 대한 몰전환 수율: 95.5%</li> </ul>	○106%
<ul style="list-style-type: none"> <li>○ 컴파운드 케이 정제 수율 (10 KL): 정제수율 70%,</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>○ 컴파운드 케이 정제 수율 (10 KL): 정제수율 70.4%</li> </ul>	○100%
<ul style="list-style-type: none"> <li>○ 컴파운드 케이 함량 (10 KL): 50% 이상</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>○ 컴파운드 케이 함량 (10 KL): 컴파운드 케이 함량 56.8%</li> </ul>	○114%

## 4. 목표 미달 시 원인분석(해당 시 작성합니다)

### 1) 목표 미달 원인(사유) 자체분석 내용

---

아모레퍼시픽의 설화수 화장품이 중국시장에서 철수 후 컴파운드 케이 시장이 많이 감소한 추세로 당사에서 제조한 컴파운드 케이의 매출도 많이 감소함.

---

### 2) 자체 보완활동

---

컴파운드 케이의 시장이 크게 감소함에 따라 당사 컴파운드 케이의 매출액도 크게 감소하는 경향을 보여, 본 연구를 통해 생산되는 효소도 부가적으로 판매하고자 여러 기관에 효소샘플을 전달하였으며, 본 과제를 통해 매출액을 증가시키고자 보완활동을 진행함.

---

### 3) 연구개발 과정의 성실성

---

공동연구개발기관인 건국대학교에서는 식품용 컴파운드 케이 생산최적화를 위해 실험실 규모에서 기초연구를 많이 수행해 왔으며, 발효, 정제과정 최적화를 통하여 연구목표 대비 우수한 연구성과를 달성하였음.

주관연구기관은 아미코젠(주)에서도 건국대학교 실험결과를 토대로 scale-up 연구에 집중하였으며, 50L, 600L, 10KL 발효조 규모에서 단계별로 스케일 업하여 최적화함으로써 생산규모에서도 연구목표 대비 동등 이상의 연구성과를 달성하였다. 또한 데이터의 완전성을 위해 공인분석기관에 분석을 의뢰하여 데이터를 확보하였으며, 생산 시제품의 COA 발행, 생산 SOP를 확립하기 까지 성실히 연구를 수행하였음.

---

## 5. 연구개발성과의 관련 분야에 대한 기여 정도

---

식품용 Compound K의 생산 및 상용화에 있어서 높은 기질비용과 높은 효소비용 그리고 효소의 낮은 전환율로 인하여 제조원가 비용이 높은 문제가 있었으나, 본 연구를 통하여 생산한 식품용 Compound K는 낮은 효소 제조비용 및 높은 전환율로 인해 제조원가를 대폭 줄일 수 있어서 추후 상업적 생산에 크게 기여할 것으로 사료됨.

---

## 6. 연구개발성과의 관리 및 활용 계획

---

이번 연구를 통하여 발표한 논문 및 출원한 특허는 식품용 Compound K 상업적 생산에 적극 활용하여, Compound K의 제조원가를 낮춤으로써 상용화 생산에 크게 기여할 것으로 기대됨.

최근 들어 컴파운드 케이 원료에 대한 수요 뿐만 아니라, 컴파운드 케이를 제조하는 식품용 효소에 대한 수요가 점차 늘어나고 있음. 기존 효소의 경우 진세노사이드로부터 컴파운드 케이를 전환하는 수율이 매우 낮기 때문에 아미코젠(주)에서는 본 연구를 통해 기술 이전 받은 균주를 이용하여 95%의 높은 물전환율을 가진 효소를 생산하여 판매를 진행하고 있으며 매출로 이어지고 있음. 아미코젠(주)에서는 컴파운드 케이 전환효소를 생산하여 CKzyme FL 이라는 이름으로 품목제조신고를 완료 후 판매를 진행하고 있음.

---

210mm×297mm[(백상지(80g/m<sup>2</sup>) 또는  
중질지(80g/m<sup>2</sup>)

#### 주 의

1. 이 보고서는 농림축산식품부에서 시행한 기술사업화 지원사업의 연구보고서입니다.
2. 이 보고서 내용을 발표하는 때에는 반드시 농림축산식품부에서 시행한 기술사업화 지원사업의 연구결과임을 밝혀야 합니다.
3. 국가과학기술 기밀 유지에 필요한 내용은 대외적으로 발표 또는 공개하여서는 안 됩니다.