

발간등록번호

11-1543000-000145-01

**면역증강 및 항암효과가 우수한 난백유래
ovotransferrin 가수분해물의 산업화 기술개발**

Development of Immunostimulating/Anticancer
Substance(s) by Hydrolysis of Ovotransferrin from
Egg White

건국대학교

농림축산식품부

제 출 문

농림축산식품부 장관 귀하

이 보고서를 “면역증강 및 항암효과가 우수한 난백유래 ovotransferrin 가수분해물의 산업화 기술개발” 과제의 보고서로 제출합니다.

2013 년 9 월 30 일

주관연구기관명 : 건 국 대 학 교

주관연구책임자 : 백 현 동

세부연구책임자 : 백 현 동

협동연구기관명 : 서 울 대 학 교

협동연구책임자 : 안 동 욱

협동연구기관명 : 경 남 대 학 교

협동연구책임자 : 박 은 주

협동연구기관명 : (주) 씨 티 씨 바 이 오

협동연구책임자 : 최 대 건

요 약 문

I. 제 목

면역증강 및 항암효과가 우수한 난백유래 ovotransferrin 가수분해물의 산업화 기술개발

II. 연구개발의 목적

21세기 식품생명과학의 발달, 건강에 대한 국민의 욕구 증대 등 보건 환경의 변화는 식품에 대한 인식을 새롭게 바꾸었다. 과거 양적인 면을 강조하던 시대는 식품수급, 식량안보가 그 대상이었다. 그러나 오늘날 세계 공중보건의 주요한 주제는 질적인 면에서 두 가지 축으로 움직이고 있다. 그 하나는 식품 안전성이며 이와 다른 하나는 식품 기능성이다. 한편, 우리나라의 노령화 사회 진입이나 만성질환 유병률 증가는 학계, 산업계 뿐 만 아니라 일반 국민들도 식품 기능성에 대하여 더욱 주목하게 되었다.

전 세계적으로 사망 원인의 1, 2위를 차지하고 있는 암에 대한 치료는 대부분 합성 화학약품을 이용한 치료요법으로 조혈 및 면역기능에 이상을 초래하고 암세포 이외의 정상세포에도 독성을 나타내고 있어, 특이적이며 선택적인 항암제의 개발이 요구되고 있는 실정이다. 최근에는 면역기능을 높여주고 암세포에만 선택적으로 작용하는 천연 항암제 개발이 요구되고 있다.

천연의 완전식품으로 잘 알려진 계란은 하나의 생명체가 자라는 데 필요한 모든 영양소와 방어체계를 위한 물질들을 보유하고 있는 것으로서 단순히 식품차원이 아닌 각 성분들의 생리적 기능과 상호작용에 의한 역할이 밝혀지고 있고, 기능성 건강식품의 주요한 소재로 사용될 수 있다는 점에서 그 중요성이 더욱 강조되고 있다 (Jeon *et al.*, 2002).

계란은 단순히 영양을 공급하는 식품으로서가 아닌 인체의 건강과 질병에 관련한 생물활성을 지닌 다양한 성분을 함유한 새로운 소재로 각광받고 있다. 오래전부터 산업계에서 실용화한 성분으로는 라이소자임이나 애비딘, 레시틴 등이 있지만 아직도 새롭게 생물활성을 지닌 계란 성분의 기능이 밝혀지고 있어 이용 범위는 더욱 확대될 것이다.

본 연구에서는 계란에서 분리 추출한 ovotransferrin과 ovotransferrin 가수분해물로부터 면역증강 및 항암효과가 우수한 펩타이드의 생산을 최적화 하고 동물실험을 통해 기능성을 입증하여, 최종적으로 대량생산시스템을 확립하여 제품화 하고자 하였다.

III. 연구개발 내용 및 범위

1. 1차년도 연구개발 내용 및 범위

<제1세부과제> 면역증강 및 항암효과를 가지는 ovotransferrin 가수분해물의 효율적인 생산

조건 확립

- Ovotransferrin에서 면역증강 및 항암효과를 가지는 생리활성 가수분해물의 선별적 제조
 - 효율적인 가수분해 방법 선정 (산, 알칼리, 열, 효소 가수분해)
 - 온도, pH, 시간 등의 반응 조건 확립
- Ovotransferrin 및 ovotransferrin 가수분해물의 건강 기능성 검증
 - MTT assay 방법을 이용한 항종양 효과
 - Nitric oxide (NO) 활성 저하 효과

<제1협동과제> 계란 흰자로부터 ovotransferrin 추출 방법 개발

- Ovotransferrin의 최적 조건 확립 (추출온도, 가열시간, 에탄올 농도, pH, 이온화력 등)
- 고수율, 고농도의 ovotransferrin의 분리 정제

<제2협동과제> In vitro 실험을 통한 ovotransferrin 및 ovotransferrin 가수분해물의 면역증강 및 항암효과 검증 및 그 기전 구명 연구

- MTT, LDH (lactate dehydrogenase) 측정
- 대장암 세포의 형태학적 변화 관찰
- 백혈구 및 대장암세포의 DNA 손상도 측정 (comet assay)
- TNF- α , IFN- γ , IL-6 측정
- Real-time PCR

<제3협동과제> Ovotransferrin의 시장 조사 및 품질평가 기준 확립

- Ovotransferrin 원료인 계란의 확보 및 경제성 분석
- 기능성 ovotransferrin의 해외 시장 조사
- Ovotransferrin 시험법 및 품질평가 기준 확립

2. 2차년도 연구개발 내용 및 범위

<제1세부과제> Ovotransferrin 가수분해물의 생산 최적화

- Ovotransferrin 가수분해물 생산의 최적 조건 확립
 - RSM (response surface methodology) 법을 이용한 효소 별, pH, 온도 등 최적조건 확립
- 확립된 최적 조건에서 면역증강 및 항암효과에 관련된 기능성 재확인

<제1협동과제> 기능성 향상을 위한 ovotransferrin 활성화 방법 개발

- Ovotransferrin으로부터 철분의 제거를 위한 최적 조건 개발
- Ovotransferrin의 철분 결합도 측정법 확립

<제2협동과제> 동물실험을 통한 ovotransferrin 및 ovotransferrin 가수분해물의 면역증강 및 항암효과 검증 및 그 기전 구명 연구

- 백혈구 및 대장 조직 DNA 손상 측정 (comet assay)

- 전암병변 (aberrant crypt) 측정
- 적혈구 내 항산화 효소활성 측정
- 혈장 TRAP (total radical trapping antioxidant potential) 측정
- 혈장 과산화지질 (conjugated dienes) 측정

<제3협동과제> Ovotransferrin 가수분해물의 대량생산 공정 개발

- Ovotransferrin 가수분해물의 정량법 및 품질평가 기준 확립
- Ovotransferrin 가수분해물의 생산 공정 검토 및 scale-up test

3. 3차년도 연구개발 내용 및 범위

<제1세부과제> 제제화 된 ovotransferrin 및 ovotransferrin 가수분해물의 미생물학적 안전성 확보 및 기능성 재확인

- 생산된 식품 제형의 미생물학적 안전성 확보, 이화학적 특성 및 유통기한 설정
- 제제화된 ovotransferrin 및 ovotransferrin 가수분해물의 기능성 재확인

<제1협동과제> Ovotransferrin의 경제적인 semi-large 규모의 시스템 확립

- Ovotransferrin의 생산을 위한 scale-up 조건 확립
 - 부피의 급격한 증가로 인해 변화되는 철분의 포화조건, 혼합 (교반), 원심분리, egg albumin과 ovotransferrin의 pH와 ethanol에 대한 반응도에 대한 조건 확립

<제2협동과제> 제제화된 ovotransferrin 및 ovotransferrin 가수분해물 제형의 면역증강 및 항암효과 검증 및 그 기전 구명 연구

- 1세부, 3협동 과제 결과로 제조된 식품제제를 F344 rat 모델에 투여 한 후 그 유효 효과를 검증

<제3협동과제> Ovotransferrin 및 ovotransferrin 가수분해물의 식품 제제화

- 식품제제로의 제형 탐색 및 제품화
- 개발된 제형에서 ovotransferrin의 장기 안정성 평가

IV. 연구개발결과

1. 1차년도 연구결과 (2010.7. - 2011.6.)

- Ovotransferrin 의 항균, 항산화, 항염 등의 기초적인 기능성 실험을 실시하여 향후 실험에 적용할 유효 농도를 설정하였다. DPPH법과 β -carotene assay를 실시하여 ovotransferrin 1 mg/mL 에서 항산화 효과를 관찰할 수 있었다. 다양한 병원성 식중독 균에 대해서도 40 mg/mL 농도에서 항균 효과를 관찰할 수 있었으며, *Helicobacter pylori*균에 대해서도 항균 효과를 관찰하였다. 식품에 이용 가능한 산업용 효소를 기준으로 가수분해를 실시하였다. Ovotransferrin과 ovotransferrin 가수분해물을 다양한 인체유래 암세포에 대해 MTT assay를 이용하여 세포독성을 측정한 결과, ovotransferrin의 경우 40 mg/mL의 높은 농도에서 몇몇의 암세포에 대해 50%가 넘는 세포독성

을 보이는 것을 관찰하였고, 가수분해물의 경우 대부분의 효소 가수분해물에서 ovotransferrin보다 암세포에 대한 세포독성이 증가하는 것을 확인할 수 있었다.

- Iron (Fe^{3+})이 ovotransferrin과 결합하는데 최적의 pH 조건과 NaCl의 영향을 실험한 결과, pH 7.0의 조건과 0.1% 농도의 NaCl 조건이 보다 높은 수율의 ovotransferrin을 얻을 수 있다는 것을 확인하였다. 또한 ovotransferrin의 분리 및 침전에 요구되어지는 최적의 에탄올 농도를 찾기 위한 실험을 진행한 결과, 43%의 에탄올 농도를 적정 농도로 설정하였다.
- Ovotransferrin 및 ovotransferrin 가수분해물의 면역증강 및 항암효과를 검증하기 이전에 항산화능을 측정하기 위해 SOD-like activity, peroxy 라디칼 소거능, ABTS 라디칼 소거능을 측정한 결과, 모든 ovotransferrin 가수분해물에서 ovotransferrin보다 높은 항산화 활성을 보였다. Ovotransferrin과 그 가수분해물의 인체 백혈구 DNA 손상 억제 효과를 측정하기 위해 comet assay를 실시한 결과, 인위적으로 산화적 스트레스를 유발한 인체 백혈구 DNA 손상을 유의하게 (34.6-53.3%) 감소시키는 것을 확인하였다. 또한 MTT assay, LDH release assay, 암세포의 형태학적 변화를 관찰한 결과, 효소를 이용하여 가수분해를 했을 시 그 효과가 증가하는 것을 확인할 수 있었다.
- 우리나라의 계란 소비 현황을 조사한 결과, 소득이 증가됨에 따라 계란 소비량이 증가하였지만, 일정 수준의 소득 수준에 올라온 이후에는 계란의 소비가 더 이상 늘지 않는 정체 상태에 다다랐다고 판단하였다. 국내의 양계산업의 발전을 위해서는 계란의 수요 증대와 가격 상승이 필요하다고 판단되었고, 이를 위해 계란의 활용도를 높일 필요가 있다고 판단되어진다. 따라서 ovotransferrin과 같은 물질의 분리 정제 및 산업화 기술은 계란의 부가가치를 높이면서 기존의 계란 소비 시장이 아닌 새로운 시장을 창출하여 활용도를 높일 것으로 기대된다. 이러한 시장조사 결과를 바탕으로 판단해 볼 때, ovotransferrin의 대량생산기술이 확보되고, 그 기능성 및 안전성이 입증된다면 iron과 결합된 형태로서 철분제의 원료, 락토페린 대체제 및 기능성 식품의 원료로서 그 활용도는 매우 높다고 판단되었다. Ovotransferrin 시험법 및 품질 평가 기준으로는 Bradford assay를 통한 단백질 정량법과 SDS-PAGE를 통한 단백질 순도 확인, 또한 HPLC를 이용하여 ovotransferrin을 정량하는 방법이 적합하다고 판단되었다.

2. 2차년도 연구결과 (2011.7. - 2012.6.)

- 효소를 이용하여 가수분해를 실시할 때 ovotransferrin 획득 수율을 높이기 위하여, 가수분해 조건을 용매 100 mL 당 ovotransferrin 2 g, 효소 0.08 g (25:1)으로 세팅하였다. 효소 가수분해물의 효율적인 생산을 위하여 반응 온도, 반응 시간 및 반응 pH 등을 고려하여 생산 조건을 최적화 하고자 하였다. 그 결과, 반응 시간과 pH에 구분 없이 고르게 세포독성이 나타나는 것을 확인하였고, 이에 기능성을 높일 수 있는 다른 방법을 모색하였다. 그러한 방법으로 mercaptoethanol과 TCEP (Tris(2-carboxyethyl) phosphine hydrochloride)를 이용하여 ovotransferrin의 이황화 결합을 분해하는 것인데, 이를 통해 생산된 ovotransferrin의 암세포 성장 억제효과를 검증한 결과, TCEP를 이용하여 제조한 물질이 4 mg/mL 농도에서도 86%의 암세포 성장 억제효과를 보임으로써 본 연구팀에서 실시한 실험 결과 중 비교적 좋은 결과를 얻을 수 있었다. 하지만, 효소 가수분해물에 비해 제조 방법상 산업적으로 이용하기에는 문제점이 존재하기 때문에 이를 극복할 방법을 찾아야 한다.
- 본 연구팀의 ovotransferrin의 분리 및 정제 방법은 계란의 ovotransferrin에 철 이온을 부착시켜 화학적 안정성을 높인 후 ethanol을 이용하여 ovotransferrin을 분리하는 방법이다. 따라서 철 이온을 효율적으로 제거하기 위한 방법을 찾고자 하였다. 먼저 pH의 영향을 조사하였는데, pH 5 이하일 경우 모두 철 이온 release가 잘 일어나는 것을 확인하였고, pH를 조정하기 위해 HCl을 사

용하기 보단 citric acid를 사용하는 것이 더 효과적인 것으로 확인되었다. Released된 철 이온을 제거하기 위해선 AG1-X2 resin을 사용하였는데, 그 최적 이용량을 확인한 결과, 6 mg/mL의 ovotransferrin을 함유하는 100 mL solution 당 0.6 g의 resin을 사용하는 것이 적합하다는 결과를 얻었고, 또한 한 번 제거한 것보다 두 번 제거하였을 때의 남은 철 이온의 양이 훨씬 줄어드는 것을 확인하였다.

- 동물실험을 통해 ovotransferrin 및 ovotrasnferrin 가수분해물의 면역증강 및 항암효과를 검증하였다. 그 결과, DMH로 유도한 대장암 rat 모델에서 대장암의 전암병변인 AC (aberrant crypt) 및 ACF (aberrant crypt foci)의 수에 ovotransferrin 및 그 가수분해물이 영향을 미치는 것을 확인하였다. 특히 trypsin 가수분해물을 공급한 실험군에 경우 전암병변이 확연하게 억제된 것을 확인할 수 있었다.
- Lab scale의 각 생산 단계를 검토한 결과를 바탕으로 대량 생산 공정을 확립하였고, 이에 따라 난백 50 L를 가지고 scale-up test를 실시하였다. 이론 상의 계란 난백 50 L 내에 존재하는 ovotransferrin의 양은 700 g으로 추정된다. 최종 ovotransferrin을 회수한 결과 450 g으로 회수율은 64.3%였고, ovotransferrin 가수분해물을 생산한다고 했을 때, 회수율을 계산한 결과 421 g으로 60.1%의 회수율을 확인하였다. 대량 생산 공정 중 원심분리 단계에서의 손실이 가장 큰 것으로 확인되어 공정의 개선이 필요할 것으로 판단되었다. Scale-up test 결과를 바탕으로 kg 당 제조 원가를 계산하였을 때, kg 당 ovotransferrin 및 그 가수분해물의 제조 원가는 약 90 만원 선으로 추정되었다. 1차년도에 조사한 바에 의하면 국내에 철분 보충제 원료로 수입되고 있는 acetyl-transferrin의 가격은 분말 형태가 kg 당 250만원으로, 이의 대체제로 Fe-ovotransferrin을 개발할 경우 시장 경쟁력을 어느 정도 확보할 수 있을 것으로 보인다.

3. 3차년도 연구결과 (2012.7. - 2013.6.)

- 2차년도 동물실험 결과를 바탕으로 ovotransferrin과 trypsin 효소 가수분해물을 제제화하였고, 이들에 대한 미생물학적 안전성 및 기능성을 재확인하였다. 제제화된 ovotransferrin 및 그 가수분해물의 일반 세균수는 g 당 5.7×10^5 CFU, 1.3×10^6 CFU로 측정되었으며, 병원성 식중독균에 대한 검사에서는 모든 시료에서 검출이 되지 않아 미생물학적 안전성을 확보하였다. 제제화된 ovotransferrin 및 그 가수분해물의 암세포 성장 억제 효과를 측정 한 결과, 제제화된 시료에서도 암세포 성장 억제 효과가 유지되는 것을 관찰할 수 있었다.
- 본 연구팀에서는 에탄올 침전을 이용한 ovotransferrin 추출 방법 이외에 ammonium sulfate와 citric acid를 이용한 추출법도 개발하였다. 이를 에탄올 추출법과 비교한 결과, 에탄올 추출법은 빠른 시간 안에 ovotransferrin을 대량 생산할 수 있다는 장점이 있지만, 철 이온을 제거시키는 과정과 ovotransferrin외 다른 단백질을 회수할 수 없다는 단점이 있고, 새로운 방법은 에탄올 추출법보다는 시간이 오래 걸리지만 다른 난 단백질을 변성 없이 같이 분리 할 수 있다는 장점이 있다. 따라서 산업적인 목적에 따라 두 방법을 선택하여 사용하여도 괜찮다고 판단하였고, 또한 급격한 부피 증가로 인해 변화되는 철분의 포화 조건과 혼합 및 원심분리의 조건을 확립하였다.
- 동물실험을 통해 제제화된 ovotransferrin 및 ovotrasnferrin 가수분해물의 면역증강 및 항암효과를 검증하였다. 그 결과, DMH로 유도한 대장암 rat 모델에서 대장암의 전암병변인 AC (aberrant crypt) 및 ACF (aberrant crypt foci)의 수에 제제화된 ovotransferrin 및 그 가수분해물이 영향을 미치는 것을 확인하였다. 특히 제제화된 trypsin 가수분해물을 공급한 실험군에 경우 전암병변이 확연하게 억제된 것을 확인할 수 있었다.
- Ovotransferrin 및 ovotransferrin의 가수분해물을 별도의 부형제 없이 동결건조 시, 동결건조

된 입자는 그 무게가 가볍고 얇은 비늘과 같은 성상으로 생산 공정 및 이후 원료로 사용함에 있어 취급이 불편한 단점이 있어 성상의 개선 및 안정성 개선을 위한 부형제를 평가하였다. 평가를 진행한 동결보호부형제 중 trehalose의 회수율이 가장 높아 동물실험에 사용할 시료를 제조 할 때 trehalose를 첨가하여 제조하였다. 동결보호부형제 별 안정성 평가에서도 trehalose를 첨가하여 제조한 시료의 안정성이 가장 높았으며, 25℃에서 보관하여도 성상이나 색의 변화가 관찰되지 않아 ovotransferrin 및 그 가수분해물의 유통조건을 실온 유통으로 설정하여도 문제가 없을 것이라 판단하였다.

V. 연구성과 및 성과활용 계획

1. 논문게재

- (1) Moon, S. H., Paik, H.-D., White, S., Daraba, A., Mendonca, A. F. and D. U. Ahn. 2011. Influence of nisin and selected meat additives on the antimicrobial effect of ovotransferrin against *Listeria monocytogenes*. *Poult. Sci.* 90: 2548-2591.
- (2) Moon, S. H., Lee, J. H., Lee, Y. J., Paik, J. Y., Ahn, D. U. and H.-D. Paik. 2012. Antioxidant, antimicrobial, and cytotoxic activities of ovotransferrin from egg white. *Korean J. Food Sci. Ani. Resour.* 32: 612-617.
- (3) Kim, J., Moon, S. H., Ahn, D. U., Paik, H.-D. and E. Park. 2012. Antioxidant effects of ovotransferrin and its hydrolysates. *Poult. Sci.* 91: 2747-2754.
- (4) Moon, S. H., Lee, J. H., Lee, Y. J., Chang, K. H., Paik, J. Y., Ahn, D. U. and H.-D. Paik. 2013. Screening for cytotoxic activity of ovotransferrin and its enzyme hydrolysates. *Poult. Sci.* 92: 424-434.

2. 특허성과

- (1) 백현동, 안동욱, 박은주, 문선희, 한경준, 김정미. 계란 난백 ovotransferrin 가수분해물의 제조방법과 이를 이용한 항산화 기능성 식품. 건국대학교 산학협력단. 대한민국 출원 제 10-2011-0040418호 (출원일: 2011. 4. 28)
- (2) 백현동, 안동욱, 박은주, 문선희, 김정미, 백지연. 계란 난백 ovotransferrin의 분리정제법과 항암 기능성 약제학 조성물. 건국대학교 산학협력단. 대한민국 출원 제 10-2011-0040419호 (출원일: 2011. 4. 28)
- (3) 백현동, 안동욱, 박은주, 문선희, 한경준, 김정미. 계란 난백 ovotransferrin 가수분해물 및 그 항산화 기능성 의약품. 건국대학교 산학협력단. 대한민국 출원 제 10-2011-0040420호 (출원일: 2011. 4. 28)
- (4) 백현동, 안동욱, 박은주, 문선희, 김정미, 백지연. 계란 난백 ovotransferrin의 분리정제법과 항암 기능성 식품. 건국대학교 산학협력단. 대한민국 출원 제 10-2011-0040421호 (출원일: 2011. 4. 28)
- (5) 백현동, 안동욱, 박은주, 문선희, 이재훈, 이경아, 민근영. 항산화 활성을 갖는 난백 단백질 오버트랜스페린의 가수분해물 및 그 제조방법. 건국대학교 산학협력단. 대한민국 출원 제 10-2012-0039672호 (출원일: 2012. 4. 17)
- (6) 백현동, 안동욱, 박은주, 문선희, 이재훈, 장경훈, 백지연, 김세영. 계란 난백 오버트랜스페린 가수분해물 및 그 항암 기능성 의약품. 건국대학교 산학협력단. 대한민국 출원 제 10-2012-0040258호 (출원일: 2012. 4. 18)
- (7) 백현동, 안동욱, 박은주, 문선희, 이재훈, 이경아, 민근영. 항산화 활성을 갖는 난백 단백질 오버트

랜스페린의 가수분해물을 함유하는 약학 조성물. 건국대학교 산학협력단. 대한민국 출원 제 10-2012-0040769호 (출원일: 2012. 4. 19)

(8) 백현동, 안동욱, 이재훈, 문선희, 김세영. 트레할로스를 첨가한 오보트란스페린을 유효성분으로 포함하는 암세포 성장 억제용 조성물. 건국대학교 산학협력단. 대한민국 출원 제 10-2013-0076094호 (출원일: 2013. 6. 28)

(9) 백현동, 안동욱, 박은주, 문선희, 이재훈, 이민희. 오보트란스페린-프로모드 278 효소 가수분해물을 유효성분으로 함유하는 항암용 조성물. 건국대학교 산학협력단. 대한민국 출원 제 10-2013-0076095호 (출원일: 2013. 6. 28)

3. 학술대회 발표

(1) Park, E., Kim, J., Moon, S. H., Ahn, D. U., Paik, H.-D. Antioxidant and antigenotoxic activity of ovotransferrin from egg white and its hydrolysates. 제 78 차 한국식품과학회 학술대회, 대구, 2011. 6. 8.

(2) Moon, S. H., Han, K. J., Lee, J. H., Lee, Y. J., Ahn, D. U., Paik, J. Y., Paik, H.-D. Antioxidant, antimicrobial, and cytotoxic activity of ovotransferrin from egg. 제 78 차 한국식품과학회 학술대회, 대구, 2011. 6. 8.

(3) Moon, S. H., Lee, J. H., Han, K. J., Lee, Y. J., Ahn, D. U. Paik, H.-D. Antimicrobial effects of ovotransferrin and ovotransferrin hydrolysates against *Bacillus cereus* and *Staphylococcus aureus*. 제 78 차 한국식품과학회 학술대회, 대구, 2011. 6. 8.

(4) Moon, S. H., Lee, J. H., Lee, Y. H., Lee, K. A., Min, K. Y., Ahn, D. U., Paik, H.-D. Antioxidant activity of autocleaved ovotransferrin against lipid oxidation. 제 79 차 한국식품과학회 학술대회, 대전, 2012. 6. 13.

(5) Abeyrathne, S., Lee, H. Y., Ahn, D. U. Separation of ovotransferrin from chicken egg white without using solvents. 제 79 차 한국식품과학회 학술대회, 대전, 2012. 6. 13.

(6) Moon, S. H., Lee, J. H., Ahn, D. U., Chang, K. H., Paik, H.-D. Cytotoxic activity of enzymatic protein hydrolysates from ovotransferrin. 2012 IFT Annual Meeting, Las Vegas, 2012. 6. 25.

(7) Lee, M., Kim, J., Paik, H.-D., Park, E. Effect of ovotransferrin and its hydrolysates on colon carcinogenesis in 1,2-dimethylhydrazine (DMH)-treated rats. 2012 한국영양학회 추계 학술대회, 서울, 2012. 11. 16.

(8) Moon, S. H., Lee, J. H., Lee, M., Park, E., Paik, H.-D., Ahn, D. U. Cytotoxic and antigenotoxic activities of enzymatic protein hydrolysate from ovotransferrin. 2013 IFT Annual Meeting, Chicago, 2013. 7. 15.

(9) Moon, S. H., Lee, J. H., Paik, H.-D., Lee, Y. H., Ahn, D. U. Hypertensive angiotensin-converting enzyme inhibitory activity of enzymatic protein hydrolysates from ovotransferrin. 2013 IFT Annual Meeting, Chicago, 2013. 7. 15.

4. 기술이전 실적

(1) 기술이전 내용

- 트레할로스를 첨가한 오보트란스페린을 유효성분으로 포함하는 암세포 성장 억제용 조성물 (대한민국 출원번호: 제 10-2013-0076094호)

(2) 기술이전 업체 및 조건

- 기업체: (주) 씨티씨바이오
- 실시 기간: 2013년 09월 ~ 2023년 08월 (총 10년)
- 실시권의 유형: 국내 전용실시권
- 기술료 납부 방법: 계약시 일시불 (12,600,000 원)

5. 인력활용 및 양성효과

지원 총인원	지원 대상 (학위별, 취득자)				성별		지역별		
	박사	석사	학사	기타	남	여	수도권	대전	기타지역
10	6	4	-	-	4	6	9	-	1

6. 연구결과 기대효과

- 생리활성 물질의 기능성 식품 소재로의 도입 원천기술 확보
 - Ovotransferrin 가수분해물의 기능성의 유지 및 생체 이용률을 제고함으로써 기능성 식품 소재로 도입이 가능
- 효율적 생리기능 활성 평가방법 확보
 - 본 연구에 의한 생리기능성 평가 방법을 표준화함으로써 타 신물질의 기능성을 객관적 방법으로 비교함으로써 효율적 검증 방법을 제시 가능
- 독자적인 연구로부터 얻은 지적재산권(특허 등)의 확보로 산업적인 응용에도 독점적인 권리 제공
- 양계업계의 부가가치 창출
 - 계란 소비량의 감소, 가격 변동 및 사료비용의 증가, AI와 같은 질병 등의 양계업계의 잠재적인 위험요소를 계란 기능성 펩타이드를 이용함으로써 해결하고, 이를 통한 새로운 부가가치 창출 가능
- 기능성 식품의 다양화로 보다 다양한 제품군을 제공하여 줌으로서 그 소비량을 증대 시킬 수 있을 것이며, 기능성이 부여된 고부가 가치의 식품군으로 제조하여 산업체의 수익성 증대 가능

SUMMARY

I. Title

Development of Immunostimulating/Anticancer Substance(s) by Hydrolysis of Ovotransferrin from Egg White

II. Purpose and Necessity of Research and Development

Cancer is one of the most prominent diseases in humans. Currently, there are considerable scientific and commercial interests in the continued discovery for new anticancer agents from natural sources. The increasing incidences of human neoplasia reported over the last few decades led the development of new anticancer drugs, drug combinations, and chemotherapy strategies through the methodical and scientific exploration of enormous pool of synthetic, biological, and natural products.

In recent years, scientific evidences showed that some bioactive peptides and proteins in foods could have several beneficial effects on human health. Bioactive peptides, which were inactive within the sequence of their parent proteins, can be released by enzymatic hydrolysis during gastrointestinal transit, fermentation, or food processing.

Also, these functional peptides can have diverse properties including immunomodulatory, antimicrobial, antioxidant, antithrombotic and antihypertensive actions depending upon their amino acid sequences. Numerous studies have been conducted to produce functional peptides from various protein sources, including soy catfish milk and whey proteins. In general, the protein hydrolysates produced from various protein sources possess some physicochemical characteristics and bioactivities, which are not found in the parent proteins.

Currently, almost all commercial transferrins marketed are lactoferrin separated from milk, and transferrins from other sources are not available in large quantity. Over the years, many laboratory-scale separation methods for ovotransferrin were developed. But no attempt has been made to separate ovotransferrin to control pathogenic and nonpathogenic microorganisms in meat or other food products. A 60 g egg contains about 0.5 g ovotransferrin, which is far better sources than milk. Thus, developing a practical preparation method for ovotransferrin from egg white would be very important for the use of ovotransferrin as a natural antimicrobial agent in meat processing. The method developed should be simple, low cost, and require minimal treatments.

In this study, we optimized the method for producing ovotransferrin from egg, and produced its hydrolysates that possesses immunostimulating and anticancer activity. The bioactivities of ovotransferrin and its hydrolysates were tested, and screened for the enzyme treatments that produce the best results. Finally, mass production systems to produce functional peptides had been established.

III. Contents and Scope of Research and Development

A. Contents and Scope of Research (1st year)

1. Finding conditions for immunostimulating/anticancer substances by hydrolyzing ovotransferrin
2. Optimizing ovotransferrin extraction method from egg white
3. Determining the immunostimulating/anticancer activity of ovotransferrin and its hydrolysates using *in vitro* experiments
4. Market research of ovotransferrin and establishment of quality evaluation

B. Contents and Scope of Research (2nd year)

1. Optimization of production of ovotransferrin hydrolysates
2. Modification of ovotransferrin separation method to improve functionality
3. Determining the immunostimulating/anticancer activity of ovotransferrin and its hydrolysates using animal models
4. Development of mass production of ovotransferrin hydrolysates

C. Contents and Scope of Research (3rd year)

1. Evaluation and confirmation of microbiological safety of ovotransferrin and its hydrolysates
2. Establishment of economical semi-large scale system of ovotransferrin
3. Determining the immunostimulating/anticancer activity of ovotransferrin and its hydrolysates produced in commercial scale using animal models
4. Production of food-grade ovotransferrin and its hydrolysates

IV. Results of Research and Development

A. Results of Research (1st year)

The antioxidant, antimicrobial and cytotoxic activities of ovotransferrin and its hydrolysates were investigated *in vitro*. Ovotransferrin has weak antioxidant, antimicrobial and cytotoxic activities. After hydrolysis using enzymes, the antioxidant, antimicrobial and cytotoxic activities had been increased.

For developing an optimized extraction method, various pH and NaCl concentrations were tested.

For developing an ovotransferrin quality assessment system, Bradford assay, SDS-PAGE method and HPLC were used.

B. Results of Research (2nd year)

For increasing the functionality of hydrolysates, mercaptoethanol and TCEP were used to breakdown disulfide bonds of ovotransferrin. Using these materials, some peptides with stronger cytotoxic activities could be produced. However, there was some process problems to use them in food systems. We have to solve these problems.

Through the animal experiments, we verified that ovotransferrin and its hydrolysates had immunostimulating/anticancer activity. In the colon cancer study, the number of AC (aberrant crypt) and ACF (aberrant crypt foci) induced by DMH in rats decreased by ovotransferrin and its hydrolysates.

50 L batches of egg white were tested for the scale-up production of ovotransferrin, and the purity and production yield was similar to the laboratory scale method. We obtained 450 g of ovotransferrin and 410 g of ovotransferrin hydrolysates. Its recovery rate were 64.3% and 60.1%, respectively. In the mass production system, we have used only single extraction. If two extraction method is used, the yield can go up to 85%. The economics of single or double extraction for ovotransferrin should be evaluated in the future.

C. Results of Research (3rd year)

Ovotransferrin and its hydrolysates with added trehalose were checked for their total plate count and reconfirmed their immunostimulating/anticancer activity. The number of total plate count for ovotransferrin and its hydrolysates were 5.7×10^5 CFU/g and 1.3×10^6 CFU/g, respectively. MTT assay and the cytotoxic activity of ovotransferrin and its hydrolysates indicated that the activities of ovotransferrin against cancer cell lines were maintained after hydrolysis.

Through the animal experiments, it was verified that ovotransferrin and its hydrolysates with added trehalose have immunostimulating/anticancer activity. In the colon cancer study using a rat model, the number of AC (aberrant crypt) and ACF (aberrant crypt foci) induced by DMH were decreased by ovotransferrin and its hydrolysates.

To improve appearance and increase stability of ovotransferrin, freeze protectors were tested. Trehalose was the best freeze protector. Trehalose protected ovotransferrin and maintained its color and appearance during the storage at 25°C.

CONTENTS

Chapter 1. Outline of research and development	15
Chapter 2. Current state of domestic and foreign technical development	21
Chapter 3. Procedures and results of research and development	24
Chapter 4. Achievement of purpose and condition of related field	125
Chapter 5. Application plan and results of research	134
Chapter 6. Information of scientific technology corrected from other countries	139
Chapter 7. References	141

목 차

제 1 장	연구개발과제의 개요	15
제 1 절	연구개발의 목적	15
제 2 절	연구개발의 중요성	16
제 3 절	연구개발의 내용 및 범위	18
제 2 장	국내외 기술개발 현황	21
제 3 장	연구개발수행 내용 및 결과	24
제 1 절	1차년도 연구개발수행 내용 및 결과	24
1.	면역증강 및 항암효과를 가지는 ovotransferrin 가수분해물의 효율적인 생산 조건 확립	
2.	계란 흰자로부터 ovotransferrin 추출방법 개발	
3.	<i>In vitro</i> 실험을 통한 ovotransferrin 및 ovotransferrin 가수분해물의 면역증강 및 항암효과 검증에 대한 그 기전 구명 연구	
4.	Ovotransferrin의 시장 조사 및 품질평가 기준 확립	
제 2 절	2차년도 연구개발수행 내용 및 결과	64
1.	Ovotransferrin 가수분해물의 생산 최적화	
2.	기능성 향상을 위한 ovotransferrin 활성화 방법 개발	
3.	동물실험을 통한 ovotransferrin 및 ovotransferrin 가수분해물의 면역증강 및 항암효과 검증 및 그 기전 구명 연구	
4.	Ovotransferrin 가수분해물의 대량생산공정 개발	
제 3 절	3차년도 연구개발수행 내용 및 결과	93
1.	제제화된 ovotransferrin 및 ovotransferrin 가수분해물의 미생물학적 안전성 확보 및 기능성 재확인	
2.	Ovotransferrin의 경제적인 semi-large 규모의 시스템 확립	
3.	제제화된 ovotransferrin 및 ovotransferrin 가수분해물 제형의 면역증강 및 항암효과 검증 및 그 기전 구명 연구	
4.	Ovotransferrin 및 ovotransferrin 가수분해물의 식품제제화	
제 4 장	목표달성도 및 관련분야에의 기여도	125
제 1 절	연구개발목표의 달성도	125
제 2 절	관련분야의 기술발전예의 기여도	132

제 5 장	연구개발 성과 및 성과활용 계획	134
제 1 절	논문 실적	134
제 2 절	학술대회 발표 실적	134
제 3 절	특허 실적	135
제 4 절	기술이전 실적	136
제 5 절	인력활용 및 양성효과	137
제 6 절	연구결과 기대효과	137
제 6 장	연구개발과정에서 수집한 해외과학기술정보	139
제 7 장	참고문헌	141

제 1 장 연구개발과제의 개요

제 1 절 연구개발의 목적

21세기 식품생명과학의 발달, 건강에 대한 국민의 욕구 증대 등 보건 환경의 변화는 식품에 대한 인식을 새롭게 바꾸었다. 과거 양적인 면을 강조하던 시대는 식품수급, 식량안보가 그 대상이었다. 그러나 오늘날 세계 공중보건의 주요한 주제는 질적인 면에서 두 가지 축으로 움직이고 있다. 그 하나는 식품 안전성이며 이와 다른 하나는 식품 기능성이다. 한편, 우리나라의 노령화 사회 진입이나 만성질환 유병률 증가는 학계, 산업계 뿐 만 아니라 일반 국민들도 식품 기능성에 대하여 더욱 주목하게 되었다.

전 세계적으로 사망 원인의 1, 2위를 차지하고 있는 암에 대한 치료는 대부분 합성 화학약품을 이용한 치료 요법으로 조혈 및 면역기능에 이상을 초래하고 암세포 이외의 정상세포에도 독성을 나타내고 있어, 특이적이며 선택적인 항암제의 개발이 요구되고 있는 실정이다. 최근에는 면역기능을 높여주고 암세포에만 선택적으로 작용하는 천연 항암제 개발이 요구되고 있다.

천연의 완전식품으로 잘 알려진 계란은 하나의 생명체가 자라는 데 필요한 모든 영양소와 방어체계를 위한 물질들을 보유하고 있는 것으로서 단순히 식품 차원이 아닌 각 성분들의 생리적 기능과 상호작용에 의한 역할이 밝혀지고 있고, 기능성 건강식품의 주요한 소재로 사용될 수 있다는 점에서 그 중요성이 더욱 강조되고 있다 (Jeon *et al.*, 2002).

계란은 단순히 영양을 공급하는 식품으로서가 아닌 인체의 건강과 질병에 관련한 생물활성을 지닌 다양한 성분을 함유한 새로운 소재로 각광받고 있다. 오래전부터 산업계에서 실용화한 성분으로는 라이소자임이나 애비딘, 레시틴 등이 있지만 아직도 새롭게 생물활성을 지닌 계란 성분의 기능이 밝혀지고 있어 이용 범위는 더욱 확대될 것이다.

본 연구는 계란에서 분리 추출한 ovotransferrin과 ovotransferrin 가수분해물로부터 면역증강 및 항암효과가 우수한 펩타이드의 생산을 최적화 하고 기능성을 동물실험을 통해 입증하며, 최종적으로 대량생산시스템을 확립하여 제품화 하고자 하였다.

제 2 절 연구개발의 중요성

1. 난백 단백질에서 ovotransferrin의 중요성

계란 흰자에서 분리된 난백 단백질은 난백 100 g당 약 10%를 차지하고 있으며 우량 식품 단백질인 콩단백질보다도 필수 아미노산이 많고 체내 흡수성이 좋다 (Keung *et al.*, 1981; Wu and Acero-Lopez, 2012). 그렇지만 난백 단백질 자체에는 알레르기의 주요 요인인 알부민이 함유되어 있기 때문에 식품으로 이용되기가 적절하지 못하다. 그렇지만 난백 단백질에서 알부민을 제거하고 ovotransferrin 만을 순수하게 추출하게 되면 알레르기에 대한 문제점을 해결 할 수 있다.

2. 유용 기능성 펩타이드 발굴

식품 중에 존재하는 펩타이드는 아미노산을 공급하는 영양 기능, 맛이나 용해성, 유화성 등에 관여하는 감각기능, 여러 생리활성을 나타내는 생체조절 기능 등에 모두 관여하는데 최근에는 특히 펩타이드의 생체조절 기능에 대한 관심이 높아지고 있다. 생체 내에 존재하는 펩타이드는 여러 가지 생리 활성을 나타내는 경우가 많은데 대표적으로 면역반응에 관여하거나 항균 작용을 하는 펩타이드가 많이 알려져 있다 (Jang *et al.*, 2008; Thammasirirak *et al.*, 2010). 이와 같이 각종 펩타이드가 생체 내에서 다양한 생리활성을 나타내므로 우유나 발효유 제품, 계란 등에 존재하는 펩타이드로 여러 가지 기능성을 찾아낼 수 있고 이를 응용할 수 있다 (Lopez-Fandino *et al.*, 2006; Yu *et al.*, 2012).

현재, ovotransferrin은 항균, 항산화, 항암, 항염 등의 많은 기능성이 밝혀져 있지만, 그 효과가 미비하다고 알려져 있다. 본 연구에서는 여러 산업용 효소로 ovotransferrin을 가수분해하여 기능성 펩타이드를 얻음으로써 고부가가치를 창출할 수 있을 뿐만 아니라 신기능 식품소재로서 응용될 수 있는 가능성을 나타내고 있다.

<식품에 존재하는 기능성 펩타이드>

Activity	Origin
	Fish (sardine muscle)
	Soy (β -conglycin)
Antioxidant	Milk (casein)
	Milk (β -lactoglobulin)
	Egg (egg white)

Antithrombotic	Milk (κ -casein)
	Milk (lactoferrin)
Hypocholesterolemic	Soy (glycinin)
	Soy (β -conglycin)
	Milk (β -lactoglobulin)
Hypotriglyceridemic	Blood (globin)
Anti-obese	Soy (β -conglycin)
	Milk (κ -casein)

3. Lactoferrin의 대체제 개발

Lactoferrin은 조제분유, 이유식, 경구·경관 영양식, 환자 회복식, 단백질 음료 등의 다양한 용도로 사용되고 있고, 1 kg 당 50만원 이상의 고가로 전량 수입되고 있으며, 그 사용량은 매년 30% 이상 증대되고 있다. 또한 수요에 비해 공급이 적기 때문에 가격이 지나치게 비싼 편이다. 따라서 lactoferrin의 대체제로서 ovotransferrin의 대량생산이 가능해진다면 가격, 이용면에서 매우 큰 경쟁력이 확보될 것이다. 또한, 난백에서 분리된 ovotransferrin은 수 백배 이상 달걀의 부가가치를 증대시킬 수 있다.

4. Ovotransferrin의 대규모 생산공정 시스템 개발

식품소재로서 활용하기 위해선 우선 대규모 생산이 이루어져야 가능하다. 따라서 간단하고 효율적인 대규모 분리공정이 개발된다면, ovotransferrin을 면역증강 및 항암효과를 갖는 기능성 식품 소재의 기초 원료로 이용할 수 있다. Ovotransferrin은 영양성분으로서 즉석 음료와 스포츠 바와 같은 단백질 보강제 제조에 이용될 수 있고, 철분 보강 혼합물, 철분 보강 음료수와 같은 철분이 강화된 제품에 이용될 수 있다.

5. 양계산업의 수익성

방송매체의 보로나 조류인플루엔자 발생 등과 같은 요인으로 인해 계란 값의 변화는 매우 심한 실정이다 (한국농어민신문: 2009. 6. 28). 산란계의 사육 현황을 통해, 소규모의 농가 수는 계속 줄어들고 있으며, 이에 반해, 5만수 이상 사육 농가는 계속 증가하고 있는 실정이다.

다. 계란의 수급은 1998년부터 2006년까지 계란 총 공급량과 소비자 1인 당 소비량을 보면 2002년까지 꾸준히 증가하다가 2003년과 2006년에는 소비가 감소하는 경향을 보이고 있다. 이는 한국 양계산업을 위협한 조류인플루엔자 발생에 따른 영향으로 분석되고 있으며, 2006년 계란 총 공급량은 540,542 톤으로 국민 1인 당 소비량은 11.2 kg에 불과하였다. 산란계 사육 규모 별 수 당 수익성 (2008년)은 계란 가격의 2000년 1월 특란 10개 당 600원대이었으며 2008년에 들어서면서 700원대를 유지하고 있다. 이는 계란가격은 경상가격으로 지난 5-6년 동안 800원대를 유지하고 있지만 물가고를 고려한 실질가격으로 환산하면 지속적으로 하락하고 있는 것으로 분석되었다 (축산신문: 2008. 1. 30). 2008년 산란계 수당 수익성을 확인해 봐도 수익성 또한 마이너스를 나타내고 있다.

6. Semi-large scale의 중요성

Scale-up은 실험실 규모의 소형 반응기에서 얻어진 실험 결과를 공업적 규모의 대형 반응 장치로 재현하고자 하는 것이다. 통상 lab scale → semi-large (bench) scale → pilot scale → plant scale 순으로 확대해 나가는데, 반응기 또는 발효조의 크기가 커짐에 따라 물리적 요인들도 급격하게 변하게 된다. 이러한 면에서 lab scale에서 plant scale로 전환하기 위해서는 반드시 semi-large scale에서의 물리적 조건을 확립하여야 한다.

제 3 절 연구개발의 내용 및 범위

1. 1차년도 연구개발 내용 및 범위

<제1세부과제> 면역증강 및 항암효과를 가지는 ovotransferrin 가수분해물의 효율적인 생산 조건 확립

- Ovotransferrin에서 면역증강 및 항암효과를 가지는 생리활성 가수분해물의 선별적 제조
 - 효율적인 가수분해 방법 선정 (산, 알칼리, 열, 효소 가수분해)
 - 온도, pH, 시간 등의 반응 조건 확립
- Ovotransferrin 및 ovotransferrin 가수분해물의 건강 기능성 검증
 - MTT assay 방법을 이용한 항종양 효과
 - Nitric oxide (NO) 활성 저하 효과

<제1협동과제> 계란 흰자로부터 ovotransferrin 추출 방법 개발

- Ovotransferrin의 최적 조건 확립 (추출온도, 가열시간, 에탄올 농도, pH, 이온화력 등)
- 고수율, 고농도의 ovotransferrin의 분리 정제

<제2협동과제> In vitro 실험을 통한 ovotransferrin 및 ovotransferrin 가수분해물의 면역

증강 및 항암효과 검증 및 그 기전 구명 연구

- MTT, LDH (lactate dehydrogenase) 측정
- 대장암 세포의 형태학적 변화 관찰
- 백혈구 및 대장암세포의 DNA 손상도 측정 (comet assay)
- TNF- α , IFN- γ , IL-6 측정
- Real-time PCR

<제3협동과제> Ovotransferrin의 시장 조사 및 품질평가 기준 확립

- Ovotransferrin 원료인 계란의 확보 및 경제성 분석
- 기능성 ovotransferrin의 해외 시장 조사
- Ovotransferrin 시험법 및 품질평가 기준 확립

2. 2차년도 연구개발 내용 및 범위

<제1세부과제> Ovotransferrin 가수분해물의 생산 최적화

- Ovotransferrin 가수분해물 생산의 최적 조건 확립
 - RSM (response surface methodology) 법을 이용한 효소 별, pH, 온도 등 최적조건 확립
- 확립된 최적 조건에서 면역증강 및 항암효과에 관련된 기능성 재확인

<제1협동과제> 기능성 향상을 위한 ovotransferrin 활성화 방법 개발

- Ovotransferrin으로부터 철분의 제거를 위한 최적 조건 개발
- Ovotransferrin의 철분 결합도 측정법 확립

<제2협동과제> 동물실험을 통한 ovotransferrin 및 ovotransferrin 가수분해물의 면역증강 및 항암효과 검증 및 그 기전 구명 연구

- 백혈구 및 대장 조직 DNA 손상 측정 (comet assay)
- 전암병변 (aberrant crypt) 측정
- 적혈구 내 항산화 효소활성 측정
- 혈장 TRAP (total radical trapping antioxidant potential) 측정
- 혈장 과산화지질 (conjugated dienes) 측정

<제3협동과제> Ovotransferrin 가수분해물의 대량 생산 공정 개발

- Ovotransferrin 가수분해물의 정량법 및 품질평가 기준 확립
- Ovotransferrin 가수분해물의 생산 공정 검토 및 scale-up test

3. 3차년도 연구개발 내용 및 범위

<제1세부과제> 제제화된 ovotransferrin 및 ovotransferrin 가수분해물의 미생물학적 안전성

확보 및 기능성 재확인

- 생산된 식품 제형의 미생물학적 안정성 확보, 이화학적 특성 및 유통기한 설정
- 제제화된 ovotransferrin 및 ovotransferrin 가수분해물의 기능성 재확인

<제1협동과제> Ovotransferrin의 경제적인 semi-large 규모의 시스템 확립

- Ovotransferrin의 생산을 위한 scale-up 조건 확립
 - 부피의 급격한 증가로 인해 변화되는 철분의 포화조건, 혼합 (교반), 원심분리, egg albumin과 ovotransferrin의 pH와 ethanol에 대한 반응도에 대한 조건 확립

<제2협동과제> 제제화된 ovotransferrin 및 ovotransferrin 가수분해물 제형의 면역증강 및 항암효과 검증 및 그 기전 구명 연구

- 1세부, 3협동 과제 결과로 제조된 식품제제를 F344 rat 모델에 투여 한 후 그 유효 효과를 검증

<제3협동과제> Ovotransferrin 및 ovotransferrin 가수분해물의 식품 제제화

- 식품제제로의 제형 탐색 및 제품화
- 개발된 제형에서 ovotransferrin의 장기 안정성 평가

제 2 장 국내외 기술개발 현황

1. 본 연구관련 국내외 기술수준 비교

개발기술명	관련기술 최고보유국	현재 기술수준	
		우리나라	연구신청팀
계란으로부터 Ovotransferrin의 분리 및 정제 기술	미국	50	80
Ovotransferrin의 안정화 및 대량 생산 기술	미국	50	70
Ovotransferrin 가수분해물의 생산 최적화 기술	미국	30	50
면역증강 및 항암 활성 ovotransferrin 가수분해물의 제조 기술	일본	50	50
난백 펩타이드를 이용한 의약품 소재 및 기능성 음료의 제조 기술	일본	30	30

2. 특허분석

개발기술명		Ovotransferrin의 분리 및 정제 기술	면역증강 및 항암 활성 ovotransferrin 가수분해물의 제조	난백 펩타이드를 이용한 의약품 소재 및 기능성 음료의 제조 기술
Keyword		purification, isolation, egg white, ovotransferrin	anticancer, functionality, ovotransferrin, hydrolysate, peptide	egg white peptide, anticancer agent, functional drink
검색건수		289	12	32
유효특허건수		3	2	5
핵심특허 및 관련성	특허명	Method of separating components of technical eggs, edible eggs, yolk and whites and products therefrom	Egg-white peptides having antithrombotic effects	Colon-cancer preventing agent and food and drink containing the colon-cancer preventing agent
	보유국	미국	일본	일본
	등록년도	2008년	2004년	2005년
	관련성 (%)	50	50	50
	유사점	계란의 성분을 난황과 난백으로 한 후 난백으로부터 ovotransferrin을 고농도로 분리 및 정제	계란으로부터 난각을 제거한 부위에서 난황과 난백을 분리한 다음, 단백질 가수분해 효소 (proteinase)를 첨가하여 가수분해하여 난단백 가수분해물을 제조	대장암 예방 조성물로서 ovotransferrin을 식품과 음료에 첨가하여 side effect 및 안전성을 검증
차이점	계란의 유효성분을 cross-linking reagent로 지질과 단백질로 분리한 후 난단백을 membrane filter를 이용하여 단계적으로 분리, 분리과정이 복잡함.	난백 가수분해물의 혈소판 응집반응, 혈액 응고반응, cAMP, cGMP 증가 반응 규명, 난백 가수분해물을 60℃에서 가열하고 proteinase로 가수분해, 스프레이 건조	Ovotransferrin의 쓴맛을 제거, Ovotransferrin을 가수분해 하지 않아 다량을 첨가하여야 함.	

3. 논문분석

개발기술명		Ovotransferrin의 분리 및 정제 기술	면역증강 및 항암 활성 ovotransferrin 가수분해물의 제조	난백 펩타이드를 이용한 의약품 소재 및 기능성 드링크의 제조 기술
Keyword		purification, ovotransferrin, egg-white peptide	egg white hydrolysate, anticancer activity	egg white peptide, anticancer agent, functional drink
검색건수		39	29	13
유효논문건수		7	2	3
핵심논문 및 관련성	논문명	Purification process for the preparation and characterizations of hen egg white ovalbumin, lysozyme, ovotransferrin, and ovomucoid	Anticancer activity of peptide fractions from egg white hydrolysate against mouse lymphoma cells	Therapeutic potential of hen egg white peptides for the treatment of intestinal inflammation
	학술지명	Preparative Biochemistry and Biotechnology	Food Science and Biotechnology	Journal of Functional Foods
	저자	Tankrathok A. <i>et al.</i>	Lee H. J. <i>et al.</i>	Lee M. <i>et al.</i>
	게재년도	2009	2003	2009
	관련성(%)	40	50	40
	유사점	Ion-exchange column을 이용하여 순도 80%의 ovotransferrin을 분리	다양한 protease를 이용한 난백가수분해물의 제조 및 항암효과 규명	난백을 가수분해하여 얻은 펩타이드의 건강기능성을 동물실험을 통해 규명, 의약품 및 건강기능성 식품소재 이용 가능성 제시
차이점	Ovalbumin, lysozyme, ovotransferrin, ovomucoid를 각기 다른 ion-exchange column chromatography를 이용하여 분리하였지만 수율이 21%로 매우 낮음.	Mouse 유래 암세포에 대한 항암 효과만 검증. 인체 유래 암세포 및 동물 실험을 통한 항암 효과에 대한 언급이 없고, 난백 펩타이드의 성분 분석 결과가 없음.	염증성 장질환 치료제의 원료로서 난백가수분해 펩타이드의 이용가능성을 동물실험을 통해 규명. 난백을 aminopeptidase로 가수분해	

제 3 장 연구개발수행 내용 및 결과

제 1 절 1차년도 연구개발수행 내용 및 결과

1. 면역증강 및 항암효과를 가지는 ovotransferrin 가수분해물의 효율적인 생산 조건 확립

가. Ovotransferrin 및 ovotransferrin 가수분해물 기능성 검증을 위한 유효농도 설정

면역증강 및 항암효과에 대한 ovotransferrin 및 ovotransferrin 가수분해물의 기능성 검증에 필요한 기초적 자료를 찾기 위해 ovotransferrin의 항균, 항산화, 항염 등 기초적인 기능성 실험을 실시하여 유효농도를 설정하였다.

(1) Ovotransferrin의 항산화 활성 검증

Ovotransferrin의 기초적인 기능성 검증 자료로서 DPPH assay (Al-Dabbas *et al.*, 2007; Xu *et al.*, 2007)와 β -carotene assay (Shon *et al.*, 2003)를 통해 항산화 활성을 검증하였다. DPPH assay 실험에는 비교구로 사용하는 ovotransferrin 만을 이용하였으며 72 시간동안 반응시키면서 DPPH 라디칼 소거능을 관찰하였다 (Fig. 1).

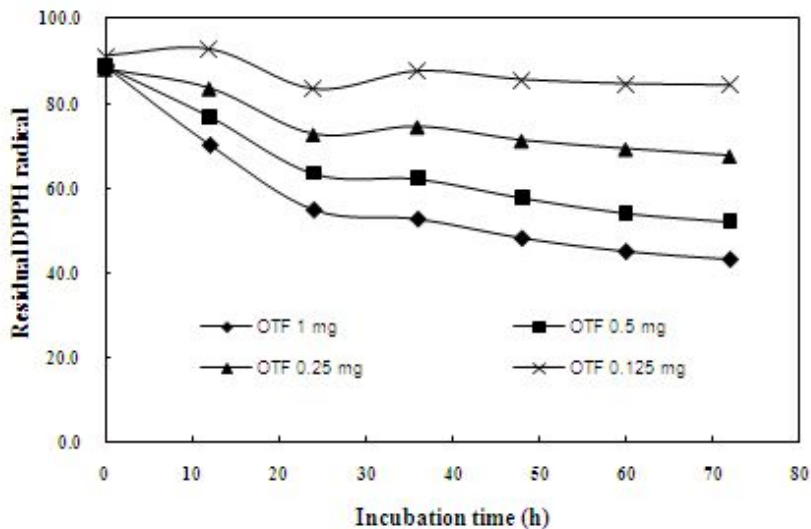


Fig. 1. Ovotransferrin의 DPPH free radical 소거능.

반응 시간이 증가됨에 따라 점차적으로 DPPH 라디칼이 소거되는 것으로 나타났으며, ovotransferrin 시료를 처리했을 때 36시간째에 최대 소거능을 보였으며 또한 이 결과가 72 시간까지 꾸준히 유지되는 것을 확인할 수 있었다.

또 다른 항산화 검증 방법인 β -carotene assay는 반응시간 동안 얼마나 β -carotene의 색소를 지켜주느냐를 측정하는 방법으로 6시간 이후 control은 경우 초기 값에 비해 10% 미만까지 색소의 색이 변화된 반면 ovotransferrin 샘플을 처리했을 시에는 이보다 색 변화가 적은 것을 알 수 있었다 (Fig. 2).

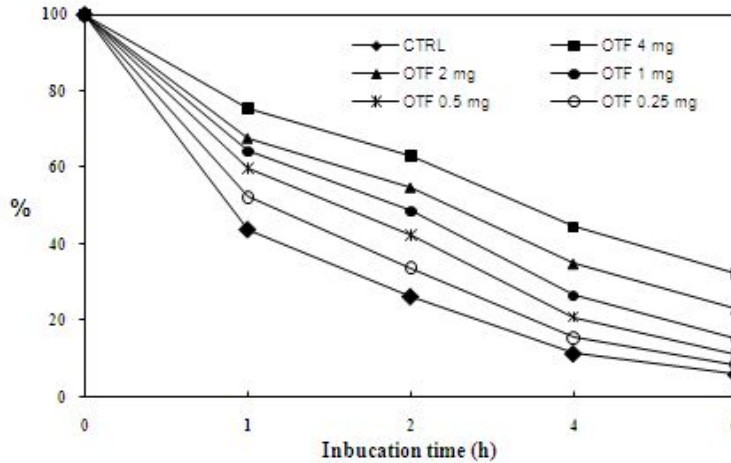


Fig. 2. β -Carotene assay를 통한 ovotransferrin의 항산화능.

두 가지 실험을 통해 ovotransferrin은 미약하지만 항산화 효과를 가지는 것을 알 수 있었고 이를 토대로 ovotransferrin 가수분해물 역시 추가적인 실험을 통해 항산화 효과를 검증할 것이다. 현재 이는 제 2협동과제팀인 경남대학교에서 본 실험과 유사하게 ovotransferrin 및 ovotransferrin 가수분해물의 항산화 효과를 검증하였으며 이는 본 세부과제 연구팀이 검증한 결과와 유사한 결과를 보였다.

(2) Ovotransferrin의 항균효과

Ovotransferrin 및 ovotransferrin 가수분해물의 항균효과는 *Listeria monocytogenes*, *Bacillus cereus*, *Escherichia coli* O157:H7, *Helicobacter pylori* 등을 이용하여 검증하였다. 우선 well diffusion method (Voidarou *et al.*, 2011)를 통해 스크리닝 단계를 거친 후 활성 여부를 판단하였고 효과가 있다고 판단되는 균주에 대해서는 시간 별 균수 변화를 측정하였다. 실험에는 대조구인 ovotransferrin 이외에 13종의 효소 가수분해물을 이용하였다.

Table 1. Well diffusion method법을 이용한 *Listeria monocytogenes* 와 *Helicobacter pylori* 균의 생육저해효과 활성 검증

• <i>Listeria monocytogenes</i>			
	OTF 80 mg	OTF 40 mg	OTF 20 mg
LM2	1.28	1.28	1.28
LM4	1.43	1.40	1.25
LM5	1.25	1.20	1.15
• <i>Helicobacter pylori</i>			
	OTF 80 mg	OTF 60 mg	OTF 40 mg
<i>H. pylori</i> 26695	1.43	1.26	1.05
<i>H. pylori</i> 52	1.55	1.41	1.21

스크리닝을 통해 그람음성균인 *Escherichia coli* O157:H7 균에서는 항균효과를 관찰 할 수 없었고, 그람 양성균인 *Listeria monocytogenes*, *Bacillus cereus*에서 생육 저해환을 관찰할 수 있었다. 또한 식품유래 식중독 균은 아니지만 최근 문제가 많이 되고 있는 *Helicobacter pylori* 균에서도 생육 저해환을 관찰할 수 있었다. Table 1에는 ovotransferrin의 *Listeria monocytogenes* 와 *Helicobacter pylori*에 대한 생육 저해환을 나타낸 결과로 ovotransferrin을 20~80 mg 처리했을 시 뚜렷한 생육 저해환을 보이는 것을 알 수 있었다. 반면 well diffusion method 실험에서는 13종의 효소 가수분해물에서 모두 뚜렷한 생육 저해환을 관찰할 수 없었지만 시간별 생균수 측정에서는 protamex 효소로 가수분해한 샘플에서 control과 비교구인 ovotransferrin에 비해 생육저해를 받는다는 것을 알 수 있었다.

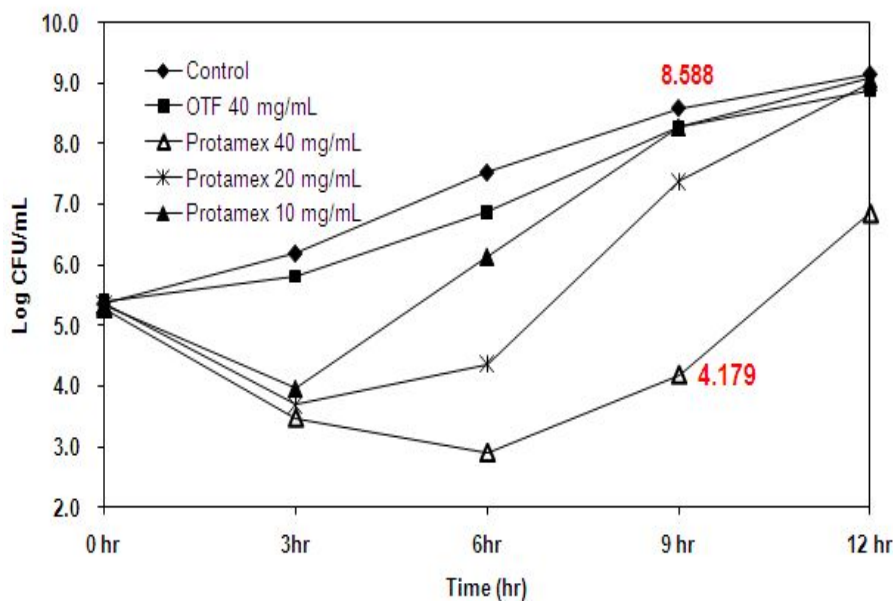


Fig. 3. BHI broth 상에서 ovotransferrin과 그 가수분해물이 *Listeria monocytogenes*의 생존에 미치는 영향.

Fig. 3에 언급되어 있듯이 *Listeria monocytogenes* 식중독 균에 ovotransferrin 및 ovotransferrin 가수분해물인 (OTH-Protamex)을 처리했을 시 생균수 변화를 관찰하였다. 특히 배양 9시간째에는 아무것도 처리하지 않은 control의 균수가 Log 8.6 CFU/mL 까지 증가한 것에 비해 40 mg/mL의 OTH-Protamex를 처리했을 시 균수가 Log 4.2 CFU/mL 정도로 약 4 log 정도 균수가 감소되는 것을 알 수 있었다. 하지만 이런 OTH-Protamex의 생육 저해효과는 12시간 이후부터 효과가 미흡해지는 것을 알 수 있었다. 그렇기 때문에 추가적인 실험을 통해 ovotransferrin 가수분해물의 항균활성을 유지시킬 수 있는 방법을 모색해야 할 것이다.

나. Ovotransferrin에서 면역증강 및 항암효과를 가지는 생리활성 가수분해물의 선별적인 제조

예비실험을 통해 얻은 기초적인 자료를 토대로 시약용으로 판매되는 순도가 높은 효소뿐만 아니라 식품에 이용이 가능한 산업용 효소를 기준으로 가수분해를 실시하였고, 약산 조건에서도 가수분해를 실시하였다. 사용된 효소 및 구입처는 Table 2에 제시하였다.

Table 2. 가수분해에 사용되는 효소 및 구입처

효소	구입처
Protamex	Novozymes Co.
Alcalase	Novozymes Co.
Trypsin	Bision Co.
Pepsin	Novozymes Co.
Neutrase	Novozymes Co.
Flavorzyme	Novozymes Co.
α -Chymotrypsin	Bision Co.
Collupulin	Bision Co.
Protex 6L	Bision Co.
Promod	Bision Co.
Protease S	Sigma Chemical Co.
Protease A	Sigma Chemical Co.
Protease M	Sigma Chemical Co.

Ovotransferrin의 가수분해물 제조는 기질 (ovotransferrin)과 효소의 증량비를 25:1로 혼합하여 45℃에서 3시간 반응 후 100℃에서 10분 동안 가열하여 효소를 불활성화 시켜 반응 정지하였다. 실험에 이용된 효소 중 pepsin을 제외한 모든 효소는 pH 7.0으로 조절하였으며, pepsin의 경우 pH 2.5로 조절하여 반응시킨 후 반응정지 전에 암모늄 수용액으로 pH 7.0으로 중화시켜 사용하였다. 약산분해의 경우 0.03 N HCl에 녹여, 100℃, 150분 간 반응시킨 후, 암모늄수용액으로 pH 7.0으로 중화시켰다. 이들 가수분해 용액은 원심분리 (1,900×g, 20 min)하여 상층액을 동결 건조하여 실험에 사용하였다.

가수분해 결과로 생성된 가수분해물의 수율은 약 70-80%정도 달하였으며 초기 small scale에서 나타나는 loss에 의해 수율이 낮아졌다고 생각되어진다.

다. Ovotransferrin 및 ovotranferrin 가수분해물의 종양세포에 대한 세포독성 확인

(1) 세포주 및 배양

Ovotransferrin의 인체 암세포 성장억제 실험을 위해 한국세포주 은행 (KCLB, Seoul)으로부터 7종류의 인간 유래 암세포주를 분양받아 사용하였다. 실험에 사용된 종양세포는 총 6종으로 후두암 세포인 Hep-2, 위암 세포인 AGS, 폐암 세포인 SK-MES-1, 폐암 세포인 A-549, 간암 세포인 HepG-2, 자궁암 세포인 MCF-7, 유방암 세포인 HeLa 등이 사용되었다.

세포 배양을 위해 RPMI 1640 medium, DMEM medium 및 MEM medium에 10% FBS (fetal bovine serum), 100 unit/mL의 penicillin, 100 μ g/mL의 streptomycin을 첨가하여 사용하였고, 95%의 습도가 유지되는 37°C, 5% CO₂ incubator (MCO-18AIC, SANYO, Osaka, Japan)에서 배양하였다.

(2) MTT 분석을 통한 세포 생존율 측정- Ovotransferrin

Ovotransferrin의 세포독성 효과를 측정하기 위하여 MTT assay를 실시하였다 (Park *et al.*, 1999; Collier *et al.*, 2003). MTT assay의 원리는 살아있는 세포 내에서 에너지를 공급하는 미토콘드리아에 MTT 시약을 처리하게 되면, 미토콘드리아의 reductase에 의해 환원되어 formazan을 형성하게 되고, 죽어있는 세포는 이미 미토콘드리아가 손상되어 있기 때문에, 이 formazan이 형성되지 않는 원리를 이용하여, ovotransferrin 및 ovotransferrin 가수분해물을 농도별로 처리하여, 세포에 독성이 나타나는지를 확인하였다. 세포내 생성된 formazan의 양은 ELISA reader (model 680, BioRad, USA)를 이용하여 570 nm에서 흡광도로 측정되며

$$\text{MTT assay 는 } \left\{ 1 - \left(\frac{\text{OD of treated cells}}{\text{OD of control cells}} \right) \right\} \times 100 \text{ 을 계산하여}$$

% 저해율로 나타내어, 저해율이 50% 이상인 경우에 종양 세포 증식 억제효과가 있다고 판정하였다.

먼저 비교군으로 이용된 ovotransferrin 자체의 암세포 성장억제 효과는 Fig. 4에 나타내었다. 연구에는 6가지의 암세포를 사용하였으며 ovotransferrin의 농도는 40 mg/mL부터 순차적으로 희석하여 사용하였다. 실험 결과 6가지 암세포에서 미흡하지만 세포 성장억제 효과가 관찰되었다. 상대적으로 낮은 농도인 2.5, 5, 10 mg/mL 처리군에서는 50%이하의 효과를 보였다. 이는 정상 대조군과 유의한 차이가 나타나지 않았다는 것을 의미한다. 하지만 암세포에 40 mg/mL ovotransferrin을 처리했을 시에는 간암세포인 HepG-2 세포를 제외한 암세포에서 60%이상의 효과를 나타내었으며 이 결과로 계란 난백에서 추출한 ovotransferrin을 암

세포에 처리했을 시 대부분의 암세포에 대해 40 mg/mL의 농도 이상에서 성장억제 효과가 관찰됨을 알 수 있었다.

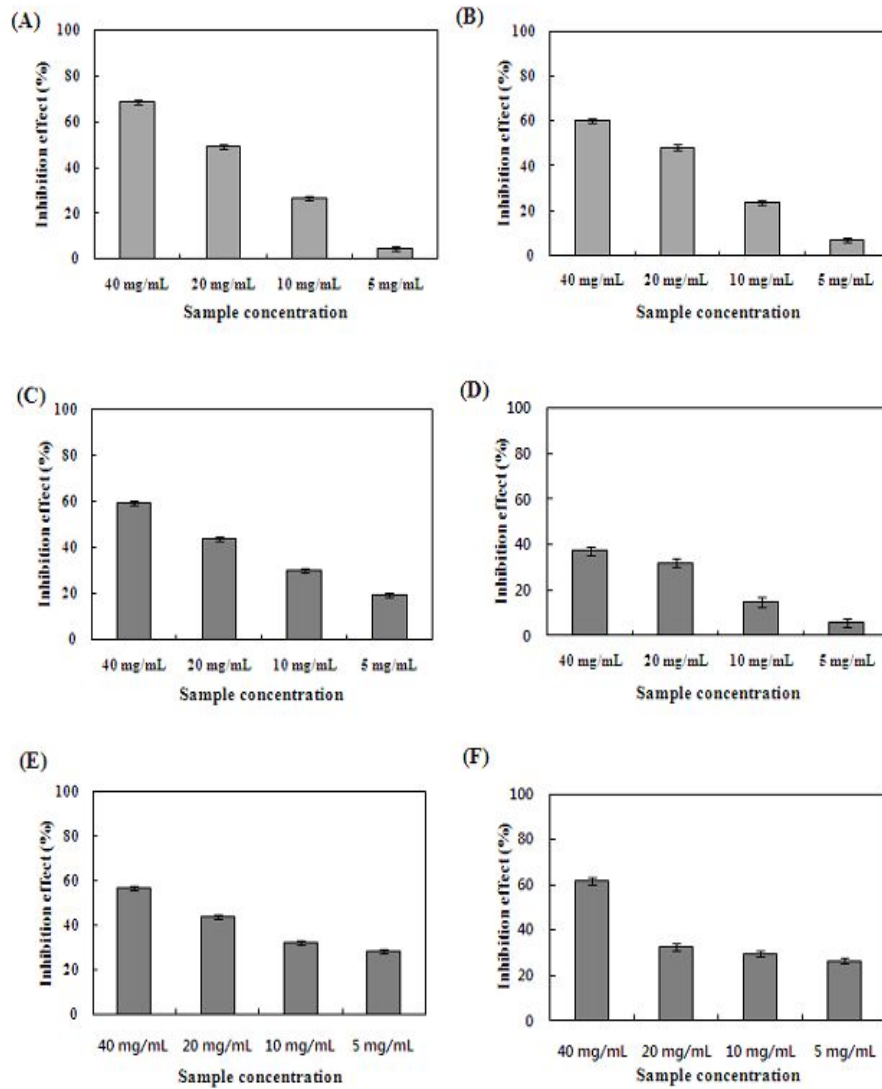


Fig. 4. Ovotransferrin의 암세포에 대한 세포독성. (A) Hep-2 cells, (B) AGS cells, (C) SK-MES-1 cells, (D) HepG-2 cells, (E) MCF-7 cells, (F) HeLa cells.

(3) MTT 분석을 통한 세포 생존율 측정 - Ovotransferrin 가수분해물

Table 3. Ovotransferrin 가수분해물의 암세포에 대한 세포독성

Sample (mg/mL)	Cells	Hep-2 후두암	AGS 위암	SK-ME S-1 폐암	A549 폐암	HepG-2 간암	HeLa 유방암	MCF-7 자궁암
OTF 2.5		-	-	0.56	-	-	34.24	19.88
OTF 5		4.39	6.65	19.48	17.61	5.55	26.31	28.45
OTF 10		26.72	23.60	30.12	46.57	14.72	29.54	32.05

OTF 20	49.37	48.33	44.02	41.67	31.99	32.47	44.08
OTF 40	68.70	60.42	59.64	47.62	37.20	61.71	56.84
Trypsin 2.5	27.65	17.36	35.30	32.03	16.54	19.97	0.82
Trypsin 5	29.95	15.14	41.81	39.09	36.41	55.32	–
Trypsin 10	59.60	95.42	62.33	37.88	68.07	92.09	51.47
Trypsin 20	96.72	98.27	98.69	81.63	82.88	94.68	93.84
Trypsin 40	99.51	98.59	99.30	93.83	87.54	93.71	95.82
Protamex 2.5	38.03	34.66	25.98	33.22	3.96	34.07	7.90
Protamex 5	59.15	47.50	35.46	43.41	29.52	37.32	1.74
Protamex 10	84.97	97.09	71.08	78.52	68.53	61.33	24.69
Protamex 20	97.28	97.58	94.82	94.92	89.12	93.22	40.85
Protamex 40	99.33	34.28	99.12	98.37	91.56	94.51	96.06
Neutrase 2.5	3.09	35.35	2.83	6.72	3.41	33.86	4.32
Neutrase 5	3.31	53.97	17.49	10.47	14.90	93.18	7.75
Neutrase 10	39.66	82.67	45.74	57.63	53.60	93.03	45.29
Neutrase 20	51.39	96.80	96.77	92.07	90.52	91.66	85.77
Neutrase 40	99.29	98.22	99.08	97.56	92.96	92.60	96.14
Flavorzyme 2.5	13.97	26.60	13.94	11.08	–	4.90	14.01
Flavorzyme 5	13.23	38.51	23.39	18.50	20.66	32.38	26.28
Flavorzyme 10	72.07	79.45	59.02	71.24	58.65	94.16	61.50
Flavorzyme 20	84.27	97.81	97.95	94.35	87.23	94.76	95.36
Flavorzyme 40	99.20	98.70	99.10	98.59	93.60	96.04	96.11
α -Chymotrypsin 2.5	8.16	46.11	24.10	2.02	16.30	–	8.62
α -Chymotrypsin 5	27.03	89.32	16.35	7.71	14.53	34.27	23.86
α -Chymotrypsin 10	72.46	67.27	46.85	55.39	51.19	61.99	38.72
α -Chymotrypsin 20	70.19	94.33	90.56	83.56	80.47	94.29	70.89
α -Chymotrypsin 40	98.83	96.40	98.33	97.44	91.01	92.69	95.75
Acid 2.5	25.93	35.95	3.53	8.01	32.33	7.27	24.88
Acid 5	33.60	52.04	20.20	27.05	48.48	39.82	32.29
Acid 10	63.94	63.76	32.71	50.34	56.83	67.34	49.42
Acid 20	67.72	72.83	57.29	68.96	87.96	96.54	59.71
Acid 40	96.46	95.60	97.77	96.65	92.90	97.18	88.53
Alcalase 2.5	6.73	21.73	13.82	–	20.90	34.70	14.54
Alcalase 5	20.79	29.39	18.25	–	17.28	44.19	19.03
Alcalase 10	63.11	75.42	39.84	43.53	52.93	80.12	23.99
Alcalase 20	69.69	96.55	94.20	89.47	90.22	93.40	95.19
Alcalase 40	99.92	97.73	97.89	92.60	91.07	94.85	96.06
Protex 2.5	31.08	27.92	24.12	13.21	27.85	25.10	20.39
Protex 5	43.20	55.70	48.88	40.89	55.55	57.74	28.74

Protex 10	62.34	86.87	87.69	66.24	78.37	94.64	54.40
Protex 20	88.63	98.85	98.67	93.14	90.43	95.70	96.01
Protex 40	98.71	99.37	99.00	98.37	89.18	96.56	96.62
Collupulin 2.5	20.74	7.25	9.50	22.07	-	16.01	8.74
Collupulin 5	30.38	38.86	63.17	39.43	42.44	33.77	22.10
Collupulin 10	57.09	87.16	51.65	65.37	88.70	95.40	43.24
Collupulin 20	90.24	99.19	97.11	91.69	93.24	93.10	95.70
Collupulin 40	98.93	99.48	99.44	98.75	92.96	96.37	96.01
Protease S 2.5	23.87	11.49	10.84	7.79	21.57	9.30	1.09
Protease S 5	35.04	32.27	13.55	13.36	46.47	31.25	8.33
Protease S 10	49.25	60.85	36.18	43.23	63.13	55.94	29.03
Protease S 20	75.80	85.49	87.17	74.77	82.94	94.21	76.14
Protease S 40	95.95	98.85	97.91	96.77	91.90	95.36	96.16
Protease A 2.5	3.84	27.89	15.44	14.24	2.80	18.11	-
Protease A 5	22.51	38.83	27.77	30.96	42.99	56.39	-
Protease A 10	48.15	80.02	43.69	58.33	65.63	95.43	14.40
Protease A 20	64.23	88.17	82.73	84.75	92.05	94.96	32.78
Protease A 40	99.87	98.96	98.92	97.96	92.93	94.81	96.43
Protease M 2.5	14.28	5.53	6.57	17.91	-	58.15	5.19
Protease M 5	16.30	30.11	17.05	48.87	8.50	28.73	15.68
Protease M 10	69.65	77.20	55.20	66.96	46.92	92.63	46.81
Protease M 20	63.75	91.80	87.07	96.01	89.27	94.76	93.33
Protease M 40	99.37	98.88	99.46	98.43	93.72	95.45	96.59

Ovotransferrin 가수분해물의 암세포 생존율 측정 실험은 MTT assay를 통해 검증하였다. 각 가수분해물에 대한 결과는 Table 3에 언급하였다.

결과를 보면 실험에 사용된 12종의 효소 가수분해물 모두 40 mg/mL 농도에서는 80% 이상의 효과를 관찰 할 수 있었다. 20 mg/mL의 농도를 기준으로 결과를 판단하였을 때 12종의 효소 가수분해물 모두에서 비슷한 효과를 보이는 것을 알 수 있었다. 본 결과를 토대로 효과가 뛰어난 몇 개의 샘플 만을 선택하여 향후 실험을 진행할 예정이었지만 대부분의 효소가수분해물의 효과가 비슷하게 검증되었기 때문에 효소의 가격 및 이용 용이성 등을 고려하여 우선적으로 trypsin, protamex, flavorzyme, protex 6L의 효소 가수분해물을 선택하여 향후 실험을 진행할 것이다.

Fig. 5에는 선택된 가수분해물의 암세포 생육저해 효과를 그래프로 나타내었다. 각 효소 가수분해 별로 유의적 효과를 보이지 않는 암세포가 있긴 하지만 대체적으로 비슷한 세포독성 효과를 보이는 것을 알 수 있었다.

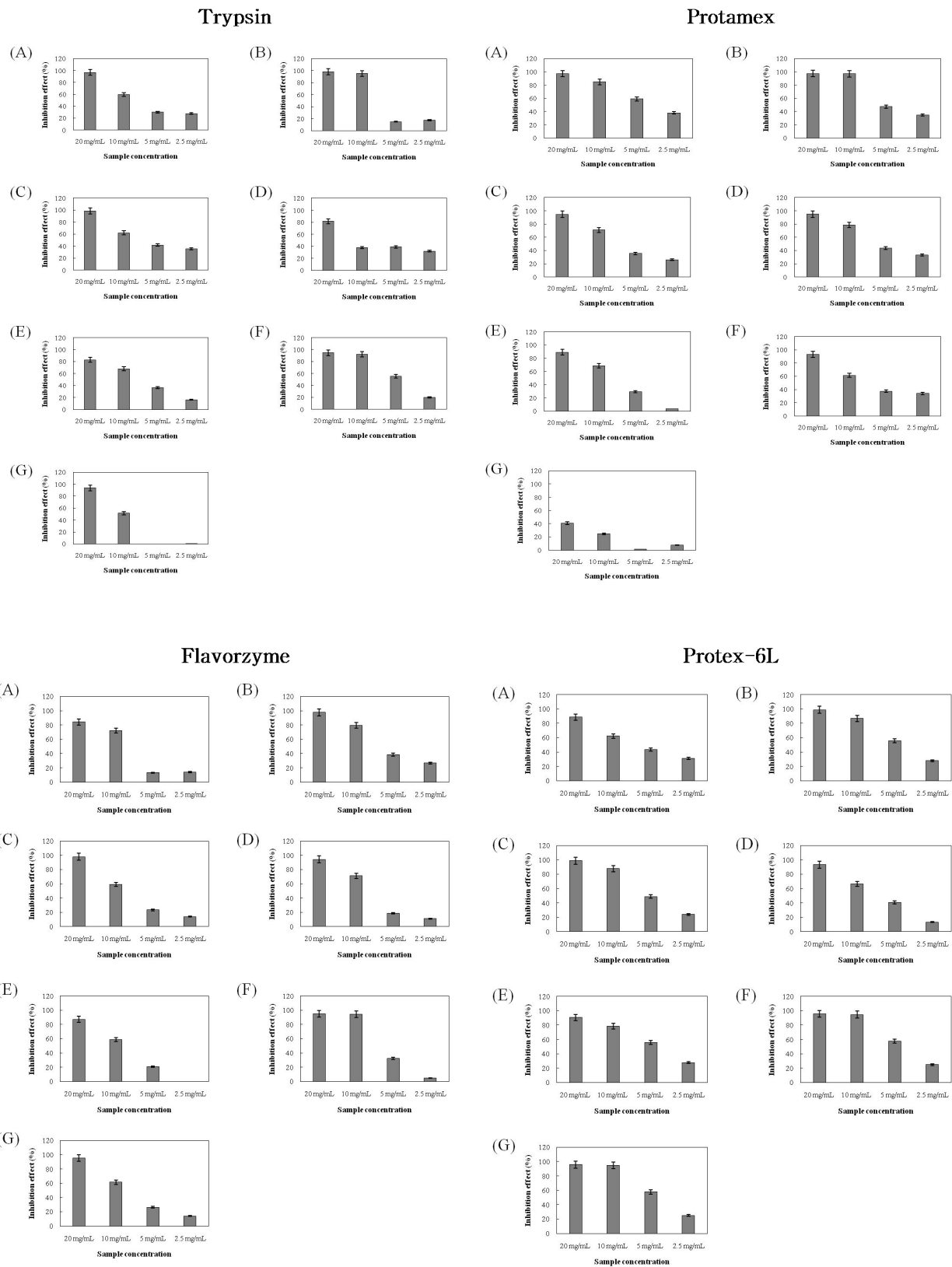


Fig. 5. Ovotransferrin–Trypsin, Protamex 가수분해물의 세포독성 효과. (A) Hep-2 cells, (B) AGS cells, (C) SK-MES-1 cells, (D) A 549 cells, (E) HepG-2 cells, (F) MCF-7 cells, (G) HeLa cells.

라. Ovotransferrin 가수분해물의 최적 조건 방법 모색

1차년도 본 세부과제 연구팀의 목표는 면역증강 및 항암효과를 가지는 ovotransferrin 가수분해물의 선별적 제조 및 효율적인 생산 조건을 찾는 것이다. 현재 효소를 이용한 ovotransferrin의 가수분해 제조방법은 확립이 된 상태이며 이를 이용한 항암효과 검증 방법 역시 마련된 상태이다.

하지만 처음 예상했던 결과에 비해 ovotransferrin 가수분해물의 효과가 미흡하다고 판단되어 본 연구팀은 각 협동 과제팀과의 회의를 통해 계획했던 가수분해 방법 외에 다른 방법 역시 추가로 찾아 예비 실험을 실시하기로 결정하였다.

초기 계획에는 가수분해에 이용되는 효소를 단독으로 처리하는 방법 만을 선택하였지만 그 결과가 만족스럽지 못하기 때문에 지금까지 결과를 토대로 선택된 4가지의 효소 (trypsin, protamex, flavorzyme, protex 6L)를 기준으로 단독 처리가 아닌 두 개 혹은 3 가지의 효소를 동시에 처리하는 방법을 세팅 하였다.

마. Ovotransferrin 및 ovotransferrin 가수분해물의 Nitric oxide (NO) 활성 저하 효과

면역증강 효과를 검증하기 위한 기본적인 실험으로 Macrophage Raw 264.7 cells로부터 생성된 nitric oxide의 양을 측정하는 실험을 진행 하였다. 현재까지 Raw 264.7 cells의 배양 조건 및 배양방법을 셋업 하였으며 Raw 264.7 cells 내에서 염증을 유발시키는 LPS의 유효 농도를 찾았다. 현재 NO 활성 실험에 기초적 자료로 이용될 Raw 264.7 cells의 세포독성 실험을 통해 세포에 영향을 받지 않는 농도를 확인하였다. Raw 264.7 cells에 대한 ovotransferrin 및 ovotransferrin 가수분해물의 세포독성 결과는 Table 4에 나타내었다. 이 결과를 토대로 Flavorzyme, Protease M, Collupulin을 제외한 Raw 264.7 cells을 이용한 NO 활성 실험은 20 mg/mL 이하로 처리해야 된다는 것을 알았다.

Table 4. Ovotransferrin 및 ovotransferrin 가수분해물의 Raw 264.7 cells에 대한 세포독성 결과

Sample (mg/mL)	Cytotoxicity (%)
OTF 2.5	13.88
OTF 5	15.85
OTF 10	21.58
OTF 20	23.58
Trypsin 2.5	-
Trypsin 5	-
Trypsin 10	6.11
Trypsin 20	46.89
Protamex 2.5	-
Protamex 5	-

Protamex 10	–
Protamex 20	28.37
Neutrase 2.5	–
Neutrase 5	–
Neutrase 10	10.79
Neutrase 20	23.34
Flavorzyme 2.5	–
Flavorzyme 5	–
Flavorzyme 10	–
Flavorzyme 20	47.89
α -chymotrypsin 2.5	–
α -chymotrypsin 5	–
α -chymotrypsin 10	–
α -chymotrypsin 20	10.79
Acid 2.5	–
Acid 5	–
Acid 10	–
Acid 20	18.36
Alcalase 2.5	–
Alcalase 5	–
Alcalase 10	–
Alcalase 20	2.91
Protease S 2.5	–
Protease S 5	–
Protease S 10	–
Protease S 20	5.01
Protease A 2.5	–
Protease A 5	–
Protease A 10	–
Protease A 20	17.35
Protease M 2.5	–
Protease M 5	–
Protease M 10	–
Protease M 20	40.36
Protex 6L 2.5	–
Protex 6L 5	–
Protex 6L 10	15.36
Protex 6L 20	23.56
Collupulin 2.5	17.56
Collupulin 5	17.88
Collupulin 10	39.26
Collupulin 20	85.20
Promod 2.5	–
Promod 5	–
Promod 10	–
Promod 20	0.80

2. 계란 흰자로부터 ovotransferrin 추출방법 개발

가. Iron (Fe^{3+})이 ovotransferrin에 결합하는데 있어서의 pH의 영향

Iron (Fe^{3+})이 ovotransferrin과 결합하는데 있어서의 pH 변화로 희석된 계란 난백 중 holo-ovotransferrin의 분홍색 강도가 달라지는 것을 알 수 있었다. 그 color 강도를 흡광도로 측정된 결과 pH 7 과 9에서 높은 흡광도 값을 갖는 것으로 나타났다 (Ko and Ahn, 2008) (Fig. 6). 그러나 43% 에탄올 첨가에 의해 얻어진 holo-ovotransferrin이 함유된 상층액의 부피측정을 각각의 샘플에서 측정해 본 결과 pH 5, 6, 7에서 비교적 높게 나왔다 (Fig. 7). 그러므로 pH 9.0에서의 holo-ovotransferrin 추출보다는 계란 난백의 pH 7.0으로 조정 한 후 Fe^{3+} 첨가한다면 높은 수율의 ovotransferrin이 얻어질 것으로 기대되어졌다.

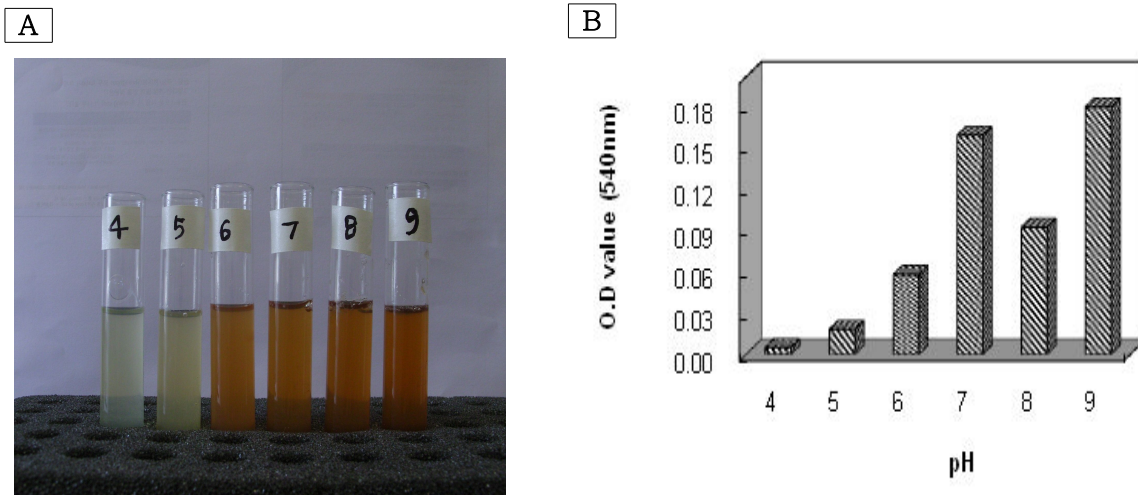


Fig. 6. 계란 난백의 pH 조건에 따른 ovotransferrin의 iron-binding capacity; (A) 시각적인 관찰, (B) 540 nm에서의 흡광도 값.

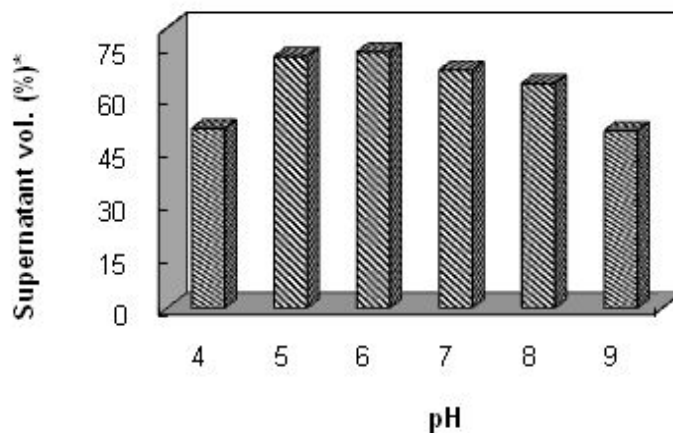


Fig. 7. 계란 난백의 pH 변화에 따른 holo-form ovotransferrin이 함유된 상층액 부피변화.
*상층액은 iron-saturated 달걀흰자액에 43% 에탄올 침전에 의해 얻어짐.

나. Iron (Fe^{3+})이 ovotransferrin에 결합하는데 있어서의 NaCl의 영향

NaCl은 ovotransferrin의 iron-binding capacity를 개선한다고 보고 되어 있어서 계란 난백에 각각의 다른 NaCl를 첨가한 후 FeCl_3 첨가하여 iron-saturated egg white 용액을 만든 다음, 그 용액에 43%의 에탄올을 첨가하여 holo-ovotransferrin을 분리해내었다.

각각의 용액의 흡광도를 측정한 결과 대조군에 비해 0.1% NaCl이 첨가된 달걀 난백샘플이 가장 높은 흡광도를 나타내는 것으로 밝혀져 이러한 농도의 NaCl이 ovotransferrin의 iron-binding capacity를 증진시키는 것으로 짐작할 수 있었다.

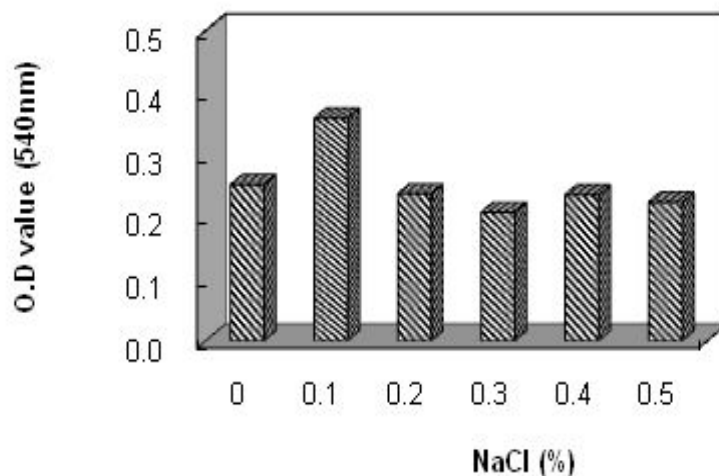


Fig. 8. 계란 난백에 첨가된 NaCl 농도의 변화에 따른 ovotransferrin의 iron-binding capacity.

다. 저장 온도에 따른 ovotransferrin의 iron-binding capacity

희석된 계란 난백을 블렌더를 사용하여 믹싱한 후, 실온과 냉장고에 샘플을 저장하여 일정시간이 지난 뒤에 충분한 양의 FeCl_3 을 첨가하여 iron-saturated egg white 용액을 만들었고, 위의 방법과 동일한 방법으로 에탄올을 첨가하여 holo-ovotransferrin을 추출하였다.

그 결과, 계란 난백을 24시간 저장한 후 FeCl_3 첨가한 것이 가장 높은 흡광도를 나타내어 바로 처리한 샘플보다는 일정시간 난백액을 저장한 후 Fe^{3+} 를 첨가하는 것이 ovotransferrin의 iron-binding capacity를 증진시키는 것을 짐작할 수 있었고, 저장 온도에 의한 영향에 있어서는 기대했던 대로 실온보다는 냉장온도에서 저장했던 샘플이 더 높은 흡광도를 나타냄으로써 iron-binding capacity는 저장온도에 의해 영향을 받는 것으로 추정할 수 있었다.

Table 5. 희석된 계란 난백의 저장온도에 따른 FeCl₃가 첨가된 계란 난백의 흡광도 변화

Storage time (hr)	Temperature	
	4°C	20°C
0	0.22 ± 0.03	0.22 ± 0.03
2.5	0.42 ± 0.12	0.34 ± 0.05
24	0.56 ± 0.01	0.51 ± 0.05

라. 계란 난백으로부터 ovotransferrin의 분리 및 침전에 요구되어지는 최적의 에탄올 농도

희석된 계란 난백에 다량의 ovoalbumin를 포함하여 다양한 단백질이 포함되어져 있다. 이러한 단백질로부터 ovotransferrin을 분리하기 위해 에탄올을 사용하였다. 에탄올에 의한 ovotransferrin의 변성을 줄이고자 FeCl₃를 첨가하여 holo-ovotransferrin을 만든 후 에탄올 첨가하였다.

실험결과, Fig. 9에서 보는 바와 같이 43%와 50%의 에탄올을 사용했을 경우 ovoalbumin을 포함한 난백 단백질이 침전이 되는 것을 알 수 있었다. 일부의 ovotransferrin도 그러한 에탄올의 농도에서 침전되었지만 재추출을 통해 침전된 ovotransferrin은 회수할 수 있었다. 그러므로 다양한 난백 단백질로부터 ovotransferrin을 추출하기 위해 적정의 에탄올 농도를 43%으로 결정하였다.

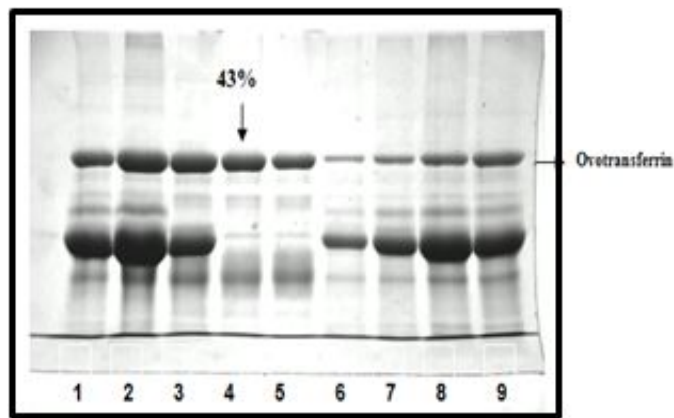


Fig. 9. Iron-saturated 계란 난백으로부터 holo-form ovotransferrin 분리를 위한 최적의 에탄올 농도. Lane 1: 2x 희석된 계란 난백, lanes 2-5: iron saturated 계란 난백에 20, 33, 43, or 50% of 에탄올 첨가 후 얻어진 상층액, lanes 6-9: 20, 33, 43, and 50%의 에탄올에 의한 침전물.

또한, holo-ovotransferrin를 추출한 후, 이 단백질을 침전하기 위해 요구되어지는 적정의 에탄올을 결정하는 실험을 수행하였다. 그 결과 Fig. 10에서 보이는 바와 같이 62%의 에탄올을 첨가 시에 거의 모든 holo-ovotransferrin이 회수되어지는 것을 볼 수 있었고, 59%의 에탄올 첨가 시에는 약간의 holo-ovotransferrin이 상층액에 남아있긴 하였으나 62%보다는 59%를 사용하였을 때 침전물에 ovotransferrin이외의 다른 단백질이 함유되어져 purity가 낮

아질 수 있기 때문에 holo-ovotransferrin을 침전시키기 위해 요구되어지는 적정의 농도를 59%로 결정하였다. 이러한 얻어진 실험의 데이터를 바탕으로 실제적으로 에탄올에 의한 holo-ovotransferrin의 추출 및 침전이 어떻게 이루어지는 지 또한 침전된 holo-ovotransferrin이 물에 용해된 상태를 Fig. 11에서 나타내었다.

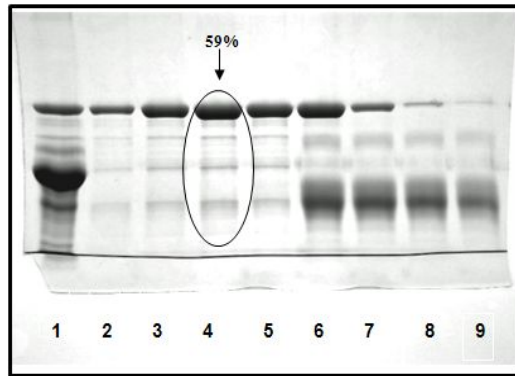


Fig. 10. 43% 에탄올 첨가에 의해 분리된 holo-form ovotransferrin의 침전을 위해 요구되어지는 최적의 에탄올 농도. Lane 1: 2× 희석된 계란 난백, lanes 2-5: 43%의 에탄올 첨가에 의해 얻어진 상층액에 53%, 56%, 59%, or 62%의 에탄올 첨가 후 얻어진 침전물, lanes 6-9: 53%, 56%, 59%, or 62%의 에탄올 첨가 후 얻어진 상층액.

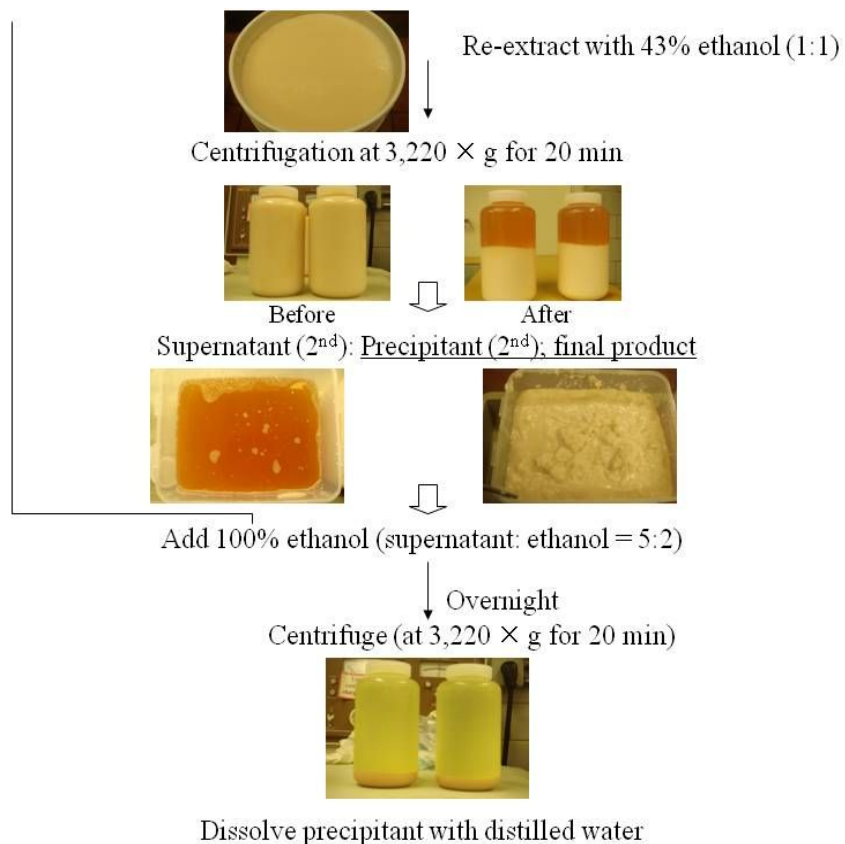


Fig. 11. 에탄올에 의한 holo-ovotransferrin 추출, 침전 및 용해.

마. pH 조건 및 저장온도에 따른 iron-bound ovotransferrin의 안정성 측정

에탄올 첨가에 의해 holo-ovotransferrin을 침전 후 5배의 해당하는 증류수를 첨가하여 현탁액을 만들었다 (Fig. 12(A)). 이 현탁액은 완전히 용해된 형태가 아니기 때문에 원심분리를 했을 경우 Fig. 12(B)에서 보이는 바와 같이 약간의 침전물이 형성이 되어졌다. pH 변화에 따른 holo-ovotransferrin의 안정성을 평가한 결과 pH 4에서는 holo-ovotransferrin이 결합되었던 Fe^{3+} 이 떨어져 나가 apo-ovotransferrin을 형성함으로써 상층액과 침전물 색깔이 거의 탈색되어지는 것으로 나타났고, pH 6에서 많은 holo-ovotransferrin이 침전되어지는 것을 볼 수 있었다 (Fig. 12(B)).

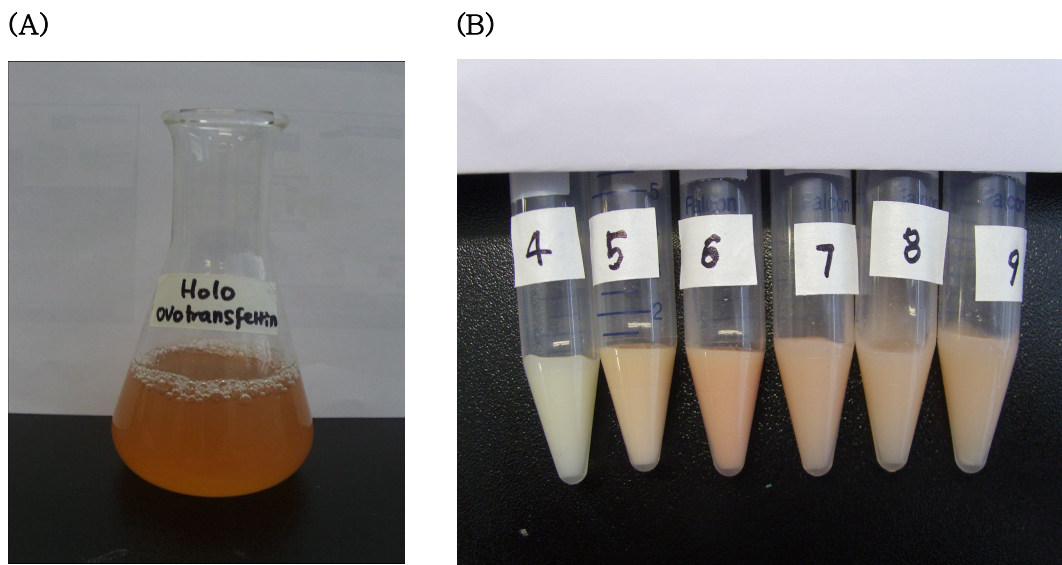


Fig. 12. 분리된 (A) holo-ovotransferrin 용액, (B) pH변화에 의한 holo-ovotransferrin용액으로부터 형성된 침전물.

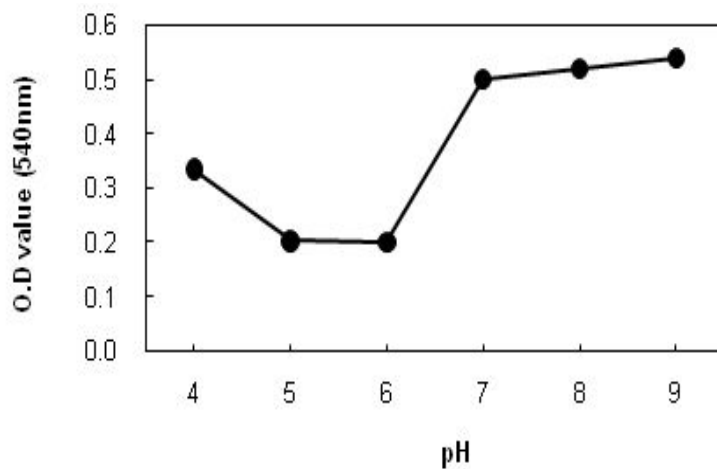


Fig. 13. pH 변화에 의한 holo-ovotransferrin stability 측정.

Holo-ovotransferrin 현탁액의 pH를 조정 한 후 원심분리하여 얻어진 상층액의 흡광도를 측정한 결과 pH 5와 6에서 가장 낮은 흡광도값을 나타내었으나 pH 7, 8, 9에서는 비교적 holo-ovotransferrin이 안정하게 유지되는 것을 볼 수 있었다 (Fig. 13). pH 5와 pH 6에서 보여진 흡광도 값이 pH 4보다 더 낮은 흡광도값을 보이는 이유는 위에서 설명했듯이 ovotransferrin의 pH가 6이기 때문에 holo-ovotransferrin이 이러한 pH조건에서 더 많이 침전되기 때문이라고 여겨졌다.

이 연구를 통해 holo-ovotransferrin 현탁액은 pH의 변화에 민감함을 알 수 있었고, 침전된 holo-ovotransferrin이 증류수에 완전히 용해되기 위해 holo-ovotransferrin 용액의 solubility 개선을 위한 연구가 차후 진행되어져야한다고 생각한다.

또한, 저장온도와 저장시간에 의한 holo-ovotransferrin의 안정성을 평가하는 연구에 있어서는 holo-ovotransferrin 용액을 실온과 냉장온도에서 저장하고 일정시간 경과한 후 540 nm에서 흡광도를 측정함으로써 평가하였다. 저장시간이 경과함에 따라 holo-ovotransferrin의 흡광도값은 점차적으로 감소되어지는 것을 볼 수 있었고 냉장온도보다 실온에 방치한 holo-ovotransferrin 현탁액이 더 큰 감소를 보였다 (Table 6). 이러한 연구결과에 의해 holo-ovotransferrin은 저장시간이 경과하면서 서서히 변성되어지는 것으로 추측되어졌으나 냉장온도에서 저장 시 이러한 변성을 크게 줄일 수 있음을 알 수 있었다.

Table 6. Holo-ovotransferrin의 저장온도 및 저장시간에 따른 흡광도 변화

Storage time (hr)	Temperature	
	4° C	20° C
0	0.63 ± 0.05	0.63 ± 0.05
15	0.56 ± 0.04	0.42 ± 0.01
20	0.54 ± 0.01	0.41 ± 0.01

바. Ovotransferrin을 침전을 위한 최적의 ammonium sulfate와 acetic acid의 농도

선행 연구를 통해 에탄올에 의한 계란 난백으로부터 ovotransferrin을 분리하는 방법이 수립되어졌다. 이 에탄올을 이용한 분리방법은 매우 간단하고 신속하게 ovotransferrin을 분리해 낼 수 있지만, ovotransferrin 이외의 난백 단백질들이 에탄올에 의한 변성되어짐으로써 다른 단백질의 이용가치가 현저히 떨어지게 된다. 이러한 문제점들을 개선하여 ovotransferrin 및 다양한 달걀 난백의 단백질을 동시에 분리할 목적으로 ammonium sulfate와 acetic acid 첨가에 의한 분리 정제에 관한 연구를 수행하였다 (Fraenkel-Conart and Feeney, 1950).

(1) Ammonium sulfate 농도 선정

Ovoalbumin과 ovotransferrin의 분리에 요구되어지는 적정의 ammonium sulfate의 농도를 결정하기 위한 연구에 있어서는 mucin-free egg white 용액에 FeCl₃로 포화시켜

holo-ovotransferrin이 함유된 FeCl_3 로 포화시켜 holo-ovotransferrin이 함유된 mucin-free egg white 용액을 만든 뒤, 여기에 5%, 7.5%, 10%의 ammonium sulfate 첨가 및 10% acetic acid를 재첨가한 다음 냉장온도에서 그 용액을 24시간 방치한 후 원심분리 하였다.

그 상층액과 침전물을 전기 영동한 결과 Fig. 14에서 보이는 바와 같이 첨가된 ammonium sulfate 농도가 증가할수록 상층액에 함유되어지는 ovoalbumin 양이 많아지는 것을 알 수 있었고, holo-ovotransferrin은 사용된 모든 농도에서는 전부 침전되는 것을 알 수 있었다. 그러므로 계란 난백 단백질의 50%정도를 차지하고 있는 ovoalbumin을 좀 더 많이 분리해내기 위해 10%의 ammonium sulfate가 적절하다고 사료되어졌다.

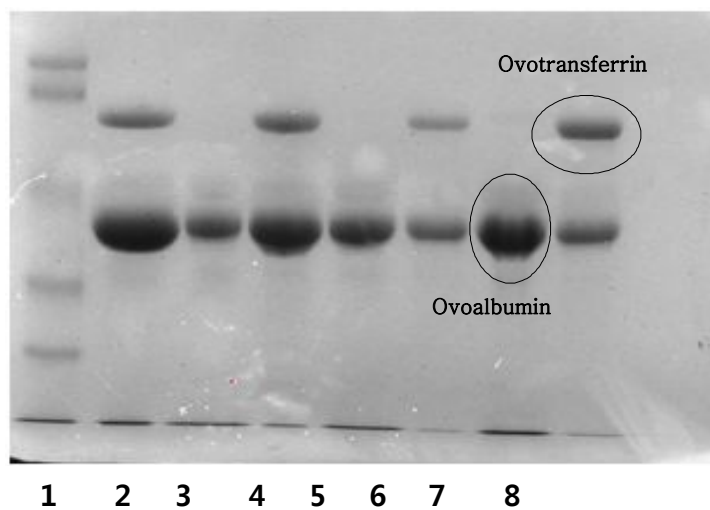


Fig. 14. Mucin-free 계란 난백으로부터 holo-form ovotransferrin 분리를 위한 10% acetic acid 첨가 및 최적의 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 농도. Lane 1: Marker, lane 2: 계란 난백, lanes 3, 5, 7: 5%, 7.5%, 10%의 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 첨가에 의해 얻어진 상층액 lanes 4, 6, 8 : 5%, 7.5%, 10%의 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 첨가에 의해 얻어진 침전물.

(2) Acetic acid 농도 선정

Ovotransferrin과 ovoalbumin 분리를 위해 ammonium sulfate 농도를 선정하기 위한 연구에서는 10% acetic acid를 사용하였다. 또한 분리과정에서 ovotransferrin의 변성을 막기 위해 위의 연구처럼 iron-saturated mucin-free egg white 용액을 만든 뒤 사용하였다.

이 연구에서는 acetic acid의 양을 줄이기 위해 2.5%와 5%를 사용하였고 동시에 ammonium sulfate 양을 10%와 12.5%를 첨가하여 위의 실험과 동일한 방법으로 수행하여 얻어진 상층액과 침전물을 가지고 전기영동을 수행하였다. SDS PAGE gel 상에서 보이는 단백질 밴드의 패턴을 살펴 본 결과, 이 실험에서 첨가된 용액 조합들은 거의 비슷한 단백질 밴드 패턴을 나타내었다 (Fig. 15).

2.5%의 acetic acid와 10% ammonium sulfate에 의해 순수한 ovoalbumin이 다량으로 확보되어졌고, 소량의 ovoalbumin과 거의 모든 holo-ovotransferrin은 침전되는 것으로 밝혀졌

다. 그러므로 ovoalbumin과 ovotransferrin의 분리를 위해 2.5%의 acetic acid가 적정하다고 여겼고, 최종적으로 얻어진 holo-ovotransferrin이 함유된 침전물은 증류수에 의해 완전히 용해되지 않아 holo-ovotransferrin 용액의 solubility 개선을 위한 연구가 필요하다고 여겨졌다.

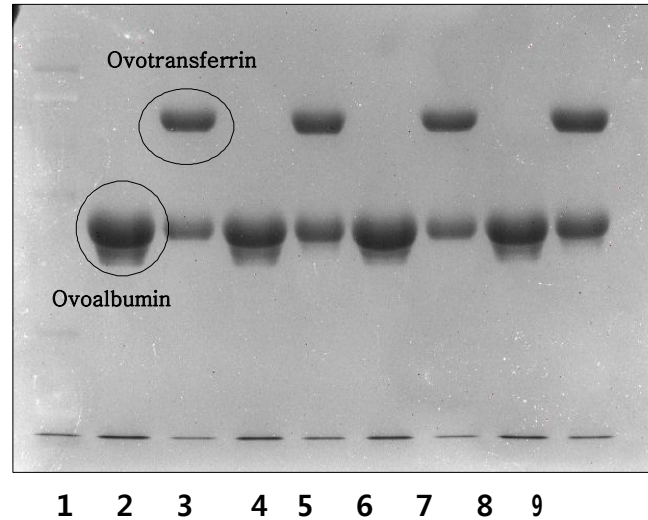


Fig. 15. Mucin-free 계란 난백으로부터 holo-form ovotransferrin 분리를 위한 최적의 acetic acid 농도 및 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 농도. Lanes 1-2: Marker, lanes 2-3: 10% $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (Am) + 2.5% acetic acid (Ac)에 의해 얻어진 상층액(2)과 침전물(3), lanes 4-5: 10% Am+ 5.0% Ac에 의해 얻어진 상층액과 침전물, lanes 6-7: 12.5% Am + 2.5% Ac에 의해 얻어진 상층액과 침전물, lanes 8-9: 12.5% Am + 5.0% Ac에 의해 얻어진 상층액과 침전물.

3. *In vitro* 실험을 통한 ovotransferrin 및 ovotransferrin 가수분해물의 면역증강 및 항암효과 검증에 대한 그 기전 구명 연구

가. Ovotransferrin과 그 가수분해물의 SOD-like activity

SOD (superoxide dismutase)는 세포내 활성산소를 과산화수소로 전환시키는 반응을 촉매하는 생체 내 항산화 효소로써 본 연구에서는 ovotransferrin과 그 가수분해물의 SOD 유사활성을 통해 superoxide 소거능 (Ibrahim *et al.*, 2007)을 측정하였다.

Fig. 16에 도시된 바와 같이 모든 가수분해물은 난백 유래 철 결합 단백질인 ovotransferrin에 비해 대략 3.2-13.5배 더 높은 superoxide anion 소거능을 보였으며 특히 protamex가수분해물이 가장 효과적인 것을 알 수 있었다.

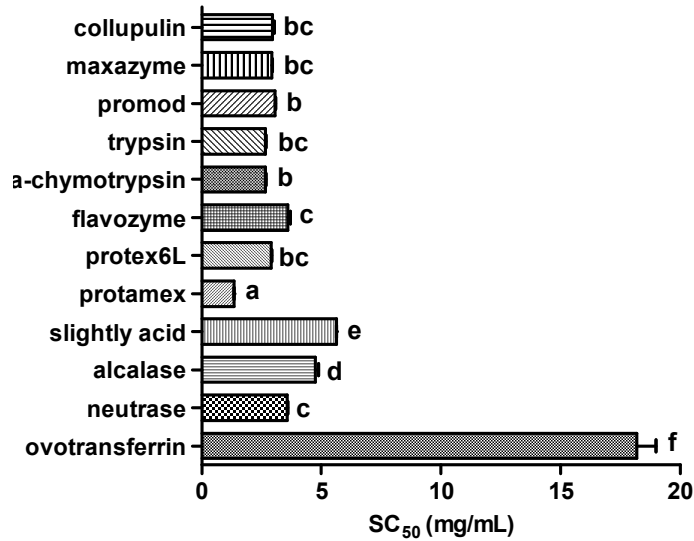


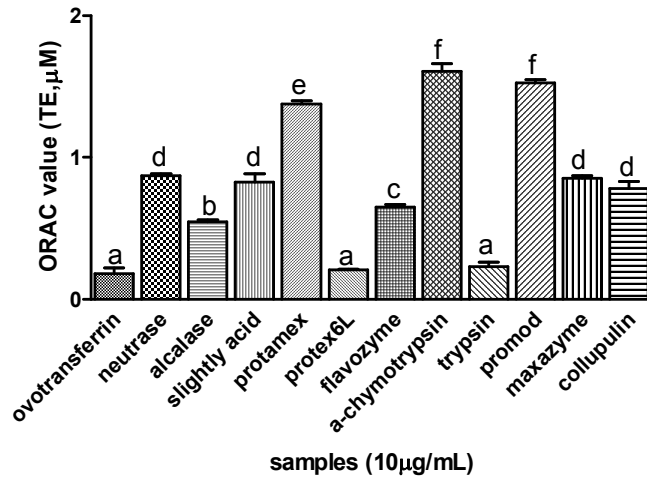
Fig. 16. Ovotransferrin과 그 가수분해물의 SOD-like activity. Values not sharing the same letter are significantly different from one another ($p < 0.05$). SC₅₀: concentration for scavenging 50% of radicals.

나. Ovotransferrin과 그 가수분해물의 peroxy 라디칼 소거능

ORAC assay는 라디칼은 식품 혹은 음료의 total antioxidant capacity (TAC)를 양적으로 측정하여 항산화 활성을 평가하는 도구로써, 2004년 항산화 작용의 표준화를 위한 세계학술대회에서 공식적으로 선정된 방법이다 (Kurihara *et al.*, 2004; Folch-Cano *et al.*, 2010).

본 연구에서 ovotransferrin 혹은 그 가수분해물의 peroxy 라디칼 제거 활성을 측정한 결과는 Fig. 17에 도시된 바와 같다. 10 $\mu\text{g/mL}$ 시료 (A)의 경우 protex 6L와 trypsin 가수분해물을 제외한 모든 가수분해물이 ovotransferrin에 비해 높은 ORAC value를 보였으며 특히 α -chymotrypsin과 promod 가수분해물은 각각 1.6, 1.5 μM TE (μM trolox equivalents)로 ovotransferrin 보다 9.0, 8.5 배 높은 값을 보였다.

(A)



(B)

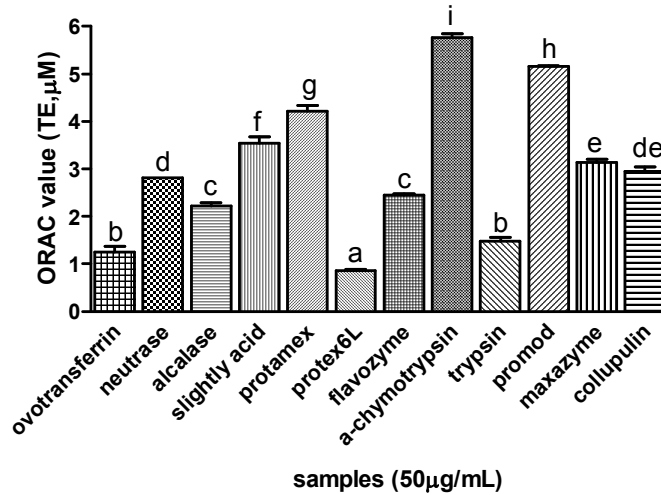


Fig. 17. Ovotransferrin과 그 가수분해물의 Peroxyl radical scavenging capacity ($\text{ORAC}_{\text{ROO}\cdot}$). ORAC values expressed as trolox equivalents (μM) according to the $10 \mu\text{g/mL}$ (A) and $50 \mu\text{g/mL}$ (B) samples. Values are mean with standard error. Values not sharing the same letter are significantly different from one another ($p < 0.05$) by Duncan's multiple range test.

다. Ovotransferrin과 그 가수분해물의 ABTS 라디칼 소거능

TRAP assay (Rice-Evans *et al.*, 1994; Park *et al.*, 2007)는 생성된 자유 라디칼을 얼마나 제거할 수 있는지에 기초를 둔 분석법으로 시료의 ABTS 라디칼을 소거하는 항산화능에 비례하여 absorbance가 억제되는 정도를 측정한다. Fig. 18에 도시된 바와 같이 모든 시료는 용매로 사용한 DMSO와 비교했을 때 월등한 ABTS 라디칼 소거능을 보여 ovotransferrin과 그 가수분해물의 항산화 효과를 확인할 수 있었다. Trypsin을 제외한 모든 가수분해물은 ovotransferrin 보다 높은 라디칼 소거능을 보였으며 약산 가수분해물이 가장 높은 (ovotransferrin의 1.0배) 효과를 보였다.

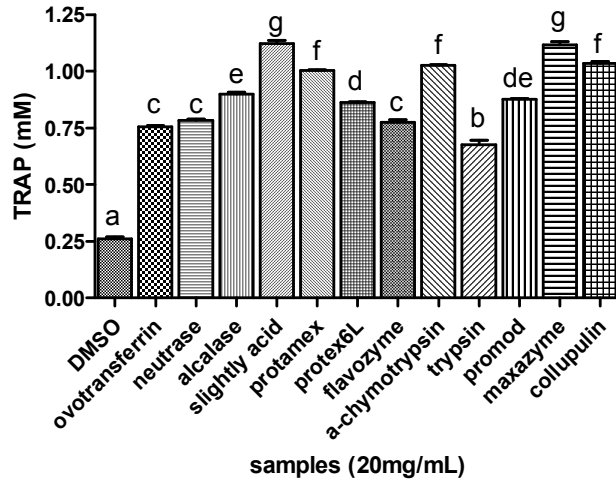
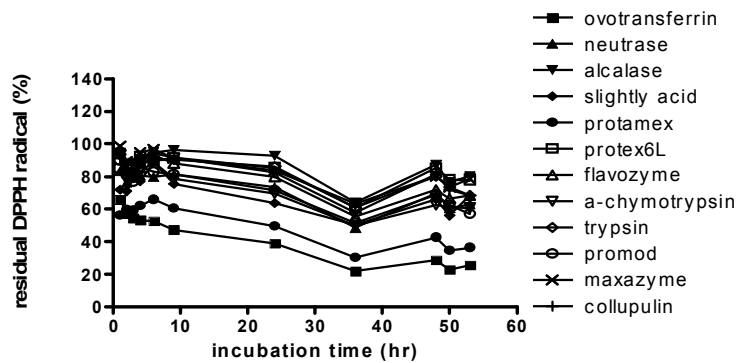


Fig. 18. Ovotransferrin과 그 가수분해물의 Total radical trapping antioxidant potential (TRAP) 능력. Values not sharing the same letter are significantly different from one another ($p < 0.05$) by Duncan's multiple range test. ED₅₀: estimation of median effective dose.

라. Ovotransferrin과 그 가수분해물의 DPPH 라디칼 소거능

DPPH assay는 비교적 안정한 화합물인 DPPH 라디칼이 항산화 활성이 있는 물질과 반응 시 전자를 내어주면서 라디칼이 소거되어 보라색에서 노란색으로 탈색되는 특성을 이용한 *in vitro* 항산화 측정법으로 본 연구에서 시료의 항산화능 측정을 위해 사용하였다. Fig. 19에 도시된 바와 같이, 반응 시간이 증가됨에 따라 점차적으로 DPPH 라디칼이 소거되는 것으로 나타났으며, 모든 시료에서 36시간째에 최대 소거능을 보였다. 특히, ovotransferrin의 36시간째 DPPH 라디칼 소거능은 78.2%로 가장 높게 나타났으며, 반면 alcalase (35.9%)와 maxazyme (36.7%) 가수분해물은 상대적으로 낮은 라디칼 소거능을 보여, superoxide (SOD)와 peroxy radical (ORAC) 소거능과는 다른 경향을 나타냄을 알 수 있었다.

(A)



(B)

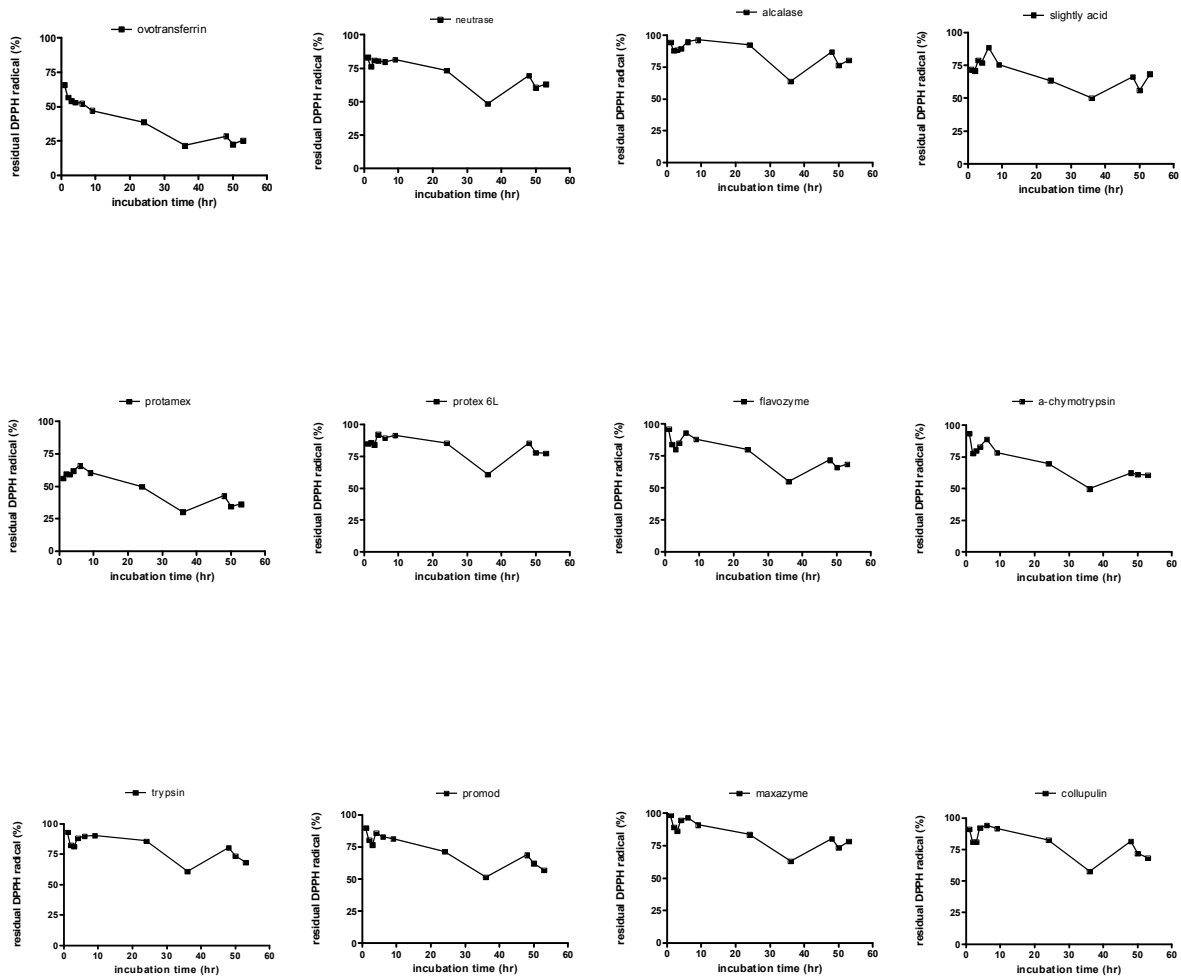


Fig. 19. Ovotransferrin과 그 가수분해물의 DPPH free radical 소거능. Values are mean with standard error. Values not sharing the same letter are significantly different from one another ($p < 0.05$) by Duncan's multiple range test.

마. Ovotransferrin과 그 가수분해물의 인체 백혈구 DNA 손상 억제 효과

암 발생의 전단계인 세포 내 DNA 손상도를 측정하는 방법인 comet assay는 단일 세포에서 DNA 손상 정도를 직접 측정할 수 있는 매우 유용한 연구 방법으로 *in vitro*, *in vivo* 연구 뿐 아니라 분자 역학적으로 광범위하게 사용된다 (Singh *et al.*, 1988; McKenna *et al.*, 2003). Ovotransferrin과 그 가수분해물은 인위적으로 산화적 스트레스를 유발한 인체 백혈구 DNA 손상을 유의하게 (34.6–53.3%) 감소시키는 것으로 나타나 항유전 독성 효과가 탁월함을 알 수 있었다. 한편, ovotransferrin보다 1.5배 강력한 항유전 독성 효과를 나타낸 약산 가수분해물을 제외한 모든 가수분해물은 ovotransferrin과 유의적인 차이를 보이지 않았다.

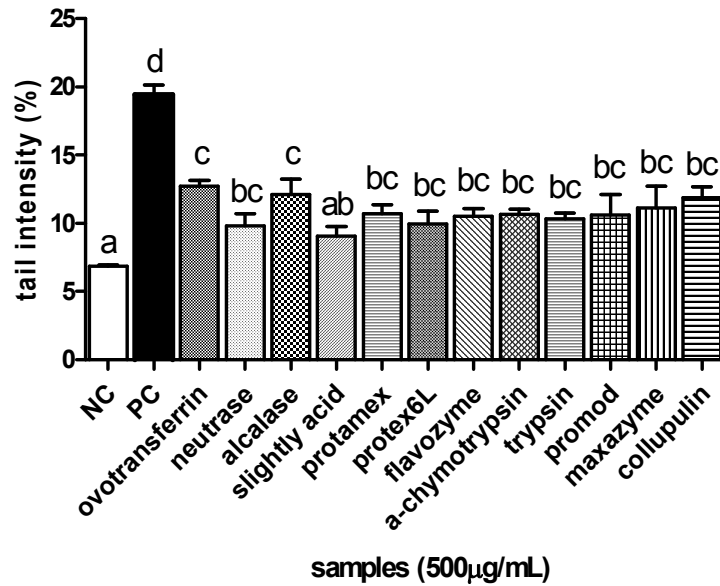


Fig. 20. Ovotransferrin과 그 가수분해물이 (500 µg/mL) 200 µM H₂O₂로 유도된 DNA 손상에 미치는 효과. Values not sharing the same letter are significantly different from one another ($p < 0.05$) by Duncan's multiple range test. NC, DMSO-treated normal control (without oxidative stimulus); PC, 200 µM H₂O₂ treated positive control.

바. Ovotransferrin의 암세포 성장 억제 효과

인체 대장암 세포주 HT-29 세포에서 ovotransferrin의 성장 억제 효과는 Fig. 21에 제시하였다. 본 연구에서 사용한 MTT reduction assay는 탈수소 효소에 의하여 노란색의 수용성 기질인 tetrazolium을 청자색의 비수용성 기질인 formazan (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenol-tetrazolium bromide) 으로 환원시키는 미토콘드리아의 능력을 이용하는 방법으로 아무것도 처리하지 않은 정상군에 대한 ovotransferrin 및 그 가수분해물의 농도 별 처리군을 비교하였다. Ovotransferrin을 비롯한 모든 가수분해물은 대조군에 비해 대장암 세포에 대해 성장억제 효과를 나타내었다. 그러나 ovotransferrin의 경우 상대적으로 높은 농도 (10, 20, 40 mg/mL)에서만 암세포 증식 억제 활성이 나타난 반면, 나머지 가수분해물들은 저농도에서도 활성이 나타나 여러 가지 효소 처리를 통한 가수분해물이 더 높은 항암활성을 나타내는 것을 알 수 있었다. 즉, 2.5 mg/mL에서 ovotransferrin (101.4%)의 경우 대조군과 유의적인 변화를 보이지 않은 반면 가수분해물들은 49.3-65.6%의 세포 독성을 나타냈으며, 특히 promod 가수분해물의 경우 ovotransferrin에 비해 2.1배 더 높은 항암 활성을 나타내는 것으로 나타났다.

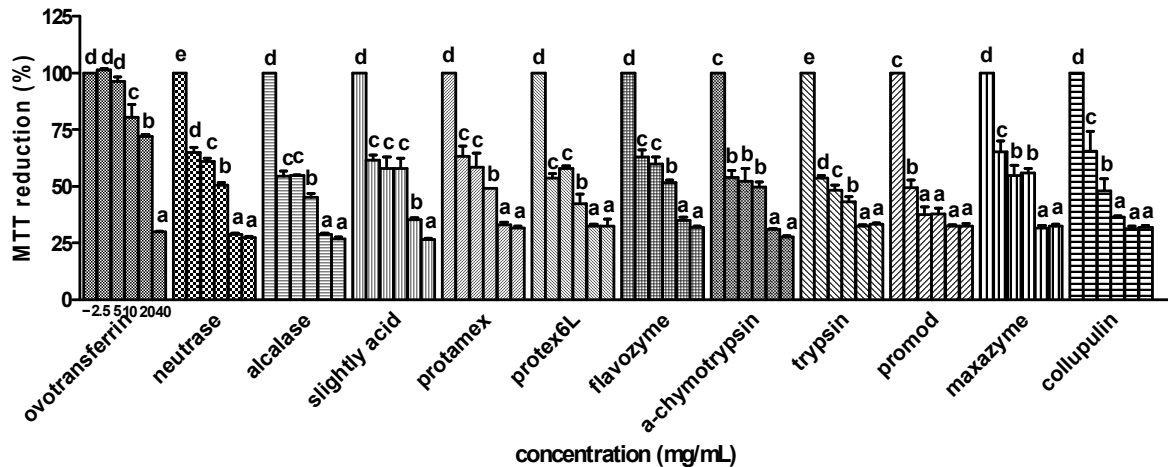


Fig. 21. Ovotransferrin과 그 가수분해물의 HT-29 세포에 대한 세포 생존률 측정. Values not sharing the same letter are significantly different from one another ($p < 0.05$) by Duncan's multiple range test.

사. LDH release assay

세포독성의 정도를 확인하기 위해 LDH 방출 양을 측정한 결과 (Jurisic *et al.*, 1999) (Fig. 22), ovotransferrin의 경우 5, 10, 40 mg/mL의 모든 농도에서 유의적인 변화가 나타나지 않은 반면, 나머지 가수분해물은 상대적으로 고농도인 40 mg/mL에서 LDH 방출량이 증가한 것으로 나타나 MTT assay와 유사한 경향을 확인할 수 있었다. 또한, MTT assay에서 저농도에서도 가장 높은 항암활성을 나타냈던 promod 가수분해물이 LDH 분비량에 있어서도 ovotransferrin에 비해 3.3배 더 높은 활성을 보여 인체 대장암 세포주에 대한 독성효과가 가장 큰 것을 알 수 있었다.

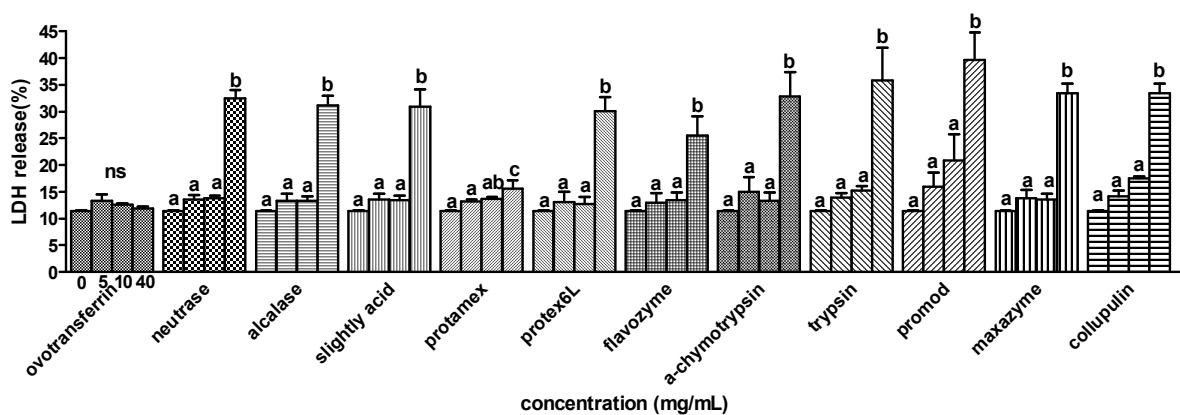


Fig. 22. Ovotransferrin과 그 가수분해물의 세포독성 효과. Data were normalized to the activity of LDH release from vehicle-treated cell and expressed as percentage of the control. Values not sharing the same letter are significantly different from one another ($p < 0.05$) by Duncan's multiple range test.

아. HT-29 세포의 형태학적 변화 관찰

Ovotransferrin과 alcalase, trypsin 가수분해물이 HT-29 세포주에 대해 어떠한 형태학적 변화를 유도하는지 확인하기 위하여 위상차 현미경을 이용하여 무처리 대조군과 비교하였다 (Fig. 23). 각 sample을 2.5, 5, 10, 20, 40 mg/mL로 HT-29 세포에 처리한 결과, 무처리 대조군과 비교해서 전체적인 세포 수가 적을 뿐 아니라 그 형태가 응축되어 있고, 형태 또한 불규칙한 것으로 나타나 암세포 사멸이 나타난 것을 알 수 있었다. 특히 20, 40 mg/mL의 고농도의 alcalase와 trypsin 가수분해물은 ovotransferrin에 비해 월등한 형태학적 변화를 나타냄으로써 MTT, LDH release assay의 결과와 마찬가지로 ovotransferrin 자체보다는 효소 처리로 인한 가수분해물의 항암 활성이 더 월등함을 알 수 있었다.

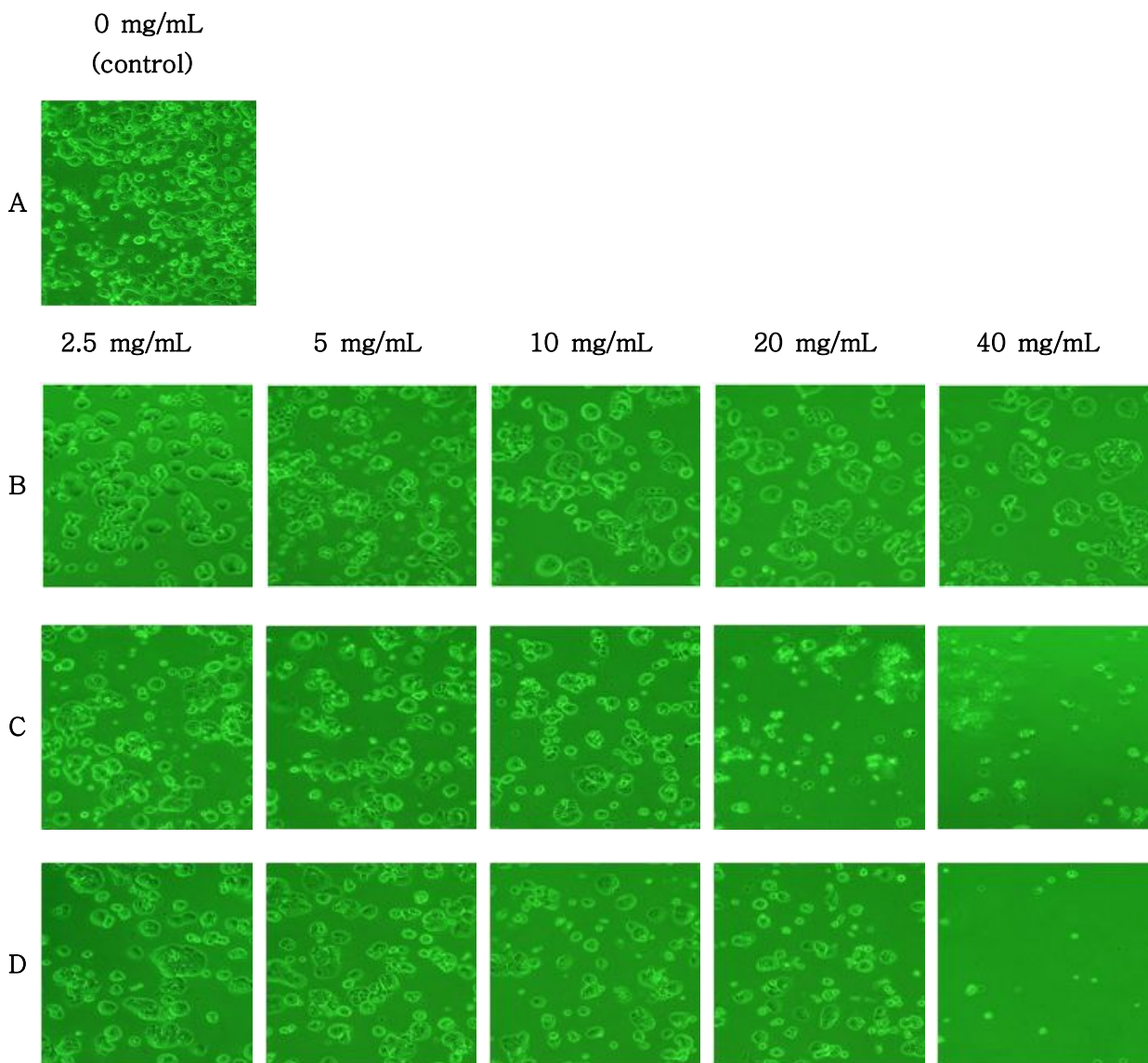


Fig. 23. Ovotransferrin과 그 가수분해물이 HT-29 cell에 미치는 형태학적 변화. The cell were exposed to various concentration of samples and morphological changes were monitored. Photographs were taken with a phase-contrast microscope at 100x magnification. A: control, B: ovotransferrin, C: alcalase, D: trypsin.

자. Ovotransferrin 및 그 가수분해물의 항염증 효과

(1) HT-29 세포에 인위적인 염증을 유도하는 LPS의 적정 농도 확정 (real-time PCR)

HT-29 세포에 LPS를 10, 100, 1000 ng/mL로 24시간 동안 처리한 후 RNA를 추출하여 real-time PCR을 통해 염증과 관련된 gene 발현을 확인한 결과 (Fig. 24), TNF- α 는 유의적인 변화가 없는 반면, IL-8 (interleukin-8)은 1000 ng/mL에서 gene 발현이 11.4 배 증가한 것으로 나타났다. 따라서 HT-29세포에 인위적으로 염증을 유도하기 위한 농도는 1000 ng/mL이 적합 할 것으로 사료되며, 나아가 세포사멸을 유도하는지의 여부를 추가로 확인하였다 (Fig. 25).

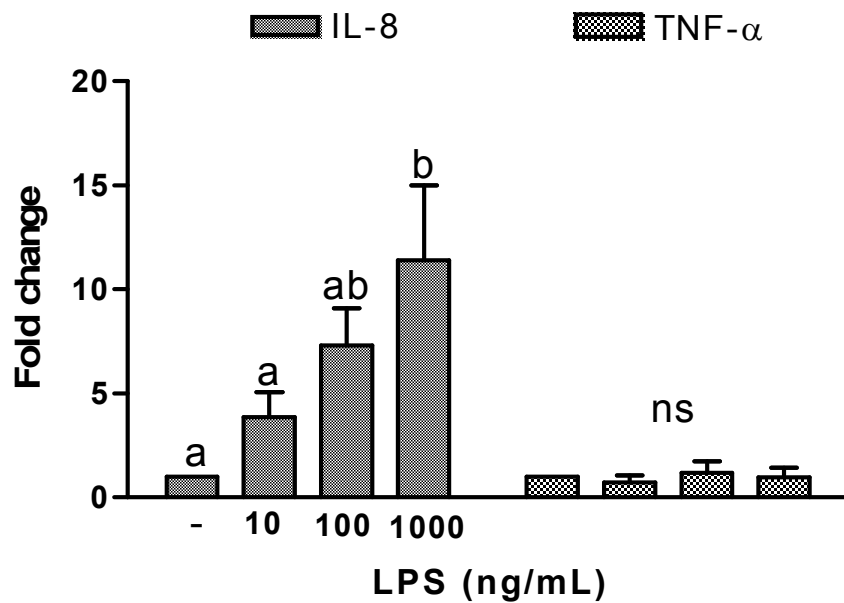


Fig. 24. Real-time PCR을 이용한 LPS로 유도된 HT-29 cell에서의 IL-8 and TNF- α 발현 변화 측정. Values not sharing the same letter are significantly different from one another ($p < 0.05$) by Duncan's multiple range test. ns; no significant change.

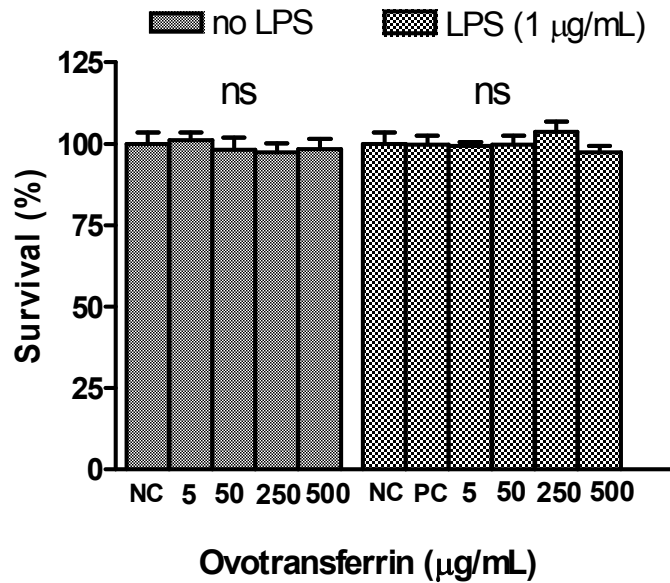


Fig. 25. LPS로 유도된 HT-29 cell에 대한 ovotransferrin과 그 가수분해물의 세포독성 조사. Values not sharing the same letter are significantly different from one another ($p < 0.05$) by Duncan's multiple range test. NC, RPMI-treated normal control (without LPS stimuli); PC, 1 µg/mL LPS treated positive control. ns; no significant change.

4. Ovotransferrin의 시장 조사 및 품질평가 기준 확립

가. Ovotransferrin의 경제성 분석 및 시장 조사

(1) 계란의 소비 및 가격 추세

일반적으로 신선식품이나 축산물 등에 대한 수요는 경제가 발전함에 따라 증가하는 것으로 알려져 있다. 계란도 소득이 증가함에 따라 수요가 증가하는 품목이다.

Table 7에는 계란의 국내생산량과 일인 당 소비량이 나와 있다. 이 표를 보면 우리나라의 계란 생산량은 1985년에는 309천 톤, 1990년에는 393천 톤, 1995년에는 454천 톤, 2000년에는 479천 톤, 그리고 2002년에는 537천 톤으로 꾸준히 증가해 왔다. 1인 1일 계란소비량을 보면 1975년에는 17.0 g, 1990년에는 21.6 g, 1995년에는 23.5 g, 2000년에는 23.5 g, 2002년에는 26.0 g으로 역시 꾸준히 증가해 왔다. 인구증가와 소득증가에 따라 우리나라의 계란 소비량과 생산량은 꾸준히 증가해왔지만, 그 증가 추세는 전체적으로 완화되고 있다.

Table 7을 보면 2002년까지는 꾸준한 증가세였던 계란의 국내 생산량과 1인 1일 당 계란 소비량이 2004년에는 국내 생산량 508천 톤, 소비량 24.4 g, 2006년에는 생산량 537천 톤, 소비량 25.8 g, 2007년에는 생산량 544천 톤, 소비량 26.1 g으로 증가추세가 정체상태임을 알 수 있다. 이는 국내의 소득 수준이 일정 수준에 다다르면서 비교적 값싼 동물성 단백질의 급원인 계란의 소비시장이 포화 상태에 이른 것이라 판단된다.

Table 7. 계란 소비추세

생산량 \ 년도	1985	1990	1995	2000	2002	2004	2006	2007
계란 국내생산량 (1,000 ton)	309	393	454	479	537	508	537	544
1인 1일당 계란 소비량 (g)	17.0	21.6	23.5	23.5	26.0	24.4	25.8	26.1

(자료 : 2006 식품수급표, 한국농촌경제연구원, 2007)

Table 8의 국가 별 1인 1일 당 계란류 공급량을 살펴보면 선진국의 경우 대부분 소비량이 정체 상태를 나타내고 있으며 일부 국가의 경우 감소 추세를 나타내고 있다. 반면에 개발도상국의 경우 계란류의 소비 추세는 계속 증가하고 있다. 이상에서 보듯이 우리나라의 경우도 소득이 증가됨에 따라 계란 소비량이 증가하였지만, 일정수준의 소득 수준에 올라온 이후에는 계란의 소비가 더 이상 늘지 않는 정체 상태에 다다랐다고 판단된다 (Kim *et al.*, 2005).

Table 8. 국가별 1인 1일 당 계란류 공급량

	1974 -76	1975 -78	1979 -81	1982 -84	1984 -86	1986 -88	1989 -91	1992 -94	1995 -97	1998 -00	2001 -03	2004	2005
한국	13	14	17	18	19	22	23	25	25	26	29	30	30
일본	43	45	45	46	47	50	52	55	54	53	52	52	51
미국	44	43	43	41	40	39	36	37	37	39	40	40	40
영국	39	39	38	35	34	32	28	28	27	27	31	25	25
캐나다	36	35	35	34	33	33	29	29	29	30	32	32	32
프랑스	35	37	40	41	42	43	41	41	43	44	42	43	43
독일	46	46	46	46	45	44	40	34	34	34	34	33	32
중국	6	7	7	9	12	14	18	26	39	43	44	48	50
칠레	15	13	14	14	15	15	17	15	8	14	15	16	17
인도	2	2	2	2	3	3	4	4	4	4	4	5	5
필리핀	12	15	13	13	-	-	14	13	19	18	18	18	18

(자료 : 2006 식품수급표, 한국농촌경제연구원, 2007)

(2) 계란의 가격변화 추세

농가 수입을 결정하는 것은 농산물의 생산량과 가격이다. 양계농가의 수입을 결정하는 것은 계란의 생산량과 가격이다. 일반적으로 농업은 타 부문에 비해 생산성 증가율이 낮은 것으로 인식된다. 따라서 비슷한 가격 상승 추세가 계속될 경우 농가소득은 비농가 소득에 비해 훨씬

낮게 된다 (Kim *et al.*, 2005).

Table 9. 계란 산지가격 변화추세 (1990~2004년)

가격 \ 년도	1990	1993	1995	1998	2000	2001	2002	2003	2004
계란산지가격(원/10개)	576	486	681	859	698	860	749	762	1,068
도매물가지수	71.2	77.4	83.2	100.1	100.0	99.5	99.2	101.4	107.6

(자료 : 축산물가격 및 수급자료, 농협중앙회, 2004)

Table 9은 계란 산지가격 변화 추세를 나타내고 있다. 가격 변화는 상대적이기 때문에 계란의 가격 변화를 보기 위해 도매 물가지수의 변화와 비교해보면, 1990년과 2004년 사이에 계란 산지가격은 576 원/10개에서 2004년 1,068 원/10개로 85% 상승하였으며, 같은 기간 도매물가는 51% 상승하였다. 계란의 가격이 2004년에 일시 급등하였기 때문에 1990년과 2003년의 가격을 비교하면 계란 산지가격은 32% 상승하였으나 도매물가지수는 42% 상승하였다. 이후의 계란 가격 추세를 보면 계란의 평균 산지가격은 900~1100 원/10개 사이로 형성이 되어있다 (Fig 26). 2009년과 2010년은 평년 가격보다 약간 상승한 1,000~1,300 원/10개대의 가격을 형성하였으며, 2011년 초는 조류독감의 유행으로 산란계의 감소로 인한 계란생산 감소의 영향 등으로 가격이 1,300~1,500 원/10개 로 상승하였다.

대체로 볼 때 계란 산지가격의 상승률은 도매물가지수와 비슷한 것으로 판단이 된다. 일반적으로 농업은 타 부문에 비해 생산성 증가율이 낮아, 비슷한 가격 상승추세가 계속될 경우 농가 소득은 비농가소득에 비해 낮을 수 있다. 국내의 양계산업의 발전을 위해서는 양계농가의 소득이 비농업가구의 소득 이상으로 유지될 필요가 있다. 양계 농가의 소득증대를 위해서는 계란의 수요증대와 가격상승이 필요하다. 계란 수요를 증대시키기 위해서는 계란의 활용도를 높일 필요가 있다. 따라서 ovotransferrin과 같은 물질의 분리 정제 및 산업화 기술은 계란의 부가가치를 높이면서 기존의 계란 소비 시장이 아닌 새로운 시장을 창출하여 활용도를 높일 것으로 기대된다.



(자료 : 한국농촌경제연구원 홈페이지 (<http://www.krei.re.kr>))

Fig. 26. 2009~2011. 3. 까지의 계란 산지가격 추세.

(3) 관련제품의 시장 현황

현재 계란의 성분 별 추출, 분리에 의한 상품화는 북미, 일본 및 유럽 각국에서 이루어지고 있으며, 난황에서 분리한 레시틴과 IgY, 난백에서 분리하는 lysozyme 등이 계란에서 추출, 분리하여 상품화된 대표적인 물질이다.

반면 ovotransferrin은 분리, 정제 및 산업화가 아직 활발히 이루어지지 않는 것으로 보인다. 현재 ovotransferrin을 분리, 정제하여 판매하는 회사는 스위스의 Fordras가 대표적인 회사이다. Fordras사는 ovotransferrin 외에 lysozyme, pancreatic enzyme 외에 난백에서 분리, 정제한 단백질인 avidin, ovoalbumin, ovotransferrin, ovomucoid 등을 생산, 제약 및 식품원료로 공급하고 있으며 ovotransferrin은 면역진단용으로 주로 판매되고 있는 것으로 보인다.

현재 ovotransferrin이 가장 많이 사용되는 분야는 면역진단 분야로 특히 가금류의 건강 진단에 사용되고 있다. 아칸소주 화에트빌레에 있는 가금생산물안전연구단 (Poultry Production and Products Safety Research Unit) 소속 과학자들은 ovotransferrin의 혈액 농도가 감염된 닭에서 증가한다는 것을 발견하고 ovotransferrin을 가금류 건강진단 표식자로 사용하고 있으며 (Panheleux *et al.*, 2000; Xie *et al.*, 2002), 점점 그 사용이 확대되는 추세이다.

또 다른 ovotransferrin을 이용한 시장 분야로는 철분제 시장을 들 수 있다. 철분제의 종류는 무기철제제, 유기철제제, 단백질철제제 (Heme 제제 포함), Ferritin 제제로 크게 구분할 수 있는데 iron과 결합된 형태의 난백 단백질인 iron acetyl-transferrin이 단백질 철제제의 한 형태로서 사용되고 있다. Iron acetyl-transferrin은 난백 단백질인 ovotransferrin과 철분이 결합하여 안정적인 단백질철염의 형태를 하고 있으며 기존의 유기철염에 비해 생체철인

ferritin과 가장 유사한 구조를 하고 있어 흡수율 및 생체 이용율이 뛰어난 것으로 알려져 있다.

국내에서는 iron acetyl-transferrin을 이용한 철분제 제품으로는 중근당의 ‘볼그레’와 한림제약의 ‘알부맥스’가 있으며 (Fig. 27), 두 제품 모두 캡슐 당 iron acetyl-transferrin으로 200 mg (Fe^{3+} 로 40 mg)을 함유하고 있다. 두 제품에 원료로 사용되는 iron acetyl-transferrin은 모두 이탈리아에서 수입하고 있으며, 수입단가는 분말형태의 iron acetyl-transferrin이 kg 당 250만원, 액상형태가 kg 당 30만원에 수입되고 있다. 시장의 규모는 분말형태의 iron acetyl-transferrin이 연 500 kg, 액상형태가 연 30 kg이 수입되고 있어 원료의 연간 수입금액만 12억원에 달하고 있는 실정이다. 이를 국산화한다면 연 12억원의 수입대체효과 뿐 아니라, 향후 건강기능식품의 미네랄 제품에서 철분 흡수를 도와주는 원료로도 사용이 가능할 것으로 예상된다.



Fig. 27. Iron acetyl-transferrin을 이용한 국내 철분제 제품들.

또한, ovotransferrin은 계란에서 유래한 transferrin으로 그 기본 기능이 우유에서 유래한 락토페린 (lactoferrin)과 유사하다. 따라서 락토페린의 대체제로의 가능성을 기대해 볼 수 있다. 락토페린은 현재 전량 수입에 의존하고 있으며, kg당 단가는 60-70만원 선으로 시장가가 형성되어 있다. 락토페린의 2000년 세계시장 규모는 약 2천억 달러, 2000년 국내시장 규모는 약 200억원으로 락토페린의 주 사용처는 분유제품이며, 이 외에 건강기능식품에도 부원료로 사용되고 있다. 락토페린은 초유에 많이 들어있는 것으로 알려져 있으며, 면역기능 강화, 항균 및 항바이러스 효과, 철흡수 조절, 항산화 기능 등을 가지고 있는 것으로 알려져 있다. 이 때문에 분유 제품에서는 모유와 유사한 성분을 강조하고 항균 및 면역기능 강화를 위해 락토페린을 첨가하고 있다. 또한 안약 및 영양제, 건강기능식품의 부원료 로도 사용되나 우유에서 소량 존재하는 락토페린을 우유로부터 분리, 정제하여 생산하고 있기 때문에 공급이 수요를 따라가지 못하고 있다. 특히 2007년 10월 도쿄에서 열린 제1회 락토페린 포럼에선 락토페린의 항염증 작용과 빈혈 개선효과에 대한 연구 성과가 보고되어 ‘철 락토페린 스킴’이라는 유제품이 일본에서 발매되기도 하였다.

국의 및 국내의 락토페린을 이용한 건강기능식품 들은 Table 10와 같다. 해외에서는 락토페린 자체를 이용한 건강기능식품이 출시되어 있는 반면, 국내에서 생산되는 제품에는 락토페린이 건강기능식품의 기능성원료가 아닌 식품첨가물로 등록이 되어 있기 때문에 어린이를 위한 건강기능식품 제품에 부원료로 주로 사용되고 있다.

지금까지의 시장조사 결과를 바탕으로 판단해 볼 때, ovotransferrin의 대량생산기술이 확보되고, 그 기능성 및 안전성이 입증된다면 iron과 결합된 형태로서 철분제의 원료, 락토페린 대체제 및 기능성 식품의 원료로서 그 활용도는 매우 넓다고 판단된다.

Table 10. Lactoferrin이 첨가된 건강기능식품

제품	제조사	가격 및 용량	성분 및 특징
 락토페린 100%	Symbiotics / 뉴질랜드	가격: 50,000원 /60캡슐/병 용량: 250 mg/캡슐	-성분: 락토페린 100% -건강한 면역체계 유지 및 철분 흡수를 도와주는 락토페린 제품
 락토페린 (Lactoferrin)	Life Extension / 베트남	가격: 55,000원 /60캡슐/병 용량: 락토페린 300 mg/캡슐	-성분: 아폴락토페린 (Apolactoferrin) -결정 셀룰로오스 외 건강한 면역체계 유지 및 철분 흡수를 도와주는 락토페린 제품
 락토페린 (Lactoferrin)	Jarrow Formulas / 미국	가격: 39,000원 /60캡슐/병 용량: 락토페린 250mg/캡슐	-성분: 락토페린, 셀룰로오스, 스테아린산마그네슘, 이산화규소 -건강한 면역체계 유지 및 철분 흡수를 도와주는 락토페린 제품
 High-Ig 초유	Symbiotics / 뉴질랜드	가격: 43,000원 /120캡슐/병 용량: 초유 960 mg/2캡슐	-성분: 초유 (우유 유래) -초유의 중요한 성분 중 하나인 면역인자를 40% 이상으로 함유한 최고 품질의 초유
 입문포플러	Symbiotics / 뉴질랜드	가격: 41,000원 /120캡슐/병 용량: 900 mg/2캡슐	-성분: 초유 (우유 유래), 인지질, 아라비노갈락톤, 올리브잎추출물, 베타 글루칸, 락토페린 -초유 및 락토페린 성분에 베타글루칸, 아라비노갈락톤과 같은 기능성 다당류 물질을

			혼합하여 면역기능 강화
 썬라이프 락토아연 120	Sunlife International limited/ 뉴질랜드	가격: 154,000원 /120캡슐/병 용량: 500 mg/2캡슐	-성분: 글루콘산아연 6%, 락토페린 농축물 93%, 스테아린산마그네슘, 이산화규소 -락토페린에 아연성분을 첨가하여 면역 기능 강화
 [메디포스트 모비타] 키키멀티	렉스진 바이오텍/대한민국	가격: 25,000원 /60정/병 용량: 1,000 mg/정	-성분: Vitamin C, E, D3, B, 산화아연, 엽산, 초유단백분말, 혼합유산균 분말, 락토페린 농축물, 클로렐라, 스피루리나 -락토페린, 클로렐라를 함유한 포도맛 어린이 영양제
 에스더포플러 아미노메가-C	Douglas/미국	가격: 45,000원 /90캡슐/병 용량: 1,060 mg/캡슐	-성분: 비타민C, 락토페린 농축물 (부원료), L-카르니틴 -철분의 흡수와 유해 산소로부터 세포를 보호하는데 도움을 줌
 [플무원플비타] 골목대장콩콩이 칼슘비타민	(주) 바이탈랩/대한민국	가격: 27,000원 /180정/병 용량: 1,000 mg/2정	-성분: 칼슘, 마그네슘,식이섬유, Vitamin C, Vitamin D3, 락토페린, 산화아연, Vitamin B1 -어린이의 뼈와 치아형성을 위한 칼슘보충제 비타민 제품

나. Ovotransferrin 시험법 및 품질평가 기준 확립

(1) Bradford assay를 통한 단백질 정량

난백에서 분리 정제된 ovotransferrin 농축물의 단백질량을 정량하기 위하여 Bradford assay를 수행하였다. Bradford assay는 다음의 과정으로 수행하였다. Protein standard 용액으로 쓸 BSA (bovine serum albumin; Sigma, USA)은 1 mg/mL 농도로 희석 후 1/2씩 serial dilution하여 준비하였다. Bradford 시약 (Biorad, USA)은 증류수로 5배 희석하여 준비하였다. 희석한 BSA 100 μ L에 Bradford 시액 900 μ L를 첨가하여 섞어준 후, 5분 간 실온에서 반응시킨다. 595 nm에서 흡광도를 측정 후, 증류수에서 반응한 값으로 data를 보정

하여 standard curve를 구하였다 (Fig. 28).

Ovotransferrin의 단백질 농도를 측정하기 위해 ovotransferrin standard (C-0755;Sigma, USA) 및 ovotransferrin 농축물을 증류수로 100배 희석한 후 다시 100배 희석하였다. 희석한 실험용액 100 μ L에 Bradford 시액 900 μ L를 첨가하여 섞어준 후 5분간 실온에서 반응시키고, 595 nm에서 흡광도를 측정하였다. 증류수에서 반응한 값으로 data를 보정 후 앞에서 구한 추세식에 대입하여 ovotransferrin의 단백질량을 구하였다.

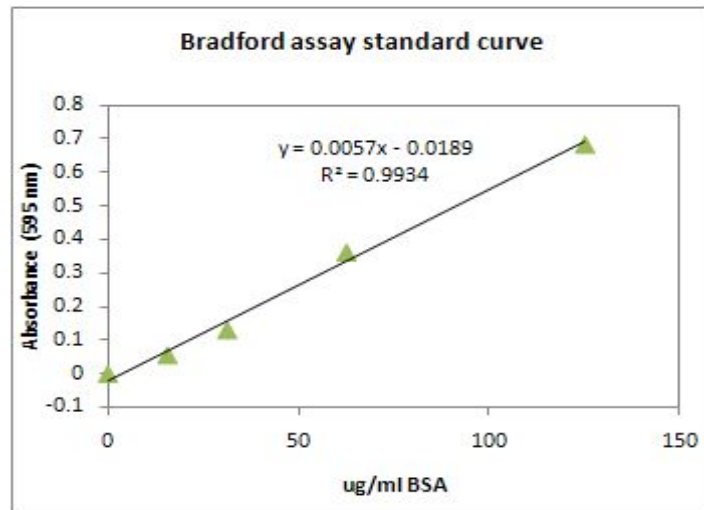


Fig. 28. Bradford assay 이용한 standard curve.

단백질 정량결과 ovotransferrin standard 시약의 단백질 함량은 1,033.6 mg/g으로 103.3%, 본 연구과제에 의해 생산된 ovotransferrin 농축물의 단백질 함량은 시료 1에서 1,062.2 mg/g으로 106.2%, 시료 2에서 1,049.1 mg/g으로 104.9%로 순수한 단백질 성분이 분리, 정제되었음을 확인할 수 있었다 (Table 11).

Table 11. Ovotransferrin의 단백질 함량 측정

Sample	Standard	Sample 1	Sample 2
Conc. of Protein (mg/g)	1,033.6 \pm 49.3	1,062.2 \pm 12.9	1,049.1 \pm 11.0

(2) SDS-PAGE를 통한 단백질 순도 확인

농축, 정제된 ovotransferrin의 단백질 순도를 확인하기 위하여 아래의 방법으로 전기영동을 실시하였다. Ovotransferrin standard (C-0755; Sigma, USA) 및 ovotransferrin 농축물은 1 mg/mL이 되도록 증류수에 녹여 희석하였다. Ovotransferrin 희석용액 100 μ L에 sample buffer (1M Tris buffer 0.6 mL, 50% glycerol 5 mL, 10% SDS 2 mL, 2-mercaptoethanol 0.5 mL, 1% bromophenol blue 1mL, ddw 0.9 mL) 25 μ L를 혼합

후 100℃에서 15분 간 열처리를 하였다. Acrylamide를 함유한 SDS gel을 제조한 후 well에 열처리한 시료를 10 μL씩 loading하여 전기영동을 실시하였다. Protein marker로는 Bio-rad사 (USA)의 prestained SDS-PAGE standards (Cat.1261-0318)을 5 μL 사용하였다.

전기영동 결과, standard 및 시료 1, 2 모두 97 kD 아래에서 진한 ovotransferrin band가 확인되었다 (Fig. 29). 특히 standard는 가장 위의 진한 band가 2개로 나타난 반면, 시료 1과 2는 하나의 band로 확인되어 standard보다 본 연구과제에 의해 분리, 정제된 ovotransferrin이 보다 정제가 잘 되었음을 확인할 수 있었다.

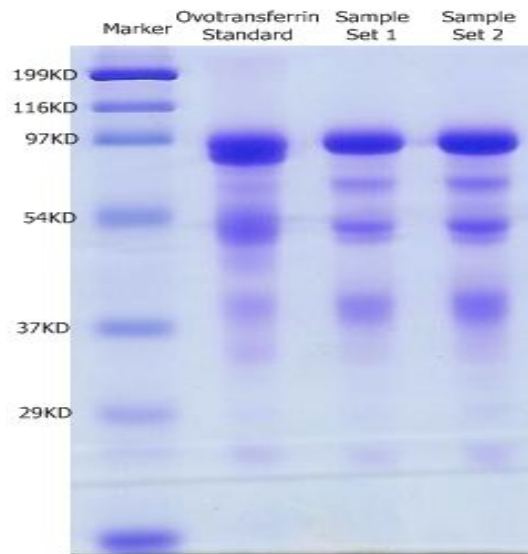


Fig. 29. Ovotransferrin의 SDS-PAGE 결과.

(3) HPLC를 이용한 ovotransferrin 정량

Ovotransferrin 농축물의 좀 더 정확한 정량방법을 찾기 위해 HPLC를 이용하여 분석을 실시하였다. 락토페린의 경우 락토페린 농축물로 식품첨가물 공전에 등재되어 있으며, 정량분석 방법으로 HPLC를 사용하여 분석을 실시한다. 따라서 식품첨가물 공전 상의 락토페린 농축물의 시험법을 참고하여 ovotransferrin 농축물의 HPLC 분석을 실시하였다.

먼저 시료를 20 mg 정밀히 달은 다음 0.5 M 염화나트륨 용액을 가하여 10 mL로 하고 0.45 μm 여과기로 여과하여 시험용액으로 하였다. 따로 ovotransferrin standard (C-0755; Sigma, USA)을 20 mg 정밀히 달은 다음 마찬가지로 하여 표준 시험용액을 조제하였다. 표준용액 및 시험용액 각각 20 μL 씩을 Table 12의 조작 조건으로 HPLC 분석을 실시하였다.

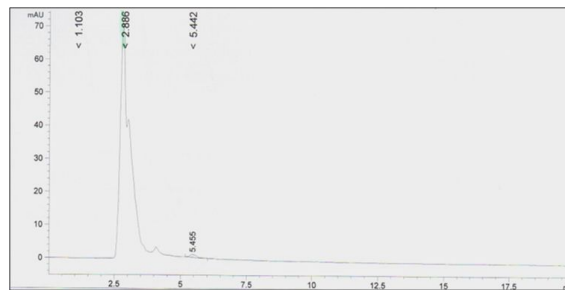
Table 12. HPLC 분석 조건 (modified Lactoferrin HPLC assay)

HPLC 분석	조작 조건
검출기	UV 280 nm
컬럼	Vydac 214TP C4 5u 4.6 mm (ID) × 25.0 cm (L)
컬럼온도	실온
이동상	A액 : B액 (30:70)
	A액 아세트나이트릴 : 0.5 M 염화나트륨용액 (1:9)
	B액 아세트나이트릴 : 0.5 M 염화나트륨용액 (5:5)
	A, B액은 0.03% 제삼불화초산 (trifluoroacetic acid)을 포함
유속	0.8 mL/min
시료량	20 μL

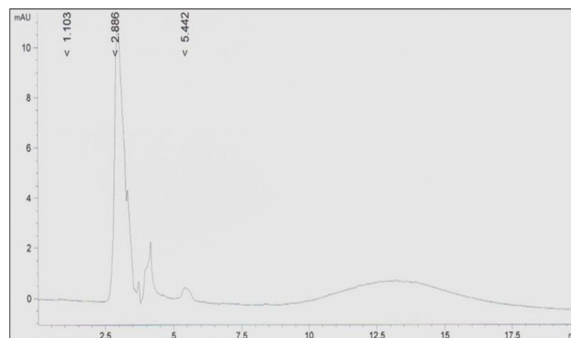
분석결과 2.8분대에 peak를 확인하였으나, ovoalbumin standard (A5503; Sigma, USA) 도 모두 같은 시간대에 peak가 확인되어 ovotransferrin만의 고유한 peak가 아닌 것으로 생각된다 (Fig. 30).

이는 사용한 colume의 pore size가 작아 거대분자의 protein들이 분석 초반에 한꺼번에 흘러나오는 것으로 판단되었으며, 본 시험방법으로는 ovotransferrin 정제 시 혼입될 수 있는 ovoalbumin 및 다른 protein류의 분리 분석은 불가능할 것으로 생각되어진다.

A. Ovotransferrin standard



B. Ovoalbumin standard



C. Ovotransferrin sample

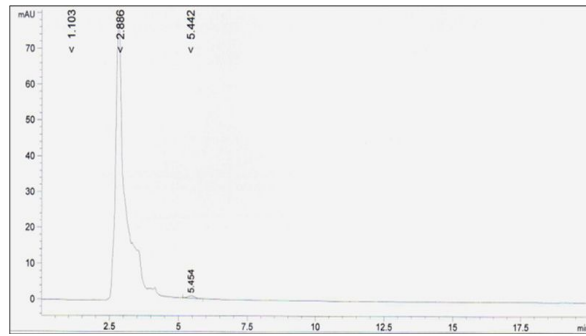


Fig. 30. HPLC 분석 결과.

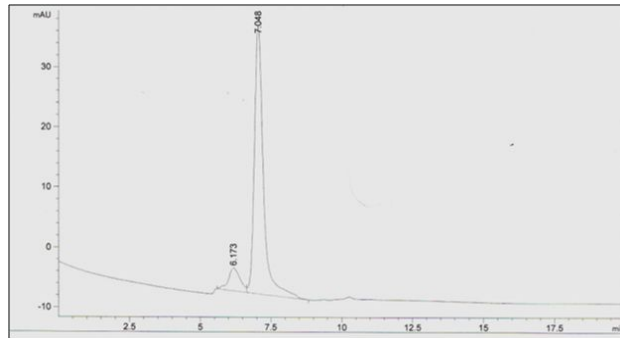
이에 분해능이 좋은 새로운 컬럼을 구입하여 새로운 조건으로 분석을 다시 실시하였다. 시료를 0.01 g 정밀히 칭량한 다음 0.1 M sodium phosphate buffer (pH 6.8, 0.3 M sodium chloride) 용액을 가하여 10 mL로 하고, 0.45 μm 여과기로 여과한 액을 시험용액으로 하였다. 표준 용액 및 시험 용액 각각 20 μL 씩을 Table 13의 조건으로 HPLC 분석을 실시하였다.

Table 13. HPLC 분석 조건

HPLC 분석	조작조건
검출기	UV 280 nm
컬럼	Biosuite 125, 5 μm HR SEC/7.8 mm (ID) \times 30.0 cm (L)
컬럼온도	25 $^{\circ}\text{C}$
이동상	0.1 M sodium phosphate buffer (pH 6.8) + 0.3 M sodium chloride
유속	1 mL/min
시료량	20 μL

그 결과 Fig. 31과 같은 깨끗한 peak를 확인할 수 있었으며, Sigma의 standard 용액을 분석한 A의 크로마토그램에서는 7분대의 ovotransferrin peak 앞의 6분대에서 또 다른 peak가 있는 것이 확인되었다. 이는 SDS-PAGE 결과에서 standard의 band 분석 결과 비슷한 위치에 2개의 band가 확인되었던 것과 유사한 결과로 생각된다. 반면, 본 연구과제에서 분리 정제된 시료를 분석한 B의 크로마토그램에서는 7분대의 ovotransferrin peak 만 검출되어 표준시약보다 ovotransferrin이 더 순수하게 정제되어 있음을 확인할 수 있었다.

A. Ovotransferrin standard



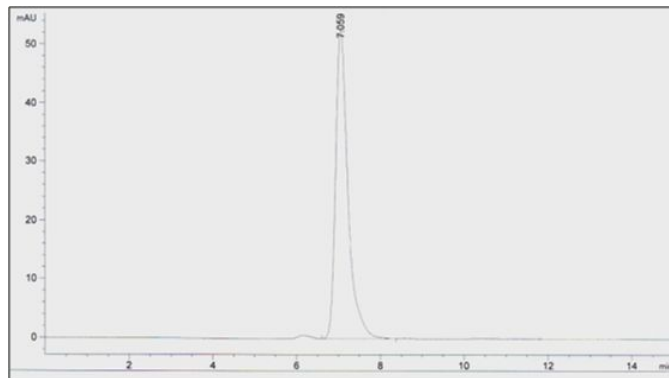
```

-----
                          Area Percent Report
-----
Sorted By      :      Signal
Multiplier:    :      1.0000
Dilution:     :      1.0000
Use Multiplier & Dilution Factor with ISTDs

Signal 1: DAD1 A, Sig=280,4 Ref=off

Peak RetTime Type Width Area Height Area
# [min] ----- [min] [mAU*s] [mAU] %
-----
1 6.173 BV 0.4083 109.40359 3.79508 9.9739
2 7.048 VB 0.3290 987.49268 44.82267 90.0261
-----
Totals :                1096.89626 48.61775
    
```

B. Ovotransferrin sample



```

-----
                          Area Percent Report
-----
Sorted By      :      Signal
Multiplier:    :      1.0000
Dilution:     :      1.0000
Use Multiplier & Dilution Factor with ISTDs

Signal 1: DAD1 A, Sig=280,4 Ref=off

Peak RetTime Type Width Area Height Area
# [min] ----- [min] [mAU*s] [mAU] %
-----
1 7.059 BB 0.3066 1081.10632 52.85995 100.0000
-----
Totals :                1081.10632 52.85995
    
```

Fig. 31. HPLC 분석 결과.

HPLC peak 면적 비율에 따른 ovotransferrin peak의 비율을 Table 14에 나타내었다. 분석 결과 ovotransferrin standard (C-0755; Sigma, USA)의 ovotransferrin 함량은 약 90%정도로 분석되었으며, 본 연구과제에서 분리, 정제된 ovotransferrin 시료들의 ovotransferrin 함량은 100%로 분석되어 본 연구과제의 분리 정제 방법이 매우 고순도의 ovotransferrin을 생산할 수 있는 방법임을 확인할 수 있었다.

Table 14. Ovotransferrin의 peak 면적 측정

No.	Ret time (min)	Width (min)	Area (Mau*s)	Height (Mau)	Area (%)
Standard	7.048	0.3290	987.49268	44.82267	90.03
Sample 1	7.057	0.3065	1060.95886	51.90389	100.00
Sample 2	7.059	0.3066	1081.10632	52.85995	100.00
Sample 3	7.061	0.3087	1034.96326	50.16945	100.00
Sample 4	7.062	0.3145	1096.33813	51.89775	100.00

제 2 절 2차년도 연구개발수행 내용 및 결과

1. Ovotransferrin 가수분해물의 생산 최적화

가. Ovotransferrin에서 면역증강 및 항암효과를 가지는 생리활성 가수분해물의 선별적 제조 및 문제점 해결

1차년도 연구 진행 사항을 살펴보면, 약산 가수분해를 포함하여 총 13종의 효소를 이용하여 ovotransferrin 가수분해물을 제조하였다. 1차년도 ovotransferrin의 가수분해물 제조는 ovotransferrin의 가수분해물 제조는 기질 (ovotransferrin)과 효소의 중량비를 25:1로 조절하여 제조하였다. 정확히 용매 100 mL에 ovotransferrin을 4 g 녹인 후 효소를 0.16 g 처리하였으며 45°C에서 3시간 반응 후 100°C에서 10분 동안 가열하여 효소를 불활성화시켜 반응 정지하였다.

효소 불활성화 후 원심분리 (1,900×g, 20 min)를 거치게 되면 침전물이 생기게 되는데 이 침전물에 가수분해 되지 않은 ovotransferrin이 변성되어 침전되었기 때문에 1차년도 가수분해 수율이 약 70-80% 정도로 낮게 나타났다.

이를 해결하기 위해 가수분해 조건을 용매 100 mL 당 ovotransferrin 및 효소의 양을 반으로 줄여 (용매 100 mL 당 ovotransferrin 2 g, 효소 0.08 g) 가수분해를 실시한 결과, 효소 불활성화 후 침전되는 침전물의 양이 거의 없어지고 그만큼 수율이 높아진 것을 알 수 있었다.

나. Ovotransferrin 효소 가수분해물 (promod 278)의 항암효과

1차년도 연구 수행 결과를 살펴보면 ovotransferrin 가수분해물의 항암효과 스크리닝 결과를 살펴보면 (1차년도 결과), 7종의 암세포에 대해 유의적으로 효과가 좋은 가수분해물을 선별하지 못하였다. 하지만 이중 효과가 가장 좋은 ovotransferrin 가수분해물은 promod 278 효소를 이용한 가수분해물로 이를 2차년도 연구 수행 시 선택하여 연구를 진행하였다.

Promod 278 효소의 경우 식품 가공에 이용되는 효소이며, 가격 면에서도 다른 효소들에 비해 저렴하기 때문에 이용성 면에서 경쟁력이 있다. 특히 2차년도에는 제 2 협동팀인 경남대에서 promod 278 효소 가수분해물을 이용하여 대장암에 대한 동물실험을 실시하기 때문에 본 연구팀에서도 대장암세포에 대한 세포독성을 검증하였다.

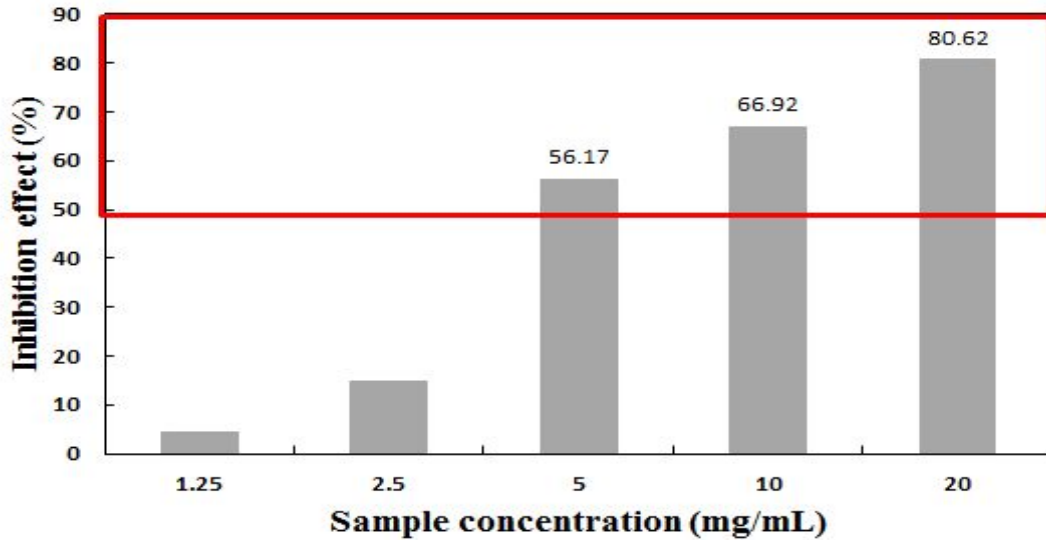


Fig. 32. 대장암 세포인 HT-29세포에 대한 ovotransferrin 효소 가수분해물의 세포독성 검증.

Fig. 32은 promod 278 효소를 이용한 ovotransferrin 가수분해물의 대장암세포인 HT-29 세포에 대한 세포독성을 나타낸 그래프이다. 그래프에는 나타나있지 않지만 기존 ovotransferrin의 경우 40 mg/mL에서만 약한 세포독성을 보인다. 하지만 ovotransferrin 가수분해물 (promod 278)의 경우 5 mg/mL에서도 50% 이상의 세포독성이 나타내는 것을 볼 수 있다.

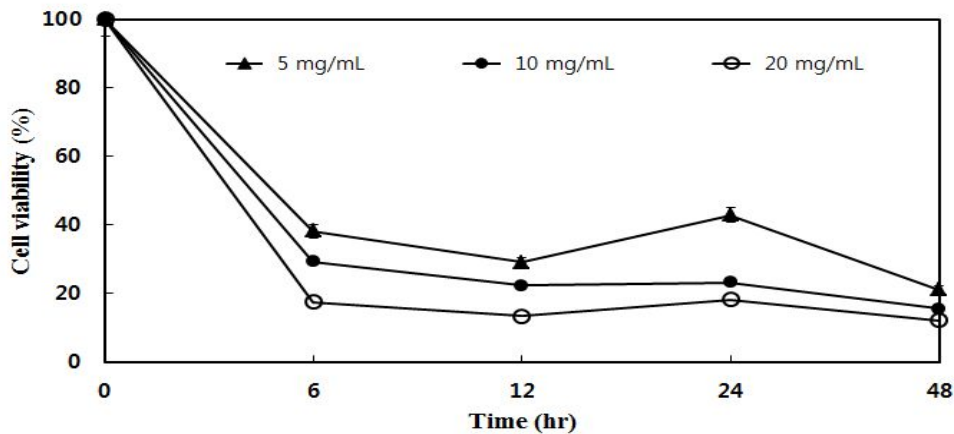


Fig. 33. 대장암세포인 HT-29세포에 대한 ovotransferrin 효소 가수분해물의 배양 시간 별 세포독성 검증.

Fig. 33는 HT-29세포에 대한 ovotransferrin 효소 가수분해물의 배양 시간 별 세포독성을 나타낸 그래프이다. 그래프를 보면 모든 농도에서 배양 6시간 쯤 급격하게 세포독성이 나타나는 것을 알 수 있으며 이후 배양 시간이 증가하여도 세포독성에는 유의적인 변화를 관찰할 수 없었다.

다. Ovotransferrin promod 278 효소 가수분해물의 생산최적화

가능성을 가지는 ovotransferrin 효소 가수분해물의 효율적인 생산을 위하여 반응 온도, 반응 시간 및 반응 pH 등을 고려하여 생산 조건을 최적화 하였다. 반응 표면 분석법(Table 15) (RSM)을 실시하기에 앞서 가수분해 반응시간, 반응 pH 별로 세포독성을 비교, 분석하였다.

Table 15. Ovotransferrin 효소 가수분해물의 생산 최적화 조건 디자인

Xn	Independent variables	Levels (Yn)			
		Y ₁	Y ₂	Y ₃	Y ₄
X ₁	Incubation Time	3	6	9	12
X ₂	pH	35	40	45	50

Table 16. HT-29 세포에 대한 pH 별 시간 별 promod 278 가수분해물 세포독성 결과

pH	시간(hr)		3	6	9	12
	농도 (mg/mL)					
4	5		69.33	58.48	-	60.02
	10		74.96	69.45	84.21	68.45
	20		79.72	76.36	86.61	77.20
5	5		64.38	55.48	85.02	55.04
	10		69.76	69.33	87.20	61.29
	20		76.90	77.43	89.37	67.43
6	5		44.41	58.32	82.88	48.71
	10		72.19	70.28	83.41	67.60
	20		80.17	79.55	87.70	79.36
7	5		55.45	64.94	79.72	56.17
	10		65.48	73.90	88.34	66.92
	20		71.46	79.61	84.34	80.62

Table 17. LoVo 세포에 대한 pH 별 시간 별 promod 278 가수분해물 세포독성 결과

pH	시간(hr)	3	6	9	12
	농도(mg/mL)				
4	5	32.59	32.11	-	27.04
	10	48.86	46.58	50.79	30.31
	20	67.57	60.46	69.65	49.29
5	5	33.84	12.19	26.73	20.79
	10	40.92	46.66	45.72	23.62
	20	62.46	65.72	60.30	48.19
6	5	35.38	20.72	3.54	5.11
	10	46.19	43.28	37.97	19.58
	20	67.33	62.97	60.69	47.80
7	5	34.71	23.27	15.61	13.52
	10	42.45	34.36	32.27	20.95
	20	62.11	50.31	58.29	45.20

Table 16와 Table 17은 ovotransferrin 가수분해물 중 선택된 promod 278 효소를 이용하여 반응 시간 별, 반응 pH 별로 가수분해를 실시하여 대장암 세포인 HT-29 와 LoVo에 대하여 세포 독성을 확인한 결과이다. Sample의 농도는 1.25 mg/mL 부터 20 mg/mL 까지 실험을 실시하였으나, 2.5 mg/mL과 1.25 mg/mL에서는 sample간의 유의적인 차이를 나타내지 않아 데이터에 첨가하지 않았다. LoVo 세포에 대해서는 세포독성이 나타나긴 했지만, sample 농도가 높았고, HT-29 세포와 비교했을 때 효과가 미미한 것을 알 수 있었다.

대체적으로 HT-29 세포에 대해서는 pH와 시간의 구분 없이 고르게 세포독성이 나타나는 것을 관찰 할 수 있었다. 이 결과를 토대로 반응 시간을 3시간 부터 12시간 까지 변화를 주고, 반응 pH를 4-7까지 변화시켜 보았지만 유의적으로 효과가 증가되는 것을 관찰 할 수 없었다. 본 연구팀은 promod 278 효소 가수분해물에 대한 생산 최적화는 현재 큰 의미가 없다고 생각되어 2차년도 계획인 반응표면분석법 (RSM)을 실시하지 않았고, 이외에 가능성을 높일 수 있는 다른 방법을 모색하였다.

또한 Table 16와 Table 17의 결과를 토대로 식품에 첨가함에 있어서 산성인 pH 4보다는 중성의 pH 7이 합당하다고 결정하였고, 추후 실험에서는 가수분해 반응시간은 3시간으로 조절하고 반응 pH는 7로 조정한 후 동물 실험에 사용하였다.

라. Ovotranferrin 가수분해물의 기능성 향상을 위한 최적 조건 모색

Ovotranferrin의 기능성 향상을 위하여 ovotransferrin의 이황화 결합을 분해 할 수 있는

방법을 선택하였다. 이황화 결합을 분해하는 방법으로는 DTT (dithiothreitol), mercaptoethanol, 그리고 TCEP (Tris(2-carboxyethyl) phosphine hydrochloride) 등의 용액을 이용하여 이황화 결합을 분해 할 수 있다.

(1) Mercaptoethanol을 이용한 이황화 결합을 분해

Mercaptoethanol을 이용한 이황화 결합 분해 방법은 100 mL 증류수에 2 g의 ovotransferrin을 녹인 후, 0.2% mercaptoethanol을 처리하고 37°C water bath에서 2시간 반응 후 원심분리 (1,900×g, 20 min) 후 상등액만 분리하여 24시간 투석을 거쳐 mercaptoethanol을 제거해주었다. 투석 후 동결 건조를 실시하여 사용하였다. 이 외에 mercaptoethanol로 이황화 결합을 분해하고 2차적으로 효소를 이용하여 가수분해를 실시하였다. 이때 이용한 효소는 trypsin, protamex, promod 278이며 투석액 100 mL 당 0.08 g 효소를 처리하여 3시간 반응시켜 주었다. 효소 반응정지는 100°C에서 10분 간 끓인 후 침전물을 제거하고 동결 건조하여 다음 실험에 사용하였다.

Table 18. Mercaptoethanol을 이용한 이황화 결합 분해에 따른 세포독성 변화

기존 샘플 (mg/mL)		세포 독성 (%)	MercaptoEtoH 처리 샘플 (mg/mL)		세포 독성 (%)
Ovotransferrin	2.5	—	M-ovotransferrin	2.5	—
	5	12.58		5	—
	10	33.47		10	—
	20	44.27		20	4.76
	40	59.19		40	18.20
Ovotransferrin -Trypsin	2.5	—	M-ovotransferrin -Trypsin	2.5	15.13
	5	—		5	20.77
	10	7.50		10	20.04
	20	86.17		20	37.47
	40	96.99		40	42.95
Ovotransferrin - Protamex	2.5	—	M-ovotransferrin -Protamex	2.5	46.41
	5	—		5	46.12
	10	—		10	63.35
	20	—		20	69.81
	40	23.92		40	81.60
Ovotransferrin - Promod 278	2.5	4.31	M-ovotransferrin -Promod 278	2.5	55.14
	5	14.76		5	66.07
	10	56.17		10	56.47
	20	66.92		20	82.65
	40	80.62		40	89.30

MTT assay를 통해 대장암 세포인 HT-29 세포에서 세포독성 효과를 비교해 본 결과는 Table 18에 나타내었다. Mercaptoethanol로 이황화 결합을 분해한 샘플의 경우 기존 ovotransferrin과 별다른 효과 차이를 보이지 않았다. 하지만 mercaptoethanol을 이용하여

이황화 결합을 분해하고 2차적으로 효소로 가수분해를 실시해 본 결과, 기존 효소 가수분해물에 비해 유의적으로 효과가 상승되는 것을 관찰 할 수 있었다. 특히 protamex 효소 가수분해물의 경우 40 mg/mL에서조차 세포독성이 관찰되지 않은 반면, mercaptoethanol을 먼저 처리하고 protamex 효소로 가수분해를 실시한 결과 40 mg/mL에서 80% 이상의 세포독성이 관찰되었으며 10 mg/mL의 농도에서도 60% 이상의 세포독성이 관찰되었다. 이는 효소 가수분해 이전에 ovotransferrin의 이황화 결합을 절단함으로써 인해 protamex 효소가 ovotransferrin를 분해하는데 용이하게 함으로써 가수분해물의 효과를 상승시킨 것으로 판단된다. 이 결과를 토대로 현재 가장 효과를 높게 나타내는 조건을 확립 중에 있으며, 이를 바탕으로 기능성을 갖는 펩타이드를 분석 중이다.

(2) TCEP를 이용한 이황화 결합을 분해

TCEP를 이용한 이황화 결합 분해방법은 다음과 같다. 먼저 0.2 mM TCEP를 pH 4.0의 20 mM citrate-phosphate buffer에 ovotransferrin과 함께 녹여 37°C에서 6시간 반응시킨 후, 암모늄 수용액을 이용하여 pH를 7.0으로 조절하였다. 이를 cut off size 3,500 Da의 투석막으로 48시간 투석하여 TCEP를 제거해 준 후 이를 1,900×g, 20분에서 원심분리 하여 상층액을 동결 건조하여 실험에 사용하였다. 뿐만 아니라 TCEP를 이용해 이황화 결합을 분해한 후 2차적으로 효소를 이용하여 가수분해를 실시하였다.

Table 19. TCEP를 이용한 이황화 결합 분해에 따른 세포독성 변화

TCEP 가수분해물 (mg/mL)	세포독성 (%)	TCEP - Trypsin (mg/mL)	세포독성 (%)	TCEP - Promod 278 (mg/mL)	세포독성 (%)
0.5	ND ¹⁾	0.5	ND	0.5	ND
1	ND	1	ND	1	ND
2	ND	2	ND	2	ND
3	19.62	3	66.59±0.02	3	66.59±0.02
4	86.38±1.09	4	97.34±0.68	4	97.34±0.68
8	97.65±0.45	8	97.34±1.25	8	97.34±1.25

¹⁾ND: Not detected.

Table 19의 결과는 TCEP를 이용한 이황화 결합 분해에 따른 세포독성 변화를 대장암 세

포인 HT-29세포를 통해 나타낸 것이다. TCEP를 이용하여 이황화 결합을 분해 한 결과 4 mg/mL 농도까지 86%정도 세포독성을 나타내었다. 기존 ovotransferrin의 경우 40 mg/mL 에서 미약하게 세포독성을 보이는 것에 비하면 세포독성이 유의적으로 증가된 것을 관찰 할 수 있다. 하지만 TCEP 처리 이후 효소를 이용하여 가수분해 한 결과에서는 TCEP 처리 만 했을 시 보다 유의적인 상승 효과는 관찰 할 수 없었다.

현재까지 본 연구팀에서 진행된 결과 중에 TCEP 처리에 따른 기능성 물질이 가장 좋은 효과를 보였다. 초기 TCEP 처리의 제조 방법에는 많은 문제점이 관찰되었는데 그 중 가장 중요한 문제점 중에 하나는 동결 건조 후 용해도에 대한 문제였다. 이는 각 연구팀과의 여러 번의 회의 및 많은 실험을 통해 0.1% SDS를 처리함으로써 극복할 수 있었다. 하지만 아직까지 이 물질의 제조 방법상에는 산업적으로 이용하기에는 몇 가지 문제점이 있기 때문에 남은 연구기간 동안 이 문제점을 해결할 수 있는 방법을 모색할 계획이다.

마. Ovotransferrin 및 ovotranferrin 가수분해물의 nitric oxide (NO) 활성 저하 효과

면역증강 효과를 검증하기 위한 기본적인 실험으로 macrophage Raw 264.7 cells 로부터 생성된 nitric oxide의 양을 측정하는 실험을 진행 중에 있다. 현재까지 Raw 264.7 cells에 저해를 주지 않으며 NO 활성을 갖는 가수분해물을 찾지 못한 상황이다.

현재 TCEP 처리에 의해 제조된 가수분해물에 대해 Raw 264.7 cells에 영향을 주지 않는 유효 농도를 찾고 있으며, 결과가 나오는대로 NO 활성 실험을 진행할 예정이다.

바. 산업적인 면을 고려한 lactoferrin과 ovotransferrin의 세포독성 비교

다음은 시중에 판매되고 있는 lactoferrin과 ovotransferrin의 암세포 세포독성을 비교한 결과이다. Table 20의 결과처럼, 각각의 세포에 대해서 lactoferrin이 ovotransferrin보다 약간 씩 높은 세포독성을 보이는 것을 관찰할 수 있었다. 하지만 lactoferrin의 세포독성의 정도 역시 50%를 넘지 못하는 것을 봤을 때, lactoferrin 과 ovotransferrin의 활성은 유의적으로 차이가 없다고 판단된다.

Lactoferrin은 ovotransferrin과 마찬가지로 철분 결합력이 높은 transferrin 계열에 단백질이다. Lactoferrin의 경우 우유에서 주로 분리되며 여러 가지 기능성이 많이 밝혀져 있는 물질이다. 하지만 현재 우리나라에서 lactoferrin의 단가는 kg 당 60-70만원으로 매우 고가로 판매되고 있는 실정이다. 그렇기 때문에 ovotransferrin이 lactoferrin과 활성이 유사하게 나타난다면 ovotransferrin을 lactoferrin 대체제로서 충분이 이용 가능하다고 생각되어 진다. 또한 ovotransferrin의 경우 현재 국내에서 제조 판매되는 곳이 없기 때문에 대량생산을 통해 ovotransferrin을 제조 한다면 충분한 경쟁력이 있다고 판단된다.

Table 20. Lactoferrin과 ovotransferrin의 세포독성 비교

농도 (mg/mL)	세포독성 (%)					
	HT-29		LoVo		MRC-5	
	LTF ¹⁾	OTF ²⁾	LTF	OTF	LTF	OTF
2.5	35.82	-	53.05	3.48	24.66	-
5	20.31	-	45.06	7.29	31.18	-
10	29.24	3.98	38.33	8.28	44.19	-
20	45.77	31.24	43.85	15.80	64.66	-

¹⁾LTF: lactoferrin, ²⁾OTF: ovotransferrin.

2. 기능성 향상을 위한 ovotransferrin 활성화 방법 개발

Ovotransferrin의 항 미생물 효과는 두 가지 기작에 의해서 이루어진다고 보고되고 있다. 그 하나는 media나 식품 중의 철분과 결합하여 미생물들이 이용할 수 있는 철분을 제거함으로써 미생물의 성장을 억제하는 것이고, 또 하나는 ovotransferrin이 미생물의 cell-membrane을 lysis시켜서 파괴함으로써 항 미생물 효과를 보는 것이 주요한 효과이다.

그 동안의 많은 연구자들이 수행한 lactoferrin의 activation과 항 미생물효과에 대한 연구에 의하면, 철 이온이 제거 된 apo-form이 holo-form에 비해 항 미생물 효과가 훨씬 뛰어난 것으로 보고되었다 (Valenti *et al.*, 1982; Ibrahim *et al.*, 2000; Ko *et al.*, 2008). 따라서 본 연구에서는 ovotransferrin에서 철 이온을 제거함으로써 ovotransferrin의 항 미생물 효과를 증진시키는 데 그 목적이 있다.

우리가 개발한 ovotransferrin의 분리 및 정제 방법은 계란의 ovotransferrin에 철 이온을 먼저 부착하여 ovotransferrin의 화학적 안정성을 높인 후 ethanol을 이용하여 ovotransferrin을 분리하는 방법이다. 따라서 ovotransferrin의 항 미생물 효과를 증진시키기 위해서는 ovotransferrin에 붙은 철 이온을 제거해야만 한다. ovotransferrin에 부착된 철 이온을 release하는 데는 pyrophosphate, sulfate, chloride 등의 간단한 음이온이 필요하다고 보고되고 있으며, 또한 pH가 중요한 역할을 한다고 알려져 있다. 특히 bicarbonate가 존재하지 않는 상황 하에서 citrate에 의한 철 이온 release는 pH에 큰 영향을 받는다고 알려져 있다. ovotransferrin으로부터 철 이온 release는 pH가 낮을수록 쉽게 이루어지지만, pH가 4.2 이하로 떨어질 경우 Fe-free ovotransferrin이 변성이 일어난다고 보고되고 있다. 이러한 연구를 바탕으로 우리는 HCl과 citric acid를 이용하여 ovotransferrin에서 철 이온을 release 시키고, 그렇게 released 된 철 이온을 철 이온 chelating resin을 이용하여 제거하는 방법을 시험하였다. 철 이온 chelating resin으로는 AG1-X2 및 chelex 두 가지를 시험해 본 결과, 그 효과가 비슷하였지만 가격적인 면에서 AG1-X2가 경쟁력이 있고, resin의 granule size가 커서 칼럼을 이용할 때에 flow rate가 빠르고 batch의 경우에도 handling이 용이하여

AG1-X2를 사용하기로 결정하였다.

가. Ovotransferrin의 생산 공정 개발

난백을 동량의 물로 희석한 후 500 mM $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 용액 (0.8 mL/L)을 넣고 2분 정도 저어서 ovotransferrin의 철분을 포화시킨 다음 100% 에탄올을 서서히 첨가하여 최종 농도가 43% 되게 하여 ovotransferrin을 제외한 기타 난백 단백질을 침전시키고 3,220×g 에서 30 분 간 원심분리 하여 ovotransferrin을 분리한다. 이렇게 분리된 상등액을 취하여 에탄올 농도를 59%로 증가시켜 ovotransferrin을 침전시킨 후 원심분리 하여 상등액을 제거하고 침전된 ovotransferrin만 수거한다. 이렇게 수거된 ovotransferrin은 10배의 증류수에 녹여서 에탄올을 제거하고 농축시킨 후 citric acid를 이용하여 pH를 4.7로 조정하여 ovotransferrin의 철 이온을 release 시키고, AG1-X2 resin을 이용하여 농축된 용액에서 철 이온을 제거한 후 동결건조 한다.

Fig. 34은 59%의 에탄올을 이용하여 침전된 ovotransferrin을 10배의 증류수로 녹인 용액이다. 이 용액을 ultrafiltration을 이용하여 에탄올을 제거하고 농축시키는 과정을 거치는데, Fig. 35에서 그 과정을 보여주고 있다. Fig. 36는 이렇게 농축된 ovotransferrin을 보여주고 있으며 이 용액을 citric acid를 이용하여 pH 조정하여 철 이온을 release 시키고, AG1-X2 resin (Fig. 37)을 이용하여 batch method로 released된 철 이온을 제거한다. Fig. 38 은 철 이온이 제거된 ovotransferrin 용액을 freeze dryer를 이용하여 동결건조시킨 최종 ovotransferrin의 모습을 보여주고 있다.



Fig. 34. 59% 에탄올로 ovotransferrin을 침전시킨 용액.



Fig. 35. Ovotransferrin solution을 ultrafiltration을 이용하여 에탄올을 제거하고 농축하는 과정.

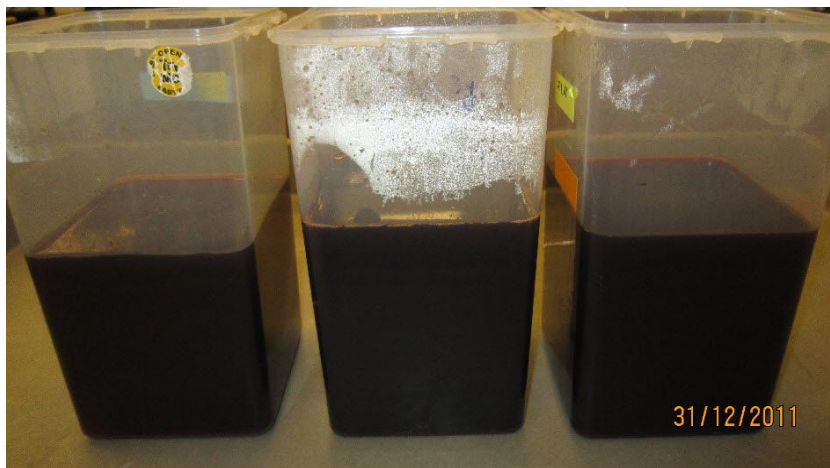


Fig. 36. Ultrafiltration을 이용하여 에탄올을 제거한 후 농축 된 ovotransferrin 용액.



Fig. 37. Batch method를 이용하여 철 이온제거에 이용될 AG1-X2 resin.



Fig. 38. Freeze dryer를 이용하여 동결건조 된 Fe-free Ovotransferrin.

나. Ovotransferrin으로부터 철분의 제거를 위한 최적 조건 개발

(1) 철 이온 (Fe^{3+})이 ovotransferrin에서 released 되는데 있어서의 pH의 영향

59%의 에탄올로 추출된 holo-ovotransferrin을 10배 볼륨의 증류수로 녹인 다음 HCl과 citric acid로 pH를 조절한 후 color 변화를 비교하여 철 이온-releasing capacity를 측정하였다. Fig. 39은 pH 변화에 따른 color 변화를 보여준 사진이다. HCl로 pH를 조정했을 경우 pH가 낮아질수록 색깔이 연해짐을 볼 수 있으나 여전히 붉은 색깔이 남아있어 철 이온-releasing이 충분히 잘 일어나지 않았다는 것을 볼 수 있다. 그에 반해 citric acid로 pH를 조정했을 경우 낮은 pH (pH 5 이하) 에서 붉은 색깔이 사라진 것으로 보아 citric acid를 사용했을 경우, pH 5 이하에서 철 이온-releasing 이 잘 일어난다는 것을 가시적으로 확인 할 수 있다. 따라서 citric acid를 사용하는 것이 HCl을 사용하는 것 보다 철 이온을 release에 훨씬 효과적이라는 것을 알 수 있다. 다만, pH가 5 이하일 경우에 모두 철 이온 release가 잘

일어났지만, pH가 너무 낮을 경우 ovotransferrin의 변성의 우려가 있으므로, 그 중 가장 최적의 pH를 선정하여 철 이온을 release 시키기로 결정하였다.

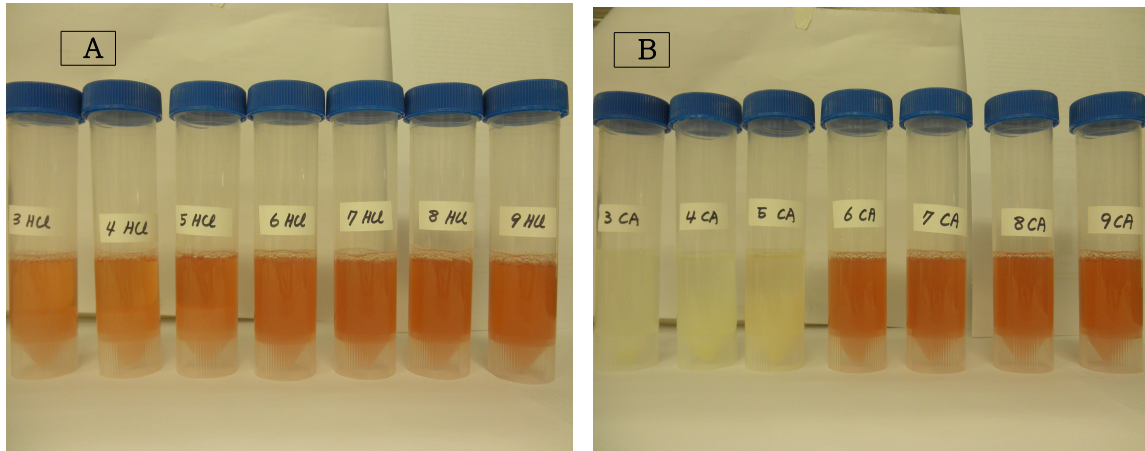


Fig. 39. pH 별 ovotransferrin의 철 이온 제거 정도 확인.
 A. pH adjusted using HCl. B. pH adjusted using citric acid.

Fig. 40-A와 B는 각각 HCl과 citric acid를 이용하여 ovotransferrin으로부터 철 이온을 release하고 AG1-X2 resin을 이용하여 철 이온을 제거한 후, ferrozine method를 이용하여 residual 철 이온을 측정된 그래프이다. Fig. 40-A와 B에서 보는 바와 같이, residual 철 이온의 농도가 citric acid를 사용했을 때가 훨씬 높고, pH가 낮을수록 residual 철 이온이 낮음을 알 수 있다. HCl과 citric acid를 사용해서 pH를 조정할 경우, citric acid를 사용한 경우가 residual 철 이온이 훨씬 낮음을 볼 수 있는데, 이는 citric acid를 이용하여 ovotransferrin으로부터 철 이온을 release한 후 AG1-X2 resin을 이용하여 철 이온을 제거하는 것이 같은 pH 조건 하에서도 훨씬 더 효과적임을 알 수 있다. 따라서 citric acid를 이용하는 것이 HCl을 이용하는 것 보다 더 좋다는 결론을 얻었으며, 이는 사진에서의 결과와 일치함을 볼 수 있다.

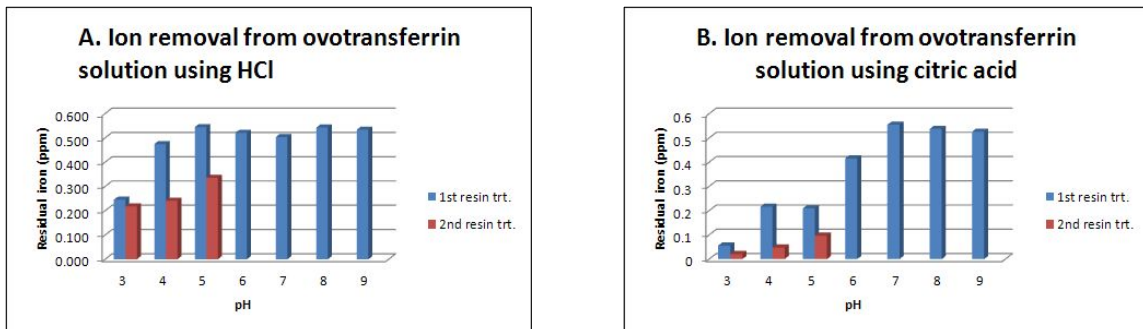


Fig. 40. HCl 및 citric acid를 이용하여 ovotransferrin으로부터 철 이온을 release한 후 AG1-X2를 이용하여 released된 철 이온을 제거한 것. A. HCl 이용 B. Citric acid 이용.

(2) 철분 제거에 필요한 resin의 최적량 확인

Holo-ovotransferrin에서 released된 철 이온의 제거를 쉽게 하기 위해서 우선 0.5 M

citric acid를 이용하여 pH 4.7로 조정 한 후, 서로 다른 양의 AG1-X2를 넣어서 철 이온 제거에 필요한 최적 AG1-X2의 양을 결정하는 실험을 수행하였다. 6 mg/mL의 ovotransferrin 이 함유된 100 mL solution에 0.1부터 0.9 g 사이의 AG1-X2 resin을 넣은 후, 노란 색을 띄는 ferric citrate가 완전히 사라질 때까지 상온에서 천천히 교반하였다. 교반 중 매 15분마다 일정양의 sample을 채취하여 용액 속에 있는 residual 철 이온의 양을 ferrozine method를 통하여 측정하였다. 그리고 ferric citrate를 제거한 후에도 남아있는 citrate는 철 이온과 binding하여 용액 속에 존재할 가능성이 있으므로 citric acid도 dialysis를 통하여 제거하였다. 그리고 citric acid가 residual 철 이온에 영향을 미치는 지도 조사하였다.

Table 21은 citric acid가 ovotransferrin 철 이온-binding capacity에 영향을 미치는 지에 대한 결과를 보여주고 있다. Table 21에서 보는 바와 같이, residual 철 이온 (ppm)의 양이 dialysis의 유무에 상관없이 값의 차이가 없다. 따라서 dialysis를 통하여 citric acid를 제거하지 않아도 ovotransferrin의 residual 철 이온에 영향을 미치지 않는다고 볼 수 있다.

Table 21. Citrate가 ovotransferrin의 철 이온-binding capacity에 미치는 영향

Treatment	Protein ¹⁾ (mg/mL)	Ovotransferrin (mg/mL)	Residual iron ²⁾ (ppm)
Without dialysis	8.59 ± 0.14	8.00 ± 0.57	0.52 ± 0.08
Dialysis	8.57 ± 0.17	8.42 ± 0.67	0.53 ± 0.06

¹⁾Protein concentrations measured by the Lowry method.

²⁾The amount of iron remaining in the solution after iron removal was measured.

Fig. 41은 100 mL ovotransferrin 당 0.1 g부터 0.9 g 까지의 AG1-X2 resin을 이용한 residual 철 이온의 양을 측정한 결과에 대한 그래프이다. AG1-X2 resin을 이용하여 released된 철 이온을 한 번 제거한 것보다 두 번 제거하였을 때의 residual 철 이온의 양이 훨씬 줄어드는 것을 볼 수 있다. 특히 0.6 g 과 0.9 g에서의 residual 철 이온 양이 확연히 줄어드는 것을 볼 수 있으므로 0.6 g 이상의 AG1-X2 resin을 이용하면 큰 효과를 볼 수 있다는 것을 알 수 있다. 0.6 g의 AG1-X2 resin 양이 0.9 g 보다 가격적인 면에서 유리한 조건에 있다는 것을 고려해 볼 때, 적어도 100 mL ovotransferrin 당 0.6 g AG1-X2 resin을 이용하여 released된 철 이온을 두 번 제거하여야 residual 철 이온의 양이 거의 무시할 수준으로 낮다는 결론을 내릴 수 있겠다. 따라서 본 실험에서는 6 mg/mL 의 ovotransferrin을 함유하는 solution 100 mL 당 0.6 g의 AG1-X2 resin을 사용하는 것으로 최종 결정하였다.

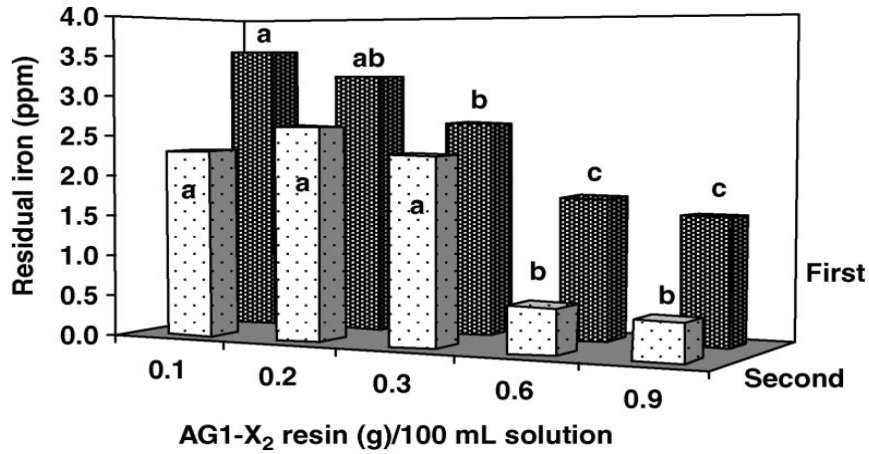


Fig. 41. AG1-X2 resin 처리에 따른 철 이온 분리 정도 확인.

3. 동물실험을 통한 ovotransferrin 및 ovotransferrin 가수분해물의 면역증강 및 항암효과 검증 및 그 기전 구명 연구

연구 디자인과 공급한 실험동물의 식이 조성은 Table 22, Fig. 42 과 같다.

Table 22. 실험 동물 식이 조성 (%)

Ingredients	Normal control	DMH	DMH+OTF ³⁾	DMH+PH ⁴⁾	DMH+TH ⁵⁾
Casein	20.0	20.0	17.5	17.5	17.5
Corn starch	40.9	40.9	40.9	40.9	40.9
Sucrose	10.0	10.0	5.8	5.8	5.8
Corn oil	10.0	10.0	6.7	6.7	6.7
Lard	12.0	12.0	12.0	12.0	12.0
Cellulose	2.0	2.0	2.0	2.0	2.0
Vitamin mixture ¹⁾	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0
Mineral mixture ²⁾	3.5	3.5	3.5	3.5	3.5
Choline bitartrate	0.3	0.3	0.3	0.3	0.3
DL-Methionine	0.3	0.3	0.3	0.3	0.3
OTF ³⁾	-	-	5.0	-	-
PH ⁴⁾	-	-	-	5.0	-
TH ⁵⁾	-	-	-	-	5.0
Total	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0

¹⁾Vitamin mixture: AIN-76A. ²⁾Mineral mixture: AIN-76A. ³⁾OTF, ovotransferrin. ⁴⁾PH, promod hydrolysate. ⁵⁾TH, trypsin hydrolysate.

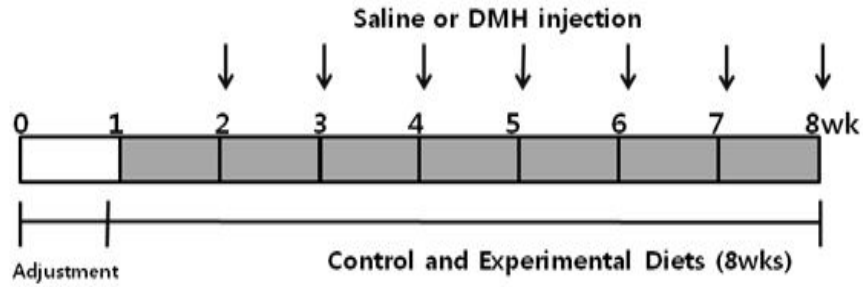


Fig. 42. 동물실험 디자인.

가. 체중증가량, 식이섭취 및 장기무게에 미치는 영향

실험 동물의 실험기간 동안의 체중증가량, 하루 평균 식이섭취량, 식이섭취 효율, 그리고 각 장기의 무게는 Table 23에 제시하였다. 총 체중증가량은 정상 대조군과 비교하였을 때, [대장암 대조군], [대장암 유발+ovotransferrin 공급군], [대장암 유발+trypsin 가수분해물 공급군]의 체중이 유의적으로 높았으며, [대장암 유발+promod 278 가수분해물 공급군]은 [대장암 대조군]에 비해 유의적으로 높게 나타났다. 반면, 세 가지 시료 공급군 사이에서는 유의적인 차이가 나타나지 않았다.

하루 식이섭취량의 경우 정상 대조군에 비해 [대장암 유발+trypsin 가수분해물 공급군]이 유의적으로 높았으며, 각 시료 공급군 사이에서는 유의적인 차이가 나타나지 않았다.

식이섭취효율은 정상 대조군에 비해 [대장암 유발군]과 [대장암 유발+ovotransferrin 공급군]이 유의적으로 낮게 나타났으며, [대장암 유발+promod 가수분해물 공급군]은 [대장암 대조군]에 비해 유의적으로 높게 나타났고, 각 시료 공급군 사이에서는 유의적인 차이가 나타나지 않았다.

간 조직의 무게는 정상대조군에 비해 [대장암 유발군]과 각각의 시료 공급군에서 유의적으로 높게 나타났으며, 심장, 신장, 비장의 무게는 유의적인 차이가 나타나지 않았다.

Table 23. Ovotransferrin과 그 가수분해물이 weight gain, food intake, food efficiency ratio, organ weight 에 미치는 영향

Ingredients	NC ¹⁾	DMH ²⁾	DMH +OTF ³⁾	DMH +PH ⁴⁾	DMH +TH ⁵⁾
Body weight gain (g)	147.50±3.86 ^c	122.79±4.34 ^a	129.50±4.75 ^{ab}	137.14±4.33 ^{bc}	129.71±5.01 ^{ab}
Food intake (g/day)	16.88±0.15 ^b	16.41±0.17 ^{ab}	16.46±0.15 ^{ab}	16.26±0.19 ^{ab}	16.06±0.16 ^a
FER ⁶⁾	0.15±0.00 ^c	0.13±0.00 ^a	0.13±0.00 ^{ab}	0.14±0.00 ^{bc}	0.14±0.00 ^{abc}
Relative organ weight (g/100 g BW)					
Liver	2.45±0.07 ^a	3.01±0.09 ^b	2.94±0.07 ^b	2.86±0.04 ^b	2.94±0.05 ^b
Heart	0.33±0.05 ^{ns}	0.33±0.01	0.33±0.01	0.35±0.01	0.33±0.01
Kidney	0.65±0.03 ^{ns}	0.73±0.03	0.73±0.02	0.68±0.03	0.68±0.02
Spleen	0.19±0.01 ^{ns}	0.20±0.02	0.22±0.01	0.22±0.01	0.22±0.01

Values are mean±SE for 10 animals in each group. ¹⁾NC, normal control. ²⁾DMH, dimethyl-hydrazin. ³⁾OTF, ovotransferrin. ⁴⁾PH, promod hydrolysate. ⁵⁾TH, trypsin hydrolysate. ⁶⁾FER, food efficiency ratio=weight gain (g/day)/food intake (g/day).

나. 지질성상에 미치는 영향

식이 급여에 따른 지질 성상의 변화는 Table 24에 제시하였다. [대장암 대조군]의 TG, GOT, GPT는 [정상대조군]에 비해 유의적으로 증가하였으며, 그 외 TC, HDL 콜레스테롤, LDL 콜레스테롤의 혈중 농도는 변화가 없었다. 8주간의 시료 공급 후, 간 기능 지표인 GOT는 [대장암유발+trypsin 가수분해물공급군]에서만 유의적으로 감소한 것으로 나타났다.

Table 24. Ovotransferrin과 그 가수분해물이 DMH-treated rats 모델에서 지질성상에 미치는 영향

Ingredients	NC ¹⁾	DMH ²⁾	DMH +OTF ³⁾	DMH+PH ⁴⁾	DMH+TH ⁵⁾
TC ⁶⁾ (mg/dL)	106.7 ± 2.2	118.4 ± 4.8	121.3 ± 5.5	109.4 ± 6.1	113.3 ± 4.4 ^{ns)}
TG ⁷⁾ (mg/dL)	48.7 ± 2.9 ^a	65.6 ± 4.4 ^b	70.6 ± 6.2 ^b	65.9 ± 5.4 ^b	60.6 ± 2.8 ^{ab}
HDL-C ⁸⁾ (mg/dL)	47.0 ± 3.0	51.9 ± 2.3	53.0 ± 4.0	46.14 ± 2.3	53.3 ± 3.2 ^{ns)}
LDL-C ⁹⁾ (mg/dL)	50.0 ± 1.7	53.5 ± 2.1	54.17 ± 4.6	50.1 ± 4.7	47.9 ± 2.6 ^{ns)}
GOT ¹⁰⁾ (U/L)	43.9 ± 3.0 ^a	53.9 ± 2.3 ^b	47.4 ± 3.4 ^{ab}	46.9 ± 1.8 ^{ab}	40.9 ± 1.7 ^a
GPT ¹¹⁾ (U/L)	17.7 ± 1.6 ^a	32.6 ± 3.6 ^b	30.9 ± 4.0 ^b	29.6 ± 2.5 ^b	28.1 ± 4.0 ^b

Values are mean±SE for 10 animals in each group. ¹⁾NC, normal control. ²⁾DMH, dimethyl-hydrazin. ³⁾OTF, ovotransferrin. ⁴⁾PH, promod hydrolysate. ⁵⁾TH, trypsin hydrolysate. ⁶⁾TC, total cholesterol. ⁷⁾TG, Triglycerides. ⁸⁾HDL-C, High-density lipoprotein. ⁹⁾LDL-C, low-density lipoprotein. ¹⁰⁾GOT, glutamic oxaloacetic transaminase. ¹¹⁾GPT,glutamic pyruvic transaminase. ^{ns)}not significant.

다. 총항산화능 및 적혈구 항산화 효소에 미치는 영향

혈장 총항산화능 (TRAP)과 적혈구 항산화 효소 (catalase)의 활성은 [정상대조군], [대장암대조군], 혹은 각 시료 공급군 간에 유의적인 차이가 나타나지 않았다 (Table 25). 그러나 [대장암유발+trypsin 가수분해물공급군]에서는 총 항산화능, catalase 효소 활성이 [대장암대조군]에 비해 증가하는 경향을 보였다.

Table 25. Ovotransferrin과 그 가수분해물의 총항산화능 및 적혈구 항산화 효소에 미치는 영향

Ingredients	NC ¹⁾	DMH ²⁾	DMH +OTF ³⁾	DMH+PH ⁴⁾	DMH+TH ⁵⁾
TRAP ⁶⁾ (mM)	1.2 ± 0.0	1.2 ± 0.0	1.3 ± 0.0	1.2 ± 0.1	1.3 ± 0.0 ^{ns)}
Catalase (K/g Hb)	798.1 ± 132.3	795.9 ± 89.6	774.2 ± 87.3	797.4 ± 46.5	822.1 ± 67.2 ^{ns)}

Values are mean±SE for 10 animals in each group. ¹⁾NC, normal control. ²⁾DMH, dimethyl-hydrazin. ³⁾OTF, ovotransferrin. ⁴⁾PH, promod hydrolysate. ⁵⁾TH, trypsin hydrolysate. ⁶⁾TRAP, total radical trapping antioxidant potential. ^{ns)}not significant.

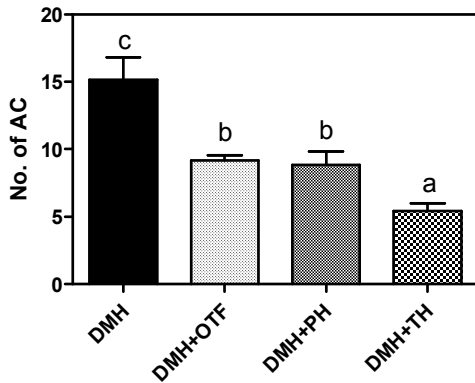
라. 대장조직의 AC 및 ACF 생성에 미치는 영향

Ovotransferrin 및 그 가수분해물이 DMH로 유도한 대장암 rat 모델에서 대장암의 전암병변인 AC (aberrant crypt) 및 ACF (aberrant crypt foci)의 수에 미치는 영향은 Fig. 43에 제시하였다 (Kanna *et al.*, 2003; Kaneko *et al.*, 2007; Tanwar *et al.*, 2009; Senedese *et al.*, 2013). [대장암대조군]의 대장조직에서는 [정상대조군]의 조직과 달리 비정상적인 세포분열로 인한 세포의 크기와 모양 변형과 상피조직이 두꺼워진 AC와 이러한 비정상적인 crypt가 여러개 모여 형성된 ACF가 관찰되었다. 8주간의 ovotransferrin 및 그 가수분해물 공급은 AC와 ACF의 생성을 유의적으로 감소시키는 것으로 나타났으며, 특히 [대장암유발+trypsin 가수분해물공급군]의 전암병변이 확연하게 억제된 것을 확인할 수 있었다.

DMH와 같은 화학적 발암물질은 대부분 그 자체로는 발암성을 나타내지 못하나, cytochrome P450등의 산화 효소들이 촉매하는 생체 대사 과정을 거쳐 친전자성 반응물질 (electrophilic reactant)로 활성화 된다. 이들 친전자성인 대사산물들은 생체 내에 존재하는 친핵성 물질인 DNA와 반응하여 DNA adduct를 생성하고, DNA 손상이 회복되지 않으면 DNA 복제 시 돌연변이가 일어나 암을 유발하게 된다.

한편, 대장상피세포의 과도한 세포분열이 대장 내 종양형성 및 대장암의 발생과 밀접한 상관성을 가진다고 알려져 있다. 따라서 DMH로 유도한 rat 모델에서 대장암 전암 병변인 AC 와 ACF의 생성이 유의적으로 억제되었으므로 ovotransferrin 및 그 가수분해물의 항암소재로서의 가치가 입증되었다고 할 수 있다.

A



B

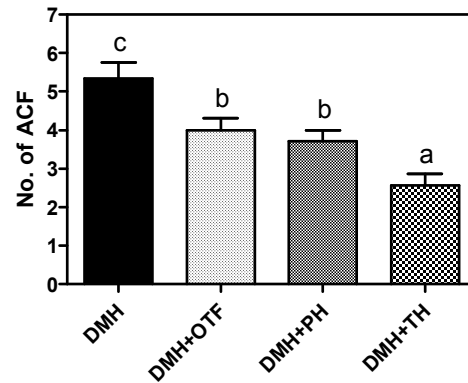


Fig. 43. Ovotransferrin과 그 가수분해물이 대장조직의 AC 및 ACF 생성에 미치는 영향.

DMH: One week after beginning the diets, rats were treated with dimethyl-hydrazin (DMH) 30 mg/kg for 7 weeks. DMH+OTF: Rats were treated with 30 mg/kg DMH + 5% ovotransferrin. DMH+PH: Rats were treated with 30 mg/kg DMH + 5% promodhydrolysate. DMH+TH: Rats were treated with 30 mg/kg DMH + 5% trypsinhydrolyate. Bars represent mean \pm S.E. Bars with different superscripts are significantly different at the $p < 0.05$ level by ANOVA and Duncan's multiple range test.

4. Ovotransferrin 가수분해물의 대량생산공정 개발

가. Ovotransferrin 가수분해물의 시험법 및 품질평가 기준 확립

(1) Bradford assay를 통한 단백질 정량

난백에서 분리 정제된 ovotransferrin 농축물 및 그 가수분해물의 단백질량을 정량하기 위하여 Bradford assay를 수행하였다 (Whiffen *et al.*, 2007; Carlsson *et al.*, 2011). Bradford assay는 다음의 과정으로 수행하였다. Protein standard 용액으로 쓸 BSA (bovine serum albumin; Sigma, USA)은 1 mg/mL 농도로 희석 후 1/2씩 serial dilution하여 준비하였다. Bradford 시약 (Biorad, USA)은 증류수로 5배 희석하여 준비하였다. 희석한 BSA 200 μ L에 Bradford 시액 800 μ L를 첨가하여 섞어준 후, 5분 간 실온에서 반응시킨다. 595 nm에서 흡광도를 측정 후, 증류수에서 반응한 값으로 data를 보정하여 standard curve를 그려 구하였다.

Ovotransferrin 및 가수분해물의 단백질 농도를 측정하기 위해 시료를 증류수로 사용해 적절한 농도로 희석하였다. 희석한 실험용액 200 μ L에 Bradford 시액 800 μ L를 첨가하여 섞어준 후 5분 간 실온에서 반응시키고, 595 nm에서 흡광도를 측정하였다. 증류수에서 반응한 값으로 data를 보정 후 앞에서 구한 추세식에 대입하여 시료의 단백질량을 구할 수 있었다.

단백질 정량결과, ovotransferrin 가수분해물의 단백질 함량은 150~250 mg/g 사이로 가수분해 전에 비해 단백질 함량이 낮게 측정되어 가수분해가 잘 이루어졌음을 확인할 수 있었다 (Table 26).

Table 26. Ovotransferrin 가수분해물의 단백질 함량

Sample	Sample 1	Sample 2
Conc. of protein (mg/g)	182.2 ± 2.9	171.5 ± 5.3

(2) SDS-PAGE를 통한 단백질 순도 확인

제조된 ovotransferrin 가수분해물의 가수분해 정도를 확인하기 위하여 아래의 방법으로 전기영동을 실시하였다. Ovotransferrin standard (C-0755; Sigma, USA) 및 ovotransferrin 가수분해물은 1 mg/mL이 되도록 증류수에 녹여 희석하였다. 시료 희석 용액 100 μL에 sample buffer 25 μL를 혼합 후 100°C에서 15분 간 열처리를 하였다. Acrylamide를 함유한 SDS gel을 제조한 후 well에 열처리한 시료를 10 μL씩 loading하여 전기영동을 실시하였다. Protein marker로는 Bio-rad사 (USA)의 prestained SDS-PAGE standards (Cat.1261-0318)을 5 μL 사용하였다.

SDS-PAGE 결과, ovotransferrin이 모두 분해되어 ovotransferrin의 밴드는 사라진 것을 확인할 수 있었고, 29 kDa 이하에서 다양한 단백질 및 펩타이드 밴드를 확인할 수 있었다 (Fig. 44).

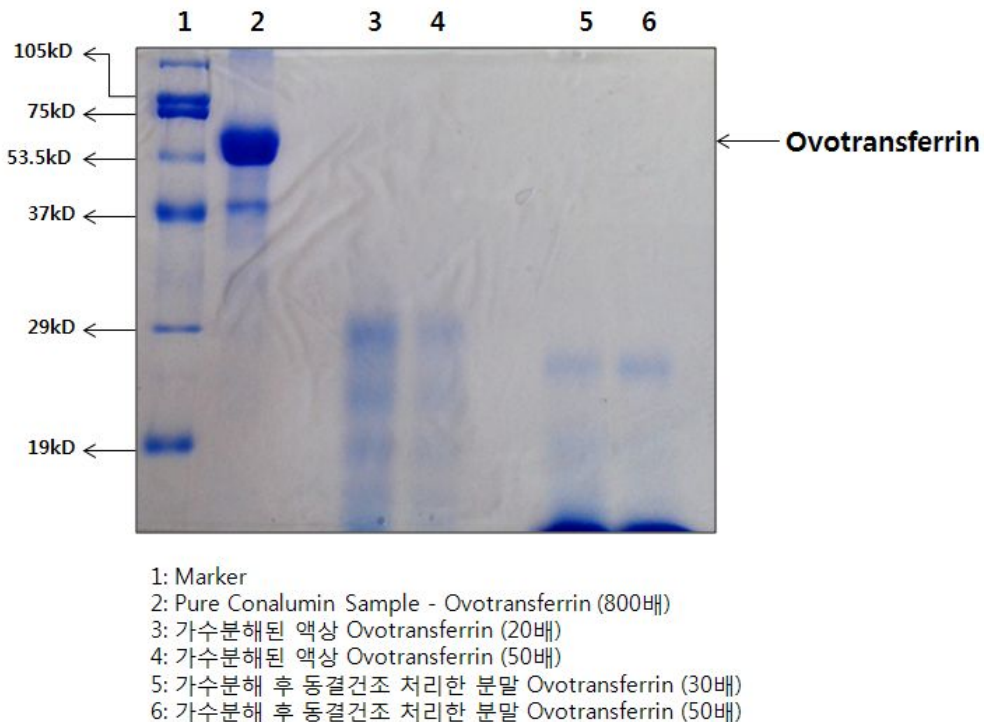


Fig. 44. Ovotransferrin 가수분해물의 SDS-PAGE 결과.

(3) MALDI-TOF를 통한 분석

시료 20 mg을 LC water (0.2% TFA) 1 mL에 현탁한 후, 시료용액 2 μL에 HCCA matrix solution을 4 μL 첨가하여 잘 섞어주었다. 그 후 2 μL를 well에 점적하여 air-dry

를 수행한 후 Table 27의 조건으로 MALDI-TOF 분석을 실시하였다.

분석결과 600-7000 Da 사이의 다양한 펩타이드 분자들이 검출되어 가수분해가 잘 되었음을 확인할 수 있었다 (Fig. 45). 그러나 분석결과 특정 분자량의 펩타이드만 존재하는 것이 아니라 다양한 크기의 펩타이드들이 혼재하여 존재하여 가수분해 후 분해된 펩타이드의 특징은 불가능하였다.

Table 27. MALDI-TOF 분석 조건

항목	조작 조건	항목	조작 조건
Mode of operation	Reflector	Acquisition mass range	600~7000 Da
Extraction mode	Delayed	Number of laser shots	500/spectrum
Polarity	Positive	Laser intensity	950~1400
Acquisition control	Manual	Laser Rep Rate	20.0Hz
Accelerating voltage	20,000 V	Calibration type	Cal Mix 2
Grid voltage	70.5%	Calibration matrix	CHCA
Guide wire	0.0%	Low mass gate	500 Da
Extraction delay time	300 nsec	Instrument name	Ultraflex III

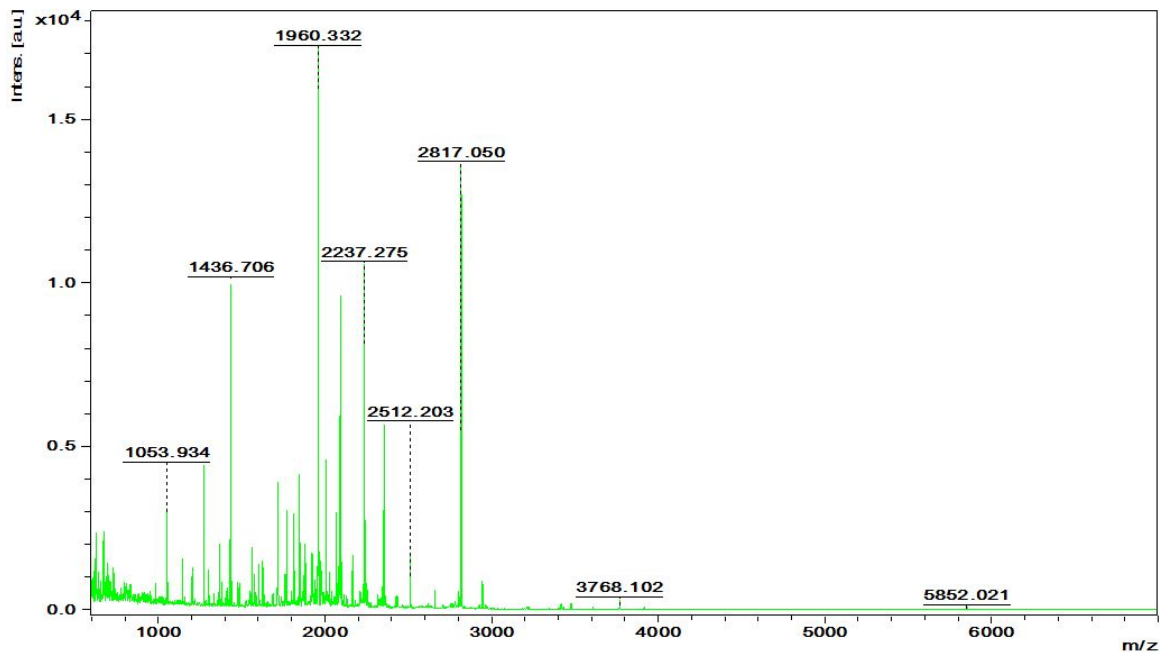


Fig. 45. ovotransferrin 가수분해물의 MALDI-TOF 분석 결과.

나. Ovotransferrin 가수분해물의 생산공정 검토 및 scale-up test

(1) 1차 에탄올 침전 및 원심분리 단계

난백에서 ovotransferrin만 분리하기 위해 ovotransferrin에 Fe을 붙여 용해도를 높여준 후, 에탄올을 첨가하여 ovotransferrin 외 다른 단백질들을 침전시켰다. 침전된 단백질들은 원심분리를 통해 제거하여 Fe-ovotransferrin 에탄올 용액을 얻었다.

이 단계를 상세히 기술하면 다음과 같다. 난백에 동량의 증류수를 넣고 교반하여 잘 섞어주었다. 0.5 M FeCl₃ 용액을 제조한 후, 난백-증류수 용액 L당 0.8 mL의 비율로 첨가한 후 교반하여 잘 섞어주었다. 30분 간 방치하여 철 이온이 ovotransferrin과 충분히 결합될 수 있도록 하여준 후, 에탄올을 43% 농도가 될 때까지 첨가하고 잘 저어주었다. 에탄올이 첨가되면 연분홍빛의 침전이 형성되는 것을 관찰할 수 있는데, 이 침전은 ovotransferrin 외 다른 단백질들로 이를 2,500×g 이상으로 원심분리를 하여 제거하여 주었다.

원심분리 단계에서 대량 생산 시 고려해야 할 점은, 연속식 원심분리기의 사용 적합성 여부였다. 연속식 원심분리기의 경우, 통상 실험실에서 사용하는 원심분리기에 비해 같은 rpm에서 더 낮은 원심력을 나타내므로 대량생산공정에서는 적절한 원심분리기를 선택하는 것이 생산성에 중요한 영향을 미칠 것으로 판단되었다. 또한 에탄올 침전 시 발생하는 침전물의 양이 전체 용량의 20%에 달하여 지속적인 침전물의 제거도 효율적인 원심분리의 조건이 될 것으로 판단되었다.

현재 (주)씨티씨바이오에서 보유하고 있는 연속식 원심분리기는 batch 타입으로 원심 분리하고자 하는 액은 연속으로 들어가나, 원심분리기 bowl의 용량에 제한이 있어 bowl 안에 침전물이 차게 되면 작동을 멈추고 수동으로 침전물을 긁어 제거해주어야 하는 형태이다. 회사 보유 연속식 원심분리기로 원심분리를 실시한 결과, 10,000 rpm 이상의 속도에서 연속식으로 원심분리를 실시하였을 때 침전물의 분리가 원활히 이루어졌다. 하지만 침전물의 양이 많기 때문에 대량 생산 시에는 중간중간 bowl 안의 침전물을 제거해주어야 하는 어려움이 있었다.

이에 원심분리기 bowl 안의 침전물도 지속적으로 제거해주는 타입의 원심분리기의 적용을 검토해 볼 필요가 있다고 판단된다. 단 이런 타입의 연속식 원심분리기의 경우, batch타입 연속식 원심분리기에 비해 rpm이 낮은 단점이 있어 test를 통해 분리능을 확인할 필요가 있을 것이다.

(2) Ultrafiltration 및 농축 단계

원심분리를 통해 ovotransferrin 외 단백질을 제거한 Fe-ovotransferrin 에탄올 용액을 ultrafiltration을 통해 순도를 높이고 에탄올을 제거, 농축하는 공정을 실시하였다.

원심분리가 끝난 Fe-ovotransferrin은 에탄올의 농도가 43%나 되므로 동결건조가 불가능하다. 따라서 ovotransferrin의 순도를 높이고 에탄올을 제거하는 공정이 필요한데, ultrafiltration을 통해 에탄올 제거 및 농축을 실시하였다. Ovotransferrin의 분자량은 약

76,000 Da으로 이미 에탄올 침전 단계에서 ovotransferrin 외의 대부분의 단백질은 제거되었지만, 제거되지 못한 저분자의 단백질을 최종적으로 제거하기 위해 30,000 Da size로 ultrafiltration을 실시하였다. 이 때 에탄올 농도가 높으면 UF의 막이 손상될 가능성이 크기 때문에 정제수로 에탄올의 농도를 20% 이하가 되도록 희석하여 ultrafiltration을 실시하였다.

원심분리 후 회수한 Fe-ovotransferrin 에탄올 용액을 정제수로 20% 이하가 되도록 희석한 후, 우선 원심분리에서 미처 제거되지 못한 침전물을 제거하기 위해 microfiltration을 실시하고, 30,000 Da size로 ultrafiltration을 실시하였다. 이때 정제수 희석 농도는 ultrafiltration의 재질 및 용량에 따라 결정하는 것이 바람직하며, 이후 에탄올 제거를 위해 정제수로 몇 차례 더 희석하여 UF를 하여야 하므로 희석농도를 높이는 것도 결과에는 영향을 미치지 않았다. Ultrafiltration 공정에서 ovotransferrin의 순도 향상 및 농축을 하는 것 외에도 용액의 에탄올도 제거해야 하므로, UF로 농축된 농축액을 정제수로 희석하여 2-3회 더 ultrafiltration을 실시하여 에탄올을 완전히 제거하였다. 최종적으로는 초기 난백의 양 대비 10%가 되도록 최종 농축액을 회수하였다.

(3) Fe-ovotransferrin의 생산

UF가 끝난 농축액을 동결건조하면 Fe-ovotransferrin을 얻을 수 있다. Fe-ovotransferrin은 철분 보충용 기능성 원료로 이용이 가능할 것으로 판단되며, 생산 공정도 간단하여 향후 산업화 가능성도 높을 것으로 판단된다. 단, 향후 산업화를 위해서는 효능 평가 및 안전성에 대한 평가가 필요할 것으로 판단된다.

(4) Ovotransferrin의 생산

Ovotransferrin의 생산을 위해서는 Fe-ovotransferrin에 붙어있는 철 이온을 제거해주어야 한다. 철 이온제거를 위해 우선 0.5 M citric acid를 사용하여 농축액의 pH를 4.5로 조정하였다. Citric acid를 첨가하면 산에 의해 철 이온이 ovotransferrin에서 떨어져 나가 농축액의 붉은색이 사라지고 노란빛으로 색이 변하게 된다. 이 과정에서 UF 농축이 충분히 이루어지지 않으면, pH 4.5로 조정하는 단계에서 citric acid의 첨가량이 적어지고, 이에 따라 철 이온이 ovotransferrin에서 분리가 되지 않아 철 이온의 제거가 이루어지지 않는 것을 확인하였다. 따라서 철 이온을 제거하기 위해서는 ultrafiltration 후 초기 난백량 대비 20% 이하로 농축이 이루어져야 한다.

이후 용액에서 철 이온을 제거하기 위해 ion-exchange resin을 농축액 1 mL 당 1 g의 양으로 첨가하여 주었다. Resin 첨가 후 철 이온의 제거 정도를 판단하기 위해 아래의 방법에 따라 용액의 철 이온 함량을 측정하였으며, 그 결과에 따라 resin을 제거하고 새로운 resin을 처리하는 과정을 반복하여 주었다. 용액의 철 이온 함량이 0.5 ppm 이하가 되었을 때 용액의 철 이온이 대부분 제거된 것으로 판단하고 resin을 걸러내어 용액에서 완전히 제거하였다.

용액의 철 이온 함량 측정은 울쏘 페난트로린 비색법 (식품공전, 2011)을 사용하며, 다음과

같은 방법으로 실시하였다.

필요한 시약은 다음과 같다.

- (가) 페난트로린 용액 : 올쏘페난트로린염산염 ($C_{12}H_8N_2 \cdot HCl \cdot H_2O$) 0.5 g을 물을 가하여 200 mL로 하여 냉소에 보존한다.
- (나) 하이드로퀴논 용액 : 하이드로퀴논 ($C_6H_6O_2$)을 물에 녹여 쓰며 사용할 때마다 새로 만들어야 한다 (희석배수 1%).
- (다) 구연산나트륨 용액 : 특급 구연산나트륨 ($Na_3C_6H_5O_7 \cdot H_2O$) 50 g을 물을 가하여 200 mL로 한다. 필요하다면 여과하여 냉소에 보존한다.
- (라) 브롬페놀블루 시약 : 브롬페놀블루 0.1 g을 0.05 N 수산화나트륨액 3 mL로 녹이고 물을 가하여 250 mL로 한다.
- (마) 철 표준액 : 특급 황산 제1철 암모늄 [$Fe(NH_4)_2(SO_4)_2 \cdot 6H_2O$] 0.7021 g을 약 1%의 염산에 용해하여 1 L로 한다. 이 액 1 L중에는 철 0.1 mg을 함유한다 (0.1 ppm).
- (바) 단백질 침전용 TCA 용액 : 11.3% TCA 를 증류수에 녹여준다.

실험 방법은 다음과 같다. 단백질 침전용 TCA용액 20 mL 과 ovotransferrin 용액 sample 20 mL (1:1)로 섞어 원심분리 (1,900×g, 20 분) 실시하여 단백질을 제거하였다. 단백질이 제거된 샘플 10 mL을 25 mL 메스플라스크 (50 mL 메스실린더)에 취하고, 별도로 pH 조절용 대조액으로 쓰기 위해 같은 sample 10 mL을 작은 삼각플라스크에 취하였다. pH 조절용 대조액에 브롬페놀블루 시약 4방울 (20-200 μ L피펫 이용) 가하고, 구연산나트륨용액을 첨가하면서 지시약이 황색에서 황록색으로 변하는 점까지 (pH 3.5) 적가하고, 이때까지 소요된 구연산나트륨 용액의 mL수를 기록하였다. 실험용 25 mL 메스플라스크에는 하이드로퀴논 용액 1 mL, 페난트로린 용액 2 mL을 가하고, pH 조절용 대조액에 들어간 구연산나트륨 용액 mL수 만큼 구연산나트륨 용액을 첨가한 후, 증류수를 이용하여 25 mL까지 용량을 맞추어 주었다. 이를 20°C 이상의 온도에서 1시간 이상 방치한 후, 510 nm에서 흡광도를 측정하였다.

철 표준용액에 대해서도 제조한 철 표준액 (0.1 ppm)을 증류수로 10배 희석한 후, 희석한 철 표준액을 1, 2, 5, 10, 15, 20 mL씩에 대해 위와 같은 방법으로 동일하게 실험을 실시하고, 510 nm에서 흡광도를 측정하여 검량선을 작성하였다. 작성된 검량선과 시료에 대해 측정된 흡광도 값을 비교하여 용액의 철 함량을 구하였다.

철 이온의 제거가 완료되면 resin을 제거하고, NaOH를 이용하여 pH를 중성으로 조정 한 후 동결건조를 실시하여 ovotransferrin을 회수하였다.

(5) Ovotransferrin 가수분해물의 생산

In vitro 평가에서 가장 효과가 좋았던 promod 278 가수분해물의 생산 공정을 검토하였다. 앞에서 제조된 ovotransferrin 농축액의 단백질 량을 Bradford assay로 측정한 후, 효소와

용액 내 단백질 량의 비율이 1:25 (w:w)이 되도록 첨가하여 주었다. 이때 사용한 효소는 식품용 단백질 가수분해 효소인 promod 278로 비전 바이오켄에서 구입하였다.

효소 첨가 후, 천천히 저어주면서 45℃에서 3 시간 동안 반응시킨 후, 90-100℃에서 10분 간 열처리하여 반응을 정지시켰다. 이후 이를 4000 rpm 이상에서 원심분리하고 상층액을 동결 건조하여 최종 가수분해물을 제조하였다.

(6) Ovotransferrin 가수분해물의 scale-up test 및 생산수율 검토

각 생산 단계의 검토 결과 확립된 생산공정은 Fig. 46와 같다. 이에 따라 난백 50 L를 가지고 scale-up test를 실시하였다. 이 과정에서 각 생산공정 별 생산량은 Fig. 47에 나타내었다.

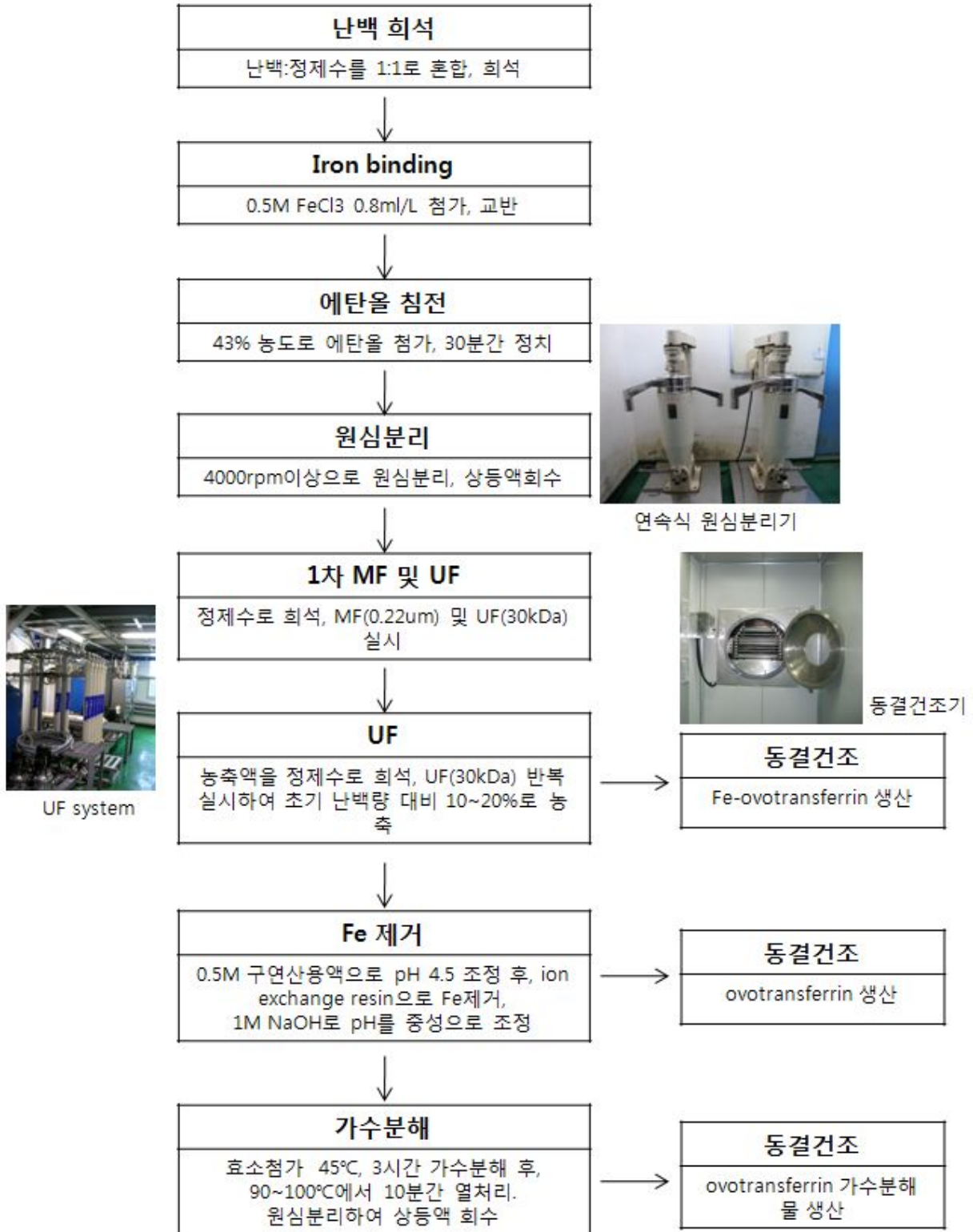


Fig. 46. Ovotransferrin 및 ovotransferrin 가수분해물 생산공정.

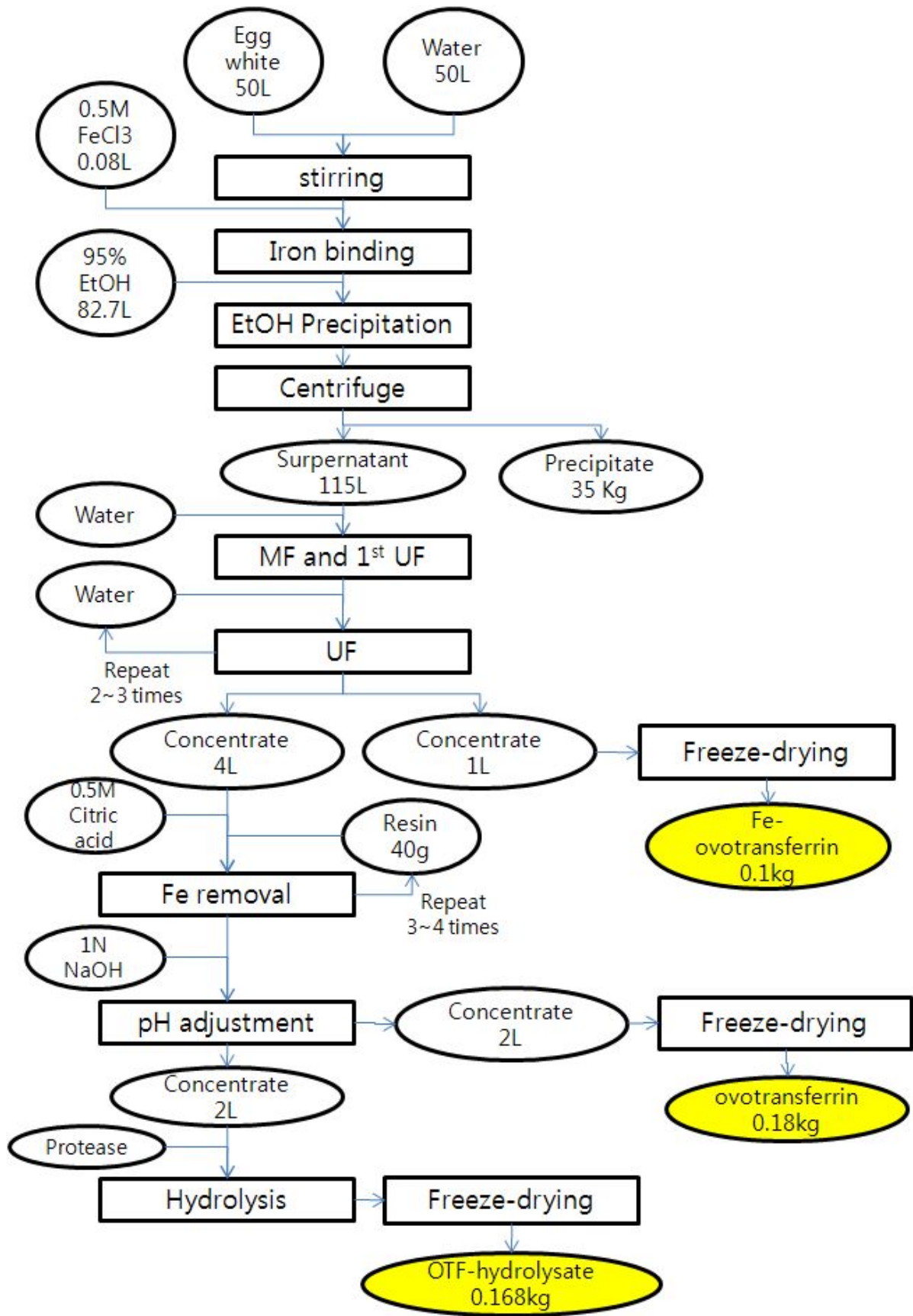


Fig. 47. Ovotransferrin 대량 생산 공정.

Ovotransferrin의 분리 정제도를 확인하기 위하여 공정 별로 시료를 채취, SDS-PAGE를 통하여 ovotransferrin의 순도를 확인하였다 (Fig. 48). 그 결과 43% 에탄올 침전 이후 원심 분리 단계에서 ovotransferrin외의 대부분의 protein이 제거되는 것을 확인할 수 있었다.

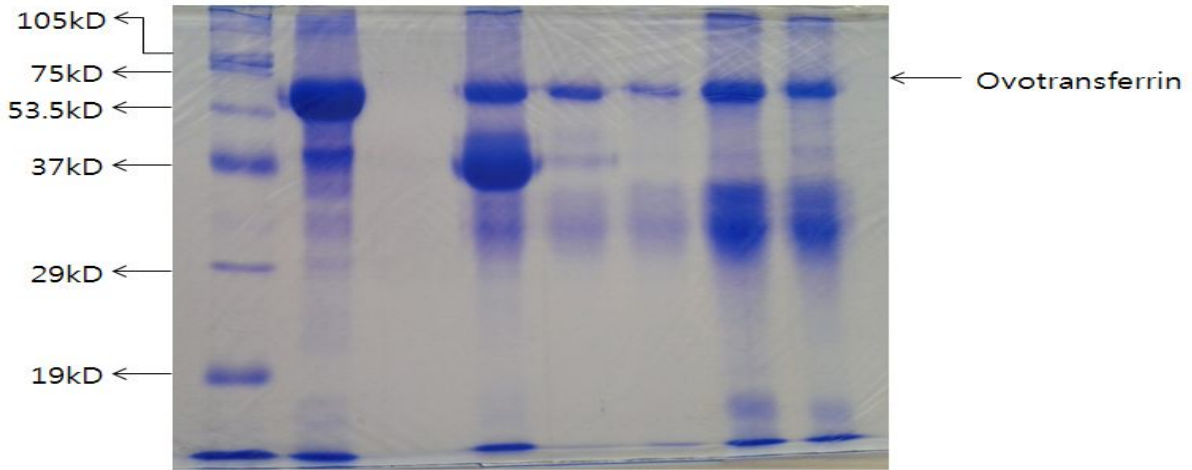


Fig. 48. 생산공정 별 ovotransferrin의 분리도 확인.

- 1 : Protein marker
- 2 : Ovotransferrin standard (400배 희석) (Sigma)
- 3 : 에탄올 첨가 후 원심분리 전 공정 (20배 희석)
- 4 : 원심분리 후 상등액 (20배 희석)
- 5 : 1차 ultrafiltration 후 (20배)
- 6 : Ultrafiltration 후 최종 농축액 (50배)
- 7 : Resin 처리 후 철 이온이 제거된 ovotransferrin 농축액 (50배)

Table 29. Ovotransferrin 및 ovotransferrin 가수분해물 생산수율 평가

공정	생산량 (L or kg)	단백질 농도 (mg/mL)	총 단백질량 (g)	회수율 (%)
Ovotransferrin 이론량 계산	50	14	700	-
에탄올침전 후 원심분리 상등액	115	4.26	489.9	70.0%
UF 후 농축액	5	78.29	391.45	55.9%
Fe-ovotransferrin 생산	0.5 ¹⁾	-	500	71.4%
Ovotransferrin 생산	0.5 ²⁾	-	450	64.3%
Ovotransferrin 가수분해물 생산	0.5 ³⁾	-	421	60.1%

¹⁾ UF 후 농축액 5 L 중 1 L를 사용하여 0.1 kg의 Fe-ovotransferrin을 회수하였으나, 편의상 UF 후 농축액 5 L 전체를 사용하였을 때 예상되는 생산량 (×5)을 추정하여 계산.

²⁾ UF 후 농축액 5 L 중 2 L를 사용하여 0.2 kg의 ovotransferrin을 회수하였으나, 편의상 UF 후 농축액 5 L 전체를 사용하였을 때 예상되는 생산량 (×2.5)을 추정하여 계산.

³⁾ UF 후 농축액 5 L 중 2 L를 사용하여 0.2 kg의 ovotransferrin을 회수하였으나, 편의상 UF 후 농축액 5 L 전체를 사용하였을 때 예상되는 생산량 (×2.5)을 추정하여 계산.

또한 생산수율의 계산을 위해 단백질 농도를 Bradford assay로 정량하여 측정된 후, 생산량에 mL 당 단백질 농도를 곱하여 총 단백질량을 계산하였다. 그리고 이론상의 계란 난백 내 ovotransferrin 양과 비교하여 회수율을 계산하였다 (Table 29). 이론 상의 계란 난백 내 ovotransferrin 량은 난백 1 mL 당 ovotransferrin 14 mg으로 (Ko and Ahn, 2008), 50 L의 난백 내에 존재하는 ovotransferrin의 이론 량은 700 g으로 추정된다. 이론 량과 비교하였을 때, 에탄올 침전 이후 원심분리 과정에서의 회수율은 70%였고 이후 UF 최종 농축액에서의 회수율은 55.9%였다.

이를 공정 별로 평가해보면 원심분리 단계에서의 손실이 30%, UF 단계에서의 손실이 약 14%로 원심분리 단계에서 침전물에 상당수의 ovotransferrin이 함께 침전되어 나간 것으로 판단된다. 따라서 ovotransferrin의 생산 수율을 높이기 위해서는 원심분리 단계의 공정 개선이 보다 필요할 것으로 보인다.

50 L의 난백을 처리하여 얻은 UF 농축액은 총 5 L로, 초기 난백 량 대비 10%까지 농축을 실시하였다. 이 농축액 중 1 L는 그대로 동결건조 하여 100 g의 Fe-ovotransferrin을 회수하였다. 이때 난백 중 존재하는 ovotransferrin의 이론량과 대비하여보면, 회수율은 71.4%로 동결건조 과정에서의 손실은 없는 것으로 평가되었다.

나머지 농축액 4 L는 철 이온 제거 공정 이후 1 N NaOH로 pH를 6.5까지 조정하였다. 이 중 2 L는 동결건조하여 180 g의 ovotransferrin을 회수하였고, 이는 ovotransferrin 이론량 대비 회수율은 64.3%였다. 나머지 2 L는 효소로 가수분해하여 동결건조를 실시하였고 최종적으로 168.4 g의 ovotransferrin 가수분해물을 회수하였다. 가수분해 단계에서의 회수율은 회수된 ovotransferrin의 양과 대비하였을 때 93.6%였으며, ovotransferrin 이론량과 대비하였을 때는 60.1%였다.

Scale-up test 결과 사용된 원료량 및 최종 생산량을 바탕으로 kg 당 제조 원가를 계산하여 Table 30에 나타내었다.

Table 30. Ovotransferrin 및 ovotransferrin 가수분해물의 제조원가

원료명	원료단가 (원/kg or L)	Fe-ovotransferrin		Ovotransferrin		Ovotransferrin 가수분해물	
		1kg		1kg		1kg	
		원료사용량 (kg or L)	제조원가 (원)	원료사용량 (kg or L)	제조원가 (원)	원료사용량 (kg or L)	제조원가 (원)
난백	1,300	100	130,000	111	144,444	119	154,394
염화제이철	14,000	0.022	303	0.024	336	0.026	360
95%발효주정	4,000	165.4	661,600	183.8	735,111	196.4	785,748
구연산	14,000	-	-	0.016	229	0.017	245
Promod 278	150,000	-	-	-	-	0.05	7,126
계			791,903		880,121		947,873

Table 30에 나타낸 제조 원가는 사용된 원료의 가격만을 계산한 것으로, resin의 경우 재생하여 재사용이 가능하기 때문에 원료의 가격에서는 제외하고 계산하였다. 원가 계산 결과 ovotransferrin 및 ovotransferrin 가수분해물의 kg당 제조 원가는 약 90 만원 선으로 추정되었다. 1차년도에 조사한 바에 의하면 국내에 철분 보충제 원료로 수입되고 있는 철 이온 acetyl-transferrin (ovotransferrin)의 가격은 분말 형태가 kg 당 250만원으로, 이의 대체제로 Fe-ovotransferrin을 개발할 경우 시장 경쟁력을 어느 정도 확보할 수 있을 것으로 보인다.

현재 제조 공정에서 보다 경제성을 확보하기 위해서는 생산 시 손실을 최소화할 수 있는 공정의 검토가 필요할 것으로 판단된다. 또한 제조원가 분석 결과, 전체 제조원가 중 발효 주정의 원가가 80% 이상을 차지하고 있어 에탄올의 사용량을 줄일 수 있는 공정의 개발이나, 분리 정제과정에서 ovotransferrin외 다른 계란 유래 기능성 소재들을 함께 분리해 낼 수 있는 공정의 개발이 필요할 것으로 보인다.

제 3 절 3차년도 연구개발수행 내용 및 결과

1. 제제화된 ovotransferrin 및 ovotransferrin 가수분해물의 미생물학적 안전성 확보 및 기능성 재확인

2차년도 동물실험에서 trypsin 효소 가수분해물이 promod 278 효소 가수분해물보다 유익적으로 효과가 좋은 것을 확인하였다. 이러한 결과를 반영하여 3차년도 연구기간에는 제 3 협동과제 팀에서 ovotransferrin과 trypsin 효소 가수분해물을 이용하여 제제화된 sample을 제조하였고, 이를 제공받아 실험에 사용하였다.

가. 제제화된 ovotransferrin 및 ovotransferrin 가수분해물의 미생물학적 안전성 확보

제제화된 ovotransferrin 및 ovotransferrin 가수분해물의 미생물학적 안전성을 확인하기 위하여 식품공전에 공시되어 있는 시험법을 이용하여 시료의 일반세균수와 병원성 식중독균인 *Esherichia coli* O157:H7, *Staphylococcus aureus*, *Salmonella* spp., *Bacillus cereus*, *Listeria* spp.의 존재 유무를 확인하였다.

(1) 일반세균수 측정

제제화된 ovotransferrin 및 ovotransferrin 가수분해물의 일반세균수를 측정하기 위해 식품공전에 공시되어 있는 시험법을 이용하였다.

제제화된 ovotransferrin 및 ovotransferrin 가수분해물 시료 1 mg/mL과 10배 단계 희석액 1 mL씩을 멸균 페트리접시 2매 이상씩에 무균적으로 취하여 43-45°C로 유지한 표준한천배지 약 15 mL를 무균적으로 분주하고 페트리접시 뚜껑에 부착하지 않도록 주의하고, 좌우로 회전하면서 검체와 배지를 잘 혼합하여 응고시켰다. 확산집락의 발생을 억제하기 위하여 다시 표준한천배지 3-5 mL를 가하여 중첩시켰다. 응고시킨 페트리접시를 거꾸로 하여 35-37°C에서 24-48시간 배양한 후, 집락수를 측정하여 일반세균수를 측정하였다.

제제화된 ovotransferrin 및 ovotransferrin 가수분해물의 일반세균수를 측정한 결과는 Table 31에 나타내었다. 제제화된 ovotransferrin의 경우 5.7×10^5 CFU/g, 제제화된 ovotransferrin 가수분해물의 경우 1.3×10^6 CFU/g으로 측정되었다. 제제화된 ovotransferrin 가수분해물이 제제화된 ovotransferrin 보다 2배 정도 일반세균수가 높게 측정된 것을 알 수 있었다. 식품첨가물 공전에서 본 연구팀의 ovotransferrin과 비교 대상이 되는 것으로는 우유 유래 단백질인 락토페린 농축물과 난 유래 단백질인 리소짐 (lysozyme)이 있으며, 이들의 일반세균수 검출 정도를 확인하면, 락토페린 농축물은 명시되어 있지 않고, 리소짐은 g당 50,000 이하여야 한다고 명시되어 있다. 리소짐보다 본 연구팀의 시료가 약 10배 정도의 일반세균수가 높게 측정된 것을 확인할 수 있었다. 이를 통해 ovotransferrin과 그 가

수분해물을 제제화 하는 공정의 위생정도를 보다 철저히 관리해야 할 것이며, 제제화 과정 중에 첨가되는 trehalose의 위생관리 역시 철저히 해야 할 것으로 사료된다.

Table 31. 제제화된 ovotransferrin 및 ovotransferrin 가수분해물의 미생물학적 안전성 평가 (CFU/g)

Microorganism	Sample	
	제제화된 ovotransferrin	제제화된 ovotransferrin 가수분해물
Total plate count	5.7×10^5	1.3×10^6
<i>Escherichia coli</i> O157:H7	ND ¹⁾	ND
<i>Staphylococcus aureus</i>	ND	ND
<i>Salmonella</i> spp.	ND	ND
<i>Bacillus cereus</i>	ND	ND
<i>Listeria</i> spp.	ND	ND

¹⁾ND: not detected.

(2) 병원성 식중독균 측정

제제화된 ovotransferrin 및 ovotransferrin 가수분해물의 병원성 식중독균의 존재 유무를 확인하기 위해 식품공전에 공시되어 있는 시험법을 이용하였다.

Escherichia coli O157:H7의 검출 여부를 확인하기 위하여 제제화된 ovotransferrin 및 ovotransferrin 가수분해물 시료 25 g을 취하여 225 mL의 mEC 배지에 가한 후 35-37°C에서 24시간 동안 증균 배양 하였다. 증균 배양액을 MacConkey sorbitol 한천배지에 접종하여 35-37°C에서 18시간 배양한 후, sorbitol을 분해하지 않는 무색집락을 취하여 EMB 한천배지에 접종하여 35-37°C에서 24시간 배양하고 녹색의 금속성 광택이 확인된 집락을 확인 시험 하였다.

*Staphylococcus aureus*의 검출 여부를 확인하기 위하여 제제화된 ovotransferrin 및 ovotransferrin 가수분해물 시료 25 g을 취하여 225 mL의 10% NaCl을 첨가한 TSB 배지에 가한 후 35-37°C에서 18-24시간 동안 증균 배양 하였다. 증균 배양액을 Baird-Parker 한천배지에 접종하여 35-37°C에서 18-24시간 배양한 후, 투명한 띠로 둘러싸인 광택이 있는 검정색 집락을 선별하여 확인시험 하였다.

Salmonella spp.의 검출 여부를 확인하기 위하여 제제화된 ovotransferrin 및 ovotransferrin 가수분해물 시료 25 g을 취하여 225 mL의 펩톤수에 가한 후 35-37°C에서 24시간 동안 증균 배양 하였다. 증균 배양액을 XLD 한천배지에 접종하여 35-37°C에서 24시간 배양한 후 전형적인 집락을 선별하여 확인시험 하였다.

*Bacillus cereus*의 검출 여부를 확인하기 위하여 제제화된 ovotransferrin 및 ovotransferrin 가수분해물 시료 25 g을 취하여 225 mL의 희석액을 가하여 균질화한 검액을 MYP 한천배지에 접종하여 30°C에서 24시간 배양하였다. 배양 후 혼탁한 환을 갖는 분홍색 집락을 선별하여 확인시험 하였다.

*Listeria spp.*의 검출 여부를 확인하기 위하여 제제화된 ovotransferrin 및 ovotransferrin 가수분해물 시료 25 g을 취하여 225 mL의 *Listeria* 증균배지를 가한 후 30°C에서 48시간 증균 배양하였다. 증균 배양액을 Oxford 한천배지에 접종하여 30°C에서 24-48시간 배양한 후 집락을 선별하여 확인시험 하였다.

병원성 식중독균 역시 식품첨가물 공전에 있는 락토페린 농축물과 리소짐의 미생물 검출 규격과 비교해 보았다. 식품첨가물 공전에는 병원성 식중독균인 대장균, 살모넬라, 황색포도상구균이 음성이어야 한다고 명시되어 있다. Table 31에서 보는 것처럼, 본 연구팀의 미생물 안전성 검사 결과 역시 제제화된 ovotransferrin과 제제화된 ovotransferrin 가수분해물 모두 대장균, 살모넬라, 황색포도상구균이 음성으로 확인되었고, 이 뿐만이 아니라 *Bacillus cereus*, *Listeria spp.* 까지 모두 음성으로 확인되었다.

나. 제제화된 ovotransferrin 및 ovotransferrin 가수분해물의 *in vitro* 상에서의 기능성 재확인

제제화된 ovotransferrin 및 ovotransferrin 가수분해물을 *in vitro* 상에서 MTT assay를 이용한 항암효과와 nitric oxide 저해 정도를 측정함으로써 항염증 효과를 측정하였다.

(1) 제제화된 ovotransferrin 및 ovotransferrin 가수분해물의 암세포 성장 억제 효과

제제화된 ovotransferrin 및 ovotransferrin 가수분해물의 암세포 성장 억제 효과를 측정하기 위하여 한국세포주 은행 (KCLB, Seoul)으로부터 5종류의 인간 유래 암세포주를 분양받아 사용하였다. 실험에 사용된 종양세포는 총 5종으로 대장암 세포인 HT-29, LoVo, DLD-1, 위암 세포인 AGS, 유방암 세포인 HeLa 등이 사용되었다.

세포 배양을 위해 RPMI 1640 medium, DMEM medium 및 MEM medium에 10% FBS (fetal bovine serum), 100 unit/mL의 penicillin, 100 μ g/mL의 streptomycin을 첨가하여 사용하였고, 95%의 습도가 유지되는 37°C, 5% CO₂ incubator (MCO-18AIC, SANYO, Osaka, Japan)에서 배양하였다.

제제화된 시료의 세포독성 효과를 측정하기 위하여 MTT assay를 실시하였다. MTT assay의 원리는 살아있는 세포 내에서 에너지를 공급하는 미토콘드리아에 MTT 시약을 처리하게 되면, 미토콘드리아의 reductase에 의해 환원되어 formazan을 형성하게 되고, 죽어있는 세포는 이미 미토콘드리아가 손상되어 있기 때문에, 이 formazan이 형성되지 않는 원리를 이용하여, 제제화된 시료를 농도 별로 처리하여 세포에 독성을 나타내는지 확인하였다.

세포내 생성된 formazan의 양은 ELISA reader를 이용하여 570 nm에서 흡광도로 측정하

였고

$$\text{MTT assay 는 } \left\{ 1 - \left(\frac{\text{OD of treated cells}}{\text{OD of control cells}} \right) \right\} \times 100 \text{ 을 계산하여}$$

%로 저해율을 나타내어, 저해율이 50% 이상인 경우에 중앙 세포 증식 억제효과가 있다고 판정하였다.

(가) 제제화된 ovotransferrin의 암세포 성장 억제 효과

제제화된 ovotransferrin의 암세포 성장 억제 효과는 Fig. 49과 Table 32에 나타내었다. 대조군으로 사용한 ovotransferrin과 제제화된 ovotransferrin의 농도는 20 mg/mL부터 순차적으로 희석하여 사용하였으며, 제제화된 ovotransferrin의 경우 총 무게의 단백질 양 (70%)을 조절하여 사용하였다.

실험 결과 대장암 세포인 DLD-1 cell에서는 ovotransferrin의 농도 10 mg/mL에서 50% 이상의 세포 성장 억제 효과를 보였고 제제화된 ovotransferrin은 더 낮은 농도인 2.5 mg/mL에서도 50%가 넘는 세포 성장 억제 효과를 보여 제제화된 시료의 효과가 증가한 것을 확인하였다. 또한 50%정도의 세포를 저해할 수 있는 농도인 IC₅₀값을 비교해 보았을 때에도 ovotransferrin과 제제화된 ovotransferrin이 각각 9.22 mg/mL, 2.18 mg/mL로 4배 이상으로 암세포 억제 효과가 증가하였음을 확인하였다.

다른 대장암 세포인 HT-29 cell과 LoVo cell에 대해서는 ovotransferrin의 모든 농도에서 50%가 넘는 세포 성장 억제 효과는 관찰되지 않았지만, 제제화된 ovotransferrin에서는 그 효과가 증가하여 20 mg/mL 농도에서 50%가 넘는 세포 성장 억제 효과를 관찰하였다. HT-29 cell과 LoVo cell에 대한 ovotransferrin과 제제화된 ovotransferrin의 IC₅₀값은 ovotransferrin은 19.54, 26.45 mg/mL, 제제화된 ovotransferrin은 13.91, 16.56 mg/mL로 암세포 성장 억제 효과가 증가하는 것을 확인하였다.

위암 세포인 AGS cell에 대해서는 ovotransferrin의 농도 20 mg/mL에서도 50%가 넘는 성장 억제 효과를 관찰하지 못했지만 제제화된 ovotransferrin에서는 5 mg/mL에서도 55.2%의 암세포 성장 억제 효과를 확인하였고, IC₅₀값을 비교 했을 때 22.45 mg/mL와 3.71 mg/mL로 4종류의 암세포 중 효과의 증가가 가장 컸음을 확인하였다.

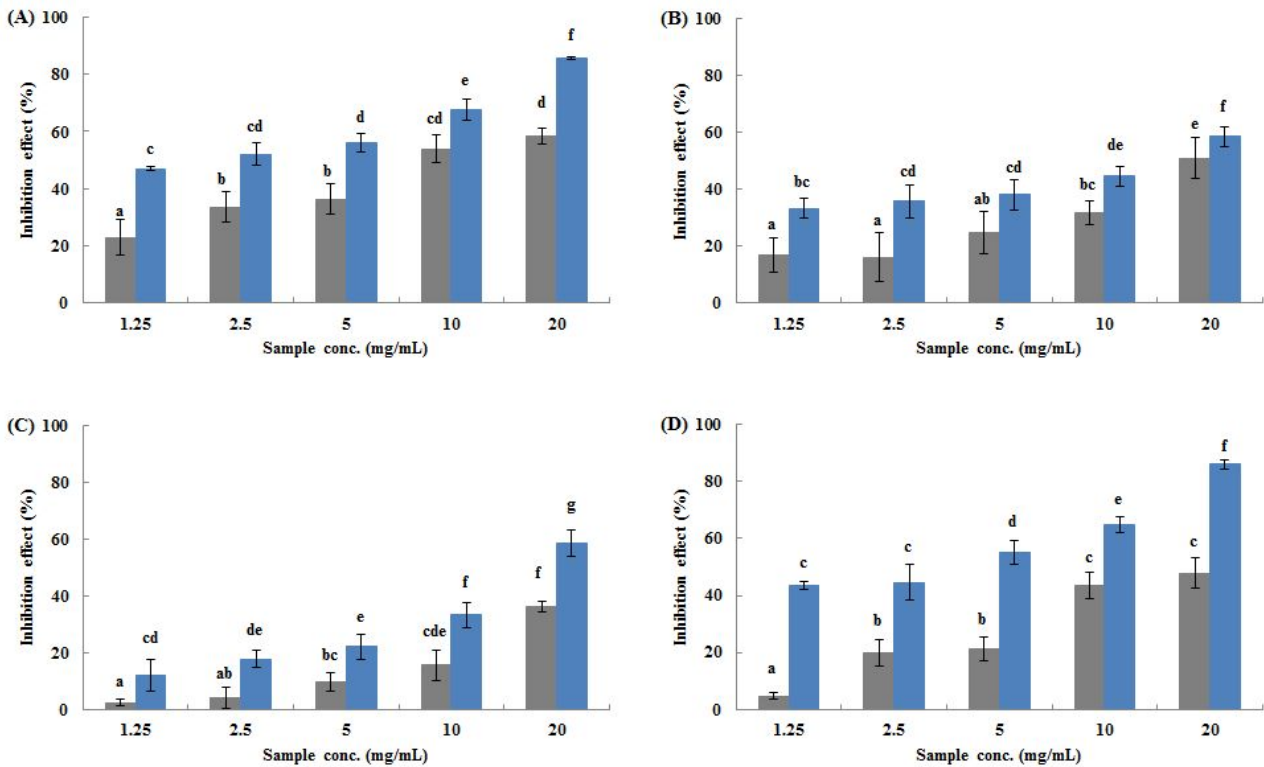


Fig. 49. 제제화된 ovotransferrin의 암세포 성장 억제 효과.
 (A) DLD-1 cell, (B) HT-29 cell, (C) LoVo cell, (D) AGS cell.
 ovotransferrin (■), 제제화된 ovotransferrin (■)

Table 32. 암세포별 제제화된 ovotransferrin의 IC₅₀값

Sample	IC ₅₀ value	IC ₅₀ (mg/mL)			
		DLD-1	HT-29	LoVo	AGS
Ovotransferrin		9.22	19.54	26.45	22.45
제제화된 ovotransferrin		2.18	13.91	16.56	3.71

(나) 제제화된 ovotransferrin 가수분해물의 암세포 성장 억제 효과

제제화된 ovotransferrin 가수분해물 (trypsin 가수분해물)의 암세포 성장 억제 효과는 Fig. 50과 Table 33에 나타내었다. 대조군으로 사용한 trypsin 가수분해물과 제제화된 trypsin 가수분해물의 농도는 20 mg/mL부터 순차적으로 희석하여 사용하였으며, 제제화된 trypsin 가수분해물의 경우 총 무게의 단백질 양 (57%)을 조절하여 사용하였다.

실험 결과 대장암 세포인 DLD-1 cell에서는 trypsin 가수분해물의 농도 5 mg/mL에서 50% 이상의 세포 성장 억제 효과를 보였고 제제화된 trypsin 가수분해물은 더 낮은 농도인 1.25 mg/mL에서도 trypsin 가수분해물 5 mg/mL의 효과와 유의적인 차이가 없는 것을 관찰함으로써 더 낮은 농도에서도 제제화된 시료의 효과가 유지 되는 것을 확인할 수 있었다. 50%정도의 세포를 저해할 수 있는 농도인 IC₅₀값을 비교해 봤을 때에는 trypsin과 제제화된

trypsin 가수분해물이 각각 4.12 mg/mL, 7.89 mg/mL로 확인하였다.

다른 대장암 세포인 HT-29 cell과 LoVo cell에 대해서는 trypsin 가수분해물과 제제화된 trypsin 가수분해물 모두 모든 농도에서 암세포 성장 억제 효과가 미미한 것을 확인할 수 있었다. HT-29 cell과 LoVo cell에 대한 trypsin 가수분해물과 제제화된 trypsin 가수분해물의 IC₅₀값은 각각 trypsin 가수분해물은 22.44, 11.08 mg/mL, 제제화된 trypsin 가수분해물은 48.58 mg/mL, 40 mg/mL 이상으로 암세포 성장 억제 효과가 미미한 것을 확인하였다.

위암 세포인 AGS cell에 대해서는 trypsin 가수분해물의 농도 20 mg/mL에서만 50%가 넘는 성장 억제 효과를 보였지만 제제화된 trypsin 가수분해물에서는 10 mg/mL에서도 60.58%의 암세포 성장 억제 효과를 보였고, IC₅₀값을 비교 했을 때 13.31 mg/mL와 5.31 mg/mL로 4종류의 암세포 중 효과의 증가가 가장 컸음을 확인하였다.

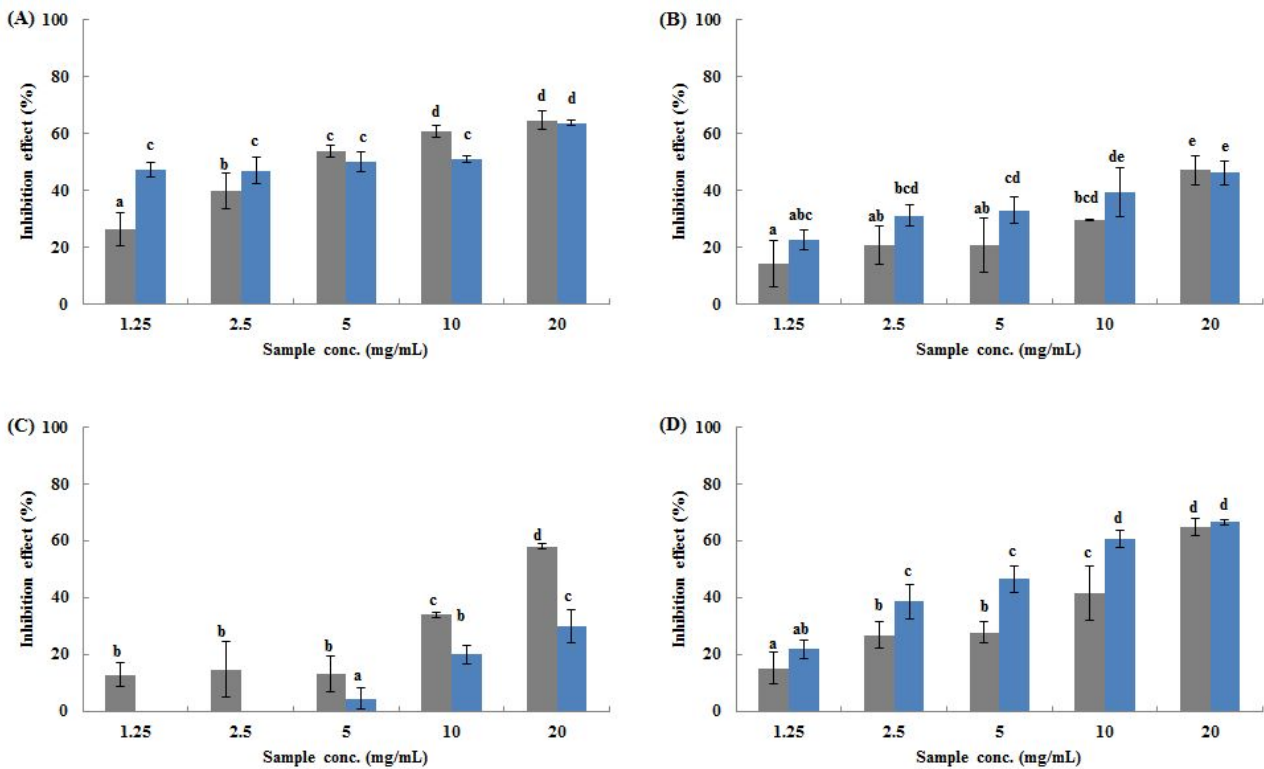


Fig. 50. 제제화된 ovotransferrin 가수분해물의 암세포 성장 억제 효과.

(A) DLD-1 cell, (B) HT-29 cell, (C) LoVo cell, (D) AGS cell.

Trypsin 가수분해물 (■), 제제화된 trypsin 가수분해물 (■)

Table 33. 암세포별 제제화된 ovotransferrin 가수분해물의 IC₅₀값

Sample	IC ₅₀ value	IC ₅₀ (mg/mL)			
		DLD-1	HT-29	LoVo	AGS
Trypsin 가수분해물		4.12	22.44	11.08	13.31
제제화된 trypsin 가수분해물		7.89	48.58	- ¹⁾	5.31

¹⁾-: 40 mg/mL 이상.

(2) 제제화된 ovotransferrin 및 ovotransferrin 가수분해물의 nitric oxide (NO) 생성 저해 효과

대식 세포인 Raw 264.7 cells은 염증반응에 관여하여 nitric oxide를 생성하는 세포이다. 생리학적으로 NO는 세균과 종양을 제거하고 혈압을 조절하거나 신경 전달을 매개하는 등 다양한 역할을 한다. 그러나 염증 반응이 일어나면 관련 세포에서 iNOS의 발현이 증가하여 많은 양의 NO가 생성이 되고, 과도하게 생성된 NO는 조직의 손상, 유전자 변이, 신경 손상등을 유발하고, 혈관 투과성을 증가시켜 부종 등의 염증 반응을 촉진시킨다. 따라서 이러한 NO의 생성을 저해하는 정도를 측정함으로써 항염증 효과를 측정할 수 있다 (Huang *et al.*, 2001; Rose *et al.*, 2005; Kmonickova *et al.*, 2007).

실험에 사용된 Raw 264.7 세포는 한국세포주 은행 (KCLB, Seoul)으로부터 분양받아 DMEM medium에 10% FBS (fetal bovine serum), 100 unit/mL의 penicillin, 100 μg/mL의 streptomycin을 첨가하여 사용하였고, 95%의 습도가 유지되는 37°C, 5% CO₂ incubator에서 계대 배양하며 사용하였다.

LPS를 이용하여 ovotransferrin의 NO 생성 저해 정도를 측정하기 이전에 ovotransferrin의 세포독성으로 인한 NO 생성 저해를 알아보기 위해 ovotransferrin 농도 2, 1, 0.5, 0.25 mg/mL의 농도로 대식세포 Raw 264.7 cell에 MTT assay를 실시하여 그 세포독성을 확인하였다. 결과는 Fig. 51에 나타내었다.

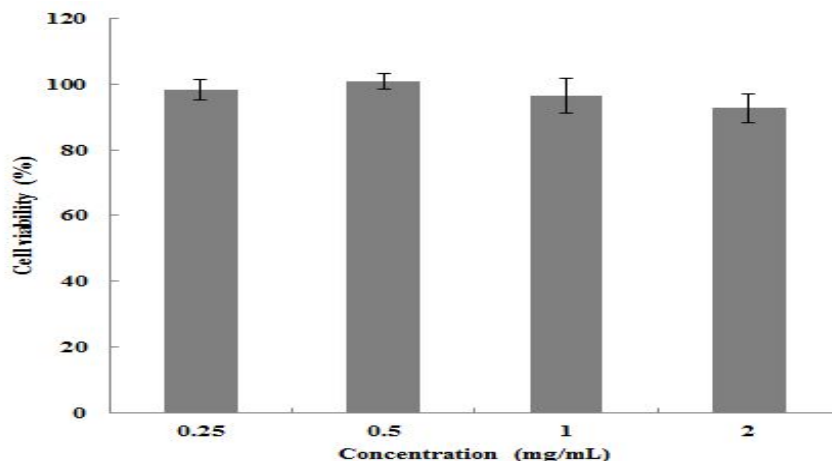


Fig. 51. Raw 264.7에 대한 ovotransferrin의 농도별 세포독성.

실험을 실시한 ovotransferrin의 모든 농도 (2, 1, 0.5, 0.25 mg/mL)에서 90%가 넘는 세포 생존률을 보임으로써 NO 저해 정도를 측정하는데 무리가 없다고 판단되어 상기 농도를 실험에 적용하였다.

세포 농도 1×10^6 cells/mL의 농도로 24 well plate에 500 μ L씩 분주한 후 4시간 뒤에 시료 (2, 1, 0.5, 0.25 mg/mL)와 LPS (1 μ g/mL)를 처리하고, 48시간 뒤 상등액 100 μ L와 griess reagent (1% sulfanilamide, 0.1% N-(1-naphthyl)ethylenediamine dihydrochloride in 5% phosphoric acid) 100 μ L를 10분 간 반응 시킨 후 540 nm에서 흡광도를 측정하였다. NO의 양은 NaNO₂의 표준곡선을 이용하여 정량하였다.

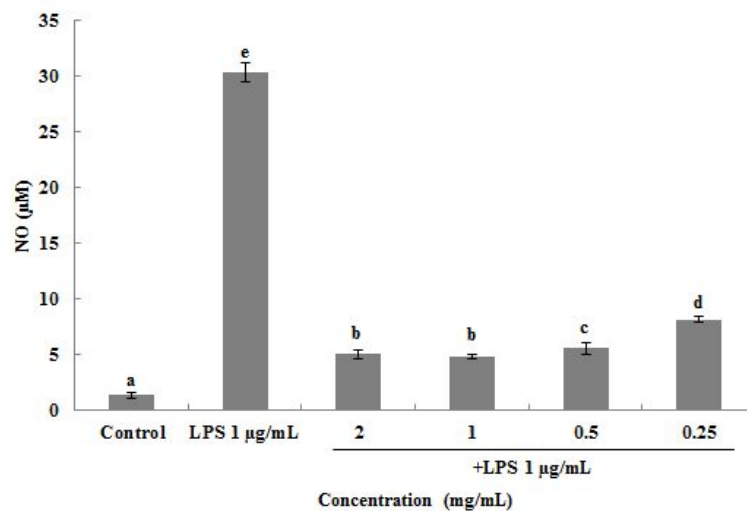


Fig. 52. Ovotransferrin의 농도에 따른 NO 생성 저해 효과.

Ovotransferrin 농도 별 NO생성 저해 효과는 Fig. 52에 나타내었다. 우선, LPS를 처리하지 않은 control군에서는 NO의 생성량이 1.33 ± 0.27 μ M로 낮은 것을 확인하였다. 반면, LPS를 1 μ g/mL 농도로 처리한 군에서는 NO의 생성량이 30.33 ± 0.82 μ M로 많이 생성되는 것을 확인하였다. 여기에 ovotransferrin을 농도 별로 2, 1, 0.5, 0.25 mg/mL로 처리한 군에서는 그 생성량이 현저히 줄어드는 것을 확인 할 수 있었다. 각 농도 별 NO 생성량은 4.98 ± 0.42 , 4.80 ± 0.21 , 5.50 ± 0.48 , 8.09 ± 0.25 μ M로 LPS 대조군에 비해 10배 가까이 그 생성량이 저해되는 것을 확인하였다. 이러한 결과를 바탕으로 ovotransferrin의 항종양 효과 뿐만이 아니라 항염증효과를 확인할 수 있었으며, 연구기간이 종료 된 후에도 ovotransferrin 가수분해물과 제제화된 ovotransferrin 및 가수분해물의 항염증 효과를 측정할 계획이다.

2. Ovotransferrin의 경제적인 semi-large 규모의 시스템 확립

달걀의 이용성과 부가가치를 높이기 위하여 우리는 이제까지 난백으로부터 ovotransferrin

을 분리하는 기술을 개발하는데 주력하였다. Small scale을 기반으로 1차년도에는 고수율, 고농도의 ovotransferrin을 분리정제 하는데 최적의 조건을 확립하기 위하여 추출온도와 가열시간, 에탄올 농도, pH 및 이온화력 등을 factor로 놓고 조사하여 ovotransferrin의 분리 및 정제 방법을 확립하였고, 2차년도에는 기능성 향상을 위한 ovotransferrin 활성화 방법을 개발하였다. 먼저, ovotransferrin으로부터 철분의 제거를 위한 최적조건을 개발하기 위하여 pH의 영향을 확인하고 pH를 조절하기 위해 쓰인 HCl과 citric acid의 철 이온제거 정도를 비교하였다. 또한 철 이온 제거에 필요한 resin의 선정 및 최적량을 확인하기 위하여 AG1-X2와 chelex가 시험되었고 그 효과를 분석하였으며, 마지막으로 철분 결합도 측정법을 확립하였다.

1차와 2차년도에 행해진 개발법을 기반으로 하여 3차년도에는 ovotransferrin의 경제적인 large-scale 시스템을 확립하고자 하였다. Small scale과는 달리 scale-up을 하게 되면 급격한 부피의 증가와 분리 정제하는 소요시간 증가에 따르는 문제점이 발생한다. 이를 극복하기 위하여 본 연구에서는 급격히 증가되는 부피로 인해 변화되는 철분의 포화조건, 교반, 원심분리, pH와 에탄올 농도 등의 factor들을 재정리하고 조정하여 그 효과를 테스트하고 최종 ovotransferrin을 대량생산하기 위한 시스템을 결정 및 확립하였다.

1, 2차년도를 기반으로 하여 개발된 ovotransferrin의 분리 및 정제방법을 이용한 대량생산 시스템 이외에도, 본 연구팀에서는 기존의 개발된 방법보다 비용이나 시간 면에서도 우수하고 높은 순도와 수율을 얻을 수 있으며 유기용매를 사용하지 않는 방법을 이용하여 ovotransferrin을 대량으로 분리, 정제할 수 있는 또 다른 방법을 제시하여 그 두 방법을 비교하고 소개하고자 한다.

가. Ethanol 추출법을 이용한 ovotransferrin의 생산 및 활성화 방법

에탄올을 이용한 방법은 난백 단백질에 철 이온을 결합시킨 후 순차적으로 침전시켜서 ovotransferrin을 분리하는 것이다. 이후 철 이온이 쉽게 제거될 수 있는 조건으로 pH 4.7로 조정하여 AG1-X2 resin을 통해 apo-form ovotransferrin을 생산하면 된다. Ovotransferrin의 대량 생산 시에 쓰이는 방법은 다음과 같다. 계란에서 흰자를 분리한 후 동량의 물로 희석한 후 500 mM FeCl₃·6H₂O용액 (0.8 mL/L)을 넣고 3-5분 정도 교반시킨 후에 ovotransferrin의 철분을 포화시킨 다음 100% 에탄올을 서서히 첨가하여 최종 농도가 43%가 되게 하여 3,400×g 에서 30분 간 원심분리 하여 ovotransferrin을 제외한 기타 난백 단백질을 침전시키고 상등액을 취해 ovotransferrin을 분리한다. 이렇게 분리된 상등액을 취하여 에탄올 농도를 61%로 증가시켜 ovotransferrin을 침전시킨 후 하룻밤 4℃에서 보관한다. 이후 대부분의 상등액은 따라버리고 남은 상등액과 침전물을 같이 모아 같은 조건으로 원심분리 하여 상등액을 제거하고 침전된 ovotransferrin만 수거한다. 이렇게 수거된 ovotransferrin은 두 가지 형태로 만들 수 있는데 하나는 철 이온이 결합된 형태 (holo-form)이고 다른 하나는 철 이온이 제거된 형태 (apo-form)이다. 연구의 목적인 항 미생물 효과가 뛰어난

ovotransferrin은 철 이온이 제거된 형태이다. 이 형태를 만들기 위해서는 수거된 ovotransferrin을 10배의 증류수에 녹여서 에탄올을 제거하고 농축시킨 후 citric acid를 이용하여 pH를 4.7로 조정하여 ovotransferrin의 철 이온을 release 시키고, ultrafiltration을 이용하여 농축된 용액에서 철 이온을 제거한 후 동결건조 한다.

Fig. 53은 에탄올의 최종 농도를 43%로 맞추어 첨가한 후, 원심분리 하여 얻은 결과물을 나타내고 있다. 여기서 상층액을 모아 다시 에탄올 농도를 61%로 증가시켜 첨가하여 교반시키는 과정을 거치는데 Fig. 54 에서 그 과정을 보여주고 있다. Fig. 55은 이 용액을 4℃에서 하룻밤 보관한 후에 나타난 결과 및 원심분리 이후에 침전된 ovotransferrin을 보여주고 있다. 침전된 ovotransferrin을 모아 에탄올 제거 및 철 이온을 제거 하거나 부착한 그대로 에탄올만 제거하여 동결건조 시킨 ovotransferrin 산물을 Fig. 56를 통해 보여주고 있다.

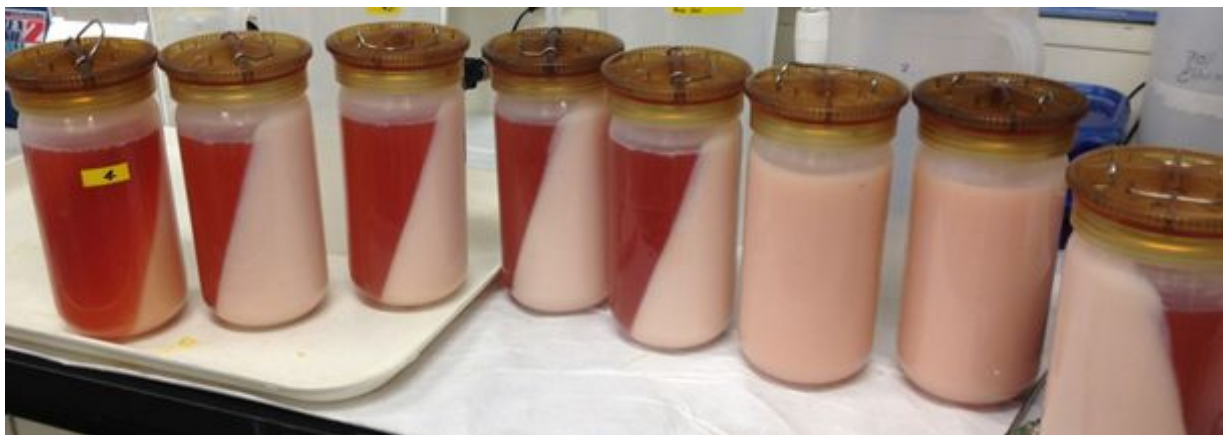


Fig. 53. 43% 에탄올로 ovotransferrin (상층액부분) 과 기타 나머지 난백 단백질을 침전 시킨 것.



Fig. 54. 모은 상층액을 다시 61%의 에탄올 농도를 이용하여 교반하는 과정.



Fig. 55. 4°C에서 하룻밤 보관한 후 자연적으로 침전된 ovotransferrin과 원심분리 이후의 결과.



Fig. 56. Freeze dryer를 이용하여 동결건조시킨 Fe-free (left) and Fe-bound (right) ovotransferrin.

나. 염을 이용한 ovotransferrin의 추출 방법 및 활성화 방법

Ovotransferrin을 대량생산할 때 쓰이는 또 다른 본 실험실에서 개발한 방법은 다음과 같다. 계란에서 흰자를 분리한 후 증류수와 1:1로 희석하고 균질 시킨다. 균질 된 용액을 3N HCl을 이용하여 pH 4.5~5.0으로 조절한 후 3,400×g 에서 30분 간 원심 분리하여 상등액을 모아 5%의 ammonium sulfate 와 2.5%의 citric acid를 함께 처리한다. 이후 4°C에서 하룻밤 보관한 후 4,500×g 에서 20분 간 원심분리 하여 침전물을 모아 증류수로 4-5배 희석하여 ultrafiltration으로 염을 제거한다. 염이 제거된 침전물에 다시 2%의 ammonium sulfate와 1.5%의 citric acid를 함께 처리하고 4°C에서 또 하룻밤 보관한다. 그 후 4,500×g 에서 다시 20분 간 원심분리 하여 최종 침전물을 모아 증류수로 2-5배 희석하여 ultrafiltration으로 염을 제거한 후 동결건조 한다.

Fig. 57는 난백을 증류수로 희석한 후에 pH를 4.5에서 5.0 사이로 조정하는 과정을 보여주고 있다. 원심분리 이후, 얻어진 상층액에 5.0%의 ammonium sulfate 와 2.5%의 citric acid 첨가 과정을 거치는데 Fig. 58에서 그 과정을 보여주고 있다. Fig. 59은 원심분리 후, 침전된 ovotransferrin을 나타내고 있다. 침전된 ovotransferrin을 모아 2-5배의 증류수에 녹인 후, ultrafiltration을 이용하여 염 제거 및 농축을 시키는데 Fig. 60에서 그 과정을 보여주고 있다. Fig. 61은 동결건조 시킨 후 얻은 ovotransferrin 산물을 보여주고 있다.



Fig. 57. 난백을 증류수로 희석하여 교반시킨 후 pH를 4.5에서 5.0으로 조정하는 과정.



Fig. 58. 원심분리 후 얻어진 상층액에 5.0%의 ammonium sulfate 와 2.5%의 citric acid 첨가 과정.



Fig. 59. 원심분리 후 얻은 ovotransferrin 침전물 (white pellet).



Fig. 60. Ovotransferrin 침전물을 증류수에 녹인 후 ultrafiltration을 이용하여 염 제거 및 농축하는 과정.



Fig. 61. Freeze dryer를 이용하여 동결건조시킨 Fe-free (left) and Fe-binded (right) ovotransferrin.

다. 에탄올 침전법과 염을 이용한 ovotransferrin 추출방법의 비교

에탄올을 이용한 ovotransferrin 대량생산 방법은 단일 단백질을 분리할 경우에 용이하게 쓸 수 있으며 이용성이 높다. 철 이온이 부착된 ovotransferrin (holo form)을 이용할 경우에 resin을 이용하지 않고 그대로 동결건조 시켜서 사용하면 되고, 철 이온이 제거된 ovotransferrin (apo form)을 원할 때는 resin을 이용하여 철 이온을 떼어내서 동결건조 시키면 이용목적에 따라 사용이 가능하다. 최소 이틀이면 ovotransferrin을 대량으로 생산할 수 있는 장점이 있다. 그러나 apo form을 만들기 위해서는 철 이온을 제거시키는 과정을 거쳐야 한다는 번거로운 점이 있으며 에탄올을 이용하여 난백에서 ovotransferrin을 분리하게 되면 ovoalbumin이 변성되어 침전을 일으킬 수 있는 소지가 있으므로 다른 곳에 이용하기가 어렵다.

반면에 ammonium sulfate와 citric acid를 이용하여 ovotransferrin을 대량생산 할 시에는 염을 이용한 침전과정이 두 번 들어가므로 에탄올을 이용한 방법보다는 덜 간단하고 다소 복잡하다. 또한, 밤새 4℃에 보관하는 과정이 두 번 들어가므로 최소 3일이 걸리게 되어 소요시간이 더 길다. 그러나 철 이온을 첨가하는 과정이 없으므로 본 연구에 필요한 apo form을 바로 생산할 수 있고, 다른 난백 단백질인 ovoalbumin을 변성 없이 같이 분리해 내는 것이 가능하다. 또한 철 이온이 부착된 holo form인 ovotransferrin을 대량생산하고 싶을 경우에는 첫 단계에서 철 이온만 첨가하면 되므로 사용하는 목적에 따라 두 가지 산물을 모두 생산해 낼 수 있다는 장점이 있다. 이 연구방법은 용매를 전혀 사용하지 않으며 낮은 농도의 ammonium sulfate와 citric acid 만을 이용한다는 점에서 에탄올 침전법과 더불어 많은 장점을 가진다고 볼 수 있다. 이는 ovotransferrin의 분리공정을 단순화 시켜 분리 시간을 단축함으로써 좀 더 효율적인 대량생산이 가능하게 함으로써 산업적인 의미가 크다.

Fig. 62은 에탄올을 이용하여 ovotrasnferrin을 분리하는 과정 중 두 번째 에탄올 처리과정에서 다양한 농도의 에탄올처리 후 실험결과를 보여주고 있다. 43% 농도의 에탄올 처리 이후 59% 농도의 에탄올 처리 시 ovotransferrin이 가장 잘 침전된다. Fig. 63은 혼합 염 처리를 이용하여 ovotransferrin을 분리하는 과정 중 두 번째 염 처리과정 후의 결과를 나타낸 gel 사진이다. 2.0% (wt/vol) ammonium sulfate and 1.5% (wt/vol) citric acid의 염 처리 후에 ovotransferrin이 가장 잘 침전된다는 결과를 보여준다.

두 방법 모두 사용 목적에 따라 철 이온이 결합되거나 제거된 형태의 ovotransferrin 대량생산이 가능하다. 따라서 어떤 방법을 사용하여도 무방하다고 볼 수 있다.

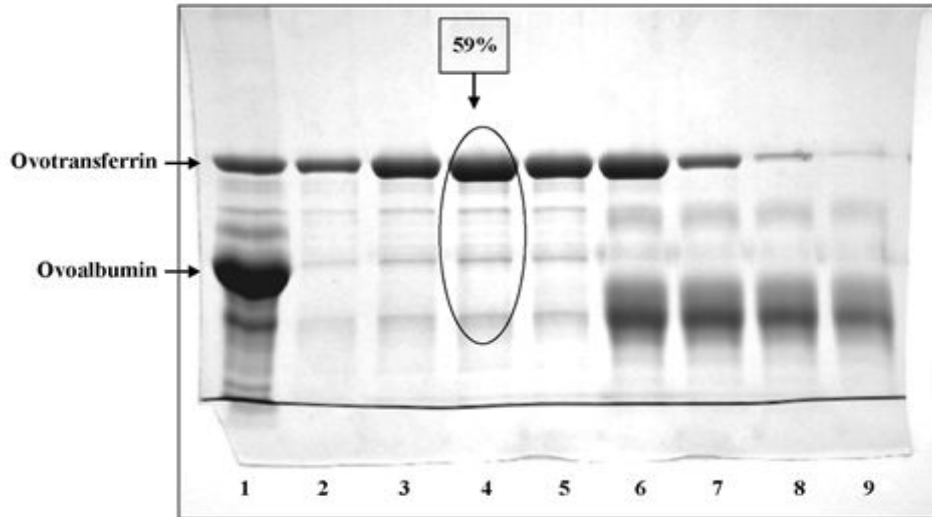


Fig. 62. 에탄올 침전 법을 이용하는 공정 중 두 번째 에탄올 처리 과정에서 다양한 농도의 에탄올 처리에 따른 SDS-PAGE 결과. Lane 1 = 2×-diluted egg white solution; lanes 2 to 5 = precipitates obtained after addition of 1 mL (53%, lane 2), 1.5 mL (56%, lane 3), 2 mL (59%, lane 4), and 2.5 mL (62%, lane 5) of ethanol to 5 mL of supernatant obtained by 43% ethanol extraction followed by dissolution of the precipitant with distilled water; lanes 6 to 9 = supernatant gained after adding 1 mL (53%, lane 6), 1.5 mL (56%, lane 7), 2 mL (59%, lane 8), and 2.5 mL (62%, lane 9) of ethanol to 5 mL of supernatant

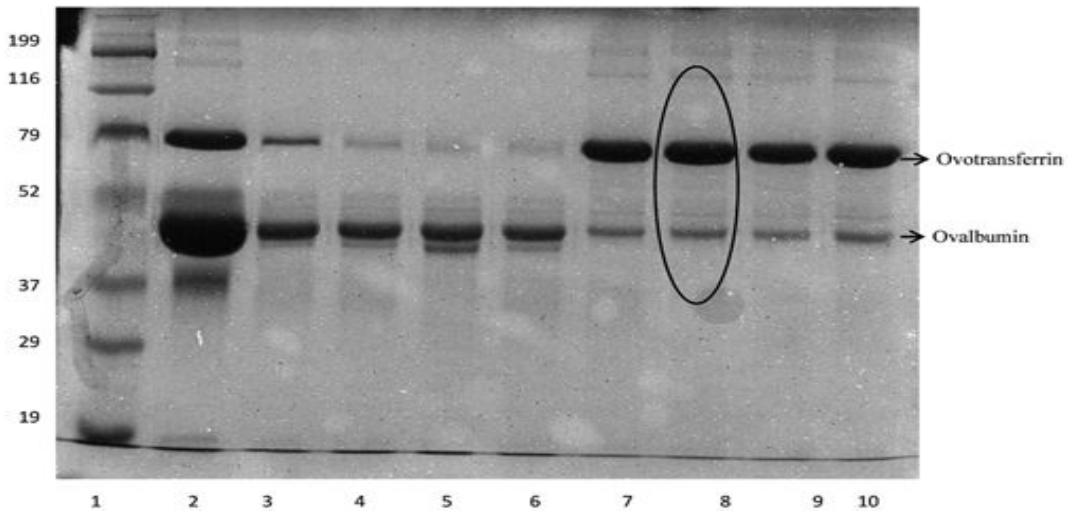


Fig. 63. Ovotransferrin으로부터 ovalbumin을 분리하는데 있어서의 citric acid의 효과. Lane 1 = marker; lane 2 = diluted egg white; lanes 3 to 6 = supernatant obtained from 1.0, 1.5, 2.0, and 2.5% citric acid, respectively, with a fixed level (2.0%) of ammonium sulfate; lanes 7 to 10 = dissolved precipitant from 1.0, 1.5, 2.0, and 2.5% citric acid, respectively, with 2% ammonium sulfate combinations

라. Large-scale로 ovotransferrin을 생산하기 위한 요인

(1) 급격한 부피 증가로 인해 변화되는 철분의 포화조건, 혼합 (교반) 및 원심분리

대량생산화 할 때에는 난백의 양도 많을 뿐 아니라 동량의 물로 희석하게 되면 부피가 급격하게 늘어나게 된다. 500 mM $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 용액 (0.8 mL/L)을 넣고 교반할 때 충분히 시간을 들여 3-5분정도 low speed 에서 교반을 시켜서 완벽하게 섞일 수 있도록 만들어주는 것이 철 이온이 ovotransferrin에 결합하는데 무엇보다 중요하다. 이 때 철 이온이 포화 (saturation) 상태가 되어야 ovotransferrin의 안정성이 높아진다. Full saturation이 될 수 있도록 철 이온을 넣고 교반을 시켜 준 후 최소 30분에서 2시간 정도 holding time을 가지는 것이 바람직하다. 이후에 교반을 시킬 때에도 완벽하게 3분에서 5분 동안 교반시켜서 확실하게 철 이온이 ovotransferrin에 결합할 수 있도록 해 주는 것이 중요하다.

철 이온을 saturation 시킨 후 100% 에탄올을 첨가하여 최종농도를 43%로 맞추고 나서 원심분리 과정을 거치게 되는데 대량 생산 시에는 원심분리 횟수의 증가로 인한 샘플 대기시간 또한 늘어나게 된다. 이 때, 샘플대기시간이 2시간 이상이 되면 ovotransferrin이 변성 되고 다른 난백 단백질과 반응을 일으켜서 순도가 낮아지게 된다. 그러므로 2시간 이내로 holding time을 잡되 4시간 이상은 놓아두지 않도록 한다. 2시간에서 4시간 이내에 원심분리가 다 이루어져야 하는데 그렇지 못할 경우, ovotransferrin의 변성 이외에도 결합한 철 이온이 떨어져 게 되므로 샘플 색상이 옅어져서 ovotransferrin 대량생산 수율에 차질이 생기는 것을 막을 수 없게 된다. 따라서 ovotransferrin 대량 생산 시에는 2시간에서 4시간 이내에 처리할 수 있는 양을 계산해서 하는 것이 좋다.

(2) Egg albumin과 ovotransferrin의 pH와 ethanol에 대한 반응도에 대한 조건

최종농도 43% 에탄올 처리 및 원심분리 이후 두 번째 59%의 에탄올 처리시 스케일이 작으면 한 차례의 원심분리과정을 거치면 되는데, 양이 많아질 경우에는 원심분리 횟수가 증가한다. 이 경우에는 59%의 에탄올 처리과정을 거치고 4°C에서 밤새 샘플을 보관하게 되면 자연적 침전이 일어난다. 이 때 상층액을 따라내고 밑에 침전물과 같이 섞이는 부분만 원심분리 하면 불륨이 그만큼 줄어들기 때문에 원심분리 횟수를 줄일 수 있어서 경제적이다. 또한, 두 번째 에탄올 처리과정에서는 59%보다는 61%의 에탄올을 처리하는 것이 대량생산과정에 있어서 더 효과적이다. 동결건조 후 수율측정결과 및 원심분리 후 침전물 색상확인결과에서 ovotransferrin의 회수율이 더 좋아지는 것을 발견하였다. 위 Fig. 62을 보면, lane 4는 59%, lane 5는 62%의 에탄올 농도 처리후 침전된 ovotransferrin의 결과를 나타내고 있다. 젤 상에서는 59%의 에탄올 농도가 가장 우세한 결과를 나타내고, 62%에서도 좋은 결과를 나타낼 수 있다. 원심분리 후 침전된 ovotransferrin을 제외한 상층액을 젤 상에서 확인하여 보았을 때, 59% 농도의 에탄올을 이용한 lane 8 결과보다 62% 농도의 에탄올을 사용한 lane 9의 결과에서 ovotransferrin이 거의 남아있지 않은 것을 미루어보아 본 연구에서 이용한 농

도 61% 에탄올 처리방법 또한 좋은 결과를 나타낸다는 것을 알 수 있다.

43%에서 59% 혹은 61% 농도의 에탄올 처리 시 이온교환수지를 이용하여 철 이온을 떼어내는 과정을 거치는데, 이 과정은 일이 다소 번거롭고 많은 거품을 유발하므로 랩 (lab) 스케일에서는 사용이 용이하지만 대량생산시에는 번거롭다. ovotransferrin 수득 (recovery) 시 손실이 많이 일어날 뿐만 아니라 시간도 많이 소요된다. 이 때, 이온교환수지 (resin) 대신에 ultrafiltration을 이용하여 철 이온을 제거하게 되면 불인 철 이온이 쉽게 제거가 된다. 또한 에탄올 제거 및 농축도 가능하므로 대량생산시에는 resin대신 ultrafiltration을 이용하는 방법이 보다 쉬운 방법으로 ovotransferrin을 얻는데 쓰일 수 있을 것이라고 사료된다.

43% 농도에서 61%의 농도로 샘플 처리 시 ovotransferrin의 리커버리에는 더 많은 도움이 되지만, 대신 대량생산 할 때는 샘플의 부피가 크므로 샘플대기 시간이 늘어나 오래 보관하게 되면 ovotransferrin의 변성이 일어나게 된다. 원심분리 이후 ovotransferrin 침전물을 수거한 후 냉동 내지 냉장 보관을 오래 하게 되면 변성이 일어나므로 가급적 빨리 증류수에 녹여서 ultrafiltration 과정을 거쳐 동결건조 시키는 것을 권장한다. Fig. 64는 변성된 ovotransferrin의 모습을 보여주고 있다. 비록 저온이라도 보관시간이 많이 지연되면, 후에 증류수에 녹여서 citric acid를 이용하여 pH를 낮출 경우 ovotransferrin이 변성되어 밑으로 침전됨을 볼 수 있다.

달걀을 오랫동안 냉장고에 저장하게 되면 달걀의 전반적인 pH가 올라가서 철 이온 결합도가 다소 높아지는 양상을 보인다. 그러나 ovotransferrin과 다른 난백 단백질인 ovoalbumin 혹은 lysozyme과 ovomucine 등이 서로 반응이 일어나서 ovotransferrin의 깨끗한 분리를 기대하기 어렵다. 그러므로 난백에서의 효과적인 ovotransferrin 분리 및 대량생산을 위해서는 늘 신선한 달걀을 사용하는 것이 바람직하며, 더불어 난백으로부터 lysozyme과 ovomucin을 제거한 이후에 ovotransferrin을 분리하는 것이 더 좋은 순도를 나타내는 데 효과적이다.

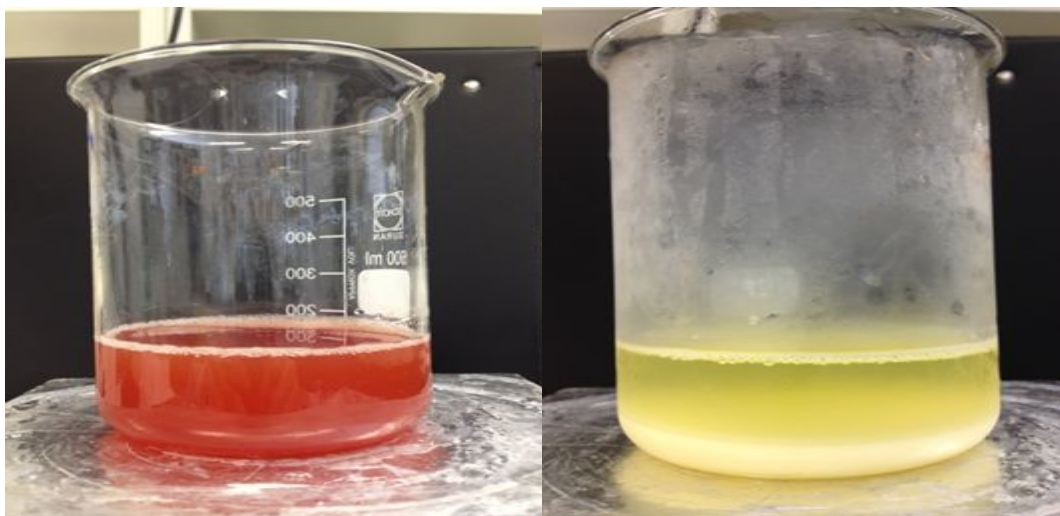


Fig. 64. 증류수에 녹인 오래 저장된 ovotransferrin 및 pH를 낮춘 후 변성된 ovotransferrin 침전물.

마. 난백으로부터 ovotransferrin의 분리에 대한 schematic diagram

아래의 두 모식도는 난백으로부터 ovotransferrin을 분리하는 전체적인 과정을 도표로 나타낸 그림이다. 에탄올을 이용한 분리방법이 Fig. 65에, 혼합 염을 이용한 분리방법이 Fig. 66에 나타나 있다. 이 두 방법은 모두 그 사용목적에 따라 선택하여 ovotransferrin을 분리하는데 이용 가능하다. 본 연구를 통해 얻어진 대량생산 시에 고려되어야 할 요소들에 주의하여 달걀로부터 ovotransferrin을 분리한다면 고수율 및 고순도의 ovotransferrin을 대량으로 생산해 낼 수 있을 것이라고 사료된다.

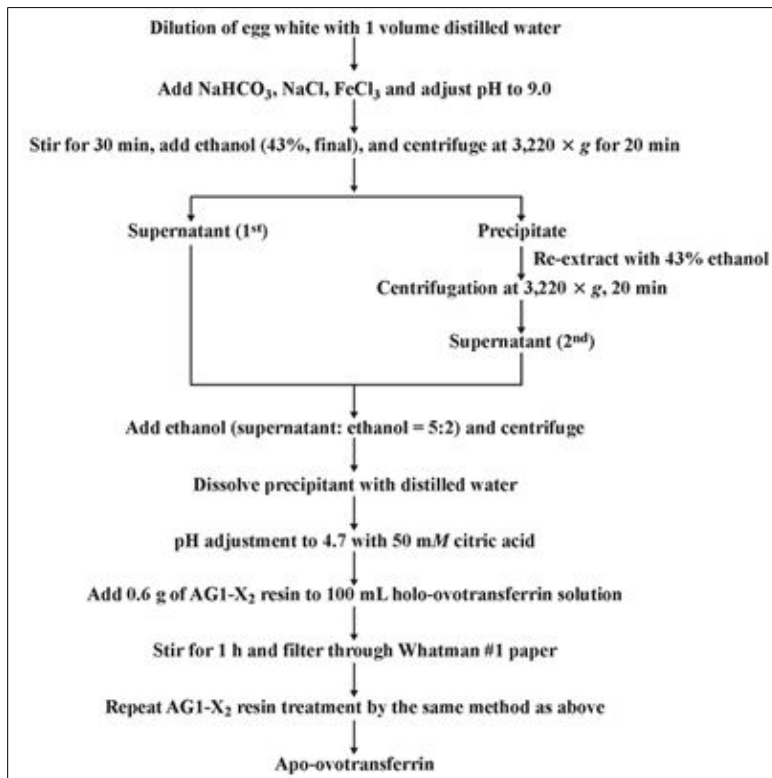


Fig. 65. 에탄올 침전법을 이용한 난백으로부터 ovotransferrin의 분리에 대한 schematic diagram.

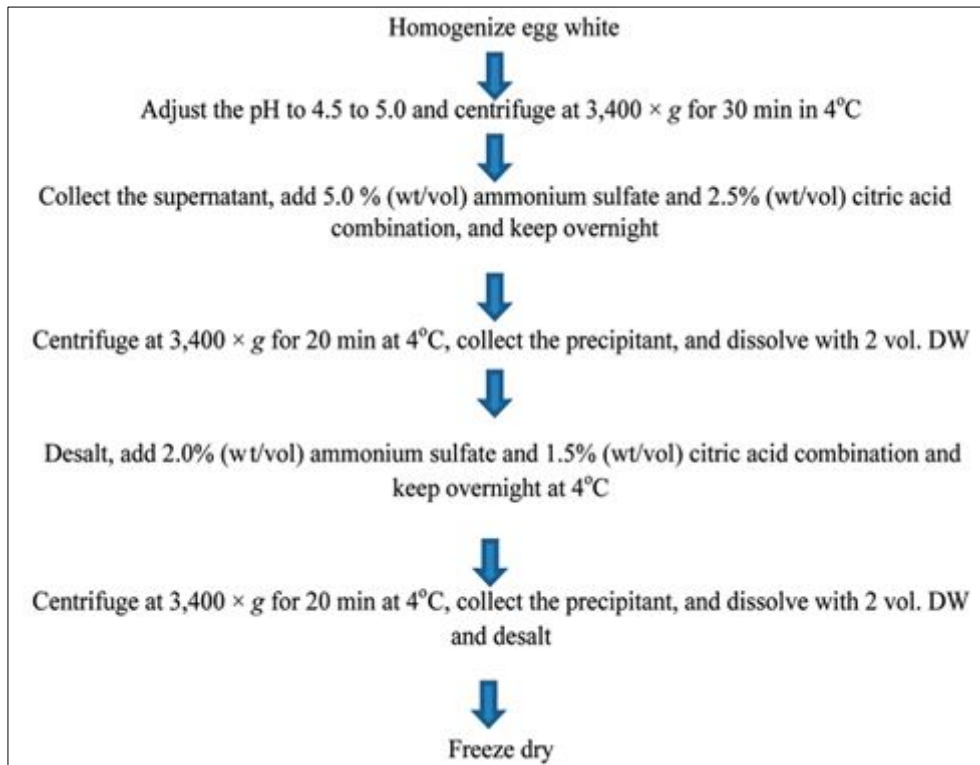


Fig. 66. 염을 이용한 난백으로부터 ovotransferrin의 분리에 대한 schematic diagram.

3. 제제화된 ovotransferrin 및 ovotransferrin 가수분해물 제형의 면역증강 및 항암 효과 검증 및 그 기전 구명 연구

3차년도 연구기간에는 제 3 협동과제 팀에서 ovotransferrin과 trypsin 효소 가수분해물을 이용하여 제제화된 sample을 제조하였고, 이를 제공받아 실험에 사용하였다

가. 실험동물의 사육 및 식이조성

4주령의 F344계 수컷 흰쥐 40마리를 1주일 간 Lab-chaw 식이 (2018S Teklad global 18% protein rodent diet, USA)를 제공하면서 적응시킨 후 체중에 따라 난괴법에 의하여 정상대조군 (NC, n=10), DMH대조군 (CCl₄, n=10), DMH-ovotransferrin섭취군 (DMH-OTF, n=10), DMH-ovotransferrin-trypsin섭취군 (DMH-OTFT, n=10)으로 나누어 8주간 사육하였다. 식이는 AIN-76 식이를 기준으로 제조하여 고지방 (23% corn oil, w/w)-저섬유소식 (2% cellulose, w/w)을 사육기간 동안 증류수와 함께 자유로이 섭취하도록 하였으며, ovotransferrin 및 ovotransferrin-trypsin 건조물은 식이의 5%를 공급하였다 (Table 34). 대장암유발을 위해 NC 그룹을 제외한 모든 그룹에 1주일에 2회씩 2주간 1,2-dimethylhydrazine (DMH) 40 mg/kg BW를 대퇴부에 주사하였다 (Fig. 67). 사육기간 동안 사육실의 온도는 20°C, 습도는 55%를 유지하였으며 명암은 12시간 (08:00-20:00)을

주기로 자동 조절하였다. 식이섭취량은 매일 기록하였고 매 7일마다 체중을 측정한 후, 사육일지의 자료를 분석하였다.

Table 34. 실험 동물 식이 조성 (%)

Ingredients	NC	DMH	DMH+OTF	DMH+OTFT
Casein	23.2	23.2	18.2	18.2
Corn starch	12.0	12.0	12.0	12.0
Sucrose	34.1	34.1	34.84	28.77
Corn oil	23.0	23.0	23.0	23.0
Cellulose	2.0	2.0	2.0	2.0
Vitamin mixture ¹⁾	1.2	1.2	1.2	1.2
Mineral mixture ²⁾	4.0	4.0	4.0	4.0
Choline bitartrate	0.2	0.2	0.2	0.2
DL-Methionine	0.3	0.3	0.3	0.3
BHT ³⁾	0.001	0.001	0.001	0.001
OTF ⁴⁾	-	-	7.14	-
OTFT ⁵⁾	-	-	-	11.11
Total	100.0	100.0	100.0	100.0

¹⁾AIN-76A vitamin mix. ²⁾AIN-76A mineral mix. ³⁾Dibutylated hydroxytoluene. ⁴⁾ovotransferrin. ⁵⁾ovotransferrin-trypsin.

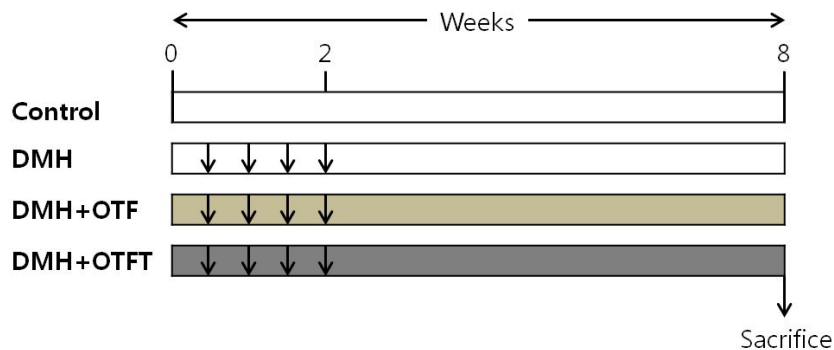


Fig. 67. 동물실험 디자인.

나. 체중증가량, 식이섭취 및 장기무게에 미치는 영향

실험동물의 실험기간 동안의 체중증가량, 식이섭취량, 식이섭취 효율, 그리고 각 장기의 무게와 대장 길이는 Table 35와 Table 36에 제시하였다. 총 체중증가량은 정상대조군 (NC)과 비교하였을 때, DMH를 처리한 그룹 (DMH대조군, DMH+OTF섭취군, DMH+OTFT섭취군)에서 다소 감소하였으나 통계적인 유의성은 나타나지 않았다. 또한 식이섭취량은 그룹간의 유의적인 차이가 나타나지 않았으며, 식이섭취효율은 정상대조군에 비해 DMH대조군에서 유의적으로 낮아 DMH에 의한 대장암유발이 식이효율을 감소시킨 것으로 보인다. 또한, DMH+OTF

섭취군은 DMH대조군보다 유의적으로 식이섭취효율이 증가하여 정상대조군 수준으로 회복되었으며, ovotransferrin섭취군 (DMH+OTF섭취군, DMH+OTFT섭취군)간의 유의적인 차이는 나타나지 않았다.

체중에 대한 상대적인 장기무게를 분석한 결과 간 조직의 무게는 정상대조군에 비해 DMH대조군과 ovotransferrin섭취군 (DMH+OTF섭취군, DMH+OTFT섭취군)에서 유의적으로 높게 나타났으며, 심장, 신장, 비장의 무게는 그룹간의 유의적인 차이가 나타나지 않았다. 또한 대장의 길이는 DMH대조군이 정상대조군과 ovotransferrin섭취군 (DMH+OTF섭취군, DMH+OTFT섭취군)보다 다소 높았으나 통계적인 유의성은 나타나지 않았다.

Table 35. Ovotransferrin과 그 가수분해물이 weight gain, food intake, food efficiency ratio에 미치는 영향

	NC	DMH	DMH+OTF	DMH+OTFT
Body weight gain (g/day)	3.8±0.2 ^{ab}	3.4±0.2 ^{ab}	3.5±0.2 ^{ab}	3.3±0.1 ^b
Food intake (g/day)	16.1±0.2 ^{ns}	15.9±0.3	15.7±0.2	15.8±0.2
FER (%) ¹⁾	23.7±1.0 ^c	21.4±0.8 ^a	22.2±1.1 ^{bc}	21.0±0.5 ^{abc}

Values are the mean ± S.E. Values with different letters are significantly different at p<0.05 after Duncan's multiple range test within group. NS : Not significant ¹⁾FER (%): food efficiency ratio(body weight gain (g/day)/food intake (g/day)×100

Table 36. Ovotransferrin과 그 가수분해물이 organ weight 에 미치는 영향

	NC	DMH	DMH+OTF	DMH+OTFT
Relative organ weight (g/100 g BW)				
Liver	2.5±0.1 ^a	3.0±0.1 ^b	2.9±0.0 ^b	2.9±0.1 ^b
Heart	0.3±0.1 ^{ns}	0.3±0.0	0.4±0.0	0.3±0.0
Kidney	0.7±0.0 ^{ns}	0.7±0.0	0.7±0.0	0.7±0.0
Spleen	0.2±0.0 ^{ns}	0.2±0.0	0.2±0.0	0.2±0.0
Colon length (cm)	16.6±0.5 ^{ns}	18.0±0.4	16.5±0.5	16.6±0.5

Values are the mean ± S.E. Values with different letters are significantly different at p<0.05 after Duncan's multiple range test within group. NS : Not significant

다. 혈중지질 및 간기능에 미치는 영향

식이 급여에 따른 지질성상의 변화는 Table 37에 제시하였다. 총 콜레스테롤은 DMH 처리에 의해 유의적으로 감소하였으며, ovotransferrin 섭취에 의한 회복효과는 나타나지 않았다. 또한 중성지방은 정상대조군보다 DMH 처리에 의해 다소 감소하였으며 특히 DMH+OTFT섭취군은 정상대조군보다 유의적으로 감소하였다. 한편, 간 기능 지표인 AST는 정상대조군보다

DMH대조군에서 다소 증가하였고, ovotransferrin 섭취는 DMH 처리에 의한 간기능 손상을 회복시키는 것으로 나타났는데, 특히 DMH+OTF섭취군은 DMH대조군보다 유의적인 감소를 나타내었다. 그러나 정상대조군보다 DMH 처리에 의한 증가한 혈중 ALT 수준은 ovotransferrin 섭취에 의한 유의적인 회복효과가 나타나지 않았다.

Table 37. Ovotransferrin과 그 가수분해물이 DMH-treated rats 모델에서 혈중지질 및 간 기능에 미치는 영향

	NC	DMH	DMH+OTF	DMH+OTFT
Total cholesterol (mg/dL)	143.5 ± 4.8 ^b	127.9 ± 6.6 ^a	124.1 ± 4.3 ^a	115.6 ± 4.5 ^a
Triglycerides (mg/dL)	116.8 ± 9.4 ^b	108.2 ± 7.5 ^{ab}	100.2 ± 8.8 ^{ab}	91.1 ± 5.9 ^a
AST (U/L)	54.2 ± 2.5 ^{ab}	59.2 ± 2.8 ^b	51.7 ± 1.7 ^a	54.1 ± 1.8 ^{ab}
ALT (U/L)	73.1 ± 4.7 ^a	88.8 ± 3.0 ^b	86.8 ± 2.0 ^b	84.6 ± 2.9 ^b

Values are the mean ± S.E. Values with different letters are significantly different at p<0.05 after Duncan's multiple range test within group.

라. 적혈구 항산화 효소 활성, 혈장 항산화 관련 지표 및 혈장 내 지질과산화물에 미치는 영향

적혈구 항산화 효소 활성 및 혈장 항산화 관련 지표는 Table 38에 나타내었다. 적혈구 항산화 효소인 catalase는 정상대조군보다 DMH대조군에서 21.9% 증가하였으며, DMH+OTF섭취군과 DMH+OTFT섭취군은 DMH대조군보다 각각 10.6%, 9.3% 감소하였으나, 그룹 간에 통계적인 유의성은 나타나지 않았다. SOD는 정상대조군보다 DMH를 처리한 모든 그룹에서 유의적인 감소를 나타내었으며, ovotransferrin 섭취에 의한 효과는 나타나지 않았다. 혈장 총항산화능 (TRAP)과 혈장 ORAC은 그룹 간에 유의적인 차이가 나타나지 않았다. 혈장 과산화지질 (CD) (Ahotupa *et al.*, 1998)은 정상대조군보다 DMH대조군에서 다소 증가하였고, ovotransferrin 섭취는 DMH 처리에 의한 지질과산화를 감소시키는 효과를 나타내었으며, 특히 DMH+OTF섭취군은 DMH대조군보다 유의적으로 감소하였다 (Fig. 68).

Table 38. Ovotransferrin 및 그 가수분해물이 DMH-treated rats 모델에서 적혈구 항산화 효소 활성, 혈장 항산화 관련 지표 및 혈장 내 지질 과산화물에 미치는 영향

	NC	DMH	DMH+OTF	DMH+OTFT
Erythrocyte enzyme activity				
Catalase (K/g Hb)	364.7 ± 59.2 ^{ns} s	422.6 ± 25.7	377.8 ± 48.2	383.4 ± 31.3
SOD ¹⁾ (U/gHb)	4181.5 ± 94.2 b	3293.7 ± 171. 3 ^a	3259.0 ± 227. 1 ^a	3180.0 ± 196 .3 ^a
Antioxidant capacity				
TRAP ²⁾ (mM TEAC ³⁾)	1.1 ± 0.0 ^{ns}	1.2 ± 0.0	1.1 ± 0.0	1.1 ± 0.0
ORACROO ⁴⁾ (TE ⁵⁾)	1.0 ± 0.0 ^{ns}	0.9 ± 0.0	1.0 ± 0.0	1.0 ± 0.0

Values are the mean ± S.E. Values with different letters are significantly different at p<0.05 after Duncan's multiple range test within group. NS : Not significant, ¹⁾SOD, superoxide dismutase. ²⁾TRAP, total radical trapping antioxidant potential. ³⁾TEAC: Trolox equivalent antioxidant capacity. ⁴⁾ORAC, oxygen radical absorbance capacity. ⁵⁾TE: Trolox equivalent.

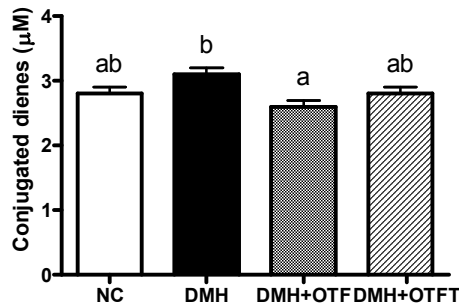


Fig. 68. DMH-treated rats 모델에서 ovotransferrin과 그 가수분해물이 lipid peroxidation status (conjugated dienes)에 미치는 영향. NC, normal control; DMH, dimethyl-hydrazin (DMH) 40 mg/kg for 2 weeks (two times per week); DMH+OTF: DMH+5% ovotransferrin; DMH+OTFT, DMH+5% ovotransferrin-trypsin. Each bar represents mean ± S.E. Bars with different superscripts are significantly different at p<0.05 by Duncan's multiple range test.

마. 백혈구의 산화적 DNA 손상에 미치는 영향

실험동물의 leukocyte에서 tail DNA의 함량을 측정한 결과 DMH 투여는 DNA의 손상을 유의적으로 증가시키는 것으로 나타났으며, DMH+OTFT 섭취군은 DMH 대조군보다 22.2% tail DNA가 감소하여 유의적으로 DNA 손상을 억제하였다 (Fig. 69).

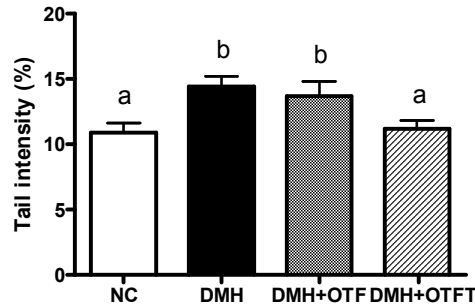


Fig. 69. DMH-treated rats 모델에서 ovotransferrin과 그 가수분해물이 백혈구의 산화적 DNA 손상에 미치는 영향. NC, normal control; DMH, dimethyl-hydrazin (DMH) 40 mg/kg for 2 weeks (two times per week); DMH+OTF: DMH+5% ovotransferrin; DMH+OTFT, DMH+5% ovotransferrin-trypsin. Each bar represents mean \pm S.E. Bars with different superscripts are significantly different at $p < 0.05$ by Duncan's multiple range test.

마. 대장조직 DNA 손상에 미치는 영향

DMH로 유도되는 대장세포의 DNA 손상정도를 분석하기 위하여 대장세포의 comet assay를 분석한 결과는 Table 39과 Fig. 70에 나타내었다. 대장세포의 Tail DNA를 분석한 결과 DMH대조군은 정상대조군보다 Tail DNA가 19.3% 증가하였고, DMH+OTF섭취군과 DMH+OTFT섭취군은 DMH대조군보다 각각 9.8%, 20.5% 감소하였으며, DMH+OTFT섭취군은 DMH대조군에 대해 유의적인 감소를 나타내었다. DMH+OTFT섭취군은 DMH대조군보다 유의적인 감소를 나타내었다. 또한 대장세포의 tail length는 정상대조군보다 DMH대조군에서 유의적으로 증가하였으며, ovotransferrin 섭취에 의해 감소하였으며, 특히, DMH+OTFT섭취군에서 유의적으로 감소하였다.

Table 39. Ovotransferrin과 그 가수분해물이 대장조직 DNA 손상에 미치는 영향

	NC	DMH	DMH+OTF	DMH+OTFT
Head DNA (%)	29.3 \pm 6.4 ^{ab}	15.7 \pm 1.4 ^a	23.9 \pm 1.6 ^{ab}	33.0 \pm 4.7 ^b
Tail DNA (%)	70.7 \pm 6.4 ^{ab}	84.3 \pm 1.4 ^b	76.1 \pm 1.6 ^{ab}	67.0 \pm 4.7 ^a
TailExtentMoment	309.4 \pm 45.9 ^a	447.6 \pm 19.9 ^b	348.9 \pm 15.4 ^a	279.0 \pm 17.1 ^a
Tail Length (μ m)	376.5 \pm 42.2 ^a	499.1 \pm 22.4 ^b	412.6 \pm 10.2 ^{ab}	367.6 \pm 10.8 ^a

Values are the mean \pm S.E. Values with different letters are significantly different at $p < 0.05$ after Duncan's multiple range test within group.

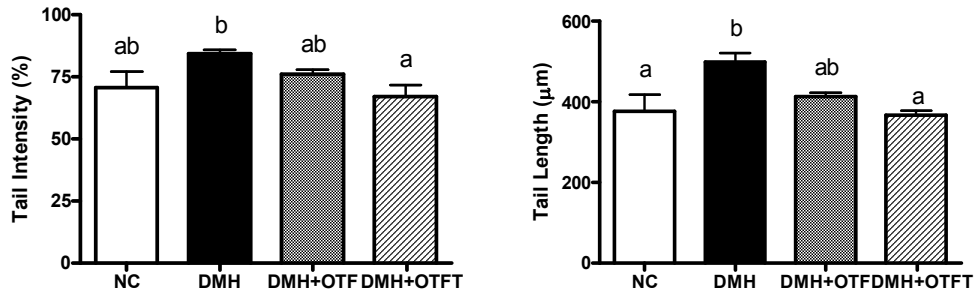


Fig. 70. Ovotransferrin과 그 가수분해물이 대장조직 DNA 손상에 미치는 영향. NC, normal control; DMH, dimethyl-hydrazin (DMH) 40 mg/kg for 2 weeks (two times per week); DMH+OTF: DMH+5% ovotransferrin; DMH+OTFT, DMH+5% ovotransferrin-trypsin. Each bar represents mean \pm S.E. Bars with different superscripts are significantly different at $p < 0.05$ by Duncan's multiple range test.

사. 대장조직 AC 및 ACF 생성에 미치는 영향

Ovotransferrin 및 그 가수분해물이 DMH로 유도한 대장암 rat 모델에서 대장암의 전암병변인 AC (aberrant crypt) 및 ACF (aberrant crypt foci)의 수에 미치는 영향은 Table 40과 Fig. 71에 제시하였다. 대장암대조군의 대장조직에서는 정상대조군의 조직과 달리 비정상적인 세포분열로 인한 세포의 크기와 모양 변형과 상피조직이 두꺼워진 AC와 이러한 비정상적인 crypt가 여러 개 모여 형성된 ACF가 관찰되었다. 대장조직에서 대장암의 전암병변인 AC (aberrant crypt) 및 ACF (aberrant crypt foci)는 정상대조군보다 DMH대조군에서 유의적으로 증가하였으며, ovotransferrin 섭취는 AC와 ACF의 생성을 유의적으로 감소시키는 것으로 나타났다. DMH와 같은 화학적 발암물질은 대부분 그 자체로는 발암성을 나타내지 못하나, cytochrome P450 등의 산화 효소들이 촉매하는 생체 대사 과정을 거쳐 친전자성 반응물질(electrophilic reactant)로 활성화 된다. 이들 친전자성인 대사산물들은 생체 내에 존재하는 친핵성 물질인 DNA와 반응하여 DNA adduct를 생성하고, DNA 손상이 회복되지 않으면 DNA 복제 시 돌연변이가 일어나 암을 유발하게 된다. 한편, 대장상피세포의 과도한 세포분열이 대장 내 종양형성 및 대장암의 발생과 밀접한 상관성을 가진다고 알려져 있다. 따라서 DMH로 유도한 rat 모델에서 대장암 전암 병변인 AC와 ACF의 생성이 유의적으로 억제되었으므로 ovotransferrin 및 그 가수분해물의 항암 소재로서의 가치가 입증되었다고 할 수 있다.

Table 40. Ovotransferrin과 그 가수분해물이 대장조직 AC 및 ACF 생성에 미치는 영향

	NC	DMH	DMH+OTF	DMH+OTFT
Number of ACF				
1	2.4±0.9 ^a	65.1±10.7 ^c	41.7±6.2 ^b	47.0±8.7 ^{bc}
2	0.0±0.0 ^{ab}	17.4±3.3 ^b	11.9±1.9 ^b	15.0±4.0 ^b
3	0.0±0.0 ^a	12.0±3.1 ^b	5.3±2.2 ^{ab}	9.3±2.6 ^b
4	0.0±0.0 ^{ns}	3.3±1.3	1.4±0.6	3.1±1.5
5	0.0±0.0 ^{ns}	1.3±0.7	0.3±0.2	0.7±0.5
Total number of ACF	2.4±0.9 ^a	99.1±6.9 ^c	60.6±9.0 ^b	75.1±14.8 ^{bc}
Total number of ACF containing 1-3 crypts	2.4±0.9 ^a	94.6±7.2 ^c	58.9±8.5 ^b	71.3±13.6 ^{bc}
Total number of ACF containing more than 4 crypts	0.0±0.0 ^a	4.6±1.7 ^b	1.7±0.8 ^{ab}	3.9±1.8 ^b
Number of AC	2.4±0.9 ^a	155.6±14.8 ^c	88.4±15.9 ^b	121.0±27.2 ^{bc}

Values are the mean ± S.E. Values with different letters are significantly different at p<0.05 after Duncan's multiple range test within group.

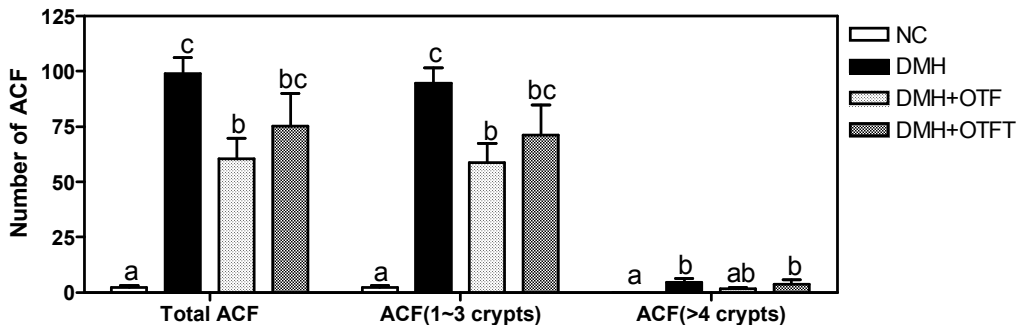


Fig. 71. Ovotransferrin과 그 가수분해물이 대장조직 AC 및 ACF 생성에 미치는 영향. NC, normal control; DMH, dimethyl-hydrazin (DMH) 40 mg/kg for 2 weeks (two times per week); DMH+OTF: DMH+5% ovotransferrin; DMH+OTFT, DMH+5% ovotransferrin-trypsin. Each bar represents mean ± S.E. Bars with different superscripts are significantly different at p<0.05 by Duncan's multiple range test.

아. 기타 분석 중인 연구

이상의 연구결과 외에, 적혈구 항산화 효소 (GSH-Px) 활성 (Urban *et al.*, 1997)을 분석 중이며, 대장 점막 조직에서 ovotransferrin과 그 가수분해물에 의한 대장암 관련 유전자 (Table 41)의 발현을 PCR을 이용하여 분석 중이다.

Table 41. 대장암 관련 유전자 발현을 분석하기 위한 primer sequence

Name	PCR primer sequence
iNOS ¹⁾	Forward: 5'-ctt ggt gag ggg act gga ct-3', Reverse: 5'-ggg gtt ttc tcc acg ttg tt-3'
COX-2 ²⁾	Forward: 5'-tgg gaa gct ttc tcc aac ct-3', Reverse: 5'-gtg aag tgc tgg gca aag aa-3'
GAPDH	Forward: 5'-ggc caa ccg ggt cat cat ct-3', Reverse: 5'-gtg atg gca tgg act gtg gt-3'
β -actin	Forward: 5'-gtc gta cca ctg gca ttg tc-3', Reverse: 5'-gcc atc tcc tgc tca aag tc-3'

¹⁾iNOS, inducible nitric oxide synthase. ²⁾COX-2, cyclooxygenase

4. Ovotransferrin 및 ovotransferrin 가수분해물의 식품 제제화

가. 식품제제로의 제형 탐색 및 제품화

(1) Ovotransferrin 동결건조 시 동결보호 부형제 평가

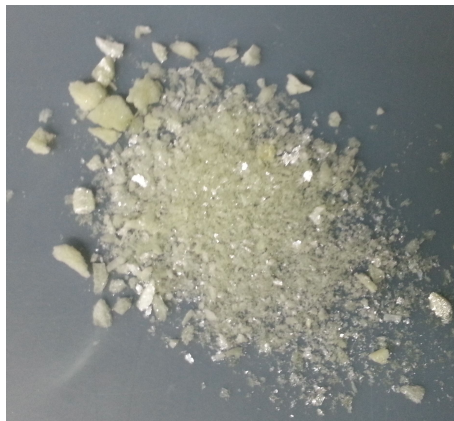
Ovotransferrin 및 ovotransferrin의 가수분해물을 별도의 부형제 없이 동결건조 시, 동결건조 된 입자는 그 무게가 가볍고 얇은 비늘과 같은 성상으로 생산 공정 및 이후 원료로 사용함에 있어 취급이 불편한 단점이 있어 성상의 개선 및 안정성 개선을 위한 부형제를 평가하였다.

단백질을 동결건조 시 동결건조된 단백질의 안정성 확보를 위해 다양한 동결보호 부형제들을 사용하게 되는데, 대표적으로 sucrose나 trehalose와 같은 당류, pH 안정화를 위한 phosphate ion, 글리세린 등이 사용된다 (Chang *et al.*, 1996; Wang, 2000; Tang *et al.*, 2004). 이에 본 연구에서는 phosphate ion과 당류를 동결보호 부형제로 사용하여 안정성 및 성상의 개선을 도모하였다. 평가에 사용된 당류는 동결보호 부형제로 많이 사용되는 sucrose, trehalose와 말토 덱스트린을 선발하였다.

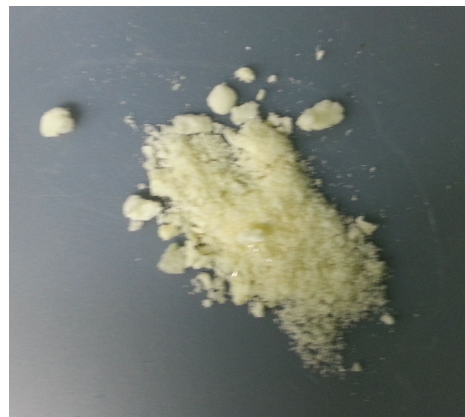
동결보호 부형제 평가를 위해 위에 기술한 생산과정을 거쳐 동결건조 전 ovotransferrin 농축액을 제조하였다. 이후 ovotransferrin 농축액 100 mL에 Table 42와 같이 동결보호 부형제를 각각 혼합한 후 동결건조를 실시하였다. 실험에 사용된 2 M phosphate buffer는 2 M monobasic sodium phosphate (276 g/L)와 2 M dibasic sodium phosphate (284 g/L)를 각각 제조 후 2 M monobasic sodium phosphate와 2 M dibasic sodium phosphate를 19:81의 비율로 혼합하여 제조하였다. 동결건조 결과, 부형제가 혼합된 시료는 성상이 기존의 얇은 비늘 상에서 비교적 구형의 분말상에 가깝게 변화하였고, 무게감이 생겨 성상이 개선되었다 (Fig. 72).

Table 42. ovotransferrin의 동결보호부형제 평가

Sample	제조 방법
Control	OTF 농축액
0.1 M phosphate buffer	OTF 농축액 + 2 M phosphate buffer (pH 7.4) 5%
sucrose 1%	OTF 농축액 + 2 M phosphate buffer (pH 7.4) 5% + sucrose 1%
sucrose 2.5%	OTF 농축액 + 2 M phosphate buffer (pH 7.4) 5% + sucrose 2.5%
sucrose 5%	OTF 농축액 + 2 M phosphate buffer (pH 7.4) 5% + sucrose 5%
Trehalose 1%	OTF 농축액 + 2 M phosphate buffer (pH 7.4) 5% + trehalose 1%
Trehalose 2.5%	OTF 농축액 + 2 M phosphate buffer (pH 7.4) 5% + trehalose 2.5%
Trehalose 5%	OTF 농축액 + 2 M phosphate buffer (pH 7.4) 5% + trehalose 5%
Maltodextrin 1%	OTF 농축액 + 2 M phosphate buffer (pH 7.4) 5% + maltodextrin 1%
Maltodextrin 2.5%	OTF 농축액 + 2 M phosphate buffer (pH 7.4) 5% + maltodextrin 2.5%
Maltodextrin 5%	OTF 농축액 + 2 M phosphate buffer (pH 7.4) 5% + maltodextrin 5%



Control



Trehalose 2.5%

Fig. 72. 동결보호 부형제 혼합 시 ovotransferrin의 성상 변화.

(2) 동결보호 부형제 혼합 동결 건조물의 회수율 평가

동결보호 부형제를 혼합하여 동결건조가 완료된 시료는 생산된 동결 건조물의 양을 측정하고 bradford assay를 통해 단백질을 정량하여 그 회수율을 계산하였다.

회수율은 Control 시료의 total protein 량에 대비하여 백분율로 계산하였고, total protein 량은 다음의 식으로 계산하였다.

$$\text{Total protein (g)} = \text{protein 농도 (mg/g)} \times \text{시료회수량 (g)} \times 1,000$$

회수율 평가 결과, 모든 시료에서 control과 유사하거나 그 이상의 회수율을 나타내었다. 그 중 trehalose 2.5% 처리 시 회수율이 121.7%로 가장 높게 평가되었다 (Table 43). 그리고 본 실험의 결과를 바탕으로 이후 동물실험에 사용될 ovotransferrin 및 ovotransferrin 가수분해물의 생산에는 2 M phosphate buffer 5%와 trehalose 2.5%를 혼합하여 생산을 실시하였다.

Table 43. 동결보호부형제 별 단백질 회수율 평가

Sample	시료회수량 (g)	시료의 protein 농도 (mg/g)	total protein 량 (g)	회수율 (%)
Control	10.9	630.9	6.9	100.0
0.1M phosphate buffer	12.4	546.4	6.8	98.6
sucrose 1%	13.3	516.1	6.9	100.0
sucrose 2.5%	15.0	531.0	8.0	115.9
sucrose 5%	17.6	397.9	7.0	101.4
Trehalose 1%	13.3	520.6	6.9	100.0
Trehalose 2.5%	14.7	370.4	8.4	121.7
Trehalose 5%	17.2	440.1	7.6	110.1
Maltodextrin 1%	13.4	508.8	6.8	98.6
Maltodextrin 2.5%	14.9	453.4	6.8	98.6
Maltodextrin 5%	17.1	395.2	6.8	98.6

나. Ovotransferrin의 장기 안정성 평가

(1) Ovotransferrin 장기 안정성 평가

2차년도 과제를 통해 생산된 ovotransferrin의 장기 안정성 및 보관조건을 검토하기 위해 안정성 평가를 실시하였다. 2차년도 과제를 통해 생산된 ovotransferrin의 경우 동결보호 부형제가 첨가되지 않은 형태로 생산된 ovotransferrin 시료를 알루미늄백에 10 g씩 담아 밀봉하여 각각 4°C, 25°C (RH 60±10%)와 50°C (RH 75±10%) 항온항습기에 보관하면서 정기적으로 Bradford assay로 단백질 정량을 실시하고 SDS-PAGE를 통해 순도를 확인하였다.

그 결과, ovotransferrin은 별도의 동결보호제의 첨가가 없이도 25°C 및 50°C에서 9개월

동안 단백질의 함량이 초기 함량 대비 95% 이상으로 안정성에 문제가 없었으며 (Fig. 73), SDS-PAGE 확인 결과도 ovotransferrin의 순도가 비교적 잘 유지가 되고 있는 것으로 확인되었다 (Fig. 74). 또한 보관과정에서 미생물의 증식이나 변색, 이취의 발생도 확인되지 않았다.

따라서 ovotransferrin은 25℃ 상온 유통에서도 안정성을 유지할 것으로 판단되며, 제조공정에서 별도의 동결보호 부형제가 첨가되지 않아도 안정성에는 큰 문제가 없는 것으로 판단된다.

ovotransferrin 가수분해물의 경우도 안정성 실험 결과 보관과정에서 미생물의 증식이나 변색, 이취의 발생도 확인되지 않아 25℃ 상온 유통에서도 안정성을 유지할 것으로 보인다.

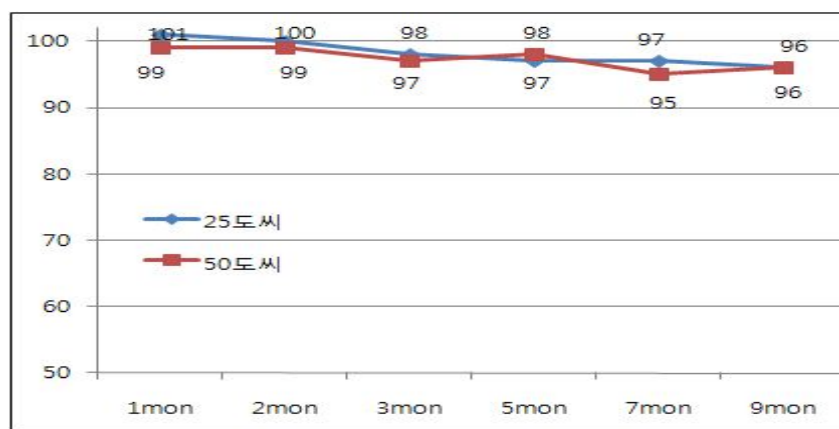


Fig. 73. 안정성 평가 중 단백질 농도 변화.

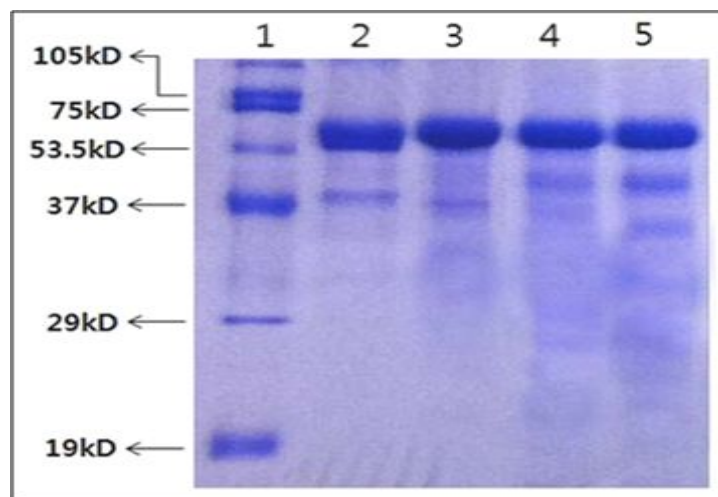


Fig. 74. 안정성 평가 9개월차 SDS-page 결과.

- 1 : Protein marker
- 2 : Ovotransferrin standard (Sigma)
- 3 : 4℃ 보관 Ovotransferrin (9개월차)
- 4 : 25℃ 보관 Ovotransferrin (9개월차)
- 5 : 50℃ 보관 Ovotransferrin (9개월차)

(2) 동결보호 부형제 별 안정성 평가

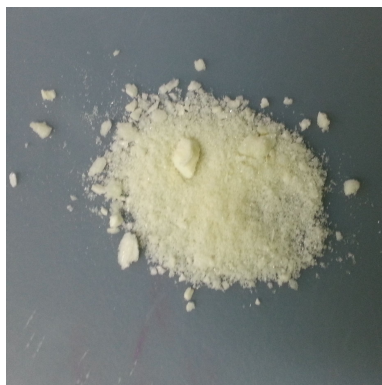
Ovotransferrin에 동결보호 부형제를 첨가하여 제조한 ovotransferrin에 대해서도 위와 동일한 방법으로 안정성 평가를 실시하였다. 생산된 ovotransferrin 시료를 알루미늄백에 각각 1 g씩 담아 밀봉하여 각각 25 °C (RH 60±10%)와 40°C (RH 75±10%) 항온항습기에 보관하면서 정기적으로 Bradford assay로 단백질 정량을 실시하고 SDS-PAGE를 통해 순도를 확인하였다. 그 결과 앞의 ovotransferrin 장기 안정성 평가와 마찬가지로 대부분의 시료에서 40°C (RH 75±10%)의 가속조건으로 실험한 경우에도 6개월간 단백질의 함량은 유지되어 안정하였으나 (Table 44), sucrose 2.5%, maltodextrin 5% 시료에서 단백질의 함량이 낮아져 안정성이 낮아지는 결과를 나타내었다. 또한, maltodextrin을 동결보호 부형제로 사용한 시료의 경우 시료 보관 2개월부터 갈변 현상이 발생하였다 (Fig. 75).

따라서 동결보호 부형제로는 trehalose나 sucrose가 바람직하며, sucrose도 5%를 첨가한 시료의 경우에도 40°C에서 보관한 시료에서 3개월부터 약간 갈변이 발생하여 5%이상의 사용은 바람직하지 않은 것으로 생각된다.

그러나 25°C에서 보관한 시료의 경우에는 모든 시료에서 성상이나 색의 변화는 관찰되지 않아 ovotransferrin 및 그의 가수분해물의 유통조건을 실온 유통으로 설정하여도 문제가 없을 것으로 판단되었다. 단, maltodextrin을 동결보호 부형제로 사용할 경우에는 40°C에서 2개월 만에 갈변이 발생한 것으로 보아 25°C에서도 장기 보관 시 성상의 변화가 있을 수 있으므로 maltodextrin은 동결보호 부형제로 사용은 바람직하지 않을 것으로 판단된다.

Table 44. 장기 보관시 동결보호부형제 별 단백질 함량 변화 (%)

Time (month)	Control		0.1M phosphate buffer		Sucrose 1%		Sucrose 2.5%	
	40℃	25℃	40℃	25℃	40℃	25℃	40℃	25℃
0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0
1	89.0	117.7	103.3	101.2	109.2	105.9	91.9	107.8
3	101.1	106.6	102.1	105.0	98.3	104.2	69.7	102.3
6	98.5	102.1	94.4	105.2	96.5	102.2	54.8	101.5
Time (month)	Sucrose 5%		Trehalose 1%		Trehalose 2.5%		Trehalose 5%	
	40℃	25℃	40℃	25℃	40℃	25℃	40℃	25℃
0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0
1	101.1	101.9	103.4	102.3	93.5	103.7	100.7	110.4
3	108.6	109.3	104.0	100.7	107.2	107.2	105.1	104.7
6	105.2	102.1	104.2	104.1	105.1	102.2	101.1	103.4
Time (month)	Maltodextrin 1%		Maltodextrin 2.5%		Maltodextrin 5%			
	40℃	25℃	40℃	25℃	40℃	25℃		
0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0		
1	112.9	106.7	105.1	103.7	100.8	106.1		
3	102.5	102.9	106.5	107.6	69.0	105.8		
6	100.3	103.6	102.5	105.7	51.2	103.2		



실험 전
(Maltodextrin 2.5%)



40℃, 3개월 보관 후
(Maltodextrin 2.5%)

Fig. 75. 장기보관 시 말토덱스트린 혼합 ovotransferrin 시료의 갈변 현상.

제 4 장 목표달성도 및 관련분야에의 기여도

제 1 절 연구개발목표의 달성도

1. 1차년도

구분 (연도)	세부과제명	세부연구목표	달성도 (%)	연구개발 수행내용
1차 연도 (2010)	제1세부과제 (건국대학교) 면역증강 및 항암효과를 가지는 ovotransferrin 가수분해물의 효율적인 생산 조건 확립	Ovotransferrin에서 면역증강 및 항암효과를 가지는 생리활성 가수분해물의 선별적 제조	100%	- 효율적인 가수분해 방법 선정 (산, 알칼리, 열, 효소 가수분해) - 온도, pH, 시간 등의 반응 조건 확립
		Ovotransferrin 및 ovotransferrin 가수분해물의 건강 기능성 검증	100%	- MTT assay 방법을 이용한 항종양 효과 - Nitric oxide (NO) 활성 저하 효과
	제1협동과제 (서울대학교) 계란 흰자로부터 ovotransferrin 추출방법 개발	최적의 수율과 순도를 얻기 위한 조건 확립	- Fe ³⁺ 이 ovotransferrin에 결합하는데 있어서의 pH 변화가 미치는 영향이 어떠한지를 조사	100%
			- Ovotransferrin이 Fe ³⁺ 와 결합하는데 있어서 달걀 난백 샘플의 저장 온도가 미치는 영향을 파악	100%
			- Fe ³⁺ 이 ovotransferrin에 결합하는데 있어서의 NaCl의 영향을 살펴보고 ovotransferrin이 iron-binding에 있어서 가장 최적의 NaCl 농도를 조사	100%
		침전된 ovotransferrin의 재용해를 위한 조건 및 순도 증진방법	- 침전된 holo-ovotransferrin이 저장 온도에 따른 안정성 측정	100%
			- 증류수에 의해 holo-ovotransferrin이 용해되어진 후 pH 변화에 따른 iron-bound ovotransferrin의 안정성 조사	100%
	Ammonium sulfate	100%	- Mucin-free 계란 흰자 용액으로부터	

	침전에 의한 ovotransferrin의 추출		ovotransferrin을 침전시키기 위해 요구되어지는 최적의 ammonium sulfate and acetic acid의 농도를 결정
Ovotransferrin 및 ovotransferrin의 면역증강 및 항암효과	Ovotransferrin 및 ovotransferrin 가수분해물의 항산화능 측정 (<i>in vitro</i>)	100%	- SOD-like activity, ORAC, DPPH, TRAP assay를 실시하여 ovotransferrin 및 그 가수분해물의 항산화능을 <i>in vitro</i> 상에서 확인함
	Ovotransferrin 및 ovotransferrin 가수분해물의 DNA 손상억제 효과 측정	100%	- 백혈구 및 대장암세포를 이용하여 인위적인 산화적 스트레스에 대한 ovotransferrin 및 그 가수분해물의 DNA 손상 억제효과를 comet assay를 통해 확인함
	Ovotransferrin 및 ovotransferrin 가수분해물의 암세포 성장에 미치는 영향 확인	100%	- Ovotransferrin 및 그 가수분해물이 인체 대장암 세포주인 HT-29 세포의 성장에 미치는 영향을 MTT assay를 통해 확인
	Ovotransferrin 및 ovotransferrin 가수분해물의 세포독성 확인	100%	- HT-29 세포에 ovotransferrin 및 그 가수분해물을 처리한 후 LDH 분비량을 측정함으로써 세포 독성에 미치는 영향을 확인
	Ovotransferrin 및 ovotransferrin 가수분해물이 암세포의 형태학적 변화에 미치는 영향 확인	100%	- 대장암 세포에 ovotransferrin 및 그 가수분해물을 처리하여 24 시간동안 배양한 후 위상차 현미경을 통해 형태학적인 관찰을 함
	Ovotransferrin 및 ovotransferrin 가수분해물이 LPS로 유도한 세포 염증에 미치는 영향 및 그 기전 구명	100%	- 예비 실험을 통해 HT-29 세포의 사멸을 유도하지 않으면서 염증을 유발할 수 있는 LPS의 적정 농도를 확인한 후, ovotransferrin 및 그 가수분해물을 처리하여 염증 반응에 미치는 영향을 배양액 및 gene 수준에서 확인
제2협동과제 (경남대학교)			
Ovotransferrin의 시장 조사 및	Ovotransferrin 원료인 계란의 확보 및 경제성 분석	100%	- 계란의 소비 및 가격 추세 조사
	기능성 ovotransferrin의	100%	- Ovotransferrin의 시장 조사

품질평가 기준 확립	해외 시장 조사		
	Ovotransferrin의 품질평가 기준 확립	100%	- Ovotransferrin의 정량시험법 확립

2. 2차년도

구분 (연도)	세부과제명	세부연구목표	달성도 (%)	연구개발 수행내용
2차 년도 (2011)	제1세부과제 <u>(건국대학교)</u> Ovotransferrin 가수분해물의 생산 최적화	Ovotransferrin 가수분해물 생산의 최적 조건 확립	100%	- RSM (response surface methodology) 법을 이용한 효소 별, pH, 온도 등 최적조건 확립
		확립된 최적 조건에서 면역증강 및 항암효과에 관련된 기능성 재확인	100%	- MTT assay 방법을 이용한 항종양 효과 확인 - Nitric oxide (NO) 활성 저하 효과 확인
	제1협동과제 <u>(서울대학교)</u> 기능성 향상을 위한 ovotransferrin 활성화 방법 개발	Ovotransferrin으로부터 철 이온의 제거를 위한 최적 조건 개발	100%	- 철 이온 제거에 있어서 pH의 영향 확 인하고, HCl과 citric acid의 pH를 조 절했을 때의 철 이온제거 정도 비교 - 철 이온 제거에 필요한 resin의 최적 량 확인
		Ovotransferrin의 철 이온 결합도 측정법 확립	100%	- Apo-ovotransferrin 20 mL을 0.15 M NaCl과 10 mM NaHCO ₃ 을 함유 하고 있는 pH 7.4의 용액으로 만든후, 10 mM 철 이온 nitrilotriacetate (Fe-NTA)을 이용하여 발색을 일으 키고 이를 흡광도 측정하여 철분 함량 측정
제2협동과제 <u>(경남대학교)</u> 동물실험을 통한 ovotransferrin 및 ovotransferrin 가수분해물의 면역증강 및	실험동물 사육	100%	- 5주령 Sprague Dawley계 수컷 흰쥐 를 군별 9 마리씩 총 45 마리를 구입 하여 한 후 체중에 따라 난피법에 의 해 [정상대조군], [대장암대조군 (DMH)], [대장암유발 +ovotransferrin (DMH+OTF)], [대 장암유발 + promod 가수분해물 (DMH+PH)], [대장암유발+trypsin	

2차 년도 (2011)	항암효과 검증 및 그 기전 구명 연구	실험동물 사육		<p>가수분해물 (DMH+TH)]로 그룹을 나누는 후 NC와 DMH 그룹에는 AIN-76을 기본으로 한 고지방저섬유 소식이를 7주 간 섭취시켰고, [DMH+OTF], [DMH+PH], [DMH+TH] 그룹에는 동결건조한 ovotransferrin, promod 278 hydrolysate, trypsin hydrolysate를 각각 식이에 5%로 섞어 공급</p> <p>- 대장암 유발을 위하여 NC 그룹을 제외한 모든 그룹의 쥐에 1주일에 한 번 씩 총 7주 간 dimethyl-hydrazine (DMH)을 대퇴부에 30 mg/kg (총 210 mg/kg BW) 농도로 주사</p>
	제2협동과제 (경남대학교) 동물실험을 통한 ovotransferrin 및 ovotransferrin 가수분해물의 면역증강 및 항암효과 검증 및 그 기전 구명 연구	실험동물 희생	100%	<p>- 9주 간의 사육 기간 후 실험동물을 12시간 동안 절식시킨 다음 희생 시켜 복부 하대정맥으로부터 혈액을 채취</p> <p>- 채취한 혈액과 대장 조직으로 alkaline comet assay를 실시</p> <p>- 간, 심장, 비장, 신장, 대장 등 각 장기를 적출하여 무게를 측정하고 대장의 경우 유전자 발현, 전암 병변을 확인하기 위하여 적절한 처치 후 보관</p>
		항암 및 항산화 지표 분석	100%	- 백혈구 및 대장 조직 DNA 손상도 확인
			100%	- 전암병변 (aberrant crypt) 측정
			100%	- 적혈구 내 항산화 효소활성 측정 (CAT, GSH-Px, SOD)
100%	- 혈장 TRAP 측정			
100%	- Real-time PCR을 수행하여 염증 (iNOS, COX, IFN-g, TNF- α , IL-8), 항산화 (CAT, Mn-SOD, CuZn-SOD, SOD, GPX, HO-1), 항암 (Bax, Bcl-2, AP1,			

2차 년도 (2011)				p21waf1/cip1, β -catenin) 관련 유전자 발현 확인
			100%	- 혈장 과산화 지질 측정 (CD)
			100%	- 혈장 지용성 항산화 비타민 분석 (retinol, α -, γ -tocopherol)
	제3협동과제 (주)씨티씨바이오 Ovotransferrin 가수분해물의 대량생산공정 개발	Ovotransferrin 가수분해물의 시험법 set-up 및 품질평가 기준 확립	100%	- SDS-PAGE, 단백질 정량, 펩타이드 정량, HPLC 분석 등을 통한 ovotransferrin 가수분해물 분석을 실시
	Ovotransferrin 가수분해물의 생산공정 검토 및 scale-up test	100%	- Ovotransferrin 및 ovotransferrin 가수분해물을 semi-pilot scale로 제조, 생산수율 확인 및 원가 계산	

3. 3차년도

구분 (연도)	세부과제명	세부연구목표	달성도 (%)	연구개발 수행내용
3차 년도 (2012)	제1세부과제 (건국대학교) 제제화된 ovotransferrin 및 ovotransferrin 가수분해물의 미생물학적 안전성 확보 및 기능성 재확인	제제화된 ovotransferrin 및 ovotransferrin 가수분해물의 미생물학적 안전성 확보	100%	- 식품공전에 공시되어 있는 시험법에 따라 총균수 및 병원성 식중독균 (<i>E. coli</i> O157:H7, <i>S. aureus</i> , <i>Salmonella</i> spp., <i>B. cereus</i> , <i>Listeria</i> spp. 등)의 유무 확인
		제제화된 ovotransferrin 및 ovotransferrin 가수분해물의 <i>in vitro</i> 상에서의 기능성 재확인	100%	- MTT assay 방법을 이용한 항종양 효과 확인 - Nitric oxide (NO) 활성 저하 효과 확인
	제1협동과제 (서울대학교) Ovotransferrin의 경제적인 semi-large 규모의 시스템 확립	Ovotransferrin의 경제적인 semi-large 규모의 시스템 확립	100%	- Ovotransferrin의 경제적인 semi-large 규모의 시스템 확립 - 철분의 포화조건, 혼합 (교반), 원심분리, egg albumin과 ovotransferrin의 pH와 ethanol에 대한 반응도에 대한 조건 확립

3차 년도 (2012)	<p>제2협동과제 (경남대학교) 제제화된 ovotransferrin 및 ovotransferrin 가수분해물 제형의 면역증강 및 항암효과 검증 및 그 기전 구명 연구</p>	식이제조 및 동물사육	100%	<ul style="list-style-type: none"> - 실험동물사육: 4주령 F344계 수컷 흰 쥐를 그룹당 10마리씩 정상대조군 (NC), DMH유도군 (DMH), DMH+ovotransferrin (DMH+OTF), DMH+trypsin 가수분해물 (DMH+OTFT)로 나누어 고지방 (23% corn oil w/w)-저섬유소식이 (2% cellulose w/w)를 8 주간 공급 함. ovotransferrin과 그 가수분해물은 식이의 5%를 공급 - 대장암 유발을 위한 DMH 투여: 정상 대조군을 제외한 DMH 투여 그룹에 1 주일에 2회씩 총 2 주간 DMH (1,2-dimethylhydrazine)을 대퇴부에 40 mg/kg BW 농도로 주사
		실험동물 희생	100%	<ul style="list-style-type: none"> - 실험동물의 희생: 8 주간의 사육기간 후 실험동물을 12 시간 동안 절식시킨 다음 희생 시켜 복부 하대정맥으로부터 혈액을 채취 - 장기무게 측정: 간, 심장, 비장, 신장, 대장 등 각 장기를 적출하여 무게를 측정하고 대장의 경우 길이를 측정
		생화학적 지표 및 항산화 관련 지표 분석	100%	- 혈중 지질 및 간기능 지표 측정: 총콜레스테롤, 중성지방, GOT, GPT를 측정
			80%	- 적혈구 내 항산화효소 활성 측정: 적혈구를 이용하여 CAT, GSH-Px, SOD 효소 활성을 측정
			70%	- 혈장 내 항산화능 측정: 혈장을 이용하여 총항산화능 (TRAP)과 ORAC 활성을 측정하고, 혈장 항산화 비타민을 측정
			100%	- 혈장 지질과산화 측정: 지질과산화의 정도를 측정하기 위해 혈장에서 conjugated dienes (CD)을 측정
100%	- 백혈구 DNA 손상측정: alkaline comet assay를 이용하여 백혈구의 DNA 손상도를 측정			

3차 년도 (2012)	제2협동과제 (경남대학교) 제제화된 ovotransferrin 및 ovotransferrin 가수분해물 제형의 면역증강 및 항암효과 검증 및 그 기전 구명 연구	대장암 관련 지표 분석	100%	- 대장 조직 DNA 손상 측정: 대장 0.5cm를 적출하여 alkaline comet assay를 실시
			100%	- 전암병변 (aberrant crypt) 측정: 분리한 distal colon을 formalin 으로 고정시킨 후 methylene blue로 염색하여 대장암의 전암병변인 aberrant crypt foci (ACF)와 aberrant crypt (AC)를 측정
			100%	- 대장암 관련 유전자 발현 측정: 대장 점막 조직을 이용하여 iNOS, COX-2 등의 염증관련 유전자 발현을 측정
	제3협동과제 (주)씨티씨바이오) Ovotransferrin 및 ovotransferrin 가수분해물의 식품 제제화	식품제재로의 제형 탐색 및 제품화	100%	- 정상 및 동결건조 시 회수율 개선을 위해 동결건조시 바람직한 동결보호부형제를 탐색
	개발된 제형에서 ovotransferrin의 장기 안정성 평가	100%	- 가속 (40℃, RH 75±10%) 및 실온 (25℃, RH 60±10%), 냉장 (10℃) 조건에서 제조된 ovotransferrin 및 ovotransferrin 가수분해물을 보관하면서 품질을 평가하여 장기 안정성 평가	

제 2 절 관련분야의 기술발전예의 기여도

1. 활용방안

- 가. 계란의 이용성 및 부가가치를 높여 양계산업의 가치부여 및 신규 부가가치 제품 개발로 신규가치 창출이 가능함.
- 나. Ovotransferrin의 생산방법의 보급
 - 시장개척에 따른 수요증가로 pilot scale 생산기술의 개발을 이용한 고부가가치 ovotransferrin 식품 소재의 대량생산으로 국내 수입시장 대체 및 수출 경쟁력 확보가 가능함.
- 다. 기능성 ovotransferrin 가수분해물을 이용한 제품의 개발
 - 면역증강 및 항암효과를 가진 건강지향식품 (LOHAS 식품) 소재로서 개발이 가능함.
 - 의약품 소재로서 개발이 가능함.
- 라. Ovotransferrin 가수분해물의 특성 및 생산, 기능성에 관련된 특허 및 논문으로 지적재산의 확보와 함께 학술적 기여가 큼.

2. 기대효과

<기술적 측면>

- 가. 생리활성 물질의 기능성 식품 소재로의 도입 원천기술 확보
 - Ovotransferrin 가수분해물의 기능성의 유지 및 생체 이용률을 제고함으로써 기능성 식품 소재로 도입이 가능함.
- 나. 효율적 생리기능 활성 평가방법 확보
 - 본 연구에 의한 생리기능성 평가 방법을 표준화함으로써 타 신물질의 기능성을 객관적 방법으로 비교함으로써 효율적 검증 방법을 제시
- 다. 독자적인 연구로부터 얻어지는 지적재산권 (특허 등)의 확보로 산업적인 응용에도 독점적인 권리 제공

<경제·산업적 측면>

- 가. 양계업계의 부가가치 창출
 - 계란 소비량의 감소, 가격 변동 및 사료 비용의 증가, AI와 같은 질병 등으로 인하여 양계업계는 잠재적인 위험요소를 가지고 있다. 계란의 기능성 펩타이드를 이용함으로써 양계업계의 새로운 계기를 마련
- 나. 고 부가가치의 기능성 물질을 대량생산하는 기술을 확보함으로써 경제적인 이윤을 극대화할 수 있고, 산업적 응용의 실용화가 가능함.
- 다. 건강에 대한 인식이 나날이 증대되고 있는 선진국에는 기능성 소재 형태로 또는

well-being 식품으로서 제품화하여 수출의 증대 가능

라. 기능성 식품의 다양화로 보다 다양한 제품군을 제공하여 줌으로서 그 소비량을 증대시킬 수 있을 것이며, 기능성이 부여된 고부가 가치의 식품군으로 제조하여 산업체의 수익성의 증대가 가능함.

<파급효과>

가. Ovotransferrin 가수분해물의 항종양 및 면역증강효과 등 생리효과를 통한 건강식품 (functional food) 뿐만 아니라 신약 (new drug) 개발에 가까운 의약식품 (medicinal food)의 주요 원료로 database화 함으로써 각 질병 치료 용도에 대한 적절한 성분 및 그 농도를 선택할 수 있으며 또한 타물질과 다양한 combination으로 synergistic한 효능의 제품을 개발하는 기초자료가 될 것이다.

나. Ovotransferrin 가수분해물의 생산 최적화를 확립함으로써, 경제적인 이윤을 극대화할 수 있고, 산업적 응용의 실용화가 가능함.

다. 기능성 펩타이드를 이용하여 기능성 유제품 및 음료제품 개발을 할 수 있으며, 이를 통한 세계 기능성 식품 시장의 진출의 발판 마련

라. 효능검증 기술의 확보로 최근에 식품 산업에서 큰 관심을 끌고 있는 각종 펩타이드를 활용하기 위한 기초 데이터를 제공하게 되며, 이를 바탕으로 관심 있는 식품 및 생물 산업 회사에서 산업화를 추진하는데 도움

마. Scale-up된 pilot 규모의 ovotransferrin 추출 장치를 구축하여 운전조건을 설정함으로써 본 연구의 결과를 바탕으로 대량생산을 위한 공장설계 기초 자료를 제공 가능

바. Ovotransferrin 및 ovotransferrin 가수분해물의 기능성 검증 기술 확보로 최근 큰 관심을 끌고 있는 건강기능성 식품 및 의약산업에 활용하기 위한 기초 데이터를 제공할 수 있고, 이를 바탕으로 관련 식품 및 생물산업 회사에서 산업화를 추진하는데 도움 제공

제 5 장 연구개발 성과 및 성과활용 계획

제 1 절 논문 실적

1. Moon, S. H., Paik, H.-D., White, S., Daraba, A., Mendonca, A. F. and D. U. Ahn. 2011. Influence of nisin and selected meat additives on the antimicrobial effect of ovotransferrin against *Listeria monocytogenes*. *Poult. Sci.* 90: 2548-2591.
2. Moon, S. H., Lee, J. H., Lee, Y. J., Paik, J. Y., Ahn, D. U. and H.-D. Paik. 2012. Antioxidant, antimicrobial, and cytotoxic activities of ovotransferrin from egg white. *Korean J. Food Sci. Ani. Resour.* 32: 612-617.
3. Kim, J., Moon, S. H., Ahn, D. U., Paik, H.-D. and E. Park. 2012. Antioxidant effects of ovotransferrin and its hydrolysates. *Poult. Sci.* 91: 2747-2754.
4. Moon, S. H., Lee, J. H., Lee, Y. J., Chang, K. H., Paik, J. Y., Ahn, D. U. and H.-D. Paik. 2013. Screening for cytotoxic activity of ovotransferrin and its enzyme hydrolysates. *Poult. Sci.* 92: 424-434.

제 2 절 학술대회 발표 실적

1. Park, E., Kim, J., Moon, S. H., Ahn, D. U., Paik, H.-D. Antioxidant and antigenotoxic activity of ovotransferrin from egg white and its hydrolysates. 제 78 차 한국식품과학회 학술대회, 대구, 2011. 6. 8.
2. Moon, S. H., Han, K. J., Lee, J. H., Lee, Y. J., Ahn, D. U., Paik, J. Y., Paik, H.-D. Antioxidant, antimicrobial, and cytotoxic activity of ovotransferrin from egg. 제 78 차 한국식품과학회 학술대회, 대구, 2011. 6. 8.
3. Moon, S. H., Lee, J. H., Han, K. J., Lee, Y. J., Ahn, D. U. Paik, H.-D. Antimicrobial effects of ovotransferrin and ovotransferrin hydrolysates against *Bacillus cereus* and *Staphylococcus aureus*. 제 78 차 한국식품과학회 학술대회, 대구, 2011. 6. 8.
4. Moon, S. H., Lee, J. H., Lee, Y. H., Lee, K. A., Min, K. Y., Ahn, D. U., Paik, H.-D. Antioxidant activity of autocleaved ovotransferrin against lipid oxidation. 제 79 차 한국식품과학회 학술대회, 대전, 2012. 6. 13.
5. Abeyrathne, S., Lee, H. Y., Ahn, D. U. Separation of ovotransferrin from chicken egg white without using solvents. 제 79 차 한국식품과학회 학술대회, 대전, 2012. 6. 13.
6. Moon, S. H., Lee, J. H., Ahn, D. U., Chang, K. H., Paik, H.-D. Cytotoxic activity of enzymatic protein hydrolysates from ovotransferrin. 2012 IFT Annual Meeting, Las Vegas, 2012. 6. 25.
7. Lee, M., Kim, J., Paik, H.-D., Park, E. Effect of ovotransferrin and its

- hydrolysates on colon carcinogenesis in 1,2-dimethylhydrazine (DMH)-treated rats. 2012 한국영양학회 추계학술대회, 서울, 2012. 11. 16.
8. Moon, S. H., Lee, J. H., Lee, M., Park, E., Paik, H.-D., Ahn, D. U. Cytotoxic and antigenotoxic activities of enzymatic protein hydrolysate from ovotransferrin. 2013 IFT Annual Meeting, Chicago, 2013. 7. 15.
9. Moon, S. H., Lee, J. H., Paik, H.-D., Lee, Y. H., Ahn, D. U. Hypertensive angiotensin-converting enzyme inhibitory activity of enzymatic protein hydrolysates from ovotransferrin. 2013 IFT Annual Meeting, Chicago, 2013. 7. 15.

제 3 절 특허 실적

1. 백현동, 안동욱, 박은주, 문선희, 한경준, 김정미. 계란 난백 ovotransferrin 가수분해물의 제조방법과 이를 이용한 항산화 기능성 식품. 건국대학교 산학협력단. 대한민국 출원 제 10-2011-0040418호 (출원일: 2011. 4. 28)
2. 백현동, 안동욱, 박은주, 문선희, 김정미, 백지연. 계란 난백 ovotransferrin의 분리정제법과 항암 기능성 약제학 조성물. 건국대학교 산학협력단. 대한민국 출원 제 10-2011-0040419호 (출원일: 2011. 4. 28)
3. 백현동, 안동욱, 박은주, 문선희, 한경준, 김정미. 계란 난백 ovotransferrin 가수분해물 및 그 항산화 기능성 의약품. 건국대학교 산학협력단. 대한민국 출원 제 10-2011-0040420호 (출원일: 2011. 4. 28)
4. 백현동, 안동욱, 박은주, 문선희, 김정미, 백지연. 계란 난백 ovotransferrin의 분리정제법과 항암 기능성 식품. 건국대학교 산학협력단. 대한민국 출원 제 10-2011-0040421호 (출원일: 2011. 4. 28)
5. 백현동, 안동욱, 박은주, 문선희, 이재훈, 이경아, 민근영. 항산화 활성을 갖는 난백 단백질 오버트랜스페린의 가수분해물 및 그 제조방법. 건국대학교 산학협력단. 대한민국 출원 제 10-2012-0039672호 (출원일: 2012. 4. 17)
6. 백현동, 안동욱, 박은주, 문선희, 이재훈, 장경훈, 백지연, 김세영. 계란 난백 오버트랜스페린 가수분해물 및 그 항암 기능성 의약품. 건국대학교 산학협력단. 대한민국 출원 제 10-2012-0040258호 (출원일: 2012. 4. 18)
7. 백현동, 안동욱, 박은주, 문선희, 이재훈, 이경아, 민근영. 항산화 활성을 갖는 난백 단백질 오버트랜스페린의 가수분해물을 함유하는 약학 조성물. 건국대학교 산학협력단. 대한민국 출원 제 10-2012-0040769호 (출원일: 2012. 4. 19)
8. 백현동, 안동욱, 이재훈, 문선희, 김세영. 트레할로스를 첨가한 오보트란스페린을 유효성분으로 포함하는 암세포 성장 억제용 조성물. 건국대학교 산학협력단. 대한민국 출원 제 10-2013-0076094호 (출원일: 2013. 6. 28)
9. 백현동, 안동욱, 박은주, 문선희, 이재훈, 이민희. 오보트란스페린-프로모드 278 효소 가수분해물을 유효성분으로 함유하는 항암용 조성물. 건국대학교 산학협력단. 대한민국 출원 제 10-2013-0076095호 (출원일: 2013. 6. 28)

제 4 절 기술 이전 실적

1. 이전할 기술의 내용 및 범위

- 트레할로스를 첨가한 오보트란스페린을 유효성분으로 포함하는 암세포 성장 억제용 조성물 (대한민국 출원번호: 제 10-2013-0076094호)

2. 이전업체 현황

업 체 명	(주)씨티씨바이오	대표자	조호연, 우성섭, 성기홍
전년도 매출액	1000 억원	종업원 수	145 명
주요 생산품목	동물약품, 사료첨가제, 인체의약품, 식품 및 건강기능식품 유산균 원료		
기업부설연구소	유		

3. 기술실시 관련도 및 기술료 산출내역

가. 기술실시 관련도

(단위 : 천원)

구 분	주요 연구결과	총 연구비	정부 출연금	기술실시 관련도(%)	비 고
3 차 년 도	제제화된 ovotransferrin 및 ovotransferrin 가수분해물의 미생물학적 안전성 확보 및 기능성 재확인	160,000	120,000	25	기술이 전부분
	Ovotransferrin의 경제적인 semi-large 규모의 시스템 확립			25	
	제제화된 ovotransferrin 및 ovotransferrin 가수분해물 제형의 면역증강 및 항암효과 검증 및 그 기전 구명 연구			25	
	Ovotransferrin 및 ovotransferrin 가수분해물의 식품 제제화			25	기술이 전부분

나. 기술료 산출내역

(단위 : 천원)

총 투자비	정부출연금 (A)	기술실시 관련도(B)	감면율(C)	계(기술료) (A×B) × (1-C)
160,000	120,000	50%	79% ○중소기업 기본 감면 70% ○조기일시납부에 따른 추가감면 율 30%	12,600

※ 농림수산식품과학기술 육성법 시행령 제14조

다. 기술료 감면 사유

본 연구과제의 핵심결과 중 3차년도 연구결과인 출원 특허 “트레할로스를 첨가한 오보트란스페린을 유효성분으로 포함하는 암세포 성장 억제용 조성물”을 우선적으로 이전코자 관련도(50%)를 제외한 일부기술이전에 따른 50% 감면, 중소기업 이전에 대한 감면 70% 및 조기일시납부에 따른 추가감면 30%를 고려하여 기술료 감면.

4. 기술이전 조건

- 실시 기간 : 2013 년 09 월 ~ 2023 년 08 월 (총 10 년)
- 실시권의 유형 : 국내전용실시권
- 기술료 납부 방법 : 계약시 일시불

5. 상용화 완료시 기대효과

- 새로운 기능성 소재를 이용한 제품의 다양성 증대
- 기존의 있던 회사의 생산기술과 접목함으로써 새로운 기능성 소재의 제품을 대량생산 가능

제 5 절 인력활용 및 양성효과

지원 총인원	지원 대상 (학위별, 취득자)				성별		지역별		
	박사	석사	학사	기타	남	여	수도권	대전	기타지역
10	6	4	-	-	4	6	9	-	1

제 6 절 연구결과 기대효과

1. 생리활성 물질의 기능성 식품 소재로의 도입 원천기술 확보
 - Ovotransferrin 가수분해물의 기능성의 유지 및 생체 이용률을 제고함으로써 기능성 식품 소재로 도입이 가능
2. 효율적 생리기능 활성 평가방법 확보
 - 본 연구에 의한 생리기능성 평가 방법을 표준화함으로써 타 신물질의 기능성을 객관적 방법으로 비교함으로써 효율적 검증 방법을 제시 가능
3. 독자적인 연구로부터 얻은 지적재산권 (특허 등)의 확보로 산업적인 응용에도 독점적인 권리 제공
4. 양계업계의 부가가치 창출
 - 계란 소비량의 감소, 가격 변동 및 사료 비용의 증가, AI와 같은 질병등의 양계업계의 잠재적인 위험요소를 계란 기능성 펩타이드를 이용함으로써 새로운 부가가치 창출 가능
5. 기능성 식품의 다양화로 보다 다양한 제품군을 제공하여 줌으로서 그 소비량을 증대 시

킬 수 있을 것이며, 기능성이 부여된 고부가 가치의 식품군으로 제조하여 산업체의 수익성 증대 가능

제 6 장 연구개발과정에서 수집한 해외과학기술정보

제 1 절 과제 관련 해외 학술 논문 정보

순번	논문명	저자	저널명	내용
1	Novel anticancer activity of the autocleaved ovotransferrin against human colon and breast cancer cells	Hisham R. Ibrahim <i>et al.</i>	Journal of Agricultural and Food Chemistry 57:11383-11390 (2009)	<ul style="list-style-type: none"> - 순수한 Ovotransferrin을 tris (2-carbo xyethyl)phosphine (TCEP) 라는 환원제를 이용하여 ovotrnsferrin이 가지고 있는 이황화 결합을 분해, 새로운 항암효과를 갖는 펩타이드를 찾는 연구임. - 이 연구에서 대장암 세포인 HCT-116 cell과 유방암 세포인 MCF-7에 대해서 항암효과를 갖는 펩타이드를 찾음. 이 펩타이드는 암세포의 형태학적인 변화를 일으키거나, 미토콘드리아의 대사과정에 영향을 주어 사멸효과를 갖는 것으로 확인.

<Data>

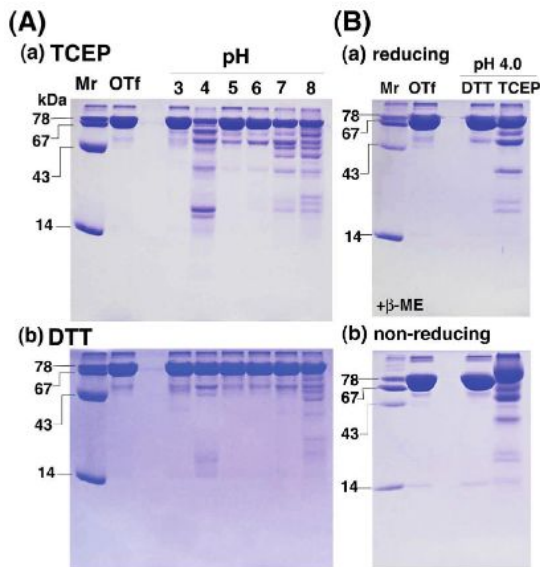


Figure 1. Electrophoretic patterns of reduction-induced autocleavage of OTf: (A) pH profile of the autocleavage of OTf incubated with 200 μ M TCEP (a) or DTT (b) at 37 $^{\circ}$ C for 6 h at different pH values (pH 3.0–8.0); portions were then applied to SDS-PAGE; (B) portion of OTf reduced at pH 4.0 by either TCEP (rac-OTf) or DTT applied to a reducing (a) or nonreducing (b) SDS-PAGE.

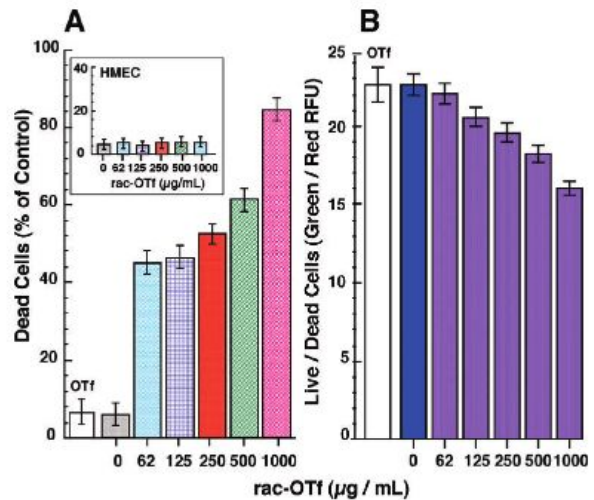


Figure 3. Viability of human colon cancer HCT-116 cells treated with rac-OTf assessed by trypan blue exclusion (A) and live/dead fluoroassay (B). Cells were pretreated for 4 h with intact OTf or different concentrations of rac-OTf. Total cell count was obtained by hemocytometer count under a microscope. In (A) the dead cells were estimated as [number of TB positive cells/number of total cells] \times 100. The inset shows the viability of normal human HMEC cells treated with rac-OTf. In (B) the cytotoxicity is represented as a ratio of green (live)/red (dead) fluorescence. In both assays, treatment with rac-OTf resulted in a statistically significant reduction in cell viability ($P < 0.001$ vs no treatment group). The effect of uncleaved OTf (OTf) at 250 μ g/mL is shown on the left (open bars) of the graphs. Values are the mean of three experiments from four parallel wells per sample in each experiment.

순번	논문명	저자	저널명	내용
2	Effect of addition of egg ovotransferrin-derived peptides on the oxygen radical absorbance capacity of different teas	Wuyang Huang <i>et al.</i>	Food Chemistry 135:1600-1607 (2012)	<ul style="list-style-type: none"> - Ovotransferrin으로부터 유래된 펩타이드를 다양한 차를 열수와 80% methanol로 추출한 추출물과 혼합하여 사용함으로써 항산화 효과를 측정하는 연구임. - 이 연구에서는 IRW 아미노산 염기서열을 갖는 펩타이드와 다양한 차 추출물의 항산화 효과를 측정. - 추출 조건에서는 열수보다는 80% methanol 추출물이 더 높은 항산화 효과를 보였고, ovotransferrin에서 추출한 IRW 펩타이드를 첨가함으로써 그 항산화 효과가 더 증가하는 것을 확인.

<Data>

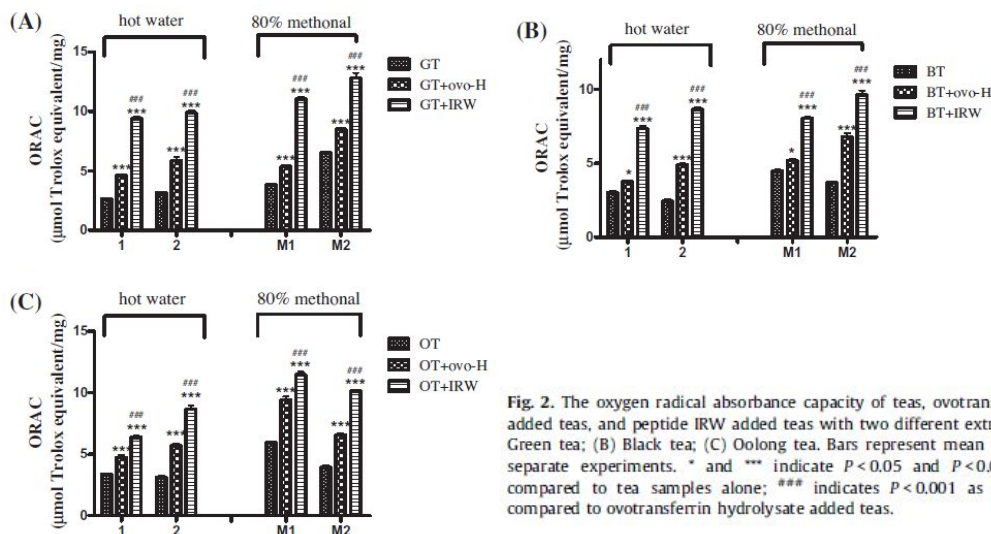


Fig. 2. The oxygen radical absorbance capacity of teas, ovotransferrin hydrolysis added teas, and peptide IRW added teas with two different extract methods: (A) Green tea; (B) Black tea; (C) Oolong tea. Bars represent mean values \pm SD, $n = 3$ separate experiments. * and *** indicate $P < 0.05$ and $P < 0.001$, respectively compared to tea samples alone; *** indicates $P < 0.001$ as IRW added teas compared to ovotransferrin hydrolysate added teas.

제 7 장 참고문헌

1. Ahotupa, M., Marniemi, J., Lehtimäki, T., Talvinen, K., Raitakari, O. T., Vasankari, T., Viikari, J., Luoma, J. and S. Ylä-Herttuala. Baseline diene conjugation in LDL lipids as a direct measure of in vivo LDL oxidation. *Clin. Biochem.* 31: 257–261.
2. Al-Dabbas, M. M., Al-Ismail, K., Kitahara, K., Chishaki, N., Hashinaga, F., Suganuma, T. and K. Tadera. 2007. The effects of different inorganic salts, buffer systems, and desalting of varthemia crude water extract on DPPH radical scavenging activity. *Food Chem.* 104: 734–739.
3. Carlsson, N., Borde, A., Wolfel, S., Akerman, B. and A. Larsson. 2011. Quantification of protein concentration by the Bradford method in the presence of pharmaceutical polymers. *Anal. Biochem.* 411: 116–121.
4. Chang, B. S., Beauvais, R. M., Dong, A. and J. F. Carpenter. 1996. Physical factors affecting the storage stability of freeze-dried interleukin-1 receptor antagonist: glass transition and protein conformation. 331: 249–258.
5. Collier, A. C. and C. A. Pritsos. 2007. The mitochondrial uncoupler dicumarol disrupts the MTT assay. *Biochem. Pharmacol.* 66: 281–287.
6. Folch-Cano, C., Jullian, C., Speisky, H. and C. Olea-Azar. 2010. Antioxidant activity of inclusion complexes of tea catechins with β -cyclodextrins by ORAC assays. *Food Res. Int.* 43: 2039–2044.
7. Fraenkel-Conrat, H. and R. Feeney. 1950. The metal-binding activity of conalbumin. *Arch. Biochem.* 29: 101–113.
8. Huang, Y. C., Guh, J. H., Cheng, Z. J., Chang, Y. L., Hwang, T. L., Lin, C. N. and C. M. Teng. 2001. Inhibitory effect of DCDC on lipopolysaccharide-induced nitric oxide synthesis in RAW 264.7 cells. *Life Sci.* 68: 2435–2447.
9. Huang, W., Shen, S., Nimalaratne, C., Li, S., Majumder, K. and J. Wu. 2012. Effects of addition of egg ovotransferrin-derived peptides on the oxygen radical absorbance capacity of different teas. *Food Chem.* 135: 1600–1607.
10. Ibrahim, H. R., Hoq, M. I. and T. Aoki. 2007. Ovotransferrin possesses SOD-like superoxide anion scavenging activity that is promoted by copper and manganese binding. *Int. J. Biol. Macromol.* 41: 631–640.
11. Ibrahim, H. R., Sugmito, Y. and T. Aoki. 2000. Ovotransferrin antimicrobial peptide (OTAP-92) kills bacteria through a membrane damage mechanism. *Bochim. Biophys. Acta.* 1553: 196–205.
12. Ibrahim, H. R. and T. Kiyono. 2009. Novel anticancer activity of the autocleaved ovotransferrin against human colon and breast cancer cells. *J. Agric. Food Chem.* 57: 11383–11390.
13. Jang, A., Jo, C., Kang, K. S. and M. Lee. 2008. Antimicrobial and human cancer cell cytotoxic effect of synthetic angiotensin-converting enzyme (ACE)

- inhibitory peptides. *Food Chem.* 107: 327–336.
14. Jeon, T. W. and K.-M. Park. 2002. Functional properties of egg shell membrane hydrolysate as a food material. *Korean J. Food Sci. Ani. Resour.* 22: 267–273.
 15. Jurisic, V., Spuzic, I. and G. Konjevic. 1999. A comparison of the NK cell cytotoxicity with effects of TNF- α against K-562 cells, determined by LDH release assay. *Cancer Letters.* 138: 67–72.
 16. Kaneko, T., Tahara, S. and F. Takabayashi. 2007. Inhibitory effect of natural coumarin compounds, esculetin and esculin, on oxidative DNA damage and formation of aberrant crypt foci and tumors induced by 1,2-dimethylhydrazine in rat colons. *Biol. Pharm. Bull.* 30: 2052–2057.
 17. Kanna, P. S., Mahendrakumar, C. B., Chakraborty, T., Hemalatha, P., Banerjee, P. and M. Chatterjee. 2003. Effect of vanadium on colonic aberrant crypt foci induced in rats by 1,2 dimethyl hydrazine. *World J. Gastroenterol.* 9: 1020–1027.
 18. Keung, W. M., Azari, P. and J. L. Phillips. 1981. Structure and function of ovotransferrin. *J. Biol. Chem.* 10: 1177–1183.
 19. KFDA. 2011. 식품첨가물공전
 20. KFDA. 2011. 식품공전
 21. Kim, J. C., Kwon, S. O., Lee, S. H., An, K. E., Lee, E. W. and M. H. Lee. 2005. Separation and utilization of whole egg components.
 22. Kmonickova, E., Melkusova, P., Farghali, H., Holy, A. and Z. Zidek. 2007. Nitric oxide production in mouse and rat macrophages: A rapid and efficient assay for screening of drugs immunostimulatory effects in human cells. *Nitric Oxide.* 17: 160–169.
 23. Ko, K. Y. and D. U. Ahn. 2008. An economic and simple purification procedure for the large-scale production of ovotransferrin from egg white. *Poult. Sci.* 87: 1441–1450.
 24. Ko, K. Y., Mendonca, A. F. and D. U. Ahn. 2008. Effect of ethylenediaminetetraacetate and lysozyme on the antimicrobial activity of ovotransferrin against *Listeria monocytogens*. *Poult. Sci.* 87: 1649–1658.
 25. Kurihara, H., Fukami, H., Asami, S., Toyoda, Y., Nakai, M., Shibata, H. and X. S. Yao. 2004. Effects of oolong tea on plasma antioxidative capacity in mice loaded with restraint stress assessed using the oxygen radical absorbance capacity (ORAC) assay. *Biol. Pharm. Bull.* 27: 1093–1098.
 26. Lee, M., Kovacs-Nolan, J., Archbold, T., Fan, M. Z., Juneja, L. R., Okubo, T. and Y. Mine. 2009. Therapeutic potential of hen egg white peptides for the treatment of intestinal inflammation. *J. Funct. Foods.* 1: 161–169.
 27. Lopez-Fandino, R., Otte, J. and J. V. Camp. 2006. Antimicrobial and human cancer cell cytotoxic effect of synthetic angiotensin-converting enzyme (ACE) inhibitory peptides. *Int. Dairy J.* 16: 1277–1293.

28. McKenna, D. J., Gallus, M., Mckeown, S. R., Stephen Downes, C. and V. J. McKelvey–Martin. 2003. Modification of the alkaline Comet assay to allow simultaneous evaluation of mitomycin C–induced DNA cross–link damage and repair of specific DNA sequences in RT4 cells. *DNA Repair*. 2: 879–890.
29. Panheleux, M., Nys, Y., Williams, J., Gautron, J., Boldicke, T. and M. T. Hincke. 2000. Extraction and quantification by ELISA of eggshell organic matrix proteins (ovocleidin–17, ovoalbumin, ovotransferrin) in shell from young and old hens. *Poult. Sci.* 79: 580–588.
30. Park, J. H., Park, S. J., Nam, I. S., Yeo, G. K., Kil, J. K. and Y. K. Youn. 2007. A fast and quantitative assay for developing zeolite–type hydrocarbon trap catalyst. *Microporous Mesoporous Mater.* 101: 264–270.
31. Park, W. B., Choung, B. Y., Park, S. M., Kim, H. S. and S. Y. Lyu. 1999. Effects of drying process of mistletoes on cytotoxicities against cultured HL–60 and Molt–4 cells. *Food Sci. Biotechnol.* 8: 391–396.
32. Rice–Evans, C. and N. J. Miller. 1994. Total antioxidant status in plasma and body fluids. *Meth. Enzymol.* 234: 279–293.
33. Rose, P., Won, Y. K., Ong, C. N. and M. Whiteman. 2005. β –Phenylethyl and 8–methylsulphinyloctyl isothiocyanates, constituents of watercress, suppress LPS induced production of nitric oxide and prostaglandin E2 in RAW 264.7 macrophages. *Nitric Oxide*. 12: 237–243.
34. Senedese, J. M., Alves, J. M., Lima, I. M., de Andrade, E. A. Furtado, R. A., Bastos, J. K. and D. C. Tavares. 2013. Chemopreventive effect of *Copaifera langsdorffii* leaves hydroalcoholic extract on 1,2–dimethylhydrazine–induced DNA damage and preneoplastic lesions in rat colon. *BMC Complement. Altern. Med.* 13:3 doi:10.1186/1472–6882–13–3.
35. Shon, M. Y., Kim, T. H. and N. J. Sung. 2003. Antioxidants and free radical scavenging activity of *Phellinus baumii* (*Phellinus* of *Hymenochaetaceae*) extracts. *Food Chem.* 82: 593–597.
36. Singh, P. N., McCoy, M. T., Tice, R. R. and E. L. Schneider. 1988. A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells. *Exp. Cell Res.* 175: 184–191.
37. Tang, X. and M. Pikal. 2004. J. Design of freeze–drying processes for pharmaceuticals: Practical advice. *Pharm. Res.* 21: 191–200.
38. Tankrathok, A., Daduang, S., Patramanon, R., Araki, T. and S. Thammastirirak. 2009. Purification process for the preparation and characterizations of hen egg white ovalbumin, lysozyme, ovotransferrin, and ovomucoid. *Prep. Biochem. Biotechnol.* 39: 380–399.
39. Tanwar, L., Vaish, V. and S. N. Sanyal. 2009. Chemoprevention of 1,2–dimethylhydrazine–induced colon carcinogenesis by a non–steroidal anti–inflammatory drug, etoricoxib, in rats: inhibition of nuclear factor kappaB.

- Asian Pac. J. Cancer Prev. 10: 1141–1146.
40. Thammarsirirak, S., Pukcothanung, Y., Preecharram, S., Daduang, S., Patramanon, R., Fukamizo, T. and T. Araki. 2010. Antimicrobial peptides derived from goose egg white lysozyme. *Comp. Biochem. Physiol. C: Pharmacol. Toxicol.* 151: 84–91.
 41. Urban, T., Akerlund, B., Jarstrand, C. and B. Lindeke. 1997. Neutrophil function and glutathione–peroxidase (GSH–px) activity in healthy individuals after treatment with N–acetyl–L–cysteine. *Biomed. Pharmacother.* 51: 388–390.
 42. Valenti, P., Antonini, G., Fanelli, M. R., Orsi, N. and E. Antonini. 1982. Antibacterial activity of matrix–bound ovotransferrin. *Antimicrob. Agents Chem.* 21: 840–841.
 43. Voidarou, C., Alexopoulos, A., Plessas, S., Karapanou, A., Mantzourani, I., Stavropoulou, E., Fotou, K., Tzora, A., Skoufos, I. and E. Bezirtzoglou. 2011. Antibacterial activity of different honeys against pathogenic bacteria. *Anaerobe.* 17: 375–379.
 44. Wei, W. 2000. Lyophilization and development of solid protein pharmaceuticals. *Int. J. Pharm.* 203: 1–60.
 45. Whiffen, L. K., Midgley, D. J. and P. A. McGee. 2007. Polyphenolic compounds interfere with quantification of protein in soil extracts using the Bradford method. *Soil Biol. Biochem.* 39: 691–694.
 46. Wu, J. and A. Acero–Lopez. 2012. Ovotransferrin: structure, bioactivities, and preparation. *Food Res. Int.* 46: 480–487.
 47. Xie, H., Huff, G. R., Huff, W. E., Balog, J. M., Holt, P. and N. C. Rath. 2002. Identification of ovotransferrin as an acute phase protein in chickens. *Poult. Sci.* 81: 112–120.
 48. Xu, X., Shigeru, K. and Y. Mine. 2007. Antioxidant activity of tryptic digests of hen egg yolk phosphovitin. *J. Sci. Food Agric.* 87: 2604–2608.
 49. Yi, H. J., Kim, J. Y., Kim, K. H., Lee, H. J. and H. J. Lee. 2003. Anticancer activity of peptide fractions from egg white hydrolysate against mouse lymphoma cells. *Food Sci. Biotechnol.* 12: 224–227.
 50. Yu, Z., Liu, B., Zhao, W., Yin, Y., Liu, J. and F. Chen. 2012. Primary and secondary structure of novel ACE–inhibitory peptides from egg white protein. *Food Chem.* 133: 315–322.
 51. 농협중앙회. 2004. 축산물가격 및 수급자료
 52. 한국농촌경제연구원. 2007. 2006 식품수급표