20161905
47

안전인증 미생물 이용 특이 이소플라본(오로볼) 대량 생산 및 소재화

최종보고서

2020

농림축산식품부

농생명산업기술사업 제3차 연도 최종보고서

발 간 등 록 번 호
11-1543000-002999-01

안전인증 미생물 이용 특이 이소플라본(오로볼) 대량 생산 및 소재화 최종보고서

2020.02.11.

주관연구기관 / 서울대학교
협동연구기관 / ㈜밥스누

농 림 축 산 식 품 부

(전문기관) 농림식품기술기획평가원

<제출문>

제 출 문

농림축산식품부 장관 귀하

본 보고서를 "안전인증 미생물 이용 특이 이소플라본(오로볼) 대량 생산 및 소재화"(개발기간 : 2016.11.29. ~ 2019.11.28.)과제의 최종보고서로 제출합니다.

2020 01. 06.

주관연구기관명 : 서울대학교 산학협력단 (대표자) 윤의준 (인)
참여기관명 : ㈜밥스누 (대표자) 정홍균 (인)

주관연구책임자 : 김병기
참여기관책임자 : 한현우

국가연구개발사업의 관리 등에 관한 규정 제18조에 따라 보고서 열람에 동의합니다.

<보고서 요약서>

보고서 요약서

<table>
<tr><td>과제고유번호</td><td>2016190547</td><td>해 당 단 계
연 구 기 간</td><td>2016.11.29.
-2019.11.28</td><td>단 계 구 분</td><td>3/3</td></tr>
<tr><td rowspan="2">연 구 사 업 명</td><td>단 위 사 업</td><td colspan="4">농식품기술개발사업</td></tr>
<tr><td>사 업 명</td><td colspan="4">농생명산업기술개발사업</td></tr>
<tr><td rowspan="2">연 구 과 제 명</td><td>대 과 제 명</td><td colspan="4">(해당 없음)</td></tr>
<tr><td>세부 과제명</td><td colspan="4">안전인증 미생물 이용 특이 이소플라본(오로볼) 대량 생산 및 소재화</td></tr>
<tr><td rowspan="2">연 구 책 임 자</td><td rowspan="2">김병기</td><td>해당단계
참여연구원
수</td><td>총: 37명
내부: 37명
외부: 명</td><td>해당단계
연구개발비</td><td>정부:660,000천원
민간:220,070천원
계:880,070천원</td></tr>
<tr><td>총 연구기간
참여연구원
수</td><td>총: 37명
내부: 37명
외부: 명</td><td>총 연구개발비</td><td>정부:660,000천원
민간:220,070천원
계:880,070천원</td></tr>
<tr><td>연구기관명 및
소 속 부 서 명</td><td colspan="3">서울대학교 화학생물공학부</td><td colspan="2">참여기업명: ㈜밥스누</td></tr>
<tr><td>국제공동연구</td><td colspan="3">상대국명:</td><td colspan="2">상대국 연구기관명:</td></tr>
<tr><td>위 탁 연 구</td><td colspan="3">연구기관명:</td><td colspan="2">연구책임자:</td></tr>
</table>

※ 국내외의 기술개발 현황은 연구개발계획서에 기재한 내용으로 갈음

연구개발성과의 보안등급 및 사유	해당사항 없음

9대 성과 등록·기탁번호

구분	논문	특허	보고서 원문	연구시설·장비	기술요약 정보	소프트웨어	화합물	생명자원		신품종	
								생명정보	생물자원	정보	실물
등록·기탁번호											

국가과학기술종합정보시스템에 등록한 연구시설·장비 현황

구입기관	연구시설·장비명	규격 (모델명)	수량	구입연월일	구입가격 (천원)	구입처 (전화)	비고 (설치장소)	NTIS 등록번호

요약(연구개발성과를 중심으로 개조식으로 작성하되, 500자 이내로 작성합니다)	보고서 면수

<요약문>

연구의 목적 및 내용	○ 본 연구진은 효소전환기술을 활용하여 **오로볼의 대량생산 및 정제를 파일럿 스케일(400L)에서 최적화**하였고, 결과적으로 3g/L(11mM)의 제니스테인을 순도 95% 이상의 오로볼을 총 수율 95% 이상으로 생산 성공함. 하지만, **경쟁력 있는 사업을 위해 생산 단가 절감을 위한 후속 연구**가 지속 되어져야함. (현 오로볼의 판매가격은 $37,000/kg이며, 초기 기질인 제니스테인은 백배이상 저렴한 $200/kg 수준임. 과제 계획서에서 새로 제안하는 초기 기질인 글루코제니스테인은 천배이상 저렴한 $20/kg 수준임.) 초기 기질인 제니스테인의 낮은 수용성으로 인한 고농도반응 불가에 따른 생산성 저하 문제를 제니스테인 **당접합체인 글루코제니스테인을 통하여 초기 기질의 농도를 높임으로서 그 문제를 해결하고자함 ($2,000/kg 이하로 오로볼 생산 목표)**. ○ 또한, 본 과제에서는 식품으로의 적용이 가능한 **GRAS 미생물을 이용, 생물전환법을 발전**시키고 **이를 소재 실용화하고자함**. 특히 자체적으로도 건강을 개선하는 기능성이 있는 것으로 알려져 있는 **누룩곰팡이, 버섯 등 GRAS균을 활용한 생물전환 기술 개발에 중점**을 두어, **콩 또는 콩비지로부터 오로볼 대량생산화 및 이를 고기능성 식품 소재 및 화장품소재 개발에 적용**하고자 함.
연구개발성과	○ **오로볼(orobol)의 대사성 질환 (비만, 장건강 등) 개선 생리활성 효능 작용기전 규명** • 세포주 모델을 활용한 오로볼(orobol)의 대사성 질환 (비만, 장건강 등) 개선 생리활성 효능 규명. • 동물 모델을 활용한 오로볼의 장건강 개선 심화 효능 규명 ○ **오로볼의 대량생산 및 분리/정제 기술 발전** • 글루코제니스테인을 이용한 새로운 대량생산 방법 개발 • GRAS 미생물을 이용한 오로볼 생산 ○ **효소의 식품 첨가물 등재를 위한 기반 연구** • GRAS 미생물(A. oryzae & A. bisporus)에서의 tyrosinase 추출 기술 및 상품화 • 효소 대량 생산 • 효소의 신규 식품 첨가물 등재 가능성을 보기위한 안정성 확인 ○ **오로볼 또는 글루코오로볼의 함유 제형개발 및 시제품 개발** • 오로볼 또는 클루코오로볼 함유 제형 개발 3건 • 오로볼 또는 클루코오로볼 함유 시제품 개발 3건 • 오로볼 또는 클루코오로볼 자체의 원료화
연구개발성과의 활용계획	○ **오로볼의 화장품 제형개발 및 시제품 생산을 통한 소재 사업화** • 본 과제를 통하여 기존 콩을 소재로 하는 화장품에 비해 **특정 고기능성 소**

<table>
<tr><td>(기대효과)</td><td colspan="5">재(오로볼)를 사용하여 기능성 (과학적 근거기반 체중조절, 장건강 개선)을 강화함
• 소재 생산단가 절감을 통해 경제성을 확보가능하여 기능적인 측면과 가격적인 면에서 동시에 경쟁력을 가질 수 있음.

○ GRAS균을 활용한 오로볼의 대량생산을 통한 소재 실용화
• 화장품뿐만 아니라 건강 기능성 식품, 의약품 등으로 오로볼의 광범위한 적용이 가능함으로 새로운 시장창출이 예상됨. 또한 완제품뿐만 아니라 오로볼의 원료화를 통하여 추가적인 매출 증대를 도모할 수 있음.

○ 친환경 지속가능한 고부가가치소재 생산 원천기술 확보_
• 식물유래 당화 이소플라본으로부터 신소재 개발 및 대량생산 제품화
• 균주를 활용한 고부가가치 소재의 생산-가공-마케팅 실증모델로 활용
• 식품의약품안전처에 기재된 식품첨가물 지정절차에 따른 과학적인 안전성 테스트를 진행함으로서, 신규 효소 식품첨가물 등재 가능성을 확인하고, 차후 이의 사업화를 추가적으로 기대할 수 있음.</td></tr>
<tr><td>국문핵심어
(5개 이내)</td><td>오로볼</td><td>GRAS 미생물</td><td>이소플라본</td><td>오르토-수산화</td><td>산화효소</td></tr>
<tr><td>영문핵심어
(5개 이내)</td><td>orobol</td><td>GRAS organism</td><td>isoflavone</td><td>ortho-hydroxylation</td><td>oxygenase</td></tr>
</table>

<본문목차>

〈 목 차 〉

제1장. 연구개발과제의 개요 ····· 7
제1절. 연구개발 목적 ····· 7
제2절. 연구개발의 필요성 ····· 13
제3절. 연구개발 범위 ····· 21

제2장. 연구수행 내용 및 결과 ····· 29
제1절. 연구개발 추진전략 및 방법 ····· 29
제2절. 연구개발 추진체계 ····· 30
제3절. 연구개발 추진일정 ····· 31
제4절. 연구개발성과 ····· 33
제5절. 연구 결과 ····· 37
제6절. 종합 결론 (연구 결과 요약) ····· 88

제3장. 목표 달성도 및 관련 분야 기여도 ····· 90
제1절. 최종 목표 및 평가 방법 ····· 90
제2절. 세부 개발목표 ····· 92
제3절. 성과목표별 가중치 ····· 96
제4절. 목표 달성여부 및 평가 ····· 97
제5절. 차후 대책(후속연구의 필요성) ····· 103

제4장. 연구결과의 활용 계획 등 ····· 104
제1절. 연구개발 결과의 활용방안 ····· 104
제2절. 기대성과 및 파급효과 ····· 105

붙임. 참고 문헌 ····· 107

<별첨> 주관연구기관의 자체평가의견서

제 1 장 연구개발과제의 개요

제 1 절. 연구개발 목적

1. 농생명자원의 고부가가치화 필요

가) 농생명자원은 다양한 산업의 소재로 활용, 소비되어 파급효과가 큰 편인데 반해, 한국농수산식품유통공사 통계 자료에 따르면 우리나라 농림수산식품은 수출액 대비 수입액이 상당히 높아 **독자적인 자원 확보가 미흡하고 수입 의존도가 높은 편**이라는 것을 알 수 있음 [표 I.].

나. 한류 열풍 등에 따라 수출이 조금씩 확대되고 있으나, 수출액이 자동차, 반도체, 석유정제 등 국내 주력업종 산업과 비교 시 1/10 수준 (또는 그 이하)에 불과한 실정임.

(단위 : 백만달러, %)

구분	'04	'05	'06	'07	'08	'09	'10	'11	'12	'13	'14
□ 농림수산식품 수출액	3,365.2	3,415.8	3,394.8	3,759.3	4,496.5	5,880.0	7,691.3	7,691.3	8,006.0	7,875.9	8,249.7
(국가전체 수출대비)	1.3	1.2	1.0	1.0	1.1	1.3	1.3	1.4	1.4	1.4	1.4
- 농림 축산 식품	2,085.0	2,221.5	2,304.4	2,531.0	3,048.2	3,298.1	4,081.8	5,383.5	5,644.9	5,724.6	6,182.7
- 수산식품	1,280.2	1,194.3	1,090.4	1,227.5	1,448.3	1,511.2	1,798.1	2,307.8	2,361.3	2,151.3	2,067.0
□ 농림수산식품 수입액	13,484.1	14,275.7	16,100.9	19,242.3	23,198.6	21,240.9	25,787.2	33,184.0	33,422.4	34,192.7	36,139.9
(국가전체 수입대비)	6.0	5.5	5.2	5.4	5.3	6.1	6.3	6.3	6.4	6.6	6.9
- 농림 축산 식품	11,204.8	11,888.5	16,182.0	16,182.0	20,120.4	18,346.5	22,329.8	28,993.7	29,447.1	30,299.4	31,635.2
- 수산식품	2,264.2	2,387.1	2,773.6	3,059.8	3,078.3	2,894.4	3,457.3	4,189.9	3,975.3	3,893.3	4,505.7

자료 : 2014 한국농수산식품유통공사 농림수산식품 수출입동향 및 통계

[표 I.] 농림수산식품 수출입동향 및 통계

다. 또한 **나고야의정서가 발효됨에 따라 국내 자생-식물 소재 기반의 고부가가치 소재 개발의 필요성이 증대되고 있음.** 더불어 생명자원소재를 개발함으로써 세계 시장을 선도할 수 있는 위치를 선점할 수 있다는 점에서 각국에서는 나고야의정서에 채택 이후부터 자체적인 생물 유전자원 확보를 위해 노력 중임. 이를 위해서는 우리 고유의 농생명자원 확보와 이의 고부가가치화를 통한 독보적인 자원 확보를 통해 글로벌 경쟁력을 확보하고 수출을 확대시켜야 하며, **독자적인 소재 및 원천기술 확보로 농생명산업을 신성장산업으로 견인하는 연구가 필요함.**

라. 특히 농생명자원 (동·식물, 곤충 등)의 부가가치 상승은 **식품 산업(소재, 일반식품, 건강기능식품)등 뿐만 아니라 기능성 화장품, 제약 분야 등 타 산업까지 가치가 확산될**

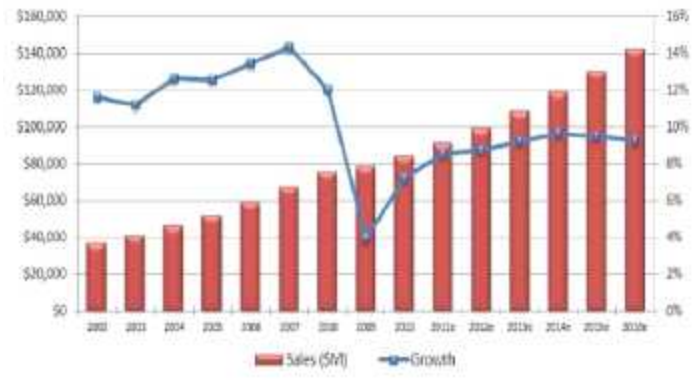
수 있는 파급효과를 기대할 수 있다는 점에서 의미가 큼. 일례로, 곤충의 경우 대체식품 뿐만 아니라 화장품 및 의약품 시장에서도 곤충의 생리활성물질을 이용할 수 있으며 최근에는 차세대 항생물질인 코프리신, 스콜로펜드라신 등을 통해 화장품을 생산하고 있음

2. 건강에 대한 관심 증가

가. 현대인의 삶의 질적 향상과 인구고령화에 따른 만성질환 발병의 증가로 **건강에 대한 관심이 지속적으로 증가하고 있음.** 국내의 경우 웰빙(Well-being)이나 로하스(LOHAS, Lifestyles Of Health And Sustainability), 셀프 메디케이션(Self-Medication)과 같은 건강 지향적 사회 트렌드로 인해 **건강기능식품 및 기능성 화장품과 같은 기능성 소재를 활용한 웰빙 제품의 수요가 증가하고 있는 추세**임.

나. **건강기능식품에 대한 관심과 수요가 늘어나고 있으며**, 식품의약품안전청의 자료에 의하면, 국내 건강기능식품의 시장규모는 1조 3,682억원(′11)으로 ′10년 대비 약 28.2%성장. 국내·외 전반적인 경기침체로 인한 건강기능식품 수요 감소 등의 이유로 둔화세를 보이기는 하지만, 꾸준한 성장이 지속되고 있음. Nutrition Business Journal(′12)의 자료에 따르면, ′10년 세계 건강기능식품 시장규모는 약 3,014억불로 추정되며, 연평균 6.6%의 성장률로 **국내 뿐 아니라 해외에서도 지속적인 관심 증가를 보임**을 알 수 있음.

다. **국내 화장품 시장 규모는** 2013년 기준 10조 1,455억원으로 2006년 이후 연평균 10.4%로 국내 경제 성장률을 크게 웃도는 **높은 성장을 지속하고 있음**. 국내 화장품 생산액 중 기능성 화장품이 차지하는 비율은 2009년 약 24.0%에서 2013년 약 32.2%로 4년 간 8.2% 증가했으며, 생산금액은 2013년 기준 약 2조 5,638억 원을 기록하였음. 기능성 화장품 내의 비중은 복합유형이 약 1조 2,259억 원으로 가장 높으며, 그 뒤로 주름개선(약 6,903억원)이 잇고 있음. 국내의 대표적인 기능성 화장품 제품을 출시하는 아모레퍼시픽의 경우 Glycin속, Panax속, solanum속 등 농생명 자원 유래 다양한 기능성 천연 소재로 화장품 연구개발을 진행하였으며, 해외 기업의 경우 일본의 SHISEIDO는 Zingiber속, Rubus 속 등의 주름, 미백, 자외선 기능연구를 진행하여 기능성 화장품을 출시하고 있음.



출처: Global Supplement & Nutrition Industry Report (2012)

[그림 1.] 연도별 세계 기능성식품 시장규모

3. 콩을 이용한 식의약소재의 관심도 증가

가. 콩은 양질의 단백질과 높은 불포화 지방산 비율 등 우수한 영양성분 외에도 다양한 생리활성을 가진 기능성 물질들을 함유하고 있음. **콩의 항암성 및 여러 생리적 기능이 있다는 연구 결과가 보고되면서 콩의 가치는 더욱 증대되고 있음.** 콩의 대표적인 기능성 물질인 이소플라본은 콩의 생리활성 배당체로 여성 호르몬인 에스트로겐과 비슷한 구조와 생리학적 기능을 가지고 있어, 여성 호르몬이 부족해 나타날 수 있는 갱년기 증세를 완화시킬 수 있을 뿐 아니라, 고혈압, 동맥경화증 예방은 물론 암을 예방하는 효과도 있음. (Altern Ther Health Med,2014,1:39-51; Am J Respir Crit Care Med,2012,185:A4773) **콩에 가장 많이 포함된 이소플라본인 제니스테인(genistein)**은 모노페놀형 구조체를 이르고 있어 tyrosinase kinase 억제효과, 난소암 치료 효과 등이 보고되어 있음.(Gynecologic Oncology, 2007, 105 (1): 23 - 30) 이 외에도 항산화 효과, 심혈관 질환 등 다양한 생리활성에 관한 연구 보고가 발표되고 있음. 콩 이소플라본 생리활성에 관한 연구에 이어 일본 화장품 SANA, GNC 퍼시픽의 프라이머리로우와 같은 이소플라본을 함유한 제품 개발이 이루어지면서 콩 이소플라본 소재를 지속적으로 할용하고 있음을 알 수 있음.

나. **콩은 발효과정을 통해 대표적인 기능성 물질인 이소플라본의 함량이 증가함이 보고되었음.** 2011년 고려대학교 이광원교수 연구팀은 전통된장의 숙성기간에 따른 isoflavone 함량 변화를 연구하였고, Isoflavone 중 비배당체인 genistein과 daidzein이 숙성기간이 늘어날수록 효소적 대사반응에 따라 비배당체가 배당체로 전환되어 증가하였음을 보고함. (J. Korean Soc. Food Sci. Nutr., 2011, 40: 557-564.)

다. **이소플라본 구조 내 수산화 위치에 따라 세포내 신호 전달 종류와 생리활성 효과는 달라지며, 모노페놀형 구조체를 이루고 있는 이소플라본 구조의 오르토(*ortho*-) 위치에 수산화기가 하나 더 도입되면 그 기능성(항산성, 항암성, 미백 효과 등)이 향상된다고 보고됨.** 예로, 다이드제인(daidzein, 콩 유래 이소플라본)에서 오르토- 특이적으로 수산화 된 6-, 8-, 3′-오르토 하이드록시 다이드제인(6-ODI, 8-ODI, 3′-ODI)은 발효 숙성된 된장에 일부 존재하며, 반응 전 보다 항산화성이 100배 이상 향상됨을 확인함. 3′-ODI는 자외선에 의한 피부암을 예방할 뿐 아니라 암전이 활성도 억제한다고 보고됨. (JBC,2010, 285:21458; JBC,2011,286:14246) (Cancer Res, 2014 74; 4228; PLoS ONE, 2014, 9(8) e104938)

라. 제니스테인의 3′-오르토 수산화물인 **오로볼은 한국 된장, 인도네시아 템페(tempeh), 중국 더우츠(豆豉) 같은 콩 발효 제품이나 약용 선태식물에서 소량 발견**되며, 항암

제 중 하나인 cisplatin과 함께 사용 시 자궁암세포의 활성 억제에 효과적이라 보고됨. (Int J Mol Sci, 2014,15:5699; Phytochemistry,1984,23(5):1073; Gynecol Oncol,2003,90(2):413) 또한 타 이소플라본에 비해 오로볼은 소량만으로 혈관내피세포증식인자를 억제함으로서 항암 또는 항알러지성을 지닌다 보고됨. 혈관내피증식인자는 쉽게 아토피성 피부질환에 염증을 유발 할 수 있음으로, **오로볼을 통한 증식인자 억제 효과는 아토피성 피부 질환을 완화 시킬 수 있다 판단됨.** (British Journal of Nutrition, 2005 (3); 317, Microcirculation, 2012,19(7);567)

4. 선택적 발효를 위한 GRAS 미생물 활용

가. **제니스테인은 콩에 가장 많이 포함된 이소플라본**으로서 모노페놀형 구조체를 이루고 있으며, 발효를 통해 모노페놀형 구조 물질의 오르토(*ortho*-) 위치에 수산화기가 하나 더 도입되면 그 기능성(**항산성, 항암성, 미백 효과** 등)이 향상된다고 보고됨.

[그림 2.] 제니스테인 및 신규 당화 기질인 제니스틴 활용 방안

나. 특히, 우리 나라에서는 발효식품을 많이 섭취하고 있으나, 대부분의 경우 발효식품은 특정 균주를 통한 선택적 발효가 아닌 **비선택적 발효 방식**을 선택 활용하여 표준화가 되지 않았으며, 어떤 성분이 얼마나 증감하는지에 대한 **객관성 과학적 근거가 부족**함. 전통 방식의 발효 방법을 개선하여 선택적 발효를 하게 된다면, 보다 과학적으로 객관성있는 발효의 우수성을 입증할 수 있으며, 이를 통한 식품 유래 소재의 고부가가치화를 할 수 있을 것으로 예상됨.

다. 오로볼은 타 이소플라본 대비 상당히 우수 기능성을 보임에도 불구하고 **자연 발효**를 통해 오로볼을 얻는 것은 **상당히 소량일 뿐만 아니라 생산 표준화가 제대로 이루어져 있지 않는다**는 단점이 있음. 이에 본 연구진에서는 특정 미생물, 효소, 또는 균사체 등을 통한 꾸준한 선택적 발효 연구를 수행하여 왔으며, 생물전환을 통해 **선택적으로 원하는**

물질을 고수율로 생산한다는 점에서 **기존에 비해 진보된 연구 결과를 제시한 바 있음.**

라. 그러나 **선택적 발효**를 통한 기존의 오로볼 개발 기술은 식품에는 활용할 수 없는 유전자 재조합 효소를 활용하여 식품으로는 적용이 불가능함. 따라서, 본 과제에서는 기존 연구의 이러한 단점을 극복하고자 미국 FDA 기준으로 정한 **GRAS(Generally Recognized As Safe) 미생물**을 활용하여 **식품 사용에 가능**하도록 하고자 함.

마. 우리 나라 식품산업은 대부분 자연 분리 균주가 이용되고 있으며, 국/내외 식용 근거가 있는 미생물에 한해 식품 원료로 허용함. 따라서, 본 과제를 통해 향후 식품 원료에서 유래된 GRAS 미생물을 활용한 발효 기술 개발이 구축된다면, 이를 통해 생산된 오로볼을 국/내외 **식품소재로써 사용될 수 있는 가능성**이 높으며, 또한 **화장품소재로써 유럽과 중국 등에도 수출**할 수 있을 것으로 예상됨.

5. 효소 연구 개발 및 식품/화장품 소재의 적용 필요성

가. 효소는 각종 산업분야에서 매우 중요한 역할을 하며 무기촉매반응과 비교하여 여러 가지의 장점을 가지고 있기 때문에, 식품, 사료, 의약, 섬유, 피혁, 세제공업, 정밀화학제품의 제조 등 다양한 산업에서 활용되고 있음.

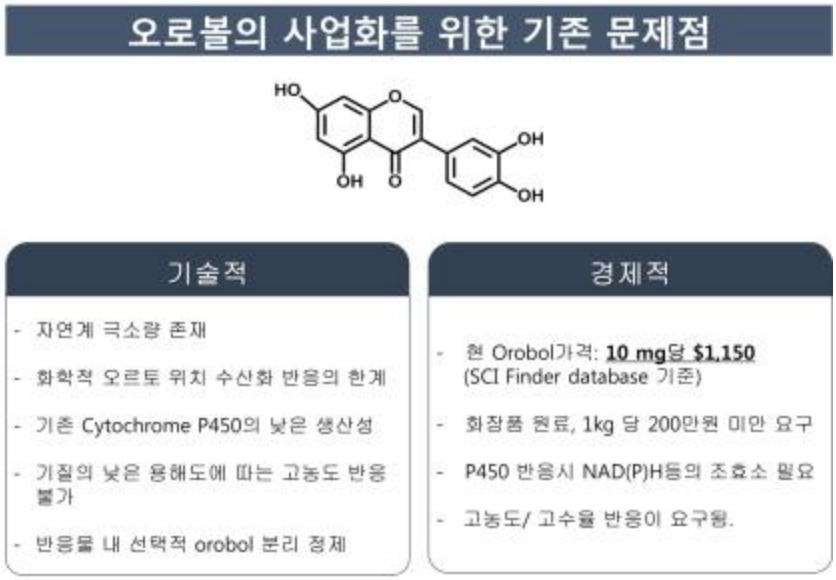
나. 현재 국내에 식품으로 사용 가능한 효소는 Transglutaminase, lipase, catalase, asparginase를 포함한 34여 종이며, 효소에 대하여 새로운 용도 개발을 하고 특성을 개량하여 산업적으로 이용할 수 있는 효소는 점진적으로 늘어날 것으로 판단됨. **대부분 국외 수입에 의존**하고 있으므로, 독자적인 국내 기술로 개발한 효소의 식품 첨가물은 고부가가치 제품으로 산업발전에 이바지 할 수 있다 판단됨.

다. 현재 전 세계적으로 효소시장은 약 12-14조의 시장 규모를 형성하고 있음. 효소 자체 이외에도 효소를 이용하여 가공된 제품의 규모는 약 100배임. 실제로 효소로 가공한 식품소재 산업의 시장규모는 100조원을 넘고 있음. 향후 **효소응용산업은 활용범위가 더 증대될 것으로 예상**되며 화학산업을 넘어 **식품/화장품 소재 산업**으로도 진출할 것으로 보임.

라. 효소는 산업적 적용범위가 무한하므로 본 과제를 통해 GRAS 미생물을 이용한 선택적 발효 플랫폼이 구축된다면, 이를 활용한 소재 개발 뿐만 아니라, **개발된 GRAS 미생물 자체로써도 효소 산업 시장의 식품가공용 분야에서 경쟁력**을 갖출 수 있을 것으로 예상됨.

[그림 3.] 상용화된 식품 첨가 효소

제 2 절. 연구개발의 필요성



1. GRAS 미생물을 이용한 기능성 소재 개발의 필요성

가. 최근, 파이토케미컬들의 hydroxy, methoxy, 이중결합 등의 숫자와 위치에 따라 서로 다른 생리활성을 가지는 것이 최근 보고되고 있으며, 이러한 연구결과를 바탕으로 하여 **다양한 농식품 유래 파이토케미컬 소재들의 분자구조를 생물학적으로 변환**시켜 대사체로 만들 경우, **기능성이 크게 향상된 고부가가치 기능성 소재를 개발**할 수 있을 것이라는 개념이 정립되었음.

나. 이에 따라 생물전환기술에 대한 연구가 활발히 이루어지고 있는 추세이며, 글로벌 경쟁력을 갖추기 위해서는 독자적인 소재와 독자적인 생물전환 기술이 필요함. 따라서, 국내 농식품 자원 중에서도 가장 경제적인 원료인 **'콩'을 활용하여, GRAS 미생물을 이용한 선택적 발효를 적용하여 고부가가치 소재인 '오로볼'을 고수율로 생산할 수 있는 원천 기술을 확보**한다면 국/내외 식품 및 화장품 시장에서 글로벌 경쟁력을 갖춘 선도 제품화가 가능할 것으로 보이며, 더 나아가 개발된 GRAS 미생물의 식품 첨가물 등재 기반 연구를 통해 향후 잠재성이 **큰 효소 산업 시장 진출까지의 가능성** 또한 갖출 수 있을 것으로 예상됨.

다. 우리나라에서는 전통적으로 발효식품을 많이 섭취하고 있으며, 발효로 인해 식품 성분들의 기능성이 증가한다는 연구가 많이 수행되어 옴. 특히 발효 제품에 대한 체중 조절 및 장 건강에 대한 기대 효능은 다수의 선행 문헌을 통해 입증된 바 있음. 그러나 대부분의 경우 현재까지의 발효식품은 특정 균주를 통한 선택적 발효가 아닌 자연발효를 통해 만들어져 왔고, 표준화가 제대로 이루어져 있지 않아 그 유효성분 및 작용

기전을 객과적으로 규명하기 어려운 부분이 있었음.

라. 본 연구진은 특정 미생물, 효소, 또는 균사체를 통한 선택적 발효 연구를 수행하여 왔는데, 생물전환을 통해 선택적으로 원하는 물질을 생산한다는 점에서 기존에 비해 진보된 연구 결과를 제시하였지만, 유전자 재조합 효소 또는 미생물, 식품에의 적용이 제한되어 있는 곰팡이 등을 사용하여 생물전환을 하였기 때문에 식품 소재로 개발되기에는 무리가 있었음.

마. 따라서 본 과제에서는 이 문제를 해결하고자 식품 소재의 적용도 가능한 GRAS 미생물을 이용한 생물전환을 목표로 함. 특히 자체적으로도 기능성이 있는 것으로 알려져 있는 **누룩곰팡이, 버섯 등 GRAS균을 활용한 생물전환 기술 개발**에 중점을 두어, **대량생산화 및 이를 고기능성 소재 개발에 적용**하고자 함.

바. 이를 통해 기존의 생물전환 기술로는 식품 소재화에 적용이 어려웠던 단점을 개선하여, GRAS 미생물을 활용한 고부부가치 식품 소재 개발을 할 수 있을 것으로 기대됨.

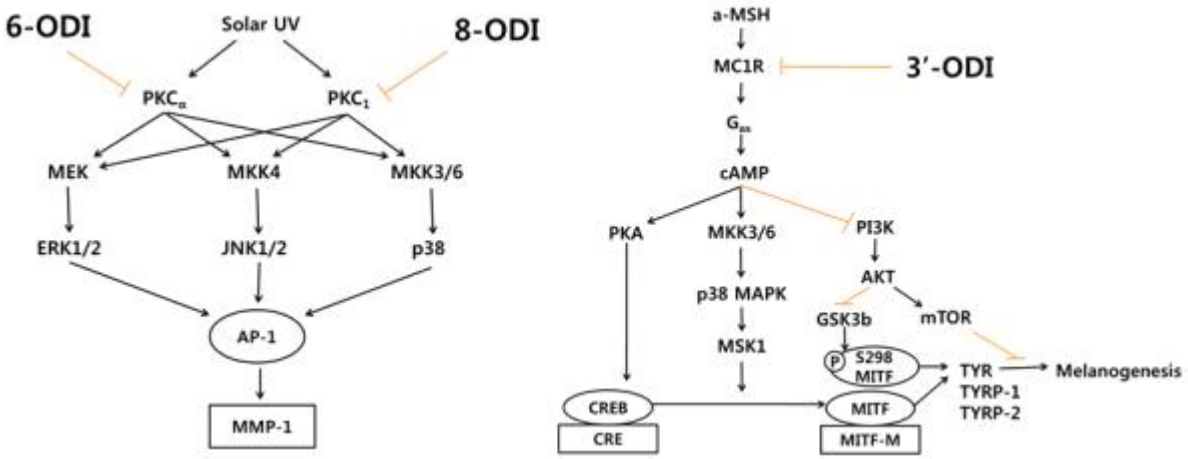
사. 또한, 건강에 대한 관심이 증대되면서 건강기능식품의 수요 또한 증가하고 있음. 특히, 대사성 질환인 체중 조절과 장 건강에 대한 건강기능식품의 수요가 증대되면서 이에 관련한 제품의 연구 및 생산 개발이 꾸준히 이루어지고 있음.

아. 예로, 다이드제인(daidzein, 콩 유래 이소플라본)에서 오르토- 특이적으로 수산화 된 6-, 8-, 3′-오르토 하이드록시 다이드제인(6-ODI, 8-ODI, 3′-ODI)은 발효 숙성된 된장에 일부 존재하며, 반응 전 보다 항산화성이 100배 이상 향상됨을 확인함. 3′-ODI는 자외선에 의한 피부암을 예방할 뿐 아니라 암전이 활성도 억제한다고 보고됨. [그림 7.] (*JBC*,2010, 285:21458; *JBC*,2011,286:14246)

자. **이소플라본 구조 내 수산화 위치에 따라 세포내 신호 전달 종류와 생리활성 효과는 달라짐.** (*Cancer Res*, 2014 74; 4228; *PLoS ONE*, 2014, 9(8) e104938) **콩에 풍부한 제니스테인을 활용**하여 제니스테인보다 효능이 높은 물질을 생산할 수 있다면 다이드제인을 활용하는 것에 비해 **경제성이 있고 효능이 높은 신규 기능성 소재를 개발**할 수 있을 것으로 사료됨.

차. 본 연구진은 콩 유래 우수 기능성 소재인 orobol을 선별하고 해당 소재에 대한 고수율 전환 및 표준화 하는 기술을 개발하였으며, 본 소재가 타 soy isoflavones 대비 대사성 질환 기능성이 뛰어남을 확인한바 있어 soy isoflavone 대사체인 orobol 소재가 기능성

이 부각되었음을 확인함. 따라서 **기능성이 향상된 orobol 소재의 심도 있는 대사질환 완화 연구**를 통해 GRAS 균을 활용한 식품 소재의 고부가가치화 및 기능성식품 제품화로의 실용화하고자 함



[그림 4.] 수산화위치에 따른 이소플라본의 세포 신호 전달 메카니즘

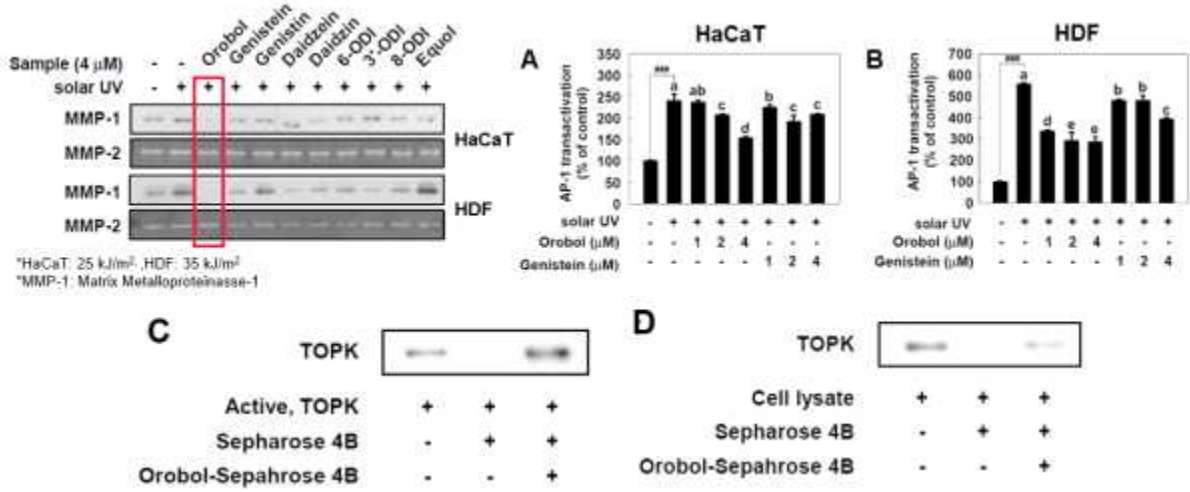
2. 피부 기능성 검증의 중요성

가. 현재 오로볼을 활용하여 피부 기능성에 대한 직접적인 연구를 수행한 결과가 거의 없음. 다만, **본 연구진의 기초실험 데이터와 유사 구조체 및 종에 대한 피부 기능성 실험결과**를 토대로 **피부 주름개선** 및 **아토피성 피부질환을 완화 또는 개선** 시킬 수 있다고 판단됨.

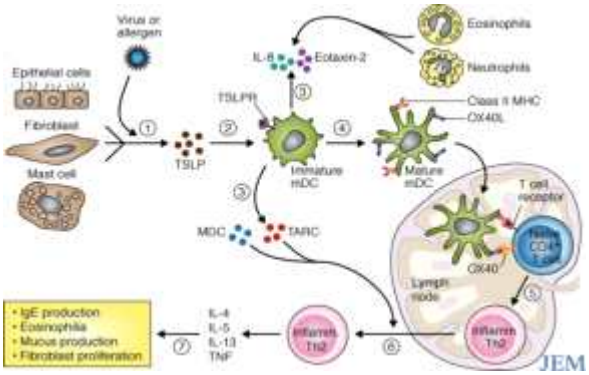
나. 최근 화장품 업계는 단순히 식물추출물이 가지고 있는 단편적인 효과 보다는 식물추출물이 가지고 있는 특정성분, 더 나아가서는 식물추출물에서 분리, 정제된 성분에 대한 직접적인 효능효과를 마케팅 및 제품의 핵심성분으로 홍보, 판매하고 있음

다. 이에 본 과제를 통해서 연구되는 오로볼의 경우에도 제품적용을 고려하였을 때 실질적 피부 기능성의 검증은 반드시 선행되어야 하는 조건임

라. 본 연구진은 다양한 콩 유래 isoflavone과 고수율로 생산가능한 orobol의 MMP-1 발현 정도를 Western blot assay를 통해 확인한 결과, **orobol이 콩유래 isoflavone 소재 중에서 가장 뛰어난 MMP-1의 발현 억제효능을 보임을 확인함**. 또한 orobol의 피부주름 개선 우수 효능을 토대로 본과제 이전에 특허를 출원 및 등록을 완료 하였음. 본 과제에서는 오로볼의 주름 효능 및 특허를 활용하여 오로볼 화장품 제품화를 진행함.

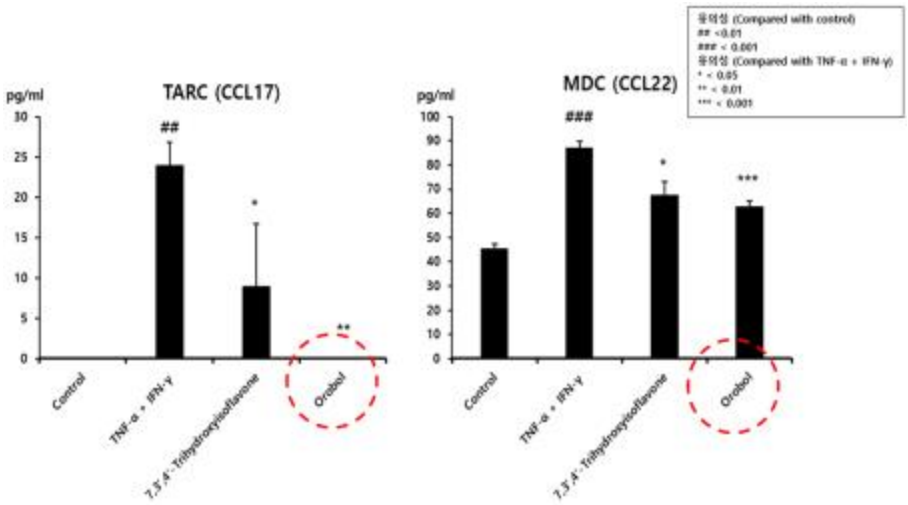


[그림 5.] 다양한 콩 유래 isoflavone와 orobol의 MMP-1 발현 억제 효능 비교



[그림 6.] 아토피 유발과정 (세포 수준 기작)

마. 본 과제의 핵심 원료인 오로볼은 아토피 유발 단백질 (TARC, MDC)의 분비 저해 효과가 다른 물질에 비해 탁월한 것으로 증명됨.



[그림 7.] 오로볼의 아토피 유발 단백질 (TARC, MDC)의 분비 저해효과

3. 원료 안정성 확보의 중요성

가. 화장품 원료 중 대부분의 유효 기능성 성분들은 높은 기능성(항산화, 항염증 등)을 가짐과 동시에 빠른 산화가 이루어져 그 기능성이 빠르게 소멸되는 문제점이 있음. 오로볼은 그 구조적 특성으로 빠른 산화가 이루어져 원료 자체의 역가가 쉽게 낮아질 가능성이 매우높음.

나. 화장품의 경우 일반적으로 제조 후 6~30개월간 사용하므로 사용기간 동안 유효한 역가를 유지하여야만 함. 또한, 화장품의 구성성분들은 반응성이 높은 계면활성제 및 기타 산화방지제 성분들이 첨가되고, 태양광, 형광, 열 등의 외부요인들에 따른 산화가 발생될 수 있음.

다. 화장품의 일반적인 원료 구성상 첨가되는 성분들은 계면활성제, 물, 보습제, 점증제, pH조절제, 방부제, 색소, 향료, 산화방지제, 중화제, 기타첨가제 등이 포함됨. 계면활성제, pH조절제, 산화방지제 등의 성분은 원료의 구조상 반응성이 높은 작용기를 가지고 있으며 이들 작용기가 제형내에서 산화, 환원반응을 일으킴.

라. 또한 이러한 반응은 태양광, 형광, 열 등의 외부인자들에 의해 그 반응이 가속되는 경우가 많음. 특히 본 실험에서 가공하고자 하는 성분들은 반응성이 높아 화장품 제형 구성성분들에 의해 산화 또는 환원반응등이 발생하여 원료 고유의 성질을 잃어버릴 수 있고 더 나아가 예측하지 못한 반응물을 생성할 가능성이 있음.

마. 화장품 내에 투입하기 전 보관기간, 화장품 제형내에 투입 후 사용기간 동안에 유효한 역가를 유지할 수 있도록 안정한 원료의 가공절차가 필요함. 역가의 유지 등을 위해 에멀젼화, 캡슐화, 포접화 등의 연구를 수행할 예정임.

4. 오로볼의 원료화 및 이를 이용한 제품화를 위한 경제적인 대량생산 기술 확보

가. 일반적으로 자연에 존재하는 식물들은 피부에 도움이 되는 유효성분들을 포함하고 있음. 다만 해당 유효성분을 얼마나 경제적으로 생산해 낼 수 있는지가 제품화에 결정적인 역할을 함. 만약 특정성분에 대한 기능성 검증만 이루어지고 실제로 대량 생산기술이 없는 경우에는, 해당 성분의 기능성을 단순히 마케팅적으로만 사용하고 해당 유효성분이 함유되어 있으리라 추정되는 식물추출물로 사용하게 됨.

나. 실제로 아모레퍼시픽의 경우에 인삼의 특이 진세노사이드인 컴파운드 케이(Compound

K)에 대한 대량생산 기술을 보유하고 있고 이를 이용하여 '설화수' 브랜드를 런칭하고 단일 브랜드로 연 5,000억 이상의 매출을 기록하고 있음.

다. 본 과제에서 연구 개발하는 오로볼의 경우에도 마찬가지로 생산 경제성 및 타당성 검토를 통한 대량생산 기술의 확보가 절실히 요구됨.

라. 오로볼은 희귀 이소플라본으로써 자연계에 극소량만 존재하며 제니스테인과 같은 천연 모노페놀형 물질에 화학적 반응을 통한 생산은 극히 어렵움. 때문에, 오로볼은 물질 자체와 생산품 모두 높은 경제적 가치를 지니고 있으며, 오로볼을 대량 생산기술 확보하는 것이 중요함.

마. 본 연구진은 파일럿 스케일(400L)로 99% 순도의 오로볼을 고수율(>90%)로 생산 최적화 함. 하지만, 초기 기질의 제니스테인의 낮은 수용성으로 3 g/L의 반응만이 가능하였고, 400L 반응에 1kg의 오로볼을 생산할 수 있었음.

바. 물에 잘 녹지 않는 제니스테인에 당화가 이뤄질 경우 수용성이 좋아져 고농도 반응이 가능해질 수 있다 판단됨. 초기 반응 기질 농도를 높임으로 생산 단가 절감에 직결될 수 있다 생각되며 이를 통해 사업화를 위한 본 연구진의 기술 한계를 극복 할 수 있다 판단됨.

사. 또한 제니스테인 보다 당화된 제니스테인이 더 안정적인 형태로 콩에 존재하기 때문에, 원료 수급 면에서도 경제적인 이득을 불러올 것이라 판단됨. 따라서 당화 기질을 통한 오로볼의 새로운 생산 경로 연구가 중요함.

5. 안전 인증 균주(GRAS)를 이용한 오로볼 대량 생산

가. 본 연구진은 효소 개량을 통해 오로볼 생산에 최적화된 tyrosinase를 제작하였음. 때문에, 현재까지는 미국, 한국 화장품 시장에서만 사용 범위가 한정 되어 있음. 인증 절차가 까다로운 유럽 또는 중국 시장으로의 수출 확대를 위해서 개량 효소가 아닌 안정성이 보장된 GRAS 미생물군을 이용한 반응 기술 개발이 절실함.

나. 실험실 수준에서 미국 FDA에서 지정한 식품안전인증 미생물(Generally Recognized As Safe, GRAS)인 *Aspergillus oryzae* 유래 tyrosinase가 오로볼 생산에 사용될 수 있음을 확인하였으며, 이를 발전시킬 계획임.

[그림 8.] 안전인증 미생물을 활용한 오로볼 생산의 중요성

다. 순도가 높은 오로볼 생산을 위해서는 효소를 이용한 생전환방법이 필수적임. 하지만, *Aspergillus* 또는 *Bacillus* 유래 tyrosinase의 식품 첨가물 등재를 위해 안정성 및 정당성 등의, 식품첨가물의 기준 및 규격 적합 여부를 확인하는 과학적인 평가가 수반되어져야 함.

6. *A. oryzae* tyrosinase 또는 *A. bisporus* tyrosinase 추출연구 및 식품 첨가물 등재 가능성을 보기위한 안정성 테스트 진행.

가. 현재 국내 GMO 식품가공 효소 식약청 안전 기준 현황은, 유전자 변형생물체의 생산시설(GMP 생산시설)을 갖춰야 하고, 또 효소를 생산한 재조합미생물의 안정성 검사를 통과해야해며, 재조합 식품 가공효소가 '식품첨가물'로 분류되어 식품가공효소의 생산과 안정성 규격 2항과 3항의 안전 기준을 통과해야함.

<식품가공효소의 생산과 안전성 규격>

1항: 유전자변형생물체의 국가간이동등에 관한 법률,

2항: 유전자재조합식품의 안전성 평가 심사 등에 관한 규정,

3항: 식품 첨가물의 기준 및 규격

나. 하지만, 위 안전성 규격을 위한 검사료가 비싸고 시간이 많이 소요됨으로, GRAS처럼 이미 안정성이 검증된 미생물에서 효소를 추출하여, 식품 첨가물의 기준 및 규격에

맞추는 것이 보다 경쟁력이 있다 판단됨.

다. 신규 식품 첨가물을 등재하기 위한 기초적인 안전성 테스트가 수반되어져야함.
식품의약품안전처에 기재된 식품첨가물 지정절차에 따른 과학적인 안전성 평가를 진행할 계획임.

제 3 절. 연구개발 범위

1. 1차년도

가. 개발 목표

▶ **주관연구기관(서울대학교) :**

(ㄱ) 세포주를 활용한 오로볼의 체지방 감소 개선 효능 규명
(ㄴ) 세포주 모델을 활용한 오로볼의 장건강 개선 효능 규명
(ㄷ) 원천원료의 중금속 및 유해 독소 분석 및 제거를 위한 연구
(ㄹ) 글루코제니스테인을 이용한 새로운 대량생산 방법 개발
(ㅁ) 오로볼의 대량생산 및 분리/정제 기술 발전
(ㅂ) GRAS 미생물을 이용한 오로볼 생산 시도
(ㅅ) *A. oryzae* tyrosinase 또는 *A. bisporus* tyrosinase 추출 연구

▶ 참여기관 1 ((주)밥스누) :

(ㄱ) 오로볼 소재 적용 제형 개발

나. 개발 내용 및 범위

▶ 주관연구기관(서울대학교) :

- 세포주 모델을 활용한 오로볼의 체지방 감소 개선 효능 평가
  - 기능성 소재로서 오로볼의 적용 범위를 다양하게 확장하기 위해 지방전구세포를 활용하여 체지방 감소 효능 평가를 진행하고자 함.
  - 선행연구를 통해 오로볼의 체지방 감소 개선 가능성을 확인한 예비 결과를 바탕으로 지방전구세포 모델을 활용하여 체지방 감소 구체적인 효능 규명 연구를 수행할 예정임.
  - T3-L1 cell (지방전구세포) 모델에서 Adipogenesis (지방생성), lipid accumulation (지방 축적) 등의 지표를 분석하여 세포 수준에서의 오로볼의 효능을 탐색할 예정임.

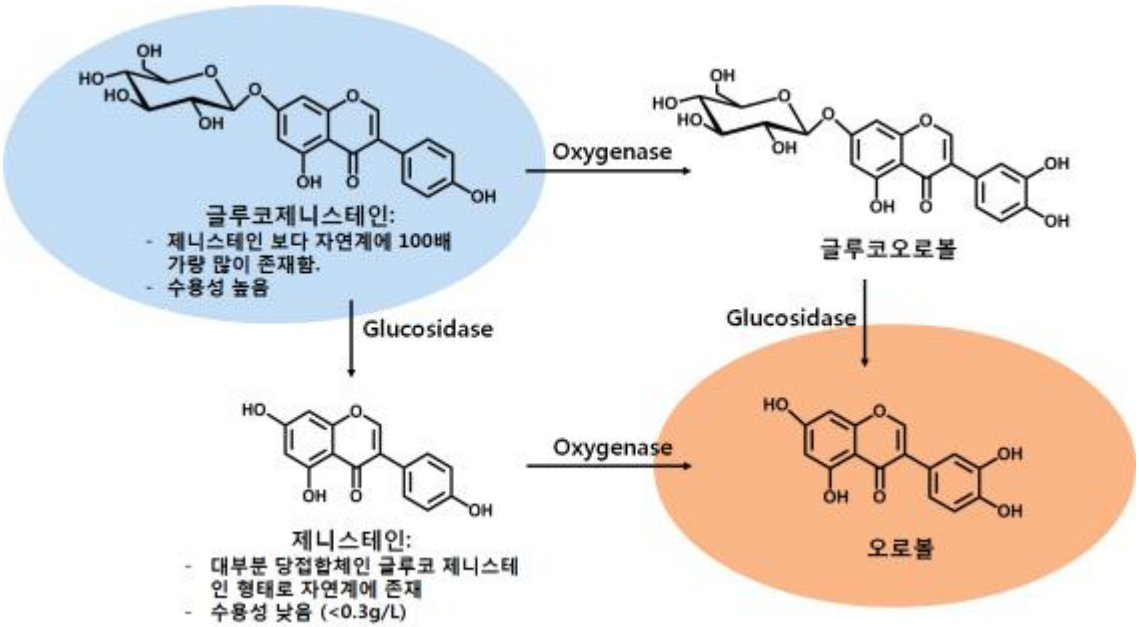
- 세포주 모델을 활용한 오로볼의 장건강 개선 효능 규명
  - 기능성 소재로서 오로볼의 적용 범위를 다양하게 확장하기 위해 지방전구세포를 활용하여 체지방 감소 효능 평가를 진행하고자 함.
  - 장건강 개선 효능 탐색을 위해 Caco-2 cell (장세포) 모델에서 Inflammatory Cytokines (IL-6, IL-8 등) 등의 지표를 분석하여 염증 완화 조절을 통한 장건강 개선 효능을 탐색할 예정임.

- 동물 모델을 활용한 오로볼의 체지방 감소 심화 효능 규명

- 세포주 효능 확인 이후, 전임상 단계인 동물모델을 통해 오로볼의 체지방 감소 효능 과학적인 효능 심화 평가를 수행할 예정임.
- 오로볼의 체지방 감소 효능 평가를 위해 동물모델 (C57BL/6J mice, Male, 5-week-old)을 이용하여, high-fat diet (고지방식이)를 23주간 경구 투여 후 동물실험 그룹간의 body weight (체중변화), visceral fat mass (지방축적량), visceral fat mass (내장 지방 함량), subcutaneous fat mass (피하지방량) 등의 지표를 통한 체지방 감소 효능 평가할 예정임.

• 원천원료의 중금속 및 유해 독소 분석 및 제거를 위한 연구
- 원천원료인 제니스테인과 글루코제니스테인의 유해 물질 분석 진행

• 글루코제니스테인의 수산화 반응 최적화
- 본 연구진은 제니스테인을 통해 고수율 오로볼 생산 반응 메커니즘을 밝혀내고 이를 최적화한 기술노하우를 보유하고 있음.
- 하지만, 제니스테인의 낮은 수용성으로 3 g/L 이상의 반응 진행은 어려움.
- 이를 극복하고, 생산단가 절감을 통한 가격 경쟁력있는 원료화 및 사업화를 위해, 수용성이 뛰어난 글루코제니스테인(제니스틴)에서부터 고농도 (>3g/L) 반응을 진행하고자함.
- 실험실 스케일에서 글루코제니스테인으로부터 글루코오로볼이 형성됨을 선행 연구를 통해 확인하였고, 이를 대량 생산하고자함.



[그림 9.] 글루코제니스테인을 이용한 오로볼 생산

- 톤(ton) 스케일반응 가능 시설탐색 및 시설에 따른 반응법 개선
  - 본 연구진은 400 L 파일럿스케일 반응 (500L 반응기) 을 통하여, 1.2kg 제니스테인으로부터 1.2 kg의 오로볼을 이론적 수율에 가깝게 생산하였으며, 이를 98% 순도로 정제함 (전체 수율>95%)
  - 본 연구진이 축적한 노하우를 바탕으로, (재)춘천바이오산업진흥원에서 보유한 ton 단위 반응기(5톤 반응기)를 통한 오로볼 생산 최적화를 진행하고, 이렇게 생산된 오로볼로 효능 검증 연구의 확대 및 화장품 제형연구에 사용할 계획임.
  - 하지만, 진흥원에 분리/정제를 위한 설비는 미비함. 산업화를 위한 톤 단위 오로볼생산 반응을 위해 적합설비를 보유한 제조업체 (예, 두산인프프라코어)를 탐색하고, 상기 최적화된 반응을 적용할 계획.
- GRAS 미생물 발효를 통한 오로볼 생산 연구
  - 본 연구진은 미국 FDA에서 제정한 GRAS에 속하는 균주인 누룩곰팡이(*Aspergillus oryzae*)와 버섯(*Agaricus bisporus*)유래 tyrosinase로 제니스테인 또는 글루코제니스테인으로부터 오로볼 또는 글루코오로볼의 전환 반응을 실험실 수준에서 확인하였고, 본 과제를 통해 스케일업 연구를 진행할 계획임.

- *A. oryzae* tyrosinase 또는 *A. bisporus* tyrosinase 추출울 통한 효소대량 생산 연구
  - 효소의 분리 추출을 위해서, 세포의 용해, 효소의 농축, 정제 등의 과정을 최적화하기 위한 연구 수행.

▶ 참여기관 1 ((주)밥스누)

- 오로볼 소재 적용 제형 개발

-생산된 오로볼의 부가가치를 높이기 위해 우선적으로 적용 가능한 화장품 제형연구를 수행할 예정임.

-특이 이소플라본인 오로볼 자체의 역가를 최대한 유지(기능성 극대화)하고 피부 세포 침투력을 증진시킬 수 있는 화장품 제형을 개발하기 위해 마이크로에멀젼 (micoemulsion), 솔리드나노파티클 (Solid nano particle) 등의 제형연구를 수행할 예정임. 해당 제형을 활용할 경우 오로볼의 열안정성 (Thermo-stability), 광안정성 (Photo-stability), pH안정성을 증가시킬 수 있을 것이라 기대됨.

-화장품 원료 구성특성을 고려하여 제형을 선정할 예정이며, 스킨케어, 클렌징 등 다양한 제형을 검토하여 최종적으로 제형 안정성이 확보되면서 오로볼 자체의 역가를 유지할 수 있는 제형을 개발할 예정임

2. 2차년도

가. 개발 목표

▶ 주관연구기관(서울대학교) :

(1) 동물 모델을 활용한 오로볼의 장건강 개선 심화 효능 규명
(2) 세포주 모델을 활용한 오로볼 및 글루코오로볼의 효능 비교 평가
(3) 글루코제니스테인을 이용한 새로운 대량생산 방법 개발
(4) *A. oryzae* tyrosinase 또는 *A. bisporus* tyrosinase 추출 연구
(5) GRAS 미생물을 이용한 오로볼 생산 연구

▶ 참여기관 1 ((주)밥스누) :
7. 오로볼 또는 글루코오로볼 소재 함유 시제품 개발

나. 개발 내용 및 범위

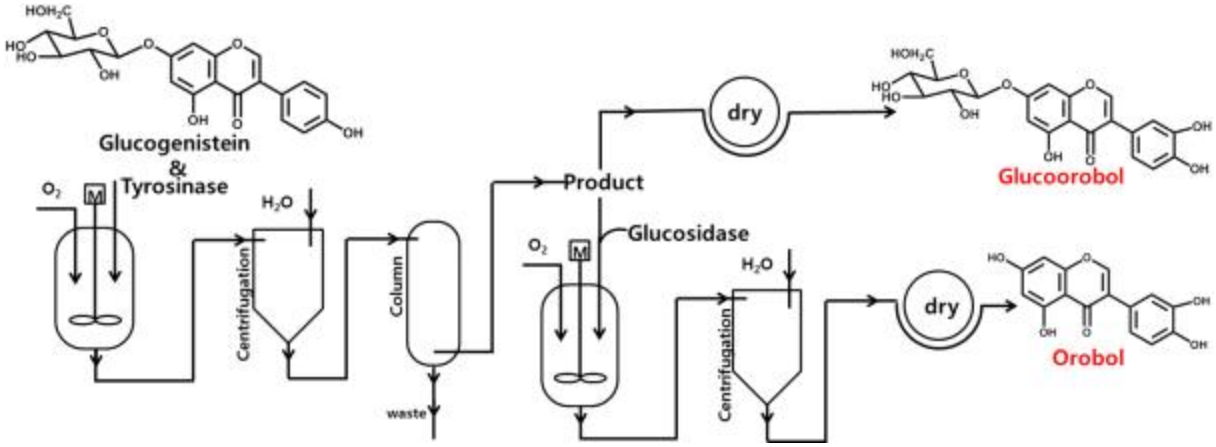
▶ 주관연구기관(서울대학교) :

- 동물 모델을 활용한 오로볼의 장건강 개선 효능 평가
  - 세포주 효능 확인 이후, 전임상 단계인 동물모델을 통해 오로볼의 장건강 개선 효능의 과학적인 효능 심화 평가를 수행할 예정임.
  - 오로볼의 장건강 개선 효능 평가를 위해 동물모델 (C57BL/6J mice, Male, 7-week-old)을 이용하여 7일간 오로볼을 경구투여 후, 이후 7일간 2.5%의 DSS(Dextran Sodium Sulfate)음용수를 공급으로 장염을 유도해 동물 실험 그룹간의 body weight loss (체중 손실 정도), colon length (대장 길이), diarrhea and bleeding (설사 및 혈변), myeloperoxidase(MPO) activity (미엘로퍼옥시다아제 활성) 등의 지표를 통한 장내 염증 완화 효능 평가를 수행할 예정임.

- 세포주 모델을 활용한 오로볼 및 글루코오로볼의 효능 비교 평가
  - 선행 연구를 통해 규명한 오로볼의 피부주름개선 효능 대비 글루코오로볼의 효능을 비교하기 위해 피부 각질 세포 또는 진피 세포를 활용하여 비교 평가할 예정임.
  - 오로볼과 글루코오로볼의 과학적인 기능성 평가 비교를 위해 지방전구세포 모델을 활용하여 체지방 감소 효능 비교 평가를 수행할 예정임.
  - 비교평가를 위해 3T3-L1 cell (지방전구세포) 모델 및 Caco-2 cell (장세포) 모델을 활용하여 각각 Adipogenesis (지방생성), lipid accumulation (지방 축적) 등 체지감 감소 지표 또는 Inflammatory Cytokines (IL-6, IL-8 등) 등의 염증 지표를 분석하여 오로볼 및 글루코오로볼의 체지방 감소 또는 장 건강 효능 비교를 진행할 예정임.

- 글루코제니스테인을 이용한 새로운 대량생산 방법 개발
  - 본 연구진은 기존 탈당화 효소(예, *beta*-glucosidase)와는 다른 새로운 메커니즘을 가진 산화환원 효소를 자연계에서 스크리닝하였고,이 효소를 이용하여 진세노사이드, 캄페롤, 이소플라본등 다양한 글라이콘에 대한 탈당화 반응을 확인하였음.
  - 글루코제니스테인과 글루코오로볼의 탈당 반응을 생산 공정에 적용하여 오로볼대량생산에 적용하고자함.

- 상기 내용은 최적화 후 특허 출원하고자함.



[그림 10.] 글루코제니스테인을 이용한 효소전환 반응 대량생산 및 분리/정제 예상 공정도

- *A. oryzae* tyrosinase 또는 *A. bisporus* tyrosinase 추출 연구
  - 효소의 분리 추출을 위해서, 세포의 용해, 효소의 농축, 정제 등의 과정을 최적화하기 위한 연구 수행하고, 각 단계에서의 효소 활성 정도를 체크하여 추출 공정 발전시킬 계획임.

- GRAS 미생물 발효를 통한 오로볼 생산 연구
  - A. oryzae 생장에 따른 tyrosinase 발현정도를 확인하고, 콩추출물에 접종한 A. oryzae 발효과정 중 오로볼 생성 여부 및 양적 분석을 질량분석기 및 크로마토그래프를 이용하여 분석할 계획임.

▶ 참여기관 2 ((주)밥스누) :

- 글루코오로볼을 적용한 화장품 제형 개발
  - 반응 생성 중간물질인 글루코오로볼은 오로볼에 당이 붙은 형태로 친수성이 더 향상됨. 친수성이 더 향상된 글루코오로볼의 경우 화장품 제형개발에 더 용이하며 해당 소재의 장점을 활용한 화장품 제형개발 연구를 수행할 예정임.

- 오로볼 또는 글루코오로볼 소재 함유 시제품 개발
  - 생산된 오로볼의 부가가치를 높이고 제형-시제품 간의 안정성을 극대화하기 위해 우선적으로 1차년도에 개발된 여러 가지 적용 가능한 화장품 제형을 시제품에 적용하여 개발함.
  - 기초 화장품류 (스킨 로션, 에센스, 크림), 워시 제품류 (폼클렌져, 클렌징 오일, 바디클렌져), 피부기능성 (피부 주름 개선 기능성화장품) 중 적합 제형에 맞는 것을 선정하여 시제품 개발 및 제작 예정임.
  - 내부 시제품 테스트를 진행할으로써 테스트 결과를 반영하여 시제품 샘플을 수정할 예정임.

3. 3차년도

가. 개발 목표

▶ 주관연구기관(서울대학교) :

(ㄱ) 오로볼의 대사성 질환 (비만, 장건강 등) 개선 생리활성 효능 작용기전 규명

(ㄴ) *A. oryzae* tyrosinase 또는 *A. bisporus* tyrosinase 대량 추출을 위한 최적화 연구

(ㄷ) *A. oryzae* tyrosinase 또는 *A. bisporus* tyrosinase 식품 첨가물 등재 가능성을 보기위한 안정성 테스트 진행

▶ 참여기관 1 ((주)밥스누) :

(ㄱ) 사업화 기반 마련을 위한 오로볼 소재 산업스케일 대량생산 시스템 구축

(ㄴ) 오로볼 함유 최종 시제품 생산 및 안전성, 인체적용 시험평가

(ㄷ) 오로볼 기능성 개별인정 화장품 개발을 위한 ICID 등재 신청

나. 개발 내용 및 범위

▶ 주관연구기관(서울대학교) :

- 오로볼의 체지방 감소 효능 작용기전 규명
  - 오로볼의 체지방 감소 효능을 세포주 모델과 동물 모델에서 확인한 후, 체지방 감소 효능에 대한 과학적인 작용기전 규명.
  - Kinase profiling analysis, Immunoprecipitation 등을 실험을 통해 오로볼의 타겟 단백질 규명하고, 3T3-L1 cell (지방전구세포) 모델을 활용하여 adipogenesis signaling pathways 내 타겟의 하위 단백질들의 발현량 분석을 통해 체지방 감소 효능 작용기전을 규명할 예정임.

- 오로볼의 장건강 개선 효능 작용기전 규명
  - 오로볼의 장건강 개선 효능을 세포주 모델과 동물 모델에서 확인한 후, 장건강 개선 효능에 대한 과학적인 작용기전 규명이 필요함.
  - Kinase profiling analysis, Immunoprecipitation 등을 실험을 통해 오로볼의 타겟 단백질 규명하고, Caco-2 (장세포) 모델을 활용하여 adipogenesis signaling pathways 내 타겟의 하위 단백질들의 발현량 분석을 통해 장건강 개선 효능 작용기전을 규명할 예정임.
  - 상기 내용은 기작 규명 후 특허 출원하고자함.

- *A. oryzae* tyrosinase 또는 *A. bisporus* tyrosinase 대량 추출을 위한 최적화 연구
- *A. oryzae* tyrosinase 또는 *A. bisporus* tyrosinase 식품 첨가물 등재 가능성을 보기 위한 안정성 테스트 진행
- GRAS 미생물로부터 추출된 효소를 활용하여 콩 원물 혹은 콩 추출물로부터 오로볼이 함유, 강화된 고기능성 이소플라본 혼합물의 생산 및 분리 정제 기술 개발

▶ 참여기관 1 ((주)밥스누)

- 사업화 기반 마련을 위한 Gras 미생물 활용 오로볼 소재 산업스케일 대량생산 시스템 구축
  - GRAS 미생물을 활용한 고도화된 오로볼 생산기술을 산업스케일로 최적화하여 해당 생산 조건에서 오로볼 대량생산을 수행
  - 생산된 오로볼을 활용한 소재 사업화를 위하여 기능성 소재에 대한 국내외 학술저널 게재, 글로벌 소재회사를 통한 공급계역 체결 등을 고려할 예정임.

- 오로볼 함유 최종 시제품 개발
  - 2차년도 시제품 개발 과정에서 나타난 개선 사항들을 최종 반영하여 최종 시제품 개발 및 생산

[그림 11.] 기능성 물질 안정성을 위한 크림 제형 개발 예시

- 오로볼 함유 최종 시제품의 안전성 및 인체적용시험 평가
  - 오로볼을 함유한 제품 사업화를 위하여 안전성 및 효능 검증을 위한 인체적용시험을 추진할 예정임. 오로볼을 함유한 제형의 피부자극안전성 검증은 경험을 다수 보유한 기관을 통해 피부첩포자극성 테스트를 의뢰할 예정임. 피부자극성 테스트는 4일간 진행되며 시험인원은 30명 내외임. 24시간동안 패쇄첩포를 진행하며 제거 후 30분, 24시간, 48 시간 후에 관찰을 하는 방식으로 진행함. 피부자극성은 국제접촉피부염학회 (OCDRG) 및 미국화장품협회 (PCPC) 기준을 응용한 기준에 의거 평가함.
  - 기능성이 검증된 우수소재 오로볼에 대하여 임상 의사들의 경험에 근거한 인체적용시험을 통해 피부노화 (주름 및 보습) 개선 효능을 검증할 예정임. 아모레퍼시픽, LG생활건강, 한국콜마, 코스맥스 등 화장품기업과 임상시험 공동연구 경험 및 관련 분야로 노하우가 있는 김범준 피부과 교수 (중앙대학교 병원)측과 진행할 예정.
  - Visio meter, Primos Primium, Corneometer 등의 기기를 활용하여 눈가주름, 보습력, 진피 치밀도를 측정하고 Skin scancer 초음파 촬영 및 분석을 진행할 수 있을 것임. 사용전, 사용 4주 후, 사용 8주 후, 사용 12주 후 시간 경과에 따른 샘플 효능을 측정함. 효능에 대한 평가뿐만 아니라 홍반, 부종 등 이상반응 평가 (Half Test)를 함께 진행하여 해당 소재의 안정성을 추가적으로 검증할 예정임.

- 오로볼 기능성 개별인정 화장품 개발을 위한 ICID 등재 신청
  - 선택적 발효기술을 통해 생산한 오로볼을 고부가가치화 하고 이를 활용한 제품으로 기능성 시장 및 중국 등 화장품 수출 시장을 고려하여 임상시험 결과를 바탕으로 오로볼 개별인정 화장품 개발을 위한 ICID 등재 신청을 확인할 예정임.

- 안전인증 미생물을 이용하여 오로볼을 대량 생산하는 기술 확립 후, 화장품 제품화로 선 적용할 예정임. 식품 쪽에서도 향후 식품첨가물 등재, 기능성 원료 등재 등의 인증 절차를 확인하여 다양한 제품 (건강기능제품 등)에 점진적으로 적용해 나갈 예정임. 또한, 식품 소재로 실용화하기 위해 안전성 확보 및 표준화도 함께 진행할 예정임.
- 식품 위생법에 따른 생산 효소의 기준을 고려하여 국내외에서의 사용현황, 제조방법, 성분과 규격에 관한 자료, 사용의 기술적 필요성 및 정당성에 관한 자료, 안전성에 관한 자료 등을 제출하여 생산 효소의 식품첨가물 등재를 함께 검토할 예정임.

제 2 장. 연구수행 내용 및 결과

제 1 절. 연구개발 추진전략 및 방법

1. 오로볼의 다양한 기능성 평가 및 작용기전 규명

가. 서울대학교는 기 검증한 오로볼의 피부 주름 개선 효능을 바탕으로 나아가 식품으로의 활용 범위를 넓히기 위해 대사성 질환에 대해 추가 기능성을 평가함. 세포주 모델을 활용하여 대사성 질환 효능을 평가 및 해당 효능에 관한 작용기전을 규명하고, 동물모델을 활용하여 전임상 수준에서의 기능성을 평가하는 역할을 수행함.

2. 오로볼 소재를 산업스케일로 대량생산 가능한 시스템 구축

가. ㈜밥스누는 다양한 소재 대량생산설비를 보유한 두산 글로넷 등과의 협력을 통해 콩 유래 고기능성 소재인 오로볼의 대량생산화를 통해 식품 또는 화장품 원료 및 제품화에 본 소재가 활용할 수 있는 사업화 기반을 마련하는 역할을 수행함.

3. 오로볼 적용 기능성 원료개발 및 제형개발

가. ㈜밥스누는 콩 유래 고기능성 소재인 오로볼의 빠른 상용화를 위해 현 기술 수준에서 우선 적용가능한 화장품 원료화 및 제품화 연구를 선 수행한 후 Gras 미생물을 활용한 고도화된 오로볼 생산기술이 개발됨에 따라 이를 활용한 식품 원료화 및 제품화 절차를 추진할 예정임.

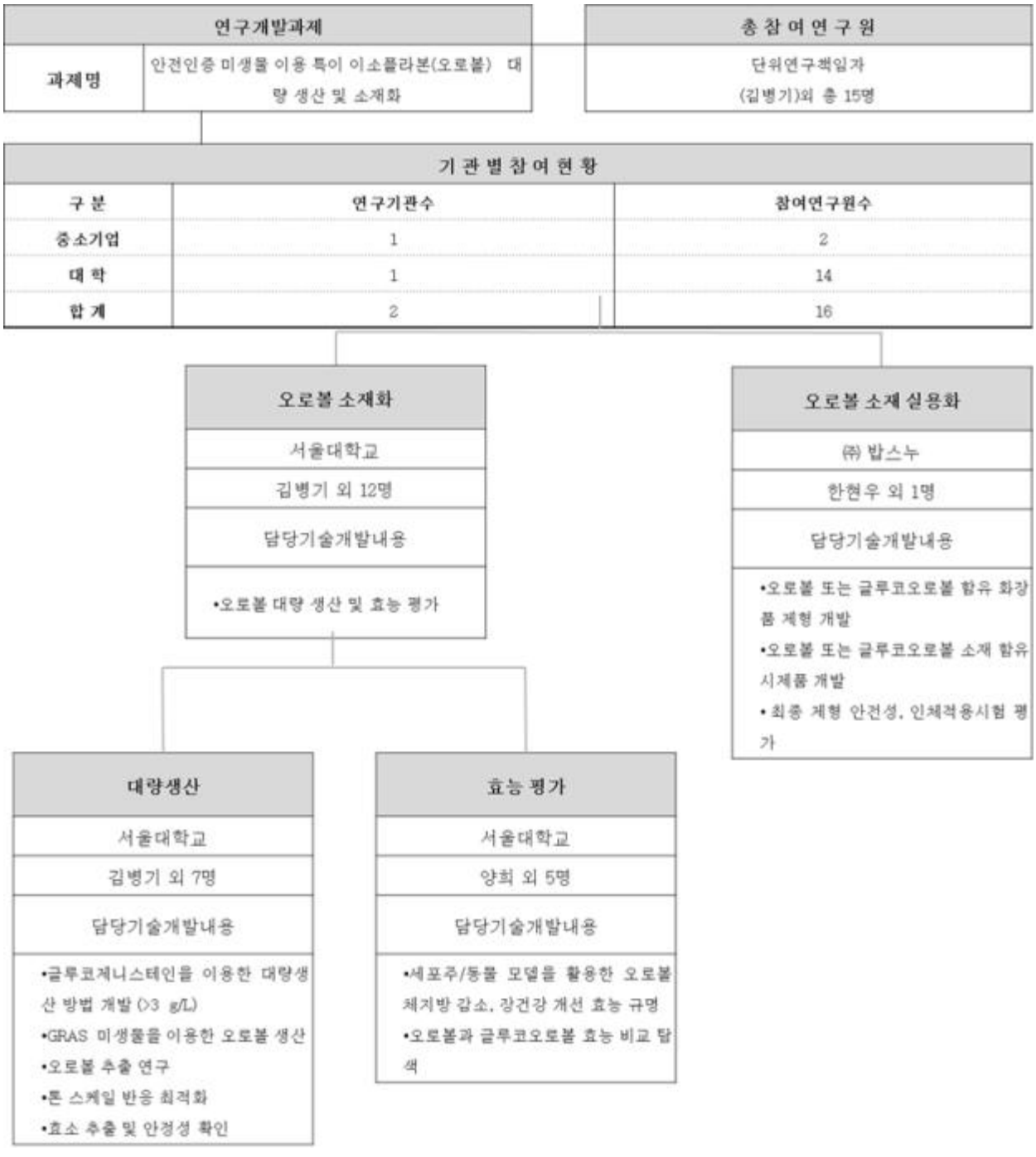
나. ㈜밥스누는 리포좀 제형 기술을 적용한 세라마이드 화장품 개발 및 출시를 완료하였으며(제품명 : 울트라쉴드 세라마이드 앰플/ 핵심기술명 : Hexagonal liposome 함유 세라마이드 제형), ㈜밥스누에서 보유 중인 화장품 제형 개발 노하우와 소재 맞춤형 제형을 개발하여 오로볼에 적용하는 역할을 담당함.

4. 오로볼 함유 최종 시제품의 안전성, 인체적용시험 평가 및 ICID 등재 신청

가. ㈜밥스누는 서울대학교와 공동연구를 통하여 효소전환 기능성소재의 피부첩포자극성 테스트를 진행한 경험을 보유함. 또한 국내외(서울대학교 병원 등) 병원들과 공동연구를 통하여 다양한 천연소재의 기능성 검증을 하였음. ㈜밥스누에서는 오로볼이 함유된 시제품의 안전성(피부자극성)을 대한피부과학연구소에 의뢰하여 평가를 진행할 예정.

나. ㈜밥스누는 중앙대학교 병원(김범준 교수)에 제조된 최종 시제품의 기능성(피부주름 개선 임상시험)시험을 의뢰할 예정이며, 향후 오로볼 개별인정 화장품 개발을 위한 ICID 등재 신청하는 역할을 담당함.

제 2 절. 연구개발 추진체계



제 3 절. 연구개발 추진일정

1차년도															
일련번호	연구내용	월별 추진 일정												연구개발비 (단위: 천원)	책임자 (소속 기관)
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12		
1	세포주를 활용한 오로볼의 체지방 감소 개선 효능 규명													15,000	김병기 (서울대)
2	세포주를 활용한 오로볼의 장건강 개선 효능 규명													15,000	김병기 (서울대)
3	동물 모델을 활용한 오로볼의 체지방 감소 개선 심화 효능 규명													33,500	김병기 (서울대)
4	글루코제니스테인을 이용한 새로운 대량생산 방법 개발													50,000	김병기 (서울대)
5	오로볼의 대량생산 및 분리/정제 기술 발전													50,000	김병기 (서울대)
6	GRAS 미생물을 이용한 오로볼 생산 시도													30,000	김병기 (서울대)
7	*A. oryzae* tyrosinase 또는 *A. bisporus* tyrosinase 추출 연구													20,000	김병기 (서울대)
8	오로볼 소재 적용 제형 개발													17,400	한현우 (밥스누)
2차년도															
1	동물 모델 활용 오로볼의 장 건강 개선 심화 효능 평가													30,000	김병기 (서울대)
2	오로볼 및 글루코오로볼의 대사성 질환 개선 생리활성 비교 효능 평가													5,000	김병기 (서울대)
3	글루코오로볼을 적용한 화장품 제형 개발													5,900	한현우 (밥스누)
4	오로볼 또는 글루코오로볼 소재 함유 시제품 개발													40,000	한현우 (밥스누)
5	글루코제니스테인을 이용한 새로운 대량생산 방법 개발													80,000	김병기 (서울대)

6	GRAS 미생물을 이용한 오로볼 생산 연구													50,000	김병기 (서울대)
7	*A. oryzae* tyrosinase 또는 *A. bisporus* tyrosinase 추출 연구													20,000	김병기 (서울대)
3차년도															
1	오로볼 체지방 감소 및 장 건강 개선 효능 작용기전 규명													20,000	김병기 (서울대)
2	GRAS 균주를 활용한 오로볼 산업스케일 대량생산 시스템 구축													90,000	김병기 (서울대)
3	*A. oryzae* tyrosinase 또는 *A. bisporus* tyrosinase 식품 첨가물 등재 가능성을 보기위한 안정성 테스트 진행													60,000	김병기 (서울대)
4	오로볼 함유 최종 시제품 생산													40,000	한현우 (밥스누)
5	오로볼 함유 최종 시제품의 안전성 및 인체적용시험 평가													40,000	한현우 (밥스누)
6	오로볼 기능성 개별인정 화장품 개발을 위한 ICID 등재 신청													15,900	한현우 (밥스누)

제 4 절. 연구개발성과

1. 논문게재 성과

논문명/저서명	저자	게재지 (권, 쪽)	게재연도 (발표연도)	국내/외 구분	SCI 여부
Biosynthesis Of (-)-5-Hydroxy-Equol And 5-Hydroxy-Dehydroequol From Soy Isoflavone, Genistein Using Microbial Whole Cell Bioconversion	Pyung-Gang Lee et al.	ACS Chemical Biology, 12, 2883-2890	2017	국외	SCI
Development Of Quenching-Qpcr (Q-Q) Assay For Measuring Absolute Intracellular Cleavage Efficiency Of Ribozyme	Min Woo Kim et al.	Analytical Biochemistry, 550:27-33	2018	국외	SCI
Tissue Adhesive, Rapid Forming, And Sprayable Ecm Hydrogel Via Recombinant Tyrosinase Crosslinking	Su-Hwan Kim, Sang-Hyuk Lee et al.	Biomaterials, 178:401-412	2018	국외	SCI
Transcriptome Analysis Of Wild-Type And Afss Deletion Mutant Strains Identifies Synergistic Transcriptional Regulator Of Afss For A High Antibiotic-Producing Strain Of Streptomyces Coelicolor A3(2)	Min Woo Kim et al.	Applied Microbiology and Biotechnology, 102:3243-3253	2018	국외	SCI
Polymeric Solvent Engineering For Gram/Liter Scale Production Of A Water-Insoluble Isoflavone Derivative, (S)-Equol	Pyung-Gang Lee et al.	Applied Microbiology and Biotechnology,102:6915-6921	2018	국외	SCI
Rational Engineering Of Ornithine Decarboxylase With Greater Selectivity For Ornithine Over Lysine Through Protein Network Analysis	Eun Young Hong et al.	Journal of Biotechnology, 281:175-182	2018	국외	SCI
Recent Advances In The Microbial Hydroxylation And Reduction Of Soy Isoflavones	Pyung-Gang Lee et al.	FEMS Microbiology Letters, 365, fny195	2018	국외	SCI
Structural Basis For Highly Efficient Production Of Catechol Derivatives At Acidic Ph By Tyrosinase From Burkholderia Thailandensis	Hyeoncheol Francis Son, San-Hyuk Lee et al.	ACS Catalysis, 8:10375-10382	2018	국외	SCI

Circular Permutation Of A Bacterial Tyrosinase Enables Efficient Polyphenol Specific Oxidation And Quantitative Preparation Of Orobol	Pyung-Gang Lee et al.	Biotechnology and Bioengineering, 116:19 - 27	2019	국외	SCI
Orobol, An Enzyme-Convertible Product Of Genistein, Exerts Anti-Obesity Effects By Targeting Casein Kinase 1 Epsilon	Hee Yang et al.	Scientific Reports, 9, 8942-8953	2019	국외	SCI

2. 특허성과

특허 명	출원국	출원· 등록일	출원인	등록・기탁번호
오로볼을 함유하는 지사제	대한민국	2017. 06. 16	서울대학교 산학협력단	10-2017-0076903
버크홀데리아 타일란덴시스 유래 티로시나아제를 이용한 카테콜형 구조 물질의 제조 방법 및 그의 응용	대한민국	2018.01.02	서울대학교 산학협력단	10-2018-0000438
오로볼을 함유하는 설사 개선용 식품 조성물 및 예방 또는 치료용 약학 조성물	대한민국	2018. 12. 14	서울대학교 산학협력단	10-2018-0162079
버크홀데리아 유래 티로시나아제를 이용하여 제조된 접착력을 가지는 가교 결합 물질, 그의 제조 방법 및 그의 응용	대한민국	2019.05.03	서울대학교 산학협력단	10-2019-0052248
오로볼의 안정성 개선을 위한 지질 나노입자 조성물 및 제조방법	대한민국	2018. 01. 31	서울대학교 산학협력단	10-2018-0012109

3. 국내 및 국제 학술대회 발표

발표자	발표제목	발표 일시	장소, 국명
Byung-Gee Kim	Monooxygenase Reaction: revisit of tyrosinase and its application	2017-08-21	Walter E. Washington Convention Center, Washington DC, USA
Byung-Gee Kim	Monooxygenase Reaction: revisit of tyrosinase and its application	2017-07-11	Eötvös Lóránd University, Budapest, Hungary
Sang-Hyuk Lee	REGIO-SELECTIVE ORTHO-HYDROXYLATION OF GLYCO-CONJUGATED MONOPHENOLIC PHYTOCHEMICALS	2017-07-10	Eötvös Lóránd University, Budapest, Hungary
Byung-Gee Kim	Oxidoreductase Reactions for Cosmeceutical Production from Soy Bean Products	2017-09-28	Pierre Baudis Congress Center, Toulouse, France
Hyun KIM	Production of Functional Isoflavone from Natural Glycoside Using GRAS Microorganism	2017-04-06	경주 화백컨벤션센터
Hee Yang	Orobol, a metabolite of genistein, exerts anti-obesity effects by targeting casein kinase 1 epsilon	2017-09-02	Conrad Hotel, Seoul
Byung-Gee Kim	Molecular Evolution of TYROSINASE: new reaction mechanisms and its application	2018-07-02	Kyoto University, Japan
Hyun Kim	Production of o-hydroxylated monophenolic glycosides using Burkholderia thailandensis tyrosinase at acidic condition	2018-07-01	Clock Tower Centennial Hall, Kyoto University, Japan
Hyun Kim	Regioselective ortho-hydroxylation of monophenolic phytochemical and glycosides using tyrosinase	2018-04-19	여수디오션리조트, 여수
Byung-Gee Kim	Production of Hydroxylated Equol Derivatives from Soy Isoflavone Using Microbial Oxidoreductases	2019-07-02	Tamsui Township, Taipei city, Taiwan
Pyung-Gang Lee	Regioselective Synthesis of Novel Ortho-Hydroxylated Equols Using Engineered Microbial Oxygenases	2019-04-12	제주, 메종글래드 호텔
Byung-Gee Kim	Production of hydroxylated equol derivatives from soy isoflavone using microbial oxidoreductases	2019-05-03	부산 벡스코 (BEXCO)

4. 인력 양성

No	분류	기준 년도	현 황										
			학위별				성별		지역별				
			박사	석사	학사	기타	남	여	수도권	충청권	영남권	호남권	기타
1		2017 2018	2	1		1	3	1	3				1

5. 고용창출

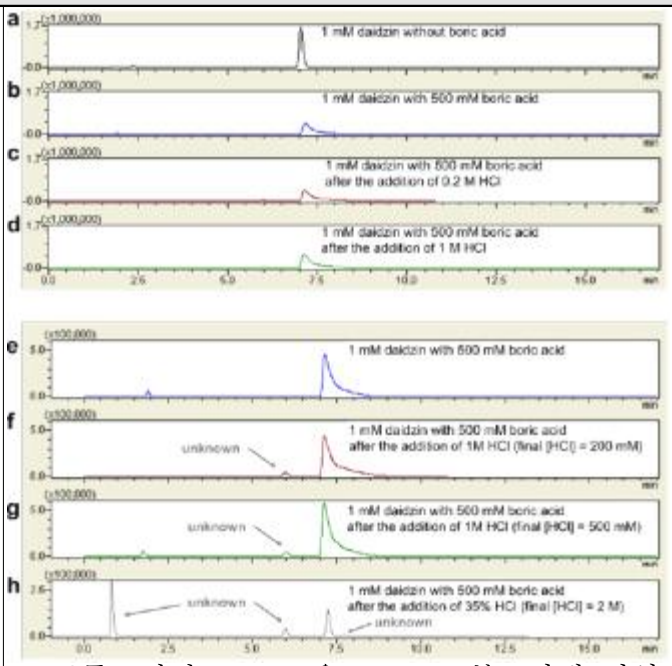
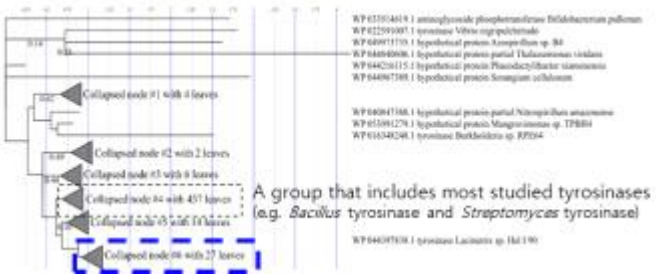
No	고용창출일(IN)	고용형태	고용구분	성명	소속기관
1	2016.12.01	정규직	신규채용	김효진	㈜밥스누
2	2017.02.01	정규직	신규채용	김두경	㈜밥스누
3	2018.04.09	정규직	신규채용	박미란	㈜밥스누
4	2019.07.15	정규직	신규채용	박해림	㈜밥스누

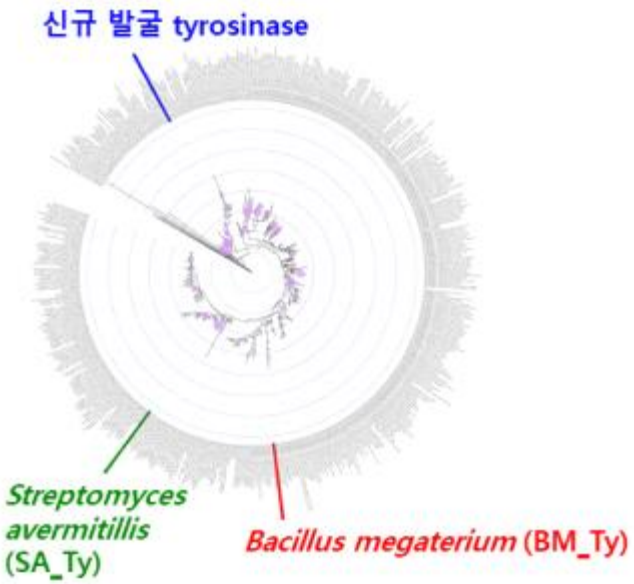
6. 사업화

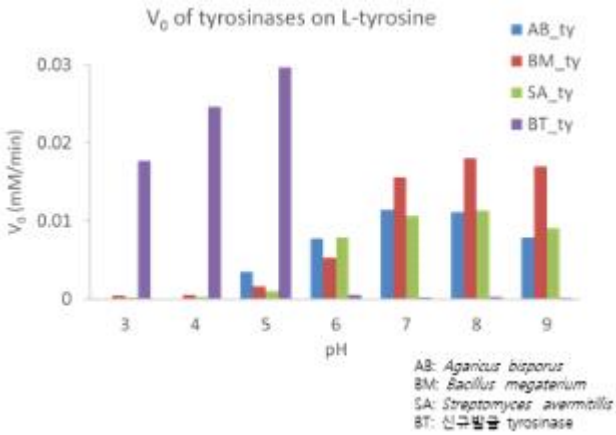
사업화명	제품명	업체명	사업화 형태
오로볼 소재 함유 화장품 시제품 개발	리아에스엔유 지부티크 아이디얼밸런서	(주)코스맥스	기술보유자의 직접사업화_기존업체-상품화
오로볼 소재 함유 화장품 시제품 개발	리아에스엔유 지부티크 컨투어세럼	(주)코스맥스	기술보유자의 직접사업화_기존업체-상품화
오로볼 소재 함유 화장품 시제품 개발	리아에스엔유 지부티크 컨투어크림	(주)코스맥스	기술보유자의 직접사업화_기존업체-상품화
오로볼 소재 함유 화장품 판매	리프레쉬콤마 밸런서	㈜밥스누	기술보유자의 직접사업화_기존업체-상품화
오로볼 소재 함유 화장품 판매	리프레쉬콤마 세럼	㈜밥스누	기술보유자의 직접사업화_기존업체-상품화
오로볼 소재 함유 화장품 판매	허브리프 리프레쉬 콤마 밸런서	㈜밥스누	기술보유자의 직접사업화_기존업체-상품화
오로볼 소재 함유 화장품 판매	허브리프 리프레쉬 콤마 세럼	㈜밥스누	기술보유자의 직접사업화_기존업체-상품화
나노제형 오로볼 소재 함유 화장품 개발	나노화제형 오로볼(브랜드: jedaum)	㈜밥스누	기술보유자의 직접사업화_기존업체-상품화
오로볼 소재 함유 화장품 판매	허브리프 리프레쉬 콤마 세럼	㈜밥스누	기술보유자의 직접사업화_기존업체-상품화
오로볼 소재 함유 화장품 판매	허브리프 리프레쉬 콤마 밸런서	㈜밥스누	기술보유자의 직접사업화_기존업체-상품화

제 5 절. 연구 결과

1. 기술적 성과

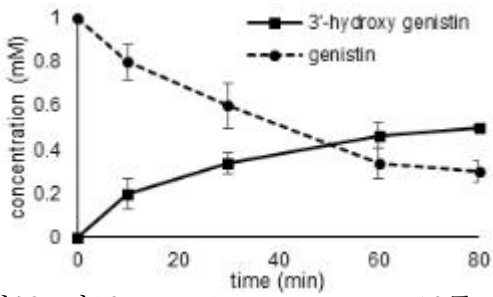
연구범위	연구수행방법 (이론적, 실험적 접근방법)	연구결과
1차년도		
글루코제니스테인을 이용한 글루코오로볼 생산 반응 최적화	○ 제니스테인의 낮은 수용성을 극복하고 원료단가 절감을 위하여 수용성이 뛰어난 글루코제니스테인을 사용한 반응을 진행함.	
	○ 글루코제니스테인을 사용할 경우 기존 반응에 적용 불가한 한계점을 파악하고 이를 해결할 수 있는 새로운 성질을 가진 효소를 이용한 반응을 진행하였음.	• 글루코기질 100mM을 500mM 붕소산에 희석한뒤 HPLC 확인 결과 붕소산을 제외한 대조군에서보다 기질 농도 감소함 확인하였음. • 산처리로 붕소산과 결합 끊을시 다시 기질 농도 증가함까지 확인. • 붕소산의해 기질이 서로 배위결합에 의해 결합함을 확인하였음.
	○ 1ml의 소량 실험실 스케일에서 글루코 제니스테인이 생산됨을 HPLC 분석을 통해 확인하였음.	 • 단백질 서열을 기준으로한 클레도그람 분석에서 기존 연구된 tyrosinase들과는 다른 위치에 속하는 tyrosinase 찾아내었음



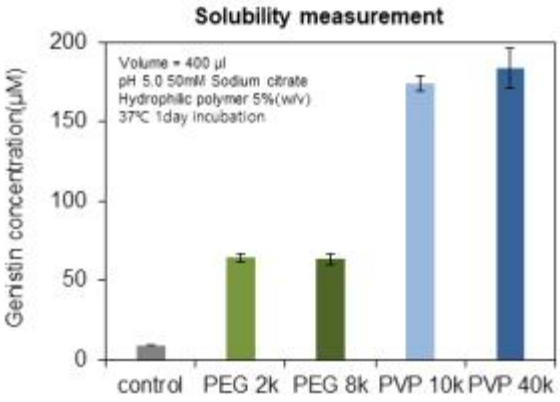
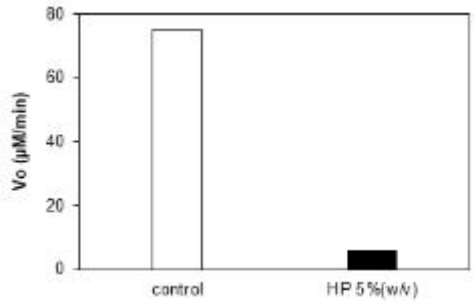
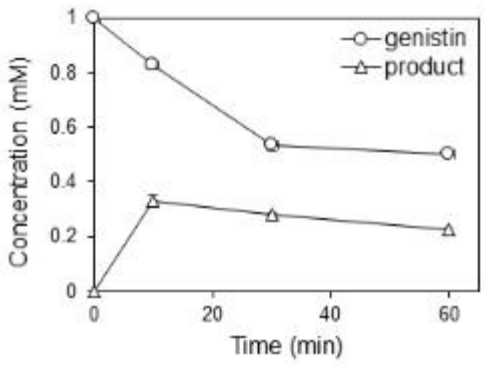


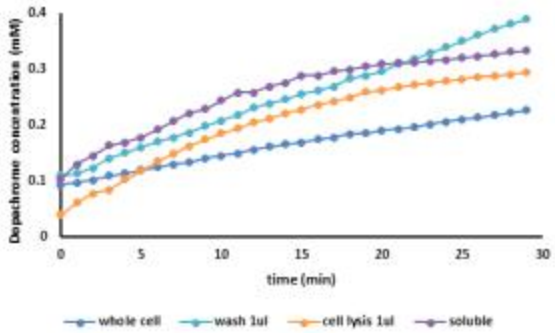
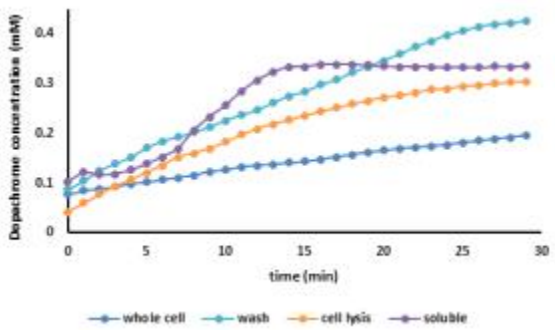
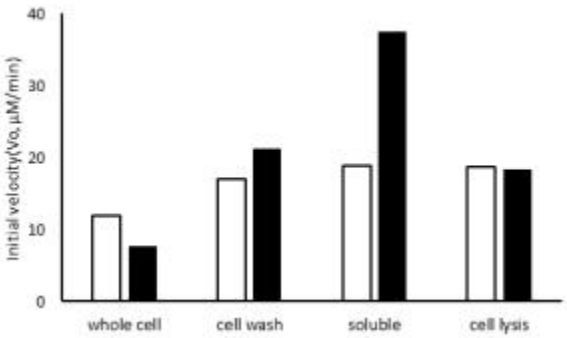
	pH		Vmax (μmol·min⁻¹·mg⁻¹)	K_m (mM)	k_{cat} (s^{-1})	k_{cat}/K_m ($mM^{-1}·s^{-1}$)
S. avermitilis	8	L-tyrosine	$1.05 \pm 1.70 \cdot 10^{-2}$	$0.589 \pm 5.83 \cdot 10^{-2}$	0.021	0.035
	8	L-Dopa	9.67 ± 1.85	$2.79 \pm 7.89 \cdot 10^{-1}$	0.190	0.068
B. megaterium	8	L-tyrosine	6.8 ± 0.4	0.05 ± 0.01	4	80
	8	L-Dopa	75 ± 7.8	0.8 ± 0.1	44.1	55.1
신규 발굴 효소	5	L-tyrosine	$4.04 \cdot 10^{-3} \pm 1.89 \cdot 10^{-4}$	$0.06 \pm 5.52 \cdot 10^{-2}$	39.75	662.5000
	5	L-Dopa	$4.95 \cdot 10^{-3} \pm 4.47 \cdot 10^{-4}$	$0.8 \pm 1.33 \cdot 10^{-1}$	48.72	60.8958

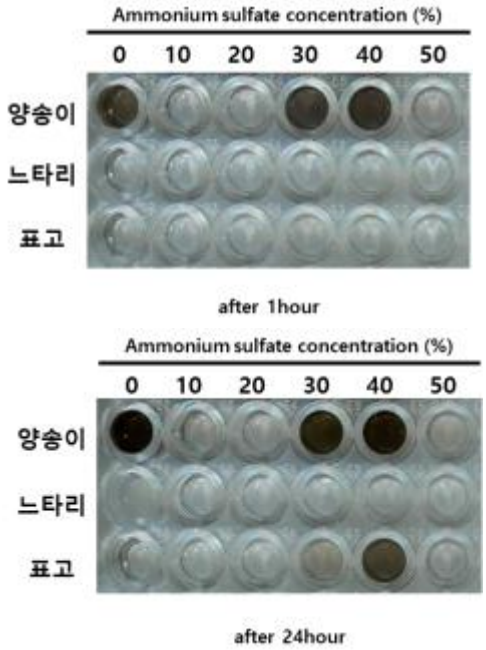
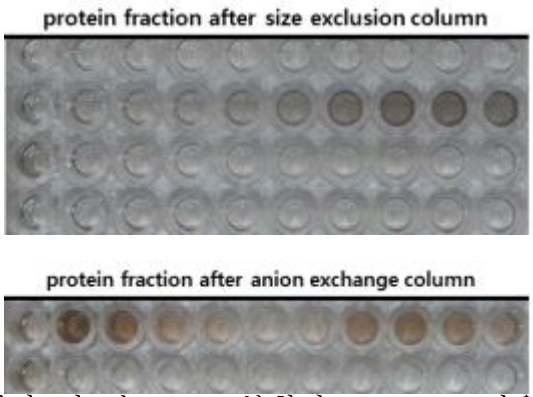
- 해당 tyrosinase의 특성을 기질 tyosine에 대하여 연구가 다수 진행되었던 tyrosinase들과는 달리 산성 pH에서 반응이 가장 좋은 활성을 보이며 catalytic efficiency 값 또한 가장 높음.

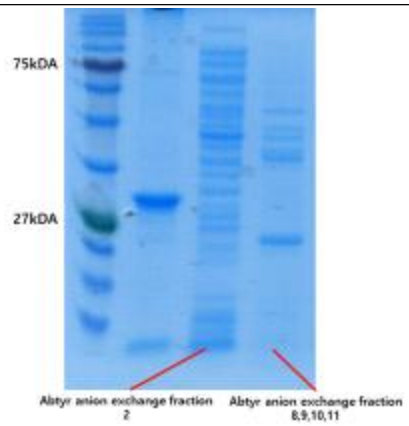
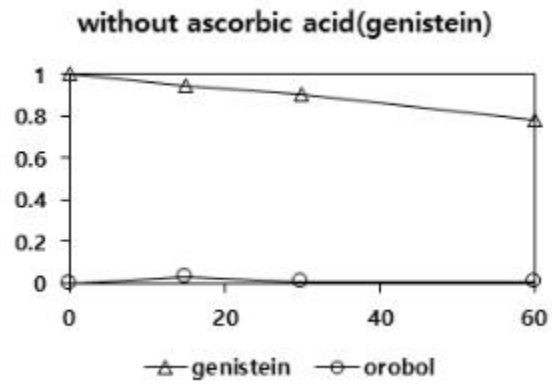
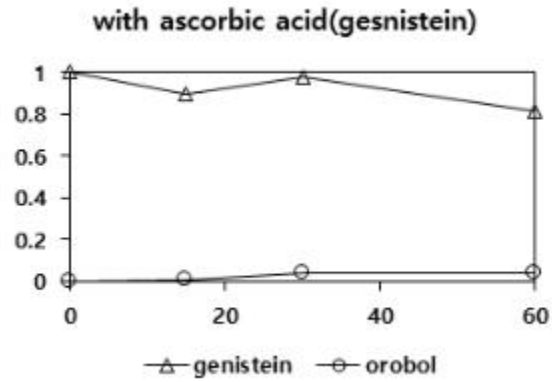


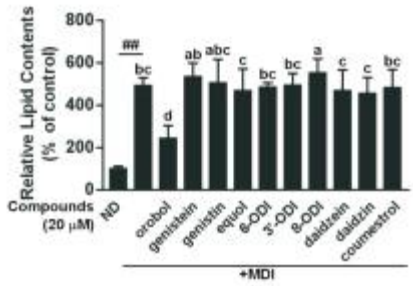
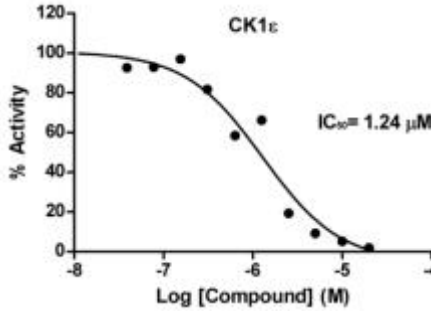
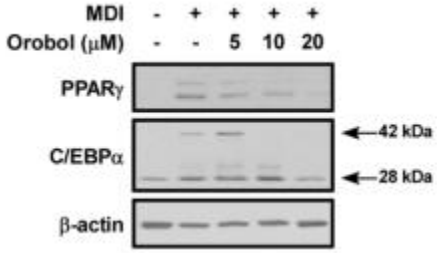
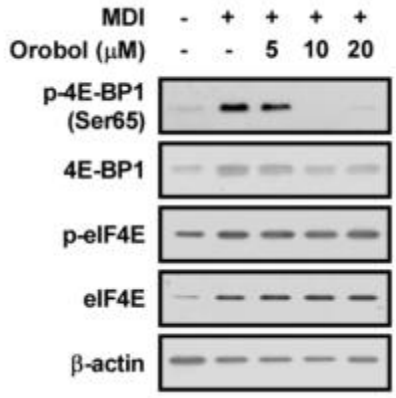
- 신규 발굴 tyrosinase 100nM, 글루코제니스테인 1mM(0.43g/L) pH 5에서의 1ml 스케일 반응에서 글루코오로볼 전환수율 46.54% 나타내었음.

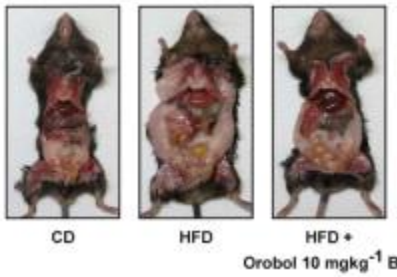
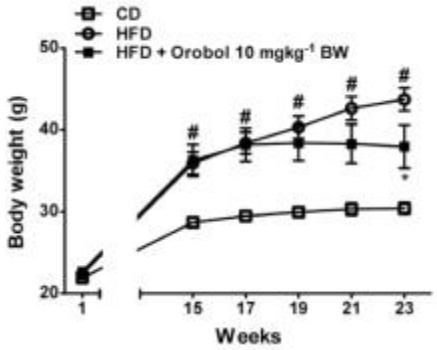
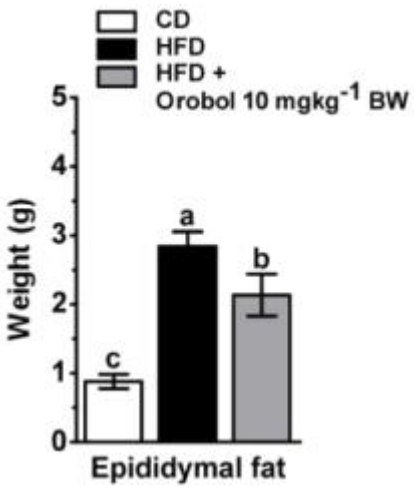
	○ 고농도(3g/L) 기질 반응을 위해 수용성 고분자 도입으로 글루코제니스테인의 용해도를 증가시킴. ○ 수용성 고분자 적용 하였을 때 신규 발굴 효소의 글루코오로볼 전환 수율을 비교함. ○ 수용성 고분자가 글루코제니스테인 용해도를 증가시켜 기질 농도 증가는 가능하지만 효소 안정성에 악영향을 줌.	 • 글루코 기질에 사용되는 tyrosianse의 반응 조건인 pH 5 50mM citiric acid buffer, 37℃에서 글루코 제니스테인의 용해도는 ~10µM 임. 수용성 고분자 5%(w/v) PEG 사용 시 ~65µM, PVP 사용시 ~185µM으로 기질 용해도 20배 증가함 • 수용성 고분자 미적용시 효소 초기 반응속도가  75.3µM/min이나 적용시 6.2µM/min로 감소함 • 또한 1ml스케일 반응에서 글루코제니스테인의  글루코오로볼의 전환수율이 22.3%로 감소하였음. • 수용성 고분자의 적용이 효소 안정성에 영향을 주어 활성 감소함. 기질 용해도 증가에는 긍정적인 영향이나 글루코 오로볼 생산에는 부정적인 영향 주는 것을 확인하였음.

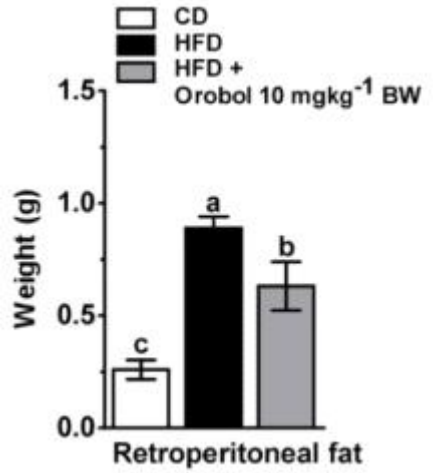
오로볼의 대량 생산 분리 정제 기술 발전	○ 대량 생산 과정의 시간 절감을 위하여 효소 생산 후 보관 시 안정성에 의한 평가 필요. ○ 효소 생산 뒤 세포 세척, 세포 파쇄, 세포 파편 제거 등의 후처리 과정에 따른 효소 안정성의 비교 진행함. ○ 각 과정 처리한 효소들을 동결건조 후 재생하여 기질 tyrosine에 대한 효소 초기 반응속도(dopachrome 생성)로 활성도 측정 ○	 • 동결 건조 전 dopachrome 생성 프로파일  • 동결 건조, 재생 후 dopachrome 생성 프로파일  • 세포 파쇄 후 세포 파편(soluble) 및 세포 세척 후 과정(cell wash) 2개의 분획에서 동결 건조 후에도 효소 활성 유지, 증가한 것을 확인하였음.
a.oryzae a.bisporus tyrosinase 추출 시도	○ 미국 FDA에서 제정한 GRAS 생물에 속하는 Agaricus bisporus(양송이버섯) 유래 tyrosinase 효소의 분리 추출 진행함. 추가로 시중에서 판매하여	

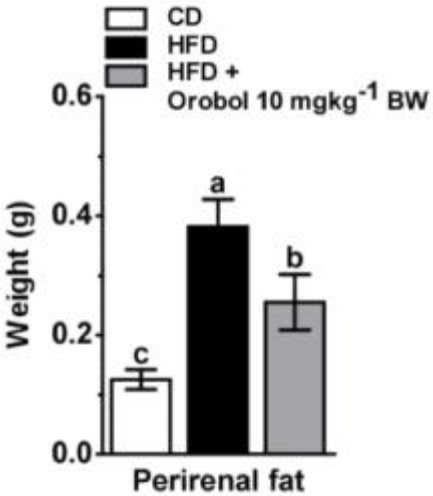
	쉽게 구할 수 있는 표고, 느타리 버섯에서의 tyrosinase 추출 가능한지 확인함. ○ 세포 용해, 효소 농축, 정제 과정의 최적화를 진행하였음.	 • 양송이 버섯에서 tyrosinase 활성이 가장 좋음을 확인함. • 황산 암모늄 30%, 40% 분획에서 기질 tyrosine에 대한 dopachrome 생성으로 효소 활성 확인하였음.  • 황산 암모늄 30% 분획의 tyrosinase만을 단독으로 분리하기 위해 size exclusion, anion exchange column을 통해서 단백질 분리 정제 최적화를 진행.

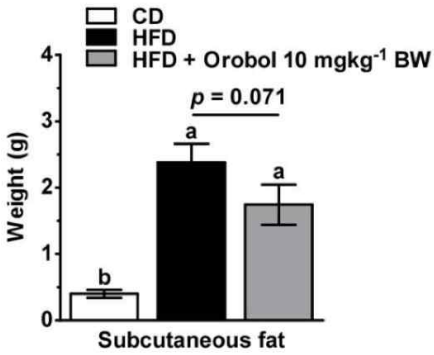
		
GRAS 미생물 이용한 오로볼 생산 시도	○ A.bisporus(양송이버섯) 추출 tyrosinase를 활용하여 제니스테인 1mM을 활용하여 1ml 스케일 반응 진행함. ○ 반응 용액 상 첨가물을 최소화 하였을 때 오로볼의 생산량을 HPLC 분석으로 확인함.	  • 오로볼의 tyrosinase에 의한 산화, 자연 산화를 막기위해 넣어주는 산화방지제인 아스코르브산 미첨가시 수율 0%로 확인 됨. • 아스코르브산 첨가시 수율 1시간 반응 수율 4%로 확인됨. • 추가해야할 효소 양, 아스코르브산의 식품첨가물 적용 여부에 대한 파악 진행예정
세포주 모델을 활용한 오로볼의 체지방 감소 개선 효능	○ 3T3-L1 cell (지방전구세포) 모델에서 Adipogenesis (지방생성), lipid accumulation (지방	• 3T3-L1 지방 전구 세포에서 콩 유래이소플라본 및 그 대사체 들 중 오로볼 (20 uM) 가장 높은 지방 축적 억제 효능을 나타냄.

평가	축적) 등의 지표를 분석하여 세포 수준에서의 오로볼의 효능을 탐색.	  • 395개의 kinases 들 중 오로볼이 CK1ε kinase 활성을 잘 저해하는 것으로 확인함.  • CK1ε의 기질로 알려져있는 4E-BP1의 인산화를 억제함을 확인함.  • 지방생성의 조절인자인 PPARɣ, C/EBPα의 protein expression level을 감소시키는 것을 확인

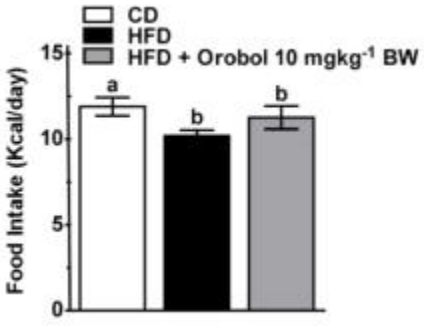
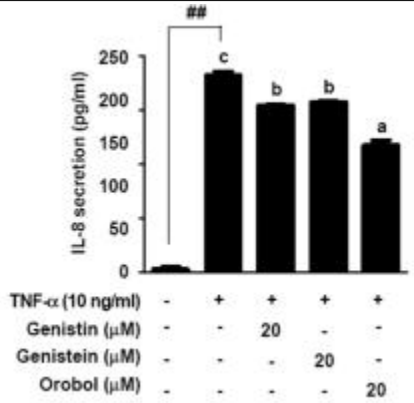
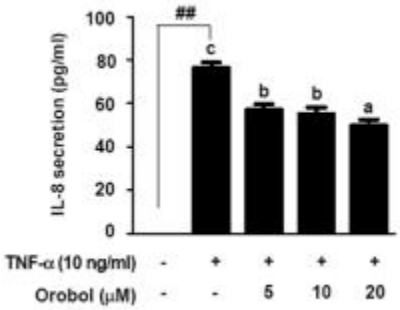
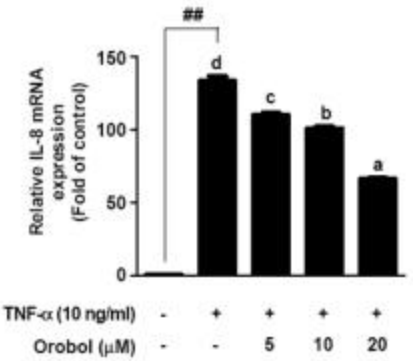
		함.
동물 모델을 활용한 오로볼의 체지방 감소 심화 효능 규명	○ 세포주 효능 확인 이후, 전임상 단계인 동물모델을 통해 오로볼의 체지방 감소 효능 과학적인 효능 심화 평가를 수행.	 • 23주간 고지방 식이를 섭취한 비만 유도 마우스(C57BL/6J, Male, 5-week-old)에서 고지방식이 + 오로볼(10 mg/kg body weight (BW)/day) 그룹에서 육안상으로도 고지방식이 그룹에 비해 지방 축적이 줄었음.  • 고지방식이 그룹은 control 그룹 대비 평균 30.5 %의 체중 증가량을 보였으나, 고지방식이 + 오로볼 그룹은 17.3 %의 체중 증가량을 보여 오로볼의 체중 증가 억제 효능을 확인할 수 있었음. 

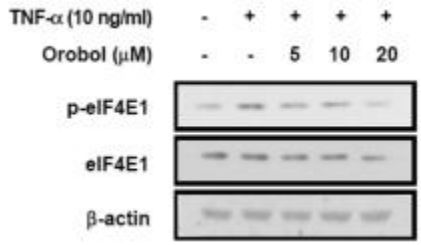




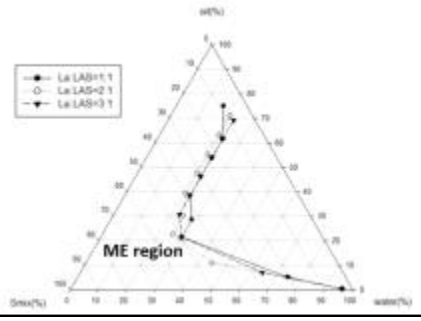


- 고지방식이+오로볼 그룹은 고지방식이 그룹에 비해 내장 지방계 무게(epididymal, retroperitoneal, perirenal fat), 피하 지방 무게가 감소한 것을 확인하였음.

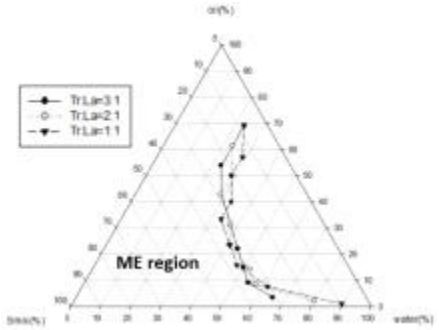
		 • 고지방식이 그룹과 고지방식이+오로볼 그룹의 사료 섭취량은 유의적으로 차이가 없었음.
세포주 모델을 활용한 오로볼의 장건강 개선 효능 규명	○ 장건강 개선 효능 탐색을 위해 HT-29 대장 유래 세포 모델에서 Inflammatory Cytokine (IL-8) 등의 지표를 분석하여 염증 완화 조절을 통한 장건강 개선 효능을 탐색.	   • 오로볼이 장건강 개선 효능의 바이오 마커인 IL-8 secretion에 대해 Genistin, Genistein 보다 더 좋은 효능을 보임.

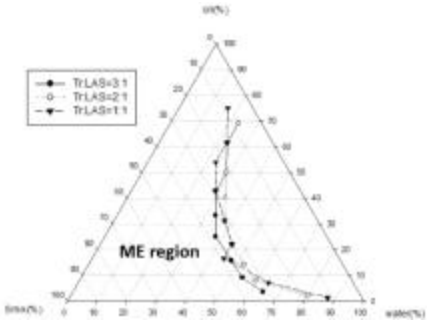
<table>
<tr>
<td></td>
<td></td>
<td>


• 오로볼은 염증성 물질인 IL-8의 조절인자로 알려져있는 eIF4E의 protein expression level을 억제하는 것을 확인함.
</td>
</tr>
<tr>
<td>오로볼
소재 적용
제형 개발</td>
<td>○ 물에 잘 녹지 않는 난용성 물질인 오로볼을 흡수력 및 안정성을 증대시킨 최적 제형을 도출하였음.</td>
<td>
<table>
<tr><th>Phase</th><th>Vehicle</th><th>Solubility (mg/ml)</th></tr>
<tr><td>Oil</td><td>MCT</td><td>0.97</td></tr>
<tr><td></td><td>Labrafac CC</td><td>0.74</td></tr>
<tr><td></td><td>Capmul MCM EP</td><td>9.51</td></tr>
<tr><td></td><td>Olive oil</td><td>1.19</td></tr>
<tr><td></td><td>Miglyol</td><td>1.05</td></tr>
<tr><td>Surfactant</td><td>Tween 20</td><td>13.69</td></tr>
<tr><td></td><td>Tween 80</td><td>28.65</td></tr>
<tr><td></td><td>Labrasol</td><td>51.22</td></tr>
<tr><td></td><td>Propanediol</td><td>16.82</td></tr>
<tr><td></td><td>1,3 BG</td><td>3.65</td></tr>
<tr><td></td><td>LAS</td><td>50.89</td></tr>
<tr><td></td><td>PEG</td><td>31.42</td></tr>
<tr><td></td><td>Transcutol</td><td>88.93</td></tr>
</table>

• - 용해도 테스트 결과 가장 용해도가 좋았던 오일은 Capmul MCM EP, 계면활성제 후보는 Transcutol, Labrasol, LAS를 선정함.


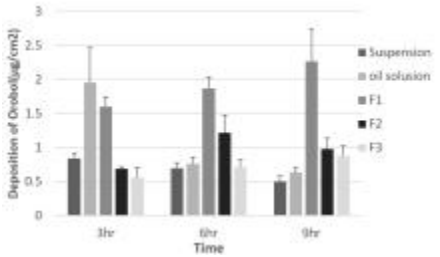
</td>
</tr>
</table>





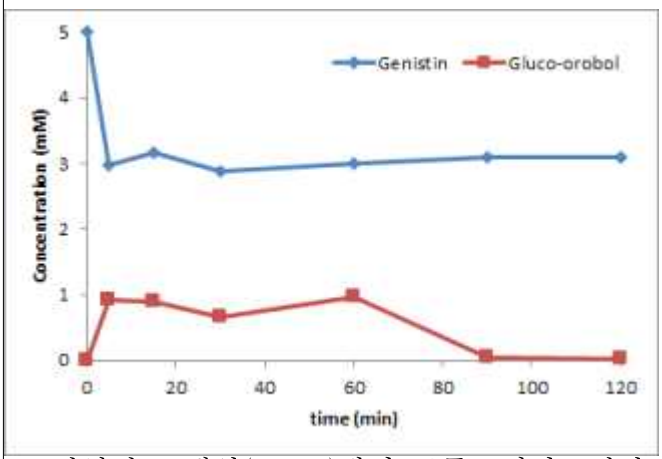
- 계면활성제 후보 중 두 가지 조합에 대해서 1:1, 2:1, 3:1 비율로 Pseudo-ternary diagram을 제작함. LAS와 Labrasol의 경우 계면활성제의 비율을 높여야만 안정한 마이크로 에멀전이 형성됨을 보임. 따라서 주계면활성제로 Transcutol을 선정하고, 사이즈 측정을 통해 보조계면활성제를 Labrasol로 설정함.

Phase	vehicle	F1 ME	F2 ME	F3 ME
Oil	Capmul MCM	20	20	20
Surfactant	Transcutol	28.7	28.7	32.25
	Labrasol	14.3	-	10.75
	LAS	-	14.3	-
Water	Distilled water	37	37	37



- 비율을 다르게 하여 F1, F2, F3의 제형을 표와 같이 제작한 뒤, 피부 흡수력을 비교함. 마이크로에멀전 이외에도 물과 Capmul MCM에 오로볼을 녹인 제형의 흡수력을 비교함. 시간이 지날수록 마이크로 에멀전의 흡수력이

		높아졌으며, 9시간에서 F1의 흡수량이 최대로, 2.27ug/cm2이 흡수되었음. 따라서 마이크로에멀전으로 오로볼의 일반 제형에 비해 피부 흡수력을 증가시켰으며, 최적 제형은 Capmul MCM을 오일로, Transcutol과 Labrasol(2:1)을 계면활성제로, 전체 오일과 계면활성제, 물의 비율이 20:43:37으로 나타났음.

연구범위	연구수행방법 (이론적, 실험적 접근방법)	연구결과
2차년도		
글루코제니스테인을 이용한 새로운 대량 생산 방법 개발	○ 글루코제니스테인 기질로부터 글루코 오로볼을 대량 생산하기 위하여 1mM~이상의 스케일에서 반응 진행 ○ 글루코제니스테인 용해도 향상을 위하여 co-solvent 반응계 구축 준비	• 기질인 제니스테인의 낮은 수용성으로 인하여 초기 고농도(>11mM) 이상의 반응이 제한되었음. 따라서 이를 극복하기 위해 제니스테인에 포도당이 결합하여 수용성이 향상된 글루코 제니스테인을 활용하여 고농도 반응을 진행하고자 함. • 전년도 결과에서 글루코제니스테인의 반응용액상에서의 기질 용해도를 수용성 고분자 사용으로 향상 시켰으나, ~200μM 이하로 반응 농도 목표치 미만임.  • 실험실 스케일(~5mL)에서 글루코제니스테인의 효소 이용 수산화 전환 반응을 아스코르브산 10mM 동시 첨가하여 진행하였으며, 5mM 반응에서 60분 반응하여 1mM의 글루코 오로볼 생산할 수 있음 확인하였음. 반응시간 추가될수록 글루코 오로볼 산화되어 사라짐 확인함. 120분 이후엔 생산된 전량 산화되어 멜라닌화 됨.

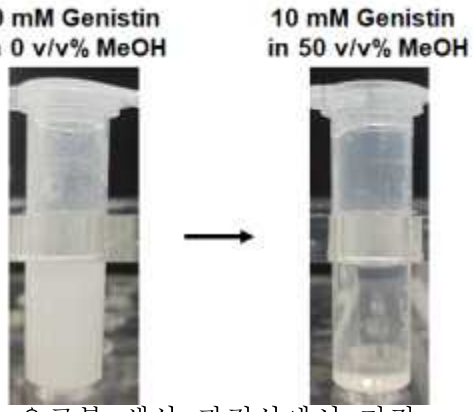
- 글루코제니스테인의 logP 값이 0.9로 대부분 유기용매보다는 값이 낮지만, 물의 logP 값에 비하여 높기 때문에 용해도가 뛰어나지 않음. 따라서 물에 용해성이 좋은 유기용매를 스크리닝하여 co-solvent로 사용하고자 하였음.

Solvent	Dipole moment (D)	
Polar aprotic solvents		
ethyl acetate (EtOAc)	1.78 D	**biphasic 반응성 감소 30%**
acetone	2.88 D	**20% in 10 min**
acetonitrile (MeCN)	3.92 D	**20% in 10 min**
Polar protic solvents		
n-butanol	1.63 D	**biphasic 반응성 감소 30%**
isopropanol (IPA)	1.66 D	bad 20% 에서 반응성 감소 EtOH와 비슷
ethanol (EtOH)	1.69 D	**bad 10% EtOH에 수용성 낮음**
methanol (MeOH)	1.70 D	**50% in 30 min**

- 기질의 용해도 향상에 앞서서 효소가 활성을 잃지 않고 안정한 용매를 찾아야하기 때문에, Non-polar solvent 7종, polar aprotic solvent 8종, polar protic solvent 8종에 대하여 효소의 안정성 테스트 진행함.

Solvent	Dielectric constant	Density	Dipole moment (D)
Non-polar solvents			
Hexane	2	0.655 g/mL	0.00 D
benzene	2.3	0.879 g/ml	0.00 D
toluene	2.4	0.867 g/mL	0.36 D
1,4-dioxane	2.3	1.033 g/mL	0.45 D
chloroform	4.8	1.498 g/mL	1.04 D
diethyl ether	4.3	0.713 g/mL	1.15 D
dichloromethane (DCM)	9.1	1.3266 g/mL	1.60 D
Polar aprotic solvents			
N-methylpyrrolidone	32.2	1.028 g/mL	4.1 D
tetrahydrofuran (THF)	7.5	0.886 g/mL	1.75 D
ethyl acetate (EtOAc)	6	0.894 g/mL	1.78 D
acetone	21	0.786 g/mL	2.88 D
dimethylformamide (DMF)	38	0.944 g/mL	3.82 D
acetonitrile (MeCN)	37	0.786 g/mL	3.92 D
dimethyl sulfoxide (DMSO)	47	1.092 g/mL	3.96 D
propylene carbonate (PC)	64	1.205 g/mL	4.90 D
Polar protic solvents			
formic acid	58	1.21 g/mL	1.41 D
n-butanol	18	0.810 g/mL	1.63 D
isopropanol (IPA)	18	0.785 g/mL	1.66 D
nitromethane	35.87	1.1371 g/mL	3.56 D
ethanol (EtOH)	24.55	0.789 g/mL	1.69 D
methanol (MeOH)	33	0.791 g/mL	1.70 D
Acetic acid (AcOH)	6.2	1.049 g/mL	1.74 D
Water	80	1.000 g/mL	1.85 D

- polar aprotic solvent 3종 (ethyl acetate / aceetone / acetonitrile), polar protic solvent 4종 (n-butanol / isopropanol / ethanol / methanol)의 20% cosolvent에서 효소의 활성 확인 하였으며, methanol 80% co-solvent에서 효소의 활성 50% 유지하여 가장 좋은 후보로 선정함. methanol 50%에서 글루코제니스테인 10mM 완전히 용해됨 확인 완료하였음.

		 • 기존 오로볼 생산 과정상에서 기질 - 산물 분리를위한 분리 정제 공정에서는 두 물질간의 화학 구조 차이를 이용한 용해도 차 형성으로 진행함. • 화학 구조를 이용한 붕소산 분리 방법은 다이올 구조의 배위 결합을 이용하였음. 그러나 글루코제니스테인의 경우 기본적으로 포도당에 다이올 그룹을 가지고 있기 때문에 기질 주입 단계에서부터 붕소산 배위 결합을 형성함. • 따라서 분리 정제 과정 단계에서 새로운 과정이 필요하여 다양한 유기 용매를 사용하면서 용매 비율을 조정(1:1/1:4/1:10)하여 분리 정제 시도하였음. • prep HPLC 이용한 물질의 소량 분리 가능함 확인하였고, 분리 정제 수율 및 분리 정제 물질의 순도 확인 진행중임.
오로볼의 대량 생산 및 분리/정제 기술 발전	○ 톤스케일 대량 생산을 위한 파일럿 스케일에서의 대량 생산 재 확인 및 대량 생산 위한 세부 수치 조정 및 개량 진행	• 오로볼 소재의 상업화를 위하여 톤 스케일에서의 대량 생산을 위한 파일럿 스케일 생산에서의 생산 최적화 및 매개 변수 수정 진행함. (재)춘천바이오산업진흥원에서 보유한 반응기를 활용하여 400L 파일럿 스케일(500L 발효기) 생산 최적화 진행 하였음. • 효소 생산 재조합 균주의 초기 실험실 스케일의 4ml 배양 성장 최적화 시간을 18시간, 400ml 배양 성장 최적화 시간을 24시간 이내로, 40L 실배양 시간 15~18시간으로 하였을 때, 목표 O.D.인 8 이상 도달 하였음. 배양된 세포량의 최대치는

O.D. 13.52임.

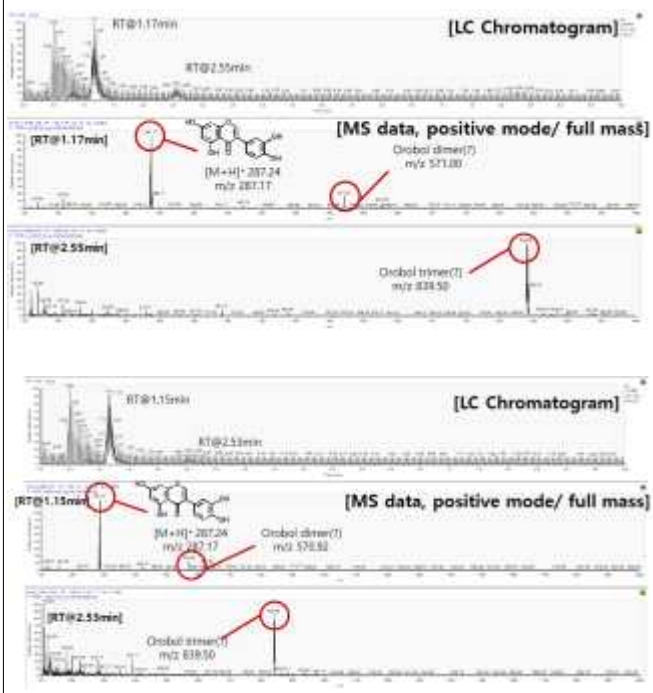
<40L 세포 배양 최적화 후 원심분리>

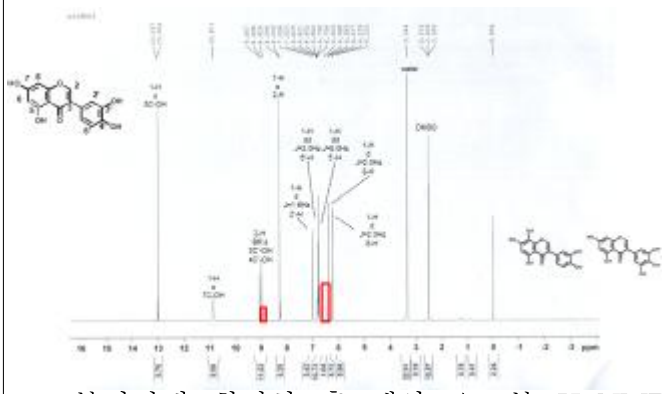
- 또한, 배양액 구성물 중 2가 이온(Mg. Cu)들의 경우 121℃ 고온 고압 배지 멸균 시 phosphate group과 결합하여 침전물 형성하였고, 이에 따라 세포 성장 크게 저하됨 확인함. 따라서 배지 제조 시 유의사항으로 2가 이온을 분리하여 멸균 진행 함.

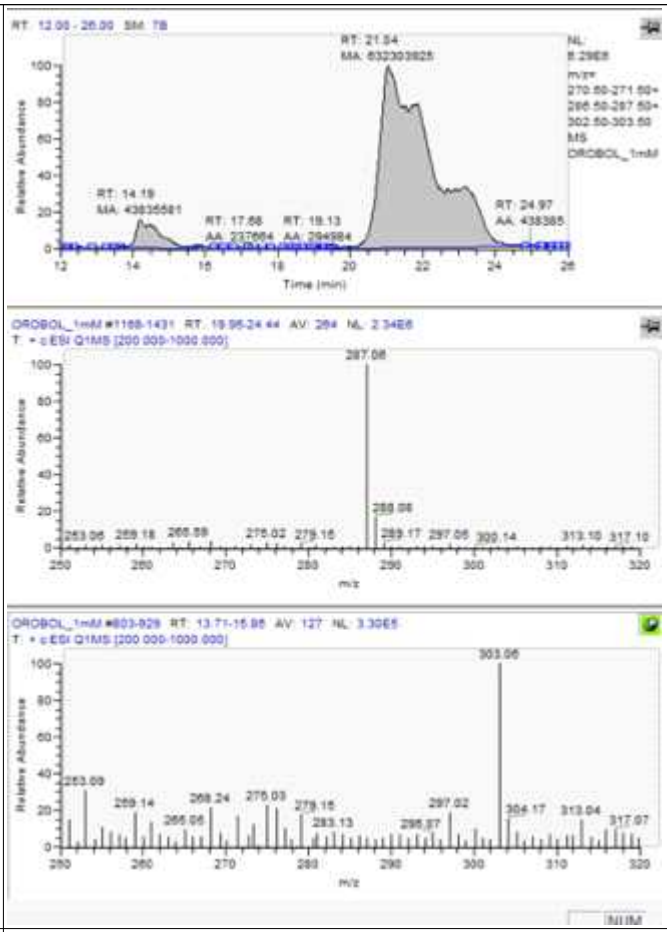
- 오로볼 생산 후 반응액에서 산물 분리 정제 시 산처리 후 ~20시간 침전으로 분리 정제 진행하게 됨. 이후 원심분리로 침전물 분리하고, 중화함.

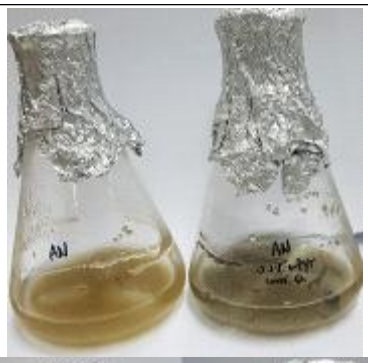
- 오로볼의 logP 값은 2.3으로 매우 hydrophobic함. 원심 분리된 산물들은 hydrophobic interaction에 의하여 packing 되어있음. 따라서 중화 위해서 물에 분산 시킬 시 particle이 분리됨.

<homogenizer 이용한 분리 정제 과정>

		• 이때 homogenizer 이용하여 물질 분리하게 될 경우, particle size가 작아짐으로써 차후 원심 분리 과정에서 hydrophobic interaction에 의한 packing이 힘들어지고, 분리 정제 과정 상 추가 시간 소요하게 됨. • 분리 정제 과정 상 pH 6 이상에서 산물이 물에 분산된 시간이 8~10시간 이상이 될 경우, 1.2kg 최종 산물의 20~30%가량이 공기 중 자연 산화됨 확인하여, 원심 분리 시간 최적화 진행함. <공기중 자연산화로 인해 갈변된 오로볼>  <오로볼 갈변 부분 LC-MS 분석 결과> • 갈변 오로볼 분석 결과, orobol의 polymer의

		mass 값이 검출되었고, 멜라닌으로 자연 산화 했음을 알 수 있음. • Stoke's의 법칙에 의하면. 입자 침강 속도는 입자 직경 제곱에 비례하며, 입자 종말 속도가 커져 원심 분리 효율을 높이기 위해선 입자와 액체의 밀도차가 비례하며, 액체 점도가 반비례함. • 따라서 분리 정제 과정의 원심 분리 효율을 높이기 위해 반응물 1.2kg로부터 최적의 용액 분산물 부피를 최적화 하였으며. 반응용액 부피의 1/10~3/40 부피 용액으로 분리 정제 진행시에 정제 효율 ~95%로 향상 및 분리 정제 시간 6시간으로 절감 가능하였음. <분리 정제 최적화 완료 후 최종 산물> <분리정제 최적화 후 생산 오로볼 LC-MS 분석>  <분리정제 최적화 후 생산 오로볼 H-NMR 분석>

		
A.oryzae tyrosinase 또는 A.bisporus tyrosinase 추출 연구	○ Aspergillus oryzae 및 Aspergillus niger tyrosinase 추출 및 효소 활성 테스트 ○ Aspergillus oryzae, Aspergillus niger에서 생산된 tyrosinase의 cell 분획, supernatant 분획으로 나누어 활성 비교	• 오로볼 소재의 식품 적용을 위하여 안전성이 검증된 GRAS 미생물로부터 tyrosinase를 생산하여 오로볼 생산 공정에 도입하고자 함. 된장 발효, 차 발효에 널리 쓰이는 대표적 GRAS 균주 중 fungi에 속하는 Aspergillus 종 곰팡이 2종의 효소를 생산함 • 일반적으로 fungi 성장에 집중하여 세포를 대량 생산할 수 있는 complex 배지 중 대표적인 potato dextrose agar에서 효소 활성 테스트함. • 50mL에서 6일 세포 배양 후 tyrosinase 활성 확인하였으나 유의미한 활성을 나타내지 않았음. • 따라서 성장에 최소로 필요한 영양만 공급하는 최소 배지를 사용하여 생산하였으며, vogel's media에서 6일 배양 후 tyrosinase 활성 확인함. <Aspergillus niger tyrosinase 발현> <Aspergillus oryzae tyrosinase 발현>



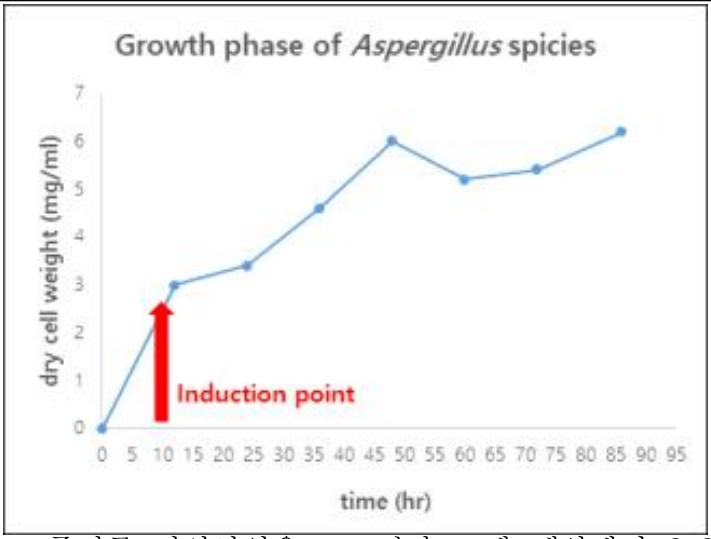
- fungi는 enzyme을 세포 외부로 잘 분비하는 미생물로 잘 알려져 있음. 따라서 오로볼의 생산에 관련된 효소는 cell 내부에도 존재할 수 있으나 cell 외부로 분비될 수 있기 때문에 제니스테인의 효소 전환에 관여 효소가 어느 분획에 더 다량 함유 되어있는지 비교 필요함.

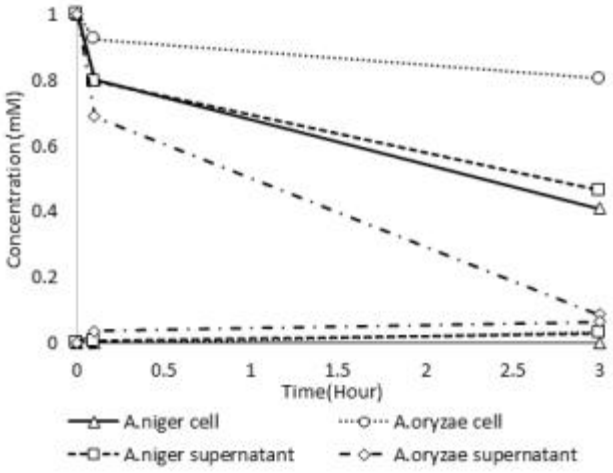
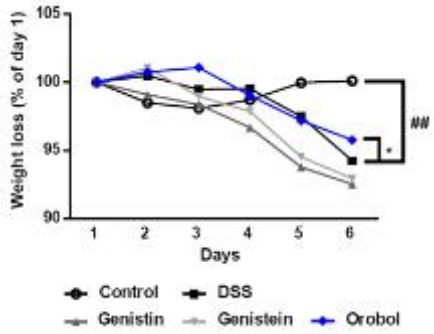
- 생산된 Aspergillus 2종의 효소를 각각 cell 분획, supernatant 분획으로 나누어 모음. cell 분획은 sonication으로 cell 외벽을 파괴하여 정제 하였으며, supernatant 분획은 10k ultracentrifuge filter 사용하여 초기 부피 50ml에서 500μl로 100배 농축함

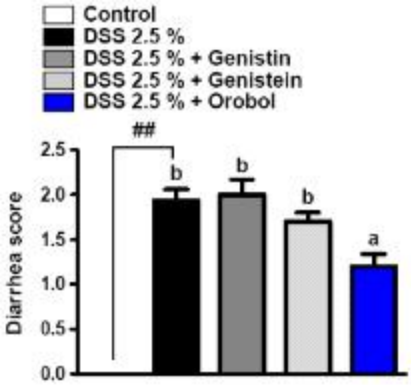
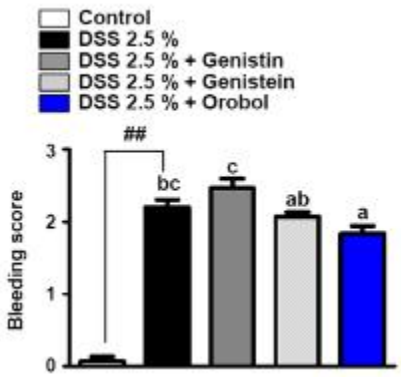
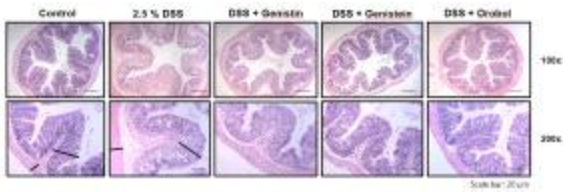
- pH 5~6에서 tyrosine의 melanin 전환 반응으로 tyrosinase activity를 확인 할 수 있었음

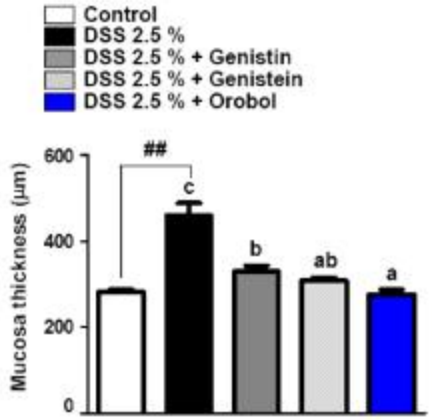
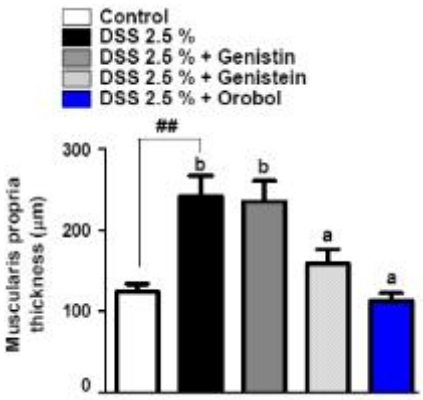
- 배지에 inducer를 투입할 경우 tyrosinase 유전자가 inducer에 의해 발현량이 증가하여 결과적으로 효소 발현량이 증대됨.

- 일반적으로 세포를 exponetial phase에서 inducing 하기 때문에 Aspergillus에서 해당 성장

		 주기를 파악하였음. 그 결과 고체 배양에서 2x2 size 1 colony를 50mL 액체 배양할 경우 16~24시간 사이에서 dry cell weight 2~3mg/ml 일때가 early exponential phase로 판단됨.
GRAS 미생물을 이용한 오로볼 생산 연구	○ Aspergillus oryzse 및 Aspergillus niger tyrosinase로 오로볼 생산 테스트	• 재조합 대장균을 사용한 반응에 필요한 붕소산, 아스코르빅 산을 제외하였을 때 제니스테인으로부터 오로볼 생산을 기질 1mM. 부피 1mL 실험실 스케일 반응을 진행함 • 식품에 실제 fungi 적용 시 reaction stop이 중요한 요소임. 식품으로부터 효소 혹은 세포만을 따로 분리할 수 없음. 제니스테인의 수산화 반응을 멈출 수 없다면 오로볼이 멜라닌화 되어 산화됨. 따라서 반응 중단 매개물로 아스코르빅산이 필수임. • 이에따라 아스코르빅산 사용시 제니스테인으로부터 오로볼 생산을 기질 1mM. 부피 1ml 실험실 스케일에서 Aspergillus 2종 효소를 각각 cell 분획, supernatant 분획으로 나누어 실험 진행하였고, 생산량을 HPLC로 확인함. • Aspergillus oryzae의 경우 cell fraction 생산 수율 3.21% supernatant 생산 수율 6.6% Aspergillus niger의 경우 cell fraction 생산 수율 2.67% supernatant 생산 수율 3.06%

		로 나타남.  • 향후 GRAS 균주 이용 대량 생산 시에 Aspergillus 균주의 세포 외부로 효소 분비 됨 이용하여 생산 진행 • 또한 생산 수율이 높은 Aspergillus oryzae 이용
오로볼의 장염 증세 완화 효능 평가	○ 7주령 수컷 C57BL/6J mice에 7일간 매일 오로볼을 경구투여 후, 이후 6일간 2.5% dextran sodium sulfate(DSS)를 음용수로 공급하여 장염을 유도함. 체중 손실 (body weight loss), 설사 (diarrhea score), 혈변 (bleeding score)을 비교함.	• DSS 음용에 의해 유발되는 장염 증세에 대해 오로볼은 다른 이소플라본 소재인 제니스틴, 제니스테인에 비해 우수한 완화 효과를 보였음.  • DSS 음용에 의해 체중이 감소하였으며 오로볼 투여에 의해 DSS에 의한 체중 손실 정도가 완화되었고 다른 이소플라본류인 제니스틴, 제니스테인은 체중 손실을 완화하지 못함.

		 • DSS 음용으로 설사가 유발되었으며 오로볼 투여로 DSS에 의한 설사가 유의적으로 완화되었고 제니스틴, 제니스테인은 설사를 완화하지 못함.  • DSS에 의해 혈변이 유발되었으며 오로볼 투여로 DSS에 의한 혈변이 유의적으로 완화되었고 제니스틴, 제니스테인은 혈변을 완화하지 못함.
오로볼의 장 조직 손상 완화 효능 평가	○ 7주령 수컷 C57BL/6J mice에 7일간 매일 오로볼을 경구투여 후, 이후 6일간 2.5% destran sodium sulfate(DSS)를 음용수로 공급하여 장염을 유도함. 장 점막 두께 (mucosa thickness), 장 근육층 두께(muscularis propria thickness)를 비교함.	• 오로볼은 다른 이소플라본 소재 제니스틴, 제니스테인에 비해 DSS에 의해 유발되는 대장 조직 손상 완화 효과를 보였음.  • 대장 조직의 단면을 관찰한 결과 DSS 처리군에서 조직 붕괴를 확인하였으며 조직 손상 정도를 파악하기 위해 장 점막 및 장 근육층 두께를 측정하였음.

		 • DSS에 의한 장 점막의 손상이 오로볼에 의해 완전히 억제되었으며 제니스틴, 제니스테인보다 그 억제 효능이 우수함.  • DSS에 의한 장 근육층 손상이 오로볼에 의해 완전히 억제되었음.
오로볼 소재 함유 시제품 개발	○ 오로볼 소재를 함유하는 화장품 시제품을 3건 개발함.	 • 오로볼 소재를 함유하는 리아에스엔유 지부티크 아이디얼밸런서(사진 좌-전면, 우-후면)를 개발함.

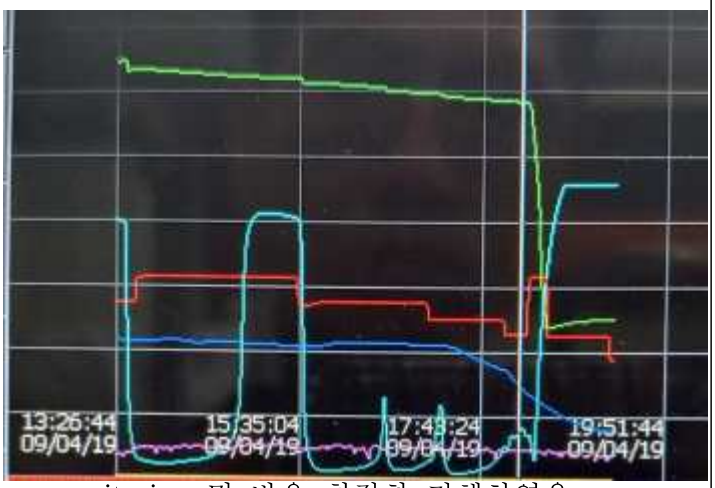
- 오로볼 소재를 함유하는 리아에스엔유 지부티크 컨투어세럼(사진 좌-전면, 우-후면)을 개발함.

- 오로볼 소재를 함유하는 리아에스엔유 지부티크 컨투어크림(사진 좌-전면, 우-후면)을 개발함.

- 시제품과 함께 시제품별로 적합한 용기를 개발하였으며 좌측부터 차례로 아이디얼밸런서, 컨투어세럼, 컨투어크림의 실물 용기 전면 사진에 해당함.

연구범위	연구수행방법 (이론적, 실험적 접근방법)	연구결과
3차년도		
오로볼의 대량 생산 및 분리/정제 기술 발전 - 소재 대량 생산 기업과의 연계를 통한 표준 생산 공정 확보	○ 오로볼 소재 대량생산 위한 생산기업과의 피드백을 통한 생산 공정 표준화	• 오로볼의 식품 또는 화장품원료 제품화를 이루고자 소재 대량생산 기술 피드백 및 발전을 바이오 기술 scale-up 전문 기업인 ㈜빔스바이오와 진행함. • Small scale(100ml)에서부터 산업화 스케일(400L)까지의 공정 표준화를 위하여 다양한 실험 요건에 대하여 분석 및 생산 실험 진행함. • 기존 구축되어있던 생산 공정에서, 세포 발현 및 정제 단계부터 시작하여 최종 생산까지의 모든 공정 과정을 대상으로 최적화 및 표준화 목표로 연구 진행함. • 생산 효소 발현 세포(*E.coli* BL21_pET28a::*Bacillus megaterium* tyrosinase)의 발현 및 배양후 wet cell 회수 후 세척시 효소 안정성 증대 위한 CuSO4 1mM 투입 진행함. • 세포 파쇄시 재조합 효소 안정성 위한 분산 버퍼 조성 최적화 진행함. 50mM Tris(pH8), 150mM NaCl, CuSO4 1mM • 실험실 수준 100ml 스케일에서 먼저 agitation speed 따른 반응 양상, 최소 enzyme 투입 위한 cell extract 투입량 따른 반응 양상 확인, 분리 정제 공정 최적화 진행함. • 이후 4L 실험실 스케일로 스케일 업 하여 효소 final OD, DO level, 초기 기질 반응 농도, 기질

용해 용매 조절 등 다양한 factor들에 대하여



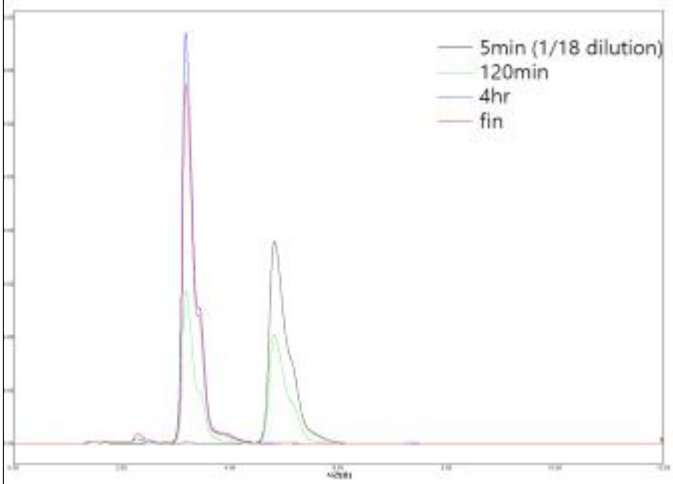
monitoring 및 반응 최적화 진행하였음.

- 반응 5L 규모로 DO 20~25% 유지
  효소는 반응 3시간 기준 완결조건 투입량인 final OD 0.45
  반응 시간 1, 2, 3, 4 시간 시료 채취하여
  Scale down 반응 공정 검증 진행하였음.

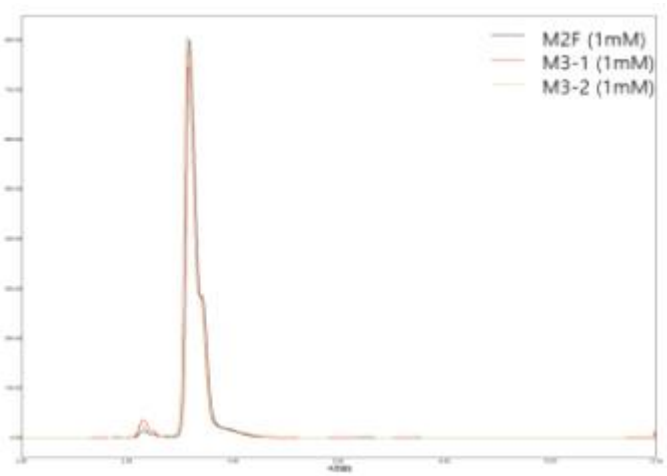
- 반응 진행 결과 pH 변화는 반응 전환율 모니터링, DO는 반응 종료 시점 판단에 유용한 것으로 밝혀짐.

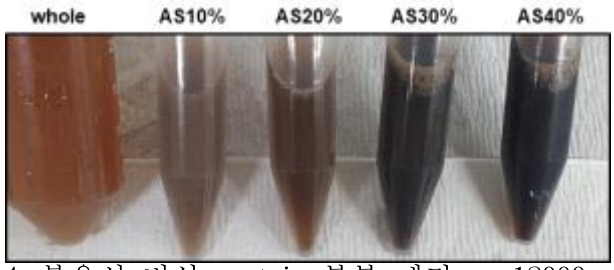
- 기질 농도 2, 3배(3, 6, 9g/L)의 반응 회수율은 90%이상으로 되었으나, 과반응에 의한 회수물 산화로 최종 수율 감소로 판단함.

- 최종 반응 조건

		 1. 반응 부피 120L 이상 2. 기질 농도 4.5g/L 3. 기질 용해 용매(DMSO) 15ml/L 4. CuSO4 1mM 5. Ascorbic acid 3g/L 반응 종료 시점 - DO level 상승 전 및 pH 8.6~8.7 전후 종료 후 30도 이하에서 산소 차단 20도 이하 냉각 후 반출하여 PE드럼에서 염산 교반 의 공정 표준화 진행함.
	○ 오로볼의 대량 생산 및 분리/정제 기술 발전 - 소재 대량 생산 기업과의 위한 생산기업과의 연계를 통한 분리/정제 공정 표준화	• 생산 반응 최적화와 동시에 오로볼 최종 분말 산물 얻기 위한 분리 정제 공정 피드백 및 최적화 진행함. • 반응 종료 후 필요 공정 1. 불용분 (미반응물, 부반응물) 여과로 제거 2. UFDF로 효소 및 엔도톡신 제거

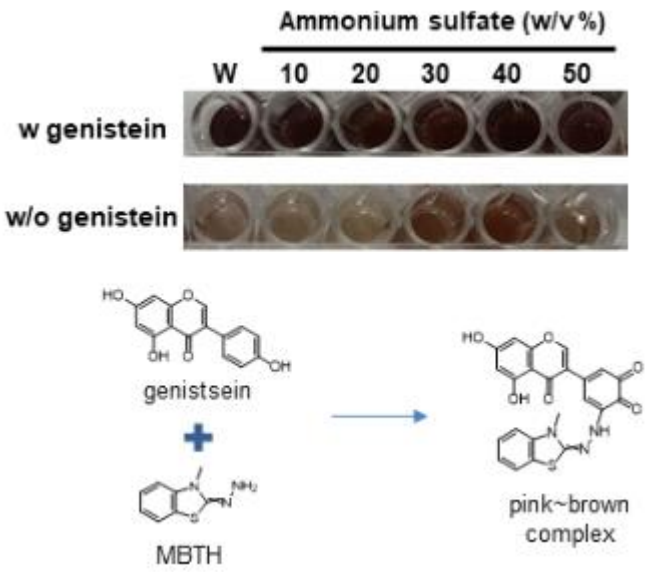
		3. 염산 투입하여 오로볼 생성 4. 오로볼 침전 회수 - EA 용매 추출 공정 추가 • 반응 종결 후 PE 드럼에서 염산투입교반 (pH4 이하 유지) 하여 침전 성장 후 필터카트리지로 여과하여 침전회수(celite) • Flter press 장비 이용하여 침전여과 가능할것으로 판단되어 필터 하우징 카트리지 메쉬망으로 celite를 여과 보조제 사용하여 침전 회수 진행함. • 이후 증류수 연속세척하여 탈수 및 wet cake 침전회수 • 회수 sample 증류수 재분산 후 EA 추출 공정 추가함. • 최종 분말 제품 제조를 위한 질소 커튼 하 건조 조건 수립 및 동결 건조 진행 함. • EA 재사용 위한 EA 감압증류 공정 추가 • EA 추출 정제 lot의 최종 회수율 = 94%(673g) Freeze drying 처리 시 회수율 = 98%(702g)로 최적화 진행됨.

		 • 정제 이후 변색 시료에 대해서는 에탄올 용해 후 공비 증류 통한 분말 정제품 최종으로 얻을 수 있었음. 불용분 손실률 = 15~20% • 대량 생산 및 분리 정제 공정 최종 완료 후 1.238kg 오로볼 생산 완료 - Lot#1(M2) 497g: FD시료 에탄올 재용해 처리 - Lot#2(M3외) 741g: EA 추출 정제 시료 통합
A. oryzae tyrosinase 또는 *A.bisporus* tyrosinase 대량 추출을 위한 최적화 연구	○ 시중에서 판매 중인 양송이 버섯(*A.bisporus*) 유래 tyrosinase 대량 추출 방법 표준화 ○ 추출 효소의 추출 파쇄 버퍼 상에서의	• A.bisporus tyrosinase 효소 대량 추출 과정 1. 양송이 버섯 1g/50mM Tris 버퍼(pH8) 2ml로 믹서기로 3분 2. 불용성 버섯 debris 제거 - 4000rpm, 10분 centrifuge 3. Ammonium sulfate 침전법 도입 - 2의 상등액에 Ammoium sulfate 10%(w/v) 투입

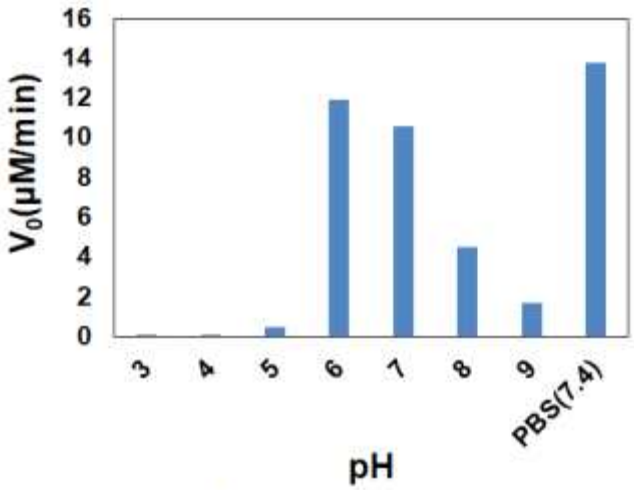
<table>
<tr>
<td></td>
<td>효소활성 유지 테스트 및 순수 기질에 대한 반응성 및 수율 테스트 진행</td>
<td>


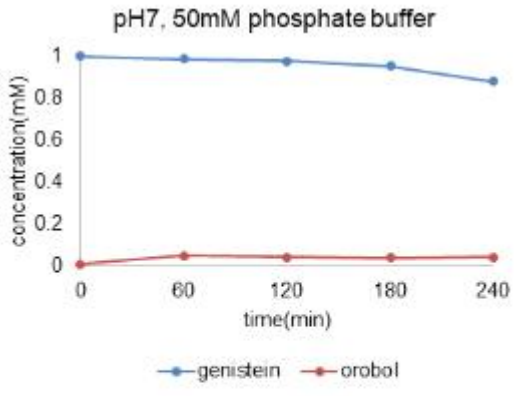
4. 불용성 버섯 protein 부분 제거 - 18000rpm, 20분 centrifuge
5. pellet은 기존 상등액 volume의 1/10으로 50mM Tris 버퍼(pH8)에 resuspension
6. 상등액에 다시 Ammonium sulfate 10%(w/v) 투입하여 과정 3~4 반복

• 이후 버섯으로부터 추출한 효소의 활성을 tyrosine 및 genitstein의 melanin 발색반응을 통하여 확인함.



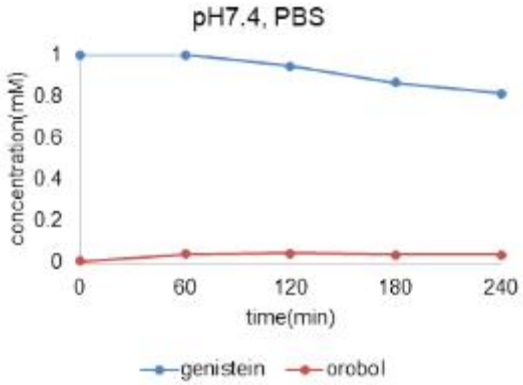
• 모든 fraction에서 tyrosinase 및 산화환원 효소 활성 확인함.
</td>
</tr>
</table>

		• Ammonium sulfate 30, 40% fraction에서 가장 좋은 활성을 가져 생산 공정에 사용될 효소로 선정함.
A. oryzae 또는 *A. bisporus tyrosinase* 식품 첨가물 등재 가능성을 보기위한 안정성 테스트 진행	○ 1단계 - A. bisporus에서 추출된 순수 정제 효소의 식용 버퍼에서의 효소 최적 활성 확인 및 기질에 대한 생전환 테스트 ○ 2단계 - A. bisporus에서 추출된 순수 정제 효소와 순수 기질간의 오로볼 생전환 테스트	• 기존 사용하던 Tris- 버퍼 시스템에서 식품 첨가물 등재를 위해 식약처 고시 산도 조절제 목록 중 phosphate 버퍼 시스템 선정함. • 위 버퍼 시스템에서도 버섯 효소의 최적 활성이 유지 되는지 알아보기 위하여 다양한 pH에서의 효소 활성 assay 진행함. • 1차로 실험실 스케일의 효소 특성 파악에서는 시중에 판매되는 정제된 순수 양송이 버섯 효소를 사용하여 반응 진행함. • 그 결과, phosphate buffer system에서 pH 6~7.4의 생리활성 pH와 유사한 영역대에서 효소 활성이 가장 최적인 것을 확인함.  pH 3, 4, 5 50mM sodium citrate, 37℃ pH 6, 7 50mM sodium phosphate, 37℃ pH 8, 9 50mM Tris-HCl, 37℃ pH 7.4 PBS, 37℃ [Ab_Ty] = 5U/ml [L-tyrosine] = 1mM [Cu^{2+}] = 100μM • 생리 활성 pH와 가장 유사한 pH 7, 7.4 버퍼 시스템에서의 순수 정제 기질로부터 오로볼 생전환 테스트를 진행함.



conversion yield = 5.2%

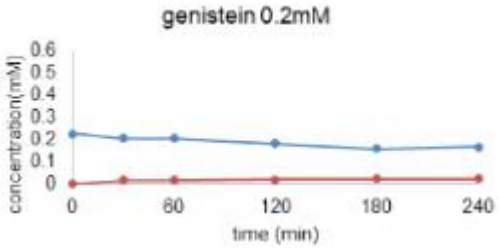
pH 7.50mM sodium phosphate, 37℃
[Ab_Ty] = 5U/ml
[genistein] = 1mM
[Cu^{2+}] = 100μM
[Ascorbic acid] = 2mM



conversion yield = 4.5%

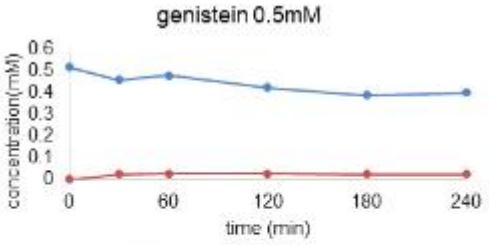
pH 7.4 PBS, 37℃
[Ab_Ty] = 5U/ml
[genistein] = 1mM
[Cu^{2+}] = 100μM
[Ascorbic acid] = 2mM

- 두 개의 반응 pH에서의 오로볼 생전환 결과, 각각 전환 수율 5.2%, 4.5%를 나타냄.
- 이후 기질 농도 조절 및 효소 사용량 조절을 통해 전환 수율을 높이고자 함.
- 기질 및 효소 사용량 최적화 결과, 약 10%로 초기 대비 2배의 오로볼 전환 수율을 나타낼 수 있었음.



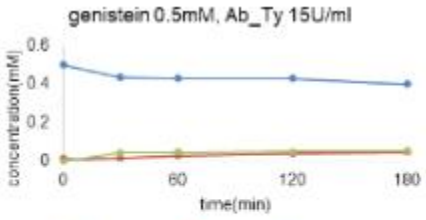
conversion yield = 11.5%

pH 7.50mM sodium phosphate, 37℃
[Ab_Ty] = 5U/ml
[genistein] = 0.2mM
[Cu^{2+}] = 100μM
[Ascorbic acid] = 2mM



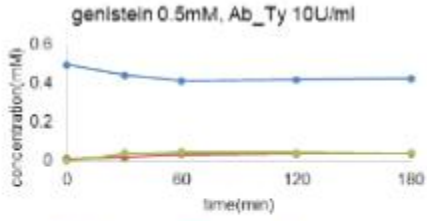
conversion yield = 5.4%

pH 7.50mM sodium phosphate, 37℃
[Ab_Ty] = 5U/ml
[genistein] = 0.5mM
[Cu^{2+}] = 100μM
[Ascorbic acid] = 2mM



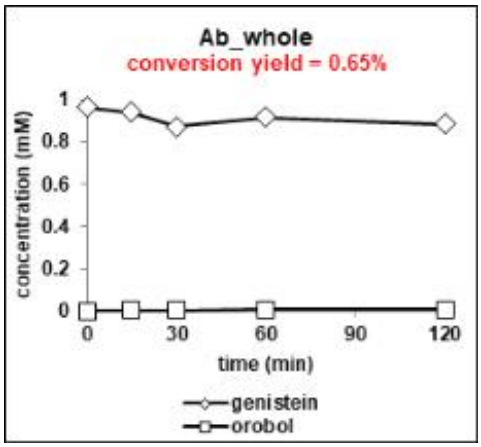
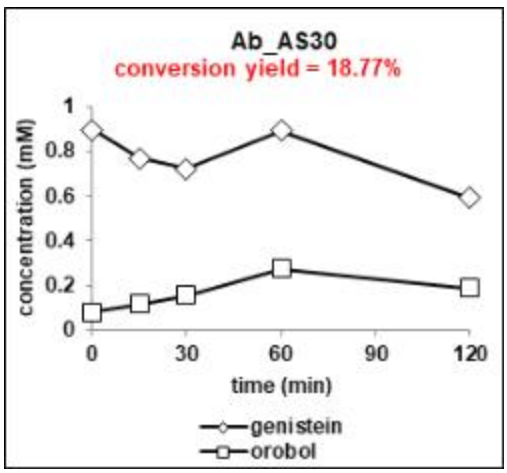
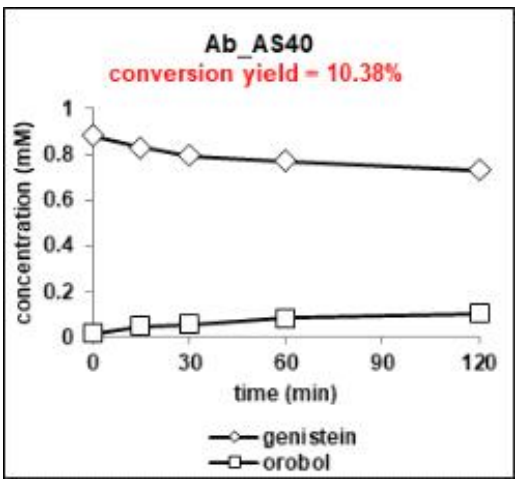
conversion yield = 9.3%

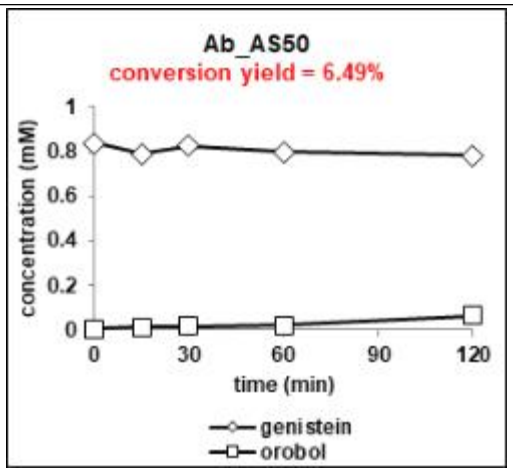
pH 7.50mM sodium phosphate, 37℃
[Ab_Ty] = 5U/ml
[genistein] = 0.2mM
[Cu^{2+}] = 100μM
[Ascorbic acid] = 2mM



conversion yield = 7.7%

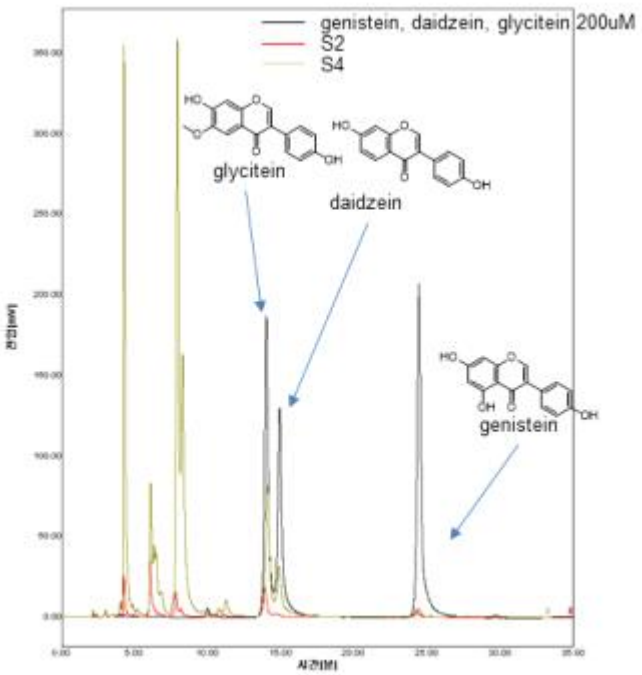
pH 7.50mM sodium phosphate, 37℃
[Ab_Ty] = 5U/ml
[genistein] = 0.5mM
[Cu^{2+}] = 100μM
[Ascorbic acid] = 2mM

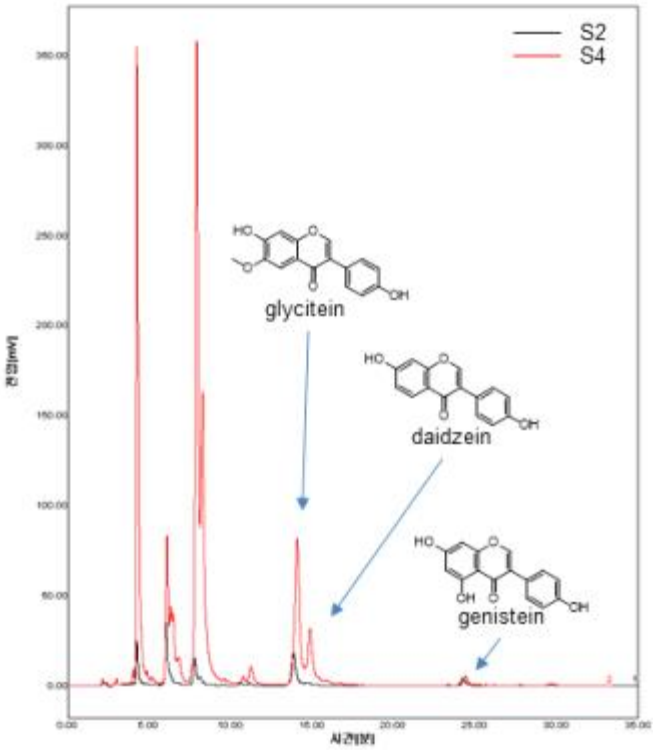
GRAS 미생물로부터 추출된 효소를 활용하여 콩 원물 혹은 콩 추출물로부터 오로볼이 함유, 강화된 고기능성 이소플라본 혼합물의 생산 및 분리 정제 기술 개발	○ 1단계 - 양송이 버섯으로부터 대량 추출된 혼합 효소로부터 순수 기질로부터 오로볼 생전환 테스트 ○ 2단계 - 양송이 버섯으로부터 대량 추출된 혼합 효소 및 콩 추출물을 기질로하여 오로볼 생전환 테스트 ○ 식품 첨가물 활용을 위한 오로볼의 원 기질인 제니스틴을 함유하고있는 원재료 선정 및 기질 함량 분석	• 정제 기질로부터 오로볼 생전환이 가능함 보였기 때문에, 앞서 확보된 대량 추출법으로 양송이 버섯으로부터 얻은 효소 혼합물과 순수 제니스테인 기질을 이용해 오로볼 생전환 반응 진행함.   



- 양송이 버섯 파쇄 후 debris 제거(whole), Ammonium sulfate 침전법 이용(AS 30, 40, 50) fraction을 이용하여 오로볼 생전환 결과, AS 30 fraction으로부터 전환 수율 18.77%로 오로볼을 생산함.

- 콩 추출물로 붉은 백태가루(S2)와 볶은 콩눈분말(S4)를 선정함. 각각의 콩 추출물에 이소플라본 계열 물질인 글리시테인, 다이드제인, 기질인 제니스테인의 함량을 HPLC 및 LC/MS 이용하여 정량 진행함.





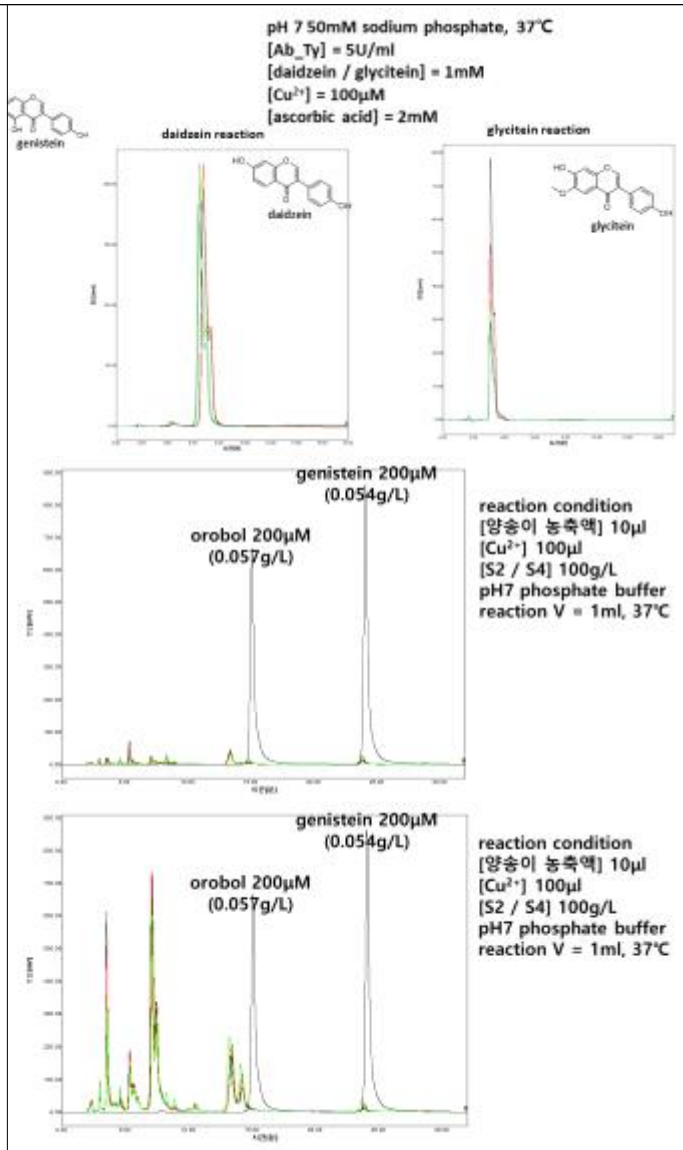
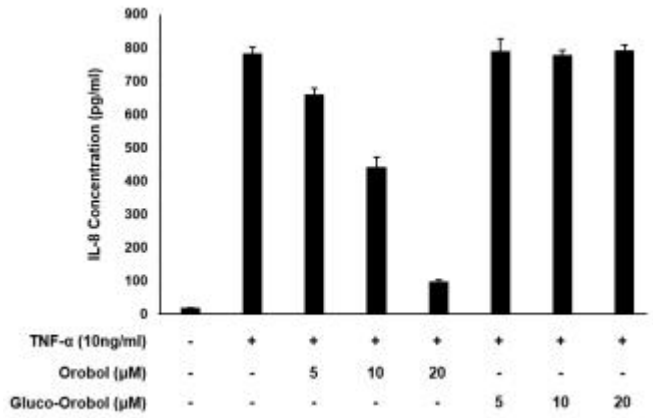
- S2, S4 100g/L 농도에서 추출한 이소플라본 함량은 수 μM 수준으로 미량 함유됨 확인하였음.

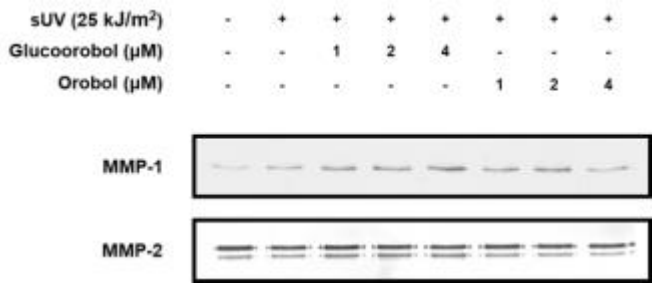
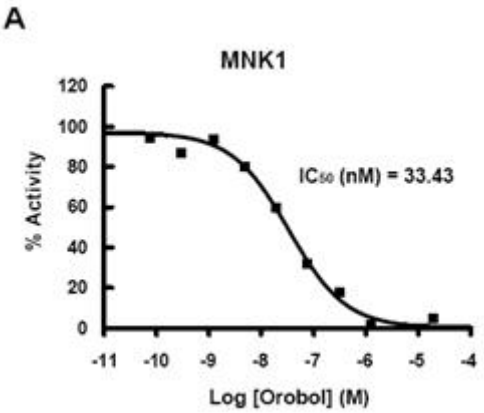
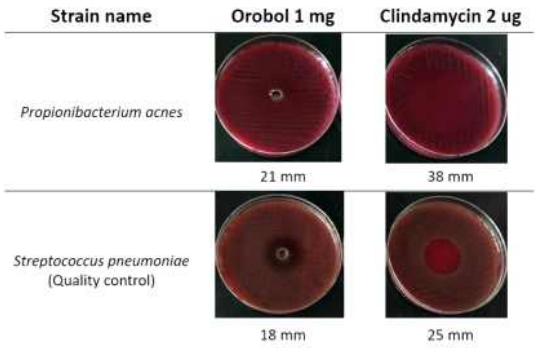
- 함유된 이소플라본 모두 양송이 버섯 효소에 의해 생전환 될 수 있다면, 모두 고기능성 신규 이소플라본으로 가치를 가지고 있음. 이에 따라 콩 추출물의 고기능성 식품으로 가치 상승을 기대함.

- 따라서 양송이 버섯 효소가 제니스테인 기질 이외에도 글리시테인, 다이드제인에도 기질 특이성 가지고 있는지 먼저 생전환 반응으로 확인하였음.

- 하지만, 양송이 버섯 효소는 제니스테인이 아닌 다이드제인 혹은 글리시테인에는 기질특이성 없음 확인함.

- 위 콩 추출물 S2, S4에 함유된 제니스테인으로부터 양송이 효소 추출물을 반응시켜 생전환된 오로볼을 함유하고 있는 기능성 콩 추출물 생산 하고자 함.

		 • S2, S4 생전환 결과, 전체적인 이소플라본의 함량은 다량 확인되었으나, 그중 기질인 제니스테인의 함량이 매우 적어 오로볼 생성은 되었으나 극미량으로 검출되었음.
오로볼 및 글루코오로볼의 다양한 효능 비교탐색	○ 오로볼 및 글루코오로볼의 장건강 개선 효능 비교	 • TNF-α에 의한 IL-8 발현량이 오로볼에 의해

		억제되었으며 글루코오로볼은 동일 농도에서 IL-8 억제 효능을 나타내지 않음.
	○ 오로볼 및 글루코오로볼의 주름 개선 효능 비교	 • solar UV에 의한 MMP-1 발현이 오로볼에 의해 억제되었으며 글루코오로볼보다 오로볼이 그 억제 효능이 우수함.
오로볼의 대사성 질환 (비만, 장건강 등) 개선 생리활성 효능 작용기전 규명	○ 오로볼 소재의 장건강 개선 생리활성 효능 작용기전 규명	 • binding assay를 통해 orobol이 장건강개선 세포모델에서 MNK1을 억제함을 확인하였으며, 이를 통해 앞서 실험결과인 eIF4E를 억제해 IL-8의 발현을 억제하는 메커니즘을 규명함.
오로볼 적용 화장품의 멀티기능성 탐색	○ 민감성 피부에 대해 주로 염증을 일으키는 Propionibacterium acnes(P. acnes)에 대한 오로볼의 항균 활성 능력 시험을 위해 Paper Disc Assay 및 MIC Test를 진행함	 • 오로볼의 항균 활성 능력을 보기 위해 Agar Disc diffustion 실험을 실행 하였음. 오로볼 처리 시 염증을 일으키는 P. acnes의 생장 저해환 크기를 보았음.

		<table><tr><th></th><th>Orobol (mM/ml)</th><th>Clindamycin (μg/ml)</th></tr><tr><td>*Propionibacterium acnes*</td><td>0.313</td><td>0.06</td></tr><tr><td>*Streptococcus pneumoniae* (Quality control)</td><td>0.156</td><td>0.06</td></tr></table> • 오로볼의 항균 활성 능력 시험에 있어서 최소 성장 저해 농도를 보기 위해 Minimum Inhibitory Concentration(MIC) 실험을 진행 하였음. 오로볼을 최소 0.313 mM/ml 농도로 처리하였을시 P. acnes 균을 성장 저해 하는 것을 확인함. 이로써, 오로볼은 항균 효능 있다는 것을 증명하였음.

2. 사업화 및 경제적 성과

2-1. 오로볼 화장품 소재화 및 ICID등재

[1] ICID 등재 심사 신청 완료, 평가 중

- 원료의 종류 : 1종 (Orobol)
- 기관 : Onbix 온빅스
- 세부 내용 :

·Orobol 생산공정 표준화 및 특징을 영문으로 작성하여 ICID의 발행기관인 PCPC(미국화장품협회)에 등재 신청완료.

·ICID 등재 평가예정일 1차 : 2020년 2월 19-20일
2차 : 2020년 4월 29-30일

INCI Name Application

Administrative Information:

International Nomenclature Committee Information:

Attachments (CAS-Reports, Literature References, etc.):

2-2. 나노제형 오로볼 적용 시제품 3종 개발 완료

[1] 나노제형 오로볼을 함유하는 시제품 3종 개발 및 품평 완료

- 나노제형 오로볼을 함유한 세럼, 크림과 아이크림 3품목의 제형개발을 위해 ㈜한국콜마와 제품에 함유되는 주요 컨셉 성분과 향, 사용감 등을 협의하였으며 각 제품의 개발 방향에 따라 1차 제형 개발 후, 2차례 품평단계를 거쳐 사용감을 개선하였음. 특히 크림은 대표 아이템으로 나노제형 오로볼의 주름개선 기능성 효과 증대를 위해 오로볼의 함량을 좀더 높이고 원료 자체 색상의 느낌을 살려 크림 제형 색상을 베이지로 개선하였음. 3종 모두 사업 방향에 맞게 EWG 그린 등급으로 무향, 무색소의 안전 제형으로 제조하였으며, 사용감도 전체적으로 오일리하고 끈적거리지 않게 점도를 낮추어 가벼운 터치감으로 보습 위주로 개발하였음.

※ EWG : 미국의 환경단체 (Environmental Working Group)에서 1~10까지 구분한 화장품 원료의 유해성을 조사해 1~10까지 객관적으로 평가하고 제시하는 등급 낮을수록 안전. EWG 그린등급의 경우 1~2등급에 해당하며, ㈜밥스누와 한국콜마는 우수한 기술력을 바탕으로 높은 흡수율은 물론 안전성까지 확보한 제형을 완성해 피부안전성과 효능, 효과 두 마리 토끼를 잡는 데 성공했음.

세럼 / 크림 / 아이크림

크림(개선 전) ----> 크림(개선 후)

품목	제품 특징	제형특징	품평내용	수정요청
①오로볼 세럼	흡수가 빠르고 촉촉한 가벼운 수분 세럼	-. 가볍게 피 발라지고 피부 흡수가 빠른 촉촉한 마무리감	- 무향, 무색소로 불투명백색으로 확정 - 사용감은 가볍게 펴발라지고 촉촉함 - -> 확정	
②오로볼 크림	보습감이 오래 지속되는 산뜻한 투명 젤 타입 수분 크림	-. 끈적임 없는 산뜻한 마무리감	- 무향, 무색소로 불투명백색으로 확정 - 사용감은 매끄럽게 펴발라지고 보습감이 오래 지속되며 끈적임 없음 - -> 확정	주요한 시그니쳐아이템으로 컨셉성분인 오로볼의 향량을 높힘 -> 색상이 자연스럽게 베이지 톤으로 변경되어 더욱 영양감이 있어보임
③오로볼 아이크림	피부 보호막을 씌우는 듯한 촉촉한 유화타입 보습 크림	-. 피부 속 당김 없이 촉촉함이 남는 마무리감	- 무향, 무색소로 반투명백색으로 확정 - 밀착감있게 펴발라지며 쫀득한 마무리감 - -> 확정	

2-3. 나노제형 오로볼 적용 시제품의 주름개선 임상테스트 및 안전성 평가

나노 Orobol 적용 화장품의 피부주름개선 효능 임상테스트 완료 및 피부주름개선 효과 확인

[1] 나노제형 오로볼 화장품의 피부주름개선 임상테스트 완료 (인체 유효성 평가)

임상시험계획서 개요 (Synopsis)

시험 번호	PNK-19919-K1R
시험 제목	나노 오로볼 크림(가칭)의 미백, 주름 기능성 평가 외 8주 인체적용시험
시험 품목	대조군 화장품 1종 / 시험군 화장품 1종 (나노 오로볼 크림(가칭))
시험 디자인	이중맹검, 무작위배정, 음성대조, half-test
의뢰사 (기관)	회사명 : ㈜밥스누

	주 소 : 경기도 수원시 영통구 에듀타운로 101 광교에듀하임 101동 204 담당자 : 한현우
시험기관	기관명 : 피엔케이피부임상연구센타㈜ 주 소 : 서울특별시 영등포구 국회대로62길 25 교육시설공제회관 4층 연락처 : TEL 02-6925-1501~3 FAX 02-6925-1504
시험 책임자	이사 이 해 광
IRB 심의	2019년 9월 18일
시험 기간	2018년 9월 19일 ~ 11월 15일
시험 목적	본 시험은 화장품 1종을 용량용법에 따라 8주간 사용후 주름(눈가) 및 미백(멜라닌 및 피부톤), 수분함유량, 탄력 개선에 대한 효능을 평가한다.
시험대상자	시험대상자 선정 및 제외기준을 만족하는 30 ~ 60세의 성인 여성
목표 시험대상자 수	탈락률 고려 모집 예상 시험대상자 수 : 26 명

- 품목 : 1. 나노 오로볼 크림 [오로볼 함유]
  2. 대조 크림
- 시험대상자 수 : 최종 유효평가 인원수 : 23명
- 시험결과 : **오로볼을 함유하는 나노 오로볼 크림(가칭)은 눈가 주름 개선에 도움을 주는 제품으로 판단된다.**

  => 8주 사용으로 눈가주름 개선에 도움을 주는 제품으로 판단된다.

  => 8주 사용으로 멜라닌양 개선, 피부톤 개선, 수분함유량 개선, 탄력 개선에 도움을 주는 제품으로 판단된다.

[2] 나노제형 오로볼 제품의 피부첩포테스트 진행 (인체 피부 안전성 평가)

- 시험기관 : 피엔케이피부임상연구센타㈜
- 시험일 : 2019년 10월 16일~10월 18일
- 품목 : 나노 오로볼 크림(가칭)
- 진행방법 : 20~50세의 성인 32명에게 첩포 제거 1시간, 24시간 후의 피부자극지수를 평가
- 평가 : Frosch & Kligman, CTFA guideline에 근거하여 피부반응도를 판독하고 Draize 방법을 응용한 피부자극지수 범위를 확인하여 피부자극정도를 구분함.
- 시험결과 : 시험제품인 오로볼을 함유하고 있는 “나노 오로볼 크림(가칭)”을 24시간 첩포하고, 첩포 제거 1시간, 24시간 후의 피부반응에 대한 연구자 육안평가를 종합한 결과, 시험 제품인 “나노 오로볼 크림(가칭)”은 비(무) 자극성으로 판단한다.

시험제품명	피부자극정도
나노 오로볼 크림(가칭)	비(무) 자극성

2-4 오로볼을 함유하는 기능성화장품 출시를 위한 제품화

2-4-1 오로볼 함유 화장품

[1] 용기 형태 및 디자인 변경

- 당초 오로볼 함유 화장품 용기로서 일반적으로 많이 쓰이는 라운드 투명 용기를 사용하고자 하였으나, 상품화 진행 중 너무 특색이 없는 것을 우려하여 화이트 사각용기 불투명으로 변경하고자 하였음. 그러나 밸런서 뚜껑과 몸통을 열고 닫을 때 너무 빡빡하고 용기 생산 시 불량률이 높은 것으로 판단되어 추가 변경을 진행하였으며, 제품을 판매할 파트너사와 지속적인 협의 끝에 깨끗하고 자연적인 이미지는 유지하면서 단가, 그립감, 용기품질(CT검사)을 고려한 제품 용기(밸런서, 세럼)로 변경하기로 하였음.

- 밸런서 용기 생산 업체로 ㈜태성산업을 선정하였으며, 라운드 투명 용기로 1차 CT 검사(적정용량, 누액, 감량, 안정도, 색소용출, 생산성 및 사양 검토 등)를 진행하여 적합 판정을 받았으나, 디자인 변경에 따라 불투명 사각용기로 변경하여 CT 검사를 재 진행 하였으나 내용물 누액현상이 발생함에 따라 추가 검토 후, 최종 원형타입 용기를 확정하였으며 CT 검사 적합판정을 받음.

밸런서용기 CT 검사

1차	2차

- 최종 확정된 밸런서 용기는 원형타입으로 아랫면은 베이지, 뚜껑과 제형이 들어가는 리드의 노출 부분은 장밋빛 계통의 금색 빛이 나는 색으로 코팅하여 고급스러운 이미지를 더하였음.

  용기 CT검사 적합판정에 따라 ㈜태성산업에 생산발주를 요청하였으며, 1차 현장 감리를

통해 인쇄문구의 색소배합을 확정지었으며, 2차 감리를 통해 뚜껑과 리드의 색상을 확정하였음.

1차	2차	3차 (최종확정)

- 세럼 용기업체로 밸런서를 생산하는 ㈜태성산업을 동일하게 선정하였으며, 기존 소비자가 사용하기 쉽고 고급스러운 느낌을 주는 에어리프 펌프형은 그대로 유지하되 1차 CT검사(적정용량, 누액, 감량, 안정도, 색소용출, 생산성 및 사양 검토 등)에서 캡색상 변색 및 낙하시 바닥부 빠짐 현상이 발견됨에 따라 추가 용기를 변경하여 CT 검사를 진행하였으며 최종 적합판정을 받음.

아이크림용기 CT 검사

1차

포장재 검사 기록서

2차

포장재 검사 결과서

- 최종 확정된 세럼 용기는 에어리프 펌프형은 유지하되 용기와 캡을 투명에서 불투명으로 바꾸고 플라스틱 캡을 장밋빛 펄 코팅하여 도시적이고 차가운 이미지에서 고급스럽고 따듯한 이미지를 더했음.

용기 CT검사 적합판정에 따라 ㈜태성산업에 생산발주를 요청하였으며, 1차 현장 감리를 통해 인쇄문구의 색소배합을 확정지었으며, 2차 감리를 통해 세럼 캡의 색상을 확정하였음.

1차	2차	3차 (최종확정)

- 당초 브랜드명을 LYA SNU로 진행하고자 하였으나, 협력업체가 ㈜리아에스엔유에서 ㈜천일네트웍스로 변경됨에 따라 브리프(Bri,f)로 확정하고 겉면에 쉼표 형압을 투명으로 로고 디자인하여 2차안을 확정하였으나, 브리프 상표 등록이 거절됨에 따라 Herbrief로 브랜드 변경 및 변경 제품의 컨셉도 유니크 하고 20~30대를 타켓으로 하여 고급스럽지만 고리타분하지 않은 젊은 이미지를 부여하고 색감도 다채롭게 활용함.

- 단상자부터 천연화장품의 느낌을 주기 위해 종이질감이 살아있는 “오트밀” 재질을 선택하였으며, 그에 맞게 3차 시안으로 디자인 확정하여 1차 감리를 진행 하였으나, 오트밀 재질 특성상 잉크를 흡수하는 정도가 예상했던 것보다 높아 기존 베이지 바탕이 아닌 전반적으로 어둡고 무거운 색상으로 인쇄가 되었으며, 색상 조절 등 디자인 수정을 추가로 진행하였으나, 원하는 색상 구현이 안되는 것을 확인함. 이에, 오트밀 재질 특성을 살리고자 디자인을 전면 재수정 하였으며 당초 깨끗한 이미지의 흰색 바탕에 안쪽으로 Herbri,f 브랜드명의 형압을 넣고 장미빛 금박으로 마무리한 디자인으로 최종확정하였음.

패키지 크기 및 디자인 변경		
	도면	실적용

1차		
2차		
3차		
4차 (최종 확정)		

[2] 브랜드 및 표시문안 변경

- 「자연으로부터 얻은 '쉼'」 이라는 카피로 Bri,f (브리프) 화장품브랜드를 개발하고 2018.09.20.과 2018.09.28.에 3건의 상표를 출원 하였으나, 2019.08.12. 거절결정됨에 따라 브랜드 변경이 불가피해짐.

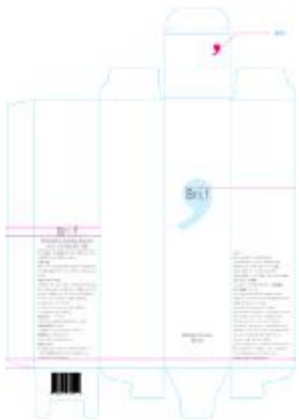
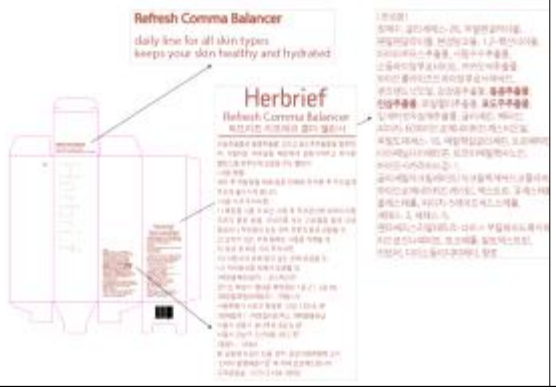
'쉼'이라는 핵심 키워드는 유지하면서 기존 등록된 상표와의 유사성을 피하기 위한 논의 끝에 Herbrief(허브리프)로 브랜드명을 변경하고 2019.08.23. 상표출원 하였으며, 2019.10.15. 출원공고가 결정됨.

브리프(거절결정)		허브리프(출원공고)	
상표	출원번호(출원일)	상표	출원번호(출원일)
브리프	40-2018-0134328 (2018.09.28)	Herbrief	40-2019-0131426 (2019.08.23)
Brief	40-2018-0132173 (2018.09.20)		
Bri,f	40-2018-0132217 (2018.09.20)		

- 브랜드 및 디자인 변경에 따라 단상자 표시문안의 변경을 매건 진행하였으며, 화장품 특성, 기능성 표기, 사용방법, 사용시 주의사항, 보관 및 취급시의 주의사항, 제조업자, 제조판매업자, 용량, 고객상담실, 기타 추가 삽입문구 및 위치를 협의하고 법적표시사항의 위반되는 부분이 없는지 확인함.

당초 제조업자는 코스맥스, 책임판매업자는 ㈜밥스누로 판매업자는 ㈜천일네트웍스로 결정하였으나, 중국수출을 고려하여 중국 현지에서 벤더역할을 할 업체((주)RGB 좋은날)를 공동판매업자로 같이 표기하는 것으로 최종 표시문안을 결정 함.

패키지 표시문안 확인		
	밸런서	세럼
1차		

2차		
3차 (최종 확정)		

2-5 오로볼을 함유하는 기능성화장품 마케팅 및 판로 개척

[1] 전문성과 신뢰성 확보

- 화장품의 초기 시장진입을 위한 전략으로 소비자들로부터 제품의 신뢰성과 전문성을 높이고자 유해성분 무첨가, 임상결과 무자극 판정, 주름개선 효능이 우수한 제품력과 서울대 특허기술 사용 등을 특징으로 하여 화장품 품목에 대한 서울대 상표 획득을 위한 자료수집, 심의신청을 진행하였으며, **서울대 상표를 득하였음**.

=> 향후 후속 기능성 제품(나노오로볼)에 서울대 상표를 적용하여 판매할 예정임.

계약상표	사용형태

서울대학교	• 계약체결일: 2019.05.01 • 계약상표: 서울대학교 • 상표형태: 각종 광고매체 및 제품포장 • 사용권의 종류: 통상사용권(상표법 제57조) • 계약제품: 약콩 등 자연유래 성분 함유된 향장제품

[2] 마케팅을 통한 제품 홍보 및 판매전략

- ㈜BOBSNU 자사몰(www.bobsnumall.com)에 먼저 출시된 화장품라인을 등록하여 피부건강을 위협하는 유해성분 무첨가와 무자극에 대한 임상결과를 업로드하여 제품의 기능성 및 품질 검증결과를 소비자에게 제공하는 것은 물론, 직접 구매에 따른 매출증대를 높이고자 함.

- 이와 동시에 마케팅 대행업체를 검토 및 선정하여 블로그 상위노출, 네이버 파워블로거 포스팅 게시 및 연관검색어 노출, SNS 및 블로그 체험단 모집 및 리뷰 작성 등을 통해 지속적으로 제품을 홍보하고 소비자에게 노출하여 제품의 정보제공 및 인터넷 검색을 통한 제품구매를 유도하고자 함.

- 또한 유튜브 크리에이터 & 인스타그램 & 페이스북을 활용하여 지속적인 홍보를 진행할 예정이며, 판매자인 ㈜천일네트웍스와 ㈜RGB 좋은날을 통하여 중국판매를 모색하고 있으며 마케팅 비용 투자를 통한 “왕홍”들을 활용하여 고품질 콘텐츠를 제작하여 라이브 방송을 통해 그들이 직접 제품을 소개하고 동시에 판매까지 진행하는 ‘V-커머스’를 기획 기획하는 것은 물론, 온라인 플랫폼의 배너 광고를 통해 소비자들에게 브랜드를 노출시키고, 한국&중국 유명 셀럽들의 SNS 홍보 및 방송 PPL 기회를 마련하여 대중적으로 소비자에게 홍보할 계획임.

2-6 오로볼을 함유 화장품 개발에 따른 경제적 성과

- 본 과제를 통하여 시장에 존재하지 않는 Orobol 화장품 원료를 최초로 서울대와 ㈜밥스누가 공동 개발함에 따라 기존 아데노신과 레티놀 등의 고시형 원료에 의존하지 않은 기능성화장품 개발이 가능할 것으로 판단됨.

- 향후, 공정 및 규격설정을 추가 개선하여 기능성과 경제성을 모두 갖춘 원료에 대한 사업화를 통해 현재 화장품 시장에서 많이 사용되고 있는 Compound K를 능가하는 원료로 성장할 가능성이 농후함.

- 생물전환을 통한 Orobol 원료를 바탕으로 **화장품 2종(밸런서, 세럼)을 최종 제품화하여 ㈜천일네트웍스와 '제품독점 공급계약서'체결**을 통해 Herbrief(허브리프) 브랜드로 탄생하였음. 실제로 ㈜천일네트웍스가 최근 중국 바이어(VGM(beijing) Technology Co.Ltd)와 상품공급계약을 체결(2019.08.30.)하였고, 중국 오프라인 판매를 위한 Watsons과 협의를 추가 진행함으로써 본 제품의 광고 및 프로모션 실행을 통한 매출 증대를 꾀하고 있음. 2019년 1월 **화장품 생산 1차분(9,944개) 생산을 통하여 매출 0.49억원을 달성**하였으며 향후, 본격적으로 중국 측 다양한 채널을 통한 판매를 시작할 예정임.

항목	세부항목			성 과
사업화 성과	매출액	개발제품	개발후 현재까지	0.49억원
			향후 3년간 매출(예상)	3억원
	시장 점유율	개발제품	개발후 현재까지	2019.01 생산완료 (시장점유율 미정)
			향후 3년간 매출(예상)	국내 : 30 %
	세계시장 경쟁력 순위	현재 제품 세계시장 경쟁력 순위		세계최초로 비교대상X
		3년 후 제품 세계 시장경쟁력 순위		5위

제 6 절. 종합 결론 (연구 결과 요약)

본 연구진은 선행 연구에서 파일럿 스케일(400L)에서 99% 순도 오로볼의 고수율(>90%) 생산 공정을 확립함. 또한 오로볼의 아토피 피부염 개선 기능성이 다른 물질에 비해 탁월한 것을 과학적으로 증명함. 이에 따라 본 연구를 통해 고부가가치 소재로 응용가능하며, 대량 생산기술이 확립된 오로볼의 소재의 사업화를 꾀하였음.

1. 오로볼 생산 기술: 글루코제니스테인(제니스틴)을 이용한 새로운 대량생산 방법 개발

가. 기존 오로볼 생산 기술은 제니스테인을 기질로 사용함. 그런데 자연계에 존재하는 콩에는 제니스테인의 당화 형태인 제니스틴이 더 많이 함유됨.

나. 따라서 글루코제니스테인을 활용하여 글루코오로볼/오로볼을 생산하는 기술을 개발함. 글루코 기질에 대하여 기질특이성이 뛰어난 tyrosinase 발굴 및 co-solvent 시스템 활용하여 고농도 반응계 구축에 성공함.

2. 오로볼 생산 기술: 400L 스케일 생산 공정 최적화 및 공정표준화 진행

가. 기존 대량생산 기술을 바탕으로 만들어진 오로볼의 새로운 기능 및 제품화를 위한 적용을 시도하였으나, endotoxin 및 불순물 함유 문제로 인하여 생산 기술에 대한 초기 단계부터의 재검토 진행함.

나. 대량생산 톤스케일업보다는 공정 표준화를 통한 품질 향상이 우선이라 판단함. 이에따라 스케일업 전문 기업인 ㈜빔스바이오와의 협업을 통한 공정 표준화를 완료함.

3. 오로볼 효능, 기능 평가: 체지방 및 장건강 개선 효능 검증

가. 생산된 오로볼을 이용하여 세포주 모델 및 동물 모델을 활용하여 새로운 기능을 탐색함. 그 결과, 오로볼이 CK1ε kinase 활성을 저해함으로써 체지방 감소 효능을 보이며, MNK1 kinase 활성을 억제하여 장건강 개선 기작을 가짐을 확인함.

4. 실용화 성과: 오로볼 화장품 소재화 및 제형 제품화를 통함 화장품 제품 개발

가. 오로볼 소재의 실용화를 위하여 오로볼 소재를 적용한 나노 제형 개발을 진행하였고, 최종 시제품 3건 개발 성공함.

나. 오로볼 자체를 화장품 소재로의 활용하기 위하여 표준화 공정을 바탕으로 ICID 등재 신청 완료함.

다. 오로볼 제형의 인체 피부 안전성 평가 및 피부주름 개선 인체 유효성 평가를 완료하고 최종 오로볼 나노제형을 함유하는 주름 개선 기능성화장품을 제품화해 5400만원 매출 실적을 달성하였고, 해외 유통판매 사업화 계약 체결 완료함.

5. 식품소재 적용을 위한 안전 인증(GRAS) 생물을 이용한 오로볼 생전환 연구

가. 식품으로의 적용 가능성을 탐색하기 위하여 안전인증 생물(GRAS)에 속하는 곰팡이류 2종(A.niger, A.oryzae) 및 양송이 버섯(A.bisporus)에서 tyrosinase 효소를 추출 정제하는 과정을 확립함.

나. GRAS로부터 얻은 tyrosinase 추출물을 활용하여 순수 제니스테인 기질 및 콩 추출물 2종(붉은 백태가루, 볶은 콩눈 분말)으로부터 오로볼 생전환에 성공함.

제 3 장. 목표 달성도 및 관련 분야 기여도

제 1 절. 최종 목표 및 평가 방법

(1) 오로볼의 대량생산 및 분리/정제 기술 발전

(가) 톤(ton) 스케일반응 가능 시설탐색 및 시설에 따른 반응법 개선

(나) 톤(ton) 스케일의 대량생산 및 분리/정제 기술 확보

(2) 글루코제니스테인(제니스틴)을 이용한 새로운 대량생산 방법 개발

(가) 글루코제니스테인의 수산화 반응 최적화

(나) 글루코제니스테인과 글루코오로볼의 탈당반응 최적화

(다) 중간산물인 글루코오로볼의 활용방안 모색

(3) 기능성 소재화를 위한 오로볼 및 글루코오로볼의 다양한 효능 탐색 및 규명

(가) 세포주 모델을 활용한 오로볼 및 글루코오로볼의 다양한 효능 비교탐색

(나) 동물 모델을 활용한 오로볼의 효능 심화 규명

(다) 오로볼의 다양한 효능 별 작용 기전 규명

(4) 오로볼 및 글루코오로볼을 활용한 기능성 소재 실용화

(가) 사업화 기반 마련을 위한 GRAS 미생물을 활용한 산업 스케일의 오로볼 대량생산 시스템 구축

(나) 오로볼 및 글루코오로볼 소재 적용 제형 개발

(다) 오로볼 및 글루코오로볼 소재 함유 시제품 개발

(라) 최종 시제품 생산 및 안전성, 인체적용시험 평가

(5) 안정 인증 물질을 이용한 오로볼 생산

(가) *A. oryzae* 발효를 통한 오로볼 생산 연구

(나) 크로마토그래프와 질량 분석기, NMR을 이용한 기질/생성물의 양적 분석.

(다) *A. oryzae* 배양 및 tyrosinase 과발현 최적화

(라) *A. oryzae* tyrosinase 또는 *A. bisporus* tyrosinase 추출연구

(마) *A. oryzae* tyrosinase 또는 *A. bisporus* tyrosinase 식품 첨가물 등재 가능성을 보기위한 안정성 테스트 진행.

(바) 기 개발한 반응의 산업화 공정으로 적용

성과목표	정량적 평가지표											정성적 평가지표							
	지식재산권			기술실시(이전)		사업화				기술인증	논문평균IF	학술성과			교육지도	인력양성	정책활용·홍보		기타(타연구활용등)
												논문		학술발표					
	특허출원	특허등록	품종등록	건수	**기술료**	(시)제품화	**매출액(백만원)**	**수출액(백만원)**	**고용창출**	투자유치		SCI	비SCI				정책활용	홍보전시	
최종목표																			
1차년도									1			1							
2차년도	1					3						1							
3차년도	1	1				3	110		1										
소 계	2	1				6	110		2			2							
종료 1차년도							200												
종료 2차년도							300												
종료 3차년도							450	0.09											
종료 4차년도							520	0.1											
종료 5차년도							600	1.2											
소 계							2,070	12.19				0							
합 계	2	1				6	2,180	12.19	2			2							

제 2 절. 세부 개발목표

1. 오로볼의 대량생산 및 분리/정제 기술 발전

가. 톤(ton) 스일반응 가능 시설탐색 및 시설에 따른 반응법 개선

① 본 연구진은 400 L 파일럿스케일 반응을 통하여, 1.2kg 제니스테인으로부터 1.2 kg의 오로볼을 이론적 수율에 가깝게 생산하였으며, 이를 98% 순도로 정제함 (전체 수율>95%)

② 본 연구진이 축적한 노하우를 바탕으로, (재)춘천바이오산업진흥원에서 보유한 ton 단위 반응기를 통한 오로볼 생산 최적화를 진행하고, 이렇게 생산된 오로볼로 효능 검증 연구의 확대 및 화장품 제형연구에 사용할 계획임.

③ 하지만, 진흥원에 분리/정제를 위한 설비는 미비함. 산업화를 위한 톤 단위 오로볼생산 반응을 위해 적합설비를 보유한 제조업체 (예, 두산인프프라코어)를 탐색하고, 상기 최적화된 반응을 적용할 계획.

2. 글루코제니스테인을 이용한 새로운 대량생산 방법 개발

가. 글루코제니스테인의 수산화 반응 최적화

① 본 연구진은 제니스테인을 통해 고수율 오로볼 생산 반응 메커니즘을 밝혀내고 이를 최적화한 기술노하우를 보유하고 있음.

② 하지만, 제니스테인의 낮은 수용성으로 3 g/L 이상의 반응 진행은 어려움.

③ 이를 극복하고, 생산단가 절감을 통한 가격 경쟁력있는 원료화 및 사업화를 위해, 수용성이 뛰어난 글루코제니스테인에서부터 고농도 (>3g/L) 반응을 진행하고자함.

④ 실험실 스케일에서 글루코제니스테인으로부터 글루코오로볼이 형성됨을 선행 연구를 통해 확인하였고, 이를 대량 생산하고자함.

나. 글루코제니스테인과 글루코오로볼의 탈당반응 최적화

① 본 연구진은 기존 탈당화 효소(예, *beta*-glucosidase)와는 다른 새로운 메커니즘을 가진 산화환원 효소를 자연계에서 스크리닝하였고,이 효소를 이용하여 진세노사이드, 캄페롤, 이소플라본등 다양한 당접합체에 대한 탈당화 반응을 확인하였음.

② 글루코제니스테인과 글루코오로볼의 탈당 반응을 생산 공정에 적용하여 오로볼대량생산에 적용하고자함.

3. 기능성 소재화를 위한 오로볼 및 글루코오로볼의 다양한 효능 탐색 및 규명

가. 기능성 소재화를 위한 오로볼 및 글루코오로볼의 대사성 질환 개선 효능 평가

① 기능성 소재로서 오로볼의 적용 범위를 다양하게 확장하기 위해 지방전구세포 및 장세포 모델을 활용하여 체지방 감소 및 장 건강 개선 효능 평가를 진행하고자 함.

② 세포주 모델을 통해 생산 기간 동안 생성되는 2가지 물질인 글루코오로볼과 오로볼의 효능 비교를 진행하여, 오로볼과 당화된 오로볼의 효능 차이를 확인하고자 함.

③ 동물모델을 통해 전임상 수준의 오로볼의 체지방 감소 및 장 건강 개선 효능을 심화 평가하고자 함. 체중 변화, 체지방 감소 등의 분석을 진행하여 체지방 감소 효능을 탐색하며, 체중 손실, 대장의 길이, 설사 및 혈변 등의 분석을 진행하여 장 건강 개선 효능을 탐색할 예정임.

4. 기능성 소재화를 위한 오로볼의 대사성 질환 개선 효능 작용기전 규명

가. 기능성 소재화를 위한 오로볼 및 글루코오로볼의 대사성 질환 개선 효능 평가

① 기능성 소재로서 오로볼의 적용 범위를 다양하게 확장하기 위해 지방전구세포 및 장세포 모델을 활용하여 체지방 감소 및 장 건강 개선 효능 평가를 진행하고자 함.

② 세포주 모델을 통해 생산 기간 동안 생성되는 2가지 물질인 글루코오로볼과 오로볼의 효능 비교를 진행하여, 오로볼과 당화된 오로볼의 효능 차이를 확인하고자 함.

③ 동물모델을 통해 전임상 수준의 오로볼의 체지방 감소 및 장 건강 개선 효능을 심화 평가하고자 함. 체중 변화, 체지방 감소 등의 분석을 진행하여 체지방 감소 효능을 탐색하며, 체중 손실, 대장의 길이, 설사 및 혈변 등의 분석을 진행하여 장 건강 개선 효능을 탐색할 예정임.

나. 기능성 소재화를 위한 오로볼의 대사성 질환 개선 효능 작용기전 규명

① 효능에 대한 과학적인 작용기전을 규명하고자 함.

② 3T3-L1 cell(지방전구세포) 모델을 활용하여 지방전구세포 분화과정 내 관여하는 표적 단백질을 규명하고 하위 단백질들의 발현량을 분석하여 체지방 감소 작용기전을 규명하고자 함. Caco-2 cell(장세포) 모델을 활용하여 장 염증반응 신호전달 과정 내 표적 단백질을 규명하고 하위 단백질들의 발현량을 분석하여 장건강 개선 작용기전을 규명할 예정임.

5. 오로볼 및 글루코오로볼을 활용한 기능성 소재 실용화

가. 사업화 기반 마련을 위한 Gras 미생물을 활용한 산업스케일의 오로볼 대량생산 시스템 구축

① 오로볼 소재 상용화를 위해 고도화된 생산 기술을 산업스케일에 적용하여 대량생산 시스템 구축.

나. 오로볼 또는 글루코오로볼 소재 적용 제형 개발

① 생산된 오로볼의 부가가치를 높이기 위해 우선적으로 적용 가능한 화장품 제형연구를 수행하고 오로볼 자체의 역가를 최대한 유지하고 피부 세포 침투력을 증진시키는 제형 개발.

② 친수성이 더 향상된 글루코오로볼의 경우 제형 개발에 더 용이하며 해당 소재의 장점을 활용한 화장품 제형개발 연구 수행.

다. 오로볼 또는 글루코오로볼 소재 함유 시제품 개발

① 제형기술이 적용된 오로볼 함유 시제품 개발.

② 기초 화장품류 (스킨 로션, 에센스, 크림), 워시 제품류 (폼클렌져, 클렌징 오일, 바디 클렌져), 피부기능성 (피부 주름 개선 기능성화장품) 중 적합 제형에 맞는 것을 선정하여 시제품 개발.

라. 최종 시제품 생산 및 안전성, 인체적용시험 평가

① 오로볼 함유 시제품의 안전성 평가를 위해 피부첩포자극성 테스트를 통한 피부자극안전성 검증.

② 기능성이 기 검증된 우수소재 오로볼에 대하여 임상 의사들의 경험에 근거한 인체적용시험을 통해 피부노화 (주름 및 보습) 개선 효능 검증

③ 피부주름개선 임상시험 결과를 바탕으로 오로볼 기능성 개별인정 화장품 개발을 위한 ICID 등재 신청 진행 예정

6. 안정 인증 물질을 이용한 오로볼 생산

가. GRAS 미생물 발효를 통한 오로볼 생산 연구

① 본 연구진은 미국 FDA에서 제정한 GRAS에 속하는 균주인 누룩곰팡이(*Aspergillus oryzae*)와 버섯(*Agaricus bisporus*)유래 tyrosinase로 제니스테인 또는 글루코제니스테인으로부터 오로볼 또는 글루코오로볼의 전환 반응을 실험실 수준에서 확인하였고, 본 과제를 통해 스케일업 연구를 진행할 계획임.

② 기 개발한 반응은 효소 개량화를 통한 대량생산 최적화였으나, 식품이용 GRAS 미생물 process에는 다음과 같은 추가 연구를 필요로 함.

③ 1) 추출물 이전 상태의 콩 잔여물 혹은 콩 전체를 원료로 한 용액에서부터 원료 물질 정량, 정성 분석 (주정과 물을 이용한 단순 콩 추출물에서의 제니스테인, 글루코제니스테인의 함량을 질량분석기, 크로마토그래피를 이용하여 양적 분석을 진행할 계획임.)

④ 2) GRAS 미생물의 전체 이용으로 자연계 상태 원료로부터 오로볼 및 그 유사체에 대한 반응성 확인 및 반응 최적화

⑤ 3) 혼합 용액으로부터의 최종 생산물 정량 및 정성 분석을 수행할 계획임.

나. *A. oryzae* tyrosinase 또는 *A. bisporus* tyrosinase 추출 연구

① 국내 유전자변형생물체를 이용한 식품가공효소사업화를 위한 안전성 규격 검사료는 높고, 인증을 받기위한 시간이 많이 소요됨. 그러므로 GRAS처럼 이미 안정성이 검증된 미생물에서 효소를 추출하여, 식품 첨가물의 기준 및 규격에 맞추는 것이 보다 경쟁력이 있다 판단됨.

② 또한, 효소의 상업화 요건 중 가장 중요한 두 가지는 간단한 정제법과 정제 전, 후의 효소 안정성임. 효소의 분리 추출을 위해서는, 세포의 용해, 효소의 농축, 정제 등의 과정이 수반되어져야하고, 이 모든 과정이 상업화 요건을 충족 시켜야함.

③ 세포의 용해: 블렌드, 호모게나이져, 초음파파쇄법등 다양한 세포 용해 법이 있으나, *A. oryzae*나 *A. bisporus* 세포 파쇄에는 유리분말, 알루미늄이나 sea sand를 이용한 뢰계법이 효과적이라 보고됨.

④ 효소의 농축: 농축에는 진공건조, 흡착법, 투석과 한외 여과 등이 있으나, 황산암모늄에 의한 침전법이 경제적이며, 대량 효소 정제에 적합하다 판단됨.

⑤ 효소의 정제: 크로마토그래피를 이용한 정제, 선택적 불활성을 이용한 정제, 용해도를 이용한 정제, 등전점의 차를 이용한 정제등 다양한 정제법이 있으나, 이 모든 방법이 효소의 분리 정제 과정 중 가장 비용이 많이 드는 곳으로 판단됨. 이를 최적화 하는 것을 목표로함.

다. *A. oryzae* tyrosinase 또는 *A. bisporus* tyrosinase 식품 첨가물 등재 가능성을 보기위한 안정성 테스트 진행.

① 신규 식품 첨가물을 등재하기 위한 기초적인 안전성 테스트가 수반되어져야함.
식품의약품안전처에 기재된 식품첨가물 지정절차에 따른 과학적인 안전성 평가를 진행할 계획임.

제 3 절. 성과목표별 가중치

1차년도		
연구목표	가중치 (%)	책임자 (소속 기관)
세포주를 활용한 오로볼의 체지방 감소 개선 효능 규명	6.5	김병기 (서울대)
세포주를 활용한 오로볼의 장건강 개선 효능 규명	6.5	김병기 (서울대)
동물 모델을 활용한 오로볼의 체지방 감소 개선 심화 효능 규명	14.5	김병기 (서울대)
글루코제니스테인을 이용한 새로운 대량생산 방법 개발	21.7	김병기 (서울대)
오로볼의 대량생산 및 분리/정제 기술 발전	21.7	김병기 (서울대)
GRAS 미생물을 이용한 오로볼 생산 시도	13	김병기 (서울대)
A. oryzae tyrosinase 또는 *A. bisporus* tyrosinase 추출 연구	8.6	김병기 (서울대)
오로볼 소재 적용 제형 개발	7.5	한현우 (밥스누)
2차년도		
동물 모델 활용 / 오로볼의 장 건강 개선 심화 효능 평가	13	김병기 (서울대)
오로볼 및 글루코오로볼의 대사성 질환 개선 생리활성 비교 효능 평가	2.2	김병기 (서울대)
글루코오로볼을 적용한 화장품 제형 개발	2.6	한현우 (밥스누)
오로볼 또는 글루코오로볼 소재 함유 시제품 개발	17.3	한현우 (밥스누)
글루코제니스테인을 이용한 새로운 대량생산 방법 개발	34.6	김병기 (서울대)
GRAS 미생물을 이용한 오로볼 생산 연구	21.7	김병기 (서울대)
A. oryzae tyrosinase 또는 *A. bisporus* tyrosinase 추출 연구	8.6	김병기 (서울대)
3차년도		
오로볼 체지방 감소 및 장 건강 개선 효능 작용기전 규명	7.5	김병기 (서울대)
사업화 기반 마련을 위한 오로볼 산업스케일 대량생산 시스템 구축	33.9	김병기 (서울대)
A. oryzae tyrosinase 또는 *A. bisporus* tyrosinase 식품 첨가물 등재 가능성을 보기위한 안정성 테스트 진행 및 대량 추출 최적화 연구	22.6	김병기 (서울대)
오로볼 함유 최종 시제품 생산	15	한현우 (밥스누)
오로볼 함유 최종 시제품의 안전성 및 인체적용시험 평가	15	한현우 (밥스누)
오로볼 기능성 개별인정 화장품 개발을 위한 ICID 등재 신청	6	한현우 (밥스누)

제 4 절. 목표 달성여부 및 평가

연도	세부연구목표	연구개발 수행내용	달성도(%)
1차년도 (2017)	세포주를 활용한 오로볼의 체지방 감소 개선 효능 규명	• 세포주 모델을 활용한 오로볼의 체지방 감소 개선 효능 평가를 위해 3T3-L1 지방전구세포를 이용하여, 오로볼은 콩 이소플라본류(genistin, daidzin, coumestrol, genistein, daidzein)와 그의 대사체(orobol, 6-ODI, equol, 3′-ODI, and 8-ODI,) 중에서 가장 지방 축적을 억제하는 효능이 있음을 확인함.	100
	세포주를 활용한 오로볼의 장건강 개선 효능 규명	• 장건강 개선 효능 탐색을 위해 HT-29 대장 유래 세포를 이용하여, 오로볼의 장건강 개선 효능을 평가하였음. • 염증성 물질인 IL-8을 억제하는 효능이 있음을 HT-29 대장 유래 세포에서 확인하였으며 오로볼 농도 20uM에서 유의적으로 효능이 있음을 확인함.	100
	동물 모델을 활용한 오로볼의 체지방 감소 개선 심화 효능 규명	• 23주간 고지방 식이로 비만이 유도된 마우스에서 오로볼의 체지방 감소 효능을 평가하기 위해 고지방식이 + 오로볼(10 mg/kg body weight (BW)/day) 그룹에서 육안상으로도 고지방식이 그룹에 비해 지방 축적이 줄었음을 확인할 수 있었음. • 고지방식이 그룹은 control 그룹 대비 평균 30.5 %의 체중 증가량을 보였으나, 고지방식이 + 오로볼 그룹은 17.3 %의 체중 증가량을 보여 오로볼의 체중 감소 효능을 확인할 수 있었음. 추가적으로 내장 지방계 무계, 피하지방계 무게도 고지방식이+오로볼 그룹에서 감소한 것을 확인함.	100
	글루코제니스테인을 이용한 새로운 대량생산 방법 개발	• 본 연구진이 보유한 기존 효소는 기질특이성이 좁아 다양한 기질을 활용한 고기능성	100

		이소플라본 생산 한계점을 보유하였음. 따라서 진화파생도 및 효소 구조 기반한 신규 효소 발굴로 기존에 다수 보고된 tyrosinase 반응들과는 차별성 갖는 효소 발굴에 성공함. • 여기서 발굴된 신규 tyrosinase로 글루코 제니스테인 반응이 매우 선택적으로 생전환 가능하며, 이외에도 다양한 당화 기질들을 사용한 생산 방법에 대한 연구를 진행함. • 글루코제니스테인으로부터 글루코오로볼 생산에 성공하였으며 대용량으로 스케일업하기 위하여 반응 최적화 연구를 진행함. • 초기 고농도 기질 반응 위한 연구 진행하여 수용성 고분자를 적용함으로써 글루코제니스테인의 반응 용액에서의 용해도 증가를 하였음.	
	오로볼의 대량생산 및 분리/정제 기술 발전	• tyrosinase 생산 세포를 대량 배양 후 장기간 보관하여 대용량 생산 공정에서에서의 준비 시간 감축을 진행함. • tyrosinase 생산 세포 배양 후 처리 과정에서의 동결건조에 따른 효소 안정성 확인 완료하였음. • (재)춘천바이오산업진흥원에서 보유하고 있는 400L 스케일 반응기를 이용하여 효소 발현 세포 성장 최적 시간, 목표 O.D., 발현 세포 배양액 제조 순서 표준화함. • (재)춘천바이오산업진흥원에서 보유하고 있는 homogenizer, centrifuge 등 분리 정제 장비를 이용하여 분리 정제 시간에 따른 산물 손실을 최소화 하기 위한 분리 정제 방법 표준화 진행함.	100
	A. oryzae tyrosinase 또는 *A. bisporus* tyrosinase 추출 연구	• GRAS 생물로 식용으로 사용되고있는	100

		A.bisporus(송이버섯)의 tyrosinase의 추출을 성공하였으며 효소 분리 정제에 대한 최적화를 진행함.	
	GRAS 미생물을 이용한 오로볼 생산 시도	• 추출된 tyrosinase에서부터 오로볼 생산 가능성을 확인하였고 스케일업을 위해 필요한 효소 양, 반응에 필요한 효소 농도에 대한 연구를 진행함.	100
	오로볼 소재 적용 제형 개발	• 오로볼은 물에 잘 녹지 않는 난용성 물질(물 용해도 : 536.8ug/ml)으로, 피부 흡수이론에 적용되는 확산법칙인 Fick's law에 따라 농도를 최대로 올리는 것이 필요함여 용해도 테스트를 통해 제형을 제작할 오일(Capmul MCM EP), 계면활성제(Transcutol, Labrasol, LAS)를 선정함. • 인공막 피부 흡수 테스트를 통하여 오로볼 제형의 흡수량을 측정하였음. 오로볼 마이크로에멀전 제형이 일반 오로볼 제형에 비해 피부 흡수력을 증가시켰으며, 최적 제형을 도출하였음	100
2차년도 (2018)	동물 모델 활용 / 오로볼의 장 건강 개선 심화 효능 평가	• 본 연구진은 오로볼의 장염 증세 완화 효능 평가를 확인하기 위해 C57BL/6J mice에 오로볼 경구투여를 통하여 효능확인 실험을 거쳤음. • 실험 결과 DSS 음용에 의해 유발되는 장염 증세(설사, 체중감소, 혈변)에 대해 오로볼은 다른 이소플라본 소재인 제니스틴, 제니스테인에 비해 우수한 완화 효과를 보였음. • 또한 오로볼의 장 조직 손상 완화 효능 평가실험을 한 결과, C57BL/6J mice에서 다른 이소플라본 소재에 비해 오로볼 투여군이 DSS에 의한 대장 조직 손상 완화 효과	100

		를 크게 보였음.	
	오로볼 및 글루코오로볼의 대사성 질환 개선 생리활성 비교 효능 평가	• 오로볼과 글루코 오로볼의 장건강 개선 효능 비교 실험에서 TNF-α에 의한 IL-8 발현량이 오로볼에 의해 억제되었으며 글루코오로볼은 동일 농도에서 IL-8 억제 효능을 나타내지 않음.	100
	글루코오로볼을 적용한 화장품 제형 개발	• 주름 개선 효능 비교 평가에 있어서 인각각질세포주에 UV를 처리하여 실험한 결과, solar UV에 의한 MMP-1 발현이 오로볼 에 의해 억제되었으며 글루코오로볼보다 오로볼이 그 억제 효능이 우수한 것을 밝혀냄. • 화장품 소재로 활용하기 위한 화장품 제형 개발은 글루코오로볼 보다는 피부 주름에 효과가 있는 오로볼에 역량을 집중하였음. (2018년 보완요구조치사항에 명시하였음)	100
	오로볼 또는 글루코오로볼 소재 함유 시제품 개발	• 오로볼 소재를 함유하는 화장품 시제품 3건, 리아에스엔유 지부티크 아이디어밸런서, 컨투어세럼, 컨투어 크림을 개발 하였음.	100
	글루코제니스테인을 이용한 새로운 대량생산 방법 개발	• 수용성고분자를 이용해 글루코제니스테인의 기질 용해도를 향상시켰으나, 반응 농도 목표치인 3g/L 이상엔 미치지 못했음. • 따라서 유기용매 사용한 co-solvent system 구축으로 용해도 증가시키기 위하여 총 25종 유기용매 선정하여 용해도 스크리닝 진행하였고, 메탄올 50% co-solvent system 구축하여 글루코제니스테인 10mM 반응 성	100

		공함	
	A. oryzae tyrosinase 또는 *A. bisporus* tyrosinase 추출 연구	• GRAS 균주로 알려진 *Aspergillus* 종 곰팡이 중 2종 - *A. oryzae*와 *A. niger*의 tyrosinase 추출을 위해 배양 조건 set-up 및 성장 phase 파악으로 tyrosinase induction 조건 최적화를 진행함. • 고체배양으로부터 생산된 fungi colony로부터 50ml 액체 배양시 DCW 2~3mg/ml로 tyrosinase 효소 발현 유도 확인함.	100
	GRAS 미생물을 이용한 오로볼 생산 연구	• Aspergillus 종 곰팡이로부터 생산된 tyrosinase를 이용하여 순수 기질 제니스테인으로부터 오로볼 생전환을 성공함. • 생전환 수율 2.7~6.6%로 GRAS 미생물 이용하여 오로볼 생산 성공하였으며, *Aspergillus oryzae*(누룩곰팡이) 이용하여 가장 높은 생산 수율을 보였음.	100
3차년도 (2019)	오로볼 체지방 감소 및 장 건강 개선 효능 작용기전 규명	• 세포실험에서 체지방감소 기전에 있어 오로볼이 395개의 kinases 들 중 CK1ε kinase 활성을 가장 많이 저해하는 것으로 확인함. 또한 지방생성의 조절인자인 PPARɣ, C/EBPα의 protein expression level을 감소시키는 것을 확인함. 또한 CK1ε의 기질로 알려져 있는 4E-BP1의 인산화를 억제함을 확인함. • 세포실험에서 장건강 완화 효능 기전에 있어 오로볼은 MNK1 억제를 통해 염증성 물질인 IL-8의 조절인자로 알려진 eIF4E의 protein expression level을 억제하는 것을 확인함.	100
	사업화 기반 마련을 위한		100

	오로볼 산업스케일 대량생산 시스템 구축	• 오로볼의 식품 또는 화장품 원료 제품화를 이루고자 소재 대량생산 기술 피드백 및 발전을 바이오 기술 scale-up 전문 기업인 ㈜빔스바이오와 진행함. • 생산 효소 발현 단계부터 실험실 스케일 생산 최적화 및 150L 파일럿 스케일, 400L 산업화 대용량 스케일까지의 생산 과정 및 분리 정제 공정에 대한 최적화와 공정 표준화를 이루어냄. • 최종으로 고순도 오로볼을 1.238kg 생산하는 대량 생산 공정을 완성함.	
	A. oryzae tyrosinase 또는 *A. bisporus* tyrosinase 식품 첨가물 등재 가능성을 보기위한 안정성 테스트 진행 및 대량 추출 최적화 연구	• 시중에 판매되는 A. bisporus(양송이 버섯)으로부터 tyrosinase를 대량 추출 할 수 있는 추출 과정에 대한 표준화를 진행함. • 식약처 고시 산도조절제 첨가한 버퍼 시스템에서의 추출 효소 활성 유지 확인하였고, phosphate 버퍼 시스템에서 pH 7을 최종 생산 조건으로 확정함.	100
		• 양송이 버섯 추출 효소의 순수 기질 제니스테인에 대한 효소 기질특이성 및 생전환을 확인하였고, 반응 최적화 결과 전환 수율 18.8%로 오로볼 생산함. • 콩 추출물인 볶은 백태 가루 와 볶은 콩눈 분말로부터 이소플라본 함량을 확인하고 그 중 제니스테인이 함유되어있음을 보았고, 이를 기질로하여 양송이 버섯 추출 효소를 이용해 오로볼이 함유된 고기능성 콩 추출물 생산이 가능함을 확인하였음.	100
	오로볼 함유 최종 시제품 생산	• 나노화 제형 오로볼 3건 개발 • 오로볼함유 화장품(제품) 생산 2건 완료	100

	오로볼 함유 최종 시제품의 안전성 및 인체적용시험 평가	• 피엔케이피부임상연구센타(주) 시험 기관에서 나노제형 오로볼 화장품의 인체 피부 안전성 평가 및 피부주름개선 임상테스트를 완료하였음. • 시험 결과, 나노제형 오로볼 화장품은 비(무) 자극성으로 판단 되며, 또한 눈가 주름 개선에 도움을 주는 제품으로 판단되었음.	100
	오로볼 기능성 개별인정 화장품 개발을 위한 ICID 등재 신청	• 오로볼이 화장품 소재로 첫 사용됨에 따라 국제화장품원료집인 International Cosmetic Ingredient Dictionary(ICID)에 화장품 원료 등재를 2019년 11월 21일 신청 완료 하였음.	100

제 5 절. 차후대책(후속연구의 필요성)

1. 오로볼을 함유하는 콩 추출물의 식품 소재화 가능성 탐색 연구

가. 본 연구 결과를 통해 GRAS 생물로부터 tyrosinase 추출을 성공하였고, 오로볼 생전환 까지 진행하였음.

나. 그중에서도, 양송이 버섯(*A.bisoporus*)를 활용한 경우 유의미하게 tyrosinase 추출(2000U/g) 및 오로볼 생전환(전환 수율 19%)이 가능함을 확인하였음.

다. 식품소재 활용을 위하여 볶은 백태가루, 볶은 콩눈분말을 이용해 오로볼이 강화된 콩 추출물 생산을 시도하였으나, 콩 추출물 내의 이소플라본 함량이 매우 적어 최종 산물 양이 nano gram 단위로 경제성 면에서 매우 불확실한 결과를 낼 수 밖에 없었음.

라. 또한 콩 추출물 내의 오로볼이 생산되자마자 자연적으로 산화되어 사라지는 문제점이 발생함. 이에따라 식품 적용을 위한 연구에 대한 진행이 완전하지 못함.

마. 따라서 위 문제를 해결하기 위하여, 콩 추출물에 이소플라본 함량이 더욱 증대될 수 있도록 콩 추출물에 대한 스크리닝 연구가 필요함.

바. 콩 자체에 함유된 이소플라본은 0.3%로 알려져 있기 때문에, 이소플라본이 가장 많이 함유된 콩 추출물을 확보하고, 이소플라본 농축을 통해 기질의 양을 mM 단위로 향상 시킬 수 있다면, 식품 소재 적용을 위한 생전환 연구 진행이 가능할것이라 판단됨.

사. 이후, 안전성 및 안정성 테스트 완료 후 식품 소재 적용이 가능할 것임.

4. 연구결과의 활용 계획 등

제 1 절. 연구개발 결과의 활용방안

1. 실용화·제품화 방안

가. GRAS균을 활용한 오로볼의 대량생산을 통한 소재 실용화

① 본 연구진은 다양한 균주를 활용하여 유용소재의 대량생산, 정제기술을 확보함 . 그러나 기존 화학적 합성법 및 효소를 활용한 소재의 생산법의 진입장벽이 높고 소비자의 인지도가 낮다는 점이 성장둔화의 주요인으로 작용하고 있음. 따라서 향후 GRAS균을 활용한 소재의 대량생산 기술력 강화뿐만 아니라 마케팅 능력을 강화하기 위해 외부 전문인력을 활용한 경영지도 및 자문사업을 적극 추진하고자 함.

나. 오로볼의 화장품 제형개발 및 시제품 생산을 통한 소재 사업화

① 본 연구진은 효소전환기술을 활용하여 오로볼의 대량생산 및 정제를 완료하였음. 대량생산된 오로볼의 화장품 제형연구를 통하여 소재(파우더)-솔루션(액상)-제형으로 변함에 따른 물성(점성, pH, 온도 안정성 등)을 파악하고 이러한 제형연구는 향후 식품제형으로 개발할 경우 소재의 제형화 선행연구로서 많은 도움을 줄 것으로 예상됨. 또한 오로볼의 화장품 시제품을 개발함으로서 시제품을 개발 전체 프로세싱을 파악하여 향후 오로볼의 식품개발로 적극 활용할 예정.

다. 과학적 근거기반 체중조절, 장건간 개선 오로볼 제품화

(1) 서구식 식습관 및 노동활동 증가에 따른 활동시간 부족, 불규칙한 생활패턴으로 인한 체중조절 및 장건강에 대한 관심 증가에 따라 체중조절 및 장건강을 위한 식품은 필수 소비재이며, 이 시장은 타 산업과 비교하여 경기상황에 큰 영향을 받지 않음. 오로볼의 체중조절 및 장건강 개선에 관련된 과학적 근거를 바탕으로 한 제품화를 통하여 소비자들에게 진정성 있는 건강함을 제공하며 이너뷰티산업의 활성화를 도모함.

2. 미래원천기술 확보

가. 친환경 지속가능한 고부가가치소재 생산 원천기술 확보

① 누룩곰팡이를 활용한 오로볼 소재의 생산은 다른 화학적 합성법은 복잡한 여러 단계를 수반하여 각 단계에 선택적 분리 정제를 요하고, 반응 후 사용된 유기용매의 처리과정 때문에 산업적 적용이 용이하지 않음. 본 연구진은 친환경적인 누룩곰팡이 균을 활용하여 오로볼을 선택적으로 높은 생산성과 고수율로 생산할 수 있는 기술을 보유함. 이와 같이 고부가가치 소재의 생산수율 및 정제과정 연구를 통하여 유용소재를 친환경적으로 대량생산할 수 있는 미래 식소재 원천기술을 확보하고자 함.

3. 신산업창출

가. 균주를 활용한 고부가가치 소재의 생산-가공-마케팅 실증모델로 활용

(1) 김병기 교수 연구진은 균주의 재조합기술을 활용하여 콩, 와인 등에 극소량으로 존재하는 고부가가치 소재의 대량생산 기술을 확보하였으며, 해당 소재를 활용하여 중소기업들과 화장품을 개발한 경험이 있음. 하지만 해당 소재는 식품으로 사용할 수 없는 균주이며 이러한 문제점 때문에 식품산업에 적용하는 데에 있어 큰 한계점이 존재함. 본 연구를 통해 식용으로 사용할 수 있는 기술을 확보하고 더 나아가서 다양한 식품제형에 적용하여 통해 누룩곰팡이를 활용한 고부가가치 소재 시장을 확대시킬 뿐만 아니라 해당 소재를 적용한 제품의 판매, 마케팅 전략을 수립하여 식품산업 활성화를 기대할 수 있음.

나. 식물유래 당화 이소플라본으로부터 신소재 개발 및 대량생산 제품화

(1) 식물에서 유래한 이소플라본 계열 당화 물질은 항산화, 항염증 효과 등 다양한 건강 기능성 효과가 알려져 있음. 그러나 대량생산이나 대량 수득에는 여전히 한계가 존재함. 제니스테인과 기타 식물 유래 이소플라본 물질들은 서로 유사한 구조를 가지고 있음으로, 본 기술 개발로 얻을 수 있는 효소 전환체 반응을 통해 해당 고부가 가치 이소플라본 물질들을 얻어낼 수 있으리라 기대됨. 이를 통해 다른 특이 이소플라본의 화장품, 식&의약품 작업으로의 사업 확장이 가능할 것이라 판단됨.

제 2 절. 기대성과 및 파급효과

[기술적 측면]

1. 기술의 확산효과

가. GRAS균을 활용한 소재 생산 및 소재 적용 식품 가공기술에 대한 실증

① 기존의 효소전환기술을 활용한 방법의 경우 식품소재로 적용할 수 없는 E.coli균과 같은 균주를 사용하기 때문에 식품산업에 적용하는 데 큰 한계점이 존재함.

② 그러나 누룩균과 같은 GRAS균을 활용한 고부가가치 식품소재 기술을 개발함으로서 화장품산업에서 국한된 소재생산기술의 범위를 식품산업으로 넓힐 수 있음. 또한 기존의 소재 생산법에 있어서 친환경적이며 고수율로 생산 가능하다는 경쟁우위에 있는 기술임.

③ 이와 같이 식품 적용 균을 활용한 소재 대량생산 기술을 실용화하기 위해 GRAS균을 생산수율 측정 및 정제과정 최적화, 식품제형적용 시 문제점을 해결하여 고부가가치 소재 적용 건강기능성식품 생산을 기대

나. 효소 식품첨가물로의 개발

① 효소를 이용하여 생산되는 식품산업으로 효소에 의해 가공된 물질이 식품으로 허가

를 받는다면 국내의 효소산업 및 효소를 이용한 식품산업이 발전할 것으로 기대가 됨.

② 현재 효소 및 효소관련 식품산업을 발전시키는 데에는 두 가지 문제점을 가지고 있음. 첫 번째현재 산업에 사용되는 효소는 유전공학에 의해 생산되는 효소라는 점과, 두 번째는 효소가 식품첨가물로 되어 있어 효소의 생산되는 균주 및 안정성에 대한 안정성 평가가 필요함.

③ 본 과제를 통해 효소 식품첨가물 등재를 위한 기반 안정성 테스트를 수행함으로서 효소 식품첨가물 개발

2. 과학기술적 경쟁력 향상으로 균을 활요한 식품 소재 시장에서 경쟁력 확보

① GRAS균을 활용한 고부가가치 소재 대량생산을 통한 특이균주 확보 및 제어, 관리 기술 확보

② 균주의 생산 및 소재 생산시 조건 최적화를 통한 오로볼의 생산원가 절감

③ 생산된 오로볼의 체중조절, 장건강 등 기능성 규명을 통한 오로볼의 건강기능성 우수성 제시

④ 천연물 유래 소재의 기능성 식품 소재화 기술로 국제적 기술경쟁력 확보

[경제적・산업적 측면]

1. 전문인력양성

가. GRAS균을 활용한 고부가가치 소재 생산 전문가 양성

1) 균주를 활용한 소재생산의 경우 균주 확보, 소재 생산조건 및 정제과정 프로세싱 중에서 기술력 부족의 애로사항이 있음. 해당 연구과제의 실무당당자의 소재생산, 정제과정에 대한 산업적 교육 프로그램에 대한 참여를 유도하고 타 생산기술 전문가와의 정보교류의 장을 마련하여 균주를 활용한 소재생산전문가를 양성

붙임. 참고문헌

[논문]

- Lee, Dong Eun, et al., Journal of Biological Chemistry, 2011
- Lim, Tae-Gyu, et al., International Journal of Molecular Science, 2014
- Kim, Eun-mi, *et al.*, Scientific Reports, 2015.
- T. Fukuyama, et al., Clinical & Experimental Allergy, 2017
- Kyu-Shik Lee, et al., Biomedicine & Pharmacotherapy, 2018
- Gaeun Park et al., Biochemical Pharmacology, 2015
- Sanguine Byun et al., Carcinogenesis, 2012
- Lee, Ki-Won, et al.., Cancer Research, 2008
- Jung, Sung-Keun et al., Carcinogenesis, 2014
- Lim, Kyung-Min, et al., Archives of Dermatological Research, 2015
- Kwon, Hyuck-Hoon, et al., Journal of Investigative Dermatology, 2015
- Yoon, Ji-Young, et al., Journal of Investigatie Dermatology, 2013
- Lee, Nahum, *et al.*, Applied microbiology and biotechnology, 2015.
- Lee, Sang Hyuk, *et al.*, Biotechnology and bioengineering, 2016.
- Kim, Eun-mi, *et al.*, Scientific Reports, 2015.
- Choi, Kwon-Young, *et al.*, Applied Microbiology and Biotechnology, 2014
- Hyungdon Yun, *et al.*, Biotechnology Progress, 2005
- Minho Cha, *et al.*, Biotechnology Progress, 2007
- Yoon-woo Kim, *et al.*, Analytical Chemistry, 2015

[특허]

- 김병기 외 2명, 티로시나아제를 이용하여 제조된 카테콜형 구조 물질, 그의 제조 방법 및 그의 응용, 등록번호 1015666720000, 2015
- 박준성 외 11명, 생변환 시스템을 이용한 오르토-디하이드록시이소플라본의 제조방법, 등록번호 1013266850000, 2013
- 김현 외 6명, 버크홀데리아 타일란덴시스 유래 티로시나아제를 이용한 카테콜형 구조 물질의 제조 방법 및 그의 응용, 특허출원 제 2018-0000438호, 2018
- 이기원 외 7명, 오로볼을 함유하는 피부 주름 개선용 조성물의 제조방법, 특허출원 제 2015-0044622호, 2015
- 이정민 외 6명, 발효 작두콩 추출물을 유효성분으로 함유하는 염증 또는 알러지 질환의 예방 및 치료용 조성물, 제 2014-0074841호, 2014
- 이찬우 외 6명, 데아닌 유도체, 이의 제조방법 및 이를 함유하는 항여드름용 피부 외용제 조성물, 특허 출원 제 2010-0077209, 2010

- 박성일 외 4명, 경피흡수용 고분자-리포좀 나노복합체 조성물 및 그 제조방법, 특허 출원 제 2010-0033710, 2010
- 진병석 외 2명, 활성성분을 포집한 나노 플렉시블 베시클의 제조 방법 및 이를 함유하는 화장료 조성물, 특허 등록 제 2015-0142194, 2015