

발간등록번호

11-1543000-001286-01

신규 효소 개량 및 균주 스크리닝을 이용한 설탕대체용 사이코스 대량생산 방법 개발

(The development for mass production method of
D-psicose as substitute sugar using novel enzyme
improvement and microorganism screening)

삼양제넥스 식품연구소

농림축산식품부

제 출 문

농림축산식품부 장관 귀하

이 보고서를 “신규 효소 개량 및 균주 스크리닝을 이용한 설당대체용 사이코스 대량생산 방법 개발” 과제의 보고서로 제출합니다.

2015 년 12 월 17 일

주관연구기관명 : 삼양제넥스 식품연구소

주관연구책임자 : 이강표

세부연구책임자 : 이강표

연 구 원 : 박종진

연 구 원 : 김혜정

연 구 원 : 박성원

연 구 원 : 김고은

연 구 원 : 이상희

연 구 원 : 박지원

연 구 원 : 안신혜

연 구 원 : 한은진

연 구 원 : 허진솔

연 구 원 : 김정은

요 약 문

I. 제 목

신규 효소 개량 및 균주 스크리닝을 이용한 설탕대체용 사이코스 대량생산 방법 개발

II. 연구성과 목표 대비 실적

구분	특허		신제품			유전자 원 등록	논문		기타
	출원	등록	등재 (제출)	허가 (제출)	시제품		SCI	비SCI	
1차 년도	목표	2				1	1		
	달성	5	1			2	0		
2차 년도	목표	2			1	0	1		
	달성	3			1	1	0		
3차 년도	목표	1	1	1	1	0	1		
	달성	4	2		1	3	0		
계	목표	5	1		1	1	3		
	달성	12	3		1	4	0		

III. 연구개발의 목적 및 필요성

1. 연구목적

- 체지방 억제 기능이 있는 기능성당인 사이코스를 생물학적으로 생산, 산업화하기 위하여 신규한 D-사이코스 에피머화 효소를 개발, 최적 생산공정을 구축하고 사이코스 함유 시제품의 유효성과 안전성을 입증하고자 함.

2. 연구필요성

- 건강지향적인 식생활을 추구하는 현대인들은 기존의 설탕과 같은 감미료 대신 칼로리는 낮으면서 기능성이 있는 감미료를 원하고 있음.
- 현재 설탕 대용으로 대체 되고 있는 감미료는 저칼로리 기능에 주요 초점을 맞추고 있음.
- 본 연구팀이 개발하고자 하는 사이코스는 설탕과 비슷한 감미도와 저칼로리의 특징을 갖고 있을 뿐만 아니라 체지방 억제, 혈당저하 라는 기능성을 가지고 있음.
- 생물학적 반응을 통한 사이코스의 산업화는 설탕 대체용 식품소재로 고칼로리에 많이 노출된 현대인들의 식생활에 많은 도움을 줄 것임.

IV. 연구개발 내용 및 범위

1. 1차년도 (2013년)

연구 범위	연구수행방법 (이론적·실험적 접근방법)	구체적인 내용
<ul style="list-style-type: none"> ● 사이코스 전환 균주 확보 	<ul style="list-style-type: none"> ● 사이코스 전환능이 있는 환경 유래 미생물 스크리닝 ● 활성 증가 균주 개량 	<ul style="list-style-type: none"> ● 과수 및 식물 주변 토양 시료에서 사이코스를 단독 탄소원으로 하는 최소배지에서 생존하는 미생물 선택 ● UV, γ-선을 이용한 무작위적 돌연변이 유발 후 배양 조건 최적화를 통한 활성 증가 균주 선택
<ul style="list-style-type: none"> ● 사이코스 전환능이 있는 재조합 효소 확보 	<ul style="list-style-type: none"> ● 분자생물학적 도구를 사용 활성 예상 유전자 스크리닝 ● 선택 유전자를 error-prone PCR과 효소의 3차 구조를 바탕으로 rational design을 실시 point mutation, saturation mutation방법으로 활성이 향상된 효소 확보 	<ul style="list-style-type: none"> ● 유전자 상동성 검색을 통하여 활성을 갖는 후보 유전자를 대상으로 재조합 유전자 구축 ● 대장균의 발현 시스템을 이용하여 단백질 발현 후 활성 측정 ● 활성 유전자 확보 ● 효소 특성 조사 후 산업화에 약점이 될 수 있는 특징을 선택하여 분자 수준에서 진화 실시 : 단백질 발현양 증대 ● 반응 조건 최적화로 활성 증가 조건 확립
<ul style="list-style-type: none"> ● GRAS 균주 확보 	<ul style="list-style-type: none"> ● GRAS 균주 중 <i>Corynebacterium glutamicum</i>에서 단백질 발현 벡터 시스템 구축 	<ul style="list-style-type: none"> ● 대장균에서 구축된 효소 발현 시스템을 식품에 사용 가능한 균주인 <i>C. glutamicum</i>에서 발현 시킬 수 있도록 프로모터 스크리닝 ● <i>C. glutamicum</i>에서 발현 가능한 벡터 시스템 구축

2. 2차년도 (2014년)

연구범위	연구수행방법 (이론적·실험적 접근방법)	구체적인 내용
<ul style="list-style-type: none"> ● 사이코스 생산 미생물 생산성 증가 조건 탐색 	<ul style="list-style-type: none"> ● 산업용 적합 GMO 미생물 개발 - 최적 프로모터 선발, free-cell 물리 이화학적 처리 	<ul style="list-style-type: none"> ● <i>C. glutamicum</i> host에서 사이코스 전환 효소의 안정성을 고려한 활성형 형태의 발현을 만족시키는 프로모터 선발 ● 효소의 고정화를 통한 전환공정에서 활성 증가를 위한 free-cell 처리방법 고안
<ul style="list-style-type: none"> ● 사이코스 생산 미생물 발효 조건 정립 	<ul style="list-style-type: none"> ● 5L 발효조에서 활성 유지 조건 최고 cell mass 생산 조건 탐색 ● 30L 발효조에서 재현성 확인으로 scale-up 가능성 타진 	<ul style="list-style-type: none"> ● 5L 발효조에서 사이코스 전환 유전자 보유 <i>C. glutamicum</i> 의 배지 최적화 및 high cell density culture 배양방법 탐색 ● 산업화에 적용될 경제성 있는 배양 배지의 전환을 위한 배지 최적화 연구 ● scale-up시 재현성 확인으로 산업화 가능성 타진 - 30L 발효조 운전조건 탐색
<ul style="list-style-type: none"> ● 사이코스 함유 시럽 생산 조건 정립 	<ul style="list-style-type: none"> ● 고정화 생물 반응기를 이용한 Non-GMO 균주 및 GMO 균주를 통한 시럽 생산 	<ul style="list-style-type: none"> ● Non-GMO 균주 또는 GMO 균주를 고정화하여 생물 반응기를 디자인한 후 최대 전환율, 안전성 증대 생물반응기 조건 등의 경제성을 고려한 운전조건 및 생물반응기 선택
<ul style="list-style-type: none"> ● 고순도 사이코스 시럽 생산 조건 정립 	<ul style="list-style-type: none"> ● FPLC를 이용한 사이코스 분리 조건 및 결정화 조건 탐색 	<ul style="list-style-type: none"> ● 결정화를 위한 사이코스 분리 조건 탐색
<ul style="list-style-type: none"> ● GMO 미생물 인허가 관련 시험 	<ul style="list-style-type: none"> ● <i>C. glutamicum</i> host에 재조합 된 사이코스 생산 유전자 및 유전자 유래 생성 물질의 인체 유해성 시험 	<ul style="list-style-type: none"> ● 신규 삽입 유전자산물 아미노산 상동성 검색-유전자 알려젠/ 독성 여부 확인 ● 신규삽입 유전자산물 물리화학적 안정성 시험 ● 유전자 분석 평가-염기서열의 부가, 삽입, 결실 등의 비의도적인 변이 여부를 확인 ● 동물 단회 투여 독성 및 알레르기성 평가

3. 3차년도 (2015년)

연구범위	연구수행방법 (이론적·실험적 접근방법)	구체적인 내용
<ul style="list-style-type: none"> ● 사이코스 함유 제품 시생산 	<ul style="list-style-type: none"> ● 생산 파이롯 플랜트 설계 최적화를 통한 순수 사이코스 정제 및 분말화 조건 확립 <ul style="list-style-type: none"> - SMB를 통한 사이코스 정제 - 용해도 차이를 이용한 결정화 조건 탐색 ● 사이코스 함유 프리미엄 설탕 시제품 생산 <ul style="list-style-type: none"> - 입도별 기능성 혼합 설탕 제조 방법 정립 - 건조 방법에 따른 제조 방법 정립 	<ul style="list-style-type: none"> ● 연속 공정 파이롯 플랜트 설계 ● 98%이상 사이코스 결정 분말 100kg 시생산 ● 95%, 50%, 25% 시럽 시생산 ● 사이코스 함유 프리미엄 설탕 시제품 생산
<ul style="list-style-type: none"> ● 경제적 사이코스 상업화를 위한 전환효소 개량 	<ul style="list-style-type: none"> ● 사이코스 전환 균주 개량 <ul style="list-style-type: none"> - GMO 균주 : GRAS 발현 시스템 증대(프로모터 개량) - Non-GMO 균주 : UV처리 자연 돌연변이에 의한 활성 증대 	<ul style="list-style-type: none"> ● RBS 개량 : site-directed mutagenesis 이용 ● 신규 프로모터 발굴
<ul style="list-style-type: none"> ● 사이코스 상업화를 위한 인허가 관련 연구 	<ul style="list-style-type: none"> ● 분말, 시럽 제품의 표준화 ● 동물 독성 평가 (설치류, 비설치류) <ul style="list-style-type: none"> - 단회투여독성시험, 유전독성시험, 반복구여독성시험 ● 시제품 안정성 조사 : 가혹조건 하에서 시험 	<ul style="list-style-type: none"> ● 시제품 규격화 ● 시제품 안전성 조사-독성평가 ● 유통기한 설정 실험

V. 연구개발결과

구분 (연도)	세부과제명	세부연구목표	달성도 (%)	연구개발 수행내용
1차 년도 (2013)	신규 효소 개량 및 균주 스크리닝 을 이용한 설당대 체용 사이코스 대 량생산 방법 개발	● 신규한 사이코스 전환 미생물군/효 소군 확보 및 개 량	100	● 환경 유래 미생물 균체반응으로 사이코스 전환조건 확립- 500g/L 과당에서 30%전환율 ● 균주개량: 야생형의 7배 활성 증 가
			100	● 재조합 단백질의 특성조사 및 효 소개량 - CDPE 온도 안전성 50℃에서 10배 이상 증가 - TDPE 발현양 10배 이상 상승
			100	● GRAS 균주로의 형질전환 및 발 현조건 확립 - 28~30% 발현율
			100	● 상품화를 위한 재조합 균주 인허 가 준비(GMO 균주 안전성 연구)
2차 년도 (2014)	신규 효소 개량 및 균주 스크리닝 을 이용한 설당대 체용 사이코스 대 량생산 방법 개발	● 사이코스 3-에피 머화 효소함유 미 생물/효소 생산 최적화 및 사이코 스 생산 조건 확 립 ● 사이코스 생산 재 조합 균주 인허가 관련 실험	100	● 활성 환경 유래 미생물 및 재조합 균주 대량생산 발효 조건 탐색 (5L)
			100	● 고정화반응조건 확립
			100	● 사이코스 함유 시럽 생산조건 확 립
			100	● 고순도 사이코스 시럽 생산조건 확립
			100	● 상품화를 위한 재조합 균주 인허 가 관련 실험 및 추출
3차 년도 (2015)	신규 효소 개량 및 균주 스크리닝 을 이용한 설당대 체용 사이코스 대 량생산 방법 개발	● 사이코스 함유 제 품 시생산 및 상 품화	100	● 순수 사이코스 정제 및 분말화 조 건 확립
			100	● 생산 파이롯 프랜트 설계 최적화
			100	● 사이코스 함유 시럽 시제품 생산
			100	● 사이코스 함유 프리미엄 설당 시 제품 생산
			100	● 시제품 규격화
			100	● 시제품 안전성 조사
			80	● 시제품 안정성 조사

VI. 연구성과 및 성과활용 계획

항목	연구성과	성과활용계획
사이코스 생산 균주/효소	<ul style="list-style-type: none"> ● GMO 균주 확보 <ul style="list-style-type: none"> - GRAS 균주인 <i>Corynebacterium glutamicum</i>을 호스트로 사용 - <i>Clostridium scindens</i> 유래 D-psicose 3-epimerase 재조합 효소 확보 - 경제성 검증 완료 - 식품 원료 안전성 확인 연구 완료 (GMO 미생물 안전성평가 인허가 진행 중) ● Non-GMO 균주 확보 <ul style="list-style-type: none"> - 식품을 대상으로 screening한 야생균주 확보 - 안전성 확인 연구진행으로 식품원료 인허가 준비 	<ul style="list-style-type: none"> ● 독자적 균주 확보로 사이코스 안정적 생산에 사용 : 자체 기술 실시
사이코스 제품 시생산	<ul style="list-style-type: none"> ● 사이코스 대량생산공정 정립 <ul style="list-style-type: none"> - 20% 이상 시럽 시생산 - 50% 이상 시럽 시생산 - 90% 이상 시럽 시생산 - 98%이상 분말 시생산 	<ul style="list-style-type: none"> ● 본생산 시설 설계 데이터로 활용 ● 안전성 연구 완료-이상 없음 ● 상업화를 위한 인허가 취득 ● 응용 연구 샘플 제공 <ul style="list-style-type: none"> - 프리미엄 사이코스 - 설탕 시생산 등

SUMMARY

I. Research Title

The development for mass production method of D-psicose as substitute sugar using novel enzyme improvement and microorganism screening

II. The Objects and Results of Research

Classification		Patent		Products			Registrati on of Microorga nism	Paper		ect.
		Applicat ion	Registrat ion	Registration (submit)	Permission(submit)	Pre-Product		SCI	Non- SCI	
1st year	Object	2					1	1		
	Result	5	1				2	0		
Second Year	Object	2				1	0	1		
	Result	3				1	1	0		
Third Year	Object	1	1	1	1	1	0	1		
	Result	4	2			3	2	0		
Total	Object	5	1			1	1	3		
	Result	12	3		1	4	5	0		

III. The Objects and Needs of Research

1. The Objects of Research

- We investigated the process of biological production, including as development of novel D-psicose 3-epimerase and optimization of production process, for psicose with anti-adipogenic effect.
- Demonstrate the efficacy and safety of psicose prototypes

2. The Needs of Research

- To pursue health-oriented diet, modern people wanted to low-calorie and physical functional sweetener instead of sugar.
- Now a day sweeteners being replaced by a sugar substitute that is focused on low-calorie main focus function.
- We are want to developed psicose not only has the characteristics of a similar sweetness and low calorie, anti-adipogenic and hypoglycemic effects.
- The industrialization of psicose through biological reaction will give a lot of help in the diet of modern man that is exposed to a lot of high-calorie substitute for sugar in the food material.

IV. The Contents and Scopes of Research

1. 1st year (2013year)

The Scopes of Research	The Methods of Research	Detailed Contents
<ul style="list-style-type: none"> ● Security of Psicose production Microorganism 	<ul style="list-style-type: none"> ● Microorganism screening from environment that have psicose production ability ● Evolution of microorganism 	<ul style="list-style-type: none"> ● The selection of surviving microorganism at soil, food ect. when it was cultivated using psicose as sole carbon source. ● Evolution of microorganism using UV, γ-ray irradiation.
<ul style="list-style-type: none"> ● Secure the recombinant enzyme that have psicose production ability. 	<ul style="list-style-type: none"> ● Gene screening using bioinformatics ● Improved activity of enzyme using error-prone PCR, rational design, point mutation and saturation mutation methods 	<ul style="list-style-type: none"> ● Constructions of target recombinant gene using Blast. ● Compared activity of D-psicose 3-epimerase using <i>E.coli</i> expression system. ● Improved expression enzyme level. ● Increased activity established through the optimized enzyme reaction condition.
<ul style="list-style-type: none"> ● Secure the GRAS microorganism 	<ul style="list-style-type: none"> ● Construction of D-psicose 3-epimerase expression system in <i>C. glutamicum</i> 	<ul style="list-style-type: none"> ● Promoter screening in <i>C. glutamicum</i> ● Established D-psicose 3-epimerase expression system in <i>C. glutamicum</i>

2. Second year (2014year)

The Scopes of Research	The Methods of Research	Detailed Contents
<ul style="list-style-type: none"> ● Explore high level psicose production conditions for recombinant <i>C. glutamicum</i>. 	<ul style="list-style-type: none"> ● Industrial development for recombinant <i>C. glutamicum</i>. - Selection of optimized promoter, physical and physicochemical treatments for free-cell. 	<ul style="list-style-type: none"> ● Selection promoter that it was satisfied to meet both the psicose production activity and thermostability in recombinant <i>C. glutamicum</i>. ● Before cell immobilization, physical and physicochemical treatments for free-cell (Improved cell permeability).
<ul style="list-style-type: none"> ● Establish optimal fermentation condition of recombinant <i>C. glutamicum</i>. 	<ul style="list-style-type: none"> ● Study of maximal cell mass production at 5L fermenter ● Study of scale-up conditions at 30L fermenter. (confirmed 5L fermentation) 	<ul style="list-style-type: none"> ● Investigation of high cell density culture methods and optimization of culture media at 5L fermenter for <i>C. glutamicum</i> harboring D-psicose 3-epimerase gene. ● Investigation of optimization for industrial culture media. ● Establish of operated conditions for 30L fermenter.
<ul style="list-style-type: none"> ● Establish psicose syrup production 	<ul style="list-style-type: none"> ● Investigation of immobilized methods and bio-conversion (psicose syrup production). 	<ul style="list-style-type: none"> ● Design of bio-reactor using immobilized bead including Non-GMO or GMO microorganism. - Maximum conversion - Improve stability
<ul style="list-style-type: none"> ● Establish high-purity psicose syrup production 	<ul style="list-style-type: none"> ● Study of separation condition using FPLC and crystallization condition. 	<ul style="list-style-type: none"> ● Optimization of crystallization process.

<ul style="list-style-type: none"> ● GMO microorganism safety assessment. 	<ul style="list-style-type: none"> ● Safety tests of <i>C. glutamicum</i> harboring D-psicose 3-epimerase gene and its product enzyme. 	<ul style="list-style-type: none"> ● Blast of enzyme amino acid sequence : Search of allergen & toxicity ● Physical chemical safety of enzyme(D-psicose 3-epimerase) ● Gene analysis ● Dose escalation oral toxicity study of d-psicose in mice and allergenicity assessment
--	---	--

3. Third year (2015year)

The Scopes of Research	The Methods of Research	Detailed Contents
<ul style="list-style-type: none"> ● Pre-manufacturing of psicose goods 	<ul style="list-style-type: none"> ● Establishment of pure psicose powder production process through optimization of pilot plant construction. - Purification of psicose using SMB - Crystallization using solubility of difference. ● Pre-manufacturing of psicose sugar <ul style="list-style-type: none"> - As grain-size - As dry condition & method 	<ul style="list-style-type: none"> ● Design of continuous process pilot plant ● Pre-manufacturing of 98% psicose powder. ● Pre-manufacturing of 95%, 50%, 25% psicose syrups ● Pre-manufacturing of psicose sugar
<ul style="list-style-type: none"> ● Evolution of psicose production microorganisms 	<ul style="list-style-type: none"> ● Evolution of psicose production microorganisms <ul style="list-style-type: none"> - GMO microorganism : evolution of promoter. - Non-GMO microorganism : UV treatment 	<ul style="list-style-type: none"> ● Optimization of RBS(ribosome binding site) : Using site-directed metagenesis ● Investigation of novel promoters ● Natural random mutation
<ul style="list-style-type: none"> ● Study of psicose licence 	<ul style="list-style-type: none"> ● Standardization of powder and syrup goods. ● Sing Oral dose toxicity study in rats and beagle ● In vivo micronucleus test, bacterial reverse mutation test, In vitro mammalian chromosome aberration test, 90 days repeated dose toxicity test ● Shelf life tests 	<ul style="list-style-type: none"> ● Standardization of 98% psicose powder, 25%, 50%, 95% psicose syrup. ● Safety tests of 98% psicose powder. ● Shelf life tests

V. Research and development results

Division (Year)	Details Project Title	Details research goals	Achievement(%)	Research Content
1st year (2013)	The development for mass production method of D-psicose as substitute sugar using novel enzyme improvement and microorganism screening	<ul style="list-style-type: none"> The acquisition and evolution of novel microbial with ability conversion fructose to psicose 	100	<ul style="list-style-type: none"> The establish of cell conversion condition using environmental derived microbial.- 500g/L fructose to 150g/L psicose (30% conversion ratio) Evolution : increased 7-fold activity
			100	<ul style="list-style-type: none"> Charaterization and evolution of recombinant enzyme - CDPE Thermostability:increased 10-fold - TDPE expression level : increased 10-fold
			100	<ul style="list-style-type: none"> The establish of expression condition and transformation at GRAS microorganism - 28~30% Expression level
			100	<ul style="list-style-type: none"> Preparation of permitting for GMO microorganism for commercialization
Second Year (2014)		<ul style="list-style-type: none"> The optimization and production conditions for psicose 3-epimerase containing microbial / enzyme Safety study for G M O microorganism licensing 	100	<ul style="list-style-type: none"> Fermentation condition of environmentally harmful microorganisms and GMO enzyme harboring psicose conversion activity (5L)
			100	<ul style="list-style-type: none"> The establishes of immobilization condition
			100	<ul style="list-style-type: none"> The establishes of psicose syrup production process
			100	<ul style="list-style-type: none"> The establishes of high concentration psicose syrup and powder production process
			100	<ul style="list-style-type: none"> The study for GMO microorganism safety evaluation
3rd year (2015)		<ul style="list-style-type: none"> Psicose product prototype production 	100	<ul style="list-style-type: none"> The purification and crystallization of psicose
			100	<ul style="list-style-type: none"> The optimization of pilot plant
			100	<ul style="list-style-type: none"> Production of psicose prototype
			80	<ul style="list-style-type: none"> Production of psicose harboring sugar prototype
			100	<ul style="list-style-type: none"> Specification of prototype
			100	<ul style="list-style-type: none"> Safety test of prototype
			80	<ul style="list-style-type: none"> Stability test of prototype

VI. Research results and utilization plan

item	Research results	Utilization plan
psicose production microorganism/enzyme	<ul style="list-style-type: none"> ● GMO microorganism <ul style="list-style-type: none"> - Using to GRAS <i>Corynebacterium glutamicum</i> as a host. - Recombinant D-psicose 3-epimerase from <i>Clostridium scindens</i> - Economic verified - Food raw materials ensure complete safety research(In progress of GMO microorganism safety evaluation) ● Non-GMO microorganism <ul style="list-style-type: none"> - In progress of temporary food ingredients 	<ul style="list-style-type: none"> ● Self-technology implementation
Psicose prototype	<ul style="list-style-type: none"> ● Establish mass-production process psicose <ul style="list-style-type: none"> - 20% syrup prototype - 50% syrup prototype - 90% syrup prototype - 98% powder prototype 	<ul style="list-style-type: none"> ● Used as the design data, manufacturing facility ● Safety test ● License acquired for commercialization ● Provide applied research sample

CONTENTS

(영 문 목 차)

Chapter 1. Introduction of Research and Development Project

Section 1. Introduction of Research

1. Need for research and development
2. Scope of research and objectives

Section 2. Research Performance against Goals

1. Patent
2. New products
3. Registration genetic resources

Chapter 2. Current Status of Domestic and Global Technical Development

Chapter 3. Contents and Results of Research and Development

Section 1. 1st (2013 year) Contents and Results of Research and Development

1. Established of D-psicose conversion using free cell reaction and production microorganism evolution
2. Selection of *Ensifer adhaerens* mutant increasing psicose production activity by random mutagenesis
3. Characterizations and evolution of recombinant enzyme
4. Evolution of D-psicose 3-epimerase (TDPE) from *Treponema primitia* ZAS-1
5. Established of transformation and expression condition for GRAS host (*Corynebacterium glutamicum*)
6. Preparation of licence for commercialization

Section 2. Second year (2014year) Contents and Results of Research and Development

1. Screening of fermentation condition for Non-GMO and GMO microorganism
2. Production D-psicose syrup using immobilized cell reactor
3. Study for supernation condition of D-psicose using FPLC
4. GMO microorganism safety study

Section 3. Third year (2015 year) Contents and Results of Research and Development

1. Established of purification and crystallization of D-psicose
2. Design of continuous D-psicose production process
3. Production of D-psicose syrup and powder
4. Specification

5. Prototype safety
6. Premium sugar including D-psicose

Chapter 4. Level of Achievement and Contribution

Section 1. Level of achievement for research objective

Section 2. Level of contribution in the food industry

Chapter 5. Outcome of Reasearch and Development and Plan for Practical Use

Section 1. Commercialization

Section 2. PR

Section 3. Patent

Section 4. Additional research, used in other research projects

Chapter 6. Performance Lab Safety Management Implementation

목 차

제 1 장 연구개발과제의 개요 및 성과목표

1절 연구개발 개요

1. 연구개발의 필요성
2. 연구개발 목표 및 범위

2절. 연구성과 목표 대비 실적

1. 특허
2. 신제품
3. 유전자원 등록

제 2 장 국내외 기술개발 현황

제 3 장 연구개발수행 내용 및 결과

1절. 1차년도 (2013년) 연구개발수행 내용 및 결과

1. 환경 유래 미생물 균체반응으로 사이코스 전환조건 확립 및 균주개량
2. Random mutagenesis를 이용한 사이코스 전환활성 증가 *Ensifer adhaerens* 균주 선별
3. 재조합 단백질의 특성조사 및 효소개량
4. 트레포니마 프리미티아 (*Treponema primitia* ZAS-1) 유래 D-psicose 3-epimerase (TDPE) 의 효소 개량
5. GRAS 생산 균주 (*Corynebacterium glutamicum*) 형질전환 및 발현조건 확립
6. 상품화를 위한 인허가 준비

2절. 2차년도 (2014년) 연구개발수행 내용 및 결과

1. 활성 환경 유래 미생물 및 재조합 균주 발효 조건 탐색
2. 고정화 생물 반응기를 이용한 Non-GMO 균주 및 GMO 균주를 통한 시럽 생산
3. FPLC를 이용한 사이코스 분리 조건 탐색
4. *Corynebacterium glutamicum* host에 재조합 된 사이코스 생산 유전자 및 유전자 유래 생성 물질의 인체 유해성 시험

3절. 3차년도 (2015년) 연구개발수행 내용 및 결과

1. 순수 사이코스 정제 및 분말화 조건 확립
2. 연속공정 파이롯프랜트 설계
3. 사이코스 함유 시럽 및 분말 시제품 생산
4. 사이코스 규격화
5. 시제품 안전성
6. 사이코스 함유 프리미엄 설탕 제작

제 4 장 목표달성도 및 관련분야에의 기여도

- 1절. 년차별 목표달성도
- 2절. 관련분야에의 기여도

제 5 장 연구개발 성과 및 성과활용 계획

- 1절. 실용화·산업화 계획(기술실시 등)
- 2절. 홍보 계획
- 3절. 지식재산권 확보계획
- 4절. 추가연구, 타연구에 활용 계획

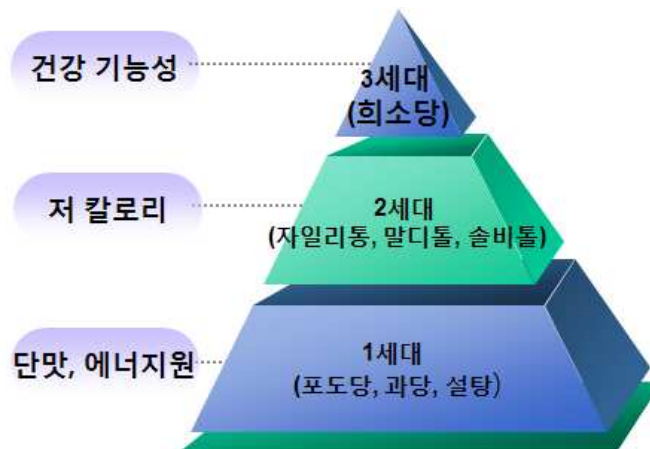
제 6 장 연구실 안전관리 이행실적

제 1 장 연구개발과제의 개요 및 성과목표

1절 연구개발 개요

1. 연구개발의 필요성

- 건강지향적인 식생활을 추구하는 현대인들은 기존의 설탕과 같은 감미료 대신 칼로리는 낮으면서 기능성이 있는 감미료를 원하고 있음.
- 현재 설탕 대용으로 대체 되고 있는 감미료는 저칼로리 기능에 주요 초점을 맞추고 있음.
- 본 연구팀이 개발하고자 하는 사이코스는 설탕과 비슷한 감미도와 저칼로리의 특징을 갖고 있을 뿐만 아니라 체지방 억제, 혈당저하 라는 기능성을 가지고 있음.
- 생물학적 반응을 통한 사이코스의 산업화는 설탕 대체용 식품소재로 고칼로리에 많이 노출된 현대인들의 식생활에 많은 도움을 줄 것임.



기존의 기능이 밝혀진 효소적 방법에 의하면 사이코스를 생산하는 방법은 중온 및 알칼리 조건의 pH 하에서 최적을 나타냄. 알칼리 조건하에서의 반응은 비특이적 반응과 당의 갈변화를 유도하기 때문에 산업화에 적당하지 않음. 또한 기존의 효소들은 높은 온도에서 안정성이 떨어지거나 느린 반응속도적 측면으로 인해 산업화에 적용되는 사이코스 생산의 제조원가를 상승하는 요인을 가지고 있는 문제가 있었음. 그러므로 사이코스의 생산 수율, 온도, pH 및 반응 속도 모두가 산업화에 적합한 신규한 D-사이코스 3-에피머화 효소 개발이 요구된다.

또한 산업화 측면에서 검토하면 기존에 특성이 밝혀진 효소는 대장균에서 발현한 유전자 재조합 효소로써 식품산업에 적용하기 위해서는 그 안정성이 증명되지 않았다.

그러므로 본 연구를 통하여 식품산업에 보다 안정하고 효율적인 GRAS 균주에서의 효소 발

현 시스템을 적용한다면 대량의 사이코스를 생산할 수 있을 것이며, 재조합 균주에 대한 안전성 연구를 함께 진행하여 상품화를 추진할 것임. 또한 이미 식품으로 식용하고 있는 미생물군 또는 유해성이 없다고 증명된 미생물에서 사이코스 전환 활성이 있는 미생물을 스크리닝하여 확보한다면 전환 균주에 대한 안전성이 증명된 상태이므로 보다 시장에 빨리 접근 할 수 있는 안전한 식품소재로의 적용이 가능할 것이다.

감미료의 기존에 틀에서 벗어난 기능성 감미료인 사이코스의 등장은 건강지향적인 현대의 식생활 문화를 충족시킬 것이며 식품소재의 대량생산은 여러 기능성당의 산업화에 시발점이 될 것이다.

2. 연구개발 목표 및 범위

가. 연구개발의 최종목표 및 주요범위

(1) 신규한 사이코스 전환 미생물 확보

사이코스는 자연계에 드물게 존재하는 희소당으로써 알로스 대사 중 인산화 당으로 존재하는 물질이나 free sugar인 사이코스는 미생물 입장으로 대사에 관여하는 당이 아니므로 탄소원으로 존재했을 때 대사에 사용가능 당으로 전환해야 한다.

타가토스 3-에피머화 효소는 넓은 기질특이성에 의해서 타가토스에 대한 반응성 뿐만 아니라 사이코스, 프락토스, 알로스, 자일로스, 자일룰로스를 기질로 사용하여 세 번째 탄소의 위치에피머화 하는 기능을 갖고 있다고 알려져 있음. 이 효소는 일부 미생물에서 존재하며 사이코스에 대한 기질특이성 또한 미생물에 따라 상이하다.

(가) 이 효소를 보유하고 있으면서 그 활성이 사이코스에 대하여 활성이 있는 미생물을 확보하기 위하여 최소배지에 단독 탄소원으로 사이코스를 사용한 배지에 토양 유래, 전통식품 유래, 과일 유래 등의 미생물을 배양하여 콜로니를 형성 유무에 따른 1차 스크리닝을 수행한다.

(나) 1차 스크리닝에서 선택된 미생물을 대상으로 기질반응을 수행하여 과당에서 사이코스로의 전환을 확인한 균주를 선택한 후 반응 최적 조건에서 최종 300g/L 이상의 과당에서 20% 이상의 전환율을 갖는 미생물을 확보 하는 것을 목표로 한다.

(다) UV등 돌연변이를 유도하여 균주 개량에 의해 효소 발현량 개선 및 반응속도 향상을 통한 2배 이상의 사이코스 생산량(수율) 향상을 취하려고 한다.

(2) 신규한 사이코스 전환 효소 확보 및 개량

신규한 사이코스 전환효소 확보하기 위해서 GeneBank 데이터 베이스를 이용하여 현재까지 과당에서 사이코스로의 전환 기능이 알려져 있지 않은 유전자를 찾는 방법을 추진한다.



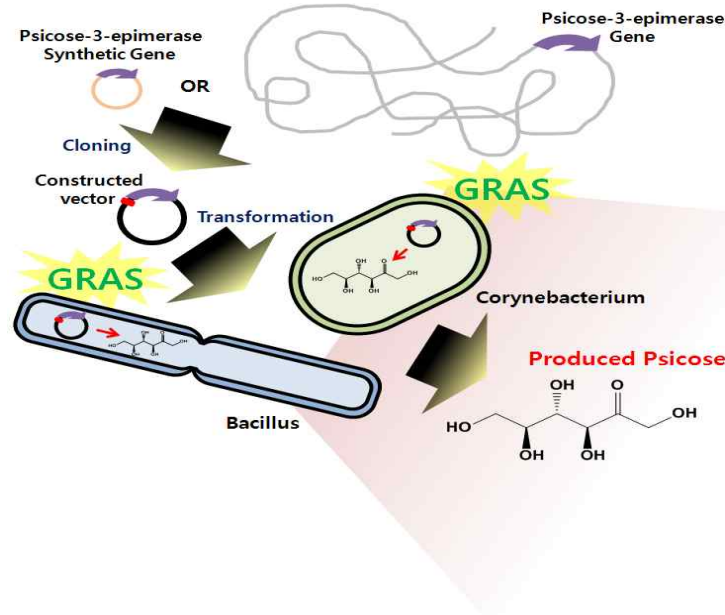
(가) 구체적 방법으로는 기존에 활성이 발표된 크로스트리디움 셀룰로리티쿰 H(10)(Mu et al. 2011), 아그로박테리움 투메패시언스(Kim et al. 2006), 슈도모나스 치코리(Itoh et al. 1994) 유래의 D-타가토스 3-에피머 효소의 단백질 정보를 바탕으로 그 활성부위의 주요 잔기가 일치하며, 단백질을 구성하고 있는 아미노산 서열의 유사도가 40% 이상인 단백질의 후보군을 결정한다.

(나) 각각의 후보군을 재조합 단백질로 구축하여 대장균에 형질 전환시킨 후 발현을 유도하여 그 활성 여부를 측정한다.

(다) 활성이 확인된 단백질에 경우 효소 특성 조사와 kinetic study 수행 후 기존에 발표된 효소와 비교했을 때 산업적으로 우수한 효소를 선택하여 차 후 효소진화에 대한 대상으로 선정한다.

(라) 산업용 효소의 중요한 항목인 specific activity, 온도안정성, 효소 발현율을 대상으로 분자 진화적 방법인 site-directed mutagenesis와 error-prone PCR을 사용하여 보유효소의 취약점을 보완함.

(마) 대장균에서 산업적으로 유용한 효소임이 증명된 효소를 대상으로 안정성이 입증된 GRAS host인 *Corynebacterium glutamicum*, 또는 *Bacillus subtilis* 에서 발현시키는 조건을 확립한다.



(3) 사이코스 3-에피머화 효소함유 미생물, 효소 생산 최적화 및 사이코스 생산 조건 확립

(가) 사이코스 3-에피머화 효소함유 미생물의 고농도 발효조건 탐색 및 확립.

(나) 생물반응기를 이용하여 사이코스를 생산하기 할 때 산업적으로 유용한 고정화 시스템을 도입하려 한다. 이를 위한 고정화 담체 선정 및 고정화 방법에 따른 생산수율을 최적화하고 운전조건을 최적화 한다.

사이코스 생산을 산업화하기 위해서는 최초의 원료물질을 무엇을 사용하느냐에 따라 최종 생산수율과 경제성이 달라질 것임. 과당을 얻을 수 있는 최초 시작물질을 설탕 또는 전분으로 시작할 때 사이코스 3-에피머 효소 이외에 사용되는 효소의 종류와 그 조건에 따른 최적화 시스템을 구축한다.

(4) 사이코스 인허가를 위한 안전성 실험 및 상품화

(가) 안전성 실험

사이코스의 상품화를 위하여 유전자변형균주의 도입유전자 위해성 판단, 방출시 주변생태계의 영향 등의 유전자변형 생물체에 대한 안정성 실험을 실시 또는 공인기관에 의뢰한다.

사이코스의 식이 안전성을 증명하기 위하여 독성 평가를 실시할 예정이다.

(나) 사이코스 상품화

사이코스 제품으로는 사이코스 함유 시럽, 사이코스 함유 분말 sugar를 생산하여 체지방을 낮추는 프리미엄 설탕 및 당시럽을 상품화할 계획이며, 순차적으로 Pure Psicose Powder 상품화를 추진할 계획이다.

사이코스 함유시럽은 사이코스의 함유량과 그 구성성분비에 의해 기능성 및 상품화 컨셉이 달라지므로 제품의 규격화가 필요, 이를 수행할 예정이다.

각각의 시제품의 안정성에 대한 연구 수행 예정이다.

사이코스 함유 분말 sugar는 고도의 재결정화 기술 확립에 의하여 제품화를 추진한다.

2절. 연구성과 목표 대비 실적

구분		특허		신제품			유전자원 등록	논문		기타
		출원	등록	등재(제출)	허가(제출)	시제품		SCI	비SCI	
1차 년도	목표	2					1	1		
	달성	5	1				2	0		
2차 년도	목표	2				1	0	1		
	달성	3				1	1	0		
3차 년도	목표	1	1	1	1	1	0	1		
	달성	4	2		1	3	2	0		
계	목표	5	1		1	1	1	3		
	달성	12	3		1	4	5	0		

1. 특허

가. 등록 (3건)

- (1) D-사이코스 에피머화 효소 및 이를 이용하는 사이코스 생산방법 10-1318422 (13.10.8)
- (2) 사이코스 에피머화 효소 및 이를 이용한 사이코스로 전환용 조성물 10-1539096
(15.07.17)
- (3) 사이코스 에피머화 효소를 암호화하는 폴리뉴클레오타이드 및 이를 이용하는 사이코스
생산방법 10-1539097 (15.07.17)

나. 국내출원 (9개)

- (1) 사이코스 3-에피머화 효소를 이용한 과당을 부터 사이코스의 제조방법 10-2012-0149908
(12.12.20)
- (2) 엔시퍼속 균주 및 이를 이용한 사이코스 생산방법 10-2013-0038593 (13.04.09)
- (3) 사이코스 에피머화효소 및 이를 이용한 사이코스로 전환용 조성물 10-2013-0094773
(13.08.09)
- (4) 사이코스 에피머화 효소를 암호화하는 폴리뉴클레오타이드 및 이를 이용하는 사이코스
생산방법 10-2013-0164686 (13.12.26)
- (5) 코리네박테리움속 균주를 이용한 사이코스 생산방법 10-2014-0142930 (14.10.21)
- (6) 사이코스 에피머화 효소의 발현 시스템 및 이를 이용한 사이코스 생산 10-2014-0149019

(14.10.30)

(7) 사이코스 제조방법 10-2014-0196040 (14.12.31)

(8) 감미질 및 결정화가 개선된 사이코스 혼합당 조성물 10-2015-0068296(15.5.15)

(9) 사이코스 에피머화 효소의 발현 시스템 및 이를 이용한 사이코스의 생산
10-2015-0072090(15.5.22)

다. 국외 출원 (2개)

(1) 사이코스 에피머화효소 및 이를 이용한 사이코스로 전환용 조성물 (201380041822.8)
(13.08.09) 중국출원

(2) 사이코스 에피머화 효소의 발현 시스템 및 이를 이용한 사이코스 생산 14/927,731
(15.10.30) 미국 출원

라. PCT 출원 (1개)

(1) 사이코스 에피머화 효소의 발현 시스템 및 이를 이용한 사이코스 생산
PCT/KR2015/011595 (15.10.30)

2. 신제품

가. 허가 (제출) : GMO 미생물 안전성 평가

(1) 허가 대상 : GM 미생물 SYG321-C

(2) 허가기관 : 식품의약품안전평가원 신소재식품과

(3) 심사기관 : 주 심사기관 : 식약처

협의 심사기관 : 생태원, 농진청, 수과원

(4) 심사범위 : 인체 위해성 평가, 환경위해성평가

(5) 인허가 제출 : 2015년 9월 30일, 접수번호 : 20151133214

(6) GM 미생물 SYG321-C 개발 목적

유전자변형미생물 SYG321-C는 과당을 원료로 D-사이코스(동명: 알룰로스)를 효소전환공정을 사용하여 대량으로 생산하기 위한 목적으로 개발된 생물전환 촉매이다. SYG321-C는 *Clostridium scindens* (이하 *C. scindens*) 유래의 D-psicose-3-epimerase(CDPE라 명명함) 유전자를

플라스미드에 클로닝하고 GRAS 속주 미생물인 *Corynebacterium glutamicum* ATCC 13032 (이하 *C. glutamicum*)에 삽입하여 CDPE 효소를 발현하는 유전자변형미생물이다.

본과제의 목적인 사이코스 대량생산 최적화에서 가장 핵심 기술이 효소 개발이다. 이 효소는 유전자 재조합 기술로 주관기관인 삼양제넥스 자체 기술로 개발하여 식품산업에서 사용하기 위하여 안전성을 평가 받아 사용하고자 한다.

안전성 평가가 통과 된 후 사이코스 생산에 사용되어 상용화를 시킬 수 있다.

(7) GM 미생물 SYG321-C 개발의 유용성 및 용도

D-사이코스(동명: 알룰로스) 생산 방법은 현재 화학적 방법과 생물학적 방법으로 개발되어 왔다. 그러나, 화학적 방법은 그 제조 방법이 비교적 단순한 알칼리 반응 공정으로 D-사이코스(동명: 알룰로스) 함유 시럽을 제조 가능하나 반응 공정 중 무작위적 당 전이 반응에 의한 많은 부산물의 생성과 비교적 낮은 D-사이코스(동명: 알룰로스) 함량이 생성되어 고순도 분말 생산에는 한계가 있는 단점이 있다. 또한 화학적 생산 방식은 반응물의 정제 등 처리과정에서 많은 부산물이 발생되어 비용적인 증가 및 환경 오염에 대한 특별한 관리가 필요하는 등 특히 제품에 대한 소비자의 화학적 생산물의 인식에서도 영향을 미친다.

생물학적 방법은 화학적 방법에 비해 여러 단계의 생산시설이 필요하며 효소 사용에 대한 인허가 기간이 길고 까다로운 단점이 있으나, 친환경적 효소 반응으로 정제 방법이 단순하며, 특별히 정제 후 발생하는 부산물이 없다. 더불어 생산공정의 시럽생산과 분말생산이 동시에 가능한 생산 공정 개발로 다양한 함량의 D-사이코스(동명: 알룰로스) 시럽 및 고순도 D-사이코스(동명: 알룰로스) 분말이 생산이 가능한 장점이 있어 화학적 생산에 비해 경쟁력을 가질 수 있다.

이러한 장점으로 사이코스 생물학 적으로 생산하기 위하여 GM 미생물 효소를 개발하여 산업에 이용하고자 한다.

(8) 안전성 연구

(가) 유전자변형미생물

개발목적 : 사이코스 생산 효소로 사용

이용방법 : 사균형태로 고정화하여 사이코스 제조공정 중에만 사용

공인유전자은행 또는 기타 유전자 보관 여부 : KCCM11593P

표준배양법 : 코리네 박테리움 성장 영양배지, 호기성 조건, 30℃

최종제품에서의 생존 유무 : 최종 제품에서 GM 균주, 삽입 유전자, 삽입유전자 유래 단백질

이 검출되지 않음

(나) 숙주 : *Corynebacterium glutamicum* ATCC13032

분류학적 특성(학명, 일반 명, 균주은행 등록번호 등)

명칭 (Name) : *Corynebacterium glutamicum* ATCC13032

계 (Kingdom) : Bacteria

문 (Phylum) : Actinobacteria

강 (Class) : Actinobacteria

아강 (Subclass) : Actinobacteridea

목 (Order) : Actinomycetales

과 (Family) : Corynebacteraceae

속 (Genus) : *Corynebacterium*

종 (Species) : *glutamicum*

식용 및 균주개량 역사: 아미노산 발효에 사용되는 숙주임

안전성이 우려되는 유전자형 및 표현형 : 없음

안전한 식 경험 유무 : 균주 자체 식이는 하지 않지만 이차 대사산물인 아미노산을
식용으로 섭취하고 있음.

최적 배양 조건: 코리네 박테리움 생장 영양배지, 호기성 조건, 30℃

전달성 유전자 존재 유무 : 없음

(다) 공여체 : *Clostridium scindens*

분류학적 특성(학명, 일반명, 균주은행 등록번호 등)

명칭 (Name): *Clostridium scindens* ATCC35704

계 (Kingdom) : Bacteria

문 (Phylum): Firmicutes

강 (Class): Clostridia

목 (Order) : Clostridiales

과 (Family) : Clostridiaceae

속 (Genus) : *Clostridium*

종 (Species) : *scindens*

안전한 식경험의 유무 : 없음

안전성 우려 유전자형 및 표현형 : 없음, safety level 1

공여체 및 근연종의 식품위해관련 정보 : 없음

(라) 유전자변형

① 균주제조과정

- 유전자변형에 사용된 기술 : 형질 전환방법

- 재조합 DNA

기원 : *E.coli* - *C. glutamicum*의 shuttle vector인 pCES208의 유래

유전자 변형 미생물 내에서의 확인 및 그 기능

: *C. glutamicum* SYG321-C의 정성분석 키트제작

플라스미드 복제수 : cell 당 평균 48copy

중간 숙주 : 없음

② 부가, 결실, 삽입, 변형된 DNA에 관한 정보

- 구성유전자의 특성

선발표지유전자 : *nptII* (Neomycin phosphotransferase II)

벡터유전자: *E.coli* - *C. glutamicum*의 shuttle vector인 pCES208

조절인자 : *sod* promoter, T7 terminator

DNA 기능에 영향을 주는 기타 인자 : *Corynebacterium* 복제개시인자 REP

- 크기 및 명칭 : 6,866bp, pCDPE

- 완성된 벡터내의 유전자 염기서열 위치 및 방향성

- 구성 유전자의 기능

(마) 유전자변형미생물의 특성

① 유전자변형미생물 내의 DNA 변형에 관한 정보

- 변형 DNA 삽입으로 인한 부가, 삽입, 결실, 변형 등에 대한 설명 : 없음

- 변형유전물질의 존재위치(염색체 또는 염색체 외부) : 염색체 내부

- 삽입부위 및 삽입수 : 염색체 내부, 하나 이상

- 삽입유전자 및 인접하는 숙주 게놈 유전자의 외래전사해독프레임 유무와 그 전사 및 발현가능성 : 없음

- 유해염기서열의 유무 : 없음

② 유전자산물에 관한 정보

- 유전자산물(단백질이나 번역되지 않은 RNA)과 그 분석방법

: CDPE와 NPTII 발현단백질의 SDS-PAGE 및 Western immunoblot 분석

- 유전자산물의 기능 : 과당에서 사이코스 전환

- 새로운 특성의 표현형 : 사이코스를 과당으로 전환 탄소원으로 이용 생육 가능

- 유전자산물의 발현부위, 발현량, 및 대사산물

: 염색체 내부, 전체 단백질의 1~10% 발현, 사이코스 생산

- 삽입유전자가 특정 내재성 mRNA나 단백질량을 변화시킬 경우 삽입유전자 산물의 양

: 없음

- 유전자산물의 유무 또는 대사산물의 변화

: YG321-C의 유전자산물은 CDPE 및 NPTII 단백질이며, 모두 효소활성기작이 명확하여 비의도적으로 대사경로에 영향을 주지 않을 것으로 판단된다.

③ 삽입유전자의 변화 등에 관한 정보

- 삽입유전자의 재배열 유무 : 세포내 삽입시, 식품으로 이용시, 보존시 : 없음

- 발현단백질의 아미노산 서열의 변이 유무, 발현단백질의 번역 후 구조적 변화 유무 : 없음

- 특성이 정확한 위치에서 발현 또는 분비되는지 여부 : ELISA로 확인

- 유전자재조합에 의한 숙주 유전자 영향 유무, 신규 융합단백질의 존재 유무: 없음

바. 독성과 병인성

- 식이 노출량, 식이 섭취량, 발현 물질의 식품 내 기능과 농도, 식품 내 생균의 농도 (식품 중 대응하는 기존종과의 비교) : 최종 제품에 혼입되지 않음

- 유전자산물이 단백질인 경우

NPTII

- 식품으로 안전하게 사용된 역사, 단백질의 구조와 기능, 기지의 독성 및 항 영양소와의 아

미노산 서열 유사성, 유전자산물의 물리화학적 처리에 대한 감수성(대체산물의 경우 유전자산물과의 생화학적, 구조적, 기능적 동질성에 관한 자료 포함), 발현단백질의 단회투여독성

CDPE

- 식품으로 안전하게 사용된 역사, 단백질의 구조와 기능, 기지의 독성 및 항 영양소와의 아미노산 서열 유사성, 유전자산물의 물리화학적 처리에 대한 감수성(대체산물의 경우 유전자산물과의 생화학적, 구조적, 기능적 동질성에 관한 자료 포함), 발현단백질의 단회투여독성

⑤ 알레르기성 : 보유 유전자 없음

- 유전자산물이 알레르겐으로 알려져 있는지 여부, 유전자산물의 물리화학적 처리에 대한 감수성(대체산물의 경우 유전자산물과의 생화학적, 구조적, 기능적 동질성 포함), 유전자산물 중 이미 알려져 있는 알레르겐과 상동성, 유전자산물이 1일 단백질섭취량의 유의한 양을 차지하고 있는지 여부

⑥ 숙주와의 차이 : 숙주와 차이 없음

- 주요영양성분, 미량영양성분, 내재성독소, 항영양소

(사) 대사산물

(아) 식품가공에 의한 영향

(자) 장관계에서의 생존능

(차) 항생제내성 유전자 및 유전자전이

(카) 유전자변형미생물의 생존·증식에 대한 정보

(타) 유전자변형미생물의 불활성화 방법

(파) 외국의 식품유통 승인 및 식품용 등의 이용 현황

나. 시제품 : 총 4개 (제품 제조기록서, 시험 성적서)

(1) 시제품 종류 : 사이코스 20% 이상 시럽, 사이코스 50% 이상 시럽, 사이코스 90% 이상 시럽, 사이코스 98%이상 분말

(2) 제품성적서

(가) 사이코스 20%이상 시럽

항목	1lot	2lot	3lot
고형분 함량	75 Brix (%)		
수분 함량	25%		
pH	3.0 ~ 7.0		
사이코스 함량	24.63%	25.16%	25.04%
일반 세균 (시럽1g)	불검출	불검출	불검출
살모넬라	불검출	불검출	불검출
황색포도상구균	불검출	불검출	불검출
대장균	불검출	불검출	불검출
회분	0.00%	0.00%	0.00%
납	0.0095 mg/kg	0.0048 mg/kg	0.0063 mg/kg
비소	0.0071 mg/kg	0.0014 mg/kg	0.0024 mg/kg

(나) 사이코스 50% 이상 시럽

항목	1lot	2lot	3lot
고형분 함량	75 Brix (%)		
수분 함량	25%		
pH	3.0 ~ 7.0		
사이코스 함량	53.37%	53.22%	54.95%
일반 세균 (시럽1g)	불검출	불검출	불검출
살모넬라	불검출	불검출	불검출
황색포도상구균	불검출	불검출	불검출
대장균	불검출	불검출	불검출
회분	0.00%	0.00%	0.00%
납	0.0040 mg/kg	0.0033 mg/kg	0.0074 mg/kg
비소	0.0015 mg/kg	0.0015 mg/kg	0.0024 mg/kg

(다) 사이코스 90% 이상 시럽

항목	1lot	2lot	3lot
고형분 함량	75 Brix (%)		
수분 함량	25%		
pH	3.0 ~ 7.0		
사이코스 함량	95.90%	95.25%	96.19%
일반 세균 (시럽1g)	불검출	불검출	불검출
살모넬라	불검출	불검출	불검출
황색포도상구균	불검출	불검출	불검출
대장균	불검출	불검출	불검출
회분	0.00%	0.00%	0.00%
납	0.0024 mg/kg	0.0021 mg/kg	0.0028 mg/kg
비소	0.0011 mg/kg	0.0006 mg/kg	0.0018 mg/kg

(라) 사이코스 98%이상 분말

항목	1lot	2lot	3lot
수분 함량	0.15%	0.16%	0.14%
pH	3.0 ~ 7.0		
사이코스 함량	99.44%	99.03%	99.43%
일반 세균 (시럽1g)	2.0 X 10 ²	2.7 X 10 ²	2.0 X 10 ²
살모넬라	불검출	불검출	불검출
황색포도상구균	불검출	불검출	불검출
대장균	불검출	불검출	불검출
회분	0.00%	0.00%	0.00%
납	0.0065 mg/kg	0.0054 mg/kg	0.0017 mg/kg
비소	0.0027 mg/kg	0.0059 mg/kg	0.0062 mg/kg

3. 유전자원 등록 : 5건

가. 유전자원 등록증

No	기탁 균주	기탁번호	기탁일자
1	<i>Escherichia coli</i> -pETCDPE-SYG321	KCCM11406P	2013.03.29
2	<i>Ensifer adhaerens</i> SYG29	KCCM11405P	2013.03.29
3	<i>Coynebacterium glutamicum</i> SYC321-C	KCCM11593P	2014.10.29
4	<i>Ensifer adhaerens</i> SYG29M	KCCM11652P	2014.12.24
5	<i>Microbacterium foliorum</i> SYG27B	KCCM11774P	2015.09.24




BUDAPEST TREATY ON THE INTERNATIONAL
RECOGNITION OF THE DEPOSIT OF MICROORGANISMS
FOR THE PURPOSES OF PATENT PROCEDURE

INTERNATIONAL FORM

To. Samyang Genex
263 Yonji-dong,
Chongro-gu,
Seoul 110-725,
Korea

RECEIPT IN THE CASE OF AN ORIGINAL
issued pursuant to Rule 7.1 by the
INTERNATIONAL DEPOSITARY AUTHORITY
identified at the bottom of this page

I. IDENTIFICATION OF THE MICROORGANISM	
Identification reference given by the DEPOSITOR : <i>Escherichia coli</i> -pETCDPE-SYG321	Accession number given by the INTERNATIONAL DEPOSITARY AUTHORITY: KCCM11406P
II. SCIENTIFIC DESCRIPTION AND/OR PROPOSED TAXONOMIC DESIGNATION	
The microorganism identified under I above was accompanied by: <input type="checkbox"/> a scientific description <input type="checkbox"/> a proposed taxonomic designation (Mark with a cross where applicable)	
III. RECEIPT AND ACCEPTANCE	
This International Depository Authority accepts the microorganism identified under I above, which was received by it on March. 29. 2013. (date of the original deposit) ¹	
IV. INTERNATIONAL DEPOSITARY AUTHORITY	
Name : Korean Culture Center of Microorganisms Address : 361-221, Yurim B/D Hongje-1-dong Seodaemun-gu SEOUL 120-091 Republic of Korea	Signature(s) of person(s) having the power to represent the International Depository Authority or of authorized official(s): Date: March. 29. 2013. 

¹ Where Rule 6.4(d) applies, such date is the date on which the status of international depository authority was acquired; where a deposit made outside the Budapest Treaty after the acquisition of the status of international depository authority is converted into a deposit under the Budapest Treaty, such date is the date on which the microorganism was received by the international depository authority.



BUDAPEST TREATY ON THE INTERNATIONAL
RECOGNITION OF THE DEPOSIT OF MICROORGANISMS
FOR THE PURPOSES OF PATENT PROCEDURE

INTERNATIONAL FORM

To. Samyang Genex
263 Yonji-dong,
Chongro-gu,
Seoul 110-725,
Korea

RECEIPT IN THE CASE OF AN ORIGINAL
issued pursuant to Rule 7.1 by the
INTERNATIONAL DEPOSITARY AUTHORITY
identified at the bottom of this page

I. IDENTIFICATION OF THE MICROORGANISM	
Identification reference given by the DEPOSITOR : <i>Ensifer adhaerens</i> SYG29	Accession number given by the INTERNATIONAL DEPOSITARY AUTHORITY: KCCM11405P
II. SCIENTIFIC DESCRIPTION AND/OR PROPOSED TAXONOMIC DESIGNATION	
The microorganism identified under I above was accompanied by: <input type="checkbox"/> a scientific description <input type="checkbox"/> a proposed taxonomic designation (Mark with a cross where applicable)	
III. RECEIPT AND ACCEPTANCE	
This International Depository Authority accepts the microorganism identified under I above, which was received by it on March. 29. 2013. (date of the original deposit) ¹	
IV. INTERNATIONAL DEPOSITARY AUTHORITY	
Name : Korean Culture Center of Microorganisms Address : 361-221, Yurim B/D Hongje-1-dong Seodaemun-gu SEOUL 120-091 Republic of Korea	Signature(s) of person(s) having the power to represent the International Depository Authority or of authorized official(s): Date: March. 29. 2013.

¹ Where Rule 6.4(d) applies, such date is the date on which the status of international depository authority was acquired; where a deposit made outside the Budapest Treaty after the acquisition of the status of international depository authority is converted into a deposit under the Budapest Treaty, such date is the date on which the microorganism was received by the international depository authority.



BUDAPEST TREATY ON THE INTERNATIONAL
RECOGNITION OF THE DEPOSIT OF MICROORGANISMS
FOR THE PURPOSES OF PATENT PROCEDURE

INTERNATIONAL FORM

To. Samyang Genex
263, Yonji-dong,
Chongro-gu,
Seoul 110-725,
Korea

RECEIPT IN THE CASE OF AN ORIGINAL
issued pursuant to Rule 7.1 by the
INTERNATIONAL DEPOSITARY AUTHORITY
identified at the bottom of this page

I. IDENTIFICATION OF THE MICROORGANISM	
Identification reference given by the DEPOSITOR : <i>Ensifer adhaerens</i> SYG29M	Accession number given by the INTERNATIONAL DEPOSITARY AUTHORITY: KCCM11652P
II. SCIENTIFIC DESCRIPTION AND/OR PROPOSED TAXONOMIC DESIGNATION	
The microorganism identified under I above was accompanied by: <input type="checkbox"/> a scientific description <input type="checkbox"/> a proposed taxonomic designation (Mark with a cross where applicable)	
III. RECEIPT AND ACCEPTANCE	
This International Depositary Authority accepts the microorganism identified under I above, which was received by it on December. 24, 2014. (date of the original deposit) ¹	
IV. INTERNATIONAL DEPOSITARY AUTHORITY	
Name : Korean Culture Center of Microorganisms Address : Yurim B/D 45, Hongjenae-2ga-gil Seodaemun-gu SEOUL 120-861 Republic of Korea	Signature (s) of person (s) having the power to represent the International Depositary Authority or of authorized official (s) : Date: December. 24, 2014.

¹ Where Rule 6.4(d) applies, such date is the date on which the status of international depositary authority was acquired; where a deposit made outside the Budapest Treaty after the acquisition of the status of international depositary authority is converted into a deposit under the Budapest Treaty, such date is the date on which the microorganism was received by the international depositary authority.

Form BP/4

Sole page

한국미생물보존센터

120-091 서울시 서대문구 홍제1동 361-221 유림빌딩 Tel: 02-391-0950, 396-0950 Fax: 02-392-2859 E-mail: kccmfcc@kccm.or.kr

KOREAN CULTURE CENTER OF MICROORGANISMS

Yoolim Bldg., 361-221 Hongje-1dong, Seodaemun-gu, Seoul, 120-0191, Korea Tel: 82-2-391-0950, 396-0950 Fax: 82-2-392-2859 E-mail: kccmfcc@kccm.or.kr



BUDAPEST TREATY ON THE INTERNATIONAL
 RECOGNITION OF THE DEPOSIT OF MICROORGANISMS
 FOR THE PURPOSES OF PATENT PROCEDURE

INTERNATIONAL FORM

To. Samyang Genex
 263 Yonji-dong,
 Chongro-gu,
 Seoul 110-725,
 Korea

RECEIPT IN THE CASE OF AN ORIGINAL
 issued pursuant to Rule 7.1 by the
 INTERNATIONAL DEPOSITARY AUTHORITY
 identified at the bottom of this page

I. IDENTIFICATION OF THE MICROORGANISM	
Identification reference given by the DEPOSITOR : <i>Corynebacterium glutamicum</i> SYG321-C	Accession number given by the INTERNATIONAL DEPOSITARY AUTHORITY: KCCM11593P
II. SCIENTIFIC DESCRIPTION AND/OR PROPOSED TAXONOMIC DESIGNATION	
The microorganism identified under I above was accompanied by: <input type="checkbox"/> a scientific description <input type="checkbox"/> a proposed taxonomic designation (Mark with a cross where applicable)	
III. RECEIPT AND ACCEPTANCE	
This International Depository Authority accepts the microorganism identified under I above, which was received by it on October. 29. 2014. (date of the original deposit) ¹	
IV. INTERNATIONAL DEPOSITARY AUTHORITY	
Name : Korean Culture Center of Microorganisms. Address : Yurim B/D 45, Hongjennae-2ga-gil Seodaemun-gu SEOUL 120-861 Republic of Korea	Signature(s) of person(s) having the power to represent the International Depository Authority or of authorized official(s) : Date: October. 29. 2014.



¹ Where Rule 6.4(d) applies, such date is the date on which the status of international depository authority was acquired; where a deposit made outside the Budapest Treaty after the acquisition of the status of international depository authority is converted into a deposit under the Budapest Treaty, such date is the date on which the microorganism was received by the international depository authority.

Form BP/4

Sole page



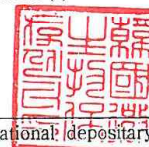
BUDAPEST TREATY ON THE INTERNATIONAL
RECOGNITION OF THE DEPOSIT OF MICROORGANISMS
FOR THE PURPOSES OF PATENT PROCEDURE

INTERNATIONAL FORM

To. Samyang Genex
263 Yonji-dong,
Chongro-gu,
Seoul 110-725,
Korea

RECEIPT IN THE CASE OF AN ORIGINAL
issued pursuant to Rule 7.1 by the
INTERNATIONAL DEPOSITARY AUTHORITY
identified at the bottom of this page

I. IDENTIFICATION OF THE MICROORGANISM	
Identification reference given by the DEPOSITOR : <i>Microbacterium foliorum</i> SYG27B	Accession number given by the INTERNATIONAL DEPOSITARY AUTHORITY: KCCM11774P
II. SCIENTIFIC DESCRIPTION AND/OR PROPOSED TAXONOMIC DESIGNATION	
The microorganism identified under I above was accompanied by: <input type="checkbox"/> a scientific description <input type="checkbox"/> a proposed taxonomic designation (Mark with a cross where applicable)	
III. RECEIPT AND ACCEPTANCE	
This International Depositary Authority accepts the microorganism identified under I above, which was received by it on September. 24. 2015. (date of the original deposit) ¹	
IV. INTERNATIONAL DEPOSITARY AUTHORITY	
Name : Korean Culture Center of Microorganisms Address : Yurim B/D 45, Hongjenae-2ga-gil Seodaemun-gu SEOUL 120-861 Republic of Korea	Signature (s) of person (s) having the power to represent the International Depositary Authority or of authorized official (s) : Date: September. 24. 2015.



¹ Where Rule 6.4(d) applies, such date is the date on which the status of international depositary authority was acquired; where a deposit made outside the Budapest Treaty after the acquisition of the status of international depositary authority is converted into a deposit under the Budapest Treaty, such date is the date on which the microorganism was received by the international depositary authority.

4. 교육 및 컨설팅 : 3건

No	교육 및 컨설팅명	대상기관	일시
1	사이코스 기술설명회	롯데중앙연구소	2015.02.24
2	사이코스 기술설명회	동서식품연구소	2015.09.24
3	사이코스 2차 기술설명회	롯데중앙연구소	2016.01.07

5. 타연구에 활용 및 2단계 연구에 활용 (1건)

사이코스 기능성 연구 농기평 과제 수행 진행 중

- 과제명 : 비만억제 기능성원료 사이코스 시럽의 개별인정 및 제품화 연구
- 주관 기관 : 삼양제넥스 식품연구소, 협동기관 : 가톨릭대학교 성 빈센트 병원
- 연구기간 : 2013년 7월~2016년 7월 (3년)
- 체지방 축적 억제 임상전 연구 및 임상 연구 진행
- 연구 성과물로 개별인정 취득 목표로 하여 기능성 식품으로도 응용 예정

제 2 장 국내외 기술개발 현황

D-사이코스(D-psicose)는 과당(fructose)의 3번 탄소의 에피머(epimer)로써 설탕과 비교했을 때 70% 감미도를 갖지만(Oshima 2006) 에너지는 0.3% 밖에 없으므로 다이어트 식품의 저칼로리 감미료로 적용 가능한 기능성 단당류임. (Matsuo et al. 2002). 또한 포도당의 흡수를 억제하여 혈당 억제 작용을 하는 기능이 있어 당뇨병 환자용 식품, 수신용 식품 등에 응용할 수 있으며, 간에서의 지질합성에 관여하는 효소 활성을 억제하는 기능이 있어 복부지방 축적 억제를 할 수 있으므로 건강식품 등 여러 기능성 식품 등에 사용할 수 있다. (Matsuo et al. 2001; Iida et al. 2008; Hayashi et al. 2010; Hossain et al. 2011).

위와 같은 특징으로 사이코스는 설탕을 대체 할 수 있는 좋은 소스이나 사이코스는 자연계에 극히 드물게 존재하는 단당류인 희소당에 속하기 때문에 식품산업에 적용하기 위해서는 사이코스를 효율적으로 생산하는 방법이 필요하다.

기존의 사이코스 생산 방법으로는 주로 화학적 과정을 거쳐 생산됨. 빌릭(Bilik)등은 폴리브산 이온의 촉매작용을 이용하여 과당에서 사이코스로 전환하는 방법을 제안함. 맥도날드(McDonald)는 1,2:4,5-디- σ -이소프로필리덴-베타-D-프락토피라노스(1,2:4,5-*isopropylidene-beta-D-fructopyranose*)로 부터 3단계의 화학적 처리과정으로 사이코스를 생산함. 또한 도너(Doner)는 에탄올과 트리메틸아민과 함께 과당을 가열하여 사이코스를 생산함. 그러나 이들 화학적 생산방법에는 비용이 많이 소모되는 반면 그 효율은 낮고 또한 부산물들이 많이 발생한다는 단점이 있다.

생물학적 사이코스 생산방법으로는 미생물의 세포반응을 이용하여 갈락티톨(galactitol), D-타가토스 또는 D-탈리톨 등으로부터 사이코스를 생산하는 방법이 제안됨(Ken Izumori). 그러나 이 방법은 기질이 희소당에 속하기 때문에 경제성이 없으므로 산업적 생산에 응용하기 힘들. 산업화에 가장 효율적인 방법은 D-케토오스 3-에피머화효소 군 중 과당에서 사이코스로 전환하는 효소를 찾는 방법임. 과당은 자연계 중에 흔히 존재하는 곡물류에서 유래된 전분에서 당화시킨 포도당을 이성화하여 만듦으로써 원료면에서 경제성을 가지고 있음. 기존에 발표된 내용은 크로스트리디움 셀룰로리티쿰 H(10)(Mu et al. 2011), 아그로박테리움 투메패시언스(Kim et al. 2006), 슈도모나스 치코리(Itoh et al. 1994), 리조비움 스페로이데스(Zhang et al. 2009) 유래의 D-타가토스 3-에피머화 효소를 대장균에 삽입하여 형질전환 시킨 후 형질전환된 대장균에서 발현된 D-타가토스 3-에피머화 효소를 사용하여 과당에서 사이코스를 생산한다.

제 3 장 연구개발수행 내용 및 결과

1절. 1차년도 (2013년) 연구개발수행 내용 및 결과

연구 범위	연구수행방법 (이론적·실험적 접근방법)	구체적인 내용
<ul style="list-style-type: none"> ● 사이코스 전환 균주 확보 	<ul style="list-style-type: none"> ● 사이코스 전환능이 있는 환경 유래 미생물 스크리닝 ● 활성 증가 균주 개량 	<ul style="list-style-type: none"> ● 과수 및 식물 주변 토양 시료에서 사이코스를 단독 탄소원으로 하는 최소배지에서 생존하는 미생물 선택 ● UV, γ-선을 이용한 무작위적 돌연변이 유발 후 배양 조건 최적화를 통한 활성 증가 균주 선택
<ul style="list-style-type: none"> ● 사이코스 전환능이 있는 재조합 효소 확보 	<ul style="list-style-type: none"> ● 분자생물학적 도구를 사용 활성 예상 유전자 스크리닝 ● 선택 유전자를 error-prone PCR과 효소의 3차 구조를 바탕으로 rational design을 실시 point mutation, saturation mutation방법으로 활성이 향상된 효소 확보 	<ul style="list-style-type: none"> ● 유전자 상동성 검색을 통하여 활성을 갖는 후보 유전자를 대상으로 재조합 유전자 구축 ● 대장균의 발현 시스템을 이용하여 단백질 발현 후 활성 측정 ● 활성 유전자 확보 ● 효소 특성 조사 후 산업화에 약점이 될 수 있는 특징을 선택하여 분자 수준에서 진화 실시 : 단백질 발현양 증대 ● 반응 조건 최적화로 활성 증가 조건 확립
<ul style="list-style-type: none"> ● GRAS 균주 확보 	<ul style="list-style-type: none"> ● GRAS 균주 중 <i>Corynebacterium glutamicum</i>에서 단백질 발현 벡터 시스템 구축 	<ul style="list-style-type: none"> ● 대장균에서 구축된 효소 발현 시스템을 식품에 사용 가능한 균주인 <i>C. glutamicum</i>에서 발현 시킬 수 있도록 프로모터 스크리닝 ● <i>C. glutamicum</i>에서 발현 가능한 벡터 시스템 구축

1. 환경 유래 미생물 균체반응으로 사이코스 전환조건 확립 및 균주개량

가. 균주 스크리닝

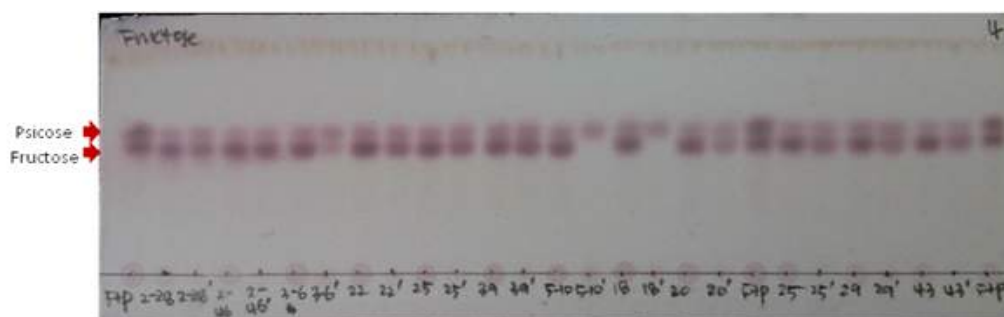
MSP plate에서 선별된 사이코스 전환균주

시료	번호	개수
토양1	16, 17, 18, 48	4
토양2	28, 46	2
토양3	6, 22, 25, 39	4
토양4	X	0
토양5	10, 18, 20, 25, 29, 43, 36	7
토양6	15, 16, 26, 27	4
토양7	43	1
토양8	X	0
토양9	1, 2, 6, 7, 8, 9, 27, 38, 39, 41, 42,	12
총계		34

나. 과당으로부터 사이코스 생산균주 선별

사이코스를 과당으로 전환하는 균주 34종은 1% fructose와 0.05% psicose를 함유한 Mineral salt 액체배지에 접종하여 30℃에서 24시간 진탕배양 하였다. 배양액은 12,000rpm에서 10분간 원심분리하여 균체를 회수한 뒤 0.85% NaCl로 세척하고 50mM PIPES buffer(pH 8.0)으로 균체를 부유시킨다.

균체는 음파진동기를 이용하여 파쇄 하였으며, 저온에서 원심분리하여 상등액을 crude enzyme으로 사용하였다. Crude enzyme은 10mM 과당을 기질로 사용하여 30℃에서 8시간 동안 반응하였으며 TLC 분석을 통해 그림1과 같이 과당을 사이코스로 전환하는 균주를 선별하였다.



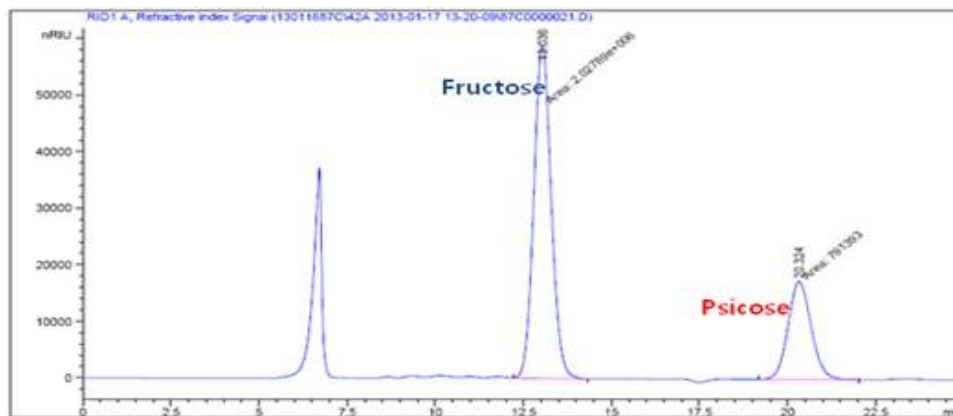
과당을 사이코스로 전환 하는 균주 TLC 분석 결과

TLC 분석 결과를 가지고 Imagej 분석을 통해 과당을 사이코스로 전환하는 균주의 전환율 우선순위를 선정하여 8종의 균주를 선별하였으며, 중복되는 균주를 제외하고 전환율 20%이상 균주 6종을 선별하였다. 선별된 균주는 1차 동정을 위해 universal primer 27F, 1492R을 사용하여 PCR을 실시하였으며 PCR 산물을 가지고 16s rDNA sequencing을 실시하였다. 염기서열 분석을 통하여 동정된 균주는 *Sinorhizobium* sp., *Pseudomonas fluorescens*, *Kaistia granuli*, *Pseudomonas putida*, *Microbacterium oxidans*, *Paenibacillus glycanilyticus*로 확인하였다.

다. 고농도 과당으로부터 사이코스 생산균주 선정

상기 6개 균주 가운데 고농도 과당에서도 사이코스를 전환하는 균주를 선별하기 위하여 배양된 각각의 균주를 400g/L 과당과 1mM 망간 이온을 첨가한 50mM PIPES buffer (pH 7.0)를 넣어 부유시키고, 70°C에서 6시간 동안 균체와 과당과의 반응을 실시하였다.

반응액은 가열하여 반응을 정지시키고 HPLC를 통하여 사이코스 생산을 확인하였다. HPLC 분석은 Aminex HPX-87C 컬럼이 장착된 HPLC(Agilent, USA)의 Refractive Index Detector를 이용하였으며 (Agilent 1260 RID) 용매는 물, 80°C에서 유속 0.6ml/min으로 수행하였다. 위와 같이 HPLC 분석을 통해서 시간 내에 과당에서 사이코스를 가장 많이 생산한 균주 1종을 최종 선정하였다.

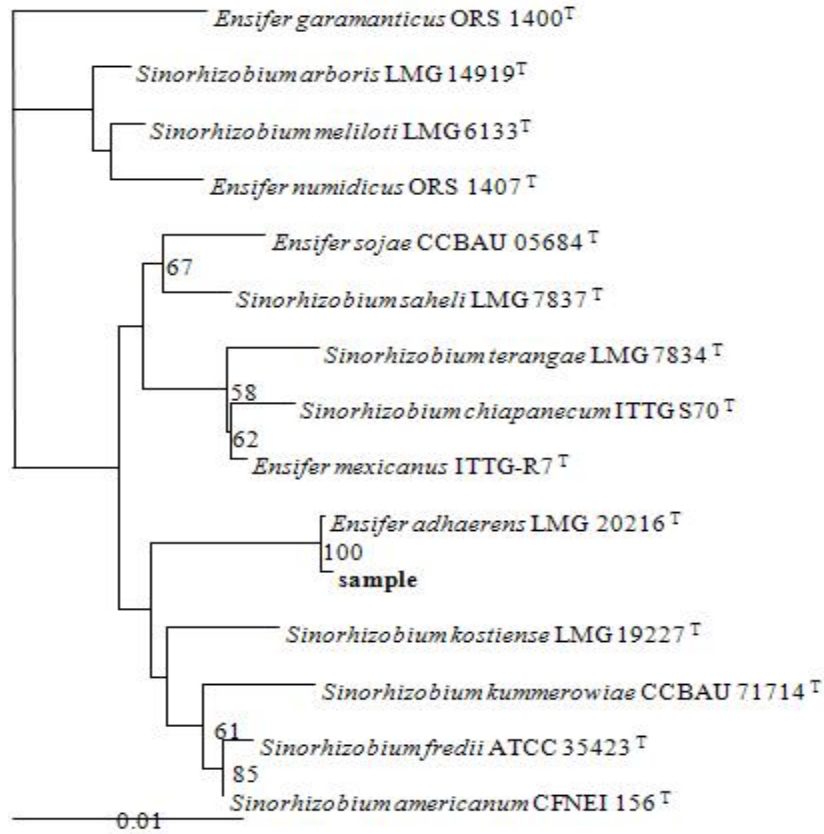


균체반응을 통해 고농도 과당으로부터 사이코스 생산 HPLC분석 크로마토그램

라. 분리균주의 동정

사이코스 생산을 위해 최종 선정된 균주1종의 동정을 위해 그람염색과 API 20NE를 이용한 생화학적 특성을 확인하였으며, 16S rRNA 서열을 분석하기 위해 universal primer 27F, 1492R을 사용하여 PCR을 실시하였으며 그 산물을 가지고 16s rDNA sequencing을 실시하였다. 16S

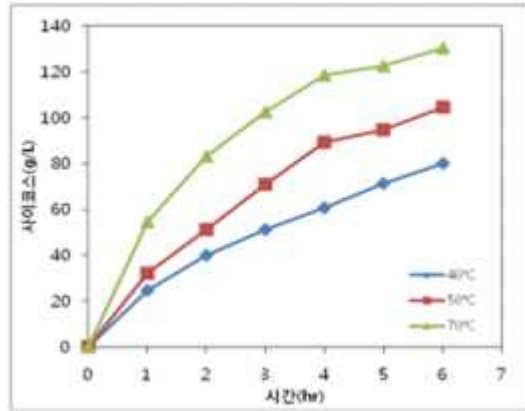
rRNA 염기서열 및 phylogenetic tree, 생화학적 특성 분석결과 *Ensifer adhaerens* 균주로 확인되었으며 이를 *Ensifer adhaerens* SYG29로 명명하였다.



선발된 사이코스 생산균주 phylogenetic tree 분석

마. *Ensifer adhaerens* free cell을 이용한 사이코스 생산성

상기에서 확립된 사이코스 대량생산 조건 하에서 반응 시간에 따른 최대 생산성을 확인하였음. 분리된 균주의 균체 농도 40mg-dcw/ml, 500g/L 과당농도 및 pH 7.0 조건 하에서, 온도 조건을 40, 50, 또는 70℃로 하여 위에서 결정된 최적 조건으로 반응을 실시하였다. 상기 반응은 6시간 동안 진행하였으며 1시간 간격으로 사이코스 생산성을 HPLC 분석을 통하여 확인하였다.



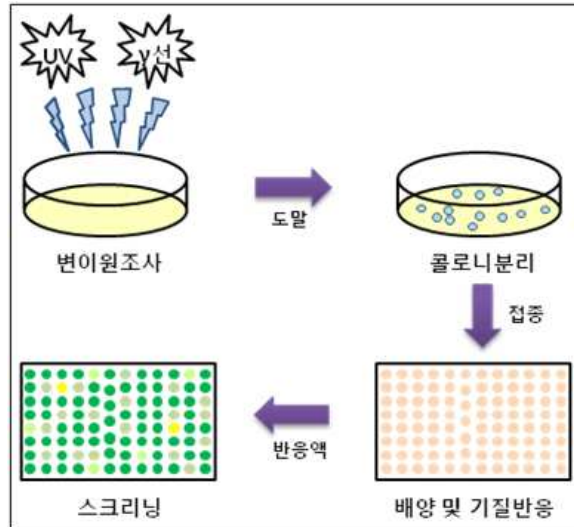
그림에서 나타난 바와 같이, 반응 온도가 증가하고 시간이 지날수록 사이코스 생산성이 증가하였으며, 특히 70°C, 6시간 후 사이코스 최대 생산성을 나타냈다.

2. Random mutagenesis를 이용한 사이코스 전환활성 증가 *Ensifer adhaerens* 균주 선별

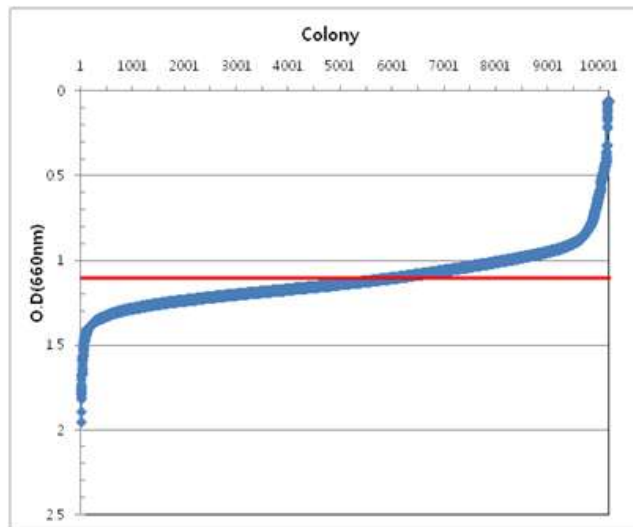
가. HTS를 이용한 사이코스 생산성 향상 균주 선별

Random mutagenesis를 통해 확보한 균주들 중에서 생산성이 향상된 균주만을 고속 탐색하기 위하여 HTS system을 이용하였으며 사이코스 전환활성은 발색법을 이용한 fructose dehydrogenase assay방법을 사용하였다. 96 well plate에 MSP broth를 분주하고 UV 및 감마선을 조사한 후 배양하여 얻은 콜로니를 접종하여 30°C에서 750rpm, 20시간 동안 배양하였다. 배양한 cell은 50mM PIPES buffer(pH7.0)에 녹인 10mM fructose와 50°C에서 500rpm으로 1시간 동안 반응하였으며 반응 완료 후 10ul를 취하여 0.1% triton x-100이 포함된 McIlvaine buffer(pH4.5) 70ul에 넣어 반응을 정지시켰다. 상기 용액에 D-fructose dehydrogenase와 potassium ferricyanide 용액을 넣고 37°C에서 20분간 반응하고 발색을 위해 ferric sulfate용액을 넣어 37°C에서 20분간 반응하였다.

반응이 완료된 용액은 660nm에서 흡광도를 측정하여 과당의 전환여부를 확인하였다. 흡광도가 낮을수록 과당에서 사이코스로전환이 많이 일어난 것으로 볼 수 있으며 실험을 통해 선별된 활성 증가 균주는 flask 상태에서 배양 하여 전환활성을 재확인하였다.



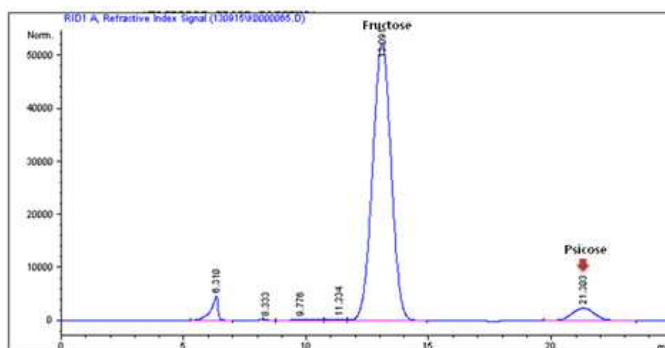
HTS를 이용한 *E. adhaerens*의 random mutagenesis



사이코스 생산 mutant의 균주 활성 경향 그래프

그림과 같이 HTS를 통해 탐색한 균주의 사이코스 전환활성을 확인한 결과 평균 O.D_{660nm}이 1.11로 나타났으며(실선) 평균값을 기준으로 우상향에 분포한 균주들이 사이코스 전환활성이 증가한 균주이다. wild type의 경우 과당과 반응하였을 때 최종 전환율이 약 30%이므로 정량하였을 때 흡광도가 0.89 이하인 균주의 경우는 30% 이상 전환된 값이므로 실험의 오차로 판단하고 제외하였다. 총 143개 균주가 활성이 증가한 것으로 확인되었으며 위 균주들은 flask에서 배양하여 활성을 재확인 하였다.

나. 선별된 균주의 사이코스 전환 활성증가 재확인(Flask test)



wild type 균체 반응 HPLC chromatogram

	Fructose (Area)	Psicose (Area)	Specific activity* (Unit)	활성증가 (%)
Wild type	2780709.5	113513	576.3	100
#63	2746004.7	150994.3	771.8	133

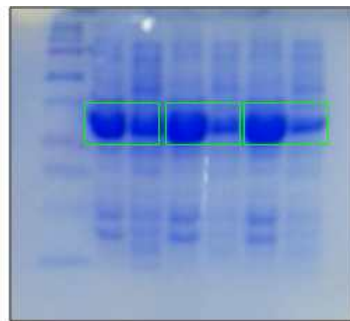
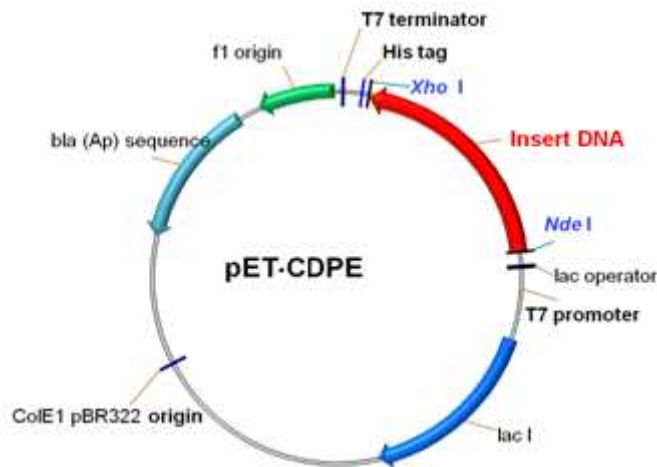
*Specific activity(Unit): 균체 1mg에서 시간당 생성되는 사이코스 mM

3. 재조합 단백질의 특성조사 및 효소개량

균주 유래	명명 상태 (단백질 이름)	새로운 후보균
1) 인분	hypothetical protein	<i>Clostridium hylemonae</i> DSM 15053 (ZP_03778576.1)
2) 인간 장 내 미생물 human intestinal bacteria (fecal flora)	hypothetical protein	<i>Clostridium scindens</i> ATCC 35704 (ZP_02432283.1)
3) 감염성 심내막염	hypothetical protein	<i>Abiotrophia defectiva</i> ATCC 49176 (ZP_04452015.1)
4) 질소고정균	sugar phosphate isomerase	<i>Rhizobium leguminosarum</i> bv. <i>viciae</i> USDA 2370(EJ_B01238.1)
5) 인분	hypothetical protein	<i>Clostridium bolteae</i> ATCC BAA-613 (ZP_02082557.1)
6) 만성 장염	hypothetical protein	Lachnospiraceae bacterium 3_1_46FAA (ZP_08338870.1)
7) 인분	hypothetical protein	<i>Anaerotruncus colihominis</i> DSM 17241 (ZP_02444800.1)
8) 포도	sugar phosphate isomerase	<i>Sphaerochaeta pleomorpha</i> str. Grapes (YP_005063155.1)

가. 사이코스 전환 유전자 스크리닝 2종의 유전자 목록 중 과당으로부터 사이코스를 생산하는 효소 발견함 : D-Psicose 3-epimerase (*Clostridium scindens*) 이후 CDPE라 명명함.

나. *Clostridium scindens* (CDPE) 유래 D-Psicose 3-epimerase cloning



신규효소
 -Hypothetical protein(*Clostridium scindens*)
 - IPTG Induction: 1mM, 0.5mM, 0.1mM

다. 효소 특성 연구

(1) 온도에 따른 활성 분석

사이코스 생산 최적 온도를 확인하기 위하여, 50 mM PIPES 버퍼 (pH 7.0), 반응기질 50 mM 과당을 0.005 mg/ml의 효소를 사용하여 30 내지 80°C 범위에서 온도를 변화시키면서, 5 분 동안 반응시키고 100°C에서 5분간 끓여 효소를 실효시킨 뒤 HPLC 분석을 통하여 사이코스 생산량을 측정하였다.

아래 그림에서 나타난 바와 같이 반응 온도가 높아질수록 활성이 증가하였다. 60°C에서 최대 활성을 나타내며 그 이후 온도에서는 활성이 급격히 떨어지는 것으로 나타났다.

(2) pH에 따른 효소 활성 분석

사이코스 생산 최적 pH를 확인하기 위하여, 반응온도 60℃에서 50 mM sodium acetate pH4-6, 50 mM sodium citrate pH5-7, 50 mM PIPES pH7, 50 mM Tris-HCl pH7-9, 50 mM glycine NaOH pH9-10에서 반응기질 50 mM 과당을 0.005 mg/ml의 효소를 사용하여 5분 동안 반응시키고 100℃에서 5분간 끓여 효소를 실활시킨 뒤 HPLC 분석을 통하여 사이코스 생산량을 측정하였다.

그 결과 아래 그림에서 나타난 바와 같이 PIPES 버퍼 pH7.5에서 가장 높은 활성을 보였다.

(3) 금속이온 요구성 분석

기존 문헌 보고에 의하면 D-psicose 3-epimerase는 금속이온 요구성이 있다고 발표 되어짐.

본 연구진에 의해 밝혀진 CDPE의 금속에 대한 특성을 알아보기 위해 1 mM CuCl₂, MnCl₂, CaCl₂, ZnSO₄, MgSO₄, NiSO₄, CoCl₂, FeSO₄을 첨가하여 그 활성 변화를 관찰한 결과 아래와 같이 코발트, 철 망간에 의하여 활성이 증가함을 보였다.

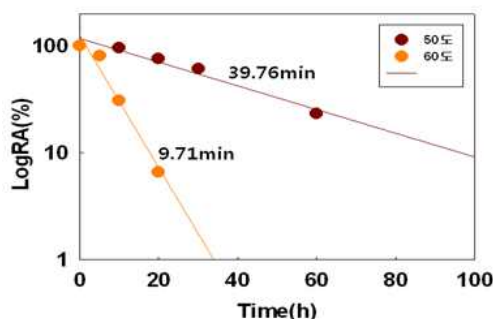
(4) 기질특이성 분석

비교적 넓은 기질 특이성을 가지고 있는 당 관련 효소들의 특징에 근거하여 본 연구에 의해 밝혀진 CDPE의 기질 특이성을 알아보기 위하여 과당, 사이코스, 타가토스, 만노스, 포도당, 자일로스에 대한 활성을 살펴 본 결과 다른 당 관련 효소와는 다르게 사이코스과 과당에서만 활성을 나타냈다.

	Psicose	Fructose	Tagatose	Mannose	Glucose	Xylose
Relative activity (%)	100	68.2	-	-	-	-

(5) 열안정성 분석 및 증대

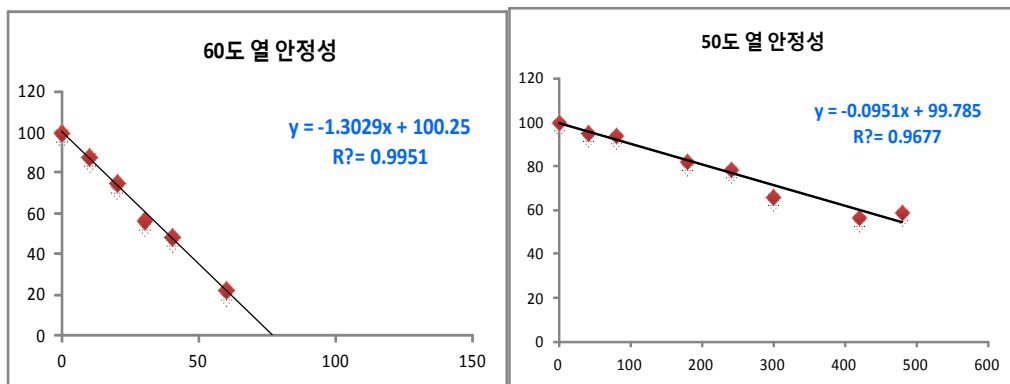
사이코스 생산온도를 결정하기 위해서는 최적 온도 보다는 안정성이 확보된 온도가 산업적으로 유리하다. 산업적으로 적용 가능한 온도범위는 일반적으로 50-60℃로써 CDPE의 half-life를 측정해 본 결과 50℃에서는 40min, 60℃에서는 10min 이하의 약한 열 안정성을 보였다.



이 효소는 활성과 단위 cell당 효소 발현율은 기존에 발표된 다른 D-psicose 3-epimerase에 비하여 뛰어나나 열안정성측면에서는 산업화에 응용하기 어려움 따라서 열안정성을 개선시키는 연구가 필요하다.

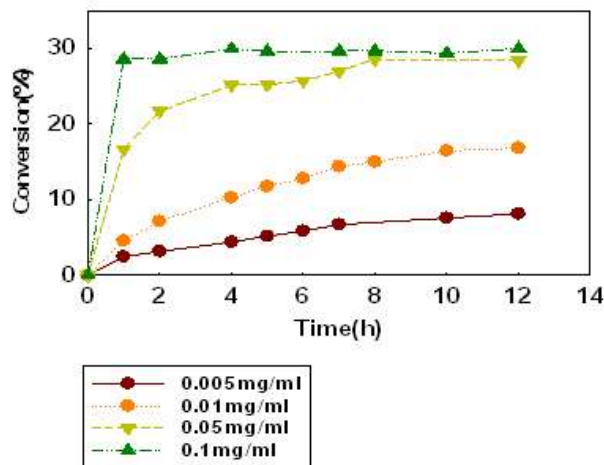
D-psicose 3-epimerase의 단백질 구조 연구에 의하면 이 효소의 3차 구조를 유지 하는데 중요한 요인 중의 하나는 금속이온이다. CDPE에서 활성 증가를 보인 금속인 코발트를 단백질 정제 후 16℃에서 4시간 이상 incubation 하여 코발트가 효소 active site 내에 안정적이게 binding 할 수 있는 조건을 만들어주었다.

그 결과 50℃ 40min, 60℃ 10분 미만인 온도 안정성은 50℃ 8.72시간, 60℃ 40분으로 증가하였다.



다. 고농도 과당에서 사이코스 생산성 분석

산업적으로 응용성을 갖추기 위해서는 고농도 과당에서 기질 저해 현상이 없이 본래의 활성을 유지해야한다. CDPE를 500g/L 과당에서 반응시켜 보았을 때 효소 0.1 mg/ml 에서 최종 152 g/L의 사이코스를 생산하여 고농도의 과당에서도 사이코스 전환율 30.9%를 획득 할 수 있었다.



4. 트레포니아 프리미티아 (*Treponema primitia* ZAS-1) 유래 D-psicose 3-epimerase (TDPE) 의 효소 개량

가. mutation site 선정

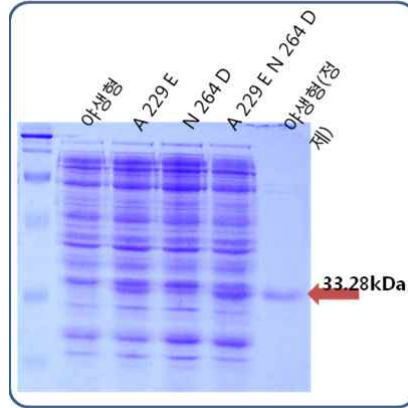
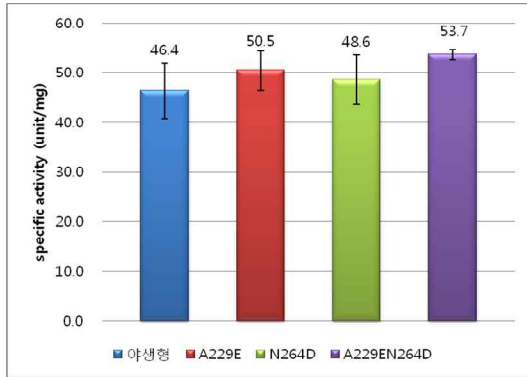
TDPE와 기존에 밝혀진 다른 D-사이코스 3-에피머화 효소의 sequence alignment를 통해, 특별히 TDPE만 다른 잔기를 선별 하였다. 그 중에서, modeling을 통한 구조 상 중요하다고 판단되는 위치, 즉 수용성 발현율을 높일 수 있는 위치에 존재한다거나, 4차 구조 형성에 영향을 미칠 것으로 예상되는 위치에 존재하는 잔기를 돌연변이 하기로 하고, 각 잔기를 선정하였으며, 그 잔기와 각각의 선정 이유는 아래와 같다.

치환 잔기	선정이유 (가정)
N 81 P	<i>Ruminococcus</i> sp. 5_1_39B_FAA와 <i>Clostridium cellulolyticum</i> H10은 P
I 103 V	Alpha helix 4와 beta sheet 4사이 짧은 loop, CH3하나가 짧아짐
S 119 T	dimer와 dimer가 interaction하는 부분
L 120 K	dimer와 dimer가 interaction하는 부분
A 125 K	<i>Ruminococcus</i> sp. 5_1_39B_FAA와 <i>Clostridium cellulolyticum</i> H10이 K, helix 끝부분이 charge 있으면서 길어지면 Solubility가 좋아질 수 있음
A 143 E	<i>Ruminococcus</i> sp. 5_1_39B_FAA와 <i>Clostridium cellulolyticum</i> H10은 Charge 가 있으므로 solubility가 좋아질 수 있음
Q 215 C	<i>Agrobacterium tumefaciens</i> evolution 논문에서 thermostability가 증대된 부분
K 222 R	<i>Clostridium cellulolyticum</i> H10 만 R, dimer 형성 부분
A 229 E	<i>Treponema primitia</i> ZAS-1만 제외하고 모두 E, tetramer를 형성하는 부분
I 255 V	fructose가 binding하기 위한 ring들이 몰려 있는 곳
N 264 D	dimer-dimer interaction하는 바깥쪽 loop에 위치, charge가 생기면 solubility와 multimer구조가 안정화 될 수 있음
D 277 E	<i>Clostridium cellulolyticum</i> H10만 glutamate인데 잔기가 더 길면 주변 상황 전체가 좋아질 수 있음

나. 수용성 발현율에 대한 부위-지향성 돌연변이 유발 효과

야생형과 A229E, N264D, A229E/N264D 돌연변이체의 발현 양 증가 여부를 육안으로 쉽게 확인하기 위하여 상등액을 SDS-PAGE를 내려서 이를 확인하였다.

단량체 분자량은 33.2kDa 이며, 해당하는 돌연변이체의 밴드가 두께로 비교해 보았을 때 10배 이상의 발현율 차이를 보였다.

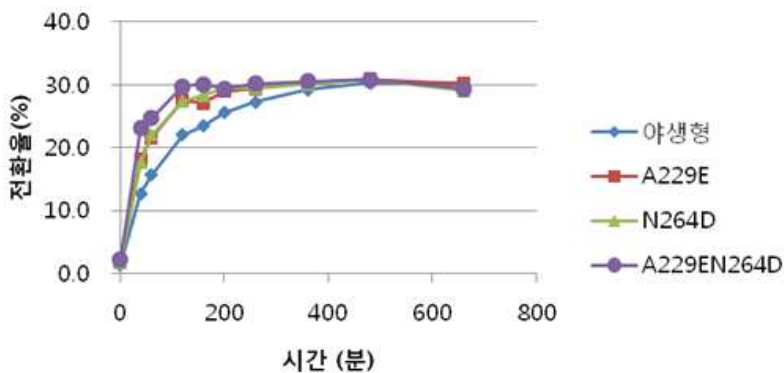


다. 변이 D-사이코스 3-에피머화 효소에 의한 사이코스 생산

변이 효소에 의한 고농도 과당에서 생물전환에 의한 사이코스 생산을 확인하고자, 변이 효소를 400g/L의 과당과 반응하여 사이코스 생산능 분석을 분석하였다.

고농도 과당에서의 사이코스 에피머화 효소와 야생형 돌연변이의 활성 실험 결과 발현을 증대가 가장 두드러진 A229EN264D의 돌연변이체에서 전환이 가장 빠르게 일어나며, A229E, N264D 역시 야생형보다 빠른 사이코스로의 전환을 보이며 전환율은 30%이다.

40% 고농도 과당 세포 전환반응

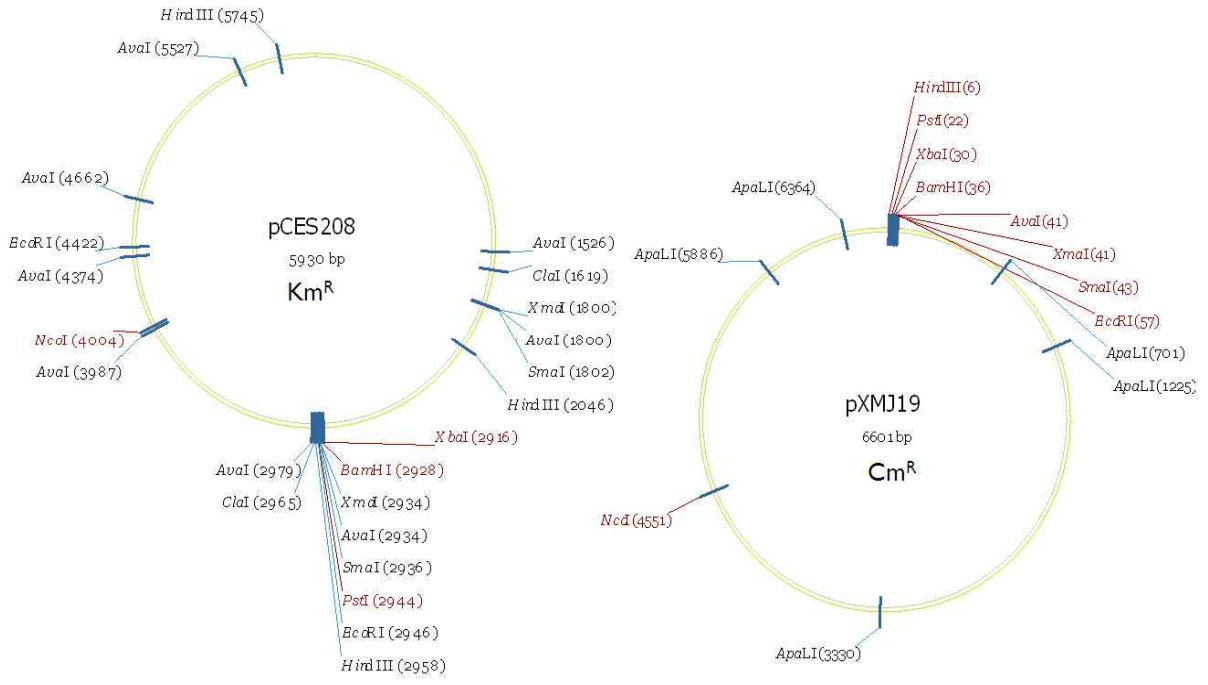


5. GRAS 생산 균주 (*Corynebacterium glutamicum*) 형질전환 및 발현조건 확립

가. 유전자 재조합

(1) *E. coli* - *C.glutamicum*간의 shuttle vector 선정하기 위하여 아래 벡터 시스템을 검토하였다.

- pXMJ19 (6601 bp), Cm^R, pCES208 (5930 bp), Km^R



shuttle vector의 copy number, handling 편의성 등의 비교 분석을 통해 pCES208 vector의 사용 결정하였다.

(2) CDPE 와 TDPE의 발현이 최대가 되는 promoter를 찾기 위한 promoter 목록은 아래와 같다.

- sod promoter (코리네박테리움 유래)
- tac promoter (pKK223-3 vector)
- tac2 promoter (pKD vector)
- trc promoter (pTrc991 vector)
- synthetic promoter (L10, L26, H30, H36)

* tac, tac2, trc promoter sequence 비교

TAC	TGTAATATGCTCGG C TACTAATTAACAGT
TAC2	TGTAATATGCTCGG CCTACTAATTAACAGT
TRC	TGTAATATGCTCGG C TACTAATTAACAGT
CONSENSUS	TGTAATATGCTCGG .CTACTAATTAACAGT
	***** * *****

(3) Primer 제작 및 Cloning 제한 효소 선정

- 대상유전자: 기존에 *E. coli*에서 발현 확인한 TDPE, CDPE 유전자
- Primer design

	Cloning vector	Promoter	Cloning site
1차 cloning	pKK223-3	tac promoter	XmaI / HindIII
2차 cloning	pXMJ19 pCES208	tac promoter	XbaI / SacI NotI / XbaI
1차 cloning	pKD	tac2 promtoer	BamHI / HindIII
2차 cloning	pXMJ19 pCES208	tac2 promtoer	XbaI
1차 cloning	pTrc99	trc promoter	XmaI / HindIII
2차 cloning	pXMJ19 pCES208	trc promtoer	XbaI
cloning	pXMJ19 pCES208	sod promoter	XbaI / SacI NotI / XbaI
cloning	pCES208	L10 L26 H30 H36	BamHI / NotI

(4) 유전자 재조합 과정



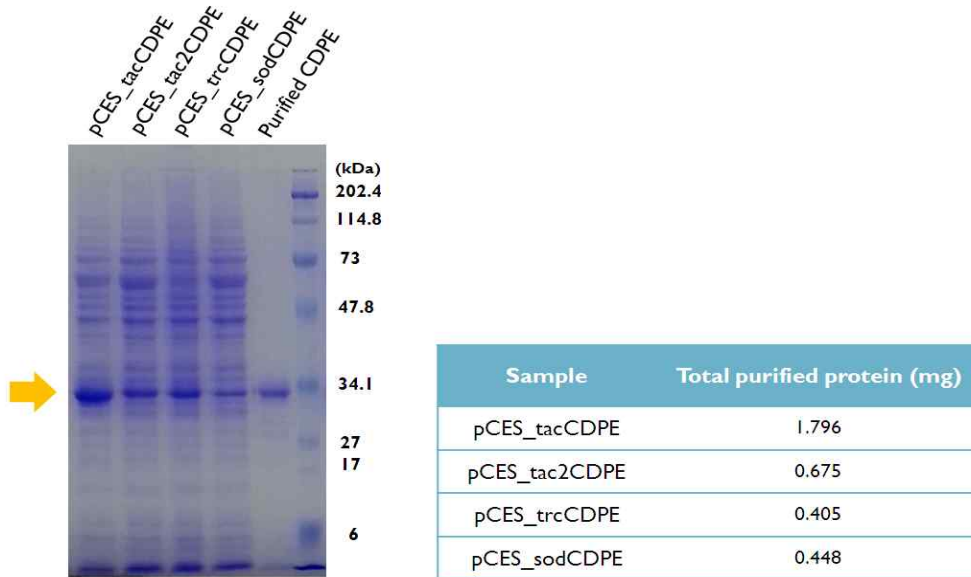
나. 단백질 발현

(1) Cell culture

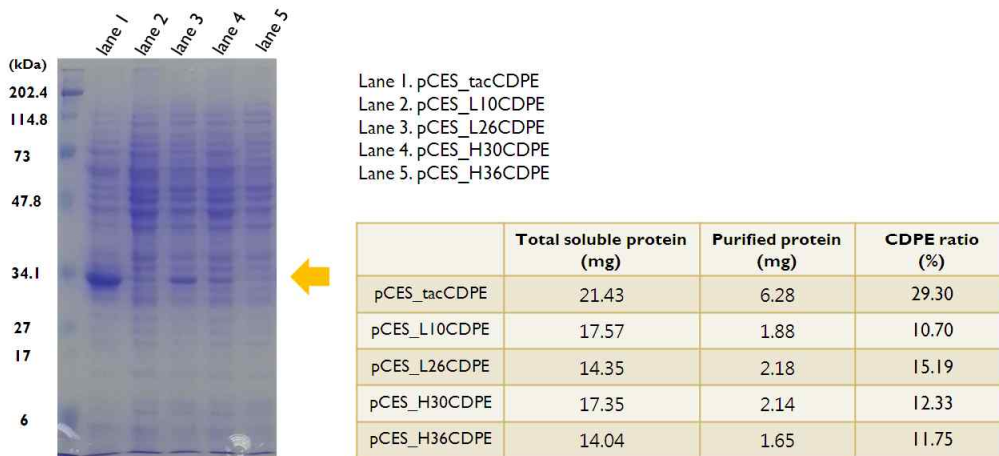
- 발현 균주: *Corynebacterium glutamicum*
- 배지 및 배양온도: LB 배지, 30도에서 Seed culture 후, 본 배양은 30도에서 24시간 배양

(2) 발현 확인(SDS-PAGE) 및 발현단백질 정량 - promoter 비교

- tac, tac2, trc, sod promoter



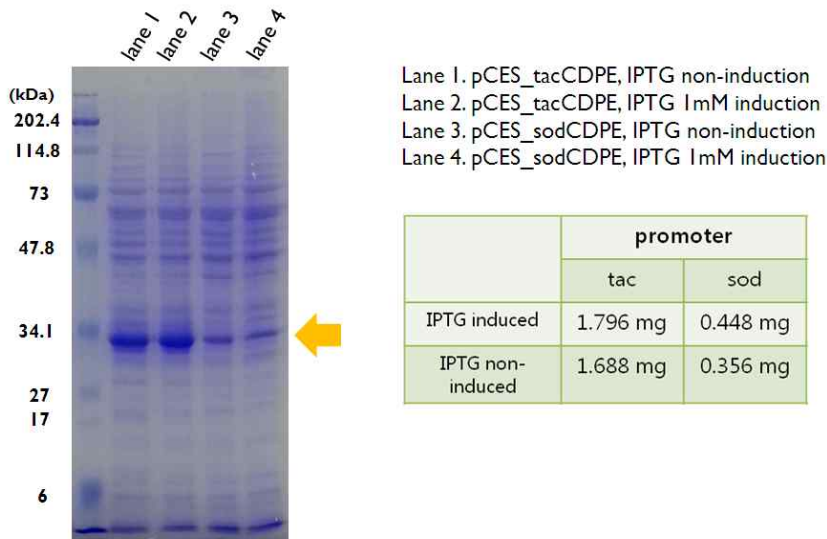
- Synthetic promoter



CDPE를 발현시키는데 각 promoter가 미치는 영향을 비교한 결과, tac promoter가 가장 뛰어나다는 것을 확인할 수 있었고 발현율은 *E. coli*에서 pET system(T7 promoter)과 비슷한 수준인 28~30% 정도라는 것을 확인할 수 있었다.

(3) 발현 확인(SDS-PAGE) 및 발현단백질 정량 -IPTG induction 비교

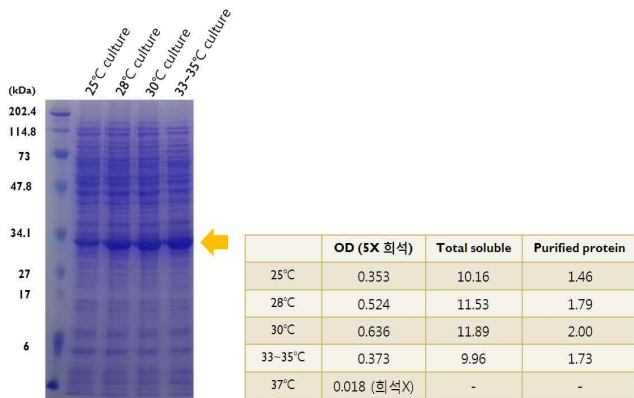
- 같은 조건의 cell culture 상에서 IPTG induction이 단백질 발현에 미치는 영향 확인



IPTG induction의 유무에 따른 단백질 발현율을 tac promoter와 sod promoter에서 확인. 그 결과 IPTG로 induction을 진행했을 때 발현율이 약간 증가하는 것을 볼 수는 있었으나 그 정도가 미미하였다.

(4) 발현 확인(SDS-PAGE) 및 발현단백질 정량 - 온도 비교

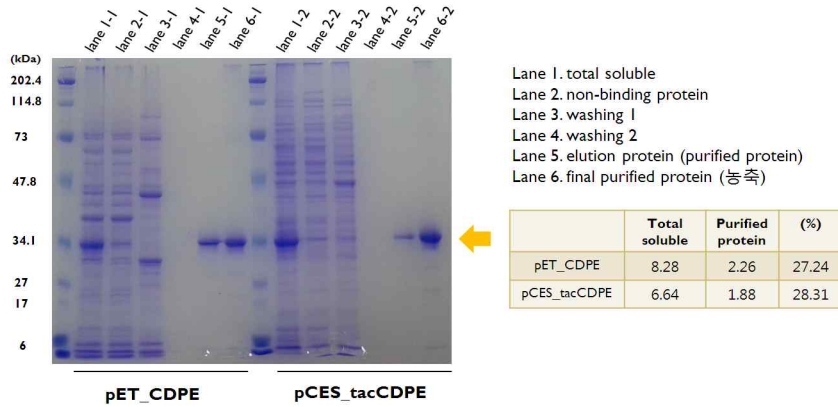
- 온도 조건 : 25, 28, 30, 33~35, 37°C



코리네박테리움 cell이 자라는 최적온도는 30°C이며, 단백질 발현율은 30°C 또는 33~35°C에서 가장 높게 나타났다.

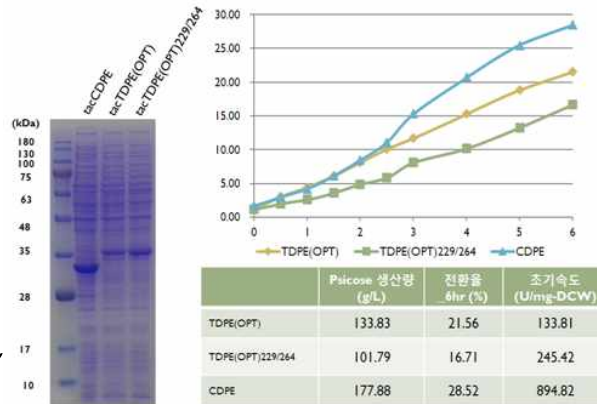
(5) 단백질 His-tag purification

- pET21a_CDPE & pCES_tacCDPE 각각의 His-tag purification 실험 진행 결과 약 34kDa 크기의 단백질이 정제됨. crude protein과 단백질양을 비교했을 때 약 28%의 목적 단백질이 발현되었고 이는 대장균에서 발현한 것과 같은 수준이다.



다. 활성 측정

Corynebacterium cell 반응 으로 사이코스 생산 가능성을 알아보기 위하여 500g/L의 과당에 다음과 같은 유전자가 각각 발현된 cell을 60°C에서 6시간 동안 반응시킨 결과이다.



-pCES_tacTDPE(OPT)229/264-1mg/ml

그림과 같이 CDPE, TDPE(wild), TDPE(mutant) 모두 반응은 일어났으며, 그중 CDPE가 발현된 cell의 활성이 가장 뛰어남을 알 수 있었다.

6. 상품화를 위한 인허가 준비

(가) GMO 미생물 안전성 평가를 위한 인허가 항목에 대한 식약처 방문 상담

(나) GMO 미생물 안전성 평가를 위한 시험 기관 및 시험 항목 선정

- 시험 기관 : 한국 생명공학 연구원
- 시험 항목 : GMO 미생물 기초위해성평가, 유전자분석평가, 및 독성/알레르기 평가
- 연구범위 : 신규삼입유전자산물 아미노산 상동성 검색, 신규삼입유전자산물 물리화학적 안

정성 시험, 신규삽입유전자 sequencing, 숙주 유전자 영향 유무 확인을 위한 Southern blot 분석, Qualitative GMO PCR detection kit 제작, 신규삽입단백질 독성 및 알레르기성 안정성 시험, 및 단회투여독성시험 등

- 연구 기간 : 2013년 11월 25일부터 2014년 11월 24일까지 12개월

2절. 2차년도 (2014년) 연구개발수행 내용 및 결과

연구범위	연구수행방법 (이론적·실험적 접근방법)	구체적인 내용
<ul style="list-style-type: none"> ● 사이코스 생산 미생물 생산성 증가 조건 탐색 	<ul style="list-style-type: none"> ● 산업용 적합 GMO 미생물 개발 - 최적 프로모터 선발, free-cell 물리 이화학적 처리 	<ul style="list-style-type: none"> ● <i>C. glutamicum</i> host에서 사이코스 전환 효소의 안정성을 고려한 활성형 형태의 발현을 만족시키는 프로모터 선발 ● 효소의 고정화를 통한 전환공정에서 활성 증가를 위한 free-cell 처리방법 고안
<ul style="list-style-type: none"> ● 사이코스 생산 미생물 발효 조건 정립 	<ul style="list-style-type: none"> ● 5L 발효조에서 활성 유지 조건 최고 cell mass 생산 조건 탐색 ● 30L 발효조에서 재현성 확인으로 scale-up 가능성 타진 	<ul style="list-style-type: none"> ● 5L 발효조에서 사이코스 전환 유전자 보유 <i>C. glutamicum</i> 의 배지 최적화 및 high cell density culture 배양방법 탐색 ● 산업화에 적용될 경제성 있는 배양 배지의 전환을 위한 배지 최적화 연구 ● scale-up시 재현성 확인으로 산업화 가능성 타진 - 30L 발효조 운전조건 탐색
<ul style="list-style-type: none"> ● 사이코스 함유 시럽 생산 조건 정립 	<ul style="list-style-type: none"> ● 고정화 생물 반응기를 이용한 Non-GMO 균주 및 GMO 균주를 통한 시럽 생산 	<ul style="list-style-type: none"> ● Non-GMO 균주 또는 GMO 균주를 고정화하여 생물 반응기를 디자인한 후 최대 전환율, 안전성 증대 생물반응기 조건 등의 경제성을 고려한 운전조건 및 생물반응기 선택
<ul style="list-style-type: none"> ● 고순도 사이코스 시럽 생산 조건 정립 	<ul style="list-style-type: none"> ● FPLC를 이용한 사이코스 분리 조건 및 결정화 조건 탐색 	<ul style="list-style-type: none"> ● 결정화를 위한 사이코스 분리 조건 탐색
<ul style="list-style-type: none"> ● GMO 미생물 인허가 관련 시험 	<ul style="list-style-type: none"> ● <i>C. glutamicum</i> host에 재조합된 사이코스 생산 유전자 및 유전자 유래 생성 물질의 인체 유해성 시험 	<ul style="list-style-type: none"> ● 신규 삽입 유전자산물 아미노산 상동성 검색-유전자 알러젠/ 독성 여부 확인 ● 신규삽입 유전자산물 물리화학적 안정성 시험 ● 유전자 분석 평가-염기서열의 부가, 삽입, 결실 등의 비의도적인 변이 여부를 확인 ● 동물 단회 투여 독성 및 알레르기성 평가

1. 활성 환경 유래 미생물 및 재조합 균주 발효 조건 탐색

가. 사이코스 생산 Non-GMO 미생물 발효 조건 정립

(1) 목적

- 1차년도 연구 결과 자연계에서 분리한 균주인 *Ensifer adhaerens*는 활성 측면과 안정성 측면에서 사이코스 생산에 매우 적합한 균주로 판단되었다.

- 또한 이 균주를 사용하여 사이코스를 생산한다면 식품 인허가 측면에서 GMO 미생물을 사용한 사이코스 보다 인허가 기간이 단축되므로 시장의 빠른 진입을 예상할 수 있었다.

- 그러나 미생물 성장에서 GMO 미생물과 비교하여 cell mass가 낮은 점을 고려 이점을 해결하기 위하여 돌연변이를 발생 시켜 생장이 증가된 균주를 선택, 산업화에 이용할 수 있는지 여부를 판단하고자 한다.

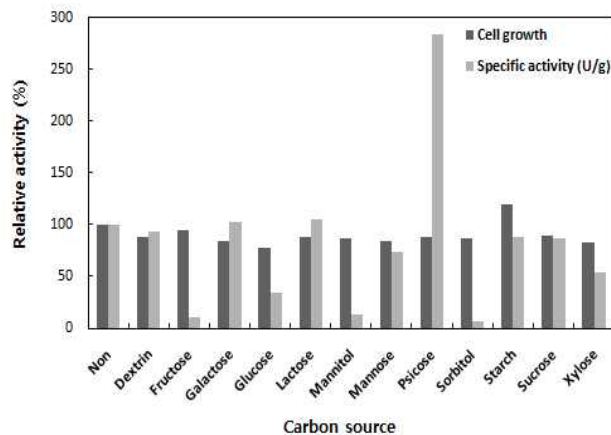
(2) 배지 최적화 (flask 조건)

(가) 탄소원의 영향

- 상기 분리된 균주의 영양원의 영향을 확인하기 위해, 250 ml 플라스크에 50 ml Mineral salt broth를 넣고 탄소원(dextrin, fructose, galactose, lactose, mannitol, mannose, psicose, sorbitol, starch, sucrose, xylose)을 달리하여 28℃에서 250rpm에서 24시간 진탕 배양하였다.

- 일정한 균주의 균체 농도 및 과당 농도 400 g/L로 하고, 온도를 70℃로 하여 30분 반응하여, 사이코스 생산량을 HPLC 분석을 통하여 측정하여 사이코스 전환 활성을 얻었다.

- 그림에 나타낸 바와 같이 각 탄소원이 cell growth에는 큰 영향을 미치지 않았으나, 활성에는 영향을 나타내는 것을 확인하였다. 특히, psicose를 탄소원으로 사용하였을 때, 가장 높은 활성을 나타내었다.



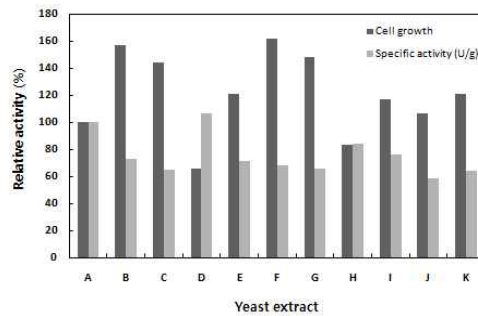
탄소원의 영향

(나) Yeast extract의 영향

- Yeast extract의 종류에 대한 영향을 살펴보기 위해, 250ml 플라스크에 50ml Mineral salt psicose broth에 탄소원을 무첨가 한 후 11가지 제조 회사별 yeast extract를 달리하여 28℃에서 250rpm에서 24시간 진탕 배양하였다.

- 일정한 균체 농도 및 과당 농도 400 g/L로 하고, 온도를 70℃로 하여 30분 반응하여, 사이코스 생산량을 HPLC 분석을 통하여 측정하여 사이코스 전환 활성을 얻었다.

- 그림의 결과를 토대로 최종적으로 F를 선정하였다.



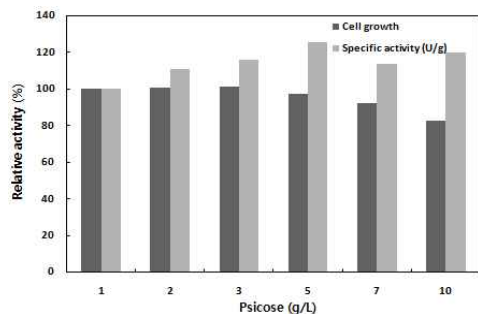
Yeast extract 농도별 영향

(다) Psicose 농도의 영향

- 배양에 적절한 배지 내 psicose의 농도를 확인하기 위해 psicose 농도별 사이코스 전환 활성을 측정하였다. 250 ml 플라스크에 50 ml Mineral salt broth를 넣고 psicose를 각각 1, 2, 3, 5, 7, 10 g/L 첨가하여 28℃에서 250rpm에서 24시간 진탕 배양하였다.

- 일정한 균체 농도 및 과당 농도 400 g/L로 하고, 온도를 70℃로 하여 30분 반응하여, 사이코스 생산량을 HPLC 분석을 통하여 측정하여 사이코스 전환 활성을 얻었다.

- 그림 3을 보면, psicose의 농도가 3 g/L보다 높아질수록 cell growth는 점점 감소하고 활성은 5 g/L에서 가장 높은 것으로 나타났다. 본 실험을 통해 경제성 및 total activity (U/L) 측면에서 최적 배지 조건에서의 psicose 농도는 3 g/L로 정하여 실험을 진행하였다.

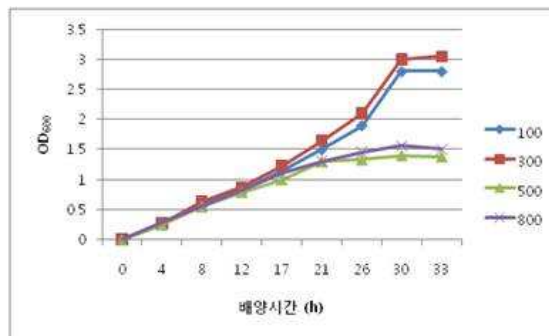


사이코스 농도별 영향

(3) *Ensifer adhaerens* 균주 5L 발효조 배양

(가) RPM에 따른 균체 성장 영향

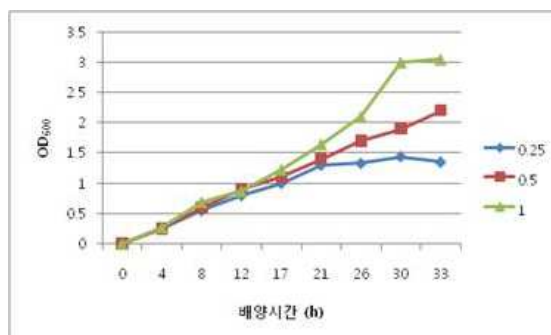
5L 발효조를 이용하여 *Ensifer adhaerens* 균주의 rpm에 따른 균체 성장 영향을 확인하기 위해, 500ml 플라스크에 250ml 최적배지에 12~16시간 동안 전배양(30°C, 250rpm) 하였다. 전배양 후 플라스크 배양액을 5L 발효조(배양볼륨 2.5L)에 접종하여 배양하면서 균체 성장(OD_{600nm}) 특성을 분석하였다. 배양조건은 배양온도 30°C, 공기 주입속도는 1.0vvm으로 하였으며, rpm(100, 300, 500, 800rpm)을 달리하여 실험하였다. 실험결과, rpm이 높을수록 균체 성장이 낮았으며, 300rpm에서 33시간째에 가장 높은 OD_{600nm} 3.0을 나타냈다.



RPM의 영향

(나) Aeration volume에 따른 균체 성장 영향

5L 발효조를 이용하여 *Ensifer adhaerens* 균주의 aeration volume에 따른 균체 성장 영향을 확인하기 위해, 500ml 플라스크에 250ml 최적배지에 12~16시간 동안 전배양(30°C, 250rpm) 하였다. 전배양 후 플라스크 배양액을 5L 발효조(배양볼륨 2.5L)에 접종하여 배양하면서 균체 성장(OD_{600nm}) 특성을 분석하였다. 배양조건은 배양온도 30°C, 300rpm, 공기 주입속도(0.25, 0.5, 1.0)를 달리하여 실험하였다. 실험결과, 그림 6에 나타낸 바와 같이 1.0vvm에서 OD_{600nm} 3.0으로 가장 높은 균체 성장을 보였다.



Aeration volume의 영향

(3) 선발된 *Ensifer adhaerens* 균주 30L 발효조 배양 scale-up

- 5L 발효조에서 최적화 되어진 *Ensifer adhaerens* 균주의 배양 조건을 바탕으로 하여 30L 발효조에서 질소원 농도별 세포 배양을 하였다. 배지 조성은 5L 조건과 동일하게 하였으며, Yeast extract 농도를 1 g/L, 5 g/L, 10 g/L로 각각 배양하여 세포의 성장 및 균체의 활성을 알아보았다.

- 종 배양 조건은 5L 조건과 동일하게 진행 하였으며, 1차 50mL vol.후 2차 1L vol.으로 배양 하여 최종 30L 발효조(실 배양 부피 20L)에 배양 부피 5%로 접종하여 배양을 진행하였다.

- 그 결과 배양 24시간에 질소원 농도가 증가 할수록 세포의 증가양상을 나타냈다. 그러나, 질소원 농도에 따라 균체의 활성은 각기 다르게 나타나며, yeast extract 농도가 증가 할수록 오히려 활성은 감소하는 양상을 나타낸다.

나. 사이코스 생산 GMO 미생물 발효 조건 정립

(1) 목적

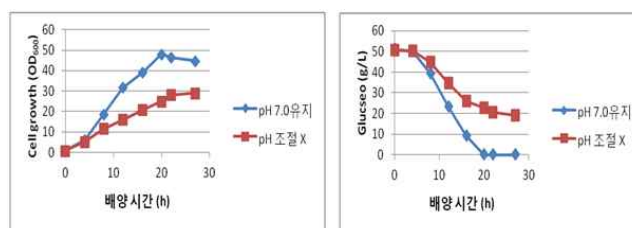
사이코스 산업화에 가장 적합한 균주인 *Corynebacterium glutamicum* CDPE 균주의 대량생산을 위하여 5L, 30L scale-up 발효조 조건을 경제성 기준으로 최적화한다.

(2) 5L 발효조 배양 조건 최적화

1) pH 조절 유무에 따른 균체 성장 영향

- 5L 발효조를 이용하여 *Corynebacterium glutamicum* CDPE 균주의 pH 조절 유무에 따른 균체 성장 영향을 확인하기 위해, 500 ml 플라스크에 250 ml 기본 배지에 12시간 동안 전배양 (30°C, 250 rpm) 하였다. 전배양 후 플라스크 배양액을 5L 발효조(배양 볼륨 2.5 L)에 접종하여 균체 성장 (OD_{600nm})을 분석하였다.

- 일정한 배양 조건에서 pH 7으로 조절유무에 따른 영향을 살펴보았다. 실험 결과, pH를 7로 조절하지 않았을 때 배양 시작 후 20시간이 지나도 glucose를 다 소모하지 못했으며, 최종적으로 OD_{600nm}에서 30을 나타냈다. 반면, pH를 7로 조절했을 때 배양시작 후 20시간째에 glucose를 모두 소모하였다. 이후 배양은 pH를 7로 조절하는 조건으로 고정하였다.

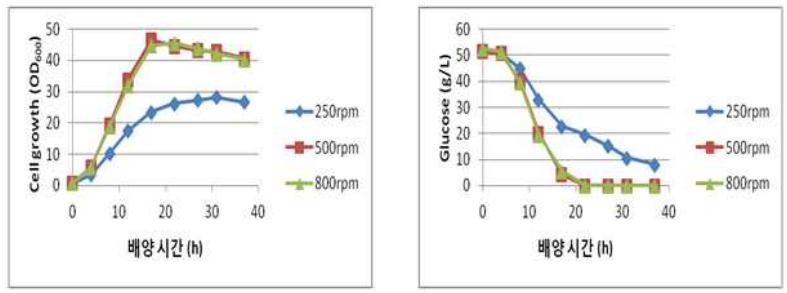


pH 조절 유무에 따른 균체 성장 및 Glucose 소모량

(3) RPM에 따른 균체 성장 영향

- 5L 발효조를 이용하여 *Corynebacterium glutamicum* CDPE 균주의 rpm에 따른 균체 성장 영향을 확인하기 위해, 500ml 플라스크에 250ml 기본배지에 12시간 동안 전배양(30°C, 250rpm) 하였다. 전배양 후 플라스크 배양액을 5L 발효조(배양볼륨 2.5)에 접종하여 배양하면서 균체 성장(OD_{600nm})특성을 분석하였다. 일정한 배양조건에서 rpm (250, 500, 800rpm)을 달리하여 배양 하였다.

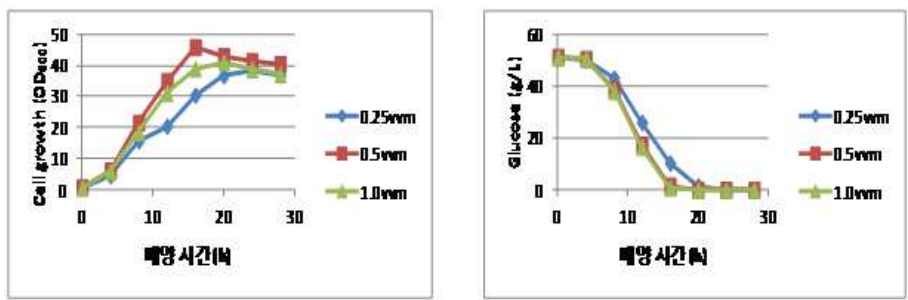
- 실험결과 그림에서 나타난 바와 같이500rpm과 800rpm은 비슷한 성장을 보였다.



5L 발효조의 RPM에 따른 균체 성장 및 Glucose 소모량

(4) 공기주입속도에 따른 균체 성장 영향

- 5L 발효조를 이용하여 *Corynebacterium glutamicum* CDPE/TDPE 균주의 Aeration volume 에 따른 균체 성장 영향을 확인하기 위해, 500ml 플라스크에 250ml 기본배지에 12시간 동안 전배양(30°C, 250rpm) 하였다. 전배양 후 플라스크 배양액을 5L 발효조(배양볼륨 2.5)에 접종하여 배양하면서 균체 성장(OD_{600nm})특성을 분석하였다. 일정한 배양조건에서 공기주입속도(0.25, 0.5, 1.0vvm)를 달리하여 배양하였다.



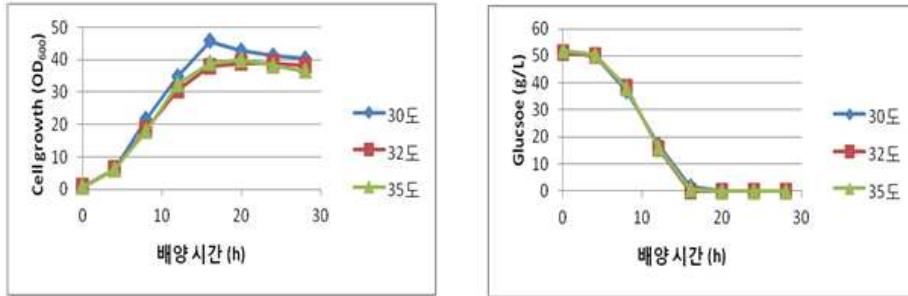
공기 주입 속도에 따른 균체 성장 및 Glucose 소모량

(5) 온도에 따른 균체 성장 영향

- 5L 발효조를 이용하여 *Corynebacterium glutamicum* CDPE/TDPE 균주의 온도에 따른 균체 성장 영향을 확인하기 위해, 500ml 플라스크에 250ml 기본배지에 12시간 동안 전배양 하였다.

전배양 후 플라스크 배양액을 5L 발효조에 접종하여 배양하면서 균체 성장(OD_{600nm})특성을 분석하였다. 배양조건은 온도(30, 32, 35°C)를 달리하여 배양하였다.

- 실험결과 그림에서 나타난 바와 같이 30°C에서 가장 높은 성장을 보였으며, 이후 배양은 30°C로 고정하였다.

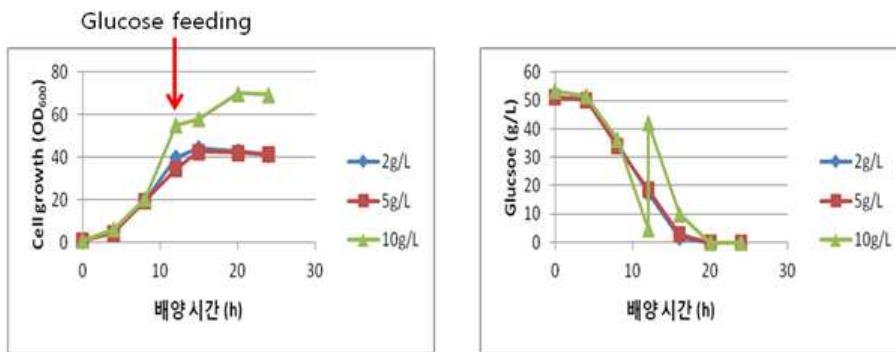


온도에 따른 균체 성장 및 Glucose 소모량

(6) 질소원 농도에 따른 균체 성장 영향

- 5L 발효조를 이용하여 *Corynebacterium glutamicum* CDPE 질소원 농도에 따른 균체 성장 영향을 확인하기 위해, 500ml 플라스크에 250ml 기본배지에 12시간 동안 전배양하였다. 전배양 후 플라스크 배양액을 5L 발효조에 접종하여 배양하면서 균체 성장(OD_{600nm})특성을 분석하였다. 배양조건은 yeast extract 농도(2, 5, 10g/L)를 달리하여 배양하였다.

- 실험결과 그림에서 나타난 바와 같이 yeast extract 10g/L에서 최고를 나타냈으며, 이때 glucose를 feeding하였다.



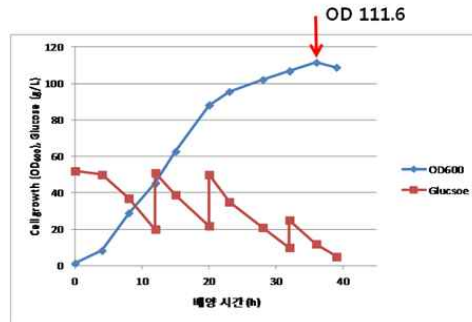
질소원 농도에 따른 균체 성장 및 Glucose 소모량

(7) 유가식 배양을 통한 균체 배양

- 5L 발효조를 이용하여 *Corynebacterium glutamicum* CDPE/TDPE 유가식 배양을 위해, 500ml 플라스크에 250ml 기본배지에 12시간 동안 전배양 하였다. 전배양 후 플라스크 배양액을 5L 발효조에 접종하여 배양하면서 균체 성장(OD_{600nm})특성을 분석하였다. 배양 12시간 후

배양볼륨을 고려해 공기주입속도 0.7vvm, 700rpm으로 배양하였다.

- 실험결과 그림에서 나타낸 바와 같이 12시간째 계속적으로 glucose를 feeding하여 36시간째 약 최고를 나타냈다.



유가식 배양 시, 균체 성장 및 Glucose 소모량

다. 30L 발효조에서 재연성 확인으로 scale-up 가능성 타진

(1) 목적

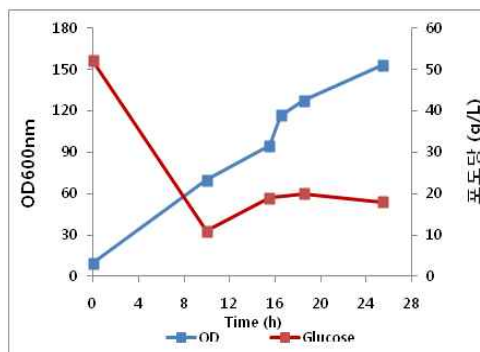
- 5L 발효조 조건에서 배양이 되어진 GMO 균주의 pilot scale 배양 조건 확인 및 고정화 비드 제조에 이용 할 균체를 확보하기 위해 발효 scale-up을 진행하였다.

(2) GMO *Corynebacterium glutamicum* 균주의 Pilot (30L) Fermentation

- 5L 발효조에서 최적화 되어진 *Corynebacterium glutamicum* 균주의 배양 조건을 바탕으로 하여 30L 발효조에서 재현성을 확인 하였다.

- 종 배양 조건은 5L 조건과 동일하게 진행 하였으며, 1차 50mL vol.후 2차 1L vol.으로 배양 하여 최종 30L 발효조에 배양 부피 5%로 접종하여 배양을 진행하였다.

- 그 결과 배양 10시간에 포도당 농도 10g/L부터 포도당을 간헐적 Feeding을 통해 공급하여 배양 25시간에 최종 세포 O.D. 약 150까지 성장을 확인 하였다.



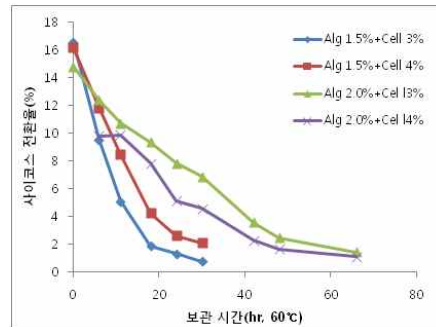
Yeast extract 농도별 세포 OD 변화

2. 고정화 생물 반응기를 이용한 Non-GMO 균주 및 GMO 균주를 통한 시럽 생산

가. 균체 고정화 알긴산 비드 제조 및 고정화 컬럼 반응

(1) 고정화 비드 균체 농도 및 알긴산 농도 테스트

- 알긴산 담체에 균체 고정화 최적 조건을 설정하기 위하여 균체 농도 3~4% (w/w), 알긴산 농도 1.5~2% (w/w)에서 비드를 제조하여 각 비드별 사이코스 전환율 및 안정성을 비교하였다.



Yeast extract 농도별 세포 OD 변화

(2) 고정화 반응 방법 설정

- 균체 고정화 된 알긴산 비드들은 그림과 같이 고정화 반응기에 충전 된 후 반응기 외부의 자켓에 일정한 온도의 온수를 공급하여 내부의 온도를 유지 시켜 온도에 의한 균체의 활성을 증가 또는 유지 시킨다.

- 반응에 투입되는 반응 기질은 약 40~50bx 농도로 맞추어 투입하며, 투입 속도는 batch 반응 결과를 바탕으로 하여 컬럼 반응시 기질 투입 시간당 사이코스 전환 시럽 생산 속도 SV(space velocity)를 결정하였다.



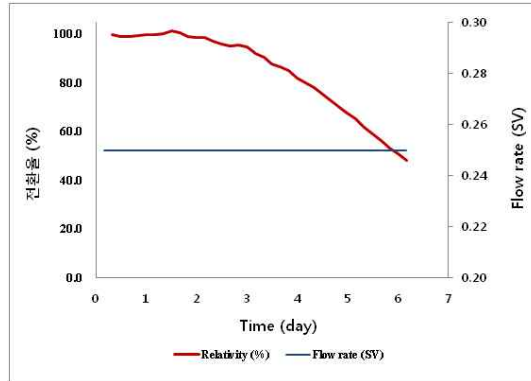
고정화 컬럼 충전된 균체 고정화 알긴산 비드에 의한 사이코스 시럽 생산

나. GMO 및 Non-GMO 균체 발현 효소별 고정화 컬럼 반응 조건 확립

(1) 결정 과당에 의한 Non-GMO (*Ensifer adhaerens*) 균체 고정화 컬럼 반응

- 회수된 균체로 제조 되어진 고정화 비드들의 생산 안정성을 알아보기 위해 컬럼 온도 60°C 에서 SV별 사이코스 시럽 생산성을 알아본다. 고정화 반응 조건은 아래와 같이 설정하여 진행 하였다.

(가) 고정화 컬럼 반응 조건별 실험



고정화 컬럼 충전된 균체(Non-GMO) 고정화 알긴산 비드에 의한 사이코스 시럽 생산

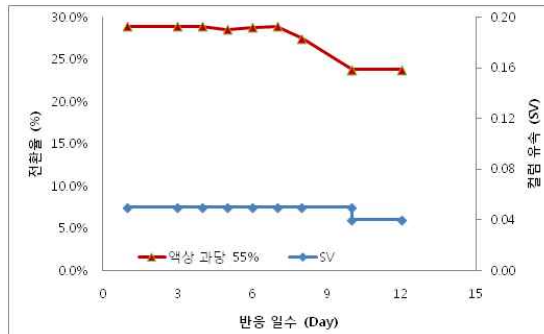
(나) 결과

- Non-GMO 균체 고정화 비드를 60도 고정화 컬럼 반응 결과 전환율이 약 2일 정도 유지 되었으나, 이후 3일째부터 급격히 활성이 감소함을 볼 수 있었다.

(2) 액상 과당에 의한 Non-GMO (*Ensifer adhaerens*) 균체 고정화 컬럼 반응

액상 과당 시럽을 이용하여 실제 사이코스 함유 시럽 생산성을 알아보기 위하여 액상 과당 시럽으로 고정화 반응을 진행하였다. 이때 고정화 반응 온도는 50°C에서 수행하였으며, SV별 사이코스 시럽 생산성을 알아본다. 고정화 반응 조건은 아래와 같이 설정하여 진행 하였다.

(가) 고정화 컬럼 반응 조건별 실험



고정화 컬럼 충전된 균체 고정화 알긴산 비드에 의한 사이코스 시럽 생산

(나) 고정화 컬럼 반응 결과

- Non-GMO 균주의 액상 과당에 의한 생산성을 알아본 결과 액상 과당은 0.05SV에서 약 5 일째 까지 안정성을 유지 하였으나, 그 이후 전환율이 급격히 감소 하였다.

- 이 결과 Non-GMO 균주에 의한 액상 과당 시럽의 생산성이 액상 과당에서 컬럼 부피 1L 당 시럽 생산량 약 3~7kg으로 매우 낮은 생산성을 나타낸다.

(3) GMO(*Corynebacterium glutamicum*)균체 발현 효소별 고정화 컬럼 반응

- 회수된 균체로 제조 되어진 고정화 비드들의 생산 안정성을 알아보기 위해 컬럼 온도 60℃에서 SV별 사이코스 시럽 생산성을 알아본다. 고정화 반응 조건은 아래와 같이 설정하여 진행 하였다.

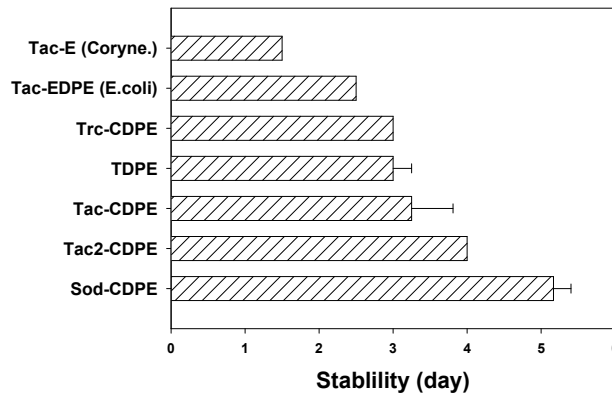
(가) 고정화 컬럼 반응 결과

- GMO 균체 6종 중에서 Sod-CDPE, Tac-CDPE 각각 전환율 29.47%, 29.50% (3회 실험 결과)로 가장 높은 전환율로 나타남. 균체 반응에서 Tac-CDPE의 초기 활성이 높으나, 고정화 컬럼 반응에서 최대 전환율에서는 활성의 차이가 크게 나타나지 않았다.

- GMO 균체 6종 중에서 Sod-CDPE가 사이코스 전환율 유지 기간이 5.2일 (3회 실험 결과)로 가장 안정성이 높게 나타났다.

- Free-cell 반응에서 온도 안정성이 가장 높게 나타난 Sod-CDPE 균주를 이용하여 고정화 컬럼 실험 결과, 60도에서 평균 5.2일로 기존 Tac-CDPE에 비해 약 1.5배 안정성이 높게 나타났으며, 전환율 결과에서도 기존 Tac-CDPE 전환율과 크게 차이가 나지 않는 29.5% (3회 실험 결과)로 안정성 및 전환율에서 가장 높은 결과로 나타났다.

※ 위 결과, 고정화 컬럼 반응에서 Sod-CDPE가 전환율 및 안정성 우수로 나타났다.



균주별 고정화 컬럼 반응 결과.

(4) 선택된 GMO(*Corynebacterium glutamicum* sod-CDPE 발현 균주) 온도별 고정화 컬럼 반응

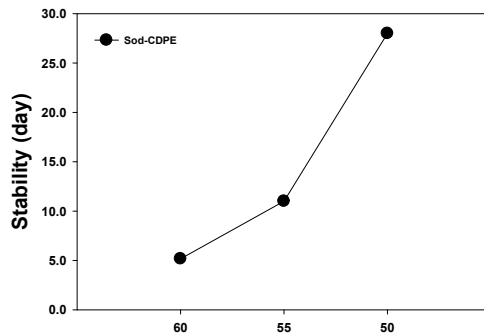
(가) 목적

- *Corynebacterium glutamicum* 균체 발현 효소별 선정 결과 가장 안정성이 우수한 효소가 sod-CDPE로 나타났다. 향후 본 sod-CDPE 발현 균체 고정화 비드의 생산성 최적 온도를 선정하고자 온도별 고정화 컬럼 반응시 안정성을 알아보하고자 한다.

(나) 고정화 컬럼 반응 결과

- sod-CDPE 균체 이용 온도 조건별 고정화 컬럼 반응 실험결과 온도가 점차 낮아 질수록 안정성이 높은 결과를 나타낸다. 이는 sod-CDPE 이외 발현 균주들과 유사한 패턴이나 안정성 면에서 60도 약 1.5배 증가, 50도 약 1.4배 증가한 결과로 다른 CDPE 발현 균주에 비해 생산성이 Sod-CDPE가 약 1.4배 높은 결과를 나타낸다.

특히, 기존 CDPE는 전환율 안정성이 유지 후 급격히 하락하는 양상을 나타내었으나 Sod-CDPE는 전환율 안정성이 급격히 떨어지지 않고 천천히 하락하는 양상을 나타내어 실제 생산 측면에서 유리한 결과를 나타낼 것으로 고려된다.



Sod-CDPE 균주의 온도 조건별 고정화 컬럼 반응 안정성 결과.

(5) *Corynebacterium glutamicum* sod-CDPE 및 Tac-CDPE 발현 균주 생산성 비교

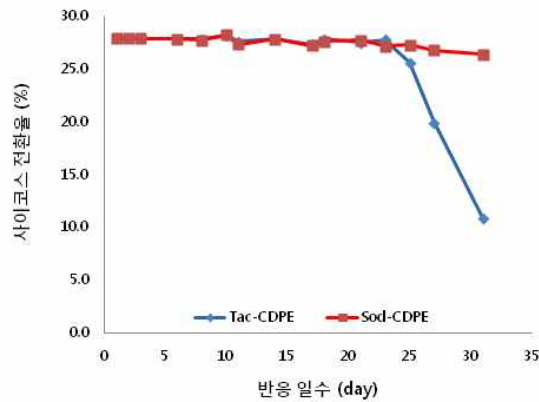
(가) 목적

- *Corynebacterium glutamicum* 균체 고정화 비드의 안정성이 가장 높은 컬럼 반응 온도 50℃에서 CDPE 발현 효소 중 생산성이 가장 높은 sod-CDPE와 Tac-CDPE의 생산성을 비교하고자 한다.

(나) 고정화 컬럼 반응 결과

- 50도 조건에서 고정화 컬럼 반응 비교 결과 tac-CDPE는 약 22일 이후부터 효소 활성이 급격히 떨어짐을 볼 수 있는 반면 sod-CDPE는 25일째 다소 감소 추세이나 이후 30일 경과 되어

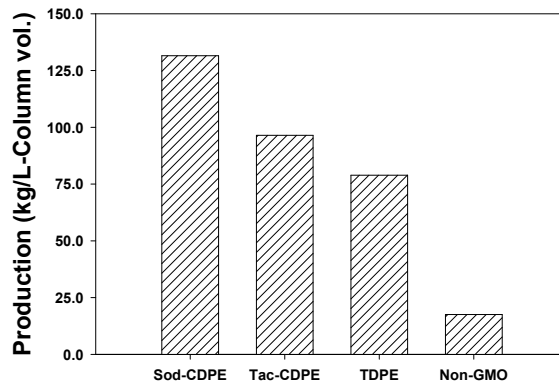
도 급격한 활성 감소는 나타나지 않았다. 이 결과 기존 CDPE 중 sod-CDPE가 온도 안정성이 가장 높게 나타난 결과 고정화 컬럼 반응에서도 생산성이 우수함 나타내었다.



Sod-CDPE와 Tac-CDPE의 고정화 컬럼 반응 비교

다. 사이코스 생산 고정화 균주 Non-GMO와 GMO 균주 생산성 비교

- 앞선 연구 결과를 바탕으로 사이코스 전환균주들의 생산 최적화를 위해 lab 단계에서 scale-up 시킨 결과 GMO-sodCDPE에서 가장 좋은 생산성이 나타났다.
- 사이코스 시럽 뿐만 아니라 사이코스 분말 대량 생산을 위해서는 GMO 균주를 이용하여 pilot 연구를 진행 할 예정이다.



Sod-CDPE 및 주요 GMO/Non-GMO 고정화 컬럼 반응 생산성

라. 고정화 컬럼 반응 시럽의 정제 : 탈색 및 이온 정제

(1) 목적

생산된 사이코스 함유 시럽에 포함된 이온 물질과 색소를 제거 위해 정제 단계를 거쳐 최종 정제 75bx 사이코스 시럽을 제조 하고자 한다.

(2) 사이코스 함유 시럽의 탈색

고정화 반응기를 통해 생산된 사이코스 함유 시럽은 시럽 내의 고형분양 대비 활성탄을 첨가하여, 온도 50℃에서 30분간 교반하여 탈색한다. 탈색이 완료된 시럽은 펄라이트를 이용하여 여과 시킨 후, 여과 filter에 의해 입자들을 완전 제거 시켜 탈색된 사이코스 함유 시럽을 제조 한다.

(3) 사이코스 함유 시럽의 이온 정제 및 농축

탈색이 완료된 사이코스 함유 시럽은 이온교환수지를 이용하여 시럽내의 이온 물질을 완전 제거하여 전도도 0.01 us/cm 이하의 제품을 만들고자 한다. 이온교환수지 조건은 강산성 양이온 교환수지 (H⁺ type), 약염기성 음이온 교환 수지(OH⁻ type), 혼합 수지(Mixed bed)를 사용하여, 시럽의 탈색 및 탈염 공정을 진행하였다. 그 결과 최종 시럽 제품의 전도도 값 0.01us/cm 이하의 시럽을 생산 할 수 있었다. 정제가 완료된 사이코스 함유 시럽은 농축 온도 50도에서 약 75brix까지 농축을 진행하여 표 의 함량과 같은 최종 제품을 제조 하였다.

액상 과당 이용 사이코스 함유 시럽의 함량 분석

Area (%)	사이코스 15% 시럽	사이코스 25% 시럽
사이코스	15.33	24.20
과당	40.94	65.40
포도당	38.51	6.84
올리고당	4.46	2.13



(사이코스 함량 15% 함유 시럽)



(사이코스 함량 25% 함유 시럽)

액상 과당 이용 사이코스 15% 및 25% 이상 함유 시럽 제품 제조

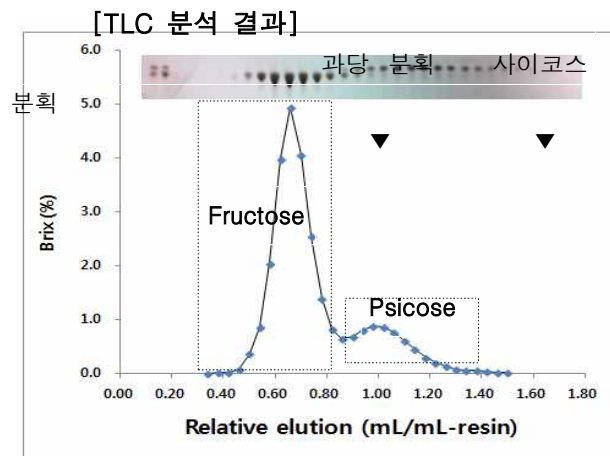
3. FPLC를 이용한 사이코스 분리 조건 탐색

가. 사이코스 함유 시럽 고순도 분리 정제

생산된 사이코스 함유 시럽에서 순도 97% 이상의 고순도 사이코스 시럽을 생산하기 위해 양이온 교환수지를 이용하여 사이코스 분획을 선택적으로 분리하고자 한다.

(1) 고순도 사이코스 분리 조건 설정

칼슘형태로 치환되어진 이온 교환 수지로 채워진 컬럼 부피 1L에 50bx 사이코스 함유 시럽을 loading 후, 증류수를 공급하였다. 그 결과 그림 18과 같이 통액된 각 부피별 과당 및 사이코스 분리가 나타났으며, 통액량 0.3CV(column vol.)부터 점차 과당 분획이 나타나기 시작하여 약 0.7~1.0CV까지 과당 및 사이코스 분획이 혼합되어 나타났다. 이후 1.0CV부터 1.4CV까지 사이코스 함량이 높은 분획이 나타나며, 이를 혼합하여 분석 결과 약 97% 이상 고순도 사이코스 함량의 시럽을 얻을 수 있다. 각 분획별 TLC 분석 결과 과당 및 사이코스 함유 위치를 알 수 있었다.



사이코스 함유 시럽의 분획별

(2) 고순도 사이코스 분리 결과

위 조건에 의한 사이코스 함유 시럽의 고순도 분리 결과 컬럼 부피 1L당 사이코스 함유 시럽 30mL 1회 투입 결과 순도 97% 이상의 사이코스를 약 85% 분리 수율로 얻을 수 있었다.

나. 고순도 사이코스 시럽을 이용한 분말 제조

제조된 고순도 사이코스 시럽을 이용하여 사이코스 분말을 제조 하기 위해서는 농축 공정, 냉각 결정화 공정, 탈수 및 세척 공정과 건조 공정 단계의 제조 조건이 필요하다.

농축 공정은 분리된 95% 이상 고순도 사이코스 시럽을 온도 50~55℃로 약 85brix까지 농축

한다. 농축 완료 후 결정화 하기 위해 온도 변환이 가능한 결정화 교반조를 이용하여 냉각 온도를 서서히 떨어뜨려 결정을 형성 시킨다. 이때, 교반날개를 이용하여 전체적으로 섞일 수 있도록 서서히 교반 시켜 결정을 잡는다. 양이온 교환수지를 이용하여 사이코스 분획을 선택적으로 분리하고자 한다.

4. *Corynebacterium glutamicum* host에 재조합 된 사이코스 생산 유전자 및 유전자 유래 생성 물질의 인체 유해성 시험

가. 기초 인체위해성 평가

(1) 신규삽입유전자산물 아미노산 상동성 검색

- 우리사에서 확보한 사이코스 전환효소인 TDPE, CDPE, EDPE의 아미노산 서열과 이미 알려져 있는 알려진 및 독소와의 상동성 유무를 알아보기 위하여 FAO/WHO (2001)에서 권장하는 방법에 따라 FASTA 및 연속된 8개의 아미노산 서열과의 상동성에 대한 검색을 실시하였다.

- TDPE, CDPE, EDPE 아미노산 서열

T효소는 295개의 아미노산으로 이루어진 단백질로서 분자량이 약 33kD이며, 그 서열은 아래와 같다.

```
1  MQYGIYFAYW TKEWQADYKK YIDKVS KLGF DILEISCAAL KDQYVSDSQL FDLRDYAKEK
61  GVTLTAGYGP AKGENLSSSD NRVKNAKAF YKDV LGKLNK LDIRLLGGGL YSYWPVDYSL
121 PIDKAGDWKR SVENIREIAA IAADRNVVLG MEVLNRFEGY LLNTCEEIK FVDEVNHPNV
181 KVMLDTFHMN IEEDNMAEAI RMAGDKLGHF HIGEQNRKVP GKGCI PWNEI GHALRDIRYN
241 GTVMEPFVM PGGTIGQDIK VWRDLLPETS ETILDRDAKG ALEFVKHVFV STSVL
```

C효소는 289개의 아미노산으로 이루어진 단백질로서 분자량이 약33kD이며, 그 서열은 아래와 같다.

```
1  MKHGIYYAYW EQEWAADYKR YVEKAAKLG F DILEVGAAPL PDYSAQEVKE LKKCADDNGI
61  QLTAGYGP AF NHNMGSSDPK IREEALQWYK RLFVEMAGLD IHLIGGALYS YWPVDFATAN
```

121KEEDWKHSVE GMQILAPIAS QYGINLGMEV L NRFESHILN TSEEGVKFVT EVGMDNVKVM
181LDTFHMNIEE SSIGDAIRHA GKLLGHFHTG ECNRMVPGKG RTPWREIGDA LREIYDGTV
241VMEPFV RMGG QVGS DIKVWR DISKGAGEDR LDEDARRAVE FQRYMLEWK

E효소는 283개의 아미노산으로 이루어진 단백질로서 분자량이 약 31kD이며, 그 서열은 아래와 같다.

1 MQGFGVHTSM WTMNWDRPGA ERAVAAVKY AVDFIEIPML NPPAVDTAHT RALLEKNKLR
61 AVCSLGLPER AWASVRPDAE IEHLKVAIDK TADLGGEALS GVIYGGIGER TGVPPTAEY
121DNIARVLQAA AKHAKTRGIE LGVEAVNRYE NHLINTGWQA VDMIKRVGAD NVFVHLDTYH
181MNIEEKIGIT GILDARDFIK YIHLSESDRG TPGYGNCAWD EIFATLAAIG FKGGLAMESF
241INMPPEVAYG LAVWRPVARD EEEVMGNSLP FLRNKARQYG LIL

- 결론

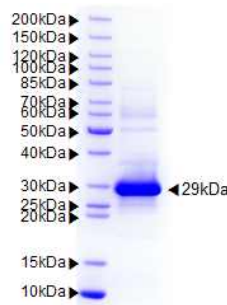
TDPE, CDPE, EDPE의 아미노산 서열을 80개 단위로 구분하여 35% 이상의 서열 상동성을 갖는 알러젠에 대한 FASTA 검색을 실시한 결과 35% 이상의 서열 상동성을 갖는 알러젠은 없는 것으로 나타났으며, 짧고 국지적인 아미노산 상동성 부분들이 일반적인 IgE-binding epitope를 나타내는지 스크린하기 위하여 8개의 인접한 아미노산 서열들을 서로 비교한 결과 8개의 연속된 아미노산 서열에 일치하는 경우는 없는 것으로 나타났다. 또한 BLASTP 프로그램을 이용한 독소와의 상동성 검색결과 아미노산 서열이 50% 이상의 similarity와 30% 이상의 identity를 동시에 만족하는 단백질독소는 없는 것으로 나타났다.

결론적으로 TDPE, CDPE, EDPE에 대하여 기지의 알러젠과 독소와의 상동성 검색을 실시한 결과 TDPE, CDPE, EDPE는 알레르기 및 독성을 유발할 가능성은 희박한 것으로 볼 수 있다.

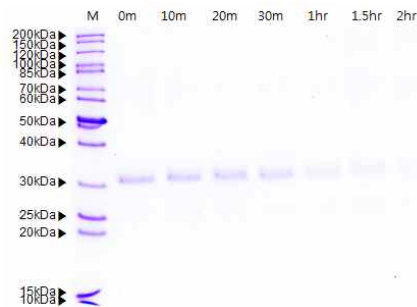
(2) 신규삼입유전자산물 물리화학적 안정성 시험

- CDPE 단백질 확인

BSA 단백질을 기준으로 단백질을 정량해본 결과 약 1.3ug/ul의 농도로 확인되었다. 그러나 단백질의 상태가 불안정하여 시간이 지날수록 aggregation이 확인되어 단백질의 농도는 점차 낮아질 것으로 예상된다. 단백질의 상태는 비교적 단일밴드로 확인되었다.



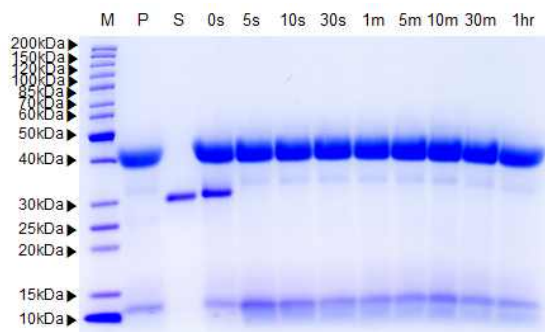
- CDPE 단백질 위해성 평가 (CDPE 단백질 열 안정성 시험)



열처리 후 30분에 약 50%의 단백질이 감소하는 것으로 보이며 1시간째에 급격한 감소를 보여 2시간째에는 밴드가 거의 보이지 않는 것을 확인했다.

- CDPE 단백질 인공위액 소화 시험

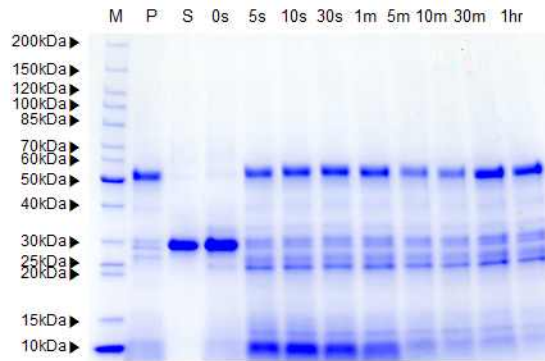
인공위액을 처리 한 5초 이전부터 단백질이 소화되고 있음을 보여준다.



M:marker, P:pepsin, S:sample

- CDPE 단백질 인공장액 소화 시험

인공장액을 처리 한 5초 이전부터 단백질이 소화되고 있음을 보여준다.



M:marker, P:pancreatin, S:sample

나. 유전자 분석 평가

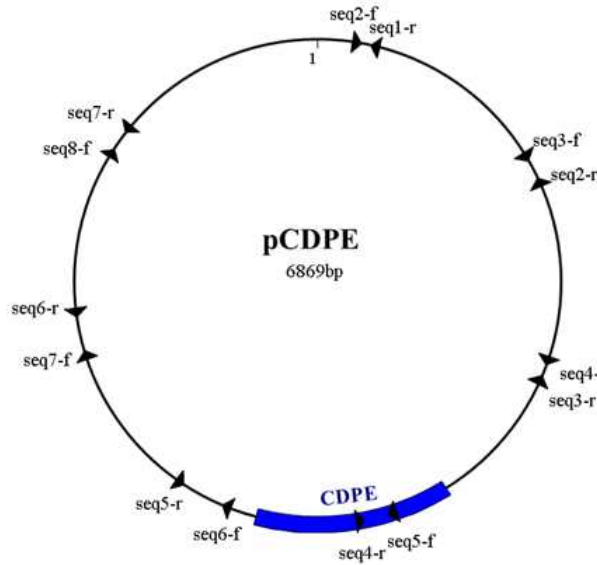
(1) 신규삽입 유전자 sequencing

- 실험 목적

유전자재조합미생물 SYG321-C는 플라스미드를 숙주에 형질전환 하였으나, 숙주의 계놈에는 삽입이 되지 않고 플라스미드 상태로 존재하도록 제작되었다. 그러므로, 재조합 플라스미드의 형질전환으로 인한 플라스미드의 염기서열의 부가, 삽입, 결실 등의 비의도적인 변이 여부를 확인하기 위하여, 유전자재조합미생물 SYG321-C에서 플라스미드를 추출, 정제하여 플라스미드의 전체 염기서열을 결정하였다.

- primer design

염기서열 결정용 프라이머는 재조합된 플라스미드의 염기서열에 바탕하여 염기서열 결정이 최소 600 bp 이상이 읽혀질 경우에 서로간에 겹칠 수 있도록 (contig형성) sequencing primer 를 제작하였다. 이는 Sanger 방법을 사용하여 정제된 plasmid의 염기서열을 읽을 시에 2014년 현재 보통 800 bp 정도까지는 명백하게 읽을 수 있는 profile 을 제공하므로 보수적인 접근이다. 프라이머는 Primer3 (v. 0.4.0) 프로그램(Steve Rozen and Helen J. Skaletsky (2000) Primer3 on the WWW for general users and for biologist programmers. In: Krawetz S, Misener S (eds) Bioinformatics Methods and Protocols: Methods in Molecular Biology. Humana Press, Totowa, NJ, pp 365-386)에 재조합된 플라스미드 전체 염기서열을 입력하여 제작하였다. 프라이머의 위치 및 염기서열은 그림 1과 표 1에 나타내었다. 프라이머는 Bioneer 사(대전, 한국)에 의뢰하여 합성하였다.



플라스미드의 염기서열 결정을 위해 제작된 프라이머의 위치.

primer name	Primer start position	Sequence (5' -> 3')
Seq1-r	282	TATCAAAAAGGATCTTCACC
Seq2-f	178	TTAAGCATTGGTAACTGTCA
Seq2-r	1275	TACAACAAAGCTCTCATCAA
Seq3-f	1126	CATCAGTGCCAACATAGTAA
Seq3-r	2194	AAGCTCTTCAGCAATATCAC
Seq4-f	2080	GAATATCATGGTGGAAAATG
Seq4-r	3263	GGTTGATACCGTACTGAGAC
Seq5-f	3095	AAACGTCTGTTCGAAGTTAT
Seq5-r	4112	GACGCAGATTTTTAGCTATC
Seq6-f	3854	cggatTCTAGAACTAGTGGA
Seq6-r	5034	GCATTTACGATGTTTGTCAT
Seq7-f	4818	CAAAATATTGCTCAGATGC
Seq7-r	5919	AACCTCCATAAGATCAGCTA
Seq8-f	5766	AACGACCGAGGAAATGAC

플라스미드 염기서열 결정용 프라이머의 염기서열

- 염기서열 profile은 대부분 800 bp 이상 high quality의 peak를 보여주었고, 일부 primer Seq5-r은 겹치는 peak를 보였으나, 아마도 염기서열 상의 2차 구조의 문제로 사료되었다. 하지만 Seq5-r 염기서열은 Seq5-f와 Seq6-f의 high quality 염기서열 부분에 해당하였다. 결과적으로 이들 염기서열을 assembly하였을 때, 모두 high quality peak에서 읽은 염기서열 부분에서 서로 교차하였다. 결과한 plasmid contig sequence를 pCDPE과 비교하였을 때 CDPE operon을

삽입하기 위해 사용한 *NotI*와 *XbaI* 위치를 확인할 수 있었고, *NotI/XbaI*바깥의 vector backbone 부위는 pCDPE의 해당 염기서열과 100% 일치하였고, 내부의 염기서열 또한 CDPE 염기서열과 100% 일치하였다. 본 결과는 재조합 및 형질전환 과정에서 비의도적인 DNA 염기서열 변이가 일어나지 않았음을 제시하였다.

플라스미드 염기서열 결정 결과 요약

primer name	Primer start position	Stop postion of high quality sequence
Seq1-r	282	920
Seq2-f	178	890
Seq2-r	1275	830
Seq3-f	1126	840
Seq3-r	2194	780
Seq4-f	2080	790
Seq4-f	3263	840
Seq5-r	3095	830
Seq5-r	4112	bad
Seq6-f	3854	800
Seq6-r	5034	815
Seq7-f	4818	800
Seq7-r	5919	830
Seq8-f	5766	820

유전자재조합미생물 SYG321-C에 형질전환된 플라스미드의 염기 서열 결정 결과. *NotI*과 *XbaI* 위치와 CDPE 유전자의 coding region은 밑줄로 표시함.

(2) 숙주 유전자 영향 유무 확인을 위한 southern blot 분석

- 실험 목적

CDPE를 장착한 플라스미드가 삽입된 유전자재조합미생물 SYG321-C는 숙주의 게놈 DNA에 는 삽입이 되지 않고 플라스미드 상태로 유전이 되도록 제작되었다. 그러므로, 숙주 미생물의 게놈에 전부 또는 일부가 비의도적으로 삽입이 되었는지를 확인하고자, 플라스미드에서 제작한 probe를 사용해 Southern blot 분석을 수행하였다.

- Southern blot probe 제작

Probe 간의 양끝이 겹치면서 전체 플라스미드를 망라할 수 있도록 pCDPE vector sequence 를 네 부분으로 나누어 PCR 증폭하는 4쌍의 primer를 작성하였고 (그림 1; 표 1), 대조 probe로

써 재조합 미생물과 숙주 게놈 DNA에 결합할 수 있는 probe를 *C. glutamicum*의 brnF 유전자 (GenBank Accession Number AF454053)의 염기서열에서 primer를 작성하였다. 한편 pCDPE 염기서열을 NCBI database (<http://ncbi.nlm.nih.gov>)에 BLAST search하였을 때, CDPE 유전자의 promoter로 장착된 sod promoter는 *C. glutamicum* ATCC 13032의 genome sequence에 100% 동일하였다. 그러므로, sod promoter 부위는 형질전환된 plasmid와 *C. glutamicum* genome 양쪽에 중합반응을 보일 것이므로, sod promoter만 포함하는 probe를 제작하기 위한 primer 쌍을 추가로 제작하였다. brnF probe의 제작을 위하여 *C. glutamicum* genomic DNA, 제작한 primer 쌍, 및 AccuPower™ PCR PreMix(Bioneer)를 사용하여 95°C 1분, 94°C 30초 56°C 30초 72°C 30초를 35 cycle, 72°C 5분간 extension하는 PCR을 수행한 산물을 TOPO-TA vector에 cloning하였다. Biotin-labeled probe를 제작하고자 pCDPE vector와 TOPO-TA clone에서 다음과 같은 PCR 조건에서 위에서 각각의 probe의 증폭을 위해 제작한 primer쌍을 사용하여 PCR을 수행하였다. AccuPower™ PCRPreMix (Bioneer) 5µl, template plasmid DNA (10~50ng) 1µl, primer (U. L) 각각 5µl, Taq polymerase 0.5µl, dNTPs (2 mM dATP, 2mM dGTP, 2mM dTTP, 0.5mM dCTP) 6µl, Biotin-14-dCTP 15µl를 총 부피 50µl로 PCR 용 물을 사용하여 맞추어 주었다. PCR 조건은 95°C에 1분 둔 다음 94°C 30초, 58°C 30초, 72°C 1분을 35 cycles 반응케하고, 72°C 5분간 extension 한 다음 4°C에 soaking하였다. PCR 산물은 1% agarose gel에 확인하였고, 해당 band를 잘라서 정제한 후, 정량하여 probe로 사용하였다.

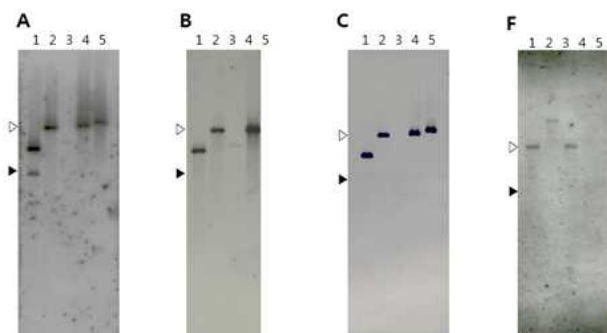
플라스미드 상의 Southern blotting 용 probe의 위치 및 제한효소 위치 표시.

Probe name	Primer orientation	Primer start position	Sequence (5'→3')	product size(bp)
CDPE	CDPE-F	2408	ATGGTCCTTCTTGAGTATCT	1700
	CDPE-R	4107	AGATTTTTAGCTATCTGTCG	
Sodpro	Sodpro-F	2475	CGCCTCATCAGCGGTAAC	345
	Sodpro-R	2819	CCTTTCGTCGTATGCGTAGT	
CDPE-B1	CDPE-B1-F	131	TATGGATGAACGAAATAGAC	2298
	CDPE-B1-R	2428	TAGATACTCAAGAAGGACCA	
CDPE-B2a	CDPE-B2a-F	4087	GCGACAGATAGCTAAAAAT	1265
	CDPE-B2a-R	5351	CTCGTCCAGCCACGTGAT	
CDPE-B2b	CDPE-B2b-F	5334	ATCACGTGGCTGGACGAG	1732
	CDPE-B2b-R	196	GACAGTTACCAATGCTTAAT	
brnF	BrnF-F		tcctcaagaattcgtccac	370
	BrnF-R		attgccgttgcgattacagt	

Southern blotting 용 probes의 프라이머 염기서열과 산물크기

- 결론 및 고찰

재조합 미생물체 SYG321-C에 재조합 플라스미드가 세포질내에서 게놈 DNA에 비의도적으로 삽입되었는지를 조사하기 위하여 전체 플라스미드를 망라하는 4 점의 probe를 이용하여 Southern blot 분석을 실시하였다. 재조합 미생물에서 추출한 게놈 DNA에 대해 *Hind*III (1번 lane) 또는 *Sac*I (2번 lane), wild type(*Corynebacterium glutamicum* ATCC13032)에서 추출한 게놈 DNA (3번 lane)에 대해 제한효소 *Hind*III 을 처리하였고, 플라스미드 DNA (4번 또는 5번 lane)를 *Sac*I 또는 *A*III으로 처리하여 Southern blot를 실시하였다. *Hind*III을 처리한 lane 1은 CDPE와 중합시에 예상되는 바와 같이 각각 2787 bp와 4082 bp의 DNA 절편에 결합하였고, *Sac*I을 처리한 genomic DNA를 함유한 lane 2와 plasmid DNA를 함유한 lane 4는 probe와 중합시에 예상되는 바와 같이 각각 710 bp와 6159 bp의 DNA 절편에 강하게 결합하였고, *A*III으로 처리한 lane 5는 항상 6869 bp의 DNA 절편이 관찰되었다. 한편, *sod* promoter를 가진 CDPE와 *Sod*pro probes는 genomic DNA를 분리한 lane 1, 2, 3에서 약한 중합 band를 보여주었으며, *Hind*III를 동일하게 처리한 lane 1과 3에서 동일한 크기의 약한 중합 band를 보여주었다. Genomic DNA에 있는 *sod*의 중합반응이 plasmid에 비하여 약한 이유는 plasmid copy 수가 미생물의 genome copy 수의 10배로 조정되었기 때문이다. Plasmid DNA lanes과 재조합 미생물의 genomic DNA lanes에서 plasmid DNA 절편의 중합 반응의 세기가 비슷하므로 본 결과는 또한 미생물의 세포당 재조합 plasmid의 copy 수가 10 내외임을 제시한다. 결론적으로 염기서열 분석에서 이미 숙주 genome에 있는 것으로 예측된 *sod* promoter에 의한 중합반응을 제외하고는 재조합 미생물의 DNA와 플라스미드 DNA에서는 항상 probe와 결합하는 DNA 절편의 pattern이 같았으며, *sod* 이외에는 wild type 에서는 결합하는 DNA 절편이 관찰되지 않았다(그림 3의 Panel A, B, C, D, E). 또한, 숙주의 게놈상에 존재하는 *brnF* 유전자에서 제작한 probe는 플라스미드 DNA에는 결합하지 않았고, *Hind*III로 동일하게 처리한 재조합 미생물과 숙주의 게놈 DNA의 동일한 크기(약 6 kbp)의 DNA 절편에 결합하였고, *Sac*I을 처리한 경우에는 약 8 kbp의 DNA 절편에 결합하였다. 결론적으로, 이러한 결과를 통하여 재조합 플라스미드는 게놈 DNA에 비의도적으로 삽입되지 않았음을 확인할 수 있었다.



Panel A, B, C, D, E, F		
Lane	Sample	Restriction enzyme
1	SYG321-C	<i>Hind</i> III
2	SYG321-C	<i>Sac</i> I
3	Wild type	<i>Hind</i> III
4	pCDPE	<i>Sac</i> I
5	pCDPE	<i>Afl</i> II

SYG321-C 재조합 미생물의 Southern blot analysis.

Panel A,probeCDPE; PanelB,Sodpro; PanelC,CDPE-B1; PanelD,CDPE-B2a; PanelE,CDPE-B2b; PanelF,BrnF. ▷ 및 ► 각각 6.0 kb, 3.0 kb의 위치를 지시함.

(3) Qualitative GMO PCR detection kit 제작

- 실험 목적

유전자 재조합 미생물은 상업화 이후에도 지속적인 모니터링이 필요하다. 본 유전자재조합미생물 SYG321-C에 대하여 특이성을 가지는 정성 분석법을 개발하고자 도입된 재조합 플라스미드의 CDPE 유전자와 pCDPE의 접합부위의 염기서열을 이용하여 SYG321-C 특이 정성 검출 PCR 키트의 제작을 완성하였다.

- PCR primer의 제작

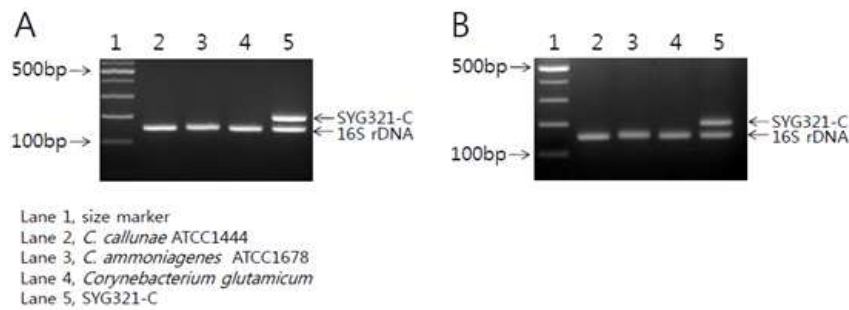
재조합 플라스미드의 CDPE 유전자의 stop codon의 양쪽에서 forward 및 reverse primer를 제작하였다(표 1). 내부양성대조 유전자로서 *Corynebacterium glutamicum*의 16S rDNA 염기서열 (GenBank accession number AY017107)에서 한쌍의 primer를 제작하였다.

Corynebacterium glutamicum SYG321-C정성 분석 키트에 사용된 primer list.

Target	Primer set name and orientation	Sequence (5'→3')	Size
3' region of CDPE and its flanking plasmid backbone	CDPE3a forward	CTGGAATGGAAACTCGAGC	194
	CDPE3a reverse	GGATCCACTAGTTCTAGAATC	
	CDPE3b forward	GGAATGGAAACTCGAGCA	195
	CDPE3b reverse	GGGGGATCCACTAGTTCT	
16S ribosomal RNA gene	Cory16S3 forward	GGGAATATTGCACAATGG	150
	Cory16S3 reverse	GCTGCTGGCACGTAGTTA	

- 결과 및 고찰

재조합 미생물SYG321-C특이 정성분석 키트의 개발을 위해서 내부양성대조 유전자 16S ribosomal RNA gene에서 제작한 primer와 CDPE gene의 3' region과 인접한 plasmid backbone에 걸쳐서 제작한 primer를 사용하여 multiplex PCR을 수행하였다. 대조 미생물로서 *C. callunae* 과 *C. ammoniagenes* 를 사용하였다. Multiplex PCR의 결과 사용한 재조합 미생물, 숙주 미생물, *C.callunae*,*C.ammoniagenes*에서는 16S ribosomal RNA gene의 PCR 산물이 뚜렷이 증폭되었으나, 재조합 미생물 특이 primer 쌍은 재조합 미생물에서만 특이 PCR 산물을 생성하였다. 본 결과는 multiplex PCR로서 다양한 환경에서 추출한 DNA sample에서 본 재조합 미생물의 DNA가 함유되었는지를 확인하는데 사용될 수 있을 것이므로, 본 정성 PCR 키트를 SYG321-C특이 정성분석 키트로 제안한다.



PCR primer 쌍 CDPE3a (A)또는 CDPE3b (B)및 Cory16S3를 사용한 *Corynebacterium glutamicum* genomic DNA의 multiplex PCR 결과의 agarose gel 분석.

다. 독성 및 알레르기성 평가

(1) 단회투여독성시험

- 시험 목적

CDPE를 ICR 계통의 마우스에 단회경구투여 하였을 때 나타나는 독성을 확인하며 개략치사량(ALD: Approximate Lethal Dose)을 확인하기 위하여 시행.

- 시험물질 및 용매대조물질

- 시험물질

명 칭 : CDPE

- 용매대조물질

명칭 : 0.5% CMC-Na

선정이유 : 물리적특성실험 수행 결과 시험물질이 멸균증류수에 현탁되었으나, 시험물질의 균질성을 확보하기 위해 선정하였다.

- 시험계

- 종 및 계통 : ICR 계통의 특정병원균 부재(SPF) 마우스
- 입수 시 동물 수 : 암수 각 13마리
- 입수 시 주령 : 암수 각 7주령
- 입수시 체중 : 수컷 28.6 ~ 31.3, 암컷 23.4 ~ 25.9 g
- 검역 및 순화기간

동물 입수시 입수동물에 대한 검수검역을 실시하였으며, 동물의 순화는 입수 후 7일간 시험을 실시하는 동물실에서 실시하였다. 동물공급업체에서 제공한 시험계의 병원체검사 성적서를 검토한 결과 시험에 영향을 줄만한 요인은 없었다. 순화기간 중 매일 1회 일반증상을 관찰하고, 투여일에 체중을 측정하여 동물에 이상이 없음을 확인하였다.

- 투여개시 시 주령 : 암수 각 8주령
- 투여개시 시 체중 : 수컷 29.0 ~ 33.9 g, 암컷 22.8 ~ 27.1 g
- 사용 동물 수 : 암수 각 10마리
- 군분리 방법 : 투여개시 전에 체중을 측정하고 순위화한 체중을 이용하여 군분리를 실시하였다.

- 동물실험법

- 투여방법

투여경로 : 경구

선택이유 : 사람에게 대한 임상 예정 경로로써 경구투여를 선택하였다.

시험 물질의 조제 및 투여액량 : 본 시험물질은 시험물질 투여 전 1시간 이내에 준비하였으며, 순도에 대한 보정없이 중량 그대로를 조제에 사용하였다. 투여 당일에 측정된 체중을 기준으로 20 ml/kg의 투여액량으로 투여하였다.

- 투여횟수 : 1일 1회
- 시험군의 구성
- 투여량 설정

군	성별	동물수(마리)	동물번호	투여액량 (mL/kg/1회)	투여량 (mg/kg/1회)
G1	Male	5	1101~1105	20	0
	Female	5	2101~2105		
G2	Male	5	1201~1205	20	2,000
	Female	5	2201~2205		

G1: 용매대조군, G2: 시험물질 투여군

본 시험물질은 의뢰자가 제공한 정보에 의하면 HisX6에 대한 affinity 정제 후 동결건조 된 단백질로서 독성이 크게 없을 것으로 추정된다. 이에 본 시험의 용량설정을 위한 단회경구투여 독성시험의 한계용량인 2,000mg/kg을 암수 각 1마리에 투여한 결과 모두 생존하였으며 특이 증상이 관찰되지 않았다. 따라서 본시험 투여용량은 2,000mg/kg을 시험물질 투여군으로 하고 용매대조군으로 0.5% CMC-Na를 투여하였다.

- 관찰 및 검사항목

일반증상관찰

투여 당일은 투여 후 30분, 1, 2, 4 및 6시간째 관찰하였으며, 익일부터 부검일 까지 1일 1회 일반증상을 관찰하였다.

체중측정

체중측정은 입수시, 군분리시, 투여후 1, 3, 7 및 14일에 측정하였다.

부검소견

시험물질 투여 후 14일째 되는 날 전체 동물에 대해 체중을 측정하고 Isoflurane 마취 하에 개복하여 복대동맥 및 정맥을 절단하여 방혈치사 시킨 후 부검을 실시하였다. 육안적으로 모든 내부장기의 이상 유무를 관찰하여 그 소견을 기록하였다.

- 시험결과

- 사망동물 및 최소치사량

전 시험기간 동안 모든 시험군에서 사망동물은 관찰되지 않았다. 따라서 본 시험에서 랫드의 최소치사량은 2,000 mg/kg을 상회하는 것으로 관찰되었다.

- 일반증상

전 시험기간 동안 모든 군에서 아무런 증상이 관찰되지 않았다.

- 체중

시험 전 기간의 체중변화(body weight changes) 및 증체량(weight gains)을 관찰한 결과 수컷 대조군과 시험군은 각각 3.3 ± 0.65 g과 2.9 ± 1.80 g 증체량을 보였으며, 대조군에 비해 유의한 차이가 없었다 ($p > 0.05$). 그리고 암컷 대조군과 시험군은 각각 3.1 ± 1.21 g 및 2.8 ± 0.87 g 으로 군간 증체량에 있어서 유의한 차이가 없다 ($p > 0.05$).

- 부검소견

관찰기간 동안 생존한 동물에 대한 계획부검 시 이상소견은 관찰되지 않았다.

- 고찰 및 결론

시험물질 CDPE의 마우스에 있어서 단회투여에 의한 독성을 조사하기 위해 암수 각각에 0 및 2,000 mg/kg 용량으로 경구투여한 후 독성지표인 사망률, 일반증상, 체중변화 및 부검소견을 관찰하였다. 일반증상에서 관찰기간동안 이상증상은 관찰되지 않았다. 관찰기간 동안 체중변화(body weight changes) 및 증체량(weight gains)을 관찰한 결과 대조군과 비교하여 군간 증체량에 있어서 유의한 차이가 없었다. 또한 사망 동물도 없었으며, 부검소견 또한 특이증상이 관찰되지 않았으므로 본 단회경구투여 독성시험에서 시험물질의 마우스에 대한 개략치사량(ALD)은 한계량인 2,000 mg/kg을 상회하는 것으로 추정된다.

3절. 3차년도 (2015년) 연구개발수행 내용 및 결과



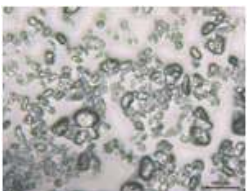
연구범위	연구수행방법 (이론적·실험적 접근방법)	구체적인 내용
<ul style="list-style-type: none"> 사이코스 함유 제품 시생산 	<ul style="list-style-type: none"> 생산 파이롯 프랜트 설계 최적화를 통한 순수 사이코스 정제 및 분말화조건 확립 <ul style="list-style-type: none"> - SMB를 통한 사이코스 정제 - 용해도 차이를 이용한 결정화 조건 탐색 사이코스 함유 프리미엄설탕 시제품생산 <ul style="list-style-type: none"> - 입도별 기능성 혼합 설탕 제조방법 정립 - 건조 방법에 따른 제조 방법 정립 	<ul style="list-style-type: none"> 연속공정 파이롯프랜트 설계 98%이상 사이코스결정분말 100kg 시생산 95%, 50%, 25%시럽 시생산 사이코스함유프리미엄설탕 시제품 생산
<ul style="list-style-type: none"> 경제적 사이코스 상업화를 위한 전환효소 개량 	<ul style="list-style-type: none"> 사이코스 전환 균주 개량 <ul style="list-style-type: none"> - GMO 균주 : GRAS 발현 시스템 증대 (프로모터 개량) - Non-GMO 균주 : UV처리 자연돌연변이에 의한 활성 증대 	<ul style="list-style-type: none"> RBS 개량 : site-directed mutagenesis 이용 신규 프로모터 발굴
<ul style="list-style-type: none"> 사이코스 상업화를 위한 인허가 관련 연구 	<ul style="list-style-type: none"> 분말, 시럽 제품의 표준화 동물 독성 평가 (설치류, 비설치류) <ul style="list-style-type: none"> - 단회투여독성시험, 유전독성시험, 반복구여독성시험 시제품 안정성 조사 : 가혹조건 하에서 시험 	<ul style="list-style-type: none"> 시제품 규격화 시제품 안전성 조사-독성평가 유통기한 설정 실험

1. 순수 사이코스 정제 및 분말화 조건 확립

가. Seed 투입량 테스트

결정 핵을 생성하기 위해 사이코스 Seed를 투입하여 결정을 형성한다. Seed 투입량에 따라 결정성을 알아보기 위해 표와 같이 1%, 5%, 10% 조건으로 투입 한 결과 1% 투입 조건에서 결정 핵의 생성 속도가 가장 빨랐으며, 입자 크기 또한 평균 75 μ m 가장 높게 나타났다. 수율적 측면에서도 1% Seed 투입 조건이 가장 높게 나타났다.



표 3. Seed 투입량에 따른 결정 수율 및 결정 입자 크기의 변화

	Seed 1%	Seed 5%	Seed 10%
결정 입자 현미경 관찰	 <p>크기 평균 75μm</p>	 <p>크기 약 50μm</p>	 <p>크기 <30 μm</p>

나. 냉각 속도 테스트

사이코스 시럽의 결정 형성시 냉각 속도에 따라 입자의 크기 및 수율의 변화를 알아본 결과 냉각 속도가 $-5^{\circ}\text{C}/\text{hr}$ 로 했을 시 평균 결정의 입경 크기가 $10\sim 15\mu\text{m}$ 이며, 수율은 52% 정도였다. 그러나, $-1^{\circ}\text{C}/\text{hr}$ 로 서서히 냉각 했을 시 평균 결정의 입경 크기가 $70\sim 80\mu\text{m}$ 이며, 수율은 약 50% 정도로 나타났다. 이 결과 냉각 속도가 서서히 내려갈수록 과포화도의 크기가 대부분 일정하게 유지되었으나 냉각 속도가 빨라질수록 과포화도의 크기 변화가 심하게 나타났다. 이는 냉각 속도가 빠를수록 교반조의 내부까지 열 전달이 일정하지 않아 결정 입자 형성에 영향을 준 것을 보여준다.

결정화 반응조의 냉각 속도 따른 결정 수율 및 결정 입자 크기의 변화

냉각 속도	$-1^{\circ}\text{C}/\text{hr}$	$-5^{\circ}\text{C}/\text{hr}$
원액 농도 Bx	86.0	86.4
과포화도	1.046	1.051
결정 석출율 % (수율)	49.8 (52.7)	52.2 (43.9)
결정 입자 현미경 관찰 광학(X63)/실체(X250)	 입경 평균 $70\sim 80\mu\text{m}$	 입경 평균 $10\sim 15\mu\text{m}$

다. 원액 농도의 영향성 테스트

고순도 사이코스 시럽의 농축 농도에 따른 결정 입자의 형성 크기를 알아보기 위하여 농축 농도에 따라 비교해 보았다.

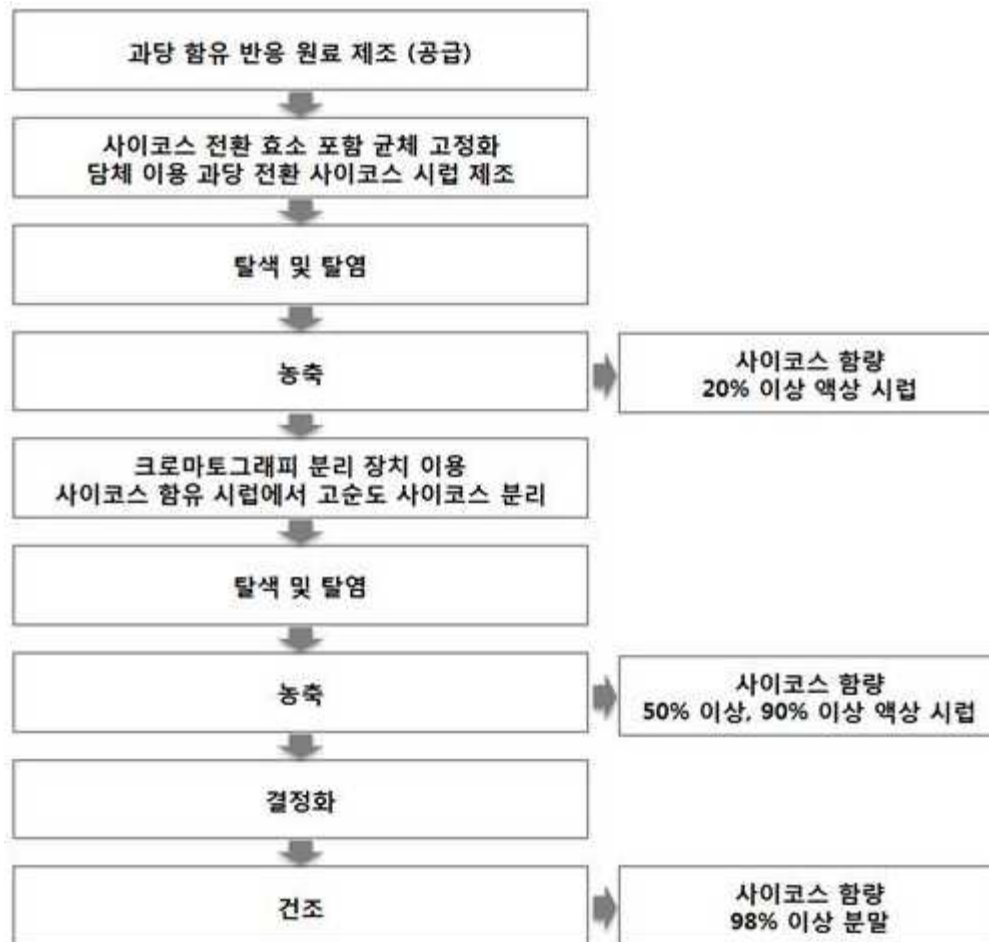
그 결과 아래 표 5과 같이 농축 농도 81brix 결정의 입경 평균 지름이 $200\sim 250\mu\text{m}$ 이며, 농축 농도 85brix에서 결정의 입경 평균 $80\sim 90\mu\text{m}$ 로 결정 입자의 크기가 작아짐을 볼 수 있었다.

고순도 사이코스 시럽 농도 따른 결정 수율 및 결정 입자 크기의 변화

원액 농도 Bx	83.4	85.1	83.7	81.3
냉각온도 $^{\circ}\text{C}$	40 → 15	40 → 15	35 → 15	35 → 15
결정 석출율 % (수율)	49.8 (52.7)	52.2 (43.9)	50.2 (46.0)	43.4 (30.0)

결정 입자 현미경 관찰 광학(X63)/실체 (X250)				
시약급 분말 (~200 μm)		입경 평균 80-90 μm	입경 평균 90-110 μm	입경 평균 200-250 μm

2. 연속공정 파이롯프랜트 설계



- 물에 의해 용해된 과당이 포함된 50 Brix(%) 이상 사이코스 생산용 액상 원료를 준비한다.
(원료탱크에 저장)

- 사이코스 생산 효소를 균체 내부에 포함하고 있는 균주 (recombinant *Corynebacterium glutamicum*, SYG321-C)를 알긴산 칼륨에 고정화된 비드로 제조한 후, 이를 반응 컬럼에 충전한다

- 50℃ 이상으로 항온 유지되는 반응 컬럼으로 50Brix (%) 이상의 과당 함유 원료를 공급하여 과당 전환 사이코스 시럽을 생산한다
- 생산된 사이코스 함유 시럽은 탈색 및 탈염의 정제 단계와 농축 단계를 거쳐 사이코스 함량 20% 이상 액상 시럽을 생산한다.
- 사이코스 함량 20% 이상 액상 시럽을 연속적으로 분리 가능한 크로마토그래피 분리 장치에 의해 고순도 사이코스를 분리한다.
- 분리된 고순도 사이코스는 65 Brix(%) 이상 농축하여 사이코스 함량 50% 이상 및 90% 이상 액상 시럽을 제조한다.
- 90% 이상 액상 시럽을 결정화기에 투입하여, 결정이 형성된 사이코스를 제조한다.
- 사이코스 결정체를 여과포가 장착된 탈수 장비에서 고속으로 회전하면서, 정제수를 골고루 분사하여 순도가 증대된 사이코스 결정을 얻는다.
- 탈수가 완료된 사이코스 결정을 로터리 건조기기에 투입하여, 최종적으로 사이코스 함량 98% 이상 분말을 제조한다.

3. 사이코스 함유 시럽 및 분말 시제품 생산

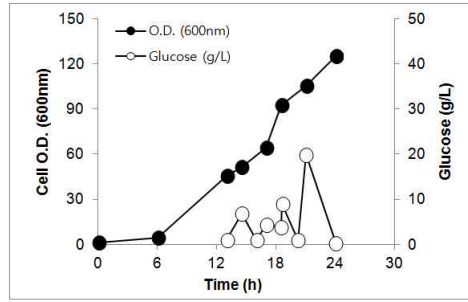
● 사이코스 함유 시럽 및 분말 생산 과정 및 결과

공정 단계	세부 제조 공정 단계	생산 결과
고정화 효소 제조	균체 배양 → 고정화 비드 제조/충진	균체 회수량 : 1.8kg 고정화 비드 제조량 : 24L
사이코스 시럽 생산	고정화 반응 → 탈색/여과 → 이온 정제 → 사이코스 시럽 제품	사이코스 시럽 제조량 - 함량 20% 시럽 : 50Bx 2,400L 제조
고순도 분리 (SMB)	고순도 분리 (SMB) → 1차 농축 (60Bx↑)	SMB 분리 순도: 95% 이상 분리 수율: 85% 이상 유지 - 함량 90% 시럽 : 75Bx 400kg 제조
사이코스 분말 제조	2차 농축 (80Bx↑) → 결정화/탈수 → 분말 건조 → 사이코스 분말 제품	결정 수율 : 평균 60% - 함량 98% 분말 : 103kg 제조

가. 균체 배양 및 고정화 비드 제조

(1) 30L 발효조 배양

- 배양 부피 : 20L
- 배양 시간 : 18 ~ 36시간 (유가식 배양)



균체 배양 결과

(2) 균체 유화제 처리 및 회수 공정

- 배양이 완료된 시점에 유화제 (sucrose fatty acid ester)를 배양조에 투입한 뒤, 가온 처리 하여 세포벽 유화 및 세포 생육 능력 실행

- 고속 원심 분리기 이용 균체 고형분 회수 및 세척

- 균체 회수율 : 90%

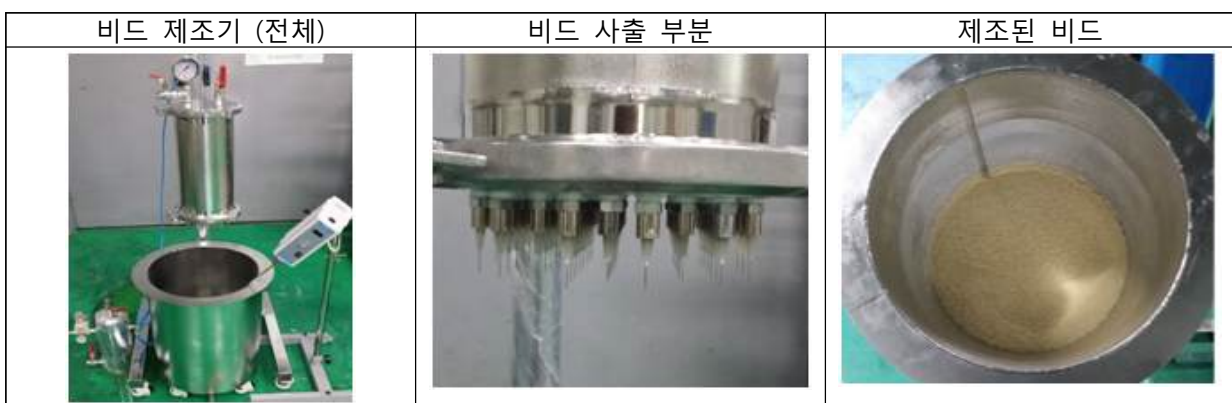
※ 30L 배양기 이용 균체 총 2.4kg 수득 하여, 균체 고정화 비드 제조용으로 사용

(3) 균체 고정화 비드 원료 혼합 및 비드 제조

- 균체 2.5% (w/w) + 알긴산 2.0% (w/w) 혼합액 제조

- 증류수로 염화칼슘 제거 후, 반응 기질로 고정화 비드 soaking 한 뒤 반응 컬럼에 제조 된 비드들들 충전하여 사이코스 시럽 생산

균체 고정화 비드 제조기



※ 50개의 Needle이장착된 비드 제조기 이용하여, 총 24L의 균체 고정화 비드 제조함.

나. 균체 고정화 비드 반응탑 충전 및 고정화 반응

(1) 고정화 비드 반응탑 충전

- 제조된 고정화 비드를 반응탑 부피 70% 수준으로 충전 후, 반응 기질을 공급 및 순환 반응하여 전환율 안정화 작업.

※ 고정화 비드 12L, 고정화 반응탑 4기 충전 (각 3L)

(2) 사이코스 함유 시럽 생산 고정화 반응

- 사이코스 함유 시럽 생산용 과당 함유 기질 공급 및 반응

(가) 고정화 반응 조건

① 반응 기질 : 과당 함유 기질 (40 ~ 50brix) 공급

② 반응 온도 : 온도 50 ~ 60℃ 범위 내 반응

③ 반응 범위 : 사이코스 함량 15% 이상 27% 이하 유지 조건 반응

사이코스 함유 시럽 생산 (반응 차수별 생산량)

반응 구분	총 시럽 생산량 (50BX,kg)
1차 반응	1080.0
2차 반응	936.0
3차 반응	950.4
4차 반응	892.8

사이코스 함유 시럽 제조용 고정화 반응기



다. 반응 완료 사이코스 함유 시럽 정제

(1) 활성탄 반응 / 여과 처리 공정

- 반응 완료 시럽의 활성탄 처리 및 여과 공정을 통하여 시럽의 탈색화

(가) 활성탄 반응 조건

- ① 반응 온도 : 35 ~ 50 °C 범위 내 반응
- ② 반응 시간 : 30분 이상 반응
- ③ 처리 농도 : 반응 시럽 고형분 함량 대비 0.5%(w/w) 이하 처리

제조 공정별 사이코스 함유 시럽 당 조성 및 정제

공정 단계	시럽 pH	전도도 (us/cm)	측정 온도 (°C)	시럽 내 당 조성 (%)				
				포도당	과당	사이코스	기타	Unknown
원료 혼합	6.49	7.00	23.6	4.75	88.34	0.86	6.06	n/d
고정화 반응	5.97	19.20	22.3	4.83	65.18	23.73	6.25	n/d
활성탄/여과	4.73	.	27.0	4.98	64.51	23.25	7.26	n/d
이온 정제	5.50	0.02	26.3	5.17	65.35	22.94	6.55	n/d

(나) 여과 처리 조건

- 활성탄 반응이 완료된 사이코스 함유 시럽의 Bag-filter 및 M/F 연속 여과에 의한 활성탄 제거 공정

활성탄 처리 및 여과 공정



(2) 이온 정제

- 활성탄 제거된 사이코스 함유 시럽의 양이온 교환 수지, 음이온 교환 수지 및 M/B 혼합수지에 의한 시럽의 탈염화 공정

이온 처리 공정



(3) 사이코스 함유 시럽 농축 공정

- 농축 온도 60℃ 미만으로 최종 75brix 함량의 시럽 제조

라. 고순도 사이코스 함량 98% 분리 공정

(1) 분리 방법

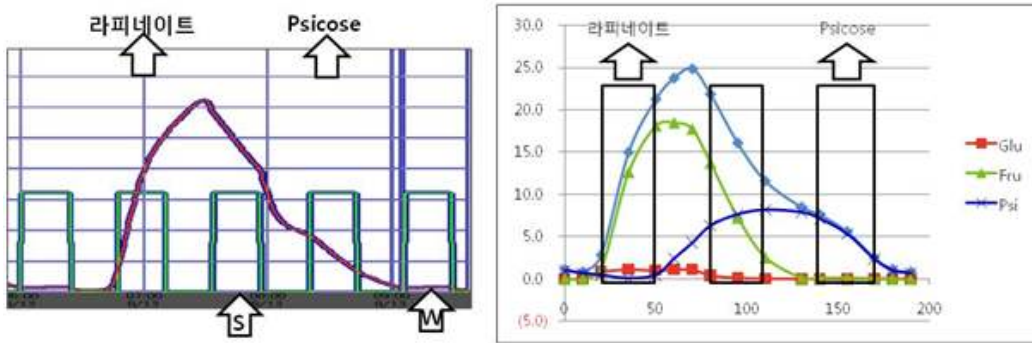
- 고순도 사이코스 분리에 사용한 수지는 Lab 실험 결과를 바탕으로 Ca²⁺ Type의 양이온 수지를 사용하였다. SMB 컬럼 온도는 60℃로 유지하고 Feeding Tank에 원료와 물을 채운 후 각각 50℃, 60℃로 가열하여 실험에 사용하였다. SMB 분리에 사용한 사이코스 시럽은 균체 고정화 비드에 의해 제조된, 사이코스 함량 20~25% 시럽을 사용하였다.



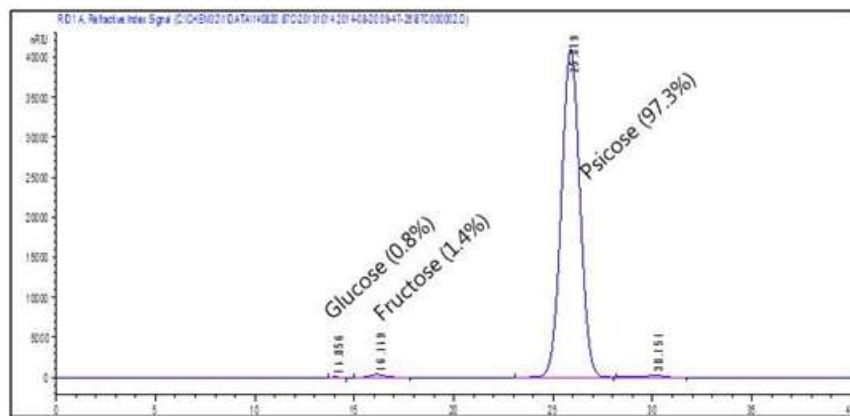
Pilot SMB(좌) 및 원료, 물 Feeding Tank(우)

(2) 분리 결과

- 사이코스 고순도 분리 결과 사이코스 분리액의 사이코스 순도는 97.3%를 나타내었고, 포도당, 과당은 각각 0.3%, 1.4%를 나타내었다. 반면, 라피네이트로 사이코스 함량이 6.2% 나타났는데, 이는 사이코스 분리액의 순도를 높이기 위해 라피네이트 분리액량을 증가시키면서 사이코스 일부가 라피네이트 쪽으로 빠져나왔다.



SMB 사이코스 분리 그래프 (좌) SMB 프로그램 Psicose 시럽 그래프, (우) SMB의 4개 탑에서 임의로 시간대별 샘플링 후 그린 당조성 그래프



사이코스 고순도 분리액 HPLC 그래프 (87C, RI-Detector)

마. 사이코스 분말 제조 공정

(1) 고순도 사이코스 결정화 방법

- 고순도 분리액을 80Bx 이상 농축 후, 냉각 결정법에 의한 결정화 유도하며 이를 탈수 및 세척하여 건조 전 단계의 사이코스 결정을 얻었다. 이를 유동층 건조기에 의해 남아 있는 수분을 완전 제거 하여 건조된 사이코스 분말을 제조 한다. 제조된 분말은 사별기에 의해 일 정 크기로 분리되어 최종 회수 한다.

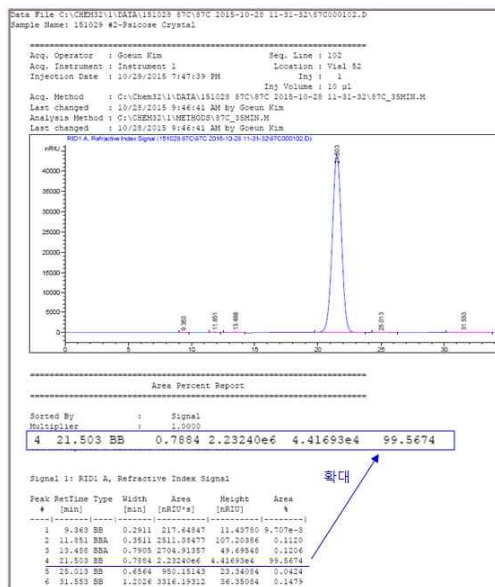


사이코스 고순도 분리액 HPLC 그래프 (87C, RI-Detector)

바. 최종 순도 98% 이상 사이코스 분말 함량 분석

(1) HPLC 분석

- 분석 조건 : Biolad Aminex HPX-87C 컬럼, 유속 0.6ml/min, 온도 80°C, 이동상 dw.



사이코스 함량 98% 제품의 HPLC 분석 그래프

(2) 최종 순도 98% 이상 사이코스 분말 생산량

- 최종 사이코스 분말 생산량 및 입도별 구분

입도	분말 무게 (kg)
20mesh ↑	5.8
20~60mesh	94.9
60mesh ↓	2.7

4. 사이코스 규격화

가. Specifications of D-psicose(D-allulose), powder form

Composition	Specification	Analytical Methods
Appearance	White crystal	Visual
Oder	No-oder	
D-Psicose (D-Allulose)	>98% (wt/wt)	HPLC analysis
Moisture	<2% (wt/wt)	KFDA
Ash	<0.1% (wt/wt)	KFDA
Lead	<1.0 ppm	KFDA (ICP-MS)
As	<1.0 ppm	KFDA (ICP-MS)
metal	<10.0 ppm	KFDA (colorimetric method)
Total plate count	<10,000 CFU/g	KFDA
Coliforms	negative	KFDA
Salmonella	negative	KFDA
Staphylococcus	negative	KFDA

나. Specifications of D-psicose(D-allulose), liquid form1.

Composition	Specification	Analytical Methods
Appearance	Clear yellow liquid	Visual
Oder	No-oder	
D-Psicose	>20 % (wt/wt)	HPLC analysis
Brix	>65	Brix meter
pH	3.0 - 7.0	pH meter
Ash	<0.5% (wt/wt)	KFDA
Lead	<1.0 ppm	KFDA (ICP-MS)
As	<1.0 ppm	KFDA (ICP-MS)
Heavy metal	<10.0 ppm	KFDA (colorimetric method)
Total plate count	<10,000 CFU/g	KFDA
Coliforms	negative	KFDA
Salmonella	negative	KFDA
Staphylococcus	negative	KFDA

다. Specifications of D-psicose(D-allulose), liquid form 2.

Composition	Specification	Analytical Methods
Appearance	Clear yellow liquid	Visual
Oder	No-oder	
D-Psicose	>50 % (wt/wt)	HPLC analysis
Brix	>65	Brix meter
pH	3.0 - 7.0	pH meter
Ash	<0.5% (wt/wt)	KFDA
Lead	<1.0 ppm	KFDA (ICP-MS)
As	<1.0 ppm	KFDA (ICP-MS)
Heavy metal	<10.0 ppm	KFDA (colorimetric method)
Total plate count	<10,000 CFU/g	KFDA
Coliforms	negative	KFDA
Salmonella	negative	KFDA
Staphylococcus	negative	KFDA

라. Specifications of D-psicose(D-allulose), liquid form3.

Composition	Specification	Analytical Methods
Appearance	Clear yellow liquid	Visual
Oder	No-oder	
D-Psicose	>90 % (wt/wt)	HPLC analysis
Brix	>65	Brix meter
pH	3.0 - 7.0	pH meter
Ash	<0.5% (wt/wt)	KFDA
Lead	<1.0 ppm	KFDA (ICP-MS)
As	<1.0 ppm	KFDA (ICP-MS)
Heavy metal	<10.0 ppm	KFDA (colorimetric method)
Total plate count	<10,000 CFU/g	KFDA
Coliforms	negative	KFDA
Salmonella	negative	KFDA
Staphylococcus	negative	KFDA

5. 시제품 안전성

(가) 사이코스 20%이상 시럽

항목	1lot	2lot	3lot
고형분 함량	75 Brix (%)		
수분 함량	25%		
pH	3.0 ~ 7.0		
사이코스 함량	24.63%	25.16%	25.04%
일반 세균 (시럽1g)	불검출	불검출	불검출
살모넬라	불검출	불검출	불검출
황색포도상구균	불검출	불검출	불검출
대장균	불검출	불검출	불검출
회분	0.00%	0.00%	0.00%
납	0.0095 mg/kg	0.0048 mg/kg	0.0063 mg/kg
비소	0.0071 mg/kg	0.0014 mg/kg	0.0024 mg/kg

(나) 사이코스 50% 이상 시럽

항목	1lot	2lot	3lot
고형분 함량	75 Brix (%)		
수분 함량	25%		
pH	3.0 ~ 7.0		
사이코스 함량	53.37%	53.22%	54.95%
일반 세균 (시럽1g)	불검출	불검출	불검출
살모넬라	불검출	불검출	불검출
황색포도상구균	불검출	불검출	불검출
대장균	불검출	불검출	불검출
회분	0.00%	0.00%	0.00%
납	0.0040 mg/kg	0.0033 mg/kg	0.0074 mg/kg
비소	0.0015 mg/kg	0.0015 mg/kg	0.0024 mg/kg

(다) 사이코스 90% 이상 시럽

항목	1lot	2lot	3lot
고형분 함량	75 Brix (%)		
수분 함량	25%		
pH	3.0 ~ 7.0		
사이코스 함량	95.90%	95.25%	96.19%
일반 세균 (시럽1g)	불검출	불검출	불검출
살모넬라	불검출	불검출	불검출
황색포도상구균	불검출	불검출	불검출
대장균	불검출	불검출	불검출
회분	0.00%	0.00%	0.00%
납	0.0024 mg/kg	0.0021 mg/kg	0.0028 mg/kg
비소	0.0011 mg/kg	0.0006 mg/kg	0.0018 mg/kg

(라) 사이코스 98%이상 분말

항목	1lot	2lot	3lot
고형분 함량			
수분 함량			
pH	3.0 ~ 7.0		
사이코스 함량	99.44%	99.03%	99.43%
일반 세균 (시럽1g)	2.0 X 10 ²	2.7 X 10 ²	2.0 X 10 ²
살모넬라	불검출	불검출	불검출
황색포도상구균	불검출	불검출	불검출
대장균	불검출	불검출	불검출
회분	0.00%		
납	0.0065 mg/kg	0.0054 mg/kg	0.0017 mg/kg
비소	0.0027 mg/kg	0.0059 mg/kg	0.0062 mg/kg

제 D2016010048 호

검 사 성 적 서

검체명	20% 이상 시럽 1	제조일자 (유통기한)	
의뢰인	업체명	(주)삼양제백스식품연구소	
	주소	대전 유성구 대덕대로 730 (화암동)	
	성명	문성환	
제조번호		접수년월일	2016-01-04
검사의뢰목적	참고용	검체접수번호	D2016010048

귀하가 우리 연구원에 검사의뢰한 결과는 다음과 같습니다.

검사관련 총 책임자: 김 천 회

시험항목	결과	검사담당자
회분(%)	0.00%	김혜운
중금속(mg/kg)	10 이하	허예성
납(mg/kg)	0.0095mg/kg	류미진
비소(mg/kg)	0.0071mg/kg	류미진

[중금속]-비색법

2016 년 1 월 13 일

한국기능식품연구원



(사)한국건강기능식품협회 부설 한국기능식품연구원 <http://www.khfi.re.kr> 전화번호 (031)628-2400 FAX(031)628-0400-1

제 D2016010049 호

검 사 성 적 서

검체명	20% 이상 시럽 2	제조일자 (유통기한)	
의뢰인	업체명	(주)삼양제텍스식품연구소	
	주 소	대전 유성구 대덕대로 730 (화암동)	
	성 명	문성환	
제조번호		접수년월일	2016-01-04
검사의뢰목적	참고용	검체접수번호	D2016010049

귀하가 우리 연구원에 검사의뢰한 결과는 다음과 같습니다.

검사관련 총 책임자: 김 천 회

시험항목	결과	검사담당자
회분(%)	0.00%	김혜윤
중금속(mg/kg)	10 이하	허예성
납(mg/kg)	0.0048mg/kg	류미진
비소(mg/kg)	0.0014mg/kg	류미진

[중금속]-비색법

2016 년 1 월 13 일

한국기능식품연구원

(사)한국건강기능식품협회 부산 한국기능식품연구원 <http://www.khfi.re.kr> 전화번호 (031)628-2400 FAX(031)628-0400-1

제 D2016010050 호

검 사 성 적 서

검체명	20% 이상 시럽 3	제조일자 (유통기한)	
의뢰인	업체명	(주)삼양제넥스식품연구소	
	주소	대전 유성구 대덕대로 730 (화암동)	
	성명	문성환	
제조번호		접수년월일	2016-01-04
검사의뢰목적	참고용	검체접수번호	D2016010050

귀하가 우리 연구원에 검사의뢰한 결과는 다음과 같습니다.

검사관련 총 책임자: 김 천 회

시험항목	결과	검사담당자
회분(%)	0.00%	김혜운
중금속(mg/kg)	10 이하	허예성
납(mg/kg)	0.0063mg/kg	류미진
비소(mg/kg)	0.0024mg/kg	류미진

[중금속]-비색법

2016 년 1 월 13 일

한국기능식품연구원



(사)한국건강기능식품협회 부설 한국기능식품연구원 <http://www.khsi.re.kr> 전화번호(031)628-2700 FAX(031)628-0400-1

제 D2016010051 호

검 사 성 적 서

검체명	50% 이상 시럽 1	제조일자 (유통기한)	
의뢰인	업체명	(주)삼양제넥스식품연구소	
	주 소	대전 유성구 대덕대로 730 (화암동)	
	성 명	문성환	
제조번호		접수년월일	2016-01-04
검사의뢰목적	참고용	검체접수번호	D2016010051

귀하가 우리 연구원에 검사의뢰한 결과는 다음과 같습니다.

검사관련 총 책임자: 김 천 회

시험항목	결과	검사담당자
회분(%)	0.00%	김혜윤
중금속(mg/kg)	10 이하	허예성
납(mg/kg)	0.0040mg/kg	류미진
비소(mg/kg)	0.0015mg/kg	류미진

[중금속]-비색법

2016 년 1 월 13 일

한국기능식품연구원



(사)한국건강기능식품협회 부설 한국기능식품연구원 <http://www.khfi.re.kr> 전화번호 011-628-2400 FAX(031)628-0400-1

제 D2016010052 호

검 사 성 적 서

검체명	50% 이상 시럽 2	제조일자 (유통기한)	
의뢰인	업체명	(주)삼양제백스식품연구소	
	주 소	대전 유성구 대덕대로 730 (화암동)	
	성 명	문성환	
제조번호		접수년월일	2016-01-04
검사의뢰목적	참고용	검체접수번호	D2016010052

귀하가 우리 연구원에 검사의뢰한 결과는 다음과 같습니다.

검사관련 총 책임자: 김 천 회

시험항목	결과	검사담당자
회분(%)	0.00%	김혜운
중금속(mg/kg)	10 이하	허예성
납(mg/kg)	0.0033mg/kg	류미진
비소(mg/kg)	0.0015mg/kg	류미진

[중금속]-비색법

2016 년 1 월 13 일

한국기능식품연구원



(사)한국건강기능식품협회 부산 한국기능식품연구원 <http://www.khsl.re.kr> 전화번호 (031)628-2400 FAX(031)628-0400-1

제 D2016010053 호

검 사 성 적 서

검체명	50% 이상 시험 3	제조일자 (유통기한)	
의뢰인	업체명	(주)삼양제백스식품연구소	
	주소	대전 유성구 대덕대로 730 (화암동)	
	성명	문성환	
제조번호		접수년월일	2016-01-04
검사의뢰목적	참고용	검체접수번호	D2016010053

귀하가 우리 연구원에 검사의뢰한 결과는 다음과 같습니다.

검사관련 총 책임자: 김 천 회

시험항목	결과	검사담당자
회분(%)	0.00%	김혜윤
중금속(mg/kg)	10 이하	허예성
비소(mg/kg)	0.0024mg/kg	류미진
납(mg/kg)	0.0074mg/kg	류미진

[중금속]-비색법

2016 년 1 월 13 일

한국기능식품연구원

(사)한국건강기능식품협회 부설 한국기능식품연구원 <http://www.khfi.re.kr> 전화번호 031-628-2400 FAX(031)628-0400-1

제 D2016010054 호

검사 성적서

검체명	90% 이상 시험 1	제조일자 (유통기한)	
의뢰인	업체명	(주)삼양제백스식품연구소	
	주소	대전 유성구 대덕대로 730 (화암동)	
	성명	문성환	
제조번호		접수년월일	2016-01-04
검사의뢰목적	참고용	검체접수번호	D2016010054

귀하가 우리 연구원에 검사의뢰한 결과는 다음과 같습니다.

검사관련 총 책임자: 김 천 회

시험항목	결과	검사담당자
회분(%)	0.00%	김혜윤
중금속(mg/kg)	10 이하	허예성
비소(mg/kg)	0.0011mg/kg	류미진
납(mg/kg)	0.0024mg/kg	류미진

[중금속]-비색법

2016 년 1 월 13 일

한국기능식품연구원



(사)한국건강기능식품협회 부설 한국기능식품연구원 <http://www.khsi.re.kr> 전화번호 (031)628-2400 FAX(031)628-0400-1

제 D2016010055 호

검 사 성 적 서

검체명	90% 이상 시럽 2	제조일자 (유통기한)	
의뢰인	업체명	(주)삼양제백스식품연구소	
	주 소	대전 유성구 대덕대로 730 (화암동)	
	성 명	문성환	
제조번호		접수년월일	2016-01-04
검사의뢰목적	참고용	검체접수번호	D2016010055

귀하가 우리 연구원에 검사의뢰한 결과는 다음과 같습니다.

검사관련 총 책임자: 김 천 회

시험항목	결과	검사담당자
회분(%)	0.00%	김혜운
중금속(mg/kg)	10 이하	허예성
비스(mg/kg)	0.0006mg/kg	류미진
납(mg/kg)	0.0021mg/kg	류미진

[중금속]-비색법

2016 년 1 월 13 일

한국기능식품연구원



(사)한국건강기능식품협회 부설 한국기능식품연구원 <http://www.khsi.re.kr> 전화번호(031)628-2400 FAX(031)628-0400-1

제 D2016010056 호

검 사 성 적 서

검체명	90% 이상 시럽 3	제조일자 (유통기한)	
의뢰인	업체명	(주)삼양제넥스식품연구소	
	주소	대전 유성구 대덕대로 730 (화암동)	
	성명	문성환	
제조번호		접수년월일	2016-01-04
검사의뢰목적	참고용	검체접수번호	D2016010056

귀하가 우리 연구원에 검사의뢰한 결과는 다음과 같습니다.

검사관련 총 책임자: 김 천 회

시험항목	결과	검사담당자
회분(%)	0.00%	김혜운
중금속(mg/kg)	10 이하	허예성
비소(mg/kg)	0.0018mg/kg	류미진
납(mg/kg)	0.0028mg/kg	류미진

[중금속]-비색법

2016 년 1 월 13 일

한국기능식품연구원

(사)한국건강기능식품협회 부설 한국기능식품연구원 <http://www.khsi.re.kr> 전화번호(031)628-2400 FAX(031)628-0400-1

제 D2016010057 호

검사성적서

검체명	98% 이상 분말 1	제조일자 (유통기한)	
의뢰인	업체명	(주)삼양제백스식품연구소	
	주소	대전 유성구 대덕대로 730 (화암동)	
	성명	문성환	
제조번호		접수년월일	2016-01-04
검사의뢰목적	참고용	검체접수번호	D2016010057

귀하가 우리 연구원에 검사의뢰한 결과는 다음과 같습니다.

검사관련 총 책임자: 김 천 회

시험항목	결과	검사담당자
회분(%)	0.00%	김혜윤
중금속(mg/kg)	10 이하	허예성
비소(mg/kg)	0.0027mg/kg	류미진
납(mg/kg)	0.0065mg/kg	류미진

[중금속]-비색법

2016 년 1 월 13 일

한국기능식품연구원



(사)한국건강기능식품협회 부산 한국기능식품연구원 <http://www.khfi.re.kr> 전화번호 (031)628-2100 FAX(031)628-0400-1

제 D2016010058 호

검 사 성 적 서

검체명	98% 이상 분말 2	제조일자 (유통기한)	
의뢰인	업체명	(주)삼양제백스식품연구소	
	주 소	대전 유성구 대덕대로 730 (화암동)	
	성 명	문성환	
제조번호		접수년월일	2016-01-04
검사의뢰목적	참고용	검체접수번호	D2016010058

귀하가 우리 연구원에 검사의뢰한 결과는 다음과 같습니다.

검사관련 총 책임자: 김 천 회

시험항목	결과	검사담당자
회분(%)	0.00%	김혜윤
중금속(mg/kg)	10 이하	허예성
비소(mg/kg)	0.0059mg/kg	류미진
납(mg/kg)	0.0054mg/kg	류미진

[중금속]-비색법

2016 년 1 월 13 일

한국기능식품연구원



(사)한국건강기능식품협회 부설 한국기능식품연구원 <http://www.kfsi.re.kr> 전화번호: (031)628-2400 FAX: (031)628-0400-1

제 D2016010059 호

검 사 성 적 서

검체명	98% 이상 분말 3	제조일자 (유통기한)	
의뢰인	업체명	(주)삼양제넥스식품연구소	
	주소	대전 유성구 대덕대로 730 (화암동)	
	성명	문성환	
제조번호		접수년월일	2016-01-04
검사의뢰목적	참고용	검체접수번호	D2016010059

귀하가 우리 연구원에 검사의뢰한 결과는 다음과 같습니다.

검사관련 총 책임자: 김 천 회

시험항목	결과	검사담당자
회분(%)	0.00%	김혜운
중금속(mg/kg)	10 이하	허예성
비스(mg/kg)	0.0017mg/kg	류미진
납(mg/kg)	0.0062mg/kg	류미진

[중금속]-비색법

2016 년 1 월 13 일

한국기능식품연구원

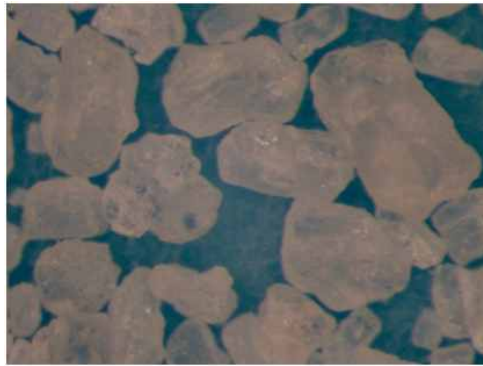


(사)한국건강기능식품협회 부설 한국기능식품연구원 <http://www.khsi.re.kr> 전화번호 (031)628-2400 FAX(031)628-0400-1

6. 사이코스 함유 프리미엄 설탕 제작

가. 사이코스과 포도당의 혼합 과립 제조

사이코스 분말과 평균 입도가 261, 295 μm 인 무수포도당 분말을 각 150g씩 1:1 중량비(w/w)가 되게 혼합한 후, InLet 온도 50 $^{\circ}\text{C}$, OutLet 온도 40 $^{\circ}\text{C}$, Air 압력 30 m^3/h 조건으로 셋팅된 유동층 과립 건조기(FBS, HÜTTLIN 제조, 독일)에 분말을 투입하여 과립을 제조하고 건조하였다. 이때, 과립이 잘 이루어지도록 결합액을 순도 95% 이상의 발효 주정으로 전체 혼합 분말 무게의 총 중량의 10~20% 부피만큼 10rpm의 속도로 15분간 분사시켜 주었다. 주정은 분사되면서 휘발되어 분말에는 존재하지 않아 함량에 영향을 주지 않는다는 장점이 있다. 주정이 모두 분사되면 내부 온도를 30 $^{\circ}\text{C}$ 이하로 서서히 냉각시킨 후, 과립 분말을 장비에서 꺼내어 회수하였다.



사이코스과 무수포도당 혼합 과립 분말 실체 현미경 사진 (X400배 확대)

나. 사이코스과 설탕의 혼합 과립 제조

사이코스 분말과 평균 입도가 72, 230, 392, 684 μm 가 되는 분당(설탕을 분쇄하여 제조한 것으로서 표 1에 기재된 것임)을 각 150g씩 1:1 중량비(w/w)이 되게 혼합한 후, 위와 동일한 방법으로 과립 분말을 제조하였다.

다. 결합제를 이용한 사이코스 및 설탕 혼합 과립 제조

분말 입자 간에 고르게 과립이 이루어지도록 결합제로서, DE12 말토덱스트린, 천연 수용성 식이섬유, 변성 전분, 및 하이드록시프로필 메틸셀룰로스(Hydroxypropyl methylcellulose, HPMC)을 준비하였다. 말토덱스트린을 30Bx 농도가 되게 물에 용해하여 용액을 준비하고, 천연 수용성 식이섬유로서 난소화성 말토덱스트린 30Bx 농도가 되게 물에 용해하여 용액을 제조하고, 변성 전분으로서 알파-전분을 10% 농도가 되게 물에 용해하여 용액을 준비하고, HPMC를 5 중량% 농도가 되게 순도 95% 발효주정에 용해하여 용액으로 제조하였다.

사이코스 분말을, 평균 입도가 230 μm 인 설탕 미립당을 각각 50g씩 1:1 중량비율이 되도록 혼합

하였다. 상기 혼합물에 준비된 결합제 용액을 적가한 후, 20mesh의 체에 통과시켜 분말 상의 입자들을 결합시켰다. 이 상태로 45℃에서 30~60분간 열풍 건조 후 과립을 고르게 체질하여 수득하였다. 상기 준비된 결합제 용액으로서, 말토덱스트린, 난소화성 말토덱스트린 및 HPMC는 과립제의 총중량 중 결합제의 최종 함량이 1 중량%가 되도록 첨가하고, 알파-전분은 과립제의 총중량 중 결합제의 최종 함량이 0.5 중량%가 되도록 첨가하였다.

(1) 분말 입도분석

입도 분석 장비 (장비명 Mastersizer 2000, 제조사 Malvern)는 레이저 회절 기술을 이용하여 입자의 크기를 측정하는 것으로, 레이저 광선이 분산된 미립자 시료를 통과할 때 산란되는 빛의 세기를 측정해서 입자크기를 계산하는 방식으로 분석된다. 이 장비를 이용하여 각 혼합 성분간의 입자 크기를 측정하였다.

당류	평균 입도 (μm)	평균 입도 비율 (사이코스 대비)	입자 크기 분포(μm)
사이코스 결정	237	1.0 (기준)	74-428
설탕 (정백당)	684	2.9	336-1125
설탕 (세립당)	392	1.7	235-580
설탕 (미립당)	230	0.9	126-356
설탕 (분당)	72	0.3	9-142
포도당 (무수)	295	1.2	75-530
포도당 (함수)	261	1.1	79-512

(2) 혼합당 과립의 혼합도 분석

과립 분말을 봉지에 담아 진동기에서 10분간 진동 후, 상중하 3부분의 과립을 부분 채취하여 고속 액체크로마토그래피로 분석하여, 각 샘플의 당 조성을 확인하였다. 그 결과 과립 분말에서 혼합 성분간의 당 조성 편차가 1% 이하 수준까지 과립당의 혼합이 균일하게 잘 이루어진 것으로 결정하였다.

당 조성 %	sample 1	sample 2
사이코스	49.1	50.7
포도당	50.9	49.3
당 조성 편차	±0.4	±0.2
혼합도	◎	◎

(혼합도: 매우 높음 -◎, 높음-○, 낮음- (X))

위의 표에 나타난 것과 같이 sample 1에서는 혼합되는 두 성분의 평균 입도 비율이 사이코스:포도당 = 1.0 : 1.1~1.2 로, 두 성분간의 입자 크기가 유사하기 때문에 결합액에 의해 과립이 잘 이루어져, 단순히“믹싱”혼합하는 방법보다 조성 편차가 적고 균일한 조성의 과립 분말 입자를 제조할 수 있음을 확인 하였다.

혼합당 과립 분말 당 조성 분석

성분조성 (중량%)	sample 3				sample 4			
	2-1	2-2	2-3	2-4	3-1	3-2	3-3	3-4
사이코스	50.9	49.3	51.0	40.1	51.4	50.2	51.0	50.6
설탕	49.1	50.7	49.0	59.9	47.8	49.6	48.8	48.9
결합제	-	-	-	-	0.8	0.2	0.2	0.5
당조성 편차	±0.9	±0.3	±1.0	±4.3	±0.8	±0.1	±0.5	±0.4
혼합도	○	◎	○	X	○	◎	○	◎

(혼합도: 매우 높음 -◎, 높음-○, 낮음- (X))

위의실험 결과 설탕 평균 입도 크기가 사이코스 보다 4배 이상 크기 때문에 결합액을 사용하더라도 균일한 조성의 혼합 과립 분말을 제조하기 힘들었다. 하지만, 2-4를 제외하고, 혼합되는 두 성분의 평균 입도 비율이 사이코스:설탕 = 1.0 : 0.3~1.7 범위 내에 있는 혼합 과립 분말(2-1, 2-2, 2-3)에서는 조성 편차가 적고 균일한 조성의 과립 분말을 제조할 수 있음을 확인하였다.

결합액 종류별로 사이코스와 설탕 혼합 과립을 제조한 결과, 결합제의 종류별로 약간의 차이는 있으나 대부분 과립이 잘 이루어져 균일한 조성의 과립 분말을 제조할 수 있음을 확인하였다.

라. 사이코스 혼합 과립 분말 관능 평가

(1) 관능 평가 방법

(가) 사이코스과 설탕의 혼합당 과립

관능 평가를 위한 과립 분말 샘플은, 결합액을 발효주정으로 하여 단순 과립 방법에 의해 제조하였다. 사이코스의 분말을 설탕 미립당과 9:1, 7:3, 5:5(w/w) 비율이 되게 각각 혼합한다. 각 100g씩을 혼합하여 순도 95% 이상의 발효 주정을 중량의 5~10%로 적가한 후, 20mesh의 체에 통과시켜 분말 상의 입자를 서로 결합 시켜준다. 이 상태로 45℃에서 30~60분간 열풍 건조 후 과립된 입자 분말을 고르게 체질하여 수득한다. 상기 수득된 혼합당은 사이코스의 분말을 설탕

의 혼합 비율에 따라, 9:1, 7:3, 5:5(w/w) 비율에 따라 SP91, SP73 및 SP55로 명명하였다.

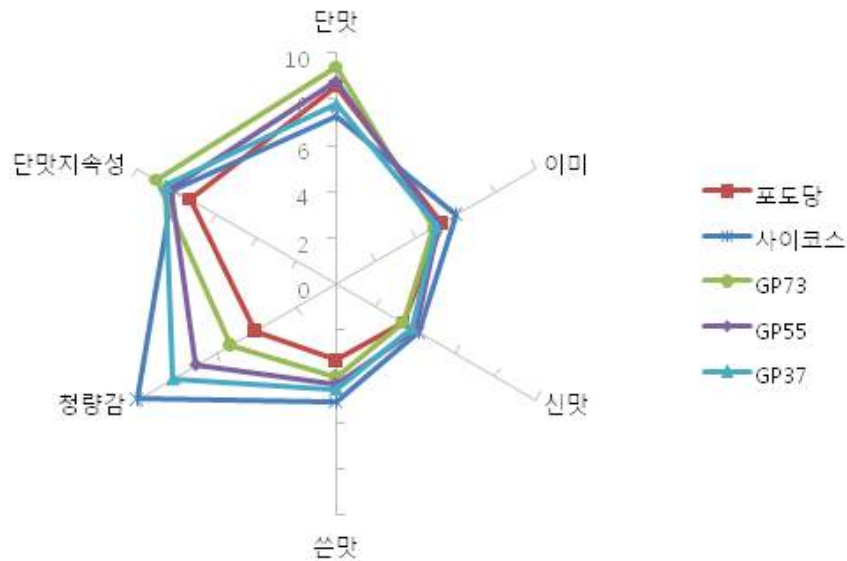
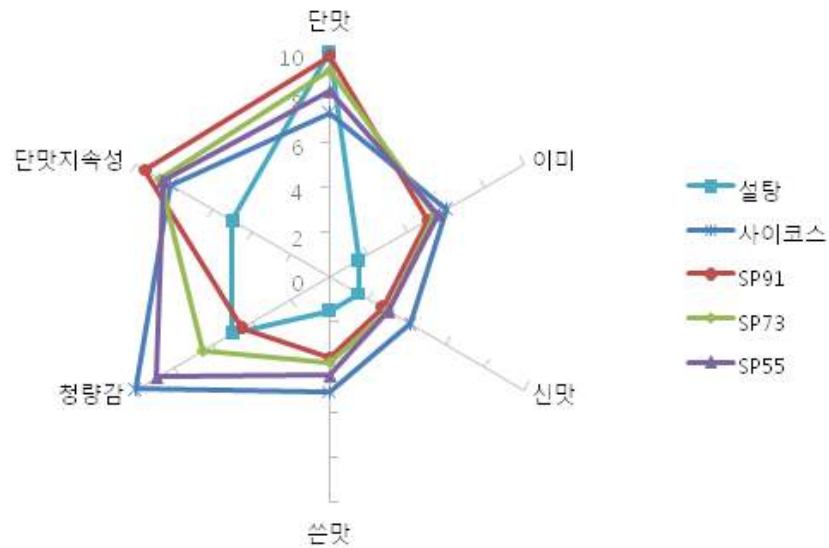
(나)사이코스과 포도당의 혼합당 과립

관능 평가를 위한 과립 분말 샘플은, 결합액을 발효주정으로 하여 단순 과립 방법에 의해 제조하였다. 사이코스의 분말을 무수포도당과 7:3, 5:5 3:7(w/w) 비율이 되게 각각 혼합한다. 각 100g씩을 혼합하여 순도 95% 이상의 발효 주정을 중량의 5~10%로 적가한 후, 20mesh의 체에 통과시켜 분말 상의 입자를 서로 결합 시켜준다. 이 상태로 45℃에서 30~60분간 열풍 건조 후 과립된 입자 분말을 고르게 체질하여 수득하였다. 상기 수득된 혼합당은 사이코스의 분말을 무수포도당과 7:3, 5:5, 3:7 (w/w) 비율에 따라 GP73, GP55 및 GP37로 명명하였다.

설탕 또는 포도당과 사이코스가 혼합된 과립 분말 시료의 관능 평가를 실시하였다. 각 시료는 각각 0.7g씩 채취하여 제공하였으며, 난수표를 이용하여 무작위로 추출한 세 자리 숫자로 표시하였다. 시료 제시 순서는 항상 무작위로 정하였고, 검사요원에게는 입을 가릴 수 있는 미지근한 물을 함께 제공하였다. 관능 검사실은 일정 온도(25±1℃)와 냄새가 없는 상태를 유지하였다. 관능검사원은 관능검사에 대한 이해도가 높고 관능 시험 경험이 있는 패널 15명을 선정하였다. 훈련은 1주일에 3회씩 1개월간 이루어졌으며, 훈련 1회당 평균 30분씩 소요되었다. 평가 내용 및 방법은, 사이코스 혼합당의 관능적 특성은 단맛, 신맛, 쓴맛, 청량감, 단맛 지속성을 평가하였고, 15cm 선척도를 사용하였다.

	단맛	이미	신맛	쓴맛	청량감	단맛지속성
설탕	10.0	1.5	1.5	1.5	5.0	5.0
사이코스	7.3	6.0	4.2	5.1	10.0	8.2
SP91	9.8	5.1	2.7	3.6	4.5	9.5
SP73	9.2	5.4	3.0	3.8	6.5	8.7
SP55	8.3	5.6	3.0	4.4	8.9	8.6

	단맛	이미	신맛	쓴맛	청량감	단맛지속성
포도당	8.6	5.3	3.4	3.3	4.1	7.3
사이코스	7.3	6.0	4.2	5.1	10.0	8.2
GP73	9.4	4.9	3.3	4.0	5.3	9.0
GP55	8.8	5.1	4.0	4.3	7.0	8.3
GP37	7.8	5.0	3.8	4.6	8.2	8.6



사이코스는 설당의 70%에 해당하는 감미도를 가지지만, 감미 상승의 늦음이나 후미에 쓴맛 또는 이미지를 갖고 있어 감미질의 개선이 필요하다.

따라서 설당 또는 포도당과 일정 비율로 혼합함으로써, 사이코스가 갖는 감미질의 단점을 보완하고 맛이 개선된 감미료를 제공할 수 있다. 관능 평가 결과 표에서 나타낸 바와 같이, 사이코스과 설당의 혼합으로 인해 사이코스 단독보다 단맛이 상승하고 이미지와 쓴맛이 완화되며, 특히 단맛의 지속성이 기존 설당보다도 훨씬 증가됨을 알 수 있었다. 또한 사이코스과 포도당의 혼합으로 인해 사이코스, 포도당 각각 단독일 때보다 단맛이 더 강하게 느껴졌으며, 이미지와 쓴맛 또한 기존 포도당과 유사한 수준으로 사이코스 단독에 비해 완화된 것을 확인하였다.

특히 단맛의 지속성이 기존 설당과 포도당 보다도 훨씬 증가되는 것을 확인하였다. 이는 사이코스 혼합당 분말 자체로 섭취하였을 때, 사이코스가 갖는 청량감이 섭취 즉시 부각되면서 사이코스의 특유의 이미지와 쓴맛을 보완해주고 뒤늦은 감미의 상승이 설당 또는 포도당의 단맛과

시너지를 일으켜 단맛이 길게 지속되면서 단맛 또한 강하게 느껴지는 것이라 판단된다.

마. 사이코스 혼합당 과립의 물성

(1) 흐름성 평가

시료 20g을 정확히 칭량하여 측정용 Funnel (Orifice 1.55mm)에 넣고, 칭량 저울 위로 시료 20g이 모두 흘러 내린 시간(초)를 측정하였다 (예, Flow Properties Tests - flow through an orifice, angle of repose, shear cell)

샘플	흐름성 평균값 (g/sec)	편차 (g/sec)	백분율(%)
사이코스	3.78	±0.37	100.0
1-1	5.81	±0.23	153.8
1-2	4.54	±0.19	120.1
2-2	5.97	±0.15	158.1
2-3	5.72	±0.21	151.5

단독 사이코스 분말 대비 혼합 과립 분말의 흐름성이 사이코스 보다 120~159% 이상 수준까지 좋아짐을 확인하였다. 흐름성이 개선됨으로써, 입자상 또는 분말상 제품을 출하하는 회사 입장에서는 제품 포장 및 유통 단계에서의 많은 이점을 제공받을 수 있다.

(2) 흡습성 평가

각 시료 3g씩 접시에 담아 온도 40℃와 상대습도 60±3% 조건의 항온항습기에서 150분간 보관하여, 50분, 70분 및 150분 경과한 후에 각각 시료의 무게를 측정하였다.

흡습 증가량 그래프에서 각 시료의 흡습성을 비교해 본 결과, 혼합당 과립의 흡습성이 단독 사이코스 분말 100% 기준으로, 84~56% 이하 수준의 낮은 흡습성을 보였다. 여기서 흡습성이 낮다는 것은, 분말상 제품의 출하 및 장기간 보관 시, 주변 환경에 따라 분말이 굳는 Caking 현상이나 축축해질 수도 있는 위험성이 낮아짐을 의미한다.

동일 시간에서의 흡습성 증가율을 비교하고자, 항온항습기에 동일한 조건에서 보관한 후에, 각 시료의 무게를 측정하고 흡습 증가량을 단독 사이코스 분말 100% 기준으로 흡습성을 환산하였다.

시료	흡습 증가량g	백분율%	백분율 편차%
사이코스	0.3356	100.0	-
1-1	0.2850	85.2	±1.26
1-2	0.2580	77.0	±3.56
2-2	0.2952	88.2	±5.47
2-3	0.2011	60.4	±10.09

7. 사이코스 시럽 안정성 조사(유통기한설정 시험)

가. 사이코스 함량별 시료 준비 (0일차)

지표 분석 시료		품질			
		사이코스 함량(%)	농도 (Brix%)	pH (30Brix)	색가 (A420nm)
대조구	액상과당	과당 54.7	30.4	3.44	0.000
실험구	사이코스 P-10시럽	10.11	29.9	3.79	0.000
	사이코스 P-15시럽	14.99	30.2	3.85	0.001
	사이코스 P-25시럽	23.91	30.2	3.99	0.007

나. 유통기한 설정 실험 방법

- (1) 각 샘플을 저장 온도를 달리하여 보관한 후, 일정 기간에 1회씩 관찰, 분석한다.
- (2) 저장 온도 : 24℃, 36℃, 45℃
- (3) 실험 횟수 : 5회 (최초 실험(0일차) 제외)
- (4) 유통기한 설정 기준

: 식약처에서 제공하는 유통기한 설정 프로그램을 이용하여 실험 가이드라인에 맞게 수행한 후, 유통기한을 예측한다.

다. 유통기한 설정 실험 결과

(1) 이슈 사항

- 사이코스 P-10시럽과 P-15시럽 제품은 실험 기간 내 포도당 성분에 의한 결정이 석출되어 유통기한 설정 실험을 더 이상 진행하기 어려웠음. 따라서 사이코스 P-25시럽 제품만 유통기한 설정 실험을 진행하여 예측하였음

(2) 품질 변화 결과값

(가) 색도 품질 변화 : 품질 규격 색도(A420nm) = 0.02 이하

저장기간(일)	24℃	36℃	45℃
0	0.007		
3	0.009	0.009	0.009
5	0.009	0.009	0.010
12	0.009	0.010	0.013
15	0.009	0.010	0.020
19	0.009	0.011	0.029

- 온도 45℃ 조건에서 갈변이 빠르게 일어남. 품질 규격에 벗어남

(나) pH 품질 변화 : 품질 규격 pH (30Brix) = 6.0 이하

저장기간(일)	24℃	36℃	45℃
0	3.99		
3	4.471	4.403	4.253
5	4.473	4.406	4.206
12	4.423	4.386	4.236
15	4.530	4.350	3.983
19	4.743	4.517	4.016

- pH 변화는 온도별, 저장 시간별 영향이 크지 않으며, 품질 규격 내 값을 나타냄
 (다) 당 함량(%) 품질 변화 : 품질 규격 당 함량 = 23% 이상 (초기 함량 대비 -1%)

저장기간(일)	24℃	36℃	45℃
0	23.91		
5	23.92	23.84	23.60
12	23.88	23.74	23.05
19	23.88	23.66	22.63
26	23.93	23.58	22.52
68	24.00	23.07	22.21

- 당 함량 변화는 저장 온도별로 시간이 지남에 따라 큰 변화를 나타냄.

(3) 품질지표별 유통기한 산출

(가) 색도

차수	최초함량-품질규격	연간변화속도상수	유통기한(일)	유통기한(개월)
0	-0.0130	0.00	1100.47	36.18
1	-1.0498	0.83	462.86	15.22

(나) pH

차수	최초함량-품질규격	연간변화속도상수	유통기한(일)	유통기한(개월)
0	-2.0100	20.20	36.32	1.19
1	-0.4080	4.49	33.17	1.09

(다) 당 함량(%)

차수	최초함량-품질규격	연간변화속도상수	유통기한(일)	유통기한(개월)
0	0.9100	0.46	723.84	23.80
1	0.0388	0.02	737.79	24.26

※ 파란색 글씨는 현재까지 실험한 지표중 유통기한 설정에 가장 적절한 지표를 표시하는

것임. 최종 유통기한은 자사(식약처 제공) 수용능력에 따라 1.0미만의 안전계수를 사용하여 설정하기 바람.

▶ 사이코스 시럽(P-25)의 유통기한 = 24개월

- 향후 사이코스 함량(%)을 세분화 하여 각 제품(시럽, 분말)의 유통기한을 재확인할 예정임

제 4 장 목표달성도 및 관련분야에의 기여도

1절. 년차별 목표달성도

구분 (연도)	세부과제명	세부연구목표	달성도 (%)	연구개발 수행내용
1차 년도 (2013)	신규 효소 개량 및 균주 스크리닝 을 이용한 설당대 체용 사이코스 대 량생산 방법 개발	● 신규한 사이코스 전환 미생물군/효 소군 확보 및 개 량	100	● 환경 유래 미생물 균체반응으로 사이코스 전환조건 확립- 500g/L 과당에서 30%전환율 ● 균주개량: 야생형의 7배 활성 증 가
			100	● 재조합 단백질의 특성조사 및 효 소개량 - CDPE 온도 안전성 50℃에서 10배 이상 증가 - TDPE 발현양의 10배 이상 상승
			100	● GRAS 균주로의 형질전환 및 발 현조건 확립 - 28~30% 발현율
			100	● 상품화를 위한 재조합 균주 인허 가 준비
2차 년도 (2014)	신규 효소 개량 및 균주 스크리닝 을 이용한 설당대 체용 사이코스 대 량생산 방법 개발	● 사이코스 3-에피 머화 효소함유 미 생물/효소 생산 최적화 및 사이코 스 생산 조건 확 립 ● 사이코스 생산 재 조합 균주 인허가 관련 실험	100	● 활성 환경 유래 미생물 및 재조합 균주 대량생산 발효 조건 탐색 (5L)
			100	● 고정화반응조건 확립
			100	● 사이코스 함유 시럽 생산조건 확 립
			100	● 고순도 사이코스 시럽 생산조건 확립
			100	● 상품화를 위한 재조합 균주 인허 가 관련 실험 및 제출(GMO 안전 성)
3차 년도 (2015)	신규 효소 개량 및 균주 스크리닝 을 이용한 설당대 체용 사이코스 대 량생산 방법 개발	● 사이코스 함유 제 품 시생산 및 상 품화	100	● 순수 사이코스 정제 및 분말화 조 건 확립
			100	● 생산 파이롯 프랜트 설계 최적화
			100	● 사이코스 함유 시럽 시제품 생산
			80	● 사이코스 함유 프리미엄 설당 시 제품 생산
			100	● 시제품 규격화
			100	● 시제품 안전성 조사-독성평가
			80	● 시제품 안정성 조사

2절. 관련분야에의 기여도

1. 식품업계에서 효소를 이용한 **생물학적 전환** 방법으로 **고부가가치 기능성 소재 시장을 창출**할 수 있는 가능성을 보여줌.

2. 최근까지 식품업계에서는 외국에서 개발된 상용화 된 효소를 가지고 식품 소재를 제조하였으나 본 과제를 통하여 국내 기술로 효소를 개발 생산하여 식품소재를 생산하는 산업에 사용할 수 있을 수준의 경제성을 가진 효소 개발 기술을 갖추으로써 **식품산업의 효소 부분에서 외국 기술에 의존성을 극복할 수 있는 예가 될 수 있음.**

3. 최근까지 학계에서 활발히 연구되고 있는 유전자 재조합 기술과 분자생물학적 개량 기술을 바탕으로 식품 제조업 계열에서 상용화까지 접목시킬 수 있는 기술로 발전시킴으로 **GMO 개발 기술을 식품에 적용 가능하다는 것**을 보여줌

4. 본 과제의 진행 실적으로 사이코스 생산 효소로 개발 된 GM미생물을 식품 원료 생산에 사용하기 위하여, 안전성 연구를 통한 GM 미생물의 안전성 데이터를 축적하고 이를 평가 받기 위하여 현재 식약처에 안전성 평가를 제출하였음.

GMO 안전성 평가는 외국에서 들어오는 식품 종자에 국한된 평가였으나, 식품공정상에 사용하는 효소로써 인허가 평가를 받는 일은 업계에서 두 번째로 진행된 사항임.

이러한 사항은 식약처에게 공정상 사용되는 효소 개념의 **GMO 미생물의 안전성 평가의 지침에 대한 체계화의 필요성**을 인식하게 함.

5. 식품 업계의 소재 글로벌화를 위하여 경제성 있는 소재 생산을 위한 해결책은 재조합 기술을 이용한 **싼값의 효소를 개발** 제공해 주는 것임.

이러한 방법으로 저가의 소재에서 고가의 소재를 개발 할 수 있으며, 소재 기능성의 다양화를 추구함으로써 가공 식품을 섭취함에도 **기호뿐만 아니라 건강 향상시키는 목적을 추구** 할 수 있다는 예를 제시함.

6. 국내의 당류 산업에서의 고부가가치 소재 개발에 선두에 서서 **해외 시장을 선점** 할 수 있는 기회를 본 과제 수행으로 획득 가능하였음.

제 5 장 연구개발 성과 및 성과활용 계획

구 분		지식-재산권		논문		학술 발표	기술 거래	교육 지도	사업 화	기술 인증	인력 양성	정책 활용	홍보 전시	기 타
		출원	등록	SCI	비 SCI									
1차 년도	목표	2	0	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	실적	5	1	0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
2차 년도	목표	2	-	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	실적	3	-	0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
3차 년도	목표	1	1	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	실적	4	2	-	-	-	-	-	4	-	-	-	-	-
소 계	목표	5	1	3	-	-	-	-	0	-	-	-	-	-
	실적	12	3	0	-	-	-	-	4	-	-	-	-	-
종료 1차 년도	목표	2	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	실적													
종료 2차 년도	목표	2	1	-	-	-	-	-	-	2	-	-	2	-
	실적													
종료 3차 년도	목표	1	2	-	-	-	1	-	1		-	-	1	-
	실적													
종료 4차 년도	목표	1	2	-	-	-	-	-	1	-	-	-	-	-
	실적													
종료 5차 년도	목표	-	1	-	-	-	-	-	1	-	-	-	-	-
	실적													
소 계	목표	6	7	-	-	-	1	-	3	2	-	-	2	
	실적													
실적 합 계		12	3	3	-	-	-	-	4	-	-	-	-	

1절. 실용화 · 산업화 계획(기술실시 등)

1. 시제품 제조 : 2015년 3차년도 실적 4건

- 사이코스 20 시럽
- 사이코스 50 시럽
- 사이코스 90 시럽
- 사이코스 분말

2. 제품화 3건 계획





- 사이코스 시럽 1건 : 2018년
- 사이코스 분말 1건 : 2019년
- 사이코스 함유 감미료 : 2020년

3. 기술인증 2건

- GM 미생물 SYG321-C 안전성 평가 인증 1건 : 2017년
- 사이코스 한시적 기준규격 인정 1건 : 2017년

[첨부 2]

농림축산식품연구개발과제 사업화실적 확인서

과제명	신규 효소 개량 및 균주 스크리닝을 이용한 설탕대체용 사이코스 대량생산 방법 개발				
주관연구기관	(주) 삼양제넥스 식품연구소	참여기관	(주) 삼양제넥스 식품연구소		
책임자	이강표		연구기간	2012년12월 ~ 2015년 12월(총 3년)	
정부출연금	440,000,000원	기업부담금	440,000,000원	총계	880,000,000원
기술이전명			기술실시대상기관	(주) 삼양제넥스 식품연구소	
기술료			기술실시일	2015.06.30 ~ 2015.09.15	
구 분	기술실시업체 결산액 (단위: 백만원) * 최근연도 결산보고서에 의해 작성		해당기술을 통한 사업화 실적		
실 적	자산 총계		제품간수	4건	
	자본 총계				
	부채 총계		기술개발성과활용 매출액		
	매출액 총계				
제품별 실적					
구 분	제품명	제품사진	제품출시일	매출액 (백만원)	해당기술의 매출액 기여율 (%)
1	사이코스 20 시럽(가칭)		2015.08.08		
2	사이코스 50 시럽(가칭)		2015.09.15		
3	사이코스 90 시럽(가칭)		2015.08.01		
4	사이코스 분말(가칭)		2015.09.15		

2016년 1월 29일

연구책임자 : 이강표 (서명 포함인)

Copyright by Samyang. 본 문서의 불법 유통시 관계법과 규정에 의해 처벌 됩니다.



2절. 홍보 계획

1. 전시회 홍보 1건 : 2017년
2. 전문 잡지 홍보 1건 : 2018년

3절. 지식재산권 확보계획

1. 특허 출원 계획 6건
 - 제조방법 및 조성물 특허
 - 사이코스 관련 물질 및 응용 특허
2. 특허 등록 계획 7건
 - 국내 외 핵심 특허 등록
 - 사업화에 중요한 핵심특허 10건 보유





4절. 추가연구, 타연구에 활용 계획

- 1 사이코스 기능성 연구 농기평 과제 수행 진행 중
 - 과제명 : 비만억제 기능성원료 사이코스 시럽의 개별인정 및 제품화 연구
 - 주관 기관 : 삼양제넥스 식품연구소, 협동기관 : 가톨릭대학교 성 빈센트 병원
 - 연구기간 : 2013년 7월~2016년 7월 (3년)
 - 체지방 축적 억제 임상전 연구 및 임상 연구 진행
 - 연구 성과물로 개별인정 취득 목표로 하여 기능성 식품으로도 응용 예정

제 6 장 연구실 안전관리 이행실적

2015.05.26 09:41/소재개발PG/SYC187550
2015.05.18 16:41/대전SS팀/SYC188201

연구실 안전관리 규정

안전	보건	대전SS팀장	소장
			

(주)삼양제넥스 식품연구소

2015. 5. 20

Copyright by Samyang. 본 문서의 불법 유출시 관계법과 규정에 의해 처벌 됩니다.

Copyright by Samyang. 본 문서의 불법 유출시 관계법과 규정에 의해 처벌 됩니다.



제1조(목적) 이 규정은 「연구실 안전환경 조성에 관한 법률」(이하 "법"이라 한다)에 따라 (주)삼양제넥스 식품연구소(이하 "연구소"라 한다)에 설치한 연구실의 안전관리에 필요한 사항을 정함을 목적으로 한다.

제2조(적용범위) 이 규정은 연구소에서 근무하는 연구원 및 연구보조원에게 적용한다.

제3조(용어의 정의) 이 규정에 사용하는 용어의 정의는 다음과 같다.

1. "사고"라 함은 연구실에서 연구활동과 관련하여 연구활동종사자가 생명 및 신체상의 손해를 입거나 연구실의 시설·장비 등이 훼손되는 것을 말한다.
2. "연구활동종사자"라 함은 연구소 연구개발활동에 종사하는 연구원 및 연구보조원 등을 말한다.
3. "위험물"이라 함은 화재, 폭발의 원인이 되는 폭발성, 발화성, 인화성, 가연성, 산화성, 부식성 물질 등을 말한다.
4. "유해화학물질"이라 함은 유독물질, 허가물질, 제한물질, 그 밖의 유해성 또는 위해성이 있거나 그러할 우려가 있는 화학물질을 말한다.
5. "연구실"이라 함은 연구활동을 위하여 설치한 시설·장비·연구실험실·연구재료 등을 갖추어 설치한 연구시설을 말한다.
6. "안전관리"라 함은 연구실에서 발생할 수 있는 화재, 가스, 화학물질, 실험폐기물, 미생물 누출 등의 사고로부터 인명 및 재산상의 피해를 예방할 수 있는 모든 조치를 말한다.
7. 이 규정에서 사용하는 용어의 정의는 특별한 규정이 있는 경우를 제외하고는 법, 시행령, 시행규칙에서 정하는 바에 따른다.

제4조(책임과 의무)

1. 연구주체의 장 : 연구주체의 장은 연구실의 안전유지·관리 및 사고 예방을 철저히 함으로써 연구실의 안전환경을 확보할 책임을 진다.
2. 연구실책임자 : 연구실책임자는 연구실 내에서 이루어지는 교육 및 연구개발활동의 안전에 관한 책임을 진다.
3. 연구실책임자는 해당 연구실의 안전관리 업무를 효율적으로 수행하기 위하여 연구실안전관리담당자를 지정할 수 있다. 이 경우 연구실안전관리담당자는 연구활동종사자 중에서 지정하여야 한다.



4. 연구실책임자는 연구활동종사자를 대상으로 해당 연구실의 유해인자에 관한 교육을 실시하여야 한다.
5. 연구실책임자는 사전유해인자위험분석을 대통령령으로 정하는 바에 따라 실시하여 연구주체의 장에게 보고하여야 한다.
6. 연구활동종사자는 연구실 안전관리에 관한 법령 및 등 규정을 준수하여야 한다.

제5조(조직)

1. 연구실의 안전환경 조성에 필요한 사항을 심의하기 위하여 연구실안전관리위원회(이하 "위원회"라 한다)를 둔다.
2. 연구실을 설치·운영하고 있는 각 팀에는 연구실책임자를 둔다.
3. 연구활동종사자에 대한 안전교육, 안전점검 및 연구실 안전과 관련한 지도를 하기 위하여 안전관리업무를 외부 전문기관에 위탁할 수 있다.

제 6 조(연구실안전관리위원회의 구성 및 운영)

1. 위원회는 위원장 1 인을 포함한 15 인 이내의 위원으로 구성한다.
2. 위원회의 위원은 법 제 6 조의 2 에 따라 지정된 연구실 안전환경관리자와 다음 각 호의 사람 중에서 연구주체의 장이 지명하는 사람으로 한다.
 - 1) 연구실책임자
 - 2) 안전환경관리자
 - 3) 연구활동종사자
3. 위원회는 다음 각 호의 사항을 심의·의결한다.
 - 1) 안전관리규정의 제·개정 등에 관한 사항
 - 2) 안전점검 및 정밀안전진단 계획 수립 등에 관한 사항
 - 3) 특별안전점검 실시여부 등에 관한 사항
 - 4) 그 밖의 연구실 안전환경 증진에 관한 주요사항
4. 위원회의 회의는 위원장이 필요하다고 인정하거나 위원 과반수의 요구가 있는 때에 위원장이 소집한다.
5. 위원회의 회의는 재적위원 과반수의 출석으로 개의하고, 출석위원 과반수의 찬성으로 의결한다.



6. 위원회의 정기회의는 매년 1 회이상 개최한다. 다만, 위원장이 필요하다고 인정하는 때에는
수시회의를 개최할 수 있다.
7. 위원장은 위원회에서 의결된 내용 등 회의결과를 게시 또는 그 밖의 적절한 방법으로
연구활동종사자에게 신속하게 알려주어야 한다.
8. 위원회의 운영에 관하여 그 밖에 필요한 사항은 위원회의 의결을 거쳐 위원장이 정한다.

제 7 조(연구실책임자)

1. 각 부서의 장은 연구실의 안전관리를 총괄하는 연구실책임자가 된다.
2. 연구실책임자의 업무는 다음 각 호와 같다.
 - 1) 안전관리업무(안전보호장비 비치, 부재중 실험에 대한 대비책 마련, 사고발생시 행동요령 교육
등) 총괄
 - 2) 안전사고 처리 및 보고에 관한 사항(별지 제 2 호 서식)
 - 3) 연구실 안전관리담당자 지정 및 관리에 관한 사항

제 8 조(안전관리담당자)

1. 연구실책임자는 부서별로 안전관리담당자를 지정할 수 있다.
2. 안전관리담당자의 업무는 다음 각 호와 같다.
 - 1) 연구실내 위험물, 유해물 취급 및 관리에 관한 사항
 - 2) 화학물질(약품) 목록 및 관리대장 작성에 관한 사항
 - 3) 보호장구 목록 및 관리대장 작성에 관한 사항
 - 4) 물질안전보건자료(MSDS)의 작성 및 보관에 관한 사항(단, 화학물질 제조업자 또는
수입업자로부터 MSDS 를 입수한 경우 MSDS 를 작성한 것으로 본다)
 - 5) 연구실 안전관리에 따른 시설 개·보수 요구에 관한 사항
 - 6) 연구실 일일 안전점검표 작성 및 보관에 관한 사항
 - 7) 연구실안전관리규정 비치 등 기타 연구실내 안전관리에 관한 사항

제 9 조(안전환경관리자)

1. 연구주체의 장은 연구실 안전관리 업무를 위하여 안전환경관리자를 지정하여야 한다.



2. 안전환경관리자의 업무는 다음 각 호와 같다.
- 1) 연구실의 안전점검 및 정밀안전진단에 관한 사항
 - 2) 연구활동종사자의 안전교육에 관한 사항
 - 3) 연구실 안전관리를 위한 기술적 지도·조언에 관한 사항
 - 4) 연구실 안전환경 및 안전관리 현황의 통계에 관한 사항
 - 5) 그 밖에 연구시설의 안전관리에 관한 사항

제 10 조(보험가입 등)

연구실책임자는 「연구실 안전환경 조성에 관한 법률시행령」(이하 "시행령"이라 한다) 제 15 조제 2 항 각 호에서 정하고 있는 연구활동종사자를 제외한 기타 연구활동종사자에 대해서도 법에서 정하고 있는 보험에 가입하여야 한다

제 11 조(안전교육)

1. 연구실 책임자는 연구활동종사자에게 반기별로 6 시간 이상의 안전교육을 실시하여야 한다.
2. 연구실책임자는 연구내용이 변경될 경우에는 연구활동종사자에게 2 시간 이상의 특별안전교육을 실시한다.
3. 연구실책임자는 신규채용자에 대해서는 담당업무 종사 전에 8 시간 이상의 연구실 안전교육을 실시하여야 한다

제 12 조(연구실의 안전관리)

1. 모든 연구실에서는 비상시 안전하게 대피할 수 있는 통로를 항상 사용 가능한 상태로 유지하여야 하고, 복도 비상계단에 실험장비 및 기타 물건을 방치하여서는 아니 된다.
2. 위험물, 유해화학물질 등을 취급하거나 사용하는 연구실의 연구실안전관리담당자는 업무수행 중 부상당한 직원의 응급치료를 위하여 제반 약품 등을 비치하여야 한다.

제 13 조(안전점검 및 정밀안전진단)

1. 안전관리담당자는 매일 연구활동 시작 전에 해당 연구실에 대하여 [서식 1]의 연구실현실 일일 안전점검표를 기준으로 일상점검을 실시하여야 한다.



2. 안전관리담당자는 제 1 항에 의한 점검결과, 문제가 발견된 경우에는 연구실책임자에게 지체 없이 보고하고 그 지시에 따라 조치하여야 한다.
3. 연구주체의 장은 연구실에 대하여 "정기점검"을 매년 1 회 이상 실시하고, "정밀안전진단"은 2 년마다 1 회 이상 실시하여야 한다.
4. 연구주체의 장은 폭발 및 화재사고 등 안전에 치명적인 위험을 야기할 가능성이 있다고 예상되는 경우에는 "특별안전점검"을 실시하여야 한다.

제 14 조(연구실의 안전 및 유지관리비의 확보)

연구실책임자는 법 제 13 조제 2 항에 따라 다음 각 호의 용도에 사용하기 위한 비용을 매년 연구실 안전 및 유지관리에 필요한 비용을 확보하여야 한다.

1. 법 제 14 조에 따른 보험료
2. 법 제 18 조제 1 항 및 제 2 항에 따른 안전관리에 관한 정보제공 및 연구활동종사자에 대한 교육·훈련
3. 법 제 18 조제 3 항에 따른 연구실 안전환경관리자에 대한 전문교육
4. 법 제 18 조제 4 항에 따른 건강검진
5. 연구실의 안전을 유지관리하기 위한 설비의 설치·유지 및 보수
6. 연구활동종사자의 보호장비 구입
7. 안전점검 및 정밀안전진단
8. 그 밖에 연구실의 안전환경 조성을 위하여 필요한 사항

제 15 조(건강검진의 실시)

연구주체의 장은 법 제 18 조제 4 항에 따라 「산업안전보건법 시행령」 제 29 조에 따른 유해물질 및 같은 법 시행규칙 별표 12 의 2 에 따른 유해인자를 취급하는 연구활동종사자에 대하여 일반건강검진과 특수건강검진을 실시하여야 한다.

제 16 조(안전수칙)

연구실내의 화학약품, 전기, 가스사용 등 안전관리가 필요한 사항은 [별표 1]의 연구실 안전관리수칙에서 정하는 바에 따른다



제 17 조(표지부착)

연구실책임자는 위험성이나 유해성이 있는 물질을 취급하는 장소에는 연구활동종사자나 방문객이 알 수 있도록 [별표 2]에 따라 적절한 표지를 부착하여야 한다.

제 18 조(위험물, 유해물의 저장 및 취급)

1. 각 연구실의 안전관리담당자는 위험물이나 유해물의 저장·조작 및 처리구역 내에는 사고의 원인이 될 수 있는 물질을 두어서는 아니 된다.
2. 위험물이나 유해물을 처리·사용하고자 하는 자는 그 이전에 안전한 취급 및 사용에 관하여 충분히 교육을 받아야 한다.

제 19 조(보호구착용 및 관리)

1. 다음 각 호에 해당하는 실험의 경우에는 작업복 등 기타 필요한 소정의 보호구를 착용하여야 한다.
 - 1) 다량의 고열, 저온물체를 취급 시
 - 2) 유해, 위험물질을 취급 시
 - 3) 피부에 장해를 주거나 중독 또는 감염될 우려가 있는 물품을 취급 시
 - 4) 기타 보호구 착용이 필요하다고 판단되는 경우
2. 보호구는 분실, 파손 또는 불결하지 않도록 관리하여야 한다.

제 20 조(사고발생시 행동요령)

1. 사고발생 시는 사고 상황에 따라 [별표 3] 연구실 사고발생시 대처요령 또는 연구실 사고대응 매뉴얼에 따라 조치한다.
2. 사고가 발생하였을 때에는 정확하고 빠르게 대응하여야 한다.
3. 사고가 발생하면 다음 각 호와 같이 행동하여야 한다.
 - 1) 신속히 사람들에게 알리고 관련 부서에 도움을 요청하도록 한다.
 - 2) 가능한 한 화재를 초기에 신속히 진압한다.
 - 3) 초기진압이 어려운 경우에는 진압을 포기하고 건물에서 대피하도록 한다.
 - 4) 소방서, 경찰서, 병원 등에 긴급전화를 하여 도움을 요청한다.



5) 응급요원에게 지금까지의 진행상황을 상세히 알리도록 한다.

제 21 조(사고조사 및 보고)

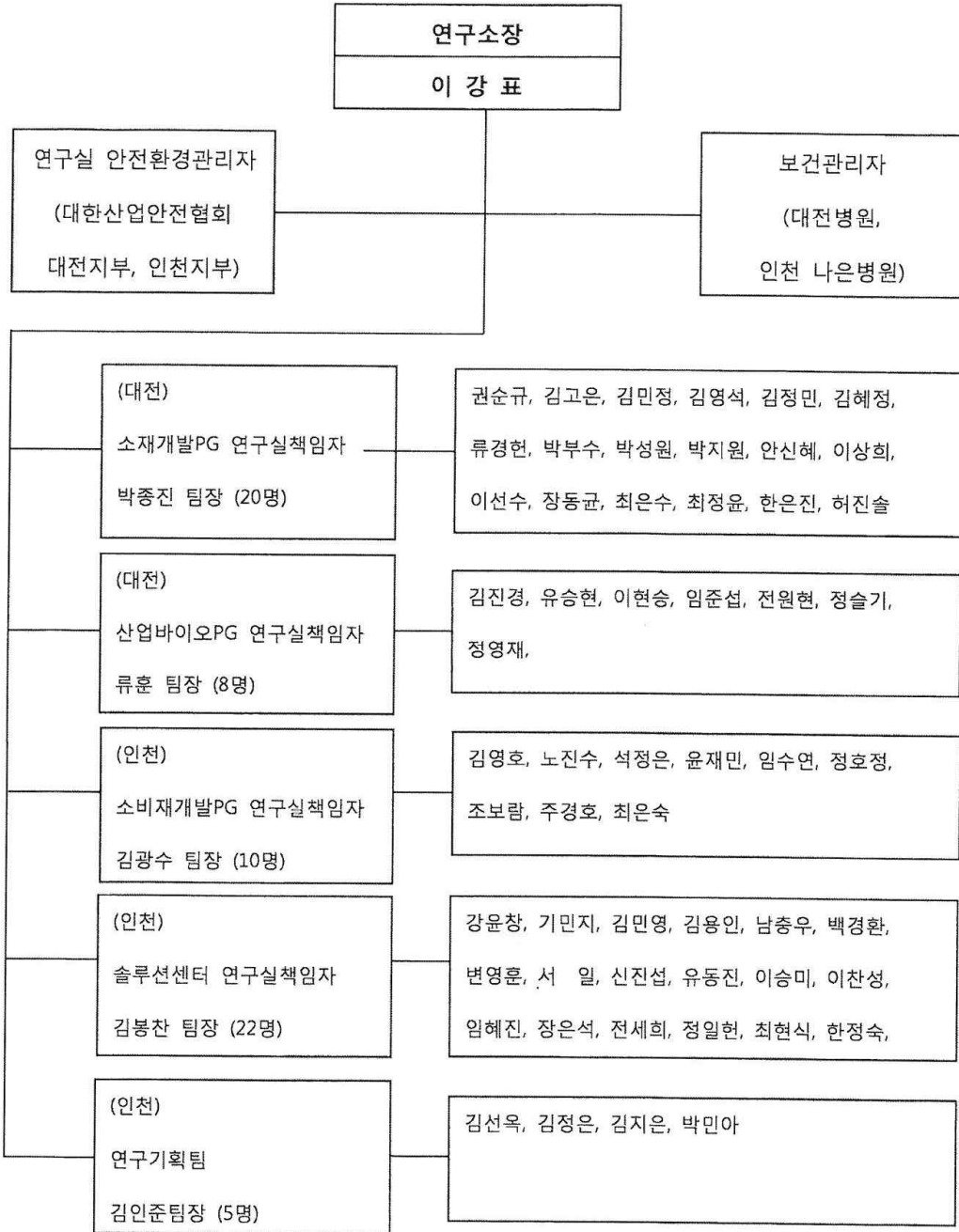
1. 사고발생현장은 사고원인 조사가 끝날 때까지 원상태로 보존하여야 하며, 연구주체의 장 또는 연구실책임자의 지시 없이 변경 또는 훼손하여서는 아니 된다.
2. 연구실책임자는 사고발생시 정확한 사고원인을 조사하고 [서식 2]에 따라 지체 없이 연구주체의 장에게 보고하여야 한다.
3. 중대사고가 발생하였거나 원인규명이 어렵다고 판단될 때에는 사고원인 조사 등을 외부전문기관에 의뢰할 수 있다.

제 22 조(기타) 본 규정에 명시되지 않은 사항은 관련 법령 및 규정에 따른다.

이 규정은 2015 년 6 월 1 일부터 시행한다.



식품연구소 안전·보건관리 조직도



전체 66명(대전 : 28명, 인천 : 38명)
 (2015. 4. 6 기준) 육아휴직자(강효진, 조아라) 제외



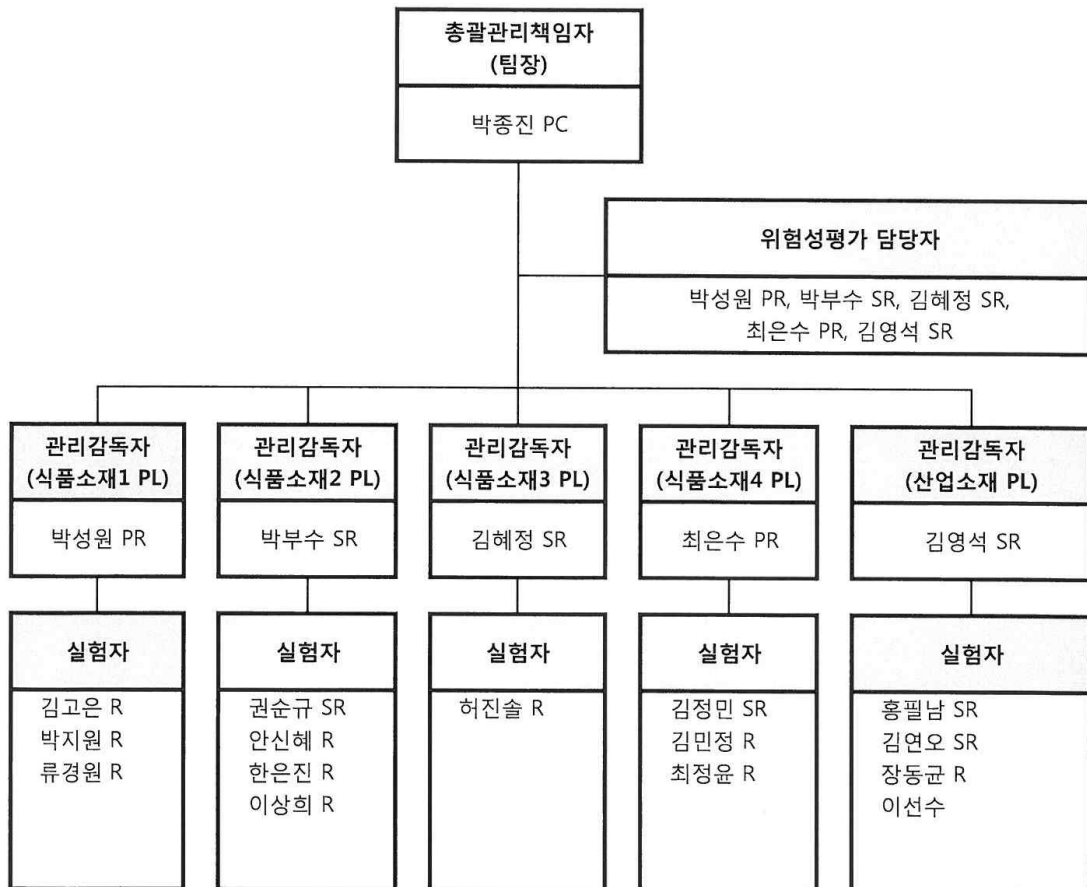
1. 실시 목적

이 실시계획서는 식품연구소 소재개발PG의 유해 위험 요인을 파악하고, 위험성을 추정, 결정한 후 위험성을 감소시키기 위해 필요한 조치를 실시함을 목적으로 한다.

2. 적용범위

식품연구소 소재개발PG에서 수행하는 모든 작업, 설비 및 공정의 위험성 평가에 대한 범위, 절차, 책임과 권한에 대하여 적용한다.

3. 조직 구성



4. 역할과 책임

총괄관리책임자

위험성평가의 총괄관리

- 안전관리 의지구현
 - 방침과 추진목표를 문서화하고 게시
 - 위험성평가 실행을 위한 노력(회의장소제공, 회의주관 등)
 - 실시계획서 작성 지원
 - 위험성평가 실행을 위한 조직구성, 역할부여 및 인지
- 위험성평가 교육
 - 총괄관리책임자 교육 이수
 - 작업자에게 외부교육기관 교육기회 제공
- 예산지원 및 산업재해 예방노력
 - 안전보건 예산편성 및 집행
 - 재해사례 수집 전파 및 중대재해 예방을 위한 노력
- 무재해 운동 참여

관리감독자
(위험성평가담당 겸임)

위험성 평가의 실행 관리 및 지원

- 위험성평가 실시 공고문 게시 및 관련회의 개최, 기록유지
- 위험성평가 담당자 교육 이수
- 위험성평가 연간계획 수립 및 실시
- 안전보건정보 수집 및 재해조사관련 자료 등 기록
- 관련직원에게 위험성평가 교육을 실시하고 기록유지
- 위험성평가 검토 및 결과에 대한 기록, 보관

위험성평가 실시

- 유해위험요인 파악하고 위험성 추정 및 결정
- 위험성 감소대책 수립 및 실행
- 위험성 평가시기, 절차 및 내용 숙지
- 책임과 권한 인지 및 이행



실험자

위험성평가 참여

- 담당업무와 관련된 위험성 평가 활동에 참여
- 담당업무에 대한 안전보건수칙 및 위험성 감소대책 숙지
- 비상상황에 대한 대비 및 대응방법 인지
- 출입허가절차 및 위험한 장소 인지

5. 실시시기

(1) 정기평가 : 실험실 전체에 대해 매년 1회 실시함

(2) 수시평가 : 아래의 상황이 발생 후 실험 개시 (재개) 전에 실시함.

- 중대산업사고 또는 산업재해 (휴업 이상의 요양을 요하는 경우에 한정)가 발생한 때
- 작업장 변경 시(작업자, 설비, 작업방법, 절차 등의 변경)
- 건설물, 기계, 기구, 설비 등의 정비 또는 보수

6. 위험성평가

(1) 실시방법

- 총괄관리책임자가 위험성평가 실시를 총괄관리한다.
- 위험성평가를 위한 체제를 구축한다.
- 작업내용 등을 상세하게 파악하고 있는 관리감독자에게 유해위험요인의 파악, 위험성의 추정 및 결정, 위험성 감소대책의 수립 및 실행을 하게 한다.
- 유해, 위험요인을 파악하거나 감소대책을 수립하는 경우, 특별한 사정이 없는 한 해당실험자를 참여하게 한다.
- 기계, 기구, 설비 등과 관련된 위험성평가에는 해당 기계, 기구, 설비 등에 전문지식을 갖춘 사람을 참여하게 한다.
- 위험성평가를 실시하기 위한 필요한 회의 및 교육등을 실시한다.



(2) 추진절차

- [1단계] 사전준비
- [2단계] 유해 위험요인 파악
- [3단계] 위험성 추정
- [4단계] 위험성 결정
- [5단계] 위험성 감소대책 수립 및 실행

※ 1회성으로 완료되는 것이 아니며, 위험성이 허용가능 수준이 될 때까지 위 단계를 반복.

(3) 위험성 추정방법

※ 대한산업안전협회 위험성평가 담당자교육자료 참조

위험성 추정 (곱셈법)			중대성 (강도)			
			최대	대	중	소
			4	3	2	1
가능성 (빈도)	최상	5	20	15	10	5
	상	4	16	12	8	4
	중	3	12	9	6	3
	하	2	8	6	4	2
	최하	1	4	3	2	1

위험성크기		허용가능여부	개선방법
16 ~ 20	매우높음	허용불가능	즉시개선
15	높음		신속하게 개선
9 ~ 12	약간높음		가급적 빨리 개선
8	보통		계획적으로 개선
4 ~ 6	낮음	허용가능	필요에 따라 개선
1 ~ 3	매우낮음		



7. 위험성평가지 유의사항

- (1) 위험성 평가 대상에는 모든 실험자에게 안전, 보건상 영향을 주는 다음사항을 포함하여야 한다.
 - 회사 내부 또는 외부에서 작업장에 제공되는 위험시설
 - 작업장에서 보유 또는 취급하고 있는 모든 유해물질
 - 일상적인 작업(협력업체 포함) 및 비일상적인 작업 (수리 또는 정비 등)
 - 발생할 수 있는 비상조치 작업

- (2) 위험성평가 결과, 위험을 제거 또는 감소시키기 위한 조치계획을 실시하고 모니터링 하여야 한다.

- (3) 위험성 감소대책을 실행한 후, 허용가능한 위험성 수준이 될 때까지 추가의 감소대책을 수립 실행하여야 한다.

- (4) 중대재해, 중대산업사고 또는 심각한 질병이 발생할 우려가 있는 위험성으로서 감소대책의 실행에 많은 시간이 필요한 경우에는 즉시 잠정적인 조치를 강구해야 한다.

- (5) 위험성 평가를 종료한 후 남아있는 유해 위험요인에 대해서는 게시, 주지 등의 방법으로 실험자에게 알려야 한다.

8. 기록관리

- (1) 위험성평가와 관련된 기록은 삼양그룹중앙연구소 SS팀의 협조 하에 작성하고, 주기적으로 출력하여 상위 결재자의 승인을 받는다.

- (2) 위험성평가 기록은 삼양그룹 중앙연구소 안전보건 기록관리규정에 준하여 보관하되 5년이상 보관한다.

- (3) 기록은 연 1회 정기적으로 검토하고, 실험자의 의견을 반영한 후에 변경여부를 결정하며 모든 실험자가 알 수 있도록 배부, 게시 또는 회람한다.

위험성 평가 연간계획서							결재	담당	팀장	
소재개발PG		작성일자 : 2015년 12월 22일								
구분	세부내용	추진일정				담당자	비고			
		1Q	2Q	3Q	4Q					
사전준비	방침 및 추진목표 공표	↔				박부수				
	실시계획서 작성회의 개최		↔			박부수				
	위험성평가 연간계획서 작성			↔		박부수				
	위험성평가 총괄책임자 교육				↔	박종진			사외교육	
위험성평가 교육	위험성평가 담당자 교육				↔	박부수				
	위험성평가 실험자 교육				↔	박부수				
	위험성평가팀 구성				↔	박종진				
위험성평가 실시	대상작업 및 분류				↔	김영식, 박성원, 박부수 김혜정, 최은수				
	유해위험요인 파악				↔	김영식, 박성원, 박부수 김혜정, 최은수				
	위험성평가 실시 (정기평가)				↔	김영식, 박성원, 박부수 김혜정, 최은수				
	수시평가						김영식, 박성원, 박부수 김혜정, 최은수			
							김영식, 박성원, 박부수 김혜정, 최은수			



최종작성일: 2015.12.22

담당	PL	팀장

부서명	소재개발 PG 산업소재파트	위험성평가	평가자	김영석
평가일시	2015.12.14 ~ 2015.12.18			

작업내용	유해 위험요인 파악			관련근거	현재 안전보건조치	현재위험성			감소 대책	개선 후 위험성	개선일	완료일	담당자	비고
	분류	원인	유해 위험 요인			가능성 (빈도)	중대성 (강도)	위험성						
청량	화학(물질)적 요인	고체(문진)	고체 시료 창량 시 분진 발생 위험		마스크 착용	2	1(낮음)	1(낮음)						
	화학(물질)적 요인	액체 · 미스트	시약으로부터 액체 미스트 발생 위험		마스크 착용 및 후드 안에서 진행	1	2(낮음)	2(낮음)						
	화학(물질)적 요인	인체 위해성	흡입 및 피부 노출로 인한 위험		안전보건규칙 제422조 [관리대상 유해물질과 관계되는 섹터]	불침투성 보호복 · 보호장갑 및 보호안경 사용	1	2(낮음)	2(낮음)					
시약 저장	화학(물질)적 요인	고체(문진)	관리대상 유해 물질 누출에 의한 작업자 노출, 접촉위험		안전보건규칙 제470조 [보호복 등의 비치 등]	1	1(낮음)	1(낮음)						
	화학(물질)적 요인	액체 · 미스트	보호구 미착용으로 인한 유해 액체류 접촉		안전보건규칙 제470조 [보호복 등의 비치 등]	1	1(낮음)	1(낮음)						
일반	작업환경 요인	공간 및 이동통로	협소한 장소 및 구석진 곳 등 제한된 공간의 작업 시 충돌 등이 발생		안전보건규칙 제3조 [전도의 방지]	2	2(낮음)	2(낮음)						



작업내용	유해 위험요인 파악			관련근거	원칙 안전보건조치	원칙위험성			감소 대책	개선후 위험성	개신일	완료일	담당자	비고
	분류	원인	유해 위험 요인			가능성 (빈도)	중대성 (강도)	위험성						
가열	전기적 요인	과열	장시간 사용시 과열로 인한 누전 및 화재의 위험		장시간 사용 제한 및 전열기 주변에 인화성 물질 보관금지	2	2(낮음)	2(4(낮음))						
	물리적 요인	열	고온의 표면과 접촉에 의한 화상사고		보호장갑을 반드시 착용하고 꺼냄	3	2(6(낮음))	보호장갑 착용 후 진행 2(낮음)	2015.11.16	2015.11.17	장동균			
교반	기계적 요인	위험한 표면 (절단, 배임, 긁힘)	강한 교반으로 인한 유리 반응기의 파손 위험		파손 유리조각 수선 및 폐기	2	2(4(낮음))							
						3	2(6(낮음))							
	기계적 요인	위험한 표면 (마찰)	회전중인 교반 용에 접촉시 위험		교반용 정지 상태에 서 조치류 체결 및 분리									
건조	전기적 요인	과열	장시간 사용시 과열로 인한 누전 및 화재의 위험		장시간 사용 제한 및 전열기 주변에 인화성 물질 보관금지	2	2(약간높음)							
	물리적 요인	열	고온으로 가열된 표면에 접촉시 화상위험		고온에서 조작시 보호장갑 착용하고 취급	2	2(4(낮음))							
작업특성 요인	반응 시약 접촉	작업특성 요인	불인 및 피부 노출로 인한 위험		마스크 착용 및 후드 안에서 진행	2	2(4(낮음))							



작업내용	유해 위험요인 파악			관련근거	원제 안전보건조치	원제위험성			감소 대책	개선후 위험성	개선일	완료일	담당자	비고
	분류	원인	유해 위험 요인			가능성 (빈도)	중대성 (강도)	위험성						
중합	화학(물질)적 요인	증기	고온에 의한 누출되는 증기의 처리		불친투성 보호복· 보호장갑 및 보호안경 사용	3	2(낮음)	3(낮음)						
	기계적 요인	위험한 표면 (마찰)	회전중인 교반 장치에 접촉시 위험		폴리스크 체결 및 분리 시 반드시 회전 정지	3	1(낮음)	3(낮음)						
물 세척	기계적 요인	위험한 표면 (절단, 배임, 긁힘)	우리 조자의 흠집 등 위험한 표면으로 인한 절단, 배임, 긁힘사		피손된 유리조각 수선 및 폐기	2	3(낮음)	3(낮음)	피손된 조각기 교체	3(낮음)	2015.11.16	2015.11.27	장동균	
	화학(물질)적 요인	반응성 물질	세척되지 않은 반응성 유기물질 접촉의 위험		충분한 세척 진행	1	2(낮음)	2(낮음)						
인쇄	화학(물질)적 요인	증기	솔벤트 증기의 흡입		인크 세척 작업 시 환기하며 진행	1	2(낮음)	2(낮음)						
	기계적 요인	위험한 표면 (마찰, 긁힘)	회전체의 접촉 위험		보호 커버 및 정지 상태에서 분리 작업 진행	3	2(낮음)	2(낮음)						
중이 분석	기계적 요인	위험한 표면 (절단, 배임, 긁힘)	샘플 채단 시 칼날에 의한 배임, 절단 위험		보호장갑 착용 및 고정 장치 확인	1	2(낮음)	2(낮음)						
	기계적 요인	위험한 표면 (압착)	기계적 압착으로 인한 부상 위험		보호장갑 및 비상장치 확인	3	2(낮음)	2(낮음)						



작업내용	유해 위험요인 파악			관련근거	원칙	원재위험성			감소 대책	개선후 위험성	개선일	완료일	담당자	비고
	분류	원인	유해 위험 요인			가능성 (빈도)	중대성 (강도)	위험성						
종이 제조	기계적 요인	위험한 표면 (압착)	기계적 압착으로 인한 부상 위험		보호장갑 및 비상장치 확인	3	2	2 (낮음)						
	물리적 요인	열	고온으로 가열된 표면에 접촉 시 화상위험		고온에서 조작 시 보호장갑 착용하고 취급	3	2	2 (낮음)						
전분 변성	화학(물질)적 요인	인체 위해성	분진 발생, 흡입 및 피부 노출로 인한 위험		보호구 착용	2	3	3 (낮음)						
	기계적 요인	위험한 표면 (철단, 배임, 긁힘)	회전체에 의한 부상 위험		보호커버 설치	1	3	3 (낮음)						



최종작성일: 2015.12.22

담당	PL	팀장

부서명	소재개발 PG 식품소재파트	평가자	최은수, 김혜정 박성원, 박부수
평가일시	2015.12.14 ~ 2015.12.18	담당자	

작업내용	분류	원인	유해 위험 요인	관련근거	현재 안전보건조치	현재위험성			감소 대책	개선 후 위험성	개선일	완료일	담당자	비고
						가능성 (빈도)	중대성 (강도)	위험성						
청량	화학(물질)적 요인	고체(분진)	고체 시료 칭량 시 분진 발생 위험		마스크 착용	1	1	1(낮음)						
	화학(물질)적 요인	액체 · 미스 트	시약으로부터 액체 미스트 발 생 위험		마스크 착용	1	2	2(낮음)						
	화학(물질)적 요인	인체 위해성	흡입 및 피부 노출로 인한 위 험		마스크 착용 및 후드 안에서 진 행	1	2	2(낮음)						
시약 저장	화학(물질)적 요인	고체(분진)	관리대상 유해 물질 누출에 의 한 작업자 노 출, 접촉위험	안전보건규 칙 제422조 [관리대상 유 해물질과 관 계되는 설비]	불침투성 보호 복 · 보호장갑 및 보호안경 사 용	1	2	2(낮음)						
	화학(물질)적 요인	액체 · 미스 트	보호구 미착용 으로 인한 유해 액체류 접촉	안전보건규 칙 제470조 [보호복 등의 마치 등]	불침투성 보호 복 · 보호장갑 및 보호안경 사 용	2	1	1(2(낮음))						
문반	작업환경 요 인	공간 및 이 동통로	협소한 장소 및 구색진 곳 등 제한된 공간의 작업 시 충돌 등이 발생	안전보건규 칙 제3조 [전 도의 방지]	작업장 정리정 돈	1	2	2(낮음)						



작업내용	유해 위험요인 파악			관련근거	원칙	원칙위험성			감소 대책	개선후 위험성	개선일	완료일	담당자	비고
	분류	원인	유해 위험 요인			가능성 (빈도)	중대성 (강도)	위험성						
가열	물리적 요인	열	고온의 표면과 접촉에 의한 화상사고		보호장감을 반드시 착용하고 작업	1	2(낮음)							
	전기적 요인	과열	장시간 사용시 과열로 인한 누전 및 화재의 위험		장시간 사용 제한 및 전열기 주변에 인화성 물질 보관금지	1	2(낮음)							
교반	물리적 요인	열	고온의 표면과 접촉에 의한 화상사고		보호장감을 반드시 착용하고 작업	1	2(낮음)							
	기계적 요인	위험한 표면 (절단, 배임, 긁힘)	강한 교반으로 인한 유리 반응기의 파손 위험		모든 유리조자를 점검하여 파손된 조자 폐기 및 수선	2	2(4(낮음))	2(낮음)	2(낮음)	2015.12.01			안신혜	
	기계적 요인	위험한 표면 (미찰)	회전중인 교반 병에 접촉시 위험 및 화전물 발생		교반용 정지 상태에 전열류 체결 및 분리	3	2(6(낮음))	2(낮음)	2(낮음)	2015.12.17			안신혜	
건조	전기적 요인	과열	장시간 사용시 과열로 인한 누전 및 화재의 위험		장시간 사용 제한 및 전열기 주변에 인화성 물질 보관금지	1	2(낮음)							
	물리적 요인	열	고온으로 가열된 표면에 접촉시 화상위험		고온에서 조작시 보호장감 착용하고 취급	1	2(낮음)							
작업특성 요인	반응 시약 접촉	흡입 및 피부 노출로 인한 위험		마스크 착용 및 후드 안에서 진행	1	2(2(낮음))								



작업내용	유해 위험요인 파악			관련근거	현재 안전보건조치	현재위험성			감소 대책	개선후 위험성	개선일	완료일	담당자	비고
	분류	원인	유해 위험 요인			가능성 (빈도)	중대성 (강도)	위험성						
중합	화학(물질)적 요인	중기	고온에 의한 누출되는 증기의 처리		불친투성 보호복·보호장갑 및 보호안경 사용	1	2(낮음)	2(낮음)						
						회전중인 교반 장치에 접촉시 위험	회전중인 교반 장치에 접촉시 위험	1	2(낮음)	2(낮음)				
물세척	기계적 요인	위험한 표면 (절단, 배임, 긁힘)	우리 조차의 흡진등 위험한 표면으로 인한 절단 배임, 긁힘		파손된 유리조각 수선 및 폐기	2	1(낮음)	1(낮음)						
						화학(물질)적 요인	반응성 물질	세척되지 않은 반응성 유기물질 접촉의 위험	1	2(낮음)	2(낮음)			
균주 개발	화학(물질)적 요인	인체 위해성	흡입 및 피부 노출로 인한 위험		마스크 착용 및 후드 안에서 진행	1	2(낮음)	2(낮음)						
						기계적 요인	위험한 표면 (압착)	기계적 압착으로 인한 부상 위험	1	2(낮음)	2(낮음)			
보호 규정	물리적 요인	열	고온으로 가열된 표면에 접촉시 화상위험		고온에서 조작시 보호장갑 착용하고 취급	1	2(낮음)	2(낮음)						
						기계적 요인	위험한 표면 (압착)	기계적 압착으로 인한 부상 위험	1	2(낮음)	2(낮음)			

저수 바로



작업내용	유해 위험요인 파악			관련근거	원제 안전보건조치	원제위험성			감소 대책	개선후 위험성	개선일	완료일	담당자	비고
	분류	원인	유해 위험 요인			가능성 (빈도)	중대성 (강도)	위험성						
정제 공정	물리적 요인	열	고온으로 가열된 표면에 접촉 시 화상위험		고온에서 조작 시 보호장갑 착용하고 취급	1	2(낮음)	2(낮음)						
	기계적 요인	위험한 표면 (압착)	기계적 압착으로 인한 부상 위험		보호장갑 및 비상정지 확인	1	2(낮음)	2(낮음)						
	물리적 요인	열	고온으로 가열된 표면에 접촉 시 화상위험		고온에서 조작 시 보호장갑 착용하고 취급	1	2(낮음)	2(낮음)						





미래창조과학부

수신 삼양제넥스식품연구소

(경유)

제목 유전자변형생물체 연구시설 설치운영 신고 수리[삼양제넥스식품연구소]

1. 관련: 유전자변형생물체 연구시설 설치운영 신고(2013.6.25)
2. 귀 기관에서 신청한 유전자변형생물체(LMO) 연구시설 설치·운영 신고(1건)에 대하여 「유전자변형생물체의 국가간 이동 등에 관한 법률」 제22조제1항 규정에 의하여 이를 수리하오니, LMO 연구·개발 안전관리에 만전을 다해 주시기 바랍니다.
3. 「유전자변형생물체의 국가간 이동 등에 관한 법률」 시행규칙이 개정되어 시행(2013.3.23)중이니, 향후 LMO 연구시설 설치·운영 신고 시에는 개정된 [별지 제22호서식]을 사용하여 주시기 바랍니다.
4. 위와 관련된 사항은 연구환경안전과 담당자 강은정(02-2110-2787, bluesky1878@msip.go.kr)으로 문의하여 주시기 바랍니다.

붙임 연구시설 설치·운영신고확인서 1부(별송). 끝.

미래창조과학부장관



주무관 김영근 행정사무관 오판동 과장 2013. 6. 26.
김재신

협조자

시행 연구환경안전과-1022 (2013. 6. 27.) 접수

우 427-700 경기도 과천시 관문로 47 (중앙동, 정부과천청사) / <http://www.msip.go.kr>

전화번호 02 팩스번호 02 / kimyg@msip.go.kr / 비공개(6)

[별지 제9-5호서식]

연구시설설치·운영신고확인서

신청인	① 상 호	삼양제넥스식품연구소	② 확 인 번 호	제 LML13-193호
	③ 주 소	대전시 유성구 화암동	④ 사업자등록번호 (법인등록번호)	
	⑤ 대표자성명	문 성 환	⑥ 주민등록번호	
신고내용	연구시설	⑦ 설치·운영책임자	(성명) 김 혜 정	
		⑧ 규모(시설내역)	151.2 m ²	
		⑨ 설치·운영 장소	대전시 유성구 대덕대로 730 삼양그룹중앙연구소 제넥스동 F222~F224	
		⑩ 안전관리등급	1등급	

「유전자변형생물체의 국가간 이동 등에 관한 통합고시」 제9-5조제3항에 의하여 위와 같이 연구시설의 설치·운영신고서를 접수하였음을 확인합니다.

2013년 6월 26일

미래창조과학부장관



제 2014-519호



수료증

소 속: 삼양제넥스

성 명: 김 혜 정

이수과정: 생물안전관리자과정 교육

이수기간: 2014년 12월 9일 (8시간)

상기 참가자는 미래창조과학부에서 주최하고 한국생명공학연구원 LMO연구안전센터에서 주관한 생물안전관리자과정 교육을 이수하였으므로 본 증서를 드립니다.

2014년 12월 9일

한국생명공학연구원 LMO연구안전센터



제 2015-600 호



수료증

소 속: 삼양제넥스

성 명: 김혜정

이수과정: 생물안전관리자 교육

이수기간: 2015년 11월 24일 (4시간)

상기 참가자는 미래창조과학부에서 주최하고 한국생명공학연구원 국가연구안전관리본부에서 주관한 생물안전관리자 교육을 이수하였으므로 본 증서를 드립니다.

2015년 11월 24일

한국생명공학연구원 국가연구안전관리 