

발간등록번호

11-1543000-002596-01

보안 과제(), 일반 과제(√) / 공개(√), 비공개() 발간등록번호()
농식품창업벤처지원 R&D 바우처 시범사업 제2차 연도 최종보고서

밀웜을 활용한 부동단백질 분리·정제 및 소재제품화 기술 개발

최종보고서

2019.01.18

주관연구기관 / 한국식용곤충연구소 지식협동조합
협동연구기관 / 건국대학교 글로벌산학협력단
협동연구기관 / 씨제이제일제당

농림축산식품부
농림식품기술기획평가원

평가의견에 대한 조치 및 개인정보 삭제 확인서

□ 평가의견에 대한 조치

평가의견	조치내용	비고
<ul style="list-style-type: none"> ○ 연구수행의 성실성 - 연구 계획서에 제시한 핵심주제 (품질 표준화, 대량정제공정개발)을 중심으로 열심히 수행한 과제로 평가됨. 그러나 개발된 연구 성과의 구체성이 약함. - 연구 계획서와 상이하지 않고 적절한 방법으로 연구가 성실하게 진행되었다고 판단됨. 	<ul style="list-style-type: none"> ○ 해당 사항 없음 ○ 해당 사항 없음 	<ul style="list-style-type: none"> OK OK
<ul style="list-style-type: none"> ○ 산업적 성과 - 연구결과를 계획서에서 제시했던 부동 단백질에 대한 기초자료구축을 성공적으로 달성함. 목표로 한 부동 단백질 분리기술에 성과 있음. - 산업화를 위한 기반연구로 보임. 실제 적용까지는 in vivo 또는 in vitro 부동 기전이 해명되어야 할 것임. - 보건 의학적으로 활용할 수 있나 세포 내 적용인가 세포 외막 적용인지의 체계적인 작용 연구가 필요합니다. - 분리, 정제된 부동 단백질을 이용한 다양한 산업에 여러 가지로 응용 가능하다고 판단됨. - 부동 단백질 분리정제 및 대량생산 기술 확보. 	<ul style="list-style-type: none"> ○ 해당 사항 없음 ○ 해당 사항 없음 ○ 해당 사항 없음 ○ 해당 사항 없음 ○ 해당 사항 없음 	<ul style="list-style-type: none"> OK OK OK OK OK

<p>○ 과학 기술적 성과</p> <ul style="list-style-type: none"> - 얻어진 밀웜 부동 단백질의 소재로서의 산업적 가치를 부분적으로 증명함. - 산업화 응용 기반연구로 그 가능성은 큼. - 현재 과제에서 분리된 부동 단백질에 대한 기본 과제 시퀀스 정보를 명확히 밝혀 유연 계통학적 연관성까지 밝히는 과제로 발전되기를 제안합니다. - 부동 단백질을 추출하는 정제 과정을 표준화하여 효과적인 부동 단백질을 확보하는 잠재성을 가짐. 가장 많은 양의 부동 단백질을 확보할 수 있는 사육조건을 밝힘. 다양한 분야를 대상으로 부동 단백질이 적용 가능한 분야를 개발 발전시킬 필요성이 있음. - 혈액 응고 등 의약품으로 활용가치도 연구 필요성 있음. 	<ul style="list-style-type: none"> ○ 해당 사항 없음 ○ 해당 사항 없음 ○ 해당 사항 없음 ○ 해당 사항 없음 ○ 해당 사항 없음 	<p>OK</p> <p>OK</p> <p>OK</p> <p>OK</p> <p>OK</p>
<p>○ 본 과제 성과 활용에 대한 건의</p> <ul style="list-style-type: none"> - 밀웜 단백질의 단백질원으로서의 가치 및 확보기술의 경제성에 대한 구체적인 내용이 없어 산업체 활용가치를 평가하는 데 한계 있음. - 추가적 연구지원 필요. - 의학 식품학에 적용 가능합니다. - 추출, 정제된 부동 단백질을 기반으로 하여 추가로 다양한 농작물, 식품 등 다양한 대상을 적용 실험이 가능하다고 봄. - 식품 화장품 등 다양한 활용범위로의 확대 제품군 형성. 	<ul style="list-style-type: none"> ○ 해당 사항 없음 ○ 해당 사항 없음 ○ 해당 사항 없음 ○ 해당 사항 없음 ○ 해당 사항 없음 	<p>OK</p> <p>OK</p> <p>OK</p> <p>OK</p> <p>OK</p>
<p>○ 불량 및 매우 불량으로 평가된 과제에 대한 이유</p> <ul style="list-style-type: none"> - 개발된 기술의 가치를 평가할 수 있도록 구체적인 성과 도출함. 제시한 연구 내용을 성실히 수행한 과제. 	<ul style="list-style-type: none"> ○ 해당 사항 없음 	<p>OK</p>

<p>○ 최종보고서의 수정, 보완 사항</p> <ul style="list-style-type: none"> - 연구개발 결과 중심으로 기술하시기 바랍니다. 현재 요약문 등은 제시했던 연구내용에 대한 작은 결과 중심으로 기술되어 있음. 평가자가 개발된 기술의 가치를 평가할 수 있도록 구체적인 성과와 객관적인 가치를 기술하시기 바랍니다. - 기존 동결보호제와의 비교실험 필요. - 보건 의학적으로 활용할 수 있나 세포 내 적용인가 세포 외막 적용인지의 체계적인 기작 연구가 필요합니다. - 거저리에서 추출된 부동 단백질을 식품이나 인체에 적용하기 위해서는 인체에 대한 유해성 평가에 관한 내용이 추가되어야 할 것으로 봄. - 분리 정제 중 침전이 계속해서 생기는 원인과 대책에 관한 내용이 필요하다고 판단됨. 	<ul style="list-style-type: none"> ○ 해당 사항 없음 ○ 해당 사항 없음 ○ 해당 사항 없음 ○ 해당 사항 없음 	<p>OK</p> <p>OK</p> <p>OK</p> <p>OK</p>
---	--	---

개인정보 삭제 확인

본인은 연구과제 최종보고서의 개인정보(주민등록번호 등)를 삭제하여 제출함을 확인합니다.

2019. 01. 18.

주관연구책임자 : 김 용 욱



<제출문>

제 출 문

농림축산식품부 장관 귀하

본 보고서를 “밀원을 활용한 부동단백질 분리·정제 및 소재제품화 기술 개발”(개발기간: 2016. 12. 05 ~ 2018. 12. 04)과제의 최종보고서로 제출합니다.

2019. 01. 18.

주관연구기관명 : 한국식용곤충연구소 지식협동조합 (대표자) 김용
협동연구기관명 : 건국대학교글로벌산학협력단 (대표자) 이승
협동연구기관명 : 씨제이제일제당 (대표자) 신현제
참여기관명 : 곡성곤충협동조합 (대표자) 구본욱



주관연구책임자 : 장 세 진
협동연구책임자 : 김 은 경
협동연구책임자 : 윤 효 정
참여기관책임자 : 구 본 욱

국가연구개발사업의 관리 등에 관한 규정 제18조에 따라 보고서 열람에 동의합니다.

<보고서 요약서>

보고서 요약서

과제고유번호	116163-02	해 당 단 계 연 구 기 간	2016.12.05. ~ 2018.12.04	단 계 구 분	(2년차 연구)/ (총 2년차 연구)
연구 사업 명	단 위 사 업	농식품기술개발사업			
	사 업 명	농식품 창업·벤처지원 R&D 바우처 시범사업			
연구 과제 명	대 과 제 명	(해당 없음)			
	세부 과제명	밀웜을 활용한 부동단백질 분리·정제 및 소재제품화 기술 개발			
연구 책임자	장 세 진	해당단계 참여연구원 수	총: 17명 내부: 17명 외부: 명	해당단계 연구개발비	정부: 155,000천원 민간: 51,700천원 계: 206,700천원
		총 연구기간 참여연구원 수	총: 17명 내부: 17명 외부: 명	총 연구개발비	정부: 300,000천원 민간: 100,200천원 계: 400,200천원
연구기관명 및 소속 부서 명	한국식용곤충연구소 지식협동조합			참여기업명 : 한국식용곤충연구소 지식협동조합 씨제이제일제당 곡성곤충협동조합	
국제공동연구	상대국명: (해당 없음)			상대국 연구기관명: (해당 없음)	
위 탁 연 구	연구기관명: (해당 없음)			연구책임자: (해당 없음)	
※ 국내외의 기술개발 현황은 연구개발계획서에 기재한 내용으로 같음					
연구개발성과의 보안등급 및 사유	보안등급 분류: 일반 결정사유 : 「국가연구개발사업의 관리 등에 관한 규정」 제24조의 4에 해당하지 않음				

9대 성과 등록·기탁번호

구분	논문	특허	보고서 원문	연구시설 ·장비	기술요약 정보	소프트 웨어	화합물	생명자원		신품종	
								생명 정보	생물 자원	정보	실물
등록·기탁 번호	2	2									

국가과학기술종합정보시스템에 등록된 연구시설·장비 현황

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

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

보고서 면수

<요약문>

<p>연구의 목적 및 내용</p>	<p>본 연구는 고품질 단백질 공급원으로 대두되고 있는 식용곤충 중 갈색 거저리 유충(밀웬)의 특수단백질인 부동단백질을 분리·정제하여 고부가가치 상품을 기획하고 특수목적 및 일반식품에 적용이 가능한 소재제품화 기술개발에 그 목적이 있으며, 시제품 생산을 목표로 하고 있음.</p> <ul style="list-style-type: none"> ○ 밀웬 부동단백질의 산업적 이용을 위한 품질표준화 <ul style="list-style-type: none"> - 밀웬 유래 소재 개발 및 물성 조사 - 밀웬 부동단백질 상품개발계획 수립 및 기업체 조사 ○ 밀웬 부동단백질 추출정제 공정 시스템 구축 <ul style="list-style-type: none"> - 밀웬 부동단백질 분리 및 정제 방법 확립 ○ 밀웬 부동단백질 대량생산 시스템 확립 및 정제 공정 구축 ○ 밀웬 부동단백질의 대량생산 공정 설립 및 제품화 <ul style="list-style-type: none"> - 밀웬 부동단백질 대량 생산 및 소재 상품화 - 밀웬 부동단백질 제품 적용성 확인 및 관능검사 - 밀웬 부동단백질 제품 보완 및 최종 제품화 				
<p>연구개발성과</p>	<ul style="list-style-type: none"> ○ (정량적) <ul style="list-style-type: none"> - 지식재산권 : 특허출원 2건 - 사업화 : 고용창출 2건 ○ (정성적) <ul style="list-style-type: none"> - 학술성과 : SCI 2건, 학술발표 2건 				
<p>연구개발성과의 활용계획 (기대효과)</p>	<p>본 연구에서는 밀웬으로부터 부동단백질을 규명하고 분리·정제를 통해 소재를 제품화 하고 기술을 개발하고자 함. 연구결과물인 밀웬 부동단백질 소재제품은 기업 특판시장에 유통·판매할 계획임.</p> <p>본 연구결과물의 기대효과로는 1) 밀웬의 부동단백질 분석기술 및 분리·정제 기술을 활용한 고부가가치 단백질 탐색, 2) 밀웬의 품질 표준화 연구가 부족한 식품산업의 기초자료 확보 및 활용가능, 3) 향후 부동단백질의 산업화를 통한 식품, 의료, 화장품 소재화 산업 확장, 4) 기업 특판시장에서의 밀웬 단백질 소재에 대한 새로운 인식 제고 및 활용성 극대화, 5) 밀웬 고부가가치 단백질 소재 개발 및 유통·판매를 통한 국내외 식용곤충 소재 판로 개척, 6) 고급 분리·정제기술의 도입을 통한 신소재 개발로 해외 시장에서의 고부가가치 단백질 경쟁력 확보 및 이미지 개선 효과임.</p>				
<p>국문핵심어 (5개 이내)</p>	<p>식용곤충</p>	<p>밀웬</p>	<p>단백질 분리정제</p>	<p>부동단백질</p>	<p>식용곤충 소재화</p>
<p>영문핵심어 (5개 이내)</p>	<p>Edible Insect</p>	<p>Tenebrio molitor</p>	<p>Protein separation and purification</p>	<p>Anifreeze protein</p>	<p>Material manufactures of edible insects</p>

※ 국문으로 작성(영문 핵심어 제외)

< 목 차 >

1. 연구개발과제의 개요	1
1-1. 연구개발 목적	1
○ 연구개발 개요	1
○ 핵심기술	2
○ 제품의 용도 및 적용분야	2
1-2. 연구개발의 필요성	2
○ 국내 기술 수준 및 시장현황	2
○ 국외 기술 수준 및 시장현황	3
○ 연구개발의 중요성	4
○ 선행연구 내용 및 결과	6
1-3. 연구개발 범위	6
○ 연구개발의 최종목표	6
2. 연구수행 내용 및 결과	7
2-1. 연구개발 추진전략 및 방법	7
2-2. 연구개발 추진체계	9
2-3. 연구개발 추진일정	10
2-4. 연구개발 수행내용 및 결과	12
○ 밀웜 부동단백질 발현 증가 최적 사육조건 탐색을 위한 조건별 밀웜사육	12
○ 밀웜 부동단백질 추출정제 공정 시스템 구축	17
2-5. 연구개발성과	40
○ 국내외 논문 게재	40
○ 국내 및 국제학술회의 발표	40
○ 지식재산권(특허)	41
○ 사업화실적	41
2-6. 결론	42
3. 목표 달성도 및 관련 분야 기여도	43
3-1. 목표	43
○ 최종목표	43
3-2. 목표 달성여부	43
3-3. 목표 미달성 시 원인(사유) 및 차후대책(후속연구의 필요성 등)	45
4. 연구결과의 활용 계획 등	46
붙임. 참고 문헌	47
<별첨> 주관연구기관의 자체평가의견서	50

〈 표 목 차 〉

[Figure 1] 부동단백질의 세포보호기능	1
[Figure 2] 곤충 부동단백질의 특징	1
[Figure 3] 연구과제 추진전략 및 방법 - 연구의 핵심과 세부과제간의 연결성	7
[Figure 4] 연구방법의 구체성 : 밀웬 유래 부동단백질 분리정제 및 소재화(1)	8
[Figure 5] 연구방법의 구체성 : 밀웬 유래 부동단백질 분리정제 및 소재화(2)	8
[Figure 6] 연구개발 추진체계	9
[Figure 7] 밀웬 부동단백질 발현 증가 최적 사육조건 탐색을 위한 온도 조건별 밀웬 사육	12
[Figure 8] 부동단백질 시장규모	16
[Figure 9] 부동단백질 주요 시장	16
[Figure 10] 부동단백질 시장에서의 주요 기업	17
[Figure 11] 추출버퍼에 따른 Antifreeze protein 추출공정 모식도	18
[Figure 12] 추출 정제 방법	19
[Figure 13] 추출버퍼(DW, Tris-HCl, TCA, NH ₄ HCO ₃)에 따른 Antifreeze protein activity	20
[Figure 14] Ion Exchange (Acetone) column peak	21
[Figure 15] Ion Exchange column fraction (11-14) AFP activity	22
[Figure 16] 부동단백질 정제 후 분자량 확인	22
[Figure 17] Gel permeation chromatography 공정 및 AFP 활성 평가	23
[Figure 18] 정제된 AFP (분자량 30,000)의 MALDI TOF-MS 결과	24
[Figure 19] 밀웬 부동단백질 추출정제 모식도	24
[Figure 20] AFP의 CD sepctrum 결과	25
[Figure 21] AFP의 N-terminal sequencing 결과	25
[Figure 22] 효모벡터시스템	27
[Figure 23] Yeast vector의 Ion exchange chromatography 결과	28
[Figure 24] 밀웬 추출방법 및 정제법 도식도	29
[Figure 25] 1차 DEAE-column 분리 후 수율	30
[Figure 26] 1차 DEAE-column을 이용한 분리 후 SDS-PAGE 결과	30
[Figure 27] Nanoliter osmometer를 이용한 얼음결정 측정	31
[Figure 28-1] 온도별 사육조건에 따른 밀웬 부동단백질 관련 mRNA 발현량 검증결과	34
[Figure 28-2] 밀웬 사육 온도 및 기간에 따른 부동단백질 관련 mRNA 발현량 변화 결과	35
[Figure 29] Ion exchange (NaCl 0~0.3M)을 이용하여 분획 후 전기 영동 결과	36
[Figure 30] Nanolier osmometer를 이용한 부동단백질 활성 측정 결과	39
[Figure 31] Nanolier osmometer를 이용한 부동단백질 활성 측정 결과	42

〈 그림 목 차 〉

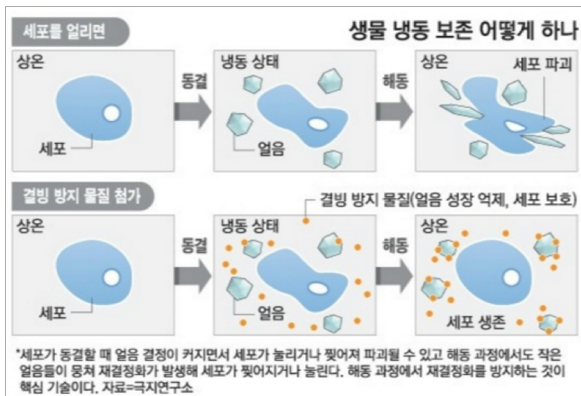
<Table 1-1> 밀웬 유래 소재개발 및 물성을 위한 건조온도 조건에 따른 시간별 수분함량 측정	13
<Table 1-2> 밀웬 유래 소재개발 및 물성을 위한 건조온도 조건에 따른 시간별 수분함량 측정	13
<Table 1-3> 밀웬 유래 소재개발 및 물성을 위한 건조온도 조건에 따른 시간별 수분함량 측정	13
<Table 1-4> 밀웬 유래 소재개발 및 물성을 위한 건조온도 조건에 따른 시간별 수분함량 측정	13
<Table 2-1> 사육온도(-5℃) 및 기간에 따른 밀웬 추출물의 이화학적 품질특성	15
<Table 2-2> 사육온도(4℃) 및 기간에 따른 밀웬 추출물의 이화학적 품질특성	15
<Table 3> 단백질 sequence분석 결과	36

1. 연구개발과제의 개요

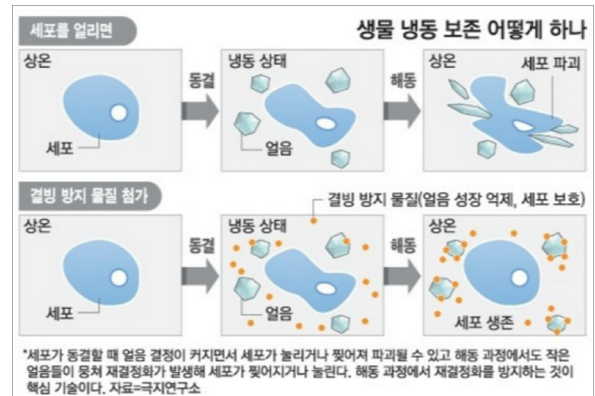
1-1. 연구개발 목적

○ 연구개발 개요

- 본 연구는 고품질 단백질 공급원으로 대두되고 있는 식용곤충 중 갈색거저리 유충인 밀웬으로부터 특수단백질인 부동단백질을 분리, 정제하고 특수목적 및 일반식품에 적용이 가능한 소재제품화 기술개발에 그 목적이 있으며, 시제품 생산을 목표로 하고 있음.
- 식품의약품안전처에 의하여 허가된 식용곤충 중 국내 최대생산량으로 여겨지는 갈색거저리 유충은 식용곤충 중 단위단가가 저렴하여 식품 소재화에 어울리는 품종이며, 단백질 함유량이 50% 이상으로 단백질의 분리, 정제 시 다량의 특수단백질 이용이 가능할 것으로 판단됨.
- 부동단백질(Antifreeze Proteins, AFP)은 북극이나 남극 대륙 등의 극지에서 서식하는 물고기, 식물 등에서 발견되는 특수물질임. 이러한 부동단백질은 생물체 내에서 온도가 낮아지더라도 얼어붙는 것을 방지하여 세포적인 손상을 방지할 수 있음[Figure 1].
- 현재 많은 연구결과에서 곤충에서도 AFP가 있는 것으로 보고되고 있으며, 곤충의 AFP의 경우 어류나 식물체보다도 더 다양하며, 효과적으로 저온에 저항하는 것으로 알려져 있음.
- 이는 곤충의 AFP에서 시스테인-시스테인(-S-S-결합)비가 커서 저온에서도 단백질 분자형태가 변하는 것을 막아 그 부동기능이 어류의 AFP보다 10-100배 뛰어난 것으로 알려져 있음 [Figure 2].
- 따라서, 본 연구에서는 국내에서 가장 많이 생산되는 식용곤충인 밀웬의 부동단백질을 구명하고, 분리·정제하여 소재제품화하며, 대량생산 공정 개발을 통하여 산업화하는 것에 그 목적이 있음.



[Figure 1] 부동단백질의 세포보호기능



[Figure 2] 곤충 부동단백질의 특징

○ 핵심기술

- 부동단백질(Antifreeze Proteins, AFP) 탐색 및 구명 : 본 과제의 핵심기술은 식용곤충인 밀웬에서 산업적으로 이용이 가능한 부동단백질을 FPLC 및 HPLC를 활용하여 동정하는 것에 있음.

- 밀웜(원료) 발현증가 최적 사육조건 탐색 : 사육조건이 밀웜 부동단백질 함유량에 미치는 영향 탐색함.
- 부동단백질(Antifreeze Proteins, AFP) 분리·정제 : 탐색된 부동단백질을 HPLC 및 분획유닛을 활용하여 분리·정제함.
- 부동단백질(Antifreeze Proteins, AFP)의 대량 배양 : 분리된 부동단백질의 RNA를 활용하여 대량배양 기술을 활용한 산업적 소재를 생산하는 것이 최종 목표임.

○ 제품의 용도 및 적용분야

- 밀웜 부동단백질의 식품소재화
- 향후 탐색 및 개발된 밀웜 부동단백질 소재를 활용하여 냉동식품, 화장품, 신소재가공 등 이용가치가 높은 고부가가치 소재로 적용 가능함.

1-2. 연구개발의 필요성

○ 국내 기술 수준 및 시장현황

○ 기술현황

- 국내에서 식용곤충 단백질 관련 기술은 농촌진흥청 국립농업과학원에서의 조단백 및 아미노산 등 일반분석 기술이 있고, 한국식용곤충연구소에서는 가수분해기술을 이용하여 식용곤충으로부터 단백질을 분리·정제하여 소재의 단백질 함량 및 소화흡수율을 높이고, 소재의 액상화 및 분말화를 통해 소재를 다양화하였음.
- 식용곤충은 일반적으로 단백질 함량이 100g 당 50~75g 이상을 함유하고 있고, 국내에서 사육 및 보급률이 높은 밀웜의 경우 50.3%의 단백질을 함유하고 있으며, 이를 구성하고 있는 아미노산으로는 루신, 이소로신, 메티오닌, 발린 등으로 체내에서 흡수되지 않아 필수적으로 음식으로 섭취해야하는 필수아미노산임. 또한 밀웜에 함유하고 있는 시스틴 및 메티오닌은 온도이격(Thermal hysteresis)효과가 있는 AFP로 알려져 있음.
- 그러나 아직까지 국내에서는 밀웜이 갖고 있는 AFP의 Thermal hysteresis 효과 규명에 관한 연구를 진행한 바가 없으므로, 이를 규명하고 소재화하여 대량 산업화함으로써 식용곤충 산업을 활성화시킬 필요가 있음.

○ 시장현황

- 국내 식용곤충 시장은 2015년 약 3,039억 원의 규모로 전년대비 약 1.8배 증가하였으며, 정부는 2020년까지 5,363억 원 규모의 시장 육성을 목표로 2016년 현재 '제 2차 곤충산업 육성 5개년 계획'을 시행중임(농림축산식품부, 2016).
- 또한 정부는 식용곤충의 범위 제한에 관한 규제가 완화됨에 따라 식용곤충 시장은 연간 최대 1,700억원대의 새로운 '곤충식품'시장이 창출될 것으로 전망함(농촌여성신문, 2015).
- 현재 국내 곤충 사육농가는 724개소이고, 산업용 곤충의 용도별 사용비 중 식용곤충 시장규모는 6% 수준이나 식용곤충 시장은 2011년에 비해 2015년에 약 5.6배 증가하여 식용곤충 식품시장의 발전가능성이 충분함에 따라 이를 위해 식용곤충의 대량사육 및 가공을 통한 시장활성화가 필요한 실정임.

○ 경쟁기관현황

- 현재 식용곤충에 관하여 기초연구 분야의 연구를 진행하는 기관은 농촌진흥청의 국립 농업과학원이 있으나, 식용곤충 유래 소재개발 및 이를 활용한 식품 등 산업화연구를 진행하고 있는 기관은 없음.

○ 지식재산권현황

- 식용곤충 및 갈색거저리 유충에 대한 지식재산권으로는 한국식용곤충연구소의 「곤충의 식용화 방법, 그 식용화 된 곤충, 이러한 식용화 된 곤충을 이용한 식품용 반죽의 제조방법」에 관한 특허(101493916000)가 있으며, 이외 농촌진흥청의 「식용 갈색거저리 유충 분말의 제조방법 및 이를 통해 제조된 식용 갈색거저리 유충 분말(1020151026000)」, 「갈색거저리 유충의 추출물 또는 갈색거저리 유충의 현탁액을 유효성분으로 포함하는 비만 예방 또는 치료용 조성물(1020160041138)」, 「갈색거저리 추출물을 포함하는 치매 예방 또는 치료용 조성물(1020140065489)」 등이 있음.
- 그러나 현재까지 밀웬(갈색거저리 유충)으로부터 유래된 부동물질 및 이의 제조방법, 또는 이의 산업적응에 관한 특허는 없었음.

○ 표준화현황

- 밀웬 유래 부동물질 및 이의 제조방법, 상품화를 위한 대량생산 표준화에 관한 연구는 없었음.

○ 기타현황

- 한국식용곤충연구소에서는 식용곤충으로부터 단백질을 분리·정제하여 단백질액상, 분리단백분말 및 단백질당 등 식품 소재화하였으며, 산업활성화를 위한 대량생산 공정을 개발하였음.
- 또한 개발된 식품소재를 활용하여 쿠키, 에너지바, 파스타, 스프, 에이드, 단백질쉐이크 등 다양한 식용곤충식을 개발하여 온·오프라인을 통해 판매하고 있음.

○ 국외 기술 수준 및 시장현황

○ 기술현황

- 세계적인 곤충산업국인 네덜란드는 고품질 단백질 공급원으로 곤충의 가치를 연구하고 사육과 관련된 기술을 개발하고 있음. 미국에서는 자원확보 및 사료소재 개발 연구가 활발하고 미주 내 식용곤충식 전문회사들 중 Chapul과 EXO는 건조시킨 귀뚜라미를 분말화하여 제품(에너지바)을 미국 전역에서 판매 중이며, 유럽 등의 지역에 수출하고 있음. 덴마크에서는 코펜하겐대학을 중심으로 지속가능한 농업, 식품생산 및 가공 등에 대한 광범위한 연구를 수행하면서 식용곤충에 대한 연구를 진행중임.
- 태국의 콘첸대학에서는 자국 내에서 소비되는 식용곤충의 사육방법을 중심으로 지속가능한 농업시스템과 곤충자원보존을 연구 진행중이고, 중국의 경우 윈난성의 임원과학 연구원이 중심이 되어 기능성 물질과 식용곤충을 동시에 연구하고 있음.
- 그러나 현재까지 밀웬 유래 부동물질 및 대량화를 위한 이의 제조공정 개발에 관한 연구 및 사례가 보고된 바는 없음.

- 시장현황
 - 세계 곤충산업 시장규모는 2015년 3,300만 달러(한화 375억 만원)이상으로, 2016년부터 2023년까지 연평균 40% 이상으로 성장할 전망이다. 식용곤충 식품시장에서 품목별 분류 중 스낵류가 2015년 1,100만 달러로 가장 큰 비중을 차지하였으며, 식용곤충 단백질 바는 2023년까지 연간 42.2%이상, 식용곤충 파우더는 연간 42% 성장할 것으로 예상됨.
 - 식용곤충 관련 연구가 활발한 네덜란드 와게닝겐(Wageningen)대 곤충학 교수 Marcel Dicke에 따르면 유럽인들도 연평균 약 500g의 곤충을 섭취하고 있음. 섭취하는 형태는 토마토수프, 땅콩버터, 애플소스, 초콜릿 등 곤충 추출물이 함유된 식품 또는 곤충껍데기에서 추출한 키타 다이어트 약품이 있음.
- 경쟁기관현황
 - 현재 식용곤충에 관한 연구를 활발하게 진행하고 있는 곳은 네덜란드 와게닝겐(Wageningen)대학으로 정부 및 산학연 공동으로 곤충단백질 가공방식을 집중 연구하고 있으나, 밀웬 유래 부동물질 및 대량화를 위한 이의 제조공정개발에 관한 연구를 진행하고 있는 기업 또는 기관은 없음.
- 지식재산권현황
 - 식용곤충 또는 밀웬 유래 부동단백질 관련 지식재산권으로는 미국의 「Tenebrio antifreeze proteins(06747130)」이 출원된바 있으나, 이의 소재화 및 대량화를 위한 제조공정 개발 관련 연구는 없음.
- 표준화현황
 - 밀웬 유래 부동물질 및 이의 제조방법, 상품화를 위한 대량생산 표준화에 관한 연구는 없었음.
- 기타현황
 - 네덜란드에서는 유럽 식품업계 및 소비자로부터 하위급 식품아이템으로서의 곤충을 수용케 하기 위해 가공기술발달의 필요성을 인식하여 정부 및 산학연 공동으로 곤충단백질 가공방식을 집중적으로 연구하고 있음. 또한 식품뿐만 아니라 약품산업 등 동물기반 단백질 원료의 주요한 대체품으로 될 것으로 전망하고 있음.
- 연구개발의 중요성
 - 식용곤충은 약 50~75% 이상의 풍부한 단백질을 함유하고 있으며, 이를 구성하고 있는 아미노산은 발린, 루신, 이소루신 등 필수아미노산으로 양적 및 질적으로 우수한 단백질 급원식품임. 본 연구에서는 국내에서 생산 및 보급률이 높은 것으로 알려져있는 밀웬으로부터 단백질 분리·정제 기술을 통해 일반 및 특수목적 단백질을 추출하여 새롭게 소재화하고, 산업화를 위해 이를 대량화 및 그 공정을 구축함으로써 식용곤충 및 관련 산업의 새로운 고부가가치를 창출하고자 함.
- 기술적 측면
 - 고단백 식자재원인 식용곤충은 체내에서 생성하지 못하여 필수적으로 음식으로 섭취해야 하는 필수아미노산인 발린, 루신, 이소루신, 메티오닌, 트레오닌, 리신, 페닐알라닌,

트립토판, 히스티딘을 구성하고 있는 완전 단백질임.

- 다양한 생명체에서 발견되고 있는 부동단백질(Antifreeze protein, AFP)은 물 분자들과 상호작용을 할 수 있는 당으로 둘러싸인 복잡한 구조의 단백질로, 이를 가지고 있는 생명체들은 낮은 온도(영하 60℃)에서도 결빙되지 않고 끊임없이 움직일 수 있음.
- 곤충 50여 종 및 여러 절지동물에서도 AFP가 발견되었으며, 대표적인 예로 딱정벌레가 있음. 딱정벌레 체내에 존재하는 부동물질은 영하 40~60℃의 낮은 온도에서도 얼음결정을 생성하거나 성장을 억제하지 않고, 체액의 과냉상태를 안정화하여 동사하지 않고 생존할 수 있음.
- 곤충의 AFP는 종에 따라 그 구조가 다양하며, 한 개체에 6~12개의 다양한 AFP도 함께 발견됨. AFP는 -S-S- 결합을 갖는 시스테인/시스틴 비가 큰 것으로 관찰되었으며, 이는 저온에서도 단백질 분자형태가 변하는 것을 막아 부동기능을 유지할 수 있는 것으로 추측하고 있음.
- 밀웜은 필수아미노산 이외 비필수 아미노산도 함유하고 있으며, 황(S) -S- 결합을 갖는 시스테인 및 메티오닌 함량이 높은 것으로 알려져 있음. 이는 부동물질을 가지는 물질 중 하나로 이를 분리·정제하여 소재화할 경우 냉동식품, 아이스크림, 의료 등 다양한 산업에서 응용가능할 것으로 사료됨.

○ 경제적 측면

- 세계 곤충산업 규모는 2015년 3,300만 달러 이상으로, 2016년부터 2023년까지 연평균 40% 이상으로 성장할 전망이다. 보고에는 월간 1인 식용곤충식 소비금액이 15달러 기준으로 10년 후 유럽 및 미국 시장규모는 33억 달러(한화 약 4조원, 유럽 22억 달러, 미국 11억 달러)를 형성할 것으로 예상됨(2015 식용곤충식 해외시장 보고서).
- 국내 곤충산업의 경우, 2015년 약 3,039억 원대 시장규모는 2020년 약 5,363억 원으로 규모가 커질 것으로 전망되며(농림축산식품부, 2016), 정부의 곤충식품 규제 개혁으로 인한 식용곤충을 활용한 식품시장은 연간 1,700억 원대로 성장할 전망이다(조선일보, 2014).
- 전국 곤충 사육농가는 724개소이며, 용도별 곤충 시장규모 중 식용곤충은 6%수준이나 식용곤충 시장은 2011년에 비해 2015년에 약 5.6배 증가하여 식용곤충 활용 식품시장의 발전가능성이 충분한 것으로 사료됨.
- 따라서, 식용곤충 식품산업의 활성화를 위해 식용곤충으로부터 단백질을 분리·정제하여 소재화하고 이를 활용함으로써 그 적용범위를 넓힘. 또한 특수목적 단백질을 소재화함으로써 응용제품의 품질을 향상시키고자 함.

○ 사회적 측면

- 현재 국내 식용곤충시장의 시장규모는 시장확장 및 발전가능성이 높은 것으로 판단되나, 곤충에 대한 소비자들의 혐오감으로 인해 식용곤충의 대중화 및 활성화에 어려움이 있음.
- 식용곤충에 대한 혐오감을 유발하는 요인들에는 여러 가지가 존재하는데 식용곤충에 대한 잘못된 정보로 인한 편견으로 거부감이 커지는 것으로 알려져 있음.
- 따라서 소비자들의 곤충에 대한 부정적 인식(불쾌감)을 저하시키기 위해 보이지 않는 형태로의 가공식을 사용하고, 유용성분(단백질 등)을 분리·정제하여 식품 내 단백질 함량을 높여 영양학적 품질향상을 통한 식용곤충의 인식을 재고하고자 함. 또한 특수목

적 단백질의 분리·정제를 통해 소재화하고 이를 식품(냉동, 아이스크림), 의약 등 다양한 산업에 적용시켜 식용곤충 시장확대 및 대중화하고자 함.

○ 선행연구 내용 및 결과

- 건국대학교에서는 극지방 어류로부터 분리된 AFP를 한우 육에 도포하여 TBARs법을 이용하여 0일, 5일, 15일, 20일 및 25일의 지질과산화 억제활성을 측정한 결과는 다음과 같았음.
 - AFP를 처리하지 않은 한우 육의 경우 10일이 지나면서 서서히 지질의 과산화도가 서서히 증가하는 모습을 보이며 20일이 지난 후 급격히 증가하는 것을 볼 수 있었음.
 - AFP를 처리한 한우 육의 경우 그렇지 않은 대조군과 비교하였을 때 20일까지는 지질 과산화도가 증가하지 않았으며 25일 이후에 서서히 증가하는 모습을 보였음.
 - 단순한 한우 육의 색만 확인하여 보아도 처리하지 않은 한우 육의 색으로 변한 반면, AFP를 처리한 군에서는 색의 변화가 거의 없었음.
 - 이는 AFP 처리로 인해 한우 육 냉동시 발생할 수 있는 세포파괴 현상이 억제되어 이 같은 현상이 일어나는 것으로 보이며 단순한 도포법으로도 한우 육의 보관을 용이하게 할 수 있을 것으로 사료됨.

1-3. 연구개발 범위

○ 연구개발의 최종목표

- 식용곤충 중 갈색거저리 유충인 밀웜을 활용하여 특수단백질인 부동단백질을 분리·정제하여 고부가가치 상품을 기획하고 특수목적 및 일반식품에 적용이 가능한 소재제품화 기술 개발에 그 목적이 있으며, 시제품 생산을 목표로 하고 있음.

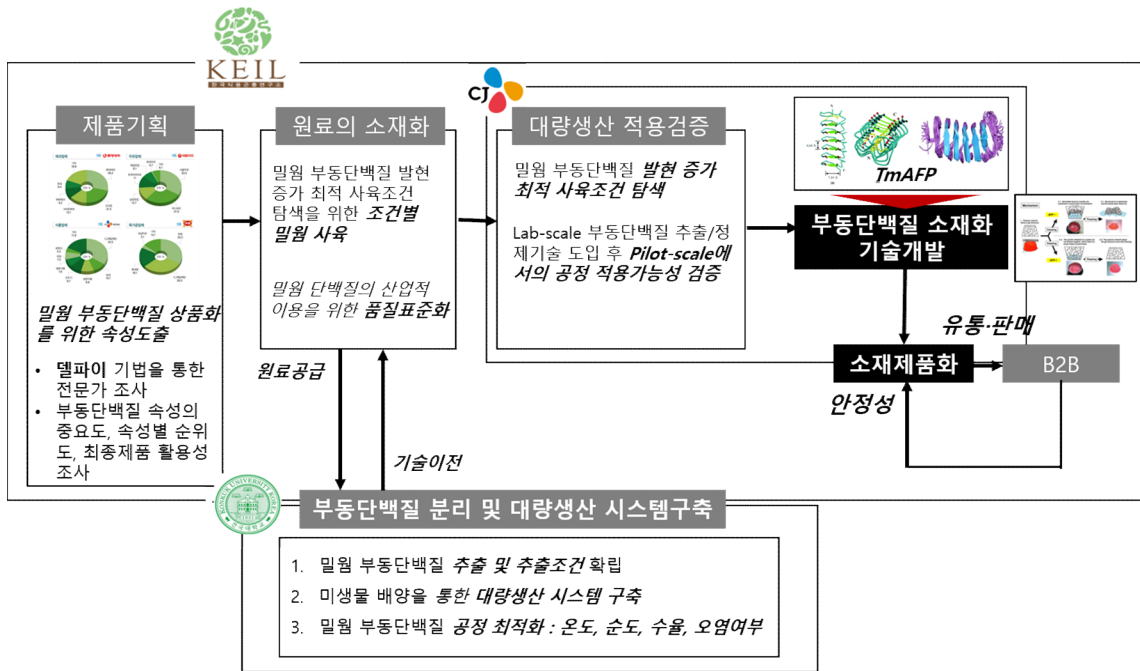
○ 세부목표

- 밀웜 단백질의 산업적 이용을 위한 품질표준화
 - 밀웜 유래 소재 개발 및 물성 조사
 - 밀웜 부동단백질 상품개발계획 수립 및 기업체 조사
- 밀웜 부동단백질 추출정제 공정 시스템 구축
 - 밀웜 부동단백질 분리 및 정제 방법 확립
- 밀웜 부동단백질 대량생산 시스템 확립 및 정제 공정 구축
- 밀웜 부동단백질의 대량생산 공정 설립 및 제품화
 - 밀웜 부동단백질 대량 생산 및 소재 상품화
 - 밀웜 부동단백질 제품 적용성 확인 및 관능검사
 - 밀웜 부동단백질 제품 보완 및 최종 제품화
 - 밀웜 부동단백질 제품 B2B 유통판매

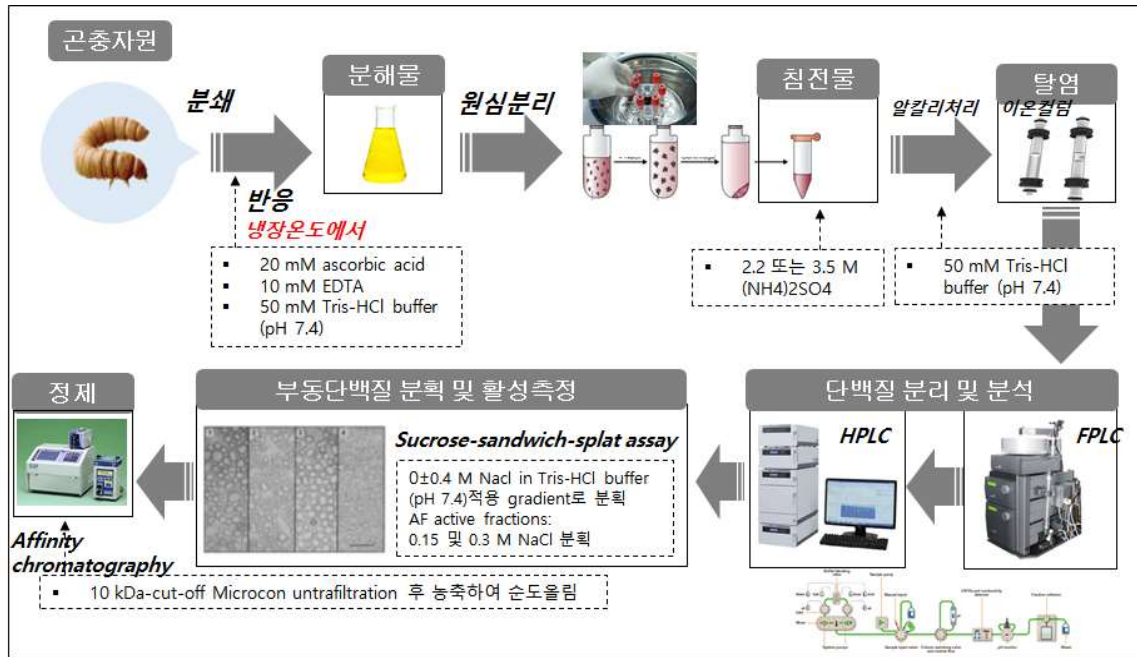
2. 연구수행 내용 및 결과

2-1. 연구개발 추진전략 및 방법

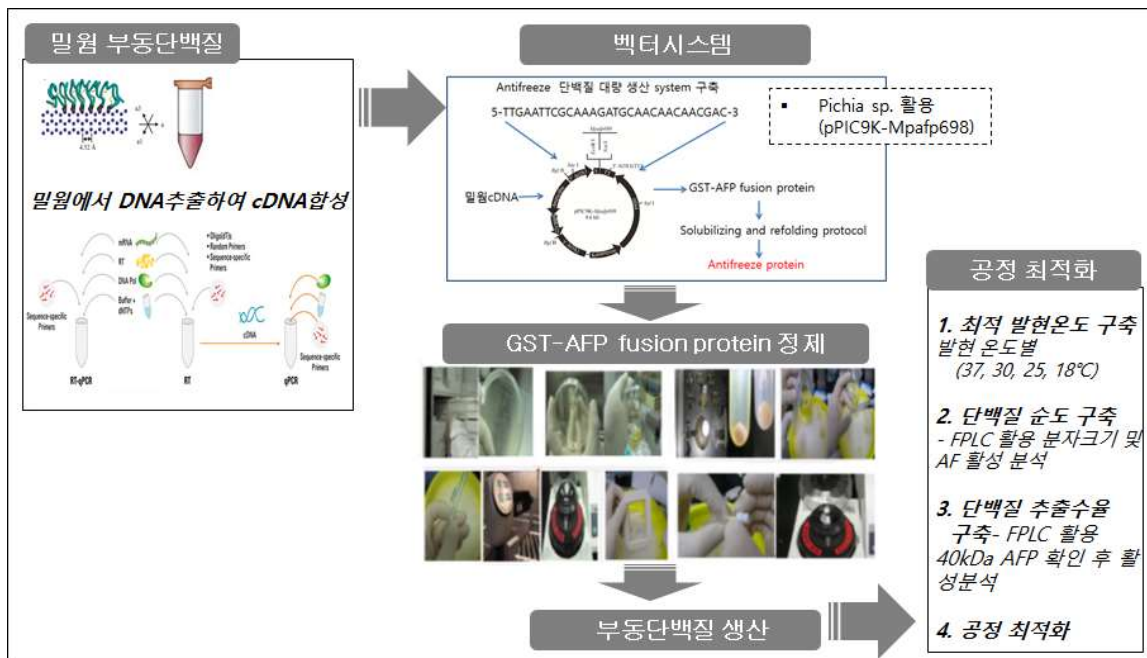
○ 밀웜을 활용한 부동단백질 분리·정제 및 소재제품화 기술 개발을 위한 추진전략 및 방법은 다음과 같음[Figure 3-5] .



[Figure 3] 연구과제 추진전략 및 방법 - 연구의 핵심과 세부과제간의 연결성



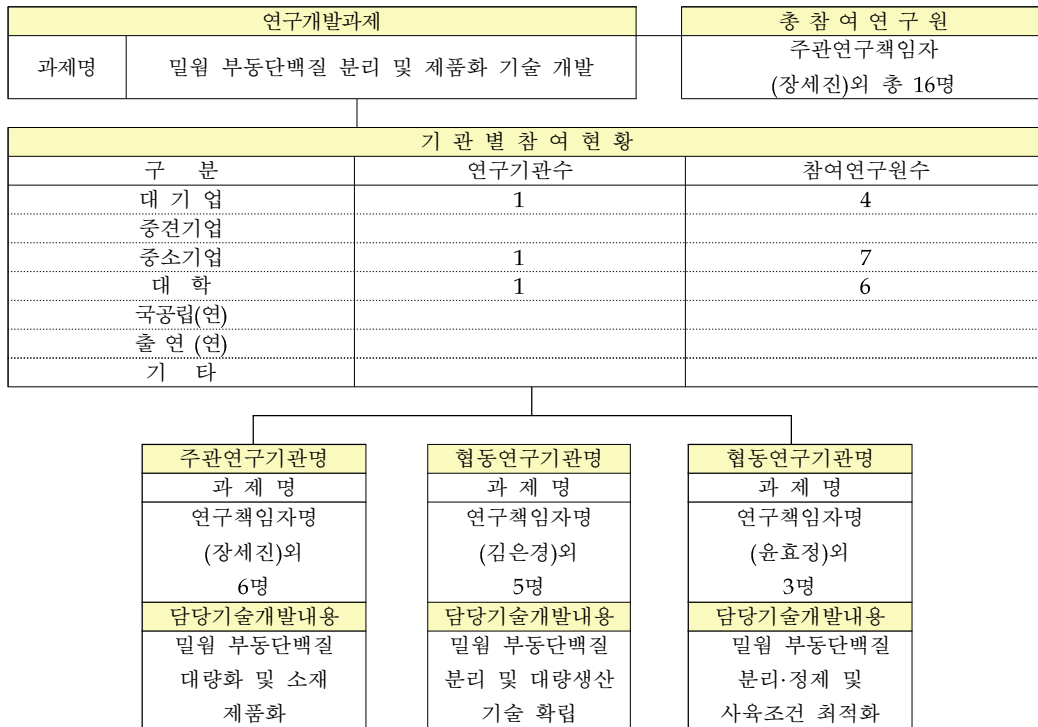
[Figure 4] 연구방법의 구체성 : 밀웬 유래 부동단백질 분리정제 및 소재화(1)



[Figure 5] 연구방법의 구체성 : 밀웬 유래 부동단백질 분리정제 및 소재화(2)

2-2. 연구개발 추진체계

- 밀웜을 활용한 부동단백질 분리·정제 및 소재제품화 기술 개발을 위한 추진체계는 다음과 같음[Figure 6].



[Figure 6] 연구개발 추진체계

2-3. 연구개발 추진일정

○ 밀웜을 활용한 부동단백질 분리·정제 및 소재제품화 기술 개발을 위한 추진일정은 다음과 같음.

1차년도														
일련 번호	연구내용	월별 추진 일정												책임자(소속기관)
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	
1	계획수립 및 자료조사	■	■	■										장세진 (한국식용곤충연구소)
2	밀웜 부동단백질 발현증가를 위한 사육조건별 확립			■	■	■	■							장세진 (한국식용곤충연구소)
3	이화학 및 기기분석 적 품질검사				■	■	■	■						장세진 (한국식용곤충연구소)
4	델파이 기법 전문가 조사							■	■	■	■			장세진 (한국식용곤충연구소)
5	델파이를 통한 밀웜 부동단백질 속성도출								■	■	■			장세진 (한국식용곤충연구소)
6	이화학 결과 및 전문가 의견 종합을 통한 활용성 검증									■	■	■		장세진 (한국식용곤충연구소)
2차년도														
1	대량생산 가공 계획 수립	■												장세진 (한국식용곤충연구소)
2	밀웜 부동단백질 공정 확립		■	■	■	■	■							장세진 (한국식용곤충연구소)
3	이화학 및 기기분석 적 품질검사				■	■	■	■						장세진 (한국식용곤충연구소)
4	부동단백질 관능평가						■	■						장세진 (한국식용곤충연구소)
5	미세조정을 통한 부동단백질 시제품생산							■	■	■	■			장세진 (한국식용곤충연구소)
6	부동단백질 제품 유통&판매 계획 수립									■	■	■		장세진 (한국식용곤충연구소)

1차년도														
일련 번호	연구내용	월별 추진 일정												책임자(소속기관)
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	
1	밀원 전처리 과정 확립	■	■											김은경 (건국대학교)
2	밀원 단백질 추출			■	■									김은경 (건국대학교)
3	밀원 부동단백질 분리					■	■	■	■					김은경 (건국대학교)
4	밀원 부동단백질 추출정제 공정 시스템 구축									■	■			김은경 (건국대학교)
5	효모벡터 시스템을 이용한 대량생산 공정 구축											■	■	김은경 (건국대학교)

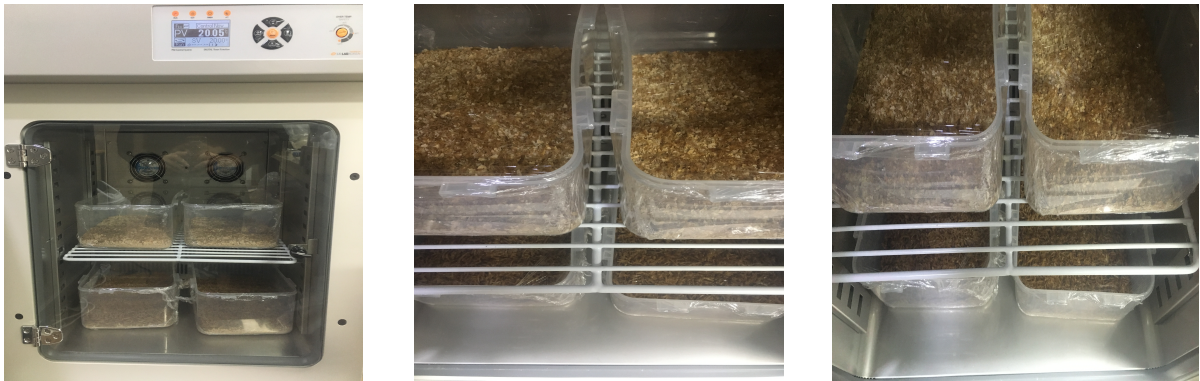
2차년도														
1	벡터 최적 조건확립	■	■	■										김은경 (건국대학교)
2	단백질 순도 확립				■	■	■							김은경 (건국대학교)
3	단백질 추출 수율 확립							■	■	■				김은경 (건국대학교)
4	공정과정 구축										■	■	■	김은경 (건국대학교)

1차년도														
일련 번호	연구내용	월별 추진 일정												책임자(소속기관)
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	
1	밀원 부동단백질 발현 증가를 위한 최적 사육조건 탐색	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	윤효정 (CJ제일제당)
2	lab-scale 추출/정제법 도입 후 파일럿 스케일 추출/정제를 위한 기본 테스트				■	■	■	■	■	■	■	■	■	윤효정 (CJ제일제당)
2차년도														
1	부동 단백질 파일럿 스케일 추출정제 공정 구축	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	윤효정 (CJ제일제당)
2	수율 극대화를 위한 사육조건 미세 조정 및 파일럿에서 생산한 부동단백질 activity 검증					■	■	■	■	■	■	■	■	윤효정 (CJ제일제당)

2.4. 연구개발 수행내용 및 결과

○ 밀웜 부동단백질 발현 증가 최적 사육조건 탐색을 위한 조건별 밀웜사육

- 밀웜 부동단백질의 발현 증가 최적 사육조건 탐색을 위해 온도 조건별 사육환경에 따른 밀웜을 사육하였음. 초기 설정 온도는 4, 10, 15 및 20℃로 향후 일반 사육장에서 쉽게 적용이 가능한 온도 범위로 설정하였으며[Figure 7], 본 환경 조건에서 30일 테스트 사육종료 후 본 사육으로 돌입하였음.



[Figure 7] 밀웜 부동단백질 발현 증가 최적 사육조건 탐색을 위한 온도 조건별 밀웜 사육

- 본 사육의 설정 온도는 -5, 4, 15 및 25℃로 설정하였으며, 각각의 온도에서 4주동안 주간격으로 샘플을 분리하여 -20℃에서 냉동보관하였음.

○ 밀웜 단백질의 산업적 이용을 위한 품질표준화

가. 밀웜 유래 소재개발 및 물성조사

- 밀웜 단백질의 산업적 이용을 위한 품질표준화를 위해 밀웜 유래 소재개발 및 물성을 위한 기초연구를 진행하였음. 밀웜의 건조온도 조건에서의 시간별 수분함량을 측정하였으며, 건조 온도 범위는 130, 150, 160 및 180℃의 범위로 설정하였음. 건조는 식품소재 고온열풍건조기(KEIL-2000)를 활용하여 간접가열에 의한 열풍순환 건조원리를 활용하였으며, 건조기 내 선반 1개당 밀웜 1kg을 정량하여 대차상 선반위치 조건에 따라 건조하였음. 본 실험결과, 건조 밀웜의 수분함량은 180℃에서 16 min 건조하였을 때 목표치에 도달하였으며, 이는 밀웜의 일반 소재화에 있어서 중요한 기초자료로 활용 가능할 것으로 사료됨<Table 1>.

<Table 1-1> 밀웜 유래 소재개발 및 물성을 위한 건조온도 조건에 따른 시간별 수분함량 측정

측정시간 (min) 설정온도 (130℃)	위치 (대차상 선반위치)	25	27	30	33	35
수분함량 (%)	상	32.29	20.44	13.44	5.17	2.46
	중	44.79	44.17	16.96	11.69	2.07
	하	35.65	21.11	13.15	8.90	3.38

<Table 1-2> 밀웜 유래 소재개발 및 물성을 위한 건조온도 조건에 따른 시간별 수분함량 측정

측정시간 (min) 설정온도 (150℃)	위치 (대차상 선반위치)	40	50	60	70
수분함량 (%)	1	30.35	20.03	8.68	1.82
	2	50.97	38.47	24.68	13.64
	3	56.24	52.15	33.59	22.65
	4	41.87	15.63	14.98	1.14
	5	47.19	23.61	16.11	0.63
	6	35.76	27.94	7.41	1.59
	7	50.10	31.52	7.96	6.06
	8	44.44	34.72	25.33	12.07
	9	54.24	38.76	51.20	30.11
	10	37.31	38.88	23.61	7.04

<Table 1-3> 밀웜 유래 소재개발 및 물성을 위한 건조온도 조건에 따른 시간별 수분함량 측정

측정시간 (min) 설정온도 (160℃)	위치 (대차상 선반위치)	15	18	21	24
수분함량 (%)	상1	47.72	33.51	6.91	1.43
	상2	22.78	7.79	0.64	0.58
	중	28.96	3.19	0.78	0.46
	하1	25.70	13.86	2.06	0.52
	하2	37.15	30.80	15.02	1.76

<Table 1-4> 밀웜 유래 소재개발 및 물성을 위한 건조온도 조건에 따른 시간별 수분함량 측정

측정시간 (min) 설정온도 (180℃)	위치 (대차상 선반위치)	14	16 (1)	16 (2)
수분함량 (%)	상	5.03	1.24	1.38
	중	5.75	1.19	1.28
	하	11.48	1.28	2.87

- 밀웜 부동단백질 추출정제 공정개발에 앞서 온도별(-5 및 4℃) 및 사육기간(7, 14, 21 및 28일 경과)에 따른 추출물의 이화학적 품질특성을 분석하였음. 밀웜 추출물은 밀웜에 50% 에 탄올 용액을 투여하여 분쇄 후 여과한 용액으로 원심분리(2100xg, 30 min)후 상등액만 취하여 사용하였으며, 이때 분석항목은 조단백질, 아미노태 질소 및 가용성 고형분함량임.

▪ 실험방법

1) 조단백 함량 분석

: 조단백 함량은 식품공전의 일반시험법(조단백질)을 참고하여 자동단백질분석기 (FoodALTY)를 사용하여 측정하였음. 검체 1 g을 정밀하게 취하여 분해튜브에 넣고 분해촉진제 0.5 g을 진한 황산 12 mL을 넣은 후 420°C의 분해장치에서 45~60 min간 분해하여 분해액의 색이 투명한 연푸른 또는 투명한 노란색이 되면 상온으로 냉각시켰음. 분해된 시험용액에 80 mL의 증류수를 주의하여 첨가한 후 증류장치에 넣은 후 25 mL의 혼합지시약(1% 붕산용액), 40% 수산화나트륨용액 50 mL을 첨가하여 자동장치에 의해 증류(3~4 min)한 후 0.1N HCl용액으로 적정하였음.

조단백질 (%)

$$= (\text{소비된 HCL양-공시험 HCL})/\text{검체량(mg)} \times M \times 14.01/\text{검체량(mg)} \times F \times 100$$

※ M : HCl 몰 농도

※ 14.01 : 질소의 원자량

※ F : 질소계수 (6.25)

2) 아미노태 질소 함량 분석

: 아미노태 질소 측정은 Formal 법을 이용하여 검체 0.5 g을 취해 증류수를 이용하여 50 mLmf 정용하고 1 min간 균질화한 후 원심분리(4000rpm, 10 min)한 후 상등액을 시료로 하였음. 상등액 5 mL에 중성 formalin 용액 10 mL을 가하고 0.1N NaOH 용액으로 pH 8.3이 되도록 중화적정하였음. 공시험은 상등액 5 mL 대신 증류수를 넣어 시료에서와의 같은 방법으로 실험을 시행하여 아미노태 질소 함량을 구하였음.

아미노태 질소 (%)

$$= (\text{소비된 NaOH양-공시험 NaOH})/\text{검체량(mg)} \times F \times 1.4/\text{시료의 채취량(g)} \times 100$$

※ F : 0.1 N NaOH 용액의 역가

※ 1.4 : 0.1 N NaOH 용액 1 mL에 상당하는 질소량

※ D : 회석배수

- 사육온도별(-5 및 4°C) 및 기간에 따른 밀웜 추출물의 이화학적 품질특성은 투석(Dialysis) 전과 후를 비교분석하였음. 분석결과, 사육온도별 및 기간에 따른 밀웜 추출물의 이화학적 품질특성은 차이가 나타나지 않았음. 그러나 투석 전과 후를 비교한 결과, 투석에 의해 100 kDa 이하의 저분자 단백질이 투석된 것으로 나타남<Table 2>.

<Table 2-1> 사육온도(-5°C) 및 기간에 따른 밀웜 추출물의 이화학적 품질특성

투석 기간(day)	조단백(%)		아미노태 질소(%)		가용성 고형분(°Brix)	
	투석 전	투석 후	투석 전	투석 후	투석 전	투석 후
A ¹⁾	0.21±0.02 ²⁾	0.07±0.01	0.08±0.00	0.03±0.00	15.10±0.00	1.00±0.00
B	0.21±0.01	0.08±0.01	0.08±0.00	0.03±0.00	13.20±0.14	1.00±0.00
C	0.22±0.03	0.10±0.03	0.11±0.01	0.07±0.00	12.90±0.00	1.00±0.00
D	0.22±0.01	0.12±0.00	0.16±0.01	0.08±0.00	14.05±0.00	1.00±0.00

¹⁾ 저장온도에 따른 사육기간 : A(7일 경과), B(14일 경과), C(21일 경과), D(28일 경과)

²⁾ Mean±S.D.

<Table 2-2> 사육온도(4°C) 및 기간에 따른 밀웜 추출물의 이화학적 품질특성

투석 기간(day)	조단백(%)		아미노태 질소(%)		가용성 고형분(°Brix)	
	투석 전	투석 후	투석 전	투석 후	투석 전	투석 후
A ¹⁾	0.23±0.05 ²⁾	0.09±0.01	0.07±0.00	0.08±0.01	15.80±0.00	2.70±0.42
B	0.27±0.02	0.09±0.00	0.11±0.01	0.12±0.00	14.00±0.00	1.00±0.00
C	0.24±0.04	0.09±0.01	0.10±0.00	0.12±0.00	14.00±0.00	1.00±0.00
D	0.21±0.02	0.10±0.01	0.10±0.00	0.12±0.00	13.75±0.00	1.20±0.00

¹⁾ 저장온도에 따른 사육기간 : A(7일 경과), B(14일 경과), C(21일 경과), D(28일 경과)

²⁾ Mean±S.D.

나. 밀웜 부동단백질 상품개발계획 수립 및 기업체 조사

- 밀웜부동단백질의 상품개발계획 수립에 앞서 부동단백질에 대한 시장조사 및 문헌조사를 진행하였으며, 이를 토대로 밀웜 부동단백질의 활용방향성에 대한 기초 자료수집 및 향후 계획을 수립하였음.

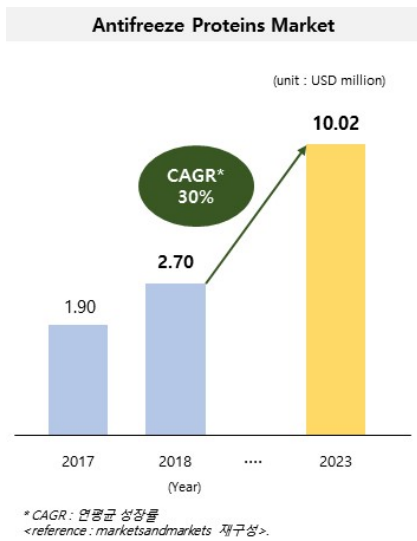
- 세계 부동단백질 시장(Global Antifreeze Proteins Market)규모는 2018년 2.70백만 달러(한화 215억 원)의 시장규모로 추정되며, 연평균 30% 성장률을 나타내어 향후 2023년에는 10.20백만 달러(한화 1,133억 원)를 형성할 것으로 예상됨[Figure 8].

- 부동단백질(Antifreeze Proteins, AFP)은 얼음 결정의 표면에 결합하여 얼음 결정의 성장을 억제하는 단백질로, 극지에서 서식하는 어류, 식물류, 곤충류 등 다양한 생명체로부터 발견됨.

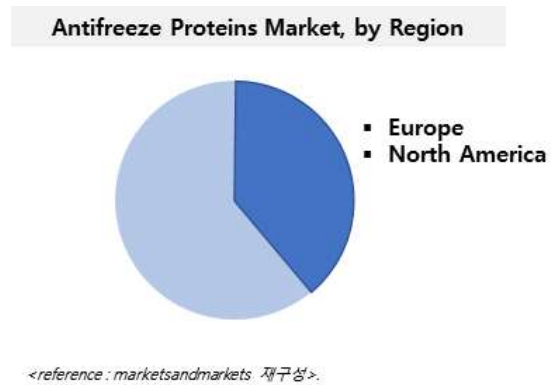
- 전 세계적으로 AFP에 대한 수요가 증가하고 있으며, 특히 의료산업에서는 동결요법(한랭수술), 장기이송 및 백신 등 사용에 있어서 질적 및 기능적 성과에 대한 업계 관심이 높음. 또한 AFP는 어류, 식물류 및 곤충류 등 다양한 원재료 품질에 따라 식품, 의약품 및 화장품과 같은 다양한 산업에 적용되고 있으며, 그중 어류 AFP가 백신, 장기이송, 안티에이징크림, 화장품 및 아이스크림 등에 가장 널리 사용되고 있음.

- AFP의 형태는 액상 및 고상 타입으로 분류되며, 고상의 AFP가 의료 및 식품분야에 적용되고 있으며, 특히 냉동식품 산업에서 그 수요가 증가하고 있음. 현재 AFP는 Type I, Type III 및 AFGP(Antifreeze Glycoprotein)으로 분류되며, 필요한 AFP 타입 및 원재료에 따라 추출 공정은 달라짐. 최근 추출기술이 향상됨에 따라 화장품 및 식품적용에 적합한 Type III의 수요가 증가하고 있음.

- AFP 시장은 북아메리카, 유럽, 아시아태평양 및 기타 지역으로 구분되며, 2018년 AFP 시장의 주요 지역은 유럽 및 북아메리카 지역으로 북아메리카에서는 AFP 시장성장 및 새로운 분야로의 적용을 위한 생명과학 및 생리학 연구를 위한 몇몇 국립연구기관을 가지고 있음 [Figure 9].

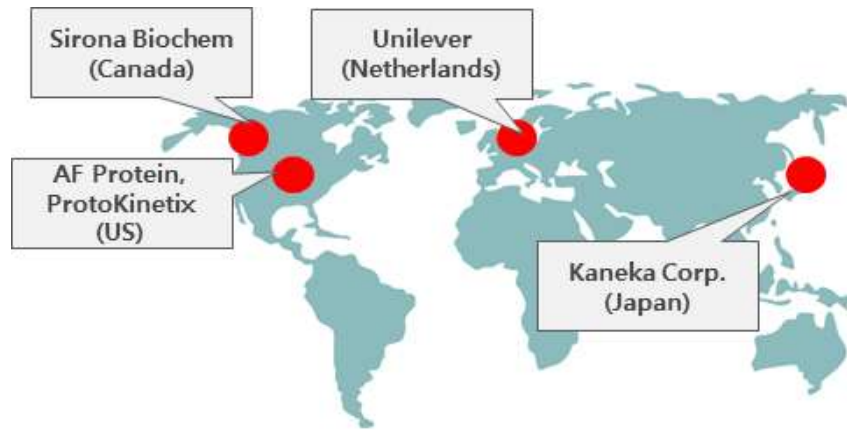


[Figure 8] 부동단백질 시장규모



[Figure 9] 부동단백질 주요 시장

- AFP 시장에 진입해 있는 기업으로는 AF Protein (Aqua Bounty Technologies, Inc. (US)), Sirona Biochem (Canada), Unilever (Netherlands), Kaneka Corp. (Japan) 및 ProtoKinetix (US)가 있으며, Kaneka Corp. (Japan)의 경우, 2018년 Kansai 대학교와 R&D Joint venture를 이루어 무순으로부터 AFP 대량생산 혁신을 촉진하였음. AF Protein 및 Unilever와 같이 R&D 기반의 몇몇 회사들이 이미 시장의 90%를 점유하고 있어서 신생 기업의 시장 진입에 어려움이 있음[Figure 10].



[Figure 10] 부동단백질 시장에서의 주요 기업

- 또한 AFP는 식품산업에서는 상업적 용도에 제한이 있음. 그러나 화장품, 건강 및 냉동식품 산업에 사용 가능하며, 최근 우리나라의 (주)넥스젠바이오텍에서도 AFP 하이브리드를 개발하여 화장품 소재화 및 제품화(CR-5)하였음. (주)넥스젠바이오텍의 AFP 단백질 하이브리드의 경우, 국제 화장품 원료집(Trade name: NEX-EAFPSR, INCI name: sh-Oligopeptide-1 sr-Sea Raven Polypeptide-1 와 Trade name: NEX-EAFPOP, INCI name: sh-Oligopeptide-1 sr-Ocean Pout Oligopeptide-1 Dipeptide-39)과, 피부 주름 개선 및 항노화 기능이 우수한 신소재 화장품 원료로 국내 특허로 등록되어 있음(특허 10-1678392).

- 여전히 많은 기업들이 AFP의 식품에서의 새로운 적용에 관해 탐구하고 있으며, 예를 들어 Kaneka Corp.에서는 AFP를 사용한 냉동면, 가공란, 즉석밥, 어묵 및 디저트 등을 연구하고 있음.

- 따라서 본 연구에서는 밀웜 유래 부동단백질에 대한 기초연구 및 기반을 구축하고 소재를 개발하고자 함.

○ 밀웜 부동단백질 추출정제 공정 시스템 구축

○ Lab-scale에서의 밀웜 부동단백질 추출정제

1) 추출버퍼에 따른 Antifreeze protein 추출

- 밀웜 100g을 62.5mM Tris-HCl (pH 6.8), 10% TCA 및 0.1M NH₄HCO₃ 용액 각 1L에 넣은 후 3 min 씩 5회에 걸쳐 충분히 갈아주었음. 분쇄된 밀웜을 sie 200 시브 표준망체에 받아 껍질 등 큰 잔여물들을 걸러낸 후 여과지(Whatman No.2)로 남은 잔여물을 2차 필터 실시하였음. 여과하여 얻은 용액에 얼음 10g을 넣어 25℃에서 10 min 간 정치한(Ice-affinity) 후 단백질을 흡수한 얼음을 상온에서 녹였음. 밀웜을 62.5mM Tris-HCl (pH 6.8) 용액에 분쇄하였을 때, 이온컬럼과 gel permeation chromatography의 조건을 확립하였음[Figure 11,12].



[Figure 11] 추출버퍼에 따른 Antifreeze protein 추출과정 모식도

▪ 추출방법

(1) Tris-HCl (pH 6.8)

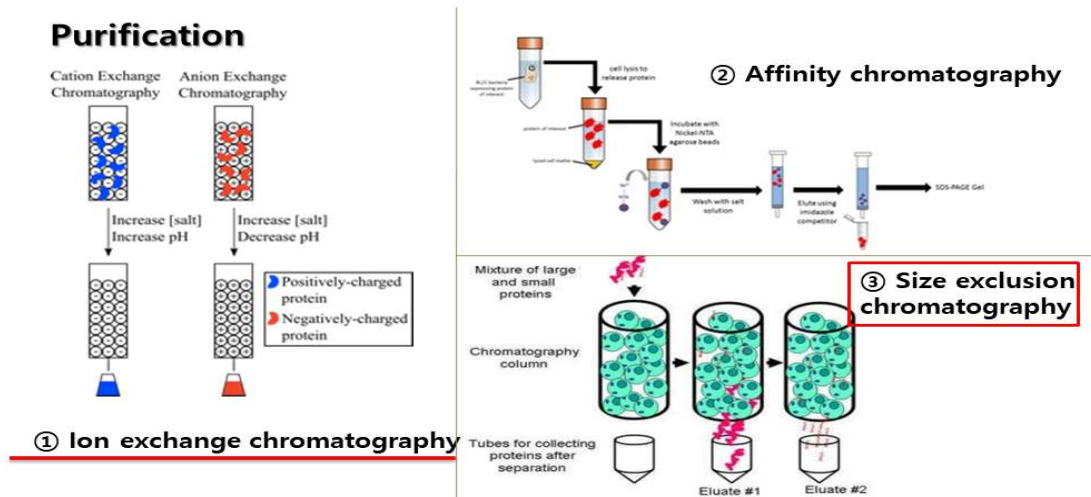
- ① 얼음 10g을 넣은 후 냉동실에서 10 min간 정치시킴
- ② 실온에서 녹인 후 아세톤 침지법으로 단백질을 침지시킴
- ③ Nanoliter osmometer를 사용하여 Thermal hysteresis (TH) activity를 측정함
- ④ 동결건조시킨 후 5 mL의 62.5mM Tris-HCl (pH 6.8)을 넣어 재용해시킴
- ⑤ 0.45 μm filter paper로 여과함

(2) TCA 방법

- ① 상층액 양의 50% 1M 트리스염기를 첨가함
- ② pH를 약 1.5에서 7로 상승시킴
- ③ Nanoliter osmometer를 사용하여 Thermal Hysteresis (TH) activity 측정함
- ④ Sample을 4 $^{\circ}\text{C}$ 의 증류수에 대해 투석시킴
- ⑤ 회전 농축기로 농축함
- ⑥ 증류수로 희석함

(3) NH_4HCO_3 방법

- ① Sample을 4 $^{\circ}\text{C}$ 의 증류수에 대해 투석시킴
- ② Nanoliter osmometer를 사용하여 Thermal Hysteresis (TH) activity 측정함
- ③ 회전 농축기로 농축함
- ④ 증류수로 희석함

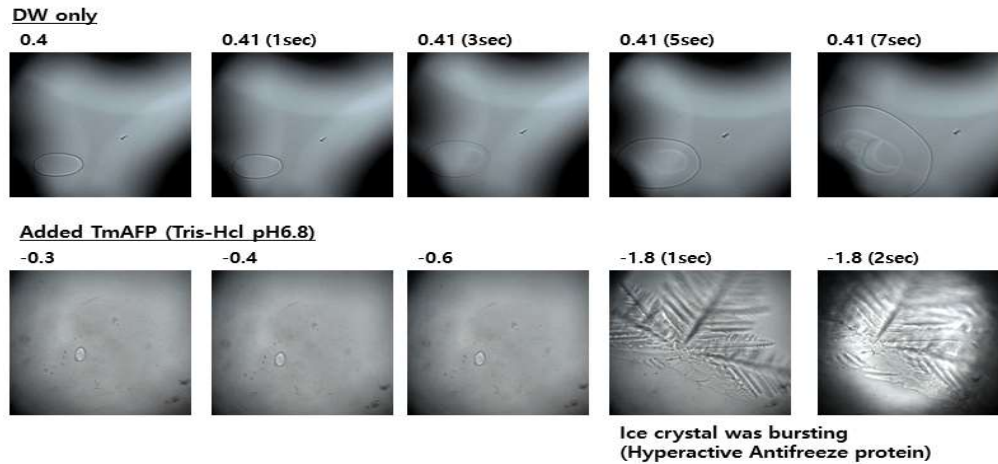


[Figure 12] 추출 정제 방법

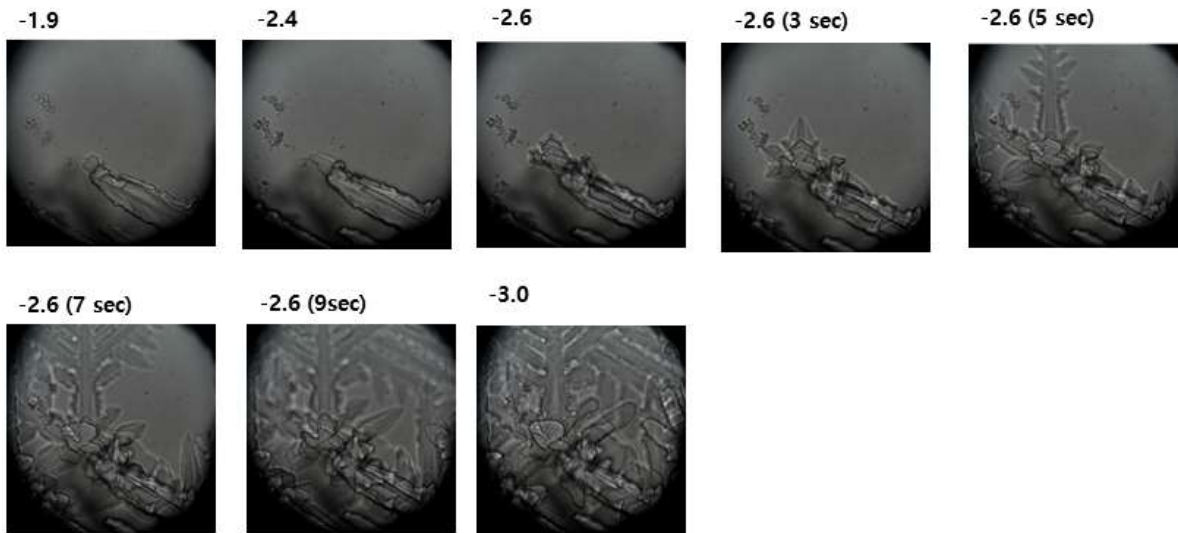
2) 추출버퍼에 따른 Antifreeze activity 확인

- 추출정제한 부동단백질을 1, 2, 5 및 10 mg/mL로 농도를 맞춰서 nanoliter osmometer 기기를 사용하여 얼음(ice)결정으로 형성되는 것을 확인하였음. Antifreeze activity 활성분석은 어류(fish)로부터 얻은 AFP를 이용하여 비교·분석하였으며, 밀웜 유래 부동단백질이 1mg/mL의 농도에서 약한 활성이 있는 것으로 나타나 우수하다고 판정하였음[Figure 13].

Thermal hysteresis activity



Added TmAFP (0.1M NH₄HCO₃)



[Figure 13] 추출버퍼(DW, Tris-HCl, TCA, NH₄HCO₃)에 따른 Antifreeze protein activity

3) 침전 용매에 따른 AFP 수율

- Nano-drop 기계를 사용하여 농도가 높은 fraction을 모았으며, Ice-affinity protein을 샘플과 아세톤의 양을 1:4로 하여 아세톤침지법으로 12시간 침지시켰음. 시료는 원심분리기를 이용하여 12,500g, 10 min에서 원심분리하여 침전물을 얻었으며, 상층액은 버리고 pellet 부분만 아세톤이 증발할 때까지 건조시켰음. 건조된 샘플은 동결건조 시켰으며, 동결건조된 샘플은 Alcohol 및 Acetone의 용매를 사용하여 침전시킨 후 수율을 확인하였음. 그 결과, Acetone으로 침전시켰을 때 추출수율이 10.88%로 10%가 넘는 반면 Alcohol 침전의 경우 추출수율이 8.96%로 10%미만으로 나타났음.

4) 용매를 이용하여 침전 후 용매 탈취 과정

- Alcohol 및 Acetone 용매를 사용하여 단백질을 침전시킨 후 Hood 안에서 침전물이 마르고 용매 냄새가 나지 않을 정도로 용매를 증발시켜주었음.

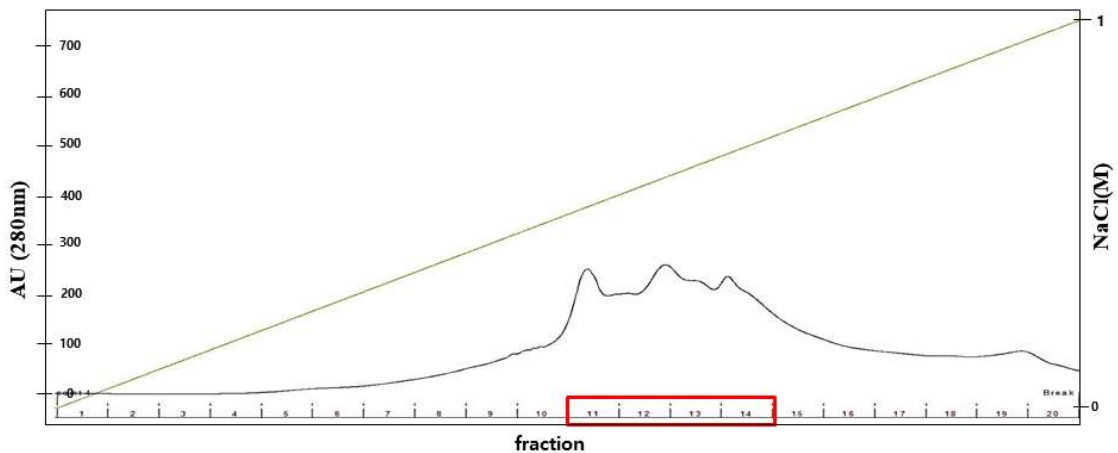
5) 이온컬럼 공정

- 동결건조시킨 샘플을 62.5mM Tris-HCl (pH 6.8) 10mL에 충분히 용해시킨 후 0.45 μ m filter를 이용하여 여과하였으며, 여과액은 HiTrap Q HP column을 이용하여 분리하였음. 0~1.0M NaCl을 1mL/min로 gradient 걸어서 fraction을 1mL씩 얻었음.

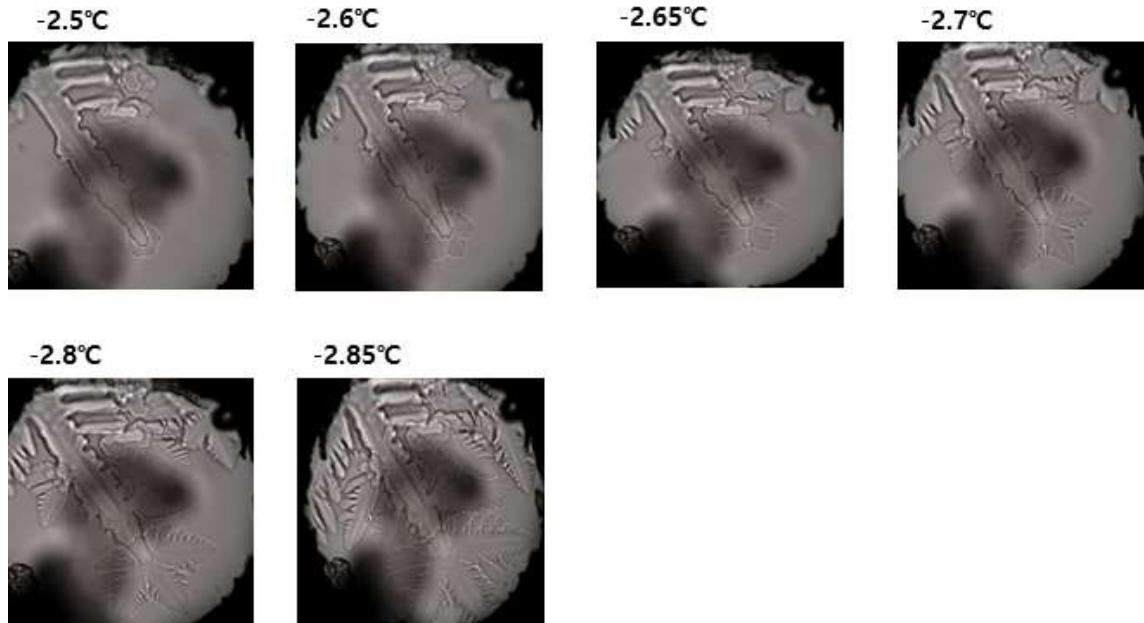
A buffer	62.5mM Tris-HCl (pH 6.8)
B buffer	62.5mM Tris-HCl 1M NaCl (pH 6.8)
▪ Conditions :	
Flow rate	1mL/min
Pressure	1mPa
Fraction size	1mL/min
Equilibrium	10mL
Wash 1 volume	10mL
Sample volume	1mL
Wash 2 volume	20mL

- 280nm 파장에서 흡광도(absorbance)값을 측정하였으며, 측정값은 prime view에서 보이는 결과와 비교하였음. 흡광도에서 높게 측정된 값과 prime view에서 보이는 결과를 비교하였을 때 일치하는 fraction을 모아서 온도이격(Thermal hythesis, TH)을 측정하였으며, 염을 제거하기 위해 투석을 실시하였음[Figure 14,15].

Ion exchange column peak



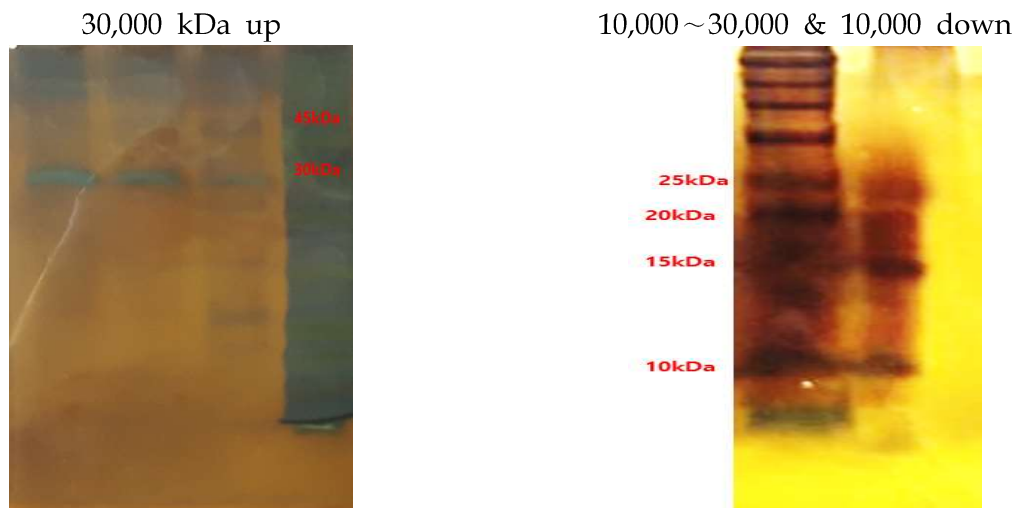
[Figure 14] Ion Exchange (Acetone) column peak



[Figure 15] Ion Exchange column fraction (11-14) AFP activity

6) 분자량에 따른 AFP 농축

- 전기영동을 실시하여 단백질을 분리하였으며, 30 kDa과 45 kDa 밴드부분을 확인할 수 있었음. Amicon tube를 사용하여 농축범위 30,000 kDa이상, 10,000~30,000 kDa, 10,000 kDa이하로 농축하였음[Figure 16].



✓ lane 1-3은 같은 샘플로서 30 kDa에서 밴드가 보이는 것을 확인할 수 있었음.

✓ 10,000~30,000사이에서는 20 kDa, 15 kDa에서 밴드를 볼 수 있었으며, 10,000 kDa 밴드는 10 kDa에서 확인할 수 있었음.

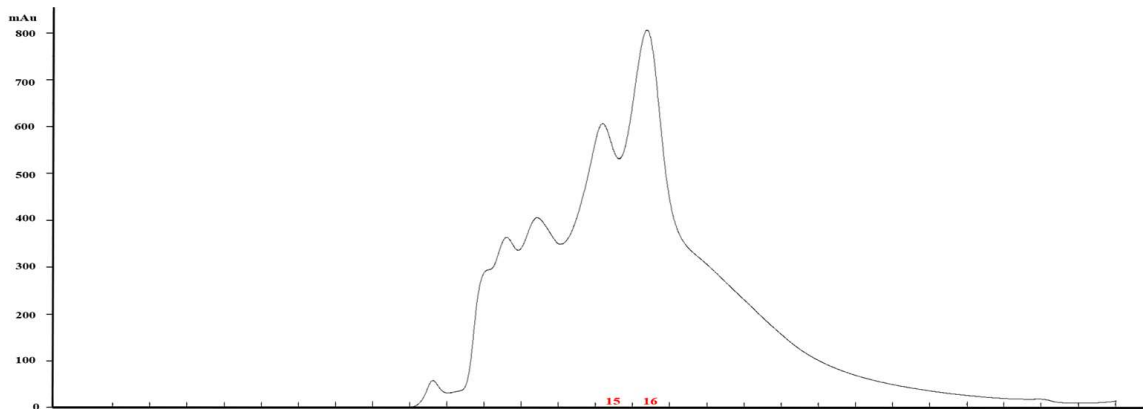
[Figure 16] 부동단백질 정제 후 분자량 확인

7) Gel permeation Chromatography 공정

- Buffer A (62.5mM Tris-HCl (pH 6.8))를 사용하여 FPLC를 실시하였으며, TH 측정에서 활성을 보이는 fraction을 모아서 gel permeation Chromatography를 하였음. FPLC peak를 토대로 fraction 단백질을 모았음.

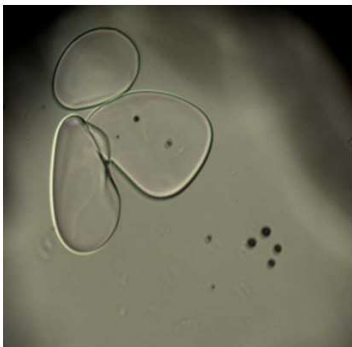
8) 분자량에 따른 AFP activity 평가

- 분자량에 맞게 농도를 맞춰서 AFP 활성을 측정하였으며, 그 결과 농축범위마다 AFP 활성을 보였으며 30,000 kDa위의 활성이 가장 좋게 나타났음. 또한 높은 값을 보이는 fraction (15, 16 fraction, 10mL)을 모아서 농축 후 전기영동을 실시하여 antifreeze activity를 측정하였음[Figure 17].



✓ Gel permeation chromatography - 15, 16에서 가장 높은 농도를 보여줌.

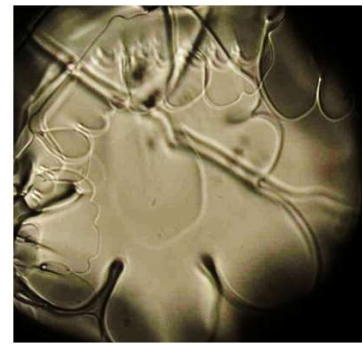
-0.2°C



-0.25°C



-0.45°C

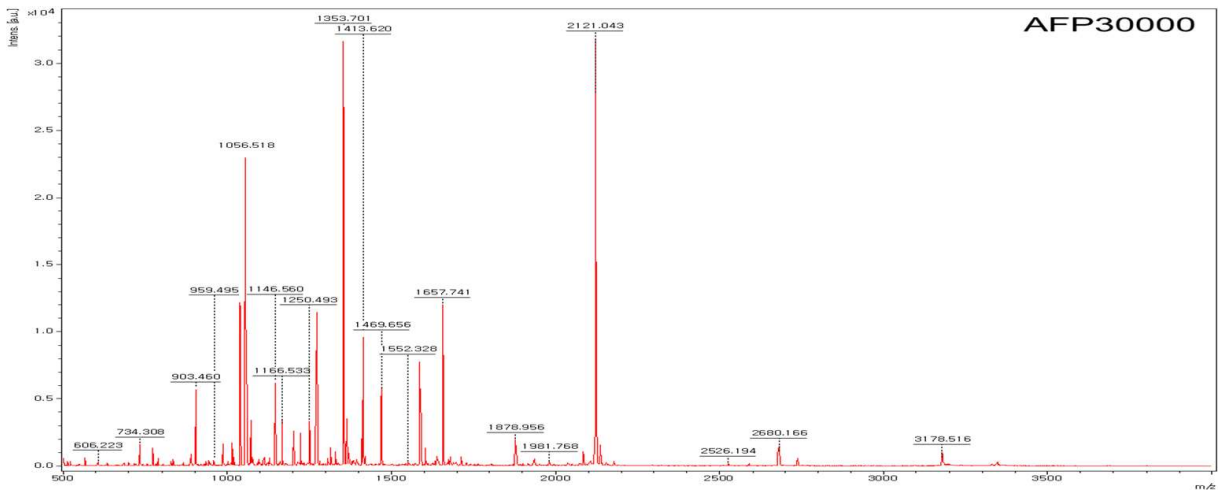


✓ Gel permeation chromatography - 15, 16에서 0.25°C의 활성을 보였음.

[Figure 17] Gel permeation chromatography 공정 및 AFP 활성 평가

9) MALDI TOF 분석

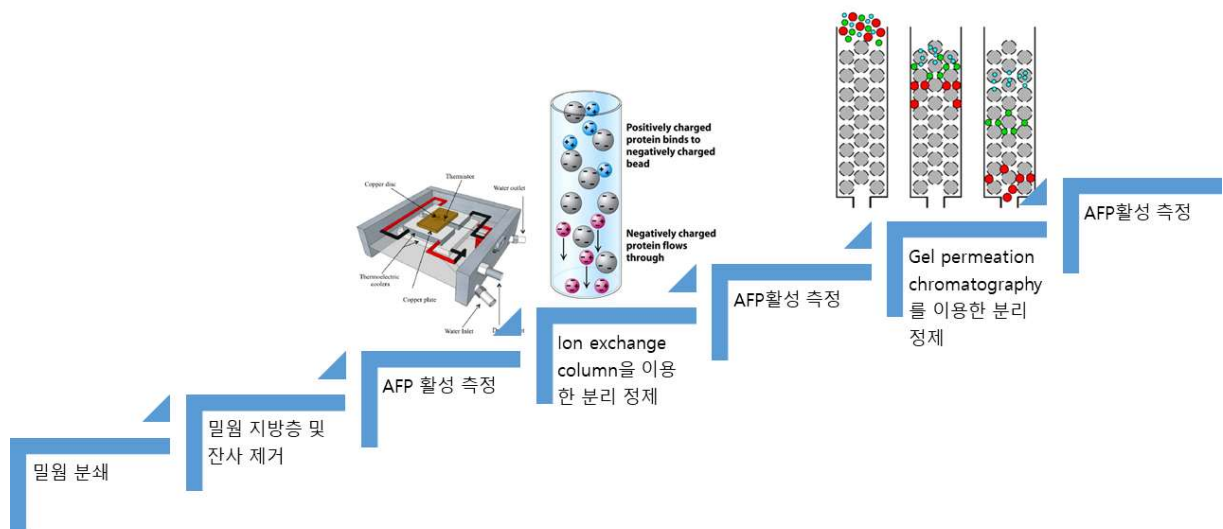
- Antifreeze 활성이 0.25°C에서 활성을 보이는 것을 확인하여 MALDI TOF로 단백질 분자량을 측정하였으며, 그 결과 수치값이 606.232, 734.308, 903.460, 959.495, 1056.518, 1146.560, 1166.533, 1250.493, 1353.701, 1413.420, 1469.656, 1552.328, 1657.741, 1878.956, 1981.768, 2121.043, 2526.194, 2680.165, 3178.516 m/z값으로 나타났음. 특히 1056.518, 1353.701, 및 2121.043 펩타이드가 얼음형성억제에 큰 역할을 한다는 것을 보여주었음[Figure 18].



[Figure 18] 정제된 AFP (분자량 30,000)의 MALDI TOF-MS 결과

○ Lab-scale에서의 밀웜 부동단백질 추출정제과정 표준화

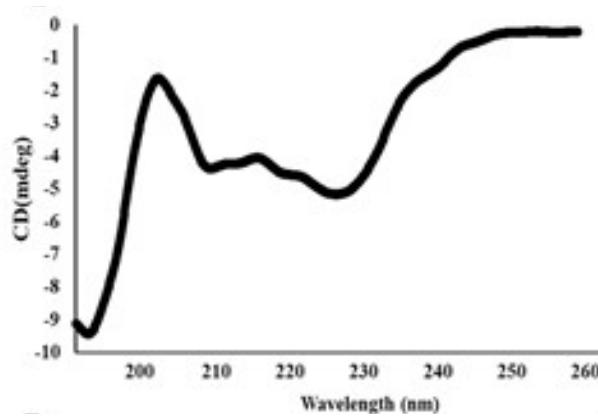
- 밀웜 정제 모식도를 토대로 밀웜을 62.5mM Tris-HCl (pH 6.8) 용액에서 분쇄 후 filter paper로 여과하였으며, 여과액은 원심분리기를 이용하여 원심분리(100,000xg 30 min, 4℃) 시킨 후 0.45 μ m filter를 이용하여 지방층을 제거한 후 탈염컬럼을 이용하여 탈염처리하였음.
- 이온컬럼을 이용하여 Antifreeze-active fractions은 1M NaCl에서 용출됨을 확인하였으며, FPLC에서 UV 280nm에서 30 kDa Antifreeze 단백질을 확인하고 Antifreeze activity를 분석하였음. Affinity Chromatography 정제 순도를 올렸으며, 사전 실험을 통해 AFP 정제 과정 표준화 작업을 표준화시켰음[Figure 19].



[Figure 19] 밀웜 부동단백질 추출정제 모식도

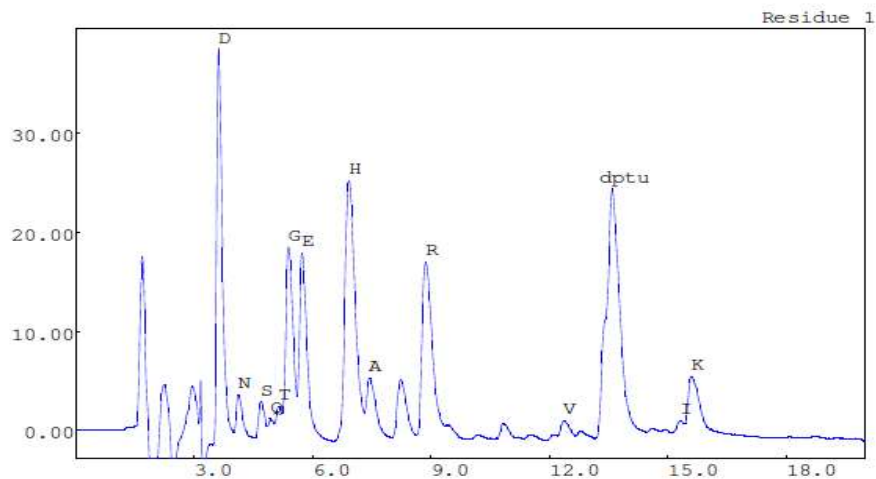
○ Lab-scale에서의 밀웜 부동단백질 추출정제과정 시스템 구축 및 구조확인

- 밀웜 분쇄후 단백질을 침전시킨 결과 추출수율은 10.88%로 10%가 넘는 결과를 나타내었으며, 밀웜의 20%를 차지하는 지방의 탈지 전 및 후의 Antifreeze 단백질 추출수율을 분석하였음.
- 분리·정제한 Antifreeze 단백질을 이용하여 N-terminal sequencing을 실시하였으며, 온도별로 circular dichroism spectrum을 실시하여 단백질의 구조를 예측하였음[Figure 20,21].



✓ CD spectrum - 단백질의 먼 UV spectrum은 특이하며 230nm 및 207nm에서 음의 최대치에 의해 지배됨. 230nm 대역은 207의 특징보다 훨씬 더 넓었으며, 실제로 광범위한 음 대역은 다양한 유형의 β-턴과 관련이 있음.

[Figure 20] AFP의 CD spectrum 결과



✓ N-terminal sequencing - 밀웜의 sequence는 부분적으로 확인(Asp, His, Arg, Gly, Glu, Ala, Lys, Ser, Asn, Thr, Gln, Val 및 Ile)하였음. 그러나 밀웜에는 Cysteine이 많아 Full sequence를 분석할 수 없었음.

[Figure 21] AFP의 N-terminal sequencing 결과

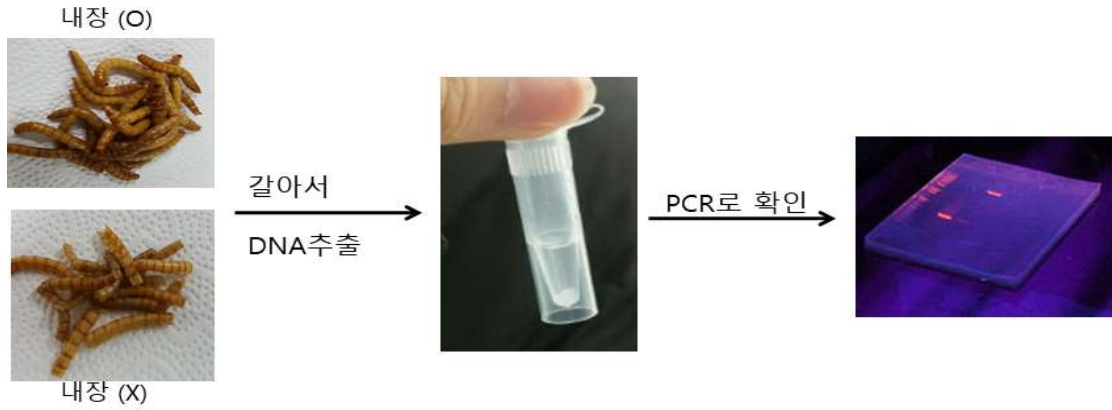
○ 밀웬 부동단백질의 효모벡터 시스템을 이용한 대량생산 공정 구축

- 밀웬은 내장을 제거하지 않은 것과 내장을 제거한 것의 2개의 샘플을 준비하였음. 각각의 샘플은 Quiagen의 genomic DNA kit를 사용하여 genomic DNA를 추출하였으며, 추출한 DNA는 sepctrophotometer에서 DNA를 정량하고 DNA template로 사용하였음. AFP를 위한 프라이머를 사용하여 Gradient PCR을 실시하였음. 이때 사용한 프라이머는 제작한 7KSK4로 Pichia vector를 이용하여 PCR을 증폭시켰음. PCR조건은 98℃ 1 min, 98℃ 10sec, 60℃ 5 sec, 72℃ 15 sec, 72℃ 5 min임.

- PCR product 일부를 전기영동(15%)하여 증폭여부 및 사이즈를 확인하였으며, 확인된 나머지 PCR product를 PCR prep kit를 사용하여 Purification하였음. LB에 vector를 키워서 plasmide prep하고 dual-cutting을 37℃에서 1~2 hr 정도하였음. 각 샘플은 PCR prep kit를 사용하여 PCR prep을 하였음.

- Cloning 된 vector를 transformation 및 분리정제하였음. 7KSK4_Pichia vector를 DH5-a 및 GS-115의 competent cell에 transformation 하였으며, transformation된 vector를 ion, size exclusion column 등을 사용하여 분리정제 실시하였음[Figure 22,23].

Forward primer	GGAATTCATATGATGTGTACTTTACAAAAAATTG
Reverse primer	CCGCTCGAGCTACTAAATGTCCGGGACATCC
▪ Conditions :	
98℃	1 min
98℃	10 sec
60℃	5 sec
72℃	15 sec
72℃	5 min

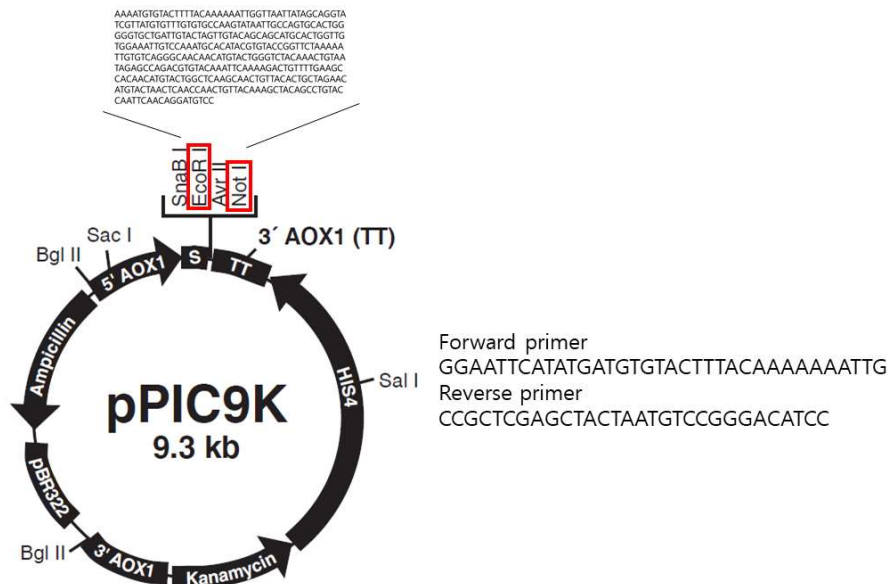


✓ Genomic DNA를 추출하여 PCR로 확인하였으며, Antifreeze protein 7KSK4의 Forward, Reverse primer를 통해 PCR을 진행하였음.



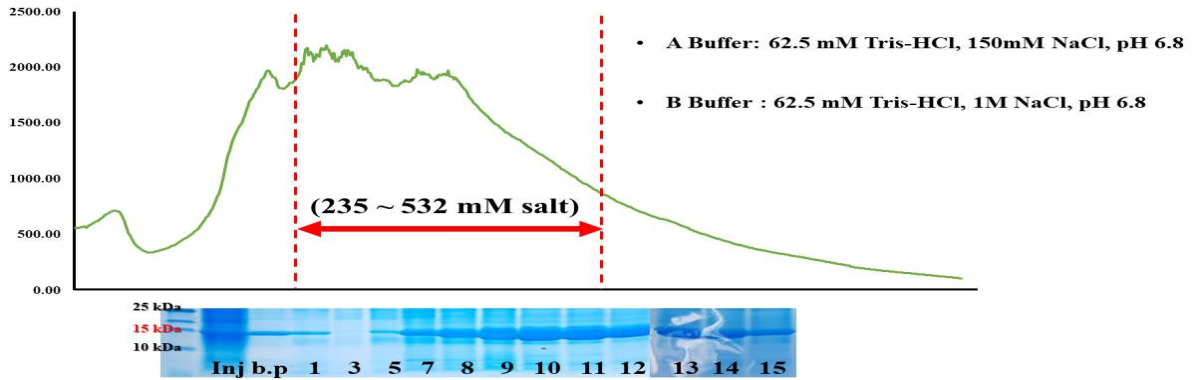
✓ Agarose gel electrophoresis of the RNA. Lanes 1-6: Lanes "ladder" were loaded with the 1kb

```
atgtgta ctttacaaa aaattggtta attatagcag gtatcggtat gtgtttgtgt gccaagtata attgccagtg cactgggggt
gctgattgta ctagtgttac agcagcatgc actggttgtg gaaattgtcc aaatgcacat acgtgtaccg gttctaaaaa
ttgtgtcagg gcaacaacat gtactgggtc tacaactgt aatagagcca cgacgtgtac aaattcaaaa gactgttttg
aagccacaac atgtactggc tcaagcaact gttactctgc tagaacatgt actaactcaa ccaactgtta caaagctaca
gctgtacca attcaacagg atgtcccgga cattag
```



✓ pPIC9K vector 및 sequence

[Figure 22] 효모벡터시스템



✓ Genomic DNA를 추출한 후 Antifreeze protein 7KSK4의 primer를 사용하여 PCR로 증폭 및 확인하였음. 이후 size exclusion chromatography를 실시하였지만, 분리정제 중 침전이 계속되었음.

[Figure 23] Yeast vector의 Ion exchange chromatography 결과

○ 밀웬 부동단백질 대량생산 시스템 확립 및 정제과정 구축

○ Lab-scale에서의 부동단백질 추출 및 정제 기술 검토

- Lab-scale에서의 부동단백질 추출 및 정제 기술을 검토하였으나 식품 원료로서 사용하기에는 유기용매 사용 등에 대한 한계가 있었음. 이에 식품 원료로서 사용하기 위한 추출방법(에탄올 추출) 및 정제 공정을 셋업(set-up)하였음.

○ 식품에서 사용 가능한 추출 및 정제 기술 공정 셋업(lab-scale set up)

- 50% 에탄올을 이용하여 밀웬 추출 후 이온 크로마토그래피를 이용한 부동단백질 조정제

▪ 실험방법

1) 추출

: 밀웬과 50%에탄올을 혼합(밀웬 50g/100mL 50%에탄올)후 5 min 간 분쇄하고 원심분리(2,100xg 30min, -4℃)하여 상등액을 필터(Whatman No.1)하였음. 에탄올 제거를 위한 투석을 6시간 이상 진행하고 동결건조 진행함.

2) 1차 DEAE-Sephadex를 이용한 Chromatography

: 추출물 500mg의 0.05M Tris-Buffer (pH 8.0) with 0.1M NaCl에 충분히 녹이고 DEAE-Sephades resin을 충전한 컬럼(250 x 25mm)에 로딩한 후 0~0.3M의 NaCl을 넣어 정제하였음. 완료 후 Abs 230nm에서 결과를 확인하고, 완료된 시료들은 투석 후 동결건조를 진행하여 -20℃에서 보관하며 실험에 사용하였음.

3) 2차 DEAE-Sephadex를 이용한 Chromatography

: 동결건조된 단백질은 50mg/mL로 0.05M Tris (pH 8.0)에 녹여준 후 DEAE-Sephadex resin(sigma aldrich)을 충전한 컬럼(25 x 250mm)에 로딩한 후 0~0.3M NaCl

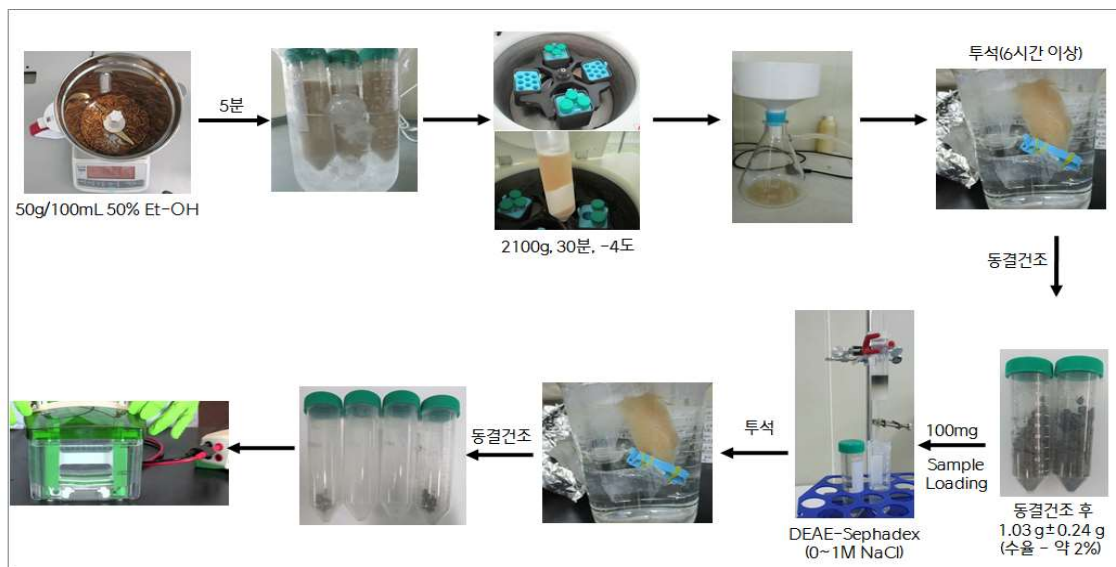
로 정제하였음. 정제완료 후 Abs 230 nm에서 결과를 확인하고, 완료된 시료들은 투석 후 동결 건조를 진행하여 -20℃에서 보관하며 실험에 사용하였음.

4) 전기영동

: 정제된 단백질의 순도를 확인하기 위하여 Sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel(SDS-PAGE)방법을 이용하였음. 동결건조된 시료를 증류수에 잘 녹인 후 5 x samper buffer(100mM Tris-Cl pH6.8, 200mM DTT, 0.1% BPB, 5% SDS, 25% glycerol, 5% β-mercaptoethanol)를 혼합한 후 95℃에서 5 min 간 denaturing 하였음. 10μl의 위의 시료(최종 단백질 농도 7.5~15μg/mL)를 20% SDS-PAGE에 주입 후 전기영동 완충용액(25mM Tris, 192mM Glycine, 1% SDS)으로 전기영동하여 Coomassie brilliant blue 염색액(0.29% coomassie brilliant blue R250, 45% methanol, 10% glacial acetic acid)으로 염색 후 탈색액(45% methanol, 10% glacial acetic acid)으로 탈색하여 분석하였음.

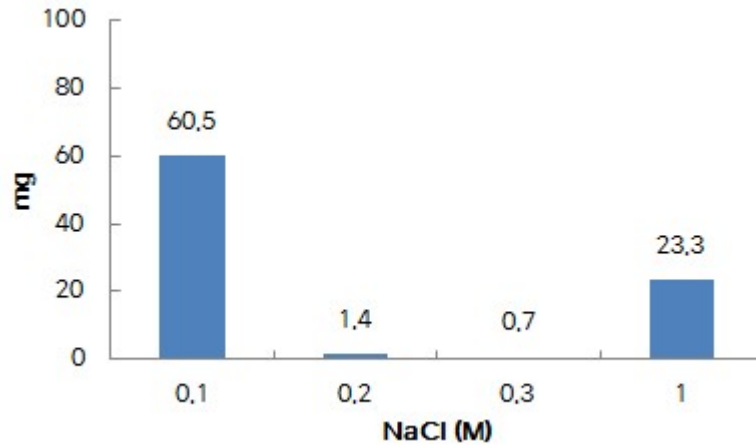
5) 부동단백질 활성 분석

: 정제된 부동단백질 활성을 분석하기 위하여 Nanoliter osmometer (nanolitre osmometer, Otago Osmometers Ltd, NewZealand)를 사용하였음. 샘플 챔버 내에 immersion oil을 채운 후 측정 시료를 오일 위에 올려둠. 샘플 챔버를 스테이지에 올려놓고 -20℃로 급속냉동 시키고 온도를 천천히 상승시켜 얼음 결정이 대부분 녹고 관찰 대상 결정만을 남겼음. 다시 스테이지의 온도를 천천히 내리면서 얼음 결정이 형성되는 것과 온도(melting temperature)를 관찰 및 측정하였음. 온도가 하강해도 얼음 결정이 커지지 않고 유지하다가 급격히 결정이 성장하는 온도를 (freezing temperature) 측정하여 결빙방지 활성(Thermal hysteresis)을 분석하였음[Figure 24].



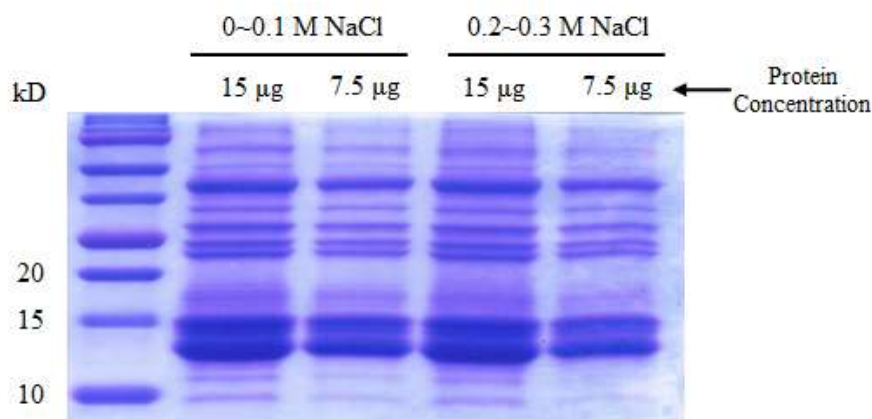
[Figure 24] 밀웬 추출방법 및 정제법 도식도

- 50% 에탄올을 사용하여 추출한 밀웬 동결건조물을 DEAE-column에 1차 조정제하고 동결 건조 후 수득물을 확인할 결과 [Figure 18]과 같음. 100mg의 밀웬 추출물을 로딩하여 NaCl 0.1~1M로 처리한 후 최종 수득물은 0.1M NaCl을 사용하여 처리하였을 때가 가장 높은 수득률을 나타내었으며(0.1M - 60.5%, 0.2M - 0.14%, 0.3M - 0.7%, 1M - 23.3%), 0.2~0.3M의 수득률은 지극히 낮거나 거의 없는 것으로 나타남[Figure 25].



[Figure 25] 1차 DEAE-column 분리 후 수율

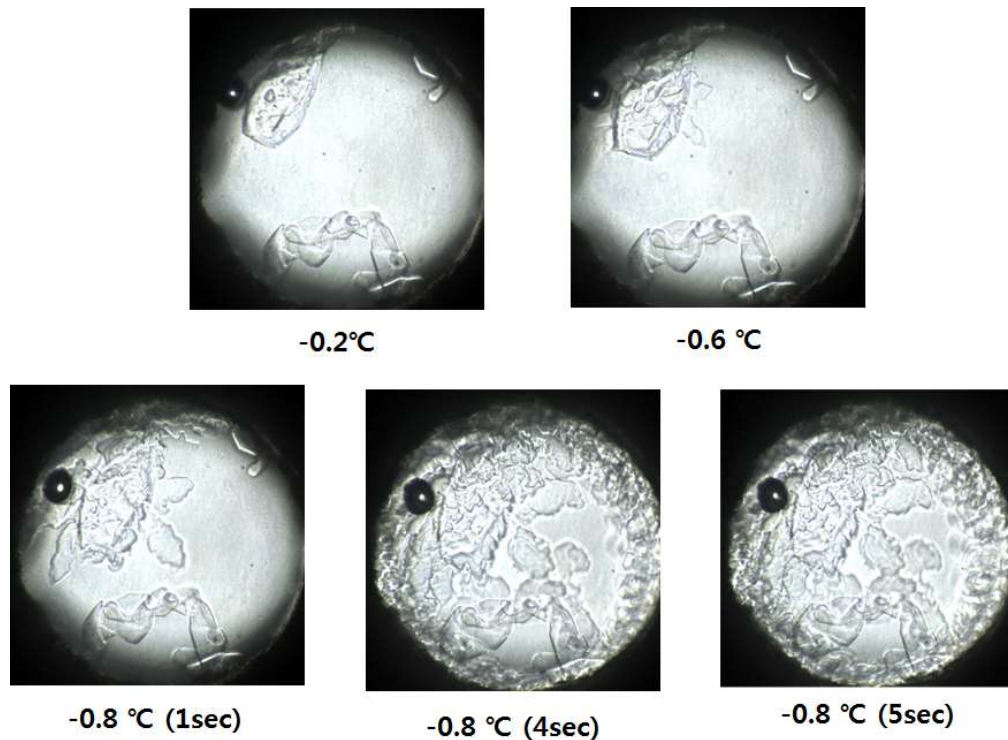
- DEAE-column으로 1차 분리된 단백질의 profile을 확인하기 위하여 20% SDS-PAGE에 전기영동한 결과 [Figure 19]와 같음. NaCl 0.1~0.3M의 전기영동 결과 모두 동일한 단백질 profile을 가지고 있는 것으로 나타남. 이에 차후 연구에 사용되어지는 조정제 건조물은 0.3M 한가지 농도를 이용하여 조정제 후 연구에 사용함[Figure 26].



[Figure 26] 1차 DEAE-column을 이용한 분리 후 SDS-PAGE 결과

- 얼음 결정의 성장을 방지하는 특성을 이용한 부동단백질 활성 분석
 - 조정제 밀웬 추출물의 부동단백 활성을 측정한 결과 약 0.6°C 정도로 나타남.

- 부동단백질은 일반적으로 얼음 결정의 특정 면에 결합하여 얼음 결정의 성장을 억제하는 특징을 가짐. 이러한 부동 단백질의 특성을 고려하여 부동단백질 활성을 Nanoliter osmometer 로 분석한 결과 [Figure 27]와 같음. 1차 조정제에서 0.1~0.3M로 수득된 추출물 10mg/mL의 부동단백질 활성은 약 0.6°C로 나타남.



[Figure 27] Nanoliter osmometer를 이용한 얼음결정 측정

○ 밀웜을 이용한 부동단백질 추출, 정제 및 활성 측정

▪ 실험방법

1) Gene Information

#	Gene Symbol	Accession No. (Species)	기타
1	7KSK4	DQ224368	
2	YL-1	AF160494	
3	THP12	U24237	
4	BST1	DQ224365	
5	BST2	DQ224366	
6	BST3	DQ224367	
7	RpL27A	X992044	Reference gene

2) RNA isolation

RNA isolation kit : RNeasy Plus Mini Kit (Qiagen, Cat.74136)

DNase treatment : RNase-Free-DNase Set (Qiagen, Cat.79254)

Elution volume : 40 μ l

3) Reverse Transcription

RNA concentration 1 μ g

RT Rxn 20 μ l / rxn

RT premix AccuPower [®] Rocketscript[™] Cycle RT

Premix (Cat.K-2201) Primer Oligo dT (20mer)

RT condition (37°C 30sec, 48°C 4min, 55°C 30sec) x 12 cycles, 95°C 10min

PCR machine MyGenie [™] 96 Gradient Thermal Block (Cat.A-2040-1)

4) qPCR

Template cDNA 5 μ l (1/5 dilution)

PCR premix AccuPower [®] 2X GreenStar Master Mix (Cat.K-6253)

PCR Rxn. 50 μ l / rxn PCR condition

Step 1 : 95°C 10 min

Step 2 : (95°C 5 sec, 58°C 25 sec, 72°C 30 sec) x 40 cycles /scan

Step 3 : 65°C 5 min

Step 4 : melting curve analysis 65~95°C (1°C/sec)

PCR machine Exicycler [™] 96 Real-Time Quantitative Thermal Block (Cat.A-2060)

5) 추출

: 밀워과 50%에탄올을 혼합(밀워 50g/100mL 50%에탄올)후 3 min 간 분쇄하고 원심분리(2,100xg, 30min, -4°C)하여 상등액을 필터(Whatman No.1)하였다. 에탄올 제거를 위한 투석을 6시간 이상 진행하고 동결건조 진행함.

6) DEAE-Sephadex를 이용한 Chromatography

: 추출물 1g의 0.05M Tris-Buffer (pH 8.0) with 0.1M NaCl에 충분히 녹여 준 후 DEAE-Sephades resin을 충전한 컬럼에 로딩한 후 0~1M의 NaCl을 넣어 정제하였다. 완료 후 Abs 230nm에서 결과를 확인하고, 완료된 시료들은 투석 후 동결건조를 진행하여 -20°C에서 보관하며 실험에 사용하였다.

7) 전기영동

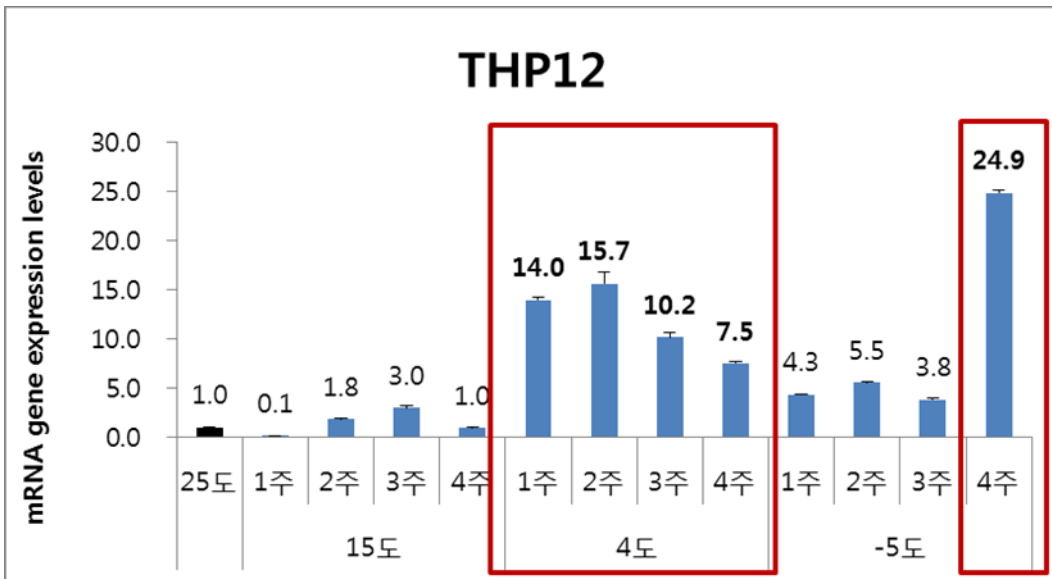
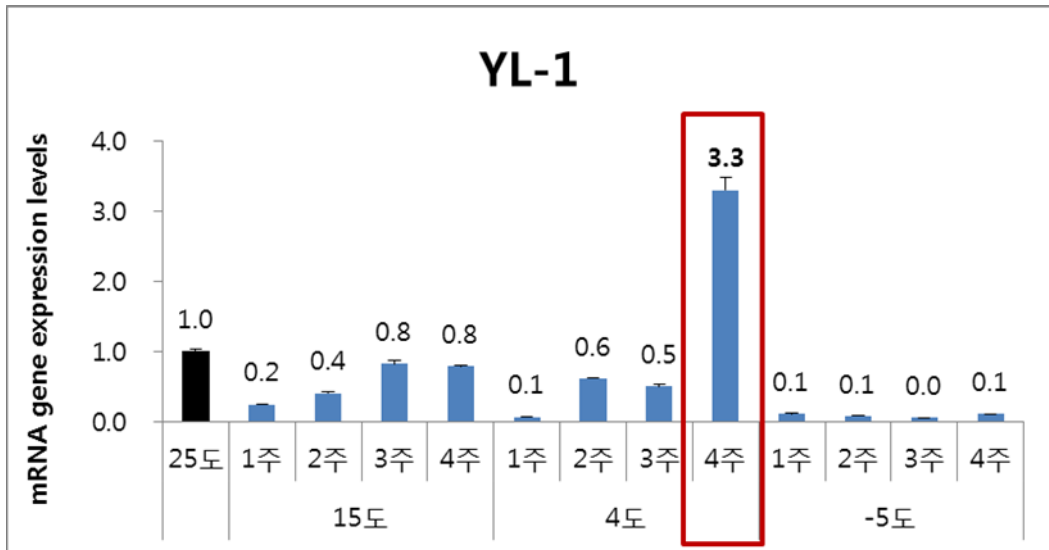
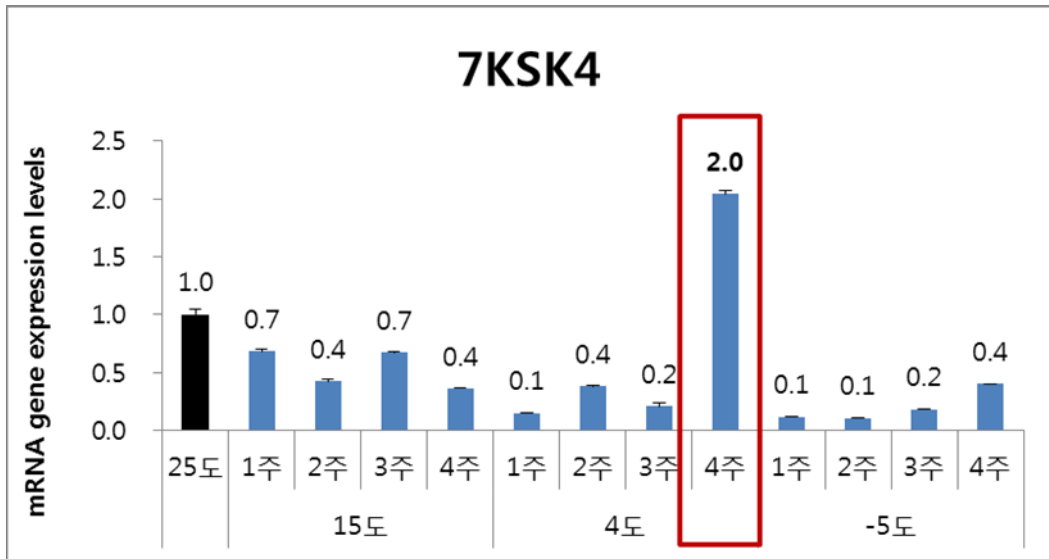
: 정제된 단백질의 순도를 확인하기 위하여 Sodium dodecyl sulfate-poyacrylamide gel(SDS-PAGE)방법을 이용하였다. 동결건조된 시료를 증류수에 잘 녹인 후 5 x samper buffer(100mM Tris-Cl pH6.8, 200mM DTT, 0.1% BPB, 5% SDS, 25% glycerol, 5% β -mercaptoethanol)를 혼합한 후 95°C에서 5 min 간 denaturing 하였다. 10 μ l의 위의 시료(최종 단백질 농도 7.5~15 μ g/mL)를 20% SDS-PAGE에 주입 후 전기영동 완충용액(25mM Tris, 192mM Glycine, 1% SDS)으로 전기영동하여 Coomassie brilliant blue 염색액(0.25% coomassie brilliant blue R250, 45% methanol, 10% glacial acetic acid)으로 염색 후 탈색액(45% methanol, 10% glacial acetic acid)으로 탈색하여 분석하였다.

8) 부동단백질 활성 분석

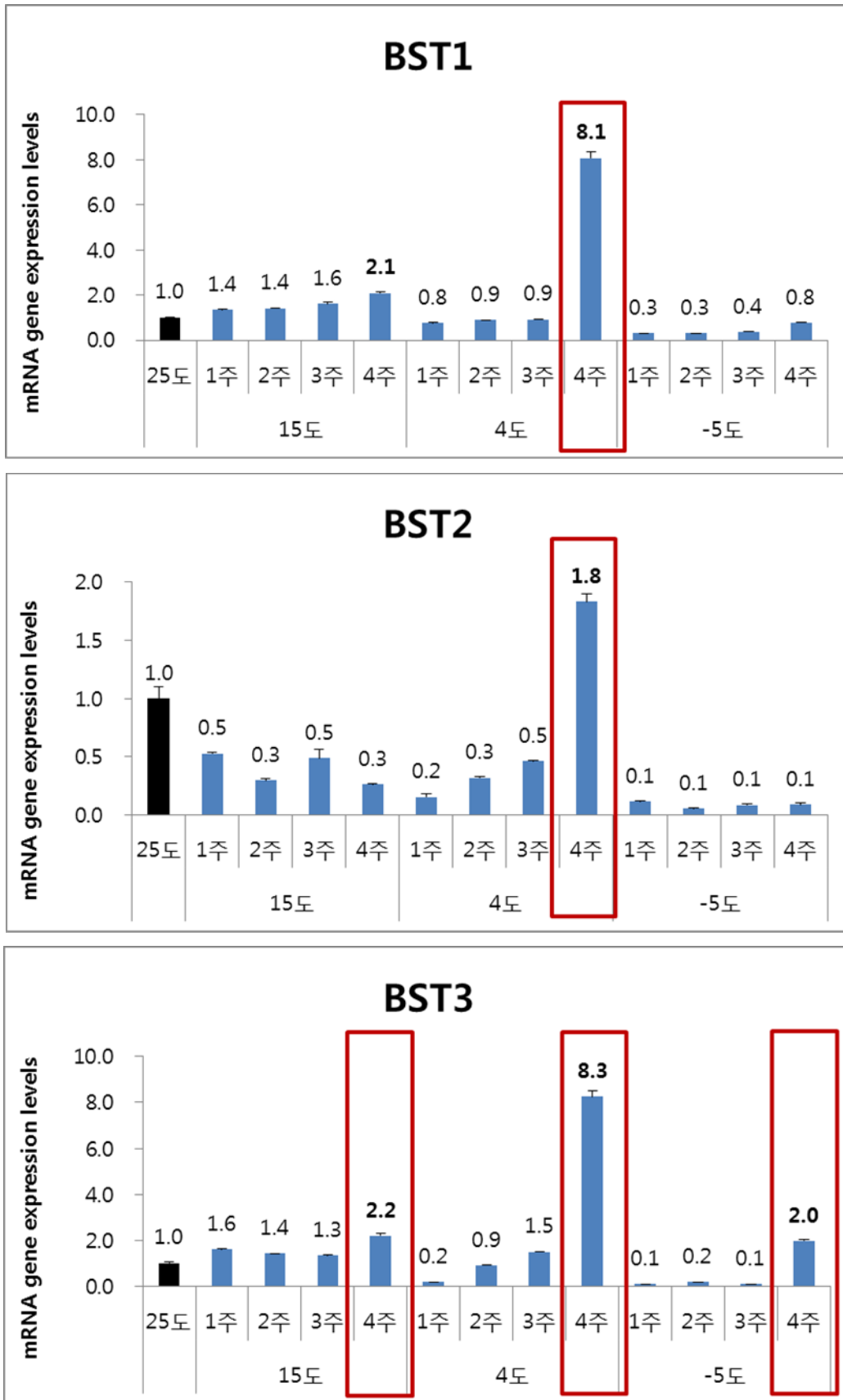
: DEAE-Sephadex로 분리된 단백질 중 순도가 가장 높은 5번 분획물의 부동 단백질 활성을 분석하기 위하여 Nanoliter osmometer (nanolitre osmometer, Otago Osmometers Ltd, NewZealand)를 사용하였음. 샘플 챔버 내에 immersion oil을 채운 g 측정 시료를 오일 위에 올려두었음. 샘플 챔버를 스테이지에 올려놓은 후 -20℃로 급속냉동 시키고 온도를 천천히 상승시켜 얼음 결정이 대부분 녹고 관찰 대상 결정만을 남겼음. 다시 스테이지의 온도를 천천히 내리면서 얼음 결정이 형성되는 것과 온도(melting temperature)를 관찰 및 측정하였음. 온도가 하강해도 얼음 결정이 커지지 않고 유지 하다가 급격히 결정이 성장하는 온도(freezing temperature)를 측정하여 결빙방지 특성(Thermal hysteresis)를 분석하였음.

(1) 온도별 사육조건에 따른 밀웜의 부동 단백질 관련 mRNA 발현량 검증

- 온도별(-5, 4, 15 및 25℃)의 사육조건에 따른 밀웜의 부동 단백질 관련 mRNA 발현량 검증을 진행한 결과, 4℃에서 4주간 사육한 밀웜이 다른 사육 조건의 밀웜보다 7KSK4, YL-1, BST(1,2,3)에서 높은 발현량을 나타내었으며, THP12와 같은 경우 4℃ 및 -5℃ 모두 25℃, 15℃에서 사육한 밀웜에 비교하여 높은 발현량을 나타내었음. 이와 같은 결과로 보아 부동단백질의 다량 발현을 위해서는 4℃에서 4주간 사육을 진행하는 것이 가장 효율적일 것으로 사료됨[Figure 28].



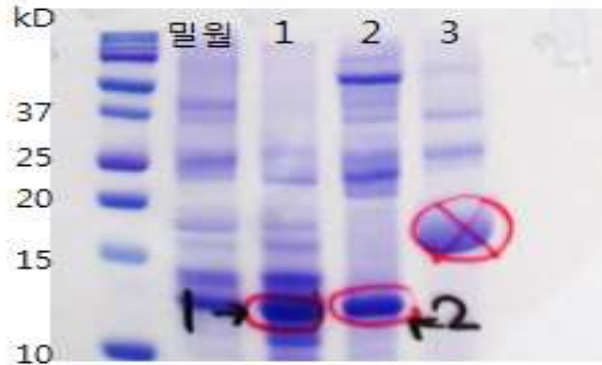
[Figure 28-1] 온도별 사육조건에 따른 밀웜 부동단백질 관련 mRNA 발현량 검증결과



[Figure 28-2] 밀웬 사육 온도 및 기간에 따른 부동단백질 관련 mRNA 발현량 변화 결과

(2) Protein sequence를 이용한 활성 단백질 분리 분석

- Protein sequence를 이용한 활성 단백질을 분리하고자 lab-scale Ion exchange(NaCl 0~0.3M)을 이용하여 분획 후 전기 영동하여 단백질 sequence 분석을 진행하였음. 진행결과 gel 1, 2번 밴드에서 THP12에 해당하는 유사 단백질을 확인하였음[Figure 29], <Table 3>.



[Figure 29] Ion exchange (NaCl 0~0.3M)을 이용하여 분획 후 전기 영동 결과

<Table 3> 단백질 sequence분석 결과

gel 1									
Hit	Acc#	Description	Score	MW	Matches (#)	Seq (#)	m/z	Score_pep	e-value_pep
1	A0A077D0C3	Glutathione S-transferase sigma OS=Tenebrio molitor GN=GSTs2 PE=2 SV=1	176	23536	8	5	809.9246	57.98	1.90E-06
1	A0A077D0C3	Glutathione S-transferase sigma OS=Tenebrio molitor GN=GSTs2 PE=2 SV=1	176	23536	8	5	839.8914	37.44	0.00018
1	A0A077D0C3	Glutathione S-transferase sigma OS=Tenebrio molitor GN=GSTs2 PE=2 SV=1	176	23536	8	5	863.4012	33.44	0.00045
1	A0A077D0C3	Glutathione S-transferase sigma OS=Tenebrio molitor GN=GSTs2 PE=2 SV=1	176	23536	8	5	591.7993	23.53	0.0044
1	A0A077D0C3	Glutathione S-transferase sigma OS=Tenebrio molitor GN=GSTs2 PE=2 SV=1	176	23536	8	5	758.3682	20.35	0.0092
2	Q7YWD5	12 kDa hemolymph protein d OS=Tenebrio molitor PE=2 SV=1	89	13935	1	1	682.812	89.16	1.20E-09
3	A0A0C5BAY4	Odorant-binding protein 14 mRNA OS=Tenebrio molitor PE=2 SV=1	72	14697	6	4	866.4398	34.56	0.00035
3	A0A0C5BAY4	Odorant-binding protein 14 mRNA OS=Tenebrio molitor PE=2 SV=1	72	14697	6	4	686.8024	28.28	0.0015
3	A0A0C5BAY4	Odorant-binding protein 14 mRNA OS=Tenebrio molitor PE=2 SV=1	72	14697	6	4	802.3951	23.7	0.0043
3	A0A0C5BAY4	Odorant-binding protein 14 mRNA OS=Tenebrio molitor PE=2 SV=1	72	14697	6	4	750.8487	14.1	0.039
4	A1XG55	Putative trypsin-like proteinase OS=Tenebrio molitor PE=2 SV=1	61	26058	1	1	753.8671	60.94	8.10E-07
5	A0A0C5DAQ4	Chemosensory protein CSP12 mRNA OS=Tenebrio molitor PE=2 SV=1	50	14455	1	1	861.4013	50.1	9.80E-06
6	Q7YWD7	12 kDa hemolymph protein b OS=Tenebrio molitor PE=2 SV=1	46	14129	3	2	952.4637	36.07	0.00025
6	Q7YWD7	12 kDa hemolymph protein b OS=Tenebrio molitor PE=2 SV=1	46	14129	3	2	690.301	22.16	0.0061
7	A0A076G467	Superoxide dismutase [Cu-Zn] OS=Tenebrio molitor PE=2 SV=1	37	15802	2	2	712.3781	26.89	0.002
7	A0A076G467	Superoxide dismutase [Cu-Zn] OS=Tenebrio molitor PE=2 SV=1	37	15802	2	2	657.8532	23.22	0.0048
8	M9NKP6	Luciferin-regenerating enzyme (Fragment) OS=Tenebrio molitor PE=4 SV=1	33	22088	2	2	744.3811	27.02	0.0024
8	M9NKP6	Luciferin-regenerating enzyme (Fragment) OS=Tenebrio molitor PE=4 SV=1	33	22088	2	2	934.4742	19.18	0.012
9	A0A0C5BN17	Odorant-binding protein 17 mRNA OS=Tenebrio molitor PE=2 SV=1	29	15149	1	1	864.9357	28.99	0.0013
10	Q7YZB8	Cockroach allergen-like protein OS=Tenebrio molitor PE=2 SV=1	24	65441	1	1	622.3216	23.92	0.0041
11	Q7YWD0	13 kDa hemolymph protein c (Fragment) OS=Tenebrio molitor PE=2 SV=1	23	14443	1	1	764.8637	22.73	0.0053
12	Q7YWC9	13 kDa hemolymph protein d (Fragment) OS=Tenebrio molitor PE=2 SV=1	20	14729	1	1	682.8245	20.33	0.0093
13	A0A0U4ARJ8	Arginine kinase (Fragment) OS=Tenebrio molitor GN=ArgK PE=3 SV=1	20	27063	1	1	850.3886	19.71	0.011
14	A0A077CUX1	Glutathione S-transferase sigma OS=Tenebrio molitor GN=GSTs4 PE=2 SV=1	17	23371	1	1	585.7639	17.26	0.019
15	Q7YWD6	12 kDa hemolymph protein c OS=Tenebrio molitor PE=2 SV=1	15	13960	1	1	639.8124	15.2	0.03
16	Q7YWD4	12 kDa hemolymph protein e (Fragment) OS=Tenebrio molitor PE=2 SV=1	15	13833	1	1	826.4126	14.92	0.032
gel 2									
Hit	Acc#	Description	Score	MW	Matches (#)	Seq (#)	m/z	Score_pep	e-value_pep
1	Q7YWD5	12 kDa hemolymph protein d OS=Tenebrio molitor PE=2 SV=1	58	13935	1	1	682.8164	57.73	1.70E-06
2	A1XG83	Putative serine proteinase OS=Tenebrio molitor PE=2 SV=1	48	28133	1	1	786.3804	48.04	1.60E-05
3	Q7YWD7	12 kDa hemolymph protein b OS=Tenebrio molitor PE=2 SV=1	40	14129	3	2	952.4736	36.28	0.00024
3	Q7YWD7	12 kDa hemolymph protein b OS=Tenebrio molitor PE=2 SV=1	40	14129	3	2	690.3083	15.44	0.029
4	Q7YWD4	12 kDa hemolymph protein e (Fragment) OS=Tenebrio molitor PE=2 SV=1	23	13833	1	1	826.421	22.77	0.0053
5	P56634	Alpha-amylase OS=Tenebrio molitor PE=1 SV=1	17	51208	1	1	677.351	16.69	0.021
gel 3									
Hit	Acc#	Description	Score	MW	Matches (#)	Seq (#)	m/z	Score_pep	e-value_pep
1	Q7YZB8	Cockroach allergen-like protein OS=Tenebrio molitor PE=2 SV=1	844	65441	64	6	792.3851	96.03	2.50E-10
1	Q7YZB8	Cockroach allergen-like protein OS=Tenebrio molitor PE=2 SV=1	844	65441	64	6	622.3343	62.99	5.00E-07
1	Q7YZB8	Cockroach allergen-like protein OS=Tenebrio molitor PE=2 SV=1	844	65441	64	6	762.8879	31.82	0.00066
1	Q7YZB8	Cockroach allergen-like protein OS=Tenebrio molitor PE=2 SV=1	844	65441	64	6	1027.5145	27.62	0.0017
1	Q7YZB8	Cockroach allergen-like protein OS=Tenebrio molitor PE=2 SV=1	844	65441	64	6	1101.1036	22.87	0.0052
1	Q7YZB8	Cockroach allergen-like protein OS=Tenebrio molitor PE=2 SV=1	844	65441	64	6	1094.0939	20.86	0.0082
2	A1XG73	Putative serine proteinase OS=Tenebrio molitor PE=2 SV=1	38	28165	2	1	1174.2551	30.22	0.00095

(3) Pilot-scale에서의 밀웜 부동단백질 추출 및 정제과정 셋업

- 다량의 THP12 유사 단백질을 분리하기 위하여 하기의 pilot scale의 정제 방법에 따라 정제를 진행하였음. 그 결과 9개의 분획을 진행하였으며, 순도가 가장 높은 5번 분획물의 활성을 측정하였음.

NO.

- 1 냉동 밀웜 500g + 50%주정(-20℃ 냉동보관) 1000g 측정하여 그라인더에 투입



- 2 3 min 분쇄 진행 (최종 -10℃ 유지)



- 3 원심분리 진행 (8000rpm, 30 min, -4℃)



- 4 원심분리 후 상등액 회수 (원심분리가 잘 되지 않을 경우, Whatman No. 2 필터 페이퍼를 이용하여 여과)



- 5 에탄올을 제거하기 위한 투석 진행 6~12 hr (4도 저온 창고에서 진행)



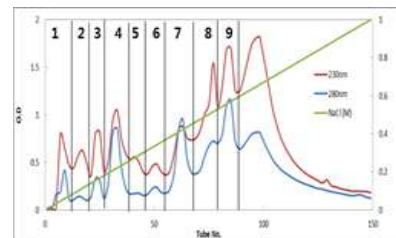
- 6 동결건조 진행



7 추출물 1g을 0.5M Tris-Buffer (pH 8.0)에 충분히 녹여준 후 DEAE-Sephadex resin에 충전한 컬럼에 로딩한 후 0~1M의 NaCl을 넣어 정제



8 12 mL/tube로 분획 후 Abs 230, 280nm에서 결과를 확인하였으며, 흡광도 결과를 기준으로 최종 9개의 분획물로 나누었음.



9 완료된 시료들은 투석을 진행하였으며, 휴대용 pH 미터기를 설치하여 실시간 pH 변화를 측정하였음.



10 투석 종료 시점을 효율적으로 확보하기 위해 휴대용 염도기를 6시간별로 염도 측정하였으며, 초기 염도 대비 염도 측정시 0.00%로 나타났을 때 투석을 종료하였음.

전
전

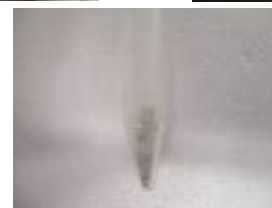


후

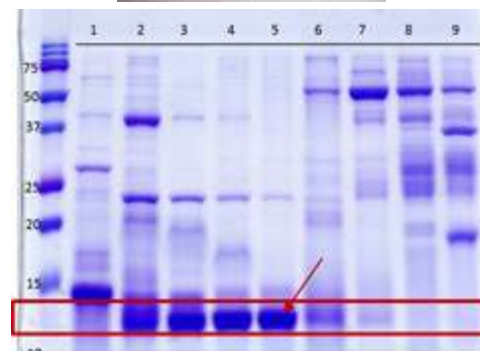


후

11 동결건조 진행 (최종 pilot scale 밀워 추출물)



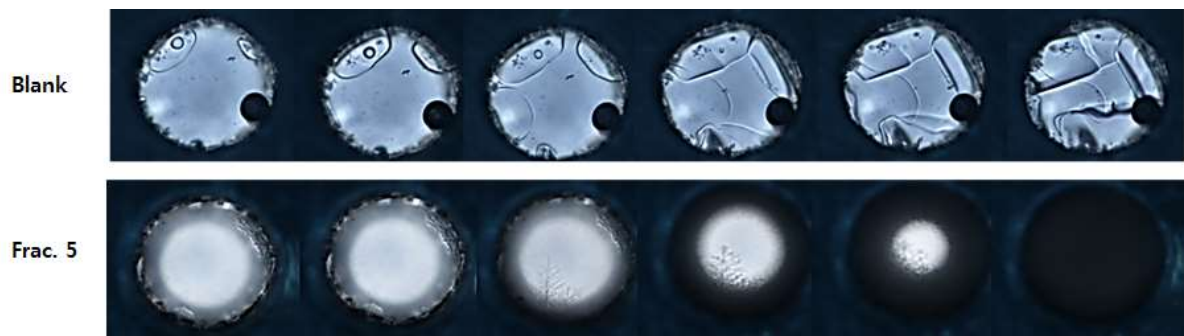
12 9개의 분획으로 나뉜 정제물을 동결건조 후 12% SDS-PAGE를 이용하여 전기영동 진행하였음. Lab-scale 실험 결과에서 나타난 밴드의 순도가 높은 5번의 분획물을 최종 활성 측정용 샘플로 선정하였음.



13 Osmometer nanoliter를 이용한 부동 효과 측정



- 가장 순도가 높은 5번 분획물을 대상으로 부동 효과를 nanoliter osmometer를 사용하여 활성을 분석한 결과 -0.69°C 의 온도 저감화 효과가 있었으며, [Figure 30]와 같이 얼음 결정의 모양이 물처럼 확산되지 않고 잔가지 형태로 형성되는 것을 확인할 수 있었음.



[Figure 30] Nanolier osmometer를 이용한 부동단백질 활성 측정 결과

2-5. 연구개발성과

○ 국내외 논문 게재

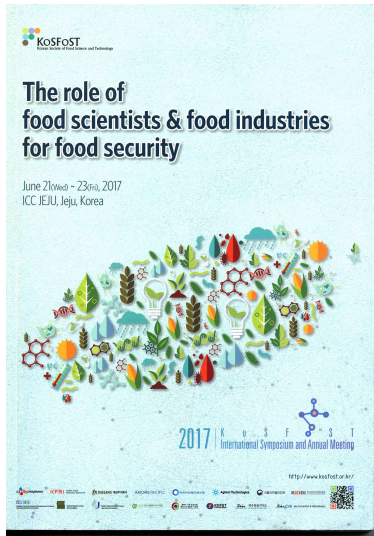
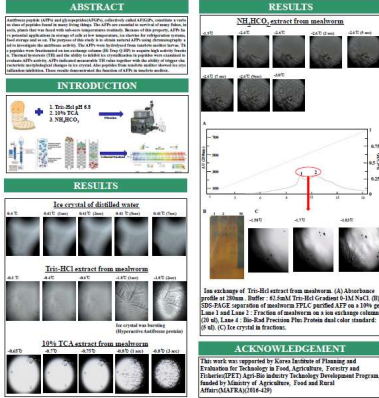
게재연도	논문명	저자명	국내외구분	학술지명	SCI 구분
2018	Investigation of the Anti-Prostate Cancer Properties of Marine-Derived Compounds	Meiqi Fan, Amit kumar Nath, Yujiao Tang, Young-jin Choi, Trishna Debnath, Eun-ju Choi, Eun-Kyung Kim	국외	Marine Drugs	SCI
2018	Sika deer (Cervus nippon) velvet antler extract attenuates prostate cancer in xenograft model	Yujiao Tang, Meiqi Fan, Young-jin Choi, Younghai Yu, Gang Yao, Yongyang Deng, Sang-Ho Moon, Eun-Kyung kim	국외	Bioscience, Biotechnology and Biochemistry	SCI

○ 국내 및 국제학술회의 발표

발표연도	회의명칭	발표자	발표제목	장소/국명	국명
2017	KOSFOST International Symposium and Annual Meeting	Da Hye Song, Sejin Jang, Young Wook Kim, Eun Kyung Kim, Kang-Hyun Chung, Jeung Hee An	Purification the hyperactive antifreeze peptides from mealworm, <i>Tenebrio molitor</i>	ICC JEJU, Jeju, Korea	대한민국
2017	ISNFF 2017 The 10 th international conference and exhibition on nutraceuticals & functional foods	Da Hye Song, Min Jae Kim, Eon Seon Kim, Dae Won Sim, Hyung-Sik Won, Eun Kyung Kim, Kang-Hyung Chung, Jeung Hee An	Cryo-Protective Effect of an Ice-Binding Protein Derived from <i>Tenebrio Molitor</i>	GSCO, Gunsan, Jeonbuk, Korea	대한민국

Purification the hyperactive antifreeze peptides from mealworm, *Tenebrio molitor*

Da Hye Song¹, Sejin Jang², Yeong Wook Kim³, Eun Kyung Kim³, Kang-Hyun Chung¹, Jeung Hee An^{3*}
¹Department of Food Science and Technology, Seoul National University of Science & Technology, Seoul 01511, Republic of Korea
²Division of Food Bioscience, Konkuk University, Chungju, Chungbuk, 27478, Republic of Korea
³Korean edible insect laboratory, 161 Daejeon Road, Jangju, Seoul, Republic of Korea



제17-03호

KOSFOST
상 장

우수포스터상

P01-073
 성명 및 소속 : Da Hye Song¹, Sejin Jang², Yeong Wook Kim³, Eun Kyung Kim, Kang-Hyun Chung, Jeung Hee An³
 Division of Food Bioscience, Konkuk University, Korea,
 Korean Edible Insect Laboratory, Korea,
 Department of Food Science and Technology, Seoul National University of Science & Technology, Korea

제목 : Purification the hyperactive antifreeze peptides from mealworm, *Tenebrio molitor*

위의 사람은 2017 한국식품과학회 국제학술대회의 포스터발표에서 창의력과 신선함이 돋보이는 우수한 연구 결과를 발표하였기에 상장을 수여합니다.

2017년 6월 23일

한국식품과학회 회장 박현진

○ 지식재산권(특허)

출연연도	출원등록명	국명	출원	
			출원인	출원등록번호
2017	밀웬 유래 부동단백질의 대량 생산방법 및 이에 따른 부동단백질	대한민국	한국식용곤충연구소 지식협동조합, 씨제이제일제당(주)	10-2017-0144172
2018	저온 사육단계를 포함하는 밀웬 유래 부동단백질의 대량 생산방법 및 이에 따른 부동단백질	대한민국	한국식용곤충연구소 지식협동조합, 씨제이제일제당(주)	10-2018-0173617

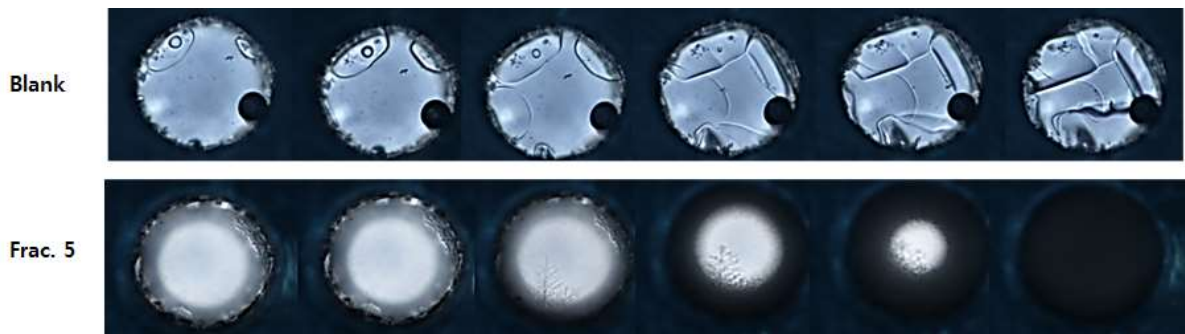
관인생략		출원번호통지서	
출원일자	2017.10.31	출원일자	2018.12.31
특기사항	심사청구(무) 공개신청(무)	특기사항	심사청구(무) 공개신청(무)
출원번호	10-2017-0144172 (접수번호 1-1-2017-1081208-35)	출원번호	10-2018-0173617 (접수번호 1-1-2018-1322876-80)
출원인명칭	한국식용곤충연구소 지식협동조합(1-2015-025942-1) 외 1명	출원인명칭	한국식용곤충연구소 지식협동조합(1-2015-025942-1) 외 1명
대리인성명	안창우(9-2009-001021-2)	대리인성명	안창우(9-2009-001021-2)
발명의명칭	밀웬 유래 부동단백질의 대량 생산방법 및 이에 따른 부동단백질	발명자성명	김용욱, 강세진, 류경표, 권효경, 박성용, 조성훈
		발명의명칭	저온 사육단계를 포함하는 밀웬 유래 부동단백질의 대량 생산방법 및 이에 따른 부동단백질
특허청장		특허청장	

○ 사업화실적

실적연도	사업화형태	사업화명	업체명	건수
2017	고용창출	단백질 분리정제를 통한 소재개발을 위한 고용창출	한국식용곤충연구소 지식협동조합	1
2018	고용창출	단백질 분리정제를 통한 소재개발을 위한 고용창출	한국식용곤충연구소 지식협동조합	1

2-6. 결론

- 세계 부동단백질 시장규모는 2018년 2,70백만 달러의 시장규모로 추정되며, 연평균 30% 성장률을 나타내어 향후 2023년에는 10.20백만 달러를 형성할 것으로 예상됨. 현재 시장에 진입해있는 기업으로는 AF Protein 및 Unilever와 같은 R&D 기반의 몇몇 회사들이 이미 시장의 90%를 점유하고 있어서 신생 기업의 시장 진입에 어려움이 있음. 또한 현재까지는 부동단백질의 주 소재로 어류를 사용하고 있음. 따라서 본 연구에서는 밀웬 유래 부동단백질에 대한 기초 연구 및 기반을 구축하고 소재를 개발하고자 하였음.
- 본 연구에서는 밀웬으로부터 부동단백질 추출정제 공정시스템 구축 후 효모 벡터시스템을 이용한 대량생산 공정을 구축하였음. 그러나 식품 원료로서 사용하기에는 유기용매 사용 등에 한계가 있음에 따라 식품 원료로서 사용하기 위한 추출방법 및 정제 공정을 구축하였음. 에탄올 추출조건에서의 부동효과를 갖는 단백질을 sequencing을 통해 확인하였으며, 파일럿 스케일로 추출정제 공정을 구축하였음. 파일럿 공정을 최종 셋업하여 파일럿 라인에서 최종 생산 진행하였으며, 생산된 부동단백질 추출물의 AFP 활성을 측정한 결과 $-0.69^{\circ}\text{C}/1\text{mg}$ protein을 확보하였음. 또한 얼음 결정의 모양이 물처럼 확산되지 않고 잔가지 형태로 형성되는 것을 확인할 수 있었음[Figure 31].



[Figure 31] Nanolier osmometer를 이용한 부동단백질 활성 측정 결과

3. 목표 달성도 및 관련 분야 기여도

3-1. 목표

○ 최종목표

- 식용곤충 중 갈색거저리 유충인 밀웜을 활용하여 특수단백질인 부동단백질을 분리·정제하여 고부가가치 상품을 기획하고 특수목적 및 일반식품에 적용이 가능한 소재제품화 기술개발에 그 목적이 있으며, 시제품 생산을 목표로 하고 있음.

○ 세부목표

- 밀웜 단백질의 산업적 이용을 위한 품질표준화
 - 밀웜 유래 소재 개발 및 물성 조사
 - 밀웜 부동단백질 상품개발계획 수립 및 기업체 조사
- 밀웜 부동단백질 추출정제 공정 시스템 구축
 - 밀웜 부동단백질 분리 및 정제 방법 확립
- 밀웜 부동단백질 대량생산 시스템 확립 및 정제 공정 구축
- 밀웜 부동단백질의 대량생산 공정 설립 및 제품화
 - 밀웜 부동단백질 대량 생산 및 소재 상품화
 - 밀웜 부동단백질 제품 적용성 확인 및 관능검사
 - 밀웜 부동단백질 제품 보완 및 최종 제품화
 - 밀웜 부동단백질 제품 B2B 유통판매

3-2. 목표 달성여부

○ 밀웜 단백질의 산업적 이용을 위한 품질표준화

- 밀웜 단백질의 산업적 이용을 위한 소재개발 및 이의 물성(건조온도 및 시간에 따른 건조 밀웜의 수분함량, 사육온도 및 기간에 따른 밀웜의 에탄올 추출물에 대한 조단백, 아미노테질소 및 가용성고형분)을 조사하였으며, 이는 밀웜의 일반 소재화에 있어서 중요한 기초자료로 활용 가능함. 또한 밀웜 부동단백질 발현 증가를 위한 최적 사육조건 탐색을 위해 조건별 밀웜을 사육하였음.

- 또한 특수단백질인 밀웜의 부동단백질의 상품개발을 위한 문헌조사 및 시장조사를 통해 밀웜 부동단백질의 활용방향성에 대한 기초 자료 수집 및 향후 계획을 수립하였음. 세계 부동단백질 시장규모는 2018년 2,70백만 달러의 시장규모로 추정되며, 연평균 30% 성장률을 나타내어 향후 2023에는 10.20백만 달러를 형성할 것으로 예상됨. 현재 시장에 진입해있는 기업으로는 AF Protein 및 Unilever와 같은 R&D 기반의 몇몇 회사들이 이미 시장의 90%를 점유하고 있어서 신생 기업의 시장 진입에 어려움이 있음. 또한 현재까지는 부동단백질의 주 소재로 어류를 사용하고 있으므로, 본 연구에서는 밀웜 유래 부동단백질에 대한 기초연구 및 기반을 구축하고 소재를 개발하고자 하였음.

○ 밀웜 부동단백질 추출정제 공정 시스템 구축

- Lab-scale에서의 추출버퍼(62.5mM Tris-HCl (pH6.8), 10% TCA 및 0.1M NH₄HCO₃용액)에 따른 부동단백질 추출연구결과를 토대로 62.mM Tris-HCL (pH 6.8)용액을 사용하여 밀웜 부동단백질 추출 및 정제 공정을 확립하였음. Gel permeation chromatography 분석을 통해 AFP 활성을 평가하였으며, MALDI TOF분석을 통해 단백질 분자량을 측정하였음. 또한 N-terminal sequencing 및 circular dichroism spectrum을 실시하여 단백질의 구조를 예측하였음.

○ 밀웜 부동단백질 대량생산 시스템 확립 및 정제 공정 구축

- 상기 공정을 바탕으로 효모벡터 시스템을 이용한 대량생산 공정을 구축하였음. 그러나 식품 원료로서 사용하기에는 유기용매 사용 등에 대한 한계가 있음에 따라 식품 원료로서 사용하기 위한 추출방법(에탄올 추출) 및 정제 공정을 셋업 하였음. 이에 Lab-scale에서의 50% 에탄올을 이용하여 밀웜 추출 후 이온 크로마토그래피를 이용한 부동단백질 조정제하였으며, 조정제 밀웜 추출물10mg/mL의 AFP 활성을 측정한 결과 약 0.6℃ 정도로 나타났음.

○ 밀웜 부동단백질 대량생산 공정 설립 및 제품화

- 상기 Lab-scale (50%에탄올 추출)에서 분리정제를 진행하여 기 추출조건에서의 부동 효과를 갖는 단백질을 sequencing하여 확인하였으며, pilot-scale로의 scale-up을 위하여 각 단계별 공정을 셋업하고 생산 효율성을 확보하였음. 또한 밀웜 부동단백질의 수율 극대화를 위한 사육조건 최적화를 위한 미세조정을 진행하여 사육 후 부동단백질 발현에 관하여 6개의 mRNA 발현 변화를 측정하였음. 그 결과 4도에서 4주 이상 사육하는 것이 부동 단백질 수율 극대화를 위한 사육조건임을 확인하였음. 또한 파일럿 공정을 최종 셋업하여 파일럿 라인에서 최종 생산 진행하였으며, 생산된 부동단백질 추출물의 AFP 활성을 측정한 결과 - 0.69℃/1mg protein을 확보하였음.

▪ SCI 논문 2편

- Fan, M., Nath, A., Tang, Y., Choi, Y. J., Debnath, T., Choi, E. J., & Kim, E. K. (2018). Investigation of the anti-prostate cancer properties of marine-derived compounds. *Marine drugs*, 16(5), 160.

- Tang, Y., Fan, M., Choi, Y. J., Yu, Y., Yao, G., Deng, Y., Moon, S. H., & Kim, E. K. (2018). Sika deer (*Cervus nippon*) velvet antler extract attenuates prostate cancer in xenograft model. *Bioscience, biotechnology, and biochemistry*, 1-9.

▪ 학술발표 2건

- Purification the hyperactive antifreeze peptides from mealworm, *Tenebrio molitor*. KOSFOST International symposium and annual meeting, (2017).

- Cryo-protective effect of an ice-binding protein derived from *Tenebrio molitor*. ISNFF 2017 The 10th international conference and exhibition on nutraceuticals &

frunctional foods, (2017).

- 특허출원 2건
 - 밀웜 유래 부동단백질의 대량 생산방법 및 이에 따른 부동단백질 (10-2017-0144172).
 - 저온 사육단계를 포함하는 밀웜 유래 부동단백질의 대량 생산방법 및 이에 따른 부동단백질 (10-2018-0173617).

- 사업화 (고용창출) 2건
 - 단백질 분리정제를 통한 소재개발을 위한 고용창출

3-3. 목표 미달성 시 원인(사유) 및 차후대책(후속연구의 필요성 등)

○ 후속연구의 필요성

- 비교실험의 경우, 추가 실험을 진행하여 특이사항이 발견될 시 후속 보고할 예정임
- 상기 비교실험에서 특이사항이 발견될 경우, 인체 실험을 추가로 시행하여 추후 보고할 예정임

4. 연구결과의 활용 계획 등

- 본 연구에서는 밀웜으로부터 부동단백질을 규명하고 분리·정제를 통해 소재를 제품화하고 기술을 개발하고자 하였으며, 연구결과물인 밀웜 부동단백질 소재제품은 기업 특판시장에 유통·판매할 계획임.
- 본 연구결과물의 기대효과로는 1) 밀웜의 부동단백질 분석기술 및 분리·정제 기술을 활용한 고부가가치 단백질 탐색, 2) 밀웜의 품질 표준화 연구가 부족한 식품산업의 기초자료 확보 및 활용 가능, 3) 향후 부동단백질의 산업화를 통한 식품, 의료, 화장품 소재화 산업 확장, 4) 기업 특판시장에서의 밀웜 단백질 소재에 대한 새로운 인식 제고 및 활용성 극대화, 5) 밀웜 고부가가치 단백질 소재 개발 및 유통·판매를 통한 국내외 식용곤추 소재 판로 개척, 6) 고급 분리·정제기술의 도입을 통한 신소재 개발로 해외 시장에서의 고부가가치 단백질 경쟁력 확보 및 이미지 개선 효과임.

붙임. 참고문헌

- Tomchaney, A. P., Morris, J. P., Kang, S. H., & Duman, J. G. (1982). Purification, composition, and physical properties of a thermal hysteresis “antifreeze” protein from larvae of the beetle *Tenebrio molitor*. *Biochemistry*, 21(4), 716-721.
- Graham, L. A., Walker, V. K., & Davies, P. L. (2000). Developmental and environmental regulation of antifreeze proteins in the mealworm beetle *Tenebrio molitor*. *European Journal of biochemistry*, 267(1), 6452-6458.
- Bu, S (2011). *Modification, Expression, and Purificatioin of Hyperactive Antifreeze Proteins from Insect Tenebrio Molitor* (Doctoral dissertation, Cleveland State University).
- Barreett, J. (2001). Thermal hysteresis proteins, *The international journal of biochemistry & cell biology*, 33(2), 105-117.
- Braslavsky, I., & Drori, R. (2013). LabVIEW-operated novel nanoliter osmometer for ice binding protein investigations. *Journal of visualized experiments: JoVE*, (72).
- Cai, Y., Liu, S., Liao, X., Ding, Y., Sun, J., & 코뿔, D. (2011). Purificatioin and prtial characterization fo antifreeze proteins from leaves of *Ligustrum lucidum* Ait. *Food and bioproducts processing*, 89(2), 98-102.

<별첨작성 양식>

[별첨 1]

연구개발보고서 초록

과 제 명	(국문) 밀웜을 활용한 부동단백질 분리·정제 및 소재제품화 기술 개발				
	(영문) Separation and purification of antifreeze protein using <i>Tenebrio molitor</i> and development of material manufacturing technology				
주 관 연 구 기 관	한국식용곤충연구소 지식협동조합	주 관 연 구 책 임 자	(소속) 한국식용곤충연구소 지식협동조합		
참 여 기 업	한국식용곤충연구소 지식협동조합 건국대학교글로벌산학협력단 씨제이제일제당 곡성곤충협동조합		(성명) 장 세 진		
총 연구개발비 (400,200천원)	계	400,200,000	총 연구 기간	2016.12.05. ~2017.12.04. (2년)	
	정부출연 연구개발비	300,000,000	총 참 여 연 구 원 수	총 인원	17
	기업부담금	100,200,000		내부인원	17
	연구기관부담금	-		외부인원	-
<p>○ 연구개발 목표 및 성과</p> <ul style="list-style-type: none"> ▪ 연구개발 목표 : 본 연구는 고품질 단백질 공급원으로 대두되고 있는 식용곤충 중 갈색거저리 유충(밀웜)의 특수단백질인 부동단백질을 분리·정제하여 고부가가치 상품을 기획하고 특수목적 및 일반식품에 적용이 가능한 소재제품화 기술개발에 그 목적이 있으며, 시제품 생산을 목표로 하고 있음. ▪ 연구개발 성과 : <ul style="list-style-type: none"> [정량적성과] - 지식재산권 : 특허출원 2건 - 사업화 : 고용창출 2건 [정성적성과] - 학술성과 : SCI 2건 - 학술발표 : 2건 <p>○ 연구내용 및 결과</p> <ul style="list-style-type: none"> ▪ 연구내용 <ol style="list-style-type: none"> 1. 밀웜 부동단백질의 산업적 이용을 위한 품질 표준화 2. 밀웜 부동단백질 추출정제 공정 시스템 구축 3. 밀웜 부동단백질 대량생산 시스템 확립 및 정제 공정 구축 4. 밀웜 부동단백질의 대량생산 공정 설립 및 제품화 					

▪ 연구결과

1. 밀웬 부동단백질의 산업적 이용을 위한 품질 표준화

- 1) 밀웬 유래 소재 개발 및 물성조사
- 2) 밀웬 부동단백질 발현 증가를 위한 최적 사육조건 탐색을 위한 조건별 밀웬 사육
- 3) 밀웬 부동단백질 상품개발계획 수립을 위한 기업체 조사(시장조사)

2. 밀웬 부동단백질 추출정제 공정 시스템 구축

- 1) 추출버퍼에 따른 부동단백질 추출 정제 공정 시스템 구축
- 2) Gel permeation chromatography 분석을 통한 AFP 활성 평가
- 3) MALDI TOF 분석을 통한 단백질 분자량 측정
- 4) N-terminal sequencing 및 circular dichroism spectrum 실시하여 단백질 구조 예측

3. 밀웬 부동단백질 대량생산 시스템 확립 및 정제공정 구축

- 1) 효모백터 시스템을 활용한 대량생산 공정 구축
 - 62.5mM Tris-HCl (pH6.8) 용액을 활용한 부동단백질 추출 및 정제
- 2) 식품원료로서 사용가능한 추출방법 및 정제공정 구축 (유기용매의 한계점)
 - 50% 에탄올을 이용한 밀웬 추출 후 이온 크로마토그래피를 이용한 부동단백질 조정제
 - 조정제 밀웬 추출물 10mg/mL의 AFP활성 측정 결과 약 0.6℃ 정도로 나타남

4. 밀웬 부동단백질 대량생산 공정 설립 및 제품화

- 1) Pilot-scale로의 scale-up을 위하여 각 단계별 공정을 셋업하고 생산 효율성 확보
 - 밀웬 부동단백질의 수율 극대화를 위한 사육조건의 최적화를 위한 미세조정을 통한 사육
 - Lab-scale (50% 에탄올 추출)에서의 부동 효과를 갖는 단백질을 sequencing하여 확인
 - pilot 공정을 최종 셋업하여 파일럿 라인에서 최종 생산 진행
 - 생산된 부동추출물의 AFP 활성 측정결과 -0.69℃/1mg protein 확보

○ 연구성과 활용실적 및 계획

- 본 연구에서는 밀웬으로부터 부동단백질을 규명하고 분리·정제를 통해 소재를 제품화 하고 기술을 개발하고자 함. 연구결과물인 밀웬 부동단백질 소재제품은 기업 특판시장에 유통·판매할 계획임.
- 본 연구결과물의 기대효과로는 1) 밀웬의 부동단백질 분석기술 및 분리·정제 기술을 활용한 고부가가치 단백질 탐색, 2) 밀웬의 품질 표준화 연구가 부족한 식품산업의 기초자료 확보 및 활용가능, 3) 향후 부동단백질의 산업화를 통한 식품, 의료, 화장품 소재화 산업 확장, 4) 기업 특판시장에서의 밀웬 단백질 소재에 대한 새로운 인식 제고 및 활용성 극대화, 5) 밀웬 고부가가치 단백질 소재 개발 및 유통·판매를 통한 국내외 식용곤충 소재 판로 개척, 6) 고급 분리·정제 기술의 도입을 통한 신소재 개발로 해외 시장에서의 고부가가치 단백질 경쟁력 확보 및 이미지 개선 효과임.

자체평가의견서

1. 과제현황

		과제번호		116163-02	
사업구분	농식품기술개발사업				
연구분야				과제구분	단위
사업명	농식품 창업·벤처지원 R&D 바우처 시범사업				주관
총괄과제	기재하지 않음			총괄책임자	기재하지 않음
과제명	밀워를 활용한 부동단백질 분리·정제 및 소재제품화 기술 개발			과제유형	(기초,응용,개발)
연구기관	한국식용곤충연구소 지식협동조합			연구책임자	장 세 진
연구기간 연구비 (천원)	연차	기간	정부	민간	계
	1차연도	2016.12.05. ~ 2017.12.04	145,000	48,500	193,500
	2차연도	2017.12.05. ~ 2018.12.04	155,000	51,700	206,700
	계		300,000	100,200	400,200
참여기업	건국대학교글로벌산학협력단, 씨제이제일제당, 곡성곤충협동조합				
상대국	-	상대국연구기관		-	

※ 총 연구기간이 5차연도 이상인 경우 셀을 추가하여 작성 요망

2. 평가일 : 2019. 01. 18

3. 평가자(연구책임자) :

소속	직위	성명
한국식용곤충연구소 지식협동조합	선임연구원(과장)	장 세 진

4. 평가자(연구책임자) 확인 : 장 세 진

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

확약	장 세 진
----	-------

I. 연구개발실적

※ 다음 각 평가항목에 따라 자체평가한 등급 및 실적을 간략하게 기술(200자 이내)

1. 연구개발결과의 우수성/창의성

■ 등급 : (아주우수, 우수, 보통, 미흡, 불량)

본 연구에서는 고품질 단백질 공급원으로 대두되고 있는 식용곤충 중 갈색거저리 유충인 밀웜으로부터 부동단백질을 분리·정제하여 소재제품화 기술개발을 하고자 하였으며, 본 연구과제를 통해 식품에서 적용가능한 추출방법으로 정제공정을 구축하였음에 이의를 두고 있음. 또한 국내에서는 아직까지 수행되지 않은 유일한 연구결과로 우수성 및 창의성이 우수하다고 평가됨.

2. 연구개발결과의 파급효과

■ 등급 : (아주우수, 우수, 보통, 미흡, 불량)

본 연구과제를 통해 밀웜 부동단백질의 분석기술 및 분리·정제 기술을 활용한 고부가가치 단백질을 탐색하였으며, 밀웜의 품질 표준화 연구가 부족한 식품산업의 기초자료로 확보 및 활용 가능하였음. 또한 향후 부동단백질의 산업화를 통한 식품, 의료, 화장품 소재화 산업으로의 확장 가능할 것으로 사료됨에 따라 본 연구결과물은 밀웜 부동단백질의 산업화를 할 수 있는 기반을 마련하는데 매우 중요하게 활용될 것으로 평가됨.

3. 연구개발결과에 대한 활용가능성

■ 등급 : (아주우수, 우수, 보통, 미흡, 불량)

본 연구과제를 통해 밀웜 부동단백질 추출정제 공정 확립 및 대량생산 시스템 구축을 하였으며, 이로부터 추출된 추출물의 부동효과를 확인하였음. 본 연구결과를 토대로 지속적인 밀웜 부동단백질의 소재개발 연구가 필요할 것으로 사료되며, 연구결과물은 향후 아직까지 적용분야가 넓지 않은 냉동식품(만두, 어묵, 디저트 등)으로의 적용하여 식품의 관능적 기호도(식감 개선)를 향상시킬 수 있을 것으로 사료됨. 또한 최근에는 부동단백질의 화장품 적용 관련하여 사례가 나타남에 따라 밀웜 유래 부동단백질의 화장품, 의약품 등에 적합한 소재개발에 관한 연구도 필요할 것으로 사료됨.

4. 연구개발 수행노력의 성실도

■ 등급 : (아주우수, 우수, 보통, 미흡, 불량)

본 연구팀은 아직까지 시도해보지 않은 밀웜 부동단백질 분리정제 및 소재화 기술개발이라는 도전적인 연구를 성실하게 수행하였음. 특히 연구결과를 얻기 위해 밀웜의 부동단백질의 수율 극대화를 위한 사육조건을 최적화하였으며, 밀웜을 대상으로 추출버퍼에 따른 다양한 연구를 실행하였음. 이 과정에서 식품 원료로서의 사용하기위한 추출방법 및 정제공정을 셋업 및 pilot-scale로 scale-up하였으며, 또한 Lab-scale 결과물을 바탕으로 효모 벡터 시스템을 활용한 대량생산 공정도 구축하였음.

5. 공개발표된 연구개발성과(논문, 지적소유권, 발표회 개최 등)

■ 등급 : (아주우수, 우수, 보통, 미흡, 불량)

본 연구팀은 계획된 연구 성과물을 달성하기 위해 성실히 수행하였으며, 그 중 “Purification the hyperactive antifreeze peptides from mealworm, *Tenebrio molitor*”에 관한 학술대회에서 포스터 우수상을 수상하였음.

II. 연구목표 달성도

세부연구목표 (연구계획서상의 목표)	비중 (%)	달성도 (%)	자체평가
밀웜 단백질의 산업적 이용을 위한 품질표준화	20	20	밀웜 단백질의 산업적 이용을 위한 품질표준화를 위해 밀웜 유래 소재 개발 및 물성조사를 진행하였음.
밀웜 부동단백질 추출정제 공정 시스템 구축	30	30	밀웜 부동단백질 분리 및 정제 방법 을 확립하였으며, 식품에 사용가능 한 추출방법으로 정제공정을 셋업하 였음.
밀웜 부동단백질 대량생산 시스템 확립 및 정제 공정 구축	30	30	Lab-scale에서의 연구개발(추출용매 에 따른 추출방법)을 바탕으로 효모 벡터시스템을 이용한 추출방법을 확 립하였으며, 또한 식품에서 적용가 능한 방법(에탄올추출)으로의 pilot 스케일로의 scale-up하였음.
밀웜 부동단백질의 대량생산 공정 설립 및 제품화	20	15	pilot 공정을 최종 셋업하여 파일럿 라인에서 최종 생산 진행하였으며, 생산된 부동단백질 추출물의 AFP 활성을 측정하였음.
합계	100점	95점	

III. 종합의견

1. 연구개발결과에 대한 종합의견

본 연구에서는 고품질 단백질 공급원으로 대두되고 있는 식용곤충 중 갈색거저리 유충인 밀웜으로부터 부동단백질을 분리·정제하여 소재제품화 기술을 개발하고자 하였으며, 본 연구과제를 통해 식품에서 적용 가능한 추출방법으로 정제공정을 구축하였음에 이의를 두고 있음. 본 연구결과물로 식품공정에서의 밀웜 부동단백질 추출공정을 pilot-scale에서의 공정을 구축하였음. 본 연구과제를 통해서 밀웜 부동단백질의 분석기술 및 분리·정제 기술을 활용한 고부가가치 단백질을 탐색할 수 있었으며, 향후 부동단백질의 산업화를 통한 식품, 의료, 화장품 소재화 산업으로의 확장 가능할 것으로 사료됨. 본 연구를 수행하면서 많은 시행착오가 있었으나 이러한 경험을 토대로 추후 더 좋은 연구기획과 결과를 낼 수 있는 초석을 다질 수 있을 것으로 사료됨.

2. 평가시 고려할 사항 또는 요구사항

본 연구는 국내에서는 아직까지 수행되지 않은 유일한 연구로 2년이라는 길고도 짧은 기간에 물성연구에서부터 소재화 기술개발을 진행하였음. 밀웬 부동단백질 소재개발에 앞서 밀웬 부동단백질의 수율 극대화를 위한 사육조건을 최적화하고자 하였으며, 소재개발을 위해 추출용매를 다양하게 적용해보기도 하였음. 그러나 본 연구팀은 연구를 위한 연구보다는 실제 산업화에 적용할 수 있는 소재를 개발하고자 식품에서 적용가능한 추출방법으로 추출공정을 셋업하였음. 기 추출조건을 바탕으로 pilot scale로 최종 셋업하여 pilot 라인에서 최종 생산을 진행하여 AFP 활성을 측정 완료하였음.

본 연구팀에서는 밀웬 부동단백질 소재개발을 하면서 추출된 추출물을 식품(냉동야채)에 적용 실험을 진행하였으며, 이에 대한 SCI 논문을 투고하였으나 현재 심사중으로 성과도출이 지연된 점을 양해해주실 부탁드립니다.1

3. 연구결과의 활용방안 및 향후조치에 대한 의견

본 연구를 토대로 밀웬 부동단백질 소재개발의 지속적인 연구가 필요할 것으로 사료되며, 향후에는 아직까지 적용분야가 넓지 않은 냉동식품으로의 적용하여 식품의 식감을 향상시킬 수 있을 것으로 사료됨. 또한 최근에는 부동단백질 하이브리드 소재가 화장품에 적용된 사례가 나타남에 따라 밀웬 유래 부동단백질의 화장품, 의약품 등에 적합한 소재개발의 추가적인 연구가 필요할 것으로 사료됨.

IV. 보안성 검토

0 연구책임자의 보안성 검토의견, 연구기관 자체의 보안성 검토결과를 기재함

※ 보안성이 필요하다고 판단되는 경우 작성함.

1. 연구책임자의 의견

현재 개발된 연구성과물이 아직 SCI 논문 심사 증으로 연구성과에 대한 보안이 필요하다고 판단됨.

2. 연구기관 자체의 검토결과

--

[별첨 3]

연구성과 활용계획서

1. 연구과제 개요

사업추진형태	<input checked="" type="checkbox"/> 자유응모과제 <input type="checkbox"/> 지정공모과제	분 야	농식품기술개발사업	
연구과제명	밀웁을 활용한 부동단백질 분리·정제 및 소재제품화 기술 개발			
주관연구기관	한국식용곤충연구소 지식협동조합	주관연구책임자	장 세 진	
연구개발비	정부출연 연구개발비	기업부담금	연구기관부담금	총연구개발비
	300,000,000	100,200,000	-	400,200,000
연구개발기간	2016년 12월 05일 ~ 2018년 12월 04일			
주요활용유형	<input type="checkbox"/> 산업체이전 <input type="checkbox"/> 교육 및 지도 <input type="checkbox"/> 정책자료 <input type="checkbox"/> 기타() <input type="checkbox"/> 미활용 (사유:)			

2. 연구목표 대비 결과

당초목표	당초연구목표 대비 연구결과
① 밀웁 단백질의 산업적 이용을 위한 품질표준화	밀웁 단백질의 산업적 이용을 위한 품질표준화를 위해 밀웁 유래 소재 개발 및 물성 조사를 진행하였음. 또한 부동단백질 시장조사 결과, 현재 시장에 진입해 있는 기업들은 R&D 기반으로 이미 시장의 90%를 점유하고 있어서 신생 기업의 시장 진입에 어려움이 있음에 따라 밀웁 유래 부동단백질에 대한 기초연구 및 기반 구축이 필요함을 확인할 수 있었음.
② 밀웁 부동단백질 추출정제 공정 시스템 구축	밀웁 부동단백질 분리 및 정제방법을 확립하였으며, 식품에 사용 가능한 추출방법으로 정제공정을 셋업하였음.
③ 밀웁 부동단백질 대량생산 시스템 확립 및 정제 공정 구축	Lab-scale에서의 연구개발(추출용매에 따른 추출방법)을 바탕으로 효모벡터시스템을 이용한 추출방법을 확립하였음. 또한 식품에서 적용가능한 방법(에탄올추출)으로의 pilot-scale로의 scale-up하였음.
④ 밀웁 부동단백질의 대량생산 공정 설립 및 제품화	pilot 공정을 최종 셋업하여 파일럿 라인에서 최종 생산 진행하였으며, 생산된 부동단백질 추출물의 AFP활성을 측정하였음.

* 결과에 대한 의견 첨부 가능

3. 연구목표 대비 성과

성과 목표	사업화지표										연구기반지표									
	지식 재산권			기술 실시 (이전)		사업화					기술 인증	학술성과				교육 지도	인력 양성	정책 활용·홍보		기타 (타 연구 활용 등)
	특 허 출원	특 허 등록	품 종 등록	건 수	기술 료	제 품 화	매 출 액	수 출 액	고 용 창 출	투 자 유 치		논문		학 술 발 표	정 책 활 용			홍 보 전 시		
												SC I	비 SC I						논 문 평 균 IF	
단위	건	건	건	건	백 만 원	백 만 원	백 만 원	백 만 원	명	백 만 원	건	건	건	건	명	건	건			
가중치	25	20		10		10	10							25						
최종목표	2	2		1		1	150				2		2	4						
연기간내 달성실적	2							2			2		2	2						
달성율(%)	100							100			100			50						

4. 핵심기술

구분	핵심기술명
①	밀워 유래 부동단백질 추출정제 공정 확립
②	효모벡터 시스템을 이용한 부동단백질 생산 공정 확립
③	식품에 적용가능한 밀워 부동단백질 추출정제 공정 확립

5. 연구결과별 기술적 수준

구분	핵심기술 수준					기술의 활용유형(복수표기 가능)				
	세계 최초	국내 최초	외국기술 복	외국기술 제	외국기술 소화·흡수	특허 출원	산업체이전 (상품화)	현장으로 해	정책 자료	기타
①의 기술				V						
②의 기술				V						
③의 기술					V	V				

* 각 해당란에 v 표시

6. 각 연구결과별 구체적 활용계획

핵심기술명	핵심기술별 연구결과활용계획 및 기대효과
①의 기술	밀워 부동단백질 분석기술 및 분리·정제기술의 기초자료로 활용
②의 기술	밀워 부동단백질의 분리정제 및 효모벡터시스템을 활용한 생산기술의 기초자료로 활용
③의 기술	식품 산업에서의 밀워 부동단백질 소재공정 개발 등의 기초자료로 활용 향후 부동단백질의 산업화를 통한 식품, 의료, 화장품 소재화 산업으로의 확장 기대

7. 연구종료 후 성과창출 계획

성과목표	사업화지표										연구기반지표								
	지식 재산권			기술실시 (이전)		사업화					기술인증	학술성과			교육지도	인력양성	정책 활용·홍보		기타 (타연구활용등)
	특허출원	특허등록	품종등록	건수	기술료	제품화	매출액	수출액	고용창출	투자유치		논문		학술발표			정책 활용	홍보 전 시	
												SCI	비SCI						
단위	건	건	건	건	백만원	건	백만원	백만원	명	백만원	건	건	건	건	명				
가중치	25	20		10		10	10							25					
최종목표	2	2		1		1	150				2		2	4					
연간내 달성실적	2								2		2		2	2					
연구종료 후 성과창출 계획		2		1		1	150							2					

8. 연구결과의 기술이전조건(산업체이전 및 상품화연구결과에 한함)

핵심기술명 ¹⁾			
이전형태	<input type="checkbox"/> 무상 <input type="checkbox"/> 유상	기술료 예정액	천원
이전방식 ²⁾	<input type="checkbox"/> 소유권이전 <input type="checkbox"/> 전용실시권 <input type="checkbox"/> 통상실시권 <input type="checkbox"/> 협의결정 <input type="checkbox"/> 기타()		
이전소요기간		실용화예상시기 ³⁾	
기술이전시 선행조건 ⁴⁾			

- 1) 핵심기술이 2개 이상일 경우에는 각 핵심기술별로 위의 표를 별도로 작성
- 2) 전용실시 : 특허권자가 그 발명에 대해 기간·장소 및 내용을 제한하여 다른 1인에게 독점적으로 허락한 권리
통상실시 : 특허권자가 그 발명에 대해 기간·장소 및 내용을 제한하여 제3자에게 중복적으로 허락한 권리
- 3) 실용화예상시기 : 상품화인 경우 상품의 최초 출시 시기, 공정개선인 경우 공정개선 완료시기 등
- 4) 기술 이전 시 선행요건 : 기술실시계약을 체결하기 위한 제반 사전협의사항(기술지도, 설비 및 장비 등 기술이전 전에 실시기업에서 갖추어야 할 조건을 기재)

주 의

1. 이 보고서는 농림축산식품부에서 시행한 농식품창업·벤처지원 R&D바우처 시범 사업의 연구보고서입니다.
2. 이 보고서 내용을 발표하는 때에는 반드시 농림축산식품부에서 시행한 농식품창업·벤처지원 R&D바우처 시범 사업의 연구 결과임을 밝혀야 합니다.
3. 국가과학기술 기밀유지에 필요한 내용은 대외적으로 발표 또는 공개하여서는 아니됩니다.