

815003-3

신기능성 네오한천올리고당 제조를 위한 베타한천분해효소의 식품 가공용 효소로의 산업화 최종보고서

2018

농림축산식품부

발간등록번호

11-1543000-002657-01

신기능성 네오한천올리고당 제조를 위한 베타
한천분해효소 DagA의 식품 가공용 효소
(신규 식품첨가물)로의 산업화
최종보고서

2019. 04. 01.

주관연구기관 / 다인바이오(주)
협동연구기관 / 명지대학교
경기대학교

농림축산식품부

**신기능성 네오한천올리고당 제조를 위한 베타
한천분해효소 DagA의 식품 가공용 효소(신규
식품첨가물)로의 산업화
최종보고서**

2019. 04. 01.

**주관연구기관 / 다인바이오(주)
협동연구기관 / 명지대학교
경기대학교**

농 립 축 산 식 품 부

제 출 문

농림축산식품부 장관 귀하

본 보고서를 “신기능성 네오한천올리고당 제조를 위한 베타 한천분해효소 DagA의 식품 가공용 효소(신규 식품첨가물)로의 산업화”(개발기간 : 2015. 10. 23 ~ 2018. 10. 22) 과제의 최종보고서로 제출합니다.

2019. 04. 01.

주관연구기관명 : 다인바이오(주)

(대표자) 이 제 현



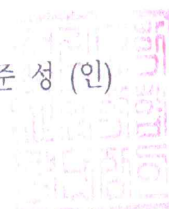
1협동연구기관명 : 명지대학교

(대표자) 한 승 수 (인)



2협동연구기관명 : 경기대학교

(대표자) 이 준 성 (인)



주관연구책임자 : 이 제 현

1협동연구책임자 : 홍 순 광

2협동연구책임자 : 이 중 훈

국가연구개발사업의 관리 등에 관한 규정 제18조에 따라 보고서 열람에 동의합니다.

제 출 문

농림축산식품부 장관 귀하

본 보고서를 “신기능성 네오한천올리고당 제조를 위한 베타 한천분해효소 DagA의 식품 가공용 효소(신규 식품첨가물)로의 산업화”(개발기간 : 2015. 10. 23 ~ 2018. 10. 22) 과제의 최종보고서로 제출합니다.

2019. 04. 01.

주관연구기관명 : 다인바이오(주) (대표자) 이 제 현 (인)

1협동연구기관명 : 명지대학교 (대표자) 한 승 수 (인)

2협동연구기관명 : 경기대학교 (대표자) 이 준 성 (인)

주관연구책임자 : 이 제 현

1협동연구책임자 : 홍 순 광

2협동연구책임자 : 이 종 훈

국가연구개발사업의 관리 등에 관한 규정 제18조에 따라 보고서 열람에 동의합니다.

보고서 요약서

과제고유번호	815003-3	해 당 단 계 연 구 기 간	2015.10.23~ 2018.10.22	단 계 구 분	3/3
연구사업명	단 위 사 업	농식품기술개발사업			
	사 업 명	기술사업화지원사업			
연구과제명	대 과 제 명	(해당 없음)			
	세부 과제명	신기능성 네오한천올리고당 제조를 위한 베타 한천분해효소 DagA의 식품가공용 효소 (신규 식품첨가물)로의 산업화			
연구책임자	해당단계 참여연구원 수	총: 22명 내부: 22명 외부: 명	해당단계 연구개발비	정부:280,000천원 민간: 94,000천원 계:374,000천원	
	총 연구기간 참여연구원 수	총:22명 내부:22명 외부: 명	총 연구개발비	정부:840,000천원 민간:282,000천원 계:1,122,000천원	
연구기관명 및 소속부서명	다인바이오(주) 명지대학교 경기대학교		참여기업명: 다인바이오(주)		
국제공동연구	상대국명: 해당사항 없음		상대국 연구기관명: 해당사항 없음		
위탁연구	연구기관명: 해당사항 없음		연구책임자: 해당사항 없음		

※ 국내외의 기술개발 현황은 연구개발계획서에 기재한 내용으로 같음

연구개발성과의 보안등급 및 사유	
-------------------------	--

9대 성과 등록·기탁번호

구분	논문	특허	보고서 원문	연구시설 ·장비	기술요약 정보	소프트 웨어	화합물	생명자원		신품중	
								생명 정보	생물 자원	정보	실물
등록·기탁 번호	6	10-1919 962	-	-	-	-	-	-	KFCC1 1668P, KFCC1 1742P	-	-

국가과학기술종합정보시스템에 등록된 연구시설·장비 현황

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

신기능성 네오한천올리고당 제조를 위한 방선균 개량 균주의 배양 조건을 최적화하고 양산 공정을 확립하여 대량 생산을 진행함. 또한 효소의 안전성 입증 및 기준 규격 설정을 통해 최종 식품첨가물 인허가를 득하여 식품가공용 효소로 사용 가능하도록 개발함.

보고서 면수
38

요 약 문

<p>연구의 목적 및 내용</p>	<ul style="list-style-type: none"> ■ 비만, 당뇨, 고지혈증 등 대사질환 개선과 면역기능 증강 효능이 규명된 신규 기능성 물질 네오한천올리고당(NAO)의 생산에 필수적인 방선균 베타 한천분해효소 DagA를 식품가공용 효소(한시적 기준의 식품첨가물)로 개발하여 조기 사업화로 신규 식품원료 NAO를 양산하여 판매하고, 단계적으로 NAO를 건강 기능식품 기능성원료로 개별인정을 받아 고부가가치 식의약소재로 사업화하고자 함. <ul style="list-style-type: none"> ▪ 베타 한천분해효소(DagA) 과발현 균주 개량 : 발현량 5배 이상 증가 ▪ DagA 상업적 생산용 발효 공정 최적화: DagA 발현 목표 수율 1,100 U/mL ▪ DagA 상업적 분리정제 공정 확립: DagA 분리정제 목표 수율 75% ▪ 베타 한천분해효소(DagA) 사용 인허가 <ul style="list-style-type: none"> - 식약처 식품첨가물의 한시적 기준 및 규격 인정을 통한 식품용 사용 허가
<p>연구개발성과</p>	<ul style="list-style-type: none"> ▪ 베타 한천분해효소 DagA 과발현 균주 확보 <ul style="list-style-type: none"> - <i>Streptomyces coelicolor</i>로부터 돌연변이주 <i>Streptomyces coelicolor</i> A3(2)_M22를 확보하고, M22 균주를 모균주로 하여 지속적인 추가 돌연변이를 통해 DagA 과발현 돌연변이 균주 M22-2C43 확보 - 베타 한천분해효소 과발현 균주 개량(균주 기탁 및 특허 출원 2건) 및 효소 생산과 NAO 생산 원천기술 확보(특허등록 1건, 농림식품부 신기술(NET) 인증) ▪ 식품용 베타 한천분해효소 DagA 대량 양산 제조공정 표준화 <ul style="list-style-type: none"> - DagA 변이주 양산 배지 및 발효조건 최적화 완료 - DagA 변이주 대량 발효공정 개발 - DagA 효소 단백질 대량 분리정제(UF/DF) 공정 확립 ▪ 베타 한천분해효소 DagA의 기준 및 규격 설정 완료 <ul style="list-style-type: none"> - 성상 및 유효성분 함량 규격 - 안전성 규격 설정 - 표준품 제조 및 표준분석법 확립 - 시험기준 및 방법 설정 ▪ 식품용 베타 한천분해효소 DagA 안전성 평가 완료 (GLP 기관) <ul style="list-style-type: none"> - <i>in vitro</i> 안전성 시험: 소핵, 염색체 이상, 복귀돌연변이 검증 - <i>in vivo</i> 안전성 시험: 설치류 단회투여, 설치류 용량설정(4주 DRF), 설치류 13주 반복투여독성 검증 ▪ 베타 한천분해효소 DagA의 식품첨가물 인허가 획득 <ul style="list-style-type: none"> - 식품의약품안전처 [식품첨가물의 한시적 기준 및 규격] 인정을 위한 자료 제출 및 식품첨가물 인정서 수령
<p>연구개발성과의 활용계획 (기대효과)</p>	<ul style="list-style-type: none"> ▪ 신규 효소 개발 및 상용화 과정에서 구축된 know-how를 후속 신규 생물소재의 상용화를 위한 기반기술로 활용 ▪ 국내에서 개발한 신규 식품가공용 효소의 인허가 및 상용화를 통한 국내 효소 산업의 활성화 ▪ 식품가공용 효소 등록과 동시에 신규 식품원료 NAO 양산 및 제품화로 판매 ▪ 방선균 베타 한천분해효소 DagA에 의해 생산되는 비만, 당뇨, 고지혈증 등 대사질환 개선(국내, 일본, 중국 특허 등록)과 면역기능 증진 및 항암효능(국내 특허 출원), 폐혈증 개선 효능(국내 특허 등록, 미국 및 중국 특허 출원)이

	<p>증명된 NAO를 건강기능식품 기능성원료로 개별인정 획득</p> <ul style="list-style-type: none"> ▪ NAO를 건강기능식품으로 사업화 시 국내에서 연간 500억 원 이상의 매출 효과가 예상됨(전문기관 기술가치평가 보고서) ▪ NAO의 글로벌 기능성 원료시장 진출을 통해 식품, 의약품, 화장품, 바이오연료 등 다양한 사업 영역으로 확장 가능 ▪ 저가의 1차 수산물 식용소재 한천의 생물전환을 통해 기능성 바이오 식의약소재 NAO로의 생산으로 경제적 효용성 극대화 및 고부가가치 산업으로 전환 				
국문핵심어 (5개 이내)	방선균	베타 한천분해효소 DagA	생물전환	한천	식품가공용 효소
영문핵심어 (5개 이내)	<i>Streptomyces</i>	β -agarase DagA	Bioconversion	agar	food-processing enzyme

※ 국문으로 작성(영문 핵심어 제외)

< 목 차 >

1. 연구개발과제의 개요	1
2. 연구수행 내용 및 결과	4
3. 목표 달성도 및 관련 분야 기여도	34
4. 연구결과의 활용 계획 등	35
붙임. 참고 문헌	36

<별첨> 주관연구기관의 자체평가의견서

1. 연구개발과제의 개요

가. 연구개발 목적

(1) 최종 목표

- 비만, 당뇨, 고지혈증 등 대사질환 개선과 면역기능 증강 효능이 규명된 신규 기능성물질 네오한천올리고당(NAO)의 생산에 필수적인 방선균 베타 한천분해효소 DagA를 식품가공용 효소(한시적 기준의 식품첨가물)로 개발하여 DagA로 생산된 신규 식품원료 NAO의 양산 및 조기 사업화를 추진하고, NAO를 개별인정형 건강기능식품 기능성원료로 인정을 받아 고부가가치 바이오 식의약품 소재로 사업화하고자 함
- 베타 한천분해효소(DagA) 과발현 균주 개량 : 발현량 5배 이상 증가
- DagA 상업적 생산용 발효 공정 최적화 : DagA 발현 목표 수율 1,100 U/mL
- DagA 상업적 분리정제 공정 확립 : DagA 분리정제 목표 수율 75%
- 베타 한천분해효소(DagA) 사용 인허가
 - 식품의약품안전처 식품첨가물의 한시적 기준 및 규격 인정을 통한 DagA의 식품용 사용 허가
 - 미국 FDA의 GRAS 인정을 통한 DagA의 식품용 사용 허가

<기술개발 개요>



나. 연구개발의 필요성

- 최근에는 식물이나 해양 바이오매스를 효소 분해하여 식품, 의약품, 산업용 소재로 개발하려는 노력이 활발하게 진행되고 있음. 우리나라의 경우 식품가공용 효소개발이 거의 이루어지지 않고 제선진국의 기업에서 대부분 수입하고 있음
- 당사는 토양미생물로 안전성이 증명된 방선균으로부터 한천을 분해하여 네오한천올리고당을 생성할 수 있는 효소(베타 한천분해효소 DagA)를 최초 발굴하였음. 베타 한천분해효소 DagA는 희귀당인 3,6-anhydro-L-galactose를 함유하는 네오한천올리고당을 생산하는 효소로 타 생물체에서도 보고된 바 없음
- 당사의 선행연구결과, DagA 효소로 제조한 네오한천올리고당은 당뇨, 비만, 고지혈증 등 대사질환 개선에 탁월한 효과가 있고, 면역기능을 증진하는 효능이 있어 기능성 식의약소재로의 개발 가능성이 매우 높고, 새로운 기능성 바이오소재 시장을 형성할 것으로 예측됨
- 해양수산자원인 우뚝가사리 유래의 한천은 이미 식용소재로 인정되어 있으며, 자원 확보가 용이하고, 가격이 저렴하기 때문에 생물전환을 통한 네오한천올리고당 생산으로 경제적 효율성 극대화가 가능하고, 고부가가치 산업으로 전환할 수 있음
- 기능성 바이오소재 네오한천올리고당의 생산을 위한 핵심요소인 베타 한천분해효소 DagA는 본 연구진이 세계 최초로 상용화를 목표로 개발하였고, 어떤 유사 효소도 인체 안전성을 평가받아 식품용으로 상용화된 바 없음
- DagA 효소 고생산 균주 및 제조공정 개발 등 효소의 상업적 양산을 목표로 한 제반연구가 필요함. DagA는 아직 국내 및 외국에서 식품용으로 기준과 규격이 고시되지 아니한 식품첨가물의 범주로 분류되기 때문에 식품첨가물 기준 및 규격의 설정과 안전성 검증이 필요함
- 향후 네오한천올리고당의 생산을 위한 베타 한천분해효소 DagA의 국내 및 해외 상용화를 위해서는 global standard에 부합하는 기능성 및 안전성이 확보되어야 하고, 베타 한천분해효소의 식품용 효소 인정이 필수임
- 본 사업을 통해 DagA가 식품가공용 효소로 인허가를 취득하게 되면 해조류 유래 다당류 분해효소로써 신규 네오한천올리고당을 일반식품원료, 기능성 식품, 의약품, 화장품 기초 원료 및 첨가제 등으로 사업화할 수 있는 높은 잠재적 가치를 가지고 있음
- 베타 한천분해효소 DagA를 이용하여 다량 생산된 네오한천올리고당은 전임상 및 임상연구를 통하여 보다 부가가치가 높은 천연물유래로 부작용이 적은 대사질환(성인질환) 예방 및 치료용 기능성 식품 및 의약품으로 개발하여 고부가가치 사업화가 가능함
- DagA는 해양 다당류 즉 아가(한천)를 가수분해하여 올리고당으로 분해하는 능력이 우수하

므로 장기적인 안목에서 해양 바이오매스인 해조류의 산업적 이용 공정의 핵심 기술로 활용하여 산업용 효소 용도로 적극적인 개발이 필요함

다. 연구개발 범위

- 베타 한천분해효소 DagA 과발현 균주 개발
 - 전통적 돌연변이 유도법(UV 돌연변이) 적용
 - 유전자 치환 또는 재조합 기술에 의한 대량 발현 균주 개발

- 베타 한천분해효소 대량 양산 제조공정 표준화
 - 대량 발효공정 개발(발효조건 확립, 산업용 배지 선정 등)
 - 효소 단백질 분리 정제 공정 개발

- 베타 한천분해효소 DagA의 기준 및 규격 설정
 - 정상 및 유효성분 함량 규격
 - 안전성 규격 설정
 - 표준품 제조 및 표준분석법 확립
 - 시험기준 및 방법 설정

- 베타 한천분해효소 DagA 안전성 평가(GLP 기관)
 - 세포 독성
 - 단회 및 반복투여 설치류 안전성
 - 유전독성(염색체이상, 복귀돌연변이, 소핵시험)

- 식품의약품안전처 식품첨가물 인정을 통한 DagA 식품용 사용 허가

- DagA 시제품 생산 및 국내·외 사업화
 - 미 FDA GRAS 인정을 통한 DagA 식품용 사용 허가
 - DagA 식품가공효소 사업화 및 DagA 가공 NAO 식품 원료 사업화
 - 기능성 건강 식의약품 소재 개별 인정 및 사업화
 - 산업용 효소

2. 연구수행 내용 및 결과

가. 방선균 유래 베타 한천분해효소(DagA) 과발현 균주 개발 및 생산 공정 최적화

(1) 베타 한천분해효소 DagA 과발현 균주 개발

- 대사질환 및 면역기능 개선 등의 다양한 효능을 가지는 기능성 소재 네오한천올리고당 (NAO) 제조에 베타 한천분해효소 DagA는 필수 요소임. 하지만 베타 한천분해효소를 이용한 네오한천올리고당의 기능성 바이오소재로 고부가가치화를 위해서는 이 효소를 식품의약품안전처로부터 식품 가공용 효소(한시적 식품첨가물)로 인정을 받아야만 함
- 산업용 효소 생산 균주에 적합하면서 식약처 인허가 취득 가능성이 높은 DagA 과발현 균주 개발을 위하여 본 연구에서는 다양한 균주 개량법(*Corynebacterium glutamicum* 균주를 숙주로 사용한 유전자 변형 방법과 전통적인 돌연변이 유도방법인 자외선 돌연변이 유도 방법)을 이용한 DagA 효소 생산 균주를 개량함

○ 유전자 변형 방법에 의한 DagA 효소 생산

1) *Corynebacterium glutamicum* 균주를 이용한 DagA 과발현 균주 개발

- ▶ *Streptomyces coelicolor* WT 균주에서 보다 DagA가 과발현되는 균주를 제작하고자 식품 산업에 다양하게 이용되고 있는 유전자변형 미생물 안전성평가 통과 사례를 조사하고 자료를 수집하여 식품첨가물 인허가 취득이 용이한 *Corynebacterium glutamicum* 균주에 pCES208 vector를 이용한 DagA 생산시스템 구축한 DagA 과발현 *C. glutamicum* 균주를 제작함(그림 1)

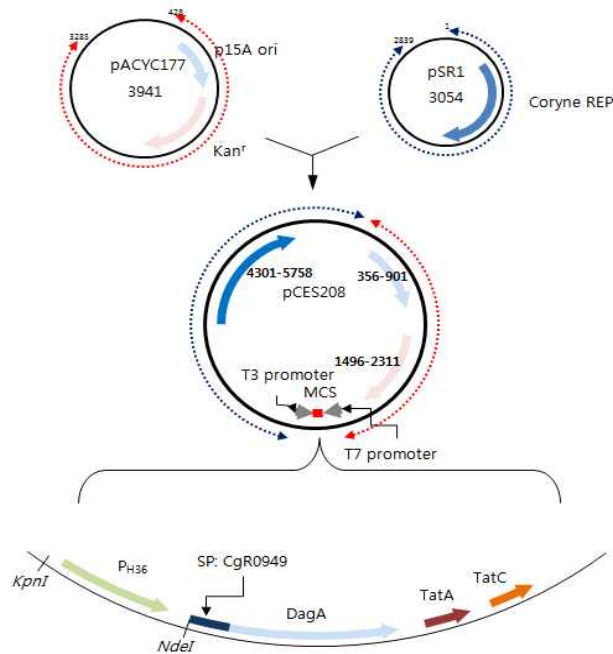


그림 1. *C. glutamicum* 균주에서의 DagA 과발현 유전자 변형 구축 구성.

- ▶ *E. coli* 유래의 pACYC177, *C. glutamicum* 유래의 pSR-1 벡터를 결합하여 카나마이신 내성 유전자(*Kan^r*)가 삽입된, *E. coli* 및 *C. glutamicum*에서 복제 가능한 shuttle vector pCES208을 이용하여 *Kpn* I/*Nde* I 제한효소 자리에 P_{H36} 프로모터를 삽입하고 DagA N-terminal 부위에 CgR0949를 결합하고, DagA downstream에 TatA/TatC를 삽입하여 최종 DagA 발현벡터를 제작하여 배양하여 배양액으로 SDS-PAGE gel에 전기영동 분석을 진행하여 DagA 발현을 확인함
- ▶ 그 결과 DagA의 정확한 단백질 크기(32kD)에서 발현되었고 DagA 외에 Cg1831(*Corynebacterium* 자체 분비 단백질) 또한 발현되고(그림 2A) Flag tag을 이용하여 western blotting 통해 확인한 결과에서 48시간 후 발현량이 포화상태에 도달함(그림 2B). 발현된 DagA는 FPLC로 분획하여 fraction별로 확인하여 ion-exchange column chromatography를 통해 DagA를 정제함(그림 2C)
- ▶ 배양액 30 ml에서 최종 DagA 13.2 mg를 정제할 수 있고 이는 40% 회수율, 95% 이상의 순도를 가지며, 2 L 배양액에서 DagA 0.88 g 회수 가능함

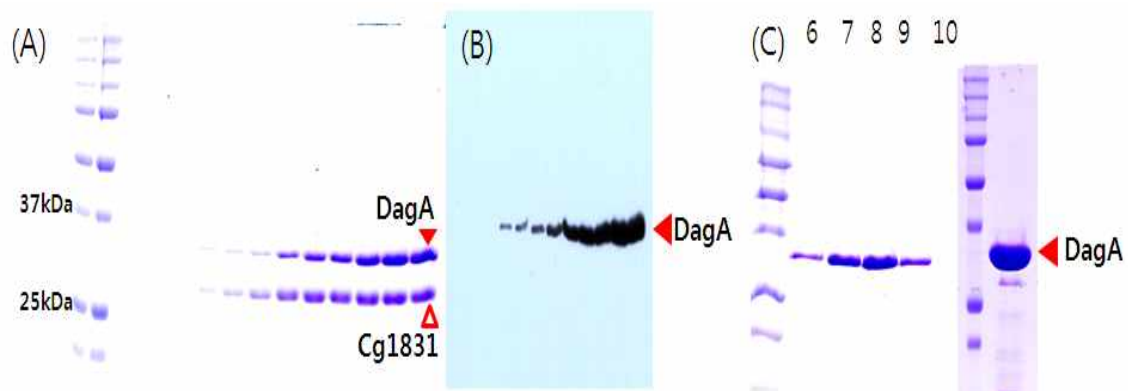


그림 2. *C. glutamicum* 균주에서 DagA 발현 확인: 배양액 SDS-PAGE(A), FLAG tag 이용한 western blotting(B), FPLC 및 ion-exchange column chromatography 통한 DagA 정제(C).

- ▶ 정제된 DagA의 반응시간별 배양액-아가로스 분해산물을 HPLC 정량 분석을 통해 1 g/L agarose에서 neoagarotetraose (DP4) 0.4 g/L, neoagarohexaose (DP6) 0.6 g/L 생성하였고, 이는 *Corynebacterium*에서 DagA가 제대로 발현됨을 확인함(그림 3)

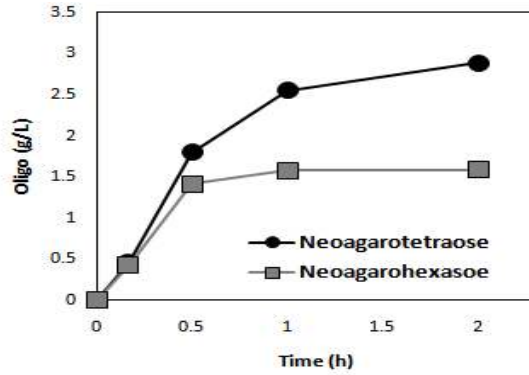


그림 3. *C. glutamicum* 균주에서 정제한 DagA 효소의 agarose 분해산물 HPLC-ELSD 분석.

○ 자외선 돌연변이 유도법을 이용한 DagA 과발현 균주 개량

- ▶ 자외선(UV) 돌연변이 유도법을 이용하여 한천의 β -1,4 결합을 특이적으로 분해하여 DP4와 DP6로 분해하는 베타 한천분해효소 DagA 고생산 균주를 스크리닝을 통해 최종 획득하였음
- ▶ 방선균 *Streptomyces coelicolor* A3(2) 균주의 포자액(spore stock)을 TSB (tryptic soy broth) 액체 배지와 희석하여 페트리디쉬에 넣고 치사율이 99.9%가 되도록 UV를 32~45 분 동안 조사한 다음, 배양액을 MM agar(방선균 최소 배지(minimal medium); Hopwood, 1967), 0.05% asparagine, 0.05% K₂HPO₄, 0.02% MgSO₄, 0.001% FeSO₄, 1% glucose, 1.5% agar)에 도말하여 28°C에서 5일 동안 정치배양한 후 Lugol's iodine 시약으로 염색하여 균주 콜로니 주변에 나타나는 투명환(halo zone)이 큰 콜로니 8,671종을 선별함 (그림 4)

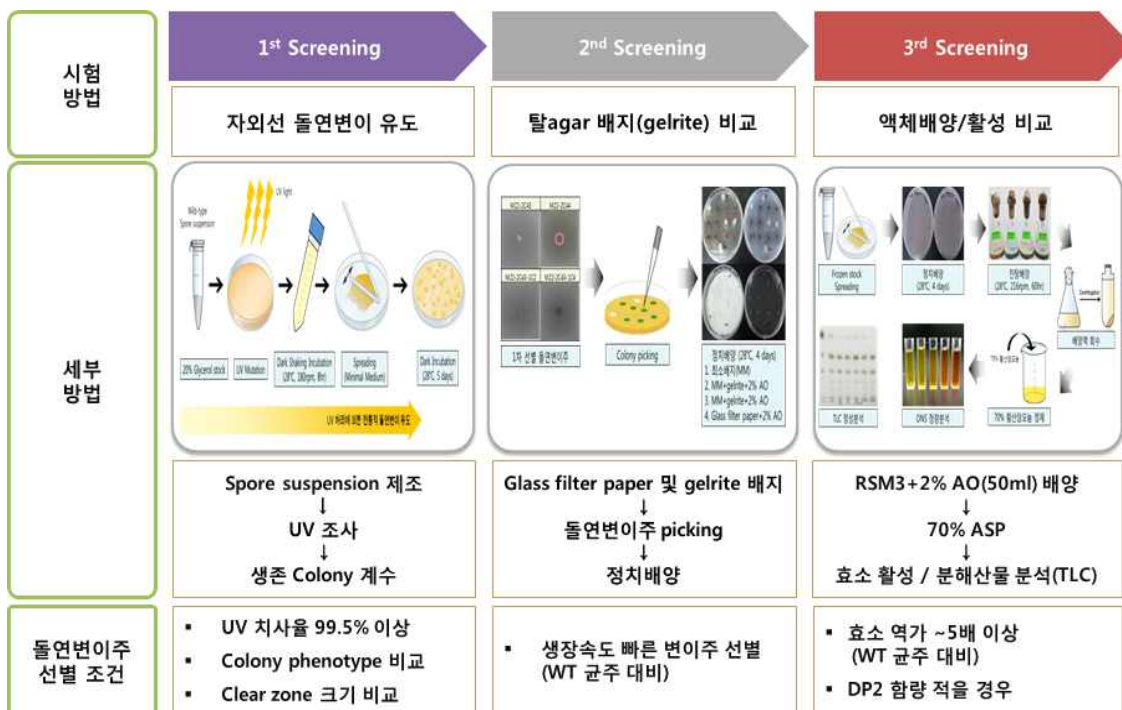


그림 4. DagA 과발현 균주 개량 선별 모식도.

- ▶ 선별한 균주 중 4,790종을 MM 액체배지와 2% 한천산당화액(AO, agarooligosaccharide, 아가-산가수분해물)을 흡수시킨 glass filter paper와 agar 대체 시약(gelrite)을 0.8% 첨가한 plate에 picking을 하여 28°C 에서 5일간 배양하여 포자를 형성하여 자라는 균주 442종을 선별함. 그런 다음, 선별한 균주를 2% 한천산당화액을 탄소원으로 포함하는 RSM3 배지(1.1% yeast extract, 0.5% MgCl₂)에 28°C, 180rpm으로 진탕배양한 후, 배양 세포를 제거하여 회수한 배양액을 50%, 70% 황산암모늄 침전(ammonium sulfate precipitation salting out, ASP)을 통해 효소를 부분 정제하여 환원당 정량방법인 DNS(dinitrosalicylic acid) 방법으로 베타 한천분해효소의 활성을 비교함
- ▶ 배양한 균주 중 높은 활성을 가지는 것으로 확인하여 변이주 9종을 선별하였고 이의 효소액을 0.5% 한천용액과 반응시켜 생성되는 네오한천올리고당(NAO)을 박층크로마토그래피(thin layer chromatography, TLC) 분석법을 통해 DP4와 DP6를 생성함을 확인하여 (그림 5), 가장 활성이 높고 DP4와 DP6 생산을 많이 하는 균주를 찾아 M22로 명명하고 한국미생물보존센터에 국내 특허 미생물로 기탁을 하고(KFCC11668P, *Streptomyces coelicolor* A3(2)_M22) 국내 특허를 출원함(10-2016-010141, 2016년 8월 17일, 그림 6)

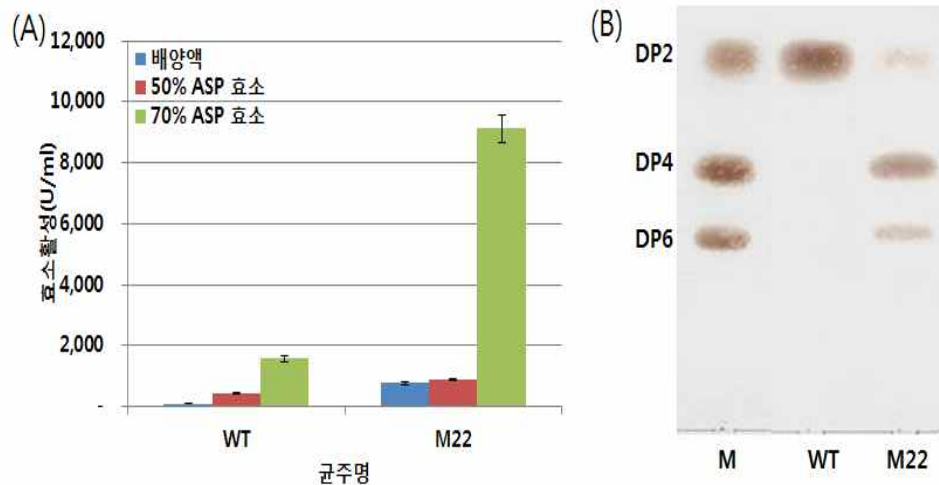


그림 5. 방선균 돌연변이주 M22 효소 활성(A) 및 분해산물(B) 비교.

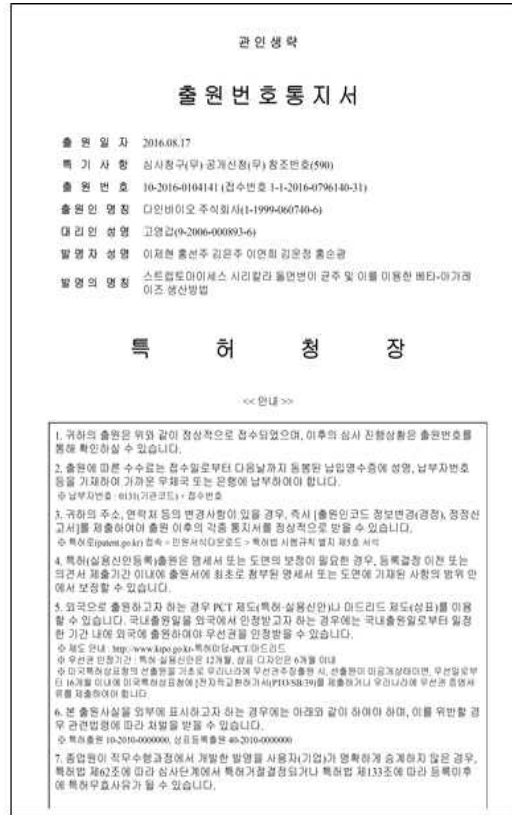
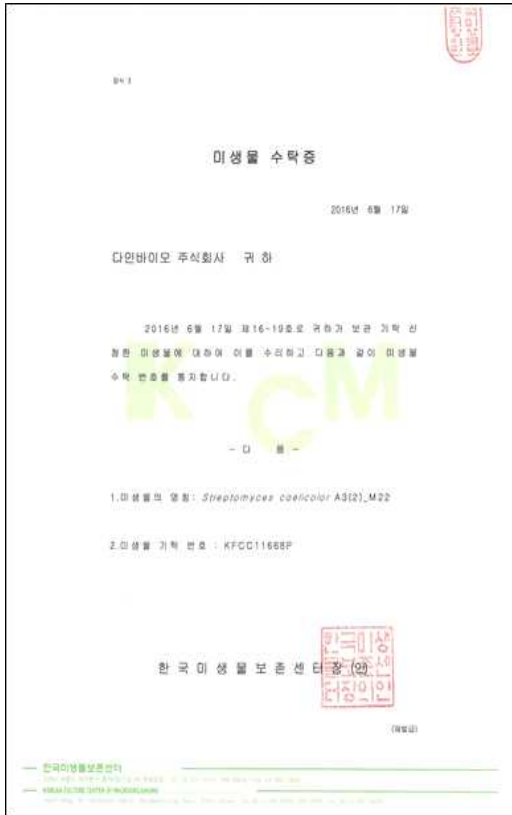


그림 6. M22 균주 기탁증 및 특허출원번호 통지서.

- 재돌연변이 유도를 통한 DagA 과발현 균주의 지속적인 개량 및 안정화
- 1차 개량균주 *Streptomyces coelicolor* A3(2) M22 균주를 모균주로 하여 포자 stock을 펠트리디쉬에 치사율 99.9% 조건으로 UV(자외선) 조사한 복귀돌연변이가 일어나지 않도록 암 조건으로 8시간 동안 28°C, 180rpm으로 진탕 배양한 다음, 배양액을 MM agar 배지에 도말하여 암 조건으로 28°C 에서 5일 동안 정치배양한 후 Lugol' s iodine 염색시약으로 염색하여 투명화(clear zone) 크기가 큰 446개의 균주를 선별함
- 선별한 446 균주 중 156 균주를 RSM3 배지에 배양한 후, 배양액을 회수하여 50%, 70% 황산암모늄 침전 (ammonium sulfate precipitation salting out, ASP)을 통해 효소를 부분 정제하여 DNS (dinitrosalicylic acid) 방법으로 배양액, 정제 효소(50% 황산암모늄 침전(50% ASP), 70% 황산암모늄 침전(70% ASP)) 각각의 베타 한천분해효소의 활성 및 분해산물 비교를 통해 상대적으로 높은 효소 활성으로 DP4와 DP6만을 생성하는 선별 변이주 1종을 최종 선별하여 *Streptomyces coleilcolor* A3(2)_M22-2C43로 명명함(그림 7, 8)

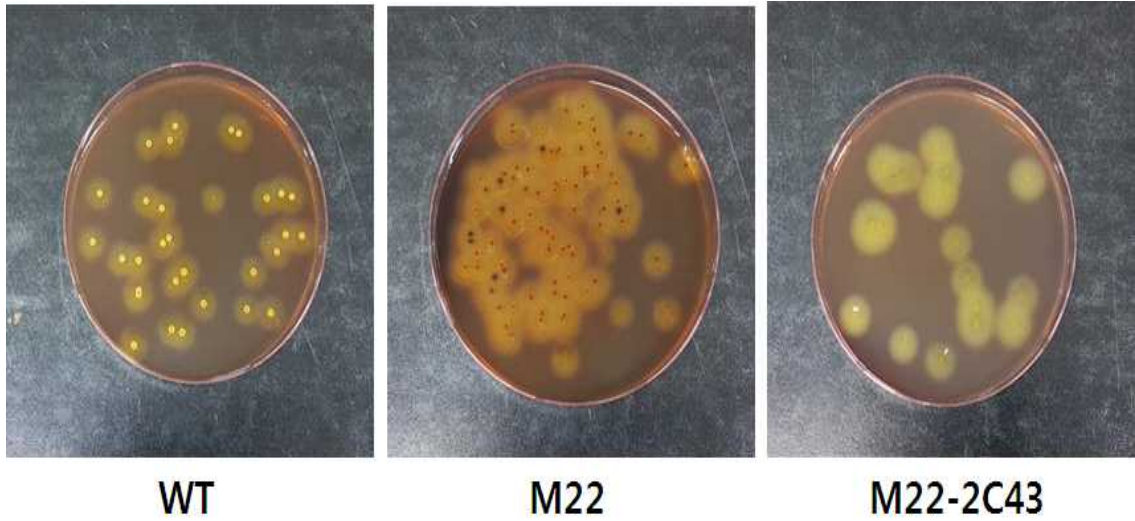


그림 7. UV 돌연변이 유도 방법으로 선별한 돌연변이주 투명환 비교.

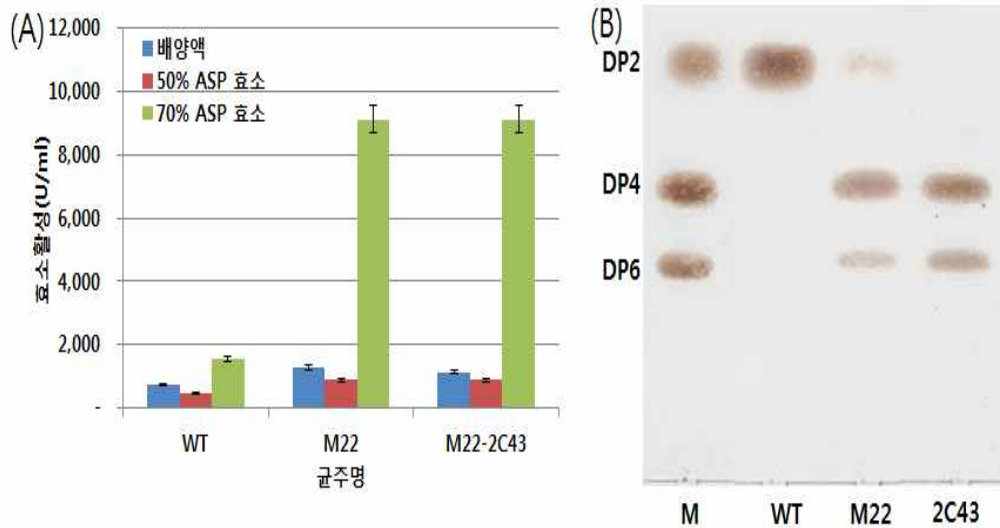


그림 8. 방선균 돌연변이주 M22 효소 활성(A) 및 분해산물(B) 비교.

- 최종 선별한 변이주 배양액을 황산암모늄으로 침전시켜 부분 정제한 효소액을 한천용액과 반응시켜 생성된 네오한천올리고당(NAO)을 TLC 및 HPLC를 이용하여 정성 및 정량적 분석을 통해 네오한천올리고당 DP4와 DP6가 생성됨을 확인함(그림 9)

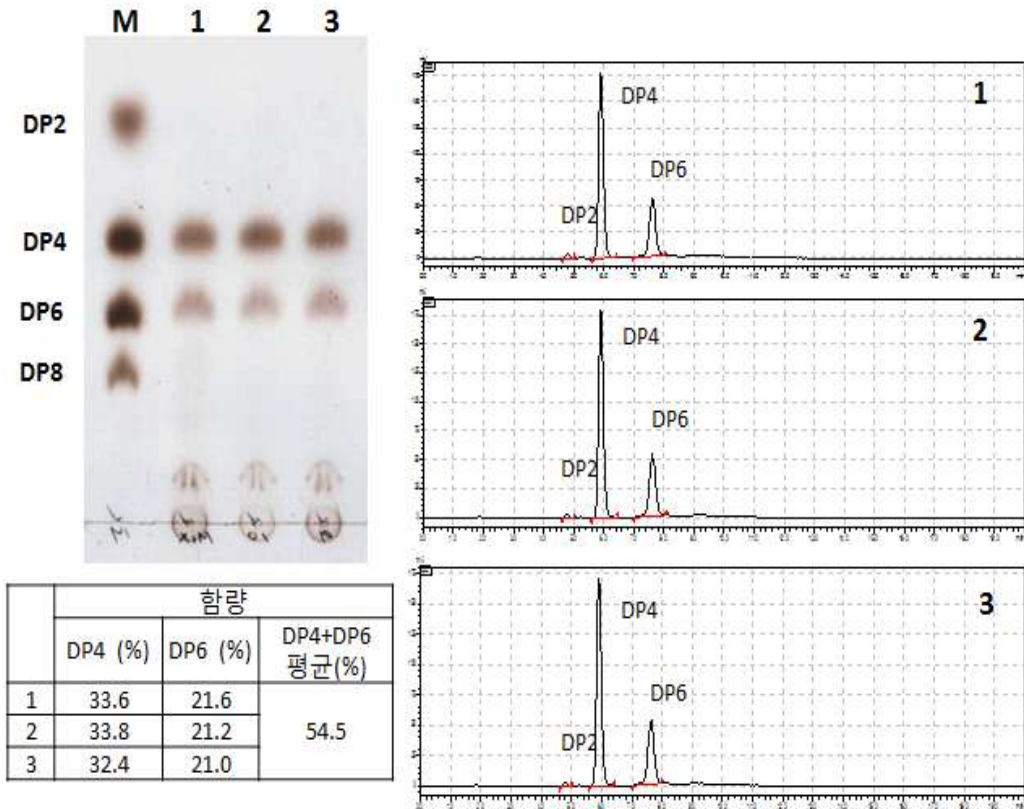


그림 9. 조효소액에 의한 한천 분해산물의 TLC 정성 및 HPLC 정량 분석.

- 자외선 돌연변이 유도법을 이용하여 한천을 분해하여 네오한천올리고당 DP4와 DP6을 다량으로 생산하고 높은 효소 활성을 가지는 베타 한천분해효소 DagA 고생산 균주를 최종 개발 완료한 1종 균주를 한국미생물보존센터에 국내 특허 미생물로 기탁을 하고 (*Streptomyces coelicolor* A3(2)_M22-2C43, KFCC11742P) 국내 특허를 출원하였고 (10-2018-0112517, 2018년 9월 19일) 본 출원 특허 M22-2C43 균주 및 이로부터 제조한 효소를 이용한 네오한천올리고당 제조 기술에 대해 특허권을 취득하여(특허번호 제 10-1919962호) 효소 및 네오한천올리고당 제조에 대한 원천기술을 확보함(그림 10).



그림 10. M22-2C43 균주 기탁증 및 특허증.

(2) DagA 효소 과발현 균주의 효소 생산 공정 최적화 및 분리정제 공정 표준화

○ 돌연변이주의 최적배지 및 배양 조건 확립

- 선별한 돌연변이주 중 네오한천올리고당 제조에 적합한 M22-2C43 균주의 생장 및 효소 생산을 위한 최적 탄소원 확인을 위해 탄소원의 종류를 변경하여 균주의 생육 및 효소 활성을 비교함(그림 11)

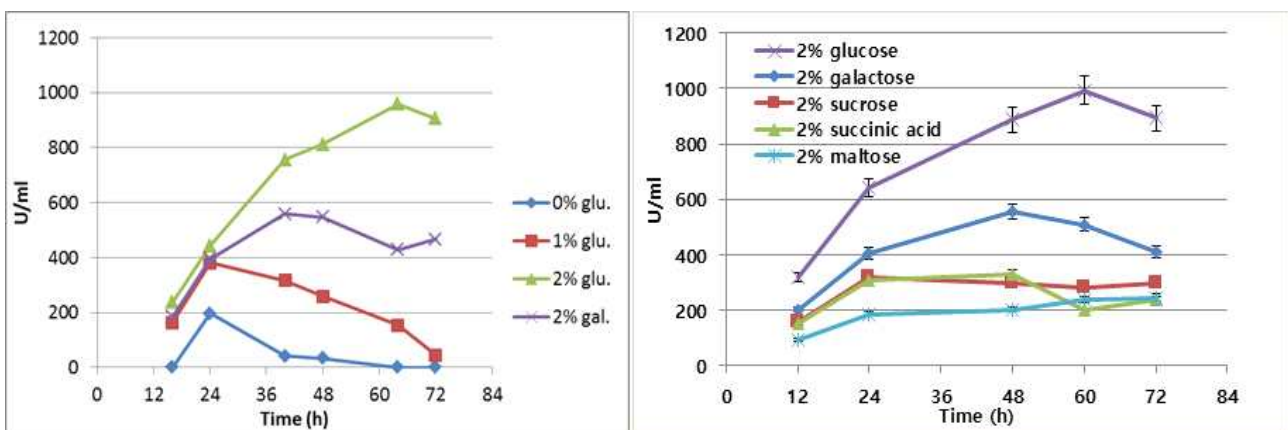


그림 11. 재돌연변이주 최적 배지 조건 확인 시험.

(A) 단일 탄소원별 배양 비교, (B) 혼합 탄소원 agar 첨가 농도에 따른 배양 비교.

- 배양 비교 결과, 가장 높은 효소 활성을 보여주는 최적 탄소원으로 2% glucose로 결정함. 또한, 최적 배양 조건 설정을 앞서 설정한 최적 탄소원 2% glucose 조건에서 배양한 결과, 30°C, 250 rpm 조건이 최적 조건으로 확인됨(그림 12)

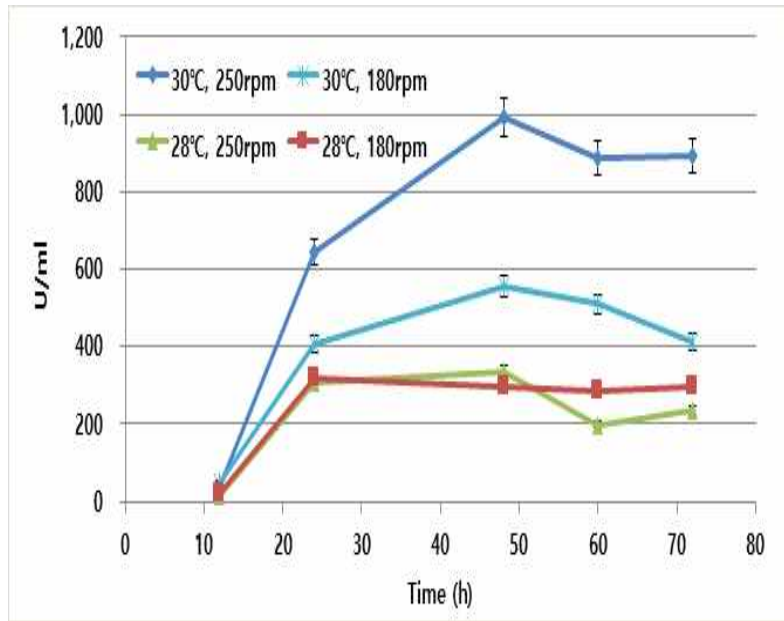


그림 12. 재들연변이주 최적 배양조건 설정 시험.

○ DagA 분리 정제 공정 표준화

- DagA 분리 정제 공정은 재들연변이주 M22-2C43의 RSM3 배지 배양액을 원심분리하여 세포를 제거한 다음, 상등액을 0.45 μm syringe filter로 제균 여과하여 정제한 후에 한외여과 (ultrafiltration)에 막 분리(diafiltration) 공정을 추가하는 과정으로 진행함(표 1).
- 한외여과 공정에 막 분리 공정이 추가되었을 때 정제 회수율이 약 2배 이상 높아짐을 확인하여 DagA의 정제 공정으로 설정함

표 1. 막 분리 공정 추가에 따른 한외여과 농축 회수율 비교

	배양액	ultrafiltration		ultrafiltration/diafiltration	
		10K 농축액	waste	10K 농축액	waste
U/ml	218±35	1,950±13	22±8	2,420±321	24±6.5
회수율(%)	100	35.8±15	9.0±12	69.4±10	9.9±7.8

나. DagA 대량생산 공정 개발 및 파일럿 공정 시험 생산

○ 식품용 DagA 대량생산용 발효 배지 개발

- 식품용 DagA 효소의 생산수율 및 최대 농도, 경제적인 가격, 공급의 용이성, 생산 공정상 문제가 없는 대량생산용 발효배지를 설계하여 개발함
- 본 연구를 통하여 균체 성장 및 효소 생산 측면에서 실험용 Lab 배지 대비 식품산업용 배지 조성으로 식품첨가물 공전 등재된 glucose, yeast extract, MgCl2로 변경하여 사용하였을 때 배양 및 효소 발현에 있어서 동등한 배양 결과가 나타나, 대량 생산을 위한 산업용 배지 조성으로 확정함(그림 13)

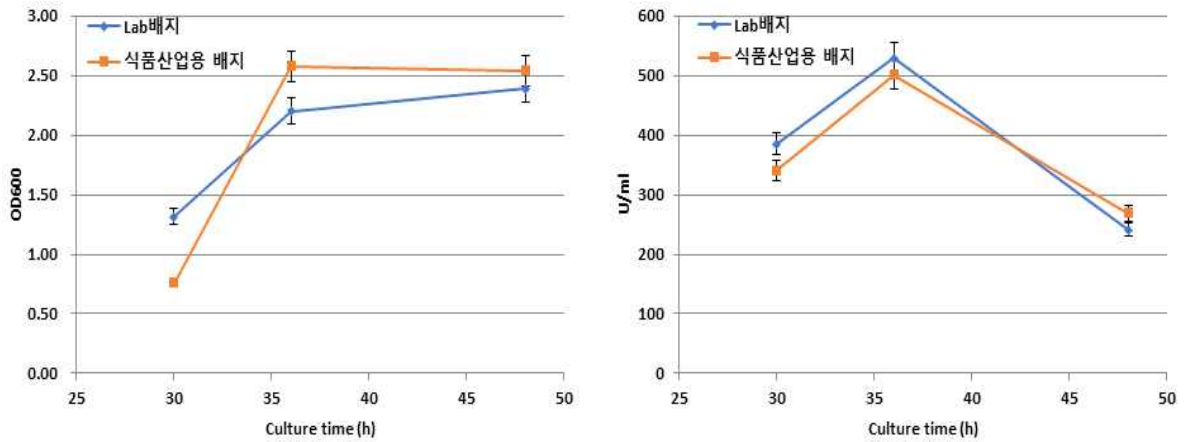


그림 13. 배지에 따른 균체 성장 및 효소 활성.

○ 5 L 발효공정 스케일 업(Scale up) 및 변수 최적화

- 산업용 배지를 기반으로 5 L 발효공정 확립을 위한 제반 변수를 확인하고 최적화 함
- 10 L jar fermenter(Fermentec, Chungbuk, Korea)를 이용한 5 L 발효 스케일 업 과정에서의 DO, pH 조건에 제반 변수 최적화 조건 확립함(표 2, 그림 14)

표 2. 5 L 발효 변수 최적화 조건 설정

	JAR 1	JAR 2	JAR 3
접종량(%)	10%	10%	10%
배양온도(°C)	30	30	30
pH	7	7	6
DO	60% 고정	비고정	비고정
glucose(g/L)	10	10	10
소포제(%)	0.5	0.5	0.5
통기량	1	1	1
교반속도	300	300	300
배양시간(h)	48	40	42
총 배양부피(L)	5	5	5

- 발효 공정의 변수를 달리한 JAR 1~3 발효 공정에서의 균체 성장 및 효소활성을 비교하였을 때, JAR 1 발효 조건에서 가장 높은 효소 발현을 확인하였고(그림 14) 본 조건을 기반으로 배양온도, pH, DO(dissolved oxygen), aeration, 발효 중 기포 발생억제를 위한 소포제 등의 스케일 업 변수를 최적화 함. JAR 조건별 3반복 배양 진행하여 가장 최적의 발효조건 JAR 1의 조건이 가장 적합한 발효 조건임을 확인함(그림 15)

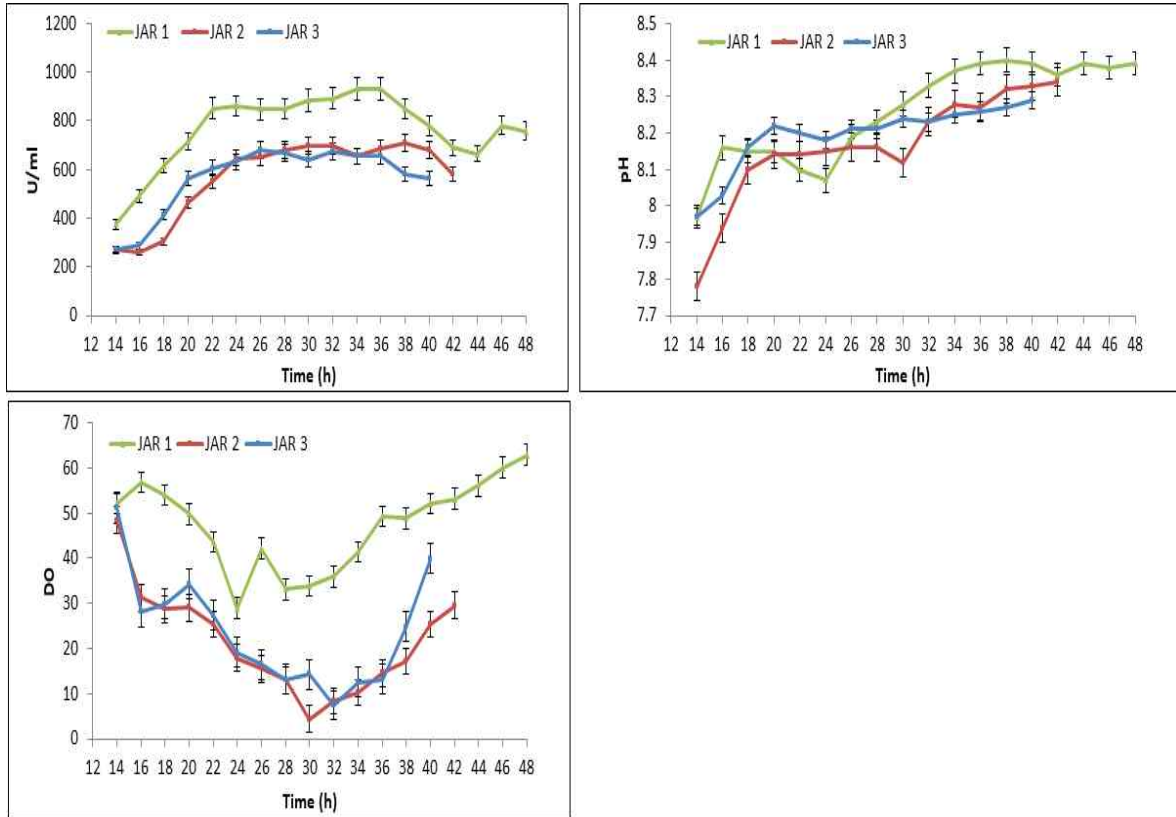


그림 14. 5 L 발효공정 변수 최적화 조건 설정

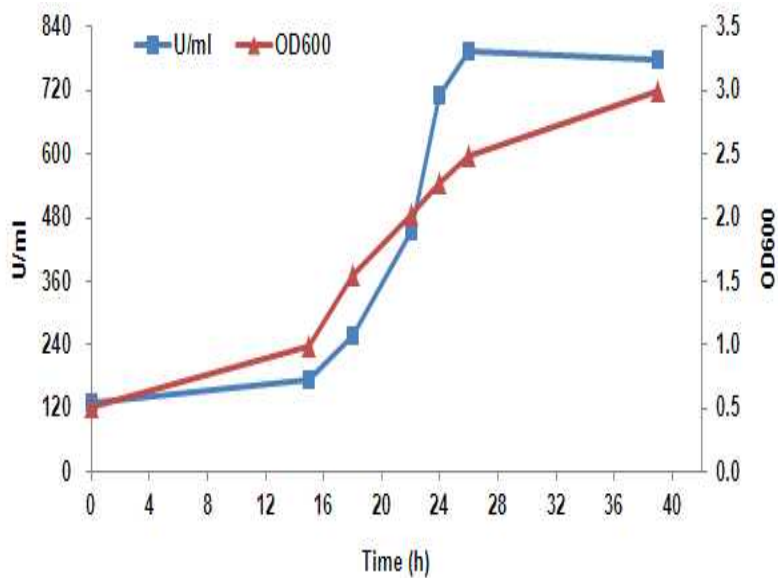


그림 15. 5 L 발효공정 변수 최적화

○ 대량 생산 발효공정 개발

- 경제성 증진을 위하여 고생산성 유가 발효법(fed-batch culture)을 적용하고, 5 L 규모 발효 공정 결과를 바탕으로 DagA 효소의 상업적 대량 생산을 위한 50 L 발효조의 운전조건을 확립하고, 발효공정을 개발함
- 5 L 발효공정을 기반으로 50 L fermenter(Kobiotech, Inchon, Korea)를 사용하여 30 L 발효

를 진행한 결과, 5 L 발효공정과 유사한 발효 양상을 확인하여, 이를 바탕으로 30 L 규모의 DagA 효소 대량 생산용 발효공정을 확립함(그림 16)

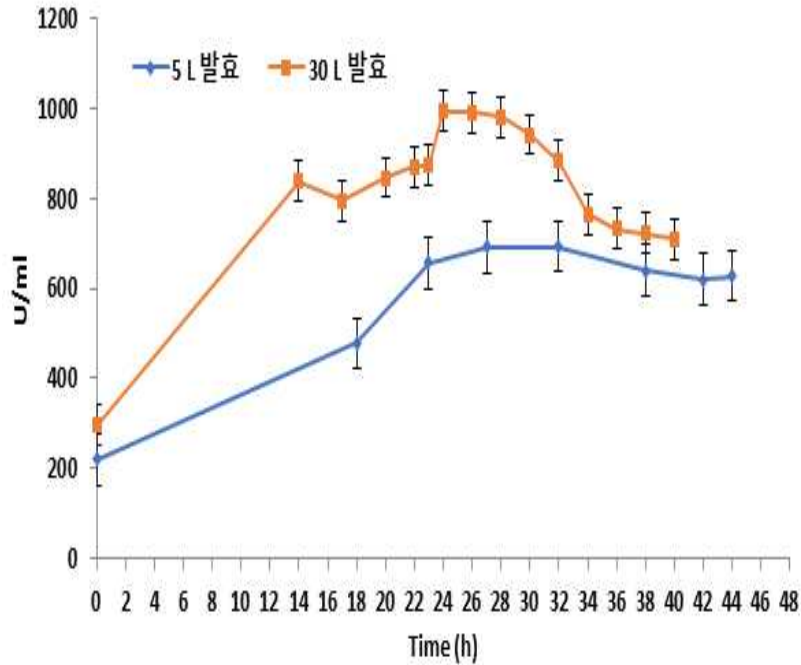


그림 16. 방선균 상업적 생산 위한 30 L 발효 조건 최적화.

○ 대량 생산용 효소 300 L, 3 kL 시생산

- 5 L, 30 L 발효를 통해 확립한 발효 조건으로 500 L fermenter(Kobiotech, Incheon, Korea)에서 300 L, 5 kL fermenter(Kobiotech, Incheon, Korea)에서 3 kL 발효 공정으로 시생산 진행한 결과, 30 L 발효와 동일한 양상으로 나타났으나 발효 종배양 횡수가 늘어남에 따라 배양 12시간 이후 빠른 시간 내 높은 활성을 나타냄. 이를 통해 30 L, 300 L, 3 kL 발효에서의 효소 대량생산 표준 공정 조건을 확립함(그림 17, 표 2)

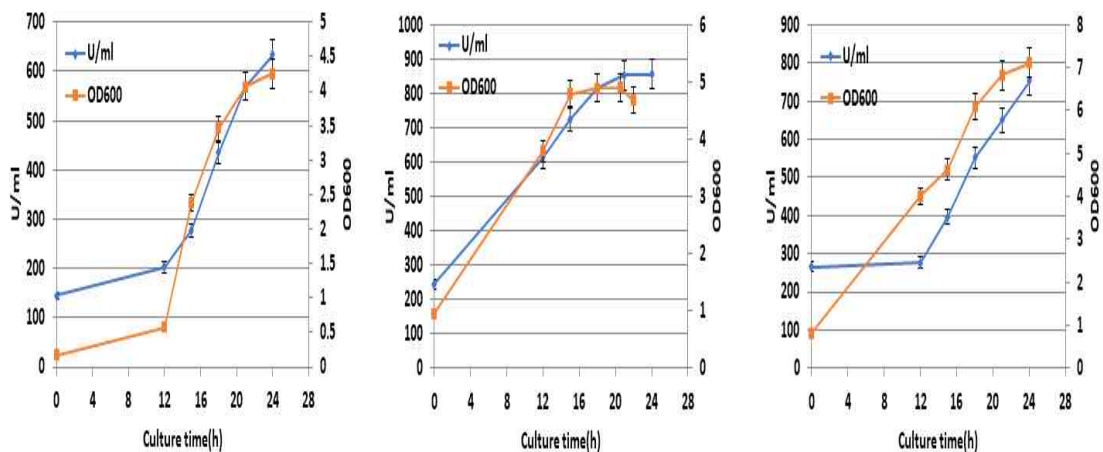


그림 17. 방선균 상업적 생산 위한 30 L, 300 L, 3 kL 발효 결과(왼쪽에서부터 30 L, 300 L, 3 kL 순).

표 3. 대량 생산을 위한 발효 스케일 별 표준 공정 설정

Working vol.	30L	300L	3kL
집중량(%)	5	10	10
온도, pH	30°C, 7		
소포제(mL)	4	40	1,000
DO(%)	60	60	60
통기량(vvm)	1	1	1
교반속도(rpm)	300	100	75
배양시간(h)	24	24	24
배양기 vol.	50L	500L	5kL

○ DagA 대량생산을 위한 분리정제 공정 개발

- 대량 생산 발효공정으로 확보한 배양액의 균체 제거와 효소액의 농축 및 분리정제를 위하여 원심분리 및 여과(microfiltration), 막 분리(diafiltration), 농축(ultrafiltration), 제균 여과 과정으로 구성된 단위조작 공정을 확립하여 DagA 효소의 회수율을 높이는 공정으로 최적화 하고 대량 발효에서부터 정제 공정에 이르는 제조공정도를 확립함(그림 18)

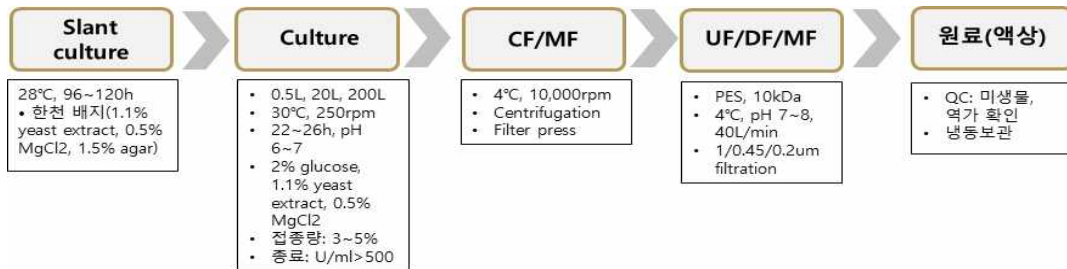


그림 18. DagA 효소 생산 공정도.

- DagA 분리 정제 공정은 앞서 확정된 재돌연변이주 M22-2C43 배양 조건으로 5 L 배양한 배양액으로 황산암모늄 침전과 한외여과 정제 방법으로 비교하였고 동일한 한외여과 공정으로 파일럿 스케일 배양액(30 L, 300 L)으로 한외여과 정제 효율을 비교하여 확인하여 정제 공정 방법을 확립함(표 4).

표 4. 대량 발효액으로부터 분리 정제 조건 설정

배양 vol.	5 L		30 L	300 L
정제방법	황산암모늄 침전(ASP)		한외여과(UF)	
	Ammonium sulfate precipitation		Pellicon® Mini Holder, 10K PES, Millipore	SARTOFLOW® BETA, 10K PES, Sartorius
적용	Lab scale		산업용 규격	
역가(U/ml)	3,261±220		3,200±25	4,668±521 6,325±450
회수율	86±10%		82.5±7%	75.2±5.4% 69~70% 전후
특징	<ul style="list-style-type: none"> - 간단, 일반적 농축, 저비용 - 추가적인 AS 제거 공정 필요 - 설비가동 및 운전복잡 - 대량생산 속도제한/비효율성 		<ul style="list-style-type: none"> - 용해된 고분자 농축 용이 - 수중콜로이드상 물질(미생물, 저분자제거) - 고가 여과막 - 생산공정 운전 조건설정可 - Pre-pilot, 단시간공정 	

다. DagA 효소 표준 규격 설정 및 표준관리법에 의한 기준 및 시험법 결정

- DagA 효소에 대한 대장균/군, 살모넬라에 대한 미생물시험, 성상 및 중금속시험, 고형분 함량 분석법은 모두 식품공전 시험법에 근거하여 수행하였고 한천분해효소 활성시험법에 대해서는 기존첨가물자주규격 제4판(일본식품첨가물협회, 2007년 10월)에 따라 진행하여 베타 한천분해효소 DagA에 대한 품질 관리 기준 및 품질 규격을 설정함

- 유효성분 함량설정: 화합물과 달리 효소의 절대 함량은 백분율(%) 표시에 어려움이 있어 유효성분의 함량을 효소활성(역가)로 기재하기로 결정하여 확인시험방법으로 베타 한천분해효소의 활성 측정법을 제시하고, 함량을 활성으로 나타냄

- 순도시험(미생물 시험, 성상 및 중금속 시험, 고형분 시험, 확인시험 등)
 - 미생물 기준 설정
 - 양산 표준 공정으로 제조한 효소액을 식품공전 일반시험법의 미생물시험법 중 대장균군, 살모넬라, 대장균에 따라 당사가 자체 시험 실시 및 한국기능식품연구원에 의뢰하여 확인한 결과, 살모넬라 및 대장균군, 대장균 모두 불검출 됨(그림 19)
 - 이 결과를 근거로 식품공전의 기준에 따라 효소의 미생물 기준을 “살모넬라 불검출, 대장균군 30 CFU/mL 이하, 대장균 불검출” 로 설정함

제 D2017090821 호 문서확인				시험·검사성적서													
제품명	베타아가라아제(β -Agarase)		제조일자 (유통기한)	2017-09-05													
의뢰인	업체명	다인바이오(주)	성명	이재현													
	주소	경기도 성남시 중원구 사기막로45번길 14 (상대원동, 우림2차비동비205호)															
제조번호	500609217	접수년월일	2017-09-11														
검사의뢰목적	제출용	접수번호	D2017090821														
<p>귀하가 우리 연구원에 시험·검사의뢰한 결과는 다음과 같습니다.</p> <p>시험·검사 완료일: 2017-09-15 시험·검사 책임자: 이정구 검사관련 총 책임자: 김천희</p> <table border="1" style="width: 100%; text-align: center;"> <thead> <tr> <th>시험·검사항목</th> <th>시험·검사 결과</th> <th>시험·검사원</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>살모넬라</td> <td>음성</td> <td>민경하</td> </tr> <tr> <td>대장균</td> <td>0</td> <td>민경하</td> </tr> <tr> <td>대장균군</td> <td>0</td> <td>민경하</td> </tr> </tbody> </table> <p>※ 위 판정은 의뢰된 시험·검사 항목만을 대상으로 한 것입니다. ※ 지면이 부족한 경우 시험·검사 및 결과판은 별지로 작성 가능합니다.</p> <p style="text-align: center;">2017년 9월 15일</p> <p style="text-align: center;">한국기능식품연구원</p> <p style="font-size: small; text-align: center;">(사)한국건강기능식품협회 부설 한국기능식품연구원 http://www.khsi.re.kr 전화번호 (031)628-2400 FAX(031)628-0400-1</p>						시험·검사항목	시험·검사 결과	시험·검사원	살모넬라	음성	민경하	대장균	0	민경하	대장균군	0	민경하
시험·검사항목	시험·검사 결과	시험·검사원															
살모넬라	음성	민경하															
대장균	0	민경하															
대장균군	0	민경하															



그림 19. DagA 효소 미생물 성적서.

- 중금속 기준 설정
 - 제조과정에서 혼입이 예상되는 중금속에 대한 기준 설정을 위하여, 베타 한천분해효소 양산 표준 공정을 통하여 제조한 효소액을 식품공인분석기관인 한국기능식품연구원에 중금속 4종에 대한 분석 시험을 의뢰하여 식품공전 일반시험법으로 비소, 납, 카드뮴은 유도결합플라즈마법(ICP-MS)에 따라, 수은은 수은분석시험법에 따라 3회 반복 분석한 결과, 비소 0.0066 ppm, 수은 0.001 ppm, 납 0.0119 ppm, 카드뮴 0.0026 ppm이 검출됨(그림 20)
 - 이 결과를 근거로 식품공전 기준에 따라 효소액의 중금속 기준을 비소 4.0ppm 이하, 납 5.0ppm 이하로 설정함.

제 D2017090820 호
문서확인

시험·검사성적서

제품명	베타아가라아제(β -Agarase)	제조일자 (유통기한)	
의뢰인	업체명	다인바이오(주)	성명
	주소	경기도 성남시 중원구 사기막골로45번길 14 (상대원동, 우림2차비동비205호)	
제조번호		접수년월일	2017-09-11
검사의뢰목적	제출용	접수번호	D2017090820


귀하가 우리 연구원에 시험·검사의뢰한 결과는 다음과 같습니다.

시험·검사 완료일 : 2017-09-22
 시험·검사 책임자 : 이정구 검사관련 총 책임자 : 김천희

시험·검사항목	시험·검사 결과	시험·검사원
성상	이미, 이취가 없고 고유한 향미가 있는 갈색의 액상	김정숙
비소(mg/kg)	0.0065mg/kg	류미진
수은(mg/kg)	불검출	조웅
납(mg/kg)	0.0044mg/kg	류미진
카드뮴(mg/kg)	0.0007mg/kg	류미진

※ 위 판정은 의뢰된 시험·검사 항목만을 대상으로 한 것입니다.
 ※ 지면이 부족한 경우 시험·검사 및 결과판은 별지로 작성 가능합니다.

2017년 9월 22일

한국기능식품연구원 

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



그림 20. DagA 효소 성상 및 중금속 분석 성적서.

- 성상시험
 - 양산 표준 공정으로 제조한 효소액을 한국기능식품연구원에 분석 의뢰하여 식품공전의 성상 시험법(관능시험법)으로 3회 시험을 진행한 결과 이미, 이취가 없는 갈색의 액상으로 정상기준을 설정함(그림 20).
- 고형분 분석시험
 - 양산 표준 공정으로 제조한 효소액을 한국기능식품연구원에 분석 의뢰하여 건강기능식품공전의 일반성분시험법 중 수분시험법으로 3회 시험을 진행하여 수분함량을 구하고 100%에서 수

분함량을 감하여 고행분 함량 1.59% 기준을 설정함(그림 21)

제 D2018071988 호 문서확인		시험·검사성적서							
제품명	베타아가라아제(β -agarase)	제조일자 (유통기한)							
의뢰인	업체명	다인바이오(주)	성명						
	주소	경기도 성남시 중원구 사기막골로45번길 14 (상대원동, 우림2차비동비205호)							
제조번호	501504217	접수년월일	2018-07-23						
검사의뢰목적	제출용	접수번호	D2018071988						
<p>귀하가 우리 연구원에 시험·검사의뢰한 결과는 다음과 같습니다.</p> <p>시험·검사 완료일 : 2018-08-01 시험·검사 책임자 : 이정구 검사관련 총 책임자 : 김천희</p> <table border="1" style="width: 100%;"> <thead> <tr> <th style="width: 40%;">시험·검사항목</th> <th style="width: 40%;">시험·검사 결과</th> <th style="width: 20%;">시험·검사원</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>고행분(%)</td> <td>1.59%(1.58, 1.61, 1.59)</td> <td>김명</td> </tr> </tbody> </table> <p>※ 위 판정은 의뢰된 시험·검사 항목만을 대상으로 한 것입니다. ※ 지면이 부족한 경우 시험·검사 및 결과란은 별지로 작성 가능합니다.</p> <p style="text-align: center;">2018 년 8 월 1 일</p> <p style="text-align: center;">한국기능식품연구원</p> <p style="text-align: center;">(사)한국건강기능식품협회 부설 한국기능식품연구원 http://www.khsi.re.kr 전화번호 (031)520-2100 FAX(031)628-0400-1</p>				시험·검사항목	시험·검사 결과	시험·검사원	고행분(%)	1.59%(1.58, 1.61, 1.59)	김명
시험·검사항목	시험·검사 결과	시험·검사원							
고행분(%)	1.59%(1.58, 1.61, 1.59)	김명							

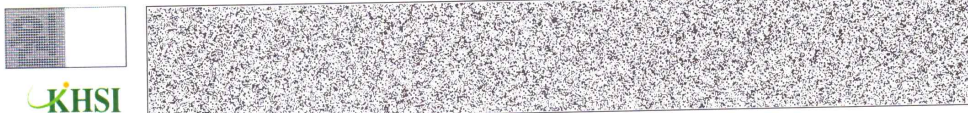


그림 21. DagA 효소 고행분 성적서.

- DagA 함량 분석 시험
 - 표준 공정으로 제조한 효소액과 FPLC로 정제한 순수 효소액에 대해 Bradford assay 방법으로 단백질을 정량하여 10 μ g에 4X SDS sample buffer를 1X 농도로 넣어 95°C에서 3분 동안 반응시킨 다음 SDS-PAGE gel에 전기영동하여 coomassie blue

- staining하여 단백질을 확인함. 단백질과 trypsin이 50:1이 되도록 trypsin을 첨가한 후 37°C에서 16시간 동안 Thermomixer에서 반응시켜 peptide화 시킨 다음 C18 spin column으로 정제한 다음 분말화하여 0.1% formic acid에 녹여서 시료를 준비함
- 준비된 시료를 LC-MS/MS 분석을 통해 단백질 동정 및 host cell protein (HCP)을 Q-Exactive를 이용하여 분석함. 또한, target 단백질(DagA)의 발현유무와 함량 그리고 HCP 함량을 SDS-PAGE, In-gel digestion, In-solution digestion 및 spectral counting 상대정량법으로 분석함

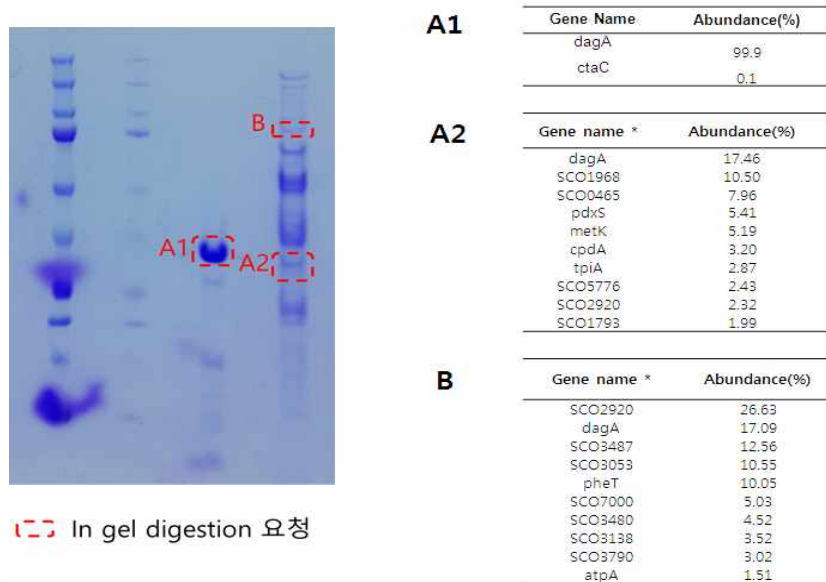


그림 22. In-gel digestion 방법을 이용한 정제 효소 DagA 단백질 동정.

- 시료 중의 target 단백질인 DagA의 함량은 2.45%였으며, 나머지 97.55%가 HCP로 확인되었음(그림 22, 23)

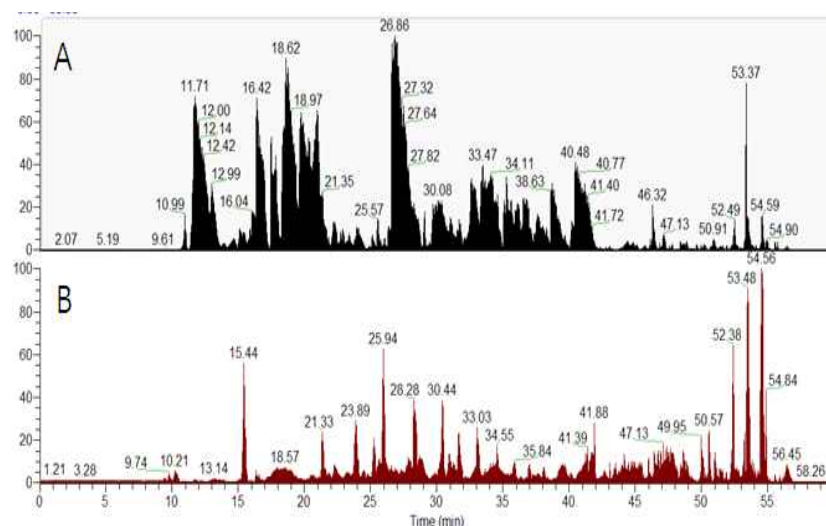


그림 23. In-solution digestion 방법을 이용한 정제 효소 DagA 단백질 동정.

A. FPLC 정제 효소액, B. M22-2C43 정제 효소액.

○ 표준분석법 확립 및 시험방법 타당성(벨리데이션) 검증

- 한천분해효소 활성 확인시험은 기존첨가물자주규격 제4판(일본식품첨가물협회, 2007년 10월)에 따라 진행을 하였고 한천과 효소액을 반응시켜 galactoside 결합의 가수분해에 의해 생성되는 환원력을 포도당을 이용하여 작성한 정량곡선을 이용하여 활성을 측정하는 방법으로 확인시험법을 설정함
- 기질은 1% 한천을 10 mM phosphate buffer (pH 7)에 녹여서 사용하였고 45°C 항온수조에서 기질과 효소액을 각각 0.125 ml씩 동량으로 섞어서 10분 동안 반응시킨 다음, DNS 시약(dinitrosalicylic acid 6.5 g, 2 M NaOH 325 ml, glycerol 45 ml/증류수 1 L)을 0.75 ml을 섞어서 끓는 물에서 5분 동안 끓이고 식힌 다음 증류수 2 ml을 첨가한 후에 A540에서 흡광도를 측정함
- 대조군은 기질과 효소 혼합액을 효소반응 시키지 않고 DNS 시약과 혼합한 용액으로 하여 측정함. 포도당 검량선은 glucose를 0.1, 0.2, 0.4, 0.8, 1, 1.6 mg/ml 농도로 제조하여 사용하였고 반응은 각 농도별 포도당 용액 0.25 ml과 DNS시약 0.75 ml을 섞어서 끓는 물에 5분간 끓여서 식힌 다음 증류수 2 ml을 첨가한 후에 A540에서 흡광도를 측정하여 시료의 역가를 환산함

○ 보존방법 및 보존 기간 설정

- 베타 한천분해효소 DagA 효소의 활성 유지를 위한 보존방법 설정을 위해 제조일자가 다른 표준 공정으로 제조한 베타 한천분해효소 DagA 3종(Lot no: 501506217, 502106217, 502806217)을 -10°C, -20°C 냉동고에 35일간 저장하면서 저장기간 중 총 8회(0, 1, 3, 5, 7, 14, 28, 35일) 실험을 수행함
- 품질지표로는 이화학적으로 효소활성 확인시험(DNS method)과 미생물학적으로 세균수와 대장균 실험을 선정하였고, 각 품질지표 중 가장 먼저 한계일에 도달한 품질지표의 한계일을 DagA 효소의 품질한계일로 산출함
- 베타 한천분해효소 DagA 효소의 품질한계일은 -10°C, -20°C 에서 35일로 나타남
- 본 제품은 냉동온도에서 유통되는 제품으로 규정하고, 유통과정 중의 안전을 고려하여 안전계수 0.9를 곱하여 최종 유통기한은 1개월로 설정함(표 5)

표 5. 보존기간에 따른 역가 및 미생물 확인 시험 비교

(mean±SD)

역가	0 일	1 일	3 일	5 일	7 일	14 일	21 일	28 일	35 일
-10°C	5.051±0.002	4.199±0.014	3.273±0.005	4.541±0.009	3.743±0.006	4.016±0.014	3.857±0.009	5.580±0.009	4.978±0.006
-20°C	4.787±0.003	3.679±0.010	3.506±0.009	4.504±0.012	3.957±0.010	3.975±0.010	3.665±0.008	4.801±0.035	4.523±0.004

미생물 확인시험	0 일	1 일	3 일	5 일	7 일	14 일	21 일	28 일	35 일
세균수 (CFU/ml)	-10°C	N.D	N.D	N.D	N.D	3	N.D	N.D	N.D
	-20°C	N.D	N.D	1	2	1	N.D	N.D	1
대장균 (CFU/ml)	-10°C	N.D	N.D	N.D	N.D	N.D	N.D	N.D	N.D
	-20°C	N.D	N.D	N.D	N.D	N.D	N.D	N.D	N.D

N.D.: Not detected, 불검출

라. 베타 한천분해효소 DagA 안전성 평가 및 사용 인허가

(1) DagA의 *in vivo* 안전성 평가

○ 개량 방선균주로부터 생산한 효소의 안전성 확인을 위해 간세포(HepG2 Cell)에 개량균주 M22-2C43 배양액을 황산암모늄 침전을 통해 정제한 효소(4,287U/mg)를 처리 후 12 h, 24 h 배양하였을 때 MTT assay로 세포생존도(cell viability)를 확인한 결과, 21.6 KU의 고농도에서도 82% 이상 생존함을 확인하였음(그림 24)

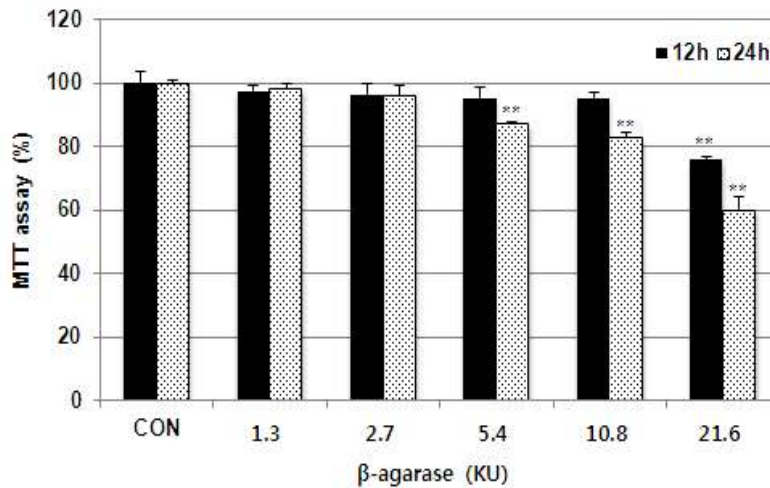


그림 24. M22-2C43 균주에서 배양 및 정제한 베타 한천분해효소의 cell viability assay(HepG2 cell).

○ 표준 제조 공정으로 제조한 베타 한천분해효소를 공인된 GLP 분석기관인 대구가톨릭대학교 GLP센터에 의뢰하여 설치류를 이용한 단회 경구투여독성 시험, 설치류를 이용한 4주 DRF 반복투여독성 시험(용량결정시험), 설치류를 이용한 13주 장기투여독성 시험, 유전독성시험(염색체이상시험, 복귀돌연변이시험, 소핵시험)을 통해 베타 한천분해효소의 안전성 평가를 수행함(표 6)

표 6. 베타 한천분해효소 안전성 평가 요약

시험기관	시험항목	시험계	시험물질	결과	결론
대구가톨릭대학교 GLP 센터	단회투여독성 시험	SD Rat	신청원료 베타아가라아제	20,000 mg/kg 투여군까지 사망동물 및 이상소견은 관찰되지 않았다.	베타아가라아제의 개략치사량은 암수 모두 20,000 mg/kg (318 mg TOS/kg/day)을 상회하는 것으로 추정되었다.
	28 일 반복투여용량결정독성시험	SD Rat		2,500, 5,000 및 10,000 mg/kg 투여군까지 사망동물이나 증상관찰에서 특이한 사항은 없었으나, 요검사(Keton body) 및 혈액생화학적 검사(Creatinine 및 γ -Glutamyl transpeptidase)에서 섭취군간 유의적인 차이가 나타났으나, 비시험물질-유래 변화로 판단되었다.	베타아가라아제의 NOEL은 암수 모두에서 고용량군 10,000 mg/kg으로 판단되었다. 따라서 13주 반복투여독성시험의 최고용량은 10,000 mg/kg/day로 하는 것이 바람직하다고 판단된다.
	13 주 반복투여독성시험	SD Rat		암수 모두에서 시험물질-유래 중요한 변화 및 시험물질-유래 경미한 변화가 없이	베타아가라아제는 암수 모두에서 NOEL(최대무영향용량)이 10,000 mg/kg/day

			비시험물질-유래 변화가 고용량군인 10,000 mg/kg/day 에서 확인되었으며, 표적장기는 관찰되지 않았다.	(159 mg TOS/kg/day)로 판단되었다.
	유전독성시험 (복귀돌연변이 시험)	- <i>Salmonella typhimurium</i> - <i>Escherichia coli</i>	대사활성계 존재 유무에 관계없이 모든 군주의 모든 농도에서 재현성 있는 복귀돌연변이 집락수의 증가가 나타나지 않았으며, 용량의존성도 확인되지 않았다.	베타아가라아제는 복귀돌연변이 유발원이 아닌 것으로 확인되었다.
	유전독성시험 (체외염색체이상시험)	CHO-k1 cell	대사활성계 존재 및 부재 6 시간 처리군, 대사활성계 부재 24 시간 처리군 모두 처리된 3 단계 농도(5.00, 2.50, 1.25 mg/mL)에서 염색체의 수적 및 구조적 이상 빈도가 용매대조군과 비교하여 유의한 차이가 확인되지 않았다.	베타아가라아제는 수적 및 구조적 염색체 이상을 유발하지 않는 것으로 확인되었다.
	유전독성시험 (체내소핵시험)	ICR mice	모든 투여농도에서 마우스골수세포에 대하여 소핵의 유발성이 없는 음성으로 판단된다.	베타아가라아제는 체내 소핵을 유발하지 않는 것으로 확인되었다.

(2) 베타 한천분해효소 DagA의 사용 인허가(식약처 첨가물 인허가)

○ 신규 개발 효소의 국내 식품용 사용 인허가

- 새롭게 개발한 효소를 국내에서 식품용으로 이용하기 위해서는 식품의약품안전처의 심사를 거쳐 식품첨가물 공전 등록 절차가 필요함

○ 국내 인허가 대상 품목

- 방선균 유래 베타한천 분해효소 DagA를 식품가공용 효소로 사용하려면 식품의약품안전처 고시 제2018-5호 식품 등의 한시적 기준 및 규격 인정 기준에 따라 천연첨가물로 인정받을 수 있음(표 7). 고시에서 규정하는 식품 등 한시적 기준 및 규격의 인정 대상 자료 제출 범위에 따라 준비한 자료를 제출함(표 8)

표 7. 식품 등 한시적 기준 및 규격의 인정 대상 제품

1. 식품(원료로 사용되는 경우만 해당: 식품원료) 가. 국내에서 새로 원료로 사용하려는 농산물·축산물·수산물 및 미생물 등 나. 농산물·축산물·수산물 등으로부터 추출·농축·분리·배양 등의 방법으로 얻은 것으로서 식품으로 사용하려는 원료
2. 천연 물질로부터 유용한 성분을 추출·농축·분리·정제 등의 방법으로 얻은 물질(천연첨가물)중 개별기준 및 규격이 고시되지 아니한 천연첨가물
3. 기구 또는 용기·포장을 살균·소독할 목적으로 사용되는 식품첨가물(기구 등의 살균·소독제)
4. 개별 기준 및 규격이 고시되지 아니한 식품 및 식품첨가물에 사용되는 기구 및 용기·포장

- 국내 식품첨가물의 기준 및 규격 인정을 위한 제출자료를 바탕으로 제조 및 성분 규격에 관한 자료, 안전성에 관한 자료 자료를 구비하여 식품의약품안전처 식품첨가물 기준과에 제출하고 총 3회의 식품첨가물 기준과 담당 주무관과 유기적인 사전상

담과 제출 자료 수정 및 보완을 진행하여 최종 자료를 제출하여(표 7) 최종 식품첨가물의 한시적 기준 및 규격 인정서를 수령함(그림 25).

표 8. 베타한천분해효소 식품의약품안전처 제출 자료 요약

식품첨가물 명칭	한글명: 베타아가라아제 영문명: β -agarase
원재료	<i>Streptomyces coelicolor</i> A3(2)_M22-2C43 균주
국내·외 인정·사용현황	
<인정현황> 1) <i>Streptomyces coelicolor</i> 균종 또는 <i>Streptomyces</i> 균속에 대한 인정현황 2) 효소류(베타아가라아제 또는 아가라아제)에 대한 인정현황	
제조방법	
원재료 <i>Streptomyces coelicolor</i> A3(2)_M22-2C43(기원:국내) → 한천배양 → 1차배양 → 본배양 → 원심분리 → 농축 → 원심분리 → 여과 → 베타아가라아제	
성분규격(안)에 관한 자료	
명칭	베타아가라아제 (β -agarase)
정의	이 품목은 <i>Streptomyces coelicolor</i> 변종의 배양물에서 얻어진 효소제이다. 다만, 역가조정, 품질보존 등을 위하여 희석제, 안정제 등을 첨가할 수 있다. 이 품목은 한천의 β -1,4-D-갈락토시딕결합을 endo형으로 가수분해하여 환원당을 생성한다.
성상	이 품목은 백~진한 갈색의 분말, 입상, 페이스트상 또는 무~진한 갈색의 액상이다.
확인시험	이 품목의 활성시험법에 따라 시험할 때 활성을 나타내어야 한다.
순도시험	(1) 비소: 이 품목을 비소시험법에 따라 시험할 때, 그 양은 4.0ppm 이하이어야 한다. (2) 납: 이 품목 5.0g을 취하여 원자흡광도법 또는 유도결합플라즈마 발광도법에 따라 시험할 때, 그 양은 5.0ppm 이하이어야 한다. (3) 대장균군: 이 품목은 「식품의 기준 및 규격」 일반시험법의 미생물시험법 중 대장균군에 따라 시험할 때, 제품 1g당 30이하이어야 한다. (4) 살모넬라: 이 품목은 「식품의 기준 및 규격」 일반시험법의 미생물시험법 중 살모넬라에 따라 시험할 때, 음성(-)이어야 한다. (5) 대장균: 이 품목은 「식품의 기준 및 규격」 일반시험법의 미생물시험법 중 대장균에 따라 시험할 때, 음성(-)이어야 한다.
활성시험법	분석원리: 본 역가시험은 pH7.0, 온도 45°C에서 한천기질을 가수분해하여 생성된 환원당을 측정하는데 근거를 두고 있다. 시험용액의 조제 시험 조작 검량선 작성 역가의 정의: 1 β -Agarase Unit은 상기시험조건 하에서 기질로부터 1분간에 1 μ mol의 포도당에 상당하는 환원당을 생성하는 효소의 양이다.
보존기준	냉암소에 밀봉 보존하여야 한다.
사용의 기술적 필요성 및 정당성에 관한 자료	
- 다인바이오(주)에서는 <i>Streptomyces coelicolor</i> A3(2)_M22-2C43 균주로부터 생성된 효소를 이용하여 한천을 가수분해하였다. 그 결과물을 TLC로 분석한 결과, 한천의 가수분해산물이 표준품 네오아가로바이오스(Neoagarobiose(DP2)), 네오아가로테트라오스(Neoagarotetraose(DP4)) 및 네오아가로헥사오스(Neoagarohexaose(DP6))의 이동거리와 동일한 위치에서 Spot을 나타내는 것을 확인할 수 있었다. HPLC 분석결과에서도 표준품과 동일한 시간대에서 Peak를 나타내어 <i>Streptomyces coelicolor</i> A3(2)_M22-2C43 유래 베타아가라아제로부터 가수분해된 한천이 네오아가로올리고당을 확인할 수 있었다. - 네오아가로올리고당은 베타아가라아제에 의해서만 생성될 수 있으며, 한천 유래 당류의 이용과 가능성에 대한 관심 또한 더욱 높아지고 있다. 이에 다인바이오(주)에서는 베타아가라아제의 식품첨가물 한시적 기준 및 규격 인정을 통하여 한천을 활용한 고부가가치 신산업 창출 및 글로벌화를 위하여 첨단 바이오 신소재 사업화에 기여하고자 한다.	
안전성	
안전성 DB 검색자료	안전성 정보 검색 결과, <i>Streptomyces coelicolor</i> A3(2) 균주로부터 생성된 효소 베타아가라아제에 대한 부작용이나 이상반응은 보고되지 않았다.
알레르기 유발성 관련자료	신청원료 베타아가라아제와 기존 알레르겐과의 상동성을 비교한 결과, 연속되는 80개 이상의 아미노산절편에서 35%이상의 상동성을 보이는 서열은 없었으며, 인접아미노산 8개절편 비교에서도 일치하는 서열은 확인되지 않았다.
독성시험	· 환회투여독성시험: 개략의 치사량(ALD)은 20,000 mg/kg을 상회한다(고형분으로서 318 mg TOS/kg 이상).

	<ul style="list-style-type: none"> · 90일 반복투여독성시험: 90일 반복투여독성시험 최대투여량을 설정하기 위한 용량은 10,000 mg/kg이었다(고형분으로서 159 mg TOS/kg). · 복귀돌연변이시험: 복귀돌연변이를 유발하지 않음 · 염색체이상시험: 염색체이상반응을 유발하지 않음 · 소핵시험: 소핵을 유발하지 않음 <p>※ 시험기관: 대구가톨릭대학교GLP센터</p>
섭취량 평가	국내 식품첨가물의 기준 및 규격 상에 등재된 효소류의 사용기준 “식품첨가물의 기준 및 규격(제2017-100호), 총칙, II. 식품첨가물 및 혼합제제류, 2. 일반사용기준, 1) 식품 중에 첨가되는 식품첨가물의 양은 물리적, 영양학적 또는 기타 기술적 효과를 달하는데 필요한 최소량으로 사용하여야 한다.”를 따른다.



그림 25. 베타 한천분해효소의 식품첨가물의 한시적 기준 및 규격 인정서

(3) 베타 한천분해효소 DagA의 사용 인허가(FDA GRAS 인정 준비)

○ 미국 FDA GRAS (generally recognized as safe) 인정

- 미국 FDA와 유럽의 EFSA(European Food Safety Authority)가 제시하고 있는 기준이 신규 식품소재의 식품 사용을 위한 국제적 인정 기준으로 통용되고 있음
- 미국에서 식품첨가물은 연방식품의약품화장품법(Federal Food, Drug and Cosmetic Act, FFDCA)에 따라 규제됨
 - FFDCA 201(s) 및 409 조항에 따르면 식품첨가물은 식품의 특성에 영향을 미칠 수 있는 성분으로 의도적으로 첨가한 물질로 정의하고 있으며, 신규 물질의 식품사용을 위해서는 FDA의 사전승인(premarket approval)을 받아야 하지만, GRAS로 인정된 식품첨가물의 사용에는 사전승인을 면제하고 있음
 - GRAS는 미국 FDA가 오랜 사용이력 및 전문가들의 평가를 통하여 일반적으로 안전하다고 판단되는 식품첨가물을 관리하는 규격(status)으로, FFDCA에 의해 GRAS시스템이 시행되기 시작한 1958년 이전부터 사용한 물질에 대해서는 사전승인(prior sanction) 물질로 간주해 안전성 평가 없이 GRAS로 인정되었지만, 현재는 안전성에 대한 과학적 근거 자료에 대한 전문가들의 심사를 통하여 인정함
- 미생물 및 미생물에서 유래한 성분을 식품에 첨가하려는 경우, 식품첨가물과 동일한 절차

를 거쳐 GRAS로 승인됨

- GRAS 규격은 식품에 첨가하는 원료 자체에 대한 안전성을 제공하는 것이 아닌, 특정 용도에서의 안전성을 의미하기 때문에 항상 용도를 지정해야 함
- GRAS notification program은 식품원료의 안전성을 증명하는 과정으로, GRAS로 인증된 식품원료는 GRAS notice inventory에 등재되어 FDA homepage (<http://www.fda.gov>)에 공개됨
- 1997년 이전에는 GRAS 인증의 심사가 FDA 및 제조업체의 안전성 평가 전문가들에 의해서 진행되었지만, 오랜 기간에 걸쳐 진행되는 단점을 보완하기 위해, 1997년 이후에는 생산자 또는 판매자가 GRAS 여부를 판단하여 FDA에 심사를 청구하면 독성, 영양, 분자생물학 분야 전문가 패널의 안전성 검증을 통해 GRAS 규격을 획득
- 지금까지 490건의 식품원료심사가 FDA에 요청되었고, 그 중 329건이 GRAS 규격을 획득함

○ *Streptomyces coelicolor* 유래 DagA 효소 제조물의 GRAS 인정

- *Streptomyces* 유래 효소 제조물이 GRAS 규격으로 인정되어 GRAS notice inventory에 등재되었기 때문에 동일한 방법론을 적용하면 인정이 가능할 것으로 사료됨
- 2004년 7월 29일자로 *Streptomyces violaceoruber* 유래 Phospholipase A2 enzyme 제조물이 계란 난황의 lecithin 분해용으로 허가됨(GRN No. 145)
- 2007년 3월 22일자로 Phospholipase A2 유전자 고발현 *Streptomyces violaceoruber* 유래 Phospholipase A2 효소 제조물의 사용이 허가됨(GRN No. 212)
- GRAS 인정에 필요한 자료
 - General introduction and claim of exemption from premarket approval requirements: 일반 사항
 - Production microorganism: 미생물에 대한 개요 및 안전성
 - Manufacturing process: 제조과정
 - Composition and specification: 화학적 조성 관련 사양
 - Safety evaluation: 안전성 평가
 - 1) 제조용 미생물의 안전성
 - 2) 효소 제조물의 안전성
 - 3) 제조과정의 안전성
 - 4) 독성시험 결과
 - 5) 사용량 및 사용방법

○ DagA 효소 제조물의 FDA GRAS 인정

- 우리나라 식품의약품안전처 제출 자료의 보안 및 서류 제출
 - GRAS 인정을 위한 절차의 문제점 해결은 FDA와 E-mail로 소통을 통해 진행하였고, 또한 GRAS 인정 대행 사업을 수행하고 있는 미국의 컨설팅 회사(NutraSource, INC)와 접촉하여 미국 FDA GRAS 인허가 준비를 위한 컨설팅도 진행하고 보고서도 수령함(그림 26)

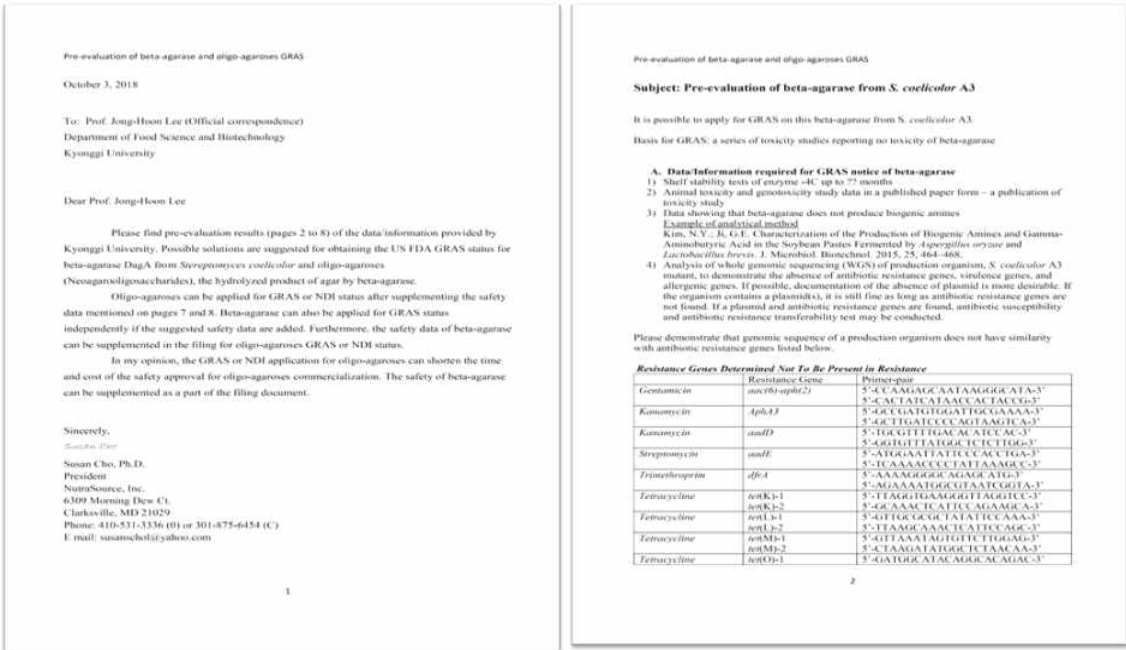


그림 26. 베타 한천분해효소를 이용한 네오한천올리고당 FDA GRAS 인정 위한 컨설팅 보고서

- 우리가 식품의약품안전처로부터 신규 식품첨가물로 지정을 받고자 할 경우, 지정의 원칙은 1) 안전성, 2) 사용의 기술적 필요성 및 정당성을 신청자가 제시하여야 함. 이때, 식품첨가물의 사용은 1) 식품의 품질 유지, 안정성 향상 또는 관능적 특성 개선, 2) 식품의 영양가 유지, 3) 특정 식사를 필요로 하는 소비자를 위하여 제조하는 식품에 필요한 원료 또는 성분을 공급, 4) 식품의 제조, 가공, 저장, 처리의 보조적 역할의 목적에 부합해야 함
- 이와 같이 우리나라에서는 식품첨가물을 사용할 대상 식품에 대한 구체적 언급 없이 첨가물이 식품용으로 목적에 타당한가를 요구하고 있음
- 한편, 미국의 FDA는 식품에 첨가할 첨가물의 GRAS 인증을 받고자 할 경우, 식품첨가물을 사용할 대상 식품을 구체적으로 명시하도록 되어있으며, 식품제조 시의 구체적 사용량 및 잔류량 등에 대해서도 언급하도록 제시되어 있음.
- 미국 FDA가 한천과 베타한천올리고당을 식품첨가물이 적용될 식품으로 규정하지 않을 경우, 미국 시장의 경우에는 방선균 균주를 GRAS 균주로, 이 균주로부터 수득한 효소와 한천이 반응하여 만들어지는 최종산물 네오한천올리고당을 식이보조제로 허가를 받는 것으로 FDA GRAS 및 NDI 인허가 전문컨설팅 업체의 자문을 받아 추진할 계획임.

마. 사업화 및 판매 전략

○ 신소재 사업화 전략 - 네오한천올리고당의 사업화 핵심요소

- 1) 신규 제조 공정으로 개발한 신물질
 - 미생물 효소를 이용한 친환경 공정, 균일한 제품
 - 단순, 고효율 공정으로 양산이 용이 함

- 시설 및 설비 투자비용이 적음

2) 작용기전이나 효능이 기존의 제품과 완전히 다른 신소재

- 작용기전과 효능이 과학적으로 명확한 근거
- 작용기전이 유사한 다른 천연물과 다른 차별성
- 성인 대사질환, 면역기능에 관한 균형(항상성) 유지

3) 원료의 입수가 용이하고 높은 생산효율로 경제성

- 국내 연안에서 쉽게 입수(년간 2~5천 톤 생산)
- 저렴한 원료 가격(12년 5,200원/kg(건물중량), 900원/kg(생물중량))
- 원료에 유효성분 함량이 높고(약 42%) 1차 가공원료 입수가 용이(수율 95%)

4) 글로벌 경쟁력의 과학적 근거로 해외시장 진출 용이

- 유효성분, 구조 및 함량, 효능 기구의 객관적 근거 제시
- 해양수산 자원의 특화 전략(식용 해조류 유래)

5) 방대한 시장규모와 높은 성장 가능성

- 고령화의 급속진행으로 수요 시장의 급팽창(고령인구 급증)
- 선진국 중심 대사증후군의 발생 증가(고령화 주요 질환)
- 예방의학 중심의 의료 개념 변화(건강식품 시장 확대)

• 적용 용도 범위 확대를 통한 초고부가가치화 실현



○ 국내 판매 전략

1) 과학적인 기능성 연구로 개별 인증 획득 및 전문가 그룹 활용

- 체지방(비만), 혈당 조절(당뇨), 고지혈증, 면역기능 증강에 도움을 주는 건강기능식품 기능성 원료 개별인정 추진

- 소비자 선호도와 고연령층 소비자를 위한 섭취 기호도 높은 새로운 제형 개발
- 과학적인 근거에 의한 원료의 생리활성 기능 검증 및 학술지 발표
- 전문의/연구자의 전문가 커뮤니티 구성, 정보공유

2) 원료 견본과 자체 제작한 시제품을 활용한 B to B 중심의 원료 공급

- 국내 건강기능식품 전문 제조 및 유통사를 위한 비즈니스 모델 개발
- 건강기능식품 원료 관련 전문 전시회 출품
- 상품 기획전문기업과 제휴하여 신시장 발굴을 위한 전략 수립

3) 일반 소비자를 위한 신개념 마케팅 강화

- 신개념 원료에 대한 직접 홍보 강화 : 건강관련 잡지, 환자용 전문 잡지 등
- 온라인(사이버) 커뮤니티 구성 및 활성화
- SNS를 통한 실시간 소비자 쌍방향/ 멀티 커뮤니케이션 시스템 구축
- TV 홈쇼핑/인터넷 쇼핑 등을 이용한 신유통 강화
- 우리나라 해산 특산물의 장점을 특화하는 전략(식용 해조류 유래)

○ 국외 판매 전략

- 미국(NDI), 일본(특정보건용식품), 중국(보건식품), 유럽의 각 국의 건강기능식품 관련 법규와 규정에 따른 인증 추진(현지 파트너 조기 선정 및 KOTRA 등 지원 기관과 협력)
- 글로벌 건강기능식품 소재 전시회 출품(경기도, 성남산업진흥재단, 중기청, KOTRA, 한국바이오협회 등 지원)으로 시장 개척(US BIO 소재, EU VitaFood 등)
- 정부의 글로벌 비즈니스 지원사업과 KOTRA 조직을 통한 글로벌 마케팅 실시
- 미국, 일본은 개발 16년부터 현지 업체와 제휴하여 연구개발과 영업 마케팅을 접목한 현지 맞춤형 특화제품 및 마케팅 프로그램 개발
- 국제적인 학술논문집, 전문잡지에 논문 등 기술자료 투고하여 신뢰성 확보
- 글로벌 전문기업과 제휴를 통한 네트워크 강화

○ 매출실적 및 계획

■ 판매 계획

- 수요처의 예상 생산 계획과 판매량을 예측하여 기술하였음
- 인허가 취득 후 본격적인 영업활동이 가능하여 초년도의 매출 예상액은 소극적으로 예상함
- 2년차부터는 해외 협력업체를 통한 글로벌 매출을 위한 적극적인 노력을 기울임
- 3년차부터는 국내외의 매출이 본격적으로 발생하고, 제조 공정 등 생산 여건이 안정되고 물량의 증가로 원가 절감 요소가 발생하여 점진적인 판매 이익률 발생하고 있음

구분		2021년	2022년	2023년
국내	시장점유율(%)	0.5	1.5	4.8
	판매량(단위: kg)	500	2,000	5,000
	판매단가(천원)	1,000	1,000	1,000
	국내매출액(천원)	500,000	2,000,000	5,000,000
해외	시장점유율(%)	0.0	0.1	0.5
	판매량(단위: kg)	-	1,000	7,000
	판매단가(\$)	-	1,000	1,000
	해외매출액(백만\$)	-	1,000,000	7,000,000
매출 총액(천원)		500,000	3,000,000	12,000,000

■ 형태 및 규모

- 1) 2019년 NAO 소재의 인허가 완료와 더불어 국내 영업을 본격적으로 추진할 계획임. 국내 건강기능식품의 원료 기능성 원료로서 신제품 개발(젤, 소프트파우치) 및 완제품으로 시장을 확대할 예정임
 - 콜레스테롤 개선 인체적용시험 및 건강기능식품 기능성 원료 개별 인정
 - 체지방(비만) 감소 건강기능식품원료 개별 인정
 - 면역기능 증강에 도움을 주는 건강기능식품 기능성 원료 개별 인정 추진
- 2) 2018년 하반기부터 인허가 일정과 연계하여 전문건강기능식품 중대형 기업(CJ 생활건강, 대산 등), 제약기업 (종근당, 일동제약 등)의 계열 건강기능식품기업, 홈쇼핑, 인터넷몰 등의 신 유통기업 등 업종 및 유통 형태에 따른 협력기업을 선정하여 공동 사업화를 적극 추진하여 양산과 동시에 본격 판매를 추진하여 브랜드 파워와 유통 파워의 상승효과로 초기 주력 시장을 적극 공략하고 있음
- 3) ODM(개발공급주문자상표방식) 및 OEM의 신제품의 완제품군을 확대하여 유통경쟁력이 강한 중소·중견 기업에 완제품 형태의 제품을 공급하여 원료 소재의 소비량을 확대하고 다양한 제품의 형태의 제품화 (ODM, OEM)를 통해 소비자의 니즈와 틈새시장을 공략하며 제품 형태와 시장경로를 다양화를 추진하여 유통 리스크 손실을 저감하고 방지하도록 할 예정임
- 4) 글로벌 시장에 관해서는 기능성 바이오소재의 선진국인 미국과 일본을 1차 목표 지역으로 선정하여 2019년도부터 각 국의 인허가 관련 법률과 규정에 적절히 대응하고 사업화 할 수 있도록 조기 시장 진입이 가능하도록 철저한 사전 준비와 역량 있는 사업파트너를 선정할 계획임. 선제적으로 본 기능성 바이오소재의 시장조사와 사업화 파트너링을 위한 국제 건강산업박람회 참석 (2016년 6월 미국 샌프란시스코 BIO2016 출품, 2017년 3월 일본 동경 건강산업박람회 비즈니스 파트너링 참석)

- 5) 2018년에는 스위스 제네바에서 개최되는 세계 최대의 건강기능식품박람회인 Vita Food 2018에 출품하고 중국 북경에서 개최하는 건강기능식품 박람회에 참석하여 사업 파트너를 적극적으로 발굴하여 대형 해외 시장 진출을 조기에 추진하고 있음

■ 상용화 능력 및 자원보유

- 1) 기술이전을 통한 산업화 기반 확보
- 2) 네오한천올리고당 제조 시 해당 원료 수급의 용이성 및 높은 생산 효율(경제성)
 - 원재료(한천) 확보 용이(연간 4천톤 생산), 저렴한 가격, 높은 수율(건조중량의 42%)
 - 생산 공정이 단순하고 용이하여 시설 투자비 및 제조원가 비용이 낮음
- 3) 예상되는 목표시장(국내외 건강기능식품 및 제약시장)에서의 유사 기능성 식품원료와는 원재료의 가격 및 주성분 함유율, 제조공정의 간편성으로 높은 가격 경쟁력을 확보하여 시장의 우위를 유지 할 수 있음
- 4) 18년 생산성과 제조 원가를 절감할 수 있는 양산체제를 구축 예정임
- 5) 중장기 성장 아이템 발굴과 용도 다변화를 통한 위협요인 제거
 - 대사질환의 각 질환(혈당조절, 혈압조절, 지방간 개선, 체지방 개선 등) 별로 인증 추가
 - 관절건강, 아토피 피부염 개선 등 면역 과민 반응 개선으로 인증 추가
 - 건강기능식품원료 다음 단계인 의약품 원료 개발 단계로 연구개발 추진
 - 동일 시장에 기여 가능한 신규 소재의 적극 발굴(오픈 이노베이션)

■ 상용화 계획 및 일정

1) 개발 제품에 대한 비즈니스 모델

- 네오한천올리고당의 고지혈증, 비알코올성 지방간에 대한 효능평가가 진행 및 완료되었으며 대사질환 및 간질환의 개선효능이 입증되었음. 항산화 및 간보호 효능평가를 통하여 네오한천올리고당의 적응증 확대 및 세계시장에 진출하는 것을 목표로 함

2) 시장진입을 위한 단계적 지원전략 (시장진입시기, 현지화 전략 등)

■ 1단계: 양산체제 구축

- 인허가 취득에 필요한 안전성 시험 완료 및 대량 생산 체제 구축
- 2019년 인허가 취득 후 2019년부터 본격 생산과 판매

■ 2단계 :국내 시장 공격적 개척

- 2019년 건강기능식품 기능성 원료 개별인정을 받은 후 본격적인 B2B 매출
- 주요 건강기능식품 제조사를 중심으로 원재료 및 ODM 판매 진행
- 네오한천올리고당 제품에 대한 TV 홈쇼핑, 인터넷 홈쇼핑 등 신유통 런칭
- 2020년부터 국내외 해외 시장에 본격적인 매출

■ 3단계: 해외 시장 진입

- 2019년부터 해외 특허 및 인허가 기반 글로벌 바이오 소재 시장 진출
- 미국, 유럽, 일본 등 건강 기능식품 선진 시장의 요구에 대응하는 과학적 근거 제시
- 개별 진출국의 인허가 제도 맞춤형 개발 및 진출전략
- 미국, 중국 등 일반시장 우선적 수출 (2016년 개별 국가사업 파트너 선정)

- 2021년 이후 유럽시장 등 진출하여 수출 급신장

3. 목표 달성도 및 관련 분야 기여도

3-1. 목표

- 신기능성 네오한천오ړ고당 제조를 위한 베타 한천분해효소의 식품가공용 효소 개발
- 베타 한천분해효소의 국내 식품가공용(신규 식품첨가물) 인정

3-2. 목표 달성여부

- 베타 한천분해효소를 과발현하는 균주를 개발하고 이 균주의 배양 및 효소 생산 공정을 확립하여 및 최종 생산 효소의 품질 규격을 표준화 함
- 베타 한천분해효소의 GLP기관의 안전성 평가(설치류 단회 및 반복독성, 유전독성)를 통해 안전함을 확인함
- 식품첨가물 인허가 취득을 위한 품질기준 규격(미생물, 중금속, 활성확인시험 등)에 대한 표준 규격을 설정함
- 베타 한천분해효소에 대한 식품의약품안전처의 식품첨가물의 한시적 기준 및 규격 인정서를 획득함(한시기준 제 2018133248호, 2018년 11월 1일)

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

4. 연구결과의 활용 계획 등

- 본 과제 수행을 통해 베타 한천분해효소 과량 생산 균주를 개발하고 식품의약품안전처의 식품첨가물 허가를 받은 베타 한천분해효를 이용하여 한천 분해산물(네오한천올리고당, DY-NAO)을 식품용 원료로 제조하여 판매할 것임
- 또한, 본 효소로 기능성 소재 DY-NAO의 혈중 콜레스테롤 개선 효능에 대한 임상시험을 수행하여 혈중 콜레스테롤 개선 효능을 가지는 개별인정형 건강기능식품 기능성 원료로 식품의약품안전처의 건강기능식품 기능성 원료 인허가를 받아 국내 건강기능식품사업에 활용할 것임
- 국내 식품의약품안전처 인허가 획득을 준비하면서 준비한 인허가 제반 규정 및 자료 준비를 토대로 해외 시장으로의 진입을 위해 해외 인허가(FDA GRAS, NDI) 획득을 추진할 계획임

붙임. 참고문헌

1. Bentley SD, Chater KF, Cerdeño-Tárraga AM, Challis GL et al. 2002. Complete genome sequence of the model actinomycetes *Streptomyces coelicolor* A3(2). *Nature* 417: 141-147.
2. Bibb MJ, Jones GH, Joseph R, Buttner MJ, Ward JM. 1987. The agarase gene (*dagA*) of *Streptomyces coelicolor* A3(2): affinity purification and characterisation of the cloned gene product. *J Gen Microbiol* 133: 2089-2096.
3. Chi WJ, Chang YK, Hong SK. 2012. Agar degrading by microorganisms and agar-degrading enzymes. *Applied Microbiology and Biotechnology* 94: 917-930.
4. Higashimura Y, Naito Y, Takagi T, Uchiyama K et al. 2016. Protective effect of agaro-oligosaccharides on gut dysbiosis and colon tumorigenesis in high-fat diet-fed Mice. *American Journal of Physiology - Gastrointestinal and Liver Physiology* 310(6): G367-G375.
5. Hodgson DA, Chater KF. (1981) A chromosomal locus controlling extracellular agarase production by *Streptomyces coelicolor* A3(2) and its inactivation by chromosomal integration of plasmid SCP1. *J Gen Microbiol* 124: 339-348.
6. Hong SJ, Lee JH, Kim EJ, Yang HJ, Park JS, Hong SK. 2017. Anti-obesity and anti-diabetic effect of neoagaro-oligosaccharides on high-fat diet-induced obesity in mice. *Marine Drugs* 15(4), doi:10.3390/md15040090.
7. Hu B, Gong Q, Wang Y, Ma Y, Li J, Yu W. 2006. Prebiotic effects of neoagaro-oligosaccharides prepared by enzymatic hydrolysis of agarose. *Anaerobe* 12(5-6): 260-266.
8. Jang MK, Lee DG, Kim NY, Yu KH, Jang HJ, Lee SW, Jang HJ, Lee YJ, Lee SH. 2009. Purification and characterization of neoagarotetraose from hydrolyzed agar. *Journal of Microbiology and Biotechnology* 1197-1200.
9. Jung IS, Choi YJ. 2007. 해양 미생물 *Algibacter lectus* AS-3으로부터 agarase의 분리 및 특성. *Journal of Marine Bioscience and Biotechnology* 2(3): 142-148.
10. Jung IS, Kim YJ, Song SJ, Gal SW, Choi YJ. 2008. 해양미생물 *Sphingomonas paucimobilis* AS-1이 생산하는 새로운 extracellular agarase의 정제 및 특성. *Journal of*

Life Science **18**(1): 103-108.

11. Kim DK, Jang YR, Kim KH et al. 2011. Isolation and culture properties of a thermophilic agarase-producing strain, *Microbulbifer* sp. SD-1. Fisheries and Aquatic Sciences **14**(3): 186-191.
12. Kim KH, Choi IG, Kang NJ, Yun EJ et al. 2013. Method for preparing 3,6-anhydro-L-galactose, and use thereof. PCT/KR2013/000423, World Intellectual Property Organization.
13. Kobayashi R, Takisada M, Suzuki T, Kirimura K, Usami S. 1997. Neoagarobiose as a novel moisturizer with whitening effect. Bioscience Biotechnology Biochemistry **61**(1): 162-163.
14. Lee SE, Kim JW, Jung JK, Kim IH, Lee SH, Kim SJ, Lee JH, 2006. 한천분해효소를 생산하는 *Agarivorans* sp. JA-1의 배양조건 및 Fed-batch 배양. Korean Journal of Biotechnology and Bioengineering **21**(5): 389-393.
15. Li M, Li G, Zhu L, Yin Y et al, 2014. Isolation and characterization of an agar-oligosaccharide-(AO)-hydrolyzing bacterium from the gut microflora of Chinese individuals. PLoS ONE **9**(3): e91106.
16. Muller R. 1908. Eine Diphtheridee und eine *Streptothrix* mit gleichen blauen Farbstoff sowie Untersuchungen über Streptothrixarten in allgemeinen. Zentralblatt für Bakteriologie, Parasitenkunde, Infektionskrankheiten und Hygiene Abteilung I **46**: 195-212.
17. Park KT, Lee DK, Kim NY, et al. 2005. 내열성 한천분해효소를 생산하는 해양세균의 분리 및 특성. Journal of Life Science **15**(6): 884-888.
18. Temuujin U, Chi WJ, Lee SY, Chang YK, Hong SK. 2011. Overexpression and biochemical characterization of DagA from *Streptomyces coelicolor* A3(2): an endo-type β -agarase producing neoagarotetraose and neoagarohexaose. Appl Microbiol Biotechnol **92**:749-59.
19. Waksman SA, Henrici AT. 1948. Family III. *Streptomycetaceae* Waksman and Henrici. In Breed RS, Murray EGD, Hitchens AP (editors): Bergey's Manual of Determinative Bacteriology, 6th ed., The Williams & Wilkins Co, Baltimore, pp. 929-980.
20. Wang J, Jiang X, Mou H, Guan H. 2004. Anti-oxidation of agar oligosaccharides

produced by agarase from a marine bacterium. *Journal of Applied Phycology* **16**(5): 333-340.

21. Wu SC, Pan CL. 2004. Preparation of algal-oligosaccharide mixtures by bacterial agarases and their antioxidative properties. *Fisheries Science* **70**(6): 1164-1173.
22. Xu X, Su B, Xie JS, Li RK, Yang J, Lin J, Ye X. 2017. Preparation of bioactive neoagaroligosaccharides through hydrolysis of *Gracilaria lemaneiformis* agar: a comparative study. *Food Chemistry* (in press).
23. Yun EJ, YU S, Kim KH. 2017. Current knowledge on agarolytic enzymes and the industrial potential of agar-derived sugars. *Applied Microbiology and Biotechnology* **101**(14): 5581-5589.
24. Zhang N, Mao X, Li R, Hou E, Wang Y, Xue C and Tang Q. 2017. Neoagarotetraose protects mice against intense exercise-induced fatigue damage by modulating gut microbial composition and function. *Molecular Nutrition Food Research* **61**(1): DOI 10.1002/mnfr.201600585.

주 의

1. 이 보고서는 농림축산식품부에서 시행한 기술사업화지원사업의 연구보고서입니다.
2. 이 보고서 내용을 발표하는 때에는 반드시 농림축산식품부에서 시행한 기술사업화지원사업의 연구 결과임을 밝혀야 합니다.
3. 국가과학기술 기밀유지에 필요한 내용은 대외적으로 발표 또는 공개하여서는 아니됩니다.