

보안과제( ), 일반과제( ○ )

과제번호 108024033

**지연형 약물방출 시스템을 활용한 장용효소제의 개발**

**(Development of enteric-coated enzyme  
applied by delayed-release system)**

**지엘팜텍(주)**

**농림수산식품부**

# 제 출 문

농림수산식품부 장관 귀하

이 보고서를 “지연형 약물방출 시스템을 활용한 장용효소제의 개발” 과제의 보고서로 제출합니다.

2011년 7월 11일

주관연구기관명 : 지엘팜텍(주)

주관연구책임자 : 박 준 상

세부연구책임자 : 박 준 상

연 구 원 : 이 문 석

연 구 원 : 이 성 훈

연 구 원 : 심 지 연

연 구 원 : 손 형 민

협동연구기관명 : (주)진바이오텍

협동연구책임자 : 조 원 탁

연 구 원 : 강 정 선

연 구 원 : 조 경 진

연 구 원 : 박 경 우

연 구 원 : 류 정 진

연 구 원 : 박 진 임

# 요 약 문

## I. 제 목

지연형 약물방출 시스템을 활용한 장용효소제의 개발

## II. 연구개발의 목적 및 필요성

동물산업에서는 소화효소는 일반적으로 동물의 생산성 제고를 위하여 사용되는데, 사료 원료가 가지고 있는 항영양인자를 감소시켜 주거나 원료의 소화율을 향상시켜줌으로써 가축의 체내 이용성을 높여 분뇨의 배출을 줄이고 환경오염 문제를 해결할 수 있는 하나의 해결책으로 자리를 잡아가고 있다. 특히 자돈의 경우 이유를 전후로 소화기관의 발달이 완전하지 않은 상태에서 부족한 소화효소로 인해 불용성 소화물 증가로 생산성 저하 등의 문제점을 가지고 있기 때문에 이 시기에 적절한 소화효소의 급이가 필요하다.

효소제 생산은 일반적으로 액상발효를 이용하는 것으로 액상발효 공정을 통해 많은 양의 폐수 발생 및 높은 배지 비용과 복잡한 정제 공정을 거치게 되므로 생산단가를 높이는 문제점을 가지고 있다. 반면 고체발효를 이용한 효소제 생산기술은 저렴한 다양한 곡물원료를 사용할 수 있으며, 생산 후 별도의 정제공정 없이 효소제로 바로 활용 가능하여 생산단가 측면에서 경제성을 확보할 수 있다. 또한, 곡물원료를 이용함으로써 효소제로 사용 시 기질친화성이 높아 효과적인 효소작용을 기대할 수 있다. 또한, 다양한 효소를 한 번에 생산할 수 있어 사료용 효소제로서 활용하기에 적합한 기술이다. 따라서 본 연구에서는 소화효소인 amylase와 protease를 동시에 발현할 수 있는 고체발효기술을 이용한 효소제 대량생산 공정의 확립을 통해 효율적인 효소제 생산기술을 확보하고자 한다.

한편, 일반적으로 효소는 제품 가공시의 열과 섭취 후 위장에서의 위산에 의한 불활성화 등의 문제점이 있다. 이를 극복하기 위해 의약품 분야에서는 약효발현 부위가 소장이나 대장인 경우 효과적으로 원하는 지점까지 약물을 전달하기 위한 수단으로 장용코팅(enteric coating) 등의 방법을 활용한 지연형 약물방출제제(delayed-release dosage form) 활용하고 있다. 이러한 장용성 코팅기술을 접목함으로써 동물사료 및 동물의약품으로서 효소를 응용하기 위한 효율성과 경제성을 동시에 증진시킬 수 있는 방안을 고려하고자 한다.

## III. 연구개발 내용 및 범위

### 1. 효소제의 내산성, 내열성 평가를 통한 안정성 평가 및 표준 효소분석방법 확립

국내에서 주로 사용되는 소화 효소제 시장에서 대표적인 제품을 수거하여 공인 분석 방법인

AOAC 분석법, 사료공정서 방법, 의약품분야의 공정서인 미국약전(U.S.P.), 대한약전(K.P.) 등에서 규정하고 있는 방법과 일반적으로 국내에서 가장 많이 사용되는 분석법 등으로 구분하여 분석하고, 또 사용되는 buffer의 기준을 명확하게 하기 위해 pH에 따른 효소역가의 차이 등의 규명을 통해 표준 효소분석법을 확립하였다. 또한, 표준분석방법을 기초로 하여 내산성 및 내열성 평가 방법을 확립하였다.

## 2. SSF 공정을 이용한 고효율 효소제 생산시스템 개발

SSF공정을 통해 최적 효소를 생산하기 위해 amylase와 protease의 활성이 가장 높은 발효 조건(발효온도, 발효시간, 발효배지)을 설정을 완료하였으며 pilot scale 생산시험을 통해 대량 생산을 위한 기초자료를 확보하였다. Pilot scale 조건에서 생산된 시제품을 활용한 코팅기술의 접목을 위한 최종 발효물의 형태 및 물리적 특성을 규명하고, 입자도의 균일화 정도와 기준을 설정하였다.

## 3. 효소제 대량생산 시스템 개발 및 효소제 평가

효소제 대량생산을 위해 pilot 테스트 조건을 기초로 하여 고체발효 설비를 이용하여 plant scale 에서의 대량생산 조건을 확립하였다. 또한, 생산된 최종 발효물을 이용하여 최적 효소활성 기준을 설정하고, 6개월간 보관을 통한 안정성 평가를 완료하였다.

## 4. 장용효소제의 최적처방 및 제조공정 연구

실제 제품화에 적합한 경제성, 내산성, 내열성 등을 만족시키기 위한 조성과 공정을 확보하기 위한 연구로서 다양한 장용성 코팅제와 여러 가지 생산조건에 따른 효소의 역할을 확인하였다.

## 5. 장용코팅 효소제의 제조공정 설정 및 pilot scale 생산을 통한 재현성 확보

원활한 대량생산 공정 설정을 위하여 planetary mixer와 fluid-bed coater를 비교하면서 설정하였으며 설정된 제조공정의 재현성을 확보하고자 pilot scale로서 3 batch를 생산하였다.

## 6. 제품의 품질평가 기준 및 시험법 확정 및 안정성 평가

장용코팅 효소제의 품질관리를 위한 기준 항목 및 해당 시험법을 의약품 공정서 및 기타 시험법 등을 검토하여 최종 설정하였으며 pilot scale로 제조된 3 batch를 각각 시험하여 품질을 평가하였다. 또한 해당 기준 및 시험법을 사용하여 장용효소제의 저장안정성을 평가하기 위하여 40℃ 75% 상대습도 조건에서 4주 및 실온조건에서 6개월 동안 효소제의 역할을 확인하였다.

## 7. 소화율 및 사양시험을 통한 장용효소제의 평가



고체발효기술을 이용하여 개발된 효소제 및 장용코팅 효소제의 소화율 및 이용률을 평가하기 위하여 in vitro에서의 조성분, 소화율, 총당 또는 단백질분석 뿐만 아니라 이유자돈에서의 사양시험 및 소화율 검증을 실시하였다.

## IV. 연구개발결과

### 1. 효소제의 내산성, 내열성 평가를 통한 안정성 평가 및 표준 효소분석방법 확립

국내에서 유통되는 대표적인 제품을 대상으로 다양한 효소제 평가방법으로 평가를 통해 최적의 효소활성 평가방법을 선정하였으며, 내열성 및 내산성 평가방법 확립을 완료하였다.

### 2. SSF 공정을 이용한 고효성 효소제 생산시스템 개발

고체발효를 위한 amylase와 protease 활성이 우수한 균주를 선발(*A. oryzae* GB N1, KCCM 11125P)하였으며, 대량생산을 위한 발효 factor를 확인을 통해 Lab 수준 및 대량생산 수준에서의 최적발효공정 확립을 완료하였다. 최적고체발효를 위한 조건으로는 초기수분함량은 45%, 초기 접종균수는  $10^4$  CFU/g, 초기 pH는 6.0~7.0, 최적발효온도는 32~33°C, 최적발효시간은 72시간이었으며, 최적 발효용 배지로는 선발균주 성장특성 및 경제성을 고려하여 소맥피를 최종 발효용 원료배지로 선정하였다.

### 3. 효소제 대량생산 시스템 개발 및 효소제 평가

효소제 대량생산을 위해 7.5톤/batch의 대량생산 실험을 통해 발효조건에 대한 검증을 완료하였으며, 반복 재현성 검증을 통해 평균 amylase 활성은 9,594U/g, protease 활성은 62,605U/g으로 개발효소제의 최종 효소활성 기준을 확립하였다. 또한, 최종 개발효소제의 6개월간 보관실험을 통해 90%이상의 높은 저장 안정성을 확인하였다.

### 4. 장용효소제의 최적처방 및 제조공정 연구

장용성 코팅제의 경우 가격과 성능을 고려하여 Na alginate, Zein, Eudragit, HPMCP 등을 연구하였으나 제조공정 및 그 성질에 따라 내산성 등의 영향이 매우 차이가 났으며 이로 인해 원활한 코팅을 위한 코어제조에 수불용성인 경화유를 사용하고, 장용성 코팅제로서 HPMCP를 적용하기로 결정하였다.

### 5. 장용코팅 효소제의 제조공정 설정 및 pilot scale 생산을 통한 재현성 확보

장용성 코팅제의 확실한 내산성을 확보하기 위해서는 fluid-bed coater에서의 공정이 바람직함을 확인하였으며 해당 설비를 사용한 생산공정을 설정하였다. Pilot scale로서 3 batch를 생산하여 제조 공정 조건의 재현성을 확보하였다.

## 6. 제품의 품질평가 기준 및 시험법 확정 및 안정성 평가

품질관리 기준 항목으로서 성장, 효소의 역가, 내산성 및 건조감량을 설정하였으며 제조된 3 batch는 양호한 결과를 나타내었으며, 40°C/75%RH, 4주 및 25°C/60%RH, 6개월 동안 장용코팅 효소제의 저장안정성을 설정된 기준 및 시험법에 근거하여 평가하였으며 매우 안정적인 양상을 나타내었다.

## 7. 소화율 및 사양시험을 통한 장용효소제의 평가

in vitro에서 총당의 용출량이 장용코팅효소제에서 크게 나타났으며, 사양시험을 통한 소화율 검증에서 효소제의 첨가시 증가되었고 장용코팅효소제의 경우 더욱 우수한 결과를 나타내었다. 효소제의 첨가가 자돈의 생산성에 긍정적 영향을 나타내었으며 특히 일당증체량 및 사료요구율은 코팅효소의 첨가에 따라 더욱 개선되었다.

# V. 연구성과 및 성과활용 계획

본 과제를 통해 고효율성 효소제 제조를 위한 고체발효기술을 확립하였으며, 효소제 평가를 위한 표준 분석방법을 확립하였다. 또한 코팅 기재의 선정을 통한 최적 코팅방법 및 코팅효소제의 안정성 검증을 완료하였다. 이를 통해 소화관내에서 안정적인 효소활성을 가질 수 있는 효소제 제조방법을 확보하였으며, 본 과제를 통해 개발된 효소제를 2012년 출시를 목표로 제품화를 위한 준비를 진행 중이며, 제품 출시를 통해 고가의 수입효소제의 효과적인 대체를 통해 농가소득 증대에 기여할 수 있을 것으로 기대된다.

# SUMMARY

## I . Title

Development of enteric-coated enzyme applied by delayed-release system

## II. Background and Rationale

Digestive enzymes in animal agriculture has generally has applied as a growth promoting agent that reduces anti-nutritional factors and enhances nutrient digestibility in the feed grains, which has been one of the promising resolutions for a environmentally friend approach by reducing animal manure through enhancement of bioavailability of feed grains. It is well know that especially very young piglets are needed to be supplied with liable enzymes due to underdevelopment of digestive system by themselves around weaning period.

Commercial production of enzyme has been accompanied through liquid submerged fermentation for decades, where has recognized to occur environmental problems due to its huge amount of waste water and high cost for media through complicated condensation process which is in turn higher cost for the application. In the meantime, solid state fermentation provides variety of media application through different feed grains with almost zero cost for condensation because grains as culture media do not needed to be condensed. Drying process, that's enough for solid state fermentation process. Furthermore, feed grains share a great deal of chances for better affinity during the fermentation process as pre-liminary experiences onto microbes, thus it is expected to be efficient to produce and excrete different enzymes through different nutrient-utilizing (fermentation) process.

Therefore, this study was designed to develop a complex solid state fermentation system to induce amylase and protease simultaneously in a commercial scale (mass production) enzyme production system.

Generally, enzyme has a tendency to be inactivated a lot during the manufacturing process by heating and by strong acidic environment of gastric fluid when it was administered. One of methods to overcome this problem in pharmaceutical drug delivery system, enteric-coating technology form as a delayed-release dosage form, are applicable to deliver the drug to intestine or colon passing through stomach without any damage by gastric fluid. Therefore, an enteric-coating technology applicable to the enzyme by solid state fermentation will be developed to increase the efficiency of enzyme activity by

providing heat-stable properties for pellet process and acid-tolerance through digestive tract for its stability and efficiency in comparisons with typical commercial enzymes.

### **III. Research Criteria**

1. Establishment of standard evaluation system of enzymes for the stability against gastric acid and heat damage

Different evaluation systems described in Association of Official Analytical Chemists (AOAC), Official Standard of Feeds in Korea, United States Pharmacopoeia (USP), Korean Pharmacopoeia (KP) and typical commercial analysis have been compared for its enzyme activities to provide clear evidence for standardization through different buffer (pH). The standard analysis protocol through this study was also applied for evaluation for acid and heat stability of enzyme.

2. High performance enzyme production system through solid state fermentation process

Optimum conditions (temperature, time, media) have been developed for maximum activities of each amylase and protease using solid state fermentation process for the pilot scale examination. Pilot scale production was applied for the evaluation of physical properties and uniformity of particles of enzymes through their distribution of size then decide standard conditions for particle size.

3. Development of commercial scale production system for enzyme and evaluation

A commercial production condition was been offset based preliminary developments through pilot scale production. A standard activities to be claimed for commercial product was decided and conducted a storage stability for 6 months of period.

4. Optimization of formulation and manufacturing process for enteric-coated enzyme

Various enteric coating materials and manufacturing processes were screened to obtain a appropriate acid and heat tolerance to be worth developing the product with an economic point view.

5. Process repeatability of pilot scale production system for enteric-coated enzyme

Manufacturing process was constructed in a lab and it was evaluated by applying pilot scale production. and process repeatability was shown by manufacturing 3 batches.

#### 6. Quality control and stability of enteric-coated enzyme

To control the enteric-coated enzyme product, quality control items and their analysis methods were established throughout the investigation and comparison between various references. And the product's stability tests in accelerated (for 4 weeks) and long term (for 6 months) conditions were conducted.

#### 7. Effects of uncoated or enteric-coated enzyme on performance, nutrient digestibility in weanling pigs

Influences of uncoated and enteric-coated enzyme respectively on growth and digestibility in weanling pigs were studied.

### **IV. Results**

#### 1. Standard evaluation system for enzyme by acid tolerance and heat stability

A standard evaluation protocol has been established for enzymes through acid tolerance and heat stability for the various commercial products in Korea.

#### 2. High performance enzyme production system through solid state fermentation process

A specific strain of microbe (*A. oryzae* GB N1, KCCM 11125P) was isolated for its high activities of amylase and protease, which was in turn decided to provide optimum conditions for solid fermentation for both laboratory and commercial scale fermentation. It was concluded to be provided 45% of initial moisture,  $10^4$  CFU/g of inoculation, pH 6.0~7.0, 32~33°C of fermentation temperature, 72 hours fermentation time, wheat bran as culture media for the best growth with less cost.

#### 3. Development of commercial scale production system for enzyme and evaluation

Repeatability of various conditions for 7.5 metric ton commercial batch was evaluated by providing 9,594 U/g of amylase and 62,605 U/g of protease as standard activities. The product was tested for 6 months to decide its storage stability and found more than 90% of enzyme activities were stable.

#### 4. Optimization of formulation and manufacturing process for enteric-coated enzyme

HPMCP as a enteric polymer and hydrogenated oil as a water-insoluble filler were applied to coating membrane. Manufacturing instruments were compared between fluid-bed

coater and planetary mixer, but the former was better to obtain a more efficient acid-resistance.

5. Process repeatability of commercial scale production system for enteric-coated enzyme

3 batches were manufactured in the pilot scale size to set-up and confirm the process conditions for the commercial production.

6. Quality control and stability of enteric-coated enzyme

Quality control tests for 3 batches were performed to confirm the production and the test methods. All results were complied. The stability in an accelerated (for 4 weeks) and long term (for 6 months) stability test condition were conducted and any change to affect a product's quality was not shown.

7. Effects of uncoated or enteric-coated enzyme on performance, nutrient digestibility in weanling pigs

Addition of enzyme on animal feed showed better growing performance and nutrient digestibility in weanling pigs and in some aspects enteric-coated enzyme had a advantage over uncoated enzyme.

## **V. Research obtains and future application plan**

A advanced solid state fermentation technology for highly active enzyme was established with its newly developed standard evaluation systems. A novel coating material was decided with optimum coating protocol then proved its stability. This study provide stable enzyme activities through the gastro-intestinal tract which in turn an expectation for commercial product in 2012 to have a competitive priority against foreign enzymes to provide cost benefits to farmers in the future.

# CONTENTS

<b>Chapter 1. Introduction</b> .....	<b>12</b>
1. Needs for Research .....	12
2. Research Criteria .....	15
<b>Chapter 2. Trends of the Study</b> .....	<b>21</b>
1. Domestic status of the study .....	21
2. Foreign status of the study .....	21
3. International position of the study .....	22
<b>Chapter 3. Contents and Results of the Study</b> .....	<b>23</b>
1. Standard evaluation system for acid tolerance and heat stability of enzyme .....	23
2. High performance enzyme production system through solid state fermentation process .....	33
3. Development of pilot scale production for enzyme .....	43
4. Commercial scale production and stability test of enzyme .....	56
5. Basic process study for enteric-coated enzyme .....	60
6. Optimization of formulation and manufacturing process of enteric-coated enzyme .....	67
7. Product and manufacturing process evaluation by quality control and stability of enteric-coated enzyme .....	84
8. Effects of uncoated or enteric-coated enzyme on performance, nutrient digestibility in weanling pigs .....	95
9. Economic evaluation based on the animal growing study .....	103
<b>Chapter 4. Achievement of the study and its contribution</b> .....	<b>104</b>
1. Achievement of the study .....	104
2. Contribution of the study .....	107
<b>Chapter 5. Product and Application</b> .....	<b>108</b>
1. Products of the study .....	108
2. Application of the study .....	110
<b>Chapter 6. Related information</b> .....	<b>111</b>
<b>Chapter 7. Reference</b> .....	<b>113</b>

# 목 차

<b>제 1 장 연구개발과제의 개요 .....</b>	<b>12</b>
제 1 절 연구개발의 필요성 .....	12
제 2 절 연구개발의 범위 .....	15
<b>제 2 장 국내외 기술개발 현황 .....</b>	<b>21</b>
제 1 절 국내 기술개발 현황 .....	21
제 2 절 해외 기술개발 현황 .....	21
제 3 절 연구개발기술의 국내외 위상 .....	22
<b>제 3 장 연구개발 수행내용 및 결과 .....</b>	<b>23</b>
제 1 절 효소제 평가방법 확립 및 내산성, 내열성 평가방법 확립 .....	23
제 2 절 고체발효를 이용한 효소제 생산기술개발 .....	33
제 3 절 효소제 pilot scale 생산조건 확립 .....	43
제 4 절 효소제 대량생산시스템 확립 및 안정성 평가 .....	56
제 5 절 장용효소제를 위한 기초 공정 연구 .....	60
제 6 절 장용효소제의 생산조건 및 최적처방 연구 .....	67
제 7 절 장용효소제의 생산, 품질관리 및 안정성시험을 통한 제품화검증 .....	84
제 8 절 이유자돈에 대한 코팅효소제의 사료영양소 이용률 평가 .....	95
제 9 절 사양시험 결과를 근거로 한 경제성 평가 .....	103
<b>제 4 장 목표달성도 및 관련분야에의 기여도 .....</b>	<b>104</b>
제 1 절 연구개발목표의 달성도 .....	104
제 2 절 관련분야에의 기여도 .....	107
<b>제 5 장 연구개발 성과 및 성과활용 계획 .....</b>	<b>108</b>
제 1 절 연구 개발 성과 .....	108
제 2 절 추가 활용 계획 .....	110
<b>제 6 장 연구개발과정에서 수집한 해외과학기술정보 .....</b>	<b>111</b>
<b>제 7 장 참고문헌 .....</b>	<b>113</b>



# 제1장 연구개발과제의 개요

## 제1절 연구개발의 필요성

### 1. 동물사료용 효소제 개발의 필요성

효소는 천연화합물로 독성이 없다는 점에서 사료첨가제로 널리 쓰일 수 있으며, 항영양인자 감소, 소화율 향상, 영양소 이용성 증대, 환경오염 절감 등 다양한 장점을 가지고 있다. Hesselman과 Aman(1986)은 보리를 위주로 한 사료에  $\beta$ -glucanase를 가하면 브로일러의 증체율과 사료효율을 개선시킬 수 있다고 하였는데 이는 효소가 소장 내에서 보리의 전분과 단백질질을 완전히 이용할 수 있게 하기 때문이다. 또한 Vandenhoeft 등 (1977)의 연구에 따르면 이유자돈 사료에 1.0%의 xylanase를 첨가한 구는 대조군에 비해 건물 및 질소 이용율이 각각 21, 34%의 개선효과가 있다고 하였다. 그 외에도 여러 연구자들에 의해 효소제 첨가의 유용성이 입증되어 왔다(표 1.1).

표 1.1. 효소제 첨가의 효과 (Han et al, 1995)

사용범위	연령대	개선효율 (%)		sources
		ADG	Gain/feed	
0.2	97 days	+8.00	+13.03	Noh et al. (1993)
0.2	0~18 wks	+16.44	+0.47	Min et al. (1992)
0.075	35 days	+9.13	+0.17	Han et al (1990)
0.125	35 days	+9.13	+0.82	Han et al (1990)

이러한 효소의 일반적 유용성외에도 생산성을 증가시키기 위한 목적으로 사용되는 소화효소제인 amylase와 protease의 기능을 보면 생후 이 두 효소의 생성량은 극히 불안하며 외부에서의 공급을 필요로 한다. 자돈의 경우 이유를 전후로 소화효소체계가 급변하게 되는데 소화기관의 발달이 완성되지 않은 상태에서 이유를 하게 되면 부족한 소화효소로 인해 불소화율 생성이 증가하게 된다. 특히, 이 시기에 사료를 통한 소화효소의 공급은 자돈의 불소화율을 최소화하게 도와줄 수 있다. 그러나 사료를 통해 공급하는 효소들은 위를 통과하는 동안 위산에 의해 효소역가가 영향을 받게 되어 효소첨가의 효과를 극대화 하지 못하게 된다. 또한 사료원료의 이용성을 증가시키기 위한 가공방법을 pellet 가공을 하는데 pellet 가공은도 만으로도 효소의 역가 변성을 초래할 수 있어 소화효소의 효율을 증대시키기 위한 기술의 개발이 요구된다.

## 2. 고체발효(SSF)를 이용한 효소제 개발의 필요성

효소 생산은 생명공학에서 가장 빨리 성장하는 영역으로서 연간 20억달러의 시장을 가지고 있다. 이러한 산업효소는 지금도 매년 4~5%의 증가율을 나타내고 있으며, 특히 동물 사료용 효소 시장은 phytase 효소의 수요량이 증가함에 따라 매년 4%이상의 시장 성장이 예측되고 있다. 현재 효소들의 생산은 주로 유전적으로 변형된 균주를 통해 Submerged fermentation(SmF)으로 이루어지고 있지만, 여러 종류의 산업 효소 생산을 위한 방법으로 Solid-state fermentation(SSF) 기술에 대한 관심이 증대되고 있다.

산업효소를 생산하기 위한 SSF의 장점들은 다음과 같이 SmF와 비교하여 설명할 수 있다.

- ① SSF는 낮은 수분 활력에 의해 오염균의 생장이 제한되므로, SmF처럼 심각한 오염 유발하지 않는다.
- ② 동일 균주로 SmF와 SSF로 효소를 생산하였을 때, 기질 친화성이 높아 SSF에 의한 효소가 높은 활성을 나타낸다.
- ③ SSF 방법으로 생산된 효소는 SmF에서 생산한 효소에 비해 별도의 공정이 필요하지 않아 안정성이 높다.
- ④ SSF에서는 균주가 효소를 생산할 때 catabolic repression을 낮은 수준으로 제어를 받아 더 많은 양의 효소가 발현이 된다.
- ⑤ 가공 중에 폐수가 거의 발생하지 않으며, 발효 잔물들은 수분함량이 낮아 동물 사료나 비료로 활용이 가능하다.
- ⑥ SSF에 이용되는 배지는 SmF에 사용되는 인공합성배지에 비해 상대적으로 단순하며 가격이 저렴하다.
- ⑦ SmF에서 요구되는 생산설비에 비해 경제적이다.
- ⑧ SSF 방법은 SmF 방법에 비해 aeration이나 온도를 조절하는데 사용되는 에너지도 비교적 낮게 요구된다.

SSF 기술을 이용할 경우 다양한 효소를 생산할 수 있다. 그렇지만, 자연계에 많은 균들 중에서 SSF에 적용 가능한 균주가 제한적이며, 효소활성 또한 배지의 종류, 발효온도, 발효시간 등 발효조건에 따라 많은 차이를 보이고 있어 발효조건의 확립이 효소의 대량생산을 위해 필요하다.

## 3. 장용코팅 효소제 개발의 필요성

이상과 같은 장점을 갖는 효소를 개발, 생산한 후 단순히 사료에 첨가하여 사용하는 경우 섭취 후 효소가 위산에 그대로 노출되어 낮은 pH에 불안정화 되거나 단순사료와의 혼합, 성형과

정 중 열 등에 의해 불활성화 되는 등의 문제점이 일부 지적되고 있으며 이를 개선함으로써 효소의 효율성을 제고하여 그 효과를 극대화할 수 있을 것으로 판단한다.

일반적으로 약학 분야에서는 소장이하에서의 약물 흡수 또는 약효발현을 목적으로 하기 위한 방법으로써 장용코팅(enteric coating) 등의 방법을 활용한 지연형 약물방출제제(delayed-release dosage form)을 활발히 활용하고 있다. 약물의 특성상 위에서는 pH가 낮은 위산에 의해 약물이 분해 또는 불활성화 되거나 약물의 주된 흡수 또는 약효발현 부위가 소장이나 대장인 경우 효과적으로 원하는 지점까지 약물을 전달하기 위한 방법으로 활용하고 있는 것이다.

대표적인 예로서 위궤양, 십이지장 궤양 등의 치료제로 사용되는 벤즈이미다졸(benzimidazole) 계열의 약물들인 오메프라졸(omeprazole), 판토프라졸(pantoprazole) 등은 낮은 pH에서 신속히 분해되는 단점을 갖고 있으며, 오메프라졸의 경우 pH 4이하에서는 반감기(half-life)가 10분, pH 6.5에서는 18시간, pH 11에서는 300일 정도로 pH의 변화에 의한 안정성 영향이 매우 크다. 또한 보관 중 열과 수분 등에 취약하고 복용의 편리성을 목적으로 제제화하기 위해 혼합한 부형제와의 상호작용으로 인해 그 분해속도가 가속되는 등 효율적으로 인체에 투여하기에 상당한 제약을 갖고 있는 의약품이다. 이를 극복하기 위하여 히드록시프로필메틸셀룰로오스 아세테이트 숙시네이트(hydroxypropylmethylcellulose acetate succinate, HPMCAS) 또는 메타크릴산 공중합체(methacrylic acid copolymer, Eudragit) 등의 장용성 제피제를 사용하여 약물을 함유한 과립 또는 정제에 적절한 장용코팅을 적용함으로써 상기 문제를 극복하여 보관기간 중 약물이 안정함과 동시에 복용시 위를 무사히 통과하고 이후 주된 약물 흡수부위인 소장상부에서 신속히 약물을 방출하여 흡수됨으로써 약물전달의 효율성을 극대화하였다. 이를 적용한 대표적인 제품으로 아스트라제네카(AstraZeneca)의 로섹® 캡슐(Losec capsule)이 있으며 지엘팜텍이 개발하여 근화제약 등이 시판 중에 있는 판테온® 정 등도 있다.

또 다른 예로서 소화효소제, 특히 판크레아틴(pancreatin)은 소나 돼지 등의 포유류의 췌장에서 분리해 낸 아밀라제(amylase), 프로테아제(protease), 리파제(lipase)의 활성을 가진 소화효소로서 원래 췌장에서 생성되어 십이지장으로 분비되므로 이와 유사한 pH조건인 중성 내지 약알칼리성에서만 활성화됨으로써 소장 상부에서 소화작용이 진행될 수 있다. 그러나 췌장기능부전 등으로 인해 환자가 외부로부터 섭취하는 판크레아틴은 위장을 거쳐야 하므로 이 때 위산과 펩신(pepsin)에 의해 비가역적으로 불활성화 된다. 산성조건하에서는 보통 10 ~ 40%의 낮은 활성을 나타내는데 그 중 리파제가 특히 많은 영향을 받는다. 그러므로 경구로 투여된 효소는 위장에서 불활성화 되어지는 것을 막기 위해 적당한 보호막이 필요하며 이에 장용코팅이 최적이다.

이전에는 판크레아틴을 포함한 복합소화효소제의 경우 전체를 당의(sugar coating) 또는 장용코팅하여 위에서부터 약효를 발현해야하는 성분까지 코팅됨으로써 충분한 약효발현이 이루어지지 못하였으나 최근에는 판크레아틴만 단독으로 미립자상태에서 장용코팅한 후 기타 효소

제와 복합으로 사용할 수 있도록 제형으로 설계, 개발되어 의약품으로서 시판 중에 있다.

장용코팅기제로서는 약물의 방출 목표 지점에 따라 활용할 수 있는 여러 종류가 있다. Shellac은 pH 7.0이상에서 가용화되는 동시에 흡습으로 인한 약물의 불안정화를 보호할 수 있는 장점이 있으며 초산프탈산셀룰로오스(cellulose acetate phthalate, CAP)는 pH 6.0이상에서 용해되지만 다소 흡습성을 나타내는 성질을 갖는다. 필요에 따라서는 십이지장 상부에서 신속히 약물방출을 유도할 수 있는 프탈산히드록시프로필메틸셀룰로오스-50 (hydroxypropylmethyl cellulose phthalate, HPMCP-50)을 적용하거나 HPMCP-55를 사용함으로써 십이지장 전체를 목적으로 할 수도 있다. 대장에서의 약물방출 목적을 위해서 메타크릴산 공중합체(methacrylic acid copolymer), 특히 Eudragit S 등도 많이 활용되고 있다.

한편, 인체에 보다 효율적으로 적용하기 위해 상기와 같이 정밀한 조건을 지닌 장용코팅기제를 사용하고 있으나 경제성 등을 감안하여 지방-지방산 혼합물 등을 사용함으로써 상기의 효과를 유도할 수도 있으며 알긴산(alginic acid) 류, 에틸셀룰로오스(ethylcellulose) 류, 메틸셀룰로오스(methyl cellulose) 류, 대두단백 또는 소맥단백 또는 이를 인위적으로 가공한 유사물질, 키틴 또는 키틴산 또는 이를 인위적으로 가공한 유사물질, 한천(agar), 카라기난(carrageenan), 펙틴(pectin), 그리고 구아검(guar gum)과 같은 검(gum)류 등이 사용가능하다. 그러나 pH 변화에 신속하게 반응하는 장용코팅기제들과 약물방출 효율성 면에서 비교할 때는 낮은 것이 사실이다.

따라서 동물사료 및 동물의약품으로서 효소를 응용하기 위한 효율성과 경제성을 동시에 증진시킬 수 있는 방안을 고려하는 것이 바람직하다고 판단된다.

## 제2절 연구개발의 범위

### 1. 효소제의 내산성, 내열성 평가를 통한 안정성 평가 및 표준 효소분석방법 확립

현재 국내 사료산업에 사용되고 있는 효소제 제품은 대부분 외국에서 수입에 의존하고 있는 실정이다. 그 중 대표적인 효소제들은 탄수화물 분해 효소제와 단백질 분해 효소제가 있다. 2007년 11월 현재 국내에 수입된 protease는 878,599톤이며 amylase는 768,918톤으로 (무역협회, 2007) 이 효소들은 모든 산업에 사용되는 대표적인 효소로 사료 산업분야에서는 주로 어린 일령의 가축 사료에 많이 사용되고 있어 그 역할에 대한 중요도는 높은 상황이나 효소의 역가를 검증하는 분석 방법에 대해서는 표준 기준이 없는 실정이다. 또한 소화 효소가 작용하는 소화 기관인 소장 상부에서의 활성도를 측정하는 기준도 없는 실정이다.

따라서 국내에서 주로 사용되는 소화 효소제 시장에서 대표적인 제품을 수거하여 공인 분석 방법인 AOAC 분석법, 사료공정서 방법, 의약품분야의 공정서인 미국약전(U.S.P.), 대한약전(K.P.) 등에서 규정하고 있는 방법과 일반적으로 국내에서 가장 많이 사용되는 분석법 등으로

구분하여 분석하고, 또 사용되는 buffer의 기준을 명확하게 하기 위해 pH에 따른 효소역가의 차이 등의 규명을 통해 표준 효소분석법을 확립하고자 한다.

소화 작용이 활발한 소장 상부에서 효소의 작용이 주로 일어나야 하나 그 평가방법 또한, 명확하게 정해지지 않은 실정이다. 효소가 소화기관을 통과함에 따라 영향을 받을 수 있는 조건들을 구분하여 효소의 역가 변화를 분석함으로써 효소가 위를 거치면서 불활성화 된 정도를 정확하게 평가할 수 있는 방법이 필요하다. 이를 위해 대한약전(K.P.)에 제시된 방법을 기준으로 붕해시험(disintegration test), 용출시험(dissolution test) 등을 통해 국내 주로 사용되는 효소의 활성이 위를 거치는 동안 얼마나 감소되는지를 조사하고자 한다. 또한, 열처리 조건을 달리하여 실제 효소제의 pellet가공 시 불활성화 되는 정도를 조사하고자 한다.

본 연구를 통해 SSF 공법을 이용하여 생산한 효소제의 평가를 같이 진행함으로써 개발제품의 명확한 효소활성 및 안정성 수준을 평가하고, 내산성, 내열성을 가지기 위한 코팅기술의 접목 시 코팅물질, 코팅정도에 대한 기초자료로 활용하고자 한다.

#### ① 효소제의 분석방법 확립

일반적인 효소제 분석방법으로 사료공정서의 분석방법을 기준으로 사용하고 있으나, 효소제의 경우는 제조사의 분석방법을 표준으로 분석이 진행되고 있는 실정이다. 그러나, 이러한 효소역가 분석방법은 효소활성을 정도를 제품별로 분석방법이 다양하고, 그 활성을 나타내는 기준 또한 다양하여 상대적으로 효소활성의 기준을 정하기에 어려움이 있다. 따라서 국내에서 주로 사용되는 효소제 및 SSF를 통해 생산한 자체 효소제와의 활성의 수준을 비교하고 각 제품의 특징을 규명함으로써 효소제에 대한 기준을 새롭게 제시하고자 한다.

이를 위해 국내 효소제 시장에서 amylase/ protease 활성을 기준으로 주로 사용되는 제품을 샘플링하고 자체 SSF공정을 통해 생산한 효소제를 비교 분석하고자 한다.

- 사료공정서 표준분석방법을 이용한 효소활성 분석
- AOAC 등 방법을 이용한 효소활성 분석
- 효소제 생산업체에서 제시한 분석법을 이용한 효소활성 분석
- 효소활성 분석법 설정을 통한 제품 및 개발품에 대한 활성 분석 및 상대평가

#### ② 효소제 내산성, 내열성 평가방법 확립

현재 국내에서 시판되는 효소제의 경우 표준화된 내산성, 내열성 평가방법이 명확히 확립되어 있지 않은 실정이다. 이를 위해 우선 약품시장에서의 효소제 평가방법을 기준으로 효소제의 내산성, 내열성 평가방법을 확립하고 그 표준 분석방법을 새롭게 접목하고자 한다. 또한, 국내외 여러 평가방법을 참조하여 효소제의 평가방법에 대한 기준을 제시하고자 한다.

- 미국약전 및 대한약전의 방법 및 국내외 문헌조사를 통한 내산성, 내열성 평가방법 확립

- 표준 평가방법 제시를 통해 효소제 시장에서 주로 판매되는 제품에 대한 평가 및 비교

③ SSF 방법을 이용한 사료곡물 분해능이 우수한 amylase, protease 생산을 위한 기초연구

SSF 방법과 기존 액상발효(SmF) 방법을 통해 생산된 효소의 비교 분석을 통해 SSF를 통해 생산된 효소의 효소 활성능을 조사한다. SSF 방법을 통해 최적 효소활성을 가지게 하기위해 효소생산을 위한 최적 발효조건을 규명한다. 아울러 고효성 효소를 생산하기 위한 원료배지의 자료조사를 통해 최적 원료배지를 선정한다.

기초자료조사의 결과를 바탕으로 실험실 조건에서 최적 발효조건을 확정하고 SmF를 통해 생산된 효소와의 활성비교를 실시한다.

- 문헌조사를 통한 amylase, protease 최적 생산조건 자료조사
- 실험실 조건에서의 amylase, protease 최적 생산조건 확립
- SmF 조건을 통해 생산된 효소와 활성 비교분석

## 2. SSF 공정을 이용한 고효성 효소제 생산시스템 개발

SSF공정을 통해 최적 효소를 생산하기 위해 amylase와 protease의 활성이 가장 높은 발효 조건(발효온도, 발효시간, 발효배지)을 설정하고 최적의 발효조건을 통해 pilot scale 생산테스트를 실시하고 대량 생산을 위한 기초자료조사를 실시한다.

아울러 코팅을 위한 SSF물의 성상 및 원료배지의 차이에 따른 코팅기술의 접목을 위한 최종 발효물의 형태 및 물리적 특성을 규명하고, 입자도의 균일화 정도와 기준을 설정한다.

최종 코팅된 효소의 활성평가 및 내산성 열안정성 평가를 통해 개발제품의 활성 수준 및 품질을 평가한다.

① SSF 공정을 이용한 고효율 효소제 생산방법 개발

고체배양을 통한 효소제의 생산방법은 고체배양용 원료배지의 침지, 원료배지의 살균, 종균접종, 발효, 건조 및 분쇄의 세부공정으로 진행한다.

효소활성에 영향을 미치는 조건으로 다음의 조건에 대해 실험을 실시하고 발효공정을 확립한다.

- 배지의 종류가 미생물 성장 및 효소생산에 미치는 영향을 조사한다. 실험실 배양조건을 토대로 하여 pilot scale 상에서 고체배양 및 효소생산을 위한 초기조건을 설정하기 위해 사용가능한 사료곡물 및 부산물을 이용하여 단일 원료 또는 여러 원료의 혼합처리를 통해 효소제 생산을 위한 최적 원료배지 조성을 확정한다.
- 발효초기 원료배지의 수분함량이 효소생산에 미치는 영향을 조사한다. 수분함량의 기준은 원료자체의 수분함량을 기준으로 30~60%까지의 조건설정을 통해 최적 수분함량조건을 확정한다.

- 발효온도가 효소생산에 미치는 영향을 조사한다. 발효온도를 25~40℃의 범위에서 효소활성 분석을 통해 효소생성량을 조사하고 최적 발효온도를 확정한다.
- 발효공정에서 초기 종균의 접종량이 효소생성에 미치는 영향을 조사한다. 초기 미생물의 접종량에 따라 균성장 속도 및 정도가 차이를 보이며, 이를 통해 효소활성의 차이를 비교 할 수 있어 최적 배지, 수분함량, 발효온도에서 접종량의 영향을 규명한다.
- 상기 발효조건을 확정을 통해 최종적으로 대량생산 조건을 확립하기 위해 원료배지의 두께 및 원료량, 교반 정도에 따른 pilot scale 생산조건을 확립한다.

## ② 약용코팅의 최적화를 위한 효소제 생산연구

발효를 통해 생산된 효소제의 장용 코팅을 위해 원료입자의 균일성을 확보하기 위한 방안에 대해 조사한다. 최종 SSF물의 코팅을 위한 생산조건을 확정하기위한 조건으로 코팅 시 요구되는 입자의 기준을 확인한다.

고체배양을 거칠 경우 가수 및 발효공정을 거치는 동안 최종발효물이 뭉치는 현상이 발생하여 코팅용 원료로서는 부적합한 입자의 균일성이 떨어지게 된다. 따라서 발효물의 입자 균일성 확보 방안으로 원료배지의 종류에 따른 최종제품의 입자균일성 및 발효조건(수분함량, 발효온도, 발효시간 등)이 입자균일성에 미치는 영향을 조사한다. 최종 건조물의 분쇄 공정을 통해 코팅용으로 적합한 입자도 기준을 맞추기 위한 스크린 크기, 분쇄시간, 투입량 등 대량생산 시 필요한 기준을 설정한다.

## ③ 약용코팅방법을 이용하여 제조된 개발효소제 평가

장용코팅방법을 통해 최종 제조된 시제품의 효소활성을 분석하고 온도와 pH 안정성을 분석한다. 이를 위해 SSF를 통해 생산된 코팅 공정을 거치지 않은 효소제와 코팅한 효소제에 대해 효소의 최적 활성 온도 및 최적 활성 pH를 조사 한다. 또한, 효소활성 분석을 통해 개발효소제의 온도 및 pH에 대한 안정성 테스트 실시를 통해 amylase 및 Acidic, neutral, alkaline protease 활성을 각각 평가하고 안정성을 확인한다.

## 3. 효소제 대량생산 시스템 개발 및 효소제 평가

효소제 대량생산을 위해 pilot 테스트 조건을 기초로 하여 SSF기를 이용하여 plant scale에서의 대량생산 조건을 확립한다. 또한, 생산된 효소제의 코팅 전, 후의 내산성, 내열성, 보존성 평가를 통해 코팅기술 접목한 효소제의 평가를 실시한다.

### ① 효소제의 대량생산 시스템 개발

효소제 대량생산을 위한 방법으로 pilot scale 생산공정을 통해 확립된 공정 및 입자도 기준을 기초로하여 장용 코팅을 위한 효소제를 대량생산한다.

- Pilot scale 생산조건을 기준으로 하여 대량생산조건에 맞는 발효 공정을 재정립한다. 특히, 가수량 및 종균첨가량, 발효원료 두께 및 교반조건에 대한 기준을 새롭게 설정하고 효소 활성이 우수한 대량 생산조건을 확정한다.
- 대량생산을 위한 세부공정도 및 각 단계별 기준을 확정을 통해 대량생산 시스템을 확립한다.

## ② 최종제품의 내산성, 내열성, 보존성 평가 연구

- 장용코팅 복합효소제의 amylase, acidic protease, neutral protease, alkaline protease에 대한 각각의 효소활성 측정 및 pH 안정성, 열안정성의 분석을 실시하고, 6개월간의 보관 테스트를 통해 제품화를 위한 제품의 안정성, 보존성을 조사한다.

## 4. 장용효소제의 최적치방 및 제조공정 연구

실제 제품화에 적합한 경제성, 내산성, 내열성 등을 만족시키기 위한 조성과 공정을 확보하기 위한 연구로서 다양한 장용성 코팅제와 여러 가지 생산조건의 영향에 따른 효소의 역가 및 내산성 등을 평가하여 설정한다.

## 5. 장용코팅 효소제의 제조공정 설정 및 pilot scale 생산을 통한 재현성 확보

설정된 조성 및 제조공정을 대량생산시 활용하기 위하여 pilot scale에서 수차례 제조함으로써 생산화를 위한 제조공정의 재현성을 확인하고 그에 따른 제조공정 조건을 설정한다.

## 6. 제품의 품질평가 기준 및 시험법 확정 및 안정성 평가

장용코팅 효소제의 품질관리를 위한 기준 항목 및 해당 시험법을 의약품 공정서 및 기타 시험법 등을 검토하여 설정하며 제조된 시료를 시험하여 설정된 시험법을 평가한다. 또한 장용효소제의 보관기간 중 설정된 품질기준에 적합한지 여부를 확인하기 위하여 가속조건(40℃ 75% 상대습도)조건에서 4주 및 실온조건(20℃, 60%상대습도)에서 6개월 동안 각 품질관리 항목을 평가한다.

## 7. 위탁과제 : 이유자돈에 대한 코팅 효소제의 사료영양소 이용률 및 가축 생산성 평가

사료 원료의 특성에 맞추어 개발된 고체발효 코팅효소제의 *in vitro* 및 *in vivo* 검증을 통해 코팅효소제의 효과를 검증하고 이를 바탕으로 경제성 평가를 통한 최적 효소제 첨가수준을 결정하고자 한다.



### ① 실험 1 : 대사 시험

- 실험대상사료: Phase I 및 Phase II 사료
- 실험대상가축: 21 - 28일령 이유자돈
- 분석항목: 건물, 유기물, 조단백질, 조지방, 칼슘, 인, 에너지, 아미노산 이용율
- 실험장소 : 성균관 대학교 실험동물 대사시험실
- 실험 설계 (5처리 5반복)
  - 기초사료 + 일반 효소제 무첨가구
  - 기초사료 + 일반 효소제 첨가구
  - 기초사료 + 코팅 효소제 1수준 첨가구
  - 기초사료 + 코팅 효소제 2수준 첨가구
  - 기초사료 + 코팅 효소제 3수준 첨가구

### ② 생산성 시험

- 실험대상사료: Phase I 및 Phase II 사료
- 실험대상가축: 21 - 28일령 이유자돈
- 분석항목: 일당증체량, 사료섭취량, 사료요구율
- 실험장소 : 성균관 대학교 현장 연구농장
- 실험 설계 (5처리 6반복)
  - 기초사료 + 일반 효소제 무첨가구
  - 기초사료 + 일반 효소제 첨가구
  - 기초사료 + 코팅 효소제 1수준 첨가구
  - 기초사료 + 코팅 효소제 2수준 첨가구
  - 기초사료 + 코팅 효소제 3수준 첨가구

## 8. 제조공정 및 사양시험 결과 등을 종합한 장용코팅효소제의 경제성 평가

최종적으로 장용코팅 효소제를 제조하기 위해 소요되는 비용과 사료비용 및 이에 따른 대상 동물의 증체 kg 당 사료비 등 성장에 미치는 효율성 등을 종합적으로 검토하여 해당 제품의 경제성을 평가한다.

## 제2장 국내외 기술개발 현황

### 제1절 국내 기술개발 현황

#### 1. 장용코팅을 통한 산불안정성 약물제제의 개발:

현재 동물용 효소제 시장에서는 코팅방법이 일반화된 방법이 아니며, 약품공업에서 주로 사용되는 약물전달 시스템이다. 축산업분야에서 본 과제와 같이 지연형 약물방출 시스템을 활용한 사례는 전무하다. 이와 관련된 약학분야의 기술은 주로 산불안정 약물에 한정된다. 인체의약품 분야에서 산불안정성으로 인한 약물보호 및 소장이하에서의 약물 흡수 또는 약효발현을 목적으로 하기 위한 방편으로써 장용코팅(enteric coating) 등의 방법을 활용한 지연형 약물방출제제(delayed-release dosage form)을 활발히 제품에 응용되어 많은 제품이 시판되고 있다. 특히 효소제에 적용한 예는 판크레아틴을 장용코팅한 제품이 대표적으로서 국내 및 해외에서 다양하게 시판되고 있다.

#### 2. SSF를 이용한 효소제 생산기술 개발:

- 해당사항 없음.

### 제2절 국외 기술개발 현황

#### 1. 장용코팅을 통한 산불안정성 약물제제의 개발:

연구수행 기관	연구개발의 내용	연구개발성과의 활용현황
아스트라제네카 사	산불안정성 약물인 오메프라졸 제제의 개발	전세계적으로 Losec® capsule이 시판되고 있으며 후속제품으로 Nexium® capsule도 시판 중임
Solvay Pharm.	Pancreatin을 장용코팅하여 복용 시 약효발현을 최대화함	Creon® capsule

#### 2. SSF를 이용한 효소제 생산기술 개발:

- 해당사항 없음.

### 제3절 연구개발 기술의 국내외 위상

#### 1. 현재의 기술개발 현황

##### (1) 세계적 수준

개념정립 단계	◎	기업화 단계		기술 안정화 단계	
---------	---	--------	--	-----------	--

##### (2) 국내수준

개념정립 단계	◎	기업화 단계		기술 안정화 단계	
---------	---	--------	--	-----------	--

#### 2. 연구결과가 국내외 기술개발현황에서 차지하는 위치

본 과제의 연구결과는 현재 기업화 단계에 있으며 국내·외를 통틀어 보아도 축산업분야에 본 과제와 같은 약물전달 시스템을 적용한 사례가 없다. 따라서 본 과제는 축산업분야에서 세계 최고 수준이다. 본 과제의 진행 단계상 대량생산 기술까지 개발하였으므로 현재 기업화 단계에 와 있다고 판단된다.

## 제3장 연구개발수행 내용 및 결과

### 제1절 효소제 평가방법 확립 및 내산성, 내열성 평가방법 확립

#### 1. 효소제 평가방법 확립

##### 가. 조사내용

효소활성 평가를 위해 표준 효소활성 분석방법인 사료공정서 분석법, 약전분석법, 일본관세청 분석방법에 대한 검증을 실시하였으며, 개발제품 및 경쟁제품에 대해 각각의 분석법으로 효소활성을 측정 후 최적의 효소활성을 나타낼 수 있는 분석방법을 표준 분석방법으로 선정하였다.

##### 나. 효소활성 분석방법

###### 1) 사료공정서 분석법

###### (1) Amylase

###### ① 효소액의 조제

###### 가. 시료의 조제

시료를 0.003M NaCl, 0.003M calcium acetate 혼합액에 용해시켜 적당한 농도로 한다.

###### 나. 활성도 측정

- 효소액을 1, 0.9, 0.8 ... 0.1mL씩 취한 후 0.1M calcium acetate buffer 1mL씩을 가한다.
- 각 시험관에 미리 예열된 1% 가용성 전분용액을 5mL씩 가하여 즉시 혼합하고 40℃의 항온수조 내에 넣어 30분간 반응시킨다.
- 반응정지 즉시 2N calcium acetate buffer 2mL씩을 가하여 반응을 정지시키고 0.01N 요오드 용액을 1mL씩 넣어서 발색시킨다.

$$\text{효소활성도(U/g)} = 5 \times (1/E) \times F$$

E: 희석된 효소액량(mL)

F: 효소액의 희석배수

- ② Amylase 활성도는 효소액 1mL에 의하여 분해된 1% 가용성 전분의 mL수로서 전분이 amylase의 작용을 받아 호정화 되어 가면 전분의 요오드 정색이 변하게 되는데 이것에 의하여 amylase의 호정화력을 측정한다.

## (2) Protease

### ① 효소액의 조제

#### 가. 시료의 조제

시료를 증류수에 용해시켜 적당한 농도로 희석하고 최종의 희석액은 0.1M 유산염완충용액 (pH 2.6)을 사용한다.

#### 나. 활성도의 측정

- 10mL 시험관에 효소액 1mL를 취하고 미리 30°C로 예열시킨 reaction buffer 4mL와 control buffer 3.5mL를 각각 첨가하고 다른 tube에 1mL의 증류수를 4mL의 reaction buffer에 첨가하여 control로 한다.
- 잘 흔든 후 정확히 120분간 항온수조 내에서 반응시킨다.
- 반응완료 후 즉시 0.44M trichloroacetic acid 5mL를 넣어서 흔들고 반응을 중지시킨다.
- 항온수조 내에서 30분간 방치한다.
- 침전 생성이 완료되면 3,000xg로 4°C에서 15분 동안 원심 분리하고 원심분리 상층액 2mL를 시험관에 취하여 0.5N NaOH 용액 2mL를 첨가하고 440nm의 파장에서 흡광도를 측정한다.

② 프로테아제 활성는 1분간 생성되는 azocasein의 ug수로서 azocasein이 프로테아제에 의해 분해될 때 분리되어 나오는 azo의 농도를 광도계를 이용하여 비색 정량한다.

## 2) 약전 분석법

### (1) Amylase

- Substrate sol. 10ml을 test tube에 넣고 37°C ± 0.5°C에서 5분간 가온한다.
- 적당히 희석된 (약 0.4~0.8 U/ml) 효소액을 1ml 넣어준후 37°C ± 0.5°C에서 정확히 10분간 반응한다.
- 10분간 반응후 Fehling II 시약 2ml을 넣어 섞은 후 Fehling I 시약 2ml을 넣고 섞는다.
- 끓는 물에 정확히 15분간 가열한 후 흐르는 물로 25°C이하로 냉각한다.
- 냉각된 반응액에 concentrated KI 2ml 및 묽은 황산 2ml을 넣은 후 유리된 요오드를 0.1 N Sodium thiosulfate 용액으로 적정한다(a ml).
- 적정종말점은 적정이 종말점 근처에 이르렀을 때 가용성전분시액 1~2방울을 넣어 생긴 청색이 탈색될 때로 한다. 따로 기질 용액 대신 물 10ml을 가지고 위와 같은 방법으로 조작하여 적정한다(b ml).

$$\text{전분 당화력(U/g)} = \text{포도당의 양(mg)} \times 1/10 \times 1/W$$

$$\text{포도당(mg)} = (b-a) \times 1.6$$

W : 조효소액 1 ml중 검체의 양(g)

전분당화력은 전분에 아밀라제가 작용할 때 글루코사이드 결합의 절단에 따라 증가하는 환원력을 측정하여 구한다. 그 단위는 조작법의 조건에 따라 시험할 때 1분간에 1mg의 포도당에 상당하는 환원력의 증가를 나타내는 효소량을 1전분당화력 단위로 한다.

## (2) Protease

- 기질용액 5ml을 정확히 취해 37°C에서 10분간 가온한 다음 적절히 희석한 효소액(약 15~30u/ml) 1ml을 정확히 취하여 넣고 곧 흔들어 섞는다.
- 이액을 37°C에서 정확히 10분간 반응을 하고 TCA 5ml을 넣어 섞은 다음 반응을 정지시킨 후 37°C에서 30분간 방치하고 여과한다.
- 처음 여액 3ml은 버리고 다음 여액 2ml을 정확히 취하여 0.4M 탄산나트륨용액 5ml 및 묽은 폴린시액 1ml을 각각 정확히 넣어 곧 흔들어 섞은 후 37°C에서 30분간 방치한 다음 이액에 대하여 물을 대조로하여 흡광도 측정법에 따라 660nm에서 측정한다(A<sub>T</sub>).
- 별도로 효소액 1ml을 취하여 TCA 용액을 섞은 다음 기질용액 5ml을 정확히 넣어 곧 흔들어 혼합한 후 37°C에서 30분간 방치하여 위와 같은 방법으로 조작하여 흡광도 A<sub>B</sub> 를 측정한다.

$$\text{단백소화력(U/g)} = (A_t - A_b) \times F \times 11/2 \times 1/10 \times 1/W$$

단백소화력은 카제인에 프로테아제가 작용할 때 펩타이드결합의 절단에 의해 증가되는 산가용성 저분자 분해산물의 양을 폴린 반응으로 비색 측정하여 구한다. 그 단위는 조작법의 조건에 따라 시험할 때 1분간에 티로신 1μg에 상당하는 폴린시액 정색물질의 증가를 나타내는 효소량을 1 unit으로 정의한다.

## 3) 일본 관세청 분석법

### (1) Amylase

#### ① 조효소 추출액

- a. 시료 3 g에 염화 나트륨이 첨가된 citric acid buffer 30 ml을 가해 상온에서 1시간 추출한다.
- b. 위의 추출액을 4000 rpm, 20분간 원심분리하여 상등액을 0.45 um syringe filter로 여과한다 .

② 조효소 반응

전분 용액 2ml을 작은 시험관에 취해, 40℃ 5분간 예열한다. 효소액 0.1ml을 더해 반응을 개시해, 반응액중부터 그 0.1ml씩을 피펫으로 일정시간 간격으로 미리 준비해둔 요오드 용액 10ml을 넣은 시험관에 넣고, 잘 혼합한 후 670nm에서 투과율 T%를 측정한다. 흡광도계의 영점조정은 요오드액으로 조정한다. 일정시간별로 구한 일련의 T%의 값 중에서 66%에 상당하는 반응 시간을 찾아 t분으로 한다.

③ 전분 호정화력은 전분에 아밀라제가 작용할 때 전분중의 직쇄성분(아밀로오스)의 저분자화에 따르는 전분의 요오드에 의한 정색의 감소를 측정하여 구한다.

(2) Protease

① 조효소 추출액

- a. 시료 3 g에 염화 나트륨이 첨가된 citric acid buffer 30 ml을 가해 상온에서 1시간 추출한다.
- b. 위의 추출액을 4000 rpm, 20분간 원심 분리하여 상등액을 0.45 um syringe filter로 여과한다 .

② 조효소액의 희석

효소 활성에 대해 Unknown일 경우에는 적절히 희석별로 반응하여 tyrosin standard의 range에 포함되는 희석배수를 선택한다.

③ 조효소 반응

- 0.5 ml 조효소액 + 1 ml McIlvaine buffer pH 6.0를 glass test tube에 넣고 40 ℃에서 5분간 예열한다. 기질용액도 따로 예열해 둔다.
- 예열된 a의 용액에 1.5ml의 기질용액을 일정시간 간격으로(10초 혹은 20초 간격) 넣고 즉시 혼합한다(vortexing).
- 40 ℃ ± 0.5에서 정확히 60분 반응 시킨 후 정확히 반응 60분이 되는 시점에 반응정지액(0.4M TCA용액) 3ml을 첨가하여 반응을 정지한다. 최종 volume은 5ml이며 TCA를 첨가한 직후 하얀색의 침전이 발생한다.
- Blank의 경우 0.5 ml 조효소액 + 1 ml McIlvaine buffer pH 6.0 + 3 ml 0.4M TCA + 1.5 ml 기질용액을 첨가한다.
- 상기 반응종료 된 용액들은 Watman paper #2에 여과하고 여과액 1ml을 test tube에 옮긴다.

④ 반응산물의 발색 반응

- 여과액 1 ml + 5ml 0.4M 탄산나트륨 용액 + 1 ml 페놀시약 순서로 첨가한 후 혼합하고 40℃에서 30분간 반응한 후 흡광도계 660 nm에서 샘플들을 측정한다.

⑤ 단백질분해력은 카제인에 프로테아제가 작용할 때 펩타이드 결합의 절단에 의해 증가되는 산가용성 저분자 분해산물의 양을 풀린 반응으로 비색 측정하여 구한다. 그 단위는 조작성의 조건에 따라 시험할 때 1분간에 티로신 1 $\mu$ g에 상당하는 풀린 시액 정색물질의 증가를 나타내는 효소량을 1 unit으로 정의한다.

#### 다. 효소활성 분석을 위한 분석방법 선정

고체발효를 통한 예비 샘플 및 경쟁제품에 대한 평가를 위해 확립된 3가지 분석방법에 대해 각각 amylase, protease 활성을 측정하였다(표 3.1).

효소활성 분석방법에 따른 효소활성의 차이를 확인 할 수 있으며, 각 방법 간 분석결과의 차이는 기질용액 및 효소활성의 정의 등에 따른 결과로 판단되며, 특히 amylase의 경우 일반적인 사료공정서 방법은 요오드화 반응을 통한 발색정도를 측정하는 방법인 반면, 일본관세청 방법은 요오드화 반응 후 실제 전분의 분해되는 정도를 측정하는 방법이다. 사료공정서 방법은 효소반응 후 남은 액을 요오드화 반응을 통해 발색정도를 측정하는 것으로 실제의 효소활성의 의미에서는 반응산물 중 분해되지 않고 남은 가용성 전분의 함량을 통해 효소활성을 유추하는 것으로 발효샘플의 경우 amylase 외에 다양한 소화효소가 같이 존재하고 있어 반응산물로만 검출하는 방법은 다른 효소의 작용 등으로 분해활성에 차이를 보일 수 있어 정확한 정량방법으로는 판단되지 않는 방법이다. 또한, 일본관세청 방법은 전분 전체를 요오드화 시킨 후 효소활성에 의해 전분의 분해정도를 투과율로 측정하는 방법으로 역시 다른 효소의 간섭 등 외부적인 영향이 있을 것으로 판단되나, 사료공정서의 방법에 비해서는 보다 정확한 방법으로 판단된다. Protease 활성측정에 대한 사료공정서의 방법은 azocasein을 기질로 하여 단백질 분해효소 작용에 의해 분해된 azo 기를 검출하는 방법이며 일본관세청 방법은 프로테아제가 작용할 때 펩타이드 결합의 절단에 의해 증가되는 산가용성 저분자 분해산물의 양을 풀린 반응으로 비색 측정하는 방법으로 방법상으로는 비슷한 방법으로 평가될 수 있으나 사료공정서는 대표되는 azo기의 측정을 통해 전체를 예측하는 방법이고 일본관세청 방법은 전체를 대상으로 검출하는 방법으로서 분석 방법상 대표되는 부분을 측정하여 전체를 예측하는 것보다는 전체를 대상으로 측정하는 것이 과 측정의 오류가 발생할 가능성도 있으나, 효소활성의 측면에서는 좀더 정확한 방법이라고 평가될 수 있다. 따라서 본 연구에서는 일본관세청의 효소활성 측정방법을 표준분석법으로 선정하고 개발품 및 경쟁제품에 대한 분석을 실시하였다.



표 3.1. 개발제품 및 국내주요제품의 효소활성 분석결과

샘플	Amylase activity (U/g)			Protease activity (U/g)		
	방법 A*	방법 B	방법 C	방법 A	방법 B	방법 C
개발품	6.3	1012.9	15,521.7	472.2	10.7	19,350
A사	4.9	426.8	15,596.3	866	39	32,553
B사	8.6	1,155	13,150.3	351	28	12,720
C사	0.12	10.6	N.D.	0	1	147
D사	0.02	3	N.D.	0	1	N.D.

\* 방법 A: 사료공정서 분석법, 방법 B: 약전 분석법, 방법 C: 일본관세청 분석법

## 2. 내산성, 내열성 평가방법 확립

### 가. 연구의 세부목표

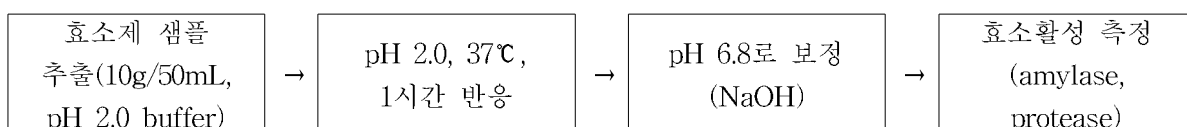
일반적인 효소제의 내산성, 내열성이 낮아 실제 동물이 이용 시 소화관을 통해 유효수준으로 장까지 도달하기 매우 어려운 문제점을 가지고 있다. 그렇지만, 본 연구를 통해 개발된 장용성 효소제는 의약품에 사용되고 있는 DDS를 접목하여 안전하게 장까지 효소제의 효소활성을 유지할 수 있으며, 코팅막으로 인해 대부분 사료에 적용되는 펠릿 제조 등 사료가공공정 중 실활되는 효소활성을 최소화 시킬 수 있다. 따라서 본 연구에서는 장용성 코팅기재의 선정 및 최종 개발제품의 안정성 검증을 위한 효소제의 내산성 및 내열성에 대한 표준 평가방법을 제시하고자 한다.

### 나. 연구방법

#### 1) 효소제의 내산성 평가방법 확립

내산성 측정방법은 약전의 내산성 측정방법을 기초로 하여 효소제 샘플에 대해 돼지 위의 pH조건인 pH 2.0에서 1시간 처리 후 효소활성 측정용 buffer를 첨가하여 각 효소제의 효소활성을 측정하였다(그림 3.1).

그림 3.1. 효소제의 내산성 평가방법



#### 2) 내열성 평가방법 확립

내열성 평가는 실제 사료가공 시 사용되는 pellet 조건보다는 높은 수준으로 효소제의 안정

성을 평가하고 효소제별로 차별성을 확보하기 위해 표 3.2와 같이 처리하여 각 효소제의 열처리에 대한 안정성을 평가하였다.

표 3.2. 고체발효 효소제의 내열성 평가방법

처리온도 (℃)	처리시간 (분)	
	80	5
100	5	10

### 3) 개발효소제의 최적 pH 범위

개발효소제 및 경쟁제품의 최적 pH 범위를 측정하기 위해 pH 범위를 2~8수준까지 달리하여 최적 pH 범위를 측정하였다. 경쟁제품은 시중에 유통 중인 대표적인 효소제 2종을 선정하여 개발효소제와 비교하였다.

## 다. 연구결과

### 1) 고체발효 효소제의 내산성 평가결과

고체발효 개발효소제 및 경쟁제품의 내산성 평가결과 amylase 활성은 초기 효소활성이 가장 높은 A사의 제품이 73U/g의 효소활성을 나타내었으며, 나머지 샘플에서는 효소활성이 없는 것으로 확인되었다(표 3.3). Protease 활성은 개발품과 A사의 제품에서 각각 7%와 3%의 효소활성을 가지고 있는 것으로 확인되었다(표 3.4). 이는 대부분의 효소제가 내산성을 확보하지 못하고 있어 이를 극복하기 위한 장용성 코팅이 필요할 것으로 판단된다.

표 3.3. 내산성조건에서의 amylase 활성의 변화

Samples	Amylase activity (U/g)		감소율 (%)
	Initial	Final	
개발품	1,700	N.D.	100.0
A사	15,596	73	99.5
B사	13,150	N.D.	100.0
C사	N.D.	N.D.	-
D사	N.D.	N.D.	-

표 3.4. 내산성조건에서의 protease 활성의 변화

Samples	Protease activity (U/g)		감소율 (%)
	Initial	Final	
개발품	16,350	1,103	93.3
A사	32,533	1,575	96.1
B사	12,720	N.D.	100.0
C사	147	N.D.	100.0
D사	N.D.	N.D.	-

2) 효소제의 내열성 평가결과

열처리에 의한 효소활성의 변화를 확인한 결과 고체발효 효소제의 amylase 활성은 열처리 조건에 거의 변화가 없는 것으로 확인되었으나 경쟁제품의 경우 약 10% 정도의 활성의 감소를 확인하였다(그림 3.2). Protease 활성은 개발품 및 경쟁제품 모두에서 감소하는 결과를 나타내었다(그림 3.3). 이중 경쟁제품 A의 감소율이 가장 컸으며, 나머지 샘플은 비슷한 경향으로 열처리 조건에 따라 20~30%의 효소활성이 감소하는 것으로 확인되어 경쟁제품에 대한 우수성을 확보하기 위해서는 protease 활성 감소를 막기 위한 코팅처리와 같은 별도의 처리를 통해 내열성을 확보하는 것이 중요할 것으로 판단된다.



그림 3.2. 열처리 조건에 따른 개발품 및 경쟁제품의 amylase 활성변화

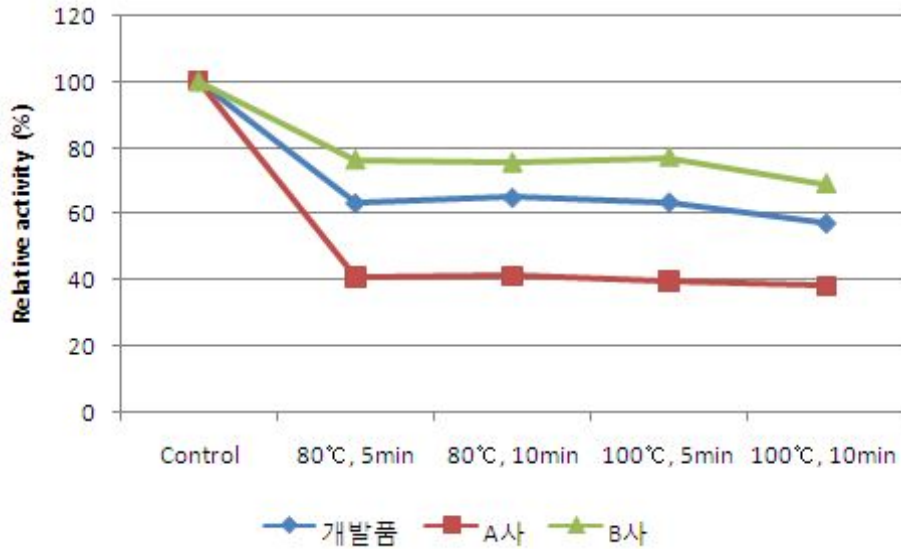


그림 3.3. 열처리 조건에 따른 개발품 및 경쟁제품의 protease 활성 변화

### 3) 개발효소제의 최적 pH 범위

pH 변화에 따른 효소활성의 변화는 amylase의 경우 pH 5.0~8.0까지는 안정적인 수준을 유지하고 있으나, 산성조건인 pH 2.0에서 효소활성을 확인할 수가 없었으며, protease 활성은 중성 pH 범위인 pH 5.0~7.0 범위에서 안정적으로 유지되었으나, 산성 및 알카리 조건에서는 급격한 효소활성 저하를 확인하였다(그림 3.4, 3.5).

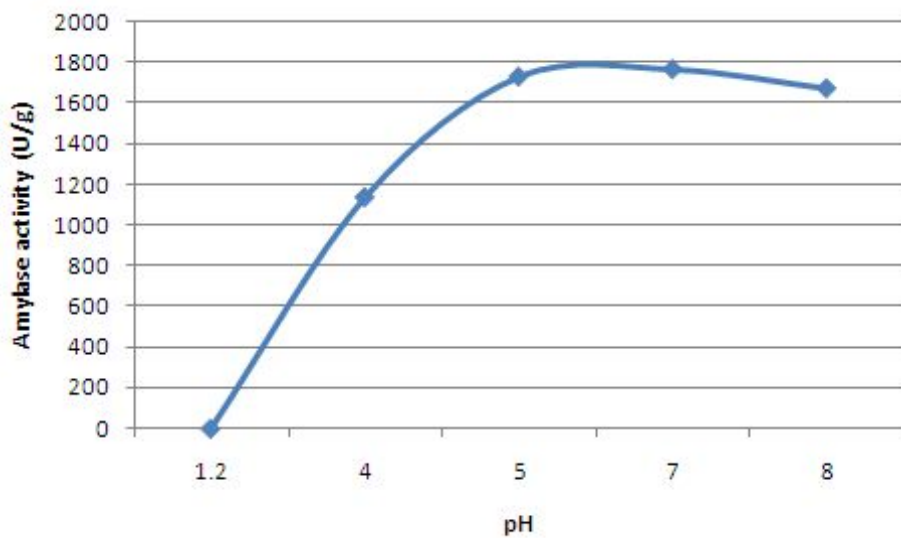


그림 3.4. pH 조건에 따른 amylase 활성변화

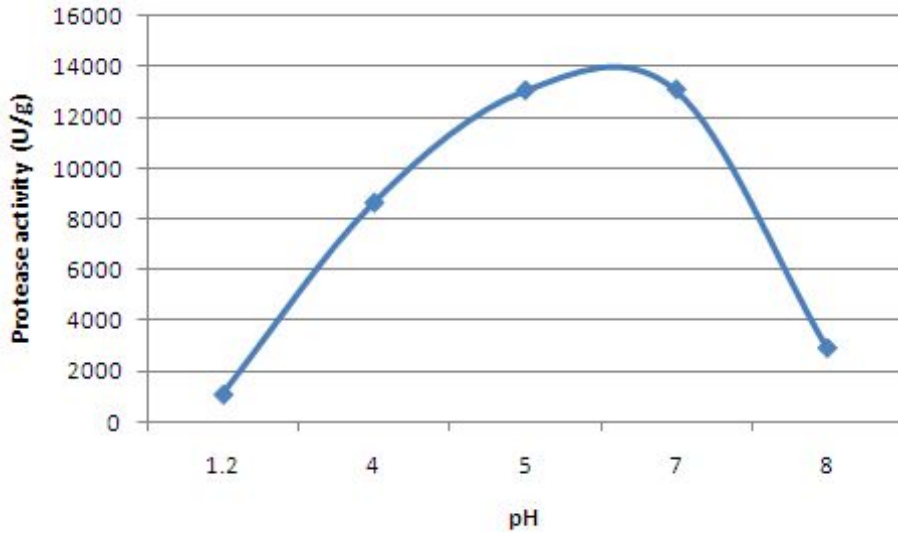


그림 3.5. pH 조건에 따른 protease 활성 변화

경쟁제품의 pH변화에 따른 amylase활성을 측정된 결과 개발품과 유사한 패턴으로 산성 pH 조건에서는 거의 효소활성을 확인 할 수 없었으며, protease의 경우도 pH 8.0의 알카리 조건에서 감소하는 경향을 나타내었다(그림 3.6, 그림 3.7). 이는 기존 효소제 및 개발품의 급이 시 실제 소화관내의 환경에서는 작용을 거의 하지 못하는 것을 나타내는 것으로 효소제의 한계를 나타낸다고 할 수 있다. 따라서 위의 조건인 pH 2.0에서의 활성 및 담즙의 pH 인 pH 8.0 수준에서 안정성을 확보하기 위해서는 장용성 코팅과정이 필수적임을 확인하였다.

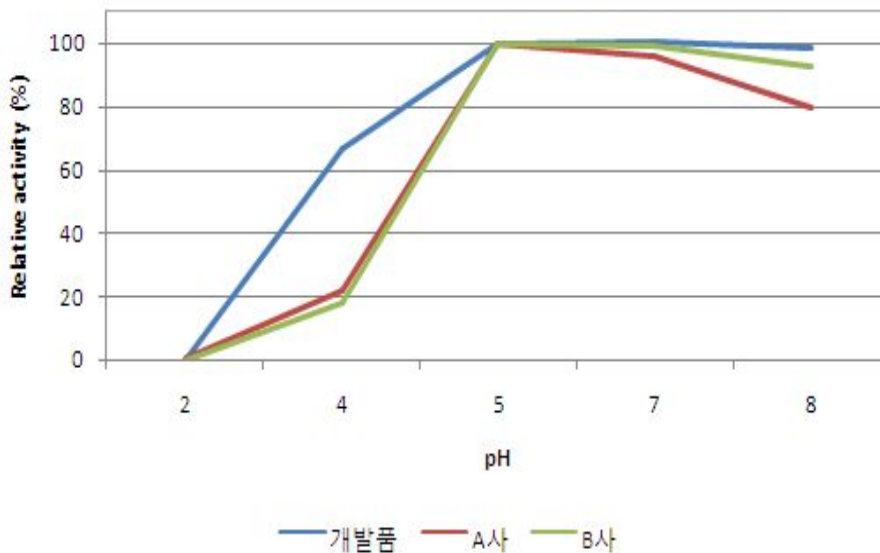


그림 3.6. 개발품 및 경쟁사 제품의 pH 별 amylase 활성

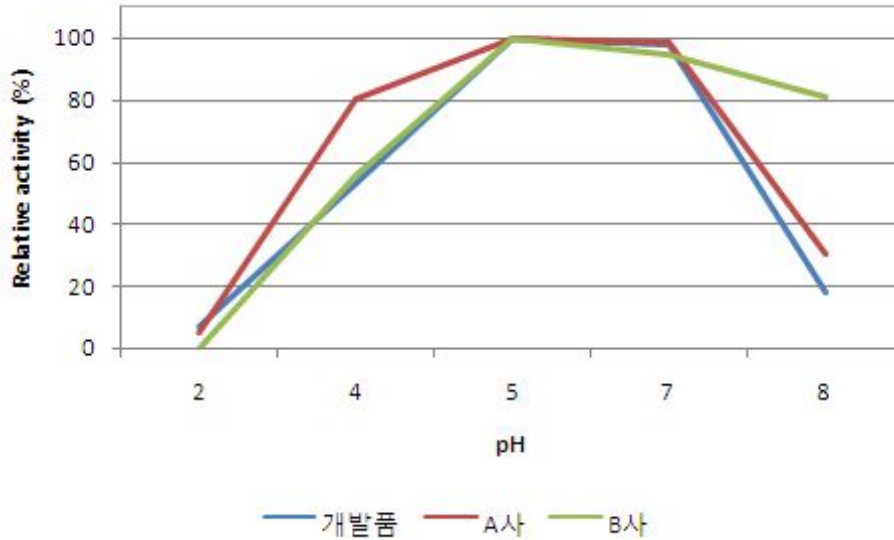


그림 3.7. 개발품 및 경쟁사 제품의 pH별 protease 활성

## 제2절 고체발효를 이용한 효소제 생산기술개발

### 1. 고체발효를 위한 기초자료 조사

#### 가. 고체발효 조건 조사

선발균주가 가진 효소활성 및 일반적인 온도에서 배양특성이 우수한 균주를 활용하는 것이 배양조건 확립에 앞서 검증을 거쳐야겠지만, 일반적인 고체발효조건에서 발효에 영향을 미치는 조건은 배양온도, 수분함량, pH, 발효시간, 접종량 등으로 각 세부 factor에 대한 검증을 실시하였다.

#### 1) 배양온도에 따른 영향

배양온도는 선발균주의 성장 및 효소활성에 적합한 온도조건으로 일반적인 Bacillus 균주는 35~40℃의 조건에서 Aspergillus 균주는 28~33℃의 조건에서 최적 성장 및 효소활성이 높은 수준으로 발현되며, 초기 종균 접종량 및 원료배지의 수분함량과 밀접한 연관성을 가지고 있다.

#### 2) 초기 수분함량에 따른 영향

초기 원료의 수분함량은 고체발효에서 가장 중요한 요인으로서 초기 수분함량이 높으면 사

용균주의 활성을 높여주어 효소발현에 영향을 미치게 된다. 일반적인 Bacillus 균주의 효소생산을 위한 수분함량 조건은 40~60%로 70%까지 효소활성이 증가된다는 연구가 보고되고 있다. Aspergillus 균주의 경우 40~55% 수준으로 초기 수분함량이 높으면 균주 성장은 빨라지나 발효시간이 길어지고 생성된 효소의 분해정도가 높으며, 온도관리가 되지 않는 문제점을 가지고 있어 효소 발현량에 영향을 미치지 않는 최소수준으로 관리가 되어야한다.

### 3) pH에 따른 영향

초기 pH는 균 성장에 중요하며 일반적으로 중성조건인 6.0~7.5 수준에서 성장이 가장 우수하며 그 범위를 벗어날 경우 pH의 보정을 통해 최적 pH로 발효를 진행하는 것이 바람직 할 것이다.

### 4) 종균 접종량에 따른 영향

종균 접종량에 따라 균 성장 수준 및 발효시간에 영향을 미칠 수 있으며, 일반적으로  $10^4$  CFU/g에서  $10^7$  CFU/g으로 그 목적에 따라 다양한 조건으로 테스트가 이루어지고 있으며, 일반적으로 초기 접종균수가 높으면 균 성장이 빨라지며 이로 인해 발효 중 수분함량 및 발효온도에 영향을 미칠 수 있어 적정 수준의 종균을 접종하는 것이 바람직하다.

### 5) 발효시간에 따른 영향

발효시간은 효소생산에서 중요한 공정으로 발효시간에 따른 균수 변화와 함께 변화를 나타내며 접종균수가 stationary phase로 접어들면서 균수가 감소함과 동시에 균수에 따라 차이는 있을 수 있으나 약 4~6시간 후부터 생성되는 효소의 양도 점차 감소하여 최대 균수 및 최대 효소활성을 나타내는 발효시간을 찾는 것이 고체발효를 통한 효소활성이 높은 제품을 만드는 데 중요하다고 할 수 있다.

## 나. 고체발효 효소제 제품화를 위한 국제 특허자료 조사

고체 발효를 이용한 효소제 생산과 관련하여 향후 제품개발 및 기초기술에 대한 특허등록을 위해 국제특허에 대한 선행기술을 조사하였다 (표 3.5). 국내 특허의 경우 고체발효를 활용한 효소제 생산방법에 대한 특허가 거의 없는 상황이며, 국제특허의 경우 대부분의 특허들이 개량된 균주(mutant)와 그에 따른 발효 공정에 대해 청구항의 범위를 설정하고 있어 특정 공정만으로는 특허등록이 불가능하며, 공정 및 사용균주에 대한 다른 특허와의 명확한 차별성을 가져야 할 것이다. 따라서 본 연구를 통해 기존에 보고된 균주보다 효소활성이 우수하거나 복합적인 효소활성을 가진 균주를 선발하고 발효공정에서도 차별성을 가지기 위한 연구를 주로 진행하였다.

표 3.5. 고체 발효 효소와 관련된 국제 특허 및 미국 특허 조사

공개번호	발명의 명칭	출원인	내 용
US 06664095	Solid state fermentation 외 다수(US, WO)	Biocon India Limited	고체 발효를 통한 곰팡이의 대사산물 (면역증강물질, 기능성 물질) 생산 및 공 정(곰팡이, 방선균)
2005019444 (WO)	Process for the preparation of an enzyme composition	Biocon India Limited	돌연변이 <i>A.niger</i> 를 이용한 N-acetyl beta D glucosaminidase와 endo xylanase 고체 발효 생산 공정 개발
2001007563 (WO)	Device for surface culture fermentation	ALLTEC H, INC.	Solid state fermentor에 관한 내용
2004103086 (WO)	Methods for improving the nutritional quality of residues of the fuel, beverage alcohol, food and feed industries	ALLTEC H, INC.	돌연변이 <i>Rhizopus oligosporous</i> 로 산 업 부산물(DDGS, soy hull 등)들을 고 체 발효하여 fungal protease 생산
20020037342 (US)	Multi-enzyme product with glucoamylase, proteolytic and xylanase activities and method for producing same by solid state fermentation of wheat bran with aspergillus niger	Gie Agro Industrie	Ethanol 생산 및 단위 동물에 유용한 복합 효소 개발. 밀기울에 대한 개량된 <i>A.niger</i> 의 발효 공정(lab scale) 개발
US 04401680	Bioconversion of cereal grain straws to protein-enriched product	Universit y of Waterloo	Cellulolytic 능력이 우수한 균주들을 이용하여 Carbon을 제거함으로써 grain straw의 단백질을 농축하는 공 정
2004113490 (WO)	Directed selective solid phase culturing of stable microbial mixed populations for the continuous preparation of defined enzyme and metabolite mixtures	Hoffer Bioreact GMBH	돌연변이 <i>A.niger</i> 를 이용한 복합 당화 효소 발현 유도를 위한 설비 및 공정

## 2. Lab scale test를 통한 효소생산을 위한 발효조건 규명

### 가. 연구의 세부목표

효소제 생산을 위한 효소활성이 우수한 균주를 선발하고 선발균주의 실험실 수준에서 최적의 고체발효 조건확립을 통해 pilot scale 및 대량생산을 위한 기초연구를 수행하였다.

### 나. 연구방법

#### (1) 고체발효를 위한 균주선발

균주선발을 위해 국내 여러 곳의 토양 샘플을 샘플링하여 평판배지 및 효소활성을 확인하기 위한 disk 확산법을 이용하여 효소활성이 우수한 균주를 선발하였으며 선발 균주의 고체발효 특성을 분석하여 최종 균주를 선발하였다.

균주선발 방법은 다음과 같다.

(가) 샘플링 한 토양 샘플을 멸균 생리식염수에 현탁하고 희석한 후, 희석액을 곰팡이 및 효모 균주 선발을 위해 chloramphenicol 100µg/mL을 포함하는 potato dextrose agar(PDA)에, 그리고 Bacillus 및 유산균류 선발을 위해 LB agar와 BCP agar에 각각 도말하여, 30°C에서 48-56시간 배양하였다.

(나) 배양 후 생성된 콜로니를 수집하여, 현미경으로 형태학적 분석을 실시한 후 생균제로 사



용가능한 균주 즉, Aspergillus, Bacillus, Lactobacillus 균주로 판단되는 균주를 1차 선발하였다.

- (다) 1차 선발한 균주를 각각 균주 특성에 맞는 상기 배지에 도말하여 30℃에서 4일간 배양하였다.
- (라) 선발 균주를 액상 및 고체발효를 통해 amylase, protease활성이 우수한 균주를 agar diffusion법을 이용하여 선발하고 추가적으로 cellulase 및 xylanase 활성에 대한 특성도 평가하였다. 이를 통해 amylase 및 protease 활성이 우수한 균주를 2차 선발하였다.
- (마) 고체발효 특성 분석을 위해 대두박 원료를 기본 원료배지로 하여 초기 수분함량을 40%로 보정한 후 121℃에서 15분간 멸균한 후 각각의 종균을 1%가 되게 접종한 후 곰팡이 균주는 30℃에서 48시간 배양을 Bacillus 균주는 37℃에서 48시간 배양 후 배양물의 효소활성 및 미생물 균수를 평가하고 최종 선발균주를 확보하였다.

## (2) 고체발효를 위한 최적조건 확립

고체발효를 위한 최적의 배양조건 확립을 위해 원료종류에 따른 영향, 초기 pH에 따른 영향, 초기배지의 수분함량에 따른 영향, 원료두께에 따른 영향에 대해 각각 검증을 통해 선발균주의 최적의 고체발효 조건을 확립하였다.

원료종류에 따른 영향은 원료종류별로 영양소 조성 및 입자도와 같은 원료적 특성에 차이가 있으므로 대두박, 소맥피, 파쇄옥수수, DDGS, 야자박, 채종박에 대해 48시간 발효 종료 후 효소활성 분석을 통해 최적원료를 선정하였다.

초기 pH에 대한 영향은 선정원료의 초기 pH 범위를 4, 5, 6, 7로 각기 달리하여 최적의 배지 pH 범위를 선정하였다. 또한, 초기 수분함량에 대한 영향은 선정배지의 초기 수분함량을 35, 40, 45, 50%로 달리하여 최적 수분함량범위를 결정하였다.

배지두께에 대한 영향은 배지의 두께에 따라 고체발효에서 효소활성, 미생물 성장 속도 등 차이가 발생할 수 있어 원료배지의 두께를 1.5, 3.5, 5.5, 7.5로 달리하여 두께에 따른 발효패턴을 분석하고 최적 효소활성을 가지기 위한 배지두께를 선정하였다.

## (3) 효소활성 증가를 위한 발효공정 개선연구

확립된 고체발효 공정을 토대로 배지조성의 변경 및 발효공정 제어를 통한 효소활성의 변화를 조사하고 최적의 고체발효용 원료배지를 선정하였다.

## 다. 연구결과

### (1) 고체발효를 위한 균주선발

고체발효를 위해 amylase, protease 외 cellulase, xylanase 활성배지에서 분해환이 가장 큰 균주를 1차 선발하고(표 3.6, 그림 3.8) 선발 균주 중 고체발효 테스트를 통해 amylase,

protease 활성이 가장 우수한 *A. oryzae* N1균주를 최종 효소제 생산을 위한 균주로 선정하였다(표 3.7).

최종 선발균주를 보관하면서 genomic DNA를 isolation하여 ITS 5.8s-rDNA sequencing 분석을 실시하여 NCBI Database search를 통해 선발균주의 동정을 통해 효소활성이 우수한 균주 *A. oryzae* GB N1 균주를 최종선발하고 효소제 생산을 위한 균주로 사용하였으며, 표 3.7의 선발균주를 각각 KCCM에 특허균주 등록하였다.

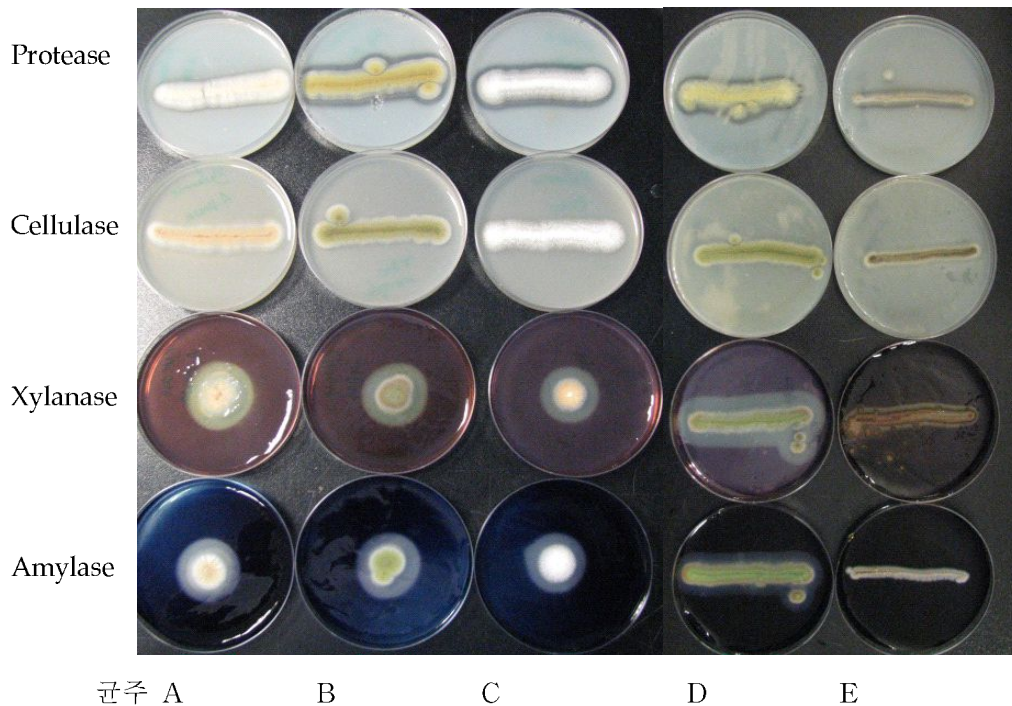


그림 3.8. 효소활성 우수균주 선발을 위한 분리균주(곰팡이 류) 테스트

표 3.6. 1차 선발균주(곰팡이 류)의 agar diffusion 법을 이용한 효소발현 평가(mm)

선발균주	Protease	Cellulase	Xylanase	Amylase
A	5	2	10	11
B	9	2	11	13
C	7	1	10	9
D	7	1	15	8
E	6	2	4	3

표 3.7. 최종 선발균주 및 효소활성

선발균주	Amylase	Protease
<i>A. oryzae</i> GB	1,100	6,600
<i>A. oryzae</i> N1	1,200	22,000
<i>A. niger</i> C1	830	11,000
<i>B. subtilis</i> GB	740	13,000
<i>B. subtilis</i> A1	475	8,300

(2) 고체발효를 위한 최적발효조건 확립

(가) 고체발효를 위한 선발균주에 적합한 최적원료 배지의 선발

고체발효를 통해 원료배지의 종류에 따른 효소활성의 차이를 확인하였으며, 이를 통해 최적 효소생산을 위한 고체원료배지를 선정하였다. 고체발효에 적합한 배지로는 amylase, protease 활성이 가장 우수한 옥수수 및 DDGS 원료를 사용하는 것이 효소발현을 위해 가장 적합할 것으로 판단된다(그림 3.9). 아울러 고체발효 조건의 확립을 통해 효소생산량은 추가적으로 더 개선될 수 있을 것으로 판단된다.

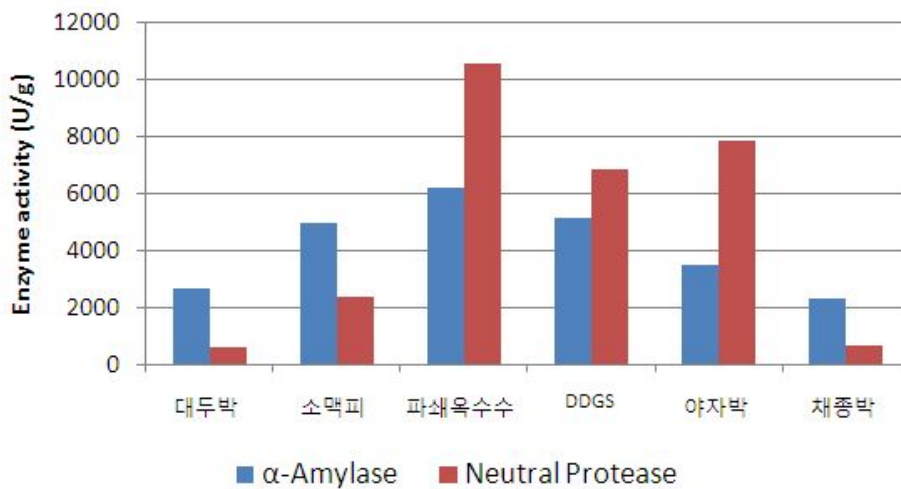


그림 3.9. 고체발효조건에서 배지종류에 따른 효소활성 변화

(나) 발효조건 확립

고체발효조건 확립을 위해 최적균주 발효조건의 확립과 효소생산조건 확립이 같은 맥락에서 진행되어야 하므로 효소생산조건 확립에 앞서 선발균주의 성장조건을 확립하였다. 고체발효조건에서 미생물 성장과 관련이 있는 부분으로 초기 pH 및 초기 수분함량과 대량생산시스템을 고려할 경우 고체발효원료의 두께에 따른 영향을 조사하고 1차 확립된 조건으로 발효시간 및 종균 접종량에 따른 효소활성을 비교 평가하여 최종 고체발효 조건을 확립하였다.

초기 pH조건에 따른 선발균주의 성장은 pH 6.0~7.0의 중성조건에서 성장이 가장 왕성하였으나 낮은 pH 즉, pH 4.0으로 발효를 시작할 경우 오히려 48시간 이후의 균수는 낮지만, 곰팡이 발효로 인한 일반세균의 오염이 발생가능성이 있지만, 낮은 pH에는 오염발생정도가 현저히 낮은 것을 확인하여 최종 고체발효조건에서는 pH 4.0을 기준으로 발효조건을 확립하였다(표 3.8).

표 3.8. 고체발효조건에서 초기 pH에 따른 선발균주 성장

Initial pH	Microbial growth (Log CFU/g)		
	24 hr	48 hr	Contamination
4.0	6.3	7.9	2.0
5.0	6.4	8.1	3.2
6.0	6.8	8.3	3.7
7.0	7.2	8.5	4.3

초기 수분함량을 35~50%로 달리하여 수분함량에 따른 미생물 성장 및 효소생성량을 조사한 결과를 그림 3.9 에 나타내었다. 초기 수분함량 증가에 따라 효소활성의 증가를 보이며, amylase의 경우 40% 이상에는 1,200U/g 이상의 효소활성을 나타내었으며 수분함량이 50% 조건이 40% 조건 보다 약 3%정도 증가하는 경향을 보였다. 그렇지만, protease의 경우 수분함량이 50% 조건에서 수분함량이 40% 조건에 비해 약 20% 정도 증가된 효소활성을 나타내어 효소활성 측면에서는 수분함량이 증가되면 효소활성도 같이 증가하는 경향을 보였다 (그림 3.10). 이는 초기 수분함량이 35%인 경우에는 배지내의 수분이 빨리 증발되어 배양이 잘 되지 않았으며 이로 인한 효소활성이 낮은 수준으로 확인되었으며, 수분이 50%이상인 경우에는 배지내의 수분이 많아 흐름성이 매우 나빴으며, 특히 배양시간이 지남에 따라 pH가 상승하여 5.0이상이 되어 다른 세균류에 의한 오염의 확률도 높아지므로 대량생산 시 문제점이 될 수 있다 (그림 3.11).

따라서 선발균주의 고체발효 조건은 생장이 최대이면서 기타 미생물에 의한 오염은 방지되는 적정 수분함량은 40~45%로 판단되었다.

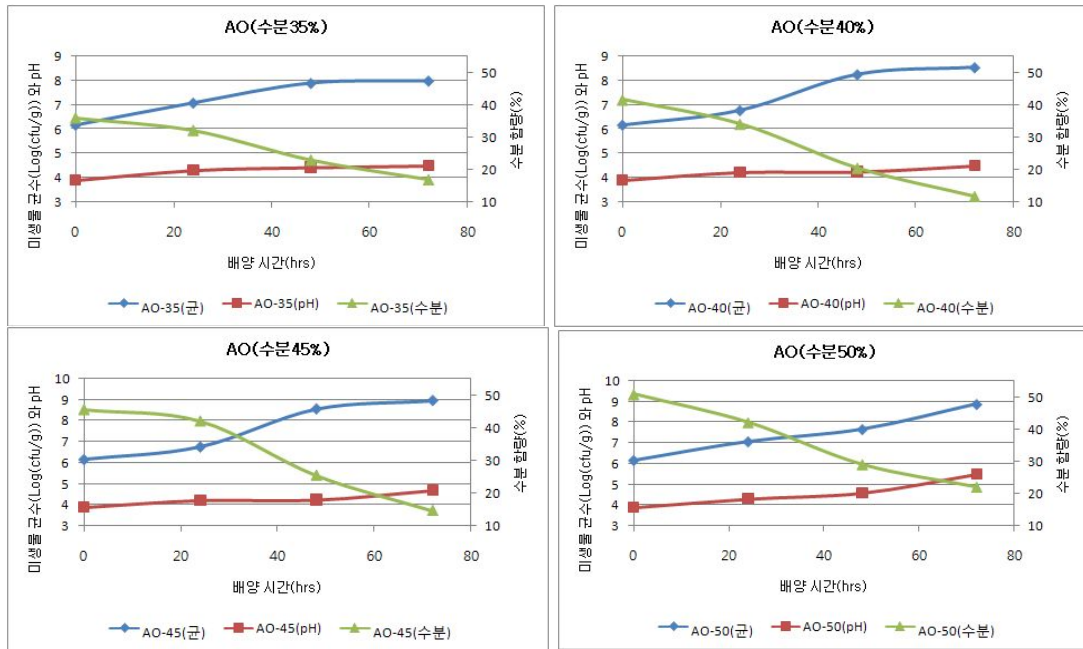


그림 3.10. 초기 수분 함량에 따른 발효패턴 변화

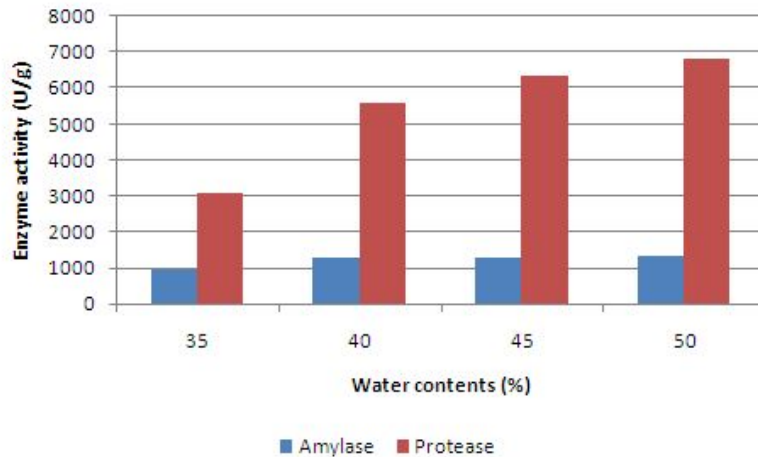


그림 3.11. 초기 수분함량에 따른 효소활성 변화

고체 발효 시 원료두께에 대해서도 차이점을 나타내었는데, 특히 곰팡이 균주의 경우 두께가 얇을수록 균의 빠른 생장이 이루어졌지만, 빠른 수분증발도 발생하여 충분한 발효가 이루어지지 않았다. 두께가 7.5cm인 경우에는 통기량이 우수하지 않아 표면에서만 집종균의 생장이 이루어지며, 배지 안쪽에서는 통기량이 부족하여 바실러스 류에 의한 오염이 관찰되어 적합하지 않은 조건으로 판단되며, 3.5 ~ 4.0cm의 두께가 실험실 발효조건에서는 최적인 것으로 판단되었다(그림 3.12).

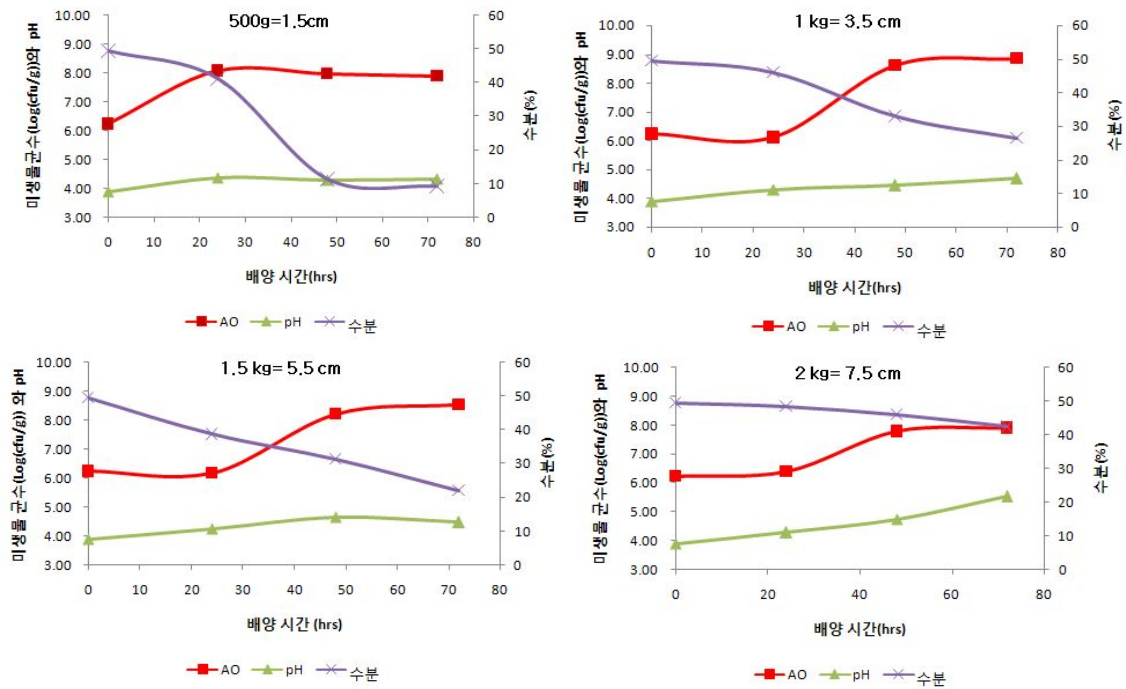


그림 3.12. 배지두께에 따른 발효패턴의 변화

초기 종균 접종량에 따른 효소활성의 변화는 초기 수분 45%, 발효온도 33°C의 조건에서 발효 온도가 35°C가 넘지 않게 관리하면서 96시간동안 샘플링을 통해 효소활성을 측정하였다.

초기 접종균수를  $10^4 \sim 10^7$ CFU/g이 되게 접종 후 각 처리구별로 효소활성을 측정한 결과 amylase의 경우 발효 72시간에 최대 효소활성을 보였으며, 특히 초기균수가  $10^7$ CFU/g이 되게 접종한 처리구에서 가장 높은 44,170U/g의 효소활성을 나타내었다(그림 3.13). 반면, protease 활성은 48시간~72시간 처리구에서 최대값을 나타내었으며(그림 3.14), 특히 초기균수를  $10^4$ CFU/g이 되게 접종하여 발효한 처리구에서 가장 높은 21,867 U/g의 효소활성을 나타내어 amylase와 protease 활성 모두를 고려할 경우 단순히 효소역가만을 고려할 경우 초기균수를  $10^7$  CFU/g이 되게 종균을 접종하고 발효시간을 72시간으로 설정하는 것이 가능할 것이나,  $10^8$  CFU/g의 균수를 가진 종균의 첨가량이 과다하여 효율적인 방법이 될 수 없다. 따라서 현재의 조건에서 가장 이상적인 방법은 초기 균수를  $10^4$  CFU/g이 되게 접종한 후 발효시간을 66~70 시간 정도에서 발효를 종료하는 것이 가장효율적인 효소제 생산방법이 될 수 있을 것으로 판단된다.

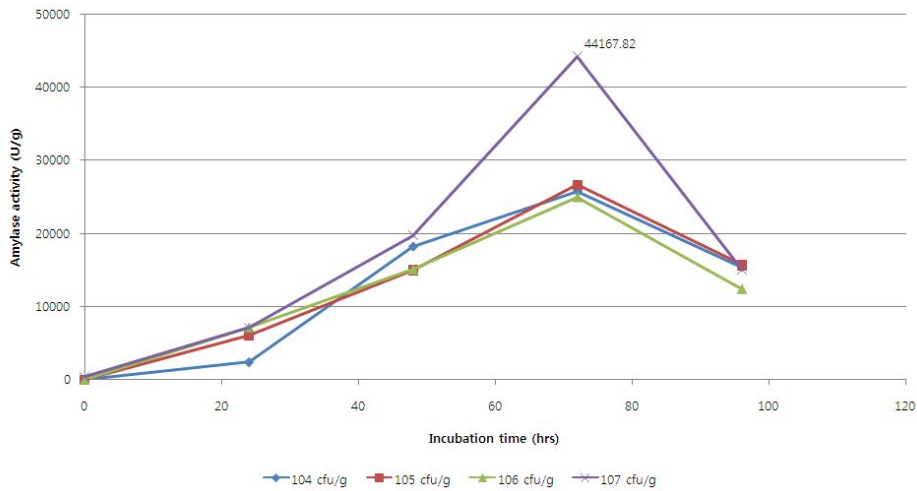


그림 3.13. 초기 종균 접종량에 따른 발효시간별 amylase 활성의 변화

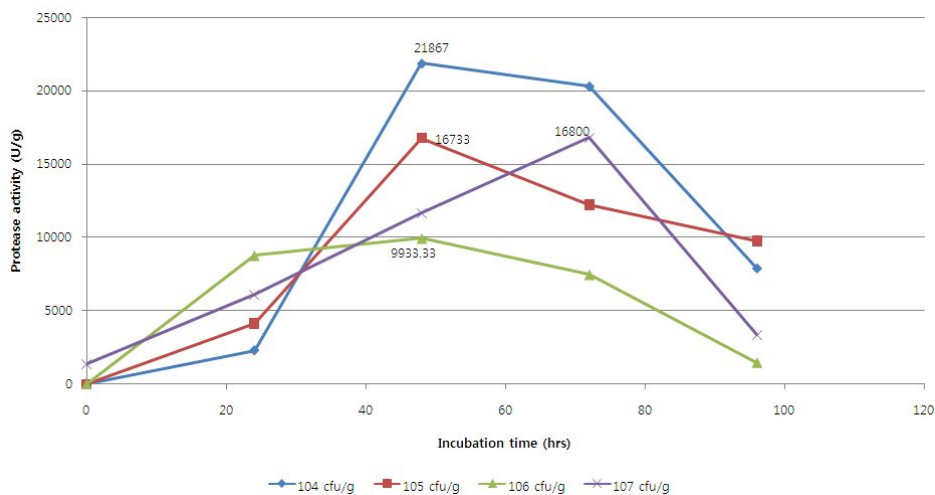


그림 3.14. 초기 종균 접종량에 따른 발효시간별 protease 활성의 변화

### (3) 효소활성 증가를 위한 발효공정 개선을 위한 연구

효소활성을 증가시키기 위해 발효공정에 대한 개선 및 이를 바탕으로 한 추가 배지조건에 대한 재검토를 실시하였다. 원료배지의 조성은 amylase, protease 활성을 증대시키기 위한 발효공정 개선연구를 진행하였다. 공정개선 부분은 최적 발효조건에서의 발효 중 온도 및 수분함량을 제어하는 것으로 원료 배지내의 수분함량 제어를 통해 추가적인 효소활성 증가효과를 확인하였다.

소맥피를 원료로 할 경우 초기 수분함량만 조절한 후 실험실상에서 48시간 배양 후 효소활성

을 평가한 결과 amylase 및 protease 역가가 각각 5,000U/g 및 2,300U/g으로 초기 선정 원료인 옥수수 및 DDGS에 비해 상당히 낮은 수준의 효소활성을 나타내었다. 그렇지만, 공정부분에서 원료배지내의 수분함량을 초기와 동일한 수준으로 발효종료시점까지 유지한 결과 효소활성 측면에서 amylase의 경우 약 5배의 효소활성 증가효과를 확인하였으며, protease의 경우 약 10배정도의 효소활성 증가효과를 확인하였다(표 3.9).

표 3.9. 효소활성 증가를 위한 배지종류의 변화

No.	원료명	Enzyme activity (U/g)		비고
		Amylase	Protease	
1	DDGS	1,700	16,350	수분 40%, 48시간 발효
2	옥수수	6,000	10,000	수분 45%, 48시간 발효
3	소맥피	15,521	19,350	공정개선 수분 45%, 72시간 발효
4	소맥피	40,000	20,000	공정개선 수분 45%, 48시간 후 수분 보정, 72시간 발효

### 제3절 효소제 pilot scale 생산조건 확립

#### 1. 연구의 세부목표

Lab scale 효소제 생산조건을 토대로 하여 1,000kg 규모의 pilot scale 발효공정을 확립하고 개발효소제의 6개월간 보관을 통한 효소활성의 변화를 조사하였다. 또한, 효소제로서의 특성을 평가하기 위해 *in vitro* 소화율 평가를 실시하였다.

#### 2. 연구방법

가. 고체발효를 통한 amylase, protease 동시발현을 위한 pilot scale 생산조건 규명

실험실 수준에서의 연구를 통해 amylase, protease 발현을 위한 조건을 표 3.10에 나타내었다. Lab scale 발효조건을 기초로 하여 pilot scale 상에서의 발효 조건을 확립하기 위해 초기 수분함량, 접종 종균첨가량, 원료배지 두께, 발효온도에 따른 효소활성을 기준으로 최적 발효조건을 확립하였다. 발효원료에 대한 평가는 단일 및 복합원료를 대상으로 amylase, protease 발현능의 평가를 통해 최적 발효용 원료를 선발하였다. 단일 원료로는 옥수수, 소맥피, 대두박,



귀리, 말분을 테스트하였으며, 복합원료로는 당밀, 대두박, 소맥피, 옥수수를 C/N ratio를 기준으로 조합을 통해 발효용 배지로서 발효시험을 실시하였다.

표 3.10. Lab scale에서의 최적 발효조건

항 목	발효 조건
최적 균주	<i>A. oryzae</i> GB N1
초기 수분함량	45%
초기 종균 접종균수	10 <sup>4</sup> cfu/g
발효온도	32 ~ 33 °C
발효시간	72 시간

초기 원료의 수분함량에 대한 검증은 수분함량을 45, 50, 55%로 각각 달리하여 소맥피를 원료로 하여 1ton scale에서 발효실험을 통해 최적 수분함량을 결정하였다. 원료의 두께에 대한 검증은 원료 두께를 0.5~1.75cm로 0.25cm 단위로 달리하여 최적의 원료두께를 선정하였다. 또한, 발효온도는 발효 공정 중 온도설정의 변화를 통해 발효시간별 최적발효온도기준을 설정하였으며, 발효시간은 발효 96시간까지 발효를 통해 효소활성 변화를 확인하고 최적 발효시간을 설정하였다.

#### 나. 최적원료배지에서의 반복, 재현을 통한 효소활성 검증

Pilot scale 발효조건설정을 토대로 1.3톤 규모의 고체발효실험을 5회 실시하여 amylase 및 protease 활성을 분석하여 동일조건에서 반복 및 재현성이 있는지를 검증하였다.

#### 다. 고체발효물의 코팅을 위한 입자도 균일성 확보방안 연구

코팅을 위해서는 원료입자의 균일성 확보가 중요하게 작용하므로 각 원료별 발효샘플을 대상으로 0.5mm 스크린으로 분쇄를 통해 각 원료별 입자도 분포 조사를 통해 원료별 물리적 특성을 조사하였다.

#### 라. 효소활성 분석법 비교연구

기존 1년차 실험결과 효소활성 비교를 위해 UV 분석법과 형광 분석법을 비교하여 효소활성 분석오차를 검증하였다. 분석에 사용한 샘플은 동일한 샘플을 사용하였으며, 샘플 처리방법은 분석방법 및 분석용 kit의 방법에 따라 실시하였다 (표 3.11).

표 3.11. Protease 분석방법 비교

분석법	분석법 1: UV 분석법	분석법 2: 형광 분석법
분석 방법	<ul style="list-style-type: none"> <li>- 시료준비 및 분석: 시료 5g, 50mL 추출 후 tyrosine 함량 분석</li> <li>- 활성측정: UV spectrophotometer (660nm)</li> <li>- 활성계산: <math>\text{Protease U/g} = \text{흡광도} * 6 / 1(\text{반응액량}) * 1 / 0.5(\text{효소액량}) * 50 / 10(\text{추출액})</math></li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- 시료준비 및 분석: 시료 5g, 50mL 추출 후 EnzChek Protease assay kit를 이용한 활성 분석</li> <li>- 활성측정: Multi-label reader (485/535nm)</li> <li>- 활성계산: <math>\text{Trypsin mg/g} = (\text{Fluorecence} * a + b) * \text{추출율} * \text{희석배수} / 1000</math></li> </ul>

마. 개발효소제의 안정성 평가

6개월간 실온조건(온도: 10~18℃, 습도: 40~70%)에서 저장테스트를 통해 효소활성 및 미생물 균수의 감소 정도의 확인을 통해 개발효소제의 최대 보관기간을 설정을 하고자 하였다.

바. 개발효소제의 *in vitro* 소화율 평가

개발효소제의 적정 첨가 수준을 알기 위해서는 Boisen (1997)의 *in vitro* 소화율 측정 방법을 변형하여 사료원료와 개발 효소제를 일정 비율별로 혼합하여 소화율 개선 정도를 확인하였으며, 사료자원에 정제된 소화효소들을 배제하고 개발효소제를 직접적으로 처리함으로써 사료자원에 대한 이용성 개선효과를 간접적으로 검증할 수 있었다.

### 3. 연구결과

가. 고체발효를 통한 amylase, protease 동시발현을 위한 pilot scale 생산조건 규명

(1) 발효용 원료

Pilot scale 발효를 위한 최적 발효용 원료로 단일 및 복합원료를 대상으로 amylase, protease 발현능의 평가를 통해 최적 발효용 원료를 선발하였다. 원료 각 5kg을 발효용 tray에 담아 최적 조건에서 발효를 진행하였다. 최종 72시간 발효 하여 42℃에서 12시간 건조 후 각 효소활성을 분석한 결과를 그림 3.15에 나타내었다. Protease 의 경우는 귀리, 소맥피 및 옥수수에서 높게 나타났고 amylase의 경우는 소맥피, 옥수수, 말분에서 다른 원료에 비해 높게 나타나 amylase와 protease 동시 발현 측면에서 소맥피와 옥수수를 배지로 하는 것이 효과적인 것으로 나타났다.

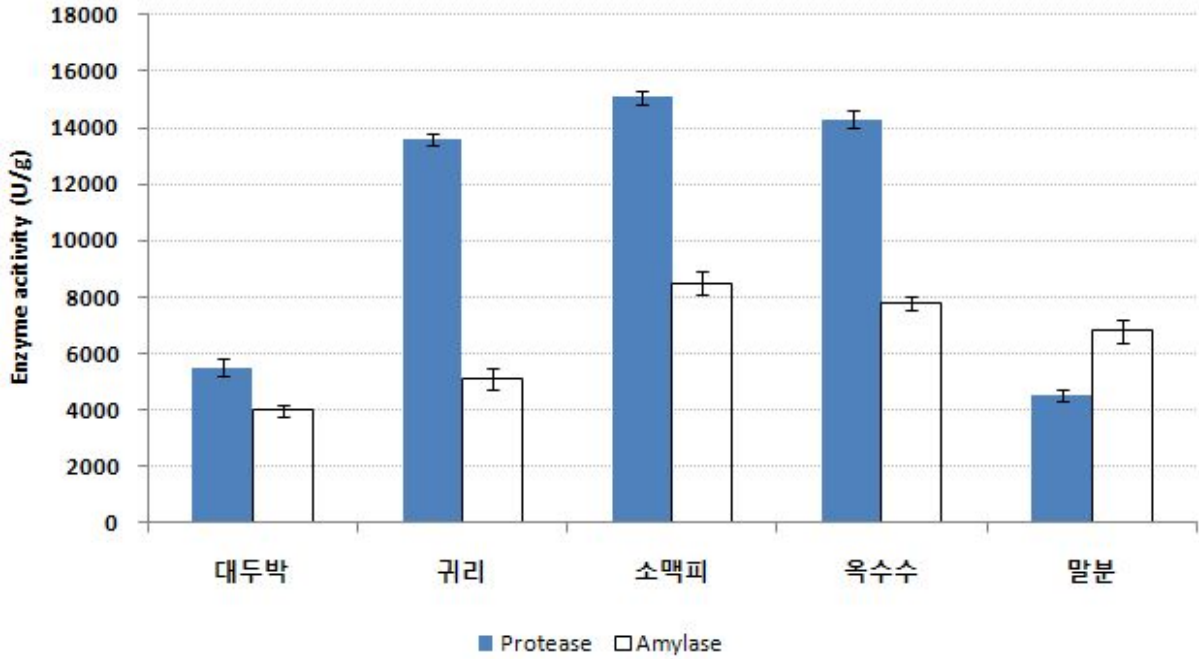


그림 3.15. 단일 원료별 amylase, protease 활성 비교

단일 원료의 발효 결과를 확보한 후 각 원료의 조합을 통해 C/N(carbon/ nitrogen) 비율을 조정하여 표 3.12과 같이 몇 종의 원료 조합을 통해 발효용 원료배지를 조성한 후 발효테스트를 실시하였다.

표 3.12. 복합원료를 이용한 효소발현 비교 테스트

원료	C/N 비율	Carbon/ Nitrogen			
		5	10	15	20
당밀	33.2	-	-	-	10%
대두박	5.2	100%	60%	20%	-
소맥피	18.1	-	40%	80%	80%
옥수수	21.2	-	-	-	10%
실제 C/N 비율		5.2	10.36	15.52	19.92

복합원료에 대한 테스트 결과를 그림 3.16에 나타내었다. 복합원료배지 조성은 C/N ratio를 기준으로 5~20까지 달리하여 발효테스트를 진행한 결과 protease 활성은 C/N ratio가 증가함에 따라 증가하는 경향을 나타내었으며, amylase 활성은 C/N ratio 15~20에서 높게 나타났으나, protease 활성과 달리 C/N ratio가 증가할수록 효소활성은 증가하지는 않았다. 이는 원료의 입자도 및 당밀과 같은 에너지 source의 첨가에 따른 원료 이용성의 저하 등의 영향을 받아 효소활성에서 차이가 나타난 것으로 판단된다. 본 실험 결과는 단일 원료 배지로 발효한 결과

와 유사하게 C/N ratio가 높은 즉, 탄소원 함량이 높은 원료일수록 amylase, protease의 활성은 높게 나타나는 것을 확인 할 수 있었다.

특히, 단일 원료 중 말분의 경우 C/N ratio가 20이상으로 탄소원의 함량이 풍부하여 효소발현 증가에는 문제가 없을 것으로 판단되나, 원료자체의 입자도가 작아 공극을 감소시켜 발효 시 aeration이 원활하지 않아 생긴 문제로 판단된다.

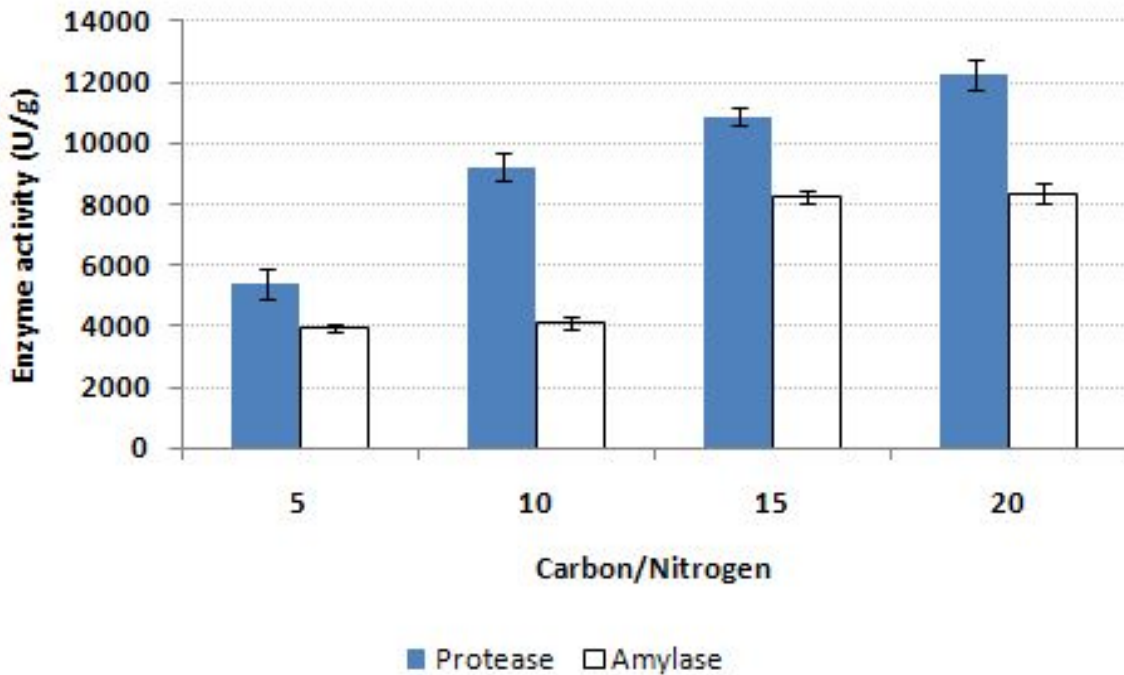


그림 3.16. 복합 원료 조성에 따른 amylase, protease 활성 비교

최적 발효용 원료 선발을 위해서는 경제성을 고려하여 최종 발효용 원료를 결정하였다. 발효용 원료는 원료용 배지 비용 및 효소활성을 기준으로 단일 원료로는 소맥피가 45.9원으로 가장 경제적이었으며, 옥수수 61.7원으로 대두박, 귀리, 말분에 비해 경제적인 원료로 확인되었다. 복합원료배지 테스트에서는 소맥피/ 옥수수/ 당밀 혼합배지가 51.5원으로 생산단가가 낮게 확인되었다. 그러나 복합배지의 경우 단일원료배지에 비해 추가 혼합하는 공정을 필요로 하므로 단일원료배지가 공정시간 및 비용 절감에 효과적인 것으로 판단된다(표 3.13).

따라서 최종 발효를 위한 배지로는 단일배지인 소맥피를 선정하였으며, 두 번째 후보군이었던 옥수수도 같이 발효를 진행하였다.

표 3.13. 단일 및 복합원료 배지의 경제성 분석

원료조성		단가 (원/kg)	Enzyme activity (U/g)		효소 생산단가 (원/U)		
			Protease	Amylase	Protease	Amylase	계
단일 원료	대두박	573	5,498.95	3,980.21	104.2	144.0	248.2
	귀리	487	13,598.22	5,102.15	35.8	95.4	131.3
	소맥피	250	15,112.24	8,512.32	<b>16.5</b>	<b>29.4</b>	45.9
	옥수수	311	14,289.11	7,795.65	21.8	39.9	61.7
	말분	260	4,503.22	6,788.52	57.7	38.3	96.0
복합 원료	대두박(60%), 소맥피(40%)	444	9,215.63	4,103.63	48.2	108.2	156.4
	대두박(20%) 소맥피(80%)	315	10,881.13	8,207.26	28.9	38.4	67.3
	소맥피(80%), 당밀(10%), 옥수수(10%)	256	12,258.25	8,355.39	20.9	30.6	51.5

(2) 초기원료의 수분함량

Pilot scale 상에서 발효를 위해서 초기 수분함량에 대한 검증을 실시하였다. Lab test 결과에서는 초기 수분함량을 45%로 설정하였으나, 대량생산단계에서는 발효 중 발효온도 조절을 위해 공기의 강제 순환 system을 이용하므로 초기 수분함량이 낮을 경우 발효 중 배지의 건조로 인해 효소 발현에 영향을 미칠 수 있다. 따라서 초기 수분함량을 45% 및 50%, 55%로 각각 달리하여 소맥피를 원료로 하여 1ton scale에서 테스트를 실시한 결과를 표 3.14에 나타내었다.

표 3.14. Pilot scale 상에서의 초기 수분함량에 따른 효소발현 비교

	가공량 (kg)	Enzyme activity (U/g)		수분함량 (%)
		Protease	Amylase	
1차	1,000	12,421	5,890	45
2차	1,000	16,237	6,980	50
3차	1,000	22,156	8,014	55

그 결과 초기 수분함량이 높을수록 효소활성이 증가하였으며, 특히, 수분함량이 55%일 경우 protease의 경우 초기 수분이 45% 일때 보다 약 78%, amylase의 경우 약 36%의 효소활성 개선효과를 보여 초기 수분함량 55%를 pilot scale 상에서의 최적 조건으로 설정하였다.

### (3) 종균첨가량 설정

종균 첨가량의 결정은 원료대비 0.01%를 첨가하였으며 이는 최초 lab scale test 결과에서  $10^4$  cfu/g 수준의 종균을 접종하는 것과 동일한 수준으로 본 실험을 위해서는 첨가량의 변화 없이 pilot scale 발효조건을 설정하였다.

### (4) 배지두께 결정

Pilot scale상에서 발효조건 설정에 중요한 부분이 발효용 원료배지의 두께로서 발효를 위해서 최적 발효두께를 결정하는 것이 batch 당 가공량 및 생산단가를 결정하는 중요한 요소로 작용한다. 따라서 최적 배지 두께를 결정하기 위해 0.5 ~ 1.75cm까지 달리하여 발효테스트를 통해 효소발현 양을 비교평가 하였다. 발효용 원료배지는 소맥피를 사용하였으며, 발효시간은 동일하게 72시간으로 설정하고 배지의 두께 외에는 모든 조건을 동일하게 유지하였다. 그 결과 protease 활성은 두께가 0.5~0.75cm로 얇을 경우 훨씬 높은 효소활성을 나타내며 배지의 두께가 두꺼워 질수록 효소활성은 감소하는 경향을 나타내었다. Amylase의 경우 0.5~1.25cm까지 배지의 두께가 증가할수록 효소활성 역시 증가하였으며, 1.5cm 이상에서는 효소활성이 감소하였다 (그림 3.17).

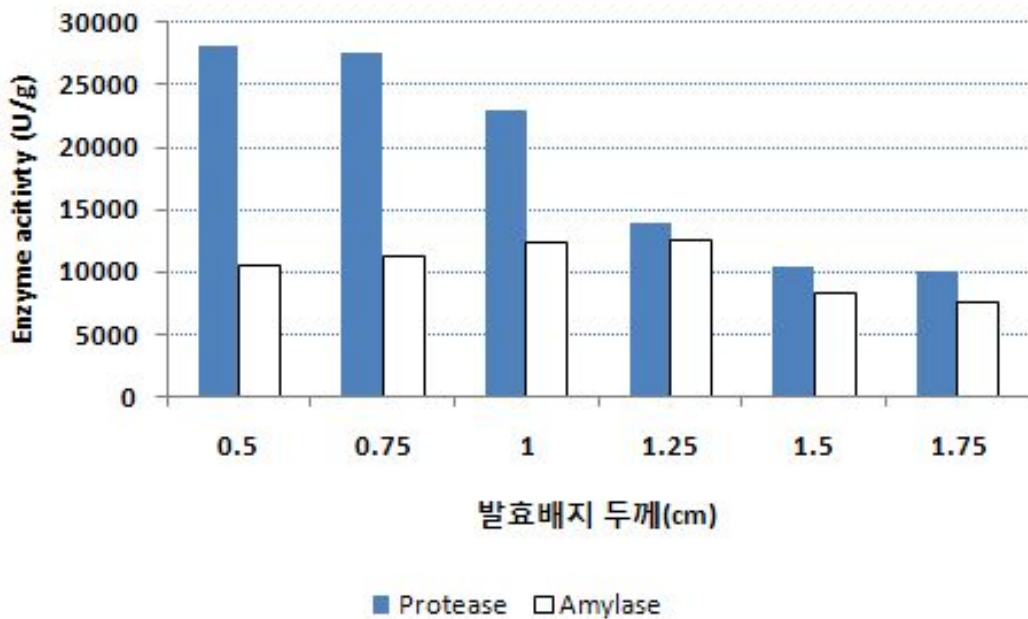


그림 3.17. 원료배지두께에 따른 효소활성 변화

이는 배지의 두께가 얇을 경우 aeration이 원활하게 작용할 수 있고, 발효 중 발생하는 발효열 관리측면에서 배지가 얇을 경우 유리할 것으로 판단되며, 특히 protease의 경우 aeration에 더 민감한 영향을 받은 반면 amylase는 1.25cm의 높이까지는 aeration의 영향 보다는 원료의

구성성분에 따라 차이를 보일 수도 있으나 초기 수분활성 및 배양 온도 등 외부환경의 영향을 더 받는 것으로 판단된다. 따라서 최적 원료두께로 amylase, protease 활성 측면 및 1회 가공량 측면에서 가장 유리하다고 판단되는 1cm를 기준으로 설정하였다.

(5) 발효온도 설정

Pilot scale 발효를 위해 발효온도관리가 중요하다 따라서, 초기 발효조건 설정을 30~33℃ 범위를 설정하여 관리하였으며, 총 72시간 동안의 발효시간동안 제품 및 발효실 내부 온도변화를 그림 3.18에 나타내었다.

제품온도는 발효 12시간 이후부터 35℃까지 증가하기 시작하여 발효 72시간까지 점차 감소하는 경향을 나타내었다. 이는 초기 발효실 내부 온도를 32~33℃로 설정하여 실제 발효온도 범위를 32~33℃로 유지하여 AO GB-N1 균주의 최적성장조건을 맞춰 균사성장을 촉진하고 균사가 본격적으로 자라기 시작하는 발효 12시간부터는 내부 설정 값을 내려 실제 제품온도가 32~33 ± 2℃ 범위가 되게 관리하는 조건을 표준 발효온도 조건으로 관리하였다.

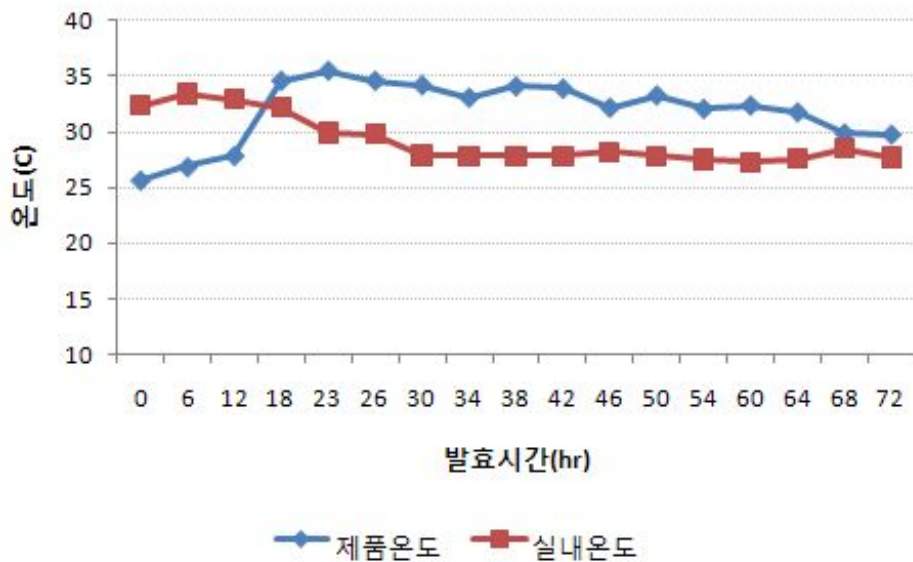


그림 3.18. 대량생산을 위한 발효온도조건 설정

(6) 발효시간별 효소활성 변화

최적 고체발효조건에서의 발효를 통해 amylase, protease 활성을 검증하였다. 발효용 원료는 소맥피를 사용하였으며, 초기 수분함량은 55%, 원료대비 0.1% 중균접종 및 35℃이하 온도관리 조건으로 하여 총 1톤의 원료를 이용하여 3번에 걸쳐 발효시간별 샘플링을 통해 효소활성 변화를 확인하였다 (그림 3.19).

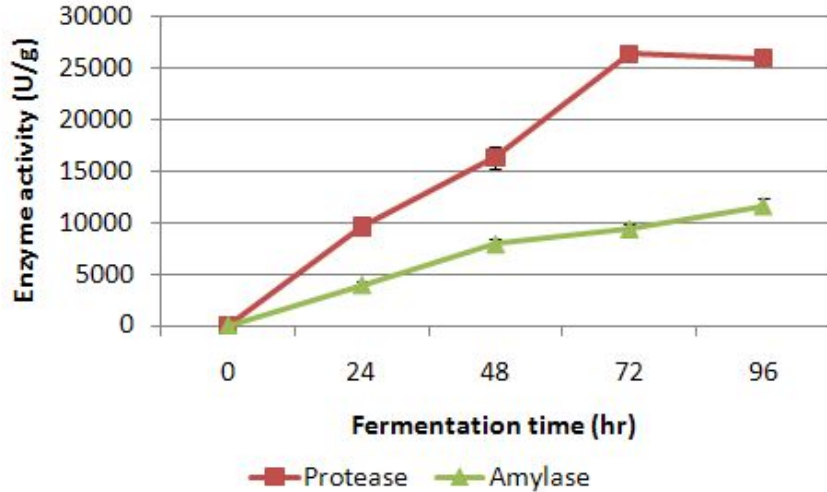


그림 3.19. 최적 발효조건에서의 발효시간별 효소활성 변화

발효 시간별로 효소활성은 증가하였으며, protease 활성은 300~400U/시간의 증가율을 보이며 발효 72시간까지 꾸준히 증가하였으나, 발효 72시간부터는 활성이 더 이상 증가하지는 않는 것으로 나타났다. Amylase 활성은 48시간까지는 160U/시간의 증가율로 증가하였으나, 48시간 이후부터는 60~90U/시간 수준의 증가율을 보였으나 protease와 달리 72시간 이후에도 효소활성이 약간 증가하는 경향을 나타내었다.

#### 나. 최적원료배지에서의 반복, 재현을 통한 효소활성 검증

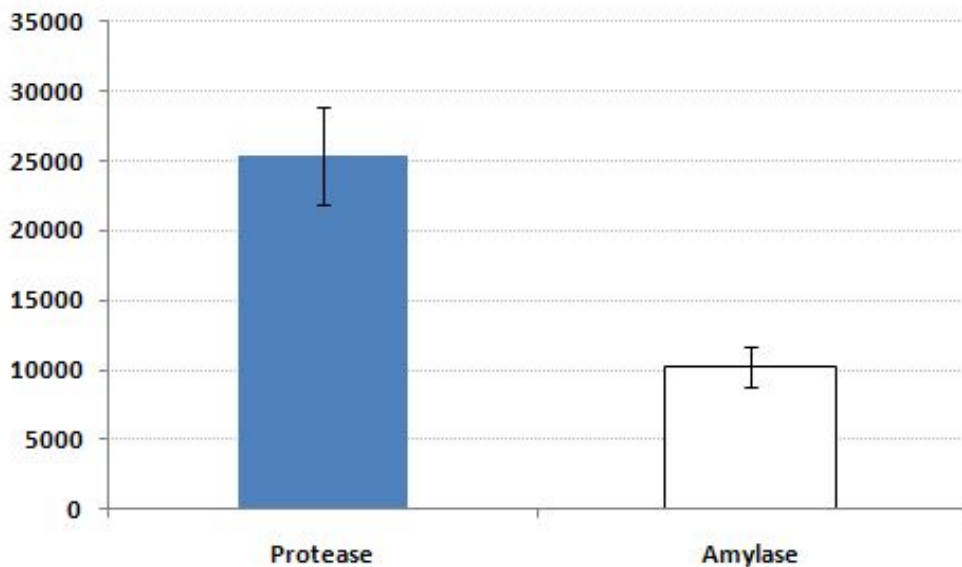


그림 3.20. Pilot scale test를 통한 protease, amylase 활성 결과

소맥피를 원료배지로 하여 1.3톤 scale로 총 5회 테스트를 실시하여 평균 protease 및



amylase 활성을 확인하였다. Protease 활성은  $24,771 \pm 3,486\text{U/g}$ , amylase 활성은  $10,263 \pm 1,456\text{U/g}$ 로 나타났으며 초기 가공조건(발효를 위한 준비 공정)에 대한 교육 및 최적 발효조건의 반복을 통해 batch가 거듭될수록 편차는 점점 줄어들 수 있을 것으로 판단된다(그림 3.20).

#### 다. 고체발효물의 코팅을 위한 입자도 균일성 확보방안 연구

코팅을 위한 발효물의 입자도 결정은 최적의 코팅 효과를 높이기 위한 조건에서 탐색되었다. 그러나 발효물 원료의 물리적 특성(수분함량, 경도 등)에 따라 동일한 스크린 크기에서도 입자도 분포가 다르게 나타났다 (그림 3.21). 0.5mm 스크린으로 각 발효물을 분쇄한 결과 코팅에 적합한 크기인 0.2~0.45mm 입자도는 소맥피(60%), 귀리(49%), 말분(45%) 순으로 소맥피가 가장 적합것으로 판단되었다. 0.2mm 이하의 입자도는 옥수수(65%)가 상대적으로 높아 코팅을 위한 입자도로는 적합하지 않았다.

입자도 측면에서는 소맥피가 최적이었으나 부피가 가벼워 직접적인 코팅이 어려운 문제점을 가지고 있어 우선 과립화를 통해 일정한 크기를 유지하게 한 후 코팅을 실시하는 것으로 공정을 변화하여 입자도의 균일성에 따른 코팅의 영향을 최소화 하였다.

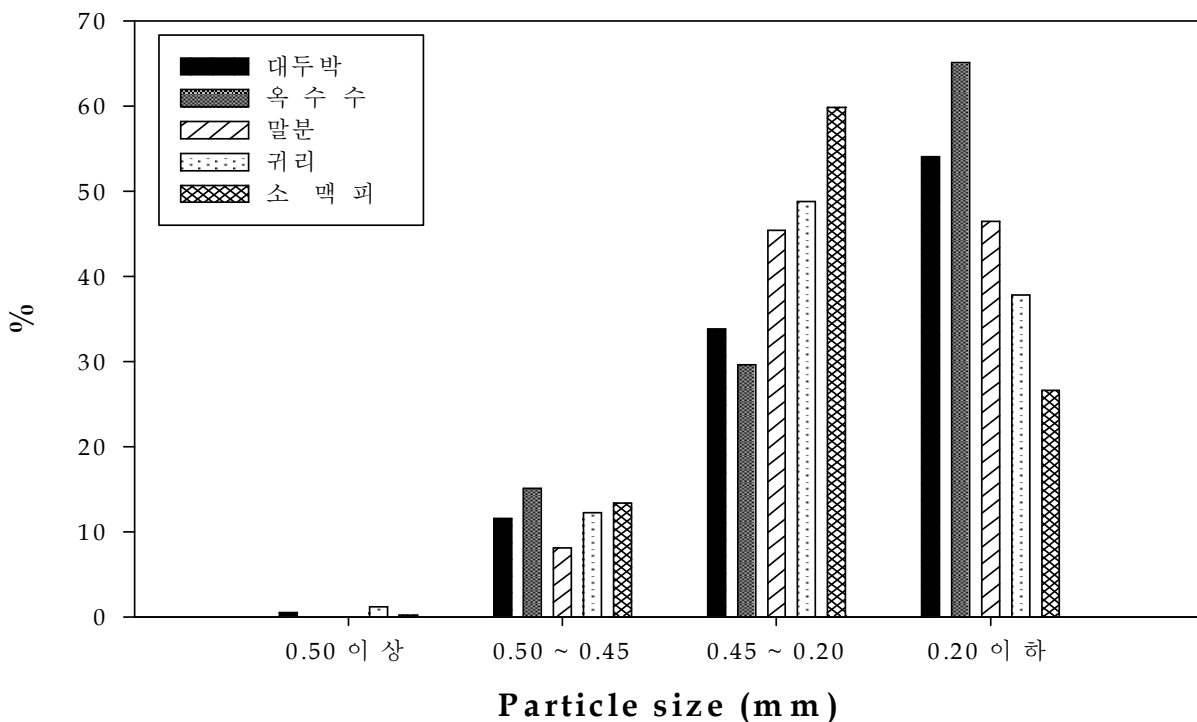


그림 3.21. 각 원료별 발효효소제의 입자도 분포

#### 라. 효소활성 분석법 비교연구

분석방법에 대한 효소활성 평가결과를 표 3.15에 나타내었다. 분석방법 비교를 통해 효소활

성 측정방법에 대해 비교를 해보고자 하였으나, 분석방법1과 2의 직접적인 효소활성 비교를 통한 분석방법 적정성에 대해서는 두 분석 방법 간에 효소활성을 정의하는 기준이 상이하여 직접적인 비교는 힘든 상황으로 각 분석방법 별 분석치의 차이만을 확인 할 수 있었다. 실제 분석방법에 따른 분석오차는 기존 분석방법인 분석법 1의 경우 평균값에 대한 표준편차 값의 비율인 CV값이 약 2% 정도로 새로 적용한 분석방법인 형광분석법에 비해 분석오차가 크지 않은 것을 확인하였다. 분석방법 측면에서는 분석오차가 낮은 분석방법을 표준분석방법으로 선정하여 활용하는 것이 유리하다고 할 수 있으나, 실제 정확한 효소활성을 표현하는지에 대한 검증이 필요할 것으로 판단된다. 또한, batch별 동일한 발효조건을 유지한다고 하여도 발효를 통해서 동일한 결과를 얻기가 힘든 만큼 여러 번의 검증을 통해 최적의 발효조건을 확립하는 것이 중요하며, 발효를 통해 얻을 수 있는 최소의 효소활성을 기준으로 하여 대량생산에 적용하는 것이 향후 제품의 spec.을 일정하게 유지하는데 바람직한 방법이 될 수 있을 것이다.

표 3.15. 분석방법에 따른 protease 분석결과 비교

분석횟수	분석법 1	분석법 2
	UV분석법 (단위: U/g)	형광분석법 (단위: mg/g)
1	26,325.0	1,057.7
2	27,012.0	1,363.0
3	25,510.0	1,205.0
4	27,135.2	1,099.8
5	27,135.4	1,057.0
6	26,730.1	1,097.0
7	25,920.6	1,149.0
8	26,325.2	1,215.0
9	24,920.0	1,123.1
<b>Mean</b>	<b>26,641.28</b>	<b>1,151.85</b>
<b>SD</b>	<b>634.55</b>	<b>97.34</b>
<b>%, CV</b>	<b>2.38</b>	<b>8.45</b>

#### 마. 개발효소제의 안정성 평가(효소활성/ 미생물 안정성)

개발효소제의 6개월간 보관실험을 통해 안정성을 검증하고 적정 보관기간을 설정하고자 하였다. 6개월간 안정성 분석결과 amylase 활성은 95%이상, protease 활성은 90%이상 유지되고 있음을 확인하였다 (그림 3.22). 아울러 미생물 균수도 초기에 비해 6개월 후 약 93% 이상이 유지되고 있어 6개월까지는 보관 시 문제가 되지 않을 것으로 판단된다(그림 3.23). 아울러 코

팅공정을 통해 보관기간은 더 길어질 수 있을 것으로 예상되었다.

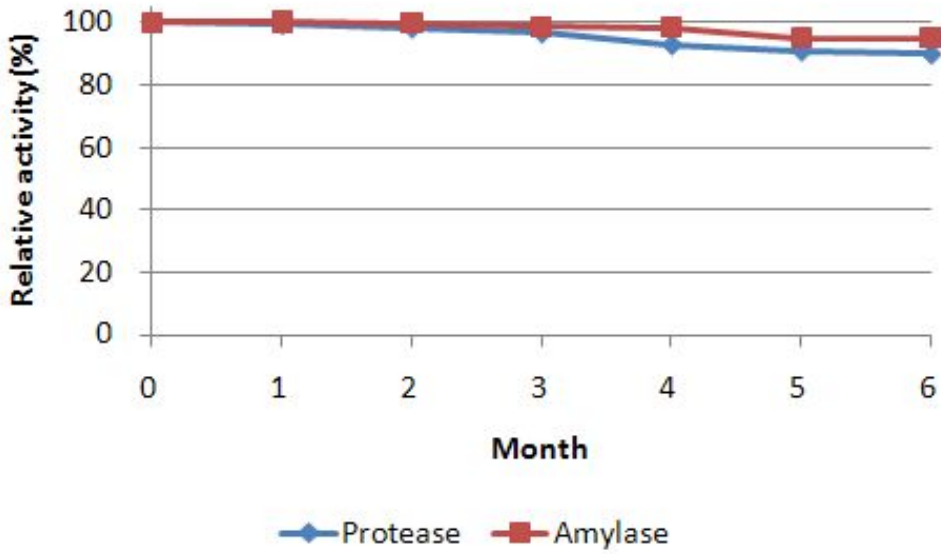


그림 3.22. 보관기간에 따른 효소활성 변화

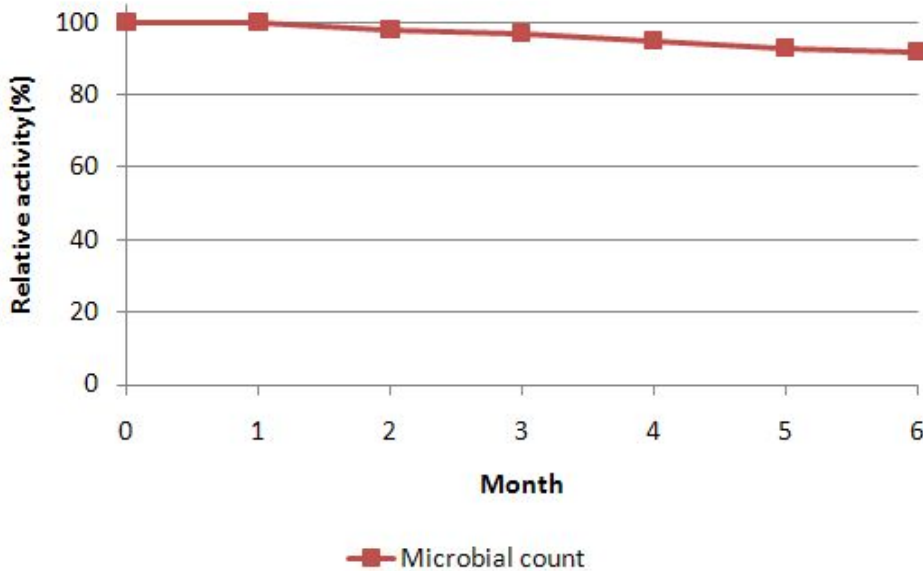


그림 3.23. 보관기간에 따른 미생물 균수의 변화

#### 마. 개발효소제의 *in vitro* 소화율 평가

개발효소제를 원료와 반응하여 원료대비 첨가수준에 따른 *in vitro* 건물 소화율의 증가를 그림 3.24 ~3.26에 나타내었다. 개발효소의 주기능인 protease와 amylase의 작용이 강피류인 소맥피 보다는 단백질 함량이 높은 대두박과 탄수화물 함량이 높은 옥수수에서 더 효과적인 것으로 예상되었는데, 실제 대두박 및 옥수수원료에서는 개발 효소제 0.1% 및 0.2% 처리 시 원

료대비 각각 6% 및 8% 이상의 우수한 개선효과를 확인할 수 있었다. 하지만 소맥피에서는 소화율 개선효과가 2% 정도로 나타나 원료의 영양소 조성에 따라 적용 효소제가 달라야 함을 다시 한 번 확인 할 수 있었으며, 본 개발효소제는 대두박이나 옥수수를 주원료로 사용하는 배합사료에서 효과적인 효소제로 적용이 가능할 것으로 판단된다(그림 3.24, 3.25).

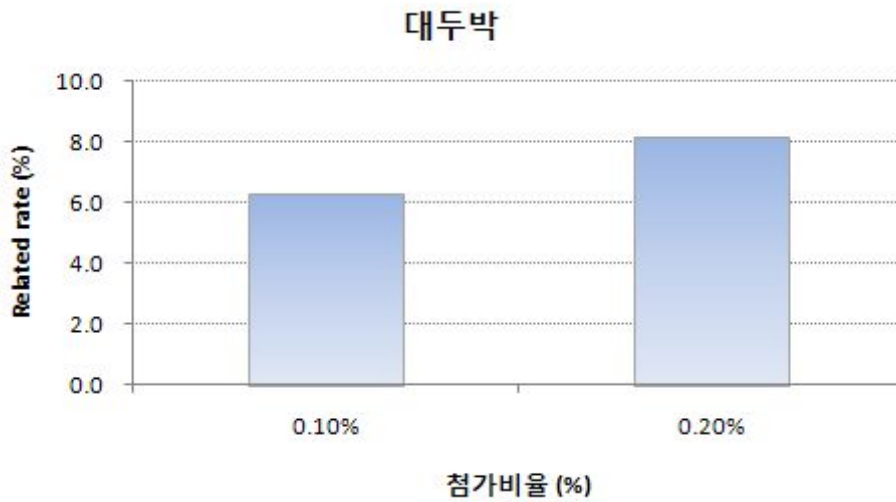


그림 3.24. 대두박에 대한 효소제의 *in vitro* 소화율

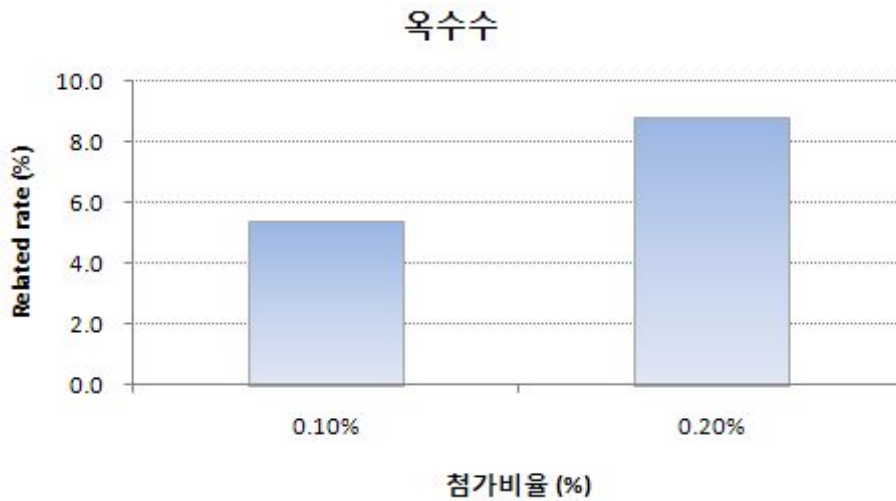


그림 3.25. 옥수수에 대한 효소제의 *in vitro* 소화율

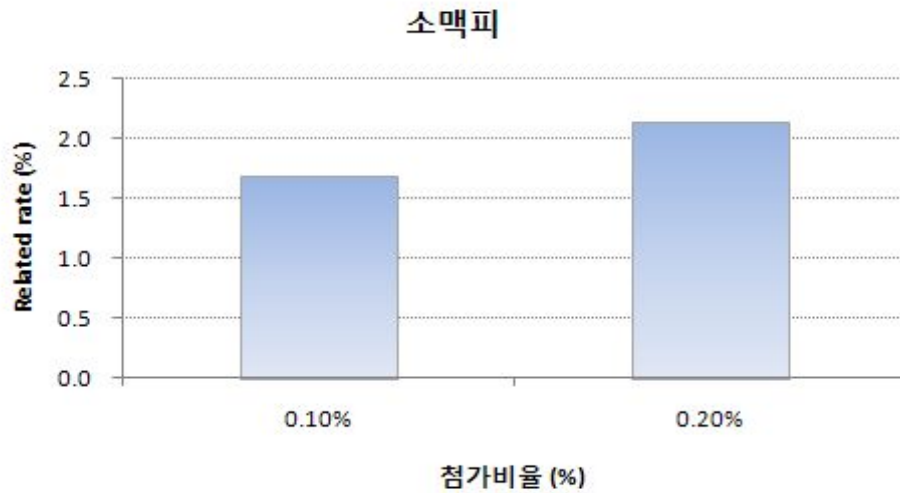


그림 3.26. 소맥피에 대한 효소제의 *in vitro* 소화율

## 제4절 효소제 대량생산 시스템 확립 및 안정성 평가

### 1. 연구의 세부목표

효소제 대량생산공정 확립을 통해 개발효소제의 대량생산 시스템을 확립하고 개발된 효소제의 안정성 평가를 통해 보관기간을 설정하고자 하였다.

### 2. 연구방법

#### 가. 효소제 대량생산 공정 확립

효소제 대량생산을 위해 pilot scale 발효조건을 토대로 최적고체발효 배지인 소맥피를 원료로 하여 대량생산(7.5톤/ batch) 조건을 확립하였다. 세부 발효조건은 표 3.16에 나타내었다.

표 3.16. 대량생산을 위한 고체발효 공정

공정/조건	내 용
원료량(kg)	7,500
증자 조건	121 ℃, 40분
증자 후 수분 함량(%)	57.0
발효 온도 설정(℃)	32.0
발효 시간(h)	47
건조 시간(h)	11.5
생산수율(kg, %)	5,355 kg (71.4%)

나. 개발효소제의 반복, 재현성 검증

대량생산조건에서의 개발효소제의 반복, 재현성 검증을 통해 amylase 및 protease 활성을 평가하고 대량생산 공정의 최적화를 검증하였다. 대량생산 조건은 기 확립된 방법을 동일하게 사용하였으며, 원료량도 최초 대량생산 조건과 동일하게 소맥피 7,500kg을 사용하여 총 5회 반복을 통해 효소활성의 반복, 재현성을 검증하였다.

다. 개발효소제의 안정성 평가

최종 대량생산 공정을 통해 생산된 효소제를 6개월간 보관하면서 보관기간 중 효소활성 및 균수의 변화를 측정하였다.

### 3. 연구결과

가. 효소제 대량생산 공정 확립

대량생산 과정 중 발효온도 및 수분함량 변화는 그림 3.26과 같다. 발효 23시간까지는 초기 수분함량대비 큰 감소가 없이 어느 정도 유지하였으나, 2차 교반이후인 23시간 이후부터는 지속적으로 감소하는 것으로 확인되었다.

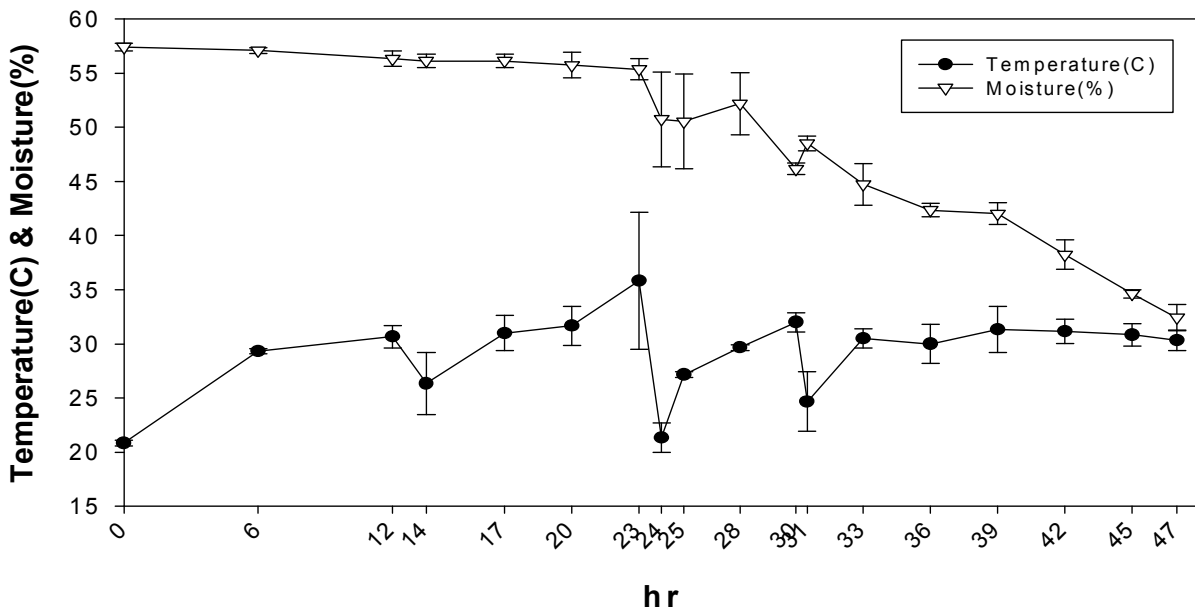


그림 3.26. 대량생산 공정 중 발효시간 별 온도 및 수분함량 변화

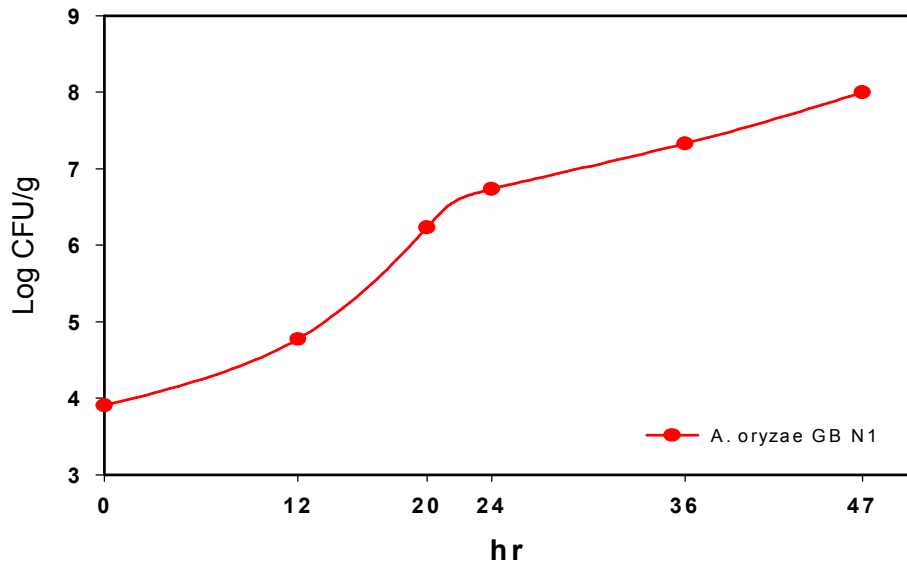


그림 3.27. 대량생산 공정 중 발효시간별 미생물 균수 변화

대량생산과정 중 균수변화는 초기  $10^4$ CFU/g이 되게 접종 한 후 발효 12~20시간까지  $10^6$ CFU/g으로 급격하게 증가하였으며, 발효 종료시점까지  $10^8$ CFU/g 수준까지 증가하였다(그림 3.27). 반면, amylase, protease 활성변화는 균수가  $10^7$ CFU/g 수준으로 증가한 24시간 이후 부터 급격하게 증가 하여 최종 47시간 발효를 통해 amylase 활성은 9,000U/g, protease 활성은 60,000U/g 수준의 효소활성을 확보하였다(그림 3.28).

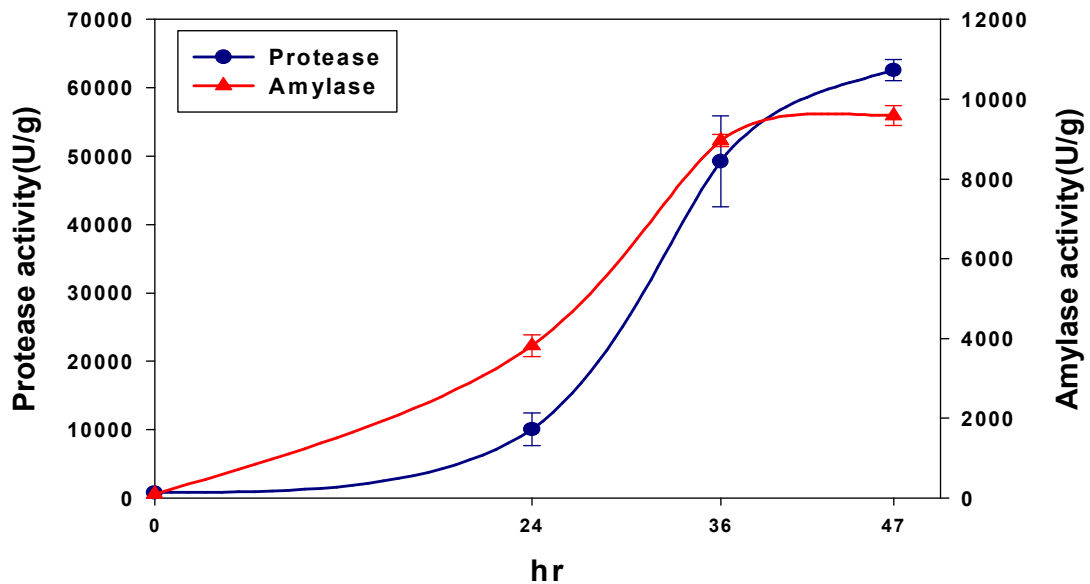


그림 3.28. 대량생산 공정 중 발효시간별 효소활성 변화

나. 개발효소제의 반복, 재현성 검증

개발효소제의 batch별 효소활성 변화를 조사하기 위해 동일하게 5batch의 대량 발효실험을 실시한 결과 효소활성 평균을 표 3.17에 나타내었다. Amylase 활성의 5batch 평균은 9,594U/g이었으며, protease 활성은 62,605U/g으로 최종 개발효소제의 효소활성은 현재 시장에서 시판되고 있는 경쟁제품보다 amylase 활성은 비슷한 수준이며, protease활성은 2배 이상 우수한 효소활성을 확보하였다.

표 3.17. 개발효소제의 대량생산 결과(5 batch 평균)

효소활성(U/g)	결 과
Amylase	9,594 ± 224
Protease	62,605± 1,535

다. 개발효소제의 안정성 평가

(1) 효소활성 변화

최종 개발 효소제를 6개월간 실온조건(온도: 17~31℃, 습도: 20~75%)에서 보관하면서 보관기간 중 효소활성 변화를 조사하였다. 6개월간 개발 효소제의 효소활성은 amylase 활성은 96% 이상의 안정적인 효소활성을 나타내었으며, protease 활성은 94% 수준의 높은 안정성을 유지하였다(그림 3.29). 또한, 미생물 균수 측면에서도 93%이상의 높은 수준을 유지하여 저장기간을 최소 6개월로 설정하여도 제품의 품질에는 문제가 없을 것으로 판단된다(그림 3.30).

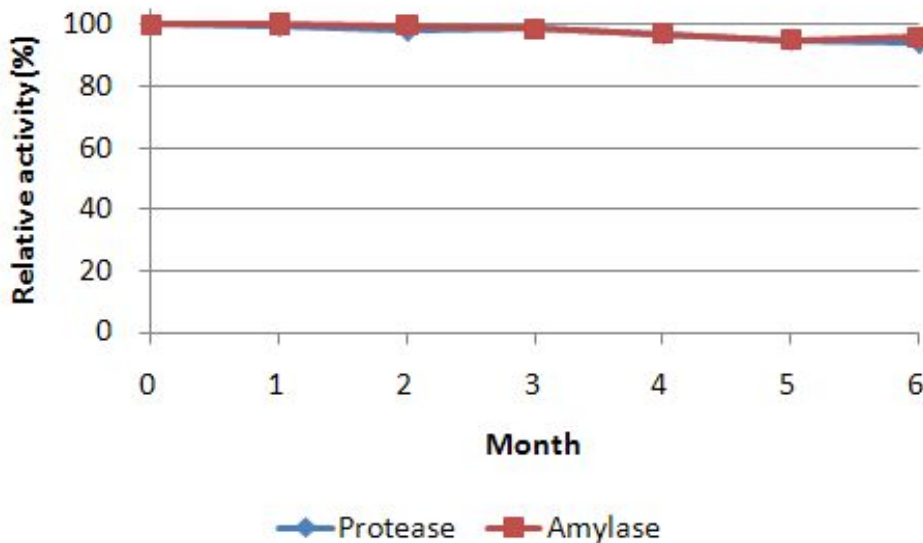


그림 3.29. 개발효소제의 저장기간 중 효소활성 변화



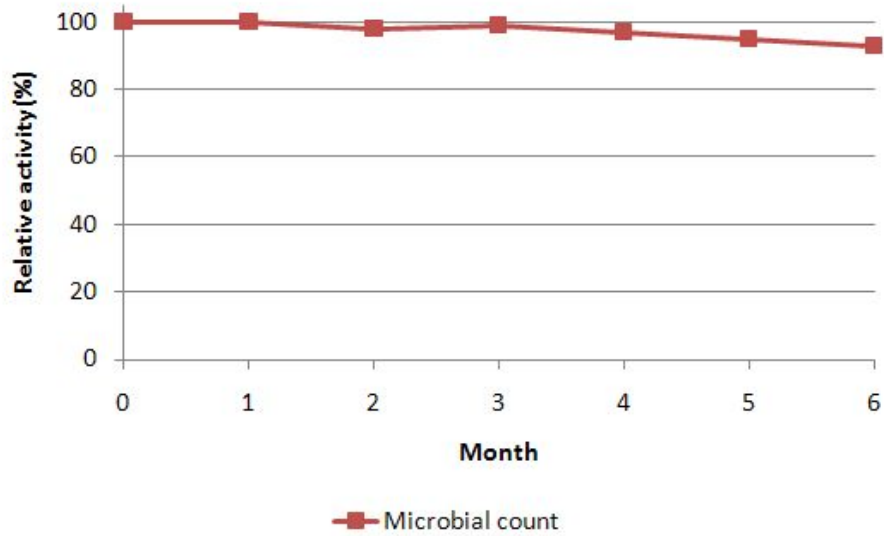


그림 3.30. 개발효소제의 저장기간 중 미생물 균수변화

## 제5절 장용효소제를 위한 기초 공정연구

효소에 고분자를 코팅함으로써 내산성을 갖도록 하는 방법은 제조법과 사용하는 고분자에 따라 다양하게 접근이 가능하다. 우선 제조방법에 따라 살펴보면 효소에 고분자를 적용하는 방법에 따라 그 효과가 크게 차이날 수 있으며 아래 그림과 같이 고분자와 효소를 혼합, 결합시킴으로써 효소 주위에서 고분자가 보호해 주도록 효소-고분자 과립을 제조하는 방법과 장용성 고분자로서 효소를 완벽하게 코팅하는 방법으로 크게 분류할 수 있으며 후자가 효소를 외부환경으로부터 완벽하게 차단함으로써 내산성을 높일 수 있는 가장 우수한 방법이다. 다만, 코팅을 하는 방법은 일반적으로 제조공정에 소요되는 시간이 오래 걸려 경제적으로 불리한 점이 있다.

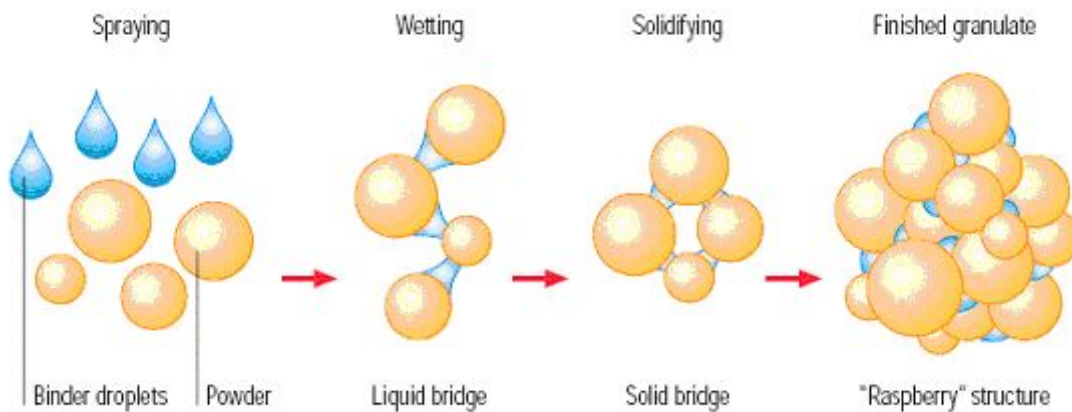


그림 3.31. 과립의 형성 과정

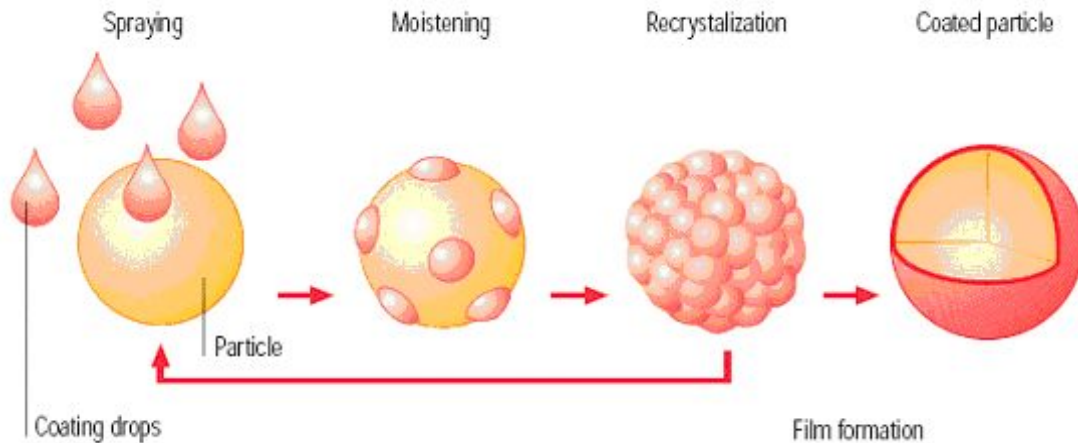


그림 3.32. 코팅막의 형성 과정

한편, 내산성을 나타낼 수 있는 고분자로서는 크게 3가지로 나눌 수 있다.

- ㄱ. pH의 변화 부위에 따라 정밀하게 용해되는 시점을 조절할 수 있는 polymer,
- ㄴ. 정밀한 pH조건보다는 pH 7.0 이상의 알칼리 조건에서 용해되면서도 일정시간을 요구하는 zein 등의 polymer
- ㄷ. pH-dependency 보다는 체내 투여 후 위를 통과하고 일정시간이 경과한 후에서 용해되기 시작하는 ethylcellulose나 fatty acid 등으로 분류할 수 있다.

즉, 장용효소제의 특성 중 갖는 내산성은 사용하는 고분자의 종류와 이를 제조하는 방법에 따라 그 특성이 영향을 받는다.

본 연구에서는 우선 최고의 내산성을 갖을 수 있는 장용효소제를 제조, 평가함으로써 어느 정도까지 장용효소제가 내산성 등의 장점을 극대화할 수 있는지를 가늠해 보고자하며 그 결과를 대조결과 설정하여 차후 상용화를 위해 제조방법 및 비용 측면에서 조절해야 하는 요소들을 변경하면서 설정, 확립하고자 한다.

### 1. 코팅법의 적용 가능성 확인

pH의 변화 부위에 따라 정밀하게 용해되는 시점을 조절 할 수 있는 고분자로는 Eudragit 류, Cellulose Acetate Phthalate(CAP), Hydroxypropylmethylcellulose Phthalate(HPMCP), PolyVinyl Acetate Phthalate(PVAP) 등이 있으며 높은 pH하에서 일정시간이 필요하는 고분자로는 zein과 shellac 등이 있으나 내산성 및 pH환경에 정밀히 대응하는 측면에서 Eudragit류 등이 zein 등에 비해 상대적으로 우수하나 가격이 고가이다.

또한 이러한 고분자로 효소를 완벽하게 코팅하여 제조하기 위해서는 Fluidized bed coater

의 Wurster type을 사용하는 것이 가장 효율적으로 알려져 있으며 그 기전은 다음의 그림과 같다. 상기 코팅기의 단점은 공정 시간이 길어져서 제조 단가에 높일 수도 있다.

그러나 본 연구에서는 우선 최고의 성능을 나타낼 수 있는 첨가제와 설비를 사용하여 우선, 경제성을 고려하지 않고, 고분자로서 상대적으로 고가인 Eudragit과 제조설비로서 Fluidized bed coater 의 Wurster type을 응용하여 본 과제에 적용 가능한 제조방법 인지 확인해 보고자 하였다.

미분의 효소를 균질하게 장용코팅하기 위해서는 적당한 크기를 갖는 구형의 과립 상태로 우선 제조 후 그 표면을 코팅하는 것이 바람직하다. 따라서 Fluidized bed coater에서 효소와 고분자를 사용하여 구형의 과립을 제조한 후 Wurster type에서 코팅 작업을 실시키로 하였다.

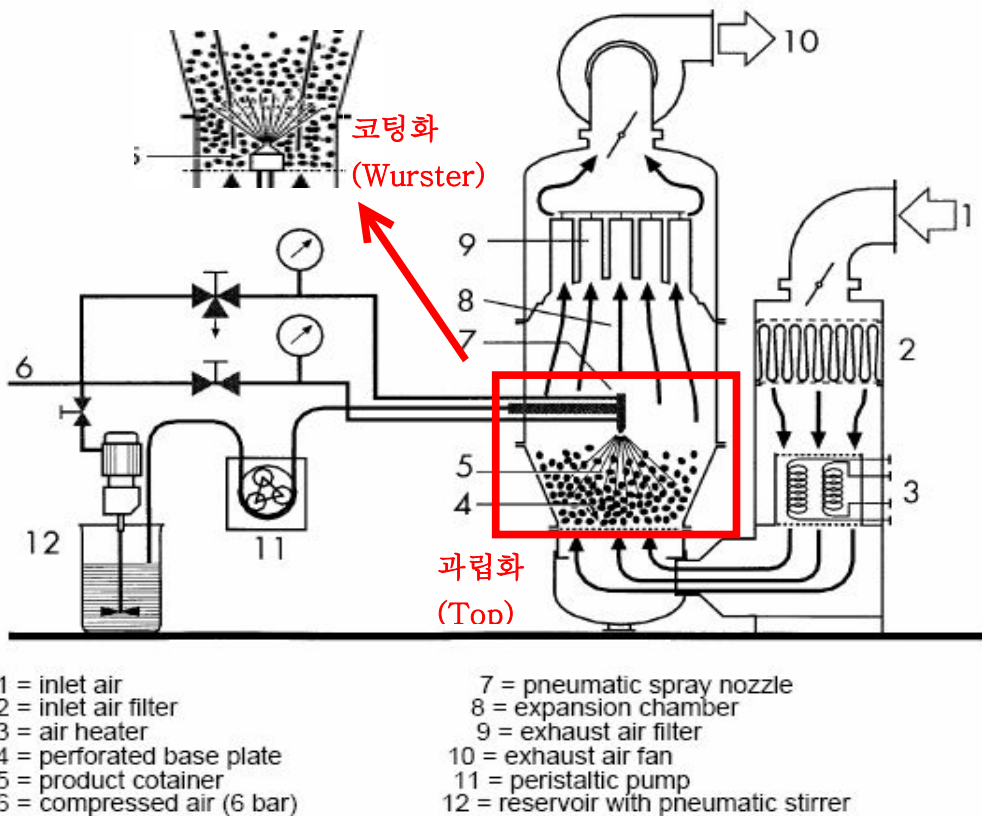


그림 3.33. Fluidized Bed Granulator와 Coater의 구조와 원리

Fluidized bed coater를 이용하여 하기와 같은 조성을 가지고 1차 과립 및 2차 코팅을 실시하였다. 1차 과립 공정은 2차 코팅과 실질적으로 동일한 공정이나, 1차 과립은 입자를 키우는데 목적이 있고, 2차 코팅은 코팅막을 형성시키는데 있다.

표 3.18. Feasibility test 의 코팅조성 (g/효소복합제 200g)

배합목적	이름	1차 과립	2차 코팅
효소	효소제(DDGS)	200	-
장용성고분자	Eudragit L100	110	100
가소제	Triethyl citrate	55	20
활제	Talc	40	50
용매	Isopropyl alcohol	1341	1413
용매	정제수	-	83
Total		1746	1666

가. 제조방법

- 사용기계: Fluid-bed coater, MFL-01 (Freund, Japan)
- 코팅 조건은 하기의 표와 같다.

표 3.19. Fluid-bed coater에서 공정 조건

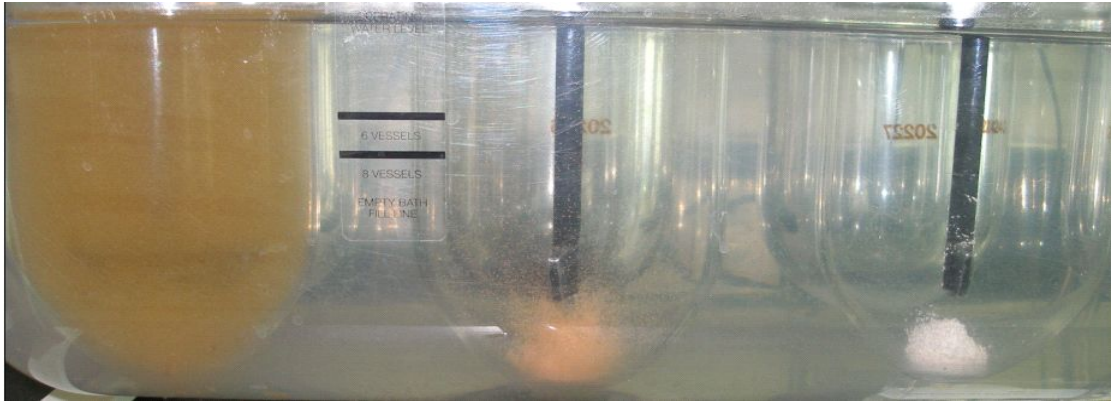
Spray volume (g/min)	약 1.5
Nozzle Air (PSIG)	9~10
Air Flow (LPM)	75~80
Inlet Temp.	30
Exhaust Temp.	27~29

나. 제조된 장용효소제의 내산성 추정평가

효소제의 내산성, 활성 분석법이 아직 확립되지 않아서 우선 산성용액 내에서 육안으로 그 변화를 확인하였다.

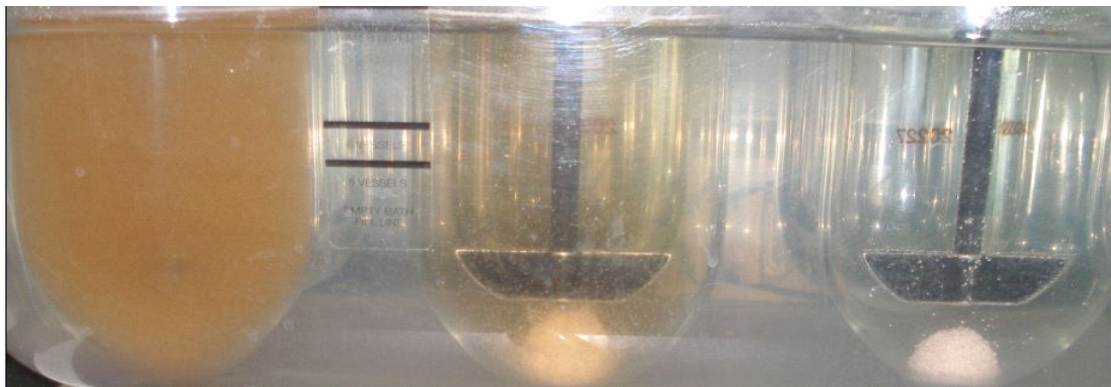
시험방법

- 용출액: pH1.2 KP buffer (NaCl 2.0g + HCl 7.0mL) in 1L D.W.), 900mL
- 회전수: 50rpm
- 온도: 37±0.5℃
- 검체: 각 3g



DDGS 효소제	1차 코팅	2차 코팅
----------	-------	-------

그림 3.34. 산성용액에서 시험 개시시의 성상



DDGS 효소제	1차 코팅	2차 코팅
----------	-------	-------

그림 3.35. 산성용액에서 1시간 경과 후의 성상

코팅되지 않은 효소제와 2차 코팅된 효소제는 시험 개시 시점과 1시간이후의 양상이 육안상 차이가 없는 것으로 보였다. 1차 코팅된 효소제는 시험 초기에는 효소가 과립내에서 보호되고 있으나 1시간 경과 후 산성 매질에 일부 노출되는 것을 확인하였다. 따라서 2차 코팅된 효소제에는 비록 효소의 활성을 측정하지 않았으나 산성매질 내의 거동으로 보아 내산성을 어느 정도 나타내는 것으로 판단된다.

#### 다. 효율적 코팅을 위한 장용효소제의 입도 비교평가

상기 결과와 같이 장용성 고분자가 효소과립의 외부를 충분히 둘러싸지 않은 1차 코팅 과립은 내산성이 1시간 경과 후 내산성이 낮아질 것으로 추정되었다. 과립화하는 공정은 효소의 표면적을 감소시킴으로써 소량의 장용성 고분자를 사용하더라도 효율적으로 내산성을 나타내기 위한 방법이다.

해당 공정을 단순화하기 위해 미분화되어 있는 효소 자체를 과립상으로 제조함으로써 코팅

공정을 단순, 효율화하기 위하여 효소, 1차 과립 및 코팅제의 입자크기를 비교하여 다음의 그림에 나타내었다.

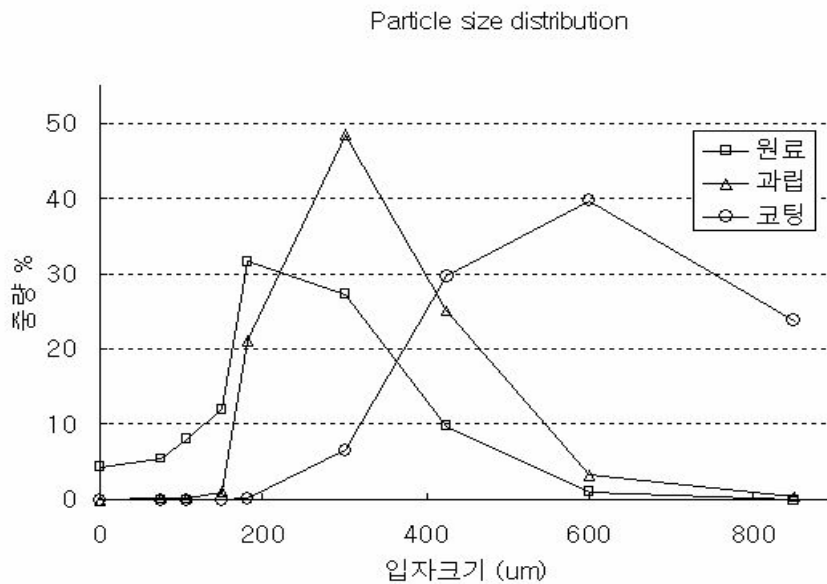


그림 3.36. 효소제, 1차과립 및 코팅제의 입자 크기 비교

상기 결과에서 효소, 과립 및 코팅제제의 입자크기가 상대적으로 증가하는 것을 확인할 수 있으며 과립 및 코팅제제는 대략 200 $\mu\text{m}$ 이상인 것으로 확인되었다.

한편, 의약품을 사용한 기 수행 과제연구에서 16~18mesh (1~1.2mm) sugar sphere를 사용하는 경우 전체 중량의 약 20%만 코팅을 하면 충분한 내산성을 확보하였다. 향후 연구에서는 코팅공정의 효율성을 감안하여 효소 입자 크기를 500 $\mu\text{m}$  내외로 조절하여 사용하는 것이 적합할 것으로 사료된다.

#### 라. 결론

순수한 코팅공정을 이용하여 내산성기제를 적용하였을 때, 산성조건에서 1시간동안 효소의 방출이 이루어지지 않고 있으므로, 장용효소제 내에서 활성을 유지하여 내산성은 매우 우수하다고 판단된다. 비록 정확한 역가의 판단없이 성상의 비교만으로 확인하였지만, 효소제를 코팅하여 외부 환경과 차단할 경우 산성조건에서 효소 활성을 그대로 유지할 수 있다는 것을 확인하였다. 단, 상기 조건은 Fluidized bed coater라는 특수 설비와 고가의 Eudragit을 사용해야 하는 단점이 있어 이를 그대로 상용화하는 데는 한계가 있다. 보다 용이한 생산설비와 저렴한 고분자를 사용하여 상기 실험 결과와 유사한 결과를 획득할 수 있는 방법을 향후 연구하고자 한다.

## 2. 과립법의 적용 가능성 확인

지금까지 코팅법을 이용하여 장용효소제를 제조하기 위하여 pH의 변화 부위에 따라 정밀하게 용해되는 시점을 조절 할 수 있는 Eudragit과 이를 효율적으로 활용하기 위해 Fluidized bed granulator 의 Wurster type을 사용하여 장용효소제제를 제조, 평가하였다. 상기의 방법은 우수한 내산성을 갖는 고품질의 장용효소제를 제조할 수 있으나 사용하는 부형제 및 설비의 가격이 높은 문제점이 있어 상용화하는데 한계가 있다. 생산원가를 낮추고자 우선 제조설비의 가격이 낮은 planetary mixer와 고분자로는 높은 pH하에서 일정시간이 필요하는 고분자로는 zein을 사용하여 코팅법의 제제와 그 특성을 비교하고자 한다. Zein은 옥수수로부터 추출된 단백질로서 예전부터 장용코팅기제로 사용되어 왔으며 옥수수에서 추출되었으므로 곡물에서 발효된 효소제와 상호작용도 적을 것으로 기대되어 검토하였다.

### 가. 제조 방법

Planetary mixer를 이용한 처방은 다음과 같으며 효소제 1kg당 원료 첨가량은 고분자로서 Zein을 106 g/batch을, 용매로서 80% EtOH을 424 g/batch을 사용하였다.

제조방법은 Zein을 용매에 녹이고 이를 효소제에 투입 후 2분간 연합하고 40℃에서 1시간 건조하였다.

### 나. 과립법으로 제조된 장용효소제의 내산성 평가

제조된 코팅과립의 내산성을 평가하기 위해서 상기의 순수 코팅공정의 평가 방법과 동일하게 산성 조건에서 1시간 방치시킨 후 그 성상을 확인한 결과 30분 정도부터 색상의 변화는 없으나 과립이 약간씩 붕해되는 경향을 나타내었다. 이는 순수 코팅법의 1차 코팅만 실시한 검체와 거의 유사한 양상을 나타내서 내산성이 부족할 것으로 판단되었다.

### 다. 결론

앞선 기술한 바와 같이 옥수수에서 추출한 단백질이기 때문에 효소제와 상호작용이 거의 없을 것으로 판단된다. 비록 대조제제에 비하여는 내산성이 낮지만 사용량도 가장 낮은 점을 감안한다면 과립법을 이용하여 추후 검토할 가능성은 매우 높다고 판단된다.

## 3. 기초 공정연구의 결론

본 연구에서는 코팅법과 과립법에 따른 내산성 제제의 효율을 측정하였다. 그 결과 내산성 측면에서는 코팅법이 과립법에 비하여 우수하였으나 제조 공정의 변수가 다양하여 이에 따른 성능의 차이가 높을 것으로 확인되었다. 또한 상대적으로 고가의 고분자가 적용되었기

때문에 향후 상용화를 위해서는 적절치 않을 것으로 판단되었다. 이에 따라서 공정이 단순하면서도 짧은 시간이 소요되는 과립법을 중심으로 연구를 더욱 진행하고자 하였다.

## 제6절 장용효소제의 생산조건 및 최적처방 연구

효율적인 내산성을 확보하기 위한 방안으로서 코팅제로는 pH의존성 고분자인 Eudragit 계열과 Zein을 선택하였으며, 제조방법으로는 Fluidized bed coater를 이용한 순수 코팅법과 Planetary mixer를 이용한 과립법을 시험하였다. 그 결과 코팅법이 상대적으로 우수하였으나, 경제성 측면에서 부적절하기 때문에 실제 상업화에 적합한 경제성을 갖춘 고분자를 이용하면서도 생산비용이 적게 드는 과립법을 중심으로 코팅기제 및 세부 제조방법을 본격적으로 탐색하고자 한다.

### 1. 단일과립 공정을 이용한 후보 코팅기제의 성능평가

적용대상 내산성 첨가제로는 저가의 지방성분으로서 식물성 경화유지(이하 경화유)를 우선 선정하였으며, 경화유는 콩기름, 면실유, 야자유, 올리브유 등에 수소를 첨가하여 만든 포화지방산 글리세리드로서 식품, 화장품 등에 널리 사용되고 있어 가격이 상대적으로 매우 저렴한 장점을 가지고 있다. 또한 물에 거의 녹지 않아, 약제학적으로 약물을 물에 서서히 녹이게 하는 용도 즉, 서방화기제로서 사용가능하다. 또한 비교적 저렴한 Zein을 사용하여 그 활용가능성을 검토하였다. 또한, Eudragit 류의 경우 protease와 incompatible한 특성을 나타내어 제조 직후 효소의 역가가 저하되는 단점을 나타내어 사용이 적절하지 못하였다. 이에 반해, Zein의 경우 pH 의존적인 용해도 특성은 상대적으로 낮지만 효소제와 incompatible 하지 않으며 가격도 Eudragit 류에 비하여 저렴하기 때문에 상업화에 상대적으로 적합할 것으로 사료되었다. 또한 HPMCP(HydroxyPropylMethylCellulosePhthalate)는 셀룰로오스 유도체로서 phthalate moiety의 pH에 따른 이온화 경향이 달라지는 특성을 갖고 있다. 이는 pH의 변화에 따라 매우 신속한 용해도 변화를 나타내며 HPMCP의 세부 분류에 따라 pH 5.0 또는 pH 5.5 이상에서 용해된다. HPMCP는 pH 의존적인 용해도 특성이 높은 반면 Zein과 가격이 비슷하여 사용에 유리한 장점이 있다. 기타 pH 의존성 고분자인 HPMCAS, CAP, PVAP 들은 경제성 측면에서 부적절하다고 판단하여 제외하였다.

#### 가. 시험 방법

##### (1) 검체 제조 방법



표 3.20. 단일과립법을 이용한 장용효소제의 조성

기능	원료명	gHV	gZE	gHP
주성분	효소제	100g		
수불용성 고분자	경화유	각 20, 40, 60, 80, 100, 200, 300g	-	-
장용성 고분자	Zein DP	-	100	-
	HPMCP	-	-	100

과립의 제조는 모두 Planetary Mixer(KitchenAid, USA)를 사용하여 제조하였다.

(가) gHV의 제조 방법

- ① 경화유를 70℃ 건조기에 넣어 녹인다.
- ② 효소제 100g에 경화유를 상기의 비율대로 planetary mixer에 넣고 연합한다.
- ③ 실온 방치하면 연합물이 응고되고 이를 14 mesh 체를 이용하여 정립한다.

(나) gZE 및 gHP의 제조 방법

- ① 효소제 100g과 zein 또는 HPMCP를 혼합 후 planetary mixer에 넣고 다시 혼합한다.
- ② Planetary mixer를 교반하면서 에탄올을 100g 가하고 연합한다.
- ③ 연합물을 50℃에서 24시간 건조한다.
- ④ 건조물을 14mesh 체를 이용하여 정립한다.

(2) 평가 방법

(가) 제조 직후 성상

육안으로 관찰한다. 이때 효소제와 내산성 기제의 혼합도를 중점으로 확인한다.

(나) 산성용액 내에서의 성상변화

제조된 제제의 내산성을 평가하기 위해서 하기의 조건에서 2시간 방치시킨 후 그 성상을 확인하였다.

- 용출액: pH1.2 KP buffer (NaCl 2.0g + HCl 7.0mL) in 1L D.W.), 900mL
- 회전수: 50rpm
- 온도: 37±0.5℃
- 검체: 각 3g

(다) 비처리 효소제 및 내산성 기제 적용 효소제의 활성 평가

내산성 기제를 적용한 효소제의 역가를 비교하기 위하여 아무런 조작도 거치지 않은 효소제의 역가를 동시에 측정하여 역가를 비교하였다.

- 추출방법 : 효소제 2g을 희석액(pH1.2) 100mL에서 2시간 추출하였다.
- Transition : pH1.2에서 추출되지 않은 효소제를 모아 중성 조건인 pH6.8에서 다시 2시간 추출하여 산성에서도 변성되지 않고 남아있는 amylase와 protease의 활성을 측정하였다.
- 또한 효소제가 역가를 충분히 발휘할 수 있는 중성조건(pH6.8)에서만 별도로 역가를 측정하여 중성조건 대비 산성 매질에서 잔류하는 효소제(pH1.2에서 방출된 효소제 + Transition 후 남아 있는 활성)의 활성을 측정하여 내산성을 확인하였다.

## 나. 시험 결과

### (1) 제조 후 성상

#### (가) gHV

백색의 경화유와 황색의 효소제를 결합시켰을 때, 백색의 경화유가 표면에 다량 존재하게 될 경우 사용량에 비해 더욱 백색으로 나타날 것으로 예측하였다. 제조 결과 시험한 사용량 범위 내에서 뚜렷한 성상 변화는 나타나지 않았고, 경화유 사용량이 많아도 효소제의 색상으로 인한 mottling 현상은 발생하였다.

#### (나) gZE

Zein의 경우 미황색을 나타내기 때문에 성상평가를 통해서는 코팅정도를 파악하기가 어려운 측면이 있으나 하지만 zein의 경우 코팅될 경우 특유의 광택이 나타나므로 표면에 광택정도를 확인하면 될 것으로 판단하였다. 제조 후 성상 관찰결과 일부 에탄올에 녹지 않은 zein이 소량 발견되었지만 전반적으로 zein이 피막을 형성하였음을 확인하였다.

#### (다) gHP

HPMCP는 백색이므로 황색의 효소제를 결합시켰을 때, 백색의 HPMCP가 표면에 다량 존재하게 될 경우 사용량에 비해 더욱 백색으로 나타날 것으로 예측하였다. 제조 후 관찰결과 시험한 사용량에서 HPMCP의 사용량이 과다하여 녹지 않는 HPMCP 입자가 다량 관찰되었지만 피막은 충분히 생성되었음을 확인하였다. 건조 후 과립은 매우 치밀하고 단단한 피를 형성하여 수분이 침투하기 힘들어 보였다.

### (2) 산성용액 내에서의 성상변화

#### (가) gHV

산성조건에서 과립에서 경화유를 제외한 효소제 spot이 녹는 현상을 관찰하였다. 또한 pH6.8 KP buffer에서 위와 동일한 조건에서 시험하였을 때, 거의 동일한 현상이 관찰되었다

#### (나) gZE

산성조건에서 과립이 그대로 유지된 상태로 약물방출이 상당히 억제되는 현상을 확인하였다. 또한 pH6.8 KP buffer에서 위와 동일한 조건에서 시험하였을 때, 산성조건보다 다소 과립이 붕해되는 현상을 나타내었으나 신속히 붕해되는 모습을 나타내지는 않았으며 이에 따라 중성 조건에서도 효소제의 방출이 억제되고 있음을 확인하였다. 이는 zein의 pH-dependent solubility가 높지 않아 과립이 신속히 붕해되지 않아서 나타나는 현상으로 판단되었다.

(다) gHP

산성조건에서 2시간 방치시킨 후 그 성상을 확인한 결과 과립 성상이 거의 변하지 않아, 효소제를 산성 매질로부터 충분히 보호 할 수 있음을 확인하였다. 또한 pH6.8 KP buffer에서 위와 동일한 조건에서 시험하였을 때, zein과 마찬가지로 약간의 정상변화 즉, 표면이 조금 녹는 것을 확인하였다.

(3) 효소제의 활성평가

코팅을 하지 않은 효소는 pH 1.2에서 2시간 노출 시 pH 6.8에서 확인한 역가에 비해 약 25 % 정도의 역가만을 나타내었다. 또한 pH 1.2에서 2시간 노출 후 잔유물을 취하여 이들의 역가를 확인한 결과 약 10%의 활성을 나타내었다.

표 3.21. 내산성기체에 따른 효소제(protease) 활성평가 결과

번호	추출액	효소제	gHV (1:1)	gZE	gHP
A	pH1.2 (2시간 후)	1212.51 (21.9%)	1239.70 (24.2%)	684.26 (44.1%)	851.49 (32.7%)
B	pH1.2 2시간 노출 후 pH 6.8에서 추출	579.45 (10.5%)	1014.12 (19.8%)	1099.15 (70.8%)	1800.85 (69.1%)
C	pH 6.8에서만 추출	5540.21	5115.06	1552.34	2605.53
내산성(U/g), A+B		1792.05	2253.82	1783.41	2652.34
내산성(%), (A+B)/C X100		32.3%	44.1%	114.9%	101.8%

경화유를 처리한 효소제의 시험결과 중 효소 : 경화유의 비율을 1:1로 처리한 시료의 결과를 표에 나타내었다. pH 1.2에서 2시간을 노출 후 총 회수된 역가가 44%로서 약 10%정도 상승하였으나 그 효과가 적어 바람직하지 않았으며 경화유의 비율을 1:0.2 에서부터 1:3의 범위까지 변동하여도 그 결과는 크게 차이를 나타내지 않았다. 경화유 자체는 lipophilic

하지만 효소와 제조된 과립의 크기가 작고, 경화유가 효소를 완벽히 보호하고 있지 못하기 때문에 나타난 현상이라고 파악되었다.

Zein과 1:1을 사용한 과립물은 pH 6.8에서 추출시 아무 처리를 하지 않는 효소제의 역가와 비교시 약 30%만이 추출되었다. 한편, 산성조건에서 2시간이후의 잔존 활성역가의 합은 pH 6.8에서의 추출역가보다 높은 값을 나타내었으며 산성 조건 2시간 노출 후에 과립에서 방출될 수 있는 효소의 약 65%(=B/C X100)를 방출하고 있었다. 이는 과립 내에 약 60~70% 정도 효소가 방출되지 못한 상태로 잔존하고 있으며 방출 가능한 30 % 가운데 그 중 65% 정도는 산성조건에서 보호된 후 방출되는 것으로 추정할 수 있다. 단, 과립내에 잔존 하면서 미방출된 60~70%의 효소를 적절히 방출할 수 있도록 설계하는 것이 바람직할 것이다.

HPMCP와 1:1을 사용한 과립물은 pH 6.8에서 추출시 기존 추출 활성역가의 약 40~50%만이 추출되었다. 한편, 산성조건에서 2시간이후의 잔존 활성역가의 합은 pH 6.8에서의 추출역가와 거의 유사한 값을 나타내었다. 산성 조건 2시간 노출 후에 과립에서 방출될 수 있는 효소의 약 70%(=B/C X100)를 방출하고 있었다. 이러한 현상은 Zein을 사용한 경우와 유사하게 나타났다. 또한 Zein에 비해서는 절대적인 내산성 값(A+B)에서 양호한 결과를 보였다.

#### 다. 단일 과립법 검토에 관한 결론

가장 경제적인 제조방법일 것으로 추정되는 **단일과립법을 이용하여** 내산성 기체에 따른 내산성을 확인하였다. 그러나 **연구 결과 내산성의 값은 양호하더라도 효소의 추출이 되지 않는 문제점이 발생**하였다. 이는 제조된 과립내의 내산성기체가 효율적으로 배치되지 않아 나타난 문제점으로 판단되었다. 즉, 효소제의 표면에 집중적으로 내산성기체가 위치하여야 하지만 실제로는 내산성 기체끼리 다량 뭉쳐있는 현상이 나타났기 때문에, 추출 자체도 잘 되지 않아 내산성이 높은 것처럼 나타난 현상이다. 이에 따라서 고분자를 효율적으로 배치 시켜 주기 위하여 효소제와 내산성기체를 1차로 과립을 제조하고 여기에 또다시 내산성 기체와 과립을 실시하면 내산성기체의 분포가 양호해 질 것으로 추정하였다.

## 2. 이중과립 공정 적용 가능성 확인

지금까지 각 고분자의 사용가능성 검토 시험에서 나타난 바와 같이 단일 과립법을 이용하여 경화유 혹은 고분자 단독으로 사용 시에는 적절한 성능을 나타내지 못하므로 이들의 조합을 이용하고자 하였다. 또한 과립화 공정을 1회만 실시할 경우 과립내의 효소제 분포 위치가 과립 내외에 균질하게 분산되기 어려우므로 과립 공정을 1회 더 수행하여 효소제가 과립의 중심부에 위치되면서 내산성 기체는 균질하게 도포시키고자 하였다.

## 가. 시험방법

### (1) 이중과립 공정을 이용한 내산성 과립의 제조

이중 과립의 조성은 하기와 같다. 사용 고분자들은 이전 연구에서 사용한 기체를 중심으로 적용하였으며 장용성 고분자와 더불어 값이 저렴한 수불용성 고분자인 magnesium stearate도 검토하였다.

표 3.22. 이중과립의 조성

단계	기능	원료명	GVP1	GPV1	GZV1
1차 과립	주성분	효소제	100	100	100
	수불용성 고분자	경화유	100		
	장용성 고분자	HPMCP		5	
	장용성 고분자	Zein			5
2차 과립	장용성 고분자	HPMCP	5.83		
	수불용성 고분자	경화유		100	100
	수불용성 고분자	Mg-stearate		50	50

#### (가) GVP1 제조 방법

- ① 경화유를 70℃ 건조기에 넣어 녹인다.
- ② 효소제 100g에 경화유를 상기의 비율대로 planetary mixer에 넣고 연합한다.
- ③ 실온 방치하면 연합물이 응고되고 이를 14mesh 체를 이용하여 정립한다.
- ④ HPMCP를 에탄올에 녹여 결합액을 제조한다.
- ⑤ ③의 정립물을 planetary mixer에 넣고 교반하면서, ④의 결합액을 가하여 연합한다.
- ⑥ 이를 50℃에서 건조하고 14mesh 체를 이용하여 정립한다.

#### (나) GPV1 제조 방법

- ① HPMCP를 에탄올에 녹여 결합액을 제조한다.
- ② 효소제를 planetary mixer에 넣고 혼합하면서 결합액을 가하여 연합한다.
- ③ 이를 50℃에서 건조하고 14mesh 체를 이용하여 정립한다.
- ④ 경화유를 70℃ 건조기에 넣어 녹인 후 Mg-stearate를 가하여 분산시킨다.
- ⑤ ③의 정립물을 planetary mixer에 넣고 혼합하면서 ④를 가하여 연합한다.
- ⑥ 실온 방치하면 연합물이 응고되고 이를 14mesh 체를 이용하여 정립한다.

#### (다) GZV1 제조 방법

- ① Zein를 에탄올에 녹여 결합액을 제조한다.
- ② 효소제를 planetary mixer에 넣고 혼합하면서 결합액을 가하여 연합한다.
- ③ 이를 50℃에서 건조하고 14mesh 체를 이용하여 정립한다.

- ④ 경화유를 70℃ 건조기에 넣어 녹인 후 Mg-stearate를 가하여 분산시킨다.
- ⑤ ③의 정립물을 planetary mixer에 넣고 혼합하면서 ④를 가하여 연합한다.
- ⑥ 실온 방치하면 연합물이 응고되고 이를 14mesh 체를 이용하여 정립한다.

(2) 평가 방법

평가 방법은 이전과 동일하게 성상, 산성용액 내에서 성상 변화, 효소활성을 평가하였다.

나. 시험 결과

(1) 제조 후 성상

Feasibility test의 최대 사용량에 비해 경화유를 적게 사용하였기 때문에 경화유가 골고루 분산되지는 않았지만 충분히 과립이 형성되었다. 경화유와 과립전에 미리 장용성 고분자와 과립을 하였을 때, 고분자가 골고루 분산되어 어느 정도 균질함을 확인하였다. 경화유와 Mg-stearate를 가한 검체는 좀 더 백색을 띄어 어느 정도 내산성을 나타낼 수 있을 것으로 판단되었다.

(2) 산성용액 내에서의 성상변화

제조된 제제의 내산성을 평가하기 위해서 하기의 조건에서 2시간 방치시킨 후 그 성상을 확인한 결과 GVP1, GPV1, GZV1 모두 과립 내에서 효소제가 일정부분 방출되었음을 확인하였다. 또한 pH6.8 KP buffer에서 위와 동일한 조건에서 시험하였을 때, 거의 동일한 현상이 관찰되었다.

(3) 효소 활성 평가

표 3.23. 이중과립법에 따라 제조된 검체의 효소 역가

Protease 추출액	효소제역가		
	GVP1	GPV1	GZV1
pH1.2 (2시간 후)	1443.79	1407.16	1326.32
pH1.2 2시간 노출 후 pH 6.8에서 추출	452.21	1564.63	531.79
총 회수 역가(내산성)	1896.00	2971.79	1858.11
pH 6.8에서만 추출	8697.11	9346.74	9137.68
내산성 %	21.8	31.79	20.33

Feasibility test에서 내산성 기제 적용량이 과다하였기 때문에 적용량을 조절한 결과 중성 조건에서 효소는 신속히 방출되었다. 하지만 절대적인 내산성 및 % 내산성은 낮게 나와 현재의 조성과 제조방법 하에서는 효소가 완벽히 코팅되지 않아 산성 매질이 쉽게 과립내부까지 침투함을 알 수 있다. 일반적으로 일정한 구형모양의 펠렛에 내산성 고분자를 적용하

여 완벽히 장용성 고분자로 코팅하여 외부환경으로부터 보호할 경우, 약 20%양으로 내산성을 확보할 수 있는 점을 감안할 때, 현 공정을 통해 제조되는 과립에는 상대적으로 상당량의 고분자를 적용해야 할 것으로 판단된다. 그러나 선행 연구에서 확인하였듯이 기제 적용량이 많을 경우 산성매질에서의 저항성은 높아지지만 중성 매질에서 효소의 방출이 이루어지지 않는 문제점이 발생하여, 적은 양의 고분자를 적절히 적용하면서 효율적인 코팅공정을 도입해야 할 것으로 판단된다.

#### 다. 과립 공정 도입 검토에 대한 결론

- (1) 경화유만 단독으로 사용하여 과립화를 하는 경우에는 효과가 크지 않다.
- (2) 장용성 고분자인 Zein과 HPMCP으로 과립화하는 경우, 내산성을 충분히 나타내기 위해서는 사용량이 높아야 하지만, 이는 중성 매질에서도 효소의 추출을 방해한다.
- (3) 상기 시험 결과를 보았을 때, HPMCP가 Zein에 비하여 중성에서 추출율도 용이하고 transition 활성도가 높다.
- (4) 경화유나 HPMCP를 단독으로 과립화하여 사용하기에는 문제가 있으므로 이들의 조합을 고려해야 한다.
- (5) 효소제와 내산성기제를 과립화 공정으로 적용하기에는 내산성 기제 사용량 대비 효율이 매우 낮다.
- (6) 내산성기제가 배치되는 효율 즉, 코팅효율을 높이기 위해서는 과립형성 공정과 순수한 코팅공정으로 제조방법을 세분화할 필요가 있다.

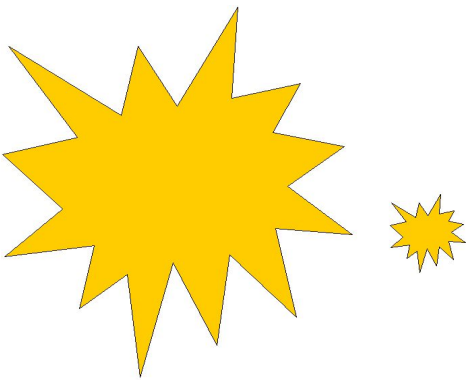
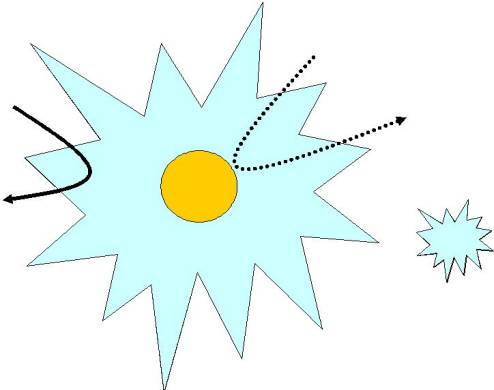
### 3. 복합공정 도입 및 최종 코팅 조성 탐색

앞선 단독 및 이중 과립공정을 이용한 내산성기제 적용에서 보았듯이 과립화 단독 공정은 산성매질을 막는 측면에서 매우 비효율적임을 확인하였다. 이의 구체적인 기전은 다음과 같을 것으로 추정한다.(표 3.24)

따라서 순수한 코팅법을 이용하여 내산성제제를 제조하는 것이 기능적 측면에서 이상적이지만, 이상의 결과와 같이 제조공정의 효율성과 제조단가의 측면까지 고려하자면, 과립화 공정과 순수한 코팅공정으로 제조방법을 세분화하여 실시하는 것이 바람직 할 것으로 사료되었다.

제약분야에서는 과립을 제조하기 위하여 일반적으로 사용하는 결합제는 주로 수용성 고분자로서 이의 사용량은 3~5% 정도이다. 현재 1차 과립공정에 사용하고 있는 경화유는 결합제로서의 능력은 낮아 사용량이 많으므로, 제약분야의 기술을 이용하여 결합력을 나타낼 수 있는 소량의 수용성 결합제를 적용하고자 하였다. 이러한 목적으로 농업 및 식품분야에서 설탕을 추출하고 남은 부산물인 당밀을 결합제로 이용하고자 하였다.

표 3.24. 단독 과립법을 이용한 제조방법의 문제점

단계	과립법을 이용하여 제조 후	매질과 접촉 시
형태		
설명	<ul style="list-style-type: none"> <li>- 과립을 planetary mixer로 제조시 모양이 구형이 아닌 불균질한 모양을 형성함.</li> <li>- 과립간 입도 분포가 넓어 입자의 크기 차이가 매우 큼.</li> <li>- 효소제와 내산성기체가 균질하게 배합되어 있음.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- 매질에 노출시켰을 때, 매질은 입자의 hydrophobicity 때문에 일정한 거리밖에 침투하지 못함.</li> <li>- 작은 크기의 과립은 과립중심까지의 거리가 짧기 때문에 쉽게 중심부까지 완벽히 수화됨.</li> <li>- 크기가 큰 과립은 표면만 수화되어 표면에 가까운 효소는 모두 방출됨.</li> <li>- 과립의 중심부는 상대적으로 매우 느리게 방출되므로 중성매질에서도 완벽히 방출되지 못함.</li> </ul>

가. 수용성 코어를 이용한 과립-코팅 복합공정

1차 과립의 결합력을 위하여 당밀을 효소제 대비 10~40%양을 사용하였다. 2차 코팅제로서 경화유와 HPMCP를, 통상적인 pore former의 비율인 9:1과 8:2의 비율로 시험하였다. 또한 신규한 장용코팅 고분자로서 Na alginate를 적용하여 시험하였다.

표 3.25. 과립-코팅 복합공정의 시험 조성

단계	기능	원료명	cHPV-1	cHPV-2	cFA-3	cFA-4
1차 과립	주성분	효소제	500	500	500	500
	수용성 결합제	당밀	50	50	200	200
2차 코팅	수불용성 고분자	경화유	375	333.3	-	-
		HPMCP	41.7	83.3	-	-
	장용성 고분자	Na alginate	-	-	50	150



(1) 제조방법

(가) 사용기계:

- ① 과립공정: Planetary Mixer(KitchenAid, USA)
- ② 코팅공정: Fluid-bed coater, DPL 1/3 (China)

(나) 제조 방법

- ① 1차 과립
  - ㉠ 효소제를 planetary mixer에 넣고 당밀을 가하여 연합한다.
  - ㉡ 50℃에서 5시간 건조한 후 14mesh 체를 이용하여 정립한다.
- ② 2차 코팅
  - ㉢ HPMCP와 경화유를 MC와 에탄올 혼합액에 녹인다. Na Alginate는 정제수에 녹인다.
  - ㉣ 이를 각각 하기의 조건대로 분사한다.

표 3.26. 복합공정 중 코팅 공정의 조작 조건

Parameter	2차코팅
Spray volume (g/min)	7~17
Coating Time(hr)	5
Inlet Temp. (℃)	60
Atomizing Air (bar)	1.5

(2) 평가

평가 방법은 이전과 동일하다.

(3) 평가 결과

(가) 성상

당밀로 과립제조 후 입도 분포는 경화유를 사용한 것과 비슷하였다. 즉, 당밀은 경화유보다 소량을 사용하여도 비슷한 결합력을 나타낸다. 검체 모두 경화유로 코팅한 cHV-1과 비슷한 성상을 나타내는 것으로 보아 코팅이 잘된 것으로 판단된다.

(나) 산성용액 내에서의 성상변화

산성조건에서 2시간 방치시킨 후 그 성상을 확인한 결과 당밀을 과립에 사용한 검체의 경우 약간의 효소 방출이 일어난 것을 확인 할 수 있었다. 또한 pH6.8 KP buffer에서 위와 동일한 조건에서 시험하였을 때, pH1.2와 거의 유사한 양상을 나타내었다.

(다) 효소 활성 평가

제조에 사용한 효소제를 평가한 결과, 효소제 자체의 내산성은 약 14%로 나타났다. pH6.8

에서 효소제와 결과와 성상을 비교하면 cHPV-1와 2 모두 추출이 충분히 되지 않음을 알 수 있다. 반면에 Na alginate를 사용한 cFA-3과 4는 효소의 추출이 원활히 된 것을 알 수 있다. 이는 주요 코팅기체인 경화유가 pH에 무관하게 매질을 침투시키지 못하였기 때문으로 판단되며 pore former로 사용한 HPMCP의 사용량이 충분하지 않아, 기대하였던 pH에 따른 내산성 barrier의 용해가 나타나지 않은 것으로 판단된다. Na alginate는 아무리 처리를 하지 않은 효소제와 비교하였을 때, 추출성은 우수하지만 내산성이 낮아 현재의 구성에서는 효과가 거의 미미한 것으로 판단된다.

표 3.27. 복합공정에 따라 제조된 검체의 효소 역가

Protease	효소제역가				
추출액	효소제	cHPV-1	cHPV-2	cFA-3	cFA-4
pH1.2, 2시간 노출 후 용액 중 역가	2179	2083	1958	2485	2924
pH 6.8로 Transition 후 역가	112	2286	2595	569	678
pH6.8에서만 추출	16029	7178	8595	15863	15961
내산성(U/g)	2291	4369	4553	3054	3602
내산성 %	14.3	60.9	53.0	19.25	22.57

(4) 수용성 코어를 이용한 과립-코팅 복합공정의 결론

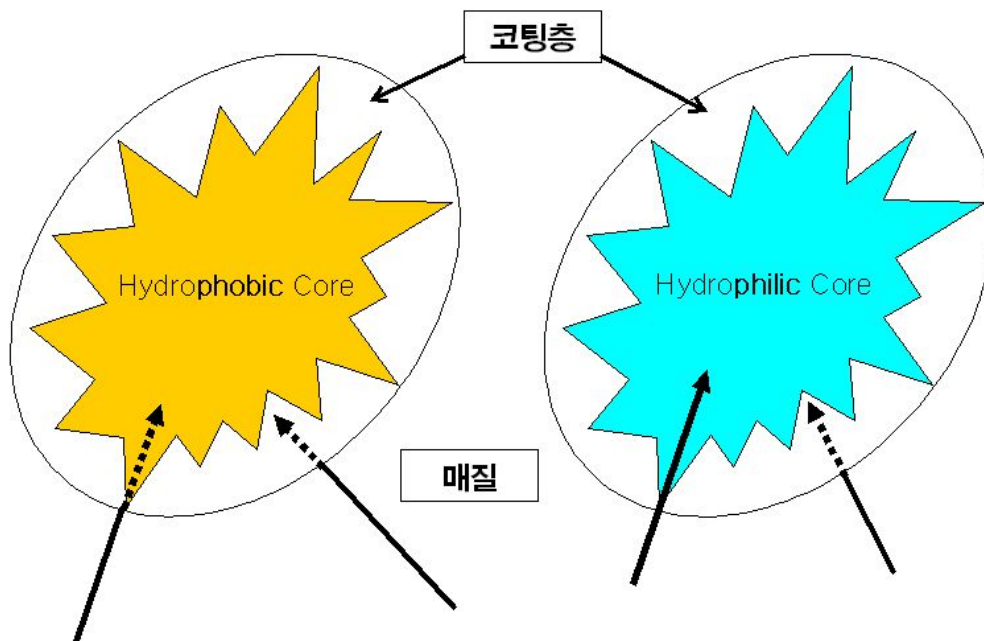


그림 3.37. 코어의 친수-친유성에 따른 매질 투과 저항성

이러한 결과를 바탕으로 원인을 생각해 보면 우선 core가 되는 과립의 성질이 hydrophilic 하면 코팅막에 매질이 전혀 침투하기 어려운 수불용성인 경화유를 사용하여도, 코어 자체가 과립법에 따라 제조되었으므로 표면이 매끄럽지 못하기 때문에 barrier로서의 역할을 제대로 하지 못하는 것으로 판단된다. 이에 따라서 core를 수불용성으로 제조하였을 때 코팅층이 불완전하다 하여도 core에서 어느 정도 2차 barrier 역할을 해 줄 수 있을 것으로 판단되었다. 이에 따라 우선 시급한 것은 코어의 구성을 hydrophobic하게 제조하여 코팅 기제를 적용시켜 보고자 하였다. 하기 연구는 코어의 구성을 경화유로 고정 후에 여러 내산성 기제를 적용해 보고자 하였다.

#### 나. 수불용성 코어를 이용한 과립-코팅 복합공정

상기의 결과에 따라 코어가 되는 1차 과립의 기제는 수불용성 고분자로 확정하였다. 이중 가장 바람직한 고분자는 hydrophobicity가 높고, 가격이 저렴한 기제가 가장 적절하다. 수불용성 고분자는 매우 다양하지만 상기의 조건에 맞는 기제로서 경화유를 이용하였다. 경화유는 앞선 연구에서 확인하였듯이 효소제와 배합적합성이 좋았기 때문에 수불용성이면서도 가격이 저렴하며 배합적합성 측면에서 가장 바람직하다.

표 3.28. 수불용성 코어를 이용한 복합공정 과립의 조성

단계	기능	원료명	cHP-1	cHP-2	cHV-1	cFA-1	cFA-2	cSL-5
1차 과립	주성분	효소제	600g	600g	600g	600g	600g	600g
	수불용성 고분자	경화유	400g	400g	400g	400g	400g	400g
2차 코팅	장용성 고분자	HPMCP	250g	500g				
		Na alginate				60g	90g	
		Shellac						400g
	수불용성 고분자	경화유			500g			

또한 장용성 고분자 중에서도 상대적으로 가격이 저렴한 Na alginate와 shellac 또한 검토하였는데, 기존에 사용하였던 zein은 가격 및 효과 측면에서 HPMCP 보다 불리하였기 때문에 검토하지 않았다. Na alginate는 해조류(*Phaeophyceae*)로부터 추출된 hydrocolloid로서 식물 줄기에 적절한 강도와 유연성을 주는 물질이며 D-mannuronate와 L-gulonate로

구성되어 있다. D-mannuronate와 L-guluronate의 carboxyl기의 pH에 따른 이온화 경향에 따라 고분자의 용해도가 변화한다. 즉, 산성에서는 수소이온을 받아들여 용해도가 낮아지고, 알칼리성에서는 수소이온을 잃고 이온화 되어 용해도가 증가한다. Shellac은 Laccifer 또는 Lacca Keer의 수지성 분비물을 가공하여 만들며, 가공방법에 따라 정제셀락, 백셀락 등으로 구분지어진다. 활성성분은 주로 shelloic acid로서 Na alginate와 마찬가지로 산성 및 알칼리조건에서의 용해도가 차이가 난다. 이러한 고분자들의 성질을 이용하여 본 시험 목적에 맞게 적용하고자 하였다. 또한 추가적으로 1차과립에 사용한 경화유를 2차코팅공정에도 적용하여 장용성 고분자와 비교하고자 하였다.

(1) 제조방법

(가) 사용기계:

- ① 과립공정: Planetary Mixer(KitchenAid, USA)
- ② 코팅공정: Fluid-bed coater, DPL 1/3 (China)

(나) 제조 방법

① 1차 과립

- ㉠ 경화유를 70℃ 건조기에 넣어 녹인다.
- ㉡ 효소제 600g에 경화유를 상기의 비율대로 planetary mixer에 넣고 연합한다.
- ㉢ 실은 방치하면 연합물이 응고되고 이를 14mesh 체를 이용하여 정립한다.

② 2차 코팅

- ㉣ HPMCP 및 경화유는 MC와 에탄올 혼합액에 녹이고, Na Alginate는 정제수에, Shellac은 에탄올에 녹인다.
- ㉤ 이를 하기의 조건대로 분사한다.

표 3.29. Fluid-bed coater의 공정 조건

Parameter	2차코팅
Spray volume (g/min)	8~17
Coating Time(hr)	4~5
Inlet Temp. (℃)	60
Atomizing Air (bar)	1.5

(2) 평가 방법

기본적인 평가 방법은 이전과 동일하며 추가로 주사전자현미경을 이용하여 코팅막의 성상을 직접 관찰하였으며 내열성 또한 확인하였다.

### (3) 평가 결과

#### (가) 정상

경화유는 효소제가 과립을 형성할 수 있을만큼 최소로 사용하였기 때문에 큰 입자와 미분이 고루 섞여 있었다. HPMCP로 코팅한 cHP-1과 cHP-2는 코팅양이 증가할수록 더욱 흰색이 나타났음. 경화유로 코팅한 cHV-1의 경우 표면이 greasy한 것으로 보아 코팅이 잘된 것으로 판단된다. Na Alginate로 코팅한 cFA-1과 2는 정제수를 이용하여 코팅액 제조시 점성이 높아 작업시간이 길어졌으며, 코팅 후에 성상은 흰색으로서 코팅은 양호한 것으로 판단되었다. Shellac으로 코팅한 cSL-5의 경우 표면에 shellac 특유의 황색 빛이 띄며 매우 구형으로서 코팅막은 우수하게 도포된 것으로 판단되었다. 이번 코팅 검체는 과립물에 비하여 전반적으로 비교적 구형에 가까워 2차 코팅기제들이 과립의 표면에 존재하는 듯하였다.

#### (나) 산성용액 내에서의 정상변화

산성조건에서 2시간 방치시킨 후 그 성상을 확인한 결과 상기 검체 모두 거의 변화가 없었다. 또한 pH6.8 KP buffer에서 위와 동일한 조건에서 시험하였을 때, HPMCP로 코팅한 검체의 경우 10분 이내에 거의 붕해가 완료 되었지만, 경화유의 경우 일부만 용해되는 양상을 나타내었다. Na alginate로 코팅한 검체는 산성 용매에서 코팅막이 녹지는 않지만 swelling되는 현상이 나타나, 산성매질이 침투하였을 것으로 판단되었다. Shellac으로 코팅한 검체는 산성 매질에서 변화가 크게 관찰되지 않았으나 pH6.8 KP buffer에서도 큰 정상 차이가 나타나지 않아 경화유와 유사한 경향을 나타내었다.

#### (다) 효소 활성 평가

표 3.30. 복합공정을 이용한 경화유-고분자 과립의 효소 역가

Protease	효소제역가						
	효소제	cHP-1	cHP-2	cHV-1	cFA-1	cFA-2	cSL-5
pH1.2, 2시간 노출 후 용액 중 역가	2179	1976	1218	1404	817	718	715
pH 6.8로 Transition 후 역가	112	3982	10950	3614	443	466	426
pH6.8에서만 추출	16029	16070	17776	5662	12088	10834	5883
내산성(U/g)	2291	5958	12168	5018	1260	1184	1141
내산성 %	14.3	37.1	68.5	88.6	10.4	10.9	19.4

효소 자체는 산성에서 충분히 추출되었기 때문에 pH6.8로 transition 후에 거의 역가를 나타내지 않았다. HPMCP를 이용하여 코팅한 cHP-1과 cHP-2의 역가는, 아무런 처리를 하지

많은 효소제와 pH6.8에서만 추출시 거의 유사한 역가를 나타내어 현재 코팅한 고분자에서의 추출에 문제가 없음을 확인하였다. 단, 경화유를 이용한 cHV-1의 경우, pH 6.8조건에서 경화유의 용해도가 높지 않아 효소의 추출이 제대로 되지 않음을 알 수 있다. 이는 2차 코팅 기제가 장용성 고분자와 같은 pH의존적인 성질을 가진 기제를 사용하여야 하는 증거이다. Na alginate를 이용한 cFA-1과 2의 추출역가가 낮은 것은 추출자체가 진행되지 않았거나, 효소제와 고분자와의 상호작용에 따라 역가 저하가 나타나 일어난 현상이라고 판단된다. 또한 shellac을 이용한 cSL-5는 육안으로 관찰하기에 추출에 문제가 있어 보였고, 효소제 역가 역시 낮게 나타나 경화유와 유사한 것으로 판단된다. HPMCP의 코팅량이 늘어날수록 내산성 값과 % 내산성 모두 증가하는 양상을 나타낸다(cHP-2). 이는 코팅량이 늘어날수록 산성조건에서 매질을 더욱 효율적으로 막아내고 있음을 의미한다. 경화유로 2차 코팅을 실시한 cHV-1의 경우 추출되지 않고 남아있는 효소가 다량 존재하는 것으로 추정되고 있다. 비록 본 시험모델인 in vitro 효소방출 시험에서는 원활한 방출을 나타내고 있지 않으나 생체 내에서 분비되는 lipase 등에 의하여 방출이 촉진될 수 있는 가능성을 차후 확인하고자 한다. Na alginate는 코팅양을 증가시켜도 내산성에 큰 상승을 가져오지 않아 부적합한 것으로 판단되었다. 또한 shellac은 비록 내산성은 높을지라도 추출 자체가 되지 않고, 경화유와 달리 소화효소에 의한 분해도 기대할 수 없어 본 과제에 적절치 못하다.

(라) 주사전자현미경(Scanning Electron Microscope, SEM) 관찰

① 50배 확대

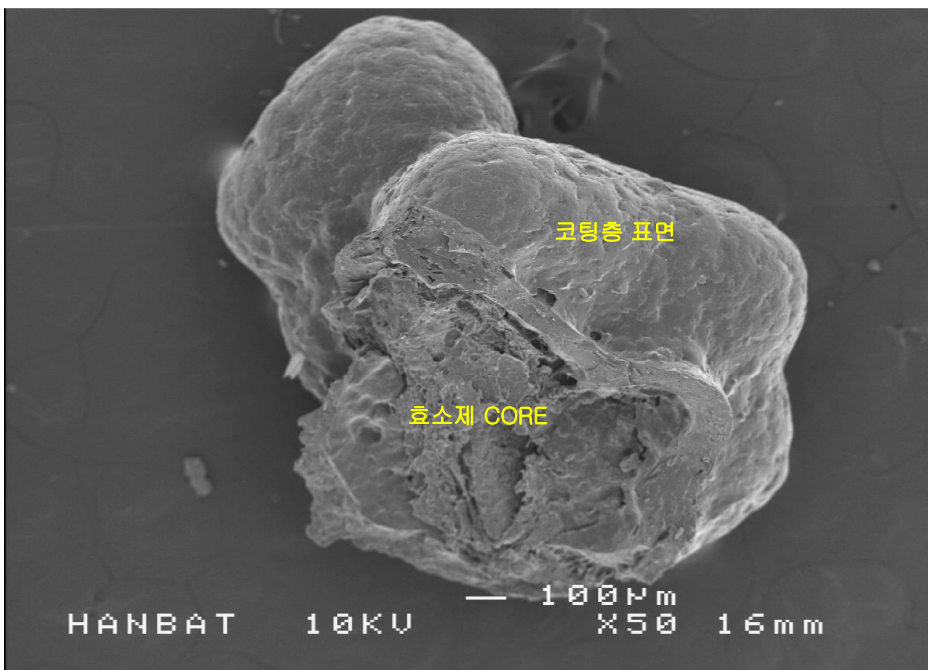


그림 3.38. 복합공정으로 제조된 효소제의 성상(50배 확대)

② 500배 확대

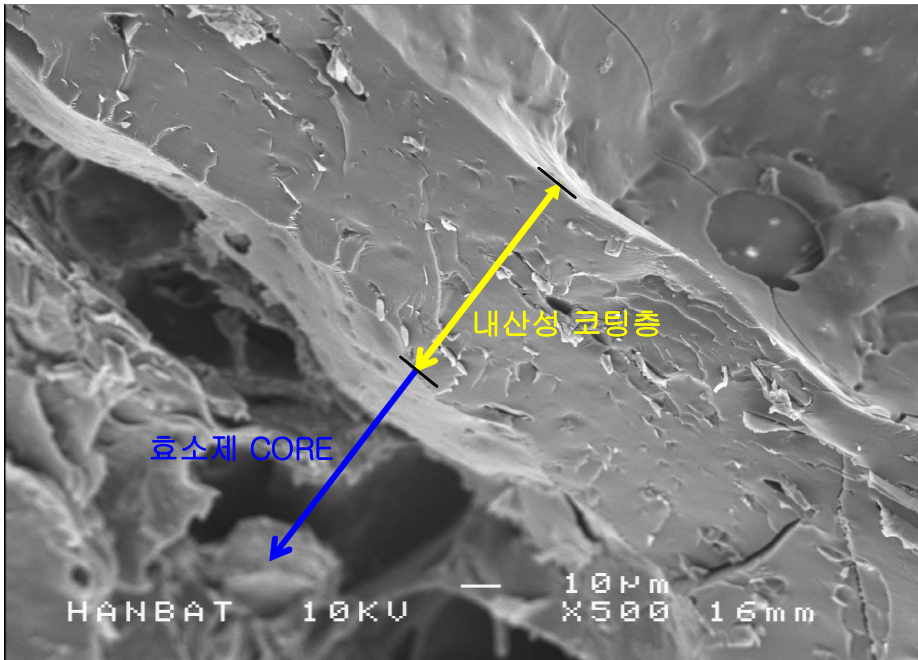


그림 3.39. 복합공정으로 제조된 효소제의 성상(500배 확대)

효소제와 경화유로 이루어진 core에 내산성 코팅막이 전반적으로 균질하게 도포되어 있음을 확인하였다. 코팅이 이루어짐으로 인하여 core의 형상이 전반적으로 매끄럽고 둥근 형태를 띄고 있음을 확인하였다. 2차 코팅 공정을 통해 과립의 표면이 대부분 코팅되어 피막이 관찰되었으며 이를 통해 외부로부터 보호될 수 있음을 알 수 있다.

500배 확대하여 코팅막의 자세히 관찰한 결과, 균질하고 치밀한 조직으로 코팅막이 구성됨을 확인하여 코팅막의 완결성이 높아 우수한 내산성을 가질 수 있었다.

(마) 내열성 확인

코팅공정을 위해서는 필수적으로 hot air를 사용하여야만 하고, 이에 따라 효소 역가가 변화될 수 있다. 본 코팅공정에서는 60℃의 열을 5시간 가하였으므로 이에 따른 영향을 확인하고자 하였다.

표 3.31. 복합공정을 이용한 경화유-고분자 과립의 내열성

	60℃ 5시간						
	효소	cHP-1	cHP-2	cHV-1	cFA-1	cFA-2	cSL-5
역가	16029	16070	17776	5662	12088	10834	5883
열처리 후 상대역가(추출값)	-	100.3%	110.9%	35.3%	75.4%	67.6%	36.7%

HPMCP를 이용하여 코팅한 검체는 60℃에서 5시간을 방치하여도 역가의 변화는 거의 없는 것으로 판단되었다. 경화유와 shellac으로 코팅한 검체는 비록 내열성이 상당히 낮은 것처럼 보이지만 이는 동일한 core를 사용한 HPMCP의 경우에 비추어 보았을 때, 내열성의 문제가 아닌 추출에 문제가 있어 발생한 현상이라고 판단된다. Na alginate를 이용한 검체들은 내열성, 배합적합성, 추출 중 어떠한 것에 의한 것인지 확인되지 않았으나, 본 과제에 적합하지 않아 추가 시험은 진행하지 않았다.

#### 다. 과립-코팅 복합공정 도입의 결론

이상의 결과에서 보았을 때,

- (1) 코어의 과립화 및 보호층의 과립화 공정 즉, 과립-과립의 이중과립 공정에 의한 내산성 있는 제제의 제조는 불가하다. 결국 **장용 효소제의 제조공정은 코어의 과립화 및 장용성 고분자의 코팅 공정이 적합함을 확인하였다.**
- (2) 상기 제조공정을 이용하여 **장용성 효소제의 제조에 가장 적합한 코어는 산성 매질의 침투를 쉽게 허용하지 않는 수불용성 고분자인 경화유가 적합하다.**
- (3) 상기 코어에 코팅을 적용하였을 경우 효소제의 방출 및 추출 용이성, 효소제와 배합적합성, 내산성 및 내열성 측면에서 **가장 적절한 고분자는 HPMCP이므로 결론적으로 cHP-2 처방이 가장 적절한 것으로 판단되었다.**



## 제7절 장용효소제의 생산, 품질관리 및 안정성 시험을 통한 제품화 검증

### 1. 장용코팅효소제의 품질관리 기준 및 시험법

장용효소제의 품질관리를 위하여 다음과 같은 시험항목의 기준과 그에 따른 시험법을 설정하였다.

#### 가. 장용효소제의 품질관리 항목 및 기준

##### 기준 및 시험방법

##### 기 준

1. 성 상 : 장용 코팅된 갈색의 과립

2. 역 가 : 다음 시험법에 따라 시험할 때, 장용코팅 효소제 중 프로테아제의 역가는 효소제 원료의 역가 대비 80% 이상이다.

3. 산저항성 : 다음 시험법에 따라 시험할 때 산처리 후 프로테아제의 역가는 상기 2. 역가항의 결과 대비 70% 이상이다.

4. 건조감량 : 다음 시험법에 따라 시험할 때 장용코팅 효소제의 건조감량은 20% 이하이다.

나. 장용효소제의 품질관리 항목에 따른 시험방법

## 시험방법

1. 성 상 : 육안으로 직접 관찰한다.

## 2. 역 가

### (1) 시험 시액 조제

- 1) pH6.8 인산염 완충액: 0.2M 인산이수소칼륨 시액 250mL에 0.2M 수산화나트륨 시액 118mL 및 물을 넣어 100mL로 한다.
- 2) 0.4M 탄산나트륨: 탄산나트륨 8.48g에 물을 가해 200mL로 한다.
- 3) 페놀 희석액: 페놀 20mL에 정제수 80mL을 가하여 혼화한다.
- 4) McIlvaine buffer(pH6.0): 인산일수소나트륨 8.98g과 구연산 3.86g을 정제수에 녹여 500mL로 한다.
- 5) 0.4M TCA시액: 삼불소초산 13.1g을 정제수에 녹여 200mL로 한다.
- 6) 1N 염산: 염산 9mL에 정제수를 가하여 100mL로 한다.
- 7) 기질용액: 가제인 2g과 McIlvaine 완충액 20mL에 정제수를 가하여 100mL로 한다.
- 8) pH1.2 완충액: 염화나트륨 2g에 염산 7mL 및 정제수를 가하여 1000mL로 한다.

### (2) 표준액 조제

티로신 표준품 10mg을 취하여 1N 염산으로 녹여 100mL로 한다. 이를 정제수로 희석하여 각각 20, 40, 60, 80, 100ppm으로 한다. 이를 각각 1mL 취하여 여기에 0.4M 탄산나트륨 시액 5mL과 페놀 희석액 1mL을 가하여 표준액으로 한다.

### (3) 검액 조제

장용코팅 효소제 5g을 취하여 pH6.8 인산염 완충액을 넣고 1시간동안 교반한다. 이를 원심분리하여 상등액 0.5mL에 McIlvaine buffer를 가하고 기질용액 1.5mL를 가하여 반응을 개시한다. 반응 개시 후 60분에 0.4M TCA시액 3mL를 가하여 반응을 중지시킨 후 여과한다. 여액 1mL에 0.4M 탄산나트륨 시액 5mL와 페놀 희석액 1mL를 가하여 검액으로 한다.

### (4) 조 작

농도가 서로 다른 5종의 표준액 및 검액을 자외부흡광광도계를 이용하여 660nm에서 흡광도를 측정한다. 표준액에서 나온 흡광도를 이용하여 표준액의 검량선을 구하고, 이를 이용하여 검액의 티로신 양을 계산한다.

(5) 계 산

중성프로테아제의 양(U) = 검액의 티로신 양 x 6(반응액량) x 1/100(희석배수)

장용코팅 효소제의 역가(%)

= 중성프로테아제의 양(U) / 효소제 원료의 역가(U) x 100

### 3. 산저항성

(1) 시액 및 표준액

상기 2.역가항의 시액 및 표준액을 사용한다.

(2) 검액 조제

1) 산성 검액 조제

장용코팅 효소제 5g을 취하여 pH1.2 완충액을 넣고 1시간 동안 교반한다. 이를 원심분리하여 상등액 0.5mL에 McIlvaine buffer를 가하고 기질용액 1.5mL를 가하여 반응을 개시한다. 반응 개시 후 60분에 0.4M TCA시액 3mL를 가하여 반응을 중지시킨 후 여과한다. 여액 1mL에 0.4M 탄산나트륨 시액 5mL와 페놀 희석액 1mL를 가하여 산성검액으로 한다.

2) 내산성 검액 조제

상기 산성검액 조제시 원심분리 후 남은 잔사를 모두 취하여 pH6.8 인산염 완충액을 넣고 1시간동안 교반한다. 이를 원심분리하여 상등액 0.5mL에 McIlvaine buffer를 가하고 기질용액 1.5mL를 가하여 반응을 개시한다. 반응 개시 후 60분에 0.4M TCA시액 3mL를 가하여 반응을 중지시킨 후 여과한다. 여액 1mL에 0.4M 탄산나트륨 시액 5mL와 페놀 희석액 1mL를 가하여 내산성 검액으로 한다.

(3) 조 작

표준액 및 산성 검액, 내산성 검액을 자외부흡광광도계를 이용하여 660nm에서 흡광도를 측정한다. 표준액에서 나온 흡광도를 이용하여 표준액의 검량선을 구하고,

이를 이용하여 산성 검액 및 내산성 검액의 티로신 양을 계산한다.

(4) 계 산

1) 산성 검액 중 중성프로테아제의 양(U)  
= 검액의 티로신 양 x 6(반응액량) x 1/100(희석배수)

2) 내산성 검액 중 중성프로테아제의 양(U)  
= 검액의 티로신 양 x 6(반응액량) x 1/100(희석배수)

산저항성(%)

= 산성 및 내산성 검액 중 중성프로테아제의 양(U) / 역가(U) x 100

#### 4. 건조감량

장용코팅 효소제 5g을 적외선수분측정기를 이용하여 105℃에서 30분간 측정한다.

## 2. Pilot scale 생산품의 제조 및 품질관리 기준 및 시험법을 사용한 품질분석

Pilot scale (장용효소제로서 10 kg/batch, 제조공정 생략)에서 생산된 장용효소제 3 batch 의 품질관리 및 시험법 검증 등을 위하여 각 항목별 시험을 실시하였으며 그 결과를 batch 별 성적서로서 나타내었다.

3 batch 모두 생산품 중 효소의 역가가 양호하였으며 특히 내산성의 경우 모두 95%이상을 유지하는 우수한 결과를 나타내었다.

1) Batch No. cHP2-P1 의 품질관리 시험성적서

### ( 장용효소제 ) 검사 성적서

제품명/성분명	장용효소제			제 조 번 호	cHP2-P1
제조일자	2010.09.02	유효(사용)기한	6개월 이상	제조처	자사
의뢰일자	2010.09.13	의뢰번호	GL-100901	검사 의뢰자	제제연구팀
접수일자	2010.09.14	검사번호	GL-100901	의뢰기관 소재지	자사
검사분류	기시법상 전항목	채취일자	2010.09.27	및 연락처	(이문석)
채취장소	자사 실험실	검체 채취자	손형민	채취방법/수량	무작위/100g
검사지시자	이성훈	지시일자	2010.09.27	검사 담당자	손형민
No.	시험항목	시험기준(규격)	검사결과	검사자	검사일자
	성상	장용 코팅된 갈색의 과립	적합	손형민	2010.09.29
	역가	효소제 원료 대비 80% 이상	92.1%	손형민	2010.09.29
	산저항성	역가대비 70% 이상	98.1%	손형민	2010.09.29
	건조감량	20% 이하	12.0%	손형민	2010.09.29
1. 이 성적서는 의뢰자가 제시한 시료 및 검사방법에 의한 검사결과로서 전체 제품에 대한 품질을 보증하지는 않습니다. 2. 이 성적서는 당 검사기관의 사전 서면동의 없이 홍보, 선전, 광고 및 소송용으로 사용될 수 없으며, 용도 이외의 사용을 금합니다.					

확인자	품질검사책임자 손형민	판정자	품질관리책임자 이문석
확인일자	2010.09.30	판정일자	2010.09.30
비고		판정결과	적합

식품의약품안전청 지정 의약품등 품질검사기관 제 7 호

경기도 성남시 중원구 상대원동 138-6, 중앙인더스피아 5차 714호

Tel : (031)739-5220, Fax : (031)739-5224

E-mail : mckwon@gplt.co.kr, Website : www.gplt.co.kr

지엘팜텍(주) 식품의약품안전청 지정 의약품등 품질검사기관 제 7 호

2) Batch No. cHP2-P2 의 품질관리 시험성적서

**( 장용효소제 ) 검 사 성 적 서**

제품명/성분명	장용효소제			제 조 번 호	cHP2-P2
제조(수입)일자	2010. 09. 06	유효(사용)기한	6개월 이상	공정/제조공급처	자사
의 퇴 일 자	2010. 09. 13	의 퇴 번 호	GL-100902	검사 의뢰자	제제연구팀
접 수 일 자	2010. 09. 14	검 사 번 호	GL-100902	의뢰기관 소재지	자사
검 사 분 류	기시법상 전항목	채 취 일 자	2010. 09. 27	및 연락처	(이문석)
채 취 장 소	자사 실험실	검체 채취자	손형민	채취방법/수량	무작위/100g
검사 지시자	이성훈	지 시 일 자	2010. 09. 27	검사 담당자	손형민
No.	시험항목	시험기준(규격)	검사결과	검 사 자	검사일자
	성 상	장용 코팅된 갈색의 과립	적합	손형민	2010.09.29
	역 가	효소제 원료 대비 80% 이상	95.5%	손형민	2010.09.29
	산저항성	역가대비 70% 이상	98.4%	손형민	2010.09.29
	건조감량	20% 이하	9.7%	손형민	2010.09.29
<p>1. 이 성적서는 의뢰자가 제시한 시료 및 검사방법에 의한 검사결과로서 전체 제품에 대한 품질을 보증하지는 않습니다.</p> <p>2. 이 성적서는 당 검사기관의 사전 서면동의 없이 홍보, 선전, 광고 및 소송용으로 사용될 수 없으며, 용도 이외의 사용을 금합니다.</p>					

검 사 자	품질검사자 손형민 <i>(서명)</i>	판 정 자	품질관리책임자 이성훈 <i>(서명)</i>
확인일자	2010.09.30	판정일자	2010.09.30
비 고		판정결과	적 합

경기도 성남시 중원구 상대원동 138-6, 중앙인더스피아 5차 714호

Tel : (031)739-5220, Fax : (031)739-5224

E-mail : [shlee@glpt.co.kr](mailto:shlee@glpt.co.kr), Website : [www.glpt.co.kr](http://www.glpt.co.kr)

**지엘팜텍(주)** 식품의약품안전청 지정 의약품등 품질검사기관 제7호

Form No.: FQ-2-03-02

*Global Leader*  
in *Pharmaceutical Technology*

3) Batch No. cHP2-P3 의 품질관리 시험성적서

**( 장용효소제 ) 검 사 성 적 서**

제품명/성분명	장용효소제			제 조 번 호	cHP2-P3
제조(수입)일자	2010. 09. 08	유효(사용)기한	6개월 이상	공정/제조공급처	자사
의뢰 일자	2010. 09. 13	의뢰 번호	GL-100903	검사 의뢰자	제제연구팀
접수 일자	2010. 09. 14	검사 번호	GL-100903	의뢰기관 소재지	자사
검사 분류	기시법상 전항목	채취 일자	2010. 09. 27	및 연락처	(이문석)
채취 장소	자사 실험실	검체 채취자	손형민	채취방법/수량	무작위/100g
검사 지시자	이성훈	지시 일자	2010. 09. 27	검사 담당자	손형민
No.	시험항목	시험기준(규격)	검사결과	검 사 자	검사일자
	성 상	장용 코팅된 갈색의 과립	적합	손형민	2010.09.29
	역 가	효소제 원료 대비 80% 이상	86.2%	손형민	2010.09.29
	산저항성	역가대비 70% 이상	107%	손형민	2010.09.29
	건조감량	20% 이하	5.3%	손형민	2010.09.29
<p>1. 이 성적서는 의뢰자가 제시한 시료 및 검사방법에 의한 검사결과로서 전체 제품에 대한 품질을 보증하지는 않습니다.</p> <p>2. 이 성적서는 당 검사기관의 사전 서면동의 없이 홍보, 선전, 광고 및 소송용으로 사용될 수 없으며, 용도 이외의 사용을 금합니다.</p>					

검 사 자	품질검사자 손형민 (인)	판 정 자	품질관리책임자 이성훈 (인)
확인일자	2010.09.30	판정일자	2010.09.30
비 고		판정결과	적 합

경기도 성남시 중원구 상대원동 138-6, 중앙인더스피아 5차 714호

Tel : (031)739-5220, Fax : (031)739-5224

E-mail : [shlee@gjpt.co.kr](mailto:shlee@gjpt.co.kr), Website : [www.gjpt.co.kr](http://www.gjpt.co.kr)

**지엘팜텍(주)** 식품의약품안전청 지정 의약품등 품질검사기관 제7호

Form No.: FQ-2-03-03

Global Leader  
in Pharmaceutical Technology

### 3. 장용코팅효소제의 보관 안정성 시험

#### 1) 가속보관조건에서의 안정성

의약품에서는 장기보관조건에서의 안정성을 보다 신속히 예측하기 위하여 가속보관조건을 40도/75%RH로 설정하여 해당 조건에서의 제품의 품질변화를 관찰한다. 이에 장용코팅효소제도 해당 조건에서의 품질변화를 확인하였다.

아래의 요약보고서와 같이 효소제의 색상, 역가, 내산성 및 건조감량에서 큰 변화를 보이지 않아 비교적 안정한 것으로 판단되었다.

가. 가속보관조건에서의 안정성시험 요약보고서

### STABILITY TEST REPORT (STR)

Project code	GL-AT		API		Enzyme					
Document No.	F-STR-01-GL-AT		Monitored product		<input checked="" type="checkbox"/> TEST <input type="checkbox"/> CTRL					
Drafting date	2010-08-30		Monitored period		ACC-4W					
Experimenter	HYUNGMIN SON		<u>이형민</u> (Date 2010.09.30)							
Coordinator	MOONSEOK LEE		<u>이문석</u> (Date 2010.10.01)							
TEST BATCH NO.	cHP2-P2									
Modification occurrence	Experimenter change				<input type="checkbox"/> YES		<input checked="" type="checkbox"/> NO			
	SOP	Standard material				<input type="checkbox"/> YES		<input checked="" type="checkbox"/> NO		
		Anal. Method				<input type="checkbox"/> YES		<input checked="" type="checkbox"/> NO		
		STD preparation method				<input type="checkbox"/> YES		<input checked="" type="checkbox"/> NO		
		Sample preparation method				<input type="checkbox"/> YES		<input checked="" type="checkbox"/> NO		
		Calculation				<input type="checkbox"/> YES		<input checked="" type="checkbox"/> NO		
		Instrument				<input type="checkbox"/> YES		<input checked="" type="checkbox"/> NO		
	Protocol	Composition				<input type="checkbox"/> YES		<input checked="" type="checkbox"/> NO		
		Manufacturing method				<input type="checkbox"/> YES		<input checked="" type="checkbox"/> NO		
		Test item				<input type="checkbox"/> YES		<input checked="" type="checkbox"/> NO		
		Specification				<input type="checkbox"/> YES		<input checked="" type="checkbox"/> NO		
	Results	Test items	Initial		2 W		4 W		6 W	
Appearance		Brown granule	Complied	Brown granule	Complied	Brown granule	Complied			Brown granule
Potency		95.5%	Complied	102.2%	Complied	96.2%	Complied			80%≤
Acid Resistance		98.4%	Complied	-	-	93.3%	Complied			70%≤
Loss on Drying		9.7%	Complied	-	-	13.1%	Complied			≤20%
Remarks	<ul style="list-style-type: none"> <li>가속조건에서 시험기간 내에 모든 항목에서 적합함.</li> </ul>									



1) Potency

APPENDIX I

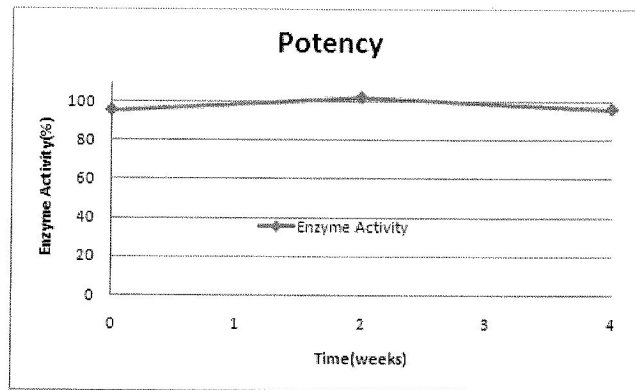


Fig.1 Potency profiles of Enteric Coated granule

① 규격에 적합함

2) Acid Resistance

APPENDIX II

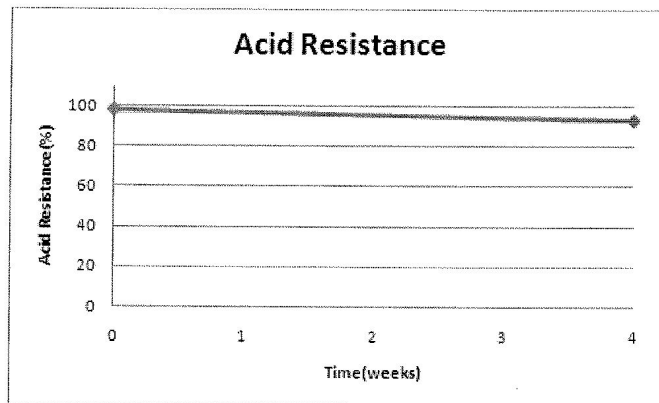


Fig.2 Acid Resistance profiles of Enteric Coated granule

① 규격에 적합함

3) Loss on Drying

APPENDIX III

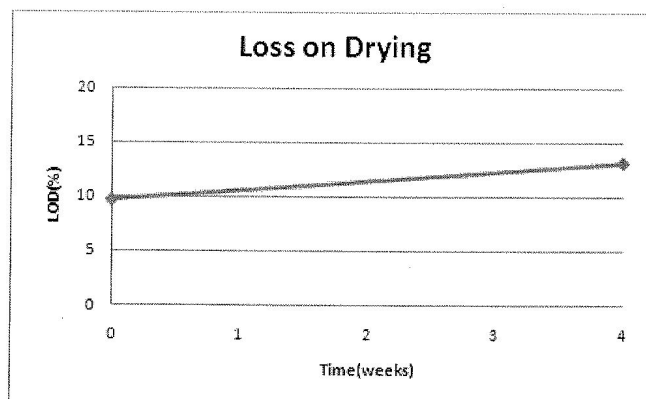


Fig.3 Loss on Drying profiles of Enteric Coated granule

① 규격에 적합함

2) 장기보관조건에서의 안정성

효소제를 장시간보관하는 동안 제품의 안정성을 확인하기 위하여 의약품의 장기보관안정성 시험 조건인 25도/60%RH에서 제품의 품질변화를 관찰하였다.

아래의 요약보고서와 같이 효소제의 색상, 역가, 내산성 및 건조감량에서 초기값에 비해 큰 변화를 보이지 않아 6개월간 안정한 것으로 판단되었다.

가. 장기보관조건에서의 안정성시험 요약보고서

STABILITY TEST REPORT (STR)

Project code	GL-AT		API		Enzyme					
Document No.	F-STR-01-GL-AT		Monitored product		<input checked="" type="checkbox"/> TEST <input type="checkbox"/> CTRL					
Drafting date	2010-08-30		Monitored period		LTS-6M					
Experimenter	HYUNGMIN SON		손형민		(Date 2011.03.16)					
Coordinator	MOONSEOK LEE		이윤석		(Date 2011.03.18)					
TEST BATCH NO.	cHP2-P2									
Modification occurrence	Experimenter change				<input type="checkbox"/> YES <input checked="" type="checkbox"/> NO					
	SOP	Standard material				<input type="checkbox"/> YES <input checked="" type="checkbox"/> NO				
		Anal. Method				<input type="checkbox"/> YES <input checked="" type="checkbox"/> NO				
		STD preparation method				<input type="checkbox"/> YES <input checked="" type="checkbox"/> NO				
		Sample preparation method				<input type="checkbox"/> YES <input checked="" type="checkbox"/> NO				
		Calculation				<input type="checkbox"/> YES <input checked="" type="checkbox"/> NO				
		Instrument				<input type="checkbox"/> YES <input checked="" type="checkbox"/> NO				
	Protocol	Composition				<input type="checkbox"/> YES <input checked="" type="checkbox"/> NO				
		Manufacturing method				<input type="checkbox"/> YES <input checked="" type="checkbox"/> NO				
		Test item				<input type="checkbox"/> YES <input checked="" type="checkbox"/> NO				
		Specification				<input type="checkbox"/> YES <input checked="" type="checkbox"/> NO				
	Results	Test items	Initial		2 M		4 M		6 M	
Appearance		Brown granule	Complied	Brown granule	Complied	Brown granule	Complied	Brown granule	Complied	Brown granule
Potency		95.5%	Complied	93.6	Complied	92.6	Complied	89.8%	Complied	80%≤
Acid Resistance		98.4%	Complied	-	-	-	-	95.2%	Complied	70%≤
Loss on Drying		9.7%	Complied	-	-	-	-	10.2%	Complied	≤20%
Remarks	<ul style="list-style-type: none"> <li>장기보관조건에서 시험기간 내에 모든 항목에서 적합함.</li> </ul>									

1) Potency

APPENDIX I

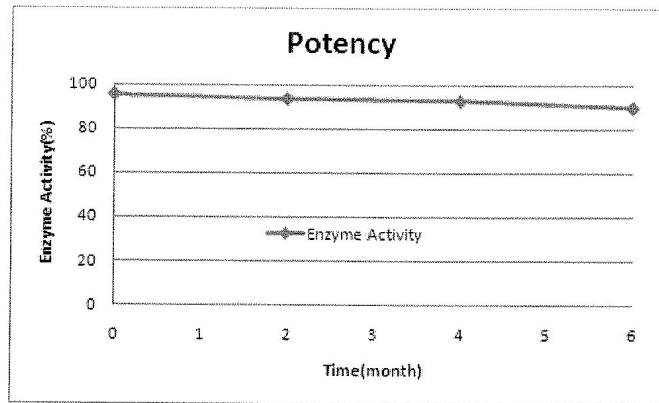


Fig.1 Potency profiles of Enteric Coated granule

① 규격에 적합함

2) Acid Resistance

APPENDIX II

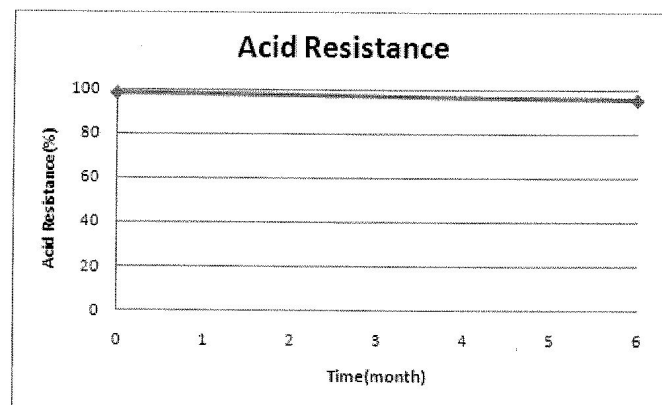


Fig.2 Acid Resistance profiles of Enteric Coated granule

① 규격에 적합함

3) Loss on Drying

APPENDIX III

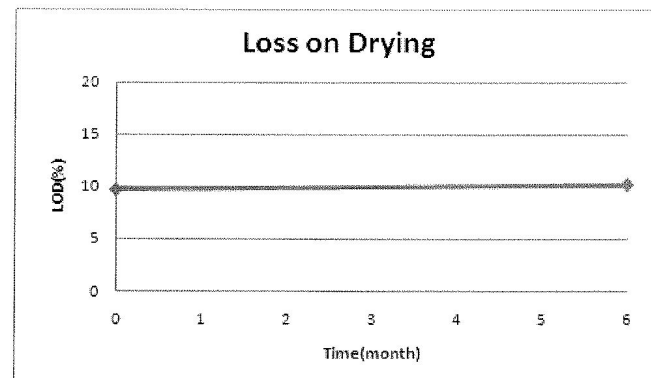


Fig.3 Loss on Drying profiles of Enteric Coated granule

① 규격에 적합함

# 제8절 이유자돈에 대한 코팅효소제의 사료영양소 이용을 평가 (위탁기관 수행)

위탁연구책임자: 성균관대학교 한 영근

## 1. 서론

소화효소는 일반적으로 동물의 생산성 제고를 위하여 사용되어 지는데, 사료 원료가 가지고 있는 항영양인자 감소시켜 주거나 원료의 소화율을 향상시켜줌으로써 가축의 체내 이용성을 높여 분뇨의 배출을 줄여 환경오염 문제를 해결할 수 있는 하나의 해결책으로 자리를 잡아가고 있다. 더욱이 2011년 7월 1일로 예정된 배합사료내 항생제 첨가 금지 규정에 따라 생산성 제고를 위한 실질적인 대안으로 자리 잡고 있어 시장에서의 위치와 의미는 매우 중요한 영향을 미치고 있으나 대부분의 효소제는 해외로부터 수입된 제품으로 구성되어 있어 국내 생산 제품에 대한 요구가 증가하고 있는 실정이다. 더욱이 소화기 내에서 위산이나 담즙의 영향으로 급변하는 pH의 변화에 따라 효소는 활성을 유지할 수 있는 범위와 구조에 영향을 받게 되며 이에 따라 pH에 대한 저항성을 갖는 제품의 개발의 필요성이 더욱 절실하다.

일반적으로 알려진 효소는 원료 또는 대상 기질을 고려하지 않고 미생물의 능력만을 기초로 한 효소제 개발에 치중되어 온 반면 원료의 특성 및 원료 특성에 맞는 효소의 개발과 함께 그 활성이 보호될 수 있는 코팅기술의 개발을 통해 경제적인 접근이 이루어져야 할 필요성이 있다.

따라서 본 과제는 사료 원료의 특성에 맞추어 개발된 고체발효기술을 이용한 효소제의 개발과 이에 따른 효소제의 소화기 내 내산성 및 내염기성을 부여함으로써 효과적이고 효율적인 코팅 기술의 개발에 따라 *in vitro* 및 *in vivo* 시험을 통해 그 가치를 구명하고자 한다.

## 2. 재료 및 방법

### 가. 대상 원료사료의 선정 및 처리

Two-stage *In vitro* 소화율 측정에 동원된 원료사료는 국내 사료공장에서 자돈용 사료에 주로 사용하는 원료 3종 (옥수수, 소맥, 대두박)이었으며, 배합사료는 시판용 자돈2호 사료였다. 모든 시험사료는 균질화 시킨 후 Cyclotec을 이용 1mm 이하의 크기로 분쇄한 후 시료병에 보관하여 분석을 실시하였다. 본 연구에 사용한 복합효소 및 코팅 첨가제는 해당 농도에 따라 각각의 원료 및 배합사료에 혼합한 후, 롤러 믹서를 이용 각 30분씩 균질화 시킨 후 사용하였다.

## 나. 화학분석

### (1) 일반조성분

원료 및 분변의 조성분은 AOAC (1990) 방법에 준하였는데, 수분 (AOAC method 930.15), 조단백질 (AOAC method 984.13) 및 조회분 (AOAC method 942.05)을 분석 하였다. 아미노산의 분석은 L8500-Hitachi Amino Acid Analyzer (Hitachi, Tokyo, Japan)를 이용하였는데, 황함유 아미노산은 Performic acid를 이용한 가수분해로, 기타 아미노산은 6N-HCl로 24시간 가수분해시킨 후 분석하였다. 총에너지는 Adiabatic Oxygen Bomb Calorimeter (Model 1241, Parr Instrument Co., Molin, IL)를 이용하여 분석하였다.

### (2) Two-stage in vitro digestion

BEDFORD와 CLASSEN (1993) 및 Malathi과 Devegowda (2001)방법을 중심으로 실시 하였다. 0.5g의 샘플을 취한 후, 2000U pepsin/ml를 함유하고 있는 0.1N HCl을 15ml 첨가한다. 40℃에서 45분 동안 incubate 한다 (peptic or gastric phase를 촉진하기 위해서 종종 볼텍싱 한다). ※ incubate 전에 water bath를 이용하여 온도를 상승시켜준다 (40℃, 5분). 45분 후 3000rpm에서 20분 동안 원심분리 하여 상등액을 분석을 위해 채취한다. 상등액을 분석을 위해 ice bath에 저장하거나 냉동실에 저장한다. 2mg pancreatin/mL를 함유한 1M NaHCO<sub>3</sub> 용액 5mL를 첨가한다. 40℃에서 2시간 동안 incubate한다 (pancreatic phase를 촉진하기 위해서 종종 vortexing 한다). Incubate 전에 water bath를 이용하여 온도를 상승시켜준다 (40℃, 5분). 2시간 후 3000rpm에서 20분 동안 원심분리하여 상등액을 분석을 위해 채취한다. 상등액을 분석을 위해 냉동실에 보관한다. 분리된 상등액을 총 당 정량 또는 총 단백질 정량 분석을 위해 사용한다.

### (3) 총당정량 (Phenol-H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> Method)

Dubois 등 (1956) 방법을 이용하여 실시하였다. Glucose 농도가 0.05~0.2mg/ml 일 때 최적흡광도를 나타낸다. 스탠다드 커브는 0, 0.05, 0.1, 0.15, 0.20mg/ml의 glucose를 이용하여 도출하였다. 0.2ml의 샘플을 채취하여 10ml 메스플라스크에 넣는다. 증류수를 이용하여 표선까지 채운다 (이 과정에서 샘플은 50배로 희석된다). 희석된 용액 2ml를 test tube에 넣고 5% phenol soln 1ml를 첨가한다. 95%황산 5ml를 첨가한 후 tube를 10분간 세워둔 다음 vortexing 하고 10~20분 동안 25℃~30℃ water bath에 둔다. Spectrometer를 이용하여 470~490nm에서 흡광도를 측정한다. Glucose standard curve를 이용하여 총 당 함량 %를 구한다. Total sugars release 분석의 경우에 480nm 파장에서 가장 좋은 흡광도를 나타내었고 최적흡광도 범위에서 흡광도를 측정하기 위해서 샘플을 50배 희석하여 사용하였다.

#### (4) Protein 정량(LOWRY METHOD)

LOWRY 등(1951) 방법을 이용하여 실시하였다. 0.2ml 단백질 수용액 샘플 또는 3~10ml보다 적은 양의 단백질 수용액을 test tube에 넣는다. Reagent C용액을 1ml 첨가한다. 볼텍싱 한 후 10분 동안 상온에서 암실에 방치한다. 매우 빠르게 reagent E 용액을 0.1ml 첨가하고 빠르게 볼텍싱 한다. 30분 동안 암실에 방치한 후 750nm에서 흡광도를 측정한다. BSA는 수용성 단백질이지만 완전히 녹이기 위해서는 충분한 시간이 필요하다. 따라서 실험을 시작하기 전 1시간 동안 혼합하여야 한다. 0.05g의 BSA를 2차 증류수에 녹여 500ml volumetric flask를 이용 500ml의 BSA용액을 만든다. (생성된 용액의 농도는 100mg BSA/L). 15ml conical tube에 희석용액을 제조한다.

### 다. 사양시험

#### (1) 사양시험

각 모돈으로 부터 생산된 자돈을 체중에 따라 랜덤으로 각 처리구별로 골고루 배치하였으며, 평균 이유일령은 28일이었고, 시험개시 평균체중은 8.47kg (표준편차 0.828)이었다. 각 돈방별 수용두수는 6두였으며, 처리별로 12반복을 실시하였다. 처리구는 대조구, 무코팅 효소제 0.1% 첨가구, 코팅제 0.5% 첨가구 및 코팅제 0.10%로 구분하였다. 실험돈사의 온도는 처음 1주일간 32℃이었으며, 점차 온도를 낮추어 이유 후 28일령 (시험 종료시) 온도는 약 21℃가 되도록 하였고 상대습도는 50~60%이었다. 돈사바닥은 보온 및 가온장치가 설비된 콘크리트 바닥이었고, 돈방당 사료 급이조는 각 2조, 물은 니플을 통해 공급하였다. 사료와 물은 무제한으로 섭취될 수 있도록 하였으며, 사료섭취량은 28일간 급여한 총량에서 잔량과 허실량을 뺀 값으로 환산하였으며, 체중은 배치 후 체중과 종료시 체중을 측정하여 증체를 계산하였다.

#### (2) 소화시험

소화율 측정은 지시제를 이용하였는데, Cr<sub>2</sub>O<sub>3</sub> 0.3%와 Celite-545 1.5%를 사료에 첨가하여 급여하기 시작하여, 1주일이 경과한 후 3일간에 걸쳐 각 돈방 별로 관찰하여 수시로 새로운 분변을 채취하여 비닐백에 넣은 후 냉동실(-55℃)에 보관하였다. 보관된 분변은 실험이 끝난 후 풀링하여 녹인 후 반죽기를 이용하여 섞은 다음 일정량을 채취하여 급속 냉동(-55℃)시킨 후 동결 건조하여 분쇄한 후 분석에 이용하였다. Celite는 Prabucki 등(1975)의 방법(HCL-Insoluble Ash)을 이용하여 분석하였으며, Chromic oxide는 Fenton과 Fenton (1979)의 방법을 적용하였다. 영양소의 소화율은 Schneider와 Flatt (1975)가 발전시킨 방법을 이용하여 도출하였다. 각 영양소의 소화율은 두 가지 지시제로 부터 각각 도출된 값의 평균값을 적용하였다.

### 라. 자료의 분석 및 통계

모든 결과는 randomized block design (Snedecor and Cochran, 1989)을 이용하여 분석하였으며, Statistix (1996) Package의 Analysis of Variance procedures를 적용하였다. 이유자돈은 이유 시 체중을 중심으로 블록화 하였으며, 각 돈방을 시험단위로 설정하였다. 모델은 effects of replication (i.e., block), treatment 및 replication x treatment (error)을 포함하였다. 처리 평균간 유의성은  $\alpha=0.05$  수준에서 LSD를 이용하여 검정하였다.

### 3. 결과 및 고찰

*In vitro*를 이용한 효소제의 효과는 다음 Table 3.32에 나타난 바와 같다. 옥수수를 대상으로 효소 사용에 따른 총당의 용출량을 조사한 결과 유의적 증가되었으며 ( $p<0.01$ ), 특히 효소제를 코팅했을 때 그 효과가 더욱 큰 것으로 조사되었다. 소맥의 경우 처리 간 유의차는 인정되지 않았으나, 효소첨가 및 코팅에 의해 증가되는 경향을 보여주었다 ( $p$ 값 증가). 대두박의 경우 소맥 및 증가되는 코팅 효소의 첨가에 비해 코팅하지 않은 효소 증가되는 및 코팅된 효소 0.05% 첨가구가 유의적으로 감소되는 것으로 나타났다( $p=0.02$ ). 사양시험에 이용된 자돈사료의 경우 효소첨가 및 코팅이 총당의 용출을 유의적으로 증가시킬 수 있는 것으로 나타났다 ( $p<0.05$ ).

이러한 결과는 효소제의 사용목적에 부합하는 결과를 예상할 수 있음을 의미한다. 즉 효소제를 사용함에 따라 에너지를 효율적으로 공급할 수 있도록 고분자의 탄수화물을 분해함으로써 *in vitro* 상태에서도 효율적이고 즉각적인 당 용출량을 증가시켜 당을 동원할 수 있는 능력을 개선시켜 줄 수 있을 것으로 기대된다.

효소는 그 자체로 단백질의 성질을 가지고 있어 변화되는 pH에 따라 구조 및 활성에 영향을 받으며 일반적으로 중성 pH의 범위를 벗어나 위산과 같이 강산의 공격을 통해 활성은 물론 구조적인 변화까지 수반되면, 효소는 그 기능이 다시 복원되지 않기 때문에 이러한 내산성 또는 내염기성에 대한 시험을 통해 효과가 검증되어야 한다.

표 3.32. Effect of enzyme on total sugars released from the different feed ingredients subjected to a two-stage *in vitro* digestion

Enzyme	Total sugars released (mg/ml)			
	Corn	Wheat	Soybean meal(local)	Diet
Control	11.82 <sup>d</sup>	8.93	5.18	16.22 <sup>b</sup>
Uncoated Enzyme, 0.10%	12.87 <sup>c</sup>	9.01	4.97	16.42 <sup>ab</sup>
Coated Enzyme, 0.05%	14.80 <sup>b</sup>	9.30	4.96	16.83 <sup>a</sup>
Coated Enzyme, 0.10%	15.32 <sup>a</sup>	9.35	5.12	16.87 <sup>a</sup>
S.E.	0.078	0.122	0.045	0.152
P value	<0.01	0.10	0.02	<0.05

본 과제에서 효소를 코팅함으로써 효소가 가지고 있는 역할이 소화기 내에서 위산 또는 담즙과 같은 알칼리 조건에서 그 성질을 잃어버리지 않도록 함으로써 소장 내에서 그 활성을 높게 유지하여 효율적인 영양소의 분해과정을 통해 동물의 소화생리를 개선시켜 줄 수 있음을 확인한 결과로 이해할 수 있다.

효소첨가에 의한 위장 및 장에서의 단백질 용출에 대한 효과는 다음 Table 3.33에서 보는 바와 같다. 옥수수를 대상으로 단백질 용출을 조사한 결과 total phase에서 코팅 처리한 효소제의 첨가가 대조구에 비해 유의적으로 단백질 용출량을 증가시킬 수 있는 것으로 조사되었다 ( $p < 0.01$ ). 소맥의 경우 코팅하지 않은 효소제 0.10% 및 코팅처리 효소 0.10%에서 대조구에 비해 유의적으로 증가되는 것으로 나타났으며 ( $p < 0.01$ ), 대두박의 경우에도 코팅된 효소 0.10% 첨가에서 대조구에 비해 유의적으로 단백질 용출량이 증가하는 것으로 조사되었다 ( $p < 0.01$ ).

표 3.33. Effect of enzyme on Total protein released from the different feed ingredients subjected to a two-stage in vitro digestion.

Enzyme	Total protein released (mg/ml)			
	Corn	Wheat	Soybean meal (local)	Diet
Gastric phase				
Control	13.82 <sup>b</sup>	11.19 <sup>c</sup>	45.20 <sup>b</sup>	18.96 <sup>c</sup>
Uncoated Enzyme, 0.1%	11.18 <sup>c</sup>	15.62 <sup>a</sup>	36.99 <sup>d</sup>	20.22 <sup>b</sup>
Coated Enzyme, 0.05%	13.69 <sup>b</sup>	11.29 <sup>c</sup>	43.17 <sup>c</sup>	21.96 <sup>a</sup>
Coated Enzyme, 0.10%	15.87 <sup>a</sup>	15.24 <sup>b</sup>	48.61 <sup>a</sup>	22.27 <sup>a</sup>
S.E.	0.138	0.093	0.576	0.166
P value	<0.01	<0.01	<0.01	<0.01
Pancreatic Phase				
Control	1.09 <sup>c</sup>	1.55	10.47	3.85
Uncoated Enzyme, 0.1%	2.00 <sup>b</sup>	1.60	10.83	2.70
Coated Enzyme, 0.05%	2.96 <sup>a</sup>	1.59	10.81	2.41
Coated Enzyme, 0.10%	1.78 <sup>b</sup>	1.65	10.64	3.16
S.E.	0.084	0.111	0.359	0.678
P value	<0.01	0.95	0.88	0.50
Total Phase				
Control	14.91 <sup>c</sup>	12.74 <sup>b</sup>	55.67 <sup>b</sup>	22.80
Uncoated Enzyme, 0.1%	13.18 <sup>d</sup>	17.23 <sup>a</sup>	47.82 <sup>c</sup>	22.92
Coated Enzyme, 0.05%	16.65 <sup>b</sup>	12.88 <sup>b</sup>	53.98 <sup>b</sup>	24.36
Coated Enzyme, 0.10%	17.65 <sup>a</sup>	16.89 <sup>a</sup>	59.25 <sup>a</sup>	25.43
S.E.	0.152	0.148	0.618	0.703
P value	<0.01	<0.01	<0.01	0.08

Means within a column with no common superscript differ significantly ( $P < 0.05$ )

S.E. = Standard error of mean



사양시험에 이용된 자돈사료의 경우 처리간 유의차는 인정되지 않았으나, 효소처리가 단백질의 용출량을 증가시키는 경향이 있는 것으로 나타났다 (p=0.08).

앞서 살펴본 탄수화물의 용출에서 나타난 결과와 마찬가지로 효소의 활성은 소화기를 통과 하면서 거치게 되는 pH 조건의 변화에 따라 큰 변화를 가지게 된다. 효소제는 강산 (HCl) 및 알칼리 (NaHCO<sub>3</sub>) 조건을 소화기 조건에 맞추어 제공함으로써 발생할 수 있는 활성의 저하 또는 구조적 변화에 따른 손실을 감안할 수 있도록 본 과제의 코팅 기술을 접목함으로써 원료에 따라 다소 다를 수는 있으나 total phase 대비 코팅된 효소제를 0.1% 사용하게 되면 단백질의 용출율은 6%~25%까지 개선되어 영양소 특히 단백질의 소화율을 유의적으로 개선시킬 수 있는 기초자료를 제공했다. 이는 단순히 효소의 작용으로 가져올 수 있는 영양소 소화율의 개선만을 목적으로 하는 것이 아니고, 실제 동물의 소화기 내에서 손상 받을 수 있는 조건을 재현함으로써 기본적으로 제공할 수 있는 효소제의 가치를 부여한다는 차원에서 보다 근접한 접근 방식으로 산업에 적용되어야 할 필요성을 설명하는 것이라 할 수 있다.

앞서 *in vitro* 상태에서의 비교를 거쳐 표 3.34에 나타난 바와 같이 사양시험 및 소화율을 검증함으로써 효소제의 코팅에 대한 효과를 살펴보면 다음과 같다.

표 3.34. Total tract digestibility of weaned pigs fed diets supplemented with uncoated or coated enzyme (no common superscript differ significantly (P < 0.05))

	Control	Uncoated-E 0.1%	Coated-E 0.05%	Coated-E 0.10%	S.E.	Pvalue
Dry matter	82.59 <sup>c</sup>	83.13 <sup>bc</sup>	85.31 <sup>ab</sup>	86.38 <sup>a</sup>	0.754	<0.01
Ash	51.19 <sup>b</sup>	51.90 <sup>b</sup>	56.88 <sup>b</sup>	60.67 <sup>a</sup>	1.653	<0.01
Protein	80.20 <sup>b</sup>	80.37 <sup>b</sup>	82.89 <sup>ab</sup>	84.84 <sup>a</sup>	1.055	0.02
Energy	83.07 <sup>b</sup>	83.29 <sup>b</sup>	85.91 <sup>a</sup>	87.15 <sup>a</sup>	0.857	<0.01
Total amino acid, (%)	82.45 <sup>b</sup>	83.36 <sup>b</sup>	85.97 <sup>a</sup>	87.42 <sup>a</sup>	0.874	<0.01
Essential amino acids						
lysine	84.13 <sup>b</sup>	84.44 <sup>b</sup>	86.97 <sup>a</sup>	88.34 <sup>a</sup>	0.833	<0.01
threonine	80.86 <sup>b</sup>	81.58 <sup>b</sup>	84.33 <sup>a</sup>	85.54 <sup>a</sup>	0.859	<0.01
methionine	83.92	83.88	86.25	87.45	0.987	0.06
Isoleusine	78.42 <sup>b</sup>	79.46 <sup>b</sup>	83.20 <sup>a</sup>	84.25 <sup>a</sup>	1.077	<0.01
leusine	80.02 <sup>b</sup>	81.64 <sup>b</sup>	84.54 <sup>a</sup>	86.71 <sup>a</sup>	0.979	<0.01
valine	76.31 <sup>c</sup>	77.71 <sup>bc</sup>	81.06 <sup>ab</sup>	81.56 <sup>a</sup>	1.151	0.01
phenylalanine	81.56 <sup>b</sup>	82.42 <sup>b</sup>	86.06 <sup>a</sup>	87.57 <sup>a</sup>	0.947	<0.01
arginine	91.33 <sup>b</sup>	91.23 <sup>b</sup>	92.85 <sup>a</sup>	93.62 <sup>a</sup>	0.410	<0.01
histidine	85.88 <sup>b</sup>	86.53 <sup>b</sup>	87.96 <sup>ab</sup>	89.36 <sup>a</sup>	0.724	0.02
cystein	75.03	75.07	78.78	78.92	1.341	0.08

표 3.34에 제시된 바와 같이 메치오닌과 시스틴을 제외한 (각각  $p=0.06$  및  $p=0.08$ ) 모든 영양소의 소화율은 효소제를 첨가함으로써 소화율이 유의적으로 개선되었다 ( $p<0.05$ ). 또한 코팅된 효소제를 사용함으로써 앞서 *in vitro* 결과에서 조사된 바와 같이 코팅되지 않은 효소를 첨가했을 때와 비교해 소화율이 개선되어 보다 효율적인 효소의 활성을 제공할 수 있다는 것을 알 수 있다.

다시 말하면, 실제 동물을 이용한 사양시험을 통하여 소화율을 조사한 결과 총당량으로 대표되는 에너지의 소화율 개선을 통해 코팅된 효소가 가지고 있는 탄수화물 분해능력과 단백질 및 아미노산의 소화율 개선으로 표현된 단백질 분해능력이 실제 소화기 내에서 위를 통해 십이지장으로 유입되는 과정에서 거치게 되는 pH의 큰 변화에도 불구하고 높은 소화율을 보여줌으로써 일정한 효과를 가져갈 수 있는 근거를 마련한 것으로 보여진다. 이러한 소화율의 개선은 동물의 성장과 직접적인 연관성을 가지게 되는데 이는 증체량의 개선이나 사료효율 또는 요구율과도 직접적으로 연계되어 나타나게 된다.

표 3.35에는 이전의 *in vitro* 결과가 실제 동물의 소화율로의 반영되고 이러한 개선효과가 동물의 성장에 어떻게 나타났는지를 보여준다. 이유 후 28일간의 사양시험을 통해 자돈의 생산성에 나타난 영향은 효소의 코팅 여부에 따른 유의성은 없었으나 일당증체량, 사료요구율은 효소의 첨가에 따라 유의적으로 개선되었으며 사료섭취량은 크게 영향받지 않는 것으로 조사되었다.

이상으로 *in vitro* 및 *in vivo* 시험을 통해 본과를 통해 개발된 효소 및 효소의 코팅 기술을 통해 소화기 내 강산 및 알칼리 조건하에서도 충분히 보호된 효소제 개발이 이루어 졌으며 이러한 기술개발을 통해 동물의 생산성을 지속적으로 높게 개선함으로써 수익증대에도 영향을 미칠 수 있을 것으로 기대된다.

표 3.35. Performance of weaned pigs fed diets supplemented with uncoated or coated enzyme

	Control	Uncoated-E 0.1%	Coated-E 0.05%	Coated-E 0.10%	S.E.	Pvalue
Daily weight gain, g	347	373 <sup>a</sup>	374 <sup>a</sup>	383 <sup>a</sup>	8.4	0.04
Daily feed intake, g	520	524	515	523	13.1	0.96
Feed conversion	1.50	1.41 <sup>b</sup>	1.38 <sup>b</sup>	1.37 <sup>b</sup>	0.021	<0.01

\* a :  $p < 0.05$ , b :  $p < 0.01$

\* S.E. = Standard error of mean

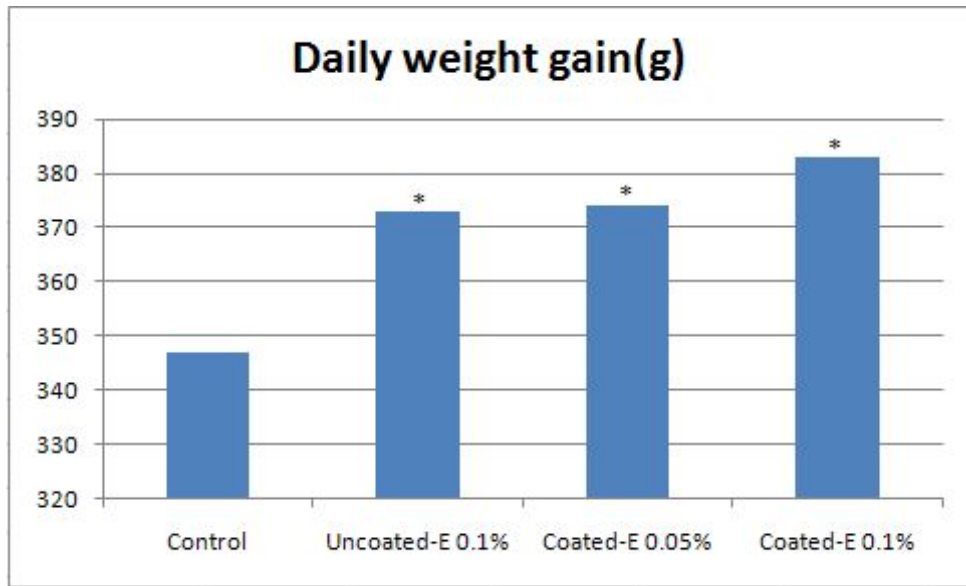


그림 3.40. Effects of uncoated and enteric-coated enzyme on the daily weight gain of pig.  
 (\*:  $p < 0.05$ )

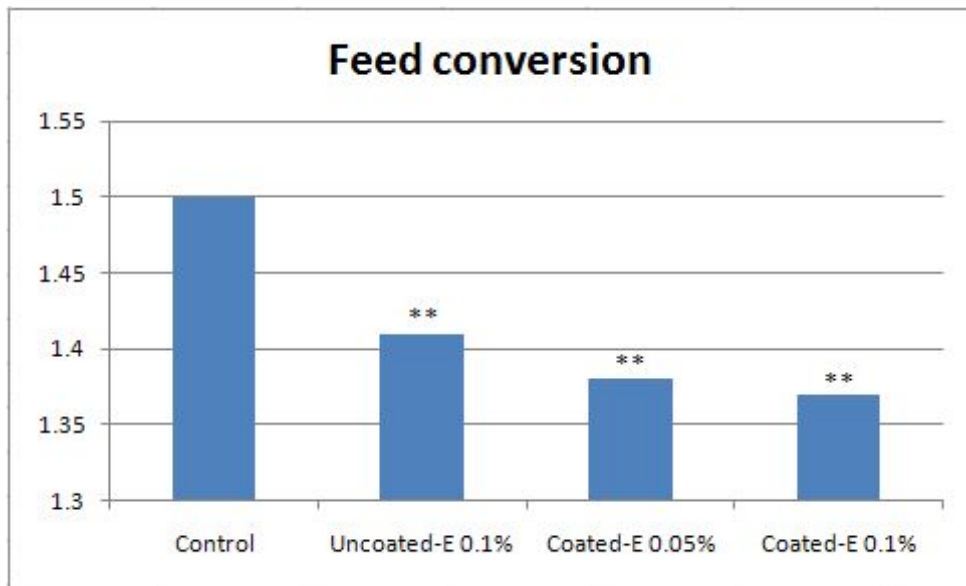


그림 3.41. Effects of uncoated and enteric-coated enzyme on the feed conversion to pig.  
 (\*\*  $p < 0.01$ )

## 제9절 사양시험 결과를 근거로 한 경제성 분석

이유 자돈을 대상으로 한 사양 시험을 통해 확인된 코팅 효소제의 경제성은 다음과 같다.

시험에 사용된 대조군의 경우 사료비가 1,100원/kg이었으며 효소 첨가에 따른 비용은 무코팅 효소제는 사료 kg당 1.5원, 코팅 효소제 0.05% 첨가군은 25원, 코팅 효소제 0.1% 첨가군은 50원의 추가 비용이 소요 되어 전체 사료 섭취량을 기준을 할 때 총 추가 사료비는 각각 22.0, 261 및 732원이었다.

총 사육기간 28일 동안 섭취한 사료량과 증체량을 비교하여 효소첨가에 따른 비용을 확인한 결과 효소를 첨가하지 않은 대조군의 경우 증체 kg 당 사료비는 1,648.4원, 코팅하지 않은 효소제 0.055를 첨가한 구는 1,545.3원, 코팅 효소제 0.05% 첨가군은 1,549.1원 및 코팅 효소제 0.1%를 첨가한 처리군의 경우는 1,570.4원으로 **enzyme**를 첨가한 모든 처리군에서 **장용코팅의 적용여부를 떠나 효소제를 첨가하지 않은 대조군에 비해 이유자돈의 증체에 소요되는 사료비를 절감할 수 있음을 확인할 수 있었다.**

그러나 각 처리군의 사료비 비교에서 코팅하지 않은 효소를 0.05% 첨가한 군과 코팅한 효소제 0.05%를 첨가한 처리군에서는 큰 차이가 없었으나 코팅한 효소제를 0.1% 첨가한 처리군은 다른 두 효소 첨가군에 비해 증체 kg 당 사료비가 약간 높게 나타났는데 이러한 차이는 사육 기간을 단축할 수 있는 잇점이 있기 때문에 추가의 비용이 발생하더라도 적용이 가능한 수준이라 할 수 있겠다. 그러나 초기 예상했던 것보다는 여전히 코팅효소제의 원가가 다소 높은 편이며 향후 보다 저렴한 가격의 코팅제 적용 등을 통한 개선의 여지가 충분한 것으로 판단되어 이를 보완하여 시장에서의 경제성을 보다 향상시킬 수 있을 것으로 기대된다.

표 3.36. 코팅 효소제 첨가에 따른 경제성 분석

항 목	대조군	NC-0.05	C-0.05	C-0.1
개시체중 (kg)	8.47	8.47	8.47	8.47
사육기간 (일)	28	28	28	28
일당증체 (g/d)	0.347	0.373	0.374	0.383
종료체중 (kg)	18.186	18.914	18.942	19.194
1일사료섭취량 (kg/d)	0.52	0.524	0.515	0.523
총사료섭취량 (kg)	14.56	14.672	14.42	14.644
추가비용 (원/사료kg)	-	22.0	361	732
총사료비 (원)	16,016	16,139	16,223	16,841
총 증가 체중(kg)	9.716	10.444	10.472	10.724
증체 kg 당 사료비 (원)	1,648.4	1,545.3	1,549.1	1,570.4

\* NC-0.05 : 무코팅 효소제 0.05% 첨가군

C-0.05, C-0.1 : 코팅 효소제 0.05% 및 0.1% 첨가군

## 제4장 목표달성도 및 관련분야에의 기여도

### 제1절 연구개발목표의 달성도

#### 1. 1차년도

고체발효공정을 이용한 고효율성 장용코팅 효소제 생산시스템 개발로 효소제 평가를 위한 분석방법 확립을 통해 개발 효소제에 맞는 효소활성 평가방법을 확립하였으며, 내산성, 내열성 평가방법 또한 설정하였다. 아울러 고체발효 방법을 이용한 소맥피를 원료로 하여 실험실 조건에서 기초 연구를 통해 최적의 고체발효 공정을 확립하였다.

구분	세부과제명	세부연구목표	달성도(%)	연구개발 수행내용
1차 연도 (2008)	곡물 친화성 고체발효기술을 이용한 고효율성 효소제 생산기술 개발	1. 효소제 평가를 위한 분석방법 확립	100	<ul style="list-style-type: none"> <li>○ 효소제 평가를 위한 방법으로 사료공정서, 약전, 일본관세청 방법을 각각 세팅하여 개발 효소제의 분석을 통해 효소활성 분석에 적합한 분석방법을 확립함.</li> <li>○ 국내 주요 효소제와 개발품을 대상으로 3가지 분석방법을 이용하여 효소활성을 분석을 완료 하였으며, 최적분석방법으로 내산성, 내열성테스트를 통해 장용성 효소제의 우수성을 확인함.</li> </ul>
		2. 고체발효 방법을 이용한 사료원료로서 적용성이 우수한 amylase, protease 생산을 위한 기초연구	100	<ul style="list-style-type: none"> <li>○ 효소활성을 증가시키기 위한 고체발효방법을 이용한 amylase, protease 생산을 위한 최적 고체발효방법을 확립하였으며, 장용성 효소제 제작을 위한 기초샘플로 활용함.</li> </ul>
	지연형 약물방출 시스템을 활용한 장용효소제의 개발	3. 장용효소제에 적합한 내산성, 내열성 평가방법 확립	100	<ul style="list-style-type: none"> <li>○ 내산성이 가장 우수한 pH신속의존성 고분자를 사용한 대조제제의 제조 후 해당 샘플을 사용하여 평가함</li> <li>○ 상기 효소제제를 사용하여 산성조건에서 효소제제 노출 후 이에 적합한 추출법 등을 확립하여 평가함</li> </ul>
		4. 효소 안정성 개선에 적합한 코팅 기제의 스크리닝 및 후보 선정	100	<ul style="list-style-type: none"> <li>○ 내산성이 가장 우수한 pH신속의존성 고분자를 사용한 대조제제의 평가 결과 산성조건에서 효소제가 노출되지 않는 것을 확인함</li> <li>○ pH신속의존성 고분자를 사용한 가능성 평가 및 검토함</li> <li>○ pH-시간 의존성 고분자를 사용한 가능성 평가 및 검토함</li> <li>○ 유동층코팅기와 planetary mixer를 사용한 제조공정 영향 검토</li> </ul>

## 2. 2차년도

2차년도 연구목표는 고체발효공정을 이용한 고효율 장용코팅 효소제 생산시스템 개발로 pilot scale 발효공정 확립을 위해 경제성평가를 통해 단일 및 복합원료의 경제성을 평가하여 최적 원료배지를 선정하였으며, 발효시간, 발효온도, 수분함량기준, pH 등 최적 발효를 위한 연구를 수행하였으며, 개발효소제의 안정성 평가를 통해 최소보관기간 등에 대한 기초연구를 수행하였다.

구분	세부과제명	세부연구내용	달성도(%)	연구범위
2차 년도 (2009)	곡물 친화성 고체발효 기술을 이용한 고효율 효소제 생산기술 개발 (협동과제)	1. 고체발효 공정을 이용한 고효율 효소제 생산방법 개발 (Pilot scale)	100 %	<ul style="list-style-type: none"> <li>○ 고체발효를 통한 amylase, protease 동시 발현을 위한 최적 생산 균주 및 생산조건 규명 연구</li> <li>○ 효소활성 분석법 비교연구 - OD 및 Fluorescence 측정방법에 따른 효소활성 평가</li> <li>○ 고체발효 원료 종류에 따른 효소활성 비교 연구</li> <li>○ 최적원료배지에서의 반복, 재연을 통한 효소활성 검증</li> <li>○ 고체발효물의 장용 코팅을 위한 입자도 균일성 확보 방안 연구</li> </ul>
		2. 개발효소제의 검증	100 %	<ul style="list-style-type: none"> <li>○ 개발 효소제의 보관 조건에서의 안정성 평가</li> <li>○ 개발 효소제의 in vitro 상에서의 주요원료(대두박, 옥수수, 소맥)에 대한 소화율 평가</li> </ul>
	지연형 약물방출 시스템을 활용한 장용효소제의 개발	1. 효소제의 장용코팅을 위한 최적처방 및 생산조건 연구	100 %	<ul style="list-style-type: none"> <li>○ 후보 코팅기제를 사용하여 제조한 장용효소제의 내산성 및 내열성 비교</li> <li>○ 코팅 공정이 효소에 미치는 영향 및 그 요소 확인</li> <li>○ 최적 코팅 공정의 확립</li> <li>○ 코팅효소제의 경제성 평가</li> <li>○ 경제성 평가를 바탕으로 한 내산성, 내열성을 갖는 최종 코팅 조성의 확립</li> </ul>
		2. 장용 코팅효소제의 검증	100 %	<ul style="list-style-type: none"> <li>○ 최종 선정된 코팅기제를 사용한 장용코팅의 정도 및 그 처방이 내산성 및 내열성에 미치는 영향</li> <li>○ 코팅효소제의 활성 평가 및 보관조건에서의 안정성 평가</li> </ul>

### 3. 3차년도

3차년도 연구목표는 장용코팅 효소제 대량생산 시스템 개발 및 개발효소제를 평가하는 것으로 1, 2년차 연구내용을 토대로 최적 대량생산 조건을 확립하고 반복, 재현성검증을 통해 효소 활성 기준 설정을 완료하였다.

구분 (연도)	세부과제명	세부연구내용	달성도(%)	연구범위
3차 년도 (2010)	곡물 친화성 고체발효 기술을 이용한 고효율 효소제 생산기술 개발 (협동과제)	1. 고체발효 고효율 효소제의 대량생산 시스템 개발	100%	○ 대량생산 시스템에서의 최적 발효조건 설정 완료 ○ 대량생산을 통한 효소활성 반복/재현성 검증 완료
		2. 고체발효 고효율 효소제의 안정성 평가	100%	○ 개발제품의 보관조건에서의 안정성 평가결과 양호함
	지연형 약물방출 시스템을 활용한 장용효소제의 개발	1. 효소제의 장용코팅을 위한 최적처방 및 대량생산 시스템 개발	100%	○ 사양시험을 위한 장용효소제를 생산하고 이의 품질평가를 마친 후 사양시험을 진행함 ○ 장용코팅효소제의 대량생산을 위한 생산조건을 확립하고 이를 확인하기 위하여 pilot scale에서 3 batch를 제조하여 생산공정의 재현성을 확보함 ○ 사양시험결과와 장용효소제의 제조원가 등을 종합하여 제품의 경제성을 평가함
		2. 장용 코팅 효소제의 안정성 평가	100%	○ 최종 개발제품의 품질을 관리하기 위한 시험항목 및 기준 확정함 ○ pilot scale로 제조된 3 batch를 사용하여 설정된 제품의 품질기준 및 시험방법에 따라 시험한 결과 모두 적합함. ○ 최종 제품의 가속조건 (40도/75%RH, 4주간) 및 보관조건 (23도/60%RH, 06개월간)에서의 제품의 안정성을 평가한 결과 양호한 결과를 나타냄
	이유자돈에 대한 코팅효소제의 사료영양소 이용률 평가 (위탁과제)	1. 소화율 및 사양시험을 통한 장용효소제의 평가	100%	○ 효소제 사용에 따른 총당의 용출량을 <i>in vitro</i> 소화율 분석을 통해 확인한 결과 유의적 증가되었으며, 장용코팅 효소제의 효과가 더욱 명확히 나타남. ○ 이유 후 28일간의 사양시험 및 소화율 검증을 통한 모든 영양소의 소화율은 효소제를 첨가함으로써 유의적으로 개선되었으며 장용코팅 효소제의 효과가 더욱 우수함. ○ 사양시험을 통해 자돈의 생산성에 나타난 영향은 효소의 코팅 여부에 따른 유의성은 없었으나 일당증체량, 사료요구율은 코팅효소의 첨가에 따라 더욱 개선되었으며 사료섭취량은 크게 영향받지 않는 것으로 나타남.

## 제2절 관련분야에의 기여도

### 1. 기술적 측면

현재 대부분 수입 판매되는 동물용 효소제는 코팅기술의 적용이 되어 있지 않으며, 효소제의 안정성 즉, 내산성, 내열성을 전혀 확보하지 못하고 있는 실정이다. 아울러 효소제 자체의 효소 활성이 대부분 SmF를 통해 생산한 것으로 고상발효를 통해 생산한 효소에 비해 그 활성이 현저히 낮은 수준에 머물고 있다. 따라서 현재 대부분을 수입에 의존하는 효소제 시장에서 국산 기술의 개발을 통해 충분히 수입대체 효과를 가져 올 수 있으며, 효소제 생산의 새로운 방향을 제시할 수 있을 것이다.

또한 고체발효 효소제의 사용을 통해 단위가축 등 사양에서 영양소 이용효율을 증대하였으며 이를 장용코팅하여 사용하는 경우, 효소제를 그대로 사용하는 경우보다 상대적으로 가축의 성장에 보다 효율적인 사료 급여임이 확인됨으로써 효율적인 사료 급여 방법을 제시하였다.

한편, 본 과제를 통해 사료산업에 활용되지 않던 의약품 제조기술을 직접 활용하여 이를 고체발효 효소제에 접목함으로써 새로운 효소제 제품 및 개념을 도입하였으며 의약품 제조기술과 사료산업간의 융합을 통해 기존 제품보다 신개념의 제품개발을 촉진할 수 있는 기반을 마련하였다.

세부적으로는 장용코팅 효소제에 대한 평가기준을 확립함으로써 그동안 효과가 구체적으로 검증되지 않은 고가의 수입효소제에 대하여 새로운 개념의 평가방법을 제시할 수 있게 되었다.

### 2. 경제적 측면

의약품 제조기술과 사료산업간의 융합을 통한 신개념의 제품개발과 함께 이로 인한 신규 시장창출을 유도할 수 있는 기반을 마련하였으며 이로 인해 고가 수입효소제 대체 효과도 충분히 기대할 수 있다.

아울러 확립된 코팅기술을 여러 효소활성을 가진 복합효소제에 접목함으로써 고가의 원료 사용량 절감 및 신규시장 창출을 통한 매출 증대 등 다양한 이점이 있을 것으로 기대된다.

한편, 본 과제를 통해 비용-효과 측면에서 경제적인 동물용 효소제를 생산하였고, 개솔개발을 지속적으로 추진하여 추후 인체용 효소제 시장도 접근이 가능할 것으로 생각된다.

### 3. 환경적 측면

단위가축 등 사양에서 영양소 이용효율의 증대를 통한 효율적인 사료 급여 및 축산부산물 감소 등 환경적인 측면에서도 개선효과가 있을 것으로 기대된다.



## 제5장 연구개발 성과 및 성과활용 계획

### 제1절 연구개발성과

#### 1. 연구성과 목표

(단위 : 건수)

구분	특허		신품종				유전자원 등록	논문		기타 (포스터)
	출원	등록	품종명 명칭등록	품종생산 수입판매 신고	품종보호			SCI	비SCI	
					출원	등록				
1차년도	목표	-	-	-	-	-	4	-	-	-
	달성	-	-	-	-	-	5	-	-	-
2차년도	목표						2			0
	달성						2			2
3차년도	목표	1						1	1	
	달성	1						1	1	
계	목표	1					6	1	1	0
	달성	1					7	1	1	2

\* 연차별 연구성과 목표는 향후 연차평가 등의 정량적 평가지표로 활용됨

#### 1) 논문게재

가. 한국미생물생명공학회 (투고예정) - 고체발효 고활성 효소제 및 장용코팅효소제의 개발 내용으로 현재 작성 중임

나. SCI (투고예정) - 사양시험결과를 종합하여 현재 작성 중임

#### 2) 학회발표

가. 조경진, 이문석, 류정진, 박준상, 조원탁, 강정선. 2010. 장용효소제의 개발. 2010 사단법인 한국동물자원과학회 proceeding, 포스터 발표 - 비만추영양-Proceedings Vol. II. PF10077, P212. (6. 24.~6. 25, 진주산업대학교)

#### 3) 특허 성과

##### 가. 기술특허

특허명 : 지연형 약물방출 시스템을 활용한 장용효소제의 제조방법

출원일 : 출원진행 중 (변리사 검토 중, 2011년 7월 예정)

출원인 : (주)진바이오텍, 지엘팜텍(주)

출원국 : 대한민국

나. 유전자원등록 (7건)

- ① *Aspergillus niger* N2 (KCCM 11075P)
- ② *Aspergillus oryzae* S1 (KCCM 11076P)
- ③ *Aspergillus oryzae* L1 (KCCM 11077P)
- ④ *Aspergillus oryzae* GB N1 (KCCM 11125P)
- ⑤ *Bacillus subtilis* S12 (KCCM 11001P)
- ⑥ *Bacillus subtilis* S13 (KCCM 11002P)
- ⑦ *Bacillus subtilis* S14 (KCCM 11003P)

2. 연구성과 활용 목표

(단위 : 건수)

구분		기술실시(이전)	상품화	정책자료	교육지도	언론홍보	기타
활용건수	목표	3	1	-	-	1	
	달성	3	1	-	-	1	

1) 기술실시(이전)

- 가. 고체발효기술의 제품화 : 고체발효기술로 개발한 효소제 발매 - 제품명 : 에너밴스
- 나. 장용코팅기술의 실시 : 본 과제에서 활용된 장용코팅 기술을 기초로 하여 지엘팜텍 (주)는 우울증 치료제를 함유하는 의약품의 개발에 적용하였으며 이를 국내제약회사에 기술이전하여 제품발매 진행 중임
- 다. 펠렛코팅기술의 실시 : 본 과제에서 활용된 펠렛코팅기술을 기초로 하여 지엘팜텍 (주)는 알쯔하이머 증상 치료제를 함유하는 의약품을 개발하는 데 적용하였으며 이를 국내제약회사에 기술이전하여 생산 중임.

2) 상품화

사업화명	사업화내용	업체명	판매개시일	매출액
효소제개발	신제품 출시	(주)진바이오텍	2010년 1월	94,500천원

3) 홍보

- 가. 제품홍보 - 에너밴스
  - Conference : World Pork Expo. 2011
  - 장 소 : Iowa State Fairgrounds, Iowa, USA
  - 일 시 : 2011. 6. 8. ~ 6. 10.

3. 인력양성 : 없음.

## 제2절 추가 활용계획

1. 제품화 : 본 과제수행을 통해 협동기관인 (주)진바이오텍에서는 효소제 신제품을 출시하여 매출이 발생되었으며(2010년 1월), 추가적인 연구를 통해 본 과제수행 결과를 바탕으로 다양한 효소활성도 같이 가지는 효소제 개발을 추진 할 예정입니다.
  - 양돈, 양계용 신제품(코팅효소제) 출시 예정(2012년 목표).
  - 본 연구 과제를 통해 개발된 제품은 기존 수입에 의존하거나 효과가 불투명한 고가의 수입효소제 제품을 효율적으로 대체가 가능할 것으로 예상됨.
  
2. 기술 활용 : 본 과제 수행과정에서 수행된 핵심기술인 고효성 효소제 생산기술 및 장용성 코팅기술을 타 제품 개발에 응용 예정입니다
  - 유산균 외 미생물의 장용성 코팅활용 등 미생물 코팅을 통한 신규 제제 개발

## 제6장 연구개발과정에서 수집한 해외과학기술정보

효소 사용은 제약, 음식, 펄프와 섬유산업에서 현저하게 증가하고 있다. 동물산업에서는 농업 부산물을 부분적으로 분해하고자 depolymerizing enzyme을 첨가제로서 사용하고 있다 (Roopesh et al., 2006; Pandey et al., 2000). 효소를 생산하는데 있어서 SSF(고체발효)는 미생물 배양 배지로서 농업과 농공산업의 부산물을 이용할 수 있는 큰 장점을 가지고 있다(Couto and Sanroman, 2006; Panagiotou et al., 2003; Pandey, 2003; Pandey et al., 2000b; Hesseltine, 1972). 특히 여러 효소제 중 pectinase(Martins et al., 2002), cellulases와 xylanases (Carmona et al., 2005; Kang et al., 2004; Kalogeris et al., 2003), amylases, ligninases (Couto and Sanroman, 2005), inulinases (Mazutti et al., 2006), chitinases (Binod et al., 2005), 그리고 phytases(Roopesh et al., 2006; Chantasartrasamee et al., 2005; Papagianni et al., 1999)등은 특정 곡물배지에서의 높은 효소활성을 나타내어 효소제 생산을 위한 고체발효 기술의 개발이 활발히 진행되고 있다. 그 밖에도 저렴한 농업 부산물을 기질로 이용하는 특정 배양조건에서 효소를 생산할 수 있는 lignicellulose-decomposing microorganisms를 분리하여 이용한 사례가 있어(Hsieh and Yang, 2004) 효소제 생산을 위한 고체발효 기술의 접목 사례는 더욱 늘어날 것이다.

표 6.1은 동물사료에 적용할 수 있는 고체발효 효소의 종류와 생산 균주들을 나타내었다. 동물 사료에 적용하기 위해서는 효소제의 가격이 저렴해야 첨가제로서 사용이 가능하기에 고체발효를 위한 배지의 가격은 중요한 고려 대상이다. 효소 생산을 위한 고체발효용 배지는 최종 생산 가격이 결정되기 때문에 저렴한 기질을 선택해야 한다. *Penicillium restrictum*을 이용하여 SSF와 SMF(액상발효) 방식으로 lipase를 생산하였을 때의 비용은 경제적으로 분석하였을 때 SMF가 SSF 방식보다 약 78% 높은 생산 투자비용이 소요되었으며 최종 제품의 가격으로 는 SSF 제품이 47% 낮았다. 그리고 5년 이내에 SSF 투자비용의 67%를 환수할 수 있어 기술 개발투자는 더욱 늘어날 전망이다(Castilho et al., 2000).

표 6.1. 고체발효 효소의 종류 및 활용미생물

Substrate	Microorganism(s)	Enzyme(s)	Author(s)/year
Rice straw	<i>Trichoderma reesei</i>	Cellulase Hemicellulase	Eun et al. (2006)
	<i>Bacillus licheniformis</i>	Protease	
Barley	<i>Talaromyces emersonii</i>	Endo- $\beta$ -glucanase	McCarthy et al. (2005)
Corn silage	<i>Thermoascus aurantiacus</i>	Xylanase	Colombatto et al.(2004b)

Corn stalk	<i>Fusarium oxysporum</i>	Endoglucanase Celobiohydrolase $\beta$ -Glucosidase Xylanase $\beta$ -Xylosidase	Panagiotou et al. (2003)
Corn straw	<i>Penicillium decumbens</i>	CMCase $\beta$ -Glucosidase Xylanase	Yang et al. (2001)
Alfalfa	<i>Gliocladium</i> spp.	Cellulase, xylanase	Schimidt et al. (2001)
	<i>Orpinomyces joyonii</i>	Endoglucanase	Hodrova et al. (1998)
	<i>Caecomycetes communis</i>	$\beta$ -Glucosidase	
Forage silage	<i>Streptomyces</i>	Cellulase, hemicellulase	Hill et al. (2001)
	<i>Achromogenes</i>		
Wheat straw	<i>Neurospora crassa</i>	Cellulase	Romero et al. (1999)
	Several fungi	Cellulase, hemicellulase	Peiji et al.(1997)
		Lignin peroxidase	
Sugarcane bagasse	<i>Trichoderma reesei</i>	Cellulase	Kansoh et al. (1999)
	<i>Phanerochaete chrysosporium</i>	Ligninase	El-Gammal et al. (1998)
	<i>Coriolus versicolor</i>		
	<i>Streptomyces viridosporus</i>		
	White rot fungi	Ligninase	Zadrazil and Puniya (1995)
Sugarcane bagasse, wheat straw, corn cobs, rice husks, peanut shells, etc.	<i>Phanerochaete chrysosporium</i>	Cellulase, xylanase	El-Nasser et al. (1997)
Soy husks	<i>Coriolus versicolor</i>	Glucanase	Jha et al. (1995)
		Cellulase	

## 제7장 참고문헌

Association of Official Analytical Chemists. Official Methods of Analysis, 15th ed., AOAC, Washington, D.C., USA.1990.

Bedford, M. R. and Classen, H. L. 1993. An In Vitro Assay for Prediction of Broiler Intestinal Viscosity and Growth When Fed Rye-Based Diets in the Present of Exogenous Enzyme. Poultry Science 72:137-143

Binod, P., Pusztahelyi, T., Nagy, V., Sandhya, C., Szakács, G., Pócsi, I., Pandey, A., 2005. Production and purification of extracellular chitinases from *Penicillium aculeatum* NRRL 2129 under solid-state fermentation. Enzyme Microb. Technol. 36, 880 - 887.

Carmona, E.C., Fialho, M.B., Buchgnani, E.B., Coelho, G.D., Brocheto-Braga, M.R., Jorge, J.A., 2005. Production, purification and characterization of a minor form of xylanase from *Aspergillus versicolor*. Process Biochem. 40, 359 - 364.

Castilho, L.R., Polato, C.M.S., Baruque, E.A., Santa' nna Jr., G.L., Freira, D.M.G., 2000. Economic analysis of lipase production by *Penicillium restrictum* in solid state fermentation and submerged fermentations. Biochem. Eng. J. 4, 239 - 247.

Chantasartrasamee, K., Israngkul, D., Intarareugsorn, A.S., Dharmsthiti, S., 2005. Phytase activity from *Aspergillus oryzae* AK9 cultivated on solid state soybean meal medium. Process Biochem. 40, 2285 - 2289.

Colombatto, D., Mould, F.L., Bhat, M.K., Morgavi, D.P., Beauchemin, K.A., Owen, E., 2003. Influence of fibrolytic enzymes on the hydrolysis and fermentation of pure cellulose and xylan by mixed ruminal microorganisms in vitro. J. Anim. Sci. 81, 1040 - 1050.

Couto, S.R., Sanroman, M.A., 2005. Application of solid-state fermentation to ligninolytic enzyme production –review. Biochem. Eng. J. 22, 211 - 219.

Couto, S.R., Sanroman, M.A., 2006. Application of solid-state fermentation to food industry –a review. J. Food Eng. 76, 291 - 302.

Dubois, M., K. A. Gilles, J. K. Hamilton, P. A. Rebers, and F. Smith, 1956. Colorimetric method for determination of sugars and related substances. *Anal. Biochem.* 28:350

El-Gammal, A.A., Kamel, Z., Adeeb, Z., Helmy, S.M., 1998. Biodegradation of lignocellulosic substances and production of sugars and lignin degradation intermediates by four selected microbial strains. *Polym. Degrad. Stabil.* 61, 535 - 542.

El-Nasser, N.H.A., Helmy, S.M., El-Gammal, A.A., 1997. Formation of enzymes by biodegradation of agricultural wastes with rot fungi. *Polym. Degrad. Stabil.* 55, 249 - 253.

Eun, J.S., Beauchemin, K.A., Hong, S.H., Bauer, M.W., 2006. Exogenous enzymes added to untreated or ammoniated rice straw: effects on in vitro fermentation characteristics and degradability. *Anim. Feed Sci. Technol.* 131, 87 - 102.

Fenton, T. W. and M. Fenton. 1979. An improved procedure for the determination of chromic oxide in feed and faeces. *Can. J. Anim. Sci.* 59. 631-634

Frazer, J. R., M. B. Bravo, and D. C. Holmes, 1956. The proximate analysis of wheat flour carbohydrate. I -methods and scheme of analysis. *J. Sci. Food. Agric.* 7:577-589

Han, I. K. and T. S. Min. 1991. The effects of dietary supplementation with kemzyme in broilers. *Kor. J. Anim. Ntir. Feed.* 15(1). 9.

Hesselman, K. and P. Aman. 1986. The effect of B-glucanase on the utilization of starch and nitrogen by broiler chickens fed on barley of high or low viscosity. *Anim. Feed Sci. Tech.* 15, 83.

Hesseltine, C.W., 1972. Solid state fermentations. *Biotechnol. Bioeng.* 14, 517 - 532.

Hill, J., Xiao, G.Q., Ball, A.S., 2001. Effect of inoculation of herbage prior to ensiling with *Streptomyces achromogenes* ISP 5028 on chemical composition of silage. *Anim. Feed Sci. Technol.* 89, 83 - 96.

Hodrova, B., Kopečna, J., Kas, J., 1998. Cellulolytic enzymes of rumen anaerobic fungi *Orpinomyces joyonii* and *Caecomyces communis*. *Res. Microbiol.* 149, 417 - 427.

Hsieh, C., Yang, F.C., 2004. Reusing soy residue for the solid-state fermentation of

*Ganoderma lucidum*. Bioresour. Technol. 91, 105 - 109.

Jha, K., Khare, S.K., Gandhi, A.P., 1995. Solid-state fermentation of soy hull for the production of cellulase. Bioresour. Technol. 54, 321 - 322 (Short communication).

Kalogeris, E., Christakopoulos, P., Katapodis, P., Alexiou, A., Vlachou, S., Kekos, D., Macris, B.J., 2003. Production and characterization of cellulolytic enzymes from the thermophilic fungus *Thermoascus aurantiacus* under solid state cultivation of agricultural wastes. Process Biochem. 38, 1099 - 1104.

Kang, S.W., Park, Y.S., Lee, J.S., Hong, S.I., Kim, S.W., 2004. Production of cellulose and hemicellulases by *Aspergillus niger* KK2 from lignocellulosic biomass. Bioresour. Technol. 91, 153 - 156.

Kansoh, A.L., Essam, S.A., Zeinat, A.N., 1999. Biodegradation and utilization of bagasse with *Trichoderma reesii*. Polym. Degrad. Stabil. 63, 273 - 278.

Lowery, O.H., N.J. Rosebrouge, A.L. Farr and R.J. Randall. 1951. Protein measurement with the Folin Phenol Reagent. J. Bio. Chem.

Malathi, V. and G. Devegowda. 2001. In Vitro Evaluation of Nonstarch Polysaccharide Digestibility of Feed Ingredients by Enzyme. Poultry Sci. 80, 302-305

Martins, E.S., Silva, D., Da Silva, R., Gomes, E., 2002. Solid state production of thermostable pectinases from thermophilic *Thermoascus aurantiacus*. Process Biochem. 37, 949 - 954.

Mazutti, M., Bender, J.P., Treichel, H., Di Luccio, M., 2006. Optimization of inulinase production by solid-state fermentation using sugarcane bagasse as substrate. Enzyme Microb. Technol. 39, 56 - 59.

McCarthy, T., Hanniffy, O., Lalor, E., Savage, A.V., Tuohy, M.G., 2005. Evaluation of three thermostable fungal endo- $\beta$ -glucanases from *Talaromyces emersonii* for brewing and food applications. Process Biochem. 40, 1741 - 1748.

Noh, S. H., C. H. Lee., Y. J. Choi and In. K. Han. 1994. Effect of antibiotics, enzyme,



Yeast, probiotics and B-agonist on the growth performance and nutrient availability in broilers. Kor, J. Anim. Sci. 36(5), 630.

Panagiotou, G., Kekos, D., Macris, B.J., Christakopoulos, P., 2003. Production of cellulolytic and xylanolytic enzymes by *Fusarium oxysporum* grown on corn stover in solid state fermentation. Ind. Crop. Prod. 18, 37 - 45.

Pandey, A., 2003. Solid-state fermentation. Biochem. Eng. J. 13, 81 - 84.

Pandey, A., Soccol, C.R., Mitchell, D., 2000. New developments in solid state fermentation. I. Bioprocesses and products. Process Biochem. 35, 1153 - 1169

Papagianni, M., Nokes, S.E., Filer, K., 1999. Production of phytase by *Aspergillus niger* in submerged and solidstate fermentation. Process Biochem. 35, 397 - 402.

Panagiotou, G., Kekos, D., Macris, B.J., Christakopoulos, P., 2003. Production of cellulolytic and xylanolytic enzymes by *Fusarium oxysporum* grown on corn stover in solid state fermentation. Ind. Crop. Prod. 18, 37 - 45.

Piao, X. S., In K. Han, J. H. Kim, W. T. Cho, Y. H. Kim and Chao Liang. 1999. Effects of kemzyme, phytase and yeast supplementation on the growth performance and pollution reduction of broiler chicks. Asian-Aust. J. Anij. Sci. 12(1). 36-41.

Prabucki AL, Rennerova L, Vogtmann H, Wenk C, Schuerch A. 1975. Die Verwendung von 4-N HCL-unloeslicher Asche als Indikator zur Bestimmung der Verdaulichkeit. Institut fuer Tierernaehrung, ETH Zuerich. Misc.Pap.Landbouwhoges. Weningen. 11, 113-114.

Romero, M.D., Aguado, J., Gonzalez, L., Ladero, M., 1999. Cellulase production by *Neurospora crassa* on wheat straw. Enzyme Microb. Technol. 25, 244 - 250.

Roopesh, K., Sumitra Ramachandran, K., Nampoothiri, M., Szakacs, G., Pandey, A., 2006. Comparison of phytase production on wheat bran and oilcakes in solid-state fermentation by *Mucor racemosus*. Bioresour. Technol. 97, 506 - 511.

Sadasivam, S., and G. Annison, 1996. Biochemical Method. 2nd ed. New Age International Publishers, New Delhi, India.

Schmidt, J., Szakaacs, G., Cenkvari, E., Sipocz, J., Urbanszki, K., Tengerdy, R.P., 2001. Enzyme assisted ensiling of alfalfa with enzymes by solid substrate fermentation. *Bioresour. Technol.* 76, 207 - 212.

Schneider, B. H. and W.P. Flatt. 1975. *The Evaluation of Feeds Through Digestibility Experiments.* University of Georgia Press, Athens, Georgia, 423

Snedecor, G. W. and W.G. Cochran. 1989. *Statistical Methods.* 7th ed. The Iowa State University Press. Ames, Iowa.

Statistix, 1996. *Statistix for Windows, User's Manual.* Analytical Software. Tallahassee, Fl.

Yang, X., Chen, H., Gao, H., Li, Z., 2001. Bioconversion of corn straw by coupling ensiling and solid-state fermentation. *Bioresour. Technol.* 78, 277 - 280.

Zadrazil, F., Puniya, A.K., 1995. Studies on the effect of particle size on solid-state fermentation of sugarcane bagasse into animal feed using white-rot fungi. *Bioresour. Technol.* 54, 85 - 87 (Short communication).

Thoma. K., Bechtold K. 1999. Influence of aqueous coatings on the stability of enteric coated pellets and tablets. *Eur J Pharm Biopharm.* 47(1), 39-50

Ahmed K. A., Emilio S. 2002. Formulation of enterosoluble microparticles for an acid labile protein. *J Pharm. Pharm. Sci.* 5(3), 234-244.

ICH Guideline for residual Solvents, Step 4 Draft, Q3C, 1997.

Chang, R. K. 1990. A comparison of rheological and enteric properties among organic solutions, ammonium salt aqueous solutions, and latex systems of some enteric polymer, *Pharm. Technol. Int.* 2, 82-90.

Davis, M.B. 1986. Preparation and stability of aqueous-based enteric polymer dispersions, *Drug Dev. Ind. Pharm.* 17, 2439-2455.

Schmidt, P.C. Niemann, F. 1992. Comparison of acid resistance of enteric-coated bisacodyl pellets coated with different polymers. *Drug Dev. Ind. Pharm.* 18, 1969-1979.

식품의약품안전청 고시 제2004-66호, 의약품등 표준제조기준

Opekun, A. R. Sutton, F. M. Graham, D. Y. 1997. Lack of dose-response with pancrease MT for the treatment of exocrine pancreatic insufficiency in adults. *Aliment Pharmacol. Ther.* 11(5), 981-986.

Delhaye M, Meuris S, Gohimont AC, Buedts K, Cremer M. 1996. Comparative evaluation of a high lipase pancreatic enzyme preparation and a standard pancreatic supplement for treating exocrine pancreatic insufficiency in chronic pancreatitis. *Eur. J. Gastroenterol. Hepatol.* 8(7), 699-703.

Ferrone M, Raimondo M, Scolapio JS, 2007. Pancreatic enzyme pharmacotherapy. *Pharmacotherapy.* 27(6), 910-920.

Lancellotti L, Cabrini G, Zanolla L, Mastella G. 1996. High- versus Low-lipase acid-resistant enzyme preparations in cystic fibrosis: a crossover randomized clinical trial. *J. Pediatr. Gastroenterol. Nutr.* 22(1), 73-78.

United States Pharmacopoeia, 30th Ed. Pancrelipase.

Raymon. C. Rowe, Paul. J. Sheskey, Marian E. Quinn, 2009. *Handbook of Pharmaceutical Excipients.* 6th Ed. Pharmaceutical Press. 333-336.

FDA Internet homepage, CREON<sup>®</sup> Label information, Solvay Pharmaceuticals.

Layer P, Keller J, Lankisch PG, 2001. Pancreatic enzyme replacement therapy. *Curr. Gastroenterol Rep.* 3(2), 101-108.