

120053
-02

축산부산물을 활용한 고부가가치 제품 개발

2021

농림축산식품부
농림식품기술기획평가원

보안 과제(), 일반 과제(O) / 공개(O), 비공개()발간등록번호(O)
유용농생명자원산업화기술개발사업 2021년도 최종보고서

발간등록번호

11-1543000-003881-01

축산부산물을 활용한 고부가가치 제품 개발

2022. 03. 22.

주관연구기관 / (주)아미노랩
협동연구기관 / 한국생명공학연구원
협동연구기관 / 충남대학교 산학협력단

농림축산식품부
(전문기관)농림식품기술기획평가원

제출문

제 출 문

농림축산식품부 장관 귀하

본 보고서를 “축산부산물을 활용한 고부가가치 제품 개발 - 동물혈액 단백질 효소분해 및 정제기술을 기반으로한 천연 미생물·동물세포 배양소재 및 운동수행능이 우수한 소재의 개발” (개발기간 : 2020. 04. ~ 2021. 12.)과제의 최종보고서로 제출합니다.

2022. 03. 22.

주관연구기관명 : (주)아미노랩

협동연구기관명 : 한국생명공학연구원

협동연구기관명 : 충남대학교 산학협력단

박해성

김장성

정종율

주관연구책임자 : 박해성

협동연구책임자 : 김성훈

참여기관책임자 : 정혜광



국가연구개발사업의 관리 등에 관한 규정 제18조에 따라 보고서 열람에 동의합니다.

최종보고서

						보안등급					
						일반[√], 보안[]					
중앙행정기관명	농림축산식품부			사업명		일반사업					
전문기관명 (해당 시 작성)	농림식품기술기획평가원			사업명 내역사업명 (해당 시 작성)		유용농생명자원산업호 기술개발(R&D)					
공고번호				총괄연구개발 식별번호 (해당 시 작성)		120053-02					
					연구개발과제번호		120053-02				
기술분류	국가과학기술 표준분류	LA09	50%	LB06	30%	LA08	20%				
	농림식품과학기술분류	CA0105	100%								
총괄연구개발명 (해당 시 작성)	국문	축산부산물을 활용한 고부가가치 제품 개발 - 동물혈액 단백질 효소분해 및 정제기술을 기반으로한 천연 미생물·동물세포 배양소재 및 운동수행능이 우수한 소재의 개발									
		영문	Development of high value-added products using livestock by-products								
연구개발과제명	국문										
		영문									
주관연구개발기관	기관명	주식회사 아이노랩		사업자등록번호		144-81-13968					
	주소	(우) 27698 충청북도 음성군 음성읍 한불로 69번길 12-5		법인등록번호		131111-0343598					
연구책임자	성명		박해성		직위		대표이사				
	연락처	직장전화	02-2038-4452		휴대전화						
		전자우편			국가연구자번호		11361152				
연구개발기간	전체		2020. 04. 29. - 2021. 12. 31(1년 9개월)								
연구개발비 (단위: 천원)	정부지원		기관부담		그 외 기관 등의 지원금				연구개발비 외 지원금		
	연구개발비		연구개발비		지방자치단체		기타()			합계	
		현금		현금		현금		현금		현금	
총계		528,000	17,601	158,400				545,601	158,400	704,001	
1단계	1년차	226,000	7,534	67,800				233,534	67,800	301,334	
	2년차	302,000	10,067	90,600				312,067	90,600	402,667	
공동연구개발기관 등 (해당 시 작성)		기관명	책임자	직위	휴대전화	전자우편	비고				
공동연구개발기관		한국생명공학연구원	김성훈	책임연구원			공동	정부출연연			
		충남대학교 산학협력단	정해광	교수			공동	대학			
연구개발담당자 실무담당자		성명		김기우		직위		부대표			
		연락처	직장전화	02-2038-4452		휴대전화					
			전자우편			국가연구자번호		11361156			

이 최종보고서에 기재된 내용이 사실임을 확인하며, 만약 사실이 아닌 경우 관련 법령 및 규정에 따라 제재처분 등의 불이익도 감수하겠습니다.

2022년 2월 11일

연구책임자: 박해성 (인)

주관연구개발기관의 장: 박해성 (인)

공동연구개발기관의 장: 김장식 (인)

공동연구개발기관의 장: 정종윤 (인)

농림축산식품부장관·농림식품기술기획평가원장 귀하

< 요약 문 >

사업명	농림축산식품부	총괄연구개발 식별번호 (해당 시 작성)	120053-02				
내역사업명 (해당 시 작성)	농림식품기술기획평가원	연구개발과제번호	120053-02				
기술분류	국가과학기술 표준분류	LA09	50%	LB06	30%	LA08	20%
	농림식품 과학기술분류	CA0105	100%				
총괄연구개발명 (해당 시 작성)	축산부산물을 활용한 고부가가치 제품 개발 - 동물혈액 단백질 효소분해 및 정제기술을 기반으로 한 천연 미생물·동물세포 배양소재 및 운동수행능이 우수한 소재의 개발						
연구개발과제명	축산부산물을 활용한 고부가가치 제품 개발 - 동물혈액 단백질 효소분해 및 정제기술을 기반으로 한 천연 미생물·동물세포 배양소재 및 운동수행능이 우수한 소재의 개발						
전체 연구개발기간	2020. 04. 29. - 2021. 12. 31(1년 9개월)						
총 연구개발비	총 704,001 천원 (정부지원연구개발비: 528,000 천원, 기관부담연구개발비: 176,001 천원)						
연구개발단계	기초[] 응용[] 개발[<input checked="" type="checkbox"/>] 기타(위 3가지에 해당되지 않는 경우)[]	기술성숙도 (해당 시 기재)		착수시점 기준(5) 종료시점 목표(8)			
연구개발과제 유형 (해당 시 작성)							
연구개발과제 특성 (해당 시 작성)							
연구개발 목표 및 내용	최종 목표	축산부산물인 동물혈액 단백질 효소분해 및 정제기술을 기반으로 한 천연미생물 배양소재 및 운동수행능이 우수한 소재의 개발로써, 주관연구기관인 주식회사 아미노랩은 동물혈액의 단백질 효소분해 및 정제기술을 제공하고, 협동1연구기관은 동물혈액의 단백질 효소분해물을 활용한 고부가 미생물·동물세포 배양 배지소재 개발하며, 협동2연구기관은 동물혈액 단백질 효소분해물로 제조된 최종 기능성 조성물(시제품)의 운동수행능력을 평가하는데 목적을 가짐.					
	전체 내용	<p>(1차년도)</p> <p>1) 주관연구기관_주식회사 아미노랩</p> <ul style="list-style-type: none"> - 미생물배양이 적합하고, 운동수행능이 우수한 동물혈액의 단백질 효소분해 기술확립 • 응고혈의 전처리 공정확립 • 효소발효분해 공정확립 • 전처리공정 및 효소분해공정의 아미노산 분석 의뢰 (공인인증기관) • 협동1기관과 협동2기관에 공정별 동물혈액물을 제공 • 협동1기관과 협동2기관에 최종 단백질 분해된 동물혈액물을 제공 <p>2) 협동1기관_한국생명공학연구원</p> <ul style="list-style-type: none"> - 동물혈액의 단백질 효소분해물을 활용한 미생물 및 동물배양 배지 개발을 위한 성분 분석 • 효소 혈액 단백질 가수산물의 단백질함량, 당성분, 당단백질, 무기물 함량 정량 분석 • 효소가수분해 동물혈액 중의 항생제 및 기타 미생물 성장 저해 성분 분석 • 미생물 배양을 위한 meat peptone 대체 배지 소재 동급 조성 및 제재화 기술개발 • 유산균 및 장내미생물을 대상으로 성장 및 형태적 특이성 비교를 통한 적합성분석 • 동물혈액 효소가수분해 산물 기반 신규 배지를 이용한 미생물 배양 후 대사체 분석을 통한 기존 상업용 배지와와의 효능 비교 분석 					

		<p>3) 협동2기관_충남대학교 산학협력단</p> <ul style="list-style-type: none"> - 공정별 축산부산물을 섭취한 동물의 운동수행능력 영향 평가 (in vivo) • 실험동물설정 • 운동수행능력평가 ✓ 탈진수영운동 테스트 ✓ 탈진 트레드밀 운동 테스트 ✓ 혈중 피로물질 평가 <p>(2차년도)</p> <p>1) 주관연구기관_주식회사 아미노랩</p> <ul style="list-style-type: none"> - 단백질 효소분해 기술을 확립한 동물혈액의 정제기술 확립 및 소재 상품화 • 단백질 효소분해 기술을 확립한 동물혈액의 분리정제기술 확립 • 탈색, 탈취공정 확립 • 여과 및 농축공정 확립 • 건조, 분쇄 공정 확립 • 최종 소재의 상품화 <p>2) 협동1기관_한국생명공학연구원</p> <ul style="list-style-type: none"> - 동물혈액의 단백질 효소분해물을 활용한 고부가 미생물 및 동물세포 배양 배지 소재 개발 • 효소가수분해 동물혈액 중의 항생제, 병원성 미생물, 바이러스, 기타 저해 성분 분석 • 동물세포 배양에 영향을 주는 당단백질, 시알산, 특정 등의 당사슬 구성 당성분 분석 • 크로마토그래피, 멤브레인 여과 농축 과정을 통한 동물세포 배양 필수성분 분획 • 분획 정제 성분의 LC-MS 분석을 통한 대사체 성분 분석 및 미코플라즈마 감염 분석 • CHO 세포주 및 특정 줄기세포를 대상으로 세포 성장, 형태적 변화, 분화도 등의 특이성 비교를 통한 적합성 분석 <p>3)협동2기관_충남대학교 산학협력단</p> <ul style="list-style-type: none"> - 동물혈액 단백질 효소분해물로 제조된 최종 기능성 조성물(시제품)을 섭취한 동물의 운동수행능력 영향 평가 (in vivo) • 실험동물설정 • 운동수행능력평가 ✓ 약력 테스트 ✓ 탈진수영운동 테스트 ✓ 탈진 트레드밀 운동 테스트 ✓ 혈중 피로물질 평가
--	--	--

연구개발성과	1. 성능 지표 및 달성도																											
	<table border="1"> <thead> <tr> <th>주요 성능지표</th> <th>가중치 (%)</th> <th>연차별 목표 (조건/환경)</th> <th>달성도 (%)</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>동물혈액 아미노산 조성</td> <td>10</td> <td>16종 이상</td> <td>100</td> </tr> <tr> <td>분리정제기술 확립</td> <td>5</td> <td>동물혈액 아미노산 분리정제</td> <td>100</td> </tr> <tr> <td>시제품 제작</td> <td>15</td> <td>시제품1건</td> <td>100</td> </tr> <tr> <td>미생물배지조건 확립</td> <td>15</td> <td>배지성능시험</td> <td>100</td> </tr> <tr> <td>동물세포배지 조건 확립</td> <td>20</td> <td>배지성능시험</td> <td>100</td> </tr> </tbody> </table>	주요 성능지표	가중치 (%)	연차별 목표 (조건/환경)	달성도 (%)	동물혈액 아미노산 조성	10	16종 이상	100	분리정제기술 확립	5	동물혈액 아미노산 분리정제	100	시제품 제작	15	시제품1건	100	미생물배지조건 확립	15	배지성능시험	100	동물세포배지 조건 확립	20	배지성능시험	100			
	주요 성능지표	가중치 (%)	연차별 목표 (조건/환경)	달성도 (%)																								
	동물혈액 아미노산 조성	10	16종 이상	100																								
	분리정제기술 확립	5	동물혈액 아미노산 분리정제	100																								
	시제품 제작	15	시제품1건	100																								
	미생물배지조건 확립	15	배지성능시험	100																								
동물세포배지 조건 확립	20	배지성능시험	100																									

주요 성능지표	가중치 (%)	연차별 목표 (조건/환경)	달성도 (%)
탈진수영운동 테스트 탈진 트레드밀 운동테스트	20	대조군대비 10%상승	100
혈중 피로물질 함량	15	대조군대비 10%감소	100
합계	100		100

2. 정량적 성과 목표 및 실적

성과목표	연구기반지표						연구기반지표		
	지식 재산권		기술 실시	사업화			학술성과		인력 양성
	특허 출원	특허 등록	건수	제품 화	매출 액	고용창 출	논문	학술 발표	
단위	건	건	건	건	백만 원	명	건	건	명
가중치	20	20	10	30		20			
최종목표	2	1	1	1	100	2	4	4	2
실적	4	1	2	2	1	11	4	4	2
달성도 (%)	200	100	200	200	1	550	100	100	100

연구개발성과
활용계획 및
기대 효과

1. 활용방안

동물혈액 단백질은 과제의 미생물소재, 운동수행능력 향상소재 뿐만 아니라 식품 및 화장품 소재에 활용이 가능함.

- 수입 대체 효과(글로빈, 플라센타(돈태반) 기반 소재 등)
- 건강보조식품, 음료, 화장품소재(복합아미노산) 등 다양한 파생제품 활용 및 개발 촉진
- 혈액 원료 천연 복합아미노산 관련 다양한 파생 제품 개발 촉진 예상
- 마유, 장어, 지렁이, 달팽이, 태반 등 동물성 원료 활용은 이미 화장품 전반 활용
- 동물성 천연 아미노산은 식물성 아미노산보다 함량, 성분 및 각종 효능 우수
- 고비용 원자재 아닌 재활용 원료 사용 시 뛰어난 가격경쟁력
- 실크아미노산 등 대비 친환경적이며 훌륭한 대체재

2. 기대성과 및 파급효과

- 혈액 자원화 제품 및 기술의 영역 확장 효과

- 비료 및 사료화 재활용 수준 -> 바이오활성소재화 첨단기술로 영역확장
- 골칫거리 폐기처리 대상 -> 유용한 생명자원으로 인식 대전환
- 폐기물에 대한 관점이 '처리'에서 '고부가가치 활용'으로 패러다임의 변화
- 국내 최고 혈액자원화 기술력을 바탕으로 고부가가치 자원화 모델 제시

- 환경 산업 및 축산혈액 폐기물 등 자원화 관련 산업 효과

- 고농도 오염물질인 도축 혈액에 대한 완벽한 자원화로 환경위협 요인 감소
- 고농도 오염원인 폐기물을 고부가가치 소재화함으로써 사회적 편익 증진
- 막대한 폐수처리 비용 절감(연간 약 12만톤, t당 처리비용 43만원_13 연구결과)
- 고부가가치 소재화로 축산경쟁력 강화 및 도축시스템 선진화 유도

연구개발성과의
비공개여부 및 사유

해당 없음

연구개발성과의 등록·기탁 건수	논문	특허	보고서 원문	연구 시설 ·장비	기술 요약 정보	소프트 웨어	표준	생명자원		화합물	신품종	
								생명 정보	생물 자원		정보	실물

	4	1						1		
연구시설·장비 종합정보시스템 등록 현황	구입 기관	연구시설 · 장비명	규격 (모델명)	수량	구입 연월일	구입가격 (천원)	구입처 (전화)	비고 (설치장소)	ZEUS 등록번호	
국문핵심어 (5개 이내)	축산부산물		동물혈액		운동수행능		미생물배지	단백질분해		
영문핵심어 (5개 이내)	Livestock by-products		Animal blood		Athletic performance		Microbial medium	Proteolysis		

〈 목 차 〉

1. 연구개발과제의 개요
2. 연구개발과제의 수행 과정 및 수행내용
3. 연구개발과제의 수행 결과 및 목표 달성 정도
4. 목표 미달 시 원인분석(해당 시 작성)
5. 연구개발성과 및 관련 분야에 대한 기여 정도
6. 연구개발성과의 관리 및 활용 계획

부록

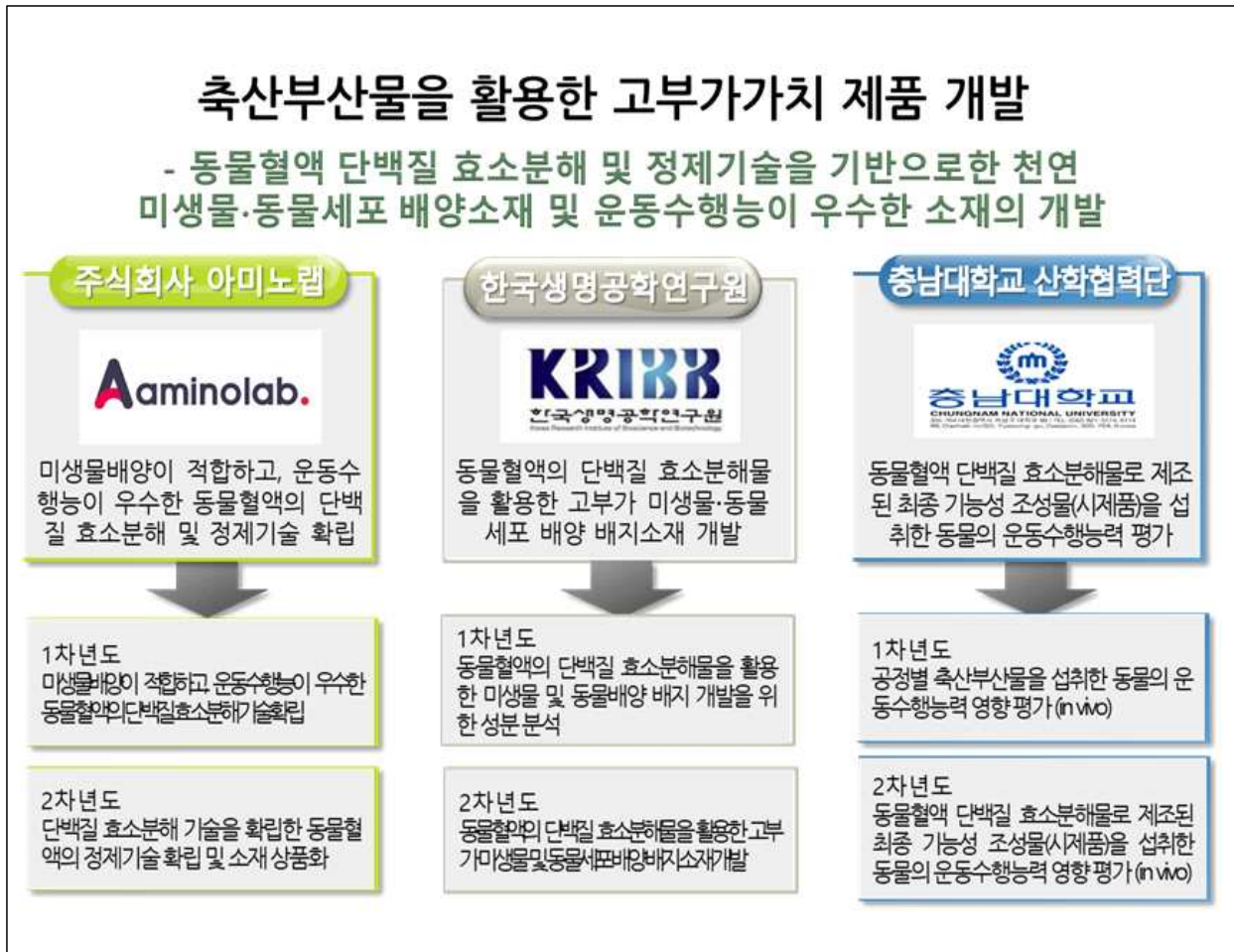
1. 아미노산 분석서
2. 특허출원서
3. 균주기탁증
4. 기술실시보고서
5. 제품출시확인서
6. 품목보고서
7. 논문
8. 학술회의 발표

별첨 자료

1. 자체평가 의견서
2. 연구성과 활용 계획서

1. 연구개발과제의 개요

1-1. 연구개발의 개요



축산부산물인 동물 혈액 단백질 효소 분해 및 정제 기술을 기반으로 한 천연 미생물 배양 소재 및 운동 수행능이 우수한 소재의 개발로써, 주관연구기관인 주식회사 아미노랩은 동물 혈액의 단백질 효소 분해 및 정제 기술을 제공하고, 협동1연구기관은 동물 혈액의 단백질 효소 분해물의 유용 성분과 저해물질 분석을 통해 미생물 및 동물 세포를 배양할 수 있는 배지 소재로 사용하기 위한 정성적, 정량적 지표물질을 개발하고 이를 활용하여 최종적으로 고부가 미생물·동물 세포 배양 배지 소재를 개발하고, 협동2연구기관은 동물 혈액 단백질 효소 분해물로 제조된 최종 기능성 조성물(시제품)을 섭취한 동물의 운동 수행 능력을 평가하는데 목적을 가짐.

[주관연구기관_주식회사 아미노랩]

미생물 배양이 적합하고, 운동 수행능이 우수한 동물 혈액의 단백질 효소 분해 및 정제 기술 확립

[협동1연구기관_한국생명공학연구원]

동물 혈액의 단백질 효소 분해물을 활용한 고부가 미생물·동물 세포 배양 배지 소재 개발

[협동2연구기관_충남대학교 산학협력단]

동물 혈액 단백질 효소 분해물로 제조된 최종 기능성 조성물(시제품)을 섭취한 동물의 운동 수행 능력 평가

1-2. 연구개발의 필요성

가. 개발의 필요성

1) 도축 폐기물이며 부산물인 동물혈액은 각종 단백질이 풍부하게 함유되어 있어 이용가치가 높은 원료자원임에도 불구하고, 1년에 7만톤 이상이 버려지고 있으며, 이로 인하여 자원의 활용은 물론 도축장의 주변 환경의 주요 오염원으로 인식됨.

- 발생 도축 혈액 중 70~80%가 식용용도 아닌 폐기물 (혈액) 처리 대상 (전세계 1,500만톤)
- 막대한 폐수처리 비용 절감이 필요한데, 연간 약 12만톤, ton당 처리비용 43만원이며, 총 처리비용이 연간 516억의 비용 발생
- 식품법상 ‘식품’인 도축혈액이 잉여로 인해 고농도 ‘환경오염물질’로 둔갑
- 불법 매립 및 투기, 화학적 폐수 처리에 따른 막대한 사회적 비용 발생
- 런던 협약 등 폐기물 관련 전세계적 친환경 정책 및 환경규제 강화 추세

2) 축산 혈액 자원화의 현재 및 한계

- 국내의 경우 농축산분야 액비 또는 단순 혈분 사료 제조 수준
- 혈액 자원화에 관심 많으나 폐수처리 기준 충족에 급급, 신소재개발 투자 주저
- 완벽한 재활용에 대한 자신감 없고 자원화 도중 2차 오염 발생 우려
- 국내 상황 틈타 중국 BAODI, 벨기에 VEOS 등 한국 혈액시장 진출 준비 중
- 제한된 국내혈액 자원량 (연간 약 12만톤)의 한계 상 향후 1~2년이 개발 골든타임
- 사료첨가제화와 병행하여 첨단 고부가가치 바이오제품·소재 개발 필요성 절실

3) 자원화 한계 극복

- 95% 이상 고순도 ‘복합 아미노산’ 바이오제품·소재 개발로 신시장 창출
- 농자재 시장규모와는 비교되지 않는 식품 및 화장품 산업 시장 진입
- 비료, 사료 및 설비의 수출과 기술개발 경험을 토대로 혈액의 완벽 재활용 가능
- 자원화 패러다임 전환 (재활용 아닌 업사이클링)으로 고부가가치 미래 자원 발굴
- 글로벌 축산혈액 자원화 기술 선도로 세계시장 선점
- 의료 관련 보조용도 및 의약외품 소재로서 단계적 진화 가능성에 초석 역할



그림 2. 도축 혈액의 폐기량 추이 및 자원화

4) 천연 '복합' 아미노산의 효능 및 가치

- 아미노산의 생리활성과 식품소재에 대한 영향 등 최근 활발한 연구 결과
- 현재 글루타믹애씨드, 메치오닌 등 '단일' 아미노산 또는 '합성' 아미노산 제품이 주류
- '복합' 아미노산은 '단일' 또는 '합성' 성분 아닌 종합 영양제와 유사
- 폐기물 원료를 활용하여 고순도 '복합' 아미노산 바이오소재 제조로 부가가치 창출

5) 한국형 축산혈액 자원화 신기술 (바이오제품·소재) 확보 필요

- 미국 A사, 벨기에 V사의 열풍건조 집중처리 방식 도입은 한국현실에 부적절
- 액비는 수출장벽, 사료는 미국과 유럽이 주도 중이나 소재분야는 블루오션
- 유럽의 경우 '글로빈 활용' 일부 식품 소재화 (사료 대비 2배~10배 부가가치)
- 비료, 사료에 이은 바이오제품·소재 (식품 또는 미생물배양산업에 활용) 첨단 기술 선도 가능
- 저부가가치 수입기술 대체를 넘어 첨단 기술 및 신소재 수출 가능

6) 잠재적 혈액내 존재하는 유용 성분의 근 기능 개선을 통한 운동수행능력 강화 소재의 이용 가능성

- 운동능력 향상 보조물은 운동수행능력의 향상뿐만 아니라 신체 활동 시 체내에 축적되어 피로를 발생시키는 피로 물질의 제거에도 효과가 있기 때문에 운동선수들뿐만 아니라 일반인들도 흔히 사용하고 있으며 이에 대한 관심도는 날로 증가되고 있는 추세
- 운동능력 향상을 위한 운동능력 향상 보조물의 효능을 검증하기 위한 연구들은 동서양을 막론하고 활발하게 연구되어 왔으며 한국, 중국, 일본 등 동양에서는 생약성분과 같은 식물 추출물에 많은 관심
- 운동수행능력 향상과 관련한 기능성 식품 개발은 일본에서 주로 연구되고 있으며, 비타민 B군류와 비타민 C 등의 비타민류, 코엔자임Q10 같은 항산화 효과를 가지는 물질, 오메가-3 같은 불포화지방산 등이 피로 회복에 도움을 준다고 상품화하여 개발되고 있음. 비타민 B와 같이 ATP 생성에 도움을 주어 피로 회복 효과를 기대하고 있으나 치료효과는 미미
- 서양에서 사용하는 운동능력 향상 보조물들은 대부분 카페인, 타우린, 아나볼릭 스테로이드 등으로 매우 짧은 시간 내에 집중력, 운동 능력, 반응 능력을 높이는 것으로 알려져 있으나, 대부분이 부작용 및 도핑의 위험성
- 국내에서도 운동수행능력 향상을 위한 각종 기능성 식품이 개발되고 있음. 국내의 경우, 전통 한의학 이론을 바탕으로 한 한방요법이나 민간요법 등에 의한 생약 추출물을 운동수행능력 향상 및 피로회복을 위한 목적으로 응용이 시도되고 있음. 이러한 전래의학을 근거로 지금까지 일반인에게 잘 알려진 생약 추출물의 인체 기능적 효능에 관심 증대

7) 근기능감소증과 운동수행능력의 저하의 상관관계

- 근육감소현상은 과정은 근량, 근력, 질적인 부분의 점진적인 감소가 수반됨. 이러한 과정은 최근 노화에 의한 노화성 근감소증 (sarcopenia) 이 주목받고 있으며 세포고사 (apoptosis)와 연관되어 있음. 또한 자연스런 노화로 인해 먼저 소실되는 근섬유의 유형은 type II fiber (fast twitch, glycolytic)와 근섬유수의 감소로 해석되고 있으며 반면 폐용성, 미세중력, 고도비만 및 만성질환 등에 의한 근감소는 type I fiber (slow twitch, oxidative)가 선택적으로 감소
- 근육감소의 주된 기전은 세포고사에 의한 것으로 알려져 있음. 심장세포들과 같이 대체할 수 없는 유사분열 후 가속화 되는 세포고사는 나이와 연관된 기능 손실이 지속적으로 나타나는 것으로 보고됨. 근육세포고사는 마지막으로 조절되는 신호전달을 통해서 실행되고 엄격히 조절되는 세포자살프로그램을 진보적으로 보존. 다세포 유기체들에 세포고사는 배아발생, 발달, 성숙한 개체에 조

직의 항상성 유지를 위해 필수적 (cellular turnover, removal of cells undergoing oncogenesis, virus-infected cells, self-reactive immune cells) 임에도 불구하고 특이적 환경 (활성산소, 방사선, 노화, 심근허혈 등)에 노출되었을 때 증가

- 근감소증은 세포고사 기전을 통한 근핵의 소실에 의한 것으로 보고됨에 따라 노화 및 폐용성에 노출된 개체의 근육내에서 세포고사를 가속화하는 조건에 초점이 맞추어짐. 근육내 지방 축적으로 인한 염증반응으로 세포고사가 가속됨. 또한, 근육량의 유지는 골격근내 단백질의 균형 (skeletal muscle protein synthesis/ degradation)과 유지 조절 능력 (ie. mitochondria function, clearance function: autophagy)이 중요하게 제시되고 있음. 따라서 근육소실의 지연 및 예방을 위해 요구되는 기작은 근육단백질 합성의 증진·질병에 의한 근육단백질 분해 억제. 또한 노후된 골격근의 질적 개선을 위한 미토콘드리아 기능의 향상 요구
- 근육량 및 지구력 증가를 유도하기 위해서는 산화적 대사에서 미토콘드리아의 크기와 효소 활성의 증가뿐만 아니라, 근육에서 미토콘드리아의 coupling과 조절을 향상시키는 것이 필요함. 이는 지구력 등 운동수행능력과 미토콘드리아의 생성 및 근육단백질 균형 조절이 밀접한 관계에 있음.
- 미토콘드리아 생성과 활성 조절은 핵에 의해 조절되며 미토콘드리아 조절단백질 PGC-1 α , NRFs는 핵 DNA에 의해 합성되어 미토콘드리아 생성과 활성을 조절하는 중요한 역할을 담당

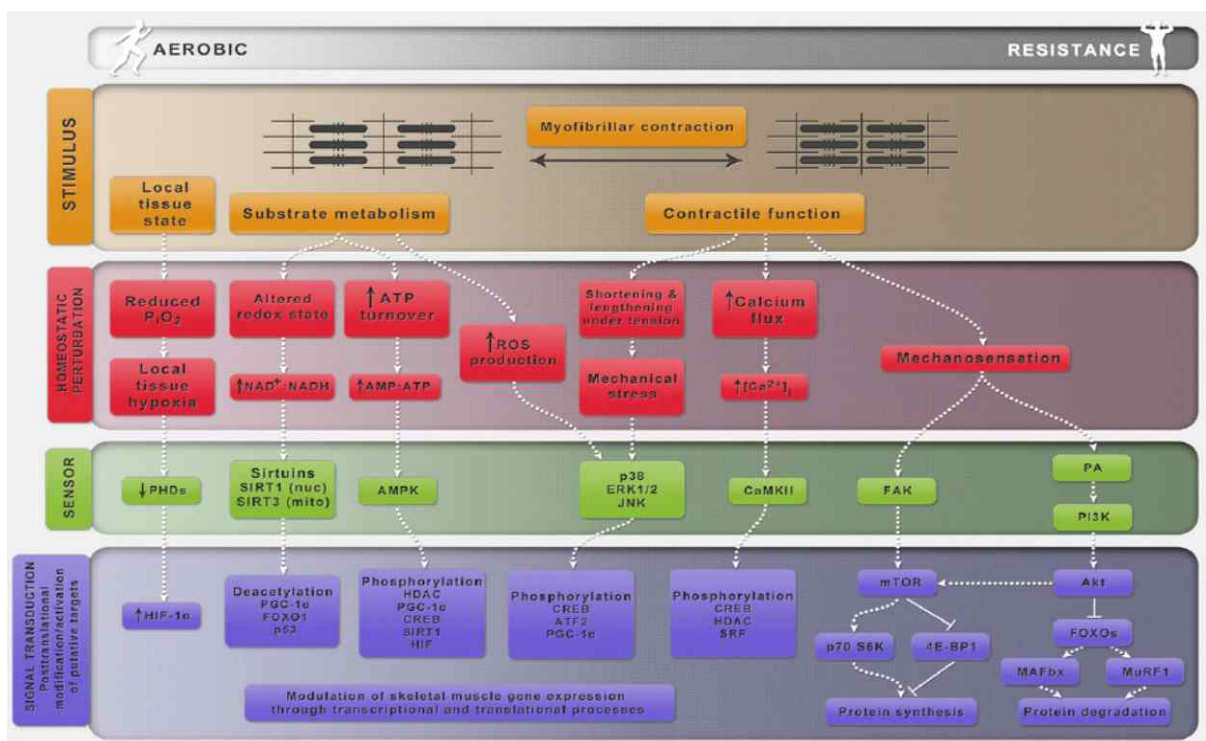


그림 3. 운동과 관련된 근육내 주요 단백질 변화 (Cell Metabolism, 2013)

8) 근육 강화 기전과 Leucine의 관계

- 본 과제를 통해 축산부산물 (도축혈액)을 혈액 효소가수분해를 통하여 고부가가치의 근육아미노산 (Leucine) 소재와 미생물 및 세포배양배지원으로 개발
- 근육강화 효능 있는 HMB는 BCAA인 leucine의 인체대사물질인데, 근육강화를 위한 일일 유리 Leucine 최소 권장량은 1,200 mg 인데, 도축혈액 100 ml의 총 구성아미노산 중의 Leucine 함량은 1200 mg이고, 유리 leucine은 10 mg 이하
- 하지만, 혈액100 ml의 단백질을 100%가수분해하면 근육강화를 위한 1,200 mg의 유리 leucine 획득 가능

- 인간 계몽분석, 의학 및 산업적으로 사용되는 단백질 생산 등 의학, 면역학, 생물학 연구의 미진한 실정



그림 6. 소태아 혈청 (FBS) 사용의 문제점

- 그래서, 폐기되는 동물혈액을 단백질 효소분해 및 정제하여 운동수행능력이 있는 Leucine의 아미노산 소재로 개발하고, 천연 미생물용 또는 소태아 혈청을 대처할 수 있는 동물세포배양 배지의 소재로 개발이 절실하여, 본 연구를 기획

나. 연구개발 대상의 국내·외 현황

1) 국내외 기술 현황

(가) 국내의 연구현황

- 국내의 특허 및 연구결과를 볼 때 도축혈액을 자원화하기 위한 노력은 지속적
- 다량의 폐수 발생 및 부대시설의 설비 증가로 인해 처리비용 등의 문제를 내포
- 폐수 해결 및 고부가가치 소재화를 통해 유의미한 극복 가능
- 기존 기술은 산 또는 효소분해를 통한 액체비료 또는 단순 혈분사로 생산에만 국한
- 도축혈액을 활용한 미생물배양소재 및 운동수행능이 우수한 소재로의 적용은 기존 기술과 확연히 다른 경제적이면서 실용적인 차별화된 기술

(나) 국내 연구논문현황

논문명	저자	권 호
도축부산물의 혐기소화를 통한 바이오에너지 잠재량 평가	김대욱, 유성일, 배일호, 이채영, 이명은, 신주희, 신승구	대한환경공학회지 2019, 677-685
효소 처리한 돈혈 활용 철분분말제제 특성	김미연, 김민아, 정용진	한국식품저장유통학회지 2021, 23(5):753-757, 1738-7248
효소분해조건에 따른 돈혈의 식품학적 품질 특성 변화	김미연, 김민아, 정용진	한국식품저장유통학회지 2016, 23(3):413-421, 1738-7248
도축부산물 혈액 현황과 이용	최준표 (제이피솔루션)	축산식품과학과 산업 2013, 2(2):2-7, 2287-3686
도축되는 한우 혈액에서 회수한 혈청의 생물학적 안전성 분석	김민수, 유지은, 민경호, 김지희, 최인호, 남상섭	한국동물자원과학회지 2012, 54(1):59-63, 1598-9429 ,
도축 폐혈액의 액비전환을 위한 단백질 분해 연구	김기은	한국도시환경학회지 2014, 127-134

도축 폐혈액 단백질로부터의 Angiotensin I Converting Enzyme 저해 펩타이드의 생산	현창기, 신현길	한국생물공학회지 1999, 14(5):600-605, 1225-7117 ,
도축 폐혈액 단백질을 이용한 Probiotics 생산에서의 동결건조 조건	현창기, 신현길	산업미생물학회지 1998, 26(3):200-205, 0257-2389
도축 폐혈액 단백질을 이용한 유산균체의 생산	현창기, 신현길	산업미생물학회지 1997, 25(2):218-223, 0257-2389
도축혈액 혈장 단백질의 특성 및 접착제로의 응용	박은희, 이화형, 송경빈	한국농화학회지 1996, 39(2):123-126, 0368-2897

(다) 지식재산권현황

지식재산권명	지식재산권출원인	출원국/출원번호
가축 혈액을 이용한 아미노산 및 이를 이용한 유기질 비료의 제조방법	임경선, 금종권	대한민국/1020110024175
땃줄혈액 혼합물의 분획화 방법 및 이로부터 얻어진 분획을 포함하는 세포배양 배지 보충용 조성물	주식회사 휴코드	대한미국/1020080097531
가축혈액을 이용한 미네랄 결합 펩타이드 제조방법	(주)바이오넬	대한민국/1020080065691
가축혈액을 이용한 아미노산-키토산 복합액비 및 이의 제조방법	한국산업기술시험원	대한민국/1020150086126
도축돈 혈액을 이용한 가축 면역증강제 제조 방법	정구홍	대한민국/1020150117079
돼지혈액 추출물을 이용한 아미노산 비료의 제조방법	(주)백암바이오	대한민국/1020130009033
동물세포 배양용 무혈청 배지	대한민국	대한민국/1020160150130

2) 시장현황

(가) 국내외 시장현황

- 미생물 배양·배지 사업은 시장 성장세는 가파르나 진입장벽이 높은 특징
- 2017년 기준으로 BS 대체세포배양배지시장의 경우 세계시장은 2억달러로 8.8%의 평균성장을 보이고, 국내시장의 경우 96.5억 원의 규모와 11.3%의 성장률
- 2017년의 시장규모와 5년간의 평균성장율이 유지된다고 가정하였을 때, 2021년의 시장규모는 세계시장의 경우 484억원, 국내시장의 경우 48억원이며, 그 후 성장규모는 다음과 같음

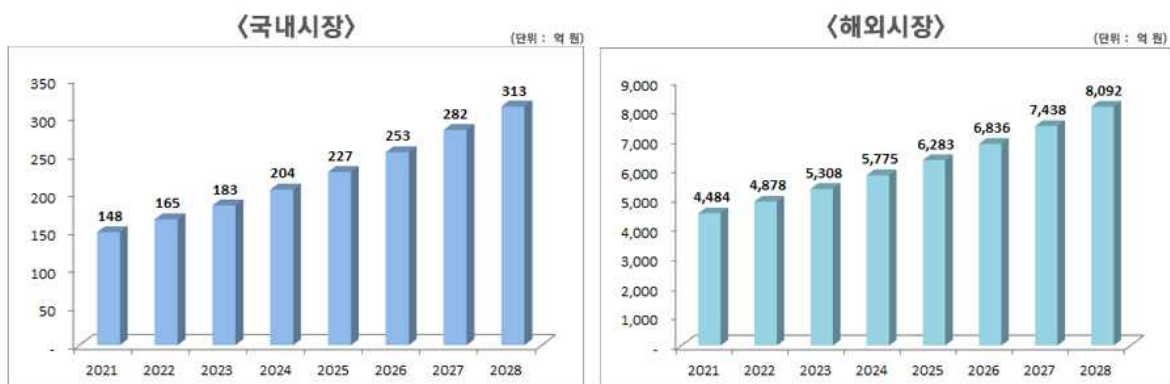


그림 7. 미생물 배양·배지 사업 성장규모

(나) 세계적 세포 배양을 위한 시장현황 및 전망

- 전세계적인 세포배양을 위한 배양-배지 사업은 Appliedmarket Research 사에서 조사된 2017년 의 시장 전망보고서인 “Culture Media Market Outlook-2025”의 데이터를 참고할 때, 2017년 도의 전세계적 시장 규모는 4,088 백만달러로 추정되고 있으며, 매년 8% 정도 시장 성장을 통해 2025년까지 7,065 백만달러로 규모로 확대될 것으로 예상 (<https://www.alliedmarketresearch.com/culture-media-market>)
- 향후, 세포배양을 기반한 조직공학 및 재생의약의 발전으로 고품의 세포 배양 배지가 요구되고 있 으며, 암 연구와 같은 실험실의 기초연구 뿐 아니라, 항체 및 세포치료제 제작 등을 위한 생명공학 산업 분야의 수요증대와 재생의약 치료제 개발의 수요에 따라 2017년에 비해 시장은 2배 이상으 로 확대될 것으로 전망

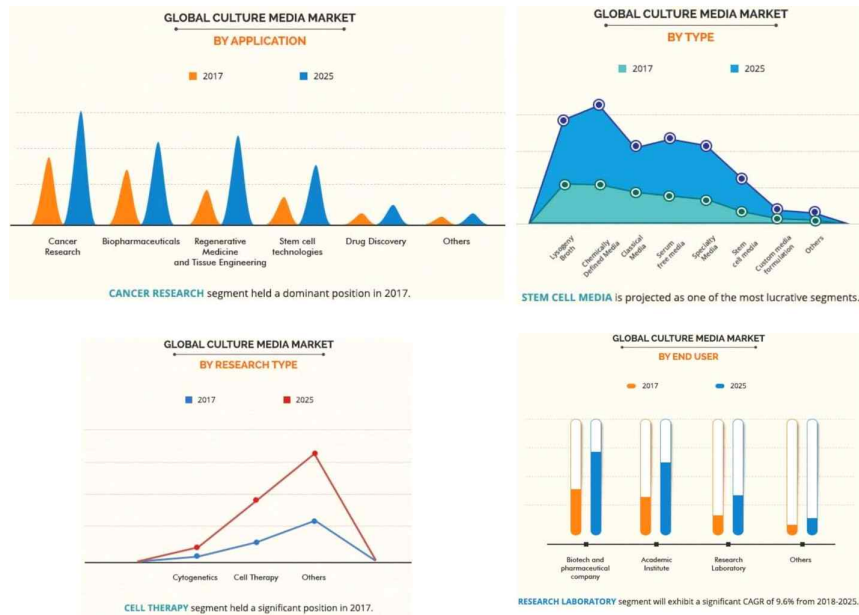


그림 8. 2017년 대비 2025년도까지의 세포배양 배지의 분야별 활용도에 따른 전세계 시장전망

- 세포배양을 위한 배지에는 세포의 성장을 위하여 아미노산, 비타민, 무기염, 성장호르몬, 당, 및 혈장 등 다양한 기능성 물질들이 포함되어 있어야 함으로 각각의 물질의 혼합을 통해 최적의 배지를 조성하거나, 유사한 성분을 갖는 동물 유래의 생체시료의 가공을 통해 제작 가능
- 따라서 현재는 축산산업의 발전으로 인한 도축 축우 유래의 장기 또는 조직 가공물로 배양배지를 제작하고 있어, 미생물 배양 배지와 비교할 때 세포 배양배지의 경우 고가의 시약 제품으로 판매 중
- 특히, 도축 혈액의 경우 기존의 고가의 세포배양배지 성분을 폐기되는 혈액의 가공 및 정제를 통해 고부가가치의 배지 성분으로 사용될 수 있는 아미노산을 획득할 수 있을 뿐 아니라, 화학적 합성으로 생산 효율이 낮아 고가로 여겨지는 당당백질 유래의 당사슬 구성 성분인 시알산, 갈락토즈, 글루코사민 등이 연결된 N-결합 당사슬과 뮤신 타입의 O-결합 당사슬의 글라이코컨쥬게이트 성분을 포함하는 배지 성분을 제작할 수 있어, 기존 화학물질의 혼합물에 비해 상대적으로 저렴한 배지 제작이 가능할 것으로 판단

3) 경쟁기관현황

(가) 국내 주요 관련 업체

- 미생물배지는 의료기기로 분류되며 체외진단용, 환경모니터링용, 특정미생물검사용으로 병원 및

- 검진센터, 제약회사, 식품회사, 화장품회사 등 산업 전반에 걸쳐 그 용도에 따라 다양하게 사용
- 국내 미생물 배지 업체들은 대부분 Merch, Millipore, Sigma-Aldrich, Gibco, LAB M, MB Cell 등과 같은 외국의 다국적 생명공학기업들의 제품을 직접 판매하거나 국내 도매상들이 이들의 제품을 이용하여 특수 목적의 제품을 수입하여 판매하고 있으나, 국내에서 자체적으로 미생물 배지를 생산하여 판매하는 곳은 3군데 뿐

(나) 국내 주요시장 경쟁사

경쟁사명	제품명	판매가격(천원)	연 판매액(천원)
한국배지(주)	미생물배지	5,000원	1,500,000
비전바이어캠	미생물배지	5,000원	3,500,000
시너지이노베이션	미생물배지 160여종	5,000원	30,000,000

2. 연구개발과제의 수행 과정 및 수행 내용

2-1. 연구개발의 목표

가. 최종목표

축산부산물인 동물혈액 단백질 효소분해 및 정제기술을 기반으로 한 천연미생물 배양소재 및 운동수행능이 우수한 소재의 개발로써, 주관연구기관인 주식회사 아미노랩은 동물혈액의 단백질 효소분해 및 정제기술을 제공하고, 협동1연구기관은 동물혈액의 단백질 효소분해물을 활용한 천연미생물배양소재의 배지로서의 적합성 검토와 활성화도 확인하며, 협동2연구기관은 동물혈액 단백질 효소분해물로 제조된 최종 기능성 조성물(시제품)을 섭취한 동물의 운동수행능력을 평가하는데 목적을 가짐.

[주관연구기관_주식회사 아미노랩]

미생물배양이 적합하고, 운동수행능이 우수한 동물혈액의 단백질 효소분해 및 정제기술 확립

[협동1기관_한국생명공학연구원]

동물혈액의 단백질 효소분해물을 활용한 고부가 미생물·동물세포 배양 배지소재 개발

[협동2기관_충남대학교 산학협력단]

동물혈액 단백질 효소분해물로 제조된 최종 기능성 조성물(시제품)을 섭취한 동물의 운동수행능력 평가

나. 세부목표

1) 1차년도

- 주관연구기관_주식회사 아미노랩
미생물배양이 적합하고, 운동수행능이 우수한 동물혈액의 단백질 효소분해 기술확립
- 협동1기관_한국생명공학연구원
동물혈액의 단백질 효소분해물을 활용한 고부가 미생물 배양 배지소재 개발
- 협동2기관_충남대학교 산학협력단
공정별 축산부산물을 섭취한 동물의 운동수행능력 영향 평가 (in vivo)

2) 2차년도

- 주관연구기관_주식회사 아미노랩
단백질 효소분해 기술을 확립한 동물혈액의 정제기술 확립 및 소재 상품화
- 협동1기관_한국생명공학연구원
동물혈액의 단백질 효소분해물을 활용한 고부가 동물세포 배양 배지소재 개발
- 협동2기관_충남대학교 산학협력단
동물혈액 단백질 효소분해물로 제조된 최종 기능성 조성물(시제품)을 섭취한 동물의 운동수행능력 영향 평가 (in vivo)

다. 연차별 목표 및 연구 범위

구분	기관명	연차별 개발목표
1차 년도	주관연 구기관 -주식 회사 아미 노랩	미생물배양이 적합하고, 운동수행능이 우수한 동물혈액의 단백질 효소분해 기술확립 <ul style="list-style-type: none"> • 응고혈의 전처리 공정확립 • 효소발효분해 공정확립 • 1차 전처리공정 및 효소분해공정의 아미노산 분석 의뢰 (공인인증기관) [정량평가지표 : 아미노산 조성분석 결과제시 1건, 분리정제기술개발 1건; 특허출원1건] <ul style="list-style-type: none"> • 협동1기관과 협동2기관에 공정별 동물혈액물을 제공 • 협동1기관과 협동2기관에 최종 단백질 분해된 동물혈액물을 제공
	협동1 기관- 한국생 명공학 연구원	동물혈액의 단백질 효소분해물을 활용한 미생물 및 동물배양 배지 개발을 위한 성분 분석 <ul style="list-style-type: none"> • 효소 혈액 단백질 가수산물의 단백질함량, 당성분, 당단백질, 무기물 함량, 항생제 및 기타 미생물 성장 저해 성분 분석 • 미생물 배양을 위한 meat peptone 대체 배지 소재 등급 조성 및 제제화 기술을 기반한 유산균 및 장내미생물을 대상으로 성장 및 형태적 특이성 비교를 통한 미생물 배지 적합성분석 • 동물혈액 효소가수분해 산물 기반 신규 배지를 이용한 미생물 배양 후 대사체 분석을 통한 기존 상업용 배지와와의 효능 비교 분석 [정량 평가 지표: 미생물 배지 조성을 위한 혈액가수분해 산물 유효 성분 함량 지표 분석표 1건; 학술발표 1건]
	협동2 기관- 충남대 학교 산학협 력단	공정별 축산부산물을 섭취한 동물의 운동수행능력 영향 평가 (in vivo) <ul style="list-style-type: none"> • 주관기관에서 제공한 축산부산물의 투여에 따른 실험동물의 운동수행능력에 대한 영향을 평가함으로써, 축산부산물을 활용한 기능성 제품 개발을 위한 근거자료를 제공하고자 함. • 실험동물설정 • 운동수행능력평가 <ul style="list-style-type: none"> ✓ 탈진수영운동 테스트 ✓ 탈진 트레드밀 운동 테스트 ✓ 혈중 피로물질 평가
2차 년도	주관연 구기관 -주식 회사 아미 노랩	단백질 효소분해 기술을 확립한 동물혈액의 정제기술 확립 및 소재 상품화 <ul style="list-style-type: none"> • 단백질 효소분해 기술을 확립한 동물혈액의 분리정제기술 확립 • 탈색, 탈취공정 확립 • 여과 및 농축공정 확립 • 건조, 분쇄 공정 확립 • 최종 소재의 상품화
	협동1 기관- 한국생 명공학 연구원	동물혈액의 단백질 효소분해물을 활용한 고부가 미생물 및 동물세포 배양 배지 소재 개발 <ul style="list-style-type: none"> • 효소가수분해 동물혈액 중의 항생제, 병원성 미생물, 바이러스, 기타 저해 성분 확인 및 동물세포 배양에 영향을 주는 당단백질, 시알산, 특정 등의 당사슬 구성 당성분 분석 • 크로마토그래피, 멤브레인 여과 농축 과정을 통한 동물세포 배양 필수성분 분획 및 분획 정제된 성분의 LC-MS 분석을 통한 대사체 성분 분석 및 미코플라스마 감염 분석

	<ul style="list-style-type: none"> • CHO 세포주 및 특정 줄기세포를 대상으로 세포 성장, 형태적 변화, 분화도 등의 특이성 비교를 통한 배지 적합성 분석 <p>[정량 평가 지표: 동물 세포배지 조성을 위한 혈액가수분해 산물 유효 성분 함량 지표 분석표 1건; SCIE 논문 1건; 논문학술발표 1건]</p>
<p>협동2 기관- 충남대 학교 산학협 력단</p>	<p>동물혈액 단백질 효소분해물로 제조된 최종 기능성 조성물(시제품)을 섭취한 동물의 운동수행능력 영향 평가 (in vivo)</p> <ul style="list-style-type: none"> • 1차년도에서 진행한 축산부산물의 운동수행능력 평가 결과에 근거하여 주관연구기관에 제조한 동물혈액 단백질 효소분해물로 제조된 최종 기능성 조성물(시제품)에 대한 운동수행능력을 평가하고자 함. • 실험동물설정 • 운동수행능력평가 <ul style="list-style-type: none"> ✓ 악력 테스트 ✓ 탈진수영운동 테스트 ✓ 탈진 트레드밀 운동 테스트 ✓ 혈중 피로물질 평가

2-2. 개발 내용 및 범위


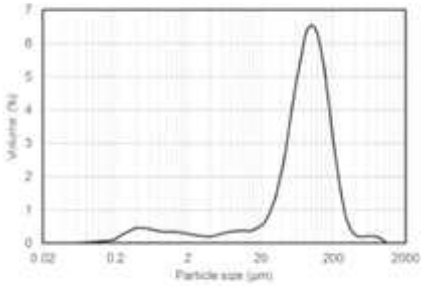
연구기관	1차년도 연구개발범위
주관연구기관- 주식회사 아미노랩	<p>미생물배양이 적합하고, 운동수행능이 우수한 동물혈액의 단백질 효소분해 기술 확립</p>
	<ol style="list-style-type: none"> 1. 응고혈의 전처리 공정확립 <ul style="list-style-type: none"> • 혈액 특성 상 방혈 즉시 응고 -> 분해효율 향상위한 액상화 공정 필수 • 액화 전 필터링 및 액화 도중 기포 제어 필요 (액화장치 특허 보유) <div style="display: flex; justify-content: space-around; align-items: center;">   </div> <p>그림 9. 응고혈의 분쇄기 사진과 응고혈 분쇄기의 입도분석결과 (예시)</p> 2. 효소발효분해 공정확립 <ul style="list-style-type: none"> • ‘생혈액’을 ‘효소 분해’하는 방식으로 ‘혈분’을 산분해하는 방식이 아니라, 발암물질 (3-MCPD:3- 모노클로로프로판디올) 생성안됨. • ‘도축 동물의 폐혈액 처리 시스템 및 아미노산 용액 생산 방법’(특허 보유) • 단백질 분해효소 중 미생물배지용으로 적합한 효소 스크리닝 • 스크리닝된 효소의 특성에 맞는 온도조건, pH조건 설정 3. 1차 전처리공정 및 효소분해공정의 아미노산 분석 의뢰 (공인인증기관) <ul style="list-style-type: none"> • 유리아미노산과 구성아미노산 함량 분석

그림 10. 아미노산 분석결과 (예시)

4. 협동1기관과 협동2기관에 공정별 동물혈액물 제공
5. 협동1기관과 협동2기관에 최종 단백질 분해된 동물혈액물 제공

협동1기관-
한국생명공학연
구원

동물혈액의 단백질 효소분해물을 활용한 미생물 및 동물배양 배지 개발을 위한 성분 분석

1. 효소 혈액 단백질 가수산물의 단백질함량, 당성분, 당단백질, 무기물 함량 정량 분석
 - 효소가수분해 혈액은 단백질 가수분해 산물로 다양한 아미노산, 단백질, 펩타이드 성분 뿐 아니라 혈액내에 당단백질, 무기물 등 다양한 성분이 포함되어 있으므로 미생물의 배양을 위해 QC/QA 가능한 표준 지표 필요
 - 따라서 미생물 배양에 필수적 성분인 carbon, nitrogen, phosphate 성분의 정량을 위하여 열처리 산가수분해를 통해 유리된 개별 당성분 함량을 HPLC 이용해 정량하고, 단백질 및 펩타이드는 화학적 정량법 및 산가수분해 산물의 amino acid 함량을 HPLC 로 정량하고자 함. 또한 무기염과 미량 중금속 함량은 원자흡광도 (Atomic absorption spectrometry)법을 이용하여 주된 성분 규명
2. 효소가수분해 동물혈액 중의 항생제 및 기타 미생물 성장 저해 성분 분석
 - 축산부산물인 동물혈액은 다양한 개체에서 회수되어 처리된 축산 과정 중에 항생제 투여로 인해 혈액 내에 잔류 항생제가 존재할 가능성이 있으며, 해당 항생제는 미생물의 배양저해 또는 제 내성 균주를 양산할 가능성 높음
 - 따라서 효소가수분해 산물 중에 존재하는 항생제 물질을 확인할 수 있는 용매추출을 통한 전처리를 통해 회수한 후 HPLC 또는 LC-MS를 활용하여 해당 항생제 물질 확인
 - 용매추출을 통해 농축된 항생제가 포함된 시료는 선별된 미생물군 (대장균, 바실러스, 유산균, 효모 등)의 표준 균주를 사용하여 항생제 내성을 MIC (Minimum Inhibition Concentration 항생제 감수성) 확인

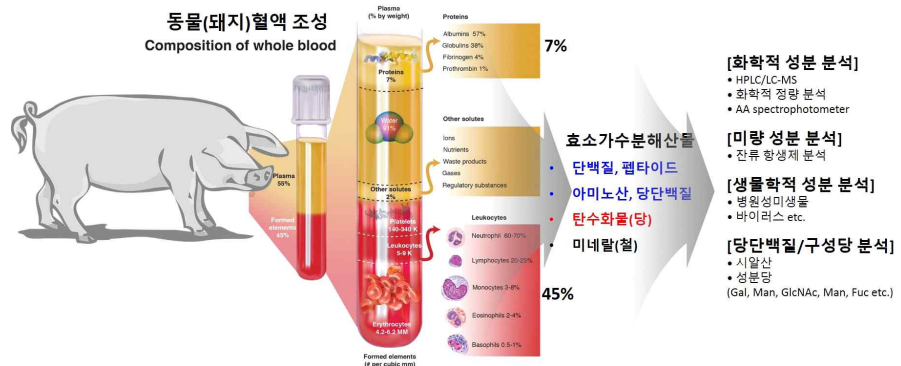


그림 11. 미생물 배양 배지 소재 개발을 위한 동물혈액 중에 유용 성분 분석

3. 효소가수분해 동물혈액 중의 유해 생물학적 성분 (병원성 미생물, 곰팡이, 바이러스) 확인
- 효소가수분해 산물 중에 존재하는 유해 생물학적 성분으로 병원성 미생물, 포자성 곰팡이, 그리고 바이러스 등을 고려할 수 있으며, 해당 생물학적 균체는 DNA 시료 추출을 통해 분자생물학적 방법을 통해 분석 가능
 - 전처리 방법으로 고형상태의 시료를 입자파쇄기를 이용하여 분쇄한 후, metagenome extraction kit를 통해 DNA를 추출한 후 미생물은 16S rDNA와 곰팡이는 ITS1-4 부분의 유전자를 PCR을 통해 증폭한 후 해당 염기서열 분석을 통해 시료 중에 포함된 미생물과 곰팡이를 측정하고자 함. 바이러스의 경우는 Universal Probe Library (UPL) probe와 돼지에서 기존에 알려진 바이러스 질병에 확인된 바이러스를 대상으로 PCR primer를 제작하여 바이러스 검출에 사용
4. 동물세포 배양에 영향을 주는 당단백질, 시알산, 특정 등의 당사슬 구성 당성분 분석
- 돼지 혈액의 효소가수분해 산물에는 당사슬이 부가되어 있는 단백질인 당단백질과 당사슬을 구성하는 성분당으로 시알산 (NeuAc), 갈락토스 (Gal), N-아세틸글루코사민 (GlcNAc), 만노스 (Man), 퓨코스 (Fuc) 등의 특정 단당류를 포함하고 있으며, 이들 당 성분은 동물세포 배양 뿐 아니라 동물세포 배양을 통해 얻어지는 단백질 제품 품질에 직간접적으로 영향을 준다고 알려져 있어, 해당 성분의 분석 필요

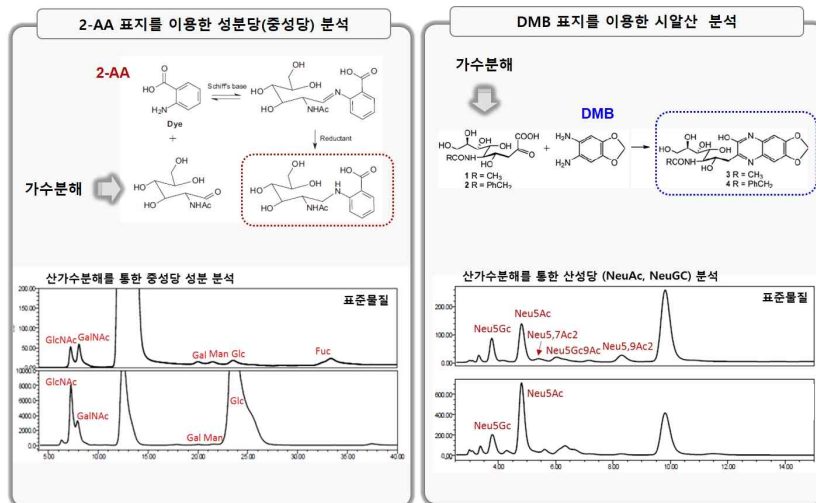


그림 12. 동물세포 배양 배지 소재 개발을 위해 당단백질, 시알산, 특정 등의 당사슬 구성 당성분의 HPLC를 이용한 정량 분석 방법

- 따라서 본 연구에서는 효소가수분해 산물로부터 단백질로부터 당사슬을 효소 처리를 통해 분리한 후, 화학적 형광라벨링과 카트리지를 추출의 일련 과정을 통해 제작한 후, 중성당과 산성당을 분리하여, 본 연구그룹이 기구축한 HPLC를 이용한 분석 방법을 통해 단위 중량당 당사슬의 함량을 정량하며, 시알산의 경우는 산가수분해를 통해 단당류로 분리한 후, 화학적 방법을 통해 정량 분석

협동2기관_
충남대학교
산학협력단

공정별 축산부산물을 섭취한 동물의 운동수행능력 영향 평가 (in vivo)

1. 연구 배경

- 식품의약품 안전처 건강기능식품성 평가 가이드 (운동수행능력 향상에 도움)에 제시된 운동수행능력 지표 중 중 지구력의 바이오마커로서 '탈진시까지 걸리는 시간 (time to exhaustion)'에 근거하여 지속적인 근력의 유지능력을 평가하기 위한 지구력 측정 은 탈진 수영 운동 (Exhausted swimming test), 탈진 트레드밀 운동 (Exhausted

treadmill test) 실시

- 식품의약품 안전처 건강기능식품 기능성 평가 가이드 (운동수행능력 향상에 도움)에 제시된 운동수행능력 지표 중 혈중 근피로 지표로서 젖산 (Lactic acid), 요소질소 (Blood urea nitrogen, BUN), 크레아틴인산화효소 (Creatine kinase, CK) 등을 측정

2. 실험 일정 및 방법

• 실험동물

6주령의 ICR 마우스 수컷을 일주일 간 순화를 하였고 실내 온도 23°C±2°C, 습도 50%±10%를 유지함. 사료 및 수분공급은 자유 급식하며, 총 5주 간 진행. 본 연구에 사용된 실험동물은 충남대학교 동물실험윤리위원회의 승인 하에 진행함. 순화된 마우스는 군별로 8마리로 분류하여 시료 투여에 의한 운동수행능력의 변화를 측정하기 위하여 경구 투여 5주 후 탈진 수영운동과 탈진 트레드밀 운동 평가

• 운동수행능력평가

✓ 탈진수영운동 테스트

Swimming Test를 위한 장치로서 지름 17 cm 높이 27 cm 규격의 물통을 사용하고, 물의 온도는 27°C로 유지하며, 수면의 높이는 20 cm로 마우스의 꼬리가 물통 바닥에 닿지 않을 정도로 함. 강제 수영의 운동 강도를 높이기 위하여 5~10%g 무게의 추를 꼬리에 매달아 테스트 실시

✓ 탈진 트레드밀 운동 테스트

마우스를 treadmill 을 이용하여 16.67 m/min의 속도에서 3분 간 적응시킨 뒤, 16.67 m/min 시작으로 3분 간격으로 1.67 m/min씩 속도를 올려 treadmill 운동을 적용하여 각 그룹별 마우스의 운동능력 평가

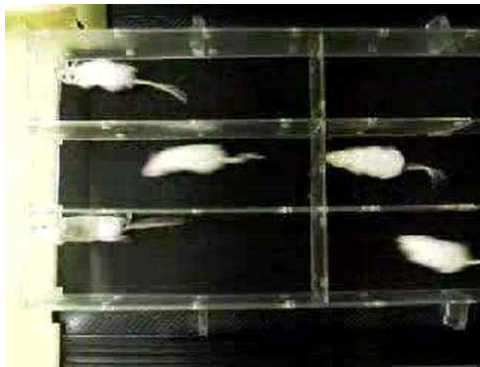


그림 13. 트레드밀 운동 테스트 (예시)

✓ 혈중 피로물질 평가

4주 간 처리한 실험동물을 대상으로 90분간 강제수영을 진행하고 1시간 휴식 후 채취한 혈액을 분석. 혈중 근피로 지표로서 젖산 (Lactic acid), 요소질소 (Blood urea nitrogen, BUN), 크레아틴인산화효소 (Creatine kinase, CK) 등을 측정하여 각 그룹별 마우스의 혈중 피로물질의 축적에 대한 영향 평가

연구기관	2차년도 연구개발범위
주관연구기관 주식회사 아미노랩	<p>단백질 효소분해 기술을 확립한 동물혈액의 정제기술 확립 및 소재 상품화</p> <p>1. 단백질 효소분해 기술을 확립한 동물혈액의 분리정제기술 확립</p> <ul style="list-style-type: none"> • 효소분해된 아미노산분해액에서 아미노산과 유기산의 분리기술확립 • 발효완성 용액을 고성능 원심분리하여 여액 (상등액)과 Cake로 1차 분리

	<p>2. 탈색, 탈취공정 확립</p> <ul style="list-style-type: none"> • 여액을 탈색, 탈취, 흡착 과정확립 • 분해효율 및 정제효율의 향상을 위한 최적 온도제어기술 확립 • 정제 각 단계별 적절한 천연탈색제와 탈취제 선택 및 사용량 조절로 탈색 탈취 조율 <p>3. 여과 및 농축공정 확립</p> <ul style="list-style-type: none"> • 천연광물질을 활용하여 여과관에서 코팅막 형성 후 여과 정제 • 최소 3차에 걸친 마이크로 필터링 공정으로 정제 공정 효율성 제고 • 최종 필터링 과정 후 완성 용액은 최초 투입량 대비 약 30% 감량 • 농축 시 최종 완성용액 산출량은 최초 대비 50% <p>4. 건조, 분쇄 공정 확립</p> <ul style="list-style-type: none"> • 온도별, 시간별 건조 조건 확립 • 분쇄입자의 크기별 조건 확립 <p>5. 최종 소재의 상품화</p> <ul style="list-style-type: none"> • 포장형태 설정 • 마케팅에 적합한 브랜드 및 디자인 결정 • 시제품 제작 (2종-농축액형태, 분말형태)
--	---



그림 14. 기술 공정도

<p>협동1기관_한국생명공학연구원</p>	<p>동물혈액의 단백질 효소분해물을 활용한 고부가 미생물 및 동물세포 배양 배지 소재 개발</p> <p>1. 미생물 배양을 위한 meat peptone/extract 대체 배지 소재를 위한 제재화 기술개발</p> <ul style="list-style-type: none"> • 효소가수분해 동물혈액 중의 대다수 성분으로 생각되는 아미노산 및 펩타이드 성분을 미생물 배양을 위한 meat peptone 대체 소재로 활용하기 위하여, 주관연구기관에서 제공한 시료의 단순 열처리 건조, 분무건조, 또는 동결건조를 통해 1차적인 고상형태의 제재화를 통해 배지소재로 활용 • 1차적으로 제작된 고상배지는 1차년도에 구축된 분석 방법에 따라 화학적, 생물학적, 잔류 항생제, 당단백질 및 성분당 분석을 통해 제재화 공정에 따른 배지 성분의 변화와 특성 비교 <p>2. 크로마토그래피, 멤브레인 여과 농축 과정을 통한 동물세포 배양 필수성분 분획 및 분획 정제된 성분의 LC-MS 분석을 통한 대사체 성분 분석</p> <ul style="list-style-type: none"> • 1차적으로 제작한 고상배지 소재를 동물세포 배양에 활용하기 위해서는 고도 정제를 통한 아미노산 성분의 농축 및 기타 세포배양에 저해 되는 물질의 제거가 필요하기 때문에, 본 연구에서는 이온교환수지 컬럼을 통한 크로마토그래피를 사용하여 아미노산 성분을 분획을 통해 유용성분 분리 • 다중컬럼을 통한 아미노산 성분의 분획 후 분획성분을 다시 특정 크기의 pore size 또는 MWCO의 갖는 멤브레인을 사용하여 농축, 한외여과를 수행한 후에, 용매추출 또는 동결건조 방법을 통한 농축을 통해 최종적으로는 고상 제재화 방법을 통해 고체 상태의 소재로 생산하여 미생물 또는 동물 세포 배양 사용
------------------------	--

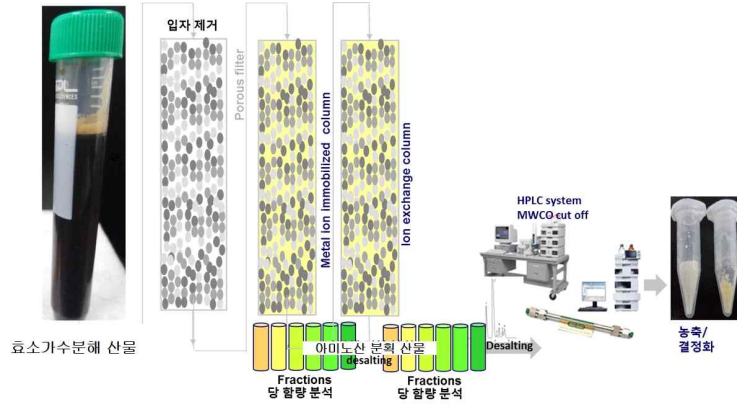


그림 15. 효소가수분해 산물의 이온크로마토그래피를 이용한
아미노산 성분 분석 및 제재화 방법

3. 유산균 및 장내미생물을 대상으로 성장 및 형태적 특이성 비교를 통한 적합성분석
 - 기존의 blood가 포함된 rich culture media를 사용하고 있는 유산균 및 장내미생물을 대상으로 배양 배지 내에 meat peptone/extract를 대체 가능한지를 최소배지에 고상 상태의 제재를 추가하여 배양배지를 제작한 후, 해당 미생물 배양을 통해 확인
 - 분석항목은 미생물의 성장, 균체의 형태적 변화, 배지 내의 pH 변화, 배양배지내의 당, 유기산등의 주요 대사물질 등의 모니터링을 통해 기존에 사용하고 있는 배지와 유사성 및 차이성을 분석
4. CHO 세포주 및 특정 세포주를 대상으로 세포 성장, 형태적 변화, 분화도 등의 특이성 비교를 통한 배지 적합성 분석
 - 한외여과 및 0.22 μm 멤브레인을 통해 멸균 상태로 제작된 아미노산 분획을 현재 사용하고 있는 동물세포 배양배지인 MEM 또는 DMEM에 amino acids 대체 성분으로 추가하여, 동물세포를 이용한 단백질제품 생산 시 주로 사용되는 CHO 세포주를 대상으로 세포배양 배지로 사용가능한지 확인
 - 증식되는 세포의 수, 형태학적 분화 및 세포 모양의 변화, 세포 사멸, 배양 배지 내의 pH 및 유기산의 변화양상 등의 다양한 변수들의 연속적 시간적 모니터링을 통하여 실제적으로 해당 성분이 동물세포 배양에 유용하게 사용되며 negative effect가 없는지 테스트
5. 동물혈액 효소가수분해 산물 기반 신규 배지를 이용한 미생물 및 동물세포 배양 후 대사체 분석을 통한 기존 상업용 배지와 효능 비교 분석
 - 동물혈액 유래의 효소가수분해 산물의 대다수 성분은 펩타이드 또는 단백질 가수분해의 유리 아미노산이지만 미량 원소로 확인이 되지 않은 저분자 성분이 포함되어 미생물 또는 동물세포 배양에 세포 저해 및 비정상적인 형태 변화 등에 영향을 줄뿐 아니라 세포 배양시의 세포 대사 과정 중에 효소반응이나 화학적 반응으로 다른 형태의 물질로 전환 가능성
 - 따라서 각각의 세포 배양에 따른 대사체 분석을 통한 배양 전, 후에 변화되는 주된 화학 물질과 미량 유기성분의 분석이 필요하므로 LC-MS를 사용하여, 기존에 일반적으로 사용하는 배지 조건과 동물혈액 유래의 효소가수분해 산물이 첨가된 배지 조건을 상호 비교하여, 미생물과 동물세포 배양 시 물리화학적 환경에 따라 생화학적 반응에 의해 특징적으로 변화되는 성분 확인

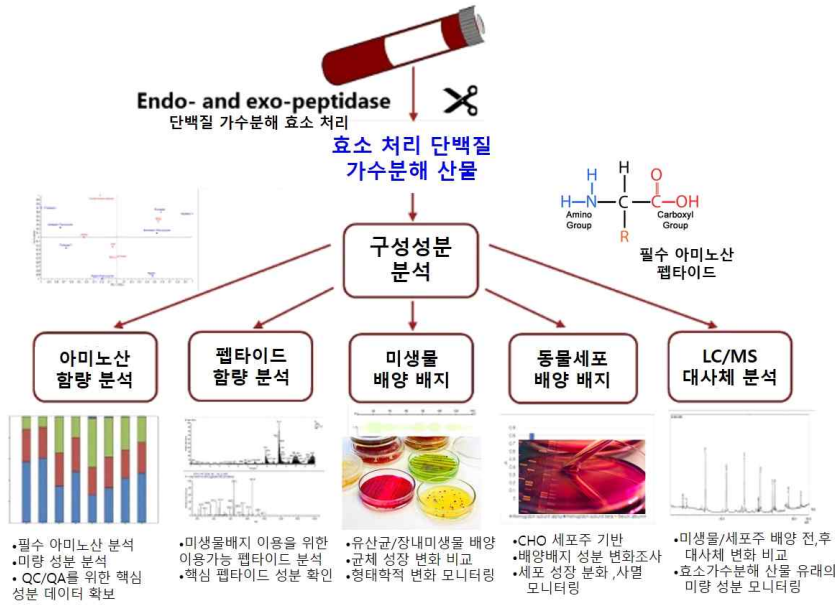


그림 16. 동물혈액 효소가수분해 산물 중의 단백질 유래의 아미노산 및 펩타이드 주 성분의 미생물-세포주 배양 배지 소재 개발을 위한 전략

동물혈액 단백질 효소분해물로 제조된 최종 기능성 조성물(시제품)을 섭취한 동물의 운동수행능력 영향 평가 (*in vivo*)

협동2기관-
충남대학교
산학협력단

1. 연구 배경

- 1차년도에서 진행한 축산부산물의 운동수행능력 평가 결과에 근거하여 주관연구기관에 제조한 동물혈액 단백질 효소분해물로 제조된 최종 기능성 조성물 (시제품)에 대한 운동수행능력을 평가
- 1차년도의 연구 방법 및 “운동수행능력” 중 최대 힘의 발휘를 평가하기 위한 근력 측정 (악력 테스트)을 포함하여 축산부산물 함유 기능성 조성물 (시제품)의 투여에 따른 실험 동물의 운동수행능력 및 혈중 피로물질 평가

2. 실험 일정 및 방법

• 실험동물

6주령의 ICR 마우스 수컷을 일주일간 순화를 하였고 실내 온도 23°C±2°C, 습도 50%±10%를 유지함. 사료 및 수분공급은 자유 급식하며, 총 4주 간 진행. 본 연구에 사용된 실험동물은 충남대학교 동물실험윤리위원회의 승인 하에 진행. 순화된 마우스는 군별로 8마리로 분류하여 시료 투여에 의한 운동수행능력의 변화를 측정하기 위하여 경구 투여 4주 후 악력 테스트, 탈진 수영운동과 탈진 트레드밀 운동을 평가.

• 운동수행능력평가

✓ 악력 테스트

근육에서 발휘되는 최대 힘의 변화를 측정하기 위하여, 대조군 및 시료 투여군의 동물들에게 악력 테스트를 실시. 마우스의 꼬리를 잡고 마우스가 악력 시험 장치를 잡게 한 후 꼬리를 뒤로 잡아당길 때 나타나는 앞발과 뒷발의 최대 악력을 측정함. 악력은 4회 반복 측정 후 최대값을 사용



그림 17. 약력 테스트 (예시)

✓ 탈진수영운동 테스트

Swimming Test를 위한 장치로서 지름 17 cm 높이 27 cm 규격의 물통을 사용하고, 물의 온도는 27°C로 유지하며, 수면의 높이는 20 cm로 마우스의 꼬리가 물통 바닥에 닿지 않을 정도로 함. 강제 수영의 운동 강도를 높이기 위하여 5~10%g 무게의 추를 꼬리에 매달아 테스트 실시

✓ 탈진 트레드밀 운동 테스트

마우스를 treadmill 을 이용하여 16.67 m/min의 속도에서 3분 간 적응시킨 뒤, 16.67 m/min 시작으로 3분 간격으로 1.67 m/min씩 속도를 올려 treadmill 운동을 적용하여 각 그룹별 마우스의 운동능력 평가

✓ 혈중 피로물질 평가

4주 간 처리한 실험동물을 대상으로 90분 간 강제수영을 진행하고 1시간 휴식 후 채취한 혈액을 분석. 혈중 근피로 지표로서 젖산 (Lactic acid), 요소질소 (Blood urea nitrogen, BUN), 크레아틴인산화효소 (Creatine kinase, CK) 등을 측정하여 각 그룹별 마우스의 혈중 피로물질의 축적에 대한 영향 평가

○ 동물 혈액 단백질 효소 가수분해 산물에 포함된 단백질, 펩타이드, 당 성분 분석

- 주관기관에서 제작한 돼지 혈액 가수분해 산물 1차적으로 주관기관에서 제공한 2종의 시료 (시료1: 2차 효소가수분해 산물; 시료2: 1차 효소가수분해 산물)에 대해 효소 가수분해 산물에 포함된 단백질 함량, 펩타이드, 탄수화물 성분 분석, 무기물 (인산, phosphate) 함량을 분석함.
- 2종의 시료를 건조중량 10 mg을 상온에서 1 ml 증류수에 현탁한 후, 상온에서 원심분리를 통해 증류수에 녹는 용해성 물질과 침전되는 비용해성 물질을 분리하였으며, 용해성 물질을 다시 0.22 µm의 셀룰로즈 필터로 필터링 하여 분석용 시료를 제작함.
- 단백질의 정량은 일반적으로 생화학분석에서 사용되는 bovine serum albumin을 표준 단백질로 하여 브래드포드 분석법 (bradford method)로 정량함. 펩타이드 성분은 증류수에 용해된 시료를 LC-MS를 사용하여 다양한 펩타이드 분자량을 측정하여 분포를 확인하였으며, 두 개의 아미노산으로 구성된 디아미노산의 경우는 LC-MS와 화학물질 데이터 बैं크를 사용하여 분석함.
- 혈액 가수분해 산물 내에 존재하는 당 성분은 HPLC-RID와 유기산 분석 또는 당분석 컬럼 사용하여 분석하였으며, 해당 물질의 표준물질의 retention time과 비교하여 정량 분석함. 상세한 단당류 분석 조건은 다음과 같음: Refractive index detector, RID, (Agilent, Santa Clara, CA, USA)와 auto-sampler가 장착된 High-performance liquid

chromatography (HPLC) 시스템 (Agilent)을 이용하여, 분석 컬럼으로 Rezex ROA-Organic Acid H+ column (7.8 x 300 mm; Rhenomenex, Torrance, CA, USA)와 guard cartridge (KJ0-4282; Rhenomenex, Torrance, CA, USA)가 포함되어 있는 SecurityGard™ 가드컬럼을 이용하여, 컬럼 온도를 65°C로 유지하면서 이동상으로 2.5 mM 황산용액으로 0.6 ml min⁻¹유속으로 함.

- HPLC로 확인된 물질은 LC-MS를 활용한 대사체 분석을 통해 다시 한번 해당 물질의 존재 여부를 확인하였으며, 정성-정량적 분석의 결과는 LC-MS에서 획득한 데이터를 우선적으로 사용함.

○ 효소 가수분해 동물혈액 중의 항생제 및 기타 미생물 성장 저해 성분 분석

- 축산부산물인 동물혈액은 다양한 개체에서 회수되어 처리된 축산 과정 중에 항생제 투여로 인해 혈액내에 잔류 항생제가 존재할 가능성이 있으며, 해당 항생제는 미생물의 배양저해 또는 제 내성 균주를 양산할 가능성이 높기 때문에 현재 농가에서 사용되고 있는 항생제 중 고시된 성분을 분석함.
- 효소 가수분해 동물 혈액 중의 항생제 물질을 확인하기 위하여, <동물의약품안전사용기준-농림축산검역본부 고시 제2016-24호>에 고시되어 있는 항생제 중 테트라사이클린 계열, 퀴논 계열, 설파아민, 클로람페니콜 계열의 항생제를 측정할 수 있는 효소 결합 면역 측정법 (enzyme immunoassay, ELISA)으로 측정함. ELISA 측정법은 Eurofins 사의 키트를 활용하였으며, 개별 항생제를 측정할 수 있는 Chloramphenicol (code: AB600), Quinolones (code: H0050005), Sulphonamides (code: HU0050006), Tetracyclines (code: AB754)를 사용함.
- 각 키트에서 제공한 적합한 측정법에 따라 시료를 효소 면역반응을 수행한 후 최종적으로 microplate reader를 사용하여 흡광도 450 nm에서 시료를 측정 후, 표준물질과의 비교를 통해 항생제의 상대적 양을 측정함.

○ 효소 가수분해 동물혈액 내에 존재하는 생물학적 인자 분석

- 효소 가수분해 동물혈액 내에 존재하는 생물학적 인자를 분석하기 위해 박테리아, 진균을 메타지놈 분석을 통해 확인함. 시료 1과 시료 2에서 전체 DNA 추출을 위하여 건조된 효소가수분해 혈액 시료 약 0.25 mg을 UltraClean Microbial DNA isolation kit (MoBio Laboratories Inc.)를 사용하여 키트에 제시된 방법으로 추출하여 DNA 양을 측정 후, PCR amplification을 위한 주형으로 사용함.
- PCR을 통한 미생물 유전자로부터 미생물을 분석하기 위해 박테리아는 16S rDNA에서 V4-V5에 해당하는 영역과 진균은 18S rDNA에서 ITS1-4에 해당하는 유전자를 선택적으로 증폭할 수 있는 프라이머를 사용하여 해당 유전자를 증폭하여 Nextera XT index kit (Illumina)를 이용하여 라이브러리를 제작함.
- 제작된 라이브러리는 Illumina Miseq platform을 이용하여 유전자 서열 정보를 획득하여, 해당 염기서열의 해석을 통해 Operational taxonomic unit (OTU)을 생물정보학 분석을 통해 미생물의 최종 군집을 통계학적으로 확인함.

○ 효소 가수분해 동물 혈액 대사체 분석을 통한 배양 배지 조성을 위한 핵심성분 확인

- 효소 가수분해 혈액 중에 존재하는 단백질 분해로 유리되는 아미노산과 다양한 물질의 정성, 정량 분석을 위하여 대사체 분석 (metabolome analysis)을 수행함.

- 대사체 분석을 위한 시료 준비는 다음과 같음: 건조 시료 1과 시료 2를 10 mg을 600 μ l 메탄올과 혼합한 후 여기에 표준물질을 추가한 후, homogenizer를 사용하여 시료를 균질화 함. 균질화된 시료에 600 μ l Milli-Q water를 추가한 후 시료를 재 균질화 시킨 후, 원심분리를 통해 시료를 회수함. 원심분리를 통해 회수된 시료 400 μ l를 5 kDa cut-off membrane filter를 통과 시켜 macromolecule을 제거한 후, 다시 50 μ l Milli-Q water를 추가하여 LC-MS 분석을 위한 시료를 준비함.
 - Agilent Capillary electrophoresis time of-flight mass spectrometry (CE-TOF-MS)를 사용하여 양이온과 음이온 분석을 수행하였으며, fused silica capillary (50 μ m x 80 cm)를 분석칼럼으로 하여 양이온 분석을 위해서는 칼럼을 5초 간 50 mbar, 4000 V, 30 kV MS capillary voltage로 하여 ESI 양이온 모드에서 분석함. 음이온 분석은 22초 간 mbar, 3500 V, 30 kV MS capillary voltage로 하여 ESI 음이온 모드에서 분석함.
 - 분석된 각각의 물질의 정성, 정량 분석은 음이온과 양이온 분석시 획득된 크로마토그램을 MS 범위를 50-1,000 m/z로 하여 스캔하여 획득하였으며, 화학 물질 라이브러리와 기 분석된 표준물질을 기준으로 확인함. 미확인 물질에 해당하는 피크의 경우는 PubChem database (<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>)를 사용하여 확인함.
- 동물 혈액의 단백질 효소분해물을 활용한 meat peptone/extract 대체를 위한 미생물 배지 효능 확인
- 동물혈액 단백질 효소분해물을 활용한 미생물 배지는 건조 상태의 돼지혈액 1차 가수 분해 산물을 사용함. 유산균 *Lactobacillus*와 그람 음성균인 *Bacillus* 균 배양에 사용되는 meat peptone/extract 배지 성분이 대체 가능한지를 확인하기 위하여 de Man, Rogosa, Sharpe (MRS) 및 Luria-Berani (LB) 배지를 대상으로 하여 complex synthetic medium 배양 배지를 제작함. 각 미생물 배양을 위한 배지 조성은 (표-15) 및 (표-16)에 표시함.
 - 혈액 효소 가수분해물을 포함하는 배지의 경우 용해되지 않는 혈액 가수분해물이 존재하여 액상배양을 통해 세포의 성장을 측정하는 spectrophotometer의 optical density (OD 600 nm)를 사용할 수 없어서, 액상에서 배양한 균체를 고상배지에 도말하여 형성된 colony의 숫자를 세는 colony forming units (CFUs)으로 미생물의 성장량을 측정함.
 - 유산균은 *Lactobacillus plantarum*과 바실러스는 *Bacillus* sp. B-100 균주를 사용하였으며, 적절한 배합 조성으로 제작한 액상 배지 또는 고상 배지를 멸균한 후, 미생물 접종 후 37°C에서 24시간 200 rpm으로 진탕 배양한 후, 균체의 성장을 연속 희석을 통해 MRS와 LB 고상배지에 도말하여 CFUs를 측정함.
- 크로마토그래피, 멤브레인 여과 농축 과정을 통한 동물세포 배양을 위한 필수 성분 확인
- 크로마토그래피 방법을 통한 동물세포 배양을 위한 필수성분 확보를 위하여 동물 혈액 가수분해 산물 중 건조된 2차 가수분해물을 10% (w/v)을 증류수에 용해시킨 후, size exclusion chromatography인 Sephadex S-300 (1.7 x117 cm) 칼럼에 주입하여 증류수를 1 ml/min으로 흘려주면서, 각 분획을 8 ml/tube로 분획함. 분획된 용액은 MW cut off 3 kDa membrane filter를 이용하여 농축하였으며, 농축용액과 필터된 용액 모두를 아미노산, 단백질 또는 펩타이드 함량을 확인함.
 - 분획된 용액에 포함된 아미노산은 각 분획 100 μ l과 10 μ l o-Phthaldialdehyde (OPA) Reagent을 혼합하여 30분 간 상온에서 반응한 후 microplate reader를 사용하여 450 nm에서 상대적인 양을 측정함. 단백질과 펩타이드 성분의 측정은 각 분획 50 μ l에 200 μ l

Bradford solution을 첨가하여 위와 동일한 방법으로 595 nm에서 측정함.

○ CHO 세포주 및 특정 세포주를 대상으로 세포성장, 형태적 변화, 분화도 등 특이성 비교를 통한 배지 적합성 분석

- Chinese hamster ovary (CHO) cells은 상업적으로 판매하고 있는 ExpiCHO-S™ Cells (Thermofisher)을 구입하여 사용하였다. 해당 세포주는 CHO-S Chinese hamster ovary (CHO) cells로부터 선별된 non-engineered subclone으로 단백질 발현에 최적인 세포로 알려져 있음.
- 세포 배양 배지에 사용되는 Fetal Bovine Serum (FBS)로 대체하여 사용하는 배지 적합성을 확인하기 위하여 Dulbecco Modified Eagle Medium (DMEM) 배지에 glutamine이 포함되어 있는 DMEM-GlutaMAX™ (Thermofisher)을 기본 배지로 하여 10% (v/v) FBS를 추가한 배지를 positive control, FBS를 추가하지 않은 negative control, 2차 혈액가수분해 산물 10% (w/v, 최종 농도 45 mg/ml) 또는 혈장가수분해 산물 10% (w/v, 최종 농도 45 mg/ml)을 포함한 실험군 (test group)으로 CHO 세포를 배양함.
- 세포 배양은 37°C에서 CO₂ 배양기에서 6~8% CO₂를 공급하여, 125 rpm으로 배양하면서 24시간 간격으로 각 배양 배지에서 총 세포 숫자와 배양배지에 남아 있는 아미노산의 함량을 측정함.
- 배양 배지에 남아 있는 유리아미노산의 함량은 o-Phthaldialdehyde (OPA)와 9-Fluorenylmethyl oxycarbonyl (FMOC) chloride를 in situ로 autosampler에서 형광 라벨링하여 HPLC를 사용하여 정량함. 상세한 측정방법은 다음과 같음: 5 µl boric acid와 2.5 µl 각각의 시료를 혼합한 후, 1.5 µl OPA 용액을 첨가하고 다시 증류수 9 µl와 1.6 µl FMOC 용액을 혼합하여 아미노산을 형광 라벨링 함. 형광 라벨링된 시료는 이동상 A (Na₂HPO₄, pH 7.8)와 이동상 B (ACN:MeOH:DW=4.5:4.5:1.0)의 농도구배로 ZORBAX Eclipse AAA (4.6 X 150 mm) 분석컬럼을 장착된 HPLC에서 Diode-Array Detection (DAD)로 형광 감도를 측정하여, 표준물질과 상대적인 비교를 통해 잔여 아미노산의 함량을 측정함.
- Skin fibroblasts 세포의 배양은 Skin fibroblasts ATCC-CRL2097 세포주를 pre-culture를 통해 96 well plate에 약 2000 cells/96 well을 complete medium로 Minimum Essential Media (MEM)/ 10% (v/v) FBS/ 1% P/S (Penicillin-Streptomycin, 5,000 U/ml)를 사용하여 37°C에서 CO₂ 배양기에서 5% CO₂를 공급하여, 정지 배양함.
- Skin fibroblasts 세포주는 10% (v/v) FBS가 포함되지 않은 MEM에 혈액 가수분해 및 혈장 가수분해산물을 phosphate saline buffer에 추가하여서 농도를 0, 500, 1000, 2500, 5000 µg/ml로 10% (v/v)로 배양 배지에 추가하여 해당 세포를 배양하였으며, 각 시간별 살아있는 세포는 Cell proliferation/ Cytotoxicity를 Cell Counting Kit-8 용액을 1:10 비율로 추가하여 살아있는 세포의 상대적인 양을 측정함.

○ 동물 혈액 효소 가수분해 산물 기반 신규 배지를 이용한 동물세포 배양 효능 비교 분석

- FBS 성분을 대체하기위한 돼지 혈액 효소 가수분해 산물이 포함된 배지에서 CHO 세포의 성장을 비교하기 위해서, 상업적으로 판매되고 있는 EXpiCHO™ expression medium (Thermofisher)을 양성대조군으로 하여 DMEM-GlutaMAX™ (Thermofisher)을 기본

배지로 하여 10% (v/v) FBS를 추가한 배지, FBS를 추가하지 않은 배지, 2차 혈액가수분해 산물 10% (w/v) 또는 혈장가수분해 산물 10% (w/v)을 포함한 실험군 (test group)으로 CHO 세포를 배양함.

- 또한 아미노산의 함량이 특징적으로 CHO 세포 배양에 직접적인 영향을 주는 것인지 확인하기 위하여 대조군으로 동물 혈액 가수분해 산물과 동일한 조성의 20개 아미노산 혼합물을 제작하여 동일량으로 DMEM-GlutaMAX 배지에 추가하여 CHO 세포의 성장을 관찰함.

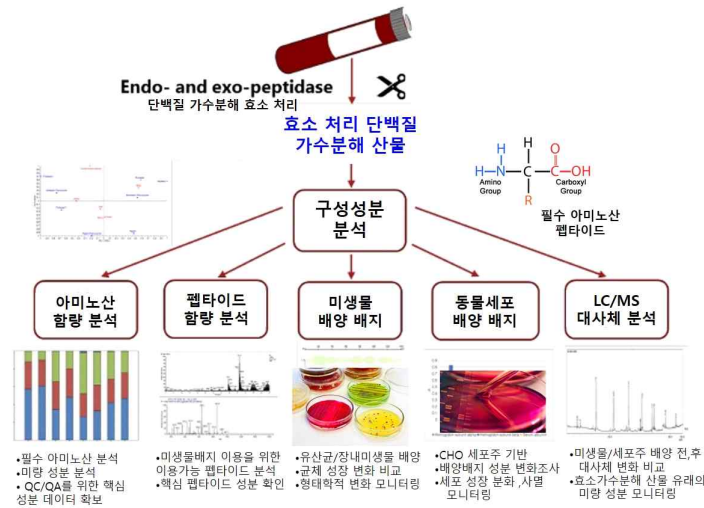


그림 18. 동물혈액 효소가수분해 산물 유래의 아미노산 주 성분의 미생물-세포주 배양 배지 소재 연구 개발 방법

○ 실험동물

- 8주령의 ICR 마우스 수컷을 일주일간 순화를 하였고 실내 온도 23°C±2°C, 습도 50%±10%를 유지하였음. 본 연구에 사용된 실험동물은 충남대학교 동물실험윤리위원회의 승인 하에 진행하였음. 순화된 마우스는 군별로 정상군, 축산부산물 250, 500 mg/kg 투여군, 양성대조군으로서 루신 (Leucine) 500 mg/kg 투여군으로 분류하였으며, 군당 마리수는 8마리로 설정하였음. 시료는 액체식이에 혼합하여 5주 간 자유식이를 실시하였으며, 5주 후 탈진 수영운동과 탈진 트레드밀 운동 테스트를 수행하였음 (그림 19).

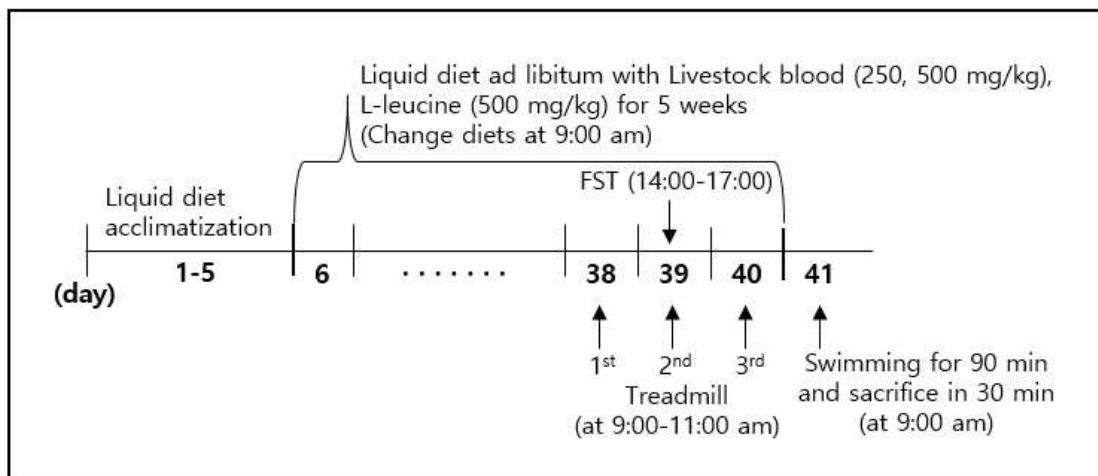


그림 19. 운동수행능력평가를 위한 동물실험 디자인

○ 운동수행 능력평가

• 탈진 수영운동 테스트 :

Swimming Test를 위한 장치로서 지름 17 cm 높이 27 cm 규격의 물통을 사용하고, 물의 온도는 27°C로 유지하며, 수면의 높이는 20 cm로 마우스의 꼬리가 물통 바닥에 닿지 않도록 하였음. 강제 수영의 운동 강도를 높이기 위하여 7% 무게의 추를 꼬리에 매달아 테스트를 실시하였으며, 탈진의 기준은 마우스가 수면 아래 5초 간 머무르는 시점으로 설정하였음.

• 탈진 트레드밀 운동 테스트



그림 20. 탈진 트레드밀 운동 테스트

표 1. 탈진 트레드밀 운동 조건

Time (min)	Speed (cm/sec)
0-3	10
3-6	15
6-9	20
9-12	23
12-15	26
15-18	30
18-21	35
21-24	40
24-27	45
27-30	50
>30	55

마우스를 treadmill을 이용하여 그림 1과 같이 마우스를 각 챔버에 넣고, 표 1의 운동조건과 같이 매 3분마다 트레드밀의 속도를 증가시켜서 실험동물의 탈진을 유도하였음. 실험동물은 반대 방향의 전기자극 장치에 의해 한 방향으로만 운동을 수행하며, 실험동물이 탈진하여 전기자극이 연속적으로 3회 이상 발생 시 해당 실험동물을 탈진으로 규정하였음.

• 악력 테스트

근육에서 발휘되는 최대 힘의 변화를 측정하기 위하여, 대조군 및 시료 투여군의 동물들에게 악력 테스트를 실시하였음. 마우스의 꼬리를 잡고 마우스가 악력 시험 장치를 잡게 한 후 꼬리를 뒤로 잡아당길 때 나타나는 앞발과 뒷발의 최대 악력을 측정하였음. 악력은 4회 반복 측정 후 최대값을 사용하였음.

- 혈중 피로물질 평가

5주간 처리한 실험동물을 대상으로 90분간 강제수영을 진행하고 30분간 휴식 후 채취한 혈액을 분석하였음. 혈중 근육 피로 지표로서 젖산 (Lactic acid), 요소질소 (Blood urea nitrogen, BUN), 크레아틴인산화효소 (Creatine kinase, CK)를 측정하여 각 그룹별 마우스의 혈중 피로물질의 축적에 대한 영향을 평가하였음.

- 웨스턴 블롯 측정 (Western blotting)

비복근 (Gastrocnemius, Gas) 조직 파쇄액을 12,000 rpm으로 15분 간 원심분리하여 획득한 단백질을 시료를 Bradford assay (Bio-rad)를 이용하여 단백질을 정량하고 10% acrylamide가 포함된 gel을 이용해 SDS-PAGE를 수행하였음. PVDF transfer membrane으로 단백질을 흡착시키고 5% skim milk가 포함된 TBS-T buffer로 2시간 동안 blocking. 1차 항체와 2차 항체를 반응시킨 후 Western ECL solution (Biofact)을 사용하여 단백질의 발현 정도를 측정하였음.

- 통계학적 유의성

실험결과는 생리식염수 투여 군 (정상군)과 시료 투여군 (축산혈액부산물, 양성대조군 L-leucine)의 Dunnett Multiple Comparisons Test를 실시하여 그 유의성을 검증하였으며, 유의수준은 < 0.05 으로 설정하였음.

3. 연구개발과제의 수행 결과 및 목표 달성 정도

1) 연구수행 결과

(1) 정성적 연구개발성과

가. 연구 수행내용 및 연구결과

구분 (연도)	세부과제명	세부연구목표	연구개발 수행내용	연구결과
1차 년도 (2020)	미생물 배양이 적합하고, 운동 수행능이 우수한 동물 혈액의 단백질 효소 분해 기술 확립	응고혈의 전처리 공정 확립	<ul style="list-style-type: none"> • 콜로이드 밀을 이용한 응고혈 분쇄 테스트 	<ul style="list-style-type: none"> • 콜로이드 밀을 이용하여 응고혈 분쇄 테스트 결과 일반 분쇄용 분쇄날 사용 시 체망에 걸릴 정도의 응고혈 입자가 많이 발생함을 확인 • 응고혈의 분쇄 정도를 높이기 위해 분쇄날의 이 (tooth)가 더 작고, 분쇄날 사이의 간극이 더 좁은 미분쇄날을 이용하여 분쇄한 결과, 일반 분쇄용 분쇄날보다 미분쇄용 분쇄날의 분쇄 성능이 보다 양호함을 확인
			<ul style="list-style-type: none"> • 응고혈 액화기를 이용한 응고혈 분쇄 테스트 	<ul style="list-style-type: none"> • 기존에 당사에서 개발한 응고혈 액화기를 이용하여 응고혈 분쇄 테스트 진행 • 응고혈 액화기를 이용할 경우 콜로이드 밀에서 발생하는 문제가 줄어들며, 응고혈 분쇄 성능은 콜로이드 밀의 미분쇄용 분쇄날의 경우보다 우수함을 확인
	효소 발효 분해 공정 확립	효소 발효 분해 공정 확립	<ul style="list-style-type: none"> • 새로운 효소를 이용한 효소 분해 테스트 	<ul style="list-style-type: none"> • 식품 첨가용 액상 효소 및 분말 효소를 이용하여 혈액의 효소 분해 테스트 진행하여 식품 첨가용 액상 효소, 분말 효소 모두 혈액의 효소 분해 정도가 양호한 것을 확인 • 상업적인 장점과 염 성분 문제에서 자유로운 식품 첨가용 액상 효소를 이용하여 본 과제를 비롯한 당사 제품에 적용하기로 결정
			<ul style="list-style-type: none"> • 구연산의 방부 효과 테스트 	<ul style="list-style-type: none"> • 구연산을 농도별로 처리하고 날짜별로 균을 침전시켜 pellet의 크기를 비교한 결과 0.5% 구연산 처리 시 10일 후까지 방부효과가 지속되는

							것을 확인		
							1차 전처리 공정 및 효소 분해 공정의 아미노산 분석 의뢰 (공인인증기관)	<ul style="list-style-type: none"> 효소 0.1%와 1%로 분해한 단백질의 유리 및 구성 아미노산 분석 효소 1.2%로 분해하여 분무 건조한 소재의 유리 및 구성 아미노산 분석 	<ul style="list-style-type: none"> 효소 0.1%와 1%로 분해한 샘플의 유리 아미노산 및 구성 아미노산의 농도는 1%를 처리한 샘플에서 약 5배 높음을 확인 총 분석한 아미노산의 함량은 84.5%로 확인되었으며 이 중 27.2%가 유리 아미노산으로 존재함을 확인
							협동1연구기관과 협동2연구기관에 공정별 동물 혈액물을 제공	<ul style="list-style-type: none"> 협동연구기관인 충남대학교 산학협력단에 공정별 동물 혈액물 제공 	<ul style="list-style-type: none"> 도축장에서 수거된 응고혈과 분쇄기를 이용하여 분쇄한 혈액물 전달
							협동1연구기관과 협동2연구기관에 최종 단백질 분해된 동물 혈액물을 제공	<ul style="list-style-type: none"> 협동연구기관인 한국생명공학연구원과 충남대학교 산학협력단에 최종 단백질 분해된 동물 혈액물 제공 	<ul style="list-style-type: none"> 단백질 분해효소로 분해한 혈액의 액상 형태와 분말 형태, 건조 후 분쇄한 입상 형태의 혈액 소재 전달
동물 혈액의 단백질 효소 분해물을 활용한 미생물 및 동물 세포 배양 배지 개발을 위한 성분 분석	효소 혈액 단백질 가수분해산물의 성분 분석	단백질 함량, 당성분, 당단백질, 무기물 함량 정량 분석	<ul style="list-style-type: none"> 혈액 가수분해 산물의 동일 양에 존재하는 단백질 함량 분석 LC-MS 기반 효소가수 분해 산물 내에 존재하는 주요 성분 및 미량 성분 분석 	<ul style="list-style-type: none"> 2종의 시료에서 시료 1은 수용성 성분은 측정한계 내에서 단백질은 측정되지 않음 LC-MS 분석을 통해 라이브리리 기반 수용성 물질 총 287종 (양이온 모드 171종, 음이온 모드 116종)의 물질 측정 81종에 대해 정량 분석 확인 					
		혈액 가수분해산물의 아미노산 함량 분석	<ul style="list-style-type: none"> 혈액 가수분해 산물의 동일 양에 존재하는 필수 아미노산 확인 효소 가수분해 공정으로 제작된 샘플 내 필수 아미노산 함량의 정량 비교 분석 	<ul style="list-style-type: none"> LC-MS 분석을 통해 2종의 시료에서 필수 아미노산 20종 모두 확인되었으며, Glu와 Trp가 최대, 최저로 측정됨 20종의 아미노산의 단위 중량당 nmol/g 함량 비교를 통해, 2종의 시료에서 최대, 최저로 Glu 21배 Trp 0.14배 차이 확인 					
	Meat pepton e 대체 배지 소재 동급 조성 및 제재화	동물 혈액 효소 가수 분해 산물 내에 존재하는 항생제 및 잔류 성분 분석	<ul style="list-style-type: none"> ELISA 정량법을 이용한 동물 항생제 측정 LC-MS를 이용한 잔류 동물 의약 물질 측정 	<ul style="list-style-type: none"> 동물용 항생제 3종 (페니실린, 퀴논계열)에 대해 ELISA 방법으로 항생제 존재 여부 확인하여 2종의 시료 내에 측정 범위 미만으로 확인 LC-MS 분석을 통해 페니실아민과 케토프로펜 측정 					

		기술을 기반한 미생물 배지 적합성 분석	동물 혈액 효소 가수분해 산물 중에 존재하는 미생물의 군집 양상 분석	<ul style="list-style-type: none"> • 분자생물학적 기법을 이용한 혈액 가수분해 산물 내에 존재하는 미생물 및 곰팡이 존재 여부 확인 • NGS를 이용한 미생물 군집의 분석 	<ul style="list-style-type: none"> • 혈액 가수분해 산물에 존재하는 미생물을 16S rDNA와 ITS1-4 probe로 확인한 결과 곰팡이는 측정 한계 미만이며, 박테리아는 다수 측정됨 • NGS를 통해 군집 분석을 한 결과 phylume 수준에서 2종의 시료 모두 proteobacteria, firmicutes, bacteroides 확인됨
		미생물 배양 후 기존 상업용 배지와 의 효능 비교 분석	1차 혈액 가수분해 산물을 이용한 미생물 배양 조건 확립	<ul style="list-style-type: none"> • 미생물 배양을 위한 1차 혈액 가수분해 산물의 최적 농도 및 첨가 성분 확립 • 농업용 활용을 위한 유산균, 바실러스 균 배양을 통한 성장 확인 	<ul style="list-style-type: none"> • 1-2% (w/v) 혈액 가수분해 산물의 미생물 배양 배지 제작 가능성 확인 • 상업용 LB에서 tryptone 또는 MRS에서 beef extract/peptone을 대용하여 동일 중량으로 바실러스와 유산균 배양 가능성 확인
			1차 혈액 가수분해 산물의 미생물 배양을 통한 배지 적합성 확인	<ul style="list-style-type: none"> • LB 또는 MRS 배지 대비 혈액 가수 분해 배지와 유산균 배양 정도 비교 	<ul style="list-style-type: none"> • 혈액 가수분해 산물만으로 배양 배지 조성 시, 바실러스 균은 2배 성장이 증가 됐으나, 유산균의 경우 탄소원 성분 부족으로 1/30로 성장감소 확인 • MRS와 동량의 탄소원 추가를 통해 유산균의 성장 확인
	동물 혈액 단백질 효소 분해물로 제조된 최종 기능성 조성물을 섭취한 동물의 운동 수행 능력 평가		공정별 축산부산물을 섭취한 동물의 운동 수행 능력 영향 평가 (<i>in vivo</i>)	<ul style="list-style-type: none"> • 실험동물 설정 	<ul style="list-style-type: none"> • 축산부산물 농도 2종 및 양성대조군 (Leucine)을 5주 간 액체 식이에 혼합하여 투여함 • 탈진 수영 운동 및 탈진 트레드밀 운동 방법을 설정함
				<ul style="list-style-type: none"> • 운동 수행 능력 평가 	<ul style="list-style-type: none"> • 탈진 수영 운동 및 탈진 트레드밀 운동 테스트에서 축산부산물의 투여에 의해 지구력이 개선됨을 확인 • 운동으로 증가된 혈중 피로물질 Lactate, BUN, CK의 양이 축산부산물의 투여에 의해 감소됨을 확인
2차 년도 (2021)	미생물 배양이 적합하고, 운동 수행능이 우수한 동물 혈액의 단백질		단백질 효소분해 기술을 확립한 동물 혈액의 분리·정제 기술 확립	<ul style="list-style-type: none"> • lab scale 혈장 분리 • 효소 분해 기술 확립 	<ul style="list-style-type: none"> • lab scale에서 원심분리기를 이용한 혈장 분리 및 효소 농도별 단백질 분해 테스트 수행 • 혈장의 단백질 분해 시 다량의 침전물이 발생함을 확인 • 효소를 농도별로 처리 한 후 SDS-PAGE를 이용하여 단백질

효소 분해 기술 확립			<ul style="list-style-type: none"> 단백질 분해능 비교 분석을 통한 최적의 효소 농도 결정 전혈에 효소를 농도별로 처리 한 후 incucyte를 이용하여 cell morphology 변화 확인 HPLC를 이용한 펩타이드 분자량 분포 확인 결과 대부분의 단백질이 단백질 분해 효소에 의해 12 kDa 이하의 펩타이드로 분해되었으며 60% 이상이 1 kDa 이하인 것을 확인 아미노산 분석을 통한 각 소재의 유리아미노산 비율 결정
		<ul style="list-style-type: none"> 산업용 원심분리기를 이용한 혈장 분리 	<ul style="list-style-type: none"> 알파라발의 클라라 20을 이용한 혈장 분리 테스트 결과 lab scale과는 다르게 적혈구 용혈 현상이 발생함을 확인
	탈색, 탈취 공정 확립	<ul style="list-style-type: none"> 혈액 가수분해물의 탈색, 탈취, 흡착 과정 확립 	<ul style="list-style-type: none"> 입상 활성탄과 분말 활성탄의 탈색·탈취 효능 비교 결과 분말 활성탄 사용 결정 활성탄의 처리 농도에 따른 고형물 변화 측정 결과 활성탄 농도에 비례하여 고형물 농도가 감소됨을 확인
	여과 및 농축 공정 확립	<ul style="list-style-type: none"> 천연 광물질을 활용한 여과 정제 	<ul style="list-style-type: none"> 규조토를 이용한 필터 제작 및 여과를 통한 활성탄 제거 공정 확립
		<ul style="list-style-type: none"> 농축 공정 테스트 	<ul style="list-style-type: none"> 대형 농축기를 이용하여 최종 여액을 농축한 후 고형물 농도 확인 농축 후 필터링이 되지 않는 문제 발생으로 농축 공정은 최종 공정에서 제외함
		<ul style="list-style-type: none"> 마이크로 필터링 공정 확립 	<ul style="list-style-type: none"> 1 μm- 0.5 μm- 0.2 μm 필터를 이용한 필터링을 통해 규조토 필터링을 거친 여액의 잔여 활성탄 및 규조토 제거 공정 확립 침전 필터와 활성탄 필터 및 UF 필터를 이용하여 혈장 분해물 여과 및 여액의 아미노산 분석 Ultrafiltration에 의한 단백질 함량 저하 확인
	건조 공정 확립	<ul style="list-style-type: none"> 건조 조건 확립 	<ul style="list-style-type: none"> 열풍 건조, 동결 건조, 분무건조를 이용하여 소재의 건조 효율

동물 혈액의 단백질 효소 분해물을 활용한 미생물 및 동물 세포 배양 배지 개발을 위한 성분 분석	최종 소재의 상품화			비교 결과 소재의 연속적인 건조에 분무건조가 가장 적합함을 결정	
		• 시제품 제작	<ul style="list-style-type: none"> • 포장 단위 및 용기 결정 • 식품 OEM 업체를 통한 시제품 제작 • 식품 유통 전문 판매업 신고 완료 및 품목보고서 제출 		
	효소 혈액 단백질 가수산물의 추가 성분분석 및 필수 성분 분획	동물혈액 가수분해 산물에 존재하는 펩타이드, 디펩타이드 및 잔류 성분 분석	<ul style="list-style-type: none"> • 혈액가수분해 산물에 존재하는 단백질 유래의 펩타이드 성분 분석 • LC-MS를 활용한 아미노산, 아미노산 유래 물질, 디펩타이드 성분 분석 	<ul style="list-style-type: none"> • 1,2차 혈액 가수분해 산물에서의 전체적인 펩타이드의 크기 프로파일 분석 • 펩타이드 ID를 통한 혈액가수분해 산물 중에 존재하는 41개 단백질 확인 • LC-MS 재분석을 통해 PubChem database에서 519개, HMP database에서 160개, HMT peptide list에서 700개의 물질을 확인 • 1,2차 혈액가수분해 산물에서의 아미노산 및 아미노산 유래 물질 정량 분석 및 상대적인 디펩타이드 성분 분석 	
			크로마토그램 및 멤브레인 농축을 통한 필수 성분의 분획	<ul style="list-style-type: none"> • Gel-filtration 크로마토그램을 이용한 단백질, 펩타이드, 아미노산 및 저분자 물질 분획 • 분획된 저분자 물질의 멤브레인을 이용한 농축 	<ul style="list-style-type: none"> • Sephadex S-300 컬럼을 이용한 고분자 단백질, 저분자 펩타이드 및 아미노산 분획 수행 • 3 kDa cut-off 멤브레인 농축을 통해 단백질 성분과 저분자 물질의 농축, 분획을 통해 펩타이드 성분 확보
		혈액 가수분해 산물을 이용한 동물세포 배양	동물 세포배양을 위한 배지 성분 대체를 통한 CHO 세포 배양 조건 확립	<ul style="list-style-type: none"> • DMEM 배지에서 FBS 대체 CHO-S 세포 배양을 통한 세포 성장 효능 분석 • 세포배양 배지 내의 아미노산 함량 분석 	<ul style="list-style-type: none"> • 10% FBS 대체를 위한 혈액가수분해 성분의 농도별 추가를 통한 최적 농도 45 mg/mL에서 최적 성장 확인 • 세포의 형태적 관찰을 통한 혈액가수분해 산물의 무독성 확인
			동물 세포 배양 배지의 적용 기술 개발을 위한 skin fibroblast 세포 대상 세포 성장	<ul style="list-style-type: none"> • 최소 배지에서 FBS를 대체한 혈액가수분해 산물 추가 상태에서의 Skin fibroblast 세포의 성장 분석 	<ul style="list-style-type: none"> • MEM 배지에서 Skin fibroblast 배양을 위한 FBS 대체 물질로 첨가하여 유사한 세포 성장 효능이 있음을 확인 • 농도별 실험을 통해 500 ug/mL이 최적 농도이며 농도가 증가할수록 세포 성장에 저해가 있으나, cytotoxicity는 관찰되지 않

		효율 분석		<p>음</p> <ul style="list-style-type: none"> Confocal microscopy 분석을 통해 FBS에 비해 cytoskeleton 형성이 상대적으로 적게 형성되는 것이 관찰됨
	혈액가수분해 산물을 포함한 동물세포 배양에서 기존 상업용 배지의 효능 비교 분석	상업적 최적 배지와 세포 성장 비교를 통한 효능 비교	<ul style="list-style-type: none"> 상업용 배지와 혈액가수분해 산물 추가 기본 배지 내에서의 세포 성장 효능 비교 분석 	<ul style="list-style-type: none"> 상업용 배지와 혈액가수분해 산물 첨가 배지에서 CHO-S 세포의 80% 정도의 세포 성장 효능 확인 혈액가수분해 산물과 동일한 필수 아미노산 혼합물 첨가 배지에서의 세포 성장 효율 비교
		세포배양액 내에 대사물질 분석을 통한 동물 세포 배양 모니터링	<ul style="list-style-type: none"> 배양 배지별 아미노산 소모량 분석을 통한 배지별 CHO-S 세포의 성장 효율 분석 	<ul style="list-style-type: none"> 각 배지별 아미노산 조성 비율 및 소모농도의 비교를 통한 상업적 배지와 혈액가수분해 배지에서 CHO-S 세포의 상대적 성장 효능 분석 아미노산 뿐 아니라 혈액가수분해 산물 내에 존재하는 펩타이드 성분과 기타 성분이 세포 성장에 영향을 주는 것을 확인
동물 혈액 단백질 효소 분해물로 제조된 최종 기능성 조성물을 섭취한 동물의 운동 수행 능력 평가	동물 혈액 단백질 효소분해물로 제조된 최종 기능성 조성물(시제품)을 섭취한 동물의 운동 수행 능력 영향 평가 (<i>in vivo</i>)	<ul style="list-style-type: none"> 실험동물 설정 	<ul style="list-style-type: none"> 동물 혈액 단백질 효소분해물로 제조된 최종 기능성 조성물(시제품) 및 양성대조군 (Leucine)을 4주 동안 실험동물에 투여함 운동 수행 능력 평가를 위한 악력 측정, 탈진 수영 운동 테스트, 탈진 트레드밀 운동 테스트, 혈중 피로물질 평가 방법을 설정함 	
		<ul style="list-style-type: none"> 운동 수행 능력 평가 	<ul style="list-style-type: none"> 악력 측정, 탈진 수영 운동 및 탈진 트레드밀 운동 테스트에서 기능성 조성물(시제품)의 투여에 의해 위 지표들이 개선됨을 확인함. 운동으로 증가된 혈중 피로물질 Lactate, BUN, CK의 양이 기능성 조성물(시제품)의 투여에 의해 감소됨을 확인. 	

(가) 미생물 배양이 적합하고, 운동 수행능이 우수한 동물 혈액의 단백질 효소 분해 기술 확립

○ 응고혈의 전처리 공정 확립

- 아미노랩에서 기존에 개발하여 사용 중인 빗살무늬 다중 커터날을 이용한 분쇄기는 응고혈을 분쇄하는 능력이 양호하여 양산 장비에 적합함. 빗살무늬 다중 커터날은 고정자와 회전자로 구성되어 있으며, 고정자와 회전자는 멧돌을 가는 원리로 응고혈을 분쇄시킴.
- 그러나 진동 및 소음이 크기 때문에 방진 시설이 추가적으로 요구되어 설치 공간이 확보되어야 하고, 방진 시설을 하더라도 소음 문제는 해결하기 어려움. 또한, 전력을 많이 소모하는 단점을 가지고 있음.



그림 21. 빗살무늬 다중 커터날 (좌)과 이를 이용한 응고혈 분쇄기 (우)

○ 콜로이드 밀을 이용한 응고혈 분쇄 테스트

- 소음 및 진동 문제를 개선하기 위해 캐비트론 社의 콜로이드 밀을 이용하여 응고혈 분쇄 테스트 진행함. 콜로이드 밀의 분쇄날은 회전 부분과 이것을 둘러싼 고정 부분으로 되어 있고, 회전 분쇄날과 고정 분쇄날에 서로 엇갈리는 작은 홈이 있으며, 두 분쇄날 사이의 마찰에 의해 분쇄가 진행됨.
- 콜로이드 밀에 공급된 입자는 원심력에 의해 중앙부에서 바깥쪽으로 이동되기 때문에 펌프와 같은 장치가 없어도 이송 및 공급이 가능하며 회전 분쇄날과 고정 분쇄날이 서로 닿지 않아 고속 회전에서도 소음 및 진동이 거의 발생하지 않으며, 펌프를 이용하면 분쇄 처리량(kg/hr)을 크게 높일 수 있음.



그림 22. 콜로이드 밀과 콜로이드 밀의 일반 분쇄용 분쇄날
(고정분쇄날 (중간), 회전분쇄날 (우))

- 콜로이드 밀에 일반적으로 사용되는 분쇄날을 이용하여 응고혈을 분쇄하였으나 눈에 보일 정도의 응고혈 입자가 발생되었으며 재순환을 통해 응고혈을 5분 정도 분쇄하여도 체망에 걸릴 정도의 응고혈 입자가 많이 발생됨. 또한, 재순환을 통해 응고혈을 오랫동안 분쇄 시 혈액의 온도가 증가하는 문제가 발생함.
- 상기 콜로이드 밀의 경우 전동기 (모터)에 직결되어 있으며, 전동기에서 발생하는 열이 콜로이드 밀로 전달됨. 그리고 콜로이드 밀 특성상 분쇄날 사이의 기계적인 마찰은 없지만, 분쇄날 사이의 좁은 틈을 혈액이 지나가면서 혈액과 분쇄날 사이의 마찰로 인해 열이 발생된 것으로 추정됨. 즉, 콜로이드 밀을 이용하여 응고혈을 10분 이상 분쇄할 경우 열이 많이 발생하는 문제가 발생함.



그림 23. 콜로이드 밀의 미분쇄용 분쇄날 (미분쇄용 분쇄날 ; 고정날(右), 회전날(左))

- 분쇄 정도를 높여 응고혈을 분쇄시키기 위해 분쇄날의 이 (tooth)가 더 작고, 분쇄날 사이의 간극이 더 좁은 미분쇄날을 이용하여 응고혈의 분쇄를 시도함. 재순환 방식으로 응고혈 분쇄 시 특정 영역의 응고혈만 여러 번 분쇄되고 나머지 영역의 응고혈은 부족하게 분쇄될 우려가 있음. 미분쇄용 분쇄날을 이용하여 응고혈 전체를 균일하게 분쇄하기 위해 재순환 방식 대신 2개의 탱크를 이용하여 즉, 콜로이드 밀 흡입구와 토출구에 각각 탱크 1개를 연결하여 응고혈을 왔다갔다 왕복하면서 5회 분쇄 진행함.



그림 24. 탱크 2개를 이용한 응고혈

- 재순환 방식 대신 적용한 N회 분쇄 방식의 경우 배관 변경의 조작이 필요하며 시간이 오래 걸리는 단점이 있음. 또한 높은 출력 (55 kW), 높은 회전수 (5000 rpm)의 전동기를 짧은 시간 동안 여러 번 ON & OFF 하였더니 전동기에 무리가 가는 문제 발생함.



그림 25. 일반 분쇄용 분쇄날을 이용하여 응고혈을 분쇄시킨 결과 (좌)와 미분쇄용 분쇄날을 이용하여 응고혈을 분쇄시킨 결과 (우)

- 분쇄 결과, 일반 분쇄용 분쇄날보다 미분쇄용 분쇄날의 분쇄 성능이 보다 양호하였지만, 분쇄혈이 체망에 걸릴 정도로 만족할만한 수준의 분쇄 결과를 얻지는 못함.

○ 응고혈 액화기를 이용한 응고혈 분쇄 테스트

- 가정용 믹서기에서 사용되는 커터날을 응용하여 기존에 당사에서 개발한 ‘응고혈 액화기’를 이용하여 응고혈 분쇄 테스트를 수행함. 커터날을 여러 겹으로 설치하고 커터날을 고속으로 회전시키며 커터날이 설치된 축방향으로 응고혈을 흐르게 하면, 고속으로 회전하는 다중 커터날이 응고혈을 분쇄하는 방식임.

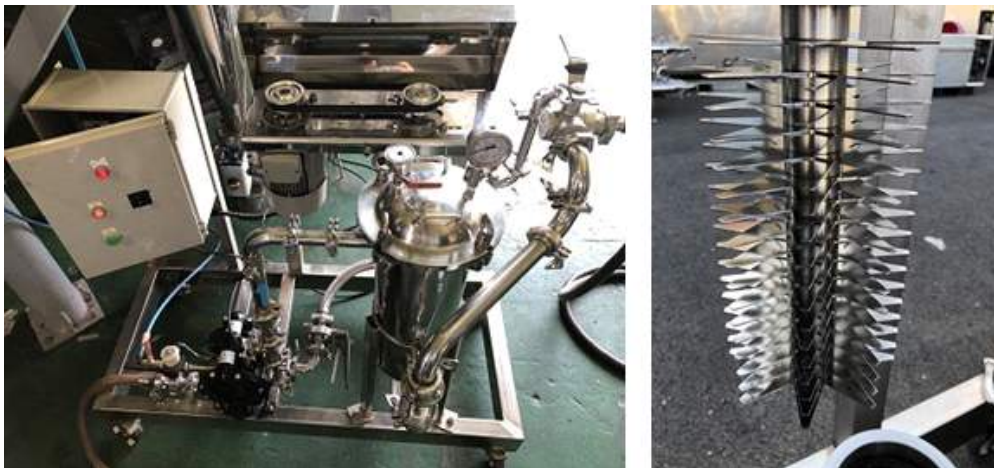


그림 26. 기존에 당사에서 개발한 응고혈 액화기 (좌)와 그 내부에 설치된 다중 커터날 (우)

- 콜로이드 밀을 이용한 응고혈 분쇄와 마찬가지로 기계적인 마찰이 없기 때문에, 그에 따른 분쇄기 자체의 소음 및 진동이 없으며 (전동기의 소음 및 진동만 있음), 기계 부품 사이의 마찰열은 거의 발생되지 않는 장점이 있음.
- 다중 커터날과 응고혈 사이에서 마찰에 의한 열은 거의 발생되지 않지만, 전동기 (모터) 및 다중 커터날에 직결된 풀리 (pulley)에서 열이 발생됨.
- 전동기의 경우 다중 커터날이 있는 하우징 부분과 간접 전동 방식으로 분리되어 열전달이 거의 없으며, 다중 커터날에 직결된 풀리 내부에 냉각수를 흐르게 할 수 있기 때문에 혈액에 열이 가해지는 문제가 발생하지 않음.

- 콜로이드 밀과 같이 응고혈 액화기 흡입구와 토출구에 각각 탱크 1개를 연결하여 응고혈을 5회 왕복하면서 분쇄 진행함.



그림 27. 응고혈 (좌)과 액화기를 이용하여 분쇄한 분쇄혈을 체망에 거르는 모습 (우)

- 응고혈 액화기를 이용하여 응고혈을 분쇄한 결과, 분쇄혈이 체망에 걸리지 않을 정도로 분쇄 결과가 양호한 것을 확인함. 콜로이드 밀을 이용한 응고혈 분쇄와 마찬가지로 일정 수준의 분쇄 성능을 얻기 위해서는 2개의 탱크를 이용하여 N회 왕복시키면서 분쇄해야함. 콜로이드 밀과 응고혈 액화기를 이용한 응고혈 분쇄 방식은 서로 장단점을 가지고 있지만, 당사에 보다 적합한 응고혈 액화기를 이용한 응고혈 분쇄 방식으로 진행하기로 결정함.

○ 효소 발효 분해 공정 확립

- 기존에 사용하던 액상 효소는 공업용으로 사용되던 것으로 미생물 및 동물 세포 배양을 위한 배지에 사용되기에는 부적합하다고 판단됨에 따라 식품 첨가용 액상 효소 및 분말 효소를 이용하여 혈액의 효소 분해 테스트 진행함.



그림 28. 공업용 효소 (좌)과 식품 첨가용 액상 효소 (우) 및 분말 효소 (우)

- 식품 첨가용 액상 효소, 분말 효소 모두 혈액의 효소 분해 정도가 양호한 것으로 판단됨 (혈액의 색도 변화, pH 변화, 점도 변화로 효소 분해 정도 확인).
- 식품 첨가용 효소에 의해 혈액의 분해 반응이 일어나면 혈액의 색이 짙은 붉은색에서 어두운 적갈색으로 변화되는 것을 볼 수 있음.



그림 29. 효소를 투입하기 전 (좌)과 효소 반응 2시간 경과 후의 액화혈 (우)

- 식품 첨가용 효소에 의해 분해되는 혈액의 점도 변화는 기존 공업용 효소에 의해 분해되는 혈액의 점도 변화와 경향성이 동일하며, 효소 투입 후 1 시간 경과 시 점도가 급격히 증가되고, 3 시간 경과 시 점도가 급격히 감소되는 결과를 얻을 수 있음.

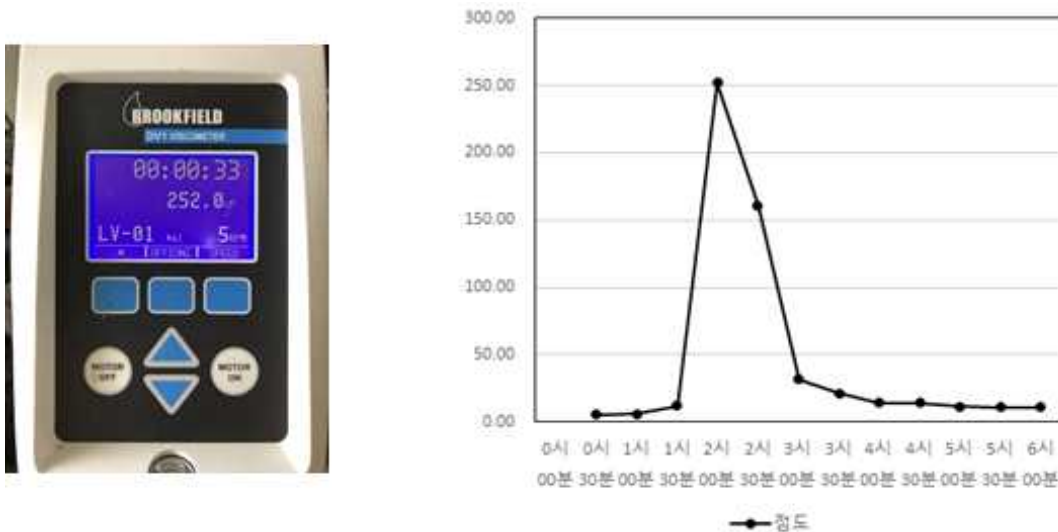


그림 30. 점도계를 이용한 액화혈의 효소 분해에 따른 점도 변화 측정

- 식품 첨가용 액상 효소에 비해 분말 효소의 경우 단가가 높고, 테스트 후 확인한 사항으로 분말 효소의 경우 염 (salt) 성분이 함유되어 있으며, 분말 효소의 경우 상업적으로 양산하기에는 비용 문제가 발생되며, 염 성분으로 인해 활용도가 낮아질 우려가 있음.
 - 이에 비용적인 문제와 염 성분 문제에 대해 보다 자유로운 식품 첨가용 액상 효소를 이용하여 본 과제를 비롯한 당사 제품에 적용 예정임.
- 협동2연구기관에 공정별 동물 혈액물을 제공
- 응고혈 및 분쇄혈을 아이스박스로 포장하여 협동2연구기관인 충남대학교 산학협력단에 제공함.



그림 31. 협동연구기관에 제공한 응고혈 (좌) 과 분쇄혈 (우)

- 협동1연구기관과 협동2연구기관에 최종 단백질 분해된 동물 혈액물을 제공
 - 단백질 효소를 이용하여 가수분해된 혈액은 액상 상태이며, 협동연구기관에서 연구 목적에 맞게 활용할 수 있도록 분말 및 입상 형태로 제조함.
 - 입상 형태는 액상의 효소 가수분해 혈액을 증숙하여 여액을 제거하고 고형물을 필터프레스로 탈수 한 후 케이크를 얻음. 케이크를 제형기에 넣어 제형을 만들고 트레이에 널게 편 후 열풍건조기에서 완전히 건조 후 분쇄하여 제작함.



그림 32. 입상 제형의 효소 가수분해 혈액 제조 공정

- 협동1연구기관인 한국생명공학연구원에는 액상 및 분말 형태로 제조하여 제공하였으며 협동2연구기관인 충남대학교 산학협력단에는 입상 형태로 제조하여 제공함.

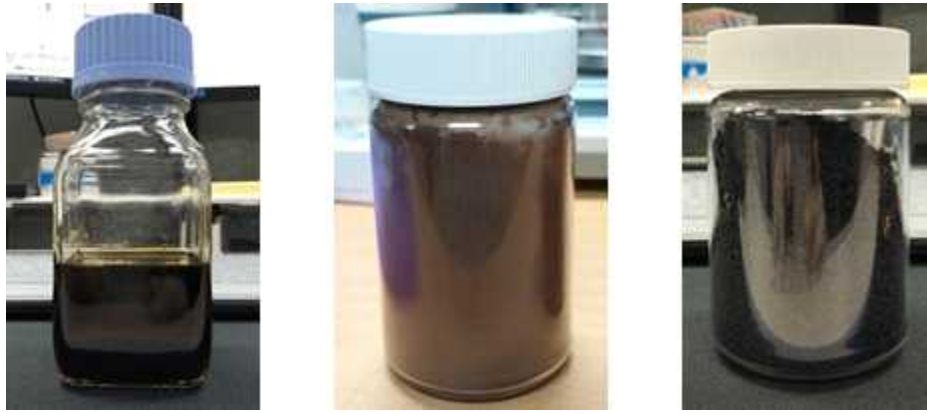


그림 33. 효소 가수분해 혈액 (액상 (좌), 분말 (중간) 및 입상 (우))

○ 효소분해 동물 혈액물 소재의 아미노산 함량 분석

- 액화한 혈액에 효소 0.1%와 1%를 처리하여 55°C에서 16시간 동안 가수분해하고 탈색·탈취한 샘플의 유리 및 구성 아미노산의 함량 분석을 진행함.

표 2. 효소 0.1% 처리 샘플의 유리 및 구성 아미노산 함량

구분	시험·검사 항목	시험·검사 결과 (mg/100 g)
구성 아미노산	Tyrosine	12.68
	Glycine	165.34
	Serine	214.08
	Alanine	515.55
	Glutamic Acid	592.11
	Lysine	199.48
	Leucine	456.33
	Methionine	36.61
	Valine	292.94
	Arginine	13.89
	Aspartic Acid	202.75
	Isoleucine	24.42
	Threonine	165.29
	Phenylalanine	30.92
	Proline	-
	Histidine	45.33
	Cysteine	11.02
	Tryptophan	-
	유리 아미노산	Threonine
Cysteine		-
Tyrosine		42.06
Arginine		8.99
Alanine		197.93
Proline		40.65
Lysine		102.96
Histidine		22.32
Isoleucine		30.12
Leucine		261.63

	Methionine	22.97
	Phenylalanine	17.88
	Tryptophan	-
	Valine	215.97
	Glutamic Acid	125.90
	Aspartic Acid	5.76
	Serine	87.24
	Glycine	65.38
	Glutamine	13.70
	Asparagine	50.04

표 3. 효소 1% 처리 샘플의 유리 및 구성 아미노산 함량

구분	시험·검사 항목	시험·검사 결과 (mg/100 g)
구성 아미노산	Tyrosine	207.97
	Glycine	902.16
	Serine	1135.14
	Alanine	1796.52
	Glutamic Acid	2208.19
	Lysine	1733.03
	Leucine	2196.39
	Methionine	166.05
	Valine	1325.58
	Arginine	423.03
	Aspartic Acid	2251.39
	Isoleucine	176.49
	Threonine	780.23
	Phenylalanine	726.60
	Proline	523.69
	Histidine	1000.04
	Cysteine	66.73
	Tryptophan	44.51
유리 아미노산	Threonine	104.88
	Cysteine	-
	Tyrosine	114.75
	Arginine	34.25
	Alanine	127.32
	Proline	26.04
	Lysine	121.26
	Histidine	41.98
	Isoleucine	88.38
	Leucine	420.76
	Methionine	43.43
	Phenylalanine	142.77
	Tryptophan	26.04
	Valine	103.49
Glutamic Acid	114.70	

	Aspartic Acid	18.83
	Serine	76.01
	Glycine	39.29
	Glutamine	29.59
	Asparagine	48.13

표 4. 샘플의 유리 및 구성 아미노산 함량

구분	아미노산 (g/100 g)	
	유리	구성
enzyme 0.1	1.43634	2.97874
enzyme 1	1.7149	17.66374

- 효소 0.1%와 1%로 분해한 샘플의 총 아미노산의 농도는 효소 1%를 처리한 샘플에서 약 5배 높음. 그러나 유리 아미노산의 함량은 크게 차이가 없음을 확인함. 효소의 함량이 높아질수록 단백질의 분해 효과는 증가하나 유리 아미노산까지의 분해는 분해 시간에 따른 것으로 생각됨. 이 후 효소의 농도를 더 세분화하여 효소 처리 농도와 반응 시간에 따른 분해 정도를 비교함.

○ 전혈을 이용한 효소 농도에 따른 단백질 분해능 비교

- 전혈에 단백질 분해 효소를 처리 한 후 혈구들의 상태 변화를 관찰하기 위하여, 전혈에 효소를 0.5% 또는 1%를 처리 한 후 250 rpm, 56°C로 shaking incubator에서 18시간 동안 반응 시키며 시간대별로 샘플링하여 incucyte에 넣어 관찰함.

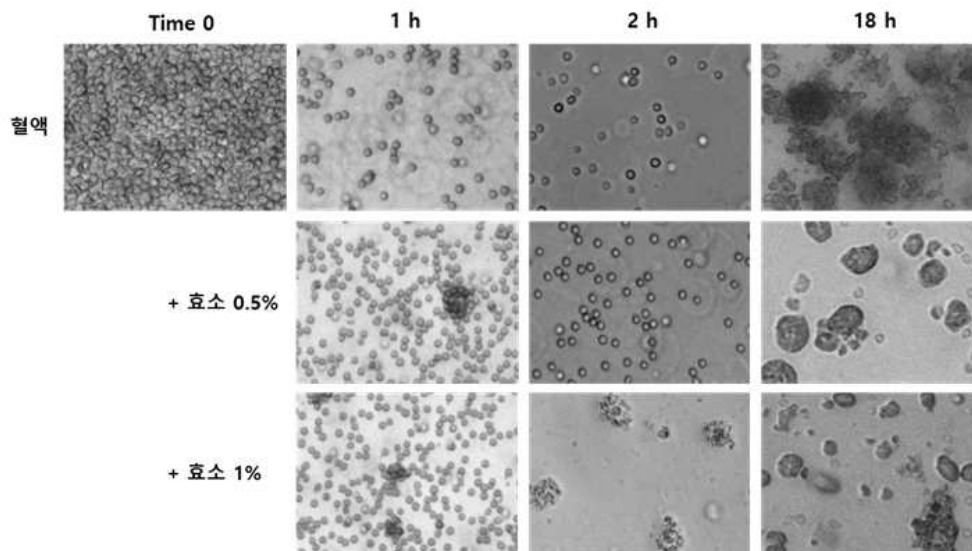


그림 34. 효소에 의한 혈구 세포의 파괴

- 효소를 처리하지 않는 혈액을 관찰한 결과, 시간이 경과함에 따라 높은 온도와 shaking으로 인해 세포의 상태가 나빠지며 서로 뭉치는 현상이 발생하는 것을 확인함. 효소 처리 시 2시간 후부터 세포 상태가 급격히 나빠지며, 0.5%를 처리한 샘플에 비해 1%를 처리한 군에서 더욱 급격한 변화가 관찰됨. 18 시간이 지난 후엔 모든 세포가 죽고 서로 뭉친 것으로 보임.

- 단백질 분해 효소에 의해 세포막에 존재하는 단백질이 분해되어 세포에 데미지를 입히는 것으로 판단됨. 이는 적혈구 내 헤모글로빈 단백질의 유출을 유도할 수 있으며 전혈 소재의 단백질 함량을 증가시키는데 도움이 될 것이라 생각됨.
- 효소의 농도와 반응 시간에 따른 단백질 분해 정도를 비교하기 위하여, 분쇄혈에 효소를 0, 0.2, 0.3, 0.4, 0.5%를 처리하여 56°C에서 반응시키며 시간대별로 샘플링한 후 SDS-PAGE를 이용하여 분해 정도를 비교 분석함.

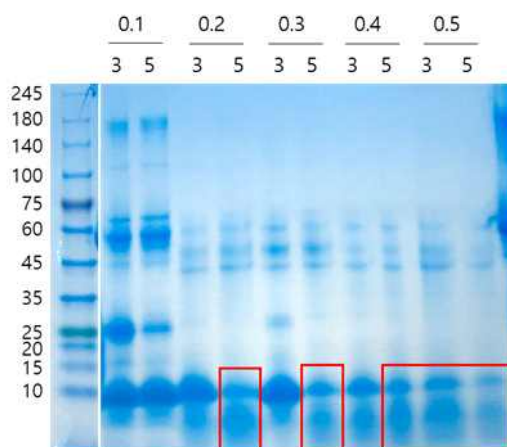


그림 35. SDS-PAGE를 이용한 단백질 밴드 양상 비교

- 효소의 농도와 반응시간에 의존적으로 큰 단백질 밴드가 감소하며, 10 kDa 아래에 넓은 형태의 다른 밴드가 나타남. 이는 효소를 0.2% 처리 한 후 5시간째에 뚜렷하게 증가하였으며 0.5%를 처리한 경우 3 시간째부터 발생하는 것을 확인함.
- 분쇄혈에 효소를 0, 0.2, 0.3, 0.4, 0.5%를 처리하여 56°C에서 반응시키며 시간대별로 샘플링한 후 HPLC를 이용하여 분해 정도를 비교 분석함.

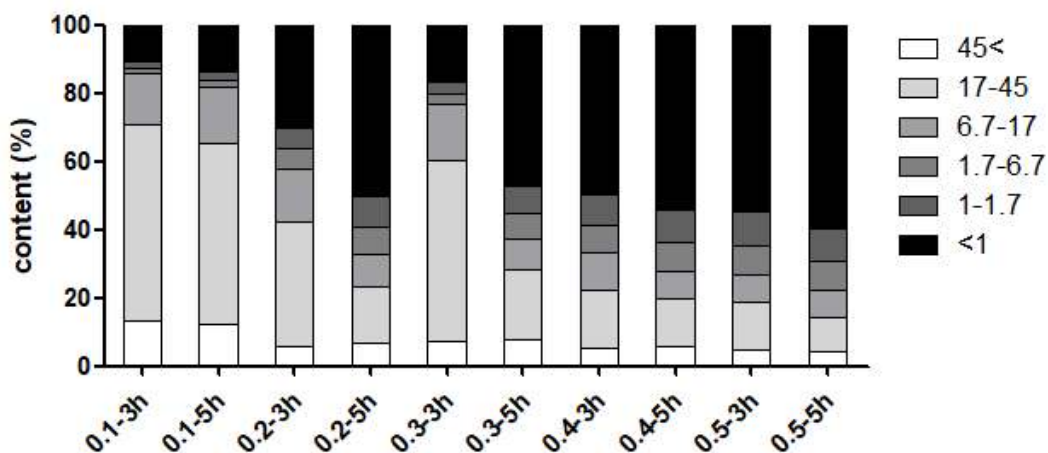


그림 36. HPLC를 이용한 펩타이드 분자량 분포 분석

- SDS-PAGE 결과와 동일한 패턴으로, 효소의 농도와 반응 시간에 의존적으로 저분자량 펩타이드가 증가하는 것으로 확인되었으며 효소 0.2%를 5시간 처리한 조건부터 1 kDa 이하의 저분자 펩타이드의 함량이 두드러지게 증가함.

○ 혈장을 이용한 효소 농도에 따른 단백질 분해능 비교

- 항응고제가 처리된 돼지 혈액을 500 ml 광구병에 동량 넣은 후 3200 rpm으로 20분간 원심분리하여 혈장을 분리함.

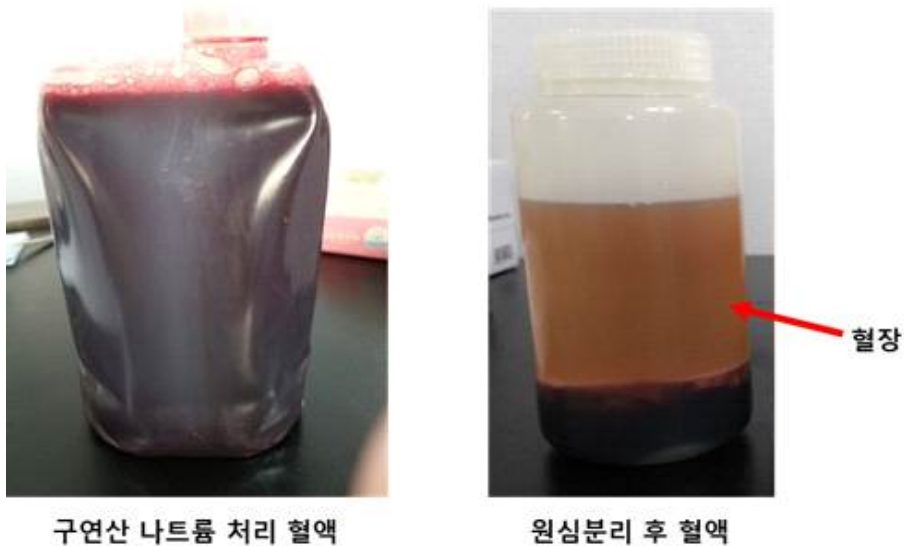


그림 37. 원심분리를 이용한 혈장 분리

- 분리한 혈장을 10 ml 씩 50 ml 튜브에 담아 효소를 0, 0.2, 0.3, 0.4, 0.5, 0.6, 0.7, 0.8, 0.9, 1%를 처리한 후 shaking incubator에서 250 rpm, 56°C의 조건으로 반응시킴.

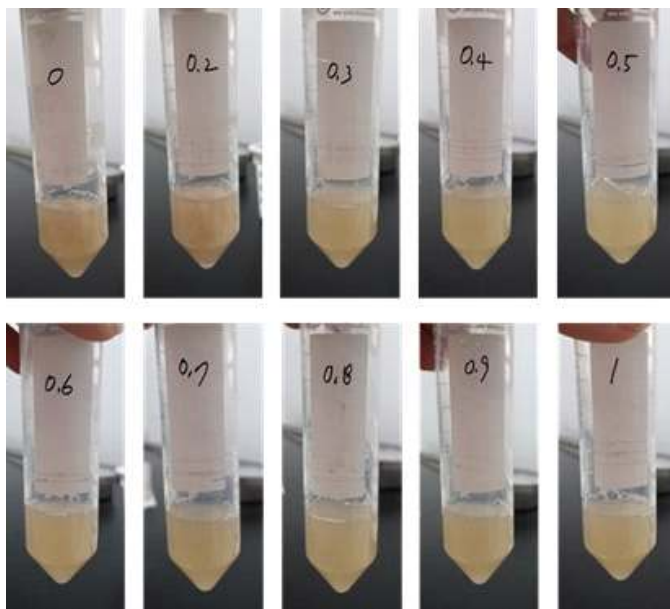


그림 38. 단백질 분해 반응 후의 혈장

- 분해 전은 노란색의 맑은 액체 상태였던 혈장이 56°C에서 반응 후 뿌옇게 변하는 것을 볼 수 있었음. 효소를 넣지 않은 0%의 샘플은 혈장 성분들이 서로 엉겨 붙어 덩어리가 형성되었는데 반해 효소가 첨가된 샘플의 경우 덩어리는 볼 수 없었으며 전체적으로 뿌옇게 변한 것을 확인하였음.
- 반복 실험을 수행하였을 때 역시 혈장이 뿌옇게 변하는 것을 다시 한 번 확인하였으며, 이를

원심분리 하여 침전물을 확인한 결과, 약 20%의 불용성 물질이 확인됨.

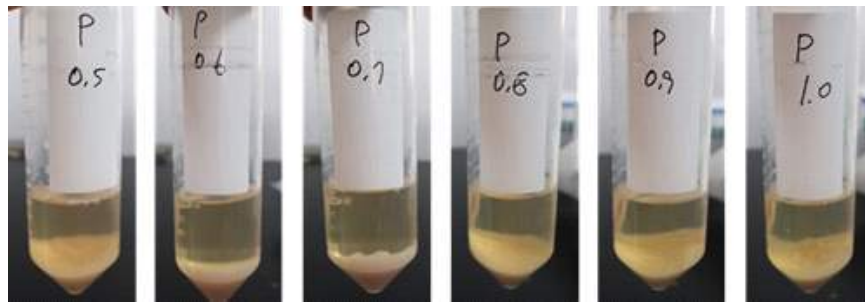


그림 39. 단백질 분해에 따른 혈장의 침전물 생성

- 혈액에는 무수히 많은 성분들이 존재하기 때문에 침전물의 정확한 성분은 알 수 없으나, 단백질에 결합하여 혈장 속에 녹아 있던 불용성 성분들이 단백질 분해에 따라 용출되었을 것으로 생각됨.
- 각 농도의 효소로 분해한 혈장의 단백질 분해 정도를 비교하기 위하여, 각 샘플에 SDS-reducing sample buffer를 넣어 100°C에서 5 분 간 끓인 후 gradient SDS-PAGE를 수행함.

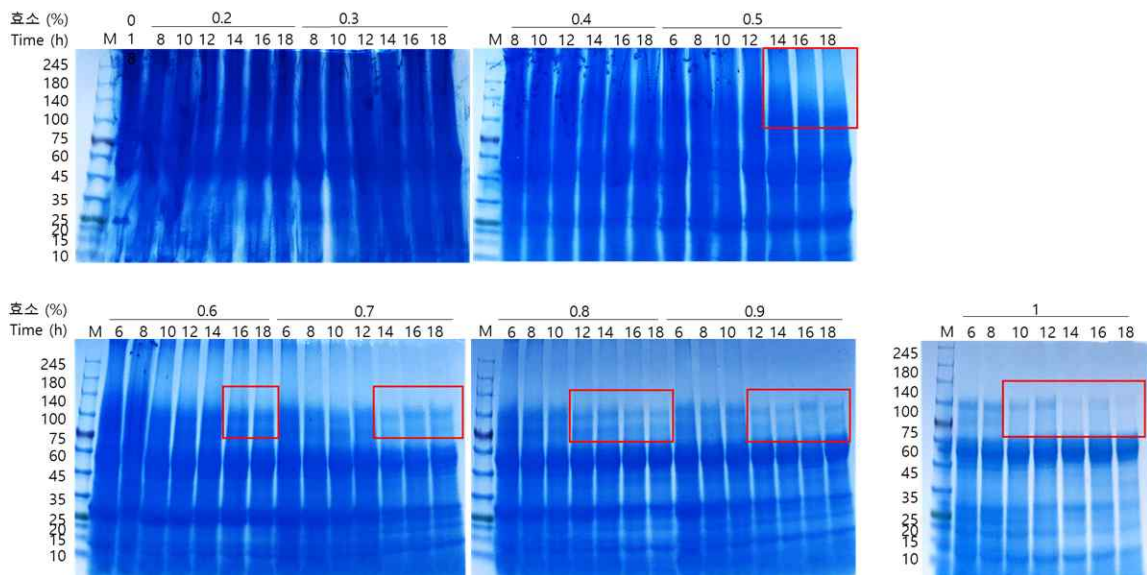


그림 40. 효소 농도 별 분해 혈장의 SDS-PAGE 결과

- 효소 0.5%를 처리하여 14 시간 이상 반응 시킨 샘플부터 140 kDa의 밴드가 사라지는 것을 볼 수 있었고, 효소를 0.6%로 처리한 경우는 10시간 반응 후부터 밴드가 열어졌으며 16 시간 후부터는 60 kDa 이상의 밴드가 점차 줄어들음을 확인함. 1%를 처리한 경우 6시간 처리 후부터 140 kDa의 밴드가 거의 보이지 않으며 14 시간 이상 처리 시 60 kDa 이상의 밴드까지 모두 사라짐. 단백질 분해는 효소의 농도와 반응 시간에 의존적으로 증가하였으며 1%의 효소를 14 시간 이상 처리 하는 것이 가장 효율이 좋음을 확인함.

○ 산업용 원심분리기를 이용한 혈장 분리

- 대용량의 혈장 소재를 만들기 위해선 산업용 연속성 원심분리기를 이용하여 연속적으로

혈장을 분리할 수 있어야 함. 이에 현재 활용이 가능한 알파라발사의 클라라 모델을 이용하여 혈장 분리 테스트를 진행함.



그림 41. 알파라발의 자동 배출 디스크형 원심분리기인 CLARA 20

- 구연산 나트륨이 처리된 혈액을 이용하여 다양한 조건으로 (7000~8000 rpm, 1000~1500 ml/min injection) 혈장을 분리한 후 각각을 50 ml tube에 담아 실험실용 원심분리기로 원심분리하여 세포의 잔존 여부 및 분리된 혈장의 색을 비교함.

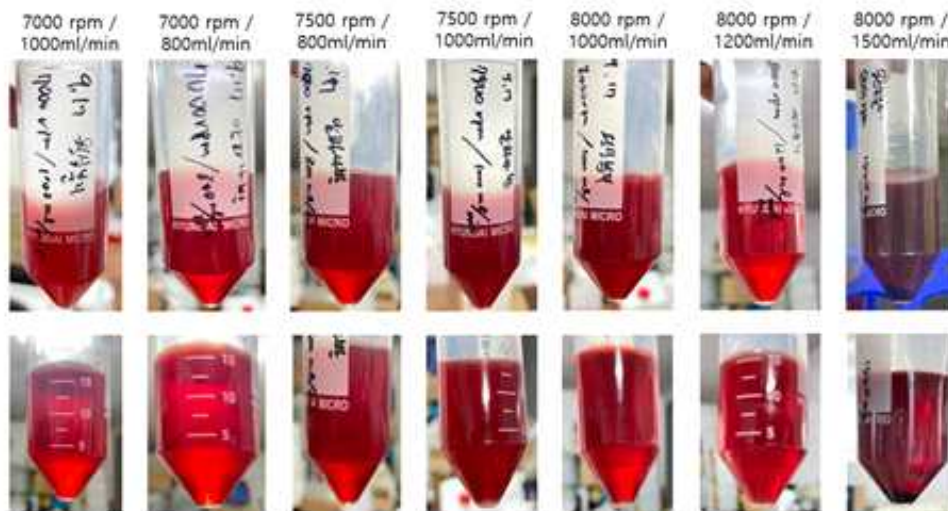


그림 42. CLARA 20을 이용하여 분리한 혈장

- 원심분리기의 rpm을 증가시키기에 따라 분리 효율은 증가하는 반면, 적혈구가 파괴되어 혈장의 색이 점점 붉어지는 것을 볼 수 있었으며, 주입속도가 증가함에 따라 혈구에 의한 오염이 증가함.
- 가장 약한 속도인 7000 rpm, 주입속도 800 ml/min을 포함한 모든 조건에서 적혈구가 일부 파괴되어 혈장이 붉어지는 현상이 발생함. 따라서, 대량을 혈장 소재 생산을 위해선 전혈 소재와 마찬가지로 탈색·탈취 공정이 필요함.

○ 탈색, 탈취 공정 확립

- 전혈과 혈장 소재의 붉은 색과 피 비린내 등의 악취를 제거하기 위하여 식품에 사용가능한 탈색·탈취제인 활성탄을 이용하여 활성탄의 형태와 농도 별로 효능을 비교함.

- 입상 활성탄 및 활성탄 필터, 분말 활성탄을 비교해본 결과, 분말 활성탄이 가장 탈색·탈취 효능이 높은 것을 확인함. 따라서 이후 공정에는 분말 활성탄을 사용하기로 결정함.
- 활성탄 사용 시 효과적으로 탈색·탈취가 가능 하지만 반면 유기물이 다량 손실되어 아미노산의 함량이 감소될 가능성이 있음. 분말활성탄의 최적 사용 농도를 결정하기 위하여, 클라라 20으로 분리한 혈장 중 세 가지 조건으로 획득한 혈장을 효소로 분해한 후 분말활성탄을 농도별로 처리하고 상층 액의 고형물 농도를 당도계로 측정함.

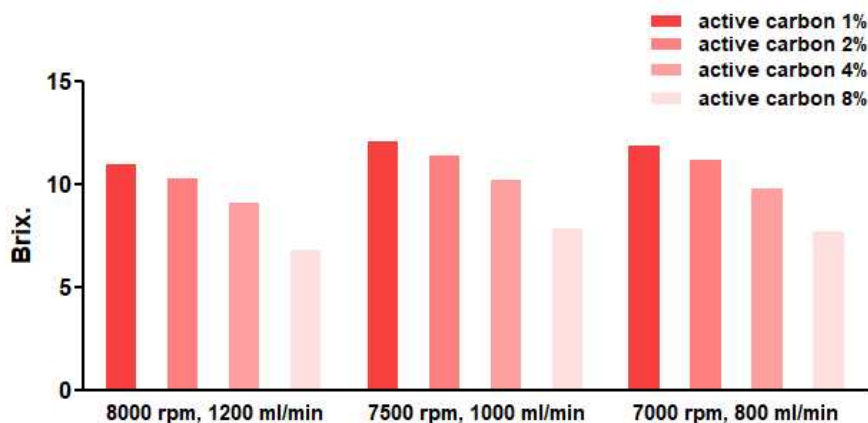


그림 43. 활성탄 농도에 따른 Brix. 감소 그래프

- 활성탄 농도에 의존적으로 탈색·탈취 효과가 증가하지만 그에 따라 고형물의 농도가 급격히 감소하는 것을 확인함. 따라서, 활성탄의 사용농도는 혈장의 경우 2%를 넘지 않도록 결정함.

○ 천연 광물질을 활용한 여과 정제

- 분말활성탄은 매우 고운 미립자로 이를 제거하기 위해선 여과 작업이 요구됨. 일반적인 여과에 사용되는 산업용 필터로 소재에 투입된 활성탄 양을 여과하는 것은 매우 비합리적인 방법임. 가격적인 면과 여과의 효율을 위해 규조토를 이용하여 누체 필터를 제작하여 소재의 여과를 테스트 함.
- 누체 내부의 금망필터를 수준기를 이용하여 수평을 조정한 후 전원 및 진공펌프 작동을 위한 물 배관을 연결함. 금망필터에 규조토 3 kg을 균일하게 도포한 후 위에 천을 덮고 물을 조금씩 흘려주며 규조토 필터를 다지는 작업을 진행함. 이때, 미세한 규조토 분말은 물과 함께 통과하며 미세한 규조토 분말이 함유된 물을 규조토 위의 천에 계속 30분 간 지속적으로 흘려주어 규조토 필터를 제작함.



그림 44. 규조토를 이용한 누체 필터 제작

- 규조토 필터에 활성탄이 처리된 소재를 일정량씩 천천히 흘려 로딩하고 감압펌프를 이용하여 필터링을 진행함.



그림 45. 누체 필터를 이용한 활성탄 여과

- 규조토 필터링 후 나온 여과액의 색을 관찰한 결과, 활성탄 처리 전 매우 어두운 적갈색의 혈액 가수분해물이 맑고 투명한 노란색으로 변한 것을 확인함. 규조토 필터링 후 나온 여과액을 50 ml 튜브에 담아 랩용 원심분리기로 원심분리 하여 침전물을 확인한 결과 활성탄은 모두 제거되었으며 규조토가 일부 섞여 나온 것을 확인함.

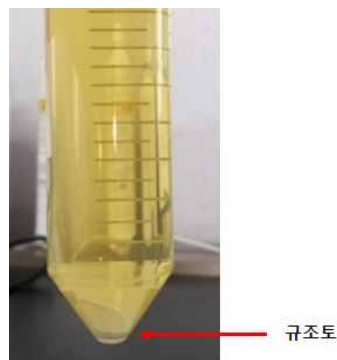


그림 46. 규조토 필터
여과액

- 소량 섞여 나온 규조토를 제거하기 위하여 산업용 필터를 이용하여 여과를 진행함. 산업용 PE 필터 1 μm 필터와 PES 0.5 μm 필터를 순차적으로 하우스징에 삽입하고 에어 펌프를 이용하여 여과를 진행함.



그림 47. 멤브레인 필터링 후 여과액

- 여과가 끝난 후 일부를 50 ml 튜브에 담아 랩용 원심분리기로 원심분리 하여 활성탄 및 규조토 잔여물을 확인한 결과, 모두 완전히 제거된 것을 확인할 수 있었음.
- 혈장의 경우 분해 시 침전물이 발생하며 특이취가 풍기는 문제가 있으나 전혈 소재에 비해 피 비린내나 붉은 색이 강하지 않기 때문에 분말 활성탄이 아닌 다른 방법을 이용하여 탈색 및 탈취를 시도함. 실험실용 원심분리기로 분리한 혈장을 효소로 분해한 후 원심분리기로 침전물을 다소 제거 하고 정수기용 침전 필터와 활성탄 필터를 사용하여 필터링을 진행함. 그리고 일부를 UF 필터링을 거친 후 각각의 아미노산 함량을 측정함.

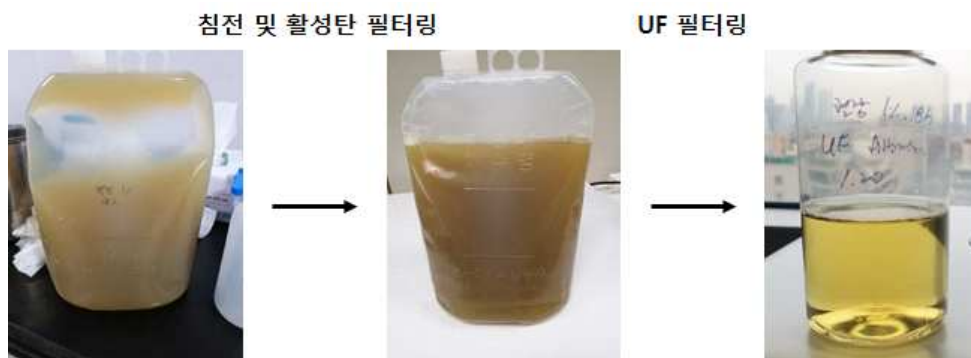


그림 48. 원심분리 후 (좌)와 침전 및 활성탄 필터링 후 (중간) 및 UF 필터링 후 (우)의 혈장 효소 분해물

- 원심분리를 통해 침전물이 다소 제거된 혈장을 정수기용 필터를 이용하여 필터링 한 경우 모든 침전물이 제거 되지는 않았으며 어두운 색을 띠. 이를 정수기용 최종 필터인 한외여과 필터 (ultrafiltration)로 필터링하면 노란색의 투명한 혈장 소재를 얻을 수 있음. 각 단계에서 얻은 혈장 소재의 아미노산 분석을 수행함.

표 5. 혈장 효소 분해물의 각 아미노산 함량

구분	시험·검사 항목	분해 혈장	침전 & 카본필터	UF 필터
구성 아미노산 (g/100g)	CYA*	2.87	2.92	0.26
	ASX**	5.12	5.42	0.40
	GLX**	7.70	7.96	0.57
	SER	3.18	3.33	0.24
	GLY	1.92	2.03	0.16
	HIS	1.72	1.77	0.14
	ARG	3.14	3.26	0.23
	THR	3.35	3.59	0.29
	ALA	3.17	3.40	0.27
	PRO	3.10	3.55	0.28
	TYR	2.63	2.90	0.20
	VAL	2.99	3.56	0.28
	MET	0.50	0.59	0.04
	ILE	1.68	2.08	0.16
	LEU	4.44	5.39	0.39
PHE	2.25	2.79	0.22	

유리 아미노산 (g/100g)	TRP	0.61	0.62	0.09
	LYS	5.90	7.59	0.57
	CYS	0.00	0.00	0.00
	ASP	0.08	0.15	0.02
	GLU	0.54	0.70	0.06
	ASN	0.11	0.15	0
	SER	0.34	0.43	0.03
	GLN	0.13	0.08	0.01
	GLY	0.10	0.12	0.01
	HIS	0.06	0.08	0.02
	ARG	0.45	0.58	0.00
	THR	0.22	0.29	0.05
	ALA	0.39	0.46	0.07
	PRO	0.09	0.08	0.01
	TYR	0.29	0.39	0.07
	VAL	0.38	0.42	0.06
	MET	0.25	0.26	0.03
	Cys2	0.00	0.31	0.00
	ILE	0.18	0.22	0.04
	LEU	0.81	0.92	0.13
PHE	0.21	0.27	0.05	
TRP	0.11	0.13	0.00	
LYS	0.70	0.84	0.21	

*CYS mean the sum of cysteine & cystine

** ASX, GLX mean the sum of asparagine & aspartic acid and glutamine & glutamic acid, respectively.

- UF 필터의 경우 pore size가 매우 작아 고분자량의 단백질 및 펩타이드의 경우 필터를 통과하지 못하기 때문에 여과액에서 단백질 함량의 손실이 발생할 가능성이 있음. 각 단계에서 얻은 샘플간 유리 및 구성아미노산의 함량을 비교해보면 분해 혈장이 구성 90.33%, 유리 9.67%, 침전 및 카본필터 혈장은 구성 89.01%, 유리 10.99%, UF 필터 혈장은 구성 82.21%, 유리 17.79%로 필터링을 거칠때마다 구성 아미노산의 함량이 감소됨을 확인함. 특히 UF 필터를 거친 후 대량 감소되어 소재 생산 시 UF 필터는 적절하지 않음을 확인함.

표 6. 혈장 효소 분해물의 구성 및 유리 아미노산 함량

구분	유리 아미노산 (%)	구성 아미노산 (%)
분해 혈장	9.67	90.33
침전 & 카본필터	10.99	89.01
UF 필터	17.79	82.21

○ 분무 건조를 통한 소재의 분말화

- 효소 분해 혈액 소재의 경우 고농도의 영양성분으로 인해 미생물 오염에 취약함. 방부제 사용 시 식품으로써의 활용도가 감소하기 때문에 수분 함량을 줄여 미생물의 번식을 방지하고 장기간의 보관이 가능하도록 분무건조를 수행함.

- 실험실용 소형 분무건조기를 이용하여 Inlet 180~200°C, Outlet 90~100°C의 조건으로 분무 건조를 수행하고 수분 함량을 측정함.



그림 49. 소형분무건조기를 이용한 소재의 분무건조

- 적외선 수분계를 이용하여 전혈 소재와 혈장 소재 분말의 함수율을 측정한 결과, 전혈 6.8%, 혈장 6.6%로 확인되었음.

○ 효소 분해 전혈 및 혈장 소재의 아미노산 함량 분석

- 분무건조기를 이용하여 분말화한 전혈 및 혈장 소재 효소분해 분말을 물에 녹여 구성 및 유리 아미노산 분석을 실시함. 분석법은 아래와 같음.

❖ 구성 아미노산

◆ Sample Preparation

1. 분석 의뢰시 시료상태 : Powder 1~3 mg 을 H₂O 1mL에 녹여 사용함.
2. 시료 : 30 μ l씩 분주하여 분석에 사용함.
3. 가수분해를 위해 취한 시료 각각을 완전히 건조시킨다.
4. 섭씨 110도에서 24시간 HCl hydrolysis 한다.
 - cys분석을 위해서는 peroxidation 시킨 후 HCl로 가수분해 한다.
 - trp 분석을 위해서는 methanesulfonic acid로 가수분해 한다.
5. 가수분해된 아미노산을 PITC (phenylisothiocyanate)로 유도체화 시킨다.
 - * (유도체화 용액 : MeOH: H₂O: TEA: PITC= 7: 1: 1: 1)- 20 μ l, 상온에서 30분간 반응
6. 시료를 완전히 말린 후 200 μ l의 A solvent로 녹인다.
7. microcentrifuge 시킨후 상층액을 따서 HPLC의 autosampler에 안치한다.
 - * A solvent에 녹인 시료는 0.45 μ m filter로 filtering 후 사용함.

◆ HPLC CONDITION (Agilent 1260 Series)

1. column : Waters Nova-Pak C18 4 μ m (3.9×300 mm)
2. column oven tempt. : 46 Celsius
3. HPLC pump : Agilent 1260 Series, Binary Pump
4. HPLC injector : Agilent 1260 Series, Autosampler
5. Variable Wavelength Detector : HP 1100 Series, 254 nm
6. solvent : A) 140 mM Sodium Acetate trihydrate, 0.15% TEA, 0.03% EDTA, 6% CH₃CN, pH6.1
B) 60% CH₃CN, 0.015% EDTA

Time	%B	Flow(ml/min)
0	0	1
4	0	1
12	8	1
13	12	1
15.2	20	1
22.5	46	1
22.72	100	1.5
23.2	100	1.5
25	100	1.5
25.7	0	1.5
26	0	1.5
29	0	1.5
30	0	1

7. elution : Linear gradient of solvent B (0–100%)

8. flow rate : 1.0 ml/min

9. run time : 30 min

10. equil. time : 10 min

11. injection vol. : standard 10 μ l, sample 10 μ l

❖ 유리 아미노산

◆ Sample Preparation

1. 분석 의뢰시 시료상태 : Powder 1~3 mg 을 H₂O 1mL에 녹여 사용함.

2. 시료 : 30 μ l씩 분주하여 분석에 사용함.

3. 분석은 시료에 대해서 Free AA 분석 실시.

4. 취한 시료 각각을 완전히 건조시킨다.

5. PITC (phenylisothiocyanate)로 유도체화 시킨다.

* (유도체화 용액 : MeOH: H₂O: TEA: PITC= 7: 1: 1: 1)– 20 μ l, 상온에서 30분간 반응

6. 시료를 완전히 말린 후 200 μ l의 A solvent로 녹인다.

7. microcentrifuge 시킨후 상층액을 따서 HPLC의 autosampler에 안치한다.

* A solvent에 녹인 시료는 0.45 μ m filter로 filtering 후 사용함.

◆ HPLC CONDITION (Agilent 1260 Series)

1. column : Waters Nova-Pak C18 4 μ m (3.9×300mm)

2. column oven tempt. : 46 Celsius

3. HPLC pump : Agilent 1260 Series, Binary Pump

4. HPLC injector : Agilent 1260 Series, Autosampler

5. Variable Wavelength Detector : HP 1100 Series, 254 nm

6. solvent: A) 140 mM Sodium Acetate trihydrate, 0.15% TEA, 0.03% EDTA, 6% CH₃CN, pH6.1

B) 60% CH₃CN, 0.015% EDTA

Time	%B	Flow(ml/min)
0	0	1
4	0	1
12	8	1
13	12	1
15.2	20	1
22.5	46	1
22.72	100	1.5
23.2	100	1.5
25	100	1.5
25.7	0	1.5
26	0	1.5
29	0	1.5
30	0	1

7. elution : Linear gradient of solvent B (0–100%)
8. flow rate : 1.0 ml/min
9. run time : 30 min
10. equil. time : 10 min
11. injection vol. : standard 10 μ l, sample 10 μ l액화

표 7. 효소 분해 전혈 소재의 각 아미노산 함량

구분	시험·검사 항목	전혈 소재
구성 아미노산 (g/100g)	CYA*	1.50
	ASX**	6.92
	GLX**	7.09
	SER	3.33
	GLY	3.43
	HIS	3.55
	ARG	1.28
	THR	5.24
	ALA	6.76
	PRO	1.99
	TYR	1.08
	VAL	5.06
	MET	0.69
	ILE	0.33
	LEU	7.62
	PHE	1.69
	TRP	0.00
LYS	5.54	
유리 아미노산 (g/100g)	CYS	0.00
	ASP	1.30
	GLU	1.52
	ASN	0.87
	SER	0.98
	GLN	0.00
	GLY	0.28
	HIS	1.15
	ARG	0.13
	THR	2.08
	ALA	2.39
	PRO	0.00
	TYR	0.66
	VAL	2.09
	MET	0.00
	Cys2	0.00
	ILE	0.00
	LEU	5.24
	PHE	1.45
	TRP	0.00
LYS	1.89	

○ 구연산의 방부 효과 테스트

- 효소 분해 후 분무 건조한 샘플의 방부를 위하여 구연산과 ϵ -polylysine을 농도별로 처리하고 날짜별로 균을 침전시켜 pellet의 크기를 비교함.

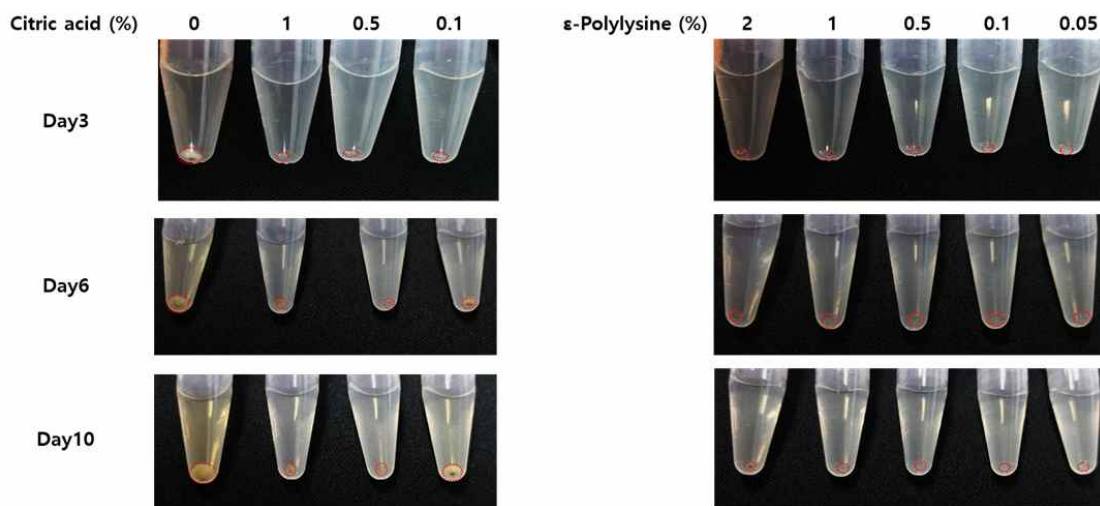


그림 50. 구연산과 ϵ -polylysine의 방부 효과 테스트 결과 (붉은 점선: pellet)

- 구연산 0.1%, 0.5%, 1% 처리 시 day 3까지 동일한 균 성장 억제 효과를 보임. 3일 이후 0.1%의 구연산을 처리한 샘플은 pellet의 크기가 증가하였으며 나머지 구연산을 처리한 샘플과 ϵ -polylysine을 처리한 샘플은 day 10까지 균의 성장이 억제되었음.
- 샘플의 단백질 농도에 따라 구연산의 방부효과에 차이가 있는지 알아보기 위하여 샘플을 15%, 30%로 증류수에 녹인 후 구연산을 농도별로 처리하여 방부 효과를 재확인함.

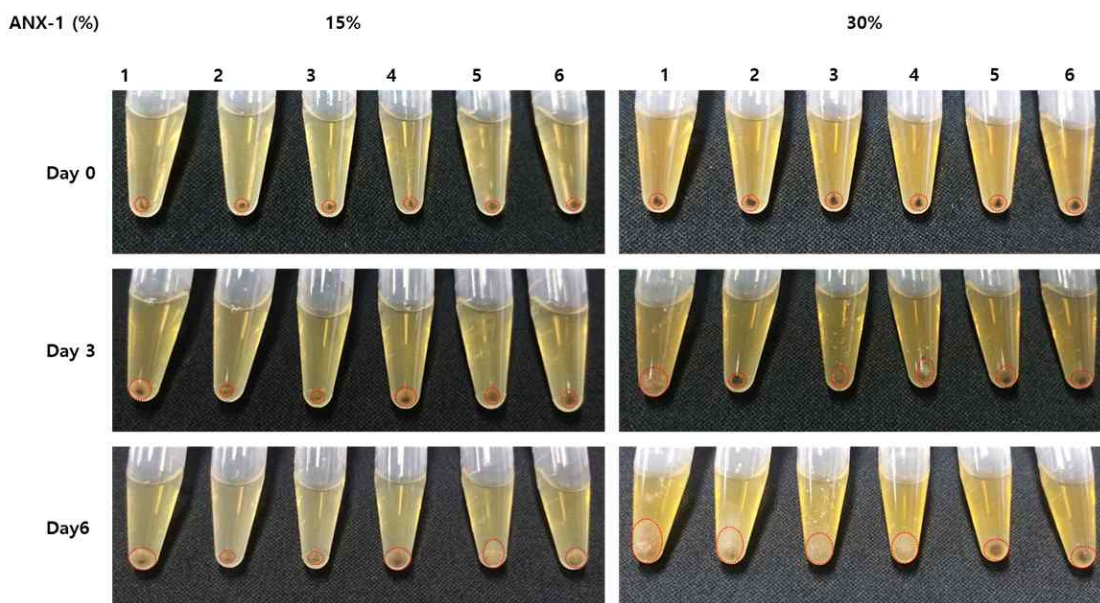


그림 51. 구연산과 poly- ϵ -lysine의 방부 효과 테스트 결과 (붉은 점선: pellet)

표 8. 그림 51에 표기된 넘버링(#)에 대한 설명

#	additive	Conc (%)
1	Citric acid	0
2		1
3		0.5
4		0.1
5	ε-polylysine	1
6		0.5

- 구연산 0.5%, 1% 처리 시 15% 농도의 샘플은 day 6까지, 30% 농도의 샘플은 day 3까지 방부 효과를 나타내었음. 30% 농도의 샘플의 경우 day 6에 방부 효과를 육안으로 확인할 수 있지만, 균의 침전이 깨끗하게 되지 않아 정확한 분석이 어려움.
- ε-polylysine의 경우 중성에서 방부 효과가 있어 샘플의 pH를 변화시키지 않고 방부 효과를 낼 수 있음. 그러나 가격이 비싸 경제적이지 못한 문제가 있음. 아미노산은 양친매성으로 pH에 따라 H⁺와 결합 또는 해리될 수 있으며 이는 pH를 일정하게 유지시키는 완충 효과가 있음. 따라서 샘플의 높은 아미노산 농도에 의해 구연산에 의한 pH 변화가 완충된다면 구연산을 사용할 수 있는 가능성이 있음. 이를 확인하기 위하여 그림 52과 같이 각 샘플의 pH를 측정하였음.



D.W.	구연산 20%	구연산 10%	PolyL 20%	polyL10%	
소재 30%	소재 30% 구연산 1%	소재 30% 구연산 0.5%	소재 30% 구연산 0.1%	소재 30% PolyL 1%	소재 30% PolyL 0.5%
소재 15%	소재 15% 구연산 1%	소재 15% 구연산 0.5%	소재 15% 구연산 0.1%	소재 15% PolyL 1%	소재 15% PolyL 0.5%

그림 52. 구연산과 poly-ε-lysine을 처리한 샘플의 pH 변화

- 구연산 용액은 pH 1로 측정되었으며 ε-polylysine은 pH 6으로 확인됨. 증류수의 경우 약산성으로 pH 5 정도를 나타내나 당사의 소재를 증류수에 녹이게 되면 중성의 pH를 나타냄. 15%와 30% 농도의 소재 용액에 구연산을 농도별로 처리 시 1% 구연산을 처리한 경우에도 pH의 변화는 보이지 않음. 앞서 말한 것과 같이 아미노산의 완충효과에 의한 것이며, 이 결과를 통하여 개발된 아미노산 소재에 구연산을 0.5% 또는 1% 농도로 처리할 시 pH 변화 없이 방부 처리할 수 있음을 확인함.
- 분말 소재의 안정성 및 안전성 테스트
- 소재 분말의 안정성 검증을 위하여 2월에 제조한 분말의 아미노산 조성을 재분석하여 비교한 결과, 6개월 후의 총 아미노산 함량은 65.84%로 2월 분석결과 (62.74%)와 비슷한 함량으로 나타남. 이는 오차범위 이내로 판단되며, 6개월 동안 보관 시 아미노산의 함량이

그대로 유지되는 것을 확인함.

- 소재의 안전성을 확인하기 위하여 한국인터텍테스팅서비스(주)를 통해 납, 비소, 수은, 카드뮴, 안티몬, 니켈, 디옥산, 메탄올, 포름알데하이드, 디부틸프탈레이트, 부틸벤질프탈레이트, 디에칠헥실프탈레이트, pH, 총 호기성생균수, 대장균, 녹농균, 황색포도상구균을 분석한 결과 중금속 및 유해세균은 모두 불검출 됨.

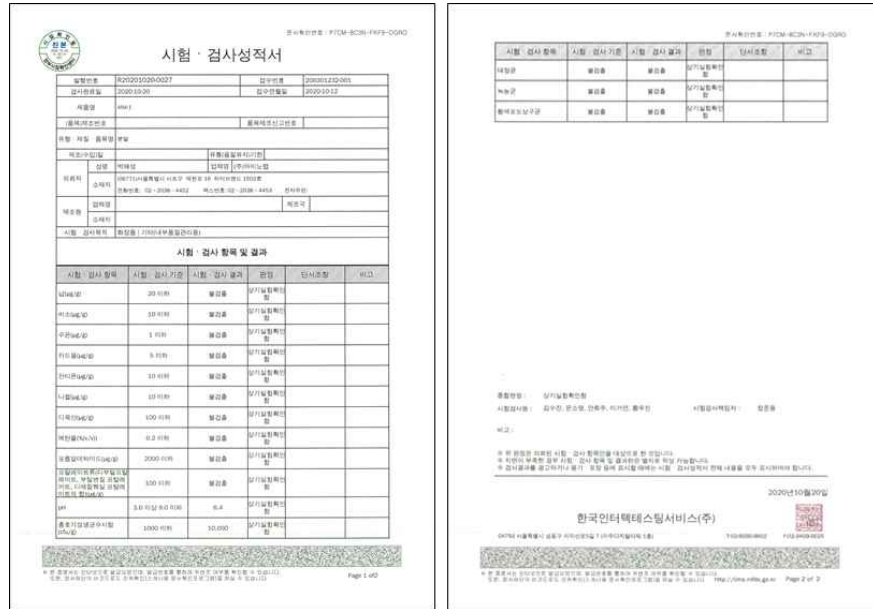


그림 53. 소재 분말의 시험검사 성적서

○ 효소 분해 전혈 및 혈장 소재를 활용한 시제품 제작

- 효소분해 전혈과 혈장의 시제품으로써 생명공학연구원과 공동으로 진행한 세포 배양 소재와 충남대학교와 공동으로 연구한 식품 시제품을 제작함.
- 세포 배양 소재는 배양액의 아미노산 원천으로써 기존에 흔히 사용되는 LB 배지의 트립톤 등의 단백질 소스의 대체재로써 뿐 아니라 탄소원만 추가 시에도 높은 균 성장을 유도할 수 있음이 확인되었으며, 동물 세포 배양 시에 사용되는 배우 고가의 FBS의 대체재로써도 사용 가능함. 배양 소재의 상품명은 HWB-100으로 300 g 단위로 시제품을 제작하였음.

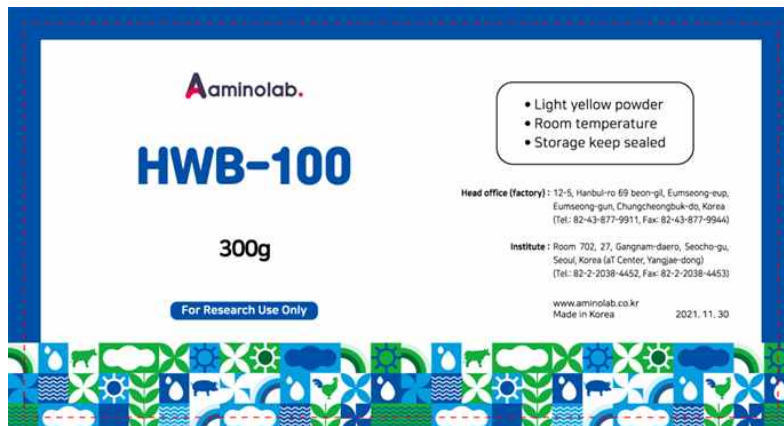


그림 54. HWB-100의 라벨 디자인



그림 55. HWB-100 시제품 사진

- 기타 가공품으로써 식품 OEM 업체인 농업회사법인 케이에스디(주)를 통해 아미노랩 아미노파워라는 상표명으로 식품 시제품을 생산함. 용도 용법은 하루 1~2회 1~3 g을 물과 함께 섭취하도록 설정하였으며, 포장 단위는 30, 35, 440, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 150, 200, 300, 500, 1,000 g으로 HDPE 또는 PET에 담아 상온 보관할 수 있도록 분말로 포장함. 이에 대한 품목 보고를 위해 식품 유통 전문 판매업을 신고하였으며 품목보고서를 제출함.



그림 56. 유통전문판매업 영업신고증 (좌)와 아미노랩 아미노파워 식품·식품첨가물 품목보고서 (우)



그림 57. 아미노랩 아미노파워 시제품

○ 사업화를 위한 원료 표준화 방안 마련

• 정상 절차 준수

- 우리나라에서는 원칙적으로 의사에 의해 도축 적합 판정을 받은 가축만이 도축대상이며, 부적합 판정을 받은 가축은 도축자체가 금지되어 혈액원료를 수급할 수 없는 시스템이며 정상 도축된 가축의 부산물 또한 당연히 정상적인 식품으로 간주됨에 따라 안전하고 적합한 식육 부산물인 혈액만을 수급하여 균일한 원료사용을 추구함.

• 신선유지 시스템

- HACCP 적합 판정을 받은 도축장에서 도축 즉시 채혈되어 냉장탱크에 이송 보관된 혈액을 위생적인 탱크로리에 의해 당일 수송하고 입고 즉시 가공을 원칙으로 원료의 신선도를 최대한 유지하는 시스템을 구축함.

• 최종성분 균일화

- 혈액 내 단백질은 18% 전후이며 천연물 특성에 따라 단백질 함량에 약간의 편차가 있으나 최종 건조를 통해 혈액 원료의 편차에 관계없이 거의 균일한 함량을 유지함 (아미노산 함량 80% 이상, 수분함량 5% 이내).

• 공정 최소화

- 식품용 혈액 원료에 단백질을 아미노산으로 분해하기 위한 식품제조용 효소만을 첨가하여 분해 후, 원심분리 1회, 90도 살균 및 건조하는 단순 공정으로 특별한 화학적 변이환경에 노출 방지함.

• 안전성 검증

- 도축혈액 (선지)의 경우 식품위생법상 식육에 해당되는 이미 안전성이 입증된 식품 (식품위생법 제7조 및 축산물위생관리법 제2조 3항)으로 이미 오래전부터 애용되고 있는 단백질

공급원임. 본 연구를 통해 개발된 식품 소재 생산 공정에 대한 안전성 우려를 제거하고 소재의 품질 관리를 위해 식품의약품안전처 지정 자가품질 위탁시험 검사기관을 통하여 제조단위 (롯데)별 1회 이상 기준·규격 항목 검사를 시행함.

- 안정성 검증
 - 롯데 별 6개월 간격으로 일반 성분 및 아미노산 분석을 통하여 제품의 유효성분의 변화를 분석함.

(나) 동물 혈액의 단백질 효소 분해물을 활용한 미생물 및 동물 세포 배양 배지 개발을 위한 성분 분석

① 효소 혈액 단백질 가수산물의 성분 분석

○ 단백질 함량, 당성분, 당단백질, 무기물 함량 분석

- 효소가수분해 혈액은 단백질 가수분해 산물로 다양한 아미노산, 단백질, 펩타이드 성분 뿐 아니라 혈액 내에 당단백질, 무기물 등 다양한 성분이 포함되어 있으므로 미생물 또는 동물 배지 제작을 위해 QC/QA 가능한 표준 지표가 필요함. 따라서 본 연구에서는 해당 성분 분석을 위해 1차적으로 주관기관에서 제공한 2종의 시료 (시료1: 2차 효소가수분해 산물; 시료2: 1차 효소가수분해 산물)에 대해 단백질 함량, 탄수화물 성분 분석, 무기물 (인산, phosphate) 함량 분석을 수행함.
- 2종의 시료를 건조중량 10 mg을 상온에서 1 ml 증류수에 현탁한 후, 상온에서 원심분리를 통해 증류수에 녹는 용해성 물질과 침전되는 비용해성 물질을 분리하였으며, 용해성 물질을 다시 0.22 μm 의 셀룰로즈 필터로 필터링 하여 분석용 시료를 제작함.
- 시료 중에 존재하는 단백질 양은 Bovine serum albumin (BSA)를 표준 물질로 하여 Bradford method로 측정하였으며, 1 ml Bradford solution에 BSA를 5~20 $\mu\text{g/ml}$ 농도로 희석하여 spectrometer 595 nm에서 흡광도를 측정하여 검량선을 작성함. 혈액가수분해 산물의 단백질 함량 측정은 시료 1과 시료 2를 적정한 농도로 희석하여 동일 방법 단백질 양을 측정함. 측정 결과, 시료 1과 시료 2는 각각 $2.6 \pm 0.15 \times 10^{-6} \mu\text{g/ml}$ 과 $5.7 \pm 0.4 \mu\text{g/ml}$ 으로, 시료 1은 단백질의 측정 범위가 측정한계 미만으로 확인되어 있으나, 시료 2의 경우 단백질이 상당량 포함되어 있는 것으로 확인됨.
- 시료 내에 존재하는 단당류와 유기산의 분석은 refractive index detector (Agilent, Santa Clara, CA, USA)와 auto-sampler가 장착된 High-performance liquid chromatography (HPLC) 시스템 (Agilent)을 이용하여, 분석 컬럼으로 Rezex ROA-Organic Acid H+ column (7.8 x 300 mm; Rhenomenex, Torrance, CA, USA)와 guard cartridge (KJ0-4282; Rhenomenex, Torrance, CA, USA)가 포함되어 있는 SecurityGard™ 가드컬럼을 이용하여, 컬럼 온도를 65°C로 유지하면서 이동상으로 2.5 mM 황산용액으로 0.6 ml min⁻¹ 유속으로 함. 시료에 포함되어 있는 단당류와 유기산 분석결과, 시료 2에 비해 시료 1에서 측정된 유기산과 단당류의 함량이 높았으며 공통적으로 아미노산, disaccharide, glucose, lactate 등이 측정됨. 특이적인 사항으로 시료 1에서 과량의 glycerol이 검출 되었는데 이것은 효소 가수분해 시 사용되는 효소의 안정제로 사용되는 첨가 물질로 혈액가수분해 산물의 원래 시료로부터 기인한 것은 아닌 것으로 추정됨.

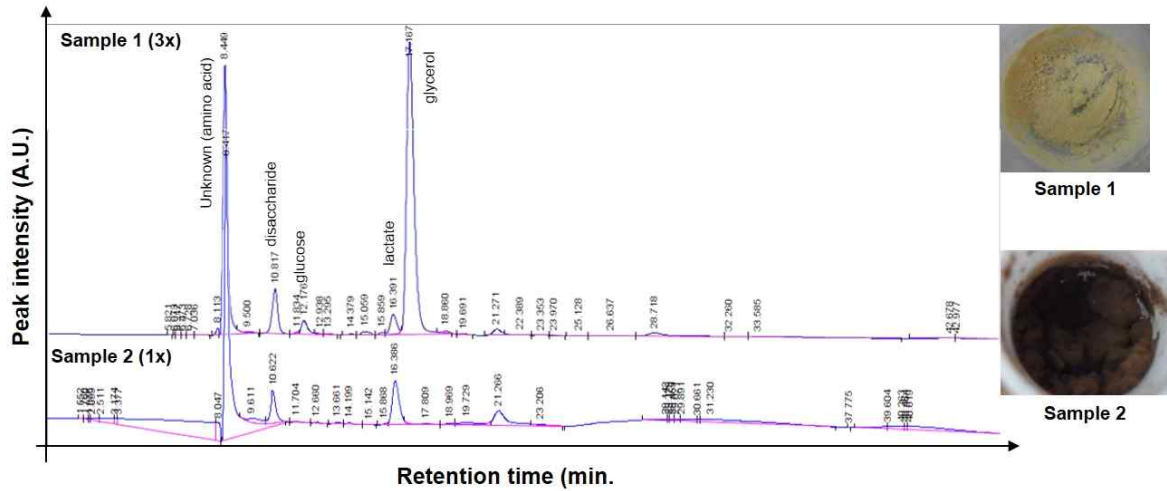


그림 58. 혈액 효소 가수분해 산물 시료 1 (sample 1, 상당 동결건조 시료)과 시료 2 (sample 2, 하단 동결건조 시료)에서 확인된 당당류와 유기산의 HPLC 측정 크로마토그램

- 시료 내에 존재하는 phosphate의 양은 앞서 제작한 시료 1과 시료 2를 사용하였으며, Malachite green phosphate detection kit (R&D systems)을 이용하여 측정함. 상대적인 phosphate의 양 확인을 위해 1 M phosphate (KH₂PO₄)를 3.12~100 μM 농도로 50 μl 증류수에 희석하여, 10 μl Malachite green reagent A와 10 μl Malachite green reagent B를 순차적으로 혼합한 후 20분 후에 microplate reader로 620 nm에서 흡광도를 측정함. 혈액가수분해 산물의 phosphate 농도 측정은 시료 1과 시료 2를 적정한 농도로 희석하여 동일 방법으로 측정함. 1 mg/ml의 시료당 시료 1에서는 phosphate의 함량이 1.5 ± 0.3 μM 그리고 시료 2에서는 24.7 ± 3.4 μM으로 측정됨.

○ 동물 혈액가수분해 산물에 존재하는 펩타이드 성분 프로파일 및 프로테오믹스를 통한 단백질 분석

- 단백질 분해 효소에 의해 분해된 혈액 가수분해 산물에 존재하는 펩타이드의 전체적인 분자량의 프로파일을 확인하기 위해서 LC-MS를 이용하여 시료1과 시료2에 포함되어있는 펩타이드의 분자량 (molecular weight, MW)을 LC-MS로 확인함. 전체적인 MW는 전반적으로 250-1,000 Da 범위에서 대다수의 펩타이드가 확인되었으며, 주된 펩타이드들은 약 250 Da ~ 750 Da에서 확인됨.
- 흥미롭게도 시료 1에 존재하는 펩타이드는 250 Da 이하에서 높은 시그널에 측정된 반면에 시료 2의 경우에는 750 Da 이상에서 높은 시그널이 확인됨. 이러한 결과는 단백질 가수분해효소 반응 시간이 증가될수록 저분자 펩타이드가 점차 증가하는 것을 알 수 있으며, 대다수의 펩타이드가 250 Da의 크기를 갖는 펩타이드라는 것을 확인할 수 있음.

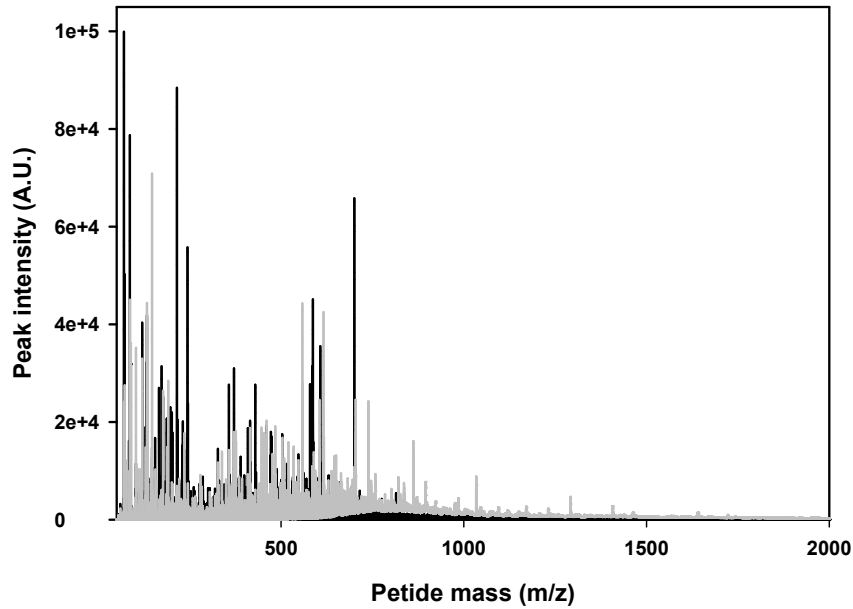


그림 59. LC-MS로 분석한 혈액 효소 가수분해 산물 시료 1 (검은색)과 시료 2 (회색)에서 확인된 전체적인 펩타이드 분자량의 분포 프로파일

- 시료 1에서 LC-MS에서 확인된 펩타이드 MS 데이터를 사용하여 프로테오믹스 분석 프로그램인 Mascot software를 활용하여 NCBI protein database에 존재하는 돼지 혈액 내에 존재하는 단백질을 확인함 (표 9). 가수분해 된 혈액 단백질로부터 효소 가수분해를 통해 만들어진 펩타이드의 MS를 protein database와 비교 분석을 통해 최소 41개 단백질과 이들의 isoform 단백질로 확인됨. 주된 단백질은 혈액 내에 존재하는 immunoglobulin superfamily protein에 해당하는 IgG, IgH, Igk, Igλ, α2-macroglobulin 등을 확인할 수 있었음. 확인된 41개 단백질 중 α1-antichymotrypsin 1과 2 단백질이 높은 펩타이드 MS 적합도로 확인된 반면, anti-thrombin-III precursor, plasma serine protease inhibitor isoform X1, putative transthyretin (pre-albumin)은 펩타이드 MS 적합도는 낮게 측정됨. 또한 serum albumin의 경우에는 주된 plasma protein의 경우에는 0.22로 상대적으로 낮은 MS 적합도로 확인됨.

표 9. Proteomics 방법을 통한 동물혈액 가수분해 산물에 존재하는 단백질의 확인

Protein	Accession number (GI number)	Protein mass (m/z)	Matching peptide number	Score
Albumin, partial	gi 164318	71,348	21	667
Antithrombin-III isoform X1	gi 545850965	54,3133	26	1,055
Antithrombin-III precursor	gi 194018664	52,866	30	1,242
Apolipoprotein B-100	gi 545892243	446,125	8	184
Apolipoprotein B, partial	gi 164370	174,721	2	67
Apolipoprotein R precursor	gi 5565904	21,775	1	45
Collagen α-1(X) chain precursor	gi 52346218	65,463	1	43
Complement C3 precursor	gi 47522844	188,227	7	255
Complement component c3d	gi 89275684	33,532	1	61
Complement component C9 precursor	gi 148233690	63,269	7	221
Ceruloplasmin	gi 189396498	38,848	1	76
Haptoglobin precursor	gi 47522826	39,028	1	51
Hemopexin precursor	gi 47522736	52,071	1	75
Heparin cofactor 2	gi 194043402	56,125	4	128
Ig α chain C region	gi 2136551	37,545	1	61

Ig κ chain V-C region (PLC18)	gi 89215	18,686	3	197
IgG heavy chain constant region	gi 291202698	36,443	6	181
IgG light chain constant region, partial	gi 559775234	12,251	9	465
Immunoglobulin E epsilon chain precursor	gi 2149936	63,019	2	138
Immunoglobulin δ heavy chain membrane bound form, partial	gi 22774002	58,754	4	279
Immunoglobulin λ -chain	gi 164503	52,217	6	367
Immunoglobulin λ -like polypeptide 5-like isoform X1	gi 311271023	22,958	31	2,398
Immunoglobulin λ -like polypeptide 5 precursor	gi 343183368	24,419	35	2,590
Inter- α -inhibitor heavy-chain 1	gi 1915956	87,209	3	100
Inter- α -trypsin inhibitor heavy chain H4 precursor	gi 48374067	102,254	5	180
Keratin, type I cytoskeletal 42-like	gi 350590317	50,331	1	54
Keratin, type II cytoskeletal 1b	gi 194037336	63,962	2	95
Keratin, type II cytoskeletal 2 epidermal	gi 148747492	66,510	2	122
Keratin, type II cytoskeletal 5-like	gi 350583995	51,982	2	56
Keratin, type II cytoskeletal 6A-like isoform X1	gi 350583965	63,984	2	51
Lysosomal α -mannosidase isoformX1	gi 311248892	114,464	1	59
N-Sulphoglucosamine sulphohydrolase	gi 350590106	57,818	2	99
Ovarian and testicular apolipoprotein N precursor	gi 51491902	28,920	1	47
Phosphatidylinositol-glycan-specific phospholipase D	gi 545837650	93,902	7	293
Plasma protease C1 inhibitor precursor	gi 178056710	54,832	3	88
Plasma serine protease inhibitor isoform X1	gi 194038342	45,935	6	242
Putative transthyretin (prealbumin)	gi 975233	15,896	2	57
Serpin A3-6	gi 194038353	47,363	54	715
Serpin A3-8	gi 545843036	47,357	69	2,772
	gi 335292947	47,196	54	2,342
α 1-antichymotrypsin 1	gi 9968809	24,775	17	557
α 1-antichymotrypsin 2 precursor	gi 47523270	46,787	284	15,360
α 1-antitrypsin-like	gi 545843002	45,900	3	105
α 1-antitrypsin isoform X1	gi 545842993	49,035	32	1,061
α 2-antiplasmin, partial	gi 545891440	34,217	1	43
α 2-macroglobulin	gi 335288480	165,2213	13	507
	gi 311256211	168,380	4	85
Mutated immunoglobulin heavy chain	gi 161511655	29,106	9	490
	gi 161511645	28,291	5	363
	gi 161511667	28,431	7	328
	gi 161511675	12,083	4	314
Immunoglobulin VDJ region, partial	gi 1022921	15,851	7	410
	gi 1022947	16,123	5	282
	gi 1022947	16,123	5	242
	gi 1022951	16,017	4	270
	gi 10222939	16,116	3	242
Ig heavy chain variable VDJ region	gi 2136537	16,016	6	263
	gi 2136539	17,006	5	240
	gi 2136522	15,621	6	218
	gi 2136543	15,763	4	215
	gi 2136530	15,685	2	200
	gi 2136546	15,627	2	142
	gi 2136531	14,703	2	126
	gi 2136549	15,553	1	113
	gi 2136544	15,475	1	77
Immunoglobulin heavy chain	gi 9954319	12,106	3	176
	gi 9954347	11,183	5	245
	gi 9954355	11,990	5	242
Immunoglobulin κ variable region	gi 41323513	13,635	2	152
	gi 41323659	14,281	3	142
	gi 41323669	14,281	3	142
	gi 41323507	14,268	3	139
	gi 41323679	14,244	3	129
	gi 41323667	14,321	3	128
	gi 41323647	13,735	2	127

	gi 41323539	14,264	4	124
	gi 41323665	14,779	2	101
	gi 41323605	14,282	3	95
	gi 41323509	14,183	1	52
	gi 41323677	14,330	1	52
IgG heavy chain precursor	gi 441477601	53,102	11	495
	gi 441477616	51,405	9	448
	gi 441477587	52,862	8	404
	gi 441477631	51,583	10	374
	gi 441477573	50,301	10	363
	gi 47523192	52,954	7	346
	gi 441477618	52,528	8	334
	gi 441477577	52,040	7	330
	gi 441477585	51,570	7	300
	gi 441477611	52,202	6	273
	gi 441477607	52,162	7	269
	gi 441477614	52,979	8	265
	gi 441477589	52,512	6	261
	gi 441477624	51,771	5	254
	gi 441477609	51,595	4	225
	gi 441477581	53,463	4	208
	gi 441477583	52,213	3	200
Immunoglobulin heavy chain variable region	gi 54888404	13,484	8	497
	gi 54888416	14,086	6	486
	gi 119662951	14,592	5	439
	gi 54888456	14,765	5	437
	gi 54888422	13,120	8	435
	gi 119663033	13,574	6	431
	gi 54888462	11,936	8	424
	gi 119662933	13,019	7	423
	gi 119663065	14,561	6	410
	gi 119662909	13,970	7	387
	gi 119662957	12,419	7	381
	gi 119662971	14,080	7	378
	gi 119662959	13,737	6	378
	gi 119662903	13,876	6	377
	gi 119662993	13,606	7	365
Immunoglobulin heavy chain variable region	gi 119663043	13,210	6	355
	gi 119663031	12,744	5	341
	gi 119662989	13,678	5	333
	gi 54888420	13,960	4	302
	gi 54888474	13,664	3	282
	gi 119663049	13,876	4	281
	gi 54888430	12,848	4	263
	gi 119662893	13,428	3	260
	gi 55294650	13,077	3	259
	gi 119663027	12,882	3	253
	gi 119662877	14,160	4	252
	gi 119663055	13,357	4	242
	gi 119662985	13,591	3	231
	gi 119662919	12,890	4	221
	gi 119663005	14,368	4	221
	gi 17225066	9,049	3	219
	gi 3171213	13,199	2	186
	gi 119662991	12,998	2	181
	gi 54888446	13,315	3	178
	gi 119662867	12,806	2	151
	gi 119663061	12,194	2	150
	gi 119662923	12,980	1	65

○ 혈액가수분해 산물에 존재하는 대사체 분석을 통한 아미노산 및 기타 생체 저분자 물질 분석

- 또한 혈액가수분해 산물 내에 존재하는 용해성 미량 성분 확인을 위해 LC-MS와 기 구축된 라이브러리 500종 화학물질 (Human Metabolome Technologies)을 대상으로 시료 1과 시료 2에 존재하는 성분을 확인함. 시료 1은 11.2 mg, 시료 2는 10.5 mg으로 측정물질의 최대 검출 peak 한계를 고려하여, 양이온 시료 분석을 위해 각각 10배와 2배 희석하였으며, 음이온 분석을 위해 10배와 5배 희석하여 5 kDa cut-off membrane filter를 통과시켜 filtrate를 Capillary Electrophoresis가 연결된 CE-TOF-MS (Agilent Technologies Inc.)를 이용하여 측정함. 상세한 분석조건은 다음과 같음:

- 양이온 모드 Cationic Metabolites (Cation Mode)

Agilent CE-TOFMS system (Agilent Technologies Inc.)

Capillary: Fused silica capillary i.d. 50 μ m \times 80 cm

Analytical Condition:

Run buffer: Cation Buffer Solution; Rinse buffer: Cation Buffer Solution

Sample injection: Pressure injection 50 mbar, 5 sec

CE voltage: Positive, 30 kV

MS ionization: ESI Positive

MS capillary voltage: 4,000 V

MS scan range: m/z 50-1,000

- 음이온 모드 Anionic Metabolites (Anion Mode)

Agilent CE-TOFMS system (Agilent Technologies Inc.)

Capillary: Fused silica capillary i.d. 50 μ m \times 80 cm

Analytical Condition:

Run buffer: Anion Buffer Solution; Rinse buffer: Anion Buffer Solution

Sample injection: Pressure injection 50 mbar, 22 sec

CE voltage: Positive, 30 kV

MS ionization: ESI Negative

MS capillary voltage: 3,500 V

MS scan range: m/z 50-1,000

- 분석 결과 라이브러리 상에 있는 500종의 물질 중에서, 양이온 모드에서 171종, 음이온 모드에서 116의 물질이 확인되었으며, 이중 정량 분석이 가능한 물질은 82종의 물질로 시료 1과 시료 2에서 측정된 단위 중량당 해당 물질의 농도는 표 10과 같음.
- 시료 1 (Sample-1)과 시료2 (Sample-2)에서 측정된 아미노산의 종류와 함량을 확인해 보면 필수아미노산 20종 모두 시료 1과 시료 2에서 확인이 되었으며, 1차 효소 가수분해 산물인 시료2에 비해 2차 효소 가수 분해 산물인 시료1에서 상대적으로 전체적인 아미노산의 함량이 증가 (Ratio: sample-1/sample-2) 하는 것으로 확인됨.
- 특징적으로 20종의 필수 아미노산 중에서 Glutamic acid (Glu)가 116,167 nmol/g으로 최대 양으로 측정됐으며, Tryptophan (Trp)이 가장 낮은 함량으로 291 nmol/g으로 확인 됨. 시료 1에서 상대적으로 함량이 높은 아미노산은 Glu (116,167 nmol/g) > Leu

(129,183 nmol/g)> Ala (110,887 nmol/g)> Ser (90,219 nmol/g)> Lys (59,474 nmol/g)> Asn (41,741 nmol/g)> Val (40,057 nmol/g)> Thr (37,902 nmol/g)> Gly (29,433 nmol/g)> Asp (25,848 nmol/g)> His (23,973 nmol/g)> Arg (23,377 nmol/g)> Phe (17,415 nmol/g)으로 14종의 아미노산이 측정되었으며, 상대적으로 낮은 농도로 Tyr (9,542 nmol/g)> Met (7,287 nmol/g)> Ile (6,698 nmol/g)> Pro (2,963 nmol/g)> Gln (1,846 nmol/g)> Trp (291 nmol/g)가 확인됨. 이와 같은 아미노산의 함량은 돼지의 생체를 구성하고 있는 단백질 또는 혈액의 고유한 특성으로 말미암아 아미노산의 함량의 차이가 나는 것으로 추정됨.

- 전반적으로 시료 1과 시료 2에서의 필수 아미노산의 함량은 효소 가수분해가 많이 일어난 시료 1에서 높은 함량으로 측정되었으며, 시료 2에서 측정된 아미노산의 함량 대비 시료1에서 Glu 경우 최대 21배가 증가 되었으며, 대다수의 아미노산의 함량이 대략적으로 12배에서 3배까지 증가하는 것으로 확인됨.

표 10. CE-TOF-MS로 측정된 정량 가능한 혈액 효소 가수분해산물에 존재하는 용해성 물질

Metabolite	Concentration (nmol/g)		Comparative Analysis		Metabolite	Concentration (nmol/g)		Comparative Analysis	
	sample-1	sample-2	Ratio			sample-1	sample-2	Ratio	
			sample-1/sample-2	sample-1/sample-2				sample-1/sample-2	sample-1/sample-2
2-Hydroxybutyric acid	514	192	2.7		Glyceraldehyde 3-phosphate	N.D.	N.D.	N.A.	
2-Oxoglutaric acid	362	197	1.8		Glycerol 3-phosphate	2,930	193	15	
2-Dxoisovaleric acid	91	68	1.3		Glycolic acid	N.D.	N.D.	N.A.	
2-Phosphoglyceric acid	2,682	1,517	1.8		Glyoxylic acid	N.D.	N.D.	N.A.	
3-Hydroxybutyric acid	404	151	2.7		GMP	116	227	0.5	
3-Phosphoglyceric acid	9,377	3,201	2.9		GTP	N.D.	12	<1	
6-Phosphogluconic acid	25	N.D.	<1		Guanine	N.D.	227	<1	
Acetyl CoA_divalent	N.D.	N.D.	N.A.		Guanosine	N.D.	60	<1	
Adenine	N.D.	60	<1		His	23,973	6,649	3.6	
Adenosine	55	192	0.3		Homoserine	67	24	2.8	
ADP	356	217	1.6		Hydroxyproline	424	213	2.0	
Ala	110,887	18,188	6.1		Hypoxanthine	52	2,863	0.02	
AMP	889	1,415	0.6		Ile	6,698	2,384	2.8	
Anthrannilic acid	N.D.	N.D.	N.A.		IMP	283	328	0.9	
Arg	23,377	1,899	12		Inosine	N.D.	96	<1	
Asn	41,741	3,469	12		Isoctic acid	N.D.	N.D.	N.A.	
Asp	25,848	2,827	9.1		Lactic acid	88,310	73,428	1.2	
ATP	74	61	1.2		Leu	129,193	14,321	9.0	
Betaine	2,002	1,071	1.9		Lys	59,474	10,897	5.5	
Betaine aldehyde_+H2O	N.D.	8.5	<1		Malic acid	993	1,085	0.9	
cAMP	N.D.	N.D.	N.A.		Malonyl CoA_divalent	N.D.	N.D.	N.A.	
Carnosine	107	53	2.0		Met	7,287	1,620	4.5	
CDP	N.D.	N.D.	N.A.		N,N-Dimethylglycine	N.D.	22	<1	
cGMP	N.D.	N.D.	N.A.		NAD*	N.D.	N.D.	N.A.	
Choline	1,026	806	1.3		NADP*	N.D.	N.D.	N.A.	
cis-Aconitic acid	N.D.	N.D.	N.A.		Ornithine	7,148	2,231	3.2	
Citric acid	930	115	7.2		Phe	17,415	7,683	2.3	
Citrulline	761	363	2.1		Phosphoenolpyruvic acid	N.D.	73	<1	
CMP	49	47	1.1		Pro	2,963	5,218	0.6	
CoA_divalent	N.D.	N.D.	N.A.		PRPP	N.D.	N.D.	N.A.	
Creatine	1,319	562	2.3		Putrescine	N.D.	69	<1	
Creatinine	818	1,556	0.5		Pyruvic acid	N.D.	715	<1	
CTP	N.D.	N.D.	N.A.		Ribose 5-phosphate	N.D.	N.D.	N.A.	
Cys	76	15	5.8		Ribulose 5-phosphate	52	16	3.3	
Cytidine	N.D.	27	<1		S-Adenosylmethionine	N.D.	N.D.	N.A.	
Cytosine	N.D.	20	<1		Sarcosine	N.D.	56	<1	
dATP	N.D.	N.D.	N.A.		Sedoheptulose 7-phosphate	N.D.	19	<1	
dCTP	N.D.	N.D.	N.A.		Ser	90,219	7,605	12	
Dihydroxyacetone phosphate	N.D.	N.D.	N.A.		Spermidine	24	22	1.1	
dTDP	N.D.	N.D.	N.A.		Spermine	N.D.	15	<1	
dTTP	N.D.	13	<1		Succinic acid	2,068	526	3.9	
dUDP	N.D.	N.D.	N.A.		Thr	37,902	6,473	5.9	
Erythrose 4-phosphate	N.D.	N.D.	N.A.		Thymidine	N.D.	N.D.	N.A.	
Fructose 1,6-diphosphate	58	18	3.3		Thymine	N.D.	32	<1	
Fructose 6-phosphate	N.D.	N.D.	N.A.		Trp	291	2,033	0.14	
Fumaric acid	210	145	1.4		Tyr	9,542	4,214	2.3	
GABA	103	54	1.9		Tyramine	N.D.	33	<1	
GDP	53	47	1.1		UDP	35	12	2.8	
Gln	1,846	833	2.2		UMP	117	96	1.4	
Glu	116,187	5,529	21		Uracil	N.D.	172	<1	
Gluconic acid	115	44	2.6		Uridine	N.D.	78	<1	
Glucose 1-phosphate	31	20	1.5		UTP	N.D.	N.D.	N.A.	
Glucose 6-phosphate	N.D.	N.D.	N.A.		Val	40,057	11,615	3.4	
Glutathione (GSH)	N.D.	32	<1		β-Ala	N.D.	98	<1	
Glutathione (GSSG)_divalent	N.D.	115	<1						
Gly	29,433	9,234	3.2						

- 이 중 시료 1에서 함량 ratio가 1 보다 낮은 Pro (0.6)과 Trp (0.14)의 경우에는, 시료 2에서 5,218 nmol/g과 2,033 nmol/g으로, 2차 효소 처리 후 활성탄 흡착과 같은 공정 후 처리 방법에 의한 소수성의 아미노산의 함량 변화가 일어난 것으로 추정됨.
- 최종적으로 혈액 효소 가수분해 산물 시료 1 (파란색)과 시료 2(빨간색)에서 확인된 개별 아미노산의 상대적인 함량을 비교한 결과는 (그림 60)과 같음.

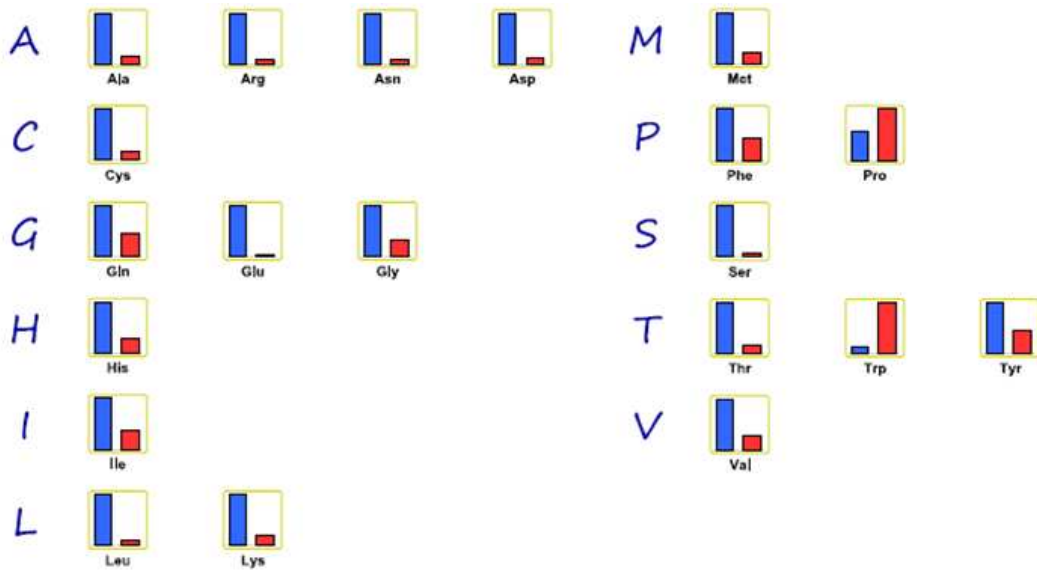


그림 60. 혈액 효소 가수분해 산물 시료 1(파란색)과 시료 2(빨간색)에서 확인된 상대적인 필수 아미노산의 함량 비교(알파벳 순서로 나열)

- 효소 가수분해에 의한 단백질로부터 유리되는 필수아미노산 20종 이외에 아미노산 이외에 아미노산 유래의 대사물질 14종이 확인되었으며, 이들 물질은 다음과 같음: β -Alanine; β -Alanyl-L-histidine (Carnosine); Citrulline; Creatine; Creatinine; GABA; Homoserine; Hydroxyproline; Hypoxanthine; Ornithine; Putrescine; Sarcosine; Spermidine; Spermine. 이들 물질의 대다수는 효소 가수분해에 의해 증가되는 양상이 보이나, 시료 1 (sample 1)과 시료 2 (sample 2)에서 변화가 없거나 감소되는 물질도 관찰됨. 하지만 대다수의 아미노산 유래의 물질은 필수아미노산 20 종에 비해 상대적인 함량이 낮은 것으로 확인됨.
- 최종적으로 돼지혈액의 효소가수분해물인 시료 1과 시료 2의 대사체 분석에서 각 시료에 존재하는 필수아미노산과 아미노산 유래의 대사물질의 분자량, 농도와 상대적인 비율은 표 11에 나타냄.

표 11. 돼지혈액 효소 가수분해 산물에 존재하는 아미노산 및 아미노산 유래의 물질의 농도

Compound	m/z	MT/RT	Concentration (nmol/g)		Ratio (sample 1/sample 2)
			Sample 1	Sample 2	
Free amino acids					
Alanine	90.055	8.51	110,887	18,188	6.1
Arginine	175.119	6.68	23,377	1,899	12.0
Asparagine	133.061	9.92	41,741	3,469	12.0
Aspartic acid	134.045	10.97	25,848	2,827	9.1
Cysteine	122.027	10.74	76	13	5.8
Glutamine	147.077	10.20	1,846	833	2.2
Glutamic acid	148.060	10.38	116,167	5,528	21.0
Glycine	76.039	7.84	29,433	9,234	3.2
Histidine	156.077	6.85	23,973	6,649	3.6
Isoleucine	132.102	9.66	6,698	2,384	2.8
Leucine	133.105	9.74	129,183	14,321	9.0
Lysine	147.113	6.45	59,474	10,897	5.5
Methionine	150.058	10.18	7,287	1,620	4.5
Phenylalanine	166.086	10.53	17,415	7,683	2.3
Proline	116.070	10.25	2,963	5,218	0.6
Serine	106.070	9.43	90,219	7,605	12.0
Threonine	120.065	9.96	37,902	6,473	5.9

Tryptophan	205.097	10.46	291	2,033	0.14
Tyrosine	182.081	10.79	9,542	4,214	2.3
Valine	118.086	9.48	40,057	11,615	3.4
Amino acid derivatives					
β-Alanine	90.055	6.90	n.d.	98	<1
β-Alanyl-L-histidine (Carnosine)	227.114	6.35	107	53	2.0
Citrulline	176.103	10.49	761	363	2.1
Creatine	132.077	8.37	1,319	562	2.3
Creatinine	114.066	6.85	818	1,556	0.5
GABA	104.071	7.24	103	54	1.9
Homoserine	120.065	9.54	67	24	2.8
Hydroxyproline	132.066	11.46	424	213	2.0
Hypoxanthine	137.046	10.53	52	2,863	0.02
Ornithine	133.097	6.39	7,148	2,231	3.2
Putrescine	89.107	4.40	n.d.	69	<1
Sarcosine	90.055	8.95	n.d.	56	<1
Spermidine	146.165	4.23	24	22	1.1
Spermine	203.225	4.17	n.d.	15	<1

¹⁾ Peak area × 100,000 divided by the internal standard peak area of metabolic compounds in the two preteolyzed blood samples

²⁾ MS scan range: m/z 50~1,000

³⁾ MT (migration time) in CE/RT (retention time) in LC

- 돼지 혈액의 효소 가수분해 산물 내에 존재하는 대사물질의 LC-MS 분석 크로마토그램 중 미분석된 물질의 확인을 위해서 대사체 분석에서 획득한 데이터를 화학물질 데이터베이스인 PubChem과 HMT의 자체 화학물질 데이터베이스 (HMT database)를 이용하여 재분석을 수행함.
- 재분석 결과 PubChem database에서 519 개, HMP database에서 160개, HMT peptide list에서 700개의 물질을 확인할 수 있었으며 LC-MS 크로마토그램 피크 중, 총 468개의 물질에 대해 시료 1과 시료 2에서 물질간의 상대적양을 비교할 수 있었음 (data not shown).
- 펩타이드 리스트에서 단백질의 분해시 발생하는 올리고머 펩타이드 물질인 두 개의 아미노산으로 구성된 디펩타이드는 20개의 모든 아미노산에서 확인되었으며, Arginine과 결합되어 있는 디펩타이드는 14개의 조합으로 가장 많이 종류로 확인이 되었으며, Tryptophan과 결합되어 있는 디펩타이드는 3개의 조합으로 다양성이 적은 것으로 확인됨. 각각의 아미노산과 결합되어 있는 개별적인 디펩타이드 종류와 시료 1과 시료2에서의 의 상대적 양의 비교는 표 12와 같음.

표 12. 혈액 효소 가수분해 시료에 존재하는 디아미노펩타이드의 상대적 양의 비교

Compound	Relative peak area		Ratio	m/z ²⁾	MT/RT ³⁾
	Sample 1 ¹⁾	Sample 2 ¹⁾			
Alanine (Ala)					
Ala-Arg/ Arg-Ala (1)	0.088	n.d.	1<	246.156	6.43
Ala-Arg/ Arg-Ala (2)	0.417	0.001	419	246.156	6.54
Ala-Asn/ Asn-Ala (1)	1.928	0.026	75	204.098	9.26
Ala-Asn/ Asn-Ala (2)	0.197	0.001	298	204.098	9.12
Ala-Asp/ Asp-Ala	1.331	0.006	209	205.082	9.61
Ala-Gly	0.761	0.007	102	147.076	8.35
Ala-His/ His-Ala	3.169	0.027	117	227.114	6.43
Ala-Ser	1.381	0.012	118	177.088	9.05
Ala-Thr/ Thr-Ala	0.889	0.002	459	191.102	9.27
Ala-Tyr/ Tyr-Ala	0.318	0.004	89	253.119	9.83

Arginine (Arg)					
Arg-Arg divalent	0.006	<0.001	94	166.114	5.62
Arg-Asn/ Asn-Arg	0.051	<0.001	129	289.161	6.77
Arg-Asp	0.025	<0.001	109	290.145	7.01
Arg-Gln	0.031	0.001	52	303.180	6.96
Arg-Glu/ Glu-Arg	0.166	0.002	83	304.162	7.06
Arg-Gly/ Gly-Arg	0.170	0.006	30	232.141	6.33
Arg-Ile (1) / Arg-Leu (1)	0.042	<0.001	102	288.202	7.01
Arg-Ile (2)/ Arg-Leu (2)	0.151	<0.001	778	288.203	6.94
Arg-Lys/ Lys-Arg	0.005	n.d.	1<	303.217	5.53
Arg-Met/ Met-Arg	0.009	<0.001	13	306.162	6.95
Arg-Ser/ Ser-Arg	0.164	0.001	173	262.152	6.66
Arg-Thr	0.037	<0.001	311	276.168	6.79
Arg-Tyr/ Tyr-Arg	0.008	0.006	1.4	338.183	7.26
Arg-Val	0.013	n.d.	1<	274.187	6.76
Asparagine (Asn)					
Asn-Asn	0.030	<0.001	198	247.103	9.58
Asn-Asp/ Asp-Asn	0.016	0.001	16	248.088	10.13
Asn-Gln	0.089	<0.001	212	261.118	9.75
Asn-Glu	0.039	0.002	30	262.103	10.36
Asn-Gly	0.002	<0.001	17	190.082	8.89
Asn-His	0.011	n.d.	1<	270.121	6.69
Asn-Ile (1)/ Asn-Leu (1)/ Ile-Asn (1)/ Leu-Asn (1)	1.313	0.003	404	246.145	9.91
Asn-Ile (2)/ Asn-Leu (2)/ Ile-Asn (2)/ Leu-Asn (2)	0.498	0.001	646	246.146	9.74
Asn-Lys/ Lys-Asn	0.062	<0.001	102	261.155	6.65
Asn-Thr (1)/ Thr-Asn (1)	0.073	0.001	160	234.108	9.57
Asn-Thr (2)/ Thr-Asn (2)	0.204	0.001	173	234.109	9.70
Asn-Val (1)/ Val-Asn (1)	0.043	<0.001	150	232.129	9.53
Asn-Val (2)/Val-Asn (2)	0.979	0.005	216	232.129	9.69
Aspartic acid (Asp)					
Asp-Arg	0.014	0.001	29	209.145	7.13
Asp-Asp	0.002	0.001	3.3	249.072	10.43
Asp-Gln	0.164	0.001	251	262.103	9.92
Asp-Glu	0.135	0.001	288	263.088	10.49
Asp-Gly	0.002	0.001	3.9	191.066	9.44
Asp-His/ His-Asp	0.018	0.001	25	271.103	7.12
Asp-Lys	0.115	0.004	26	262.139	7.0
Asp-Met	0.007	n.d.	1<	265.083	10.33
Asp-Ser/ Ser-Asp	0.358	0.001	330	221.077	9.79
Asp-Tyr	0.038	0.001	70	297.107	10.75
Asp-Val	0.017	0.001	14	233.113	10.12
Cysteine (Cys)					
Cys-Ala	0.001	n.d.	1<	193.066	9.06
Cys-Thr	0.008	n.d.	1<	223.074	9.56
Glutamine (Gln)					
Gln-Thr/ Thr-Gln	0.466	0.004	109	248.124	9.93
Glutamic acid (Glu)					
Glu-Ala	0.353	0.001	296	219.098	9.57
Glu-Asp	0.013	<0.001	44	263.088	10.31
Glu-Gln	0.322	n.d.	1<	276.118	10.10
Glu-Glu	0.305	<0.001	669	277.104	10.35
Glu-Gly/ Gly-Glu	0.241	0.002	99	205.082	9.38
Glu-His	0.043	<0.001	295	285.119	7.01
Glu-Ile/ Glu-Leu/ Ile-Glu/ Leu-Glu	0.679	0.001	740	261.144	10.19
Glu-Lys/ Lys-Glu	0.952	0.002	583	276.155	6.97
Glu-Met/ Met-Glu	0.054	n.d.	1<	279.099	10.21
Glycine (Gly)					
Gly-Asn	0.600	0.188	68	190.083	8.99
Gly-Asp	0.061	0.001	127	191.066	9.35
Gly-Gly	0.048	0.002	30	133.061	7.89
Gly-His/ His-Gly	0.541	0.004	157	213.098	6.25
Gly-Ile/ Gly-Leu	1.714	0.013	135	189.123	9.17
Gly-Lys/ Lys-Gly	1.313	0.006	238	204.134	6.19
Gly-Met/ Met-Gly	0.012	<0.001	43	207.079	9.21
Gly-Phe/ Phe-Gly	0.048	0.002	22	223.108	9.40
Gly-Pro/ Pro-Gly	0.003	<0.001	11	173.092	8.54
Gly-Ser	0.265	0.003	84	163.071	8.70
Gly-Thr	1.360	0.011	120	177.087	8.95
Gly-Tyr	0.016	0.002	8.8	239.103	9.69

Gly-Val	0.263	0.003	88	175.108	8.92
Histidine (His)					
His-Asn	0.029	<0.001	116	270.120	6.85
His-Gln	0.005	n.d.	1<	284.136	6.93
His-Glu	0.135	n.d.	1<	285.119	7.12
His-Lys (1)/ Lys-His (1)	n.d.	<0.001	1<	284.171	5.56
His-Lys (2)/ Lys-His (2)	0.006	n.d.	1<	284.171	5.52
His-Met	0.002	n.d.	1<	287.119	7.00
His-Pro	0.001	<0.001	6.2	253.129	6.83
His-Thr/ Thr-His	0.067	<0.001	174	257.124	6.81
Isoleucine (Ile)					
Ile-Ala (1)/ Leu-Ala (1)	n.d.	<0.001	<1	203.139	9.29
Ile-Ala (2)/ Leu-Ala (2)	3.583	0.014	259	203.139	9.45
Ile-Arg divalent	0.132	0.002	86	144.606	7.00
Ile-Asp/ Leu-Asp	2.228	0.019	117	247.129	10.30
Ile-Gln (1)/ Leu-Gln (1)	0.055	<0.001	132	260.159	9.96
Ile-Gln (2)/ Leu-Gln (2)	0.429	0.001	375	260.160	10.09
Ile-Lys/ Lys-Ile/ Leu-Lys/ Lys-Leu	1.759	0.001	1,255	260.197	6.84
Ile-Ser/ Ser-Ile/ Leu-Ser/ Ser-Leu	2.252	0.014	156	219.134	9.69
Ile-Thr/ Leu-Thr/ Thr-Ile/ Leu-Thr	0.518	0.004	146	233.15	9.89
Ile-Val	0.856	0.004	217	231.171	9.88
Leucine (Leu)					
Leu-His	0.294	<0.001	684	269.161	6.97
Leu-Ile/ Leu-Leu	0.127	0.001	164	245.186	10.10
Lysine (Lys)					
Lys-Asp	0.060	<0.001	155	262.139	6.91
Lys-Gln	0.186	<0.001	383	275.170	6.87
Lys-Lys	0.017	n.d.	1<	275.206	5.47
Lys-Met/ Met-Lys	0.017	n.d.	1<	278.154	6.84
Lys-Phe/ Phe-Lys	0.089	<0.001	167	294.181	6.97
Lys-Ser (1)/ Ser-Lys (1)	0.002	<0.001	8	234.145	6.31
Lys-Ser (2)/ Ser-Lys (2)	0.657	0.004	153	234.145	6.55
Lys-Tyr/ Tyr-Lys	0.048	<0.001	209	310.179	7.16
Methionine (Met)					
Met-Ala	0.072	<0.001	380	221.095	9.45
Met-Asn	0.016	n.d.	1<	264.101	9.78
Met-His	0.002	n.d.	1<	287.114	6.88
Met-Ser (1)/ Ser-Met (1)	0.041	n.d.	1<	237.091	9.77
Met-Ser (2)/ Ser-Met (2)	0.016	n.d.	1<	237.091	9.45
Met-Thr	0.008	n.d.	1<	251.106	9.76
Phenylalanine (Phe)					
Phe-Ala	0.187	<0.001	302	237.124	9.63
Phe-Arg divalent	0.002	<0.001	13	161.596	7.09
Phe-Asn	0.047	<0.001	310	280.129	10.04
Phe-Asp	0.011	n.d.	1<	281.112	10.32
Phe-Gln	0.079	<0.001	416	294.143	10.24
Phe-Glu	0.024	n.d.	1<	293.116	9.51
Phe-Thr	0.048	<0.001	109	267.134	10.06
Phe-Val	0.005	n.d.	1<	265.154	10.04
Proline (Pro)					
Pro-Ala	0.013	n.d.	1<	187.108	8.88
Pro-Asn	0.002	n.d.	1<	230.114	9.40
Pro-Asp	0.007	n.d.	1<	231.097	9.71
Pro-Glu	0.058	n.d.	1<	245.113	9.73
Pro-Ile/ Pro-Leu	0.019	0.001	31	229.155	9.57
Pro-Lys	0.010	n.d.	1<	244.166	6.51
Pro-Ser	0.018	<0.001	107	203.103	9.17
Pro-Thr	0.011	<0.001	25	217.120	9.39
Pro-Tyr	0.022	n.d.	1<	279.134	10.12
Pro-Val	0.187	n.d.	1<	215.139	9.75
Serine (Ser)					
Ser-Asn	0.330	0.001	410	220.093	9.45
Ser-Glu/ Glu-Ser	0.375	0.002	164	235.093	9.81
Ser-His/ His-Ser	0.850	0.004	228	243.109	6.61
Ser-Ser	0.202	0.001	195	193.082	9.24
Ser-Thr/ Thr-Ser	0.451	0.005	97	207.097	9.50
Ser-Tyr/ Tyr-Ser	0.030	<0.001	164	269.113	10.12
Ser-Val/ Val-Ser	0.817	0.014	60	205.118	9.47

Threonine (Thr)					
Thr-Asp/ Asp-Thr	0.053	0.001	54	235.092	10.08
Thr-Glu	0.195	0.001	229	249.108	10.03
Thr-Lys	1.018	0.010	103	248.161	6.74
Thr-Met	0.010	n.d.	1<	251.109	9.88
Thr-Thr	0.121	0.001	145	221.112	9.71
Thr-Tyr/ Tyr-Thr	0.024	<0.001	67	283.128	10.30
Tryptophan (Trp)					
Trp-Ala	0.010	0.001	16	276.135	9.90
Trp-Asn	0.002	n.d.	1<	319.141	10.28
Trp-Tyr/ Tyr-Trp	0.001	n.d.	1<	368.163	10.70
Tyrosine (Tyr)					
Tyr-Arg divalent	0.011	0.013	0.9	169.594	7.27
Tyr-Asn	0.009	n.d.	1<	296.124	10.20
Tyr-Gln	0.009	<0.001	40	310.142	10.48
Tyr-Glu/ Glu-Tyr	0.050	<0.001	217	311.123	10.57
Tyr-His	0.010	0.001	17	319.138	7.23
Tyr-Tyr	0.003	n.d.	1<	345.149	10.95
Valine (Val)					
Val-Arg divalent	0.064	<0.001	26	137.593	6.84
Val-Asp	0.649	0.004	171	233.114	9.99
Val-Glu	0.493	0.003	174	247.129	10.05
Val-His	0.683	0.003	229	255.145	6.77
Val-Lys	0.704	0.008	93	246.182	6.74

¹⁾ Peak area × 100,000 divided by the internal standard peak area of metabolic compounds in the two preteolyzed blood samples

²⁾ MS scan range: m/z 50~1,000

³⁾ MT (migration time) in CE/RT (retention time) in LC

- 아미노산을 제외한 61종의 물질은 돼지 혈액에 존재하는 glycolysis/ glyconeogenesis, TCA cycle, amino acid biosynthesis, glutamate metabolism 등의 생화학 경로에서 생합성 또는 분해에 의해 생성되는 대사물질로 추정되며, glycerol-3-phosphate (15 배)와 citric acid (7.2 배)를 제외한 대다수의 물질이 시료 1과 시료 2에서의 양적인 ratio 변화가 약 3~4배 이하이거나 1 보다 낮은 것으로 확인됨. 이는 돼지 혈액의 효소 가수분해에 의한 물질이 아닌 혈액 내에 존재하면서 혈액의 효소가수분해 공정 상에서 특정 성분의 농축 혹은 생화학적 대사 변화 과정에서 생성되는 물질로 추정됨.

② 미생물 배지 사용을 위한 배지 적합성 분석

○ 동물 혈액 효소가수분해 산물 중의 항생제 및 잔류성분 분석

- 축산부산물인 동물혈액은 다양한 개체에서 회수되어 처리된 축산 과정 중에 항생제 투여로 인해 혈액 내에 잔류 항생제가 존재할 가능성이 있으며, 해당 항생제는 미생물의 배양저해 또는 내성 균주를 양산할 가능성이 높기 때문에 혈액 내에 존재하는 항생제를 측정함.
- 잠재적 항생제에 대한 측정은 <동물의약품안전사용기준-농림축산검역본부 고시 제2016-24호>에 명시되어 있는 대상동물 돼지에 사용하는 항생 물질을 참조하여 테트라사이클린 (tetracyclines), 클로람페니콜 (chloramphenicol), 퀴놀로론 (quinolones), 설포노아마이드 (sulphonamides) 계열을 측정할 수 있는 enzyme immunoassay kit (Eurofins Technologies)를 사용하여 하여 측정함. 측정방법은 키트에 포함되어 있는 방법에 따라 수행하였으며, 위에서 준비한 시료 1과 시료 2를 사용하여 측정함. 주로 사용하는 이 방법은 개별항생제에 비록 감도의 차이는 있으나, chloramphenicol 그룹의 경우 5종의 클로람페니콜 모 구조 (backbone structure)를 갖는 항생제를 측정할 수 있으며, quinolones의 경우는 9 종류의 퀴놀로론 모 구조를 포함하는

항생제 측정이 가능하며, Sulphonamides 그룹의 경우 21종류의 설폰노아마이드 모 구조를 포함하는 항생제를 마지막으로 tetracyclines 그룹의 경우 10종류의 테트라사이클린 구조를 갖는 항생제를 측정할 수 있음.

- 시료 1과 시료2에서 ELISA 측정결과, 동물혈액에 남아 있는 상대적인 항생제의 양은 시료 2에 비해 시료 1에서 높은 양이 측정되었으며, 상대적으로 남아 있는 잔여 항생제는 sulphonamides> Chloramphenicol>> Quinolones >> Tetracyclines 순으로 테트라사클린 계열 항생제는 측정 오차 범위 내에서 측정됨. Blank와 비교했을 때 항생제인 Sulphonamides와 Chloramphenicol가 40~50%로 상대적으로 높은 양이 측정되지만 상대적 감도 비율 50% 미만으로 측정되기 때문에 항생제의 농도가 0.1-0.5 ng/ml 수준인 ppb 단위의 농도로 측정되기 때문에 미생물 배양이나 동물세포 배양에는 혈액 가수분해 산물 내에 존재하는 항생제가 영향이 미비할 것으로 예상됨.

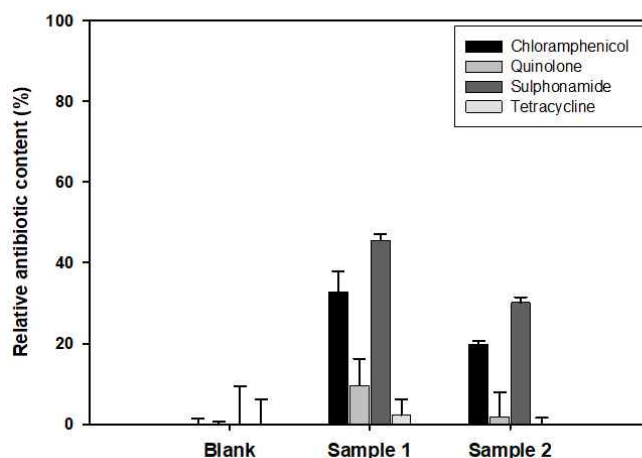


그림 61. 동물혈액 가수분해 산물인 시료 1과 시료 2에서 ELISA 측정법을 이용한 잔여 항생제 측정 (트라사이클린 (tetracyclines), 클로람페니콜 (chloramphenicol), 퀴놀로론 (quinolones), 설폰노아마이드 (sulphonamides) 계열 항생제에 대한 잔여함량)

- 이와 더불어 CE-TOF-MS (Agilent Technologies Inc.)를 이용하여 500종의 표준물질을 기준으로, 측정된 양이온 모드에서 171종, 음이온 모드에서 116의 물질 중에서 항생제 물질로 사용되고 있는 페니실린아민 (penicillamine)이 시료 1에서 확인 되었으나 시료 2에서는 검출되지 않음. 검출된 peak area는 시료 1에서 4.7E-3 이고 시료 2에서는 측정되지 않아 (N.D.) 상대적인 양의 비율은 1< 로 확인됨.
 - 또한 소염진통제로 사용되고 있는 케토프로펜 (ketoprofen)이 시료 1과 시료 2에서 검출되었으며, 검출된 peak area는 시료 1에서 5.4E-4이고 시료 2에서는 1.8E-4로 측정되어 상대적 비율은 시료 1에서 3배 높게 측정됨.
- 동물 혈액 효소가수분해 산물 내에 존재하는 미생물 군집 분석
- 효소가수분해 산물 중에 존재하는 유해 생물학적 성분으로 병원성 미생물, 포자성 곰팡이, 그리고 바이러스 등을 고려할 수 있으며, 해당 생물학적 균체는 DNA 시료 추출을 통해 분자생물학적 방법을 통해 분석함. 전처리 방법으로 고형상태의 시료를 입자파쇄기를 이용하여 분쇄한 후, metagenome extraction kit를 통해 DNA를 추출한 후, 박테리아는

16S rDNA와 곰팡이 또는 효모는 ITS1-4 부분의 유전자를 PCR을 통해 증폭하여 NGS (next generation sequencing) 분석을 위한 라이브러리를 제작함.

- 박테리아와 곰팡이 또는 효모는 16S rDNA와 ITS1-4 유전자를 증폭하여 DNA의 농도를 확인한 결과, 시료 1과 시료 2에서 박테리아에서는 18.7 ng/μl와 12.04 ng/μl의 양이 확보되었으나, ITS1-4의 경우 0.21 ng/μl와 0.27 ng/μl로 90배와 45배 낮은 농도로 DNA가 얻어져 곰팡이/효모의 균집은 확보할 수 없었음 (표 13). 증폭된 DNA 양으로 추정할 때 혈액가수분해 산물에는 곰팡이나 효모에 비해 박테리아의 양이 상대적으로 많은 것으로 추정된다. 또한 시료 1에서 시료 2에 비해 DNA 양이 약 1.6배 많은 것으로 확인됨에 따라, 2차 효소 가수분해 후에 효소가수 분해 산물 내에 증가되는 유용 아미노산에 의해 외부 박테리아의 성장이 증가하여 많은 양의 박테리아 DNA가 추출 되었을 것으로 추정됨.

표 13. 동물 혈액 효소 가수분해 산물에 존재하는 미생물 균집 분석을 위한 NGS 메타게놈 라이브러리 제작을 위한 박테리아 16S rDNA와 곰팡이/효모 ITS1-4 증폭 유전자의 양 비교

#	Library Name	Library Type	Conc. (ng/ul)	Conc. (nM)	Size (bp)	Result*	
1	Sample - 1_16S	Metagenome Amplicon	18.7		605	Pass	
2	Sample - 2_16S	Metagenome Amplicon	12.04		612	Pass	
3	Sample - 1 ITS	Metagenome Amplicon	0.21		676	Fail	Low Quantity to (Run or Capture)
4	Sample - 2 ITS	Metagenome Amplicon	0.27		617	Fail	Low Quantity to (Run or Capture)

- 메타게놈 분석을 통해 얻어진 박테리아의 16S rDNA의 정보도 마찬가지로 시료 1 (sample 1)이 시료 2 (sample 2)에 비해 약 1.3배 많은 정보가 분석되었으며, GC 및 AT content 비교를 통해 유사한 미생물 군들이 존재하는 것으로 추정됨 (표 14).

표 14. 각 시료에서 NGS 분석을 통해 분석된 총 염기서열과 분석된 서열 수

Sample ID	Total read bases (bp)	Total reads	GC(%)	AT(%)	Q20(%)	Q30(%)
Sample-1_16S	74,557,700	247,700	52.31	47.69	94.17	86.84
Sample-2_16S	58,641,422	194,822	52.62	47.38	93.83	85.81

- 시료 1 (sample 1)과 시료 2 (sample 2)에서 NGS 분석을 통한 박테리아 균집의 구성 비율을 보면 phylum level/ family level/ genus level/ species level에서 각 미생물의 균집 양상이 다르게 나타나며, 주된 미생물 균집의 종류와 양이 다른 것으로 확인됨 (그림 62).
- Phylum level에서 각 시료에 존재하는 미생물을 비교해 보면, 시료 1은 Proteobacteria (53.7%)> Firmicutes (26.7%)> Bacteroidetes (15%)> Actinobacteria (3.5%)> 기타 (1.1%)로 확인되는 반면, 시료 2는 Firmicutes (55.5%)> Proteobacteria (21.5%)> Bacteroidetes (19.7%)> Actinobacteria (1.4%)> Fusobacteria (0.8%)> Tenericutes (0.1%)> 기타 (0.9%)로 시료 2에서 다양한 균의 균집이 확인됨. Family level의 시료

1에서는 주된 미생물은 *Moraxellaceae* (26.7%)> *Pseudomonadaceae* (19.4%)> *Planococcaceae* (13.7%)로 확인되었으나, 시료 2의 경우 *Streptococcaceae* (36.6%)> *Porphyromonadaceae* (8.5%)으로 확인되었다. Genus level에서는 시료1의 경우 *Psychrobacter* (19.5%)> *Pseudomonas* (19.4%)> *Sporosarcina* (10.8%)> *Acinetobacter* (7.4%)> *Sphingobacterium* (6.8%)> *Bacillus* (6.6%) 등으로 확인됐으나, 시료 2의 경우에는 *Streptococcus* (35.0%)> *Bacteroides* (6.4%)> *Aeromonas* (5.4%)> *Clostridium* (3.5%)> *Faecalibacterium* (3.3%) 등으로 확인됨. Species level의 시료 1에서는 *Psychrobacter maritimus* (17.3%)> *Pseudomonas weihenstephanensis* (17.1%)> *Sporosarcina luteola* (8.9%)> *Acinetobacter lwoffii* (4.7%) 등으로 확인되었으며, 시료 2의 경우에는 *Streptococcus dysgalactiae* (32.1%)> *Aeromonas hydrophila* (5.4%)> *Clostridium saudiense* (2.6%)> *Peptostreptococcus russellii* (2.1%) 등으로 확인됨.

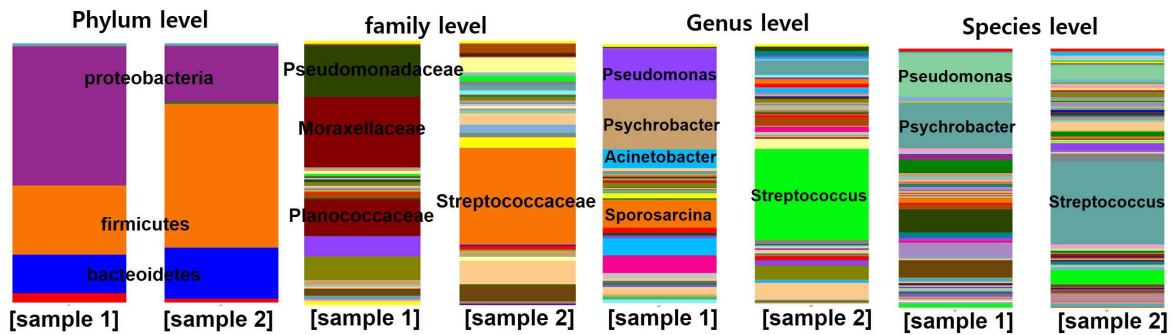


그림 62. 혈액 효소 가수분해 산물 시료 1 (sample 1)과 시료 2 (sample 2)의 메타게놈 분석에서 확인된 박테리아의 균총변화 (phylum, family, genus, species level 비교; 상대적으로 높은 미생물 군 표시)

- 흥미롭게, 시료 1과 시료 2에는 상당히 많은 종류와 수의 미생물이 존재하는 것이 확인되는데, 이와 같은 현상은 시료 1과 시료 2에서 전혀 다른 균총의 패턴은 돼지 혈액의 효소가수분해 공정과정에서 외부 미생물로 의한 오염으로 해석될 수 있음. 특히 시료 2에서 발견되는 주된 균주가 돼지 장내에서 발견되는 혐기 또는 통성 혐기균 종으로 확인되는데, 최초의 혈액 시료가 돼지 부산물과의 접촉 또는 오염에 의해 해당 균주들이 다수 존재하는 것으로 추정되며, 해당 균주들이 헴 철과 같은 혈액에 존재하는 성분들에 의해 성장이 증가하는 일반적 특성을 고려할 때 혈액 가공중에 미생물의 성장이 활발해져 양적인 변화에 영향을 주었을 것으로 예상됨.
- 따라서, 미생물 또는 동물세포 배양을 위한 배지 사용을 위해서는 해당 균주를 제거 또는 멸균하는 공정 개발이 필요할 것으로 판단됨.
- 돼지에 감염을 일으키는 바이러스의 경우는 종류와 변종의 수가 다양하여 Universal Probe Library (UPL) probe 제작이 불가능하여, 혈액 효소 가수분해 산물 제작 시 사용한 원 시료의 출처 및 경로가 확인되지 않아 측정 대상 바이러스 선정이 명확하지 않아 본 실험에서는 메타게놈을 대상으로 한 바이러스 군집에 대한 분석은 제외함.

③ 미생물 배양 후 상업용 배지와 효능 비교 분석

○ 1차 혈액 효소 가수분해 산물을 이용한 미생물 배양 조건 확립

- 기존의 blood가 포함된 rich culture media를 사용하고 있는 유산균을 포함한 유용 농업용 미생물인 바실러스 균주를 대상으로 배양 배지 내에 meat peptone/extract를 대체 가능한지를 MRS 및 LB 배지를 대상으로 하여 complex synthetic medium을 1차 혈액 효소 가수분해 산물 (시료 1)을 추가하여 배양 배지를 제작함 (표 15와 표 16).
- 유산균은 *Lacobacillus plantarum*과 바실러스는 *Bacillus sp. B-100* 균주를 사용하였고, 상기의 배지를 액상 배지로 제작하여 멸균한 후, 미생물 접종 후 37°C에서 24시간 200 rpm으로 진탕 배양한 후, 균체의 성장을 연속 희석을 통해 MRS와 LB 고상배지에 도말하여 colony forming unit (CFU)을 확인함. 미생물의 성장 확인 결과, LB 배지에서 *Bacillus sp. B-100* 균주는 양성대조군으로 사용한 LB-tryptone에서는 CFUs는 5.0×10^9 로 측정됐으며, 1차 혈액 효소 가수분해산물을 포함한 LB-PBH에서는 5.2×10^9 로 1.04배 성장이 증가한다는 것을 확인함. MRS 배지에서는 배양한 *L. plantarum*의 경우에는 양성대조군으로 사용한 MRS-peptone/beef extract에서는 CFUs는 1.2×10^9 로 측정됐으며, 1차 혈액 효소 가수분해산물을 포함한 MRS-PBH에서는 1.8×10^9 로 1.5배 성장이 증가한다는 것을 확인함 (표 17).

표 15. 유산균 배양을 위한 MRS 배지 내에 peptone과 beef extract를 1차 혈액 효소 가수분해 산 (Porcine blood hydrolysate, PBH)로 대체한 배지 조성표

	MRS(g/l)	PBH-MRS(g/l)
Peptone	10	-
Beef extract	10	-
Porcine blood hydrolysate (PBH)	-	20
Yeast extract	1	1
Glucose	20	20
Sodium acetate trihydrate	5	5
Tween 80	1	1
Diptassium hydrogen phosphate	2	2
Triammonium citrate	2	2
Magnesium sulfate	0.2	0.2
Manganese sulfate	0.05	0.05

표 16. 바실러스 균주 배양을 위한 LB 배지 내에 tryptone을 1차 혈액 효소 가수분해 산물 (Porcine blood hydrolysate, PBH)로 대체한 배지 조성표

	LB(g/l)	PBH-LB(g/l)
Tryptone	10	-
Porcine blood hydrolysate	-	10
NaCl	5	5
Yeast extract	10	10

표 17. 1차 혈액 효소 가수분해 산물 (Porcine blood hydrolysate, PBH)을 대체한 LB와 MRS 배지에서 바실러스 균과 유산균의 상대적 성장 차이 비교(CFU로 미생물 성장 측정)

	<i>Bacillus sp. B100</i>	<i>Lactobacillus plantarum</i>
LB	5.0×10^9	-
PBH-LB	5.2×10^9	-
MRS	-	1.2×10^9
PBH-MRS	-	1.8×10^9

- 또한 MRS 배지와 MRS-PHB 배지에서 배양한 유산균 배양액을 연속 적정 희석하여 5 μ l를 MRS 고상배지에 spotting을 한 결과 (그림 63A) MRS에서 배양한 유산균과 MRS-PHB에서 배양한 균주 모두 성장에 차이 없이 동일한 성장 정도를 육안으로 확인할 수 있었음. 또한 항공팡이 및 항균 활성을 갖는 바실러스 *Bacillus sp. B-100*을 LB와 LB-PHB에서 배양한 후 항공팡이 및 항균활성 비교하기 위해 병원성 곰팡이인 *Phytophthora capsici*, *Colletotrichum gloeosporioides*, *Fusarium fujikuroi*, *Cylindrocarpon destructans*에 대한 clear zone 및 성장 저해 효과를 확인한 결과, 음성대조군에서는 곰팡이가 전체 고상배지에 자라났으나, 양성대조군인 *Paenibacillus S3* (S3로 표기)와 동일한 활성으로 *Bacillus sp. B-100* (B로 표기)은 항공팡이 활성을 보여줌 (그림 63B). 또한 *Saprolegnia* (어류곰팡이병원균)에 활성을 보이는 길항 미생물 *Bacillus sp. B-100*는 해당 미생물에 항균 활성을 보여주고 있어 (그림 64), 1차 혈액 효소 가수분해 산물을 배지의 특정배지 성분 대체제로 활용할 수 있다는 것을 확인함.

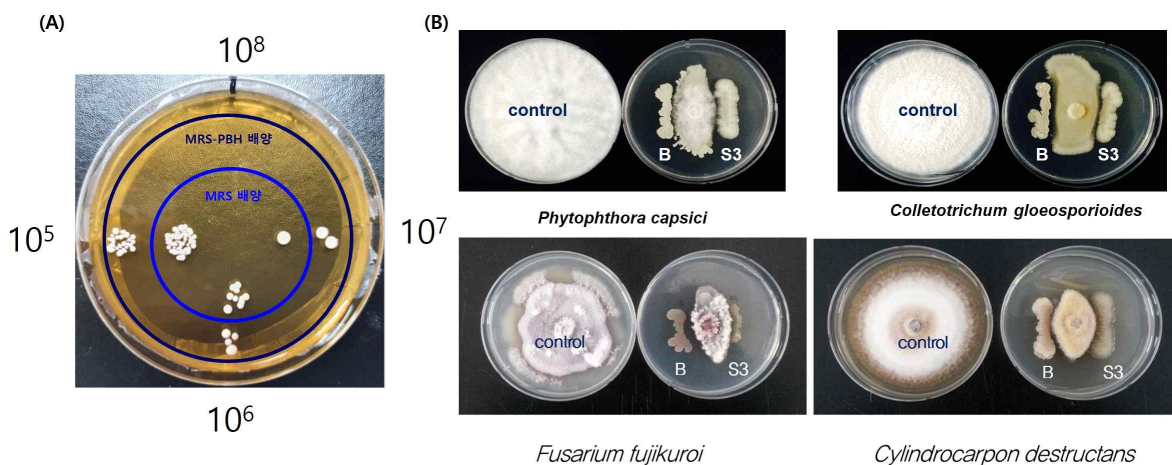


그림 63. MRS에서 배양한 유산균과 MRS-PHB에서 배양한 유산균의 spotting assay 결과 (A) 및 LB-PHB에서 배양한 *Bacillus sp. B-100* 균주의 항공팡이 활성 비교 실험 결과 (B)



Saprolegnia(어류곰팡이병원균) 길항 미생물 *Bacillus* sp. B-100

그림 64. LB-PHB에서 배양한 *Bacillus* sp. B-100 균주의 어류 물곰팡이 병원균에 대한 항균 활성 비교 실험 결과

○ 1차 혈액 가수분해산물의 미생물 배양을 통한 배지 적합성 확인

- 1차 혈액 가수분해 산물만으로 배지로 사용하여 바실러스 균과 유산균 배양이 가능한지를 확인하기 위하여 2 % (w/v)의 혈액 효소 가수분해 산물을 증류수에 넣고 멸균 후에 미생물을 배양함. 위와 동일한 바실러스는 *Bacillus* sp. B-100와 유산균 *Lactobacillus plantarum*를 사용하였고, 미생물 접종 후 37°C에서 24시간 200 rpm으로 진탕 배양한 후, 균체의 성장을 연속 희석을 통해 LB와 MRS 고상배지에 도말하여 colony forming unit (CFU)을 확인함.
- 미생물의 성장 확인 결과, LB 배지에서 *Bacillus* sp. B-100 균주는 양성대조군으로 사용한 LB-tryptone에서는 CFUs는 2.0×10^7 로 측정됐으며, 1차 혈액 효소 가수분해산물 만을 포함한 PBH에서는 4.2×10^7 로 2.1배 성장이 증가한다는 것을 확인함. 그러나 유산균의 경우에는 MRS 배지에서는 배양한 *L. plantarum*는 양성대조군으로 사용한 MRS-peptone/beef extract에서는 CFUs가 1.4×10^9 로 측정됐으며, 1차 혈액 효소 가수분해산물에서 배양한 균체의 경우에는 5.0×10^7 으로 미생물의 성장이 30배 이하로 감소하는 것으로 확인됨 (표 18).

표 18. 1차 혈액 효소 가수분해 산물 (Porcine blood hydrolysate, PBH)만으로 배양한 바실러스 균과 유산균의 상대적 성장 차이 비교 (CFU로 미생물 성장 측정)

	<i>Bacillus</i> sp. B100	<i>Lactobacillus plantarum</i>
LB	2.0×10^7	
PBH(2%)	4.2×10^7	5.0×10^7
MRS		1.4×10^9

- 유산균의 성장이 낮은 이유는, 1 L 기준으로 배지를 제작할 때 MRS 배지에는 20 g/L의 포도당이 존재하지만, 1차 혈액 효소 가수분해 산물 내에 포도당이 거의 존재하지 않기 때문에 유산균이 이용할 수 있는 탄소원의 부재로 인한 원인으로 생각하고, 2% (w/v) PBH에 탄소원을 추가함. 탄소원으로는 glucose 또는 당밀을 사용하여 배지를 조성하였으며, 상기와 동일한 배양 조건으로 유산균을 배양한 후, CFUs를 측정한 결과 1차 혈액 효소 가수분해산물 만을 포함한 PBH에서는 1.0×10^6 이었으며, glucose와 당밀을 넣은 PHB의 경우에는 각각 3.0×10^8 , 3.1×10^8 으로 유산균의 성장이 300배 이상으로 크게

증가하는 것으로 확인됨 (표 19). 이와 같은 결과는 1차 혈액 효소 가수분해산물에 탄소원 추가로 유산균을 배양할 수 있으며, 기존 MRS 대비 성장률을 크게 증대시킬 수 있는 가능성을 보여줌.

표 19. 1차 혈액 효소 가수분해 산물 (Porcine blood hydrolysate, PBH)에 탄소원 2% (w/v)을 추가하여 배양한 유산균의 상대적 성장 차이 비교 (CFU로 미생물 성장 측정)

	<i>Lactobacillus plantarum</i>
PBH (2%)	1.0 x 10⁶
PBH(2%)+Glucose (2%)	3.0 x 10⁸
PBH(2%)+Molasses (2%)	3.1 x 10⁸

- 위의 실험에 추가하여, 난용성 고체의 1차 혈액 효소 가수분해산물을 가용화시켜 유용 배양배지 성분 전환하기 위하여, 바실러스 균주 배양을 통해 단백질 분해 효소를 촉진시켜 난용성 1차 혈액 효소 가수분해산물을 분해시켜 미생물을 배양하는 방법을 테스트 함. 바실러스 균주는 추가적인 배지 성분 없이도 1차혈액 가수분해 산물에서 성장이 잘 되기 때문에, 선 바실러스 배양 후 멸균 후 유산균 접종 후 배양을 통해 유산균의 배양을 확인함. 이에 추가하여 바실러스 배양 후, 혈액 가수분해 산물인 아미노산 및 펩타이드 등의 질소원은 풍부하나 탄소원 고갈로 인한 영양성분 부족으로 미생물 배양저해가 일어나는 것을 방지하기 위해 glucose와 같은 탄소원 추가를 통해 배지를 조성하여 유산균 배양을 테스트 함.
- 실험 결과, 2% (w/v)에 Bacillus sp. B-100 균주를 배양한 후, 멸균을 통해 균체를 제거한 후 여기에 다시 유산균 L. plantarum를 배양할 때 CFUs가 2.0 x 10³로 낮게 측정되지만, 여기에 탄소원인 glucose를 2% 추가하여 배양하였을 때 CFUs는 1.7 x 10⁷로 85,000배 균체 성장이 늘어나는 것으로 확인됨 (표 20).
- 또한 혈액 가수분해 산물의 농도를 2, 5, 10% (w/v)로 증가시켜 탄소원 2% (w/v)를 추가하게 되면 균체의 성장이 약 100~300배 까지 성장이 월등하게 증가하는 것으로 확인됨. 이를 통하여, 난용성 혈액 효소 가수분해 산물의 1차 바실러스 배양을 통한 용해도 증가를 통해 미생물이 이용 가능한 성분의 증대를 통해, 유산균과 같은 유용 미생물의 배양이 가능하며, 추가 효소 처리 없이 미생물 처리만으로도 동물혈액을 사용하여 혈액 내 유용 성분 활용이 가능하다는 것을 확인할 수 있었음.

표 20. 바실러스 선배양을 통해 가용화 시킨 1차 혈액 효소 가수분해 산물 (Porcine blood hydrolysate, PBH)에 탄소원 2% (w/v)을 추가하여 배양한 유산균의 상대적 성장 차이 비교 (CFU로 미생물 성장 측정)

PHB Media After bacillus culture	<i>Lactobacillus plantarum</i>
2% PHB	2.0 x 10³
2% PHB + 2% Glucose	1.7 x 10⁷
5% PHB + 2% Glucose	4.5 x 10⁹
10% PHB + 2% Glucose	1.6 x 10⁹

④ 크로마토그래피, 멤브레인 여과 농축 과정을 통한 동물세포 배양을 위한 필수 성분 확인

○ 2차 혈액가수분해 산물의 size exclusion chromatography를 이용한 성분 분석

- 2차 혈액가수분해 산물에 존재하는 거대분자 단백질, 올리고머 펩타이드 및 저분자 펩타이드와 아미노산 성분 등을 분석하기 위해서 Size exclusion chromatograph, Sephadex S-300 (1.7 x117 cm) 컬럼에 0.553 g/ml의 혈액 가수분해 산물을 주입하여, peristaltic pump로 이동상인 증류수를 1 ml/min으로 흘려주어 분당 8 ml로 분석을 회수함.
- 각 분석에 포함된 단백질과 펩타이드는 각 분석에서 100 µl를 Bradford solution과 혼합하여 microplate reader를 사용하여 595 nm에서 상대적인 양을 측정하였으며, 아미노산 성분은 위와 동일한 방법으로 각 분석 100 µl에 10 µl o-Phthaldialdehyde (OPA) Reagent를 혼합하여 15분 간 상온에서 반응한 후 microplate reader 사용하여 450 nm에서 상대적인 아미노산 양을 측정함.
- 측정결과 분석된 단백질과 펩타이드는 fraction number 36-58과 63-70 튜브에서 단백질과 펩타이드 함량이 높은 것으로 확인이 되었으며, 아미노산의 경우는 fraction number 41-54 튜브에서 아미노산의 함량이 가장 높게 측정됨 (그림 65). 본 크로마토그램의 분석에서는 단백질과 펩타이드의 분석이 아미노산의 분석과 거의 동일한 부분에서 검출이 되는 것으로 확인됨.
- 추가적으로 분석된 용액은 MW cut off 3 kDa membrane filter를 이용하여 농축하였으며, 농축용액과 필터된 용액 모두를 아미노산, 단백질 또는 펩타이드 함량을 확인하였으나 아미노산 성분과 low molecular weight peptide 성분이 모두 필터를 통과되는 것이 검출되어 추후 세포배양을 위한 배양액 제조에 사용에는 0.22 µm를 통과시켜 해당 용액만을 세포 배양에 사용함.

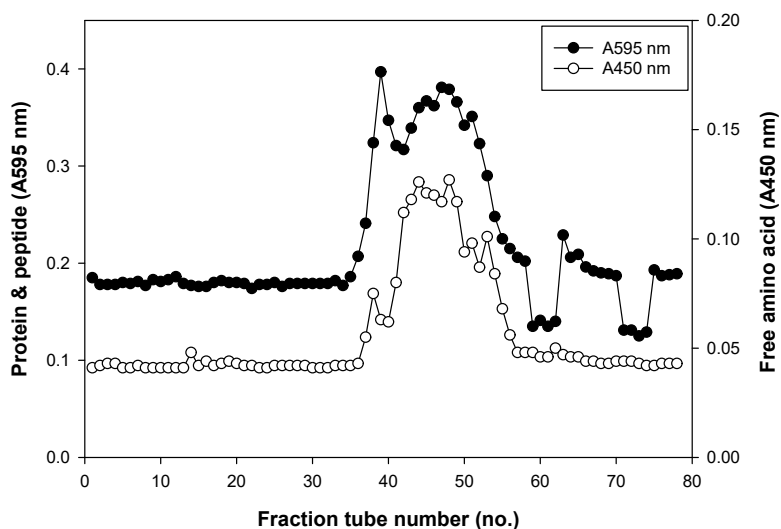


그림 65. Size exclusion chromatograph, Sephadex S-300 컬럼을 이용하여 2차 혈액가수분해 산물을 분석한 분석물에 존재하는 단백질, 펩타이드 성분과 아미노산 성분의 모니터링

⑤ Chinese hamster ovary (CHO) cells 및 특정 세포주를 대상으로 세포성장, 형태적 변화, 분화도 등 특이성 비교를 통한 배지 적합성 분석

○ Fetal Bovine Serum (FBS) 대체물질로 혈액 가수분해 산물을 사용한 CHO 세포 배양

- 상업적으로 치료용 단백질 생산에 활용되고 있는 CHO 세포를 대상으로 하여, 동물배지에서 핵심 성분으로 10% (v/v)으로 추가되고 있는 Fetal Bovine Serum (FBS)를 동물혈액 가수분해 산물로 대체 가능한지를 세포배양을 통해 확인함. CHO 세포 배양에 사용한 세포주는 상업적으로 판매하고 있는 ExpiCHO-S™ Cells (Thermofisher)로 CHO-S cells로 부터 non-engineered subclone으로 외래 단백질 발현에 최적인 세포임.
- CHO 세포 배양을 위한 배지 조성은 FBS 대체 효능 확인을 위해서 Dulbecco Modified Eagle Medium (DMEM) 배지에 glutamine이 포함되어 있는 DMEM-GlutaMAX™ (Thermofisher)을 기본 배지 (Basal medium)로 하여 10% (v/v) FBS를 추가한 배지를 positive control, FBS를 추가하지 않은 negative control, 2차 혈액가수분해 산물 10 % (w/v, 최종 농도 45 mg/ml) 또는 혈장가수분해 산물 10 % (w/v, 최종 농도 45 mg/ml)을 포함한 실험군 (test group)으로 하여 CO₂ 배양기에서 6~8% (v/v) CO₂를 공급하여 37°C에서 80 rpm으로 하여 세포를 배양함. 혈액 가수분해물과 혈장 가수분해산물은 배지에 추가하기 전에 0.22 µm 멤브레인 필터에 투과 시킴.
- FBS에 포함된 총 단백질의 함량이 38 g/L, albumin 23 g/L, Hemoglobin 113 mg/L, α2-macroglobulin 3 g/L을 고려하여 10% (v/v) 부피로 45 mg/ml (1x), 225 mg/ml (5x), 450 mg/ml (10x) 농도로 혈액 가수분해물 (A)을 추가 하였으며, 추가적으로 혈장가수분해 산물 (B) 또한 동일한 방법으로 배지 조성을 조성하여 24시간 간격으로 각 배양 배지에서 배지의 교체 없이 총 세포 숫자를 확인함.

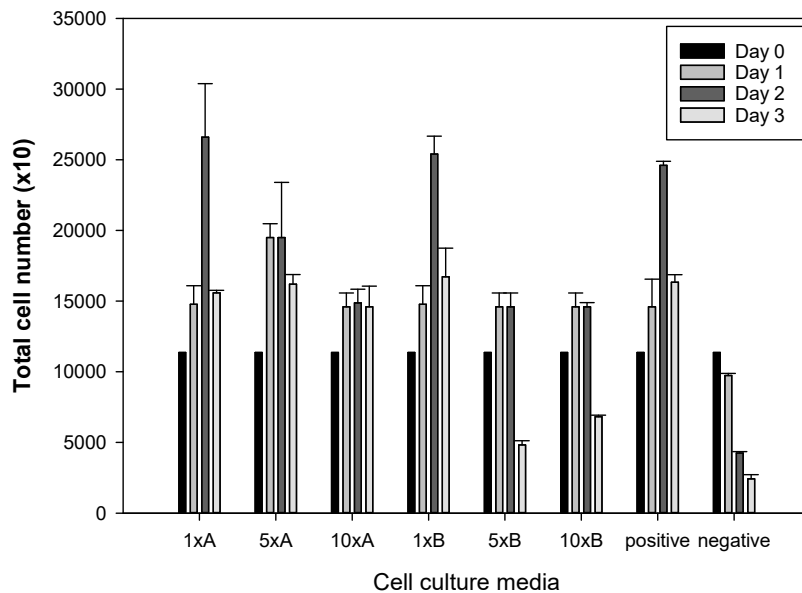


그림 66 . DMEM를 기본 배지로 하여 FBS를 대신하여 혈액가수분해물과 혈장가수분해물을 10% (v/v) 추가한 CHO 세포 배양 배지에서의 CHO-S 세포의 성장 비교. 혈액가수분해산물 A: 1xA, 45 mg/mL; 5xA, 225 mg/mL; 10xA, 450 mg/mL. 혈장가수분해산물 B: 1xB, 45 mg/ml; 5xB, 225 mg/ml; 10xB, 450 mg/ml. positive, 10% (v/v) FBS 추가. negative, DMEM 배지 단독

- 실험결과 혈액가수분해산물 (A)와 혈장가수분해산물 (B)에서 FBS를 대체하여 유사 또는 20-30% 정도 세포의 성장이 증가되는 것으로 확인되었으나, 농도가 5배 (5x), 10배 (10x)

증가될 때 마다 세포에 독성효과 또는 삼투압 문제로 인해 세포의 성장이 감소하는 것으로 확인됨 (그림 66). 따라서 세포를 배양하는 배양액의 교체가 없는 batch 형태의 배양에서는 45 mg/ml의 농도가 FBS를 대체할 수 있는 최적의 농도로 확인되며, 초기 세포의 접종량에 차이가 있으나, 배양 후 2일 (day 2) 이후에 FBS가 추가된 배지에 비해 급격하게 세포의 사멸이 증가하기 때문에 2일 후에는 세포배양 배지 교체가 필요한 것으로 확인됨. 이러한 현상은 배지 내에 포함된 아미노산의 흡수 속도가 빨라짐에 따라 배지 내에 포도당 소모와 대사 속도에 비례하여 lactic acid 생산이 증가하기 때문에 배지의 pH의 감소로 균체의 수가 감소되는 것으로 추정됨.

- 또한 광학현미경으로 DMEM 배지에 혈액가수분해 산물 (DMEM-A), 혈장가수분해 산물 (DMEM-B), DMEM 배지에 10% (v/v) FBS를 추가한 양성대조구 (DMEM-FBS)와 DMEM 단독 배지에서 배양된 세포를 형태적 특징을 확인한 결과, 전체적으로 상대적인 세포수의 차이는 있으나 형태학적으로 세포의 모양 변화는 관찰되지 않았음 (그림 67). 하지만 FBS에서 성장한 세포의 경우 부분적으로 세포 간에 서로 응집되는 현상이 확인되었으며, 상대적으로 약하긴 하지만 DMEM-A에서도 동일한 현상이 관찰됨.

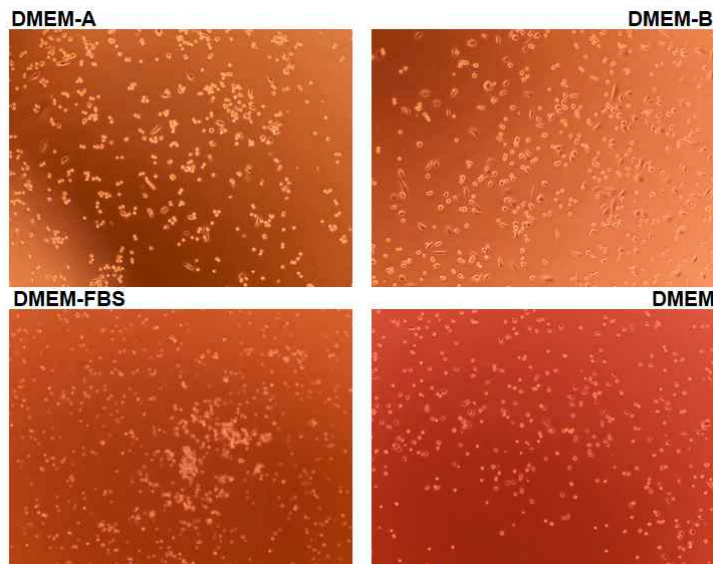


그림 67. 광학현미경으로 관찰한 DMEM를 기본 배지로 하여 FBS를 대신하여 혈액가수분해물과 혈장가수분해물을 10% (v/v) 추가한 CHO 세포 배양 배지에서의 CHO-S 세포의 성장 확인. DMEM-A, 혈액가수분해산물; DMEM-B, 혈장가수분해산물; DMEM-FBS, 10% (v/v) FBS 추가 (positive control); DMEM, DMEM 배지 단독 (negative control)

○ Fetal Bovine Serum (FBS) 대체물질로 혈액 가수분해 산물을 사용한 Skin fibroblasts 세포 배양

- Skin fibroblasts 세포의 배양은 Skin fibroblasts ATCC-CRL2097 세포주를 선 배양을 통해 동일한 세포 상태 유지를 수행하였으며, 배양된 세포주를 96 well plate에 Well 당 약 2,000 cells을 Minimum Essential Media (MEM)/ 10% (v/v) FBS/ 1 % P/S (Penicillin-Streptomycin, 5,000 U/ml)에 접종함. 10% (v/v) FBS가 포함되지 않은 MEM에 2차 혈액 가수분해물 (A) 및 혈장 가수분해산물 (B)을 phosphate saline buffer (PBS)에 추가하여서 농도를 0, 500, 1000, 2500, 5000 µg/ml로 10% (v/v)로 배양 배지에 추가하여 37°C에서 CO₂ 배양기에서 5% CO₂를 공급하여, 정지 배양함.

- MEM 배지에 10% (v/v) FBS를 대체하기 위해 농도를 0, 500, 1000, 2500, 5000 $\mu\text{g/ml}$ 로 추가한 배지에서 skin fibroblasts 세포를 배양한 결과, FBS가 포함된 GM 대비 전반적으로 2차 혈액가수분해 산물(A)의 농도 기준으로 500 $\mu\text{g/ml}$ 에서 GM과 유사한 성장이 관찰되었으며, 해당 농도 이상에서는 세포의 성장이 점차 감소하는 결과를 보여 주었으며 농도가 10배 정도 증가했을 때 세포의 생존율이 80%로 나타남 (그림 68A). 또한 혈장 가수분해 산물(B)의 경우는 500~2,500 $\mu\text{g/ml}$ 농도에서 FBS가 포함되어 있는 GM배지 대비 유사한 세포 성장을 보여 주었으나 10배 이상의 농도에서는 상대적으로 세포의 성장이 10~15% 감소하는 것이 확인됨 (그림 68B).

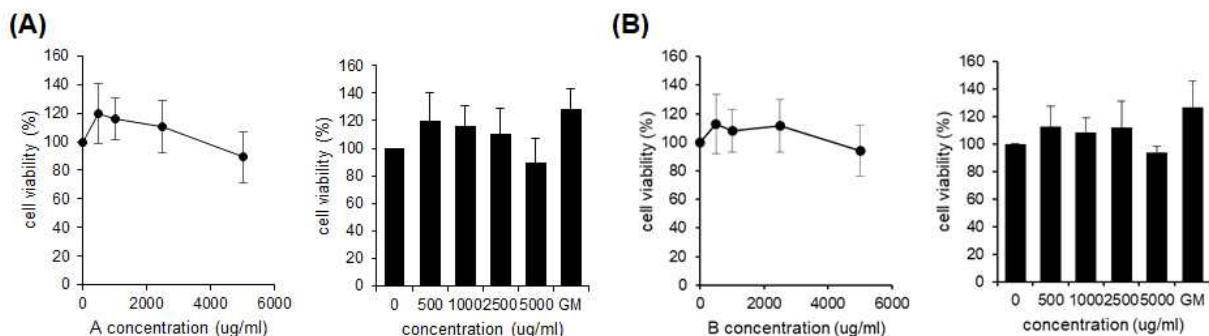


그림 68. MEM 배지에서 Fetal Bovine Serum (FBS) 대체물질로 혈액 가수분해 산물 (A) 및 혈장 가수분해 산물 (B)의 농도에 따른 상대적인 Skin fibroblasts 세포 성장 비교

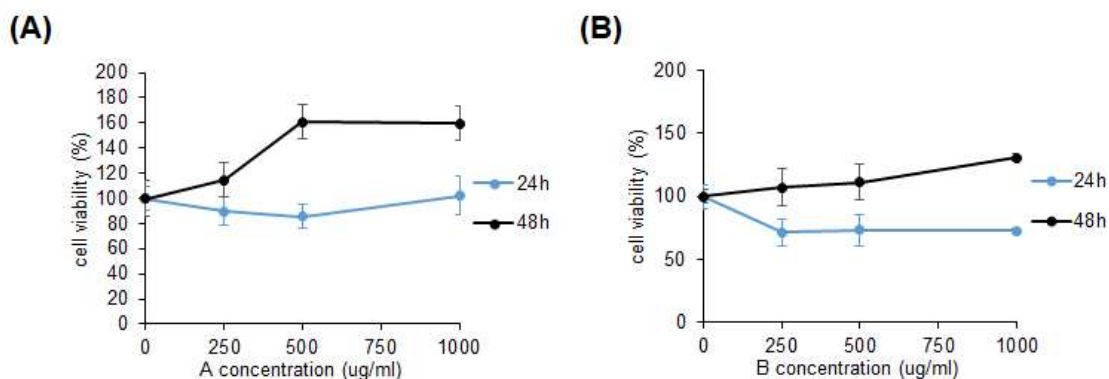


그림 69. MEM 배지에서 Fetal Bovine Serum (FBS) 대체물질로 혈액 가수분해 산물 (A) 및 혈장 가수분해 산물 (B)의 농도에 따른 상대적인 Skin fibroblasts 세포의 cytotoxicity 비교

- Skin fibroblasts 세포에 대한 혈액가수분해 산물 (A)와 혈장가수분해 산물 (B)의 농도에 따른 cytotoxicity를 확인하기 위하여, 각각의 배양 배지에 포함된 첨가물의 농도에 따른 viability를 24시간 배양된 세포와 48 시간 배양된 세포에 Cell Counting Kit-8 (CCK-8) 용액 10% (v/v)를 추가하여 3시간 반응 후, microplate reader로 450 nm에서 측정함. 측정 결과 테스트한 결과 혈액 가수분해 산물 (A)의 농도 250~1,000 $\mu\text{g/ml}$ 범위에서는 세포 배양 초기인 24시간 내에서 약간의 세포 성장량 감소가 확인 되지만, 48시간 부터는 세포의 성장이 빠르게 회복 되는 것으로 확인됨 (그림 69A). 이와 반대로 혈장 가수분해 산물(B)의 경우는 농도 250~1,000 $\mu\text{g/ml}$ 범위에서 세포의 viability가 약 20% 정도 저해됐으나 48시간 배양 후에는 세포의 viability가 회복되는 것으로 확인됨 (그림 69B).

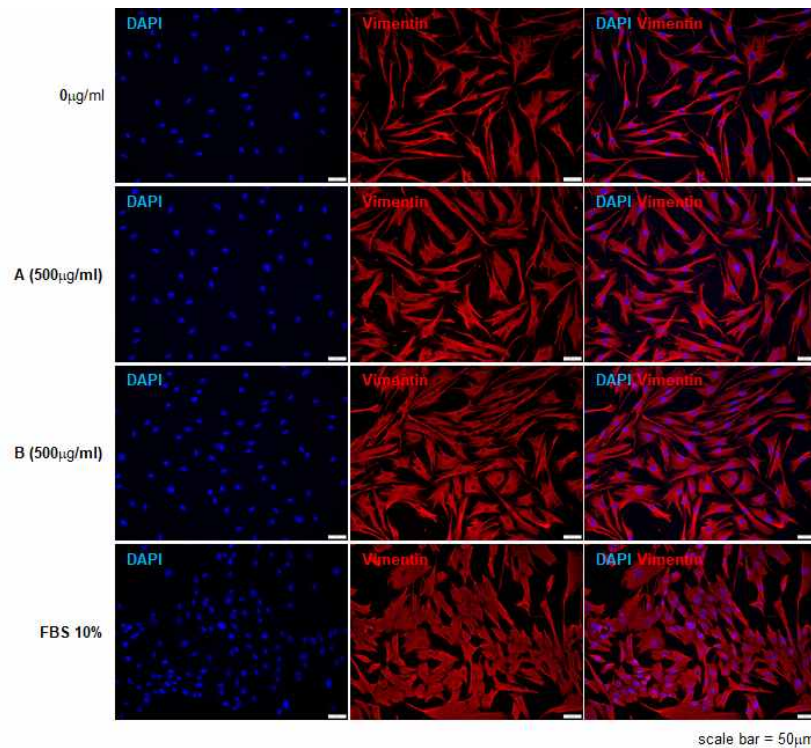


그림 70. Confocal microscopy로 관찰한 MEM 배지에서 Fetal Bovine Serum (FBS) 대체물질로 500 $\mu\text{g/ml}$ 혈액 가수분해 산물 (A) 및 혈장 가수분해 산물 (B) 첨가 배지에서 성장한 Skin fibroblasts 세포의 형태

- MEM 배지에 10% FBS를 대체한 500 $\mu\text{g/ml}$ 혈액가수분해 산물 (A)과 혈장가수분해 산물 (B)에서 배양한 세포의 형태학적 관찰을 위해 각 배지에서 배양한 Skin fibroblasts 세포를 Cytoskeleton marker인 vimentin 항체 (anti-vimentin; ab92547; 1:200 dilution)을 형광라벨링 (red)하여 DAPI (blue)와 함께 세포염색을 한 후에 Confocal microscopy로 관찰함 (그림 70).
 - 관찰결과 FBS를 추가한 배지에서 성장한 세포에 비해 혈액가수분해 산물 (A)과 혈장가수분해 산물 (B)을 추가한 배지에서 성장한 세포의 경우 세포의 부피 측면에서 상대적으로 부분적인 왜소한 세포들이 관찰됨. 이러한 세포 형태의 차이는 MEM 배지에 추가적인 성분을 공급하지 않은 세포와 비교할 때 확연히 구분이 되며 상대적으로 혈액가수분해 산물이 혈장가수분해 산물에 비해 FBS를 추가한 배지에서 성장하는 것과 근접하게 세포의 cytoskeleton이 형성되는 것을 확인할 수 있었음. 이러한 결과는 FBS에 비해 혈액가수분해 산물 내에 세포가 성장하는데 요구되는 growth factor와 다른 미량 물질 (trace elements) 등과 같은 unknown compound의 세포 성장에 주는 영향인 것으로 추정됨.
- 혈액 가수분해 산물과 동일한 조성비의 아미노산 혼합물을 사용한 Skin fibroblasts 세포 배양
- 아미노산의 함량이 특징적으로 skin fibroblasts 세포 배양에 직접적인 영향을 주는 것인지 확인하기 위하여, MEM 배지에 10% FBS 대신에 1차 또는 2차 혈액가수분해 산물에서 측정된 동일한 아미노산 조성으로 제작한 필수 아미노산 혼합물을 추가하여 세포를 배양함. 아미노산 조성물의 농도는 혈액가수분해 산물 첨가 세포 배양에서 확인된 최적 농도인 500 $\mu\text{g/ml}$ 을 기준으로 500, 1,000, 2,500, 5,000, 10,000 $\mu\text{g/ml}$ 을 첨가함.

- 세포 배양에 앞서 농도가 증가함에 따라, 특히 1차 혈액가수분해 산물과 동일한 아미노산 조성을 갖는 B 배지에서는 관찰되지 않았으나, 2차 혈액가수분해 산물과 동일한 아미노산 조성을 갖는 A 배지의 경우 배양 배지가 산성으로 변하는 것이 확인이 되었으며, 농도가 증가함에 따라 MEM 배지에서 아미노산이 완전히 용해되지 않는 문제점이 발견됨. 이러한 문제는 혈액가수분해 산물에 주된 아미노산인 aspartic acid의 산성도에 의한 영향으로 추정되고 있음.
- 실험 결과 MEM에 10% (v/v) FBS를 포함한 GM에서 배양된 세포에 비해 MEM 배지에 아미노산 혼합물을 500, 1,000, 2,500, 5,000, 10,000 $\mu\text{g/ml}$ 을 첨가한 배지에서 아미노산의 농도가 증가함에 비례하여 세포의 성장이 점차 감소되는 것으로 확인됨. 특히, 1차 및 2차 아미노산 배양에 앞서 농도가 증가함에 따라, 세포의 성장이 줄어드는 현상이 관찰되었으며, 전반적으로 아미노산을 추가하지 않은 배지에 비해서도 세포의 성장이 감소하며 GM 배지 대비 60% 미만의 세포 성장만이 관찰됨 (그림 71). Skin fibroblasts 세포 배양에 있어 유리아미노산이 직접적인 영향 보다는 혈액가수분해 산물에 존재하는 펩타이드나 디펩타이드와 다른 성분들에 의해 1차적으로 buffering 효과와 세포 성장에 필요한 미량 원소들이 공급되기 때문에 인공적인 필수아미노산의 화합물 첨가물이 혈액가수분해 산물보다는 세포 배양에 의해 FBS 대체 효과가 감소하는 것으로 판단됨.

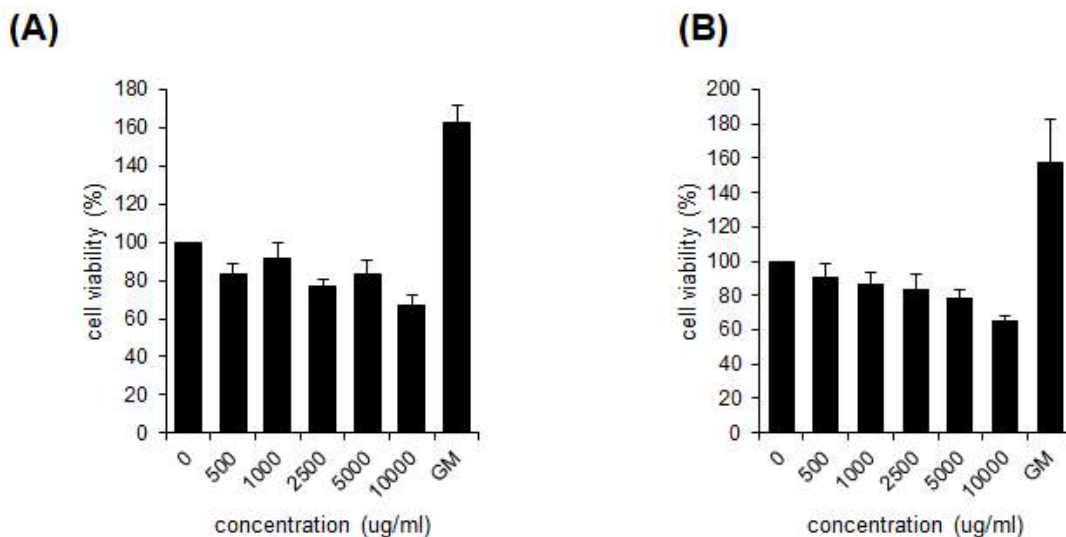


그림 71. MEM 배지에서 FBS 대체물질로 1차 및 2차 혈액 가수분해 산물과 동일한 필수 아미노산 양을 공급한 배지에서 아미노산의 농도에 상대적인 skin fibroblasts 세포의 성장효율 비교. (A) 2차 혈액가수분해 산물에서 확인된 필수 아미노산의 조성과 동일한 조성물을 추가한 배지 (B) 1차 혈액가수분해 산물에서 확인된 필수 아미노산의 조성과 동일한 조성물을 추가한 배지

- MEM 배지에 500 $\mu\text{g/ml}$ 혈액가수분해 산물 (A)과 혈장가수분해 산물 (B)과 동일한 아미노산 조성과 동일한 조성물에서 배양한 세포의 형태학적 관찰을 위해 각 배지에서 배양한 Skin fibroblasts 세포를 위에서 언급한 방법을 통해 형광라벨링 (red)하여 DAPI (blue)와 함께 세포염색을 한 후에 Confocal microscopy로 관찰함 (그림 72). 관찰 결과 FBS를 추가한 배지에서 성장한 세포에 비해 서로다른 조성을 갖는 필수 아미노산 혼합물을 추가한 배지 (A)와 배지 (B)을 추가한 배지에서 성장한 세포의 경우 세포의 수가 상대적으로 적게 확인이 되었으며, 위와 마찬가지로 부분적인 왜소한 세포들이 관찰됨.

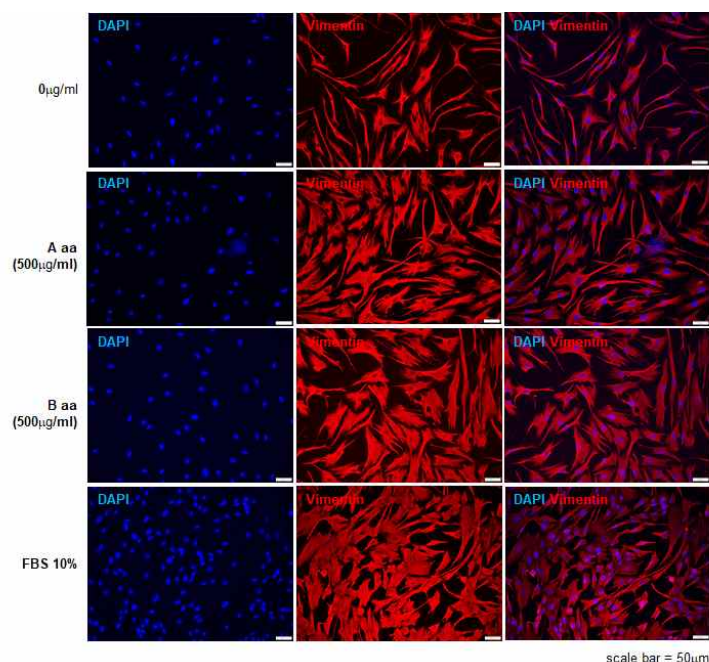


그림 72. Confocal microscopy로 관찰한 MEM 배지에서 FBS 대체물질로 혈액가수분해 산물에 포함된 아미노산과 동일한 조성으로 제작한 아미노산 복합 소재 500 $\mu\text{g/ml}$ 를 추가한 배지-2차 혈액 가수분해 산물에서 아미노산 함량과 동일한 양(A) 및 1차 혈액 가수분해 산물에서 아미노산 함량과 동일한 양(B)에서 성장한 Skin fibroblasts 세포의 형태

⑥ 동물 혈액 효소 가수분해 산물 기반 신규 배지를 이용한 동물세포 배양 효능 비교 분석

○ 동물 혈액 효소 가수분해 산물 기반 신규 배지를 이용한 상업적 판매 동물 세포용 배지와 효능 비교

- FBS 성분을 대체하기 위한 돼지 혈액 효소 가수분해 산물이 포함된 배지에서 CHO 세포의 성장을 비교하기 위해서, 상업적으로 판매되고 있는 ExpiCHOTM expression medium (Thermofisher)을 양성대조군으로 하여 DMEM-GlutaMAXTM (Thermofisher)을 기본 배지로 하여 10% (v/v) FBS를 추가한 배지, FBS를 추가하지 않은 배지, 혈액가수분해 산물 10% (w/v, 최종 농도 22.5 mg/L)을 넣은 실험군 (test group)으로 CHO 세포를 배양함.
- 또한 아미노산의 함량이 특징적으로 CHO 세포 배양에 직접적인 영향을 주는 것인지 확인하기 위하여, 1차 또는 2차 혈액가수분해 산물의 아미노산 조성으로 제작한 필수 아미노산 혼합물 10% (w/v, 최종 농도 45 mg/ml)을 포함한 대조군으로 DMEM-GlutaMAX 배지에 추가하여 CHO 세포의 성장을 관찰함.
- 세포의 배양 결과 DMEM 단독배지인 대조군에 비해 CHO-S 세포는 1차 (B 시료)와 2차 (A 시료) 혈액가수분해 산물과 동일한 조정의 아미노산 혼합물을 포함한 배지에서는 세포의 성장이 상대적으로 증가되긴 하지만, 혈액가수분해 산물에 비해서 최대 성장대비 약 30% 미만의 비율로 성장만 일어났으며, 현저히 성장이 감소되는 것으로 확인됨. 특히 배양 시간에 따라 급격한 성장의 감소가 관찰되었는데 이것은 아미노산과 배지 내에 존재하는 포도당의 소모 속도가 급격하게 증가함에 따라 배지에 존재하는 가용 포도당의 농도와 특정 아미노산의 고갈로 인해 세포의 성장이 저해가 일어난 것으로 추정됨. 특히 배지의 색깔이 노란색으로 변하는 산성도가 증가한 것으로 봤을 때 lactic acid의 생산량이 세포의 성장에 영향을 준 것으로 판단됨 (그림 73).

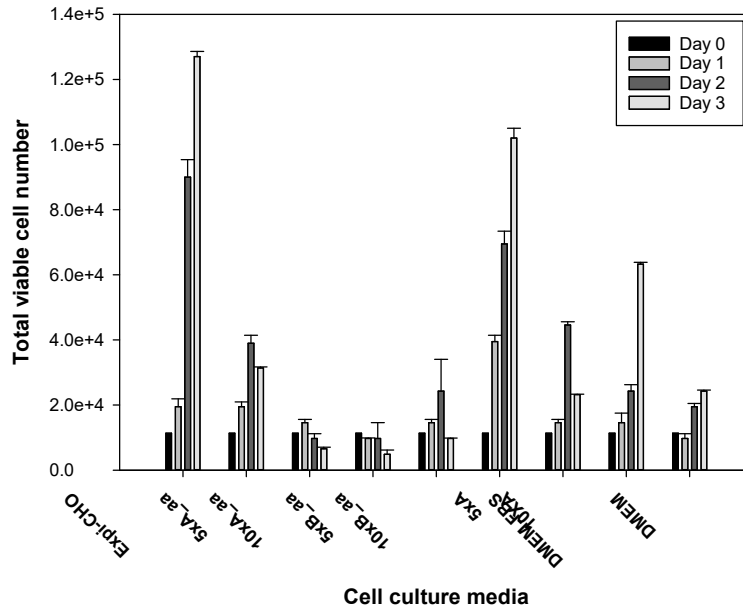


그림 73. 상업용 CHO 세포 배양 배지와 DMEM를 기본 배지로 하여 FBS를 대신하여 혈액가수분해물 또는 아미노산 혼합물을 10% (v/v) 추가한 CHO 세포 배양 배지에서의 CHO-S 세포의 성장 비교. Expi-CHO, 상업용 CHO 세포 배양배지; 5xA_aa, 2차 혈액가수분해 산물의 유리 아미노산 함량과 동일한 배지에 아미노산 혼합물 225 mg/ml; 10xA_aa, 2차 혈액가수분해 산물의 유리 아미노산 함량과 동일한 배지에 아미노산 혼합물 450 mg/ml. 5XB_aa, 1차 혈액가수분해 산물의 유리 아미노산 함량과 동일한 배지에 아미노산 혼합물 225 mg/ml; 10xB_aa, 1차 혈액가수분해 산물의 유리 아미노산 함량과 동일한 배지에 아미노산 혼합물 450 mg/ml. 5xA, 혈액 가수분해 산물 225 mg/ml; 10xA, 2차 혈액가수분해 산물 450 mg/ml. DMEM-FBS, 10% (v/v) FBS 추가 (positive); DMEM, DMEM 배지 단독 (negative)

- 상업적 배지인 ExpiCHOTM expression medium에서 성장한 세포의 경우 최대 세포수 성장이 확인되었으며, 이에 반하여 2차 혈액가수분해 산물을 포함한 배지에서는 상업용 배지 대비 약 80% 정도까지 세포수의 성장이 확인되었으며, 양성대조군으로 사용한 DMEM-FBS 배지에 비해서는 약 30% 이상의 세포수 성장이 관찰되어, 혈액가수분해 산물에 존재하는 아미노산 및 펩타이드 성분이 CHO-S 세포의 배양에 FBS를 대체하여 사용할 수 있다는 것을 확인함 (그림 74).

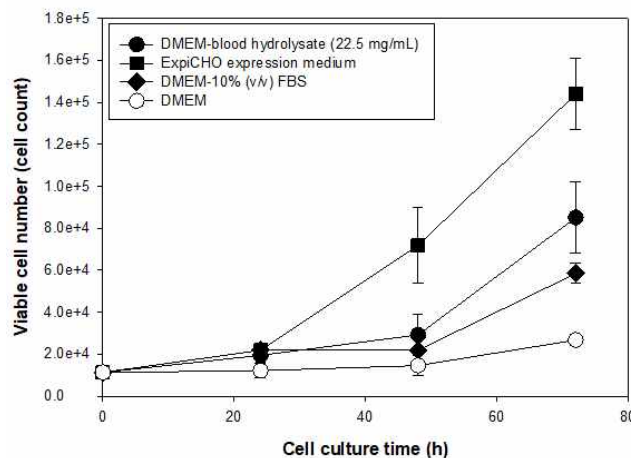


그림 74. 상업용 CHO 세포 배양 배지와 DMEM를 기본 배지로 하여 FBS를 대신하여 혈액가수분해물을 10% (v/v) 추가한 CHO 세포 배양 배지에서의 CHO-S 세포의 성장 패턴 비교

○ 동물혈액 효소 가수분해 첨가 배지와 상업적 판매 배지에서 배양된 세포의 아미노산 소모 효능 비교

- 동물혈액 효소 가수분해 첨가 배지와 상업적 판매 배지에서 배양된 세포의 아미노산 소모도를 비교하기 위해서 배양 배지에 남아 있는 유리아미노산의 함량을 o-Phthaldialdehyde (OPA)와 9-Fluorenylmethyl oxycarbonyl (FMOC) chloride를 in situ로 형광 라벨링하여 HPLC를 사용하여 정량함.
- HPLC에서 표준물질과 상대적인 비교를 통해 잔여 아미노산의 함량을 측정한 결과, 세포의 성장이 증가함에 따라 빠른 속도로 필수 아미노산의 소모가 확인됨 (그림 75). 이중 가장 많은 함량을 보여 주고 있는 8개의 특정 아미노산을 모니터링한 결과 DMEM 배지와 DMEM-FBS 배지에서는 전반적으로 아미노산이 20 mM 정도로 매우 낮게 존재하지만, DMEM 배지에 혈액가수분해 산물을 포함한 배지에서는 약 20~60 mM으로, 상업적으로 판매되는 ExpiCHO™ expression medium에서는 20~80 mM로 존재한다는 것을 확인함.
- 흥미롭게도 DMEM에 혈액가수분해 산물이 포함된 배지에서는 Alanine의 소모 속도가 급격하게 일어나는 반면, 상업적 배지와 DMEM-FBS에서는 완만한 소모 패턴을 보임 (그림 75). 이러한 결과는 세포의 성장과 아미노산의 흡수 속도가 직접적인 연관이 있으며, 아미노산의 종류와 농도에 따라 세포의 성장에 직접적으로 영향을 받는 것을 추정해 볼 수 있음.

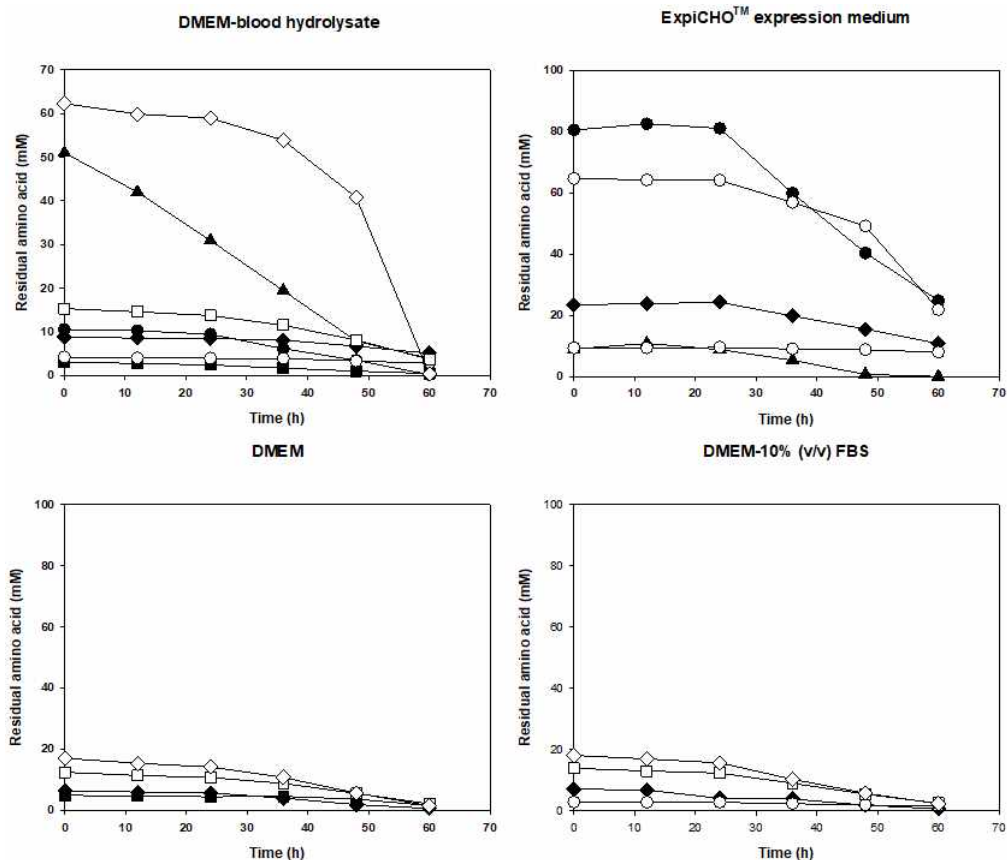


그림 75. 상업용 CHO 세포 배양 배지와 DMEM를 기본 배지로 하여 FBS를 대신하여 혈액가수분해물을 10% (v/v) 추가한 CHO 세포 배양 배지에서의 다양한 아미노산의 소모 패턴 비교. Leucine(◇), Alanine(▲), Isoleucine (□), Aspartic acid (●), Arginine (◆), Methionine (○), Glycine (■)

- 이러한 아미노산의 개별적인 양과 소모 속도에 데이터는 추가적으로 혈액가수분해 산물에 유리 아미노산을 추가하여 CHO 세포 배양에 있어 균체 성장을 증대시킬 수 있는 직간접적인 근거를 제공해준다고 할 수 있으며, 아미노산의 조합에 따라 동물세포 이외에 박테리아나 곤충세포 배지 개발에도 해당 소재가 사용 될 수 있을 것으로 판단됨.
- 현재는 세포 별 맞춤 무혈청 배지들이 많이 개발되고 있으나 기본배지에 FBS를 추가하여 사용하는 것보다 가격이 비싸며 세포의 종류가 매우 다양하여 아직까지는 신경세포나 재조합 단백질 생산을 위한 CHO-S 등의 특정 세포에 국한되어 있음. 이외 실험실에서 주로 사용하는 대부분의 세포주 배양에는 에너지원으로써 FBS가 가장 많이 사용되며 특정 성장인자를 필요로 하는 세포의 경우 추가적으로 첨가하여 배양하는 방법이 일반적임.
- FBS 외에도 FCS, NRS 등 다양한 동물 유래 혈청이 판매되고 있으나 그중에서도 매우 고가인 FBS를 사용하는 이유는 앞서 말한 듯 면역 거부반응이 상대적으로 적게 유발되기 때문임. 본 연구를 통해 개발된 돼지 혈액 가수분해물은 도축 부산물로서 생산되는 매우 저렴한 단가의 원료이며 성체에서 분리한 것임에도 가수분해를 통해 면역반응을 유발하지 않을 정도로 단백질을 분해하였으므로 다양한 세포주에 광범위하게 사용이 가능할 것으로 판단됨.

(다) 동물 혈액 단백질 효소 분해물로 제조된 최종 기능성 조성물을 섭취한 동물의 운동 수행 능력 평가

① 공정별 축산부산물을 섭취한 동물의 운동수행능력 영향 평가 (in vivo)

○ 실험동물의 체중 및 근육무게의 변화 조사

- 본 연구개발 목표에 따라 돼지도축혈액 부산물 (Procrine whole blood protein hydrolysates, PWBPH)의 투여에 따른 체중의 변화와 근육량 증가를 조사하기 위하여, 생리식염수 투여군, PWBPH 250, 500 mg/kg 투여군, 양성대조군 L-leucine 500 mg/kg 투여군에 대한 체중 변화를 5주 동안 관찰하고 운동수행능력 평가 후 비복근 (Gastrocnemius, Gas)과 넙다리네갈래근 (Quadriceps femoris, QF)을 적출하여 무게를 측정하였음.
- 돼지도축혈액 부산물 (PWBPH)의 투여에 따른 유의적인 체중의 변화는 관찰되지 않았으나, 근육 무게는 유의적으로 증가하는 경향을 관찰하였음 (그림 76). 비복근 무게는 돼지도축혈액 부산물 (PWBPH)의 투여에 의한 농도의존적인 경향은 관찰되지 않았으나, 넙다리네갈래근 무게에서는 돼지도축혈액 부산물 (PWBPH)의 투여에 의한 일부 농도의존적인 경향이 관찰되었음.

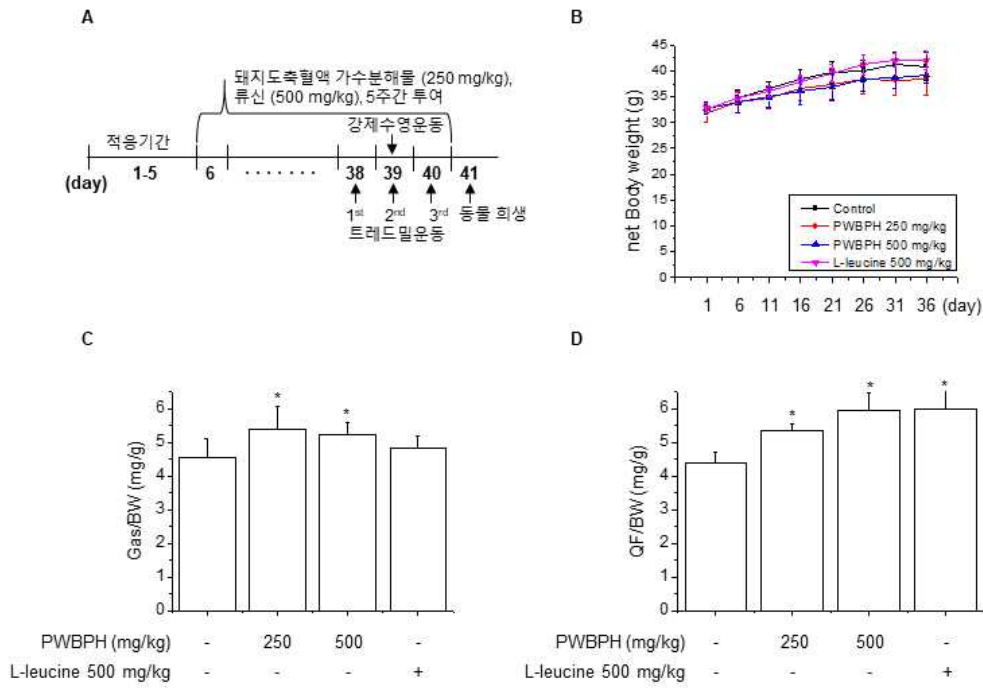


그림 76. 실험동물의 체중과 근육 무게의 변화 (A) 운동수행능력 평가 동물 실험 디자인, (B) 체중 (Body weight, BW), (C) 비복근(Gastrocnemius, Gas)/체중 무게, (D) 넓다리네갈래근 (Quadriceps femoris, QF)/체중 무게, * $p < 0.05$, 생리식염수 투여군과 비교

○ 운동수행능력에 대한 영향 조사

- 돼지도축혈액 부산물 (PWBPH)의 운동수행능력에 대한 영향을 조사하기 위하여, 트레드밀 내에서 운동 지속능력을 측정된 결과, 생리식염수 투여군과 비교하여 돼지도축혈액 부산물 (PWBPH) 투여군에서 탈진 시까지 걸리는 시간이 유의적으로 증가하였으나, 돼지도축혈액 부산물 (PWBPH) 투여에 의한 농도의존적인 경향은 관찰되지 않았음.
- 운동수행능력에 대한 돼지도축혈액 부산물 (PWBPH)의 영향을 재확인하기 위하여 체중의 7%에 해당되는 무게를 적용하여 탈진 수영운동 테스트를 실시한 결과, PWBPH 250 mg/kg 투여군에서 탈진 시까지 걸리는 시간이 유의적으로 증가하였음.

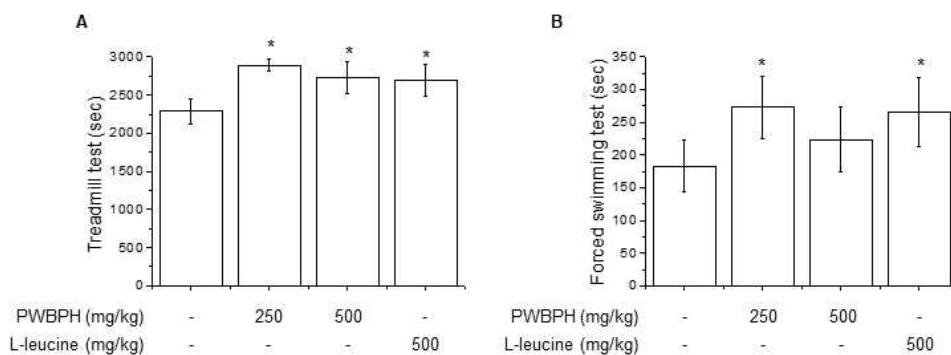


그림 77. PWBPH 투여에 의한 운동수행능력 평가 (A) 탈진 트레드밀 운동 테스트, (B) 탈진 수영 운동 테스트, * $p < 0.05$, 생리식염수 투여군과 비교

- 장기간 운동에 의한 혈중 피로물질 증가에 대한 돼지도축혈액 부산물 (PWBPH)의 영향을

조사하기 위하여, 실험동물을 90분간 수영 운동을 시킨 다음 30분 휴식 후, 혈액을 채취하여 젖산 (Lactic acid), 요소질소 (Blood urea nitrogen, BUN), 크레아틴인산화효소 (Creatine kinase, CK)를 측정하였음.

- 실험결과, 돼지도축혈액 부산물 (PWBPH)의 투여에 의해 장기간 운동으로 증가된 혈중 피로물질 지표들이 감소되는 경향이 관찰되었으나, PWBPH 투여에 의한 농도의존적인 경향은 관찰되지 않았음.

표 21. PWBPH 투여에 의한 혈중피로물질에 대한 영향 평가

Group	Lactate (mg/dL)	BUN (mg/dL)	CK (U/L)
Control	1.30 ± 0.12	22.5 ± 2.4	1186 ± 299
PWBPH 250 mg/kg	1.07 ± 0.13**	19.4 ± 1.1**	802 ± 129**
PWBPH 500 mg/kg	1.12 ± 0.07*	19.6 ± 1.1**	966 ± 103
L-leucine 500 mg/kg	1.14 ± 0.07*	20.3 ± 0.6*	945 ± 83

* $p < 0.05$, 생리식염수 투여군과 비교 / ** $p < 0.01$, 생리식염수 투여군과 비교

○ 운동수행능력 관련 근육 분화에 대한 영향 조사

- 돼지도축혈액 부산물 (PWBPH)의 투여에 따른 운동수행능력과 관련된 근육의 분화에 대한 연구를 추가적으로 수행하였음.
- 마우스의 비복근에 대한 H&E염색을 실시한 후, 근섬유의 단면 크기를 비교 관찰하였으며, 생리식염수 투여군과 비교하여 돼지도축혈액 부산물 (PWBPH) 투여군에 따른 근섬유의 크기가 증가하는 경향이 관찰되었음 (그림 78).

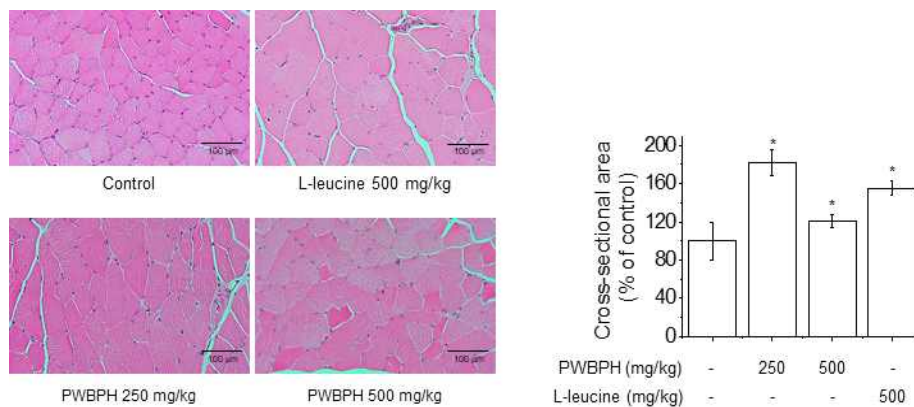


그림 78. PWBPH 투여에 의한 마우스 비복근에 대한 영향, Gas 횡단면 H&E 염색, magnification 200X

- 또한, 돼지도축혈액 부산물 (PWBPH)의 투여에 따른 근섬유 분화에 대한 영향을 조사하기 위하여, 마우스의 비복근에서 근섬유 분화의 주요 지표인 MyoD 및 Myogenin 발현의 변화를 조사하였음.
- 실험결과, 생리식염수 투여군과 비교하여 돼지도축혈액 부산물 (PWBPH) 250 mg/kg 및 양성대조군 L-leucine 500 mg/kg의 투여에 의해 MyoD 및 Myogenin의 발현이 증가하였으나, PWBPH 투여에 의한 농도 의존적인 경향은 관찰되지 않았음.

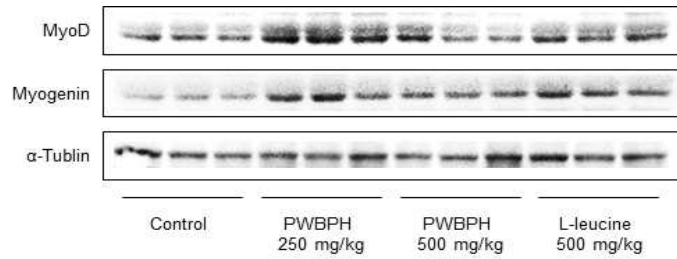


그림 79. PWBPH 투여에 의한 근섬유 분화 지표에 대한 영향

② 동물혈액 단백질 효소분해물로 제조된 최종 기능성 조성물(시제품)을 섭취한 동물의 운동수행능력 영향 평가 (in vivo)

○ 실험동물의 체중 및 근육무게의 변화 조사

- 본 연구개발 목표에 따라 동물혈액 단백질효소 분해물로 제조된 최종 기능성 조성물(시제품, ANX-1)의 투여에 따른 체중의 변화와 근육량 증가를 조사하기 위하여, 생리식염수 투여군, ANX-1 50, 200 mg/kg 투여군, 양성대조군 L-leucine 200 mg/kg 투여군에 대한 체중 변화를 4주 동안 관찰하고 운동수행능력 평가 후 비복근과 넓다리네갈래근을 적출하여 무게를 측정하였음.
- ANX-1의 투여에 따른 유의적인 체중의 변화는 관찰되지 않았으나, 근육 무게는 ANX-1 200 mg/kg 투여에 의한 비복근 및 넓다리네갈래근 무게에서 유의적으로 증가하는 경향을 관찰하였음 (그림 80).

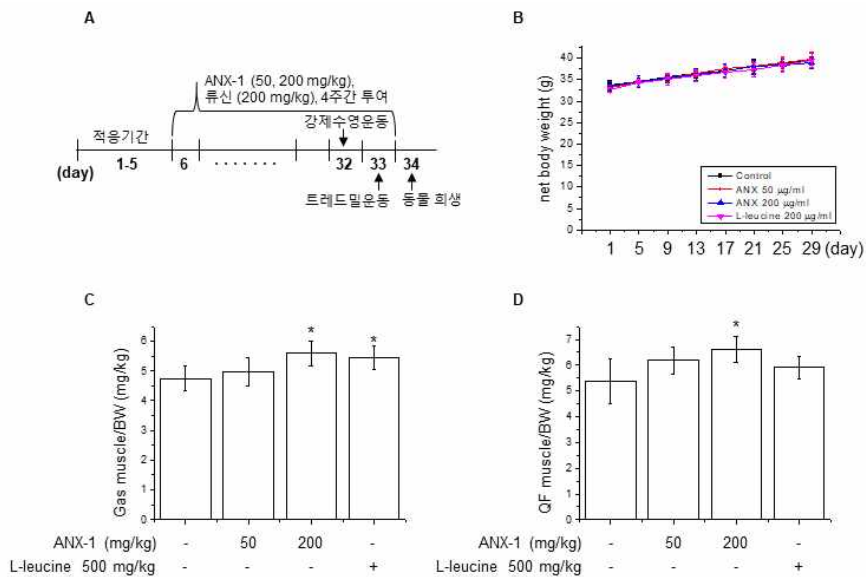


그림 80. 실험동물의 체중과 근육 무게의 변화 (A) 운동수행능력 평가 동물 실험 디자인, (B) 체중 (Body weight, BW), (C) 비복근(Gastrocnemius, Gas)/체중 무게, (D) 넓다리네갈래근 (Quadriceps femoris, QF)/체중 무게, * $p < 0.05$, 생리식염수 투여군과 비교

○ 운동수행능력에 대한 영향 조사

- ANX-1의 운동수행능력 (지구력)에 대한 영향을 조사하기 위하여, 트레드밀 내에서 운동 지속능력을 측정된 결과, 생리식염수 투여군과 비교하여 ANX-1 투여에 의해 탈진 시까지 걸리는 시간이 증가하는 경향을 관찰하였으며, ANX-1 200 mg/kg 투여군은 탈진 시까지 걸리는 시간이 유의적으로 증가하였음.

- 운동수행능력 (지구력)에 대한 PWBPH의 영향을 재확인하기 위하여 체중의 7%에 해당되는 무게를 적용하여 탈진 수영운동 테스트를 실시한 결과, ANX-1 투여에 의해 탈진 시까지 걸리는 시간이 증가하는 경향을 관찰하였으며, ANX-1 200 mg/kg 투여군은 탈진 시까지 걸리는 시간이 유의적으로 증가하였음.
- 근육에서 발휘되는 최대 힘의 변화를 측정하기 위하여, 악력 시험 장치를 이용하여 꼬리를 뒤로 잡아당길 때 나타나는 앞발과 뒷발의 최대 악력 테스트를 실시한 결과, ANX-1 투여에 의해 발휘되는 최대 악력이 증가하는 경향을 관찰하였으며, ANX-1 200 mg/kg 투여군에서 발휘되는 최대 악력이 유의적으로 증가하였음.

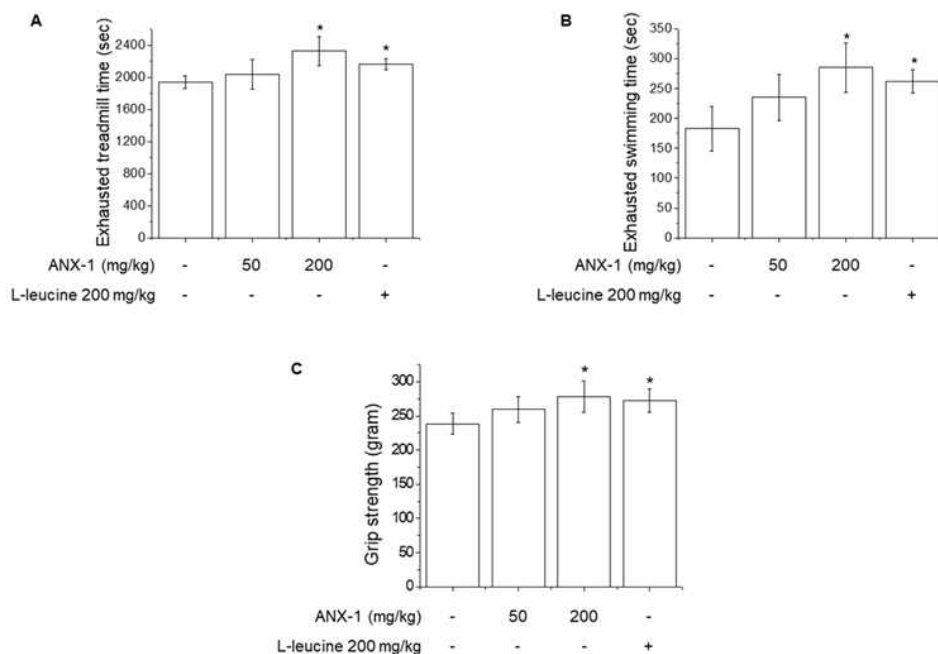


그림 81. ANX-1 투여에 의한 운동수행능력 평가 (A) 탈진 트레드밀 운동 테스트, (B) 탈진 수영운동 테스트, (C) 악력 테스트, * $p < 0.05$, 생리식염수 투여군과 비교

- 장기간 운동에 의한 혈중 피로물질 증가에 대한 ANX-1의 영향을 조사하기 위하여, 실험동물을 90분 간 수영 운동을 시킨 다음 30분 휴식 후, 혈액을 채취하여 젖산 (Lactic acid), 요소질소 (Blood urea nitrogen, BUN), 크레아틴인산화효소 (Creatine kinase, CK)를 측정하였음.
- 실험결과, ANX-1 투여에 의해 장기간 운동으로 증가된 혈중 피로물질 지표들이 감소되는 경향이 관찰되었으며, ANX-1 200 mg/kg 투여군에서 유의적으로 감소되었음.

표 22. ANX-1 투여에 의한 혈중피로물질에 대한 영향 평가

Group	Lactate (mg/dL)	BUN (mg/dL)	CK (U/L)
Control	3.36 ± 0.54	20.6 ± 0.9	1287 ± 239
ANX-1 50 mg/kg	2.08 ± 0.76**	19.3 ± 1.5	1057 ± 187
ANX-1 200 mg/kg	1.59 ± 0.29**	16.8 ± 0.9**	468 ± 67**
L-leucine 200 mg/kg	1.99 ± 0.48**	18.4 ± 1.5*	848 ± 160**

* $p < 0.05$, 생리식염수 투여군과 비교 / ** $p < 0.01$, 생리식염수 투여군과 비교

○ 운동수행능력 관련 근육 분화에 대한 영향 조사

- ANX-1의 투여에 따른 운동수행능력과 관련된 근육의 분화에 대한 연구를 추가적으로 수행하였음. 마우스의 비복근에 대한 H&E염색을 실시한 후, 근섬유의 단면 크기를 비교 관찰하였으며, 생리식염수 투여군과 비교하여 ANX-1 투여에 따른 근섬유의 크기가 증가하는 경향이 관찰되었음 (그림 82).

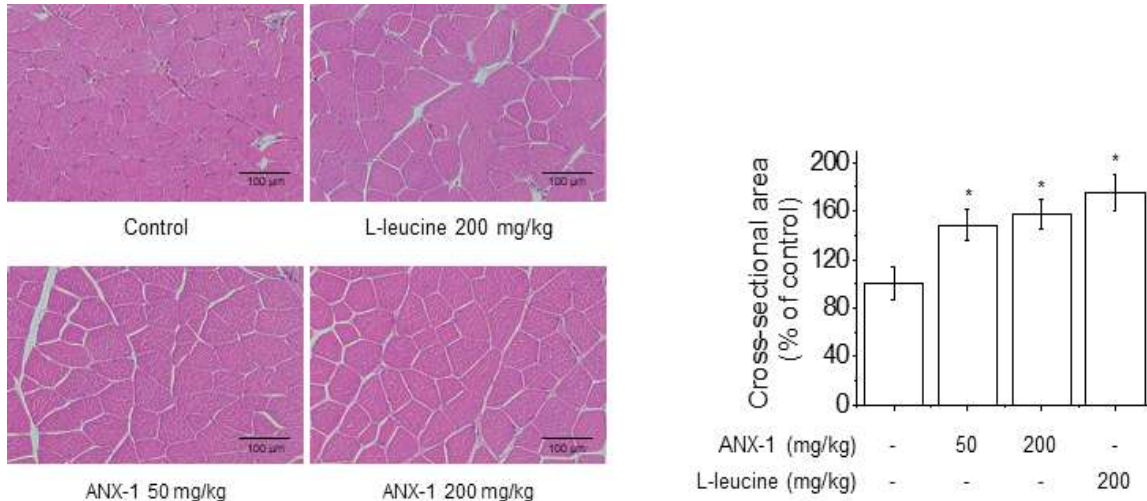


그림 82. ANX-1 투여에 의한 마우스 비복근에 대한 영향, Gas 횡단면 H&E 염색, magnification 200X

- 또한, ANX-1의 투여에 따른 근섬유 분화에 대한 영향을 조사하기 위하여, 마우스의 비복근에서 근섬유 분화의 주요 지표인 MyoD 및 Myogenin 발현의 변화를 조사하였음. 실험결과, 생리식염수 투여군과 비교하여 ANX-1 투여에 의해 MyoD 및 Myogenin의 발현이 유의적으로 증가하였음.

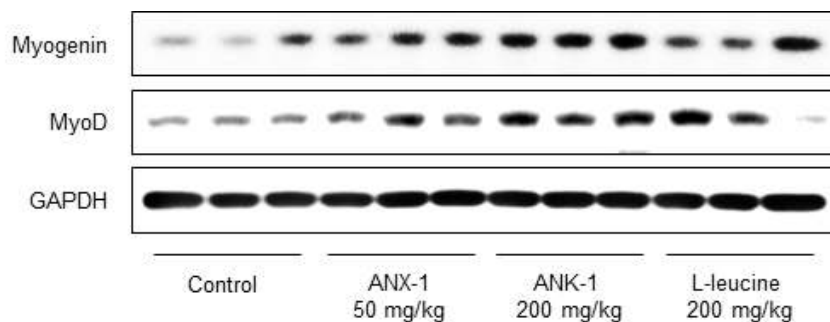


그림 83. ANX-1 투여에 의한 근섬유 분화 지표에 대한 영향

③ 돼지도축혈액 부산물 (PWBPH)의 근육 분화에 대한 영향 및 작용기전 평가 (in vivo)

- 본 연구 결과를 종합하여 볼 때 PWBPH의 운동수행능력 향상 및 혈중 피로물질 감소에 대한 영향을 관찰하였으며, 이러한 결과는 근육 분화 유도와 밀접하게 관련되어 있을 것으로 사료됨. 따라서 PWBPH에 의한 운동수행능력 관련 근육 분화에 대한 영향 및 작용기전을 조사하고자 세포 및 분자수준의 연구를 추가적으로 진행하였음.
- PWBPH 투여에 의한 근섬유 분화에 대한 영향을 조사하기 위하여, 마우스 비복근에서 근섬유 분화관련 주요 지표의 단백질 발현에 대한 변화를 관찰하였음. 실험결과, 마우스

비복근에서 PWBPH 250 mg/kg 투여군에서 근섬유 분화관련 주요 지표인 MyoD, Myogenin, MHC3 및 Pax-7의 단백질 발현이 유의적으로 증가하였음.

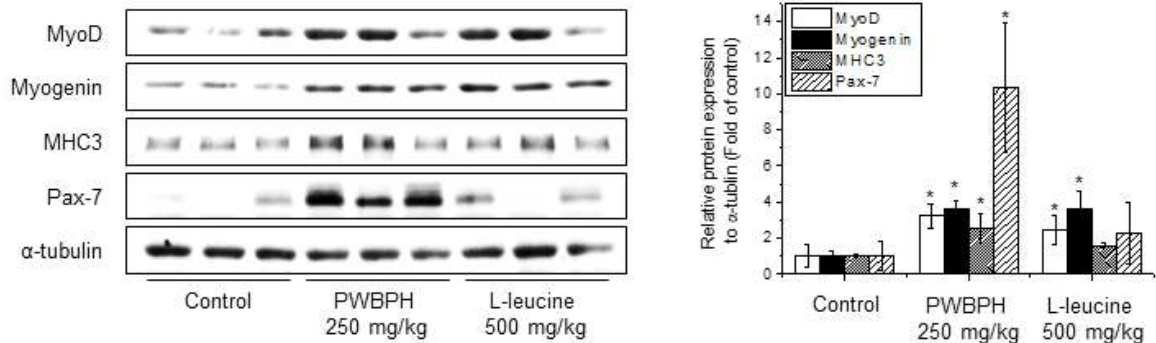


그림 84. PWBPH 투여에 의한 근섬유 분화 관련 단백질에 대한 영향
* $p < 0.05$, 생리식염수 투여군과 비교

- 또한, PWBPH 투여에 의한 근섬유 분화 관련 상위조절기전을 조사하기 위하여 마우스 비복근에서 근섬유 분화 관련 조절 단백질들의 인산화에 대한 변화를 측정하였음. 실험결과, 마우스 비복근에서 PWBPH 250 mg/kg 투여군에서 단백질 합성관련 조절자인 Akt, mTOR, p-70S6K의 인산화가 유의적으로 증가하는 것을 관찰하였음.

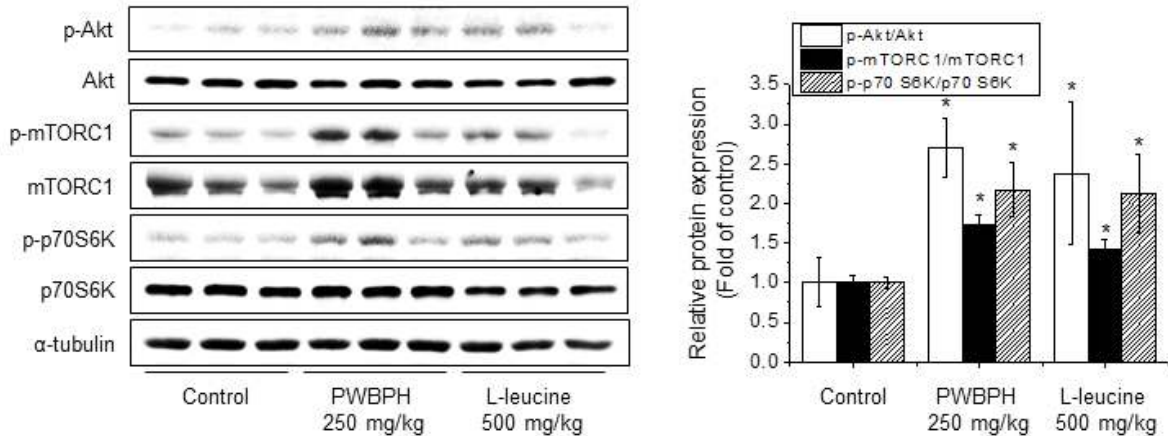


그림 85. PWBPH 투여에 의한 근섬유 분화 및 재생 관련 신호경로에 대한 영향
* $p < 0.05$, 생리식염수 투여군과 비교

- 근육섬유는 특성에 따라 크게 지근섬유 (Type I, slow-twitch fiber)와 속근섬유 (Type II, fast-twitch fiber)로 구분되며, 그 중 지근섬유는 유산소성의 대사능력이 높고 피로에 대한 저항능력이 탁월하기 때문에 지구력 관련 운동수행능력 향상에서 주요한 역할을 함.
- 본 연구결과에서 관찰한 PWBPH의 운동수행능력 향상 및 혈중 피로물질 감소에 대한 영향과 근육섬유 종류와의 연관성을 조사하기 위하여, 마우스 넓다리네갈래근에서 근육섬유 종류에 대한 변화를 관찰하였음.

- 마우스의 넓다리네갈래근에서 근육섬유에 대한 항체 (anti-slow-twitch fiber, anti-fast-twitch fiber)를 이용하여 IHC염색을 실시한 후 근육섬유의 염색 정도를 비교 관찰한 결과, 생리식염수 투여군과 비교하여 ANX-1 투여에 따른 지근섬유의 염색되는 비율이 증가되었으며, 속근섬유의 염색되는 비율이 감소하는 것을 관찰하였음 (그림 86).

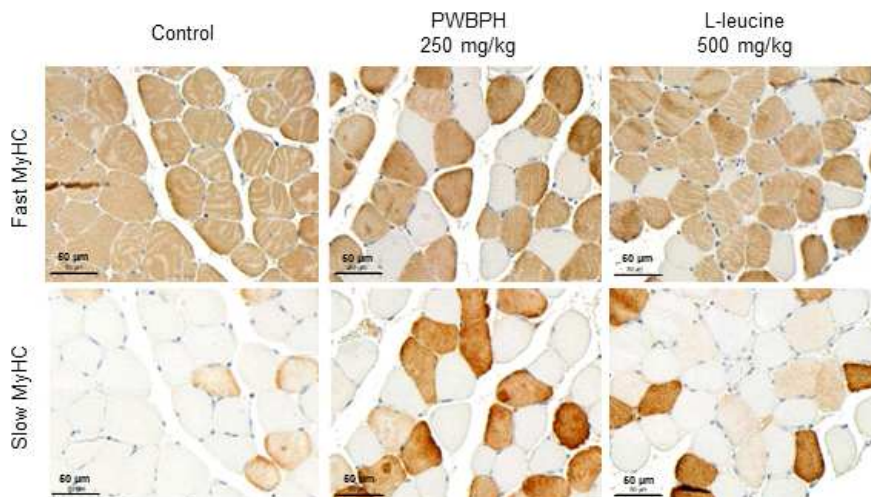


그림 86. PWBPH의 지근섬유 및 속근섬유에 대한 영향

- 마우스의 넓다리네갈래근에서 지근 및 속근 섬유 관련 유전자 발현변화를 조사한 결과, 지근섬유 관련 유전자인 MyHC1, Tnni1, Tnnc1의 발현은 유의적으로 증가하였으며, 속근섬유 관련 유전자인 MyHC2b 및 MyHC2x의 발현은 감소하는 것을 관찰하였음.

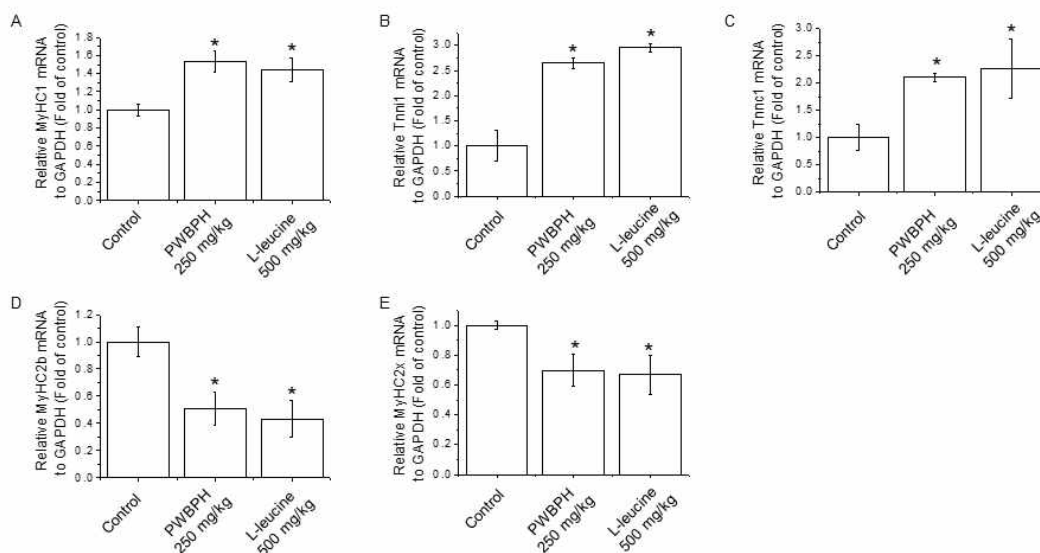


그림 87. PWBPH 투여에 의한 지근 (slow-twitch fiber) 및 속근 (fast-twitch fiber) 관련 유전자 발현에 대한 영향, * $p < 0.05$, 생리식염수 투여군과 비교

- 또한, 넓다리네갈래근에서 지근섬유 관련 지표인 slow MyHC의 단백질 발현은 유의적으로 증가하였으며, 속근섬유 관련 지표인 fast MyHC의 단백질 발현은 감소하는 것을 관찰하였음.

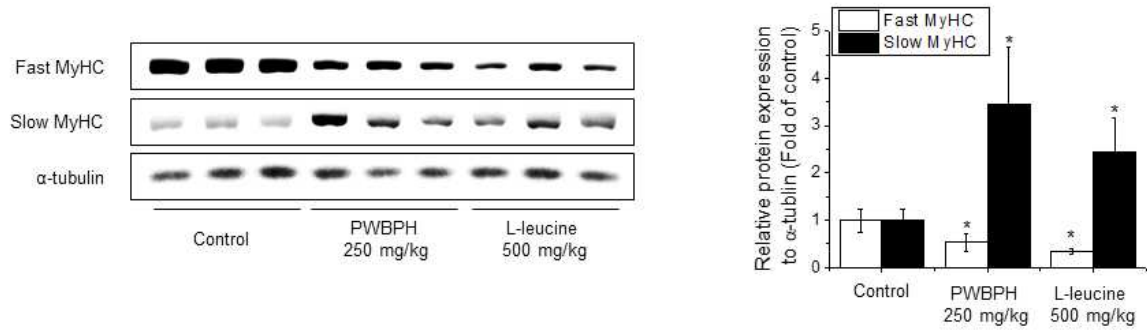


그림 88. PWBPH 투여에 의한 지근 (slow-twitch fiber) 및 속근 (fast-twitch fiber) 관련 단백질 발현에 대한 영향, * $p < 0.05$, 생리식염수 투여군과 비교

- 유산소성 대사 능력이 높은 지근섬유는 미토콘드리아 수가 많고 미오글로빈 (myoglobin)의 농도가 높아 백색으로 관찰되는 특징을 나타냄. 따라서 본 연구에서 PWBPH에 의해 증가된 지근섬유의 발현에 대한 상위조절기전을 조사하기 위하여 미토콘드리아 관련 지표들에 대한 변화를 관찰하였음.
- 실험 결과, 넙다리네갈래근에서 미토콘드리아 생합성 관련 지표인 NRF1 및 TFAM의 발현이 유의적으로 증가되었으며, 미토콘드리아 생합성 관련 조절자인 AMPK 인산화가 증가되었고 Sirt1 및 PGC-1 α 의 단백질 발현이 유도되는 것을 관찰하였음.

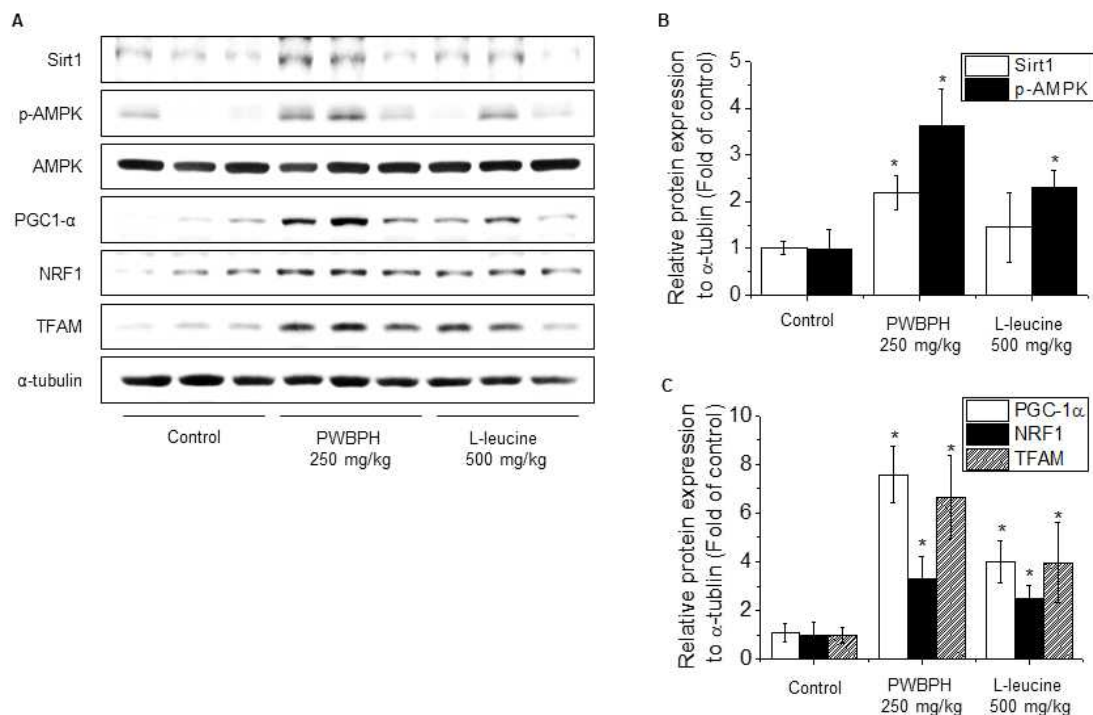


그림 89. PWBPH 투여에 의한 미토콘드리아 생합성 관련 단백질에 대한 영향 * $p < 0.05$, 생리식염수 투여군과 비교

- ④ 돼지도축혈액 부산물 (PWBPH)의 근섬유 분화에 대한 영향 및 작용기전 평가 (in vitro)
- PWBPH의 근섬유 분화에 대한 영향 및 작용기전 평가

- 본 연구결과에서 도출한 돼지도축혈액 부산물에 의한 운동수행능력 향상 및 근섬유 분화유도에 대한 영향을 기반으로 세포 수준의 연구에서 돼지도축혈액 부산물의 근섬유 분화유도 관련 기전 연구를 추가적으로 진행하였음.
- PWBPH의 근섬유 분화에 대한 영향 및 조절기전을 세포수준에서 조사하기 위하여, PWBPH 처리에 의한 마우스 유래 C2C12 근아세포에서 근관으로의 분화수준을 관찰하였음. 실험결과, PWBPH 처리에 의해 농도 의존적으로 C2C12 근아세포에서 근관의 형성이 유도되었으며, 형성된 근관의 직경이 PWBPH 처리에 의해 유의적으로 증가하였음 (그림 90).

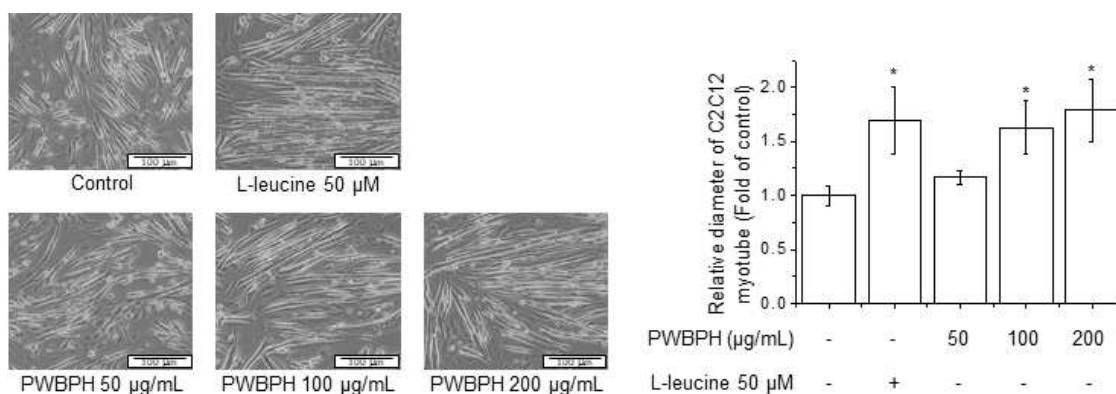


그림 90. PWBPH 처리에 의한 C2C12 근관으로의 분화, * $p < 0.01$, control과 비교

- 근섬유 분화 및 형성 관련 주요 지표에 대한 PWBPH의 영향을 조사하기 위하여, C2C12 근아세포에 PWBPH를 농도별 (50-200 μM)로 처리한 후 근섬유 분화관련 지표들의 변화를 관찰한 결과, PWBPH 처리에 의한 근섬유 분화지표인 Myo D, Myogenin, MHC3, Pax-7의 발현의 증가를 관찰하였음 (그림 91).

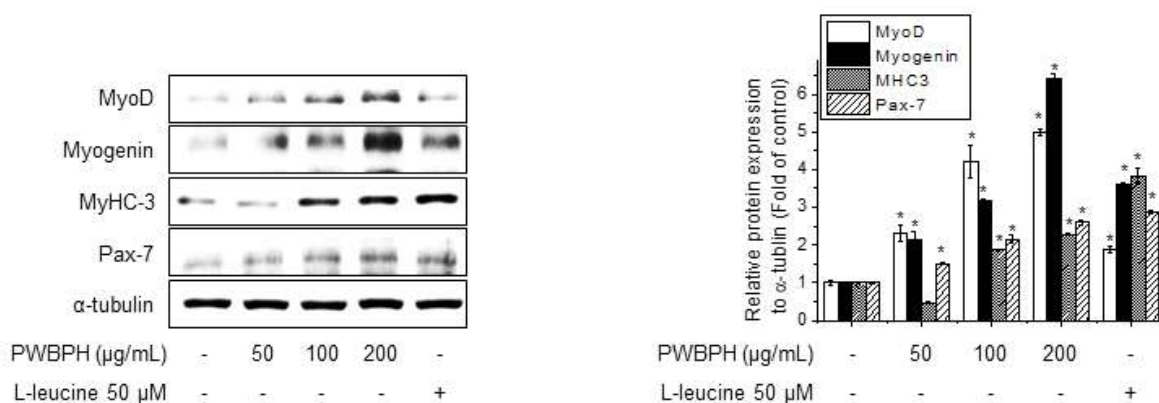


그림 91. PWBPH 처리에 의한 근섬유 분화 지표 발현에 대한 영향
* $p < 0.01$, control과 비교

- PWBPH의 근섬유 분화 및 형성 관련 작용기전을 조사하기 위하여, 단백질 합성 관련 신호경로에 대한 PWBPH의 영향을 관찰한 결과, PWBPH 처리에 의한 단백질 합성관련 신호경로인 Akt, mTORC, p70S6K의 인산화의 증가를 관찰하였음 (그림 92).

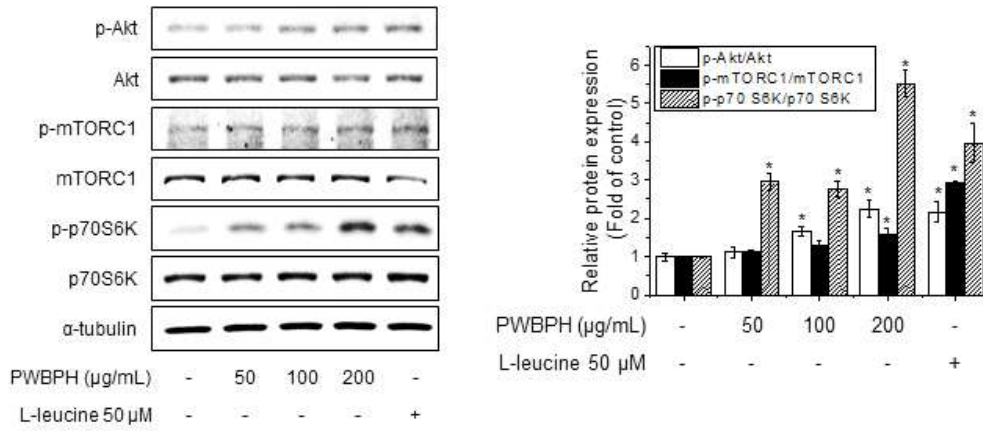


그림 92. PWBPH 처리에 의한 Akt, mTORC, p70S6K 인산화에 대한 영향
* $p < 0.01$, control과 비교

○ 돼지도축혈액 부산물 (PWBPH)의 지근섬유 형성에 대한 영향 및 작용기전 평가

- 돼지도축혈액 부산물 (PWBPH)에 의한 지근섬유 형성 및 분화유도에 대한 영향을 기반으로 세포 수준의 연구에서 돼지도축혈액 부산물의 지근섬유 형성 및 분화유도 관련 기전 연구를 추가적으로 진행하였음.
- PWBPH의 지근섬유 형성 및 분화유도에 대한 영향을 세포수준에서 조사하기 위하여, C2C12 근아세포를 근관으로 분화 후 PWBPH 처리에 의한 지근섬유 및 속근섬유 관련 지표들에 대한 변화를 관찰하였음.
- 실험결과, PWBPH 처리에 의해 지근섬유 관련 지표인 MyHC1(slow MyHC)의 발현이 농도 의존적으로 증가하였으며, 속근섬유 관련 지표인 MyHC2b (fast MyHC)의 발현이 유의적으로 감소하였음 (그림 93).

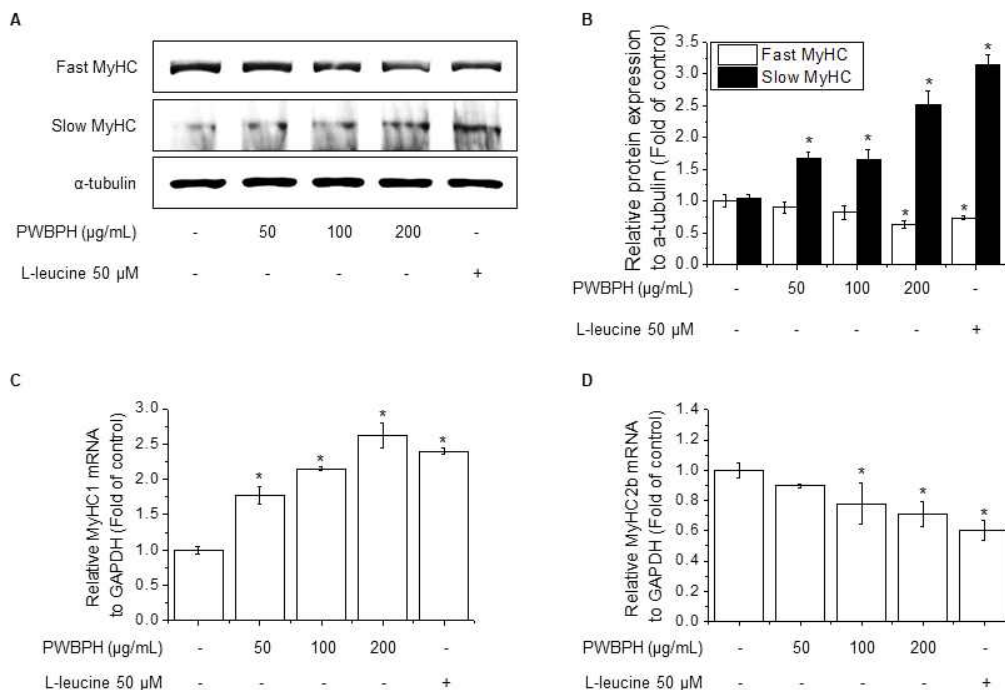


그림 93. PWBPH 처리에 의한 지근 (slow-twitch fiber) 및 속근 (fast-twitch fiber) 관련 지표에 대한 변화, * $p < 0.01$, control과 비교

- PWBPH의 지근섬유 형성 및 분화유도 관련 작용기전을 조사하기 위하여, 지근섬유의 형성에서 중요한 역할을 하는 미토콘드리아 생합성 관련 지표들에 대한 PWBPH의 영향을 관찰하였음.
- 실험결과, PWBPH 처리에 의해 미토콘드리아 생합성관련 지표인 NRF1 및 TFAM의 발현이 증가하였으며, 미토콘드리아 관련 조절자인 AMPK 인산화가 증가와 Sirt1 및 PGC-1 α 의 단백질 발현이 유도되는 것을 관찰하였음 (그림 94).

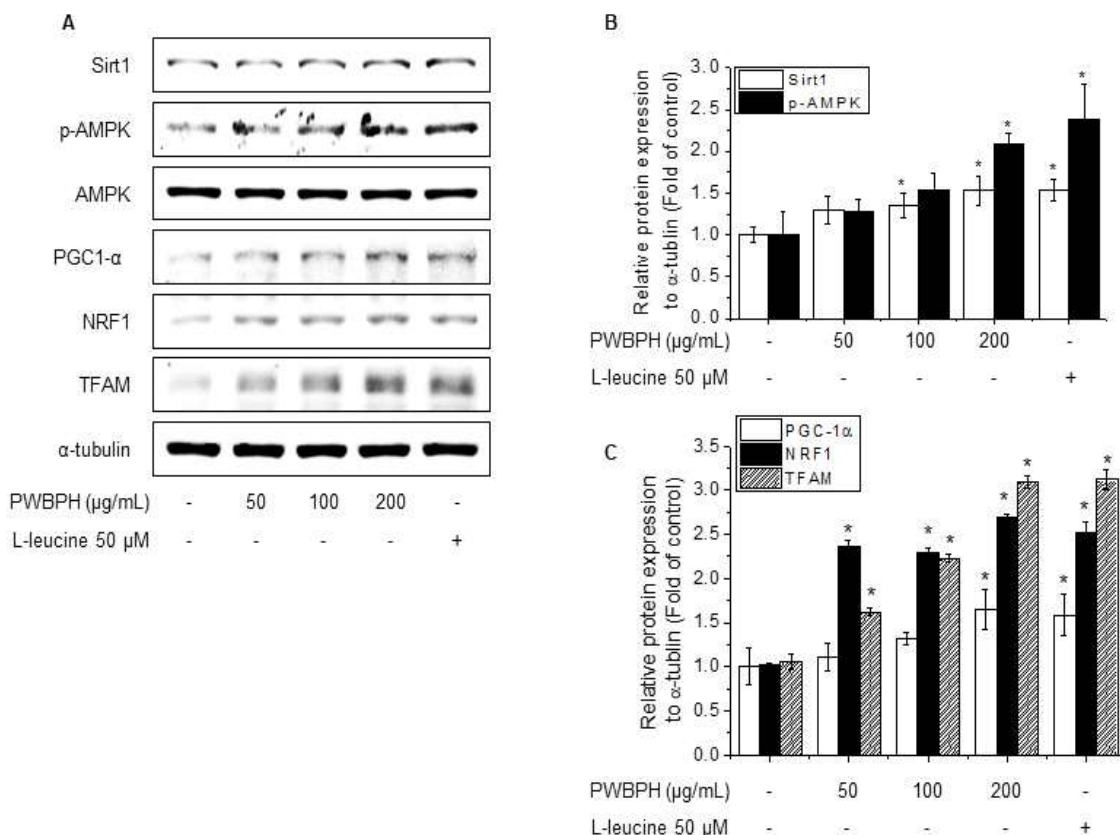


그림 94. PWBPH 처리에 의한 미토콘드리아 관련 지표에 대한 영향
**p*<0.01, control과 비교

- AMPK 및 Sirt1의 신호가 지근섬유 및 속근섬유의 분화유도와의 연관성을 조사하기 위하여, 각각의 억제제를 전처리한 후 PWBPH에 의한 지근섬유 및 속근섬유 관련 지표의 변화를 관찰하였음.
- 실험결과, AMPK 및 Sirt의 활성억제는 PWBPH에 의해 증가된 지근섬유 관련 지표인 MyHC1의 유전자 발현을 억제하였으며, PWBPH에 의해 감소된 속근섬유 관련 지표인 MyHC2b의 유전자 발현을 증가시켰음 (그림 95).

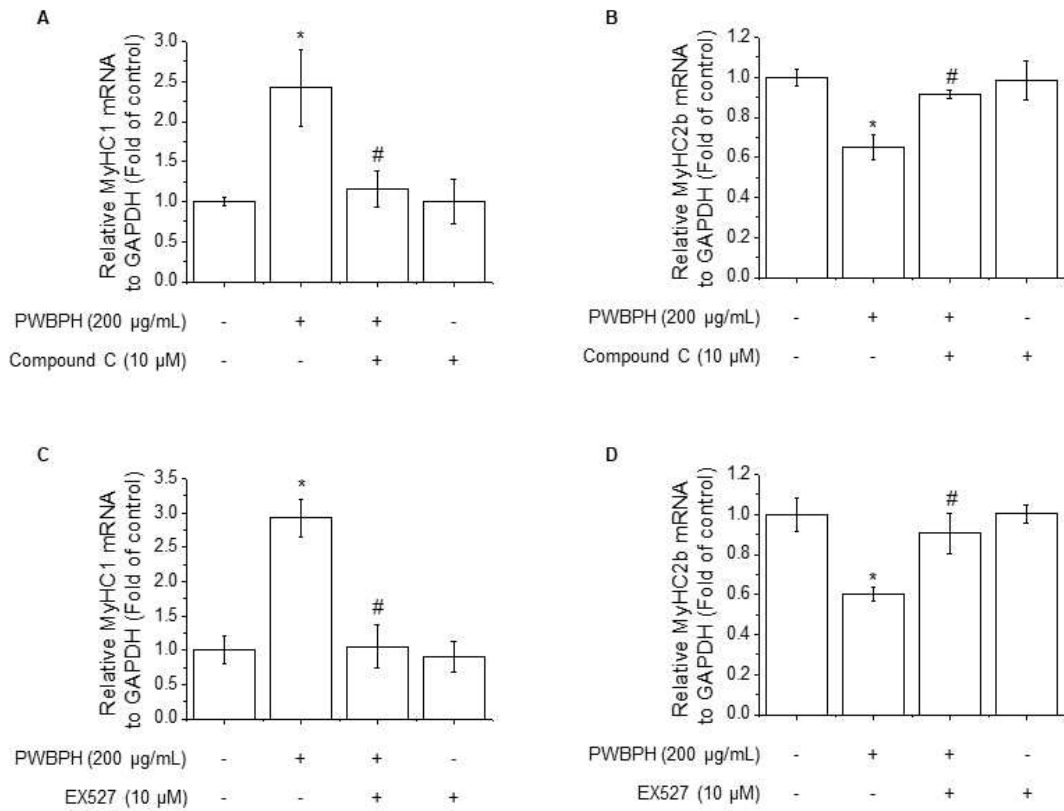


그림 95. PWBPH에 의한 지근섬유 및 속근섬유 형성 및 분화 유도에서 AMPK 및 Sirt1의 신호의 역할, * $p < 0.01$, control과 비교

나. 성능지표 및 달성도

주요 성능지표	가중치 (%)	연차별 목표 (조건/환경)	달성도 (%)
동물혈액 아미노산 조성	10	16종 이상	100
분리정제기술 확립	5	동물혈액 아미노산 분리정제	100
시제품 제작	15	시제품1건	100
미생물배지조건 확립	15	배지성능시험	100
동물세포배지 조건 확립	20	배지성능시험	100
탈진수영운동 테스트 탈진 트레드밀 운동테스트	20	대조군대비 10%상승	100
혈중 피로물질 함량	15	대조군대비 10%감소	100
합계	100		100

(2) 정량적 연구개발성과

연구 개발 성과는 특허 출원 2건, 특허 등록 1건, 기술 실시 1건, 제품화 1건, 매출액 1억, 고용 창출 2건, SCI 논문 2건, 비SCI 논문 2건, 학술 발표 4건, 인력 양성 2건을 목표로 하였으며, 특허 출원 4건, 특허 등록 1건, 기술 실시 2건, 제품화 2건, 매출액 백만원, 고용 창출 11건, SCI 논문 4편, 학술 발표 4건, 인력 양성 2건의 실적을 달성하였음.

< 정량적 연구개발성과표 >

성과목표							연구기반지표		
	지식 재산권		기술 실시	사업화			학술성과		인력양성
	특허출원	특허등록	건수	제품화	매출액	고용창출	논문	학술발표	
단위	건	건	건	건	백만원	명	건	건	명
가중치	20	20	10	30		20			
최종목표	2	1	1	1	100	2	4	4	2
실적	4	1	2	2	1	11	4	4	2
달성도 (%)	200	100	200	200	1	550	100	100	100

(3) 세부 정량적 연구개발성과

[과학적 성과]

□ 논문(국내외 전문 학술지) 게재

번호	논문명	학술지명	주저자명	호	국명	발행기관	SCIE 여부 (SCIE/비SCIE)	게재일	등록번호 (ISSN)	기여율
1	Effects of Porcine Whole-Blood Protein Hydrolysate on Exercise Function and Skeletal Muscle Differentiation	Applied Sciences	Sun Woo Jin	12(1)	스위스	MDPI	SCIE	2021.1 2.21	2076-34 17	90
2	Mushroom Ligninolytic Enzymes—Features and Application of Potential Enzymes for Conversion of Lignin into Bio-Based Chemicals and Materials	Applied Sciences	Seonghu n Kim	11(13)	스위스	MDPI	SCIE	2021.0 7.02	2076-34 17	100
3	In vitro Models of the Small Intestine for Studying Intestinal Diseases	Frontiers in Microbiology	Sang-Myung Jung	12	스위스	Frontiers	SCIE	2022.0 1.04	1664-30 2X	100
4	Effect of porcine whole blood protein hydrolysate on slow-twitch muscle fiber expression and mitochondrial biogenesis via the AMPK/SIRT1 pathway	International Journal of Molecular Sciences	Sun Woo Jin	ijms	스위스	MDPI	SCIE	2022.0 1.20	1422-00 67	100

□ 국내 및 국제 학술회의 발표

번호	회의 명칭	발표자	발표 일시	장소	국명
1	2020 한국생물공학회 추계학술발표대회 및 국제 심포지엄	김성훈	2020.10.22	라마다 서울 호텔	한국
2	한국독성학회	김지연	2021.11.01	스카이베이호텔경포	한국
3	춘계대한약학회	진순우	2021.04.22	온라인 생중계	한국
4	2021 한국생물공학회 춘계학술발표대회	김성훈	2021.04.14	라마다프라자 제주호텔	한국

□ 기술 요약 정보

연도	기술명	요약 내용	기술 완성도	등록 번호	활용 여부	미활용사유	연구개발기관 외 활용여부	허용방식

□ 보고서 원문

연도	보고서 구분	발간일	등록 번호

□ 생명자원(생물자원, 생명정보)/화합물

번호	생명자원(생물자원, 생명정보)/화합물 명	등록/기탁 번호	등록/기탁 기관	발생 연도
1	Bacillus tequilensis HCB	KCTC18926P	한국생명공학연구원 생물자원센터	2021

[기술적 성과]

□ 지식재산권(특허, 실용신안, 의장, 디자인, 상표, 규격, 신제품, 프로그램)

번호	지식재산권 등 명칭 (건별 각각 기재)	국명	출원				등록			기여율	활용 여부
			출원인	출원일	출원 번호	등록 번호	등록인	등록일	등록 번호		
1	도축폐혈액을 입상아미노산으로 자원화하는 차량탑재형 자원화장치	한국					주식회사 아미노랩	2021.09 .14	10-2303 893-000 0	50	
2	혈액을 이용한 바이오 활성 소재 생산 방법 및 그 응용	한국	주식회사 아미노랩	2021.10 .26	10-2021 -014362 7					50	활용
3	고농도 혈액에서 액화할 수 있는 신규한 바실러스 속 균주 및 그 균주의 응용	한국	주식회사 아미노랩	2021.11 .03	10-2021 -014988 8					100	
4	헬리시움 에리나세우스(Hericium erinaceus) 유래의 단백질분해효소 카테일 및 이의 활용	한국	한국생명 공학연구 원	2021.11 .05	10-2021 -015171 2					80	
5	돼지 도축혈액 가수분해물을 포함하는 근육 질환 치료 또는 운동수행능력 향상용 조성물	한국	충남대 학 교산학협 력단, 주식회사 아미노랩	2021.12 .31	10-2021 -019460 7					75	활용

○ 지식재산권 활용 유형

번호	제품화	방어	전용실시	통상실시	무상실시	매매/양도	상호실시	담보대출	투자	기타
1	√								√	

□ 저작권(소프트웨어, 서적 등)

번호	저작권명	창작일	저작자명	등록일	등록 번호	저작권자명	기여율

□ 신기술 지정

번호	명칭	출원일	고시일	보호 기간	지정 번호

□ 기술 및 제품 인증

번호	인증 분야	인증 기관	인증 내용		인증 획득일	국가명
			인증명	인증 번호		

□ 표준화

○ 국내표준

번호	인증구분 ¹⁾	인증여부 ²⁾	표준명	표준인증기구명	제안주체	표준종류 ³⁾	제안/인증일자

○ 국제표준

번호	표준화단계구분 ¹⁾	표준명	표준기구명 ²⁾	표준분과명	의장단 활동여부	표준특허 추진여부	표준개발 방식 ³⁾	제안자	표준화 번호	제안일자

[경제적 성과]

□ 시제품 제작

번호	시제품명	출시/제작일	제작 업체명	설치 장소	이용 분야	사업화 소요 기간	인증기관 (해당 시)	인증일 (해당 시)
1	아미노랩 아미노파워	2021.12.27	농업회사법인 케이에스디	-	식품	1년		
2	HWB-100	2021.12.31	(주)아미노랩	-	생명, 화학	1년		

□ 기술 실시(이전)

번호	기술 이전 유형	기술 실시 계약명	기술 실시 대상 기관	기술 실시 발생일	기술료 (해당 연도 발생액)	누적 징수 현황
1	직접실시 특허출원	고농도 혈액에서 액화할 수 있는 신규한 바실러스 속 균주 및 그 균주의 응용 기술	(주)아미노랩	2021.11.03		
2	직접실시 노하우	효소 분해와 정제공정을 기반으로 한 돈혈 식품분말화 기술	(주)아미노랩	2021.12.31		

□ 사업화 투자실적

번호	추가 연구개발 투자	설비 투자	기타 투자	합계	투자 자금 성격*
1		7,759,837천원		7,759,837천원	투자유치, 자체조달

□ 사업화 현황

번호	사업화 방식 ¹⁾	사업화 형태 ²⁾	지역 ³⁾	사업화명	내용	업체명	매출액		매출 발생 연도	기술 수명
							국내 (천원)	국외 (달러)		
1	자기실시	기술보유자의 직접사업화_기존업체-상품화	국내	축산부산물을 활용한 미생물 배양 배지 소재 개발	시제품	(주)아미노랩	-	-	2022	
2	자기실시	기술보유자의 직접사업화_기존업체-상품화	국내	축산부산물을 활용한 식품첨가물 소재 개발	시제품	(주)아미노랩	1,000	-	2022	

□ 매출 실적(누적)

사업화명	발생 연도	매출액		합계	산정 방법
		국내(천원)	국외(달러)		
축산부산물을 활용한 식품첨가물 소재 개발	2021	1,000	-	1,000	세금계산서
합계		1,000	-	1,000	

□ 사업화 계획 및 무역 수지 개선 효과

성과		효소분해 혈액단백질을 활용한 식품과 미생물배양 및 화장품소재			
사업화 계획	사업화 소요기간(년)	1			
	소요예산(천원)	100,000			
	예상 매출규모(천원)	현재까지	3년 후	5년 후	
		1,000	1,000,000	3,000,000	
	시장 점유율	단위(%)	현재까지	3년 후	5년 후
		국내			
국외					
향후 관련기술, 제품을 응용한 타 모델, 제품 개발계획	근감소예방 기능성식품소재				
무역 수지 개선 효과(천원)	수입대체(내수)	현재	3년 후	5년 후	
	수출				

□ 고용 창출

순번	사업화명	사업화 업체	고용창출 인원(명)		합계
			2020년	2021년	
1	축산부산물을 활용한 미생물 배양 배지 소재 개발	(주)아미노랩	3	1	4
2	축산부산물을 활용한 식품첨가물 소재 개발	(주)아미노랩	6	1	7
합계			9	2	11

□ 고용 효과

구분			고용 효과(명)
고용 효과	개발 전	연구인력	3
		생산인력	4
	개발 후	연구인력	5
		생산인력	8

□ 비용 절감(누적)

순번	사업화명	발생연도	산정 방법	비용 절감액(천원)
합계				

□ 경제적 파급 효과

(단위: 천원/년)

구분	사업화명	수입 대체	수출 증대	매출 증대	생산성 향상	고용 창출 (인력 양성 수)	기타
해당 연도							
기대 목표							

□ 산업 지원(기술지도)

순번	내용	기간	참석 대상	장소	인원

□ 기술 무역

(단위: 천원)

번호	계약 연월	계약 기술명	계약 업체명	계약업체 국가	기 징수액	총 계약액	해당 연도 징수액	향후 예정액	수출/ 수입

[사회적 성과]

□ 법령 반영

번호	구분 (법률/시행령)	활용 구분 (제정/개정)	명 칭	해당 조항	시행일	관리 부처	제정/개정 내용

□ 정책활용 내용

번호	구분 (제안/채택)	정책명	관련 기관 (담당 부서)	활용 연도	채택 내용

□ 설계 기준/설명서(시방서)/지침/안내서에 반영

번호	구분 (설계 기준/설명서/지침/안내서)	활용 구분 (신규/개선)	설계 기준/설명서/ 지침/안내서 명칭	반영일	반영 내용

□ 전문 연구 인력 양성

번호	분류	기준 연도	현황										
			학위별				성별		지역별				
			박사	석사	학사	기타	남	여	수도권	충청권	영남권	호남권	기타
1	이기호	2021	0				0			0			
2	김지연	2021	박사	석사	학사	기타	남	여	수도권	충청권	영남권	호남권	기타
				0				0		0			

□ 산업 기술 인력 양성

번호	프로그램명	프로그램 내용	교육 기관	교육 개최 횟수	총 교육 시간	총 교육 인원

□ 다른 국가연구개발사업에의 활용

번호	중앙행정기관명	사업명	연구개발과제명	연구책임자	연구개발비

□ 국제화 협력성과

번호	구분 (유치/파견)	기간	국가	학위	전공	내용

□ 홍보 실적

번호	홍보 유형	매체명	제목	홍보일

□ 포상 및 수상 실적

번호	종류	포상명	포상 내용	포상 대상	포상일	포상 기관

[인프라 성과]

□ 연구시설·장비

구축기관	연구시설/ 연구장비명	규격 (모델명)	개발여부 (○/×)	연구시설·장비 종합정보시스템* 등록여부	연구시설·장비 종합정보시스템* 등록번호	구축일자 (YY.MM.DD)	구축비용 (천원)	비고 (설치 장소)

* 「과학기술기초법 시행령」 제42조제4항제2호에 따른 연구시설·장비 종합정보시스템을 의미합니다.

[그 밖의 성과](해당 시 작성합니다)

가. 아미노산 분석서

(4) 계획하지 않은 성과 및 관련 분야 기여사항

가. 연구개발에서 파생한 추가기술 확보 및 사업화

(가) 바이오활성소재화 기술에서 파생한 화장품 원료화기술

- 발명의 명칭 : ‘혈액을 이용한 바이오활성소재 생산 방법 및 그 응용’
- 국내 특허출원 완료
- PCT 출원 완료 (과제비용이 아닌 별도 비용으로 진행)

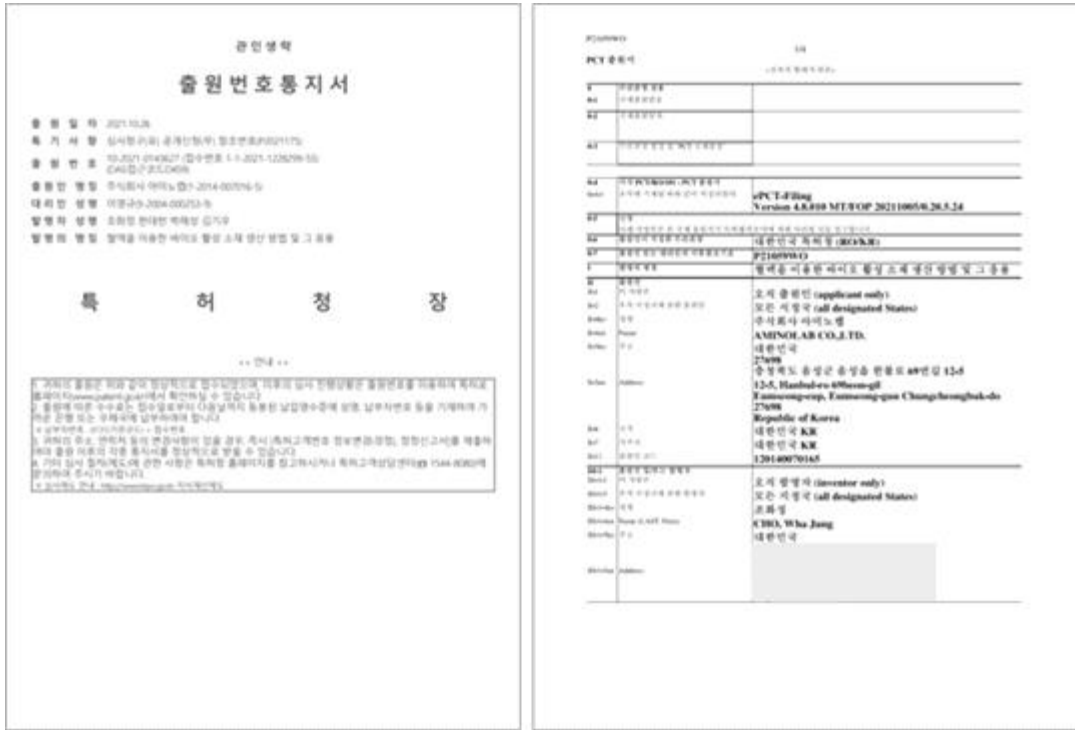


그림 96. 국내특허출원 및 PCT 출원서

(나) 화장품원료화 및 원료를 활용한 제품화

- 세계최초 돼지혈액을 재활용한 화장품 원료화 -> INCI 세계최초 등재 완료 (2종)
- INCI Name 1: Hydrolyzed Pig Blood Lysate Extract (상품명: ANX-PP (전혈분해))
- INCI Name 2: Hydrolyzed Pig Plasma Extract (상품명: ANX-WP (혈장분해))
- 화장품 제품화: 에이퍼센트 샴푸 2종 (두피케어, 기능성탈모증상완화), 미용비누 1종
- 상표등록: Apercent, 에이퍼센트



그림 97. 화장품원료 2종(액상/분말)과 샴푸 2종(두피케어/탈모기능성) 및 비누 제품

(다) 기여사항

- 식품 분야 외 화장품 원료화가 가능하며 축산혈액 재활용도를 높일 수 있음
- 신원료 개발 및 출시로 다양한 화장품 제품에 원료활용 옵션 제공
- 다양한 분야에서 혈액 재활용 및 부가가치를 높일 수 있는 연구개발 관심 유도

나. 투자유치 및 공장 신축

(가) 투자유치

- 목표 X -> 1건 (15억원)
- 투자자: IDV-IP 수산전문투자조합 2호 (아이디벤처스)

- 계약일: 2021년 11월 2일
- 투자액: 1,500,001,500원
- 배정주식수: 990,100주
- 신주의 종류: 기명식 상환전환우선주
- 의미: 저조한 매출 ('20년 58백만원)에도 불구하고 종합적인 혈액자원화기술과 연구개발에 대한 향후 성장성에 대해 투자기관으로부터 평가받았으며 공장신축 및 추가 연구개발 등 사업화에 필요한 유동성 확보

(나) 신축공장

- 소재지: 충남 세종 미래산업단지, 약 5,000평방미터
- 용도: 축산혈액자원화센터 (비료동, 사료동, 소재동, 연구사무동)
- 준공: 2022년 2월
- 인허가업종: 폐기물종합재활용업, 비료 및 사료 생산업, 화장품원료 등
- 생산능력: 소재(분말 일 100kg, 액상 일 500kg), 비료 및 사료(일 5톤)



그림 98. 신축 공장 및 연구동, 내부 설비 등 전경

표 23. 신축공장 설비투자 내역

구분	내용	계약이름	계약주체	계약일	합계
설비 투자	공장	세종미래산업단지 분양계약서	세종미래산업단지(주)	2020.10.30	1,880,207,250
		건축물의 설계 및 감리용역 계약서	(주)제이플러스종합건축사사무소	2020.08.24	
		환경 컨설팅 용역 계약서	(주)금강엔지니어링	2020	
		세종공장_건축 계약서	(주)웰크론타텍	2021.05.24	7,759,837,364
		지반공사 계약서	(주)신창이엔씨	2021.05.27	
		소방공사감리 표준도급계약서	(주)엠에스이엔지	2021.08	
	설비	세종공장_건조기 및 백필터 설비 계약서(변경)	(주)웰크론타텍	2021.04.28	
		세종공장_사료 및 유틸 설비 계약서(AL1-PJT)	(주)웰크론타텍	2021.05.24	
		세종공장_비료설비 계약서	(주)케이피	2021.05.24	

	사료첨가제 포장설비 계약서	(주)솔팩	2021.07.19	
	탱크로리제작 및 특수차량 납품 계약서	(주)정우정공(차량: 현대자동차주)	2021.09.08	
	혈액저장탱크 설치공사(홍주미트 냉장저장조)	(주)백경산업	2021.10.19	
합계	총 설비투자금액			9,640,044,614

(다) 기여사항

- 융복합 혈액자원화기술을 선도하고 있는 점을 인정받아 연속적인 투자유치 성공
- 국내 최초 종합 축산혈액자원화센터 구축 사례(비료, 사료, 소재, 자원화설비)
- 국내 15만톤 및 전세계 1500만톤 발생하는 혈액에 대한 재활용 관심 확산
- 유럽과 미국 대비 축산혈액자원화기술 후발국가로 종합기술 국내 첫 시도에 의미
- 축산혈액에 대해 폐기물 관점이 아닌 생명자원으로의 인식 전환에 기여

다. 사업화

(가) 판매 준비

- 시제품 실적 추가로 제품군 확장 가능 (목표 1건 -> 실적 2건)
- 식품(기타 가공품) 원료와 동일 공정 및 원료를 활용하여 배지 배양원료 제품군 확장
- 유통전문판매업 취득 완료 및 품목제조보고 완료

(나) 소재 (원료) 양산 준비

- 신축공장 내 소재동에서 원료 연내 양산 준비
- 1단계 공정으로 분말 소재 일 100kg 연간 24톤 생산 가능 (2022년)
- 2단계 공정개선 및 설비보완작업 완료 시 연간 48톤 예상 (2024년)

(다) 기여사항

- 돼지혈액을 효소분해한 연구개발결과물에 따른 식품 (기타가공품) 사업화는 국내 최초
- 식품소재와 동일원료 및 공정을 활용한 배지원료 제품화로 가격 경쟁력 확보
- 혈액을 활용한 일반 식품소재에서 기능성식품소재화 (면역 등)를 위한 토대 구축
- 동물성 원료를 주로 활용한 건강식품의 시장 태핑 (tapping) 의미

라. 고용창출

(가) 현황

- 창출 목표 (2명) 초과 달성 (누적11명)
- 과제 수행 전 전체 임직원 수 7명 -> 과제 종료 시점 13명
- 이공계 석박사급 고급 연구인력 중심 고용창출로 질적 도약
- 박사급 2명, 석사급 2명, 축산혈액분야 10년 이상 경력직 1명 (이공계학사) 등

(나) 기여사항

- 관련 분야 연구개발 역량을 대폭 강화하여 사업화 및 고도화에 가속도
- 석박사급 고급연구인력이 태부족 상태인 축산혈액분야에 연구활력 기대
- 혈액분야 장기간 생산경력 엔지니어 확보로 생산성 향상 및 안정화 향상
- 신제품 추가 개발 및 공정개선으로 품질 및 원가절감 도움

마. 품종등록 (균주기탁) 및 지식재산권 확보

(가) 품종등록 (균주기탁)

- 목표X -> 1건
- 특허출원 10-2021-0149888 ‘고농도 혈액에서 액화할 수 있는 신규한 바실러스 속 균주 및 그 균주의 응용’

(나) 지식재산권 (특허)

- 특허출원 2건 -> 4건
- 파생 기술에 의한 소재 관련 상표 출원 7건 및 등록 2건



그림 99. 특허미생물 기탁증 및 국내 특허출원서

표 24. 파생기술에 의한 소재 관련 상표출원 및 등록 현황

권리	출원번호	출원일자	상태	명칭	출원인
상표	40-2020-0141207	2020.08.11	공고	제[01] 류를 포함한[7]개류 Aminolab	(주)아미노랩
상표	40-2020-0166344	2020.09.17	등록	제[03] 류 에이퍼센트	(주)아미노랩
상표	40-2020-0166345	2020.09.17	등록	제[03] 류 Apercent	(주)아미노랩
상표	40-2020-0193070	2020.10.29	공고	제[03] 류 A%	(주)아미노랩
상표	40-2020-0193071	2020.10.29	공고	제[03] 류 AA%	(주)아미노랩
상표	40-2020-0221823	2020.12.07	공고	제[03] 류 Amino Bomb	(주)아미노랩
상표	40-2020-0221824	2020.12.07	공고	제[03] 류 Amino Balm	(주)아미노랩
상표	40-2020-0221825	2020.12.07	공고	제[03] 류 Amino Barm	(주)아미노랩

(다) 기여사항

- 품종등록 및 지식재산권 추가 확보로 사업화 시 권리침해 방어 및 회피 역량 강화목적
- 과제 연구개발에 의한 파생기술 (소재) 관련 사업화를 대비한 상표 출원 및 등록 목표
- 공고 중인 상표 Aminolab 활용하여 식품 제품 출시 사업화 (아미노랩 아미노파워)
- 등록 완료한 Apercent (에이퍼센트)상표를 활용하여 신규 화장품 브랜드 론칭 사업화



그림 100. 출원 및 등록 상표 활용 사업화 사례_식품, 배양원료, 화장품브랜드

2) 목표 달성 수준

추진 목표	달성 내용	달성도(%)
16종 이상의 아미노산을 함유한 동물혈액 효소분해물	<ul style="list-style-type: none"> 전처리 공정 확립 효소 발효 분해 공정 확립 20종의 아미노산 검출 	100
동물혈액 아미노산 분리 정제기술 확립	<ul style="list-style-type: none"> 혈장 분리 탈색·탈취 공정 확립 여과 정제 공정 확립 	100
시제품 제작 1건	<ul style="list-style-type: none"> 시제품 제작 2건 품목보고서 제출 	100
미생물 배지 조건 확립	<ul style="list-style-type: none"> 혈액 단백질 가수분해산물의 성분 분석 Lactobacillus와 Bacillus strains 2종을 이용한 배지 성능 시험 기존 상업용 배지와 효능 비교 분석 	100
동물 세포 배지 조건 확립	<ul style="list-style-type: none"> 추가 성분분석 및 필수 성분 분석 CHO-S 와 Skin fibroblasts 2종 세포주에 대해 배지 성능 시험 기존 상업용 배지와 효능 비교 분석 	100
동물의 운동수행능력 영향 평가	<ul style="list-style-type: none"> 탈진수영운동 테스트 탈진 트레드밀 운동 테스트 대조군대비 10%상승 	100
동물의 혈중 피로물질 평가	<ul style="list-style-type: none"> 혈중 피로물질 평가 대조군대비 10%감소 	100
특허 출원 2건	<ul style="list-style-type: none"> 특허 출원 4건 	200
특허 등록 1건	<ul style="list-style-type: none"> 특허 등록 1건 	100
기술실시 1건	<ul style="list-style-type: none"> 기술 실시 2건 	200
제품화 1건	<ul style="list-style-type: none"> 제품화 2건 	200
매출액 100백만원	<ul style="list-style-type: none"> 매출액 백만원 	1
고용창출 2건	<ul style="list-style-type: none"> 고용 11건 	550
논문 4건	<ul style="list-style-type: none"> 논문 4건 	100
학술발표 4건	<ul style="list-style-type: none"> 학술발표 4건 	100
인력양성 2건	<ul style="list-style-type: none"> 인력양성 2건 	100

4. 목표 미달 시 원인분석

1) 목표 미달 원인 (사유) 자체분석 내용

- 목표했던 성능지표와 각종 정량적 목표는 대부분 달성 또는 초과달성하였음.
 - 거의 유일하게 매출액 항목에서 당초 목표로 한 100백만원에서 미달 (목표매출 100백만원 -> 1백만원)
 - 시제품화 (2건)까지는 성공했으며 투자유치에도 성공 (과제 직전 투자유치 포함 총 2회 약 80억원 투자유치)
 - 다만 투자금을 활용하여 소재를 양산할 수 있는 설비를 구축하기로 한 예정일이 2021년 9월 준공 예정에서 과제 종료 후인 2022년 2월로 약 5개월 지연되었으며 이는 설계사 및 시공사측의 공정지연이 가장 큰 원인
 - 연구개발 일정과 사업화 일정에 비해 매출 목표를 지나치게 높게 잡은 측면도 있다고 판단되나 향후 사업화에 속도를 내어 보완할 계획임
-

2) 자체 보완활동

- 식품으로 제조한 시제품은 2022년 1월 현재 OEM으로 생산할 수 있는 체계를 갖추었음
 - 현재 신축중인 공장에서 원료를 제조할 수 있는 양산설비에 대한 보완작업과 시운전 등을 진행하고 있으며 2022년 상반기 중에는 소재원료를 생산할 예정임
 - 양산 체계를 갖추기 전에 이미 식품 판매활동에 필요한 식품유통전문판매업 (등록번호 제 2022-0121101호)을 취득하였으며 이에따라 OEM제조로 연계한 품목제조보고서 (제품명: 아미노랩 아미노파워)를 보고완료한 상황임
 - 기보유 중인 통신판매업신고증 (제2015-충북음성군-93호)도 신축공장이 최종 준공되는대로 소재지인 세종으로 변경 신고할 예정임
 - 사업화에 필요한 법적 기반을 갖추었음에 따라 양산설비가 준비될 때까지 최종 보완과정을 거친 후 본격 매출 시현할 계획임
 - 사업화와는 별도로 연구개발관련한 세부 보완이 필요한 부분들은 향후 지속적인 추가 사내 연구를 통해 보완할 계획임
-

3) 연구개발 과정의 성실성

가. 주관사

- 주관사는 자체개발 보유 중인 등록특허 12건과 국내외 출원 중인 특허 5건 등에서 알 수 있듯 그동안 주로 연구개발에 조직역량을 집중해왔으며 본 과제 역시 연구개발에 많은 역량과 노력을 집중하였던 반면 연구개발성과의 매출 시현 등 사업화에는 목표달성에 미치지 못함에 따라 MBA출신과 사업체운영경험 인력을 임원급으로 영입하였음.
 - 과제 착수 후 안정적인 연구개발 필요성에 따라 1차년도부터 충분한 고용창출을 통해 고급 연구개발 인력을 확보하고자 노력하였으며 이에따라 과제 종료시점 (2021년 12월)에는 과제 수행시점 (2020년 4월) 대비 약 100%의 신규 고용을 창출하였으며 신규 고용창출인력 중 석박사급 고급연구인력 비중이 약 70% (이공계 박사급 2명, 이공계 석사급 2명)를 차지함.
 - 신규채용된 고급연구인력들은 본 과제에 정식 등록여부와 관계없이 직간접적으로 연구개발과정에 적극 참여하였으며 연구정보와 개발과정을 공유하였음.
-

-
- 연구개발을 성실히 수행하여 목표대비 시제품 1건, 특허출원 2건, 균주기탁 (품종등록) 1건을 초과달성하였으며 벤처캐피탈 기관으로부터 투자유치에도 성공하였음.

나. 공동개발기관

- 각 공동연구개발기관의 특성에 따라 1년 8개월여 과제수행기관동안 연구 인력의 변동과 안정성에 다소 차이가 있었으나 사전 정보공유와 신속한 연구인력 대체 및 성실한 인수인계 작업 등으로 연구공백을 방지하고자 노력하였음.
- 연구개발과정 중 국내외 관련 연구개발정보 또는 연구애로사항 등에 대한 문의 및 협조요청에 공동연구개발기관 중 정부출연기관인 한국생명공학연구원의 적극적인 자세가 많은 도움이 되었음.
- 목표(SCI급 논문 2건, 비SCI급 논문 2건)대비 SCI급 논문으로만 총 4건을 게재하였으며 학술발표와 인력양성도 목표한 바대로 성실히 수행하였음.

다. 연구개발기관간 협력

- 주관사는 자체개발 보유 중인 등록특허 12건과 국내외 출원 중인 특허 5건 등에서 알 수 있듯 그동안 주로 연구개발에 조직역량을 집중해왔으며 본 과제 역시 연구개발에 많은 역량과 노력을 집중하였음.
- 본 과제를 수행하면서 예측하기 힘들었던 코로나19로 인해 공동연구개발기관들인 한국생명공학연구원과 충남대학교 산학협력단과의 수시 미팅을 통한 긴밀한 협의에 어려움이 있었음.
- 코로나19로 인해 대면 회의보다는 주로 온라인을 활용하여 연구정보를 공유하고자 하였으며 익숙해지는데 시간이 걸렸으나 최대한의 연구 성과를 도출하기 위해 노력하였음.

5. 연구개발성과의 관련 분야에 대한 기여 정도

가. 국내 혈액자원화 연구 한계 극복: 친환경적 방법론과 고부가가치 제품화

- 축산혈액을 재활용하는 지금까지의 국내 연구는 주로 비료화재활용 또는 사료화재활용 등 저부가가치 제품화 수준에 그쳤으며 이마저도 2차 폐기물 발생으로 인해 불완전했던 재활용구조였으나 기존 보유 중인 비료 및 사료재활용기술을 바탕으로 본 연구개발을 통해 효소분해기술을 활용한 매우 친환경적이고 부가가치도 높은 종합적인 축산부산물 자원화 기술로 대체할 수 있게 되었음.
- 축산업 분야의 골칫거리였던 축산부산물 중 하나인 도축혈액의 고부가가치 재활용을 통한 제품화로 막대한 폐기처리비용부담을 줄이고, 오랜 먹거리였던 축산부산물인 도축혈액의 생명자원화를 통해 비료 및 사료 등 단순 재활용에서 식품 및 식품첨가물, 배지원료 및 화장품소재 등 고부가가치 산업분야로 확장하는데 기여함.
- 개발원료의 운동수행능력 평가연구를 기반으로 근육감소예방물질 등 기능성소재화가 가능하며 향후 연구고도화 및 사업화를 통해 근감소완화 기능성을 획득한 식품원료, 음료 등 다양한 제품의 핵심소재화 토대를 마련함.
- 축산부산물은 막대한 비용을 들여가며 환경까지 위협하는 유기성 폐기물이 아닌 고유의 특성을 갖는 생명자원이라는 인식전환을 제공하여 활발한 연구저변 확산 계기가 될 수 있음.

나. 축산부산물의 경제적 가치에 더해 윤리적 가치 부여

- 고비용구조인 소태아혈청 (FBS)을 주원료로 했던 기존 미생물 배양원료를 저렴하고 수급이 안정적인 돼지혈액 원료로 대체할 수 있는 가능성을 발견한 점에서 축산부산물의 새로운 가치를 발견했다는데 기여하였음.
- 도축장의 경우 혈액이 소비되지 않고 잉여될 경우 반드시 폐수처리 해야 하기 때문에 처리비용부담을 줄이기 위해서라도 원료를 대부분 무료로 반출하려고 함으로 도축 혈액은 무료로 수급할 수 있으며, 효소의 최적 농도 확립을 통해 최소한의 효소 사용 및 공정 최소화를 통해 가격경쟁력을 확보함으로써 기존 배지 대비 저렴한 가격으로 실험용 배지를 공급할 수 있음.

표 25. 미생물 배지 가격 비교

명칭	제조사	가격 (500g)	사용량
Peptone from meat, bacteriological	millipore	106,500	1%
Bacto™ Tryptone	Gibco™	150,000	1%
[BD] Tryptone	BD Difco	163,100	1%
Peptone from casein and other animal protein	millipore	284,800	1%
Peptone from animal tissue	Sigma-aldrich	385,100	1%
HWB-M (가칭)	Aminolab	40,000	2%

표 26. 동물 세포 배지 가격 비교

명칭	제조사	가격 (500g)	사용량
Fetal Bovine Serum, certified, heat inactivated,	Gibco™	903,000	10%
Fetal Bovine Serum, USA origin, sterile-filtered	Sigma-aldrich	946,900	10%
Fetal Bovine Serum, US Origin, sterile-filtered, suitable for cell culture	Sigma-aldrich	1,074,900	10%
HWB-100	Aminolab	300,000	4.5%

- 도축과정에서 자연적으로 발생하는 축산혈액을 활용한 배양 원료화 기술은 특히 비윤리적이고 비환경적인 소태아를 활용한 기존 배양원료 제품의 윤리적 문제해결에도 기여할 수 있음.

라. 재활용 지평 확장 및 선진화

- 주로 사료첨가제, 식품첨가물에 국한되어 있는 미국과 유럽이 선도하고 있는 축산혈액자원화기술을 극복하고 이에 더해 파생기술로서 최초로 혈액을 활용한 확장품소재화 기술을 확보하게 되어 혈액활용분야의 지평을 확장하였음.
- 식물성자원의 선호 추세에 따라 가려지고 있는 동물부산물을 활용한 동물성 생명자원의 효능평가연구를 통해 다른 동물성자원의 활용성에 대한 관심을 소환하는 계기가 됨.
- 고부가가치 소재화와 각종 폐기에 따른 비용절감을 통해 국내 축산업의 경쟁력을 강화할 수 있고 한국 축산도축시스템의 선진화에 기여할 수 있음.
- 폐기되는 자원을 고부가가치 소재로 재활용함에 있어 불가피하게 발생하기 마련인 2차 부산물 또는 2차 폐기물들에 대해 사료화, 비료화 등 다양하고 종합적인

축산부산물자원화 방법론과 자원화센터 공장설립을 통해 완전히 또는 대부분 극복할 수 있는 설비시스템 및 기술체계를 갖추에 따라 국내만이 아니라 글로벌시장을 대상으로 축산부산물 (혈액)자원화 기술 및 설비수출을 기대할 수 있음.

6. 연구개발성과의 관리 및 활용 계획

가. 연구개발성과의 관리 및 계획

- 주관사의 기업부설연구소 (축산혈액자원화연구소)를 중심으로 공동개발기관과 정기적인 소통으로 추가 연구 및 사업화 등 진행상황 공유
- 연구고도화를 위한 향후 과제공동수주 또는 주관사 자체 추가연구를 통한 결과물들을 활용하여 매년 1건 내외 지속적인 특허출원 및 등록으로 지식재산화
- 연구소와 사내 생산 조직, 마케팅부서가 연구개발결과물의 사업화를 위한 TFT를 구성하여 공동으로 사업화로 연계
- 연구개발 종료 후 3년 이내 국외 SCI급 논문 1편 이상 게재, 국내특허출원 2건, 해외출원 1건, 국내특허등록 및 해외특허등록 각 1건을 달성
- 매년 1건 이상의 시제품개발과 이를 통해 3년내 1건의 기술이전 및 2건의 상품을 출시하고자 하며 2건의 공정을 개발
- 보도기사, 박람회 참가 등 다양한 방법을 활용하여 성과를 홍보하고 이를 통해 3년내 8건의 고용을 창출

나. 연구개발 성과 활용 분야 및 방안

(가) 활용분야

- 효소분해 동물혈액 단백질은 ‘미생물배양소재’, ‘운동수행능력 향상 식품소재’ 뿐만 아니라 ‘화장품 소재’ 및 ‘반려동물 사료첨가물’ 등에도 활용 분야가 다양함.
- 이미 혈액단백질을 효소 분해한 천연아미노산을 활용하여 가축들에게 면역증강 및 성장촉진 등에 효능이 확인되었으며 천연항생대체물질로도 주목받고 있어 고급 기능성 사료첨가제로도 활용이 가능하며 인간에게도 오랫동안 양질의 단백질 보충식품으로서 역할해왔음에 따라 향후 면역 및 피로회복, 키 성장 등을 위한 기능성식품 및 음료 등 분야에서 다양한 활용이 가능함.
- 단백질을 분해한 천연 아미노산은 인간의 피부에 직간접적으로 다양한 효능이 입증 및 연구되고 있으며 이미 수많은 화장품에 활용되고 있는 중이나 가격이 비싼 편이라 필수 및 비필수 천연아미노산이 균형있게 존재하는 축산혈액기반 효소분해 소재가 이를 충분히 대체할 수 있음.
- 화장품 원료로서도 글로빈, 플라센타 (돈태반) 기반 소재 등의 수입을 대체하는 효과가 있으며 기존에 마유, 장어, 지렁이, 달팽이, 태반 등 동물성 원료들이 미 화장품 전반에 활용 중이고 실크아미노산 등 대비 친환경적이며 훌륭한 대체재이기도 한 혈액기반 천연 복합아미노산 소재는 식물성 아미노산보다 함량, 성분 및 각종 효능 우위에 있는 만큼 고비용 원료가 아닌 재활용 원료로 사용 시 가격경쟁력도 뛰어나 활용가치가 충분할 것임.
- 반려동물 역시 근육감소 예방에 대한 관심과 수요가 증가하고 있어 면역증강효과와 동시에 근감소 예방 소재로서도 시장창출이 기대됨.

(나) 활용방안

- 윤리적 문제를 해결한 동물혈액 단백질을 기반으로 한 미생물배양소재를 활용하여 관련 주관사 소재 산업단지 내 기업 연구소 등을 대상 샘플테스트 베드 진행 후 단계별 테스트결과에 따른 상품성 보안을 진행하며 이를 통해 신뢰성 및 완성도를 보완할 것임.
- 배양 관련 학술단체 등에 상품성을 보완한 결과물을 활용하여 지속적으로 홍보하고 기존에 활용 중인 쿠팡 등 마케팅채널을 활용하여 제품 등록 및 판매를 병행할 계획임
- 운동수행능력 향상 식품소재의 경우 현재 품목보고를 완료하였으나 양산 전 시제품 단계에 가까우며 향후 공장 신축 후 원료 품질 표준화 및 공정 안정화와 관련한 추가 보완 연구를 통해 생산 및 품질 신뢰성을 확보할 것임.
- 당사가 기 보유 중인 ISO9001인증 (인증번호: Q323520, 인증범위: '가축혈액을 자원화한 비료, 사료, 소재의 개발, 제조 및 자원화설비에 대한 설계, 개발, 제조')을 숙지 및 참고하여 당사 생산 환경에 최적화한 품질관리시스템을 정립한 후 원료의 채혈단계부터 최종 포장단계까지 일련의 공정을 표준화할 것임. 또한 이를 활용하여 생산관계 담당임직원들에게 표준화 정립을 위한 정기적인 사내교육 및 학습활동을 진행할 것임.
- 2022년 내 일반식품 (첨가물) 수준으로 정식 완제품을 출시할 계획이며 초기 2~3년간 건강보조일반식품 수준으로 판매를 진행하면서 건강기능성식품원료화를 준비하고자 함.
- 현재 개발 원료를 활용하여 2022년 상반기 내에 근육 감소증 (근감소) 예방 물질 in vitro를 준비 중이며 in vitro 결과에 따라 제품개발을 보완하고 향후 연구개발 고도화 및 임상을 계획 중임.
- 특히 면역 및 근감소 예방에 관심 높은 고령층을 대상으로 체험단모집 등을 통한 홍보 또는 고령층에 특화된 라이브커머스 등 새로운 마케팅툴을 적극 활용하는 등 고령층 집중 홍보를 진행하고자 함.
- 주관사 주주이기도 한 일동바이오와의 협업으로 개발 원료를 활용하여 건강보조식품을 출시하여 제품인지도 및 신뢰도를 높인 후 홈쇼핑 진출 계획임.
- 양산 준비 완료 전까지는 사전마케팅 차원에서 20명 안팎 체험단을 구성하여 1개월간 식품 체험테스트를 진행하고 체험 결과를 바탕으로 식감 맛 섭취편의성 등 개선 사항을 보완하고자 함.
- 자체 확보 중인 화장품브랜드인 에이퍼센트 (Apercent)로 출시한 샴푸 및 비누제품을 활용하여 화장품회사에 원료공급 또는 제품화 경험을 활용하여 개발 원료를 핵심 원료로 비누 등 OEM도 진행할 것임.
- 반려동물 사료업체와의 협업을 통해 동물임상 또는 반려동물 섭취 체험 (개, 고양이)을 진행하고 임상결과 등을 확보하여 기능성 반려동물 사료제품화에도 활용하고자 함.
- 이미 비료제품에서 협업 중인 온라인 마케팅대행업체를 활용하여 유튜브 광고 등을 활용하고 쿠팡 등 B2C 채널에 제품등록 및 판매할 계획임.
- 양산과 관련하여 현재 단계에서는 일반 식품 (첨가물) 원료의 안정적 생산에 필요한 표준공정을 수립 중이며 공정보완 및 최종 수립 후 즉시 양산체제와 함께 기능성소재 연구를 병행할 계획임.
- 양산을 위한 설비는 신축공장 내 별도 소재동에 구축 중이며 준공 후 시운전 등을 마치고 2022년 상반기내 분말 기준 일 100 kg 양산준비를 마칠 예정임.

< 연구개발성과 활용계획표 >

구분(정량 및 정성적 성과 항목)		연구개발 종료 후 5년 이내
국외논문	SCIE	1
	비SCIE	0
	계	1
국내논문	SCIE	
	비SCIE	
	계	
특허출원	국내	2
	국외	1
	계	3
특허등록	국내	1
	국외	1
	계	2
고용창출	학사	3
	석사	3
	박사	2
	계	8
사업화	상품출시	2
	기술이전(실시)	2
	공정개발	2
제품개발	시제품개발	3
비임상시험 실시		1
성과홍보		2

< 별첨 자료 >

중앙행정기관 요구사항	별첨 자료
1. 자체평가 의견서 및 연구 성과 활용 계획서	1) 자체평가의견서
	2) 연구성과 활용계획서

[부록 1]

- 아미노산 분석서-1. 효소 0.1% 처리 샘플

제 D2020101000 호 문서확인 RHEF-59G0-D2H1				시험·검사성적서	
제품명	소제(액상)enzyme 0.1%		제조일자 (유통기한)		
의뢰인	업체명	(주)아미노랩	성명	박래성	
	주소	충청북도 음성군 음성읍 한밭로69번길 12-5			
제조번호			접수년월일	2020-10-14	
검사의뢰목적	참고용		접수번호	D2020101000	
<p>귀하가 우리 연구원에 시험·검사의뢰한 결과는 다음과 같습니다.</p> <p>시험·검사 완료일 : 2020-10-26 시험·검사 책임자 : 이현영 검사관련 총 책임자 : 김천희</p>					
시험·검사항목		시험·검사 결과		시험·검사원	
구성아미노산(티로신)(mg/100g)		12.68 mg/100g		이순영	
구성아미노산(글리신)(mg/100g)		165.34 mg/100g		이순영	
구성아미노산(세린)(mg/100g)		214.08 mg/100g		이순영	
구성아미노산(알라닌)(mg/100g)		515.55 mg/100g		이순영	
구성아미노산(글루탐산)(mg/100g)		592.11 mg/100g		이순영	
구성아미노산(라이신)(mg/100g)		199.48 mg/100g		이순영	
구성아미노산(로이신)(mg/100g)		456.33 mg/100g		이순영	
구성아미노산(메티오닌)(mg/100g)		36.61 mg/100g		이순영	
구성아미노산(발린)(mg/100g)		292.94 mg/100g		이순영	
구성아미노산(아르기닌)(mg/100g)		13.89 mg/100g		이순영	
구성아미노산(아스파라긴산)(mg/100g)		202.75 mg/100g		이순영	
구성아미노산(이소로이신)(mg/100g)		24.42 mg/100g		이순영	
구성아미노산(트레오닌)(mg/100g)		165.29 mg/100g		이순영	
구성아미노산(페닐알라닌)(mg/100g)		30.92 mg/100g		이순영	
구성아미노산(프롤린)(mg/100g)		불검출		이순영	
구성아미노산(히스티딘)(mg/100g)		45.33 mg/100g		이순영	
구성아미노산(시스틴)(mg/100g)		11.02 mg/100g		이순영	
구성아미노산(트립토판)(mg/100g)		불검출		이순영	
유리아미노산(트레오닌)(mg/100g)		124.84 mg/100g		김정숙	
유리아미노산(시스틴)(mg/100g)		불검출		김정숙	



시험·검사항목	시험·검사 결과	시험·검사원
유리아미노산(타로신)(mg/100g)	42.06 mg/100g	김정숙
유리아미노산(아르기닌)(mg/100g)	8.99 mg/100g	김정숙
유리아미노산(알라닌)(mg/100g)	197.93 mg/100g	김정숙
유리아미노산(프롤린)(mg/100g)	40.65 mg/100g	김정숙
유리아미노산(라이신)(mg/100g)	102.96 mg/100g	김정숙
유리아미노산(히스티딘)(mg/100g)	22.32 mg/100g	김정숙
유리아미노산(이소로이신)(mg/100g)	30.12 mg/100g	김정숙
유리아미노산(포이신)(mg/100g)	261.63 mg/100g	김정숙
유리아미노산(에티오닌)(mg/100g)	22.97 mg/100g	김정숙
유리아미노산(케닐알라닌)(mg/100g)	17.88 mg/100g	김정숙
유리아미노산(트립토판)(mg/100g)	불검출	김정숙
유리아미노산(발린)(mg/100g)	215.97 mg/100g	김정숙
유리아미노산(글루탐산)(mg/100g)	125.90 mg/100g	김정숙
유리아미노산(아스파라긴산)(mg/100g)	5.76 mg/100g	김정숙
유리아미노산(세린)(mg/100g)	67.24 mg/100g	김정숙
유리아미노산(글리신)(mg/100g)	65.38 mg/100g	김정숙
유리아미노산(글루타민)(mg/100g)	13.70 mg/100g	김정숙
유리아미노산(아스파라긴)(mg/100g)	50.04 mg/100g	김정숙

- ※ 위 판정은 의뢰된 시험·검사 항목만을 대상으로 한 것입니다.
- ※ 본 성적서는 참고용 성적서입니다. 시험·검사결과에 시험·검사목적 이외의 광고 및 홍보 등에 이용할 수 없으며, 자가품질검사 또는 정무기관 외 제출 용도로 활용할 수 없습니다.
- ※ 본 성적서는 KS Q ISO/IEC 17025 및 KOLAS 인정과 관련이 없습니다.
- ※ 지면이 부족한 경우 시험·검사 및 결과판은 별지로 작성 가능합니다.

2020년 10월 26일

한국기능식품연구원



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



KHSI



• 아미노산 분석서-2. 효소 1% 처리 샘플

제 D2020101001 호 문서확인 6KQM-9806-F51Y		시험·검사성적서	
제품명	소제(역상)enzyme 1%	제조일자 (유통기한)	
의뢰인	업체명 (주)아미노랩	성명	박해성
	주소 충청북도 음성군 음성읍 한빛로69번길 12-5		
제조번호		접수년월일	2020-10-14
검사의뢰목적	참고용	접수번호	D2020101001
<p>귀하가 우리 연구원에 시험·검사의뢰한 결과는 다음과 같습니다.</p> <p>시험·검사 완료일 : 2020-10-26 시험·검사 책임자 : 이현영 검사관련 총 책임자 : 김천희</p>			
시험·검사항목		시험·검사 결과	시험·검사원
구성아미노산(타로신)(mg/100g)		207.97 mg/100g	이순영
구성아미노산(글리신)(mg/100g)		902.16 mg/100g	이순영
구성아미노산(세린)(mg/100g)		1135.14 mg/100g	이순영
구성아미노산(알라닌)(mg/100g)		1796.52 mg/100g	이순영
구성아미노산(글루탐산)(mg/100g)		2208.19 mg/100g	이순영
구성아미노산(라이신)(mg/100g)		1733.03 mg/100g	이순영
구성아미노산(로이신)(mg/100g)		2196.39 mg/100g	이순영
구성아미노산(메티오닌)(mg/100g)		166.05 mg/100g	이순영
구성아미노산(발린)(mg/100g)		1325.58 mg/100g	이순영
구성아미노산(아르기닌)(mg/100g)		423.03 mg/100g	이순영
구성아미노산(아스파라긴산)(mg/100g)		2251.39 mg/100g	이순영
구성아미노산(이소로이신)(mg/100g)		176.49 mg/100g	이순영
구성아미노산(트레오닌)(mg/100g)		780.23 mg/100g	이순영
구성아미노산(페닐알라닌)(mg/100g)		726.60 mg/100g	이순영
구성아미노산(프롤린)(mg/100g)		523.69 mg/100g	이순영
구성아미노산(히스티딘)(mg/100g)		1000.04 mg/100g	이순영
구성아미노산(시스틴)(mg/100g)		66.73 mg/100g	이순영
구성아미노산(트립토판)(mg/100g)		44.51 mg/100g	이순영
유리아미노산(트레오닌)(mg/100g)		104.88 mg/100g	김정숙
유리아미노산(시스틴)(mg/100g)		불검출	김정숙



시험 · 검사항목	시험 · 검사 결과	시험·검사원
유리아미노산(티로신)(mg/100g)	114.75 mg/100g	김정숙
유리아미노산(아르기닌)(mg/100g)	34.25 mg/100g	김정숙
유리아미노산(알라닌)(mg/100g)	127.32 mg/100g	김정숙
유리아미노산(프롤린)(mg/100g)	26.04 mg/100g	김정숙
유리아미노산(라이신)(mg/100g)	121.26 mg/100g	김정숙
유리아미노산(히스티딘)(mg/100g)	41.98 mg/100g	김정숙
유리아미노산(이소로이신)(mg/100g)	88.38 mg/100g	김정숙
유리아미노산(로이신)(mg/100g)	420.76 mg/100g	김정숙
유리아미노산(메티오닌)(mg/100g)	43.43 mg/100g	김정숙
유리아미노산(케닐알라닌)(mg/100g)	142.77 mg/100g	김정숙
유리아미노산(트립토판)(mg/100g)	26.04 mg/100g	김정숙
유리아미노산(말린)(mg/100g)	103.49 mg/100g	김정숙
유리아미노산(글루탐산)(mg/100g)	114.70 mg/100g	김정숙
유리아미노산(아스파라긴산)(mg/100g)	18.83 mg/100g	김정숙
유리아미노산(세린)(mg/100g)	76.01 mg/100g	김정숙
유리아미노산(글리신)(mg/100g)	39.29 mg/100g	김정숙
유리아미노산(폴루타민)(mg/100g)	29.59 mg/100g	김정숙
유리아미노산(아스파라긴)(mg/100g)	48.13 mg/100g	김정숙

- ※ 위 판정은 위외권 시험 · 검사 항목만을 대상으로 한 것입니다.
- ※ 본 성적서는 참고용 성격서입니다. 시험 · 검사결과에 시험 · 검사목적 이외의 광고 및 홍보 등에 이용할 수 없으며, 자칫잘못된사 또는 정부기관 외 세출 용도로 활용할 수 없습니다.
- ※ 본 성적서는 KS Q ISO/IEC 17025 및 KOLAS 인정과 관련이 없습니다.
- ※ 지면이 부족한 경우 시험 · 검사 및 결과란은 별지로 작성 가능합니다.

2020년 10월 26일

한국기능식품연구원



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



• 아미노산 분석서-3. 효소 1% 처리 식품 소재

제 D2020100975 호 문서확인 90D1-ONC4-5ZEE		시험·검사성적서	
제품명	ANX-1(분말)	제조일자 (유통기한)	
의뢰인	업체명	(주)아미노텍	성명
	주소	충청북도 음성군 음성읍 한불로69번길 12-5	
제조번호		접수년월일	2020-10-14
검사의뢰목적	참고용	접수번호	D2020100975
<p>귀하가 우리 연구원에 시험·검사의뢰한 결과는 다음과 같습니다.</p> <p>시험·검사 완료일 : 2020-10-26 시험·검사 책임자 : 이현영 검사관련 총 책임자 : 김천희</p>			
시험·검사항목		시험·검사 결과	시험·검사원
구성아미노산(티로신)(mg/100g)		1037.39 mg/100g	이순영
구성아미노산(글리신)(mg/100g)		4429.84 mg/100g	이순영
구성아미노산(세틴)(mg/100g)		4940.68 mg/100g	이순영
구성아미노산(알라닌)(mg/100g)		8446.04 mg/100g	이순영
구성아미노산(글루탐산)(mg/100g)		9994.28 mg/100g	이순영
구성아미노산(라이신)(mg/100g)		8317.42 mg/100g	이순영
구성아미노산(로이신)(mg/100g)		11 354.69 mg/100g	이순영
구성아미노산(에티오닌)(mg/100g)		723.51 mg/100g	이순영
구성아미노산(발린)(mg/100g)		6779.05 mg/100g	이순영
구성아미노산(아르기닌)(mg/100g)		1868.70 mg/100g	이순영
구성아미노산(아스파라긴산)(mg/100g)		10 798.90 mg/100g	이순영
구성아미노산(이소로이신)(mg/100g)		606.58 mg/100g	이순영
구성아미노산(트레오닌)(mg/100g)		3568.21 mg/100g	이순영
구성아미노산(페닐알라닌)(mg/100g)		4151.77 mg/100g	이순영
구성아미노산(프롤린)(mg/100g)		2225.33 mg/100g	이순영
구성아미노산(히스티딘)(mg/100g)		5294.03 mg/100g	이순영
유리아미노산(트레오닌)(mg/100g)		1197.01 mg/100g	김정숙
유리아미노산(시스틴)(mg/100g)		70.79 mg/100g	김정숙
유리아미노산(티로신)(mg/100g)		1111.59 mg/100g	김정숙
유리아미노산(아르기닌)(mg/100g)		불검출	김정숙



시험·검사항목	시험·검사결과	시험·검사원
유리아미노산(알라닌)(mg/100g)	2056.28 mg/100g	김정숙
유리아미노산(프롤린)(mg/100g)	165.18 mg/100g	김정숙
유리아미노산(라이신)(mg/100g)	1464.38 mg/100g	김정숙
유리아미노산(히스티딘)(mg/100g)	984.23 mg/100g	김정숙
유리아미노산(이소로이신)(mg/100g)	611.30 mg/100g	김정숙
유리아미노산(로이신)(mg/100g)	6016.50 mg/100g	김정숙
유리아미노산(메티오닌)(mg/100g)	401.51 mg/100g	김정숙
유리아미노산(페닐알라닌)(mg/100g)	2147.77 mg/100g	김정숙
유리아미노산(트립토판)(mg/100g)	76.33 mg/100g	김정숙
유리아미노산(발린)(mg/100g)	1738.06 mg/100g	김정숙
유리아미노산(글루탐산)(mg/100g)	1850.13 mg/100g	김정숙
유리아미노산(아스파라긴산)(mg/100g)	1520.94 mg/100g	김정숙
유리아미노산(세린)(mg/100g)	1226.45 mg/100g	김정숙
유리아미노산(글리신)(mg/100g)	340.33 mg/100g	김정숙

※ 위 판정은 의뢰된 시험·검사 항목만을 대상으로 한 것입니다.
 ※ 본 성적서는 참고용 성적서입니다. 시험·검사결과는 시험·검사목적 이외의 광고 및 홍보 등에 이용할 수 없으며, 자기품질검사 또는 정부기관 외 제삼 용도로 활용할 수 없습니다.
 ※ 본 성적서는 KS Q ISO/IEC 17025 및 KOLAS 인정과 관련이 없습니다.
 ※ 치연이 부족한 경우 시험·검사 및 결과판은 별지로 작성 가능합니다.

2020년 10월 26일

한국기능식품연구원



(사)한국건강기능식품협회 부설 한국기능식품연구원 <http://www.khfi.re.kr> 전화번호 (031-959-4400) (031-959-4401) (031)628-0400-1



KHSI



- 아미노산 분석서-4. 효소 1% 처리 혈장 소재의 구성 아미노산

AMINO ACID COMPOSITION ANALYSIS

Korea Basic Science Institute / Seoul Center

Sample Name : 혈장 1% 18h

Date of Analysis start : 21.02.05

Date of Analysis end : 21.02.16

**** AMINO ACID COMPOSITION TABLE ****

AA	Result	MOL%	(ug/mg) ^a	(nmol/mg) ^b
CYA*	713.73	3.58	28.73	153.49
ASX**	1787.88	8.97	51.18	384.49
GLX**	2432.58	12.20	76.97	523.14
SER	1408.60	7.07	31.83	302.92
GLY	1190.47	5.97	19.22	256.02
HIS	515.76	2.59	17.21	110.92
ARG	837.02	4.20	31.36	180.00
THR	1306.44	6.55	33.47	280.96
ALA	1653.87	8.30	31.69	355.67
PRO	1252.60	6.28	31.01	269.38
TYR	674.99	3.39	26.30	145.16
VAL	1186.59	5.95	29.89	255.18
MET	155.82	0.78	5.00	33.51
ILE	595.40	2.99	16.80	128.04
LEU	1575.06	7.90	44.43	338.72
PHE	632.21	3.17	22.46	135.96
TRP	138.66	0.70	6.09	29.82
LYS	1878.03	9.42	59.04	403.88
TOTAL	19935.70	100.00	562.69	4287.25

DATA ANALYSIS.

* Result : HPLC chromatogram의 peak area를 standard(1250pmol)에 기준하여 산출한다.

*CYA mean the sum of cysteine & cystine

** ASX, GLX mean the sum of asparagine & aspartic acid and glutamine & glutamic acid, respectively.

*a =(각 아미노산의 분자량*b)단위전환

*b =(Result1 * (A buffer에 녹인 volume/ injection volume)) /(sample weight)

- 아미노산 분석서-5. 효소 1% 처리 혈장 소재의 유리 아미노산

AMINO ACID COMPOSITION ANALYSIS

Korea Basic Science Institute / Seoul Center

Sample Name : 혈장 1% 18h

Date of Analysis start : 21.02.05

Date of Analysis end : 21.02.16

**** AMINO ACID COMPOSITION TABLE ****

AA	Result	MOL%	(ug/mg) ^a	(nmol/mg) ^b
Cys	0.00	0.00	0.00	0.00
ASP	57.14	1.49	0.82	6.14
GLU	342.95	8.94	5.43	36.88
ASN	80.02	2.09	1.14	8.60
SER	297.32	7.75	3.36	31.97
GLN	79.67	2.08	1.25	8.57
GLY	126.17	3.29	1.02	13.57
HIS	34.52	0.90	0.58	3.71
ARG	238.74	6.23	4.47	25.67
THR	174.04	4.54	2.23	18.71
ALA	409.44	10.68	3.92	44.03
PRO	69.39	1.81	0.86	7.46
TYR	149.01	3.89	2.90	16.02
VAL	305.55	7.97	3.85	32.85
MET	157.13	4.10	2.52	16.90
Cys2	0.00	0.00	0.00	0.00
ILE	127.37	3.32	1.80	13.70
LEU	574.52	14.98	8.10	61.78
PHE	119.16	3.11	2.12	12.81
TRP	48.34	1.26	1.06	5.20
LYS	443.91	11.58	6.98	47.73
TOTAL	3834.39	100.00	54.40	412.30

DATA ANALYSIS

* Result : HPLC chromatogram의 peak area를 standard(1250pmol)에 기준하여 산출한다.

*a =(각 아미노산의 분자량*b)/단위전환

*b =(Result1 * (A buffer에 녹인 volume/ injection volume)) / (실험에 사용한 volume)

- 아미노산 분석서-6. 침전 및 카본 필터링 한 효소 1% 처리 혈장 소재의 구성 아미노산

AMINO ACID COMPOSITION ANALYSIS

Korea Basic Science Institute / Seoul Center

Sample Name : 혈장 1% 18h 침전&카본필터

Date of Analysis start : 21.02.05

Date of Analysis end : 21.02.16

**** AMINO ACID COMPOSITION TABLE ****

AA	Result	MOL%	(ug/mg) ^a	(nmol/mg) ^b
CYA*	795.27	3.27	29.19	155.93
ASX**	2076.20	8.53	54.18	407.10
GLX**	2758.15	11.33	79.57	540.81
SER	1615.42	6.63	33.29	316.75
GLY	1379.41	5.66	20.30	270.47
HIS	580.93	2.39	17.67	113.91
ARG	954.27	3.92	32.59	187.11
THR	1535.41	6.31	35.86	301.06
ALA	1947.52	8.00	34.02	381.87
PRO	1570.72	6.45	35.46	307.98
TYR	816.06	3.35	28.99	160.01
VAL	1548.24	6.36	35.56	303.58
MET	201.71	0.83	5.90	39.55
ILE	809.08	3.32	20.81	158.64
LEU	2096.93	8.61	53.94	411.16
PHE	862.38	3.54	27.93	169.09
TRP	154.27	0.63	6.18	30.25
LYS	2649.18	10.88	75.94	519.45
TOTAL	24351.15	100.00	627.40	4774.74

DATA ANALYSIS

* Result : HPLC chromatogram의 peak area를 standard(1250pmol)에 기준하여 산출한다.

*CYA mean the sum of cysteine & cystine

** ASX, GLX mean the sum of asparagine & aspartic acid and glutamine & glutamic acid, respectively.

*a =(각 아미노산의 분자량*b)/단위전환

*b =(Result1 * (A buffer에 녹인 volume/ injection volume)) / (sample weight)

- 아미노산 분석서-7. 침전 및 카본 필터링 한 효소 1% 처리 혈장 소재의 유리 아미노산

AMINO ACID COMPOSITION ANALYSIS

Korea Basic Science Institute / Seoul Center

Sample Name : 혈장 1% 18h 침전&카본필터

Date of Analysis start : 21.02.05

Date of Analysis end : 21.02.16

**** AMINO ACID COMPOSITION TABLE ****

AA	Result	MOL%	(ug/mg) ^a	(nmol/mg) ^b
Cys	0.00	0.00	0.00	0.00
ASP	58.52	2.25	1.53	11.47
GLU	243.65	9.38	7.03	47.77
ASN	57.61	2.22	1.49	11.30
SER	207.32	7.98	4.27	40.65
GLN	28.84	1.11	0.83	5.65
GLY	82.31	3.17	1.21	16.14
HIS	26.49	1.02	0.81	5.19
ARG	168.68	6.49	5.76	33.07
THR	122.39	4.71	2.86	24.00
ALA	263.02	10.12	4.60	51.57
PRO	37.52	1.44	0.85	7.36
TYR	110.77	4.26	3.94	21.72
VAL	180.93	6.96	4.16	35.48
MET	87.72	3.38	2.57	17.20
Cys2	65.93	2.54	3.11	12.93
ILE	87.05	3.35	2.24	17.07
LEU	358.34	13.79	9.22	70.26
PHE	84.42	3.25	2.73	16.55
TRP	33.41	1.29	1.34	6.55
LYS	293.72	11.30	8.42	57.59
TOTAL	2598.63	100.00	68.94	509.54

DATA ANALYSIS

* Result : HPLC chromatogram의 peak area를 standard(1250pmol)에 기준하여 산출한다.

*a =(각 아미노산의 분자량*b)/단위전환

*b =(Result1 * (A buffer에 녹인 volume/ injection volume))/(실첨에 사용한 volume)

- 아미노산 분석서-8. 침전 및 카본 필터링 후 UF 필터링 한 효소 1% 처리 혈장 소재의 구성 아미노산

AMINO ACID COMPOSITION ANALYSIS

Korea Basic Science Institute / Seoul Center

Sample Name : 혈장 1% 18h UF 필터

Date of Analysis start : 21.02.05

Date of Analysis end : 21.02.16

**** AMINO ACID COMPOSITION TABLE ****

AA	Result	MOL%	(ug/mL) ^a	(nmol/mL) ^b
CYA*	1026.93	3.76	256.32	1369.25
ASX**	2234.65	8.17	396.58	2979.53
GLX**	2920.66	10.68	572.96	3894.21
SER	1703.20	6.23	238.65	2270.93
GLY	1638.07	5.99	163.96	2184.09
HIS	692.51	2.53	143.27	923.35
ARG	978.51	3.58	227.28	1304.68
THR	1832.23	6.70	291.01	2442.98
ALA	2311.55	8.46	274.61	3082.06
PRO	1825.63	6.68	280.25	2434.18
TYR	836.44	3.06	202.07	1115.25
VAL	1780.76	6.51	278.15	2374.35
MET	211.61	0.77	42.10	282.15
ILE	905.80	3.31	158.43	1207.74
LEU	2209.92	8.08	386.53	2946.56
PHE	978.07	3.58	215.42	1304.09
TRP	322.62	1.18	87.85	430.16
LYS	2928.32	10.71	570.79	3904.43
TOTAL	27337.48	100.00	4786.22	36449.97

DATA ANALYSIS

* Result : HPLC chromatogram의 peak area를 standard(1250pmol)에 기준하여 산출한다.

*CYA mean the sum of cysteine & cystine

** ASX, GLX mean the sum of asparagine & aspartic acid and glutamine & glutamic acid, respectively.

*a =(각 아미노산의 분자량*b)/단위전환

*b =(Result1 * (A buffer에 녹인 volume/ injection volume)) /(sample weight)

*c = a x 회석배수

- 아미노산 분석서-9. 침전 및 카본 필터링 후 UF 필터링 한 효소 1% 처리 혈장 소재의 유리 아미노산

AMINO ACID COMPOSITION ANALYSIS

Korea Basic Science Institute / Seoul Center

Sample Name : 혈장 1% 18h UF 필터

Date of Analysis start : 21.02.05

Date of Analysis end : 21.02.16

**** AMINO ACID COMPOSITION TABLE ****

AA	Result	MOL%	(ug/mL) ^a	(nmol/mL) ^b
Cys	0.00	0.00	0.00	0.00
ASP	627.28	2.16	18.55	139.40
GLU	1795.45	6.18	58.70	398.99
ASN	0.00	0.00	0.00	0.00
SER	1360.62	4.68	31.77	302.36
GLN	192.54	0.66	6.25	42.79
GLY	711.91	2.45	11.88	158.20
HIS	538.61	1.85	18.57	119.69
ARG	0.00	0.00	0.00	0.00
THR	1880.57	6.47	49.78	417.90
ALA	3371.10	11.60	66.75	749.13
PRO	154.20	0.53	3.95	34.27
TYR	1747.52	6.01	70.36	388.34
VAL	2174.17	7.48	56.60	483.15
MET	854.06	2.94	28.32	189.79
Cys2	0.00	0.00	0.00	0.00
ILE	1533.42	5.28	44.70	340.76
LEU	4412.35	15.18	128.62	980.52
PHE	1367.86	4.71	50.21	303.97
TRP	0.00	0.00	0.00	0.00
LYS	6347.38	21.84	206.21	1410.53
TOTAL	29069.04	100.00	851.23	6459.79

DATA ANALYSIS

* Result : HPLC chromatogram의 peak area를 standard(1250pmol)에 기준하여 산출한다.

*a =(각 아미노산의 분자량*b)/단위전환

*b =(Result1 * (A buffer에 녹인 volume/ injection volume)) / (실험에 사용한 volume)

*c = a x 회색배수

- 아미노산 분석서-10. UF 필터링 전 효소 1% 처리 전혈 소재의 구성 아미노산

AMINO ACID COMPOSITION ANALYSIS

Korea Basic Science Institute / Seoul Center

Sample Name : no filtering

Date of Analysis start : 21.03.02

Date of Analysis end : 21.03.12

**** AMINO ACID COMPOSITION TABLE ****

AA	Result	MOL%	(ug/mL) ^a	(nmol/mL) ^b	(ug/mL) ^c
CYA*	166.61	0.87	103.96	555.36	1039.6
ASX**	2142.50	11.21	950.56	7141.67	9505.6
GLX**	1916.51	10.02	939.92	6388.38	9399.2
SER	1363.71	7.13	477.71	4545.69	4777.1
GLY	1711.58	8.95	428.29	5705.26	4282.9
HIS	927.15	4.85	479.52	3090.49	4795.2
ARG	374.43	1.96	217.42	1248.09	2174.2
THR	1171.94	6.13	465.34	3906.47	4653.4
ALA	3034.95	15.87	901.38	10116.49	9013.8
PRO	720.05	3.77	276.33	2400.17	2763.3
TYR	145.83	0.76	88.07	486.09	880.7
VAL	1474.84	7.71	575.92	4916.12	5759.2
MET	129.90	0.68	64.61	432.99	646.1
ILE	151.27	0.79	66.14	504.23	661.4
LEU	1609.45	8.42	703.76	5364.83	7037.6
PHE	408.75	2.14	225.07	1362.51	2250.7
TRP	0.00	0.00	0.00	0.00	0.0
LYS	1671.40	8.74	814.47	5571.34	8144.7
TOTAL	19120.86	100.00	7778.49	63736.19	77784.86

DATA ANALYSIS

* Result : HPLC chromatogram의 peak area를 standard(1250pmol)에 기준하여 산출한다.

*CYA mean the sum of cysteine & cystine

** ASX, GLX mean the sum of asparagine & aspartic acid and glutamine & glutamic acid, respectively.

*a =(각 아미노산의 분자량*b)/단위전환

*b =(Result1 * (A buffer에 녹인 volume/ injection volume)) /(sample weight)

*c = a x 회석배수

- 아미노산 분석서-11. UF 필터링 전 효소 1% 처리 전혈 소재의 유리 아미노산

AMINO ACID COMPOSITION ANALYSIS

Korea Basic Science Institute / Seoul Center

Sample Name : no filtering

Date of Analysis start : 21.03.02

Date of Analysis end : 21.03.12

**** AMINO ACID COMPOSITION TABLE ****

AA	Result	MOL%	(ug/mL) ^a	(nmol/mL) ^b	(ug/mL) ^c
Cys	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
ASP	1334.79	5.43	118.44	889.86	1184.41
GLU	1829.14	7.45	179.41	1219.43	1794.15
ASN	799.07	3.25	70.38	532.72	703.82
SER	1886.03	7.68	132.14	1257.35	1321.35
GLN	105.27	0.43	10.26	70.18	102.56
GLY	651.35	2.65	32.60	434.23	325.98
HIS	874.55	3.56	90.46	583.03	904.64
ARG	166.17	0.68	19.30	110.78	192.98
THR	966.44	3.93	76.75	644.29	767.48
ALA	3307.18	13.46	196.45	2204.79	1964.46
PRO	137.43	0.56	10.55	91.62	105.48
TYR	449.67	1.83	54.32	299.78	543.17
VAL	2108.50	8.58	164.67	1405.66	1646.74
MET	648.98	2.64	64.56	432.65	645.56
Cys2	360.13	1.47	57.69	240.08	576.92
ILE	725.70	2.95	63.47	483.80	634.65
LEU	4864.02	19.80	425.37	3242.68	4253.75
PHE	1352.38	5.51	148.93	901.59	1489.33
TRP	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
LYS	1998.71	8.14	194.79	1332.47	1947.94
TOTAL	24565.51	100.00	2110.54	16377.01	21105.37

DATA ANALYSIS

* Result : HPLC chromatogram의 peak area를 standard(1250pmol)에 기준하여 산출한다.

*a =(각 아미노산의 분자량*b)/단위전환

*b =(Result1 * (A buffer에 녹인 volume/ injection volume)) / (실험에 사용한 volume)

*c = a x 회석배수

- 아미노산 분석서-12. UF 필터링 후 효소 1% 처리 전혈 소재의 구성 아미노산

AMINO ACID COMPOSITION ANALYSIS

Korea Basic Science Institute / Seoul Center

Sample Name : UF filtering

Date of Analysis start : 21.03.02

Date of Analysis end : 21.03.12

**** AMINO ACID COMPOSITION TABLE ****

AA	Result	MOL%	(ug/mL) ^a	(nmol/mL) ^b	(ug/mL) ^c
CYA*	152.12	0.92	94.92	507.07	949.2
ASX**	1792.20	10.82	795.14	5974.00	7951.4
GLX**	1581.05	9.54	775.40	5270.15	7754.0
SER	1146.34	6.92	401.56	3821.14	4015.6
GLY	1452.15	8.77	363.38	4840.48	3633.8
HIS	791.73	4.78	409.48	2639.10	4094.8
ARG	323.48	1.95	187.84	1078.28	1878.4
THR	921.35	5.56	365.84	3071.16	3658.4
ALA	2632.36	15.89	781.81	8774.52	7818.1
PRO	607.98	3.67	233.32	2026.59	2333.2
TYR	130.90	0.79	79.06	436.33	790.6
VAL	1269.17	7.66	495.61	4230.56	4956.1
MET	118.69	0.72	59.03	395.62	590.3
ILE	141.78	0.86	62.00	472.61	620.0
LEU	1493.71	9.02	653.15	4979.04	6531.5
PHE	401.14	2.42	220.88	1337.13	2208.8
TRP	0.00	0.00	0.00	0.00	0.0
LYS	1609.10	9.71	784.11	5363.67	7841.1
TOTAL	16565.23	100.00	6762.53	55217.45	67625.27

DATA ANALYSIS

* Result : HPLC chromatogram의 peak area를 standard(1250pmol)에 기준하여 산출한다.

*CYA mean the sum of cysteine & cystine

** ASX, GLX mean the sum of asparagine & aspartic acid and glutamine & glutamic acid, respectively.

*a =(각 아미노산의 분자량*b)/단위전환

*b =(Result1 * (A buffer에 녹인 volume/ injection volume)) /(sample weight)

*c = a x 희석배수

- 아미노산 분석서-13. UF 필터링 후 효소 1% 처리 전혈 소재의 유리 아미노산

AMINO ACID COMPOSITION ANALYSIS

Korea Basic Science Institute / Seoul Center

Sample Name : UF filtering

Date of Analysis start : 21.03.02

Date of Analysis end : 21.03.12

**** AMINO ACID COMPOSITION TABLE ****

AA	Result	MOL%	(ug/mL) ^a	(nmol/mL) ^b	(ug/mL) ^c
Cys	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
ASP	1038.68	5.20	92.17	692.45	921.65
GLU	1462.06	7.32	143.41	974.71	1434.09
ASN	629.73	3.15	55.47	419.82	554.67
SER	1607.09	8.04	112.59	1071.39	1125.93
GLN	79.31	0.40	7.73	52.87	77.27
GLY	550.94	2.76	27.57	367.29	275.73
HIS	680.94	3.41	70.44	453.96	704.36
ARG	126.92	0.64	14.74	84.61	147.40
THR	811.42	4.06	64.44	540.95	644.38
ALA	2821.47	14.12	167.60	1880.98	1675.95
PRO	112.93	0.57	8.67	75.29	86.68
TYR	359.60	1.80	43.44	239.73	434.37
VAL	1668.87	8.35	130.34	1112.58	1303.39
MET	547.23	2.74	54.44	364.82	544.35
Cys2	302.89	1.52	48.52	201.93	485.24
ILE	579.34	2.90	50.67	386.23	506.65
LEU	3912.59	19.58	342.17	2608.39	3421.69
PHE	1090.74	5.46	120.12	727.16	1201.20
TRP	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
LYS	1601.01	8.01	156.03	1067.34	1560.35
TOTAL	19983.77	100.00	1710.53	13322.52	17105.34

DATA ANALYSIS

* Result : HPLC chromatogram의 peak area를 standard(1250pmol)에 기준하여 산출한다.

*a =(각 아미노산의 분자량*b)/단위전환

*b =(Result1 * (A buffer에 녹인 volume/ injection volume))/(실험에 사용한 volume)

*c = a x 회석배수

[부록 2]

- 특허출원서-1. 혈액을 이용한 바이오 활성 소재 생산 방법 및 그 응용

2021-10-26

【서지사항】

【서류명】	특허출원서
【참조번호】	P2021175
【출원구분】	특허출원
【출원인】	
【명칭】	주식회사 아이노랩
【특허고객번호】	1-2014-007016-5
【대리인】	
【성명】	이영규
【대리인번호】	9-2004-000253-9
【포괄위임등록번호】	2015-094146-2
【대리인】	
【성명】	윤병국
【대리인번호】	9-2004-000251-6
【포괄위임등록번호】	2015-094145-5
【발명의 국문명칭】	혈액을 이용한 바이오 활성 소재 생산 방법 및 그 응용
【발명의 영문명칭】	Method for producing bioactive material using blood and its application
【발명자】	
【성명】	조화정
【성명의 영문표기】	CHO, Wha Jung
【주민등록번호】	

35-1

- 특허출원서-2. 고농도 혈액에서 액화할 수 있는 신규한 바실러스 속 균주 및 그 균주의 응용

2021-11-03

【서지사항】

【서류명】 특허출원서

【참조번호】 P2021186

【출원구분】 특허출원

【출원인】

【명칭】 주식회사 아미노랩

【특허고객번호】 1-2014-007016-5

【대리인】

【성명】 이영규

【대리인번호】 9-2004-000253-9

【포괄위임등록번호】 2015-094146-2

【대리인】

【성명】 윤병국

【대리인번호】 9-2004-000251-6

【포괄위임등록번호】 2015-094145-5

【발명의 국문명칭】 고농도 혈액에서 액화할 수 있는 신규한 바실러스 속 균주 및 그 균주의 응용

【발명의 영문명칭】 Novel Bacillus sp. strains that can liquefy in high concentration blood and applications of the strains

【발명자】

【성명】 조화정

【성명의 영문표기】 CHO, Wha Jung

【주민등록번호】 [REDACTED]

22-1

- 특허출원서-3. 돼지 도축 혈액 가수분해물을 포함하는 근육 질환 치료 또는 운동수행능력 향상용 조성물

2021-12-31

【서지사항】

【서류명】	특허출원서
【출원구분】	특허출원
【출원인】	
【명칭】	충남대학교산학협력단
【특허고객번호】	2-2004-008410-4
【출원인】	
【명칭】	주식회사 아미노랩
【특허고객번호】	1-2014-007016-5
【대리인】	
【명칭】	특허법인 공간
【대리인번호】	9-2014-100141-0
【지정원변리사】	백경업
【포괄위임등록번호】	2015-044612-0
【발명의 국문명칭】	돼지 도축혈액 가수분해물을 포함하는 근육 질환 치료 또는 운동수행능력 향상용 조성물
【발명의 영문명칭】	Composition for treating muscle diseases or enhancing exercise capacity comprising porcine blood plasma protein hydrolysates
【발명자】	
【성명】	정혜광
【성명의 영문표기】	JEONG, Hye Gwang
【주민등록번호】	

45-1

- 특허출원서-4. 헬리시움 에리나세우스 유래의 단백질 분해효소 카테일 및 이의 활용

2021-11-05

【서지사항】


【서류명】	특허출원서
【출원구분】	특허출원
【출원인】	
【영칭】	한국생명공학연구원
【특허고객번호】	3-1999-034166-5
【대리인】	
【영칭】	특허법인 한일
【대리인번호】	9-2020-100061-3
【지정된변리사】	손민
【포괄위임등록번호】	2020-010417-0
【발명의 국문명칭】	헬리시움 에리나세우스(Hericium erinaceus) 유래의 단백질 분해효소 카테일 및 이의 활용
【발명의 영문명칭】	Protease cocktail derived from Hericium erinaceus, and their application
【발명자】	
【성명】	김성훈
【성명의 영문표기】	Seonghun Kim
【주민등록번호】	
【우편번호】	
【주소】	
【출원언어】	국어

40-1

- 특허등록-1. 도축폐혈액을 입상아미노산으로 자원화하는 차량탑재형 자원화장치



등록특허 10-2303893

	(19) 대한민국특허청(KR)	(45) 공고일자 2021년09월24일
	(12) 등록특허공보(B1)	(11) 등록번호 10-2303893
		(24) 등록일자 2021년09월14일
(51) 국제특허분류(Int. Cl.)	COSF 1/02 (2006.01) A23K 40/10 (2016.01)	(73) 특허권자
	A23N 17/00 (2006.01) COSF 1/00 (2006.01)	주식회사 아미노랩
	COSF 17/00 (2020.01) COSF 17/90 (2020.01)	충청북도 음성군 음성읍 한불로40번길 12-5
(52) CPC특허분류		(72) 발명자
	COSF 1/02 (2013.01)	박해성
	A23K 10/24 (2016.05)	
(21) 출원번호	10-2019-0156013	김기우
(22) 출원일자	2019년11월28일	
(23) 심사청구일자	2019년11월28일	
(65) 공개번호	10-2021-0079429	박덕규
(43) 공개일자	2021년06월30일	
(56) 선행기술조사문헌		(74) 이영규, 윤병국
	KR101573712 B1*	
	KR101777658 B1*	
	KR1020190010189 A*	
	KR101808512 B1	
	*는 심사관에 의하여 인용된 문헌	

전체 청구항 수 : 총 3 항

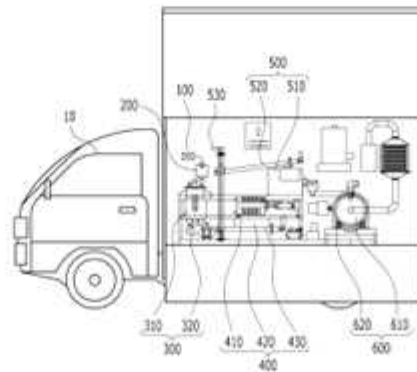
심사관 : 이진숙

(54) 발명의 명칭 **도축폐혈액을 입상아미노산으로 자원화하는 차량탑재형 자원화장치**

(57) 요약

본 발명은 도축폐혈액을 단순 가열방식이 아닌 고순도 아미노산계제로 자원화할 수 있는 도축폐혈액을 입상아미노산으로 자원화하는 차량탑재형 자원화장치에 관한 것으로, 수거된 도축폐혈액을 계량하고 필터링하여 투입하는 투입부와, 상기 투입부를 통해 투입된 도축폐혈액을 발효탱크에 담아 교반하며 발효제를 첨가한 후 가열하여 도축폐혈액 내에 포함된 단백질을 발효시켜 아미노산으로 전환시켜주는 발효부와, 상기 발효부를 통해 발효된 도축폐혈액을 증속기에서 증속시키는 증속부와, 상기 증속부를 통해 증속된 부정형 아미노산 덩어리와 잔류 수분을 분리시키는 탈수부와, 상기 탈수부를 통해 잔여수분이 탈수된 부정형 아미노산 덩어리를 스크류컨베이어를 이용하여 압출성형기로 투입하여 입상 또는 입자 형태로 압출 성형하는 성형부와, 상기 성형부에서 압출 성형된 입상 아미노산을 로타리칼론 건조기를 이용해 건조하여 완성하는 건조부를 포함하는 것을 특징으로 한다.

대표도 - 도1



[부록 3]

- 균주기탁증

특허미생물 기탁증

2021년 10월 1일

박해성 귀하

충청북도 음성군 음성읍 한불로69번길 12-5

2021년 9월 14일 제 7626호 귀하가 보관 기탁 신청한

특허미생물에 대하여 이를 수리하고 다음과 같이 미생물 기탁번호를 통지합니다.

— 다 음 —

1. 미생물 기탁번호 : **KCTC18926P**
2. 미생물의 명칭 : *Bacillus tequilensis* HCB

한국생명공학연구원 생물자원센터장 (인)



[부록 4]

- 기술실시보고서-1. 효소 분해와 정제공정을 기반으로 한 돈혈 식품 분말화 기술

기술실시 보고서						
(단위 : 원)						
연구개발과제 현황	사업명	유용농산물가공식품산업기술개발사업		연구과제번호	120063-02	
	연구과제명	축산부산물을 활용한 고부가가치 제품 개발				
	연구개발기관명	(주)아미노랩	연구책임자	박해성	참여기업명	
	연구협약일	2020.04.29	연구기간	2020.04.29.~2021.12.31		
	연구개발비	정부지원연구개발비 528,000천원	기관부담연구개발비 176,001천원	기타 ()	계 704,001천원	
기술실시계약 및 성과활용 현황	계약(활용)명	효소 분해와 정제공정을 기반으로 한 돈혈 식품분말화 기술				
	계약(활용)일	2021.12.31	실시(활용)기간	3년		
	지재권 종류	노하우, 특허출원	실시권 유형	직접 실시		
	+ 지재권이 특허(출원 등)인 경우	명 칭	돼지 도축혈액 가수분해물을 포함하는 근육 질환 치료 또는 운동수행능력 향상용 조성물			
		번호	10_2021_0194607	일 자	2021.12.31	
	실시(활용)기관	기관명	(주)아미노랩		기관유형	중소기업
		주 소	충북 음성군 음성읍 한불로69번길 12-5		대 표 자	박해성, 기정욱
		사업자번호	144-81-13968		전화번호	02-2038-4452
부서(담당자)		권택희		e-mail		
기 술 료	정액기술료		경상기술료		기타 조건	
	징수(예정)일	징수(예정)금액	착수기분료	징수(예정)일 징수(예정)금액		
			매 출에 따 른 기 술 료	징수시작(예정)일	결산월	
				징수종료(예정)일	징수율	
					매출액의 ()%	
	계					
기타특기사항						
<p>「농림축산식품 연구개발사업 관리기준」 제35조제3항에 따라 위와 같이 기술실시 내용을 보고합니다.</p> <p>붙임 1. 기술실시계약서 사본 1부(타기관으로 기술이전시). 2. 지식재산권을 포함하는 기술이전인 경우 해당 증빙자료(특허 등록증, 출원증 등) 1부 (타기관으로 기술이전시). 3. 연구개발과제협약서 사본 1부(직접실시시).</p> <p style="text-align: center;">2021년 12월 31일</p> <p style="text-align: center;">연구개발기관 (주)아미노랩의 대표 [직인]</p> <p style="text-align: center;">농림식품기술기획평가원장 귀하</p>						

[부록 4]

- 기술실시보고서-2. 고농도 혈액에서 액화할 수 있는 신규한 바실러스 속 균주 및 그 균주의 응용 기술

기술실시 보고서							
(단위 : 원)							
연구개발과제 현황	사업명	유종농산물자원산업육성기술개발사업		연구과제번호	120063-02		
	연구과제명	축산부산물용 함유한 고부가가치 제품 개발					
	연구개발기관명	(주)아미노랩	연구책임자	박해성	참여기업명		
	연구협약일	2020.04.29	연구기간	2020.04.29.~2021.12.31			
	연구개발비	정부지원연구개발비 528,000,000	기관부담연구개발비 176,001,000	기타 ()	계 704,001,000		
기술실시계약 및 성과활용 현황	계약(활용)명	고농도 혈액에서 액화할 수 있는 신규한 바실러스 속 균주 및 그 균주의 응용 기술					
	계약(활용)일	2021.11.03	실사(활용)기간	3년			
	지재권 종류	특허출원		실시권 유형	직접 실시		
	+ 지재권이 특허(출원, 등록)인 경우	명 칭	고농도 혈액에서 액화할 수 있는 신규한 바실러스 속 균주 및 그 균주의 응용 기술				
		번호	10-2021-0149888	일 자	2021.11.03		
		기관명	(주)아미노랩	기관유형	중소기업		
		주 소	충북 음성군 음성읍 한불로69번길 12-5	대 표 자	박해성, 기정욱		
		실사(활용)기관	사업자번호	144-81-13968	전화번호	02-2038-4452	
		부서(담당자)	권택희		e-mail		
기 술 료	정액기술료		경상기술료			기타 조건	
	징수(예정)일	징수(예정)금액	착수기본료	징수(예정)일	징수(예정)금액		
			매 출 에 따 른 기 술 료	징수시작(예정)일	결산월		
				징수종료(예정)일	징수율		
				계	매출액의 ()%		
기타특기사항							
<p>「농림축산식품 연구개발사업 관리기준」 제35조제3항에 따라 위와 같이 기술실시 내용을 보고합니다.</p> <p>붙임 1. 기술실시계약서 사본 1부(타기관으로 기술이전시). 2. 지식재산권을 포함하는 기술이전인 경우 해당 증빙자료(특허 등록증, 출원증 등) 1부 (타기관으로 기술이전시). 3. 연구개발과제협약서 사본 1부(직접실시시).</p> <p style="text-align: right;">2021년 11월 03일</p> <p style="text-align: right;">연구개발기관 (주)아미노랩의 대표 [직인]</p> <p style="text-align: right;">농림식품기술기획평가원장 귀하</p>							

[부록 5]

- 제품 출시 확인서-1. HWB-100

<첨부3>

농림축산식품 연구개발과제 제품출시 확인서

과제명	축산부산물을 활용한 고부가가치 제품 개발			
주관연구기관	(주)아미노랩	참여기관	한국생명공학연구원	
연구책임자	박해성	연구기간	20년 04월 ~ 21년 12월(총 1.8 년)	
총 정부출연금	528,000,000 원			
해당 기술의 제품출시 유형				
시제품(제품출시 예정)	(<input checked="" type="checkbox"/>)	기존 제품 공정개선	(<input type="checkbox"/>)	
신제품(제품출시 완료)	(<input type="checkbox"/>)	기 타	(<input type="checkbox"/>)	
제품 출시 실적				
제품명	제품사진	제품용도	제품 출시일	해당 기술의 제품출시 기여율(%)
HWB-100		미생물배양원료	2022년(예정)	100
<p>• 첨부 : 당해연도 제품출시 여부를 확인할 수 있는 자료(제조년월일 표기사진, 제품등록번호 등) **식품R&D는 품목제조보고서 제출 필수</p> <p style="text-align: center;">상기와 같이 R&D 기술을 제품화한 실적을 보고합니다.</p>				

2021년 12 월 31 일

연구책임자 : 박해성 (서명 또는 인)

- 제품 출시 확인서-2. 아미노랩 아미노파워

<첨부3>

농림축산식품 연구개발과제 제품출시 확인서

과제명	축산부산물을 활용한 고부가가치 제품 개발			
주관연구기관	(사)아미노랩	참여기관	충남대학교 산학협력단	
연구책임자	박해성	연구기간	20년 04월 ~ 21년 12월(총 1.8 년)	
총 정부출연금	528,000,000 원			
해당 기술의 제품출시 유형				
시제품(제품출시 예정)	(<input checked="" type="checkbox"/>)	기존 제품 공정개선	(<input type="checkbox"/>)	
신제품(제품출시 완료)	(<input type="checkbox"/>)	기 타	(<input type="checkbox"/>)	
제품 출시 실적				
제품명	제품사진	제품용도	제품 출시일	해당 기술의 제품출시 기여율(%)
아미노랩 아미노파워		식품첨가물 (기타가공품)	2022년(예정)	100
<p>• 첨부 : 당해연도 제품출시 여부를 확인할 수 있는 자료(제조년월일 표기사진, 제품등록번호 등) **식품R&D는 품목제조보고서 제출 필수</p> <p style="text-align: center;">상기와 같이 R&D 기술을 제품화한 실적을 보고합니다.</p>				

2021년 12 월 31 일

연구책임자 : 박해성 (서명 또는 인)

[부록 6]

- 품목보고서

식품·식품첨가물 품목제조보고서

보고인	성명 권순덕	생년월일	
	주소	전화번호	휴대전화
영업소	명칭(상호) 농업회사법인 케이에스디(주)	영업등록번호 20170624091	
	소재지 경상남도 거창군 가조면 원천1길 171		
제품정보	식품의 유형	기타가공품	품목제조보고번호 2017062409122
	제품명	아이노랩 아이노과워	
	유통기한	제조일로부터 12개월	
	품질유지기한		
	원재료명 또는 성분명 및 배합비율	맛장에 기재	
	용도 용법	맛장에 기재	
	보관방법 및 포장재질	맛장에 기재	
	포장방법 및 포장단위	맛장에 기재	
	성상	고유의 연노란색액과 향미를 지닌 분말로서 아이, 이취가 없어여한다.	
	품목의 특성	■ 고열량·저영양 식품 해당 여부 []예 []아니오 []해당 없음 ■ 영,유아를 섭취대상으로 표시 판매하는 식품 해당 여부 []예 []아니오 ■ 고열량식품으로 표시해 판매하는 식품의 해당 여부 []예 []아니오 ■ 상균·열균 제품의 해당 여부 []비상균 []상균 []열균	
기타	유통전문판매원:(주)아이노랩/서울특별시 서초구 강남대로 27,AT센터 7층 702호(양재동)		

「식품위생법」 제37조 제5항 및 같은 법 시행규칙 제45조 제1항에 따라 식품
(식품첨가물) 품목제조 사항을 보고합니다.

2022년 01월 27일
보고인 권순덕

경상남도 거창군수 귀하

품목보고번호 : 2017062409122

처리부서	행정복지국 민원소통과	처리지성명	김성희	처리일자	2022년 01월 28일
------	-------------	-------	-----	------	---------------

용도용법	하루 1~2회 1~3g 정도를 물과 함께 음용하십시오.
보관방법 및 포장재질	실온보관(1~35℃) HDPE or PET
포장방법 및 포장단위	일봉(30g, 35g, 40g, 50g, 60g, 70g, 80g, 90g, 100g, 150g, 200g, 300g, 500g, 1,000g)

[부록 7]

- 논문-1. Mushroom Ligninolytic Enzymes—Features and Application of Potential Enzymes for Conversion of Lignin into Bio-Based Chemicals and Materials

Mushroom Ligninolytic Enzymes—Features and Application of Potential Enzymes for Conversion of Lignin into Bio-Based Chemicals and Materials

Seonghun Kim ^{1,2} 

¹ Jeonbuk Branch Institute, Korea Research Institute of Bioscience and Biotechnology, 181 Ipsin-gil, Jeongeup 56212, Korea; seonghun@kribb.re.kr; Tel.: +82-63-570-5113

² Department of Biosystems and Bioengineering, KRIBB School of Biotechnology, University of Science and Technology (UST), 217 Gajeong-ro, Daejeon 34113, Korea

Abstract: Mushroom ligninolytic enzymes are attractive biocatalysts that can degrade lignin through oxido-reduction. Laccase, lignin peroxidase, manganese peroxidase, and versatile peroxidase are the main enzymes that depolymerize highly complex lignin structures containing aromatic or aliphatic moieties and oxidize the subunits of monolignol associated with oxidizing agents. Among these enzymes, mushroom laccases are secreted glycoproteins, belonging to a polyphenol oxidase family, which have a powerful oxidizing capability that catalyzes the modification of lignin using synthetic or natural mediators by radical mechanisms via lignin bond cleavage. The high redox potential laccase within mediators can catalyze the oxidation of a wide range of substrates and the polymerization of lignin derivatives for value-added chemicals and materials. The chemoenzymatic process using mushroom laccases has been applied effectively for lignin utilization and the degradation of recalcitrant chemicals as an eco-friendly technology. Laccase-mediated grafting has also been employed to modify lignin and other polymers to obtain novel functional groups able to conjugate small and macro-biomolecules. In this review, the biochemical features of mushroom ligninolytic enzymes and their potential applications in catalytic reactions involving lignin and its derivatives to obtain value-added chemicals and novel materials in lignin valorization are discussed.

Keywords: lignin; ligninolytic enzyme; mushroom; laccase; lignin peroxidase; manganese peroxidase; versatile peroxidase; lignin valorization; lignin bioconversion; laccase-mediated grafting



Citation: Kim, S. Mushroom Ligninolytic Enzymes—Features and Application of Potential Enzymes for Conversion of Lignin into Bio-Based Chemicals and Materials. *Appl. Sci.* **2021**, *11*, 6161. <https://doi.org/10.3390/app11136161>

Academic Editor: Alejandro Rodríguez Pascual

Received: 14 June 2021

Accepted: 30 June 2021

Published: 2 July 2021

Publisher's Note: MDPI stays neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



Copyright: © 2021 by the author. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

1. Introduction

Lignocellulose is a renewable bioresource used to produce bio-based fuel, chemicals, and materials. Lignocellulosic biomass is an abundant and renewable resource from plants such as soft grasses, hard woods, agricultural crops, and their waste byproducts, mainly composed of polysaccharides. These plant cell walls consist of a complex polyphenolic lignin combined with rigid cellulose amorphous hemicellulose structures [1,2]. Since plant cell walls are arranged with multi-layers consisting of lignin, cellulose, and hemicellulose, which have strong interactions with each other, the disturbance and breakdown of polymeric structures are the initial processes required for the utilization of subunit compounds such as sugar monomers, oligomers, and other aromatic derivatives [1,2]. Lignin binds to cellulose fibers to harden and strengthen plant cell walls. Cellulose is the main structural polysaccharide of the primary plant cell wall, and it accounts for 30–50% of the dry weight of lignocellulose. The second polysaccharide component of lignocellulose is hemicellulose, which accounts for 15–34% of the plant cell wall. The third main component is lignin. Conceptually, the microbial bioconversion of renewable chemicals from the biomass involves four main steps: physical and chemical pretreatment of biomass, depolymerization of the pretreated biomass, fermentation of the resulting sugars, and purification or distillation of the products [3,4]. Other processes directly depolymerize biomass under harsh physical



In vitro Models of the Small Intestine for Studying Intestinal Diseases

Sang-Myung Jung¹ and Seonghun Kim^{1,2*}

¹Jeonbuk Branch Institute, Korea Research Institute of Bioscience and Biotechnology (KRIBB), Jeonjeou, South Korea,

²Department of Biosystems and Bioengineering, KRIBB School of Biotechnology, University of Science and Technology (UST), Daejeon, South Korea

OPEN ACCESS

Edited by:

Gerardo R. Vasta,
University of Maryland,
Baltimore, United States

Reviewed by:

Rishi Droke,
Purdue University,
United States
Wei Long Ng,
Nanyang Technological University,
Singapore

Michael Super,

Harvard University,
United States

*Correspondence:

Seonghun Kim
seonghun@kribb.ust.ac.kr

Specialty section:

This article was submitted to
Infectious Agents and Diseases,
a section of the journal
Frontiers in Microbiology

Received: 30 August 2021

Accepted: 07 December 2021

Published: 04 January 2022

Citation:

Jung S-M and Kim S (2022) In vitro
Models of the Small Intestine for
Studying Intestinal Diseases.
Front. Microbiol. 12:767038.
doi: 10.3389/fmicb.2021.767038

The small intestine is a digestive organ that has a complex and dynamic ecosystem, which is vulnerable to the risk of pathogen infections and disorders or imbalances. Many studies have focused attention on intestinal mechanisms, such as host-microbiome interactions and pathways, which are associated with its healthy and diseased conditions. This review highlights the intestine models currently used for simulating such normal and diseased states. We introduce the typical models used to simulate the intestine along with its cell composition, structure, cellular functions, and external environment and review the current state of the art for *in vitro* cell-based models of the small intestine system to replace animal models, including *ex vivo*, 2D culture, organoid, lab-on-a-chip, and 3D culture models. These models are described in terms of their structure, composition, and co-culture availability with microbiomes. Furthermore, we discuss the potential application for the aforementioned techniques to these *in vitro* models. The review concludes with a summary of intestine models from the viewpoint of current techniques as well as their main features, highlighting potential future developments and applications.

Keywords: small intestine, *in vitro* model, *ex vivo* model, 3D culture, disease model, intestinal glycans, host-microbiome interaction

INTRODUCTION

The small intestine is a key part of the digestive system that has critical roles essential for sustaining life. It plays crucial roles in food digestion and nutrient absorption, as well as homeostasis maintenance via host-microbe interactions. The small intestine has a long tubular structure of 6 m–7 m in length and an inner diameter of 3 cm–4 cm. The inner side of the small intestine, called the lumen, is an epithelial cell layer whose microstructure consists of villi and the basal crypt. Moreover, the small intestine has a large surface area around 250 m²; thus, its vast microstructure area enhances the efficient absorption of a wide range of smaller molecules that result from the digestion of macromolecules in the stomach, i.e., amino acids from proteins, sugars from polysaccharides, glycerol, and short-chain fatty acids from lipids, etc. (Biernat et al., 1999; Sokolis and Sassani, 2013). Gut intestines are complex ecosystems under anaerobic conditions that include a variety of microorganisms and are rich in nutrients. Such human gut microbiota are relevant to human health and pathogenesis (Tuddenham and Sears, 2015; Hillman et al., 2017; Shortt et al., 2018).

Gut microbiomes predominantly consist of bacterial genera, including *Faecalibacterium*, *Roseburia*, and *Bifidobacterium*, even though other main groups of microorganisms, such as archaea, fungi, protozoa, and viruses, can be observed (Bédard et al., 2020). These microbiome

- 논문-3. Effects of Porcine Whole-Blood Protein Hydrolysate on Exercise Function and Skeletal Muscle Differentiation

Article

Effects of Porcine Whole-Blood Protein Hydrolysate on Exercise Function and Skeletal Muscle Differentiation

Sun Woo Jin ^{1,2,†}, Gi Ho Lee ^{1,†}, Ji Yeon Kim ^{1,†}, Chae Yeon Kim ¹, Young Moo Choo ², Whajung Cho ³, Jae Ho Choi ⁴, Eun Hee Han ⁵, Yong Pil Hwang ⁶ and Hye Gwang Jeong ^{1,*}

- ¹ Department of Toxicology, College of Pharmacy, Chungnam National University, Daejeon 34134, Korea; mpassword@cnu.ac.kr (S.W.J.); ghk1900@cnu.ac.kr (G.H.L.); jykim525@o.cnu.ac.kr (J.Y.K.); chaeyeon05@o.cnu.ac.kr (C.Y.K.)
- ² Department of R&D, Jinju Bioindustry Foundation, Jinju 52839, Korea; ychoo@jbio.or.kr
- ³ R&D Institute, AMINOLAB Co., Ltd., Seoul 06774, Korea; wjcho@aminolab.co.kr
- ⁴ Subtropical/Tropical Organism Gene Bank, Jeju National University, Jeju 63243, Korea; chlksala@naver.com
- ⁵ Drug & Disease Target Research Team, Division of Bioconvergence Analysis, Korea Basic Science Institute (KBSI), Cheongju 28119, Korea; heb4285@kbsi.re.kr
- ⁶ Fisheries Promotion Division, Mokpo 58613, Korea; protoplast@hanmail.net
- * Correspondence: hgjeong@cnu.ac.kr; Tel.: +82-42-821-5936
- † These authors contributed equally to this work.



Citation: Jin, S.W.; Lee, G.H.; Kim, J.Y.; Kim, C.Y.; Choo, Y.M.; Cho, W.; Choi, J.H.; Han, E.H.; Hwang, Y.P.; Jeong, H.G. Effects of Porcine Whole-Blood Protein Hydrolysate on Exercise Function and Skeletal Muscle Differentiation. *Appl. Sci.* **2022**, *12*, 17. <https://doi.org/10.3390/app12010017>

Academic Editor: Wojciech Kolancowski

Received: 22 November 2021

Accepted: 20 December 2021

Published: 21 December 2021

Publisher's Note: MDPI stays neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



Copyright: © 2021 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

Abstract: A number of studies have utilized blood waste as a bioresource by enzymatic hydrolysis to obtain amino acids, such as branched-chain amino acids, which can increase muscle mass or prevent muscle loss during weight loss. Although a significantly high content of branched-chain amino acids has been reported in porcine whole-blood protein hydrolysate (PWBPH), the effects of PWBPH on skeletal muscle differentiation and exercise function remain unclear. In this study, we investigated the effects of PWBPH on exercise endurance in ICR mice and muscle differentiation in C2C12 mouse myoblasts and gastrocnemius (Gas) muscle of mice. Supplementation with PWBPH (250 and 500 mg/kg for 5 weeks) increased the time to exhaustion on a treadmill. PWBPH also increased the Gas muscle weight to body weight ratio. In addition, PWBPH treatment increased skeletal muscle differentiation proteins and promoted the Akt/mTOR-dependent signaling pathway *in vitro* and *in vivo*. These results suggest that PWBPH can be utilized as a bioresource to enhance exercise function and skeletal muscle differentiation.

Keywords: porcine whole blood protein hydrolysates; branched-chain amino acid; skeletal muscle differentiation

1. Introduction

When slaughtering livestock, blood is treated as waste. Therefore, the 2.5–3.0 L of blood per pig, amounting to approximately 39,216 tons per year, has a major impact on water pollution [1,2]. Blood, which accounts for approximately 7% of the total weight of pigs, generally contains 75–80% moisture and 15–17% high-quality protein; the protein is composed of albumin, globulin, and hemoglobin [3,4]. Although this blood has the potential to become a valuable bioresource, it is disposed of due to a lack of research on possible industrial uses and a general aversion to blood. A recent study showed that the content of free amino acids, including branched-chain amino acids (BCAAs), such as valine (Val), isoleucine (Ile), and leucine (Leu), can be increased by enzymatic hydrolysis of pig blood [2]. In the human body, the 3 proteinogenic BCAAs Val, Ile, and Leu are included among the 9 essential amino acids (EAAs), accounting for 21% of the total protein content and 35% of the EAAs in muscle [5,6]. Especially, the BCAA Leu plays important roles in the regulation of muscle protein synthesis [7–9].

Increases in strength and endurance are related to muscle metabolism and mass. Pathological conditions, such as sarcopenia, cachexia, sepsis, burns, and trauma can weaken

- 논문-4. Effect of porcine whole blood protein hydrolysate on slow-twitch muscle fiber expression and mitochondrial biogenesis via the AMPK/SIRT1 pathway



- 학술회의 발표-1. 2020 한국생물공학회 추계학술발표대회 및 국제 심포지엄

P0409 Characterization of Protein Hydrolysates of Porcine Whole Blood for Extraction of Valuable Amino Acids

Seonghun KIM^{1,2}

¹Jeonbuk Branch Institute, Korea Research Institute of Bioscience and Biotechnology (KRIBB), Jeongeup, Korea, ²Department of Biosystems and Bioengineering, KRIBB School of Biotechnology, University of Science and Technology(UST), Daejeon, Korea

Corresponding Author Email : seonghun@kribb.re.kr

Animal bloods are agricultural byproducts in meat processing industries. Although the tons of blood wastes is not utilized and disposed, it could be a potential bioresource for recycling raw materials or for conversion into useful products of higher value products. In this study, we investigated the enzymatic treatment of porcine whole blood for extraction of valuable amino acids. Porcine whole blood was hydrolyzed by endo- and exo-protease cocktails. After the enzymatic hydrolysis, the crude hydrolysate was filtrated through activated carbon column to remove dark red color and Maillard reaction products. The filtrant was formulated to dried powder form to analyze the content of free amino acids and sugar compounds. The low molecule compounds analysis revealed the blood hydrolysate contained higher contents of branched chain and acidic amino acids rather than other amino acid groups. In addition, the sugar content analysis showed monosaccharide sugars consisting of O-glycans attached to porcine red blood cells. Non-residual antibiotics dominantly used in livestock were not detected by enzyme-linked immunosorbent assays (ELISAs) for analysis of antibiotics in the blood hydrolysate. However, the 16S rRNA or 18S rRNA based metagenomic analysis of microbial communities in the prepared hydrolysates revealed many bacteria species dominantly belonging to proteobacteria, firmicutes, and bacteroidetes phylum, but it could not detect any yeast and fungi. This analytical data could contribute the potential utilization of a blood byproduct for valuable compounds as a bioactive supplementary and ingredient in food or cosmetic products.

** This work was supported by Korea Institute of Planning and Evaluation for Technology in Food, Agriculture, Forestry and Fisheries (IPET), funded by Ministry of Agriculture, Food and Rural Affairs (MAFRA) (1545021966).

Keywords : whole blood, valuable amino acid, blood hydrolysate, blood byproduct, branched chain amino acid

References

1. Fu et al. Food Res. Int. 121, 28 (2019).
2. Zheng et al. BioMed Res. Int. 2013, 278927 (2013).

P0238 LC-MS/MS-based Metabolite Identification for the Protein Hydrolysates of Porcine Whole Blood and Its Application for the Microbial Culture Media

Seonghun KIM^{1,2}, Hoy Kon JEON¹

¹Jeonbuk Branch Institute, Korea Research Institute of Bioscience and Biotechnology (KRIBB), Jeongeup, Korea, ²Department of Biosystems and Bioengineering, KRIBB School of Biotechnology, University of Science and Technology(UST), Daejeon, Korea

Corresponding Author Email : seonghun@kribb.re.kr

Animal bloods are agricultural byproducts in meat processing industries. Although the tons of blood wastes is not utilized and disposed, it could be a potential bioresource for bioconversion into higher value products. In this study, we identified the metabolic compounds in the enzymatic hydrolysate of porcine whole blood for the application of microbial culture media. Porcine whole blood was hydrolyzed by endo- and exo-protease cocktails. After the enzymatic hydrolysis, the crude hydrolysate was formulated to dried powder form to analyze the content of soluble compounds. A total of 287 metabolites were identified through liquid chromatography-mass spectrometry/mass spectrometry (LC-MS) analysis under cationic and anionic modes. Overall, 82 metabolites, including the twenty essential amino acids, were quantitatively analyzed. Other metabolites involved in glycolysis/ glyconeogenesis, TCA cycle, amino acid biosynthesis, and glutamate metabolism were also detected in the enzymatic blood hydrolysate. Based on these analysis, the blood lysate was used as a nitrogen source in the culture media preparation for two GRAS strains, *Lactobacillus plantarum* and *Bacillus* sp. B-100. These bacteria showed the normal growth patterns in the culture media supplemented with the blood lysate. In addition, *Bacillus* sp. B-100 also displayed successfully its anti-fungal activities toward pathogenic fungi strains, *Hyphophora capsici*, *Colletotrichum gloeosporioides*, *Fusarium fujikuroi*, and *Cylindrocarpon destructans*, like the comparable bioactivities of the strain cultivated in the defined medium. This analytical data could contribute the potential utilization of a blood byproduct as the supplementary compounds in the microbial culture medium.

Acknowledgement: This work was supported by Korea Institute of Planning and Evaluation for Technology in Food, Agriculture, Forestry and Fisheries (IPET), funded by Ministry of Agriculture, Food and Rural Affairs (MAFRA)(1545021966)

Keywords : Porcine whole blood, LC-MS, Metabolite analysis, enzymatic blood hydrolysate, Microbial culture media, essential amino acids, GRAS strain, *Lactobacillus plantarum*, *Bacillus* sp., protease cocktail

References

1. Fu et al. Food Res. Int. 121, 28 (2019).
2. Zheng et al. BioMed Res. Int. 2013, 278927 (2013).

- 학술회의 발표-3. 2021 춘계대한약학회

[P-4] Effects of porcine whole blood protein hydrolysate on exercise function and skeletal muscle protein synthesis

Sun Woo Jin¹, Gi Ho Lee¹, Jin Song Park¹, Ji Yeon Kim¹, Chae Yeon Kim¹, Hye Gwang Jeong^{*1}

¹College of Pharmacy, Chungnam National University, Korea

*Corresponding author: hgieong@cnu.ac.kr

Presenting author: mpassword@cnu.ac.kr

There have been research trials to utilize the blood waste for bioresources by enzymatic hydrolyzing into valuable amino acids such as branched chain amino acid (BCAA). BCAA increase muscle mass or prevents muscle loss during weight loss. Recently, a marked increase in contents of BCAA from porcine whole blood protein hydrolysates (PWBPH) was observed, but the effects of PWBPH on exercise function and skeletal muscle protein synthesis remain unknown. In this study, we investigated whether PWBPH enhances physical activity and skeletal muscle function in ICR mice and mouse myoblast C2C12 cells. Supplementation with PWBPH (250, 500 mg/kg for 5 weeks) increased time to exhaustion in the treadmill and decreased blood markers of exercise-induced fatigue. PWBPH also induced the muscle weight (tibialis anterior and gastrocnemius) per body weight. Furthermore, PWBPH increased the synthesis of skeletal muscle proteins and promoted mTOR-dependent signaling pathway *in vivo* and *in vitro*. These results suggest that PWBPH enhances exercise function by ameliorating skeletal muscle protein synthesis.

Keywords : Exercise function, Porcine whole blood protein hydrolysates, Branched chain amino acid, Skeletal muscle synthesis

- 학술회의 발표-4. 2021 한국독성학회

Effect of porcine whole blood protein hydrolysate on slow-twitch muscle fibers expression and mitochondrial biogenesis by AMPK/SIRT1/PGC-1 α pathway

Ji-Yeon Kim, Gi-Ho Lee, Chae-Yeon Kim, Sun-Woo Jin, Hye-Gwang Jeong*

College of Pharmacy, Chungnam National University, Republic of Korea

Skeletal muscle, as a heterogeneous tissue, is composed of a large variety of functionally diverse fiber types. Slow-twitch type I muscle fibers contain a high concentration of mitochondria and mitochondrial biogenesis can drive muscle fiber type switch toward more slow fibers. Leucine, one of branched chain amino acid (BCAA), is known to regulate slow-twitch muscle fibers expression and mitochondrial function by Sirt1/AMPK signaling in porcine skeletal muscle satellite cells. Recently, a marked increase in contents of BCAA from porcine whole blood protein hydrolysates (PWBPH) was observed, but the effects of PWBPH on muscle fiber type conversion remain unknown. Supplementation with PWBPH (250, 500 mg/kg for 5 weeks) increased time to exhaustion in the forced swimming test and decreased blood markers of exercise-induced fatigue. PWBPH also promoted expression of slow muscle fiber markers (MyHC I, TNNI2 and TNNI3) and mitochondrial biogenesis makers (SIRT1, p-AMPK, and PGC-1 α) in ICR mice and mouse myoblast C2C12 cells. These results provide the evidence that PWBPH induces slow-twitch muscle fibers expression and improves mitochondrial function through AMPK/SIRT1/PGC-1 α signaling pathway.

Keyword: porcine whole blood protein hydrolysates, branched chain amino acid,

Funding Source:

Disclosure Statement : None of the authors have any conflicts of financial interest to declare.

자체평가의견서

1. 과제현황

		과제번호	120053-02		
사업구분	유용 농생명자원 산업화 기술개발 사업				
연구분야				과제구분	단위
사업명	유용 농생명자원 산업화 기술개발 사업				주관
총괄과제	기재하지 않음			총괄책임자	기재하지 않음
과제명	축산부산물을 활용한 고부가가치 제품 개발 - 동물혈액 단백질 효소분해 및 정제기술을 기반으로 한 천연 미생물·동물세포 배양소재 및 운동수행능이 우수한 소재의 개발			과제유형	(기초,응용,개발)
연구개발기관	(주)아미노랩			연구책임자	박해성
연구기간 연구개발비 (천원)	연차	기간	정부	민간	계
	1차년도	2020.04.29.~ 2020.12.31	226,000	75,334	301,334
	2차년도	2021.01.01.~2 021.12.31	302,000	100,667	402,667
	3차년도				
	4차년도				
	5차년도				
	계		528,000	176,001	704,001
참여기업	(주)아미노랩, 한국생명공학연구원, 충남대학교 산학협력단				
상대국			상대국연구개발기관		

※ 총 연구기간이 5차년도 이상인 경우 셀을 추가하여 작성 요망

2. 평가일 : 2022. 02. 11.

3. 평가자(연구책임자) :

소속	직위	성명
(주)아미노랩	대표이사	박해성

4. 평가자(연구책임자) 확인 :

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

확약	
----	--

I. 연구개발실적

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

1. 연구개발결과의 우수성/창의성

■ 등급 : 우수, 보통, 미흡, 극히불량)

- 연구개발 수행을 통해 환경을 위협하는 축산부산물 폐기물이었던 도축혈액을 고부가가치 제품화하여, 폐기에 따른 부담 등 사회적 비용을 절감하였고, 다양한 활용방안을 제시하였음

2. 연구개발결과의 파급효과

■ 등급 : 우수, 보통, 미흡, 극히불량)

- 저부가가치 재활용에 머물렀던 국내 축산혈액자원화 연구의 한계를 식품소재 및 배양소재 등 고부가가치 제품화로 극복하고자 하였음
- 재활용에 의한 2차 폐기물에 대한 다양한 2차재활용 방법론을 통해 친환경 자원화를 실현하였음
- 축산부산물의 생명자원화기술을 통해 폐기처리비용 절감하고 환경 위해요소를 경감하였음
- 윤리적 이슈가 있는 소태아혈청 활용한 배지원료를 대체하여 경제적 가치에 윤리적 가치도 부여하였음

3. 연구개발결과에 대한 활용가능성

■ 등급 : 우수, 보통, 미흡, 극히불량)

- 축산혈액단백질을 효소분해하여 소재화하여 배양소재와 식품소재 외에도 반려동물 사료첨가제와 화장품 소재 등 다양한 분야로 활용이 가능함
- 운동수행능평가결과를 바탕으로 근감소예방물질 건강기능성 식품소재로서 고도화하여 부가가치를 높이고자 함

4. 연구개발 수행노력의 성실도

■ 등급 : 우수, 보통, 미흡, 극히불량)

- 연구개발 수행을 통해 목표대비 특허출원 2건, 기술실시 1건, 제품화 1건, 품종등록 1건, 석박사급 인력양성 2건을 포함하여 고용창출 9건(누적성과)을 초과 달성하였고, 기관투자사로부터 투자유치 1건을 달성하였음

5. 공개발표된 연구개발성과(논문, 지적소유권, 발표회 개최 등)

■ 등급 : 우수, 보통, 미흡, 극히불량)

- 연구개발 수행을 통해 SCI급 논문 4편 제출과 특허 4건 출원 및 1건을 등록하였고, 학술발표 4회를 진행하는 성과를 달성하였음

II. 연구목표 달성도

1. 성능 지표 및 달성도

세부연구목표 (연구계획서상의 목표)	비중 (%)	달성도 (%)	자체평가
16종 이상의 아미노산을 함유한 동물혈액 효소분해물	10	100	• 20종의 아미노산 검출로 초과 달성
동물혈액 아미노산 분리 정제기술 확립	5	100	• 혈장 분리 • 탈색·탈취 공정 확립 • 여과 정제 공정 확립
시제품 제작 1건	15	100	• 시제품 제작 2건으로 초과 달성
미생물 배지 조건 확립	15	100	• Lactobacillus와 Bacillus strains 2종을 이용한 배지 성능 시험
동물 세포 배지 조건 확립	20	100	• CHO-S 와 Skin fibroblasts 2종 세포주에 대해 배지 성능 시험
동물의 운동수행능력 영향 평가	20	100	• 탈진수영운동 테스트 • 탈진 트레드밀 운동 테스트 • 대조군대비 10%상승
동물의 혈중 피로물질 평가	15	100	• 혈중 피로물질 평가 • 대조군대비 10%감소
합계	100점		

2. 정량적 성과 목표 및 실적

세부연구목표 (연구계획서상의 목표)	비중 (%)	달성도 (%)	자체평가
특허 출원 2건	20	200	• 4건의 특허 출원으로 초과 달성
특허 등록 1건	20	100	• 1건의 특허 등록 완료
기술실시 1건	10	200	• 2건의 기술실시로 초과 달성
제품화 1건	30	200	• 2건의 제품화로 초과 달성
매출액 100백만원	0	1	• 당초 목표로 한 100백만원에서 미달
고용창출 2건	20	550	• 11건의 고용창출로 초과 달성
논문 4건	0	100	• 4건의 논문 게재 완료
학술발표 4건	0	100	• 4건의 학술발표 완료
인력양성 2건	0	100	• 2건의 인력양성 완료
합계	100점		

III. 종합의견

1. 연구개발결과에 대한 종합의견

- 성과목표 중 매출액을 제외한 모든 항목에서 목표달성 내지 목표를 초과달성하였으며, 향후 지속적인 연구개발 및 공정보완을 통해 원가를 절감하고 품질을 높일 것임

2. 평가시 고려할 사항 또는 요구사항

해당없음

3. 연구결과의 활용방안 및 향후조치에 대한 의견

- 양산설비를 구축하고 다양한 분야의 제품화를 통해 안정적인 사업화에 매진하고자 하며 수입대체 외에도 자원화기술시스템 및 활용제품의 수출성과와 고용창출을 확대할 것임
- 식품, 배양소재 및 화장품소재 등 다양한 분야에서의 사업화를 위한 추가적인 연구개발을 지속할 것이며 이에따라 특허출원 등 지식재산화할 것임
- 본 연구개발결과물 및 연구경험을 통해 취득한 논문, 보고서, 문헌조사 등 모든 자료는 향후 면역증강, 근감소예방, 탈모예방 등 다양한 기능을 확보하기 위한 연구 또는 건강기능식품의 기능성원료화를 위한 신청자료로 활용할 것임
- 부산물의 재활용에 있어 단순 처리 관점 또는 제품의 부가가치만 높이는 기술이 아닌, 친환경적인 기술적 해결방법론과 더불어 윤리적인 문제해결에도 노력할 것임

IV. 보안성 검토

해당없음

※ 보안성이 필요하다고 판단되는 경우 작성함.

1. 연구책임자의 의견

- 연구개발 결과물은 필요에 따라 일정부분 사내 연구인력들과 공유할 것이며 전체 개발결과물은 기술임치할 것임

2. 연구개발기관 자체의 검토결과

- 기업부설연구소의 신축이전에 따라 출입보안시스템과 사내 보안규칙을 강화할 필요가 있음

연구성과 활용계획서

1. 연구과제 개요

사업추진형태	<input type="checkbox"/> 자유응모과제 <input type="checkbox"/> 지정공모과제	분 야		
연구과제명	축산부산물을 활용한 고부가가치 제품 개발 - 동물혈액 단백질 효소분해 및 정제기술을 기반으로한 천연 미생물·동물세포 배양소재 및 운동수행능이 우수한 소재의 개발			
주관연구개발기관	(주)아미노랩		주관연구책임자	박해성
연구개발비	정부지원 연구개발비	기관부담연구개발비	기타	총연구개발비
	528,000	176,001		704,001
연구개발기간	2020.04.29.~2021.12.31			
주요활용유형	<input checked="" type="checkbox"/> 산업체이전 <input type="checkbox"/> 교육 및 지도 <input type="checkbox"/> 정책자료 <input type="checkbox"/> 기타() <input type="checkbox"/> 미활용 (사유:)			

2. 연구목표 대비 결과

당초목표	당초연구목표 대비 연구결과
① 단백질 효소분해 기술을 확립한 동물혈액의 정제기술 확립 및 소재 상품화	동물혈액의 효소분해 및 정제 기술 확립 완료 효소분해 기술을 적용한 동물혈액 소재의 상품화 완료
② 동물혈액의 단백질 효소분해물을 활용한 고부가 미생물 및 동물세포 배양 배지 소재 개발	고부가가치 미생물 및 동물세포 배양 배지 소재 개발 완료
③ 동물혈액 단백질 효소분해물로 제조된 최종 기능성 조성물(시제품)을 섭취한 동물의 운동수행능력 영향 평가 (in vivo)	최종 기능성 조성물(시제품)을 섭취한 동물의 운동수행능력 영향 평가 (in vivo) 완료

* 결과에 대한 의견 첨부 가능

3. 연구목표 대비 성과

(단위 : 건수, 백만원, 명)

성과 목표	사업화지표										연구기반지표									
	지식 재산권				기술 실시 (이전)		사업화				기술 인증	학술성과			교육 지도	인력 양성	정책 활용·홍보		기타 (타연구활용액) (백만원)	
	특허출원	특허등록	품종등록	S M A R T 평가인증	건수	기술료	제품화	매출액	수출액	고용 창출		투자유치	논문				학술 발표	정책 활용		홍보 전시
													S C I	비 S C I						
단위	건	건	건	건	건	백만원	건	백만원	백만원	명	백만원	건	건	건	명	건	건			
가중치	20	20			10		30			20										
최종 목표	2	1			1		1	100		2		2	2	4	2					
당해 년도 목표																				

실적	4	1			2		2	1		2			2	2		4		2		
달성률 (%)	200	100			200		200	1		550			100	100		100		100		

4. 핵심기술

구분	핵심기술명
①	동물혈액의 효소분해 및 정제 기술
②	동물혈액의 효소분해 및 정제를 통한 배지 및 식품소재화 기술
③	

5. 연구결과별 기술적 수준

구분	핵심기술 수준					기술의 활용유형(복수표기 가능)					
	세계 최초	국내 최초	외국기술 복	외국기술 소화·흡수	외국기술 개선·개량	특허 출원	산업체이전 (상품화)	현장애로 해	결	정책 자료	기타
①의 기술		√				√					
②의 기술		√				√	√				
③의 기술											
·											
·											

* 각 해당란에 v 표시

6. 각 연구결과별 구체적 활용계획

핵심기술명	핵심기술별 연구결과활용계획 및 기대효과
①의 기술	개발기술을 활용하여 양산설비를 설계 및 구축하고, 양산경험을 통해 기술을 고도화하여 고부가가치 혈액자원화기술 기반 설비시스템을 수출 등 사업화할 것임
②의 기술	개발기술을 활용하여 배지원료 및 식품소재로 제품화하였으며 향후 근육감소에방 또는 면역증강용 등 건강기능성식품의 원료로 업그레이드할 것임
③의 기술	

7. 연구종료 후 성과창출 계획

(단위 : 건수, 백만원, 명)

성과 목표	사업화지표										연구기반지표									
	지식 재산권				기술 실시 (이전)		사업화				기술인증	학술성과			교육지도	인력양성	정책 활용·홍보		기타 (타연구활용액)(이)	
	특허출원	특허등록	품종등록	S M A R T 평점(10점)	건수	기술료	제품화	매출액	수출액	고용창출		투자유치	논문				학술발표	정책 활용		홍보 전시
													SCI	비SCI						
단위	건	건	건	평점	건	백만원	건	백만원	백만원	명	백만원	건	건	건	명	건	건			
가중치																				
최종목표	2	1			1		1	100		2		2	2		4		2			

연구기간내 달성실적	4	1	1		2		2	1		2	1,500		2	2		4		2		2
연구종료후 성과장출 계획	3	2			2		3	5,000		8			1							2

8. 연구결과의 기술이전조건(산업체이전 및 상품화연구결과에 한함)

핵심기술명 ¹⁾	동물혈액의 효소분해 및 정제 기술		
이전형태	<input checked="" type="checkbox"/> 무상 <input checked="" type="checkbox"/> 유상	기술료 예정액	천원
이전방식 ²⁾	<input type="checkbox"/> 소유권이전 <input type="checkbox"/> 전용실시권 <input type="checkbox"/> 통상실시권 <input checked="" type="checkbox"/> 협의결정 <input type="checkbox"/> 기타()		
이전소요기간	12개월	실용화예상시기 ³⁾	2022년
기술이전시 선행조건 ⁴⁾	협의 후 결정		

핵심기술명 ¹⁾	동물혈액의 효소분해 및 정제를 통한 배지 및 식품소재화 기술		
이전형태	<input checked="" type="checkbox"/> 무상 <input checked="" type="checkbox"/> 유상	기술료 예정액	천원
이전방식 ²⁾	<input type="checkbox"/> 소유권이전 <input type="checkbox"/> 전용실시권 <input type="checkbox"/> 통상실시권 <input checked="" type="checkbox"/> 협의결정 <input type="checkbox"/> 기타()		
이전소요기간	6개월	실용화예상시기 ³⁾	2022년 상반기
기술이전시 선행조건 ⁴⁾	협의 후 결정		

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

주 의

1. 이 보고서는 농림축산식품부에서 시행한 유용 농생명자원 산업화 기술개발사업의 연구보고서입니다.
2. 이 보고서 내용을 발표하는 때에는 반드시 농림축산식품부에서 시행한 유용 농생명자원 산업화 기술개발사업의 연구결과임을 밝혀야 합니다.
3. 국가과학기술 기밀 유지에 필요한 내용은 대외적으로 발표 또는 공개하여서는 안 됩니다.