

발간등록번호

11-1541000-001324-01

과제번호(109116-3)

영유아식내 유해병원균 사멸형 NANA

대량생산제법개발 및 제품적용

(Developing the mass production ability of a type of perishing harmful germs in part of infant and toddler foods and the production application)

GMP로부터 N-Acetylneuraminic acid(NANA) 생산을 위한 Neuraminidase 개발 및 NANA 생산기술 개발

(From GMP, Developing Neuraminidase for N-Acetylneuraminic acid(NANA) production and NANA production technique)

매일유업(주) 중앙연구소

농림수산식품부

제 출 문

농림수산식품부 장관 귀하

이 보고서를 “영유아식내 유해병원균 사멸형 NANA대량생산 제법개발 및 제품적용” 과제(세부과제 “GMP로부터 N-Acetylneuraminic acid(NANA) 생산을 위한 Neuraminidase의 개발 및 NANA 생산기술 개발”)의 보고서로 제출합니다.

2012년 04월 10일

주관연구기관명 : 매일유업(주) 중앙연구소

주관연구책임자 : 김 희 경

세부연구책임자 : 최 유 영

연 구 원 : 김 재 홍

연 구 원 : 김 성 진

연 구 원 : 신 호 재

연 구 원 : 김 영 진

연 구 원 : 전 지 영

협동연구기관명 : 경상대학교 미생물학과

협동연구책임자 : 신 용 철

연 구 원 : 조 수 정

연 구 원 : 심 희 연

요 약 문

I. 제 목

영유아식내 유해병원균 사멸형 NANA대량생산 제법개발 및 제품적용(협동연구기관 : GMP로부터 N-Acetylneuraminic acid(NANA)생산을 위한 Neuraminidase의 개발 및 NANA 생산기술 개발)

II. 연구개발의 목적 및 필요성

1. 연구개발의 목적

본 과제에서는 우유내 존재하는 미이용 자원인 NANA가 보유한 다중 기능성증 항균성에 주목하고, 경제성이 확보되도록 대량생산시스템을 구축 및 산업적으로 생산한 NANA 소재에 대한 동물임상(안전성 평가) 절차를 수행한 후, 최종적으로 영·유아 식품내 감염되어 공중보건학적 피해를 유발하는 병원균(*E. sakazakii* 및 *B. cereus*) 제어형 고부가 제품으로 개발코져 하였다.

2. 연구개발의 필요성

Gram 양성균인(*Bacillus cereus*, 증상 : 설사, 구토, 복통)와 Gram음성균인(*Enterobacter sakazakii*, 증상 : 신생아 뇌수막염)은 영·유아 및 노약자에게 피해를 일으키는 국내외적 법적규제항목 균(*B. cereus* : 100cfu/100g이내 규제, *E. sakazakii* : 불검출)이며, 영유아 및 노인식에서는 특별 관리대상 병원균이다.

2006년부터 2007년 국내에서 발생하였던 두 병원균 영유아식 감염사태로 유아용 조제분유는 500억(1개사, 1품목 기준), 이유식은 15억(1개사, 1품목 기준)으로 약 550억의 손해(1개사 기준)가 발생하였다고 추정되고 있으며, 유형 및 무형적인 부분에서 식품업계의 손실에 대한 평가는 상상을 할 수 없다.

현재 유업계를 포함한 식품업계는 영·유아 식품내에서 상기 두 병원균이 검출될 시, 조치사항으로는 1차적으로 해당 제품의 단산과 2차적으로는 전량 제품 수거 및 해결 방향을 모색하는 수준이며, 현재는 제조상 열처리 공정과 더불어 2차 오염을 예방하는 단순처리방법이외는 뾰족한 해결방법이 없는 실정이다.

또한, 영유아식품은 병원균을 예방하기 위한 소재(합성제제, 항생제 및 방부제 등)는 첨가자체가 일체 불허되는 특성(법적규제)을 보유하고 있다.

우유는 특성상 항균소재(항생제 제외)를 첨가하는 경우, 우유고유 구성물질(유단백질, 유지방, 탄수화물 등)들과 즉각적인 킬레이팅 반응 유발효과가 발생, 소재 고유의 항균능력을 무력화 시키는 특성을 보유함에 따라 이를 해결할 수 있는 천연항균소재의 개발에 대한 국내외적 연구가 활발히 진행되고 있다.

본 과제에서는 이러한 상기사항을 해결하는 방안으로 유단백질내 존재하는 당단백질인 시알산(Sialic acid=N-Acetylneuraminic acid=NANA, 이하 NANA)에 주목하였는데, 미이용 소재이면서 추후 경제성만 확보된다면 상용화에 있어 국내외적으로 “글라이코믹스 및 탄수화물 의약품”의 개발 경쟁과 관련, 가장 중요한 소재로 대두될 수 있다고 판단되었다.

본 연구과제와 관련 NANA는 다양한 고유특성(항바이러스작용, 항암작용, 항염증억제작용, 세균감염방어 및 억제기작 보유, 면역증강 능력, 신경신호전달 및 피부색소 침착억제효과 등)을 보유하고 있다고 알려지고 있음을 주목하였는데, 현재 국내외적으로 사용(대부분이 의료용)되고 있는 NANA는 대장균의 유전자 재조합에 따른 미생물 생성물과 합성제품이 주종을 이루고 있음에 따라 식품에 광범위하게 적용하기 위해서는 안전성 등의 해결하여야 할 문제가 많은 실정이다.

현재, NANA의 국제 시장 가격은 10,000~16,000\$(1\$: 1,000원 기준)/Kg으로 형성되어 있으며 대부분은 중국산(JK Biotech사)이 시장을 장악하고 있는 실정이고, 일부 특수 병원영양식에 적용되고 있으나 일반 식품에 대한 적용사례는 없다.

이는 안전성을 확보(용도용법 확대)하기 위한 글라이코믹스 연구개발[식물의 물질 대사를 이용한 NANA생산(Nature Biotech., 21권, 12호, 1470-1471), 당사슬 리모델링(유럽 EURO Card DB), Bacterial Polysaccharide, Glycoconjugate 및 Carbohydrate 합성 등]이 국내외 연구자들에 의하여 다각도로 진행되고 있다.

본 과제와 관련될 수 있는 단백질 의약품 세계시장(당단백질 의약품이 단백질 시장의 60%점유)은 '06년 474억\$에서 2011년에는 557억달러로 점차적인 증가가 예상(근거 : 글라이코믹스 및 탄수화물 의약품, 국가생명공학정책연구센터, 총서 제39권, 2007.)되고 있으며, 이에 따라 국내도 2005년부터 “Glycomics를 이용한 차세대의약품 개발사업(총사업비 :100.5억원)”이 시작되었으나 기초단계로 진행되고 있다.

당단백질 의약품은 미생물의 유전자 재조합 부산물(호르몬, 사이토카인, 효소 및 효소조절인자, 성장인자, 혈액응고인자, 단클론항체)에 대한 사용 규제(허가 가이드라인 설정 중)에 대한 것이고, 본 과제와 관련된 유단백질 기원성 항균소재와 관련 항목은 현재 없다(근거 : 당단백질의약품의 당구조 분석 및 시험법 길라잡이, 식약청, 2007.).

국내외적 “글라이코믹스 및 탄수화물 의약품 연구개발” 과정과 동일선상의 연구개

발이라 할 수 있으며, 따라서 본 과제는 우유유래의 다기능성을 보유한 천연 항균성 소재개발결과(기초연구)를 영·유아식품에 일련되게 바로 적용(실용화)하는 현장애로 해결과 국제기술우위를 선점하는 대안을 동시에 확보한다 할 수 있다.

주관연구기관과 협동기관은 유제품과 효소 연구개발 및 생산에 관하여 충분한 KNOW-HOW와 인적구성 및 시설장비를 보유하고 있는 전문회사로서, 천연 NANA를 분리하기 위한 유단백질의 목적원료(분유)내 대량 생산이 가능하고, 본 과제는 병원성 및 일반세균에 대한 제품안전에 대한 대안을 어떻게라도 찾아야 한다는 데에는 상호 충분히 공감하고 이에 대한 이견은 없다.

현재, 국내외 식품에 대한 소비자의 요구성을 살펴보면, 가격은 식품으로, 품질 및 기능성은 의약품 수준으로 요구하고 있는 바, 본 과제에서 개발될 소재는 여기에 적합하다 할 수 있으며, 국내외 시장 점유율 신장에 있어 우위를 점유할 수 있을 첨단 핵심기술인으로 예상된다.

따라서, 상기 필요성에 충족될 수 있도록 영·유아식품내 고질적인 병원성 세균에 대하여 항균능력(경제성 확보)을 보유한 유단백질 기원성 천연Bacteriocin(NANA)를 분리정제(협동기관) 및 대량생산(주관기관)과 이를 제품적용 생산이라는 일관된 시스템을 적용하므로서, 국제기술력(글라이코믹스 연구개발 분야) 우위선점과 산업화가 담보된 최종 안전 영·유아식품 개발 및 추후 용도용법 확대를 위한 제품개발과 더불어 용도용법 확대를 위한 기초자료를 확보하고 저 하였다.

III. 연구개발 내용 및 범위

1. NANA소재개발 기초자료 조사 및 필수분석법 정립

- 가. NANA소재개발 및 제품화 관련 기초자료 조사
- 나. NANA개발간 필수분석법 정립

2. NANA생산용 Neuraminidase 효소생산 및 NANA 대량생산시스템 정립

- 가. NANA 및Neuraminidase Assay기법 정립
- 나. 기존상업용 효소내 Neuraminidase스크리닝 기법 정립
- 다. 식품용 미생물로부터 Neuraminidase스크리닝 정립
- 라. 선발 식품미생물 적용 Neuraminidase분리정제 및 특성연구
- 마. 개발 Neuraminidase적용 유단백질(GMP)내 NANA 최적 생산조건 확립
- 바. NANA 분리효소 및 NANA대량생산기법(경제성 평가 포함)정립

3. 목적 유해세균에 대한 항균메카니즘 구명 및 제품적용성 평가
 - 가. 현장적용 조건대비 물리/이화학적 변화 사전평가
 - 나. 항균(유해미생물 대상)스펙트럼 사전평가
 - 다. 개발 NANA의 항균 스펙트럼 및 항균메카니즘
 - 라. NANA유래 내성형성 및 항생제 내성 보유균에 대한 항균효과 평가

4. 장단기 물리/이화학적/생물학적 변화 조사
 - 가. NANA제제의 열안정성 평가
 - 나. 장단기(최대 1년), 성상별[분말 및 액상] 및 보관조건별(상온, 냉장)에 따른 안정성 연계 평가[물리이화학적 및 항균성(생물학적) 변화]
 - 다. 제품적용 방향성 설정(액상제품 첨가형 및 분말제품 첨가형 구분)

5. 개발 NANA의 동물임상평가(안전성 및 기초효능)
 - 가. MIC설정(동물임상)을 위한 사전 안전성(*in vitro* : Cell-line 활용)평가
 - 나. 방사선생물학 기법을 적용한 NANA의 생체전이메카니즘 구명
 - 다. NANA제제의 장단기 섭취를 통한 동물 안전성 평가

6. 영·유아식내 유해세균 제어형 제품 레시피 정립
 - 가. 항균효과 보유 첨가량 및 항균간섭요인 구명
 - 나. 제품화 관련 최적 제형(TYPE)별 레시피 정립
 - 타정(정제)형 및 액상제제 적용형 분산(과립)형 구분
 - 다. 제형 레시피별 용도·용법(응용성)확대방안 정립

7. 사업화(단계별 로드맵 구축 및 진행)
 - 가. 1단계 : 지적소유권 확보(특허 출원 및 등록)후 학술발표
 - 나. 2단계 : 관련기관(식약청, 수과원) 기술컨설팅 실시
 - 다. 3단계 : GLP검정(천연물신약 분야 : 천연항균제)
 - 라. 4단계 : NANA대량생산시스템 및 사업화 로드맵 설정
 - 1) 연간 NANA생산량, 연간 예상판매액, 생산시설구축 소요예산 및 소요대지 평가
 - 2) 시설디자인 예정(주관기관 승인후)
 - 마. 5단계 : 홍보 및 마케팅실시(종료후 3년 소요예산)

IV. 연구개발결과

1. 신규소재 개발에 따른 필수 분석법 정립

본 연구는 신규한 소재개발과 관련된 것으로서, 원료 유단백질로부터 NANA제조 전후의 분석방법 확립을 통하여 개발제제의 안전성 및 특성을 명확하게 구명할 필요가 있다. 즉, 개발간 필요에 따라 영양성분(단백질, 지방, 탄수화물등) 분석, 목적 개발제제인 NANA의 장단기 보관, 내열, 내산 및 내염기조건 확인을 위한 물리이화학적 물성(분자량 등) 분석조건을 정립하였다. 그리고 목적유해균에 대한 NANA 항균성 평가와 더불어 항균성 저하와 관련되는 킬레이팅 등의 간섭효과 및 제품 적용성 확보, 유해미생물 제어효율 검정 및 NANA소재의 동물안전성 평가시에 장내미생물총 변화를 확인하기 위한 미생물 검사 및 동정법 등을 일관되게 정립하였다.

2 Neuraminidase(NANA생산효소)생산 및 대량생산시스템 정립

가. 현재 영유아식품(조제분유 및 이유식 등)내 감염되어 공중보건학적인 피해를 일으키고 있으나 뚜렷한 대책이 없는, 고질적인 병원성 세균(*Bacillus cereus*, *Enterobacter sakazakii*)에 대하여, 항균능력(경제성 확보)을 보유한 유단백질(GMP)을 원료로 기원성 천연 항균제로서 NANA를 개발하였다.

나. 기질인 유단백질에서 NANA를 효소적 처리법으로 분리하기 위한 효소인 Neuraminidase는 식품첨가물로 등재되어 있는 식품미생물중 *Arthrobacter ureafaciens*를 선발하고, 대량생산시스템조건에서 효소생산 및 이를 적용한 NANA 대량생산시스템 정립을 일련의 시스템으로 완료하였다. 시작품에 대한 결과는 다음과 같다.

다. 결과

- 1) 경제성이 확보되는 분해효소를 생산하기 위하여 상업효소(17종), 식품첨가물로 등재된 식품미생물을 수거하여 이들에 대하여 Neuraminidase를 스크리닝 과정을 실시하였다. 결과로서, *Arthrobacter ureafaciens*를 Neuraminidase생산 유효균으로 선발하였다.
- 2) 기질 GMP내 NANA 생산을 위해 선발된 *Arthrobacter ureafaciens*를 대상으로 실험실적 반응조건 등 NANA생산조건을 정립하였다.
- 3) 효소와 NANA의 대량생산시스템 정립을 위하여, 효소생산(3톤 반응조) 및 이를 이용한 NANA 생산(10톤, 기질GMP 대비 효소첨가량 1% 기준)을 위한 효소생산 및 NANA생산성을 검정하였다. 결과는 다음과 같다.

가) 반응조내 최종 효소생산성은 0.16unit/ml였는데, 이때 총 432,000unit의

Neuraminidase가 생산되었다($p < 0.05$).

- 나) 기질인 GMP 1g을 효소분해시켜 NANA를 생산하기 위한 Neuraminidase 효소 역가치는 0.5unit/g(GMP)였다($p < 0.05$).
- 다) Neuraminidase 432,000unit를 적용시, GMP(NANA 4% 함유)는 864Kg을 분해 시킬 수 있었으며, 이때 NANA생산량(100%순도 기준)은 25.9Kg였다.
- 라) 100%순도 NANA를 생산시, Neuraminidase비용은 386,100원/Kg, 25%의 경우는 96,525원/Kg이 소요되었다.
- 마) 개발 Neuraminidase 효소를 적용한 유단백질 GMP(NANA 4%)로부터 생산된 NANA(순도 25% 기준)의 생산량은 GMP 1Kg당 99g(동결건조)였고, 이때 생산수율은 63%였다. 이는 기질로서 GMP내 NANA함유량이 4%임을 감안하면 Neuraminidase에 의해 분해되는 NANA의 이론치 생산수율은 75%임에 비교하여 실제 생산수율은 63%였다. 이는 분해반응공정(침전물 제거시) 약 8%, 에탄올 침전물 제거 공정시 액 33%가 손실됨으로 인한 것이었다. 이를 감안하고 순도 25% 기준으로 1Kg NANA의 생산가는 674,471원(생산비용 125,000원/Kg 포함)이었다.
- 바) 대량생산을 위한 공정소요시간으로서 Neuraminidase 생산소요시간은 18시간, NANA는 112시간(동결건조 시간 제외)으로 총 130시간이 소요되었다.
- 사) NANA생산수율(63%)증가를 위한 방법을 검정한 결과, 분해반응공정단계에서는 침전물 회수 및 물세척 회수공정, 에탄올 침전물 제거공정에서 에탄올첨가량 최적화후 필터프레스 또는 원심분리공정을 거쳐 수율을 최대 73%까지 증대하였다($p < 0.05$).
- 아) 결론적으로, 잉여 미이용 자원인 유청단백질에서 분리한 유단백질(GMP)로부터 NANA생산을 위한 효소(Neuraminidase)생산용 미생물(식품첨가 미생물) 확보, 이를 이용한 3~10톤 규모의 Neuraminidase 대량생산 및 생산된 Neuraminidase를 이용한 10톤 규모의 NANA대량 생산시스템을 일련되게 정립하였다.

3. 목적 유해균에 대한 항균스펙트럼 효과

배지로서 생리적 식염수와 우유내 구별하고, 세균종류별로 각각 감염 시킨후 개발 NANA를 농도별 첨가한 후, 이어서 공시세균별, NANA처리 농도별 및 시간경과에 따른 항균성 더불어 항균저하에 관계하는 간섭요인 등을 병행하여 검정하여 보았다. 결과는 다음과 같다.

- 가. NANA제제는 그람음성균에 대하여는 사멸효과를 보였으나, 그람양성균에 대하여는 사멸효과 보다는 정균효과를 보이는 경향의 항균효과를 보였다($P < 0.01$).
- 나. 생육저지농도(MIC)를 비교하여 본 결과, MIC는 2.5~5ppm범위였으며 역시 그람음성균의 MIC수치가 낮게 나타나는 경향을 보였다($P < 0.01$).
- 다. 대조배지로서 생리적식염수를 비교실험구로서 멸균유에 공시균을 감염시킨후 동일농도의 NANA를 처리 후 항균성을 비교하여 보았더니, 유의한 차이가 인정되지 않았다. 이는 NANA제제가 우유내 여러인자(단백질류, 지방류, 탄수화물류, 미네랄류, 효소류 등)와 간섭반응이 일어나지 않는 소재임이 확인되었다($P < 0.01$). 사전예비시험에서, 생리적 식염수에서 항균성이 인정된 키토산이 멸균유내에서는 첨가농도에 비례하여 우유단백질과 결합되어 침전현상이 발생되면서역시 항균성도 소실되었는데, 이와 비교할 때 NANA소재는 우수한 항균소재임이 확인되었다($P < 0.01$).
- 라. NANA처리농도 대비 항균성과 관련된 시간을 비교하여 보았더니, 농도와 시간은 비례적 결과를 보였는데, 0.5% (w/w)NANA 농도를 기준으로 3분이내에 99%이상의 항균효과를 보였다($P < 0.05$)
4. 유산균에 대한 항균효과를 유해균과 동일한 과정으로 검정하여 보았더니, 공시 유해균과 유사한 항균결과를 보였다. 즉, 생리식염수 및 멸균유 조건에서 NANA농도가 1.0%이상 첨가시 1시간이후부터 20%로 유산균의 급격한 감소가 이루어지고 16시간이 경과시는 생존 콜로니는 검출되지 않았다.
5. 유해세균에 대하여, 37종의 항균제를 대상으로 먼저 내성여부보유여부를 확인한 후 NANA제제를 처리시 항균성을 검정한 결과, 내성보유균에 대하여도 유의한 항균제임이 확인되었다($P < 0.01$)
6. 유해세균(*E.coli* O157:H7)만을 대상으로, NANA를 동일농도(0.25%)로 처리조건에서 1세대에서 생존한 콜로니를 채취한 후, 이를 10세대동안 반복처리시 항균차이를 비교함으로써 NANA로 기인한 내성이 유발되는지를 검정결과에서, 전체세대에서 항균성 차이는 인정되지 않았다. 따라서, NANA기안성 내성은 유발되지 않는 것으로 인정되었다($P < 0.01$).
7. NANA이 항균성 관여하는 항균메카니즘을 검정하여 보았더니, NANA는 세포막에 직접적으로 lysis 또는 damage를 주지 않았다. 그러나, MIC농도이상에서 세포 내

부유입이 극대화됨으로 인하여 이차적으로 삼투압현상을 교란을 시켜, 최종적으로 세포막을 파괴시킴으로 인한 항균성을 나타내는 메카니즘을 갖고 있는 것으로 파악되었다($P < 0.05$)

8. 개발NANA소재의 제품적용성 평가

NANA소재개발의 최종목표가 천연항균제로서 고부가 제품개발임에 따라 제품화를 위한 주요항목별 평가를 실시하였다. 평가항목으로서는 내열성, 보관조건별(상온 및 냉장), 기간별(최초 대비 7일, 37일 및 10개월)로 구분하여 제품화를 위한 적용성 평가를 실시하였다.

결과로서, NANA소재를 천연항균제로서 사용에 있어 액상제형보다는 고상제형이 적절함을 알 수 있었다. 따라서, 생산 NANA소재는 제품화 원료시는 분말 혹은 고상제형이 적절함을 알 수 있었으며($P < 0.01$), 제품적용성 평가를 종합하여 최종적으로 제품화 제형은 액상첨가형(과립형)과 섭취형(정제형)로 구분 제조레시피를 정립하므로써 제품 상용성을 극대화 하였다.

개발NANA소재의 세부항목별 제품적용성 평가결과는 다음과 같다.

가. 1% 농도로 조성한 NANA는 두개의 분자량[저분자 : 37.4min.(85%), 고분자 : 37.5min.(15%)을 보유하는 패턴을 보유하고 있었다(FPLC분석).

나. 보관(상온 및 냉장)조건에 따른 물성변화 조사 결과

- 1) NANA소재는 상온보관 조건에서 시간이 경과하면 할수록(2일 이상), 갈변화 현상과 침전 및 부착현상이 심하게 진행되었다. 이 경우 NANA는 고분자량 분포대가 15%에서 72%증가하였는데, 동시에 저분자량 분포는 85%에서 오히려 28%대 감소하는 패턴을 보이는 물성변화가 발생하였다($P < 0.01$).
- 2) 냉장보관시, 단기간(30일이내)에서는 갈변화 및 분자량 변화등 물성변화는 발생하지 않았으나, 이후 시간이 경과하면 경시적인 변화는 발생하는 것으로 파악되었다($P < 0.05$).
- 3) 상온 및 냉장보관 조건에서 기간경과에 따른 항균성 저감여부를 확인하여 보았더니, 차이가 인정되지 않았다. 따라서, 보관조건과 시간경과에 따른 물성변화가 항균성 저하에 미치는 효과는 없는 것으로 인정되었다($P < 0.01$).
- 4) 결론적으로, NANA소재는 제품적용에 있어 항균성을 제외한 성상변화를 기준으로 평가한다면 액상보다는 고상제품에 보다 적합함을 확인하였다. 그러나, 액상에

적용시는 첨가후, 냉장보관조건에서 30일 이내에 소진하는 조건을 반드시 준수하여야 할 것으로 판단되었다(P<0.01).

다. NANA소재의 내열성 및 항균성에 미치는 영향조사

1) NANA소재에 대한 내열성 평가를 위하여, 대조구 대비 비열처리구 및 열처리구 (75℃, 90℃ 및 121℃)로 구분 분자량 및 물성변화를 검정하여 보았다.

결론으로, NANA소재는 온도조건이 높을수록 갈변화 현상과 고분자량 분포대 (RT : 37.5min.)로 이동하는 패턴 또한 매우 빠른 것으로 조사되어 NANA소재는 열안전성은 인정되지 않았다(P<0.01).

2) NANA소재에 대한 내열처리가 항균성 저하에 미치는 영향이 있는지를 검토하여 본 결과, 균 종류에 따라 항균효과는 다소 차이가 있었으나, 전체적으로는 열처리 및 비열처리조건에서 항균성 차이는 나타나지 않았다(P<0.01).

3) 결론적으로, NANA소재의 기본구성 분자량은 저분자와 고분자로 구성되어 있는데, 온도와 보관조건의 차이에 따라 분자량 변화(고분자대로 이동)와 동시에 갈변화 현상이 발생하는 패턴을 보였지만, 이러한 물성변화가 항균성 저하 효과와는 무관한 것으로 인정되었다(P<0.05).

9. NANA의 내산 및 내염기성 평가

산성(HCl, Acetic acid, H₂SO₄, HNO₃) 및 염기성(NaOH) 시료를 농도별로 희석한 후 동일농도의 NANA를 첨가 한 후 시간경과시 NANA의 분자량 변화패턴을 조사함으로써 NANA의 내산 및 내염기성을 평가하여 보았다.

결과로서, NANA소재는 내알카리성은 다소 안정되었으나, 산성조건에서는 NANA소재의 고유분자량이 붕괴되는 패턴을 보여 내산성은 인정되지 않았다(P<0.01). 그러나, 경과시간이 길면 길수록 알카리 조건에서도 동일하게 분자량이 변하는 패턴을 보였다.

10. 개발NANA소재의 제품화 레시피 정립

NANA소재개발의 최종목표가 천연항균제로서 고부가 제품개발임에 따라 제품적용성 평가를 기초로 하여, 액상제형보다는 고상제형이 적절함을 알 수 있었다. 따라서, 생산 NANA소재는 제품화 원료로서 고상제형으로 정하고, 액상첨가형(과립형)과 섭취형(정제형)로 구분 제품화 하였으며 최종 상용성을 극대화 하였다. 제품화를 위한 제형별 레시피(경제성 평가 포함) 정립 결과는 다음과 같다.

가. NANA소재의 목적유해균의 제균성을 확보 되도록 제형을 정제형과 분말형으로

제조 레시피를 구분정립하였는데, 상용시 최종 용해액 100g당 0.5% NANA제제가 함유되도록 고려하여 제형화 레시피를 정립하였다.

나. 제형별 레시피로서, 섭취용으로는 정제형 I(원형, 1정/500mg, NANA함유량 : 2.5mg, 단가 : 약 12원/정)과 정제형 II(봉상형, 정/750mg, NANA함유량 : 5mg/정, 단가 : 20.25원/정) 그리고 액상제제용으로, 과립형(분말형, 1스틱/2,000mg, NANA함유량: 5mg/1Stick, 단가 : 22.25원/Stick)으로 구분하여 최종 레시피를 정립하였다. 이때 제형별 NANA함유량은 정제형(타정형)은 40~50mg, 과립형은 100mg이 함유토록 하였다.

11. 동물임상 실험을 통한 사전안전성 평가(동물임상 섭이농도 설정)

정립된 대량생산시스템 적용 생산된 개발NANA(순도 25%) 대비 합성NANA(대조)의 동물임상 실험 진행을 위한 사전 안전성 평가를 위하여, 0%~1%농도조성 NANA에 대하여 HEK 293(human embryonic kidney cell)과 RAW264.7(macrophage cell) cell를 이용하여 MTT, NO, Cytokines 및 Western blot analysis검정을 거쳐 안전성을 평가하였다. 결과는 다음과 같다.

가. NANA소재는 표준주를 대상으로 안전성 평가 결과, NANA는 0.5%(w/w) 농도이상에서는 독성을 나타내었는데, 이는 대조 NANA 및 개발NANA처리군에서 동일한 패턴을 보였다(P<0.01).

나. NANA소재는 0.5% 이하의 농도에서는 무독성이며, 항염증 효과(염증완화 효과)를 보유하고 있는 것으로 평가되었다(P<0.01).

1) NANA처리시 iNOS, COX-2와 염증성 cytokine인 TNF- α 발현량을 효과적으로 억제하였는데, 항염증 효과를 나타내기 때문으로 판단 되었다(P<0.05)

2) NANA소재는 LPS에 의해 유발되어지는 메커니즘에 MAPK 신호전달과정을 조절하여 항염증 효과를 나타내는 것이 우수하다는 것을 확인하였다(P<0.05).

3) 따라서, NANA는 염증성 질환의 예방 또는 치료에 유용하게 사용될 수 있을 것으로 판단되었으며,사전안전성 평가결과를 기준으로 동물안전성 평가시, 사료내 첨가 NANA농도를 0.1%, 0.5% 그리고 고농도 처리구는 1%로 설정하였다.

12. 동물임상 평가(안전성 및 기초효능 평가)

가. NANA 동물임상평가를 통한 안전성 평가를 위한 사료 레시피는 AIN-76A를 기본으로 하여 1Kg당 NANA(100% 순도 기준)는 1g(NANA-L처리구),

5g(NANA-M처리구) 및 10g(NANA-H처리구)로 혼합 조성하였다.

나. 전체시험구는 대조구(AIN-76A사료섭이구)와 비교구(기본사료에 합성NANA첨가구, SNANA) 그리고 시험구로서는 기본사료(AIN-76A)와 개발NANA를 동일농도로 혼합하여 조성하였다.

다. 시험동물에 조성 사료를 자유섭이토록 한 후 4주, 8주 및 13주에 각각 성장관련 및 도살조건하에서 안전성평가 항목별로 조사하였다. 주요 평가항목으로 사료효율(성장), 무게(총무게 및 기관별), 기관별 조직병리, 혈액지표 및 염색체이상 조사, 기관별 및 분변내 미네랄 분포와 장내미생물총 변화로 하여 총 9개 항목으로 대별하였다.

- 1) 일정별로 구분하여 사료섭취량과 관련한 일일성장률(24시간 단위로 13주동안 측정)을 대조 대비 NANA처리구와 비교하여 보았더니, 차이가 인정되지 않았다.
- 2) 생체중 및 기관별 무게변화에 미치는 결과를 역시 기간별로 구분하여 대조 대비 NANA처리구와 비교하여 보았다.

결과로서 생체중 및 근조직(5개기관 : Liver, Kidney, Spleen, Heart, Lung)과 골조직(2개 : femur, Backbone) 전체시험구에서 대조구 대비 차이가 인정되지 않았다.

- 3) NANA제제의 성장관련 안전성 결과를 기초로, 추가적으로 혈액조성과 지표안전성 및 염색체 이상 조사를 통하여 생체내 안전성 결과를 조사하여 보았더니, 역시 차이는 인정되지 않았다.
- 4) 성장 및 혈액안전성 평가를 기초로 조직검사를 실시함으로서, 8주 및 13주가 경과시에 기관별(7개기관 : Liver, Kidney, Spleen, Heart, Lung, Femur 및 Backbone)로 조직병리학적 안전성 검사를 실시하였다.

(가) 8주 경과시는 전체조직에서 유의한 차이는 안정되지 않았는데, 13주 경과시 개발NANA 처리구의 Spleen에서 Necrosis(조직괴사)현상이 발생하였다.

(나) 개발NANA의 농도별 안전성을 평가하여 본 결과, 적어도 8주이상의 섭이조건에서 0.5%이상을 지속적으로 섭이시 안전성이 없는 것으로 판단되었다. 그러나, 동일 분자 및 화학식 구조를 보유하고 있는 비교구(합성NANA)의 경우는 안전성에 있어 문제가 없는 것으로 보아 추가 검정이 필요할 것으로 판단되었다.

- 5) NANA제제가 중요장기내 미네랄 변화를 유발하는지를 경과시간별로 구분하여 조사하여 보았다.

(가) 주요변화를 유발하는 이온은 칼슘이었고, 7개기관중 골조직에서 유의성이 인정되었다.

(나) 골조직을 중심으로 일정별 칼슘변화를 조사하여 보았더니, 대조 대비 전체 NANA처리구에서 4주 경과시는 10~20% 범위로 감소현상을 보였으나, 8주가 경과하면 오히려 20%범위 이내에서 증가하는 결과를 보였다. 이 결과는 NANA소재는 생체내 흡수되어 미네랄 이온의 치환과 교체성향을 나타내는 기능을 보유하는 것으로 판단되었다.

(다) 근조직내에서 주요한 미네랄 변화는 Spleen에서 발생하였는데, 주요 미네랄은 철분이온이었다. 검출량을 비교하여 보았더니 대조(150~180ppm) 대비 NANA처리구에서 약 2배에서 3배로 고농도로 축적되는 경향을 보였으며, 농도에 비례하여 증가하는 경향이였다.

(라) NAN소재 및 처리농도별로 기관별 분포조사 결과, 대조 대비 합성NANA와 개발NANA 농도별 패턴은 유사하였는데, 고농도로 갈수록 감소하는 경향이였으며 NANA소재별 차이는 인정되지 않았다.

(마) 골조직 인장강도

NANA소재별(합성NANA 및 개발NANA), 농도별(0.1%, 0.5% 및 1%) 및 섭이기간(8주 및 13주)에 따라 골조직(건조 Femur기준)의 무게, 성장(길이, 폭), 인장강도 변화를 대조 대비 비교조사 하였다. 결과는 다음과 같다.

(1) NANA섭이시 골조직내 칼슘의 함유량은 4주까지는 10~20%가 감소하였으나, 8주이후 부터는 오히려 약 10~20% 증가하는 결과를 보였다($P<0.05$).

(2) NANA처리구의 골조직내 칼슘증가하면 역시 골조직의 무게, 길이성장 및 인장강도 10%이상 증가하는 것으로 조사되었다.

(3) NANA섭이시 농도차에 따른 골조직내 변화에 미치는 영향은 인정되지 않았다($P<0.05$).

(4) NANA소재간 골조직내 변화에 미치는 영향은 인정되지 않았다($P<0.05$).

13. 장내미생물 분포변화 조사

NANA소재별(합성NANA 및 개발NANA), 농도별(0.1%, 0.5% 및 1%) 및 섭이기간(4주, 8주 및 13주)에 따라 장내미생물총 변화를 유발하는지를 총균수(TSA 배지) 대비 대장균구(MacConkey배지) 및 유산균(BCP 배지)으로 구분하여 호기조건 하에서 확인하였다. 결과는 다음과 같다.

가. 14주간 평균 사료섭취량은 관찰한 결과, 실험구간의 농도별 섭취량은 유의적인 차이가 없으나 대조 대비 실험구의 사료섭취량이 최대 $21 \pm 5\%$ 감소하였으며 유의적인 차이가 인정되었으나, 생체중감소와 기관별 무게 및 안전성과 관련한 유의성은 없었다($P < 0.05$)

나. NANA의 섭취여부와 섭이기간은 장내미생물총의 변화유발과 밀접한 관계를 보였으며, 이때 대장균구와 유산균구가 변화유발 미생물로 인정되었다($P < 0.01$).

다. NANA의 섭이기간에 따른 조사결과는 다음과 같다.

- 1) 전체적인 경향으로서, NANA섭이후 8주이내에서는 총균중 대장균구는 대부분 검출되지 않았으며, 대신에 유산균총이 유의하게 최대 9배까지 증가하는 패턴을 보였다($P < 0.05$). 그러나, 8주이상의 장기섭이시는 대조구 대비 차이가 인정되지 않아 결국 장내균형을 유지하고 있음을 알 수 있었다.
- 2) 최초 NANA섭취 및 생체전이메카니즘을 통해 장내에 유입된 NANA의하여, 장내미생물총의 변화가 유발되었으나, 섭이기간이 길면 길수록 장내 미생물총이 안정화 되는 것으로 판단되었으며, 결론적으로, NANA섭이가 장내미생물총의 변화를 유발하는 기간은 최대 8주이내였다.

라. 동일 화학 및 분자구조를 보유하고 있는 합성NANA와 개발NANA가 장내미생물 분포조사에 영향(8주 섭이기준)을 미치는지를 조사하여 보았다. 결과로서, NANA소재중 개발NANA가 합성NANA보다, 약 7~10배의 장내미생물총 변화를 유발하는 것으로 인정되었다. 이는 동일성분의 NANA라 할지라도 체내 흡수 및 생체전이 메카니즘 및 최종 배설경로인 장내축적과 이로 인한 항균성 차이 등의여 복합적인 결과로 인한 것으로 판단되므로 추후 세세한 연구가 필요하다.

마. NANA소재의 섭이여부와 기간에 따른 장내미생물의 변화유무와 이들에 의하여 흡수되고 배출되는 분변내 영양소 분포변화와의 상관관계를 대조 대비 비교하였다.

비교결과를 통하여, 대조구 대비 NANA섭이로 인하여 유도된 미생물의 변화와 더불어 영양원의 분포를 기준으로 Probiotic제제 및 대장균등 장기원성 질병에 대하여 Synbiotic 소재(예방 및 치료관련)로의 개발 가능성을 확인 하고 저 하였다.

- 1) NANA섭이이후 장내미생물의 분포변화가 심한 경우는 분변내 영양원 분포 역시 유의하게 감소되는 경향을 보였다.
- 2) NANA섭이에 따른 장내미생물의 변화와 분변내 배출영양원 감소에 미치는 결과를 조사하여 보았다.

가) 장내미생물의 변화가 심한경우(8주섭이)는 역시 분변내 영양원의 배출농도도 감소하였다.

나) NANA소재의 장기간 섭이(8주 이상)에 따라 장내세균총이 정상으로 전환시, 역시 분변내 배출영양원의 구성은 차이가 인정되지 않았다.

바) NANA섭이시 장내 미생물의 변화와 배출되는 분변내 영양소 분포변화와의 상관 관계를 비교하여 NANA의 용도·용법 및 관련 이용성을 확인하여 보았다.

즉, 8주 경과시 채취한 대조구 분변 중 일정량을 취한 후, 80% EtOH용액으로 지방류 및 단백질류만을 침전을 유도하였다. 다음으로 원심분리 과정을 거쳐 최종 상등액(수용성 탄수화물류 및 NANA)만을 취하여 HPLC분석과정(NANA분석법 기준)실시하였다. 이를 위한 시험구로서는, 대조구 대비 NANA처리구중 유산균의 검출되지 않고 대장균만이 증가된 분변시료, 대장균은 검출되지 않고 유산균만이 증가된 분변시료를 대상으로 분변내 영양성분(단백질류 및 지방류 및 수용성 탄수화물류 등으로 구분) 비교하였다. 결과는 다음과 같다.

1) NANA섭이후 체내에 흡수된 NANA는 생체대사 메카니즘을 거쳐 최종 배설경로인 장내분변으로 축적되면서 Trigger로서 장내미생물의 변화를 점진적으로 유발하는 것으로 판단되었다($P < 0.01$).

2) 장내 축적된 NANA는 Probiotic 혹은 Synbiotic패턴으로 장내미생물의 변화를 유발하였는데, 섭이기간과 섭이농도 증가에 따라 Probiotic(유산균 증가) 패턴에서 Synbiotic(유산균증가 및 대장균구 감소)패턴으로 전환되는 경향으로 인정되었다($P < 0.05$).

3) NANA소재의 섭이기간별 장내미생물의 패턴변화에 미치는 경향을 살펴보았다.

가) 섭이기간별로 8주이내는 전체시험구(NANA섭이)에서 대부분이 Probiotic과 Synbiotic패턴을 동시에 보였다. 그러나, 8주이상 경과시 장내미생물총은 정상적인 균형을 회복하는 경향을 보였다($P < 0.01$).

나) 세균총의 변화(대조 대비)는 8주이내에서, 분변내 총균수는 최대 약 5배까지 감소와 더불어 대장균은 대부분 검출되지 않았으나, 유산균은 최대 10배까지 증가하는 패턴을 보였다($P < 0.01$).

다) NANA제제별로 Probiotic 및 Synbiotic패턴 변화에 미치는 효과를 비교하여 보았더니, 단기간(8주 이내)에 대부분이 Probiotic패턴과 동시에 Synbiotic패턴을 유의하게 높게 유발하였던 개발NANA가 합성NANA보다 정상적인 장내미생물의 정상적인 회복도 높은 것으로 인정되었다($P < 0.05$).

라) NANA섭이시 장내미생물의 변화 패턴(Probiotic과 Synbiotic패턴)에 따른 분변내 영양원(단백질류, 지방류 및 탄수화물류 등)의 변화를 비교함으로써 NANA기인성 영양이용성을 판단하여 보았다. 그 결과는 다음과 같다.

- (1) 대조구의 경우, 분변내 영양원(단백질류, 지방류 및 탄수화물류, 수용성 단백질류 및 수용성 탄수화물류별 검출량 합계 100기준)이 골고루 검출되었다. 그러나, 장내미생물의 변화가 심하였던 전체NANA섭이구에서는 이들의 활동에 의하여 분변내 영양원은 높은 수치로 감소하였다. 즉, 합성NANA섭이구는 약 26%~97%가 감소하였으며, 개발NANA경우도 약12%에서 최대95%까지 농도 별로 비례하여 감소하는 경향을 보였다($P<0.01$).
- (2) NANA섭이에 따라 유산균 혹은 대장균이 우점균으로 증가하면, 공통적으로 분변내 영양원은 감소하는 결과를 보였다($P<0.01$)
- (3) 대조구 대비 NANA섭이에 의하여 단기간(8주 이내)에 Probiotic패턴과 Synbiotic패턴을 동시에 보였던 장내미생물이 13주 경과후에 정상회복후의 분변내 영양원은 검출되지 않았다($P<0.01$).
- (4) 총균수와 유산균등도 동시에 활성화 됨으로 인하여, 장내에서 영양분해 및 영양원으로 사용됨에 따라 대조구에서 검출되었던 단백질류 및 지방류등은 검출되지 않았다. 이는 유산균이 증가되면 단백질류 및 지방류가 대부분 분해 및 체내흡수되어 영양원으로 재사용되는 메카니즘으로 인한 것으로 판단되었다 ($P<0.05$).
- (5) 결국, NANA소재는 섭이농도 및 기간 등을 적절히 배분하여 활용시 Probiotic 및 Synbiotic소재로의 제품화 및 용도용법 확대가 가능한 소재로 판단되었다 ($P<0.01$)

14. 연구목표 대비 세부 항목별 연구개발성과

핵심연구목표 대비 세세한 연구개발성과는 다음과 같다.

연구목표	연구개발결과
1. NANA 소재 개발을 위한 기초자료조사	1. 국내외 NANA가격 및 시장적용성 조사 완료 2. 국내외 연구개발방향 조사 완료 3. 국내외 관련특허출원(등록, 기준: 일본,미국)자료 조사 완료 4. 합성NANA 물질안전성자료(MSDS)자료 조사 완료
2. NANA 개발간 필수분석법 정립	1. 영양성분 분석법 정립완료 - 조단백질(킬달분석), 조지방(거버법), 당류분석법(HPLC) - 지방산 분석 : GC(FID) 2. 분자량 변화분석 : FPLC 3. 유기산(NANA) 분석 : HPLC 4. 개발NANA물성 검정 : FT-IR, XRD, SEM 등 5. 미생물 검사법(식품공전기준) 정립
3. NANA제제 분리용 유단백질(GMP) 소재 준비 및 공여(협동연구기관)	1. Milk->유청분말(치즈 제조 부산물) 제조->GMP제조 완료 2. GMP 협동연구기관 공여(제조 및 공여량) : 1,200Kg
4. NANA항균(유해미생물 대상)스펙트럼 사전평가	1. 공시균 대비 NANA의 MIC검정완료 2. 균별(그람음성 및 양성균 및 <i>E.coli</i> O157:H7)항균성 검정완료 3. 열처리 및 비열처리 조건하 항균성 검정완료 4. 미네랄 및 Milk첨가시 항균저하요인 분석완료
5. NANA의 현장적용 조건대비 물리/이화학적 변화 사전평가	1. 열처리 조건(70~121℃)별 NANA분자량(FPLC, HPLC) 변화 조사 완료 2. 열처리 전/후, 항균성(그람양성 및 음성균 구분) 조사 완료 3. 열처리 전/후, 장단기(1년)분자량 변화 및 항균성 조사 완료 4. 산 및 알카리 안정성(색상 및 분자량 변화) 조사완료 5. NANA의 제품적용성 사전평가 기초자료 확보완료
6. NANA 동물안전성 사전평가(<i>in vitro</i> : 표준 세포주 활용)	1. 표준 세포주[HEK 293 cell (human embryonic kidney cell), RAW 264.7 cell (macrophage cell)] 활용 <i>in vitro</i> 독성검정법 정립 2. 검증법 정립 : NO 및 MTT assay(연계 독성평가)
7. NANA 안정성(장단기 가속시험)평가	1. NANA함유 완제품 제조방법 평가 완료: 분말형 저온보관 2. 단기 및 장기 보관시 분자량 변화 조사 결과 확보 3. 연구종료 시, 제품 레시피(보관안정성) 기초자료 확보
8. NANA유래 내성형성 및 항생제 내성보유균에 대한 항균효과 평가	1. NANA처리에 따른 항균관련 형태변화 확인(완료) 2. 상용 항균제 대비 NANA제제 처리에 따른 항균 메카니즘(SEM)검정(완료)
9. NANA생산형 Neuraminidase Assay기법 정립	1. 최적 기질조성 조건 정립(완료) 2. 반응액 조건(온도 및 시간) 정립(완료) 3. Blank 조건 정립(완료) 4. NANA정량(TBA 방법)기법 정립(완료) - NANA 농도별 검량곡선 정립(OD, 549nm)
10. 기존산업용 효소내 Neuraminidase 스크리닝 기법 정립	1. 기존 식품용 효소로 사용되고 있는 약 40여 종 상업용 효소제를 이용Neuraminidase스크리닝(완료). 2. 일부 효소에서 매우 낮은 효소활성이 측정되었음 - 효소활성이 너무 낮아 경제성 부적합 판단

연구목표	연구성과
11. 식품용 미생물로부터 Neuraminidase스크리닝 정립	1. 50여종중 3 종류의 미생물에서 유의성 높은 Neuraminidase 활성 측정 완료(경제성 적합평가). 2. Neuraminidase 생산균주 선발 결과 : 효소역가와 효소생산의 용이성을 등을 고려하여 <i>Arthrobacter ureafaciens</i> KCTC 3387를 Neuraminidase 생산균주로 최종결정
12. 선발 식품미생물 적용Neuraminidase 분리정제 및 특성 연구	1. 분리정제 배양 상등액에 비해서 최종적으로 specific activity를 약 5배 증가 조건정립(완료) 2. 분리 효소액 사용하여 유단백질 (GMP)에 대한 반응특성을 연구완료 (2차년도 대량생산시스템정립과 연계) - 최적 pH,온도,효소 열안정성,pH, 안정성,염류등 간섭 및 영향평가(완료)
13. 선발식품 미생물 분리 Neuraminidase 적용 GMP내 NANA최적 생산조건 확립	1. Neuraminidase를 이용하여 GMP로부터 NANA를 절단하여 내는 최적 조건을 확립 기법 정립완료 2. 기질GMP적용 분리효소 반응조건 정립 (완료) 3. 최적 기질농도 정립완료(2차년도 개발효소 적용NANA대량생산 연계 시스템 정립연계 실시 완료)
14.NANA제조용 효소 및 NANA 대량생산 방법 정립	1. 선발식품미생물(<i>Arthrobacter</i>)분리효소(Neuraminidase)를 이용한 NANA대량생산기법 정립(완료) 가. <i>Arthrobacte</i> 대상 Neuraminidase 대량생산기법 정립 - 개발효소 이화학적 특성조사 완료 - 효소대량 생산시, 경제성(생산수율,분해율등)평가(완료) 나. 개발효소 아미노산 서열분석 완료 - <i>Arthrobacter</i> 분리 Neuraminidase지적재산권 확보연계 2. 개발효소 적용 GMP내 NANA대량생산기법 정립 가. 경제성(NANA생산성, unit/GMP 1Kg기준)평가 나 대량생산시 문제점(NANA손실 및 수율향상) 도출완료 다. NANA 산업화 기준설정(완료) - 생산수율(목표대비 33% Loss발생)등 대량생산간 문제점 도출 - 제품적용형 NANA대량생산시 순도기준설정(생산순도 : 26%기준) 3. NANA생산시 회수율(손실을 저감)증대기법 정립(완료) 가. 분해반응공정(침전물 제거)시 Loss해결 나. 에탄올 침전물 제거공정시 Loss 해결 다. 건조비용 저감 방법 : 동결건조 공정개선 라. 회수율 증강방법 : 75%이상 정립
15.개발 NANA의 항균 스펙트럼 및 항균메카니즘	1. 개발 NANA 항균스펙트럼 비교조사(완료) - 그람양성균, 그람 음성균 및 효모구분(MIC 변화율 검정) 2. 개발 NANA 내성형성 유무판정(완료) 가. 37종 항생제 대비 내성보유 여부확인 나. 10세대 반복처리(내성보유 및 미보유 <i>E. coli</i> 표준균 적용 평가) 3. 항균(효모, 대장균) 메카니즘 평가(완료) 가. 형태(SEM)변화(효모, 대장균 기준) 나. 세포막 관련평가(방법 1: 형광dye Method, 방법 2: Depolarization Method, 방법 3: Calcein Leakage in artificial Vesicles Method)

연구목표	연구성과
16. 개발NANA현장적용성 평가	1. 장단기(1년) 물리/이화학적/생물학적 변화 조사(완료) 가. 열처리 전/후 안정성 평가 나. 장단기(최대 1년),성상별[분말, 1%(w/w)액상] 및 보관조건별(상온, 냉장)안정성[물리이화학적 및 항균성(생물학적) 변화] 연계 평가 2. 제품적용 방향성 설정 평가 :액상제품 및 분말제품 첨가형 구분
17. 목적균 제어효과 보유 제형 및 관련 레시피 정립(경제성 평가)	1. 유해균 제어형 NANA 제품화 레시피 확립(완료) - 타정형(즉시섭이형), 과립형(우유등 액상제품 첨가형) 2. 식품첨가물 허가진행 : 검정기관(수과원, 축산물규격과, '10.12.19.기준) 검토중(제품적용 허가부분) - 관련기관(식약청, 수과원) 기술컨설팅 실시후 제품화 방향 설정(방안: 식품첨가물->건기식->의약품->의약품 순) 3. NANA항균성 확보형 첨가량 확보(완료) - 천연항균제로서 효과 확보 - 액체 100ml(혹은 g)당 NANA첨가량 확보 : 0.5g(0.5%) - 천연항균제 효능 확보:그람음성균(사멸), 그람양성균(정균) 4. 제형(TYPE)별 레시피 구분 정립(완료) - 정제형(타정), 과립분말형(액체적용형) 5. 제형 레시피별 용도용법(응용성)확대(완료) 가. 정제(타정)형: 유아용~성인용 1) 구강 적용형(치주염예방/치료제), 2) 위 적용형(항헬리코박터) 3) 장 적용형(Probiotic 및 Synbiotic제제) 나. 액상제품첨가(과립)형 : 영유아용 1) 우유 및 액상제품 첨가형 : 영유아 유해세균 사멸제 2) 구강적용형 : 치주염 및 충치예방제 3) 장 적용형 : Synbiotic제제, 장염예방/치료제(대장균)
18. 동물임상평가	1. NANA 동물안전성 사전평가(<i>in vitro</i> : 표준 세포주 활용) 가. 표준 세포주[HEK 293 cell (human embryonic kidney cell), RAW 264.7 cell (macrophage cell)] 활용 <i>in vitro</i> 독성검정법 정립 나. 검증법 정립 : MTT assay(세포활성도 측정) 2. 동물임상 평가 가. 동물검정용 NANA함유 사료레시피 설정 및 제조 나. NANA 장단기(4주, 8주, 13주) 섭이시 안전성 평가(완료) 1) 일정별 사료섭취량 및 일일성장 결과 측정 2) 병리/혈액 조성, 생체중 및 기관별(간,신장,지라,심장,허파,척추,대퇴골)무게변화 및 조직병리 검사(완료) 3) 혈액안전성 지표 조사(혈액조성 : 4종, 지표 : 14종)완료 4) 적출기관별 및 분변내 미네랄(Ca, Fe, Zn, Cu, Mn, Mg, P, S)배설량 조사 및 대퇴골내 염색체 이상 조사 3. 장내 미생물 우점변화 비교조사(총균수, 대장균구, 유산균구로 구분)완료
19. 사업화	1. 사업화 진행 로드맵 설정 가. 1단계 : 지적소유권 확보(특허 출원 및 등록)후 학술발표 나. 2단계 : 관련기관(식약청, 수과원) 기술컨설팅 실시 다. 3단계 : GLP검정(천연물신약 분야 : 천연항균제) 라. 4단계 : NANA대량생산시스템 및 사업화 로드맵 설정 1) 연간 NANA생산량, 연간예상판매액, 생산시설구축예정예산, 소요대지 2) 시설디자인 예정(주관기관 승인후) 2. 홍보 및 마케팅실시(종료후 3년 소요예산)

V. 연구성과 및 성과활용계획

1. 특허출원(4)

- 1) 특허출원 제10-2011-0029609호: 식품용 미생물에서 분리한 Neuraminidase를 이용한 N-Acetylneuraminic Acid의 제조방법
- 2) 특허출원 제10-2011-0069459호:N-Acetylneuraminic Acid을 포함하는 GMP Neuraminidase분해물을 유효성분으로 하는 천연항균제조성물
- 3) N-Acetylneuraminic Acid을 유효성분으로 하는 대장균성 설사 치료용 조성물
- 4) N-Acetylneuraminic Acid을 유효성분으로 하는 구강 치주염 치료용 조성물

나. 신규인력고용(석사 3, 박사 1) : 정규직(중앙연구소연구원)

다. 석사양성(석사 2) : 경상대(조선정, 심희연)

라. 논문(1) : 비SCI급, 국내학술지(한국유가공기술과학회지)

- 유청단백질 GMP에서 분리한 NANA의 안전성 및 염증저하 메카니즘 구명 연구. Vol29,No2.pp17-23. 011

마. 특이사항 : 비밀배포제한 조치 완료('13. 06.30일한)

- 지적소유권 확보후 논문발표 예정(근거:연구협약서 기준, 9연구성과의 등록·기탁의향)

2. 연구성과 활용계획

가. NANA제조 기법 및 대량생산방법 정립연구 결과

- 1) 개발 KNOW-HOW, 이중 기능성 유단백질 식품개발에 응용성 확대
 - 제품군 : 천연항균제, Probiotic효과 및 골다공증 예방 등
- 2) 고부가 제품화 연계활용(수과원 및 식약청) 검토결과에 준하여 순차적 진행
 - 가) 1단계: 식품부산물의 고부가제품에 적용(허가절차 불필요, 효능표시 불가)
 - 나) 2단계: 건강보조식품개발에 활용(건기법준수 등재후 효능표시)
 - 다) 3단계 : 의약품개발에 활용(인체임상기준 준수, 진행후 적용)
- 3) 개발 KNOW-HOW신규 고부가가치 제품화 개발에 적극활용
 - 제품군 : 개발소재 첨가형 및 제품개발형 구분

나. NANA제품화(제형화 및 레시피 정립)연구결과

- 1) 영유아용 및 노인 등 질병취약 노약자 제품군 확대적용
- 2) 현재 천연항균제 요구형 제품의 단점보강형 제품군 개발에 적극활용
- 3) 점차적 합성항균제 대체형 천연항균제 강화 식품개발 개발시 기초자료로 적극활용

- 제품군 : 영유아식품, 건강기호식품 등
- 4) 연구결과를 기초로 의약품수준의 고부가가치화 식품개발로 연계

다. NANA의 동물임상 효능평가 결과

- 1) 정제형 : 고체형 고부가가치 제품군 개발에 적극활용
- 2) 과립형 : 액체형 고부가가치 제품군 개발에 적극활용
- 3) 용도용법 응용성 확대에 적극활용 : 동물분야 및 수산분야
- 4) 신소재로서 적극활용, 기존제품내 첨가를 통하여 기능성 제품개발 및 품질 UP-GRADE화 및 신소재 자체의 신제품개발에 적극활용
- 5) 고부가 가치 상품화 컨셉 적용
 - 가) Probiotic 및 골다공증 예방형 기능성 노인식식품개발
 - 나) 현재제품의 단점 보강형 제품 재개발
- 6) 국내외 영업 및 판매전략 적극활용(수익극대화)

라. 사업화

- 1) 사업화에 있어 국가 과제의 수행이라는 잇점을 살려 국내외 영업에서 기술우위성을 무기로 하여 이를 최대로 활용할 것임
- 2) 천연항균제 개발에 있어 객관성이 증명된 개발결과가 도출될 것이고, 항균기능성 소재 개발 결과는 국내외 기술우위성을 확보하였음을 사업화(마케팅 및 영업)시 적극활용할 것임.
- 3) 개발 및 시제품 생산과 배합비율 등의 제조기법 KNOW-HOW를 응용하여 용도용법 확대형 제품개발에 적극 활용할 것임.
- 4) 개발소재 동물 임상실험결과를 활용하여, 마케팅 능력지원과 응용제품 개발시 사전 메카니즘 파악에 적극 활용 할 것임.

SUMMARY

I. Title

Developing the mass production ability of a type of perishing harmful germs in part of infant and toddler foods and The production application (Cooperative research institution : From GMP, Developing Neuraminidase for N-Acetylneuraminic acid(NANA) production and NANA production technique

II. The object of research and development and necessity

1. The object of research and development

In this subject, we paid attention to the antibiosis among diverse functions of NANA which is a resource that never been used existing in milk. After accomplished the procedure that constructed mass production system for insuring economical efficiency and performed animal clinical testing, finally we intended to make NANA as a high value-added product that controls germs(*E.sakazakii* and *B.cereus*) which are infected to foods for infant and toddler and cause the public health academical harms.

2. objective and Significance

Gram Positive (*B. cereus*, symptoms : diarrhea, vomiting, stomachache) and Gram Negative Bacteria(*E.sakazakii*, symptoms : meningitis of the newborn) are germs legally restricted both within and without the country because of their harm to infant, toddler, the old and the weak, and they are also the target to be particularly restricted in the case of food for infant, toddler and the old.

Because of two germ babyfood infection avalanches that happened in Korea from 2006 to 2007, it is estimated that the entire loss is 55 billion won as the loss of powdered milk for toddler is 50 billion won(per one company, one item), and that of weaning food is 1.5 billion won(per one company, one item). Moreover, there is the tremendous loss of the food industry in points of both material and moral.

Nowadays, when the two germs written above are detected, food industry including dairy industry only presents stopping production of the goods as the first measure, and removing all products and finding solutions as a second measure. It is true that there is no other proper solutions except for heat treatment when manufacture the goods or simple processing method that prevents the second contamination.

Also, baby foods maintain a property (legal restriction) that addition of some materials (synthetic material, antibiotics and preservative and so on) for preventing germ is all restricted.

It is found that when bactericide (except for antibiotics) is added to milk, the bactericide and milk's essential structure materials (proteinoid, milk fat, carbohydrate etc.) cause immediate chelate reaction induction effect. And according to the trait which disables material's own antibacterial ability, many researches for developing natural antibacterial material are proceeding actively both inside and outside of Korea.

In this subject, we noticed the glycoprotein sialic acid (=N-Acetylneuraminic acid=NANA) existing in proteinoid as a solution to problem written above, and it is judged that when it comes to commercialization, if it is not-been-used material and also secures the afterward economic, it can be raised as the most important material in the point of "Glycomix and carbohydrate medicine" development competition.

Relating to this subject, NANA is noticed that it maintain many unique features (antivirus effect, anticancer effect, anti-inflammatory effect, defending bacterial infection and maintaining restraining mechanism, immune reinforcing ability, nerve signal delivery and skin pigmentation restraining effect etc.). Currently, NANA used (almost for medical purpose) in and out of Korea has many problems to be solved to apply NANA to food extensively since the NANA is mostly consist of microbe product which is made by genetic recombination of colon bacillus and synthetic goods.

Currently, NANA's international market price is \$10,000~16,000 (consider \$1 as 1000 won)/kg and most of the NANA is dominated by Chinese (Co. JK Biotech). Though NANA is applied to some part of special diet in hospitals,

there is no example of application to common foods.

This is proceeded in many different sides by internal and external researchers

The international market of protein medicine (glycoprotein medicine occupies 60% of protein market) that can be related to this subject is expected to gradually increase from \$47.4 billion in 2006 to \$55.7 in 2011 (basis : glycomics and carbohydrate medicine, Biotech policy center, the 39th book of series, 2007.), therefore "Next generation medicine development business using glycomics (whole working expenses : \$10.05 billion)" is started from 2005 and it is progressing at the basic level.

Glycoprotein medicine is about the using restriction of genetic recombination by-product (hormone, cytokine, enzyme and enzyme controlling element, growth element, clotting of blood element, monoclonal antibodies), there is no related item to proteinoid originated antibacterial materials which is connected to this subject. (basis : analysis of Glycoprotein medicine's sugar structure and the method of experiment guide, KFDA, 2007.).

It can be said that this subject is the research and development that is at the same level with the process "glycomics and carbohydrate medicine research and development" inside and outside of Korea. Thus, this subject is said to secure both practical problem solving that applying (commercialization) the development result (basic research) of natural antibacterial material which has milk originated multifunction to babyfoods and alternative occupying superiority of the international technique.

The supervising research institution and cooperating institution is professional companies that possess enough KNOW-HOW about dairy and research and development and production of enzyme, sufficient manpower and installation equipment. So the mass production of proteinoid in powdered milk for separating natural NANA, this subject agrees enough to the view that the alternative to the product safety of pathogenic organisms and general bacteria should be found and no objection.

For now, When checking for the demand by consumers about internal and external foods, they demand the price as that of foods, quality and

functionality as the level of medicine. Therefore, the material that will be produced in this subject is suitable to the demanding point, and we expect that it would be the core technique cause which can take the superiority of increasing the share in the international market.

Consequently, to satisfy the necessity written above, we applied the system that separating and purifying (cooperating institute), mass producing (supervising institute) of proteinoid originated natural Bacteriocin (NANA) maintaining antibacterial ability (securing economic) about the chronic pathogenic germs in babyfoods and a consistent product applying production system. As a result, we tried to secure the basic data for expanding usage in addition to taking the superiority of the international technique skills (the area of glycomics research and development) and the material development for development of the final safe babyfood with security of industrialization.

III. Contents of research and development and the range

1. Investigating the basic data of NANA material development and founding required analysis law
 - a. Developing NANA material and Investigating basic data related to commercialization
 - b. Founding the required analysis law of NANA development

2. Production of Neuraminidase enzyme for producing NANA and Founding a mass production system of NANA
 - a. Founding NANA and Neuraminidase Assay technique
 - b. Founding the Neuraminidase screening technique in the existing commercial enzyme
 - c. Founding the Neuraminidase screening from microbes for food
 - d. Separating and Purifying selected food microbes applied Neuraminidase and Researching on the feature
 - e. Establishing the optimum production condition of NANA in developed

Neuraminidase applied proteinoid(GMP)

- f. Founding NANA separating enzyme and the mass producing technique of NANA(including economic feasibility assessment)
3. Looking deep into antibacterial mechanism of harmful germs and Assessing property of product application
 - a. Advance assessment of physical/physico-chemical change compared to condition of application to actual field
 - b. Advance assessment antibacterial(target for harmful microbes) spectrum
 - c. Antibacterial spectrum of developed NANA and Antibacterial mechanism
 - d. Forming NANA originated resistance and Assessment of antibacterial effect about germs which has antibiotic tolerance
 4. Investigating physical/physico-chemical/biological change for long and short-term
 - a. Assessment of heat stability of NANA material
 - b. Stability relating assessment [physical, physico-chemical and antibacterial(biological) change] for long and short-term(maximum : 1 year), property and state(powder and liquid) and storage condition(room temperature, refrigeration)
 - c. Setting directivity of product application(Dividing the liquid product added type and powder product added type)
 5. Clinical testing of developed NANA(safety and basic effect)
 - a. Assessment of advance safety(in vitro : Cell-line using) for MIC setting(clinical testing)
 - b. Clearing up the body spread mechanism of NANA which used radiobiology technique
 - c. Assessment of animal safety through the long and short-term feeding of NANA material
 6. Establishing a recipe of harmful germ controlling product in babyfoods

- a. Clearing up additive amount containing antibacterial effect and cause of antibacterial interference
- b. Establishing recipe by optimum type of commercialization
 - Dividing tablet type and liquid type material applied pulp type
- c. Establishing the method to expand usage(applicability) by a fixed form recipe

7. commercialization(progress phased Roadmap)

- a. Stage 1 : conference after securing intellectual property(apply for patent and register)
- b. Stage 2 : Implement technique consulting with related institution(KFDA, NVRQS)
- c. Stage 3 : GLP license (field of natural substance new drug : natural antimicrobial)
- d. Stage 4 : Setting NANA mass production system and commercialization roadmap
 - 1) output of NANA per year, expected sales per year, assessment necessary budget for building production institution and required land
 - 2) plan for facility design(after the approval of supervising institution)
- e. Stage 5 : Implementing advertising and marketing(after finishing, 3-year-expected)

IV. Achievement of central research development

1. Founding compulsory analysis method according to development of new material

This research is related to development of new material, it is necessary to clear up the safety of development material and property through founding analysis method before and after the NANA production from raw proteinoid. That is, we founded the nutritional contents(protein, fat, carbohydrate etc.) analysis, long and short-term storage of aimed development material NANA, the analysis condition of

physical · physio-chemical property of matter for certifying heat-resistance, acid-resistance and base-resistance condition according to necessity between development. And we founded the securing of the interference effect that is related to antibiosis decrease such as chelating, harmful microbe controlling effect certification, the method of microbe test and purification procedure for checking the whole change of intestine microbes when test the animal safety of NANA material in addition to the NANA antibacterial assessment about aimed harmful germs consistently.

2. Founding Neuraminidase(NANA production enzyme) production and mass production system

1) Currently, we developed NANA as a originated natural antimicrobial using antibacterial ability(securing economic) included proteinoid(GMP) as material against chronic decease producing germ(*Bacillus cereus*, *Enterobacter sakazakii*) which is doing public-health-engineeringly damage infected into babyfoods(powdered-milk and weaning food etc.) but there is no specific measure to deal.

2) Neuraminidase, the enzyme for separating NANA from the substrate proteinoid through enzyme using method is completed the NANA mass production system that selected *Anthrobacter ureafaciens* from food microbes registered as food additive and adopted the enzyme production in condition of mass production system through a series of system.

3) Result

a) To produce the economic securing decomposition enzyme, we went through the Neuraminidase screening to commercial enzyme(17 types), collected microbes registered as food additive. As a result, we selected *Anthrobacter ureafaciens* as Neuraminidase producing valid germ.

b) Aiming *Arthrobacter ureafaciens* selected for NANA production within substrate GMP, we founded the NANA production condition such as

laboratory reaction condition.

- c) To establish the mass production system of enzyme and NANA, we certificated enzyme production and NANA productivity for enzyme production(3 tons of reaction family) and the NANA production(10 tons, on the basis of the amount of added enzyme compared to substrate GMP) using enzyme production. The result is as written as below.
- (1) Final enzyme productivity in reaction family was 0.16unit/ml, at that moment totally 432,000unit of Neuraminidase was produced($p < 0.05$).
 - (2) Neuraminidase enzyme역가치 for produce NANA through enzyme decomposition of 1g of substrate GMP was 0.5unit/g(GMP) ($p < 0.05$).
 - (3) When applied Neuraminidase 432,000unit, GMP(included 4% of NANA) could decompose 864kg, at that time the NANA production amount(on the basis of 100% of purity) was 25.9kg.
 - (4) When produce 100% purity of NANA, it costs 386,100won/kg for Neuraminidase, and 96,525won/kg in case of 25%
 - (5) The production amount of NANA(on the basis of 25% of purity) produced from development Neuraminidase enzyme applied proteinoid GMP(4% of NANA) was 99g(freeze-dried) per 1kg of GMP, the percentage of production number was 63% at that time. Considering the NANA content in GMP as substarte, this actual percentage of production numver was 63% compared to the theoretical percentage of production number of NANA decomposed by Neuraminidase was 75%. This comes from the loss of about 8% during the decomposition reaction process(during precipitate removal) and the loss of 33% of liquid during and the process of ethanol precipitate removal. Considering this, the producer price of 1kg of NANA was 674,471won(including 125,000won/kg of production cost) on the basis of 25% of purity.
 - (6) It took 18 hours of Neuraminidase production consuming time as a process consuming time for mass production, 112 hours(excluding freeze-drying time) for NANA, so totally 130 hours.
 - (7) As certificated the method for increasing percentage of NANA

production number, we make ratio of number to maximum 73% through the filter press or centrifugal separating process after the collecting precipitate and the water cleaning collecting process, optimizing the amount of ethanol addition in the ethanol precipitate removal process at the stage of decomposition react process($p < 0.05$).

- (8) As a result, we secured the microbes(food additive microbes) for production of NANA producing enzyme(Neuraminidase) from the proteinoid(GMP) separated from surplus non-used resource whey protein. And using the former, we established a series of 3~10 tons scale of Neuraminidase mass production and 10 tons scale of NANA mass production system using produced Neuraminidase.

3. Antibacterial effects and Assessing property of product application

After the process of division in physiological saline and milk as culture medium, infecting each kind of germs and adding development NANA per concentration, then certificated antibiosis according to each NANA process concentration and time passing along with the interference cause related to antibacterial decrease and so on. The result is written as below.

- 1) Although NANA material showed perishing effect for Gram-negative germs, it showed antibacterial effect showing fungiatatic effect rather than showing perishing effect about gram-positive germs($p < 0.01$).
- 2) As compared growth blocking concentration(MIC), MIC was ranged 2.5~5ppm and also tend to show low MIC figure of gram-negative germs($p < 0.01$).
- 3) As compared antibiosis after the process that infect bacterial to comparing experimental sterilized milk using physiological salt solution as a controlled experimental group, no similar difference was recognized. It is confirmed that NANA material is the thing that occurs no interference with many factors in milk(type of protein, fat, carbohydrate, mineral, and enzyme etc) ($p < 0.01$). In advance experiment, the chitosan which acknowledged that has antibiosis in physiological salt solution also lost antibiosis in fertilized milk combining with milk protein proportioning to

added concentration and then generating precipitation effect. Comparing to this, it is certificated that NANA material is the great antibiosis material($p < 0.01$).

4) As compared time related to NANA process concentration comparing antibiosis, concentration and time showed proportional result, it showed more than 99% of antibacterial effect within 3 minutes on the basis of 0.5% (w/w) NANA concentration($p < 0.05$).

4. As certificated antibacterial effect to lactobacillus through same process of harmful germ, it showed similar antibacterial result with materials harmful germ. That is, lactobacillus decrease dramatically to 20% after 1 hour when added NANA concentration over 1.0% under the condition of physiological saline and sterilized milk, and no survived colony was detected after 16 hours.

5. As certificated the antibiosis during NANA material after the advance check of whether the 37 types of antibiosis has resistance or not about harmful germs, it is confirmed that it is similar antibiosis to resistance possessing germs($p < 0.01$).

6. In the result of certification whether the resistance due to NANA through comparing antibacterial difference after the repeated process during 10 generations. aiming just the harmful germs (E.coli O157:H7), after collected the survived colony in the first generation under the same NANA process condition of identical concentration (0.25%), the antibacterial difference in whole generation was not acknowledged. Therefore, it is acknowledged that the NANA originated resistance is not caused($p < 0.01$).

7. When certificated the antibacterial mechanism NANA antibacterially participating, NANA didn't give lysis or damaged to cell membrane directly. But, it is apprehended that NANA has antibacterial showing mechanism from finally destroying membrane, by secondly disturbing osmotic

pressure state maximizing cell inner flow in the condition that above the MIC concentration($p < 0.05$).

8. Assessment of product applicability of development NANA material

As the final goal of NANA material development is the high value material development as a natural antimicrobial, we started assessment by important item for commercialization. We did the applicability assessment for commercialization dividing estimating category into heat-resistance, per storage condition(at room temperature and refrigeration), per period(comparing to the first time, 7 days, 37 days and 10 months).

Consequently, we recognized that the solid type is much proper than liquid type in using NANA material as a natural antibiotics. Therefore, powder or solid type is proper when commercializing NANA material($p < 0.01$), we maximized the practical common usability as finally establishing the divided manufacture recipe which divide product time into liquid-added type(pulp type)and intaking type(tablet type) after synthesizing product application assessment.

The product applicability assessment result by detailed item of development NANA material is seen as below.

- 1) NANA composed by 1% of concentration had the pattern possessing two molecular weights[low molecule : 37.4min.(85%), high molecule : 37.5min.(15%) (FPLC analysis)
- 2) Investigation result of property of matter change according to storage(at room temperature and refrigeration) condition
 - a) NANA material had a extreme browning effect, precipitation, and sticking effect progress as time passes(more than 2 days) under the condition of storage at room temperature. In this case, the life zone of high molecular weight increases from 15% to 72%, the life zone of low molecular weight rather decreases from 85% to 28% at the same time.
 - b) When refrigerating, No change of property of matter such browning and

molecular weight change happened in short-term (within 30 days), as time passes slight change was shown to be happened ($p < 0.05$).

- c) As we checked whether the antibiosis reduces or not according to time pass under the condition of room temperature and refrigeration, no difference was acknowledged. Therefore, it is confirmed that the storage condition and the property of matter change according to time pass didn't affected to the antibiosis reduction ($p < 0.01$).
- d) Consequently, when it comes to product application, NANA material is much more proper to solid product than to liquid product if assessed on the basis of the change of property and state except for antibiosis. However, when NANA material is added to liquid product, it should be consumed within 30 days under the condition of refrigerate storage ($p < 0.01$).

3) Investigation of NANA material's effect on heat-resistance and antibiosis

- a) For heat-resistance assessment about NANA material, we certificated molecular weight and change of property of matter by non-heat treated instrument and heat treated instrument (75°C , 90°C and 121°C) compared to controlled group.

As a result, the heat-safety of NANA material was not acknowledged because browning phenomenon and pattern moving toward range of high molecular weight (RT : 37.5min.) as the temperature goes up ($p < 0.01$).

- b) As review whether the process of heat-resistance to NANA material affect the decrease of antibiosis, somewhat difference in antibacterial effect according to the type of germs, generally no difference of antibiosis under the condition of heat-treatment and non-heat treatment was shown ($p < 0.01$).
- c) Consequently, basically composing molecular weight of NANA material consists of low-molecule and high-molecule, it showed browning pattern as well as the change of molecular weight (move to high-molecule level) according to temperature and storage condition, this sort of change in property of matter is acknowledged as it has no relevance to antibiosis

lowering effect ($p < 0.05$).

9. Assessment of acid-resistance and alkaline-resistance of NANA

As investigate the molecular weight changing pattern of NANA by time passing after diluting the acid (HCl, Acetic acid, H_2SO_4 , HNO_3) and alkaline (NaOH) sample per concentration and then adding NANA at the same concentration, we estimated the acid-resistance and alkaline-resistance of NANA. Although the alkaline-resistance of NANA material was somewhat stable, the acid-resistance of NANA was not acknowledged because of the pattern that shows disruption of NANA material's own molecular weight under the acid condition ($p < 0.01$). However, the longer the passing, the same change of molecular weight under the alkaline condition.

10. Founding manufacture recipe of development NANA material

As the final goal of NANA material development is the high-value product development as a natural antibiotics, based on the product applicability assessment, solid type is more proper than liquid type. Thus, we set the producing NANA material as a solid type for manufacture material, divide-manufactured into liquid-added type (pulp type) and intaking type (tablet type) and maximized the final common usability. The setting result of recipe by trapezoid for manufacture is written as below.

- 1) We divide-established production recipe trapezoid to tablet type and powder type for securing fungistatic property of target harmful germs living in NANA, we founded recipe for trapezoid considering including of 0.5% of NANA material per 100g of common used final solution.
- 2) As a recipe for trapezoid, we established final recipe dividing into tablet type I (circular shape, 1 pill/500mg, NANA content : 2.5mg, price : about 12won/a pill), tablet type II (Road type , pill/750mg, NANA content : 5mg/a pill, price : 20.25won/a pill) for intaking and pulp type (powder type, 1stick/2,000mg, NANA content : 5mg/1stick, price : 22.25won/stick) for liquid type. And then, NANA content per trapezoid should have 40~50mg for tablet type and 100mg for pulp type.

11. Advance safety assessment through animal clinical experiment(set animal clinical testing eating concentration)

For the advance safety assessment for process of clinical testing experiment of synthetic NANA(controlled) compared to settled mass production system applied development NANA(25% of purity), we tested the safety through MTT, NO, Cytokines and Western blot analysis certification about 0~1% of concentration making NANA using HEK 293(human embryonic kidney cell) and RAW264.7(macrophage cell)cell. The result is written below.

- 1) As a result of safety assessment aiming to standard strain, NANA material showed toxicity in over 0.5%(w/w) of concentration, this showed same pattern in controlled NANA and development NANA process group($p < 0.01$).
- 2) NANA material is assessed that it is nontoxic under the 0.5% of concentration, and has anti-inflammation effect(inflammation reducing effect) ($p < 0.01$).
 - a) During NANA process, it effectively restricted iNOS, COX-2 and the amount of TNF- α developing which is inflammatory cytokine, because it showed anti-inflammation effect($p < 0.05$).
 - b) NANA material is superior because it shows anti-inflammation effect controlling MAPK signal delivery process to the mechanism arisen by LPS($P < 0.05$).
 - c) Consequently, NANA is judged that it can be useful to prevent or cure inflammatory disease.
 - d) When doing the animal safety assessment on the basis of the result of advance safety assessment, we set the added NANA concentration in feed as 0.1%, 0.5% and high-concentration processed group as 1%.

12. Animal clinical testing assessment(safety and basic effect assessment)

- 1) Feeding recipe for the safety assessment through NANA clinical testing was mixed and composed with NANA per 1kg (on the basis of 100% of purity) for 1g(NANA-L processed group), 5g(NANA-M processed group) and 10g(NANA-H processed group) on the basis of AIN-76A.

2) The whole experimental group was composed by mixing the control group(AIN-76A feeding intake group) and comparison group(synthesized NANA added basic feeding group, SNANA) and basic feeding(AIN-76A) and development NANA as a test group at the same concentration.

3) Method and materials

We investigated by the safety assessment item under the condition of growth and butchery on each 4th, 8th, and 13th week after having experimental animal freely-intake the made feeding. Main assessment category was divided and compared by 9 items : the efficiency of feeding(growth), weight(whole weight and per organs), histopathology by organs, investigation of blood indicator and abnormality of chromosome, mineral distribution per organs and in fecal and the whole change of microbes living inside of intestine.

- a) Dividing by schedule, we compared everyday growth ratio related to feeding intake amount(measured for 13 weeks per 24hours) to the control-comparison NANA process group, no difference was acknowledged.
- b) We compared the result which affect to body weight and the change per organs to control-comparison NANA process group also dividing by term. As a result, the difference compared to control group in the whole experimental group of body weight and muscular tissue(5 organs : Liver, Kidney, Spleen, Heart, Lung) and 2 osseous tissues(femur, Backbone) was not acknowledged.
- c) On the basis of the safety result related to the growth of NANA material, we additionally investigated the safety result in body through the investigation of blood making and index safety and chromosome abnormality, no difference was acknowledged too.
- d) Implementing tissue investigation on the basis of the assessment of growth and blood safety, we did histopathological safety investigation by

each 7 organs(Liver, Kidney, Spleen, Heart, Lung, Femur and Backbone) after 8 weeks and 13 weeks passed.

- (1) No similar difference was acknowledged in the whole tissue after 8 weeks, but Necrosis phenomenon was happened in the Spleen of the development NANA process group when 13 week passed.
- (2) As a result of assessment of the safety by the concentration of development NANA, it is acknowledged that there is no safety when intakes more than 0.5% of development NANA consistently under the intaking condition at least more than 8 weeks. However, additional certification was considered to be needed as there was no problem with safety in the case of the comparison group which possesses identical molecule and chemical formula structure(synthesized NANA).

e) We investigated whether the NANA material arises the mineral change in the important organs dividing by the elapsed time.

- (1) The ion that evoke the central change was calcium, and the similarity was acknowledged in the osseous tissue of 7 organs.
- (2) As investigated the change of calcium by schedule with the osseous tissue as the center, it showed decrease from 10~20% in the whold control-contrast NANA process group after 4 weeks, but when 8 weeks passes it rather showed the increase with in the range of 20%. This result was judged that NANA material is absorbed into body and has a functionality which shows the tendency of the substitution of mineral ion and change.
- (3) The important mineral change in muscular tissue was happened in Spleen, the main mineral was iron ion. As compared the detected amount, it tended to be accumulated as high concentration from about double to 3 times in the control(150~180ppm)-comparison NANA process group, and increases proportional to the concentration.
- (4) As a result of distribution investigation by organs according to the NANA material and processed concentration, the pattern of control-contrast synthesized NANA and development NANA

concentration was similar, it tended to decrease as the concentration goes up and the difference by the material of NANA was not acknowledged.

f) The breaking force of osseous tissue

We did control–contrast comparing investigation of the change of the weight of osseous tissue(dried Femur standard), growth(length, width), and breaking force according to NANA material(synthesized NANA and development NANA), concentration(0.1%, 0.5% and 1%) and intaking term(8weeks and 13weeks). The result is written as below.

- (1) The calcium content in osseous tissue when intaking NANA decreased 10~20% until the 4th week, but it rather increased about 10~20% after the 8th week.
- (2) It is investigated that when the calcium in osseous tissue of NANA process group is increase, the weight of osseous tissue, lengthe growth and strength also increases more than 10%.
- (3) The effect to the change in osseous tissue according to the concentration difference when intaking NANA was not acknowledged($p < 0.05$).
- (4) The effect to the change in osseous tissue between the NANA material was not acknowledged($p < 0.05$).

g) Investication of the distribution change of the microbes living in intestine

We confirmed whether the whole change of microbes living in intestine is evoked according to NANA material(synthesized NANA and development NANA), concentration(0.1%, 0.5% and 1%) and intaking term(4 weeks, 8 weeks and 13 weeks) under the condition of aerobic condition dividing into colon bacillus group(MacConkey culture medium) compared to whole number of germs(TSA culture medium) and lactobacillus(BCP culture medium). The result is written as below.

- (1) As a result of the observation of the average intaking amount of feeding during 14 weeks, the intaking amount per concentration of experiment

section had no similar difference, but the intaking amount of feeding of the control contrast experiment group decreased at maximum $21 \pm 5\%$ and the similar difference was acknowledged ($p < 0.05$).

- (2) Intaking of NANA and the intaking term showed close relation with change induction of the microbes living in intestine, then the colon bacillus group and lactobacillus was acknowledged as a difference causing microbes ($p < 0.01$).
- (3) The investigation result according to intaking term of NANA is written as below.
 - (a) As a overall tendency, most of colon bacillus group was not detected within 8 weeks after NANA intake, instead the whole lactobacillus similarly increase to maximum 9 times ($p < 0.05$). However, eventually balanced in intestine because the contrast difference of control group was not acknowledged when intaking for long-term more than 8 weeks.
 - (b) Therefore, although the change of the microbes living in intestine was evoked by NANA that flowed into intestine through the first NANA intaking and body spreading mechanism, it is judged that the longer the intaking term the more stable the microbes living in intestine. Consequently, the term the NANA intaking evoke the change of microbes living in intestine is at most within 8 weeks.
- (4) We investigated whether the synthesized NANA possessing identical chemical structure and molecular structure and development NANA affect to the distribution investigation of microbes living in intestine (8 weeks of intaking standard). As a result, the development NANA of NANA material is acknowledged that evoke about 7~10 times of the change of the microbes living in intestine as the synthesized NANA. This is judged that it is caused from the complex result such as absorption into body and body spread mechanism and accumulation in intestine : the final way to excretion and the following antibiosis difference although it is the NANA with same ingredient. So later detailed research is needed.

- (5) We controled, contrasted, and investigated the correlation with the NANA material intaking and the change of microbes living in intestine according to terms and the change of nutritional distribution in excretion which is not emitted but absorbed by the former two things.
- a) When the distribution change of microbes living in intestine after the NANA taking is extreme, the distribution of nutrient sources in excretion also tends to decrease similarly.
 - b) We investigated the result affecting to the change of the microbes living in intestine according to NANA intaking and decrease of the emitted nutrient source in excretion.
 - (1) When the change of the microbes living in intestine is extreme(8 weeks of intake), the emitting concentration of the nuritient source in excretion also decreased.
 - (2) When the germs living in intestine is changed to normal state according to the long-term intake of NANA material(more than 8 weeks), no difference of the composition of emitted nutrient source was not acknowledged.

13. Detailed classified research development result compared to research object

Object of research	Result of research
1. Investigating basic data for developing NANA material	<ol style="list-style-type: none"> 1. Completed investigation of price of NANA and market applicability in both inside and outside of Korea 2. Completed investigation of direction of research and development in both inside and outside of Korea 3. Accomplished investigation about related patent application data(registration, standard : Japan, US 4. Completed investigation about data of synthetic NANA material safety data(MSDS)
2. Establishing the required analysis law of NANA development	<ol style="list-style-type: none"> 1. Completed founding of nutritional contents analysis method <ul style="list-style-type: none"> -Crude protein(Kjedhal analysis), crude fat(Gerber method), sugars analysis method(HPLC) -Fatty acid analysis : GC(FID) 2. Analysis of molecular change : FPLC 3. Analysis of organic acid(NANA) : HPLC 4. Certification of developed NANA property : FT-IR, XRD, SEM etc. 5. Founded microbe test method(Korean Food Standards Codex standard)
3. Preparing proteinoid material for seperating NANA material (GMP) and provision(cooperative research institution)	<ol style="list-style-type: none"> 1. Milk->Whey Protein->GMP 1. Milk -> Manufacturing sweet whey powder(by-product of cheese) ->Finishing manufacturing GMP 2. Provision of GMP cooperative institution(manufactures and provided amount) : 1,200kg
4. Advance assessment of NANA antibacteiral(target for harmful microbes) spectrum	<ol style="list-style-type: none"> 1. Completed MIC certification of NANA compared to bacterias 2. Completed certification of antibiosis per germ(gram-negative and gram-positive bacillus and E.coliO157:H7) 3. Completed certification of antibiosis under the condition of heat treatment and non-heat treatment 4. Completed analysis of cause of antibacterial decline when adding mineral and milk
5. Advance assessment of physical/physico-chemical change compared to condition of application of NANA to actual field	<ol style="list-style-type: none"> 1. Completed investigation of NANA molecular weight(FPLC, HPLC) change per the condition of heat treatment(70~121℃) 2. Completed investigation of antibiosis(Division of gram-positive and negative bacillus) before and after the heat treatment 3. Completed investigation of antibiosis and long and short-term(1 year) change of molecular weight before and after the heat treatment 4. Completed investigation of acid and alkali stability(change of color and molecular weight) 5. Completed securing basic data of product applying advance assessment of NANA
6. Advance assessment of NANA animal safety (in vitro : standard cell line usage)	<ol style="list-style-type: none"> 1. Founded <i>in vitro</i> toxicity certification method using standard cell strain[HEK 293 cell (human embryonic kidney cell), RAW 264.7 cell(macrophage cell)] 2. Founded verification method : NO and MTT assay(connected toxicity assessment)
7. Assessment of NANA stability(long and short-term)	<ol style="list-style-type: none"> 1. Completed assessment of manufactures method of complete NANA containing product 2. Secured investigation result of molecular weight change when storing for short and long term 3. Secured basic material of product recipe(storage stability) when finish the research
8. Assessing formation of resistance and NANA originated reantibacterial effect for the germs having antibacterial resistance	<ol style="list-style-type: none"> 1. Certificated(Finished) shape change related to antibacterial according to NANA process 2. Certificated antibacterial mechanism through NANA material process compared to mutual antimicrobial
9. Establishing NANA production type of Neuraminidase Assay technique	<ol style="list-style-type: none"> 1. Finished foudation of optimum disposition making condition 2. Finished foundation of reacting liquid condition(temperature and time) 3. Finished foundation of Blank condition 4. Finished foundation of NANA amount fixing)technique
10. Founding the Neuraminidase screening technique in the existing commercial enzyme	<ol style="list-style-type: none"> 1 Finished Neuraminidase screening utilizing about 40 types of commercial enzyme supplement which used as existing enzyme for food 2. Measured considerably low enzyme activity in part of enzyme(Judged as economic inconsistence because of the exceedingly low enzyme activity)

Object of research	Result of research
11. Founding Neuraminidase screening from microbes for food	<ol style="list-style-type: none"> 1. Completed Neuraminidase active measurement which has high significance in 3 microbes of about 50 (economic consistence assessment) 2. result of selecting Neuraminidase production strain : Finally decided <i>Arthrobacter ureafaciens</i> KCTC 3387 as Neuraminidase production strain considering the ease of enzyme titer and enzyme production
12. Seperating and Purifying selected food microbes applied Neuraminidase and Researching on the feature	<ol style="list-style-type: none"> 1. Established condition of final increasing specific activity about fivefold compared to seperating purification culture supernatant. 2. Completed research of reaction feature to proteinoid(GMP) using seperating enzyme liquid (related to the mass production system establishing of the second year) <ul style="list-style-type: none"> - Assessment(Completion) of the interference optimum pH, temperature, enzyme heat stability, pH, stability, salts etc and effect
13. Separating selected microbes and Establishing the optimum production condition of NANA in developed Neuraminidase applied GMP	<ol style="list-style-type: none"> 1. Completed establishing the technique and the optimum condition of cutting off NANA from GMP using Neuraminidase 2. Established(Completed) the reaction condition disposition GMP applied seperation enzyme 3. Completed establishing of optimum disposition concentration(Finished related implementing of the system related to developed enzyme applied NANA mass production system of the second year)
14. Establishing enzyme for NANA production and NANA mass production system	<ol style="list-style-type: none"> 1. Established(Completed) NANA mass production technique using selected food microbe(<i>Arthrobacter</i>) seperating enzyme(Neuraminidase) <ol style="list-style-type: none"> a. Establishing Neuraminidase mass production technique for <i>Arthrobacter</i> <ul style="list-style-type: none"> - Completed the developed enzyme physiochemical property investigation - Assessment(Completed) of economic(percentage of production amount, decomposition and so on) b. Completed rank analysis of developed enzyme amino acid <ul style="list-style-type: none"> - <i>Arthrobacter</i> seperation Neuraminidase Intellectual property rights security - Connection of securing the intellectual property right of <i>Arthrobacter</i> seperating Neuraminidase 2. Established NANA mass production technique in developed enzyme applied GMP <ol style="list-style-type: none"> a. economic(productivity of NANA, on unit/GMP 1kg) assessment b. Completed deduction of problem of mass production (loss of NANA and yield growth) c. Set(Completed) the standard of NANA industrialization <ul style="list-style-type: none"> - Deduction of problem between mass production such as the percentage of production amount(lost about 33% of aimed amount) - Set the purity standard in the product applied type of NANA mass production (on production purity : 26%) 3. Founded(Completed) recovery(loss decreasing) increasing technique in NANA production <ol style="list-style-type: none"> a. Solution of loss in decomposing active process(removing precipitate) b. Solution of loss in the removing process of ethanol precipitate c. dry expense lowering method : improving the lyophilization dry process d. Method of increasing recovery : founded over 75%
15. Antibacterial spectrum of developed NANA and Antibacterial mechanism	<ol style="list-style-type: none"> 1. Comparing investigation(completed) of the antibacterial spectrum of developed NANA <ul style="list-style-type: none"> - Dividing gram-positive bacillus, gram-negative bacillus and yeast(MIC rate of change certification) 2. Checked(Completed) whether the developed NANA forms resistance or not <ol style="list-style-type: none"> a. Confirmed the possession or non-possession of resistance compared to 37 types of antibiotic b. 10th generation repeated process(<i>E.coli</i> standard germ(whether possesses resistance or not) applied assessment) 3. Assessment(Completed) of antibacteiral(yeast, colon bacillus) mechanism <ol style="list-style-type: none"> a. Change of shape(SEM) (on the basis of yeast, colon bacillus) b. Cell membrane related assessment(method 1 : Fluorescence dying Method, method 2 : Depolarization Method, method 3 : Calcein Leakge in artificial Vesicles Method)

Object of research	Result of research
16. Assessment of the application of developed NANA to actual field	1. Investigated(Completed) physical/physico-chemical/biological change in long and short-term <ul style="list-style-type: none"> a. Stability assessment before and after the heat treatment b. long and short-term(maximum 1 year), per property and state assessment[powder, 1%(w/w)liquid] and per storage condition(room temperature, refrigeration) 2. Assessment of directivity setting of the product application <ul style="list-style-type: none"> - the liquid product added type and powder product added type
17. Establishing recipe of Type possessing controlling effect and related recipe(economic feasibility assessment)	1. Establishing the recipe of harmful germ controlling NANA commercialization <ul style="list-style-type: none"> - tablet type(immediate eating type), pulp type(liquid product type such as milk and so on) 2. Progress of food additive approval : in certification institution(Animal, Plant and Fisheries Quarantine And Inspection Agency, on the basis of 2010.12.19) reviewing(in part of the approval of product application) <ul style="list-style-type: none"> - Setting the directivity of the manufacturing after the technique consulting of related institution(KFDA, NVRQS) (order of measure : food additive→Health functional food.→ product outside of medicine→medicine) 3. Secured(Completed) NANA antibacterial securing type of addition amount <ul style="list-style-type: none"> - Secured effect as a natural antimicrobial - Secured NANA addition amount per liquid 100ml(or g) : 0.5g(0.5%) - Secured natural antimicrobial effect : gram-negative bacillus(extinction), gram-positive bacillus(fungistatic action) 4. Secured(Completed) division of recipe per Type <ul style="list-style-type: none"> - Tablet type, pulp powder type(liquid applied type) 5. Magnified(Completed) usage(applicability)per a fixed form recipe <ul style="list-style-type: none"> a. tablet type : for toddler~for adult <ul style="list-style-type: none"> 1) oral application type(prevention/cure of periodontitis) 2) type for stomach(anti-helicobacter) 3) type for intestine(Probiotic and Synbiotic material) b. liquid product added(pulp) type : for infant and toddler <ul style="list-style-type: none"> 1) milk and liquid product added type : harmful germs extinction material for infant and toddler 2) type for oral : sanitube of periodontitis and cavity 3) type for intestine : Synbiotic material, sanitube/medicine of enteritis
18.commercialization	1. Set of commercialization progress roadmap <ul style="list-style-type: none"> a. stage 1 : conference after securing intellectual property right(patent application and registration) b. stage 2 : Implementing technique consulting with related institution(KFDA, NVRQS, Korea) c. stage 3 : GLP certification(field of natural material new medicine : natural antimicrobial) d. stage 4 : Set the roadmap of NANA mass production system and commercialization <ul style="list-style-type: none"> 1) output of NANA per year, expected sales per year, assessment necessary budget for building production institution and required land 2)plan for facility design(after the approval of supervising institution) 2. Implementing advertising and marketing (after finishing, 3-year-expected)

V. Result of Research and Plan of utilization

1. Result of research

a. Patent application(4)

- 1) Patent application No. 10-2011-0029609 : Producing method of N-Acetylneuraminic using Neuraminidase separated from microbes for food
- 2) Patent application No. 10-2011-006459 : Natural antimicrobial composite using Glycomacropeptide Neuraminidase resolvent including N-Acetylneuraminic as active constituent
- 3) Resolvent for colon bacillus diarrhea cure using N-Acetylneuraminic as active constituent
- 4) Resolvent for oral periodontitis cure using N-Acetylneuraminic as active constituent

b. New personnel hire (3 masters, 1 doctor) : Senior Research, Rresearcher of central laboratory

c. masters training (2 masters) : Gyeongsang university (Cho seon jeong, Sim heui yeon)

d. Thesis(1) : Non SCI level, Korean J. Dairy Sci. Technol.

- Research on the safety of NANA separated from milk serum protein GMP and clearing up the inflammation soothing mechanism. Vol29,No2.pp17-23. 011

e. significance : Finished action of restriction on secret distribution

- Expecting to present thesis after securing intellectual property rights(Basis : research written agreement as standard, registering result of research · intention to donate)

2. Research achievement using plan

Core result of research	Research achievement using plan
<p>1. Founding research result of NANA manufactures method and mass production method</p>	<ol style="list-style-type: none"> 1. Expanding applicability to development KNOW-HOW, development of double functional proteinoid food <ul style="list-style-type: none"> - natural antimicrobial, Probiotic effect and prevention of osteoporosis etc. 2. Gradual progress according to the result of review of high value manufacturing association usage (approval institution : NVRQS and KFDA) <ul style="list-style-type: none"> - Stage 1 : Applying unused surplus food by-product to high-value product (approval procedure is unnecessary, effect indication is impossible) - Stage 2 : apply to development of health supplement food (mark effect after registration of observance) - Stage 3 : apply to medicine product development (apply after observance of standard of human body clinical testing, progress) 3. Active application to development of developed KNOW-HOW new high value manufacturing <ul style="list-style-type: none"> - Separating development material addition type and product development type
<p>2. Research result of NANA manufacturing (a fixed form and founding recipe)</p>	<ol style="list-style-type: none"> 1. Enlarged application of product family for infant and toddler and the old who is vulnerable to illness 2. Active application to developing weakness strengthening product family of current natural antimicrobial requiring products 3. Actively using as basic data when gradually developing natural antimicrobial strengthened food , the alternative to synthetic antimicrobial (babyfood, health favorite food etc.) 4. connect to development of medicine level high value food based on research result

<p>3. Effect assessment result of animal clinical testing of NANA</p>	<ol style="list-style-type: none"> 1. Tablet type : actively apply to development of solid type high value product family 2. pulp type : actively apply to development of liquid type high value product family 3. actively apply to expanding usage applicability : animal field and fishery field 4. Actively use as a new material, developing and upgrading quality of functional product through addition to existing product 5. Application of high value commercialization concept <ol style="list-style-type: none"> a. Developing Probiotic and osteoporosis preventing type functional food for the old b. redevelopment product as a supplement to weakness of existing product 6. Actively using sales and selling strategy of both inside and outside of Korea(profit maximization)
<p>4.commercialization</p>	<ol style="list-style-type: none"> 1. In the point of commercialization, capitalizing the advantage as a fulfill of nation assignment and utilizing technical superiority we will get the most out of the advantage. 2. In developing natural antimicrobial, the objectively proved development result will be deducted, we will actively use the fact that the result of antibacterial functional material development secure the technical superiority both in and out of Korea when it comes to commercialization(marketing and sales). 3. Using making technique KNOW-HOW such as developing and production trial goods, maxing ratio, actively apply to developing usage maximizing product. 4. Utilizing the result of development material animal clinic testing, we will actively apply to support for marketing ability and advance mechanism grasping when developing applications.

CONTENTS

Chapter 1. Introduction	48
Chapter 2. International and domestic trends of the technical development	54
Chapter 3. Results and discussion	60
Section 1. Establishment of essential analysis methods for NANA	60
Section 2. Production of Neuraminidase enzyme for producing NANA and Founding a mass production system of NANA	84
Section 3. Advance assessment of NANA antibacteiral(target for harmful microbes) spectrum	142
Section 4. Investigating physical/chemical/biological change for long and short-term	183
Section 5. Advance assessment of NANA animal safety(<i>in vitro</i> : standard cell line usage)	201
Section 6. Clinical testing of developed NANA(Safety and Basic effect)	216
Section 7. Establishing a recipe of harmful germ controlling product in babyfoods	263
Chapter 4. Achievements and contribution to the related fields	269
Section 1. Achievement of research and development	269
Section 2. Contribution of research and development	273
Chapter 5. Application	274
Section 1. Results of study	274
Section 2. Plans for application	287
Chapter 6. International techniques	291
Chapter 7. References	299

목 차

제 1 장 연구개발과제의 개요	48
제 2 장 국내외 기술개발 현황	54
제 3 장 연구개발수행 내용 및 결과	60
제 1 절. NANA소재개발 관련 필수분석법 정립	60
제 2 절. Neuraminidase(NANA생산효소) 및 NANA 대량생산 시스템 정립	84
제 3 절. NANA소재의 항균메카니즘 구명	142
제 4 절. NANA소재의 제품적용성 평가	183
제 5 절. NANA소재의 사전안전성(Cell-line) 평가	201
제 6 절. NANA소재의 동물임상평가(안전성 및 기초효능)	216
제 7 절. 영·유아식내 유해세균 제어형 제품 레시피 정립	263
제 4 장 목표 달성도 및 관련분야에 기여도	269
제 1 절 목표달성도	269
제 2 절 관련분야의 기여도	273
제 5 장 연구개발성과 및 활용계획	274
제 1 절 연구결과 성과	274
제 2 절 연구결과 활용계획	287
제 6 장 연구개발 과정에서 수집한 해외과학 기술정보	291
제 7 장 참고문헌	299

제 1 장 연구개발과제의 개요

1. 영유아식내 유해병원균 사멸형 NANA소재의 제품화

영유아식품은 병원균을 예방하기 위한 소재(합성제제, 항생제 및 방부제 등)는 첨가 자체가 일체 불허되는 특성(법적규제)을 보유하고 있다.

우유는 특성상 항균소재(항생제 제외)를 첨가하는 경우, 우유고유 구성물질(유단백질, 유지방, 탄수화물 등)들과 즉각적인 킬레이팅 반응 유발효과가 발생, 소재 고유의 항균능력을 무력화 시키는 특성을 보유함에 따라 이를 해결할 수 있는 천연항균소재의 개발에 대한 국내외적 연구가 활발히 진행되고 있다.

본 과제에서는 이러한 상기사항을 해결하는 방안으로 유단백질(K-casein)내 존재하는 당단백질인 NANA에 주목하였는데, NANA는 세포막의 세포 표면에 있는 당단백질 또는 당지질의 구성성분으로 말단에 위치함으로써 다양한 생물학적인 기능을 발휘하는데, 최근의 활발한 연구로 인하여 여러 가지 생리적 기능이 해명되고 있다. 예를 들면, 시알릭산은 포유동물의 생체 내에서 프락토즈-6-포스페이트(fructose-6-phosphate)로부터 N-아세틸만노즈아민(N-acetylmannosamine)을 경유하여 합성된다.

이러한 NANA는 뇌의 강글리오사이드(ganglioside)나 당단백질의 구성성분으로, 뇌나 중추신경계에 특히 많이 함유되어 있으며, 그 양이 유아기에 급격히 증가하기 때문에, NANA는 이러한 조직의 기능 발현이나 발달에 중요한 역할을 하는 것으로 생각되어진다. 또한, 바이러스나 세균 등의 감염은 점막 상피세포에 있는 당 그룹에 바이러스나 세균이 결합함으로써 시작되는데, 병원성 대장균이나 콜레라균이 생산하는 독소는 소화관 상피세포에 NANA를 함유하는 당 그룹에 결합하여 설사를 일으키며, 또한, 점액단백질(mucoprotein)의 불가결한 성분으로 인플루엔자 바이러스의 용혈작용을 저지하는 등 다양한 역할이 밝혀지고 있으며, 이외에 항암제의 개발, 독소성분의 중화작용, 항염증 작용 등의 기능이 보고되고 있다.

본 과제에서 주목한 유해세균인 Gram 양성균인 *Bacillus cereus*(증상 : 설사, 구토, 복통)와 Gram양성균인 *Enterobacter sakazakii*(증상 : 신생아 뇌수막염)는 영.유아 및 노약자에게 피해를 일으키는 국내외적 법적규제항목(*B. cereus* : 100cfu/100g이내 규제, *E. sakazakii* : 불검출)며, 영유아 및 노인식에서는 특별 관리대상 병원균이다.

이들 유해세균으로부터 야기된 산업적 피해사항을 살펴보면, 2006년부터 2007년

국내에서 발생하였던 두 병원균 영유아식 감염사태로 유아용 조제분유는 500억(1개사, 1품목 기준), 이유식은 15억(1개사, 1품목 기준)으로 약 550억의 손해(1개사 기준)가 발생하였다고 추정되고 있으며, 유형 및 무형적인 부분에서 식품업계의 손실에 대한 평가는 상상을 할 수 없다.

현재 유업계를 포함한 식품업계는 영·유아식품내에서 상기 두 병원균이 검출될 시, 조치사항으로는 1차적으로 해당 제품의 단산과 2차적으로는 전량 제품 수거 및 해결 방향을 모색하는 수준이며, 현재는 제조상 열처리 공정과 더불어 2차 오염을 예방하는 단순처리방법이외는 뾰족한 해결방법이 없는 실정이다.

본 과제에서는 NANA는 다양한 고유특성(항바이러스작용, 항암작용, 항염증 억제작용, 세균감염방어 및 억제기작 보유, 면역증강 능력, 신경신호전달 및 피부색소 침착 억제효과 등)을 보유하고 있다고 알려지고 있음을 주목하였는데, 현재 국내외적으로 사용(대부분이 의료용)되고 있는 NANA는 대장균의 유전자 재조합에 따른 미생물 생성물과 합성제품이 주종을 이루고 있음에 따라 식품에 광범위하게 적용하기 위해서는 안전성 등의 해결하여야 할 문제가 많은 실정이다.

현재, NANA의 국제 시장 가격은 10,000~16,000\$(1\$:1,000원기준, '11년 기준)/Kg으로 형성되어 있으며 대부분은 중국산이 시장을 장악하고 있는 실정이고, 일부 특수 병원영양식에 적용되고 있으나 일반 식품에 대한 적용사례는 없다.

이는 안전성을 확보(용도용법 확대)하기 위한 글라이코믹스 연구개발[식물의 물질 대사를 이용한 NANA생산(Nature Biotech., 21권, 12호, 1470-1471), 당사슬 리모델링(유럽 EUROCardDB), Bacterial Polysaccharide, Glycoconjugate 및 Carbohydrate 합성 등]이 국내외 연구자들에 의하여 다각도로 진행되고 있다.

본 과제와 관련될 수 있는 단백질 의약품 세계시장(당단백질 의약품이 단백질 시장의 60%점유)은 '06년 474억\$에서 2011년에는 557억달러로 점차적인 증가가 예상(근거 : 글라이코믹스 및 탄수화물 의약품, 국가생명공학정책연구센터, 총서 제39권, 2007.)되고 있으며, 이에 따라 국내도 2005년부터 “Glycomics를 이용한 차세대 의약품 개발사업(총사업비 :100.5억원)” 이 시작되었으나 기초단계로 진행되고 있다.

당단백질 의약품은 미생물의 유전자 재조합 부산물(호르몬, 사이토카인, 효소 및 효소조절인자, 성장인자, 혈액응고인자, 단클론항체)에 대한 사용 규제(가이드라인 설정 중)에 대한 것이고, 본 과제와 관련된 유단백질 기원성 항균소재와 관련 항목은 현재는 없다(근거: 당단백질의약품의 당구조 분석 및 시험법 길라잡이, 식약청, 2007.). 국내외적 “글라이코믹스 및 탄수화물 의약품 연구개발” 과정과 동일선상의 연구개발이라 할 수 있으며, 따라서 본 과제는 우유유래의 다기능성을 보유한 천연

항균성 소재개발결과(기초연구)를 영·유아식품에 일련되게 바로 적용(실용화)하는 현장어로해결과 국제기술우위를 선점하는 대안을 동시에 확보한다 할 수 있다.

주관연구기관과 협동기관은 유제품과 효소 연구개발 및 생산에 관하여 충분한 KNOW-HOW와 인적구성 및 시설장비를 보유하고 있는 전문회사로서, 천연 NANA를 분리하기 위한 유단백질의 목적원료(분유)내 대량 생산이 가능하고, 본 과제는 병원성 및 일반세균에 대한 제품안전에 대한 대안을 어떻게라도 찾아야 한다는 데에는 상호 충분히 공감하고 이에 대한 이견은 없다.

현재, 국내외 식품에 대한 소비자의 요구성을 살펴보면, 가격은 식품으로, 품질 및 기능성은 의약품 수준으로 요구하고 있는 바, 개발될 소재는 여기에 적합하다 할 수 있으며, 국내외 시장 점유율 신장에 있어 우위를 점유할 수 있을 첨단 핵심기술인으로 예상된다.

결국, 본 과제는 현재 영유아식품(조제분유 및 이유식 등)내 감염되어 공중보건학적인 피해를 일으키고 있으나 뚜렷한 대책이 없는, 고질적인 병원성 세균(*Bacillus cereus*, *Enterobacter sakazakii*)에 대하여, 항균능력(경제성 확보)을 보유한 유단백질(K-casein 및 GMP) 기원성 천연Bacteriocin(NANA)를 효소적 처리법으로 분리 정제 및 이를 대량생산과 이를 다시 유제품내 첨가하므로써, 소비자 기호성에 충족되는 안전식품 생산에 적용하는 일관된 시스템을 적용 구축하므로써, 국제기술력(글라이코믹스 연구개발 분야에서 국제 우위선점과 산업화가 담보된 최종 안전 영·유아식품 개발 및 추후 용도용법 확대를 위한 소재 및 제품화에 개발에 목적을 두었다.

2. GMP로부터 N-Acetylneuraminic acid(NANA)생산을 위한 Neuraminidase의 개발 및 NANA 생산기술 개발

가. Glycomacropeptide(GMP)와 N-acetylneuraminic acid

Glycomacropeptide(GMP) 우유 속 단백질의 일종인 κ -casein에 chymosin의 작용으로 105번 Phe와 106번 Met 사이의 펩타이드 결합이 절단되어 생성되는 C-말단 63개의 펩타이드를 의미하며(그림 1), 생산 방법에 따라 당과 인의 함량에 상당한 차이를 가진다고 한다.¹

GMP는 *Vibrio cholera*와 *E.coli*의 enterotoxins과 부착하는 능력을 가지고 있고 *Bifidobacterium*의 성장을 촉진하며, 박테리아와 바이러스의 장기와의 접촉을 억제하는 효능을 가지고 있다.²

GMP에는 N-acetylneuraminic acid(NANA), galactose(gal),

N-acetylgalactosamine (GalNAc)의 3개의 당이 3개 또는 4개가 연결된 형태로 Thr나 Ser 잔기에 연결되어 있는데 이때 말단에 위치한 NANA를 자르는 효소를 neuraminidase라고 한다(그림 2).³

NANA는 nine-carbon sugar family에 속하는 단당으로 세포나 수용성 단백질에 당사슬 형태로 부착되어 있으며 고등동물의 세포나 미생물에서 glucose로부터 복잡한 과정을 거쳐 생성된다.⁴

NANA는 우리 몸 속의 수용기의 인지, 신경 신호전달 등에 역할을 하며, 뇌의 ganglioside의 구조와 기능에 역할을 하는 구성 물질이고,^{4,5,6} 뇌의 발달과 인지능력에 중요한 역할을 하는 필수 성분으로 영아기에 섭취는 기억과 학습 능력 향상에 역할을 하는 것으로 알려져 있다.^{6,7,8} 이 밖에도 항염증 효과나 몸속의 과산화수소 제거에 역할을 한다고 알려져 있어 현재 기능성 식품으로 연구되어지고 있다.^{9,10}

NANA는 현재 대부분 재조합 *E. coli* 에서 합성되거나 *E. coli*로부터 생산된 효소를 이용해 N-acetyl-D-glucosamine으로 부터 합성되며 일부가 화학적 합성방법으로 생산되고 있다.^{11,12} NANA는 대부분 의료용 소재로 활용되고 있으며 아직까지 식품산업에 적용된 예는 없다.

나. Neuraminidase

당단백질이나 당지질, 올리고당, colominic acid 등의 말단에 존재하는 NANA를 자르는 효소를 neuraminidase라고 하며, 일반적으로 *Influenza virus*, *Vibrio cholera*, *Clostridium perfringens*와 같은 병원성 균주에서 병원성 요소로서 숙주와의 부착에 중요한 역할을 하는 것으로 알려져 있으며,¹³ 일부 유산균과 비병원성 균주에서도 생산되는 것으로 알려져 있다.^{14,15,16} 하지만 대부분의 neuraminidase가 병원성 균주로부터 생산되기 때문에 이러한 neuraminidase는 식품산업에서의 사용이 부적절하다.

따라서 본 연구에서는 식품 산업에 사용할 수 있는 neuraminidase를 찾고자 식품용 효소와, 식품산업용 미생물, 비병원성 미생물을 이용한 neuraminidase screening을 진행하였고 이 중 *Arthrobacter ureafaciens*를 선택하였다.

*A. ureafaciens*는 비병원성 균주로서 L(88kDa), M1(66kDa), M2(66kDa), S(52kDa)의 총 4개의 neuraminidase를 가지고 있으며, 이 4가지는 하나의 gene으로부터 생성되어 C-말단이 특이적으로 잘려 다른 4가지 형태로 존재하는 것으로 알려져 있으며, gene의 서열은 이미 알려져 있다.^{17,18} 이 균주는 특이적으로 4가지 효소 모두가 α -(2,3), α -(2,6), α -(2,8) 세 개의 결합을 끊을 수 있는 능력을 가

지고 있기 때문에 이 균주를 이용하여 실험을 진행하였다.¹⁸

*A. ureafaciens*의 neuraminidase는 현재 Sigma, Merck와 같은 회사에서 상품화 되어있지만 연구목적으로 생산된 효소이기 때문에 생산량과 가격적 측면에서 식품산업에서의 상업적 이용은 부적절하다. 따라서, 식품산업에서 이용할 수 있는 생산방법의 개발이 필요한 실정이다.

따라서, 본 연구에서는 1) GMP에 작용하여 NANA를 생산할 수 있는 neuraminidase를 선발하고자 하며, 2) 선발된 neuraminidase를 분리하여 반응특성을 연구하고, 3) 이 효소제를 이용하여 GMP로부터 NANA를 상업적으로 생산하기 위한 기초연구를 수행하고자 하였다.

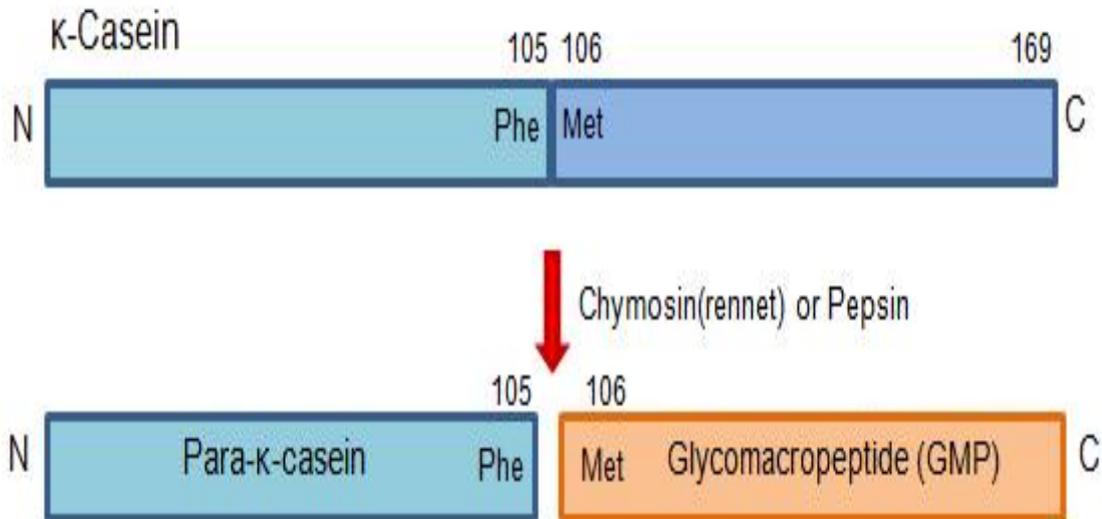


그림 1. 기질 κ -casein에 대하여 chymosin 또는 pepsin처리후 GMP제조 메카니즘

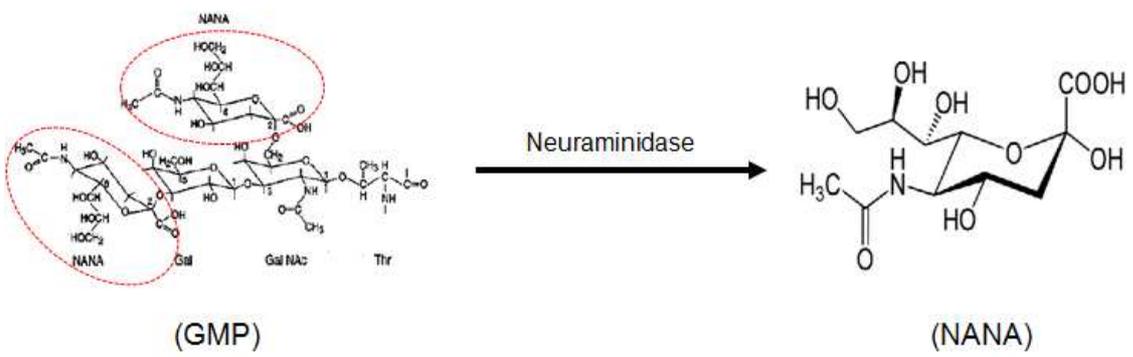


그림 2 . GMP로부터 neuraminidase처리에 의한 NANA제조 Scheme

제 2 장 국내외 기술개발 현황

본 과제에서는 우유내 존재하는 미이용 자원인 NANA가 보유한 다중 기능성중 항균성에 주목하고, 경제성이 확보되도록 대량생산시스템을 구축 및 산업적으로 생산한 NANA 소재에 대한 동물임상(안전성 평가) 절차를 수행한 후, 최종적으로 영·유아 식품내 감염되어 공중보건학적 피해를 유발하는 병원균(*E. sakazakii* 및 *B. cereus*) 제어형 고부가 제품으로 개발코져 하였다. 연구가 종료되는 시점에서 조사된 국내외 기술개발 현황은 다음과 같다.

1. 국내외 관련시장현황

가. 국내 유업계의 현황

선진 낙농국의 원유 및 관련 유제품의 국내 가격경쟁력은 약 1/2~1/3수준임에 따라 농축산물 FTA와 시장개방에 속도에 따라 국내 낙농산업은 비례하여 피해(낙농분야 : 416~594억원)가 증가될 것이다.

낙농제품 수출입 현황으로, '07년 무역적자는 약 2억\$[수출 :13천톤(42,241천\$), 총수입량 : 72천톤(233,951천\$)]에 달하고 있다. 현재 국내 낙농업 현황으로서, 낙농산업 총생산액('07)은 1조 6천억원이고, 젖소사육두수는 점차 감소하고 있으나 규모화 및 젖소두당 산유량 증가로 원유와 더불어 분유류의 재고량이 동시에 급격히 증가되고 있다.

현재 국내 낙농산업의 주요 이슈는, 총체적인 고민거리인 잉여 원유('07 기말재고량 : 141천톤)의 안정적인 소비방법을 확보하는 것인데, 생산자는 정부에 전적으로 대책을 의존하고 있으며, 정부 또한 뚜렷한 대안(공급 및 가격관리, 유통 및 품질관리, 소비촉진과 신규 유제품개발)이 없어 결국 낙농산업의 총체적인 피해로 연결되고 있다

이러한 측면에서 본 과제는 우유소재의 침단화(세분화) 연구를 통하여 잉여 국내산 원유를 이용한 기술 우위의 고부가 가치의 소재 및 상품으로 개발하고, 제품적용성의 개발을 점진적으로 확대 시, 낙농산업의 발전의 고민거리인 잉여 원유의 수급불균형 해소에 기여가 될 것이고, 이는 결국 가격경쟁력 강화와 낙농산업전반의 기반보호 및 육성이라는 대안도 될 것으로 판단된다.

나. 국내 유업관련 연구진 현황

시장전망에 대한 불확실성으로 극소수 연구자만의 산업화가 배제된 단편적 연구 활동에 치중하고 있으며, 인력공급의 핵심인, 낙농 관련 대학/학과 등 관련분야의 축소 및 폐지 등으로 연구인력 인프라는 점차적으로 축소되고 있으며, 제조업체의 가격경쟁력 저하와 수입원료 대체 등으로 전반적인 취약성이 증가일로에 있다.

기존의 단편적인 연구개발과정을 통합연구개발시스템을 통한 첨단화 소재개발로 가격경쟁력 확보 및 소비시장의 확대, 고부가가치 제품으로서 응용 및 용도/용법 확대에 필요성에 대하여 절실히 공감하고 있다.

글라이코믹스 관련 기초 연구 및 이를 토대로 한 활용연구에 대한 중요성이 인식되면서, 전문 연구 집단 및 기업 수가 점차 증가하는 추세임, 그러나 국내 글라이코믹스 관련 연구는 선진국에 비해 단편적이고 비체계적이며, 정부의 지원 규모도 매우 미비한 실정이며, 현재 본 과제와 관련하여 유사한 연구는 일부 진행되고 있지만, 직접 관련된 국내외 연구 진행사항은 현재까지는 없다[근거:국가과학기술정보서비스(NTIS), 범부처 국가 R&D현황, 2001~2008].

다. 국내 제품생산 및 시장 현황

본 과제와 관련하여 개발소재의 경우는 더욱이 적용사례가 없는데, 이는 신소재 연구개발 및 산업화에 있어서, 제조시설은 기본 분유제조공정(집유→농축(탈지)→분말)이 필요하며, 소재별 구분에 따른 제조시는 추가적으로 별도 시설 및 자금이 막대히 소요되기 때문에 영세 제조업체가 이를 산업화 하기에는 곤란하기 때문에 설사 의지가 있다 하더라도 실천이 어려움이 있다.

본 과제가 성공적인 종결이 됨에 따라 천연 NANA제제(순도 25% 기준)의 생산단가는 650\$/Kg(원료비+가공+마진포함)로 현재 국제시장 대비 1/8~10이내 가격으로 대량생산이 가능함에 따라 경제성 또한 확보 되었으며, 안전식품인 우유 단백질 유래인 만큼 시장진입시 필수적인 식품공전 및 의약품 공전내 등록문제는 없을 것으로 판단됨에 따라 현재는 건기식 및 식의약품 신청을 위한 GPP전단계에 해당하는 동물임상 검정이 완료된 상태이다.

라. 국외 제품생산 및 시장 현황

바이오의약품 중 단백질 의약품 분야가 가장 큰 시장을 차지할 것으로 전망되며, 특히 당사슬 리모델링을 통한 효능 및 안전성을 극대화 할 수 있는 Glycomicsbased drugs 개발은 향후 세계 제약시장을 주도 할 것으로 기대된다.

'06년 기준 단백질 의약품의 세계 시장은 474억 달러의 규모이며, 개량형(글라이코믹

스 기술을 포함) 항체분야가 265억 달러(전체의 56%)로 가장 큰 시장을 형성하고 있다.

2011년 단백질 의약품 시장은 557억 달러로 전망되고 있으며, 이중 개량형 항체 시장이 절반 이상을 차지하며 가장 큰 시장을 형성하며 호르몬 시장이 5.1%의 높은 성장률로 두각을 나타낼 것으로 전망된다.

최근 5년(2001~2005) 세계 재조합 단백질 의약품의 판매액 기준 상위 10위 제품들을 살펴볼 때 대부분이 당단백질로, 당단백질의 당사슬 구조 리모델링을 통하여 효능 및 안전성 극대화와 면역반응 등의 부작용을 최소화하기 위한 글라이코믹스 기술개발은 향후 바이오제품 개발의 성패를 좌우할 것으로 예상된다.

당단백질은 일반적으로 당화에 따른 치료능(therapeutic potency) 및 치료효과(therapeutic efficacy) 증가와 많은 양을 투여할 수 있게 되는(Stronger dosing possible) 장점이 있음. 이에 당단백질 시장은 '05년 250억 달러에서 '09년 402억 달러의 규모로 증가되었는데 이는 지속적인 전망이 가능할 것으로 판단된 반면 비당단백질 시장은 동기간 130억 달러에서 176억 달러로 비교적 소폭상승 경향을 보였다.

NANA의 국제 시장 가격은 10,000~16,000\$(1\$: 1,000원기준)/Kg으로 형성되어 있으며, 대부분은 중국산이 대부분의 시장을 장악하고 있는 실정이고, 4톤 규모(2007)가 수입되고 있는 있으나, 일반 식품에 대해 적용사례는 현재까지는 없다. 따라서, 본 과제에서 해결하고 저 하는 무독성이면서, 안전성이 보장된 천연NANA제제의 개발은 전체 시장에서 중요한 변수로 작용할 수 있다.

치즈 잉여 부산물(Whey)중 수용성단백질의 경우는, 많은 미이용 단백질을 보유하고 있으며, 단백질의 기본 구성인 아미노산의 구성체인 특성으로 인하여 킬레이팅과 관련한 기본적 기능기(-SH, -COOH, -P 및 -NH₂)를 보유하고 있으므로 이의 이용성과 화학 반응성을 구명할 수 있다면 다양한 분야소재개발에 활용성이 클 것으로 알려지고 있으며 경쟁적인 연구가 진행되고 있으면 본 과제도 동일선상이다.

마. 인체 항생제 시장의 추후전망

현재 항생제 개발관련 시장은 합성제품이 주종을 이루고 있으나, 이들의 지속적 사용에 따른 내성형성 및 독성 등의 문제해결을 위한 방안을 다각도로 모색중이다.

국제적인 기술개발 및 시장전망으로서, 생물전환제제(단백질 성분을 대체할 수 있는 식물지방산 소재를 의약품등 산업적 전환제제) 및 단백질의약품(당단백질 의약품이 단백질 시장의 60%점유)등 분야가 향후 연구개발 및 세계시장을 향후 주도할 것으로 예상된다.

본 연구과제와 관련한 현재 시장성은 항암제 시장과 단백질의약품 시장으로 구분할

수 있는데, 세계 항암제 시장은 853억\$('10기준), 단백질 의약품시장은 557억 \$('11년기준)으로 총 1,410억\$ 시장을 형성하고 있으며, 이중 단백질의약품분야의 비약적 증가가 예측됨. 국내도 중요성을 인식하고 2005년부터 “Glycomics를 이용한 차세대약품 개발사업(총사업비 :100.5억원)” 이 시작되었으나, 기초단계로 진행되고 있다.

따라서, 본 연구는 우유가 보유한 단백질류 및 지방산류 내에 미이용 기능성소재(당, 당-단백질, 지방산류)의 의약(외)품으로의 전환기술개발과 이를 적용한 제품개발이라는 차원은 국내외적 “Glycomics 및 탄수화물 의약품 연구개발” 과정과 동일 선상의 연구개발이라 할 수 있으며, 국제기술 우점화 관련 통합적 대안을 제시하는 연구개발이라 할 수 있다.

바. 국내 가축사양(대표적 질병) 치료제 시장

세계수의사회(WVA: World Veterinary Association, '98)가 항생물질은 성장촉진제로 사용되어서는 안된다고 규정한 이후, 배합사료내 항생제 사용금지로 인한 한국 축산농가 생산비는 12,279억원/년이 증가할 것으로 예하고 있다.

한국의 항생제 시장은 998톤(2009 기준)으로 계속 감소(치료목적 이외의 사료첨가 금지) 하는 추세이며, 1,595톤, 이중 설사치료제시장은 사료1kg당 12원으로 책정시 월 48억의 시장성을 가지고 있음.

설사피해에 가장 심각한 피해를 입는 간난돼지의 경우 월 90,510톤(10억 정도)의 사료가 사용되고 있는데, 현재 국내양돈은 9,585천두, 양계는 130,161천수, 축우의 경우는 3,080천두를 보유하고 있으며, 이에 따라 필수적으로 형성되는 가축질병 치료를 위한 치료제 시장으로서 전체 월 2,500억원 시장중 설사예방 및 치료시장으로서 789억의 시장이 월별 형성되고 있다[출처:2009년 배합사료첨가제 사용량 추세, (사)한국동물약품협회, 2009].

사. 국내외적 연구과제 및 유사 소재개발관련

1) 우유단백질 가공기술(효소가수분해) 연구개발

현재 우유가 보유한 기능성 물질 및 단백질의 이용성을 확대하기 위한 방안으로 유단백질 가수분해를 통한 분자량 조절기법 연구개발이 국내외적으로 경쟁적으로 진행되고 있는데, 인구 고령화에 따른 노인식, 환자식 등을 포함한 특수용도식 시장이 급격히 확대되고 있기 때문이다.

우유단백질의 활용은 다음조건외의 장애요인을 해결하여야만 경쟁력을 갖출수 있음에 따라 관련 개발연구가 치열하게 진행되고 있으나, 뚜렷한 성과가 현재까지도 없다 할 수 있다. 이는 우유단백질이 보유한 고유 고단백질 원료가 가진 기술적 장벽들을 극복이 필요함을 말하는 것으로서 유단백질 함량이 85%이상을 보장하되 모두 신선우유로 변성방지가공을 거쳐서 만들어져야 하므로 고도의 가수분해 가공기술이 필요함을 말한다 (근거:<http://www.nutraingredients.com/Industry/Ingredia-launches-milk-protein-and-hydrolysate-range>, 2010.10.10).

또한, 가수분해물의 유동성을 높여 음료 텍스처에 영향 없이 단백질수치를 증가시켜 목적제품개발에 잘 사용할 수 있어야 한다.

그리고, 유단백질 가수분해물의 특징인 쓴 맛을 해결하여야 하는데 이 또한 고도의 가수분해물 가공기술이 필요로 하며, 제품적용 간 가수분해 수치를 높게 사용할 수 있게 하여야 하고, 영양원으로 활용을 위한 기술개발이 필요한데, 이는 가수분해된 단백질이 가수분해되지 않은 단백질보다 더 소화가 잘 되고 영양원으로서 아미노산 흡수를 보장하여야 함을 말한다.

2) 우유 단백질(유청)의 국내외 이용성 연구경향

유럽식품안전청(EFSA)은 최근 여러 개의 유청 관련 신청건을 거부했는데, 그 이유는 유청 섭취와 포만감사이의 상관관계 체중증가억제 근육조직 성장 또는 유지 에너지를 제한하면서 날씬함을 유지하게 하는 것 등의 기능에서 그 인과관계가 성립되지 않는다 하였으나, 단백질로서는 근육조직 성장 또는 유지, 건강한 뼈유지 효과에 대한 인과관계를 인정하였다 (근거 : <http://www.foodmanufacture.co.uk/Ingredients/Whey-protein-health-claims>Hello-article-13.5>(2010.10.22).

이는 유청단백질 전체에 대한 이용성에 관한 문제이며, 기능성소재 등의 이용성에 대하여는 철저히 배제된 결과라고 할 수 있다. 따라서, 본 연구에서는 유청단백질중 기능성 원료로 인정받고 있는 GMP(Glycomacropeptide)소재만을 선택적으로 사용하여 상기 문제점을 근본적으로 해결한 것이라 할 수 있다.

아. 유단백질 함유 기능성소재(NANA)개발관련

당단백질은 일반적으로 당화에 따른 치료능(therapeutic potency) 및 치료효과(therapeutic efficacy) 증가와 많은 양을 투여할 수 있게 되는(Stronger dosing possible) 장점이 있다. 이에 당단백질 시장은 '05년 250억 달러에서 '09년 402억 달러의 규모로 증가되었는데 이는 지속적인 전망이 가능할 것으로 판단된 반면 비

당단백질 시장은 동기간 130억 달러에서 176억 달러로 비교적 소폭 상승하는 경향을 보였다.

관련하여 연구개발의 핵심소재인 NANA의 국제 시장가격은 1,000~1,600만원/Kg을 호가하는 초고가이고, 드물게 복합기능성 소재임에 따라 이용성이 높으나, 경제성 원리와 제조방법(합성, 미생물 유전자 재조합 생산)에 의하여 사용이 특정 의약품에 한정되어 왔다. 세계적으로 사용되고 있는 NANA의 대부분은 중국산이 대부분의 시장을 장악하고 있는 실정이고, 국내도 4톤 규모(2007)가 수입되고 있는 있으나, 일반 식품에 대해 적용사례는 현재까지는 없다.

따라서, 본 과제수행에서 해결한 무독성이면서, 안전성이 보장된 우유유래 NANA제의 개발(생산가 : 100만원이하 /1Kg예정)과 이의 제품적용성까지의 연계는 전체시장에서 중요한 변수로 작용할 수 있다.

제 3 장 연구개발수행 내용 및 결과

제 1 절 NANA소재 개발을 위한 필수분석법 정립

1. 필수 분석법 정립

본 연구는 유업계 및 식품산업 전반에서 고질적으로 알려져 있는 병원균에 대하여 우유 단백질(GMP)내 포함되어 있는 NANA라는 천연항균제를 영·유아식품 원료 제조 및 제품화함에 있어 제조 및 품목허가 획득에 있어 법적인 규제 등에 대응할 수 있도록 대량생산시스템을 정립함으로써 식품업계의 절실한 현장어로 기술을 해결하고자 하였다.

기질 유단백질과 개발효소를 적용한 NANA소재 개발, 그리고 개발 NANA가 보유한 항균 및 미네랄 킬레이팅(항균간섭 효과)등의 기능성 등 관련 메카니즘을 종합적으로 파악할 필요가 있다. 따라서, 천연항균소재의 개발과 제품까지라는 일련의 과정에서 이제까지의 연구개발과는 다른 차원의 목표와 수단이 적용됨에 따라 총체적으로 반응전/후의 변화확인을 위한 분석방법 정립은 절대적으로 필요하다 할 수 있다.

본 연구간 정립하고자 하는 분석법은, 영양성분 분석(당류, 단백질류, 지방류, 유기산류, 그리고 미네랄류 등), 개발간 반응전/후의 분자량 변화량 확인 분석, 항균성 및 기능성 관련 주요한 관련 기능기 확인분석 (FT-IR 분석), NANA와 단백질류, 지방류, 탄수화물류 및 미네랄류등 킬레이팅 관련 이온검출 및 검정을 위한 분석법(IC분석)과 최종적으로 개발목적 관련 기질별 결합구조 및 변화 등의 성상 분석(X-선회절분석)에 관한 연계된 일련의 분석법을 전체적으로 정립함으로써 개발제제의 특성을 구명하고자 하였다.

가. 영양성분 분석법 정립

1) HPLC분석 (당류)

당류분석 위한 HPLC시스템 및 정립조건은 Table 1과 같으며, 기본적으로는 식품공전(제10 일반시험법, 5) 탄수화물, 2009)에 준하여 실시하였다.

최저검출한계검정은 1%(w/v) 당류(5종, Lactose, Galactose, Glucose, Fructose 및 Sucrose)를 표준체로 하였는데, 측정간 농도는 당류별 5,000ppm, 10,000ppm,

100ppm, 10ppm, 1ppm 및 0.1ppm농도별로 희석하여 사용하였다. 검출효율검정은 멸균유내 표준체별 100ppm을 첨가한 후 역시 식품공전법에 준하여 실시하였다.

2) HPLC 분석(유기산류)

유기산류 분석 또한 HPLC분석법을 적용하여 실시하였다. 분석조건은 Table 3과 같으며 시료로 유기산 표준체 9종을 선별하여, 측정 간 1,000ppm의 Stock solution을 준비하여 희석하여 사용하였다. 분석법 정립시, 유기산은 Tartaric acid(Sigma, USA), DL-Malic acid(Junsei, Japan)을 사용하였으며, 시료 표준체는 Table 4와 같다.

3) ICP 분석(미네랄)

영양성분 분석법 중 미네랄류는 ICP분석법을 적용(ICP-OES시스템, 모델 : Optima 5300DV, Perkin Elmer사, USA)실시하였으며, 기본분석법은 식품공전(제10 일반시험법, 10)칼슘, 2009)에 준하여 실시하였다.

연구간 사용할 ICP분석기기의 최저검출효율 및 검출한계는 기본적으로 사용하는 ICP 분석용 표준용액을 사용하였다.

최저검출효율 및 검출한계를 검정하기 위하여 ICP표준 용액 중 Ca, Fe 및 Mg 3종을 선별하여 이들 용액을 0.01ppm, 0.1ppm, 1.0ppm 그리고 10ppm까지 농도별로 조성한 후 이를 시료로 사용하였다(Table 5.).

전처리로 마이크로웨이브 시스템 병행적용 하였다. 분석샘플에서 분취(0.5g)를 하여 가수분해용액 첨가 (70% HNO₃ 7ml+H₂O₂ 1ml)하고 유기물 제거(마이크로웨이브 시스템,190℃ 20min)과정을 거치고 Massup(2% HNO₃ 용액첨가, 최종50ml로 조절) 통해 ICP 샘플별 3반복 측정하여 결과도출(평균±표준편차)을 하였다.

검정방법으로는 우선 조성된 검정용액으로 ICP시스템의 표준검량선을 작성한 후, 이를 시료로 재측정 하므로써, 최저검출한계(ppm) 및 측정효율(%) 비교하였다.

4) FPLC(Peptide, GPC) 분석

NANA는 예비 검정중 액상조건하에서 온도 및 경과시간에 따라 물성미 변하는 특성을 보였다 따라서, NANA를 포함한 기질단백질 및 미셀러 등과 복합적인 반응으로 인하여 분자량 변화가 야기할 수 있다고 판단되었다. 따라서, 사전에 NANA를 기준으로 관련된 검정법 설정을 위한 FPLC분석시스템 및 분석조건은 Table 6과 같다.

시험간 표준체로서는 저분자부터 고분자까지 분자량을 보유하고 있는 FPLC Calibration kit를 시험간 사용하였다(Table 7). 표준체 시료는 가장 낮은 분자량인

Mw 209인 NAG(N-acetyl glucosamine. 1당체), 분자량이 1,355인 Vitamine B12, Aprotinin(Mw 6,500) Chtochromec(Mw 12,384), Ribonuclease-A(Mw 13,700), Ovalbumin(Mw 43,000), Conalbumin(Mw 75,000), Aldolase(Mw 158,000) 그리고 가장 높은 분자량 수치를 보유한 Myosin(Mw 212,000)까지 9종을 대상으로 검량선을 작성하였다(Fig 5).

본 연구간 연구개발간 절대적으로 필요한 분자량 변화 검정은 저분자부터 고분자까지 분자량별 표준체별로 FPLC 측정을 통하여 분자량별 검출시간을 측정하였으며, 이를 기준으로 검출식을 분자량 대비 시간으로 각각 작성하였다. 이를 기준으로 제제 개발간 분자량변화가 예상되는 시료를 검출식에 대입하여 결과를 확인하였으며, 검량식 대비 동일 분자량의 표준체를 재측정하여 검출효율 측정을 통하여 검량식의 측정효율을 재확인하였다.

5) FT-IR 분석

본 연구간 NANA와 미네랄류 및 관련 단백질 혹은 지방류 혹은 탄수화물류 등과의 킬레이팅에 관련한 기능기 확인이 필요하여 FT-IR분석을 통한 킬레이팅 기능기 분석법을 정립하고 저 하였다.

분석간 사용기기는 Bruker Optics IFS66/S기종, 4,000~600Cm⁻¹/Resol 이었으며, 분석 샘플은 KBr-Pellet Disc법에 의해 준비되었으며 실험구 내역 및 분석방법은 Table 9와 같다.

6) X-선 회절분석

NANA개발간 미네랄 혹은 이중 단백질 및 지방류 및 탄수화물류 등과 NANA와의 결합에 따른 NANA고유 물성의 변화가 예상되었다.

이를 대비하기 위하여 X-선 회절분석법의 정립을 검토하게 되었는데, 주관연구기관이 보유한 칼슘과 유단백질간의 유기태화 제조간 대조구 WPS 분말과 함께 유기태화 칼슘 함유 유단백질 분말(Ca-WPS)의 칼슘의 결합 형태와 킬레이팅 구조를 분석을 위해 X-선회절분석방법(XRD분석)시스템이 사용되었다.

분석조건 정립하기 위한 시료는 다음과 같이 준비하였다. 대조구(WPS)로서는, 유청분말(매일유업) 50g을 정제수 300ml에 용해한 후 상온조건에서 30분동안 교반(150rpm)하였다. 그리고, 원심분리(10,000rpm,15℃,15분)후 동결건조 처리하였다. 처리구(Ca-WPS)로서는 유청분말 50g 대비 CaCl₂·2H₂O 30g을 혼합한 후 정제수 300ml에 용해한 후 89℃조건하에서 30분동안 교반(150rpm)처리하였다. 그리고, 이를

원심분리(10,000rpm,15℃,15분)하고 침전물만을 대상으로 다시 멸균수 200ml를 첨가하여 현탁한 후 5회 반복 세척과정을 거쳐 동결건조 처리하였다.

동결처리된 시험구별(WPS, Ca-WPS) 시료는 XRD 분석을 통하여 기질단백질과 칼슘의 킬레이팅 반응에 따른 구조분석을 실시하였다. 분석은 Powder XRD 분석시스템(모델: D8-FOCUS, BURKER사, USA)을 이용하였으며, 기기 권장방법에 의하여 결과를 확인하였다.

7) IC 분석법 정립(이온분석)

NANA개발간 미네랄 혹은 이중 단백질 및 지방류 및 탄수화물류 등이 NANA와의 결합여부 또는 유단백질내 결합되어 있는 NANA분리 및 정제 과정에 잔류(NANA항균성 저하 및 물성변화 유발)할 수 있는 이온제거공정간 제거효율 확인을 위한 검정법 정립이 필요하였다.

주관기관의 생산품인 유기태화 칼슘제조간 발생하는 염소이온 제거공정에서 관련된 IC분석법을 정립하였다. 즉, 칼슘유기태화 제제 제조시, 기질단백질로는 유청분말을 킬레이팅 물질로는 칼슘소재($\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$)를 사용하고, 칼슘유기태화 반응이 종료되게 되면 미반응 칼슘과 음이온(Cl^-)이 다량잔존하게 되는데 이때 독성을 보유하기 때문에 반드시 이를 제거하여야 한다. 따라서, 칼슘유기태화 대량 생산시스템내 세척공정을 정립하기 위하여 이의 제거간 분석법을 정립하였다.

본 분석법은 기본적으로 칼슘 고함량(80,000~100,000ppm) Ca-WPS제조법을 적용하였다. 즉, 유청분말 4.5Kg 대비 $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 3Kg을 혼합한 후 정제수 10Kg에 용해한 후 89~90℃조건에서 30분동안 교반(150rpm)한 후 NF시스템을 사용하여 필터링작업을 실시하였다. 그리고, 정제수를 10Kg단위로 반복처리하면서 5회 세척처리 과정을 거치는 단계별로 세척액을 분취하여 음이온(Cl)의 제거효율 검정 시료로 사용하였다.

세척단계별 상층액내 음이온(Cl^-)의 제거효율은 IC분석법을 적용하여 검정하였는데, 적용한 IC분석시스템 및 분석조건은 다음과 같다.

- 분석시스템 : Dionex ICS-3000(USA)

- 분석조건

Eluent : 3~75mM KOH

Gradient : 0min.(3mM KOH) → 15min.(3mM KOH) → 15~30min.(20mM KOH) → 30min.(75mM KOH) → 34min.(75mM KOH) → 34min.(3mM KOH) → 45min.(3mM KOH)

Eluent Source : EGC-KOH II Cartridge

- . Flow rate : 1.2ml/min.
- . Detection : Suppressed Conductivity
- . Suppressor : Anion Self-Regenerating Suppressor (ASRS 300 x 4mm)
- . Applied Current : 223mA
- . Injection Volume : 250uL

나. 영양성분 분석법 정립결과

1) HPLC분석 (당류)결과

설정 조건에서 당류별 최저 검출한계는 10ppm이상이었으며, 당류별 검출효율은 92~108%범위로 조사되어 유의성이 인정되었다. 결과로서, 본 연구개발간 필수적으로 필요한 당류분석방법은 정립되었다(Table 2. Fig 2.).

2) HPLC 분석(유기산류)결과

본 연구간 NANA생산을 위한 기질로서 유청단백질(GMP)을 사용하였는데, 이에 따라서, 유청단백질의 생산을 위한 치즈제조간 사용되는 유기산과 미생물 번식에 의하여 야기될 수 있는 단백질의 변성 등의 영향을 평가하기 위하여 유기산 분석법을 정립하였다.

결과로서, 유기산에 분석을 위한 HPLC(Aminex 컬럼)분석법이 정립되었고, 분석대상 유기산 9종을 대상으로 실시한 검출한계는 1ppm이상이었다.. 또한, 유기산 검출효율은 81~114%범위로 조사되어 유의성이 인정되었다(Fig 3~4.).

3) ICP 분석(미네랄)결과

연구개발간 미네랄류 관련 분석을 위한 분석조건 정립을 위하여, 3종의 표준시료(Ca, Fe, Mg)에 대하여 측정 시, 최저검출한계는 0.10ppm이상이었고, 검출효율은 전체 표준시료에서 97~109%범위를 보여 유의성이 인정되었다(P<0.05). 또한, 미네랄별 검출농도는 다른 것으로 나타나 미량인 경우는 표준용액 범위를 조절하여 측정함으로써 검출오차를 줄여야 한다고 판단되었다. 결과로서, 본 연구개발간 필수적으로 필요한 미네랄 분석방법은 정립 되었다.

4) FPLC분석법 정립결과

표준체를 이용한 FPLC(Peptide, GPC)를 통해 분자량을 기준으로 작성한 검량식은 $y=5616.7x^2-31422x+37263$, 검출시간을 기준으로 작성한 검정식으로는

$y=5616.7x^2-31422x+37263$ 을 정립 완료하였다. 또한, 정립된 검량식 대비 동일 분자량의 표준체를 재측정하여 분자량을 확인시 검출효율은 95~112%의 범위로 나타나 검량식은 정립되었음을 확인하였다(Fig 8).

5) FT-IR분석법 정립결과

NANA개발시 반응성 및 제품의 물성변화 관련 기능기 변화 검정을 위한 FT-IR분석법에 의하여 정립되었다.(Fig 5~6.).

정립된 분석법에 의한 분석 결과 Ca의 경우는 이온화 후 유단백질내 치환 가능 기능기 중(-NH₂, -COOH) -COOH기와 결합하는 것으로 확인되었으며, 제법에 따라 유단백질 보유기능기중 Ca이온과 결합되는 기능기 극대화 방법(처리구1.) 정립을 완료하였다. 정립된 FT-IR분석법을 통하여 내열성 보유 유단백질인 유청분말(아산공장, 유효기간 : 2010.02.03)를 기준으로 미네랄 킬레이팅 도입량별 기능기 확인을 완료하였으며, 칼슘 함량 동시증대 및 이중 미네랄의 킬레이팅 기능기 극대화 효과를 확인 정립하였다. 결과로서 본 연구개발간 필수적으로 필요한 킬레이팅에 관련한 기능기 확인을 칼슘소재를 활용한 FT-IR분석을 통한 킬레이팅 기능기 분석법이 정립되었다.

6) X-선 회절 분석법 정립결과

미네랄인 칼슘과 유단백질간 킬레이팅 반응후 유기태 칼슘의 결합 형태는 칼슘 포타슘 포스페이트 하이드레이트(Calcium Potassium Phosphate Hydrate [Ca₂K₂(P₆O₁₈)₆(H₂O)]), 칼슘 하이드로젠 포스페이트 하이드레이트(Calcium Hydrogen Phosphate Hydrate [Ca₈H₂(PO₄)₆H₂O]), 아나파이트(Anapaite [Ca₂Fe+2(PO₄)₂H₂O]), 포타슘 칼슘 하이드로젠 포스페이트(Potassium Calcium Hydrogen Phosphate [CaK₃H(PO₄)₂]), 브루샤이트(Brushite [CaPO₃(OH)H₂O]), 칼슘 설파이드 포스페이트(Calcium Sulfide Phosphate [Ca₁₀(PO₄)₆S])인 것을 X-선 회절분석을 통해 확인 할 수 있었다.(Table 9, Fig 7).

7) IC분석법 정립결과

칼슘 유기태화 제조 후 용액내 염소이온(Cl⁻)의 검출량은 57,500ppm이었으나, 세척단계가 진행될 수록 검출수치는 감소하였으며, 최종 5단계 세척시는 검출량은 0.01ppm으로 나타나 완전히 제거된 것으로 판정되었다. 따라서, 이상의 결과로 볼 때 음이온(Cl⁻)의 검출방법은 정립되었다(Table 10. Fig 8.).

Table 1. HPLC 분석시스템 및 분석조건

분석시스템 구성 (Agilent HPLC)	분석조건
. Degasser : Model G1322A	.Column : Carbohydrate (5um,4.6 x 150mm)
. QuatPump : Model G1311A	. Mobile Phase :ACN(75):ddH ₂ O(25)
Autosampler:Model G1313A	.Flow Rate:1.0ml/min.
. Detector (RI):Model G1365B	.Column Temp. : 35℃
. Detector (RI):Model G1365B	.Injection Vol.: 20ul

Table 2. 설정 HPLC조건에서의 당류표준체별 검출한계 및 검출효율 검정결과

표준체별 조성내역	최저검출한계 (ppm)	검출효율 (%)
Lactose	10	108
Galactose	10	97.9
Glucose	10	92.5
Fructose	10	105
Sucrose	10	92.2

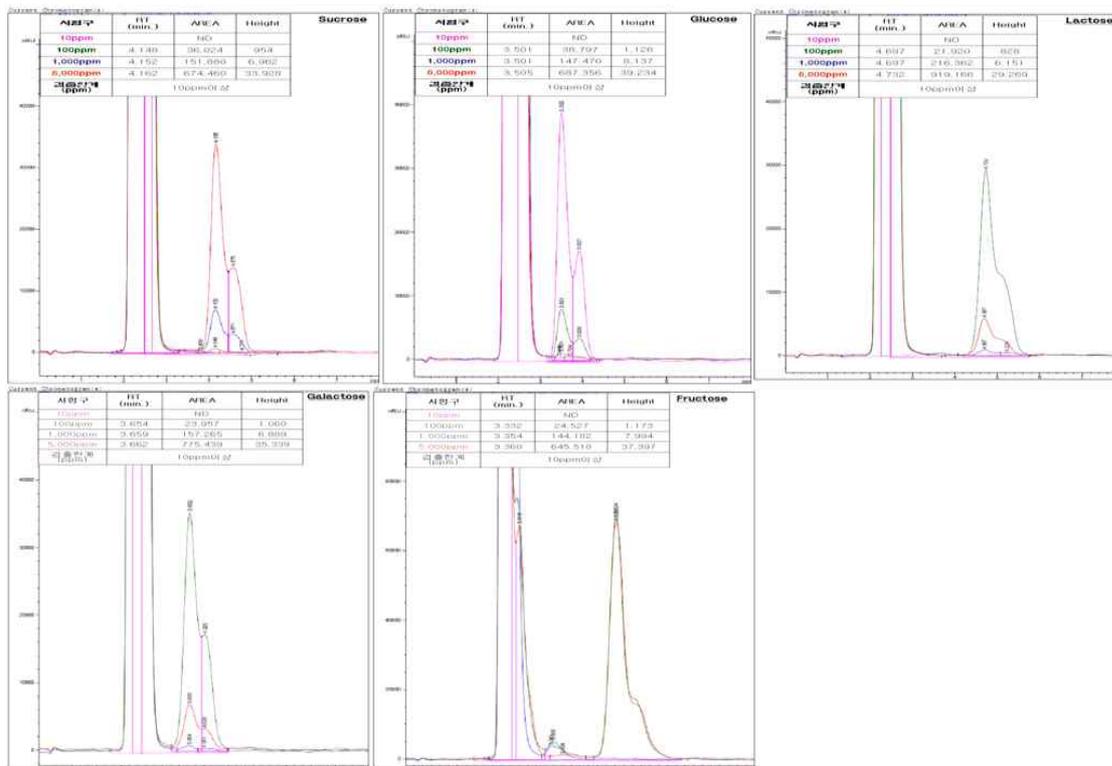


Fig 1. 당류 분석법 정립을 위한 당류별 최저검출한계 검정(Peak analysis) 결과

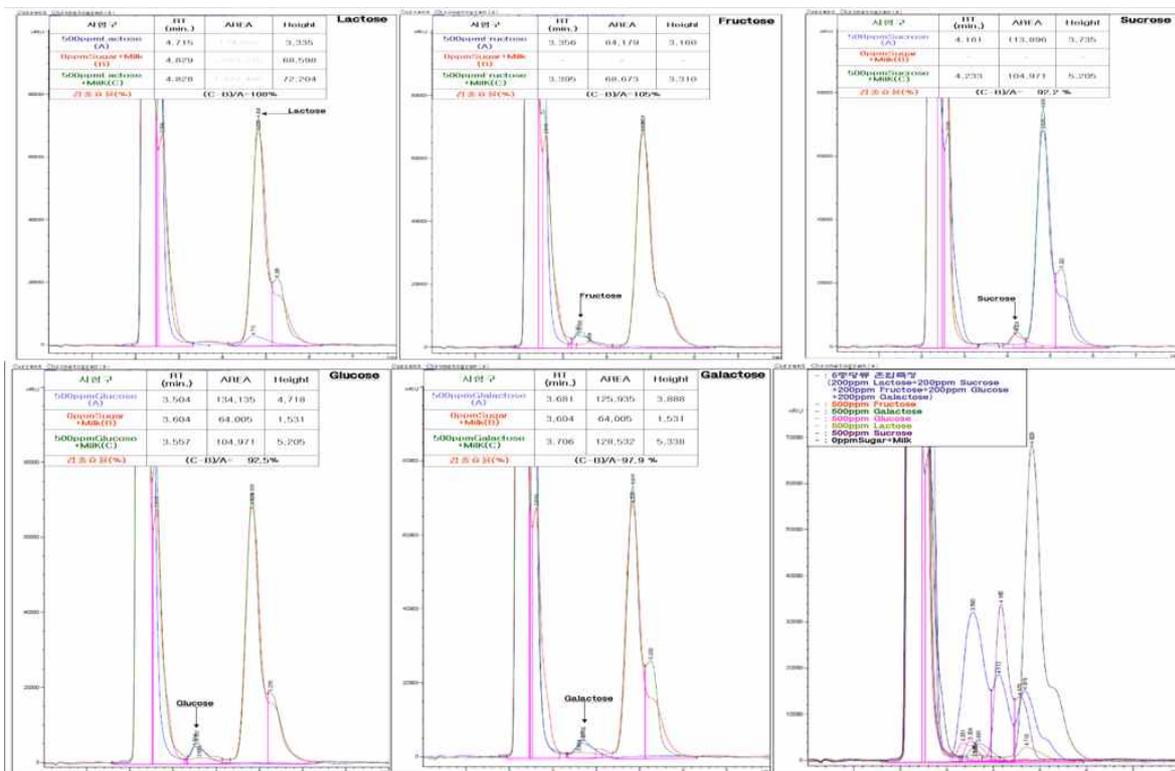


Fig .2 . 당류 분석법 정립을 위한 당류별 최저검출효율 검정(Peak analysis) 결과

Table 3. HPLC 분석시스템 및 분석조건

분석시스템 구성 (Agilent HPLC)	분석조건
. Degasser : Model G1322A	.Column : AMINEX HPX-87 (300mm x 7.8mm)
. QuatPump : Model G1311A	. Mobile Phase : 10mM H ₂ SO ₄
Autosampler: Model G1313A	.Flow Rate: 1.0ml/min.
. Detector (RI): Model G1365B	.Column Temp. : 35°C
. Detector (RI): Model G1365B	.Injection Vol.: 20ul
	.Detection (UV): 210nm

Table 4. 유기산 표준체 함유량 및 제조사

표준체명 (9종, 함유량)	제조사명
1. Sodium Oxalate (0.8umol)	Organic Acid Standard (Bio-RAD(USA))
2. Sodium Citrate (4.0umol)	
3. Sodium Malate (8.0umol)	
4. Sodium Succinate (20.0umol)	
5. Sodium Formate (20.0umol)	
6. Sodium Acetate (40.0umol)	
7. Tartaric acid (C ₄ H ₆ O ₆ .H ₂ O)	SAMCHUN (KOREA)
8. D-Lactic acid	GmBH (Germany)
9. L-Lactic Acid	GmBH (Germany)

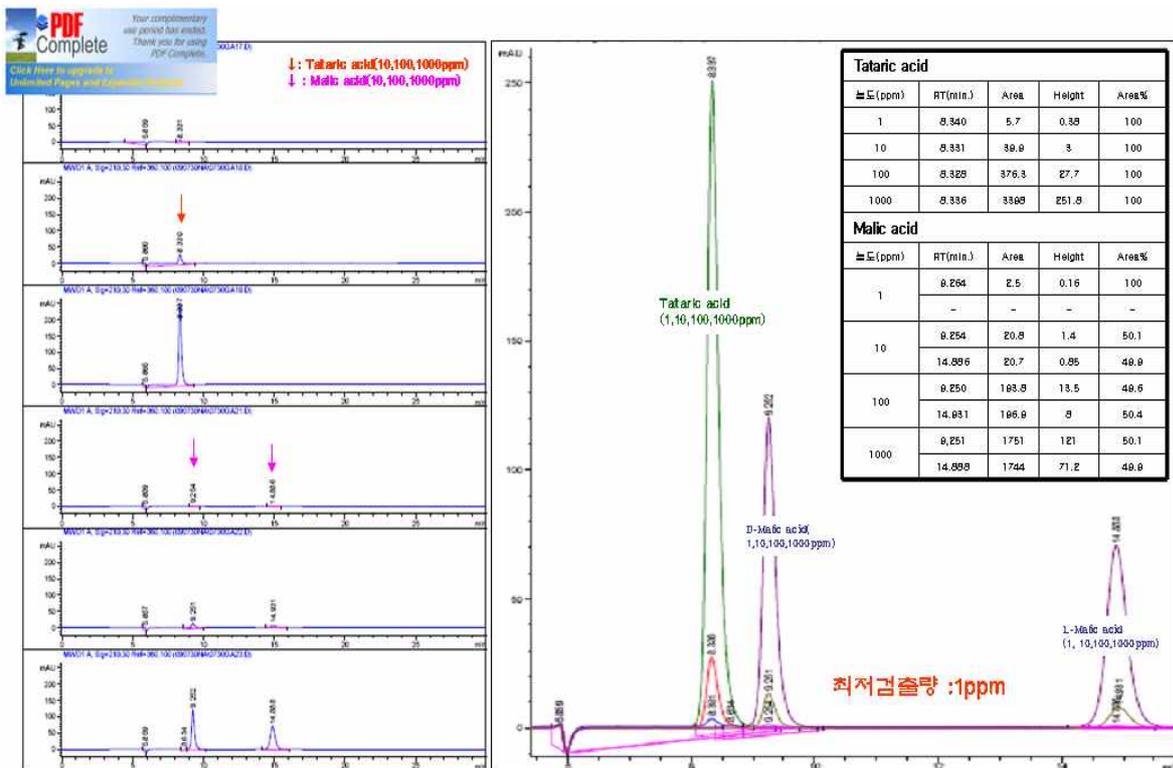


Fig . 3 . 유기산 분석법 정립을 위한 유기산별 최저검출한계 검정 (Peak analysis) 결과

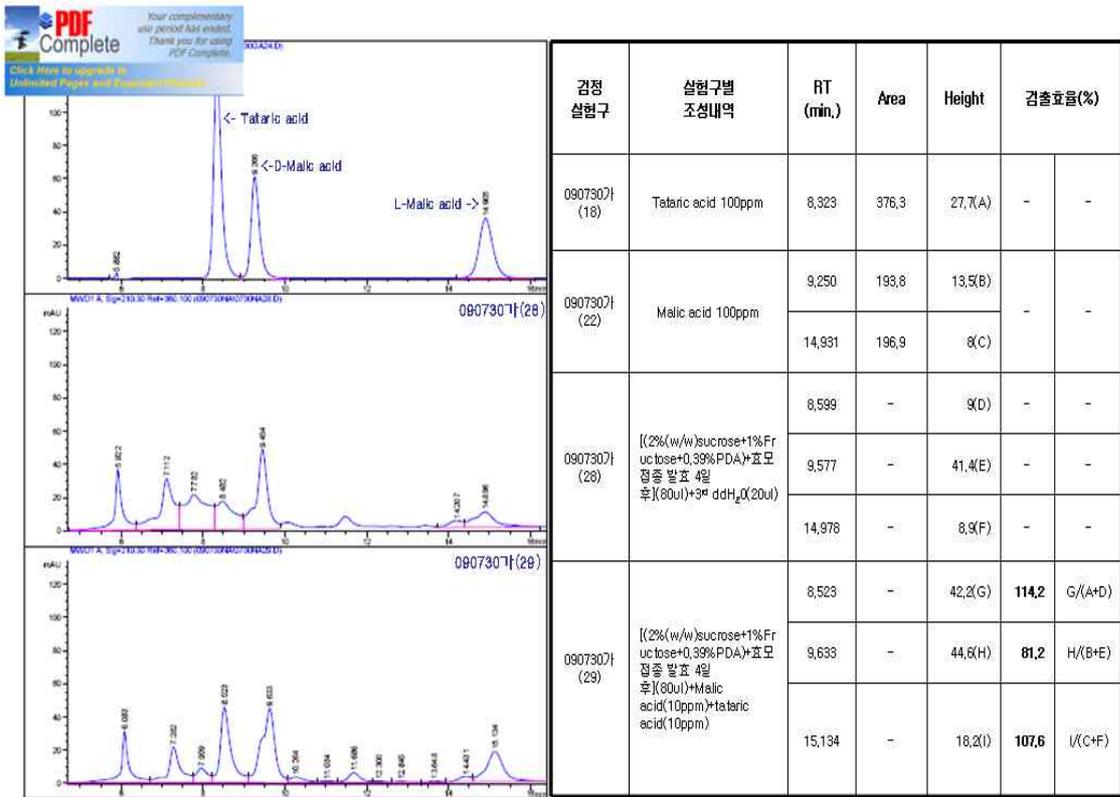


Fig . 4 . 유기산 분석법 정립을 위한 유기산별 최저검출효율 검정(Peak analysis) 결과

Table 5. ICP분석법 정립을 위한 미네랄별 최저검출효율 및 검출한계 측정결과

ICP분석법정립용 표준용액(ppm)	Ca		Fe		Mg	
	최저검출한계 (ppm)	검출효율 (%)	최저검출한계 (ppm)	검출효율 (%)	최저검출한계 (ppm)	검출효율 (%)
0.01	ND	-	ND	-	ND	-
0.10	0.097	79	0.109	109	0.108	108
1.0	1.049	105	1.010	101	1.096	109
10.0	10.66	106	10.44	104	10.55	105

Table 7. NANA개발간 기질단백질 및 관련된 분자량 변화 검정을 의한 FPLC분석시스템 및 분석조건

FPLC 분석시스템 및 분석조건

1. 시스템(AKTA, 스웨덴) : UPC900 +D920+CU950
 2. 운용조건
 - 가. column(Temp.) : Superdex Pep 10/300GL(35' C)
 - 나. Mobile Phase : Phosphate buffer (50mM Na₂HPO₄+150mM NaCl+ddH₂O 1L)
 - 다. Flow rate : 0.5ml/min.
 - 라. Press : 0.84PSI
 - 마. injection volumn: 100ul(시료 1%용액)
 3. 표준체 : FPLC Calibration kit
-

Table 8. NANA 연구개발간 분자량 변화 검정용 표준체 내역

표준체명	분자량	비고
NAG	209	N-acetyl glucosamine
Vitamine B12	1,355	Sigma
Aprotinin	6,500	
Chtochromec	12,384	FPLC Calibration kit
Ribonuclease-A	13,700	"
Ovalbumin	43,000	"
Conalbumin	75,000	"
Aldolase	158,000	"
Myosin	212,000	

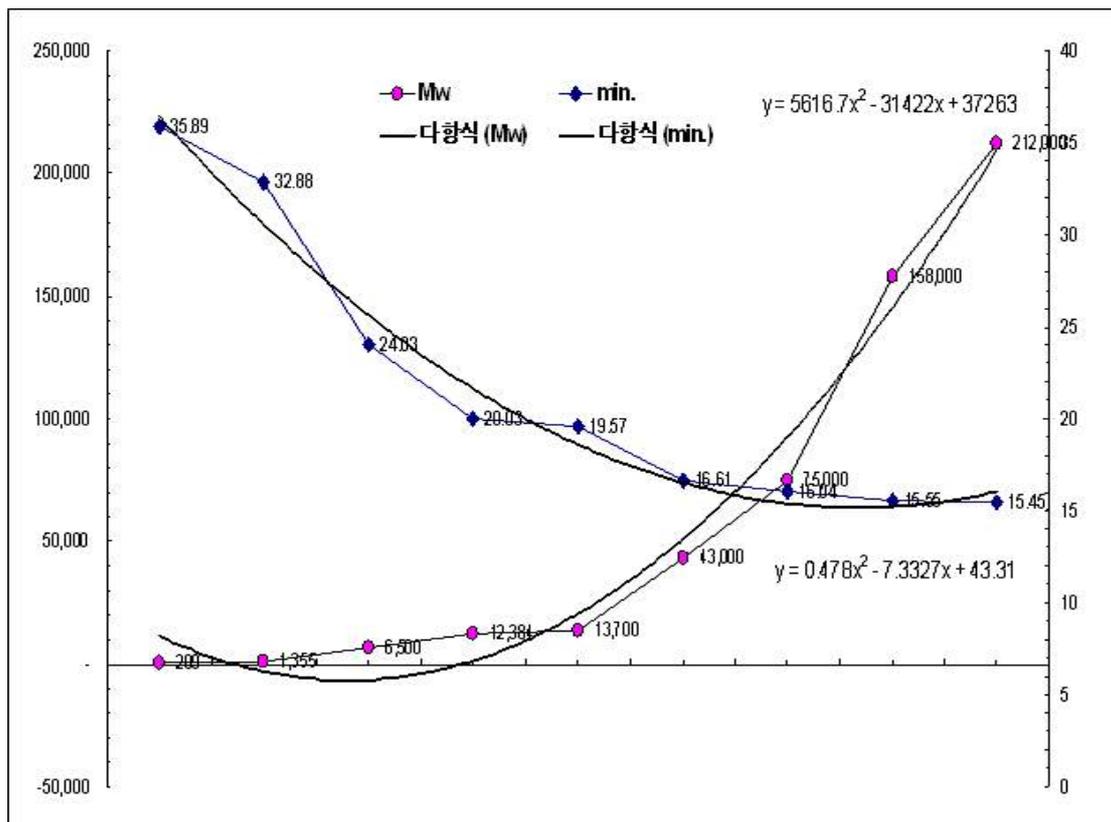


Fig .5. NAN연구개발간 관련 분자량검정을 위한 FPLC Calibration 작성결과 및 검정식 정립결과

Table .9. FT-IR분석을 위한 기능기 검정을 위한 시험조성내역

실험구	내역	비 고
대조구	20%CaCl ₂ (정제수 180g+CaCl ₂ 70g) 제조 후 20%CaCl ₂ 100g분취하여 동결건조 후 FT-IR분석(KBr-Pellet Disc법)	CaCl ₂
비교구	정제수 90dp WPI(Arla Co.,) 10g만을 첨가하여 동결건조 후 FT-IR분석(KBr-Pellet Disc법)	WPI
처리구-1	WPI(Arla Co., Lot No.: S090213) 10g과 CaCl ₂ 13.23g을 먼저 혼합후 정제수 90g을 추가첨가하여 용해후 동결건조 시켜 FT-IR분석(KBr-Pellet Disc법)	(CaWPI+DW)
처리구-2	정제수 90g에 CaCl ₂ 1.32g을 녹인 후 WPI(Arla Co., Lot No.: S090213)10g을 첨가하여 반응 시킨 후 동결건조 시켜FT-IR분석(KBr-Pellet Disc법)	(DWCa+WPI)

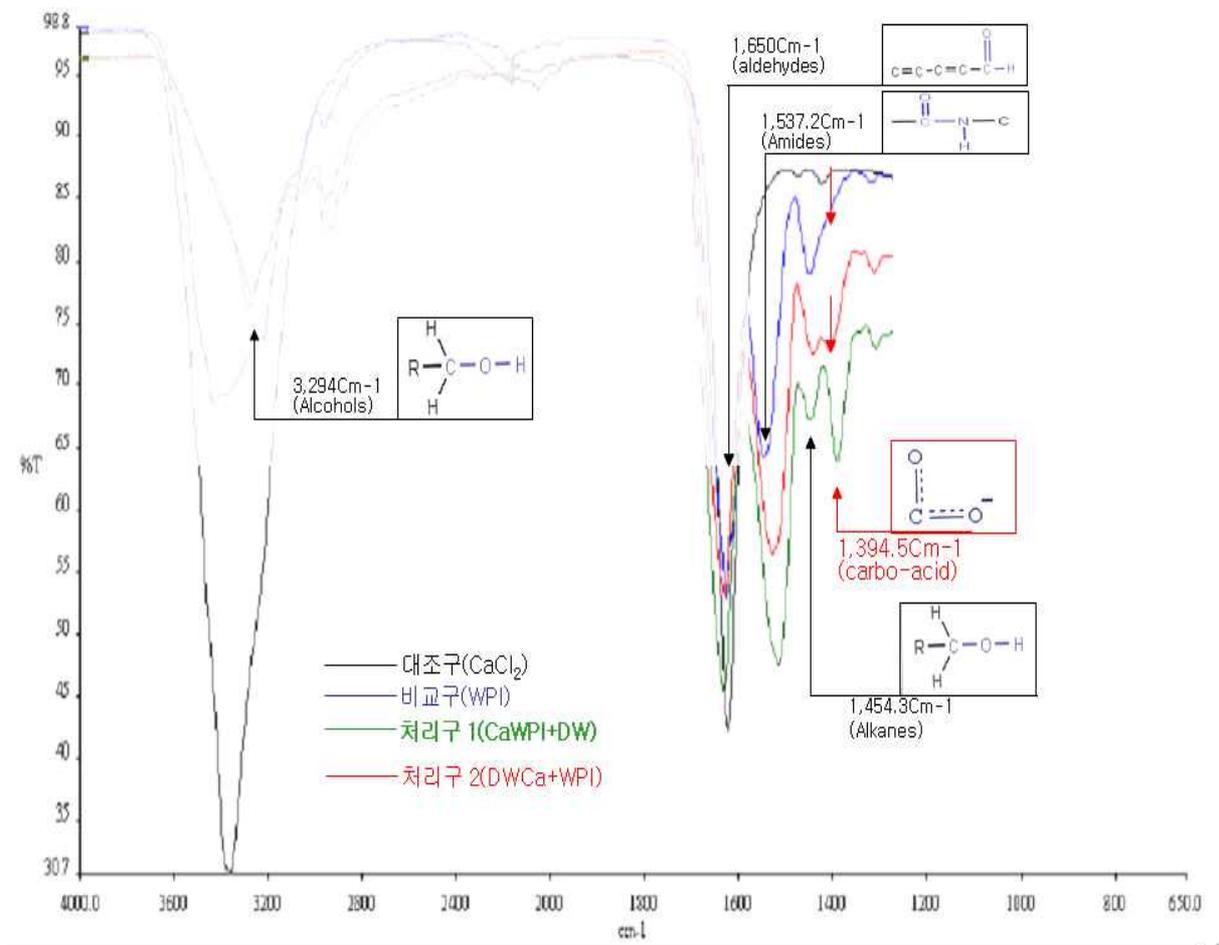


Fig .6. 유단백질 보유 기능기중 Ca이온과 결합되는 활성 기능기 판단(↓)을 위한 FT-IR Peak analysis결과

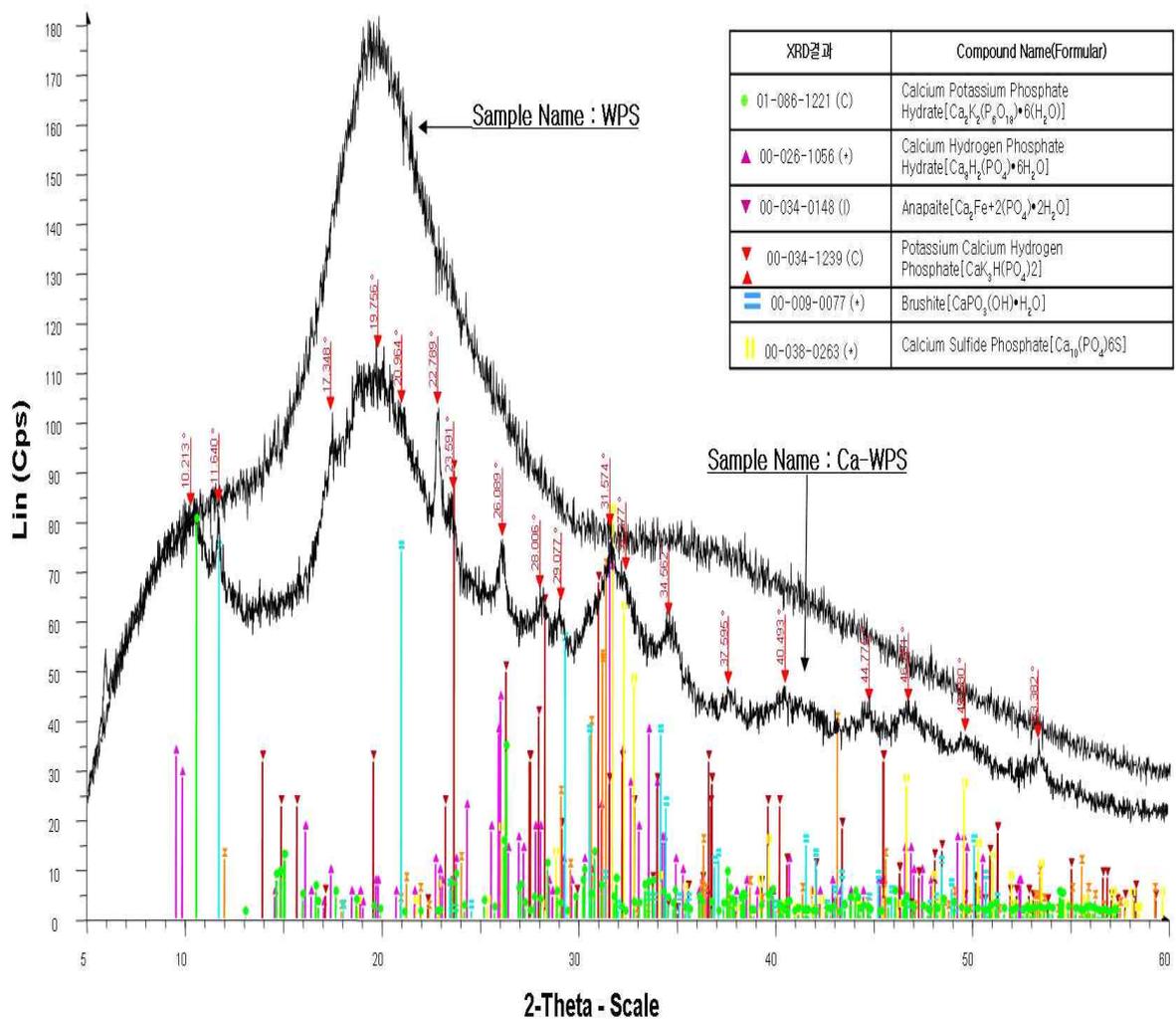


Fig .7. 원료유청분말(WPS) 대비 칼슘 유기태화 제제(Ca-WPS)의 화학구조 구조결정 분석(XRD anayls)결과

Table 9. XRD분석을 통한 칼슘 유기태화 제제의 화학구조 분석결과표

XRD결과	Compound Name(Formular)	λ -Scale	d x by	Wavelength	System	a	b	c	alpha	beta	gamma	Bravais L.	Space Group
01-086-1221 (C)	Calcium Potassium Phosphate Hydrate [Ca ₂ K ₂ (P ₆ O ₁₈)(H ₂ O) ₆]	43.56	1	1.5406	Monoclinic	7.266	11.833	12.3	90	103.17	90	Primitive	P21/n (14)
00-026-1056 (*)	Calcium Hydrogen Phosphate Hydrate [Ca ₈ H ₂ (PO ₄) ₆ •6H ₂ O]	119.95	1	1.5406	Triclinic	9.529	18.994	6.855	92.33	90.13	79.93		
00-034-0148 (I)	Anapaite [Ca ₂ Fe•2(PO ₄)•2H ₂ O]	49.53	1	1.5406	Triclinic	6.4508	6.8187	5.9017	101.65	104.26	70.76	Primitive	P-1 (2)
00-034-1239 (C)	Potassium Calcium Hydrogen Phosphate [CaK ₃ H(PO ₄) ₂]	38.57	1	1.5406	Monoclinic	9.88	5.733	7.432	90	94.1	90	Base-centered	C2/m (12)
00-009-0077 (*)	Brushite, syn [CaPO ₃ (OH)•H ₂ O]	40.58	1	1.5406	Monoclinic	6.363	15.19	5.815	90	118.5	90	Base-centered	Cc (9)
00-038-0263 (*)	Calcium Sulfide Phosphate [Ca ₁₀ (PO ₄) ₆ S]	44.59	1	1.5406	Hexagonal	9.4554	9.4554	6.8405	90	90	120	Primitive	P63 (173)

Table 10. IC분석시스템을 이용한 세척단계별 음이온(Cl⁻) 제거효과

세척단계	검출염소이온농도(ppm)	비고
Blank	0.01	IC분석전용액
원액	57,500	칼슘유기태화 반응후 분리용액
1 단계	22,500	세척수 : 2차 정제수
2 단계	15,000	
3 단계	5,000	
4 단계	0.01	
5 단계	0.01	

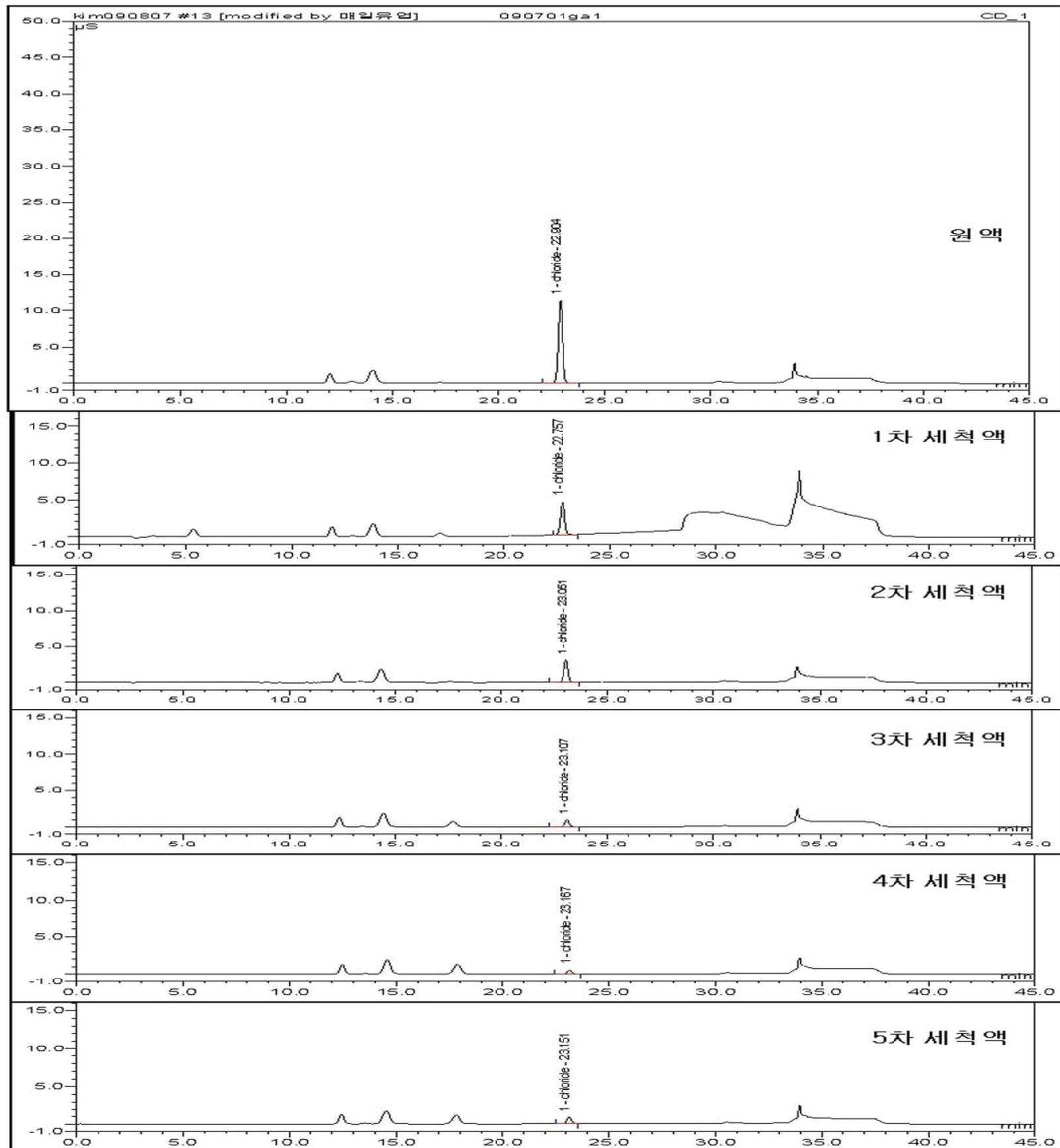


Fig 8. IC분석시스템을 이용한 칼슘유기태화 제조간 세척단계별 음이온(Cl^-) 제거효과

제 2-1 절 Neuraminidase 및 NANA 대량생산 시스템 정립 (실험실적 기초조건 정립)

1. 연구목적

본 연구에서는 1) GMP에 작용하여 NANA를 생산할 수 있는 neuraminidase를 선발하고자 하며, 2) 선발된 neuraminidase를 분리하여 반응특성을 연구하고, 3) 이 효소제를 이용하여 GMP로부터 NANA를 상업적으로 생산하기 위한 기초연구를 수행하고자 하였다.

2. 연구수행방법

가. TBA법을 이용한 NANA 함량 측정

GMP에서 생성된 NANA의 함량을 측정하기 위해 Warren Thiobarbituric Acid(TBA) 방법을 이용해 NANA를 정량하였다.^{19,20} 시료 0.5ml을 시험관에 넣고 Solution I을 100 μ l 넣은 후 실온에서 25분 반응 시키고, 그 다음 Solution II 1ml 넣고 vortexing 후 3ml의 Solution III를 넣은 다음 끓는 물에서 25분간 가열하였다. 그 후 5분 동안 얼음물에 넣어 식힌 다음 1:1 비율로 cyclohexanone과 섞은 후, 7000rpm에서 5분 동안 원심분리 시켜 cyclohexanone층을 분리 한 다음 549nm에서 흡광도를 측정하였다. 표준 NANA 용액을 이용하여 0.05mM부터 0.5mM 농도의 범위에서 표준곡선을 만든 다음, 이것으로부터 시료의 NANA 함량을 계산하였다.

Solution I: 0.2M sodium (meta)periodate, 9.0 M phosphoric acid

Solution II: sodium (meta)arsenite, 10%(w/v), 0.5M sodium sulphate, 0.1N H₂SO₄

Solution III: 0.5M sodium sulphate, 0.6% thiobarbituric acid

(Solution III는 assay 전에 만들어서 70°C로 온도를 유지한 후 사용하였다.)

나. Neuraminidase 활성 측정

Neuraminidase의 활성 측정은 효소와 기질의 반응 후 생성된 NANA의 함량을 Warren의 TBA 방법을 이용해 측정하였다. Neuraminidase 1unit(U)은 1분 동안 1 μ mole의 NANA를 생성하는 효소의 양으로 정의하였다. 0.1M sodium acetate (pH 5.0) 완충용액에 녹인 2% GMP 0.5ml 기질과 0.5ml 효소 용액을 섞은 후, 10분 동안 반응시킨 후 200 μ l TBA solution I 용액을 첨가하여 반응을 종료 시켰다.

이 용액 600ml를 시험관으로 옮기고 25분 반응시키고, 그 뒤의 과정은 TBA법을 이용한 분해된 NANA 함량 측정 실험 방법과 동일하였다.

다. Neuraminidase의 분리 정제

1) *A. ureafaciens*의 배양

Neuraminidase 생산을 위한 *A. ureafaciens*의 배양은 표 1의 M-9 GMP배지를 이용하여 25°C에서 36시간 배양 하였고, 균체배양액을 원심분리하여 배양상등액만을 회수하여 neuraminidase분리에 사용하였다.

2) 한외여과 (Ultrafiltration, UF)

한외여과법을 이용하여 배양상등액을 농축한 후에 10mM sodium phosphate (pH 6.0) 완충용액을 이용해 완충용액을 교환을 하였다. Ion exchange chromatography 후에는 한외여과 후 50mM sodium phosphate (pH 7.0) 완충용액을 이용하여 완충용액을 교환하였다.

3) DEAE-cellulose ion exchange chromatography

DEAE-cellulose(Sigma)를 활성화시킨 후 10mM sodium phosphate 완충용액 (pH6.0)으로 평형화 시켰다. 여기에 UF로 농축한 시료를 loading 하고 동일한 완충용액으로 세척한 후 0~0.5M NaCl linear gradient를 이용해 용출하였다. 유속은 1ml/min으로 하였고, 한 분획 당 5ml씩 받았으며 모두 4°C에 보관하면서 다음 실험에 사용하였다.¹⁷

4) Sephacryl S-300 HR gel filtration

DEAE-cellulose ion exchange chromatography에서 모은 neuraminidase활성 분획을 Sephacryl S-300 HR(GE Healthcare)를 150mM NaCl이 첨가된 50mM sodium phosphate 완충용액(pH 7.0)을 이용하여 평형화시킨 gel을 이용해 gel filtration을 수행하였다. 유속은 1.1ml/min으로 하였고, 각 분획의 단백질함량은 280nm에서 흡광도를 측정하여 표시했다. 한 분획 당 5ml씩 총 80개의 분획을 얻었고, 모두 4°C에 보관하면서 실험에 사용하였다.

라. 단백질 정량

단백질 농도는 Bradford 방법을 이용하여 정량하였다.²¹ Bovine serum albumin을 표준 단백질로 이용하였고, protein assay kit (Bio-Rad)를 사용하여 595nm에서 흡광도를 측정하여 표준곡선으로부터 단백질 함량을 계산하였다.

마. SDS-Polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE)

단백질의 SDS-PAGE는 Laemmli 방법에 따라 Mini-PROTEAN[®] 3 system(Bio-Rad)을 사용하여 수행하였다.²² 10% Polyacrylamide gel에서 1시간 30분 동안 100V에서 전기영동한 후 Coomassie Brilliant Blue 염색시약으로 단백질 band를 확인하였다. 단백질 크기는 Prestained Protein Ladder(Fermentas)를 이용하여 상대적 분자량을 결정하였다.

바. Neuraminidase의 최적 pH와 최적 온도 실험

pH에 따른 효소활성을 측정하기 위해 pH 4.0~6.0범위는 100mM sodium acetate 완충용액, pH 5.0~8.0 범위는 100mM sodium phosphate 완충용액을 사용하여 측정하였다. 온도에 따른 효소활성 측정은 30℃~60℃까지 10℃간격으로 측정하였으며, 최대활성을 좀 더 정확히 확인하기 위해 53℃, 55℃에서도 효소활성을 측정하였다.

사. Neuraminidase의 pH와 온도 안정성 조사

pH에 따른 효소의 안정성의 측정하기 위해 pH 3.0~6.0범위는 10mM sodium acetate 완충용액, pH 5.0~9.0 범위는 10mM sodium phosphate 완충용액에서 효소를 4℃에서 1시간 동안 방치 후, pH 5.0에서 효소의 잔존활성을 측정하였다. 온도에 따른 효소의 안정성은 효소를 4℃, 30℃, 37℃, 40℃, 50℃, 60℃, 70℃에서 1시간 방치 후 다시 4℃에서 10분 방치한 다음 잔존활성을 측정하였다.

아. GMP에 포함된 총 NANA의 함량 측정

Svennerholm resorcinol method를 이용하여 GMP에 포함된 total NANA량을 정량하였다.²³ Solution I 과 II는 모두 10X stock 상태로 만들어 어둡게 -20℃에 보관해 두면서, 사용 시 1X로 만들어 사용하였고, GMP는 1%가 되도록 3차 증류수에 녹여 사용하였다. 1% GMP시료 0.5ml에 Solution I 을 0.1ml 넣고 ice bath에서 20분 반응 후, 1.25ml의 Solution II를 넣고 5분 동안 ice bath에 방치한 다음 10℃에서 15min간 가열하여 반응시켰다. 이 반응액을 수돗물에 넣어 식힌 다음 1.25ml의 Solution III를 넣어 37℃에서 3분간 반응시킨 후 상온에서 식힌 다음 630nm에서 흡광도를 측정하였다. 표준 NANA를 사용하여 0.025mM~0.4mM 농도 범위에서 위와 동일한 방법으로 표준곡선을 작성 한 후, 이 표준곡선으로부터 시료의 총 NANA함량을 계산하였다.

Solution I : 0.04M periodic acid

Solution II: 0.6g resorcinol (Fisher certified) in 28% HCl 60ml을
25 μ moles CuSO₄를 40ml을 증류수에 녹여, 섞은 후 사용
Solution III: 95% tert-butyl alcohol

자. Neuraminidase를 이용한 GMP로부터 NANA 생산

일정농도의 GMP를 100mM sodium acetate 완충용액(pH 5.0) 또는 증류수(pH 5.0)에 현탁 시키고 37 $^{\circ}$ C에서 30분 정도 방치시킨 후 효소(0.5U/g GMP)를 첨가하여 반응 시켰다. 반응 중 GMP가 가라앉기 때문에 30분 간격으로 교반시켜 주었다. 반응이 끝난 용액은 100 $^{\circ}$ C에서 10분간 가열해서 효소를 불활성화 시켰다. NANA 생산 시에는 Begerow사의 BECO Depth filter sheets (pore size 1.0 μ m)를 이용해 침전물질을 제거시켰다. 여과 후 감압농축기를 이용하여 농축하였다. 그 후 음이온 교환수지 TRILITE SAR20(이롱화학)를 1N Formic acid로 평형화 시킨 것에 농축액을 loading하고 증류수로 세척한 후 1N formic acid를 이용해 용출 하고 NANA가 함유된 분획을 모아 동결건조 하였다.

차. HPLC를 이용한 NANA의 정량

GMP로부터 생산된 NANA시료를 매일유업(주)에 의뢰하여 합성 NANA를 표준으로 하여 NANA시료를 비교하여 분석하였다.

카. 대장균에서 neuraminidase의 고발현

1) Chromosome DNA와 plasmid DNA의 분리

*A. ureafaciens*의 chromosome DNA는 LB에서 18시간 배양 후 QIAGEN의 DNeasyTMTissue Kit를 이용하여 분리하였다. 대장균에서 plasmid DNA의 분리는 QIAGEN의 QIAprepTMSpin Miniprep Kit를 이용하여 분리하였다.

2) Neuraminidase gene cloning과 대장균에서의 고발현

이미 알려진 *A. ureafaciens*의 neuraminidase 유전자 정보를 이용하여 *A. ureafaciens*의 chromosome DNA로부터 PCR방법으로 neuraminidase를 cloning 하였다. Neuraminidase 고발현 벡터를 함유한 대장균에서 neuraminidase를 발현시키기 위해 LB에서 600nm에서 흡광도가 0.5가될 때까지 키운 후, 0.5mM IPTG를 첨가하여 6시간 동안 induction 시키고, 각각에 대해 배양 상등액, periplasm, 세포내 분획으로 나누어 효소의 활성을 측정하였다.²⁴ 실험에 사용한 primer는 표 2에 나타내었다.

Table 1. The composition of culture media used in this study

Strain	Medium	Composition (g/ℓ)	
<i>A. oryzae</i> <i>A. niger</i> <i>T. viride</i> <i>T. reesei</i>	Czap-dox GMP (pH 5.0)	Dextrose	5
		GMP	50
		Sodium nitrate	2
		Di-potassium phosphate	1
		Magnesium sulfate	0.5
		Potassium chloride	0.5
		Ferrous sulfate	0.01
<i>L. acidophilus</i> <i>B. longum</i> <i>B. bifidum</i> <i>B. infantis</i>	MRS GMP-N (pH 7.0)	GMP	50
		Proteose peptone	10
		Beef extract	10
		Yeast extract	5
		Dextrose	20
		Polysorbate 80	1
		Ammonium citrate	2
		Sodium acetate	5
		Magnesium sulfate	0.1
		Manganese sulfate	0.05
		Di-potassium phosphate	2
<i>A. nicoitiana</i> <i>E. ureafaciens</i>	M-9 GMP (pH 7.0)	N-Acetylneuraminic acid	0.62
		N-Acetyl-D-mannosamine (Only <i>B. infantis</i>)	0.62
		L-Cystein (Only <i>B. infantis</i>)	0.5
		GMP	15
		Di-sodium phosphate	6
<i>A. ureafaciens</i> <i>E. coli</i>	LB (Luria-Bertani) (pH 7.0±0.5)	Mono-potassium phosphate	3
		Sodium chloride	0.5
		Ammonium chloride	1
		Magnesium sulfate	0.5
		Calcium chloride	0.01
<i>A. ureafaciens</i> <i>E. coli</i>	LB (Luria-Bertani) (pH 7.0±0.5)	Tryptone	10
		Yeast extract	5
		Sodium chloride	10

Table 2. Primer used in this study

Primer	Sequence(5'→3')	Used for
AU54-F(Xba I)	ATTAAGTCTAGAACTCCGTTACTGCTCGC	Cloning, sequencing
AU54-R(EcoRI)	ACCATGGAATTCACCGAGTCACAGAGTACAG	Cloning, sequencing
AU54Int-F	AGCAACAAGATCCAGGCCT	Sequencing
AU54Int-R	CCATTGATCCGATACGTCCT	Sequencing
AU54-Trc-F(EcoR)	TTTCCGGAATTCAGGAGATATACATATGAGATCCAACAGCACC	High level expression
AU54-Trc-R(Xba)	TTCTAGTCTAGATTAGATCTTCTCCCCCTTCG	High level expression
AU54-T7-F(Nde)	GGAATTCATATGAGATCCAACAGCACC	High level expression
AU54-T7-R(Hind)	TTTCCAAGCTTTTAGATCTTCTCCCCCTTCG	High level expression

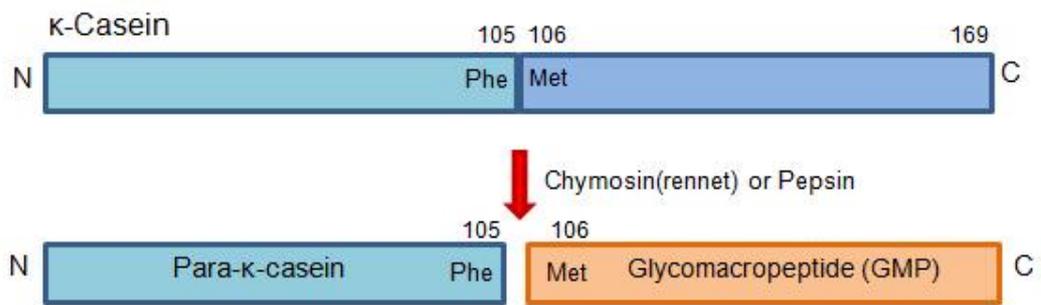


Fig. 1. GMP produced by a cleavage of κ -casein with chymosin or pepsin

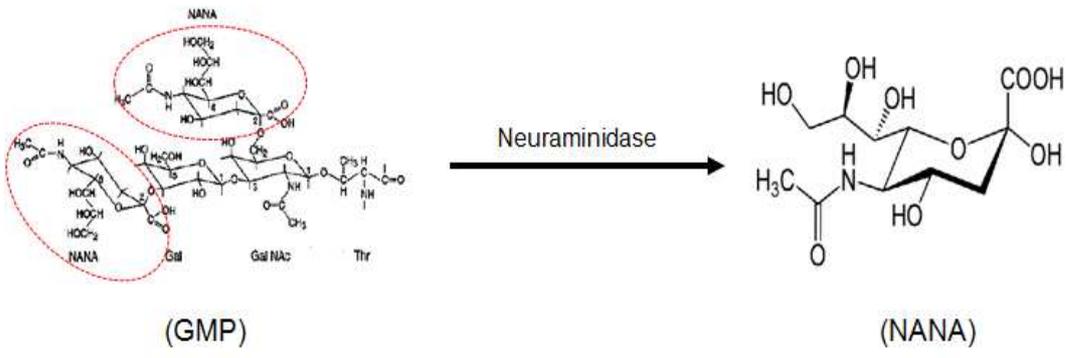


Fig. 2. NANA production from GMP by a neuraminidase

3. 연구수행결과

가. 식품용 neuraminidase 선발

식품산업에 이용할 수 있는 neuraminidase를 선발 하고자 식품산업용 효소제와 몇 종류의 식품용 미생물을 이용하여 neuraminidase 활성을 측정하였다. 표 3에서 보는바와 같이 상업용 효소제에서는 거의 neuraminidase 활성이 없었으며, Umamizyme G와 Celluclast 1.5F에서 약 0.02U/ml의 낮은 활성이 측정되었다. 상업용 효소제의 낮은 활성으로는 경제성이 없는 것으로 판단되어 식품용 효소 생산균주를 이용하여 neuraminidase 활성을 조사하였다. 표 4에서 보듯이 대부분의 균주에서 neuraminidase 활성이 없었다. 비병원성 균주 중 neuraminidase를 생산하는 것으로 알려진 *Arthrobacter nicotianae*, *Arthrobacter ureafaciens* 두 균주의 활성을 측정한 결과 *A. ureafaciens*에서 0.08U/ml로 높은 활성이 측정되었다.^{14,15}

나. *A. ureafaciens*로부터 neuraminidase의 생산

*A. ureafaciens*에서 neuraminidase의 생산조건을 찾기 위해, M-9 minimal medium에 유일한 탄소원으로 0.5, 1, 1.5, 2%의 GMP를 첨가하거나 glucose를 2.5% 넣어 준 후 배양 시간에 따라서 배양 상등액의 효소 활성을 측정하였다. 그림 3에서 보듯이, 유일한 탄소원으로 2.5% glucose만 첨가한 경우와 1% GMP와 2.5% glucose가 함유된 배지에서는 neuraminidase 활성이 전혀 측정되지 않았다. 유일한 탄소원으로 GMP를 첨가하는 경우 효소활성이 측정되었으며 모두 36시간 배양 시 최고 활성을 나타내었다. 1.5% GMP 농도에서 최대 0.19U/ml의 효소활성을 보였으며 그 이상의 GMP 농도에서는 효소 활성이 더 이상 증가되지 않았다.

다. Neuraminidase의 정제

Neuraminidase를 정제하기 위해서 1.5% 농도의 GMP를 첨가한 배지에서 36시간 배양한 후 원심분리하여 배양상등액을 회수하였다. Molecular cut-off 10kDa 여과막이 장착된 UF 장치를 이용하여 배양상등액을 18.5배 농축하고 10mM sodium phosphate 완충용액(pH6.0)으로 완충용액을 교환한 후 ion exchange chromatography를 수행하였고, 활성분획을 molecular cut-off 30kDa 여과막이 장착된 UF 장치로 농축하고 50mM sodium phosphate 완충용액(pH7.0)으로 완충용액을 교환한 후 gel filtration 하는 방법으로 분리 정제하였다.

1) DEAE-cellulose ion exchange chromatography

배양 상등액을 UF를 이용하여 농축하고 diafiltration한 후 ion-exchange chromatography를 수행하였다. 그림 4에서 보듯이, 일부 단백질이 loading 과정에서 빠져나왔으나 neuraminidase활성은 나타나지 않았고, 대부분의 단백질이 NaCl gradient 용출과정에서 빠져나오는 것을 확인할 수 있었다. Neuraminidase는 약 0.1M NaCl 농도에서 빠져나오는 것을 확인할 수 있었다. DEAE-cellulose ion exchange chromatography 결과 neuraminidase의 활성분획은 specific activity가 배양 상등액 0.6U/mg에서 59.3배 증가된 35.6U/mg이었고 회수율은 90.5%였다.

2) Sephacryl S-300 HR gel filtration

Ion exchange chromatography에서 neuraminidase 활성을 가지는 분획을 모아 한 외여과법(molecular cut-off 30kDa)으로 농축하고 50mM sodium phosphate 완충용액 (pH 7.0)으로 완충용액을 교환한 후 gel filtration을 수행하였다. Gel filtration에서 단백질은 주로 27번~37번 분획에서 용출되었고, neuraminidase는 단백질이 빠져나오기 시작하는 27번~31번 분획에서 대부분이 용출되었다. 표 5와 그림 6에서 보듯이 gel filtration에서 분리된 neuraminidase는 27번 분획에서 specific activity가 124.6U/mg으로 가장 높았으며 fraction number가 증가할수록 점점 떨어지는 경향을 보였다.

3) Neuraminidase 정제과정 요약 및 SDS-PAGE 분석

표 5에서 보듯이, 배양상등액의 specific activity는 0.6U/mg이었으나 분리정제과정을 거치면서 specific activity가 증가되어 gel filtration의 27번 분획에서는 124.6U/mg으로 207.7배 순도가 증가되었다. 또한 gel filtration 27번 분획은 SDS-PAGE 결과 거의 단일 밴드를 보여 분자량 88kDa의 neuraminidase가 고도로 순수분리된 것을 알 수 있었다(그림 6). 또한 gel filtration 분획 28번과 29번도 각각 85.9U/mg, 86.9U/mg의 specific activity를 보여 상당히 정제된 것을 알 수 있었다. 그러나 30번 분획 이상의 것은 앞의 단계인 DEAE-cellulose ion exchange chromatography에서 정제된 시료에 비해서 오히려 순도가 떨어졌다. 그림 6에서 보듯이, 이러한 표 5의 분석 결과는 SDS-PAGE 분석결과와도 일치하였다.

라. 정제 neuraminidase의 특성

앞에서 gel filtration으로 정제한 27번 분획을 이용하여, 효소의 pH와 온도에 따른 활성과 안정성을 조사하였다.

그림 7의 A와 C에서 보듯이 neuraminidase의 최적 pH는 5.0이었으며 pH 4.0~9.0

사이에서는 80%이상의 잔존 활성을 보여 비교적 안정한 것으로 나타나 비교적 넓은 pH 안전성을 보였다. 그림 7의 B와 D에서 보듯이 neuraminidase의 최적 활성은 55°C에서 나타났다. 그러나 40°C 이후에는 온도 안정성이 떨어져 50°C 이상에서는 급격히 실패하는 결과를 보였다. 이러한 결과로 볼 때 neuraminidase의 온도안정성을 고려하여 반응 최적온도는 40°C가 좋은 것으로 판단되었다.

마. GMP로부터 NANA의 생산 조건

GMP로부터 NANA를 생산하기 위해 NANA의 분해에 필요한 효소량을 조사하였다. 5% GMP용액(총 1g GMP/20ml)에 각각 0.125, 0.25, 0.5, 1, 2 U의 neuraminidase를 넣고 4시간 반응시킨 후 NANA의 생산량을 측정하였다. Svennerholm 방법으로 GMP속 총 NANA를 정량 했을 때 NANA의 총함량은 5.05%(w/w)로 측정되었고, 이를 바탕으로 효소반응으로 생성된 NANA의 수율을 계산하였다. 1g의 GMP에 대해 0.5U 이상의 효소를 넣어주었을 때 수율이 일정하게 나타나 1g의 GMP를 분해하는데 0.5U의 효소가 필요하다는 것을 알 수 있다(그림 8, A).

1g의 GMP에 대해서 0.5U 비율로 neuraminidase를 첨가하는 방법으로 몇 %의 GMP까지 최대수율로 생산할 수 있는지를 확인하기 위해 2%~12% GMP 농도 범위에서 NANA 생산수율을 조사하였다. 7% GMP까지는 약 85~95%의 NANA 생산수율을 보였으나 그러나 10% 이상에서는 초기 반응속도가 현저히 떨어지고 최종 수율도 80% 이하로 낮았다(그림 8, B).

바. GMP로부터 NANA의 공업적 생산과 분리정제

GMP로부터 NANA의 생산은 그림 9와 같이 수행하였다. 5% GMP용액을 효소와 4시간 동안 반응시키고 침전물을 filter를 이용해 여과한 후 감압농축하였다. 단백질과 같은 고분자 물질을 침전시키기 위해 농축액의 3배 부피에 해당하는 에탄올을 첨가한 후 4°C에서 12시간 방치한 다음 침전물질을 filter로 여과하여 제거하였다. 그 후 감압농축을 통해 에탄올을 제거한 다음 동결 건조하였다. NANA의 순도를 높이기 위해 앞에서 농축한 반응액을 1N formic acid로 평형화된 음이온교환수지에 loading하여 NANA를 수지와 결합시키고, 나머지 물질을 증류수로 깨끗하게 세척한 후 다시 1N formic acid를 이용해 NANA를 회수하여 동결건조 시켰다.

이렇게 생산된 NANA시료를 TBA assay로 NANA 순도를 측정한 결과 음이온 교환을 하지 않았을 경우 25%로 나타났으며, 음이온 교환을 한 경우 48%로 나타났다. 생산 과정 중 침전물질을 제거할 때 일부가 손실되어 음이온 교환을 하지 않은 경우 생산수율

이 63%였고, 음이온 교환을 하고 난 후에는 생산수율이 48%였다.

사. 생산된 NANA의 HPLC 분석

Neuraminidase를 이용하여 GMP로부터 생산한 물질이 NANA가 맞는지를 확인하기 위하여 NANA시료를 매일유업(주)에 의뢰하여 HPLC로 분석을 한 결과 표준 NANA 물질과 동일한 retention time에서 분리되어졌다(그림 10). TBA assay에서는 NANA함량이 48%로 나타났으나 HPLC 분석법에서는 46.3%로 나타났다. 약간의 오차는 있었지만 GMP로부터 생산된 물질이 NANA가 맞다는 것을 확인할 수 있었다.

아. Neuraminidase의 대장균에서의 고발현

Neuraminidase를 산업적으로 활용하기 위해서는 효소 생산성을 높이는 것이 필수적이다. 본 연구에서는 neuraminidase 유전자를 대장균으로 cloning하여 고발현시켰다. *A. ureafaciens* neuraminidase는 이미 그 gene의 서열이 알려져 있기 때문에 PCR방법으로 cloning을 하여 *E. coli*로 transformation시켰다.¹⁸ Neuraminidase의 발현을 증가시키기 위해 promoter 종류가 다른 세 개의 vector(pTrc99A, PET29a, pBluscript II SK)에 cloning한 후 *E. coli*로 transformation하여 transformant를 얻었다. 각각의 transformant를 흡광도가 0.5가 될 때까지 배양 후 IPTG를 첨가하여 induction하였다. Induction 시킨 후 6시간째 시료를 채취하여 세포내 분획, periplasm 분획, 배양 상등액 분획으로 나누어 neuraminidase 활성을 측정하였다. 표 6에서 보듯이 neuraminidase를 대장균에서 배양하는 경우 대부분의 활성이 배양 상등액에서 나타났으며, 실험에 사용한 3개의 promoter 중에서 T7 promoter를 이용해 발현시킨 경우 가장 높은 활성을 보였다.

4. 종합고찰

A. ureafaciens neuraminidase는 다른 탄소원 없이 1.5% GMP 배지 조건에서 36시간 배양하였을 때 가장 높은 활성을 가졌다. 그러나 포도당이나(GMP+ 포도당)이 존재하는 경우 neuraminidase가 전혀 생산되지 않은 것으로 보다 *A. ureafaciens* neuraminidase는 catabolite repression을 받는 것으로 생각된다.

*A. ureafaciens*의 배양상등액에서 분리한 neuraminidase의 최적 pH는 5.0이며, pH 4.0~9.0 범위에서 비교적 안정하였다. 최대 효소활성은 55℃에서 나타났으나 40℃ 이후에는 실활되기 때문에 이 효소의 최적 반응온도는 40℃로 생각되었다. Yoshihiro Uchida²⁵에 따르면 *A. ureafaciens* neuraminidase의 최적 pH는 5.0~5.5이고 최적온도

는 53℃로 본 실험결과와 비교적 일치하며, pH 안정성은 pH 6.0~ pH 9.0 범위에서, 온도 안정성은 10분 동안 최대 50℃까지 안정하다고 보고 하여 본 연구결과와 다소 차이가 있었다. 하지만 pH 안정성에 대한 실험에서 실험 온도와 반응 시간이 서로 다르기 때문에 차이가 나는 것으로 생각된다. 온도 안정성의 경우 참고문헌과 같이 10분 동안 반응 시켰을 경우 동일한 결과를 얻을 수 있었다.

1g의 GMP를 분해하는데 필요한 효소량은 0.5U 이었고, 4시간 반응 시 2~7% GMP로부터 85~95%의 수율로 NANA를 생산할 수 있었다. GMP를 neuraminidase와 반응시킨 후 에탄올 침전법으로 고분자 물질을 제거하는 경우 25%의 순도를 갖는 NANA를 생산할 수 있었다. 또 이것을 음이온 교환수지를 이용하여 정제하였을 경우 48%의 수율로 48%의 순도를 가지는 NANA를 생산할 수 있었다.

NANA 분리정제 시 에탄올을 이용한 단백질 침전과 동결건조 등의 과정은 산업적으로 적용 시 많은 비용을 초래하므로 산업적 이용을 위해서 NANA 생산 공정의 개선이 필요할 것으로 생각된다. NANA의 정제 과정 중 에탄올 침전이나 음이온 교환 수지를 이용하여 GMP를 제거하려 했지만 GMP 혹은 GMP분해물의 일부가 물에 녹은 형태로 NANA와 함께 분리되어 높은 순도를 가지는 NANA를 생산할 수 없었다. 앞으로 NANA의 순도를 높이기 위해 GMP 혹은 GMP 분해물을 효과적으로 제거할 방법이 더 개발되어야 할 것이다.

Neuraminidase의 생산성을 증대시키기 위해서 *E. coli*에서 T7 promoter여 발현시키는 경우 gene donor인 *A. ureafaciens*의 약 3배에 해당하는 neuraminidase를 세포배양액에서 생산할 수 있었다. Neuraminidase가 대장균에서 발현되어 배지 중으로 대부분 분비되는 것은 흥미로운 결과이다. Neuraminidase가 대장균에서 분비되는 기작에 대해서는 좀 더 많은 연구가 필요한 것으로 생각된다.

*A. ureafaciens*가 비병원성 균주이기는 하지만 이 균주로부터 생산된 neuraminidase를 식품산업에 이용하기 위해서는 생산된 neuraminidase의 안전성 연구가 선행되어야 할 것으로 생각된다. 또한 본 연구에서 생산된 NANA의 활용도를 증가시키기 위해서 앞으로 식품이나 의료용 소재로서 활용하기 위한 연구가 더 진행되어야 할 것이다.

Table 3. Neuraminidase activities of various commercial food-grade enzymes

Commercial enzyme	Neuraminidase activity (U/ml)
Protex 7L	-
Peptidase R	-
Umamizyme G	0.025
Collupulin MG	-
Flavourzyme 500 MG	-
Lipozyme TL 100L	-
Termamyl 300L, Type DX	-
Ultraflo L	-
Pectinex 100L	-
Celluclast 1.5 FG	0.020
Citrozym cloudy 100L	-
Flavourzyme 1000L	-
AMG 300L	-
Alcalase	-
Viscozyme L	-
Pectinex 5XL	-
Neutrase 0.8L	-

Table 4. Neuraminidase activities of various microbial species

Strain	Supernatant (U/ml)	Cell free extract (U/ml)
<i>Aspergillus oryzae</i>	-	-
<i>Aspergillus niger</i>	-	-
<i>Trichoderma viride</i>	-	-
<i>Trichoderma reesei</i>	-	-
<i>Lactobacillus acidophilus</i>	-	-
<i>Bifidobacterium longum</i>	-	-
<i>Bifidobacterium bifidum</i>	-	-
<i>Bifidobacterium infantis</i>	-	0.001
<i>Arthrobacter nicotianae</i>	0.01	-
<i>Arthrobacter ureafaciens</i>	0.08	-

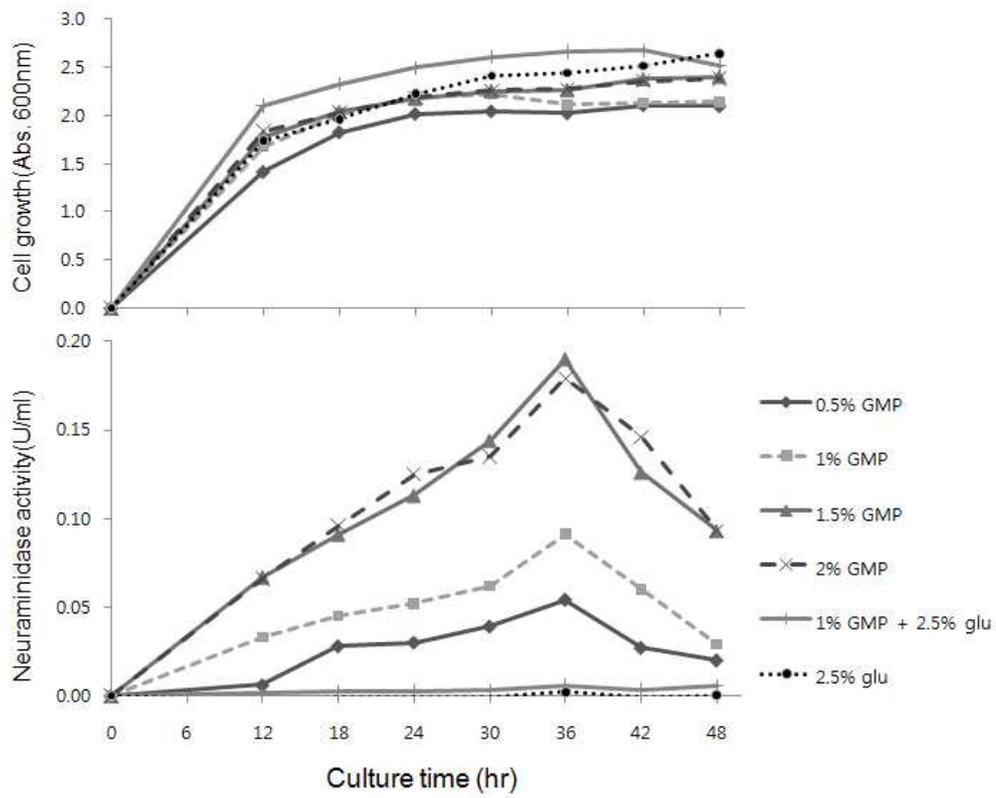


Fig. 3. Production of neuraminidase from *A. ureafaciens* in M-9 minimal medium containing GMP or GMP+ glucose as sole carbon sources.

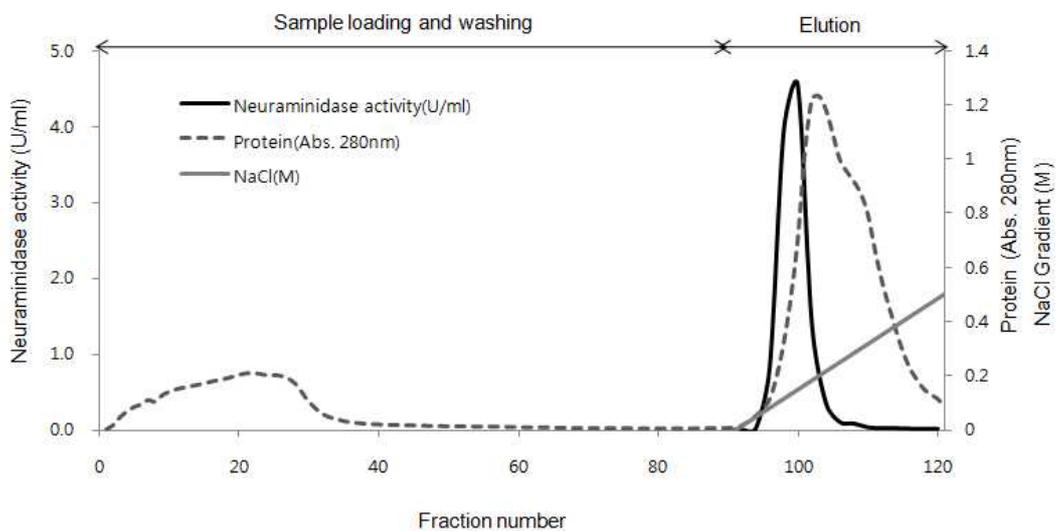


Fig. 4. DEAE-cellulose ion exchange chromatography

760ml of culture supernatant was concentrated by ultrafiltration(molecular cut-off, 10kDa) and the concentrate was washed by a diafiltration with 10mM sodium phosphate buffer(pH 6.0). The concentrated enzyme solution was loaded on DEAE-cellulose column equilibrated with 10mM sodium phosphate buffer(pH 6.0). Neuraminidase was eluted by a linear gradient of NaCl in the same buffer from 0.0M to 0.5M.

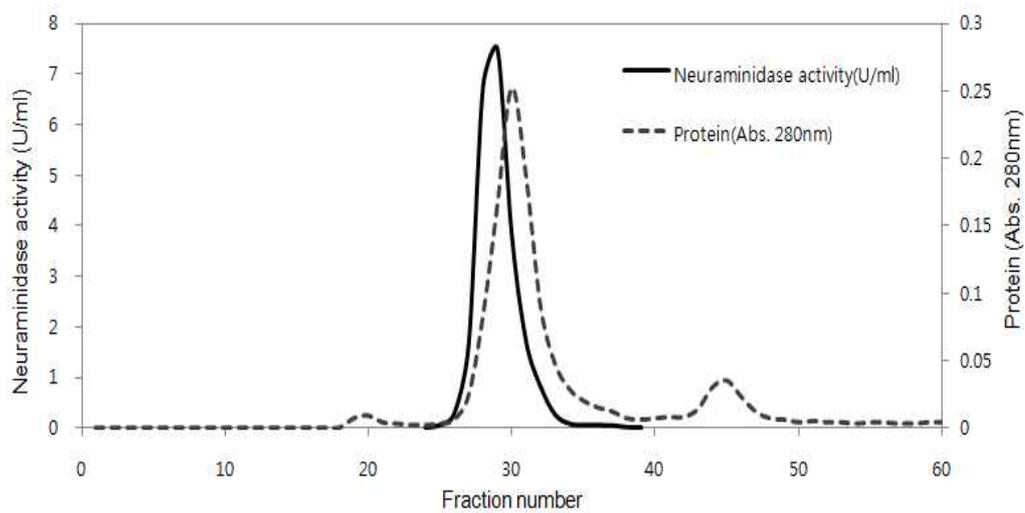


Fig. 5. Sephacryl S-300 HR gel filtration

Active fractions (fraction number 96~108) of DEAE-cellulose ion exchange chromatography were concentrated by an ultrafiltration and the concentrate was washed by a diafiltration with 50mM sodium phosphate buffer(pH 7.0). The concentrated enzyme solution(5ml) was loaded on Sephacryl S-300 HR gel filtration column (60cm×16mm).

Table 5. Summary of purification steps for neuraminidase from *A. ureafaciens*

Step	Total protein (mg)	Total activity (U)	Sp. Activity (U/mg)	Purification (-fold)	Yield (%)
Culture supernatant	260	143.6	0.6	1	100
Ultrafiltration (cut-off, 10kDa)	23.1	133.6	5.8	9.7	93
DEAE-cellulose	3.7	130	35.6	59.3	90.5
Ultrafiltration (cut-off, 30kDa)	2.4	118.8	50.6	84.3	82.7
Sephacryl S-300 HR gel filtration					
GF27	0.1	8.1	124.6	207.7	5.6
GF28	0.4	33.5	85.9	143.2	23.3
GF29	0.4	37.4	86.9	144.8	26
GF30	0.8	19.2	22.8	38	13.3
GF31	0.5	8.4	16.6	27.7	5.9

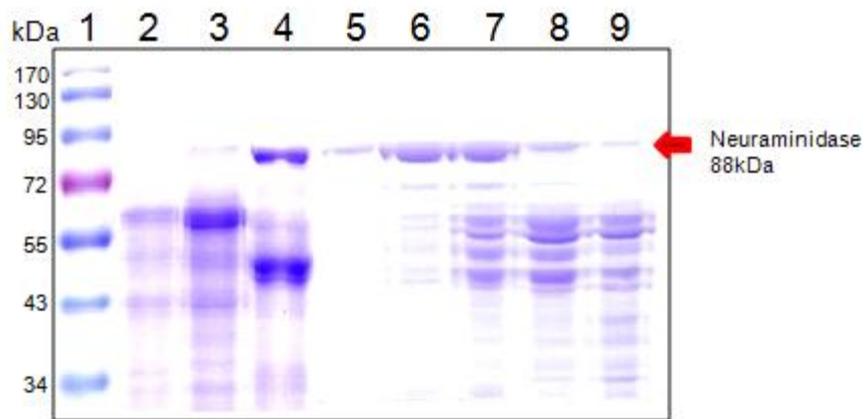


Fig. 6. SDS-PAGE of neuraminidase fractions in purification steps

Lane 1: size marker proteins, lane 2: culture supernatant, lane 3: UF (molecular cut-off, 10kDa), lane 4: DEAE-Cellulose ion exchange chromatography and UF (molecular cut-off, 30kDa), lane 5 to 9: gel filtration fractions (fraction number 27, 28, 29, 30 and 31, respectively).

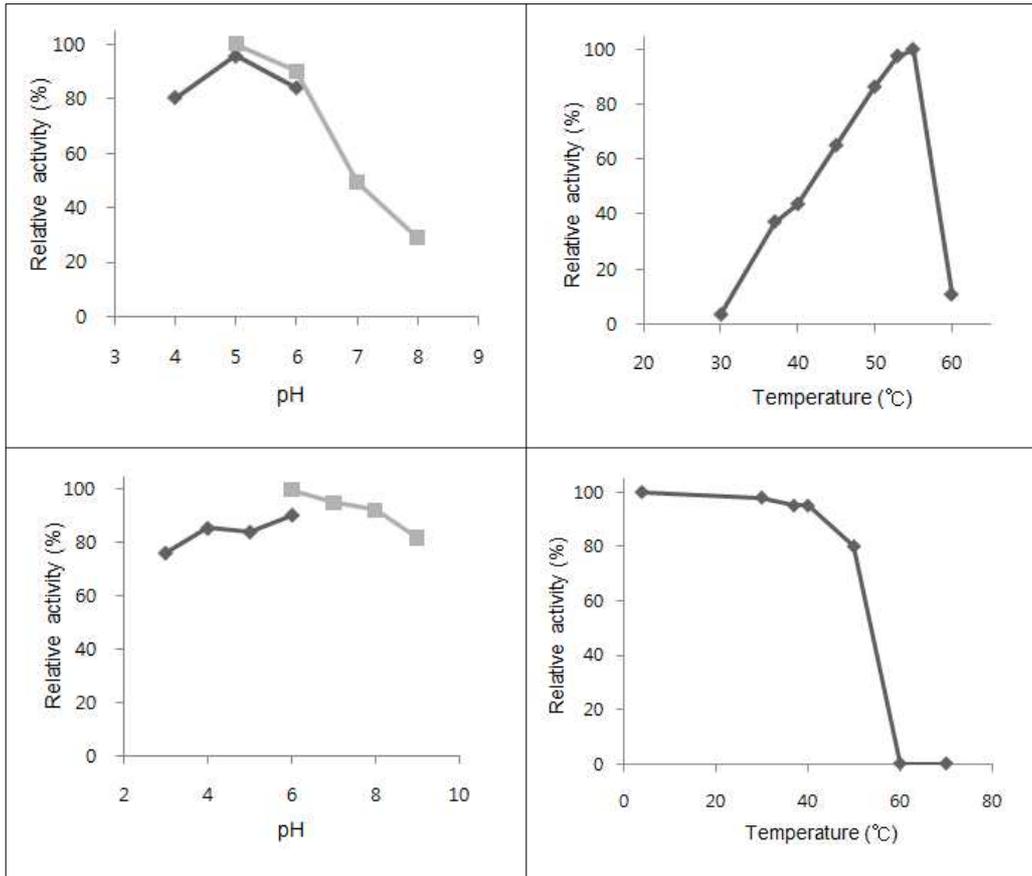


Fig. 7. Effects of pH and temperature on the activity and stability of neuraminidase purified from *A. ureafaciens*

A. Effect of pH on the activity of neuraminidase. Neuraminidase was incubated 10min using 100mM acetate buffer pH 4.0–6.0 (◆) and 100mM phosphate buffer pH5.0–8.0 (■), B. Effect of temperature on the activity of neuraminidase. Neuraminidase was incubated at the following temperatures: 30, 37, 40, 45, 50, 53, 55 and 60°C for 10min, C. Effect of pH on the stability of neuraminidase. Neuraminidase was pre-incubated in pH 3.0–6.0 10mM acetate buffer(◆) and pH 6.0–9.0 10mM phosphate buffer(■) at 4°C for 1hr and then, residual enzyme activity was measured, D. Thermal stability of neuraminidase : Pre-incubation of neuraminidase was incubated at each temperature for 1hr. at 4°C or 10 min and then, residual enzyme activity was measured.

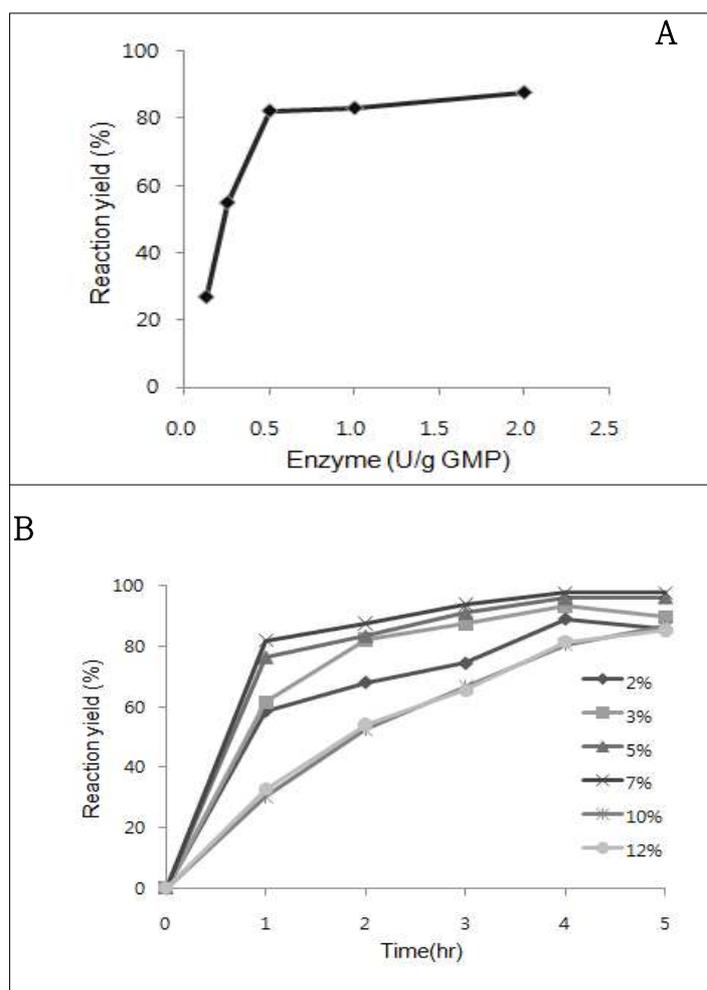


Fig. 8. NANA production from GMP by using neuraminidase purified from *A. ureafaciens*

A. Effect of neuraminidase activity per g GMP on the production yield of NANA. Reaction conditions: 5% GMP in 100mM sodium acetate buffer (pH 5.0), 37°C, 4hr, enzyme addition (0.125U, 0.25U, 0.5U, 1U or 2U). B. Effect of GMP concentration on the production yield of NANA.

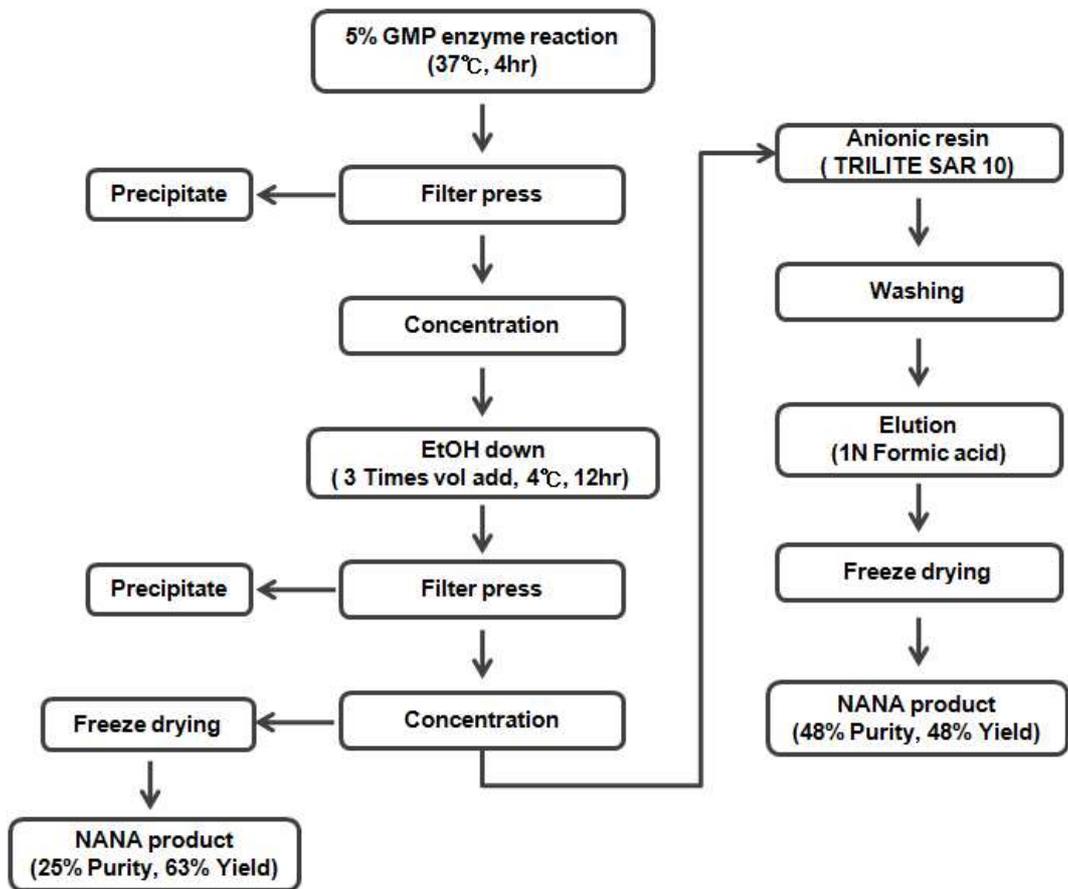


Fig. 9. Purification processes of NANA from GMP hydrolysate with neuraminidase

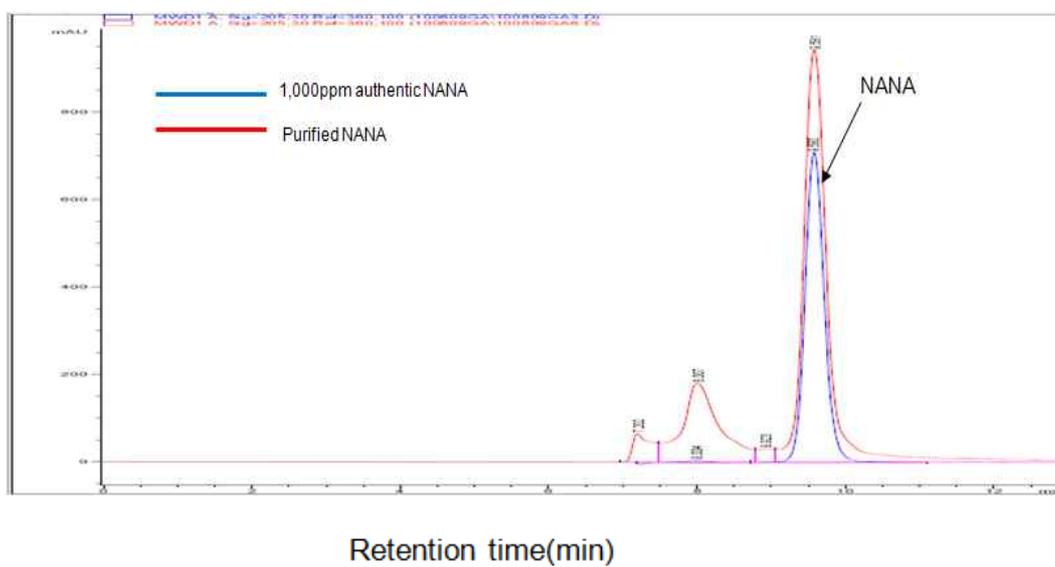


Fig. 10. HPLC analysis of the purified NANA from the GMP hydrolysate

Table 6. High-level expression of neuraminidase in *E.coli*

Plasmid	Promoter	Strain	Neuraminidase activity (U/ml)		
			Culture medium	Periplasm	Cytoplasm
pBSK-Neu	T3	MC1061	0.022	0.001	0.000
pTrc-Neu	Trc	JM109	0.065	0.010	0.012
pET-Neu	T7	BL21	0.692	0.015	0.010

제 2-2절 Neuramininase대량생산시스템 정립

1. 연구목적

현재 영유아식품(조제분유 및 이유식 등)내 감염되어 공중보건학적인 피해를 일으키고 있으나 뚜렷한 대책이 없는, 고질적인 병원성 세균(*B.cereus*, *E.sakazakii*)에 대하여, 유단백질(GMP)을 원료로 기원성 천연 항균제로서 NANA를 개발하기 위해서는 기질에서 NANA만을 선택적으로 분리해 낼 수 있는 최적의 효소개발이 절대적으로 필요하다.

본 연구에 앞서 실험실 조건에서 기질인 유단백질(GMP)에서 NANA를 효소적 처리법으로 분리하기 위한 효소인 Neuraminidase는 식품첨가물로 등재되어 있는 식품미생물중 *Arthrobacter ureafaciens*를 선발하고, 이를 이용한 기질내 NANA생산에 적합하도록 최적 효소생산 조건 및 NANA생산 관련 적용기법을 정립한 바 있다(3장, 제2절). 본 연구에서는 실험실적 적립된 연구결과를 토대로 개발효소에 대한 대량생산시스템 정립을 위한 시작품 제조를 통하여 대량생산시스템 정립과 더불어 경제성 평가를 동시에 실시 하였다. 시작품 제조에 따른 결과는 다음과 같다.

2. 연구수행방법

가. 원료 GMP제조

최초 우유로부터 치즈생산 후 유청액을 원료로 제조된 GMP는 매일유업(주)로부터 공여받아 이를 기준으로 NANA대량생산간 원료로 사용하였다. 우선 GMP를 생산하기 위한 원료인 유청제조 방법은 Fig 1과 같다. 그리고 제조된 유청분말내 GMP생산을 위한 기본제조법은 문 등(2005)의 방법에 따라서 제조하였다.

NANA 생산 및 Neuraminidase생산용 기질로 사용하기 위한 원료 GMP는 주관기관인 매일유업(주)의 안전연구센터로부터 성분 및 안전성 평가 과정을 통과한 최종 480Kg를 공여받아 전체 연구간 사용하였다(Fig 1~2).

나. Neuraminidase 대량생산시스템 정립

Neuraminidase생산을 위하여는 GMP내 함유되어 있는 NANA를 분리하기 중균을 배양과 이를 이용한 Neuraminidase생산 공정으로 구분할 수 있다. 공정별 진행내용은 다음과 같다

1) 뉴라미니다아제(Neuraminidase) 제조용 종균배양 공정은 다음과 같다(Fig. 3.).

가) 1st Seed Culture : 멸균된 액상 영양배지(Lactose-broth) 300ml에 선발 종균 *Arthrobacter ureafaciens* KCTC 3387)을 1차 접종하고 이를 30℃, 300 rpm의 조건으로 배양하되, 3.0~4.0 OD600값을 보일 때 작업을 완료 하였다.

나) 2ed seed Culture : 1st Seed Culture가 완료되면 3L 액상 영양배지(Lactose-broth) 로 접종하여 5L fermentation에서 7시간 30℃, 300 rpm의 조건으로 배양하며, 3.0~4.0 OD600값을 보일 때 작업을 완료 하였다.

다) 이를 GMP내 뉴라미니다아제(Neuraminidase) 제조를 위한 효소생산을 위한 종균으로 사용하였다.

2) 뉴라미나아제 대량생산(배지조성 및 배양조건)

본 연구 단계에서는 뉴라미니다아제(Neuraminidase) 생산용 기질을 준비(용해 및 멸균)하기 위하여 다음과 같이 실시하였다.

가) 재료준비

- (1) M9 {배지조성: CaCl₂ (0.015g/l, pH 7.4), Na₂HPO₄ (6g/l), KH₂PO₄ (3g/l), NaCl (1g/l), MgSO₄ (0.5g/l), NH₄ Cl (1g/l), Glucose (2g/l) } 배지 2200L 살균
- (2) 10% GMP (GMP:25kg,R/O수 250L) 별도살균
- (3) 5L 1M MgSO₄·7H₂O 별도살균
- (4) 250ml 1M CaCl₂ 별도살균

나) 효소생산 방법은 총 10단계의 공정으로 진행하였다.

- (1) 10톤 반응기에 M9배지 2200L를 조성하고 살균처리(121℃,15분)를 한 후 30℃로 온도를 저하시켰다(50rpm 교반조건).
- (2) “1)공정” 이 완료되면 별도 살균된 1M MgSO₄·7H₂O(5L), 1M CaCl₂ (250ml)을 넣어 주었다.
- (3) “2)공정” 이 완료되면 별도 살균된 준비된 기질 10% GMP (GMP:25kg,R/O수 250L)를 투입하였다.
- (4) “3)공정” 이 완료되면 종균배양된 선발 종균(*A. ureafaciens* KCTC 3387)을 접종하였다.
- (5) “4)공정” 이 완료되면 30℃, 50~100rpm, 0.3~0.6 VVM, 0.2~0.3 bar, DO=20% 이상 유지 및 pH 7.1 조건으로 배양 공정을 진행하였다.
- (6) 효소생산 공전간, 30~40 OD600 도달점에서 반응을 종결 하였다.
- (7) “6)공정” 이 완료되면 UF시스템을 이용하여 분자량 10,000이하의 물질을 제거

함과 동시에 10배로 농축하였다.

- (8) “7)공정” 이 이루어지면서 Filter press를 이용한 최종 여과공정을 진행하였다.
- (9) “8)공정” 이 완료되면 한외여과기를 통한 분자량 30,000이하의 물질을 제거하며 농축하여 뉴라미니다아제 배양액을 분리하였다.
- (10) 9)공정” 이 완료된 효소농축액을 동결건조시켜 최종 목표 “뉴라미니다아제” 를 생산하였다.

다) 효소생산 시 문제점 및 해결책

- (1)기질 살균시 열에 의한 단백질 염침현상이 나타남에 따라 살균후 균질 과정을 해결하였다.
- (2)UF시스템과 Filter press를 이용한 여과공정중 종균에 의한 막힘 현상 나타났는데, 연속원심분리기를 이용한 1차 정제 후 정밀필터 공정으로 이를 해결하였다.
- (3) Filter press로는 깨끗한 여과액을 얻을 수 없어서, UF 진행후 원심분리와 여과기를 사용하여 최종 55L의 맑은 효소액을 회수하였다.
- (4) 발효 준비시 GMP를 고농도(10%)로 살균하게 되면, 단백질 영김현상으로 인해 발효상 효소 생산성 10~15% 감소하는 문제점 발생하였다.

3. 연구수행결과

현재 영유아식품(조제분유 및 이유식 등)내 감염되어 공중보건학적인 피해를 일으키고 있으나 뚜렷한 대책이 없는, 고질적인 병원성 세균(*B.cereus*, *E.sakazakii*)에 대하여, 항균능력(경제성 확보)을 보유한 유단백질(GMP)을 원료로 기원성 천연 항균제로서 NANA를 하기 위한 핵심소재로서 Neuraminidase 대량생산시스템 정립을 완료하였다. 기질인 유단백질에서 NANA를 효소적 처리법으로 분리하기 위한 효소인 Neuraminidase는 식품첨가물로 등재되어 있는 식품미생물중 *A.ureafaciens*를 선발하고, 대량생산시스템조건에서 효소생산관련 대량생산시스템 정립을 일련의 시스템으로 완료하였다. 시작품에 대한 결과는 다음과 같다.

가. 경제성이 확보되는 분해효소를 생산하기 위하여 상업효소(17종), 식품첨가물로 등재된 식품미생물을 수거하여 이들에 대하여 Neuraminidase를 스크리닝 과정을 실시하였다. 결과로서, *A.ureafaciens*를 Neuraminidase생산 유효균으로 선발하였다.

나. 기질 GMP내 NANA 생산을 위해 선발된 *A.ureafaciens*를 대상으로 실험실적 반응조건 등 NANA생산조건을 정립하였다(Fig 1~2. Fig 4.)

다. 효소와 NANA의 대량생산시스템 정립을 위하여, 효소생산(3톤 반응조) 및 이를 이용한 NANA 생산(10톤, 기질GMP 대비 효소첨가량 1% 기준)을 위한 효소생

산 및 NANA생산성을 검정하였다. 결과는 다음과 같다.

- 1) 시제품 제작을 통하여 도출된 효소생산시 문제점을 해결한 최종 뉴라미니다아제 대량생산 공정도는 Fig 5와 같이 정립이 완료되었다.
- 2) 배양액 1L기준으로 실험실적 조건에서의 효소생산성은 0.16unit/ml이었고, 이때 역가치는 74u/g이었다. 그러나, 시작품(3톤 스케일)에서는 효소생산성은 4u/ml 그리고 역가치는 116u/g으로 증가하였다. 그리고, 배양액 1L에서 생산량은33g(3.3%)이었다(Fig 4~5).
- 2) 10톤 반응조(Working Vol. 5톤)에서 총생산효소량은 1,998g(232,000U)였으며, 이때 생산수율은 71.5%였다(Table 1).
- 3) 생산간 총소요경비는 7,625,000원이었으며, 이때 생산효소 1g의 생산단가는 3,816원이었으므로 경제성은 확보되었다 할 수 있다(Table 2).
- 4) 결론적으로, 잉여 미이용 자원인 유청단백질에서 분리한 유단백질(GMP)로부터 NANA생산을 위한 효소(Neuraminidase)생산용 미생물(식품첨가 미생물) 확보, 이를 이용한 3~10톤 규모의 Neuraminidase 대량생산 및 생산된 Neuraminidase를 이용한 10톤 규모의 NANA대량 생산시스템을 일련되게 정립하였다.

Table 1. Neuraminidase대량생산 공정 내역(10톤 반응조 조건, Working Vol. 5톤) 및 경제성 평가

공정순서	제조공정	원료	실시내역	생산수율
1	반응기 준비	1. 10톤 미생물 배양전용반응기(10톤) - Working Vol. : 5톤		
2	배양액조성	1. R/O수 :2.5톤 2. M9배지 :{배지 조성: CaCl ₂ (0.015g/l, pH 7.4), Na ₂ HPO ₄ (6g/l), KH ₂ PO ₄ (3g/l), NaCl(1g/l), MgSO ₄ (0.5g/l), NH ₄ Cl(1g/l), Glucose(2g/l)}	10톤 반응기에 M9배지 2200L를 조성하고 살균처리 (121℃,15분)를 한 후 3 저하시킨다(50rpm 교반조건).	
3	멸균작업	1. 5L 1M MgSO ₄ ·7H ₂ O 별도살균 2. 250ml 1M CaCl ₂ 별도살균	1. 별도살균(121℃,15분) 2. 추가배지 투입	
4	기질투입(멸균)	1. 10% GMP 별도살균		
5	종균접종	1.선발 종균(<i>Arthrobacter ureafaciens</i> KCTC 3387)	1. 6L, 3.0~4.0 OD ₆₀₀ 값을 보일때 접종	
6	배양		1.30℃, 50~100rpm, 0.3~0.6 VVM, 0.2~0.3 bar, DO=20% 이상 유지 및 pH 7.1 조건으로 배양 시킨다. 2. 30~40 OD ₆₀₀ 값을 보일때 배양종료	
7	여과	1. Centrifuge 2. Ultra Filtration Filter 3. Filter press 4. 한외여과기	1. CF여과를 통하여 균체 및 불용성 물질제거 2. UF시스템을 이용하여 분자량 10,000이하 물질을 제거함과 동시에 10배 농축한다. 3. Filter press를 통하여 제균 및 염 소거 4. 한외여과기를 통한 분자량 30,000이하의 물질을 제거하며 농축하여 뉴라미니다아제 배양액을 분리한다.	
8	동결건조	1. 동결건조기		71.5%

Table 2. 정립 Neuraminidase 대량생산시스템 공정단계별 소요경비 및 경제성 평가

공정	소모량(소모품)	사용료(원)	계(원)	작업시간	Kg당 비용
원료(GMP)	25kg		1,625,000		65,000원(부가세 별도)
발효기	10톤, 500L 발효기	150,000	450,000	3일 사용	
UF기		150,000	150,000	1일 사용	
원심분리기		200,000	200,000	1일 사용	
동결건조기		100,000	300,000	3일 사용	
발효배지	L-broth, M9배지	500,000	500,000	Pre batch	
가공비	폐수, 에너지, 소모품 등	2,400,000	2,400,000		
인건비		200,000	1,200,000	6일	
기타비용	관리비, 운임 등	800,000	800,000		
제조원가 (Neuraminidase 1g 생산기준)			7,625,000		3,816원/g (1998g, 232,000U)

과정	주요기기	공정내용
원유검사	Milcoscan Charm II	일반성분검사, 관능검사, 가수검사, 항생제검사등을 실시하여 합격유를 선별한다.
원유수유 / 저장	Milk Tank	원유검사 합격유만을 수유하여 Milk Tank에 저장한다.
표준화 및 살균, 냉각	Separator Standardisation Unit Bactofuger Homogeniser Pasteuriser	원유를 표준화시키고 살균한 다음 냉각시켜 저장한다.
우유 투입		생산공정에 따라 균주, 렌넷을 첨가하고 절단하여 커드와 웨이를 만든다.
균주(Starter) 첨가		
응유효소(Rennet) 첨가	Coagulator	
절단(Cutting)		
웨이분리	커드	웨이와 커드를 분리하여 커드는 재품을 만들기 위한 다음공정으로 보낸다.
Whey Balance Tank 저장		
농축 (Evaporator)	Whey Evaporator	
냉각 (Cooling)		농축웨이 당도 32%, 냉각온도 4°C
저장 (Storage)	Whey Tank	농축 냉각된 웨이를 Whey tank에 저장한다.

Fig. 1. 우유로부터 치즈를 제조 후 유청액 생산공정도(매일유업(주) 제공)

GMP(Glycomacropeptide) 제조Scheme

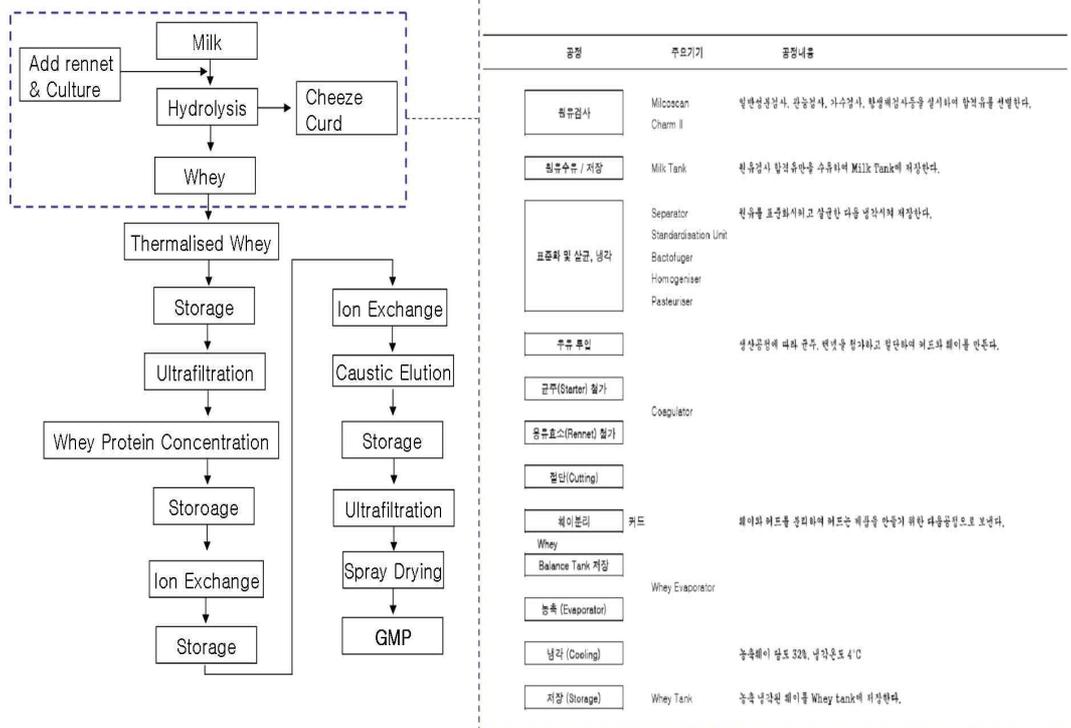


Fig. 2. 유청으로부터 GMP 생산공정도(매일유업(주) 제공)

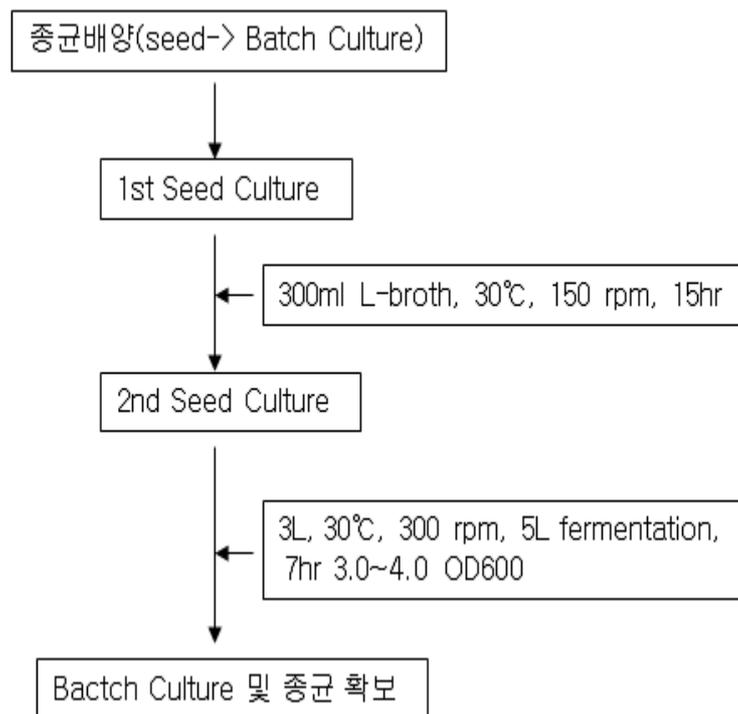


Fig. 3. GMP내 함유되어 있는 NANA를 분리하기 Neuraminidase생산용 종균배양공정

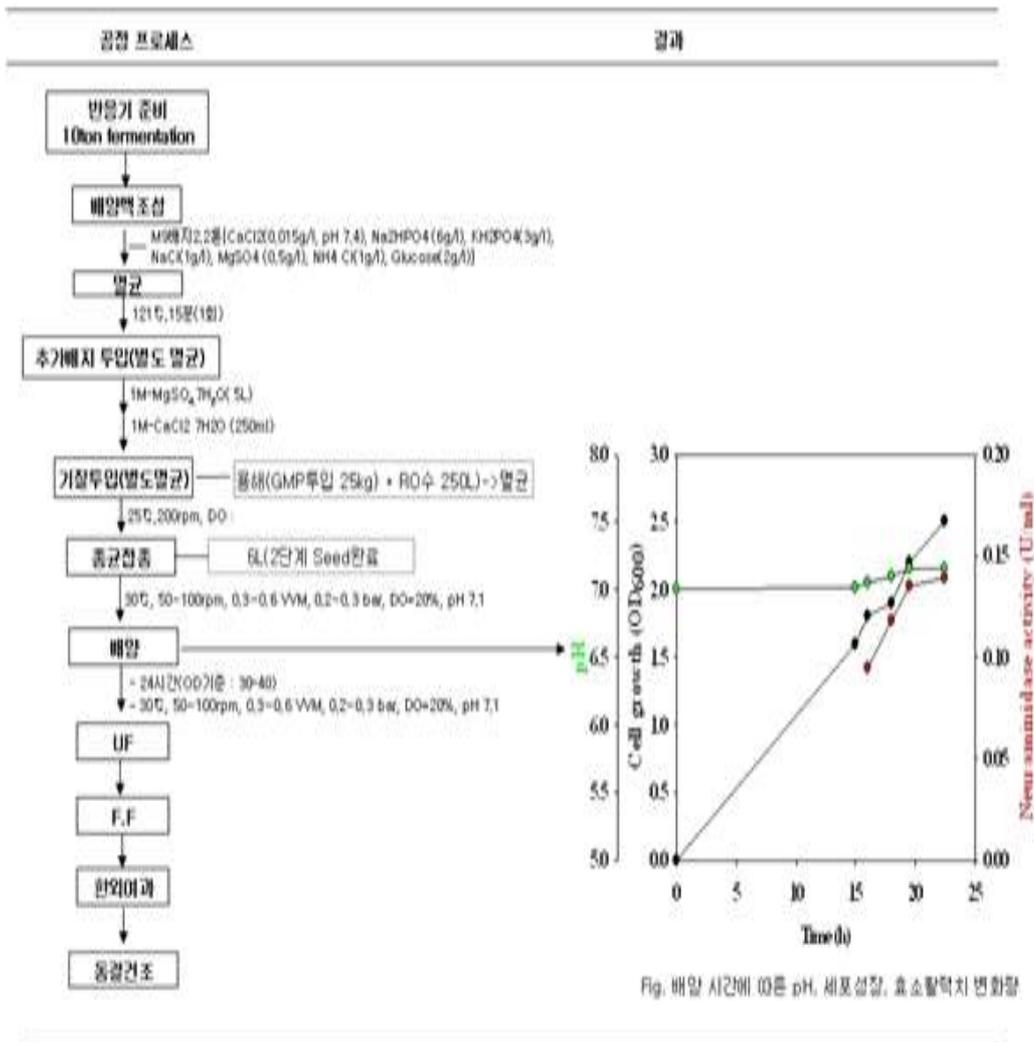


Fig 4 . 실험실적 Neuraminidase 생산법 정립을 의한 소형 Scale (30L) 시제 공정도

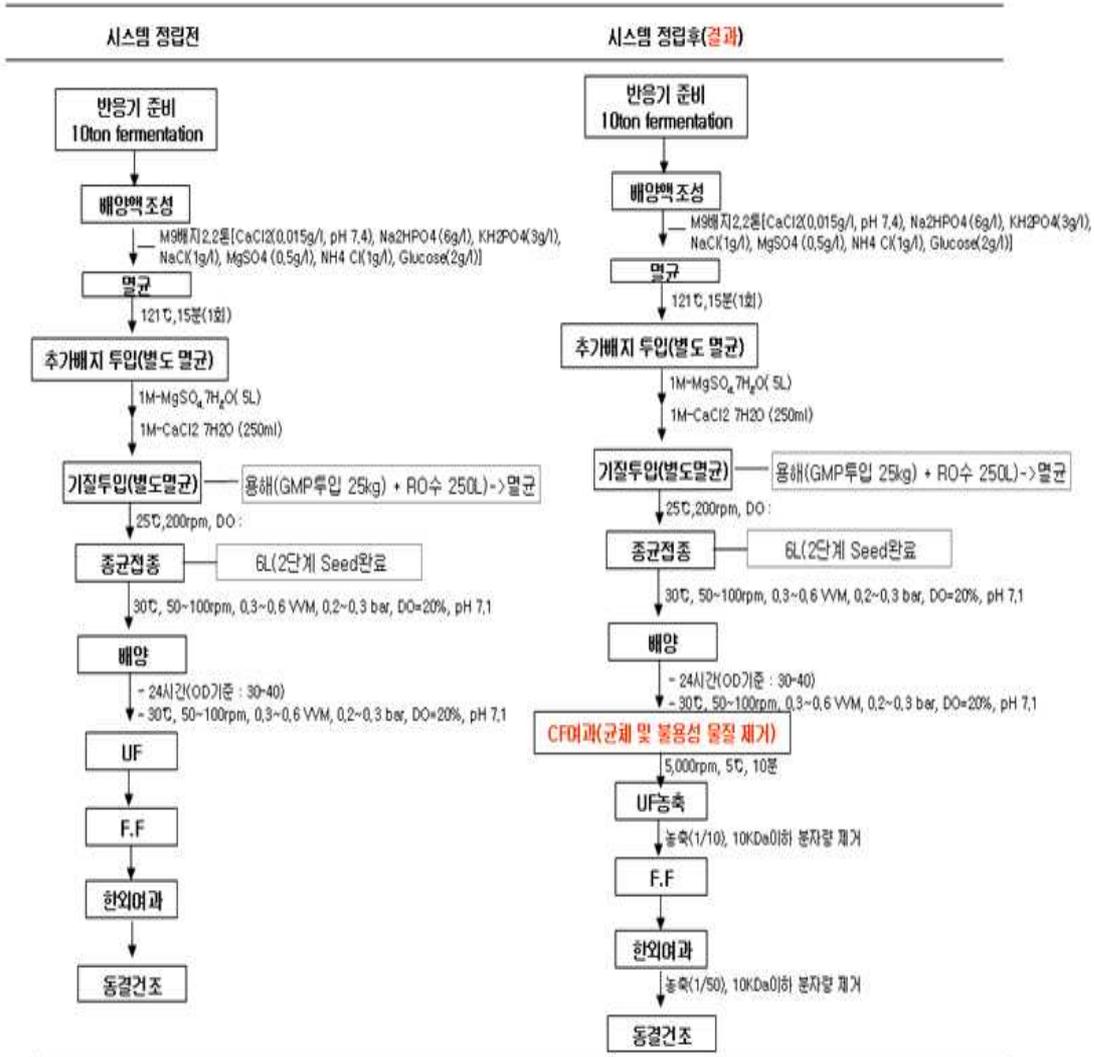


Fig 5. 시제 결과 문제점을 보완하여 정립된 뉴라미나아제 대량생산시스템

제 2-3 절 NANA 대량생산시스템 정립

1. 연구목적

현재 영유아식품(조제분유 및 이유식 등)내 감염되어 공중보건학적인 피해를 일으키고 있으나 뚜렷한 대책이 없는, 고질적인 병원성 세균(*B.cereus*, *E. sakazakii*)에 대하여, 항균능력(경제성 확보)을 보유한 유단백질(GMP)을 원료로 기원성 천연 항균제로서 NANA를 개발하였다.

기질인 유단백질(GMP)에서 NANA를 효소적 처리법으로 분리하기 위한 효소인 Neuraminidase는 식품첨가물로 등재되어 있는 식품미생물중 *Arthrobacter ureafaciens*를 선발하고, 대량생산시스템조건에서 효소생산 및 이를 적용한 NANA 대량생산시스템 정립을 일련의 시스템으로 완료하였다.

본 연구에서는 실험실적 정립이 완료된 GMP내 NANA 분해 및 생산조건을 충족하는 neuraminidase를 적용한 GMP로부터 NANA를 상업적으로 대량생산을 위한 시스템 정립에 목적을 부여하였다. 이를 위하여, 최초 우유로부터 치즈생산 후 유청액을 원료로 GMP를 생산하고, 이를 개발효소를 적용하여 최종목적 NANA를 생산하되, 현장적용성과 생산수율 향상 및 경제성을 동시에 충족시킬 수 있도록 최종 생산 NANA의 순도를 25%로 정하였다. 최종정립된 연구결과를 토대로 시작품 효소를 적용한 NANA 시작품 실시결과는 다음과 같다.

2. 연구수행방법

가. 재료 및 방법

1) 원료 GMP제조

최초 우유로부터 치즈생산 후 유청액을 원료로 제조된 GMP는 매일유업(주)로부터 공여받아 이를 기준으로 NANA대량생산간 원료로 사용하였다. 우선 GMP를 생산하기 위한 원료인 유청제조 방법은 Fig 1과 같다. 그리고 제조된 유청분말내 GMP생산을 위한 기본제조법은 문 등(2005)의 방법에 따라서 제조하였다.

NANA 생산 및 Neuraminidase생산용 기질로 사용하기 위한 원료 GMP는 주관기관인 매일유업(주)의 안전연구센터로부터 성분 및 안전성 평가 과정을 통과한 최종 480Kg를 공여받아 전체 연구간 사용하였다.

2) Neuraminidase 제조

원료 GMP내 함유된 NANA 분리 및 생산용 효소인 neuraminidase는 본 연구간 정립된 제조법에 따라 실시하였으며, Neuraminidase제조관련 세세한 내역은 제2장 및 8장(제 1 절)에 세세히 기술하였다.

나. NANA대량생산시스템 정립

NANA대량 생산시스템은 3단계 시작품 제조과정을 거쳐 정립되었는데, 1단계는 소형 Pilot Schele(40L)를 기준으로 실험실적 조건을 확인하고 저 하였으며, 2단계는 1단계 결과를 기초로 대형 Pilot Schele(10톤 반응조, GMP사용량 : 380Kg)에서 실시하였다. 3단계는 2단계에서 생산된 저순도 NANA(10%)를 원료로 고순도 정제법을 검토하는 순으로 정립되었다. 단계별 공정도 및 공정내역과 결과는 다음과 같다.

1) 1단계 : NANA대량생산시스템 공정도(25%, 생산수율 63%)

(필터프레스법 적용, Pilot Schele : 40L, GMP사용량 : 2Kg 기준)

가) 시제목적 : 1단계에서는 개발Neuraminidase를 적용 GMP내 NANA대량생산조건 설정을 위한 시제Pilot Scale(40L)실시하고, Pilot 실시결과를 토대로 대량생산시스템 정립을 위한 시작품(10톤규모) 실시전 문제점 및 경제성을 사전평가하고자 하였다.

나) 재료 및 방법 : 기질(GMP: 2Kg)대비 Pilot공정(40L)단계별(8단계) NANA생산 효율등 평가하되, Pilot 단계별(8단계)로 액량(L), 총건조무게(g), NANA총량(g), Purity(%) 및 Yield(%)을 확인하고, 단계별 분취시료내 NANA의 함유량을 정립된 필수분석법(HPLC 및 FPLC)에 준하여 검정하였다(Table 1, Fig 1.).

시제간 공정은 총8단계로 진행하였으며, 1공정은 반응액을 GMP 2.0kg와 정제수 40L(기질농도 5%)를 배합하여 조성하였으며, 2공정은 시제에서 중요한 핵심 공정인 효소반응으로서 효소는 기질인 GMP 대비 1%를 사용하는 조건으로 하여 pH 5.0 및 37℃조건으로 4시간을 반응시켜 GMP로부터 NANA를 분리하였다.

이어서 효소반응 후 불용성 침전물을 제거하는 3공정과 진공농축과정을 실시하여 반응액량을 1/8배로 농축 후 에탄올 농도구배법(반응액 대비 3배)으로 추가 단백질을 침전 유도 및 제거과정을 실시한 후 상등액만을 진공농축 및 동결건조과정까지 총 8단계 공정을 거쳐 최종 25% 순도의 NANA가 함유된 GMP가수분해물을 획득하였다(Table 2., Fig 3~4., Fig 6.).

다) 결과확인

1단계 시제품 완료후 목적 대비 결과 확인은 우선 실험실적 NANA생산 정립결과
의 현장적용공정 시스템 기초정립여부와 NANA생산수율 최대 공정단계 확인 및 최
적 산업화 단계설정(기준 : 순도 25% 이상) 및 공정단계별 문제점(NANA 생산수
율저하 등)도출을 목표로 하였다.

라) 연구수행결과

(1) NANA(40L 반응기, GMP 2Kg)생산 공정 및 작업지시서 정립이 완료되었다
(Fig 3, Table 1.)

(2) NANA 및 부산물(GMP 가수분해물)별 분리제조법 정립되었으며, 동시에 25%
순도를 NANA의 생산수율은 63%였다.

(3) 시제를 통한 생산기법 정립시 도출된 문제점은 다음과 같다(Table 1.).

(가) NANA생산시 분해반응공정(침전물 제거시)시 약 8% NANA 그리고 에탄올
침전물 제거공정에서 약 33% NANA Loss 발생하였다(Table 2).

(나) NANA 생산수율(손실률 감소) 증대방안으로서, 분해반응공정반응 후 침전물을
회수한 후 물로 세척한 후 필터프레스 또는 원심분리기를 이용 침전물을 회수
하고 물로 세척하여 침전물 속에 있는 NANA를 회수하는 방법과 에탄올 침전
물 제거공정에서 에탄올 첨가량 최적화를 통한 Loss발생 최소화를 위하여 역시
필터프레스 또는 원심분리기를 이용하여 침전물 회수하고 물로 세척하여 침전
물 속에 있는 NANA를 회수하는 방법중 적정방법의 검토가 필요하였다(Table
2, Fig 4.~6.).

(다) 최종 8단계 공정이 완료시, 동결건조를 통한 최종 NANA의 건조비용은 원가상
승에 미치는 영향이 높다. 따라서, 건조방법 재검토가 필요하다.

(라) NANA회수율 증대목표는 75%이상(예비실험시 회수율 75%)으로 설정하였다.

(4) 효소처리후 공정단계별 NANA생성량 조사결과, 반응시간 및 단계별 NANA 함유
량은 6%~46%까지 검출되어 순도 조절 및 대량생산 시스템의 정립이 가능함을
알 수 있었다(Fig 6).

(5) 표준체 NANA 대비 GMP가수분해물내 NANA는 저분자(48.40분)와 고분자(39
분) 범위에서 검출되는 분자량을 보유하고 있었다(Fig 7.~8.).

(6) NANA시제시 부산물인 GMP가수분해 단백질별 용해성 평가와 동시에 NANA함
유량을 조사하여 본 결과, 효소반응 후 침전물의 경우는 불용성 단백질로서
NANA를 1.3% 함유하고 있었으며, 에탄올 침전물의 경우는 수용성 단백질로서
NANA함유량을 검토한 결과 2.5% 함유를 함유하고 있었다(Fig 4~5.). 특히, 시

제간 부산물(GMP 가수분해물)은 분리 및 생산효율을 평가 후 향후 고부가가치 부형제 등의 소재로 적용성을 적극 검토할 예정이다.

2) 2단계 : NANA대량생산시스템 공정도(10%, 생산수율 90%)

(드럼여과법 적용, Pilot Schele : 10톤, GMP사용량 : 380Kg 기준)

본 연구에서는 개발Neuraminidase적용 NANA대량생산조건 설정을 위한 Pilot Scale(40L)시제결과를 대형Pilot Scale-Up한 시작품(10톤규모)시제를 통한 대량생산형 Pilot공정도 확정 및 경제성 또한 사전예측평가 하고 저 하였다.

가) 연구수행방법

2단계의 기본 공정은 1단계에 준하여 단지 Scale-Up하여 실시하였다. 즉, 공정 1은 반응액 조성공정으로서 반응조 10톤에 기질인 GMP 400Kg과 정제수 8톤을 충전하고 기질 대비 개발Neuraminidase효소를 1%(4Kg)을 혼합하는 반응액을 조성하고, 2공정으로 pH 5.0, 반응온도 및 시간 등 전체적인 공정은 동일하게 부여하였다. 그러나, 1차 진공감압농축공정에서 1단계에서는 1/8배농축을, 2단계에서는 1/5농축으로 그리고 에탄올 첨가공정에서는 1단계에서는 농축반응액 대비 3배를 첨가하였으나, 2단계에서는 2배를 첨가하는 방법을 달리하였다. 그리고, 효소반응 후 불용성 단백질과 NANA 농도를 농축하기 위한 에탄올 처리공정 후 생성침전물 등의 제거를 위하여 1단계에서 필터프레스 방식으로 사용하였던 불용분 제거 시스템을 2단계에서는 드럼필터 방식으로 변경하여 시간 단축효과와 더불어 원가 절감을 목표로 시제를 실시하였다(Fig 7, Table 4.).

나) 연구수행결과

(1) 기질 GMP를 380Kg으로 효소처리후 드럼여과방식을 채택하여 실시한 시제에서 NANA생산량은 92.9Kg이 생산되어 생산수율은 90%를 초과하였으나, 순도는 10%로 낮게 나타났다(Fig 7, Table 4.).

(2) 대량생산 결과에서 제품순도가 낮은 원인 분석 결과. 시제생산시 분해완료액을 8배 부피로 농축 후, 실험실로 운반하여 에탄올을 3배 부피로 투입하여 침전공정 수행한 결과에서는 순도 25% NANA생산이 가능하였으나, 대량생산시스템에서는 분해완료액을 5.1배 농축시 농축액의 점성증가로 인해 농축 불가함에 따라 에탄올을 2배 부피 투입하여 침전 공정을 수행함으로 인하여 순도가 낮게 나타만을 알 수 있었다,

, NANA순도가 10%로 낮은이유로서, 당초 예상 에탄올양은 투입 되었지만 농축을

많이 진행하지 못해 상대적으로 에탄올 농도가 낮아 불순물의 침전이 적게 일어나 제품의 순도가 낮은 것으로 사료되었다.

결론적으로, 1단계 소형 Pilot Scale(40L) 시제결과를 이어서 Scale-Up한 대형시제결과와 비교함으로써, NANA생산량 및 순도증가에 미치는 효과를 검토하여 본 결과 필터방식보다는 효소반응액의 감압농축공정과 에탄올 첨가량에 의하여 NANA비포함 가수분해단백질에 대한 제거효율이 결국 NANA순도와 생산수율 증가에 중요한 변수임을 확인할 수 있었다

3) 3단계 : 저순도 NANA(10%)의 고순도 정제기법 정립

3단계에서는 2단계에서 제조된 10%순도의 NANA를 사용하여 NANA의 순도를 증가(20% 이상)시키는 정제방법 확립과 더불어 NANA대량생산시스템 정립 목표인 고순도의 생산수율이 높은 NANA생산시스템을 완료하고 저 하였다(Table 5.)

가) 연구수행방법

순도증강 공정정립을 위하여, 2단계 제품(NANA순도 : 10%, 생산수율 90.01%)을 30%로 녹인 후 에탄올 3배 부피 투입하여 불순물 침전, 상온, 12시간 상등액 회수하여 농축 후 동결건조한 후 NANA순도를 조사하였다.

나) 연구수행 결과로서, 2단계에서의 10%순도 NANA가 3단계 공정을 거쳐 20%의 순도로 증가 되었다. 따라서, 순도가 낮은 경우는 에탄올 농도구배 공정을 통하여 순도를 높힐 수 있음이 확인되었으며, 반응조내에서 반응액이 최대농축과 더불어 에탄올 농도구배 방법으로 최대 생산수율 및 순도를 보유한 대량NANA제조시스템은 완료 되었다 (Table 5).

3. 연구수행결과(종합결론)

가. 현재 영유아식품(조제분유 및 이유식 등)내 감염되어 공중보건학적인 피해를 일으키고 있으나 뚜렷한 대책이 없는, 고질적인 병원성 세균(*Bacillus cereus*, *Enterobacter sakazakii*)에 대하여, 항균능력(경제성 확보)을 보유한 유단백질(GMP)을 원료로 기원성 천연 항균제로서 NANA를 개발하였다.

나. 기질인 유단백질에서 NANA를 효소적 처리법으로 분리하기 위한 효소인 Neuraminidase는 식품첨가물로 등재되어 있는 식품미생물중 *Arthrobacter ureafaciens*를 선발하고, 대량생산시스템조건에서 효소생산 및 이를 적용한 NANA 대량생산시스템 정립을 일련의 시스템으로 완료하였다. 최종적으로 효소와 NANA의 대량생산시스템 정립을 위하여, 효소생산(3톤 반응조) 및 이를 이용한 NANA

생산(10톤, 기질GMP 대비 효소첨가량 1% 기준)을 위한 효소생산 및 NANA생산성을 검정하였다. 결과는 다음과 같다.

- 1) 반응조내 최종 효소생산성은 0.16unit/ml였는데, 이때 총 432,000unit의 Neuraminidase가 생산되었다($p < 0.05$).
- 2) 기질인 GMP 1g을 효소분해시켜 NANA를 생산하기 위한 Neuraminidase효소역가치는 0.5unit/g(GMP)였다($p < 0.05$).
- 3) Neuraminidase 432,000unit를 적용시, GMP(NANA 4% 함유)는 864Kg을 분해시킬 수 있었으며, 이때 NANA생산량(100%순도 기준)은 25.9Kg였다.
- 4) 100%순도 NANA를 생산시, Neuraminidase비용은 386,100원/Kg, 25%의 경유는 96,525원/Kg이 소요되었다.
- 5) 개발 Neuraminidase효소를 적용한 유단백질 GMP(NANA 4%)로부터 생산된 NANA(순도 25% 기준)의 생산량은 GMP 1Kg당 99g(동결건조)였고, 이때 생산수율은 63%였다. 이는 기질로서 GMP내 NANA함유량이 4%임을 감안하면 효소에 의해 분해되는 NANA의 이론치 생산수율은 75%임에 비교하여 실제 생산수율은 63%였다. 이는 분해반응공정(침전물 제거시) 약 8%, 에탄올 침전물 제거 공정시 액 33%가 손실됨으로 인한 것이었다. 이를 감안하고도 25% 기준으로 1Kg NANA의 생산가는 674,471원(생산비용 125,000원/Kg 포함)이었다.
- 6) 대량생산을 위한 공정소요시간으로서 Neuraminidase 생산소요시간은 18시간, NANA는 112시간(동결건조 시간 제외)으로 총 130시간이 소요되었다.
- 7) NANA생산수율(63%)증가를 위한 방법을 검정한 결과, 분해반응공정단계에서는 침전물 회수 및 물세척 회수공정, 에탄올 침전물 제거공정에서 에탄올첨가량 최적화후 필터프레스 또는 원심분리공정을 거쳐 수율을 최대 73%까지 가능함을 알 수 있었다($p < 0.05$).
- 8) 결론적으로, 잉여 미이용 자원인 유청단백질에서 분리한 유단백질(GMP)로부터 NANA생산을 위한 효소(Neuraminidase)생산용 미생물(식품첨가 미생물) 확보, 이를 이용한 3~10톤 규모의 Neuraminidase 대량생산 및 생산된 Neuraminidase를 이용한 10톤 규모의 NANA대량 생산시스템을 일련되게 정립하였다((Table 6.~7.)).

공정	주요기기	공정내용
원유검사	Milcoscan Charm II	일반성분검사, 관능검사, 가수검사, 항생제검사등을 실시하여 합격유를 선별한다.
원유수유 / 저장	Milk Tank	원유검사 합격유만을 수유하여 Milk Tank에 저장한다.
표준화 및 살균, 냉각	Separator Standardisation Unit Bactofuger Homogeniser Pasteuriser	원유를 표준화시키고 살균한 다음 냉각시켜 저장한다.
우유 투입		생산공정에 따라 균주, 렌넷을 첨가하고 절단하여 커드와 웨이플을 만든다.
균주(Starter) 첨가		
용효소(Rennet) 첨가	Coagulator	
절단(Cutting)		
웨이분리	커드	웨이와 커드를 분리하여 커드는 제품을 만들기 위한 다음공정으로 보낸다.
Whey Balance Tank 저장		
농축 (Evaporator)	Whey Evaporator	
냉각 (Cooling)		농축웨이 당도 32%, 냉각온도 4°C
저장 (Storage)	Whey Tank	농축 냉각된 웨이플 Whey tank에 저장한다.

Fig. 1. 우유로부터 치즈를 제조 후 유청액 생산공정도(매일유업(주) 제공)

GMP(Glycomacropeptide) 제조Scheme

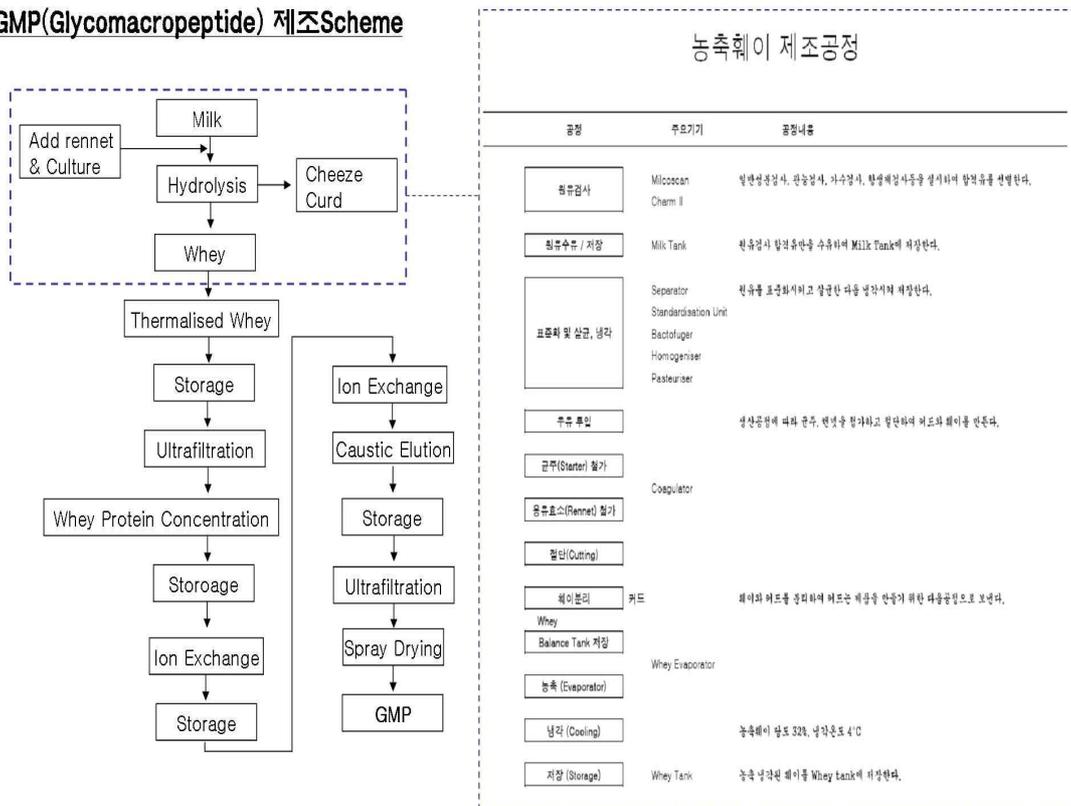


Fig. 2. 유청으로부터 GMP 생산공정도(매일유업(주) 제공)

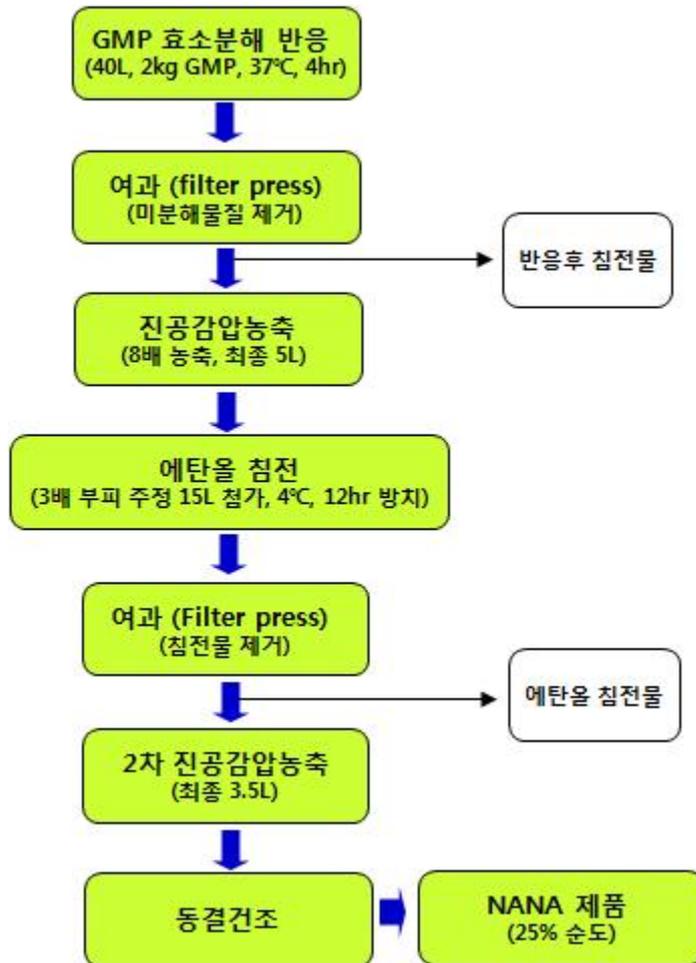


Fig. 3. NANA (25%, 생산수율 63%)대량생산시스템 공정도
(필터프레스법 적용, 40L반응조, GMP사용량 : 2Kg)

Table 1. NANA 대량생산시스템(1단계) 정립을 위한 공정내역 (Pilot Scale : 40L)

공정단계	공정단계별 진행내역	비고
1.반응액 제조	GMP 2.0kg+정제수 40L(기질농도 5%)	1. 액량(L) 2. 총건조무게(g) 3. NANA총량(g) 4. Purity(%) 5. Yield(%)
2.효소반응 후	효소(기질양의 1%),pH 5.0, 37℃, 4시간 반응	
3.반응후 침전물	반응침전물을 동결건조 후 NANA함량 확인	
4.1차 진공감압농축	반응액을 약 8배 농축	
5.에탄올침전상등액	농축액의 약 3배 부피 주정 투입	
6.에탄올침전물	에탄올 침전물을 동결건조후, NANA함량 확인	
7.2차 진공감압농축	약 20brix까지 농축	
8.동결건조	40℃, 48시간	

Table 2. NANA제조단계별 (1단계) 생산수율 평가 결과(Pilot Scale : 40L반응, GMP 2Kg)

공정단계	공정내역	NANA제조단계별 생산성 평가 결과					비고
		액량 (L)	총건조 무게 (g)	NANA 총량 (g)	Purity (%)	Yield (%)	
1. 반응액 제조	GMP2.0kg+정제수 40L	40	2,000	0	0	0	기질농도 5.0%
2. 효소반응 및 효소실활	효소(기질양의 1%), pH 5.0, 37℃, 4시간 반응 후 90℃, 30분 실활	40	2,000	79.0	3.95	100	
3. 반응후 침전물 (반응액 여과)	반응침전물을 동결건조후 NANA 함량 확인		610	6.3	1.03	7.98 (Loss)	불용성 (GMP가수분해단백질)
4. 1차 진공감압 농축	반응액을 8배 농축	5	1,350	72.5	5.37	91.8	
5. 에탄올 침전	농축액의 3배 부피 주정투입	20					
6. 에탄올침전물 여과/정밀여과	에탄올 침전물여과(필터프레스여과 및 0.45um여과) 및 동결건조후 NANA 함량 확인		1,020	25.5	2.5	32.28 (Loss)	수용성 (GMP가수분해단백질)
7. 2차 진공감압 농축	약 20brix까지 농축	1.35	204	49.5	24.26	62.66	
8. 동결건조	48시간 동결건조(40℃)		198	49.8	25.15	63.04	산업화기준 설정



개발NANA(순도 :25%)

GMP가수분해물

효소반응후 침전물(불용성, NANA함유:1.03%) 메탄올 침전물(수용성, NANA함유:2.5%)

Fig 4. 시제 Pilot NANA생산시스템 (40L) 적용 제조된 NANA(순도 25%) 및 기능성부산물 (GMP가수분해물)

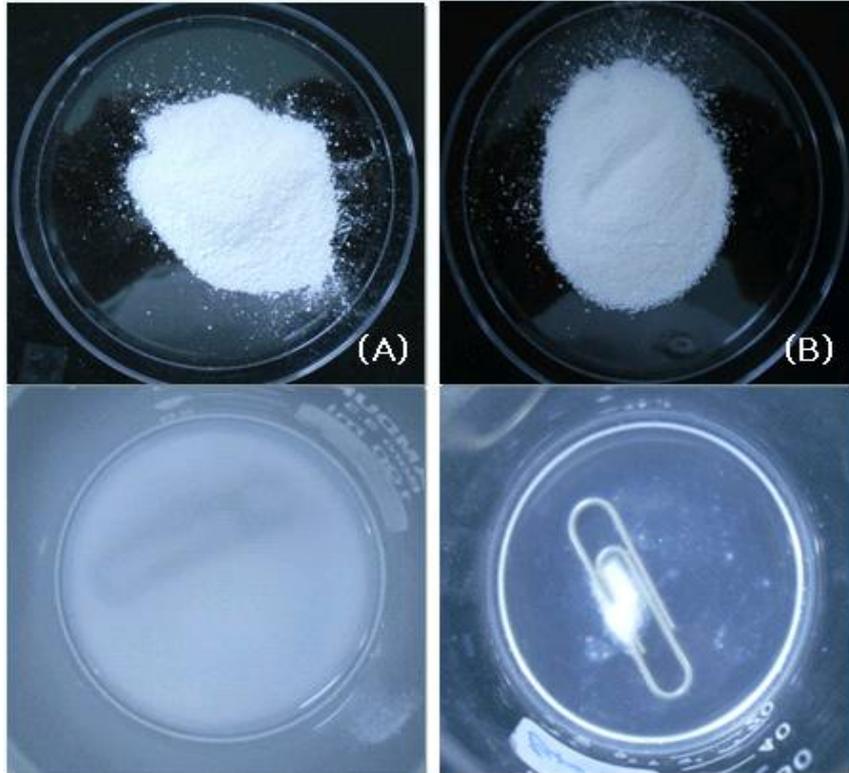


Fig 5. NANA시제시 GMP가수분해 부산물의 특성평가결과
 [A : 불용성(효소반응후 침전물, NANA 1.03% 함유), B : 수용성
 (에탄올 침전물, NANA 2.5% 함유), 용해조건 : 정제수내 GMP
 가수분해물 2% (w/w)용해]



Fig 6. 원료(GMP)의 NANA생산시스템 적용(40L) 순도별 NANA
(대조:합성NANA, G0420:순도6% NANA, G0426:순도 46.24%
NANA)

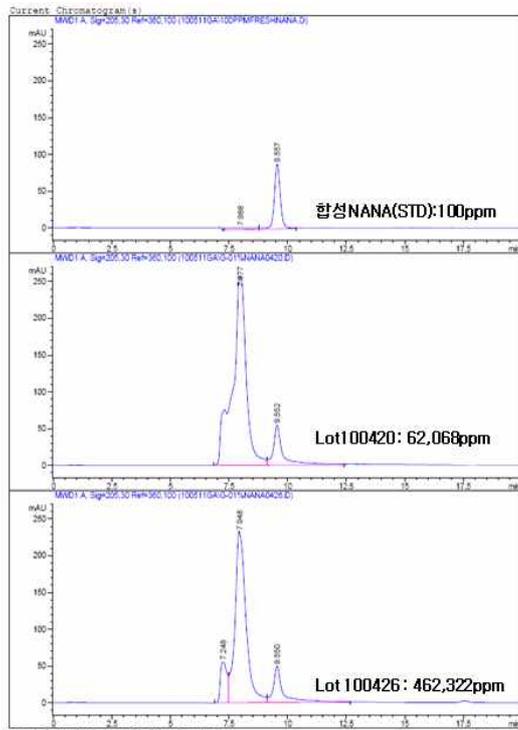
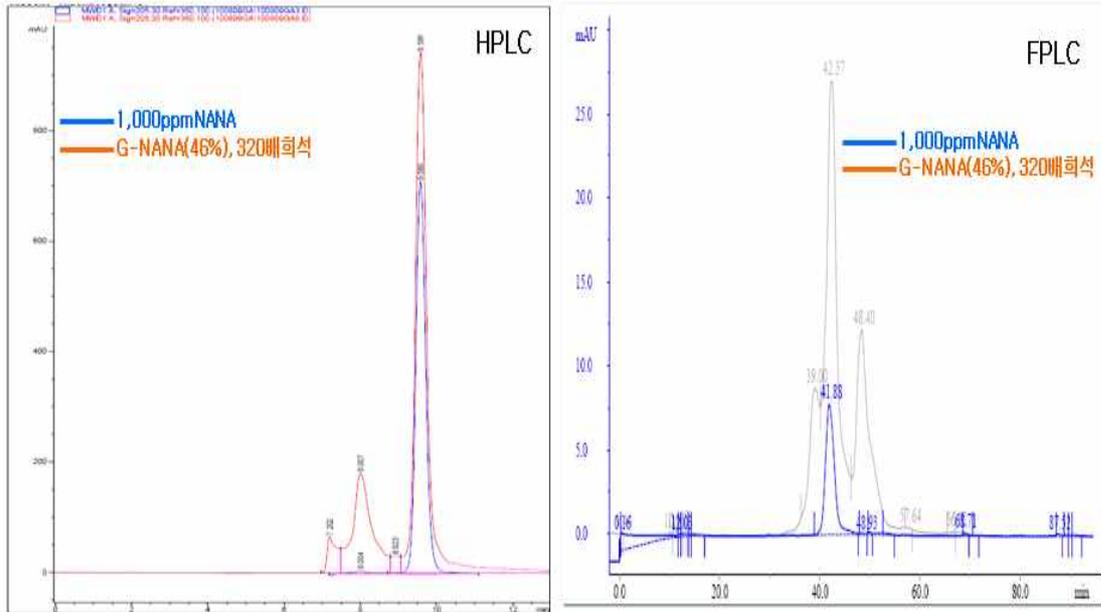


Fig 7. 원료(GMP)의 NANA생산시스템 적용(40L) 제조된 순도별 NANA의 HPLC분석결과 (대조 : 합성NANA, G0420:순도6% NANA, G0426:순도 46.24% NANA)



시료	RT(min.)별 분포율(%)					비고
	7.20	8.009	8.918	9.582	합계	
1,000ppmNANA (STD, 0day)	-	-	-	100	100	
G-NANA	3.845	21.74	1.58	72.83 (46.24%)	100	0.312 %
비고				NANA		

시료	RT(min.)별 분포율(Height, %)				비고
	39.00	42.37	48.40	합계	
1,000ppmNANA (STD, 0day)	-	100 (7,769)	-	100	1,000ppm
G-NANA	16.9 (7,123)	58.9 (24,85)	24.3 (10,23)	100	0.312%
비고	HMW	NANA	LMW		

Fig 6. 원료(GMP)의 NANA생산시스템 적용(40L) 제조된 순도별 NANA의 HPLC(순도조사) 및 FPLC(NANA 및 GMP가수분해물별 분자량 분포)분석결과.
 대조 : 합성NANA, G-NANA : Lot No. G0426(순도 46.24% NANA)

Table 3. NANA(25%, 생산수율 63%)대량생산시스템 공정내역
(필터프레스법 적용, 40L반응조, GMP사용량 : 2Kg)

공정	방법	액량 (L)	총건조 무게(g)	NANA 총량(g)	Purity (%)	Yield (%)
반응액 제조	GMP2.0kg + 정제수 40L (기질농도 5.0%)	40	2,000	0	0	0
효소반응 후	효소(기질양의 1%), pH 5.0, 37℃, 4시간 반응	40	2,000	79.0	3.95	100
반응후 침전물 (미분해 물질)	반응후 침전물을 동결 건조 후 NANA 함량 확인		610	6.3	1.03	7.98 (Loss)
진공감압 농축액	반응액을 약 8배 농축	5	1,350	72.5	5.37	91.8
에탄올 침전 상등액	농축액의 약 3배 부피 주정 투입	20				
에탄올 침전물	에탄올 침전물을 동결 건조 후 NANA 함량 확인		1,020	25.5	2.5	32.28 (Loss)
2차 진공감압 농축액	약 20brix까지 농축	1.35	204	49.5	24.26	62.66
동결건조 제품	40℃ 48시간 동결건조	198(g)		49.8	25.15	63.04



Fig. 7. NANA (순도 10%, 생산수율 90.1%) 대량생산시스템 공정도
(10톤규모, GMP사용량 : 380Kg)

Table 4. NANA(순도 10%, 생산수율 90.1%)대량생산시스템 공정도
(10톤규모, GMP사용량 : 380Kg)

공정	방법	액량 (L)	중건조 부계(kg)	NANA 총량(kg)	Purity (%)	Yield (%)
반응액 제조	GMP380kg + 정제수 7,600L(기질농도 약 5.0%)	7,600	380	0	0	0
효소반응 및 실관	효소(5톤 배양액 전부), pH 5.0, 37℃, 12시간 반응	7,600	380	14.44	3.80	100
반응후 침전물 (미분해 물질)	반응 후 침전물 샘플링하여 건조무게 확인	7,600	68.8 (9.05g/L)			Loss
드립여과 및 경밀여과	규조도 100kg 코팅 여과 후 펠티프레스를 이용한 경밀여과	7,500	311.2	14.40	4.63	99.73
전공감압 농축액	반응액을 약 5.1배 농축	1,500				
에탄올 첨가	농축액의 약 2배 부피 에탄올 을 투입	3,000				
에탄올 침전물	에탄올 침전물을 샘플링하여 건조무게 확인	4,500	187.65 (41.7g/L)			Loss
에탄올 상등액 회수	드립여과를 통한 상등액 회수 (규조도 260kg 코팅)					
2차 전공감압 농축액	약 27brix까지 농축	350				
동결건조 (제품)	40℃ 72시간 동결건조		92.9	13.01	10.0	90.10

Table 5. 3단계 : 저순도 NANA(10%)의 고순도 정제기법 정립

공정	방법	액량 (L)	총건조 무게 (kg)	NANA 총량(kg)	Purity (%)	Yield (%)
동결건조 제품			80.0	11.2	14.0	100
분말제품 용해	분말 80kg + 정제수 260L					
에탄올 첨가	에탄올 1,040L 첨가					
상등액 회수	필터프레스를 통한 상등액 회수					
상등액 농축	약 27brix 까지 농축	100				
최종 동결건조 (제품)	40℃, 72시간 건조		25.0	6.3	20	56.3

Table 6. 최종정립된 NANA대량생산 공정도[10톤반응조건, 사용 GMP : 400kg]

공 정	시제처리조건	사용장비	비 고
반응액	GMP400kg+정제수 8,000L (기질농도 5.0%)	10톤 반응기	Working Vol. 8톤
효소반응 및 실활	효소 (기질량의 1%, 4kg), pH5.0, 37℃, 4시간 반응, 90℃ 30분 실활	효소반응기, 보일 러	
반응액 여과	필터프레스 여과	필터프레스	
진공감압 농축	여과 액량의 약 8배 부피로 농 축	진공감압농축기	
에탄올 침전	농축 액량의 약 3배 주정 투입	5톤 반응기	
에탄올 침전물 여과 /정밀여과	필터프레스 여과 및 0.45um 여 과	필터프레스, 정밀여과 장치	
진공감압 농축	약 20brix까지 농축	진공감압농축기	
동결건조	40℃ 48시간 동결건조	동결건조기	

Table 7. 최종정립된 NANA대량생산시스템(규모:10톤) 및 소요경비 내역(경제성 평가)

공 정		소요재료 (소모품)	비 용	작업 시간	Kg당 비용
원료 비용	원료(GMP)	400kg	26,000,000원		65,000원/Kg
	효소비용	560g	386,100원		기질(GMP))x0.14%
생산 비용	효소분해 및 실활	에너지비용, 전력비, 염산, 정제수 등	200,000원	8시간	
	고액분리(필터프레스)	필터패드비용, 폐수비용, 전력비 등	300,000원	4시간	
	여과액 진공감압농축	에너지비용, 폐수비용, 전력비 등	400,000원	8시간	
	에탄올 침전	발효주정3,000L(80% 회수가정, 600L), 전력비 등	1,100,000원	12시간	
	고액분리(필터프레스) 및 정밀여과	필터패드비용, membrane 비용, 전력비 등	300,000원	4시간	
	여과액 진공감압농축	에너지비용, 전력비 등	200,000원	4시간	
	동결건조	동결건조 임가공 비용	2,000,000원	3일	
	감가상각비		400,000원		
	인건비	1인 5일(200,000원/일)	1,000,000원		
	기타비용		100,000원		
제조원가 (25% NANA1Kg생산 기준)			32,386,000원		674,471원 (생산비용:125,000원 포함)
연구관리비 및 예비실험비			3,000,000원		
총소요경비 합계 (25% NANA 1Kg생산기준)			35,386,000원	112시간	737,208원 (생산비용:187,000원 포함)

제 3 절 NANA소재의 항균 메카니즘 구명

1. NANA 동물안전성 사전평가(*in vitro*: 표준 세포주 활용)

가. 연구목적

천연NANA개발 후 동물안전성 평가전, 사전에 표준균수를 사용하여 세포주에 대해 세포 독성이 있는 지를 관찰함으로써 사전 독성평가 기초자료를 확보하고자 하였다.

나. 연구재료 및 방법

표준 세포주는 HEK 293 cell (human embryonic kidney cell) 및 RAW 264.7 cell (macrophage cell)을 사용하였다. 세포배양은 HEK 293 cell의 경우 DMEM에 10% fetal bovine serum (이하, FBS라 함), 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ penicillin, 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ streptomycin을 혼합한 배지를 사용하여 37 $^{\circ}\text{C}$, 5% CO₂ incubator에서 배양하였다. 각각의 cell는 culture dish (1x10⁵ /ml)에서 세포 배양조건에 의해 배양하였다. 실험군 설정 (*in vitro*)은 실험군-1(정상군), 실험군-2(NANA, 0.1%/ml), 실험군-3(NANA, 0.05%/ml), 실험군-4(NANA, 0.1%/ml) 및 실험군-5(NANA, 0.5%/ml) 처리한 군으로 나누워 수행하였다.

세포활성도 측정은 MTT assay를 사용하였다. 분석 방법은 배양중인 cell 950 μl 에 MTT solution을 50 μl 씩 섞어서 세포에 처리해 준 후 37 $^{\circ}\text{C}$, 5% CO₂ incubator에서 3~4 시간 incubation 하고, media를 모두 제거 후 DMSO(350 μl)를 각각의 sample에 넣어 반응시킨 후, microplate reader(Molecular Devices, Sunnyvale CA, U. S. A)를 이용하여 540nm에서 흡광도 값을 측정하였다. Blank는 PBS 용액으로 조성하였으며, 측정시간은 6, 12 및 24시간 경과 시 각각 측정하였다.

다. 연구결과

NANA 독성유발 농도를 구하는 목적으로 농도별로 세포독성을 관찰하였다. HEK293 cell과 RAW 264.7 cell 모두 NANA가 0.1% 농도까지는 관찰 시간대에 세포 독성이 관찰 되지 않았으며, 세포 모두 0.25% 농도 이상에서는 24 시간째에 약 20% 정도 세포활성도가 감소되었다(Figure. 1)

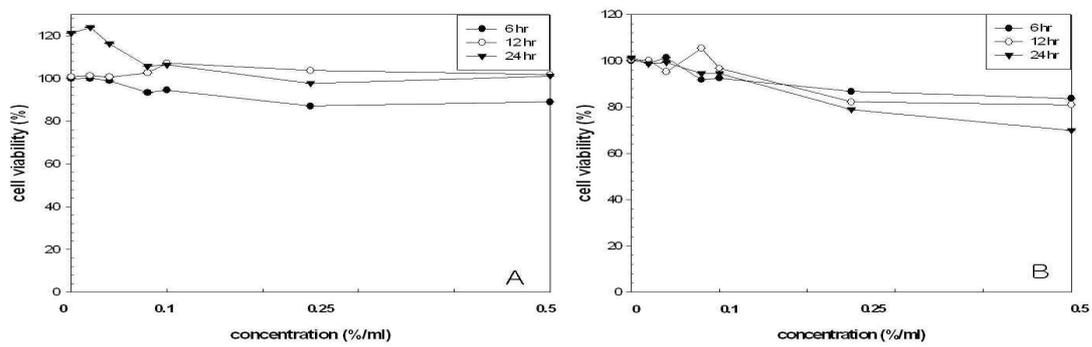


Figure 1. 표준 세포주(A : HEK 293 cell, B:, RAW 264.7 cell)에 대하여 농도별 NANA가 독성에 미치는 효과 평가 결과

2. NANA의 안정성(상온보관 및 장단기 경과) 사전평가

가. 연구목적

1% NANA 용액제조(1차 증류수) 후, 상온보관 조건하에서 단기 및 장기 보관 시 분자량 변화 조사를 통하여 연구종료 시 제품 레시피 확정시 보관성(안정성) 사전평가 자료로 사용하고자 한다.

나. 연구재료 및 방법

시료는 1% NANA(1차 증류수 용해)를 사용하였으며, 실험구 조성은 실험구-1(시료조성 즉시 분석, 대조), 실험구-2(시료조성 후 상온보관조건에서 2일 경과) 및 실험구-3(시료조성 후 상온보관조건에서 15일 경과)으로 설정하였다. 분석 방법은 FPLC를 이용하여 실시하였다.

다. 연구결과

시료 1% NANA의 각 조건별 분자량 변화는 시간 경과 시 분자량의 변화가 발생하였다. 시간은 37.40min에서 34.57min(고분자로 이동)으로 이동하였다(Figure 2.). 또한, 정상 변화는 15일 경과 시 관찰되지 않았으나 장기(6개월 및 1년) 경과시 변화 또한 관찰 예정이다.

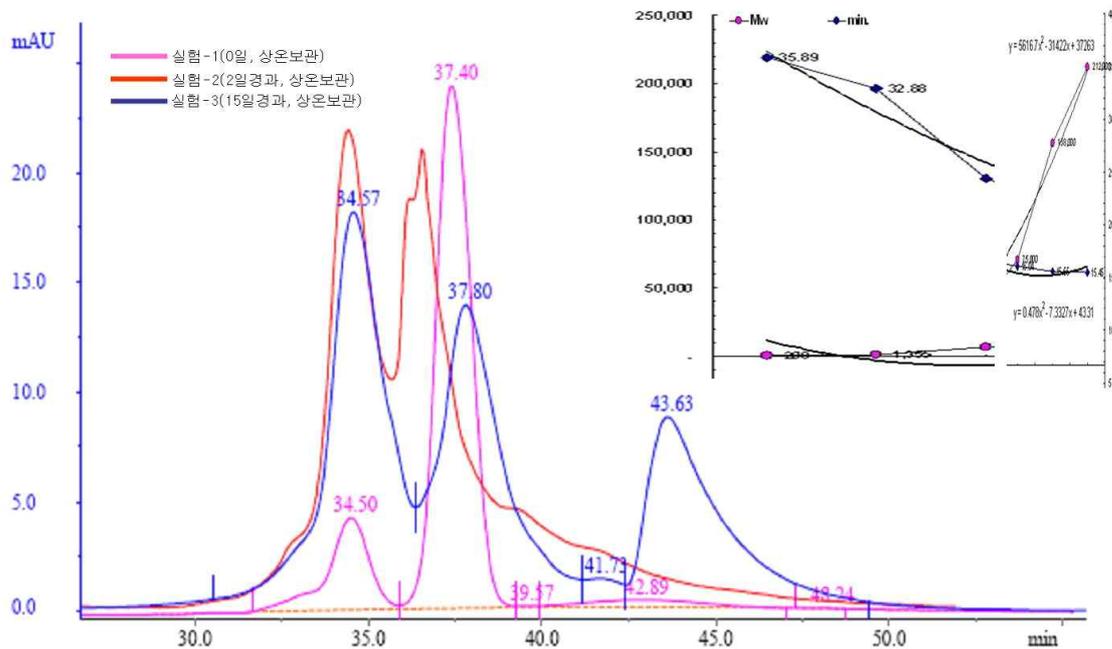


Figure 2. FPLC를 이용한 1% NANA에 대한 각 조건별분자량의 변화 조사
 실험구-1(시료조성 즉시 분석, 대조), 실험구-2(시료조성 후 상온보관조건에서 2일 경과) 및 실험구-3(시료조성 후 상온보관조건에서 15일 경과)

3. NANA유래 내성형성 및 항생제 내성 보유균에 대한 항균효과 평가

가. 연구목적

개발NANA제제의 영유아식품내 감염 예상 유해균(목적 유해세균외 효모균 포함)에 대한 항균소재로 활용함에 있어 예상될 수 있는 내성유발여부를 사전확인함으로써 공중보건학적 안전성 확보를 필요로 한다. 설정완료 된 MIC농도를 기준으로, 선발 균에 대하여 사전 항균스펙트럼 검정을 실시하며, 생존균에 대하여 10세대까지 반복처리과정을 수행함으로써, NANA유래 내성형성이 발생하는지를 확인하고자 한다.

나. 연구재료

공시균은 그람 양성균(1종, *B.cereus*), 그람 음성균(2종, *E.sakazakii*, *E.coli* O157:H7) 및 효모균(1종, *S.cereviase* JKK091002)을 사용하였다. 항생제는 항생제 내재 Paper disk 37종[1: Ceftazidime/Clavulanic Acid 30/10 μ g, 2: Ampicillin(10 μ g), 3: Cefepime 30 μ g, 4:Clindamycin 2 μ g, 5:Kanamycin 30 μ g, 6: Linezolid 30 μ g, 7:Colistin 10 μ g, 8: Streptomycin 10 μ g, 9:Vancomycin 30 μ g, 10:Oxacillin 1 μ g, 11:Cefoxitin 30 μ g, 12:Gentamycin 10 μ g, 13:Erythromycin 15 μ g, 14:Rifampin 5 μ g, 15:Amoxicillin/Clavulanic Acid 30 μ g, 16:Ceftazidime 30 μ g, 17:Sulfamethoxazole/Trimethoprim 23.75/1.25 μ g, 18:Cephalothin 30 μ g, 19:Penicillin 10IU, 20:Lincomycin 2 μ g, 21:Cefotaxime 30 μ g, 22:Amikacin 30 μ g, 23:Quinupristin / Dalfopristin 15 μ g, 24:Aztreonam 30 μ g, 25:Bacitracin 10IU, 26:Neomycin 30 μ g, 27:Amoxicillin/Clavulanic Acid 30 μ g, 28:Chloramphenicol 30 μ g, 29:Cefotaxime/Clavulanic Acid 30/10 μ g, 30:Telithromycin 15 μ g, 31:Penicillin / Novobiocin 40 μ g, 32:Apramycin 15 μ g, 33:Ceftiofur 30 μ g, 34:Pirlimycin 2 μ g, 35:Novobiocin 30 μ g, 36:Enrofloxacin Batril 5 μ g, 37:Ceftriaxone 30 μ g,]을 사용하였다. 내성보유여부조사는 Paper Disk Method 적용하여 관찰하였다. 항생제 반응조건은 48 시간 25 $^{\circ}$ C 호기조건에서 배양하였다. 항생제 감수성 평가는 +(양성)/음성(-)으로 나누워 표시하였다.

다 연구결과

효모균에 대한 항생제 감수성 조사결과는 아래의 Table 1.과 Figure 3.에 제시하였다.

Table 1. 효모균에 대한 항생제 감수성 조사결과

항생제별 내성보유결과	항생제 내재 Paper Disk별 효모균에 대한 감수성 보유 확인 결과									
Paper Disk No.	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
감수성검정결과	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Paper Disk No.	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20
감수성검정결과	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+
Paper Disk No.	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30
감수성검정결과	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Paper Disk No.	31	32	33	34	35	36	37			
감수성검정결과	-	-	+	+	+	+	+			

1 : Ceftazidime / Clavulanic Acid 30/10 μ g, 2: Ampicillin(10 μ g), 3: Cefepime 30 μ g,
 4:Clindamycin 2 μ g, 5:Kanamycin 30 μ g, 6: Linezolid 30 μ g, 7:Colistin 10 μ g, 8: Streptomycin 10 μ g,
 9:Vancomycin 30 μ g, 10:Oxacillin 1 μ g, 11:Cefoxitin 30 μ g, 12:Gentamycin 10 μ g, 13:Erythromycin 15 μ g,
 14:Rifampin 5 μ g, 15:Amoxicillin/Clavulanic Acid 30 μ g, 16:Ceftazidime 30 μ g,
 17:Sulfamethoxazole/Trimethoprim 23.75/1.25 μ g, 18:Cephalothin 30 μ g, 19:Penicillin 10IU,
 20:Lincomycin 2 μ g, 21:Cefotaxime 30 μ g, 22:Amikacin 30 μ g, 23:Quinupristin / Dalfopristin 15 μ g,
 24:Aztreonam 30 μ g, 25:Bacitracin 10IU, 26:Neomycin 30 μ g, 27:Amoxicillin/Clavulanic Acid 30 μ g,
 28:Chloramphenicol 30 μ g, 29:Cefotaxime/Clavulanic Acid 30/10 μ g, 30:Telithromycin 15 μ g,
 31:Penicillin / Novobiocin 40 μ g, 32:Apramycin 15 μ g, 33:Ceftiofur 30 μ g, 34 Pirlimycin 2 μ g,
 35:Novobiocin 30 μ g, 36:Enrofloxacin Batril \square 5 μ g, 37:Ceftriaxone 30 μ g, + : 양성, - : 음성

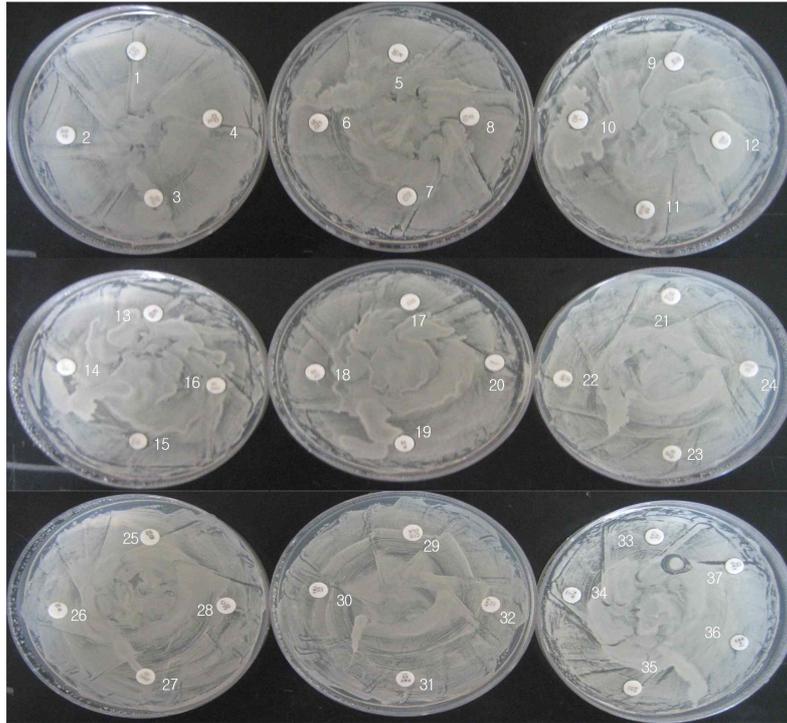


Figure 3. 효모균에 대한 항생제 감수성 조사결과

1 : Ceftazidime / Clavulanic Acid 30/10 μ g, 2: Ampicillin(10 μ g), 3: Cefepime 30 μ g, 4:Clindamycin 2 μ g, 5:Kanamycin 30 μ g, 6: Linezolid 30 μ g, 7:Colistin 10 μ g, 8: Streptomycin 10 μ g, 9:Vancomycin 30 μ g, 10:Oxacillin 1 μ g, 11:Cefoxitin 30 μ g, 12:Gentamycin 10 μ g, 13:Erythromycin 15 μ g, 14:Rifampin 5 μ g, 15:Amoxicillin/Clavulanic Acid 30 μ g, 16:Ceftazidime 30 μ g, 17:Sulfamethoxazole/Trimethoprim 23.75/1.25 μ g, 18:Cephalothin 30 μ g, 19:Penicillin 10IU, 20:Lincomycin 2 μ g, 21:Cefotaxime 30 μ g, 22:Amikacin 30 μ g, 23:Quinupristin / Dalfopristin 15 μ g, 24:Aztreonam 30 μ g, 25:Bacitracin 10IU, 26:Neomycin 30 μ g, 27:Amoxicillin/Clavulanic Acid 30 μ g, 28:Chloramphenicol 30 μ g, 29:Cefotaxime/Clavulanic Acid 30/10 μ g, 30:Telithromycin 15 μ g, 31:Penicillin / Novobiocin 40 μ g, 32:Apramycin 15 μ g, 33:Ceftiofur 30 μ g, 34:Pirlimycin 2 μ g, 35:Novobiocin 30 μ g, 36:Enrofloxacin Batril \square 5 μ g, 37:Ceftriaxone 30 μ g, + : 양성, - : 음성

4. 개발NANA의 현장적용성 평가[장기보관에 따른 항균성저하에 미치는 효과 변화]

가. 연구목적

액상제품 및 분말형 제품으로 구분, 장기간 보관시 물성변화와 더불어 항균성 저감효과 파악 결과를 토대로 NANA제형 레시피 TYPE설정하였다. 이에 1년차(완료)에는 0일, 5일 및 37일 경과시 물성(물리/이화학적 및 항균성 저하효과 연계조사)변화를 확인하였고 2년차(완료)에는 1년차 연계 10개월 경과시, 항균성 저하효과)변화를 확인하였다.

이에, 동일(1%,w/w)농도 NANA용액을 단기(1년차 완료) 및 장기(1년) 저온 및 상온 조건으로 구분 보관 시, 물리(색상변화, 침전등), 이화학적(물성, 분자량 등)와 관련 생물학적(항균성 저하)영향을 연계 평가를 수행하고자 한다.

나. 연구 재료 및 방법

최초 NANA의 열처리 및 보관조건별 조성 및 10개월후 항균성 조사하였다. 보관기간은 2009.09.08.에서 2010.07.01.까지이며 Table 2.에 따라 처리 후 보관하였다(Figure 4.). 장기보관(10개월)에 따른 항균성변화 조사를 위해 공시균은 3종 혼합(*E.sakazakii*, *B.cereus*, *Ecoli* 0157:H7) 사용하였으며 배양은 TSA배지에 37℃, 24시간동안 호기조건에서 배양하였다. 3종균 혼합(cfu/ml) 비율은 *E. coli* 0157:H7(6.7×10^7), *E. sakazakii* (5.9×10^6) 및 *B. cereus*(1.5×10^3)으로 수행하였다. NANA처리농도 및 항균성 검정시간은 0.5% 동일농도로 처리하였으며, 공시균 접촉전(0시간), 접촉후 1시간, 3시간 및 24시간 후 생존 콜로니를 조사하였다(Table 3).

다. 연구결과

장기보관조건별 항균성에 미치는 효과 조사하였다(Figure 5~6, Table 4.). 외적 환경(열처리, 장단기 보관)요인에 따른 물성변화가 항균성 저하에 미치는 영향은 없었다. 결과를 살펴보면, 열 처리시, 물성의 변화가 가장 심하였던 121℃ 고온처리구에서 항균성이 가장 높았으며, 항균성 효과는 그람 음성균이 그람 양성균에 비하여 높은 항균효과를 보였다. 하지만, 그람 음성균의 경우에서도 균종에 따라 항균효과는 차이를 보였다. 제품화 레시피 개발방향 설정을 위해 액상제품 첨가형(액체첨가시, 분산효과보유 과립분말형), 타정형(섭이식)으로 레시피 구분하여 개발하였다.

Table 2. NANA의 열처리 및 보관조건

구분	비열처리 NANA시험구 [1%(w/w), 보관(상온, 저온)]		열처리 NANA시험구 [1%(w/w), 75℃~121℃, 보관(상온, 저온)]					
시험구	Fresh NANA(RT)	Fresh NANA(CT)	Heated NANA(75-RT)	Heated NANA(75-CT)	Heated NANA(90-RT)	Heated NANA(90-CT)	Heated NANA(121-RT)	Heated NANA(121-CT)
조성 내용	상온보관 (25℃)	저온보관 (5℃)	75℃(30분), 1회 열처리후 상온보관(25℃)	75℃(30분), 1회 열처리후 저온보관(5℃)	90℃(30분), 1회열처리후 상온보관(25℃)	90℃(30분), 1회열처리후 저온보관(5℃)	121℃(15분, 멸균조건), 1회열처리후 상온(25℃)보관	121℃(15분, 멸균조건), 1회열처리후 저온보관(5℃)

Table 3. 1% (w/w) NANA의 온도별(75~121℃)처리후 보관조건(RT:상온, CT:냉장)시 장기(10개월) 보관에 따른 항균성 평가를 위한 실험디자인

실험구	실험조성	비고
control	생리식염수 950 μ L+3종균 혼합배양액 50 μ L	3종균혼합(cfu/ml): <i>E.coli</i> 0157:H7(2×10^4) + <i>E.sakazakii</i> (6.7×10^5) + <i>B.cereus</i> (6.7×10^5)
0.5%Fresh NANA(0day)	생리식염수 700 μ L+2% fresh NANA 250 μ L+3종균 혼합배양액 50 μ L	NANA 대조시험구
0.5%Fresh NANA(RT)	생리식염수 700 μ L+1% fresh NANA 500 μ L(상온보관)+3종균 혼합배양액 50 μ L	1% fresh NANA(상온보관:090908~100701)
0.5%Heated-NANA(75-RT)	생리식염수 700 μ L+1% Heated(75℃, 상온보관)NANA 250 μ L+3종균 혼합배양액 50 μ L	1%fresh NANA 제조후 열처리(75℃,30분, 1회)후 상온보관 관:090722~100701)
0.5%Heated-NANA(90-RT)	생리식염수 700 μ L+1% Heated(95℃, 상온보관) NANA 250 μ L+3종균 혼합배양액 50 μ L	1%fresh NANA 제조후 열처리(90℃,30분, 1회)후 상온보관 관:090722~100701)
0.5%Heated-NANA(121-RT)	생리식염수 700 μ L+1% Heated(121℃, 상온보관) NANA 250 μ L+3종균 혼합배양액 50 μ L	1%fresh NANA 제조후 열처리(121℃,15분,1회)후 상온보관 관:090721~100701)
0.5%Fresh NANA(CT)	생리식염수 700 μ L+1% fresh NANA 500 μ L(5℃냉온보관)+3종균 혼합배양액 50 μ L	1%fresh NANA(5℃ 냉장보관:090908~100701)
0.5%Heated-NANA(75-CT)	생리식염수 700 μ L+1% Heated(75℃, 5℃냉온보관)NANA 250 μ L+3종균 혼합배양액 50 μ L	1%fresh NANA 제조후 열처리(75℃,30분, 1회)후 NANA(5℃ 냉장보관(090722~100701)
0.5%Heated-NANA(90-CT)	생리식염수 700 μ L+1% Heated(95℃, 5℃냉온보관) NANA 250 μ L+3종균 혼합배양액 50 μ L	1%fresh NANA 제조후 열처리(90℃,30분, 1회)후 NANA(5℃ 냉장보관(090722~100701)
0.5%Heated-NANA(121-CT)	생리식염수 700 μ L+1% Heated(121℃, 5℃냉온보관) NANA 250 μ L+3종균 혼합배양액 50 μ L	1%fresh NANA 제조후 열처리(121℃,15분, 1회)후 NANA(5℃ 냉장보관(090721~100701)

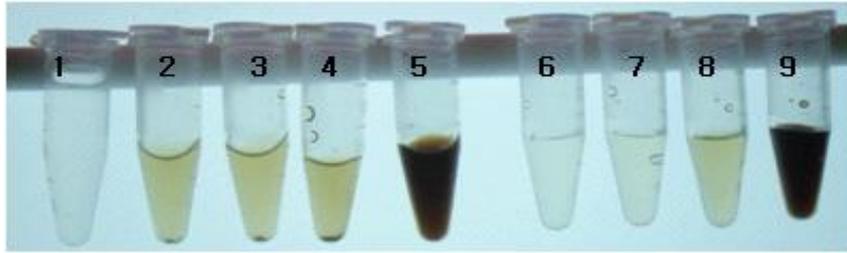


Figure 4. 동일농도(1%, w/w)로 조성된 NANA의 온도별 처리후, 장기(10개월)보관에 따른 항균성 효과분석용 시료별 성상

1: Fresh NANA(0day), 2: Fresh NANA(RT), 3: Heated NANA(75-RT), 4: Heated NANA(90-RT), 5: Heated NANA(121-RT), 6: Fresh NANA(CT), 7: Heated NANA(75-CT), 8: Heated NANA(90-CT), 9: Heated NANA(121-CT)

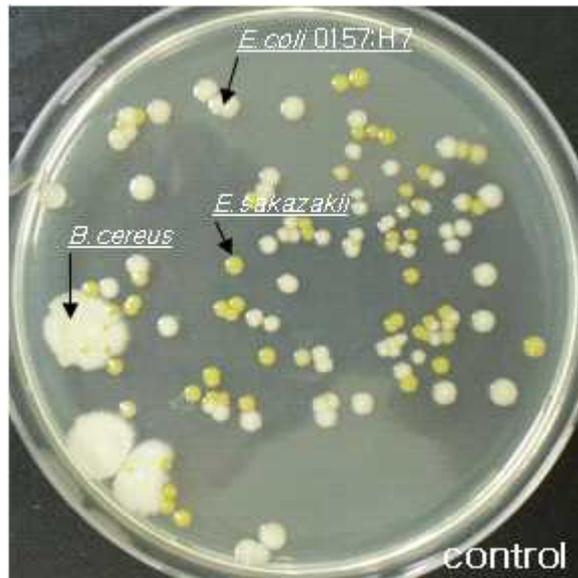


Figure 5. 공시균으로 적용된 3종 혼합(*E.sakazakii*, *B.cereus*, *Ecoli* 0157:H7)균의 형태(TSA배지, 37℃,24시간 호기배양)

3종균 혼합조성 (cfu/ml): *E.coli* 0157:H7(6.7×10^7) + *E.sakazakii* (5.9×10^6) + *B.cereus*(1.5×10^3)

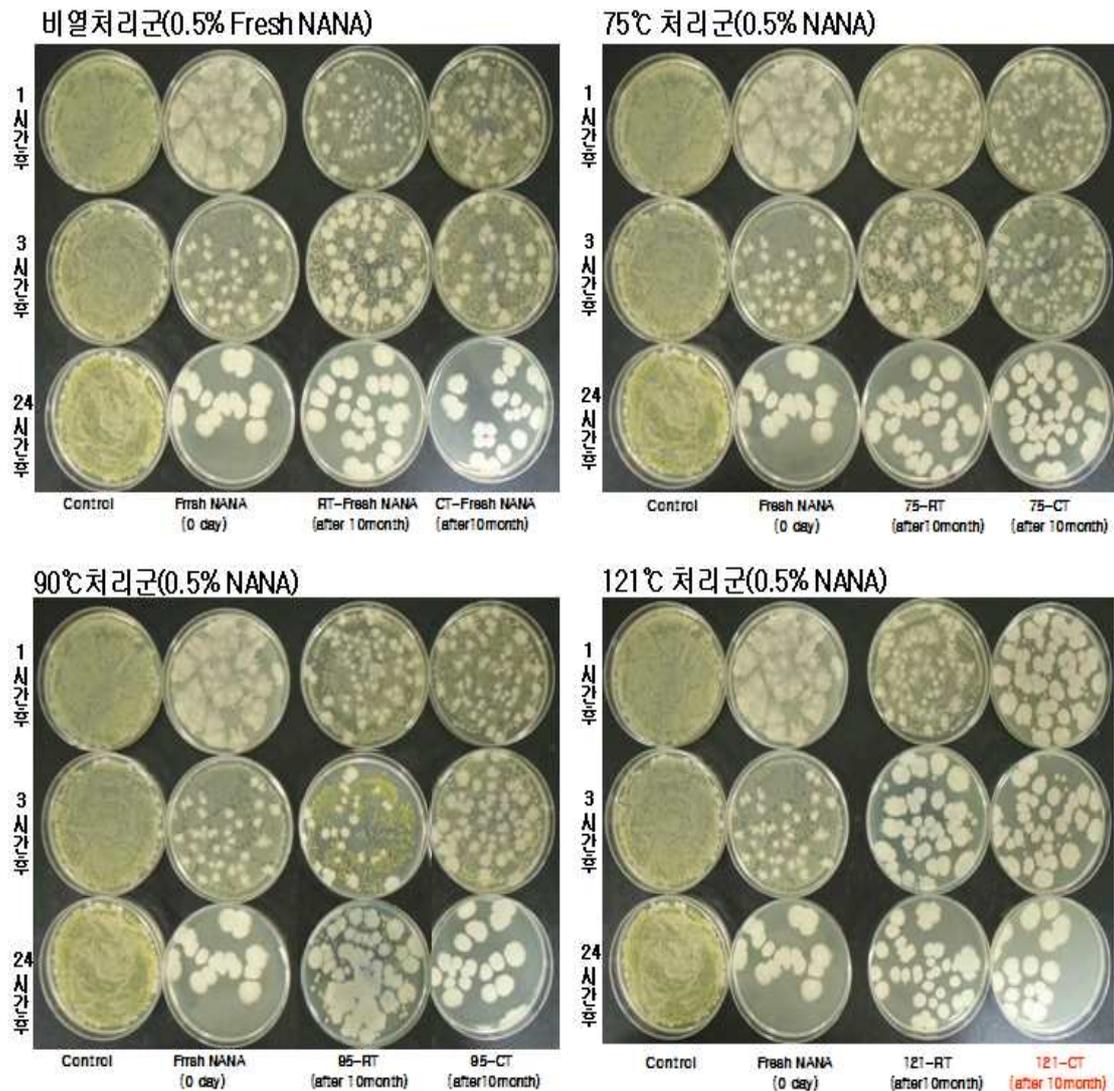


Figure 6. 0.5% (w/w) NANA의 온도별(75~121°C)처리후 보관조건(RT:상온, CT:냉장)시 장기(10개월)경과에 따른 항균성(안정성) 평가결과[3종균 혼합조성(cfu/ml): *E.coli* 0157:H7(6.7×10^7)+*E.sakazakii* (5.9×10^6)+ *B.cereus*(1.5×10^3), TSA배지, 37°C, 24시간 호기배양]

Table 4. 0.5% (w/w) NANA의 온도별(75~121℃)처리후 보관조건(RT:상온, CT:냉장)시 장기(10개월)경과에 따른 항균성(안정성) 평가결과

시험구	<i>E.coli</i> 0157:H7 (cfu/ml)				<i>E.sakazakii</i> (cfu/ml)				<i>B.cereus</i> (cfu/ml)			
	0시간	1시간	3시간	24시간	0시간	1시간	3시간	24시간	0시간	1시간	3시간	24시간
control	6.7x10 ⁷	-	-	7.3x10 ⁸	5.9x10 ⁵	-	-	2.7x10 ⁷	1.5x10 ³	-	-	4.0x10 ⁵
0.5%Fresh NANA (Oday)	6.7x10 ⁷	5,734,000	2,542,000	0	5.9x10 ⁵	0	0	0	1.5x10 ³	5,000	3,900	2,600
0.5%FreshNANA (RT)	6.7x10 ⁷	5,011,243	94,400	0	5.9x10 ⁵	0	0	0	1.5x10 ³	5,700	4,800	2,600
0.5%Heated NANA (75-RT)	6.7x10 ⁷	4,512,000	150,400	0	5.9x10 ⁵	0	0	0	1.5x10 ³	8,000	3,400	2,800
0.5%Heated NANA (90-RT)	6.7x10 ⁷	300,800	1,400	0	5.9x10 ⁵	0	0	0	1.5x10 ³	7,500	4,000	2,400
0.5%Heated NANA (121-RT)	6.7x10 ⁷	752,400	500	0	5.9x10 ⁵	0	0	0	1.5x10 ³	6,200	3,400	2,100
0.5%Fresh NANA (CT)	6.7x10 ⁷	4,313,700	82,400	0	5.9x10 ⁵	0	0	0	1.5x10 ³	5,700	1,700	2,200
0.5%Heated NANA (75-CT)	6.7x10 ⁷	2,320,000	170,000	0	5.9x10 ⁵	0	0	0	1.5x10 ³	5,060	5,700	4,400
0.5%HeatedNANA (90-CT)	6.7x10 ⁷	290,800	0	0	5.9x10 ⁵	0	0	0	1.5x10 ³	5,700	6,800	4,800
0.5%HeatedNANA (121-CT)	6.7x10 ⁷	5,800	200	0	5.9x10 ⁵	0	0	0	1.5x10 ³	6,000	4,200	1,800

3종균 혼합조성 (cfu/ml): *E.coli* 0157:H7(6.7x10⁷)+*E.sakazakii* (5.9x10⁶)+ *B.cereus*(1.5x10³), TSA배지, 37℃, 24시간 호기배양

5. 개발 NANA의 항균스펙트럼 평가

가. 연구목적

항균성 소재로서의 사용을 위한 다중 공시균에 대한 항균스펙트럼 변화조사를 목적으로 한다.

나. 연구수행방법

개발 NANA의 농도별 처리시 공시균에 대한 항균성 비교조사를 위해 공시균은 7종 (*E.coli*, *E.coli* O157, *E.sakazaki*, *B.subtilis*, *B.cereus*, *S.aureus*, 및 *S.typhimurium*)을 사용하였다. 처리농도는 8개 농도(Control(NANA 0mg/ml), 0.078mg/ml, 0.15mg/ml, 0.31mg/ml, 0.62mg/ml, 1.25mg/ml, 2.5mg/ml 및 5mg/ml)로 나누어 평가하였다.

개발NANA의 항균성 효과 증대를 위한 Surfactant의 항균성 검정 효과 평가는 공시균 7종(*E.coli*, *E.coli* O157, *E.sakazaki*, *B.subtilis*, *B.cereus*, *S.aureus* 및 *S.typhimurium*)을 사용하여 8가지의 처리농도(Control(Surfactant 700PS, 0mg/ml), 0.078mg/ml, 0.15mg/ml, 0.31mg/ml, 0.62mg/ml, 1.25mg/ml, 2.5mg/ml 및 5mg/ml)를 나누어 평가하였다.

검정조건은 각 박테리아 균주 (5×10^5 CFU/ml)에 NANA와 Surfactant를 각각 농도별로 처리한 후 37°C에서 24시간 경과시, 흡광도의 변화와 현미경을 이용한 생육정도를 관찰하여 최소생육저해농도(MIC)를 측정하였다.

3) 결과

NANA의 항균스펙트럼은 2.5~5mg/ml 범위에서 공통항균성 범위를 보였다(Table 5., Figure 7.). 결과를 보면, Surfactant의 경우, 0.31~2.5mg/ml범위에서 공통항균성 범위를 보였으나, NANA 및 Surfactant는 공통적으로 농도별 및 접촉시간에 따라 항균스펙트럼 범위는 다소 차이를 보일 것으로 예측되었다.

Table 5 . 공시균 대비 NANA 및 Surfactant(700PS)의 농도별 처리에 따른 생육저해효과(MIC)

Bacteria	MIC (mg/ml)	
	NANA	Surfactant
<i>E. coli</i>	5	2.5
<i>E. coli O157</i>	2.5	1.25
<i>E. sakazaki</i>	5	2.5
<i>B. subtilis</i>	5	1.25
<i>B. cereus</i>	2.5	0.31
<i>S. aureus</i>	2.5	1.25
<i>S. typhimurium</i>	5	1.25

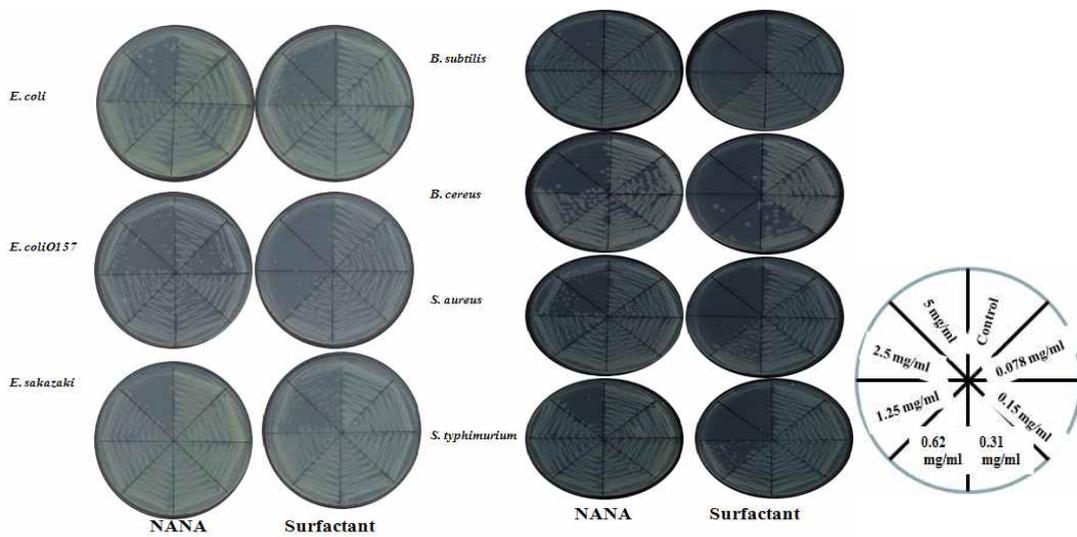


Fig 7. 7종 공시균 대비 NANA 및 Surfactant(700PS)의 농도별 처리에 따른 생육저해효과(MIC)

6. 공시균에 대한 항생제 내성보유 평가 및 내성형성균에 대한 개발 NANA의 항균효과 평가

가. 연구목적

개발NANA 제제의 영유아 식품내 감염 예상 유해균에 대한 항균소재로 활용함에 있어 예상될 수 있는 내성유발여부를 사전 확인함으로써 공중보건학적 안전성 확보 필요로 되어진다. 따라서, 설정 완료된 MIC농도(0.5%)를 기준으로, 선발균에 대하여 사전 항균 스펙트럼 검정을 실시하고자 한다.

나. 연구재료 및 방법

공시균은 그람 양성균(1종, *B.cereus*), 그람 음성균(2종, *E.sakazakii*, *E.coli* O157:H7) 및 효모균(1종, *S.cereviase* JKK091002, 1년차 완료)을 사용하였다. 공시균 조성 (cfu/ml)은 *E.coli* O157:H7(6.7×10^3), *E.sakazakii*(5.9×10^3), *B.cereus*(1.5×10^2)을 TSA배지에 도말 후 항생제 페이퍼 디스크 거치 시키고 37℃에서 24시간 호기배양을 실시하였다. 항생제 내재 Paper disk 37종[1: Ceftazidime/Clavulanic Acid 30/10 μ g, 2: Ampicillin(10 μ g), 3:Cefepime 30 μ g, 4:Clindamycin 2 μ g, 5:Kanamycin 30 μ g, 6: Linezolid 30 μ g, 7:Colistin 10 μ g, 8:Streptomycin 10 μ g, 9:Vancomycin 30 μ g, 10:Oxacillin 1 μ g, 11:Cefoxitin 30 μ g, 12:Gentamycin 10 μ g, 13:Erythromycin 15 μ g, 14:Rifampin 5 μ g, 15:Amoxicillin/Clavulanic Acid 30 μ g, 16:Ceftazidime 30 μ g, 17:Sulfamethoxazole/Trimethoprim 23.75/1.25 μ g, 18:Cephalothin 30 μ g, 19:Penicillin 10IU, 20:Lincomycin 2 μ g, 21:Cefotaxime 30 μ g, 22:Amikacin 30 μ g, 23:Quinupristin / Dalfopristin 15 μ g, 24:Aztreonam 30 μ g, 25:Bacitracin 10IU, 26:Neomycin 30 μ g, 27:Amoxicillin/Clavulanic Acid 30 μ g, 28:Chloramphenicol 30 μ g, 29:Cefotaxime/Clavulanic Acid 30/10 μ g, 30:Telithromycin 15 μ g, 31:Penicillin / Novobiocin 40 μ g, 32:Apramycin 15 μ g, 33:Ceftiofur 30 μ g, 34:Pirlimycin 2 μ g, 35:Novobiocin 30 μ g, 36:Enrofloxacin Batril \square 5 μ g, 37:Ceftriaxone 30 μ g,]을 사용하였다.

내성보유여부조사를 위해 Paper Disk Method 적용을 기본으로 수행하였으며, 항생제 반응조건은 TSA배지에서 24시간, 25℃, 호기조건으로 설정하였다. 항생제 감수성 평가는 성장저지환 측정(mm)결과를 토대로 내성보유 여부를 판단하였다.

항균성 검정을 위해 실험구조성은 Control (생리식염수 950 μ L+3종균 혼합배양액 50 μ L), NANA처리구 (생리식염수 700 μ L+2% fresh NANA 250 μ L+3종균 혼합배양액 50 μ L)으로 나누워 수행하였다. 실험조건은 NANA를 농도 0.5%(w/w)로 하여 공시균에 접촉 전(0시간) 및 접촉 후 1시간, 3시간 및 24시간 경과 시 생존콜로니수를 접촉 전과 비교 항균효과 평가하였다.

다. 연구결과

공시균 별 대비 항생제 종류별 내성보유 차이가 있었다(Figure 8, Table 6). 내성보유 공시균 대비 0.5%이상 NANA농도처리 시 항균성이 인정되었다(Table 7).

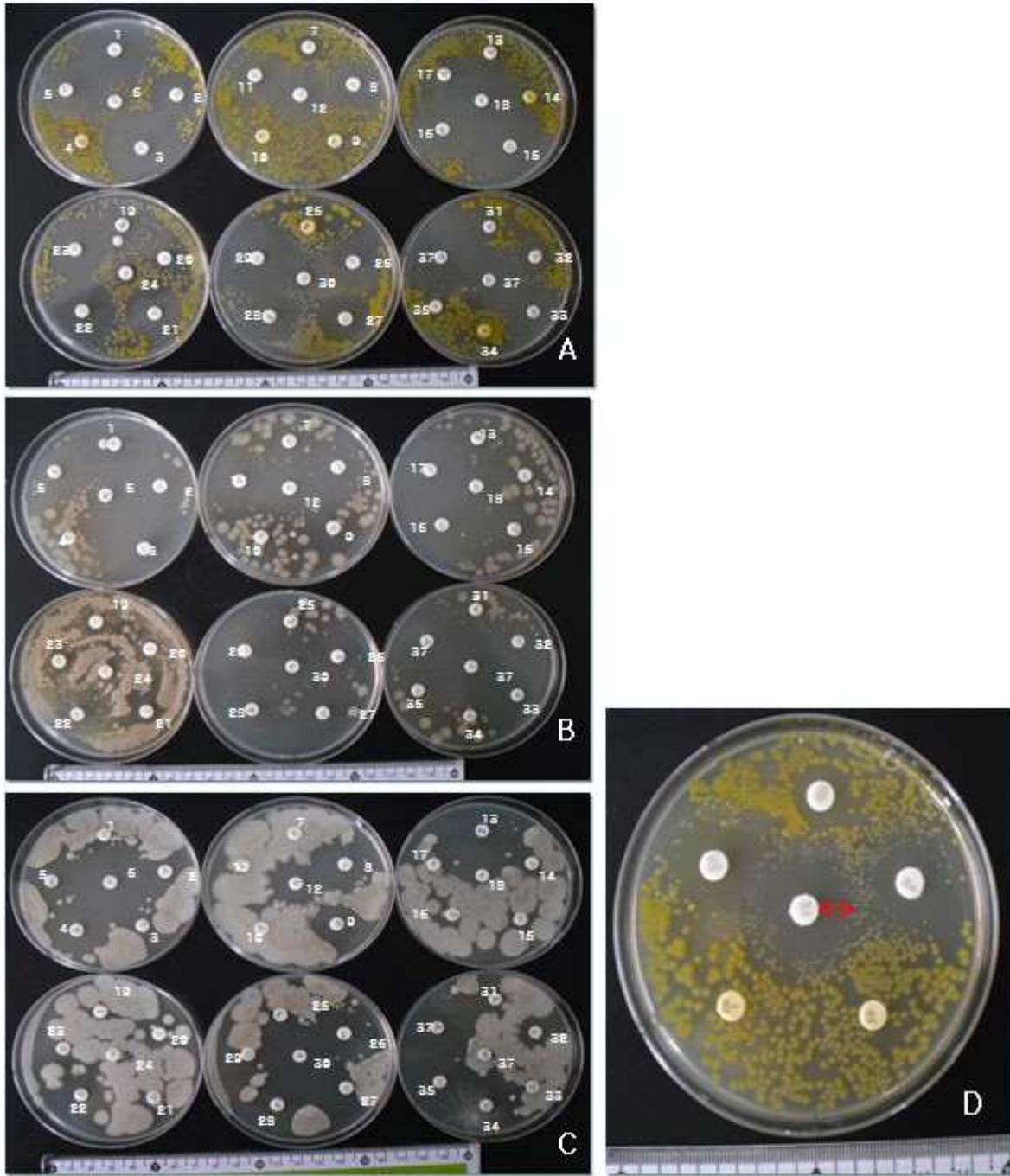


Figure 8. 공시균(3종)에 대한 항생제 (37종)의 감수성 조사결과
 A:*E.sakazakii*, B:*E.coli* O157:H7, C:*B.cereus*, D:생장저지환(mm)

Table 6. 공시균(3종)에 대한 항생제 (37종)의 감수성 조사결과

Paper Disk No.	항생제 명	공시균별 항생제 감수성 확인결과 (mm)		
		<i>E.coli</i> O157:H7	<i>B.cereus</i>	<i>E.sakazakii</i>
1	Ceftazidime/Clavulanic Acid 30/10 μ g	15.49	0.84	14.53
2	Ampicillin 20 μ g	9.13	4.2	8.94
3	Cefepime 30 μ g	16.68	3.53	16.04
4	Clindamycin 2 μ g	0	8.78	0
5	Kanamycine 30 μ g	8.68	7.01	7.43
6	Linezolid 30 μ g	0	14.64	0
7	Colistin 10 μ g	3.95	0	3.97
8	Streptomycin 10 μ g	5.10	6.71	4.59
9	Vancomycin 30 μ g	0	6.21	0
10	Oxacillin 1 μ g	0	0	0
11	Cefoxitin 30 μ g	9.07	1.92	5.17
12	Gentamycin 10 μ g	8.43	8.14	6.33
13	Erythromycin 10 μ g	2.23	10.46	2.11
14	Rifampin 5 μ g	0	5.47	3.26
15	Amoxicillin/Clavulanic Acid 30 μ g	8.88	3.43	10.79
16	Ceftazidime 30 μ g	14.3	0	12.83
17	Sulfamethoxazole/Trimethoprim 23.75/1.25 μ g	12.5	0	10.51
18	Cephalothin 30 μ g	7.86	3.37	3.31
19	Penicillin 10IU	0	3.7	0
20	Lincomycin 2 μ g	0.62	1.11	0
21	Cefotaxime 30 μ g	4.8	1.03	12.88
22	Amikacin 30 μ g	7.59	9.96	7.9
23	Quinupristin/Dalfopristin 15 μ g	0	7.43	0
24	Aztreonam 30 μ g	0	0	14.13
25	Bacitracin 10IU	0	1.42	0
26	Neomycin 30 μ g	6.59	6.94	5.86
27	Amoxicillin/Clavulanic Acid 30/10 μ g	10.72	5.40	9.08
28	Chloramphenicol 30 μ g	11.04	9.54	7.36
29	Cefotaxime/Clavulanic Acid 30/10 μ g	16.12	0	13.51
30	Telithromycin 15 μ g	4.52	13.96	3.05
31	Penicillin/Novobiocin 40 μ g	1.89	8.02	3.51
32	Apramycin 15 μ g	5.96	8.75	5.06
33	Ceftiofur 30 μ g	15.2	1.56	10.08
34	Pirlimycin 2 μ g	0	9.3	0
35	Novobiocin 30 μ g	2.46	9.72	3.1
36	Enrofloxacin 5 μ g	13.29	13.32	13.17
37	Ceftriaxone 30 μ g	15.4	0	11.6

Table 7. 항생제 내성보유 공시균에 대한 NANA(0.5%)의 항균효과 평가결과

시험구	<i>E.coli</i> 0157:H7 (cfu/ml)				<i>E.sakazakii</i> (cfu/ml)				<i>B.cereus</i> (cfu/ml)			
	0시간	1시간	3시간	24시간	0시간	1시간	3시간	24시간	0시간	1시간	3시간	24시간
Control	6.7x10 ⁷	NT	NT	7.3x10 ⁸	5.9x10 ⁵	NT	NT	2.7x10 ⁷	1.5x10 ³	NT	NT	4.0x10 ⁵
NANA처리구	6.7x10 ⁷	5.7x10 ⁷	2.5x10 ⁷	0	5.9x10 ⁵	0	0	0	1.5x10 ³	5x10 ³	3.9x10 ³	2.6x10 ³

7. 내성보유 및 미보유균에 대한 NANA의 내성유발 및 항균효과 평가

가. 연구목적

개발NANA제제의 영유아 식품내 감염대상 유해균에 대한 항균소재로 활용함에 있어 예상될 수 있는 내성유발여부를 사전 확인함으로써 공중보건학적 안전성 확보가 필요하다. 이에, 설정 MIC농도(0.25%)를 기준으로 처리 후 생존균에 대하여 10세대까지 반복 처리과정을 수행함으로써, NANA유래 내성형성이 발생하는지를 확인하였다.

나. 연구실험방법

NANA기원성 내성형성여부를 판별하기 위해서 Paper Disk Method(37종 항생제) 적용하여 공시균 별 내성보유 유무를 우선 확인하였다.

내성형성(항균성) 조사를 시료준비는 NANA는 45% NANA 0.25%(w/v) 희석하여 사용하였으며, 공시균은 항생제 내성미보유균(*E. coli* NCTC 9001), 항생제 내성보유균(Cf 및 Cm, *E. coli* O157:K88ac)를 이용하였다.

내성형성 검정은 절차는 NANA처리 후 MacConkey Agar 3시간 배양 후 생존콜로니 채취하여 재배양 후 다시 NANA 0.25%처리 후 10세대반복 항균성 조사를 수행하였다.

항균성 검정은 공시균에 대하여 NANA접촉전(control) 및 접촉후 30분, 1시간, 2시간, 3시간, 6시간 및 18시간 경과 시 생존콜로니수 비교하여 측정하였다.

다. 연구결과

개발 NANA 기원성 공시균에 대한 내성유발효과 없음을 확인하였다. 결과를 보면, 1~10세대 전체처리구간 18시간이내에 사멸율은 99.9%이상임을 확인하였다(Figure 9.)

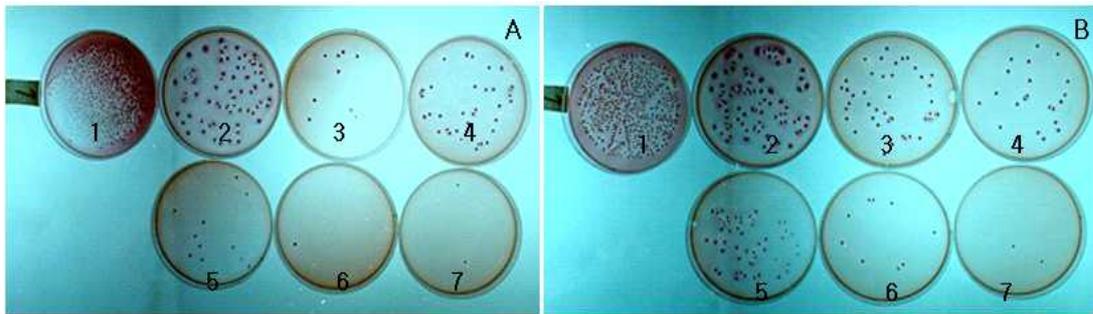


Figure 9. NANA제제 처리에 의한 내성유발여부 판정결과.

1: control, 2: 0.25% NANA 처리후 10분경과, 30분경과(3), 1시간(4), 3시간(5), 6시간(6) 및 18시간 경과(7)., A: 1 세대, B :10세대

8-1. 개발 NANA의 항균메카니즘 조사(형태변화 ;SEM)

가. 연구목적

병원성(*E.coli* O157:H7) 미생물 및 효모균에 대한 NANA처리 및 Surfactant 처리가 (MIC 대비) 성장(SEM)변화에 미치는 효과 관정을 목적으로 한다.

나. 연구재료 및 방법

공시균은 병원성미생물인 *E. coli* O157과 효모인 *S. cerevisiae*를 사용하였다. 시험균의 처리는 병원성미생물인 *E. coli* O157 (5×10^5 CFU/ml)을 NANA(2.5mg/ml), nano-NANA (2.5 mg/ml), surfactant (1.25 mg/ml)을 각각 처리한 후 37°C에서 20분 처리 후 고정하여 SEM (scanning electron microscopy)를 이용하여 각 시료의 항균효과를 관찰하였다. 효모인 *S. cerevisiae* 은 5×10^5 CFU/ml의 농도로 하였으며 NANA (5mg/ml), nano-NANA (5 mg/ml), surfactant (2.5 mg/ml)을 각각 처리한 후 28°C에서 30분 처리후 고정하여 SEM (scanning electron microscopy) 를 이용하여 각 시료의 항진균효과를 관찰하였다.

다. 연구결과

각 공시균에 미치는 NANA 효과를 살펴보면, 병원성미생물(*E. coli* O157)의 경우 대조군에 비해 처리구의 박테리아의 표면이 파괴되어 aggregation되어 있는 것을 관찰하였다(Figure 10.). 효모(*S. cerevisiae*)의 경우 대조군에 비해 처리구의 효모의 표면에 크고 작은 구멍이 생겼음을 관찰하였다(Figure 11.). 이와 반대로 Surfactant 균종류에 상관없이 세포막을 붕괴시키는 것으로 관찰되었다.



Figure 10. *E.coli* O157:H7공시균에 대하여, NANA 및 surfactant(700PS)의 항균 메카니즘 구명(SEM, 1: *E. coli* O157, 2: *E. coli* O157+NANA , 3:*E. coli* O157+Surfactant)

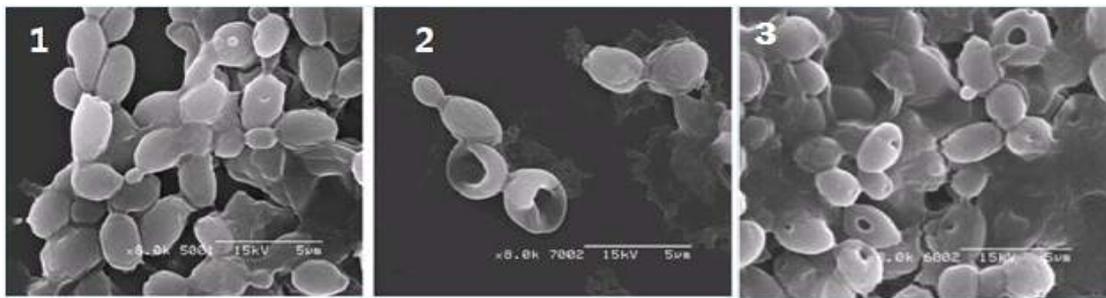


Figure 11. 효모균에 대하여 NANA 및 surfactant(700PS)의 항진균 메커니즘 구명 (SEM)효과(1: *S. cerevisiae*, 2: *S. cerevisiae* + NANA 3: *S. cerevisiae* + Surfactant)

8-2. 개발 NANA의 항균메카니즘 조사(Step 1 : 형광dye Method)

가. 연구목적

개발NANA 및 surfactant(700P2)의 항균성에 있어 세포막 공격성(관련성) 여부를 평가하였다. 이에 형광dye를 이용하여 개발 NANA소재의 박테리아의 세포막에 영향을 주는지를 알아보는 실험을 하였다. 이 형광dye는 스스로는 세포안으로 들어가지 못하나, 만약 세포막이 파괴되면 안으로 들어가 nucleic acids과 결합하여 형광을 띄는 성질을 이용하여 관찰함으로써 항균성에 대한 평가를 수행하고자 한다.

나. 연구재료 및 방법

공시균은 *E. coli* O157을 사용하였으며 검정방법에 사용하는 형광dye는 SYTOX green을 사용하여 항균성 평가를 수행하였다. 시험구 조성(mg/ml)은 시료별 농도별로 조성(0, 0.039, 0.078, 0.156, 0.3125, 0.625, 1.25, 2.5 및 5)하였으며, 처리시간은 공시균의 시료 접촉 후 1분 단위씩 30분 동안 검정하였다.

다. 연구결과

전체시료 모두 9분 이후에 세포막에 손상을 가하며, NANA에 비해 surfactant가 세포막을 크게 손상시켰다(Table 8.).

결론적으로, MIC이상 농도의 항균성은 세포막과 관련이 있으나, 직접적인 lysis 및 Damage효과여부는 판단할 수 없었다. 이를 확인하기 위하여, Membrane Potential을 확인(Depolarization)함으로써 확인이 필요로 한다.

Table 8. *E.coli* O157:H7균에 대하여 NANA 및 Surfactant 처리가 박테리아의 세포막에 미치는 영향[형광dye (SYTOX green)]조사 결과

1)NANA

Concentration (mg/ml)	Fluorescent intensity (arbitrary unit)												
	0 min	2 min	4 min	6 min	8 min	10 min	13 min	16 min	19 min	22 min	25 min	28 min	30 min
5	0	8	12	19	24	130	137	139	147	148	152	152	152
2.5	0	7	13	20	21	120	124	140	142	143	147	147	147
1.25	0	12	14	21	32	101	120	120	121	124	134	134	134
0.625	0	4	4	10	18	53	55	55	57	56	57	58	57
0.3125	0	4	8	9	16	42	43	43	51	52	52	52	52
0.156	0	4	8	8	16	41	42	42	47	47	47	47	47
0.078	0	0	0	5	10	32	33	35	36	36	36	36	36
0.039	0	0	0	5	10	15	18	19	19	20	21	21	21

2) Surfactant(700PS)

Concentration (mg/ml)	Fluorescent intensity (arbitrary unit)												
	0 min	2 min	4 min	6 min	8 min	10 min	13 min	16 min	19 min	22 min	25 min	28 min	30 min
5	0	124	125	128	130	209	209	209	209	253	254	255	255
2.5	0	63	76	80	82	186	207	208	211	212	211	225	225
1.25	0	31	42	48	54	144	161	162	165	168	169	189	195
0.625	0	21	31	36	41	128	120	121	120	140	139	140	155
0.3125	0	8	8	24	34	83	99	101	108	112	113	125	134
0.156	0	7	7	16	28	76	90	98	106	101	107	128	132
0.078	0	5	23	16	22	68	72	78	76	82	98	105	109
0.039	0	2	19	16	22	68	72	76	78	81	92	106	109

8-3. 개발 NANA의 항균메카니즘 조사(Step 2 : Depolarization Method)

가. 연구목적

개발 NANA 및 surfactant의 항균성에 있어 세포막 공격성(관련성) 여부평가를 하기 위한 형광dye(SYTOX green)Method를 적용 시, MIC이상 농도의 항균성은 세포막과 관련이 있음을 파악하였으나 직접적인 lysis 및 Damage효과여부는 판단할 수 없었다. 이에, 이를 확인하기 위하여, 각각의 sample을 처리한 후, bacterial membrane potential의 변화를 알아보는 실험으로 potential indicator dye로써 DisC₃₅를 사용 하였다.

나. 연구재료 및 방법

공시균은 *E. coli* O157, *S.aureus* 및 *B.cereus*을 사용하였으며, 공시시료는 NANA 및 surfactant(700P2)를 사용하였다. 검정방법은 Depolarization of membrane Potential indicator dye인 DisC₃₅ 사용하였다. 시험구의 조성(mg/ml)은 시료별 농도별 조성(0, 0.1, 0.2, 0.3, 0.6, 1.3, 2.5, 5.0 및 10.0mg/ml)하여 연구를 수행하였다.

다. 연구결과

Surfactant의 경우, 모든 cell 에서 높은 depolarization을 보였고, 앞선 SYTOX green uptake실험에서의 결과와 분석해보면 bacterial membrane에 직접적으로 작용함을 알 수 있었다. NANA의 경우, SYTOX green uptake와 마찬가지로 현저한 변화는 보이지 않으며, Surfactant에 비해 NANA는 MIC이하에서는 거의 변화를 보이지 않지만 MIC값에서 20-30%의 depolarization이 나타났다(Figure 12.).

결론적으로 NANA는 membrane에 직접적으로 lysis 또는 damage를 주지 않는것으로 판단되고, Surfactant의 경우는 직접적으로 세포막에 lysis 및 damage를 주는 것으로 확인되었다.

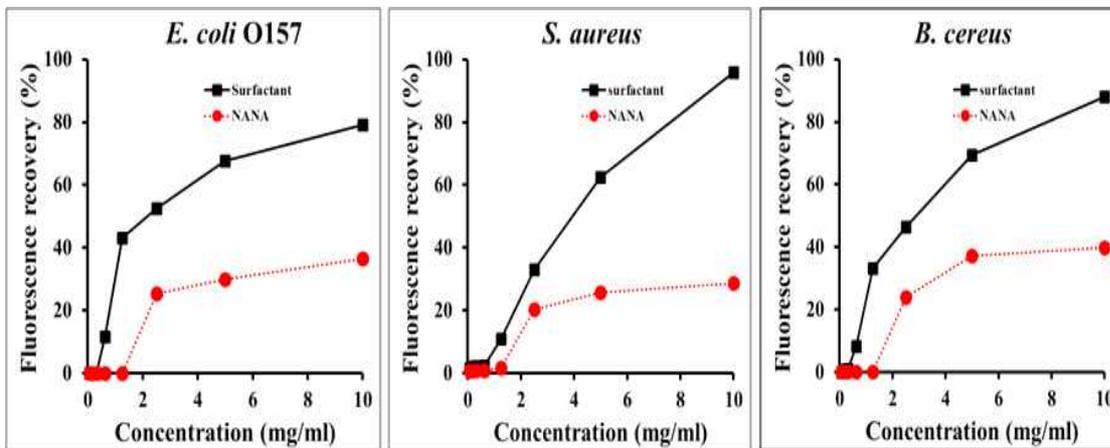


Figure 12. 공시균(3종)에 대하여 NANA 및 Surfactant처리가 세포막에 미치는 영향 조사 결과

8-4. 개발 NANA의 항균메카니즘 조사(Step 2 : Calcein Leakage in artificial Vesicles Method)

가. 연구목적

개발NANA 및 surfactant의 항균성에 있어 세포막 공격성(외부 및 내부 관련성) 여부 평가를 위해 형광dye(SYTOX green)Method를 적용 하였다. MIC이상 농도의 항균성은 세포막과 관련이 있음을 파악하였으나, 직접적인 lysis 및 damage효과여부는 판단할 수 없었다. 이에 Potential indicator dye로써 DisC₃₅를 사용 depolarization평가하여 그 결과 NANA는 membrane에 직접적으로 lysis 또는 damage를 주지 않는 것으로 판단하였다.) 따라서, 인공세포벽과 지질막(Calcein Leakage in artificial Vesicles)기법 적용 membrane에 직접적인 작용 여부를 확인 할 필요성이 있다.

나. 연구재료 및 방법

공시시료는 인공세포막 및 지질막 PE/PG(7:3, w/w)을 사용하였다. Calcein이 entrapped PE/PG(7:3, w/w, bacterial membrane)를 sample들의 membrane에 직접적인 작용 여부 판정시 사용하였다. 공시시료는 NANA 및 surfactant(700P2)이며, 검정방법은 Calcein Leakage in artificial Vesicles기법을 적용 평가하였다(Figure 13.). 시험구 조성(mg/ml)은 시료별 농도별 조성은 0, 0.1, 0.2, 0.3, 0.6, 1.3, 2.5, 5.0 및 10.0mg/ml으로 정하였다.

다. 연구결과

Surfactant는 vesicle에서 농도비례해서 현저한 fluorescent dye의 유출을 보이나, NANA는 거의 일어나지 않음을 확인하였다(Table 9.)

이전의 결과들과 종합해보면, NANA는 membrane에 직접적으로 작용하지 않는 것으로 결론 내렸다. 즉, MIC이상의 농도 처리 시 내부유입이 극대화(삼투압 현상 교란) 후 세포벽 파괴 메커니즘을 유발하는 것으로 최종 결론을 내렸다.

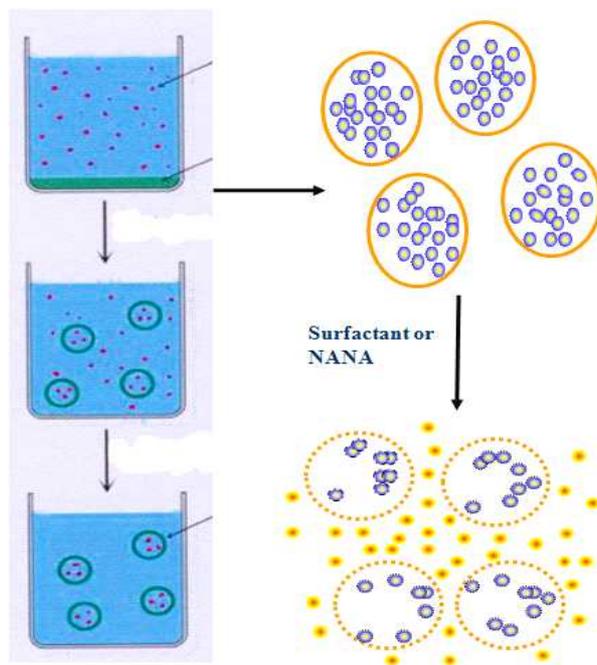


Figure 13. Calcein이 entrapped PE/PG(7:3, w/w, bacterial membrane)를 sample들의 membrane에 직접적인 작용 여부 판정을 위한 실험디자인

Table 9. 개발 NANA의 항균메카니즘 조사를 위한 측정결과

처리농도 (mg/ml)	surfactant (700P2)	NANA
0.100	98.9	5.8
0.050	87.1	1.3
0.025	74.4	0.0
0.013	65.7	0.0
0.006	55.1	0.0
0.003	38.4	0.0
0.002	32.5	0.0

9. 개발NANA의 동물 생체전이메카니즘 구명

가. 연구목적

방사선생물학기법 적용한 NANA의 생체전이효과를 평가하였다. NANA에 ^{14}C 을 치환 후 실험동물에 대하여 일정량을 경구투여, 시간경과별 조직별 전이 및 체내 체류효과 판정을 통한 안전성 및 이용성 평가를 위한 기초자료로 활용하였다. 방사성 생물학 기법적용은 ^{14}C -NANA 유도체 적용하여 1회 경구투여 하여 측정하였으며, 시간별 및 조직별 생체전이(간, 신장관련 배설 Route) 메카니즘 평가하였다.

나. 연구재료 및 방법

공시실험동물 (실험구별 개체 반복수)은 B10 ICR 웅성마우스(SLC Co.,Hamamatsu, Japan)를 3개체(20~31g/개체)를 사용 하였다. 방사성NANA는 개체별 1회 경구투여량을 ^{14}C -NANA($0.3\ \mu\text{Ci}$)을 정하였다. 치환 방사선동위원소는 $500\ \mu\text{Ci}$ ($1\text{-}^{14}\text{C}$)ACETIC ANHYDRIDE($0.442\text{mg}/500\ \mu\text{Ci}=4.333\ \mu\text{mol}$; Amersham Code CFA 339)을 사용하였다. 이에, 기관별 존재NANA측정 하였다.

^{14}C -NANA($0.3\ \mu\text{Ci}$) 1회 경과투여후 조직적출 시간은 6시간, 12시간, 24시간 및 72시간으로 하였으며, 적출조직(21개 기관 : Blood, RBC, Serum, Urine, Liver, Lung, Kidney, Spleen, Pancreas, Thymus, Heart, Muscle, Stomach , Testis, USI(upper part of small intestine), MSI (middle part of small intestine), LPI,(and lower part of intestine), Brain, Tyroid,Preputial gland, Rectum 및 Feces)은 베타-ray liquid scintillation 전처리 방법 적용하여 조직을 용해하였다. 기관별 방사능 측정은 liquid scintillation analyzer (2500 TR, Packard Instrument CO.).을 이용하였다.

연구결과 확인은 $RC = [(\text{검출방사능 농도}/\text{기관무게}) / (\text{투여방사능 농도}/\text{개체총무게}) \times 100]$ - RC(Realtive concentration, 상대농도)측정 하였다. 시간경과별 및 기관별 세포상 NANA 분포를 자가 방사 기록법(autoradiography) 적용 확인하였다. 측정시간은 6시간, 12시간 및 24시간이며 시료는 ^{14}C -NANA($0.3\ \mu\text{Ci}$) 경구투여후 경과시간별 도살 및 생체조직 전체 동결 후 중앙 및 중앙우측 동결절편을 이용하였다. 검출방법은 암실내 KONIKA-NR2 nuclear emulsion 슬라이드 액침 및 건조후 방사선 검출필름에 노출시켜 확인하였다.

다. 연구결과

NANA는 생체 조직내 특정 Target 기관은 없었다(Table 10., Figure 14.). NANA의 전이 및 배설관련 메커니즘은, 주로 Urine(Kidney)보다는 Feces(Liver)시스템에 관여하여 전이되었다.

NANA는 6시간 이내에 전체기관(뼈조직 및 근육조직 등)내로 흡수되고 시간이 경과되면 점차적으로 배설되는 메커니즘을 보였다. 이는 추후 기능성제품 및 용도용법 확대에 있어 중요한 기초자료로 활용하고자 한다.

Table 10. 공시실험동물(B10 웅성마우스)에 대하여 放射性동위원소(¹⁴C)치환NANA를 경구투여후(0.3uCi/1회) 시간경과별(6시간, 12시간, 24시간 및 72시간) 및 기관별 NANA분포량 조사결과(상대농도 : Relative concentration, 3개체 반복결과 평균)

Organs	경구투여 ¹⁴ C-NANA의 시간경과별 체내대사메카니즘 검정결과			
	0.25days	0.5days	1days	3days
Blood	11.53±4.43a	6.42±1.23	5.86±2.84	-
RBC	4.12±1.49	3.19±0.94	-	2.95±0.65
Serum	12.74±1.23	3.44±0.06	7.30±3.55	2.56±0.75
Urine	-	5.91±1.21	-	1.49±0.93
Liver	95.63±26.49	64.46±10.7	28.78±4.37	24.99±4.60
Lung	23.44±1.89	17.66±4.04	17.27±4.25	13.06±3.87
Kidney	26.37±0.53	18.20±3.85	18.71±3.24	15.37±4.65
Spleen	19.53±1.43	13.31±2.91	16.29±6.28	13.71±3.83
Pancreas	24.77±2.19	12.37±3.76	12.59±0.14	10.88±2.82
Thymus	22.41±2.15	14.20±2.45	19.22±2.70	17.80±4.01
Heart	14.72±2.16	8.63±3.46	8.81±1.2	8.33±2.09
Muscle	6.93±0.91	4.09±0.98	4.23±0.62	4.61±2.18
Stomach	32.61±2.60	23.90±2.21	17.37±4.96	14.41±1.48
Testis	6.35±0.51	4.64±1.26	4.71±1.09	6.93±2.99
USI	29.78±2.17	23.91±0.76	17.20±5.34	12.53±3.93
MSI	82.03±32.66	31.28±9.35	30.33±1.97	18.84±5.07
LPI	59.96±33.33	60.87±16.6	30.25±8.22	21.42±4.13
Brain	6.93±0.42	4.69±0.73	4.09±1.23	5.44±0.56
Tyroid	34.59±1.01	19.37±6.13	19.27±0.74	21.27±6.36
Proximal	17.79±8.49	21.68±8.06	24.11±8.09	32.48±18.3
Rectum	47.93±9.84	28.89±5.03	26.82±9.19	18.0±6.51
Feces	221.9±13.89	78.31±36.7	10.7±6.63	5.31±0.47

RC : (radioactivity in tissue/ mg tissue)/(radioactivity dose/mg body weight)100)), USI, MSI, 및 LSI ; 소장의 상부, 중부, 하부부분

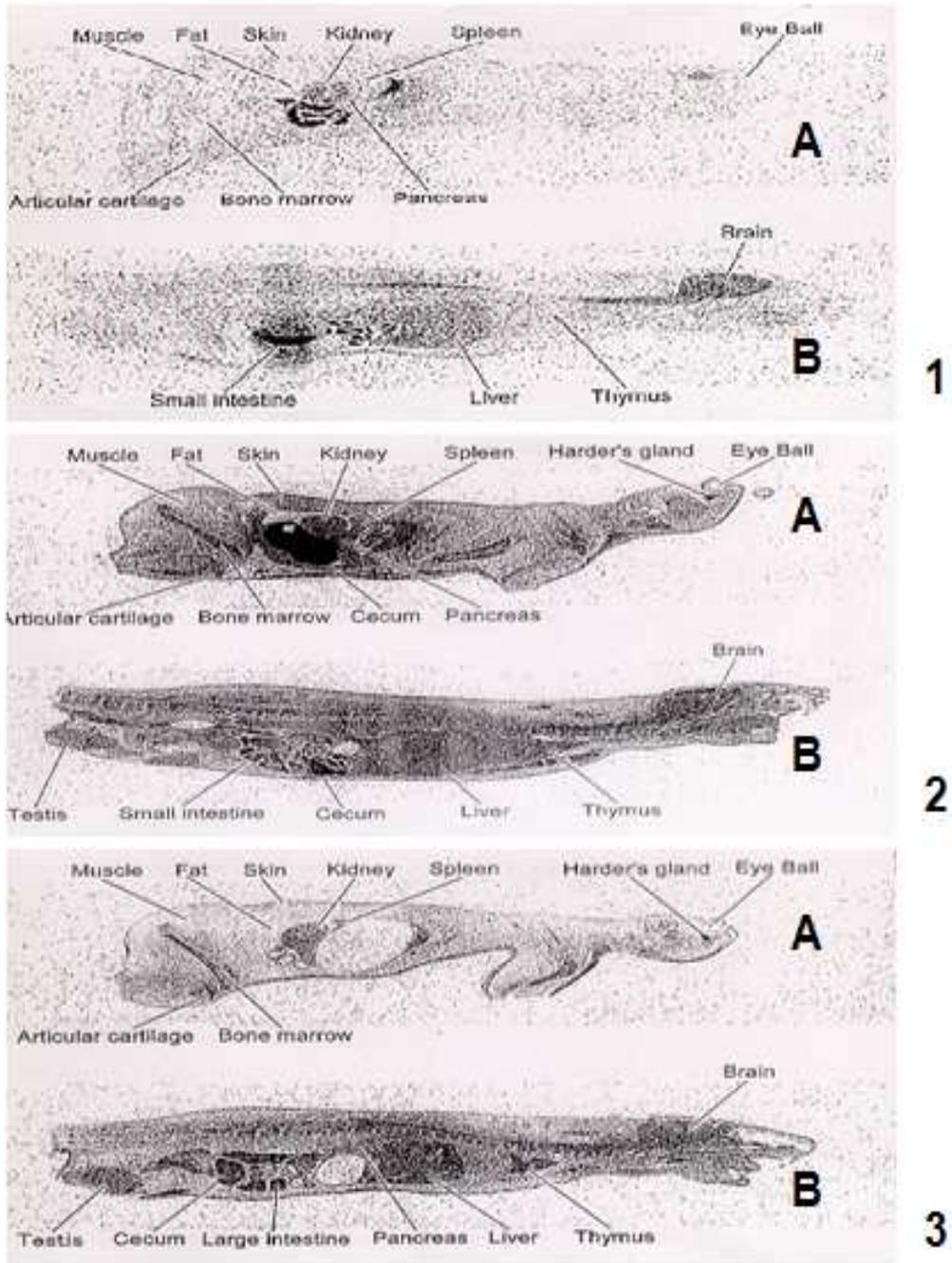


Figure 14. 放射性동위원소(¹⁴C)치환NANA를 경구투여후(0.3uCi/1회) 시간경과별(1:6시간, 2:12시간, 3:24시간 및 72시간) 全身Autoradiography측정결과(A: 中央右側絶斷, B: 中央絶斷)

10. 개발NANA 표준주 이용독성평가(Hemolysis 및 cytotoxicity)

가. 연구목적

NANA 및 surfactant의 hemolysis와 cytotoxicity평가를 통한 독성 검정을 목적으로 한다.

나. 연구재료 및 방법

표준 cell-line은 human erythrocyte(적혈구 용혈성평가), HaCaT(독성평가), H1H3T3 cell(독성평가)을 이용하였다. 시험구조성 처리농도(mg/ml)는 0, 0.78, 1.5624, 3.125, 6.25, 12.5, 25, 50 및 100으로 설정하였다.

다. 연구결과

NANA의 독성평가결과, Hemolysis effect(human erythrocyte)는 26.7%(3.2mg/ml)이며, Cell line cytotoxic effects(HaCaT 및 H1H3T3) 각각 HaCaT (12.5mg/ml기준) 31.2%이며 H1H3T3(12.5mg/ml기준) 49.3%로 관찰되었다. Surfactant(700P-2)의 독성평가를 실시한 결과 Hemolysis effect는 0.78 mg/ml에서 69% hemolysis가 일어났으며, Cell line(HaCaT 및 H1H3T3)의 cytotoxic effects는 0.78mg/ml에서 100% cytotoxicity를 가졌다(Figure 15., Table 11.).

결론적으로 human erythrocyte인 HaCaT 및 H1H3T3 cell은 공시균의 MIC 수준값에서는 거의 cytotoxic effect를 보이지 않으나, hemolysis는 관찰됨에 비교시 erythrocyte와 다른 mammalian cell의 membrane 구성성분의 차이에서 기인되는 것으로 판단되어진다.

HEK293 cell (human embryonic kidney cell) 및 RAW 264.7 cell (macrophage cell)을 이용한 독성평가는 1년차에 완료하였으며, HEK293 cell의 경우, 0.1%~0.5%농도 및 전체시간(24시간)범위에서 세포독성이 관찰되지 않았다. RAW 264.7 cell의 경우, 고농도 처리구(0.5%)이외의 농도 및 전체시간(24시간) 범위에서 세포독성이 관찰되지 않았다. 그러나 개발 NANA는 표준주별 독성효과가 큰 것으로 확인되었다.

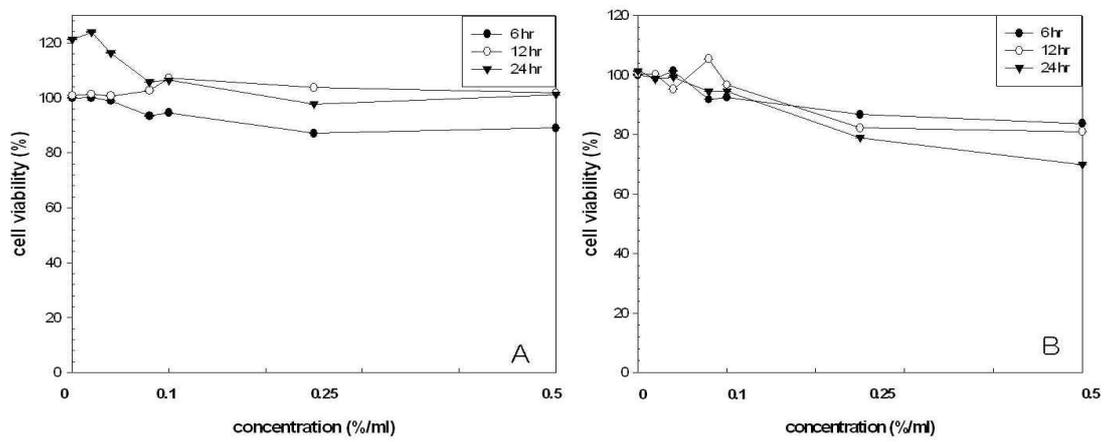


Figure 15. 표준 세포주(A : HEK 293 cell, B:, RAW 264.7 cel)에 대하여 농도별 NANA가 독성에 미치는 효과 평가 결과

Table 11. NANA 및 surfactant의 표준 celline(human erythrocyte, HaCaT 및, HIH3T3 cell)에 대한 농도별 및 경과시간별 독성평가 결과

Cell-line Name	처리농도(mg/ml)	시료농도별 Cytotoxicity 평가결과(%)	
		Sulfactant(700P2)	NANA
HaCaT cell	100	0	0
	50	0	0
	25	0	12.1
	12.5	0	68.78
	6.25	0	85.78
	3.125	0	90.64
	1.5624	0	97.55
	0.78	0	98.25
	0	100	100

Cell-line Name	처리농도(mg/ml)	시료농도별 Cytotoxicity 평가결과(%)	
		Sulfactant(700P2)	NANA
NIH3T3	100	0	0
	50	0	0
	25	0	21.7
	12.5	0	50.7
	6.25	0	71.04
	3.125	0	90.8
	1.5624	0	99.2
	0.78	0	100
	0	100	100

Cell-line Name	처리농도(mg/ml)	시료농도별 hymolysis 평가결과(%)	
		sulfactant(700P2)	NANA
Human erythrocyte	100	100.0	100.0
	50	100.0	100.0
	25	100.0	100.0
	12.5	100.0	100.0
	6.25	100.0	79.1
	3.125	3.1	95.1
	1.5624	83.6	14.3
	0.78	69.0	9.6
	0	0	0

제 4-1 절 NANA소재의 제품적용성 평가 (내산/내알카리 저항성 조사)

1. 연구목적

NANA소재개발의 최종목표가 천연항균제로서 고부가 제품개발임에 따라 제품화를 위한 주요항목별 평가를 실시하였다. 평가항목으로서는 내열성, 보관조건별(상온 및 냉장), 기간별(최초 대비 7일, 37일 및 10개월)로 구분하여 제품화를 위한 적용성 평가를 실시하였다. 결과로서, NANA소재를 천연항균제로서 사용에 있어 액상제형보다는 고상제형이 적절함을 알 수 있었고, 제품화를 원료로 사용시는 분말 혹은 고상제형이 적절함을 알 수 있었다($P < 0.01$). 제품적용성 평가를 종합하여 최종적으로 제품화 제형은 액상첨가형(과립형)과 섭취형(정제형)로 구분 제조레시피를 정립하므로써 제품 상용성을 극대화 하였다.

본 연구는 NANA을 제품에 적용시 예측되는 물리/이화학적 변화여부를 사전에 평가하고 저 함에 있다. 즉, NANA소재를 인위적으로 섭취시 위산액과의 접촉 혹은 산성을 띠는 음료 혹은 비누 등의 알카리성 등과 다종의 내산 및 내알카리를 띠는 제제들과 접촉시 물성변화를 유발됨이 예상되고 동시에 목적하는 항균성 소재로서의 효능을 상실할 수 있다고 생각됨에 따라 산 및 알카리성 시약을 수중 준비하고 이들을 여러농도에서 접촉조건에서 저항성 조사를 실시하였다.

이를 위하여 NANA를 이용 산 및 알카리 조건하에서 시간경과에 따른 성상, 분자량 변화, 항균성 및 우유내 반응성 조사를 사전 실시함으로써 개발 NANA에 대한 내산 및 내알카리 저항성 결과를 기초자료 확보코져 하였다.

2. 연구수행방법

시험구는 8개 실험구로 조성하였는데, 대조(1% NANA, w/w), 0.05N NaOH용액(1% NANA 함유), 0.6N HCl용액(1%NANA 함유), 25% Acetic acid 용액(1%NANA 함유), 1.5%Acetic acid 용액(1% NANA 함유), 5% H_2SO_4 -1%NANA, 1M HNO_3 (1% NANA 함유) 그리고 1% HCl 용액(1%NANA 함유)시험구로 조성하였으며, 여기에 1%되게 NANA를 첨가하였다.

산 및 알카리 조건에서 NANA의 변화는 상온보관조건에서 1일 및 11일 경과 시, 성상(색상)변화 및 FPLC분석을 통하여 동시에 NANA고유의 분자량의 변화를 대조구와 비교하였다.

3) 연구수행결과

산성(HCl, Acetic acid, H₂SO₄, HNO₃) 및 염기성(NaOH) 시료를 농도별로 희석한 후 동일농도의 NANA를 첨가 한 후 11일이 경과시, NANA의 분자량 변화패턴을 비교함으로서 NANA의 내산 및 내염기성을 평가하여 보았다.

- 1) 1% 농도로 조성한 NANA는 두개의 분자량[저분자 : 37.4min.(85%), 고분자 : 37.5min.(15%)을 보유하는 패턴을 보유하고 있었다(Fig 1).
- 2) NANA소재는 내알카리성은 다소 안정되었으나, 산성조건에서는 NAN소재의 고유 분자량이 붕괴되는 패턴을 보여 내산성은 인정되지 않았다(Fig 2.).
- 3) 초기에는 물성 및 분자량 변화가 적었던 알카리 조건에서도 NANA는 경과시간이 길면 길수록 동일하게 분자량이 변하는 패턴을 보였다(Fig. 1~2.).
- 4) 특히 산성액내에서 NANA는 시간이 경과할 수록 갈변화와 동시에 침전현상 및 벽면에 침착되는 현상이 심하게 발생하였다(Fig 2-C).

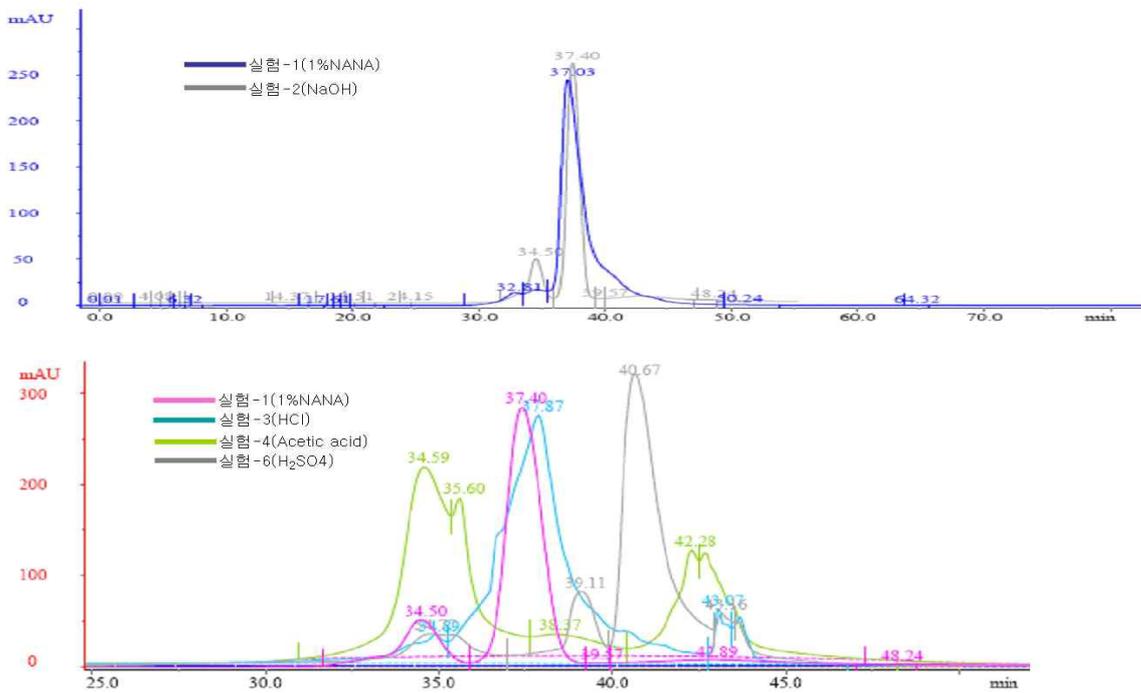


Fig. 1. 대조 NANA(1%, w/w) 대비 산 및 알카리 용액조건에서 11일 경과시 NANA의 분자량 변화검정(FPLC 분석)

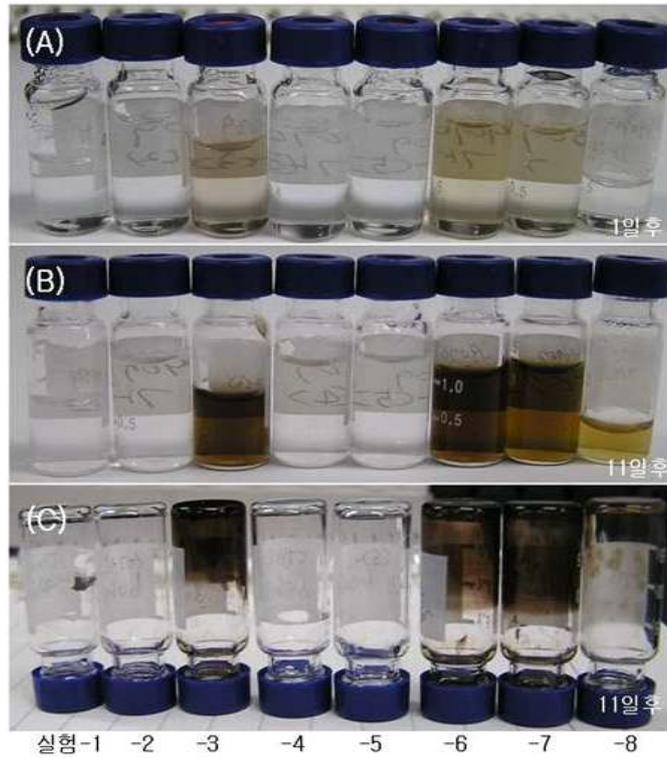


그림 . 대조 NANA(1%, w/w) 산 및 알카리 용액조건에서 11일 경과시 NANA의 색상변화

[실험-1(대조, saline in 1% NANA), 실험-2(0.05N NaOH in 1% NANA), 실험-3(0.6N HCl in 1% NANA), 실험-4(25% Acetic acid in 1% NANA), 실험-5(1.5% Acetic acid in 1% NANA), 실험-6(5% H₂SO₄ in 1% NANA), 실험-7(1M HNO₃ in 1% NANA), 실험-8(1% HCl in 1% NANA), A: 1일경과, B: 11일 경과, C: 11일 경과시 색상(침전 및 부착)변화]

제 4-2 절 NANA소재의 제품적용성 평가 (장기보관에 따른 물리이화학적 변화 조사)

1. 연구목적

NANA소재개발의 최종목표가 천연항균제로서 고부가 제품개발임에 따라 제품화를 위한 주요항목별 평가를 실시하였다. 평가항목으로서는 내열성, 보관조건별(상온 및 냉장), 시간이 경과시 제품화를 위한 적용성 평가를 실시하였다.

이를 위하여, 액상제품 및 분말형 제품으로 구분, 장기간 보관시 물성변화와 더불어 항균성 저감효과 파악 결과를 토대로 NANA제형 레시피 TYPE설정하고 저 하였으며, 동일(1%,w/w)농도 NANA용액을 단기(1년차 완료) 및 장기(1년) 저온 및 상온조건으로 구분 보관시, 물리(색상변화, 침전등), 이화학적(물성, 분자량 등)와 관련 생물학적(항균성 저하)영향을 연계 평가함으로서 개발NANA소재를 제품에 적용시 장단기 경과시 예측되는 문제점을 분명히 확인하고자 하였다.

2. 연구수행방법

가. 개발NANA의 장기(10월)보관에 따른 물리이화학적 변화 조사를 위한 시험디자인은 Table 1과 같다.

나. 비열처리 NANA의 장기보관이 물성변화에 미치는 영향을 조사하기 위하여, 각각 1%(w/w)NANA 희석용액을 준비한 후 이를 상온 및 냉장조건에서 10개월동안을 보관하였으며, 최종 10개월이 경과시 성장 및 물성(분자량) 변화를 HPLC와 FPLC 분석을 통하여 비교 확인하였다.

다. 열처리 NANA에 대한 장기보관이 역시 물성변화에 미치는 영향을 조사하였다.

1) 비열처리구와 동일하게 우선 1%(w/w)NANA 희석용액을 각각 준비한 후 75℃에서 30분동안 1회 열처리후 저온((5℃, CT) 및 상온(RT)보관 시험구, 90℃조건에서 30분동안 1회 열처리후 저온(5℃, CT) 및 상온보관(RT)시험구로 조성하였다.

2) 고온시험구로서는 121℃조건에서 15분동안 1회 열처리 후 상온(RT) 및 저온(5℃)보관 시험구로 구분하여 조성하였다.

3) 대조구로서는 측정시 즉시 동일하게 1% 농도로 제조한 NANA용액을 조제하여 비교측정하였다.

라. 전체시험구에 대하여 장기간 경과시에 NANA소재의 성장변화는 외관평가를 실시하여 색상변화와 침전 및 부착현상이 발생하였는지를 기준으로 평가하였다.

3) 연구수행결과

가. 대조구(1% 농도로 조성한 NANA)의 고유분자량을 FPLC분석을 통하여 검정하여 보았더니, 두개의 분자량[저분자 : 41.81min(95.2%), 고분자 : 44.31min.(4.8%)을 보유하는 패턴을 보였다(Table 2, Fig 1.). 또한, 대조구의 경우라 하더라도 상온조건에서 6일이 경과시는 갈변화 현상과 더불어 고분자로 분자량이 이동하는 경향을 보였는데, 최초 95.2%에서 99%로 최초 대비 약 4%의 분자량 변화가 관찰되었다(Table 2). 이러한 경향은 NANA는 물과 같은 액상제제와 접촉시 안정하지 않음을 알 수 있는 결과였다.

나. 보관(상온 및 냉장)조건에 따른 물성변화 조사 결과는 다음과 같다.

- 1) 대조구 조건으로 상온 및 저온보관 조건에서, 10개월이 경과시 동일하게 갈변화 현상이 발생하였으나, 침전 및 부착 등과 같은 현상은 발생하지 않았다. 그리고, 분자량의 변화를 살펴보았더니, 이 경우에는 저분자쪽으로 약 30% 분자량이 이동하는 패턴을 보였는데 보관조건에 따른 유의한 차이는 인정되지 않았다(Table 2., Fig 1).
- 2) NANA대하여 온도별로 다르게 열처리한 경우에는 전체적으로 저온보관조건에 상온보관 조건보다 분자량의 변화폭은 낮게 나타났다(Table 2., Fig 1).

다. 고온처리 및 보관조건에 따른 NANA의 물성변화(Table 2)

- 1) 고온처리후에 NANA의 물성을 살펴보았더니, 우선 최초 처리온도가 높으면 높을수록 갈변화와 침전 및 부착 등 성상변화가 심하게 나타났으며, 동시에 NANA고유분자량은 최대 약 43%까지 소실되는 경향을 보였으며, 이러한 경향은 시간경과에 따라 더욱 심하게 나타났다. 이러한 결과를 HPLC시스템을 사용하여 조사하여 본 결과도 동일 결과를 보였다(Table 3., Fig. 2.)
- 2) 고온처리후 보관조건에 따른 NANA의 물성변화를 FPLC분석을 통하여 조사하여 보았다. 이경우도 저온보다는 상온 보관조건에서 성상 및 분자량의 변화가 심하게 나타났는데, 특히 75℃처리구에서는 약 25%, 121℃처리구는 20% 그리고 95℃처리구는 약 11%의 차이를 보일 정도로 높은 변화를 보였다. 이러한 결과를 HPLC시스템을 사용하여 조사하여 본 결과도 동일 결과를 보였다(Table 3., Fig. 2.)

라. 결론적으로, NANA소재는 제품적용에 있어 항균성을 제외한 성상변화를 기준으로 평가한다면 액상보다는 고상제품에 보다 적합함을 확인하였다. 또한, 액상제품에 첨가후 멸균처리를 위한 열처리조건에서 NANA고유의 성상 및 물성변화가 예상되며, 냉장보관조건에서 30일 이내에 소진하는 조건을 반드시 준수하여야 할 것으로 판단되었다.

Table 1. 개발NANA의 장기(10월)보관에 따른 물리이화학적 변화 조사를 위한 시험디자인

실험구 조성 및 분석항목	대조	비가열 NANA[1%(w/w), 보관(상온, 저온)]			열처리 NANA[1%(w/w), 75℃~121℃, 보관(상온, 저온)]			
	1% NANA (즉시제조)	제조후 (0일경과)	상온 보관	저온 보관 (5℃)	75℃ (30분), 1회 열처리후 저온보관(5℃)	90℃ (30분), 1회 열처리후 저온보관(5℃)	121℃ (15분, 멸균조건), 1회 열처리후 상온보관	121℃ (15분, 멸균조건), 1회 열처리후 저온보관(5℃)
HPLC분석	필수 분석법 정립 부분 참조							
FPLC분석	필수 분석법 정립 부분 참조							
성상확인	관능(외관)평가							

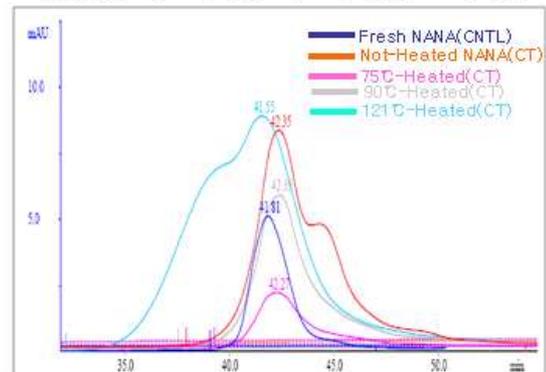
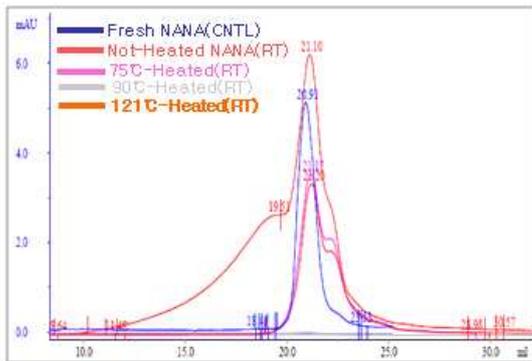
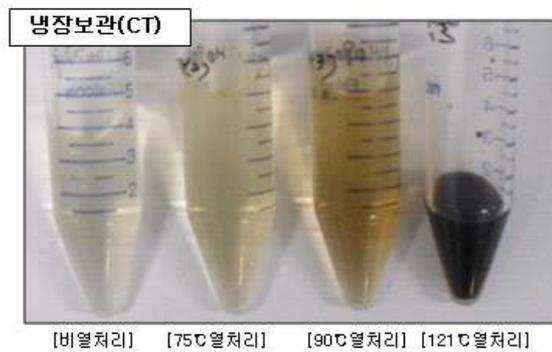
Table 1. 1% (w/w) NANA의 온도별(75~121℃)처리후 보관조건(RT:상온, CT:냉장)시 장기(10개월) 안전(정)성 평가 결과(FPLC 분석)

실험구	보관조건	분석시간(RT)별 NANA점유율(%)변화				성상변화		비고
		RT	Area(mAU*min)	Height	점유율(%)	색상(갈색)	침전/부착	
control	Oday	41.81	10.3	5.0	95.2	-	-/-	F r e s h NANA(NZL)
		44.31	0.5	0.4	4.8			
	6 day(RT)	42.03	28.4	13.2	99.0	+	-/-	
		47.8	0.3	0.2	1.0			
비열처리	RT	42.41	137.5	54.1	64.2	+	-/-	NANA(NZL), 상온보관
		43.89	66.4	29.5	322.7			
		46.16	10.2	4.5	4.8			
	CT	42.35	132.1	53.7	63.1	+	-/-	1%NANA(NZL), 냉장보관(5℃)
		44.31	66.1	30.2	31.6			
		47.79	11.0	4.4	5.3			
75℃ 열처리 (30분)	RT	42.35	146.9	57.8	62.9	+	-/-	75℃, 30분, 1 회처리, 상온보 관
		44.25	73.5	34.3	31.5			
		47.55	13.0	5.1	5.6			
	CT	42.24	20.2	7.6	88.2	+	-/-	75℃, 30분, 1 회처리,냉장보 관(5℃)
45.61		2.7	1.4	11.8				
90℃ 열처리 (30분)	RT	42.13	2.2	0.6	88.0	+	++/+	90℃, 30분, 1 회처리,상온보 관
		43.88	0.3	0.2	12.0			
	CT	42.39	76.3	21.6	98.6	+	-/-	90℃, 30분, 1 회처리,냉장보 관(5℃)
		56.76	1.1	0.4	1.4			
121℃ 열처리 (15분)	RT	39.04	432.6	63.8	41.1	+++	+/+++	평균조건(121℃,15분,1회처 리),상온보관
		39.69	18.7	63.9	1.8			
		42.2	448.7	152.4	42.6			
		43.89	152.4	74.2	14.5			
	CT	40.19	433.2	145.3	38.9	+++	++/+	평균조건(121℃,15분,1회처 리),냉장보관 (5℃)
		41.55	679.6	177.8	61.1			
		42	0.0	0.0	0.0			

- : 대조 대비 정상, + :변화초기, ++: 변화심함, +++:변화매우 심함, RT(Room Temp,25℃.): 상온, CT(Cold Temp.): 저온(5℃)

Table 2. 1% (w/w) NANA의 온도별(75~121℃)처리후 보관조건(RT:상온, CT:냉장)시 장기(10개월) 안전(정)성 평가결과(HPLC 분석)

실험구	보관조건	분석시간(RT)별 NANA결유율(%)변화				비고
		RT	Area	Height	결유율(%)	
control	0 day	9.49	14,079.34	773.25	100	1,000ppm-Fresh NANA(NZL)
배열처리	RT	8.87	386.44	22.44	3	1,000ppm-NANA(NZL), 상온보관
		9.51	12,536.87	85.58	93	
		10.40	250.91	9.92	2	
		11.68	199.21	7.65	2	
		12.39	64.50	1.97	1	
	CT	9.53	13,840.69	755.20	100	1,000ppm-NANA(NZL), 냉장보관(5℃)
75℃ 열처리	RT	8.89	433.95	25.12	3.34	75℃, 30분, 1회처리, 상온 보관
		9.53	11,969.24	659.38	92.48	
		10.42	298.08	12.62	2.28	
		11.71	194.48	7.58	1.47	
		12.42	60.36	1.81	0.43	
	CT	8.90	32.46	2.05	0.24	75℃, 30분, 1회처리, 냉장 보관(5℃)
9.54	12,740.28	704.38	98.99			
90℃ 열처리	RT	8.89	406.75	23.06	3.06	90℃, 30분, 1회처리, 상온 보관
		9.53	11,920.14	655.88	89.65	
		10.42	685.25	33.24	5.16	
		11.70	216.89	8.87	1.62	
		12.41	67.53	2.26	0.51	
	CT	8.90	116.81	7.05	0.81	90℃, 30분, 1회처리, 냉장 보관(5℃)
		9.54	12,515.27	691.64	94.44	
		10.43	582.59	29.45	4.81	
11.68		67.11	2.78	9.44		
121℃ 열처리	RT	8.88	543.69	29.44	5.68	별균조건(121℃, 15분, 1회 처리), 상온보관
		9.51	8,320.42	464.34	69.64	
		10.40	2457.09	127.57	20.59	
		11.68	364.69	17.49	3.07	
		12.41	119.42	4.62	1.02	
	CT	8.90	601.06	34.53	3.06	별균조건(121℃, 15분, 1회 처리), 냉장보관(5℃)
		9.54	8,569.09	477.82	89.65	
		10.43	2846.15	149.10	5.16	
11.69		190.73	8.78	1.62		
12.44	42.62	1.69	0.51			



1. 보관조건(안정성 평가순) : CNTL > CT > RT
2. 열처리조건(안정성 평가순) : CNTL > CT > RT
3. 분자량 변화(장기보관, CNTL 기준) : 고유피크 >> 고분자 형태 > 저분자 형태
- " " (" " , 변화량 기준) : RT > CT > CNTL

Fig 1. 1% (w/w) NANA의 온도별(75~121°C)처리후 보관조건(RT:상온, CT:냉장)시 장기(10개월) 안전(정)성 평가 결과(성상변화, FPLC)

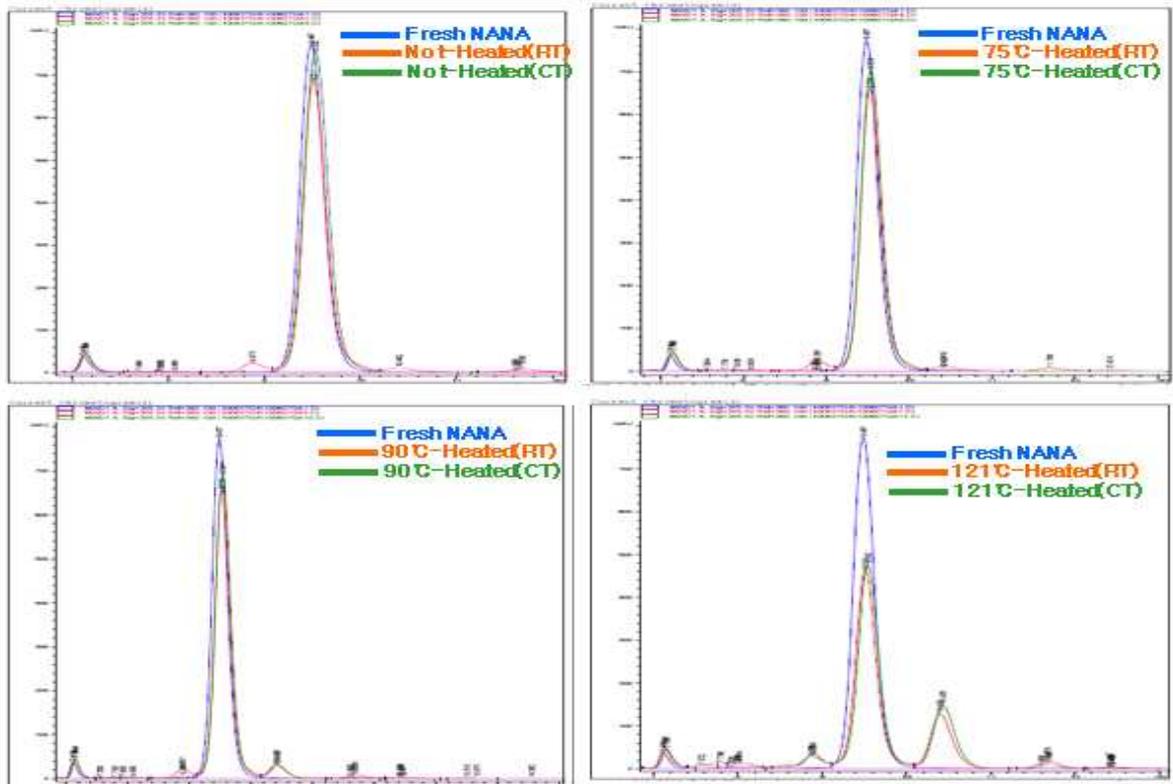


Fig 2. 1% (w/w) NANA의 온도별(75~121℃)처리후 보관조건(RT:상온, CT:냉장)시 장기(10개월) 안전(정)성 평가 결과(성상변화, HPLC)

제 4-3 절 NANA소재의 제품적용성 평가 (장기보관이 항균성에 미치는 변화조사)

1. 연구목적

NANA소재개발의 최종목표가 천연항균제로서 고부가 제품개발임에 따라 제품화를 위한 주요항목별 평가를 실시하였다. 평가항목으로서는 내열성, 보관조건별(상온 및 냉장), 시간이 경과시 제품화를 위한 적용성 평가를 실시하였다.

본 연구에선는 4-2절에서 1%의 농도로 조성한 후 비열처리 및 열처리 조건에서 보관조건 및 시간경과에 따라 물성 및 분자량의 변화를 검토하였다. 이러한 결과를 기준으로 동일 처리조건에서 NANA의 물성변화를 인위적으로 유발 한 후, 항균성 평가를 실시한 후 이 결과를 기준으로 제품적용성 평가의 기준을 설정하고 저 하였다.

2. 연구수행방법

가. 개발NANA의 장기(10월)보관에 따른 물리이화학적 변화 결과를 기준으로 항균성에 미치는 효과를 조사하기 위한 시험디자인은 Table 1(4-2절)과 같다.

나. 비열처리 NANA의 장기보관이 물성변화가 항균성에 미치는 영향을 조사하기 위하여, 각각 1%(w/w)NANA 희석용액을 준비한 후 이를 상온 및 냉장조건에서 10개월동안을 보관하였으며, 최종 10개월이 경과시 성상 및 물성(분자량)변화를 조사 후 항균성평가를 위한 시료로 사용하였다.

다. 열처리 NANA에 대한 장기보관시, 발생하는 물성변화가 역시 항균성에 미치는 효과를 조사하였다.

1) 비열처리구와 동일하게 우선 1%(w/w)NANA 희석용액을 각각 준비한 후 75℃에서 30분동안 1회 열처리후 저온(5℃, CT) 및 상온(RT)보관 시험구, 90℃조건에서 30분동안 1회 열처리후 저온(5℃, CT) 및 상온보관(RT)시험구로 조성하였다.

2) 고온시험구로서는 121℃조건에서 15분동안 1회 열처리 후 상온(RT) 및 저온(5℃)보관 시험구로 구분하여 조성하였다.

3) 대조구로서는 측정시 즉시 동일하게 1% 농도로 제조한 NANA용액을 조제하여 비교측정하였다.

라. 전체시험구에 대하여 장기간 경과시에 NANA소재의 성상변화는 외관평가를 실시하여 색상변화와 침전 및 부착현상이 발생하였는지를 기준으로 평가하였다.

마. 항균성조사는 다음과 같이 실시하였다.

- 1) 공시균(배양조건)은 3종 혼합(*E.sakazakii*, *B.cereus*, *E.coli* 0157:H7)하여 사용 (TSA배지, 37°C, 24시간 호기배양)하였으며, *E.coli* 0157:H7는 6.7×10^7 cfu/ml, *E.sakazakii*는 5.9×10^6 cfu/ml 그리고 *B.cereus*의 경우는 1.5×10^3 cfu/ml를 혼합한 후 시험간 적절히 희석하여 사용하였다.
- 2) NANA처리농도 및 항균성 검정시간 조건은 대조 대비 NANA시료별 0.5%(v/v)의 동일농도로 처리하되 공시균과 접촉전(0시간), 접촉후 1시간, 3시간 및 24시간 후 생존 콜로니 조사후 이를 비교하여 확인하였다.
- 3) 항균성 검정을 위한 시험구는 Table 2.와 같다.

3) 연구수행결과

가. 대조구(1% 농도로 조성한 NANA)의 고유분자량을 FPLC분석을 통하여 검정하여 보았더니, 두개의 분자량[저분자 : 41.81min(95.2%), 고분자 : 44.31min.(4.8%)을 보유하는 패턴을 보였다(4-2절의 Table 2 및 Fig 1.). 또한, 대조구의 경우라 하더라도 상온조건에서 6일이 경과시는 갈변화 현상과 더불어 고분자로 분자량이 이동하는 경향을 보였는데, 최초 95.2%에서 99%로 최초 대비 약 4%의 분자량 변화가 관찰되었다(4-2절의 Table 2). 이러한 경향은 NANA는 물과 같은 액상제제와 접촉시 안정하지 않음을 알 수 있는 결과였다.

나. 보관(상온 및 냉장)조건에 따른 물성변화 조사 결과는 다음과 같다.

- 1) 대조구 조건으로 상온 및 저온보관 조건에서, 10개월이 경과시 동일하게 갈변화 현상이 발생하였으나, 침전 및 부착 등과 같은 현상은 발생하지 않았다. 그리고, 분자량의 변화를 살펴보았더니, 이 경우에는서는 저분자쪽으로 약 30% 분자량이 이동하는 패턴을 보였는데 보관조건에 따른 유의한 차이는 인정되지 않았다(4-2절의 Table 2.과 Fig 1).
- 2) NANA대하여 온도별로 다르게 열처리한 경우에는는 전체적으로 저온보관조건에 상온보관 조건보다 분자량의 변화폭은 낮게 나타났다(4-2절의 Table 2 및 Fig 1).

다. 고온처리 및 보관조건에 따른 NANA의 물성변화(4-2절의 Table 2)

- 1) 고온처리후에 NANA의 물성을 살펴보았더니, 우선 최초 처리온도가 높으면 높을수

록 갈변화와 침전 및 부착 등 성상변화가 심하게 나타났으며, 동시에 NANA고유 분자량은 최대 약 43%까지 소실되는 경향을 보였으며, 이러한 경향은 시간경과에 따라 더욱 심하게 나타났다. 이러한 결과를 HPLC시스템을 사용하여 조사하여 본 결과도 동일 결과를 보였다(4-2절의 Table 3과 Fig. 2.)

2) 고온처리후 보관조건에 따른 NANA의 물성변화를 FPLC분석을 통하여 조사하여 보았다. 이경우도 저온보다는 상온 보관조건에서 성상 및 분자량의 변화가 심하게 나타났다는데, 특히 75℃처리구에서는 약 25%, 121℃처리구는 20% 그리고 95℃처리구는 약 11%의 차이를 보일 정도로 높은 변화를 보였다. 이러한 결과를 HPLC시스템을 사용하여 조사하여 본 결과도 동일 결과를 보였다(4-2절의 Table 3. Fig. 2.)

라. NANA시료별 항균성에 미치는 조사결과는 다음과 같다(Fig 2~3, Table 3)

- 1) 외적 환경(열처리, 장단기 보관)요인에 따른 물성변화가 항균성 저하에 미치는 영향은 없었다.
- 2) 열처리시, 물성의 변화가 가장 심하였던 121℃고온처리구에서 항균성이 가장 높았다.
- 3) 항균성 효과는 그람음성균이 그람양성균에 비하여 높은 항균효과를 보였으며, 그람음성균의 경우에서도 균종에 따라 항균효과는 차이를 보였다.

마. 따라서, 제품화 레시피 개발방향 설정은 다음과 같다.

- 1) 액상제품 첨가형(액체첨가시, 분산효과보유 과립분말형), 타정형(섭이식)으로 레시피 구분개발하여야 할 것으로 판단되었다.
- 2) 결론적으로, NANA소재는 제품적용에 있어 항균성을 제외한 성상변화를 기준으로 평가한다면 액상보다는 고상제품에 보다 적합함을 확인하였다. 또한, 액상제품에 첨가후 멸균처리를 위한 열처리조건에서 NANA고유의 성상 및 물성변화가 예상되며, 냉장보관조건에서 30일 이내에 소진하는 조건을 반드시 준수하여야 할 것으로 판단되었다.

Table 1. 최초 NANA의 열처리 및 보관조건별 조성 및 10개월후 항균성 조사를 위한 열처리 조건

구분	비열처리 NANA시험구 [1%(w/w), 보관(상온, 저온)]		열처리 NANA시험구 [1%(w/w), 75℃~121℃, 보관(상온, 저온)]					
시험구	Fresh NANA(RT)	Fresh NANA(CT)	Heated NANA(75-RT)	Heated NANA(75-CT)	Heated NANA(90-RT)	Heated NANA(90-CT)	Heated NANA(121-RT)	Heated NANA(121-CT)
조성 내용	상온보관 (25℃)	저온보관 (5℃)	75℃(30분), 1회열처리후 상온보관(25℃)	75℃(30분), 1회열처리후 저온보관(5℃)	90℃(30분), 1회열처리후 상온보관(25℃)	90℃(30분), 1회열처리후 저온보관(5℃)	121℃(15분, 멸균조건), 1회열처리후 상온(25℃) 보관	121℃(15분, 멸균조건), 1회열처리후 저온보관(5℃)

Table 2. 1% (w/w) NANA의 온도별(75~121℃)처리후 보관조건(RT:상온, CT:냉장)시 장기(10개월) 보관에 따른 항균성 평가를 위한 실험디자인

실험구	실험조성	비고
control	생리식염수 950 μL+3종균 혼합배양액 50 μL	3종균혼합(cfu/ml): <i>E.coli</i> 0157:H7(2x10 ⁴)+ <i>E.sakazakii</i> (6.7x10 ⁴) + <i>B.cereus</i> (6.7x10 ⁴)
0.5%Fresh NANA(Oday)	생리식염수 700 μL+2% fresh NANA 250 μL+3종균 혼합배양액 50 μL	NANA 대조시험구
0.5%Fresh NANA(RT)	생리식염수 700 μL+1% fresh NANA 500 μL(상온보관)+3종균 혼합배양액 50 μL	1% fresh NANA(상온보관:090908~100701)
0.5%Heated-NANA(75-RT)	생리식염수 700 μL+1% Heated(75℃,상온보관)NANA 250 μL+3종균 혼합배양액 50 μL	1%fresh NANA 제조후 열처리(75℃,30분, 1회)후 상온보관관:090722~100701)
0.5%Heated-NANA(90-RT)	생리식염수 700 μL+1% Heated(95℃,상온보관) NANA 250 μL+3종균 혼합배양액 50 μL	1%fresh NANA 제조후 열처리(90℃,30분, 1회)후 상온보관관:090722~100701)
0.5%Heated-NANA(121-RT)	생리식염수 700 μL+1% Heated(121℃,상온보관) NANA 250 μL+3종균 혼합배양액 50 μL	1%fresh NANA 제조후 열처리(121℃,15분,1회)후 상온보관관:090721~100701)
0.5%Fresh NANA(CT)	생리식염수 700 μL+1% fresh NANA 500 μL(5℃냉온보관)+3종균 혼합배양액 50 μL	1%fresh NANA(5℃ 냉장보관:090908~100701)
0.5%Heated-NANA(75-CT)	생리식염수 700 μL+1% Heated(75℃, 5℃냉온보관)NANA 250 μL+3종균 혼합배양액 50 μL	1%fresh NANA 제조후 열처리(75℃,30분, 1회)후 NANA(5℃ 냉장보관(090722~100701)
0.5%Heated-NANA(90-CT)	생리식염수 700 μL+1% Heated(95℃, 5℃냉온보관) NANA 250 μL+3종균 혼합배양액 50 μL	1%fresh NANA 제조후 열처리(90℃,30분, 1회)후 NANA(5℃ 냉장보관(090722~100701)
0.5%Heated-NANA(121-CT)	생리식염수 700 μL+1% Heated(121℃, 5℃냉온보관) NANA 250 μL+3종균 혼합배양액 50 μL	1%fresh NANA 제조후 열처리(121℃,15분, 1회)후 NANA(5℃ 냉장보관(090721~100701)

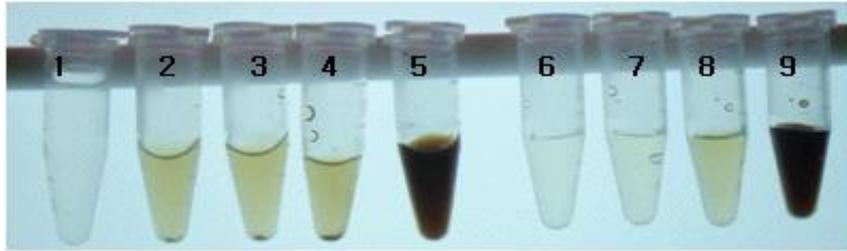


Fig 1. 동일농도(1%, w/w)로 조성된 NANA의 온도별 처리후, 장기 (10개월)보관에 따른 항균성 효과분석용 시료별 성상
1: Fresh NANA(0day), 2: Fresh NANA(RT), 3: Heated NANA(75-RT), 4: Heated NANA(90-RT), 5: Heated NANA(121-RT), 6: Fresh NANA(CT), 7: Heated NANA(75-CT), 8: Heated NANA(90-CT), 9: Heated NANA(121-CT)

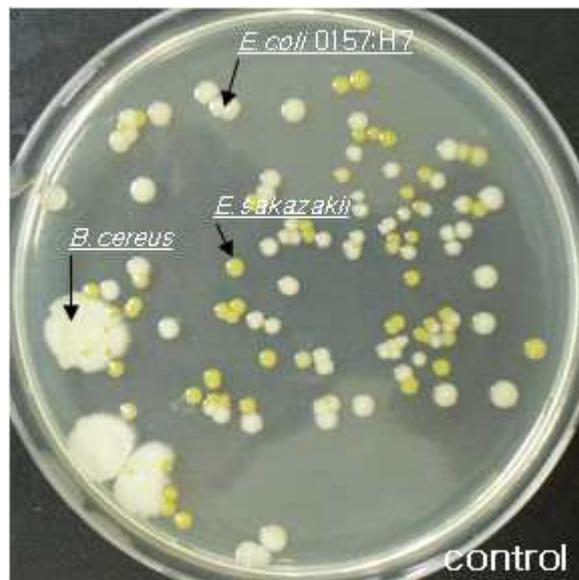


Fig 2. 공시균으로 적용된 3종 혼합(*E.sakazakii*, *B.cereus*, *E.coli* 0157:H7)균의 형태(TSA배지, 37℃,24시간 호기배양)
3종균 혼합조성 (cfu/ml): *E.coli* 0157:H7(6.7×10^7) + *E.sakazakii* (5.9×10^6) + *B.cereus*(1.5×10^3)

제 5 절 NANA소재의 사전안전성(Cell-line) 평가

1. 연구목적

NANA의 경우 식품첨가물(식약청, 기능성원료 및 식품 기준)로서 허가가 되어 있다 하더라도 안전성 평가는 필수항목이다. 따라서, 본 연구에서는 대량생산된 GMP에서 분리한 개발NANA(이하 G-NANA) 대해 합성NANA(이하S-NANA)를 통하여 동물안전성 평가전, 사전에 표준주를 사용하여 세포주들에 대해 세포독성이 있는 지를 관찰함으로써 사전 독성평가 기초자료를 확보하고, 동물실험간 투여량을 사전에 산정하고자 하였다.

염증(inflammation)은 외래의 자극원이나 다른 질병에 대한 생체의 방어 반응으로, 다양한 세포와 cytokine들이 관여하는 일련의 과정이다. 이러한 과정은 lipopolysaccharide(LPS)와 같은 외부 자극이나 arachidonic acid 대사물과 같은 내부 자극을 매개로 하여 대식세포(macrophage)나 과립구(granulocyte) 등의 염증 관련 세포들의 염증 부위로의 유입과 축적을 주요 특징으로 한다(Zamora *et al.*, 2000). 특히 활성화된 대식세포는 cytokine뿐만 아니라 nitric oxide(NO)나 prostaglandin E₂ (PGE₂)를 과도하게 생성하여 염증 과정에 큰 역할을 담당한다는 사실이 보고되고 있다(Higuchi *et al.*, 1990; Corbett와 MacDaniel, 1995).

대식세포는 숙주의 방어 및 항상성 유지에 중요한 역할을 하는 면역세포로서 염증반응 시에는 활성산소종 및 IL-6 등의 cytokine을 생산하여 감염 초기에 관여한다고 보고되고 있다. 특히 대식세포가 탐식된 이물질을 분해시킬 때 생성되는 NO는 숙주에 치명적인 결과를 초래할 수 있는 것으로 알려져 있다(Higuchi *et al.*, 1990; Corbett와 MacDaniel, 1995; MacDaniel *et al.*, 1996; Lee *et al.*, 2000).

NO는 NO synthase(NOS)에 의해 L-arginine으로부터 생합성되며, 신경전달, 혈액응고 및 혈압조절 등의 다양한 생리적 역할을 한다. 그러나 세포외 자극으로 활성화되어 inducible NOS(iNOS)에 의해 대량으로 합성된 NO는 대식세포의 cytotoxicity에 중추적인 역할을 할 뿐만 아니라 염증반응에 관여하여 조직의 손상, 유전자 변이 및 신경 손상, septic shock, 순환부전 등을 포함한 systemic한 damage를 유발하는 것으로 알려져 있다. TNF- α (Tumor Necrosis Factor- α)는 ‘중양괴사인자’로, 중양세포에 신호를 주어 자살하도록 만들거나, 그 밖에 바이러스의 세포 내 복제를 저해하기도 하고, 대식세포를 자극하기도 하며, 염증반응을 촉진하는 등, 내재면역반응(innate immune response)에 폭넓게 관여하는 신호분자입니다. 두 분자 모두 대식세포에 작

용하여 대식세포를 활성화시키며 염증반응을 유도한다.

Cyclooxygenase-2(COX-2) 역시 대식세포에서 발현되는 단백질로서 arachidonic acid로부터 PGE₂를 생합성하는데 관여하여 염증과 암 등의 각종 퇴행성 질환에 중요한 역할을 한다. 대표적인 염증성 cytokine인 interleukin-6(IL-6)는 염증반응을 매개하는 cytokine으로, B cell의 항체 생성을 촉진시키고 T cell의 분화를 유도하며(Garman *et al.*, 1987; Muraguchi *et al.*, 1988; Park *et al.*, 2007), 염증부위에서 항상 증가하는 것으로 보고되고 있다(Delgado *et al.*, 2003).

시알릭산(NANA, N-acetylneuraminic acid, 이하 NANA)은 세포막의 세포 표면에 있는 당단백질 또는 당지질의 구성성분으로 말단에 위치함으로써 다양한 생물학적인 기능을 발휘하는데, 최근의 활발한 연구로 인하여 여러 가지 생리적 기능이 해명되고 있다.

예를들면, 시알릭산은 포유동물의 생체 내에서 프락토스-6-포스페이트(fructose-6-phosphate)로부터 N-아세틸만노즈아민(N-acetylmannosamine)을 경유하여 합성된다. 이러한 NANA는 뇌의 ganglioside나 당단백질의 구성성분으로, 뇌나 중추신경계에 특히 많이 함유되어 있으며, 그 양이 유아기에 급격히 증가하기 때문에, NANA는 이러한 조직의 기능 발현이나 발달에 중요한 역할을 하는 것으로 생각되어진다.

바이러스나 세균 등의 감염은 점막 상피세포에 있는 당그룹에 바이러스나 세균이 결합함으로써 시작되는데, 병원성 대장균이나 콜레라균이 생산하는 독소는 소화관 상피세포에 NANA를 함유하는 당 그룹에 결합하여 설사를 일으킨다. 또한, 점액단백질(mucoprotein)의 불가결한 성분으로 인플루엔자 바이러스의 용혈작용을 저지하는 등 다양한 역할이 밝혀지고 있으며, 이외에 항암제의 개발, 독소성분의 중화작용, 항염증 작용 등의 기능이 보고 되고 있다.

본 연구에서는 잉여 유청의 GMP(4~5% NANA) 내에서 천연 NANA(이하 G-NANA)를 분리하여 대량생산시스템 구축하였고, 생산 G-NANA에 대해 안전성 및 기능이 보고되고 있는 항염증 메커니즘을 조사하고자 하였다.

따라서, 본 연구는 항균제로 연구되어지고 있지만, 아직까지 보고되지 않은 대식세포에 의해 수행되는 염증 면역반응에 관한 천연 NANA안전성과 더불어 조절 작용을 조사해 보고자 한다.

2. 연구수행 방법

가. 기기 및 시약

실험에 사용한 시약은 Dulbecco's RPMI-1640, penicillin-streptomycin, Dulbecco's phosphate buffered saline, sodium dodecyl sulfate (SDS), fetal bovine serum (FBS), trypsin은 Gibco Co. (Gibco BRL, Grand Island, NY, USA)에서 anti-mouse iNOS는 Santa Cruz에서 구입한 것을 사용하였다. Lipopolysaccharide (LPS), 항체, 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium (MTT)은 Sigma Co.에서 기타 시약은 cell culture용 및 1급 시약을 사용하였다.

사용기구는 culture flask (Nunc, Roskilde, Denmark), 24 well plate (BD, MA, USA), CO₂ incubator (Vision scientific Co.), inverted fluoromicroscope (Zeiss Co., AG, Deatschland), electrophoresis system (Bio-Rad, MA, USA), XAR-5 X-ray film (Kodak, Tokoy, Japan), microplate reader (Tecan, Maennedorf, Switzerland) 등을 사용하였다.

NANA소재 준비로서 S-NANA (Synthetic N-acylneuraminic acid, 이하 S-NANA)는 일본 Mrukin bio (Tokoy, Japan)사의 순도 98% 이상을 사용하였고, 개발 NANA (이하 G-NANA)는 매일유업(주)의 생산품을 사용하였다.

2. RAW264.7세포의 배양 및 NANA 처리

본 연구에 사용된 RAW264.7세포는 ATCC (Rockville, MD, USA) 분주 받아 사용하였으며, 90%의 RPMI-1640 (Gibco BRL, Grand Island, NY, USA)에 10% fetal bovine serum (FBS), 1%의 penicillin 및 streptomycin (Biofluids, Rockville, MD, USA)이 포함된 배지를 사용하여 배양하였다. S-NANA는 일본에서 구입하였으며, G-NANA는 매일유업(주) 개발 NANA를 사용하였고 Cho 등 (2008)의 방법에 준하여 처리하였다.

3. 세포생존도 측정

RAW264.7세포를 24 well plate에 3×10^5 cells/well이 되도록 분주한 다음, NANA를 농도별로 처리하여 세포의 생존도를 측정하였다. 37°C, 5% CO₂에서 24시간 동안 배양하였다. 24시간 후 세포에 0.5 mg/mL의 MTT용액 (Amresco, Ohio, USA)을 50 µL를 처리하고 3시간 동안 배양한 후, 배지를 제거하고 생성된 formazan crystal을 DMSO에 녹여 microplate reader를 이용하여 570 nm에서 흡광도를 측정하였다.

4. Nitric Oxide 생성량 분석

LPS에 의해 생성되는 NO의 양은 세포배양액에 존재하는 NO_2^- 의 형태로 Griess 시약을 이용하여 측정하였다. RAW264.7 세포를 1×10^5 cells/well이 되도록 24 well plate에 분주한 다음 NANA을 30분 전 처리하고, LPS 0.1 mg/mL를 $50 \mu\text{L}$ 씩 처리하여 24시간 동안 배양하였다. 배양 후 세포배양액과 Griess 시약을 각각 $100 \mu\text{L}$ 씩 혼합하여 37°C 에서 10분 동안 배양한 다음 micro plate reader를 이용하여 540 nm에서 흡광도를 측정하였으며, NO_2^- 의 농도는 NaNO_2 의 검량선에 의해 환산하였다.

5. RT-PCR법

mRNA 발현 정도를 전사수준에서 조사하기 위해 각 NANA를 일정시간 동안 처리하고 Trizol reagent를 사용하여 Total RNA를 First stands cDNA를 제조한 다음, 동량의 cDNA를 PCR로 증폭하였다. PCR amplification은 i-Master PCR kit(iNtRON, Seongnam, Korea)를 사용하여 각 실험군 cDNA와 표적단백질들의 sense 및 antisense primers, 대조군 GAPDH primer를 dNTP 250 mM, Tris-HCl(pH 8.3) 10 mM, KCl 50 mM, NaCl_2 1.5 mM를 포함한 i-master solution $20 \mu\text{L}$ 에서 시행하였다. PCR은 95°C 에서 45초간 denaturing, 55°C 에서 45초간 annealing 그리고 72°C 에서 1분간 extension하는 조건으로 시행하며, 총 30 cycles을 수행하였다. PCR로 증폭된 DNA는 1.5% agarose gel에서 전기영동하였고, 분획된 DNA band의 intensity를 측정하였다. 실험에 사용된 DNA primer의 서열은 Table 1에 정리되어 있다.

6. $\text{TNF-}\alpha$ 분비량 분석

$\text{TNF-}\alpha$ 를 측정하기 위하여 24 well plate에 RAW264.7 세포를 well당 5×10^5 개씩 분주하고, NANA을 농도 별로 처리하였다. 30분 뒤 LPS 0.1 mg/mL 처리한 다음, 24시간 동안 incubator에서 배양하였고, 배양액을 수거하여 -20°C 에서 보관하였다. $\text{TNF-}\alpha$ 는 ELISA Kit(R&D bio, CA, USA)의 manufacturer's instruction에 따라 측정하였다.

7. Immunoblot Analysis

포집된 세포는 40 mM Tris-HCl, 10 mM EDTA, 1 mM dithiothreitol, 120 mM NaCl, 1 mM PMSF, 1 mM NaF, 0.1% nonidet P-40, 1 mM Na_3VO_4 , P_1 cocktail이 포함된 lysis buffer에 4에서 1시간 동안 반응시킨 다음 sample buffer와 혼합하여 100°C 에서 3분 동안 가열하여 단백질 변성을 유도하였다. 완성된 cell

lysate는 10% SDS-polyacrylamide gel을 이용하여 전기영동한 다음 분리된 gel의 단백질은 nitrocellulose membrane으로 electroblotting에 의해 transfer하였고, membrane은 5% skim milk에 반응시켜 비특이적 단백질을 blocking 하였다. 일차 항체를 skim milk에 각각 1:500으로 희석하고, 2시간 동안 각각 항원 항체 반응을 시킨 다음 5분 간 3번 PBS-T로 씻어내고, 이차 항체인 antimouse IgG, anti-rabbit IgG conjugated HRP를 1시간 30분 동안 반응시킨 후 ECL kit를 사용하여 X-ray film에 감광시켜 발현된 단백질의 양을 분석하였다.

8. 통계처리

실험결과는 SAS program을 이용하여 통계분석하고(SAS, 1999), 실험군 간의 유의성은 ANOVA로 검증한 후 Duncan's multiple range test로 비교 분석하여(Duncan, 1955) 평균치와 표준편차로 나타내고 5% 수준에서 유의성을 표시하였다.

3. 연구수행결과

가. 세포독성평가 결과

MTT assay는 세포의 증식을 측정하기 위한 실험실 시험법으로써 준 비색분석법(standard colorimetric assay)이라고 할 수 있다. 생명과학분야에서 세포의 증식을 정확하고 신속하게 결정할 수 있는 방법은 기본적 기술이다.

일반적으로 hemocytometer를 이용하여 생존세포수를 세거나 광학밀도(optical density)를 측정하는 방법이 사용되지만 많은 양을 측정 시 시간과 노력이 필요이상으로 요구되고 부정확한 결과를 가져올 수 있다. 이를 대체하기 위해 개발된 MTT assay는 살아있는 세포의 미토콘드리아 탈수소 효소작용(dehydrogenases)에 의하여 노란색의 수용성 기질인 MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl-tetrazolium bromide, Thiazolyl Blue Tetrazolium Bromide)를 자주색을 띄는 비수용성의 MTT-formazan 결정으로 환원시키는 미토콘드리아의 능력을 이용하는 검사법으로써 신속하고 정확하게 많은 양의 세포 증식거동을 측정할 수 있다.

자주색 결정은 DMSO에 용해되고 흡광도(Optical Density)는 540nm의 파장에서 최대가 되며, 이 파장에서 측정된 흡광도는 살아있는 세포의 수와 직선적인 상관관계를 나타내게 된다. 이를 통해 S-NANA 및 G-NANA가 세포들에 대해 세포독성이 있는지를 관찰하기 위하여 MTT assay를 실시하였다.

NANA의 실험 농도는 0, 0.05, 0.1, 0.25, 0.5, 0.75% 이었고 측정 시간은 24시간 이었다. S-NANA 및 G-NANA 모두 0.25% 농도까지는 세포 독성이 관찰되지 않았다. 하지만, 두 세포 모두 0.25% 농도 이상에서는 세포생존도가 감소되는 관찰할 수 있었다(Fig 1, P<0.05).

나. 염증관련 인자 NO (Nitric oxide) 측정 결과

Nitric oxide(이하, NO)는 염증 반응이 유발될 경우 분비 되어지는 대표적인 염증성 물질이다. 실험에 사용되어진 LPS 대표적인 염증 유발 물질로서 NO 생성을 유발시킨다.

본 연구에서는 MTTassay법과 동일 조건으로 S-NANA 및 G-NANA를 RAW 세포에 처리하고 24시간 배양 후 NO생성량을 관찰한 결과, NANA소재 전체에서 0.25%에서부터 NO가 감소되는 경향을 보였으나, MTT결과와 연결하여 본 결과 0.25%이상의 농도에서는 세포독성을 보여 NO가 생성되지 않은 것임을 알 수 있었다(Fig 1, P<0.05).

이에 본 연구에서는 대표적 염증억제 물질로 사용되고 있는 AG490과 교차실험을 실시하였으며, AG490 대비 합성 NANA 및 G-NANA에서도 항염증 효과를 보인다고 관찰할 수 있었다(Fig 2, P<0.01).

다. 면역 관련(TNF- α) 인자 측정 결과

TNF- α 는 염증 유발 시 생성되어 여러 세포들을 자극하여 염증성 Cytokine을 분비시키는 대표적인 염증성 물질이다. 실험에 사용되어진 LPS 대표적인 염증 유발 물질로서 TNF- α 생성을 12시간째에 유발시켰더니, 합성 NANA 및 G-NANA 모두 TNF- α 생성량을 감소시켰다(Fig 3, P<0.05).

특히, G-NANA의 경우는 0.25%농도에서 합성NANA에 대비해 TNF- α 억제능에 효과적이었으며 대조 대비 30%에 가까운 억제 효과를 보여 NO억제 효과 외에 세포내 억제 기전을 통한 항염증 효과를 나타내는 것으로 사료되어 염증 전구물질들의 전사활성에 NANA가 어떠한 영향을 미치는지 알아보고 저 RT-PCR법과 Immunobloting법을 이용하여 결과를 연계하고자 하였다.

라. 전사인자 측정결과

Reverse transcription PCR법은 RNA level 에서 특정 gene 의 expression level 을 확인하고자 할 때 주로 쓰이며, 전사인자의 활성을 파악하는데도 많이 쓰이는 분석

법이다(Fig 4).

본 연구에서는 mRNA Level에서의 iNOS, TNF- α , COX-2를 분석하였으며 primer는 Table 1과 같다. 합성 NANA 및 G-NANA 모두 mRNA 수준에서 iNOS와 COX-2의 억제 효과를 보이며 특히 NO생성 전구체인 iNOS를 강력하게 억제시키는 것으로 보아 다음으로 iNOS 타겟 신호전달과정을 Immunoblotting으로 확인하였다(P<0.05).

마. 염증관련 cell signal pathway(Immunoblotting) 사전평가 결과.

본 연구에서는 G-NANA와 S-NANA 처리시 LPS에 의해 인산화 되고 활성화 되는 Table 적 단백질 발현에 G-NANA와 S-NANA가 미치는 효과를 알아보기 위하여 핵 내 단백질과 세포 내 염증에 영향을 미치는 단백질들을 Immunoblot analysis을 통해 확인하였다.

결과로서, S-NANA의 경우 핵 내 단백질 발현에 아무런 영향을 주지 않는 것을 확인할 수 있었는데, G-NANA의 경우 염증 신호전달에 주요 경로인 MAPK Kinase중 LPS에 의해 활성화 되는 c-Fos와 c-JUN을 강력하게 억제하는 것을 확인하였다((Table1, Fig 6.).

이를 확인하여 보기 위하여, RAW 264.7세포에 NANA를 처리하고, LPS 0.1 mg/ml로 처리하여 5분, 15분, 30분 및 90분간 배양하여 whole lysate 얻어 LPS에 의해 나타나는 신호경로에 대한 대표 표적 단백질들에 대한 실험을 실시하였다.

결과로서, Fig. 6.과같이 Whole lysate에서도 합성 NANA의 경우는 단백질 발현을 저해하지 않는 것을 확인할 수 있었는데, 반면에 G-NANA의 경우 c-Fos와 c-JUN의 상위단백질인 JNK의 활성을 억제하는 것으로 알 수 있었다.

결과적으로 G-NANA와 S-NANA는 모두 쥐의 복강 대식세포 모델에서 LPS에 의해 생성된 NO를 유의적으로 억제하였으며, 이는 iNOS 발현의 감소에서 기인함을 확인하였다. G-NANA와 S-NANA는 TNF- α 의 발현 역시 농도 의존적으로 감소시켰으며, 더욱이 G-NANA는 단백질 수준에서 MAPK Kinase를 억제함을 보였다(P<0.05).

바. 종합결론

본 연구에서 개발NANA(G-NANA) 대비 합성NANA(S-NANA)의 항염증 활성 및 안전성을 알아보기 위해 쥐의 복강 대식세포주인 RAW264.7 세포를 LPS로 활성화시킨 후 세포독성 그리고 NO의 생성량 및 iNOS와 COX-2의 발현량, TNF- α 분비량

에 G-NANA 와 S-NANA가 미치는 영향을 살펴보았다.

표준주에 대하여, NANA소재는 0.25%농도 이상에서는 세포생존도가 감소되는 관찰할 수 있었다($P < 0.05$, Fig).

G-NANA 와 S-NANA은 LPS에 의해 생성된 NO를 농도 의존적으로 감소 시켰으며, 이는 NANA로 기인된 세포독성은 아님을 확인하였다.

우유유래 GMP에서 분리한 천연 G-NANA가 합성으로 만들어진 NANA에 비해 안정성이 뛰어난 것을 확인할 수 있었으며, NANA에 의해 iNOS, TNF- α 와 COX-2의 발현량 역시 억제되는 것을 확인 하였고, 염증성 cytokine인 TNF- α 를 효과적으로 억제 하였다($P < 0.05$).

결과를 종합해 NANA소재 공히 항염증 효과를 나타내는 것을 확인함과 동시에 G-NANA가 S-NANA에 비해 LPS에 의해 유발 되어지는 메커니즘에 MAPK 신호전달과정을 조절하여 항염증 효과를 나타내는 것이 우수하다는 것을 확인하였다 ($P < 0.05$, Fig. 6).

이러한 결과로 보아, 실험실적 조건에서는 0.25%까지 농도에서 NANA는 안전함과 동시에 항염증 활성을 가지고 있음을 기초로 동물검정을 거쳐 농도별 및 섭취기간별 안전성 결과가 추가적으로 확인된다면, 천연항균제로서 뿐만 아니라 추후 염증성 질환의 예방 또는 치료 등 관련연구에서도 유용하게 사용될 수 있을 것으로 사료되었다.

따라서, 실험실적 안전성 평가를 기초로, 동물임상시 NANA의 사료첨가량은 0.5%를 기준으로 저농도 처리구는 0.1%, 고농도 처리구는 1%로 설정하여 동물임상평가를 실시할 예정이다.

Table 1. PCR primers used in this experiment.

Name		Sequence (5' to 3')
Real-time PCR		
iNOS	F	GGA GCC TTT AGA CCT CAA CAG A
	R	TGA ACG AGG AGG GTG GTG
TNF- α	F	TGC CTA TGT CTC AGC CTC TTC
	R	GAG GCC ATT TGG GAA CTT CT
IL-6	F	TCC AAG AAA GGA CGA ACA TTC G
	R	TGA GGA CAT CTC CCA CGT CAA
GAPDH	F	CAA TGA ATA CGG CTA CAG CAA C
	R	AGG GAG ATG CTC AGT GTT GG

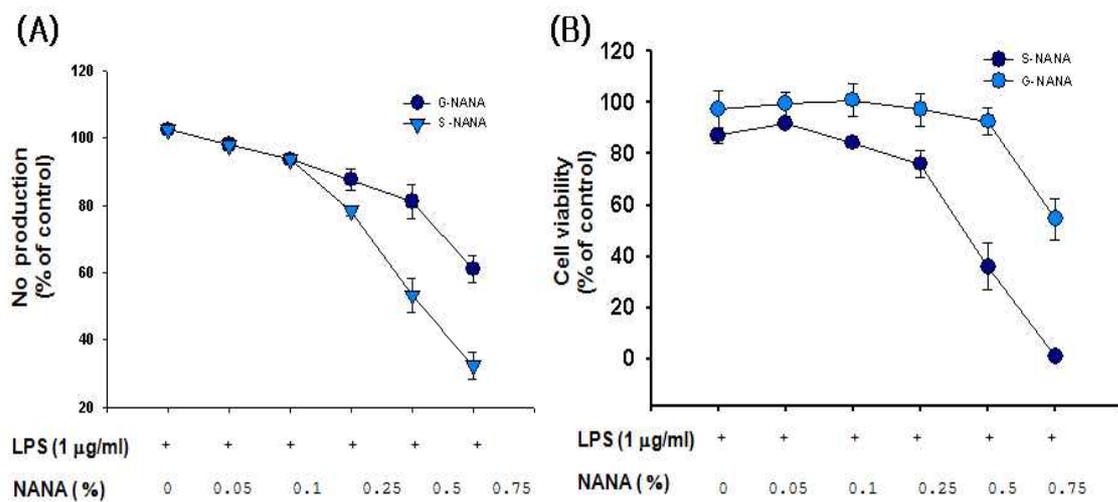


Fig. 1. LPS에 의해 유도되는 염증 및 독성에 대한 NANA의 억제효과 평가결과 .

(A) LPS (1 mg /ml) 에 의해 유도되는 RAW264.7 cells에서 개발NANA(G-NANA) 및 합성 NANA(S-NANA)의 NO억제능 평가. (B) MTT assay법을 이용한 G-NANA 및 S-NANA의 독성 평가.

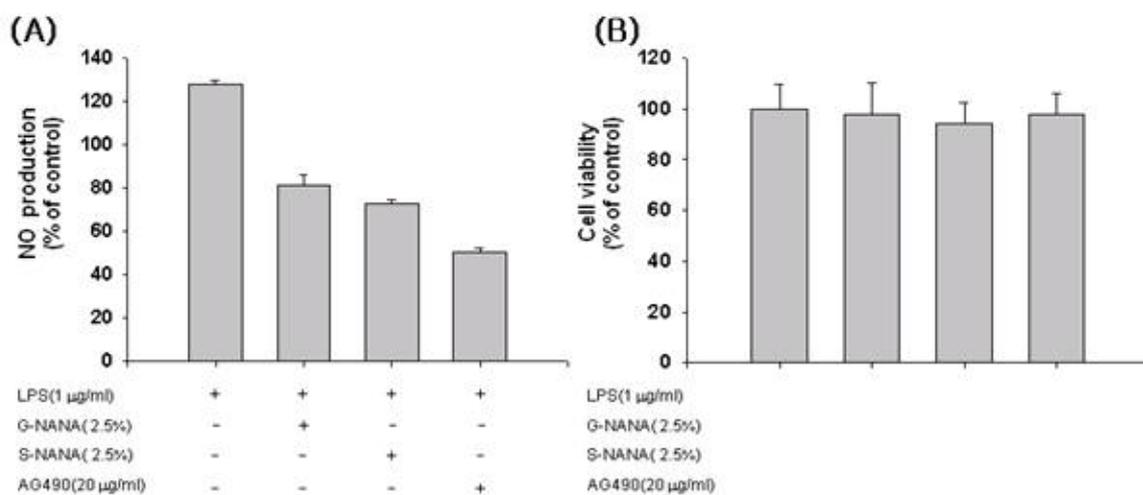


Fig. 2. LPS에 의해 유도되는 염증 및 독성에 대한 AG490 대비 NANA소재별 억제효과
 (A) LPS (1 mg/ml)에 의해 유도되는 RAW264.7 cells에서 개발NANA(G-NANA)와 합성 NANA(S-NANA)의 NO억제능 평가. (B) MTT assay법을 이용한 G-NANA 및 S-NANA의 독성 평가.

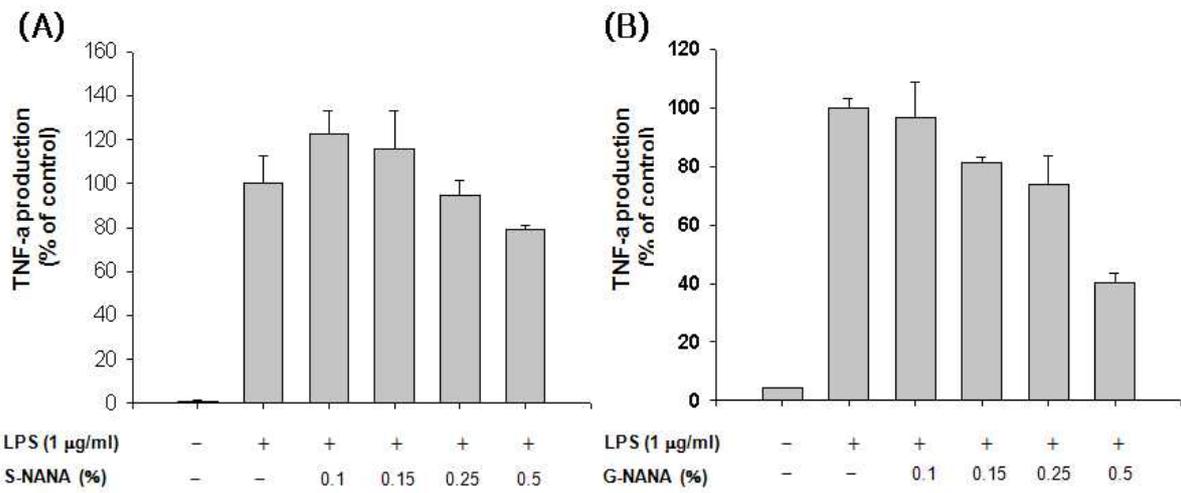


Fig. 3. 농도별 조성된 NANA소재별 RAW 264.7 세포에서 ELISA assay를 통한 TNF- α 분비조절능 평가 결과.

(A) 합성NANA(S-NANA)의 TNF- α 억제능 평가. (B) 개발NANA(G-NANA)의 TNF- α 억제능 평가.

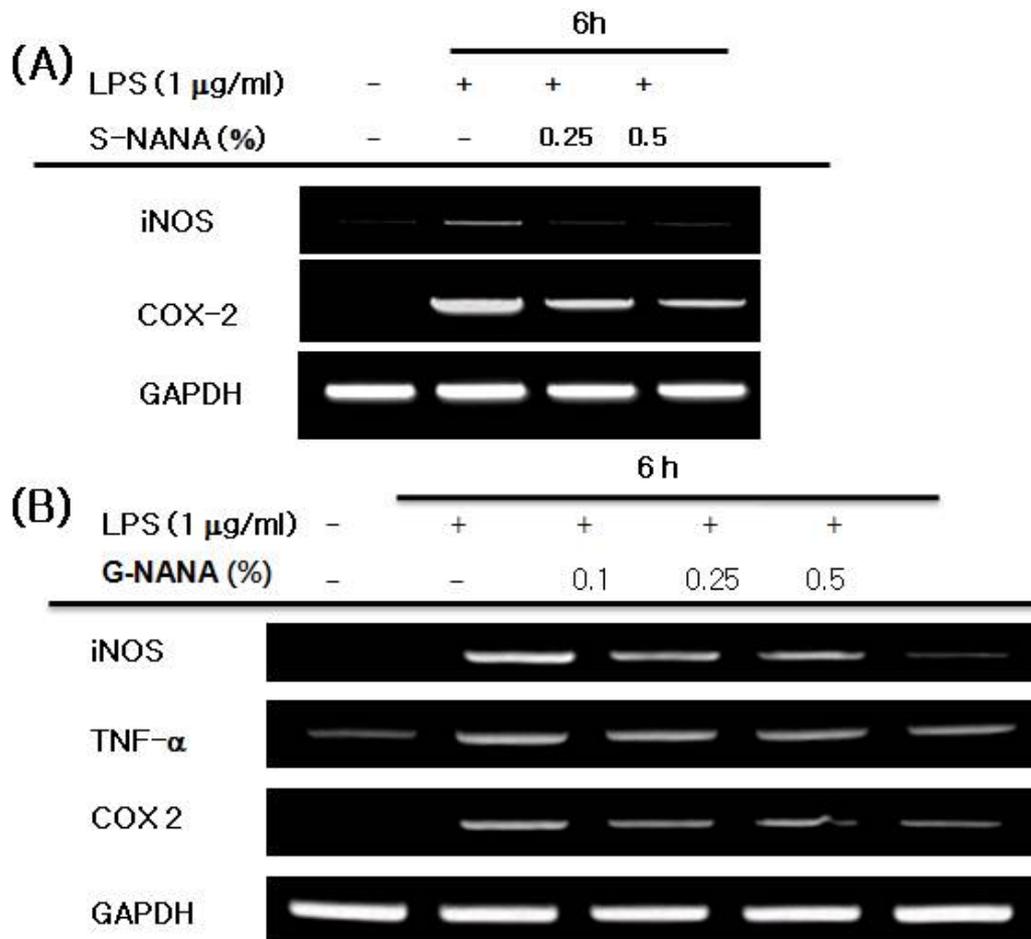


Fig. 4. RAW264.7 세포에서 RT-PCR법을 이용한 염증 전구물질에 대한 NANA의 농도 별 항염증 효과 평가결과

(A) 합성NANA(S-NANA)의 TNF- α 억제능 평가. (B) 개발NANA(G-NANA)의 TNF- α 억제능 평가. (A) 합성NANA(S-NANA)의 전사인자 억제능 평가. (B) 개발NANA(G-NANA)의 전사인자 억제능 평가.

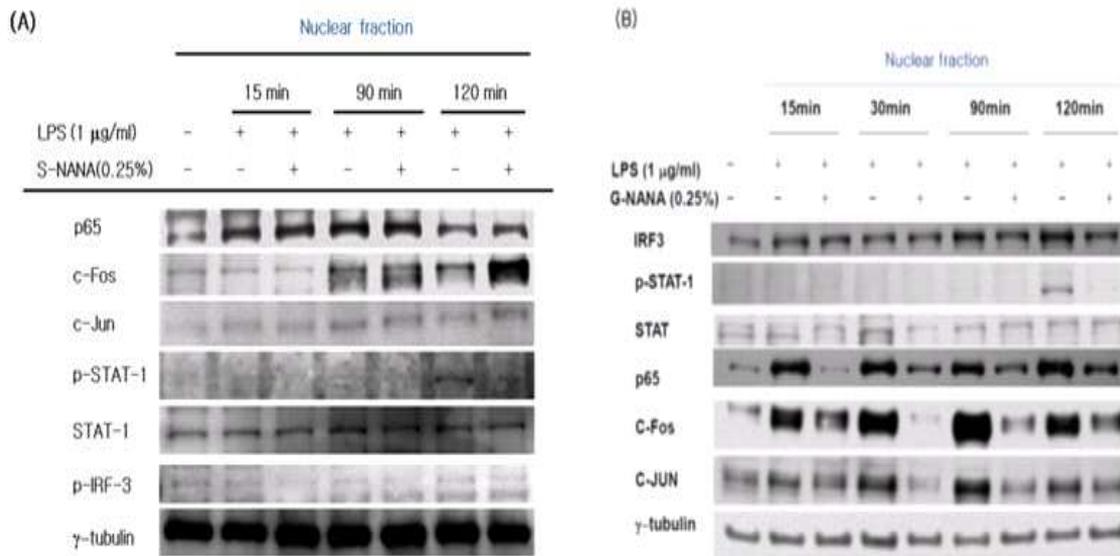


Fig. 5. immunoblotting을 통한 핵내 전사인자들에 대한 동침농도(0.25%, w/w)로 처리한 NANA별 (합성: S-NANA, 개발: G-NANA)의 평가결과(A-B)

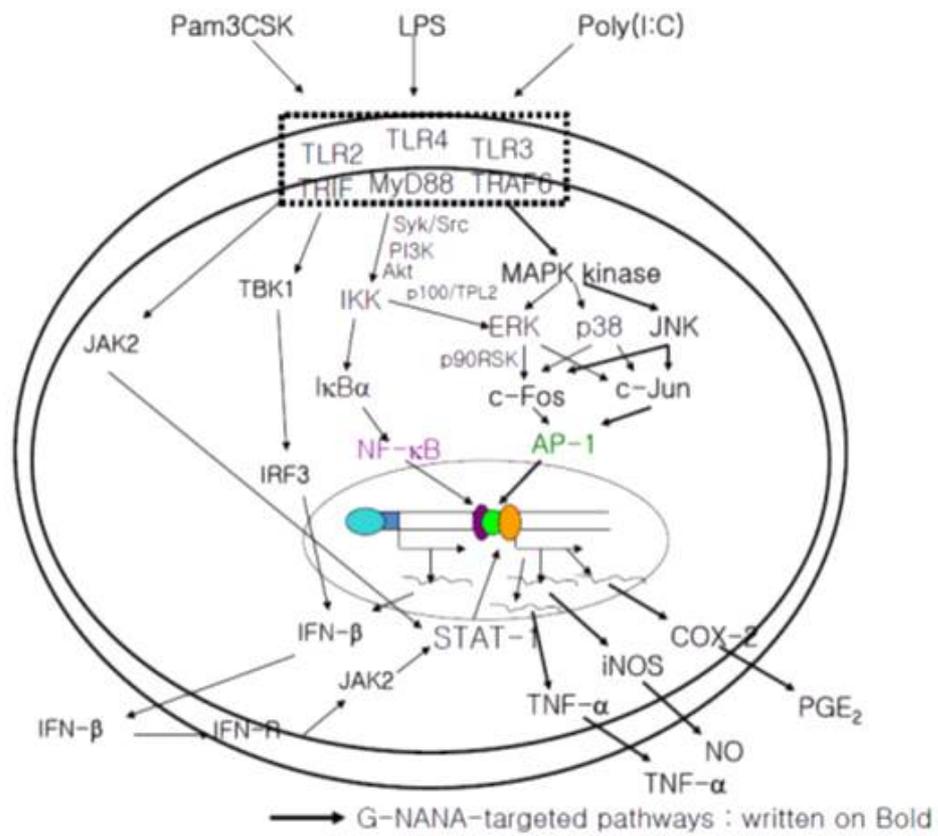


Fig. 6. NANA소재의 함염증 메카니즘

제 6-1절 동물임상 평가(일정별 사료섭취량과 일일성장률)

1. 연구목적

세계 재조합 단백질 의약품의 판매액 기준(2001~2005) 상위 10위 제품들을 살펴볼 때 대부분이 당단백질로, 당단백질의 당사슬 구조 리모델링을 통하여 효능 및 안전성 극대화와 면역반응 등의 부작용을 최소화하기 위한 글라이코믹스 기술개발은 향후 바이오제품 개발 성패의 큰 부분을 차지할 것으로 기대된다.

당단백질은 일반적으로 당화에 따른 치료능 및 치료효과 증가와 많은 양을 투여할 수 있게 되는 장점이 있다. 이에 영유아 식품 내 병원성세균 사멸형 NANA소재의 개발목적으로 2차년도 까지 대량생산기술 개발, 제품적용 레시피 정립이 확립하였다. 또한 NANA소재의 특징은 미생물(*E. coli* 0157, *S. aureus*, *B. cereus*)의 membrane에 직접적으로 lysis 또는 damage를 주지 않으면서 항균작용에 탁월함을 확인하였다. 또한 개발NANA가 표준주(HEK293 cell 및 RAW 264.7 cell)에 대한 독성평가 결과 NANA 0.1%~0.5%에서 독성이 관찰 되지 않은 것을 확인하였다. 이에 NANA의 항균성 및 표준주의 대한 사전 안정성 평가결과를 기준으로 동물섭이를 통한 안전성 평가를 수행이 요구되어진다.

그러므로, 실험동물의 성장기 및 NANA소재 처리농도별로 단계를 구분하고 동물 임상 검정을 기초로 합성NANA 및 개발NANA를 비교하여 장단기 섭취시 안전성, 체내 미네랄의 변화 및 미생물의 분포변화의 결과를 토대로 영유아 식품 내 병원성 세균 사멸형 NANA소재의 개발 확립 및 실용화(제품화)에 최종 목적을 두었다.

2. 연구 내용 및 방법

가. 실험 설계와 동물사육

본 시험에서는 갓 이유한 3주령의 특정병원체 부재(specific pathogen free)수컷 ICR 마우스(대한바이오링크(주)) 81마리를 실험 조건을 일정하게 하기 위해 10일간 정상식으로 순화 적응시킨 후 건강한 동물을 3마리씩 7군(대조구;1군, 실험구;6군)으로 임의 배치하여 사용하였다.

NANA 동물임상평가를 위한 사료 레시피는 AIN-76A를 기본으로 하여 1kg 당 NANA(100% 순도 기준)는 1g(NANA-L(low) 처리구), 5g(NANA-M(medium) 처리구) 및 10g(NANA-H(high) 처리구)로 혼합 조성하였다(Table 1.) 실험식이와 식수

는 자유 급여법으로 급여하였다. 실험 동물 사육실 환경은 온도 $22\pm 2^{\circ}\text{C}$, 상대습도 $55\pm 10\%$ 로 유지 하였으며 명암은 12시간 주기(light : 06:00~18:00)로 조절하였다.

나. 체중과 사료섭취량 측정

시험에 사용된 모든 동물에 대하여 일일단위로 13시~15시 사이에 체중 및 사료섭취량을 측정하였다.

다. 통계처리

실험결과는 SAS program을 이용하여 통계분석하고(SAS,1999), 실험군 간의 유의성은 ANOVA로 검증한 후 Duncan`s multiple range test로 비교 분석하여(Duncan,1955) 평균치와 표준편차로 나타내고 5% 수준에서 유의성을 표시하였다.

3. 연구수행결과

NANA소재를 혼합한 사료가 마우스가 장단기 섭이 시 마우스의 체중 및 일일섭취량을 AIN-76A 식이만 섭취한 마우스와 비교함으로써 NANA소재에 대한 안정성을 확인하여 보았다(Table 2., Table 3.)

결과로서, 사료는 NANA소재의 농도(L;0.1%, M;0.5% 및 H;1%)에 따라 나누워서 제작을 하여 장단기로 나누워 일일섭취량과 체중량을 확인하여보았다. 우선 초기(0주)의 대조구의 체중량(22.7g) 및 일일섭취량(4.8g)과 실험구(NANA)와는 유의적인 차이를 확인할 수 없었다. 그렇다면 장단기(4주, 8주 및 13주)의 체중량과 일일섭취량을 확인해 보았다. 8주 결과를 기준으로 마우스의 체중량과 일일섭취량을 비교하여 보았더니, 대조구의 체중량(36.4g) 및 일일섭취량(6.6g)이며, 이에 비해 실험구의 체중량은 유의적인 차이가 없었으나 일일섭취량은 23%~36% 감소하였다. 다른 기간의 체중량과 일일섭취량은 8주의 경우와 같은 경향을 보였다.

결론으로, NANA소재를 혼합한 사료의 일일섭취량은 대조군에 비해 감소하여 NANA소재 섭취에 대한 약간의 거부감이 나타나지만, 체중량은 유의적인 차이가 없는 것으로 보아 마우스 성장에는 부정적인 영향은 미치지 않는 것으로 판단되었다.

Table 1. 합성NANA(SNANA, 대조) 대비 개발NANA(GNANA)의 농도별 사료조성내역

시험구	사료제조시 NANA첨가량(mg/사료 1Kg, AIN-76A Diet)					비고
	0일 (Starter)	4주후	8주후	13주	소계	
진행일정	11. 01.02. (입식, 순치)	'12.01.09. (1차부검)	'12.02.03. (2차부검)	'12.02.31. (3차부검)	13주	
Control	사료 1Kg(AIN-76A Diet)+NANA 무첨가					
SNANA	SNANA(L)	사료 1Kg(AIN-76A Diet)+합성NANA (순도 99%이상) 1g첨가				합성 NANA
	SNANA(M)	사료 1Kg(AIN-76A Diet)+합성NANA(순도 99%이상) 5g첨가				
	SNANA(H)	사료 1Kg(AIN-76A Diet)+합성NANA(순도 99%이상) 10g첨가				
GNANA	GNANA(L)	사료 1Kg(AIN-76A Diet)+개발 GNANA (순도 20%) 2.5g첨가				개발 NANA
	GNANA(M)	사료 1Kg(AIN-76A Diet)+개발 GNANA (순도 20%) 12.5g첨가				
	GNANA(H)	사료 1Kg(AIN-76A Diet)+개발 GNANA (순도 20%) 25g첨가				

Table 2. 개발 NANA(비교구: Ca) 첨가사료를 단기(10일) 섭이에 따른 일당성장률 및 사료효율 조사결과

시�험구	0일		1일경과		2일경과		3일경과		4일경과		5일경과		6일경과		7일경과		8일경과		9일경과		10일경과		
	Weight (g)	Incest (g)																					
Control	20.8	4.7	21.4	4.8	22.0	4.7	22.9	4.9	23.4	5.1	24.0	4.7	24.5	4.7	25.2	4.9	26.1	5.0	26.2	4.8	26.8	5.0	
Ca	CaCNTL-L	20.6	4.6	21.2	4.8	21.7	4.6	22.3	4.5	22.9	4.6	23.2	4.6	23.8	4.4	24.5	4.5	24.9	4.3	25.9	4.8	26.9	4.6
	CaCNTL-M	18.8	4.6	20.1	4.6	20.6	5.0	21.2	4.6	21.8	4.8	22.5	4.8	23.4	4.7	24.6	4.7	25.0	4.1	26.6	4.5	27.5	4.7
	CaCNTL-H	18.9	4.7	19.3	4.3	19.9	4.2	20.2	4.4	21.0	4.5	21.3	4.4	21.9	4.4	22.8	4.3	24.7	4.5	24.9	4.2	26.0	4.6
NANA	SNANA-L	20.6	4.3	20.8	4.9	21.1	4.8	21.6	4.9	21.9	4.7	23.0	4.9	23.1	4.6	24.6	4.5	24.9	4.8	25.7	4.9	26.8	4.6
	SNANA-M	20.2	4.7	20.5	4.8	22.4	4.6	22.4	4.6	22.7	4.6	22.9	4.7	23.9	4.6	24.7	4.7	25.2	4.7	26.7	4.3	27.4	4.5
	SNANA-H	20.9	4.8	21.3	4.7	21.7	4.6	22.0	4.7	22.3	4.3	22.8	4.8	23.6	4.7	24.7	4.7	25.0	4.3	26.3	4.3	27.7	4.8
	GNANA-L	20.1	4.7	20.8	4.7	21.4	4.7	22.2	4.3	22.4	4.9	22.7	4.6	22.8	4.7	23.8	4.3	24.2	4.4	25.7	4.8	26.9	4.5
	GNANA-M	20.4	4.6	20.8	4.5	21.7	4.7	22.2	4.9	22.7	4.8	23.3	4.9	24.3	4.7	25.2	4.5	25.2	4.5	25.9	4.4	26.8	4.4
	GNANA-H	19.2	4.6	20.5	4.3	20.6	4.3	21.1	4.7	21.3	4.6	21.6	4.8	22.7	4.6	23.6	4.3	24.7	4.5	25.9	4.5	26.6	4.3

Control:사료 1Kg(AIN-76A Diet)+무첨가, Ca-CNTL(L) :AIN-76A Diet+CaCl2(무수) 3.5g, Ca-CNTL(M):AIN-76A Diet+CaCl2(무수6.5g,Ca-CNTL(H):AIN-76A Diet+CaCl2(무수) 13g

Table 3. 개발 NANA(비교구 : Ca) 첨가사료를 장단기(35일 경과) 섭이에 따른 안전성(성장률 및 사료효율) 조사결과

시험구	0일		5일경과		15일경과		25일경과		35일경과		
	Weight(g)	Ingest(g)									
Control	20.8±0.65	4.7±0.32	24±0.58	4.7±0.22	29.3±34	4.5±0.29	32.7±0.45	4.8±0.29	33.4±1.22	5.4±0.65	
Ca	CaCNTL-L	20.6	4.6	23.2	4.6	29.3	4.3	32	3.9	33.7	4.7
	CaCNTL-M	18.8	4.6	22.5	4.8	30	4.3	30.5	4.5	32.4	5.5
	CaCNTL-H	18.9	4.7	21.3	4.4	29.1	4.2	31.5	4.2	32.2	4.6
NANA	SNANA-L	20.6	4.3	23	4.9	30	3.9	32.5	3.3	33.8	4.6
	SNANA-M	20.2	4.7	22.9	4.7	30.9	4.2	30.4	3.1	33.2	4.7
	SNANA-H	20.9	4.8	22.8	4.8	30.4	4.1	32.5	3.6	35.6	5
	GNANA-L	20.1	4.7	22.7	4.6	30.5	3.7	31.7	3.5	33.7	4.9
	GNANA-M	20.4	4.6	23.3	4.9	30.4	4.2	33.1	3.1	34.2	4.8
	GNANA-H	19.2	4.6	21.6	4.8	29.8	4	33.1	4	35.4	5.1

Control:사료 1Kg(AIN-76A Diet)+무첨가, Ca-CNTL(L) :AIN-76A Diet+CaCl2(무수) 3.5g, Ca-CNTL(M):AIN-76A Diet+CaCl2(무수)6.5g,Ca-CNTL(H):AIN-76A Diet+CaCl2(무수) 13g

Table 4. 마우스를 대상으로 농도별 조성된 NANA제제의 장기섭이가 성장 및 사료섭취량에 미치는 영향조사

시험구		갈습 및 NANA제제 섭취에 따른 성장(weight, g) 및 사료섭취량(Ingest, g) 조사 (mean±SD)							
		0주		4주		8주		13주	
		Weight	Ingest	Weight	Ingest	Weight	Ingest	Weight	Ingest
Control		22.7±1.4	4.8±0.2	33.0±0.4	5.4±0.4	36.4±0.7	6.6±1.4	37.3±0.2	6.5±0.2
Ca	CaCNTL-L	22.2±1.1	4.6±0.1	33.2±0.4	3.9±0.4	37.3±0.3	4.6±0.4	38.2±0.1	5.2±0.1
	CaCNTL-M	21.2±1.5	4.7±0.1	32.4±0.8	4.6±0.3	35.4±1.0	5.1±0.4	38.2±0.2	5.3±0.2
	CaCNTL-H	20.4±1.1	4.4±0.2	32.6±0.4	4.1±0.4	34.3±1.0	4.2±1.0	36.3±0.5	5.0±0.5
NANA	SNANA-L	21.7±1.0	4.7±0.2	33.0±0.3	4.2±0.2	36.2±1.5	4.7±0.6	36.7±0.2	4.8±0.2
	SNANA-M	22.2±1.3	4.6±0.1	32.3±0.9	4.1±0.6	37.0±0.6	4.8±0.8	38.9±0.1	5.1±0.1
	SNANA-H	22.1±0.9	4.7±0.2	34.5±0.6	4.2±0.2	38.0±1.0	4.8±0.8	38.6±0.2	5.1±0.2
	GNANA-L	21.8±1.0	4.7±0.2	32.7±0.5	4.5±0.4	36.6±0.6	4.8±0.3	37.8±0.4	5.3±0.4
	GNANA-M	22.2±1.4	4.7±0.7	33.6±0.6	4.4±0.2	36.6±0.5	4.6±0.4	38.0±0.2	5.1±0.2
	GNANA-H	21.0±1.1	4.6±0.2	34.5±0.5	4.2±0.4	37.7±0.7	4.7±0.4	39.2±0.2	4.8±0.2

Control:사료 1Kg(AIN-76A Diet)+무첨가, Ca-CNTL(L) :AIN-76A Diet+CaCl2(무수) 3.5g, Ca-CNTL(M):AIN-76A Diet+CaCl2(무수6.5g,Ca-CNTL(H):AIN-76A Diet+CaCl2(무수) 13g

제 6-2절 동물임상 평가(생체중 및 기관별 무게변화)

1. 연구목적

세계 재조합 단백질 의약품의 판매액 기준(2001~2005) 상위 10위 제품들을 살펴 볼 때 대부분이 당단백질로, 당단백질의 당사슬 구조 리모델링을 통하여 효능 및 안전성 극대화 및 면역반응 등의 부작용을 최소화하기 위한 글라이코믹스 기술개발은 향후 바이오 제품 개발 성패의 큰 부분을 차지할 것으로 기대된다.

당단백질은 일반적으로 당화에 따른 치료능 및 치료효과 증가와 많은 양을 투여할 수 있게 되는 장점이 있다. 이에 영유아식품내 병원성세균 사멸형 NANA소재의 개발목적으로 2차년도 까지 대량생산기술 개발, 제품적용 레시피 정립이 확립하였다. 또한 NANA소재의 특징은 미생물(*E. coli* 0157, *S. aureus*, *B. cereus*)의 membrane에 직접적으로 lysis 또는 damage를 주지 않으면서 항균작용에 탁월함을 확인하였다. 또한 개발NANA가 표준주(HEK293 cell 및 RAW 264.7 cell)에 대한 독성평가 결과 NANA 0.1%~0.5%에서 독성이 관찰 되지 않은 것을 확인하였다. 이에 NANA의 항균성 및 표준주의 대한 사전 안정성 평가결과를 기준으로 동물섭이를 통한 안전성 평가를 수행이 요구되어진다.

그러므로, 실험동물의 성장기 및 NANA소재 처리농도별로 단계를 구분하고 동물 임상 검정을 기초로 합성NANA 및 개발NANA를 비교하여 장단기 섭취시 안전성, 체내 미네랄의 변화 및 미생물의 분포변화의 결과를 토대로 영유아식품 내 병원성 세균 사멸형 NANA소재의 개발 확립 및 실용화(제품화)에 최종 목적을 두었다.

2. 연구수행방법

가. 실험 설계와 동물사육

본 시험에서는 갓 이유한 3주령의 특정병원체 부재(specific pathogen free)수컷 ICR 마우스(대한바이오링크(주)) 81마리를 실험 조건을 일정하게 하기 위해 10일간 정상식이로 순화 적응시킨 후 건강한 동물을 3마리씩 7군(대조구;1군, 실험구;6군으로 임의 배치하여 사용하였다.

NANA 동물임상평가를 위한 사료 레시피는 AIN-76A를 기본으로하여 1kg당 NANA(100% 순도 기준)는 1g(NANA-L 처리구), 5g(NANA-M 처리구) 및 10g(NANA-H 처리구)로 혼합 조성하였다(Table 1.) 실험식이와 식수는 자유급여법으

로 급여하였다. 실험 동물 사육실 환경은 온도 $22\pm 2^{\circ}\text{C}$, 상대습도 $55\pm 10\%$ 로 유지 하였으며 명암은 12시간 주기(light : 06:00~18:00)로 조절하였다.

나. 부검

실험구(NANA제제 섭취마우스)과 대조구 4주, 8주 및 13주 3차례에 걸쳐 생존한 마우스 3마리씩을 ether로 마취시킨 후 흉부절개를 한 다음 복부대동맥에서 혈액을 채취하여 항응고제 튜브(EDTA 및 헤파린)에 보관하였다. 실험동물의 장기조직(5개 기관: Liver, Kidney, Spleen, Heart 및 Lung)은 혈액 채취 후 즉시 적출하여 PBS(phosphate buffered saline)용액에 1차례 세척 후 생조직의 무게를 측정 후 10% 포르말린용액에 보관하였다. 골조직은 양쪽 대퇴골, 척추골을 적출하였다. 대퇴골은 부착되어 있는 근육, 지방, 인대 등 부착물들을 모두 제거한 다음 자연건조($25\pm 2^{\circ}\text{C}$, 상대습도 $50\pm 10\%$)에서 48시간 후 무게를 측정하였다.

다. 통계처리

실험결과는 SAS program을 이용하여 통계분석하고(SAS,1999), 실험구 간의 유의성은 ANOVA로 검증한 후 Duncan`s multiple range test로 비교 분석하여(Duncan,1955) 평균치와 표준편차로 나타내고 5% 수준에서 유의성을 표시하였다.

3. 연구수행결과

NANA 소재의 장단기 섭이 후 근조직(간, 신장, 비장, 심장 및 폐) 및 골조직(대퇴골)에 대한 무게변화를 확인함으로써 NANA 소재의 안전성지표로 각 조직의 성장 변화를 확인하여 보았다(Figure 1., Table 5.).

우선 4주 경과 시 근조직의 무게변화를 살펴보면, 마우스의 체중량을 100으로 기준하였을 때, 대조구의 근조직의 무게는 간(5.86), 신장(2.1), 비장(0.42), 심장(0.57) 및 폐(0.84)와 실험구(NANA소재 섭취 마우스)와 비교하여 유의적인 차이가 없었다($P<0.05$). 4주 경과 시의 NANA소재 처리농도에 따른 변화도 없었다. NANA소재의 장기(8주 이상) 섭이 시 각 농도에 따른 대조구와 실험구의 차이는 볼 수 있지만, 통계적으로 유의한 차이로 보기 힘들었다.

골조직은 무게 오차를 줄이기 위해 대퇴골을 건조 후 근조직을 떼어내고 순수 대퇴골의 무게만을 측정하였다(Table 6.). 결과를 보면, 대조구과 실험구 동이 대퇴골의 무게 증가가 지속적으로 일어났다. 처리 농도에 상관없이 13주 경과 기준으로 볼 때, 대퇴골

의 무게는 4주 대비 18.8% 증가하였고 NANA제제를 섭취한 마우스의 경우는 27%~40%까지 증가하였다.

NANA 소재 처리 농도별로 8주차를 기준으로 각 조직의 무게를 살펴보면, 합성NANA는 저 농도(L) 보다는 그 이상의 농도(M 및 H)에서 대퇴골의 무게가 3% 증가하였고 개발 NANA의 경우 4~7%정도 증가하였다. 전체적으로 대조 대비 NANA제제를 섭취한 마우스의 대퇴골의 무게가 증가하였다. 그렇다면 이에 따른 대퇴골의 길이, 두께, 폭 및 인장강도의 변화가 있을 것으로 사료되어 각각의 변화를 관찰하였다. 대조구에 비해 실험구의 길이, 두께, 폭 및 인장강도는 증가하는 경향이 있지만 통계적으로 유의하지는 않았다.

결론적으로 NANA소재의 장단기적 농도별 근조직의 무게 변화에는 영향을 주지 않아 마우스 성장에 부정적 영향을 주지 않는 것으로 판단된다. 또한 대퇴골의 무게변화의 경우 대조구에 비해 증가됨으로써 뼈를 구성하고 있는 칼슘, 인, 황의 변화가 있을 것으로 판단된다.

Table 1. 합성NANA(SNANA, 대조) 대비 개발NANA(GNANA)의 농도별 사료조성내역

시험구		사료제조시 NANA첨가량(mg/사료 1Kg, AIN-76A Diet)					비고
		0일 (Starter)	4주후	8주후	13주	소계	
진행일정		11. 01.02. (입식, 순치)	'12.01.09. (1차부검)	'12.02.03. (2차부검)	'12.02.31. (3차부검)	13주	
Control		사료 1Kg(AIN-76A Diet) + NANA 무첨가					
SNANA	SNANA(L)	사료 1Kg(AIN-76A Diet) + 합성NANA (순도 99%이상) 1g첨가					합성 NANA
	SNANA(M)	사료 1Kg(AIN-76A Diet) + 합성NANA(순도 99%이상) 5g첨가					
	SNANA(H)	사료 1Kg(AIN-76A Diet) + 합성NANA(순도 99%이상) 10g첨가					
GNANA	GNANA(L)	사료 1Kg(AIN-76A Diet) + 개발 GNANA (순도 20%) 2.5g첨가					개발 NANA
	GNANA(M)	사료 1Kg(AIN-76A Diet) + 개발 GNANA (순도 20%) 12.5g첨가					
	GNANA(H)	사료 1Kg(AIN-76A Diet) + 개발 GNANA (순도 20%) 25g첨가					

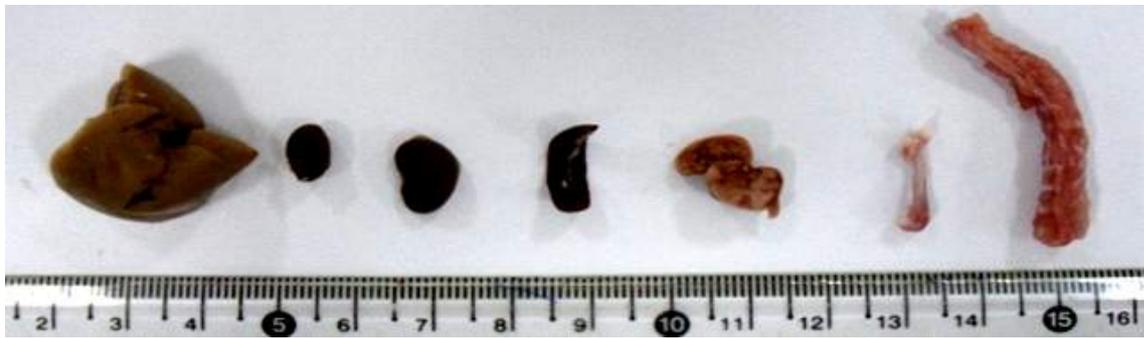


Figure 1. 합성NANA 대비 개발NANA의 장단기 섭이에 따른 마우스 생체기관내 미네랄 분포조사를 위한 채취샘플. 1 : Liver, 2 : Heart, 3 : Kidney, 4 : Spleen, 5 : Lung, 6 : Femur, 7 : Vertebra

Table 5. 합성NANA(SNANA, 대조) 대비 개발NANA(GNANA) 농도별 함유 사료의 섭이기간 경과에 따른 생체중 및 기관별 무게변화조사

시험구	경과 일수 (Week)	농도별 함유 사료 섭이기간 경과에 따른 생체중 및 기관별무게변화조사 (단위 :g, mean±SD)				
		기관별 무게변화(마우스 체중 100기준)				
		Liver	Kidney	Spleen	Heart	Lung
Control	4	5.86±0.58	2.10±0.11	0.42±0.06	0.57±0.05	0.84±0.13
	8	5.96±0.36	2.21±0.28	0.91±0.64	0.61±0.06	0.86±0.12
	13	4.39±0.63	1.81±0.36	0.49±0.13	0.48±0.06	0.73±0.00
SNANA(L)	4	6.51±0.56	2.04±0.08	0.59±0.10	0.52±0.04	0.85±0.07
	8	4.62±0.70	2.01±0.07	0.71±0.21	0.52±0.04	0.70±0.01
	13	4.42±0.29	1.84±0.17	0.53±0.22	0.62±0.02	0.72±0.06
SNANA(M)	4	5.28±0.65	1.97±0.09	0.52±0.09	0.54±0.08	0.80±0.02
	8	5.09±0.63	1.94±0.17	0.95±0.09	0.63±0.05	0.87±0.08
	13	3.87±0.12	1.49±0.36	0.66±0.39	0.56±0.04	0.77±0.07
SNANA(H)	4	5.79±0.36	1.90±0.09	0.39±0.10	0.56±0.12	0.73±0.03
	8	5.47±0.70	2.06±0.24	0.31±0.41	0.70±0.14	0.75±0.14
	13	5.30±0.51	1.89±0.15	0.48±0.02	0.50±0.19	0.75±0.06
GNANA(L)	4	5.31±0.58	1.94±0.13	0.53±0.15	0.53±0.06	0.78±0.02
	8	5.46±0.48	2.22±0.18	0.74±0.10	0.58±0.05	0.73±0.03
	13	5.51±0.36	1.96±0.03	0.79±0.46	0.59±0.09	0.85±0.11
GNANA(M)	4	6.06±0.80	2.14±0.10	0.49±0.09	0.59±0.06	0.82±0.02
	8	5.13±0.41	1.90±0.27	0.41±0.10	0.57±0.15	0.73±0.08
	13	4.81±0.42	1.85±0.11	0.43±0.13	0.56±0.05	0.78±0.08
GNANA(H)	4	5.63±0.34	1.88±0.04	0.53±0.11	0.55±0.07	0.76±0.06
	8	5.25±0.24	2.01±0.10	0.46±0.14	0.57±0.05	0.79±0.04
	13	6.22	2.49	0.44	0.60	0.73

S:합성NANA(순도 98%), G : GMP유래개발 NANA(순도 20%), L : 순수NANA 기준 0.1%(w/w)첨가, M : 순수NANA기준 0.5%(w/w)첨가, H : 순수 NANA기준 1%(w/w)첨가

Table 6. NANA제제별(SNANA: 합성, GNANA:유단백질 유래 개발NANA) 및 사료내 농도별(L: 1g, M:5g 및 H : 10g, 첨가기준:100% NANA 기준/사료 1Kg)로 장단기 처리시 시간경과에 따른 골격계(Femur, n=3)에 미치는 변화 조사(P<0.05)

시험구	경과일수 (week)	건조무게 (g)	두께 (mm)	폭 (mm)	길이 (mm)	인장강도 (Kg)	
Control	4	0.064±0.002	1.49±0.03	2.10±0.06	15.69±0.10	NT	
	8	0.070±0.004	1.58±0.14	2.15±0.13	16.27±0.19	2.61± 0.60	
	13	0.076±0.022	1.51±0.21	2.17±0.14	16.30±0.27	2.59±0.54	
비교구 (합성NANA)	SNANA(L)	4	0.061±0.009	1.61±0.08	2.03±0.20	16.33±0.68	NT
		8	0.078±0.005	1.72±0.15	2.30±0.21	16.18±0.21	2.72±0.68
		13	0.078±0.002	1.66±0.11	2.19±0.12	16.39±0.05	2.67±0.18
	SNANA(M)	4	0.068±0.005	1.45±0.24	2.07± 0.20	15.74±0.08	NT
		8	0.079±0.004	1.70±0.04	2.29±0.09	16.07±0.46	2.60±0.69
		13	0.086±0.006	1.80±0.04	2.40±0.18	16.50±0.28	3.32±1.00
	SNANA(H)	4	0.067±0.007	1.48± 0.07	2.16±0.15	15.93±0.74	NT
		8	0.080±0.007	1.65±0.10	2.49±0.19	16.30±0.29	2.59±0.67
		13	0.085±0.002	1.75±0.15	2.39±0.19	16.32±0.26	3.14±1.31
시험구 (개발NANA)	GNANA(L)	4	0.060±0.008	1.54±0.04	2.14± 0.06	15.56±0.63	NT
		8	0.074±0.004	1.54±0.04	2.39± 0.04	15.99± 0.09	2.65±0.17
		13	0.084±0.003	1.62±0.08	2.30±0.17	16.73±0.17	2.59±0.45
	GNANA(M)	4	0.063±0.004	1.55±0.09	2.24± 0.08	16.25±0.99	NT
		8	0.077±0.008	1.63±0.11	2.36±0.16	16.43± 0.15	3.68±1.05
		13	0.080±0.004	1.62±0.08	2.30±0.17	16.73±0.17	2.59±0.45
	GNANA(H)	4	0.067±0.005	1.79±0.24	2.15±0.10	16.33±0.45	NT
		8	0.079±0.007	1.73±0.08	2.33± 0.20	16.54±0.16	2.84±0.46
		13	NT	NT	NT	NT	NT

제 6-3절 동물임상 평가(혈액학적검사, 혈액생화학적 검사 및 염색체이상 검사)

1. 연구목적

세계 재조합 단백질 의약품의 판매액 기준(2001~2005) 상위 10위 제품들을 살펴볼 때 대부분이 당단백질로, 당단백질의 당사슬 구조 리모델링을 통하여 효능 및 안전성 극대화와 면역반응 등의 부작용을 최소화하기 위한 글라이코믹스 기술개발은 향후 바이오제품 개발 성패의 큰 부분을 차지할 것으로 기대된다.

당단백질은 일반적으로 당화에 따른 치료능 및 치료효과 증가와 많은 양을 투여할 수 있게 되는 장점이 있다. 이에 영유아식품내 병원성세균 사멸형 NANA소재의 개발목적으로 2차년도 까지 대량생산기술 개발, 제품적용 레시피 정립이 확립하였다. 또한 NANA소재의 특징은 미생물(*E. coli* 0157, *S.aureus*, *B. cereus*)의 membrane에 직접적으로 lysis 또는 damage를 주지 않으면서 항균작용에 탁월함을 확인하였다. 또한 개발NANA가 표준주(HEK293 cell 및 RAW 264.7 cell)에 대한 독성평가 결과 NANA 0.1%~0.5%에서 독성이 관찰 되지 않은 것을 확인하였다. 이에 NANA의 항균성 및 표준주의 대한 사전 안정성 평가결과를 기준으로 동물섭이를 통한 안전성 평가를 수행이 요구되어진다.

그러므로, 실험동물의 성장기 및 NANA소재 처리농도별로 단계를 구분하고 동물 임상검정을 기초로 합성NANA 및 개발NANA를 비교하여 장단기 섭취시 안전성, 체내 미네랄의 변화 및 미생물의 분포변화의 결과를 토대로 영유아 식품 내 병원성 세균 사멸형 NANA소재의 개발 확립 및 실용화(제품화)에 최종 목적을 두었다.

2. 연구수행방법

가. 실험 설계와 동물사육

본 시험에서는 갓 이유한 3주령의 특정병원체 부재(specific pathogen free)수컷 ICR 마우스(대한바이오링크(주)) 81마리를 실험 조건을 일정하게 하기 위해 10일간 정상식으로 순화 적응시킨 후 건강한 동물을 3마리씩 7군(대조구;1군, 실험구;6군으로 임의 배치하여 사용하였다.

NANA 동물임상평가를 위한 사료 레시피는 AIN-76A를 기본으로 하여 1kg당 NANA(100% 순도 기준)는 1g(NANA-L 처리구), 5g(NANA-M 처리구) 및

10g(NANA-H 처리구)로 혼합 조성하였다(Table 1.). 실험식이와 식수는 자유급여법으로 급여하였다. 실험 동물 사육실 환경은 온도 $22\pm 2^{\circ}\text{C}$, 상대습도 $55\pm 10\%$ 로 유지하였으며 명암은 12시간 주기(light : 06:00~18:00)로 조절하였다.

나. 혈액채취

실험구(NANA제제 섭취마우스)과 대조군 4주, 8주 및 13주 3차례에 걸쳐 생존한 마우스 3마리씩을 ether로 마취시킨 후 흉부절개를 한 다음 복부대동맥에서 혈액을 채취하여 혈액학적검사는 EDTA가 들어있는 용기(SARSTEDT, Germany)에 넣어 백혈구, 적혈구, 혈소판 수는 동물용 자동 혈액분석기 (SEAC, Italy)를 이용하여 분석하였다. 혈액생화학적 검사는 헤파린이 들어있는 용기(SARSTEDT, Germany)에 채혈한 혈액을 넣고 ALT, ALP, 총 단백질 외 11 종류의 생화학적 마커는 동물용 혈액생화학 측정기 (VETSCAN, USA)를 이용하여 분석하였다.

다. 미소핵 분석

실험구(NANA제제 섭취마우스)과 대조군 4주, 8주 및 13주 3차례에 걸쳐 생존한 마우스 3마리씩의 꼬리정맥에서 혈액을 3ul 채취하여 미리 아크리딘오렌지가 도말된 슬라이드에 올려 커버글라스로 포배 하여 냉장(4°C)보관 하였으며 7일 이내에 관찰하였다. 적혈구내 미소핵분석은 Hayashi 등(Hayashi et al, 1983)이 기술한 방법에 따랐다. 대조구의 적혈구는 개체 당 1,000개~2000개씩 관찰하였으며, 실험구는 개체당 1,000개씩 계수하여 MN의 비율을 측정 하였다.

라. 통계처리

실험결과는 SAS program을 이용하여 통계분석하고(SAS,1999), 실험군 간의 유의성은 ANOVA로 검증한 후 Duncan`s multiple range test로 비교 분석하여(Duncan,1955) 평균치와 표준편차로 나타내고 5% 수준에서 유의성을 표시하였다.

3. 연구수행결과

NANA소재의 장단기 섭취 후 체내 흡수 시 NANA소재로 인한 마우스의 혈액의 혈액학적검사, 혈액생화학적 검사 및 염색체이상 검사를 통해 대조구와 비교하여 NANA의 안전성을 확인하여 보았다.

NANA제제의 안전성지표로 혈액학적검사를 수행하여 백혈구, 림프구, 적혈구 및 혈소

판의 수치를 측정하였다. 우선 4주, 8주 및 13주 3차례의 대조구의 혈액학적 수치 범위를 보면, 백혈구($4.3 \pm 0.21 \sim 7.0 \pm 0.63 \times 10^9/L$), 림프구($1.4 \pm 0.13 \sim 3.6 \pm 1.3 \times 10^9/L$), 적혈구($6.4 \pm 0.5 \sim 8.5 \pm 0.2 \times 10^{12}/L$) 및 혈소판($1,154 \pm 378 \sim 2,792 \pm 842 \times 10^9/L$) 수치는 정상범위 안에 포함되었다. 이에 대조 대비 NANA제제를 혼합한 사료를 섭취한 마우스의 백혈구, 림프구, 적혈구 및 혈소판의 수치를 확인한 결과 다소 감소하는 경향이 있으나 정상범위에 포함되어 있으며 통계적으로 유의적인 차이는 인정되지 않았다 ($P < 0.05$) (Table 7.).

다음으로, 성장관련 안전성지표로, 혈액생화학적 검사를 수행하여 간기능 지표인 ALB(albumin), ALP(alkaline phosphatase), ALT(alanine aminotransferase) 및 TBIL(total bilirubin)과 신장 기능 지표인 BUN(blood urea nitrogen) 및 CRE(creatinine) 그리고 비장 기능 지표인 AMY(amylase) 및 GLU(glucose) 갑상선 기능 지표인 PHOS(phosphorus), 전해물질인 Na, Ca 및 K 그리고 TP(total protein), GLOB(globulin) 총 14종을 조사하였다. (Table 8.) 우선 생체 내 생리활성의 지표인 전해물질(Na, Ca, K)의 수치를 확인함으로써, 마우스 생체내의 항상성이 유지하는지를 판단하였다. 기간별 및 처리 농도별에 관계없이 전체 시험구 중 대조구의 혈액 내 전해질의 수치를 보면, Na는 160~162 mmol/dL, Ca는 10.3~12 mg/dL, K는 8.5 mmol/dL이다. 이 수치는 성숙 마우스 표준 범위의 임상 화학적 수치 범위안에 포함되어 있으므로 안정성을 확인하였다. 이에 따른 대조 대비 실험구와의 차이는 없었다. 전체 시험구의 마우스의 영양상태지표인 TP의 수치(5.4~7.1 g/dL)를 통해 정상임을 확인하였다. 전체 시험구의 마우스는 정상상태에서 실험이 진행되었음을 증명하였다. 이에 간(ALB, ALP, ALT 및 TBIL), 신장(BUN 및 GLU), 비장(AMY 및 GLU) 및 갑상선(PHOS) 손상에 대해 각각의 지표를 통해 확인하였다. 대조군 마우스의 기간별 생화학적 수치는 각각 ALB(2.6~3.3 g/dL), ALP(17~63 g/dL), ALT(37~46 U/L), TBIL(0.2 mg/dL), BUN(20~24 mg/dL), CRE(0.2 mg/dL), AMY(1,186~1,387 U/L), GLU(158~307 mg/dL) 및 PHOS(9.7~12 mg/dL)으로 정상범위에 포함되어 있다. 대조 대비 NANA 제제 혼합한 사료 섭취 마우스의 제제농도별 성장기간별 대한 혈액 생화학적 수치 역시 차이가 없으므로 혈액학적 및 생화학적 지표를 통해 NANA소재의 안전성을 확인하였다.

더 나아가, NANA 제제를 섭취한 ICR마우스의 MN(Micronuclei)분석을 통한 염색체 이상조사를 확인하였다(Table.). 염색체이상조사 중 MN분석이 가장 보편화되어 있는 방법이며 0.1% acridine orange를 통해 적혈구를 염색하는 방법을 사용하였다. 이 방법은 마우스를 치사시키지 않고 꼬리정맥에서 혈액을 채취함으로써 지속적인 관찰을 할 수

있는 장점이 있다. 이에 MN분석을 통해 NANA의 안전성을 확인하였다(Table 9.).

우선 통계적으로 유의한 결과를 얻기 위해 대조구의 4주, 8주 및 13주의 각각 2500개, 6000개, 4000개를 계수하였으며 그 중 포함된 MN 비율은 0%, $0.0013 \pm 0.0013\%$, $0.0005 \pm 0.0007\%$ 이었다. 이 비율은 정상범위인 0.002%내를 벗어나지 않았으며, NANA제제를 섭취한 마우스의 합성NANA 및 개발NANA의 실험구 또한 처리농도별 기간별로 관찰된 MN비율($0\% \sim 0.0027 \pm 0.0012\%$) 모두 정상범위를 벗어나지 않았으며, NANA소재의 농도에 따른 차이도 없었다.

결론적으로 NANA 소재는 장단기적 및 처리 농도별 성장 안정성 지표인 혈액학적, 혈액생리학적 및 염세체이상조사에 안전성을 확인하였다. 혈액학적 지표를 통해 마우스의 면역 항상성 유지에도 이상이 없었으며, 혈액생리학적 지표를 통해 중요장기 및 질병에도 이상이 없음을 확인하였다. 또한 MN분석을 통해 NANA소재를 섭취한 마우스의 염색체에 이상이 없음을 재차 확인하였다.

Table 1. 합성NANA(SNANA, 대조) 대비 개발NANA(GNANA)의 농도별 사료조성내역

시험구		사료제조시 NANA첨가량(mg/사료 1Kg, AIN-76A Diet)					비고
		0일 (Starter)	4주후	8주후	13주	소계	
진행일정		11. 01.02. (입식, 순치)	'12.01.09. (1차부검)	'12.02.03. (2차부검)	'12.02.31. (3차부검)	13주	
Control		사료 1Kg(AIN-76A Diet)+NANA 무첨가					
SNANA	SNANA(L)	사료 1Kg(AIN-76A Diet)+합성NANA (순도 99%이상) 1g첨가					합성 NANA
	SNANA(M)	사료 1Kg(AIN-76A Diet)+합성NANA(순도 99%이상) 5g첨가					
	SNANA(H)	사료 1Kg(AIN-76A Diet)+합성NANA(순도 99%이상) 10g첨가					
GNANA	GNANA(L)	사료 1Kg(AIN-76A Diet)+개발 GNANA (순도 20%) 2.5g첨가					개발 NANA
	GNANA(M)	사료 1Kg(AIN-76A Diet)+개발 GNANA (순도 20%) 12.5g첨가					
	GNANA(H)	사료 1Kg(AIN-76A Diet)+개발 GNANA (순도 20%) 25g첨가					

Table 7. 합성NANA 대비 개발NANA의 장단기 섭이에 따른 마우스 혈액이상(혈액생리학적 지표반응 분석)조사결과(단위 : mean±SD)

시험구		경과일수 (Week)	NANA소재의 농도별 및 장단기 섭이에 따른 혈액안전성 평가결과				
			백혈구($10^9/L$)	림프구($10^9/L$)	적혈구($10^{12}/L$)	혈소판($10^9/L$)	
Control		4	4.6±0.21	2.9±0.5	8.5±0.2	2,792±842	
		8	7.0±0.63	3.6±1.3	6.8±1.2	1,154±378	
		13	4.3±0.39	1.36±0.13	6.4±0.5	1,422±138	
비교구 (합성NANA)	SNANA(L)	4	3.8±0.44	2.2±0.4	7.0±1.1	1,409±252	
		8	2.3±0.12	0.6±0.2	5.9±0.5	1,259±134	
		13	3.1±0.33	1.31±0.1	6.1±N.D	1157±N.D	
	SNANA(M)	4	4.9±1.76	2.2±0.6	7.1±0.7	1,244±89	
		8	3.1±1.54	0.6±0.5	6.4±0.6	3,584±384	
		13	3.0±0.18	1.41±0.47	7.4±0.2	6,777±158	
	SNANA(H)	4	3.9±0.43	2.5±0.1	7.7±0.7	1,082±111	
		8	5.0±1.86	1.8±0.7	8.9±0.0	1,144±190	
		13	4.0±0.85	2.09±0.56	8.0±0.2	882±140	
	시험구 (개발NANA)	GNANA(L)	4	6.0±3.82	2.6±0.9	6.8±0.4	1,109±254
			8	NT	NT	NT	NT
			13	5.1±1.30	1.53±0.98	5.5±1.3	1,802±8
GNANA(M)		4	3.3±1.11	2.0±0.9	5.7±0.7	1,178±155	
		8	2.9±0.80	1.1±0.2	8.3±0.5	1,025±72	
		13	6.2±0.21	1.24±0.25	7.0±0.8	1,426±ND	
GNANA(H)		4	4.6±0.9	2.3±1.0	8.1±0.5	1,491±167	
		8	2.5±0.18	1.1±0.4	8.0±0.3	887±86	
		13	NT	NT	NT	NT	

Table 8. 합성NANA 대비 개발NANA의 장단기 섭이에 따른 마우스 혈액이상(혈액생화학적 지표반응 분석)조사결과(단위 : mean±SD)

시험구	경과 일수 (Week)	Liver				Kidney			Spleen		Tyroid	Serum					
		ALB (g/dl)	ALP (U/L)	ALT (U/L)	TBIL (mg/dl)	BUN (mg/dl)	CRE (mg/dl)	AMY (U/L)	GLU (mg/dl)	PHOS (mg/dl)	Na (mmol/dl)	Ca (mg/dl)	K (mmol/dl)	TP (g/dl)	GLOB (g/dl)		
Control	4	3.3	63	44	0.2	20	0.2	1,387	307	12	160	12	8.5	5.8	2.5		
	8	2.9	34	37	0.2	20	0.2	1,186	167	10.3	162	10.3	8.5	5.4	2.5		
	13	2.6	17	46	0.2	24	0.2	1,253	158	9.7	160	10.9	8.5	6.1	3.5		
비교구 (합성 NANA)	SNANA(L)	4	2.4	54	38	0.4	20	0.2	1,497	297	10.7	162	11.3	8.5	5.7	2.9	
		8	1.8	24	50	0.4	57	0.2	1,039	44	12.4	161	11.2	8.5	5.9	4.1	
		13	1.4	22	87	0.4	17	0.2	1,028	86	9	146	9.4	8.3	5.9	4.5	
	SNANA(M)	4	2.5	57	44	0.3	23	0.2	1,559	314	12.1	162	11.3	8.5	6.1	3.6	
		8	2.3	36	48	0.3	29	0.2	1,340	353	12.1	160	12.4	7.7	6.0	3.6	
		13	3.5	28	35	0.3	26	0.2	1,602	166	10.1	168	12.2	7.9	7.1	3.6	
	SNANA(H)	4	3.1	63	31	0.3	23	0.2	1,674	421	10.1	158	12.3	8.5	6.1	3.6	
		8	2.9	31	40	0.4	34	0.2	1,764	300	13.2	166	12.4	8.5	5.9	2.9	
		13	3.1	29	44	0.4	26	0.2	1,765	270	9.2	156	10.9	8.3	6	2.9	
	시험구 (개발 NANA)	GNANA(L)	4	2.1	49	37	0.2	23	0.2	1,589	465	14.1	161	13	8.5	5.9	3.8
			8	1.9	27	38	0.3	29	0.2	1,103	238	12.0	161	10.7	8.5	5.8	3.8
			13	2.5	16	38	0.3	24	0.2	1,347	288	10.1	160	12.3	8.5	5.8	3.3
GNANA(M)		4	2.5	71	42	0.3	22	0.2	1,577	389	11.1	162	12.4	8.5	6	3.6	
		8	2.6	44	45	0.3	25	0.2	1,820	296	12.2	162	11.3	8.4	5.8	3.1	
		13	2.3	25	47	0.3	27	0.2	1,214	152	10	159	11.3	8	5.4	3.1	
GNANA(H)		4	3.0	84	35	0.3	19	0.2	1,371	334	10.2	160	11.7	8.5	6.1	3.2	
		8	3.0	31	40	0.4	34	0.2	1,764	300	13.2	166	12.4	8.5	5.9	2.9	
		13	3.4	33	34	0.4	25	0.2	1,516	297	10.3	158	12.2	8.5	5.8	2.4	

S:합성NANA(순도 98%), G : GMP유래개발 NANA(순도 20%), L : 순수NANA 기준 0.1%(w/w)첨가., M : 순수NANA기준 0.5%(w/w)첨가, H : 순수 NANA기준 1%(w/w)첨가

Table 9. 합성NANA (SNANA, 대조) 대비 개발NANA (GNANA) 농도별 섭이시간에 따른 적혈구내 염색체이상 비교조사(MN: micronucleus assay) 조사 결과

시험구	염색체이상(MN)조사 결과(단위 : mean±SD, Abserration/total)		
	4주후	8주후	13주후
Control	N.D.	0.0013±0.0013	0.0005±0.0007
SNANA(L)	0.0027±0.0012	0.0010±0.0010	0.0010±0.0000
SNANA(M)	0.0013±0.0012	0.0003±0.0006	0.0005±0.0007
SNANA(H)	0.0007±0.0012	0.0010±0.0010	N.D.
GNANA(L)	0.0013±0.0012	0.0003±0.0006	0.0005±0.0007
GNANA(M)	0.0020±0.0035	N.D.	0.0007±0.0012
GNANA(H)	N.D.	0.0017±0.0006	N.D.

S:합성NANA(순도 98%), G : GMP유래개발 NANA(순도 20%), L : 순수NANA 기준 0.1%(w/w)첨가., M : 순수NANA기준 0.5%(w/w)첨가, H : 순수 NANA기준 1%(w/w)첨가

제 6-4절 동물임상 평가(중요장기, 골조직 및 분변에서 미네랄 분포 조사)

1. 연구목적

세계 재조합 단백질 의약품의 판매액 기준(2001~2005) 상위 10위 제품들을 살펴볼 때 대부분이 당단백질로, 당단백질의 당사슬 구조 리모델링을 통하여 효능 및 안전성 극대화와 면역반응 등의 부작용을 최소화하기 위한 글라이코믹스 기술개발은 향후 바이오제품 개발 성패의 큰 부분을 차지할 것으로 기대된다.

당단백질은 일반적으로 당화에 따른 치료능 및 치료효과 증가와 많은 양을 투여할 수 있게 되는 장점이 있다. 이에 영유아식품내 병원성세균 사멸형 NANA소재의 개발목적으로 2차년도 까지 대량생산기술 개발, 제품적용 레시피 정립이 확립하였다. 또한 NANA소재의 특징은 미생물(*E. coli* 0157, *S.aureus*, *B. cereus*)의 membrane에 직접적으로 lysis 또는 damage를 주지 않으면서 항균작용에 탁월함을 확인하였다. 또한 개발NANA가 표준주(HEK293 cell 및 RAW 264.7 cell)에 대한 독성평가 결과 NANA 0.1%~0.5%에서 독성이 관찰 되지 않은 것을 확인하였다. 이에 NANA의 항균성 및 표준주의 대한 사전 안정성 평가결과를 기준으로 동물섭이를 통한 안전성 평가를 수행이 요구되어진다.

그러므로, 실험동물의 성장기 및 NANA소재 처리농도별로 단계를 구분하고 동물 임상검정을 기초로 합성NANA 및 개발NANA를 비교하여 장단기 섭취시 안전성, 체내 미네랄의 변화 및 미생물의 분포변화의 결과를 토대로 영유아 식품 내 병원성 세균 사멸형 NANA소재의 개발 확립 및 실용화(제품화)에 최종 목적을 두었다.

2. 연구수행방법

가. 실험 설계와 동물사육

본 시험에서는 갓 이유한 3주령의 특정병원체 부재(specific pathogen free)수컷 ICR 마우스(대한바이오링크(주)) 81마리를 실험 조건을 일정하게 하기 위해 10일간 정상식으로 순화 적응시킨 후 건강한 동물을 3마리씩 7군(대조구;1군, 실험구;6군)으로 임의 배치하여 사용하였다.

NANA 동물임상평가를 위한 사료 레시피는 AIN-76A를 기본으로 하여 1kg당 NANA(100% 순도 기준)는 1g(NANA-L 처리구), 5g(NANA-M 처리구) 및

10g(NANA-H 처리구)로 혼합 조성하였다(Table 1.). 실험식이와 식수는 자유 급여법으로 급여하였다. 실험 동물 사육실 환경은 온도 $22\pm 2^{\circ}\text{C}$, 상대습도 $55\pm 10\%$ 로 유지하였으며 명암은 12시간 주기(light : 06:00~18:00)로 조절하였다.

나. 시료 채취

실험구(NANA제제 섭취마우스)과 대조구 4주, 8주 및 13주 3차례에 걸쳐 생존한 마우스 3마리씩을 ether로 마취시킨 후 흉부절개를 한 다음 복부대동맥에서 혈액을 채취하여 항응고제 튜브(EDTA, 헤파린)에 보관하였다. 실험동물의 장기조직(5개 기관: Liver, Kidney, Spleen, Heart, Lung)은 혈액 채취 후 즉시 적출하여 PBS(phosphate buffered saline)용액에 1차례 세척 후 생조직의 무게를 측정 후 10%포르말린용액에 보관하였다. 골조직은 양쪽 대퇴골, 척추골(흉추골~요추골)을 적출하였다. 대퇴골은 부착되어 있는 근육, 지방, 인대 등 부착물을 모두 제거한 다음 -30°C 에 보관하였다.

마우스의 분변은 부검들어가기 전일 30분 내에 배설한 변을 채취하여 멸균된 1.5 ml 튜브에 넣고 4°C 에 보관 후 전처리 3일전에 자연건조 하였다.

다. 시료 전처리

마우스로부터 채취한 시료(간, 신장, 비장, 심장, 폐, 대퇴골, 척추골, 자연건조된 분변)를 전자저울에 무게를 측정한 후 microwave용 테플론 가압분해용기(teflon vessel)에 담아 7ml 질산(동우화인캠(주)), 1 mL 및 과산화수소수(동우화인캠(주))를 첨가 후 시료를 microwave(ETHOS1, MILESTONE)에 장착시켜 198°C , 1,000 W에서 45분간 용해하였다. 시료가 담긴 teflon vessel을 분리하여 RT(Room temp.)에서 식힌 후 용해된 시료를 50 mL 튜브에 담아 3차 증류수로 부피를 맞춘 후 ICP 분석을 진행하였다.

라. 미네랄 분석

미네랄(Ca, Fe, Zn, Cu, P, S, Mn, Mg) 분석은 유도 결합 플라즈마 분광분석기(Inductively coupled plasma-optical emission spectrometer, ICP-OES)는 PerkinElmer사의 Optima 5300 DV를 사용하였다. 표준체는 Tin Dstandard Solution(Wako Pure Chemical Industries)을 이용하였다.

마. 통계처리

실험결과는 SAS program을 이용하여 통계분석하고(SAS,1999), 실험군 간의 유의성은 ANOVA로 검증한 후 Duncan`s multiple range test로 비교 분석하여

(Duncan,1955) 평균치와 표준편차로 나타내고 5% 수준에서 유의성을 표시하였다.

3. 연구수행결과

NANA소재의 장단기 섭취후 장내 흡수 및 체내이행과정을 거쳐 최종 장내로 축적되고 배설되는 과정에서 NANA로 인한 미네랄이 체내 기관별 증가 및 감소결과와 분변을 통한 배설되는 경향을 비교함으로써 NANA의 안전성을 확인하여 보았다.

결과로서, 기관중 골조직(Femur)과 분변과 연계성을 가지고 평가하면, NANA를 4주간 섭취시 대조구(114,900ppm) 대비 NANA처리구에서는 칼슘의 함유량이 최저 15%~28% 범위에서 감소하는 경향을 나타내었으며, NANA섭이농도에 따른 유의한 차이는 인정되지 않았다. 이를 기준으로 분변의 배설량은 비교하여 보았더니 대조구는 28,250ppm(1배 기준)의 칼슘이 배설되었는데, 최저 2.45배에서 최대 2.9배로 높은 수치를 보였다. 이러한 결과는 NANA전체 처리구에서 유사한 경향으로 나타났다(P<0.05). 4주 결과를 기준으로 장기 섭취에 따른 변화를 조사하여 보았더니, 4주섭이 기간과 유사한 패턴을 보였다.

칼슘이외의 분변내 미네랄 변화를 비교하여 보았더니, 칼슘과는 다르게 Zn을 제외하고는 대부분의 미네랄 분포의 변화가 있었다.

이중 NANA의 생체전이메카니즘에서 칼슘 등의 미네랄 치환 및 체내 골조직내 칼슘등의 용출 및 유지와 관련된 주요 미네랄인 P와 S의 수치를 확인하여 본 결과, 대조 대비 유의한 차이는 인정되지 않았다. 그러나, NANA를 섭취한 마우스의 분변에서의 P와 S 및 칼슘의 함유량은 공통적으로 2~3배 증가하였다. 그리고, 장기간(8주 및 13주) NANA섭이시도 칼슘의 패턴과 동일한 경향을 보였다.

기타 미네랄의 경우도 살펴보았는데, 4주섭이시 Fe와 Cu의 함유량이 대조구에 비해 최소 2배~9배 분변으로 배설량이 유의하게 감소하는 것으로 나타나 NANA는 칼슘과는 다르게 미량원소의 체내 이용성을 증가시키는 것으로 판단되었다(P<0.05).

결론으로, 전술 내용에서 장단기적으로 골조직 및 근육기관별 미네랄 증가와 감소패턴과 분변을 통한 배설량을 비교하여 보면, NANA소재는 체내에 흡수된 이후에 1일 이내 대부분이 배설되는 메카니즘에서 기존 기관별 축적된 미네랄과 신규공급되는 미네랄의 치환반응을 유박하는 효과 있는 것이 아닌가 하고 판단되었다. 이러한 결과는 추후 세세히 연구가 필요하다 할 수 있다.

Table 1. 합성NANA(SNANA, 대조) 대비 개발NANA(GNANA)의 농도별 사료조성내역

시험구	사료제조시 NANA첨가량(mg/사료 1Kg, AIN-76A Diet)					비고
	0일 (Starter)	4주후	8주후	13주	소계	
진행일정	11. 01.02. (입식, 순치)	'12.01.09. (1차부검)	'12.02.03. (2차부검)	'12.02.31. (3차부검)	13주	
Control	사료 1Kg(AIN-76A Diet)+NANA 무첨가					
SNANA	SNANA(L)	사료 1Kg(AIN-76A Diet)+합성NANA (순도 99%이상) 1g첨가				합성 NANA
	SNANA(M)	사료 1Kg(AIN-76A Diet)+합성NANA(순도 99%이상) 5g첨가				
	SNANA(H)	사료 1Kg(AIN-76A Diet)+합성NANA(순도 99%이상) 10g첨가				
GNANA	GNANA(L)	사료 1Kg(AIN-76A Diet)+개발 GNANA (순도 20%) 2.5g첨가				개발 NANA
	GNANA(M)	사료 1Kg(AIN-76A Diet)+개발 GNANA (순도 20%) 12.5g첨가				
	GNANA(H)	사료 1Kg(AIN-76A Diet)+개발 GNANA (순도 20%) 25g첨가				

Table 10. 합성NANA 대비 개발NANA의 장단기 섭이에 따른 마우스 생체기관별 (Femur, 생체중량) 미네랄 분포조사(ppm)

시험구	경과 일수 (Week)	일반미네랄 함유량(PPM)							
		Ca	Fe	Zn	Cu	P	S	Mn	Mg
Control	4	114,900± 771	35.5±0.47	72.5±0.94	0.96±0.18	42,800±277	1,192±10.4	0.46±0.01	3,239±2.4
	8	95,130±1,091	45.5±0.3	81.9±0.3	1.61±0.01	40,280±265	1,090±33.9	0.86±0.05	2,310±17
	13	111,600± 954	90.2±1.25	66.4±0.97	ND	40,630±631	1,395±44.2	0.39±0.01	3,328±75.2
SNANA(L)	4	95,090±1,605	35.0±0.05	80.5±0.4	ND	41,800±301	1,335±37	0.36±0.01	2,723±22
	8	140,000±1,048	40±0.7	121±1.6	4±0.1	56,380±1,642	1,172±55	0.7±0.05	3,349±104
SNANA(M)	4	98,710± 939	19.5±0.16	58.0±0.35	ND	36,010±696	1,318±22.7	0.19±0.01	2,843±41.1
	8	82,660±1,058	33.9±0.06	83.9±1.3	ND	35,900±451	1,169±21	0.51±0.01	2,523±11
	13	126,900±5,973	40.9±0.1	105±0.2	4.1±0.06	52,040±1,654	1,534±40	0.6±0.01	3,150±102
SNANA(H)	4	106,700±2,258	42.3±0.54	57.7±0.75	ND	37,470±862	1,417±67.4	0.23±0.01	3,131±77.4
	8	85,870± 864	36.7±0.09	69.9±0.6	ND	35,560±54	1,207±39	0.45±0.008	2,538±6.6
	13	139,600±7,883	46.1±0.6	110±1.7	4.4±0.03	56,520±2,092	1,291±9	0.6±0.02	3,373±132
GNANA(L)	4	95,930±2,993	35.8±0.31	48.1±1.01	ND	33,700±363	1,133±69.4	0.13±0.004	2,798±29.9
	8	97,450± 908	32.9±0.2	87.6±0.9	ND	41,770±399	1,115±22	0.48±0.02	2,946±45
	13	105,500±4,231	46±0.2	88.1±0.4	4±0.05	43,600±126	1,077±29	0.5±0.01	2,618±13
GNANA(M)	4	108,600± 894	14.5±0.11	60.2±0.22	ND	39,160±732	1,483±24.2	0.22±0.02	3,148±65.5
	8	89,040±1,248	42.1±0.2	78.7±0.8	ND	39,180±271	1,149±49	0.5±0.009	1,149±49
	13	121,600±6,137	41±0.6	97±0.9	5.4±0.07	48,050±409	1,563±10	0.6±0.01	2,739±26
GNANA(H)	4	108,200±2,611	52.4±0.36	61.2±0.13	ND	38,590±452	1,257±16.2	0.25±0.01	3,270±42.8
	8	86,720±1,288	29.9±0.07	77.4±0.31	ND	38,770±435	1,199±21	0.48±0.02	2,563±27
	13	108,800±4,776	39±1.1	94.7±3.4	17.9±0.6	44,100±1,543	1,330±75	0.6±0.01	2,632±104
		100,100±2,537	43.8±0.27	57.7±0.27	ND	35,720±159	1,192±8.1	0.23±0.03	2,903±15.5

Table 11. 합성NANA 대비 개발NANA의 장단기 섭이에 따른 마우스 생체기관별 (Vertebra, 생체중량) 미네랄 분포조사(ppm)

시험구	경과 일수 (Week)	일반미네랄 함유량(PPM)							
		Ca	Fe	Zn	Cu	P	S	Mn	Mg
Control	4	38,380±117	30.5±0.44	31.4±0.23	1.07±0.05	15,350±135	1,536±7.6	0.27±0.005	1,161±15.9
	8	41,940±529	38.6±0.5	56±0.8	2.4±0.20	19,870±731	1,273±33	0.35±0.004	1,143±17
	13	32,630±124	52.5±0.47	25.7±0.31	0.13±0.02	12,810±131	1,670±5.6	1,105±15.2	1,105±15.2
SNANA(L)	4	35,210±477	23.3±0.07	38.5±0.33	ND	16,630±201	1,494±13.2	0.33±0.007	1,109±4.0
	8	43,320±667	26.2±0.2	59.4±0.4	2.2±0.2	70,310±751	1,213±14	0.40±0.003	1,203±15
	13	30,700±79.5	37.9±0.52	24.8±0.23	ND	12,070±174	1,754±20.8	0.12±0.004	1,044±20.6
SNANA(M)	4	40,170±381	23.4±0.03	46.3±0.1	ND	17,980±104	1,205±9.4	0.37±0.002	1,203±17.5
	8	34,540±273	18.6±0.4	46±1	2.1±0.1	17,430±926	1,423±15	0.20±0.006	1.05±1.3
	13	40,110±433	35.9±0.13	29.4±0.22	ND	14,740±21.8	1,687±1.8	0.14±0.003	1,259±22.7
SNANA(H)	4	40,290±695	30.2±0.2	39.4±0.6	ND	17,840±71	1,104±11.4	0.36±0.007	1,184±20
	8	42,120±228	36.9±0.07	47.5±0.4	2.4±0.05	20,540±303	1,345±12	0.20±0.007	1,105±17
	13	27,620±106	29.3±0.44	22.6±0.15	ND	11,070±104	1,822±8.0	0.09±0.002	985±20.0
GNANA(L)	4	36,110±395	27.3±0.2	40.7±0.3	ND	16,350±149	1,208±4.9	0.31±0.005	1,120±5.5
	8	39,280±463	23.9±0.3	48.9±0.8	2.0±0.07	18,740±460	1,263±15	0.30±0.01	1,116±22
	13	27,820±412	31.5±0.48	24.9±0.27	ND	10,840±182	1,763±19.8	0.11±0.008	943±26.3
GNANA(M)	4	35,480±575	28.4±0.26	38.9±0.3	ND	16,140±85	1,322±2.4	0.32±0.006	1,806±12
	8	42,220±312	27.9±0.4	50.1±1.1	2.4±0.06	21,060±212	1,438±6	0.30±0.01	1,185±18
	13	26,000±417	31.8±0.48	23.2±0.50	ND	10,010±182	1,631±14.8	0.12±0.004	891±7.58
GNANA(H)	4	42,890±933	27.4±0.03	45.1±0.15	ND	19,760±13.9	1,306±8.3	0.39±0.001	1,271±17.8
	8	38,470±156	26.6±0.3	47.6±0.7	1.5±0.03	20,040±415	1,416±20	0.30±0.09	1,166±47
	13	27,210±218	35.3±0.42	25.7±0.13	ND	10,400±96.2	1,673±16.6	0.15±0.002	928±5.36

Table 12. 합성NANA 대비 개발NANA의 장단기 섭이에 따른 마우스 생체기관별 (Liver, 생체중량) 미네랄 분포조사(ppm)

시험구	경과 일수 (Week)	일반미네랄 함유량(PPM)							
		Ca	Fe	Zn	Cu	P	S	Mn	Mg
Control	4	37.0±15.5	186±2.8	24.9±0.42	8.33±0.13	3,076±26	1,855±16.6	0.95±0.02	267±3.3
	8	43.4±8.60	173±2.2	37.8±0.06	8.82±0.02	2,699±9.6	1,698±11.1	1.2±0.01	238±0.72
	13	39.0±23.1	162±3.26	22.5±0.24	6.54±0.18	2,008±26	1,463±18.1	0.33±0.002	135±2.98
SNANA(L)	4	38.6±2.30	265±0.86	27.4±0.03	4.50±0.01	2,765±7.8	1,730±7.3	0.84±0.001	212±0.53
	8	45.7±14.1	89.8±0.85	61.7±0.41	10.7±0.09	3,061±26	1,735±11.5	0.84±0.008	243±1.84
	13	361±13.1	1,855±18.7	230±2.61	59.3±0.87	25,440±223	18,550±88.3	4.15±0.04	2,145±29.3
SNANA(M)	4	48.9±14.6	333±3.9	29.9±0.12	4.4±0.05	3,016±23	1,744±4.5	0.88±0.002	203±1.6
	8	36.6±9.5	45.4±0.44	41.1±0.42	9.25±0.05	3,020±23	1,868±6.9	0.97±0.004	232±1.63
	13	18.8±14.5	36.0±0.60	16.4±0.10	7.06±0.16	1,994±35.3	1,425±4.8	0.35±0.004	139±2.64
SNANA(H)	4	20.8±1.8	225±2.9	26.1±0.22	3.5±0.12	2,578±43	1,624±7.0	0.77±0.003	206±3.22
	8	29.0±10.1	211±2.63	37.4±0.12	5.25±0.11	3,074±47	2,138±5.0	236±4.29	236±4.3
	13	24.7±5.24	172±2.72	18.4±0.11	6.47±0.09	2,372±41.1	1,542±9.2	0.35±0.002	190±3.36
GNANA(L)	4	37.5±2.5	208±1.25	32.2±0.07	5.9±0.04	3,224±9.3	2,093±7.9	1.04±0.004	255±0.39
	8	49.1±5.4	115±1.19	41.4±0.13	5.3±0.03	3,067±37	2,060±9.7	1.20±0.004	252±2.98
	13	23.0±3.41	37.7±0.46	16.5±0.15	6.14±0.03	2,266±24.1	1,520±12.5	0.39±0.004	211±2.62
GNANA(M)	4	22.7±6.2	282±3.3	33.7±0.08	5.7±0.14	3,427±45	2,382±12.4	261±3.7	261±3.67
	8	20.4±9.2	166±0.98	32.2±0.13	4.34±0.02	2,792±7.6	1,717±10.3	0.73±0.002	215±1.14
	13	37.3±11.6	190±1.26	18.0±0.08	7.27±0.10	2,338±14.8	1,661±9.8	0.43±0.002	217±2.29
GNANA(H)	4	38.7±8.3	124±1.7	30.6±0.09	2.7±0.03	3,332±47	2,103±2.2	1.19±0.005	243±3.9
	8	30.8±11.8	297±3.0	34.5±0.009	5.87±0.04	2,663±24	1,913±2.5	0.82±0.002	215±1.67
	13	52.9±35.5	92.3±0.62	13.8±0.14	4.98±0.06	2,258±17.9	1,246±14.5	0.21±0.002	62.9±0.52

Table 13. 합성NANA 대비 개발NANA의 장단기 섭이에 따른 마우스 생체기관별 (Kidney, 생체중량) 미네랄 분포조사(ppm)

시험구	경과 일수 (Week)	일반미네랄 함유량(PPM)							
		Ca	Fe	Zn	Cu	P	S	Mn	Mg
Control	4	115±12.2	88.9±0.72	17.0±0.25	4.96±0.07	2,845±39	1,558±10.8	1.42±0.01	209±2.66
	8	42.8±3.3	85.8±0.26	29.8±0.11	4.33±0.01	2,679±21.2	1,739±3.3	1.30±0.007	192±1.5
	13	34.0±7.62	71.8±1.14	13.7±0.22	1.17±0.06	1,708±11.5	1,242±10.4	0.24±0.004	94.1±0.95
SNANA(L)	4	41.4±24.4	122.6±1.73	28.3±0.4	ND	3,238±13.1	1,959±17	2.2±0.01	201±3.6
	8	24.6±43.2	81.2±1.04	29.7±0.17	2.68±0.16	2,493±23.3	1,398±9.8	0.87±0.009	162±2.06
	13	ND	83.7±1.51	14.4±0.50	1.45±0.06	1,727±18.8	1,253±28.8	0.35±0.007	150±1.62
SNANA(M)	4	77.4±4.6	122±0.92	22.6±0.3	ND	2,739±6.1	1,543±9.9	1.9±0.005	162±2.0
	8	38.4±4.0	74.2±0.29	32.3±0.29	1.59±0.08	2,733±20	1,703±15.7	1.12±0.007	196±2.64
	13	34.3±49.8	48.2±0.52	19.5±0.20	4.86±0.002	2,407±25.6	1,670±17.4	0.36±0.002	123±0.73
SNANA(H)	4	83.1±37	117±0.93	23.5±0.22	ND	2,797±15.6	1,544±17.3	2.2±0.01	184±1.2
	8	20.0±4.0	157±2.4	33.9±0.15	4.4±0.01	2,844±19.3	2,047±6.9	1.81±0.01	206±2.41
	13	63.8±41.5	85.1±0.51	16.6±0.12	4.32±0.006	2,159±20.1	1,449±5.2	0.39±0.009	150±1.46
GNANA(L)	4	74.9±9.8	150±1.07	30.3±0.57	ND	3,253±23.8	2,082±20.2	2.67±0.03	236±2.93
	8	17.1±2.2	111±1.89	35.5±0.32	2.29±2.57	2,808±46.4	1,788±8L3	1.3±0.01	206±2.89
	13	73.4±13.2	63.1±1.42	15.8±0.05	4.39±0.02	2,099±23.5	1,439±8.7	0.37±0.003	171±3.46
GNANA(M)	4	31.6±0.68	134±0.07	25.7±0.11	ND	3,025±9.7	1,901±21.5	202±1.6	202±1.59
	8	3.15±1.6	99.7±1.35	25.0±0.06	0.99±0.04	2,275±36.3	1,413±5.4	0.93±0.005	153±2.92
	13	45.9±12.2	93.0±0.67	18.9±0.18	5.47±0.007	2,403±10.7	1,708±5.1	0.55±0.005	195±1.44
GNANA(H)	4	60.4±7.2	115±0.61	27.0±0.5	ND	3,161±24	1,943±22	2.23±0.008	187±2.39
	8	67.3±3.8	137±0.31	31.5±0.2	4.15±0.01	2,652±5.8	1,751±12.2	1.18±0.01	175±1.26
	13	75.1±78.0	80.8±0.41	16.0±0.10	4.17±0.07	2,277±12.9	1,428±2.9	0.27±0.002	61.5±0.29

Table 14. 합성NANA 대비 개발NANA의 장단기 섭이에 따른 마우스 생체기관별 (Spleen, 생체중량)미네랄 분포조사(ppm)

시험구	경과 일수 (Week)	일반미네랄 함유량(PPM)							
		Ca	Fe	Zn	Cu	P	S	Mn	Mg
Control	4	91.6±40.8	424±7.88	26.8±0.97	4.66±0.16	4,610±6.3	1,877±18	0.28±0.03	318±2.7
	8	49.5±5.2	149±1.3	32.4±0.19	1.77±0.01	3,947±30.8	1,376±7.9	0.76±0.002	324±3.11
	13	30.4±2.85	353±4.27	15.9±0.19	ND	2,900±38.5	1,081±44.8	0.29±0.02	150±2.96
SNANA(L)	4	485±1.6	987±10	30±0.3	ND	4,844±3.6	1,573±23	0.11±0.02	228±1.7
	8	62.5±1.9	255±2.4	34.4±0.04	ND	4,077±25.2	1,370±21	0.56±0.01	302±2.85
	13	ND	125±1.19	15.0±0.28	ND	2,397±11.9	1M097±30.6	0.33±0.01	217±6.03
SNANA(M)	4	123±11.1	622±11	27.0±0.7	ND	4,854±32.3	1,465±27	0.23±0.02	277±2.6
	8	37.4±10.8	92.5±0.67	35.8±0.03	ND	4,535±14.2	1,638±10	0.63±0.01	363±3.2
	13	ND	50.0±0.49	13.9±0.14	ND	2,982±37.2	1,101±11.0	0.23±0.003	167±1.83
SNANA(H)	4	ND	669±5.2	26.2±1.1	ND	4,511±14	1,618±23	0.47±0.03	301±2.1
	8	44.2±6.6	578±6.3	31.0±0.45	1.80±0.05	3,847±40	1,494±23	0.90±0.01	274±3.42
	13	187±74.0	671±5.07	17.1±0.20	2.52±0.05	3,326±41.0	1,308±23.1	0.39±0.02	215±2.35
GNANA(L)	4	ND	733±3.4	33.5±0.3	ND	5,453±3.1	2,146±53	0.33±0.02	381±3.53
	8	32.9±3.2	224±1.01	35.1±0.14	ND	4,193±6.1	1,659±8.8	0.60±0.01	308±1.23
	13	69.0±65.8	96.9±0.83	18.1±0.14	2.33±0.006	3,253±27.2	1,452±7.6	0.45±0.003	233±3.35
GNANA(M)	4	129±14.2	466±1.8	26.3±0.55	ND	4,688±20.3	1,681±23	0.28±0.01	291±0.78
	8	ND	597±8.18	28.5±0.47	ND	3,854±23.8	1,428±20	298±3.98	298±3.98
	13	159±13.7	366±6.83	21.4±0.66	4.57±0.12	3,182±9.6	1,382±36.0	0.56±0.01	260±4.14
GNANA(H)	4	ND	544±3.6	32.3±0.46	ND	4,999±17.3	1,977±37	0.49±0.01	361±2.2
	8	80.0±9.1	707±11.2	31.9±0.66	0.93±0.05	4,018±47.3	1,501±15	0.70±0.01	268±5.07
	13	497±29.3	437±0.98	17.3±0.59	2.44±0.17	3,222±22.6	1,224±54.6	0.26±0.02	60.8±0.87

Table 15. 합성NANA 대비 개발NANA의 장단기 섭이에 따른 마우스 생체기관별 (Heart, 생체중량)미네랄 분포조사(ppm)

시험구	경과 일수 (Week)	일반미네랄 함유량(PPM)							
		Ca	Fe	Zn	Cu	P	S	Mn	Mg
Control	4	204±109	79.1±0.68	16.0±0.52	7.96±0.05	2,340±13.7	2,075±24	0.53±0.02	248±2.07
	8	37.6±9.7	92.7±0.86	16.8±0.26	7.08±0.04	2,040±11.7	1,851±9.3	0.96±0.01	154±1.82
	13	ND	79.8±0.90	12.9±0.60	ND	1,438±6.6	1,465±33.2	0.30±0.001	80.3±1.22
SNANA(L)	4	206±42	182±0.7	22±0.2	ND	2,532±2.3	=	ND	222±4.7
	8	23.35±3.8	121±1.5	29.6±0.60	4.92±0.16	2,233±36.2	1,919±31	0.6±0.02	165±2.13
	13	ND	73.9±0.51	11.0±0.16	ND	1,421±14.5	1,449±4.9	0.29±0.02	120±0.91
SNANA(M)	4	111±10.7	139±0.6	25.5±0.43	ND	2,552±14.4	2,160±14.	0.89±0.01	225±1.4
	8	5.12±3.0	100±0.74	23.5±0.12	1.96±0.04	2,096±0.3	1,867±17	0.55±0.01	155±1.36
	13	ND	77.3±0.52	14.8±0.23	8.18±0.09	1,929±15.3	1,881±19.0	0.48±0.005	107±0.30
SNANA(H)	4	226±11.5	109±0.62	21±0.32	ND	2,549±11.1	2,006±33	0.89±0.004	208±2.64
	8	54.2±4.6	140±1.99	24.2±0.16	5.52±0.07	2,155±13.9	2,133±17	0.96±0.01	164±2.36
	13	2.75±10.2	78.2±0.58	12.8±0.11	6.09±0.07	1,722±14.3	1,629±24.0	0.42±0.005	122±1.33
GNANA(L)	4	ND	140±1.15	23.9±0.53	ND	2,619±33.3	2,235±46	0.82±0.01	217±1.94
	8	ND	127±0.77	27.1±0.15	3.64±0.03	2,291±30.1	2,026±9.6	0.72±0.005	167±1.01
	13	151±53.9	85.5±0.85	13.0±0.32	6.42±0.03	1,780±6.8	1,699±20.5	0.40±0.003	132±1.50
GNANA(M)	4	96.9±10	96.5±0.44	28.1±0.49	ND	3,484±11.7	3,144±15	0.91±0.02	243±2.54
	8	20.5±2.5	121±1.2	19.0±0.13	1.73±2.44	2,050±17.6	1,615±5.9	1.01±0.003	166±1.03
	13	108±17.5	103±0.41	12.9±0.14	6.95±0.03	1,797±6.8	1,802±18.9	0.50±0.02	131±1.20
GNANA(H)	4	ND	127±1.5	24.7±0.52	ND	2,606±22.2	2,342±28	0.93±0.009	229±4.02
	8	21.5±2.2	138±2.11	22.3±0.19	5.63±0.06	2,006±11.3	1,845±7.5	0.80±0.007	146±2.62
	13	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT

Table 16. 합성NANA 대비 개발NANA의 장단기 섭이에 따른 마우스 생체기관별 (Lung, 생체중량)미네랄 분포조사(ppm)

시험구	경과 일수 (Week)	일반미네랄 함유량(PPM)							
		Ca	Fe	Zn	Cu	P	S	Mn	Mg
Control	4	67.9±8.7	96.3±0.1	13.4±0.15	3.01±0.06	2,695±13.5	1,097±13.2	0.16±0.01	97.2±1.5
	8	47.8±6.3	95.7±0.6	17.4±0.2	3.65±0.008	2,255±12.8	1,020±7.7	0.28±0.005	126±0.8
	13	ND	78.9±1.16	12.2±0.40	ND	1,575±21.1	765±1.80	0.16±0.007	58.6±1.36
SNANA(L)	4	11.5±0.96	148±1.9	20±0.2	ND	2,834±124	1,326±16.8	0.09±0.002	84±0.9
	8	4.54±3.70	147±2.9	25.8±0.29	1.08±0.09	2,462±53.8	995±10.4	0.18±0.005	117±2.01
	13	11.4±6.67	82.0±1.13	11.6±0.43	ND	1,768±36.7	880±24.0	0.18±0.008	109±3.29
SNANA(M)	4	29.8±18	135±0.68	17.8±0.63	ND	2,557±5.5	1,088±10.6	0.09±0.001	85.5±0.41
	8	41.3±3.2	77±0.66	18.5±0.02	ND	2,219±22.5	931±7.74	0.11±0.004	109±0.99
	13	85.1±11.1	92.1±0.33	14.0±0.14	3.21±0.06	2,010±11.4	973±4.52	0.20±0.006	71.0±1.00
SNANA(H)	4	23.9±2.7	98.2±0.5	23.2±0.54	ND	3,729±6.3	1,612±25.2	0.07±0.01	101±0.86
	8	11.9±6.3	128±0.75	21.9±0.16	1.94±0.02	2,322±31.5	1,143±16.2	0.33±0.009	116±1.49
	13	38.9±16.9	52.0±0.20	7.20±0.02	1.37±0.03	1,187±2.8	568±1.42	0.11±0.004	55.6±1.04
GNANA(L)	4	22.8±10.2	134±0.9	18.1±0.16	ND	2,712±14.7	1,192±6.6	0.12±0.004	104±1.22
	8	28.5±4.4	131±2.5	23.4±0.21	0.43±0.01	2,435±44	1,116±2.1	0.21±0.001	127±2.13
	13	78.7±56.0	96.3±0.82	13.7±0.33	2.98±0.02	1,940±18.7	1,011±13.4	0.23±0.002	115±0.38
GNANA(M)	4	ND	167±2.8	19.3±0.15	ND	2,758±21.2	1,352±37.2	0.14±0.01	106±1.92
	8	40.1±4.7	113±1.07	19.3±0.07	2.27±0.01	2,422±21.6	1,069±19.6	0.43±0.005	112±1.07
	13	82.9±30.1	109±0.90	13.9±0.24	3.47±0.09	2,016±9.7	1,065±21.3	0.23±0.004	106±1.24
GNANA(H)	4	62.8±11.6	125±0.8	18.5±0.23	ND	2,707±11.1	1,183±13.1	0.18±0.006	88.3±0.55
	8	24.0±10.4	130±1.62	20.7±0.28	2.34±0.006	2,108±14.2	960±12.2	0.31±0.003	103±1.36
	13	58.2±69.3	69.4±0.26	11.0±0.28	1.88±0.09	2,045±3.2	829±17.9	0.13±0.001	31.3±1.16

Table 17. 합성NANA 대비 개발NANA의 장단기 섭이에 따른 마우스 분변내 미네랄 분포조사(NANA기인성 체내메카니즘 활성화유발효과 평가,ppm)

시험구	경과 일수 (Week)	분변내 일반미네랄 함유량(PPM)							
		Ca	Fe	Zn	Cu	P	S	Mn	Mg
Control	4	28,250± 243	1,027±5.7	325±3.03	369±2.96	12,530±17.7	2,628±11.0	277±2.16	8,108±46.9
	8	23,990±1,113	781±13.5	273±1.93	241±5.82	10,400±217	1,536±46.7	237±4.15	6,995±137
	13	27,040±1,050	930±5.37	280±0.63	237±1.72	9,895±24.4	1,481±32.8	250±0.41	7,828±14.2
SNANA(L)	4	69,280± 483	347±2.14	320±0.77	69.1±0.57	21,650±110	3,535±40.2	64.9±0.35	4,729±17.9
	8	65,800± 558	338±1.59	316±2.14	ND	21,310±205	2,289±38.3	62.9±0.38	4,840±32.3
	13	57,720±2,355	282±1.99	262±2.06	4.94±0.32	16,990±116	2,623±53.4	53.6±0.26	4,378±19.5
SNANA(M)	4	78,520± 539	558±3.69	386±2.88	57.2±0.57	25,410±199	3,594±15.8	79.1±0.47	5,933±35.7
	8	85,580±3,100	385±6.84	383±5.75	ND	25,420±856	2,768±60.2	81.4±2.37	5,898±196
	13	65,830±1,250	326±3.42	309±4.34	19.2±0.47	22,570±230	2,719±34.2	62.3±0.69	5,448±63.3
SNANA(H)	4	74,750±1,129	383±3.05	356±0.70	48.6±0.36	23,710±204	2,821±29.2	72.6±0.42	4,901±38.9
	8	62,530±2,816	335±1.07	300±2.39	0.39±0.33	20,110±156	4,729±36.0	61.0±0.26	4,729±36.0
	13	84,290±1,240	424±3.01	403±5.17	60.9±0.94	26,830±327	3,843±39.4	77.7±0.39	6,384±52.8
GNANA(L)	4	82,680± 666	467±4.09	380±1.70	55.7±1.14	26,270±371	3,266±25.4	81.4±0.82	6,379±66
	8	75,470±1,408	352±2.80	353±6.14	ND	22,520±208	3,390±102	72.4±0.45	6,012±19.2
	13	84,210± 876	450±2.04	401±1.25	78.3±0.82	26,830±327	3,843±39.4	77.7±0.39	6,384±52.8
GNANA(M)	4	81,180±1,054	428±3.64	381±1.23	43.7±0.73	26,020±229	4,500±48.7	78.3±0.83	6,592±48.7
	8	63,490±3,642	331±0.90	300±1.98	ND	19,620±103	2,475±29.1	61.2±0.09	4,511±10.4
	13	86,940±1,445	408±3.98	397±3.39	67.1±1.09	27,210±197	3,038±118	74.6±0.79	6,878±46.6
GNANA(H)	4	71,390± 73.4	392±3.07	337±1.09	39.2±0.54	22,570±139	3,206±69.8	70.7±0.59	4,924±18.4
	8	49,760±1,078	260±1.63	235±2.50	ND	15,740±27.0	1,379±69.4	50.4±0.23	3,576±51.7
	13	88,820±2,266	454±3.40	461±2.64	84.0±2.05	32,560±851	2,170±34.8	80.9±1.84	5,303±144

제 6-5절 동물임상 평가(조직병리학적 안전성 조사)

1. 연구목적

세계 재조합 단백질 의약품의 판매액 기준(2001~2005) 상위 10위 제품들을 살펴볼 때 대부분이 당단백질로, 당단백질의 당사슬 구조 리모델링을 통하여 효능 및 안전성 극대화와 면역반응 등의 부작용을 최소화하기 위한 글라이코믹스 기술개발은 향후 바이오제품 개발 성패의 큰 부분을 차지할 것으로 기대된다.

당단백질은 일반적으로 당화에 따른 치료능 및 치료효과 증가와 많은 양을 투여할 수 있게 되는 장점이 있다. 이에 영유아식품내 병원성세균 사멸형 NANA소재의 개발목적으로 2차년도 까지 대량생산기술 개발, 제품적용 레시피 정립이 확립하였다. 또한 NANA소재의 특징은 미생물(*E. coli* 0157, *S. aureus*, *B. cereus*)의 membrane에 직접적으로 lysis 또는 damage를 주지 않으면서 항균작용에 탁월함을 확인하였다. 또한 개발NANA가 표준주(HEK293 cell 및 RAW 264.7 cell)에 대한 독성평가 결과 NANA 0.1%~0.5%에서 독성이 관찰 되지 않은 것을 확인하였다. 이에 NANA의 항균성 및 표준주의 대한 사전 안정성 평가결과를 기준으로 동물섭이를 통한 안전성 평가를 수행이 요구되어진다.

그러므로, 실험동물의 성장기 및 NANA소재 처리농도별로 단계를 구분하고 동물 임상 검정을 기초로 합성NANA 및 개발NANA를 비교하여 장단기 섭취시 안전성, 체내 미네랄의 변화 및 미생물의 분포변화의 결과를 토대로 영유아 식품 내 병원성 세균 사멸형 NANA소재의 개발 확립 및 실용화(제품화)에 최종 목적을 두었다.

2. 연구수행방법

가. 실험 설계와 동물사육

본 시험에서는 갓 이유한 3주령의 특정병원체 부재(specific pathogen free)수컷 ICR 마우스(대한바이오링크(주)) 81마리를 실험 조건을 일정하게 하기 위해 10일간 정상식이로 순화 적응시킨 후 건강한 동물을 3마리씩 7군(대조구;1군, 실험구;6군)으로 임의 배치하여 사용하였다.

NANA 동물임상평가를 위한 사료 레시피는 AIN-76A를 기본으로하여 1kg당 NANA(100% 순도 기준)는 1g(NANA-L 처리구), 5g(NANA-M 처리구) 및 10g(NANA-H 처리구)로 혼합 조성하였다(Table 1.). 실험식이와 식수는 자유급여법

으로 급여하였다. 실험 동물 사육실 환경은 온도 $22\pm 2^{\circ}\text{C}$, 상대습도 $55\pm 10\%$ 로 유지하였으며 명암은 12시간 주기(light : 06:00~18:00)로 조절하였다.

나. 시료 채취

실험구(NANA제제 섭취마우스)과 대조구 8주 및 13주 2차례에 걸쳐 생존한 마우스 3마리씩을 ether로 마취시킨 후 흉부절개를 한 다음 복부대동맥에서 혈액을 채취하여 항응고제 튜브(EDTA, 헤파린)에 보관하였다. 실험동물의 장기조직(5개 기관: Liver, Kidney, Spleen, Heart 및 Lung)은 혈액 채취 후 즉시 적출하여 PBS(phosphate buffered saline)용액에 1차례 세척 후 생조직의 무게를 측정 후 PBS에 2차례 세척 후 10% natural buffered paraformaldehyde(NBP)에 보관하였다.

다. 근조직의 hematoxylin & eosin 염색

조직을 10% NBP에 12시간 이상 고정시킨 다음 흐르는 물에 24시간 동안 조직을 세수 한 후 automated tissue processing에서 paraffin embedding하여 paraffin block을 만들었다. 절편기(microtome)이용하여 두께 $5\ \mu\text{m}$ 의 연속절편을 만들어 슬라이드글라스에 부착 후 xylene으로 탈파라핀화 하였다. 그리고 100%, 90%, 80%, 70%, 60% ethanol 순으로 수화(hydration)시키고 hematoxylin으로 각 조직의 핵을 염색한 후 1% HCl로 탈색한 다음 0.3% ammonia water로 중화를 시켰다. 세포질 염색을 위해 eosin Y로 세포질의 대비 염색한 후 60%, 70%, 80%, 90%, 100% ethanol 순으로 탈수과정을 거쳤다. 청명과정으로 xylene I 및 II에 담갔다가 canada balsam으로 mounting하여 광학현미경(Olympus)으로 조직을 관찰하고 사진작업을 수행한다. 각 조직 손상의 조직학적 검사는 손상 범주에서 세포의 배열상태, 핵 응축 및 necrosis(괴사)를 검사한다.

3. 연구수행결과

NANA제제의 성장 및 혈액조성과 혈액지표안전성 결과를 기초로, 추가적으로 8주 및 13주가 경과 시에 기관별(5개기관 : 간, 신장, 비장, 심장 및 폐)로 조직병리학적 안전성 검사를 실시함으로써 NANA소재의 마우스 체내 안정성을 확고히 하고자 수행하였다. 결과로서, 고 농도(1%, w/w)의 NANA제제 섭취 마우스의 8주 경과시 조직병리학적 조사를 하였다(Figure 2.)

먼저 간 조직에서 간소엽 중앙에 중심정맥을 중심으로 간세포의 배열등에 대조군과 실

협근 모두 이상이 없었다. 허파의 경우에도 허파짜리를 이루는 세포들의 이상이 없었으며 심장세포의 가로무늬근세포의 핵의 분포 등에 이상이 없었다. 또한 신장 조직에서 결합질의 사구체(토리)와 보오만주머니(토리주머니)에서 세포의 배열이나, 핵 응축과 괴사 등이 대조구와 실험구에서 차이가 없으며, 세뇨관 세포들의 파괴(세포의 배열)등에도 이상이 관찰되지 않았다. 비장의 경우에도 8주에서는 백색속질(white pulp)와 적색속질(red pulp)의 경계 부위가 뚜렷하고, 세포의 괴사 등이 관찰되지 않았다. 따라서 전체적으로 8주의 실험결과 각 장기의 손상은 아직 조직학적인 차이를 보이지 않는 것으로 판단된다.

이에 장기간인 13주차 경과 시 NANA소재 처리 농도에 따른 조직병리학적 조사를 수행하였다. NANA제제를 저 농도(0.1%, w/w)를 급이했을 때 각 근조직의 이상 여부를 확인하였다. 개발NANA 비장을 제외하고는 다른 조직에는 이상이 없었다. 개발NANA의 비장에서 백색속질과 적색속질의 경계 부위가 불분명하고, 일부의 세포가 괴사되는 경향을 보였다. 또한 간세포에서 개발NANA에서 중심정맥 주위의 간세포가 약간 비대해짐이 관찰되었다. 그러나 핵의 응축이나, 세포의 괴사는 관찰되지 않았다.

NANA제제를 중 농도(0.5%, w/w)를 급이 했을 때 각 조직의 이상 여부를 알아보았다. 모든 조직 세포에서 핵 응축이나, 괴사 등의 변화가 관찰되지 않았으며, 단지 개발NANA에서 간세포의 중심정맥 주위의 세포가 약간 비대해짐이 관찰되었다. 비장에서 백색속질의 범위가 약간 응축되어 있음이 관찰되었다. 이런 결과는 비장의 전체 무게와 비교하여 판단해야 되므로 확인 결과, 대조구의 조사된 평균 비장무게는 0.49(마우스 체중 100기준)이고 개발NANA(M)의 비장무게는 0.43으로 개발NANA의 비장의 크기가 대조구에 비해 작아 약간 응축되어 보이는 것으로 판단된다.

결론적으로, 전체적으로 보았을 때 NANA에 대한 각 조직의 독성은 조직학적으로 큰 차이를 나타내지 않았으며, 13주 급이 후 저 농도(0.1%, w/w)의 개발NANA 비장 조직에서 약간의 괴사 현상은 개체간의 차이일 수 있으며, 더 정확한 실험은 각 장기에서 발현되는 특정 단백질의 발현정도를 면역 조직 화학법으로 관찰하여 판정해야 할 것으로 판단된다.

Table 1. 합성NANA(SNANA, 대조) 대비 개발NANA(GNANA)의 농도별 사료조성내역

시험구		사료제조시 NANA첨가량(mg/사료 1Kg, AIN-76A Diet)					비고
		0일 (Starter)	4주후	8주후	13주	소계	
진행일정		11. 01.02. (입식,순치)	'12.01.09. (1차부검)	'12.02.03. (2차부검)	'12.02.31. (3차부검)	13주	
Control		사료 1Kg(AIN-76A Diet)+NANA 무첨가					
SNANA	SNANA(L)	사료 1Kg(AIN-76A Diet)+합성NANA (순도 99%이상) 1g첨가					합성 NANA
	SNANA(M)	사료 1Kg(AIN-76A Diet)+합성NANA(순도 99%이상) 5g첨가					
	SNANA(H)	사료 1Kg(AIN-76A Diet)+합성NANA(순도 99%이상) 10g첨가					
GNANA	GNANA(L)	사료 1Kg(AIN-76A Diet)+개발 GNANA (순도 20%) 2.5g첨가					개발 NANA
	GNANA(M)	사료 1Kg(AIN-76A Diet)+개발 GNANA (순도 20%) 12.5g첨가					
	GNANA(H)	사료 1Kg(AIN-76A Diet)+개발 GNANA (순도 20%) 25g첨가					

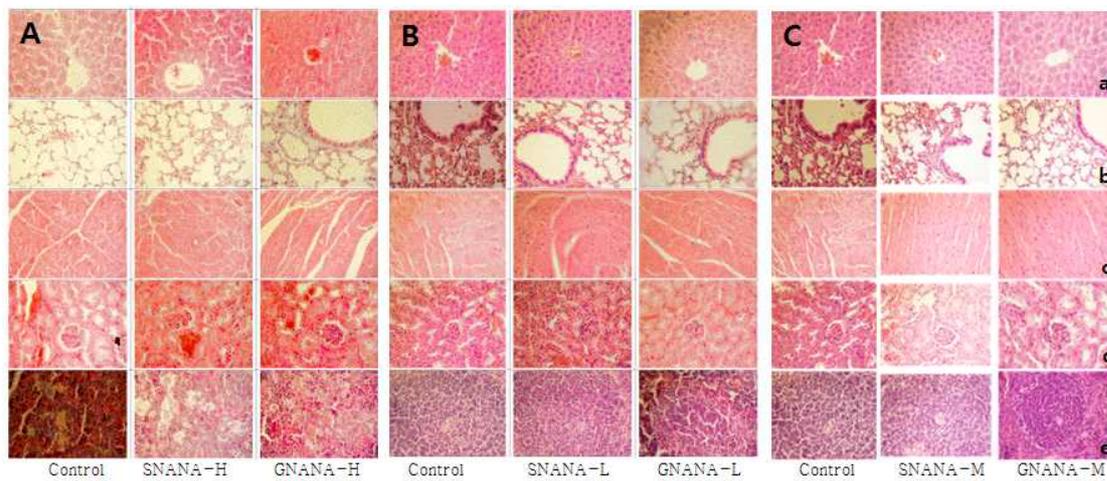


Figure 2. 마우스를 대상으로 대조 대비 합성 NANA(SNANA)와 개발 NANA(GNANA)를 농도별로 장단기(A : 8주 경과, B와 C: 13주 경과)섭이시 마우스 기관별(a: Liver b:Lung, c: Heart, d : Kidney, e : spleen)병리학적 이상 조사
 L : NANA 1g / AIN-76A사료 1Kg, M : NANA 5g/ AIN-76A사료 1Kg, H : NANA 10g/ AIN-76A사료 1Kg

제 6-6절 동물임상 평가(장내 미생물 분포변화 조사)

1. 연구목적

세계 재조합 단백질 의약품의 판매액 기준(2001~2005) 상위 10위 제품들을 살펴 볼 때 대부분이 당단백질로, 당단백질의 당사슬 구조 리모델링을 통하여 효능 및 안전성 극대화 및 면역반응 등의 부작용을 최소화하기 위한 글라이코믹스 기술개발은 향후 바이오 제품 개발 성패의 큰 부분을 차지할 것으로 기대된다.

당단백질은 일반적으로 당화에 따른 치료 능 및 치료효과 증가와 많은 양을 투여할 수 있게 되는 장점이 있다. 이에 영유아 식품 내 병원성세균 사멸형 NANA소재의 개발목적으로 2차년도 까지 대량생산기술 개발, 제품적용 레시피 정립이 확립하였다. 또한 NANA소재의 특징은 미생물(*E. coli* 0157, *S.aureus*, *B. cereus*)의 membrane에 직접적으로 lysis 또는 damage를 주지 않으면서 항균작용에 탁월함을 확인하였다. 또한 개발NANA가 표준주(HEK293 cell 및 RAW 264.7 cell)에 대한 독성평가 결과 NANA 0.1%~0.5%에서 독성이 관찰 되지 않은 것을 확인하였다. 이에 NANA의 항균성 및 표준주의 대한 사전 안정성 평가결과를 기준으로 동물섭이를 통한 안전성 평가를 수행이 요구되어진다.

그러므로, 실험동물의 성장기 및 NANA소재 처리농도별로 단계를 구분하고 동물 임상 검정을 기초로 합성NANA 및 개발NANA를 비교하여 장단기 섭취시 안전성, 체내 미네랄의 변화 및 미생물의 분포변화의 결과를 토대로 영유아 식품 내 병원성 세균 사멸형 NANA소재의 개발 확립 및 실용화(제품화)에 최종 목적을 두었다.

2. 연구수행방법

가. 실험 설계와 동물사육

본 시험에서는 갓 이유한 3주령의 특정병원체 부재(specific pathogen free)수컷 ICR 마우스(대한바이오링크(주)) 81마리를 실험 조건을 일정하게 하기 위해 10일간 정상식으로 순화 적응시킨 후 건강한 동물을 3마리씩 7군(대조구;1군, 실험구;6군)으로 임의 배치하여 사용하였다.

NANA 동물임상평가를 위한 사료 레시피는 AIN-76A를 기본으로하여 1kg당 NANA(100% 순도 기준)는 1g(NANA-L 처리구), 5g(NANA-M 처리구) 및 10g(NANA-H 처리구)로 혼합 조성하였다(Table 1.). 실험식이와 식수는 자유 급여법

으로 급여하였다. 실험 동물 사육실 환경은 온도 $22\pm 2^{\circ}\text{C}$, 상대습도 $55\pm 10\%$ 로 유지하였으며 명암은 12시간 주기(light : 06:00~18:00)로 조절하였다.

나. 시료채취

마우스의 분변은 부검들어가기 전일 30분내에 배설한 변을 채취하여 멸균된 1.5 ml 튜브에 넣고 4°C 에 보관 하였다.

다. 시료 전처리 및 배양조건

채취한 분변시료를 멸균된 식염수(0.9% NaCl)에 십진 희석 방법을 이용하여 희석하였다. 사용된 배지는 유산균을 확인하기 위해 BCP 한천배지(Eiken), 대장균을 확인하기 위해 MacConkey 한천배지(BD), 총 균수를 확인하기 위해 TSA 한천배지(Tryptic Soy Agar, BD)를 사용하였다. 희석된 시료를 각 배지에 $50\ \mu\text{l}$ 씩 도말하여 평판배양법으로 37°C 24시간(BCP, 48시간 배양) 배양하였다. 배양 후 세포의 수가 30~300개인 플레이트의 세포수를 측정기로 각 균의 세포수를 측정하였다.

라. 미생물 동정

미생물의 동정에는 Matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry (MALDI-TOF) Bruker사의 microflex제품을 사용하여 분석하였다.

마. 분변에서의 영양원 분석

채취 한 분변 시료를 0.9%생리식염수에 희석 후 원심분리(10000rpm 5분) 후 상층액을 $0.25\ \mu\text{m}$ 필터를 이용하여 HPLC(High-Performance Liquid Chromatography)(Agilent 1100; Agilent Technologies)분석 시료를 만들었다. Column은 Aminex[®] HPX-87H Ion Exclusion Column(Bio-Rad)을 사용하여 분석하였다.

3. 연구수행결과

NANA소재별(합성NANA 및 개발 NANA), 농도별(0.1%, 0.5% 및 1%) 및 섭이기간(8주 및 13주)에 따라 장내미생물총 변화를 유발하는지를 총 균수(TSA 배지) 대비 대장균구(MacConkey 배지) 및 유산균(BCP 배지)으로 구분하여 호기조건하에서 확인하

였다(Figure 3., Table 18.). 또한, HPLC를 이용한 분변내의 영양원의 분포를 확인함으로써 NANA 소재가 미생물 변화와 영양원과의 상관관계를 확인하고자 하였다(Figure 4., Table 19.). 이는 NANA소재로 인한 유산균의 증가로 정장작용, 면역증강 작용 및 영양학적 가치증진의 기초적 연구를 확보하는 목적이기도하다. 결과는 다음과 같다.

NANA섭이후 체내에 흡수된 NANA는 생체대사 메카니즘을 걸쳐 최종 배설경로인 장내분변으로 축적되면서 Trigger로서 장내미생물의 변화를 점진적으로 유발하는 것으로 판단되었다($P<0.01$). 장내 축적된 NANA는 Probiotic 혹은 Synbiotic패턴으로 장내미생물의 변화를 유발하였는데, 섭이기간과 섭이농도 증가에 따라 Probiotic(유산균 증가) 패턴에서 Synbiotic(유산균증가 및 대장균구 감소)패턴으로 전환되는 경향으로 인정되었다($P<0.05$). 우선 8주 경과시 장내미생물의 패턴변화에 미치는 경향을 살펴보았다.

섭이기간별로 8주이내는 전체시험구(NANA섭이)에서 대부분이 Probiotic과 Synbiotic 패턴을 동시에 보였다. 그러나, 8주이상 경과시 장내미생물총은 정상적인 균형을 회복하는 경향을 보였다($P<0.01$).

세균총의 변화(대조 대비)는 8주이내에서, 분변내 총균수는 최대 약 5배까지 감소와 더불어 대장균은 대부분 검출되지 않았으나, 유산균은 최대 10배까지 증가하는 패턴을 보였다($P<0.01$).

NANA제제별로 Probiotic 및 Synbiotic패턴 변화에 미치는 효과를 비교하여 보았더니, 단기간(8주 이내)에 대부분이 Probiotic패턴과 동시에 Synbiotic패턴을 유의하게 높게 유발하였던 개발NANA가 장기간(8주 이상)에서 보면 합성NANA보다 정상적인 장내미생물의 정상적인 회복도 높은 것으로 인정되었다($P<0.05$). 다시 말하자면 단기간 동안의 NANA섭이시는 유산균은 증폭되면서 대장균이 검출되지 않은 Probiotic의 효과가 있었으나 장기간으로 가면, 개발NANA를 섭이 시 유산균도 증폭되면서 대장균의 검출도 보이며 장내 미생물총에 안정적인 형태의 Synbiotic의 패턴을 보였다.

NANA섭이시 장내미생물의 변화 패턴(Probiotic과 Synbiotic패턴)에 따른 분변내 영양원(단백질류, 지방류 및 탄수화물류 등)의 변화를 비교함으로써 NANA기인성 영양이용성을 판단하여 보았다(Figure 4.) 그 결과는 다음과 같다.

대조구의 경우, 분변 내 영양원(단백질류, 지방류 및 탄수화물류, 수용성 단백질류 및 수용성 탄수화물류 별 검출 량 합계 100기준)이 골고루 검출되었다. 그러나, 장내미생물의 변화가 심하였던 전체NANA 섭이구에서는 이들의 활동에 의하여 분변내 영양원은 높은 수치로 감소하였다. 즉, 합성NANA 섭이구는 약 26%~95%가 감소하였으며, 개발NANA경우도 약12%에서 최대95%까지 농도별로 비례하여 감소하는 경향을 보였다($P<0.01$). NANA섭이에 따라 유산균 혹은 대장균이 우점균으로 증가하면, 공통적으로

분변내 영양원은 감소하는 결과를 보였다($P<0.01$)

대조구 대비 NANA섭이에 의하여 단기간(8주 이내)에 Probiotic패턴과 Synbiotic패턴을 동시에 보였던 장내미생물이 13주 경과 후 정상회복시에도 분변내 영양원은 검출되지 않았다($P<0.01$). 총 균수와 유산균등도 동시에 활성화 됨으로 인하여, 장내에서 영양분해 및 영양원으로 사용됨에 따라 대조구에서 검출되었던 단백질류 및 지방류 등은 검출되지 않았다. 이는 유산균이 증가되면 단백질류 및 지방류가 대부분 분해 및 체내 흡수 메카니즘으로 인한 것으로 판단되어 결국 NANA소재는 섭취농도 및 기간 등을 적절히 배분하여 활용 시 Probiotic 및 Synbiotic효과가 뛰어날 것으로 확인되었다($P<0.01$).

Table 1. 합성NANA(SNANA, 대조) 대비 개발NANA(GNANA)의 농도별 사료조성내역

시험구		사료제조시 NANA첨가량(mg/사료 1Kg, AIN-76A Diet)					비고
		0일 (Starter)	4주후	8주후	13주	소계	
진행일정		11. 01.02. (입식, 순치)	'12.01.09. (1차부검)	'12.02.03. (2차부검)	'12.02.31. (3차부검)	13주	
Control		사료 1Kg(AIN-76A Diet)+NANA 무첨가					
SNANA	SNANA(L)	사료 1Kg(AIN-76A Diet)+합성NANA (순도 99%이상) 1g첨가					합성 NANA
	SNANA(M)	사료 1Kg(AIN-76A Diet)+합성NANA(순도 99%이상) 5g첨가					
	SNANA(H)	사료 1Kg(AIN-76A Diet)+합성NANA(순도 99%이상) 10g첨가					
GNANA	GNANA(L)	사료 1Kg(AIN-76A Diet)+개발 GNANA (순도 20%) 2.5g첨가					개발 NANA
	GNANA(M)	사료 1Kg(AIN-76A Diet)+개발 GNANA (순도 20%) 12.5g첨가					
	GNANA(H)	사료 1Kg(AIN-76A Diet)+개발 GNANA (순도 20%) 25g첨가					

Table 18. 마우스를 대상으로 합성NANA(SNANA) 대비 천연NANA(GNANA)소재를 농도별 및 장단기(4주,8주 및 13주)섭이에 따른 장내 미생물총 변화 조사

섭이일정 및 선택배지별 동정군류		무기태 및 유기태화 미네랄 소재의 섭이일정에 따른 검출균수 (cfu/feces 1g)													
		CNTL		무기태 미네랄처리구						유기태 미네랄 처리구					
				SNANA(L)		SNANA(M)		SNANA(H)		GNANA(L)		GNANA(M)		GNANA(H)	
섭이일수 (Week)		8	13	8	13	8	13	8	13	8	13	8	13	8	13
TSA (X10 ⁶)	<i>Enterococcus faecalis</i>	0.74	0.17	0	0.45	0	10.24	0	1.44	0.21	5.13	0	0.5	0	0.79
	<i>Aerococcus viridans</i>	0	0	0.1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	소계 (유산균)	0.74	0.17	0.1	0.45	0	10.24	0	1.44	0.21	5.13	0	0.5	0	0.79
	<i>Staphylococcus sciuri</i>	0	0.1	0.46	0.14	0.93	0	0.14	0.1	2.45	0.06	0.52	0.01	0.54	0.03
	<i>Enterococcus hirae</i>	0	0.03	0	0	4.48	0	1.52	0.1	1.89	0.02	0.01	0.06	0	0.03
	<i>Escherichia coli</i>	1.54	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	소계 (일반균)	1.54	0.13	0.46	0.14	5.41	0	1.66	1.64	4.35	0.08	0.53	0.07	0.54	0.06
	기타(미동정균)	0.11	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
합 계	2.39	0.3	0.56	0.59	5.41	10.24	1.66	1.64	4.56	5.22	0.53	0.57	0.54	0.84	
MacConkey (X10 ⁶)	<i>Escherichia coli</i>	1.81	1.72	0	0	0	0	0	1.66	0	22.5	0	0.65	0	2
BCP (X10 ⁶)	<i>Staphylococcus xylosum</i>	0	0	0.03	0	0	0	0	0.03	0	0.23	0.03	0	0	0.81
	<i>Enterococcus faecalis</i>	0.06	0	0	0.32	2.26	7.59	0.04	0.42	2.63	0.23	0	0.28	0	0
	<i>Lactobacillus murinus</i>	0.31	2.99	0.16	0.01	0	0	0	0	0	0	0.16	0	0.3	0
	소계 (유산균)	0.38	2.99	0.19	0.33	2.26	7.59	0.04	0.45	2.63	0.46	0.19	0.28	0.3	0.81
	<i>Staphylococcus sciuri</i>	0	0.11	0.05	0	0	0	0	0	0	0	0.22	0	0.23	0
	<i>Enterococcus hirae</i>	0	0	0	0.55	1.96	0	2.38	0	0.03	0.3	0.02	0	0	0.23
	<i>Escherichia coli</i>	0.03	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	소계 (일반균)	0.03	0.11	0.05	0	1.96	0	2.38	0.81	0.03	0.3	0.24	0	0.23	0.23
기타(미동정균)	0	0.01	0	0.06	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
합 계	0.4	3.12	0.23	0.94	4.22	7.59	2.41	1.26	2.66	0.76	0.42	0.28	0.52	1.04	

TSA배지(총균수 조사), MacConkey Agar(총균수내 대장균군 분포), BCP Agar(총균수내 유산균수 분포), Control(Control), 섭이방법 : AIN-76A Diet내 농도별 첨가 및 시험기간별 자유 섭이, 배양조건: 37℃, 24시간 호기 배양

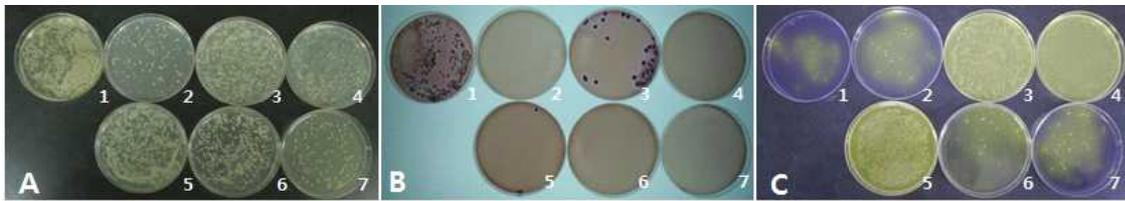


Figure 3. 마우스를 대상으로 8주간 농도별 혼합섭식에 따른 합성NANA(2,3,4)와 개발NANA(5,6,7)의 장내 미생물총 변화조사[A : 총균수(TSA배지), B : 대장균군(MacConkey배지), C:유산균(BCP), 1 : 대조군, 2: SNANA-L처리구, 3 : SNANA-M 처리구, 4: SNANA-H처리구, 5: GNANA-L처리구, 6 : GNANA-M처리구, 7: GNANA-H처리구

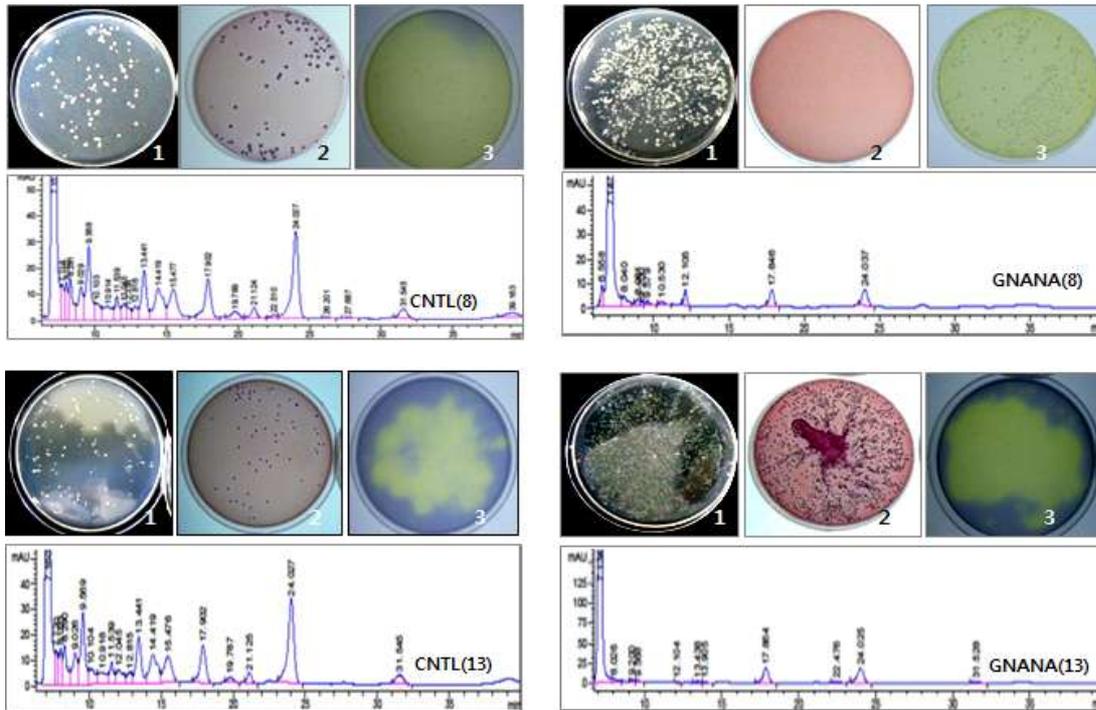


Figure 4. NANA제제를 장기(8주 및 13주)섭이시, 장내미생물총 변화 및 이에따른 분변내 영양원 분포패턴(HPLC) 비교결과

CNTL(8) : 대조구(8주경과), CNTL(13) : 대조구 13주 경과, GNANA(8) : GNANA-L처리구 8주경과, GNANA(13) :GNANA-L처리구(13주 경과) 1 : 분변내 총균수(TSA배지, 희석배수: 2.8×10^5 cfu/g), 2:대장균수(MacConkey, 희석배수 : 2.8×10^3 cfu/g), 3: 유산균(BCP, 희석배수 : 2.8×10^5 cfu/g)

Table 19. NANA제제를 장기(8주 및 13주)섭이시, 분변내 장내미생물총 변화 및 이에 따른 영양원 분포패턴 비교결과

시험구		NANA섭이기간별 영양원 분포변화 조사\ (HPLC, 검출Peak 총면적 기준/분변g)	
		8주	13주
Control		92,290	45,170
비교구 (합성NANA)	SNANA(L)	68,800	9,792
	SNANA(M)	12,841	57,272
	SNANA(H)	2,627	22,204
시험구 (개발NANA)	GNANA(L)	10,771	19,387
	GNANA(M)	4,907	12,328
	GNANA(H)	10,701	4,029

S:합성NANA, G : GMP유래개발 NANA, L : 순수NANA 기준 1,000ppm첨가(0.1%)., M : 순수NANA기준 5,000ppm첨가(0.5%), H : 순수 NANA기준 10,000ppm첨가(1%)

제 7 절 영·유아식내 유해세균 제어형 제품 레시피 정립

1. 연구목적(제품화 레시피 설정 배경)

개발 NANA소재의 제품화(제형화)를 위한 레시피 설정을 위하여, NANA를 각각 액상 및 고형상 구분하여 농도별(w/w), 보관조건별(상온, 냉장)로 장단기 보관성 등과 관련한 제품적용성 평가를 거쳐 상용화에 있어 편리성이 확보되는 정형화 제품 레시피를 확립하였다. 다음의 결과를 토대로 제형화 레시피를 정립하였다.

가. 우유 단백질(GMP)에서 대량생산된 NANA의 제품내 감염균에 대한 농도별 및 시간경과에 따른 항균성 더불어 항균저하에 관계하는 간섭요인 등을 병행하여 판단한 항균성 평가결과, 최적 MIC농도는 0.5%(w/w)로 설정하였다($P < 0.05$). 따라서, 제형화 레시피 정립간 고려사항으로서, 최종사용시 0.5% 농도가 함유되어야 한다는 조건이 필요함을 주요조건으로 채택하였다.

나. 항균성과 관련한 MIC농도를 기준으로, 상온조건에서 멸균수 및 멸균유에 첨가후 시간이 경과하면 할수록 성장변화(갈변화 및 분자량 변화)가 점차적으로 심해지는 경향이였다. 따라서, 제형화(제품화)에 있어 액상제제 보다는 분말화 및 고형화 제품으로 하는 레시피 설정간 또 하나의 주요조건으로 채택하였다.

다. 항균성과 관련한 MIC농도를 기준으로, 내산 및 내염기 조건을 평가하여 보았더니, 내산성은 인정되지 않았으며, 내알카리성은 보유하고 있음을 확인하였으나, 경과시간이 길어지면 역시 내알카리 효과도 감소하는 것으로 평가되었다. 따라서, 이 결과는 제형화(제품화)시 분말화 및 고형화 형태에서 pH는 중성 조건을 충족하는 조건을 또 다른 레시피 항목으로 채택하였다.

라. 결론적으로, 상기 제품화(제형화) 조건에 충족하도록 있어 최종 정형화 제품 레시피를 확립하였다.

2. 연구수행방법

본 연구는 개발된 개발 NANA를 원료로 하여 제품화를 위한 제형 및 제형별 레시피를 설정하였다. 제형화 성상으로는 바로 섭취가 가능한 정제형 그리고 액상제품 내 첨가시 분산과 용해가 쉽도록 한 과립형으로 하여 레시피를 정립하였다(그림 1). 이를 위하여, 건강기능성 식품제조회사이면서, 정제형 및 과립형 생산시설을 보유하고 관련 제품개발에 관한 KNOW-HOW를 충분히 보유하고 있는 아미코젠사(경남 진주소재)에 의뢰하여 제형별 레시피를 정립하였다.

제형별 레시피 조건으로서, 정제형과 과립형으로 대별하여 섭취의 편리성을 부여하

도록 제품화 하였다.

정제형은 2가지 형태로 설정하였고, TYPE-1은 원형(크기 : 직경 1cm x 두께 0.5cm, 무게 : 500mg/정, NANA함유량 : 2.5mg/정), TYPE-2는 봉상형(크기 : 가로 1.8cm x 세로 0.8cm x 두께 0.5cm, 무게 : 750mg/1정, NANA함유량 : 5.0mg/정)으로 레시피를 정하였으며, 과립형은 1포(Stick 포장)당 1,000mg으로 정하였고 이때 제품별 NANA함유량은 5mg이 되도록 조건을 부여하였다(Table 1~2). 제형별 섭취에 따른 조건으로서, 정제형은 위내에서 분해되어 위장관내에서 흡수되도록 제형화 조건을 부여하였고, 과립형은 액상음료를 통한 섭취를 기준으로 하였으므로 액상제품내에서 혼합이 용이토록 하는 조건으로 정하였다.

제품내 감염된 병원균에 대한 항균성을 확보하도록 제품사용방법은 다음과 같다. 즉, 액상내 혼합조건으로 100g(ml)당 정제형-1은 2정, 정제형-2는 1정 및 과립형은 1포를 첨가시 NANA함유량은 0.5%를 충족하는 조건으로 3분을 접촉시 항균성은 99%이상을 확보토록 조성하였다. 제형별 제품은 추후 영·유아부터 성인까지 전 연령대에 적용이 가능하도록 영유아식 제품 제조기준으로 하여 사용재료는 식품공전(식약청, 2010) 및 식품첨가물공전(한국식품공업협회,2007)에 등재된 재료만을 엄선하여 최종 레시피 조성을 완료하였다.

3. 연구결과

NANA소재개발의 최종목표가 천연항균제로서 고부가 제품개발임에 따라 제품적용성 평가를 기초로 하여, 액상제형보다는 고상제형이 적절함을 알 수 있었다. 따라서, 생산 NANA소재는 제품화 원료로서 고상제형으로 정하고, 액상첨가형(과립형)과 섭취형(정제형)로 구분 제품화 하였으며 최종 상용성을 극대화 하였다. 제품화를 위한 제형별 레시피(경제성 평가 포함) 정립 결과는 다음과 같다.

가. NANA소제의 목적유해균의 제균성을 확보 되도록 제형을 정제형과 분말형으로 제조 레시피를 구분정립하였는데, 상용시 최종 용해액 100g당 0.5% NANA제제가 함유되도록 고려하여 제형화 레시피를 정립하였다(Table 1-2).

나. 제형별 레시피로서, 섭취용으로는 정제형 I(원형, 1정/500mg, NANA함유량 : 2.5mg, 단가 : 약 11.63원/정)과 정제형 II(봉상형, 정/750mg, NANA함유량 : 5mg/정, 단가 : 20.25원/정) 그리고 액상제용으로, 과립형(분말형, 1스틱/2,000mg, NANA함유량: 5mg/1Stick, 단가 : 22.25원/Stick)으로 구분하여 최종 레시피를 정립하였다. 이때 제형별 NANA함유량은 정제형(타정형)은 40~50mg, 과립형은 100mg이 함유토록 하였다.



G-NANA(순도:25%)

GMP가수분해물

효소반응후 침전물(NANA함유:1.03%)

메탄올 침전물(NANA함유:2.5%)

Fig. 1. 대량생산 NANA를 이용한 정립된 제품화 레시피를 적용하여 생산된 NANA시작품

Table 1. 개발NANA의 제형화 TYPE별 레시피 정립결과(과립형)

제품명	NANA 과립			제형 1정		과립 NANA 5mg/1,000mg	
	원료명	배합비	mg	NANA함량	단가(원)	1kg 제조 (g)	샘플과립 사진
조성비	NANA(25%)	2.000	20.000	5.000	15	20.00	 S size : <20mesh
	capric acid	0.500	5.000		0.25	5.00	
	스테아린산마그네슘	1.000	10.000		7	10.00	
	HPMC	2.000	20.000			20.00	
	미소말트	14.500	145.000			145.00	
	결정셀룰로오스	30.000	300.000			300.00	
	폴리덱스트로즈	50.000	500.000			500.00	
	합계	100	1,000			22.25	
생산량	1kg 생산수율 : 95%, 1g/우유, 물100ml기준						

Table 2. 개발NANA의 제형화 TYPE별 레시피 정립결과(TYPE : 정제형-1)

제품명	NANA 500mg 정제			제형		정제	
	원료명	배합비	mg/1정	NANA함량	단가(원)	1kg 제조(g)	샘플타정 사진
조성비	NANA(25%)	2.000	10.000	2.500	7.5	20.00	 직경: 1cm, 두께: 0.5cm
	capric acid	0.500	2.500		0.125	5.00	
	스테아린산마그네슘	1.000	5.000			10.00	
	HPMC	2.000	10.000			20.00	
	이소말트	14.500	72.500		4	145.00	
	결정셀룰로오스	30.000	150.000			300.00	
	폴리빅스트로즈	50.000	250.000			500.00	
	합계	100	500		11.625	1,000	
생산량	1kg 타정시 생산되는 타정 개수: 2,000개						

Table 2. 개발NANA의 제형화 TYPE별 레시피 정립결과(TYPE : 정제형-2)

제품명	NANA 750mg 정제			제형 1정		정제 NANA 5mg/750mg(1정)	
	원료명	배합비	mg/1정	NANA함량	단가(원)	1kg 제조(g)	샘플타정 사진
조성비	NANA(25%)	2.670	20.025	5.01	15	26.70	 가로 1.8cm, 세로 0.8cm, 두께 0.5cm
	capric acid	0.667	5.003		0.25	6.67	
	스테아린산마그네슘	1.000	7.500		5	10.00	
	HPMC	2.000	15.000			20.00	
	이소말트	13.663	102.473			136.63	
	결정셀룰로오스	30.000	225.000			300.00	
	폴리빅스트로즈	50.000	375.000			500.00	
합계	100	750		20.25	1,000		
생산량	1kg 타정시 생산되는 타정 개수 : 1,300개, 적용: 1정 /1타백 100g						

제 4 장 목표 달성도 및 관련분야에 기여도

제 1 절 목표달성도

현재 영유아식품(조제분유 및 이유식 등)내 감염되어 공중보건학적인 피해를 일으키고 있으나 뚜렷한 대책이 없는, 고질적인 병원성 세균(*Bacillus cereus*, *Enterobacter sakazakii*)에 대하여, 항균능력(경제성 확보)을 보유한 유단백질(K-casein 및 GMP)기원성 천연Bacteriocin(NANA)를 효소적 처리법으로 분리정제 및 이를 대량생산과 이를 다시 유제품내 첨가하므로써, 소비자 기호성에 충족되는 안전식품 생산에 적용하는 일관된 시스템을 적용 구축하므로써, 국제기술력(글라이코믹스 연구개발 분야에서 국제 우위 선점과 산업화가 담보된 최종 안전 영·유아식품 개발 및 추후 용도용법 확대를 위한 소재 및 제품화에 개발에 목적을 두었다. 전체 연구목표별 달성도는 다음과 같다.

연구목표	달성도 (%)	연구개발결과
1. NANA 소재 개발 기초자료조사	100	1. 국내외 NANA가격 및 시장적용성 조사 완료 2. 국내외 연구개발방향 조사 완료 3. 국내외 관련특허출원(등록, 기준: 일본,미국)자료 조사 완료 4. 합성NANA 물질안전성자료(MSDS)자료 조사 완료
2. NANA 개발간 필수분석법 정립	100	1. 영양성분 분석법 정립완료 - 조단백질(킬달분석), 조지방(거버법), 당류분석법(HPLC) - 지방산 분석 : GC(FID) 2. 분자량 변화분석 : FPLC 3. 유기산(NANA) 분석 : HPLC 4. 개발NANA물성 검정 : FT-IR, XRD, SEM 등 5. 미생물 검사법(식품공전기준) 정립
3. NANA제제 분리용 유단백질(GMP) 소재 준비 및 공여(협동연구기관)	100	1. Milk->유청분말(치즈 제조 부산물) 제조->GMP제조 완료 2. GMP 협동연구기관 공여(제조 및 공여량) : 1,200Kg
4 .NANA항균(유해미생물 대상)스펙트럼 사전평가	100	1. 공시균 대비 NANA의 MIC검정완료 2. 균별(그람음성 및 양성균 및 <i>E.coli</i> O157:H7)항균성 검정완료 3. 열처리 및 비열처리 조건하 항균성 검정완료 4. 미네랄 및 Milk첨가시 항균저하요인 분석완료
5. NANA의 현장적용 조건대비 물리/이화학적 변화 사전평가	100	1. 열처리 조건(70~121℃)별 NANA분자량(FPLC, HPLC) 변화 조사 완료 2. 열처리 전/후, 항균성(그람양성 및 음성균 구분) 조사 완료 3. 열처리 전/후, 장단기(1년)분자량 변화 및 항균성 조사 완료 4. 산 및 알카리 안정성(색상 및 분자량 변화) 조사완료 5. NANA의 제품적용성 사전평가 기초자료 확보완료

연구목표	달성도 (%)	연구개발결과
6. NANA 동물안전성 사전평가(<i>in vitro</i> : 표준 세포주 활용)	100	1. 표준 세포주[HEK 293 cell (human embryonic kidney cell), RAW 264.7 cell (macrophage cell)] 활용 <i>in vitro</i> 독성검정법 정립 2. 검증법 정립 : NO 및 MTT assay(연계 독성평가)
7. NANA 안정성(장단기 가속시험)평가	100	1. NANA함유 완제품 제조방법 평가 완료: 분말형 저온보관 2. 단기 및 장기 보관시 분자량 변화 조사 결과 확보 3. 연구종료 시, 제품 레시피(보관안정성) 기초자료 확보
8. NANA유래 내성형성 및 항생제 내성보유균에 대한 항균효과 평가	100	1. NANA처리에 따른 항균관련 형태변화 확인(완료) 2. 상용 항균제 대비 NANA제제 처리에 따른 항균 메카니즘(SAM, TEM) 검정
9. NANA생산형 Neuraminidase Assay기법 정립	100	1. 최적 기질조성 조건 정립완료 2. 반응액 조건(온도 및 시간) 정립완료 3. Blank 조건 정립완료 4. NANA 정량(TBA 방법) 기법 정립완료(NANA 농도별 검량곡선 정립, OD, 549nm)
10. 식품용 미생물로부터 Neuraminidase스크리닝 정립	100	1. 50여종중 3 종류의 미생물에서 유의성 높은 Neuraminidase 활성 측정 완료(경제성 적합평가). 2. Neuraminidase 생산균주 선발 결과 : 효소역가와 효소생산의 용이성을 등을 고려하여 <i>Arthrobacter ureafaciens</i> KCTC 3387를 Neuraminidase 생산균주로 최종결정
11. 선발 식품미생물 적용Neuraminidase 분리정제 및 특성 연구	100	1. 분리정제 배양 상등액에 비해서 최종적으로 specific activity를 약 5배 증가 조건정립(완료) 2. 분리 효소액 사용하여 유단백질 (GMP)에 대한 반응특성을 연구완료 (2차년도 대량생산시스템정립과 연계) - 최적 pH,온도,효소 열안정성,pH, 안정성,염류등 간섭 및 영향평가(완료)
12. 선발식품 미생물 분리 Neuraminidase 적용 GMP내 NANA최적 생산조건 확립	100	1. Neuraminidase를 이용하여 GMP로부터 NANA를 절단하여 내는 최적 조건을 확립 기법 정립완료 2. 기질GMP적용 분리효소 반응조건 정립 (완료) 3. 최적 기질농도 정립완료(2차년도 개발효소 적용NANA대량생산 연계 시스템 정립연계 실시 완료)
13.NANA제조용 효소 및 NANA 대량생산 방법 정립	100	1. 선발식품미생물(<i>Arthrobacter</i>)분리효소(Neuraminidase)를 이용한 NANA대량생산기법 정립(완료) 가. <i>Arthrobacte</i> 대상 Neuraminidase 대량생산기법 정립 - 개발효소 이화학적 특성조사 완료 - 효소대량 생산시, 경제성(생산수율,분해율등)평가(완료) 나. 개발효소 아미노산 서열분석 완료 - <i>Arthrobacter</i> 분리 Neuraminidase지적재산권 확보연계

연구목표	달성도 (%)	연구개발결과
13.NANA제조용 효소 및 NANA 대량 생산방법 정립	100	2. 개발효소 적용 GMP내 NANA대량생산기법 정립 가. 경제성(NANA생산성, unit/GMP 1Kg기준)평가 나. 대량생산시 문제점(NANA손실 및 수율향상) 도출완료 다. NANA 산업화 기준설정(완료) -생산수율(목표대비 33% Loss발생)등 대량생산간 문제점 도출 -제품적용형 NANA대량생산시 순도기준설정(생산순도:26%기준) 3. NANA생산시 회수율(손실을 저감)증대기법 정립(완료) 가. 분해반응공정(침전물 제거)시 Loss해결 나. 에탄올 침전물 제거공정시 Loss 해결 다. 건조비용 저감 방법 : 동결건조 공정개선 라. 회수율 증강방법 : 75%이상 정립
14.개발 NANA의 항균 스펙트럼 및 항균메카니즘	100	1. 개발 NANA 항균스펙트럼 비교조사(완료) - 그람양성균, 그람 음성균 및 효모구분(MIC 변화율 검정) 2. 개발 NANA 내성형성 유무판정(완료) 가. 37종 항생제 대비 내성보유 여부확인 나. 10세대 반복처리(내성보유 및 미보유 <i>E. coli</i> 표준균 적용 평가) 3. 항균(효모, 대장균) 메카니즘 평가(완료) 가. 형태(SEM)변화(효모, 대장균 기준) 나. 세포막 관련평가(방법 1: 형광dye Method, 방법 2: Depolarization Method, 방법 3: Calcein Leakage in artificial Vesicles Method)
15.개발NANA현장적용성 평가	100	1. 장단기(1년) 물리/이화학적/생물학적 변화 조사(완료) 가. 열처리 전/후 안정성 평가 나. 장단기(1년),성상별[분말, 1%(w/w)액상] 및 보관조건별(상온,냉장)안정성[물리이화학적 및 항균성(생물학적)변화]연계평가 2. 제품적용 방향성 설정 평가 :액상제품 및 분말제품 첨가형 구분
16. 목적균 제어효과 보유 제형 및 관련 레시피 정립(경제성 평가)	100	1 유해균 제어형 NANA 제품화 레시피 확립(완료) - 타정형(즉시섭이형), 과립형(우유등 액상제품 첨가형) 2. 식품첨가물 허가진행: 검정기관(수과원, 축산물규격과, '10.12.19.기준) 검토중(제품적용 허가부분) - 관련기관(식약청, 수과원)기술컨설팅 완료 (방안 : 식품첨가물->건기식->의약외품->의약품 순) 3. NANA항균성 확보형 첨가량 확보(완료) - 천연항균제로서 효과 확보 -액체 100ml(혹은 g)당 NANA첨가량 확보 : 0.5g(0.5%) - 천연항균제 효능 확보:그람음성균(사멸), 그람양성균(정균) 4. 제형(TYPE)별 레시피 구분 정립(완료) - 정제형(타정), 과립분말형(액체적용형) 5 제형 레시피별 용도용법(응용성)확대(완료) 가. 정제(타정)형: 유아용~성인용 1) 구강 적용형(치주염예방/치료제), 2)위 적용형(항헬리코박터) 3) 장 적용형(Probiotic 및 Synbiotic제제) 나. 액상제품첨가(과립)형 : 영유아용 1) 우유 및 액상제품 첨가형 : 영유아 유해세균 사멸제 2) 구강적용형 : 치주염 및 충치예방제 3) 장 적용형 : Synbiotic제제, 장염예방/치료제(대장균)

연구목표	달성도 (%)	연구성과
17.개발NANA현장 적용성 평가	100	1. 장단기(1년) 물리/이화학적/생물학적 변화 조사(완료) 가. 열처리 전/후 안정성 평가 나. 장단기(1년),성상별[분말, 1%(w/w)액상] 및 보관조건별(상온, 냉장)안정성[물리이화학적 및 항균성(생물학적)변화] 연계 평가 2. 제품적용 방향성 설정 평가 :액상제품 및 분말제품 첨가형 구분
18. 목적균 제어효과 보유 제형 및 관련 레시피 정립(경제성 평가)	100	1 유해균 제어형 NANA 제품화 레시피 확립(완료) - 타정형(즉시섭이형), 과립형(우유등 액상제품 첨가형) 2. 식품첨가물 허가진행 : 검정기관(수과원, 축산물규격과, '10.12.19.기준) 검토중(제품적용 허가부분) - 관련기관(식약청, 수과원) 기술컨설팅 실시후 제품화 방향 설정(방안:식품첨가물->건기식->의약외품->의약품 순) 3. NANA항균성 확보형 첨가량 확보(완료) - 천연항균제로서 효과 확보 -액체 100ml(혹은 g)당 NANA첨가량 확보 : 0.5g(0.5%) - 천연항균제 효능 확보:그람음성균(사멸), 그람양성균(정균) 4. 제형(TYPE)별 레시피 구분 정립(완료) - 정제형(타정), 과립분말형(액체적용형) 5 제형 레시피별 용도용법(응용성)확대(완료) 가. 정제(타정)형: 유아용~성인용 1) 구강 적용형(치주염예방/치료제), 2)위 적용형(항헬리코박터) 3) 장 적용형(Probiotic 및 Synbiotic제제) 나. 액상제품첨가(과립)형 : 영유아용 1) 우유 및 액상제품 첨가형 : 영유아 유해세균 사멸제 2) 구강적용형 : 치주염 및 충치예방제 3) 장 적용형 : Synbiotic제제, 장염예방/치료제(대장균)
19. 동물임상평가	100	1. NANA 동물안전성 사전평가(<i>in vitro</i> : 표준 세포주 활용) 가. 표준 세포주[HEK 293 cell (human embryonic kidney cell), RAW264.7cell(macrophage cell)] 활용 <i>in vitro</i> 독성검정법 정립 나. 검증법 정립 : MTT assay(세포활성도 측정) 2. 동물임상 평가 가. 동물검정용 NANA함유 사료레시피 설정 및 제조 나) NANA 장단기(4주, 8주, 13주) 섭이시 안전성 평가(완료) 1) 일정별 사료섭취량 및 일일성장 결과 측정 2) 병리/혈액 조성, 생체중 및 기관별(간,신장,지라,심장,허파,척추, 대퇴골)무게변화 및 조직병리 검사(완료) 3)혈액안전성 지표 조사(혈액조성 : 4종, 지표 : 14종)완료 4)적출기관별 및 분변내 미네랄(Ca, Fe, Zn, Cu, Mn, Mg, P, S) 배설량 조사 및 대퇴골내 염색체 이상 조사 3. 장내미생물 비교조사(총균수, 대장균구, 유산균구로 구분)완료
20. 사업화	100	1. 사업화 진행 로드맵 설정 가. 1단계 : 지적소유권 확보(특허 출원 및 등록)후 학술발표 나. 2단계 : 관련기관(식약청, 수과원) 기술컨설팅 실시 다. 3단계 : GLP검정(천연물신약 분야 : 천연항균제) 라. 4단계 : NANA대량생산시스템 및 사업화 로드맵 설정 1)년간 NANA생산량, 예상판매액, 생산시설구축예정예산, 소요대지 2) 시설디자인 예정(주관기관 승인후) 2. 홍보 및 마케팅실시(종료후 3년 소요예상)

제 2 절 관련분야의 기여도

현재 영유아식품(조제분유 및 이유식 등)내 감염되어 공중보건학적인 피해를 일으키고 있으나 뚜렷한 대책이 없는, 고질적인 병원성 세균(*Bacillus cereus*, *Enterobacter sakazakii*)에 대하여, 항균능력(경제성 확보)을 보유한 유단백질(K-casein 및 GMP)기원성 천연Bacteriocin(NANA)를 효소적 처리법으로 분리정제 및 이를 대량생산과 이를 다시 유제품내 첨가하므로서, 소비자 기호성에 충족되는 안전식품 생산에 적용하는 일관된 시스템을 적용 구축하므로서, 국제기술력(글라이코믹스 연구개발 분야에서 국제 우위선점과 산업화가 담보된 최종 안전 영·유아식품 개발 및 추후 용도용법 확대를 위한 소재 및 제품화에 개발에 목적을 두었다. 연구성과에 대한 관련분야의 기여도는 다음과 같다.

1. 기술적 측면

- 가. 우유 유래 단백질류 및 지방류 등 미이용 소재 개발에의 가능성 제시와 기능성화 제품 개발 관련 활용방향 제시
- 나. 식품산업 요구성 충족형 천연항균제로서, 기존 항생제 문제점(내성형성 등) 해소형 신규제제 개발기법 체계화 기여
- 다. 저가 잉여 축산물의 신규 이용성 방향제시 및 수익창출기여
- 라. NANA소재의 제형화 적용시 제품 응용성 및 신규한 용도·용법 창출에 대한 새로운 지표제시 기여
- 마. 관련 유가공 및 연구자들에 대한 신규연구개발 방향 제시

2. 경제적·산업적 측면

- 가. 우유유래 기능성 소재 개발과 고부가 가치화를 통한 산업체의 수익창출 및 국제경쟁력 확보
- 나. 잉여 우유소재의 소요처 창출을 통한 관련 축산업의 추가 수익증대 기여
- 다. 신규시장 개척을 위한 소재 및 응용제품의 개발로 관련산업 경쟁력 증대 기여

3. 공중보건학적 측면

- 가. 합성 및 화학 항생제 문제해결형 안전식품개발로 공중보건학적 요구성 충족에 기여
- 나. 국민 건강 증진에 기여

제 5 장 연구개발성과 및 활용계획

제 1 절 연구개발성과

본 과제는 현재 영유아식품(조제분유 및 이유식 등)내 감염되어 공중보건학적인 피해를 일으키고 있으나 뚜렷한 대책이 없는, 고질적인 병원성 세균(*Bacillus cereus*, *Enterobacter sakazakii*)에 대하여, 항균능력(경제성 확보)을 보유한 유단백질(K-casein 및 GMP)기원성 천연Bacteriocin(NANA)를 효소적 처리법으로 분리정제 및 이를 대량생산과 이를 다시 유제품내 첨가하므로써, 소비자 기호성에 충족되는 안전 식품 생산에 적용하는 일관된 시스템을 적용 구축하므로써, 국제기술력(글라이코믹스 연구개발 분야에서 국제 우위선점과 산업화가 담보된 최종 안전 영·유아식품 개발 및 추후 용도용법 확대를 위한 소재 및 제품화에 개발에 목적을 두었다. 전체 연구개발목표 대비 핵심연구개발 성과는 다음과 같다.

1. 연구개발 목표

- 가. 유단백질(GMP)로부터 NANA 분리생산형 Neuraminidase대량생산기술 정립
- 나. 영·유아식품내 병원성세균 사멸형 NANA 대량생산기술 개발
- 다. 목적 유해균에 대한 항균스펙트럼 효과
- 라. 개발NANA소재의 제품적용성 평가
- 마. 개발NANA소재의 제품화 레시피 정립
- 바. 동물임상 실험을 통한 안전성 평가
- 사. 사업화(관련산업 기술이전)

2. 핵심연구개발성과

가. 신규소재 개발에 따른 필수 분석법 정립

본 연구는 신규한 소재개발과 관련된 것으로서, 원료 유단백질로부터 NANA제조 전후의 분석방법 확립을 통하여 개발제제의 안전성 및 특성을 명확하게 구명할 필요가 있다. 즉, 개발간 필요에 따라 영양성분(단백질, 지방, 탄수화물등)분석, 목적 개발제제인 NANA의 장단기 보관, 내열, 내산 및 내염기조건 확인을 위한 물리이화학적 물성(분자량 등)분석조건을 정립하였다. 그리고 목적유해균에 대한

NANA 항균성 평가와 더불어 항균성 저하와 관련되는 킬레이팅 등의 간섭효과 및 제품 적용성 확보, 유해미생물 제어효율 검정 및 NANA소재의 동물안전성 평가에 장내미생물총 변화를 확인하기 위한 미생물 검사 및 동정법 등을 일관되게 정립하였다.

나. Neuraminidase(NANA생산효소) 생산 및 대량생산시스템 정립

- 1) 현재 영유아식품(조제분유 및 이유식 등)내 감염되어 공중보건학적인 피해를 일으키고 있으나 뚜렷한 대책이 없는, 고질적인 병원성 세균(*Bacillus cereus*, *Enterobacter sakazakii*)에 대하여, 항균능력(경제성 확보)을 보유한 유단백질(GMP)을 원료로 기원성 천연 항균제로서 NANA를 개발하였다.
- 2) 기질인 유단백질에서 NANA를 효소적 처리법으로 분리하기 위한 효소인 Neuraminidase는 식품첨가물로 등재되어 있는 식품미생물중 *Arthrobacter ureafaciens*를 선발하고, 대량생산시스템조건에서 효소생산 및 이를 적용한 NANA 대량생산시스템 정립을 일련의 시스템으로 완료하였다. 시작품에 대한 결과는 다음과 같다.
- 3) 결과
 - 가) 경제성이 확보되는 분해효소를 생산하기 위하여 상업효소(17종), 식품첨가물로 등재된 식품미생물을 수거하여 이들에 대하여 Neuraminidase를 스크리닝 과정을 실시하였다. 결과로서, *Arthrobacter ureafaciens*를 Neuraminidase생산 유효균으로 선발하였다.
 - 나) 기질 GMP내 NANA 생산을 위해 선발된 *Arthrobacter ureafaciens*를 대상으로 실험실적 반응조건 등 NANA생산조건을 정립하였다.
 - 다) 효소와 NANA의 대량생산시스템 정립을 위하여, 효소생산(3톤 반응조) 및 이를 이용한 NANA 생산(10톤, 기질GMP 대비 효소첨가량 1% 기준)을 위한 효소생산 및 NANA생산성을 검정하였다. 결과는 다음과 같다.
 - (1) 반응조내 최종 효소생산성은 0.16unit/ml였는데, 이때 총 432,000unit의 Neuraminidase가 생산되었다($p < 0.05$).
 - (2) 기질인 GMP 1g을 효소분해시켜 NANA를 생산하기 위한 Neuraminidase효소역가치는 0.5unit/g(GMP)였다($p < 0.05$).
 - (3) Neuraminidase 432,000unit를 적용시, GMP(NANA 4% 함유)는 864Kg을 분해 시킬 수 있었으며, 이때 NANA생산량(100%순도 기준)은 25.9Kg였다.

- (4) 100%순도 NANA를 생산시, Neuraminidase비용은 386,100원/Kg, 25%의 경우는 96,525원/Kg이 소요되었다.
- (5) 개발 Neuraminidase효소를 적용한 유단백질 GMP(NANA 4%)로부터 생산된 NANA(순도 25% 기준)의 생산량은 GMP 1Kg당 99g(동결건조)였고, 이때 생산수율은 63%였다. 이는 기질로서 GMP내 NANA함유량이 4%임을 감안하면 Neuraminidase에 의해 분해되는 NANA의 이론치 생산수율은 75%임에 비교하여 실제 생산수율은 63%였다. 이는 분해반응공정(침전물 제거시) 약 8%, 에탄올 침전물 제거 공정시 액 33%가 손실됨으로 인한 것이었다. 이를 감안하고 순도 25% 기준으로 1Kg NANA의 생산가는 674,471원(생산비용 125,000원/Kg 포함)이었다.
- (6) 대량생산을 위한 공정소요시간으로서 Neuraminidase 생산소요시간은 18시간, NANA는 112시간(동결건조 시간 제외)으로 총 130시간이 소요되었다.
- (7) NANA생산수율(63%)증가를 위한 방법을 검정한 결과, 분해반응공정단계에서는 침전물 회수 및 물세척 회수공정, 에탄올 침전물 제거공정에서 에탄올첨가량 최적화후 필터프레스 또는 원심분리공정을 거쳐 수율을 최대 73%까지 증대하였다($p < 0.05$).
- (8) 결론적으로, 잉여 미이용 자원인 유청단백질에서 분리한 유단백질(GMP)로부터 NANA생산을 위한 효소(Neuraminidase)생산용 미생물(식품첨가 미생물) 확보, 이를 이용한 3~10톤 규모의 Neuraminidase 대량생산 및 생산된 Neuraminidase를 이용한 10톤 규모의 NANA대량 생산시스템을 일련되게 정립하였다.

다. 목적 유해균에 대한 항균스펙트럼 효과

배지로서 생리적 식염수와 우유내 구별하고, 세균종류별로 각각 감염 시킨후 개발 NANA를 농도별 첨가한 후, 이어서 공시세균별, NANA처리 농도별 및 시간경과에 따른 항균성 더불어 항균저하에 관계하는 간섭요인 등을 병행하여 검정하여 보았다. 결과는 다음과 같다.

- 1) NANA제제는 그람음성균에 대하여는 사멸효과를 보였으나, 그람양성균에 대하여는 사멸효과 보다는 정균효과를 보이는 경향의 항균효과를 보였다($P < 0.01$).
- 2) 생육저지농도(MIC)를 비교하여 본 결과, MIC는 2.5~5ppm범위였으며 역시 그람음성균의 MIC수치가 낮게 나타나는 경향을 보였다($P < 0.01$).
- 3) 대조배지로서 생리적식염수를 비교실험구로서 멸균유에 공시균을 감염시킨후 동

일농도의 NANA를 처리 후 항균성을 비교하여 보았더니, 유의한 차이가 인정되지 않았다. 이는 NANA제제가 우유내 여러인자(단백질류, 지방류, 탄수화물류, 미네랄류, 효소류 등)와 간접반응이 일어나지 않는 소재임이 확인되었다($P < 0.01$). 사전예비시험에서, 생리적 식염수에서 항균성이 인정된 키토산이 멸균우유내에서는 첨가농도에 비례하여 우유단백질과 결합되어 침전현상이 발생되면서역시 항균성도 소실되었는데, 이와 비교할 때 NANA소재는 우수한 항균소재임이 확인되었다($P < 0.01$).

4) NANA처리농도 대비 항균성과 관련된 시간을 비교하여 보았더니, 농도와 시간은 비례적 결과를 보였는데, 0.5%(w/w)NANA 농도를 기준으로 3분이내에 99%이상의 항균효과를 보였다($P < 0.05$)

라. 유산균에 대한 항균효과를 유해균과 동일한 과정으로 검정하여 보았더니, 공시 유해균과 유사한 항균결과를 보였다. 즉, 생리식염수 및 멸균우 조건에서 NANA 농도가 1.0%이상 첨가시 1시간이후부터 20%로 유산균의 급격한 감소가 이루어지고 16시간이 경과시는 생존 콜로니는 검출되지 않았다.

마. 유해세균에 대하여, 37종의 항균제를 대상으로 먼저 내성여부보유여부를 확인한 후 NANA제제를 처리시 항균성을 검정한 결과, 내성보유균에 대하여도 유의한 항균제임이 확인되었다($P < 0.01$)

바. 유해세균(*E.coli* O157:H7)만을 대상으로, NANA를 동일농도(0.25%)로 처리조건에서 1세대에서 생존한 콜로니를 채취한 후, 이를 10세대동안 반복처리시 항균 차이를 비교함으로써 NANA로 기인한 내성이 유발되는지를 검정결과에서, 전체 세대에서 항균성 차이는 인정되지 않았다. 따라서, NANA기안성 내성은 유발되지 않는 것으로 인정되었다($P < 0.01$).

사. NANA이 항균성 관여하는 항균메카니즘을 검정하여 보았더니, NANA는 세포막에 직접적으로 lysis 또는 damage를 주지 않았다. 그러나, MIC농도이상에서 세포 내부유입이 극대화됨으로 인하여 이차적으로 삼투압현상을 교란을 시켜, 최종적으로 세포막을 파괴시킴으로 인한 항균성을 나타내는 메카니즘을 갖고 있는 것으로 파악되었다($P < 0.05$)

아. 개발NANA소재의 제품적용성 평가

NANA소재개발의 최종목표가 천연항균제로서 고부가 제품개발임에 따라 제품화를 위한 주요항목별 평가를 실시하였다. 평가항목으로서는 내열성, 보관조건별(상온 및 냉장), 기간별(최초 대비 7일, 37일 및 10개월)로 구분하여 제품화를 위한 적용성 평가를 실시하였다.

결과로서, NANA소재를 천연항균제로서 사용에 있어 액상제형보다는 고상제형이 적절함을 알 수 있었다. 따라서, 생산 NANA소재는 제품화 원료시는 분말 혹은 고상제형이 적절함을 알 수 있었으며($P < 0.01$), 제품적용성 평가를 종합하여 최종적으로 제품화 제형은 액상첨가형(과립형)과 섭취형(정제형)로 구분 제조레시피를 정립하므로서 현장 상용성을 극대화 하였다.

개발NANA소재의 세부항목별 제품적용성 평가결과는 다음과 같다.

1) 1% 농도로 조성한 NANA는 두개의 분자량[저분자 : 37.4min.(85%), 고분자 : 37.5min.(15%)을 보유하는 패턴을 보유하고 있었다(FPLC분석).

2)보관(상온 및 냉장)조건에 따른 물성변화 조사 결과

가) NANA소재는 상온보관 조건에서 시간이 경과하면 할수록(2일 이상), 갈변화 현상과 침전 및 부착현상이 심하게 진행되었다. 이 경우 NANA는 고분자량 분포대가 15%에서 72%증가하였는데, 동시에 저분자량 분포는 85%에서 오히려 28%대 감소하는 패턴을 보이는 물성변화가 발생하였다($P < 0.01$).

나) 냉장보관시, 단기간(30일이내)에서는 갈변화 및 분자량 변화등 물성변화는 발생하지 않았으나, 이후 시간이 경과하면 경시적인 변화는 발생하는 것으로 파악되었다($P < 0.05$).

다) 상온 및 냉장보관 조건에서 기간경과에 따른 항균성 저감여부를 확인하여 보았더니, 차이가 인정되지 않았다. 따라서, 보관조건과 시간경과에 따른 물성변화가 항균성 저하에 미치는 효과는 없는 것으로 인정되었다($P < 0.01$).

라) 결론적으로, NANA소재는 제품적용에 있어 항균성을 제외한 정상변화를 기준으로 평가한다면 액상보다는 고상제품에 보다 적합함을 확인하였다. 그러나, 액상에 적용시는 첨가후, 냉장보관조건에서 30일 이내에 소진하는 조건을 반드시 준수하여야 할 것으로 판단되었다($P < 0.01$).

3) NANA소재의 내열성 및 항균성에 미치는 영향조사

가) NANA소재에 대한 내열성 평가를 위하여, 대조구 대비 비열처리구 및 열처리구(75℃, 90℃ 및 121℃)로 구분 분자량 및 물성변화를 검정하여 보았다.

결론으로, NANA소재는 온도조건이 높을수록 갈변화 현상과 고분자량 분포대

(RT : 37.5min.)로 이동하는 패턴 또한 매우 빠른 것으로 조사되어 NANA소재는 열안전성은 인정되지 않았다(P<0.01).

나) NANA소재에 대한 내열처리가 항균성 저하에 미치는 영향이 있는지를 검토하여 본 결과, 균 종류에 따라 항균효과는 다소 차이가 있었으나, 전체적으로는 열처리 및 비열처리조건에서 항균성 차이는 나타나지 않았다(P<0.01).

다) 결론적으로, NANA소재의 기본구성 분자량은 저분자와 고분자로 구성되어 있는데, 온도와 보관조건의 차이에 따라 분자량 변화(고분자대로 이동)와 동시에 갈변화 현상이 발생하는 패턴을 보였지만, 이러한 물성변화가 항균성 저하 효과와는 무관한 것으로 인정되었다(P<0.05).

자. NANA의 내산 및 내염기성 평가

산성(HCl, Acetic acid, H₂SO₄, HNO₃) 및 염기성(NaOH) 시료를 농도별로 희석한 후 동일농도의 NANA를 첨가 한 후 시간경과시 NANA의 분자량 변화패턴을 조사함으로써 NANA의 내산 및 내염기성을 평가하여 보았다.

결과로서, NANA소재는 내알카리성은 다소 안정되었으나, 산성조건에서는 NANA소재의 고유분자량이 붕괴되는 패턴을 보여 내산성은 인정되지 않았다(P<0.01). 그러나, 경과시간이 길면 길수록 알카리 조건에서도 동일하게 분자량이 변하는 패턴을 보였다.

차. 개발NANA소재의 제품화 레시피 정립

NANA소재개발의 최종목표가 천연항균제로서 고부가 제품개발임에 따라 제품적용성 평가를 기초로 하여, 액상제형보다는 고상제형이 적절함을 알 수 있었다. 따라서, 생산 NANA소재는 제품화 원료로서 고상제형으로 정하고, 액상첨가형(과립형)과 섭취형(정제형)로 구분 제품화 하였으며 최종 상용성을 극대화 하였다.

제품화를 위한 제형별 레시피(경제성 평가 포함) 정립 결과는 다음과 같다.

- 1) NANA소재의 목적유해균의 제균성을 확보 되도록 제형을 정제형과 분말형으로 제조 레시피를 구분정립하였는데, 상용시 최종 용해액 100g당 0.5% NANA제제가 함유되도록 고려하여 제형화 레시피를 정립하였다.
- 2) 제형별 레시피로서, 섭취용으로는 정제형 I(원형, 1정/500mg, NANA함유량 : 2.5mg, 단가 : 약 12원/정)과 정제형 II(봉상형, 정/750mg, NANA함유량 : 5mg/정, 단가 : 20.25원/정) 그리고 액상제용으로는, 과립형(분말형, 1스틱/2,000mg, NANA함유량: 5mg/1Stick, 단가 : 22.25원/Stick)으로 구분하여 최

중 레시피를 정립하였다. 이때 제형별 NANA함유량은 정제형(타정형)은 40~50mg, 과립형은 100mg이 함유토록 하였다.

카. 동물임상 실험을 통한 사전안전성 평가(동물임상 섭이농도 설정)

정립된 대량생산시스템 적용 생산된 개발NANA(순도 25%) 대비 합성NANA(대조)의 동물임상 실험 진행을 위한 사전 안전성 평가를 위하여, 0%~1%농도조성 NANA에 대하여 HEK 293(human embryonic kidney cell)과 RAW264.7(macrophage cell) cell를 이용하여 MTT, NO, Cytokines 및 Western blot analysis검정을 거쳐 안전성을 평가하였다. 결과는 다음과 같다.

- 1) NANA소제는 표준주를 대상으로 안전성 평가 결과, NANA는 0.5%(w/w) 농도이상에서는 독성을 나타내었는데, 이는 대조 NANA 및 개발NANA처리군에서 동일한 패턴을 보였다(P<0.01).
- 2) NANA소제는 0.5% 이하의 농도에서는 무독성이며, 항염증 효과(염증완화 효과)를 보유하고 있는 것으로 평가되었다(P<0.01).
- 가) NANA처리시 iNOS, COX-2와 염증성 cytokine인 TNF- α 발현량을 효과적으로 억제하였는데, 항염증 효과를 나타내기 때문으로 판단 되었다(P<0.05)
- 나) NANA소제는 LPS에 의해 유발되어지는 메커니즘에 MAPK 신호전달과정을 조절하여 항염증 효과를 나타내는 것이 우수하다는 것을 확인하였다(P<0.05).
- 다) 결과적으로, NANA는 염증성 질환의 예방 또는 치료에 유용하게 사용될 수 있을 것으로 판단되었다.
- 라) 사전안전성 평가결과를 기준으로 동물안전성 평가시, 사료내 첨가 NANA농도를 0.1%, 0.5% 그리고 고농도 처리구는 1%로 설정하였다.

타. 동물임상 평가(안전성 및 기초효능 평가)

- 1) NANA 동물임상평가를 통한 안전성 평가를 위한 사료 레시피는 AIN-76A를 기본으로 하여 1Kg당 NANA(100% 순도 기준)는 1g(NANA-L처리구), 5g(NANA-M처리구) 및 10g(NANA-H처리구)로 혼합 조성하였다.
- 2) 전체시험구는 대조구(AIN-76A사료섭이구)와 비교구(기본사료에 합성NANA첨가구, SNANA) 그리고 시험구로서는 기본사료(AIN-76A)와 개발NANA를 동일 농도로 혼합하여 조성하였으며, 실험동물에 조성 사료를 자유섭이토록 한 후 4주,

8주 및 13주에 각각 성장관련 및 도살조건하에서 안전성평가 항목별로 조사하였다. 주요 평가항목으로 사료효율(성장), 무게(총무게 및 기관별), 기관별 조직병리, 혈액지표 및 염색체이상 조사, 기관별 및 분변내 미네랄 분포와 장내미생물총 변화로 하여 총 9개 항목으로 대별하였다.

가) 일정별로 구분하여 사료섭취량과 관련한 일일성장률(24시간 단위로 13주동안 측정)을 대조 대비 NANA처리구는, 차이가 인정되지 않았다.

나) 생체중 및 기관별 무게변화에 미치는 결과를 역시 기간별로 구분하여 대조 대비 NANA처리구와 비교하여 보았다. 결과로서 생체중 및 근조직(5개기관 : Liver, Kidney, Spleen, Heart, Lung)과 골조직(2개 : femur, Backbone) 전체시험구에서 대조구 대비 차이가 인정되지 않았다.

다) NANA제제의 성장관련 안전성 결과를 기초로, 추가적으로 혈액조성과 지표안전성 및 염색체 이상 조사를 통하여 생체내 안전성 결과를 조사하여 보았더니, 역시 차이는 인정되지 않았다.

라) 성장 및 혈액안전성 평가를 기초로 조직검사를 실시함으로써, 8주 및 13주가 경과시에 기관별(7개기관 : Liver, Kidney, Spleen, Heart, Lung, Femur 및 Backbone)로 조직병리학적 안전성 검사를 실시하였다.

(1) 8주 경과시는 전체조직에서 유의한 차이는 인정되지 않았는데, 13주 경과시 개발NANA 처리구의 Spleen에서 Necrosis(조직괴사)현상이 발생하였다.

(2) 개발NANA의 농도별 안전성을 평가하여 본 결과, 적어도 8주이상의 섭이조건에서 0.5%이상을 지속적으로 섭이시 안전성이 없는 것으로 판단되었다. 그러나, 동일 분자 및 화학식 구조를 보유하고 있는 비교구(합성NANA)의 경우는 안전성에 있어 문제가 없는 것으로 보아 추가 검정이 필요할 것으로 판단되었다.

마) NANA제제가 중요장기내 미네랄의 변화패턴을 유발하는지 경과시간별 구분하여 조사하여 보았다.

(1) 주요변화를 유발하는 이온은 칼슘이었고, 7개기관중 골조직에서 유의성이 인정되었다.

- (2) 골조직을 중심으로 일정별 칼슘변화를 조사하여 보았더니, 대조 대비 전체 NANA처리구에서 4주 경과시는 10~20% 범위로 감소현상을 보였으나, 8주가 경과하면 오히려 20%범위 이내에서 증가하는 결과를 보였다. 이 결과는 NANA소재는 생체내 흡수되어 미네랄 이온의 치환과 교체성향을 나타내는 가능성을 보유하는 것으로 판단되었다.
- (3) 근조직내에서 주요한 미네랄 변화는 Spleen에서 발생하였는데, 주요 미네랄은 철분이온이었다. 검출량을 비교하여 보았더니 대조(150~180ppm) 대비 NANA 처리구에서 약 2배에서 3배로 고농도로 축적되는 경향을 보였으며, 농도에 비례하여 증가하는 경향이였다.
- (4) NANA소재 및 처리농도별로 기관별 분포조사 결과, 대조 대비 합성NANA와 개발NANA 농도별 패턴은 유사하였는데, 고농도로 갈수록 감소하는 경향이였으며 NANA소재별 차이는 인정되지 않았다.

바) 골조직 인장강도

NANA소재별(합성NANA 및 개발NANA), 농도별(0.1%, 0.5% 및 1%) 및 섭이기간(8주 및 13주)에 따라 골조직(건조 Femur기준)의 무게, 생장(길이, 폭), 인장강도 변화를 대조 대비 비교조사 하였다. 결과는 다음과 같다.

- (1) NANA섭이시 골조직내 칼슘의 함유량은 4주까지는 10~20%가 감소하였으나, 8주이후 부터는 오히려 약 10~20% 증가하는 결과를 보였다($P<0.05$).
- (2) NANA처리구의 골조직내 칼슘증가하면 역시 골조직의 무게, 길이생장 및 인장강도 10%이상 증가하는 것으로 조사되었다.
- (3) NANA섭이시 농도차에 따른 골조직내 변화에 미치는 영향은 인정되지 않았다 ($P<0.05$).
- (4) NANA소재간 골조직내 변화에 미치는 영향은 인정되지 않았다($P<0.05$).

아) 장내미생물 분포변화 조사

NANA소재별(합성NANA 및 개발NANA), 농도별(0.1%, 0.5% 및 1%) 및 섭이기간(4주, 8주 및 13주)에 따라 장내미생물총 변화를 유발하는지를 총균수(TSA 배지) 대비 대장균구(MacConkey배지) 및 유산균(BCP 배지)으로 구분하여 호기 조건하에서 확인하였다. 결과는 다음과 같다.

- (1) NANA의 섭취여부와 섭이기간은 장내미생물총의 변화유발과 밀접한 관계를 보였으며, 이때 대장균구와 유산균구가 변화유발 미생물로 인정되었다($P<0.01$).

(2) NANA의 섭취기간에 따른 조사결과는 다음과 같다.

(가) 전체적인 경향으로서, NANA섭이후 8주이내에서는 총균중 대장균구는 대부분 검출되지 않았으며, 대신에 유산균총이 유의하게 최대 9배까지 증가하는 패턴을 보였다($P < 0.05$). 그러나, 8주이상의 장기섭이시는 대조구 대비 차이가 인정되지 않아 결국 장내균형을 유지하고 있음을 알 수 있었다.

(나) 따라서, 최초 NANA섭취 및 생체전이메카니즘을 통해 장내에 유입된 NANA의하여, 장내미생물총의 변화가 유발되었으나, 섭취기간이 길면 길수록 장내 미생물총이 안정화 되는 것으로 판단되었으며, 결론적으로, NANA섭이가 장내미생물총의 변화를 유발하는 기간은 최대 8주이내였다.

(3) 동일 화학 및 분자구조를 보유하고 있는 합성NANA와 개발NANA가 장내미생물 분포조사에 영향(8주 섭취기준)을 미치는지를 조사하여 보았다. 결과로서, NANA소재중 개발NANA가 합성NANA보다, 약 7~10배의 장내미생물총 변화를 유발하는 것으로 인정되었다. 이는 동일성분의 NANA라 할지라도 체내 흡수 및 생체전이메카니즘 및 최종 배설경로인 장내축적과 이로 인한 항균성 차이 등이 복합적인 결과로 인한 것으로 판단되므로 추후 세세한 연구가 필요하다.

4) NANA소재의 섭취여부와 기간에 따른 장내미생물의 변화유무와 이들에 의하여 흡수되고 배출되는 분변내 영양소 분포변화와의 상관관계를 대조대비 조사하여 보았다.

가) NANA섭이후 장내미생물의 분포변화가 심한 경우는 분변내 영양원 분포 역시 유의하게 감소되는 경향을 보였다.

나) NANA섭이에 따른 장내미생물의 변화와 분변내 배출영양원 감소에 미치는 결과를 조사하여 보았다.

(1) 장내미생물의 변화가 심한경우(8주섭이)는 역시 분변내 영양원의 배출농도도 감소하였다.

(2) NANA소재의 장기간 섭취(8주 이상)에 따라 장내세균총이 정상으로 전환시 역시 분변내 배출영양원의 구성은 차이가 인정되지 않았다.

과. 연구목표 대비 세부 항목별 연구개발성과

상기 기술한 핵심연구결과 이외의 연구개발성과는 Table 1와 같다.

Table 1. 연구목표 대비 세부 항목별 연구개발성과

연구목표	연구성과
1. NANA 소재 개발을 위한 기초자료조사	1. 국내외 NANA가격 및 시장적용성 조사 완료 2. 국내외 연구개발방향 조사 완료 3. 국내외 관련특허출원(등록, 기준: 일본,미국)자료 조사 완료 4. 합성NANA 물질안전성자료(MSDS)자료 조사 완료
2. NANA 개발간 필수분석법 정립	1. 영양성분 분석법 정립완료 - 조단백질(킬달분석), 조지방(거버법), 당류분석법(HPLC) - 지방산 분석 : GC(FID) 2. 분자량 변화분석 : FPLC 3. 유기산(NANA) 분석 : HPLC 4. 개발NANA물성 검정 : FT-IR, XRD, SEM 등 5. 미생물 검사법(식품공전기준)정립: MALDI-TOFF(균류동정)
3. NANA제제 분리용 유단백질(GMP) 소재 준비 및 공여(협동연구기관)	1. Milk->유청분말(치즈 제조 부산물) 제조->GMP제조 완료 2. GMP 협동연구기관 공여(제조 및 공여량) : 1,200Kg
4. NANA항균(유해미생물 대상)스펙트럼 사전평가	1. 공시균 대비 NANA의 MIC검정완료 2. 균별(그람음성 및 양성균 및 <i>E.coli</i> O157:H7)항균성 검정완료 3. 열처리 및 비열처리 조건하 항균성 검정완료 4. 미네랄 및 Milk첨가시 항균저하요인 분석완료
5. NANA의 현장적용 조건대비 물리/이화학적 변화 사전평가	1. 열처리 조건(70~121℃)별 NANA분자량(FPLC, HPLC) 변화 조사 완료 2. 열처리 전/후, 항균성(그람양성 및 음성균 구분) 조사 완료 3. 열처리 전/후, 장단기(1년)분자량 변화 및 항균성 조사 완료 4. 산 및 알카리 안정성(색상 및 분자량 변화) 조사완료 5. NANA의 제품적용성 사전평가 기초자료 확보완료
6. NANA 동물안전성 사전평가(<i>in vitro</i> : 표준 세포주 활용)	1. 표준 세포주[HEK 293 cell (human embryonic kidney cell), RAW 264.7 cell (macrophage cell)] 활용 <i>in vitro</i> 독성검정법 정립 2. 검증법 정립 : NO 및 MTT assay(연계 독성평가)
7. NANA 안정성(장단기 가속시험)평가	1. NANA함유 완제품 제조방법 평가 완료: 분말형 저온보관 2. 단기 및 장기 보관시 분자량 변화 조사 결과 확보 3. 연구종료 시, 제품 레시피(보관안정성) 기초자료 확보
8. NANA유래 내성형성 및 항생제 내성보유균에 대한 항균효과 평가	1. NANA처리에 따른 항균관련 형태변화 확인(완료) 2. 상용 항균제 대비 NANA제제 처리에 따른 항균 메카니즘(SAM, TEM) 검정
9. NANA생산형 Neuraminidase Assay기법 정립	1. 최적 기질조성 조건 정립완료 2. 반응액 조건(온도 및 시간) 정립완료 3. Blank 조건 정립완료 4. NANA 정량(TBA 방법) 기법 정립완료(NANA 농도별 검량곡선 정립, OD, 549nm)
10. 기존산업용 효소내 Neuraminidase 스크리닝 기법 정립	1. 기존 식품용 효소로 사용되고 있는 약 40여 종 산업용 효소체를 이용Neuraminidase스크리닝 완료. 2. 일부 효소에서 매우 낮은 효소활성이 측정되었음(효소활성이 너무 낮아 경제성 부적합 판단)

연구목표	연구성과
11. 식품용 미생물로부터 Neuraminidase스크리닝 정립	1. 50여종중 3 종류의 미생물에서 유의성 높은 Neuraminidase 활성 측정 완료(경제성 적합평가). 2. Neuraminidase 생산균주 선발 결과 : 효소역가와 효소생산의 용이성을 등을 고려하여 <i>Arthrobacter ureafaciens</i> KCTC 3387를 Neuraminidase 생산균주로 최종결정
12. 선발 식품미생물 적용Neuraminidase 분리정제 및 특성 연구	1. 분리정제 배양 상등액에 비해서 최종적으로 specific activity를 약 5배 증가 조건정립(완료) 2. 분리 효소액 사용하여 유단백질 (GMP)에 대한 반응특성을 연구완료 (2차년도 대량생산시스템정립과 연계) - 최적 pH,온도,효소 열안정성,pH, 안정성,염류등 간섭 및 영향평가(완료)
13. 식품미생물유래 분리Neuraminidase 적용 GMP내 NANA최적 생산조건 확립	1. Neuraminidase를 이용하여 GMP로부터 NANA를 절단하여 내는 최적 조건을 확립 기법 정립완료 2. 기질GMP적용 분리효소 반응조건 정립 (완료) 3. 최적 기질농도 정립완료(2차년도 개발효소 적용NANA대량생산 연계 시스템 정립연계 실시 완료)
14.NANA제조용 효소 및 NANA 대량생산 방법 정립	1. 선발식품미생물(<i>Arthrobacter</i>)분리효소(Neuraminidase)를 이용한 NANA대량생산기법 정립(완료) 가. <i>Arthrobacte</i> 대상 Neuraminidase 대량생산기법 정립 - 개발효소 이화학적 특성조사 완료 - 효소대량 생산시, 경제성(생산수율,분해율등)평가(완료) 나. 개발효소 아미노산 서열분석 완료 - <i>Arthrobacter</i> 분리 Neuraminidase지적재산권 확보연계 2. 개발효소 적용 GMP내 NANA대량생산기법 정립 가. 경제성(NANA생산성, unit/GMP 1Kg기준)평가 나. 대량생산시 문제점(NANA손실 및 수율향상) 도출완료 다. NANA 산업화 기준설정(완료) - 생산수율(목표대비 33% Loss발생)등 대량생산간 문제점 도출 - 제품적용형 NANA대량생산시 순도기준설정(생산순도 : 26%기준) 3. NANA생산시 회수율(손실을 저감)증대기법 정립(완료) 가. 분해반응공정(침전물 제거)시 Loss해결 나. 에탄올 침전물 제거공정시 Loss 해결 다. 건조비용 저감 방법 : 동결건조 공정개선 라. 회수율 증강방법 : 75%이상 정립
15.개발 NANA의 항균 스펙트럼 및 항메카니즘	1. 개발 NANA 항균스펙트럼 비교조사(완료) - 그람양성균, 그람 음성균 및 효모구분(MIC 변화율 검정) 2. 개발 NANA 내성형성 유무판정(완료) 가. 37종 항생제 대비 내성보유 여부확인 나. 10세대 반복처리(내성보유 및 미보유 <i>E. coli</i> 표준균 적용 평가) 3. 항균(효모, 대장균) 메카니즘 평가(완료) 가. 형태(SEM)변화(효모, 대장균 기준) 나. 세포막 관련평가(방법 1: 형광dye Method, 방법 2: Depolarization Method, 방법 3: Calcein Leakage in artificial Vesicles Method)

연구목표	연구성과
16. 개발NANA현장적용성 평가	1. 장단기(1년) 물리/이화학적/생물학적 변화 조사(완료) 가. 열처리 전/후 안정성 평가 나. 장단기(최대 1년),성상별[분말, 1%(w/w)액상] 및 보관조건별(상온, 냉장)안정성[물리이화학적 및 항균성(생물학적) 변화] 연계 평가 2. 제품적용 방향성 설정 평가 :액상제품 및 분말제품 첨가형 구분
17. 목적균 제어효과 보유 제형 및 관련 레시피 정립(경제성 평가)	1 유해균 제어형 NANA 제품화 레시피 확립(완료) - 타정형(즉시섭이형), 과립형(우유등 액상제품 첨가형) 2. 식품첨가물 허가진행 : 검정기관(수과원, 축산물규격과, '10.12.19.기준) 검토중(제품적용 허가부분) - 관련기관(식약청, 수과원) 기술컨설팅 실시후 제품화 방향 설정(방안: 식품첨가물->건기식->의약외품->의약품 순) 3. NANA항균성 확보형 첨가량 확보(완료) - 천연항균제로서 효과 확보 -액체 100ml(혹은 g)당 NANA첨가량 확보 : 0.5g(0.5%) - 천연항균제 효능 확보:그람음성균(사멸), 그람양성균(정균) 4. 제형(TYPE)별 레시피 구분 정립(완료) - 정제형(타정), 과립분말형(액체적용형) 5 제형 레시피별 용도용법(응용성)확대(완료) 가. 정제(타정)형: 유아용~성인용 1) 구강 적용형(치주염예방/치료제), 2) 위 적용형(항헬리코박터) 3) 장 적용형(Probiotic 및 Synbiotic제제) 나. 액상제품첨가(과립)형 : 영유아용 1) 우유 및 액상제품 첨가형 : 영유아 유해세균 사멸제 2) 구강적용형 : 치주염 및 충치예방제 3) 장 적용형 : Synbiotic제제, 장염예방/치료제(대장균)
18. 동물임상평가	1. NANA 동물안전성 사전평가(<i>in vitro</i> : 표준 세포주 활용) 가. 표준 세포주[HEK 293 cell (human embryonic kidney cell), RAW 264.7 cell (macrophage cell)] 활용 <i>in vitro</i> 독성검정법 정립 나. 검증법 정립 : MTT assay(세포활성도 측정) 2. 동물임상 평가 가. 동물검정용 NANA함유 사료레시피 설정 및 제조 나) NANA 장단기(4주, 8주, 13주) 섭이시 안전성 평가(완료) 1) 일정별 사료섭취량 및 일일성장 결과 측정 2) 병리/혈액 조성, 생체중 및 기관별(간,신장,지라,심장,허파,척추,대퇴골)무게변화 및 조직병리 검사(완료) 3) 혈액안전성 지표(혈액조성 : 4종, 지표 : 14종)조사(완료) 4)적출기관별 및 분변내 미네랄(Ca, Fe, Zn, Cu, Mn, Mg, P, S)배설량 조사 및 대퇴골내 염색체 이상 조사(완료) 3.장내미생물 변화(총균수, 대장균구, 유산균구로 구분)조사(완료)
19. 사업화	1. 사업화 진행 로드맵 설정 가. 1단계 : 지적소유권 확보(특허 출원 및 등록)후 학술발표 나. 2단계 : 관련기관(식약청, 수과원) 기술컨설팅 실시 다. 3단계 : GLP검정(천연물신약 분야 : 천연항균제) 라. 4단계 : NANA대량생산시스템 및 사업화 로드맵 설정 1) 연간 NANA생산량, 연간예상판매액, 생산시설구축예정예산, 소요대지 2) 시설디자인 예정(주관기관 승인후) 2. 홍보 및 마케팅실시(종료후 3년 소요예상)

제 2 절 연구결과 활용계획

본 과제에서는 우유내 존재하는 미이용 자원인 NANA가 보유한 다중 기능성증 향균성에 주목하고, 경제성이 확보되도록 대량생산시스템을 구축 및 산업적으로 생산한 NANA 소재에 대한 동물임상(안전성 평가) 절차를 수행한 후, 최종적으로 영·유아 식품내 감염되어 공중보건학적 피해를 유발하는 병원균(*E. sakazakii* 및 *B. cereus*) 제어형 고부가 제품으로 개발코져 하였다. 연구개발과제 수행에 따라 확보된 소재개발, 동물임상 및 제형화 기술의 KNOW-HOW는 다음과 같이 활용할 예정이다.

1. 핵심연구개발결과 활용계획

가. NANA제조 기법 및 대량생산방법 정립연구 결과

- 1) 개발 KNOW-HOW, 이중 기능성 유단백질 식품개발에 응용성 확대
 - 제품군 : 천연항균제, Probiotic효과 및 골다공증 예방 등
- 2) 고부가 제품화 연계활용(수과원 및 식약청) 검토결과에 준하여 순차적 진행
 - 가) 1단계: 식품부산물의 고부가제품에 적용(허가절차 불필요, 효능표시 불가)
 - 나) 2단계: 건강보조식품개발에 활용(건기법준수 등재후 효능표시)
 - 다) 3단계 : 의약품개발에 활용(인체임상기준 준수, 진행후 적용)
- 3) 개발 KNOW-HOW신규 고부가가치 제품화 개발에 적극활용
 - 제품군 : 개발소재 첨가형 및 제품개발형 구분

나. NANA제품화(제형화 및 레시피 정립)연구결과

- 1) 영유아용 및 노인 등 질병취약 노약자 제품군 확대적용
- 2) 현재 천연항균제 요구형 제품의 단점보강형 제품군 개발에 적극활용
- 3) 점차적 합성항균제 대체형 천연항균제 강화 식품개발 개발시 기초자료로 적극활용
 - 제품군 : 영유아식품, 건강기호식품 등
- 4) 연구결과를 기초로 의약품수준의 고부가가치화 식품개발로 연계

다. NANA의 동물임상 효능평가 결과

- 1) 정제형 : 고체형 고부가가치 제품군 개발에 적극활용
- 2) 과립형 : 액체형 고부가가치 제품군 개발에 적극활용
- 3) 용도용법 응용성 확대에 적극활용 : 동물분야 및 수산분야

- 4) 신소재로서 적극활용, 기존제품내 첨가를 통하여 기능성 제품개발 및 품질 UP-GRADE화 및 신소재 자체의 신제품개발에 적극활용
- 5) 고부가 가치 상품화 컨셉 적용
 - 가) Probiotic 및 골다공증 예방형 기능성 노인식식품개발
 - 나) 현재제품의 단점 보강형 제품 재개발
- 6) 국내외 영업 및 판매전략 적극활용(수익극대화)

2. 사업화 진행시 성과활용계획

- 가. 사업화에 있어 국가 과제의 수행이라는 잇점을 살려 국내외 영업에서 기술우위성을 무기로 하여 이를 최대한으로 활용할 것임
- 나. 천연항균제 개발에 있어 객관성이 증명된 개발결과가 도출될 것이고, 항균기능성 소재 개발 결과는 국내외 기술우위성을 확보하였음을 사업화(마케팅 및 영업)시 적극활용할 것임.
- 다. 개발 및 시제품 생산과 배합비율 등의 제조기법 KNOW-HOW를 응용하여 용도용법 확대형 제품개발에 적극 활용할 것임.
- 라. 개발소재 동물 임상실험결과를 활용하여, 마케팅 능력지원과 응용제품 개발시 사전 메카니즘 파악에 적극활용 할 것임.

3. 실용화·산업화 실용계획(기술실시)

- 가. 현재 주관기관(매일유업(주))은 국내대표적인 유업체로서 연구개발결과의 실용화 및 산업화를 위해 필요한 기초원료 및 개발기술을 적용할 수 있는 기반시설 및 인원 등의 인프라를 완벽히 구비하고 있어 별도의 투자가 필요 없음.
- 나. 개발결과의 실용화는 관련산업체 중 1곳(매일유업 아산공장, 주요사업분야 : 유청분말 제조)를 선정하고 기술이전 및 실용화를 실시할 예정임. 이유로서, 현재 건조 공정만을 통하여 저가의 유청분말을 생산하고 이를 판매하고 있으나, 기술이전 실시를 통하여 저가원료인 유청분말을 고부가가치화 제품화 하도록 할 예정임.
- 다) 본 과제에서 개발된 소재는 영·유아식 제품내 존재하는 병원균의 사멸이 가능한 천연항균제의 개발에 목표를 두 있는 바, 최종 안전성, 제품내 첨가후 물리(열 및 압력 등과 화학반응)적 요인에 대해 안정성이 보장되도록 제조될 예정임.
- 라) 개발 제제는 일차적으로 영유아식 제품에 적용되도록 개발될 것이나, 점차적으로 의영양 수준의 식품으로 발전시킬 것이며, 최종적으로는 의약품 수준의 식품을 개발함에 산업화 방향을 설정할 것임.

마) 국내 및 국외시장은 음료류나 우유, 조제식품 및 이유식 등에 병원성 혹은 부패 미생물 등을 제어하기 위하여 방부제 등을 단순히 첨가한 제품 등의 생산 및 판매가 이루어지고 있으나, 현재 쇠퇴기에 접어들었으므로, 본 연구개발결과를 토대로 문제점(단점)을 장점화(천연 유단백질 기원성 무독성 다기능성 소재 개발)로 해결하는 방향으로 연구를 추진 하므로써, 국제기호성에 충족되는 첨단소재 및 제품군을 본 과제 수행간 간 습득된 기술을 접목생산하여 국내 및 국외에 판매할 계획임.

4. 특허·논문등 지식재산권 확보계획

1) 특허분석 측면

- 가) 현재 해당연구개발과 관련하여 국내외 출원 및 등록건과 관련하여 조사한 바 해당과제에서 출원한 이외에는 없음.
- 나) 기존 특허는 유단백질의 가수분해물과 산업화 된 단일제제들을 영양학적인 측면만이 강조되고, 이를 혼합하는 조성물분야에 치중하고 있음.
- 다) 본 연구과제에서는 영·유아조제분유 혹은 이유식 식품내 원료로 사용되는 유단백질내에 존재하는 고질적 병원균을 사멸시키기 위해 역시 유단백질내에 존재하는 기능성 소재를 분리하고 재투입함으로써 소비자 기피성을 조기에 차단되게 제조하되, 동물 안전성 부분과 체내대사까지도 점정한 신규한 소재 개발을 완료함.
- 라) 이들을 천연항균제로서 식품첨가물로서 사용하는 방향으로 연구를 추진하여 국내 및 특허 등을 국내 및 국외에 적극적으로 출원할 계획임.

2) 논문분석 측면

- 가) 기존 논문은 단순히 유단백질들의 특정 구성물과 이들에 대한 단일 효과를 탐구하는 임상.분야에 치중되어 있으므로, 본 연구과제에서는 임상을 기본으로 하되 천연항균제개발에 있어 첨단 제조방법의 정립과 이들의 안전성과 다기능성 등을 종합하여 효과적인 방향으로 연구를 추진하여 의약분야의 학술지 등에 게재할 계획임.
- 나) 연구결과는 국내외적으로 식품관련회사 뿐만 아니라, 관련산업 전반에서 절실히 요구되는 바, 고품질 제품생산과 마케팅에 활용할 것이므로, 특허등록(향후 2년 소요예정) 후 논문 발표부분을 제외한 모든자료는 비밀보존을 원칙으로 할 것임. 따라서, 절차에 의거 비밀유지 요청과정을 실시할 것이며, 단기 및 장기적 논문 및 특허진행 결과는, 매년 활용보고서 제출 시 보고 할 것임.

3) 추후 지식재산권 확보계획

현재 개발결과 고부가가치 제품화를 위하여, 관련허가기관인 수의과학거역질병본부(검토)와 식약청(기술컨설팅) 자문을 받았으며, 이에 따라서, 3단계에 준하여 순차적으로 지적재산권(특허 및 논문) 확보와 더불어 산업화를 진행할 예정임.

- 1단계 : 우유(식품)부산물 허가시(허가사항 필요없음. 효능표시 불가)
- 2단계 : 건기식 허가획득(동물임상 결과, 건기법 준수 등재 후 효능표시 가능)
- 3단계 : 의약품 개발(인체임상기준 준수, 식의약품)

5. 추가연구, 타연구에 활용계획

가. 본 연구개발간 KNOW-HOW로서 우유 유래 단백질내 미이용 기능성 소재인 NANA의 대량생산 및 이의 항균 및 생체내에서의 메카니즘을 완벽히 파악하였으며 결과 또한 축적된 상태임.

나. 연구 KNOW-HOW는 이중 기능성 소재 및 제품 개발에 연계 진행할 것이며, 역시 확보된 동물임상결과를 기초자료로 활용하여 고부가가치화 소재 및 제품화 개발을 진행 할 것임.

6. 교육.지도.홍보 등 기술확산계획

가. 개발 및 임상결과는 사업화에 있어 주요한 판매전략 지침자료로 재편성할 것임.

나. 개발 NANA의 산업화를 위한 핵심기술에 대한 지적소유권 확보와 허가기관의 검증절차가 완료되면, 국내외적 기술을 선도함과 동시에 축산농가 및 관련 축산업의 수익창출에 기여토록 할 것임.

제 6 장 연구개발 과정에서 수집한 해외과학 기술정보

본 과제에서는 우유내 존재하는 미이용 자원인 NANA가 보유한 다중 기능성증 향균성에 주목하고, 경제성이 확보되도록 대량생산시스템을 구축 및 산업적으로 생산한 NANA 소재에 대한 동물임상(안전성 평가) 절차를 수행한 후, 최종적으로 영·유아 식품내 감염되어 공중보건학적 피해를 유발하는 병원균(*E. sakazakii* 및 *B. cereus*) 제어형 고부가 제품으로 개발코져 하였다. 연구가 종료되는 시점에서 관련한 국내외 과학기술 정보는 다음과 같다.

1. 국내외 관련시장현황

가. 국내 유업계의 현황

- 1) 선진 낙농국가의 원유 및 관련 유제품의 국내 가격경쟁력은 약 1/2~1/3수준임에 따라 농축산물 FTA와 시장개방에 속도에 따라 국내 낙농산업은 비례하여 피해(낙농분야 : 416~594억원)가 증가될 것임.
- 2) 낙농제품 수출입 현황으로, '07년 무역적자는 약 2억\$[수출 :13천톤(42,241천\$), 총수입량 : 72천톤(233,951천\$)]에 달함.
- 3) 현재 국내 낙농업 현황으로서, 낙농산업 총생산액('07)은 1조 6천억원이고, 젖소 사육두수는 점차 감소하고 있으나 규모화 및 젖소두당 산유량 증가로 원유와 더불어 분유류의 재고량이 동시에 급격히 증가되고 있음.
- 4) 현재 국내 낙농산업의 주요 이슈는, 총체적인 고민거리인 잉여 원유('07 기말재고량 : 141천톤)의 안정적인 소비방법을 확보하는 것인데, 생산자는 정부에 전적으로 대책을 의존하고 있으며, 정부 또한 뚜렷한 대안(공급 및 가격관리, 유통 및 품질관리, 소비촉진과 신규 유제품개발)이 없어 결국 낙농산업의 총체적인 피해로 연결되고 있음.
- 5) 이러한 측면에서 본 과제는, 1) 우유소재의 첨단화(세분화) 연구를 통하여 2) 잉여 국내산 원유를 이용한 기술 우위의 고부가 가치의 소재 및 상품으로 개발하고, 3) 제품적용성의 개발을 점진적으로 확대 시, 4) 낙농산업의 발전의 고민거리인 잉여 원유의 수급불균형 해소에 기여가 될 것이고, 이는 결국 5) 가격경쟁력 강화와 낙농산업 전반의 기반보호 및 육성이라는 대안도 될 것임.

나. 국내 유업관련 연구진 현황

- 1) 시장전망에 대한 불확실성으로 극소수 연구자만의 산업화가 배제된 단편적 연구 활동에 치중하고 있음. 또한, 인력공급의 핵심인, 낙농 관련 대학/학과 등 관련분야의 축소 및 폐지 등으로 연구인력 인프라는 점차적으로 축소되고 있으며, 제조업체의 가격경쟁력 저하와 수입원료 대체 등으로 전반적인 취약성이 증가일로에 있음.
- 2) 기존의 단편적인 연구개발과정을 통합연구개발시스템을 통한 첨단화 소재개발로 가격경쟁력 확보 및 소비시장의 확대, 고부가가치 제품으로서 응용 및 용도/용법 확대에 필요성에 대하여 절실히 공감하고 있음.
- 3) 글라이코믹스 관련 기초 연구 및 이를 토대로 한 활용연구에 대한 중요성이 인식되면서, 전문 연구 집단 및 기업 수가 점차 증가하는 추세임, 그러나 국내 글라이코믹스 관련 연구는 선진국에 비해 단편적이고 비체계적이며, 정부의 지원 규모도 매우 미비한 실정임.
- 4) 현재 본 제안서와 유사한 연구는 일부 진행되고 있지만, 직접 관련된 국내외 연구 진행사항은 현재까지는 없음[근거:국가과학기술정보서비스(NTIS), 범부처 국가 R&D 현황, 2001~2008].

다. 국내 제품생산 및 시장 현황

- 1) 본 과제와 관련하여 개발소재의 경우는 더욱이 적용사례가 없는데, 이는 신소재 연구개발 및 산업화에 있어서, 제조시설은 기본 분유제조공정(집유->농축(탈지)->분말)이 필요하며, 소재별 구분에 따른 제조시는 추가적으로 별도 시설 및 자금이 막대히 소요되기 때문에 영세 제조업체가 이를 산업화 하기에는 곤란하기 때문에 설사 의지가 있다 하더라도 실천이 어려움으로 인한 것임.
- 2) 본 과제종결에 따라 천연 NANA제제(순도 25% 기준)의 생산단가는 650\$/Kg(원료비+가공+마진포함)로 현재 국제시장 대비 1/10 이내 가격으로 대량생산이 가능함에 따라 경제성 또한 확보 되었음. 또한, 안전식품인 우유 단백질 유래인 만큼 시장 진입시 필수적인 식품공전 및 의약품 공전내 등록문제는 없을 것으로 판단됨에 따라 현재는 건기식 및 식의약품 신청을 위한 GPP전단계에 해당하는 동물임상 검정이 완료된 상태임.

라. 국외 제품생산 및 시장 현황

- 1) 바이오의약품 중 단백질 의약품 분야가 가장 큰 시장을 차지할 것으로 전망되며, 특히 당사슬 리모델링을 통한 효능 및 안전성을 극대화 할 수 있는 Glycomicsbased drugs 개발은 향후 세계 제약시장을 주도 할 것으로 기대함.

- 2) '06년 기준 단백질 의약품의 세계 시장은 474억 달러의 규모이며, 개량형(글라이코믹스 기술을 포함) 항체 분야가 265억 달러(전체의 56%)로 가장 큰 시장을 형성하고 있음.
- 3) 2011년 단백질 의약품 시장은 557억 달러로 전망되고 있으며, 이중 개량형 항체 시장이 절반 이상을 차지하며 가장 큰 시장을 형성하며 호르몬 시장이 5.1%의 높은 성장률로 두각을 나타낼 것으로 전망됨.
- 4) 최근 5년(2001~2005) 세계 재조합 단백질 의약품의 판매액 기준 상위 10위 제품들을 살펴볼 때 대부분이 당단백질로, 당단백질의 당사슬 구조 리모델링을 통하여 효능 및 안전성 극대화와 면역반응 등의 부작용을 최소화하기 위한 글라이코믹스 기술개발은 향후 바이오제품 개발의 성패를 좌우할 것임.
- 5) 당단백질은 일반적으로 당화에 따른 치료능(therapeutic potency) 및 치료효과(therapeutic efficacy) 증가와 많은 양을 투여할 수 있게 되는(Stronger dosing possible) 장점이 있음. 이에 당단백질 시장은 '05년 250억 달러에서 '09년 402억 달러의 규모로 증가되었는데 이는 지속적인 전망이 가능할 것으로 판단된 반면 비당단백질 시장은 동기간 130억 달러에서 176억 달러로 비교적 소폭상승 경향을 보였음.
- 6) NANA의 국제 시장 가격은 10,000~16,000\$(1\$: 1,000원기준)/Kg으로 형성되어 있으며, 대부분은 중국산(JK Biotech사)이 대부분의 시장을 장악하고 있는 실정이고, 4톤 규모(2007)가 수입되고 있는 있으나, 일반 식품에 대해 적용사례는 현재까지는 없음.
- 7) 따라서, 본 과제에서 해결하고 저 하는 무독성이면서, 안전성이 보장된 천연NANA제제의 개발은 전체 시장에서 중요한 변수로 작용할 수 있음.
- 8) 치즈 잉여 부산물(Whey)중 수용성단백질의 경우는, 많은 미이용 단백질을 보유하고 있으며, 단백질의 기본 구성인 아미노산의 구성체인 특성으로 인하여 킬레이팅과 관련한 기본적 기능기(-SH, -COOH, -P 및 -NH₂)를 보유하고 있으므로 이의 이용성과 화학 반응성을 구명할 수 있다면 다양한 분야소재개발에 활용성이 클 것으로 알려지고 있으며 경쟁적인 연구가 진행되고 있으면 본 과제도 동일선상임.

마. 인체 항생제 시장의 추후전망

- 1) 현재 항암(생)제 개발관련 시장은 합성제품이 주종을 이루고 있으나, 이들의 지속적 사용에 따른 내성형성 및 독성 등의 문제해결을 위한 방안을 다각도로 모색중임.
- 2) 국제적인 기술개발 및 시장전망으로서, 생물전환제제(단백질 성분을 대체할 수 있는 식물지방산 소재를 의약품등 산업적 전환제제) 및 단백질의약품(당단백질 의약

품이 단백질 시장의 60% 점유) 등 분야가 향후 연구개발 및 세계시장을 향후 주도할 것으로 예상된다.

- 3) 본 연구과제와 관련한 현재 시장성은 항암제 시장과 단백질의약품 시장으로 구분할 수 있는데, 세계 항암제 시장은 853억\$('10기준), 단백질 의약품시장은 557억\$('11년기준)으로 총 1,410억\$ 시장을 형성하고 있으며, 이중 단백질의약품분야의 비약적 증가가 예측됨. 국내도 중요성을 인식하고 2005년부터 “Glycomics를 이용한 차세대 의약품 개발사업(총사업비 :100.5억원)” 이 시작되었으나, 기초단계로 진행되고 있음
- 4) 따라서, 본 연구는 우유가 보유한 단백질류 및 지방산류 내에 미이용 기능성소재(당, 당-단백질, 지방산류)의 의약(외)품으로의 전환기술개발과 이를 적용한 제품개발이라는 차원은 국내외적 “Glycomics 및 탄수화물 의약품 연구개발” 과정과 동일선상의 연구개발이라 할 수 있으며, 국제기술 우점화 관련 통합적 대안을 제시하는 연구개발이라 할 수 있음.

바. 국내 가축사양(대표적 질병) 치료제 시장

- 1) 세계수의사회(WVA: World Veterinary Association, '98)가 항생물질은 성장촉진제로 사용되어서는 안된다고 규정한 이후, 배합사료내 항생제 사용금지로 인한 한국 축산농가 생산비는 12,279억원/년이 증가할 것으로 예상.
- 2) 한국의 항생제 시장은 998톤(2009 기준)으로 계속 감소(치료목적 이외의 사료첨가 금지) 하는 추세이며, 1,595톤, 이중 설사치료제시장은 사료1kg당 12원으로 책정시 월 48억의 시장성을 가지고 있음(Table 1).
- 3) 설사피해에 가장 심각한 피해를 입는 간난돼지의 경우 월 90,510톤(10억 정도)의 사료가 사용되고 있는데, 현재 국내양돈은 9,585천두, 양계는 130,161천수, 축우의 경우는 3,080천두를 보유하고 있으며, 이에 따라 필수적으로 형성되는 가축질병 치료를 위한 치료제 시장으로서 전체 월 2,500억원 시장중 설사예방 및 치료시장으로서 789억의 시장이 월별 형성되고 있음[Table 2., 출처:2009년 배합사료첨가제 사용량 추세, (사)한국동물약품협회, 2009].

사. 국내외적 연구과제 및 유사 소재개발관련

- 1) 우유단백질 가공기술(효소가수분해) 연구개발

가) 현재 우유가 보유한 기능성 물질 및 단백질의 이용성을 확대하기 위한 방안으로 유단백질 가수분해를 통한 분자량 조절기법 연구개발이 국내외적으로 경쟁적으로 진행되고 있는데, 인구 고령화에 따른 노인식, 환자식 등을 포함한 특수용도식 시장이 급격히 확대되고 있기 때문임.

나) 우유단백질의 활용은 다음조건외의 장해요인을 해결하여야만 경쟁력을 갖출수 있음에 따라 관련 개발연구가 치열하게 진행되고 있으나, 뚜렷한 성과가 현재까지도 없다 할 수 있음.

(1) 우유단백질이 보유한 고유 고단백질 원료가 가진 기술적 장벽들을 극복이 필요함. 즉, 유단백질 함량이 85%이상을 보장하되 모두 신선우유로 변성방지가공을 거쳐서 만들어져야 하므로 고도의 가수분해 가공기술이 필요함.

(근거:<http://www.nutraingredients.com/Industry/Ingredia-launches-milk-protein-and-hydrolysate-range>, 2010.10.10).

(2) 가수분해물의 유동성을 높여 음료 텍스처에 영향 없이 단백질수치를 증가시켜 목적제품개발에 잘 사용할 수 있어야함.

(3) 유단백질 가수분해물의 특징인 쓴 맛을 해결하여야 하는데 이 또한 고도의 가수분해물 가공기술이 필요로 하며, 제품적용 간 가수분해 수치를 높게 사용할 수 있게 하여야 함.

(4) 영양원으로 활용을 위한 기술개발이 필요한데, 이는 가수분해된 단백질이 가수분해되지 않은 단백질보다 더 소화가 잘 되고 영양원으로서 아미노산 흡수를 보장하여야 함.

2) 유청단백질의 국내외 이용성 연구경향

가) 유럽식품안전청(EFSA)은 최근 여러 개의 유청 관련 신청건을 거부했는데, 그 이유는 유청 섭취와 포만감사이의 상관관계 체중증가억제 근육조직 성장 또는 유지에너지를 제한하면서 날씬함을 유지하게 하는 것 등의 기능에서 그 인과관계가 성립되지 않는다는 것임. 그러나, 단백질로서는 근육조직 성장 또는 유지, 건강한 뼈 유지 효과에 대한 인과관계를 인정하였음.

(근거 : <http://www.foodmanufacture.co.uk/Ingredients/Whey-protein-health-claims>Hello-article-13.5>(2010.10.22).

나) 이는 유청단백질 전체에 대한 이용성에 관한 문제이며, 기능성소재 등의 이용성에 대하여는 철저히 배제된 결과라고 할 수 있음. 따라서, 본 연구에서는 유청단백질중 기능성 원료로 인정받고 있는 GMP(Glycomacropeptide)소재만을 선택적으로 사용

하여 상기 문제점을 근본적으로 해결한 것임.

아. 유단백질 함유 기능성소재(Silaic acid)개발관련

- 1) 당단백질은 일반적으로 당화에 따른 치료능(therapeutic potency) 및 치료효과(therapeutic efficacy) 증가와 많은 양을 투여할 수 있게 되는(Stronger dosing possible) 장점이 있음. 이에 당단백질 시장은 '05년 250억 달러에서 '09년 402억 달러의 규모로 증가되었는데 이는 지속적인 전망이 가능할 것으로 판단된 반면 비당단백질 시장은 동기간 130억 달러에서 176억 달러로 비교적 소폭 상승하는 경향을 보였음.
- 2) 본 과제에서 수행한 핵심소재인 NANA의 국제 시장가격은 1,000~1,600만원/Kg을 호가하는 초고가이고, 드물게 복합기능성 소재임에 따라 이용성이 높으나, 경제성 원리와 제조방법(합성, 미생물 유전자 재조합 생산)에 의하여 사용이 특정 의약품에 한정되어 왔음. 그리고, 대부분은 중국산(JK Bioteck사)이 대부분의 시장을 장악하고 있는 실정이고, 4톤 규모(2007)가 수입되고 있는 있으나, 일반 식품에 대해 적용사례는 현재까지는 없음.
- 3) 따라서, 본 과제수행에서 해결한 무독성이면서, 안전성이 보장된 우유유래 NANA제제의 개발(생산가 : 100만원이하 /1Kg예정)과 이의 제품적용성까지의 연계는 전체 시장에서 중요한 변수로 작용할 수 있음.
- 4) 상용 합성NANA의 국제안전규격(MSDS)조사결과는 다음과 같음(상기 일본 및 중국 제조사 기준 작성).

MATERIALSAFETYDATASHEET

SECTION1.-----CHEMICALIDENTIFICATION-----

CATALOG #: A8001.

NAME: SIALIC ACID

SYNONYMS: SA, N-ACETYLNEURAMINIC ACID, NANA

5-Acetamido-3,5-dideoxy-D-glycero-D-galactonulosonic acid

SECTION2.-----COMPOSITION/INFORMATIONONINGREDIENTS-----

CAS #: 131-48-6

MF: C11H19NO9

EC NO: 205-023-1

SECTION3.-----HAZARDSIDENTIFICATION-----

HYGROSCOPIC. POTENTIAL HEALTH EFFECTS THE TOXICOLOGICAL PROPERTIES OF THIS MATERIAL HAVE NOT BEEN INVESTIGATED. USE APPROPRIATE PROCEDURES TO PREVENT OPPORTUNITIES FOR DIRECT CONTACT WITH THE SKIN OR EYES AND TO PREVENT INHALATION.

SECTION 4.-----FIRST-AID MEASURES-----

IN CASE OF CONTACT, IMMEDIATELY FLUSH EYES WITH COPIOUS AMOUNTS OF WATER FOR AT LEAST 15 MINUTES. IN CASE OF CONTACT, IMMEDIATELY WASH SKIN WITH SOAP AND COPIOUS AMOUNTS OF WATER. IF INHALED, REMOVE TO FRESH AIR. IF NOT BREATHING GIVE ARTIFICIAL RESPIRATION. IF BREATHING IS DIFFICULT, GIVE OXYGEN. IF SWALLOWED, WASH OUT MOUTH WITH WATER PROVIDED PERSON IS CONSCIOUS. CALL A PHYSICIAN. WASH CONTAMINATED CLOTHING BEFORE REUSE.

SECTION 5.-----FIRE FIGHTING MEASURES-----

EXTINGUISHING MEDIA WATER SPRAY. CARBON DIOXIDE, DRY CHEMICAL POWDER OR APPROPRIATE FOAM. SPECIAL FIRE FIGHTING PROCEDURES WEAR SELF-CONTAINED BREATHING APPARATUS AND PROTECTIVE CLOTHING TO PREVENT CONTACT WITH SKIN AND EYES. UNUSUAL FIRE AND EXPLOSIONS HAZARDS EMITS TOXIC FUMES UNDER FIRE CONDITIONS.

SECTION 6.-----ACCIDENTAL RELEASE MEASURES-----

WEAR RESPIRATOR, CHEMICAL SAFETY GOGGLES, RUBBER BOOTS AND HEAVY RUBBER GLOVES. SWEEP UP, PLACE IN A BAG AND HOLD FOR WASTE DISPOSAL. AVOID RAISING DUST. VENTILATE AREA AND WASH SPILL SITE AFTER MATERIAL PICKUP IS COMPLETE.

SECTION 7.-----HANDLING AND STORAGE-----

REFER TO SECTION 8.

SECTION 8.-----EXPOSURE CONTROLS/PERSONAL PROTECTION-----

-
CHEMICAL SAFETY GOGGLES. COMPATIBLE CHEMICAL-RESISTANT

GLOVES. NIOSH/MSHA-APPROVED RESPIRATOR. SAFETY SHOWER AND EYE BATH. MECHANICAL EXHAUST REQUIRED. AVOID INHALATION. AVOID CONTACT WITH EYES, SKIN AND CLOTHING. AVOID PROLONGED OR REPEATED EXPOSURE. WASH THOROUGHLY AFTER HANDLING. KEEP TIGHTLY CLOSED AND FREEZE.

SECTION 9.-----PHYSICAL AND CHEMICAL PROPERTIES-----

APPEARANCE AND ODOR. WHITE TO OFF-WHITE POWDER.

PHYSICAL PROPERTIES

MELTING POINT: 184 C TO 186 C (DEC).

SECTION 10.-----STABILITY AND REACTIVITY-----

CHEMICAL STABILITY: STABLE UNDER NORMAL TEMPERATURES AND PRESSURES.

CONDITIONS TO AVOID: STRONG OXIDANTS.

INCOMPATIBILITIES WITH OTHER MATERIALS: NOT AVAILABLE.

HAZARDOUS DECOMPOSITION PRODUCTS: IRRITATING AND TOXIC FUMES AND GASES.

HAZARDOUS POLYMERIZATION: HAS NOT BEEN REPORTED.

SECTION 11.-----TOXICOLOGICAL INFORMATION-----

ACUTE EFFECTS

MAY BE HARMFUL BY INHALATION, INGESTION, OR SKIN ABSORPTION.

MAY CAUSE EYE IRRITATION. MAY CAUSE SKIN IRRITATION. TO THE BEST OF OUR KNOWLEDGE, THE CHEMICAL, PHYSICAL, AND TOXICOLOGICAL PROPERTIES HAVE NOT BEEN THOROUGHLY INVESTIGATED.

SECTION 12.-----ECOLOGICAL INFORMATION-----

DATA NOT YET AVAILABLE.

SECTION 13.-----DISPOSAL CONSIDERATIONS-----

DISSOLVE OR MIX THE MATERIAL WITH A COMBUSTIBLE SOLVENT AND BURN IN A CHEMICAL INCINERATOR EQUIPPED WITH AN AFTERBURNER AND SCRUBBER. OBSERVE ALL FEDERAL, STATE AND LOCAL ENVIRONMENTAL REGULATIONS.

제 7장 참고문헌

1. Neuraminidase(NANA생산효소) 및 NANA 대량생산 시스템 정립

1. Y. C. Yoon, J. K. Cho, C. H. Song, S. Lee, C. I. Chung. (2000). Purification of the glycomacropeptide from cheese whey. *Korean J. Food SCI. ANI. Resour.* 20 : 159-165
2. Ernest P. Brody. (2000). Biological activities of bovine glycomacropeptide. *British Journal of Nutrition.* 84 : S39-S46
3. Yong-II Moon, Wonjae Lee, and Sejong Oh. (2005). Glycomacropeptide hydrolysed from bovine κ -casein ; II. Chromatographic changes of κ -casein macropeptide as related to Trichloroacetic acid concentration. *KOREAN J. FOOD SCI. ANI. RESOUR.* 25 : 478-482
4. B Wang and Brand-Miller. (2003). The role and potential of sialic acid in human nutrition. *European Journal of Clinical Nutrition.* 57 : 1351-1369
5. R. Schauer, Springer-Verlag, Wien and New York. (1984). Sialic acids : Chemistry, metabolism and function. *Carbohydrate Research.* 129 : c5-c7
6. Bing Wang, Janette Brand-Miller, Patricia McVeagh, and Peter Petocz. (2001). Concentration and distribution of sialic acid in human milk and infant formulas¹⁻³. *Am J Clin Nutr.* 74 : 510-515
7. Bing Wang. (2009). Sialic acid is an essential nutrient for brain development and cognition. *Annu. Rev. Nutr.* 29 : 177-222.
8. Bing Wang, Bing Yu, Muhsin Karim, Hongua Hu, Yun Sun, Paul McGreevy, Peter Petocz, Suzanne Held, and Jennie Brand-Miller. (2007). Dietary sialic acid supplementation improves learning and memory in piglets¹⁻³. *Am J Clin Nutr.* 85 : 561-569
9. P. Gorog and Iren B. Kovacs. (1978). Anti-inflammatory effect of sialic acid. *Agents and Actions.* 8 : 543-545
10. Ryosuke Iijima, Hideyo Takahashi, Rie Namme, Shiro Ikegami, Masatoshi Yamazaki. (2004). Novel biological function of sialic acid (N-acetylneuraminic acid) as a hydrogen peroxide scavenger. *FEBS Letters.* 561 : 163-166

11. Mari Ishikawa, Satoshi Koizumi. (2010). Microbial production of N-acetylneuraminic acid by genetically engineered *Escherichia coli*. *Carbohydrate Research*. 345 : 2605–2609
12. Vera Zimmermann, Hans-Georg Hennemann, Thomas Daußmann, Udo Kragl. (2007). Modelling the reaction course of N-acetylneuraminic acid synthesis from N-acetyl-D-glucosamine new strategies for the optimisation of neuraminic acid synthesis. *Appl Microbiol Biotechnol*. 76 : 597–605
13. Yoshihiro Uchida, Yoji Tsukada, and Tsunetake Sugimori. (1977). Distribution of neuraminidase in *Arthrobacter* and Its purification by affinity chromatography¹. *J. Biochem*. 82 : 1425–1433
14. Masao Iwamori, Yasuhiro Ohta, Yoshihiro Uchida and Yoji Tsukada. (1997). *Arthrobacter ureafaciens* sialidase isoenzymes, L, M1, and M2, cleave fucosyl GM1. *Glycoconjugate Journal*. 14 : 67–73
15. Ignat R. Abrashev, Vesela E. Genova, Anna V. Sotirova, and Konstantina Z. Ilieva. (1998). Purification and partial characterization of neuraminidase from the non-pathogenic *Arthrobacter nicotianae*. *Enzyme and Microbial Technology*. 22 : 142–146
16. Hubertus von Nicolai, Paul Esser and Eckhard Lauer. (1981). Partial purification and properties of neuraminidase from *Bifidobacterium lactentis*. *Hoppe-Seyler's. Physiol. Chem*. 362 : 153–162
17. Masao Iwamori, Takeo Kaido, Yuriko Iwamori, Yasuhiro Ohta, Kentaro Tsukamoto and Shunji Kozaki. (2005). Involvement of the C-terminal tail of *Arthrobacter ureafaciens* sialidase isozyme M in cleavage of the internal sialic acid of ganglioside GM1. *J. Biochem*. 138 : 327–334
18. Soren Christensen and Jan Egebjerg. (2005). Cloning, expression and characterization of a sialidase gene from *Arthrobacter ureafaciens*. *Biotechnol. Appl. Biochem*. 41 : 225–231
19. Leonard Warren. (1959). The Thiobarbituric acid assay of sialic acids. *The Journal of Biological Chemistry*. 234 : 1971–1975
20. Richard O'Kennedy. (1979). Some observations on sialic acid determination by the Warren thiobarbituric acid method. *Irish Journal of Medical Science*.

148 : 92-96

21. Bradford, M. M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem.* 72 : 248-254
22. Laemmli, U. K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature.* 227 : 680-685
23. George W. Jourdan, Lawrence Dean, and Saul Roseman. (1971). The sialic acids. *The Journal of Biological Chemistry.* 246 : 430-435
24. Shin, Yong Chul, Sang Yeol Lee. and Ki Seok Kim. (1990). Secretion of the cloned *Serratia marcescens* nuclease in *Escherichia coli*. *Kor. Jour. Microbiol.* 28 : 297-303
25. Yoshihiro Uchida, Yoji Tsukada, and Tsunetake Sugimori. (1979). Enzymatic properties of neuraminidase from *Arthrobacter ureafaciens*. *J. Biochem.* 86 : 1573-1585
25. 문용일, 이용재, 오세종/(2005). 우유의 k-Casein에서 분해한 Glycopeptide에 관한 연구; II. Trichoroacetic acid의 농도에 따른 k-Casein Macropeptide분별특성의 연구. *Korean J. Food SCI. ANI. RESOUR.* Vol.(25). No(4). pp478-482.

2. 영유아식내 유해병원균 사멸형 NANA대량생산 제법개발 및 제품적용

1. Cetkovic-Cvrlje, M. and Eizirik, D. L. 1994. TNF and IFN γ potentiate the deleterious effects of IL-1 β in mouse pancreatic islets mainly via generation of nitric oxide. *Cytokine* 6:399- 406.
2. Corbett, J. A. and MacDaniel, M. L. 1995. Intraislet release of interleukin-1 inhibits beta cell function by inducing beta cell expression of inducible nitric oxide synthases. *J. Exp. Med.* 181:559-568.
3. Delgado, A. V., McManus, A. T. and Chambers, J. P. 2003. Production of tumor necrosis factor-alpha, interleukin 1-beta, interleukin 2, and interleukin 6 by rat leukocyte subpopulations after exposure to substance P. *Neuropeptides* 37: 355-361.
4. Fu, J. Y., Masferrer, J. L., Seibert, K., Raz, A. and Needleman, P. 1990. The

- induction and suppression of prostaglandin H₂ synthase (cyclooxygenase) in human monocytes. *J. Biol. Chem.* 265:16737–16740.
5. Garman, R. D., Jacobs, K. A., Clark, S. C. and Raulet, D. H. 1987. B-cell-stimulatory factor 2 (beta 2 interferon) functions as a second signal for interleukin 2 production by mature murine T cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 84: 7629–7633.
 6. Higuchi, M., Higashi, N., Taki, H. and Osawa, T. 1990. Cytolytic mechanisms of activated macrophages. Tumor necrosis factor and L-arginine-dependent mechanisms act synergistically as the major cytolytic mechanisms of activated macrophages. *J. Immunol.* 144: 1425–1431.
 7. Lee, Y. S., Kim, H. S., Kim, H. S. and Kim, S. D. 2000. IL-6 mRNA expression in mouse peritoneal macrophages and NIH3T3 fibroblast in response to *Candida albicans*. *J. Microbiol. Biotechnol.* 10:8–15.
 8. McCartney-Francis, N., Allen, J. B., Mizel, D. E., Albina, J. E., Xie, Q. W., Nathan, C. F. and Wahl, S. M. 1993. Suppression of arthritis by an inhibitor of nitric oxide synthase. *J. Exp. Med.* 178:749–754.
 9. McDaniel, M. L., Kwon, G., Hill, J. R., Marshall, C. A. and Corbett, J. A. 1996. Cytokines and nitric oxide in islet inflammation and diabetes. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 211: 24–32.
 10. Muraguchi, A., Hirano, T., Tang, B., Matsuda, T., Horii, Y., Nakajima, K. and Kishimoto, T. 1988. The essential role of B cell stimulatory factor 2 (BSF-2/IL-6) for the terminal differentiation of B cells. *J. Exp. Med.* 167: 332–344.
 11. Park, J. Y. and Pillinger, M. H. 2007. Interleukin-6 in the pathogenesis of rheumatoid arthritis. *Bull. NYU. Hosp. Jt. Dis.* 65:4–10.
 12. Phan, H. M., Alpert, J. S. and Fain, M. F. 2008. Inflammation, and cardiovascular disease: Evidence of a connection. *Am. J. Geriatr. Cardio.* 17:101–107.
 13. Salvemini, D., Korb, R., Anggard, E. and Vane, J. 1990. Immediate release of a nitric oxide-like factor from bovine aortic endothelial cells by *Escherichia coli* lipopolysaccharide. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 87:2593–2597.

14. Stuehr, D. J., Cho, H. J., Kwon, N. S., Weise, M. F. and Nathan, C. F. 1991. Purification and characterization of the cytokine-induced macrophage nitric oxide synthase: An FAD and FMN-containing flavoprotein. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 88:7773-7777.
15. Ting, S., Lee, Y. J. and Cho, J. Y. 2008. Effect of hot water extract from *Scutellaria barbato* on the macrophage activated by lipopolysaccharide. Korea J. Medicinal Crop Sci. 16(5): 313-319.
16. Trowbridge, H. O. and Emling, R. C. Inflammation: A review of the process, 5th Ed. Quintessence Pub. Co., Chicago.
17. Weisz, A., Cicatiello, L. and Esumi, H. 1996. Regulation of the mouse inducible-type nitric oxide synthase gene promoter by interferon-gamma, bacterial lipopolysaccharide and NGmonomethyl- L-arginine. Biochem. J. 316:209-215.
18. Zamora, R., Vodovotz, Y. and Billiar, T. R. 2000. Inducible nitric oxide synthase and inflammatory diseases. Mol. Med. 6:347-373.

3. NANA소재의 항균메카니즘 구명

1. Cutler Dairy Products, Inc. home page <http://www.cutleregg.com/shells.htm>
2. Ebina, T., Tsukada, K., Umezu, K., Nose, M., Tsuda, K., Hatta, H., Kim, M. and Yamamoto, T. : Gastroenteritis in suckling mice caused by human rotavirus can be prevented with egg yolk immunoglobulin(IgY) and treated with a protein-bound polysaccharide preparation(PSK), Microbiol.Immunol. 34: 617-629 (1990)
3. Ichikawa, Y., Look, G.C. and Wong, C.H.: Enzyme-catalyzed oligosaccharide synthesis, Anal. Biochem. 202: 215-238 (1992)
4. Itoh, T., Miyazaki, J., Sugawara, H. and Adachi, S. : Studies on the characterization of ovomucin and chalaza of the hen's egg, J. Food Sci. 52:1518-1521 (1987)
5. Juneja, L.R., Koketsu, M., Nishimoto, K., Kim, M., Yamamoto, T. and Itoh, T. : Large-scale preparation of sialic acid from chalaza and egg-yolk membrane, Carbohydr. Res. 214: 179-186 (1991)

6. Kakoki, H., Kono, Y., Funatsu, S. and Komatsu, M. : Anti-peroxide external preparation for skin. United States Patent No. 5,415,875, Date of patent: May (1995)
7. Koketsu, M., Juneja, L.R. and Hiroshi Kawanami : Preparation of N-acetylneuraminic acid from delipadated egg yolk, Glyconjugate J. 9: 70-74(1992)
8. Koketsu, M., Nakata, K., Juneja, L.R., Kim, M. and Yamamoto, T. : Learning performance of egg yolk sialyloligosaccharide fraction, 畜用糖質科學. 42: 15-18 (1995)
9. Li-Chan, E.C.Y., Powrie, W.D. and Nakai, S. : Chapt. 6. The chemistry of eggs and egg products. In "Egg Science and Technology", Stadelman, W.J. and Cotterill, O.J. (eds.), 105-175 (1996)
10. Morschhauser, J., Hoschutzky, H., Jann, K. and Hacker, J. : Functional analysis of the sialic acid-binding adhesion SfaS of pathogenic Escherichia coli by site-specific mutagenesis, Infect. Immun. 58: 2133-2138 (1990)
11. Nesse, N. and Rustad, T. : Heat treatment and drying of capelin mince. Effect of water binding and soluble protein, J. Food Sci. 48: 1320-1322, 1347(1983)
12. Okubo, T., Akachi, S. and Hatta, H. : Chapt. 1. Structure of hen eggs and physiology of egg laying. In "Hen Eggs: Their basic and applied science".
13. Yamamoto, T., Juneja, L.R., Hatta, H. and Kim, M. (eds.), 1-12 (1996)
14. Paulson, J.C., Rogers, G.N., Carroll, S.M., Higa, H.H., Priechstt, T., Milks, G. and Sabesan, S. : Selection of influenza virus variants based on sialyloligosaccharide receptor specificity, Pure & Appl. Chem. 56: 797-805(1984)
15. Pearce, K. M. and Kinsella, J. E. : Emulsion stabilizing properties of proteins: evaluation of a turbidimetric technique. J. Agric. Food Chem. 26:716-723 (1978)
16. Pegg, M.S. and von Itzstein, M. : Slow-binding inhibition of sialidase from influenza virus, Biochem. & Molecular Biology International. 32:851-858 (1994)
17. Schauer, R. : Chemistry, metabolism, and biological functions of sialic

- acids, *Adv. Carbohydr. Chem. Biochem.* 40: 131–234 (1982)
18. Sim, J.S. : Development of sialic acid production technology from egg.
 19. <http://www.agric.gov.ab.ca/research/ari/matching/92-93/92m439.html>
(1995)
 20. Someya, K., Totsuka, Y., Murakoshi, M., Kitano, H. and Miyazawa, T. : The antioxidant effect of palm fruit carotene on skin lipid peroxidation in guinea pigs as estimated by chemiluminescence-HPLC method. *J. Nutr. Sci. Vitaminol.* 40: 315–324 (1994)
 21. Suyama, K., Nakamura, H., Ishida, M. and Adachi, S. : Lipids in the exterior structures of the hen egg. *J. Agric. Food Chem.* 25: 799–803 (1977)
 22. Tung, M.A. and Richards, J.F. : Ultrastructure of the hen's egg shell membranes by electron microscopy. *J. Food Sci.* 37: 277–281 (1972)
 23. William J. and Owen, J. *Egg Science and Technology*, Food Products Press, pp. 39–41 (1996)
 24. <http://ext.msstate.edu/anr/poultry/poultrypapers/twsconts.htm>.
 25. Lekh, R. J., Mamoru, K., Katsuya, N., Mujo, K., Takehiko, Y. and Takatoshi, I. Large-scale preparation of sialic acid from chalaza and egg-yolk membrane. *Carbohydr. Res.*, 214, 179–186 (1991)
 26. Takehiko, Y., Lekh, R. J., Hajime, H., Mujo, K. Hen eggs. pp 105–111, (1997)
 27. <http://www.tcp-ip.or.jp/~aiie-k-n/taiyo-43.htm>
 28. Koketsu, M., Juneja, L. R., Kawanami, H., Kim, M. and Yamamoto, T., Preparation of N-acetylneuraminic acid from delipidated egg yolk, *Carbohydrates.*, 214, 179 (1991)
 29. Schauer, R. Chemistry, metabolism and biological functions of sialic acid. *Adv. Carbohydr. Chem. Biochem.*, 40, 131–234 (1982)
 30. Mamoru, K., Teruhiko, N., Lekh, R. J., Mujo, K., Naoki, K. and Takehiko, Y. Sialyloligosaccharides from egg yolk as an inhibitor of rotaviral infection. *J. Agric. Food Chem.*, 43, 858–861 (1995)
 31. Akiko, T., Katsuyuki, O., Naofumi, T., Kiyotaka, T., Akihiro, Y., Koichi, Z., Akira, H. and Reiji, K. Adhesion of human cancer cell to vascular endothelium mediated by a carbohydrate antigen, Sialyl Lewis A1. *Biochem. Biophys. Res.*

- Commun., 179, 713–719 (1991)
32. Bruce, A. and Dennis, B. *Molecular biology of the cell*(3rd eds.), 4,483–484, (1994)
 33. Ebina, T., Taukada, K., Umezu, K., Nose, M., Tsuda, K., Hatta, H., Kim, M. and Yamamoto, T. Gastroenteritis in suckling mice caused by human rotavirus can be prevented with egg yolk immunoglobulin(Ig Y) and treated with a protein-bound polysaccharide preparation(PSK). *Microbiol. Immunol.*, 34, 617–629 (1990)
 34. Hasegawa, K., Motosuchi, W., Tanaka, S. and Dosako, S. Inhibition with lactoferrin of in vitro infection with human herpes virus. *Jpn. J. Med. Sci. Biology.*, 47, 73–85 (1994)
 35. Mochalova, L. V., Tuzikov, A.B., Marinina V.P., Gambaryan, A.S., Byramova, N.E., Bovin, N.V. and Matrosovich, M.N. Synthetic polymeric inhibitors of influenza virus receptor-binding activity suppress virus replication. *Antiviral Res.*, 23, 179–190 (1994)
 36. Paulson, J.C., Rogers, G.N., Carroll, S.M., Higa, H.H., Priechstt, T., Milks, G. and Sabesan, S. Selection of influenza virus variants based on sialyloligosaccharide receptor specificity. *Pure Appl. Chem.*, 56, 797–805(1984)
 37. Akira, S., Mamoru, K., Masakazu, N., Yuko, E., Hisham, R. I., Lekh, R. J.,Mujo, K. and Takehiko. Y. Occurrence of a sialylglycopeptide and free sialylglycans in hen's egg yolk. *Biochimica et Biophysica Acta.*, 1335, 23–32(1997)
 38. Simon, P. M., Goode, P. L., Mobasseri, A. and Zopf, D. Inhibition of helicobacteria pylori binding to gastrointestinal epithelial cells by sialicacid-containing oligosaccharides. *Ameiacn Soci. Microbiology*, 65, 750–757(1997)
 39. Akio, K., Yoshiharu, M., Masataka, S. and Kunihiko K. Separation and characterization of sulfated glycopeptides from ovomucin, chalazae and yolk membrane in chicken eggs. *Agric. Biology Chem.*, 46, 1285–1290 (1982)
 40. Bradford, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding.

- Anal. Biochem., 72, 248–254 (1976)
41. Hwang, M., and Ederer, G. M. Rapid hippurate hydrolysis method for presumptive identification of group B streptococci. *J. Clin. Microbiol.*, 1,114–119, (1975)
 42. Mei-Gang, Y., Christopher C.Q.C. and Finn, W. The covalent structure of individual N-linked glycopeptides from ovomucoid and asialofetuin. *J. Biological Chem.*, 263, 111–117 (1988)
 43. George, W., Lawrence, D., and Saul, Roseman. The sialic acid. *J. of Biological. Chem.*, 246, 430–435 (1971)
 44. Chaplin, M. F. and Kennedy, J. F. *Carbohydrate Analysis*. pp2–3
 45. Takatoshi, I., Junko, M., Hiroshi, S. and Susumu, A. Studies on the characterization of ovomucin and chalaza of the hen's egg. *J. Food Sci.*, 52, 1518–1521 (1987)
 46. Mamoru, K., Akira, S., Lekh, R. J., Mujo, K., Naoki, K. and Takehiko, Y. An efficient preparation and structural characterization of sialyloligosaccharides from protease treated egg yolk. *J. Carbohydr. Chem.*, 14, 833–841 (1995)
 47. Weitong, W., Karin, E., Frank, L., Torgny, L. and David, Z. High-performance liquid chromatography of sialic acid-containing oligosaccharides and acidic monosaccharides. *Anal. Biochem.*, 190, 182–187(1990)
 48. Mark, R. H., Dale, A., C., Jeremy, P. C. and Brad, B. Separation of branched sialylated oligosaccharides using high-pH anion-exchange chromatography with pulsed amperometric detection. *Anal. Biochem.*, 182,1–8 (1989)
 49. Jeffrey, S. and R. Reid Townsend. Identification, quantification, and characterization of glycopeptides in reversed-phase HPLC separations of glycoprotein proteolytic digests, *Anal. Biochem.* 211, 72–80 (1993)
 50. Niclas, G. K. and Gunnar, C. H. Analysis of monosaccharide composition of mucin oligosaccharide alditols by high-performance anion-exchange chromatography, *Anal. Biochem.* 224, 538–541 (1995)
 51. Sakako, I., Mariko, I., Koji, I., Ken, K. and Yasuo, I. Isolation and structures of glycoprotein-derived free sialooligosaccharides from the unfertilized eggs of *Tribolodon hakonensis*, a dace. *J. Biological Chem.*, 264, 18520–18526

(1989)

52. Jaakko, P. and Jukka, F. Isolation and structural characterization of five major sialyloligosaccharides and a sialyloligosaccharide from normal human urine. *Eur. J. Biochem.*, 136, 355–361 (1983)
53. Hgihara, B. *Method of enzyme vol II*. Asachoushoten. Tokyo. Japan, Vol. 2, pp. 237–246 (1956)
54. Alforonso, C. Enzymatic protein hydrolysates in human nutrition. *Trends Food Sci. Technology.*, 11, 254–262 (2000)
55. Mamoru, K., Lekh, R. J., Mujo, K., Masaya, O., Fumito, M. and Takehiko, Y. Sialyloligosaccharides of delipidated egg yolk fraction. *J. Food Sci.*, 58, 743–747 (1993)
56. Branko, K., Blanka, R. and Pavao, M. N-acetylation of amino sugar methyl glycosides for gas-liquid chromatographic analysis. *Anal. Biochem.*, 94, 36–39 (1979)
57. Akio, K. and Yasushi, S. The release of carbohydrate rich component from ovomucin gel during storage. *Agr. Biol. Chem.*, 36, 831–836 (1972)
58. Francis, J. L.: *Fibrinogen, Fibrin Stabilisation, and Fibrinolysis*. Ellis horwood Ltd, pp. 326–353 (1998)
59. 김길영: 임상지혈혈전학. 군자출판사, pp. 12–21 (1998)
60. Sottrup, J., Claeys, H., Zaidal, M., Peterson, T. and Magnusson, S.: The primary structure of human plasminogen; Isolation of two lysine-binding fragments and one mini-plasminogen(MW, 38,000) by elastase-catalyzed specific limited proteolysis. Raven Press, NY, 3, pp. 191–209 (1978)
61. Collen, D. and Lijnen, H. R.: Recent developments in thrombolytic therapy. *Fibrinol. Proteol.*, 14, 66–72 (2000)
62. Collen, D., Lijnen, H. and Gold, H.: Toward better thrombolytic therapy. *Prog. Cardiovasc. Dis.*, 34, 101–112 (1991)
63. Verstraete, M., Lijnen, H. and Collen, D.: Thombolytic agents in development. *Drugs*, 50, 29–42 (1991)
64. 신용희: 혈전 치료제의 최근 동향. *의약정보*, 1, 59–62 (1995)
65. 김승호: 된장의 기능성에 대한 새로운 연구방향(혈전용해능에 관하여). *Korea Soybean Digest*, 15, 8–15 (1996)

66. Siigur, E., Siigur, J.: Purification and characterization of lebetase, a fibrinolytic enzyme from Viper lebetina(snake) venom. *Biochem. Biophys. Acta*, 1074, 223–229 (1991)
67. Liang, X., Chen, J. and Zhou, Y.: Purification and biochemical characterization of F IIa, a fibrinolytic enzyme from Agkistrodon acutus venom. *Toxicon*, 39, 1133–1139 (2001)
68. Mihara, H., Sumi, H. and Yoneta, T.: A novel fibrinolytic enzyme extracted from the earthworm, *Lumbricus rubellus*. *Jpn. J. Physiol.*, 41, 461–472 (1991)
69. Nakajima, N. H., Mihara, H. and Sumi, H.: Characterization of potent fibrinolytic enzymes in earthworm, *Lumbricus rubellus*. *Biosci. Biotech. Biochem.*, 57, 1726–1730 (1993)
70. Swadesh, J. K. and Huang, I. Y. and Budzynski, A. Z.: Purification and characterization of hementin, a fibrinolytic protease from the leech *haementeria ghilianii*. *J. Chromatogr.*, 502, 359–369 (1990)
71. Li, A. and Wun, T.: Proteolysis of tissue factor pathway inhibitor (TFPI) by plasmin; Effect on TFPI activity. *Thromb. Haemost.*, 80, 423–427 (1998)
72. Helft, G., Lebrazaï, J. and Beygui, F.: Staphylokinase. *Ann. Cardiovasc. Angiol.*, 47, 582–588 (1998)
73. Roschlau, W. and Lves, D. A.: Review of the biochemistry and coagulation physiology of brinolase(Fibrinolytic enzyme from *Aspergillus oryzae*). *Folia Haematologica*, 101, 22–37 (1974)
74. Samy, A.: Production and properties of fibrinolytic enzyme in solid state cultures of *Fusarium pallidoroseum*. *Biotech. Lett.*, 17, 943–948 (1995)
75. Nakajima, N., Taya, N. and Sumi, H.: Potent fibrinolytic enzyme from the lysate of *Katsuwonus pelamis* digestive tract(shiokara); purification and characterization. *Biosci. Biotech. Biochem.*, 57, 1604–1605 (1993)
76. Mitsugu, F., Keiichi, N., Kyongsu, H. and Yae, I.: Purification and characterization of a strong fibrinolytic enzyme(Nattokinase) in the vegetable cheese Natto, a popular soybean fermented food in japan. *Biochem. Biophys. Res. Communi.*, 197, 1340–1347 (1993)
77. Kim, W. K., Choi, K. H. and Kim, Y. T.: Purification and characterization of fibrinolytic enzyme produced from *Bacillus* sp. strain CK 11–4 screened from

- chungkook-jang. *Appl. Enciro. Micro.*, 62, 2482–2488 (1996)
78. Kim, S. H., and Choi, N. S.: Purification and characterization of subtilisin DJ-4 secreted by *Bacillus* sp. strain DJ-4 screened from doen-jang. *Biosci. Biotechol. Biochem.*, 64, 1722–1725 (2000)
 79. Holvoet, P.: Thrombolytic profiles of clot-targeted plasminogen activators, *Circulations*, 87, 1007–1016 (1993)
 80. Toshi, I., Keiji, H., Tohur, K. and Akira, E.: Enhancement of plasminogen binding to U937 cells and fibrin by complestatin. *Thromb. Haemost.*, 77,137–142 (1995)
 81. Toshi, I., Keiji, H., Tohur, K. and Akira, E.: Enhancement of plasminogen binding and fibrinolysis by chloropeptin I. *Thromb. Haemost.*, 87, 571–576(1997)
 82. Kiyoshi, T., Keiji, H., Tohur, K. and Akira, E.: Isolation of Plactins A, B,C, D, novel cyclic pentapeptides that stimulate cellular fibrinolytic activity.*J. Antibiot.*, 49, 45–49 (1995)
 83. Gomes, A. and Pallabi, D.: Hannahpep; A novel fibrinolytic peptide from the indian King Cobra(*Ophiophagus hannah*) veonm. *Biochem.Biophys. Res.Communi.*, 266, 488–491 (1999)
 84. Soichi, K., Tatsuya, I. and Terutoshi, K.: Synthetic peptides derived from midkine enhance plasminogen activator in bovine aortic endothelial cells. *Biochem. Biophys. Res. Communi.*, 206, 468–473 (1995)
 85. Hua, Z. C., Chen, X. C., and Chen, D.: Characterization of a recombinant chimeric plasminogen activator composed of Gly-Pro-Arg-Pro tetrapeptide and truncated urokinase-type plasminogen activator expressed in *Escherichia coli*. *Biochem. Biophy. Res. Communi.*, 22, 576–583 (1996)
 86. <http://chickscope.beckman.uiuc.edu/explore/embryology/day01/thealbumen.html>
 87. Akio, K., Yoshiharu, M., Masataka, S. and Kunihiro, K.: Separation and characterization of sulfated glycopeptides from ovomucin, chalazae and yolk membrane in chicken eggs. *Agric. Biolo. Chem.*, 64, 1285–1290 (1982)
 88. 이선희: 효소가수분해에 의한 시알릴올리고당의 분리기술에 관한 연구. 연세대학교 석사학위논문 (2001)
 89. Clare, E. N., Alcocer, M. J. C. and Morgan, M. R. A.: *Biochemical*

- interactions of food-derived peptides. *Trends Food Sci. Technol.* 3, 64-68(1992)
90. Fiat, A. M., Migliore, S. D. and Jolles, P.: Biologically active peptides from milk proteins with emphasis on two examples concerning antithrombotic and immunomodulating activities. *J. Dairy Sci.*, 76,301-310(1993)
 91. Kitts, D. D. and Yuan, Y. V.: Caseinophosphopeptides and calcium bioavailability. *Trends Food Sci. Technol.* 3, 31-35 (1992)
 92. Zwierzina, W. D. and Kunz, F.: A method of testing platelet aggregation in native whole blood. *Thromb. Res.*, 38, 91-97 (1985)
 93. Shin, J. I., Ahn, S. W. and Nam, H. S.: Angiotensin I converting enzyme inhibitor derived from fermented soybean paste and enzymatic soybean hydrolyzed. *Proceedings of IUFOST 96 Regional Symposium*, 265 (1996)
 94. Suzuki, T., Ishikawa, N. and Meguro, H.: Angiotensin- I converting enzyme inhibiting activity in foods. *Nipp. Nogei. Kai.*, 57, 1143-1147 (1983)
 95. Sweet, C. C. and Stone, C. A.: A new class of angiotensin converting enzyme inhibitors. *Nature*, 228, 280-283 (1980)
 96. 남희섭: 생리활성 펩타이드의 개발 및 시장동향. *식품산업과 영양*, 4, 17-19(1999)
 97. Takatoshi, I., Junko, M., Hiroshi, S. and Susumu, A.: Studies on the characterization of ovomucin and chalaza of the hen's egg. *J. Food Sci.*,52, 1518-1521 (1987)
 98. Astrup, T. and Mullerz, S.: The fibrin plate method for estimating fibrinolytic activity. *Arch. Biochem. Biophys.*, 40, 346-351 (1952)
 99. 정광희: 한국산 살모사(*Agkistrodon halys*)등의 fibrinolytic enzyme에 관한 연구. 연세대학교 박사학위논문 (1993)
 100. Retzios, A. D., and Markland, F. S.: A direct-acting fibrinolytic enzyme from the venom of *Agkistrodon contortrix contortrix*; effects on various components of the human blood coagulation and fibrinolysis system. *Thromb. Res.*, 52, 541-552 (1988)
 101. Laemmi, U. K.: Cleavage of structural protein during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 227, 680-685 (1970)
 102. Schagger, H. and Fagow, F.: Tricine-sodium dodecyl sulfatepolyacrylamide

- gel electrophoresis for the separation of proteins in the range from 1 to 100kDa. *Anal. Biochem.*, 166, 368–379 (1987)
103. Momburg, F. Roelse, J., Hammerling, G. J. and Neefjes, J. J.: Peptide size selection by the major histocompatibility complex–encoded peptide transporter. *J. Exp. Med.*, 179, 1613–1623 (1994)
104. Herraiz, T.: Sample preparation and reversed phase–high performance liquid chromatography analysis of food–derived peptides. *Anal. Chim. Acta*, 352, 119–139 (1997)
105. Elkin, R. W. and Gryffith, J. E.: Hydrolysate preparation for analysis of amino acids in sorghum grains: effect of oxidative pretreatment. *J. Assoc. Anal. Chem.*, 68, 1117–1121 (1985)
106. Hillenkamp, F. and Capriolo, R. M.: Matrix–assisted laser desorption/ionization (MALDI). *Biological mass spectrometry*. John wily and Sons Ltd., chapter 24, pp. 101–118 (1994)
107. Deogny, L., Weidenbach, A.: Improved fibrin plate method for fibrinolytic activity measurements; Use of bentonite precipitation and agar solidification. *Clin. Chim. Acta*, 60, 85–89 (1975)
108. Rahama, E. H. and Narasinga, M. S.: Effect of acetylation and succinylation of cottonseed flour on its funtional properties. *J. Agric. Food Chem.*, 31, 352–357 (1983)
109. Takehiko, Y., Lekh, R., Hajime, H. and Mujo, K.: Hen eggs; Their basic and applied science. CRC press, Inc, pp. 25–35 (1997)
110. Kaufmann, R.: Matrix–assisted laser desorption ionization(MALDI) mass spectrometry; a novel analytical tool in molecular biology and biotechnology. *J. Biotechnol.*, 41, 155–160 (1995)
111. Lee, J. W., Seu, J. H., Rhee, I. K. and Jin, I.: Purification and characterization of brevinase, a heterogeneous twp–chain fibrinolytic enzyme from the venom of korean snake, *Agkistrodon blomhoffii brevicaudus*. *Bichem. Biophy. Res. Communi.*, 260, 665–570 (1999)
112. Carl, Y., Hsingchi, L. Antonino, P.: Regulation of urokinase plasminogen activator(u–PA) activity by E–cadherin and hormones in mammary epithelial cells. *J. Cell. Physiol.*, 181, 1–13 (1999)

4. NANA소재의 사전안전성(Cell-line) 평가

1. Cetkovic-Cvrlje, M. and Eizirik, D. L. 1994. TNF and IFN γ potentiate the deleterious effects of IL-1 β in mouse pancreatic islets mainly via generation of nitric oxide. *Cytokine* 6:399-406.
2. Corbett, J. A. and MacDaniel, M. L. 1995. Intra-islet release of interleukin-1 inhibits beta cell function by inducing beta cell expression of inducible nitric oxide synthase. *J. Exp. Med.* 181:559-568.
3. Delgado, A. V., McManus, A. T. and Chambers, J. P. 2003. Production of tumor necrosis factor- α , interleukin 1- β , interleukin 2, and interleukin 6 by rat leukocyte subpopulations after exposure to substance P. *Neuropeptides* 37: 355-361.
4. Fu, J. Y., Masferrer, J. L., Seibert, K., Raz, A. and Needleman, P. 1990. The induction and suppression of prostaglandin H₂ synthase (cyclooxygenase) in human monocytes. *J. Biol. Chem.* 265:16737-16740.
5. Garman, R. D., Jacobs, K. A., Clark, S. C. and Raulet, D. H. 1987. B-cell-stimulatory factor 2 (beta 2 interferon) functions as a second signal for interleukin 2 production by mature murine T cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 84: 7629-7633.
6. Higuchi, M., Higashi, N., Taki, H. and Osawa, T. 1990. Cytolytic mechanisms of activated macrophages. Tumor necrosis factor and L-arginine-dependent mechanisms act synergistically as the major cytolytic mechanisms of activated macrophages. *J. Immunol.* 144: 1425-1431.
7. Lee, Y. S., Kim, H. S., Kim, H. S. and Kim, S. D. 2000. IL-6 mRNA expression in mouse peritoneal macrophages and NIH3T3 fibroblast in response to *Candida albicans*. *J. Microbiol. Biotechnol.* 10:8-15.
8. McCartney-Francis, N., Allen, J. B., Mizel, D. E., Albina, J. E., Xie, Q. W., Nathan, C. F. and Wahl, S. M. 1993. Suppression of arthritis by an inhibitor of nitric oxide synthase. *J. Exp. Med.* 178:749-754.

9. McDaniel, M. L., Kwon, G., Hill, J. R., Marshall, C. A. and Corbett, J. A. 1996. Cytokines and nitric oxide in islet inflammation and diabetes. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 211: 24–32.
10. Muraguchi, A., Hirano, T., Tang, B., Matsuda, T., Horii, Y., Nakajima, K. and Kishimoto, T. 1988. The essential role of B cell stimulatory factor 2 (BSF-2/IL-6) for the terminal differentiation of B cells. *J. Exp. Med.* 167: 332–344.
11. Park, J. Y. and Pillinger, M. H. 2007. Interleukin-6 in the pathogenesis of rheumatoid arthritis. *Bull. NYU. Hosp. Jt. Dis.* 65:4–10.
12. Phan, H. M., Alpert, J. S. and Fain, M. F. 2008. Inflammation, and cardiovascular disease: Evidence of a connection. *Am. J. Geriatr. Cardio.* 17:101–107.
13. Salvemini, D., Korbout, R., Anggard, E. and Vane, J. 1990. Immediate release of a nitric oxide-like factor from bovine aortic endothelial cells by *Escherichia coli* lipopolysaccharide. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 87:2593–2597.
14. Stuehr, D. J., Cho, H. J., Kwon, N. S., Weise, M. F. and Nathan, C. F. 1991. Purification and characterization of the cytokine-induced macrophage nitric oxide synthase: An FAD and FMN-containing flavoprotein. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 88:7773–7777.
15. Ting, S., Lee, Y. J. and Cho, J. Y. 2008. Effect of hot water extract from *Scutellaria barbato* on the macrophage activated by lipopolysaccharide. *Korea J. Medicinal Crop Sci.* 16(5): 313–319.
16. Trowbridge, H. O. and Emling, R. C. *Inflammation: A review of the process*, 5th Ed. Quintessence Pub. Co., Chicago.
17. Weisz, A., Cicatiello, L. and Esumi, H. 1996. Regulation of the mouse inducible-type nitric oxide synthase gene promoter by interferon-gamma, bacterial lipopolysaccharide and NG-monomethyl-L-arginine. *Biochem. J.* 316:209–215.
18. Zamora, R., Vodovotz, Y. and Billiar, T. R. 2000. Inducible nitric oxide synthase and inflammatory diseases. *Mol. Med.* 6:347–373.