



## Sialic Acid를 지표성분으로 하는 유청가수분해단백분말의 기능성식품 개발연구

### - III. 효소분리로 7% Sialic Acid가 표준적으로 함유된 유청가수분해단백분말의 미생물복귀돌연변이시험 연구 -

김희경<sup>1\*</sup> · 노혜지<sup>2</sup> · 조향현<sup>1</sup> · 고흥범<sup>3</sup>

<sup>1</sup>한일바이오메드, <sup>2</sup>메디뉴트롤, <sup>3</sup>전남대학교 수의과대학

## Development and Research into Functional Foods from Hydrolyzed Whey Protein Powder with Sialic Acid as Its Index Component

### - III. Bacterial Reverse Mutation Testing of Hydrolyzed Whey Protein Powder Containing Normal Concentration of Sialic Acid (7%) with Enzyme Separation Method -

Hee-Kyong Kim<sup>1\*</sup>, Hye-Ji Noh<sup>2</sup>, Hyang-Hyun Cho<sup>1</sup> and Hong Bum Koh<sup>3</sup>

<sup>1</sup>HANILBIOMED Co., Gwangju 67024, Korea

<sup>2</sup>MEDINUTROL Co., Yeonggwang 57024, Korea

<sup>3</sup>College of Veterinary Medicine, Chonnam National University, Gwangju 500-757, Korea

#### Abstract

The ultimate research goal of the current study was a development of hydrolyzed whey protein powder (7%-GNANA) manufactured with normal content of sialic acid, a marker compound, that is naturally occurring at 7% concentration in GMP obtained from the milk protein. GMP is a safe food, used worldwide in infant and baby foods, etc. The test substance was prepared using (7% sialic acid containing) GMP as a raw material, and then using alcalase, an enzyme approved as a food additive, after separation of sialic acid with 100% efficiency and 7%-GNANA (containing 7% sialic acid and protein; product name: HELICOBACTROL-7) provided by MEDINUTROL Inc. (Korea). Bacterial reverse mutation (Ames) test was conducted in accordance with GLP Guideline using the test substance specified above. To identify its mutagenic potential against microorganisms, histidine auxotrophic strains of *Salmonella* Typhimurium, TA98, TA100, TA1535, and TA1537, and tryptophan auxotrophic strain of *Escherichia coli*, WP2uvrA, were used. The bacterial reverse mutation (Ames) test was performed by dividing the test substances into five different concentration groups (0, 61.7, 185, 556, 1,670, 5,000 µg/plate). Results of this experiment did not reveal repetitive increase of colony generating values or positive criteria for reverse mutagenicity for any concentration of test substances in any of the five strains, regardless of the presence of a metabolic activation system, and no dose-dependency was identified. In conclusion, the safety of 7%-GNANA test substance was verified by bacterial reverse mutation test conducted before registration of 7%-GNANA as a food additive.

Keywords: glycomacropeptide, sialic acid, bacterial reverse mutation test, base substitution, frameshift

\* Corresponding author: Hee-Kyong Kim, HANILBIOMED Co., Gwangju 67024, Korea. Tel: +82-61-352-2166, Fax: +82-61-352-2167; E-mail: mulsambong@naver.com

## 서론

GMP(Glycomacropeptide)는 수용성 유청단 백질의 일종이고, 현재 영유아 식품 등에 식품첨가제로 제품화 및 판매되고 있다. GMP는 우유 속 단백질의 일종인  $\kappa$ -casein에 chymosin의 작용으로 105번 Phe와 106번 Met 사이의 펩타이드 결합이 절단되어 생성되는 C-말단 63개의 펩타이드를 일컫는다(Yoon *et al.*, 2000). 또한 효소에 의하여  $\kappa$ -casein의 phenylalanine-methionine peptide bond가 절단되면 친수성의 GMP가 유리되는데, N-acetylneuraminic acid(sialic acid), galactose(gal) 그리고 N-acetylgalactosamine(GalNAc)의 3개의 당이 3개 또는 4개가 연결된 형태로 Thr나 Ser 잔기에 연결되어 있다(Brody, 2000). Sialic acid는 다양한 기능성을 보유하고 있는데, 이를 이용하기 위해서는 효소가 반드시 필요한데, neuraminidase라고 한다(Fig. 1)(Moon *et al.*, 2005). Sialic acid는 nine-carbon sugar family에 속하는 당당으로 세포나 수용성 단백질에 당사슬 형태로 부착되어 있으며, 고등동물의 세포나 미생물에서 glucose로부터 복잡한 과정을 거쳐 생성된다(Wang and Brand-Miller, 2003). Sialic acid는 수용기의 인지, 신경 신호전달, 뇌의 ganglioside의 구조와 기능에 역할을 하는 구성 물질이고(Wang and Brand-Miller, 2003; Springer-Verlag, 1984; Wang *et al.*, 2001), 뇌 발달과 인지능력에 중요한 역할을 하는 필수 성분으로 영아기에 섭취는 기억과 학습 능력 향상에 역할을 하는 것으로 알려져 있다(Wang *et al.*, 2001; Wang, 2009; Wang *et al.*, 2007; Gorog and Kovacs, 1978). Sialic acid는 현재 대부분 제조합 *E. coli*에서 합성되거나 *E. coli*로부터 생산된 효소를 이용해 N-acetyl-D-glucosamine으로부터 합성되며, 일부가 화학적 합성방법으로 생산되고 있다(Iijima *et al.*, 2004). Sialic acid는 대부분 의약품 소재로 활용되고 있으며, 유청 단백질에서 분리한 sialic acid를 식품산업에 적용된 예는 국내외적으로 아직까지는 없다. 건강기능성 식품원료 등록을 위하여 필수적으로 수행되는 항목인 미생물복귀돌연변이시험에서

일반적으로 살모넬라균(*Salmonella typhimurium*) 또는 대장균(*Escherichia coli*)을 이용하는데, 살모넬라균은 히스티딘 요구성의 변이를, 대장균은 트립토판 요구성의 변이를 지표로 한다. 이들 균주는 유전독성유발물질에 대해 높은 감수성을 나타내는 유전적 형질을 가지고 있어 유전독성시험에 널리 이용되고 있다(Maron and Ames, 1983). 따라서, 본 연구에서는 안전식품 및 식품첨가물로 사용되고 있는 GMP 내 지표성분인 sialic acid를 식품소재로 활용성을 높이기 위하여, 시험물질로서 유청가수분해단백(이하 7%-GNANA)을 미생물복귀돌연변이시험용 공시균주를 이용하여 GLP 가이드라인 기준에 준하는 안전성을 평가하였다.

## 재료 및 방법

### 1. 시험물질 준비

GMP는 sialic acid가 7%가 결합된 형태로 판매되는 NatraPep GMP(Murry Goulburn Co-Operative Co., Australia)을 구입하여 시험물질 제조를 위한 원료로 사용하였다. 시험물질 제조는 정제수에 7%(w/v)되게 GMP를 우선 용해시킨 후 Alcalase 2.4FL(Novozymes Co., Denmark) 효소를 기질 대비 0.2%(w/v)로 혼합 및 57°C에서 1시간 동안 가수분해시킨 용액을 동결분말로 제조한 7%-GNANA(제품명: HELICOBACTROL-7)을 한일바이오테드사(한국)로 공여 받아 시험물질로 사용하였다(Fig. 2). 시험물질 내 지표성분인 sialic acid의 분리 여부 및 함유량 검정을 위한 표준체 sialic acid는 Sigma-Aldrich 사(A2090)에서 구입하여 0.1 ppm(w/w), 1 ppm 및 10 ppm 되게 희석하여 분석간 표준용액으로 사용하였다.

### 2. 시험물질 내 지표성분 Sialic acid 분리 및 함유량 검정

10 mM sodium acetate buffer 용액에 시험물질인 7%-GNANA를 완전히 용해시킨 후, 에탄올 8 mL에 희석액 2 mL를 혼합한 후 Sonication(25°C) 및 원심분리(3,000 rpm × 20 min, 25°C)

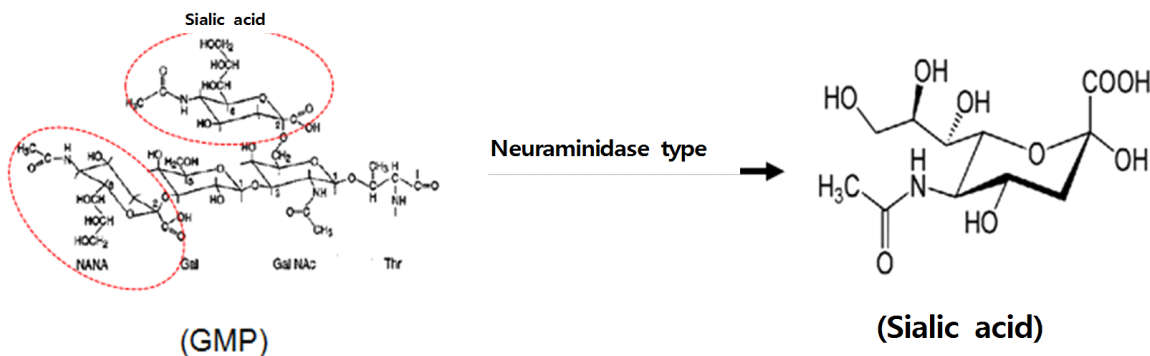


Fig. 1. Sialic acid production from GMP by a Alcalase 2.4FL(Neuraminidase type)

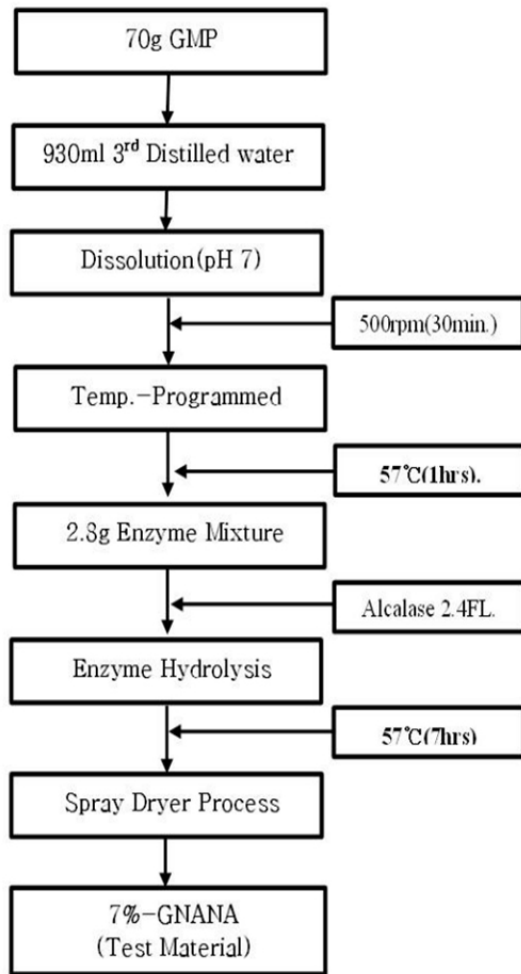


Fig. 2. Manufacturing process diagram for 7%-GNANA, a test substance containing 7% sialic acid, through the enzyme (Alcalase 2.4 FL) separation mechanism of sialic acid, the marker compound having the Glycomacropeptide (GMP) as a substrate.

Table 1. HPLC operation conditions for analysis of sialic acid

1. HPLC system (Agilent 1260)	2. Analysis conditions
<ul style="list-style-type: none"> <li>• Pump: G1311C</li> <li>• Auto sampler: G1329B</li> <li>• Column: G1316A</li> <li>• UV detector: G1314F</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Wavelength: 205 nm</li> <li>• Column: Aminex® HPX-87H Ion Exclusion Column (300×7.8 mm, 9 μm, Bio-Rad Co.)</li> <li>• Mobile phase: 10 mM H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub></li> <li>• Running time: 20 min</li> <li>• Flow rate: 0.5 mL/min</li> <li>• Injection volume: 10 μL</li> <li>• Temperature: 40°C</li> <li>• Standard sol.(w/w): Sialic acid 0.1 ppm, 1 ppm, 10 ppm</li> </ul>

과정을 거쳐 상등액만을 0.22 μm membrane으로 여과 후, 이를 최종 HPLC System(Agilent 1260, USA) 시료로 사용하였다(Table 1). 분석간 검출허용 표준편차는 90~110% 범위 내에서 평가하였다(Table 1, Fig. 1).

### 3. 미생물복귀돌연변이시험

#### 1) 시험용 균주 준비

표준균주로 *Salmonella typhimurium* 계열의 돌연변이 균주인 TA98, TA100 및 TA1535, TA1537을, 그리고 *Escherichia coli*의 돌연변이 균주인 WP2uvrA를 전체 시험간 이용하였으며, MOLTOX™(USA)으로 부터 구입하여 전체 시험간 사용하였다.

#### 2) 시험용 균주 시험용 배지조성

Plate 배지는 Top Agar와 Vogel-Bonner 최소 Glucose 한천 배지를 Maron 및 Ames의 방법(Maron and Ames, 1983)의 시험법에 준하여 제조 및 사용하였다.

#### 3) 시험균주의 유전형질 확인

시험균주는 Maron 및 Ames의 방법(Maron and Ames, 1983)에 따라 아미노산 요구성, UV 민감도, *rfa* 돌연변이 및 R-factor 유지 여부 등의 확인 시험을 수행하여 유전형질이 잘 유지되고 있음을 시험 전에 확인하였다.

#### 4) 양성대조물질 조성 및 처리조건

표준균주별 감수성 평가를 위한 양성대조물질로서는 sodium azide(NaN<sub>3</sub>), 9-aminoacridine(9-AA), 4-nitroquinoline-N-oxide(4-NQO) 및 2-aminoanthracene(2-AA)와 용매로서는 dimethyl sulfoxide(Sigma-Aldric Co., USA)를 사용하였다. 대사활성계

Table 2. Name and applied concentration of positivity comparison substance used in the evaluation of bacterial reverse mutation for 7%-GNANA holding the sialic acid as a marker compound

Bacteria name	Division	S9 Mix(+)		S9 Mix(-)	
		Positive control	Concentration (μg/plate)	Positive control	Concentration (μg/plate)
<i>Sal. typhimurium</i> TA98	4-NQO		0.5	2-AA	0.5
<i>Sal. typhimurium</i> TA100	NaN <sub>3</sub>		1.5	2-AA	1.0
<i>Sal. typhimurium</i> TA1535	NaN <sub>3</sub>		1.5	2-AA	2.0
<i>Sal. typhimurium</i> TA1537	9-AA		80	2-AA	2.0
<i>E. coli</i> WP2uvrA	4-NQO		0.5	2-AA	10

부재조건에서 양성대조물질은 2-AA를 공시균종에 따라 0.5~10 µg/plate 범위에서 농도치리를 다르게 하였다. 대사활성계 존재조건에서 *Sal. typhimurium* TA98와 *E. coli* WP2uvrA 균주는 4-NQO를 0.5 µg/plate 그리고 *Sal. typhimurium* TA100과

TA1535는 NaN<sub>3</sub>를 1.5 µg/plate, *Sal. typhimurium* TA1537 균주는 9-AA를 80 µg/plate로 양성대조물질을 처리하는 조건으로 실시하였다(Table 2).

**Table 3.** S9 Mixture spectrum table for evaluation of standard susceptibility with the treatment of 7%-GNANA by each concentration level, a test substance, effecting on bacterial reverse mutation

S-9	1		3	
S-9 (mL)	2.1	2	6.3	5.5
20 mM HEPES (mL)	6		15	
50 mM MgCl <sub>2</sub> (mL)	3		7.5	
330 mM KCl (mL)	3	18	7.5	49.5
50 mM G-6-P (mL)	3		7.5	
40 mM NADP · Na (mL)	3		7.5	
Diatilled water (mL)	3		7.5	
SUM (mL)	20		55	

**5) S9 Mixture 조성**

대사활성계 존재 시 미생물복귀돌연변이시험을 위하여, Sprague Dawley male rat에 유도물질인 Aroclor 1254을 도살 5일 전 단회복강투여 후 간조직을 적출 및 균질화 한 후 -20℃에서 보관된 S9(MOLTOX사, USA)을 구입하여 시험에 사용하였다. S9 mixture의 조성은 Table 3과 같이 제조하였다.

**6) 시험군 구성**

시험물질을 미생물복귀돌연변이시험에 일반적으로 고려되고 있는 최고투여농도인 5,000 µg/plate를 최고농도로 설정하고, 대사활성계 존재 및 부재조건에서 공비 2로 하여, 5단계 농도군(0, 312, 625, 1,250, 2,500 그리고 5,000 µg/plate)에서 예비적으로 농도결정시험 결과, 모든 균주의 모든 농도에서 복귀돌연변이 집락수의 증가 또는 명백한 세포독성이 나

**Table 4.** The result of concentration range setting test conducted to evaluate the effect on increase & decrease of reverse mutation colonies by the addition of 7%-GNANA, a test substance, under the presence and absence conditions of metabolic activation system

With and without metabolic activation	Test materials conc. (µg/plate)	Number of revertant colony (cfu/plate)					
		Base substitution types			Frameshiftm types		
		TA100*	TA1535*	WP2uvrA*	TA98*	TA1537*	
S9 Mix(-)	0	109.0±3.61 <sup>#</sup>	19.0±2.65 <sup>#</sup>	32.0±2.00 <sup>#</sup>	46.0±2.00 <sup>#</sup>	12.7±3.06 <sup>#</sup>	
	61.7	105.7±7.51	20.3±4.73	31.0±1.00	46.0±4.36	12.7±1.15	
	185	115.3±9.29	21.0±2.00	36.0±2.00	44.7±4.16	11.0±1.00	
	556	116.0±9.54	19.7±2.52	31.0±3.61	44.3±4.04	14.0±1.73	
	1,670	105.7±7.77	21.3±1.15	31.0±1.73	46.7±4.93	15.3±1.15	
	5,000	114.3±6.03	21.0±4.00	34.0±2.00	42.7±1.15	11.7±1.53	
S9 Mix(+)	0	117.0±20.22	21.0±2.65	29.7±3.06	43.0±5.20	13.0±3.00	
	61.7	113.0±11.36	18.7±3.79	33.3±4.04	46.3±3.06	13.0±1.00	
	185	121.0±11.53	20.7±4.04	30.0±2.65	50.0±1.00	14.3±2.08	
	556	126.0± 6.56	21.3±4.62	32.3±4.73	44.0±3.46	12.7±0.58	
	1,670	133.3± 9.87	21.0±4.00	31.0±3.61	41.7±2.89	12.3±1.15	
	5,000	133.7±11.93	19.7±3.21	35.0±3.46	45.3±3.06	14.7±1.15	
Positive control	S9 Mix (-)	Materials	NaN <sub>3</sub>	NaN <sub>3</sub>	4-NQO	4-NQO	9-AA
		Conc. (µg/plate)	1.5	1.5	0.5	0.5	80
	S9 Mix (+)	Materials	2-AA	2-AA	2-AA	2-AA	2-AA
		Conc. (µg/plate)	1.0	2.0	10	0.5	2.0
		cfu/plate	327.7±23.97	228.7±15.04	220.7±18.90	269.3±31.50	151.0±11.53
		cfu/plate	441.7±17.95	189.3±13.50	258.3±3.06	265.3±21.55	218.0±34.70

\*: TA98 (*Sal. typhimurium* TA98), TA100 (*Sal. typhimurium* TA100), TA1535 (*Sal. typhimurium* TA1535), TA1537 (*Sal. typhimurium* TA1537), WP2uvrA (*E. coli* WP2uvrA), #: Represents a significant difference at p<0.01 level compared with the vehicle control

타나지 않았다(Table 4). 따라서 OECD Guideline(Organization for Economic Cooperation and Development(OECD), 1993; OECD, 2008)에 따라 역시 동일하게 대사활성계 존재 및 부재조건에서 5,000 µg/plate를 최고농도로 설정하고, 공비 3으로 5단계의 농도군(0, 61.7, 185, 556, 1,670, 5,000 µg/plate)을 본 시험에 적용하였다(Table 5).

7) 표준시험방법

시험물질 처리에 따른 미생물복귀돌연변이시험은 의약품 등의 독성시험기준(Korea Food and Drug Administration(KFDA), 2014; KFDA, 2015)와 OECD guideline for the testing of chemicals(OECD, 1993; OECD, 2008)에 준하여 Plate법으로 수행하였다.

8) 평가기준

표준균주별 정상 성장범위를 *Sal. typhimurium* TA98는 15~60 cfu/plate, TA100는 60~200 cfu/plate, TA1535는 10~40 cfu/plate, TA1537는 5~20 cfu/plate 그리고 *E. coli* WP2uvrA 경우는

10~40 cfu/plate 범위 내에서 집락수를 나타내는 경우를 시험물질에 대하여 안전성을 보이는 정상범위로 평가하였다. 시험물질에 대한 복귀돌연변이 평가는 대사활성계 존재 유무에 관계없이 최소 1개 균주에서 플레이트 당 복귀된 집락수에 있어서 1개 이상의 농도에서 재현성 있는 증가를 나타낼 때 양성으로 판정하였다.

8) 복귀돌연변이 평가항목

*Sal. typhimurium* TA100, TA1535와 *E. coli* WP2uvrA는 복귀돌연변이 평가 시 염기치환형을, 그리고 *Sal. typhimurium* TA98과 TA1537의 경우는 Frameshiht형에 대한 평가를 실시하였다.

결 과

1. 시험물질 내 지표성분 함유량 평가

시험물질 내 sialic acid의 분리 및 함유량을 HPLC 분석법을 적용하여 평가한 결과, GMP 내 결합되어 있던 sialic acid

Table 5. The result of evaluation (main study) conducted to evaluate the effect on increase & decrease of reverse mutation colonies by the addition of 7%-GNANA, a test substance, under the presence and absence conditions of metabolic activation system

With and without metabolic activation	Test material conc. (µg/plate)	Number of revertant colony (cfu/plate)					
		Base substitution types			Frameshiftm types		
		TA100*	TA1535*	WP2uvrA*	TA98*	TA1537*	
S9 Mix(-)	0	124.3± 2.31 <sup>#</sup>	25.7±2.31 <sup>#</sup>	24.7±1.53 <sup>#</sup>	32.0±1.73 <sup>#</sup>	13.7±2.08 <sup>#</sup>	
	61.7	111.3± 7.77	25.7±2.08	26.0±5.00	34.0±2.65	13.0±1.00	
	185	115.7±12.66	25.0±2.00	27.3±2.08	35.3±1.53	13.7±0.58	
	556	132.0±13.00	27.7±2.08	26.7±3.21	39.0±1.00	14.7±2.89	
	1,670	119.3± 7.51	26.0±5.00	26.7±3.79	36.7±0.58	13.3±0.58	
	5,000	128.7±10.97	28.3±2.89	24.0±1.00	37.3±2.08	13.3±0.58	
S9 Mix(+)	0	134.7± 0.58	24.0±1.73	25.3±1.53	35.7±1.53	14.7±2.52	
	61.7	120.0± 2.65	23.3±3.21	25.0±6.93	38.3±2.08	13.7±1.53	
	185	117.7± 1.15	24.0±3.61	25.7±3.79	37.0±2.65	12.7±3.06	
	556	109.7± 8.96	22.0±1.00	28.0±4.00	37.0±3.61	13.0±1.00	
	1,670	125.7± 7.77	23.3±4.93	29.3±1.53	33.7±4.73	13.0±1.00	
	5,000	125.7±13.20	27.0±2.65	29.7±4.16	36.7±2.52	13.7±0.58	
Positive control	S9 Mix (-)	Materialds	NaN <sub>3</sub>	NaN <sub>3</sub>	4-NQO	4-NQO	9-AA
		Conc. (µg/plate)	1.5	1.5	0.5	0.5	80
	S9 Mix (+)	Materialds	2-AA	2-AA	2-AA	2-AA	2-AA
		Conc. (µg/plate)	1.0	2.0	10	0.5	2.0
		cfu/plate	442.3±10.26	237.0±13.53	241.3±25.01	287.3±15.14	272.7±9.87
		cfu/plate	406.7±3.51	241.0±14.11	344.7±9.50	265.7±17.62	290.0±23.43

\*: TA98 (*Sal. typhimurium* TA98), TA100 (*Sal. typhimurium* TA100), TA1535 (*Sal. typhimurium* TA1535), TA1537 (*Sal. typhimurium* TA1537), WP2uvrA (*E. coli* WP2uvrA), #: Represents a significant difference at p<0.01 level compared with the vehicle control

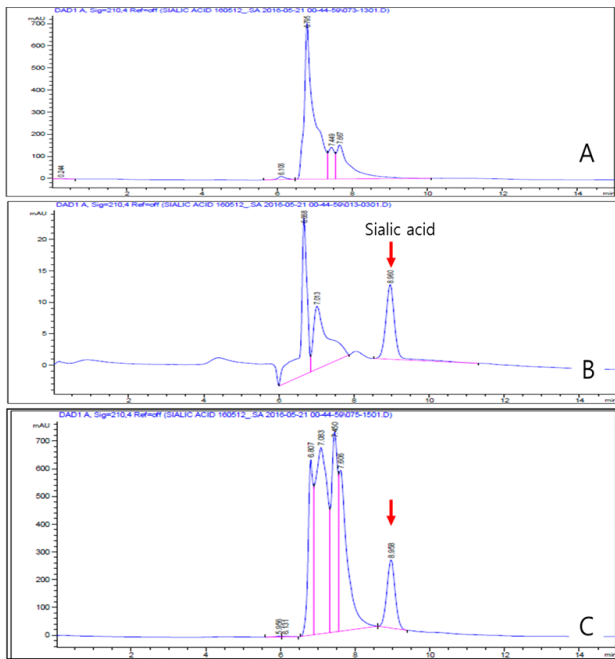


Fig. 3. Result of evaluation for separation and content of sialic acid in hydrolyzed whey protein (7%-GNANA), a test substance, vs. the standard sialic acid applying the HPLC analysis method. A: Non-enzymatically modified GMP, B: Standard sialic acid (25 ppm), C: Result of sialic acid detection in 7%-GNANA. was prepared through the ethanol enriching process and final hot air drying process after treating the 0.2% (v/v) Alclase for 1 hour (40 °C) versus GMP.

는 100% 효율로 분리(Fig. 3)되었으며,  $7.43 \pm 0.28\%$ 의 sialic acid와 GMP 유래의 단백질로 구성되어 있었다(Fig. 1).

## 2. 시험물질의 미생물복귀돌연변이 평가

### 1) 사전 실험농도 설정 평가시험

양성대조물질처리에 따른 표준균주들에 대한 표준 감수성을 검정한 후, 본 시험을 위해 시험물질을 5,000  $\mu\text{g}/\text{plate}$ 를 최고농도로 하여 0, 312, 625, 1,250 그리고 2,500  $\mu\text{g}/\text{plate}$ 에서 모든 균주에서 유의한 생육저해가 없었기 때문에, 이를 기준으로 본 시험은 5,000  $\mu\text{g}/\text{plate}$ 를 최고농도로 설정하였다(Table 4).

### 2) 미생물복귀돌연변이 평가

전체 균주에 대하여 양성대조물질 처리를 통한 표준 감수성을 확인한 결과, 대사활성계 미처리의 경우 TA100, TA1535, WP2uvrA, TA98 및 TA1537 균주는 각각  $442.3 \pm 10.26$  cfu/plate,  $237.0 \pm 13.53$  cfu/plate,  $241.3 \pm 25.01$  cfu/plate,  $287.3 \pm 15.14$  cfu/plate 및  $272.7 \pm 9.87$  cfu/plate로 나타났으며, 대사활성계

처리 조건에서는  $406.7 \pm 3.51$  cfu/plate,  $241.0 \pm 14.11$  cfu/plate,  $344.7 \pm 9.50$  cfu/plate,  $265.7 \pm 17.62$  cfu/plate 및  $290.0 \pm 23.43$  cfu/plate로 나타나, 정상적인 감수성을 보였다. 음성 대조군 대비 시험물질을 5단계의 농도에서 처리한 본 시험 중 대사활성계 부재의 경우에서 복귀돌연변이에 미치는 결과를 살펴보았더니, *Sal. typhimurium* TA100 균주는 최저  $111.3 \pm 7.77$  cfu/plate에서 최대  $128.7 \pm 10.9$  cfu/plate의 범위의 수치를 나타냈으며, TA1535 균주는  $25.0 \pm 2.00$  cfu/plate에서 최대  $28.3 \pm 2.89$  cfu/plate, *E. coli* WP2uvrA 균주는 최저  $24.0 \pm 1.00$  cfu/plate에서 최대  $27.3 \pm 2.08$  cfu/plate, TA98 균주의 경우는 최저  $32.0 \pm 1.73$ 에서 최대  $39.0 \pm 1.00$  cfu/plate 범위의 수치를 보였고, *Sal. typhimurium* TA1537 균주는 최저  $13.0 \pm 1.00$  cfu/plate에서 최대  $14.7 \pm 2.89$  cfu/plate의 범위로 나타나, 전체 균주에서 정상적인 수준의 결과치를 보였다( $P < 0.01$ ). 대사활성화계 존재의 경우에서 *Sal. typhimurium* TA100 균주는 최저  $109.7 \pm 8.96$  cfu/plate에서 최대  $134.7 \pm 0.58$  cfu/plate 범위의 수치를 보였으며, TA1535 균주는 최저  $22.0 \pm 1.00$  cfu/plate부터 최대  $27.0 \pm 2.65$  cfu/plate, *E. coli* WP2uvrA 균주는 최저  $25.0 \pm 6.93$  cfu/mL에서 최대  $29.7 \pm 4.16$  cfu/plate, *Sal. typhimurium* TA98 균주는 최저  $35.7 \pm 1.53$  cfu/plate에서 최대  $38.3 \pm 2.08$  cfu/plate를 보였으며, TA1537 균주는  $12.7 \pm 3.06$  cfu/plate에서 최대  $14.7 \pm 1.53$  cfu/plate 범위의 수치를 나타내었다. 이러한 결과는 표준 균주별로 안전성 관련 허용 범위 내에서의 수치였으므로 시험물질은 농도와 상관없이 안전한 것으로 평가되었다( $P < 0.01$ ). 따라서, 전체 표준균주에 대하여 시험물질인 7%-GNANA를 농도별로 처리시 미생물복귀돌연변이 평가에서는 안전한 것으로 확인되었다(Table 5, Fig. 4).

## 고 찰

우유 및 유제품에 함유된 카제인 유래 생리활성 peptide가 생체 내에서 심혈관계, 신경계, 면역계 및 영양계에 걸쳐 중요한 기능을 한다는 사실이 밝혀진 이래로 현재까지 이에 대한 여러 연구가 진행되어 왔다. 유단백질 중 영양학적인 관점에서 본 생리활성 peptide로는 CPP와 GMP를 들 수 있는데, GMP는 분자량이 크기 때문에 그 자체로 흡수될 수 없어서 분자량이 작은 peptide로 분해된 후 흡수되어야 한다. GMP의 아미노산 구성성분은 방향족 아미노산이 부족한 반면, 측쇄 아미노산(UAL, ILU)과 낮은 MET 함량을 갖는 독특한 아미노산 조성은 phenylketonurine 환자의 diet 소재와 간 질환의 치료(Marshall, 1991) 및 Hypoallergic Food 등으로 개발이 가능하다고 할 수 있다(Takahashi, 1992). GMP는 칼슘, 철 및 아연의 흡수에 도움을 주는 것으로 알려져 있는데, Kelleher 등(2003)이 Rh(Rhesus) 인자를 가진 어린 원숭이에게 GMP와

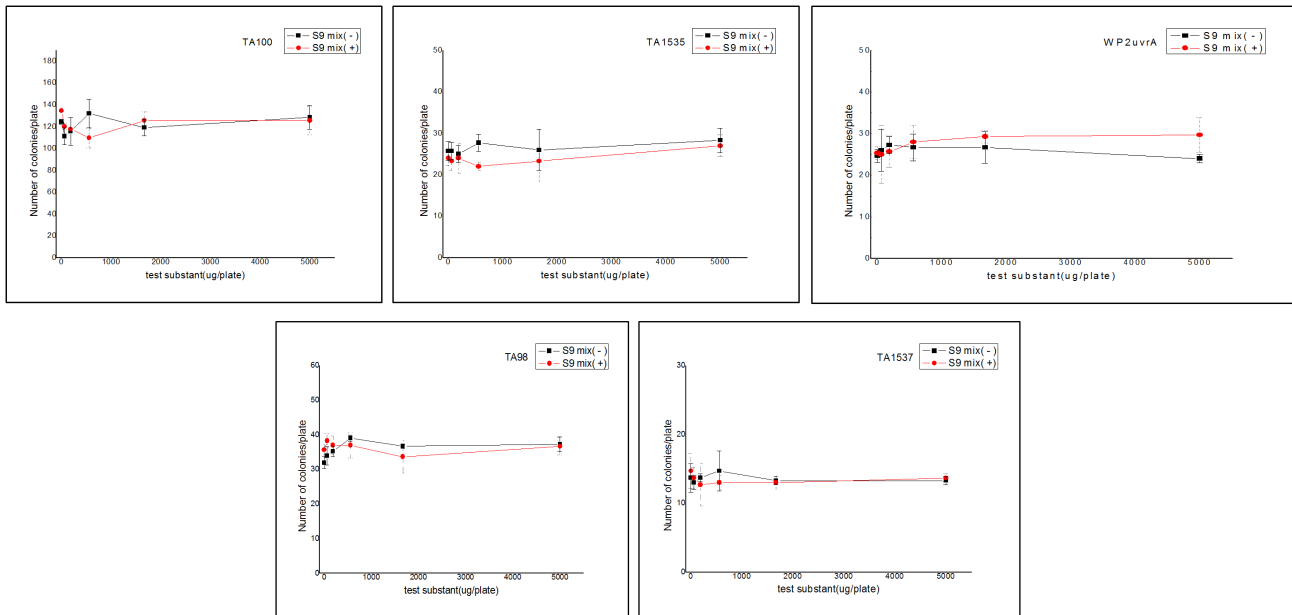


Fig. 4. The result of evaluation conducted to evaluate the effect on increase & decrease of reverse mutation colonies by the addition of 23% -GNANA, a test substance, under the presence and absence conditions of metabolic activation system versus the solvent control group. TA98 (*Sal. typhimurium* TA98), TA100 (*Sal. typhimurium* TA100), TA1535 (*Sal. typhimurium* TA1535), TA1537 (*Sal. typhimurium* TA1537), WP2uvrA (*E. coli* WP2uvrA), S9 Mix (-) : without metabolic activation, S9 Mix (+) : with metabolic activation

조제용 분유의  $\alpha$ -lactalbumin 성분을 보충했을 때에 나타나는 변화를 관찰하였는데, 양쪽 모두에서 아연 흡수의 증가를 관찰하였다. 영양적인 측면 이외에도 충치 예방(Aimutis, 2004)에 있어 유제품에 포함된 생리활성 peptide에 관한 기능성 연구가 진행되어 왔다. 본 연구에서는 식품첨가물로 등재가 되어 있으며, Endo-protease인 Alcalase를 사용하여 GMP 내 지표성분인 sialic acid를 분리시킴과 동시에 아미노산 형태로 가수분해함으로써 이들의 기능성을 동시에 제품개발에 활용하고자 하였다. 본 연구가 유청가수분해단백분말(7% G-NANA) 소재의 기능성 유제품으로 개발을 위하여 sialic acid를 분리 및 정제 등의 인위적인 원료 GMP의 변형 유발과 기능성 식품으로 개발을 목표로 하고 있기 때문에 관련법규에 준하는 해당 시험물질의 안전성 평가는 필수적이라고 할 수 있다. 이에 따라 본 연 연구에서는 GMP를 원료로 하여 제조된 시험물질인 7%-GNANA에 대한 발암성 유발 유·무 판단에 기초자료를 얻기 위하여 유전독성시험 중 미생물복귀돌연변이 시험을 실시하였다. 시험에는 *Sal. typhimurium*의 돌연변이 균주인 TA100, TA1535과 *E. coli*의 WP2uvrA의 염기치환형, *Sal. typhimurium*의 돌연변이 균주인 TA198과 TA1537의 경우는 Frameshift를 복귀돌연변이 유발 여부 평가를 위한 항목으로 정하였다. 시험물질인 7%-GNANA의 유전독성시험 중 미생물복귀돌연변이시험을 실시한 결과, 대사활성계 존재 유무에

관계없이 모든 균주는 모든 농도에서 재현성 있는 증가를 나타내지 않았으며, 용량의존성도 확인되지 않았음에 따라 GMP를 원료로 제조한 7%-GNANA는 복귀돌연변이 유발원이 아닌 것으로 판정되었다. 따라서, 본 시험의 목표인 안전식품인 GMP를 원료로 7% sialic acid를 분리 및 이를 고농도로 함유토록 제조된 7%-GNANA는 단지 원료인 GMP 수준의 안전한 식품소재임이 확인되었다.

### 요 약

본 시험은 GMP 내 기본적으로 7%로 결합되어 있는 sialic acid의 함유량을 그대로 보유하도록 제조한 유청단백가수분말(시험물질명: 7%-GNANA)을 기능성 식품 원료 개발함에 최종 연구목표를 두었다. 시험물질은 GMP(7% sialic acid 함유)를 원료로 하고, 여기에 식품첨가물로 허용된 효소인 Alcalase를 사용하여 지표성분인 sialic acid를 100% 효율로 분리시킨 후, 동결 건조한 7%-GNANA(7% sialic acid와 GMP 단백질로 구성, 제품명: HELICOBACTROL-7)을 (주)한일바이오메드사(한국)에서 공여 받아 GLP 가이드라인에 따라 미생물복귀돌연변이시험을 실시하였다. 미생물에 대한 돌연변이 유발성 유무를 검색하기 위해 히스티딘 요구성 균주인 *Sal. typhimurium* TA98, TA100, TA1535 및 TA1537과 트립토판 요구성 균주인 *E. coli* WP2uvrA를 이용하였다. 미생물복귀돌연변이시험

은 시험물질을 5단계의 농도군(0, 61.7, 185, 556, 1,670, 5,000 µg/plate)으로 하여 평가하였다. 본 시험을 통한 평가결과, 대사활성계 존재 유무와 관계없이 모든 군주에서 시험물질의 각 농도에 의한 복귀돌연변이 유발원 양성기준인 콜로니 생성수치가 재현성 있는 증가를 나타내지 않았으며, 용량의존성도 확인되지 않았다. 결론적으로, 시험물질인 7% G-NANA의 식품첨가물로서 등록을 위하여 수행한 미생물돌연변이시험에서 안전성이 확인되었다.

## 감사의 글

본 연구는 농림축산식품부(기질 특이적 유기태화-미네랄류 제조법 확립을 통한 다기능성 사료첨가제 개발 및 수출용 기능성 미네랄 강화한 대량생산시스템 정립, 고부가가치식품 개발산업, 제 113024-3호)에 의해 이루어진 것임.

## 참고문헌

1. Aimutis, W. R. 2004. Bioactive properties of milk proteins with particular focus on anticariogenesis. *J. Nutr.* 134:989-995.
2. Brody, E. P. 2000. Biological activities of bovine glycomacropeptide. *British Journal of Nutrition* 84:S39-S46.
3. Gorog, P. and Kovacs, I. B. 1978. Anti-inflammatory effect of sialic acid. *Agents and Actions* 8:543-545.
4. Iijima, R., Takahashi, H., Namme, R., Ikegami, S. and Yamazaki, M. (2004). Novel biological function of sialic acid (N-acetylneuraminic acid) as a hydrogen peroxide scavenger. *FEBS Letters* 561:163-166.
5. Kelleher, S. L., Chatterton, D., Nielsen, K. and Lonnerdal, B. 2003. Glycomacropeptide and  $\alpha$ -lactalbumin supplementation of infant formula affects growth and nutritional status in infant rhesus monkeys. *Am. J. Clin. Nutr.* 77:1261-1268.
6. Korea Food and Drug Administration(KFDA). 2014. The above study was conducted in accordance with the Ministry of Food and Drug Safety. *KFDA Notice No. 2014-136* (Jul. 30.).
7. Korea Food and Drug Administration(KFDA). 2015. Guidelines for toxicity tests in drugs, etc. *KFDA Notice No. 2014-67* (Feb. 12).
8. Maron, D. M. and Ames, B. N. 1983. Revised methods for the *Salmonella* mutagenicity test. *Mutation Res.* 113:173-215.
9. Marshall, S. C. 1991. Casein macropeptide from whey. A new product opportunity. *Food Res. Quar.* 15:86-91.
10. Moon, Y.-I., Lee, W. and Oh, S. 2005. Glycomacropeptide hydrolysed from bovine  $\kappa$ -casein: II. Chromatographic changes of  $\kappa$ -casein macropeptide as related to trichloroacetic acid concentration. *Korean J. Food Sci. Ani. Resour.* 25: 478-482.
11. Organization for Economic Cooperation and Development. 1993. OECD guideline for the testing of chemicals, 'Guidelines for the management of non-clinical studies' OECD Test guidelines (No. 473) and GLP Center Standard Operating Procedures.
12. Organization for Economic Cooperation and Development. 2008. OECD Guidelines 408 for the testing of chemicals: Repeated Dose 90-day Oral Toxicity Study in Rodents.
13. Springer-Verlag, R. S. 1984. Sialic acids: Chemistry, metabolism and function. *Carbohydrate Research* 129:c5-c7.
14. Takahashi, N., Asakawa, S., Shunichi, D. and Tadashi, I. 1992. Hypoallergenic nutritive composition. *French Pat. Appl. Fr. 2667 850A1*.
15. Wang, B. 2009. Sialic acid is an essential nutrient for brain development and cognition. *Annu. Rev. Nutr.* 29: 177-222.
16. Wang, B. and Brand-Miller, J. 2003. The role and potential of sialic acid in human nutrition. *European Journal of Clinical Nutrition* 57:1351-1369.
17. Wang, B., Brand-Miller, J., McVeagh, P. and Petocz, P. 2001. Concentration and distribution of sialic acid in human milk and infant formulas<sup>1-3</sup>. *Am. J. Clin. Nutr.* 74:510-515.
18. Wang, B., Yu, B., Karim, M., Hu, H., Sun, Y., McGreevy, P., Petocz, P., Held, S. and Brand-Miller, J. 2007. Dietary sialic acid supplementation improves learning and memory in piglets<sup>1-3</sup>. *Am. J. Clin. Nutr.* 85:561-569.
19. Yoon, Y. C., Cho, J. K., Song, C. H., Lee, S. and Chung, C. I. 2000. Purification of the glycomacropeptide from cheese whey. *Korean J. Food Sci. Ani. Resour.* 20:159-165.

Received June 1, 2016  
 Revised June 20, 2016  
 Accepted June 24, 2016