

유전자재조합 면화 COT102  
안전성평가자료 심사결과 보고서

2014. 1. 9.

식품의약품안전처  
유전자재조합식품등 안전성평가자료심사위원회

## <차 례>

1. 요약 .....	1
2. 심사경위 .....	3
3. 심사경과 .....	3
4. 심사방법 .....	3
5. 심사 신청 자료 검토 .....	4
5-1. 심사 신청된 식품의 개요 .....	4
5-2. 식품으로의 적합성 검토 .....	4
5-3. 유전자재조합체의 안전성 .....	4
가. 유전자재조합체의 개발목적 및 이용방법에 관한 자료 .....	4
나. 숙주에 관한 자료 .....	4
(1) 분류학적 특성(일반명, 학명, 계통분류 등) .....	4
(2) 재배 및 품종개량의 역사 .....	5
(3) 기지의 독성 또는 알레르기 유발성 .....	5
(4) 안전한 식경험의 유무 .....	5
다. 공여체에 관한 자료 .....	5
(1) 분류학적 특성(일반명, 학명, 계통분류 등) .....	5
(2) 안전한 식경험의 유무 .....	6
(3) 공여체 및 근연종의 독성, 항영양성, 알레르기성(미생물의 경우 병원성 및 기지의 병 원체와의 관련성) .....	6
라. 유전자재조합에 대한 자료 .....	6
(1) 형질전환 과정에 대한 정보 .....	6
(2) 도입 유전자에 대한 정보 .....	7
마. 유전자재조합체의 특성에 관한 자료 .....	9
(1) 유전자재조합체 내 도입된 유전자에 관한 정보 .....	9
(2) 유전자산물에 관한 정보 .....	11
(3) 독성 .....	12
(4) 알레르기성 .....	14
(5) 숙주와의 차이 .....	15
(6) 유전자산물이 대사경로에 미치는 영향(숙주가 함유한 고유의 성분을 기질로 하여 반 응할 가능성) .....	17
(7) 외국의 식품유통 승인 및 식용 등의 이용 현황 .....	17
6. 심사 신청 자료 검토 결과 .....	17
7. 기타 .....	17

# 유전자재조합 면화 COT102

## 안전성평가자료 심사결과 보고서

### 1. 요약

신젠타코리아(주)는 유전자재조합 면화 COT102를 식품의약품안전처에 안전성 심사를 신청하였고, “유전자재조합식품등 안전성평가자료 심사위원회”는 「유전자재조합식품등의 안전성평가 심사등에 관한 규정」에 따라 안전성 심사를 수행하였다.

COT102는 *Bacillus thuringiensis* strain AB88 유래의 *vip3Aa1*와 *E. coli* 유래의 *aph4* 유전자가 아그로박테리움법으로 도입되었다. COT102에 도입된 유전자에 의해 Vip3Aa19 단백질과 hygromycin에 내성을 나타내어 형질전환 표지로 사용되는 APH4 단백질을 발현하는 유전자재조합 면화 COT102를 개발하였다.

COT102에는 각각 한 개의 *vip3Aa1* 유전자와 *aph4* 유전자가 도입되었으며 Southern blot을 통하여 도입 유전자의 재배열이 나타나지 않았음이 확인되었다. 또한, COT102에 도입된 유전자는 3세대에 걸쳐 안정적으로 유지되는 것이 확인되었다.

NCBI 독소 데이터베이스를 이용하여 Vip3Aa19 단백질과 APH3 단백질 단백질의 아미노산 서열과 이미 알려진 독소 및 항영양소 아미노산 서열에 대해서 생물정보학적으로 비교 분석한 결과, 서열 상동성이 없는 것으로 확인되었다. 또한 Vip3Aa19 단백질과 APH3 단백질로 마우스 단회투여독성을 평가한 결과 독성이 없는 것으로 확인되었다.

FARRP 알레르겐 데이터베이스를 이용하여 Vip3Aa19 단백질과 APH3 단백질 단백질의 아미노산 서열과 이미 알려진 알레르겐 아미노산 서열을 생물정보학적으로 비교분석한 결과, 80개 이상의 아미노산으로 이루어진 절편에 걸쳐 35%이상의 상동성을 보이는 아미노산 서열은 없었으며 8개씩의 인접 아미노산과 일치하는 서열도 확인되지 않았다.

COT102와 일반 면화의 주요영양성분, 미량영양성분, 항영양소 등의 함량을 비교한 결과, 생물학적인 차이가 없었다. 육계를 대상으로 COT102을 42일 동안 섭취시킨 결과, 일반 면화와 비교하여 영양성에 차이가 없는 것이 확인되었다.

결론적으로, COT102는 지금까지 식품으로 섭취해온 면화와 비교하여 안전성에 문제가 없음이 확인되었다.

## 2. 심사경위

- 신젠타코리아(주)는 나비목 해충에 저항성을 나타내는 유전자재조합 면화 COT102를 식품위생법 제18조에 따른 안전성 평가심사를 받기 위하여 2011년 8월 23일 식품의약품안전처에 「유전자재조합식품등의 안전성평가 심사 등에 관한 규정」(이하 '심사규정'이라고 함)에서 규정한 관련 자료를 첨부하여 심사 신청하였다.
- 이에 식품의약품안전처장은 본 품목이 심사규정에 따라 안전성 평가가 이루어졌는지 여부에 대하여 '유전자재조합식품등 안전성평가자료심사위원회' (이하 '심사위원회'라고 함)에 검토 의뢰하고,
- 심사위원회는 신청인이 제출한 자료에 근거하여 아래와 같이 심사규정에 따라 안전성평가가 이루어졌음을 확인하였다.

## 3. 심사경과

- 심사대상품목

대상품목	신청자	개발사	제외국의 안전성 승인 현황
유전자재조합 면화 COT102	신젠타코리아(주)	Syngenta Crop Protection AG	미국(2005), 호주/뉴질랜드(2005), 멕시코(2010), 캐나다(2011) 일본(2012)

- 심사경과

- 2011년 8월 23일 : 안전성 평가자료 심사신청
- 2011년 8월 24일 : 심사위원회 서류심사 의뢰
- 2011년 12월 20일 : 1차 심사위원회 개최
- 2013년 2월 19일 : 2차 심사위원회 개최
- 2013년 8월 20일 : 3차 심사위원회 개최
- 2013년 9월 10일 : 환경위해성 심사완료(농촌진흥청, 국립수산물과학원, 국립환경과학원)
- 2013년 11월 19일 : 4차 심사위원회 개최
- 2013년 12월 17일 : 5차 심사위원회 개최
- 2013년 12월 19일~ 2014년 1월 8일: 공개의견수렴 실시

## 4. 심사방법

- 본 품목과 관련하여 심사 신청된 유전자재조합체가 심사규정의 적용대상 인지를 검토하였고,

- 제출된 안전성 평가 자료가 심사규정에서 요구하는 자료를 갖추었는지를 확인한 후 자료의 내용을 토대로 안전성 평가 자료를 심사하였다.

## 5. 심사 신청 자료 검토

### 5-1. 심사 신청된 식품의 개요

- 신젠타코리아(주)가 심사 신청한 유전자재조합 면화 COT102는 *vip3Aa19* 유전자와 *aph4* 유전자를 가져 나비목 해충에 저항성을 나타낸다.

### 5-2. 식품으로의 적합성 검토

- 본 품목과 관련하여 제출된 안전성 평가자료가 심사규정 제12조에서 요구하는 자료를 만족시키는지 여부를 검토하였으며,
- 자료의 내용을 토대로 다음과 같이 식품으로서의 안전성이 확보되어 있는지를 심사하였다.

### 5-3 유전자재조합체의 안전성

#### 가. 유전자재조합체의 개발목적 및 이용방법에 관한 자료

- 신젠타는 나비목 해충에 저항성을 나타내도록 *Vip3Aa19* 단백질과 hygromycin에 내성을 나타내어 형질전환 표지로 사용되는 *APH4* 단백질을 발현하는 유전자재조합 면화 COT102를 개발하였다.
- 재배방법 및 이용방법은 기존의 일반 면화와 동일하다.

#### 나. 숙주에 관한 자료

##### (1) 분류학적 특성(일반명, 계통분류 등)

- 종(Species) : *hirsutum*
- 속(Genus) : *Gossypium*
- 과(Family) : Malvaceae
- 일반명(Common Name) : 면화, 목화

##### (2) 재배 및 품종개량의 역사

- *Gossypium* 속은 전세계적으로 50여 종이 존재하고 있으나, 가장 널리

경작되고 있는 종은 *G. hirsutum* 이다. 면화는 원래 다년생 식물이지만 일부 지역에서 선택적 품종개량을 통해 일년생 작물로 육성되었다.

- 면화는 오랜 이용 역사를 가지는 주요 섬유 작물 중 하나로서, B.C. 3,000년경 파키스탄 인더스 강 계곡에서 경작한 면화로부터 실을 뽑아 천을 제작하였다는 기록이 남아있다.

### (3) 기지의 독성 또는 알레르기 유발성

- 면화는 자연발생의 항영양성분인 고시폴과 사이클로프로페노이드 지방산을 생산한다. 이들 독성물질은 면실을 오일이나 린터로 가공하는 과정 중 고온 고염기 처리를 통한 비셀룰로오스 분리 공정 중에 대부분 제거된다.
- 면화는 국제식품규격위원회(Codex) 확인 결과 특별하게 과민증 표시를 요구하는 식품군에 포함되지 않았다.

### (4) 안전한 식경험의 유무

- 일반적으로 면화 자체는 식품으로 사용되지 않으며, 면실은 총 4가지 종류의 부산물(면실유, 면실박, 면실껍질, 린터)로 가공되는데 이 중 면실유와 가공한 린터만이 식품에 사용되고 있다. 면실유는 19세기 중반부터 통상적으로 사용되었으며, GRAS로 인정받은 바 있다.

## 다. 공여체에 관한 자료

### (1) 분류학적 특성(일반명, 학명, 계통분류 등)

#### ① *vip3Aa19* 유전자

*vip3Aa19*은 *Bacillus thuringiensis* strain AB88의 *vip3Aa1*에서 유래하였다.

- 균주(strain) : AB88
- 종(Species) : *thuringiensis*
- 속(Genus) : *Bacillus*
- 과(Family) : *Bacillaceae*

- 아미노산 치환에 따른 유전자명 및 개발농산물은 아래와 같다.

유전자	치환형태	
	129번	284번
<i>vip3Aa1</i> (wild type)	M(메티오닌)	K(라이신)
<i>vip3Aa19</i> (COT102)	M(메티오닌)	Q(글루타민)
<i>vip3Aa20</i> (MIR162)	I(이소류신)	Q(글루타민)

② *aph4* 유전자

- 균주(strain) : K-12
- 종(Species) : *coli*
- 속(Genus) : *Escherichia*
- 과(Family) : *Enterobacteriaceae*

(2) 안전한 식경험의 유무

- *B. thuringiensis*는 직접적으로 식용으로 이용된 적은 없으나, 오래전부터 BT 단백질들은 농업분야에서 살충제로 널리 사용되어 왔다.
- *E. coli* 또한 직접적으로 식용으로 이용된 적은 없다.

(3) 공여체 및 근연종의 독성, 항영양성, 알레르기성(미생물의 경우 병원성 및 기지의 병원체와의 관련성)

- *B. thuringiensis* 및 *E. coli*는 인간이나 동물에 대한 병원성 생물체로 알려지지 않았다.

라. 유전자재조합에 대한 자료

(1) 형질전환 과정에 대한 정보

(가) 형질전환방법

- 아그로박테리움법을 사용하였다.

(나) 재조합에 사용된 벡터에 대한 정보

1) 기원

- pNOV1417의 *vip3Aa19* 유전자 카세트(*SalI*/*KpnI* 제한효소 단편)와 pNOV101의 *aph4* 유전자 카세트(*HindIII*/*XmaI* 제한효소 단편)를

pHiNK078 벡터에 삽입함으로써 pCOT1을 최종적으로 완성하였다.

## 2) 숙주에서의 확인

- Southern blot분석 결과, 유전자재조합 면화 COT102에는 단일카피의 *vip3Aa19* 유전자와 *aph4* 유전자가 포함되어 있는 것이 확인되었으며, 삽입된 DNA 서열은 상응하는 재조합 플라스미드 DNA 서열과 동일함을 확인하였다.

## 3) 숙주에서의 기능

- *vip3Aa19* 유전자는 Vip3Aa19 단백질을 발현하여 나비목 해충에 대한 저항성을 나타낸다.
- *aph4* 유전자는 APH4 단백질을 발현하여 hygromycin에 대한 내성을 나타내어 형질전환 과정에서 선발표지로 사용된다.

## (다) 중간숙주에 대한 정보

- COT102의 형질전환을 위하여 무력화된 *Agrobacterium* strain GV3101이 중간숙주로 사용되었다.

## (라) 전달성에 관한 정보

- 플라스미드 벡터 pCOT1에는 숙주이외의 다른 생물체로 스스로 이동될 수 있는 전달성과 관련된 유전자를 포함하고 있지 않다.

## (2) 도입 유전자에 대한 정보

### (가) 구성 유전자의 특성

#### 1) 선발표지유전자

- *aph4* : hygromycin의 인산화를 촉매하는 phosphotransferase 효소를 암호화하며, hygromycin 존재 시 선택적인 세포의 증식을 가능하게 하여 형질전환된 세포의 선발을 가능하게 한다.

#### 2) 조절인자

- *vip3Aa19* 유전자 카세트에는 *Arabidopsis thaliana*의 *actin-2(act2)* 유전자와 인트론에서 유래한 프로모터 및 *Agrobacterium tumefaciens*의 nonpaline synthase 유전자에서 유래한 터미네이터가 이용되었다.



- *aph4* 유전자 카세트에는 *Arabidopsis thaliana*의 *ubiquitin-3(ubq3)* 유전자와 인트론에서 유래한 프로모터 및 *Agrobacterium tumefaciens*의 nopaline synthase 유전자에서 유래한 터미네이터가 이용되었다.

### 3) DNA의 기능에 영향을 주는 기타 인자

- 삽입유전자 발현과 관련된 인자 이외의 다른 염기 서열은 삽입되지 않았다.

#### (나) 크기 및 명칭

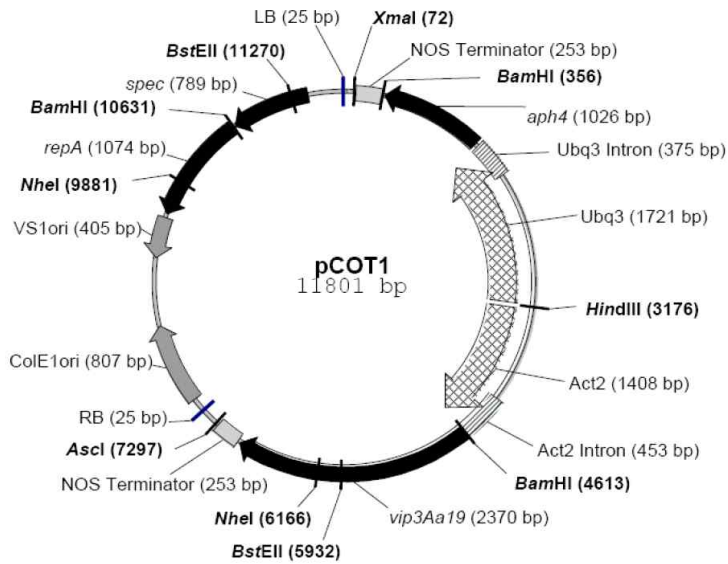
- *vip3Aa19* 유전자와 *aph4* 유전자는 각각 2,370bp 및 1,026bp이며 다른 구성 인자는 [표 1]과 같다.

[표 1] 플라스미드 벡터(pCOT1)의 주요 구성 요소

명칭	크기 (bp)	유래 및 기능
<b><i>vip3Aa19</i> 유전자 카세트</b>		
<i>act2</i>	1408	<i>Arabidopsis thaliana</i> 의 <i>actin-2</i> 유전자와 그 인트론에서 유래한 프로모터.
<i>vip3Aa19</i>	2370	<i>B. thuringiensis</i> strain AB88에서 발견된 <i>vip3Aa1</i> 유전자의 변형체. <i>vip3Aa19</i> 유전자는 식물체에서 더 선호되는 codon usage를 지니도록 전환됨. (Vip3Aa1: 284번째 lysine, Vip3Aa19: 284번째 glutamine)
<i>NOS</i>	253	<i>Agrobacterium tumefaciens</i> 의 nopaline synthase 유전자로부터 유래한 터미네이터.
<b><i>aph4</i> 유전자 카세트</b>		
<i>ubq3</i>	1721	<i>Arabidopsis thaliana</i> 의 <i>ubiquitin-3(ubq3)</i> 에서 유래한 프로모터 부분과 첫 번째 intron이 포함됨.
<i>aph4</i>	1026	hygromycin의 인산화를 촉매하는 phosphotransferase 효소를 암호화함.(형질전환 표지유전자로 사용됨.)
<i>NOS</i>	253	<i>Agrobacterium tumefaciens</i> 의 nopaline synthase 유전자로부터 유래한 터미네이터.

#### (다) 완성된 벡터내의 유전자 염기서열의 위치 및 방향성

- 제한효소 지도, 벡터 내에서의 유전자위치, 방향성은 [그림 1]과 같다.



[그림 1] PV-GMIR9의 유전자 위치 및 제한효소 위치

(라) 구성 유전자의 기능

- *vip3Aa19* 유전자는 Vip3Aa19 단백질을 암호화하며, Vip3Aa19 단백질은 나비목 해충에 대한 저항성을 부여한다.
- *aph4* 유전자는 APH4 단백질을 암호화하며, APH4 단백질은 hygromycin에 대한 내성을 부여한다.

(마) 유해염기서열의 유무

- 유해염기서열은 존재하지 않는 것으로 나타났다.

(바) 외래전사해독프레임의 유무와 그 전사 및 발현가능성

- 목적으로 하는 Vip3Aa19 및 APH4 단백질의 발현과 관련된 서열 이외 전사 및 발현가능성이 있는 새로운 외래전사해독프레임이 존재하지 않는 것으로 나타났다.

(사) 목적하는 유전자 이외의 염기서열의 혼입

- 목적하는 유전자 이외의 염기서열은 혼입되지 않았다.

마. 유전자재조합체의 특성에 관한 자료

(1) 유전자재조합체 내 도입된 유전자에 관한 정보

(가) 유전자재조합체의 게놈에 삽입된 유전자의 특성 및 기능

- 유전자재조합 면화 COT102에 도입된 유전자 *vip3Aa19*는 Vip3Aa19 단백질을 발현하여 나비목 해충에 대해 저항성을 나타낸다.
- *aph4* 유전자는 APH4 단백질을 발현하여 hygromycin에 대한 내성을 나타내며 형질전환 표지 유전자로 사용된다.

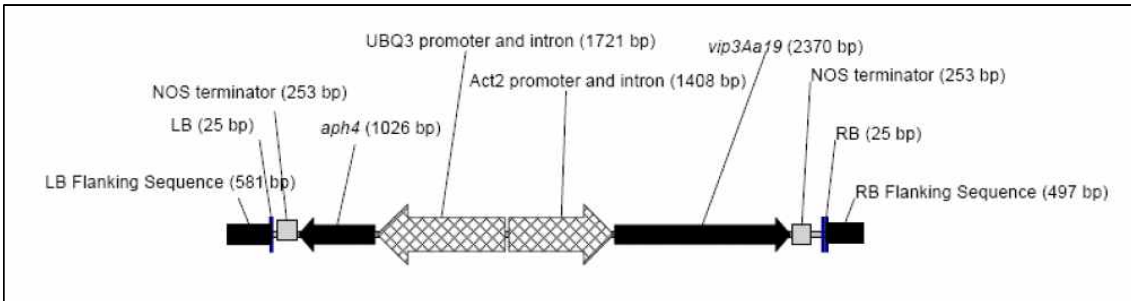
(나) 삽입부위의 수

- COT102에는 단일 유전자 자리에 각각 한 개의 *vip3Aa19* 유전자 카세트 및 *aph4* 유전자 카세트가 삽입되어 있는 것이 확인되었다.

(다) 각 삽입부위의 삽입유전자의 구성

1) 복제수, 염기서열(주변염기서열 포함)

- Southern 분석 결과, COT102의 게놈에는 한 개의 *vip3Aa19* 유전자 카세트 및 *aph4* 유전자 카세트가 삽입되었음이 확인되었다.
- 아래의 [그림 2]는 유전자재조합 면화 COT102 안에 플라스미드 삽입 유전자의 전체적인 모식을 나타내고 있다.



[그림 2] 유전자재조합 면화 COT102에서 삽입 유전자의 모식도

2) 기지의 독성이나 항영양소를 암호화하는 유전자가 없음을 입증하는 자료

- 기지의 독성물질이나 항영양소를 암호화하는 것으로 알려진 유전인은 유전자재조합 면화 COT102의 삽입 DNA에 존재하지 않는다.

(라) 삽입유전자 및 인접하는 숙주 게놈 유전자의 외래전사해독프레임의 유무와 그 전사 및 발현가능성

- COT102 삽입유전자의 5' 및 3' 말단과 면화 내재 유전자 사이 접합부에서 시작코돈과 종결코돈을 가지는 잠재적인 외래전사해독프레임(ORF)은 2개가 확인되었으나, 동 ORF는 발현되더라도 이미 알려진

알레르겐 및 독소와 상동성이 없는 것으로 확인되었다.

**(마) 안정성에 관한 사항**

**1) 복수세대에서 삽입된 유전자의 서열, 크기**

- COT102에 존재하는 삽입 DNA의 안정성을 평가하기 위해 COT102 DNA를 사용하여 3세대(F1, BC1F1, BC4F1)에 걸친 Southern blot 분석을 실시한 결과 3세대에 걸쳐 COT102에 삽입된 DNA가 유지됨이 확인되었다.

**2) 복수 세대에서 발현부위, 발현시기, 발현량**

- COT102 앞에서의 Vip3Aa 단백질 발현량과 APH4 단백질 발현량을 3세대(F1, BC1F1, BC4F1)에 걸쳐 효소면역측정법(ELISA)으로 분석한 결과, Vip3Aa19는 3세대에 걸쳐 안정적으로 발현됨이 확인되었고, APH4 단백질은 3세대 모두에서 정량 한계 이하로 확인되었다.

**(2) 유전자산물에 관한 정보**

**(가) 유전자산물의 화학적 성질**

- 유전자재조합 면화 COT102의 Vip3Aa19 단백질은 789개 아미노산으로 구성되어 약 89kDa의 분자량을 가지며, APH4 단백질은 341개 아미노산으로 구성되어 약 42kDa의 분자량을 가진다.

**(나) 유전자산물의 기능**

- Vip3Aa 단백질이 발현됨에 따라 식물체는 나비목 해충에 대한 저항성을 나타내며, APH4 단백질이 발현됨에 따라 hygromycin에 대한 내성을 나타낸다.

**(다) 발현단백질의 아미노산 서열의 번역 후 변이 유무**

- Vip3Aa 단백질에 대해 당화분석을 실시한 결과, 당화되지 않았음을 확인하였다.

**(라) 발현단백질의 구조적 변화 여부**

- 발현단백질 Vip3Aa19에 대하여 SDS-PAGE 및 Western blot을 통한 분자량과 면역반응성 분석, 곤충 생물활성 분석, 펩타이드 질량 분석

을 실시한 결과 구조적변화는 확인되지 않았다.

- 발현단백질 APH4은 식물체 대부분의 조직에서 정량한계 이하로 검출되어(ELISA 분석결과) 식물체 유래 APH4를 이용한 직접실험을 수행하는 것이 사실상 불가능하므로 *E. coli*에서 발현되는 APH4만을 이용하여 SDS-PAGE 및 Western blot을 통한 분자량과 면역반응성 분석, 효소활성측정, N-말단 서열분석을 수행한 결과 구조적변화는 확인되지 않았다.

#### (마) 새로운 특성의 표현형

- Vip3Aa 단백질이 발현됨에 따라 나비목 해충에 저항성을 나타내며, APH4 단백질이 발현됨에 따라 hygromycin에 내성을 나타내어 형질 전환된 세포의 성장과 선발을 가능하게 한다.

#### (바) 유전자산물의 발현부위 및 발현량

- COT102 다양한 조직에서 Vip3Aa19 단백질 발현 수준 및 APH4 단백질 발현 수준을 효소면역측정법(ELISA)으로 분석한 결과,
- Vip3Aa19 단백질의 평균 발현 수준은 잎(squaring 단계)에서 21.51  $\mu\text{g/g}$  생체중량으로 가장 높게 측정되었으며, 종자에서는 2.88  $\mu\text{g/g}$  생체중량으로 측정되었다.
- APH4 단백질은 대부분의 조직에서 정량한계 미만으로 측정되었거나, 검출되지 않았다.

### (3) 독성

#### (가) 생산물이 단백질인 경우

##### 1) 안전한 식경험의 유무

- Vip3Aa19 단백질 및 APH4 단백질에 대한 직접적인 식경험은 없다.

##### 2) 기지의 독성 및 항영양소와의 아미노산 서열 유사성

- NCBI Entrez 단백질 데이터베이스(NCBI, 2007)를 이용하여 이미 알려진 독소 및 항영양소의 아미노산 서열과 Vip3Aa19 단백질의 아미노산 서열을 생물정보학적으로 비교분석한 결과, 역치( $5 \times 10^{-5}$ ) 미만의 E-value를 나타내는 독소 단백질은 3종류가 검색되었으나,
- 역치(1.0) 미만의 E-value를 나타내는 독소 단백질은 없는 것으로 확

인되었다.

순번	Hit name	E-value
1	NR gi 7458799 gb AAB41263.3 rhoptry protein[Plasmodium yoelii]	$2 \times 10^{-6}$
2	NR gi 82541475 ref XP_724976.1 235kDa rhoptry protein [Plasmodium yoelii yoelii str. 17XNL] gb EAA16541.1 235kDa rhoptry protein [Plasmodium yoelii yoelii]	$4 \times 10^{-6}$
3	NR gi 123456829 ref XP_001316147.1 viral A-type inclusion protein [Trichomonas vaginalis G3] gb EAY03924.1 viral A-type inclusion protein, putative [Trichomonas vaginalis G3]	$6 \times 10^{-6}$

### 3) 유전자 산물의 물리화학적 처리에 대한 감수성

#### ① Vip3Aa19 단백질

- SDS-PAGE 및 Western blot을 통한 분자량과 면역반응성 분석, 곤충 생물활성 분석, 펩타이드 질량 분석을 통해 *E. coli* 유래 Vip3Aa19 단백질은 COT102 유래 Vip3Aa19 단백질과의 동등성이 확인되어 대체산물로의 사용이 가능할 것으로 판단된다.
- 인공위액 안정성 : Vip3Aa19 단백질은 인공위액에서 1분경과 후 분해되는 것으로 확인되었다.
- 인공장액 안정성 : Vip3A19 단백질은 인공장액에서 5분경과 후 분해되는 것으로 확인되었으나, 일부 분해산물(62kDa, 55kDa)은 48시간의 노출에서도 잔류하는 것으로 확인되었다. 그러나 소화기관의 특성상 인공위액 노출단계에서 빠르게 분해될 것으로 판단된다.
- 열 안정성 : Vip3Aa19 단백질은 120°C 이상의 온도에서 30분간의 열처리에 의해 효소면역측정법(ELISA)에서 정량한계 미만으로 검출되었으며, 65°C 이상의 온도에서 30분간의 열처리에 의해서는 반수치사량(LD<sub>50</sub>)을 측정할 수 없을 정도로 분해되는 것이 확인되었다.

#### ② APH4 단백질

- APH4 단백질은 식물체 대부분의 조직에서 정량한계 이하로 검출되어(ELISA 분석결과) 식물체 유래 APH4를 이용한 직접실험을 수행하는 것이 사실상 불가능하므로 *E. coli*에서 발현되는 APH4(APH4-0102)만을 이용하여 SDS-PAGE 및 Western blot을 통한 분자량과 면역반응성 분석, 효소활성측정, N-말단 서열분석을 수행되었다.
- 인공위액 안정성 : APH4 단백질은 인공위액에 노출된 후 수 초이내

분해되는 것으로 확인되었다.

- 인공장액 안정성 : APH4 단백질은 인공장액에 노출된 후 수 초이내 분해되는 것으로 확인되었다.
- 열 안정성 : APH4 단백질은 170°C 이상의 온도에서 30분간의 열처리에 의해 효소면역측정법(ELISA)에서 검출한계 미만으로 확인되었다.

#### 4) 발현단백질의 단회투여독성

- *E. coli*에서 발현시킨 실험물질 VIP3A-0100을 Crl-1 마우스를 대상으로 5,000mg/kg body wt. 용량으로 단회 투여한 결과 사망사례는 발견되지 않았으며, 체중 및 체중증가량, 임상학적 징후, 기관무게, 병리소견 등에서 부정적인 영향이 발견되지 않았다.
- *E. coli*에서 발현시킨 실험물질 APH4-0102을 AP<sub>1</sub>CD-1 마우스를 대상으로 1,828mg/kg body wt. 용량으로 단회 투여한 결과 사망사례는 발견되지 않았으며, 체중 및 체중증가량, 임상학적 징후, 기관무게, 병리소견 등에서 부정적인 영향이 발견되지 않았다.

#### (4) 알레르기성

##### (가) 유전자산물이 알레르겐으로 알려지고 있는가에 관한 자료

- Vip3Aa19 단백질과 APH4 단백질이 알레르겐이라는 보고는 없다.

##### (나) 유전자 산물의 물리화학적 처리에 대한 감수성

- Vip3Aa19 단백질과 APH4 단백질 모두 인공위액 또는 인공장액과 같은 소화효소에 쉽게 분해되며, 열처리에 의해 쉽게 면역반응성 또는 생물학적 활성을 잃는 것으로 확인되었다.

##### (다) 유전자산물 중 이미 알려져 있는 알레르겐과 상동성에 관한 자료

- Vip3Aa19 단백질과 APH3 단백질 각각의 아미노산 서열과 이미 알려진 알레르겐의 아미노산 서열을 알레르겐 데이터베이스(FARRP)를 이용하여 분석한 결과 80개 아미노산 절편에 걸쳐 35% 이상의 상동성을 보이는 알레르겐 서열은 없었으며, 8개씩의 인접 아미노산과 일치하는 서열도 확인되지 않았다.

##### (라) 유전자산물이 1일 단백질섭취량의 유의한 양을 차지하고 있는지에 관한 자료

- 식용에 이용되는 주요 면실 산물은 면실유이다. 유전자재조합 면화 COT102의 정제 면실유에는 Vip3Aa19 단백질이 검출되지 않는 것으로 확인되었다. 그러므로 면실유를 통한 Vip3Aa19 단백질의 섭취량은 없을 것으로 판단된다.

## (5) 숙주와의 차이

- 2001년(지역별 단일샘플)과 2002년(지역별 4반복) COT102 면실과 일반 면화(Coker312) 면실을 수확하여 성분 분석을 실시하였으며, 통계방법은 분산분석을 사용하였고, 통계학적으로 유의적 차이가 나는 성분에 대해 생물학적으로 유의적 차이가 있는지 여부 확인을 위해 문헌범위(ILSI 및 OECD범위)를 사용하여 상업적 일반 면화의 자연적인 변이범위와 비교분석하였다.

### (가) 주요영양성분

#### ① 일반성분

- 일반성분(수분, 지방, 단백질, 총식이섬유소, 산성세제섬유소, 중성세제섬유소, 회분, 탄수화물)은 모두 통계적으로 유의적인 차이를 보이지 않았다.

#### ② 아미노산

- 아미노산(18개) 중 serine은 통계적으로 유의적인 차이를 보였으나, 문헌범위 이내에 존재하였으므로 생물학적으로 유의적인 차이가 없음이 확인되었다.

#### ③ 지방산

- 지방산(C14:0, C16:0, C16:1, C18:0, C18:1, C18:2, C18:3, C20:0, C22:0)은 모두 통계적으로 유의적인 차이를 보이지 않았다.

### (나) 미량영양성분

#### ① 무기질

- 무기질 중 칼륨, 아연, 구리는 통계적으로 유의적인 차이를 보였으나, 모두 문헌범위 이내에 존재하였으므로 생물학적으로 유의적인 차이가 없음이 확인되었다.



② 비타민

- 비타민 E는 2007년 6개 포장지역에서 4반복으로 수확한 면실을 이용하여 분석하였으며, 통계적으로 유의적인 차이를 보이지 않았다.

(다) 내재성독소

- 면화 내에서 발생한다고 알려진 내재성 독소는 없다.

(라) 영양억제인자

- 영양억제인자(총 고시폴, 유리 고시폴(free gossypol), 스테르큐르산(sterculic acid), 말발산(malvalic acid), 디히드로스테르큐르산(dihydrosterculic acid)는 통계적으로 유의적인 차이를 보이지 않았다.

(마) 알레르기유발성분

- 면화는 주된 알레르기 유발 식품으로 알려져 있지 않다.

(바) 삽입된 유전자의 대사산물

- Vip3A 단백질은 효소 활성 및 식물 대사 경로와의 연관성을 가지고 있지 않으며,
- APH4 형질전환 표지 단백질은 hygromycin의 인산화를 촉진하는 phosphotransferase나 기질이 한정되어 있어, hygromycin B, hygromycin B<sub>2</sub> 및 destromycin A, destromycin B 외에 다른 계열의 항생제를 인산화시키지 않으며, 식물체는 APH4의 기질을 지니고 있지 않은 것으로 알려져 있다.

(사) 영양성

- Ross 708 육계를 이용하여 starter, grower/finisher용 사료에 COT102 면실박을 이용하여 21일령까지는 starter용 사료, 그 이후 42일령까지는 grower/finisher용 사료를 섭취시킨 결과, 폐사율·증체량·사료효율·도체 중량 등 모든 항목에서 특이적 영향은 관찰되지 않았다.

(6) 유전자산물이 대사경로에 미치는 영향

- Vip3A 단백질은 효소활성을 가지고 있지 않고, 식물대사 경로와 연관성을 지니고 있지 않다.

- 식물체는 APH4에 대한 기질이 없으므로 식물대사 경로에 영향을 미치지 않을 것으로 판단된다.

#### (7) 외국의 식품유통 승인 및 식용 등의 이용 현황

- 현재까지 미국(2005), 호주/뉴질랜드(2005), 멕시코(2010), 캐나다(2011), 일본(2012)에서 승인받았다.

### 6. 심사신청 자료 검토 결과

- 이상의 검토 내용과 같이 심사규정에 따라 제출된 안전성 평가 자료를 심사한 결과, 사용된 공여체, 숙주 및 유전자재조합 과정 등이 식품으로 이용 시 안전성 문제를 유발하지 않는다고 판단되었다.
- 유전자재조합체에 관해서도 도입된 유전자, 유전자산물, 알레르기성, 독성 및 영양성 등에서 안전성 평가에 필요한 적절한 자료가 제출되었다. 이 자료를 토대로 검토한 결과 지금까지 식품으로 섭취해온 면화와 비교하여 안전성에 문제가 없음이 확인되었다.

### 7. 기타

- 「유전자변형생물체의 국가간 이동 등에 관한 법률」에 의하여 유전자재조합 면화 COT102의 작물재배환경, 자연생태계, 해양생태계에 대한 환경위해성은 농촌진흥청, 국립환경과학원, 국립수산물과학원에서 심사 완료하였다.