최 종
연구보고서

치즈유청의 생리활성 펩타이드와 프로바이오틱스를 이용한 인스턴트 건강음료의 개발

Development of Instant Health Beverage by Bioactive Peptidesand Probiotics of Whey

건 국 대 학 교

농 림 부

제 출 문

농림부 장관 귀하

본 보고서를 “치즈유청의 생리활성 펩타이드와 프로바이오틱스를 이용한 인스턴트 건강음료의 개발에 관한 연구” 과제의 최종보고서로 제출합니다.

2007 년 4 월 24 일

주관연구기관명 : 건국대학교
총괄연구책임자 : 윤 여 창
세부연구책임자 : 백 현 동
연 구 원 : 유 성 호
연 구 원 : 이 승 용
연 구 원 : 최 귀 헌
연 구 원 : 문 선 희
협동연구기관명 : 경남대학교
협동연구책임자 : 박 은 주
연 구 원 : 김 수 연

요 약 문

Ⅰ. 제 목

치즈유청의 생리활성 펩타이드와 프로바이오틱스를 이용한 인스턴트 건강음료의 개발

Ⅱ. 연구개발의 목적 및 필요성

유청 단백질은 용해성, 점성, 보수성, 기포생성, 유화와 젤 생성 등 넓은 범위의 기능성을 제공한다. 유청 단백질제품은 pH 변화에 안정되어 광범위한 pH에서 용해성을 소지한다. 이는 유청 단백질의 이용을 증가시키고 넓은 범위의 식품의 응용에서 기능성 소재로 이용될 수 있는 장점이 있다. 단백질의 가수분해는 영양적 특성과 조직을 개선시키고 품질 저하를 억제하며 조직을 개선시킨다. 천연 상태의 단백질의 기능성은 제한되어 있으나 protease에 의한 가수분해에서 얻어지는 생리활성 펩타이드는 영양학적 및 기능적 특성을 소지함으로 인해 부가가치 높은 건강식품 제조와 제약분야에서 사용할 수 있는 소재이다. 여러 종류의 cytochemical 연구에 기초하여 유단백질에서 가수분해한 펩타이드가 암세포 억제에 관여할 수 있다는 증거가 보고되고 있다.

본 연구에서 개발되는 기능성 건강음료의 원료로는 치즈 유청이 이용됨. 유청은 우유로부터 치즈의 제조 시에 형성되는 커드의 수확 후에 남는 액체를 지칭한다. 유청은 제대로 처리되지 못하면 식품 자원의 손실과 환경 및 경제적 부담을 초래하고 있다.

현재 웰빙 추세와 함께 치즈의 소비는 증가하고 있다. 이와 더불어 농가형 치즈를 제조하려는 움직임이 활발하다. 이러한 치즈생산의 증가에 따라 생산되는 유청은 공해요인으로 작용할 수 있으나 식품산업에서 가치 있는 소재로 이용될 수 있다.

Ⅲ. 연구개발 내용 및 범위

가. WPC 및 WPC 가수분해물의 생산 및 기능성 조사

○ 단백질 함량 70%의 WPC를 한외여과에 의해 생산

○ 단백질 함량 80%의 WPC를 diafiltration 기법에 의해 생산

○ 얻어지는 WPC의 물리화학적 성질과 기능성 검증
○ WPC의 단백질 분획 조사
○ WPC의 건조 및 변성도의 파악
○ 파일로트 플랜트에서 WPC의 산업적 생산 가능성의 조사
○ WPC에서 생리활성 펩타이드의 제조 및 적정조건 파악
○ 프로바이오틱 유산균의 생존율을 고려하여 프로바이오틱 유산균을 함유하는 WPC 가수분해물의 건조공정 적정화
○ 분무건조된 WPC 가수분해물의 물리화학적 및 기능성 조사

나. 생리활성 펩타이드와 프로바이오틱스를 함유하는 인스턴트 건강음료의 제조

○ 생리활성 펩타이드와 프로바이오틱 유산균을 함유하는 분무건조된 WPC 가수분해물에 대한 물리화학적, 기능성, 저장성 검증
○ 프로바이오틱 유산균을 함유하는 WPC 가수분해물을 이용하여 기능성 건강음료의 생산에 필요한 소재의 배합비 결정
○ 인스턴트 건강음료믹스의 제조
○ 기능성 건강음료의 실험실적 생산 및 저장성 검사
○ 파일로트 생산플랜트에서 WPC 및 생리활성 펩타이드의 생산
○ 파일로트 생산플랜트에서 기능성 건강음료의 산업적 생산 검토

다. 유용 프로바이오틱 유산균의 특성 및 건강기능성 조사

○ 기존에 확보된 유산균 및 상업적인 유산균의 프로바이오틱의 특성 검토
○ 기존에 확보된 유산균 및 상업적 유산균의 건강 기능성 검증

라. 유용 프로바이오틱 유산균의 생산최적화 및 건강음료제품의 유통기한 설정

○ WPC를 기본배지로 한 유용 프로바이오틱 유산균의 생산 검토
○ 유용 프로바이오틱 유산균의 생산을 최적화하기 위한 WPC-based medium을 개발
○ 최적배지 하에서 생산방법을 최적화하여 생산성을 극대화
○ 생산된 건강 음료제품들의 미생물학적 검사를 통한 안전성 확인
○ 생산된 건강 음료제품들의 유통기한 설정

마. *In vitro, In vivo* 동물실험을 통한 항산화 활성 검증

○ 물질의 총항산화력 측정
○ 포유류 세포를 이용한 DNA 손상 억제능 평가
○ 식이제조 및 동물 사육

○ 백혈구 내 DNA 손상 억제능 측정
○ 혈장 내 총항산화력 측정
○ 혈장 내 항산화 비타민 측정
○ LDL의 conjugated diene 측정
○ 적혈구 내 항산화 효소활성 측정
○ 데이터 분석 및 보고서 작성

바. 건강음료의 임상실험을 통한 항산화 및 면역력 개선 효과 검증

○ 대상자 모집 및 intervention
○ 임파구 내 DNA 손상 억제능 측정
○ 혈장 내 총항산화력 측정
○ 혈장 내 항산화 비타민 측정
○ LDL의 conjugated diene 측정
○ 적혈구 내 항산화 효소활성 측정
○ 데이터 분석 및 보고서 작성

Ⅳ. 연구개발 결과 및 활용에 대한 건의

1. 연구 개발 결과

○ 100 리터 유청을 50℃에서 한외여과를 통해 80-85리터의 permeate을 제거한 후 얻어지는 retentate 15-20리터를 농축 후 분무 건조하여 단백질 함량 35%의 WPC를 생산하였다.

○ 100 리터 유청을 50℃에서 한외여과를 통해 95-97.5%의 permeate을 제거한 후 얻어지는 5-2.5 리터의 retentate에 5-2.5 리터 물을 첨가하여 한외여과 하여 단백질 함량 70%의 WPC를 생산하였다.

○ 가수분해물(WPC-70H와 WPC-80H)의 시료는 가수분해되지 않은 시료에 비해 낮은 pH를 보인다.

○ 분무건조된 가수분해 시료인 WPC-70H와 WPC-80H의 bulk density는 0.42와 0.44 g/ml로서

WPC-70, WPC-80의 0.35와 0.37 g/ml 보다 유의하게 높게 나타났으나 불용성지수는 감소하였다.

○ Maillard 반응은 WPC-70 과 WPC-70H에서 WPC-80과 WPC-80H와 비교할 때 훨씬 높게 관찰되었다.

○ 단백질의 용해도는 5.51에서 5.62 단위가 개선되었고 기포 생성능은 4.2단위, 유화능은 5.7에서 6.3단위가 개선된 사실에서 효소적 가수분해의 긍정적 효과를 관찰할 수 있다.

○ 가수분해시의 점도 감소의 정도는 1.54-1.65 단위를 나타내었다.

○ 거품 생성능은 WPC 가수분해물에서 모든 pH에서 현저히 증가하였다.

○ 가수분해된 WPC는 유화능에서 가수분해 되지 않은 단백질과 비교 시 EAI 단위 차이는 5.7에서 6.3 m^2/g 으로 높게 나타났다.

○ WPC는 설탕, 구연산, 향료, 색소를 첨가한 placebo의 배합비(%)는 각각 20.8, 77.50, 1.15, 0.28, 0.28로 재조합하였다. 그리고 가수분해 된 WPC와 설탕, 구연산, 향료, 색소를 첨가한 sample 1의 배합비(%)는 각각 20.8, 77.50, 1.15, 0.28, 0.28로 재조합하였고 가수분해 된 WPC와 설탕, 구연산, 향료, 색소에 probiotics를 첨가한 sample 2의 배합비(%)는 각각 20.8, 77.50, 1.15, 0.28, 0.28, 0.1로 나타내었다.

○ 재조합된 시료의 단백질 함량이 증가함에 따라 pH는 감소하였고 산도와 bulk density, 비중은 증가하였다.

○ 대체적으로 냉장보관 보다는 Incubator 보관에서 pH 값의 변화가 큰 것으로 보였다. 그리고 sample 1보다 probiotics를 첨가한 sample 2에서 가장 큰 폭으로 감소한 것으로 보아 첨가된 probiotics가 pH를 감소시키는 영향을 끼친 것으로 사료된다.

○ 대체적으로 비중의 값과 bulk density의 값에 큰 차이가 없었다.

○ pH 2.5와 pH 4.0으로 조정된 인공위액에서의 실험결과, 2시간 경과 후 각각 77.76와 87.57%의 생존률을 나타내었다. 또한 인공담즙산에 대하여 내성을 보임에 따라 목적 부위인 장에 도달하

여 생균제로서의 역할을 충분히 수행할 수 있을 것으로 판단되어진다.

○ 예비적 발암물질을 발암물질로 변환시키는 β-glucosidase의 활성, 역시 없는 것으로 확인되었다. 이러한 결과는 프로바이오틱 생균으로 인해 발생할 수 있는 발암 유발의 위험성이 없다는 사실을 뒷받침한다.

○ 배양 상등액을 희석한 희석액에 존재하는 항산화물질로 80% 이상의 활성을 나타내었기 때문에 천연 항산화제로서의 가능성을 보여주고 있다.

○ WPC를 효소적으로 가수분해 시켰을 때, alcalase를 이용하여 가수분해시킨 가수분해물에서 폐암세포에 특이적으로 활성을 나타내었다.

○ WPC를 기본 배지로하여 *Bacillus polyfermenticus* SCD균을 배양하였을 때 기존에 사용하는 TSB보다 생육속도는 늦었지만 이 균이 생성하는 물질의 항산화효과는 더 높게 나타났다.

○ 생산된 건강 음료제품들에 첨가된 두 종류의 프로바이오틱 혼합균주는 균체의 수를 측정한 결과 4개월 이후에도 식품공전에서 말하고 있는 혼합 유산균 이용식품의 유산균 총균수인 10^7이상을 유지하고 있으므로 유통기한이 최소 4개월 이상인 것으로 나타났다.

2. 활용에 대한 건의

○ 본 건강음료 개발기술을 국내 음료 업체에 제공하여 새로운 건강 기능성 음료를 개발하는 데 이용하며 국내 기존 음료 산업체에서의 제품의 다양화 및 고급화에 활용할 수 있다.

○ 현재 우유 소비가 침체상태에 있는 주 된 원인으로서 우유와 우유 이외의 음료사이에 경쟁이 심화되는 현상을 들 수 있다. 본 연구 결과를 활용함으로써 탄산음료와 콜라 같은 소프트드링크와 경쟁이 가능한 유음료의 개발에 기여할 수 있음. 따라서 축산농가의 소득에 기여가 될 수 있으며, 고부가가치의 기능성 유음료의 공급으로 말미암아 국민의 건강에 크게 기여할 수 있다.

○ 각종식품에서 활용도가 높은 WPC의 수입이 본 연구로 말미암아 상당 부분대체 될 수 있겠다.

○ 한외여과에 의한 원료의 농축은 용이한 관리 및 공간의 절약 효과를 수반하여 국내 낙농산업의 견인차 역할을 할 수 있는 고품질의 치즈를 경제성 있는 조건에서 개발할 수 있다.

○ 개발된 가수분해물의 분말은 다량 소비되는 식품인 두부, 국수, 라면, 햄, 스포츠 음료 등에 소재로 활용하여 유청 식품 소재로서 사용량은 매우 클 것임. 또한, 개발된 경쟁력있는 가수분해물을 식품업계에 활성화하여 생산성을 증대시켜 고부가가치 산업화를 촉진시킬 수 있다.

○ 본 연구결과를 바탕으로 건강기능성 음료 및 식품(두부, 국수, 라면, 햄, 스포츠 음료 등)의 재료로서 모든 연령층의 기호에 맞는 제품 개발에 응용할 수 있다.

○ WPC의 alcalase 가수분해물이 특이적으로 사람 폐암 세포에 대해 항종양 활성을 나타내었으므로 물질 규명을 위한 연구가 필요하다.

○ WPC를 기본 배지로하여 *Bacillus polyfermenticus* SCD를 배양하였을 때 높은 항산화 활성을 보였으며 여기에 관한 체계적인 연구가 필요하다.

SUMMARY

Ⅰ. Title

Development of Instant Health Beverage by Bioactive Peptides and Probiotics of Whey

Ⅱ. Objective and Importance of Research

Whey protein provides the functional characteristic of wide scope that solubility, viscosity, water holding, foam capacity, emulsification and the gel creation. Whey protein provides the functional characteristic of wide scope that solubility, viscosity, water holding, foam capacity, emulsification and the gel creation. WPC hydrolysisates improves a nutrition quality, texture and it suppresses a decline in quality. Functional of the protein of natural condition is restricted. But physiological activity peptide by hydrolysis have a funtional characteristic, and It is a subject matter will be able to use from health food manufacture and restricted field(Meisel, 1998). Peptide will be able to participate to a cancer sell suppression the evidence was reported. In cytochemical researches of various type about under foundation.

Cheese whey is used with the materials of the functional characteristic healthy beverage which is developed from this research. Whey from the milk, it calls the liquid which remains after manufacture of the cheese. If whey is not controlled well, it brings about the loss and an environment and an economic charge of the food resources.

Currently consuming of cheese is increasing with the well-being tendency. With this it joins, manufactures of the farmhouse cheese is active. It will be able to operate with the environmental pollution factor in increase of like this cheese production, but it could be used with the subject matter which is value from food industry.

III. Research Development Contents and Scope.

A. WPC and production of WPC hydrolisates and functional investigation

○ Production by ultrafiltration WPC in protein content 70%
○ Production by diafiltration WPC in protein content 80%
○ Physical chemistry nature of WPC and functional characteristic
○ Disjunct investigation of WPC protein
○ Industrial produce of WPC and possibility investigation in pilot plant
○ Manufacture of physiological activity peptide and grasp of proper condition
○ As considering Probiotics lactobacillus survival rate, of lactobacillus about under
○ Drying process of WPC hydrolysates that contains Probiotics lactobacillus

○ Spray drying WPC hydrolysates which is chemicophysics and functional characteristic investigation

B. Manufacture of instant healthy beverage mixture that contain physiological activity peptide and probiotics

○ Verification of chemicophysics, functional, store characteristic about spray drying WPC hydrolysates that contain physiological activity peptide and probiotics

○ Under using WPC hydrolysates that contain probiotics lactobacillus, determination of mixture rate which is necessary to the production of the functional healthy beverage

○ Manufacture of instant healthy beverage mixture

○ Productive and store characteristic test of functional healthy beverage

○ Production of WPC and physiological activity in pilot plant

○ Industrial production investigation of functional healthy beverages in pilot plant

C. Characterization and health benefits of lactic acid bacteria

○ Characterization of lactic acid bacteria as a probiotics

○ Study of health benefits as lactic acid bacteria

D. Growth characteristics and optimized production of in WPC-based medium

○ Growth Characteristics of *B. polyfermenticus* SCD in WPC-based medium.

○ Optimized production of *B. polyfermenticus* SCD in WPC-based medium.

○ Proposal of shelf-life on the powder beverage.

E. Antioxidant effect of whey protein hydrolysates

○ Effect of whey protein hydrolysates on DNA damage

○ Iron overload induces oxidative stress

○ Effects of whey protein and probiotics on liver, heart, kidney and spleen in rats fed high Fe diet

○ Effects of whey protein and probiotics on plasma antioxidant vitamins in rats fed high Fe diet

○ Effect of whey protein and probiotics on erythrocyte antioxidant enzyme activities in rats fed high Fe diet

F. Healthy effect of instant beverage mixture

○ Changes of anthropometric data

○ Changes of plasma lipid profiles and liver function

○ Changes of plasma lipid peroxidation, total antioxidant status, antioxidant vitamin levels

and erythrocytic antioxidant enzyme activities

○ Changes of lymphocytic DNA damage

Ⅳ. Result and Suggestion for Application

1. Results of this research

○ 100 L whey protein by ultrafilteration(at 50℃) was removed 80-85 L permeates. Obtained 15-20 L retentate was concentrated. Spray dryed retentates was produced WPC of protein content 35%.

○ 100 L whey protein by ultrafilteration(at 50℃) was removed 95-97.5% permeate. Obtained 15-20 L retentate was added water. It was produced WPC of protein content 70% by ultrafilteration.

○ The pH of hydrolysates(WPC-70H and WPC-80H) was lower than WPC.

○ The bulk density of hydrolysates(WPC-70H , WPC-80H: 0.42, 0.44 g/ml) was higher than non-hydrolysates(WPC-70, WPC-80: 0.35, 0.37 g/ml) but insolubility index was decreased.

○ Maillard reaction of WPC-70 and WPC-70H was higher than WPC-80 and WPC-80H.

○ The protein solubility and foam capacity and emultion capacity of hydrolysates was higher WPC.

○ The viscosity of hydrolysates was lower WPC.

○ Mix rate of WPC was WPC(20.8%), sugar(77.5%), citric acid(1.15%), spices(0.28%), coloring matter(0.28%). And maximum rate of hydrolysates sample 1 hydrolysates(20.8%), sugar(77.5%), citric acid(1.15%), spices(0.28%), coloring matter(0.28%). Maximum rate of hydrolysates sample 2 was hydrolysates(20.8%), sugar(77.5%), citric acid(1.15%), spices(0.28%), coloring matter(0.28%), probiotics(0.1%).

○ The more protein content of sample 1 and 2 were increased, the more was decreased pH value, but acidity, bulk density and specific gravity value was increased.

○ First and last, it was visible with the fact that change of pH value is bigger from Incubator custodies than refrigeration custody substitutionally. From sample 2 adds probiotics, it diminished at the biggest width. Consequently, it have effect that added probiotics diminishes pH.

○ There was not a big difference to value of specific gravity and bulk density value.

○ *L. lactis* NK34 was highly resistant to artificial gastric juice(pH 2.5) and artificial bile acid. we believe that it is likely that *L. lactis* NK 34 could be used as a probiotic strain.

○ β-Glucuronidase was not produced by *L. lactis* NK34 and thus its use as a probiotic would not carry any risk of carcinogenesis.

○ Antioxidative activity of the culture supernatant was determined by measuring the scavenging activity with regard to the DPPH radical. *L. lactis* NK34 was shown to 80.8% DPPH radical scavenging activity.

○ Particularly whey protein hydrolysates(WPHs) made with alcalase showed the growth inhibition against lung carcinoma cell(A-549 and SK-MES-1).

○ Antioxidant activity of culture supernatant of *B. polyfermenticus* in WPC-based medium is more effective than TSB medium.

○ three type of whey protein supplementation decreased plasma lipid profiles and lymphocytic DNA damages significantly. However, only whey protein(WPC) could increase the level of plasma-lipid vitamins.

2. Suggestion for application of result

○ It gets from the research which it sees and it provides healthy beverage development technique to the domestic beverage enterprise. Also it uses the new healthy functional characteristic beverage in development. So the domestic existing beverage Industries applies in diversification and upgrade of the product.

○ Currently, the decrease cause of milk consuming decrease is a serious competition between the beverage other than the milk and the milk. Our research result will be able to contribute the development of milk beverages that competes with a carbonated drink and a soft drink. Consequently there is a possibility becoming the contribution in income of the livestock raising farmhouse. Supply of functional milk beverages of a higher value will be able to contribute public health.

○ WPC income which is variously used from the many kinds foodstuffs will be able to substitute many part from our researches.

○ The concentration of the materials by using ultrafiltration gets the space-saving effect and easy management. As a result the cheese of quality that is important in domestic dairy farming industry will be able to develop with economic method.

○ The whey protein hydrolysates which is developed from our researches will be used with the materials of the soybean curd, the noodles, the instant noodle, the ham and the sports beverage etc. Also the whey protein hydrolysates which is competitive will use from the foodstuffs industry. So, it will increase a productivity.

○ In turn, it uses the product development which hits to all age groups from the healthy functional beverage and the material of the foodstuffs.

○ The purification and characterization of antitumor substance in whey protein hydrolysates (WPHs) against lung carcinoma cell (A-549 and SK-MES-1) is necessary.

○ Because antioxidant activity of culture supernatant of *B. polyfermenticus* in WPC-based

medium is more effective than TSB medium, it is necessary for more study

○ These results demonstrate whey protein supplementation could ameliorate lipid profiles and the antioxidative and antigenotoxic capacity in male smokers, although there was no synergic effect of hydrolysis of whey protein or probiotics.

CONTENTS

Chapter 1. Introduction of the Project ····· 1

Section 1. Significance of Research ····· 1
1. Technological point of view ····· 1
2. Economical/Industrial point of view ····· 4
3. Social/Cultural point of view ····· 6

Section 2. Object and contents of research and development ····· 7
1. Object and contents of research and development ····· 7
2. Research and development object and content of ····· 8
3. Propulsion system of research and development ····· 10

Chapter 2. Technology Development of Foreign Countries and Kore ····· 11
Section 1. Present state of Technology Development and Issue ····· 11
Section 2. Future Prospect ····· 12
Section 3. Propriety of technical introduction ····· 12

Chapter 3. Research and development accomplishment contents and result ····· 13
Section 1. WPC and production of WPC hydrolysates and functional investigation ····· 13
1. Introduction ····· 13
2. Research contents and method ····· 13
A. Production and quality of WPC ····· 13
B. Production and quality of WPC hydrolysates ····· 14
3. Research result ····· 15
A. Composition of retentate and permeate ····· 15
B. Rate of retention ····· 17
C. Production of WPC-35 ····· 17
D. Production of WPC-70 ····· 18
E. Hydrolysis of WPC ····· 20

Section 2. Development of instant Healthy beverage mixture that contain physiological activity peptide and probiotics lactobacillus ····· 26
1. Introduction ····· 26
2. Research contents and method ····· 26
A. Reconstituted of WPC-40 ····· 26
B. Chemical composition of reconstituted WPC ····· 26
C. Measurement of the storage temperature against the existence of Probiotic starters effective ····· 27
3. Research result ····· 27

A. Different ratio of baverage ·····27
B. Chemical composition ·····27
C. Physicochemical composition ·····27

Chapter 3 section. Characterization and health benefits of lactic acid bacteria ·····45
1. Introduction ·····45
2. Content and method of research ·····46
A. Stain and Medium ·····46
B. Culture condition and method ·····46
C. Cell counting ·····46
D. Tolerance about art gastric juice ·····46
E. Tolerance about art bile acid ·····46
F. Enzyme productivity ·····47
G.Tolerance about antibiotic ·····47
H. Activity of antigenotoxic ·····47
I. Erythrocyte antioxidant activities by DPPH method ·····47
3. Results ·····48
A. Tolerance about art gastric juice ·····48
B. Tolerance about art bile acid ·····48
C. Enzyme productivity ·····49
D. Tolerance about antibiotic ·····50
E. Activity of antigenotoxic ·····52
F. Antioxidant activities by DPPH method ·····52

Chapter 4 section. Antioxidant Effect by Enzymes of WPC hydrolisates(WPHs) ·····53
1. Introduction ·····53
2. Content and method of research ·····53
A. Whey protein concentrates and Enzymes ·····53
B Hydrolysis conditions ·····53
C. Cell lines and culture conditions ·····54
D. Cell cytotoxicity test ·····54
3. Results ·····54

Chapter 5 section. lactic acid mass production and circulation time limit of healthy beverage product of on pilot size ·····57
1. Introduction ·····57
2. Contents and scope of research ·····57
A. Stain ·····57
B. Making of WPC-based medium ·····57
C. Culture condition and method ·····57
D. Bath culture for productivity ·····57
E. Cell counting ·····57

F. Antioxidant activities by DPPH method ·····58

G. Decision of the period of circulation by microbiological test of produced health beverage products ·····58
3. Result and Discussion ·····58
A. Counting of bacteria of WPC based culture medium ·····58
B. Counting of bacteria in batch culture of 5 L fermenter ·····59
C. Decision of the period of circulation by microbiological test of produced health beverage products ·····60

Section 6. *In vitro* and *In vivo* animal experiment by antioxidant active test ·····61
1. Contents of research and Scope ·····61
2. Method of reseach ·····61
A. Separateness of lymphoid ·····61
B. Treatment of whey protein hydrolysate ·····61
C. DNA damage control test(Comet assay) ·····61
3. Conclusion of research ·····62

Section 7. Antioxidant active test of whey protein hydrolysate(WPH), whey protein concentrate(WPC) by animal test ·····65
1. Contents of research and Scope ·····65
2. Method of reseach ·····65
A. Experiment animal and diet ·····65
B. Picking of all organ and blood ·····67
C. Comet assay for test of DNA damage in large intestine organization and leucocyte ·····67
D. Analysis of plasma fat-solubility vitamin ·····68
E. Plasma TRAP measurement ·····68
F. Lipid peroxide(Baseline Diene Corrjugation in LDL lipids) measurement ·····68
G. Measurement of antioxidant enzyme activeness in erythrocyte ·····68
H. Treatment of data ·····69
3. Result of research ·····69
A. Effect of Body weight increase quantity, diet intake quantity, and diet efficiency ·····69
B. Effect of organ weight ·····70
C. Effect of plasma antioxidant vitamin ·····70
D. Effect of erythrocyte antioxidant enzyme activeness ·····71
E. Effect of DNA damage degree of large intestine cell and leucocyte ·····72

Chapter 8. Test of antioxidant improvement effect by clinical demonstration·····74
1. Contents of research and Scope·····74
2. Method of reseach·····74
A. Target selection and question paper, diet intake research, blood pressure measurement·····74
B. Whey supplement giving·····74
C. Picking of blood and urine·····75
D. Analysis of plasma lipid degree·····75
E. Analysis of plasma Conjugated diene (CD)·····75
F. Measurement of plasma antioxidant vitamin·····75
G. Measurement of plasma concentration of total radical antioxidant·····75
H. Measurement of Erythrocyte antioxidant enzyme active degree·····76
I. Measurement of lymph oxidative DNA damage by Alkaline Comet assay·····76
J. Statiscal and correlation analysis·····76

3. Experimental result·····77
A. Change of body Measurements·····77
B. Change of blood Lipid Level and Liver Dysfunction level·····77
C. Plasma Lipid Peroxidation and change of Total Antioxidative and Antioxidative vitamin level·····77
D. Change of Cellular DNA Damage·····77
E. Summary and conclusion·····77

Chapter 4. Contribution in attainment of objective and relation field·····81
Section 1. Research and development object and attainment of year·····81

Section 2. Contribution in research and development result and technical advance··85
1. Research and development result·····85
A. The scientific journal announcement against research result·····85
B. Patent application against research result·····85
C. The scientific conference announcement against research result·····85
D. Education and directions application·····85
2. Contribution in relation field technical advance·····85

Chapter 5. Application plan of research and development result·····87
Section 1. Expectation result·····87
1. Technological aspect·····87
2. Economy and industrial aspect·····87

Section 2. Application and industrial application plan in other research ·····87

Chapter 6. The overseas scientific and technical information which it collects from research and development process ·····89
1. International journal·····89

Chapter 7. Selected bibliography·····91

목 차

제 1 장 연구개발과제의 개요 ·····1

제 1 절 연구개발의 필요성 ·····1
1. 기술적 측면 ·····1
2. 경제·산업적 측면 ·····4
3. 사회·문화적 측면 ·····6

제 2 절 연구개발의 목표 및 내용 ·····7
1. 연구개발 목표와 내용 ·····7
2. 연차별 연구개발 목표와 내용 ·····8
3. 연구개발 추진체계 ·····10

제 2 장 국내외 기술개발 현황 ·····11
제 1 절. 국내·외 관련기술의 현황과 문제점 ·····11
제 2 절. 앞으로의 전망 ·····12
제 3 절. 기술도입의 타당성 ·····12

제 3 장 연구개발수행 내용 및 결과 ·····13
제 1 절 WPC 및 WPC 가수분해물의 생산 및 기능성 조사 ·····13
1. 서 론 ·····13
2. 연구내용 및 방법 ·····13
가. WPC의 생산 및 특성 ·····13
나. WPC 가수분해물의 생산 및 특성 ·····14
3. 연구결과 ·····15
가. 농축액(retentate)과 투과액(permeate)의 조성 ·····15
나. 수율(Rate of retention) ·····17
다. WPC-35의 생산 ·····17
라. WPC-70의 생산 ·····18
마. WPC의 가수분해 ·····20

제 2 절 생리활성 펩타이드와 프로바이오틱스를 함유하는 인스턴트 건강음료의 개발 ·26
1. 서 론 ·····26
2. 연구내용 및 방법 ·····26
가. WPC-40 음료의 제조합 ·····26
나. 제조합한 음료의 이화학적 성질 ·····26
다. Probiotic 스타터의 생존에 대한 저장온도의 효과 측정 ·····27
3. 연구결과 ·····27
가. 음료의 배합비 ·····27
나. 재조합된 WPC의 화학적 조성 ·····27

다. 재조합된 WPC음료의 이화학적 성질 ·····28

제 3 절 유용 프로바이오틱 유산균의 특성 및 건강 기능성 조사 ·····45
1. 서 론·····45
2. 연구내용 및 방법·····46
가. 균주 및 배지·····46
나. 배양조건 및 방법·····46
다. 균수의 측정·····46
라. 인공위액에 대한 내성·····46
마. 인공담즙산에 대한 내성·····46
바. 효소 생산성·····47
사. 항생물질에 대한 내성·····47
아. 항종양 활성·····47
자. DPPH법에 의한 항산화 활성 측정·····47
3. 결과 및 고찰·····48
가. 인공위액에 대한 내성·····48
나. 인공담즙산에 대한 내성·····48
다. 효소 생산성·····49
라. 항생물질에 대한 내성·····50
마. 항종양 활성·····52
바. DPPH법에 의한 항산화 활성 측정·····52

제 4 절 효소를 이용한 유청 단백질 가수분해물의 종양세포 억제효과 ·····53
1. 서 론·····53
2. 연구내용 및 방법·····53
가. Whey protein concentrates and Enzymes·····53
나. Hydrolysis conditions·····53
다. Cell lines and culture conditions·····54
라. Cell cytotoxicity test·····54
3. 결과 및 고찰·····54

제 5 절 파일로트 규모에서의 유산균 대량생산 및 건강음료제품의 유통기한 설정 ····57
1. 서 론·····57
2. 연구내용 및 방법·····57
가. 사용균주·····57
나. WPC를 기본으로 한 배지의 제조·····57
다. 배양조건 및 방법·····57
라. 생산성 극대화를 위한 회분식 배양·····57
마. 균수의 측정·····57
바. DPPH법에 의한 항산화 활성 측정·····58
사. 생산된 건강 음료제품들의 미생물학적 검사를 통한 유통기한 설정·····58
3. 결과 및 고찰·····58

가. WPC를 기본으로 한 배지에서의 생균수 측정 ·····58
나. 5 L발효조를 이용한 회분식 배양에서의 균수측정 ·····59
다. 생산된 건강 음료제품들의 미생물학적 검사를 통한 유통기한 설정 ·····60

제 6 절 *In vitro* 및 *In vivo* 동물실험을 통한 항산화 활성 검증 ·····61
1. 연구내용 및 범위 ·····61
2. 연구방법 ·····61
가. 임파구 분리 ·····61
나. 치즈유청 단백질 가수분해물의 처리 ·····61
다. DNA 손상 억제능 평가 (Comet assay) ·····61
3. 실험결과 ·····62

제 7 절 동물실험을 통한 치즈유청 단백질 (WPC), 치즈유청 단백질 가수분해물(WPH)의 항산화 활성 평가 ·····65
1. 연구내용 및 범위 ·····65
2. 연구방법 ·····65
가. 실험동물 및 실험식이 ·····65
나. 혈액 및 각종 장기의 채취 ·····67
다. 백혈구 및 대장 조직 내 DNA 손상의 측정을 위한 comet assay ·····67
라. 혈장 지용성 비타민의 분석 ·····68
마. 혈장 TRAP 측정 ·····68
바. 과산화지질 (Baseline Diene Corrjugation in LDL lipids) 측정 ·····68
사. 적혈구 내 항산화 효소활성 측정 ·····68
아. 자료의 처리 ·····69
3. 연구결과 ·····69
가. 체중증가량, 식이섭취량, 식이효율에 미치는 영향 ·····69
나. 장기무게에 미치는 영향 ·····70
다. 혈장 항산화 비타민에 미치는 영향 ·····70
라. 적혈구 항산화 효소 활성에 미치는 영향 ·····71
마 백혈구 및 대장세포의 DNA 손상정도에 미치는 영향 ·····72

제 8 절 건강음료의 임상실험을 통한 항산화 개선 효과 검증 ·····74
1. 연구내용 및 범위 ·····74
2. 연구방법 ·····74
가. 대상자 선정 및 질문지, 식이섭취 조사, 혈압 측정 ·····74
나. 유청 보충 투여 ·····74
다. 혈액 및 소변 채취 ·····75
라. 혈장 지질 수준 분석 ·····75

마. 혈장 Conjugated diene (CD) 분석 ····· 75
바. 혈장 항산화 비타민 측정 ····· 75
사. 혈장 총 유리기 포집 항산화능 측정 ····· 75
아. 적혈구 항산화 효소활성도 측정 ····· 76
자. Alkaline Comet assay을 이용한 임파구 oxidative DNA damage 측정 ····· 76
차. 자료의 통계처리 및 각 요인과의 상관관계 분석 ····· 76
3. 실험결과 ····· 77
가. 인체계측치 변화 ····· 77
나. 혈중 지질 및 간기능 수치의 변화 ····· 77
다. 혈장 지질과산화, 총항산화력 및 항산화 비타민 수준의 변화 ····· 77
라. 임파구 DNA 손상도의 변화 ····· 77
마. 요약 및 결론 ····· 77

제 4 장 목표달성도 및 관련분야에의 기여도 ····· 81
제 1 절 연도별 연구개발목표 및 달성도 ····· 81

제 2 절 연구개발 실적 및 기술발전에의 기여도 ····· 85
1. 연구개발 실적 ····· 85
가. 연구 결과에 대한 학술논문 발표 ····· 85
나. 연구 결과에 대한 특허 출원 ····· 85
다. 연구 결과에 대한 학술대회 발표 ····· 85
라. 교육 및 지도 활용 ····· 85
2. 관련분야 기술발전에의 기여도 ····· 85

제 5 장 연구개발결과의 활용계획 ····· 87
제 1 절. 기대 성과 ····· 87
1. 기술적 측면 ····· 87
2. 경제·산업적 측면 ····· 87

제 2 절. 타 연구에의 응용 및 산업체 활용 방안 ····· 87

제 6 장 연구개발과정에서 수집한 해외과학기술정보 ····· 89
1. 국외 논문 ····· 89

제 7 장 참고문헌 ····· 91

제 1 장 연구개발과제의 개요

제 1 절 연구개발의 필요성

1. 기술적 측면

○ 유청의 고형분 중에 존재하는 유청 단백질에는 α-lactalbumin과 β-lactoglobulin이 주 성분임. β-Lactoglobulin은 유청 단백질의 50~60%로서 가장 풍부하게 함유되어있고 두 번째 큰 fraction인 α-lactalbumin은 유청 단백질의 20~25%를 차지하며, 국내에서 생산되는 유청은 유청 분말(whey powder)의 형태로 가공되어 식품에 첨가되고 있음. 이 중 유청 단백질은 보다 부가가치가 높은 형태로 이용 가능함. 대두, 쇠고기, 계란, casein 등의 여러 단백질원에서 유청 단백질은 영양학적, 경제적인 견지에서 우수하며 이들은 또한 다양한 기능성을 보이고 있음(Mann, 1998; Lahl and Braun, 1994; Jayaprakasha and Brueckener, 1999).

○ 유청 단백질의 아미노산 조성은 모든 아미노산을 함유하며 FAO 권장 표준을 초과함. 주요 아미노산 함량은 100 g 단백질에서 라이신 11.3 g, 메티오닌 2.4 g, 시스틴 2.8 g, 트레오닌 8.4 g, 류신 11.8 g, 아이소류신 8.6 g, 페닐알라닌 3.6 g, 시스테인 2.6 g, 트립토판 2.4 g, 발린 7.2 g의 함량을 나타냄. 유청 단백질의 생물가는 104, 순단백질이용율(NPU)은 92, 단백질효율(PER)은 3.6으로 역시 높음. Casein의 경우 이 수치는 77, 76, 2.9이고 계란은 100, 94, 38이며 우유단백질은 91, 82, 31 임(Renner and Abd-EL-Salam, 1991). 따라서 체중 70 kg 성인의 단백질요구량은 14.5 g의 유청 단백질을 소비함으로써 공급이 가능함. 우유 단백질은 28.4 g, 난 단백질은 17.5 g을 소비할 때 가능함(Renner and Abd-ElSalam, 1991). 이러한 영양학적 특성은 취학 전 아동, 청소년에게 여러 필수 영양소의 요구를 충족시키는데 있어 중요함(Kansal, 1992).

○ 유청 단백질 제품은 안전한 것으로 인정되므로(Generally Recognized As Safe) 식품을 조제할 경우 소재로 사용 가능함(Hugunin, 1987; Morr, 1987). 또한 유청 단백질은 고기, 대두 등 다른 식품단백질보다 항암작용이 높은 것으로 보고되는데 유황함유 아미노산이 높은 것과 관련될 수 있음(Mcintosh et al., 1998).

○ 우유 단백질 내의 생리활성 펩타이드는 단백질 분자 내에서는 비활성이나 그들은 효소적 단백질 분해에 의해 방출될 수 있음. 즉, 단백질 가수분해 시 펩타이드 결합에 연결된 아미노산은 분리되어 유리아미노산과 펩타이드가 방출됨(Giese, 1995).

○ 생리활성 펩타이드는 체 내에서 생체기능의 조절역할을 수행하므로 식품과 제약분야에서 건강증진 물질로 이용될 수 있음(Nielsen et al., 2000). 유청 단백질의 기능성은 효소적 가수분해에 의해 증진되어 보다 넓은 범위의 식품응용에 사용될 수 있음(Nielsen and Turner, 1992). 이와 같이 유청 단백질이 소지하는 고유의 기능성은 효소적 가수분해에 의해 발현되고 조형될 수 있음.

○ 생리활성 펩타이드는 천연상태에서 활력이 없는 아미노산의 작은 결합체이나 단백질의 가수분해 후 방출될 수 있음. 예를 들어 생리활성 펩타이드인 tripeptide(Val-Pro-Pro 또는 Ilu-Pro-Pro)는 혈압을 내리는 기능이 있다고 알려져 있음(Berry, 2000). 이외에 의미있는 생리활성 peptide는 아편상 펩타이드, 면역기능을 조절하는 펩타이드, 항혈전(antithrombic) 펩타이드 등임(Schanbacher et al., 1998; Nayak et al., 1999; Clare and Swaisgood, 2000; Sood and Ganguli, 2000; Meisel, 2001).

○ 이들 가수분해물 또는 펩타이드는 소화력이 높고 개선된 기능성을 보임(Pintado et al. 2000). 유청 단백질 가수분해물의 영양적 품질은 비교 단백질과 비교할 때 NPU가 높고 생물가도 좋음. 이외에 유청 단백질 가수분해물은 항원으로서의 감소된 기능, 개선된 약리 및 예방적 성질을 나타냄(Boza et al. 1995). 유청 단백질 가수분해물의 필수 아미노산은 43.8%로서 고품질의 단백질 공급원임(Boza et al. 1994). 또한 가수분해된 유청 단백질은 균형잡힌 필수 아미노산 조성을 갖는 단백질 공급원임. 이는 상처의 치료, 환자식, 주사를 통한 급여 등 전문화된 식이요법적 기능을 갖는 음료의 제조에 이용될 수 있음(Manson, 1980). 단백질 가수분해물은 수술 후 환자의 주사를 통한 영양에 이용되어 왔고 가수분해된 유청 단백질은 유아식품의 조제에 이용되어 왔음(Mulvihil, 1991).

○ 우유 단백질로부터 유래되는 생리활성 펩타이드는 주로 casein으로부터 보고 되었으나 최근에는 유청 단백질 α-lactalbumin, β-lactoglobulin 유래의 생리활성 펩타이드가 보고 되었음(Mullally, 1997; Pihlanto-Leppl et al., 2000). α-Lactalbumin과 β-lactoglobulin은 아편상 펩타이드인 α-lactorphin(50-53)과 β-lactorphin(102-105)을 생성함. α-Lactalbumin에서 유래하는 가수분해물인 펩타이드(99-110)는 상당한 ACE 저해효과를 나타냄. β-Lactoglobulin에서 생성되는 22-25와 32-40 fraction 역시 양호한 ACE 저해효과를 보임. 유청 단백질의 α-lactalbumin과 β-lactoglobulin에서 유래한 α-lactorphin과 β-lactorphin은 보통의 ACE 저해효과를 나타냄. β-Lactorphin의 N-terminal의 dipeptide(Tyr-Leu)와 β-lactoglobulin fraction 142-148은 ACE 저해효과가 가장 크다고 보고 되었음. 인체의 말초혈액 임파구(peripheral blood lymphocytes, PBL) 면역력은 α-lactalbumin에서 유래한 α-lactorphin에 의해 PBL의 증식에 의해 강화되었음.

○ *Lactobacillus helveticus*에 의한 유청투과액 발효에서 가수분해된 유청 단백질로 3~4% 단

백질 보강하여 공급할 경우 30~40시간 발효에서 젖산생산의 수율이 증가되었음(Fitzpatrick and O-Keeffee, 2001). 특정한 영양효과를 위한 식품의 조제 시 가수분해된 유청 단백질 첨가는 indometacin에 의해 야기된 궤양의 억제효과를 나타내었음(Ueda et al., 2001). 효소적 가수분해결과로 유청 단백질의 개선된 화학적, 영양적, 낮은 antigenic 성질은 여러 식품의 조제에서 이용될 수 있음(Boza et al., 1995). 생리활성 펩타이드의 아미노산 배열에 따라 여러 종류의 활성을 보일 수 있음.

○ 이와 같은 견지에서 생리활성 펩타이드를 제조하기위한 기술을 개발하고 이러한 생리활성 펩타이드를 이용한 기능성 식품의 개발이 필요하다고 보여짐. 생리활성 펩타이드의 생산에는 효소가 이용되고 또한 발효유 제품의 제조 시 발효과정에 의해 미생물이 생성하는 단백질 분해효소에 의해 다양한 펩타이드가 유리될 수 있음(Fox, 1989). Yamamoto 등(1994a)은 유산균을 사용한 발효유의 고혈압의 원인이 되는 ACE의 저해활성을 조사한 결과, *L. helveticus*을 사용한 발효유에서 혈압강하 효과가 있었고 Gouda cheese 추출물 중 저분자 peptide에서 ACE 저해 활성이 보고 되었음(Meisel et al., 1997). 첨가한 단백질 분해효소와 미생물에 의한 효소에 의해 단백질 분해가 보다 원활히 발생하여 생리활성 펩타이드가 형성될 수 있는 가능성을 상정할 수 있음. 생리활성 펩타이드를 이용하기 위해 이러한 과정의 파악이 필요함. 이를 위해 한외여과공정의 제반요소가 파악되고 제품화를 위한 건조공정의 적정조건에 대한 조사가 필요함.

○ 영양적 이용에 추가하여 심혈관(cardiovascular), 내분비계(endocrine), 면역, 신경시스템 등에 영향을 끼치며 가수분해된 유청 단백질은 여러 종류의 소화효소로 단백질 분해 후 ACE 저해활동을 보인 바 있음. 또한 여러 종류의 금속을 결합하는 펩타이드가 α-lactalbumin, β-lactoglobulin, lactoferrin의 유청 단백질 분획에서 방출되었음(Anne, 2001). 활력있는 유청 단백질 가수분해물은 아토피성 피부염(atopic dermatitis), 당뇨병(diabetis melitus.)과 비당뇨성비만, 녹내장과 기타질병에서 임상적 의미가 있었음(Gouri, 1997). 또한 생리활성 펩타이드는 장에서 흡수과정을 조절할 수 있음. 소장과 대장에서 이들 펩타이드에 의한 net water와 전해질의 흡수증진은 그들이 항 설사작용의 주 요인임. 이는 융모막(brush border)의 수용체에 결합함으로써 가능하였음(Meisel, 1998).

○ ROS는 산소의 체 내 대사과정 또는 흡연, 환경오염 등의 외부 인자로부터 생성되며 일부는 체 내에서 매우 중요한 역할도 하고 항산화 방어기전에 의해 제거되면서 균형을 유지하는 물질임(Ames et al., 1993). 세포 내 방어기전은 superoxide radical과 H_2O_2 제거 항산화 효소인 superoxide dismutase, catalase, glutathione peroxidase 등에 의해 수행되며(Fanton and Ward, 1982), glutathione과 ascorbate도 세포 내 ROS의 독성을 중화시키는데 중요한 역할을 담당함(Bergsten et al., 1990).

○ 세포 외의 ROS의 중화는 주로 혈장과 간질액에 고농도로 존재하는 비 효소계 방어 기전, 특히 ascorbate 및 지용성 항산화 비타민(vitamin E, carotenoids)들에 의해 이루어지고 있음(Burton and Ingold, 1984; Frei et al., 1988). 그런데 나이를 먹으면서, 또는 환경오염에 노출이 증가되면서 ROS의 생성속도가 높아져 항산화계와의 균형이 깨어지면 oxidative stress 현상이 일어나고 그 결과로 DNA 손상, 지질과산화 등을 유발하게 되며 이는 암, 뇌・심혈관 질환, 당뇨, 치매 등으로까지 발전하게 된다고 알려져 있음(Anderson, 1991).

2. 경제・산업적 측면

○ 최근 우리나라는 급속한 경제 성장에 따라 생활양식과 식생활의 많은 변화를 겪고 있으며, 그에 따라 질병의 양상도 달라지고 있음(이홍규, 1997). 통계청이 발표한 바에 따르면 1974년 이후 현재까지 악성 신생물, 즉 암으로 인한 사망, 뇌혈관 및 심혈관 질환으로 인한 사망이 우리나라 사망률의 수위를 차지하고 있음. 1983년에는 암으로 인한 사망률이 10만 명당 72명이였던 것에 비해 2002년에는 130.7명으로 20년 동안 2배 정도로 꾸준히 증가하는 추세임(http://nso.go.kr, 2004). 또한 1987년도 뇌・심혈관 질환으로 인한 사망률은 뇌졸중이 인구 10만명당 73.5명 그리고 1996년에는 74.7명으로 여전히 수위를 차지하고 있으며, 허혈성 심장병은 1987년에는 6.2명에 불과 했으나 1996년도에 들어와서는 13명으로서 10년 동안 2배 이상의 급격한 증가하였고, 관상동맥질환의 유병률도 최근 10년 동안 3.2배 증가하고 있는 추세임 (http://nso.go.kr, 2004). 현재까지 밝혀진 암, 뇌혈관 및 심혈관 질환의 원인 혹은 위험요인으로 노화, 흡연, 환경오염, 만성 감염 등을 들 수 있으며 이 요인들에 의해 신체 내에서 해로운 활성을 가진 활성산화물질(reactive oxygen species, ROS)의 비정상적인 과잉 생산과 면역력 저하에 의한 것이라고 알려져 있음(Sun, 1990; Halliwell, 1996).

○ 유청의 고형분은 탁월한 영양가와 기능성으로 인해 식품에서 이용가능성이 큼. 특히 유청 단백질은 가장 양호한 품질의 단백질일 뿐만 아니라 특정한 생리활성을 나타내는 것으로 알려지고 있음(Morr, 1987; Morr and Foegeding, 1990; Jayaprakasha and Brueckner, 1999). 유청 단백질은 용해성, 점성, 보수성, 기포생성, 유화와 젤 생성 등 넓은 범위의 기능성을 제공함(Giese, 1994; Asitsherma and Bhatia, 1999; Jayaprakasha and Brueckner, 1999).

○ 이러한 기능성은 유청 단백질의 이용을 증가시키고 식품 시스템에서 바람직한 특성을 얻기 위해 조제할 수 있음. 또한 유청 단백질제품은 pH 변화에 안정되어 광범위한 pH에서 용해성을 소지함. 이는 유청 단백질의 이용을 증가시키고 넓은 범위의 식품의 응용에서 기능성 소재로 이용될 수 있는 장점이 있음(Zadow, 1986).

○ 천연 상태로부터 개발될 수 있는 기능성을 소지하는 단백질의 수식(modification)은 그들의 영양가, 식이요법, 기능성의 변화를 일으켜 부가가치 높은 식품 개발에 이용될 수 있음. 이러한 단백질의 수식된 형태는 단백질의 가수분해물(hydrolysate)을 들 수 있겠음(Dave et al., 1991).

○ 단백질의 가수분해는 영양적 특성을 개선시키고 품질 저하를 억제하며 조직을 개선시키는 동시에 용해도를 증가시키며 독성이나 저해성분을 제거함(Lahl and Grindstaff, 1989). 이러한 단백질의 가수분해물은 가치가 인정되어 있는 펩타이드를 함유함(Lahhl and Grinstaff, 1989, pearce, 1994). 이들은 식이요법적 기능을 갖는 의약식품(medicinal foods)의 생산에 이용될 수 있는 단백질 첨가물을 생산하기 위한 대안으로 이용될 수 있음(Nielsen et al., 2000). 천연 상태의 단백질의 기능성은 제한되어 있으나 protease에 의한 가수분해에서 얻어지는 생리활성 펩타이드는 의미있는 영양학적 및 기능적 특성을 소지함으로 인해 부가가치 높은 건강식품 제조와 제약분야에서 사용할 수 있는 소재임(Meisel, 1998).

○ 본 연구에서 개발되는 건강음료와 기능성 이유식의 원료로는 치즈 유청이 이용됨. 유청은 우유로부터 casein 또는 치즈의 제조 시에 형성되는 커드의 수확 후에 남는 액체를 지칭함. 유청은 낙농산업의 주요 부산물로서 우유 고형분의 약 50%를 함유하고 있음. 총 고형분의 함량은 6~7%로서 이 중에서 14~15%는 단백질, 70~75% 유당, 7~8%는 회분과 수용성 비타민임(Renner, 1983). 유청은 제대로 처리되지 못하면 식품 자원의 손실과 환경 및 경제적 부담을 초래함.

○ 현재 웰빙 추세와 함께 치즈의 소비는 증가 추세에 있어 1990년의 치즈 수입량 123톤에서 1995년 11,073톤, 2002년 1,942톤을 기록하고 있음. 정부의 적극적인 지원에 힘입어 앞으로 국내 치즈 생산은 2000년 4,107톤, 2001년 8,235톤, 2002년 9,508톤, 2003년 11,569톤으로 증가하고 있음. 이와 더불어 농가형 치즈를 제조하려는 움직임이 활발함. 이러한 치즈생산의 증가에 따라 생산되는 유청은 공해요인으로 작용할 수 있으나 식품산업에서 가치 있는 소재로 이용될 수 있음.

○ 우유 칼슘의 대부분과 치즈 칼슘의 전부는 casein의 소화 시에 생성하는 phosphopeptide와 용해성 complex를 형성함(Chahani and Kaup, 1989). 이 CPP는 불용의 calcium-phosphate complex의 생성을 방지함으로써 장에서 칼슘 흡수를 촉진함(Erba et al., 2001). 이러한 칼슘 흡수에 대한 CPP의 효과는 동물실험에서 입증된 바 있음. 또한 치아에 무정형의 phosphate를 고정시키는 능력에 의해 CPP는 충치 억제작용을 나타냄(Reynolds, 1997, 1999).

○ 여러 종류의 cytochemical 연구에 기초하여 유단백질에서 유래한 펩타이드가 암세포 억제에 관여할 수 있다는 증거가 보고 되고 있음(Meisel and Gunter, 1998; Hartmann et al., 2000). Hata 등(1999)은 β-casein과 α-casein에서 유래된 CPP의 면역증진 작용에 대해 보고하였음. 쥐 비장세

포 배양액에서 IgG 생산이 증진되었고 면역조절 기능이 있는 CPP의 구강투여는 점막에 대한 면역성의 증진작용이 있다고 주장이 제기되었음(Otani et al., 2000). 이러한 CPP의 생리활성 효과는 식품첨가물로서 이용가치가 매우 높음.

3. 사회・문화적 측면

○ 식생활의 서구화와 의학의 발달 등으로 평균 수명이 증가하여 고령화 사회로 진입하면서 뇌혈관질환, 동맥경화증, 고혈압 등의 성인병으로 인해 국민의 건강을 위협하고 삶의 질을 떨어뜨리는 사회적 큰 문제로 대두되고 있는 실정임. 이러한 질환은 잠복기간이 길고 일단 발병하면 치료가 어려운 만큼 무엇보다 예방이 중요한데, 이러한 점에서 건강기능식품(functional foods)에 대한 소비자들의 관심은 크게 높아지고 있음.

○ 이에 우리나라에서도 국민보건과 건강기능식품산업의 발전을 위한 건강기능식품에 관한 법률이 지난 2002년 7월 31일에 국회 본회의를 통과하였고 2003년 8월에 시행 중에 있음. 건강기능성 식품은 기능성소재(functional substances)를 기초로 한 제품이기 때문에 이러한 소재 발굴과 기능성 검정이 매우 시급한 과제임(Geissman, 1963; Dixon et al., 1998; Montanari et al., 1999).

○ 일반적으로 영양상태가 불량한 사람들은 저항력이 저하되어 질병에 잘 걸리고 사망률이 높으며, 영양상태가 양호한 사람은 병균에 대한 저항력이 강하다는 것은 오래전부터 알려져 온 사실임(김, 1992). 그러므로 영양상태는 면역체계에 영향을 미치리라고 생각하게 되었고 이를 뒷받침할만한 많은 임상적, 역학적 연구들이 있음. 또한 최근 악성종양의 치료를 위한 접근방법으로 면역요법에 대한 관심이 증대되고 있음(이 등, 2004). 따라서 면역력, 즉 생체방어능력을 증가시킬 수 있는 기능성 식품 소재 개발은 면역력 저하에 따른 전염성 질환 또는 암을 비롯한 만성퇴행성 질환을 예방 및 치료에 큰 도움이 되리라 사료됨.

○ *Lactobacillus acidophilus*와 *Bifidobacterium bifidum*을 함유하는 제품은 장내 균총을 정상화시켜 장내 질병과 소화기관의 만성질병 치료에 이용할 수 있는 가능성에 대해서 많은 보고가 있음(Acharya and Shah, 1998). 프로바이오틱 유산균은 장관과 관련된 대부분의 질병 및 기타 질병에서 유익한 효과를 보일 수 있음. 또한 프로바이오틱 스타터를 함유하는 제품은 정상적인 장내 균총을 유지하게 하고 원치 않는 부패성 미생물을 억제할 수 있음. Bifidobacteria와 lactobacilli 같은 균은 유해 미생물에 대해 억제작용을 보였고, *L. acidophilus* M92는 enteropathogenic 포자형성 미생물과 곰팡이에 대해서도 저해 효과가 있는 것으로 입증되었음. 아르헨티나의 Tucuman 빈민굴 지역에서 심한 설사로 고생하던 아동들이 *L. casei* CRL 31로 처리된 우유로 급여되었음. 이 스타터를 함유한 발효 우유를 이용한 처리는 보통의 의료법으로는 치료될 수 없었던 설사 증

상을 4 일 안에 치료하였음. 이는 프로바이오틱 유산균을 함유한 물질이 장에 관련된 질병을 제어하는데 있어 긍정적 효과를 지니고 있다는 것을 입증한 사례임. 이들은 인슐린과 stematostatin의 분비를 자극해 줌으로써 위장 통과시간을 늘리어 설사억제 효과를 나타내고 아미노산의 장 운송을 조절하며 식사 이후의(postprandial) 대사에 영향을 줌. 또한 장에 서식하는 유해 미생물에 대한 항균성을 갖으며, 병원체와 대장균에 대한 항생력을 가지고 있고 장내 유익균의 성장을 촉진함.

○ 이미 1970년대에 특정한 미생물이 건강증진 효과를 얻기 위한 목적으로 사용된 이래 전 세계적으로 프로바이오틱 유산균의 건강증진 가능성에 대한 관심이 다시 일기 시작하고 있음. 이들 프로바이오틱 유산균의 건강효과의 일부는 이미 많은 연구결과에 의해 입증되어 이들을 함유하는 식품은 전 연령층의 소비자에게서 큰 관심의 대상임. 이러한 견지에서 영양가 높은 유청 단백질, 생리활성 펩타이드와 프로바이오틱 유산균을 함유한 인스턴트 음료가 개발된다면 국민건강에 큰 의미가 있을 것으로 사료됨.

제 2 절 연구개발의 목표 및 내용

1. 연구개발 목표와 내용

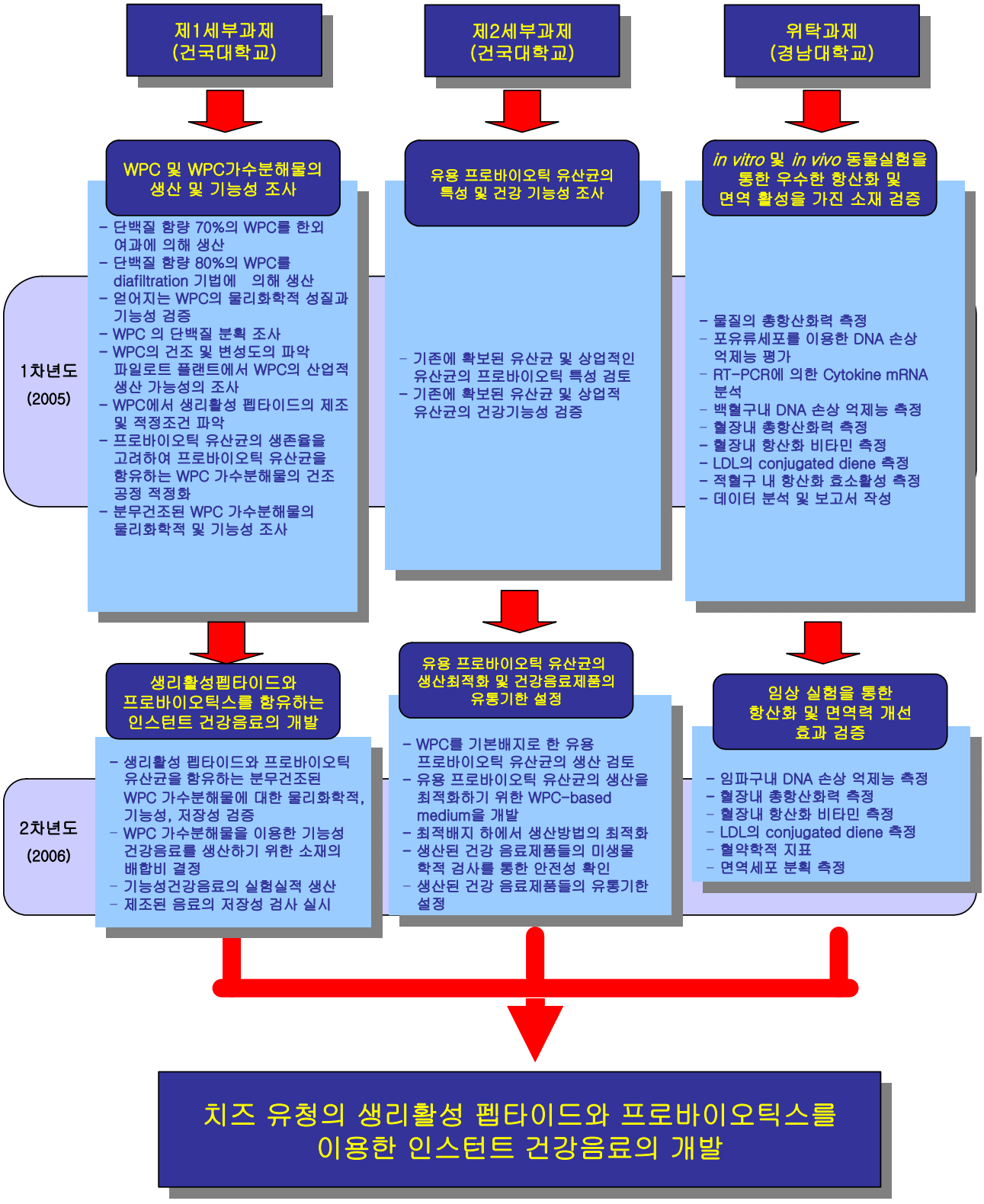
본 연구의 목적은 생리활성 펩타이드와 프로바이오틱 유산균을 이용한 인스탄트 기능성 건강음료의 개발에 있다. 이를 위해 우선 유청에서 WPC를 생산하고 이어서 생리활성 펩타이드를 함유하는 WPC 가수분해물을 생산한다. 개발되는 제품에는 이 외에 프로바이오틱 유산균과 필요한 일반성분이 함유시킨다. 이들 성분의 생산 공정이 적정화되고 배합비를 조사하며 최종 제품의 인스탄트화를 실시함. 아울러 산업시설에서의 적용 가능성을 조사한다.

2. 연차별 연구개발 목표와 내용

구 분	연 구 개 발 목 표	연구개발 내용 및 범위	비고
1차년도 (2005년)	WPC 및 WPC 가수분해물의 생산 및 기능성 조사(1세부과제)	○ 단백질 함량 70%의 WPC를 한외여과에 의해 생산 ○ 단백질 함량 80%의 WPC를 diafiltration 기법에 의해 생산 ○ 얻어지는 WPC의 물리화학적 성질과 기능성 검증 ○ WPC의 단백질 분획 조사 ○ WPC의 건조 및 변성도의 파악 ○ 파일로트 플랜트에서 WPC의 산업적 생산 가능성의 조사 ○ WPC에서 생리활성 펩타이드의 제조 및 적정조건 파악 ○ 프로바이오틱 유산균의 생존율을 고려하여 프로바이오틱 유산균을 함유하는 WPC 가수분해물의 건조공정 적정화 ○ 분무건조된 WPC 가수분해물의 물리화학적 및 기능성 조사	
	유용 프로바이오틱 유산균의 특성 및 건강 기능성 조사(2세부과제)	○ 기존에 확보된 유산균 및 상업적인 유산균의 프로바이오틱의 특성(인공위액에 대한 내성, 인공담즙산에 대한 내성, 효소활성, 항생물질에 대한 내성, 항균활성, 내열성 등) 검토 ○ 기존에 확보된 유산균 및 상업적 유산균의 건강 기능성(항산화 및 면역증강 기능성을 중심으로) 검증	
	In vitro, In vivo 동물실험을 통한 항산화 활성 검증(위탁과제)	○ 물질의 총항산화력 측정 ○ 포유류세포를 이용한 DNA 손상 억제능 평가 ○ 식이제조 및 동물 사육 ○ 백혈구 내 DNA 손상 억제능 측정 ○ 혈장 내 총항산화력 측정 ○ 혈장 내 항산화 비타민 측정 ○ LDL의 conjugated diene 측정 ○ 적혈구 내 항산화 효소활성 측정 ○ 데이터 분석 및 보고서 작성	

구 분	연 구 개 발 목 표	연구개발 내용 및 범위	비고
2차년도 (2006년)	생리활성 펩타이드와 프로바이오틱스를 함유하는 인스턴트 건강음료의 제조(1세부과제)	○ 생리활성 펩타이드와 프로바이오틱 유산균을 함유하는 분무건조된 WPC 가수분해물에 대한 물리화학적, 기능성, 저장성 검증 ○ 프로바이오틱 유산균을 함유하는 WPC 가수분해물을 이용하여 기능성 건강음료의 생산에 필요한 소재의 배합비 결정 ○ 인스턴트 건강음료믹스의 제조 ○ 기능성 건강음료의 실험실적 생산 및 저장성 검사 ○ 파일로트 생산플랜트에서 WPC 및 생리활성 펩타이드의 생산 ○ 파일로트 생산플랜트에서 기능성 건강음료의 산업적 생산 검토	
	유용 프로바이오틱 유산균의 생산최적화 및 건강음료제품의 유통기한 설정(2세부과제)	○ WPC를 기본배지로 한 유용 프로바이오틱 유산균의 생산 검토 ○ 유용 프로바이오틱 유산균의 생산을 최적화하기 위한 WPC-based medium을 개발 ○ 최적배지 하에서 생산방법을 최적화(회분식, 유가식, 연속식 등)하여 생산성(productivity)을 극대화 ○ 생산된 건강 음료제품들의 미생물학적 검사를 통한 안전성 확인 ○ 생산된 건강 음료제품들의 유통기한 설정	
	건강음료의 임상실험을 통한 항산화 및 면역력 개선 효과 검증(위탁과제)	○ 대상자 모집 및 intervention ○ 임파구 내 DNA 손상 억제능 측정 ○ 혈장 내 총항산화력 측정 ○ 혈장 내 항산화 비타민 측정 ○ LDL의 conjugated diene 측정 ○ 적혈구 내 항산화 효소활성 측정 ○ 데이터 분석 및 보고서 작성	

3. 연구개발 추진체계


제1세부과제
(건국대학교)
제2세부과제
(건국대학교)
위탁과제
(경남대학교)
WPC 및 WPC가수분해물의 생산 및 기능성 조사
유용 프로바이오틱 유산균의 특성 및 건강 기능성 조사
in vitro 및 in vivo 동물실험을 통한 우수한 항산화 및 면역 활성을 가진 소재 검증
1차년도
(2005)
- 단백질 함량 70%의 WPC를 한외 여과에 의해 생산
- 단백질 함량 80%의 WPC를 diafiltration 기법에 의해 생산
- 얻어지는 WPC의 물리화학적 성질과 기능성 검증
- WPC 의 단백질 분획 조사
- WPC의 건조 및 변성도의 파악
- 파일로트 플랜트에서 WPC의 산업적 생산 가능성의 조사
- WPC에서 생리활성 펩타이드의 제조 및 적정조건 파악
- 프로바이오틱 유산균의 생존율을 고려하여 프로바이오틱 유산균을 함유하는 WPC 가수분해물의 건조 공정 적정화
- 분무건조된 WPC 가수분해물의 물리화학적 및 기능성 조사
- 기존에 확보된 유산균 및 상업적인 유산균의 프로바이오틱 특성 검토
- 기존에 확보된 유산균 및 상업적 유산균의 건강기능성 검증
- 물질의 총항산화력 측정
- 포유류세포를 이용한 DNA 손상 억제능 평가
- RT-PCR에 의한 Cytokine mRNA 분석
- 백혈구내 DNA 손상 억제능 측정
- 혈장내 총항산화력 측정
- 혈장내 항산화 비타민 측정
- LDL의 conjugated diene 측정
- 적혈구 내 항산화 효소활성 측정
- 데이터 분석 및 보고서 작성
생리활성펩타이드와 프로바이오틱스를 함유하는 인스턴트 건강음료의 개발
유용 프로바이오틱 유산균의 생산최적화 및 건강음료제품의 유통기한 설정
임상 실험을 통한 항산화 및 면역력 개선 효과 검증
2차년도
(2006)
- 생리활성 펩타이드와 프로바이오틱 유산균을 함유하는 분무건조된 WPC 가수분해물에 대한 물리화학적, 기능성, 저장성 검증
- WPC 가수분해물을 이용한 기능성 건강음료를 생산하기 위한 소재의 배합비 결정
- 기능성건강음료의 실험실적 생산
- 제조된 음료의 저장성 검사 실시
- WPC를 기본배지로 한 유용 프로바이오틱 유산균의 생산 검토
- 유용 프로바이오틱 유산균의 생산을 최적화하기 위한 WPC-based medium을 개발
- 최적배지 하에서 생산방법의 최적화
- 생산된 건강 음료제품들의 미생물학적 검사를 통한 안전성 확인
- 생산된 건강 음료제품들의 유통기한 설정
- 임파구내 DNA 손상 억제능 측정
- 혈장내 총항산화력 측정
- 혈장내 항산화 비타민 측정
- LDL의 conjugated diene 측정
- 혈약학적 지표
- 면역세포 분획 측정
치즈 유청의 생리활성 펩타이드와 프로바이오틱스를 이용한 인스턴트 건강음료의 개발

제 2 장 국내외 기술개발 현황

제 1 절 국내·외 관련기술의 현황과 문제점

○ 유단백질에서 산 및 효소적 침전에 의해서 단지 casein 만을 이용하는 것이 아니라 그 외의 중요한 유청 단백질을 이용하려는 연구가 외국에서 활발히 진행되고 있음. 국내에서도 유청 단백질의 식품소재로서의 관심이 증가하고 있음. 현재 유청 단백질(whey protein concentrate; WPC)은 전량 수입에 의존하고 있음. 막을 이용한 분리에 기초한 한외여과(ultrafiltration)는 단백질의 큰 분자를 작은 분자인 유당, 무기질에서 분리하여 천연의 유청 단백질의 농축을 가능하게 하여 유청 단백질을 WPC의 형태로 획득할 수 있게 함. 이 기법을 이용하여 단백질은 열 응고, 침전 등의 전통적 방법에 비교하여 천연 상태로 얻을 수 있음. 유청 단백질을 변성화시키지 않은 천연의 상태로 얻을 수 있다면 식품산업에서 이용 가능성이 매우 크리라 판단됨. 한외여과는 낙농 선진국에서 실용화되고 있는 기법으로서 국내에서 치즈생산의 증가에 따라 개발이 필요함.

○ 단백질의 생물학적, 물리화학적 기능을 수행하는 능력은 물 등의 용매를 통해 움직이는 능력과 비례하므로 식품소재에서 용해도는 큰 의미가 있음. 천연의 단백질은 용해성이 좋으나 많은 단백질의 용해도는 그들 분자의 큰 크기에 의해 제한됨. 또한 변성되면 거의 불용이어서 식품에 이용될 수 없음. 변성되지 않은 유청 단백질은 용해성이 크고 넓은 pH 범위에서 용해성을 보이는 특징이 있음. 변성되지 않은 유청 단백질은 이들이 기능성을 잃지 않고 산성식품과 음료에서도 이용 가능하므로 유청 단백질의 변성도를 낮게 하는 연구가 필요함.

○ 유단백질의 물리·화학적 성질은 proteolysis에 특히 민감하게 영향을 받기 때문에 단백질분해효소는 다른 어느 효소보다 유가공에서 중요한 역할을 함. 단백질 가수분해물(protein hydrolysates)의 제조는 잘 알려진 공정으로서 단백질이 풍부한 식품 폐기물의 modification에 많이 사용되고 있음. 이는 acid hydrolysis로서 몇몇 아미노산의 전체 또는 부분적 파괴를 야기함. 효소적 가수분해는 acid 가수분해의 대안이나 특정한 효소는 특정한 기질에서 bitter peptide를 발생함. 치즈산업에서 이러한 bitter peptide의 발생을 제어하는 연구가 일부 진행되었음.

○ Protease를 이용한 가수분해는 주로 영양학적인 이유에서 실시되었음. 이때 가능한 allergy반응이 봉쇄되고 phenylalanine 함량을 낮추어 PKU 환자용의 식단에 이용됨. 우유로부터 생리활성 물질의 분리 및 정제하려는 연구에서 α-lactalbumin에 효소를 첨가하여 생리활성 테트라 펩타이드인 알파-락토핀을 분리하였음(홍, 1996). 이 연구는 우유에서 유청 단백질의 일부분인 α-lactalbumin을 분리하여 이용한 것으로서 산업체에서의 참여는 아직까지 이루어지지 않고 있음. 보다 경제성이 있는 방법이 개발되어야 할 필요성을 시사하고 있음.

○ 현재 농림기술관리센터 연구과제로서 ACE 억제활성 젖산균주 선발 및 이를 이용한 항 고

혈압 발효유 개발에 관한 연구가 수행 중임. 이 연구는 중심어(key words)가 ACE 억제, 젖산균주 선발, 항고혈압발효유로서 이 연구에 더하여 보다 넓은 범위의 생리활성, 젖산균과 효소의 상승작용, 신기술의 개발 및 낙농발전에의 기여도를 목표로 하는 연구가 침체상태에 처해있는 국내산업계의 활성화를 위해 필요함.

○ 또한 농림기술관리센터의 연구과제로 2002년 선정되어 현재 진행 중인 우유 펩타이드를 이용한 골밀도 강화기능 식품소재화 기술개발(과제명)은 국내에서도 우유 펩타이드에 관한 관심이 증대하고 있다는 것을 말해주고 있음. 제한된 proteolysis는 단백질의 기능성을 modify하기 위해 사용될 수 있음. 유청 단백질에서 생물공학적 기법에 의해(proteolysis) 변화가 발생한다면 식품제조에서 보수, 유화 안정성, 점도 상승, gel 생성, 거품을 생성시키는 기능에 이용될 수 있음. 국내에서 이와 관련된 연구는 미미한 실정임.

○ 또한 프로바이오틱 유산균의 건조공정 시의 영향에 대한 연구 역시 미미함. 유단백질에서 유래하는 생리활성 펩타이드를 이용하려는 외국에서의 연구는 다음과 같이 요약될 수 있음(Pihlanto-Leppl, 2001). 국내에서 유청 단백질의 생리활성 펩타이드의 이용에 대한 연구는 치즈 유청에 존재하는 GMP(glycomacropepteide)의 분리에 관한 연구(윤, 2000)를 비롯하여 이제 시작 단계에 있음. 생리활성 펩타이드를 이용하기 위한 첫 단계 공정에 필요한 한외여과(ultrafiltration)는 외국의 경우 연질치즈(soft cheese) 및 반경질치즈(semi hard cheese) 분야와 WPC 생산에서 이미 실용화되고 있음.

제 2 절 앞으로의 전망

○ 우유의 높은 영양가는 대부분 유단백질에 함량에 기인하는 바가 큼. 유단백질을 인간의 영양에 이용하고 새로운 사용처를 발견하려는 노력은 지속적으로 필요함. 유청 단백질에 존재하는 lactoferrin은 항균력이 있는 단백질로 알려져 있으나 최근 연구에 의하면 감각기관인 중추신경계에 존재하는 수용체에 작용하여 진통효과를 나타내는 것이 실험동물에서 밝혀졌음(윤과 전, 2004).

○ 유청 단백질은 영양가 있는 소프트드링크와 고단백질의 우유를 기초로 한 음료의 제조에 적합하므로 우유 조성 성분을 이용하는데 있어 새로운 가능성을 제공함. 우유를 기초로 하는 음료는 현재 우유의 공급 과잉상태에 있는 국내 낙농 산업계에 새로운 활로를 제공할 수 있음. 유단백질은 필수아미노산 메티오닌과 라이신이 부족한 식물성 단백질과 이상적으로 결합할 수 있어 전통식품의 가치를 보강하기 위해 조화될 수 있음. 이러한 목적에 도달하기 위한 조작은 복잡한 시스템에 대한 지식을 필요로 하므로 이 분야의 지속적인 연구가 활발할 것으로 예상됨.

제 3 절 기술도입의 타당성

해당 사항 없음.

제 3 장 연구개발수행 내용 및 결과

제 1 절 WPC 및 WPC 가수분해물의 생산 및 기능성 조사

1. 서 론

유청은 다양한 화학적, 물리적, 기능적 성질을 가진 단백질의 여러 혼합체임. 단백질은 영양면에서 중요한 역할을 할 뿐만 아니라, 많은 경우 생체 내에서 특수한 생리적인 활동을 함. 여러 종류의 유청 단백질은 신생아에게 병에 대한 비면역성 보호를 해주며 생물학적, 물리적인 효력도 가지고 있음. 이 외에 작게 소화된 단백질들은 생리적인 활력을 제공하는 생리활성 펩타이드의 한 부분으로서 작용할 수 있음. 이들은 유청 단백질에 중점을 둔 식품개발에 기초가 됨. 생리활성 펩타이드와 프로바이오틱 유산균으로 강화된 음료는 아동, 운동가, 체중 조절자, 노인을 위한 음식으로 폭넓게 응용될 수 있음. 이는 유청을 낭비하게 되는 문제를 해결해주는 것 이외에도 영양이 풍부하고 갈증을 해소해 주는 음료로 응용되는 등 유용한 한 방법이 됨. 연구는 구체적으로 다음과 같이 진행됨.

2. 연구내용 및 방법

가. WPC의 생산 및 특성

1) WPC의 생산

서울우유 신갈공장에서 공급된 신선한 모짜렐라 치즈 유청을 pH 7.0으로 조정한 후 70℃에서 5분 열처리하고 50℃로 냉각하였다. 열처리된 유청은 한외여과방법을 통한 WPC생산에 이용되었다. 폴리설폰으로 된, 분자량 cut off rate 20,000 daltons인 막을 장착한 spiral wound type 한외여과기를 이용하여 처리되었다. 유청은 한외여과기의 balance tank에 넣은 후 여러 종류로 volume이 감소되도록 가공되었다. 사용된 압력은 유입압력 1.5 bar 와 유출 압력 5 bar이었고 가공 중의 세균 증식을 억제하기 위해 50℃의 온도를 사용하였다. 요구되는 양의 투과액(permeate)을 제거한 후 공정은 중지되었다. 투과액의 제거를 통한 유청의 농축은 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 95, 97.5%까지 실시되었다. 얻어지는 WPC의 종류에 따라 diafiltraltion을 1단계, 2단계로 실시한 후 제조된 WPC는 inlet 온도 175℃와 outlet 온도 70℃에서 Buechi(스위스) 분무건조기에서 분무건조 되었다.

2) WPC의 이화학적 성질

가) 유청과 분무건조된 WPC의 총고형분, 단백질, 지방, 유당, 회분은 AOAC법(1980)에 의해 측정. 유당은 Lawrence 법(1963), NPN은 Rowland(1938)법에 의해 측정되었다.

나) pH 측정은 pH meter(Orion 420A, U.S.A)를 이용하여 실시하였다.

다) 비중(bulk density)은 표준방법에 의해 실시하였다.

라) HMF(5-hydroxy-methyl-2-furfural)함량은 Keeney와 Bassette(1959) 방법에 의해 실시하였다.

마) Lysin 함량은 Carpenter(1960)의 방법에 의해 측정되었다.

바) Protese-peptone함량은 Paquet 등(1988)의 방법에 의해 측정되었다.

사) 분무 건조된 제품의 Whey protein nitrogen index(WPNI)는 mg nitrogen/g powder로서 Mahmoud 등(1992)의 방법에 의거하여 실시하였다.

아) 분무건조된 WPC의 용해도는 Morr와 Foegeding(1990)의 방법에 의해 분석했다.

자) 습윤성(wettability)은 Sorrensen 등(1978) 의 방법에 의해 실시하였다.

차) 점도는 분말이 10%의 총고형분을 갖도록 환원시킨 후 점도계를 이용(Brookfield, Mode LVDV-E) 하여 측정하였다.

카) 기포 생성능(Foaming capacity)는 Phillips 등(1987)의 방법을 약간 수정하여 overrun %로 표현하였다.

타) 유화능은 Pearce 와 Kinsella(1978)의 turbidometric method로 측정하여 emulsifying activity index(EAI)로 표현하였다.

나. WPC 가수분해물의 생산 및 특성

1) 시료

효소처리의 기질은 제조된 WPC와 구입한 WPC분말을 사용했다.

2) 단백질분해효소

사용된 효소는 neutrase, trypsin, flavorzyme, alcalase, protamax이다. 가수분해는 Shobha(2002)의 방법에 의해 WPC에 효소 1 mL : 단백질 25 g으로 효소를 첨가하여 40℃에서 배양시간은 3시간으로 실시하였다. 가수분해가 종료된 후 가수분해물을 원심분리를 해서 상층액만을 분리했다. 가수분해된 WPC는 WPC의 경우와 같은 조건에서 분무건조되었다. 분무건조 된 WPC 가수분해물은 즉시 포장되어 이화학적 및 기능성을 조사하기 위해 보존되었다.

3) WPC 가수분해물의 이화학적 성질

가) 분무건조된 WPC 가수분해물의 총고형분, 단백질, 지방, 회분, 유당함량, 점도, pH, 비중, HMF, Whey protein nitrogen index(WPNI), 용해도, 거품생성능, 유화능은 WPC와 동일한 방법으로 분석되었다.

나) 가수분해도는 Alder-Nissen(1979)의 방법을 변형하여 Trinitrobenzen sulfonic acid(TNBS)의 측정에 의해 실시하였다.

3. 연구결과

가. 농축액(retentate)과 투과액(permeate)의 조성

여러 단계로 용량을 축소해서 얻은 농축액의 화학적 분석결과는 Table 1에서, 투과액의 조성은 Table 1-1과 1-2에서 볼 수 있다. Table 1-1에 나타난 NPN 함량의 의의는 한외여과시 NPN의 retention은 매우 낮으므로 true protein 함량이 중요하다는데서 찾을 수 있다.

Table 1-1. Composition of retentate at various stages of ultrafiltration of cheese whey

Volume reduction (%)	Constituents (%)					
	Total solids	Protein	NPN	Fat	Lactose	Ash
0	6.28	0.78	0.05	0.05	4.90	0.55
10	6.75	1.01	0.05	0.10	5.06	0.58
20	7.26	1.24	0.05	0.20	5.20	0.62
30	7.80	1.47	0.06	0.30	5.32	0.66
40	8.25	1.79	0.06	0.40	5.44	0.71
50	8.74	1.96	0.06	0.50	5.54	0.76
60	9.20	2.16	0.07	0.60	5.63	0.81
70	9.62	2.27	0.07	0.70	5.69	0.86
80	10.62	3.20	0.08	0.80	5.74	0.88
90	14.36	6.78	0.08	0.90	5.78	0.90
95	21.30	12.58	0.08	1.00	5.80	0.92
97.5	22.29	14.30	0.08	1.20	5.85	0.94

Table 1-2. Chemical composition of permeate at various stages of whey ultrafiltration

Volume Reduction (%)	Total solids protein lactose		Protein		Lactose	
	Instantaneous Permeate	Pooled permeate	Instantaneous permeate	Pooled permeate	Instantaneous permeate	Pooled permeate
Whey	–	–	–	–	–	–
0	4.55	–	0.17	–	3.98	3.98
50	4.60	4.50	0.18	0.16	4.12	3.96
60	4.61	4.51	0.18	0.16	4.14	3.97
70	4.77	4.53	0.19	0.16	4.23	3.98
80	4.90	4.54	0.19	0.16	4.32	3.99
90	5.05	4.60	0.24	0.17	4.39	4.04
95	5.28	4.65	0.29	0.17	4.55	4.09
97.5	5.41	4.73	0.33	0.17	4.62	4.15

Table 1-3. Chemical composition of permeate at various stages of whey ultrafiltration

	Ash		Npn	
	Instantaneous permeate	Pooled permeate	Instantaneous permeate	Pooled permeate
Whey	-	-	-	-
0	0.40	0.40	0.02	-
50	0.30	0.28	0.02	0.02
60	0.29	0.28	0.02	0.02
70	0.36	0.30	0.03	0.02
80	0.40	0.34	0.03	0.02
90	0.42	0.36	0.03	0.02
95	0.43	0.38	0.03	0.02
97.5	0.46	0.41	0.03	0.01

Table 1-4는 여러 단계의 한외여과 과정에서 조사된 유청의 물리적 성질을 보여준다. 농축이 진행됨에 따라 pH, 비중, 점도가 증가했다. pH의 증가는 무기질의 일부가 permeate로 빠져 나가기 때문으로 판단된다. Instantaneous permeate는 특정한 시점에서 얻어진 투과액을 뜻하고 pooled permeate은 투과액을 전부 수집한 후의 평균 조성을 말한다. 투과액의 조성이 균일하지 않으므로 이 두 가지를 측정했다.

Table 1-4. Physical properties retentate at various stages of ultrafiltration of cheese whey

Volume reduction(%)	Physical properties		
	pH	Specific gravity	Viscosity(cP)
0	6.40	1.03	1.16
20	6.45	1.04	1.38
30	6.45	1.04	1.63
40	6.46	1.04	1.90
50	6.46	1.05	2.53
60	6.47	1.05	2.80
70	6.47	1.06	3.96
80	6.52	1.06	4.25
95	6.58	1.07	10.98
97.5	6.74	1.07	12.20

나. 수율(rate of retention)

유청의 용량이 한외여과 과정에서 농축되어 WPC로 제조되는 과정에서 조성 분석을 한 후 최초 유청의 성분과 비교하여 다음 공식에 의해 각개 성분의 수율을 계산할 수 있다.

y(성분의 수율) = C1/f $C_{。}$
$C_{。}$ = 특정성분의 최초농도
C_1 = 특정성분의 마지막농도
f = 농축factor

분무 건조된 WPC 수율은 유청의 최초 단백질에 영향을 받는다는 것을 알 수 있다. 원료 유청의 단백질 함량이 낮으면 WPC를 생산하기 위한 유청의 소비량이 큰 것으로 나타났다. WPC 35는 WPC 50, 70, 80 의 고단백질제품과 비교 시 높은 수율을 나타냈는데 이러한 결과는 투과액의 제거정도와 유당의 제거가 낮으므로 유당과 회분의 높은 retention이 초래되기 때문인 것으로 설명할 수 있다. 한외여과가 진행되면 단백질은 증가하는 반면에 유당과 무기질은 투과된다. 유청에서 여러 종류의 농축 수준에서 유청 단백질을 분리한 후에 잔존하는 permeate의 조성 및 함량을 보면(Table 1-2와 Table 1-3) permeate의 이용 가능성에 대한 연구가 필요함을 보여준다.

다. WPC-35의 생산

100 리터 유청을 50℃에서 한외여과를 통해 80-85리터의 permeate을 제거한후 얻어지는 retentate 15-20리터를 농축 후 분무 건조하여 단백질 함량 35%의 WPC를 생산했다.

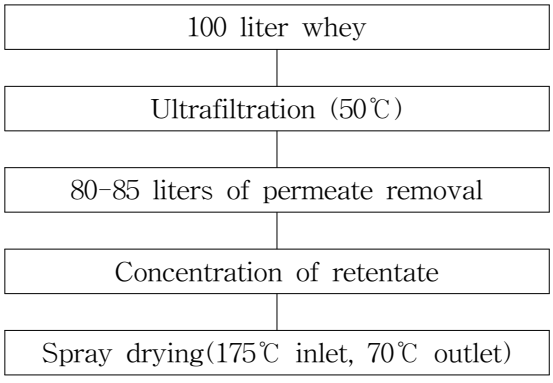


Fig. 1-1. Production of dried WPC-35.

한외여과에 의해 우유로부터 유당과 수용성 염류의 대부분이 수분과 함께 분리되고 유청 단백질을 포함한 단백질, 유지방은 retentate에 남게 된다.

어느 정도까지 한외여과 되어야 하는 가는 최종 제품에 의존한다. WPC-35 생산에는 6시간이 소요되었다.

라. WPC-70의 생산

100 리터 유청을 50℃에서 한외여과를 통해 95-97.5%의 permeate을 제거한 후 얻어지는 5-2.5 리터의 retentate에 5-2.5 리터 물을 첨가하여 한외여과하였다. 동량의 permeate 제거(1st diafiltration)하여 70% 단백질을 함유한 WPC를 얻었다.

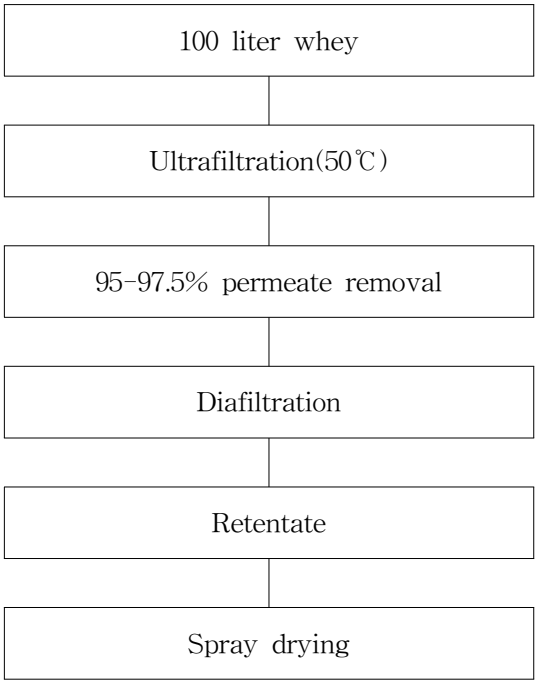


Fig. 1-2. Production of dried WPC-70.

상기 공정에서 retantate에 물을 첨가하여 빼내는 공정을 diafiltration이라 한다. 이 공정에 의해 유당, 회분, NPN의 농도가 감소된다. 여기서 얻어진 retentate의 양만큼 다시 50℃ 증류수를 추가로 첨가한 후 첨가된 증류수에 상응하는 양의 permeate를 빼내면 단백질 함량 80%의 WPC를 얻게 되는데 이 공정을 2차 diafiltration이라 한다. Table 1-4는 한외여과와 diafiltration 후 분무건조된 WPC의 조성을 보여준다. 단백질 함량이 높아짐에 따라 lysine 함량 역시 증가하여(Table 1-7) Maillard 반응에의 성향이 커지게 된다. 분무건조된 WPC-35, WPC-70, WPC-80의 조성은 Table 1-6에서 물리적 성질은 Table 1-8에서 볼 수 있다. 이렇게 얻어진 retentate는 분무건조와 가수분해를 위해 사용되었다.

Table 1-5. Composition of spray dried wpc retentate after different stages of ultrafiltration and diafiltration

Components (%)	Stages of ultrafiltration and diafiltration			
	UF retentate (after 80% volume Reduction)	UF retentate (after 97.5% volume Reduction)	1st stage diafiltration (after 97.5% volume reduction)	2nd stage diafiltration (after 97.5% volume reduction)
Moisture	3.80	3.75	3.40	4.10
Protein	33.50	62.20	70.50	80.20
Lactose	53.80	24.25	16.30	6.30
Fat	1.45	4.40	5.20	5.80
Ash (minerals)	7.58	5.40	4.60	3.60

Table 1-6. Chemical composition of spray dried whey protein concentrates

Product	Components (%)				
	Moisture	Protein	Lactose	Fat	Ash
WPC-35	3.80	33.50	53.67	1.45	7.58
WPC-70	3.40	70.50	16.30	5.20	4.60
WPC-80	4.10	80.30	6.30	5.80	3.60

Table 1-7. Protein quality of spray dried whey protein concentrate

Product	Components					
	Total nitrogen (%)	Non protein nitrogen (% of total nitrogen)	Protease peptone (% of total nitrogen)	Whey protein nitrogen (% of total nitrogen)	Lysine (g/100 g protein)	Extent of denaturation (%)
WPC-35	5.40	8.90	11.40	79.70	8.40	23.0
WPC-70	11.15	7.10	9.95	82.95	9.33	27.0
WPC-80	12.63	6.25	9.20	84.55	10.75	32.0

마. WPC의 가수분해

분무건조 WPC 가수분해물이 식품 소재로 이용하는데 적합성을 파악하기 위해 조사한 이화학적 및 기능적 특성은 다음과 같다.

1) 화학적 조성

Table 1-7에서 보듯이 효소적 가수분해는 WPC-70H, WPC-80H의 조성에 영향을 끼치지 않는다. 단백질, 유당, 지방, 회분함량은 가수분해된 시료 및 비가수분해 된 WPC-70, WPC-80에서 유의적으로 변화하지 않았다($p<0.05$). 가수분해는 단백질의 펩타이드 결합을 분해하므로 질소화합물의 형태에만 변화를 초래할 뿐, 총 질소함량의 변화는 나타나지 않았다.

2) 이화학적 성질

WPC와 가수분해물의 pH, bulk density, 불용성지수(insolubility index)는 Table 1-8, 1-9 에서 볼 수 있다.

Table 1-8. Physical properties of spray dred whey protein concentrate

Properties	Product		
	WPC-35	WPC-70	WPC-80
pH	6.58	6.74	6.78
Bulk density(g/ml)	0.52	0.45	0.40
Dispersability(%)	95.40	97.00	98.30
Wettability(sec)	35	65	80
Insolubility index(ml)	0.45	0.55	0.60
Sinkability(% transmission)	48	58	62

Table 1-9. Chemical composition of spray dried WPC and WPC hydrolysates

Products	Components (%)				
	Moisture	Protein	Lactose	Fat	Ash
WPC-70	4.41	70.40	14.70	6.40	4.05
WPC-70H	4.50	70.25	14.55	6.38	4.08
WPC-80	4.55	80.60	4.90	7.20	2.80
WPC-80H	4.62	80.40	4.88	7.22	2.82

Table 1-10. Physicochemical attributes of spray dried WPC and hydrolyzates

Products	Attributes				
	pH	Bulk density (g/ml)	Insolubility index (ml)	HMF (ηmol/100g)	WPNI (mg N/g)
WPC-70	6.68	0.35	0.85	1.30	59.45
WPC-70H	6.55	0.42	0.62	3.20	71.75
WPC-80	6.72	0.37	0.75	0.60	74.59
WPC-80H	6.60	0.44	0.53	1.80	87.61

가) 가수분해 시료의 pH

WPC-70과 WPC-80의 가수분해물(WPC-70H와 WPC-80H)의 시료는 가수분해되지 않은 시료에 비해 낮은 pH를 보인다. 가수분해된 시료의 낮은 pH는 가수분해의 결과 펩타이드의 -COOH기가 많이 노출되기 때문으로 사료된다. 가수분해의 결과 발생한 WPC의 pH 감소는 여러 종류의 단백질 분해효소를 사용한 다양한 단백질종 류에서의 효소처리결과에서도 유사하게 보고되었다(Adler-Nissen 1981, Mahmoud 1984). 이러한 pH 저하는 식품에 이용할 수 없을 정도는 아니었다.

나) Bulk density

분무건조된 가수분해 시료인 WPC-70H와 WPC-80H의 bulk density는 0.42와 0.44 g/ml로서 WPC-70, WPC-80의 0.35와 0.37 g/ml 보다 유의하게 높게 나타났다(Table 11). 가수분해는 입자 크기가 축소된 유리 아미노산과 작은 분자의 펩타이드를 초래함으로써 bulk density가 높게 나타나는 것으로 판단된다(Adler-Nissen 1981, Mahmoud 1984). 작아진 입자는 큰 입자 사이의 공간에 채워짐으로써 효소적으로 가수분해 된 분무건조 WPC의 높은 bulk density가 초래된다는 사실을 설명할 수 있다. Neutrase에 의해 가수분해된 시료의 높은 bulk density는 가수분해되지 않은 시료에 비해 건조제품의 포장 시 의의가 있다.

다) 불용성지수(insolubility index)

WPC-70과 WPC-80 의 불용성지수는 0.85와 075를 나타낸데 비해 가수분해된 시료의 불용성지수는 0.62, 0.53으로 감소했다(Table 1-11). 이러한 현상은 단백질 가수분해는 단백질의 열 안정성을 증가시킨다고 보고된 바 있듯이(Hindalgo 1977, Chen 등 1995) 개선된 열안정성으로 인해 유청 단백질의 변성화가 감소되었기 때문으로 사료된다. 열 안정성의 증가는 단백질 용해도가 식품 기능성에 범위에 들어갈 때 의의가 크다. 가수분해 된 WPC 농축물(retentate)과 가수분해 되지 않은 WPC의 농축물(retentate) 모두 분무건조 전후 열처리 받는 정도는 비슷하나 가수분해된 WPC의 시료는(WPC-70H 와 WPC-80H) 가수분해 되지 않은 시료보다(WPC-70과 WPC-80)

WPNI가 높게 나타났다(Table 1-11). 이러한 결과는 가수분해가 유청 단백질의 변성화도를 감소시키는 것을 의미한다. 이는 가수분해된 시료의 불용성지수 감소에서 다시 입증되었다.

감소된 변성화도는 높은 WPNI에서 볼 수 있듯이 가수분해의 결과로서 단백질의 열 안정성이 개선되었기 때문에 초래된 것으로 사료된다. Casein 가수분해물에서도 개선된 열 안정성이 관측된 바 있고 가수분해물의 단백질은 고온에서 열처리해도 용해성이 양호하다고 보고된 바 있다(Hindalgo 1977, Chen 등 1995). 가수분해물의 열 안정성은 가수 분해물을 함유하는 식품을 고온에서 가공하는 경우가 많으므로 실용적 의미가 크다.

라) Maillard 반응

분무 건조된 WPC 제품에서 발생하는 Maillard 반응은 HMF 함량으로 나타내었다. HMF 함량은 WPC-70 과 WPC-70H에서 WPC-80과 WPC-80H와 비교할 때 훨씬 높게 관찰되었다(Table 1-11). 이 같은 결과는 WPC-70의 최초 유당 함량이 높기 때문에 나타난 것으로 사료된다. 그러나 두 시료의 분무건조된 WPC 가수분해물은 HMF 함량이 그들의 WPC에 비교할 때 높게 나타났다. 이 같은 결과는 가수분해가 HMF 함량에 영향을 끼치는 것을 의미한다.

Maillard 반응은 라이신(lysine)과 유당의 반응의 결과로 발생한다. 가수분해된 제품에 유리상태의 라이신 함량이 높으므로 maillard 반응이 촉진되어 HMF 함량이 높은 것으로 판단된다. 가수분해 된 분말에서 HMF 함량이 높게 관측되어 갈변화정도가 높은 것은 유리 아미노산과 펩타이드의 비율이 높으므로 Maillard 반응 성향이 큰 것에 기인한다고 볼 수 있다. 비 변성화된 단백질로서 측정된 변성화의 정도는 효소적 가수분해의 효과를 보여주는 결과로서 Table 2의 WPNI로서 확인할 수 있다. 가수분해된 WPC 시료는 가수분해 되지 않은 WPC보다 비변성화단백질(WPNI) 함량이 높게 나타났다. 이와 같이 가수분해의 긍정적 효과는 불용성지수, WPNI와 bulk density에 대해서 관찰되었다.

마) 기능성

WPC의 효소적 가수분해가 여러 pH에서 용해성, 점도, 기포 생성능, 유화능 등 몇몇 기능성에 끼치는 효과는 Table 1-11~1-14에서 볼 수 있다. 단백질의 용해도는 5.51에서 5.62 단위가 개선되었고(Table 1-11) 기포 생성능은 4.2단위(Table 1-13), 유화능은 5.7에서 6.3단위가 개선된 사실에서(Table 1-14) 효소적 가수분해의 긍정적 효과를 관찰할 수 있다. 이 같은 현상은 모든 pH 범위에서 나타났고 특히 pH 4와 5에서도 볼 수 있다. 식품 조제 시 기능성의 개선 효과를 얻을 수 있다는 것을 시사한다.

바) 용해도

분무건조된 WPC와 WPC 가수분해물의 pH 변화에 따른 용해도의 변화는 Table 1-11에서 볼 수 있다. 효소 가수분해는 모든 pH에서 용해도를 개선한 것으로 나타났다. 가수분해의 결과 평

균 5.51에서 5.62 단위의 용해도가 개선되었다. WPC 가수분해물의 용해도 개선 정도는 pH 4.5에서 현저함으로써 단백질 용해도 개선에 있어 효소적 분해의 의의는 등전점에서도 입증되었다. 반면에 가수분해되지 않은 단백질은 제한된 용해도를 보인다. 이 결과는 여러 종류의 단백질에서 다양한 효소를 이용한 가수분해에서 용해도의 증가를 보인 많은 문헌의 결과와 일치한다.

WPC 가수분해의 증가된 용해도는 펩타이드, 아미노산 등 작은 분자화합물의 방출에 기인하는 것으로 사료된다. 가수분해는 이온화될 수 있는 아미노기와 카르복실기의 수를 증가시킴으로써 친수성이 증가되어 용해도의 증가를 초래한다고 볼 수 있다. 이와 같은 결과는 WPC를 산성의 과일주스에 기초한 음료, tm프와 같은 식품에 이용할 때 단백질의 용해도가 중요하므로 의의가 있다.

사) 점도

분무 건조된 WPC(WPC-70와 WPC-80)와 가수분해물의 재 조합된 시료의 점도는 pH 2와 8 사이에서 측정되었다. 그 결과는 Table 1-11에서 볼 수 있듯이 가수분해된 시료인 WPC-70H와 WPC-80H는 가수분해 되지 않은 WPC와 비교할 때 점도가 유의하게 감소했다. 효소처리되지 않은 WPC 시료의 점도는 pH 4-5 범위에서 매우 높게 나타났다. 가수분해는 점도의 감소를 현저히 초래하나 가수 분해하지 않은 WPC는 여러 범위의 pH에서 점도가 매우 높은 것을 알 수 있다. 반면에 가수 분해된 시료의 경우 pH에 따른 점도변화의 정도는 그들의 가수 분해되지 않은 시료에 비교할 때 그리 크지 않았다. 가수분해시의 점도 감소의 정도는 1.54-1.65 단위를 나타냈다. 점도 감소는 단백질 가수분해물을 음료에 이용하는데 있어 중요하다. 이러한 점도변화의 원인으로는 몇몇 펩타이드 결합이 분해되어 단백질 가수 분해물을 생성하는데 기인하는 것을 들 수 있다 (Adler-Nissen 1986, Mahmoud 1994, Mahmoud 등 1992). 즉, 가수분해 중 사슬이 길고 분자량이 큰 단백질은 사슬이 짧고 낮은 분자량의 펩타이드로 분해되어 점도는 감소한다.

아) 거품 생성능

WPC 효소적 가수분해가 pH의 작용과 관련하여 거품 생성능에 끼치는 영향은 Table 1-12에서 볼 수 있다. 오버런으로 표현되는 거품 생성능은 WPC 가수분해물에서 모든 pH에서 현저히 증가한데서 볼 수 있듯이 가수분해가 거품 생성능에 긍정적으로 작용하는 것을 시사한다. 개선의 정도는 특히 등전점 pH에서 확실하게 나타났다. WPC에 대한 효소적 가수분해의 거품 생성능의 개선은 다른 연구에서도 관측되고 있다(Vkjayakumar 등 2000). 거품생성능이 개선된 현상은 가수분해로 인해 작은 분자인 펩타이드와 아미노산이 방출되는데서 설명할 수 있다. 이들 작은 펩타이드와 아미노산은 물에 잘 용해되고 기포가 잘 생성되는 경향이 있어 수분의 경계면에 단백질의 신속히 확산되어 표면의 장력을 감소시킨다. 이로 인해 기포의 캡슐화 초래가 용이하게 된다. 이러한 거품 생성능은 특정 음료에서 중요한 의의가 있다.

자) 유화능

분무건조된 WPC와 WPC 가수분해물의 유화능은 pH 범위 2에서 8까지 Emulsifying activity index(EAI)로 측정하였다. 가수분해된 시료인 WPC-70H과 WPC-80H에서 가수 분해되지 않은 시료와 비교할 때 높은 EAI가 모든 pH에서 관찰되었다. 가수분해된 WPC는 유화능에서 가수분해되지 않은 단백질과 비교 시 EAI 단위 차이는 5.7에서 6.3 m^2/g 으로 높게 나타났다(Table 1-14). 유화능의 개선은 여러 종류의 단백질과 효소를 이용한 많은 가수분해 실험에서 관찰된 바 있다(Turgeon 등 1992). 이러한 현상은 가수분해에 의한 단백질 분자구조의 변경으로 인하여 숨겨진 소수성 내부를 물의 환경으로 노출되게 하여 유화능에 변화를 초래한다고 사료된다(Phillips와 Beuchat 1981). Oil과 소수성 잔기는 물과 상호반응을 원활하게 하여 소수성 잔기와 점액의(cohesive) 표면막을 생성한다는데서 유화능의 개선을 설명할 수 있다(Turgeon 등 1992).

Table 1-11. Solubility of spray dried WPC and hydrolyzates as a function of pH

pH	Solubility			
	WPC -70	WPC - 70H	WPC -80	WPC -80H
2	92.4	97.5	90.2	96.0
3	89.0	94.5	87.0	93.0
4	83.0	90.0	81.0	88.0
5	80.0	89.0	78.0	86.0
6	92.0	96.0	90.0	94.5
7	94.5	98.0	92.0	96.5
8	94.0	98.5	92.5	96.0

Table 1-12. Viscosity of spray dried WPC and hydrolyzates as a function of pH

pH	WPC-70	WPC-70H	WPC-80	WPC-80H
2	7.5	6.4	8.2	6.9
3	8.0	6.5	8.7	7.1
4	8.8	7.0	9.5	7.5
5	9.1	7.2	9.9	7.9
6	8.4	6.8	9.1	7.4
7	8.0	6.4	8.7	7.1
8	7.6	6.3	8.3	6.9

Table 1-13. Foaming capacity of spray dried WPC and hydrolyzates as a function of pH of WPC

pH	Foaming (%)			
	WPC-70	WPC-70H	WPC-80	WPC-80H
2	420	450	460	495
3	440	475	485	525
4	480	530	520	570
5	530	595	570	630
6	470	520	505	550
7	400	440	445	480
8	340	370	390	420

Table 1-14. Emulsion capacity of spray dried WPC and hydrolyzates as a function of pH

pH	Emulsion activity index (EAI m^2/g)			
	WPC-70	WPC-70H	WPC-80	WPC-80H
2	34.2	39.4	36.4	42.0
3	33.0	38.0	35.4	41.0
4	25.2	31.7	27.8	34.5
5	22.4	29.4	24.2	31.7
6	36.1	40.5	38.2	43.7
7	38.2	43.7	40.5	46.6
8	41.0	47.5	43.5	50.5

제 2 절 생리활성 펩타이드와 프로바이오틱스를 함유하는 인스턴트 건강음료의 개발

1. 서 론

프로바이오틱 유산균를 함유하는 가수분해된 WPC에 CPP를 첨가한다면 칼슘 흡수를 통하여 성장을 촉진하고 아동과 노인을 비롯한 소비자에게 중요한 역할을 하게 될 것임. 생리활성 펩타이드를 소재로 한 식품의 개발을 위해서는 우선 WPC를 생산하고 유용한 생리활성 펩타이드를 선택함. 본 세부과제에서는 유청 단백질에서 효소와 프로바이오틱 유산균을 이용하여 ACE 저해효과를 나타내는 α-lactorphin(50-53)과 β-lactorphin(102-105)을 생성하고자 함. α-Lactalbumin에서 유래하는 ACE 저해효과를 나타내는 가수분해물인 펩타이드(99-110) 역시 생산됨. 또한 β-Lactoglobulin에서 유래되는 22-25와 32-40 142-148 fraction 역시 ACE 저해효과를 보이므로 이 fraction을 아울러 제조함. 인체의 말초 혈액 임파구(peripheral blood lymphocytes, PBL)를 증식시켜 면역력을 강화시키는 α-lactalbumin에서 유래한 α-lactorphin의 제조는 특별한 관심사임. 이어서 펩타이드를 생성하기 위한 조건의 최적화가 필요함. 생산된 유청 단백질 가수분해물은 적합한 기능성을 소지해야 하고 프로바이오틱 유산균을 함유한 최종제품은 소비자의 needs를 충족시키는 기능성식품으로서의 제반요건을 구비해야 함. 연구는 구체적으로 다음과 같이 진행됨.

2. 연구내용 및 방법

가. WPC40 음료의 제조합

분무 건조된 단백질함량 40%의 WPC는 여러 종류의 가수분해도로 가수분해 되었다. 결과로서 생기는 가수분해물은 재조합된 분무건조된 음료의 기초 물질로써 사용하였다. 여기에 첨가되는 물질로는 설탕, 구연산, 향료, 색소와 함께 *Bifidobacterium bifidum* 과 *Lactobacillus acidophilus* 과 같은 Probiotic 배양액이었다. WPC 가수분해물과 Probiotic를 함유한 재조합된 음료믹스로 기초로 준비한 생산물을 얻기 위한 가공공정의 최적화 하였다.

나. 제조합한 음료의 이화학적 성질

1) WPC40 재조합 음료의 총고형분, 단백질, 지방, 유당, 회분은 AOAC법(1980)에 의해 측정. 유당은 Lawrence 법(1963), NPN은 Rowland(1938)법에 의해 측정되었다.
2) pH 측정은 pH meter(Orion 420A, U.S.A.)를 이용하여 실시하였다.
3) 비중(bulk density)은 표준방법에 의해 실시하였다.
4) HMF(5-hydroxy-methyl-2-furfural)함량은 Keeney와 Bassette(1959) 방법에 의해 실시하였다.
5) 분무 건조된 제품의 Whey protein nitrogen index(WPNI)는 mg nitrogen/g powder로서 Mahmoud 등(1992)의 방법에 의거하여 실시하였다.
6) 점도는 분말이 10%의 총고형분을 갖도록 환원시킨 후 점도계를 이용(Brookfield, Mode LVDV-E) 하여 측정하였다.

다. Probiotic 스타터의 생존에 대한 저장온도의 효과 측정

유산균수의 측정은 37℃에서 72시간 배양한 후에 standard method(APHA, 1985)에 따라 counting하였다.

3. 연구결과

가. 음료의 배합비

WPCH40은 설탕, 구연산, 향료, 색소를 첨가하여 재조합한 mix의 배합비는 Table 2-1에 나타내었다. placebo의 배합비(%)는 각각 20.8, 77.50, 1.15, 0.28, 0.28로, 가수분해 된 WPC와 설탕, 구연산, 향료, 색소를 첨가한 sample 1의 배합비(%)는 각각 20.8, 77.50, 1.15, 0.28, 0.28로 재조합하였고 가수분해 된 WPC와 설탕, 구연산, 향료, 색소에 probiotics를 첨가한 sample 2의 배합비(%)는 각각 20.8, 77.50, 1.15, 0.28, 0.28, 0.1로 제조했다.

Table 2-1. 음료의 배합비

	Placebo	Sample 1	Sample 2
WPC	20.80%	0.00%	0.00%
H-WPC	0.00%	20.80%	20.80%
설탕	77.50%	77.50%	77.40%
구연산	1.15%	1.15%	1.15%
향료	0.28%	0.28%	0.28%
색소	0.28%	0.28%	0.28%
Probiotics	0.00%	0.00%	0.10%
total	100.00%	100.00%	100.00%

나. 재조합된 WPC의 화학적 조성

Table 2-2에서 볼 수 있듯이 재조합된 시료의 단백질함량이 15%에서 22%까지 증가함에 따라 총고형분 함량(20.65-30.14 %)의 증가와 함께 유당함량(3.72-5.41 %), 회분함량(1.04-1.47 %), 지방함량(0.88-1.28 %)의 증가를 보였다.

Table 2-2. 재조합된 음료의 화학적 조성

Chemical components (percent)	Spray dried WPC	Protein (%) (reconstituted WPC)			
		15	18	20	22
Protein	70.13	14.99	17.98	20.04	21.98
Lactose	17.38	3.72	4.43	4.92	5.41
Ash	4.87	1.04	1.21	1.34	1.47
Fat	3.99	0.88	1.05	1.16	1.28
T.S.	96.58	20.65	24.67	27.46	30.14

다. 재조합된 WPC음료의 이화학적 성질

설탕, 구연산, 향료, 색소를 첨가한 WPCH는 각각 15%. 17%, 20%, 22%의 단백질함량으로 재조합 하였다. 그리고 각각 물에 희석하여 음료로 제조하였다. 재조합 정도에 따른 재조합된 WPC의 물리적 특성은 Table 2-3에 나타내었다. 재조합된 WPC 시료의 pH는 단백질 함량이 높아질수록 4.96에서 6.79로 높아지는 경향을 나타냄으로써 0.27에서 0.35까지 변화하는 산도와 상응하는 결과를 나타냈다. 재조합된 시료들의 비중은 1.044, 1.045, 1.046, 1.046으로 단백질 함량에 따라 증가하였다. bulk density는 단백질 함량이 높아질수록 0.66에서 0.83까지 증가하였다. 이 결과로부터 재조합된 시료의 단백질 함량이 증가함에 따라 pH는 감소하였고 산도와 bulk density, 비중은 증가하였다.

Table 2-3. 재조합된 WPCH의 이화학적 특성

Physical properties	Protein(%)			
	15	17	20	22
pH	4.96	4.92	4.87	4.79
TA(%)	0.27	0.30	0.32	0.35
Specific gravity	1.044	1.045	1.046	1.046
Bulk density	0.66	0.71	0.77	0.83

1) WPC음료의 pH

WPC는 설탕, 구연산, 향료, 색소를 첨가한 placebo와 가수분해 된 WPC와 설탕, 구연산, 향료, 색소를 첨가한 sample 1 그리고 가수분해 된 WPC와 설탕, 구연산, 향료, 색소에 probiotics를 첨가한 sample 2로 재조합하였다. 그리고 4℃ 냉장보관과 22℃의 온도유지가 가능한 incubator에서 0-42일 동안 보관한 후 각각 물에 희석하여 pH를 측정하였다. 온도와 시료의 종류에 따라 각기 측정한 pH의 값은 Table 2-4에 나타내었다. 42일 동안 기간이 지남에 따라 placebo의 pH 결과 값은 냉장보관 시 4.39에서 4.24까지 감소하였고 incubator에서 보관 시 4.39에서 4.23까지 감소하는 값을 나타내었다. sample 1의 냉장보관 시 4.27에서 4.16까지 감소하였고 incubator에서 보관 시 4.27에서 4.14까지의 감소하였다. sample 2 또한 냉장보관은 4.26에서 4.11까지 감소하였고 incubator에서 보관은 4.26에서 4.05까지의 감소되는 값을 나타내었다. 대체적으로 냉장보관 보다는 incubator 보관에서 pH 값의 변화가 큰 것으로 보였다. 그리고 sample 1보다 probiotics를 첨가한 sample 2에서 가장 큰 폭으로 감소한 것으로 보아 첨가된 probiotics가 pH를 감소시키는 영향을 끼친 것으로 사료된다.

Table 2-4. 재조합된 WPC음료의 pH 결과

Storage (days)	Placebo		sample 1		sample 2	
	cold room	22℃ incubation	cold room	22℃ incubation	cold room	22℃ incubation
0	4.39	4.39	4.27	4.27	4.26	4.26
14	4.34	4.34	4.24	4.21	4.22	4.20
28	4.29	4.29	4.20	4.18	4.16	4.11
42	4.24	4.23	4.16	4.14	4.11	4.05

2) WPC음료의 TA(titrable acidity)

WPC는 설탕, 구연산, 향료, 색소를 첨가한 placebo와 가수분해 된 WPC와 설탕, 구연산, 향료, 색소를 첨가한 sample 1 그리고 가수분해 된 WPC와 설탕, 구연산, 향료, 색소에 probiotics를 첨가한 sample 2로 제조합 하였다. 그리고 4℃ 냉장보관과 22℃의 온도유지가 가능한 incubator에서 0-42일 동안 보관한 후 각각 물에 희석하여 측정한 TA의 값은 Table 2-5에 나타내었다. 42일 동안 기간이 지남에 따라 TA 결과 값은 placebo의 냉장보관 시 0.18에서 0.25까지 증가하였고 incubator에서 보관은 0.18에서 0.28까지 증가하는 값을 나타내었다. Sample 1의 냉장보관은 0.27에서 0.32까지 증가하였고 incubator에서 보관은 0.27에서 0.36까지의 증가하였다. Sample 2 또한 냉장보관은 0.26에서 0.35까지 증가하였고 incubator에서 보관은 0.26에서 0.39까지 증가하는 값을 나타내었다. 대체적으로 냉장보관 보다는 incubator 보관에서 TA의 변화가 큰 것으로 보였다. 그리고 sample 1보다 probiotics를 첨가한 sample 2에서 가장 큰 폭으로 증가한 것으로 보아 첨가된 probiotics가 TA를 증가시키는 영향을 끼친 것으로 사료된다

Table 2-5. 재조합된 WPC음료의 TA 결과

Storage (days)	Placebo		Sample 1		Sample 2	
	Cold room	22℃ incubation	Cold room	22℃ incubation	Cold room	22℃ incubation
0	0.18	0.18	0.27	0.27	0.26	0.26
14	0.20	0.21	0.28	0.30	0.29	0.30
28	0.22	0.24	0.30	0.33	0.32	0.34
42	0.25	0.28	0.32	0.36	0.35	0.39

3) WPC음료의 비중

WPC는 설탕, 구연산, 향료, 색소를 첨가한 placebo와 가수분해 된 WPC와 설탕, 구연산, 향료, 색소, 물을 첨가한 sample 1 그리고 가수분해 된 WPC와 설탕, 구연산, 향료, 색소에 probiotics를 첨가한 sample 2로 제조합 하였다. 그리고 4℃ 냉장보관과 22℃의 온도유지가 가능한 incubator에서 0~42일 동안 보관한 후 각각 물에 희석하여 측정한 비중의 값은 Table 2-6에 나타

내었다. 42일 동안 기간이 지남에 따라 placebo의 비중 값은 냉장보관 시 1.042, 1.041, 1.040, 1.041의 값을 나타내었고 incubator에서 보관 시 1.042, 1.041, 1.039, 1.039의 비슷한 값을 나타내었다. Sample 1의 냉장보관 시 1.041, 1.042, 1.039, 1.041을 나타내었고 incubator에서 보관 시 1.041, 1.042, 1.041, 1.042의 값을 나타내었다. Sample 2 또한 냉장보관 시 1.042, 1.041, 1.043, 1.040을 나타내었고 incubator에서 보관 시 1.042, 1.041, 1.042, 1.040의 값을 나타내었다. 대체적으로 비중의 값에 큰 차이가 없었다.

Table 2-6. WPC음료의 비중

Storage (days)	Placebo		Sample 1		Sample 2	
	Cold room	22℃ incubation	Cold room	22℃ incubation	Cold room	22℃ incubation
0	1.042	1.042	1.041	1.041	1.042	1.042
14	1.041	1.041	1.042	1.042	1.041	1.041
28	1.040	1.039	1.039	1.041	1.043	1.042
42	1.041	1.039	1.041	1.042	1.040	1.040

4) WPC음료의 bulk density

WPC는 설탕, 구연산, 향료, 색소를 첨가한 placebo와 가수분해 된 WPC와 설탕, 구연산, 향료, 색소를 첨가한 sample 1 그리고 가수분해 된 WPC와 설탕, 구연산, 향료, 색소에 probiotics를 첨가한 sample 2로 제조합 하였다. 그리고 4℃ 냉장보관과 22℃의 온도유지가 가능한 incubator에서 0-42일 동안 보관한 후 각각 물에 희석하여 측정한 bulk density의 값은 Table 2-7에 나타내었다. 42일 동안 기간이 지남에 따라 bulk density 값은 placebo의 냉장보관은 0.95, 0.96, 0.95, 0.94를 나타내었고 incubator에서 보관은 0.95, 0.95, 0.95, 0.96의 각각 비슷한 값을 나타내었다. sample1의 냉장보관은 0.76, 0.76, 0.77, 0.77의 값을 나타내었고 Incubator에서 보관은 0.76, 0.76, 0.77, 0.75의 각각 비슷한 값을 나타내었다. sample 2 또한 냉장보관은 0.77, 0.76, 0.76, 0.77의 값을 나타내었고 incubator에서 보관은 0.77, 0.76, 0.76, 0.77의 각각 비슷한 값을 나타내었다. 대체적으로 bulk density의 값에 큰 차이가 없었다. Placebo의 값이 sample 1과 sample 2보다 높은 값을 나타낸 것은 WPCH의 가수분해 후 동결건조 시 부피가 증가했기 때문인 것으로 사료된다.

Table 2-7. WPC음료의 bulk density

Storage (days)	Placebo		Sample 1		Sample 2	
	Cold room	22℃ incubation	Cold room	22℃ incubation	Cold room	22℃ incubation
0	0.95	0.95	0.76	0.76	0.77	0.77
14	0.96	0.95	0.76	0.76	0.77	0.76
28	0.95	0.95	0.77	0.77	0.78	0.76
42	0.94	0.96	0.77	0.75	0.77	0.77

5) WPC의 효소 가수분해를 위한 공정의 최적화

여러 종류의 단백질함량으로 재조합된 분무 건조된 WPC는 neutrase, trypsin, chymotrypsin 효소를 사용하여 가수분해 하였고 가장 적합한 가수분해 조건을 조사했다. 효소의 종류, 효소와 기질의 비율이 가수분해도에 끼치는 영향과 관련된 결과는 Table 2-8과 Table 2-9에 나타내었다.

Table 2-8. Enzymatic hydrolysis with different proteolytic enzymes

Time (min)	Enzyme		
	Neutrase	Trypsin	Chymotrypsin
	Degree of hydrolysis (%)		
20	4.17	2.79	3.43
40	4.58	3.22	4.21
60	5.03	3.87	4.59
90	5.82	4.29	4.97
120	6.02	4.68	5.33
150	6.19	4.84	5.59
180	6.31	5.01	5.75
CD		0.14	

Table 2-9. Effect of various E: S ratio of neutrase enzyme on hydrolysis of WPC

Time (min)	E:S ratio CD			CD
	1:25	1:50	1:100	
20	4.14	3.87	3.39	0.231
40	4.55	4.29	2.81	
60	5.01	4.53	4.07	
90	5.83	4.80	4.39	
120	6.08	5.04	4.66	
150	6.34	5.29	4.90	
180	6.57	5.50	5.12	
240	6.69	5.59	5.18	
CD		0.243		

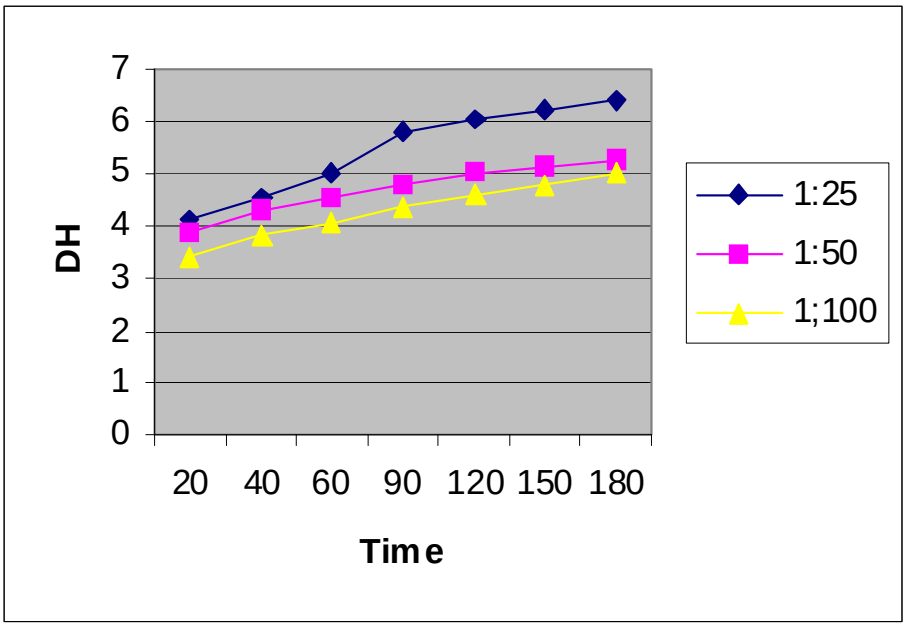


Fig. 2-1. Effect of various E: S ratio of neutrase enzyme on hydrolysis of WPC.

6) 효소의 가수분해도의 성능비교

가수분해도를 측정한 결과 얻어진 여러 종류 효소의 성능은 Table 2-10에서 나타내었다. neutrase, trypsin, chymotrypsin을 사용하여 가수분해를 실시했을 때 3시간 배양후 가수분해도는 6.31, 5.01, 5.75을 나타내었다. Neutrase는 chymotrypsin (5.75 %) 과 trypsin (5.01 %)의 성능과 비교할 때 6.31의 높은 가수분해도치를 나타냈다. 통계분석으로부터 사용된 효소의 종류는 가수분해도에 유의한 영향을 끼친다는 것이 입증되었다. WPC의 가수분해에는 neutrase가 가장 효과가 좋았고 그 다음으로는 chymotrypsin 과 trypsin의 순서이었다. Table 2-10에 나타난 결과를 토대로 하여 neutrase 효소를 사용할 때의 효소의 이용가능성, 효율성 및 가격에 대한 문제가 검토되었다.

Table 2-10. Enzymatic Hydrolysis with different proteolytic enzymes

Time (min)	Enzyme		
	Neutrase	Trypsin	Chymotrypsin
	Degree of hydrolysis(%)		
20	4.17	2.79	3.43
40	4.58	3.22	4.21
60	5.03	3.87	4.59
90	5.82	4.29	4.97
120	6.02	4.68	5.33
150	6.19	4.84	5.59
180	6.31	5.01	5.75
CD		0.14	

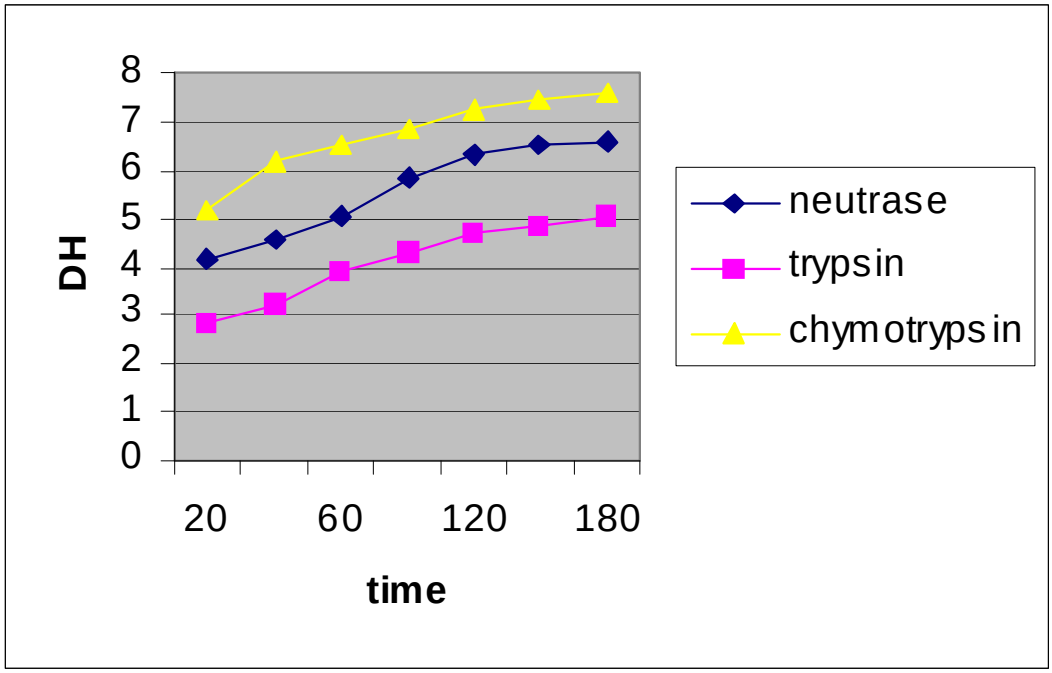


Fig. 2-2. Enzymatic Hydrolysis with different proteolytic enzymes

7) 가수분해된 WPC로부터 제조된 음료의 선호도

5, 6, 7, 8% 가수분해도로 가수분해된 WPC를 설탕, 구연산, 색소, 향료를 혼합하여 음료 제조에 사용하였다. 가수분해도 6%로 가수분해된 WPC 가수분해물로부터 제조된 음료가 7, 8%의 가수분해도를 가진 음료와 비교하여 선호도가 높게 나타났다. 6%보다 높게 가수분해할 때 관능검사의 모든 항목에서 낮은 점수를 나타냈다. 가수분해도가 5, 6, 7, 8%로 가수분해된 WPC로 제조된 음료의 스코어는 모든 평가항목에서 7.79, 7.78, 7.52와 7.20 (Table 2-11)이었다. 평균 스코어의 감소폭은 풍미와 감도에서 보다 유의하게 높이 나타났다. 가수분해도가 6, 7%로 가수분해된 WPC로부터 제조된 음료수에서 풍미는 7.78과 7.51로, 감도는 7.81, 7.25로 나타났다.

Table 2-11. Effect of degree of hydrolysis on acceptability of beverage prepared from hydrolysed WPC

Extent of hydrolysis(%)	Sensory attributes			
	Colour & appearance	Flavour	Sweetness	Overall acceptability
5	7.78	7.75	7.83	7.79
6	7.76	7.78	7.81	7.78
7	7.61	7.51	7.25	7.52
8	7.67	7.13	7.19	7.20
CD	0.232	0.252	0.245	0.239

8) 가수분해된 WPC 음료의 전체적인 선호도에 대한 설탕과 구연산의 효과

가수분해도 6%로 가수분해된 WPC에 설탕과 구연산의 함량을 변화시킨 후 음료를 제조하였다. 설탕의 함량을10, 12, 14, 15 및 16%로 하고 구연산은 0.1, 0.25, 0.3%로 하여 제조한 음료의 스코어는 Table 2-12에서 볼 수 있다. 이 결과로부터 보듯이 15% 이상의 설탕을 함유한 음료에서 스코어는 유의하게 증가하였고 전체적인 선호도는 감소했다. 구연산이 많이 첨가되면 설탕요구량도 유의하게 변화한다. 음료수에서 구연산 함량이 증가함에 따라 각각의 점수는 0.25%까지 증가했고 전체적인 선호도는 유의하게 감소하였다. 15% 설탕과 0.25% 구연산을 배합하여 제조한 음료는 다른 배합과 비교할 때 전체적인 선호도는 8.14의 높은 점수를 나타냈다.

Table 2-12 Effect of sugar and citric acid level on overall acceptability of HWPC beverage

Sugar (%)	Citric acid (%)			CD
	0.1	0.25	0.30	
10	4.14	3.87	3.39	
12	4.55	4.29	2.81	
14	5.01	4.53	4.07	0.163
15	5.83	4.80	4.39	
16	6.08	5.04	4.66	
CD		0.189		

9) 가수분해된 WPC로부터 제조한 음료의 침전물형성에 대한 안정제의 효과

단백질 함량을 0.50, 1.0, 1.5 및 2.0%로 변화시킨 가수분해된 WPC 음료에 xanthum gum의 양을 달리하여 첨가하였다. 저장기간 동안 육안으로 관찰한 침전결과는 Table 2-13에서 볼 수 있다. 단백질 함량이 0.5-2.0%로 증가했을 때 침전물은 뚜렷이 증가했다. 그러나 0.05-2.0의 안정제를 첨가했을 때 침전물을 형성하는 정도가 감소하였고 음료의 단백질함량이 0.05와 1.0%일 때는 침전물이 생기지 않았다. 단백질함량 1%와 안정제의 함량이 0.15%로 제조된 음료는 다른 배합과 비교하여 조직형성이 양호했고 침전이 형성되지 않았다.

Table 2-13: Effect of xanthum gum on sedimentation of beverage prepared from HWP

Stabilizer (%)	Protein (%			
	0.5	1.0	1.5	2.0
	Extent of sedimentation			
0.05	+ +	+ +	+ + + +	+ + + +
0.10	+	+	+ + +	+ + +
0.15	-	-	+ +	+ +
0.20	-	-	+	+

+ + + +	-	High sediment
+ + +	-	Medium sediment
+ +	-	Low sediment
+	-	Insignificant
-	-	Nil

10) 분무건조된 WPC 가수분해물로부터 제조된 음료의 선호도에 대한 단백질함량의 효과

18% 단백질함량인 WPC 가수분해물을 0.5, 1.0, 1.5, 2.0%의 단백질함량으로 재조합한 후 설탕, 구연산, 색소 그리고 향료의 요구량의 농도로 혼합하였다. 여러 종류의 단백질 함량에서 실험한 결과 1.0%단백질함량으로부터 제조된 음료는 높은 단백질함량(1.5, 2.0%)과 비교하여 더 나은 결과를 나타냈다. 단백질 함량이 1.0%이상으로 증가할 때 전체적 선호도와 관련된 스코어는 유의하게 감소하였다. Table 2-14에서 보듯이 0.5, 1.0, 1.5, 2.0% 단백질 함량으로 제조된 음료의 전체적 선호도에 대한 스코어는 7.74, 7.76, 7.58, 7.41로 나타났다. 풍미와 감도 스코어 에서 감소정도는 유의하게 높았다. 1.0%와 1.5%의 단백질함량에서 풍미에 대한 스코어는 7.73, 7.54이고. 감도 스코어는 7.85와 7.69를 나타냈다.

Table 2-14: Effect of different protein level on acceptability of beverage prepared from Hydrolysed WPC

Protein (%)	Sensory attribute			
	Colour & appearance	Flavour	Sweetness	Overall acceptability
0.5	7.65	7.69	7.84	7.74
1.0	7.66	7.73	7.85	7.76
1.5	7.68	7.54	7.69	7.58
2.0	7.67	7.47	7.13	7.41
CD	0.158	0.147	0.144	0.153

11) 분무건조된 WPC 가수분해물의 물리 화학적 특성에 대한 가공공정의 효과

고형분함량 25%(18% 단백질)로 재조합 한후 6%가수분해도를 갖도록 가수분해한 WPC를 설탕(5, 10, 15, 20%)의 함량을 달리하여 고형분 함량이 30, 35, 40, 45%가 되도록 혼합했다. 이어서 여러 종류의 outlet 온도에서flow rate을 조절하며 건조하였다. 여러 종류의 고형분함량과 건조 온도 배합과 관련된 분무 건조된 제품의 이화학적 특성에 대한 실험결과는 아래와 같다.

12) 분무건조된 WPC 가수분해물의 수분 함량에 대한 outlet 공기 온도와 총고형분의 효과

총고형분과 outlet 온도의 여러 종류의 배합이 분무 건조된 WPC가수분해물의 수분함량에 대한 효과는 Table 2-15에서 볼 수 있다. Table 2-15에서 보듯이 분무건조 시 outlet 온도가 증가하면 분말의 수분함량은 모든 고형분 함량에서 유의하게 감소한다. 700℃의 outlet 온도의 수분함량은 30, 35, 40, 45%의 고형분함량에서 각각 4.43, 4.84, 5.01, 5.19로 나타났다. 750℃의 outlet 온도에서수분함량은 상기 고형분함량에서 각각 4.21, 4.38, 4.75, 5.01으로 나타났다.

Table 2-15 Effect of outlet air temperature and feed total solids on moisture content of enzymatically hydrolysed spray-dried WPC

Outlet temperature (0℃)	Total solids(%)			
	30	35	40	45
	Moisture content(%)			
70	4.43	4.84	5.01	5.19
75	4.21	4.38	4.75	5.01
80	4.02	4.16	4.58	4.87
85	3.80	3.92	4.14	4.69
CD	0.130			

13) 분무건조된 WPC 가수분해물의 bulk density에 대한 outlet 공기 온도와 총 고형분의 효과

Table 2-16에서 볼 수 있듯이 고형분 함량이 30%에서 45%로 증가하면 모든 outlet 공기 온도(70~85℃)에서 bulk density는 유의하게 증가한다. 그러나 outlet 온도가 70℃에서 85℃로 증가하면 모든 고형분 함량에서 bulk density는 감소한다. 75℃ outlet 온도에서 bulk density는 30, 35, 40, 45%의 총고형분 함량에서 각각 0.41, 0.44, 0.50, 0.54 g/ml으로 나타났다. 이는 단백질 농축물에서 총고형분 함량과 분무건조의 outlet 공기온도가 분말의 bulk density에서 명백한 영향을 끼친다는 것을 의미한다.

Table 2-16. Effect of outlet air temperature and feed total solids on bulk densityof enzymatically hydrolysed spray dried WPC

Out let temperature (℃)	Total solids(%)			
	30	35	40	45
	Bulk Density(g/ml)			
70	0.45	0.48	0.53	0.58
75	0.41	0.44	0.50	0.54
80	0.35	0.39	0.44	0.45
85	0.30	0.34	0.37	0.39
CD	0.043			

14) 분무건조된 WPC 가수분해물의 불용성 지수에 대한 outlet 공기 온도와 총고형분의 효과

분무건조된 WPC 가수분해물의 불용성 지수는 단백질 농축물에서 건조온도와 총고형분 함량과 영향을 받은 것으로서 그 결과는 Table 2-17에 나타내었다. 이 결과에서 분명한 사실은 총고형분함량이 30%에서 45%로 증가함에 따라 모든 outlet 온도에서 불용성 지수가 유의하게 증가하였다. 이와 유사하게 outlet 온도가 70℃에서 85℃로 증가하면 모든 총고형분함량에서 불용성지수는 유의하게 증가했다. 75℃에서 총고형분함량이 30, 35, 40, 45%로 건조 되었을 때 불용성 지수는0.67, 0.72, 0.78, 0.88로 나타났다. 85℃ outlet 공기 온도일 때 불용성 지수는 상기 총고형분에서 0.85, 0.89, 0.94, 0.99로 나타났다.

Table 2-17. Effect of outlet air temperature and feed total solids on insolubility index of enzymatically hydrolysed spray dried WPC

Outlet temperature (℃)	Total solids(%)			
	30	35	40	45
	Insolubility index			
70	0.64	0.68	0.75	0.84
75	0.67	0.72	0.78	0.88
80	0.75	0.81	0.87	0.95
85	0.85	0.89	0.94	0.99
CD	0.048			

15) 분무 건조된 WPC 가수분해물의 HMF 함량에 대한 outlet 공기 온도와 총고형분의 영향

건조조건 변화가 HMF로 측정된 갈변화반응의 정도에 대한 효과는 Table 2-18에 나타내었다. 이 결과에서 분명한 것은 outlet 온도와 총고형분 모두 갈변화 정도에 지대한 영향을 끼친다는 사실이다. 총고형분함량이 30%에서 35%로 증가함에 따라 모든 outlet 온도에서 갈변화가 유의하게

증가하지 않았다. 그러나 35%이상의 총고형분 함량에서 HMF 함량은 유의하게 증가하였다. 이와 유사하게 75℃이상의 outlet 온도에서 갈변화 증가의 정도는 그다지 크지 않았다. 75℃ 이상에서 갈변화의 증가는 매우 유의하게 나타났다. HMF 함량은 각각 총고형분 함량이 30, 35, 40, 45%일 때 2.90, 2.92, 3.09, 3.32 μmol/100 g를 나타냈다. outlet 온도가 80℃일 때 각각의 HMF 함량은 3.06, 3.12, 3.26, 3.55 μ mol/100 g였다.

Table 2-18. Effect of outlet air temperature and feed total solids on HMF content of enzymatically hydrolysed spray dried WPC

Outlet Temperature (℃)	Total solids(%)			
	30	35	40	45
	HMF content (μ mol/100g)			
70	2.84	2.87	3.02	3.26
75	2.90	2.92	3.09	3.32
80	3.06	3.12	3.26	3.55
85	3.24	3.37	3.52	3.79
CD	0.077			

16) probiotic 스타터의 활성에 대한 접종량의 효과

멸균한 유청에 probiotic 스타터(*Lactobacillus acidophilus, Bifidobacterium bifidium*)를 첨가하여 37℃에서 배양하였다. Probiotics 의 활력은 pH와 산생성에 의해 3시간 간격으로 측정했다. 실험결과는 Tables 2-19에 나타내었다.

Table 2-19. Effect of extent of inoculum on the activity of *Lactobacillus acidophilus*

Incubation (h)	Level of inoculation (%)					
	4		5		6	
	pH	Acidity	pH	Acidity	pH	Acidity
6	4.87	0.324	4.85	0.342	4.80	0.36
9	4.84	0.341	4.82	0.350	4.74	0.378
12	4.80	0.369	4.77	0.378	4.70	0.414
15	4.72	0.405	4.69	0.414	4.62	0.486
18	4.66	0.416	4.63	0.441	4.55	0.519
21	4.62	0.420	4.59	0.447	4.51	0.524

17) *Lactobacillus acidophilus*의 활력에 대한 접종량의 효과

pH와 산생성으로 측정한 *Lactobacillus acidophilus*의 활력과 관련된 결과는 Table 2-20에 나타내었다. 접종량 4%에서 6시간에서 18시간 동안 배양했을 때 배양 기간이 증가함에 따라 pH(4.87 to 4.66)는 감소하였고 산도(0.324 to 0.416% LA)는 증가하였다. 그러나 배양 18시간 후에 pH의 감소 정도와 산도 증가 정도는 유의하지 않았다. 이와 유사한 결과는 5%와 6%의 접종량에서 나타났다. 접종량 5%, 6%와 모든 배양기간에서 4% 접종량과 비교했을 때 pH의 감소와 산도의 증가는 유의하지 않았다.

Table 2-20. Effect of extent of inoculum on the activity of *Lactobacillus acidophilus*

Incubation (h)	Level of inoculation(%)					
	4		5		6	
	pH	Acidity	pH	Acidity	pH	Acidity
6	4.87	0.324	4.85	0.342	4.80	0.36
9	4.84	0.341	4.82	0.350	4.74	0.378
12	4.80	0.369	4.77	0.378	4.70	0.414
15	4.72	0.405	4.69	0.414	4.62	0.486
18	4.66	0.416	4.63	0.441	4.55	0.519
21	4.62	0.420	4.59	0.447	4.51	0.524

18) *Bifidobacterium bifidum*의 활력에 대한 접종량의 효과

pH와 산생성에 의해 측정한 *Bifidobacterium bifidum*의 활력과 관련된 결과는 Table 2-21에 나타내었다. 4% 접종량에서 배양시간이 6시간에서 18시간으로 증가함에 따라 pH(4.95 to 4.70)는 감소하였고 산도(0.315 to 0.409 % LA)는 증가하였다 그러나 배양 18시간 후에 pH의 감소와 산도 증가는 유의하지 않았다. 유사한 관찰은 5%와 6%의 접종량에서 나타났다. *Bifidobacterium bifidium* 스타터를 5%와 6%로 접종했을때 배양 기간 동안의 pH의 감소와 산도 증가에 대한 효과는 유의하지 않았다.

Table 2-21. Effect of extent of inoculum on the activity of *Bifidobacterium bifidum*

Incubation (h)	Level of inoculation(%)					
	4		5		6	
	pH	Acidity	pH	Acidity	pH	Acidity
6	4.95	0.315	4.92	0.321	4.90	0.323
9	4.91	0.327	4.89	0.334	4.86	0.336
12	4.85	0.365	4.83	0.371	4.81	0.397
15	4.78	0.398	4.76	0.406	4.73	0.425
18	4.70	0.409	4.68	0.413	4.65	0.427
21	4.68	0.414	4.66	0.417	4.62	0.432

19) 건조된 WPC 가수분해물에서 probiotics의 생존율에 대한 건조기술과 스타터 함량 변화의 효과

Table 2-22에 건조유형과 접종량에 따른 *Lactobacillus acidophilus*와 *Bifidobacterium bifidium*의 생존율을 나타내었다. 표에서 볼 수 있듯이, 접종양은 *Lactobacillus acidophilus*와 *Bifidobacterium bifidium*의 생존력에 유의한 영향을 끼치지 않았다. 그러나 건조 유형은 *Lactobacillus acidophilus*와 *Bifidobacterium bifidium* 생존율에 유의한 영향을 끼쳤다. 분무 건조 시료에서 *Lactobacillus acidophilus*의 수치는 4.49 log cfu/g 이었다. 반면에 fluid bed drying에서는 거의 두 배의 수치를(8.64 log cfu/g) 보였다. 이는 분무 건조가 *Lactobacillus acidophilus*의 생존율에 악영향을 끼친다는 것을 의미한다. 이와 유사하게 *Bifidobacterium bifidium*의 숫자는 4.18 log cfu/g 이었다. 반면에 fluid bed drying에서는 거의 두 배의 수치를(8.22 log cfu/g) 보였다. 분무건조가 *Bifidobacterium bifidium*의 생존에 악영향을 끼친다는 것을 의미한다.

Table 2-22. Effect of drying techniques on viability of probiotic culture

Culture level (%)	LA		BB	
	Spray dried	Fluid bed dried	Spray dried	Fluid bed dried
	Viability(log cfu/g)			
4	4.49	8.64	4.18	8.22
5	4.47	8.83	4.32	8.49
6	4.72	8.91	4.38	8.65
CD	0.09	0.12	0.14	0.178

20) Probiotics를 첨가한 음료의 관능적 특성

단백질 함량 1.0%에 *Lactobacillus acidophilus* 와 *Bifidobacterium bifidium* 스타터를 첨가한 환원 음료의 관능적 특성을 Table 2-23에 나타내었다. Lactobacillus acidophilus 와 *Bifidobacterium bifidium*배양균을 혼합해서 재조합한 음료에 주어진 점수는 상당한 차이가 없는 것이 분명히 나타났다. Lactobacillus acidophilus와 *Bifidobacterium bifidium* 스타터를 첨가한 음료의 전체적인 선호도 점수는 각각 7.82와 7.84였다.

Table 2-23. Sensory characteristics of beverages prepared from probiotics enriched beverage mix

Type of beverage	Colour & Appearance	Flavour	Sweetness	Overall acceptability
LA	7.82	7.79	7.92	7.82
BB	7.88	7.83	7.90	7.84
CD	0.12	0.09	0.14	0.07

21) Probiotics를 첨가한 음료의 이화학적 특성

적정한 건조기술을 이용하여 건조된 WPC 가수분해물에 설탕, 구연산, 색소, 향료, 안정제, 스타터(LA, BB)를 혼합하여 fluidized bed에서 건조하여 인스턴트 형태로 만들었다. 이 공정은 fig. 1에 나타내었고 이 제품의 이화학적에 특성에 관한 결과는 Table 2-24에 나타내었다. 제품의 pH와 불용성지수, bulk density의 값은 4.60, 0.28ml, 0.73g/ml 각각 나타내었다. 건조된 생산물의 WPNI와 HMF는 55.23 mgN/100 g과 3.42μ mol/100 g 로 나타났다. 일반성분 값은 단백질 7.14%, 유당 1.80%. 회분 2.60%, 설탕 85.21% 그리고 수분은 2,75% 이었다.

Table 2-24. Physicochemical characteristics of probiotics enriched beverage mix

Trials	Physical characteristics			Chemical characteristics					
	pH	Insolubility index	Bulk density	WPNI (mg N/g)	HMF (mol /100 g)	Protein (%)	Lactose (%)	Moisture (%)	Ash (%)
1	4.62	0.28	0.71	54.75	3.39	7.10	1.75	2.74	2.58
2	4.58	0.26	0.73	55.46	3.41	7.16	1.82	2.72	2.62
3	4.60	0.29	0.75	55.19	3.43	7.13	1.81	2.76	2.63
Average	4.60	0.28	0.73	55.23	3.42	7.14	1.80	2.75	2.60

22) Probiotic 스타터의 생존에 대한 저장온도의 효과

*Lactobacillus acidophilus*와 *Bifidobacterium bifidium*의 생존율에 대한 저장온도의 영향에 관한 결과는 Table 2-25에서 볼 수 있다. 표에서 나타난 결과에서 알 수 있듯이 냉장온도에서 LA와 BB를 첨가한 인스턴트 재조합 분말의 저장 시 LA와 BB의 생균측정에서 유의한 감소는 없었다. 생균수는 저장초기 8.96 log cfu/g이었고 90일후 균수는 8.16 log cfu/g로 변함없이 나타났다. 이와 유사하게 3개월 동안의 저장 전의 균수는 8.77고 저장 3개월 후의 균수는 8.15로 불리한 영향이 없었음을 알 수 있다. 그러나 실온에서의 저장은 3개월 후 균수가 유의하게 감소했다. 저장초기에 8.96 와 8.77 log cfu/g의 생균이 LA 와 BB에서 측정되었다. 이에 대하여 90일 후의 측정 때에는 7.76 와 7.65 log cfu/g 로 나타났다. 그렇다 해도 균수는 수용 가능한 범위에서 존재하였다(10^7cfu/g).

Table 2-25. Effect of storage temperature on viability of Probiotic cultures

Storage (days)	LA		BB	
	Room temperature (Log cfu/g)	Refrigerated temperature (Log cfu/g)	Room temperature (Log cfu/g)	Refrigerated temperature (Log cfu/g)
0	8.96	8.96	8.77	8.77
15	8.79	8.87	8.62	8.68
30	8.58	8.76	8.46	8.58
45	8.39	8.60	8.29	8.43
60	8.24	8.45	8.08	8.27
75	8.01	8.31	7.92	8.09
90	7.76	8.16	7.65	7.92
CD	0.26	0.23	0.28	0.23

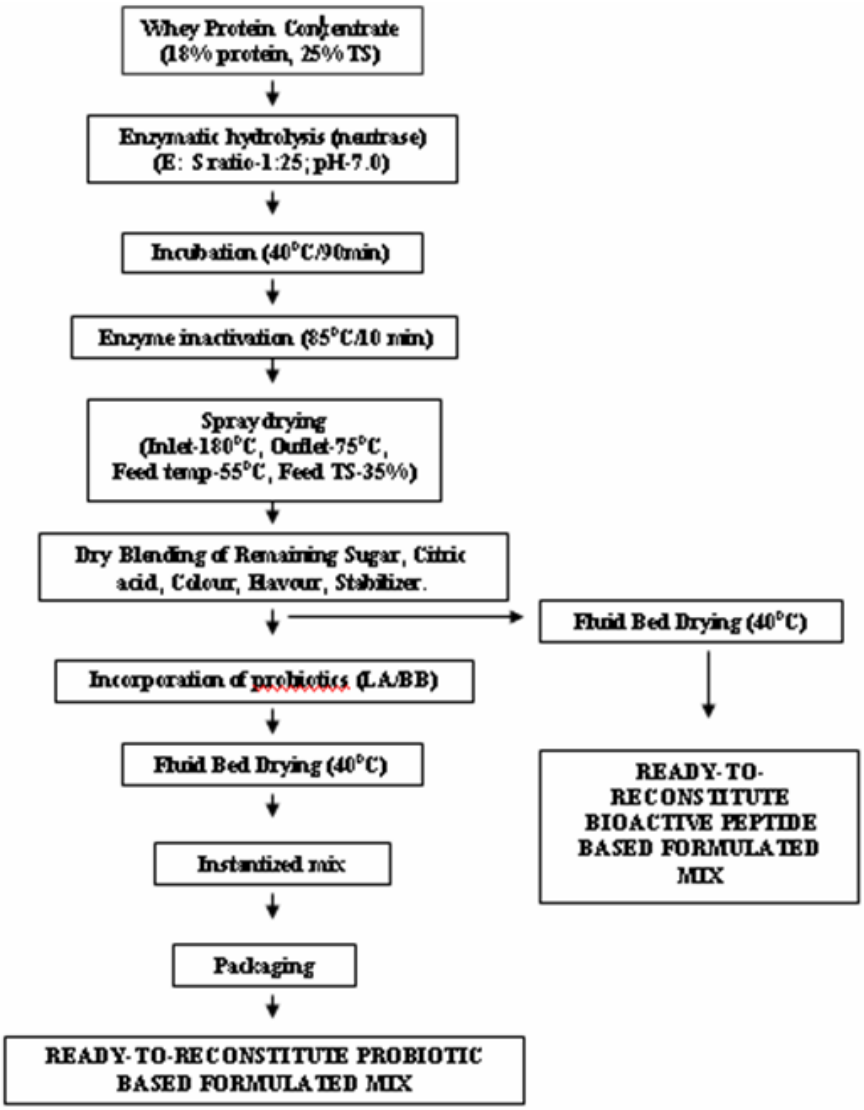


Fig. 2-3. Flow diagramfor ready-to-use whey protein and probiotic beverage mix.

23) 가수분해된 유청단백질 시료(WPCH)의 생리활성 펩타이드 분석

유청단백질의 주성분인 β-Lactoglobuline과 α-Lactalbumine은 alcalse, neutrase, protamax, flavourzym으로 3시간과 4시간 동안 가수분해했다. WPCH80은 단백질함량 80%의 가수분해물을 WPCH40은 단백질 함량 40%의 가수분해물을 의미한다.

Table 2-26. Enzymatic hydrolysis of whey protein

No.	Description	Enzyme	Duration of hydrolysis(hr)
M1	WPCH80	Alcalase	3
M2	WPCH80	Flavourzyme	3
M3	WPCH80	Neutrase	3
M4	WPCH80	Protamex	3
M5	WPCH80	Alcalase	4
M6	WPCH80	Flavourzyme	4
M7	WPCH80	Neutrase	4
M8	WPCH80	Protamex	4
M11	WPCH40	Alcalase	3
M12	WPCH40	Neutrase	3

Massspectrometer(MS) 분석에 의해 Table 2-27에서 볼 수 있는 생리활성 펩타이드의 존재를 확인했다. M은 분자량을 의미하고 [M+H]+ 는 단순 하전된, [M+H]2+ 는 이중으로 하전 된 분자 이온을 뜻한다.

Table 2-27. Molecular weight and electric charge of peptide

Peptide	M	[M+H]+	[M+2H]2+
YGLF	498,25487	499,25566	250,62862
YLLF	554,31747	555,31826	278,65992
LAMA	404,21638	405,21717	203,609375
LDAQSAPLR	969,53141	970,5322	486,26689
ALPMHIR	836,47611	837,4769	419,73924
YL	294,16499	295,16578	148,58368
VGINWLAHKAL	1220,71001	1221,7108	611,85619

YGLF: tyr-gly-leu-phe

YLLF: tyr-leu-leu-phe

LAMA: leu-ala-met-ala

LDAQSAPLR: leu-asp-ala-gln-ser-ala-pro-leu-arg

ALPMHIR: ala-leu-pro-met-his-ile-arg

YL: tyr-leu

ESI/MS 측정에 의해 7개의 찾으려고 하는 펩타이드 중에서 다음 5개의 생리활성펩타이드가 검출되었다. 특히 alcalase 처리된 시료에서(M1, M5, M11) 많은 펩타이드가 검출되었다. 시료 M1에서 발견된 펩타이드는 YGLF, YLLF, LAMA, LDAQSAPLR, YL,시료 M5에서 발견된 펩타이드는 YGLF, 시료 M11에서 발견된 펩타이드는 YGLF, YLLF, LAMA, LDAQSAPLR 이었다. Protamax 처리한 시료 M4와 M8에서도 한두개 펩타이드가 검출되었다. 시료 M4에서 발견된 펩타이드는 YGLF, YL, 시료 M8에서 발견된 펩타이드는 YGLF 이었다. Flavorzyme 과 Neutrase (시료 M2, M3, M4, M7) 처리된 시료에서는 찾으려는 펩타이드가 검출되지 않았다. 단지 시료 M12에서 5개 펩타이드 검출되었다. Neutrase 처리한 시료 M12에서 발견된 펩타이드는 YGLF, YLLF, LAMA, LDAQSAPLR, YL 가수분해 시간과 생성된 펩타이드와의 관계에서 발견된 것은 4시간 동안 분해한 시료에서 찾으려는 펩타이드가 3시간동안 분해한 시료보다 적게 검출되었다. 이 같은 결과는 분해시간이 길어짐에 따라 펩타이드 분해가 짧은 분해시간에서 보다 강하게 일어났다는 사실을 뜻한다고 볼 수 있다. 즉, alcalase 가수분해 한 시료 M1에서 3시간 가수분해시 5개의 펩타이드가 검출된 반면에 4시간 가수분해된 시료 M5 에서는 찾으려는 펩타이드에서 한개만 검출되었다. 전체의 스펙트럼은 복잡하므로 찾으려는 펩타이드 중에서 몇 개는 숨어 있을 가능성이 있다.

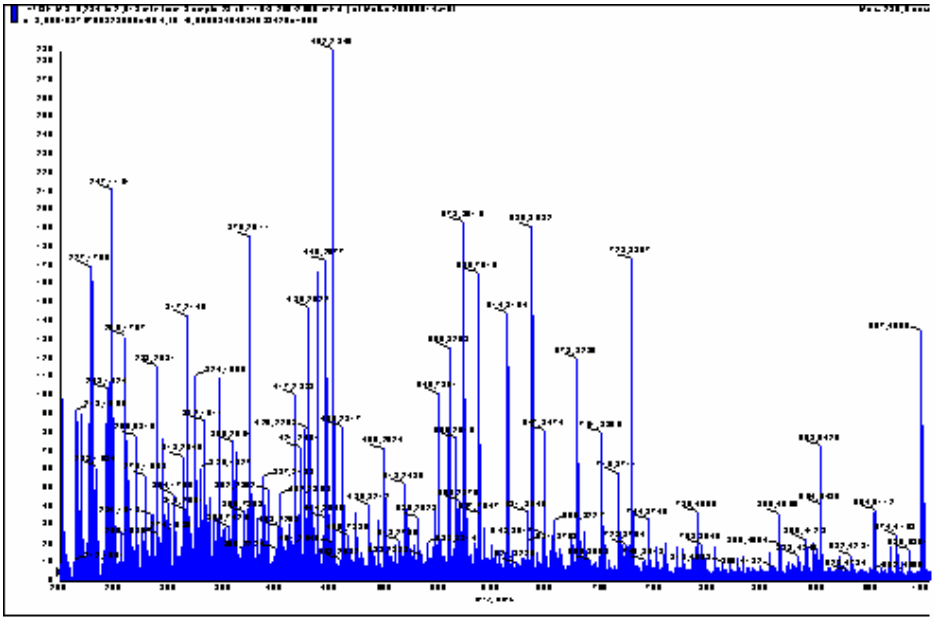


Fig. 2-4. ESI-MS spectrum of hydrolyzed whey protein.

24) 기능성 건강음료의 제조

재조합된 WPC 가수분해물의 특성 실험 및 가수분해된 유청단백질 시료(WPCH)의 생리활성 펩타이드 분석결과를 토대로 하여 alcalase로 3시간 처리한 WPCH40 을 음료제조용으로 사용했다. 재조합된 WPC의 단백질 함량은 20%이고 음료의 단백질은 1%로 하였다. 배합이 끝난 음료 mix는 -50℃의 온도로 동결건조를 하였고 이때 가수분해도는 3.53%이었다.

제 3 절 유용 프로바이오틱 유산균의 특성 및 건강 기능성 조사

1. 서 론

생균제 (probiotic)라는 용어는 'for life' 라는 의미의 그리스어에서 유래한 것으로 '원생동물에 의하여 생성된 물질로서 다른 원생동물의 생장을 촉진시키는 것'으로 맨 처음 정의되었다. 그 후에 '장내 미생물 균형에 기여하는 미생물과 물질'로 정의되었으나, 이는 항생제를 포함하는 의미를 가져 만족할만한 내용이 되지 못하였다. Fuller는 항생제와 미생물 촉진제를 제외한 의미로 '장내 미생물 균총의 균형을 개선시켜 숙주동물에게 유익한 영향을 주는 살아있는 미생물 사료 첨가제'로 다시 정의하였고, 뒤이어 '섭취시 장내 미생물상의 성질을 개선시켜 숙주에 유익한 영향을 주는 살아있는 미생물의 단독 또는 복합균주'로 정의하였다. 최근 들어 유럽의 전문가들은 미생물 균총의 조정만이 아니고 작용기작까지도 포함하는 것으로 범위를 넓히고 있으며, 생균제의 효과를 증명하는 최근의 응용과 과학적 자료는 식품뿐 아니라, 건강증진효과가 보고된 다른 응용분야에도 사용하고 있다. 미생물 세포 뿐만 아니라 세포의 대사산물도 숙주의 건강을 증진시키는 것이 관찰되었으나, 이에 의한 유용효과는 현재의 정의에는 포함되지 않고 있다. Lee와 Salminen 등은 생균제는 인체나 동물의 건강을 증진시키기 위하여 고안된 식품 및 사료 또는 식이첨가제에 들어있는 살아있는 미생물 제제라고 정의하였다. 이와 같은 생균제는 장내 균총의 안정화, 유해세균의 정착 억제에 따른 부패산물 생성 감소 및 경감, 변비억제 등의 기능을 갖고 있다고 알려져 있다. 따라서 기능성 식품으로 생균제를 이용하려는 제품 개발 및 연구가 활발하게 이루어지고 있다. 한편, 생균제로서 필요한 특성은 안전성, 기능적 측면(생존성, 정착성, 서식성, 항미생물제 생성능, 면역촉진능, antigenotoxic 활성, 병원성 세균의 억제능), 기술적 측면(관능적 특성, 안정성, bacteriophage 저항성, 제조과정 중의 생존성)에 있어서 우수성이 있어야 하고, 그리고 GRAS (Generally Recognized As Safe) 미생물로서 장내 생존력이 커야 한다는 것 등이다.

Lactic acid bacteria(LAB)는 인간이 이용할 수 있는 가장 유익한 미생물의 한 종류로서 오래 전부터 발효 유제품 (발효유, 치즈 등)을 중심으로 각종 장류, 김치, 발효 소세지, 의약품 및 가축의 사료첨가제에 이르기까지 그 특성에 따라 인류생활에 광범위하게 활용되면서 인류의 생활에 직접, 간접적으로 밀접한 관계를 맺고 있으며, 지금까지 유산균은 300~400여종이 있는 것으로 알려져 있다. 이들은 균의 형태, 발효 형식, 산소 내성 등의 성상에 따라 *Lactobacillaceae*에 속하는 *Streptococcus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus*, *Lactobacillus*와 *Actinomycetaceae*에 속하는 *Bifidobacterium*, 그리고 *Bacillacea*에 속하는 *Sporolactobacillus*의 6가지 genus로 구분된다. 유산균은 발효 유제품의 starter로 이용될 뿐만 아니라 장내 세균균총의 안정화, 위장관 내 병원균의 증식억제, 혈중 콜레스테롤의 저하, 특이·비특이 면역 반응의 유도 및 영양소 이용의 향상, 암 퇴화 및 장내 효소 활성 감소로 결장암의 예방 효과, 그리고 비타민과 같은 인체 유용물질의 합성에 의한 영양 및 건강증진 효과를 목적으로 광범위하게 이용되고 있다.

본 연구의 목적은 유용 유산균 NK34균을 동정하고, 프로바이오틱 생균의 주요 특성인 인공위액 및 인공담즙에 대한 내성 및 효소생산성, 항생물질에 대한 내성, 항산화 활성측정, 콜레스테롤 저하 효능과 같은 기능성을 검토하여 프로바이오틱 균주로서의 이용 가능성을 확인하는데 있다.

2. 연구내용 및 방법

가. 균주 및 배지

본 연구에서 선별된 *Lactococcus lactis* NK34균은 3~4회에 걸친 계대배양으로 활성화하였으며, glycerol stock법으로 -70℃에서 보존하였고, working culture는 한달에 1회씩 계대배양을 하여 사용하였다. *L. lactis* NK34균의 배양배지는 MRS broth (Difco Laboratories, Detroit, USA)를 사용하였다.

나. 배양조건 및 방법

L. lactis NK34을 10 mL의 MRS broth에 접종하여 37℃에서 교반속도 50 rpm으로 12시간 동안 전배양한 다음, 다시 500 mL baffled flask(working volume: 100 mL)에 접종하여 12시간 동안 본배양하였다. 내생포자의 경우에는 3일간 본배양한 후 80℃에서 10분간 열처리하여 사용하였다.

다. 균수의 측정

균수는 배양액을 0.1% 펩톤수로 10배씩 연속적인 희석을 시킨 다음, 평판배지에 0.1 mL씩 분주하여 도말한 후 최적온도에서 배양하고 콜로니형성단위(colony forming unit)를 측정하여 총균수를 계산하였다.

라. 인공위액에 대한 내성

인공위액은 Kobayashi 등의 방법에 따라 5 N HCl을 사용하여 pH 2.5, pH 4.0으로 조정한 broth에 pepsin을 1% 첨가하여 사용하였다. 영양세포의 인공위액에 대한 내성을 실험하기 위해 *L. lactis* NK34의 12시간 배양된 배양액 1 mL을 test tube의 인공위액 9 mL에 넣어 배양하면서 0, 0.5, 1, 1.5, 2시간 간격으로 sampling하여 MRS agar plate를 이용하여 총균수를 측정하였다. 내생포자의 인공위액에 대한 내성을 실험하기 위해서는 3일 배양된 배양액을 80℃에서 10분간 열처리하여 6,000 rpm에서 10분간 원심분리한 후 배양상등액을 버리고 균체를 회수하여 위와 동일한 방법으로 실험하였다. Control은 pH를 조절하지 않고, 또한 pepsin을 첨가하지 않은 broth에 위와 같은 동일한 방법을 사용하여 실험하였다.

마. 인공담즙산에 대한 내성

인공담즙산은 살균된 broth에 멸균한 0.3% oxgall(Difco)을 첨가하여 사용하였다. 인공담즙산 내성을 실험하기 위해서 인공위액을 거친 배양액을 인공담즙산이 있는 시험관에 첨가하여 37℃에서 24시간 동안 배양한 후 생존력을 조사하기 위해서 인공위액과 마찬가지로 총균수 및 총 아포

균수를 측정하였다. Control은 oxgall이 첨가되지 않은 broth에 위와 같은 동일한 방법을 사용하여 실험하였다.

바. 효소 생산성

효소 생산성을 측정하기 위해서 균 배양액을 원심분리하여 균체만을 회수하여 멸균수로 2회 반복하여 세척한 후 멸균수에 현탁하여 10^6 CFU/mL 정도의 농도가 되도록 하였다. 이 현탁액을 API ZYM kit (bioMerieux Co., France)에 접종하여 어두운 곳에서 37℃의 조건으로 4시간 배양하였다. 표현활성 증가와 용해를 돕기 위해 ZYM A, B 시약을 각각의 큐플에 한 방울씩 떨어뜨리고 밝은 곳에서 약 5분간 반응시킨 후 색깔의 변화를 관찰하여 효소활성을 측정하였다.

사. 항생물질에 대한 내성

항생물질 내성을 측정하기 위해서 paper disc 방법을 사용하였다. 즉, 균의 최적의 온도에서 12시간 배양하고, TS soft agar(0.75% agar)에 배양액을 100 μL로 접종하여 agar plate에 overlay하였다. Overlay된 plate에 paper disc를 멸균된 핀셋으로 올려 놓고, paper disc에 각 농도별의 항생물질을 10 μL씩 떨어뜨린 후 12시간 배양하여 항생물질 내성을 측정하였다.

아. 항종양 활성

각 종양 세포주를 배지에 접종 농도의 세포 수를 접종하여 37℃ CO_2 incubator에서 24시간 동안 배양한 후, 시료를 첨가하여 48시간 동안 배양하였다. 배양이 끝나기 4시간 전에 MTT(0.5 mg/mL)용액 50 μL를 첨가한 다음 4시간 추가 배양하여 formazan 형성을 유도시키고, 추가 배양이 끝난 후 원심분리(1000 rpm, 5 min, 4℃)하여 상등액을 제거하였다. 원심분리 후 생긴 blue formazan을 용해시키기 위하여 DMSO를 각 well 당 100 μL씩 첨가한 후 plate shake에서 20분간 교반한 후 각 well의 흡광도를 측정하였다. MTT assay는 [1-(OD of treated cells/OD of control cell)]×100을 계산하여 % 저해율(% inhibition)로 나타내었으며, 저해율이 50% 이상인 경우에 종양세포 증식억제 효과가 있다고 판정하였다. 사용된 tumor cell line은 SW-156(human kidney carcinoma), HEP-2(human larynx carcinoma), Hep-G2(hepatocellular carcinoma)를 사용하였고 사용한 배지는 PRMI-1640에 10% FBS가 함유된 배지와 DMEM배지에 10% FBS가 함유된 배지를 사용하였다.

자. DPPH법에 의한 항산화 활성 측정

L. lactis NK34를 10 mL의 MRS broth에 접종하여 37℃에서 교반속도 50 rpm으로 12시간 동안 전배양한 다음, 다시 500 mL baffled flask(working volume: 100 mL)에 접종하여 12시간 동안 본배양하여 배양액을 12,000 rpm으로 4℃, 20분간 원심분리하여 얻은 상등액을 100 mM DPPH(1,1-diphenyl-2-picyryl hydrazyl)용액 3 mL에 상등액 600 μL를 가하여 10초 동안 진탕한

후, 10분간 방치하고 528 nm에서 흡광도를 측정하여 수소 공여능을 계산하였다.

3. 결과 및 고찰

가. 인공위액에 대한 내성

본 연구에 사용된 *L. lactis* NK34균의 영양세포의 인공위액에 대한 내성을 확인하였다. pH 2.5와 pH 4.0으로 조정된 인공위액에서의 실험 결과, 2시간 경과 후 영양세포는 각각 77.76와 87.57%의 비교적 높은 생존률을 나타내어 *L. lactis* NK34의 생균제로써의 가능성을 보여주고 있다(Fig. 3).

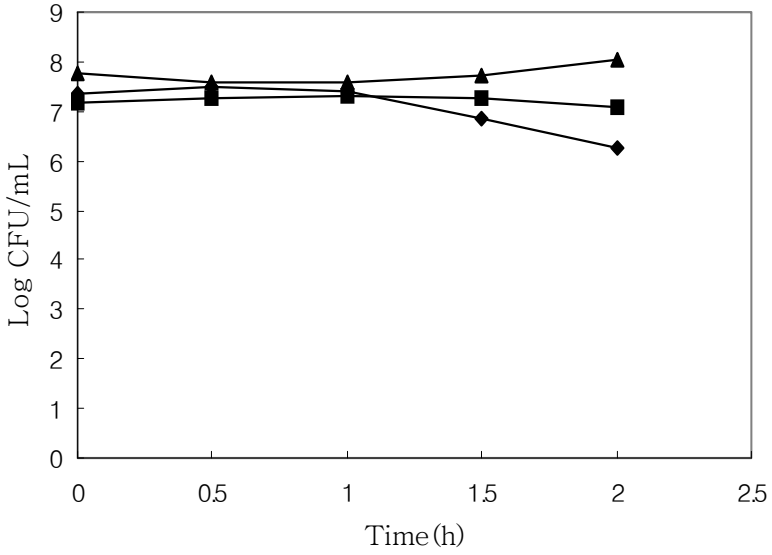


Fig. 3-1. Survival of vegetable cell of *L. lactis* NK34 in artificial gastric juice. -▲-, non-treated with artificial gastric juice(control); -■-, treated with artificial gastric juice(pH 4.0); -◆-, treated with artificial gastric juice (pH 2.5).

나. 인공담즙산에 대한 내성

인공담즙산에 대한 내성을 실험한 결과 인공담즙산이 함유되지 않은 대조구와 비교하였을 때 Fig. 4에서 보이는 바와 같이 인공 담즙산이 들어간 배지에서 거의 차이를 보이지 않고 있다. 따라서 인공위액을 통과한 *L. lactis* NK34균은 인공담즙산에 대하여 내성을 보임에 따라 목적 부위인 장에 도달하여 생균제로서의 역할을 충분히 수행할 수 있을 것으로 판단되어 진다.

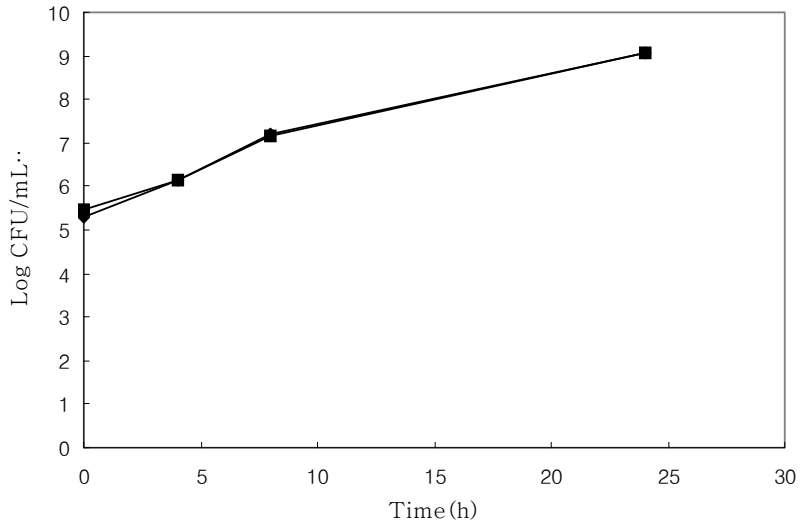


Fig. 3-2. Survival of vegetable cell of *L. lactis* NK34 in artificial bile acid after treated with artificial gastric juice(pH 2.5) at 37℃ for 2 h. -■-, non-added bile acid after treated with artificial gastric juice (control); -◆-, treated with artificial gastric juice and bile acid.

다. 효소 생산성

균의 효소 생산성을 API ZYM kit를 통해 확인한 결과, Table 5과 같이 발암효소인 β-glucuronidase가 생산되지 않음을 확인할 수 있었다. 그리고 예비적 발암물질을 발암물질로 변환시키는 β-glucosidase의 활성, 역시 없는 것으로 확인되었다. 이러한 결과는 프로바이오틱 생균으로 인해 발생할 수 있는 발암 유발의 위험성이 없다는 사실을 뒷받침한다.

Table 3-1. Enzyme activity of *L. lactis* NK34 by API ZYM kit

Enzyme	*L. lactis* NK34
Control	0[1)]
Alkaline phosphatase	1
Esterase(C_4)	1
Esterase Lipase(C_8)	0
Lipase(C_{14})	1
Leucine acrylamidase	2
Valine acrylamidase	1
Crystine acrylamidase	2
Trypsin	2
α-Chymotrypsin	2
Acid phosphatase	1
Naphthol-AS-BI-phosphohydrolase	1
α-Galactosidase	1
β-Galactosidase	3
β-Glucuronidase	0
α-Glucosidase	2
β-Glucosidase	0
N-Acetyl-β-glucosaminidase	0
α-Mannosidase	0
α-Fucosidase	0

[1)]0: 0 nmol, 1: 5 nmol, 2: 10nmol, 3: 20nmol, 4: 30nmol, 5: ≥40 nmol

라. 항생물질에 대한 내성

L. lactis NK34은 roxithromycin과 erythromycin의 경우 10 μg/mL 이상의 농도에서 생육 저해를 받는 감수성을 나타내었으며, streptomycin, neomycin, chloramphenicol, 그리고 gentamycin은 20 μg/mL 이상의 농도에서 저해를 받지 않는 내성을 나타내었으며, nisin은 100 μg/mL의 농도에서도 저해를 받지 않는 내성을 나타내었다(Table 16).

Table 3-2. Antibiotic resistances of *L. lactis* NK34

Antibiotics	(μg/mL)	*L. lactis* NK34
Nisin	0	+
	25	+
	50	+
	100	+
Streptomycin	0	+
	5	+
	10	+
	20	+
Neomycin	0	+
	5	+
	10	+
	20	+
Roxithromycin	0	+
	5	+
	10	-
	20	-
Chloramphenicol	0	+
	5	+
	10	+
	20	+
Gentamycin	0	+
	5	+
	10	+
	20	+
Rifampicin	0	+
	5	+
	10	+
	20	+
Erythromycin	0	+
	5	+
	10	-
	20	-

+: growth, -: no growth

마. 항종양 활성

MTT assay로 *L. lactis* NK34 배양액의 종양세포 생육 억제를 효과를 살펴본 결과 SW-156(human kidney carcinoma)은 배양상등액의 경우에는 40.2%의 생육억제 효과를 나타내었으나 상등액을 75%로 에탄올로 침전시킨 후 D-PBS로 녹여 2배 농축하여 사용한 것에서는 79.8%로 높은 생육억제 효과를 나타내었다. HEP-2(human larynx carcinoma), Hep-G2(human hepatocellular carcinoma) cell은 배양 상등액에서는 50%이하로 생육억제 효과가 나타나지 않았으나 에탄올 침전물에서는 약 55% 내외의 종양세포 생육억제 효과를 나타내었다(Table 17).

Table 3-3. Growth inhibition of *L. lactis* NK34 against various tumor cell lines

	Cell line		
	SW-156	Hep-G2	HEP-2
Supernatant	40.2±0.7	35.5±1.5	38.2±0.8
Culture fluid precipitate	79.8±2.8*	50.2±1.4*	58.1±1.0*

* : Sensitive i.e., % inhibition≥50

바. DPPH법에 의한 항산화 활성

L. lactis NK34 배양액을 증류수로 2~10배 희석한 희석액의 항산화력을 DPPH법에 의한 전자 공여능을 측정하여 Fig. 5에 나타내었다. 본 실험에서 배양상등액을 희석한 희석액에 존재하는 항산화물질로 45% 이상의 활성을 나타내었기 때문에 천연 항산화제로서의 가능성을 보여주고 있다.

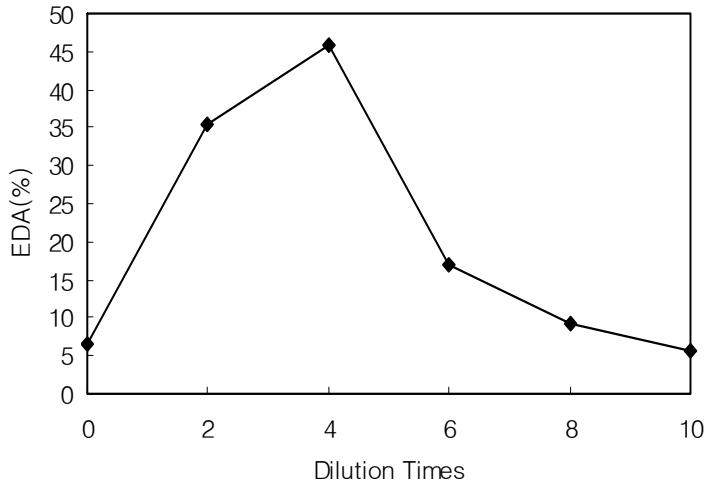


Fig. 3-3. Scavening effects on the DPPH radical by *L. lactis* NK34.

제 4 절 효소를 이용한 유청 단백질 가수분해물의 종양세포 억제 효과

1. 서 론

유청은 치즈를 제조하거나 식품에 이용되는 casein을 생산하기 위해 우유를 응유효소로 응고시킨 후 형성된 커드를 분리해 낼 때 얻어지는 액상부분을 말한다. 유청은 높은 영양적인 가치와 여러 가지 생리활성을 가지는 단백질이 포함되어 있다. 유청 단백질은 β-lactoglobulin, α-lactoalbumin과 미량의 BSA, immunoglobulins, phospholipoproteins, lactoferrin, enzyme 등 다양한 생리활성 단백질 인자로 구성되어 있다.

유청 단백질을 효소적으로 가수분해하면 작은 분자량으로 가수분해되거나 소수성 그룹이 깨어지거나 이온화된 그룹들이 늘어가면서 다양한 펩타이드들이 만들어진다. 이러한 펩타이드들은 유청 단백질과 가수분해 효소의 종류에 따라서 달라지고 온도, pH, 반응시간에 따라서 다양한 종류의 펩타이드들로 가수 분해된다.

유청 단백질 가수분해물들은 원래의 유청 단백질에 비해 용해성이 증가하고, 점도가 감소하며, 거품성, 겔 강도, 유화성 등의 중요한 이화학적 특성들이 변화한다. 따라서 이러한 유청 단백질 가수 분해물들은 식품의 가치를 높이거나 영양적으로 우수한 식품을 만들기 위해 많이 사용되어진다. 또한 유청 단백질이나 유청 단백질 가수분해물들은 항산화효과, 항고혈압 효과, 면역조절 기능, ACE-저해효과, 항균효과, 지방산 합성 저해 효과 등 다양한 생리활성을 가진다고 보고된다.

이와 같이 유청 단백질이나 유청 단백질 가수 분해물의 다양한 생리활성에 관한 여러 가지 연구 결과들이 보고되고 있으나 항암효과에 대한 연구결과는 아직 이루어지고 있지 않은 실정이다. 따라서 본 연구에서는 여러 가지 생리활성을 가지는 유청 단백질 가수분해물을 이용하여 다양한 종양세포에 대한 증식억제 효과를 연구하였다.

2. 연구내용 및 방법

가. Whey protein concentrates and Enzymes

Whey protein concentrate(WPC, 40% proteins)은 미국의 HILMAR ingredients에서 구입하여 사용하였고, 단백질 분해효소인 neutrase, alcalase, flavourzyme, protamex는 덴마크의 Novo Nordisk에서 구입하여 사용하였다.

나. Hydrolysis conditions

가수분해 조건은 Mota와 Gauthier 등의 방법을 응용하였다. 즉 효소와 기질을 1:25의 비율로 섞어서 반응하였고, 모든 효소에 대해 pH 6.5, 45℃에서 6시간동안 진탕하면서 반응시켰다. 가수

분해 반응이 끝난 후 효소는 90℃에서 10분간 가열하여 불활성화시키고 가수 분해물들을 분무 건조하여 실험에 사용하였다.

다. Cell lines and culture conditions

본 실험에 사용한 종양세포주는 MCF-7(mammary gland adenocarcinoma), A549(lung carcinoma), SK-MES-1 (lung carcinoma), AGS(gastric adenocarcinoma), HEC-1B(uterus adenocarcinoma), SW-156(kidney hypernephroma)를 사용하였고, 대조군으로 사용한 정상 세포는 MRC-5(lung normal cell)을 사용하였다. 모든 세포는 Korean Cell Line Bank(KCLB)에서 구입하여 사용하였다. 사용한 배지는 Gibco(Life Technologies,INC., Rockville, ML, USA)사에서 구입하였고 SK-MES-1은 Dulbeccos Modified Eagle Medium(DMEM)에 MCF-7, A549, AGS, HEC-1B, SW-156은 RPMI 1640 Medium에 MRC-5는 Minimum Essential Medium(MEM) 배지를 이용하여 배양하였으며 각 배지에는 1% penicillin/streptomycin과 10% fetal bovine serum(FBS)을 첨가하여 37℃, 5% CO_2 incubator에서 배양하였다.

라. Cell cytotoxicity test

유청 단백질과 유청 단백질 가수분해물들의 항종양 활성을 알아보기 위하여 MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide)assay를 사용하였다. 각각의 종양세포주 2×10^5 cells/mL를 100 μL씩 96 well plate에 분주하고 37℃, 5% CO_2 incubator에서 24시간 배양한 후, 적절한 농도의 시료를 100 μL로 접종하여 48시간 노출시켰다. 배양이 끝나기 4시간 전에 MTT solution(0.5 ㎎/mL)을 50 μL씩 첨가하여 blue formazan 형성을 유도하였다. 생성된 blue formazan을 용해시키기 위해 dimethyl sulfoxide(DMSO)를 각 well마다 100 μL씩 첨가하여 plate shaker에서 교반한 후, Multi well scanning spectrophotometer로 570 nm에서 흡광도를 측정하였다. 항종양 활성은 세포성장 저해율로 평가하였는데 저해율이 50% 이상 일때만 항종양 활성이 있는 것으로 판정하였다.

3. 결과 및 고찰

유청 단백질 및 여러 가지 단백질 분해효소를 사용하여 가수 분해한 유청 단백질 가수분해물의 종양세포 증식억제효과는 Fig. 4-1에서 보는 바와 같다. 유청 단백질 및 neutrase, flavourzyme, protamex 등의 단백질 분해효소로 6시간 가수분해 시킨 유청 단백질 가수분해물들은 여러 가지 종양세포에 대하여 30%이하의 생육억제 효과를 나타내었다. 그러나 alcalase를 이용하여 6시간 가수분해 시킨 유청 단백질 가수분해물은 동일 농도에서 다른 종양세포 대해서는 생육억제효과가 그렇게 높게 나타나지 않았으나 특이적으로 유방암 세포인 MCF-7와 폐암 세포인 A549, SK-MES-1에 대해 50% 이상의 높은 생육억제효과를 나타내었다. 여러 가지 효소들로 가수분해 시킨 유청 단백질 가수분해물 중에 MCF-7, A549, SK-MES-1의 생육억제 효과를 보이는 alcalase 가수분해물에 대해 효소반응 시간을 다르게 하여 유청 단백질 가수분해물을 얻었다.

Alcalase 가수분해 시간에 따른 유청 단백질 가수분해물의 종양 세포주에 대한 생육억제 효과를 측정한 결과 반응시간이 길어짐에 따라 생육억제 효과가 높게 나타났다(Fig. 4-2). 그러나 6시간 이후는 오히려 생육억제효과가 낮아지거나 비슷한 추세를 보였다.

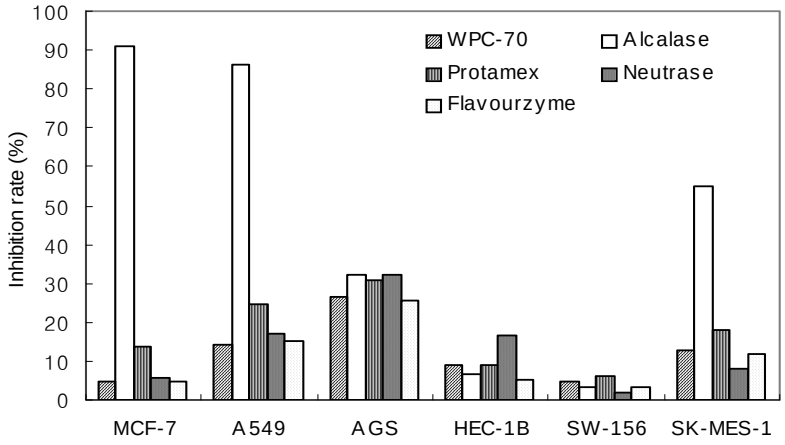


Fig. 4-1. Growth inhibitory effects from various whey protein hydrolysates (WPH) against tumor cell lines. (concentration : 5 mg/ml)

Alcalase에 분해된 유청 단백질 가수분해물을 농도에 따라 종양세포 생육억제효과를 측정하였다. MCF-7과 A549 cell의 경우에는 2 mg/mL의 농도에서도 50% 이상의 생육억제효과를 나타내었고 2mg/ml 이상의 농도에서는 비슷한 생육억제 효과를 나타내었다.

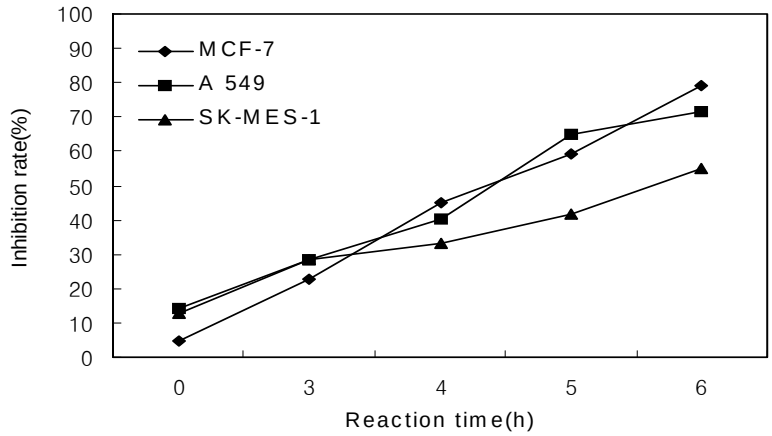


Fig. 4-2. In vitro antitumor activity according to alcalase hydrolysis reaction-time(concentration : 5mg/mL)

Alcalase에 의해 분해된 유청 단백질 가수분해물이 A549, SK-MES-1 세포와 같은 폐암 세포에 특이적으로 생육억제 효과를 나타내었다. 그래서 대조군으로 폐의 정상 세포인 MRC-5를 이용하여 같은 실험을 한 결과 A549, SK-MES-1의 폐암세포와는 다르게 정상 cell인 MRC-5는

alcalase에 의해 분해된 유청 단백질 가수분해물의 5 mg/mL에서도 40% 정도의 생육억제효과를 나타내어 정상 세포에 대한 세포 독성은 종양세포에 비해 현저하게 낮았다(Fig. 4-3).

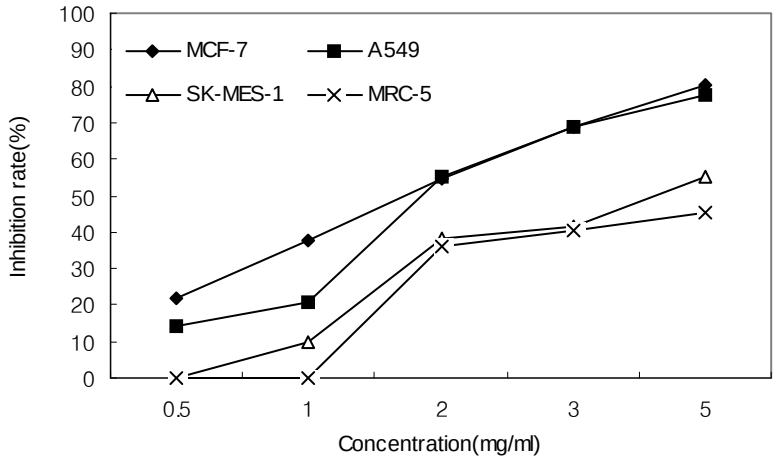


Fig. 4-3. Growth inhibitory effects according to alcalase hydrolysates concentration on tumor cells and normal cell.

제 5 절 파일로트 규모에서의 유산균 대량생산 및 건강음료제품의 유통기한 설정

1. 연구내용 및 방법

가. 사용균주

본 연구에서 사용된 *Lactococcus lactis* NK34 및 *Bacillus polyfermenticus* SCD균은 3~4회에 걸친 계대배양으로 활성화하였으며, 20% glycerol법으로 -70℃에서 보존하였으며, working culture는 한 달에 1회씩 계대배양하여 사용하였다.

나. WPC를 기본으로 한 배지의 제조

WPC를 기본으로 한 배지는 WPC-35을 사용하였고, 사용량은 lactose의 함량을 기준으로 하였다. lactose의 함량이 0.5, 1, 1.5, 2%로 하였고 pH를 7로 조절하여 121℃에서 15분간 autoclave하여 사용하였다.

다. 배양조건 및 방법

B. polyfermenticus SCD를 500 mL Erlenmeyer flask의 100 mL의 TSB broth에 접종하여 150 rpm, 37℃에서 약 6시간 동안 전배양한 다음 각각의 성분이 조제되어 있는 500 mL Erlenmeyer flask (working volume: 100 mL)에 2% 접종비로 접종하여, 배양온도 37℃, 교반속도 150 rpm, initial pH 7.0으로 24시간동안 본 배양하였다.

라. 생산성 극대화를 위한 회분식 배양

접종용(seed) 균주의 배양은 *B. polyfermenticus*를 500 ml baffled flask(working volume: 150 mL)에 2%(v/v)의 접종비로 접종하여 배양온도 37℃, 교반속도 150 rpm에서 9시간 동안 shaking incubator에서 수행되었다. 본 배양은 5 liter 발효조(working volume: 3 Liter)에 2%(v/v)의 접종비로 접종하여 배양온도 37℃, 교반속도 500 rpm에서 배양하였고, 과량의 거품을 방지하기 위해 30% antifoam LS-300를 사용하였고, pH 7.0±0.1로 조절한 후, 121℃에서 15분간 멸균하여 사용하였고, 36시간 배양하여 시간별로 sample을 취하여 분석하였다.

마. 균수의 측정

균수는 배양액을 0.1% 펩톤수로 10배씩 연속적인 희석을 시킨 다음, 평판배지에 0.1 mL씩 분주하여 도말한 후 최적온도에서 배양하고 콜로니형성단위(colony forming unit)를 측정하여 총균수를 계산하였다.

바. DPPH법에 의한 항산화 활성 측정

DPPH법은 tocopherol, ascorbate, flavonoid 화합물, 방향족 아민류, maillard형 갈변 생성물질, peptide 등의 항산화 활성을 나타내는 생리활성 물질에 의해 환원됨으로써 짙은 자색이 탈색되는 정도에 따라 항산화 효과를 전자공여능으로 측정하는 방법으로 항산화제 탐색에 일반적으로 이용되는 방법으로 알려져 있다. DPPH 용액은 100 mL의 에탄올에 DPPH (1,1-diphenyl-2-picyryl hydrazyl, Sigma, USA) 6 mg을 녹인 후 증류수 100 mL를 혼합하여 조제하였다. 배양액을 4℃에서 12,000 rpm의 속도로 15분간 원심분리한 후 상등액을 취하여 DPPH (1,1-diphenyl-2-picyrylhydrazyl, Sigma, USA)에 대한 수소 공여능(electron donating activity, EDA)을 측정하였다. 즉, 100 mM DPPH ethanol solution 1 ml을 200 ㎕의 sample에 첨가하여 실온에서 10분간 반응시킨 후 528 nm에서 흡광도를 측정하였다. 측정된 값과 다음의 식을 이용하여 수소 공여능을 나타내었다.

$$\text{Scavenging effect (\%)} = \left[1 - \frac{\text{528 nm 에서 시료의 흡광도}}{\text{528 nm 에서 대조구의 흡광도}}\right] \times 100$$

사. 생산된 건강 음료제품들의 미생물학적 검사를 통한 유통기한 설정

연구과제 수행결과를 바탕으로 프로바이오틱스가 첨가된 WPH 인스턴트 건강음료믹스를 개발하였으며 여기에 사용된 프로바이오틱스는 *Lactococcus lactis* NK34 및 *Bacillus polyfermenticus* SCD의 두 가지 혼합균주를 사용하였다. 이 제품들의 유통기한을 알아보기 위하여 첨가된 프로바이오틱스의 생균수를 측정하였다. 우리나라 식품공전에 명시된 식용 가능한 유산균의 수가 10^7 이상이 되어야 유산균 함유식품으로 인정하고 있음으로 저장기간 중의 유산균의 생균수를 측정하여 유통기한을 설정하였다.

제조된 음료믹스를 제조한 날로부터 일정한 간격으로 sample을 취하여 Sample 1 g에 0.1% 멸균 펩톤수 9 mL를 첨가하여 완전히 녹였고, 0.1% 멸균 펩톤수를 이용하여 단계 희석하여 사용하였고, *B. polyfermenticus* SCD의 균수를 알기 위해 *B. polyfermenticus* SCD는 포자상태로 제품에 첨가하였음으로 80℃에서 10분간 처리하여 *L. lactis* NK34는 모두 사멸시키고 *B.polyfermenticus* SCD의 균수만을 측정하였고, *L. lactis* NK34의 균수를 알기위하여 총균수에서 *B. polyfermenticus* SCD의 균수를 뺀 것을 *L. lactis* NK34로 하였다.

2. 결과 및 고찰

가. WPC를 기본으로 한 배지에서의 생균수 측정

WPC를 기본으로 한 배지는 WPC-40을 사용하였고, 사용량은 lactose의 함량을 기준으로 하였다. WPC-40 중의 lactose의 함량이 0.5, 1, 1.5, 2%로 하였을 때 배양시간별 *B. polyfermenticus* SCD의 생균수는 WPC의 함량이 증가할 수 *B. polyfermenticus* SCD는 더 빨리 자라는 경향을 나타내었으며 모든 배지에서 거의 비슷한 패턴으로 나타났다. 접종 후 12시간 배양하였을때 최대 생

육곡선이 나타났으며 그 후로는 점차 감소하는 경향을 나타내었다. 기존에 사용한 TSB 배지와 비교하였을때 최대 생육시간이 약간 길어졌고 최대 생균수도 약간 줄어드는 경향을 보였다.

나. 5 L 발효조를 이용한 대량 배양

5 L 발효조를 이용한 대량 배양에서는 pH를 7.0 ± 0.1로 조절한 WPC-medium에서는 배양시간에 따라 생균수와 항산화효과가 증가하였다. pH를 조절하지 않은 배지에서는 배양시간에 따라 pH의 변화는 처음 3시간까지는 낮아졌으나 그 후로는 계속 상승하여 pH 8.4까지 나타났다. 또한 생균수와 항산화 효과는 pH를 조절한 배지보다 높게 나타났다.

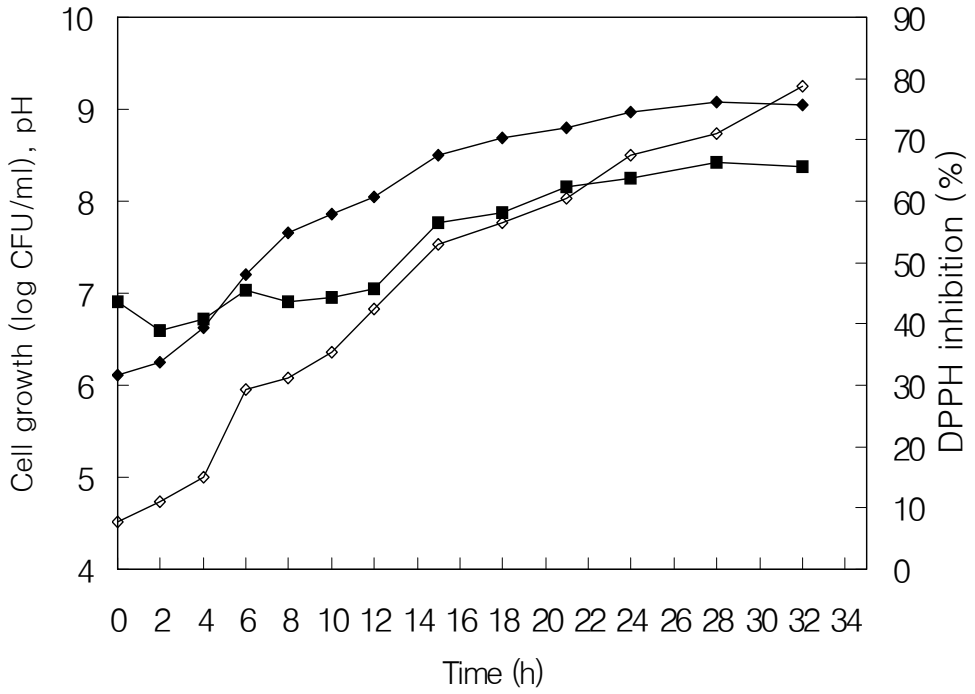


Fig. 5-1. Cell growth and antioxidant production by *Bacillus polyfermenticus* SCD in 5 L jar fermenter with WPC-medium.
Symbols: -◆-; viable cells (log CFU/ml), -◇-; DPPH inhibition (%), -■-; pH

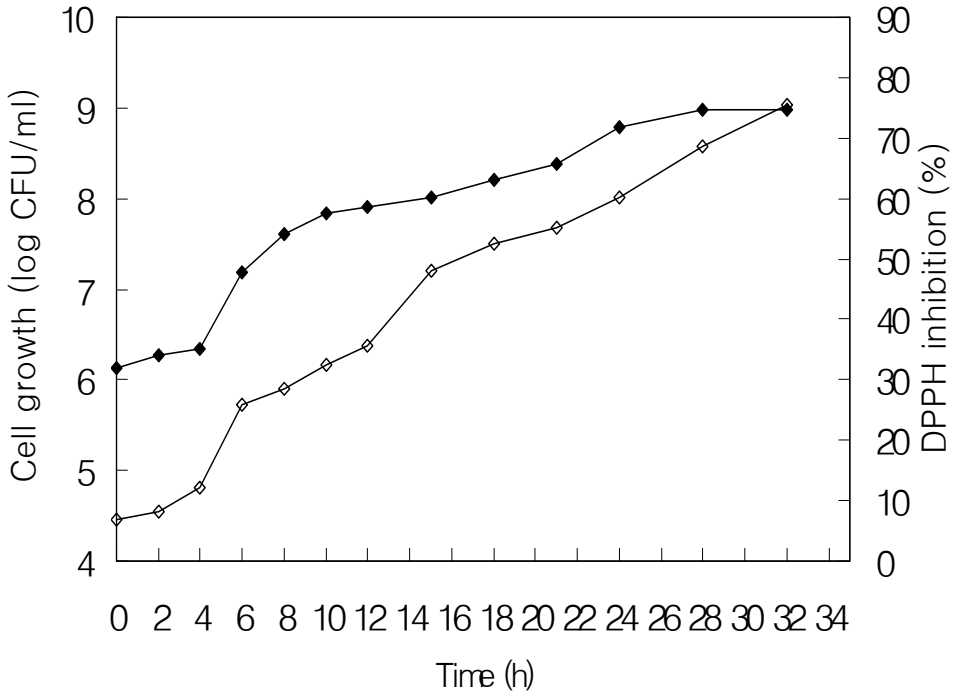


Fig. 5-2. Cell growth and antioxidant production by *Bacillus polyfermenticus* SCD in 5 L pH 7 controlled-jar fermenter with WPC-medium. Symbols: -◆-; viable cells (log CFU/ml), -◇-; DPPH inhibition (%).

다. 생산된 건강 음료제품들의 미생물학적 검사를 통한 유통기한 설정

연구과제 수행결과를 바탕으로 개발 된 프로바이오틱스가 첨가된 WPH 인스턴트 건강음료믹스에 *L. lactis* NK34 및 *B. polyfermenticus* SCD의 두 가지 혼합균주의 프로바이오틱스의 생균수를 측정한 결과 처음 넣어준 프로바이오틱스 생균 두가지의 균수가 모두 10^8을 나타내었고, 제조 후 4개월까지 균수를 측정한 결과 시간이 지남에 따라 조금씩 감소하는 경향을 나타냈다. 4개월 후의 *L. lactis* NK34 및 *B. polyfermenticus* SCD는 다음 표에 나타내었다.

Table 5-1. Effect of storage period on viability of probiotic cultures

Storage(weeks) / probiotics	0	4	8	12	16
L. lactis NK34	1.3×10^8	3.4×10^7	3.2×10^7	3.8×10^7	1.9×10^7
B. polyfermenticus SCD	1.2×10^8	6.8×10^7	4.9×10^7	4.5×10^7	2.1×10^7

제 6 절 *In vitro* 및 *In vivo* 동물실험을 통한 항산화 활성 검증

1. 연구내용 및 범위

임파구를 이용한 치즈유청 단백질 가수분해물(whey protein hydrolysate)의 DNA 손상 억제능 평가한다.

2. 연구방법

가. 임파구 분리

건강한 성인남성 2명으로부터 채혈한 신선한 전혈 5 ml을 Histopaque 1077를 이용해 임파구만을 분리해 낸 후 본 실험에 사용하였다.

나. 치즈유청 단백질 가수분해물의 처리

본 과제의 주관연구책임자로부터 치즈유청 단백질을 4 종류의 효소(alcalase, flavozyme, neutrase, protamex)로 반응시간을 달리하여(1-4시간) 얻은 치즈유청 단백질 가수분해물을 전달받아서 본 실험에 사용하였다. 총 16개의 샘플을 50 μg/ml 의 농도로 임파구에 처리한 후 37℃에서 30분간 전반응시켰다. 전반응이 끝난 후 임파구에 산화적 손상을 주기 위해 200 μM의 hydrogen peroxide를 4℃에서 5분간 반응시켰다.

다. DNA 손상 억제능 평가(Comet assay)

Comet assay를 위해 반응을 끝낸 임파구를 75 ㎕의 0.5% low melting agarose gel(LMA)과 섞은 후, 1.0% normal melting agarose(NMA)가 precoating된 normal slide 위로 cell suspension과 LMA의 현탁액이 골고루 분산되게 한 후 cover glass로 덮어 4℃ 냉장고에 보관하였다. Gel이 굳으면 Cover glass를 벗기고 그 위에 다시 0.7% LMA 용액 75 ㎕로 한겹 더 덮었다. 미리 준비해 둔 차가운 alkali lysis buffer(2.5 M NaCl, 100 mM Na_2EDTA, 10 mM tris)에 사용 직전에 1% Triton X-100을 섞은 후 slide를 담가 저온, 암실에서 1시간 동안 침지시켜 DNA의 double strand를 풀어주었다. Lysis가 끝난 slide를 electrophoresis tank에 배열하고 전기영동 4℃의 차가운 buffer(300 mM NaOH, 10 mM Na_2EDTA, pH>13)를 채워 40분 동안 unwinding 시켜 DNA의 alkali labile sites가 드러나게 한 후 25V/300±3 mA의 전압을 걸어 20분간 전기영동을 실시하였다. 빛에 의해 DNA가 부가적으로 손상되는 것을 방지하기 위해 위의 과정은 전기영동 tank를 어두운 천으로 덮은 채 실시하였다. 전기영동이 끝난 후 0.4 M Tris 완충용액(pH 7.4)에 10분씩 담가 세척하는 과정을 3회 반복하여 slide를 건조시켰다. 20 ㎕/㎖ 농도의 ethidium bromide로 핵을 염색하여 cover glass로 덮은 뒤 형광현미경(Leica, Germany) 상에서 관찰하였다. CCD camera(Nikon, Japan)를 통해 보내진 각각의 세포핵 image는 Komet 4.0 comet image analyzing system(Kinetic Imaging, UK)이 설치된 컴퓨터 상에서 분석하였다. 임파구의 hydrogen peroxide에 의한 DNA 손상 및 치즈유청 단백질 가수분해물에 의한 손상억제 정도는 핵으로부터 이동해서 꼬리 부분으로 떨어져 나간 꼬리 부분내 DNA %함량(% Tail DNA), 핵 머리부분의 DNA %함량, 핵으로부터 이동한 DNA 파편의 거리(tail length, TL) 또는 tail length에 tail내 함유된 DNA%를

곱해준 tail moment(TM) 값을 측정하여 나타내었다. 각각의 처리구에서 2개의 slide를 만들어 각각 100개 세포의 DNA 손상 정도를 측정하고 각 처리구는 최소 3회 반복 실험하였다.

모든 자료의 처리는 SPSS-PC+ 통계 package를 사용하여 처리하였다. 각 항목에 따라 백분율과 평균치±표준오차(SE)를 구하고 각 물질의 DNA 손상 억제 정도를 비교하기 위해 one-way 분산분석(ANOVA)을 시행하여 F 값을 구하고 Duncan's multiple range test를 이용하여 각 구간의 유의성 차이를 검증하였다. 모든 통계적 유의성은 5% 수준에서 평가하였다.

3. 실험결과

Comet assay를 이용한 치즈유청 단백질 가수분해물의 DNA 손상 억제 효과 실험의 결과는 다음 Fig. 6 및 Table 18과 같다. 산화적 스트레스 유발물질인 hydrogen peroxide 200 μM의 농도로 임파구에 처리했을 때 핵으로부터 떨어져 나간 손상된 DNA의 상대적 양을 나타내는 % tail DNA는 43.%로 PBS 완충용액을 처리한 음성대조구의 8.2%에 비해 유의적으로 높은 것으로 나타나 200 μM의 hydrogen peroxide에 의한 DNA 손상을 확인하였다. Hydrogen peroxide 처리에 의해 손상된 DNA는 다양한 효소로 가수분해 시킨 치즈 유청 단백질 가수분해물을 50 μg/ml의 농도로 세포에 처리하였을 경우 DNA 손상정도가 유의적으로 감소하였으며 그 수준이 PBS 만을 처리한 negative control 수준과 비슷한 것으로 나타났다. 치즈유청 단백질의 산화적 스트레스에 의한 DNA 손상을 억제시키는 효과는 가수분해 효소의 종류나 가수분해 시간과는 크게 상관없이 우수한 활성을 보이는 것으로 사료된다. 이상의 결과에서 치즈유청단백질 가수분해산물은 산화적 스트레스 유발물질인 hydrogen peroxide에 의해 유도되는 DNA 손상을 효과적으로 억제시키고 있음을 알 수 있었다.

Fig. 6-1. Effect of Whey protein hydrolysates on DNA damage in human lymphocytes.
NC: negative control; PC. positive control (H_2O_2, 200 uM); A1: WPH produced by alcalase treatment for 1hr; A2: WPH produced by alcalase treatment for 2hr; A3: WPH produced by alcalase treatment for 3hr; A4: WPH produced by alcalase treatment for 4hr; F1: WPH produced by flavozyme treatment for 1hr; F2: WPH produced by flavozyme treatment for 2hr; F3: WPH produced by flavozyme treatment for 3hr; F4: WPH produced by flavozyme treatment for 4hr; N1: WPH produced by neutrase for 1hr; N2: WPH produced by neutrase for 2hr; N3: WPH produced by neutrase for 3hr; N4: WPH produced by neutrase for 4hr; P1: WPH produced by protamex for 1hr; P2: WPH produced by protamex for 2hr; P3: WPH produced by protamex for 3hr; P4: WPH produced by protamex for 4hr.

Table 6-1. Effect of whey protein hydrolysates on DNA damage in human lymphocytes

		Head DNA (%)	Tail moment	Tail length (um)
Negative control		91.8 ± 0.5	3.1 ± 0.7	33.3 ± 6.7
Positive control		57.0 ± 2.8	137.7 ± 13.1	250.9 ± 13.6
Alcalase	1 hr	89.5 ± 2.5	7.4 ± 3.2	48.1 ± 13.4
	2 hr	93.2 ± 0.6	3.3 ± 0.5	37.3 ± 6.3
	3 hr	91.0 ± 0.5	3.6 ± 0.8	36.8 ± 4.2
	4 hr	89.3 ± 0.3	5.4 ± 0.4	39.5 ± 3.7
Flavozyme	1 hr	91.9 ± 1.3	4.9 ± 2.1	32.9 ± 0.5
	2 hr	91.5 ± 0.8	3.8 ± 0.3	33.1 ± 3.2
	3 hr	91.6 ± 0.1	2.8 ± 0.4	26.5 ± 0.8
	4 hr	91.7 ± 0.5	3.3 ± 0.7	32.3 ± 3.3
Neutrase	1 hr	90.0 ± 0.1	3.9 ± 0.8	26.0 ± 3.2
	2 hr	91.3 ± 0.1	3.8 ± 0.4	31.8 ± 1.4
	3 hr	91.0 ± 0.8	4.3 ± 0.8	33.9 ± 6.5
	4 hr	91.2 ± 0.0	3.0 ± 0.2	24.3 ± 0.6
Protamex	1 hr	91.7 ± 0.1	3.7 ± 0.3	37.4 ± 2.6
	2 hr	90.8 ± 0.2	6.0 ± 1.0	49.1 ± 3.4
	3 hr	89.2 ± 0.7	5.6 ± 1.0	37.0 ± 0.8
	4 hr	90.2 ± 0.6	4.1 ± 0.2	29.2 ± 2.1

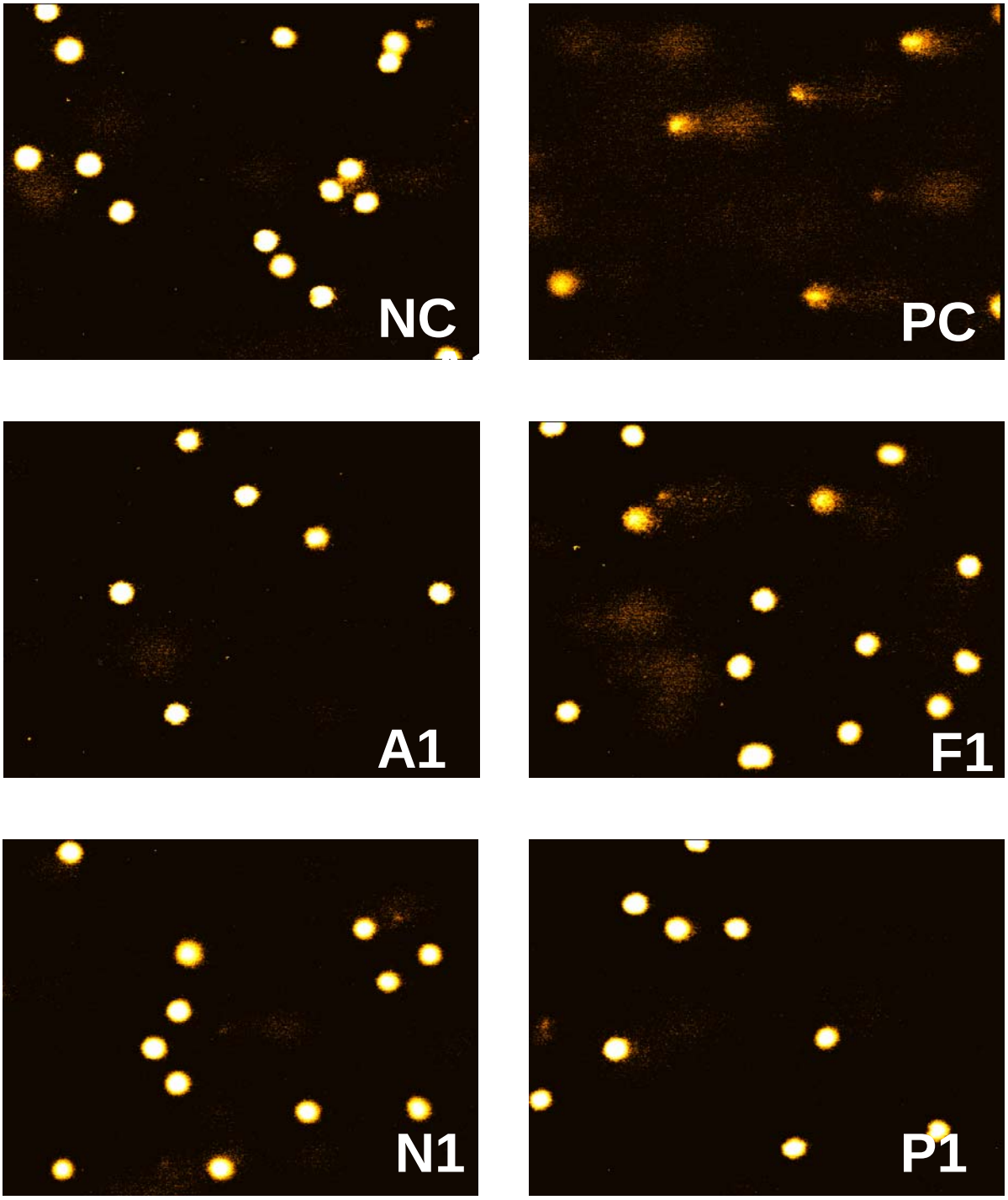


Fig. 6-2. Comet images.

NC: negative control; PC. positive control (H_2O_2, 200 uM); A1: WPH produced by alcalase treatment for 1 hr; F1: WPH produced by flavozyme treatment for 1 hr; N1: WPH produced by neutrase for 1 hr; P1: WPH produced by protamex for 1 hr.

제 7 절 동물실험을 통한 치즈 유청단백질(WPC), 치즈 유청단백질 가수분해물(WPH)의 항산화 활성 평가

1. 연구내용 및 범위

과량의 철은 hydrogen peroxide (OH•) 생산을 증가시키는 산화적 스트레스 상태를 유발시킴으로 생체내에서 단백질, 지질, DNA를 공격하는 것으로 알려져 있다(Fig. 7-1). 따라서 본 연구에서는 실험동물에 과량을 철을 투여하여 산화적 스트레스를 유발시킨 후 치즈유청 단백질(WPC), 치즈 유청 단백질 가수분해물(WPH) 및 프로바이오틱이 포함된 실험식이를 제조하여 6주간 공급한 후 각 시료의 항산화 활성을 *in vivo*수준에서 평가하고자 하였다. 이를 위해 백혈구 및 대장조직 내 DNA손상정도, 혈장 내 총항산화능(TRAP), 지질과산화(conjugated dienes), 항산화 비타민 (retinol, α-, ɣ-tocopherols) 적혈구내 항산화효소(SOD, GSH-Px, Catalase) 등을 측정한 후 이의 데이터들을 분석하고 통계처리하여 유효성을 검정하였다.

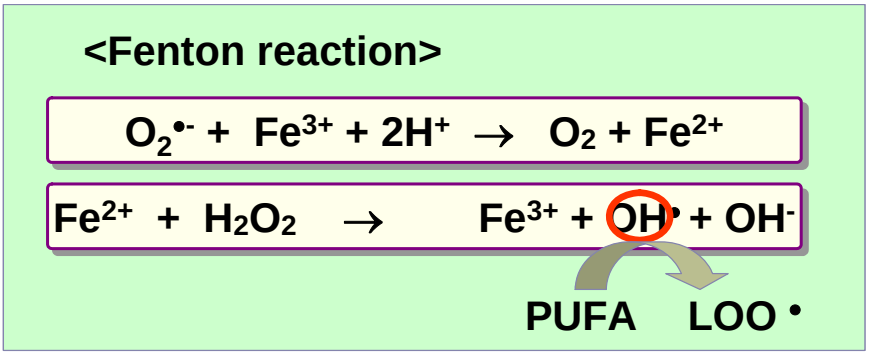


Fig. 7-1. Iron overload induces oxidative stress.

2. 연구방법

가. 실험동물 및 실험식이

평균 체중이 250 g인 6주령의 Sprague-Dawley 종 수컷 흰쥐를 코아텍 (Koatech)으로부터 받아 1주간 pellet으로 적응시키고 난 후에 쥐의 무게를 달아 난괴법으로 6군으로 나누었다. 실험동물은 5 종류의 실험식이로 6주간 cage에 한 마리씩 분리 사육하였고 실험식이와 물은 자유섭취법으로 공급하였다. 사육실의 실내온도는 22±2℃, 습도는 50±5%를 유지하고, 전등을 조절하여 낮 12시간, 밤 12시간으로 조절하였다. 실험식이는 정상식이군 (Normal Fe group, NFe)과 산화적 스트레스를 유발하기 위한 과량의 철투여군 (High Fe supplemented group, HFe), 과량의 철과 동시에 10%의 치즈유청단백질 투여군(WPC), 치즈유청단백질 가수분해물 투여군 (WPH), 프로바이오틱 투여군(Pro), 치즈유청단백질가수분해물 + 프로바이오틱 투여군 (WPC+Pro) 등 총 6군으로 나누어 각 군당 10마리씩 배정하였으며 실험식이는 6주간 급여하였다. Probiotics는 *B.*

polyfermenticus SCD(3×10^6)와 *L. lactics*(3×10^8)을 혼합하여 투여하였다. 식이섭취량은 하루에 한 번씩, 체중은 일주일에 한 번 일정한 시간에 측정하였다. 실험 기간 동안의 체중증가량을 같은 기간 동안의 총 식이섭취량으로 나누어 식이효율을 구하였다.

* 식이효율(FER)=6주간 체중증가량(g)/6주간 식이섭취량(g)

Table 7-1. Composition of the experimental diet

(g/100 g diet)

Ingredients	NFe[1)]	HFe	WPC	WPH	Pro	WPH+Pro
Casein	20	20	10	16.125	20	16.125
WPC	-	-	10	3.875	-	3.875
Corn starch	55.924	54.959	54.959	54.959	54.959	54.959
Sucrose	10	10	10	10	10	10
Corn oil	5	5	5	5	5	5
Cellulose	4	4	4	4	4	4
Vitamin mixture[2)]	1	1	1	1	1	1
Mineral mixture[3)]	3.5	3.5	3.5	3.5	3.5	3.5
Choline bitartarate	0.25	0.25	0.25	0.25	0.25	0.25
DL-Methionine	0.3	0.3	0.3	0.3	0.3	0.3
Butylated hydroxy toluene	0.001	0.001	0.001	0.001	0.001	0.001
Iron ($FeSO_4 \bullet 7H_2O$)	0.025	0.99	0.99	0.99	0.99	0.99
Total	100	100	100	100	100	100

[1)]NFe: Normal control group, HFe: High Fe supplemented group, WPC: High Fe + whey protein concentrates, WPH: High Fe + whey protein hydrolysates. Pro: *B. polyfermenticus* SCD(3×10^6)와 *L. lactics*(3×10^8), WPH+Pro: High Fe + whey protein hydrolysates + *B. polyfermenticus* SCD(3×10^6)와 *L. lactics*(3×10^8)

[2)] AIN 76 vitamin mixture contained (in g/kg of mixture): thiamine HCl 0.6; riboflavin 0.6; pyridoxine HCl 0.7; niacin 3; d-calcium pantothenate 1.6; folic acid 0.2; d-biotin 0.02; cyanocobalamin(vitamin B_{12}) 0.001; dry vitamin A palmitate(500,000 U/d) 0.8; dry vitamin E acetate(500 U/d0 10; vitamin D_3 trituration(400,000 U/g) 0.25; menadione sodium bisulfite complex 0.15; sucrose finely powdered 981.08

[3)]AIN 76 mineral mixture contained(in g/kg of mixture): calcium phosphate, dibasic 500; sodium chloride 74; potassium citrate, monohydrate 220; potassium sulfate 52; magnesium oxide 24; manganous carbonate(43-48% Mn) 3.5; ferric citrate(16-17% Fe) 6; zinc carbonate (70% ZnO) 1.6; cupric carbonate(53-55% Cu) 0.3; potassium iodate 0.01; sodium selenite 0.01; chromium potassium sulfate 0.55; sucrose, finely powdered 118.03

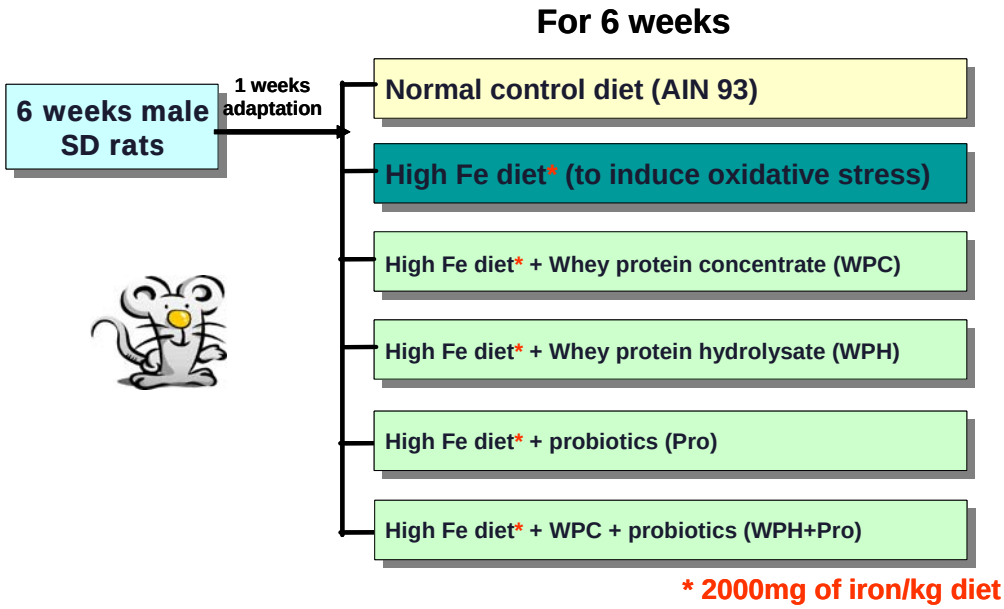


Fig. 7-2. Experimental design.

나. 혈액 및 각종 장기의 채취

실험동물을 희생시키기 전 12시간 동안 금식을 시킨 후 , 에틸에테르 마취하여 복부 대동맥으로부터 혈액을 채취하고 헤파린으로 응고를 방지 하였다. 혈액을 3000 rpm에서 30분간 원심분리하여 혈장과 적혈구를 분리 하여 분석시 까지 -70℃에 냉동 보관하였다. 실험동물의 장기는 적출하여 생리식염수에 세척한 후, 흡수지로 물기를 제거하고 무게를 측정한 후 액체질소로 급속 냉동시킨 후 분석시까지 -70℃에 냉동 보관하였다.

다. 백혈구 및 대장 조직 내 DNA 손상의 측정을 위한 comet assay

전혈 20㎕을 채취하여 75㎕의 0.7% low meltin g agarose gel (LMA)과 섞은 후, 0.5% normal melting agarose(NMA)가 precoating된 fully frosted slide 위로 전혈과 LMA의 현탁액이 골고루 분산되게 한 후 cover glass로 덮어 4℃ 냉장고에 보관하였다. Gel 이 굳으면 Cover glass를 벗기고 그 위에 다시 0.7% LMA 용액 75 ㎕로 한 겹 더 덮었다. Cell lysis를 위해 미리 준비해 둔 차가운 alkali lysis buffer(2.5 M NaCl, 100 mM EDTA, 10 mM tris)에 사용직전에 1% Triton X-100을 섞은 후 slide를 담가 저온, 암실에서 1시간 동안 침지시켜 DNA의 double strand를 풀어주었다. Lysis가 끝난 slide를 electrophoresis tank에 배열하고 4℃의 차가운 buffer (300 mM NaOH, 10m M Na_2EDTA)를 채워 unwinding 시켰다. 20분이 지나면 25 V/300±3 mA의 전압을 걸어 20분간 전기영동을 실시하였다. 전기영동이 끝난 후 0.4 M Tris 완충용액(pH 7.4)으로 충분히 세척하고 20 ㎕/㎖ 농도의 ethidium bromide로 핵을 염색하여 형광현미경상에서 관찰하고 CCD camera를 통해 보내진 각각의 세포핵 image는 comet image analyzing system이 설치된 컴퓨터 상에서 분석하였다. 전혈 또는 임파구의 H_2O_2 에 의한 DNA 손상 및 비스판 상등액에 의한 손상억제정도는 핵으로부터 이동한 DNA 파편의 거리(tail length)를 정량하여 이동정도를 측정하

였다. 대장조직은 collagenase로 세포를 분리해 낸 뒤 혈액과 같은 방법으로 comet assay를 실시하였다.

라. 혈장 지용성 비타민의 분석

혈청 지용성 항산화 비타민, retinol α-tocopherol 및 γ-tocopherol의 분석은 HPLC에 의해 실시하였다. -80℃에 냉동되어 있던 혈장을 꺼내어 녹인 후 ehtanol로 단백질을 제거하였다. n-Hexane으로 지방을 추출한 후 rotary evaporator로 hexane을 증발시킨 후 mobile phase (methanol:dichloromethane=85:15) 150 ㎕에 녹여 HPLC의 guard column에 주입시켰다. Flow rate는 0.8 ml/min으로 하며 UV/VIS detector를 사용하였다. 각 비타민별로 retinol은 325nm, tocopherols은 295 nm에서의 흡수율을 모니터하였다. 각 영양소의 농도는 external calibration curve를 사용하여 curve 밑의 area로부터 계산하였다.

마. 혈장 TRAP 측정

혈장 중 총항산화 능을 측정하는 TRAP assay는 ABTS(2,2′-azinobis(3-ethylbenzothiazo- line 6-sulfonate), 150μM)와 metmyoglobin(2.5μM)을 H_2O_2(75μM)로 활성화시킴으로써 생성된 ferryl myoglobin radical species와의 상호 작용에 의해 형성된 ABTS radical cation의 absorbance를 측정하는데 기초를 두고 있으며 그 absorbance의 억제 정도는 sample(0.84% plasma)에 들어 있는 antioxidant capacity에 비례하게 된다. Sample을 6분 동안 30℃에서 배양한 후 UV/VIS spectrometer로 740 nm의 파장에서 absorbance를 측정하였다. 혈장의 TRAP 농도는 trolox의 calibration curve를 이용하여 계산하며 TEAC(Trolox equivalent antioxidant capacity, mM)로 표현하였다.

바. 과산화지질 (Baseline diene corrjugation in LDL lipids) 측정

Plasma 100 ㎕에 1.1 mg EDTA와 1100 ㎕ trisodium cirtrate Buffer(0.064M)를 진탕혼합 후 600 ㎕ trisodium cirtrate Buffer(0.064 M)를 다시 혼합 하여 2500 rpm에서 10 min간 원심 분리하여 LDL를 획득하였다. 분리한 LDL에 0.1M Na-phosphate Buffer 100 ㎕, Chloroform과 methanol을 2:1비율로 3 ml 와 3차 증류수 1 ml을 혼합하여 2500 rpm에서 10 min 원심 분리하였고 다시 분리한 chloroform을 질소(N_2)가스로 치환한 후 cyclohexane 1 ml을 첨가하고 Spectrophotometer(234 nm)에서 측정하였다.

사. 적혈구 내 항산화 효소활성 측정

적혈구와 대장 내 GSH-Px, catalase 등의 항산화 효소의 분석은 UV/VIS spectrometer에 의해 측정하였다. 적혈구내 SOD의 활성은 pyrogallol의 자동산화를 50% 억제하는 antioxidant capacity로 정의하였다. GSH-Px는 과산화물(t-butylhydroperoxide)에 의해 glutathione이 산화되는 반응을 촉매한다. 이 때 산화된 glutathione은 glutathione reductase와 $NADPH_2$ 의 존재하에 다시 glutathione으로 환원되고 $NADPH_2$ 는 NADP로 산화된다. 이를 이용해 용혈된 적혈구에 glutathione, glutathione reductase, NADPH를 첨가하고 37℃, 10분간 배양한 뒤 t-butylhydroperoxide를 넣어 반응시키며 이 때 감소된 NADPH농도를 340 nm에서 90초간 측정함

으로써 GSH-Px의 항산화정도를 측정하였다. Catalase의 활성은 용혈된 적혈구에 50 mM phosphate buffer(pH 7) 와 hydrogen peroxide를 첨가한 후 hydrogen peroxide의 감소량을 240 nm에서 30초간 측정하였다.

아. 자료의 처리

모든 자료의 처리는 SPSS-PC+ 통계 package를 사용하여 처리하였다. 각 항목에 따라 백분율과 평균치±표준오차 (SE)를 구하고, 두 군 이상의 군별 유의성 검증을 위해서는 one-way 분산분석 (ANOVA)을 시행하여 F 값을 구한 뒤, Durcan's multiple range test를 이용하여 각 군간의 유의성 차이를 검증하였다.

3. 연구결과

가. 체중증가량, 식이섭취량, 식이효율에 미치는 영향

실험기간 중 평균 식이섭취량은 NFe와 HFe군에 비해 WPC군과 WPH+Pro 군이 유의적으로 높은 것으로 나타났으나 체중증가량은 NFe군이나 HFe군에 비해 Pro군이나 WPH+Pro군이 유의적으로 낮은 것으로 나타나 WPH와 probiotics의 섭취가 체중감소의 효과가 있는 것으로 사료된다 (Table 7-2).

Table 7-2. Effects of Whey protein and probiotics on Body weight gains, Food intake and FER in rats fed high Fe diet

	Food intake(g/d)	Weight gain(g/d)	FER[3)]
NFe[1)]	18.4 ± 0.4[2)a4)]	3.7 ± 0.1[c]	19.4 ± 0.5[b]
HFe	18.6 ± 0.4[a]	3.5 ± 0.2[bc]	18.5 ± 1.2[b]
WPC	18.8 ± 0.3[ab]	3.4 ± 0.1[abc]	17.7 ± 0.8[b]
WPH	19.7 ± 0.2[b]	3.0 ± 0.2[ab]	14.8 ± 0.9[a]
Pro	19.4 ± 0.3[ab]	2.9 ± 0.2[a]	14.7 ± 1.0[a]
WPH+Pro	19.6 ± 0.2[b]	3.0 ± 0.2[a]	14.8 ± 1.2[a]

[1)]NFe: Normal control group, HFe: High Fe supplemented group, WPC: High Fe + whey protein concentrates, WPH: High Fe + whey protein hydrolysates. Pro: *B. polyfermenticus* SCD (3×10^8) and *L. lactics* (3×10^8), WPH+Pro: High Fe + whey protein hydrolysates + *B. polyfermenticus* SCD (3×10^8) and *Lactobacillus* (3×10^8)

[2)]Mean±SE. [3)]FER : Food efficiency rate. [4)]Values with different superscript within a column are significantly different at $p<0.05$.

나. 장기무게에 미치는 영향

Table 7-3에는 실험식이가 쥐의 100 g당 장기무게에 미치는 영향을 살펴보았다. 간의 무게는 NFe 군에 비해 WPH, Pro 및 WPH+Pro 군에서 유의적으로 낮았다. 심장의 무게는 HFe군이 다른 군들에 비해 유의적으로 높은 것으로 나타났다. 비장의 경우 HFe군이 WPH, Pro 및 WPH+Pro 군에 비해 유의적으로 높은 것으로 나타났으며, 신장의 무게는 각 군간의 별다른 차이가 없었다.

Table 7-3. Effects of Whey protein and probiotics on liver, heart, kidney and spleen in rats fed high Fe diet

(g/100 g B.W)

	Liver	Heart	Kidney	Spleen
NFe[1)]	4.18 ± 0.11[2)c3)]	0.54 ± 0.02[a]	0.96 ± 0.02[ns4)]	0.30 ± 0.01[bc]
HFe	4.09 ± 0.08[bc]	0.59 ± 0.01[b]	0.97 ± 0.02	0.33 ± 0.02[c]
WPC	3.96 ± 0.11[abc]	0.53 ± 0.02[a]	0.94 ± 0.01	0.30 ± 0.01[abc]
WPH	3.83 ± 0.13[ab]	0.52 ± 0.01[a]	0.95 ± 0.02	0.28 ± 0.01[ab]
Pro	3.68 ± 0.09[a]	0.50 ± 0.01[a]	0.93 ± 0.02	0.26 ± 0.01[a]
WPH+Pro	3.88 ± 0.12[ab]	0.51 ± 0.01[a]	0.95 ± 0.01	0.29 ± 0.01[ab]

[1)]NFe: Normal control group, HFe: High Fe supplemented group, WPC: High Fe + whey protein concentrates, WPH: High Fe + whey protein hydrolysates. Pro: *B. polyfermenticus* SCD (3×10^8)와 *L. lactics* (3×10^8), WPH+Pro: High Fe + whey protein hydrolysates + *B. polyfermenticus* SCD (3×10^8)와 *Lactobacillus* (3×10^8)

[2)]Mean±SE.

[3)]Values with different superscript within a column are significantly different at $p<0.05$.

[4)]ns: not significant

다. 혈장 항산화 비타민에 미치는 영향

각 식이의 혈장 항산화 비타민 농도에 미치는 영향을 Table 7-4에 나타내었다. 혈장 retinol의 경우 WPH+Pro 군에서 과량의 철 투여군(HFe)에 비해 유의적으로 높은 것으로 나타났다. γ-tocopherol은 WPH+Pro 군이 NFe군에 비해 유의적으로 높았으며, α-tocopherol의 경우 WPC, Pro 및 WPH+Pro 군이 HFe군에 비해 유의적으로 높은 것으로 나타났다.

Table 7-4. Effects of Whey protein and probiotics on plasma antioxidant vitamins in rats fed high Fe diet

	Retinol*	ɣ-Tocopherol*	α-Tocopherol*
NFe[1)]	0.43 ± 0.04[2)ab3)]	0.15 ± 0.02[a]	14.08 ± 1.74[ab]
HFe	0.38 ± 0.02[a]	0.16 ± 0.01[ab]	12.80 ± 0.59[a]
WPC	0.44 ± 0.02[ab]	0.19 ± 0.02[ab]	17.12 ± 1.64[b]
WPH	0.41 ± 0.03[ab]	0.17 ± 0.02[ab]	15.45 ± 1.68[ab]
Pro	0.44 ± 0.04[ab]	0.20 ± 0.02[ab]	21.37 ± 1.35[a]
WPH+Pro	0.50 ± 0.02[b]	0.33 ± 0.02[b]	25.49 ± 0.91[a]

[1)]NFe: Normal control group, HFe: High Fe supplemented group, WPC: High Fe + whey protein concentrates, WPH: High Fe + whey protein hydrolysates. Pro: *B. polyfermenticus* SCD (3×10^8)와 *Lactobacillus* (3×10^8), WPH+Pro: High Fe + whey protein hydrolysates + *B. polyfermenticus* SCD (3×10^8)와 *Lactobacillus* (3×10^8)

[2)]Mean±SE.

[3)]Values with different superscript within a column are significantly different at $p<0.05$.

* Corrected by plasma triglycerides

라. 적혈구 항산화 효소 활성에 미치는 영향

각 식이의 적혈구 항산화 효소 활성에 미치는 영향은 Table 7-5에 나타내었다. 적혈구 catalase의 활성은 WPH+Pro 군에서 WPC를 제외한 다른 군들에 비해 유의적으로 높은 것으로 나타났으며, GSH-Px는 WPH군이 Pro 군에 비해 유의적으로 증가한 것으로 나타났다.

Table 7-5. Effect of Whey protein and probiotics on erythrocyte antioxidant enzyme activities in rats fed high Fe diet

	Catalase(K/gHb)	GSH-Px(U/gHb)
NFe[1)]	170.6 ± 24.6[2)a3)]	286.1 ± 21.8[ab]
HFe	182.3 ± 16.7[a]	268.0 ± 19.3[ab]
WPC	212.9 ± 26.3[ab]	282.3 ± 33.0[ab]
WPH	163.7 ± 21.4[a]	318.1 ± 23.0[b]
Pro	166.7 ± 14.8[a]	238.5 ± 29.2[a]
WPH+Pro	247.0 ± 21.3[b]	280.0 ± 12.5[ab]

[1)]NFe: Normal control group, HFe: High Fe supplemented group, WPC: High Fe + whey protein concentrates, WPH: High Fe + whey protein hydrolysates. Pro: *B. polyfermenticus* SCD (3×10^8)와 *Lactobacillus* (3×10^8), WPH+Pro: High Fe + whey protein hydrolysates + *B. polyfermenticus* SCD (3×10^8)와 *Lactobacillus* (3×10^8)

[2)]Mean±SE.

[3)]Values with different superscript within a column are significantly different at $p<0.05$.

마 백혈구 및 대장세포의 DNA 손상정도에 미치는 영향

과량의 철 투여로 유발된 산화적 스트레스에 의해 백혈구 및 대장 조직의 DNA 손상에 미치는 영향을 살펴보기 위해 백혈구와 대장세포를 이용해 comet assay를 실시하였다.

실험결과 과량의 철 투여시 백혈구와 대장세포의 DNA 손상정도가 정상대조군에 비해 유의적으로 증가한 것을 관찰할 수 있었다. 백혈구의 경우 모든 실험식이군에서 HFe군에 비해 유의적으로 DNA 손상정도가 감소하였으며, 특히 WPH+Pro 군에서는 정상대조군 (NFe)과 비슷한 수준으로 감소하였다. 대장세포의 경우도 마찬가지로 모든 실험식이군에서 HFe군에 비해 유의적으로 DNA 손상정도가 감소하였으며, CS와 MeCS 투여군에서 HFe군에 비해 DNA 손상이 유의적으로 감소하였으며 WPC, WPH 및 WPH+Pro군에서는 정상대조군에 비해서도 유의적으로 감소한 것으로 나타났다.

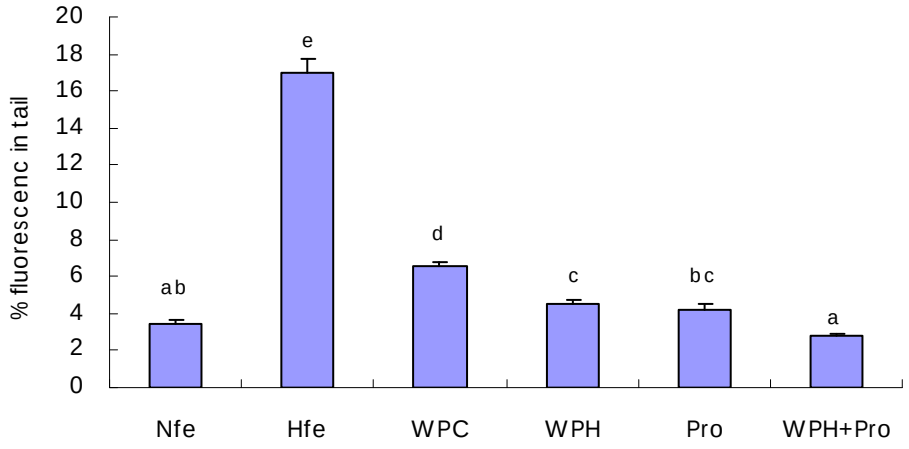


Fig. 7-3. Effect of Whey protein and probiotics on lymphocytic DNA damage in rats fed high Fe diet.

[1)]NFe: Normal control group, HFe: High Fe supplemented group, WPC: High Fe + whey protein concentrates, WPH: High Fe + whey protein hydrolysates. Pro: *B. polyfermenticus* SCD(3×10^8)와 *L. lactics*(3×10^8), WPH+Pro: High Fe + whey protein hydrolysates + *B. polyfermenticus* SCD(3×10^8)와 *L. lacticss*(3×10^8)

Values are Mean±SE. Values with different superscript above bars are significantly different at $p<0.05$.

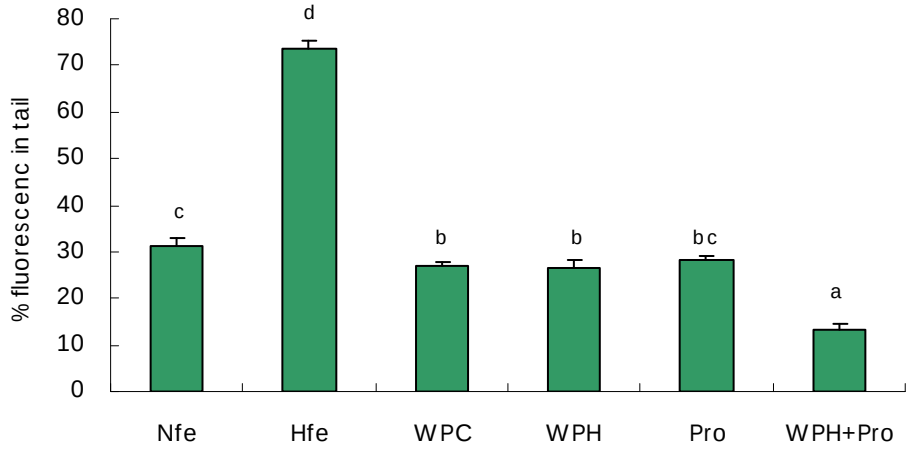


Fig. 7-4. Effect of Whey protein and probiotics on lcoloncytic DNA damage in rats fed high Fe diet

[1)]NFe: Normal control group, HFe: High Fe supplemented group, WPC: High Fe + whey protein concentrates, WPH: High Fe + whey protein hydrolysates. Pro: *B. polyfermenticus* SCD(3×10^8)와 *L. lactics*(3×10^8), WPH+Pro: High Fe + whey protein hydrolysates + *B. polyfermenticus* SCD(3×10^8)와 *L. lactics*(3×10^8)

Values are Mean±SE. Values with different superscript above bars are significantly different at $p<0.05$.

제 8 절 건강음료의 임상실험을 통한 항산화 개선 효과 검증

1. 연구내용 및 범위

항산화 활성이 저하되어 있다고 알려진 흡연자를 대상으로 1차년도 연구를 통해 개발된 기능성 음료를 8주간 투여한 후 투여 전후로 항산화 활성을 평가하였다.

2. 연구방법

가. 대상자 선정 및 질문지, 식이섭취 조사, 혈압 측정

본 연구는 마산, 창원지역에 거주하는 젊은 성인남성 흡연자 30명을 대상으로 실시되었다. 설문지의 내용은 나이, 건강상태 등 일반사항, 신장과 체중, 흡연에 관한 사항, 운동에 관한 사항, 비타민 영양제 복용 여부, 알코올 섭취 여부 등으로 구성되었다. 흡연에 관한 사항은 흡연여부, 흡연량, 흡연력, 금연기간 등을 조사하였으며, 운동에 관하여는 운동의 규칙성, 운동 횟수, 운동량, 운동 강도 및 종류에 대한 내용을 조사하였다. 회수된 설문지를 검토하여 설문지 대답이 불성실한 사람과 비타민 영양제를 복용하고 있는 사람은 대상자에서 제외하고 최종 대상자 30명을 선정하였다. 설문지를 통하여 대상자의 인구학적 특성, 건강상태 및 생활습관(흡연, 음주, 운동 등)을 조사하였다. 체중계, 신장계와 줄자를 이용하여 체중, 신장 및 WHR(wasit-hip ratio)을 측정하였고, 체지방량은 체지방측정계(HBF-302, OMRON)를 이용하여 측정하였다. 영양소 섭취상태 및 식습관은 1대 1 면담하는 방식으로 24시간 회상법을 이용하여 조사하였으며 영양소 섭취량은 한국영양학회에서 제작한 CAN program과 한국인 영양권장량을 이용하여 구하였다.

나. 유청 보충 투여

30명의 대상자를 각 10씩 세 그룹으로 나누어 유청, 유청가수 분해물 및 유청가수 분해물+프로바이오틱 가루를 매일 24 g 씩을 8주 동안 섭취하도록 지도하였으며 실험기간동안 유청 섭취 이전의 식이 양상을 유지하도록 지시하였다. 각 시료의 조성은 다음과 같다.

Table 8-1. Composition of the Whey products

	WPC	HWPC	HWPC+Pro
WPC	20.8	0	0
H-WPC	0	20.8	20.8
설탕	77.5	77.5	77.4
구연산	1.15	1.15	1.15
색소	0.275	0.275	0.275
향료	0.275	0.275	0.275
Probiotics	0	0	0.1
	100	100	100

다. 혈액 및 소변 채취

총 30명의 성인 대상자로부터 본인의 동의를 얻어 유청 섭취 전과 후에 채혈을 하였다. 대상자들은 채혈하기 전 8시간 이상 음식물을 먹지 않도록 지도하였으며 대상자들의 혈액은 아침식사 전에 10 ml 정도 채혈 후 lithium-heparinic polystyrene에 담아 1000 rpm에서 10분간 원심 분리한 후 얻어진 platelet-rich-plasma는 ascorbic acid 측정을 위해 분리하였다. 분리하고 남은 platelet-rich-plasma는 다시 3000 rpm에서 15분간 원심 분리한 후 혈장 지질, 항산화 비타민 및 TRAP 분석을 위해 -80℃ 냉동고에 보관하였다. 적혈구는 isoosmotic phophate buffered saline으로 처리한 후 질소를 채운 뒤 항산화 효소 분석을 위해 -80℃ 냉동고에 보관하였다. 소변은 수거한 뒤 3000 rpm에서 5분간 원심 분리한 후 상층액을 모아 분석 전까지 -80℃ 냉동 보관하였다.

라. 혈장 지질 수준 분석

혈장 총 콜레스테롤, HDL 콜레스테롤 및 중성지방 수준과 간기능을 나타내는 GOT, GPT 효소활성은 kit 시약을 이용하여 Photometric Autoanalyzer(Biotron Scientific instruments BTR 815)로 측정하였다. LDL 콜레스테롤은 Friedewald식을 이용하여 계산하였다.

마. 혈장 Conjugated diene (CD) 분석

CD 형성은 지질의 과산화 현상으로 생기는 첫 물질이므로 LDL 산화정도를 보기 위해 혈장 CD 수준을 분석하였다. 혈장(1 mg/ml EDTA)에 trisoduim citrate buffer (pH 5.05, 5 N HCl, 50000 IU/L heparin)를 넣어 LDL을 침전시키고 Na-phosphate buffer (pH 7.4, 0.9 % NaCl)로 녹였다. 다음으로는 chloroform : methanol(2 : 1) 3 ㎖을 첨가하고 증류수를 1 ㎖ 넣은 후 지용성 부분만 취하여 rotary evaporator로 증발시켰다. 이것을 cyclohexane 1 ml로 녹인 후 234 ㎚에서 spectrophotometer로 분석하였다.

바. 혈장 항산화 비타민 측정

대상자들의 혈장 ascorbic acid는 2, 4-dinitrophenylhydrazine method에 의해 UV/VIS spectrometer로 분석하였다. 혈장을 metaphosphoric acid로 처리하여 단백질을 침전시키고 ascorbic acid를 안정화시켰다. Ascorbic acid는 copper-sulfate로 처리하면 dehydroascorbic acid로 산화된 뒤 diketogluconic acid로 가수분해된다. 이를 2, 4-dinitrophenylhydrazine으로 처리하면 안정한 적갈색물의 osazone이 형성되는데 이것을 520 ㎚에서 측정하여 혈장 ascorbic acid의 농도를 분석하였다. 혈장 retinol, α-tocopherol, γ-tocopherol, carotenoids 및 conenzyme Q10은 ethanol로 단백질을 제거하고 n-hexane으로 지방을 추출한 후 rotary evaporator로 hexane을 증발시키고, mobile phase(metanol:dichloromethane=85:15)에 녹여 HPLC로 측정하였다.

사. 혈장 총 유리기 포집 항산화능 측정

최근에 개발된 혈장 총 유리기포집 항산화능(TRAP, total radical-trapping antioxidant potential) 측정법은 혈장 내 α-tocopherol, ascorbate, urate, protein sulfhydryl groups 등의 항산화제들의 복합된 활성을 측정하여 혈장의 총 유리기 포집 항산화능을 나타내므로 시간과 노력을 절약할 수 있는 매우 유용한 방법이다. 혈장 중 TRAP은 Rice-Evans and Miller의 inhibition

assay 법에 따라 분석하였다. 이 방법은 ABTS(2,2′-azinobis(3-ethylbenzothiazo- line 6-sulfonate), 150 μM)와 metmyoglobin(2.5 μM)을 H_2O_2(75 μM)로 활성화시킴으로써 생성된 ferryl myoglobin radical species와의 상호 작용에 의해 형성된 ABTS radical cation의 absorbance를 측정하는데 기초를 두고 있으며 그 absorbance의 억제 정도는 sample (0.84% plasma)에 들어 있는 antioxidant capacity에 비례하게 된다. Sample을 6분 동안 30℃에서 배양한 후 UV/VIS spectrometer로 740 nm의 파장에서 absorbance를 측정하였다. 혈장의 TRAP 농도는 trolox의 calibration curve를 이용하여 계산하였으며 TEAC(Trolox equivalent antioxidant capacity, mM)으로 표현하였다.

아. 적혈구 항산화 효소활성도 측정

적혈구내 glutathion peroxidase(GSH-Px), catalase 등의 항산화효소의 분석은 UV/VIS spectrometer에 의해 측정하였다. GSH-Px는 과산화물(t-butylhydroperoxide)에 의해 glutathione이 산화되는 반응을 촉매한다. 이 때 산화된 glutathione은 glutathione reductase와 NADPH의 존재하에 다시 glutathione으로 환원되고 NADPH는 NADP로 산화된다. 이를 이용해 용혈된 적혈구에 glutathione, glutathione reductase, NADPH를 첨가하고 37℃, 10분간 배양한 뒤 t-butylhydroperoxide를 넣어 반응시켰으며 이 때 감소된 NADPH농도를 340nm에서 90초간 측정함으로써 GSH-Px의 항산화 정도를 측정하였다. Catalase의 활성은 용혈된 적혈구에 50mM phosphate buffer(pH 7)와 hydrogen peroxide를 첨가한 후hydrogen peroxide의 감소량을 240nm에서 30초간 측정하였다.

자. Alkaline Comet assay을 이용한 임파구 oxidative DNA damage 측정

임파구는 신선한 전혈 70 ㎕을 1 ml의 PBS에 섞은 후 Histopaque 1077를 이용하여 분리해 내었다. 임파구 DNA에 산화적 스트레스를 가하기 위해 200 μM H_2O_2를 사용하였다. Alkali lysis buffer를 사용하여 DNA의 double strand를 풀어주었으며 lysis가 끝난 slide를 전기영동 buffer로 40분 동안 unwinding 시켜 DNA의 alkali labile sites가 드러나게 한 후 25 V/300±3 mA의 전압을 걸어 20분간 전기영동을 실시하였다. 20 ㎕/㎖ 농도의 ethidium bromide로 핵을 형광 염색하고 cover glass로 덮은 뒤 형광현미경(Leica, Germany)으로 관찰하면서 CCD camera(Nikon, Japan)를 통해 보내진 각각의 세포핵 image를 Komet 4.0 comet image analyzing system(Kinetic Imaging, UK)이 설치된 컴퓨터 상에서 분석하였다. 임파구의 DNA 손상정도는 핵으로부터 이동한 DNA 파편의 거리(tail length, TL) 또는 tail length에 tail내 함유된 DNA%를 곱해준 tail moment(TM) 값을 측정하여 나타내었으며 각 대상자 당 2개의 slide를 만들어 각각 50개씩 총 100개의 임파구에서 DNA 손상정도를 측정하였다.

차. 자료의 통계처리 및 각 요인과의 상관관계 분석

모든 자료는 MS의 excel database system을 이용하여 입력한 후 SPSS-PC+ 통계 package (version 12.0)를 사용하여 처리하였다. 각 항목에 따라 백분율과 평균치±평균오차(SE)를 구하였으며 야채음료 섭취 전과 8주 섭취 후의 평균치에 대한 유의적인 차이는 Paired t-test를 통해 검증하였다.

3.. 실험결과

가. 인체계측치 변화

세 그룹 대상자의 평균나이는 약 26 ± 2.2 세로 세 그룹간의 차이는 없었다. 8주간의 중재연구 기간 중의 체중, 체지방, 엉덩이 및 허리 둘레의 변화는 없는 것으로 나타났다.

나. 혈중 지질 및 간기능 수치의 변화

유청 섭취 (WPC) 군에서는 혈장 콜레스테롤, LDL 콜레스테롤 및 동맥경화지수가 유의적으로 감소하였으며, 유청가수분해물 섭취 (HWPC) 군에서도 LDL 콜레스테롤과 동맥경화지수가 유의적으로 감소하였다. 유청가수분해물과 프로바이오틱 비스판균을 혼합하여 섭취한 군에서는 동맥경화지수만이 유의적으로 감소하였다. 간기능수치에는 세 그룹 모두에서 유의적인 변화가 없었다.

다. 혈장 지질과산화, 총항산화력 및 항산화 비타민 수준의 변화

8주간의 유청 섭취(WPC 군) 후 gamma-tocopherol을 제외한 혈장 지용성 비타민(retinol, α-tocopherol, lycopene, α-carotene, β-carotene, coenzymeQ10) 수준이 유의적으로 증가하였다. 혈장 지용성 비타민은 콜레스테롤 수준과 유의적인 관계가 있으므로 혈장 지용성 비타민을 혈장 콜레스테롤 수준으로 나누어 본 결과에서도 마찬가지로 혈장 지용성 비타민 수준이 유의적으로 증가한 것으로 나타났다. 반면, 유청가수분해물 섭취군에서는 혈장 coenzymeQ10 수준만이 유의적으로 증가하였고 유청가수분해물과 프로바이오틱을 같이 섭취한 군에서는 혈장 지용성 비타민 농도에 변화는 없었다. 혈장 지질과산화, 혈장 총 콜레스테롤 및 적혈구 항산화 효소는 아무런 변화가 없었다.

라. 임파구 DNA 손상도의 변화

유청, 유청가수분해물 및 유청가수분해물+프로바이오틱 섭취는 임파구의 DNA 손상정도를 유의적으로 감소시키는 효과가 있는 것으로 나타났다.

마. 요약 및 결론

본 연구에서는 젊은 성인 남서 흡연자 30명을 대상으로 유청, 유청 가수분해물 및 유청 가수분해물+프로바이오틱을 8주간 섭취시킬 때 혈중지질, 항산화 양상 및 임파구 DNA 손상에 대한 보호효과가 있는지를 알아보았다. 연구 결과, 유청, 유청 가수분해물 및 유청가수분해물+프로바이오틱 보충 섭취 후에 대상자의 혈장 지질 수준과 임파구 DNA 손상정도가 유의적으로 개선되는 것으로 나타났다. 특히 유청섭취는 대상자의 혈장 지용성 비타민의 농도를 유의적으로 증가시키는 것으로 나타났다. 이로써 유청의 꾸준한 섭취는 흡연자에게 그 위험성이 증가하는 각종 자유 라디칼로 인한 손상 및 암 등의 만성질환을 예방하는 효과가 있을 가능성을 제시할 수 있다. 그러나 유청의 이러한 효과는 유청을 가수분해 시키거나 프로바이오틱을 첨가한다고 해서 더 좋아지지는 않는 것으로 사료된다.

Table 8-2. Changes of Anthropometric data during 8 week trial

	WPC		HWPC		HWPC+Pro	
	0 week	8 week	0 week	8 week	0 week	8 week
Age (years)	26.9 ± 0.4		26.4 ± 0.8		26.0 ± 0.4	
Height (cm)	173.0 ± 2.3		176.9 ± 1.5		172.3 ± 1.4	
Weight (kg)	73.56 ± 3.90	70.40 ± 3.14	78.38 ± 4.55	78.78 ± 4.75	68.65 ± 2.29	69.23 ± 2.70
Body Fat (%)	22.26 ± 1.54	22.88 ± 1.57	20.08 ± 1.86	20.46 ± 2.07	21.81 ± 1.08	23.50 ± 1.22
BMI (Kg/m^2)	24.26 ± 0.97	24.77 ± 1.17	25.02 ± 1.43	22.11 ± 2.83	23.30 ± 0.74	23.49 ± 0.87
Waist circumference (cm)	82.66 ± 3.33	85.76 ± 3.11	83.47 ± 2.60	86.44 ± 3.71	83.31 ± 2.33	83.19 ± 2.06
Hip circumference (cm)	98.90 ± 2.23	101.92 ± 2.22	97.45 ± 1.80	102.67 ± 2.54	98.75 ± 1.35	98.86 ± 1.54
WHR	0.83 ± 0.02	0.84 ± 0.02	0.86 ± 0.02	0.84 ± 0.02	0.84 ± 0.01	0.84 ± 0.01

Values are Mean ± S.E.

Significantly different at $p<0.05$ by paired t-test.

Table 8-3. Changes of Plasma lipid profiles and Liver function during 8 week

	WPC		HWPC		HWPC+Pro	
	0 week	8 week	0 week	8 week	0 week	8 week
Triglycerides (mg/dl)	93.3 ± 15.8	101.7 ± 7.8	119.3 ± 13.2	124.2 ± 16.5	115.1 ± 11.3	97.8 ± 8.6
Total cholesterol (mg/dl)	174.1 ± 10.2	153.4 ± 7.8*	170.2 ± 7.0	151.3 ± 7.7	170.1 ± 8.1	158.3 ± 5.9
HDL cholesterol (mg/dl)	59.4 ± 5.2	63.0 ± 5.2	54.4 ± 2.9	59.9 ± 4.2	63.4 ± 5.9	71.1 ± 6.0
LDL cholesterol (mg/dl)	96.0 ± 10.9	70.1 ± 6.2**	91.9 ± 6.9	66.6 ± 10.6*	83.7 ± 9.8	67.6 ± 6.0
Atherogenic Index	2.1 ± 0.3	1.5 ± 0.2**	2.2 ± 0.2	1.7 ± 0.3*	1.8 ± 0.3	1.3 ± 0.2*
GOT (U/L)	22.3 ± 1.9	28.1 ± 3.0	26.9 ± 2.4	30.6 ± 7.4	20.7 ± 1.9	29.0 ± 3.5
GPT (U/L)	26.6 ± 2.3	25.8 ± 2.6	30.0 ± 4.4	28.2 ± 2.1	26.9 ± 2.5	26.0 ± 2.7

Values are Mean ± S.E.

Significantly different at * $p<0.05$, ** $p<0.01$ by paired t-test.

Table 8-4. Changes of Plasma lipid peroxidation, total antioxidant status, antioxidant vitamin levels and erythrocytic antioxidant enzyme activities during 8 week trial.

	WPC		HWPC		HWPC+Pro	
	0 week	8 week	0 week	8 week	0 week	8 week
Plasma						
Conjugated Dienes (μM)	2.15 ± 0.47	1.70 ± 0.48	2.73 ± 0.51	2.37 ± 0.62	1.86 ± 0.27	1.84 ± 0.37
TRAP (mM)	1.45 ± 0.02	1.47 ± 0.01	1.47 ± 0.02	1.52 ± 0.01	1.48 ± 0.02	1.49 ± 0.01
vitamin C (mM)	0.33 ± 0.03	0.30 ± 0.03	0.34 ± 0.03	0.26 ± 0.02	0.36 ± 0.06	0.29 ± 0.04
Retinol (μg/dl)	51.4 ± 4.2	65.2 ± 3.9*	54.4 ± 3.8	62.7 ± 8.0	60.9 ± 6.9	60.6 ± 4.6
γ-tocopherol (μg/dl)	79.7 ± 14.6	128.6 ± 17.9	100.1 ± 13.9	141.7 ± 18.9	126.2 ± 24.0	136.7 ± 22.6
α-tocopherol (μg/dl)	762.5 ± 85.1	1051.1 ± 125.7**	747.0 ± 88.3	871.0 ± 103.0	931.0 ± 104.7	921.6 ± 66.7
lycopene (μg/dl)	5.3 ± 1.0	13.0 ± 2.7*	7.9 ± 2.5	7.7 ± 1.9	9.4 ± 1.8	14.2 ± 4.0
α-carotene (μg/dl)	3.6 ± 0.9	9.0 ± 1.4***	4.7 ± 1.3	4.3 ± 0.9	4.3 ± 0.6	4.8 ± 0.9
β-carotene (μg/dl)	12.3 ± 3.2	28.0 ± 4.8***	16.8 ± 4.0	14.1 ± 3.6	11.2 ± 2.3	12.7 ± 2.1
coenzymeQ10 (μg/dl)	52.3 ± 11.3	94.9 ± 12.6**	46.5 ± 5.5	71.5 ± 8.1*	76.0 ± 16.3	83.8 ± 13.5
retinol_TC	0.30 ± 0.02	0.43 ± 0.02**	0.32 ± 0.03	0.44 ± 0.07	0.36 ± 0.05	0.39 ± 0.04
γ-tocopherol_TC	0.45 ± 0.07	0.84 ± 0.11*	0.58 ± 0.07	0.98 ± 0.16	0.77 ± 0.17	0.86 ± 0.13
α-tocopherol_TC	4.33 ± 0.40	6.75 ± 0.50***	4.36 ± 0.45	5.95 ± 0.79	5.58 ± 0.74	5.91 ± 0.55
lycopene_TC	0.03 ± 0.01	0.09 ± 0.02**	0.05 ± 0.01	0.05 ± 0.02	0.05 ± 0.01	0.09 ± 0.02
α-carotene_TC	0.02 ± 0.00	0.06 ± 0.01***	0.03 ± 0.01	0.03 ± 0.01	0.03 ± 0.00	0.03 ± 0.01
β-carotene_TC	0.07 ± 0.02	0.18 ± 0.03***	0.10 ± 0.02	0.10 ± 0.03	0.06 ± 0.01	0.08 ± 0.02
coenzymeQ10_TC	0.29 ± 0.05	0.61 ± 0.07**	0.27 ± 0.03	0.49 ± 0.06**	0.43 ± 0.08	0.53 ± 0.09
Erythrocytic antioxidant enzymes						
CAT (K/g Hb)	82.98 ± 7.59	80.04 ± 5.70	85.10 ± 5.75	96.80 ± 6.54	84.31 ± 6.97	83.98 ± 5.43
GSH-Px (U/g Hb)	27.79 ± 4.85	29.39 ± 3.56	22.71 ± 4.33	27.34 ± 3.27	29.58 ± 3.62	32.62 ± 2.51

Values are Mean ± S.E.

Significantly different at * $p<0.05$, ** $p<0.01$, *** $p<0.001$ by paired t-test.

Table 8-5. Changes of Lymphocytic DNA damage during 8 week trial

	WPC		HWPC		HWPC+Pro	
	0 week	8 week	0 week	8 week	0 week	8 week
Head DNA	71.0 ± 1.6	91.9 ± 0.4***	67.5 ± 1.8	89.9 ± 0.7***	72.2 ± 1.5	89.8 ± 0.7***
Tail DNA	29.0 ± 1.6	7.9 ± 0.4***	32.5 ± 1.8	10.1 ± 0.7***	27.8 ± 1.5	10.2 ± 0.7***
Tail Extent Moment	53.8 ± 5.5	4.0 ± 0.7***	66.0 ± 5.6	7.4 ± 1.4***	49.0 ± 5.3	7.0 ± 1.3***
Tail Length	95.9 ± 6.9	27.2 ± 2.6***	112.0 ± 6.6	34.9 ± 2.9***	90.8 ± 5.8	38.6 ± 4.4***

Values are Mean ± S.E.

Significantly different at *** $p<0.001$ by paired t-test.

제 4 장 목표달성도 및 관련분야에의 기여도

제 1 절 연도별 연구개발목표 및 달성도

구분	연구개발목표	연구개발 목표 및 내용	평가 척도(점)	연구 결과	달성도(%)
1차 년도	WPC 및 WPC 가수분해물의 생산 및 기능성 조사(1세부과제)	○ 단백질 함량 70%의 WPC를 한외여과에 의해 생산	10	단백질 함량 70%의 WPC를 한외여과에 의해 생산하였으며 여과조건을 확립함.	100
		○단백질 함량 80%의 WPC를 diafiltration 기법에 의해 생산	10	단백질 함량 80%의 WPC를 diafiltration 기법에 의해 생산하였으며 여과조건을 확립함.	
		○얻어지는 WPC의 물리화학적 성질과 기능성 검증	10	얻어지는 WPC의 물리화학적 성질과 기능성 검증하였음.	
		○WPC의 단백질 분획 조사	10	WPC의 단백질 분획 조사하였음.	
		○WPC의 건조 및 변성도의 파악	10	WPC의 건조 및 변성도의 파악하였음.	
		○파일로트 플랜트에서 WPC의 산업적 생산 가능성의 조사	10	파일로트 플랜트에서 WPC의 산업적 생산 가능성을 검토하였음.	
		○WPC에서 생리활성 펩타이드의 제조 및 적정조건 파악	20	WPC에서 생리활성 펩타이드의 제조 및 적정조건 파악 하였음.	
		○프로바이오틱 유산균의 생존율을 고려하여 프로바이오틱 유산균을 함유하는 WPC 가수분해물의 건조공정 적정화	10	프로바이오틱 유산균의 생존율을 고려하여 프로바이오틱 유산균을 함유하는 WPC 가수분해물의 건조공정 적정화 하였음.	
		○ 분무건조된 WPC 가수분해물의 물리화학적 및 기능성 조사	10	분무건조된 WPC 가수분해물의 물리화학적 및 기능성 조사 하였음.	

구분	연 구 개 발 목 표	연구개발 목표 및 내용	평가 척도(점)	연구 결과	달성도(%)
1차 년도	유용 프로바이오틱 유산균의 특성 및 건강기능성 조사(2세부과제)	○기존에 확보된 유산균 및 상업적인 유산균의 프로바이오틱의 특성(인공위액에 대한 내성, 인공담즙산에 대한 내성, 효소활성, 항생물질에 대한 내성, 항균활성, 내열성 등) 검토	50	기존에 확보된 유산균 및 상업적인 유산균의 프로바이오틱의 특성(인공위액에 대한 내성, 인공담즙산에 대한 내성, 효소활성, 항생물질에 대한 내성, 항균활성, 내열성 등) 검토하였음.	100
		○기존에 확보된 유산균 및 상업적 유산균의 건강 기능성(항산화 및 면역증강 기능성을 중심으로) 검증	50	기존에 확보된 유산균 및 상업적 유산균의 건강 기능성(항산화 및 면역증강 기능성을 중심으로) 검증하였음.	
	In vitro, In vivo 동물실험을 통한 항산화 활성 검증(위탁과제)	○물질의 총항산화력 측정	10	물질의 총항산화력 측정 하였음.	100
		○포유류세포를 이용한 DNA 손상 억제능 평가	10	포유류세포를 이용한 DNA 손상 억제능 평가하였음.	
		○식이제조 및 동물 사육	20	식이제조 및 동물 사육하였음.	
		○백혈구 내 DNA 손상 억제능 측정	10	백혈구 내 DNA 손상 억제능 측정하였음.	
		○혈장 내 총항산화력 측정	10	혈장 내 총항산화력 측정하였음.	
		○혈장 내 항산화 비타민 측정	10	혈장 내 항산화 비타민 측정하였음.	
		○ LDL의 conjugated diene 측정	10	LDL의 conjugated diene 측정하였음.	
		○적혈구 내 항산화 효소활성 측정	10	적혈구 내 항산화 효소활성 측정하였음.	
		○데이터 분석 및 보고서 작성	10	데이터 분석 및 보고서 작성하였음.	

구분	연 구 개 발 목 표	연구개발 목표 및 내용	평가 척도(점)	연구 결과	달성도(%)
2차 년도	생리활성 펩타이드와 프로바이오틱스를 함유하는 인스턴트 건강음료의 제조(1세부과제)	○생리활성 펩타이드와 프로바이오틱 유산균을 함유하는 분무건조된 WPC 가수분해물에 대한 물리화학적, 기능성, 저장성 검증	10	생리활성 펩타이드와 프로바이오틱 유산균을 함유하는 분무건조된 WPC 가수분해물에 대한 물리화학적, 기능성, 저장성 검증	100
		○프로바이오틱 유산균을 함유하는 WPC 가수분해물을 이용하여 기능성 건강음료의 생산에 필요한 소재의 배합비 결정	10	프로바이오틱 유산균을 함유하는 WPC 가수분해물을 이용하여 기능성 건강음료의 생산에 필요한 소재 의 배합비 결정	
		○인스턴트 건강음료믹스의 제조	20	인스턴트 건강음료믹스의 제조	
		○기능성 건강음료의 실험실적 생산 및 저장성 검사	20	기능성 건강음료의 실험실적 생산 및 저장성 검사	
		○파일로트 생산플랜트에서 WPC 및 생리활성 펩타이드의 생산	20	파일로트 생산플랜트에서 WPC 및 생리활성 펩타이드의 생산	
		○파일로트 생산플랜트에서 기능성 건강음료의 산업적 생산 검토	20	파일로트 생산플랜트에서 기능성 건강음료의 산업적 생산 검토	
	유용 프로바이오틱 유산균의 생산최적화 및 건강음료제품의 유통기한 설정(2세부과제)	○WPC를 기본배지로 한 유용 프로바이오틱 유산균의 생산 검토	20	WPC를 기본배지로 한 유용 프로바이오틱 유산균의 생산 검토하였음.	100
		○유용 프로바이오틱 유산균의 생산을 최적화하기 위한 WPC-based medium을 개발	20	유용 프로바이오틱 유산균의 생산을 최적화하기 위한 WPC-based medium을 개발하였음.	
		○최적배지 하에서 생산방법을 최적화(회분식, 유가식, 연속식 등)하여 생산성(productivity)을 극대화	20	최적배지 하에서 생산방법을 최적화(회분식, 유가식, 연속식 등)하여 생산성(productivity)을 극대화하였음.	

구분	연 구 개 발 목 표	연구개발 목표 및 내용	평가 척도(점)	연구 결과	달성도(%)
2차 년도	유용 프로바이오틱 유산균의 생산최적화 및 건강음료제품의 유통기한 설정(2세부과제)	○생산된 건강 음료제품들의 미생물학적 검사를 통한 안전성 확인	20	생산된 건강 음료제품들의 미생물학적 검사를 통한 안전성 확인하였음.	
		○생산된 건강 음료제품들의 유통기한 설정	20	생산된 건강 음료제품들의 유통기한 설정하였음.	
	건강음료의 임상실험을 통한 항산화 및 면역력 개선 효과 검증(위탁과제)	○대상자 모집 및 intervention	10	대상자모집 및 intervention 하였음.	100
		○임파구 내 DNA 손상 억제능 측정	10	임파구 내 DNA 손상 억제능 측정하였음.	
		○혈장 내 총항산화력 측정	10	혈장 내 총항산화력 측정하였음.	
		○혈장 내 항산화 비타민 측정	20	혈장 내 항산화 비타민 측정하였음.	
		○ LDL의 conjugated diene 측정	20	LDL의 conjugated diene 측정하였음.	
		○적혈구 내 항산화 효소활성 측정	20	적혈구 내 항산화 효소활성 측정하였음.	
		○데이터 분석 및 보고서 작성	10	데이터 분석 및 보고서 작성하였음.	

제 2 절 연구개발 실적 및 기술발전에의 기여도

1. 연구개발 실적

가. 연구 결과에 대한 학술논문 발표

1) “Cytotoxicity effects of whey protein hydrates (WPH) by enzymatic hydrolysis of whey protein concentrate” Milk Science International에 투고중

나. 연구 결과에 대한 특허 출원

1) 특허출원 1건
출원번호 : 10-2007-0022265
제목 : 유청단백질 가수분해물을 유효성분으로 포함하는 항암용 식품조성물

다. 연구 결과에 대한 학술대회 발표

1) 2006년 한국축산식품학회 제 38차 추계 학술대회 및 임시총회 포스터 발표
- WPC-30 가수분해물의 이화학적 특성에 관한 연구, p. 266-268.
2) 2006년 한국축산식품학회 제 38차 추계학술대회 포스터 발표(우수포스터상 수상)
효소를 이용한 유청 단백질 가수분해물의 종양세포 억제효과
3) 2006년 한국미생물·생명공학회 학술대회 포스터 발표
Microbial identification and probiotic properties of lactic acid bacteria isolated from Jeot-gal

라. 교육 및 지도 활용

1) 석사학위 논문 - 1 건
- WPC-30 가수분해물의 이화학적 특성에 관한 연구(2006년 8월 졸업).
2) 학사학위 논문 - 1 건

2. 관련분야 기술발전에의 기여도

○ 본 건강음료 개발기술을 국내 음료 업체에 제공하여 새로운 건강 기능성 음료를 개발하는 데 이용하며 국내 기존 음료 산업체에서의 제품의 다양화 및 고급화에 활용함.

○ 현재 우유 소비가 침체상태에 있는 주 된 원인으로서 우유와 우유 이외의 음료사이에 경쟁이 심화되는 현상을 들 수 있음. 본 연구 결과를 활용함으로써 탄산음료와 콜라 같은 소프트드링크와 경쟁이 가능한 유음료의 개발에 기여할 수 있음. 따라서 축산농가의 소득에 기여가 될 수 있으며, 고부가가치의 기능성 유음료의 공급으로 말미암아 국민의 건강에 크게 기여할 수 있음.

○ 각종식품에서 활용도가 높은 WPC의 수입이 본 연구로 말미암아 상당 부분대체 될 수 있겠음.

○ 한외여과에 의한 원료의 농축은 용이한 관리 및 공간의 절약 효과를 수반하여 국내 낙농산업의 견인차 역할을 할 수 있는 고품질의 치즈를 경제성 있는 조건에서 개발할 수 있음.

○ 개발된 가수분해물의 분말은 다량 소비되는 식품인 두부, 국수, 라면, 햄, 스포츠 음료 등에 소재로 활용하여 유청 식품 소재로서 사용량은 매우 클 것임. 또한, 개발된 경쟁력있는 가수분해물을 식품업계에 활성화하여 생산성을 증대시켜 고부가가치 산업화를 촉진시킴.

○ 본 연구결과를 바탕으로 건강기능성 음료 및 식품(두부, 국수, 라면, 햄, 스포츠 음료 등)의 재료로서 모든 연령층의 기호에 맞는 제품개발에 응용함.

○ WPC의 alcalase 가수분해물이 특이적으로 사람 폐암 세포에 대해 항종양활성을 나타내었으므로 물질 규명을 위한 연구가 필요함.

○ WPC를 기본 배지로하여 *Bacillus polyfermenticus* SCD를 배양하였을 때 높은 항산화활성을 보였음. 여기에 관한 자세한 연구가 필요함.

제 5 장 연구개발 결과의 활용 계획

제 1 절 기대 성과

1. 기술적 측면

○ 치즈 whey로부터 순도와 수율이 높은 WPC의 산업적 분리 방법이 개발되어 유가공 분야에 막분리법인 한외여과를 이용하는데 필요한 제반사항이 파악됨.
○ 이와 함께 유단백질에서 생리활성 펩타이드를 생산하기 위한 적정조건의 파악 및 가수분해물의 분무화 과정의 제어는 유단백질을 활용하기 위한 새로운 지평을 열어줄 것임.
○ Milk-based 음료의 개발로 말미암아 다양한 건강기능식품의 발전에 기여할 수 있다. 본 과제에 의해 개발되는 건강음료가 향후 좋은 모델이 될 수 있음.

2. 경제·산업적 측면

○ 현재 우유 소비가 침체상태에 있는 주 된 원인으로서 우유와 우유 이외의 음료사이에 경쟁이 심화되는 현상을 들 수 있다. 본 연구가 수행됨으로써 탄산음료와 콜라 같은 소프트드링크와 경쟁이 가능한 유음료의 개발에 기여할 수 있음. 따라서 축산농가의 소득에 기여가 될 수 있으며, 고부가가치의 기능성 유음료의 공급으로 말미암아 국민의 건강에 크게 기여할 수 있음.
○ 또한 각종식품에서 활용도가 높은 WPC의 수입이 본 연구로 말미암아 상당 부분 대체될 수 있겠음.
○ 한외여과에 의한 원료의 농축은 용이한 관리 및 공간의 절약 효과를 수반하여 국내 낙농산업의 견인차 역할을 할 수 있는 고품질의 치즈를 경제성 있는 조건에서 개발할 수 있음.

제 2 절 타 연구에의 응용 및 산업체 활용 방안

1. 치즈유청을 이용한 인스턴트 건강음료에 관한 체계적인 연구로 학문적 기초자료 제공.

가. 본 연구 결과를 국내학술대회(한국식품과학회, 한국축산식품학회 등) 및 해외학술대회(International Congress of Meat Science and Technology)에 발표할 예정.
나. 또한 한국식품과학회지, 한국축산식품학회지 등의 학술진흥재단 등재지와 Mest Science 등 SCI 논문에 게재할 예정임.

2. 치즈유청의 생리활성 펩타이드와 프로바이오틱스를 이용한 인스턴트 건강음료 제조 및 관련 사항에 대한 지적재산권(특허, 상표 출원) 취득 및 참여기업 또는 관련 기업들에 대한 산업체 기술 이전 실시 예정.

3. 참여기업체 및 음료 관련 중소기업과 연계하여 치즈유청을 활용한 새로운 신상품을 개발하기 위해 기술지도 및 산업화할 계획임.

4. 치즈유청의 생리활성 펩타이드와 프로바이오틱스를 이용한 인스턴트 건강음료 제조법 및 제조 공정에 대한 기준 model을 제시함.

제 6 장 연구개발과정에서 수집한 해외과학기술정보

1. 국외 논문

가. Angiotensin-I-converting enzyme inhibitory activities of gastric and pancreatic proteinase digests of whey proteins

1) 저자 : Margaret M. Mullallya
2) 저널 : National Dairy Products Research Centre
3) 발행연도 : 1997
4) 요약

β-lactoglobulin(β-Lg)와 α-lactalbumin(α-La)의 효소를 사용하여 가수분해하였다. 그리고 WPC의 가수분해물은 ACE 활동을 저해하는 것으로 나타났다. 대체적으로 가수분해 하지 않은 기질은 가수분해한 기질보다 매우 낮은 ACE 저해효과를 가진다. 고혈압 예방을 위한 기능성 식품으로써 WPC의 잠재적인 응용성을 검토하였다.

나. Functional and Biological Properties of Peptides Obtained by Enzymatic Hydrolysis of Whey Proteins

1) 저자 : S. F. Gauthier
2) 저널 : J. Dairy Science
3) 발행연도 : 2003
4) 요약

이 연구는 WPH가 사용하는 효소를 유청 단백질의 열안정성을 개선하는 목적을 두고 있다. 트립신으로 가수분해한 펩타이드는 열안정성에 개선되어 졌다. 최근 연구에서 가수분해한 유청 펩타이드는 항고혈압 특성을 증명하는 생리적인 기능을 일으킬 수 있다고 보여 졌다. 이 연구는 일정한 펩타이드의 프렉션의 필터링에 의한 가수분해의 분류에 초점을 맞추었다.

다. Separation of iron-binding protein from whey through enzymatic hydrolysis

1)저자 : Sang Bum Kim
2) 저널 : J. Dairy Science
3) 발행연도 : 2007
4) 요약

WPC는 철결합을 위한 가수분해물의 유효성 검사를 하기 위한 9개의 단백질 가수분해효소에

의해 가수분해 하였다. WPC의 가수분해도는 다른 효소(esperase, neutrase, papain, pepsin, protease, trypsin)와 비교하여 pancreatin(13.91%), alcalase(13.60%), flavourzyme(12.80%)가 높았다. Alcalase로부터 분해한 펩타이드의 분자량은 6.5 kDa보다 낮았다. Alcalase 가수분해물에 의한 Iron-binding은 모든 다른 가수분해물 중에서 97.6%로 가장 높았다. 이러한 분리된 fraction은 Lys (18.09%), Ala(17.24%), and Phe(16.58%) 함량들이 높게 나타났다. Alcalase는 WPC로 분리한 iron-binding 펩타이드에 분리를 위한 가수분해물의 생산하기 위한 다른 효소보다 두드러진 효율성을 보여준다.

라. Effect of heat and enzymatic treatment on the antihypertensive activity of whey protein hydrolysates

1) 저자 : Elizabete Lourenço da Cost
2) 저널 : J. Dairy Science
3) 발행연도 : 2006
4) 요약

WPI로부터 획득하여 가수분해물 활력에서 열처리와 효소처리의 영향을 실험하였다. WPI는 65℃~95℃에서 미리 변성하여 Alcalase, α-chymotrypsin 혹은 Proteomix를 사용하여 가수분해하였다. 이렇게 얻어진 가수분해물은 ACE(angiotensin converting enzyme)저해활동과 SHR(spontaneously hypertensive rats)에서 혈압을 낮추는 것에 관하여 연구하였다. α-chymotrypsin효소는 높은 ACE저해활동이 발견되어졌다. Alcalase 효소로 처리되고 65°C에서 열처리에서 얻어진 가수분해물이 SHR에서 가장 효과적으로 감소되었다.

제 7 장 참고문헌

김화영. 1992. 영양상태와 면역능력. 한국영양학회지 25: 312-320.

낙농편람. 2002. 농림부.

이해미, 이여진, 박태선. 2004. 누에번데기 및 누에애벌레 밀리타리스동충하초(*Cordyceps militaris*) 열수추출물의 투여가 고형암이 유발된 마우스의 종양성장 억제 및 면역기능에 미치는 영향. 한국식품영양과학회지 33: 59-65.

이홍규. 한국인의 질병양상의 변화. In: 한국인의 식생활과 질병, pp. 30-44, 서울대학교 출판부, 1997

윤여창. 2000. 치즈 유청으로부터 glycomacropeptide의 분리정제. Korean J. Food Sci. Ani. Resour. 20: 159-165.

전용준. 2004. 우유 락토페린의 NMDA 수용체를 통한 진통효과. 석사학위논문, 건국대학교 축산대학 낙농학과(지도교수 윤여창).

Acharya, M. R. and Shah, R. K. 1998. Infant and weaning food formulations containing probiotic cultures. Indian Food Industry 17: 358-356.

Adamson, N. J. and Reynolds, E. C. 1995. Characterization of tryptic casein phosphopeptides prepared under industrially relevant conditions. Biotechnol. Bioeng. 45: 196-204.

Ames, B. N., Shigenaga, M. K., Hagen, T. M. 1993. Oxidants, antioxidants and the degenerative diseases of aging. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90: 7915-7922.

Andersn, J. W. and Gilliland, S. E. 1999. Effect of fermented milk (Yoghurt) containing Lactobacillus acidophilus L1 on serum cholesterol in hypercholesterolemic humans. J. Am. Coll. Nutr. 18: 43-50.

Asit Sharma, A. and Bhatia, K. L. 1999, Functional properties of whey protein concentrates-A review. J. Dairying Foods Home Sci. 18: 141-154.

Adler-Nissen J. 1986. Enzymatic hydrolysis of proteins for increased solubility. J. Agri. Food Chem. 24: 24-26.

Anne P. L. 2001. Bioactive peptides derived from bovine whey proteins: opoid and ace-inhibitory peptides. Trends in Food Science & Technology 11: 347-356.

Bergsten, P., Amitai, G., Kehrl, J., Levine, M. 1990. Ascorbic acid content of human B and T lymphocytes and monocytes. Ann NY Acad Sci 587: 275-277.

Berry, D. 2000. Blood pressure reducing milk components. Dairy Foods 101: 25-27.

Black, F. T., Anderson, P. L, Oerskov, J. Gaarslev, K. and Laulund, S. 1989. Prophylactic efficacy of lactobacilli on travellers diarrhoea. Travel Medicine 333-335.

Boza, J. J., Augustin, O. M. and Gil, A. 1995. Nutritional and antigenic characterization of an enzymatic whey protein hydrolysate. J. Agric. Food Chem. 43: 872-875.

Boza, J. J., Jimenez, J., Martinez, O., Suarez, M. D. and Gil, A. 1994. Nutritional value and antigenicity of two milk protein hydrolysates in rats and guinea pigs. J. Nutr. 124: 1978-1986.

Burton, G. W., Ingold, K. U. 1984. β-carotene: an unusual type of lipid antioxidant. Science 224: 569-573.

Chahani. K. M., Kaup, S. M. 1989. Calcium metabolism an overview. Nutr. Quart. 13: 47-60.

Clare, D. A. and Swaisgood, H. E. 2000. Bioactive milk peptides: A prospectus. J. Dairy Sci. 83: 1187-1195.

Dave, R. I., Joshi, N. S., Patel, J. R. and Thakar, P. N. 1991. Protein hydrolysates A review. Indian J. Dairy Sci. 44: 557-564.

Elmer, G. W., C. M. Surawicz and Mofarland, L. V. 1996. Biotherapeutic agents Jama 275: 870-876.

Erba, D., Ciappellano, S. and Testolin, G. 2001. Effect of caseionphosphopeptides oninhibition of calcium intestinal absorption due to phosphate. Nutr. Res. 21: 649-656.

Fanton, J. C. and Ward, P. A. 1982. Role of oxygen-derived free radicals and metabolites in leukocytes-dependent inflammatory reactions. Am. J. Pathol. 107: 397-418.

Fitzpatrick, J. J. and O-Keeffe, U. 2001. Influence of whey protein hydrolysate addition to whey permeate batch fermentations for producing lactic acid. Process Biochem. 37: 183-186.

Fox, P. F. 1989. Proteolysis during cheese manufacture and ripening. J. Dairy Sci. 72: 1379-1400.

Frei, B., Sticker, R., Ames, B. N. 1988. Anti-oxidant defenses and lipid peroxidation in human blood plasma. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85: 9748-9752.

Giese, J. 1995. Development in beverages additives. Food Technol. 9: 64-72.

Gonzalez, S. N., Cardozo, R., Appela, M. C , and Oliver, G. 1995. Biotherapeutic role of fermented milk. Biotherapy 8: 129-134.

Hata, Y., Yamamoto, M., Ohni, M., Nakajima, K. Nakamura, Y. and Tokano, T. 1999. Study of the eefect of sour milk on blood pressure in hypertensive subjects. Am. J. Clin. Nutr. 64: 767-771.

Hugunin, A. G. 1987. Application of UF whey proteins: Developing new market in trends in whey utilization. Int. Dairy Fed. Brussels, Belgium, 135.

Gouri, K. K. 1997. Int. Dairy Federation. Proceedings of the second International whey conference in Chicago, USA.

Halken, S., Hansen, K. S., Jacobsen, H. P. 2000. Compension of a partially hydrolysed infant formula with two extensively hydrolysed formulae for allergy prevention. Aprospective, randamised study. Pediatric Allergy and Immunology 11: 149-16.

Halliwell, B. 1996. Antioxidants in human health and disease. Annu Rev Nutr 16: 33-50.

Jayaprakasha, H. M. and Brucekner, H. 1999. Whey protein concentrate : A potential functional ingredient for food industry. J. Food Sci. Technol. 36: 189-204.

Kansal, V. K.. 1992. Essentialities of milk proteins in human nutrition. Indian Dairyman 44: 328-331.

Lahl, W. J. and Braun, S. D., 1994, Enzymatic production of protein hydrolysates for food uses. Food Technol. *48*: 68-71.

Lahl, W. J. and Grindstaff, D. A., 1989, Spices and seasonings: Hydrolysed proteins. Proc. 6th SIFST Symp. Food Ingredients, 27-29.

Mann, E. J.. 1998. Various dairy products. Dairy Ind. Int. 63: 16-17.

McIntosh, G. H., Royle, P. J., Le Leu, R. K., Regester, G. O., Johnson, M. A., Grinsted, R. L., Kenward, R. S. and Smithers, G. W. 1998. Whey proteins as functional food ingredients? Int. Dairy J. 8: 425-434.

Meisel, H. 2001 Bioactive peptides from milk proteins: A perspective for consumers and producers. Aust. J. Dairy Technol. 56: 83-94.

Morr, C. V. 1987. The effect of HTST Pasteurization of milk, cheese whey and cheese whey UF retentates upon the composition, physico-chemical and functional properties of whey protein concentrates. J. Food. Sci. 52: 312-319.

Morr, C. V. and Foegeding, E. A. 1990. Composition and functionality of commercial whey and milk protein concentrates and isolates: A status report. Food Technol. 44: 110-112.

Mulvihill, D. M. 1991. Trends in the production and utilization of dairy protein products: Functional properties and utilization. Food Res. Quarterly 5: 65-73.

Manson W and Annan W. D. 1991. The structure of a phosphopeptides derived from -casein. Achieves of Biochemistry and Biophysics 145: 16-26.

McDonagh, D. and Fitz Gerald R. 1998. Production of Caseinophosphopeptides (CPPs) from sodium caseinate using a Range of commercial protease preparations. J. Int. Dairy Journal 39-45.

Meisel, H., Goepfert, A. and Gnther, S. 1997. ACE-inhibitory activities in milk product. Milchwissenschaft 52: 307-311.

Meisel H and Gunther S. 1998. Food proteins as precursors of peptides modulating human cell activity, Nahrung/Food 42: 175-176.

Meisel, H., Bernard, H., Fairweather Tait S., Fitzgerald R. J., Hartmann, R., Lane, C. N., Mcdonald, D., Teucher, B. and Wal, J. M. 2001. Nutraceutical and functional food ingredients for food and pharmaceutical applications. Br. J. Nutr. 85: 635-640.

Mullally, M. M, H. Meisel, and R. J. FizGerald. 1997. Identification of novel angiotensin-I converting enzyme inhibitory peptide corresponding to tryptic fragment of bovine beta lactoglobuline. FEBS Lett. 402: 99-101.

Nayak, S. K., Pattnaik, P., Sumit Arora and Sindhu, J.S. 1999. Functional peptides from milk proteins. Indian Dairyman 51: 29-34.

Nielsen, W. K. 2000. Cost-effective recovery of whey protein. SDI 3: 24-27.

Otani, H., Kihara, Y. and Park, M. 2000. The immunoenhancing property of a dental casein phosphopeptide preparation in mice. Food Agric Immunol. 12: 165-173.

Ouwehand, A. C., Bianchi , S. B., Fonden, R., Mogensen, S and Salminen, S. 2003. International Dairy Fedration Bulletin No. 380: 4 -19.

Pearce, R. J., 1995. Food functionatilty : Success of failure for dairy based ingredients. Aust. J. Dairy Technol. 50: 15-23.

Pihlanto-Leppl. A. 2001. Bioactive peptides derived from bovine whey proteins: opioid and ace-inhibitory peptides. Trends in Food Science & Technology 11: 347-356.

Pihlanto-Leppl. A., P. Koskinen, K. Piiloa, T. Tupasela, and H. Korhonnen. 2000. Angiotensin-I converting enzyme inhibitory properties of whey protein digets: concentration and characterization of active peptides. J. Dairy Res. 67: 53-57.

Pintado, M. E. and Malcata, F. X. 2000. Hydrolysis of ovine, caprine and bovine whey proteins by trypsin and pepsin. Bioprocess Eng. 23: 275-282.

Pryor, W. A., and Stone, K. 1993. Oxidants in cigarette smoke: radicals, hydrogen peroxide, peroxynitrate, and peroxynitrite. Ann. NY Acad. Sci. 686: 12-18.

Renner, E. 1991. Cultured dairy products in human nutrition. In: *Bulletin of the International Dairy Fedration* No. 255. pp 2-24. Brussels: IDF.

Renner, E. and Abd-EL-Salam. l991. Application of Ultrafiltration in the Dairy Industry. Elsevier Applied Science, London.

Renner, E. l983. Milk and dairy products in human nutrition. Volksw, Verlag, Munchen.

Reynolds E. C. 1997. Reminerilization of enamel subsurface lesions by casein phosphopeptides stabilized calcium phosphate solutions. J. Ent. Res. 76: 1587-1595.

Reynolds E. C. 1999. Anticariogenic casein phosphopeptides. Prot. Pep. Lett. 6: 295-303.

Simakachorn, N., Pichaipat, V., Rithipornpaisarn, P., Kongkaew, C., Tongpradit, P and Varavithya, W. Clinical evaluation of the addition of lyophilized, heat killed Lactobacillus acidophllus LB to oral rehydration therapy in the treatment of acute diarrhea in children. J. Ped. Gastroenterol. Nutr. 30: 68 -72.

Schanbacher, F. L., Talhouk, R. S. Murray, F. A., Gherman, L. I. and Willett, L. B., l998, Milk borne bioactive peptides. Int. Dairy J. 8: 393-403.

Schaafsma, G. 1996. State of the art concerning the probiotic probiotic strains in milk products. Paper given at the IDF Nutrition Week in Potsdam, Germany. Newsletter of the International Dairy Fedration, 145, pp. 23-24. Brussels: IDF.

Sood, S.M. and Ganguli N.C. 2000. Bioactive peptides and proteins from milk. Indian Dairyman 52: 79.

Suskovic, J. Brkic, B., Matosic, S. and Maric, V. 1997. *Lactobacillus acidophilus* M92 as potential probiotic strain. Milchwissenschaft 52: 430-435.

Saavedra, J. M., Bauman, N. A., Oung, I., Perman, J. A. and yolken, R. H. 1994. Feeding of Bifidobacterium bifidum and Streptococcus thermophilus to infants in hospital for prevention of diarrhea and shedding of rotavirus. Lancet 344: 1046-1049.

Sun Y. 1990. Free radicals, antioxidants enzymes, and carcinogenesis, Free Radic. Biol. Med. 8: 583-599.

Ueda.Y, Sakata, F., Watanuma, M., Hayasawa, H., Miyakawa, H., Ochi, H. and Nakasaki, H., 2001, Protective effect of new enteral nutritional formula including whey protein hydrolysate against indomethacin induced ulceration in rats. J. JPN Soc. Nutri. Food Sci. 53: 161-169.

Yamamoto, N. A. Akino, and T. Takano. 1994 a. Antihypertensive effects of different kinds of fermented milk in spontaneously hypertensive rats. Biosci. Biotech. Biochem. 57: 776-778.

Zadow, J. G., 1986. In: *Modern Dairy Technology*. Vol. I. Advances in milk processing. Robinson, R. D. (ed), Elsevier Applied science publishers, London. 273.

주 의

1. 이 보고서는 농림부에서 시행한 농림기술개발사업의 연구보고서입니다.

2. 이 보고서 내용을 발표할 때에는 반드시 농림부에서 시행한 농림기술개발사업의 연구결과임을 밝혀야 합니다.

3. 국가과학기술 기밀유지에 필요한 내용은 대외적으로 발표 또는 공개하여서는 아니됩니다.