

최 중
연구 보고서

지방분화 억제 기능성 유제품 가공 기술 개발

Development of processing technology for weight
control functional dairy products

연구기관

전남대학교 동물자원학부
전남대학교 생물학과
국민대학교 식품영양학과

농림수산식품부

제 출 문

농림수산식품부 장관 귀하

본 보고서를 “지방분화 억제 기능성 유제품 가공 기술 개발” 과제의 최종보고서로 제출합니다.

2008 년 4 월 24 일

주관연구기관명: 전남대학교

총괄연구책임자: 오 세 중

세부연구책임자: 김 응 석

연 구 원: 조 윤 희

연 구 원: 김 승 진

협동연구기관명: 국민대학교

협동연구책임자: 임 지 영

참 여 기 업: 명가유업(주)

서 재 경

요 약 문

I. 제 목

지방분화 억제 기능성 유제품 가공 기술 개발

Development of processing technology for weight control functional dairy products

II. 연구개발의 목적 및 필요성

- 비만은 체내 지방이 과도하게 축적된 상태로 정의할 수 있으며, 최근 비만이 당뇨병이나 동맥경화 등 각종 질병의 원인이 됨은 물론 사회적, 정신적으로 삶의 질을 저하시키는 것으로 알려지면서 치료되어야 할 만성질환이라는 인식이 증가하고 있음.
- 전세계적으로 비만으로 인한 사회, 경제적인 손실은 급격히 상승하고 있으며, 미국의 경우, 비만으로 인하여 매년 약 1170억 달러의 직, 간접경비가 지출되고 있음.
- 우리나라의 경우도 비만으로 인한 사회, 경제적 비용이 1조 17억원(국민건강 영양조사, 2001)에 이르고 있으며 이러한 액수는 비만관련 질병으로 인한 국민의료비의 5%에 해당됨. 또한, 비만인구는 성인에서만 매년 40만 명씩 증가하고 있는 것으로 보고 됨.
- 2001년 보건의식행태 조사의 결과에 따르면 20세 이상 인구 중 24.3%가 지난 1년 간 체중을 줄이려고 노력한 것으로 나타나 체중의 조절에 대한 문제점을 인식하고 의지를 보이고 있음.
- 최근 비만학회는 우리나라 남성의 비만율은 36%, 여성의 비만율은 29.9%에 이르는

것으로 발표하였으며 OECD가 발표한 세계 최고 수준인 미국의 비만율에 근접하고 있음. 따라서, 국민건강 위협에 대한 심각성을 고려할 때 비만에 대한 원인분석 및 대책이 현안과제로 대두되고 있음.

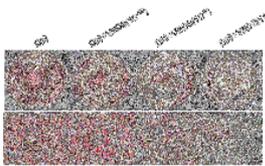
- 전 세계적인 비만 치료제 시장은 약 13억 달러 규모(2000년 기준)이며, 2010년경에는 80억 달러에 달할 것으로 전망되어 높은 산업적 중요성을 가짐.
- 현재 비만 치료를 위한 약물은 심각한 부작용들로 인하여 상당부분 사용이 엄격하게 제한되고 있는 실정이므로, 안전성이 확보될 수 있고 새로운 작용기전을 가진 소재의 개발이 요청되며 비만 억제 식품소재의 개발 시 비만 억제를 위한 예방적 차원의 접근이 가능함.
- .○ 칼슘, 유제품의 섭취수준 증가와 체내 지방세포 분화 억제 효과와의 관련성은 학계, 산업계를 비롯하여 일반 소비자들에게도 많은 관심을 일으키고 있음.
- 본 연구과제에서는 우유칼슘을 비롯한 유청성분의 체중 조절 효과에 주목하고, calcium-binding 활성이 높은 유산균을 선발하고 우유칼슘 함유 체중조절 효과를 보유한 기능성 유제품을 개발하고자 하였음.

III. 연구개발 내용 및 범위

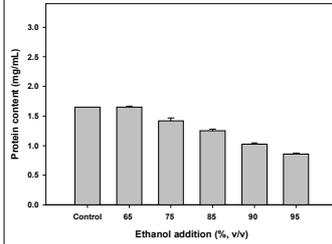
연구개발 목표	연구개발 내용 및 범위
<p>프로바이오틱 활성화평가 및 calcium-binding 프로바이오틱스의 선발</p>	<ul style="list-style-type: none"> • 다양한 원천에서 신규 유산균의 분리 • 유산균의 calcium assimilation 활성 평가 • 유산균의 Calcium phosphopeptide 생산 활성의 비교 • 유산균의 protease 활성 평가 • 선발 유산균의 동정 및 특성 규명 • 선발 유산균의 배양특성 평가 • Cottage cheese 제조를 위한 배양특성 비교
<p>Calcium에 의한 지방축적 감소의 분자적 기전연구</p>	<ul style="list-style-type: none"> • 칼슘에 의한 지방세포 분화 초기의 지방세포 분화 억제 양상 • 칼슘 effector인 Vitamin D3의 지방세포 분화 및 지방축적 억제 분석 • 지방세포 분화 후반부의 칼슘처리에 따른 분화 지연 및 지방축적 양상 비교분석 • 지방세포 분화 후반부의 칼슘처리에 따른 핵수용체 및 핵수용체 표적유전자의 발현변화 • 핵수용체 PPARγ 전사활성에 대한 칼슘의 영향 • 밀크칼슘의 지방세포 분화 및 지방축적에 미치는 영향
<p>우유칼슘 함유 체중조절 소재의 생산 공정 개발 및 제품적성 평가</p>	<ul style="list-style-type: none"> • 초기 시료의 형태, 산제의 종류와 온도 처리 조합이 칼슘가용화에 미치는 효과 조사 • Whey permeate의 효율적 생산 및 calcium phosphate의 침전, 분리 조건 설정 및 수율 개선 • Milk mineral, milk salt와의 화학적 조성 비교 분석 및 유성분 배합을 통한 소재화 연구 • 강화 수준이 원유의 열안정성에 미치는 영향 및 상용칼슘염의 반응양상과 비교 분석 • 강화수준이 음료의 혼탁도, 관능적 특성 및 저장안정성에 미치는 영향 조사 • 강화수준이 요구르트의 조직감 특성 및 관능적 특성에 미치는 영향 평가

IV. 연구개발 결과 및 활용에 대한 건의

1. 연구개발 결과

세부과제명	연구 결과
<p style="text-align: center;">유산균의 calcium-binding 활성 평가 및 최적 균주 선발 (전남대학교)</p>	 <p>10% 탈지유에 dextrose 0.5%와 yeast extract 0.25%를 첨가하여 만든 배지를 멸균(121℃, 15분)하여 균주를 계대 배양하고, MRS broth에 0.1% 염화칼슘을 첨가하여 선발된 균주(40464, 3136, L55, 4149)를 계대 배양한후 칼슘의 농도를 평가한 결과 <i>Lactobacillus plantarum</i> LDM543균주를 선발할 수 있었으며, CPP 생산 능력을 평가한 결과 유아분변에서 분리한 <i>L. plantarum</i> YH가 가장 우수하였음.</p> <p>상업적으로 시판되는 Y-740 균주과 선발된 <i>L.platarum</i> YH 두 균주 stater로 사용하여 각각 cottage cheese를 제조하였으며, <i>L.platarum</i> YH stater는 산생성능력이 다소 미약해 우유에 glucose를 첨가하거나 복합균주로 사용하는 것이 효율적인 것으로 나타났음.</p>
<p style="text-align: center;">Calcium에 의한 지방축적 감소의 분자적 기전연구 (전남대학교)</p>	 <p>Calcium의 농도와 밀접한 관계를 가지는 vitamin D₃가 지방세포분화에 미치는 영향을 살펴보았으며, 분화 8일째 Oil-Red O 염색법을 통해 지방세포 분화 및 지방축적을 확인한 결과 3 sets 모두 지방세포 분화가 억제되었음. 칼슘은 분화초기에 지방세포분화 프로그램에 따라 지방세포 분화를 조절하는 전사조절인자인 PPARγ, SREBP, LXR등 여러 핵수용체들의 발현 시작을 저해하고 분화 후반부의 시기에도 지방세포의 분화를 지연시킬 뿐 아니라 지방축적을 저해하였으며 기존의 발현중인 이들 핵수용체의 발현을 감소시킬 뿐 아니라 지방세포 분화 조절자인 PPARγ의 전사활성을 억제하여 aP2, adiponectin, resistin 등의 표적유전자의 발현을 억제하였음.</p>

**우유칼슘 함유
체중조절 소재의 생산
공정 개발 및
제품적성 평가
(국민대학교)**



농축 한외여과액의 95% 정도를 차지하는 유당은 에탄올 침전 및 가열을 통하여 농축액으로부터 제거되었으며 제조된 우유 칼슘 시제품의 칼슘함량은 탈지유의 한외여과액에서 제조한 시제품은 14.95%, cottage cheese whey

의 한외 여과액을 이용한 경우에는 20.35%로 측정되었음.
칼슘 : 인의 비율은 cottage cheese whey 한외여과액으로부터 제조한 시제품은 1 : 0.68, 탈지유 한외여과액으로 제조한 시제품은 1 ; 1.73으로 나타나 Cottage cheese whey 여과액이 이상적인 칼슘과 인의 비율인 1: 0.8에 유사한 것으로 나타났다.

Calcium은 pH가 감소함에 따라 용해도는 상승하여 pH 4에서는 300mg/200mL의 수준으로 칼슘을 첨가한 경우 98% 이상이 용해 상태로 존재하였다. 시제품을 적용하여 제조한 음료(pH 3.5)는 칼슘을 첨가하지 않은 대조구와 외관을 포함한 관능적 품질에서 차이를 나타내지 않았음.

칼슘 강화 요구르트의 경우 200mg/100 mL의 수준으로 칼슘을 첨가하여도 산의 생성, 생균수 등의 품질요소가 변화하지 않았으며, 공초점 레이저 현미경으로 요구르트의 미세구조는 칼슘이 강화됨에 따라 단백질의 구조가 치밀해 지는 경향이 관찰되었음.

2. 활용에 대한 건의

본 연구에서 선발된 칼슘 assimilation 활성이 있는 *L. plantarum* LDM534 균주와 CPP를 생산하는 *Lactobacillus plantarum* YH는 각각 김치와 유아분변에서 분리한 미생물로 요구르트, 치즈와 같은 발효제품에 적용이 가능한 것으로 확인되어 섭취한 칼슘의 소화관에 있어서 흡수율의 저하에 따른 칼슘부족을 방지할 수 있는 발효제품에 직접적인 응용이 가능할 것으로 판단된다.

현재까지 칼슘은 지방세포의 분화초기에만 지방세포의 분화를 억제하는 효과를 가지는 것으로 알려져 있다. 본 연구에서는 지방세포의 분화가 완성되고 지방축적이 왕성하게 이루어지기 시작하는 분화 후반부(분화 3일 -5일째)에 칼슘(10mM CaCl₂ 혹은 4μM A23187) 처리가 지방세포 분화프로그램의 진행을 지연시키고 이에 수반되는 지방축적이 각각 41% 감소를 유도하는 것으로 조사되어 칼슘은 지방세포 분화 초기 뿐 아니라 중후반부에도 지속적으로 지방축적을 감소시키는 것으로 나타났다. 주관 및 협동과제에서 도출된 밀크칼슘 시스템(pH 4.0, 3mM 칼슘)에 칼슘을 추가하여 최종배지 상태에서 5mM 칼슘 농도를 유지시켜 분화 후반부(분화 3일째)에 처리를 시작하여 2일간 처리하였을 때 지방세포의 분화를 지연시키고 지방축적을 뚜렷하게 저해하였다.

따라서 칼슘은 지방세포 분화 초기 뿐 아니라 중후반부에도 지속적으로 지방축적을 저해하고 본 연구에서 도출된 밀크칼슘시스템에서 이러한 칼슘의 효과가 뚜렷하게 나타나므로 칼슘 유입 능력을 극대화하여 다양한 칼슘강화 제품에 적용될 수 있는 것으로 판단된다.

우유칼슘으로 불리는 우유 유래 미네랄은 농축유청분말 생산의 부산물로부터 분리되는 것이 일반적이다. 본 연구에서는 유당 감소 우유 생산 과정에서 얻어지는 탈지유의 한외여과액이나 cottage cheese whey의 한외 여과액을 농축하여 우유미네랄을 생산하였다. 칼슘 : 인의 비율은 cottage cheese whey 한외여과액으로부터 제조한 시제품은 1 : 0.68, 탈지유 한외여과액으로 제조한 시제품은 1 ; 1.73으로 나타나 Cottage cheese whey 여과액이 이상적인 칼슘과 인의 비율인 1: 0.8에 유사한 것으로 나타났

다. 시제품을 적용하여 제조한 음료(pH 3.5)는 칼슘을 첨가하지 않은 대조구와 외관을 포함한 관능적 품질에서 차이를 나타내지 않았다. 칼슘 강화 요구르트의 경우 200mg/100 mL의 수준으로 칼슘을 첨가하여도 산의 생성, 생균수 등의 품질요소가 변화하지 않았다. 본 연구에서 제조한 우유칼슘은 관능적 품질의 저하 없이 칼슘 강화 기능성 요구르트를 생산하는데 사용될 수 있을 것으로 판단되며 요구르트 자체가 가지는 산성 pH는 칼슘을 이온화시켜 칼슘의 장내 흡수를 촉진에 기여할 것으로 생각된다.

본 연구결과 중 *Lactobacillus plantarum* YH에 대해서는 참여기업과 공동으로 특허출원(출원번호:10-2008-0019589)을 하여 산업화를 위한 기반을 조성하였고, SCI급 논문에 연구결과를 다수 게재할 계획이다

SUMMARY

Lactic acid bacteria (LAB) have been studied for use as probiotics for dairy products and dietary supplement. We found among strains of LAB isolated from various sources such as dairy products, Kimchi, raw milk, and infant feces with regard to the ability to bind Ca ion from laboratory growth medium. Ca-binding *Lactobacillus* strain was isolated from Kimchi and the strain was identified as *Lactobacillus plantarum* LDM534. by use of API carbohydrate fermentation pattern and 16s rDNA analysis. And we screened and characterized CPP produced by *L. plantarum* YH from infant feces.

Probiotic study was to investigate the comparative antioxidant activities of 23 probiotics strains according to their free radical scavenging activities against DPPH (1,1-diphenyl-2-picrylhydrazil), L-lactate production, Ca-binding activity, Tested strains were grown in MRS broth and 10% skim milk at 37°C for 24 h. The bacterial cell were centrifugated at 6000 x g for 20 min at 4°C to obtain cell-free supernatant. The L-lactate ration, DPPH radical-scavenging, Ca-binding activity of all tested strains were in the range of 50 ~ 80%, 90%, and 1 ~ 2.3mg/L respectively. Based on their lactic acid production, 10 strans of *Lactobacillus* were isolated to assess the ratio of lactate isomer using analysis of L-lactate dehydrogenase activity. *L. casei* and *S. thermophilus* produced D(-) and L(+) lactate at the ratio of 0:100 whereas *L. acidophilus* strains produced L(+) lactate at 80% ratio. *L. plantarum* YH with antioxidant potential and CPP production will improve the beneficial effect in intestinal microbial ecosystem. This strain may be a promising material for new applications in the dairy industry.

Calcium plays a role as a signaling molecule in various cellular events. It has been reported that cellular calcium inhibits lipid accumulation via suppression of adipocyte differentiation at the early stage. In our study,

mobilization of intracellular calcium using calcium ionophore, A23187, at the early stage of adipocyte differentiation (day 0) resulted in the suppression of adipocyte differentiation and this result is consistent with previous report. This calcium effect may be due to block the expression of C/EBP α , PPAR γ and SREBP which are known for key regulators in adipogenesis. Vitamin D3, a calcium effector and regulator in our body, also has a inhibitory effect in adipocyte differentiation at the early stage. VDR, the cognate receptor for VitD3, has no suppressive effect on PPAR γ -mediated transcriptional activity in the presence or absence of VitD3. In contrast, VDR/VitD3 reduced LXR-induction of LXR element-fused luciferase, suggesting that VitD3 reduces fat accumulation in adipocyte via suppression of LXR-mediated transcription activity. High concentration of extracellular calcium increases calcium influx and thus causes suppression of adipocyte differentiation at the early stage. However, it was not clear whether increased extracellular calcium has the similar suppressive effect on adipocyte differentiation and following lipid accumulation in the middle or late stage. In our study, high extracellular calcium (10 mM CaCl₂) treatment to 3T3-L1 cells in the late stage (day 3-5) of adipocyte differentiation led to reduction of lipid droplets in adipocytes with reduction of mRNA level of adipogenic transcription factor such as PPAR γ . A23187 (4 μ M) also showed the same effect with extracellular calcium in the late stage of adipocyte differentiation. Furthermore, mRNA level of aP2, a well-known differentiation marker of adipocyte, was also dramatically reduced, suggesting that increased intracellular calcium may reverse back the adipogenic program by reduced expression of adipogenic transcription factors. PPAR γ , the master regulator of adipogenesis, initiates its expression at day 2 and facilitate adipogenesis by upregulation of adipogenic gene expression. In reporter gene assay using PPAR response element-fused luciferase, A23187 (2 μ M) inhibited PPAR γ induction of

the luciferase activity in a dose-dependent manner, indicating that calcium suppresses adipogenesis not only through reduction of PPAR γ expression but also through inhibition of PPAR γ transcription activity. Rosiglitazone, a PPAR γ ligand for PPAR γ activation, partially recovered A23187-mediated suppression of adipogenesis at the late stage (day 3) but not at the early stage (day 0). Since PPAR γ initiates its expression at day 2 during adipocyte differentiation, this result further strengthens that calcium inhibits adipogenesis in the late stage at least partially through suppression of PPAR γ -induced transcriptional activity. Calcium has been reported to activate ERK activity. ERK phosphorylates PPAR γ , resulting in reduction of PPAR γ transcription activity. In our study, inhibition of ERK activity by an ERK inhibitor, PD98059, did not rescue A23187 suppression of adipogenesis, indicating that inhibitory effect of calcium is not due to ERK activation. Since milk calcium samples (pH 4.0, 3mM calcium) has low calcium content, we increased calcium concentration using CaCl₂ and adjusted to 5mM concentration in the differentiation media. Milk calcium (pH 4.0, 5mM) also showed strong suppression of adipogenesis in the late stage and this results suggest that milk calcium system used in our study may be applied for developing new milk products which have the intensified capacity of calcium influx.

Milk mineral also called as milk calcium was produced from two different sources, skim milk UF permeate (SM-UFP) and cottage cheese whey UF permeate (CW-UFP) after concentration. Lactose, the major constituent in SM-UFP and CW-UFP was crystallized out by the addition of ethanol followed by heat treatment. The calcium content in pilot calcium product produced from SM-UFP and CW-UFP was 14.95 and 20.35%, respectively. Pilot Ca product produced from CW-UFP provides the 1 : 0.7 calcium to phosphorus ratio that is close to optimal absorption ratio of 1 : 0.8.

There was no significant difference in solubility between pilot Ca products and solubility was greatly improved as pH decreased. When Ca was added at the level of 300 mg/ 200 mL more than 98% of Ca was present as soluble form at pH 4. In terms of sensory quality, no difference was found between control and Ca fortified acid beverage (pH 3.5) at the same additive level. The Ca fortified yogurt (200 mg Ca/100 mL) showed the same quality attributes including acid production viable cell count and sensory quality. Based on the result, pilot ca product (from CW-UFP) can be used for the production of functional Ca fortified yoghurt without sacrificing sensory quality. Considering acidic nature of yoghurt, it can be used as a suitable carrier to deliver functional Ca to our body.

CONTENTS

Chapter 1. Introduction	14
1. Justification of research	14
2. Objective and scope of research	15
Chapter 2. Current status of technique	16
Chapter 3. Research contents and result	18
1. Characterization of probiotic culture for calcium-binding activity and development of functional cultured dairy products	18
2. Molecular study of Calcium suppressive effects on the adipogenesis	110
3. Development of processing steps for the production of milk calcium and its application in functional foods as a weight control ingredient	164
Chapter 4. Achievements and contributions	199
1. Characterization of probiotic culture for calcium-binding activity and development of functional cultured dairy products	199
2. Molecular study of Calcium suppressive effects on the adipogenesis	200
3. Development of processing steps for the production of milk calcium and its application in functional foods as a weight control ingredient	200
Chapter 5. Application	201
Chapter 6. International trend and scientific information	202
Chapter 7. Reference	203

목 차

제 1 장 연구개발과제의 개요 ————	14
제 1 절 연구개발의 필요성————	14
제 2 절 연구개발의 목적 및 범위————	15
제 2 장 국내외 기술개발 현황 ————	16
제 3 장 연구개발수행 내용 및 결과 ————	18
제 1 절 Probiotic 활성 평가 및 calcium-binding Probiotics의 선발	— 18
제 2 절 Calcium에 의한 지방축적 감소의 분자적 기전연구	— 110
제 3 절 우유칼슘 함유 체중조절 소재의 생산 공정 개발 및 제품적성 평가	— 164
제 4 장 목표달성도 및 관련분야의 기여도 ——	199
제 1 절 Probiotic 활성 평가 및 calcium-binding Probiotics의 선발	— 199
제 2 절 Calcium에 의한 지방축적 감소의 분자적 기전연구	— 200
제 3 절 우유칼슘 함유 체중조절 소재의 생산 공정 개발 및 제품적성 평가	— 200
제 5 장 연구개발결과의 활용 계획 ————	201
제 6 장 연구개발과정에서 수집한 해외과학기술정보 —	202
제 7 장 참고문헌 ————	203

제 1 장 연구개발과제의 개요

유산균은 프로바이오틱스(Probiotics)로 이용되는 대표적 미생물로 낮은 pH에 대한 내성이 있고 탄수화물을 발효시켜 최종 대사산물로 젖산을 생산하는 미생물의 총칭이다. 유산균은 발효식품과 인체 장내에 존재하기 때문에 직접적으로 식품에 이용이 가능한 장점이 있다. 우유 칼슘은 우유 중에 존재하는 미네랄 성분중 많은 양을 차지하며 소화 흡수율이 높은 기능성 때문에 많은 식품에서 유용한 첨가물로 사용되고 있다.

사회, 경제적인 측면에서 비만으로 인한 손실이 커지고 있어 많은 비만에 대한 국가적 손실을 최소화하기 위한 노력이 진행되고 있다. 우유 칼슘이 지방세포 분화억제에 대하여 영향을 주어 체지방의 축적을 방지 할 수 있다면 침체된 국내 유아공품의 소비 증진에 도움이 될 것이다. 그러나 이러한 물질들이 발현하는 저해효과는 많은 비만치료제와 직접 비교하였을 때에는 비교적 낮은 활성을 나타내지만 대량으로 상시 섭취하는 식품 중에 존재한다는 점에서 그 유용성이 기대된다.

칼슘은 세포내의 다양한 신호경로를 활성화하여 세포의 생리적 기능을 수행하며 최근 들어 지방세포의 분화를 억제하는 것으로 확인되었으나 분화초기에만 작용하는 것으로 집중 연구되어 고칼슘 섭취를 통한 지속적인 체중감량에 대한 가능성에 대한 연구가 필요하다. 본 연구과제에서는 골밀도 증진에만 집중되어 있는 칼슘의 효과에 대해 칼슘의 새로운 생리적 역할, 즉, 지방세포 분화 및 지방축적 억제에 대한 분자기전을 연구함으로써 고칼슘 함유 기능성 유제품의 기능 다양성에 대한 기초자료를 제공하였다.

따라서 본 과제에서는 칼슘의 지방세포 분화 억제 기전 규명을 통하여 유제품의 칼슘함량을 증진시키고 칼슘의 이용성을 확대시키고자 칼슘과 결합하는 유산균을 선발하여 그 유산균으로 제조된 유제품에 대한 가공기술을 개발함과 동시에 칼슘 용해성을 개선시킨 식품가공처리 기술에 대한 연구를 수행하였다.

제 1 절 연구개발의 필요성

비만은 체내 지방이 과도하게 축적된 상태로 정의할 수 있으며, 최근 비만이 당뇨병이나 동맥경화 등 각종 질병의 원인이 됨은 물론 사회적, 정신적으로 삶의 질을 저하시키는 것으로 알려지면서 치료되어야 할 만성질환이라는 인식이 증가하고 있다. 전세계적으로 비만으로 인한 사회, 경제적인 손실은 급격히 상승하고 있으며, 미국의 경우, 비만으로 인하여 매년 약 1170억 달러의 직, 간접경비가 지출되고 있는 것으로 파악되고 있다.

우리나라의 경우도 비만으로 인한 사회, 경제적 비용이 1조 17억원(국민건강영양조사, 2001)에 이르고 있으며 이러한 액수는 비만관련 질병으로 인한 국민의료비의 5%에 해당됨. 또한, 비만인구는 성인에서만 매년 40만 명씩 증가하고 있는 것으로 보고되고 있어 비만에 대한 사회적 문제로 대두되고 있다.

특히 복부비만은 환경적인 요인과 더불어 유전적 요인에 의한 영향을 받으며, 성인형 당뇨병 (제2형 당뇨병), 고혈압, 심장동맥성심질환 등과 같은 주요 성인병의 원인이 되며 여러 가지 암 등을 유발시켜 그 중요성에 대한 인식이 점차 증가되고 있다. 따라서, 세계보건기구가 성인건강을 위협하는 심각한 질병의 하나로 규정하고 있으며 복부비만은 고혈당증 (hyperglycemia), 고지혈증(hyperlipidemia) 및 고인슐린혈증(hyperinsulinemia)을 유발시켜 이자의 기능상실로 이어지고 궁극적으로는 인슐린저항성(insulin resistance)을 일으켜 당뇨병적 환경을 가져온다.

최근 한국도 이러한 복부비만에 의한 성인형 당뇨병이 전체 당뇨의 80~90%를 차지하는 것으로 확인되었으며 2030년이면 7백22만명에 달해 인구 7명당 1명꼴로 성인형 당뇨병 환자가 발생될 것으로 예측된다(2005년 3월 14일자 조선일보).

현재 국내에서 빠른 증가율을 보이는 이러한 복부비만, 당뇨병, 심질환 및 암(유방암, 대장암, 췌장암 및 전립선암 등)에 의한 국민건강 위협에 대한 심각성을 고려할 때 이에 대한 원인분석 및 대책이 현안과제로 대두되고 있다.

2001년 보건 의식행태 조사의 결과에 따르면 20세 이상 인구 중 24.3%가 지난 1년간 체중을 줄이려고 노력한 것으로 나타나 체중의 조절에 대한 문제점을 인식하고 의

지를 보이고 있으며, 최근 비만학회는 우리나라 남성의 비만율은 36%, 여성의 비만율은 29.9%에 이르는 것으로 발표하였으며 OECD가 발표한 세계 최고 수준인 미국의 비만율에 근접하고 있음. 따라서, 국민건강 위협에 대한 심각성을 고려할 때 비만에 대한 원인분석 및 대책이 현안과제로 대두되고 있다.

전 세계적인 비만 치료제 시장은 약 13억 달러 규모(2000년 기준)이며, 2010년 경에는 80억 달러에 달할 것으로 전망되어 높은 산업적 중요성을 가진 제약산업에서 블루오션으로 자리매김을 하고 있다. 현재 비만 치료를 위한 약물은 심각한 부작용들로 인하여 상당부분 사용이 엄격하게 제한되고 있는 실정이므로, 안전성이 확보될 수 있고 새로운 작용기전을 가진 소재의 개발이 요청되며 비만 억제 식품소재의 개발 시 비만 억제를 위한 예방적 차원의 접근이 가능하다.

칼슘, 유제품의 섭취수준 증가와 체내 지방세포 분화 억제 효과와의 관련성은 학계, 산업계를 비롯하여 일반 소비자들에게도 많은 관심을 일으키고 있다.(Jemel et al., 2000; Hand and Jemel, 2003). 비록 비만치료제 보다 낮은 활성을 나타내지만 대량으로 상시 섭취하는 유가공품 중에 존재한다는 점에서 그 유용성이 있을 것이다.

따라서, 칼슘의 지방세포 분화 및 지방축적 억제효과에 대한 분자기전을 연구하여 고칼슘 함유 기능성 유제품의 비만예방 및 감소 효과에 대한 이론적 기초자료를 제공함으로써 칼슘향상 유제품의 지속적인 개발과 생산 증대의 효과를 기대할 수 있다.

본 연구과제에서는 우유칼슘을 비롯한 유청성분의 체중 조절 효과에 주목하고, calcium-binding 활성이 높은 유산균을 선발하고 우유칼슘 함유 체중조절 효과를 보유한 기능성 유제품 개발에 대한 연구를 수행하였다.

제 2 절 연구개발의 목적 및 범위

본 연구에서는 비만억제 및 체중조절에 효과를 나타낼 수 있는 유산균 및 유유성분을 탐색하고 궁극적으로 이를 이용한 기능성 유제품을 개발하고자 하였으며 연구

의 목적 달성을 위한 핵심기술을 다음과 같이 정하였다.

- 칼슘 흡착 활성이 있는 신규 유산균의 선발 및 프로바이오틱 활성 조사 기술 개발 및 밀크칼슘 시료의 지방세포 분화 및 지방축적에 미치는 영향 평가기술 개발
- 지방세포 분화 후반부의 칼슘에 의한 분화 및 지방축적에 대한 평가 및 이에 대한 분자기전 연구 및 칼슘 effector인 VitD3을 이용한 칼슘조절을 통한 지방세포 분화 및 지방축적억제 기술개발
- 효율적 칼슘가용화 방법 정립 및 한외여과를 이용한 whey permeate의 생산과 우유칼슘의 분리 정제기술 개발

Calcium-binding 활성이 높은 프로바이오틱스 균주를 선발하고, 우유칼슘 함유 체중조절소재의 생산 공정을 개발하며, 최종적으로 cottage cheese와 요구르트에의 제품 적성을 평가하여 기능성 유제품의 생산에 기초자료를 제공하고자 하였다.

제 2 장 국내외 기술개발 현황

2005년 9월 미국의 시카고에서 개최되었던 국제 유청학회(International Whey Conference)에서 테네시 주립대학(Univ. of Tennessee)의 Zemel 교수는 유청에 존재하는 성분과 체중조절과의 상관관계가 있으며, 유청중의 칼슘이 체중감소에 효과적이라고 보고하였다.

체중조절에 작용하는 유청 성분은 칼슘이 60%, 그 밖의 성분이 40% 정도로 관여되어 있을 추정되고 있으며 칼슘의 비만 억제 효과에 관하여 다음과 같은 기작이 설명되고 있다 (Fig. 1).

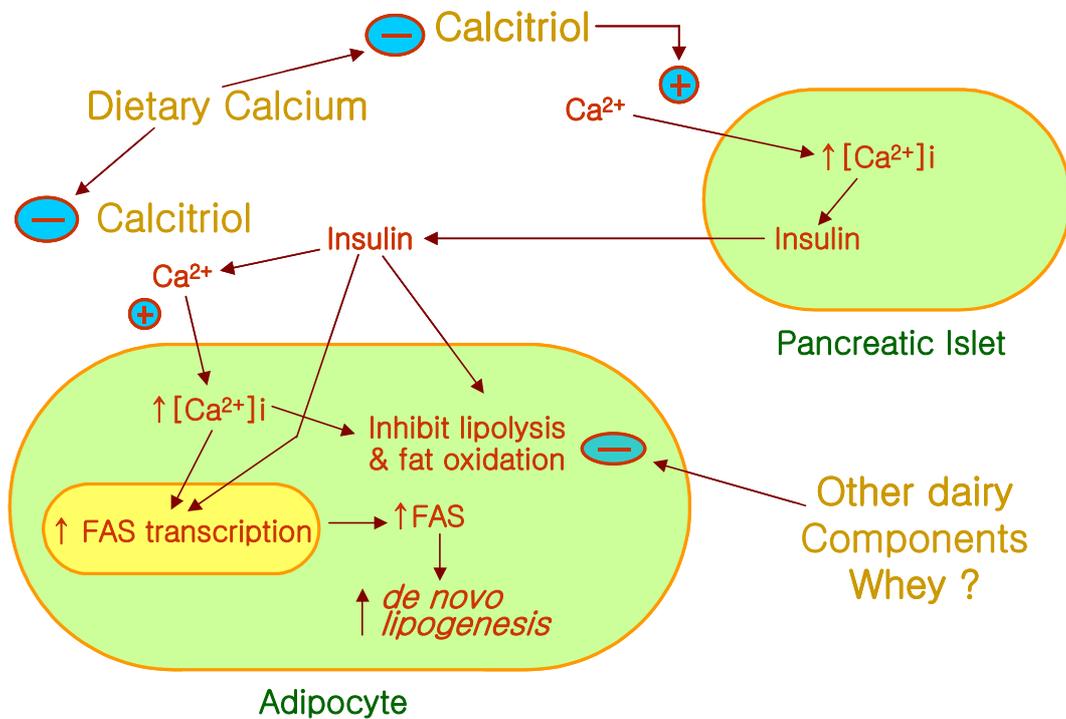


Fig. 1 Proposed mechanism of calcium on inhibition of adiposity

현재까지 국내에서 칼슘이 지방세포에 관련하여 연구된 분야는 Sphingosine-1-phosphate (S1P)에 의한 지방세포내에 지질분해의 증가와 leptin mRNA 생성감소와 함께 세포내 cAMP와 칼슘증가에 대한 연구(Jun et al., 2006)가 진행되었으나 cAMP의 활성화에 의한 지질분해 증가에 대한 연구로 칼슘과의 직접 연관성은 가지고 있지 않다.

해외의 경우 최근 칼슘이 지방세포 분화초기에 미치는 영향과 기작에 관한 연구가 보고되었다. Patel and Lane(2000)은 칼슘 의존적 단백질분해효소인 Calpain이 지방전구세포의 mitotic clonal expansion 시기인 지방세포 분화초기에 CDK 저해제인 p27의 분해촉진을 통해 지방세포의 분화를 촉진한다고 보고하였으며, Neal and Clipstone(2002)은 또 다른 칼슘 의존적 단백질인 serine/threonine phosphatase calcineurin이 세포내 칼슘에 의한 분화 초기 지방세포 분화억제 효과를 매개한다고 보고하였다. 이 연구에서 지방전구세포에서 calcineurin의 지속적인 발현은 지방세포 분화 촉진 전사인자인 PPAR γ 와 C/EBP α 등의 발현시작을 억제하여 분화프로그램의 진행이 이루어지지 않는다고 보고하였다.

Kong과 Li(2006)는 calcitriol(Vit. D3)는 지방세포의 분화를 농도 의존적으로 억제하고 지방세포 분화를 조절하는 전사인자인 PPAR γ , C/EBP α 및 SREBP 등의 발현억제를 유도한다고 보고하였다.

한편 Zemel(2000a) 등은 고칼슘 diet는 비만환자의 체중감소를 유도하나 세포내 칼슘증가는 지방세포의 분화에 대한 칼슘의 영향을 연구하는 다른 연구진과는 달리 오히려 지질형성유전자의 발현과 지질형성은 촉진시키고 지질분해는 감소시키며, 칼슘의 effector인 Vit.D3는 사람의 지방세포에서 지질분해를 억제한다고 보고하였다. Zemel은 다른 논문(2000b)에서 사람의 지방세포 분화에 있어서 세포내 칼슘은 분화초기에는 분화를 억제하나 후반부에는 분화를 촉진하고 지질 축적을 촉진시키는 양면성 조절역할을 한다고 보고하였다.

유청 내 존재하는 체중 조절성분의 명확한 구명과 구체적 상품화가 시도된 사례는 전 세계적으로 보고된 바 없으나, 우유에 존재하는 칼슘이 세포내 지질 대사에 연관성이 있을 것으로 추정하고 있다.

식품에 칼슘 강화의 목적으로 상용되는 칼슘은 화학적 합성품으로 탄산, 인삼칼슘, 염화칼슘 등이 있으며 천연칼슘 소재로는 우골, 돈골, 난각, 해조분말 등이 이용되고 있으나, 그 효용성 측면에서는 유청 칼슘보다는 낮은 것으로 보고되고 있다.

칼슘의 체내 이용성은 식품에서 섭취된 칼슘의 양과 장관으로부터 흡수되는 정도에 따라 좌우된다. 일반적으로 칼슘의 흡수는 소장 상부에서 능동수송(active transport)에 의해서 이루어지며, 장관의 하부로 내려갈수록 수동수송(passive transport)에 의해서 흡수가 된다. 칼슘이 체내로 흡수되려면 장관내에서 가용상태로 존재해야 되는데, 장내의 pH가 알칼리성으로 변하면 칼슘은 쉽게 침전되기 쉬운 상태가 되어 이용성이 낮아진다. 또한 불용성 칼슘염의 형성은 영양가의 저하와 요로 결석이 발생할 위험성이 높아진다. 우유 칼슘의 장내 흡수는 Vitamin D가 촉진시키며 우유 중에 함유된 유당에 의해서도 흡수가 촉진되는 것으로 알려져 있다.

우유중의 casein에서 분리된 phosphopeptide는 소장에서 칼슘을 가용화시키는 ligand의 역할을 함으로써 칼슘의 흡수를 촉진하는 것으로 밝혀졌다. β -casein으로부터 얻어진 phosphopeptide가 칼슘과 결합하여 장 점막 세포로의 흡수를 촉진하며, phosphopeptide가 칼슘 흡수 및 대퇴부의 칼슘 축적을 유의적으로 증가시킨다. β -Casein 중 인과 결합된 serine이 많이 존재하는 영역은 소화효소에서 쉽게 가수분해 되지 않으며, 소장 내의 칼슘 침전을 억제시켜 궁극적으로 가용성 칼슘 함량을 증가시켜 회장에서의 칼슘 흡수를 촉진시키는 것으로 밝혀졌다. 또한 casein phosphopeptide (CPP)는 소장 내에 존재하는 인산칼슘의 침전을 억제시키는데, α_{s1} -casein-5P (59~79잔기), β -casein-4P (1~25잔기)가 이러한 기능을 수행하는 CPP인 것으로 밝혀졌다.

그러나 CPP는 체내 칼슘의 흡수율을 증가시키는데 효과가 인정되지만 다른 칼슘제와의 병용에 한계점이 있으며 가격이 고가(40,000원/kg) 이므로 대체 소재 개발에 관한 연구가 진행되고 있다.

또한 어류를 이용한 천연칼슘제는 일본의 경우 어류의 뼈를 초산에 침적시키고 연화시키는 수용성 칼슘의 제조 방법이 개발 되었으나 공정이 복잡하고 수율이 낮은 단점이 있으며 유청칼슘은 "milk mineral" 이라는 이름으로 생산 판매되고 있으며(\$9,200/ton) 제품 내 칼

습의 함량은 20~30% 수준이며 유제품에 가장 많이 이용되고 있다.

비만관련 식품 소재화 기술은 주로 식물추출물을 대상으로 진행되었으며, 콩, 은행나무, 쑥, 유칼리나무, 박하, 녹차 등이 많이 연구되어 왔으나, 국내 식품회사의 원재료 수입 의존도는 90%이상으로 추정하고 있다.

기능성 유산균 역시 80% 이상을 미국과 유럽에서 수입하고 있으며, 우유 유래 기능성 물질은 거의 100%를 수입에 의존하고 있는 실정이다.

이와 같은 조사결과를 근거로 할 때, 비만 조절용 소재로써 칼슘의 기능성에 관한 연구는 체계적으로 진행된 바 없으며, 특히 유산균 및 유가공품에 대한 비만 소재 및 칼슘 소재와 관련된 연구는 매우 미흡한 실정으로서 유가공의 산업적 발전을 위한 관련 기술의 개발이 요청된다.

제 3 장 연구개발수행 내용 및 결과

제 1 절 : Probiotic 활성 평가 및 calcium-binding Probiotics의 선발

1. 연구수행방법

가. 유산균의 분리, 동정 및 보존

본 실험에서 사용한 유산균은 유제품, 분변 등에서 분리한 균주를 사용하였다. MRS Agar plate에 23종의 유산균을 각각 streak plate법으로 도말하고 37℃, 24시간 배양하여 노란색 집락을 띄는 colony를 선택하여 순수분리 하였다. 선발된 균주는 Bergey's Manual of systematic bacteriology 및 Bergey's Manual of Determinative Bacteriology에 따라 그람염색, catalase 및 3% KOH test 등을 조사하였고, Biomerieux API 50CH를 이용하여 동정을 완료하였다. 유산균의 보존을 위해 MRS Agar에 streak plate법을 이용하여 순수분리 한 후 MRS broth에 2차 계대 배양한다. 3,000rpm에서 10분간 원심 분리하여 상등액은 버리고 pellet에 skim milk (10%), lactose (2%), yeast extract (0.3%)가 함유된 배지를 제조하여 혼합하였다. 이것을 vial에 1ml씩 분주하여 동결건조하고 -70℃의 deep freezer에 보관하면서 사용하였다.

나. 내산, 내담, 박테리오신 평가

1) 내산, 내담증성 평가

김치와 유아분변에서 총 120종의 유산균을 분리하였으며, 이중 유제품에 적용이 가능한 49종을 선발하여 내산성, 내담증산성, 박테리오신 생성 유무 등을 확인하였으며, 전남대학교 동물자원학부 보유 유산균 16종을 더하여 총 65종의 유산균을 대상으로 평가 하였다. 유제품에 사용되고 있는 유산균의 경우 내산성이 높은 것으로

알려져 있기 때문에 이들 간의 내산성 비교는 보다 극단적인 조건이 요구되는바 pH 1.5, 2.0, 및 2.5에서 수행하였다. 내산성 평가는 0.05 M Sodium phosphate 용액을 제조하여 HCl로 pH를 1.5, 2.0, 5.2로 조정하였다. 여기에 37종의 유산균을 MRS 및 GAM broth에서 18시간 배양한 후 Cell을 원심분리(2000 rpm, 15분) 한 다음 0.85% saline으로 washing(3회 반복) 하였다. 초기균수가 10^8 /ml 정도가 되도록 0.05 M Sodium phosphate buffer에 접종 한 후 37°C에서 2시간 진탕배양기에서 배양한 후 생균수를 측정하여 내산성을 비교 하였다. 내담즙산성 평가는 MRS 배지에 여과 제균된 oxgall(Difco, USA) 용액을 oxgall 함량으로 0.5% (w/v)가 되도록 첨가하여 준비한 다음 내산성평가에서 준비한 유산균 현탁액을 접종하여 37°C에서 24시간 배양하여 생균수를 평가하였다.

2) 박테리옌 평가

박테리옌 생산 여부를 확인하기 위하여 내산성 평가에 사용하였던 49종의 균주를 대상으로 평가 하였다. 유산균을 MRS 고체배지에 이쑤시개로 접종 후 37°C에서 24시간 배양한 다음 지시균이 접종된 MRS soft-agar(50°C)를 중층하여 다시 37°C에서 24시간 배양하여 억제환의 생성 여부를 조사하였다. 박테리옌 활성의 최종 확인은 MRS broth에서 배양된 유산균 배양액을 원심분리(5,000 rpm, 15분) 하여 셀을 제거한 다음 1 N HCl을 이용하여 pH를 6.5로 조정한 후 0.45 μ m filter로 셀을 완전히 제거후 MRS agar에 점적하여 clean bench에서 건조(실온에서 10분)시킨 후 여기에 0.05M sodium phosphate(pH 7.0)에 protease-K를 1 μ g/ml의 농도가 되도록 제조된 효소액 2 μ g을 박테리옌 점적부위 근처에 재차 점적하여 37°C에서 1시간 배양하였다. 반응이 완료된 plate를 지시균이 1% 접종된 MRS-soft agar 7 ml 중층하여 37°C에서 24시간 배양하여 억제환의 여부를 확인하였다. 이때 유산균의 지시균으로는 항균물질에 대한 감수성이 좋은 *Lactobacillus delbrueckii lactis* ATCC 4797를 고려대학교에서 분양받아 사용하였다.

다. 젖산 생산 능력의 평가

유산균의 젖산 생산 정도를 비교하기 위하여 0.5% CaCO₃가 첨가된 MRS 배지에 유산균액 10ml을 paper disc에 점적한 다음, 24시간, 48시간 배양 후 0.85% lactic acid control과 비교하여 CaCO₃의 용해성을 비교하였다. 또한 젖산의 이성질체 비율을 조사하기 위하여 HPLC를 이용하여 L형태와 D형태의 비율을 평가하였다.

라. Calcium (Ca²⁺) Assay

유산균을 10% skim milk 배지에 배양하여 원심 분리하여 상등액을 0.45µm syringe filter로 여과하여 시료로 사용하였다., 대조구는 10% 탈지유 배지에 lactic acid를 이용하여 pH를 4.5로 조정 한 후, 3,000rpm에서 10분간 원심 분리하여 상등액을 0.45µm syringe filter로 필터하여 사용하였다. 칼슘 함량은 Quanticrom™ calcium assay kit (DICA-500)을 사용하여 Table 1.과 같이 희석한 후 96-well plate에 각각 5 µl씩 넣고 612nm에서 흡광도를 측정하였으며, calcium standard curve와 비교하여 함량을 계산하였다.

Table 1. Diluted standard

No.	Premix + H ₂ O	Total Volume (ul)	Ca(mg/dL)
1	100ul + 0ul	100	20
2	80ul + 20ul	100	16
3	60ul + 40ul	100	12
4	40ul + 60ul	100	8
5	30ul + 70ul	100	6
6	20ul + 80ul	100	4
7	10ul + 90ul	100	2
8	0ul + 100ul	100	0

마. Protease 활성측정

Protease fluorescent detection kit(Sigma Product Code PF0100)를 이용하여 측정하였다. Pellet은 50mM Tris buffer(0.5g/ml)에 용해시켜 사용하였다. Incubation buffer(20mM sodium phosphate with 150mM sodium chloride, pH 7.6) 20 μ l, FITC-casein substrate 20 μ l, sample 10 μ l를 혼합하여 빛을 받지 않게 갈색 microcentrifuge tube에 담았다. Blank는 sample대신 D.W나 MRS broth를 사용하였고 대조구는 FITC(Fluorescein isothiocyanate) 0.5 μ g/ml를 시료 대신 첨가하여 잘 혼합한 후 37 $^{\circ}$ C 항온 수조에서 60분간 처리하였다. 0.6N Trichloroacetic acid(TCA)를 150 μ l 첨가한 후 37 $^{\circ}$ C 항온수조에서 30분 동안 처리하였다. 14,000rpm에서 10분간 원심분리 한 후 상등액 10 μ l와 Assay buffer(500mM Tris buffer, pH8.5) 1ml을 잘 혼합하여 485/535nm에서 측정하였다.

바. Casein Phosphopeptide (CPP) 측정

1) 시료의 준비

MRS broth 200ml에 시료 2ml을 넣고 37 $^{\circ}$ C에서 24시간동안 배양하고 4 $^{\circ}$ C에서 3,000rpm으로 15분 원심분리하여 상등액과 pellet을 각각 따로 멸균된 튜브에 보관하였다. Pellet 0.2g에 50mM Tris hydrochloride buffer(pH 7.0) 2ml을 혼합하여 sonication한 다음(1분 sonication, 30초 휴식 총7번), -70 $^{\circ}$ C deep freezer에 보관하였으며 상등액은 투석 막을 이용하여 -4 $^{\circ}$ C에서 48시간 투석하여 동결건조 후 -70 $^{\circ}$ C deep freezer에 보관하였다.

2) Na-Caseinate Hydrolysates

Na-caseinate를 50mM Potassium Phosphate buffer(pH 7.5) 250ml당 12.5g을 녹여 10ml씩 분주한 다음, 준비한 sample을 100 μ l와 chloramphenicol을 0.1g/L 넣고 혼합하여 37 $^{\circ}$ C에서 48시간 방치하였다(Shake 130rpm). 그 후 enzyme 반응을 정지시키기 위해 -20 $^{\circ}$ C에 보관하였다.

3) CPPs Enrichment

Enzyme 반응을 정지시킨 sample을 2N HCl을 이용하여 pH 4.6까지 맞추고 4°C에서 14,000rpm으로 10분간 원심분리 후 상등액을 2N NaOH를 이용하여 pH 7.0로 조정하였다. 최종 volume의 1%가 되도록 CaCl₂(Calcium chloride)를 넣고 잘 혼합하여 1시간동안 실온에 방치하였다. 동량의 ethanol(99%)을 첨가하고 잘 혼합한 후 4°C, 7,000rpm, 10분 동안 원심 분리한 다음, 상등액은 버리고 pellet을 동결 건조하여 -70°C deep freezer에 보관하여 시료로 사용하였다.

4) OPA(*O*-phthaldialdehyde) 측정

Peptone을 standard(0.25-1.5mg/ml)로 측정하였으며 50mM Potassium phosphate buffer(pH7.5)를 시료를 희석하였다. 동결 건조한 시료는 potassium phosphate buffer에 1g/ml이 되도록 용해시켜 원심분리 후 상등액만 사용하였다. OPA reagent는 di-sodium tetraborate 7.620g과 SDS 0.2g을 증류수 150ml에 용해시키고 OPA(97%) 0.16g을 에탄올 4ml에 용해시켜 dithiothreitol 99% (DTT) 0.176g을 첨가해 증류수로 최종 volume을 200ml로 맞추어 사용하였다. 이 OPA reagent 3ml과 sample 400µl을 혼합하여 2분 후에 340nm에서 흡광도를 측정하였다. Blank는 sample 대신 증류수를 사용하였으며 대조구로는 Serine(0.1mg/ml)을 사용하였다.

5) 칼슘 흡착 활성의 평가

10% 탈지유에 Dextrose 0.5%와 Yeast extract 0.25%를 첨가하여 만든 배지를 멸균(121°C, 15분)하여 균주를 계대 배양하였다. Calcium을 sonication하기 위해 MRS Broth에 0.1% calcium chloride를 첨가하여 선발된 균주(40464, 3136, L55, 449)를 계대 배양하였다. 계대배양 한 균주를 3000rpm에서 15분 동안 원심분리 한 후, 0.45µm sterile-filter로 filtering 해서 멸균된 tube에 넣어 냉장 보관하였다. Control은 계대 배양할 때 사용한 배지에 Lactic acid를 첨가하여 pH를 4~4.5까지 내려 위와 마찬가지로 원심분리 후 filtering하여 냉장 보관하였다. MRS Broth + 0.1% Calcium Chloride에 첨가한 4개의 선발된 균주도 동일하게 하였다. Calcium standard 측정은

BioAssay Systems의 QuantiChrom™ Calcium Assay Kit (DICA-500)을 사용하여 배양 상등액에서 줄어든 칼슘의 양을 평가함으로써 흡착력을 간접적으로 측정하였다.

사. 선발균주 sequencing 방법

1) Chromosomal DNA Isolation

OPA 측정 시 가장 뛰어난 균주를 선발하여 streaking 방법으로 순수분리 하여 MRS broth에 2차 계대 배양하였다. sample 1.5ml을 8,000rpm에서 1분 동안 원심 분리하여 pellet을 얻어 0.85% NaCl로 2회 세척하였다. lysozyme(10mg/ml) 0.5ml 처리 후 37°C water bath에서 1시간 incubation하였다. protenase K(10mg/ml) 20 μ l와 10% SDS 25 μ l를 처리 후 60°C water bath에서 30분 incubation하였다. Phenol : Chloroform : Isoamyl alcohol을 25:24:1의 비율로 섞어서 만든 P:C:I 용액을 1:1로 현탁 후 14,000rpm, 3분, 4°C에서 원심 분리하여 상층액만 분리하고 다시 한번 반복하였다. 상층액 총 volume의 half volume의 3M NH₃OAC(pH 4.8)을 첨가하고 two volume의 100% alcohol을 첨가하였다. -20°C에서 1시간 정치시켰다. 14,000rpm, 15분, 4°C에서 원심 분리 후 pellet을 확인하고 상등액을 완전히 제거하였다. 70% ethanol 1ml을 넣고 현탁 후 14,000rpm, 5분, 4°C에서 원심 분리하여 상등액 제거 후 상온에서 20분정도 건조시켰다. 증류수 100 μ l처리 후 pellet을 잘 용해시켜. RNase A(10mg/ml) 1 μ l 처리 후 37°C에서 1시간 incubation하였다. 0.8% agarose gel에 전기영동 하여 DNA를 확인하였다.

2) 16SrDNA의 Amplication

다음의 두가지 primer를 이용하여

SL-1(Forward) : GAG TTT GAT CCT GGC TCA G

SL-2(Reverse) : AGA AAG GAG GTG ATC CAG CC

PCR-Premix(Bioneer)에 Primer 각각 1 μ l와 D.W 17 μ l, 추출한 DNA 1 μ l를 잘 섞어 PCR한다. PCR 조건은 다음과 같다. PCR 완료 후 1% agarose gel에 전기영동 하여

띠를 확인하였다.

Table 2. PCR condition

	94℃	5분	
Denaturing	94℃	30초	
Annealing	55℃	30초	35 cycle
Extension	72℃	40초	
	72℃	7분	

3) PCR Purification

PCR Product Purification Kit(INTRON)를 사용하여 불순물을 제거하고, 0.8% agrose gel에 전기영동하여 DNA band를 확인하였다. sequencing 하여 그 결과로 NCBI 홈페이지에서(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) 확인하였다

아. Cottage cheese 만들기

원유의 지방을 분리하기 위해 5,000rpm, 20분으로 원심분리하여 지방을 뺀 탈지유를 얻었다. 탈지유를 65℃ 항온수조에서 30분 처리하여 살균하였다. 살균된 탈지유를 34℃로 맞춘 후 Stater 0.02%, 렌넷 0.1%를 접종하여 pH 4.65~4.80이 될 때까지 incubation하였다. 이때 stater는 10%탈지유에 미리 배양해놓고 사용하였으며 OPA를 통해 선발되어 동정이 완료된 균주와 control로 상업적으로 이용되는 Y-740균주(Chr. Hansen, Denmark), 두 가지 균주로 각각 따로 치즈를 만들었다. 거즈를 이용해 유청과 치즈를 분리하였다. 분리한 치즈를 55~58℃에서 60~70분 동안 열탕처리하고 13~15℃ 물에서 두 번, 2~5℃ 물로 한번 세척하여 2~4℃에 보관하였다. 유청은 5,000rpm에서 20분간 원심 분리하여 가라앉은 단백질은 버리고 상등액만 UF(Ultra Filtration) 하였다.

자. 선발 균주의 배양 특성 및 저장중의 변화

1) SNF-11% 우유배지에서의 배양중 변화

Starter로 사용될 선발균주를 MRS broth에 2차 계대배양 한 후 10% skim milk 배지에 배양해 놓았다. 우유에 무지유고형분(SNF, Solid Non Fat)의 함량을 충족시키기 위해서 SNF 11%로 표준화 작업을 실시한 후 끓는 물에 20분 증탕시킨 후 사용하였다. Stater를 접종하기 전에 우유를 항온수조에서 37℃로 맞춰놓고 각각 0.02%씩 접종하였다. 0시간을 시작으로 2시간 단위로 24시간 동안 생균수(MRS Agar), pH, 적정산도를 측정하였다.

2) MRS 배지에서 배양 중 변화

MRS broth를 32℃, 37℃, 42℃로 각각 맞춘 후 선발균주 0.1% 접종하고 2시간 단위로 24시간 동안 생균수, pH, 적정산도를 측정하였다.

3) Glucose 첨가에 따른 배양특성의 변화

10% skim milk배지에 1%, 2%, 3% Glucose를 첨가한 배지, 총 4가지 배지를 사용하였다. 각각의 배지를 37℃로 맞춰놓고 stater를 0.1% 접종하였다. 배양 종료 pH는 4.6으로 설정하였고 생균수, pH, 및 적정산도를 측정하였다. 4가지 배지 중 stater의 활성이 가장 좋은 배지를 선발하여 배양전과 배양후로 나눠 실험하였다. 배양전 실험은 stater접종 후 그 전과 동일하게 시간대 별로 측정하고 배양 후 실험은 pH가 4.6까지 떨어지면 찬물에 1시간동안 냉각한 후 4℃에 보관하면서 30일 동안 3일 간격으로 생균수, pH, 적정산도를 측정하였다.

2. 연구개발수행 내용 및 결과

가. 유산균의 내산, 내담성과 박테리오신 생산 여부

김치와 유아분변에서 총 120종의 유산균을 분리하였다. 이중 유제품에 적용이 가능한 49종을 선발하여 내산성, 내담즙산성, 박테리오신 생성 유무 등을 확인하였으며, 전남대학교 동물자원학부 보유 유산균 16종을 더하여 총 65종의 유산균을 대상으로 평가하였다. *L. plantarum* 일부 균주(K47, K48, K49)와 *L. paracasei* 균주(K46)에서 내담즙산성을 보였고 대부분의 균주에서 내산성을 보여 제품에의 적용 가능성은 있는 것으로 평가되었다(Table 3)

나. 젖산 생산 능력의 평가

유산균의 젖산 생산 정도를 비교하기 위하여 0.5% CaCO₃가 첨가된 MRS 배지에 유산균액 10 ml를 paper disc에 점적한 다음, 24시간, 48시간 배양후 0.85% lactic acid control과 투명환을 비교하였다. 또한 젖산의 이성질체 비율을 조사하기 위하여 HPLC를 이용하여 L형태와 D형태의 비율을 평가하였다. 비피더스균과 *L. casei*, *S. thermophilus* 균은 100% L-lactate를 생산하는 것으로 나타났으나, *L. acidophilus* 유산균들은 50%~80% 수준으로 L-lactate를 생산하는 것으로 확인 되었다(Fig. 2).

Table 3. Probiotic activities of *Lactobacillus* strains isolated from infant feces and Kimchi

Strains		Acid (Survival / growth)	Bile (Survival / growth)	Anti-microbial activity
K1	<i>L. acidophilus</i>	+/-	-/-	-
K2	<i>L. acidophilus</i>	+/-	-/-	-
K3	<i>L. acidophilus</i>	+/-	-/-	-
K4	<i>L. brevis</i>	+/-	-/-	-
K5	<i>L. acidophilus</i>	+/-	-/-	-
K6	<i>L. acidophilus</i>	+/-	-/-	-
K7	<i>L. brevis</i>	+/-	-/-	-
K8	<i>L. plantarum</i>	+/-	-/-	-
K9	<i>L. acidophilus</i>	+/-	-/-	-
K10	<i>L. acidophilus</i>	+/-	-/-	-
K11	<i>L. acidophilus</i>	+/-	-/-	-
K12	<i>L. acidophilus</i>	+/-	-/-	-
K13	<i>L. plantarum</i>	+/-	-/-	-
K14	<i>L. brevis</i>	+/-	-/-	-
K15	<i>L. rhamnosus</i>	+/-	-/-	-
K16	<i>L. acidophilus</i>	+/-	-/-	-
K19	<i>L. plantarum</i>	+/+	-/-	-
K20	<i>L. acidophilus</i>	+/-	-/-	-
K21	<i>Lac. raffinolactis</i>	+/-	-/-	-
K22	<i>L. rhamnosus</i>	+/-	-/-	-
K23	<i>L. acidophilus</i>	+/-	-/-	-
K24	<i>L. acidophilus</i>	+/-	-/-	-
K25	<i>L. acidophilus</i>	+/-	-/-	-
K26	<i>L. paracasei ssp paracasei</i>	+/-	-/-	-
K28	<i>L. plantarum</i>	+/-	-/-	-
K29	<i>L. acidophilus</i>	+/-	-/-	-
K30	<i>L. acidophilus</i>	+/-	-/-	-
K32	<i>L. acidophilus</i>	+/-	-/-	-
K36	<i>L. acidophilus</i>	+/-	-/-	-

K37	<i>L. acidophilus</i>	+/-	-/-	-
K39	<i>L. acidophilus</i>	+/-	-/-	-
K40	<i>L. plantarum</i>	+/-	-/-	-
K41	<i>L. acidophilus</i>	+/-	-/-	-
K42	<i>L. acidophilus</i>	+/-	-/-	-
K44	<i>L. acidophilus</i>	+/-	-/-	-
K45	<i>L. brevis</i>	+/-	-/-	-
K46	<i>L. paracasei</i> subsp <i>paracasei</i>	-/-	+/-	-
K47	<i>L. plantarum</i>	+/-	+/-	-
K48	<i>L. plantarum</i>	+/-	+/-	-
K49	<i>L. plantarum</i>	+/-	+/-	-

^a: Positive control strain of acid, bile tolerance and antimicrobial activities

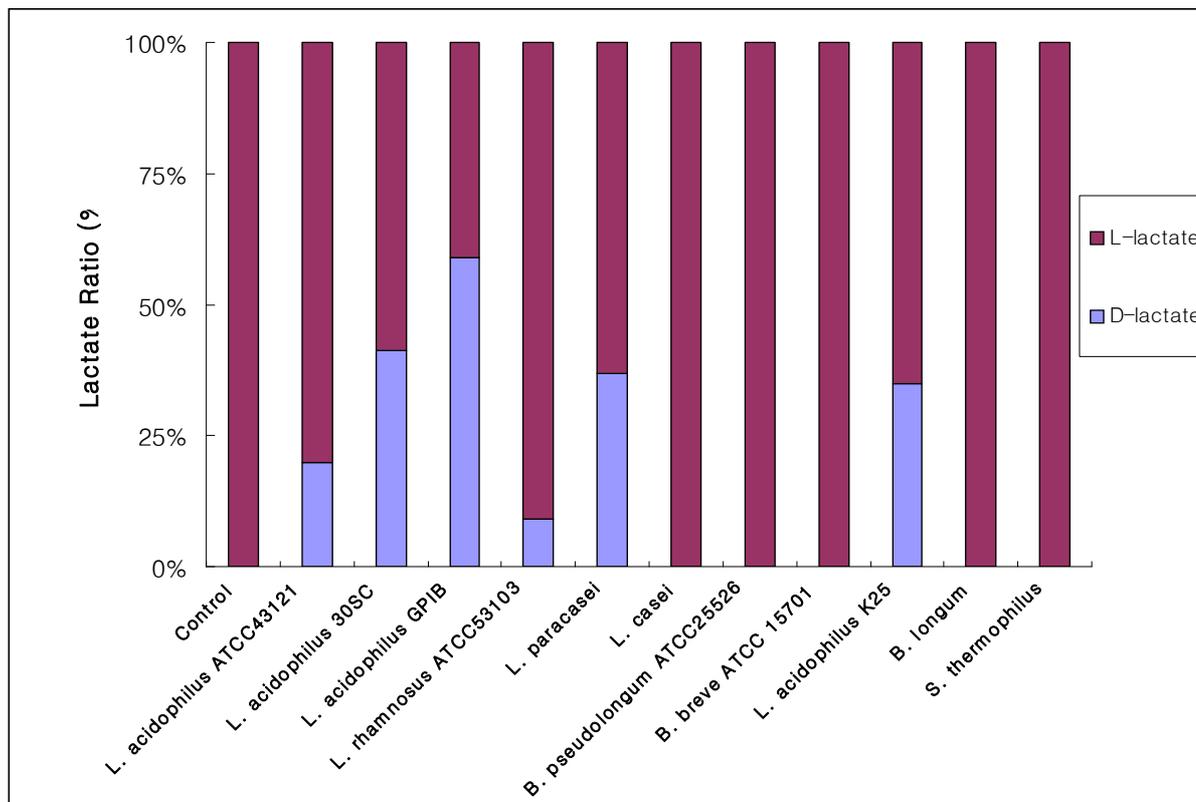


Fig. 2. Comparison of lactate isomer produced by lactic acid bacteria

다. Calcium assimilation의 평가

Calcium assay kit는 색의 농도를 612nm에서 측정하여 비례적으로 sample의 칼슘 양을 계산하는 Kit로써 마그네슘, 지질, 단백질, 빌리루빈과 같은 물질의 방해를 최소화 시켜주는 최적화된 방법이다. 유산균의 칼슘 양을 측정하기 위해 standard를 찍은 결과는 Fig. 3에 나타내었고 이 결과를 바탕으로 유산균의 칼슘 양을 측정한 결과는 Fig. 4에 나타내었다. Fig. 3.에서 볼 수 있는 것처럼 control로 사용된 아무것도 배양하지 않은 10% skim milk배지는 9.604mg/dL의 칼슘양을 가지고 있고, 이보다 칼슘의 양이 많이 측정된 균주는 35464(11.634mg/dL), 01(10.481mg/dL), GP1B(10.356mg/dL) 세 가지 균주로 나타났다. 유산균을 배양했을 하여 칼슘 양과 비교했을 때 Control의 칼슘함량이 꽤 높은 것을 알 수 있었다. 이 실험에서 사용한 skim milk의 성분 자체에 100g당 칼슘이 1100mg이 함유되어있어 이와 같은 결과가 나온 것으로 판단된다. 또한 유산균을 배양했을 때 칼슘양이 증가하지 않았고 Control 과 비교했을 때에도 그 양이 많지 않기에 유산균이 칼슘 양을 증가시키는 데에는 별 효과가 없는 것으로 판단되었다.

따라서 예비시험에서 우수하게 나타나 유산균을 대상으로 MRS 배지에서 비교한결과, *Lactococcus* KU107, *L. plantarum* LDM 534, 40464, 3136 균주를 선발할 수 있었으며, 이 균주를 1차 후보균주로 확정하였다(Fig. 5). 이들 균주에 대하여 당 테스트와 우유 배지에서의 생육활성을 검토한 결과 *L. plantarum* LDM 534 균주가 비교적 우수하게 나타났다. *L. plantarum* LDM 534의 균주에 대하여 공초점레이저 현미경으로 모습을 관찰한 결과는 Fig. 6에 나타난 바와 같다.

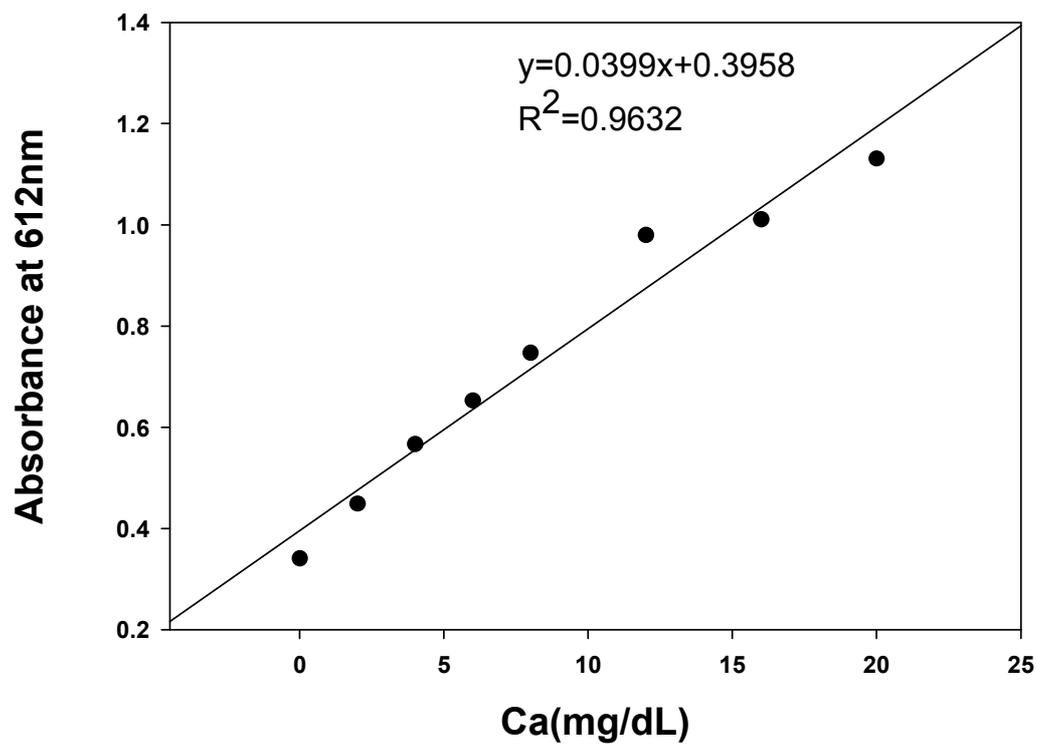


Fig. 3. Calibration curve of calcium standard.

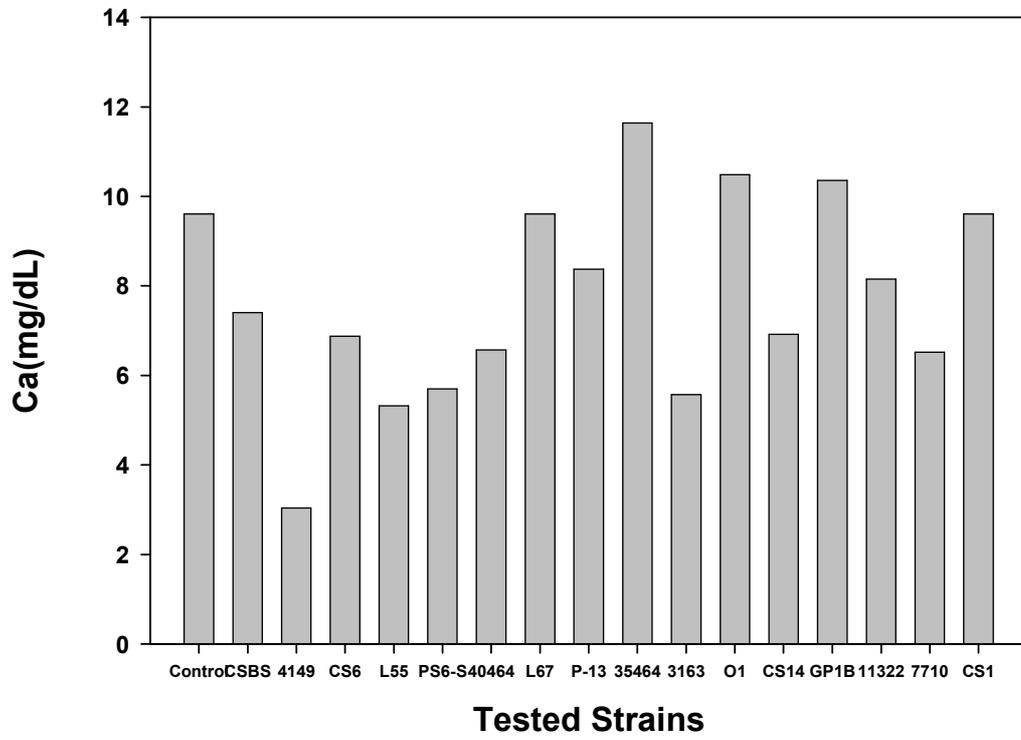


Fig. 4. Calcium content of various lactic acid bacteria in 10% skim milk.

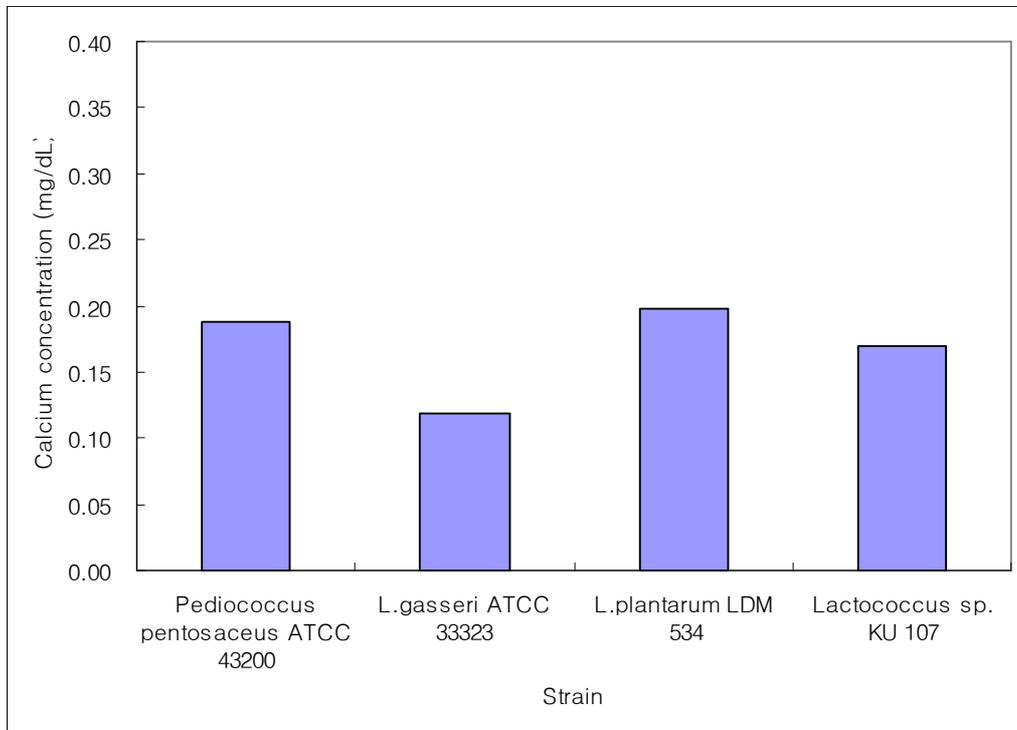


Fig. 5. Calcium content of Lactic acid bacteria isolated from infant feces and Kimchi in MRS medium.

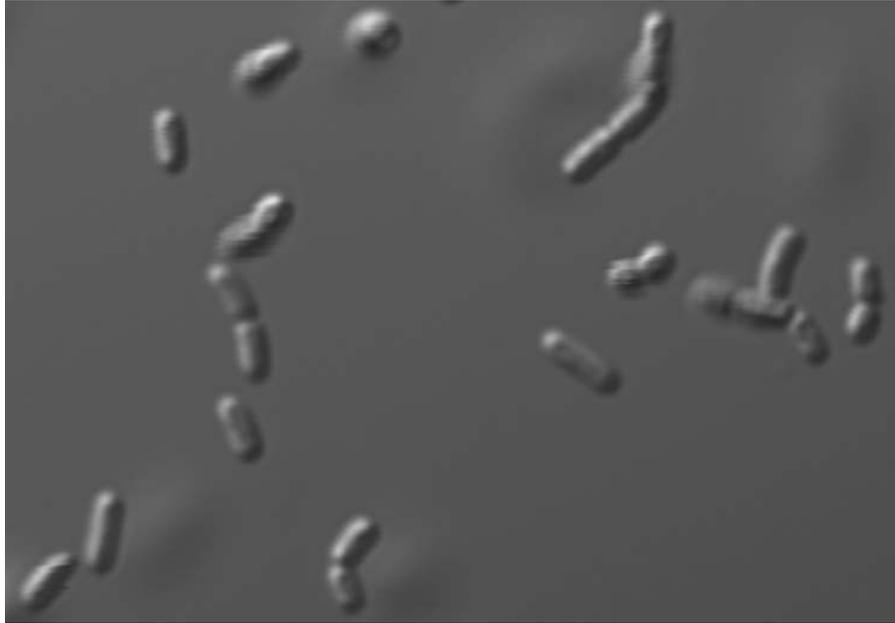


Fig. 6. Confocal laser micrograph of *Lactobacillus plantarum* LDM 534 isolated from Kimchi.

라. 유산균의 CPP 생산 활성 비교

칼슘이 흡수되기 위해서는 가용성 상태로 소장 내에 존재해야 되는데 소장하부의 pH는 중성에서 알칼리 쪽이므로 칼슘이온이 인산이온과 공존하면 calcium phosphate를 형성하여 침전하거나 불용화하기 쉬운 형태로 존재하게 된다. 생체 내에서도 마찬가지로 섭취된 칼슘은 소장에서 과량의 인산이온에 의해 침전되어 체내로 흡수되지 않고 그대로 배설되어 버린다. 그러나 우유 중의 Phosphoserine을 함유한 CPP(Casein Phosphopeptide)가 존재하면 이는 소화효소에 의해 공격받기 어렵고, 또 칼슘이온과 가용성의 염을 형성하기 때문에 칼슘의 흡수를 촉진한다.(Naito et al, 1972) 이러한 메커니즘에서 보면 펩타이드의 인산화는 칼슘의 체내흡수를 촉진시킬 것이라는 가능성을 제시해 준다.

유리되는 CPP의 함량은 calcium assimilation 평가에서 나타난 바와 같이 우유중에 존재하는 칼슘이 너무 많아 정확한 비교가 어려운 점이 있어 casein을 분해시킨 peptide양을 간접적으로 평가하였다. 이와 같은 방법은 Na-caseinate로부터 CPP를 생산할 때 많이 사용되는 방법이다(Corsetti 등, 2003).

우유중에 존재하는 peptide 양의 측정을 위하여 사용된 OPA (O-phthaldialdehyde)를 이용한 방법은 fluorometric 방법에 많이 사용되며 빠르고, 간단하여 모든 단백질에 바로 적용할 수 있다(Church et al., 1983). 또한, OPA 부가물은 340nm에서 강하게 흡수된다고 보고 된바 있다. 이로써 아미노산을 분광 광도계를 이용하여 측정할 때나 N-acyl peptides의 가수분해를 측정할 때 OPA 방법을 사용하기도 한다. 다른 한가지 방법은 Calcium standard를 BioAssay Systems의 QuantiChrom™ Calcium Assay Kit (DICA-500)을 사용하여 측정해서 배양 상등액에서 줄어든 칼슘의 양을 평가함으로써 흡착력을 간접적으로 측정하는 것이다.

유산균의 칼슘흡착 능력 평가를 위해 OPA를 이용하여 측정한 peptone standard는 Fig. 7에 나타내었고 Fig. 8은 유산균을 각각 따로 배양하여 OPA방법으로 2번 측정하여 평균을 측정한 값으로 Control로 사용된 serine(0.1mg/1ml)의 peptone 함량은 0.760mg/ml로 유산균은 대체적으로 이보다 높은 함량을 나타내었다. 1번 균주가 1.244mg/ml로 peptone의 함량이 가장 높았으며, AE(1.237mg/ml),

P-13(1.171mg/ml), CSBS(1.137mg/ml) 균주도 높은 결과를 보였다. 따라서 1번 균주가 칼슘 흡착율이 가장 좋은 것으로 나타나 이를 선발균주 후보로 선정 할 수 있었다.

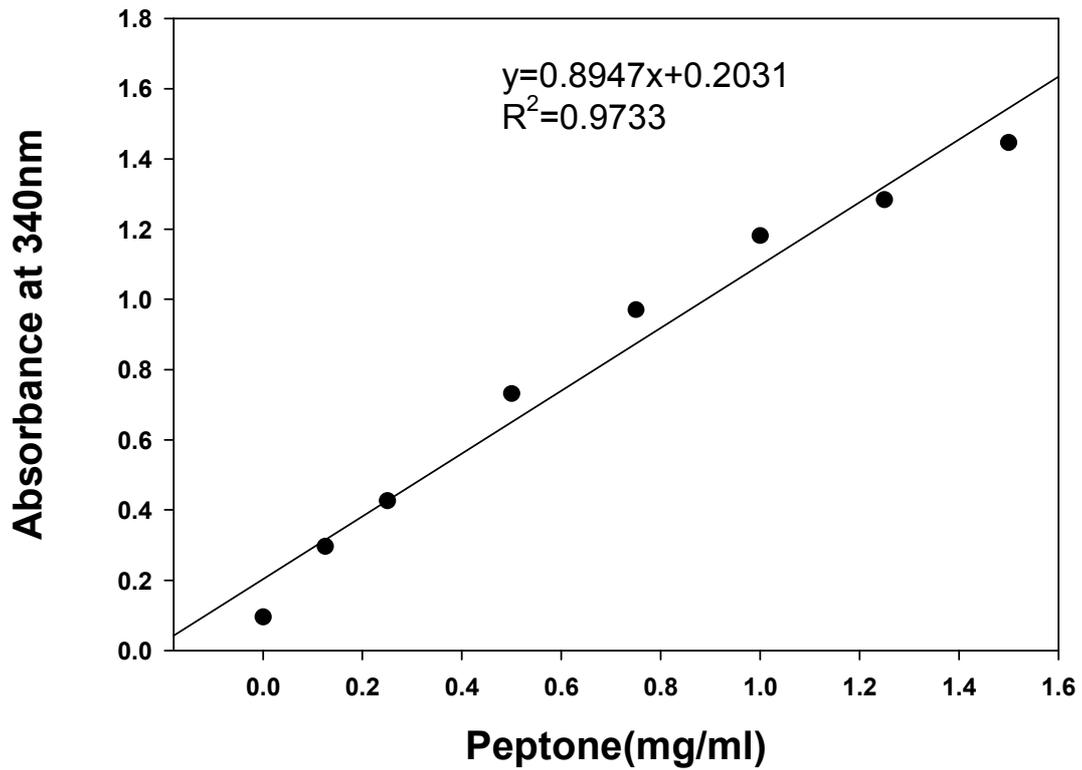


Fig. 7. Calibration curve of peptide at *O*-phthaldialdehyde (OPA) method

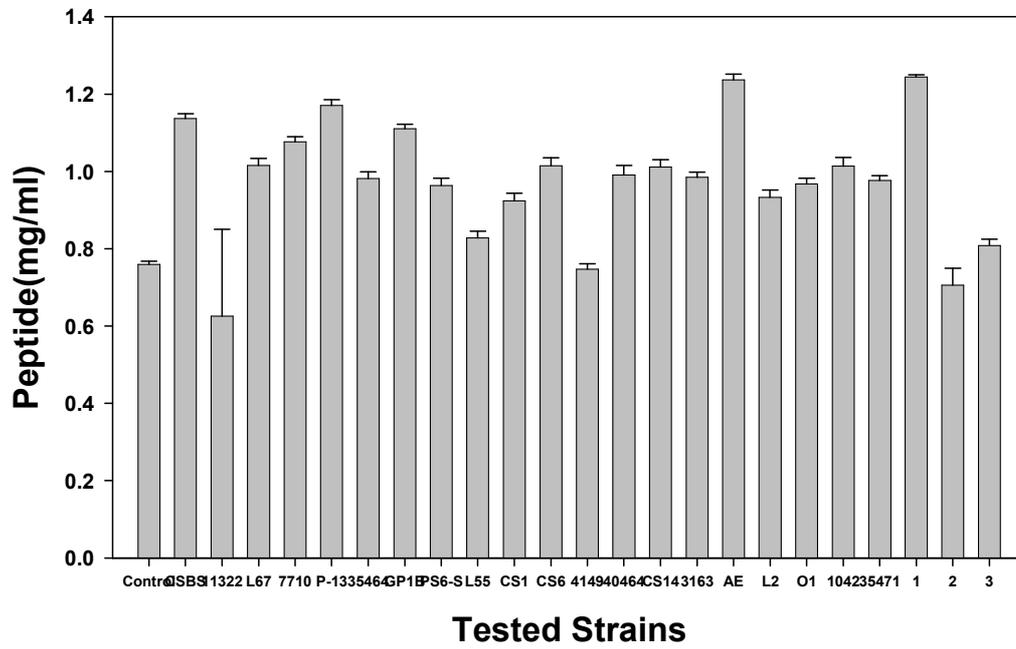


Fig. 8. Peptide content hydrolyzed by lactic acid bacteria

마. CPP생산을 위한 유산균의 Protease 활성비교

β -Casein 중 인과 결합된 serine이 많이 존재하는 영역은 소화효소에서 쉽게 가수분해 되지 않으며, 소장 내의 칼슘 침전을 억제시켜 궁극적으로 가용성 칼슘 함량을 증가시켜 회장에서의 칼슘 흡수를 촉진시키는 역할을 수행한다. 특히, casein phosphopeptide (CPP)가 이와 같은 기능을 가지고 있으며 우유 단백질 분해물인 α_{s1} -casein-5P (59~79잔기), β -casein-4P (1~25잔기)가 보고되었다. 일차적으로 우유 단백질 분해력을 평가하기 위하여 유산균의 protease 활성을 조사하였으며 그 결과는 Fig. 7과 8에 나타내었다.

본 실험에 사용된 방법은 Protease Fluorescent Detection Kit(Sigma Product Code PF0100)을 이용하여 측정하였는데, 우유 단백질인 casein에 가용성 Fluorescein isothiocyanate(FITC)을 label 시켜 측정하는 방법이다. Casein은 Fluorescein thiocarbonyl 형태로 FITC와 반응하고, 이 기질이 trypsin, chymotrypsin, elastase, subtilisin, thermolysin에 의해 가수분해 되는 성질을 이용하여 casein 분해 효소를 nanogram과 sub-nanogram의 범위에서 측정할 수 있는 장점이 있다.

유산균의 protease 활성 측정을 위해 trypsin으로 standard curve를 작성하여 peptide 함량을 비교하였다(Fig. 9). 유산균에 의하여 생산된 protease 유리된 peptide 함량의 비교는 Fig. 10에 나타난 바와 같으며, pellet과 배양 상등액으로 나눠 실험하였다. 유리된 peptide 양은 배양 상등액이 더 높은 활성을 나타내었는데 이는 유산균이 생산하는 저분자 물질 또는 유산균의 세포질 성분이 상등액에 포함되어 이러한 결과가 나왔다고 판단되어진다. 또한 Pellet과 상등액의 성분이 다르기 때문에 같은 균주라도 Protease 활성이 동일하게 나타나지 않았다. Pellet에서는 3번, AC, CS6균주가, 상등액에서는 CS1, L2, 3163균주의 활성이 높은 것으로 나타났다. Control과 유산균의 Protease 활성을 비교해보았을 때 그 차이가 크지는 않지만 pellet에서나 상등액에서 거의 대부분의 유산균이 control보다 약간 높은 활성을 나타낸 것으로 보아 미미하지만 유산균은 protease 활성이 있다고 확인되었다. 이러한 약한 protease 활성이지만 CPP를 생산하기에는 충분하다고 생각되어 유리된 peptide 함량과 calcium 함

량을 비교하였다.

Protease는 단백질 분해 효소로 다른 단백질의 아미노산간 peptide 결합을 가수분해하는 효소이며 전 세계적으로 공업효소 판매량의 60%를 차지하고 있다. 현재 산업적으로 사용되는 대부분의 단백질 분해효소는 생물 공학적 응용에 필요한 모든 특성을 만족시켜주는 미생물 유래의 효소가 많이 사용되며, 대부분의 산업적 단백질 분해효소는 *Bacillus sp.*의 세균으로부터 생산되는 중성 EH는 알칼리성 효소들이다. *Bacillus sp.*외에도 *Vibrio*, *Serratia*, *Pseudomonas*, *Pseudoaltermonas*, *Streptomyces*, *Brevibacterium*, *Kocuria sp.*의 균주들과 치즈에 존재하는 미생물중 단백질 분해효소를 분비하는 *Micrococcus sp.*의 균주가 분리 보고 되었다.

유산균은 전반적으로 protease 활성이 낮은 미생물로 보고되고 있으나, *L. helveticus* 같은 유산균에서 비교적 높은 protease 활성을 보이는 것으로 알려져 있다.

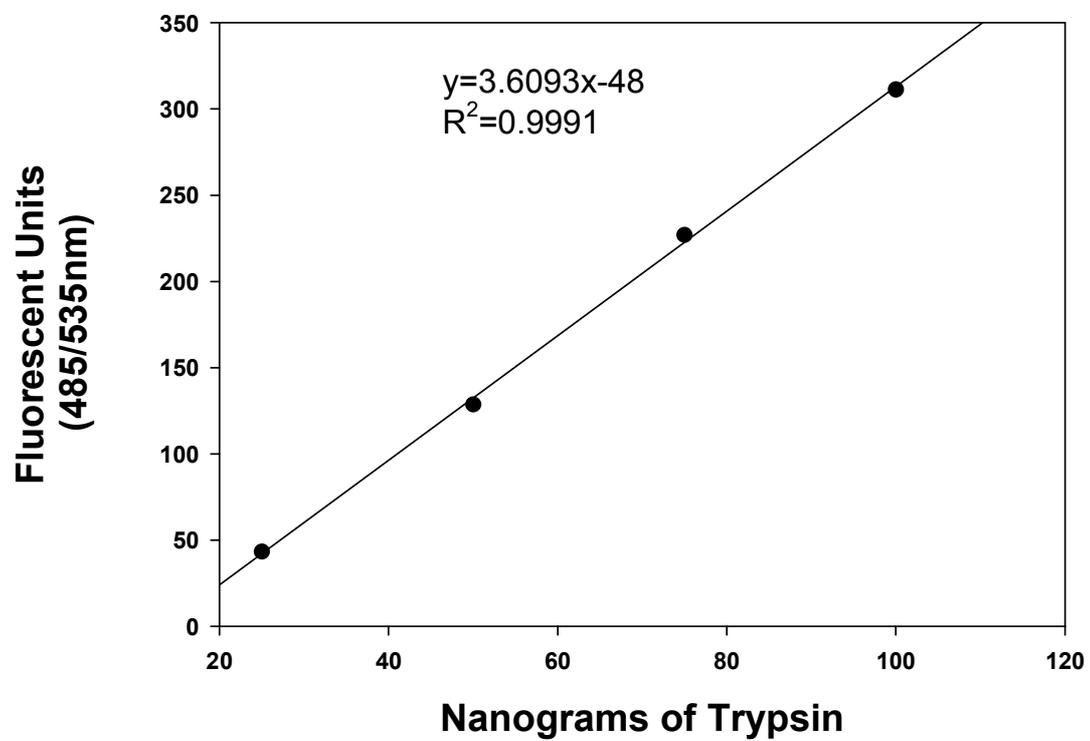


Fig. 9. Standard curve of Trypsin activity

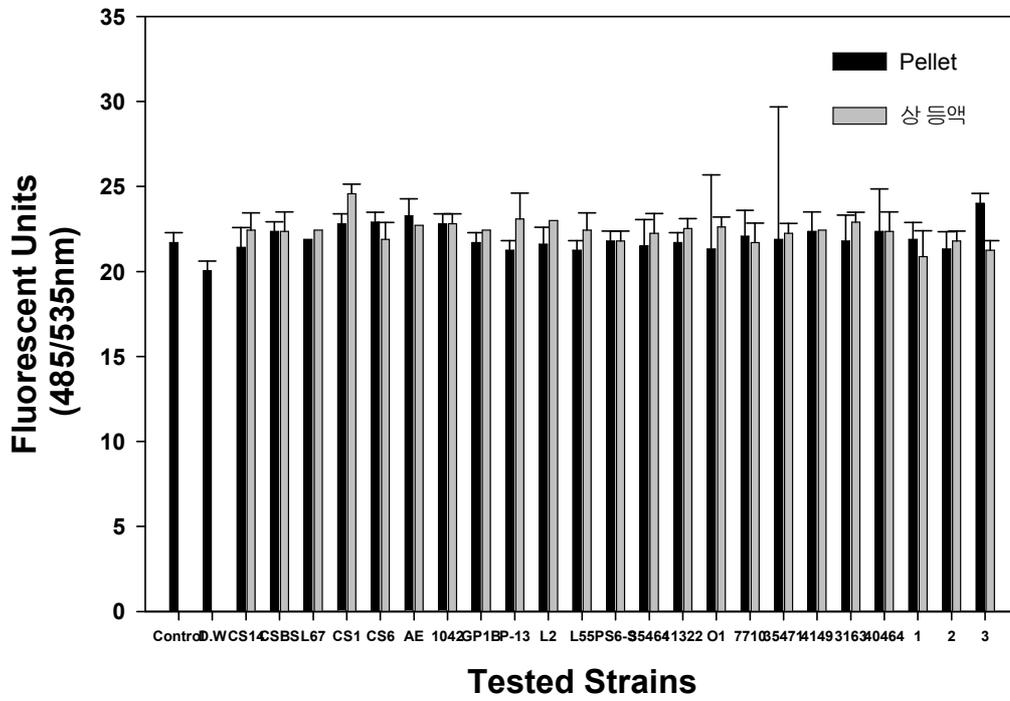


Fig. 10. Protease Fluorescent Unit of various lactic acid bacteria

바. 선발 유산균의 동정

상기 실험에서 선발된 1번 균주는 유아분변으로 분리하였으며 균주동정을 하기 위하여 API 50CH를 이용해 당 test를 실시하였으며 결과는 Table 4에 나타내었다. 24시간과 48시간에 한번씩 색깔의 변화를 관찰하였는데 색깔이 노란색으로 변하면 그 당을 이용할 수 있다는 의미로 양성으로 표시하고 색깔이 변하지 않고 보라색이면 음성으로 표시하였다. 1번 균주에서 Lactose는 24시간 배양하였을 때에는 색의 변화가 미미하였으나 48시간 때에는 색의 변화가 노란색으로 관찰되었다. 이 결과로 미루어 보아 1번 균주는 Lactose의 이용성이 낮다고 판단되어 진다.

보다 정확한 species를 확인 하기위하여 16S rDNA 분석을 실시하였다. DNA를 추출하여 PCR 처리 후 0.8% agarose gel에 전기 영동한 모습은 Fig. 11에 나타냈으며 sequencing 결과는 Fig. 12에 나타난 바와 같다. 이와 같은 결과로 Genbank에서 검색한 결과 *Lactobacillus plantarum*으로 동정되었으며 이를 *Lactobacillus plantarum* YH로 명명하였다.

Table 4. Carbohydrate fermentation test of No. 1 strain isolated from infant feces

Carbohydrate	Result
Glycerol	+
Erythritol	-
D-Arabinose	-
L-Arabinose	-
D-Ribose	+
D-Xylose	-
L-Xylose	-
D-Adonitol	-
Methyl- β D-Xylopyranoside	-
D-Galactose	+
D-Glucose	+
D-Fructose	+
D-Mannose	+
L-Sorbose	-
L-Rhamnose	-
Dulcitol	-
Inositol	-
D-Mannitol	+
D-Sorbitol	+
Methyl- α D-Mannopyranoside	-
Methyl- α D-Glucopyranoside	-
N-AcetylGlucosamine	+
Amygdalin	+
Arbutin	+
Esculin ferric citrate	+
Salicin	+
D-Celiobiose	+
D-Maltose	+
D-Lactose(bovine origin)	+
D-Melibiose	-
D-Saccharose(sucrose)	+
D-Trehalose	+
Inulin	-
D-Melezitose	+
D-Raffinose	-
Amidon(starch)	-
Glycogen	-
Xylitol	-
Gentiobiose	+
D-Turanose	-
D-Lyxose	-
D-Tagatose	+
D-Fucose	-
L-Fucose	-
D-Arabitol	-
L-Arabitol	-
Potassium Gluconate	+
Potassium 2-KetoGluconate	-
Potassium 5-KetoGluconate	-

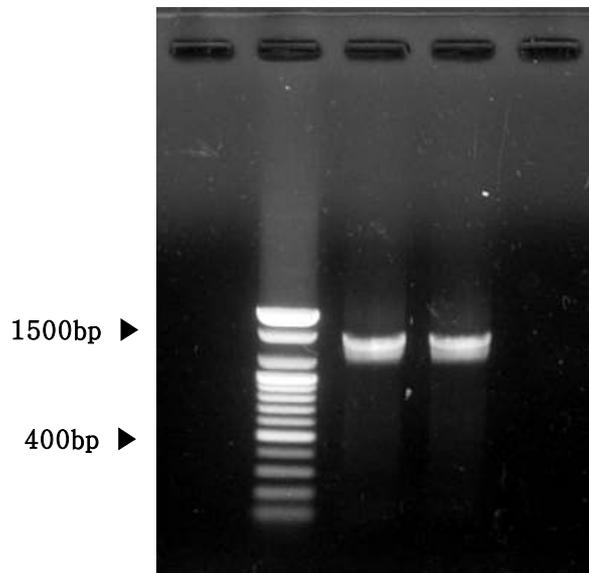


Figure 11. Analysis of PCR product of 16S rDNA of *Lactobacillus plantarum* YH isolated from infant feces.

TGATCGGGTACTATAATGCAGTCGACGCTTCTTTCCTCCCGAGTGCTTGCACTCAATTGG
AAAGAGGAGTGGCGGACGGGTGAGTAACACGTGGGTAACCTACCCATCAGAGGGGGATAA
CACTTGAAAACAGGTGCTAATACCGCATAACAGTTTATGCCGCATGGCATAAGAGTGAAA
GGCGCTTTCGGGTGTCGCTGATGGATGGACCCGCGGTGCATTAGCTAGTTGGTGAGGTAA
CGGCTCACCAAGGCCACGATGCATAGCCGACCTGAGAGGGTGATCGGCCACACTGGGACT
GAGACACGGCCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCGGCAATGGACGAAA
GTCTGACCGAGCAACGCCCGTGAGTGAAGAAGGTTTTTCGGATCGTAAAACCTCTGTTGTT
AGAGAAGAACAAGGACGTTAGTAACTGAACGTCCCTGACGGTATCTAACAGAAAAGCCA
CGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGTAATACGTAGGTGGCAAGCGTTGTCCGGATTTA
TTGGGCGTAAAGCGAGCGCAGGCGTTTTCTTAAGTCTGATGTGAAAGCCCCGGCTCAAC
CGGGGAGGGTCATTGAAAACCTGGGAGACTTGAGTGCAGAAGAGGAGAGTGGAATTCCATG
TGTAGCGGTGAAAATGCGTAGATATATGGAGGAACACCAGTGGCGAAGGCGGCTCTCTGGT
CTGTAACCTGACGCTGAGGCTCGAAAGCGTGGGAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAG
TCCACGCCGTAAACGATGAGTGCTAAGTGTGGAGGGTTTCGCCCTTCAGTGCTGCAGC
AAACGCATTAAGCACTCCGCCTGGGGAGTACGACCGCAAGGTTGAAAACCTCAAGGAATTGA
CGGGGGCTCGACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTAATTCGAAGCAACGCGAGAACCTTAC
CAAGTCTTGACATCCTTTGACCACTCTAGAGATAGAGCTTCCCTTCGGGACAGAGTGAC
AGGTGGTGATGGGTGGGCGTCAGCTCGTGTGAGATGTTGTGTTTAGTCCCGCAACG
AGCGCAACCCTTATGTTAGTTGCCATCATTAGTGGGTCCTCTACGAGACTGCCGTGAC
AAGCAGAAGATGTGGGGATGACGTCAAATCATCATGCCCTTATGACCTGGCTACAGAGGG
TGCTACAAATGGGAAGTACAGCGAGTCGCTAGACCGGAGGTCATGCAATCTCTAAGCTTC
TTCTCAGTCGGATGCAGCTGCAACTCCCTGGCATGAGCTGATCCTAGTATCCGATCAGCA
CGCCGGTGATACGTCCTGACCTGTATGCATCCGCTCGGTCATCCAAGAGAAGGTTGATA
AACTCGTAATTGTGAAGAAAACCTTTTTGGAGATCGATCCGCCT

Figure 12. Sequence alignment of *Lactobacillus plantarum* YH
GenBank(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>).

사. *L. plantarum* YH의 배양특성

선발균주의 배양특성을 조사하기 위하여 MRS배지를 사용하여 32℃, 37℃, 42℃에서 각각 실험을 실행하였다. 그 결과는 Figure 13-15에 나타내었다. 32℃에서는 37, 42℃보다 pH의 저하가 낮게 나타났으며, 37℃와 42℃는 유사하게 나타났다. 생균수의 경우에는 배양 10시간에 모두 10⁹에 이르는 높은 생균수를 나타내었다.

우유에서의 배양특성을 조사하기 위하여 SNF-11%로 조정된 우유배지를 사용한 결과 배양 24시간에도 pH 변화가 나타나지 않았으나, 생균수는 배양 5시간에 2 log 증가를 보였다(Fig. 16-18). 이와같은 결과는 *L. plantarum* YH균주는 lactose의 이용성이 매우 낮기 때문인데, *L. plantarum* YH균주를 starter로 사용하는데 문제점이 있는 것으로 확인되었다.

이러한 문제점을 극복하고자 10% skim milk에 glucose를 첨가하여 배양 특성을 조사하였다. Glucose를 첨가하지 않은 10% skim milk 배지를 control로 실험하고 glucose를 각각 1, 2, 3%씩 첨가하여 pH, TA, 생균수를 측정하였다. 3% glucose 첨가구의 경우 pH 저하 속도 및 생균수에 있어서 starter로 사용이 가능한 것으로 판단되었으며, cottage cheese를 제조하기 위하여 이와 같은 3% glucose를 첨가하는 것이 바람직한 것으로 나타났다(Fig. 19-21).

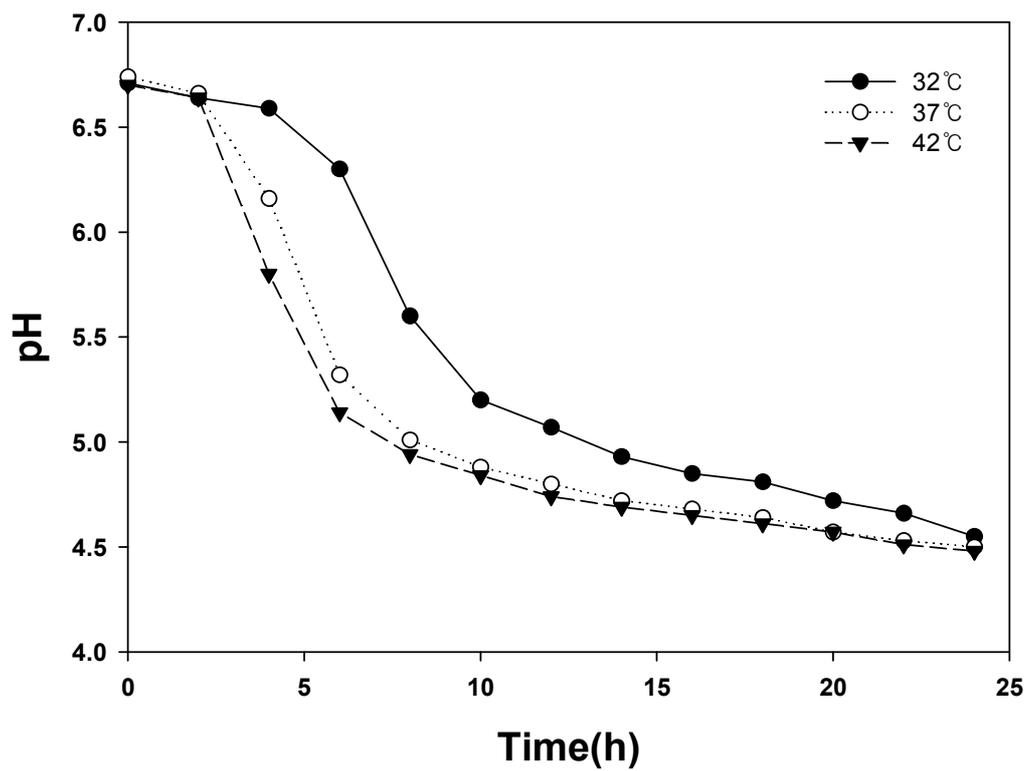


Fig. 13. Changes of pH in MRS broth by *L. plantarum* YH during the fermentation.

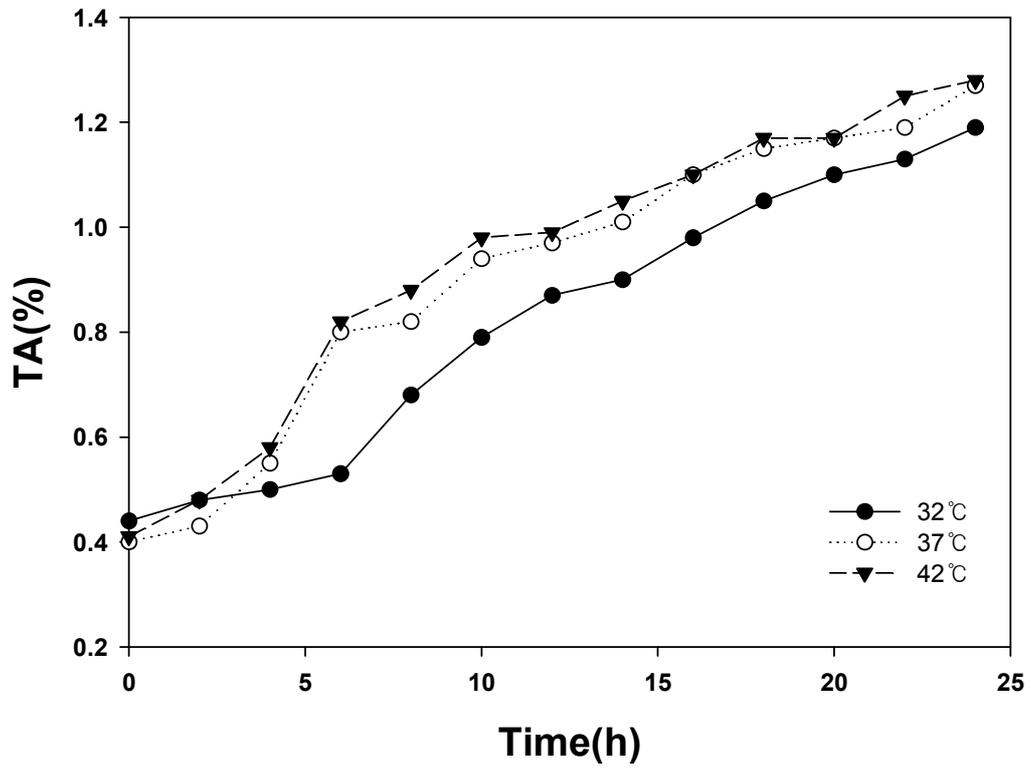


Fig. 14. Changes of titratable acidity (%) in MRS broth by *L. plantarum* YH during the fermentation.

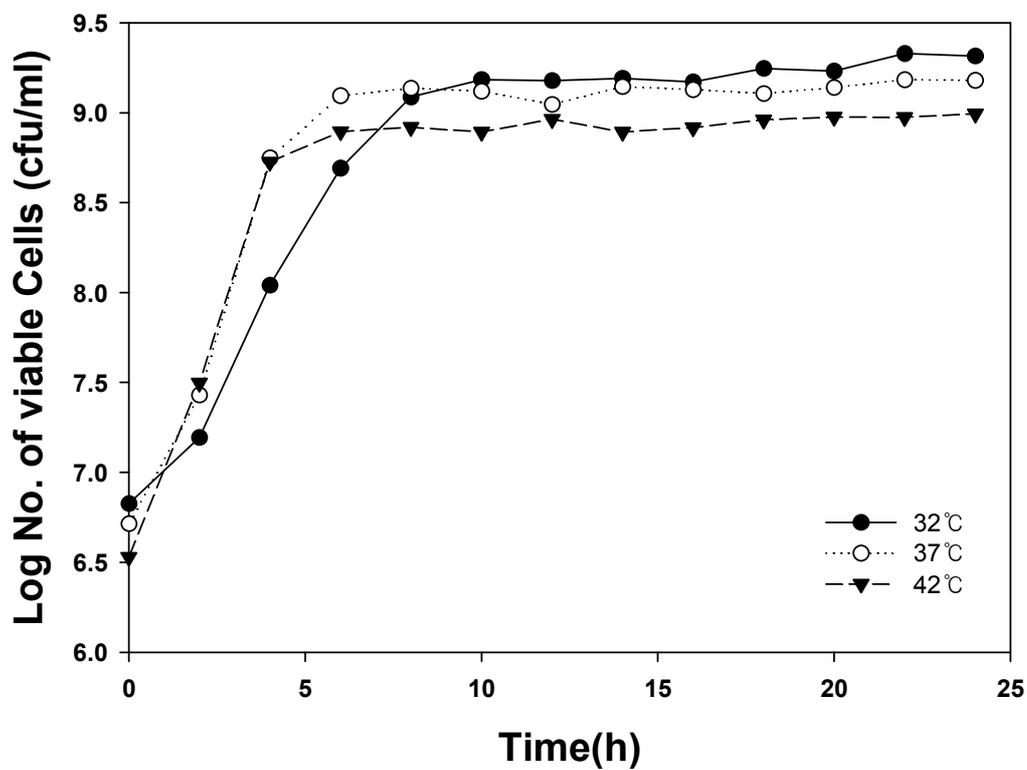


Fig. 15. Growth of *L. plantarum* YH in MRS.

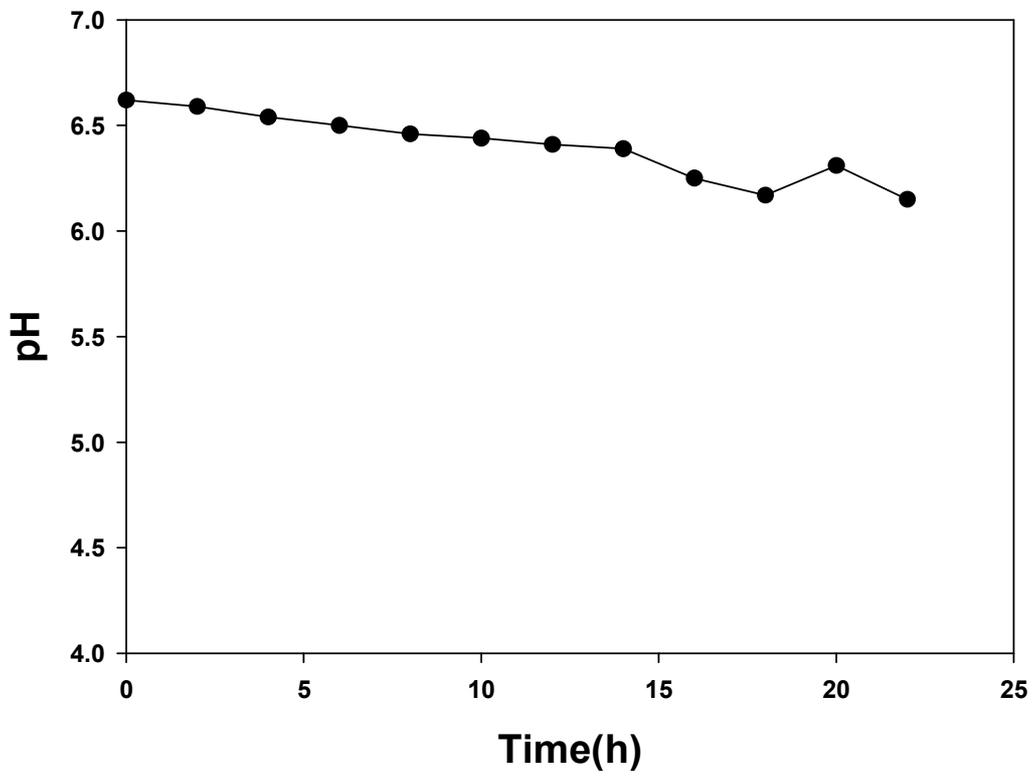


Fig. 16. Change of pH in SNF fortified milk (11%) by *L. plantarum* YH during the fermentation.

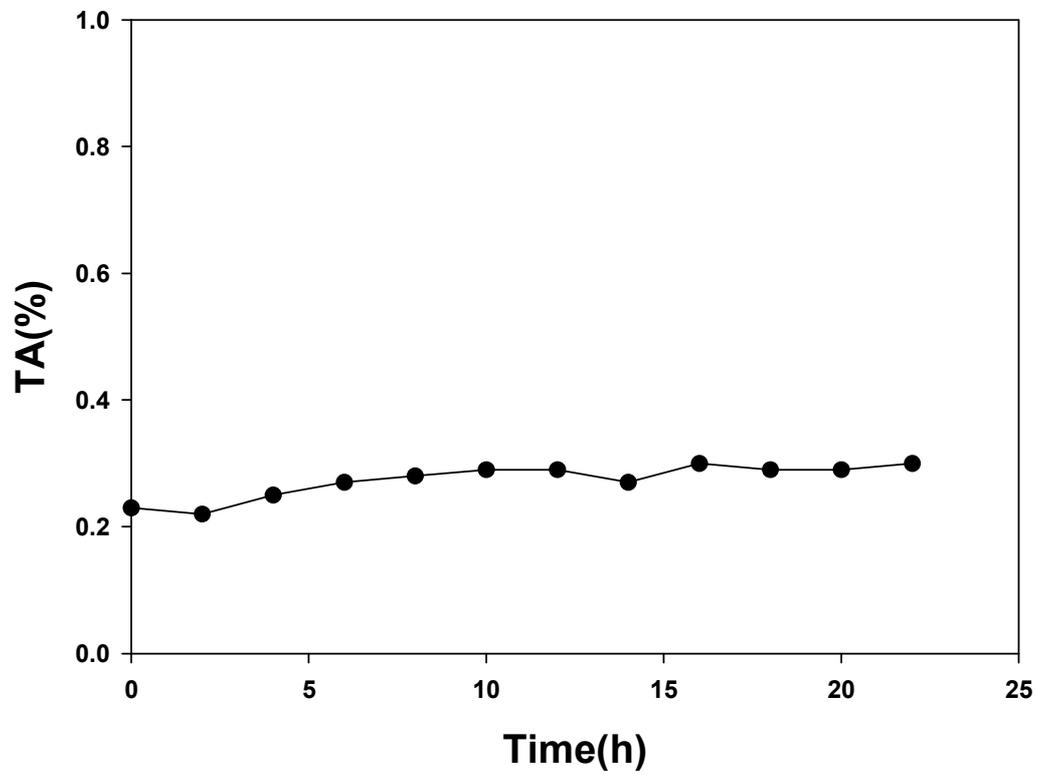


Fig. 17. Change of titratable acidity (%) in SNF fortified milk (11%) by *L. plantarum* YH during the fermentation.

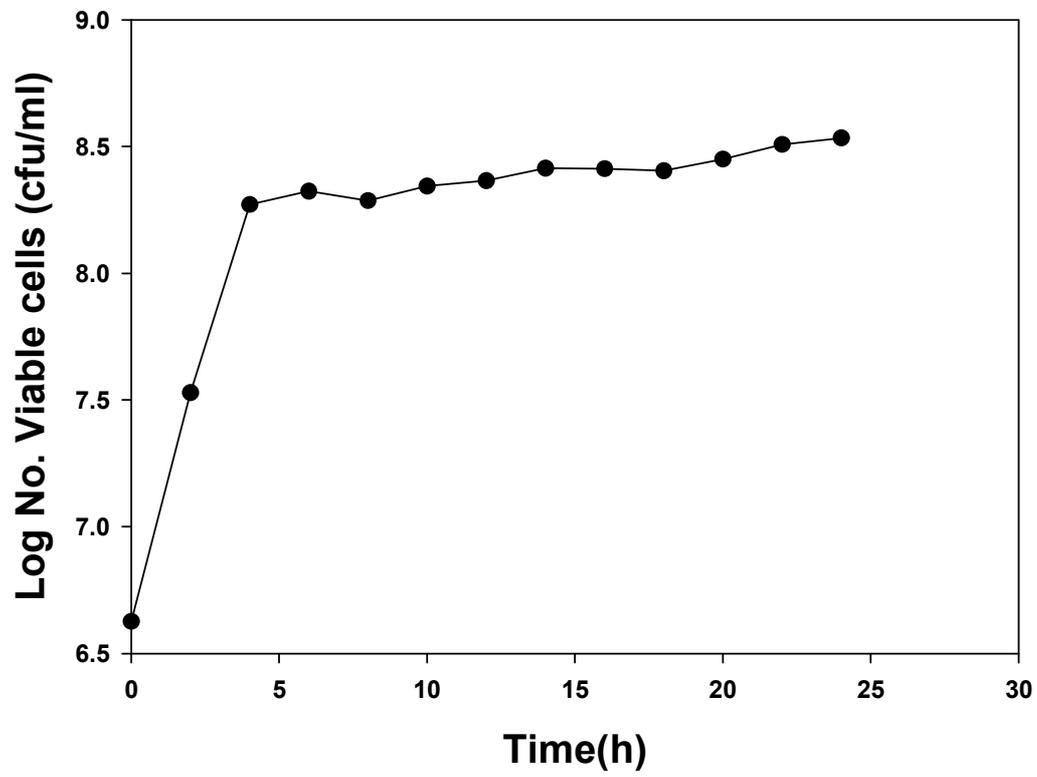


Fig. 18. Growth of *L. plantarum* YH in SNF fortified milk (11%).

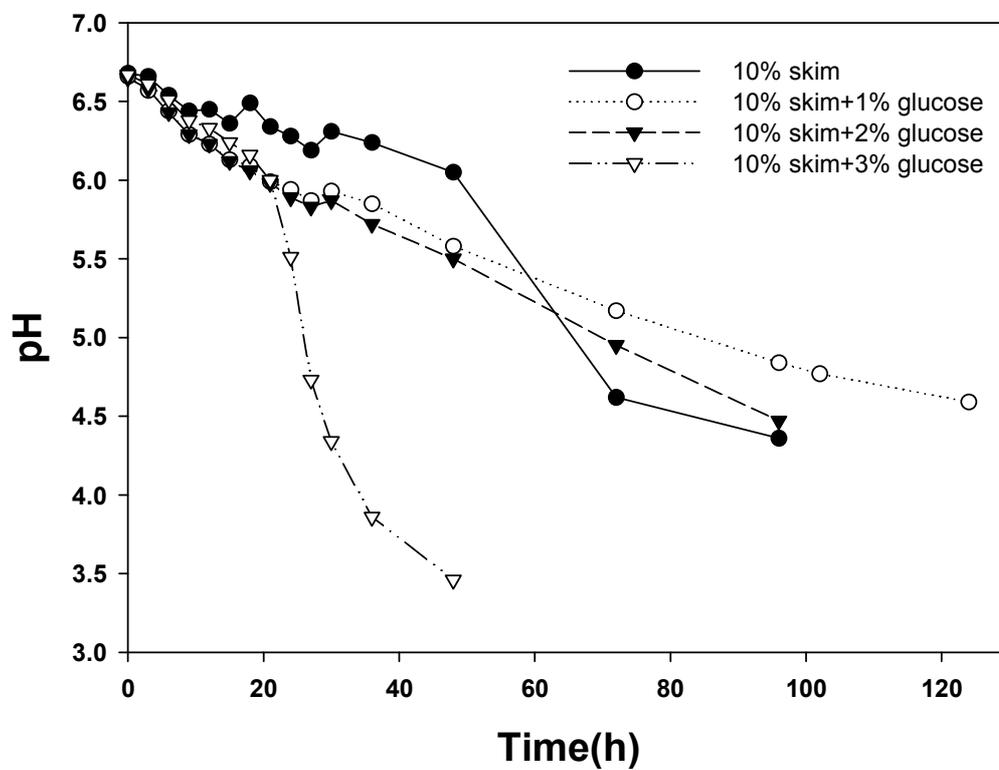


Fig. 19. Effect of glucose concentration on the culture pH of *L. plantarum* YH in 10% skim milk.

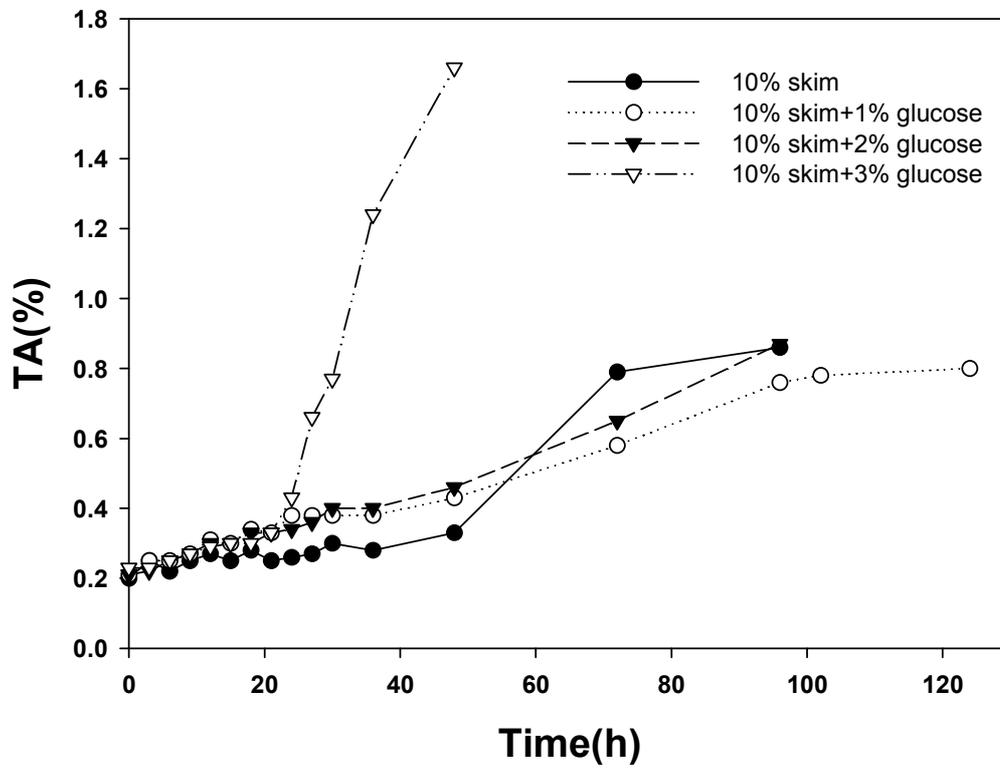


Fig. 20. Effect of glucose concentration on the culture titratable acidity (%) of *L. plantarum* YH in 10% skim milk.

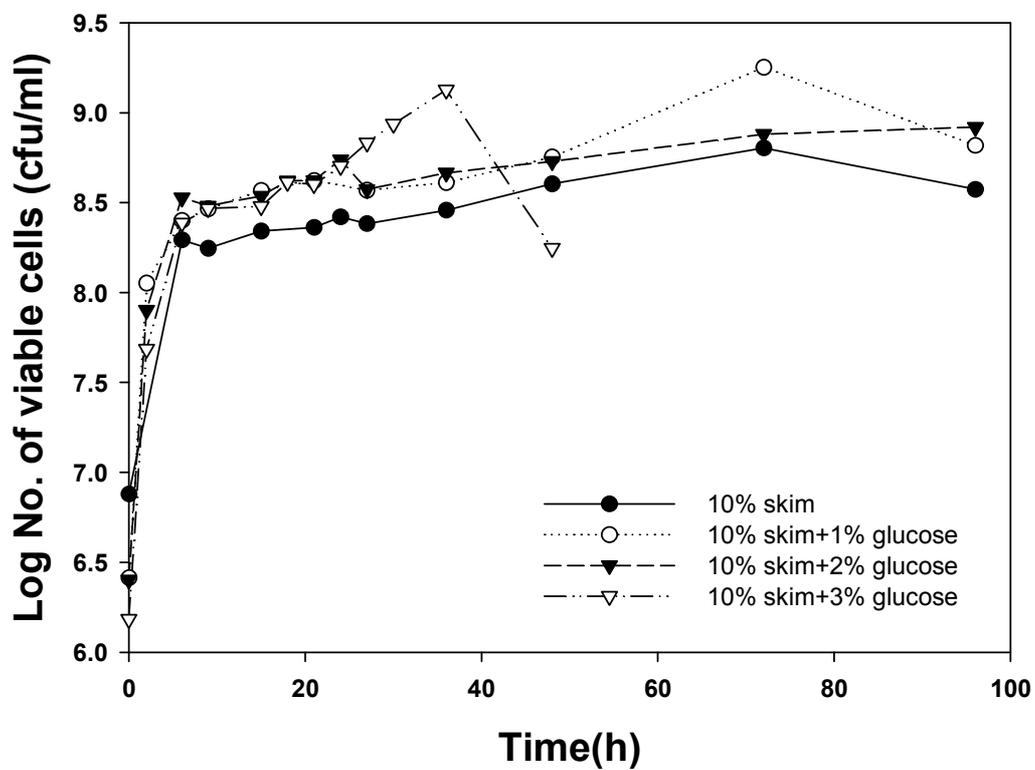


Fig. 21. Effect of glucose concentration on the growth of *L. plantarum* YH in 10% skim milk.

아. *L. platarum* YH를 이용한 Cottage Cheese의 제조

Cottage Cheese는 원유에서 유지방을 제거하여 저온 살균된 우유에 스타터를 첨가하여 카제인을 응고시켜 만든 숙성시키지 않은 대표적인 cheese이다. Cottage cheese는 약간 신맛이 나는데 이러한 신맛을 제거하기 위해 커드를 씻는 작업을 거친다. 또한 지방성분이 적기 때문에 저지방성 다이어트 식품으로 많은 사람들이 선호하는 cheese이다.

L. platarum YH 균주를 starter로 사용하여 cottage cheese를 제조하여 사업적으로 판매되는 Y-740 starter와 특성을 비교하였다. Cheese를 만들 때 치즈가 응고되면 유청과 분리하는데 이때의 적정 pH는 열처리와 탈지유의 총 고형분에 따라 다르다. 일반적으로 탈지유에 렌넷을 사용할 경우에 커드의 pH가 4.6에 도달할 때까지 배양을 계속하였다. Fig. 22은 제조된 cottage cheese의 curd 상태를 나타낸 것으로 여기서 얻어진 유청과 시료에 대하여 지방세포주에 대한 효능을 분석하였다(2세부과제).

(A)



(B)



Fig. 22. Structural form of curd of cottage cheese (A) and separated whey (B).

제 2 절 : Calcium에 의한 지방축적 감소의 분자적 기전 연구

1. 연구수행방법

가. 공통 연구수행방법

1) Cell culture

지방전구세포인 3T3-L1은 37°C 5% CO₂ incubator(Nuair, Air Jacketed, USA)에서 10%(v/v) Bovine Calf Serum(BCS), 100U/ml Penicillin과 100µg/ml Streptomycin, 칼슘농도가 1.8mM인 Dulbecco's Modified Eagle's Medium(DMEM, GIBCO, USA)으로 배양하였다. 배양접시 내의 세포가 Confluence 상태가 되면, 지방전구세포에서 지방세포로의 분화유도를 위하여 Differentiation Media(DM) -10%(v/v) Heat Inactivated Fetal Bovine Serum (HI-FBS), 100U/ml Penicillin과 100µg/ml Streptomycin을 포함한 DMEM에 standard hormonal cocktail(5µg/ml의 Insulin, 2.5µM의 Dexamethasone, 250µM의 3-Isobutyl-1-methylxanthine(IBMx))-을 Day0로부터 3일간 처리하고, 이후에는 5µg/ml Insulin, 2.5µM Dexamethasone을 포함한 10% FBS-DMEM으로 지방세포분화를 유지한다. 실험에 쓰인 3T3-L1 Cell line은 모두 P7~P17 사이의 Passage number를 가진 세포를 사용하였다. Fibroblast인 NIH/3T3는 37°C 5% CO₂ incubator에서 10%(v/v) Bovine Calf Serum(BCS), 100U/ml Penicillin과 100µg/ml Streptomycin을 포함한 DMEM에서 배양하였다.

2) RNA extraction과 Semi-Quantitative PCR

6cm culture Dish(Falcon, USA) 또는 6well plate 상의 분화가 진행된 3T3-L1을 Trizol(Invitrogen, Cat. No. 15596-018)로 cell lysis하여 Trizol : Chloroform =5 : 1 의 비율로 넣고 vortexing 후 4°C 미량원심분리기를 이용하여 12,000g에서 15분 동안 원심분리를 한다. 원심분리 후 상층의 RNA층만을 새로운 EP

tube에 옮기고, 100% Isopropanol을 넣어서 vortexing하여 잘 섞어준다. 다시 4°C에서 12,000g, 15분 동안 원심분리를 한 후 상층액을 제거하고 75%(v/v) 에탄올을 넣고 세척한다. 이것을 4°C에서 12,000g, 15분 동안 원심분리 후 상층액을 제거하고, 반건조 후에 DEPC-DW로 회수한다. 회수된 RNA는 Oligo dT(Invitrogen, USA Cat no. 18418-012) 와 MMLV(Promega, USA Cat no. M1701) 역전사효소를 이용하여 cDNA를 합성한다. 만들어진 cDNA는 Taq Polymerase와 Primer를 이용하여 PCR 기법으로 특정유전자를 증폭시킨다. 이 때 분석에 이용한 Primer sequence는 table 5 과 같다. PCR product는 0.1% EtBr이 들어있는 1.5% Agarose gel에 100V로 전기영동하고, Gel doc XR system(Bio-Rad, USA)을 통하여 Band analysis하였다.

Table 5. Primers for Semi-Quantitative PCR

Target genes		Sequences
mPPAR γ	forward	TGCTGTTATGGGTGAAACTCTGGG
	reverse	CGCTTGATGTCAAAGGAATAATAAG
mC/EBP α	forward	AGGTGCTGGAGTTGACCAGT
	reverse	CAGCCTAGAGATCCAGCGAC
mSREBP1c	forward	GATCAAAGAGGAGCCAGTGC
	reverse	TAGATGGTGGCTGCTGAGTG
mLXR α	forward	AGGAGTGTCGACTTCGCAA
	reverse	CTCTTCTTGCCGCTTCAGTTT
mFXR	forward	CCAACCTGGGCTTCTACCC
	reverse	CACACAGCTCATCCCCTTT
mVDR	forward	CTGCTCGATGCCCACCACAAGACCTACG
	reverse	GTGGGGCAGCATGGAGAGCGGAGACAG
mResistin	forward	AGCATGCCACTGTGTCCCATCG
	reverse	GCCAACTTCCCTCTGGAGGAGACT
mAdiponectin	forward	TCTCCTGTTCCCTCTTAATCCTGCC
	reverse	ATCTCCTTTCTCTCCCTTCTCTC
mh36B4	forward	AGATGCAGCAGATCCGCAT
	reverse	ATATGAGGCAGCAGTTTCTCCAG

2. 세부연구수행방법

가. High calcium 섭취에 따른 Vitamin D3/VDR의 활성저하가 지방세포분화와 지방축적에 미치는 영향분석

1) VitD3/VDR에 따른 지방세포의 분화의 변화

가) 지방세포분화에 따른 VDR 발현양상 측정

지방세포 분화에 따른 VDR 발현양상 확인은 Semi-Quantitative PCR을 통해서 시행하였다. Preadipocyte 상태의 3T3-L1과 분화가 시작된 day0-DM 및 VitD3 24시간 처리세포로부터 각 Stage 별로 Trizol로 RNA를 추출하여 cDNA를 합성한 후, Semi-Quantitative PCR을 시행하였다. 전기영동은 0.1% EtBr이 들어있는 1.5% Agarose gel에 100v로 전기영동을 하고, 최종적으로 전기영동된 agarose gel을 gel doc 시스템을 통하여 발현 변화를 확인하였다. Internal Control gene으로써 36B4 primer를 이용하였다.

나) VitD3/VDR을 통한 지방세포분화의 변화 확인 실험

VitD3가 지방세포분화에 미치는 영향 확인은 Oil-Red O 염색법을 통해서 확인하였다. 분화가 시작하는 Day0부터 VitD3(10^{-8})을 처리한 후 분화 8일째 배지를 제거하고, PBS로 2번 세척한 후 Oil-Red O 염색을 시행하였으며, 염색된 Oil-Red O를 추출하여 500nm에서 O.D.값을 측정하였다.

다) VitD3 농도에 따른 지방세포의 분화 확인 실험

VitD3의 농도에 따른 지방세포 분화 억제효과는 10^{-10} ~ 10^{-8} M의 VitD3를 분화 0일부터 48시간 동안 처리한 후 분화 8일째 Oil-Red O 염색법을 통해 확인하였다.

라) 분화시기에 따른 지방세포 분화 실험

분화시기에 따른 지방세포 분화를 알아보기 위해서 지방세포 분화를 시키는 실험을 시행하였다. 지방전구세포의 밀도가 100%에 이른 뒤 약 2일간의 postconfluent 시기를 거친 후 지방세포의 분화가 시작될 시기에 배지를 GM(Growth Medium: 10% BCS in DMEM)에서 DM(Differentiation Medium: 5 μ g/ml의 insulin, 2.5 μ M의 dexamethasone, 250 μ M의 3-isobutyl-1-methylxanthine, 10% FBS in DMEM)으로 3일간 처리한 뒤 지방세포유지배지(5 μ g/ml insulin, 2.5 μ M dexamethasone, 10% FBS in DMEM)로 추가로 6일간 지방축적을 유도한다.

2) VitD3/VDR에 의한 지질대사조절핵수용체의 활성 조절

가) 전사활성도 조절 실험 (Promoter assay)

VitD3에 의한 지방세포분화 억제효과가 지질대사조절 핵수용체의 활성조절을 통해 이루어지는지 알아보기 위해서 각 수용체의 response element-fused reporter genes(PPRE-Luc, LXRE-Luc)을 이용하였다. 24 well plate에 5.0 x 10⁴ cells/cm² 밀도로 자란 NIH3T3세포에 Superfect를 이용하여 Reporter gene : VDR의 비율 3:1로 Transfection 하였다. 12시간 이후에 PBS로 2회 세척 후 배지를 바꿔준 다음, VitD3를 10⁻⁸M 농도로 처리하였다. 또한 PPAR γ 의 ligand인 Rosiglitazone은 10⁻⁶M을 처리하였으며, LXR의 ligand인 GW3965는 10⁻⁶M을 처리하였다.

나) VitD3 처리에 따른 지질대사조절인자 및 adipocytokine 발현변화 양상 측정

지질대사조절인자 및 adipocytokine 발현 변화 양상 확인은 Semi-Quantitative PCR 방법으로 확인하였다. Preadipocyte 상태의 3T3-L1과 분화가 시작된 day0-DM 및 VitD3 24시간 처리세포로부터 각 stage 별로 Trizol로 RNA를 추출하여 cDNA를 합성한 후, Semi-Quantitative PCR을 시행하였다. 전기영동은 0.1% EtBr이 들어있는 1.5% agarose gel에 100v로 전기영동을 하고, 최종적으로 전기영동된 agarose gel을 gel doc 시스템의 band analysis 프로그램을 통하여 상대적인 mRMA level을 Quantitation 하였다. Internal Control로써 36B4 primer를 이용하였다.

3) VitD3에 의한 지방세포분화 억제에 있어서 Calcium 의존성 단백질의 역할

가) VitD3에 의한 Calcium/Calmodulin-dependent protein Kinase(CaMK) 활성 조절을 통한 지방세포 분화 억제 실험

VitD3에 의한 지방세포분화억제에 있어서 CaMK의 역할을 알아보기 위한 실험은 Oil-Red O 실험을 통해 확인하였다. VitD3를 10^{-8} M 처리하였고, CaMK specific inhibitor인 KN-62를 10 μ M처리하였다. 세포 사진은 디지털 카메라와 광학현미경을 통해서 확인하였다.

나) VitD3에 의한 Calpain 활성조절을 통한 지방세포 분화 억제 실험

VitD3에 의한 지방세포분화억제에 있어서 Calpain의 역할을 알아보기 위한 실험은 Oil-Red O 실험을 통해 확인하였다. VitD3를 10^{-8} M 처리하였고, Calpain specific inhibitor인 ALLN을 26 μ M처리하였다. 세포 사진은 디지털 카메라와 광학현미경을 통해서 확인하였다.

다) VitD3에 의한 Calcineurin 활성조절을 통한 지방세포 분화 억제 실험

VitD3에 의한 지방세포분화억제에 있어서 Calcineurin의 역할을 알아보기 위한 실험은 Oil-Red O 실험을 통해 확인하였다. VitD3를 10^{-8} M 처리하였고, Calcineurin specific inhibitor인 Cyclosporin A를 100ng처리하였다. 세포 사진은 디지털 카메라와 광학현미경을 통해서 확인하였다.

나. Calcium 농도 변화에 의한 지방세포 분화와 지방축적을 조절하는 핵수용체들의 활성 조절 연구

1) 칼슘의 지방세포 분화에 미치는 영향 관찰

가) Intracellular calcium의 영향 측정

지방전구세포의 분화과정 중 미치는 칼슘의 영향은 Oil Red O staining을 통하여 확인하였다. 세포 내의 칼슘농도를 높이는 calcium ionophore A23187을 지방전구세포인 3T3-L1에 0, 1, 2, 4 μ M을 처리하였고, 처리 시작 시점은 각각 day 0, 1, 2, 3, 4로부터 day 8까지 처리하거나 이틀간 처리 후 A23187 을 제거하였다. A23187의 용매인 에탄올의 최종 함량은 배지의 1%(v/v) 이하가 되도록 처리하였다.

나) Extracellular calcium의 영향 측정

지방전구세포의 분화과정 중 미치는 칼슘의 영향은 Oil Red O staining을 통하여 확인하였다. 세포 외부의 칼슘농도를 높이는 calcium chloride(CaCl_2)를 지방전구세포인 3T3-L1에 농도별, 처리 시작 시점별로 비교하였다. 실험에 쓰인 DMEM media에는 이미 CaCl_2 의 농도가 1.8mM 이기 때문에, 처리농도의 구간을 1.8, 2.5, 5, 10mM 로 설정하였고, 처리 시작 시점은 각각 day 0, 4로부터 day 8까지 처리하거나 이틀간 처리 후 CaCl_2 를 제거하였다.

2) 지방전구세포인 3T3-L1의 분화과정에 관여하는 핵수용체에 대한 칼슘의 영향

가) Intracellular calcium의 영향

칼슘에 의한 핵수용체의 발현양상 변화는 semi-quantitative PCR을 이용하여 관찰하였다. Day 0로부터 day 8까지 calcium ionophore A23187 2 μ M을 처리한 후(또는 day 0로부터 이틀간 처리 후 A23187 을 제거하고 day 8 까지 differentiation media 를 처리한 후), 각 day 별로 Trizol을 이용하여 mRNA를 추출하여 semi-quantitative PCR을 수행하였다.

나) Extracellular calcium의 영향

칼슘에 의한 핵수용체의 발현양상 변화는 semi-quantitative PCR을 이용하여 관찰하였다. Day 0로부터 day 8까지 10mM의 calcium chloride(CaCl_2)을 처리한 후(또는 day 0로부터 이틀간 처리 후 CaCl_2 을 제거하고 day 8까지 differentiation media를

처리한 후), 각 day 별로 Trizol을 이용하여 mRNA를 추출하여 semi-quantitative PCR을 수행하였다.

3) PPAR γ ligand인 Rosiglitazone이 칼슘의 지방분화 억제 효과에 미치는 영향

가) Oil Red O staining 을 통하여 Rosiglitazone이 칼슘의 효과에 미치는 영향 확인

Calcium ionophore A2317 처리시 나타나는 3T3-L1의 지방세포분화와 지방 축적에 미치는 영향을 PPAR γ ligand인 Rosiglitazone을 처리하여 rescue back이 일어나는지 확인하였다. A23187 4 μ M과 Rosiglitazone 1 μ M을 각각 처리하고, 처리 시작 시점은 day 0, 1, 2, 3으로 day 8까지 계속 처리하였다.

나) Semi-quantitative PCR을 통하여 Rosiglitazone이 칼슘의 효과에 미치는 영향 확인

Calcium ionophore A2317 처리시 나타나는 3T3-L1의 지방세포분화와 지방 축적에 미치는 영향을 PPAR γ ligand 인 rosiglitazone을 처리하여 rescue back이 일어나는지 확인하였다. 4 μ M의 A23187 을 1시간 전처리 후 rosiglitazone 1 μ M을 처리하고, 처리 시작 시점은 day 3에서 day 5까지로 day 5에 Trizol을 이용하여 mRNA를 회수하였다.

4) ERK inhibitor 인 PD98059 가 칼슘의 지방분화 억제 효과에 미치는 영향

가) Oil Red O staining을 이용한 PD98059 가 칼슘의 효과에 미치는 영향 확인

Calcium ionophore A2317 처리시 나타나는 3T3-L1의 지방세포분화와 지방 축적에 미치는 영향이 ERK pathway를 통하여 가는지 확인하기 위하여, ERK inhibitor인 PD98059를 처리하여 3T3-L1 differentiation에 미치는 영향을 확인하였다. Day 3로부터 PD98059를 1시간 전처리 후 A23187 4 μ M 처리하여 이틀 후 PD98059와

A23187을 제거한 배지를 넣어주었다.

나) Semi-quantitative PCR을 통하여 PD98059가 칼슘의 효과에 미치는 영향 확인

Calcium ionophore A2317 처리시 나타나는 3T3-L1 의 지방세포분화와 지방 축적에 미치는 영향이 ERK pathway를 통하여 가는지 확인하기 위하여, ERK inhibitor인 PD98059를 처리하여 지방세포분화에 관여하는 핵수용체의 발현양상 변화를 확인하였다. Day 3로부터 PD98059를 1시간 전처리 후 A23187 4 μ M 처리하여 이틀 후 PD98059와 A23187을 제거한 배지를 넣어주었다.

5) 칼슘이 지방세포 분화과정에 관여하는 핵수용체의 transcription activity에 미치는 영향

NIH/3T3를 이용하여 reporter gene assay를 수행하였다. Intracellular calcium의 증가에 의한 영향은 A23187을 이용하였고, extracellular calcium의 증가에 의한 영향은 calcium chloride(CaCl₂)를 처리하였다. 관련된 핵수용체로는 PPAR γ , C/EBP α , SREBP1c, LXRA, FXR을 확인하였고, transfection 후 배지 교환시 A23187 또는 CaCl₂를 1시간 전처리하고 각각 해당하는 ligand를 처리하여, 24시간 뒤에 harvest 하였다. 보정은 β -galactosidase를 이용하였다.

6) Calcium binding protein에 의한 PPAR γ transcription activity 조절 여부 확인

Calcium binding protein inhibitor인 ALLN(calpain inhibitor)와 cyclosporin A(calcineurin inhibitor, CsA)를 이용하여, PPAR γ transactivity 조절에 calpain 또는 calcineurin의 관여여부를 NIH/3T3에서 luciferase assay를 통하여 확인하였다. ALLN(13 μ M) 또는 CsA(100ng/ml)을 1시간 전처리 후 PPAR γ ligand인 rosiglitazone을 처리하여 24시간 후에 harvest하였다.

7) 칼슘농도 증가에 의한 PPAR γ target gene의 발현변화 관찰

A23187 처리 후 나타나는 PPAR γ target gene의 발현양상 변화는 semi-quantitative PCR을 이용하여 관찰하였다. Day 3 로부터 day 8 까지 calcium ionophore A23187 4 μ M을 처리한 후, 각 day 별로 Trizol 을 이용하여 mRNA 를 추출하여 semi-quantitative PCR 을 수행하였다.

8) 열처리 시료가 지방세포분화에 미치는 영향

가) Oil Red O staining을 통하여 열처리 시료가 지방세포분화에 미치는 영향

지방전구세포의 분화과정 중 미치는 열처리 시료의 영향은 Oil Red O staining 을 통하여 확인하였다. 대조군으로 탄산칼슘(CaCO₃)과 밀크칼슘을 이용하였고 모든 시료의 칼슘농도는 3mM, pH는 4를 띄웠다. 분화과정동안 쓰인 배지의 칼슘의 농도는 열처리 시료 처리기간 동안 CaCl₂를 이용하여 최종농도가 5mM과 10mM이 되도록 하였다. 처리 시작 시점은 각각 day 0, 3 로부터 이틀간 처리 후 시료를 제거 하였다.

나) Semi-quantitative PCR을 통하여 열처리 시료가 지방세포분화 관련 핵수용체에 미치는 영향

열처리 시료에 의한 핵수용체의 발현양상 변화는 semi-quantitative PCR 을 이용하여 관찰하였다. 대조군으로는 탄산칼슘(CaCO₃)과 밀크칼슘을 이용하였고, 마찬가지로 분화과정동안 쓰인 배지의 칼슘의 농도는 열처리 시료 처리기간 동안 CaCl₂를 이용하여 최종농도가 5mM과 10mM이 되도록 하였다. Day 0 또는 3로부터 이틀간 열처리 시료를 처리하여, day 8에 Trizol 을 이용하여 mRNA 를 추출하여 semi-quantitative PCR 을 수행하였다.

3. 연구개발수행 내용 및 결과

가. High calcium 섭취에 따른 vitamin D3/VDR의 활성화가 지방세포분화와 지방축적에 미치는 영향분석

1) 지방세포분화에 따른 VDR 발현양상

체내 칼슘항상성을 유지시키는 vitamin D3(VitD3)는 calcium effector로 작용하여 세포내 칼슘농도를 조절하는 호르몬으로 VDR과 결합을 통하여 다양한 유전자의 발현을 조절하는 것으로 알려져 있다.(Jones et al. 1998) 최근 Vitamin D3가 지방세포의 분화를 억제하는 것으로 보고되었는데(Kong and Li. 2006) 이러한 VitD3의 지방세포분화 억제효과가 VDR 의존적 혹은/그리고 비의존적 기작을 통해 이루어지는지 알아보기 위한 진단계로 Fig. 23에서 보는 바와 같이 3T3-L1 지방전구세포, 분화기작된 세포(day0-DM) 및 분화시작 후 VitD3 24시간 처리 세포(day1-DM+VitD3)로부터 RNA를 추출하여 VDR의 발현양상을 비교한 결과 지방전구세포(confluent stage)에서는 VDR이 거의 존재하지 않다가 confluence 2일 후 분화유도배지 처리시 VDR발현이 다소 증가하다가 분화유도배지와 VitD3를 24시간처리시 VDR의 mRNA가 급격히 증가함을 확인하였다. (Fig. 23)

2) VitD3/VDR을 통한 지방세포분화의 변화

Calcium의 농도와 밀접한 관계를 가지는 vitamin D3가 지방세포분화에 미치는 영향을 살펴 보기위하여 지방세포 분화 및 지방축적에 대한 VitD3의 효과를 확인하였다. Fig. 24에서 보는 바와 같이 분화시작(day 0)과 함께 VitD3(10^{-8} M)을 처리한 후 분화 8일째 Oil-Red O 염색법을 통해 지방세포 분화 및 지방축적을 확인한 결과 3 sets 모두 지방세포 분화가 억제 된 것을 볼 수 있었으며(Fig. 24A & C), 염색된 Oil-Red O를 추출하여 500nm에서 O.D. 값을 비교한 결과 대조군(vehicle)에 비해 vitD3를 처리한 세포의 분화와 지방축적이 약 55% 감소함을 확인하였다 (Fig. 24B).

3) VitD3 농도에 따른 지방세포의 분화

농도에 따른 VitD3의 지방세포 분화 억제효과를 비교하기 위하여 3T3-L1 세포를 이용하여 각기 다른 농도 (10^{-10} ~ 10^{-8} M)의 VitD3를 분화 0일부터 48시간 처리 후 분화 8일째 Oil-Red O 염색을 통해 지방세포 분화 및 지방축적의 정도를 비교한 것이다.(Kong and Li. 2006) Fig. 25에서 보는 바와 같이 10^{-10} M의 경우 지방세포의 분화정도가 대조군과 비슷하나 10^{-8} M을 처리할 경우 지방세포 형성을 뚜렷이 억제함을 확인 하였다. (Fig. 25)

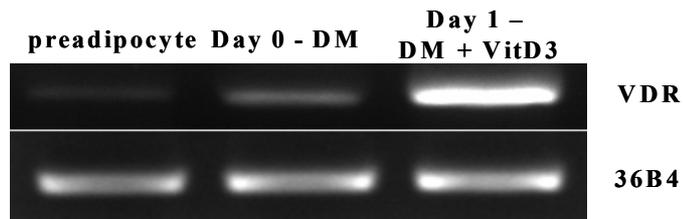


Fig. 23.. VDR was induced in the early stage of adipocyte differentiation

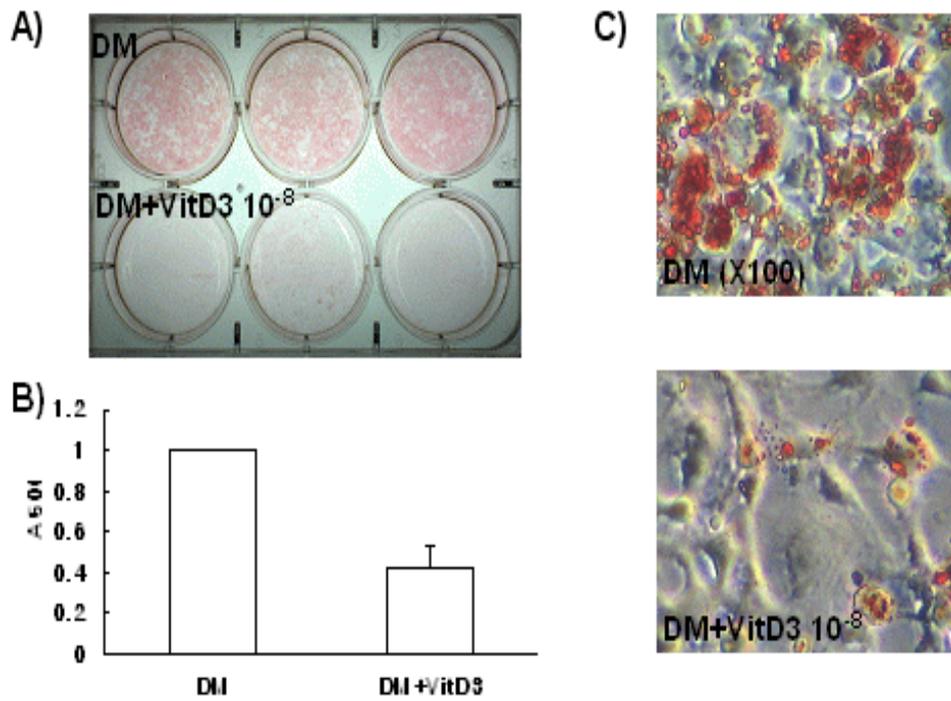


Fig. 24.. 1,25-dihydroxyvitamin D3 inhibits 3T3-L1 cell differentiation into adipocytes

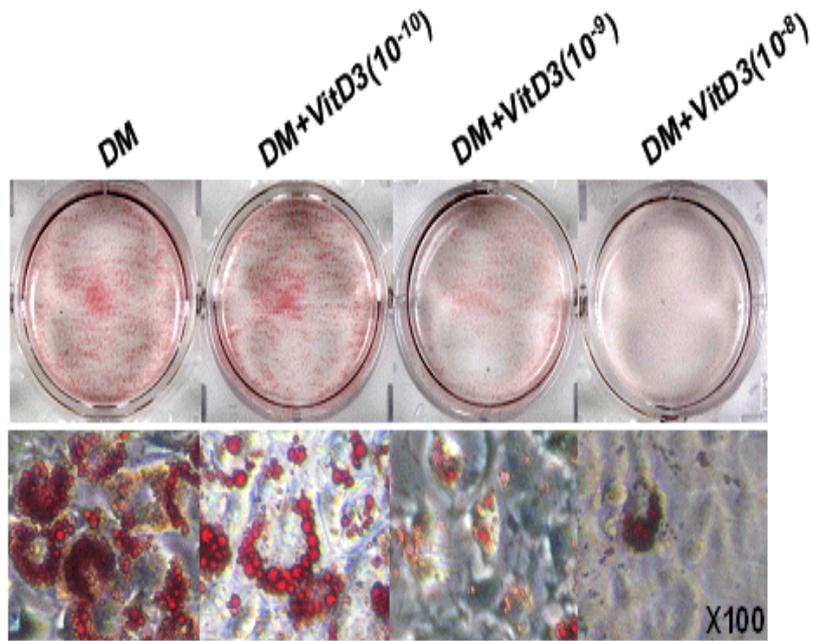


Fig 25.. Dose-dependent suppression of adipogenesis by 1,25-dihydroxyvitamin D3

4) 분화시기에 따른 지방세포 분화에 대한 VitD3의 효과

Fig. 26A에서 보는 바와 같이 지방전구세포는 세포의 밀도가 100%에 이른 후 약 2일 간의 postconfluent clonal expansion시기를 거친 후 지방세포의 분화가 시작되며 이때 배지를 정상적인 성장배지(Growth medim, GM: 10% BCS in DMEM)에서 분화배지(Differentiation medium, DM: 5 μ g/ml Insulin,250nM Dexamethasone, 250 μ M,IBMX, 3 μ g/ml Rosiglitazone, 10%FBS in DMEM)를 3일간 처리한 뒤 지방세포유지배지(Adipocyte maintenance medium: 5 μ g/ml Insulin,250nM Dexamethasone, 10%FBS in DMEM)로 추가로 6일간 지방축적을 유도한다. 분화시기에 따라 VitD3의 지방세포분화 억제효과가 변화하는지 확인하기 위하여 지방전구세포의 밀도가 100%가 되었을때 clonal expansion 기간 동안만 vitD3를 48시간 처리 후 VitD3 없이 분화배지를 처리한 경우 (GM+VitD3/DM)와 분화시작점(day 0)에 분화배지와 함께 vitD3를 48시간동안 처리 후 지방세포유지배지를 처리한 것(DM+VitD3)을 VitD3를 처리하지 않고 분화를 유도한 대조군(DM)과 비교한 결과 두 경우 모두 대조군에 비해 지방세포 분화가 감소하였으나 clonal expansion 기간동안 처리한 경우(대조군에 비해 약 40% 감소)보다 분화시작점에 처리한 경우(대조군에 비해 약 60%정도 감소) VitD3의 억제효과가 훨씬 뚜렷함을 확인하였다 (Fig. 26B & C). 또한 지방세포분화 후 6일째 지방축적에 대한 VitD3의 효과를 조사한 결과 대조군과 차이가 없었다(data not shown).

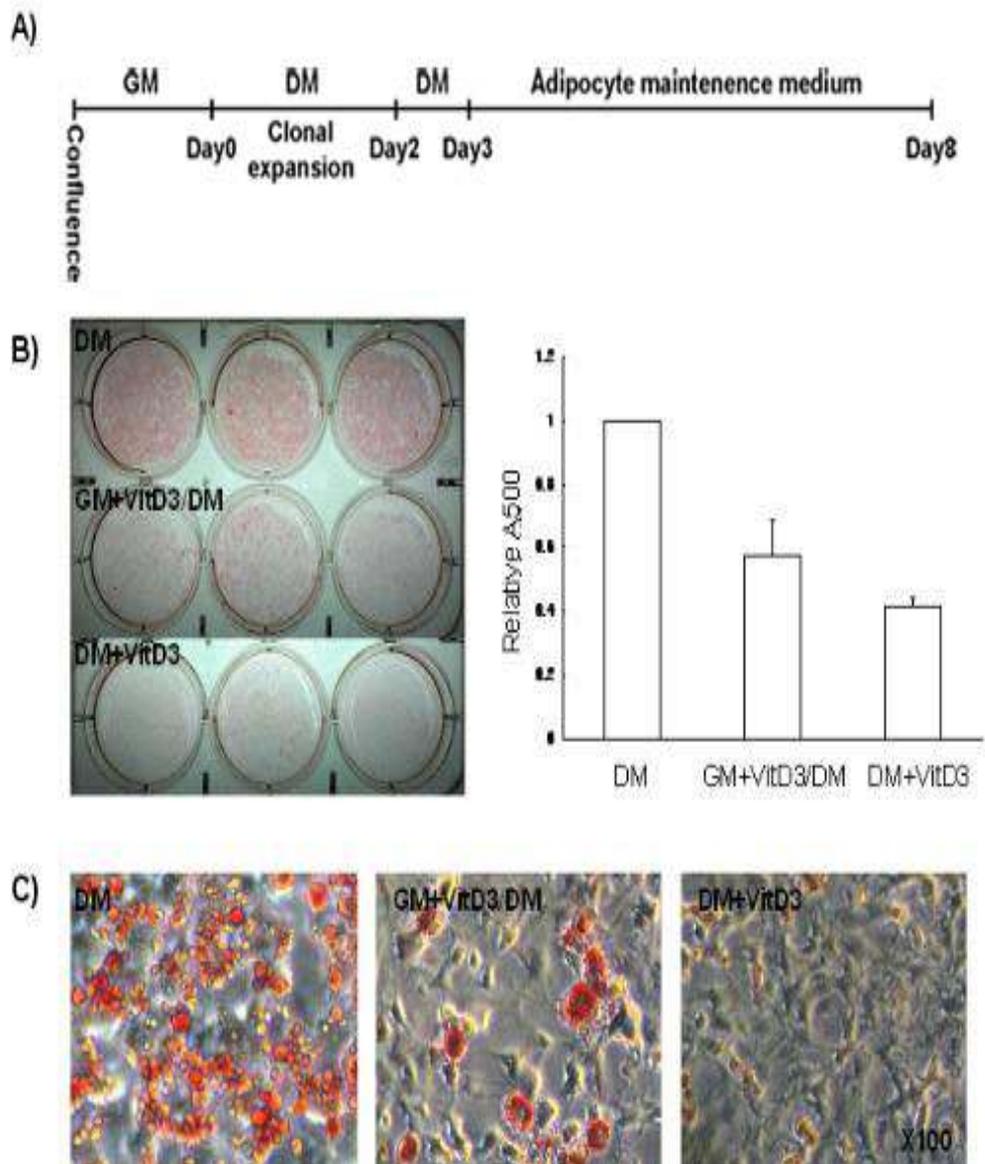


Fig. 26.. 1,25-dihydroxyvitamin D3 strongly inhibited adipogenesis after initiation of adipogenic program.

5) VitD3/VDR에 의한 지질대사조절핵수용체의 활성 조절

핵수용체 그룹의 PPAR γ 는 지방세포분화의 master regulator로 잘 알려져 있으며 또한 LXR도 지방세포분화를 유도하는 중요한 핵수용체로 알려져 있다.(Science 294, 1866 (2001);Ajay Chawla, et al.) calcium의 downstream effector인 VitD3에 의한 지방세포분화 억제효과가 PPAR γ , LXR등과 같은 지질대사조절핵수용체의 활성 조절을 통해 이루어지는지 알아보기 위하여 각 핵수용체의 response element-fused reporter genes (PPRE-Luc, LXRE-Luc)을 이용하여 reporter gene assay를 실시하였다. Fig 27.(upper panel)에서 보는 바와 같이 VDR만 transfection 할 경우 대조군(empty vector/vehicle)에 비해 luciferase activity에 큰 영향을 주지않고 PPAR γ 와 rosiglitazone을 처리할 경우 luciferase activity가 약 32배 증가하였으며 PPAR γ /rosiglitazone과 같이 VDR을 과발현 시킬 경우 vitamin D3의 존재유무와 관계없이 PPAR γ /rosiglitazone의 전사활성도에 큰 영향을 미치지 않는 것으로 확인되었다.

반면 LXRE-Luc의 경우(lower panel) VDR/vitD3 처리시 대조군에 비해 2배 이상의 전사활성을 보였으며 LXR/GW3965의 경우 대조군에 비해 약 30배정도의 전사활성을 보였다. LXR의 전사활성에 대한 VDR의 효과를 알아보기 위하여 LXR/GW3965와 함께 VDR을 transfection시킬 경우, VDR만 처리 할 경우 LXR/GW3965의 전사활성이 약 84% 감소하였으며, VDR/VitD3의 경우 약 50% 감소하였다. 또한 LXR의 전사활성에 대한 VDR의 dosage효과를 알아보기 위하여 VitD3의 존재하에서 VDR의 양(100ng - 500ng)을 증가시킬 경우 LXR의 전사활성이 50% - 22.86%로 감소하는 것으로 나타나 VDR이 dose-dependent manner로 LXR의 전사활성을 억제하는 것으로 확인되었다.

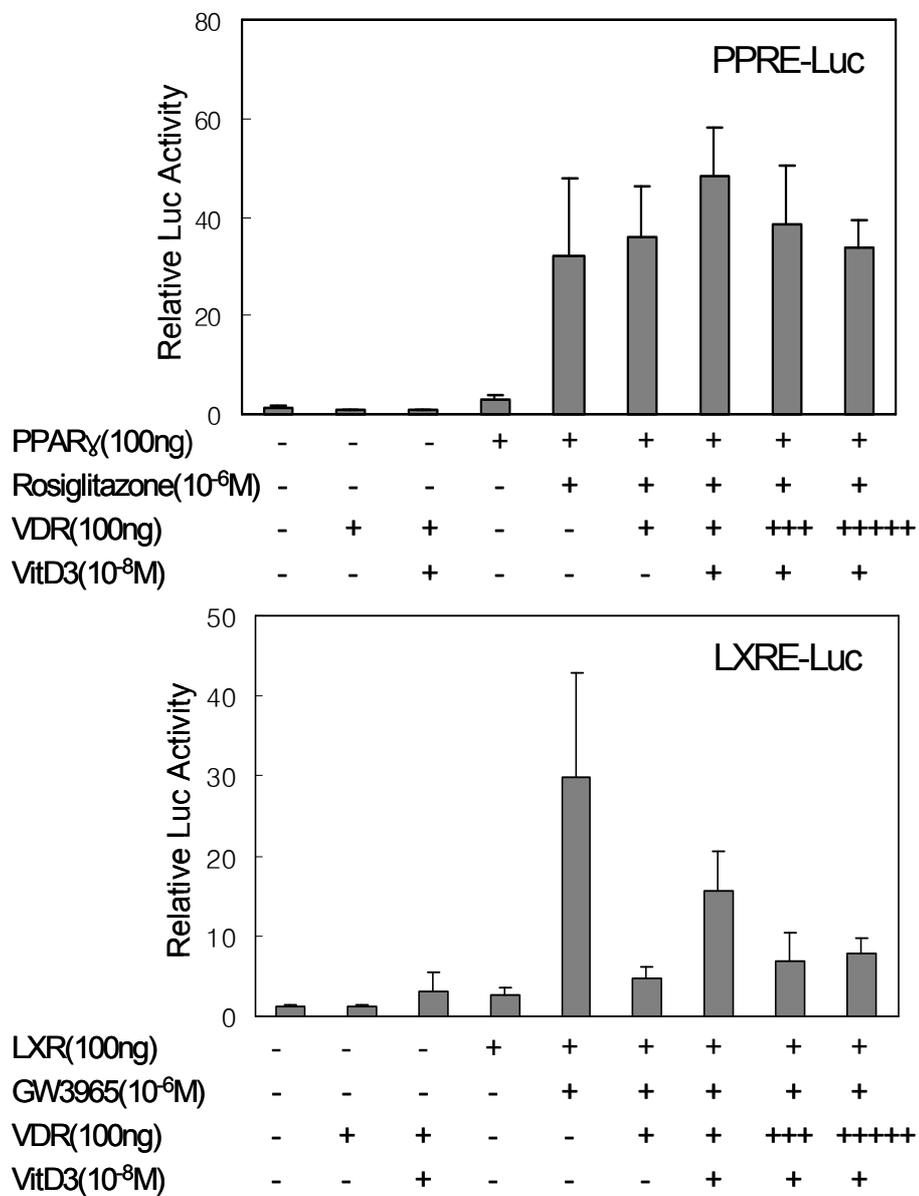


Fig 27. VDR/VitD3 inhibition of PPAR γ and LXR-mediated transcriptional activities

6) VitD3 처리에 따른 지방세포의 지질대사조절인자 및 adipocytokine 유전자의 발현변화

지방세포의 분화는 분화과정에 다양한 전사인자가 참여 하는 것으로 잘 알려져 있으며 특히 핵수용체그룹의 PPAR γ , LXR, FXR 등이 지방세포분화 및 지방축적의 주조절자로 보고되었다. (Seo et al. 2004) VitD3/VDR이 이들 핵수용체의 전사활성 뿐 아니라 발현억제를 통해 지방세포 분화억제를 유도하는지 알아보기 위하여 지방전구세포, 대조군(분화배지: DM) 및 분화와 동시에 VitD3를 처리한 세포(DM+VitD3)로부터 이들 핵수용체 유전자들의 발현정도를 비교하였다. Fig. 28A.에서 보는 바와 같이 PPAR γ 유전자의 경우 대조군에 비해 VitD3를 처리한 경우 발현이 감소한 반면 LXR과 FXR의 경우 발현변화가 없는 것으로 확인되었다. 지방은 에너지공급을 위한 단순한 지방축적기관으로서의 역할 뿐 아니라 다양한 adipocytokine을 분비하는 내분비기관으로 작용하며 이러한 adipocytokine은 지방조직 뿐 아니라 간과 근육에 작용하여 지방축적조절과 인슐린감수성을 조절하고 뇌의 시상하부에도 식욕을 조절함으로써 대사 질환에 중요한 역할을 수행한다. VitD3가 지방세포 분화와 지방축적을 억제하는 것으로 확인되었으므로 이들 adipocytokine 유전자들(TNF- α , adiponectin, resistin)의 발현변화를 조사하였다. Fig. 28B에서 보는 바와 같이 인슐린저항성을 유도하는 TNF- α 의 경우 VitD3를 처리하였을 경우 대조군에 비해 45% 정도 감소하였으며 또한 resistin의 경우 지방전구세포 수준과 마찬가지로 거의 발현이 일어나지 않았다(95%감소). 반면 인슐린감수성을 증가시키는 것으로 알려진 adiponectin의 경우 대조군에 비해 약 20% 정도만 감소하는 것으로 확인되었다.

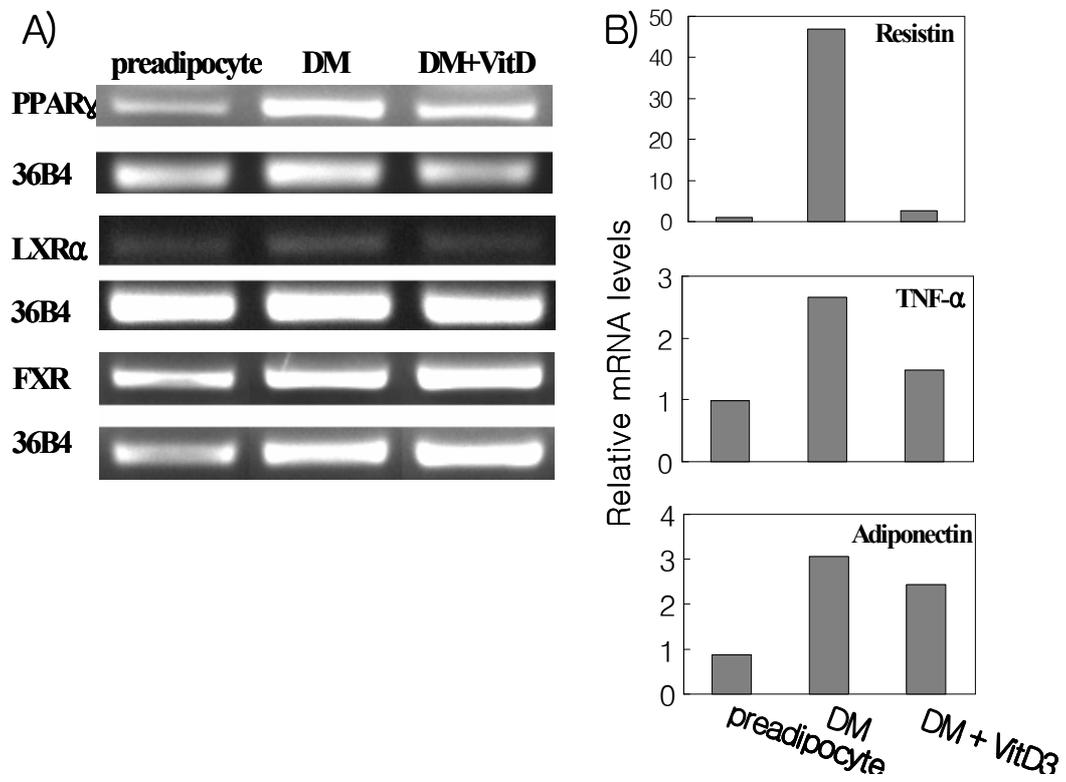


Fig 28. Changes of expression profiles of the nuclear receptors involved in lipid metabolism (A) and adipocytokine genes (B) by 1,25-dihydroxyvitamin D3

7) VitD3에 의한 지방세포분화 억제에 있어서 calcium 의존성 단백질의 역할

세포내 칼슘농도의 변화는 지방세포분화에 밀접한 영향을 가지며 VitD3는 세포내 칼슘농도의 증가를 가져온다. VitD3는 세포내 칼슘의 mobilization을 유도하므로 VitD3가 다양한 칼슘-의존적 단백질의 활성 조절을 통해 지방세포의 분화억제를 유도하는지 조사하였다.

가) VitD3에 의한 Calcium/Calmodulin-dependent protein kinase(CaMK) 활성조절을 통한 지방세포분화 억제

CaMK(Calmodulin-dependent protein kinase)은 중요한 칼슘 신호전달의 downstream effector로 VitD3의 지방세포분화의 억제효과가 칼슘 mobilization을 통한 CaMK의 활성 증가에 의해 이루어지는지 조사하였다.(Vazquez et al 2000) Fig 29-1에서 보는 바와 같이 VitD3를 처리 할 경우 Oil-Red O 염색이 대조군(DM)에 비해 급격히 감소하여 지방세포 형성이 억제되나 VitD3와 함께 CaMK 특이적 inhibitor인 KN-62 10 μ M(Wang et al. 1997)을 처리할 경우 VitD3의 지방세포분화 억제효과가 감소하는 것으로 나타나 VitD3는 지방세포분화 억제효과가 적어도 부분적으로는 CaMK 활성화를 통해 이루어지는 것으로 확인되었다.

나) VitD3에 의한 Calpain 활성조절을 통한 지방세포분화 억제

Calpain은 calcium activated serine protease로서 세포주기에 관여하는 다양한 factor 들의 degradation에 관여하는 단백질분해효소로 지방세포분화 초기에 중요한 역할을 수행하여 지방세포 분화를 촉진하는 것으로 알려져 있다.(Patel and Lane. 2000; Patel and Lane. 1999) VitD3가 Calpain의 활성조절을 통해 지방세포분화를 조절하는지 알아보기 위하여 Fig 29-2에서 보는 바와 같이 VitD3와 함께 Calpain 특이적 inhibitor인 ALLN 26 μ M을 처리 할 경우 VitD3의 지방세포분화 억제효과가 현저히 감소하는 것으로 나타났다. 다른 그룹에 의해 Calpain이 지방세포분화에 필수적인 것으로 보고되었으나 Calpain 특이적 inhibitor인 ALLN을 이용한 본 연구결과는 기존의 연구결과와는 반대로 적어도 지방세포분화 억제에 대한 VitD3의 효과가 Calpain 활성증가를 통해 이루어지는 것으로 확인되었다.

다) VitD3에 의한 Calcineurin 활성화조절을 통한 지방세포분화 억제

Calcineurin은 calcium-dependent serine/threonine phosphatase로 중요한 칼슘 신호전달의 downstream effector 중 하나이다.(Neal and Clipstone. 2002) VitD3에 의한 지방세포분화의 억제가 칼슘 mobilization을 통한 Calcineurin의 활성 증가에 의해 이루어지는지 조사하였다. Fig. 29-3에서 보는 바와 같이 Calcineurin 특이적 inhibitor인 Cyclosporin A 100ng을 VitD3와 함께 처리할 경우 vitD3의 지방세포분화 억제효과를 감소시키는 것으로 나타났으나 CaMK inhibitor인 KN-62나 Calpain inhibitor인 ALLN 보다 그 효과는 낮은 것으로 확인되었다.

이상에서 보는 바와 같이 VitD3는 적어도 부분적으로 세포내 calcium mobilization에 의해 다양한 칼슘-의존적 단백질들 (CaMK, Calpain, Calcineurin 등)의 활성화조절을 통해 지방세포 분화에 관여하는 것으로 확인되었다.

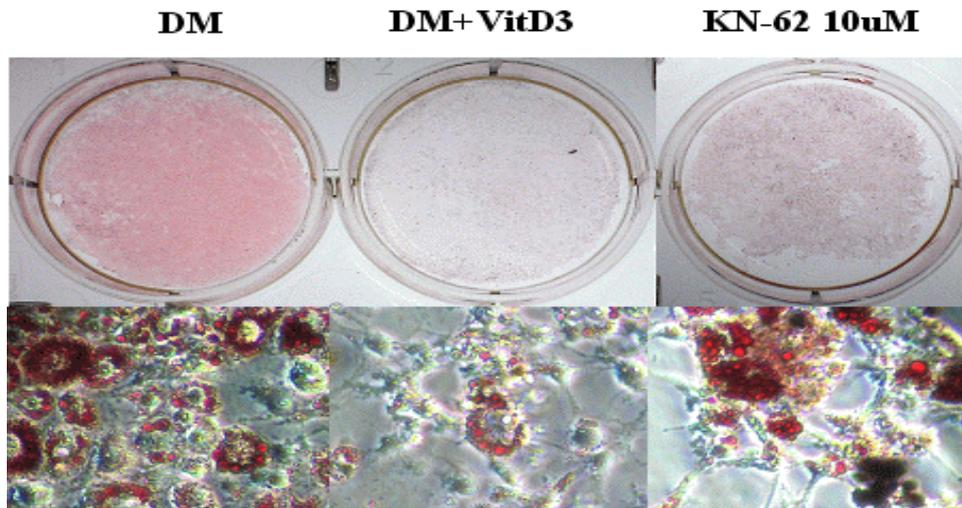


Fig 29-1. CaMK effect on 1,25-dihydroxyvitamin D3-mediated suppression of adipogenesis

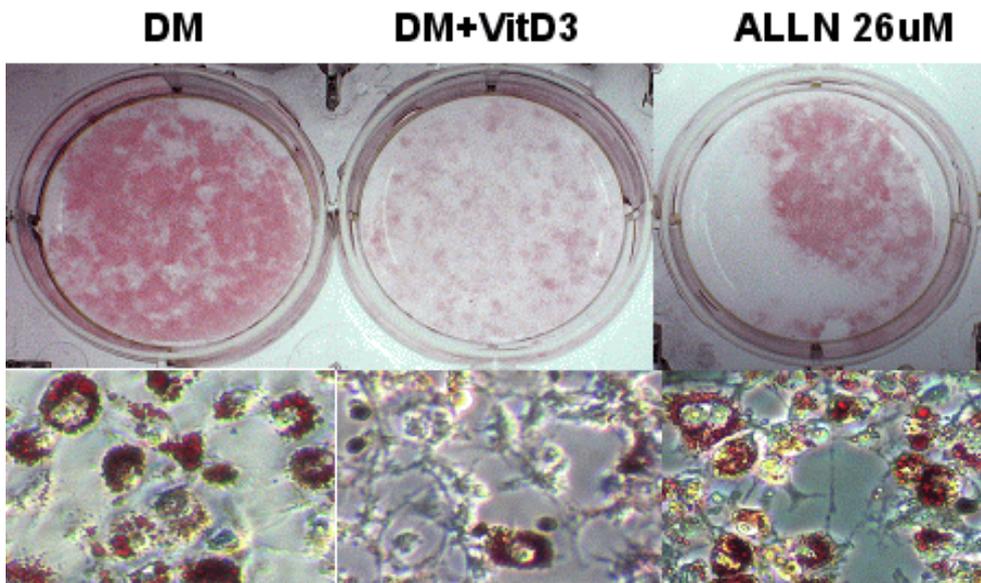


Fig 29-2. Calpain effect on 1,25-dihydroxyvitamin D3-mediated suppression of adipogenesis

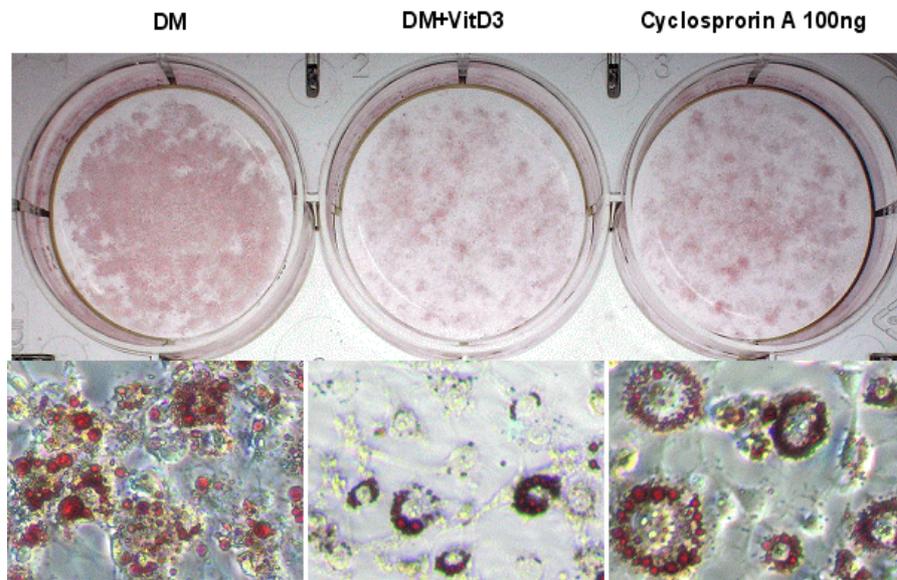


Fig. 29-3. Calcineurin effect on 1,25-dihydroxyvitamin D3-mediated suppression of adipogenesis

나. Calcium 농도 변화에 의한 지방세포 분화와 지방축적을 조절하는 핵수용체들의 활성 조절 연구

1) 지방세포 분화에 있어서 세포내 calcium농도의 역할

세포내 칼슘농도의 변화는 세포의 생리적 환경을 변화시켜 세포내의 다양한 신호경로를 조절한다. 세포내 칼슘 농도의 변화는 지방조직의 축적 및 비만과 밀접한 관계가 있는 것으로 알려져 있다. 지방세포 분화의 최초 시기에는 세포내 칼슘의 증가가 지방세포의 분화를 억제하는 것으로 알려져 있으나 (Zemel et al. 2000) 등에 의하면 세포의 칼슘유입 및 세포내 칼슘농도의 증가는 분화시작 단계에는 지방세포의 분화를 억제하나 분화 중, 후반부의 경우 오히려 지방의 축적을 촉진하는 것으로 보고되었다.

가) 세포내 칼슘농도의 증가에 따른 지방세포의 분화

지방세포의 분화에 대한 세포내 칼슘농도 영향을 확인하기 위하여 3T3-L1 세포가 100% confluence 한 후 2일동안 clonal expansion 기간을 거쳐 지방세포 분화 프로그램(Insulin/ Dex/IBMX) 시작하기 직전부터 세포내 칼슘농도를 증가시키는 것으로 알려진 A23187을 여러 농도로 8일째 까지 지속적으로 처리한 후 Oil-Red O 염색을 통해 지방축적을 조사하였다. A23187 1 μ M은 지방세포의 분화 억제 및 이에 따른 지방축적을 부분적으로 억제하며 2 μ M과 4 μ M 처리 시 지방세포 분화를 완전히 억제 시키는 것으로 확인되었다(Fig 30A). 지방세포 분화 1일째에는 0일째와는 달리 A23187 2 μ M은 지방세포 분화를 부분적으로 억제하고 4 μ M만 지방세포의 분화를 완전히 억제하였다. 세포내 칼슘농도 증가에 따른 지방세포분화 억제 효과는 분화 초기에만 작용하고 중후반부에는 지방 축적을 증가 시키는 것으로 보고되었으므로(Shi et al, 2000) 본 과제에서는 세포내의 칼슘의 분화 억제효과가 분화의 중반부에서도 지속적인지 여부를 확인한 결과 분화 후반부인 4일째에서도 A23187 4 μ M은 지방세포의 지방축적을 부분적으로 억제하는 것으로 확인되어 기존의 보고와는 달리 칼슘의 증가는 지방세포 분화 초기 뿐 아니라 분화가 완전히 진행되고 지방축적이 일어나는 후반

부에도 분화프로그램을 되돌리거나 지방축적의 감소를 유도 할 수 있는 것으로 조사되었다. 기존의 보고에서는 세포내 칼슘농도의 증가를 2일간만 유지하였으므로 본 과정의 칼슘의 세포내 농도 증가에 따른 지방세포 분화 및 지방축적 억제효과가 후반부까지도 작용하는 것이 처리기간의 차이 때문인지 확인하기 위해 지방세포 분화 0. 3. 5일째 A23187을 다른 농도로 2일간만 처리하고 제거 후 8일째 지방축적을 조사한 결과 A23187을 분화과정 동안 계속 처리한 Fig 30A의 실험 결과와 비슷한 결과를 얻었다(Fig 30B).

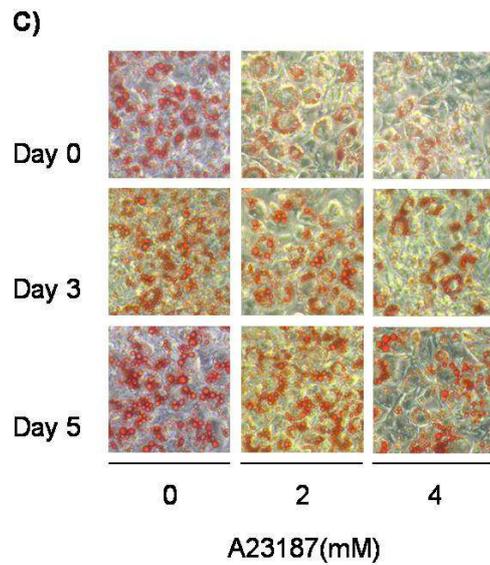
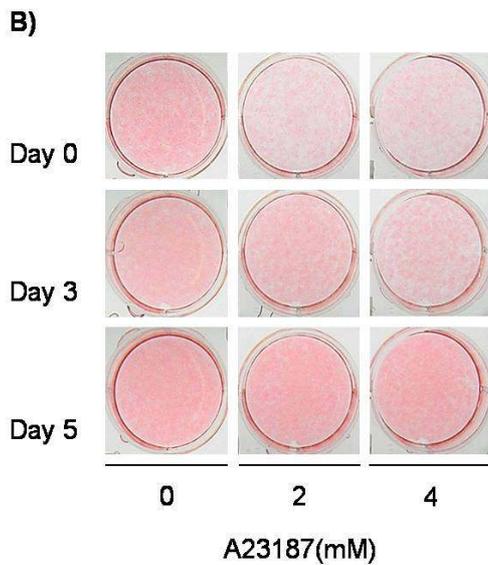
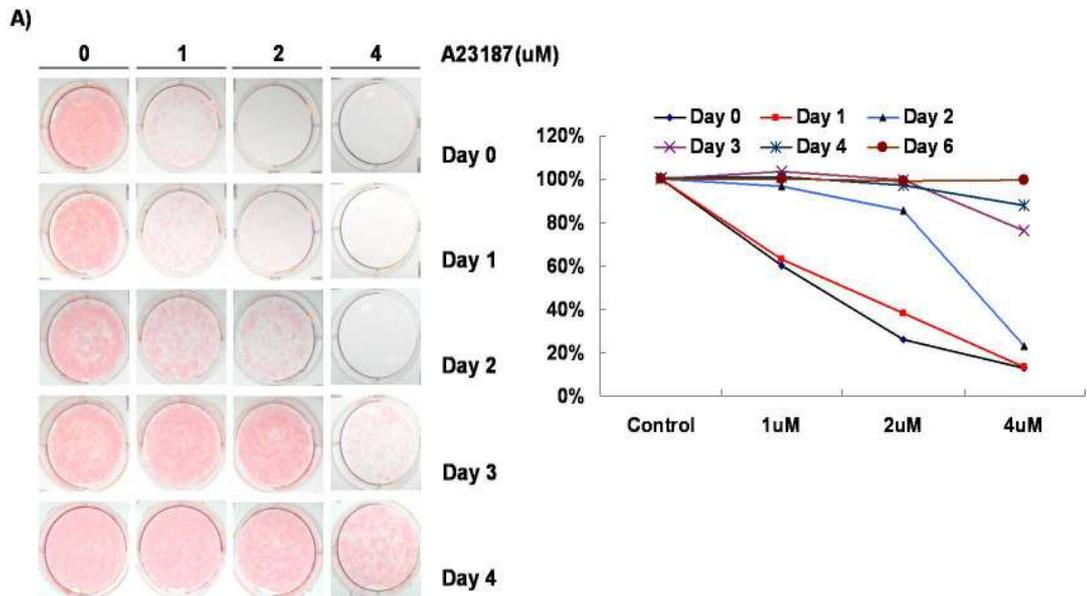


Fig 30. A23187 effects on 3T3-L1 cell differentiation into adipocytes. A) A23187 was added at the indicated time and treated until day 8 after initiation of adipogenic program. B) A23187 was added at the indicated time and treated for 2 days C) Lipid droplets of adipocytes (X 100 of B).

나) 세포의 칼슘농도 증가에 따른 지방세포 분화 및 지방축적의 변화

세포의 칼슘의 증가는 칼슘채널을 통해 칼슘 유입을 증가시킨다(Vazquez et al. 2000). 따라서 A23187 처리에 따른 세포내 칼슘농도 증가와 마찬가지로 세포의 칼슘농도 증가 시에도 지방세포 분화 및 지방축적의 억제효과가 나타나는지 알아보기 위하여 세포분화 0, 4일 째에 다른 농도의 칼슘을 세포배지에 처리하여 8일째 지방세포의 분화 및 이에 따른 지방축적에 대한 세포의 칼슘의 효과를 Oil-Red O 염색법에 의해 대조군 배지와 비교하였다. Fig 31.에서 보는 바와 같이 분화 시작과 함께 세포의 칼슘을 처리 할 경우, 대조군 배지(1.8mM CaCl_2)에 비해 5 및 10mM의 CaCl_2 처리의 경우 Brian Jensen et al.(2004)의 보고에서와 마찬가지로 지방세포 분화 억제의 효과를 보였다(Fig 31A). 지방세포 분화 중후반부에 세포의 칼슘 농도의 증가가 분화 및 지방축적에 미치는 영향을 확인하기 위하여 분화 4일째 10mM의 세포의 칼슘을 처리한 경우 부분적이거나 뚜렷한 지방축적 억제의 효과를 보여주어 세포의 칼슘농도의 증가에 따른 칼슘의 유입은 지방세포 분화 초기 뿐 아니라 후반부 까지도 지속적으로 칼슘에 의한 지방축적 억제가 가능한 것으로 조사되었다(Fig 31A). 지방세포 분화 0. 1. 4일째 CaCl_2 를 다른 농도로 2일간만 처리하고 제거 후 8일째 지방축적을 조사한 결과 CaCl_2 를 분화과정 동안 계속 처리한 Fig 31A의 실험 결과와 비슷한 결과를 얻었다(Fig 31B).

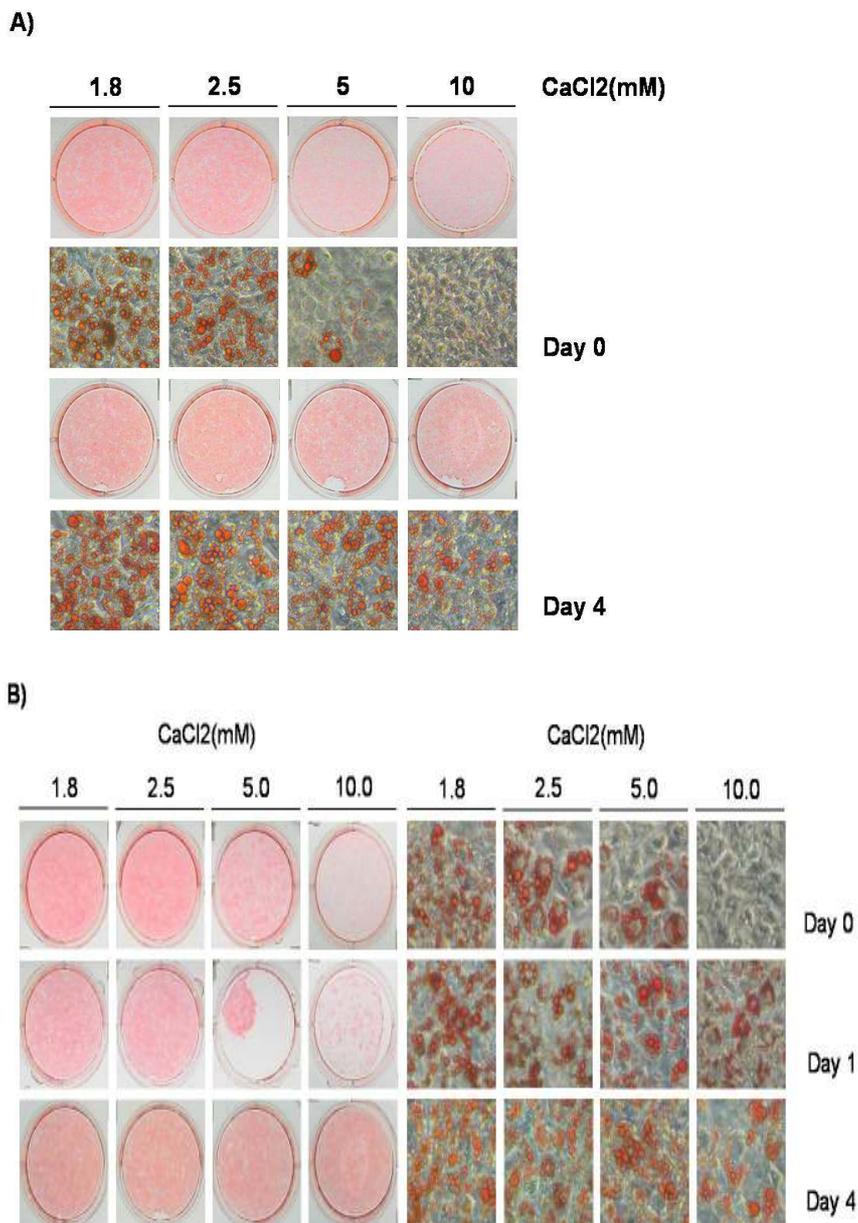


Fig 31. CaCl₂ effects on 3T3-L1 cell differentiation into adipocytes. A) CaCl₂ was added at the indicated time and treated until day 8 after initiation of adipogenic program. B) CaCl₂ was treated at the indicated time and treated for 2 days.

다) 세포내 칼슘농도 변화에 따른 지방세포 분화 및 지방축적에 관여하는 전사조절인자의 발현 변화

세포내 칼슘농도 변화에 따른 지방세포 분화 억제에 대한 분자적 기전 연구는 생리적 및 병리적 환경에서의 지방조직 성장에 대한 세포 및 분자수준의 이해를 증진시킬 뿐 아니라 비만 및 비만과 관련된 다양한 대사성 질환의 예방 및 치료에 대한 기초자료를 제공한다. 지방세포의 분화는 다양한 전사인자가 연쇄적으로 활성화되어 지방세포의 분화를 유도하고 지방축적을 촉진시키는 것으로 잘 알려져 있다. 분화 초기 C/EBP α 가 adipogenic 유전자의 발현을 조절하는 PPAR γ 와 SREBP의 발현을 촉진시킨다. 특히 PPAR γ 는 지방세포의 분화 및 지방축적을 촉진시키는 다양한 유전자의 발현을 조절하여 지방세포 분화의 master regulator로서 역할을 수행한다. 이와 함께 LXR, FXR 등의 핵수용체 또한 지방세포의 지질대사에 관여하는 유전자들의 발현을 조절하여 지방 세포내의 지방축적을 조절하는 것으로 보고되었다. 분화 초기 세포내 칼슘농도의 증가는 이러한 전사조절인자의 발현 시작을 억제하여 분화프로그램의 진행을 막는다. 지방세포 분화 중후반부에는 이들 전사조절인자가 이미 발현되어 지방세포의 분화프로그램을 진행시켜 지방축적이 일어나므로 이 시기에 세포내 칼슘농도의 변화가 기 발현된 이들 전사인자의 mRNA 수준에 어떠한 영향을 미치는지 알아보기 위하여 분화 0일과 3일째 각각 A23187 4 μ M을 처리한 후 분화과정에 따른 이들 전사인자의 발현을 비교하였다.

Fig 32A의 무처리 대조군에서 보는 바와 같이 분화의 진행과 함께 2일째 PPAR γ 의 발현이 일어나기 시작하여 mRNA 수준이 점차 증가함을 확인할 수 있었다. 이와 반대로 분화 시작과 함께 A23187(2 μ M) 처리 시 이미 알려진 바와 같이 Insulin/Dex/IBMX를 처리하여 분화를 유도하여도 PPAR γ 의 발현이 일어나지 않는 것을 확인하였다. 분화가 진행되어 지방이 축적되기 시작하는 분화 후반부에 세포내 칼슘증가가 기 발현되고 있는 이들 전사인자의 발현 감소를 유도하여 지방축적의 감소를 일으키는지 알아보기 위하여 분화 3일째 A23187(4 μ M)을 처리한 후 이들 전사인자들의 mRNA 수준의 변화를 확인하였다. Fig 33. 에서 보는 바와 같이 처리 전에 이미 발현되어 지방세포의 분화프로그램을 진행시키는 PPAR γ 를 비롯한 SREBP-1c,

C/EBP α , LXR의 mRNA는 A23187 처리와 함께 각각 감소 한 것을 확인 할 수 있었다. 따라서 세포내 칼슘의 증가는 기 발현된 이들 전사인자의 발현을 감소시켜 부분적인 지방축적 감소를 유도하는 것으로 생각된다.

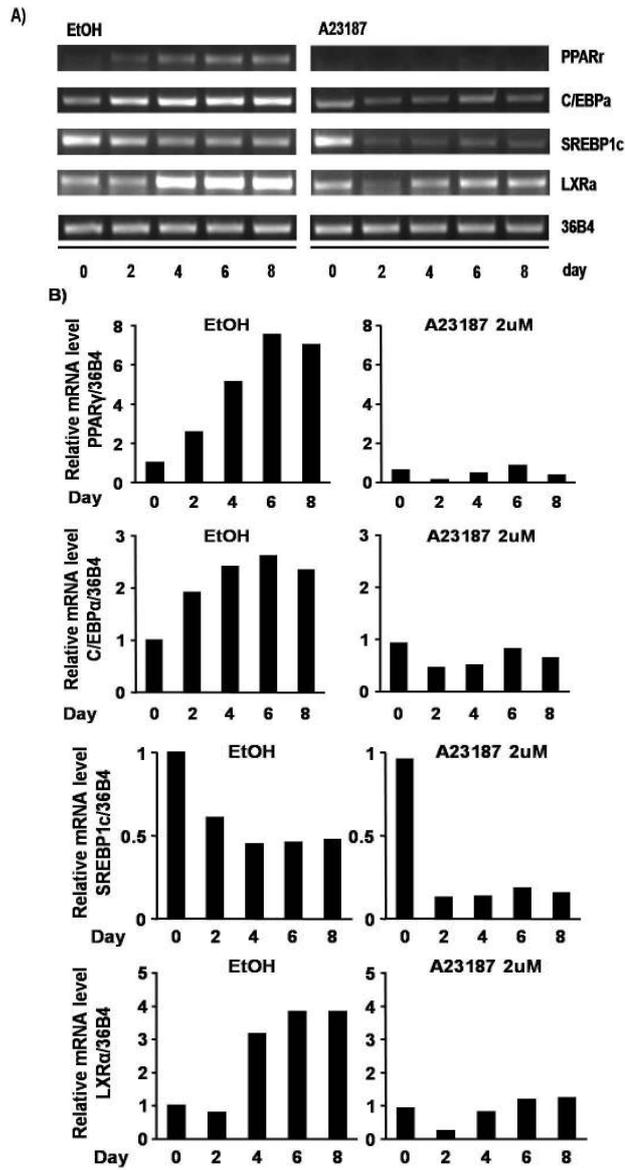


Fig 32. Changes of expression profiles of the nuclear receptors involved in lipid metabolism by A23187 treatment at the early stage of adipocyte differentiation. A23187 was added at the early stage (day 0) after initiation of adipogenic program and treated until day 8.

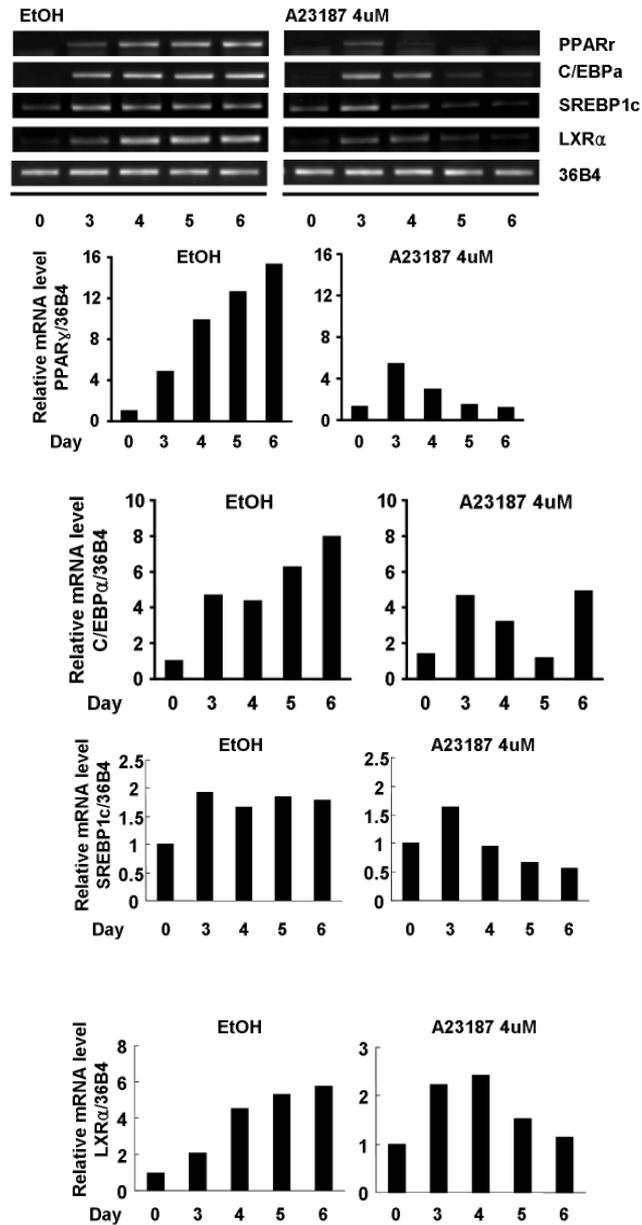


Fig 33. Changes of expression profiles of the nuclear receptors involved in lipid metabolism by A23187 at the late stage of adipocyte differentiation.. A23187 was added at the late stage (day 3) after initiation of adipogenic program and treated until day 8.

세포의 칼슘농도의 증가도 궁극적으로는 기 발현된 이들 전사인자의 발현감소를 유도하여 분화 후반부에 부분적으로 분화프로그램의 역진행을 유도하여 지방축적을 감소시킬 것으로 사료되며 이러한 가설을 확인하기 위하여 분화 3일째 CaCl_2 (10mM)을 처리한 결과 PPAR γ 의 발현변화가 A23187 처리의 경우와 유사한 결과를 얻었다(Fig 34). 지금까지 얻어진 결과를 종합하여 볼 때, 세포의 칼슘농도의 변화는 기존에 알려진 분화 초기 뿐 아니라 이미 지방이 축적되고 있는 분화 중후반부에도 지방세포 분화와 지방축적에 참여하는 유전자들의 발현을 조절하는 PPAR γ 의 발현조절을 통해 지방세포의 지방축적을 조절하는 것으로 생각된다.

라) 칼슘이 지방세포 분화 및 지방축적을 조절하는 핵수용체의 활성화에 미치는 영향

위에서 보는 바와 같이 분화 중후반부의 칼슘농도의 변화는 이미 발현되고 있는 지질대사 조절 핵수용체의 발현 수준을 분화초기와 비슷한 수준으로 되돌릴 수 있음을 확인하였다. 이들 핵수용체들은 다양한 유전자의 발현을 조절하는 전사조절인자이므로 칼슘이 이들 핵수용체의 발현 뿐 아니라 핵수용체의 전사활성도 조절할 수 있는지 알아보기 위해 reporter gene assay를 실시하였다. Fig 35.에서 보는 바와 같이 PPAR γ , C/EBP α , LXR, FXR 모두 각각의 ligand를 처리시 표적유전자의 response element에 연결된 luciferase의 활성을 증가시킨 반면 이들 핵수용체들의 ligand와 함께 A23187 혹은 세포의 칼슘을 다른 농도로 처리 시 A23187- 혹은 칼슘농도-의존적으로 reporter gene의 전사활성이 감소됨을 볼 수 있었다. 따라서 세포의 칼슘농도의 변화는 이들 핵수용체의 mRNA 수준의 감소 뿐 아니라 전사활성의 억제를 통하여 지방축적의 감소를 유도하는 것으로 생각된다.

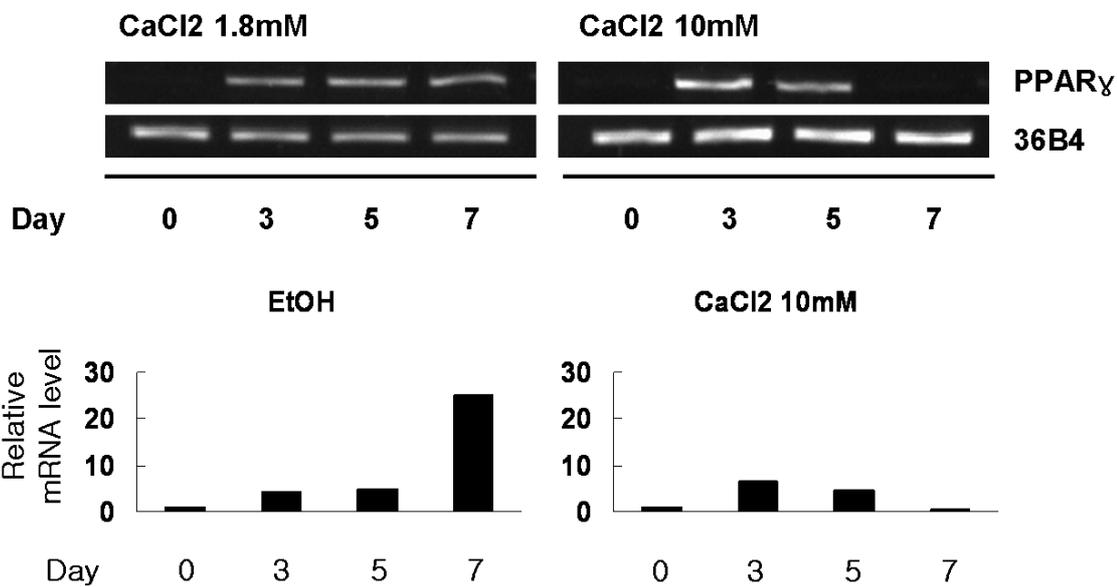


Fig 34. CaCl₂ suppressed PPAR γ expression in adipocytes.. CaCl₂ was added at the late stage (day 3) after initiation of adipogenic program and treated for 2 days.

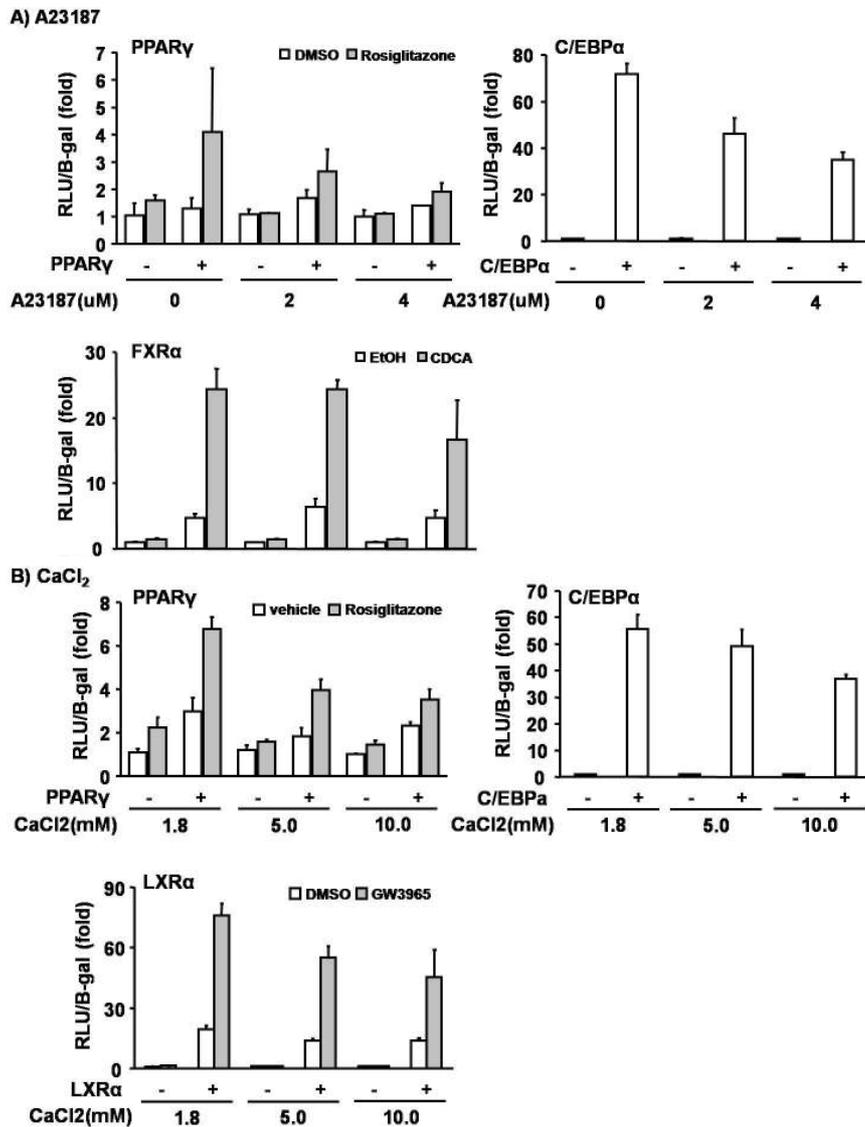


Fig 35. Calcium effects on the nuclear receptor-mediated transcriptional activities. A) A23187 was used for the reporter gene assay. B) CaCl $_2$ was used for the reporter gene assay.

마) 지질대사조절 핵수용체인 PPAR γ 활성조절을 통한 지방축적에 참여하는 표적 유전자의 발현변화

핵수용체 PPAR γ 는 전사조절인자로서 지방세포 분화 및 지방축적에 관여하는 다양한 표적유전자의 전사를 촉진하여 지방세포의 분화와 지방축적을 촉진한다. 세포의 칼슘농도의 변화는 PPAR γ 의 발현 및 전사활성을 억제하는 것으로 확인 되었으므로 칼슘이 지방세포의 분화와 지방축적을 조절하는 PPAR γ 의 표적유전자인 aP2와 adipocyteokine의 발현조절에 참여하는지 알아보기 위하여 칼슘농도에 따른 이들 표적유전자의 발현 변화를 조사하였다. Fig 36.에서 보는 바와 같이 3일째 A23187 4 μ M 처리 후 8일째 지방세포로부터 total RNA를 추출하여 대조군 세포(에탄올)와 이들 표적유전자의 mRNA 수준을 비교한 결과 지방세포 분화의 marker로 이용되는 aP2의 발현이 칼슘 처리 전인 3일째에 비해 감소한 것으로 조사되어 칼슘농도의 증가는 지방세포 분화프로그램을 부분적으로 역진행 시키는 것으로 보이며, 이와 함께 adiponectin 및 resistin 등 adipocytokine 유전자의 발현도 각각 감소하였다.

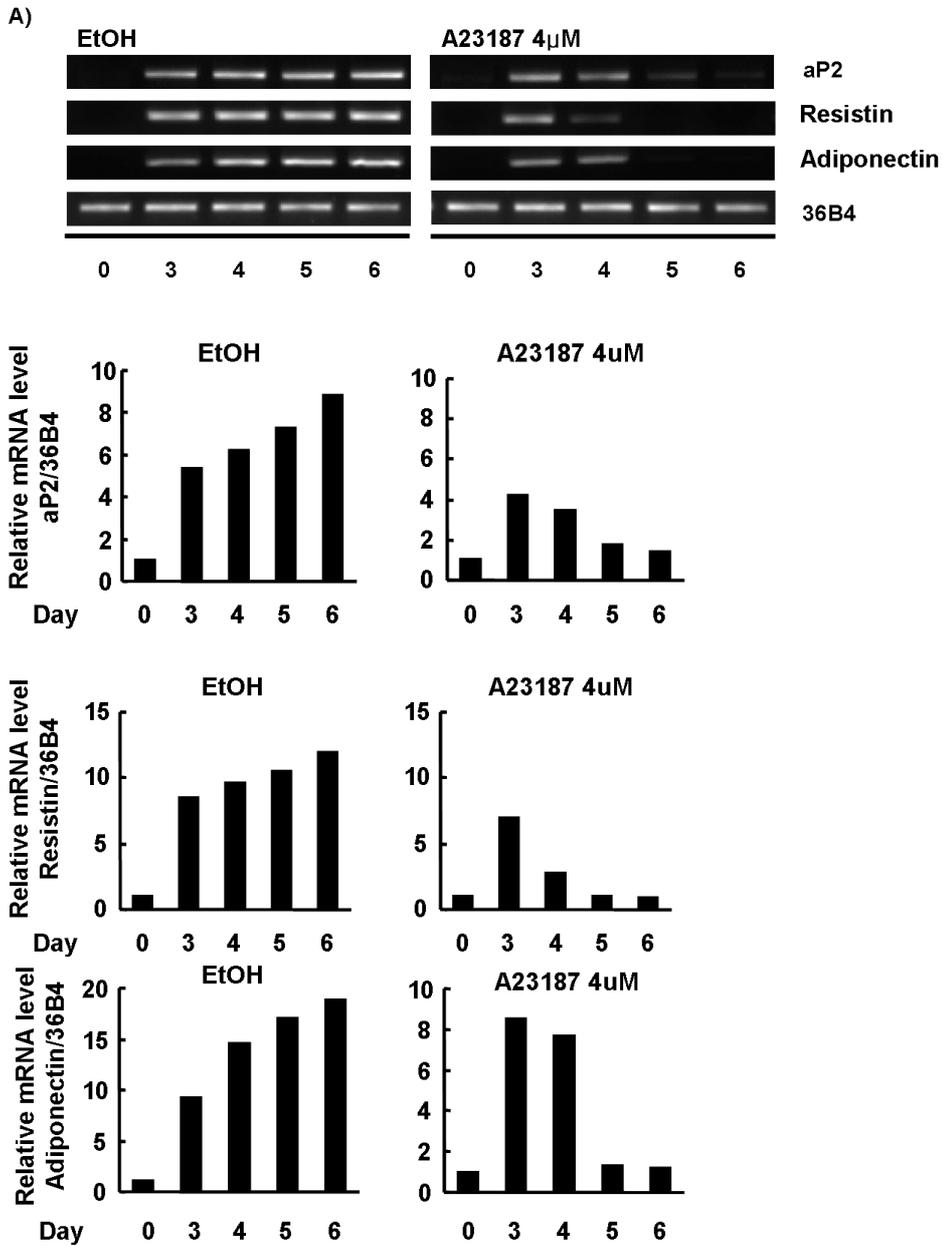


Fig 36. Calcium effects on the expression of adipogenic marker (aP2) and adipocytokine genes during adipocyte differentiation. A23187 was added at the late stage (day 3) after initiation of adipogenic program and treated until 8 days.

바) 칼슘에 의한 지방세포 분화 억제효과에 대한 PPAR γ ligand, rosiglitazone의 영향

지방세포 분화의 master regulator인 PPAR γ 는 핵수용체 그룹에 속하는 전사 조절인자로 ligand에 의해 활성화되어 표적유전자의 발현을 조절한다. PPAR γ 의 ligand 중 하나인 rosiglitazone은 PPAR γ 의 활성화 및 PPAR γ 자체의 발현 또한 증가시키며 지방전구세포에 처리 시 지방세포의 분화 및 지방축적을 촉진시킨다. 본 과제에서 칼슘은 PPAR γ 의 발현 억제 뿐 아니라 전사활성 저해를 통해 지방세포 분화 및 지방축적 억제효과를 나타내는 것으로 확인 되었으므로 PPAR γ ligand 인 rosiglitazone이 이러한 칼슘 효과를 상쇄시킬 수 있는지 알아보기 위하여 분화 0일-3일째 A23187(4 μ M)과 함께 rosiglitazone(1 μ M)을 처리한 후 지방세포의 분화와 지방축적의 변화를 조사하였다. Fig 37.에서 보는 바와 같이 분화 0일째 rosiglitazone은 칼슘의 지방세포 분화억제를 상쇄시키지 못하였으나 3일째 A23187과 함께 처리 시 A23187의 지방축적 억제효과를 감소시켜 A23187만 처리하였을 때보다 지방축적을 부분적으로 회복하였다. PPAR γ 의 발현이 분화 2일째 시작되는 것을 고려할 때 PPAR γ 가 발현되기 전에는 rosiglitazone이 칼슘에 대한 저해효과를 가지지 못하나 PPAR γ 이 발현 된 뒤에는 칼슘에 의한 PPAR γ 의 전사활성 억제로부터 PPAR γ 의 활성을 유지시켜 지방세포 분화를 지속시키고 지방축적을 부분적으로 복원시키는 것으로 생각된다. 따라서 칼슘은 지방세포 분화 초기에는 PPAR γ 의 발현자체를 억제시켜 지방세포의 분화를 저해하고 PPAR γ 가 발현되는 분화 중반부 이후에는 PPAR γ 의 발현감소와 더불어 전사활성을 억제하여 지방세포 분화프로그램을 지연시키고 지방축적을 저해 할 수 있는 것으로 확인되었다.

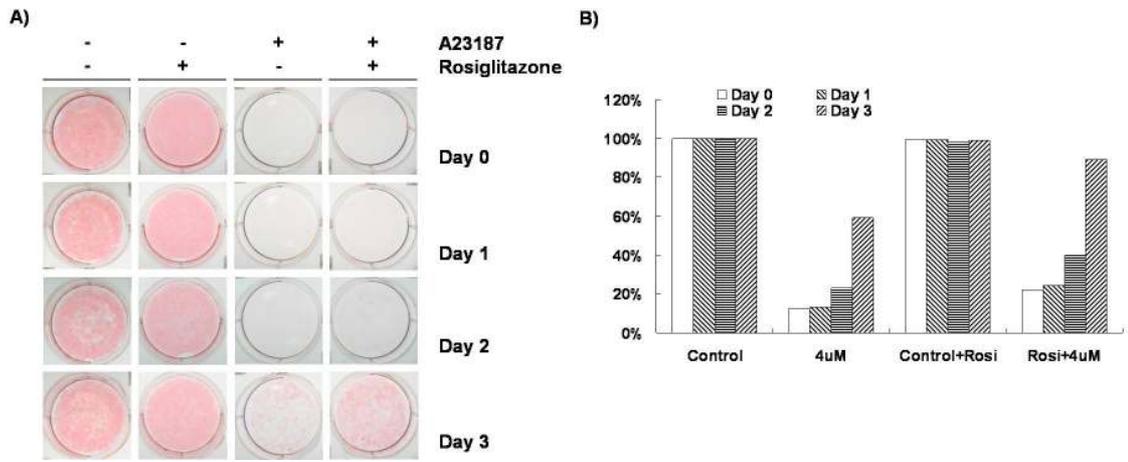


Fig 37. Rosiglitazone, a PPAR γ ligand, partially recovered calcium suppression of adipogenesis. Rosiglitazone (1 μ M) was treated at the indicated time as above.

사) 칼슘에 의한 지방세포 분화억제에 있어 MAPK의 역할

칼슘은 세포내 다양한 신호를 유도하는 것으로 잘 알려져 있으며 MAPK(ERK) 신호경로도 활성화한다는 보고가 있다(Oyvind Melien, 2002). 지방세포 분화에서 ERK의 활성화는 지방세포 분화의 master regulator인 PPAR γ 를 인산화 시켜 전사활성을 억제시킨다. 본 과제에서 지방세포 분화 후반부에 칼슘에 의한 PPAR γ 의 전사활성 억제를 통한 지방세포의 분화지연과 지방축적의 감소가 ERK 활성화 때문인지 조사하였다. 분화 3일째 ERK의 inhibitor인 PD98059를 처리 시 50 μ M일 때 지방세포내의 lipid droplet 크기가 현저히 증가함을 확인하였다. 하지만 A23187과 함께 처리시 PD98059는 세포내 칼슘증가에 따른 지방축적 억제를 저해하지 못하는 것으로 나타나 분화 후반부에 칼슘의 지방세포 분화 지연 및 지방축적 감소는 ERK의 활성화 때문이 아닌 것으로 조사되었다.

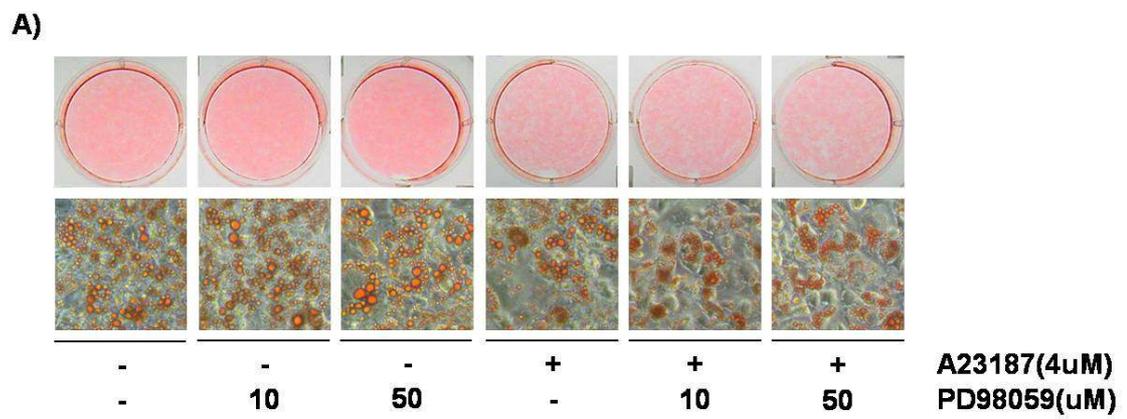
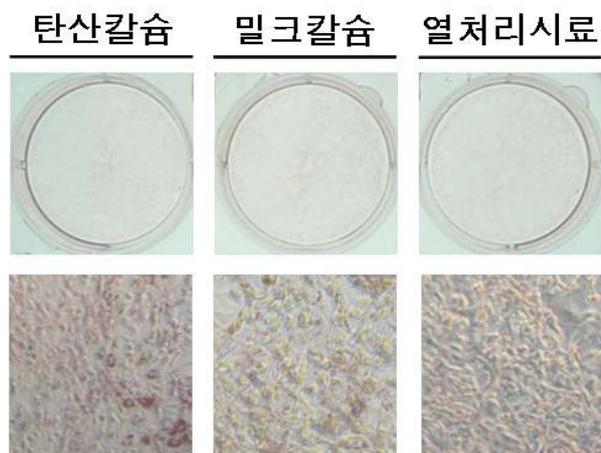


Fig 38. Inhibition of ERK activity had no effect on calcium suppression of adipogenesis. PD98059, an ERK inhibitor, was added at the late stage (day 3) after initiation of adipogenic program.

아) 밀크칼슘 시스템에 의한 칼슘의 지방세포 분화 및 지방축적 억제 증가

주관 및 협동과제에서 도출한 밀크 칼슘시스템이 칼슘 influx를 향상시켜 기존의 CaCl_2 자체 보다 효과적으로 지방세포의 분화와 지방축적을 억제시키는지 조사하였다. 분화 3일째 지방세포의 분화지연 및 지방축적을 감소시키는데 요구되는 최저 칼슘농도는 5mM 이므로 3mM의 칼슘을 함유하고 있는 밀크칼슘 시료(pH4.0)에 CaCl_2 를 첨가하여 배지의 최종 칼슘농도가 5mM가 되도록 하였다. Fig 39.에서 보는 바와 같이 분화 3일째 밀크칼슘 시료를 첨가하여 분화중인 지방세포의 분화지연과 이에 따른 지방축적의 감소를 조사한 결과 두 종류의 밀크칼슘 시료(pH 4.0, 5mM 칼슘) 모두 지방세포 분화 지연과 지방축적 감소에 뛰어난 효과를 보이는 것으로 조사되었다.



Day 3에서 이틀간 처리. CaCl₂를 이용하여 칼슘농도를 10mM로 보정

Fig 39. Milk calcium effects on 3T3-L1 cell differentiation into adipocytes. Milk calcium products were added at the late stage (day 3) after initiation of adipogenic program.

제 3 절 협동과제 : 우유칼슘 함유 체중조절 소재의 생산 공정 개발 및 제품적성 평가

1. 연구수행방법

가. 효율적 칼슘 가용화 방법의 설정

1) 칼슘가용화 조건 설정

신선한 우유를 구입하여 지방을 제거한 후 여러 가지 산제(GDL, lactic acid, citric acid)를 이용하여 탈지유의 pH를 6.7에서 4.0까지 0.5 간격으로 조정하였다. 산제의 종류와 pH의 변화에 따른 탈지유의 칼슘 가용화 정도 측정은 각 조건에서 시료를 0.4 um syringe filter로 여과하여 단백질을 제거한 후 실시하였다. 우유에 존재하는 총 칼슘 함량은 최종 농도가 12%(w/v)가 되도록 TCA를 첨가하여 단백질을 제거한 후 측정하였다.

2) 칼슘의 정량

시료에 존재하는 칼슘의 정량은 두 가지 방법으로 실시하였으며 두 방법으로 측정된 결과를 비교 분석 하였다.

가) Spectroscopy에 의한 칼슘의 정량

시료 칼슘의 신속 정량법으로서 Connerty and Briggs(1966)의 방법을 변형하여 실시하였다. 칼슘은 o-creosolphthalein complexone(CPC)과 복합체를 형성하면 최대흡수파장(575 nm)이 변화되게 되므로 시료로부터 칼슘과 결합되지 않은(CPC_{free})를 구하였다. 그 후 시료에 EGTA를 첨가하여 칼슘의 EGTA에 대한 선택적 결합 및 칼슘과 결합되었던 CPC의 방출을 유도하여 전체 CPC(CPC_{total})의 양을 측정하였다. 칼슘의 양은 CPC_{total} - CPC_{free}로 계산하였으며 탄산칼슘을 이용하여 표준곡선을 작성하

고 칼슘의 양을 산출하였다.

나) 유도결합 플라즈마 방출분광기(Inductively Coupled Plasma Emission Spectromete, ICP-AES)에 의한 칼슘의 정량

시료에 존재하는 칼슘을 비롯한 무기질의 정확한 정량법으로 유도결합 플라즈마 방출분광기를 이용하였다. 시료는 분석 전 여과지(Whatman No. 5)를 통과시켰으며 분석 장치의 제원 및 측정조건은 Table 6과 같다.

나. 유청여과액의 생산과 우유칼슘의 분리 정제

1) 농축유청여과액의 생산

한외여과를 이용한 농축유청여과액(concentrated ultrafiltrate permeate; CUFPP)의 생산은 매일유업(주)의 도움을 받아 실시하였다. 신선한 탈지유를 75℃에서 15초간 예열한 후 10,000 da의 여과막이 장착된 한외여과 장치를 이용하여 한외여과 여과액(UF permeate)을 회수하였다. 한외여과 여과액은 nanofiltration을 이용하여 약 4배 농축하였으며 80℃에서 15초간 살균하고 5℃로 냉각하였다. 또한 Cottage cheese whey를 이용하여 농축유청여과액을 제조하였다.

2) 농축유청여과액으로부터 칼슘(milk mineral)의 회수

한외여과투과 농축액(CUFPP)은 고형분 함량을 기준으로 약 93% 내외의 유당과 4.5%의 미네랄을 포함하고 있으므로 체중 소절 소재로 사용될 수 있는 칼슘을 회수하기 위하여 CUFPP로부터 유당을 제거하는 공정을 설계하였다.

가) 에탄올 침전법에 의한 유당의 제거

유당의 결정화에 의한 제거공정으로 에탄올의 첨가에 의한 유당의 침전을 시도하였다. 에탄올 침전법의 적용 시 공정 변수로서 pH 조정, 에탄올의 첨가수준(에탄올과 시료의 혼합비율), 방치시간, 에탄올의 농도, 에탄올의 재활용 가능성을 조사하였으

Table 6. Experimental Conditions for ICP–AES

Description	Condition
R.F generator	27.12 MHz
R.F. power	1.15 Kw
Plasma torch	Quartz
Nebulizing system	Concentric Nebulizer
Flow rate of argon gas	Carrier 0.5 L/min Coolant 16 L/min
Analytical Line	Calcium 317.933 nm Magnesium 280.271nm Phosphorous 177.499 nm Iron 238.204 nm Zinc 202.548 nm

며 회수된 시료를 분말화하여 화학적 조성을 분석하였다.

나) 가열에 의한 칼슘의 회수

농축유청여과액(CUFP)의 에탄올 침전을 실시한 후 여러 가지 조건에서 가열하여 우유 칼슘의 침전 회수를 시도하였다.

다. 제조된 밀크칼슘의 성분분석

제조된 밀크칼슘의 일반성분(수분, 단백질, 지방, 유당, 회분)과 칼슘의 함량을 다음의 방법으로 정량하였다.

가) 수분 및 회분 함량

시료의 수분 함량은 상압가열 건조법을 이용하여 105°C에서 12시간 건조한 후 측정하였으며 회분 함량은 550°C의 회화로에서 4시간 회화한 후 측정하였다. 시료의 총고형분함량(%)은 $100 - \text{수분함량}(\%)$ 로 계산하였다.

나) 단백질 함량

시료의 단백질 함량은 micro Kjeldahl법을 이용하여 automatic Kjeldahl system(Buichi, Switzerland)으로 분석하였으며 총질소량에 질소계수 6.38을 곱하여 조단백질의 양을 산출하였다.

다) 지방함량

지방은 Soxhlet 장치(IKA, Germany)를 이용한 에테르 추출법(ether extraction)으로 정량하였다.

라) 유당함량

시료 내 유당의 함량은 Kwak and Jeon (1988)의 방법을 일부 변형하여 사용하였다. 시료에 isopropanol을 첨가하고 원심분리 하여 얻어진 상등액을 0.45 μm

syringe filter(National Scientific, Rockwood, USA)로 여과한 후 Rezex RCM-monosaccharide column이 장착된 HPLC system(Jasco, Tokyo, Japan)에 주입하였다. 이동상으로는 증류수(HPLC grade)를 이용하였으며 0.5 mL/min의 속도로 이동시켜 ELSD detector(Softa Co., US)를 사용하여 분석하였다. 유당 정량은 유당용액을 이용하여 표준곡선을 작성한 후 유당의 함량을 산출하였다.

라. 우유 칼슘의 이화학적 특성 및 제품적성 평가

1) 칼슘의 용해도

시제품 칼슘을 다양한 농도로 증류수와 탈지유에 각각 첨가한 후 pH를 4-7로 조정하였다. 시료를 일정 속도로 30분간 교반하고 5500 x g에서 10분간 원심분리하여 상정액을 회수하였다. 원심분리 전후의 칼슘 함량을 ICP-AES로 측정하였으며 용해도(%)는 [상정액의 칼슘량(mg)/원심분리 전 칼슘의 양(mg)] x 100으로 계산하였다.

2) 칼슘 강화가 우유의 열안정성에 미치는 영향

신선한 탈지유에 제조한 칼슘시제품을 132(대조구), 150, 175, 200 mg/100mL 수준으로 첨가하고 열안정성을 측정하였다. 열안정성은 Vyas and Tong(2004)의 방법에 따라 시료 2 mL를 test tube에 넣은 후 140°C oil bath에 유지시켜 flake가 생성되는 시간(heat coagulation time, sec)으로 측정하였다.

3) 칼슘 강화 음료의 관능검사

칼슘 강화 수준이 관능적 특성에 미치는 영향을 조사하기 위하여 칼슘 강화 음료를 제조하고 관능적 특성을 평가하였다. 칼슘을 용해하기 위한 매질은 구연산과 설탕을 각각 0.65%, 9% 수준으로 첨가하여 제조하였으며 최종 pH는 3.5가 되도록 하였다. 각 시료는 3 단위 임의의 숫자를 부여하여 표시하였으며 투명한 컵에 50 mL씩 담아 동시에 제시하였다. 검사항목은 Fig. 40에 나타낸 바와 같이 외관 기호도,

제품 : 칼슘 강화 음료

이름 :

성별 : 남 / 여

연령 :

외관 기호도 (색상, 탁한 정도, 침전물 등등)

매우싫다 매우좋다

맛 기호도 (맛의 조화, 비정상적인 맛 등등)

매우싫다 매우좋다

전반적 기호도 (외관, 맛, 냄새, 기타)

매우싫다 매우좋다

단맛 (강도)

매우약하다 매우강하다

신맛 (강도)

매우약하다 매우강하다

쓴맛 (강도)

매우약하다 매우강하다

비정상적인 맛 (off-flavor) (강도)

매우약하다 매우강하다

얼마나 자주 기능성 음료를 드십니까? ()회/월

Fig 40. Ballot for sensory evaluation of calcium fortified beverage product.

맛 기호도, 전반적 기호도, 단맛, 신맛, 쓴맛, 비정상적인 맛(off-flavor) 강도를 9점 척도로 평가하였다. 기호도의 경우 척도의 양끝을 매우 싫다(1)에서 매우 좋다(9)로 표시하였으며 강도 측정의 경우 매우 약함(1)에서 매우 강함(9)으로 지정하였다. 제시된 시료의 온도는 10℃를 유지하도록 하였으며 한 가지 시료의 평가가 끝날 때마다 물로 입을 헹구고 다음 시료를 평가하도록 하였다, 패널은 국민대학교의 학부 및 대학원생 52명(20-30세, 남 17, 여 35명)을 대상으로 하였으며, 칼슘 강화 음료임을 알려주고 평가를 실시하였다.

4) 칼슘 강화 음료의 혼탁도

제조된 칼슘 강화음료의 혼탁도는 400 nm에서 흡광도를 측정하여 표현하였다.

5) 칼슘강화 요구르트의 제조

우유에 탈지분유를 첨가하여 고형분 함량이 11%가 되도록 조정된 후 칼슘의 함량이 150, 175, 200 mg/100 mL의 수준이 되도록 요구르트 remix를 제조하였다. 요구르트 premix를 100℃에서 20분간 중탕하여 살균한 후 38℃로 냉각하고 상업용 스타터(YC-380, *S. thermophilus*, *L.bulgaricus*, *B. longum*) 1%를 접종하고 6시간 동안 발효하여 요구르트를 제조하였다. 발효된 요구르트를 4℃에서 24시간 동안 방치한 후 요구르트의 품질특성과 관능적 특성을 평가하였다.

가) 칼슘강화 요구르트의 pH 및 적정산도

칼슘의 강화가 젖산균의 산생성에 미치는 영향을 조사하기 위하여 발효 종료 후 요구르트의 pH와 적정산도를 측정하였다. pH는 측정은 pH-meter(Model 420, Thermo Orion, USA)를 사용하였으며 적정산도는 시료 10 g을 동량의 증류수로 희석하고 지시약(0.1% phenolptalein)을 2-3방울을 가한 후 분홍색이 소실되지 않고 10초간 유지될 때까지 중화 적정하여 소비된 0.1 N NaOH의 부피를 lactic acid (% w/w)로 환산하여 표시하였다.

나) 칼슘강화 요구르트의 생균수

시료를 각각 1 g씩 무균적으로 취하여 멸균 peptone 수에 의한 10배 희석법으로 희석하고 MRS (Difco, Detroit, MI, USA) 배지에 plating한 후 37°C incubator(Vision. scientific, Seoul, Korea)에서 48시간 동안 배양하여 colony 수가 30-300개가 나타나는 평판을 선택하여 산출하였다.

다) 칼슘강화 요구르트의 brix 및 점도

요구르트의 점도는 Martinou-Voulasiki and Zerfiridis(1990)의 방법에 의해 Brookfield viscometer (Model LVF, Brookfield Eng., USA)를 사용하여 측정하였다. 점도의 측정은 4°C에서 spindle No.6를 사용하여 10 rpm에서 spindle이 돌기 시작한 후 1분이 되는 순간의 점도를 centipose(cp) 단위로 읽었다.

라) 칼슘강화 요구르트의 미세구조(microstructure) 관찰

칼슘강화 요구르트의 미세구조는 Lee and Lucey (2004)의 방법에 따라 공초점 레이저 현미경(confocal scanning laser microscopy; CSLM)로 측정하였다. 단백질 형광염색제로 acridine orange(0.2%, w/w) 300 μ L를 요구르트 culture 50 mL에 첨가하여 잘 혼합한 후 혼합물 소량을 slide에 옮기고 Ar/Kr laser를 이용하여 confocal scanning laser microscopy로 이미지를 관찰하였다. 이미지 관찰은 Plan-APOCHROMAT 100 x oil DIC objective lens (aperture=1.30)를 사용하였으며 488 nm의 excitation wavelength에서 대표적 이미지를 선택하였다

마) 칼슘강화 요구르트의 관능평가

칼슘강화 요구르트의 관능 평가는 국민대학교 학부 및 대학원생 50명(20-30세, 남 15, 여 35명)을 대상으로 실시하였다. 관능평가는 음료의 평가와 유사한 방법으로 진행하였으며 기호도 평가, 기본적 맛의 강도 평가 이외에 조직감 특성으로서 녹는 정도(melting)와 거친느낌(roughness)을 평가에 포함하였다.

마. 통계분석

모든 분석 실험은 2회 이상 반복 측정하였으며, 결과의 통계분석은 Minitab Ver. 13.1(Minitab inc., USA)을 이용하였다. 처리구간의 유의적 차이($p < 0.05$)는 일원 분산분석(one-way ANOVA)과 Tukey의 다중비교 검정법을 이용하였다.

2. 연구개발수행 내용 및 결과

가. 효율적 칼슘가용화 방법 정립

우유에 존재하는 총 칼슘 함량은 약 29.3 mM로서 이중 2/3 정도는 casein에 결합되어 있으며 약 1/3은 가용성 칼슘의 형태로 존재한다(Walstra and Jenness, 1984). 우유의 pH가 저하되면 colloidal calcium phosphate의 가용화가 일어나며 유장(serum phase)내 칼슘과 인의 농도 증가가 나타난다. pH의 조정 후 유장에서 관찰되는 칼슘의 농도 변화는 초원심분리나 한외여과법을 실시하여 단백질을 배제한 후 측정하는 것이 일반적이다. Law and Leaver(1998)는 탈지유를 산성화 시킨 후 0.2 μm 의 공극을 가진 filter로 여과한 경우 초원심분리나 한외여과를 실시한 경우와 매우 유사한 결과를 얻을 수 있는 것으로 보고하였다. 따라서 본 연구에서도 다양한 산제를 이용하여 pH를 일정 간격으로 조정 후 30분간 방치하고 유장내로 이동하는 칼슘의 농도 변화를 측정하였다.

Fig. 41에 나타낸 바와 같이 유장으로 용해되는 칼슘의 양은 산제의 종류보다는 최종 pH에 의해 결정되었다. pH 5.0-4.5이하에서는 거의 모든 칼슘이 용해되어 유장으로 이동하는 것으로 나타났으며 가용화된 칼슘의 농도는 신선한 우유를 12% TCA를 처리하여 전체 칼슘 농도로 측정한 경우와 유사한 27 mM 수준이었다. 그러므로, cheese 제조 부산물인 유청으로부터 우유 칼슘을 제조하는 경우 최종 pH의 조정이 매우 중요할 것으로 판단된다. 또한, pH 5.0 근처에서는 colloidal calcium phosphate의 대부분이 유청으로 이동하게 되므로 sweet whey(감성유청)보다는 cottage cheese whey와 같은 acid whey(산성유청)이 칼슘 제조에 적합한 것으로 판단된다. 한편, Law and Leaver(1998)는 colloidal calcium phosphate의 가용화에 미치는 온도의 영향은 크지 않다고 보고하였다.

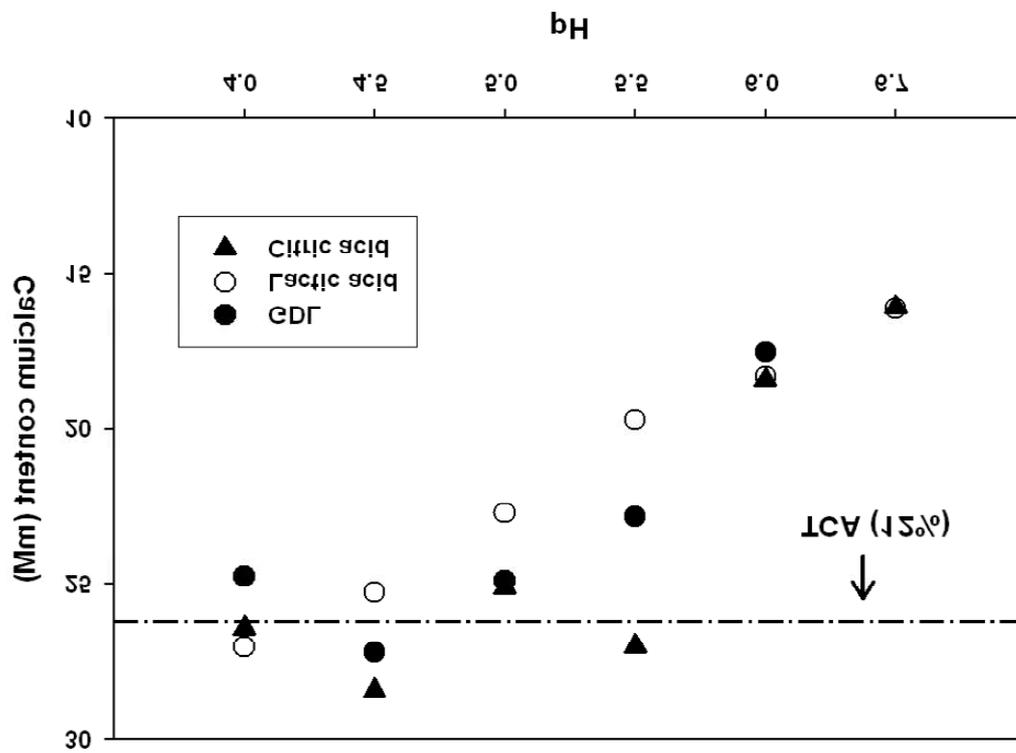


Fig. 41. Changes of calcium content by the acidification of skim milk with various acidulants.

나. 한외여과를 이용한 한외여과투과액(UF permeate)의 생산

치즈생산의 부산물로 생산되는 유청을 이용하는 대표적 형태는 한외여과(ultrafiltration)를 이용하여 단백질을 농축함으로써 농축유청단백질(whey protein concentrate, WPC)을 생산하는 과정이다. 이 과정에서 단백질을 제외한 물, 유당 및 칼슘을 포함한 가용성 미네랄이 투과액(permeate)로 이동한다. 본 연구에서는 체중조절 소재로서의 우유칼슘을 제조하기 위한 원천으로서 탈지유의 한외여과투과액(UFP), 농축한외여과투과액(CUFP)을 제조하고 그 화학적 조성을 분석하였다(Table 7).

UFP의 성분 조성은 사용되는 UF system이나 사용 시 가해지는 압력, membrane의 재질에 따라 일부 차이를 보이는 것으로 보고되어 있다. 본 연구에 사용한 UFP의 총고형분 함량은 5.08%로 탈지유의 Carbosep UF system 투과액의 고형분 함량(5.1%)과 매우 유사하였다(Ratray and Jelen, 1996). 한편, 단백질의 함량은 논문의 보고(0.3%)보다 낮게 나타났다. 이러한 차이는 단백질 정량방법의 차이에 기인한 것으로 판단되는데 문헌에서는 발색법을 이용한 본 연구방법과는 달리 Kjeldahl 방법을 이용하여 요소와 같은 비단백태질소(non protein nitrogen)를 포함하기 때문인 것으로 생각되며 true protein의 측면에서는 큰 차이가 없을 것으로 생각된다.

시료 내 존재하는 칼슘의 농도는 24.87 mg/dL로서 27 mg/dL 정도의 칼슘이 Carbosep UF permeate에 존재한다고 보고한 위의 논문과 매우 유사한 수준으로 나타났다. UFP를 약 4배 농축하여 제조한 CUFP에는 약 84.94 mg/dL의 칼슘이 존재하였다. CUFP의 성분 분석 결과를 근거로 할 때 칼슘을 분리하기 위하여서는 전체 고형분의 96%를 차지하는 유당의 제거가 필수적인 것으로 확인되었다.

다. 체중조절 소재용 milk mineral의 회수 및 성분조성 평가

CUFP로부터 칼슘을 주성분으로 한 milk mineral을 회수하는 방법은 두 가지 측면에서 생각할 수 있다. 첫 번째 방법은 CUFP를 가열하여 calcium phosphate를 침전시켜 회수하는 방법이며 두 번째 방법은 CUFP로부터 유당을 선택적으로 제거한 후 건조하는 방법이다. 예비실험을 통하여 CUFP를 침전물이 형성되는 시점까지 가열한 결과 갈변이 심하게 발생하여 유당의 선별적 회수는 불가능한 것으로 판단되었으

Table 7. Proximate analysis and pH of fresh ultrafiltration permeate (UFP) and concentrated ultrafiltration permeate (CUFP).

	Total solid (%)	Protein (%)	Lactose (%)	Lipid (%)	pH	Calcium (mg/dL)
UFP	5.08	0.02	3.325	–	6.47	24.87
CUFP	19.85	0.12	19.091	–	6.16	84.94

므로 유당과 milk mineral을 각각 회수할 수 있는 용매침전법을 이용하여 milk mineral의 회수를 실시하였다.

일반적으로 alcohol은 유당의 용해도를 감소시키는데 효과적이므로 alcohol을 이용한 유당의 결정화 방법이 시도되었다. Hoff 등(1987)의 보고에서와 같이 methanol은 ethanol에 비하여 lactose의 분리 효율에 우위를 가질 수 있으나 독성의 문제가 있어서 식품 가공에 사용되는 용매로서 적합하지 않음을 고려하여 본 연구에서는 ethanol을 추출 용매로 선정하였다. 에탄올의 첨가가 CUFP의 성분에 미치는 효과를 측정하기 위하여 1:1-1:4 (CUFP:ethanol)의 비율로 ethanol을 첨가한 후 상온에서 방치하였다. 본 연구에서는 에탄올의 첨가 후 방치 온도에 따른 차이는 변수에서 제외하였는데 그 이유는 본 연구와 유사한 유당 결정 시스템에서 온도는(10°C vs. 22°C) 결정화에 영향을 미치지 않는다는 보고에 근거하였다(Singh, 1991b). 일정시간을 방치한 후 침전물을 여과지로 용해한 후 상정액의 유당 함량을 측정한 결과는 Fig. 42와 같다.

에탄올을 첨가됨에 따라 CUFP의 유당포화점은 감소하였으며 유당 결정화 속도는 에탄올의 비율 증가에 따라 크게 증가하였다. CUFP와 동일한 부피의 에탄올을 첨가한 경우 96 시간 방치 후에도 초기 유당 농도의 약 34%가 시료 내에 잔존하는 것으로 나타났다. CUFP:ethanol의 비율을 1:4로 변화시킨 경우 시료 내 잔존하는 유당의 농도는 초기 유당 농도의 18% 수준으로 감소하였다. 따라서 CUFP의 농축정도 및 CUFP:ethanol의 비율은 유당의 결정화속도에 유의적인 영향을 주는 것으로 확인되었다.

CUFP:ethanol의 비율은 유당의 결정화뿐만 아니라 시료 내에 존재하는 다른 성분의 안정성에도 영향을 미칠 수 있다. 위와 동일한 조건에서 에탄올 침전 후 시료 내 존재하는 칼슘의 안정성을 측정한 결과 CUFP:ethanol의 비율이 1:1, 1:2인 조건에서는 칼슘의 침전 정도는 크지 않았으며 약 96시간의 방치 후에도 초기 칼슘농도의 약 90%가 용해된 상태로 존재하였다(Fig. 43). 그러나, 1:4인 조건에서는 24시간 방치 후 칼슘 함량이 23% 수준으로 감소하는 것으로 나타나 칼슘의 안정성을 크게 감소시키지 않는 범위 내에서 유당을 결정화를 가속화할 수 있는 세부 조건의 설정이 필요한 것으로 나타났다. 유청단백질의 일부는 ethanol에 의하여 변성되는 것으로 알려져 있으며 변성 정도는 단백질의 종류와 pH, 이온강도, 온도, ethanol의 농도와 같은 환경 요인에 따라 차

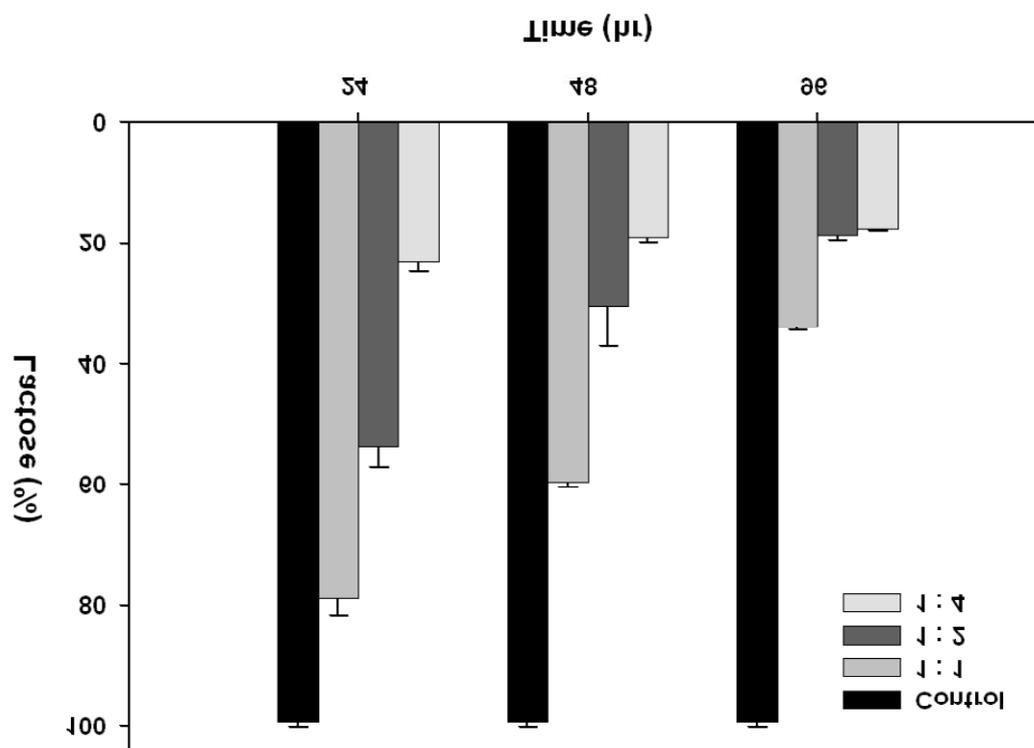


Fig. 42. Effect of ethanol addition on lactose crystallization of CUFP at pH 2.75. Ethanol (95%, v/v) was added to CUFP at designated ratio (CUFP:ethanol).

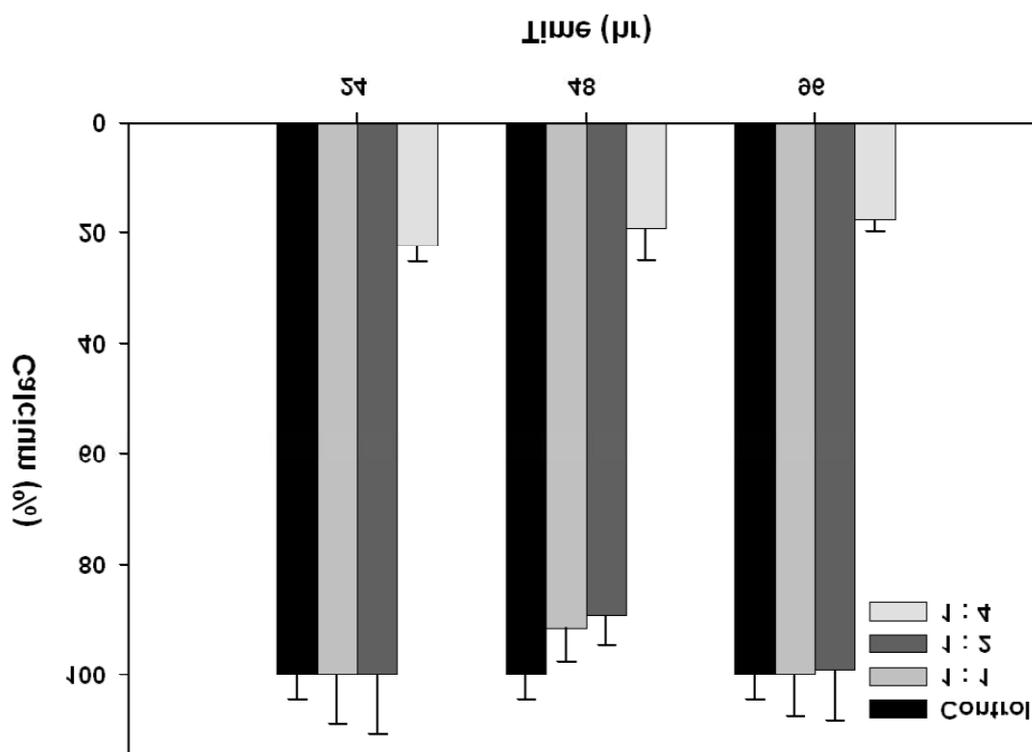


Fig. 43. Effect of ethanol addition on calcium content in CUFP at pH 2.75. Ethanol (95%, v/v) was added to CUFP at designated ratio (CUFP:ethanol).

이를 나타낸다(Tumerman and Webb, 1976). 에탄올 침전 후 시료 내 용해상으로 존재하는 단백질 함량은 CUFP:ethanol의 비율이 1:4인 경우 가장 낮은 경향을 보였다(Fig. 44).

그러나, 시료 내에 존재하는 초기 단백질의 함량이 1.2 mg/mL 수준으로 190 mg/mL의 수준으로 존재하는 유당의 함량과 비교할 때 시료에 존재하는 단백질 함량은 회수되는 칼슘의 순도에 크게 영향을 미치지 않을 것으로 판단되며, milk mineral의 순도 측면에서 볼 때 시료로부터 단백질의 제거는 칼슘의 순도를 높이게 되므로 바람직한 것으로 생각된다.

Milk mineral의 순도를 높이기 위해서는 유당의 선별적 제거가 일차적으로 요구된다. 선행 된 연구에서 유당의 결정화에 가장 효과적이었던 1:4(CUFP:ethanol)의 조건에서 방치 시간의 경과에 따른 유당의 결정화를 측정된 결과는 Fig. 45과 같다. Ethanol의 첨가 후 15시간까지 지속적으로 유당의 결정화가 진행되었으며 15시간이후에서는 결정화의 속도가 현저히 감소하였다. 최종적으로 42시간의 경과 후 시료 내 남아 있는 유당의 농도는 2.8%로 나타났다.

유당을 더 낮은 농도로 감소시키기 위한 현실적 방법은 첨가되는 ethanol의 비율을 증가시키거나 본 실험에서와 같이 유당의 농도를 일정 수준이하로 감소시키고 가열하여 칼슘을 침전시키는 방법을 고려할 수 있다. 첨가되는 ethanol의 비율을 증가시키는 방법에 대하여 Singth 등(1991a)은 ethanol(86%, v/v)의 비율을 CUFP의 29배까지 증가시킨 경우 유당의 결정화는 전체 유당 농도의 90% 수준으로 상승시킬 수 있다고 하였으나 이 경우 제반 처리비용의 증가가 예상되므로 보다 경제적인 방법의 검토가 필요할 것으로 판단된다. 동일한 조건에서 시간의 경과에 따른 칼슘의 함량 변화를 측정된 결과는 Fig. 46과 같다. 칼슘의 함량은 ethanol 첨가 후 6시간 이후에 최저 농도인 약 25 mg/dL 수준으로 감소하였으며 방치 시간을 연장하여도 더 이상의 유의적 변화는 관찰되지 않았다. 이 결과는 앞의 ethanol 첨가 비율에 따른 변화와 유사한 수준으로 확인되었다. 시료 내 단백질의 농도 변화는 크지 않은 것으로 나타났으며 0.9 에서 0.7 mg/mL의 수준으로 감소하였다(Fig. 47).

Fig. 48-50은 CUFP에 첨가되는 에탄올의 농도를 변화시켰을 때 유당, 칼슘, 단백질의 농도 변화를 측정된 결과이다. 다양한 순도의 ethanol을 1:4의 비율로 첨가하고

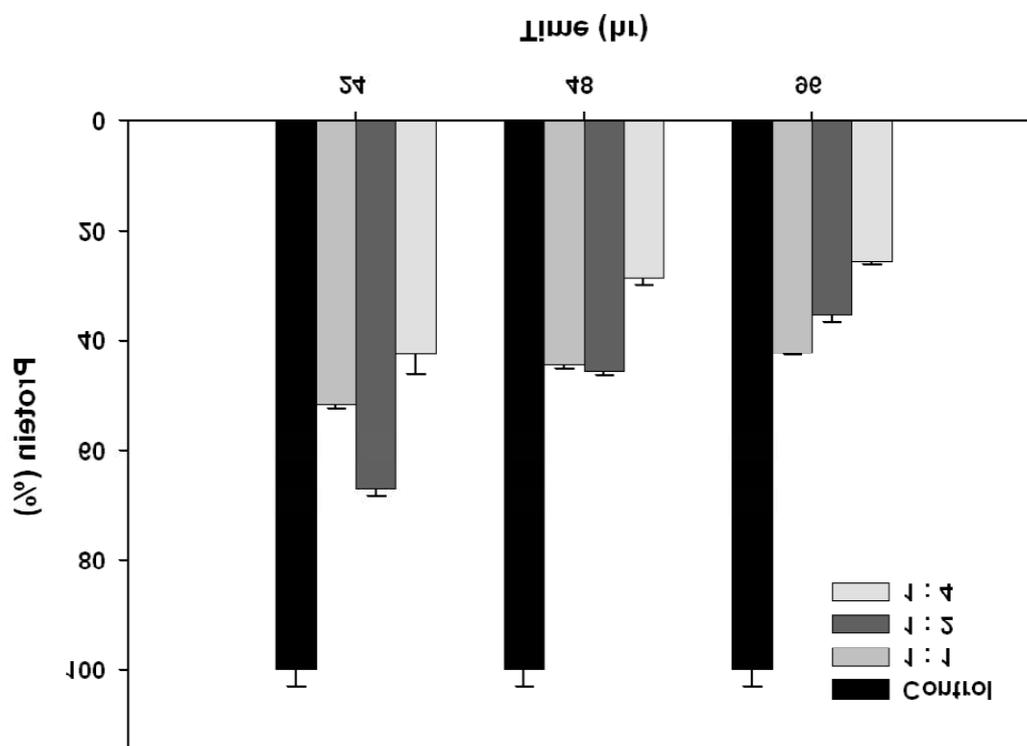


Fig. 44. Effect of ethanol addition on protein content in CUFp at pH 2.75.
 Ethanol (95%, v/v) was added to CUFp at designated ratio (CUFP:ethanol).

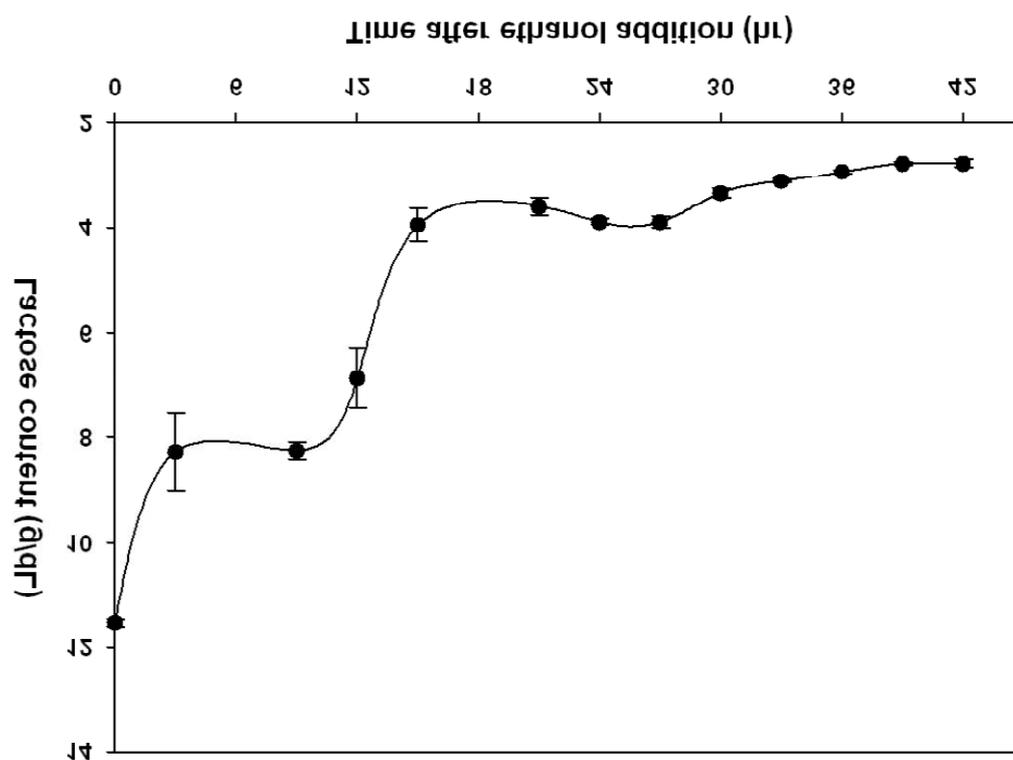


Fig. 45. Changes of lactose content in CUFP at pH 2.75 by the addition of ethanol. The ratio of CUFP : ethanol (95%, v/v) was 1:4.

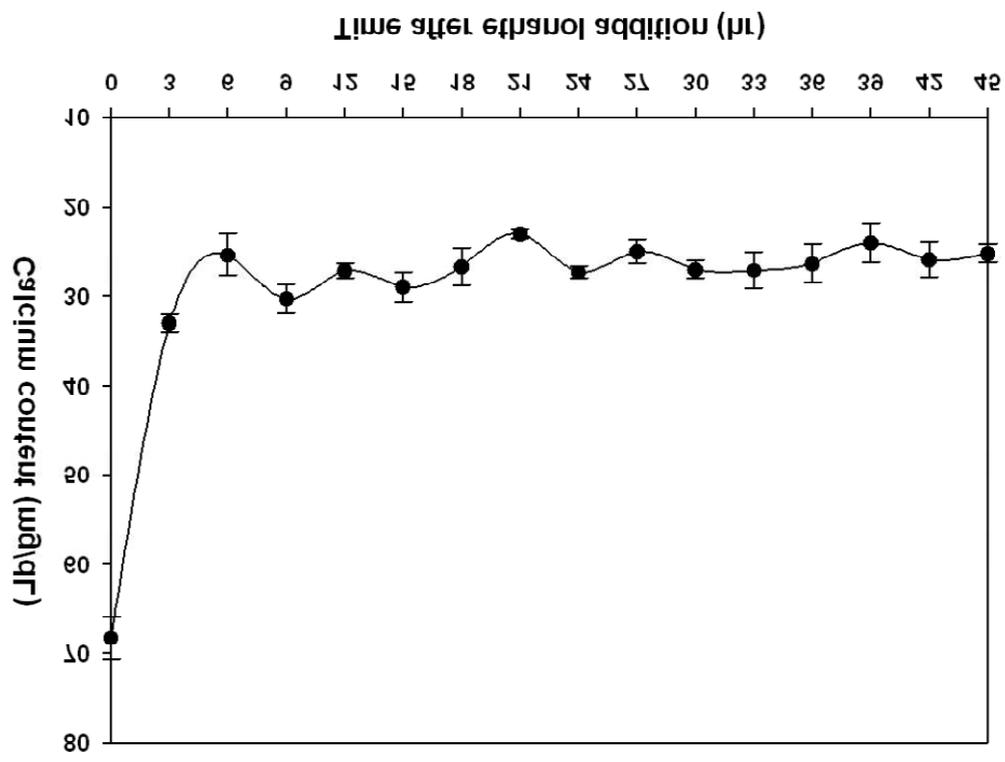


Fig. 46. Changes of calcium content in CUFP at pH 2.75 by the addition of ethanol. The ratio of CUFP : ethanol (95%, v/v) was 1:4.

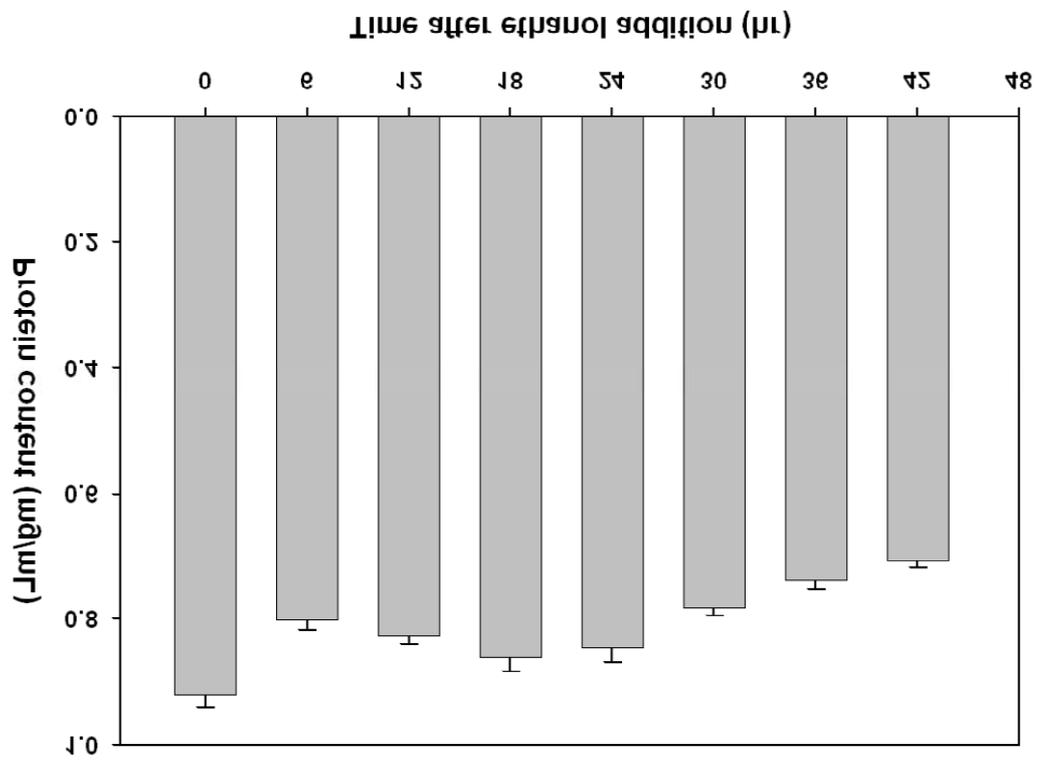


Fig. 47. Changes of protein content in CUFp at pH 2.75 by the addition of ethanol. The ratio of CUFp : ethanol (95%, v/v) was 1:4.

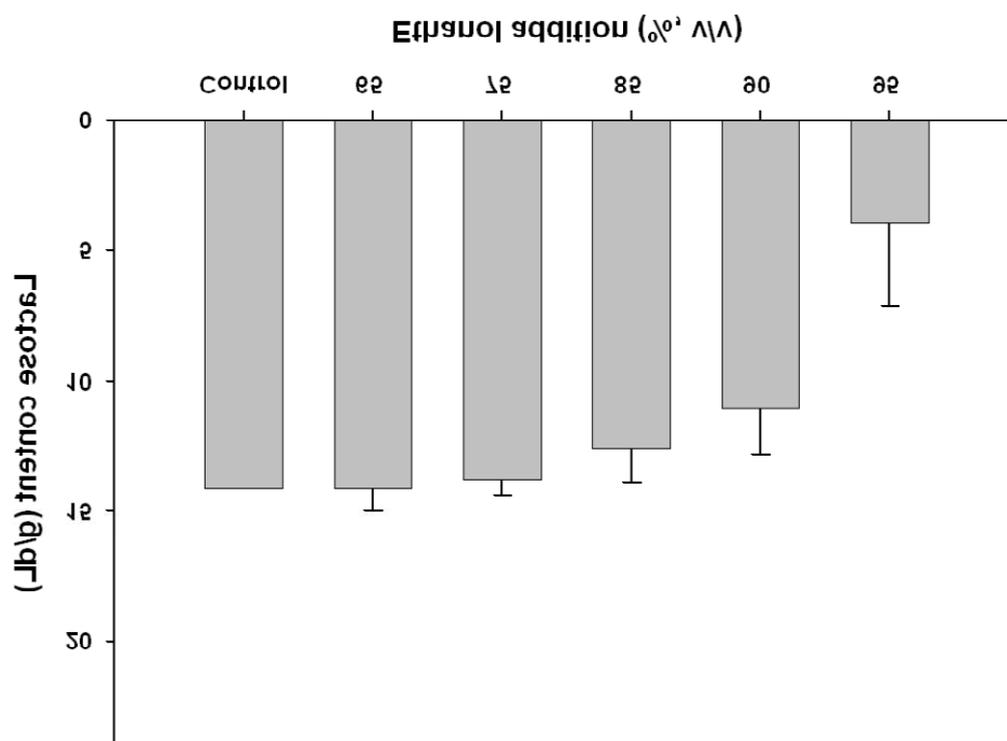


Fig. 48. Effect of ethanol concentration on lactose crystallization of CUFP at pH 2.75. The ratio of CUFP : ethanol was 1:4. Lactose concentration was determined after 15 hr of ethanol addition.

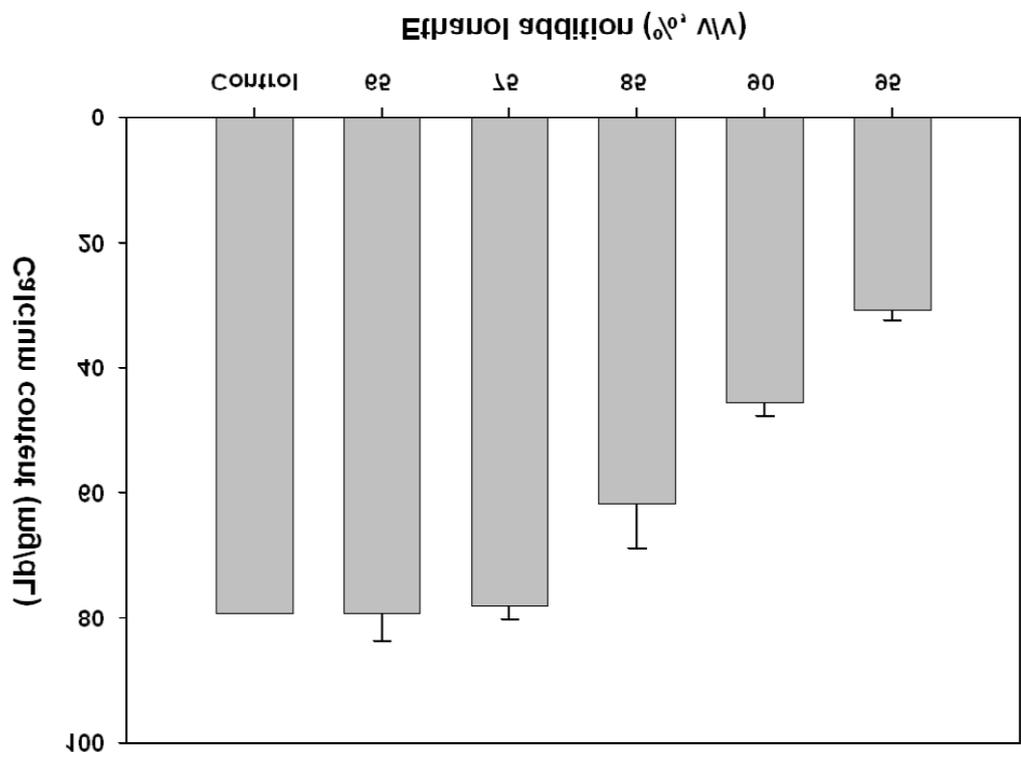


Fig. 49. Effect of ethanol concentration on calcium content in CUFP at pH 2.75. The ratio of CUFP : ethanol was 1:4. Calcium concentration was determined after 15 hr of ethanol addition.

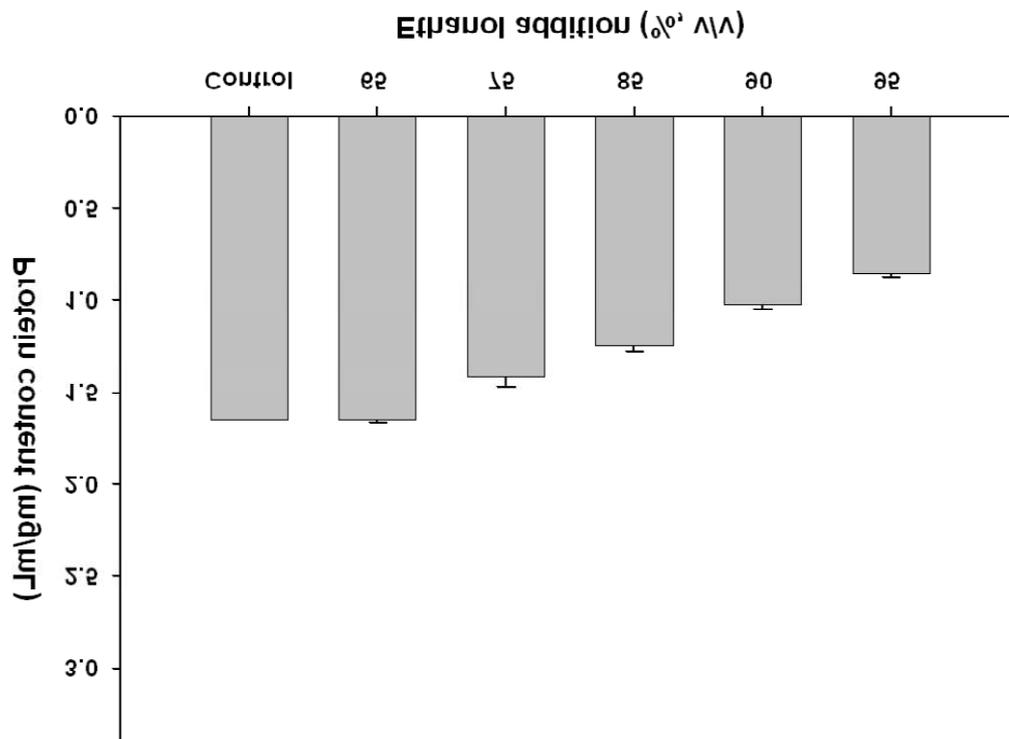


Fig. 50. Effect of ethanol concentration on protein content in CUFp at pH 2.75. The ratio of CUFp : ethanol was 1:4. Protein concentration was determined after 15 hr of ethanol addition.

유당결정화의 한계치에 도달하는 15시간 방치한 경우 95%의 농도를 가진 ethanol에서는 초기 유당 농도의 74%를 결정화시켜 제거할 수 있었으나 90%의 ethanol 경우에는 초기 유당의 28%만이 제거되었으며 ethanol의 농도가 85% 이하에서는 유당의 제거효과가 미미하였다. 한편, 90%의 ethanol을 사용하는 경우 초기 농도의 57%에 해당하는 칼슘이 안정하게 용해된 상태로 존재하였다. 이와 같은 결과는 유당 침전을 위한 ethanol의 재사용 시 고려하여야 할 문제점을 시사하는 것으로 ethanol을 재사용할 경우 유당의 결정화 속도를 유지하기 위해서는 ethanol 농도의 보정이 필요한 것으로 생각된다.

실제 에탄올을 재사용한 경우 회수되는 칼슘과 유당의 함량 변화를 조사한 결과는 Fig. 51와 같다. 초기 95% 에탄올을 사용하여 유당의 침전을 유도하고 회수한 에탄올의 농도는 77%로 측정되었으며 이 에탄올을 이용하여 동일한 조건에서 처리 시간을 24 또는 30시간으로 연장한 경우에도 잔존하는 유당의 함량은 10% 정도로 처리 시간의 연장이 유당의 침전 분리에 미치는 영향은 미미한 것으로 확인된 반면 칼슘의 함량은 상대적으로 높은 수준으로 유지되었다. 본 연구에서는 유당의 회수가 궁극적인 목적이 아니었으므로 높은 순도의 에탄올을 이용하였으나 회수된 유당의 용해도 및 안정성의 측면에서는 첨가되는 에탄올 농도의 변화가 기능 특성의 변화를 초래할 수 있을 것으로 판단된다. 실제적으로 Singh 등(1991a)은 약 80%의 에탄올이 회수된 유당의 기능성 측면에서 가장 적합하였다고 보고하였다.

CUFP로부터 milk mineral을 회수하는 방법과 처리 비용의 경제적 적합성 판정을 위해서는 앞서 언급한 바와 같이 세심한 고려가 필요하다. 본 연구에서 제안한 공정의 개요는 Fig. 52과 같다. 이 공정은 첫째로 유당을 결정화하여 침전 회수하는 공정과 둘째로 수용액층의 칼슘을 건조하여 milk mineral을 생산하는 두 가지 공정을 함께 진행하는 것으로 두 가지 식품소재의 수요처를 확보할 수 있다면 충분한 타당성이 있을 것으로 예측된다.

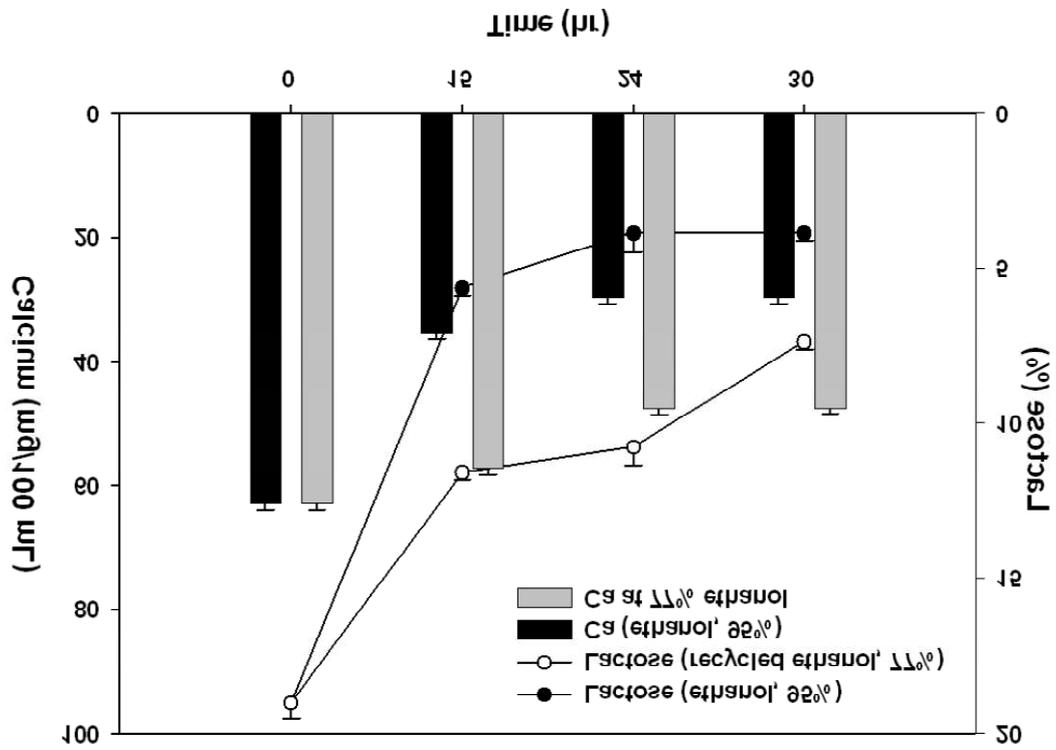


Fig. 51. Effect of ethanol recycling on calcium and lactose content in CUFP at pH 2.75.

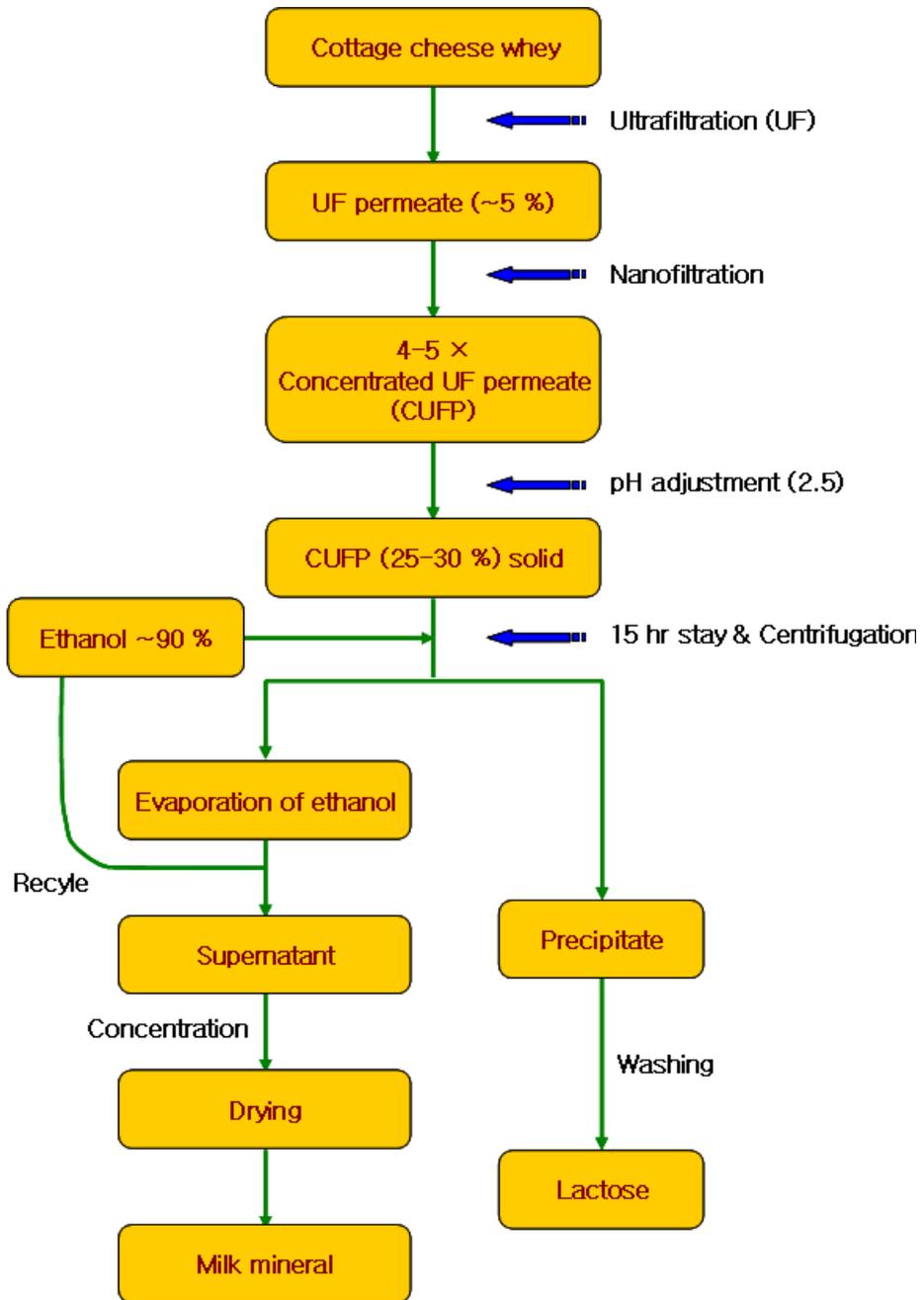


Fig. 52. Flow chart of milk mineral and lactose production

라. 우유 칼슘의 이화학적 특성 및 제품적성 평가

1) 칼슘 시제품의 성분분석

오늘날 칼슘의 섭취는 뼈의 건강뿐만 아니라 골다공증, 고혈압, 대장암의 위험성을 낮추는데 매우 중요한 역할을 하는 것으로 보고됨에 따라 칼슘은 이미 오렌지 주스나 기타 다양한 음료에 강화되어 시판되고 있다. 식품에 칼슘 강화를 목적으로 사용되는 칼슘의 원천은 크게 유기염과 무기염의 형태로 구분할 수 있으며 무기염에는 주로 탄산칼슘과 인산칼슘이 유기염에는 젖산칼슘, tricalcium citrate, calcium lactate gluconate 등을 들 수 있다.

Milk calcium 또는 milk mineral로 불리우는 우유유래 무기질은 본 연구에서 제안한 공정과 유사하게 주로 농축유청단백질(whey protein concentrate) 생산의 부산물로서 얻어질 수 있으며 입자 크기가 7 μM 이하의 백색분말이다(Allen and Cornforth, 2007). 우유 무기질은 칼슘과 인을 주성분으로 하고 있으며 유당, 단백질과 매우 소량의 지방을 포함하고 있다. 본 연구에서 두 가지 다른 원천으로부터 제조한 칼슘시제품의 화학적 조성은 Table 8에 나타난 바와 같다. Cottage cheese whey로부터 제조한 칼슘의 양은 30%로서 탈지유 여과농축액으로부터 제조한 경우에 비하여 약 2배 높은 칼슘량을 나타냈으며 칼슘과 인의 비율에서도 현저한 차이를 보였다

이와 같은 무기질 조성의 차이는 우유에 존재하는 무기질 균형(mineral balance)이 제조공정에 따라 변화를 보이기 때문인 것으로 설명할 수 있으며 특히 Cottage cheese whey의 경우 최종 pH가 5.0-5.2 정도로 신선한 탈지유의 pH 6.5-6.7과는 현저한 차이가 존재한다. 우유 무기질의 대부분을 차지하는 칼슘과 인의 존재 형태는 매우 복잡하며 아직 명확히 밝혀지지 않았는데 그 이유는 서로 다른 칼슘과 인의 비율을 가진 다양한 형태의 인산칼슘염이 존재하기 때문이며 그 열역학적인 동적평형도 천천히 이루어지는 것으로 보고되어 있다. 또한 케이션 마이셀과 결합되어 존재하는 통상 micellar calcium이라 지칭되는 칼슘의 경우에도 엄밀히 구분하면 무기 형태의 인산칼슘과(calcium phosphate)와 직접 케이션과 결합되어 있는 유기인산(calcium caseinate)으로 구분되지만 실험적으로는 두 가지 형태를 분리하여 동태를 파

Table 8. Compositional analysis of milk mineral prepared either from skim milk permeate or cottage cheese whey.

Components (%)	Milk mineral	
	Skim milk permeate	Cottage cheese whey
Total ash	64.63	67.68
Calcium	14.94	20.35
Phosphorus	26.50	13.95
Magnesium	2.92	3.20
Iron	0.01	0.03
Zinc	0.01	0.06
Lactose	27.50	25.18
Protein	0.21	1.09
Fat	0.88	1.43
Moisture	5.37	4.73

약 하는 것은 불가능하다. 우유의 pH가 감소하면 pH에 의하여 변화를 나타내는 작용기 (예를 들어 인산칼슘, 카르복실기)들은 수소와 결합한 형태로 전환되며 결과적으로 케이션 마이셀에 존재하는 인산칼슘의 가용화가 일어나며 칼슘의 존재 형태에 따라 가용화의 정도에는 차이가 존재하지만 무기태의 인산칼슘(inorganic calcium phosphate)은 pH 5.2에서 완전히 용해되는 것으로 알려져 있다(Gaucheron, 2005).

따라서 cottage cheese whey는 다른 원천으로부터 제조한 칼슘에 비하여 높은 칼슘함량을 나타낼 수 있는 것으로 확인되었으며 칼슘과 인의 비율로 탈지유 여과액을 원천으로 하여 제조한 칼슘시제품과 차이를 나타냈다. Fig. 53에 나타난 바와 같이 칼슘과 인의 비율은 cottage cheese whey에서 제조한 시제품의 경우 1 : 0.68, 탈지유 여과액에서 제조한 시제품은 1 : 1.73으로 나타났다. 한편 대조구로 사용한 상업용 우유무기질의 경우 칼슘과 인의 비율이 이 두 시제품의 중간 정도인 1 : 1.25로 측정되었다.

칼슘제품에 존재하는 다른 성분의 양은 현실적으로 매우 중요한 의미를 가질 수 있다. 첫 번째로 칼슘 이외에 다른 무기질의 존재량은 칼슘의 흡수율에 영향을 미칠 수 있으며 다양한 생물학적인 활성에도 관여할 수 있다. Kansal(2002)은 인이 체내 칼슘의 흡수에 유의적인 영향을 미친다고 하였으며 칼슘 : 인의 비율이 1이상 경우가 생체이용성이 높다고 보고하였다. 또한, 사람의 골격을 구성하는 뼈의 칼슘과 인의 구성 비율이 2 : 1 정도이며 대부분의 가공식품에서 인산이 첨가됨을 고려할 때 칼슘 소재에서 인의 비율이 지나치게 높은점은 바람직하지 않은 것으로 판단된다. 이 밖에 무기질 조성은 관능적인 품질의 변화에 영향을 미칠 수 있으며 무기질뿐 아니라 단백질 등의 다른 성분의 존재량도 관능적 품질 및 용해도에도 직접적인 영향을 미칠 수 있다.

2) 칼슘 시제품의 용해도

칼슘을 음료 등에 강화하고자 할 때 가장 중요한 문제는 칼슘의 용해도와 제품내에서의 안정성을 들 수 있다. 칼슘의 유기산염은 용해도가 높은 장점을 가지고 있으나 칼슘염에 존재하는 칼슘의 양이 낮은 단점(13-20%)을 가진 반면 무기염 형태

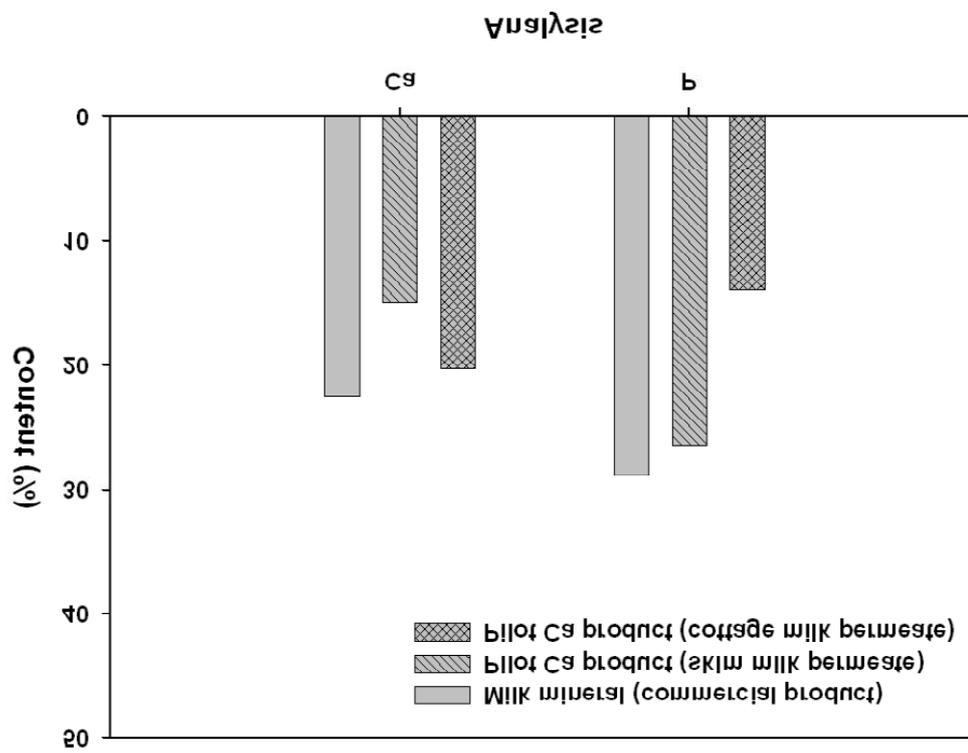


Fig. 53. Calcium and phosphorous content in various calcium products

의 칼슘은 용해도는 낮으나 칼슘 함량이 높은 특징(17-40%)을 가지고 있다. 본 연구에서는 지방 분화 억제 칼슘 음료의 개발을 염두에 두고 제조된 시제품의 용해도를 측정하였다. 칼슘의 첨가 기준은 우유의 1회 분량(one serving size)인 200 mL을 기준으로 하여 우유에 존재하는 것과 유사한 수준(230 mg/200 mL)의 칼슘을 공급하는 것을 목표로 정하였으며 pH를 4, 5, 6, 7로 조정하여 용해도를 측정하였다.

Fig. 54-56은 세 가지 농도 조건에서 측정한 용해도 실험의 결과이다. 칼슘 시제품의 용해도는 pH 4의 조건에서는 300mg/200mL의 수준에서도 98% 이상이 안정하게 용해된 상태로 존재하였으며 pH가 증가함에 따라 뚜렷이 감소하는 경향을 나타냈다. 두 가지 시제품 간에는 첨가 농도 및 pH에 따라 차이를 나타내는 구간도 있었으나 뚜렷한 일관성은 발견할 수 없었으며 특히 첨가량을 300mg/200mL 수준으로 증가시킨 후 측정한 두 개의 pH 구간에서는 용해도의 유의적 차이가 발견되지 않았다. 또한 각 pH 조건에서 시료에 존재하는 칼슘의 함량분석을 ICP와 spectrophotometer로 각각 실시한 경우 분석 결과는 매우 유사하였으며 측정오차는 최대 5 mg/100 mL 이하로 측정되었다(Fig. 57)

pH가 감소함에 따라 칼슘의 용해도가 증가하는 이유는 낮은 pH에서 불용성으로 존재하던 인산칼슘의 이온화가 일어나기 때문인 것으로 추정되며 우유 무기질을 원료로 하는 칼슘 음료의 개발을 위하여서는 용해도와 제품안정성의 측면에서 구연산 등의 유기산을 첨가하여 신맛을 부여하며 과일향을 컨셉으로 하는 제품의 개발이 적당할 것으로 생각된다. 특히 본 시제품의 경우 바람직한 인의 함량과 일정량의 유당을 함유하고 있으므로 관능적인 문제와 용해도의 문제가 없을 경우 장내 pH를 낮추어 칼슘의 흡수를 향상시킬 수 있을 것으로 기대된다.

3) 시제품을 이용하여 제조한 음료의 관능적 특성 평가

칼슘강화 기능성 음료의 개발에 있어서 관능적 특성은 생리적 기능성 이외에 제품의 선호도에 매우 중요한 영향을 미친다. 본 연구에서는 칼슘시제품을 농도별로 첨가하여 칼슘 함유 음료의 관능적 특성을 조사하였다. 칼슘을 용해시키기 위한 매질은 구연산과 설탕을 각각 0.65%, 9% 수준으로 첨가하여 제조하였으며 최종 pH는 3.5

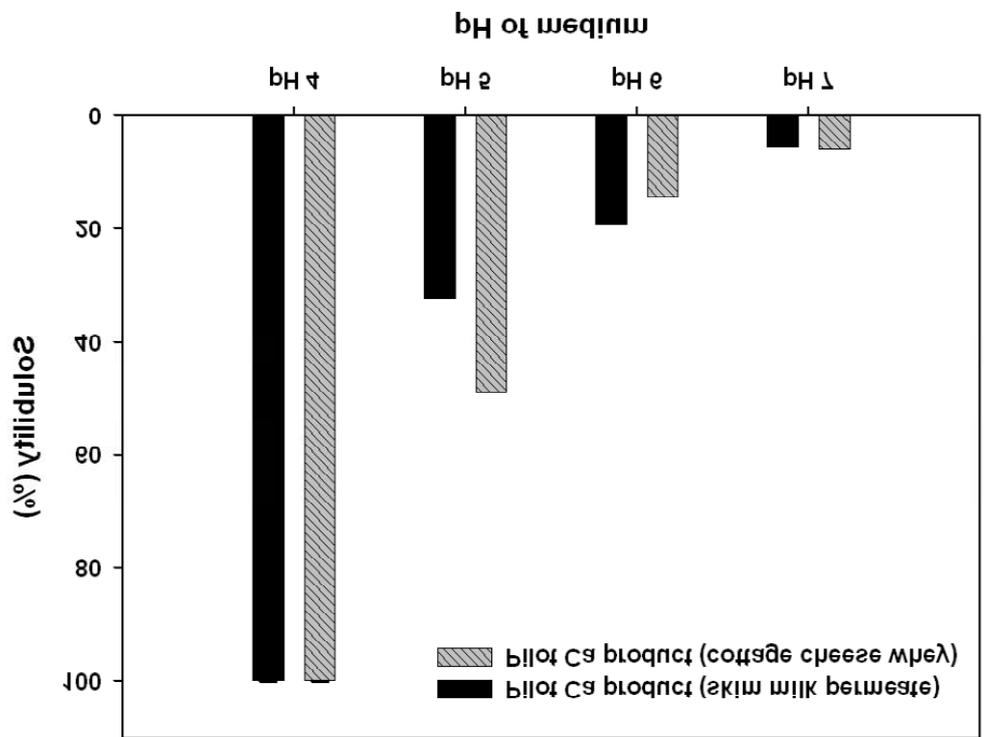


Fig. 54. Solubility of pilot calcium products at 100 mg / 200 mL in different pH conditions

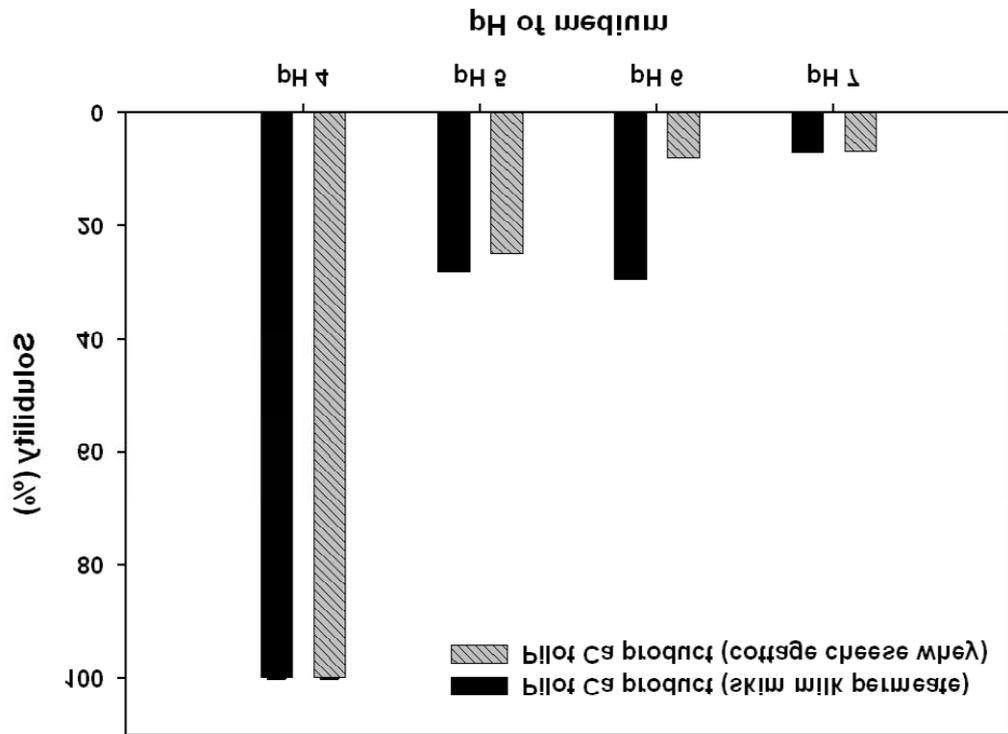


Fig. 55. Solubility of pilot calcium products at 200 mg / 200 mL in different pH conditions

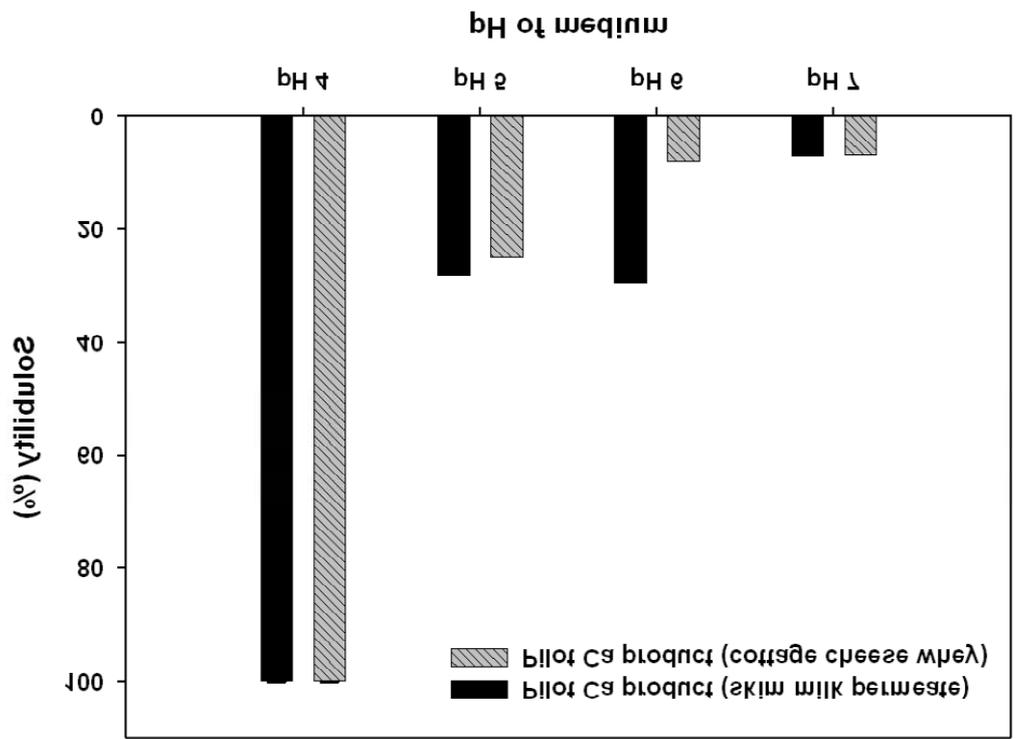


Fig. 56. Solubility of pilot calcium products at 300 mg / 200 mL in different pH conditions

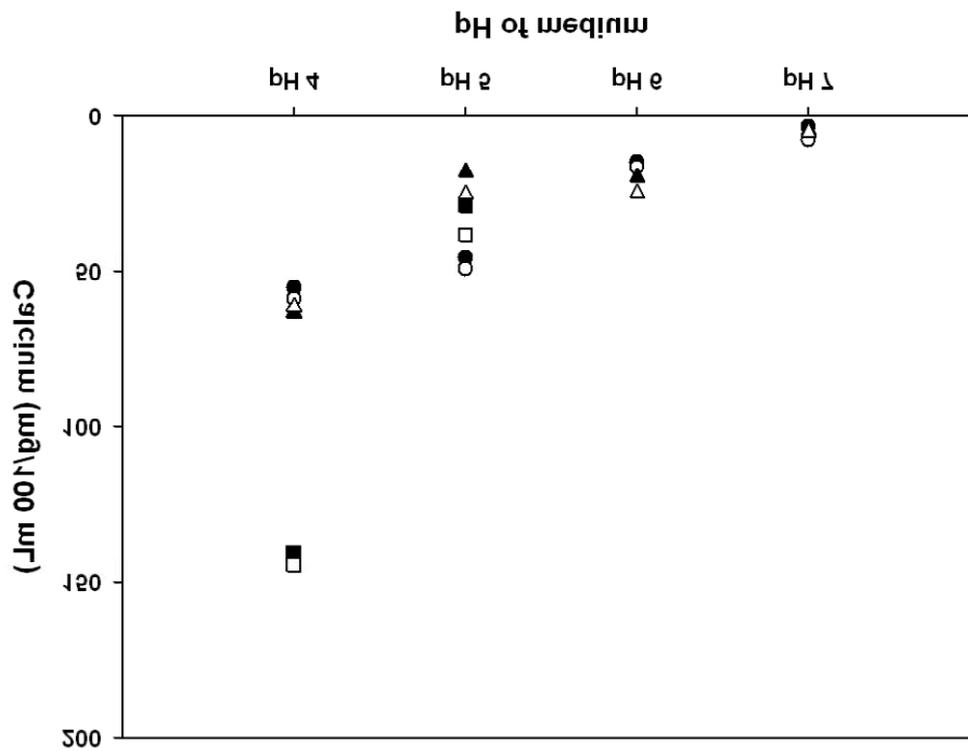


Fig. 57. Comparison of calcium analysis data using ICP and spectrophotometer. The symbols with the same shape indicate the same sample. Open symbol: spectroscopic determination, solid symbol: ICP determination.

가 되도록 하였다. 관능검사는 국민대학교에 재학 중인 20-30세의 남녀 52명을 대상으로 하였으며 관능검사 방법을 충분히 숙지시킨 후 평가를 실시하였다.

Fig. 58에 나타난 바와 같이 칼슘 농도의 증가에 의하여 기호도 항목은 유의적인 차이를 나타내지 않았으며 100 mg/200 mL 수준으로 시제품 칼슘을 첨가하는 경우 대조구에 비하여 맛과 전반적인 기호도가 우수하였다. 이와 같은 기호도의 차이는 대조구는 단맛이 상대적으로 강하게 느껴지는 반면 신맛이 약하게 느껴져 단맛과 신맛의 조화가 부족하였기 때문인 것으로 생각된다. 쓴맛과 비정상적인 금속성의 맛과 같은 기호도 감소 요인들은 칼슘의 농도를 300 mg/200 mL 수준으로 증가시킨 경우에도 관찰되지 않았다(Fig. 59).

일반적으로 용해도가 낮은 칼슘의 무기염, 예를 들어 탄산칼슘이나 인산칼슘을 제품에 첨가하게 되면 거친 입안촉감(chalky mouthfeel)을 생성하거나 뚝은맛이나 쓴맛 등을 발생시킬 수 있는 것으로 알려져 있다(Flynn and Cashman, 1999). 본 연구에서 제조한 시제품을 산성 음료(pH 3.5)에 첨가할 경우에는 200 mL을 1회 분량으로 가정할 때 300 mg의 칼슘을 첨가하여도 혼탁한 외관이나 낮은 용해도로 인한 거친 입안 촉감 등의 문제가 나타나지 않는 것으로 확인되었다. 관능검사 이외에 흡광도를 이용하여 음료의 혼탁도를 측정할 경우에도 대조구에 비하여 유의적인 흡광도 증가는 관찰되지 않았다(Fig. 60).

4) 칼슘 강화 우유의 열안정성

칼슘의 하루 권장섭취량은 연령과 성별에 따라 차이를 보이나 우리나라는 성인을 기준으로 하루 700 mg 정도를 권장하고 있으며 미국은 어린이의 경우 800 mg, 성인의 경우 1200 mg을 각각 권장하고 있다. 우리나라를 비롯하여 미국의 경우에도 국민의 칼슘 섭취수준은 하루 권장량의 70-80% 수준으로 낮은편으로 알려져 있다. 우유와 유제품에 칼슘을 강화하는 연구 결과를 고찰하여 보면 칼슘염의 종류에 따라 열안정성이 차이를 보일 수 있는 것으로 보고 되어 있다.

Vyas and Tong(2004)에 의하면 탈지분유를 환원하여 측정된 열안정성의 실

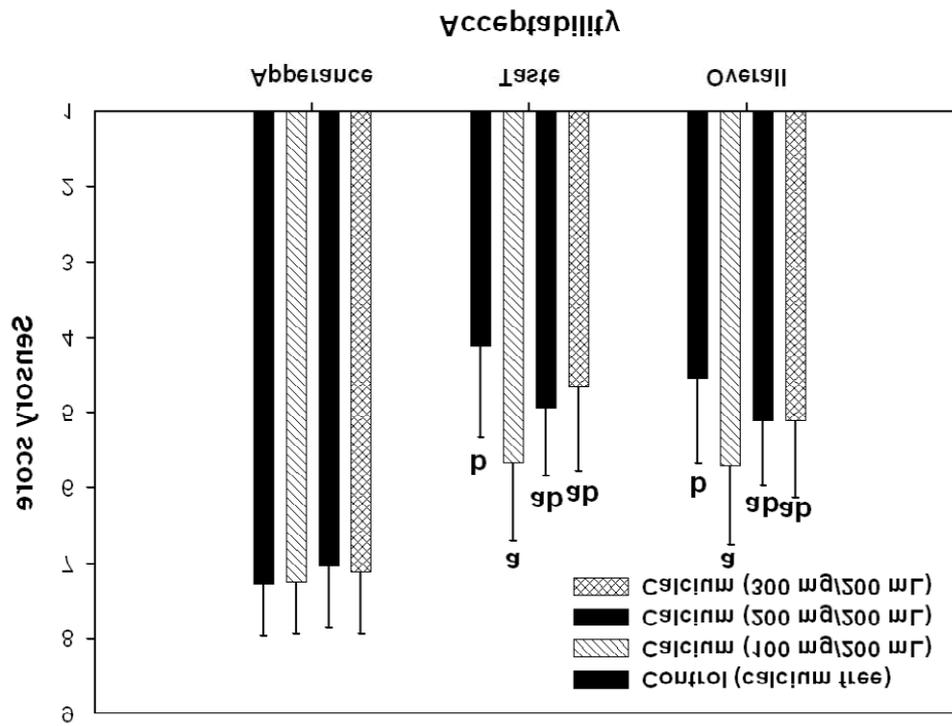


Fig. 58. Acceptability of beverage containing pilot calcium product.

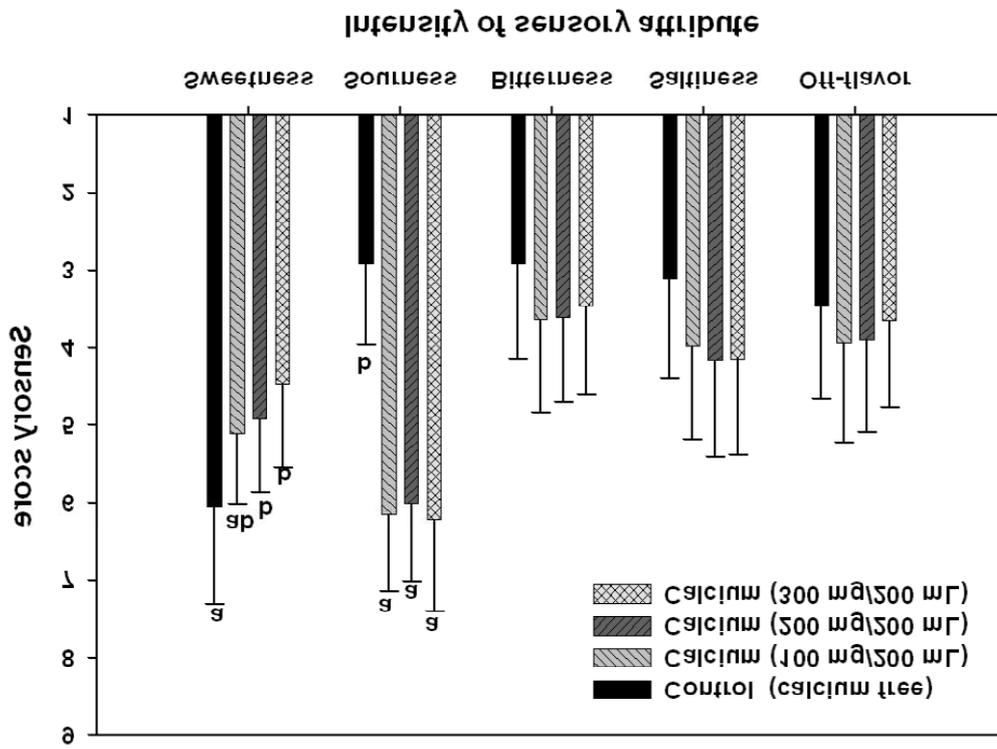


Fig. 59. Perceived intensity of sensory attributes for beverage containing pilot calcium product.

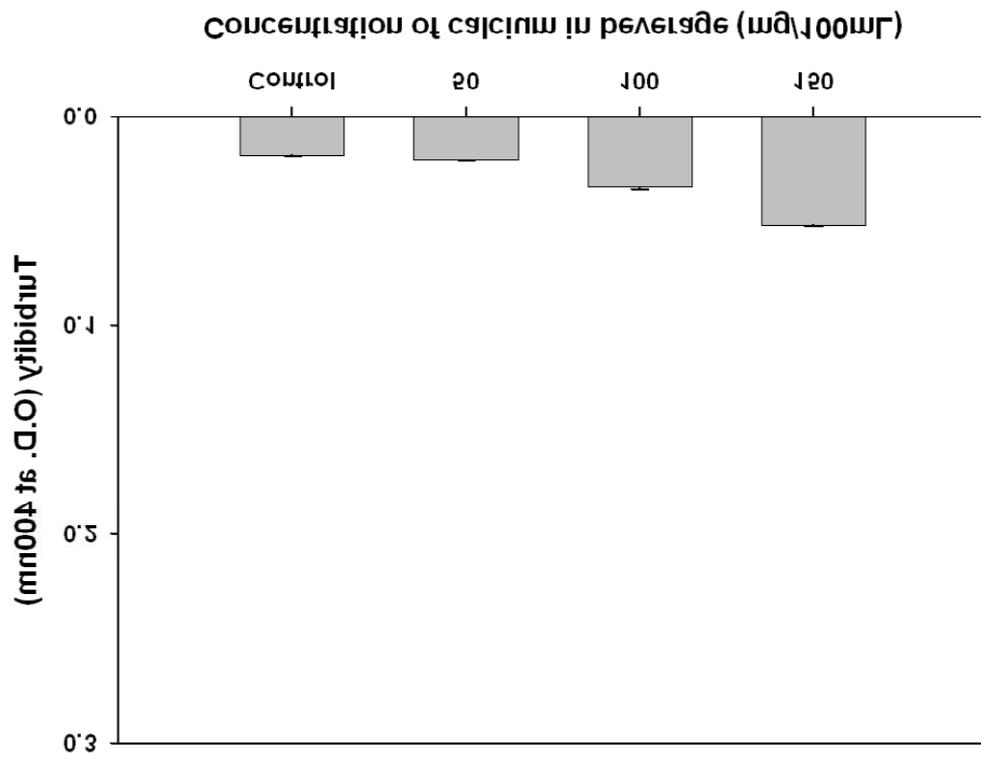


Fig. 60. Turbidity of beverage containing pilot calcium product.

험에서 인산염이나 젖산염을 첨가하면 pH의 저하가 관찰되는 반면 구연산염은 유의적인 pH 변화를 일으키지 않는다고 하였으며 pH의 변화가 열 안정성을 변화시키는 주요한 원인으로 작용한다고 하였다. 신선한 탈지유에 시제품 칼슘을 강화하고 열안정성을 측정한 결과는 Fig. 61와 같다. 강화된 칼슘의 농도가 증가됨에 따라 열안정성은 일관되게 감소하는 경향을 나타냈으나 모든 경우에 있어서 pH의 유의적 변화는 관찰되지 않았다. 우유의 열안정성은 우유단백질의 안정성을 의미하는 것이므로 열안정성의 변화는 칼슘을 첨가하여 우유 염류의 평형이 교란되면 케이스인 마이셀간의 결합양식이나 크기, 혹은 반발력이 변화하는 것으로 생각할 수 있다. 그리고 칼슘의 원천에 따라 나타나는 열안정성의 차이는 칼슘염 구성 성분의 차이 때문에 우유의 pH 내에서 이온화 되는 정도 및 속도에 차이가 존재하기 때문인 것으로 판단된다.

5) 칼슘강화 요구르트의 제품 적성 평가

수집한 정보에 의하면 칼슘 강화 요구르트를 이용하여 비만억제 기능성을 주장한 제품은 Yoplait와 Dannon 그리고 Nestlé에서 모두 찾아볼 수 있다. 이들 제품의 칼슘 함량은 1회 분량 당 각각 300, 150, 210 mg으로 나타났으며(Yoplait와 Dannon의 1회 분량은 170 g; Nestlé은 88 g) 하루에 3-4개의 요구르트를 섭취하여 하루 권장량의 칼슘을 섭취할 것을 권장하고 있었다. 강화하는 칼슘의 종류에 있어서는 Yoplait 제품은 tricalcium phosphate를 이용하고 있었으며 Nestlé의 경우 본 연구의 시제품과 같은 우유유래 무기질을 사용하는 것으로 나타났다. 본 연구에서는 우유에 탈지분유를 첨가하여 고형분 함량이 11%가 되도록 조정하고 요구르트 premix내 최종적인 칼슘의 함량이 150, 175, 200 mg/100 mL 수준이 되도록 칼슘을 강화한 요구르트를 제조하여 기본적인 품질 특성을 조사하였다.

Table 9에 나타난 바와 같이 칼슘의 강화는 pH나 적정산도로 확인할 수 있는 유산균의 산 생성이나 생균수의 측정에서도 매우 유사한 결과를 나타냈다. Pirkul 등 (1997)은 젖산칼슘과 글루콘산 칼슘을 이용하여 각각 칼슘 강화요구르트를 제조하고 요구르트의 품질 특성을 비교하였다. 칼슘 강화요구르트의 품질 특성은 강화에 사용된 칼

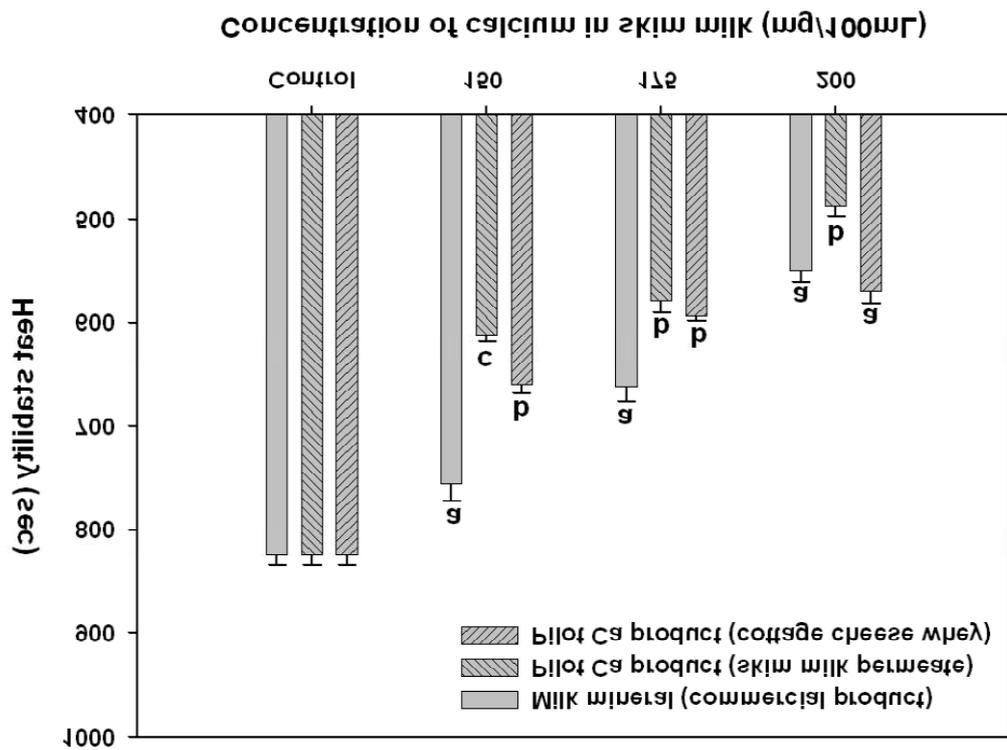


Fig. 61. Changes in heat stability of skim milk by calcium fortification.

Table 9. pH, titratable acidity and viable cell count of calcium fortified yoghurt.

Ca fortification (mg/100 mL)	pH	Titratable acidity (%)	Viable cell count (CFU/mL)
0	4.44 ± 0.01	0.93 ± 0.05	2.60 × 10 ⁹
150	4.47 ± 0.01	0.96 ± 0.03	2.50 × 10 ⁹
175	4.47 ± 0.02	0.93 ± 0.02	2.53 × 10 ⁹
200	4.46 ± 0.02	0.93 ± 0.02	2.47 × 10 ⁹

습의 종류에 따라 차이를 나타내었으며 젖산칼슘을 이용한 경우에는 클루콘산 칼슘을 첨가한 경우와 비교하여 우수한 관능적 품질과 lactobacilli의 수를 증가시킨다고 하였다. 또한, 칼슘 강화 요구르트는 저장기간 동안 대조구에 비하여 산생성으로 인한 pH의 저하속도가 느린 것으로 보고하였으며 이같은 결과는 강화된 칼슘의 종류와 무관하게 일정하였다. 칼슘시제품을 이용하여 제조한 요구르트는 6시간의 발효 종료 후 측정된 pH와 적정산도를 근거로 할 때 산 생성 속도에 영향을 받지 않는 것으로 확인되었으며 칼슘 강화 효과는 저장 기간의 산생성 속도를 지연시킴으로써 후산발효로 인한 관능적 특성의 저하 가능성을 감소시킬 수 있을 것으로 판단된다. 한편, 칼슘 강화 요구르트의 점도는 칼슘의 강화수준이 증가함에 따라 유의적으로 증가하는 것으로 나타났으며 (Fig. 62) 이 같은 결과는 칼슘의 첨가에 의하여 케이신 마이셀간의 colloidal calcium phosphate 결합이 강화되기 때문으로 생각된다.

요구르트 조직감에 대한 예측과 그 변화에 대한 설명은 요구르트의 미세구조 관찰을 통하여 가능할 수 있다. 요구르트의 조직감은 다양한 요인에 의하여 변화될 수 있으나 가장 중요한 기본적인 구조적 단위는 입자상의 케이신이 산에 의하여 형성하는 3차원적인 엉킴구조라고 할 수 있다. 요구르트 젤이 구성하는 3차원적 구조의 크기, 모양 그리고 공극 등은 전자현미경으로 관찰할 수 있는데 일반적인 전자현미경 관찰을 위하여서는 상당량의 수분의 건조가 불가피하며 이때 생기는 젤 구조의 변화는 실제 존재하는 구조를 왜곡시키는 결과를 초래할 수 있다. 반면 공초점 레이저 현미경(confocal scanning laser microscopy; CSLM)은 수분 건조와 같은 전처리 과정이 불필요하므로 보다 자연적 상태의 미세구조 관찰이 가능하다(Hassan 등, 1995).

다양한 농도의 칼슘을 강화한 요구르트의 미세구조를 CSLM으로 관찰한 결과는 Fig. 63와 같다. 시료는 작은 입자형의 단백질들이 응집되어 network를 형성하고 있었으며 상대적으로 밝은 색을 띠는 구상의 케이신은 첨가된 칼슘의 농도가 증가함에 따라 보다 치밀하게 밀집하여 존재한 반면 검은색으로 보이는 공극의 크기는 현저하게 줄어드는 경향을 나타냈다. 이 결과는 칼슘의 첨가에 의하여 요구르트 젤의 구조적 단위가 강화될 수 있다는 가설을 뒷받침할 수 있다.

칼슘강화 요구르트의 관능적 특성을 조사한 결과는 Fig. 64-65와 같다. 칼슘

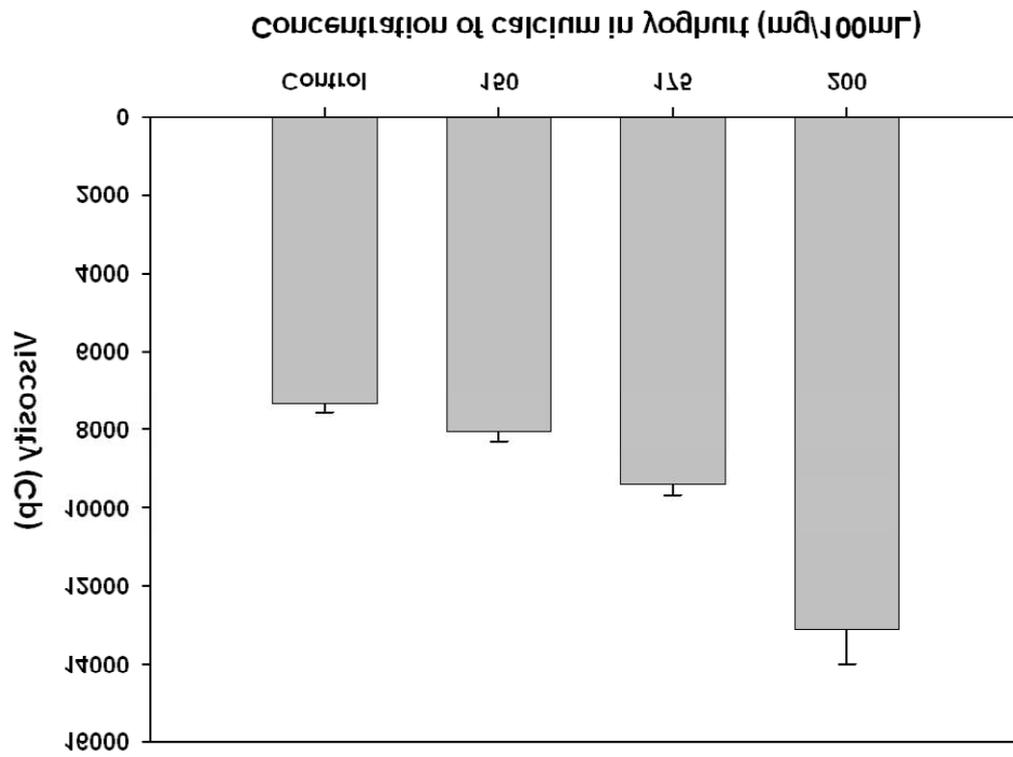


Fig. 62. Changes of viscosity in calcium fortified yogurt

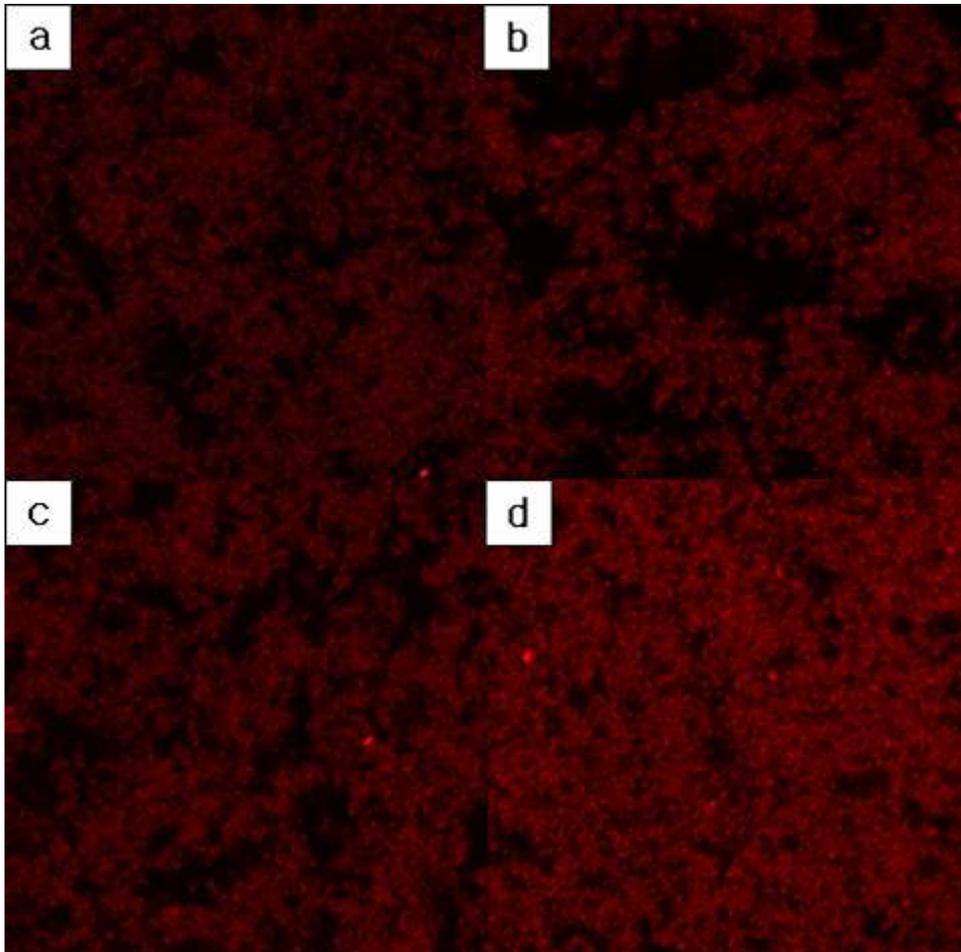


Fig. 63. Microstructure of calcium fortified yoghurt observed by confocal scanning laser microscopy. a: control, b: calcium (150 mg/100 mL), c : calcium (175 mg/200 mL), d: calcium (200 mg/100 mL).

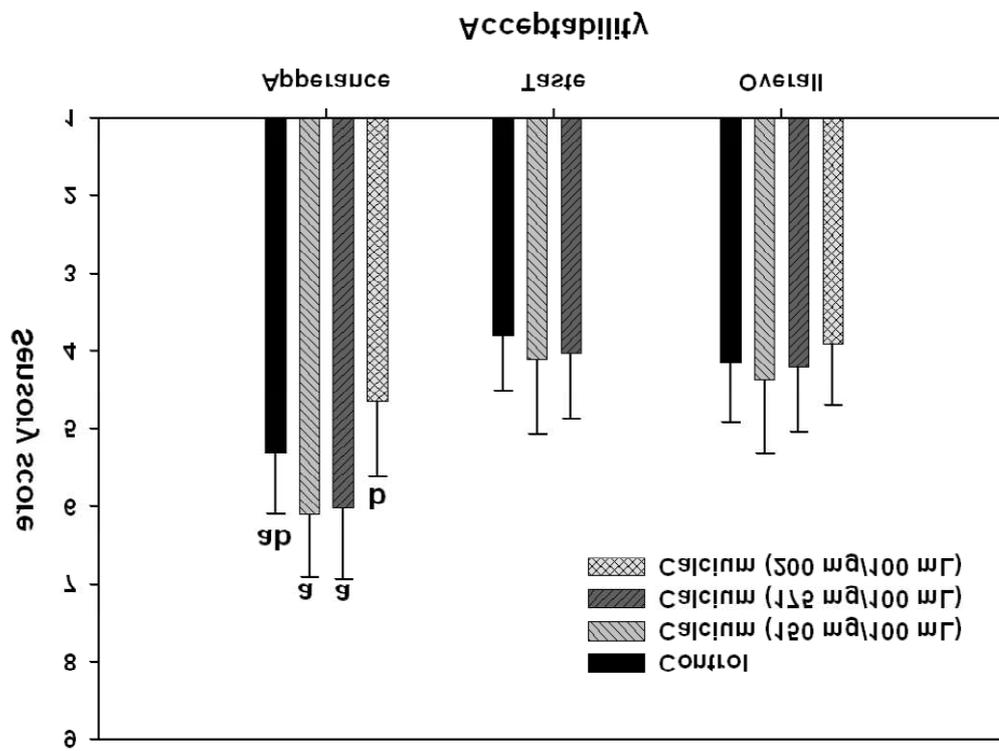


Fig. 64. Acceptability of calcium fortified yoghurt.

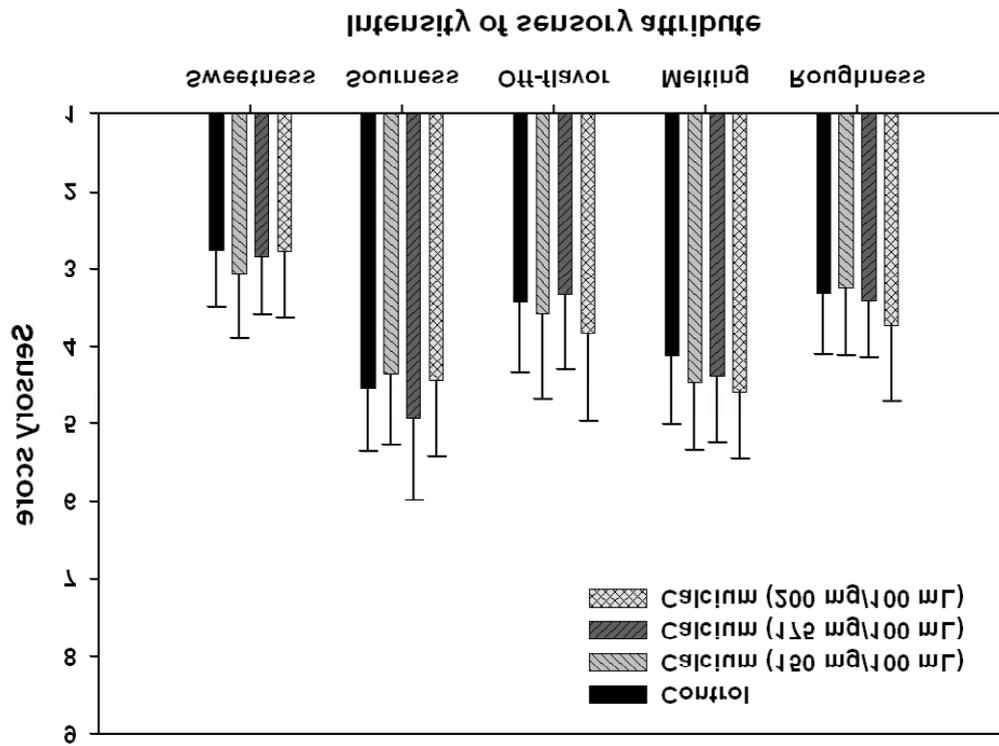


Fig. 65. Perceived intensity of sensory attributes for calcium fortified yoghurt.

강화요구르트의 관능적 특성은 외관에서 나타나는 일부 차이를 제외하고는 모든 특성에서 유의적 차이를 나타내지 않았다. 요구르트 커드의 강도(firmness)는 칼슘의 첨가 농도가 증가함에 따라 증가하는 경향을 보였으나 통계적 유의성은 없는 것으로 나타났다. 이상의 결과를 종합하여 볼 때 요구르트는 관능적 품질의 저하 없이 칼슘 강화 기능성 유제품을 제조하기에 가장 적합한 형태로 간주할 수 있으며 요구르트 자체가 가지는 산성 pH는 칼슘을 이온화시켜 칼슘의 장내 흡수를 촉진에 기여할 것으로 생각된다.

제 4 장 목표달성도 및 관련분야의 기여도

제1절 목표 달성도

구분	연도	세부연구개발 목표	달성도
1차 년도	2006 - 2007	○ Calcium-binding 프로바이오틱스의 선발	100 %
		○ High calcium 섭취에 따른 vitamin D3/VDR의 활성저하가 지방세포분화와 지방축적에 미치는 영향분석	100 %
		○ 우유칼슘 함유 체중조절 소재의 생산 공정 개발	100 %
2차 년도	2007 - 2008	○ 고농도 calcium-binding 프로바이오틱스의 대량배양 및 칼슘강화 cottage cheese 제조	100 %
		○ Calcium 농도 변화에 의한 지방세포 분화와 지방축적을 조절하는 핵수용체들의 활성 조절 연구	100 %
		○ 우유칼슘 함유 체중조절소재의 이화학적 특성 및 제품적성 평가	100 %

제2절 관련분야의 기여도

제 1 절 제1세부과제 : 유산균의 calcium-binding 활성 평가 및 최적 균주 선발

제1세부과제에서 선발된 칼슘 assimilation 활성이 있는 *L. plantarum* LDM534균주와 CPP를 생산하는 *Lactobacillus plantarum* YH는 각각 김치와 유아분변에서 분리한 미생물로 요구르트, 치즈와 같은 발효제품에 적용이 가능한 것으로 확인되어 섭취한 칼슘의 소화관에 있어서 흡수율의 저하에 따른 칼슘부족을 방지할 수 있는 발효 제품에 직접적인 응용이 가능한 자료를 제공하였다. 본 과제에서 선발된 유산균 중 *Lactobacillus plantarum* YH에 대해서는 참여기업과 공동으로 특허출원을 하여 산업화를 위한 기반을 조성하였다.

제 2 절 제2세부과제 : 칼슘에 의한 지방축적 억제 작용의 분자적 기전연구

제2세부 과제에서는 분화 초기 뿐 아니라 분화 후반부에서도 칼슘이 지방세포 분화 및 지질형성에 핵심적인 역할을 하는 핵수용체의 발현 감소와 전사활성 억제를 통해 지속적으로 지방세포 분화지연과 이에 따른 지방축적 저해를 유도 할 수 있음을 확인하여 칼슘강화 지방분화 억제 기능성 유제품의 산업적 적용에 필요한 기초 자료를 제공하였다.

제 3 절 협동과제 : 우유칼슘 함유 체중조절 소재의 생산 공정 개발 및 제품적성 평가

협동 과제에서는 탈지유 여과농축액이나 Cottage cheese whey로부터 칼슘시제품을 생산하는 효율적인 공정을 제안하고 칼슘시제품의 성분을 분석하였다. 또한 칼슘강화 지방분화 억제 기능성 유제품의 산업적 적용을 위하여 음료 및 요구르트 제품을 제조하고 물리화학적 특성 및 관능적 특성을 평가하여 산업화의 기초 자료를 제공하였다.

제 5 장 연구개발결과의 활용 계획

유산균은 숙주의 면역기능을 증강시키고, 장내에서 콜레스테롤의 흡수를 억제하여 성인병의 예방에도 기여하고, 장내의 발암촉진물질을 불활성화 시키고, 발암생성에 관여하는 효소작용을 억제시켜 장암 등의 발생을 억제하는 효과가 있음이 알려져 있다. 이밖에도 장내 유해균 억제 작용 및 정장작용, 노화억제, 피부 미용 효과, 유당 불내증 격감 작용, 돌연변이 억제효과 등 다양한 범위에서 적용이 가능한 것으로 여겨지고 있다.

칼슘은 우리 몸에서 여러 가지 기능을 수행하는 필수무기질이자만 현재까지 우리나라 국민의 칼슘 섭취 수준은 하루 섭취 권장량인 700 mg/day에 미치지 못하고 있는 실정이다. 유제품은 칼슘의 가장 중요한 공급원으로서 칼슘을 강화한 기능성 요구르트는 유럽을 중심으로 제품에 체중의 감량과 관련된 유효성 표시를 하여 판매되고 있다. 본 연구 결과에 따르면 요구르트에 칼슘을 강화하는 경우 100g의 제품 중량을 기준으로 200 mg의 칼슘을 강화한 경우에도 용해도나 제품의 관능적 품질을 훼손하지 않는 것으로 나타났다. 따라서 칼슘 강화 기능성 요구르트를 하루에 3-4개 섭취하면 권장섭취량을 충분히 공급할 수 있으며 체중 감량과 관련된 기능성을 기대할 수 있으므로 매우 현실적인 제품의 제조가 가능할 것으로 판단된다.

뼈의 밀도를 유지 하는데 필수적 일 뿐 아니라 세포내 다양한 신호 경로를 활성화 시키는 칼슘은 최근 지방세포 분화를 억제하는 것으로 확인되었으나 분화 초기에만 작용하는 것으로 알려져 있다. 본 연구에서는 지방세포 분화 초기 뿐 아니라 분화프로그램이 완성되는 분화 후반부에도 작용하여 부분적으로 분화의 지연 및 이에 따른 지방축적의 감소가 지속적으로 이루어 질 수 있음을 보여 주었다. 따라서 이러한 연구 결과를 바탕으로 칼슘을 대폭 강화한 기능성 유제품의 체중감량과 관련된 기능성에 대한 이론적 바탕을 제공 할 수 있을 것으로 판단된다.

또한 본 연구에서 선발된 칼슘 흡착능력이 있는 *Lactobacillus plantarum* YH는 유아분변에서 분리한 미생물로 요구르트, 치즈와 같은 발효제품에 적용이 가능란 것으로 확인 되어 섭취한 칼슘의 소화관에 있어서 흡수율의 저하에 따른 칼슘부족을

방지할 수 있는 발효 제품에 직접적인 응용이 가능할 것으로 판단된다.

국내 낙농산업의 기술적 측면에서 유청의 생산 및 그 이용 방안이 확립되지 않은 국내 실정을 고려할 때 cottage cheese 생산의 부산물인 유청으로부터 고부가가치의 체중조절용 소재를 생산하는 기술은 국내 낙농 가공 기술의 선진화에 크게 기여할 것으로 생각되며, 우유 및 유산균 유래의 생리활성 물질을 이용한 비만억제 기능을 세포 및 유전자 수준으로 검증함으로써 유가공 식품 소재로써 객관적인 제시가 가능한 것으로 판단된다.

또한, 국내 낙농산업의 안정적 발전의 측면에서 제품의 고급화와 다양화를 통한 고부가가치 제품의 생산은 필수적 요소이며 새로운 개념의 기능성 유제품의 창출은 유가공품의 소비확대에 크게 기여할 수 있을 뿐 아니라 우유 및 유산균 유래의 식품소재의 사용은 식품 자원의 효율적인 활용이 가능하며 국내 및 국외로의 기술이전을 통해 유제품 산업의 내수시장 안정화, 원료수입에 대한 대체효과 및 수출 효과를 기대할 수 있을 것으로 판단됨.

궁극적으로 본 연구팀에서 얻어진 연구결과가 과제 종료이후에도 중소기업의 제품화 기술지원에 따른 고부가가치 창출을 위한 새로운 유가공품의 개발에 적용될 수 있도록 심혈을 기울일 것이다.

제 6 장 연구개발과정에서 수집한 해외과학기술정보

Calcium gluconate와 같은 칼슘의 유기산염은 비교적 높은 용해도를 가지고 있으므로 식품에 칼슘을 강화하는 목적으로 빈번히 사용되고 있으나 칼슘의 함유량이 낮아 한계가 있으며 많은 양의 첨가 시 gluconate 성분 때문에 제품에 단맛을 나타내거나 칼로리를 증가시키는 문제가 발생할 수 있다. 우유무기질의 용해도를 증가시키는 목적으로 casein phosphopeptide를 골격으로 칼슘과 인의 염을 첨가하고 pH를 조정하여 제조한 calcium phosphate nanocluster(Holt, 2006)는 치아 에나멜층의 부식을 억제하는 효과를 가지고 있어서 구강 청결제나 치약 등의 치아 건강을 위한 제품에 활용될 수 있다. 또한 Allen and Cornforth(2007)는 우유유래 무기질이 철에 대한 강한 결합 능력을 가지고 있기 때문에 식품에 첨가 시 지방의 산패를 억제할 수 있다고 보고하였다.

유산균을 이용한 발효유의 체중감소 효과는 주로 Ca^{2+} 에 기인 하는 것으로 알려져 있다. Ca^{2+} 의 용해성은 pH 4부근이 가장 좋기 때문에 발효유가 Ca의 좋은 source가 되는 것으로 보고되고 있다. 특히 발효유를 급여하였을때 지방의 감소가 가장 높게 나타난점은 발효유가 체지방의 감소를 일으키는 적절한 식품으로 보고 하였다(Zemel 등, 2005).

칼슘 유입 혹은 세포내 칼슘의 증가는 일부 지방축적을 증가시킨다는 보고가 있으나 대부분의 연구는 칼슘은 지방분화세포 초기(분화 0일 쯤)에만 작용하여 초기 분화프로그램을 조절하는 다양한 전사조절인자의 발현 시작을 막음으로써 지방세포의 분화를 저해하고 이에 따른 지방축적의 감소를 유도할 수 있는 것으로 보고되었다.

제 7 장 참고문헌

Adamson, N. J., Reynolds, E. C. Characterisation of tryptic casein phosphopeptides prepared under industrially relevant conditions. *Biotechnology and Bioengineering*. 45. 196–204. (1995)

Aldo C., Ombretta M., Fabio M., Patrick F., Marco G. Production of caseinophosphopeptides from Na-Caseinates prepared from the milk of several species by a proteinase of *Lactobacillus helveticus* PR4. *Food Biotech*. 17. 183–192. (2003)

Allen K, Cornforth D. Antioxidant mechanism of milk mineral-high affinity iron binding 72: C78–C83 (2007)

Benson. J. R., and P. E. Hare o-Phthalaldehyde : Fluorogenic detection of primary amines in the picomole range. Comparison with fluorescamine and ninhydrin. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 72. 619. (1975)

Blazer DG, Moody-Ayers S, Craft-morgan J, Burchett B. Depression in diabetes and obesity, racial/ethnic.gender issues in older adults. *J. Psychosomatic Res*. 52: 1–4 (2002)

Bost, F., M. Aouadi, L. Caron, B. Binetruy. The role of MAPKs in adipocyte differentiation and obesity. *Biochimie* 87: 51–56 (2005)

Brian Jensen, Mary C. Farach-Carson, Erin Kenaley, Kamil A. Akanbi. High extracellular calcium attenuates adipogenesis in 3T3-L1 preadipocytes. *Exp Cell Res* 301: 280–292 (2004)

Chawla. A., J.J. Repa, R.M. Evans, and D.J. Mangelsdorf, Nuclear receptors and lipid physiology: Opening the X-files. *Science* 294 (2001) 1866–1870.

Chawla. Ajay, Joyce J. Repa, Ronald M. Evans, David J. Mangelsdorf. Nuclear receptors and Lipid Physiology: Opening the X-Files. *Science* 294: 1866–1870 (2001)

Chen, R. F., C. Scott, and E. Trepman. Fluorescence properties of o-phthaldialdehyde derivatives of amino acids. *Biochim. Biophys. Acta.* 576. 440. (1979)

Connerty, HV, Briggs, AR. Determination of serum calcium by means of orthocresolphthalein complexone. *Am. J. Clin. Pathol.* 45: 290–296 (1966)

Daodong P., Yongkang L., Masaru T. Antihypertensive peptides from skimmed milk hydrolysate digested by cell-free extract of *Lactobacillus helveticus* JCM1004. *Food Chem.* 91. 123–129. (2005)

Dong-Jae Jun, Jong-Hee Lee, Bo-Hwa Choi, Tae-Kyung Koh, Dae-Cheong Ha, Min-Woo Jeong, and Kyong-Tai Kim. Sphingosine-1-Phosphate Modulates Both Lipolysis and Leptin Production in Differentiated Rat White Adipocytes *Endocrinology*, 147 (2006) 5835 – 5844

Erding Hu, Jae Bum Kim, Pasha Sarraf, Bruce M. Spiegelman. Inhibition of Adipogenesis Through MAP Kinase-Mediated Phosphorylation of PPAR γ . *Science* 274: 2100–2103 (1996)

Flegal KA, Grauard BI, Williamson DF, Gail MHH. Excess deaths associated with underweight, overweight, and obesity. *J. Am. Med. Assoc.* 293: 1861–1867 (2005)

Flegal KM, Carroll MD, Kuczmarski RJ, Johnson CL. Overweight and obesity in the United States: Prevalence and trends. *Int. J. Obes.* 22: 39–47 (1998)

Flynn A, Cashman K. Calcium. pp. 18–53, In: Hurrell, R. (ed.) *The Mineral Fortification of Foods*. Leatherhead International Ltd., Surrey, England (1999)

Frank C., Harold E., David H., George L. Spectrophotometric assay using *o*-Phthaldialdehyde for determination of proteolysis in milk and isolated milk proteins. *J Dairy Sci.* 66. 1219–1227. (1983)

Gaucheron F. The minerals of milk. *Repro. Nutr. Dev.* 45: 473–483 (2005)

Giovanni Rizzo, Moises Disante, Andrea Mencarelli, Barbara Renga, Antimo Gioiello, Roberto Pellicciari, and Stefano Fiorucci. The Farnesoid X Receptor Promotes Adipocyte Differentiation and Regulates Adipose Cell Function in Vivo. *MCB* 70: 1164–1173 (2006)

Goodno, C. C., H. E. Swaisgood, and G. L. Catignani. A fluorimetric assay for available lysine in proteins. *Anal. Biochem.* 115. 203. (1981)

Guillermo Vazquez, Ana Russo de Boland, and Ricardo L. Boland. Involvement of Calmodulin in 1,25-Dihydroxyvitamin D₃ Stimulation of Store-operated Ca²⁺ Influx in Skeletal Muscle Cells. *JBC* 275: 16134–16138 (2000)

Hang SHI, Anthony W. Norman, William H. Okamura, Anindita Sen and Michael B. Zemel. 1,25-dihydroxyvitamin D₃ modulates human adipocyte metabolism via nongenomic action. *The FASEB Journal*. 15: 2751–2753 (2001)

Hang Shi, Yuan-di Halvorsen, Pamela N. Ellis, Wilium O. Wilkison, and Michael B. Zemel. Role of intracellular calcium in human adipocyte differentiation. *Physiol Genomics* 3: 75-82 (2000B)

Hassan AN, Frank JF, Farmer MA, Schmidt KA, Sharabi SI. Formation of yoghurt structure and three-dimensional visualization as determined by confocal scanning laser microscopy. *J. Dairy Sci.* 78: 2629–2636 (1995)

Hoff, JE, Nielsen SS, Peng IC, Chambers, VC. Ethanol extraction of lactose from nonfat dry milk: Production of protein raffinate. 70: 1785–1796 (1987)

Holt C. Calcium phosphate nanoclusters and their applications. US Patent US007060472B2 (2006)

James M. Ntambi, Tsetska Takova. Role fo Ca²⁺ in the early stages of murine adipocyte differentiation as evidenced by calcium obilizing agents. *Differentiation* 60: 11–158 (1996)

Jeffrey M. Blumberg, Iphigenia Tzamelis, Inna Astapova, Francis S. Lam, Jeffrey S. Flier, and Anthony N. Hollenberg. Complex Role of the Vitamin D Receptor and Its Ligand in Adipogenesis in 3T3-L1 Cells. *JBC* 281: 11205–11213 (2006)

Joel W. Neal and Neil A. Clipstone. Calcineurin Mediates the Calcium-dependent

Inhibition of Adipocyte Differentiation in 3T3-L1 Cells. *JBC* 277: 49776-49781 (2002)

Jones. G., S.A. Strugnell, and H.F. DeLuca, Current understanding of the molecular actions of vitamin D. *Physiol Rev* 78 (1998) 1193-231.

Juan Kong and Yan Chun Li. Molecular mechanism of 1,25-dihydroxyvitamin D3 inhibition of adipogenesis in 3T3-L1 cells. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 290: E916-E924 (2006)

Kansal VK, Chaudhary S. Biological availability of calcium, phosphorus and magnesium from dairy products. *Milchwissenschaft* 37: 261-263 (1982)

Kansal VK. Health benefit claims of dairy calcium-Review. *Indian J. Dairy Sci.* 55: 12-32 (2002)

Kevin D. Healy, Julia B. Zella, Jean M. Prah, and Hector F. DeLuca. Regulation of the murine renal vitamin D receptor by 1,25-dihydroxyvitamin D3 and calcium. *PNAS* 19: 9733-9737 (2003)

Kwak, HS, Jeon IJ. Comparison of high performance liquid chromatography and enzymatic method for the measurement of lactose in milk. *J. Food Sci.* 53: 975-976 (1988)

Law AJR, Leaver J. Effects of acidification and storage of milk on dissociation of bovine casein micelles. *J. Agric. Food Chem.* 46: 5008-5016 (1998)

Lee WJ, Lucey JA. Rheological properties, whey separation, and microstructure in set-style yoghurt: Effects of heating temperature and incubation temperature. *J. Texture Stud.* 34: 515–536 (2004)

Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 193: 265–275 (1951)

Martinou–Voulasiki IS, Zerfiridis GK. Effect of some stabilizers on textural and sensory characteristics of yoghurt ice cream from sheep's milk. *J. Food Sci.* 55: 703–707 (1990)

Michael B. Zemel, Hang SHI, Betty Greer, Douglas Dirienzo, and Paula C. Zemel Regulation of adiposity by dietary calcium The FASEB Journal. 2000A;14:1132–1138.)

Naito H. the mechanism of enhancement in intestinal calcium absorption with phosphopeptides derived during casein digestion. *J. Jpn. Soc. Nutr. Food Sci.* 39(6). 433–439. (1986)

Nea. J. W., and N.A. Clipstone, Calcineurin mediates the calcium-dependent inhibition of adipocyte differentiation in 3T3–L1 cells. *J Biol Chem* 277 (2002) 49776–81.

Oyvind Melien, Laila S. Nilssen, Olav F. Dajani, Kristin Larsen Sand, Jens–Gustav Iversen, Dagny L. Sandnes and Thoralf Christoffersen. Ca²⁺–mediated activation of ERK in hepatocytes by norepinephrine and prostaglandin F_{2a}: role of calmodulin and src kinases. *BMC Cell Biology* 3: 1471–2121 (2002)

Patel Y. M., and M.D. Lane, Mitotic clonal expansion during preadipocyte differentiation: calpain-mediated turnover of p27. *J Biol Chem* 275 (2000) 17653–60.

Patel. Y. M., and M.D. Lane, Role of calpain in adipocyte differentiation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96 (1999) 1279–84.

Pirkul T, Temiz A, Erdem YK. Fortification of yoghurt with calcium salts and its effect on starter microorganisms and yoghurt quality. *Int. Dairy J.* 7: 547–552 (1997)

Poneros-Schneier AG, Erdman JW Jr. Bioavailability of calcium from sesame seeds, almond powder, whole wheat bread, spinach and nonfat dry milk in rats. *J. Food Sci.* 54: 150–153 (1982)

Rattray W, Jelen P. Thermal stability of skim milk with protein content standardized by the addition of ultrafiltration permeate. *Int. Dairy J.* 6: 157–170 (1996)

Ray CL, Maubois JL, Gaucheron F, Brule G, Pronnier P, Garnier F. Heat stability of reconstituted casein micelle dispersions: changes induced by salt addition. *Lait* 78:375–390 (1998)

Rowlett, R., and J. Murphy. A convenient spectrophotometric method for the kinetic analysis of the enzymic hydrolysis of N-acyl peptides using phthalaldehyde. *Anal. Biochem.* 53. 484. (1981)

Sally S. Fluorescein isothiocyanate-labeled casein assay for proteolytic enzymes.

Analytical biochem. 143. 30–34. (1984)

Sarah Hummasti, Bryan A. Laffitte, Michael A. Watson, Cristin Galardi, Lily C. Chao, Lakshman Ramamurthy, John T. Moore, and Peter Tontonoz. Liver X receptors are regulators of adipocyte gene expression but differentiation: identification of apoD as a direct target. *J Lipid Res* 45: 616–625 (2004)

Seo. J. B., H.M. Moon, W.S. Kim, Y.S. Lee, H.W. Jeong, E.J. Yoo, J. Ham, H. Kang, Park. M.G., K.R. Steffensen, T.M. Stulnig, J.A. Gustafsson, S.D. Park, and J.B. Kim, Activated liver X receptors stimulate adipocyte differentiation through induction of peroxisome proliferator-activated receptor gamma expression. *Mol Cell Biol* 24 (2004) 3430–44.

Shi H, DiRienzo K, Zemel MB. Effects of dietary calcium on adipocyte lipid metabolism and body weight regulation in energy-restricted aP2-agouti mice. *FASEB J.* 15: 291–293 (2001)

Simons, S. S., Jr., and D. F. Johnson. Reaction of o-phthalaldehyde and thiols with primary amines: Fluorescence properties of 1-alkyl (and aryl) thio-2-alkylisoindoles. *Anal. Biochem.* 90. 705. (1978)

Singh RK, Nielsen SS, Chambers JV. Lactose crystallization from whey permeate in an ethanol-water mixture. *J. Food Sci.* 56: 935–937 (1991b)

Singh RK, Shah BB, Nielsen SS, Chambers JV. α -lactose monohydrate from ultrafiltered whey permeate in one-step crystallization using ethanol-water mixture. *J. Food Sci.* 56: 777–781, 788 (1991a)

Svedas, V-J. K., I. J. Galaev, I. L. Borisov, and I. V. Berezin. The interaction of amino acids with o-phthaldialdehyde: A kinetic study and spectrophotometric assay of the reaction product. *Anal. Biochem.* 101. 188. (1980)

Taylor, S., and A. L. Tappel. Lysosomal peptidase measurement by sensitive fluorometric amino acid analysis. *Anal. Biochem.* 56. 140. (1973)

Toba Y, Takada Y, Tanaka M, Aoe S. Comparison of the effects of milk components and calcium source on calcium bioavailability in growing male rats. *Nutr. Res.* 19: 449–459 (1999)

Tumerman L, Webb BH. Coagulation of milk and protein denaturation. pp. 506–509 In: *Fundamentals of Dairy Chemistry*. BH Webb, AH Johnson (eds.) AVI Publ. Co., Inc. Westport, CT. (1976)

Vazquez, G., A.R. de Boland, and R.L. Boland, Involvement of calmodulin in 1 α ,25-dihydroxyvitamin D₃ stimulation of store-operated Ca²⁺ influx in skeletal muscle cells. *J Biol Chem* 275 (2000) 16134–8.

Vyas HK, Tong PS. Impact of source and level of calcium fortification on the heat stability of reconstituted skim milk powder. *J. Dairy Sci.* 87: 1170–1180 (2004)

Walstra P, Jenness R. Salts. pp. 42–47 In: *Dairy Chemistry and Physics*. Wiley & Sons, New York (1984)

Wang, H., M.S. Goligorsky, and C.C. Malbon, Temporal activation of Ca²⁺-calmodulin-sensitive protein kinase type II is obligate for adipogenesis. *J Biol Chem* 272 (1997) 1817–21.

Wong NP, Lacroix DE. Biological availability of calcium in dairy products. *Nutr Rep. Int.* 21: 673–680 (1980)

Xiaocun Sun and MB. Zemel. Calcium and 1,25–Dihydroxyvitamin D3 Regulation of Adipokine Expression. *Obesity* 15: 340–348 (2007)

Yashomati M. Patel and M. Daniel Lane. Role of calpain in adipocyte differentiation. *PNAS* 96: 1279–1284 (1999)

Zemel MB, Shi H, Greer B. Regulation of adiposity by dietary calcium. *FASEB J.* 14: 1132–8 (2000)

Zemel MB. Role of calcium and dairy products in energy partitioning and weight management. *Am. J. Clin. Nutr.* 79: 907S–12S (2004a)

Zemel MB, Thompson W, Milstead A, Morris K, Campbell P. Calcium and dairy acceleration of weight and fat loss during energy restriction in obese adults. *Obes. Res.* 12: 582–590 (2004b)